



*Uniwersytet Jagielloński
Wydział Biochemii Biofizyki i Biotechnologii
Wydziałowa Pracownia Biofizyki Komórki*

Rozprawa doktorska

**Analiza procesu rekrutacji
heterochromatynowych białek 1 (HP1)
do obszarów uszkodzonej chromatyny**

mgr Elżbieta Wiernasz

Promotor:
dr hab. Jerzy Dobrucki

Kraków 2009

Panu Doktorowi hab. Jerzemu Dobruckiemu, mojemu promotorowi i kierownikowi Wydziałowej Pracowni Biofizyki Komórki, bardzo dziękuję za możliwość kontynuacji rozpoczętych podczas studiów magisterskich badań nad rolą białka HP1 w procesach oksydacyjnego uszkodzenia i naprawy DNA. Dziękuję za liczne dyskusje oraz konstruktywne uwagi, które znacząco ułatwiły planowanie kolejnych etapów pracy eksperymentalnej oraz za zaangażowanie i czas poświęcony na przygotowywanie niniejszej rozprawy doktorskiej. W szczególności dziękuję za opiekę naukową w trakcie trwania studiów doktoranckich oraz przychylność i zachętę do pogłębiania wiedzy podczas moich pobytów naukowych za granicą.

Pani Doktor hab. Alicji Józkowicz z Zakładu Biotechnologii Medycznej, serdecznie dziękuję za wprowadzenie mnie w tajniki technik biologii molekularnej, entuzjizm oraz niezastąpiony wkład w tym projekcie.

Pani Profesor dr hab. Marcie Dziedzickiej-Wasylewskiej, oraz całemu zespołowi Zakładu Biochemii Fizycznej dziękuję za udostępnienie laboratorium oraz ciepło i serdeczność z jakimi się spotkałam.

I would like to thank to Professor Roel van Driel, the group leader of the Structural and Functional Organization of the Cell Nucleus at the University of Amsterdam, for the warm welcome in his lab and the great opportunity to work on HP1 protein in NER repair.

Dear Prof. van Driel, thank you for your supervision, all your help and support. I would like to thank to Dr Martijn Luijsterburg for his help with the local UV damage technique and the numerous discussions about NER repair.

I would also like to express my gratitude to Dr Pernette Verschure, as well as all the people from the lab of Prof. van Driel. Dear Dr Verschure, thank you for the HP1 plasmids and your contribution to the study on HP1.

Pragnę gorąco podziękować wszystkim Koleżankom i Kolegom z Pracowni Biofizyki Komórki, a w szczególności dr. Mirosławowi Zarębskiemu za cenne wskazówki przy analizie obrazów, dyskusje i wspierającą atmosferę w pracy. Dodatkowo dziękuję Pani mgr inż. Barbarze Czubie – Pełech za prowadzenie części hodowli komórkowych, co znacznie ułatwiło moje eksperymenty.

Markowi za cierpliwość i wsparcie oraz ogromną pomoc przy redagowaniu niniejszej rozprawy.

Spis treści

Streszczenie	1
Spis skrótów	5
Definicje użytych terminów	8
Rozdział 1. Wstęp	11
1.1 Struktura i upakowanie DNA u eukariota	12
1.1.1 Budowa DNA	12
1.1.2 Nukleosomy	15
1.1.3 Wysokorzędowa struktura DNA	20
1.1.4 Chromosomy	22
1.2 Chromatyna	23
1.2.1 Euchromatyna	23
1.2.2 Heterochromatyna	23
1.3 Białka HP1	25
1.3.1 Struktura białka HP1	25
1.3.2 Rodzina białek chromodomenowych	28
1.3.3 Rozmieszczenie białek HP1	30
1.3.4 Funkcje białek HP1	32
1.4 Naprawa DNA	39
1.4.1 Rodzaje uszkodzeń DNA	40
1.4.2 Rodzaje napraw DNA	40
1.4.3 Mechanizm naprawy NER	43
1.4.4 Mechanizm naprawy BER	47
1.4.5 Naprawa SOS	49
1.4.6 Podwójne pęknięcia nici DNA	50
1.4.7 Mechanizm naprawy HR	52
1.4.8 Mechanizm naprawy NHEJ	54
1.4.9 Naprawa MMR	56
1.4.10 Naprawa DNA w kontekście chromatyny	58
Rozdział 2. Cel pracy	59

Rozdział 3.

Materiały i metody

61

3.1 Materiały	62
3.1.1 Odczynniki	62
3.1.2 Plazmidy ekspresyjne kodujące białka fuzyjne	65
3.1.3 Eukariotyczne linie komórkowe	68
3.2 Metody	70
3.2.1 Powielanie plazmidowego DNA	70
3.2.2 Hodowla eukariotycznych linii komórkowych	72
3.2.3 Transfekcja komórek ssaczych plazmidowym DNA	73
3.2.4 Procedura generowania lokalnego uszkodzenia chromatyny przy udziale wzbudzonego jonu etidiowego	74
3.2.5 Procedury immunofluorescencyjne w badaniach uszkodzeń wywołanych wzbudzonym jonem etidiowym	77
3.2.6 Metody generowania lokalnych uszkodzeń DNA indukowanych promieniowaniem UV	80
3.2.7 Metoda generowania DSBs za pomocą cząstek α	83
3.2.8 Mikroskopia konfokalna	84
3.2.9 Analiza obrazów mikroskopowych	84

Rozdział 4.

Wyniki

86

4.1 HP1 w odpowiedzi komórki na uszkodzenie oksydacyjne	88
4.1.1 Wprowadzenie - charakterystyka lokalnego uszkodzenia chromatyny indukowanego wzbudzonym jonem etidiowym	88
4.1.2 Wykrycie akumulacji białek heterochromatynowych HP1 w obszarach lokalnego uszkodzenia chromatyny indukowanego wzbudzonym jonem etidiowym	94
4.1.3 Brak gromadzenia EGFP-HP1 α w nieobecności fotouczulacza	100
4.1.4 Badanie procesu gromadzenia białek HP1 w obszarach lokalnego uszkodzenia chromatyny indukowanego wzbudzonym jonem etidiowym	101
4.1.5 Badanie zależności tempa gromadzenia białka HP1 od temperatury	104
4.1.6 Badanie ruchliwości HP1 nagromadzonego w miejscu uszkodzenia	108
4.1.7 Pomiary gromadzenia różnych wariantów białka fuzyjnego HP1 „z zablokowanymi sterycznie końcami”	112
4.1.8 Badanie zmian upakowania chromatyny w miejscu uszkodzenia	120
4.1.9 Pomiary zmian stopnia metylacji lizyny 9 histonu H3 (Me3K9H3) w miejscach rekrutacji białka HP1	127
4.1.10 Badanie akumulacji Ku70 w miejscu uszkodzenia	130
4.1.11 Badanie akumulacji PCNA w miejscu uszkodzenia	133
4.1.12 Badanie akumulacji Dnmt1 w miejscu uszkodzenia	140
4.1.13 Badanie akumulacji ligazy DNA I w miejscu uszkodzenia	142

4.1.14	Badanie akumulacji ligazy DNA III w miejscu uszkodzenia.....	143
4.2	HP1 w odpowiedzi komórki na uszkodzenie wywołane przez promieniowanie UV.....	145
4.2.1	Wykrywanie uszkodzeń DNA indukowanych przez UV i aktywacji NER.....	145
4.2.2	Badanie akumulacji białek HP1 w miejscach uszkodzeń wywołanych przez UV.....	149
4.2.3	Badanie akumulacji białek HP1 β w rejonach uszkodzonej chromatyny w komórkach Suv39dn.....	150
4.2.4	Badanie akumulacji SUV39H1 w obszarach uszkodzeń UV.....	152
4.2.5	Badanie zależności rekrutacji HP1 od aktywności NER.....	153
4.2.6	Badanie zależności rekrutacji HP1 od fazy cyklu komórkowego.....	155
4.2.7	Badanie różnic w procesie akumulacji HP1 w komórkach XP-A i komórkach z funkcjonalną naprawą NER.....	157
4.2.8	Badanie akumulacji HP1 w komórkach Seckel.....	158
4.2.9	Badanie rekrutacji Dnmt1 w obszarach uszkodzeń UV.....	159
4.2.10	Badanie akumulacji HP1 w komórkach Dnmt1-/-.....	161
4.2.11	Badanie akumulacji MeCP2 w obszarach uszkodzeń UV.....	162
4.2.12	Badanie akumulacji SUV4-20 w obszarach uszkodzeń UV.....	163
4.2.13	Badanie akumulacji ACF1 w miejscach uszkodzeń UV.....	164
4.2.14	Badanie akumulacji BRG1 w obszarach uszkodzeń UV.....	166
4.2.15	Badanie wrażliwości komórek na UV po utracie HP1.....	168
4.3	HP1 w procesach towarzyszących naprawie DSBs.....	169
4.3.1	Badanie akumulacji białek HP1 w obszarach formowania DSBs.....	169
4.3.2	Badanie akumulacji HP1 w miejscach uszkodzeń chromatyny w komórkach z deficytem KU80.....	171
Rozdział 5.		
Dyskusja		173
5.1	Wprowadzenie.....	174
5.2	Oksydacyjne uszkodzenie chromatyny indukowane wzbudzoną jonem etydium powoduje aktywację procesów naprawczych BER oraz powstawanie DSBs.....	175
5.3	Gromadzenie białka HP1 w obszarach lokalnych uszkodzeń chromatyny świadczy o zaangażowaniu HP1 w procesie naprawy DNA.....	181
5.4	W procesie rekrutacji białka HP1 do miejsc uszkodzeń DNA uczestniczy domena CSD.....	187
5.5	Rekrutacja białka HP1 do obszarów uszkodzeń wywołanych przez UV nie zależy od aktywności białek naprawczych NER.....	190
5.6	Rekrutacja białka HP1 zachodzi we wszystkich fazach cyklu komórkowego.....	192
5.7	Kaskada transdukcji sygnału w której uczestniczy ATR nie wpływa na rekrutację białka HP1.....	193
5.8	Nagromadzone w rejonach uszkodzeń białko HP1 uczestniczy w komórkowej odpowiedzi DDR.....	194
5.9	Podsumowanie.....	202
5.10	Proponowane dalsze doświadczenia.....	204

Rozdział 6. Wnioski	207
Rozdział 7. Spis tabel rycin i rysunków	210
Rozdział 8. Literatura	214

Streszczenie

Prawidłowe funkcjonowanie wszystkich organizmów żywych zależy od zachowania informacji genetycznej. Genom bez przerwy narażany jest na atak ze strony różnego rodzaju czynników genotoksycznych, pochodzenia wewnątrz- lub zewnątrzkomórkowego. Szybka i skuteczna naprawa każdego uszkodzenia DNA jest zatem kluczowa dla zachowania integralności informacji genetycznej. W toku ewolucji komórki rozwinęły mechanizmy odpowiedzi na uszkodzenie DNA (ang. *DNA damage response*, DDR), w których uczestniczą różnorodne systemy naprawcze (m.in. BER, NER, HR, NHEJ) oraz szlaki kaskad sygnałowych. Substratem do naprawy jest uszkodzona matryca DNA, występująca w komórkach eukariotycznych w postaci chromatyny, która zbudowana jest z kwasów nukleinowych oraz białek. W niniejszej pracy doktorskiej skoncentrowano się na badaniach białka HP1, ważnego składnika chromatyny, w kontekście uszkodzenia i naprawy DNA.

Heterochromatynowe białka 1 (HP1) zasocjowane są z chromatyną. Częsteczka HP1 zbudowana jest z dwóch domen: N-końcowej chromodomeny, która wiąże DNA poprzez Me2K9H3 lub Me3K9H3 oraz C-końcowej domeny chromoshadow, zaangażowanej w tworzenie homo- oraz heterodimerów, a także oddziaływać z różnorodnymi białkami jądrowymi. HP1 występuje głównie w heterochromatynie, choć jest również obecne w euchromatynie, i uczestniczy w wielu procesach jądrowych, m.in. w organizacji struktury chromatyny, transkrypcji czy replikacji DNA. Białka HP1 odgrywają istotną rolę w generowaniu i zachowaniu informacji epigenetycznej. W momencie rozpoczęcia doświadczeń opisanych w niniejszej pracy, w literaturze naukowej nie było żadnych informacji na temat udziału białek HP1 w naprawie DNA. Wyniki przeprowadzonych badań pokazują, iż w komórkach ludzkich wszystkie trzy izoformy białka (HP1 α , HP1 β oraz HP1 γ) ulegają gromadzeniu w obszarach uszkodzeń DNA. Pomiary prowadzone przy użyciu mikroskopu konfokalnego pozwoliły wykazać, iż proces rekrutacji zależy od temperatury w sposób charakterystyczny dla reakcji enzymatycznych i nie wynika z lokalnej agregacji uszkodzonej chromatyny ani też zatrzymania replikacji. Nagromadzone w miejscu uszkodzenia białko ulega wymianie z jądrową pulą HP1, co świadczy o tym, że w obszarze

uszkodzonym jest więcej miejsc wiązania dla cząsteczek białka HP1, choć zgromadzone w rejonie uszkodzenia białko nie jest związane trwale i podlega wymianie z niezwiązaną pulą HP1. Kluczową rolę w procesie gromadzenia HP1 odgrywa C-końcowa domena chromoshadow, co potwierdziły badania wykonane na mutantach delecyjnych oraz białku fuzyjnym ze steryczną blokadą C-końca HP1. Chromodomena HP1 nie wydaje się być bezpośrednio zaangażowana w procesie gromadzenia, co potwierdza brak zarówno wzrostu poziomu Me3K9H3, jak i metylotransferazy histonowej SUV39 w miejscu uszkodzenia. Rola HP1 w naprawie uszkodzenia jest jednak kluczowa, o czym świadczy zwiększenie wrażliwości komórek na UV po utracie tego białka. Gromadzenie HP1 nie zależy od rodzaju uszkodzenia i występuje powszechnie zarówno w miejscach powstałych uszkodzeń oksydacyjnych, DSBs, jak i indukowanych przez UV fotoproduktów 6-4PP oraz CPD. Rekrutacja HP1 nie zależy od funkcjonalnej naprawy NER, ani NHEJ, a jedynie od obecności uszkodzenia. Stosunkowo powolne tempo gromadzenia białka pozwala wykluczyć, że HP1 jest nieznanym dotąd białkiem naprawiającym sekwencję DNA. Gromadzenie partnerów interakcji HP1, wprowadzających zmiany w strukturze chromatyny pozwala przypuszczać, iż HP1 uczestniczy w rearanżacji struktury chromatyny, która może stanowić jeden z procesów mechanizmu DDR. Wydaje się również bardzo prawdopodobne, iż zakumulowane białko HP1 może uczestniczyć w towarzyszącym uszkodzeniu procesie regulacji transkrypcji, gdyż, jak wcześniej wykazano, zahamowanie transkrypcji towarzyszy uszkodzeniu i nie zależy od procesu naprawy DNA.

Zaprezentowane w niniejszej rozprawie eksperymenty pokazują niezwykle interesujące zjawisko, jakim jest gromadzenie HP1 w obszarach uszkodzeń DNA. Z całą pewnością badania w tym temacie będą kontynuowane, aż poznany zostanie dokładny molekularny mechanizm odpowiedzi na uszkodzenie, w którym zaangażowane jest HP1.

Abstract

Maintenance of genome information is crucial for normal functioning of all lively organisms. The genome is constantly facing the action of a variety of genotoxic agents which come from intercellular or extracellular environmental aggressions. Rapid and accurate repair of all DNA lesions is crucial for the protection of the genome integrity. The cellular mechanism of DNA damage response (DDR) has evolved in order to avoid the serious biological consequences of DNA lesions. DDR involves different repair pathways (BER, NER, HR, NHEJ, etc.) and signaling cascades. The substrate for the repair is a damaged DNA template which in eukaryotic cells is organized into chromatin that is composed of nucleic acids and proteins. This doctoral dissertation regards HP1 proteins, the important chromatin constituents, in the context of DNA damage and repair.

Chromatin associated heterochromatin protein 1 (HP1) consists of two domains: N-terminal chromodomain, which binds to DNA via Me2K9H3 or Me3K9H3 and C-terminal chromoshadow domain, which is involved in homo- and heterodimers formation as well as interactions with plethora of nuclear proteins. Heterochromatin protein 1 is mainly present in heterochromatin, even though HP1 is also found in euchromatin, and is involved in a number of nuclear processes, among others chromatin organization, transcription or DNA replication. It has been shown that HP1 proteins play an important role in generation and maintenance of epigenetic information in chromatin. When the experiments to this thesis were commenced, there had been no available scientific paper regarding the involvement of HP1 in DNA repair. The results of the experiments demonstrated the recruitment of all three HP1 isoforms: HP1 α , HP1 β and HP1 γ , to the DNA damage sites in human cells. Research conducted on confocal microscopy showed that HP1 accumulation depends on temperature similarly to the enzymatic processes and is not a result of local aggregation of the damaged chromatin or stalled replication. HP1 protein recruited to the site of damage can still exchange with the mobile pool of the protein. That observation suggests more HP1 binding sites in the damaged area. Although the recruited HP1 is not stably bound, it is exchanged with the unbound protein. The C-terminal chromoshadow domain is essential for the HP1 accumulation. This has been confirmed by experiments on HP1 deletion mutants as well

as fusion proteins with the steric blockade (bulky tag) on C-terminal of HP1. Chromodomain of HP1 appears not to be directly involved in accumulation process, consistent with the lack of increase of Me3K9H3 as well as no recruitment of the histone methyltransferase SUV39 in the damaged site. The increased sensitivity to UV irradiation after the loss of HP1 indicates the crucial role of HP1 protein in the normal DNA damage response. The recruitment of HP1 is independent of the kind of damage introduced and occurs for many types of DNA lesions, among others oxidative damage, DSBs as well as UV-induced 6-4PP and CPD photoproducts. HP1 accumulation to the sites of DNA damage neither require functional NER nor NHEJ and is only triggered by the presence of damage. Rather slow recruitment process indicates that HP1 is not an unknown repair protein involved in DNA sequence restoration. The similar recruitment of several HP1 - interacting proteins, which are involved in remodeling of chromatin, suggests that HP1 might be recruited to damage to re-establish higher order chromatin structure in one of the step in the mechanism of DDR. It is quite likely that accumulated HP1 protein is involved in the regulation of transcription since it was previously demonstrated that the inhibition of transcription after the DNA damaged is independent of the on-going DNA repair process. Experiments described in this thesis are showing very interesting phenomenon - HP1 accumulation in the sites of DNA damage. The further research in this subject will surely be conducted until the entire molecular mechanism of the HP1 - involved DNA damage response is discovered.

Spis skrótów

Skrót	Objaśnienie skrótu
6-4PP	(ang. <i>6-4 photoproduct</i>) fotoprodukt 6-4, który powstaje podczas uszkodzeń DNA wywołanych promieniowaniem UV
8-OHdG	(ang. <i>8-hydroxy-deoxyguanosine</i>) 8-hydrokso-deoksyguanozyna, powstaje w wyniku oksydacyjnego uszkodzenia DNA, jest najbardziej mutagenna spośród wszystkich modyfikacji zasad,
ACF1	(ang. <i>ATP-utilizing chromatin assembly and remodelling factor</i>) czynnik składania i remodelingu chromatyny wykorzystujący ATP
APE	(ang. <i>AP endonuclease</i>) endonukleaza AP uczestnicząca w naprawie BER
ATM	(ang. <i>Ataxia telangiectasia mutated</i>) kinaza białkowa serynowo-treoninowa, należąca do rodziny kinaz PI3/PI4, aktywowana przez uszkodzenia DSBs; białko enzymu kodowane jest przez gen <i>ATM</i> , którego nazwa pochodzi od jednostki chorobowej (zespół ataksja-teleangiektazja), w której ten gen jest uszkodzony (mutacje)
ATR	(ang. <i>Ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>) kinaza białkowa serynowo-treoninowa, aktywowana przez uszkodzenia SSBs, uczestniczy w naprawie HR oraz NER; mutacje w obrębie genu <i>ATR</i> powodują powstanie jednostki chorobowej - zespół Seckela
BER	(ang. <i>base excision repair</i>) naprawa przez wycinanie zasad
BRG1	(ang. <i>Brahma related gene 1</i>) białko BRG1 wchodzi w skład kompleksu białek remodelingu chromatyny - SWI/SNF, który ma aktywność ATP-azy zależnej od DNA
CAF1	(ang. <i>chromatin assembly factor 1</i>) czynnik składania chromatyny 1, białko zbudowane z trzech podjednostek: p50, p60 oraz p150; CAF-1 uczestniczy w składaniu oktameru histonowego w nowo zreplikowanej nici DNA oraz w procesie naprawy DNA
CD	(ang. <i>chromo domain</i>) chromodomena; znajduje się na N-końcu białka HP1
CFP	(ang. <i>cyan fluorescent protein</i>) niebieskie białko fluoryzujące
CPD	(ang. <i>cyclobutane pyrimidine dimmer</i>) dimer cyklobutano-pirymidynowy, który powstaje podczas uszkodzeń DNA wywołanych promieniowaniem UV
CS	(ang. <i>Cockayne Syndrome</i>) Zespół Cockayne'a, choroba genetyczna o dziedziczeniu autosomalnym recesywnym spowodowana defektem mechanizmu NER naprawy DNA; występują 3 odmiany choroby (CSA, CSB oraz CS typu III)
CSD	(ang. <i>chromo-shadow domain</i>) domena chromoshadow; znajduje się na C - końcu białka HP1
DDB2	(ang. <i>DNA damage binding protein 2</i>) białko wiążące się do uszkodzonego DNA, które rozpoznaje uszkodzenie w GG-NER
DDR	(ang. <i>DNA Damage Response</i>) komórkowa odpowiedź na uszkodzenie DNA
Dnmt1	(ang. <i>DNA methyltransferase 1</i>) metylotransferaza DNA 1; enzym katalizuje metylację dwunukleotydów CpG
DSB	(ang. <i>double strand break</i>) podwójne pęknięcie nici DNA

EGFP	(ang. <i>green fluorescent protein</i>) zielone białko fluoryzujące, emitujące zieloną fluorescencję, pochodzące z meduzy <i>Aequorea victoria</i>
EtBr	(ang. <i>ethidium bromide</i>) bromek etydyny (bromek etidiowy)
FLIP	(ang. <i>fluorescence loss in photobleaching</i>) utrata fluorescencji w wyniku fotobłaknięcia; metoda badania ruchliwości cząsteczek białka wyznakowanego fluorescencyjnie, która pozwala na wykonanie ilościowych pomiarów molekularnej mobilności badanych cząsteczek; po spowodowaniu fotobłaknięcia w precyzyjnie wybranym rejonie komórki, rejestrowane są zmiany sygnału fluorescencji w obszarze, który nie został poddany fotobłaknięciu
FRAP	(ang. <i>fluorescence recovery after photobleaching</i>) odzyskanie fluorescencji po fotobłaknięciu; metoda badania ruchliwości białek wyznakowanych fluorescencyjnie; po spowodowaniu fotobłaknięcia w precyzyjnie wybranym rejonie komórki, rejestrowane są zmiany sygnału fluorescencji w obszarze, który podany został fotobłaknięciu
GG-NER	(ang. <i>global genome NER</i>) jeden z mechanizmów NER, w którym naprawiane są uszkodzenia w aktywnych, jak i nieaktywnych transkrypcyjnie sekwencjach DNA, w obrębie całego genomu
H1	(ang. <i>histone H1</i>) histon H1
H2A	(ang. <i>histone H2A</i>) histon H2A; w obrębie rodziny histonów H2A wyróżnić można trzy podrodziny: H2A1-H2A2, H2AZ oraz H2AX; każdy z histonów należących do rodziny H2A zajmuje analogiczną pozycję w różnych nukleosomach, co powoduje znaczną różnorodność w obrębie poszczególnych nukleosomów
H2AX	(ang. <i>histone H2AX</i>) wariant histonu H2A, który tym różni się od pozostałych histonów należących do rodziny H2A tym, iż posiada ewolucyjnie konserwatywny motyw KKATQASQEY na C-końcu sekwencji białka; znajdujący się w tym motywie aminokwas seryna ulega fosforylacji w odpowiedzi na powstałe uszkodzenie DSB
H2B	(ang. <i>histone H2B</i>) histon H2B
H3	(ang. <i>histone H3</i>) histon H3
HP1	(ang. <i>Heterochromatin Protein 1</i>) białko heterochromatynowe 1
HR	(ang. <i>homologous recombination</i>) rekombinacja homologiczna; jeden z mechanizmów naprawy DSBs
jEt	jon etidiowy
KU70	białko Ku70; wiąże się do podwójnych pęknięć DNA, tworzy heterodimer z Ku80 i uczestniczy w mechanizmie naprawczym NHEJ
KU80	podjednostka wchodząca w skład heterodimeru Ku70/80
LacR	(ang. <i>Lac repressor</i>) represor Lac; białko które wiążąc się do DNA powoduje zahamowanie ekspresji genów kodujących białka metabolizmu laktozy u bakterii
Lig 1-DNA	(ang. <i>DNA ligase 1</i>) ligaza DNA 1; enzym łączący wolne końce cząsteczek DNA
Lig 3-DNA	(ang. <i>DNA ligase 3</i>) ligaza DNA 3; enzym łączący wolne końce cząsteczek DNA
mCherry	czerwone białko fluoryzujące o budowie monomerycznej i ulepszonych właściwościach (Shaner i wsp., 2004)
MeCP2	(ang. <i>metyl CpG binding protein 2</i>) białko wiążące się do zmetylowanych reszt CpG w DNA
MeK9H3	zmetylowana lizyna 9 histonu H3

mVenus	mVenus należy do grupy białek emitujących żółtą fluorescencję (ang. <i>yellow fluorescent protein</i>); odmiana Venus powstała w wyniku mutacji GFP; jedno z najjaśniej świecących białek fluoryzujących, niewrażliwe na zmiany warunków eksperymentu, jak pH czy siła jonowa
NER	(ang. <i>nucleotide excision repair</i>) naprawa przez wycięcie nukleotydu; mechanizm naprawczy zaangażowany w usuwanie uszkodzeń DNA wywołanych promieniowaniem UV
NHEJ	(ang. <i>non-homologous end joining</i>) niehomologiczne łączenie końców; jeden z mechanizmów naprawy DSBs
OGG1	(ang. <i>8-oxoguanine glycosylase</i>) glikozylaza usuwająca 8-oksoguaninę
PCNA	(ang. <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>) jądrowy antygen komórek proliferujących; uczestniczy w replikacji i naprawie DNA
Rad51	białko uczestniczące w naprawie DSBs; gen kodujący białko Rad51 jest homologiem prokariotycznego genu <i>RecA</i> ; podobne strukturalnie białka zgrupowane zostały w rodzinę białek RAD51, które zaangażowane są w naprawę DNA w mechanizmie HR
RFP	(ang. <i>red fluorescent protein</i>) czerwone białko fluoryzujące
RPA	(ang. <i>replication protein A</i>) białko replikacyjne A, które wiąże się do ssDNA i uczestniczy w replikacji oraz naprawie DNA
SSB	(ang. <i>single strand break</i>) jednoniciowe pęknięcie DNA
SUV39H1	(ang. <i>SUV39 methyltransferase</i>) ludzka metyltransferaza histonowa SUV39; odpowiada za potrójną metylację lizyny 9 histonu H3 (Me3K9H3)
SUV4-20	(ang. <i>SUV4-20 methyltransferase</i>) metyltransferaza histonowa SUV4-20, odpowiada za potrójną metylację lizyny 20 histonu H4 (Me3K20H4)
TC-NER	(ang. <i>transcription coupled NER</i>) jeden z mechanizmów NER, w którym naprawiane są uszkodzenia w aktywnych transkrypcyjnie sekwencjach DNA; naprawa TC-NER zachodzi znacznie szybciej niż GG-NER
UV	(ang. <i>ultraviolet</i>) promieniowanie ultra-fioletowe
UV-DDB	(ang. <i>UV DNA damage binding</i>) kompleks wiążący DNA, które uszkodzone zostało promieniowaniem UV; zbudowany z dwóch podjednostek białkowych: DDB1 (p127) oraz DDB2 (p48)
XP	(ang. <i>Xeroderma Pigmentosum</i>) skóra pergaminowa; zespół chorób skóry o dziedziczeniu autosomalnym recesywnym; występuje 7 odmian choroby (typ A-G)
XPA	(ang. <i>Xeroderma Pigmentosum, complementation group A</i>) ludzkie białko naprawcze kodowane przez gen <i>XPA</i> , uczestniczy w naprawie NER; mutacje w genie <i>XPA</i> powodują <i>Xeroderma Pigmentosum</i> typu A
XPC	(ang. <i>Xeroderma Pigmentosum, complementation group C</i>) ludzkie białko naprawcze kodowane przez gen <i>XPC</i> , uczestniczy w naprawie NER; mutacje w genie <i>XPC</i> powodują <i>Xeroderma Pigmentosum</i> typu C
XPE	(ang. <i>Xeroderma Pigmentosum, complementation group E</i>) ludzkie białko naprawcze kodowane przez gen <i>XPE</i> , uczestniczy w naprawie NER; mutacje w genie <i>XPE</i> powodują <i>Xeroderma Pigmentosum</i> typu E
XPG	(ang. <i>Xeroderma Pigmentosum, complementation group G</i>) ludzkie białko naprawcze kodowane przez gen <i>XPG</i> , uczestniczy w naprawie NER; mutacje w genie <i>XPG</i> powodują <i>Xeroderma Pigmentosum</i> typu G
YFP	należy do grupy białek fluoryzujących na kolor żółty (ang. <i>yellow fluorescent protein</i>); powstało w wyniku mutacji GFP

Definicje użytych terminów

agregacja – ogólny termin określający proces łączenie się mniejszych cząstek lub cząsteczek w większe zespoły (agregaty);

agregacja białek – to zjawisko nieswoistego łączenia się białek, które prowadzi do powstania bezpostaciowych skupisk (agregatów) lub włókienek (amyloidu);

agregacja chromatyny – proces zmian w przestrzennej strukturze chromatyny, w wyniku czego przybiera ona formę bardziej upakowaną i skondensowaną, dochodzi do zwiększenia lokalnego stężenia białek wchodzących w skład chromatyny oraz kwasów nukleinowych w obszarze chromatyny, który uległ agregacji; agregacja chromatyny jest jednym z etapów procesu śmierci komórki na drodze apoptozy. W przeciwieństwie do agregacji, **kondensacja chromatyny** towarzyszy podziałom komórkowym i jest odwracalna. Polega na zwiększeniu stopnia upakowania struktury chromatynowej, w wyniku czego formowane są skondensowane chromosomy; w procesie tym uczestniczą specjalne białka zwane kondensynami;

dynamiczna wymiana białka – zmiany stężenia białka w poszczególnych obszarach lub przedziałach subkomórkowych np. jądra komórkowego lub całej komórki, a także wymiana cząsteczek białka między pulą wolną, a związaną;

monowarstwa komórek – (ang. *cell monolayer*) hodowla, w której komórki rosną w postaci jednej warstwy na powierzchni; komórki rosnące w ten sposób mogą mieć różną gęstość, hodowla konfluentna (ang. *confluent* - zgromadzony), tzn. taka, która osiągnęła 100% konfluencji, to hodowla, w której komórki pokryły całą powierzchnię naczynia hodowlanego i zaczynają się odklejać od podłoża;

naświetlanie – termin ten użyto w tekście w dwóch znaczeniach: (1) poddanie komórek znajdujących się w polu widzenia mikroskopu działaniu dawki światła potrzebnej do rejestracji pojedynczego obrazu konfokalnego lub pojedynczej klatki filmu w serii czasowej trwającej np. 30 min, oraz (2) poddanie komórek działaniu dawki światła o określonej długości fali (514nm), w celu wzbudzenia zinterkalowanego z DNA jonu etydioowego i wywołania lokalnego uszkodzenia w naświetlanym obszarze;

piksel – (ang. *pixel*) najmniejszy element obrazu cyfrowego;

powiększenie elektroniczne – funkcja urządzenia elektronicznego (np. kamery cyfrowej), która powoduje „zbliżenie obrazu” i działa na podobnych zasadach, jak powiększanie zdjęć w programach komputerowych; ten rodzaj powiększania nie zwiększa rozdzielczości obrazu, ponieważ obraz zostaje w prosty sposób powiększony bez dodawania dodatkowych pikseli. W skaningowym laserowym mikroskopie konfokalnym CLSM (ang. *Confocal Laser Scanning Microscopy*) powiększenie elektroniczne zależy od zakresu ruchu luster;

powiększenie optyczne – jest stosunkiem wymiarów obrazu mikroskopowego danego przedmiotu, wytworzonego w układzie optycznym, do rozmiarów rzeczywistych tego przedmiotu; całkowite powiększenie mikroskopu jest iloczynem powiększenia obiektywu i okularu;

przebudowa chromatyny – zwana też rearanżacją lub remodelingiem chromatyny (ang. *chromatin remodeling*), jest to występujący u większości organizmów eukariotycznych proces polegający na zmianie struktury chromatyny przy pomocy określonych, wielopodjednostkowych kompleksów białkowych, w których centralną rolę odgrywa białko o aktywności ATP-azy, wykorzystujące energię hydrolizy ATP do wbudowywania nukleosomów. Wspólnym elementem działania wszystkich kompleksów jest tworzenie pętli DNA, które może ulegać przemieszczeniu w obrębie nukleosomu. Zmiany struktury chromatyny uczestniczą w większości procesów jądrowych, m.in. regulacji ekspresji genów, replikacji, czy naprawie DNA. Białka wprowadzające zmiany w przestrzennej strukturze chromatyny po raz pierwszy odkryte zostały stosunkowo niedawno, w początkach lat 90

ubiegłego (XX) wieku. Do chwili obecnej poznano budowę i mechanizm działania czynników białkowych, takich jak: kompleks SWI/SNF (do którego należy BRG1), kompleks NURF i CHRAC, ACF-1, oraz białka Polycomb (w tym białko PC zawierające chromodomenę);

rekrutacja białek – nazywana także **akumulacja** lub **gromadzeniem** - proces przybywania nowych cząsteczek białka do populacji białek istniejących już w danym miejscu, w przedziale komórkowym, bądź obszarze jądrowym, w wyniku czego następuje lokalne zwiększenie stężenia tego białka w danym obszarze;

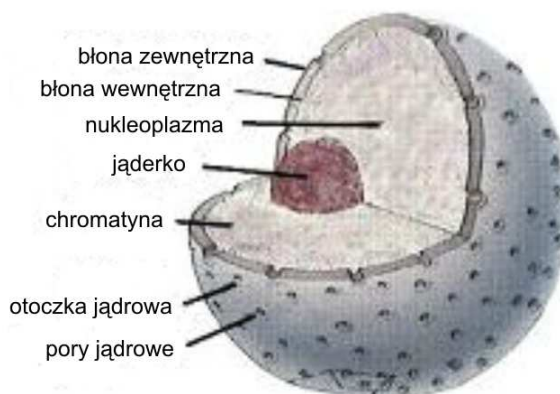
targetowanie białek – inaczej zwane kierowaniem białek; termin ten pochodzi z języka angielskiego (ang. *targeting*) i określa mechanizm, w którym następuje transport cząsteczki białka do odpowiednich przedziałów komórkowych (min. organellum takich, jak jądro komórkowe, czy specyficzne domeny jądrowe) lub rejonów poza komórką. Proces targetowania odbywa się przy udziale informacji zawartej w samej cząsteczce danego białka. Transport odbywa się po określonych trajektoriach i uczestniczyć w nim mogą inne białka lub specyficzne kompleksy białkowe. Przemieszczanie w odpowiednie miejsca pozwala białkom pełnić określone funkcje w tych przedziałach. Sygnały do przemieszczania białek są różne, jednym z nich może być m.in. fosforylacja w obrębie określonych reszt aminokwasowych.

Rozdział 1**Wstęp**

1.1	Struktura i upakowanie DNA u eukariota.....	12
1.1.1	Budowa DNA.....	12
1.1.2	Nukleosomy.....	15
1.1.3	Wysokorzędowa struktura DNA.....	20
1.1.4	Chromosomy.....	22
1.2	Chromatyna.....	23
1.2.1	Euchromatyna.....	23
1.2.2	Heterochromatyna.....	23
1.3	Białka HP1.....	25
1.3.1	Struktura białka HP1.....	25
1.3.2	Rodzina białek chromodomenowych.....	28
1.3.3	Rozmieszczenie białek HP1.....	30
1.3.4	Funkcje białek HP1.....	32
1.4	Naprawa DNA.....	39
1.4.1	Rodzaje uszkodzeń DNA.....	40
1.4.2	Rodzaje napraw DNA.....	40
1.4.3	Mechanizm naprawy NER.....	43
1.4.4	Mechanizm naprawy BER.....	47
1.4.5	Naprawa SOS.....	49
1.4.6	Podwójne pęknięcia nici DNA.....	50
1.4.7	Mechanizm naprawy HR.....	52
1.4.8	Mechanizm naprawy NHEJ.....	54
1.4.9	Naprawa MMR.....	56
1.4.10	Naprawa DNA w kontekście chromatyny.....	58

1.1 Struktura i upakowanie DNA u eukariota

Jądro to organella komórkowa występująca u organizmów eukariotycznych, w której umieszczony jest prawie cały materiał genetyczny komórki. W komórce znajduje się zazwyczaj jedno jądro (monokariocyty), choć spotykane są również komórki dwujądrzaste (dikariocyty) oraz wielojądrzaste (polikariocyty). Jądro posiada własną otoczkę jądrową, która zbudowana jest z dwóch dwuwarstwowych błon białkowo-lipidowych: wewnętrznej i zewnętrznej (Rys. 1.1). Transport pomiędzy jądrem a cytoplazmą odbywa się przez umieszczone w błonach liczne pory jądrowe. Znajdujący się wewnątrz jądra kompleks DNA i białek nosi nazwę chromatyny. Ponadto, wewnątrz jądra znajdują się również małe ciała zwane jąderkami oraz inne struktury, jak ciała jądrowe PML czy ciała Cajala (ang. *Cajal bodies*, CBs). W organizacji struktury jądrowej uczestniczą laminy jądrowe, tworzące dwie sieci filamentów pośrednich, które umieszczone są wewnątrz oraz na zewnątrz otoczki jądrowej.



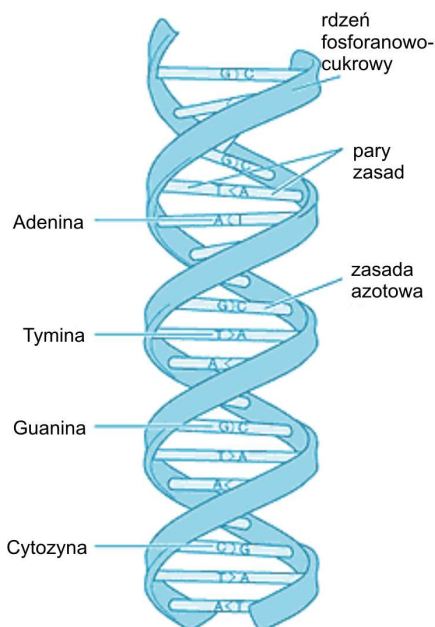
Rysunek 1.1. Jądro komórkowe

Schemat budowy jądra komórkowego. Jądro otoczone jest otoczką jądrową, która zbudowana jest z dwóch błon: zewnętrznej oraz wewnętrznej, w których znajdują się pory jądrowe. Wnętrze jądra stanowi nukleoplazma, w której znajduje się chromatyna oraz jąderka. Wykonano na podstawie: (<http://rwyman.com/nucleus-sm.jpg>).

1.1.1 Budowa DNA

Nośnikiem informacji genetycznej jest dwuniciowy DNA. Struktura przestrzenna DNA opisana została w 1953 roku przez Watson'a i Crick'a. Cząsteczka DNA zbudowana jest z czterech prostych jednostek, zwanych nukleotydami: adeninowego (A), tyminowego

(T), guaninowego (G) oraz cytozynowego (C). Każdy nukleotyd składa się z odpowiedniej zasady azotowej (A, T, G, C), połączonej z pięciowęglowym cukrem - deoksyrybozą oraz resztą kwasu fosforowego (P) (Rys. 1.2).



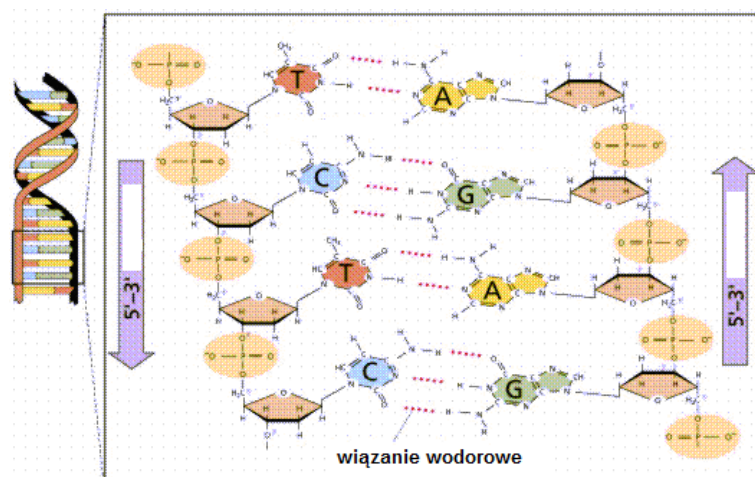
Rysunek 1.2. Dwuniciowa cząsteczka DNA

Schemat cząsteczki DNA złożonej z dwóch łańcuchów DNA. Pojedyncza nić DNA zbudowana jest z nukleotydów. W każdym nukleotydzie znajduje się utworzony przez cukier deoksyrybozę oraz resztę kwasu fosforowego rdzeń fosforanowo-cukrowy, który łączy się z rdzeniem drugiej nici poprzez zasady azotowe (adenina, tymina, guanina i cytozyna). W oddziaływaniach pomiędzy zasadami azotowymi, należącymi do sąsiednich nici, uczestniczą mostki wodorowe. Wykonano na podstawie: (<http://whyfiles.org/075genome/images/dna.gif>).

Cząsteczka DNA zbudowana jest z dwóch nici, które leżą naprzeciwko siebie, przy czym każda nić to długi łańcuch nukleotydów. DNA jest zatem dwuniciowym polinukleotydem (Alberts i wsp., 2002). Łańcuchy DNA ustawione są antyrównolegle i owijają się wokół wspólnej osi, tworząc tzw. prawoskrętną podwójną helisę. Reszty cukrowe i fosforowe, połączone ze sobą wiązaniem fosfodiesterowym, znajdują się na zewnątrz helisy formując rdzeń fosforanowo-cukrowy.

W wewnętrznej części podwójnej helisy znajdują się zasady azotowe. W utrzymaniu dwóch nici razem uczestniczą wiązania wodorowe, utworzone pomiędzy zasadami azotowymi sąsiednich nici. Wiązania te powstają pomiędzy parami zasad azotowych według bardzo prostych reguł, wynikających ze struktury tych zasad. Adenina (A) zawsze łączy się za pomocą dwóch wiązań wodorowych z tyminą (T), a cytozyna (C), za pomocą trzech wiązań,

z guaniną (G). Ponadto, adenina może także łączyć się z uracylem (U), w kwasie rybonukleinowym (RNA). W ten sposób jedna nić DNA wyznacza budowę drugiej nici, a zatem dwie nici są komplementarne, czyli wzajemnie się uzupełniają (Rys. 1.3). Znając sekwencję zasad jednej nici cząsteczki można w prosty sposób przewidzieć ułożenie zasad w drugiej nici, należącej do tej samej cząsteczki DNA.



Rysunek 1.3. Komplementarność zasad azotowych w DNA

Po wewnętrznej stronie łańcucha DNA znajdują się wiązania wodorowe, które powstają pomiędzy parami zasad azotowych; tymina (T) łączy się z adeniną (A), a cytozyna (C) z guaniną (G). Łańcuch DNA posiada polaryzację chemiczną (łańcuchy obydwu nici biegną przeciwnie; na rysunku zaznaczono kierunek 5'-3'), a obydwie nici ułożone są względem siebie antyrównolegle. Według: (<http://library.thinkquest.org/>).

Wspomnieć jednak należy, iż pary typu Watsona-Cricka (A i T oraz G i C) nie są jedynym ułożeniem zasad spotykanym w obrębie DNA. Spotykany jest również inny rodzaj parowania, nazywany parowaniem typu Hoogsteena. Odkrywca tego zjawiska - Karst Hoogsteen w 1963 roku wykazał bowiem, iż zarówno w kryształach DNA, które znajduje się w kompleksie z niektórymi związkami interkalującymi, jak i w DNA o strukturze znacznie zakłóconej, w wyniku jego oddziaływań z pewnymi białkami, do tworzenia wiązań wodorowych w parach zasad częściowo wykorzystywane są inne miejsca, niż w parach typu Watsona-Cricka. Nie zostało jednak potwierdzone, czy parowanie typu Hoogsteena odgrywa jakąś rolę w procesach zachodzących w komórce (Węgleński 2006). Wykazano jednak, iż ten typ parowania odgrywa bardzo istotną rolę przy tworzeniu struktur trójniciowych. Pojawia się jednak pytanie, dlaczego alternatywne formy par A-T i G-C nie występują w dwuniciowych cząsteczkach DNA? Odpowiedzią jest niestabilność. Okazuje się bowiem, że w fizjologicznym pH pary G-C typu Hoogsteena są niestabilne, zaś dwa wiązania wodorowe

czynią parę G-C typu Hoogsteena mniej stabilną od pary G-C typu Watsana-Cricka, w której występują trzy wiązania wodorowe.

Ze względu na formę przestrzenną, dwuniciowa cząsteczka DNA nosi nazwę podwójnej helisy (Alberts i wsp., 2002). Każda z nici DNA posiada na jednym końcu (oznaczanym jako 5'), przy ostatnim nukleotydzie, wolną grupę fosforanową przy węglu 5' deoksyrybozy, zaś na drugim końcu (oznaczanym jako 3') ostatni nukleotyd z wolną grupą hydroksylową przy węglu 3' deoksyrybozy. Helisa dwóch nici DNA spleciona jest w ten sposób, że jedna z nici zaczyna się od końca 5', a druga od 3'. Obydwie nici są względem siebie antyrównoległe, co oznacza, że koniec jednej położony jest dokładnie naprzeciwko początku drugiej. Sposób połączenia jednostek nukleotydowych w łańcuch nadaje mu polaryzację chemiczną. Polarność łańcucha DNA oznacza się przez oznakowanie jednego z jego końców jako 3', a drugiego 5' (Alberts i wsp., 2002).

Oprócz wiązań wodorowych, pomiędzy ułożonymi w pozycji poziomej zasadami azotowymi, występują tzw. oddziaływania „stackingowe”, które uczestniczą w tworzeniu charakterystycznych struktur tzw. stosów (ang. *stacks*) (Saenger 1988). Oddziaływania „stackingowe” pełnią kluczową rolę w stabilizacji helisy DNA. Jest to rodzaj oddziaływań pionowych, które powstają pomiędzy ułożonymi nad sobą zasadami. W tworzeniu oddziaływań „stackingowych” zaangażowane są: system elektronów π , dipole oraz indukowane momenty dipolowe. Istotną rolę odgrywają tu także siły dyspersyjne Londona oraz oddziaływania wodorowe (szczególnie w roztworach wodnych). Stosy utworzone pomiędzy zasadami purynowymi uważa się za najbardziej stabilne, z kolei najmniej stabilne, i tym samym najsłabsze, są „oddziaływania stackingowe” utworzone pomiędzy zasadami pirymidynowymi (Saenger 1988).

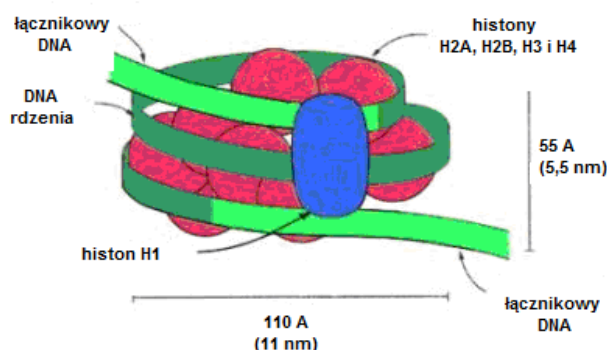
1.1.2 Nukleosomy

Białka histonowe opisane zostały po raz pierwszy w 1884 roku przez Albrecht'a Kossel'a. Histony obecne są we wszystkich komórkach eukariotycznych, nie występują natomiast u prokariota. Wykazano jednak, że w komórkach prokariotycznych obecne są białka wykazujące podobieństwo do białek histonowych (Turner 2001). Histony to małe białka o wielkości 102-135 reszt aminokwasowych. Spośród innych białek wyróżnia je to, iż

są bogate w dwa aminokwasy: lizynę i argininę, które przyjmują ładunek dodatni w neutralnym pH. Znanych jest pięć rodzajów białek histonowych (histony H1, H2A, H2B, H3 i H4), które wykazują istotne różnice w wielkości, całkowitym ładunku oraz zawartości aminokwasów, a w szczególności lizyny i argininy. Histony uważane są za wysoce konserwatywne białka, zaś histon H3 i H4 zalicza się do najbardziej konserwatywnych spośród wszystkich poznanych białek (Turner 2001).

Oktamer histonowy

Białka histonowe uczestniczą w organizacji chromosomów tworząc podstawową jednostkę organizacyjną, jaką jest nukleosom (Rys. 1.4) (Alberts i wsp., 2002). Nie dziwi zatem fakt, iż zawartość histonów w komórce jest duża, zaś całkowita masa białek histonowych równa jest masie DNA. Pojedynczy nukleosom składa się z czterech rodzajów białek histonowych: H2A, H2B, H3 i H4, które w liczbie po dwie cząsteczki na każdy nukleosom tworzą kompleks tzw. oktamer histonowy. W środowisku podwyższonej siły jonowej oktamer ten może dysocjować na jeden tetrametr $(H3-H4)_2$ i dwa dimery H2A-H2B.



Rysunek 1.4. Nukleosom

Schemat budowy pojedynczego nukleosomu wielkości 5,5 nm i szerokości 11 nm. Nukleosom składa się z oktameru histonowego (zbudowanego z histonów rdzeniowych: H2A, H2B, H3 i H4), na który nawinięty jest łańcuch DNA, a znajdujący się na zewnątrz histon H1 pełni rolę łącznika – szczegóły w tekście. Według: (http://zguw.ibt.waw.pl/~knbm/bmwi/podrek/gen_eu/MB-Nukleosom.gif).

Oktamer histonowy jest swego rodzaju rdzeniem białkowym, na który nawinięte jest DNA o długości 146 nukleotydów (Luger i wsp., 1997). Pomiędzy nukleosomami znajduje się tzw. łącznikowe DNA, którego długość jest zmienna i mieści się w przedziale od kilku do 80 par nukleotydów. W utrzymaniu struktury nukleosomowej uczestniczy wiele oddziaływań, które występują pomiędzy DNA a resztami aminokwasowymi, m.in. oddziaływania wodorowe,

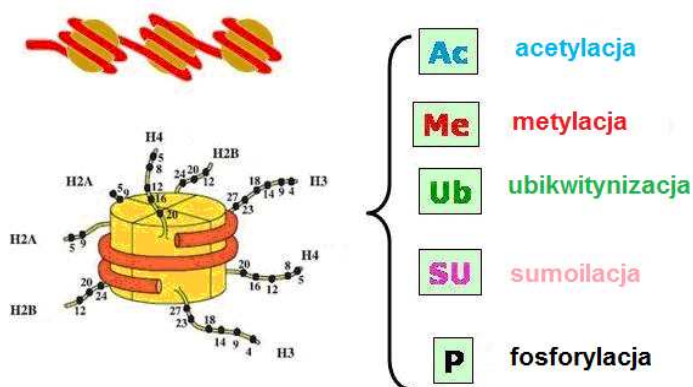
oddziaływania o charakterze niepolarnym czy oddziaływania elektrostatyczne typu jon-jon („mostki solne”).

Chromatosom

Na zewnątrz nukleosomu znajduje się histon H1, który pełni rolę łącznika i uczestniczy w formowaniu oraz stabilizacji wysokorzędowej struktury chromatyny. Histon ten zawiera globularny rdzeń, na którego N- oraz C-końcu znajdują się dwa długie „ogony”, które oddziałują z nukleosomowym oraz łącznikowym DNA. Na zewnątrz każdego rdzenia nukleosomowego znajduje się jedna cząsteczka histonu H1, a położona jest ona dokładnie w miejscu wchodzącej i wychodzącej z nukleosomu nici DNA. Terminem „chromatosom” określa się kompleks, w skład którego wchodzi nukleosom oraz histon H1 (Turner 2001).

Ogony histonowe

Na zewnątrz rdzenia nukleosomowego wystają N-końcowe fragmenty białek histonowych, wielkości około 25 aminokwasów, nazywane „ogonami histonowymi”. Wykazano, że białkowe fragmenty „ogonów histonowych” są szczególnie bogate w aminokwasy zawierające ładunek dodatni. Ponadto, tylko niektóre fragmenty wystających na zewnątrz nukleosomu domen posiadają strukturę α -helisy, gdyż w domenach tych przeważa struktura „kłębka statycznego” (Turner 2001). W obrębie „ogonów histonowych” zachodzą liczne modyfikacje potranslacyjne (Peterson i Laniel 2004) (Rys. 1.5), które niosą informację epigenetyczną i pełnią kluczową rolę w wielu procesach jądrowych, m.in. w naprawie DNA oraz ekspresji genów. Modyfikacje w obrębie ogonów histonowych uczestniczą w bardzo ciekawym mechanizmie epigenetycznym (Turner 2001), w którym zachodzić może aktywacja lub wyciszenie genów. Mechanizm epigenetycznej regulacji ekspresji genów wynika nie tyle ze zmiany samej sekwencji DNA, co z oddziaływań DNA ze swoistymi białkami jądrowymi.



Rysunek 1.5. Potranslacyjne modyfikacje „ogonów histonowych”

Schemat nukleosomu z wystającymi na zewnątrz „ogonami histonowymi”. W obrębie aminokwasów wchodzących w skład „ogonów histonowych” zachodzić mogą następujące modyfikacje potranslacyjne: acetylacja, metylacja, ubikwitynizacja, sumoilacja i fosforylacja – szczegóły w tekście. Według: (<http://chemistry.gsu.edu/faculty/Zheng/nucleosome.jpg>).

Aminokwasy, które znajdują się w domenach „ogonów histonowych” podlegają licznym modyfikacjom potranslacyjnym, a w procesach tych uczestniczą specyficzne kompleksy enzymatyczne. W obrębie grup ϵ -aminowych lizyny zachodzi acetylacja, która jest katalizowana przez kompleks enzymatyczny acetylotransferazy histonowej (HAT). W procesie przeciwnym, usuwaniu grup acetylowych, uczestniczy deacetylaza histonowa (HDAC) (Turner 2001).

Oprócz acetylacji, do ϵ -aminowych reszt lizyny dołączone mogą być reszty metylowe. Proces ten nosi nazwę metylacji i katalizowany jest przez kompleks metylotransferaz histonowych (HMT). Wprowadzona może być 1, 2 lub 3 reszty metylowe, odpowiednio: pojedyncza-, podwójna-, potrójna metylacja. Metylowane są najczęściej histony H3 oraz H4. Obydwa procesy, metylacja oraz acetylacja, odgrywają kluczową rolę w regulacji transkrypcji w chromatynie. Do niedawna uważano, iż metylacja jest procesem nieodwracalnym. Ostatnie odkrycia dowodzą jednak, że proces ten jest odwracalny. Demetylację lizyny 36 histonu H3 (H3-K36) katalizuje białko JHDM1 (ang. *JmjC domain-containing histone demethylase 1*), które należy do rodziny białek zawierających domenę JmjC (Tsukada i wsp., 2006).

Kolejną modyfikacją potranslacyjną jest fosforylacja, która zachodzi w obrębie aminokwasów takich, jak: seryna, tyrozyna, treonina, a także lizyna, histydyna czy arginina.

Pomimo, iż procesowi fosforylacji podlegają głównie histony rdzeniowe, najbardziej intensywna fosforylacja obserwowana jest w przypadku histonu H1 (Turner 2001). Ponadto, w histonie H1 fosforylacja zachodzi zarówno w obrębie ogonów N- oraz C-końcowych, podczas gdy w histonie H3 ogranicza się jedynie do N-końca. Odkryto, że proces fosforylacji histonów H1 oraz H3 zależy od faz cyklu komórkowego, zaś największą fosforylacją cechują się histony w mitozie (van Holde 1989). Panuje obecnie pogląd, że fosforylacja, podobnie jak i acetylacja histonów, powoduje zmniejszenie stopnia upakowania struktury chromatynowej i aktywację transkrypcji (Chadee i wsp., 1999).

Ubikwitynizacja jest procesem odwracalnym, który dotyczy histonów H2A, H2B oraz H3 i polega na przyłączeniu małego (76 reszt aminokwasowych) białka ubikwityny do aminokwasu lizyny.

W procesie sumoilacji następuje kowalencyjne przyłączenie małego białka SUMO. Białka histonowe podlegać mogą również procesowi ADP-rybozylacji (przyłączenie jednej lub kilku reszt adeninowych), a także cytrulinacji (deiminacji argininy) (Turner 2001).

Kod histonowy

Ze względu na rodzaj modyfikacji potranslacyjnych mówić można o swoistym kodzie histonowym (Jenuwein i Allis 2001). Różnorodne modyfikacje w obrębie N-końcowych domen białek histonowych wpływać mogą aktywująco lub hamująco na powinowactwo i oddziaływanie białek z chromatyną. Specyficzne białka chromatynowe mogą, z kolei wpływać na dynamiczne zmiany pomiędzy transkrypcyjnie aktywnymi, a transkrypcyjnie wyciszonymi stanami chromatyny. Zbiór modyfikacji w obrębie N-końcowych „ogonów histonowych” stanowi zatem specyficzny „kod histonowy”, który w znaczny sposób zwiększa potencjał informacji zawartej w samym kodzie genetycznym (Jenuwein i Allis 2001). Co więcej, metylacje w obrębie histonów (K9H3) mogą wpływać na aktywność enzymu metylotransferazy DNA i w ten sposób prowadzić do metylacji cytozyny w sąsiadujących sekwencjach DNA (Bird 2001).

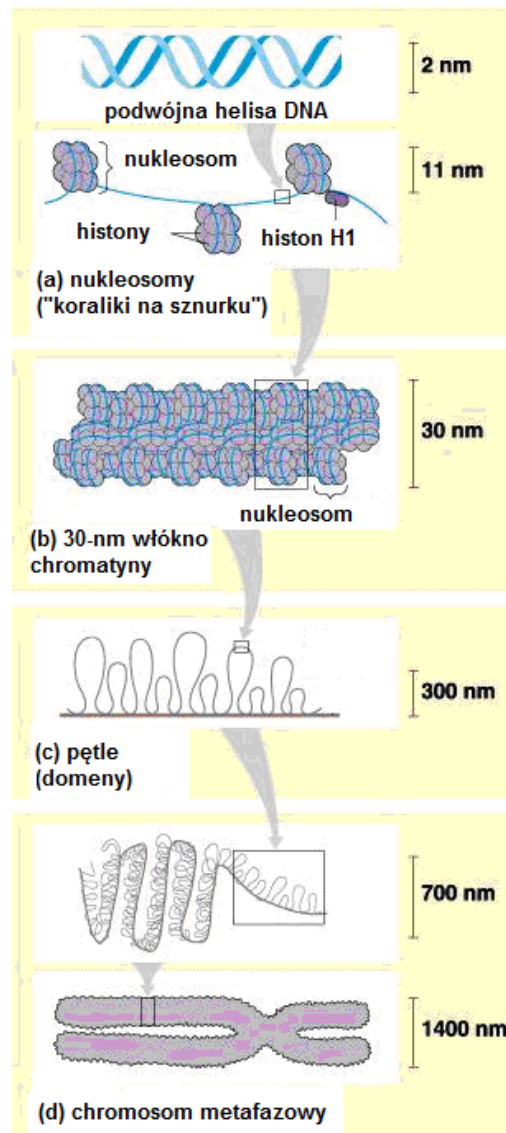
Rozmieszczenie nukleosomów

Każdy fragment helisy DNA może zostać nawinięty na nukleosom, wydaje się więc logiczne, że odległości pomiędzy nukleosomami powinny być regularne. Tak jednak nie jest,

występują bowiem duże różnice w rozmieszczeniu nukleosomów. Okazuje się, że miejsce, w którym utworzony zostanie nukleosom determinowane jest dwoma czynnikami. Jednym z nich jest zgięcie helisy DNA, po którym następuje nawinięcie DNA na rdzeń histonowy. Jest to dość trudny proces i wymaga zaistnienia specjalnych warunków, m.in. kompresji małego rowka DNA. Wykazano, iż kompresja ta zachodzi znacznie łatwiej w przypadku sekwencji DNA bogatych w pary A-T niż C-G. Czynnik drugi, ważniejszy, dotyczy obecności innych białek jądrowych, które oddziałują z DNA. Wśród białek tych są takie, które preferencyjnie wiążą się w sąsiedztwie nukleosomów, lecz są też i takie, które oddziałują z DNA i tworzą rodzaj „przeszkód” dla formowania nukleosomów (Alberts i wsp., 2002).

1.1.3 Wysokorzędowa struktura DNA

Podstawowy stopień upakowania DNA w jądrze komórkowym stanowią nukleosomy. Powstało kilka modeli w celu wyjaśnienia wysoce uporządkowanej struktury DNA w jądrze komórkowym. Jeden z modeli zakłada, iż nukleosomy wraz z łącznikowym DNA układają się w specyficzny sposób, w postaci struktury zygzakowatej, która tworzy solenoid (van Holde i Zlatanova 1995). Średnica solenoidu wynosi 30 nm i dlatego często określa się go mianem 30-sto nanometrowego włókna chromatyny. Następnie, solenoid układa się w charakterystyczne pętle, które budują chromatydy (Rys. 1.6). Odkryto, że w procesie formowania 30-sto nanometrowego włókna chromatyny zaangażowany jest histon H1, który wiąże się z nukleosomem i powoduje zmianę orientacji cząsteczki DNA, która z niego wychodzi (Alberts i wsp., 2002). Ponadto, w tworzeniu wysokorzędowej struktury DNA istotną rolę odgrywają również „ogony histonowe”, które wystając z rdzenia nukleosomowego uczestniczą w łączeniu nukleosomów i formowaniu 30-sto nanometrowego włókna chromatyny.



Rysunek 1.6. Upakowanie DNA w jądrze komórkowym

Poszczególne etapy upakowania DNA, począwszy od nukleosomów aż po chromosomy – szczegóły w tekście. Według: (<http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/proceuc/chromosome.jpg>).

Odkryto, iż regularna struktura helikalna występuje tylko w niektórych obszarach chromatyny. Prawie cała chromatyna jądrowa posiada nieregularną strukturę helikalną, która wynika z różnej długości łącznikowego DNA i lokalnych zakłóceń struktury zygzakowatej. Ponadto, dodatkowe zakłócenia i utrudnienia w upakowaniu DNA wynikają również z obecności innych białek chromatynowych. W chromatynie obecne są również olbrzymie, zależne od ATP kompleksy białkowe, które wprowadzają przejściowe zmiany w strukturze chromatyny, umożliwiając w ten sposób zachodzenie takich procesów, jak m.in. transkrypcja, replikacja czy naprawa DNA (Alberts i wsp., 2002).

1.1.4 Chromosomy

Upakowanie DNA w jądrze komórkowym jest różne w kolejnych fazach cyklu komórkowego. Formą organizacji materiału genetycznego w jądrze metafazowym są chromosomy (gr. *chroma* - kolor; gr. *soma* - ciało), które wykazują różnice w wielkości oraz kształcie. U organizmów eukariotycznych chromosom składa się z dwóch chromatyd siostrzanych, które zbudowane są z pojedynczych cząsteczek DNA (Alberts i wsp., 2002). Najbardziej skondensowane i jednocześnie najlepiej widoczne pod mikroskopem są chromosomy metafazowe (Rys. 1.6). W strukturze chromosomów wyróżnić można dwie chromatydy siostrzane, połączone w jednym punkcie centromerem. Chromosomy z obu stron zakończone są powtarzającą się sekwencją nukleotydów, które tworzą telomer. Skracanie telomerów, które towarzyszy podziałom, prowadzi do starzenia się komórki.

Struktura chromatyny w jądrze interfazowym nie jest tak skondensowana, jak przy podziale komórkowym. Chromosomy w interfazie zlokalizowane są w określonych rejonach, tzw. „terytoriach chromosomowych” (Lamond i Earnshaw 1998).

Ruchy chromosomów

Chromosomy charakteryzują się dynamiczną strukturą. Kondensacja chromosomów nie zachodzi tylko przy podziale, lecz również w trakcie interfazy. Obserwowano ruchy „ramion chromosomowych” w jądrze interfazowym, które towarzyszą cyklom kondensacji i dekondensacji chromatyny. Wykazano, iż ruchy te zależą od fazy cyklu komórkowego i mogą odbywać się w kierunku środka jądra - otoczka jądrowa lub w kierunku przeciwnym (van Holde i Zlatanova 1995). Odkryto, że ruchy chromosomów zachodzą również w trakcie replikacji DNA, podczas której odpowiednie fragmenty DNA przemieszczane są do jądrowych obszarów tzw. „fabryk replikacyjnych”, w których zgromadzone są białkowe kompleksy enzymatyczne (van Holde i Zlatanova 1995). Kondensacja i dekondensacja chromatyny w jądrze interfazowym odgrywa istotną rolę w wielu procesach jądrowych, m.in. w ekspresji genów, rekombinacji czy naprawie DNA.

1.2 Chromatyna

Występujący w jądrze komórkowym kompleks DNA i białek nosi nazwę chromatyny. Na podstawie różnic w wybarwieniu wyszczególniono dwa typy chromatyny: wysoko skondensowaną - heterochromatynę oraz mniej skondensowaną - euchromatynę (Alberts i wsp., 2002). Termin heterochromatyna wprowadzony został pod koniec lat 20-tych XX wieku przez Emila Heitz'a, aby opisać postać chromatyny, która pozostaje skondensowana na przestrzeni prawie całego cyklu komórkowego, w przeciwieństwie do pozostałej części genomu (euchromatyny), która podlega intensywnej dekondensacji w trakcie przejścia z metafazy do interfazy (Heitz 1928).

1.2.1 Euchromatyna

W interfazie euchromatyna występuje w stanie zdekondensowanym i zlokalizowana jest na terenie całego jądra komórkowego. Euchromatyna jądra interfazowego to 30 nm nić chromatynowa, która zorganizowana jest w postaci zawierających od 50 do 100 par zasad DNA, olbrzymich pętli domenowych (Cooper 2000). W konformacji bardziej rozluźnionej, w postaci 10 nm nici chromatynowej, występuje około 10% euchromatyny. W obszarach tych zlokalizowane są geny i podlegają one aktywnej transkrypcji. Regulacja ekspresji genów powiązana jest ze strukturą chromatyny. Wykazano, iż większość podlegających transkrypcji fragmentów DNA, tzw. „aktywnych genów”, zlokalizowana jest w euchromatynie (Cooper 2000).

1.2.2 Heterochromatyna

Okolo 10% chromatyny interfazowej stanowi heterochromatyna, która występuje w stanie skondensowanym we wszystkich fazach cyklu komórkowego, z wyjątkiem późnej fazy S, gdy podlega ona replikacji. Tylko niewielka liczba aktywnych genów zlokalizowana jest w heterochromatynie i w związku z tym tę postać chromatyny określa się mianem nieaktywnej transkrypcyjnie. Wyższy poziom upakowania struktury chromatyny reprezentuje heterochromatyna, która zawiera liczne białka, w tym specyficzne białka heterochromatynowe (Avramova 2002). W obrębie heterochromatyny wyróżniono dwie

formy: heterochromatynę konstytutywną oraz fakultatywną (Turner 2001; Elgin i Grewal 2003). Obydwie postacie heterochromatyny, fakultatywna oraz konstytutywna, bogate są w hypoacetylowane histony H4 oraz sekwencje DNA zawierające zmetylowaną cytozynę w dwunukleotydach CpG (Turner 2001).

Heterochromatyna konstytutywna

Heterochromatyna konstytutywna występuje głównie w rejonach pericentromerowych (wokół centromeru), obszarach telomerowych (przy końcach chromosomów) oraz w rejonach organizatora jąderka. Ta postać heterochromatyny obfituje w sekwencje repetytywne (powtórzenia pewnych sekwencji nukleotydów), jest stosunkowo uboga w sekwencje kodujące geny i zawiera tylko niewielką frakcję acetylowanych histonów H4 (Turner 2001).

Heterochromatyna fakultatywna

Heterochromatyna fakultatywna posiada zarówno cechy euchromatyny, jak i heterochromatyny. Zawiera charakterystyczne dla euchromatyny sekwencje DNA, jednakże przyjmuje własności strukturalne i funkcjonalne (intensywne barwienie, replikacja w późnej fazie S oraz utrata aktywności transkrypcyjnych), które charakterystyczne są dla heterochromatyny. Przykładem heterochromatyny fakultatywnej jest nieaktywny chromosom X, który występuje w komórkach somatycznych ssaków płci żeńskiej. Ulega on replikacji w późnej fazie S, zaś w interfazie przyjmuje konformację wysoce skondensowaną, którą określa się mianem ciała Barra. Inaktywacja chromosomu X występuje również w komórkach męskich, podczas spermatogenezy (Cowell i wsp., 2002).

Formowanie heterochromatyny

Powstawanie heterochromatyny nie jest determinowane samą sekwencją DNA, lecz oddziaływaniami specyficznych białek z DNA. Zauważyć można, iż istotna różnica pomiędzy euchromatyną, a heterochromatyną widoczna jest już na poziomie potranslacyjnych modyfikacji w obrębie tzw. „ogonów histonowych”. Podkreślić należy, że ilość białek histonowych zarówno w euchromatynie, jak i heterochromatynie jest taka sama. Ponadto, heterochromatyna zawiera zestaw specyficznych białek heterochromatynowych, a pierwszym zidentyfikowanym i opisanym białkiem heterochromatynowym było białko HP1 (ang. *Heterochromatin Protein 1*) (Eissenberg i Elgin 2000). Odkryto, że bloki heterochromatynowe wpływają na transkrypcję genów umieszczonych w rejonach

euchromatynowych. Wykazano, iż przyjęcie przez gen struktury heterochromatynowej może spowodować wyłączenie genu, grupy genów, a nawet całego chromosomu (Turner 2001). Zjawisko wyciszania genów, przemieszczonych w sąsiedztwo heterochromatyny, określane jest mianem *PEV* (ang. *Position Effect Variegation*) i występuje u wielu organizmów eukariotycznych. W procesie wyciszania, opartym na mechanizmie *PEV*, zaangażowane są białka heterochromatynowe, m.in. HP1 (Turner 2001).

1.3 Białka HP1

Heterochromatynowe białko HP1 (ang. *Heterochromatin Protein 1*) odkryte zostało w połowie lat 80-tych w laboratorium Sarah C. R. Elgin (Washington University, St. Louis) u muszki owocowej *Drosophila melanogaster*, a nazwa białka pochodzi od jego dominującej lokalizacji w heterochromatynie centromerowej. HP1 jest wysoce konserwatywnym, niehistonowym białkiem chromosomowym, które uczestniczy w wielu procesach jądrowych (Fanti i Pimpinelli 2008), m.in. w formowaniu heterochromatyny oraz wyciszaniu genów (Eisenberg i Elgin 2000). Od czasu odkrycia HP1 stało się popularnym obiektem badań i wykazano, iż oddziałuje ono z szeroką grupą białek jądrowych oraz bierze udział w wielu procesach jądrowych (Li i wsp., 2002).

1.3.1 Struktura białka HP1

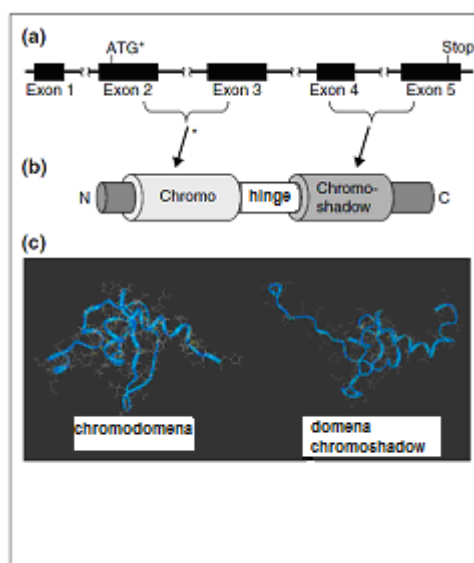
HP1 to białko niewielkich rozmiarów (173-240 reszt aminokwasowych) i średniej masy cząsteczkowej wynoszącej 25 kDa. Strukturę białka HP1 (Rys.1.7) najprościej określić można jako dwie konserwatywne domeny oddzielone mniej konserwatywnym rejonem zawiasowym (Li i wsp., 2002).



Rysunek 1.7. Schemat budowy białka HP1

Pojedyncza N-końcowa chromodomena (Chromo) i pojedyncza C-końcowa domena chromoshadow (Chromoshadow) oddzielone są rejonem zawiasowym (Hinge). Według: (Maison i Almouzni 2004).

W obrębie sekwencji, jak i struktury białka HP1, wyróżnić można trzy rejony (Rys. 1.8). Pierwszy to występująca przy N-końcu chromodomena (CD), która zaangażowana jest w wiązanie HP1 do zmetylowanej lizyny 9 histonu H3 (K9H3). Rejon drugi stanowi C-końcowa domena chromoshadow (CSD), która może dimeryzować oraz oddziaływać z dużą grupą białek jądrowych. Trzeci to tzw. zmienny rejon zawiasowy, tzw. „hinge” (ang. *variable linker, hinge region*), który oddziela obydwie domeny i zawiera sygnał lokalizacji jądrowej (Lomberk i wsp., 2006). Każdy z trzech rejonów HP1 zaangażowany jest w specyficzne oddziaływania z innymi białkami.



Rysunek 1.8. Struktura białka HP1 oraz kodującej go sekwencji

Na rysunku przedstawiono: (a) strukturę genów kodujących białko HP1; każdy gen składa się z 5 egzonów przedzielonych 4 intronami, (b) konserwatywne rejony białek HP1, które zlokalizowane są w obrębie dwóch domen, (c) trójwymiarową strukturę chromodomeny oraz domeny chromoshadow mysiego HP1 β . Według: (Lomberk i wsp., 2006).

Chromodomena

Chromodomena (CD) posiada konformację globularną i składa się z trzech beczulek β w ułożeniu antyrównoległym oraz pojedynczej α -helisy (Rys. 1.8). CD określana jest mianem domeny wiążącej chromatynę (Bannister i wsp., 2001). Chromodomena oddziałuje ze zmetylowaną lizyną 9 histonu H3 (K9H3). W oddziaływaniu tym uczestniczy hydrofobowa kieszeń chromodomeny (Lomberk i wsp., 2006). Na uwagę zasługuje fakt, iż żadne inne kombinacje naturalnie występujących aminokwasów nie oddziałują z CD, a zmetylowany histon K9H3 jest jedynym miejscem wiązania dla tej domeny. Pojawienie się mutacji w sekwencji kodującej domenę CD uniemożliwia rekrutację HP1 do miejsc

heterochromatyny centromerowej (Cheutin i wsp., 2003). Wiązanie HP1 z chromatyną, poprzez oddziaływanie chromodomeny z K9H3, może być zakłócone w wyniku zahamowania metylacji K9H3 przez inhibitor deacetylazy histonowej (HDAC) czy trichostatynę A (TSA) (Taddei i wsp., 2001). Wiązanie to może być również zakłócone przez mutacje w genie specyficznej dla K9H3 metylotransferazy histonowej (HMT), SUV39H (Cheutin i wsp., 2003).

Domena chromoshadow

Domena chromoshadow wykazuje duże podobieństwo struktury z chromodomeną. CSD, podobnie jak CD (Rys. 1.8), posiada konformację globularną i składa się z trzech beczulek- β w ułożeniu antyrównoległym oraz nie pojedynczej, jak w chromodomenie, lecz podwójnej α -helisy w rejonie C-końcowym (Lomberk i wsp., 2006). W przeciwieństwie do CD, domenę CSD określa się jako domenę dimeryzacyjną (Brasher i wsp., 2000). W roztworze wodnym CSD łatwo dimeryzuje, podczas gdy CD pozostaje w formie monomerycznej. A zatem, dwie cząsteczki białka HP1 mogą oddziaływać ze sobą i tworzyć homo- lub heterodimery w obrębie różnych izoform białka HP1.

Domena CSD uczestniczy w oddziaływaniach białko - białko, które występują pomiędzy białkiem HP1 i innymi białkami zawierającymi sekwencję konsensusową PxVxL (gdzie P = prolina, V = walina, L = leucyna, x = dowolny aminokwas) (Cowieson i wsp., 2000). Wśród białek posiadających pentapeptyd PxVxL wyróżnić można: czynniki transkrypcyjne TIFs oraz Su(z), białko TAF_{II}130 wiążące się do kasety TATA, CAF1 i NIPBL (Hiragami i Festenstein 2005). Nie wszystkie białka oddziałujące z HP1 wiążą się z nim za pośrednictwem domeny CSD, czego przykładem jest ORC, które oddziałuje z domeną CD białka (Pak i wsp., 1997). Ponadto niektóre komponenty otoczki jądrowej, takie jak: LAP2 β czy lamina B również oddziałują z domeną CD białka HP1 (Polioudaki i wsp., 2001).

Rejon zawiasowy

Dwie wysoce konserwatywne domeny, CD oraz CSD, oddzielone są mniej konserwatywnym, elastycznym rejonem zawiasowym (ang. *hinge region*), który zawiera zmienną sekwencję aminokwasową i jest wysoce podatny na modyfikacje potranslacyjne, a w szczególności na fosforylację. Modyfikacje te wpływają na lokalizację, oddziaływanie oraz funkcje HP1.

Interesującą cechą obszaru „hinge” jest to, iż posiada on wiele zgodnych miejsc fosforylacji dla różnych kinaz białkowych (Eissenberg i wsp., 1994). Przypuszczać można, iż fosforylacja w obrębie „hinge” odgrywać może ważną rolę w regulacji aktywności domeny CD oraz CSD, a nawet całej cząsteczki HP1. Fragment białka zawierający rejon zawiasowy może być zatem centralnym punktem kontrolnym w regulacji HP1 (Lomberk i wsp., 2006).

Niewielka liczba białek oddziałuje z obszarem „hinge” HP1. Rejon zawiasowy odgrywa kluczową rolę jedynie w przypadku wiązania HP1 α z białkiem wewnątrzchromosomowym INCEP (Ainsztein i wsp., 1998). Ponadto, „hinge” oddziałuje z RNA oraz chromatyną, a oddziaływanie to wydaje się być istotne w kierowaniu białka HP1 do domen pericentrycznych (Muchardt i wsp., 2002).

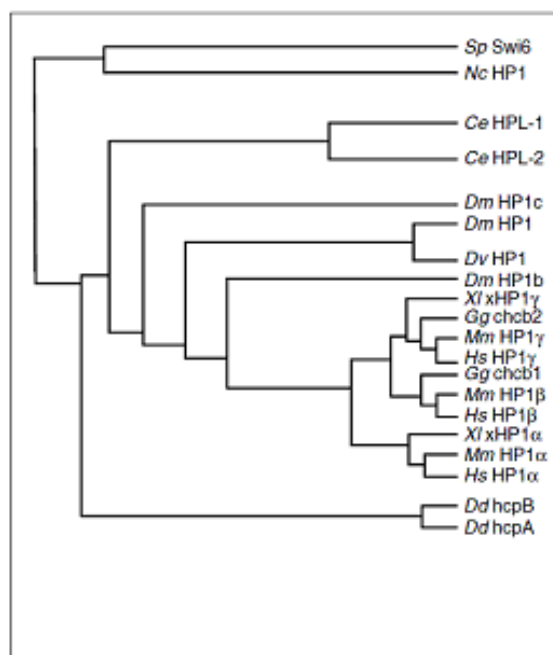
1.3.2 Rodzina białek chromodomenowych

HP1 należy do rodziny białek chromodomenowych, które występują u licznych gatunków grzybów, roślin, jak i zwierząt. U ssaków, białka chromodomenowe wchodzi w skład dużych, wielocząsteczkowych kompleksów chromatynowych, bądź białek zaangażowanych w zmianę struktury chromatynowej (Jones i wsp., 2000). Chromodomena (ang. *chromatin organisation modifier*) zdefiniowana została jako homologiczny rejon 50 reszt aminokwasowych, występujący w białkach należących do tej rodziny.

Rodzinę białek chromodomenowych, ze względu na organizację domenową, podzielić można na trzy klasy (Lomberk i wsp., 2006). Białka należące do pierwszej klasy charakteryzuje obecność pojedynczej chromodomeny. Białka drugiej klasy posiadają parę tandemowych chromodomen. W skład trzeciej klasy wchodzi białka zawierające zarówno chromodomenę, jak i domenę chromoshadow, należą tu wszystkie białka rodziny HP1. Domena chromoshadow posiada wysoki stopień identyczności sekwencji aminokwasowej z chromodomeną. Przypuszczać zatem można, iż geny kodujące HP1 powstać mogły na skutek duplikacji sekwencji jednej z tych domen. Konserwatywność pomiędzy dwoma rejonami, N-końcową chromodomeną oraz C-końcową domeną chromoshadow, wskazuje na kluczowe znaczenie tych domen w funkcjonowaniu HP1 (Lomberk i wsp., 2006). Warto tu również wspomnieć, iż odmiana HP1 α cechuje się największym polimorfizmem genów, spośród całej rodziny białek HP1 (Dialynas i wsp., 2007).

Rodzina białek HP1

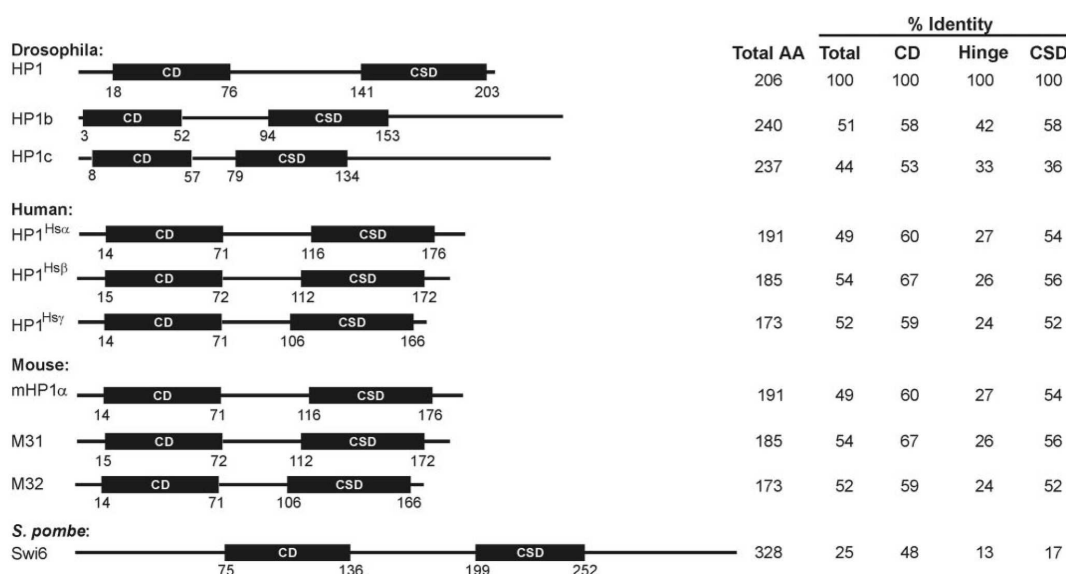
Rodzina białek HP1 jest ewolucyjnie konserwatywna, jej przedstawicieli spotkać można u niemal wszystkich organizmów eukariotycznych, począwszy od *Schizosaccharomyces pombe*, a skończywszy na człowieku (Rys. 1.9). Białka HP1 nie występują jednak u prokariota.



Rysunek 1.9. Drzewo filogenetyczne białek HP1

Przedstawione gatunki: *Caenorhabditis elegans* (Ce), *Drosophila melanogaster* (Dm), *Drosophila virilis* (Dv), *Dictyostellum discoideum* (Dd), *Gallus gallus* (Gg), *Homo sapiens* (Hs), *Mus musculus* (Mm), *Neurospora crassa* (Nc), *Schizosaccharomyces pombe* (Sp) oraz *Xenopus laevis* (Xl). Według: (Lomberk i wsp., 2006).

Wysoki stopień konserwatywności i podobieństwa sekwencji aminokwasowej potwierdza fakt, iż homologia pomiędzy domenami CD oraz CSD ssaków i *Drosophila melanogaster* wynosi około 50-70% (Rys. 1.10). Konserwatywność w obrębie rejonu zawiasowego jest mniejsza, zaledwie 25-30% identyczności sekwencji (Li i wsp., 2002).



Rysunek 1.10. Diagram białek HP1 u *Drosophila*, myszy, człowieka i *S. pombe*

Całkowita długość każdego białka przedstawiona jest w ilości aminokwasów. Wyznaczone procenty identyczności z porównania całej sekwencji białka, rejonu CD, CSD oraz „hinge” względem HP1 *Drosophila*. Według: (Li i wsp., 2002).

Rodzina białek HP1 kodowana jest przez klasę genów chromobox (CBX). U ssaków występują trzy białka: HP1α, HP1β i HP1γ; sekwencja każdego zapisana jest w odrębnym genie. HP1α jest kodowane u człowieka przez gen CBX₅, HP1β przez gen CBX₁, zaś HP1γ przez CBX₃ (Lomberk i wsp., 2006).

1.3.3 Rozmieszczenie białek HP1

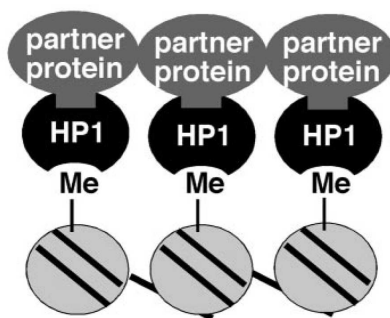
Choć nazwa białka wskazuje, iż HP1 jest białkiem heterochromatynowym, jest ono również obecne w rejonach euchromatynowych. W obszarach heterochromatynowych ruchliwość białka HP1 jest zmniejszona i występuje większa frakcja statycznie związanego HP1, w porównaniu z rejonami euchromatynowymi (Schmiedeberg i wsp., 2004). Mobilność HP1 wydaje się być powiązana ze stopniem metylowania K9H3. Wykazano, iż HP1 posiada różne powinowactwo do pojedynczo-, podwójnie- oraz potrójnie metylowanej lizyny K9H3, które uszeregować można ze względu na malejące powinowactwo: potrójna > podwójna > pojedyncza (Fischle i wsp., 2003). W obrębie gatunków występują różnice w rozmieszczeniu zmetylowanych form K9H3, np. u myszy Me3K9H3 występuje głównie w rejonach pericentromerowych, zaś Me2K9H3 i Me1K9H3 przeważa w euchromatynie, wokół jąder i otoczki jądrowej (Wu i wsp., 2005).

Pomimo podobieństwa pierwszorzędowej sekwencji aminokwasowej, izoformy białka (HP1 α , HP1 β oraz HP1 γ) wykazują różnice w interfazowej oraz metafazowej lokalizacji jądrowej. HP1 α oraz HP1 β występuje głównie w heterochromatynie, zaś HP1 γ przeważa w euchromatynie. W jądrze interfazowym zachodzi częściowe nakładanie się rejonów zajmowanych przez poszczególne izoformy (Minc i wsp., 1999). Jednakże, w trakcie metafazy poszczególne izoformy HP1 zachowują się odmiennie. Liczne badania potwierdziły, iż HP1 α jest dominującą izoformą centromerów chromosomów metafazowych (Hayakawa i wsp., 2003). Każda z odmian białka HP1 regulowana jest w wyniku modyfikacji potranslacyjnych, a fosforylacja wydaje się najbardziej wpływać na regulację rozmieszczenia HP1 (Zhao i Eissenberg 1999). Na rozmieszczenie HP wpływa również obecność innych cząsteczek białka HP1. Zaobserwowano bowiem, iż przywoływanie HP1 γ do heterochromatyny odbywa się przy udziale HP1 α , jak i HP1 β (Dialynas i wsp., 2007).

W kierowaniu białka HP1 do chromatyny jądrowej konieczne jest nie tylko rozpoznanie zmetylowanej lizyny K9H3, lecz również oddziaływanie z białkiem zawierającym motyw sekwencji PxVxL. Interferencyjne RNA (iRNA) pełni kluczową rolę w tworzeniu i utrzymaniu domen heterochromatynowych. Ponadto, wykazano, iż utrata lub mutacje w elementach maszynierii iRNA powodują nieprawidłowe rozmieszczenie HP1 (Pal-Bhadra i wsp., 2004).

HP1 białkiem „pomostowym”

Podwójnie lub potrójnie metylowana reszta lizyny 9 histonu H3 (Me2K9H3 i Me3K9H3) jest miejscem wiązania dla chromodomeny HP1. Odkrycie to potwierdza zatem hipotezę, która zakłada, iż modyfikacje w obrębie ogonów histonowych stanowią specyficzne motywy, które rozpoznawane są przez białka chromatynowe (Li i wsp., 2002). Domena chromoshadow oddziałuje z dużą grupą białek jądrowych. HP1 określane jest mianem „białka pomostowego” (Rys. 1.11), które wiąże histony poprzez domenę CD z niehistonowymi białkami chromosomowymi, oddziałującymi z domeną CSD (Li i wsp., 2002).



Rysunek 1.11. HP1 białkiem pomostowym

Model HP1 jako białka pomostowego, w którym jeden koniec białka wiąże metylowaną lizynę histonu H3, zaś drugi koniec wiąże inne białka jądrowe – szczegóły w tekście. Według: (Li i wsp., 2002).

1.3.4 Funkcje białek HP1

HP1 oddziałuje bezpośrednio lub pośrednio z dużą grupą niehistonowych białek zaangażowanych w wiele procesów jądrowych (Hiragami i Festenstein 2005; Fanti i Pimpinelli 2008), m.in. w regulację transkrypcji, modyfikację struktury chromatynowej, replikację, organizację struktury jądra oraz formowanie chromosomów. Oddziaływania te mogą być albo izoformowo specyficzne albo uniwersalne dla wszystkich trzech izoform białka HP1 i wynikać z potranslacyjnych modyfikacji w obrębie HP1. Szczególne znaczenie w tych oddziaływaniach przypisuje się fosforylacji, która rządzi tworzeniem dimerów HP1 - HP1, a także interakcjami pomiędzy HP1 i innymi białkami (Eissenberg i Elgin 2000). HP1 podlega różnorodnym modyfikacjom potranslacyjnym, takim jak: fosforylacja, acetylacja, metylacja, sumoylacja oraz ubikwitynizacja. Mówić zatem można o obecności specyficznego kodu chromatynowego, tzw. subkodu HP1 (Lomberg i wsp., 2006).

Domena chromoshadow HP1 oddziałuje z dużą grupą białek jądrowych (Tab. 1.1). Większość z tych białek zawiera zgodną sekwencję pentamerową PxVxL (Smothers i Henikoff 2000; Lechner i wsp., 2005). Pentamer ten nie występuje jednak u wszystkich białek oddziałujących z HP1, nieobecny jest m.in. w białku wewnątrz-centromerowym (INCENP), ORC, SU(VAR)3-9 oraz receptorze lamin typu B (LBR). Mechanizm oddziaływania HP1 z tymi białkami jest najprawdopodobniej odmienny, a w interakcjach tych uczestniczyć mogą inne fragmenty HP1 zlokalizowane w chromodomenie lub rejonie „hinge” (Jones i wsp., 2000).

Tabela 1.1. Białka oddziałujące z HP1

Zestawienie partnerów interakcji białek HP1 – szczegóły w tekście. Według: (Li i wsp., 2002).

BIĄŁKO	ORGANIZM	IZOFORMA HP1
Regulacja transkrypcji/ Remodeling chromatyny		
H1	<i>Drosophila</i>	HP1
HP1-BP74 H1-like	Mouse	mHP1 α
H3	Mouse	mHP1 α , M31, M32
H3	<i>Drosophila</i>	HP1
Methylated K9 of H3	<i>S. pombe</i>	Swi6
Methylated K9 of H3	<i>Drosophila</i>	HP1
Methylated K9 of H3	Mouse	mHP1 α , M31, M32
Methylated K9 of H3	Human	HP1 ^{Hsu} , HP1 ^{Hsβ} , HP1 ^{Hsγ}
H4	Mouse	M31
H4	<i>Drosophila</i>	HP1
MacroH2A1.2*	Mouse	M31
SUVAR3-9	<i>Drosophila</i>	HP1
Suv39h1	Mouse	M31
SUV39H1	Human	HP1 ^{Hsβ}
Suvar3-7	<i>Drosophila</i>	HP1
KAP-1/TIF1 β	Human	HP1 ^{Hsu} , HP1 ^{Hsγ}
KAP-1/TIF1 β	Mouse	mHP1 α , M31, M32
TRF1/PIN2	Mouse	M31
TAF _{II} 130	Human	HP1 ^{Hsu} , HP1 ^{Hsγ}
TIF1 α	Mouse	mHP1 α , M31, M32
mSNF2 β	Mouse	mHP1 α
Rb	Human	HP1, HP1 ^{Hsγ}
Rb	Maize	HP1 γ
Dnmt3a	Mouse cells	mHP1 α
Dnmt3b	Mouse cells	mHP1 α
ATRX/HP1-BP38	Mouse	mHP1 α , M31
Pim-1	Human	HP1 ^{Hsγ}
CKII	<i>Drosophila</i>	HP1
dAF10	<i>Drosophila</i>	HP1
Replikacja i naprawa DNA		
CAF-1 p150	Mouse	mHP1 α , M31
CAF-1 p150	Human	HP1 ^{Hsu}
Ku70	Human	HP1 ^{Hsu}
BRCA-1*	Human	HP1 ^{Hsu}
ORC1	<i>Drosophila</i>	HP1
ORC2	<i>Drosophila</i>	HP1
ORC3	<i>Drosophila</i>	HP1
ORC4	<i>Drosophila</i>	HP1
ORC5	<i>Drosophila</i>	HP1
ORC6	<i>Drosophila</i>	HP1
Xorc1	<i>Xenopus</i>	XHP1 α , XHP1 γ
HOAP	<i>Drosophila</i>	HP1
Organizacja jądra		
Lamin B receptor	Human	HP1 ^{Hsu} , HP1 ^{Hsβ} , HP1 ^{Hsγ}
HP1-BP84	Mouse	mHP1 α , M31
Lamin B	Mouse	M31
LAP2 β	Mouse	M31
Nuclear envelope	Mouse	mHP1 α , M31, M32
Inne białka oddziałujące z chromosomami		
Psc3	<i>S. pombe</i>	Swi6
DDP1	<i>Drosophila</i>	HP1
Arp4/dArp6	<i>Drosophila</i>	HP1
INCENP	Human	HP1 ^{Hsu} , HP1 ^{Hsγ}
Ki-67	Human	mHP1 α , M31, M32
SP100B	Human	HP1 ^{Hsu} , HP1 ^{Hsβ} , HP1 ^{Hsγ}
EST AA153281	Mouse	mHP1 α , M31
EST AA003533	Mouse	mHP1 α , M31

Funkcjonowanie centromerów oraz telomerów

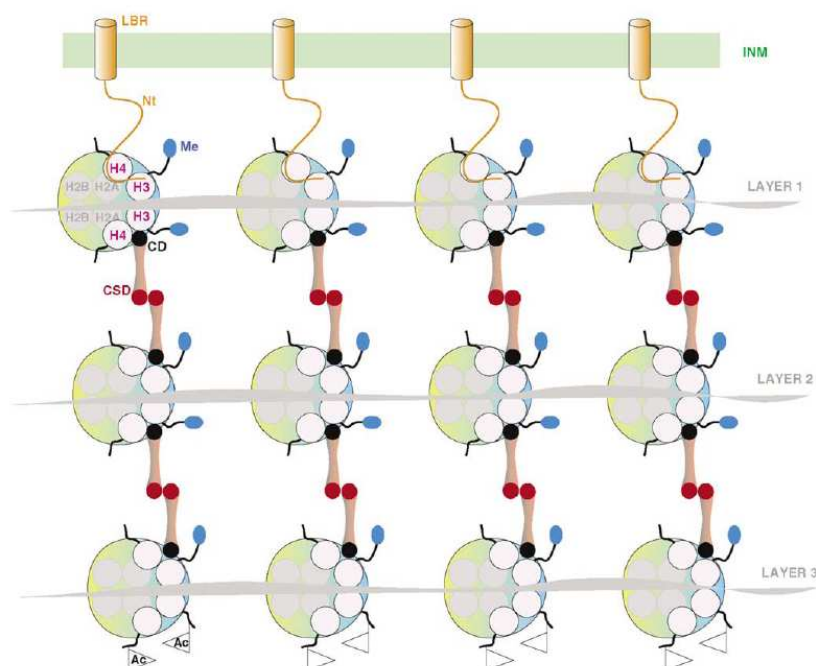
Białko HP1 pełni kluczową rolę w prawidłowym rozwoju organizmów eukariotycznych. Homozygotyczna mutacja w genie kodującym HP1, *Su(var)2-5*, powoduje śmierć w stadium larwalnym u *Drosophila melanogaster* (Lu i wsp., 2000).

Centromery wyższych eukariota, drożdży oraz *S. pombe* zawierają sekwencje repetytywnego DNA i zasocjowane są z białkiem HP1. Występujący u *S. pombe* homolog HP1 - Swi6 - jest niezbędny do efektywnej kohezji chromatyd siostrzanych w trakcie cyklu komórkowego (Bernard i wsp., 2001). Podobnie u *Drosophila melanogaster*, HP1 jest potrzebny do prawidłowej segregacji chromosomów (Kellum i Alberts 1995). Z kolei, utrata lub redukcja metylacji w obrębie K9H3 prowadzi do wyraźnego wzrostu niestabilności chromosomowej, na skutek zwiększonej częstości niehomologicznego parowania (Peters i wsp., 2001). Białko HP1 wydaje się zatem pomagać w rozmieszczeniu lub/oraz ładowaniu odpowiedniej liczby cząsteczek kohezyn w chromatydach siostrzanych, w procesie homologicznego parowania i właściwej segregacji chromosomów. HP1 oddziałuje również z telomerami i zapobiega ich fuzji. Białko to najprawdopodobniej uczestniczy w tworzeniu zakończeń telomerowych (ang. *telomere capping*) (Perrini i wsp., 2004).

Organizacja jądrowa

W wielu typach komórek ludzkich heterochromatyna centromerowa obecna jest w sąsiedztwie otoczki jądrowej (Weierich i wsp., 2003). Badania wykazały, iż HP1 oddziałuje z komponentami otoczki jądrowej, takimi jak LBR (Polioudaki i wsp., 2001), lamina B oraz LAP2β (Kourmouli i wsp., 2000). Oddziaływanie HP1 z LBR (Rys. 1.12) zachodzić może na drodze pośredniej lub bezpośredniej, a w procesie tym uczestniczą histony: H3 oraz H4 (Polioudaki i wsp., 2001). Oddziaływania te zaangażowane są w tworzenie błony jądrowej, białka HP1 uczestniczą zatem w procesie formowania struktury jądrowej (Kourmouli i wsp., 2000).

Ponadto, badania wykazały, iż w procesie wyciszania genów, który zachodzi podczas rozwoju, następuje rekrutacja niektórych genów w kierunku otoczki jądrowej (Dietzel i wsp., 2004). Przemieszczanie wyciszonych genów w sąsiedztwo otoczki jądrowej zależeć może od wiązania HP1.



Rysunek 1.12. Rozmieszczenie heterochromatyny peryferyjnej w obrębie otoczki jądrowej

Warstwowe (layer 1, layer 2, layer 3) ułożenie heterochromatyny jądrowej, przyłączonej do błony wewnętrznej (ang. *inner membrane*, INM) otoczki jądrowej – szczegóły w tekście. Według: (Singh i Georgatos 2002).

Wydaje się prawdopodobne, że białko HP1, poprzez wiązanie heterochromatyny oraz wyciszonych genów do otoczki jądrowej, umożliwia przesuwanie transkrypcyjnie aktywnych rejonów do fabryk transkrypcyjnych, które znajdują się w wewnętrznej części jądra komórkowego (Pombo i wsp., 2000). Oprócz udziału w organizacji struktury jądrowej, białko HP1 wydaje się również być zaangażowane w procesach cytokinezy oraz mitozy (Auth i wsp., 2006).

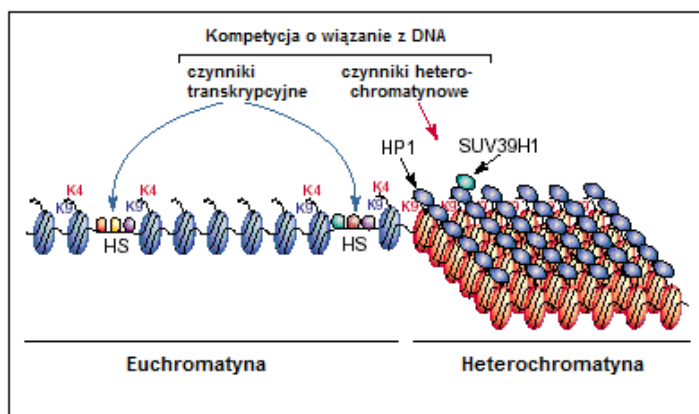
Przebudowa chromatyny

HP1 oddziałuje z białkami zaangażowanymi w składanie chromatyny, w trakcie replikacji oraz naprawy DNA. Podjednostka p150 czynnika składania chromatyny, CAF1, oddziałuje z HP1 α oraz HP1 β (Murzina i wsp., 1999). CAF1 posiada konsensusową sekwencję PxVxL, dzięki której wchodzi w interakcję z domeną CSD białka HP1. Prawdopodobnie istnieje replikacyjno - specyficzna pula HP1 α , która oddziałuje z CAF1, a powstały kompleks HP1 α /CAF1 nie zawiera histonów H3/H4. Kompleks ten zlokalizowany jest na obrzeżach domen heterochromatyny pericentromerowej, w której zachodzi replikacja DNA w sposób

niezależny od metylacji K9H3. Lokalizacja ta wydaje się być niezależna od CAF1. Wydaje się prawdopodobne, że CAF1 może w jakiś sposób promować inkorporację HP1 w rejony heterochromatyny pericentromerowej, podczas ich replikacji, która zachodzi w późnej fazie S. Wykazano, iż HP1 oddziałuje również z obecnymi u *Drosophila* kompleksami białkowymi ORC (Pak i wsp., 1997) oraz HAOP (Badugu i wsp., 2003), które uczestniczą w procesie składania heterochromatyny.

Regulacja ekspresji genów

Przyłączenie HP1 do chromatyny prowadzi do przyjęcia przez nią konfiguracji bardziej zwartej i zwiększenia upakowania struktury chromatyny, w wyniku czego dostępność czynników transkrypcyjnych do sekwencji regulatorowych zostaje zmniejszona (Rys. 1.13). Podobny mechanizm występuje w somatycznych komórkach ssaków płci żeńskiej w procesie inaktywacji jednego z chromosomów X.



Rysunek 1.13. Białko HP1 w regulacji transkrypcji

Model wyjaśniający rolę aktywujących oraz hamujących czynników w organizacji struktury eu - oraz heterochromatynowej. Zmetylowane reszty aminokwasowe histonu H3 zaznaczono na czerwono, zaś acetylowane na niebiesko. Sekwencje satelitarnych powtórzeń powodują formowanie regularnych szeregów nukleosomów, które aktywują metylację K9H3 przez SU(VAR)3-9H1. Przyłączenie HP1 do zmetylowanej K9H3 prowadzi do tworzenia wysokorzędowej struktury heterochromatynowej. Przyłączenie czynników transkrypcyjnych prowadzi do powstania transkrypcyjnie aktywnej euchromatyny oraz miejsc hyperwrażliwych (HS) na DNazę I. HS generuje oraz utrzymuje otwartą strukturę euchromatyny, przez umożliwianie acetylacji H3K9 oraz metylacji K4H4 sąsiednich nukleosomów. Miejsca HS działać mogą jako bariery zapobiegające rozprzestrzenianiu się heterochromatyny do sąsiedniej euchromatyny. Według: (Dillon i Festenstein 2002).

HP1 uczestniczy w regulacji transkrypcji oraz oddziałuje z dużą grupą białek zaangażowanych w zmianę struktury chromatynowej i ekspresji genów. Oddziaływanie HP1, białka retinoblastomy (Rb) i SU(VAR)3-9H1 z promotorem cyklin E powiązane jest

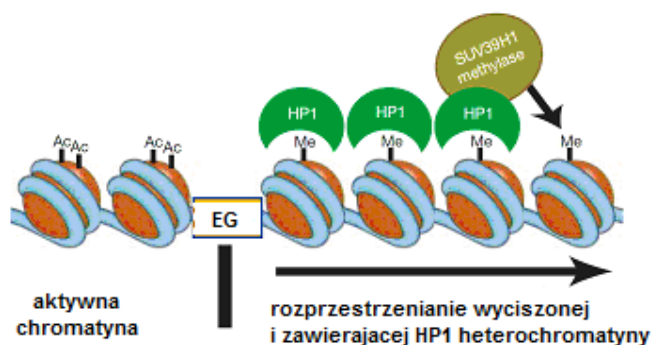
z procesem wyciszania genów. HP1 pośredniczy również w procesie hamowania ekspresji genów, dokonywanej przy udziale białka KRAB (ang. *Krüppel-associated box*) (Ayyanathan i wsp., 2003). W wyniku oddziaływań białko - białko następuje rekrutacja HP1 w rejony specyficznych genów. Badania wykazały, iż represory transkrypcji oraz kompleksy białkowe uczestniczące w zmianie struktury chromatynowej, takie jak: Su(z)12 (Ogawa i wsp., 2002), TIF1 α (Nielsen i wsp., 1999), TIF1 β /KAP-1 (Ryan i wsp., 1999) i ATRX (Nielsen i wsp., 2002) oraz podjednostka podstawowej maszyny transkrypcyjnej, TIF_{II}130 (Vassallo i Tanese 2002), a także metylotransferaza DNA, Dnmt3a/b (Fuks i wsp., 2003), mogą oddziaływać z izoformami białka HP1, albo w oddziaływaniach bezpośrednich, albo w kompleksach białkowych.

W przeciwieństwie do efektu wyciszania, jaki HP1 wykazuje w stosunku do genów euchromatynowych, białko to jest niezbędne w replikacji genów zlokalizowanych w heterochromatynie (Lu i wsp., 2000).

HP1 w heterochromatynie

HP1 wpływa na ekspresję genów i uczestniczy w procesie wyciszania genów, który zależy od położenia genu na chromosomie (ang. *Position Effect Variegation*, PEV). Wyniki badań wskazują, iż chromatyna zawierająca wyciszony gen posiada więcej cech heterochromatyny, niż aktywny transkrypcyjnie odpowiednik, obecny w euchromatynie (Wallrath i Elgin 1995). Wśród cech tych wyróżnić można: większą odporność na trawienie nukleazami oraz organizację locus w regularny i gęsto upakowany szyc nukleosomowy (Sun i wsp., 2001). HP1 powodować może wyciszenie genu w określonym stadium rozwojowym i gen ten może być aktywny lub ulec wyciszeniu w mechanizmie *PEV* (Wallrath i Elgin 1995).

Białka HP1 uczestniczą w organizacji heterochromatyny. Mechanizm ten wynika z fizycznej interakcji HP1 z SUV3-9 (Aagaard i wsp., 1999). Jeden z modeli formowania heterochromatyny oparty jest na założeniu, iż następuje cykliczna rekrutacja białka poprzez wiązanie HP1 do K9H3. Wiązanie to odbywa się przy udziale metylotransferazy histonowej SUV39H1, która dodając grupę metylową do K9H3 powoduje rekrutację kolejnych cząsteczek białka (Rys. 1.14), co prowadzi do formowania i propagacji heterochromatyny (Grewal i Elgin 2002). Samonapędzający się mechanizm umożliwia rozprzestrzenianie związanego białka HP1 w chromatynie i postępowanie procesu heterochromatynizacji (Bannister i wsp., 2001).



Rysunek 1.14. Udział kompleksu SU(VAR)39H1/HP1 w propagacji heterochromatyny

Model propagacji heterochromatyny poprzez przyłączanie cząsteczek białka HP1 do zmetylowanych lizyn K9H3, powstałych w skutek aktywności metylotransferazy histonowej SU(VAR)39H1. Elementy graniczne (EG) oddzielają euchromatynę (*aktywna chromatyna*) od heterochromatyny. Według: (Bannister i wsp., 2001).

W obecności HP1 i SUV3-9 zachodzić może rekrutacja metylotransferazy Dnmt3a/b, zaś w obecności SUV3-9 gromadzona jest metylotransferaza Dnmt1 oraz deacetylaza histonowa (HDAC) (Czermin i wsp., 2001). Przyłączanie kolejnych białek prowadzi do wyciszania genów na drodze mechanizmu epigenetycznego. Jak dotąd nie wykryto bezpośredniego oddziaływania pomiędzy HP1 i HDAC. Jednakże wiadomo, iż HDAC rekrutowane jest do domen bogatych w HP1, pośrednio przy udziale SUV3-9 (Vaute i wsp., 2002) lub kompleksu wyciszającego transkrypcję, który zawiera TIF β /KAP-1 (Schultz i wsp., 2001).

Efekt wyciszania genów przez heterochromatynę pericentromerową czy telomerową jest prawdopodobnie wynikiem generowania gęsto metylowanej K9H3 i wiązania HP1, co prowadzi do ciasnych wiązań krzyżowych pomiędzy nukleosomami i tym samym ułatwia formowanie wysoce skondensowanej struktury chromatyny (Bannister i wsp., 2001). Wydaje się to być wystarczające, aby wyciszyć geny zlokalizowane w sąsiedztwie heterochromatyny, gdzie występuje nadmiar wszystkich potrzebnych w tym procesie czynników.

HP1 w euchromatynie

Zjawisko wyciszania genów przy udziale białka HP1 występuje również w środowisku euchromatynowym (Hediger i Gasser 2006). Gromadzenie HP1 prowadzi do zahamowania transkrypcji i jest to powiązane z rekrutacją SETDB1, metylotransferazy specyficznej dla K9H3, która powoduje potrójną metylację lizyny 9. Wykazano, że efekt wyciszania jest

krótkozasięgowy i sugeruje, iż HP1 może powodować wyciszanie sąsiadujących genów (van der Vlag i wsp., 2000). Prawdopodobnie, HP1 pośredniczy w tworzeniu małych, heterochromatynowych struktur w rejonach specyficznych loci genowych.

Możliwe jest również, że białko HP1 wycisza geny w inny sposób, na drodze mechanizmu niezależnego od formowania struktur heterochromatynowych. Z kolei, rekrutacja HP1 do specyficznych genów wynikać może z interakcji białka z kompleksem zawierającym specyficzne, dla danych sekwencji DNA, białka wiążące oraz metylotransferazę histonową K9H3 HMT (Stewart i wsp., 2005).

HP1 oddziałuje z białkami naprawczymi

Wśród partnerów interakcji HP1 znajdują się również białka naprawcze. Przypuszczać zatem można, iż HP1 w jakiś sposób powiązane jest również z procesem naprawy DNA. Jednym z tych białek jest Ku70, które uczestniczy w naprawie DSBs (ang. *Double-Strand Breaks*) w mechanizmie NHEJ (ang. *Non-Homologous End Joining*) (Song i wsp., 2001). Wśród innych białek naprawczych, oddziałujących z HP1, wymienić należy: BRCA1 (Maul i wsp., 1998), które uczestniczy w naprawie DSBs w mechanizmie HR (ang. *Homologous Recombination*) oraz bezpośrednio oddziałuje z kompleksem białek naprawczych z grupy Rad51. BRCA1 uczestniczy również w regulacji ekspresji genów białek naprawczych (Somasundaram 2003). Do partnerów interakcji HP1 należy również liczna grupa białek uczestniczących w rekombinacji DNA (powiązanych z procesem naprawy DNA), a wśród nich rodzina białek ORC, Xorc1, HOAP, a także CAF-1 p150 (Li i wsp., 2002).

1.4 Naprawa DNA

Wszystkie organizmy żywe oraz pojedyncze komórki przez cały czas istnienia narażone są na kontakt zarówno z produktami metabolizmu komórkowego, jak i z czynnikami środowiskowymi, które oddziałując z DNA powodować mogą zmiany w strukturze materiału genetycznego. Zmiany te prowadzić mogą do niestabilności genetycznej, apoptozy, a nawet kancerogenezy. Naprawa uszkodzeń DNA jest zatem procesem kluczowym dla istnienia każdej żywej komórki. W odpowiedzi na stres genotoksyczny dochodzi do aktywacji komórkowych mechanizmów odpowiedzi na uszkodzenie DNA, tzw. DDR (ang. *DNA*

damage response). Zachodzi wówczas uruchomienie takich procesów, jak: naprawa DNA, zahamowanie cyklu komórkowego, zahamowanie transkrypcji oraz indukcja apoptozy (Bartek i Lukas 2007; Huen i Chen 2008; Shimada i wsp., 2008). W naprawie uszkodzenia i odtworzeniu informacji genetycznej uczestniczy kilka złożonych szlaków naprawy DNA (Hoejmakers 2001).

1.4.1 Rodzaje uszkodzeń DNA

Uszkodzenie DNA może być wywołane zewnętrznymi czynnikami środowiskowymi, takimi jak: promieniowanie jonizujące, czynniki chemiczne występujące w dymie papierosowym (np. benzopiren) czy niezdefiniowane czynniki żywieniowe. Zmiany w strukturze DNA mogą być pochodzenia wewnątrzkomórkowego i być spowodowane wewnętrznymi, słabymi mutagenami, takimi jak m.in. reaktywne formy tlenu (ang. *Reactive Oxygen Species*, ROS) czy metabolity komórkowe, które działają jako czynniki alkilujące. Uszkodzenia DNA pochodzenia endogennego, powstałe na skutek błędów w replikacji czy akumulacji metabolitów, stanowią również dużą grupę uszkodzeń.

Dokonać można klasyfikacji uszkodzeń ze względu na ich strukturę chemiczną czy miejsce ich powstawania. W przypadku uszkodzeń zasad azotowych zachodzić może modyfikacja strukturalna czy delokalizacja zasady, w konsekwencji czego powstaje miejsce apurynowe lub apirymidynowe. Innymi typami uszkodzeń są wewnątrznicziowe połączenia DNA - DNA, wewnątrznicziowe połączenia krzyżowe (ang. *cross-links*) czy połączenia krzyżowe DNA - białka. Do uszkodzeń zalicza się także pęknięcia w obrębie pojedynczej (tzw. SSBs; ang. *single strand breaks*) lub podwójnej nici DNA (tzw. DSBs; ang. *double strand breaks*) (Moustacchi 2000).

1.4.2 Rodzaje napraw DNA

Obecność mechanizmów naprawczych chroni komórkę, a także cały organizm, przed niestabilnością genetyczną, która wynikać może z działania olbrzymiej ilości czynników uszkadzających. Wykazano, iż w genomie ludzkim obecnych jest 130 genów, które zaangażowane są w naprawę DNA (Wood i wsp., 2001). Dalsze badania potwierdziły duże

podobieństwo mechanizmów naprawy DNA, jakie występują u prokariota i eukariota. Procesy naprawcze podzielić można na trzy grupy: (1) bezpośrednia naprawa uszkodzenia, (2) naprawcze wycięcie zmienionej reszty oraz (3) naprawa poreplikacyjna (Blackburn i Gait 1996).

Bezpośrednia naprawa uszkodzenia

Znane są trzy typy uszkodzeń DNA, które eliminowane są przez mechanizmy komórkowej naprawy DNA w wyniku chemicznej modyfikacji uszkodzenia. Każde z tych uszkodzeń dotyczy wyłącznie jednego rodzaju zasady azotowej, do ich naprawy nie jest zatem potrzebna matryca DNA. Mechanizmy te są specyficzne dla poszczególnych typów uszkodzeń i zalicza się do nich: reakcję fotolizy, różne rodzaje przeniesienia, w tym reakcję metylotransferazy metyloguaninowej czy prostej demetylacji zasad cytozynowych i adeninowych.

1) Fotoliza

Fotoreaktywacja jest procesem, w którym zachodzi bezpośrednie odwrócenie uszkodzenia powstałego na skutek ekspozycji DNA na promieniowanie UV o długości fali w zakresie 200-300 nm. W procesie naprawy wykorzystywana jest energia dostarczana przez promieniowanie z zakresu światła widzialnego. Jest to jeden z mechanizmów naprawy DNA, obecny m.in. u *E. coli* i *S. cerevisiae*, w którym enzym fotoliaza specyficznie reaguje z jedno- lub dwuniciowym fragmentem DNA, zawierającym fotodimery pirymidyn, na etapie niezależnym od światła widzialnego. Pod wpływem światła o długości fali 310-480 nm następuje enzymatyczne rozszczepienie fotodimerów do monomerów pirymidyn i przywrócenie DNA do stanu pierwotnego (Sancar 2003). Reakcja fotoreaktywacji katalizowana jest przez fotoliazę, która nacina cyklobutanowy fotoprodukt i przekształca go do odpowiedniej pirymidyny. Proces rozszczepiania dimerów przebiega najefektywniej dla dimerów T:T, zaś najmniej efektywnie w stosunku do dimerów C:C.

2) Metylotransferaza metyloguaninowa

Metylotransferaza 06-metyloguaniny (MGMT, bakteryjny odpowiednik *ogt*) katalizuje reakcję demetylacji metylowanych zasad guaninowych. Proces ten jest kosztowny dla komórki, ponieważ każda reakcja enzymatyczna pochłania jedną cząsteczkę enzymu, który nie może już katalizować następnych reakcji (Watson i wsp., 2004).

3) Demetylacja zasad cytozynowych i adeninowych

Demetylacja DNA to prosty proces, odwrotny do metylacji DNA (Wolffe i wsp., 1999). W komórkach ludzkich, proces demetylacji katalizowany jest przez enzym demetylaza DNA, dMTase (ang. *DNA demethylase*). Demetylacja jest reakcją hydrolizy, która dotyczy wiązań C-C. Przykładem tego rodzaju naprawy jest reakcja demetylacji 5-metylo-cytozyny, w której następuje usunięcie reszty metylowej z cytozyny i jako produkt uboczny reakcji uwalniany jest metanol (Ramchandani i wsp., 1999).

Naprawa pojedynczej nici DNA

Jeśli uszkodzenie występuje w obrębie pojedynczej nici DNA, wówczas druga nić użyta zostaje jako matryca w naprawie uszkodzenia. Wyróżnić można kilka mechanizmów naprawy uszkodzenia pojedynczej nici na matrycy drugiej, komplementarnej nici DNA. Do mechanizmów tych należą naprawa: BER, NER i MMR.

Uszkodzenia pojedynczych nukleotydów, które powstają w reakcji oksydacji, alkilacji, hydrolizy czy deaminacji naprawiane są w procesie naprawczym BER (ang. *Base Excision Repair*). Uszkodzenia w obrębie dłuższych fragmentów nici DNA (2-30 nukleotydów) naprawiane są w mechanizmie NER (ang. *Nucleotide Excision Repair*). Zarówno BER, jak i NER zaliczane są do procesów nieobarczonych błędami. W mechanizmie MMR (ang. *Mismatch Repair*) naprawiane są błędy źle sparowanych nukleotydów, które towarzyszą procesom replikacji i rekombinacji DNA.

Naprawa podwójnych pęknięć nici DNA

Podwójne pęknięcia nici, DSBs (ang. *Double-strand breaks*), to uszkodzenia, w których dochodzi do pęknięć w obrębie obydwu nici wchodzących w skład helisy DNA. Ten rodzaj uszkodzenia jest szczególnie niebezpieczny dla komórki, gdyż prowadzić może do utraty ciągłości chromosomów, konsekwencją czego jest niestabilność genetyczna, kancerogeneza, a nawet śmierć komórki. Znane są dwie drogi naprawy podwójnych pęknięć: rekombinacja homologiczna HR (ang. *Homologous Recombination*) oraz niehomologiczne łączenie końców NHEJ (ang. *Non-homologous End Joining*).

1.4.3 Mechanizm naprawy NER

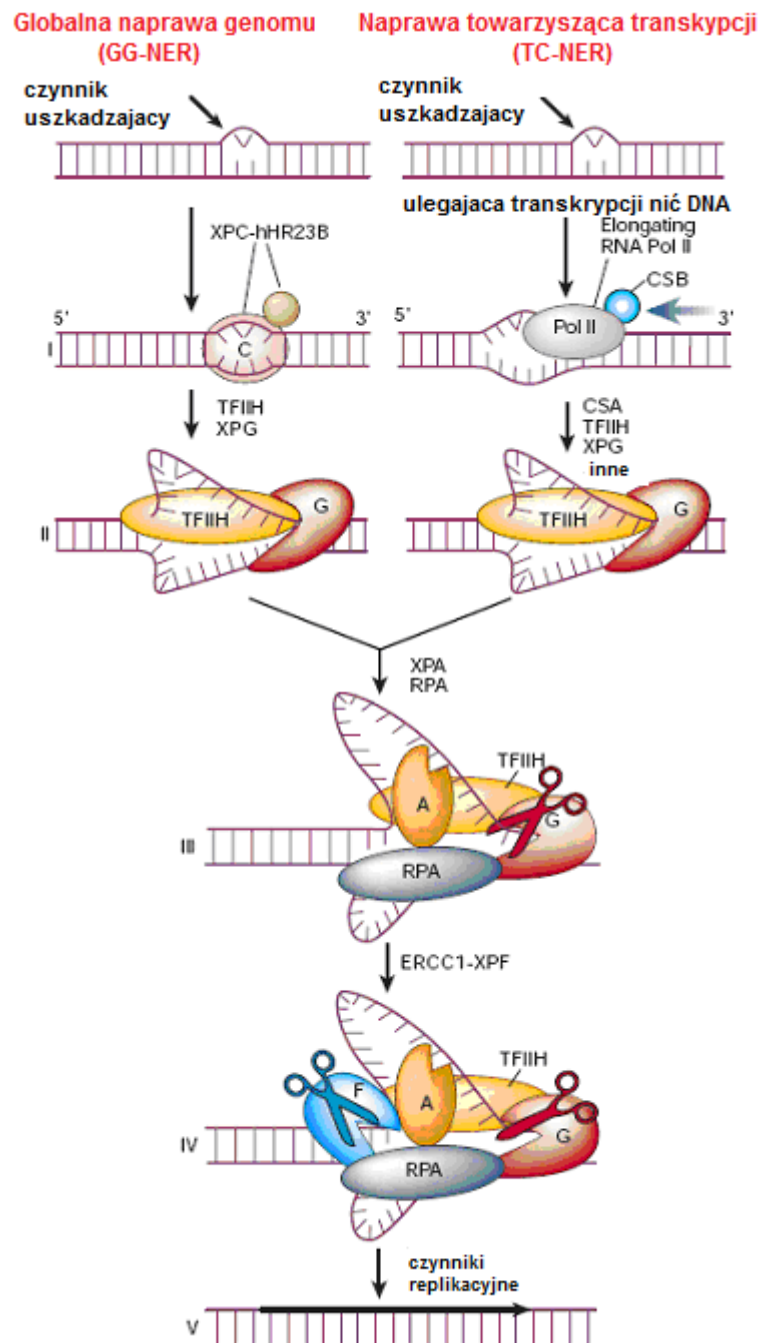
Naprawa przez wycięcie nukleotydu (ang. *Nucleotide Excision Repair*, NER) to mechanizm naprawy DNA, w komórkach prokariotycznych i eukariotycznych, w którym usuwane są uszkodzenia DNA spowodowane czynnikami chemicznymi lub fizycznymi, m.in. promieniowaniem UV. Na drodze naprawy, polegającej na wycięciu nukleotydu, usuwane są różnorodne, zniekształcające strukturę DNA uszkodzenia, m.in. indukowane UV dimery cyklobutano - pirymidynowe (CPDs) oraz fotoprodukty pirymidyno - pirymidonowe (6-4 PP) (de Laat i wsp., 1999; Peterson i Côté 2004).

W procesie NER usuwane są uszkodzenia, które powodują zniekształcenie struktury podwójnej helisy DNA i prowadzą do zahamowania procesu transkrypcji oraz replikacji DNA. Pomimo, iż w mechanizmie naprawy NER u prokariota zaangażowane są inne enzymy, niż u eukariota, zauważyć można wysoką konserwatywność tego systemu naprawczego. Wpływ niedoborów w naprawie NER na ludzkie zdrowie manifestowany jest występowaniem bardzo rzadkich, dziedziczonych autosomalnie recesywnie schorzeń, takich jak: Skóra pergaminowa (łac. *Xeroderma pigmentosum*, XP), Zespół Cockayne'a (ang. *Cockayne Syndrome*, CS) czy Trichotiodystrofia (Zespół Taya, ang. *trichothiodystrophy*, TTD). Wszystkie te zaburzenia związane są ze wzmożoną wrażliwością na światło UV (Fousteri i Mullenders 2008).

Drogi naprawy NER

W mechanizmie NER wyróżnia się dwa szlaki naprawy: globalną naprawę genomu GG-NER (ang. *Global Genome Repair*, GGR) oraz naprawę towarzyszącą transkrypcji TC-NER (ang. *Transcription-coupled Repair*, TCR) (Mellon i wsp., 1987; Fousteri i Mullenders 2008; Hanawalt i wsp., 2003). Naprawa związana z transkrypcją TC-NER (ang. *Transcription Coupled Nucleotide Excision Repair*) polega na usuwaniu uszkodzeń w sekwencjach genów, które podlegają transkrypcji. Z kolei, pozostała część materiału genetycznego naprawiana jest na drodze całkowitej naprawy genomu, GG-NER (ang. *Global Genome Nucleotide Excision Repair*) (Costa i wsp., 2003). Procesy te różnią się tempem usuwania uszkodzeń. Wykazano, iż uszkodzenia zlokalizowane w aktywnych transkrypcyjnie genach podlegają szybszej naprawie w porównaniu z fragmentami genomu, które są nieaktywne transkrypcyjnie (Fousteri i Mullenders 2008).

W obydwu mechanizmach naprawy NER (Rys. 1.15) wyróżnić można 4 etapy: (1) detekcję uszkodzenia, (2) rozkręcenie nici DNA w sąsiedztwie uszkodzenia, (3) wycięcie uszkodzenia oraz (4) syntezę DNA (Hoeijmakers 2001; Volker i wsp., 2001; Peterson i Côté 2004).



Rysunek 1.15. Mechanizm naprawy NER

Kolejne etapy mechanizmów naprawczych NER: GG-NER i TC-NER – szczegóły w tekście. Według: (Hoeijmakers 2001).

Mechanizmy naprawcze TC-NER oraz GG-NER różnią się jedynie pierwszym etapem, tzn. detekcją uszkodzenia. W rozpoznaniu uszkodzeń naprawianych na drodze GG-NER uczestniczą kompleksy XPC oraz DDB2, z kolei w naprawie TC-NER sygnałem detekcji uszkodzenia jest zahamowanie polimerazy RNA, RNAPII (Sugasawa i wsp., 1998; Tang i wsp., 2000; van den Boom i wsp., 2002). Zatrzymana polimeraza musi zostać usunięta, aby obszar uszkodzenia mógł być naprawiony. W procesie tym uczestniczą specyficzne dla TC-NER czynniki: CSA oraz CSB (Fousteri i Mullenders 2008). Kolejne etapy szlaków naprawczych GG-NER oraz TC-NER są identyczne. W procesie otwarcia fragmentu nici DNA, zawierającego około 30 par zasad, który znajduje się w sąsiedztwie uszkodzenia, uczestniczą: helikazy należące do wielopodjednostkowego czynnika transkrypcyjnego TFIIH, XPB oraz XPD (de Laat i wsp., 1999).

Na kolejnym etapie naprawy NER uczestniczy białko XPA, które rozpoznaje zniekształcenie w strukturze DNA (Friedberg 2001) oraz białko RPA (ang. *Replication Protein A*), które wiąże się do pojedynczych nici DNA i stabilizuje powstałą strukturę. Następnie, endonukleaza XPG „w parze” z ERCC1/XPF dokonują cięcia w sąsiedztwie uszkodzenia i usuwają zawierający uszkodzenie oligonukleotyd, wielkości 24-32 par zasad (Hoeijmakers 2001; Park i Choi 2006). Na etapie końcowym, maszyneria replikacji DNA, przy udziale polimerazy δ/ϵ , PCNA oraz innych czynników towarzyszących, uzupełnia powstałą przerwę i następuje odtworzenie brakującej nici (Shivji i wsp., 1992; Peterson i Côté 2004).

Kaskada sygnału ATR

Po wykryciu uszkodzeń w DNA, równolegle z aktywacją procesu naprawczego NER, następuje zatrzymanie transkrypcji oraz replikacji, co prowadzić może do indukcji apoptozy poprzez mechanizmy punktu granicznego cyklu komórkowego (Zou i Elledge 2003; Melo i Toczyski 2002). Procesy te u ssaków znajdują się pod kontrolą dwóch fosfatydyloinozytolowych kinaz białkowych, ATM (ang. *Ataxia telangiectasia mutated*) oraz ATR (ang. *Ataxia telangiectasia and Rad3 related*) (Abraham 2001; Bakkenist i Kastan 2003).

Aktywacja szlaku sygnałowego kinaz ATR/ATM prowadzi do mechanizmu zahamowania cyklu komórkowego (Chk1 oraz Chk2) oraz fosforylacji licznych białek, zaangażowanych w DDR (Bartek i Lukas 2007). Kinaza ATM jest głównie aktywowana

przez podwójne pęknięcia DNA (DSBs) (Lee i Paull 2004; Lee i Paull 2005; Dupre i wsp., 2006; Bakkenist i Kastan 2003), które powstają m.in. pod wpływem promieniowania jonizacyjnego, IR. Z kolei, kinaza ATR odpowiedzialna jest za przekaz sygnału w odpowiedzi na uszkodzenia DNA różnego typu, w tym generowane przez UV (Zou i Elledge 2003; Zou i wsp., 2003).

Uszkodzenie DNA, indukowane przez UV, powoduje aktywację kinazy ATR, która odpowiedzialna jest m.in. za towarzyszącą UV ubikwitynizację histonu H2A (Bergink i wsp., 2006). ATR posiada aktywność enzymatyczną i powoduje fosforylację różnorodnych substratów, m.in. kinazy Chk1 (ang. *Checkpoint kinase*) oraz p53. Następstwem fosforylacji p53 i kinazy Chk1 jest zahamowanie cyklu komórkowego, dzięki temu komórka dysponuje dodatkowym czasem potrzebnym na usunięcie fotoproduktów indukowanych przez promieniowanie UV (Bartek i wsp., 2007).

Struktura chromatyny a NER

Upakowanie DNA w postaci chromatyny stanowi główną przeszkodę dla naprawy NER w komórkach eukariotycznych. Rezultaty licznych badań wskazują, iż zmiana struktury chromatyny towarzyszy naprawie NER (Smerdon i Libereman 1978). Chromatynę uznać można za swoisty inhibitor wszystkich procesów zachodzących w DNA. Szybkość naprawy w chromatynie jest aż o 90% mniejsza w porównaniu z nagą cząsteczką DNA (Wang i wsp., 1991; Hara i wsp., 2000; Ura i wsp., 2001). W celu przezwyciężenia tych utrudnień komórki aktywują maszynę przebudowy chromatyny (ang. *chromatin remodeling*), SWI/SNF oraz ACF1 (Ura i wsp., 2001; Hara i Sancar 2002). W ten sposób tworzone są bardziej sprzyjające warunki dla lokalnej naprawy DNA. Zwiększenie dostępności chromatyny dla enzymów, czynników prowadzących naprawę NER, zachodzi przy udziale kilku innych mechanizmów, takich jak: ubikwitynizacja histonów (Kapetanaki i wsp., 2006; Wang i wsp., 2006a), acetylacja histonów (Fousteri i wsp., 2006; Brand i wsp., 2001; Martinez i wsp., 2001; Rubbi i Milner 2003) czy działanie białek HMGN1, które destabilizują włókna chromatyny i tym samym ułatwiają naprawę DNA (Birger i wsp., 2003).

Naprawa indukowanych przez UV uszkodzeń DNA pociąga za sobą zwiększenie stopnia acetylacji histonów. Przypuszczać zatem można, iż jedną z funkcji kompleksu acetylotransferazy histonowej (HAT) jest udział w naprawie DNA (Brand i wsp., 2001).

Acetylacja histonów najprawdopodobniej umożliwia wiązanie i prawidłowe funkcjonowanie maszynerii NER. Może być ona również powiązana z regulacją wiązania zawierających bromodomenę, zależnych od ATP, enzymów SWI/SNF, które wprowadzają zmiany w strukturze chromatyny (Hara i Sancar 2002). Po usunięciu uszkodzenia, w celu zachowania informacji epigenetycznej, komórki muszą odtworzyć oryginalną strukturę chromatyny. W procesie tym uczestniczą specjalne czynniki (Groth i wsp., 2007). Jednym z nich jest CAF-1, który po wbudowaniu histonu H3.1. ulega rekrutacji w miejscu toczącej się naprawy NER. Udział CAF-1 wskazuje, iż po naprawie DNA następuje składanie struktury chromatyny (Green i Almouzni 2003; Polo i wsp., 2006). Taki mechanizm, w którym przebudowa chromatyny następuje przed oraz po naprawie DNA, zaproponowany został w modelu dostęp - naprawa - odtworzenie. Model ten okazuje się być bardzo pomocny w zrozumieniu, w jaki sposób NER operuje w kontekście struktury chromatynowej (Green i Almouzni 2002; Smerdon 1991).

NER u bakterii

Obecny u *E. coli* system naprawczy z udziałem genów *uvrABC* okazuje się być najlepiej poznanym mechanizmem naprawy NER (Blackburn i Gait 1996). Proces ten zapoczątkowany zostaje przez białko *uvrA*, które rozpoznaje zmodyfikowane zasady. Po związaniu białka *uvrA* następuje przyłączenie kolejnych dwóch białek: *uvrB* i *uvrC*, które powodują nacięcie oraz usunięcie fragmentu nici zawierającego uszkodzenie. Powstała, niewielka luka ulega powiększeniu w reakcji katalizowanej przez egzonukleazę, która wycina fragment wielkości 30-60 nukleotydów. Następnie, polimeraza III dobudowuje brakujący fragment nici na matrycy drugiej, nieuszkodzonej nici. Na ostatnim etapie naprawy enzym ligaza katalizuje reakcję ligacji.

1.4.4 Mechanizm naprawy BER

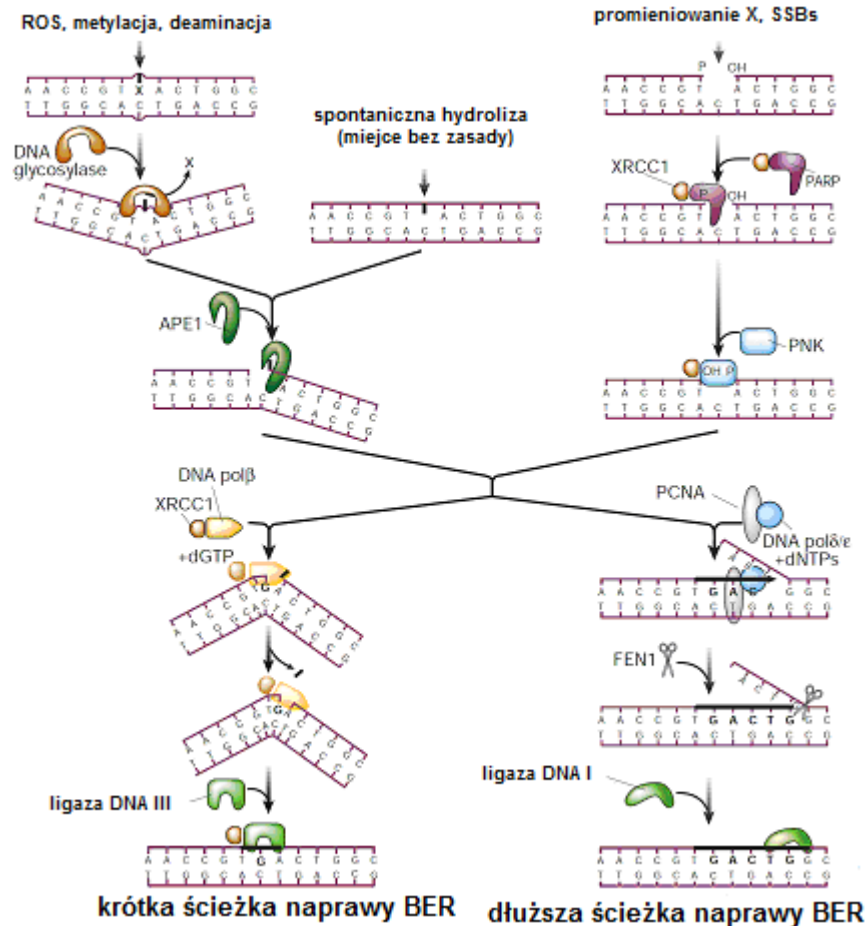
Naprawa utlenionych, alkilowanych czy poddanych deaminacji zasad azotowych oraz powstałych w reakcji hydrolizy miejsc po brakujących zasadach, które generowane są w wyniku spontanicznej depurynacji i depirymidynacji, zachodzi w procesie BER (ang. *Base Excision Repair*). W mechanizmie BER następuje wycięcie zmienionej zasady azotowej. Najbardziej powszechnym i wysoce mutagennym, naprawianym przez BER, uszkodzeniem DNA jest utleniona zasada 8-oxo-guanina (8-oxoG), która może efektywnie parować zarówno

z cytozyną, jak i z adeniną. 8-oxoG jest najczęściej występującą mutacją w nowotworach ludzkich (Bruner i wsp., 2000).

W mechanizmie BER następuje wycięcie i zastąpienie uszkodzonej pary zasad. Proces naprawy zapoczątkowany zostaje przez glikozylazę DNA, która usuwa zmodyfikowaną zasadę (Moustacchi 2000). U człowieka występuje ponad osiem genów kodujących różne rodzaje glikozylaz DNA. Każdy z enzymów odpowiada za identyfikację oraz usunięcie specyficznego rodzaju uszkodzenia zasady, np. glikozylaza OGG1 usuwa 8-oxoG. W kolejnych etapach naprawy działa endonukleaza, która powoduje nacięcie łańcucha cukrowo-fosforanowego i usunięta zostaje reszta cukrowa z brakującą zasadą. W wyniku działania egzonukleazy dochodzi do powiększenia powstałej luki. W końcowym etapie naprawy, po dobudowaniu brakującego fragmentu przez polimerazę, następuje ligacja.

Drogi naprawy BER

Powstała luka, miejsce AP (ang. *apurinic and apyrimidinic*), może ulec naprawie na dwóch ścieżkach: krótszej lub dłuższej (Rys. 1.16). W krótszej drodze naprawy (ang. *short-patch BER*) następuje zamiana pojedynczej zasady w wyniku działania czterech białek enzymatycznych: polimerazy DNA β , endonukleazy APE (APE1) oraz ligazy DNA III i XRCC1. W dłuższej drodze naprawy BER (ang. *long-patch BER*) uczestniczy polimeraza δ/ϵ oraz wiele czynników pomocniczych (dodatkowych), m.in. PCNA oraz zachodzi bardziej szczegółowa i rozbudowana synteza DNA. Usunięty fragment jest wycinany przez endonukleazę Fen1p, a w reakcji ligacji uczestniczy ligaza DNA I oraz XRCC1 (Peterson i Côté 2004). Badania dowodzą, iż w mechanizmie dłuższej drogi BER naprawiane są uszkodzenia zawierające 2-10 par zasad (Hoeijmakers 2001). Potencjalnie bardziej dokładna jest dłuższa droga naprawy BER, co sugeruje, iż ten mechanizm naprawczy może być również zaangażowany w składanie nowych nukleosomów.



Rysunek 1.16. Dwie drogi naprawy BER: krótsza i dłuższa

Kolejne etapy szlaku naprawczego BER – szczegóły w tekście. Według: (Hoeijmakers 2001).

Zmiana struktury chromatyny a BER

Najprawdopodobniej, w mechanizmie BER zaangażowane są różnorodne acetylazy histonowe HATs (ang. *Histone acetyltransferases*) oraz zależne od ATP enzymy remodelingu chromatyny. Badania wykazały, iż glikozylaza MPG (ang. *methylpurine-DNA glycosylase*) wiąże się z białkiem MBD1 (represor ekspresji genów, białko wiążące się ze zmetylowanym DNA), które bezpośrednio oddziałuje z metylotransferazą histonową SUV39h1 i HP1 (Fujita i wsp., 2003).

1.4.5 Naprawa SOS

Mechanizm naprawczy SOS zaliczany jest do naprawy postreplikacyjnej i występuje tylko u bakterii. SOS to rodzaj wzmożonej naprawy (ang. *enhanced repair*), która

indukowana jest różnorodnymi uszkodzeniami DNA. Jeśli w trakcie syntezy DNA enzym polimeraza natrafia na miejsce uszkodzenia, to omija je i pozostawia lukę, która może ulec uzupełnieniu, albo na drodze naprawy rekombinacyjnej, albo w wyniku aktywacji procesu naprawczego SOS.

Odpowiedź SOS określa zmiany w ekspresji genów u *E. coli* i innych bakterii w odpowiedzi na uszkodzenie DNA. W mechanizmie tym zaangażowane są białka genów *recA* i *recBC* (Blackburn i Gait 1996). Po zahamowaniu polimerazy DNA zachodzi przyłączenie białek *RecB*, które wycinają uszkodzenie i przyczyniają się do powstania długich, jednoniciowych odcinków DNA. Następnie, do powstałych struktur jednoniciowego DNA przyłączają się białka *RecA*, po czym zaktywowane zostają białka genu *lexA*. Homodimer *LexA* jest represorem transkrypcji, który przyłącza się do sekwencji operatorowych, zazwyczaj określanych jako kaseta SOS (ang. *SOS box*). *LexA* reguluje proces transkrypcji około 48 genów, w tym *lexA* i *recA*. Najczęstszym, komórkowym sygnałem aktywującym odpowiedź SOS jest obecność jednoniciowego DNA, powstającego przy replikacji w miejscu widełek replikacyjnych lub przy rozdzielaniu podwójnej nici DNA, które zachodzi przy udziale helikazy DNA. W wyniku naprawy DNA, przez polimerazę lub na drodze rekombinacji, zmniejsza się liczba pojedynczych pęknięć DNA oraz przyłączonych do nich cząsteczek białka *RecA*, zaś aktywność tnąca homodimeru *LexA* ulega obniżeniu. Normalny poziom ekspresji genów odtworzony zostaje na skutek związania *LexA* z kasetą SOS, w pobliżu miejsc promotorowych.

1.4.6 Podwójne pęknięcia nici DNA

Prawdopodobnie najbardziej niebezpieczną formą uszkodzenia są podwójnoniciowe pęknięcia DNA, tzw. DSBs (ang. *Double Stand Breaks*), które uszkadzają obydwie nici DNA jednocześnie i znajdują się naprzeciw lub prawie naprzeciw w obydwu niciach. Inne uszkodzenia też dotyczą obu nici DNA, lecz nie zachodzą jednocześnie. Podwójne pęknięcia DNA generowane są wówczas, gdy dwie komplementarne nici helisy DNA ulegają jednoczesnemu uszkodzeniu w sąsiedztwie, a parowanie zasad i struktura chromatyny są niewystarczające do utrzymania dwóch nici razem. Towarzysząca temu fizyczna dysocjacja obydwu końców DNA prowadzić może do niewłaściwej rekombinacji z innymi miejscami genomu (Jackson 2002).

Skąd się biorą DSBs ?

Podwójne pęknięcia DNA są głównym, cytotoksycznym uszkodzeniem występującym w wyniku działania promieniowania jonizującego i niektórych związków chemicznych oraz wolnych rodników, które powstają w normalnym metabolizmie komórkowym. Ten rodzaj uszkodzeń może być również generowany przez mechaniczne rozerwanie chromosomów oraz w trakcie replikacji, gdy widelki replikacyjne napotkają na swej drodze pojedyncze pęknięcie DNA lub inny typ uszkodzenia. DSBs pojawiają się również jako naturalne zjawisko wielu istotnych procesów biologicznych, takich jak: *crossing-over* czy *rekombinacja V(D)J*, która towarzyszy dojrzewaniu limfocytów B oraz T i prowadzi do powstania różnorodności w obrębie miejsc wiązania dla antygenów w immunoglobulinach oraz receptorach białkowych limfocytów T.

Do czego prowadzą DSBs ?

Niewydajna naprawa DSB, albo jej brak, prowadzi do mutacji oraz niestabilności genetycznej i powstania dicentrycznych lub centrycznych fragmentów chromosomowych. Takie zmiany genomu mogą prowadzić do kancerogenezy. Jeśli podwójne pęknięcie nici DNA nie zostanie szybko wychwycone i naprawione, prowadzić może do aberacji chromosomowych, mutacji, a nawet śmierci komórki. Aby się bronić, organizmy, począwszy od bakterii, aż po ludzi, wytworzyły dwa główne szlaki naprawy tych pęknięć: rekombinację homologiczną oraz niehomologiczne łączenie końców. Defekty w każdym z tych szlaków prowadzą do niestabilności genetycznej oraz zwiększenia ryzyka kancerogenezy, dowodem czego są liczne aberacje chromosomowe obserwowane w wielu typach nowotworów.

Struktura chromatyny a DSBs

Wyniki ostatnich badań dowodzą, iż oprócz białek zaangażowanych bezpośrednio w enzymatyczną naprawę DNA, czynniki organizujące specyficzną strukturę chromatyny w sąsiedztwie miejsca uszkodzenia, powodują wzmożenie kaskady sygnału oraz procesu naprawy DNA. Powszechnie wiadomo, iż acetylotransferaza histonowa *HAT* (ang. *histone acetyltransferase*) oraz deacetylaza histonowa *HDAC* (ang. *histone deacetylase*) odgrywają istotną rolę w procesie modyfikacji struktury chromatyny, a także odgrywają one centralną rolę w procesie regulacji transkrypcji (Fernandez-Capetillo i Nussenzweig 2004). Najlepiej scharakteryzowaną, indukowaną uszkodzeniami DNA, modyfikacją w obrębie białek histonowych jest fosforylacja histonu H2A.X (γ -H2A.X). Ufosforylowany histon H2A.X jest

markerem podwójnoniciowych pęknięć DNA (DSBs) (Fernandez-Capetillo i wsp., 2004). Fosforylacja histonu H2A.X może bezpośrednio lub pośrednio modulować strukturę chromatyny w sąsiedztwie DSB (Kruhlak i wsp., 2006).

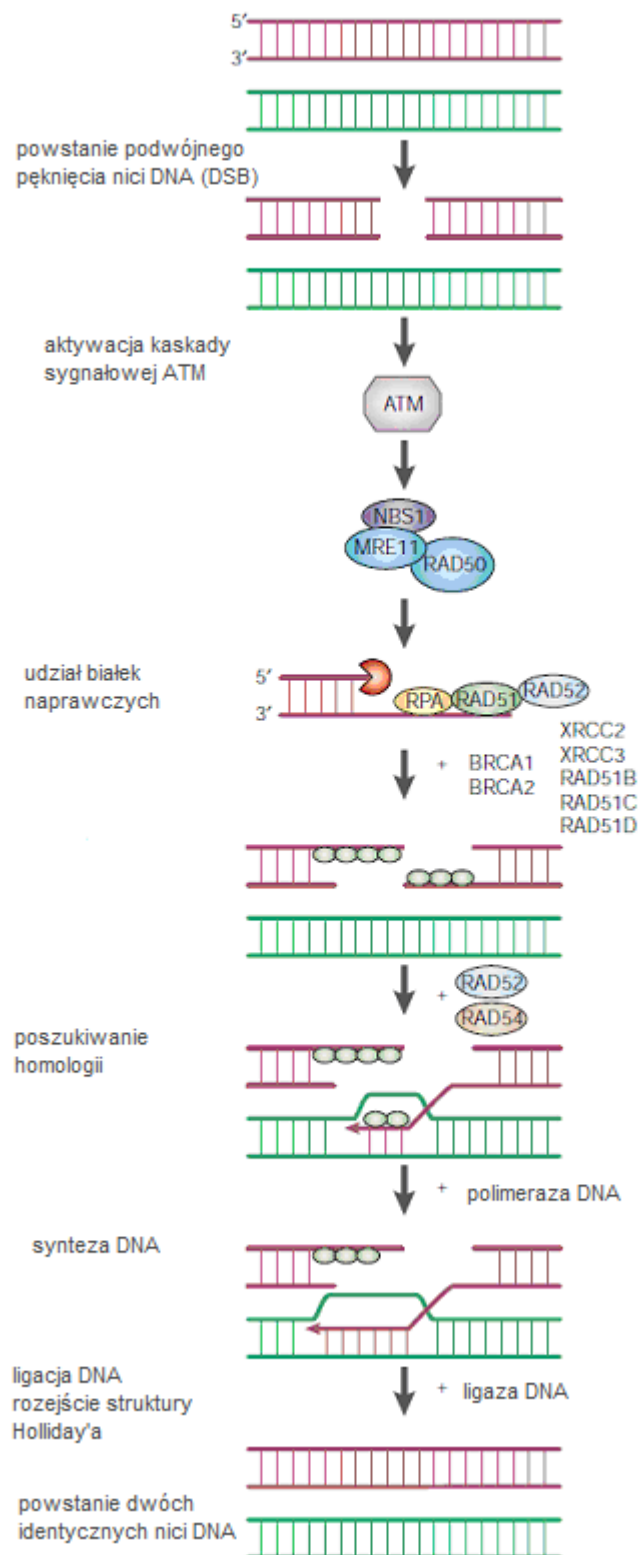
Naprawa DSBs

Naprawa DSBs odbywa się na drodze dwóch mechanizmów: rekombinacji homologicznej (ang. *Homologous Recombination*, HR) oraz nie-homologicznego łączenia końców (ang. *Non-homologous End Joining*, NHEJ). Obydwie drogi bardzo się różnią i funkcjonują w sposób komplementarny, aby zapewnić efektywną naprawę DNA (Takata i wsp., 1998). W procesie HR uszkodzony chromosom wchodzi w *synapsis* (proces asocjacji chromosomów homologicznych, matczynego z ojcowskim, zachodzący w pierwszej fazie podziału mejotycznego) i odzyskuje informację genetyczną od nieuszkodzonej, homologicznej cząsteczki DNA. W NHEJ, w przeciwieństwie do HR, dochodzi do ligacji dwóch pękniętych nici DNA, bez konieczności homologii pomiędzy nimi. Nie zachodzi również *synapsis* pomiędzy uszkodzoną, a nieuszkodzoną cząsteczką DNA. Obydwa szlaki są wysoce konserwatywne, jednakże ich znaczenie różni się pomiędzy organizmami (Jackson 2002). Proste eukariota, takie jak: drożdże, *S. cerevisiae* oraz *S. pombe*, naprawiają indukowane radiacyjnie DSBs głównie na drodze HR, z kolei u ssaków dominuje szlak NHEJ (Johnson i Jasin 2000).

1.4.7 Mechanizm naprawy HR

Molekularny mechanizm naprawy opartej na rekombinacji homologicznej (ang. *Homologous Recombination*, HR) początkowo badany był u bakterii i drożdży. Pomimo, iż proces naprawy HR jest dobrze zachowany u eukariota (van Gent i wsp., 2001), mechanizm ten jest bardziej skomplikowany u wyższych eukariota (Jackson 2002).

W procesie HR matrycą do naprawy jest nienaruszona kopia (homolog lub chromatydę siostrzaną) uszkodzonego chromosomu, co prowadzi do dokładniejszej naprawy DSB. W mechanizmie tym uczestniczy tzw. grupa białek Rad52, w skład której wchodzi: Rad50, Rad51, Rad52, Rad54 oraz Mre11 (Rys. 1.17). W trakcie naprawy DSBs, białka Rad52 ulegają przemieszczeniu do obszarów uszkodzenia.



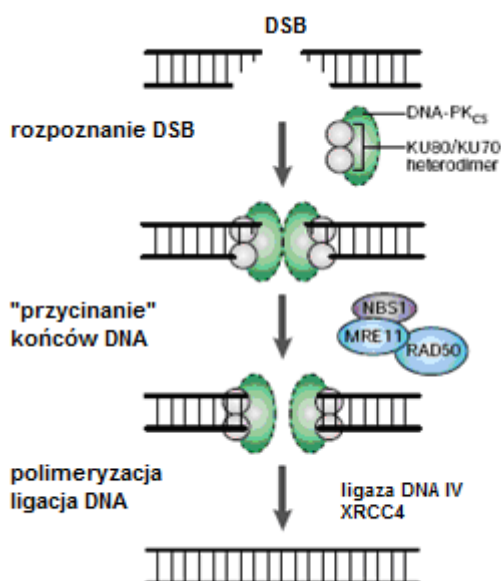
Rysunek 1.17. Naprawa DSBs w mechanizmie rekombinacji homologicznej (HR)

Kolejne etapy naprawy podwójnych pęknięć DNA na drodze HR – szczegóły w tekście.
Według: (van Gent i wsp., 2001).

Pośrednikiem początkowej odpowiedzi komórki na uszkodzenia DSBs jest ATM i NBS1. Fragmenty jednoniciowego DNA wiązane są przez białko Rad51, które pełni kluczową rolę w procesie naprawczym. Następnie, dochodzi do przyłączenia białek pomocniczych: RPA, Rad52, Rad54 i licznych paralogów białka Rad51 (van Gent i wsp., 2001). Ostatnim etapem naprawy jest synteza DNA, w wyniku której następuje odtworzenie zdegradowanej nici DNA (Rys. 1.17).

1.4.8 Mechanizm naprawy NHEJ

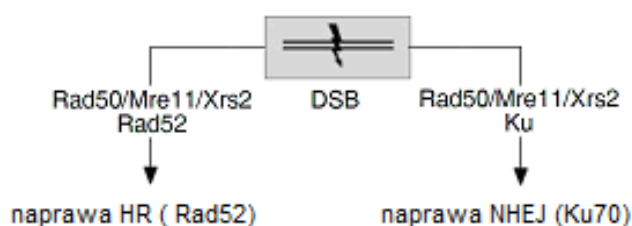
W przeciwieństwie do HR, naprawa NHEJ (ang. *Non-Homologous End Joining*), wykorzystuje niewiele lub w ogóle nie wykorzystuje homologii w łączeniu końców DNA (Burma i wsp., 2006; Weterings i Chen 2008). Mechanizm ten nie tylko występuje przy naprawie DSBs, generowanych przez egzogenne czynniki uszkodzające DNA (promieniowanie jonizujące), lecz również jest on niezbędny do prawidłowej rekombinacji V(D)J (Gellert 2002; Rooney i wsp., 2002; Moshous i wsp., 2001). W procesie tym uczestniczy heterodimer Ku, który składa się z dwóch podjednostek (Ku70 i Ku80) i posiada wysokie powinowactwo do końców DNA. Po związaniu Ku z kwasem nukleinowym, przywołana zostaje jednostka katalityczna zależnej od DNA kinazy białkowej (DNA-PK), która ulega autofosforylacji oraz fosforyluje liczne białka, m.in. p53 i Ku (Rys. 1.18).



Rysunek 1.18. Naprawa DSBs w mechanizmie niehomologicznego łączenia końców (NHEJ)

Kolejne etapy naprawy podwójnych pęknięć DNA na drodze NHEJ – szczegóły w tekście. Według: (van Gent i wsp., 2001).

Główną rolę w naprawie DSBs, u niższych eukariota (drożdże), odgrywa rekombinacja homologiczna. Z kolei, u człowieka dominuje proces NHEJ (Johnson i Jasin 2000). Wykazano, iż ludzkie Rad52, podobnie jak Ku70, wiąże się bezpośrednio z podwójnymi pęknięciami DNA, zabezpieczając je tym samym przed atakiem endonukleaz i umożliwiając oddziaływanie końców DNA. Zaproponowano model naprawy DSBs, w którym jedno z białek, Ku70 lub Rad52, wiąże podwójne pęknięcia DNA (Rys. 1.19).



Rysunek 1.19. Model inicjacji naprawy DSBs

Związanie Rad52 zapoczątkowuje naprawę HR, zaś związanie Ku70 wprowadza DSBs na drogę naprawy NHEJ. Według: (van Dyck i wsp., 1999).

Związanie Ku70 kieruje DSBs na drogę naprawy NHEJ, natomiast związanie Rad52 zapoczątkowuje naprawę opartą na rekombinacji homologicznej. Ku70 i Rad52 bezpośrednio kierują DSBs na alternatywne drogi naprawcze. Można zatem mówić o występowaniu swoistej kompetencji, współzawodniczenia w wiązaniu DSBs przez Ku70 lub Rad52 (van Dyck i wsp., 1999). Ponadto, w trakcie postępowania cyklu komórkowego istnieje specyficzna preferencja wyboru szlaku naprawczego, usuwającego powstałe uszkodzenia DSBs. Wykazano, iż u ssaków naprawa NHEJ dominuje głównie w fazie G1 oraz wczesnej S. Z kolei, mechanizm naprawczy HR jest aktywny w fazach S oraz S/G2 cyklu komórkowego (Hendrickson 1997; Johnson i Jasin 2000).

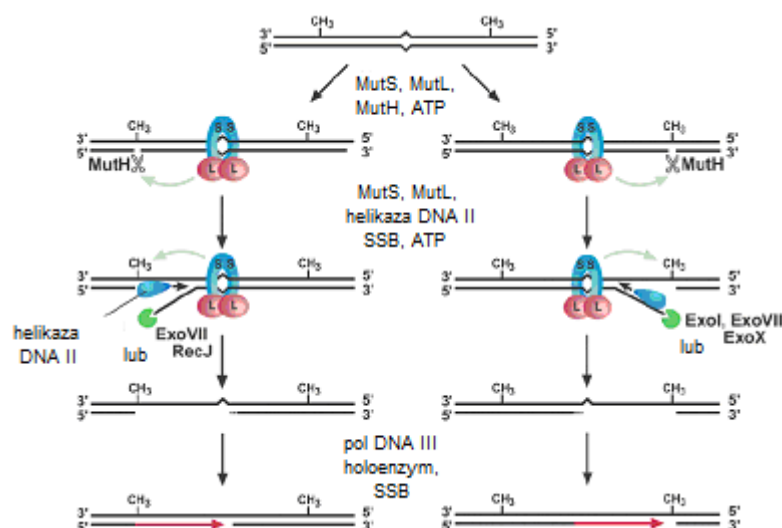
1.4.9 Naprawa MMR

MMR (ang. *Mismatch Repair*) uczestniczy w naprawie ogromnych insercji, delecji oraz niedopasowanych par zasad, w celu zachowania parowania zasad (A-T, C-G). W mechanizmie tym uczestniczą zarówno enzymy szlaku naprawczego BER i NER, jak i enzymy swoiste tylko dla naprawy MMR. W procesie MMR naprawiane są błędy towarzyszące replikacji oraz rekombinacji DNA (Iyer i wsp., 2006).

Wyróżnić można dwa rodzaje naprawy MMR: szlak dłuższy oraz szlak krótszy (Iyer i wsp., 2006). W towarzyszącym głównie replikacji szlaku dłuższym naprawiane są wszystkie rodzaje „niedopasowań” oraz usuwane są fragmenty o długości do kilku tysięcy par zasad. W szlaku krótszym naprawiane są specyficzne „niedopasowania” powstałe na skutek uszkodzenia genomu, a usuwane fragmenty mają wielkość około 10 nukleotydów. Naprawa MMR składa się z następujących etapów: (1) rozpoznanie niedopasowanej pary zasad, (2) ustalenie która zasada jest niewłaściwa, oraz (3) usunięcie błędu.

Naprawa Mismatch jest niciowo-specyficzna (ang. *strand-specific*). W naprawie MMR następuje rozróżnienie nowo syntetyzowanej nici potomnej od nici matrycowej (Iyer i wsp., 2006). W bakteriiach gram-ujemnych przejściowa hemimetylacja pozwala rozróżnić nici (metylacją objęta jest tylko nić matrycowa). Nie poznano dokładnego mechanizmu tego zjawiska u pozostałych prokariota i eukariota. Naprawa MMR jest procesem wysoce konserwatywnym, występuje zarówno u prokariota, jak i eukariota. U *E. coli* zidentyfikowano dużą grupę genów, inaktywacja których prowadzi do powstania hipermutacyjnych szczepów bakteryjnych (Iyer i wsp., 2006). Produkty tych genów nazwano białkami Mut i są one głównymi składnikami systemu naprawczego MMR (Joseph i wsp., 2006). Trzy spośród tych białek (MutS, MutH oraz MutL) uczestniczą w detekcji niedopasowanej zasady (Rys. 1.20) oraz rekrutacji maszyneryi naprawczej (Yang 2000).

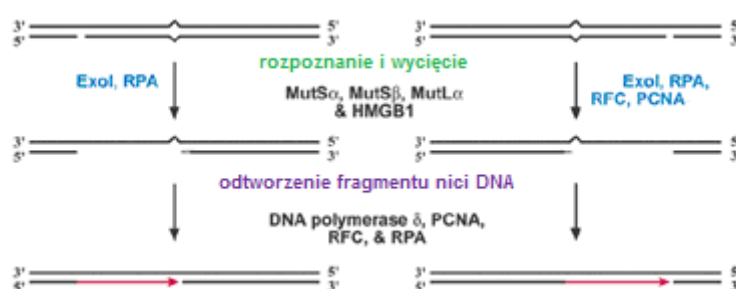
W procesie MMR uczestniczy również helikaza II oraz specyficzne endonukleazy MutH. Powstała po wycięciu nukleotydów luka ulega zabudowaniu przy udziale polimerazy DNA III, która dobudowuje brakujący fragment na zasadzie komplementarności z nicią matrycową, a następnie ligaza zamyka szczelinę (Lahue i wsp., 1989). Proces naprawy kończy metylaza Dam, która wprowadza metylację w nici potomnej (Marinus 1976).



Rysunek 1.20. Mechanizm naprawy MMR u *E. coli*

Kolejne etapy szlaku naprawczego Mismatch Repair u *E. coli*. Według: (Iyer i wsp., 2006).

Heterodimeryczny kompleks, złożony z obecnych u *E. coli* MutS i MutL, zaangażowany jest w naprawę MMR u człowieka (Rys. 1.21) (Kolodner i Marsischky 1999). Każdy z heterodimerów, hMutS α oraz MutS β , zawiera podjednostkę hMSH2 oraz jedną z dwóch podjednostek: hMSH6 (inaczej zwaną białkiem wiążącym G/T, ang. *G/T binding protein*, GTBP) lub podjednostkę hMSH3 (Kunkel i Erie 2005).



Rysunek 1.21. Szlak naprawy MMR u człowieka

Kolejne etapy szlaku naprawczego Mismatch Repair u człowieka. Według: (Iyer i wsp., 2006).

W naprawie MMR zaangażowane jest również MutL α oraz dodatkowe białka, takie jak: egzonukleaza 1 (EXO1), helikazy, PCNA, białko wiążące się z pojedynczoniciowym DNA (RPA) oraz polimeraza DNA δ i ϵ , a także niehistonowe białko chromatynowe HMGB1. Dokładny mechanizm wycięcia oraz replikacji towarzyszącej naprawie MMR u człowieka nie został jeszcze dokładnie poznany (Iyer i wsp., 2006).

1.4.10 Naprawa DNA w kontekście chromatyny

Upakowanie genomu w postaci wysoce skondensowanej chromatyny, czyni go niedostępnym dla czynników potrzebnych w procesie transkrypcji, replikacji, rekombinacji czy naprawy DNA. W toku ewolucji, organizmy eukariotyczne rozwinęły jednak złożone mechanizmy, w celu przezwyciężenia hamującego wpływu struktury chromatynowej na procesy jądrowe. A zatem, wykształcone w komórkach mechanizmy naprawcze, musiały ominąć naturalne bariery i zdobyć dostęp do miejsca uszkodzenia, w odpowiednich przedziałach czasowych.

Naprawa uszkodzeń DNA w kontekście chromatyny zachodzi przyz udziale zależnych od ATP enzymów remodelingu chromatyny (Atainan i Krebs 2006) oraz enzymów wprowadzających modyfikacje w obrębie białek histonowych (Altaf i wsp., 2007). W ten sposób, odpowiednie czynniki naprawcze mają dostęp do uszkodzenia. Co więcej, modyfikacje w obrębie histonów działają jak sygnały i „platformy lądowania” dla różnorodnych białek naprawczych. Rola modyfikacji potranslacyjnych w zachowaniu integralności genomu wydaje się być zatem kluczowa (Altaf i wsp., 2007).

Rozdział 2**Cel pracy**

Celem niniejszego projektu badawczego było przeprowadzenie analizy procesu rekrutacji heterochromatynowych białek 1 (HP1) w obszarach uszkodzonej chromatyny, a także próba interpretacji obserwowanego zjawiska. Dalekosiężnym celem tych badań jest poznanie funkcji białka HP1 w naprawie chromatyny.

Cel główny badań podzielony został na opisane poniżej cele cząstkowe:

- 1) sprawdzenie, czy po wprowadzeniu lokalnego, oksydacyjnego uszkodzenia chromatyny, wywołanego wzbudzonym jonem etidiowym, zachodzą zmiany w wewnątrzjądrowym rozkładzie białek HP1;
- 2) zbadanie, czy obserwowane zjawisko nie jest artefaktem, który wynika z agregacji chromatyny lub adsorpcji HP1 do chromatyny w obszarze uszkodzonym;
- 3) pomiar tempa gromadzenia białka HP1 w uszkodzonych obszarach jądra komórkowego;
- 4) sprawdzenie, czy nagromadzone w miejscu uszkodzenia białko jest związane kowalencyjnie, czy ruchliwe i wymienia się z pulą niezwiązaną;
- 5) sprawdzenie, czy proces gromadzenia ma charakter enzymatyczny;
- 6) udzielenie odpowiedzi na pytanie, czy gromadzenie białka HP1 jest powszechną odpowiedzią komórki na uszkodzenie i zachodzi także w innych, niż oksydacyjne, uszkodzeniach chromatyny; a zatem sprawdzenie, czy rekrutacja HP1 zachodzi również w NER lub naprawie podwójnych pęknięć nici DNA (DSBs);
- 7) zbadanie, która z domen cząsteczki HP1 jest istotna w procesie rekrutacji białka do uszkodzonych obszarów chromatyny;
- 8) sprawdzenie, czy w miejscach uszkodzenia następuje akumulacja metylotransferazy SUV3-9 i zwiększenie stopnia metylacji lizyny 9 histonu H3 (Me3K9H3);
- 9) sprawdzenie, czy gromadzenie HP1 wymaga innych czynników naprawczych i czy zachodzi tylko w obecności funkcjonalnej naprawy NER;
- 10) zbadanie, czy rekrutacja HP1 zależy od fazy cyklu komórkowego;

- 11) zidentyfikowanie białka, które uczestniczy w rekrutacji HP1 do uszkodzonej chromatyny, a zatem próba ustalenia czy białka, które mogą oddziaływać z domeną chromoshadow HP1 również gromadzą się w miejscu uszkodzenia;
- 12) sprawdzenie, czy HP1 uczestniczy w odtworzeniu informacji epigenetycznej w miejscu uszkodzenia i czy rekrutowane jest przez metylotransferazę Dnmt1;
- 13) sprawdzenie, czy w miejscu uszkodzenia następuje gromadzenie metylotransferazy SUV4-20;
- 14) zbadanie, czy gromadzenie HP1 zależy od aktywności kaskady sygnałowej ATR;
- 15) sprawdzenie, czy utrata białka HP1 powoduje zwiększenie wrażliwości *Caenorhabditis elegans* na promieniowanie UV.

Rozdział 3**Materiały i metody**

3.1	Materiały	62
3.1.1	Odczynniki.....	62
3.1.2	Plazmidy ekspresyjne kodujące białka fuzyjne.....	65
3.1.3	Eukariotyczne linie komórkowe.....	68
3.2	Metody	70
3.2.1	Powielanie plazmidowego DNA.....	70
3.2.2	Hodowla eukariotycznych linii komórkowych.....	72
3.2.3	Transfekcja komórek ssaczych plazmidowym DNA.....	73
3.2.4	Procedura generowania lokalnego uszkodzenia chromatyny przy udziale wzbudzonego jonu etidiowego.....	74
3.2.5	Procedury immunofluorescencyjne w badaniach uszkodzeń wywołanych wzbudzonym jonem etidiowym.....	77
3.2.6	Metody generowania lokalnych uszkodzeń DNA indukowanych promieniowaniem UV.....	80
3.2.7	Metoda generowania DSBs za pomocą cząstek α	83
3.2.8	Mikroskopia konfokalna.....	84
3.2.9	Analiza obrazów mikroskopowych.....	84

3.1 Materiały

3.1.1 Odczynniki

Odczynniki używane w opisanych w tej pracy doświadczeniach przedstawiono w Tabeli 3.1 i 3.2.

Tabela 3.1. Spis odczynników używanych do pracy z komórkami eukariotycznymi

Odczynnik	Producent	Nr katalogowy
DMEM z czerwienią fenolową	Sigma-Aldrich (Niemcy)	D5523
DMEM	Gibco (Breda, Holandia)	12320-032
DMEM/F-12 (bez czerwieni fenolowej i węglanu sodu, z 15 mM HEPES)	Sigma-Aldrich (Niemcy)	D2906
Ham's F-10 bez czerwieni fenolowej	Gibco (Breda, Holandia)	31550-023
DMEM High Glucose (4500 mg/L)	Gibco (Breda, Holandia)	12491-023
β-merkaptotanol	Gibco (Breda, Holandia)	31350-010
MEM-Non-Essential Amino Acids	Gibco (Breda, Holandia)	11130-051
McCoy's 5A	Gibco (Breda, Holandia)	36600-021
L-glutamine-200 mM	Gibco (Breda, Holandia)	25030-081
Opti-MEM	Gibco (Breda, Holandia)	11058-021
FBS	Gibco (UK)	10106-169
FCS	Sigma-Aldrich (Niemcy)	F7524
Trypsyna (0,25% z EDTA)	Gibco (Breda, Holandia)	25200-106
Penicylina/Streptomycyna	Gibco (Breda, Holandia)	15070-063
Gentamycyna	Gibco (Breda, Holandia)	15750-037
Genetycyna (Geneticin 418-Sulfate)	Gibco (Breda, Holandia)	11811-031
Hygromycyna (Hygromycin B)	Gibco (Breda, Holandia)	10687-010
FuGENE 6	Roche (Indianapolis, IN, USA)	1988387
FuGENE HD	Roche (Indianapolis, IN, USA)	4709705
Lipofectamina 2000	Invitrogen (Breda, Holandia)	11668-019
bromek etydyny (EtBr)	Fluka Biochemie (Niemcy)	46-065
formaldehyd (16% EM Grade)	Electron Microscopy Sciences (Fort Washington, PA, USA)	15710-S
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Niemcy)	T-8787
Tween 20	Sigma-Aldrich (Niemcy)	P-2287
żelatyna rybia	Sigma-Aldrich (Niemcy)	A-7906
BSA	Sigma-Aldrich (Niemcy)	A-7906
glicyna	Sigma-Aldrich (Niemcy)	G-7126
HCl (0,5 M)	PoCh (Polska)	575318161
NaOH	PoCh (Polska)	810925112
NaCl	PoCh (Polska)	794121116

Odczynnik	Producent	Nr katalogowy
NaH ₂ PO ₄	PoCh (Polska)	799280115
NaHCO ₃	PoCh (Polska)	810530115
KCl	PoCh (Polska)	739740114
anty-HP1β	Abcam (UK)	ab10811
anty-HP1β	(Wreggett i wsp., 1994)	-
anty-HP1γ	Chemicon International Temacula (CA, USA)	MAB3450
anty-Ku70	Abcam (UK)	ab3114
anty-Me3K9H3 (RaH3K9me3)	(Mateos-Langerak i wsp., 2007; Cowell i wsp., 2002)	-
anty-γH2A.X (clone JBW301)	(Upstate Biotechnology, Waltham, MA, USA)	06-636
anty-rat FITC	Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, Pensylwania (USA)	112-095-003
anty-mouse Ig1 Cy2	Jackson Immunoresearch (USA)	115-225-146
anty-mouse Cy3	Jackson Immunoresearch (USA)	115-165-003
anty-mouse Alexa 488	Molecular Probes (Eugene, OR, USA)	MOPA-21121
anty-rat Ig1 Alexa 488	Molecular Probes (Eugene, OR, USA)	MOPA-11006
anty-rat Ig1 Alexa 546	Molecular Probes (Eugene, OR, USA)	MOPA-11081
anty-rabbit Alexa 488	Molecular Probes (Eugene, OR, USA)	MOPA-11034
anty-rabbit Alexa 546	Molecular Probes (Eugene, OR, USA)	MOPA-11035

W trakcie prowadzenia pomiarów mikroskopowych komórki umieszczone były w pożywce DMEM/F12 (tzn. pożywka, w której znajdowały się komórki podczas generowania uszkodzeń oksydacyjnych) z 1-2% FCS i obniżoną zawartością węglanu sodu, doprowadzonej do optymalnego pH w równowadze z powietrzem lub w pożywce mikroskopowej (tzn. pożywka, w której umieszczone były komórki lokalnie uszkodzane UV oraz naświetlane cząstkami α), której skład podano poniżej:

- **Pożywka mikroskopowa**

- NaCl (137 mM)
- D-glukoza (20 mM)
- HEPES (20 mM)
- KCl (5.4 mM)
- CaCl₂ · 2H₂O (1.8 mM)
- MgSO₄ · 7 H₂O (0.8 mM)

Wszystkie składniki odważono i rozpuszczono w 1L wody MiliQ, doprowadzono pH do wartości 7.0, a następnie autoklawowano przez 20 min.

Tabela 3.2. Wykaz odczynników używanych w hodowlach bakteryjnych

Odczynnik	Producent	Nr katalogowy
ekstrakt drożdżowy	Gibco BRL (UK)	30393-029
hydrolizat kazeiny	Gibco BRL (UK)	50014-034
NaCl	Merck (Niemcy)	6406.0
ampicylina	Polfa Tarchomin (Polska)	-
kanamycyna	Gibco (Breda, Holandia)	11815-032

Do podłoża płynnych LB oraz stałych (LB-agar) dodawano roztwór podstawowy odpowiedniego antybiotyku, ampicyliny lub kanamycyny, tak aby końcowe stężenie antybiotyków osiągnęło wartość 100 µg/ml ampicyliny lub 50 µg/ml kanamycyny. Podłoże stałe przygotowywano w ten sposób, że rozpuszczano 15 g agaru w 1 litrze pożywki płynnej LB. Następnie, po autoklawowaniu i ochłodzeniu do temperatury około 50°C dodawano antybiotyki i wylewano na szalki Petriego Ø 90 mm (Sarstedt, Niemcy). Spis wszystkich odczynników, używanych do oczyszczania DNA plazmidowego z zawiesin bakteryjnych, zestawiono w poniższej tabeli (Tab. 3.3).

Tabela 3.3. Spis odczynników używanych do oczyszczania DNA plazmidowego

Odczynnik	Producent	Nr katalogowy
Plasmid Mini	A&A Biotechnology (Gdynia, Polska)	020-250
Plasmid Midi AX	A&A Biotechnology (Gdynia, Polska)	092
QIAprep Spin MiniPrep Kit	QIAGEN (Holandia)	27106
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN (Holandia)	12145
Tris	Roth (Niemcy)	4855.2
EDTA	Roth (Niemcy)	8043.1
HCl (1M)	PoCh (Polska)	575320161
H ₂ O (apteczna)	Polpharma (Polska)	-
agaroza	SERVA Electrophoresis (Niemcy)	11404.04
bromek etydyny	Sigma (USA)	E-7637
kwask borny	Roth (Niemcy)	6943.1

Wyizolowane DNA plazmidowe rozpuszczano w wodzie aptecznej lub w buforze TE (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA). Następnie dokonywano analizy restrykcyjnej, w której wykorzystywano pochodzące z firmy MBI Fermentas (Litwa) i New England BioLabs (Kanada) enzymy restrykcyjne oraz bufor. Używane w rozdziale elektroforetycznym markery DNA pochodziły z firm: MBI Fermentas (Litwa) oraz DNA-Gdańsk II (Polska). W pracy wykorzystano wodę oczyszczoną w aparatach: Mili-Q Synthesis

A10 i Mili-Q Plus firmy Milipore. Do pracy z preparatami bakteryjnymi i hodowlami komórkowymi wykorzystywano również wodę apteczną i autoklawowaną.

3.1.2 Plazmidy ekspresyjne kodujące białka fuzyjne

W poniższej tabeli (Tab. 3.4) zamieszczono plazmidy białek fuzyjnych, których opisy odnaleźć można w cytowanych publikacjach naukowych.

Tabela 3.4. Wykaz używanych plazmidów

Plazmid	Opis konstruktu
EGFP-LacR- <i>AscI</i> -HP1 α -NLS	(Verschure i wsp., 2005)
EGFP-LacR- <i>AscI</i> -HP1 β -NLS	(Verschure i wsp., 2005)
EGFP-LacR- <i>AscI</i> -HP1 α - Δ (2-39)	(Brink i wsp., 2006)
EGFP-HP1 α	(Schmiedeberg i wsp., 2004)
EGFP-HP1 β	(Schmiedeberg i wsp., 2004)
EGFP-HP1 γ	(Schmiedeberg i wsp., 2004)
EGFP-HP1 β (Δ CSD)	(Cheutin i wsp., 2003)
EGFP-HP1 β (Δ hinge)	(Cheutin i wsp., 2003)
pmCherry-HP1 β - Δ (2-40)	(Mateos-Langerak i wsp., 2007)
EYFP-CSD	(Hayakawa i wsp., 2003)
DDB2-mCherry	(Luijsterburg i wsp., 2007)
MeCP2-mRFP1	(Brero i wsp., 2005)
GFP-Ligaza DNA 1	(Mortusewicz i wsp., 2006)
GFP-Ligaza DNA 3	(Mortusewicz i wsp., 2006)
EGFP-Dnmt1	(Mortusewicz i wsp., 2005)
RFP-PCNA	(Mortusewicz i wsp., 2005; Leonhardt i wsp., 2000)
EYFP-BRG1	(Phair i wsp., 2004)
ACF1-EGFP	(Collins i wsp., 2002)
EYFP-Suv3-9H1	(Krouwels i wsp., 2005)
EGFP-Suv4-20H1	(Schotta i wsp., 2008)
EGFP-Suv4-20H2	

Szczegółowe opisy etapów konstrukcji plazmidów kodujących białka fuzyjnych, które nie zostały zamieszczone w publikacjach naukowych i tym samym nie występują w Tabeli 3.4 przedstawiono poniżej.

- **HP1 β -XhoI-EGFP-LacR-AscI-NLS**

Podstawą konstrukcji plazmidu *HP1 β -XhoI-EGFP-LacR-AscI-NLS* był wektor *p3'SS-EGFP-dimer Lac repressor* (Robinett i wsp., 1996; Tumber i wsp., 1999), zmodyfikowany do *EGFP-LacR-AscI-NLS (NYE4)* (Nye i wsp., 2002). W reakcji PCR powielono pełną sekwencję genu kodującego HP1 β z użyciem primerów zawierających miejsce *XhoI* z zachowaniem tej samej ramki odczytu. Produkty PCR poddano trawieniu enzymem *XhoI* i zligowano z trawionym *XhoI* wektorem *EGFP-LacR-AscI-NLS (NYE4)*, uzyskując C-kończową fuzję HP1 β z *EGFP-LacR-AscI-NLS (NYE4)*. Wszystkie fragmenty konstruktów, które poddano reakcji PCR, zostały zsekwencjonowane.

- **EGFP-XbaI-HP1 β -AscI-LacR-NLS**

Konstrukcję wektora *EGFP-XbaI-HP1 β -AscI-LacR-NLS* rozpoczęto od reakcji PCR, w wyniku której utworzono *HP1 β XbaI/AscI*. Produkty PCR poddano trawieniu endonukleazami *XbaI* oraz *AscI*, subklonowano w wektorze pUCAP i zsekwencjonowano. Wektor *p3'SS-EGFP-LacR* (Tumber i wsp., 1999) trawiono endonukleazami *XbaI* oraz *EcoRV*, w celu usunięcia *EGFP* oraz większego fragmentu *LacR*. Uzyskany plazmid poddano reakcji kolejnego trawienia endonukleazami *XbaI* i *AscI*, a następnie wligowano do niego *HP1 β XbaI/AscI*, uzyskując plazmid *p3'ss HP1-lacR*. W kolejnej reakcji PCR, do wektora *p3'ss EGFP-lacR* dodano miejsca *XbaI* i *AscI* (zachowując ramkę odczytu dla HP1 β). Powstały plazmid trawiono endonukleazami *XbaI* oraz *EcoRV*, subklonowano w *pBSK* i zsekwencjonowano. Wykonano kolejny PCR na plazmidzie *p3'ss EGFP-LacR* (w celu uzyskania fragmentu *EGFP XbaI*), dodając miejsca *XbaI* i *AscI* (miejsce *AscI* w celu sprawdzenia właściwej orientacji) powyżej oraz *XbaI* poniżej, subklonowano w wektorze *pBSK* i zsekwencjonowano. Wcześniej utworzony wektor *p3'ss HP1-LacR* oraz fragment *EGFP XbaI* trawiono enzymem *XbaI*, a następnie w wyniku ligacji obydwu fragmentów uzyskano plazmid *EGFP-HP1 β -LacR*.

- **mRFP-HP1 α**

Do wektora *mRFP-N1* wklonowano cDNA ludzkiego genu HP1 α w ten sposób, aby zachować tę samą ramkę odczytu. Wektor *mRFP-N1*, który zawiera monomeryczne, czerwone białko fluorescencyjne (ang. *Red Fluorescent Protein*, RFP) otrzymano od prof. Roger'a Tsien'a (UC San Diego, CA, USA) (Campbell i wsp., 2002).

- **SCFP3a-HP1 β**

Do wektora SCFP3a wklonowano cDNA ludzkiego genu HP1 β , zachowując tę samą ramkę odczytu. Wektor SCFP3a, zawierający cyjanowe białko fluorescencyjne o wzmożonej fluorescencji (ang. *Super Cyan Fluorescent Protein*, SCFP), otrzymano od dr. Joachima Goedhart'a (Kremers i wsp., 2006).

- **XPC-mVenus**

Do wektora mVenus-N1 wklonowano cDNA ludzkiego genu białka XPC, z zachowaniem tej samej ramki odczytu. Wektor mVenus-N1, zawierający żółte białko fluorescencyjne, otrzymano od dr. Joachima Goedhart'a (Kremers i wsp., 2006).

- **DDB2-mVenus**

Do wektora mVenus-N1 wklonowano cDNA ludzkiego genu białka DDB2, zachowując tę samą ramkę odczytu. Wektor mVenus-N1, zawierający żółte białko fluorescencyjne (mVenus), otrzymano od dr. Joachima Goedhart'a (Kremers i wsp., 2006).

- **mVenus-XPA**

Do wektora mVenus-N1 (Kremers i wsp., 2006), który zawiera żółte białko fluorescencyjne (mVenus), wklonowano cDNA ludzkiego genu kodującego białko XPA, zachowując tę samą ramkę odczytu.

3.1.3 Eukariotyczne linie komórkowe

Skróconą charakterystykę wszystkich linii komórkowych, które wykorzystano do eksperymentów opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej, zamieszczono w poniższej tabeli (Tab. 3.5).

Tabela 3.5. Charakterystyka użytych linii komórkowych

Nazwa linii komórkowej	Opis linii komórkowej			
	Organizm	Pochodzenie	Charakterystyka wzrostu	Morfologia
HeLa 21-4	<i>Homo sapiens</i> (człowiek)	rak szyjki macicy	komórki adherentne	nabłonek
• HeLa H1-GFP	HeLa stabilnie ztransfekowane H1-GFP (Kimura i wsp., 2001)			
• HeLa H2B-GFP	HeLa stabilnie ztransfekowane H2B-GFP (Kimura i wsp., 2001)			
• HeLa H3-GFP	HeLa stabilnie ztransfekowane H3-GFP (Kimura i wsp., 2001)			
MSU-1.1	<i>Homo sapiens</i>	napletek (ang. <i>foreskin</i>)	komórki adherentne	fibroblasty (Bernas i wsp., 2004; Morgan i wsp., 1991)
Hep2	<i>Homo sapiens</i>	rak krtani	komórki adherentne	nabłonek
• Hep2-EGFP-HP1 α	Hep2 stabilnie ztransfekowane EGFP-HP1 α (Schmiedeberg i wsp., 2004)			
C2C12	<i>Mus musculus</i> (mysz domowa)	mioblasty dorosłej myszy C3H	komórki adherentne	mioblasty
• C2C12-EGFP-PCNA	C2C12 stabilnie ztransfekowane GFP-PCNA (Leonhardt i wsp., 2000)			
MRC5-SV	<i>Homo sapiens</i>	płuca	komórki adherentne	fibroblasty
• MRC5-EGFP-HP1 α	MRC5 stabilnie ztransfekowane EGFP-HP1 α			
• MRC5-EGFP-HP1 γ	MRC5 stabilnie ztransfekowane EGFP-HP1 γ			
CHO-K1	<i>Cricetulus griseus</i> (chiński chomik)	jajnik	komórki adherentne	nabłonek
NIH/3T3	<i>Mus musculus</i>	embriony mysie	komórki adherentne	fibroblasty
• NIH/3T3 EGFP-HP1 β	NIH/3T3 stabilnie ztransfekowane EGFP-HP1 β (Mateos-Langerak i wsp., 2007)			
U2OS	<i>Homo sapiens</i>	mięsak kościopochodny	komórki adherentne	nabłonek

Nazwa linii komórkowej	Opis linii komórkowej			
	Organizm	Pochodzenie	Charakterystyka wzrostu	Morfologia
HCT116	<i>Homo sapiens</i>	rak jelita grubego	komórki adherentne	nabłonek (Rhee i wsp., 2000)
• Dnmt1 -/- HCT116	Linia komórkowa HCT116 z wyłączeniem (<i>knock-out</i>) genu <i>Dnmt1</i> (Rhee i wsp., 2000)			
KU80 -/- XR-V15B	<i>Cricetulus griseus</i>	płuca	komórki adherentne	Fibroblasty (Errami i wsp., 1996; Zdzienicka i wsp., 1988).
ATR -/-GM18366-hTERT komórki Seckel	<i>Homo sapiens</i>	osobnik płci męskiej z syndromem <i>Seckel</i> (ATR)	komórki adherentne	Fibroblasty (Bergink i wsp., 2006)
MEFS	<i>Mus musculus</i>	embriony mysie	komórki adherentne	fibroblasty
• Suv3-9dn MEFs	MEFS <i>double-null</i> : Suv3-9h1 i Suv3-9h2 (Peters i wsp., 2001; Schotta i wsp., 2004)			
• MEFs XPC-/-	Linia komórkowa MEFs z wyłączeniem (<i>knock-out</i>) genu <i>XPC</i>			
KU80 -/- XR-V15B	<i>Cricetulus griseus</i>	płuca	komórki adherentne	Fibroblasty (Errami i wsp., 1996; Zdzienicka i wsp., 1988).
XP4PA-SV (XP-C)	<i>Homo sapiens</i>	skóra mężczyzny z XP-C	komórki adherentne	fibroblasty (Luijsterburg i wsp., 2007)
XP2OS-SV (XP-A)	<i>Homo sapiens</i>	skóra kobiety z XP-A	komórki adherentne	fibroblasty (Luijsterburg i wsp., 2007)
XP12RO-SV (XP-A)	<i>Homo sapiens</i>	skóra mężczyzny z XP-A	komórki adherentne	fibroblasty (Luijsterburg i wsp., 2007)
XP23PV (XP-E)	<i>Homo sapiens</i>	skóra kobiety z XP-E	komórki adherentne	fibroblasty
CS1AN (CS-B)	<i>Homo sapiens</i>	skóra kobiety z CS-B	komórki adherentne	fibroblasty (van Hoffen i wsp., 1993)

3.2 Metody

Bufory używane w opisanych w tej pracy doświadczeniach przygotowywano według protokołów (Sambrook i Russell 2001) lub zgodnie z zaleceniami producentów odczynników. Eksperymenty klonowania molekularnego, mające na celu uzyskanie plazmidowego DNA, które wykorzystywano do ekspresji badanych białek lub fuzji z białkami fluorescencyjnymi, przeprowadzono posługując się standardowymi metodami, opisanymi obszernie w literaturze (Sambrook i Russell 2001) oraz zamieszczonymi w procedurach podawanych przez producentów odczynników. W kolejnych podrozdziałach przedstawiono jedynie metody opracowane samodzielnie lub zmodyfikowane specjalnie dla potrzeb opisanych w niniejszej rozprawie eksperymentów.

3.2.1 Powielanie plazmidowego DNA

Namnażanie DNA plazmidowego prowadzono według standardowych procedur (Sambrook i Russell 2001) lub ich zmodyfikowanych wersji. Poniżej zamieszczono skrócone opisy poszczególnych etapów powielania DNA plazmidowego.

3.2.1.1 Transformacja bakteryjna

Wykorzystane w transformacji bakteryjnej pożywki przygotowano zgodnie ze standardowymi protokołami (Sambrook i Russell 2001). Procedurę transformacyjną rozpoczęto od rozmrożenia (na lodzie) bakterii kompetentnych *E. coli* szczepu *JC* lub *DH5α*, do których następnie dodawano 1 µl roztworu powielanego DNA plazmidowego. Tak przygotowaną mieszaninę transformacyjną inkubowano na lodzie przez 20 min, a następnie wykonywano szok cieplny (42°C, 90 s). Do każdej mieszaniny dodawano 200 µl pożywki SOC i inkubowano w temp. 37°C, po czym mieszaninę transformacyjną zaszczepiano płytki agarowe, które zawierały odpowiedni antybiotyk (amp/kan) i inkubowano w temp. 37°C przez noc. W ten sposób selekcjonowano klony zawierające wektor.

3.2.1.2 Zakładanie hodowli bakteryjnej w skali mini

Przygotowywano pożywki LB, zawierające antybiotyk (amp/kan) w takim samym stężeniu jak na płytkach agarowych, które zaszczepiano kilkoma, wyrosłymi na płytkach, pojedynczymi koloniami bakteryjnymi. Hodowle bakteryjne prowadzono w warunkach standardowych (wyrząsarka, 37°C) przez 12-16 godz. (inkubacja nocna).

3.2.1.3 Izolacja plazmidowego DNA (MiniPrep) z hodowli bakteryjnych w skali mini

Z wyrosłych hodowli bakteryjnych pobierano 1,5 ml zawiesiny, aby wyizolować plazmidowe DNA. Niewielką objętość zawiesiny pozostawiano w temp. 4°C. Izolację plazmidowego DNA przeprowadzano zgodnie z załączonym przez producenta protokołem do zestawu odczynników MiniPrep. Wyizolowane DNA zawieszano w 30 µl H₂O aptecznej lub buforu TE. Stężenie DNA wyznaczano przy użyciu spektrofotometru NanoDrop ND-1000.

3.2.1.4 Analiza restrykcyjna i elektroforetyczna

Przygotowywano mieszaninę reakcyjną, która zawierała wyizolowane DNA plazmidowe, endonukleazy i odpowiadające im bufory, wodę apteczną oraz BSA (jeśli wymagane). Reakcję trawienia prowadzono w temp. 37°C przez 1,5-2 godz. Następnie, przygotowywano 1% żel agarozowy (agaroz, 1xTAE lub 1xTBE, bromek etydyny) i przeprowadzano rozdział elektroforetyczny produktów reakcji trawienia oraz odpowiednich markerów DNA. Elektroforeza przebiegała w warunkach 70 mV (lub 80 mV) przez 30-60 min. Wykonywano analizę uzyskanych prążków. Do zakładania hodowli bakteryjnych, na większą skalę (w większej objętości LB) wybierano tę hodowlę, z której wyizolowane DNA plazmidowe, po trawieniu endonukleazami, posiadało odpowiednią ruchliwość elektroforetyczną.

3.2.1.5 Zakładanie hodowli bakteryjnej w większej objętości LB

Przygotowywano pożywkę LB, o takim samym stężeniu antybiotyku (amp/kan) jak na płytce agarowej. Do pożywki dodawano odpowiednią objętość zawiesiny bakteryjnej, która pozostała z hodowli w skali mini. Hodowlę bakteryjną prowadzono w warunkach standardowych przez 12-16 godz.

3.2.1.6 Izolacja plazmidowego DNA (MidiPrep)

Izolację plazmidowego DNA przeprowadzano zgodnie z protokołem załączonym do zestawu odczynników MidiPrep. Wyizolowane DNA zawieszano w odpowiedniej objętości wody aptecznej lub buforu TE. Stężenie DNA wyznaczano przy użyciu spektrofotometru NanoDrop ND-1000. Następnie, przeprowadzano analizę restrykcyjną oraz elektroforetyczną wyizolowanego DNA plazmidowego, w sposób opisany w *Materiały i Metody 3.2.1.4*.

3.2.2 Hodowla eukariotycznych linii komórkowych

Hodowle komórkowe prowadzono w standardowych warunkach w temp. 37°C i wilgotnej atmosferze zawierającej 5% CO₂. Komórki hodowano w następujących pożywkach hodowlanych:

- a) linie komórkowe HeLa, MSU-1.1 oraz Hep2 hodowano w pożywce DMEM z 2 mM L-glutaminą, kwaśnym węglanem sodu, 10% FCS i antybiotykami (penicyliną 50 U, streptomycyną 50 µg),
- b) komórki mioblastów mysich, C2C12, hodowano w pożywce DMEM z 2 mM L-glutaminą, kwaśnym węglanem sodu, 20% FCS i antybiotykami (penicyliną 50 U, streptomycyną 50 µg oraz dodatkowo gentamycyną w stężeniu 0,05 mg/ml),
- c) komórki MRC5 oraz NIH/3T3 hodowano w pożywce DMEM, zawierającej 2 mM L-glutaminę, antybiotyki (penicylinę 50 U i streptomycynę 50 µg) oraz 10% FCS,
- d) linie komórkowe: CHO-K1, U2OS, GM18366-hTERT Seckel cells, XR-V15B, XP4PA (XP-C), XP20S (XP-A), XP12RO (XP-A), XP23PV (XP-E), CS1AN (CS-B) hodowano w pożywce DMEM/F10 (stosunek 1:1), zawierającej 2 mM L-glutaminę, antybiotyki (penicylinę 50 U i streptomycynę 50 µg) oraz 10% FCS,
- e) linie komórkowe HCT116 hodowano w pożywce McCoy's 5A z 2 mM L-glutaminą, antybiotykami (penicyliną 50 U i streptomycyną 50 µg) i 10% FCS oraz dodatkowo hygromycyną w stężeniu 0,1 mg/ml,
- f) linia komórkowa MEFs Suv39dn hodowana była w pożywce DMEM High Glucose z L-glutaminą (2 mM), 10% FCS, antybiotykami (penicyliną 50 U i streptomycyną 50 µg), β-merkaptotanołem i dodatkowym zestawem aminokwasów (MEM).

Wszystkie komórki, wykorzystywane zarówno do eksperymentów, w których obrazowano żywe komórki (ang. „*live cell imaging*”), jak i immunofluorescencji, hodowane były na szalkach Petriego Ø 35 mm, zawierających szklany spód (ang. *glass-bottomed*), typu MaTek Dish (Matek Corporation Ashland MA, USA) lub na jałowych, okrągłych szkiełkach mikroskopowych (Menzel Gläser, Braunschweig, Niemcy) o grubości 0,17 µm, umieszczonych w szalkach Petriego Ø 35 mm (TPP, Szwajcaria). W czasie prowadzenia pomiarów komórki umieszczone były w pożywce DMEM/F12 z 1% FCS, obniżoną zawartością kwaśnego węgla sodu i bez czerwieni fenolowej lub w pożywce mikroskopowej.

3.2.3 Transfekcja komórek ssaczych plazmidowym DNA

Użyto następujących czynników transfekcyjnych: FuGENE-6 (La Roche, USA), FuGENE-HD (La Roche, USA) oraz Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Holandia). Procedury transfekcji prowadzono zgodnie z protokołami załączonymi przez producentów. Wykonano optymalizację transfekcji, co pozwoliło na dobór takich warunków, w których uzyskano najwyższą wydajność transfekcji oraz najniższą cytotoksyczność. Ustalono następujące stosunki czynników transfekcyjnych i DNA: 6 µl FuGENE-6 i 2 µg DNA (stosunek 6:2), 5 µl FuGENE-HD i 2 µg DNA (stosunek 5:2) oraz 4 µl Lipofectaminy i 1-2 µg DNA (stosunek 4:1 lub stosunek 4:2).

3.2.3.1 Transfekcja czynnikiem transfekcyjnym FuGENE-6

Dzień przed transfekcją komórki wysiano na pojedynczych, okrągłych szkiełkach hodowlanych, które umieszczone zostały w szalkach hodowlanych Ø 35 mm (2 ml objętości pożywki hodowlanej). Komórki hodowano w pożywce z surowicą w warunkach standardowych (37°C i 5% CO₂). W dniu transfekcji hodowla komórkowa posiadała 60-70% konfluencji. Mieszaninę transfekcyjną przygotowano w 94 µl pożywki DMEM (bez surowicy i antybiotyków) lub Opti-MEM, dodając 6 µl FuGENE-6 i inkubując 5 min (RT). Następnie, do mieszaniny dodano plazmidowe DNA, w objętości odpowiadającej 2 µg DNA i inkubowano 30 min. Po zakończeniu inkubacji mieszaninę transfekcyjną dodano do komórek, które pozostawiono w hodowli. Obserwacje żywych komórek („*live cell imaging*”) prowadzono 72 godz. po transfekcji.

3.2.3.2 Transfekcja czynnikiem transfekcyjnym FuGENE-HD

Komórki wysiano, jeden dzień przed transfekcją, na pojedynczych, okrągłych szkiełkach umieszczonych w szalkach hodowlanych Ø 35 mm. Komórki hodowano w warunkach standardowych (37°C i 5% CO₂) w pożywce DMEM. W dniu transfekcji hodowla komórkowa posiadała 70-90% konfluencji. Do 100 µl pożywki Opti-MEM dodano 2 µg plazmidowego DNA i 5 µl FuGENE-HD (stosunek FuGENE-HD do DNA wynosił 5:2). Tak przygotowaną mieszaninę transfekcyjną inkubowano 15 min (RT). Po zakończeniu inkubacji całość roztworu dodano do komórek, w których po 24 godz. hodowli zmieniono pożywkę hodowlaną. Pomiary prowadzono 48 godz. po transfekcji.

3.2.3.3 Transfekcja czynnikiem transfekcyjnym Lipofectamine 2000

Dzień przed transfekcją wysiano komórki na szalki Petriego typu MaTek Dish. Komórki hodowano w warunkach standardowych (37°C i 5% CO₂) w pożywce DMEM lub DMEM/F10. W dniu transfekcji hodowla komórkowa posiadała konfluencję 85-95%. Do transfekcji użyto pożywki Opti-MEM. Przygotowano dwa eppendorfy, zawierające po 100 µl pożywki. Do pierwszego eppendorfa dodano 1-2 µg plazmidowego DNA (w przypadku kotransfekcji, tzn. transfekcji komórek dwoma różnymi plazmidami, łączna zawartość DNA nie przekraczała 2 µg) i delikatnie wymieszano. Do drugiego eppendorfa, zawierającego pożywkę Opti-MEM (100 µl), dodano 4 µl Lipofectaminy 2000 i inkubowano 5 min. Następnie, połączono obydwa roztwory, całość wymieszano i inkubowano 30 min w temp. pokojowej. W tym czasie zmieniono w komórkach pożywkę na tzw. „pożywkę transfekcyjną” (Opti-MEM z 10% FBS, bez antybiotyków). Po inkubacji, do komórek dodano mieszaninę transfekcyjną i pozostawiono je w hodowli (37°C i 5% CO₂). Po 4-6 godz. zmieniono pożywkę na standardową pożywkę hodowlaną. Obserwacje komórek („*live cell imaging*”) prowadzono 48 godz. po transfekcji.

3.2.4 Procedura generowania lokalnego uszkodzenia chromatyny przy udziale wzbudzonego jonu etidiowego

Szkiełka mikroskopowe z komórkami umieszczono w specjalnych komorach, które zbudowane były z dwóch pierścieni: metalowego oraz plastikowego. Konstrukcję komory uszczelniono smarem silikonowym (PPHU LEDA, Polska), a następnie wypełniono 1 ml

jałowej pożywki DMEM/F12 z 1% FCS oraz obniżoną zawartością NaHCO_3 , aby umożliwić buforowanie pożywki w warunkach atmosferycznych (0,0333% CO_2). Przygotowaną w ten sposób komorę z komórkami umieszczono w mikro-inkubatorze (Life Science Research, Cambridge, UK), na stoliku mikroskopowym. W czasie trwania eksperymentu komórki znajdowały się w temp. 37°C lub niższej, jeśli wymagał tego eksperyment (temperaturowa zależność gromadzenia HP1 - *Wyniki 4.1.5*).

3.2.4.1 Procedura inkubacji komórek z bromkiem etydyny

Umieszczone na szkiełku komórki zalewano 1 ml pożywki DMEM/F12 (2% FCS), a następnie dodawano bromek etydyny (0,1 mM roztworu wyjściowego) w objętości 1 μl lub 2 μl , uzyskując stężenie bromku w pożywce równe 100 nM lub 200 nM. Inkubację prowadzono na stoliku mikroskopowym w mikro-inkubatorze w temp. 37°C przez 20 min. Następnie, komórki zawieszano w 1 ml świeżej pożywki DMEM/F12 (2% FCS). Eksperymenty wykonywano natychmiast po zmianie pożywki.

3.2.4.2 Metoda rejestrowania obrazów kontrolnych

W jądrach komórkowych obserwowano fluorescencję pochodzącą od GFP (zielona fluorescencja) i EtBr (czerwona fluorescencja). Stosowano linię wzbudzenia 488 nm oraz filtr neutralny 1%. Obrazy rejestrowano używając powiększenia elektronicznego 1 oraz 4, co odpowiada rozmiarowi piksela odpowiednio 0,113 μm i 0,085 μm . Pomiary prowadzono przy otwartej przesłonie konfokalnej.

3.2.4.3 Metoda wprowadzania lokalnych uszkodzeń jąder w żywych komórkach

W jądrze komórkowym wybierano obszar w kształcie kwadratu o boku 1,8 x 1,8 μm , który zawierał zieloną fluorescencję pochodzącą od HP1-GFP. Następnie, fragment ten skanowano 3-krotnie wiązką światła laserowego o długości 514 nm, mocy 105 μW i szybkości przemiatania 166 linii/s. Dostarczana sumaryczna dawka światła wynosiła 1100 μJ . Wiązka światła emitowana była przez laser argonowy (ILT, Salt Lake City, UT, USA) o mocy 100 mW. Wprowadzane w ten sposób lokalne uszkodzenie chromatyny, w obszarze jądrowym o kształcie kwadratu, pozwalało dokładnie kontrolować obszar uszkodzony oraz dostarczaną dawkę światła. Podkreślić jednak należy, że rzeczywista wielkość boku uszkodzonego obszaru jest średnio o 1,5x większa od zdefiniowanego obszaru, co spowodowane jest

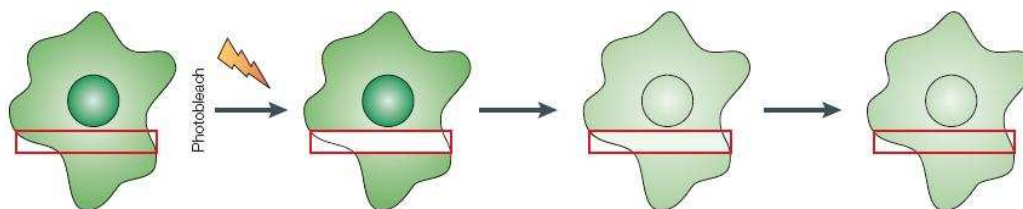
rozproszaniem światła na elementach próbki (Dobrucki i wsp., 2007). Analizę uzyskanych wyników wykonywano zatem w płaszczyźnie preparatu na obszarach wielkości $2,7 \times 2,7 \mu\text{m}$.

3.2.4.4 Metoda prowadzenia pomiarów czasowych (*Time Course*)

Natychmiast po zakończeniu naświetlania światłem o długości 514 nm, prowadzono pomiary intensywności fluorescencji, która pochodziła od GFP. Stosowano wiązkę światła laserowego o długości 488 nm oraz filtr neutralny 1%. W detekcji barwy czerwonej stosowano wzmocnienie 1500, w zielonej 1320. Obrazy rejestrowano przy rozmiarze piksela równym $0,085 \mu\text{m}$ i otwartej przesłonie konfokalnej. Wykorzystano program *Time Course*, dzięki któremu możliwe było rejestrowanie i zapisywanie obrazów co 60 s, w postaci serii następujących po sobie obrazów, które tworzyły filmy trwające 30-60 min.

3.2.4.5 Badanie ruchliwości białka HP1 metodą *FRAP/FLIP*

Pomiary ruchliwości nagromadzonego białka (HP1 zfuzowanego z białkiem fluorescencyjnym) prowadzono metodą odzyskiwania fluorescencji FRAP (ang. *Fluorescence Recovery After Photobleaching*) (Sprague i McNally 2005). Zasadę metody FRAP zaprezentowano na poniższym rysunku (Rys. 3.1).

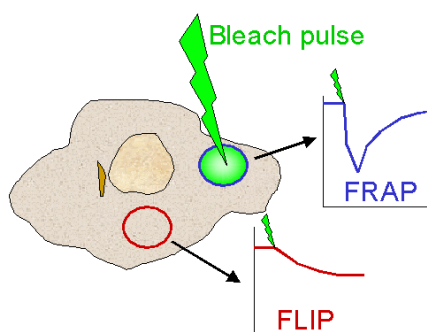


Rysunek 3.1. Schemat metody FRAP

Naświetlanie intensywnym światłem laserowym (Photobleach) wybranego obszaru komórki (wewnątrz czerwonej ramki) prowadzi do nieodwracalnego uszkodzenia fluoroforu w białku fluorescencyjnym i obniżenia intensywności fluorescencji w obszarze naświetlanym. Metodę tę wykorzystuje się do badania ruchliwości białek. W przypadku białek nieruchliwych, całkowicie związane ze strukturami komórkowymi, nie dochodzi do odbudowania fluorescencji w obszarze naświetlonym. Dla białek niezwiązanych stabilnie następuje napływ białek z obszarów nie naświetlanych intensywnym światłem laserowym i intensywność fluorescencji białka w komórce ustala się na poziomie stacjonarnym. Na podstawie (Lippincott-Schwartz i wsp., 2003).

Oprócz metody FRAP, stosowano również drugą metodę, tzw. FLIP (ang. *Fluorescence Loss In Photobleaching*), która pozwala badać spadek fluorescencji GFP w wyniku odpływu białka do obszarów naświetlonych intensywnym światłem laserowym

(Goldman i Spector 2004). Schemat metody FRAP/FLIP przedstawiono na poniższym rysunku (Rys. 3.2).



Rysunek 3.2. Schemat metody FRAP/FLIP

Metodę FRAP/FLIP stosuje się w badaniach dyfuzji (mobilności) cząsteczek białka. W wybranym obszarze naświetlonym (ang. *bleach pulse*) następuje odzyskiwanie fluorescencji (FRAP), na skutek przyływu cząsteczek białka, które zawierają nieuszkodzony fluorofor. Wzrostowi intensywności fluorescencji w obszarze naświetlonym towarzyszy spadek fluorescencji (FLIP) w obszarze, który nie był naświetlany. Na podstawie (<http://www.mscwu.wur.nl/UK/Equipment/CLSM/>).

Komórki poddano transfekcji (*Materiały i metody 3.2.3.1*) odpowiednim DNA plazmidowym, a następnie inkubowano z bromkiem etydyny, uszkodzano oraz rejestrowano obrazy w sposób opisany w *Materiały i Metody 3.2.4.1-3.2.4.3*. Po lokalnym uszkodzeniu chromatyny obserwowano gromadzenie białka HP1 (*Materiały i Metody 3.2.4.4*). W uszkodzonej komórce wybierano obszar jądra, który odpowiadał wielkości 1/3 jądra komórkowego i położony był z dala od uszkodzenia. Obszar ten poddawano 10-krotnemu naświetlaniu intensywnym światłem laserowym (fotobłaknięcie) o długości 488 nm i szybkości przemieszczania 166 linii na sekundę, wykorzystując 3% mocy lasera argonowego i 20-krotne powiększenie elektroniczne. Następnie, rejestrowano obrazy całej komórki (przy 4-krotnym powiększeniu elektronicznym) w odstępach 1 min przez okres 30-60 min po naświetlaniu intensywnym światłem. W sposób analogiczny wykonywano kolejne dwa fotobłaknięcia, na tym samym obszarze o wielkości 1/3 jądra komórkowego.

3.2.5 Procedury immunofluorescencyjne w badaniach uszkodzeń wywołanych wzbudzonym jonem etidiowym

Komórki hodowano na okrągłych szkiełkach mikroskopowych w Ø 35 mm szalkach hodowlanych. Na spodniej stronie szkiełek naklejano, używając matowej taśmy klejącej

(Scotch), miedzianą siatkę o kratkach wielkości 50 μm (TEM Graticules Ltd, UK). Zastosowanie miedzianej siatki pozwoliło wybrać oraz dokładnie zlokalizować te same komórki przed oraz po barwieniu immunofluorescencyjnym. Przygotowane w ten sposób szkiełka mikroskopowe umieszczano w specjalnych pierścieniowych komorach, które uszczelniano smarem silikonowym. Komórki zalewano 1 ml pożywki DMEM/F-12 (2% FCS). Inkubację z fotouczulaczem (bromkiem etydyny) przeprowadzano w ten sam sposób, jak opisano w rozdziale *Materiały i Metody* 3.2.4.1. Po wprowadzeniu lokalnego uszkodzenia, komórki inkubowano przez 30-60 min w pożywce (DMEM/F12 z 2% FCS). W czasie tym zachodziło gromadzenie (lub brak gromadzenia) badanych białek w lokalnie uszkodzanych obszarach chromatyny.

3.2.5.1 Metoda rejestrowania obrazów przed wprowadzeniem uszkodzenia

Na obszarach jąder komórkowych i cytoplazmy obserwowano fluorescencję, która pochodziła od bromku etydyny. Stosowano wiązkę światła laserowego o długości 488 nm i filtr neutralny 0,3%. Obrazy rejestrowano używając 1 lub 2-krotnego powiększenia elektronicznego, co odpowiada rozmiarowi piksela odpowiednio 0,34 μm oraz 0,17 μm .

3.2.5.2 Metoda wprowadzania lokalnego uszkodzenia

Do eksperymentów wybierano te pola widzenia, w których znajdowała się grupa kilku komórek i możliwe było wybranie 3 oddalonych do siebie komórek. Na obszarze jąder komórkowych, omijając jąderka, zaznaczano kwadratowe obszary ROI (ang. *Region of Interest*) o wielkości 15 pixeli (2,5 x 2,5 μm), które kolejno naświetlano 10-krotnie przy pomocy światła o długości 514 nm i mocy 105 μW . Sumaryczna dawka dostarczonego światła wynosiła 3672 μJ . Komórki umieszczano w cieplarni (37°C, 0,0333% CO_2), natychmiast po zakończeniu naświetlania. Po 30-90 min od naświetlania usuwano pożywkę hodowlaną, a komórki przepłukiwano roztworem PBS (3x1'). Następnie, utrwalano inkubując 15 min w 4% roztworze formaldehydu, przepłukiwano kilkakrotnie zimnym roztworem PBS i znakowano immunofluorescencyjne, stosując odpowiednią dla danego przeciwciała procedurę barwienia immunofluorescencyjnego.

3.2.5.3 Procedura immunofluorescencji dla HP1 β

Permabilizację utrwalonych komórek wykonywano w roztworze 0,1% TritonX-100 w buforze KCM (120 mM KCl, 20 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) przez 15 min

(RT). Blokowano przez 1 godz. w roztworze 2% BSA 0,1% TritonX-100 KCM. Następnie, przepłukiwano roztworem 0,1% TritonX-100 KCM (3x5') i inkubowano 16 godz. w temp. 4°C ze szczurzym przeciwciałem I-rzędowym (anty-HP1β) rozcieńczonym 1:100 w roztworze 2% BSA 0,1% TritonX-100 KCM (pH 8.0). Przepłukiwano w roztworze 0,1% TritonX-100 KCM (3x5') i inkubowano (RT) 2 godz. z przeciwciałem II-rzędowym (anty-szczurze Alexa488), rozcieńczonym 1:300 w roztworze 2% BSA PBS (pH 7.4). Po usunięciu roztworu przepłukiwano PBS (3x5').

3.2.5.4 Procedura immunofluorescencji dla HP1γ

Utrwalone komórki permabilizowano 5 min w roztworze 0,25% Triton-X100 PBS, a następnie przepłukiwano roztworem PBS (3x5'). Blokowanie wykonywano przez 30 min w roztworze 1% BSA PBST (0,25% TritonX-100 PBS). Prowadzono inkubację całonocną w temp. 4°C z mysim przeciwciałem I-rzędowym (anty-HP1γ), rozcieńczonym 1:500 w 1% BSA PBST. Następnie, przepłukiwano roztworem PBS (3x5') i inkubowano (RT) 4 godz. z przeciwciałem II-rzędowym (anty-mysie Alexa488), rozcieńczonym 1:500 w roztworze 1% BSA PBST. Po usunięciu roztworu przepłukiwano roztworem PBS (3x5').

3.2.5.5 Procedura immunofluorescencji dla Me3K9H3

Permabilizację utrwalonych komórek prowadzono w roztworze 0,5% Triton-X100 PBS przez 5 min (RT). Następnie, przepłukiwano zimnym roztworem PBS (2x3'), blokowano 10 min w roztworze 100 mM glicyny i przepłukiwano roztworem PB (130 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2,5 mM MgCl₂, pH 7.4). Kolejne blokowanie wykonywano inkubując komórki 10 min w roztworze WB (PB 0,5% BSA, 0,1% żelatyna, 0,05% Tween20). Następnie, inkubowano 16 godz. w temp. 4°C z króliczym przeciwciałem I-rzędowym (anty-Me3K9H3), rozcieńczonym w roztworze WB w stosunku 1:500. Przepłukiwano roztworem WB (4x5'), po czym inkubowano 2 godz. (RT) z przeciwciałem II-rzędowym (anty-królicze Alexa488), rozcieńczonym 1:300 w buforze WB, a na koniec przepłukiwano roztworem WB (2x5').

3.2.5.6 Procedura immunofluorescencji dla Ku70

Permabilizację utrwalonych komórek wykonywano w roztworze 0,25% Triton-X100 PBS przez 5 min (RT). Następnie, przepłukiwano zimnym roztworem PBS (3x5'), blokowano 30 min w roztworze 1% BSA PBST (PBS, 0,25% TritonX-100), po czym inkubowano w temp. 4°C przez 16 godz. z mysim przeciwciałem I-rzędowym (anty-Ku70),

rozcieńczonym w 1% BSA PBST w stosunku 1:100. Przepłukiwano w roztworze PBS (3x5'), a następnie prowadzono 2 godz. inkubację (RT) z przeciwciałem II-rzędowym (anty-mysie Alexa488), rozcieńczonym 1:500 w buforze 1% BSA PBST i przepłukiwano roztworem PBS (3x5').

3.2.5.7 Metoda rejestrowania obrazów immunofluorescencyjnych

Zastosowanie metalowych kratek, które przyklejone były do szkiełek, pozwalało na odszukiwanie lokalnie uszkodzonych obszarów chromatyny, które znajdowały się na terenie jąder komórkowych. W przypadku komórek nieuszkodzonych (kontrolnych), rejestrowano jądrową lokalizację wybarwionych immunofluorescencyjnie białek. Na terenie jąder komórkowych obserwowano zieloną fluorescencję, która pochodziła od przeciwciał II-rzędowych Alexa488. W pomiarach stosowano wiązkę światła laserowego o długości 488 nm, filtr neutralny 0,3% lub 1% i powiększenie elektroniczne 1 oraz 2, co odpowiada rozmiarowi piksela odpowiednio 0,34 μm oraz 0,17 μm .

3.2.6 Metody generowania lokalnych uszkodzeń DNA indukowanych promieniowaniem UV

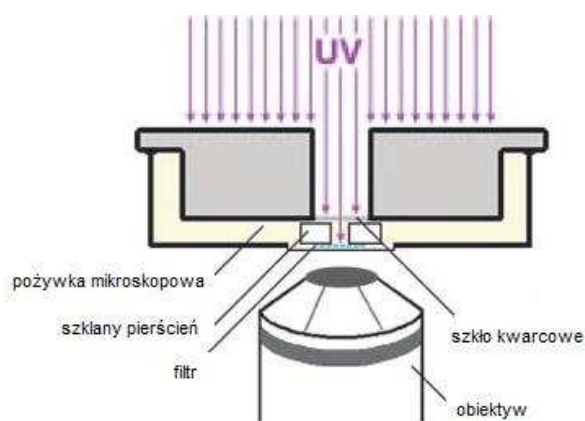
Lokalne uszkodzenia DNA indukowane promieniowaniem UV generowano przy użyciu dwóch metod. W pierwszej wykorzystywano laser UV-C emitujący światło o długości fali 266 nm (Dinant i wsp., 2007). Wiązką światła o długości 266 nm lokalnie naświetlano wybrany fragment jądra komórkowego, generując w nim uszkodzenie. W drugiej metodzie zastosowano lampę UV-C (254 nm) oraz poliwęglanowy filtr (ang. *polycarbonate mask*) z porami o średnicy 5 μm , przez który przepuszczano promieniowanie UV i w ten sposób indukowano uszkodzenie na małym obszarze DNA (Moné i wsp., 2001; Moné i wsp., 2004; Luijsterburg i wsp., 2007).

3.2.6.1 Metoda generowania uszkodzeń UV przy użyciu lampy UV-C

Indukowane UV uszkodzenia DNA wykonywano przy użyciu światła UV-C, które powoduje powstawanie dimerów cyklobutano-pirymidynowych (CPDs) oraz foto-produktów 6-4 (6-4PPs). Źródło promieniowania UV stanowiły 4 lampy UV-C Philips TUV 9W PL-S (Eindhoven,

Holandia), które umieszczono nad stolikiem mikroskopowym. Dokonano pomiarów dawki UV dla 254 nm i wyznaczono, że jest ona równa 3 W/m^2 .

W celu wprowadzenia globalnego uszkodzenia UV, hodowane na szalkach MaTek Dish komórki umieszczano w pożywce mikroskopowej, a następnie naświetlano przez 9 s, co odpowiada dawce 25 J/m^2 . Przy generowaniu lokalnego uszkodzenia UV, hodowane na szalkach (MaTek Dish) komórki zalewano pożywką mikroskopową, a następnie przykrywano poliwęglanowym filtrem (Milipore Billerica, Massachusetts, USA), który zawierał pory o średnicy $\varnothing 5 \mu\text{m}$ (Moné i wsp., 2004; Luijsterburg i wsp., 2007). Szklany pierścień ($\varnothing 6 \text{ mm}$), w którym znajdował się otwór ($\varnothing 2 \text{ mm}$), umieszczany był na filtrze w ten sposób, aby zabezpieczyć filtr na komórkach (Rys. 3.3). Następnie, całość konstrukcji uszczelniano specjalną pokrywą, która zawierała szkło kwarcowe.

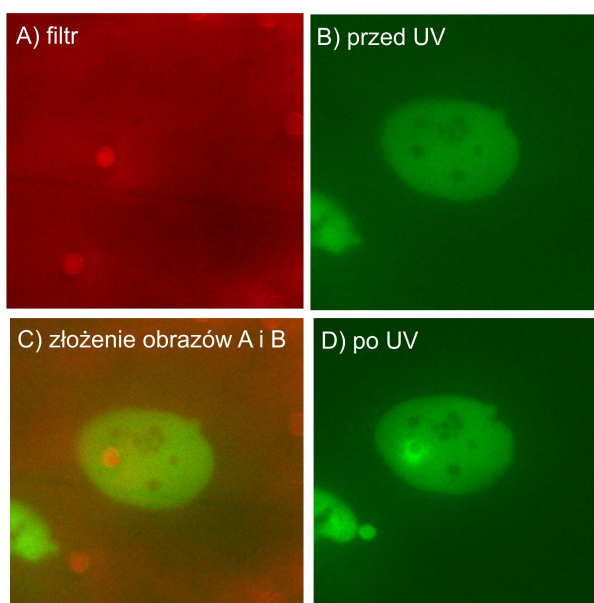


Rysunek 3.3. Schemat generowania lokalnych uszkodzeń UV

W postaci schematycznej przedstawiono ustawienia poszczególnych elementów układu. Komórki umieszczano na stoliku mikroskopowym (wyposażonym w inkubator, który umożliwiał kontrolę temperatury), zalewano pożywką mikroskopową i przykrywano poliwęglanowym filtrem, który utrzymywany był w stałej pozycji poprzez zastosowanie szklanego pierścienia. Promieniowanie UV przechodziło przez szkło kwarcowe, które znajdowało się w miejscu otwarcia pierścienia, a następnie dochodziło do komórek i w miejscu otworów filtra generowane były lokalne uszkodzenia jądra. Wykonano na podstawie (Moné i wsp., 2004).

Naczynie hodowlane umieszczane było na ogrzewanym stoliku mikroskopowym. Eksperymenty rozpoczynano po ustabilizowaniu temperatury na poziomie 37°C . Komórki wraz z filtrem naświetlano przez 39 s, co odpowiada dawce światła 100 J/m^2 (Luijsterburg i wsp., 2007). Sprawdzone, że tylko niewielka liczba jąder komórkowych zawierała więcej niż jeden obszar lokalnie uszkodzonej chromatyny (Moné i wsp., 2001). Średnica uszkodzonego obszaru jądra odpowiadała średnicy porów.

W metodzie tej wykorzystywano komórki kotransfekowane dwoma lub trzema plazmidami białek fuzyjnych, z których jeden zawsze zawierał, używane jako marker uszkodzenia, mCherry-DDB2 lub DDB2-mVenus. Gromadzenie DDB2 w lokalnie uszkodzanych obszarach jądrowych, które znajdowały się poniżej porów poliwęglanowego filtra (Rys. 3.4), pozwalało śledzić proces akumulacji badanych białek w rejonach uszkodzeń UV.



Rysunek 3.4. Pozycja filtra względem jąder komórkowych

Rozmieszczenie porów filtra w stosunku do pozycji jąder komórkowych. **(A)** Obraz odbiciowy filtra (kolor czerwony) ukazuje rozmieszczenie porów; nie wszystkie pory ułożone są w pozycji prostopadłej w stosunku do powierzchni filtra, a zatem obrazy transmisyjne ukazują pory jako odpowiednio przepuszczające światło (pory z okręgami). **(B)** Obraz znajdujących się pod filtrem komórek, z ekspresją mCherry-DDB2 (kolor zielony) pokazuje jednolite, jądrowe rozmieszczenie białka DDB2 przed naświetleniem UV. **(C)** Złożenie obrazów **A** i **B** ukazuje dokładną pozycję porów na tle jąder. **(D)** Po naświetleniu, lokalne gromadzenie Cherry-DDB2 w uszkodzonych obszarach jądrowych, znajdujących się poniżej oznaczonych **(A)** porów filtra.

Obrazy rejestrowano używając mikroskopu fluorescencyjnego szerokiego pola (Zeiss Axiovert 200M), który wyposażony był w olejowy obiektyw Plan Apo 100x (1.4 NA) (Zeiss, Oberkochen, Niemcy) oraz lampę ksenonową o wyładowaniu łukowym (ang. *xenon arc*), z monochromatorem (Cairn Research, Kent, UK). Obrazy rejestrowano przy użyciu chłodzonej kamery CCD (Coolsnap HQ, Roper Scientific, USA). Mikroskop zawierał układ ogrzewający obiektyw oraz komorę ogrzewającą próbkę.

3.2.6.2 Metoda generowania uszkodzeń UV przy użyciu lasera UV-C

Indukowane laserem uszkodzenia UV generowano przy użyciu pulsującej (7.8 kHz) diody lasera emitującej wiązkę światła o długości 266 nm (Rapp OptoElectronics, Hamburg GmbH, Niemcy) i mocy 2mW. Laser podłączony był do mikroskopu konfokalnego (Zeiss LSM 510), poprzez łącznik UV (Axiovert 200 M) i wykonane z kwarcu elementy optyczne. Specjalny adapter (ZSI-A200, Rapp OptoElectronic, Hamburg GmbH, Niemcy), pasujący do apertury dla preparatu w mikroskopie (Axiovert 200), zaprojektowany został w ten sposób, aby zogniskować światło lasera na preparacie. W celu wprowadzenia lokalnych uszkodzeń, przy użyciu lasera UV-C, komórki hodowano na kwarcowych szkiełkach (010191T-AB, SPI supplies) o średnicy Ø 25 mm (Dinant i wsp., 2007).

3.2.7 Metoda generowania DSBs za pomocą cząstek α

Komórki wysiano na szalki hodowlane, zawierające ultra-cienki spód wykonany z membrany Mylar (Aten i wsp., 2004; Stap i wsp., 2008), która w celu polepszenia przyczepności komórek pokryta została węglem. Hodowane w temp. 37°C przez 24 godz. komórki naświetlano cząstkami α , które pochodziły ze źródła radioaktywnego ameryku (Am-241) o aktywności 140 kBq (kilobecquerel). Źródło ameryku znajdowało się pod spodem naczynia i w niewielkim tylko stopniu dotykało membrany Mylar. Radioaktywne źródło umieszczone zostało pod kątem 30° w płaszczyźnie pionowej, dzięki czemu możliwe było uzyskanie długich, liniowych skupisk DSBs w jądrach komórkowych. Komórki naświetlano przez 0,5 min (RT), a następnie utrwalano w 2% formaldehydzie.

3.2.7.1 Wykrywanie DSBs metodą immunofluorescencji

Ludzkie komórki U2OS oraz mysie NIH/3T3 utrwalano w 2% formaldehydzie (procedura w: Aten i wsp., 2004; Stap i wsp., 2008), a następnie wybarwiano immunofluorescencyjnie. Wykorzystano następujące przeciwciała: pierwszorzędowe anti- γ H2A.X i anti-HP1 β oraz drugorzędowe Cy3 i FITC. Roztwory wszystkich przeciwciał przygotowywano w PBS, zawierającym 0,1% Tryton-X 100 oraz 1% FCS. Obrazy fluorescencyjne rejestrowano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Leica DM RA HC (Leica Microsystems, Wetzlar, Niemcy), który wyposażony był w obiektyw olejowy PLAN APO 100x/1.40 oraz chłodzoną kamerę CCD (KX1400, Apogea Instruments, CA, USA).

3.2.8 Mikroskopia konfokalna

W skład elementów pomiarowych wchodził układ skaningowego obrazowania konfokalnego Bio-Rad MRC 1024 (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK), połączony z mikroskopem odwróconym Nikon Diaphot 300, który wyposażony był w obiektyw olejowy 60x Oil Plan Apo (NA 1.4). Jako źródło światła zastosowano chłodzony powietrzem laser argonowy (Ar) (ILT, Salt Lake City, Utah, USA) o mocy 100 mV, emitujący wiązki światła o długościach: 457 nm, 488 nm oraz 514 nm. Dodatkowym wyposażeniem układu był mikro-inkubator (Life Science Resources, Cambridge, UK) z regulacją temperaturą w zakresie 0-50°C oraz kontrolą wilgotności. Emitowana fluorescencja rejestrowana była przez układ trzech fotopowielaczy. Wszystkie elementy układu podłączone były do komputera PC z zainstalowanym oprogramowaniem LaserSharp2000 dla NT (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK) lub LaserSharp v.4.2 dla OS/2 (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK), które wykorzystywane było do rejestrowania oraz opracowywania zbieranych obrazów konfokalnych.

Do wzbudzenia GFP, Alexa488 oraz Cy2 wykorzystywano wiązkę światła laserowego o długości 488 nm, a emitowaną „zieloną” fluorescencję obserwowano w zakresie 525-555 nm. Światło o długości fal 514 nm oraz 568 nm stosowane było do wzbudzenia barwników takich, jak: Alexa546 oraz Cy3, a emitowaną fluorescencję rejestrowano w zakresie 550 nm i fal dłuższych lub fal dłuższych niż 585 nm. Do wzbudzenia bromku etydyliny stosowano wiązkę światła laserowego o długości 514 nm, a obserwację „czerwonej” fluorescencji prowadzono w zakresie fal dłuższych niż 585 nm. Przy rejestracji obrazów konfokalnych używano małych dawek światła wzbudzającego oraz stosowano filtr neutralny, przepuszczający 0,3%, 1% lub 3% mocy lasera. Konfigurację układu optycznego dobierano w ten sposób, aby zminimalizować towarzyszące rejestracji obrazów zjawiska fototoksyczności oraz fotobłaknięcia fluoroforów.

3.2.9 Analiza obrazów mikroskopowych

Do analizy ilościowej uzyskanych danych wykorzystywano następujące programy: Image-Pro Plus Version 4.5, Image J oraz MetaMorph Version 7.0. Obrazy mikroskopowe zamieszczone w niniejszej rozprawie przygotowane zostały przy użyciu programu ImageJ

z zainstalowaną wtyczką, która pozwala na otwieranie plików zapisywanych w programie LaserSharp oraz programu MetaMorph. W obrazach dokonywano zmian parametru gamma, usuwania szumów oraz rozciągania histogramu.

3.2.9.1 Analiza kinetyki gromadzenia białek HP1 w obszarach uszkodzonych

W analizie kinetyki gromadzenia białek HP1 (konstruktów białek fuzyjnych HP1 z białkiem fluorescencyjnym GFP) wykorzystano program Image-Pro Plus Version 4.5 (wersja dla Windows). Po wprowadzeniu uszkodzenia, obrazy jąder komórkowych rejestrowane były co minutę i zapisywane w serii obrazów w postaci filmu. Po rozłożeniu serii obrazów na pojedyncze klatki, dokonywano korekcji obrotu jąder oraz ustalano położenie, mających kształt kwadratu, obszarów lokalnego uszkodzenia chromatyny. Aby uwzględnić efekt rozpraszania światła, bok wyznaczonego kwadratu był o 1,5x większy od rzeczywistego obszaru naświetlanego. Dokonywano pomiarów zmian jasności fluorescencji na terenie obszaru uszkodzonego oraz pozostałej, kontrolnej (nieuszkodzonej) części jądra, z wyłączeniem obszaru uszkodzonego. Wartości średniej intensywności fluorescencji poddawano dalszej analizie przy użyciu programu Microsoft Office Excel 2003. Uzyskane wyniki przedstawiano w postaci wykresów.

3.2.9.2 Analiza ruchliwości nagromadzonego białka HP1 w rejonie uszkodzonym

W analizie ruchliwości nagromadzonego w rejonie uszkodzonym białka HP1 wykorzystano program Image-Pro Plus. W sposób analogiczny, jak przedstawiono w *Materiały i Metody* 3.2.9.1, dokonywano rozłożenia filmu na pojedyncze obrazy oraz wyznaczano obszar lokalnego uszkodzenia. Wykonywano pomiary zmian intensywności fluorescencji na terenie obszaru uszkodzonego oraz pozostałej, nieuszkodzonej części jądra (z wyłączeniem obszaru uszkodzonego), która zawierała obszar jądra, na którym wprowadzano fotobłaknięcie. Wartości średniej intensywności fluorescencji analizowano przy użyciu programu Microsoft Office Excel 2003, zaś uzyskane wyniki przedstawiano na wykresach.

Rozdział 4**Wyniki**

4.1	HP1 w odpowiedzi komórki na uszkodzenie oksydacyjne.....	88
4.1.1	Wprowadzenie - charakterystyka lokalnego uszkodzenia chromatyny indukowanego wzbudzonym jonem etidiowym.....	88
4.1.2	Wykrycie akumulacji białek heterochromatynowych HP1 w obszarach lokalnego uszkodzenia chromatyny indukowanego wzbudzonym jonem etidiowym.....	94
4.1.3	Brak gromadzenia EGFP-HP1 α w nieobecności fotouczulacza	100
4.1.4	Badanie procesu gromadzenia białek HP1 w obszarach lokalnego uszkodzenia chromatyny indukowanego wzbudzonym jonem etidiowym.....	101
4.1.5	Badanie zależności tempa gromadzenia białka HP1 od temperatury.....	104
4.1.6	Badanie ruchliwości HP1 nagromadzonego w miejscu uszkodzenia.....	108
4.1.7	Pomiary gromadzenia różnych wariantów białka fuzyjnego HP1 „z zablokowanymi sterycznie końcami”.....	112
4.1.8	Badanie zmian upakowania chromatyny w miejscu uszkodzenia.....	120
4.1.9	Pomiary zmian stopnia metylacji lizyny 9 histonu H3 (Me3K9H3) w miejscach rekrutacji białka HP1.....	127
4.1.10	Badanie akumulacji Ku70 w miejscu uszkodzenia.....	130
4.1.11	Badanie akumulacji PCNA w miejscu uszkodzenia.....	133
4.1.12	Badanie akumulacji Dnmt1 w miejscu uszkodzenia.....	140
4.1.13	Badanie akumulacji ligazy DNA I w miejscu uszkodzenia.....	142
4.1.14	Badanie akumulacji ligazy DNA III w miejscu uszkodzenia.....	143
4.2	HP1 w odpowiedzi komórki na uszkodzenie wywołane przez promieniowanie UV.....	145
4.2.1	Wykrywanie uszkodzeń DNA indukowanych przez UV i aktywacji NER.....	145
4.2.2	Badanie akumulacji białek HP1 w miejscach uszkodzeń wywołanych przez UV.....	149

4.2.3	Badanie akumulacji białek HP1 β w rejonach uszkodzonej chromatyny w komórkach Suv39dn.....	150
4.2.4	Badanie akumulacji SUV39H1 w obszarach uszkodzeń UV.....	152
4.2.5	Badanie zależności rekrutacji HP1 od aktywności NER.....	153
4.2.6	Badanie zależności rekrutacji HP1 od fazy cyklu komórkowego.....	155
4.2.7	Badanie różnic w procesie akumulacji HP1 w komórkach XP-A i komórkach z funkcjonalną naprawą NER.....	157
4.2.8	Badanie akumulacji HP1 w komórkach Seckel.....	158
4.2.9	Badanie rekrutacji Dnmt1 w obszarach uszkodzeń UV.....	159
4.2.10	Badanie akumulacji HP1 w komórkach Dnmt1-/-.....	161
4.2.11	Badanie akumulacji MeCP2 w obszarach uszkodzeń UV.....	162
4.2.12	Badanie akumulacji SUV4-20 w obszarach uszkodzeń UV.....	163
4.2.13	Badanie akumulacji ACF1 w miejscach uszkodzeń UV.....	164
4.2.14	Badanie akumulacji BRG1 w obszarach uszkodzeń UV.....	166
4.2.15	Badanie wrażliwości komórek na UV po utracie HP1.....	168
4.3	HP1 w procesach towarzyszących naprawie DSBs.....	169
4.3.1	Badanie akumulacji białek HP1 w obszarach formowania DSBs.....	169
4.3.2	Badanie akumulacji HP1 w miejscach uszkodzeń chromatyny w komórkach z deficytem KU80.....	171

4.1 HP1 w odpowiedzi komórki na uszkodzenie oksydacyjne

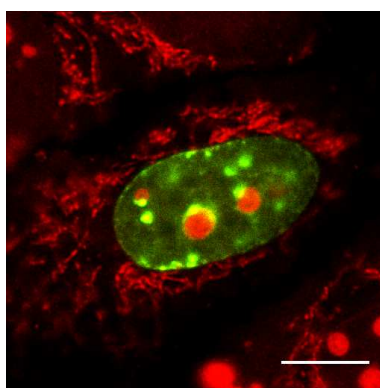
4.1.1 Wprowadzenie - charakterystyka lokalnego uszkodzenia chromatyny indukowanego wzbudzonym jonem etidiowym

Rozwój mikroskopii fluorescencyjnej umożliwił badania procesów fizjologicznych w komórkach hodowanych w warunkach laboratoryjnych. Istnieje wiele metod śledzenia szlaków naprawy DNA w żywych komórkach (Lukas i wsp., 2005). W metodach tych dokonywane jest lokalne uszkodzenie DNA i obserwowana jest akumulacja czynników naprawczych. Do uszkodzania DNA wykorzystane jest m.in. promieniowanie X (Nelms i wsp., 1998), promieniowanie jonizujące (IR) (Shiloh i wsp., 2003; Essers i wsp., 2002; Houtsmuller i wsp., 1999), promieniowanie UV w komórkach uwrażliwionych bromodeoksyurydyną (BrdU) lub barwnikami interkalującymi do DNA (Rogakou i wsp., 1999; Tashiro i wsp., 2000; Walter i wsp., 2003; Lukas i wsp., 2003; Celeste i wsp., 2003; Fernandez-Capetillo i wsp., 2004; Bekker-Jensen i wsp., 2005), promieniowanie UV w komórkach niewrażliwionych (Moné i wsp., 2004; Luijsterburg i wsp., 2007; Dinant i wsp., 2007), wzbudzenie dwu-fotonowe (Bradshaw i wsp., 2005), promieniowanie o długości fali 532 nm, emitowane przez laser Nd:YAG (Kim i wsp., 2002; Mikhailov i wsp., 2002), cząstki- α (Aten i wsp., 2004; Stap i wsp., 2008) oraz endonukleazy dokonujące cięcia w rzadko występujących miejscach restrykcyjnych (Jasin 1996; Melo i wsp., 2001; Lisby i wsp., 2003). Wymienione powyżej metody uszkodzania DNA są trudne technicznie i wymagają zastosowania wyspecjalizowanej aparatury. Pojawiła się zatem potrzeba opracowania nowej, znacznie prostszej metody indukowania uszkodzeń DNA, w celu zweryfikowania postawionej w Pracowni Biofizyki Komórki (WBBiB UJ) hipotezy, która zakładała, że białko HP1 jest zaangażowane w procesach naprawy uszkodzeń DNA.

Optymalizacja uszkodzenia

W metodzie generowania uszkodzeń jądra komórkowego, opracowanej we współpracy z dr. M. Zarębskim, zastosowany został bromek etidiowy (ang. *Ethidium bromide*, EtBr). EtBr to barwnik wykazujący powinowactwo do DNA oraz RNA i emitujący czerwoną fluorescencję w kompleksach z kwasami nukleinowymi. Wyniki wcześniejszych badań potwierdziły, że jon etidiowy (jEt) może przenikać do wnętrza nie tylko utrwalonych, lecz

także żywych komórek (Ferlini i wsp., 1996; Diaz i wsp., 1997). Chociaż EtBr używany jest w tzw. „testach żywotności” komórek, błędna jest ogólnie przyjęta opinia, że jEt nie przenika przez błony żywych komórek (Ronot i wsp., 2001). Jon etidiowy posiada powinowactwo do DNA oraz RNA i wybiórczo wiąże się z kwasami nukleinowymi jądra komórkowego, mitochondriów oraz cytoplazmy (Ryc. 4.1). W wyniku barwienia EtBr uwidocznąć można fluoryzujące czerwono obszary komórki, w których znajduje się DNA i dsRNA, m.in. DNA i RNA w jądrze komórkowym, dsRNA w retikulum endoplazmatycznym (Stockert i wsp., 1974; Diaz i wsp., 1997), czy DNA i RNA mitochondrialne (Li i wsp., 2007). Zaznaczyć należy, iż bromek etidiowy wykazuje również powinowactwo do form jednonicowych (RNA, ssDNA), które jest jednak dużo słabsze. Najprawdopodobniej, z powodu ochronnego działania białek chromatyny, jądrowe DNA ulega tylko słabemu wybarwieniu (Stockert i wsp., 1974).



Rycina 4.1. Komórki HeLa wybarwione bromkiem etidiowym (EtBr)

Reprezentatywny obraz fluorescencyjny żywej komórki HeLa po transfekcji konstruktem białka fuzyjnego HP1-GFP oraz inkubacji z EtBr (o stężeniu 6 μM) przez 50 min. Po wymienieniu pożywki zarejestrowano obrazy fluorescencji GFP (zielona) oraz EtBr (czerwona). Bromek etidiowy wykazuje powinowactwo do kwasów nukleinowych i pozwala na uwidocznienie jądra, mitochondriów oraz cytoplazmy w żywej komórce. Słaba fluorescencja na terenie jądra komórkowego (w porównaniu z cytoplazmą) wynikać może m.in. z niższego stężenia EtBr związanego z DNA, które osłonięte jest białkami chromatynowymi. Odcinek skalujący 10 μm .

Obecny w żywych komórkach bromek etidiowy wywołuje efekt fotodynamiczny, który zachodzi pod wpływem światła widzialnego (Deniss i Morgan 1976). Uszkodzenie komórki objawia się powstaniem wiązań krzyżowych między białkami budującymi chromatynę (Sheval i wsp., 2002; Sheval i wsp., 2004), oraz pęknięciami nici DNA (Deniss i Morgan 1976; Baguley i Falkenhaus 1978). Proces uszkodzenia rozpoczyna się od tego, że aromatyczny kation etidiowy wiąże się z DNA na drodze interkalacji, tzn. wsuwa się pomiędzy pary zasad i oddziałując z nimi powoduje nieznaczne rozkręcenie nici. Z kolei,

niearomatyczna część jonu etidiowego oddziałuje elektrostatycznie z DNA, co wpływa na zwiększenie stabilności kompleksu DNA-jon etidiowy (Bugs i Cornélio 2002). Nie zaobserwowano silnej preferencji wiązania do żadnej z par zasad (Chen i wsp., 2000). Wykazano, że zinterkalowany jon etidiowy może pod wpływem światła spowodować przecięcie izolowanej nici DNA (Baguley i Falkenhaus 1978). Zinterkalowany jon etidiowy jest bowiem w stanie oderwać atom wodoru od deoksyrybozy, co prowadzi do powstania niestabilnego, wolnego rodnika furanozowego. Następnie, powstały rodnik furanozowy oddziałuje z tlenem i tworzy nadtlenek, którego rozpad powoduje pęknięcie nici DNA (Deniss i Morgan 1976). W wyniku oddziaływania jonu etidiowego ze światłem, na skutek reakcji rodnikowych w wyizolowanym DNA, powstają zatem podwójne pęknięcia nici (DSBs) (Krishnamurthy i wsp., 1990; Deniss i Morgan 1976). Zaznaczyć jednak należy, że w eksperymentach tych badacze (Deniss i Morgan 1976; Sheval i wsp., 2002; Sheval i wsp., 2004) stosowali stosunkowo wysokie, rzędu mikromoli, stężenia fotouczulacza (EtBr). Ponadto, wykazano również, iż w warunkach tych w wyizolowanych jądrach komórkowych dochodzi do powstania wiązań krzyżowych pomiędzy składnikami chromatyny (Sheval i wsp., 2002; Sheval i wsp., 2004).

Powyższe informacje wykorzystano do opracowania metody wywoływania lokalnych uszkodzeń chromatyny w żywych komórkach hodowanych na stoliku mikroskopowym. W metodzie tej wprowadzano jon etidiowy do żywych komórek, a następnie oświetlano wybrany fragment jądra komórkowego światłem zielonym i tym samym wzbudzano fluorescencję jEt. W ten sposób wywoływano uszkodzenia wybranych, niewielkich rejonów jądra komórkowego. Po dobraniu odpowiednich warunków (stężenia EtBr, czasu inkubacji, natężenia i dawki światła wzbudzającego oraz wielkości naświetlanego obszaru jądra) wywoływać można lokalne uszkodzenia chromatyny w sposób ściśle kontrolowany i powtarzalny (Zarębski 2008).

Wydaje się logiczne, że rodzaj i wielkość powstałych uszkodzeń zależą będzie od stężenia EtBr, a także od dawki i natężenia użytego światła wzbudzającego. Postanowiono dokładnie zbadać, jakiego rodzaju uszkodzenia generuje ta metoda oraz jakie mechanizmy naprawcze zostają uaktywnione. Prowadzono zatem równoległe badania, mające na celu scharakteryzowanie powstałego uszkodzenia (Zarębski 2008), a także zbadanie roli, jaką w procesie naprawy DNA pełni rekrutowane w miejscu uszkodzenia białko HP1 (Wiernasz 2004). Opisane w tym podrozdziale eksperymenty stanowiły część wspólnego projektu

badawczego wykonanego we współpracy z dr. Mirosławem Zarębskim (Pracownia Biofizyki Komórki, WBBiB UJ, Kraków). Wyniki poniższych eksperymentów nie są ilustrowane wykresami i obrazami, gdyż te w części znajdują się w pracy doktorskiej M. Zarębskiego (Zarębski 2008) oraz we wspólnych publikacjach (Zarebski i wsp., 2009; Rapp i wsp., 2009 – praca w przygotowaniu).

Wykonane we współpracy z dr. M. Zarębskim eksperymenty miały na celu opracowanie metody uszkodzenia. Po pierwsze, dokonano optymalizacji stężenia użytego fotouczulacza, ponieważ wysokie stężenia EtBr (>250 nM) prowadzą do wyraźnego zahamowania tempa wzrostu hodowli komórkowych (Zarębski 2008). Aby generować wyłącznie aktywowane światłem, subletalne (naprawiane przez komórkę, nie powodujące jej śmierci) uszkodzenia chromatyny, dobrano niższe stężenia EtBr, tzn. 100-200 nM. W warunkach tych uszkodzenie chromatyny jądrowej ograniczone było tylko do obszaru wybiórczo naświetlonego, nie obserwowano natomiast uszkodzeń w obszarach nienaświetlanych (Wiernasz 2004; Zarebski i wsp., 2009). Przyjąć zatem można, że obszar nienaświetlony nie był uszkodzany.

W kolejnych eksperymentach dokonano optymalizacji stężeń oraz czasu inkubacji z fotouczulaczem, biorąc pod uwagę tempo wzrostu hodowli komórkowych. Wyznaczono, że 20 min inkubacja z EtBr w stężeniach niższych niż 200 nM, w ciemności, powodowała tylko nieznaczne opóźnienie cyklu komórkowego. Przyjąć można, że komórki wystawione na działanie światła zielonego, w obecności EtBr o stężeniu 100-200 nM, ulegają uszkodzeniu w wyniku efektu fotodynamicznego wywołanego przez oddziaływanie jonu etidiowego ze światłem, w obecności tlenu (Zarębski 2008). Z kolei, uszkodzenia powstałe bez obecności światła, wywołane przez sam EtBr, są na tyle małe, że nie były wykrywalne dostępnymi metodami (barwienie immunofluorescencyjne γ H2A.X, 8-OHdG) (Zarebski i wsp., 2009).

Po serii doświadczeń, mających na celu optymalizację dawki użytego światła wzbudzającego fotouczulacz, wybrano długość fali 514 nm i moc wiązki światła w zakresie 35-105 μ W. Uszkodzenie wprowadzano na wybranych rejonach płaszczyzny konfokalnej jądra komórkowego, które naświetlano zogniskowaną wiązką światła zielonego (514 nm). W ten sposób kontrolować można było rozmiary wprowadzanego uszkodzenia przy zachowaniu warunków, w których generowane były tylko uszkodzenia subletalne. Po wprowadzeniu tego rodzaju uszkodzeń, komórki zachowują zdolność do podziałów, a powstałe uszkodzenia naprawiane są przez fizjologiczne procesy naprawcze komórki (Zarebski i wsp., 2009).

Stwierdzić zatem można, że nowo opracowana metoda wprowadzania lokalnego, kontrolowanego uszkodzenia chromatyny jądrowej spełnia podstawowe wymogi stawiane metodom generowania lokalnych uszkodzeń DNA i może być wykorzystana do badania zachodzących w żywych komórkach procesów naprawy DNA.

Charakterystyka uszkodzenia

Wiadomo, że uszkodzenia chromatyny, powstałe w wyniku oddziaływania związanego z DNA i wzbudzonego światłem zielonym jonu etidiowego, zachodzą w obecności tlenu (Deniss i Morgan 1976; Sheval i wsp., 2004). Charakterystykę uszkodzeń DNA, wywołanych przez jEt, rozpoczęto od sprawdzenia, czy w obszarze uszkodzonym zachodzi utlenienie zasad, a w szczególności 8-OHdG (8-hydrokso-2'-deoksyguaniny), która powstaje w wyniku oddziaływania czynników utleniających z DNA (Martinez i wsp., 2003). W miejscu uszkodzenia zaobserwowano duże stężenie reszt utlenionej deoksyguaniny, 8-OHdG (Zarebski i wsp., 2009). W nieobecności tlenu nie dochodzi do utleniania zasady, albo stężenie 8-OHdG jest na tyle niskie, że znajduje się poniżej progu detekcji, a zatem powstawanie uszkodzenia uzależnione jest od obecności tlenu cząsteczkowego w próbce. Kolejne doświadczenia potwierdziły, że w miejscach uszkodzenia obecne jest również XRCC1 (Zarebski i wsp., 2009) oraz glikozylaza OGG1 (Rapp i wsp., 2009 – praca w przygotowaniu). Zaznaczyć należy, iż glikozylazy DNA to enzymy, które rozpoznają uszkodzone pary zasad i są kluczowym elementem naprawy BER (Fromme i wsp., 2004). Stwierdzić zatem można, że wzbudzony światłem jon etidiowy generuje uszkodzenia oksydacyjne, naprawiane na drodze BER (ang. *Base Excision Repair*).

Wielokrotnie wykazano, że naprawa utlenionej guaniny zachodzić może nie tylko na drodze BER, lecz również NER (Le Page i wsp., 2000; Sunesen i wsp., 2002). Postanowiono zatem sprawdzić, czy uszkodzenie wywołane wzbudzonym jonem etidiowym prowadzi do uaktywnienia mechanizmu naprawczego NER (ang. *Nucleotide Excision Repair*). W tym celu zbadano, czy w miejscach uszkodzenia następuje rekrutacja czynnika transkrypcyjnego TFIIH (ang. *Transcription Factor II H*), który uczestniczy w obydwu drogach naprawy NER: TC-NER oraz GG-NER. Uzyskane wyniki dowodzą, że TFIIH nie gromadzi się w miejscu uszkodzenia (Rapp i wsp., 2009 – praca w przygotowaniu). A zatem, w badanym układzie doświadczalnym generowane wzbudzonym jonem etidiowym uszkodzenia nie są naprawiane na drodze NER.

W kolejnych eksperymentach sprawdzono, czy w obszarze uszkodzonym dochodzi do pęknięć nici DNA. Wykazano, iż w miejscu uszkodzenia gromadzi się kompleks białkowy RPA (Zarębski 2008). Kompleks RPA w miejscu podwójnych pęknięć nici DNA (ang. *DNA double-strand breaks*, DSBs) w obrazie mikroskopowym widoczny jest w postaci punktowych skupisk tego białka. Skupiska RPA odpowiadają jednoniciowemu DNA, które stanowi stadium pośrednie naprawy DSBs na drodze HR (Bekker-Jensen i wsp., 2006). Wykazano również, że miejsca uszkodzenia wyznakowane są γ H2A.X, tzn. ufosforylowaną formą histonu H2A.X (Zarębski 2008). Modyfikacje w obrębie histonów zachodzą w odpowiedzi na różnorodne uszkodzenia DNA (Altaf i wsp., 2007). Fosforylacja histonu H2A.X jest elementem wczesnej odpowiedzi komórki na powstanie podwójnych pęknięć nici DNA (Rogakou i wsp., 1998; Rogakou i wsp., 1999; Thiriet i Hayes 2005). Wiadomo bowiem, że γ H2A.X flankuje miejsca DSBs, stabilizuje luźne końce uszkodzonego DNA (Paull i wsp., 2000), oraz stanowi sygnał do akumulacji innych białek naprawczych (Celeste i wsp., 2003). W nieuszkodzonych jądrach komórkowych obecne są zawsze niewielkie obszary zawierające γ H2A.X, powstałe w wyniku działania wewnętrznych czynników uszkodzających (Vilenchik i Knudson 2003; Huang i wsp., 2004). Indukowane wzbudzonym jEt obszary lokalnego uszkodzenia zawierają duże skupiska γ H2A.X. Wysokie stężenie ufosforylowanego histonu H2A.X świadczyć może o tym, że w miejscach tych generowane są podwójne pęknięcia nici DNA.

Wyniki kolejnych doświadczeń wykazały, że w miejscu uszkodzenia zachodzi rekrutacja Rad51 (Zarębski 2008). Białko naprawcze Rad51 uczestniczy w naprawie DSBs na drodze rekombinacji homologicznej (ang. *Homologous Recombination*, HR). W mechanizmie HR zachodzi bezbłędna naprawa DNA i uszkodzona nić DNA zostaje odtworzona w reakcji rekombinacji z nieuszkodzoną nicią DNA chromatydy siostrzanej. Uczestniczące w tym procesie białka gromadzą się w postaci skupisk i stabilizują jednoniciowe DNA (ssDNA), powstałe w stadiach pośrednich naprawy DSBs (Wold i wsp., 1997; Iftode i wsp., 1999). W skupiskach tych obecne są zarówno białka naprawcze (Rad51, Rad52, BRCA2, itp.), kinaza ATM jak i kompleks białkowy RPA (Bekker-Jensen i wsp., 2006). Można zatem wnioskować, iż generowane przez wzbudzony jon etidiowy uszkodzenie prowadzi do powstania DSBs, które najprawdopodobniej naprawiane są na drodze rekombinacji homologicznej.

Podsumowując, w opisanych powyżej badaniach, w których uszkodzenia DNA wywoływano z udziałem jEt i światła zielonego, udowodniono, że wzbudzony światłem jon etidiowy powoduje: 1) utlenianie zasad i aktywację drogi naprawy BER, oraz 2) powstawanie DSBs, zapewne tylko przy wyższych dawkach światła wzbudzającego (w niektórych eksperymentach nie obserwowano γ H2A.X w obszarach uszkodzenia, przypuszczać można, iż w miejscach tych zachodziło tylko utlenianie zasad), które naprawiane są na drodze rekombinacji homologicznej HR, a 3) naprawa wywołanych tą metodą uszkodzeń nie zachodzi w wyniku aktywacji szlaku naprawczego NER. W układzie tak generowanych uszkodzeń autorka rozprawy kontynuowała rozpoczęte w pracy magisterskiej eksperymenty, mające na celu zweryfikowanie hipotezy o potencjalnej roli białka HP1 w naprawie uszkodzenia DNA (Wiernasz 2004) i udzielenie odpowiedzi na pytanie, jaka jest funkcja białka HP1 nagromadzonego w miejscu uszkodzenia.

4.1.2 Wykrycie akumulacji białek heterochromatynowych HP1 w obszarach lokalnego uszkodzenia chromatyny indukowanego wzbudzonym jonem etidiowym

Zapoczątkowane w pracy magisterskiej (Wiernasz 2004) doświadczenia wykazały, że białko HP1 ulega gromadzeniu w obszarach indukowanego wzbudzonym fotouczulaczem (EtBr), lokalnego uszkodzenia chromatyny jądrowej. Zastosowane wówczas warunki uszkodzenia nie były jednak zoptymalizowane i stosowano bardzo wysokie stężenia fotouczulacza, rzędu 500-1000 nM. Przeprowadzone zatem zostały dokładniejsze badania procesu gromadzenia białka HP1 w warunkach zoptymalizowanego (Wyniki 4.1.1), ściśle kontrolowanego, lokalnego, subletalnego uszkodzenia chromatyny jądrowej.

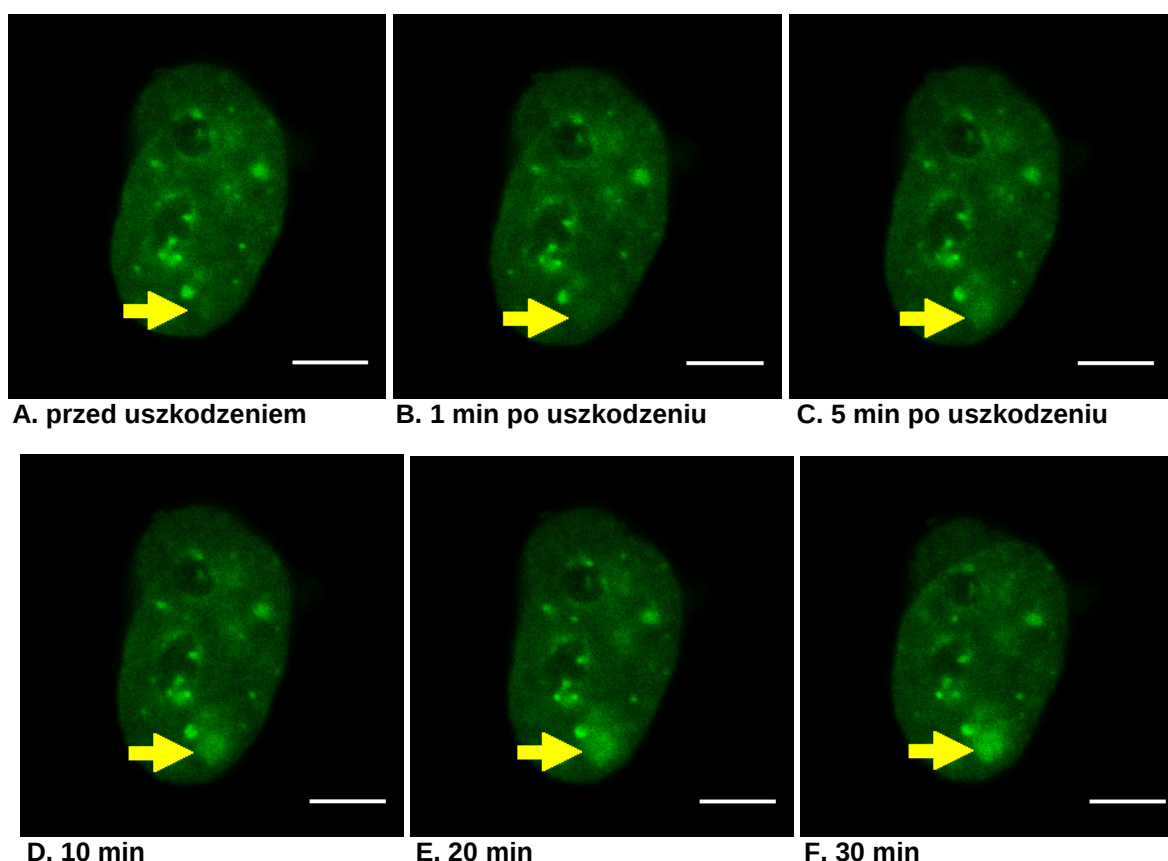
4.1.2.1 Wykrycie akumulacji białka HP1 α w miejscu uszkodzenia

Serię eksperymentów rozpoczęto od zbadania zmian stężenia izoformy HP1 α w odpowiedzi na lokalne uszkodzenie chromatyny. Użyto komórek HeLa, które poddano przejściowej transfekcji (*Materiały i metody 3.2.3.1*) konstruktem białka fuzyjnego EGFP-LacR-AscI-HP1 α -NLS (*Materiały i metody 3.1.2*) (Rys. 4.1), a następnie inkubowano 20 min z fotouczulaczem (EtBr) w stężeniu 100 nM. Następnie, skupiona wiązka światła zielonego

(514 nm) użyta została do wprowadzenia lokalnego uszkodzenia chromatyny (obszar uszkodzenia zaznaczono żółtą strzałką) (*Materiały i metody 3.2.4*).

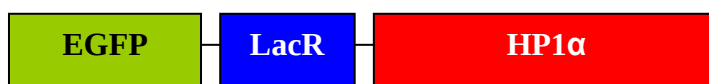
W celu śledzenia zmian jądrowego rozkładu białka HP1 α , po wprowadzeniu uszkodzenia, dokonano czasowych (30 min) pomiarów zmian intensywności fluorescencji EGFP. Poniższe obrazy (Ryc. 4.2) ukazują rozkład białka fuzyjnego EGFP-LacR-HP1 α w jądrze komórkowym HeLa.

HP1 α



Rycina 4.2. Zmiany w rozmieszczeniu białka HP1 α po wprowadzeniu lokalnego uszkodzenia

Obrazy jądra komórki wykazującej ekspresję białka EGFP-LacR-HP1 α , w której wywołano lokalne uszkodzenie chromatyny w wyniku 20 min inkubacji z EtBr (100 nM) i ekspozycji na światło o długości fali 514 nm. **(A)** Obraz zarejestrowany tuż przed wprowadzeniem lokalnego uszkodzenia, **(B)** po 1 min od naświetlania wskazanego żółtą strzałką obszaru wewnątrz jądra. Naświetlanie spowodowało blaknięcie GFP oraz lokalne uszkodzenie DNA. **(C)** Po 5 min, **(D)** 10 min, **(E)** 20 min, oraz **(F)** po 30 min od wywołania uszkodzenia. Odcinek skalujący 5 μ m.



(N)**EGFP**(C) - (N)**LacR**(C) *AscI*- (N-terminus)**HP1α** (C-terminus)-**NLS**

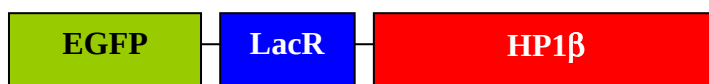
Rysunek 4.1. Schemat konstrukt białka fuzyjnego EGFP-LacR-HP1α

Schematyczny rysunek użytego do transfekcji plazmidu zawierającego konstrukt białka fuzyjnego, w którym EGFP oraz LacR znajdują się na N-końcu białka HP1α, zaś C-koniec pozostaje wolny.

Zauważyć można (Ryc. 4.2), że w miejscu fotouszkodzenia dochodzi do lokalnego nagromadzenia białka HP1α, a już po 5 min od uszkodzenia następuje wyraźne zwiększenie lokalnego stężenia białka w obszarze uszkodzonym (Ryc. 4.2.C), w porównaniu ze stanem początkowym (Ryc. 4.2.A).

4.1.2.2 Wykrycie akumulacji białka HP1β w miejscu uszkodzenia

W kolejnych eksperymentach sprawdzono, jak w odpowiedzi na lokalne uszkodzenie zachowuje się izoforma HP1β. Komórki HeLa przejściowo ztransfekowano (*Materiały i metody 3.2.3.1*) konstrukt białka fuzyjnego EGFP-LacR-*AscI*-HP1β-NLS (*Materiały i metody 3.1.2*) (Rys. 4.2) i lokalnie uszkodzono (*Materiały i metody 3.2.4*).

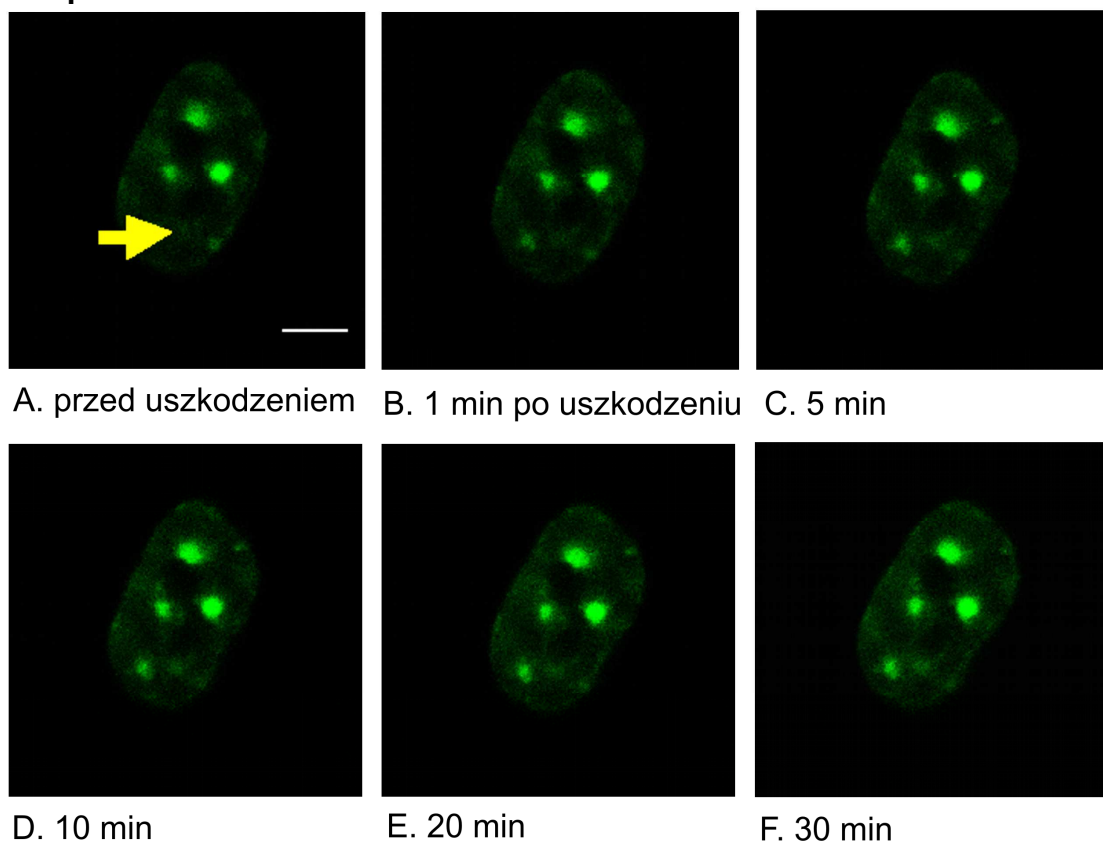


(N)**EGFP**(C) - (N)**LacR**(C) *AscI*- (N-terminus)**HP1β** (C-terminus)-**NLS**

Rysunek 4.2. Schemat konstrukt białka fuzyjnego EGFP-LacR-HP1β

Schematyczny rysunek użytego do transfekcji plazmidu zawierającego konstrukt białka fuzyjnego, w którym EGFP oraz LacR znajdują się na N-końcu białka HP1β, zaś C-koniec pozostaje wolny.

Po wprowadzeniu uszkodzenia śledzono zmiany rozkładu jądrowego białka HP1β, w tym celu dokonywano czasowych (30 min) pomiarów zmian intensywności fluorescencji EGFP. Poniższe obrazy (Ryc. 4.3) ukazują rozkład białka fuzyjnego EGFP-LacR-HP1β w jądrze komórkowym.

HP1 β 

Rycina 4.3. Zmiany w rozmieszczeniu białka HP1 β po wprowadzeniu lokalnego uszkodzenia

Obrazy jądra komórki wykazujące ekspresję białka EGFP-LacR-HP1 β , którą poddano lokalnemu uszkodzeniu chromatyny w wyniku 20 min inkubacji z EtBr (100 nM) i ekspozycji na światło o długości fali 514 nm. **(A)** Obraz zarejestrowany tuż przed wprowadzeniem lokalnego uszkodzenia, **(B)** po 1 min od naświetlania wskazanego żółtą strzałką obszaru wewnątrz jądra. Naświetlanie spowodowało blaknięcie GFP oraz lokalne uszkodzenie DNA. **(C)** Po 5 min, **(D)** 10 min, **(E)** 20 min, oraz **(F)** po 30 min od uszkodzenia. Odcinek skalujący 5 μ m.

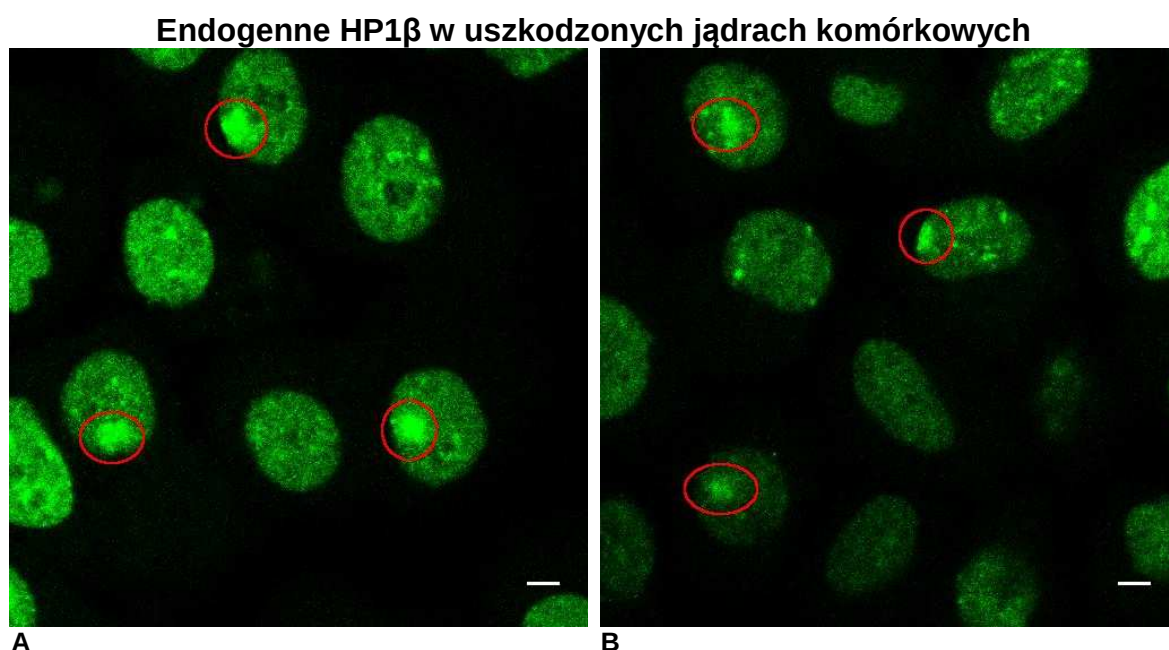
Zauważyć można (Ryc. 4.3), że podobnie jak w przypadku białka HP1 α , w miejscu lokalnego uszkodzenia następuje gromadzenie HP1 β . Również dla tej izoformy, już po 5 min od uszkodzenia następuje wyraźne zwiększenie lokalnego stężenia białka HP1 β w obszarze uszkodzonym (Ryc. 4.3.C), w porównaniu ze stanem początkowym (Ryc. 4.3.A).

4.1.2.3 Wykrycie akumulacji endogennego HP1 β w miejscu uszkodzenia

Opisane w rozdziałach *Wyniki 4.1.2.1 i 4.1.2.2* eksperymenty dowodzą, że w obszarach lokalnego uszkodzenia chromatyny jądrowej następuje nagromadzenie białek fuzyjnych EGFP-LacR-HP1 α i EGFP-LacR-HP1 β . Aby potwierdzić, że obserwowany wzrost intensywności fluorescencji wynika z rekrutacji HP1 i tym samym wykluczyć niespecyficzne oddziaływania składowych konstruktów białka fuzyjnego z obszarem uszkodzonym, postanowiono powtórzyć doświadczenia na komórkach nietransfekowanych i zbadać, czy

rekrutacja występuje również w przypadku endogennego, niemodyfikowanego białka HP1. Użyto komórek HeLa, w których wywołano lokalne uszkodzenie chromatyny (*Materiały i metody 3.2.5*). Komórki utrwalono po 30-90 min od wprowadzenia uszkodzenia i zbadano rozkład HP1 β metodą immunofluorescencji (*Materiały i metody 3.2.5.3*).

Poniższe obrazy (Ryc. 4.4) ukazują rozkład jądrowy wybarwionego immunofluorescencyjnie endogennego białka HP1 β w komórkach uszkodzonych.



Rycina 4.4. Rekrutacja endogennego białka HP1 β do miejsc uszkodzenia

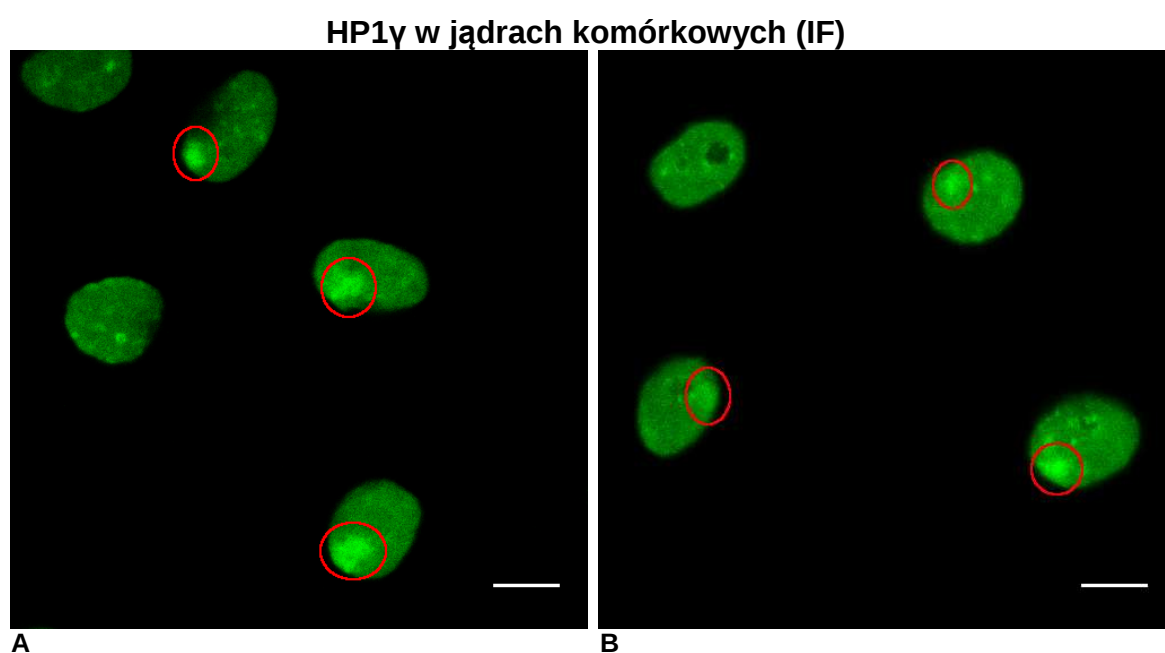
Obrazy dwóch różnych grup komórek HeLa (**A** i **B**), które inkubowano z EtBr (200 nM) i naświetlano światłem zielonym (514 nm) w wybranych rejonach (znajdujących się w środkach czerwonych okręgów), aby wprowadzić lokalne uszkodzenie chromatyny. Następnie, po 30-90 min od wprowadzenia uszkodzenia, komórki utrwalono i wybarwiono immunofluorescencyjnie przy użyciu przeciwciał anti-HP1 β . W obszarach uszkodzenia następuje gromadzenie białka HP1 β . Odcinek skalujący 5 μ m.

Zauważyć można, że w obszarach uszkodzeń chromatyny następuje lokalne nagromadzenie endogennego białka HP1 β (Ryc. 4.4). Takie same wyniki uzyskano dla białka fuzyjnego EGFP-LacR-HP1 β w żywych komórkach. Przypuszczać zatem można, że podobnie jak obserwowano rekrutację białka fuzyjnego EGFP-LacR-HP1 α , zachodzić również będzie gromadzenie endogennego białka HP1 α . Kolejne eksperymenty pokazały istotnie gromadzenie endogennego białka HP1 α (Rapp i wsp., 2009 – praca w przygotowaniu).

4.1.2.4 Wykrycie akumulacji endogennego HP1 γ w miejscu uszkodzenia

Wyniki opisanych w rozdziale Wyniki 4.1.2.3 eksperymentów pokazują, że uszkodzeniu chromatyny towarzyszy rekrutacja endogennego białka HP1 β . Postanowiono zatem sprawdzić, czy izoforma białka HP1 γ również ulega gromadzeniu w miejscu uszkodzenia. Użyto komórek HeLa, które lokalnie uszkadzano (*Materiały i metody 3.2.5*), a następnie metodą immunofluorescencji (*Materiały i metody 3.2.5.4*) zbadano rozmieszczenie HP1 γ .

Na poniższych obrazach (Ryc. 4.5) przedstawiono rozkład jądrowy endogennego białka HP1 γ w komórkach uszkodzonych.



Rycina 4.5. Rekrutacja endogennego białka HP1 γ do miejsc uszkodzenia

Obrazy dwóch różnych grup komórek HeLa (**A i B**), które inkubowano z EtBr (200 nM) i naświetlano światłem zielonym (514 nm) w wybranych rejonach (znajdujących się w środkach czerwonych okręgów), aby wprowadzić lokalne uszkodzenie chromatyny. Następnie, po 30-90 min od wprowadzenia uszkodzenia, komórki utrwalono i wybarwiono immunofluorescencyjnie przy użyciu przeciwciał anti-HP1 γ . W obszarach uszkodzenia następuje gromadzenie białka HP1 β . Odcinek skalujący 10 μ m.

W obszarze uszkodzonym zauważyć można zwiększone stężenie endogennego białka HP1 γ (Ryc. 4.5). Podsumowując, w zamieszczonych powyżej podrozdziałach przedstawiono dane dowodzące, że w obszarze uszkodzonym następuje lokalne nagromadzenie wszystkich trzech izoform białka: HP1 α , HP1 β oraz HP1 γ , zarówno endogennego, jak i fuzyjnego.

4.1.3 Brak gromadzenia EGFP-HP1 α w nieobecności fotouczulacza

Wykonano serię doświadczeń kontrolnych, w których sprawdzano, w jakich warunkach zachodzi lub nie zachodzi gromadzenie białka HP1. Postanowiono również sprawdzić, w jaki sposób uszkodzenie wywoływane w opisanych tu eksperymentach wpływa na komórki.

Wykonane we współpracy z dr. M. Zarębskim doświadczenia wykazały, iż stężenie bromku etidiowego rzędu 100-200 nM w niewielkim tylko stopniu spowalnia tempo wzrostu komórek, natomiast użycie samego światła zielonego nie wpływa na tempo wzrostu (Zarębski 2008). Komórki traktowane zarówno bromkiem etidiowym, jak i światłem zielonym zachowują zdolność do formowania kolonii, choć rosną one wolniej. Ten rodzaj uszkodzenia jest zatem uszkodzeniem subletalnym. Wykazano, iż gromadzenia HP1 w rejonie uszkodzonej chromatyny zależy od dawki światła wzbudzającego zinterkalowany jEt. Użycie większej dawki światła powoduje silniejsze uszkodzenie i wyższe lokalne stężenie białka HP1, nagromadzonego w obszarze uszkodzonym (Zarębski 2008). Należy jednak zaznaczyć, iż niskie natężenie światła wzbudzającego fotouczulacz generuje zbyt mało uszkodzeń i nieznaczne gromadzenie HP1, poniżej progu detekcji mikroskopu. Natomiast wysokie natężenie generuje zbyt wiele uszkodzeń, aby wywołać fizjologiczną odpowiedź komórki. M. Zarębski wykazał również, iż akumulacja HP1 zachodzi przy stężeniu EtBr w zakresie 25-2500 nM. Ponadto, gromadzenie HP1 obserwowane było zarówno w jądrowych obszarach o niewielkim zagęszczeniu chromatyny (euchromatynie), jak i w obszarach o większym zagęszczeniu chromatyny (heterochromatynie) (Zarębski 2008).

Wydaje się zatem logiczne, że w nieobecności fotouczulacza lub światła wzbudzającego jon etidiowy, nie będzie następować rekrutacja białka HP1. W celu potwierdzenia tej hipotezy przeprowadzono doświadczenia kontrolne, w których nie użyto jonu etidiowego.

Aby zbadać odpowiedź białka HP1 w warunkach bez EtBr, użyto komórek HeLa, które poddano przejściowej transfekcji (*Materiały i metody 3.2.3.1*) konstruktem białka fuzyjnego EGFP-LacR-HP1 α lub EGFP-LacR-HP1 β (*Materiały i metody 3.1.2*). Pomijając etap inkubacji komórek z EtBr wykonano naświetlanie wybranego obszaru jądra skupioną

wiązką światła o długości fali 514 nm. Po dokonaniu naświetlania wykonano czasowe pomiary zmian jądrowego rozkładu białka HP1 α lub HP1 β , śledząc zmiany natężenia fluorescencji EGFP (*Materiały i metody* 3.2.4.2-3.2.4.4). Wykazano, że w nieobecności EtBr, po lokalnym naświetlaniu skupioną wiązką światła zielonego (514 nm), nie następuje rekrutacja białek HP1 do naświetlanych obszarów chromatyny (Wiernasz 2004).

A zatem, w nieobecności fotouczulacza, i przypuszczać można, że również w obecności fotouczulacza niewzbudzonego (w stanie podstawowym, bez naświetlania światłem zielonym o długości fali 514 nm), nie następuje rekrutacja, ani też zmiana rozkładu białka HP1 w jądrze komórkowym. Wykonane eksperymenty dowodzą, iż obecność wzbudzonego jonu etidiowego, zinterkalowanego do DNA i RNA, jest warunkiem koniecznym, aby mogła zajść rekrutacja HP1. Wiadomo bowiem, iż jon etidiowy fluoryzuje po związaniu z kwasami nukleinowymi, z kolei fluorescencja niezwiązanego jonu w roztworze jest bardzo słaba (wydajność kwantowa fluorescencji jest niska) (Baguley i Falkenhaus 1978). Podkreślić należy, że w metodzie tej wywoływane zostaje nie tylko uszkodzenie chromatyny, lecz także innych obszarów komórki, przez które przechodzi wiązka światła. Wiadomo, że znajdujący się w komórce jEt wykazuje powinowactwo do dwuniciowych kwasów nukleinowych (DNA, RNA), obecnych w jądrze komórkowym, jak i cytoplazmie. Jednakże, natężenie światła (514 nm) w miejscu zogniskowania wiązki w jądrze komórkowym jest wyższe niż w rejonach powyżej i poniżej tego obszaru, a tym samym wywołane w chromatynie uszkodzenie jest znacznie większe niż w cytoplazmie.

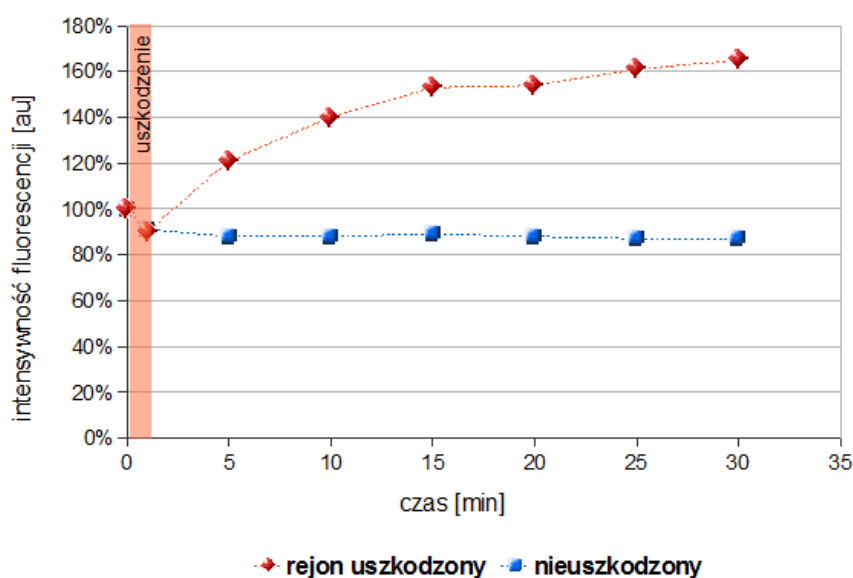
4.1.4 Badanie procesu gromadzenia białek HP1 w obszarach lokalnego uszkodzenia chromatyny indukowanego wzbudzonym jonem etidiowym

Wyniki doświadczeń, zaprezentowane w poprzednim podrozdziale (*Wyniki* 4.1.2), dowodzą, iż w rejonach fotouczulanego uszkodzenia chromatyny jądrowej, wywołanego wzbudzonym jonem etidiowym, zachodzi lokalne gromadzenie wszystkich trzech izoform heterochromatynowego białka (HP1 α , HP1 β , HP1 γ). Aby scharakteryzować proces gromadzenia białek HP1 postanowiono zbadać tempo indukowanych uszkodzeniem, lokalnych zmian stężeń białek HP1, znakowanych GFP.

4.1.4.1 Badanie tempa akumulacji białek EGFP-HP1 α oraz EGFP-HP1 β w miejscu uszkodzenia

Tę serię doświadczeń rozpoczęto od zbadania tempa gromadzenia dwóch izoform białka: HP1 α oraz HP1 β . Komórki HeLa ztransfekowano (*Materiały i metody 3.2.3.1*) plazmidem EGFP-LacR-HP1 α (*Materiały i metody 3.1.2*) lub plazmidem EGFP-LacR-HP1 β (*Materiały i metody 3.1.2*) i lokalnie uszkadzano (*Materiały i metody 3.2.4.1-3.2.4.4*). Prowadzono pomiary zmian intensywności fluorescencji pochodzącej od EGFP. Wyniki pomiarów przedstawiono na wykresach, osobno dla EGFP-LacR-HP1 α (Rys. 4.3) oraz EGFP-LacR-HP1 β (Rys. 4.4).

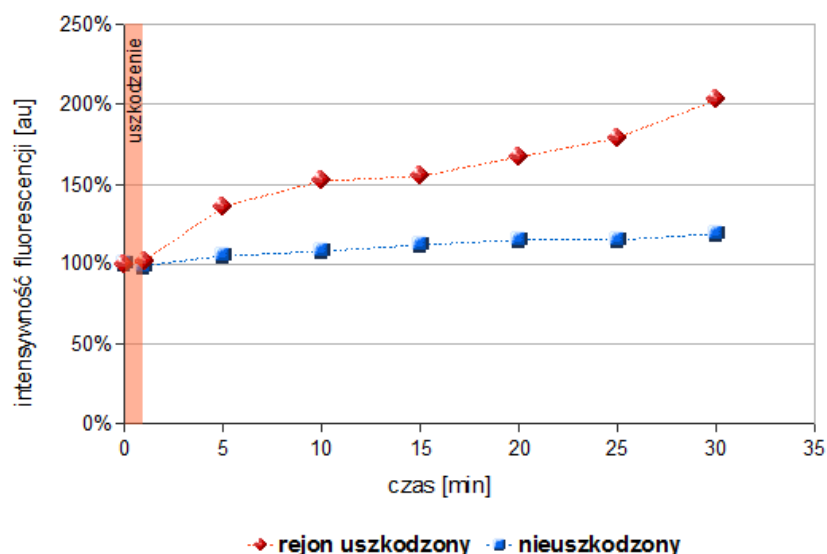
Rekrutacja białka EGFP-LacR-HP1 α do miejsc lokalnego uszkodzenia



Rysunek 4.3. Gromadzenie białka HP1 α w uszkodzonym obszarze chromatyny

Wykres przedstawia zmiany intensywności fluorescencji białka EGFP-LacR-HP1 α w uszkodzonym (czerwony), oraz w nieuszkodzonym (niebieski) obszarze jądra. Wartości intensywności fluorescencji znormalizowano do wartości początkowej (przed uszkodzeniem) i wyrażono je w procentach, przyjmując wartość intensywności fluorescencji przed uszkodzeniem (czas 0 min) jako 100%.

Rekrutacja białka EGFP - LacR - HP1 β do miejsc lokalnego uszkodzenia



Rysunek 4.4. Gromadzenie białka HP1 β w uszkodzonym obszarze chromatyny

Wykres przedstawia zmiany intensywności fluorescencji białka EGFP-LacR-HP1 β w uszkodzonym (czerwony), oraz w nieuszkodzonym (niebieski) obszarze jądra. Wartości intensywności fluorescencji znormalizowano do wartości początkowej (przed uszkodzeniem) i wyrażono je w procentach, przyjmując wartość intensywności fluorescencji przed uszkodzeniem (czas 0 min) jako 100%.

Na powyższych wykresach zależności intensywności fluorescencji od czasu (Rys. 4.3 i Rys. 4.4) zauważyć można, że po początkowym spadku intensywności fluorescencji w obszarze uszkodzonym (krzywa czerwona), spowodowanym fotobłaknięciem GFP i wymianą GFP-HP1 α oraz GFP-HP1 β między związaną, a rozpuszczalną pulą HP1 (Schmiedeberg i wsp., 2004), następuje „odbudowanie” poziomu intensywności fluorescencji na skutek dynamicznej wymiany białka. Zauważyć można (Rys. 4.3 i Rys. 4.4), że już po kilku minutach od uszkodzenia następuje zwiększenie lokalnego stężenia białka HP1 α oraz HP1 β w obszarach uszkodzonych, powyżej poziomu wyjściowego. Gromadzenie obydwu izoform HP1 α oraz HP1 β zachodzi przez kilkadziesiąt minut po uszkodzeniu, a najwyższe lokalne stężenie nagromadzonego białka HP1 α (w tym przypadku na poziomie 160%) zaobserwowano po 30-40 min od uszkodzenia, z kolei najwyższe lokalne stężenie nagromadzonego HP1 β (w tym przypadku na poziomie 200%) zaobserwowano po 30 min od uszkodzenia.

Zaznaczyć należy, że w przypadku innych komórek ztransfekowanych plazmidem EGFP-LacR-HP1 α (dane nie zamieszczone), najwyższe zaobserwowane lokalne stężenie HP1 α w obszarze uszkodzonym znajdowało się na poziomie 130-250%. Ponadto,

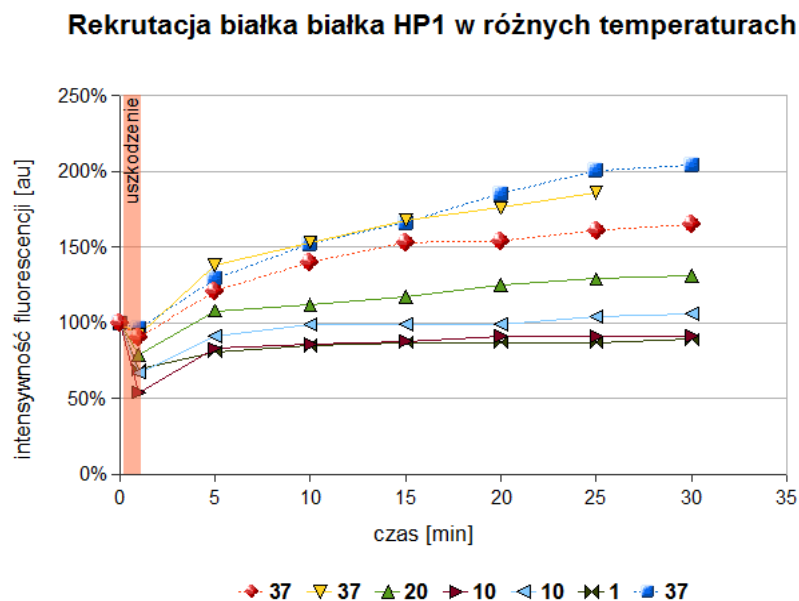
obserwowany na Rys. 4.4 niewielki wzrost intensywności fluorescencji GFP w obszarze nieuszkodzonym (niebieska krzywa na wykresie) wynikać może z nieznacznych ruchów płaszczyzny konfokalnej podczas prowadzenia pomiarów.

Podsumowując, zauważyć można, iż tempo gromadzenia białka HP1 α wydaje się być znacznie wolniejsze w porównaniu z tempem gromadzenia niektórych białek naprawczych (Rapp i wsp., 2009 – praca w przygotowaniu).

4.1.5 Badanie zależności tempa gromadzenia białka HP1 od temperatury

Z opisanych w poprzednich podrozdziałach doświadczeń wynika, że wzbudzenie zinterkalowanego do DNA jEt powoduje uszkodzenie i indukuje rekrutację białek HP1 do uszkodzonych rejonów chromatyny. Zaobserwowano gromadzenie wszystkich trzech izoform białka (HP1 α , HP1 β , oraz HP1 γ). Co więcej, wykazano, że rekrutacja HP1 nie zachodzi w nieobecności fotouczulacza, albo światła wzbudzającego fluorescencję EtBr. Gromadzenie białka HP1 może być zatem częścią procesu DDR, tj. komórkowej odpowiedzi na uszkodzenie DNA (ang. *DNA Damage Response*).

Kolejne eksperymenty zaplanowano w ten sposób, aby można było sprawdzić, czy gromadzenie HP1 jest naturalną reakcją fizjologiczną komórki i wykluczyć artefakt doświadczalny. Ponieważ procesy enzymatyczne wykazują specyficzną zależność temperaturową, w przeciwieństwie do procesów nieenzymatycznych (Lehninger 1979; Szewczyk 1993; Murray i wsp., 2005), postanowiono sprawdzić do której grupy procesów należy rekrutacja HP1. Zbadano zatem, czy proces gromadzenia HP1 zależy od temperatury i czy obniżenie temperatury ma wpływ na tempo rekrutacji białka. W tym celu użyto komórek HeLa, które poddano przejściowej transfekcji (*Materiały i metody 3.2.3.1*) plazmidem EGFP-LacR-HP1 α (*Materiały i metody 3.1.2*), a następnie lokalnie uszkodzono (*Materiały i metody 3.2.4*). Wywoływanie uszkodzenia, oraz następujące po nim pomiary zmian lokalnego stężenia HP1 prowadzono w różnych temperaturach: 37°C, 20°C, 10°C i 1°C. Uzyskane wyniki wpływu temperatury na tempo gromadzenia białka HP1 przedstawiono w postaci wykresu zmian intensywności fluorescencji GFP od czasu (Rys. 4.5). Poniższy wykres zawiera 7 krzywych, które obrazują zachodzące w różnych temperaturach zmiany intensywności fluorescencji GFP-HP1 α w obszarze uszkodzonym.



Rysunek 4.5. Temperaturowa zależność gromadzenia białka HP1α w obszarach lokalnego uszkodzenia chromatyny

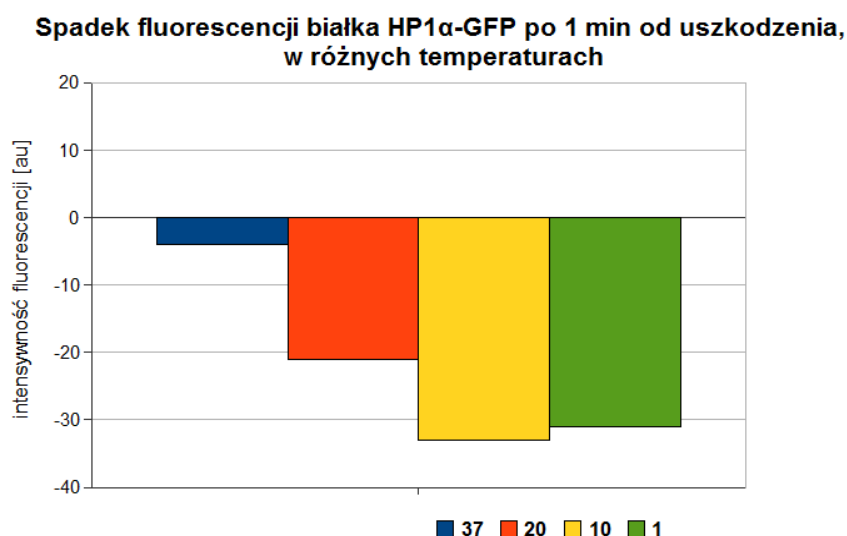
Wykres przedstawia zmiany intensywności fluorescencji białka EGFP-LacR-HP1α w obszarze uszkodzonym, w różnych temperaturach (37°C, 20°C, 10°C i 1°C). Wartości intensywności fluorescencji znormalizowano do wartości początkowej (przed uszkodzeniem) i wyrażono je w procentach, przyjmując wartość intensywności fluorescencji przed uszkodzeniem (czas 0 min) jako 100%.

Analizując Rys. 4.5 zauważyć można, że zarówno proces dynamicznej wymiany białka w obszarze naświetlonym, jak i rekrutacji HP1α w miejscu uszkodzenia silnie zależą od temperatury. Po początkowym spadku intensywności fluorescencji spowodowanym przez fotobłaknięcie, następuje wzrost intensywności fluorescencji białka wynikający z dynamicznej wymiany z pulą rozpuszczalną (Schmiedeberg i wsp., 2004). W niższej temperaturze (1°C, 10°C, 20°C) proces dynamicznej wymiany białka, i tym samym odzyskania intensywności fluorescencji GFP w naświetlonym obszarze chromatyny, zachodzi znacznie wolniej, w porównaniu z temp. 37°C. W przypadku temp. 1°C poziom intensywności fluorescencji GFP nie zostaje odbudowany nawet po 30 min od naświetlania.

Wpływ temperatury na proces gromadzenia HP1 w miejscu uszkodzenia jest również widoczny. Rekrutacja HP1 w obszarze uszkodzonym zachodzi w warunkach fizjologicznych (37°C), z kolei w niższych temperaturach proces ten zachodzi znacznie wolniej (20°C) lub wcale nie zachodzi (1°C, 10°C). Po 30 min od uszkodzenia, lokalne stężenie nagromadzonego w obszarze uszkodzonym białka HP1 w temp. 20°C jest znacznie niższe, w porównaniu ze stężeniem białka nagromadzonego w temp. 37°C.

Uzyskane wyniki przedstawiono również w postaci wykresów słupkowych intensywności fluorescencji w obszarze uszkodzonym, dla różnych temperatur, po czasie 1 min, 10 min, oraz 20 min od wprowadzenia uszkodzenia (Rys. 4.6-4.8). Zaznaczyć należy, że słupki na wykresach opisują wypadkową blaknięcia oraz dynamicznej wymiany białka.

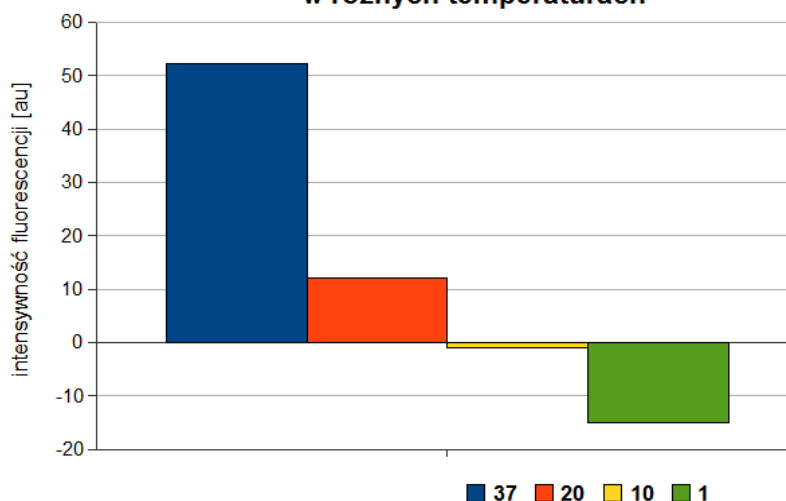
Rys. 4.6-4.8 potwierdzają, iż rekrutacja białka HP1 α w obszarze lokalnego uszkodzenia chromatyny zależy silnie od temperatury. Wpływ ten widoczny jest w każdym punkcie czasowym. Obniżenie temp. do 20°C wywiera ogromny wpływ na rekrutację (Rys. 4.8) i sprawia, że poziom nagromadzonego (po 25 min od uszkodzenia) białka nie osiąga tej samej wartości, co w temperaturze 37°C i jest około 70% niższy. Z kolei, poziom nagromadzonego w temp. 10°C białka HP1 jest niższy o około 95% w porównaniu ze stężeniem w temp. 37°C. Należy zaznaczyć, że nie można mówić o gromadzeniu w temp. 1°C, gdyż lokalne stężenie HP1 nie osiąga nawet wartości początkowej (przed wprowadzeniem uszkodzenia).



Rysunek 4.6. Temperaturowa zależność lokalnego stężenia HP1 α po 1 min od uszkodzenia

Na rysunku przedstawiono intensywności fluorescencji białka EGFP-LacR-HP1 α w obszarze uszkodzonym, w różnych temperaturach (37°C, 20°C, 10°C i 1°C), 1 min po uszkodzeniu. Wartości intensywności fluorescencji znormalizowano do wartości początkowej (przed uszkodzeniem, 0%) i wyrażono je w procentach.

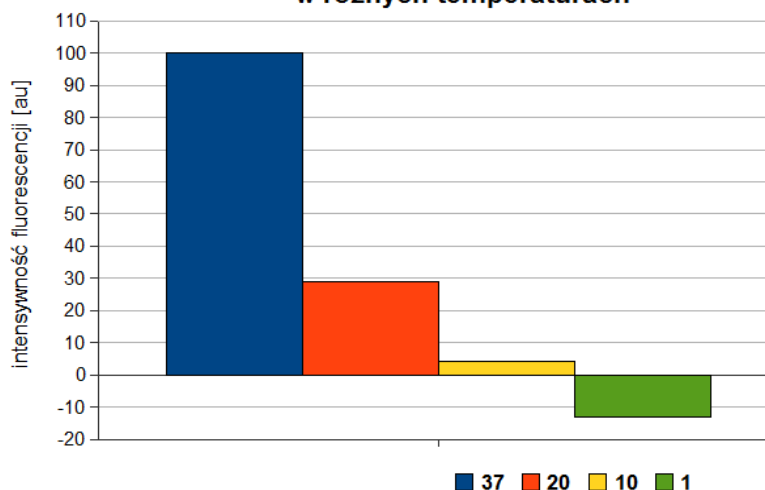
Spadek fluorescencji białka HP1 α -GFP po 10 min od uszkodzenia, w różnych temperaturach



Rysunek 4.7. Temperaturowa zależność lokalnego stężenia HP1 α po 10 min od uszkodzenia

Na rysunku przedstawiono intensywności fluorescencji białka EGFP-LacR-HP1 α w obszarze uszkodzonym, w różnych temperaturach (37°C, 20°C, 10°C i 1°C), 10 min po uszkodzeniu. Wartości intensywności fluorescencji znormalizowano do wartości początkowej (przed uszkodzeniem, 0%) i wyrażono je w procentach.

Spadek fluorescencji białka HP1 α -GFP po 25 min od uszkodzenia, w różnych temperaturach



Rysunek 4.8. Temperaturowa zależność lokalnego stężenia HP1 α po 25 min od uszkodzenia

Na rysunku przedstawiono intensywności fluorescencji białka EGFP-LacR-HP1 α w obszarze uszkodzonym, w różnych temperaturach (37°C, 20°C, 10°C i 1°C), 25 min po uszkodzeniu. Wartości intensywności fluorescencji znormalizowano do wartości początkowej (przed uszkodzeniem, 0%) i wyrażono je w procentach.

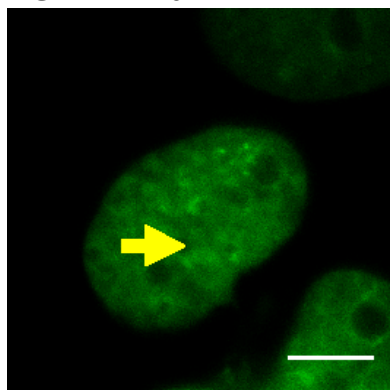
Tego rodzaju temperaturowa zależność rekrutacji białka HP1 sugeruje, że akumulacja HP1 w miejscu uszkodzenia jest kontrolowana w procesie enzymatycznym i nie wydaje się przebiegać na zasadzie prostej adsorpcji. Adsorpcja, jako proces nieenzymatyczny,

wynikający tylko z asocjacji białka z obszarem uszkodzonym, powinna zależeć od temperatury w skali bezwzględnej i miałyby na nią wpływ tylko duże zmiany temperaturowe (Lehninger 1979; Szewczyk 1993; Murray i wsp., 2005). Natomiast w przypadku HP1 już nawet niewielkie obniżenie temperatury silnie wpływa na proces gromadzenia białka. Najprawdopodobniej wynika to z optimum aktywności enzymów wewnątrzkomórkowych, które mieści się w przedziale 30-40°C. A zatem, obserwowany proces to zapewne zjawisko katalizowane enzymatycznie, a nie artefakt polegający na nieenzymatycznej adsorpcji HP1 do uszkodzonej chromatyny.

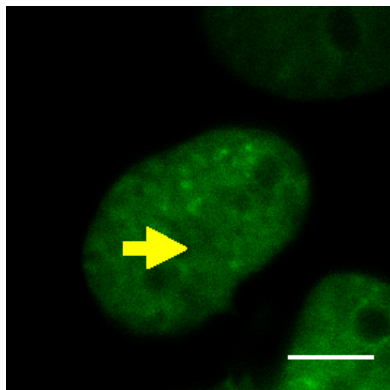
4.1.6 Badanie ruchliwości HP1 nagromadzonego w miejscu uszkodzenia

Wcześniejsze doświadczenia wykazały, że białko HP1 ulega rekrutacji do obszarów lokalnego, indukowanego wzbudzonym jEt uszkodzenia chromatyny jądrowej. Aby lepiej scharakteryzować proces rekrutacji HP1 postanowiono sprawdzić, jak zachowuje się pula nagromadzonego białka, tzn. czy jest ona trwale związana w miejscu uszkodzenia, czy mobilna i podlega wymianie z pulą cząsteczek niezwiązanych. Do przeprowadzenia tych pomiarów zastosowano metodę lokalnego uszkodzenia oraz *FLIP*. Metoda *FLIP* (ang. *Fluorescence Loss In Photobleaching*) wykorzystuje zjawisko fotobłaknięcia i pozwala prowadzić pomiary ubytku intensywności fluorescencji z obszaru, który nie był poddany blaknięciu (Goldman i Spector 2004).

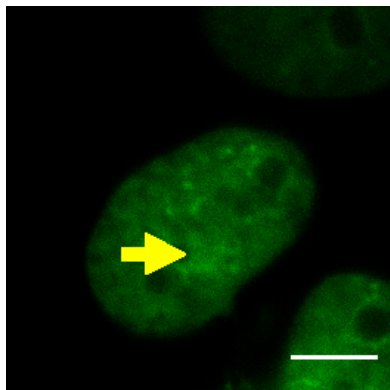
Wykorzystane do doświadczeń komórki poddano przejściowej transfekcji (*Materiały i metody 3.2.3.1*) plazmidem EGFP-LacR-HP1 α (*Materiały i metody 3.1.2*), a następnie lokalnie uszkadzano (*Materiały i metody 3.2.4.1-3.2.4.4*) i prowadzono pomiary zmian intensywności fluorescencji GFP na obszarze całego jądra komórkowego. Następnie wywoływano blaknięcie fluorescencji w określonym, odległym od uszkodzonego, obszarze jądra (*Materiały i metody 3.2.4.5*) i prowadzono pomiary zmian intensywności fluorescencji GFP. Obrazy na Ryc. 4.6 ukazują rozkład białka fuzyjnego EGFP-LacR-HP1 α w jądrze komórkowym przed oraz po uszkodzeniu.

EGFP-HP1 α 

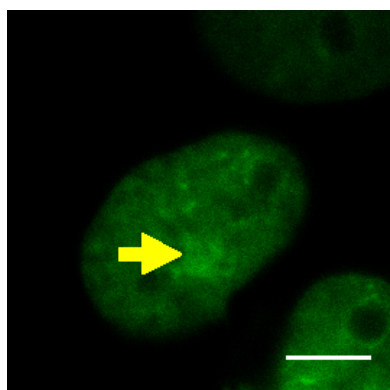
A. przed uszkodzeniem



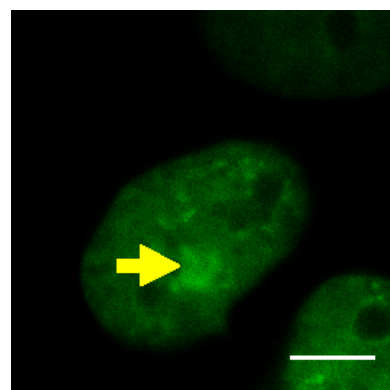
B. 1 min po uszkodzeniu



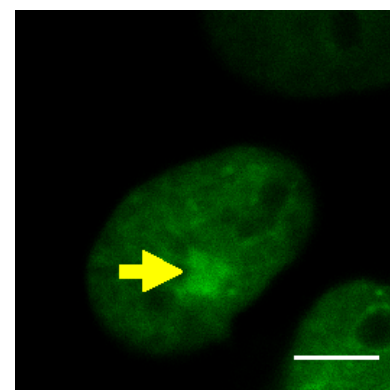
C. po 5 min



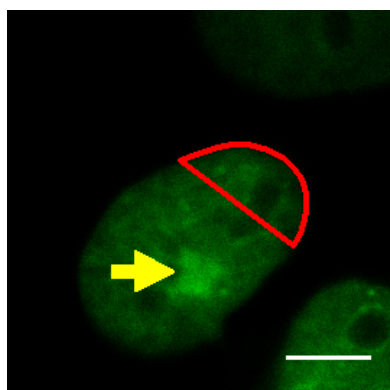
D. po 10 min



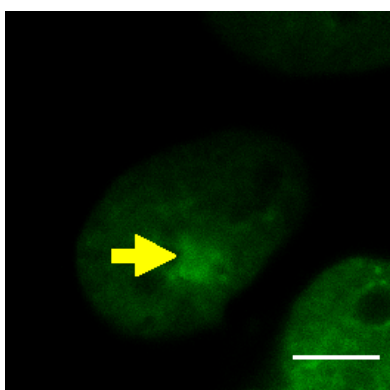
E. po 20 min



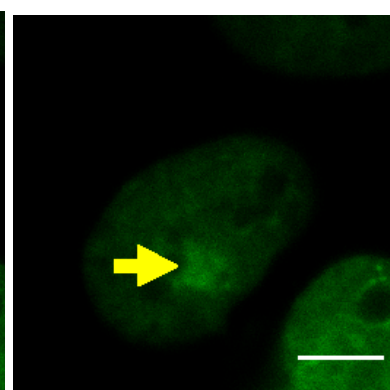
F. po 30 min



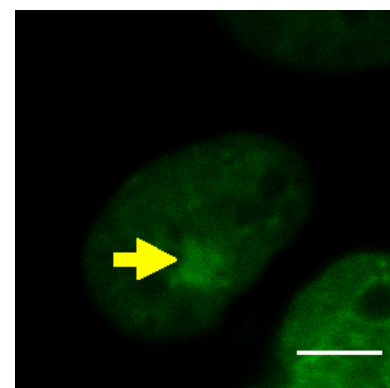
G. przed 1 fotoblaknięciem



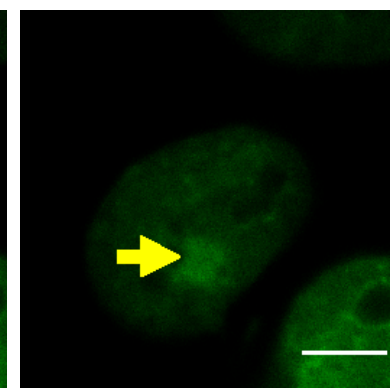
H. 1 min po 1 fotoblaknięciu



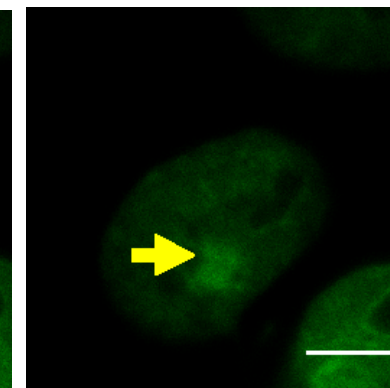
I. po 5 min



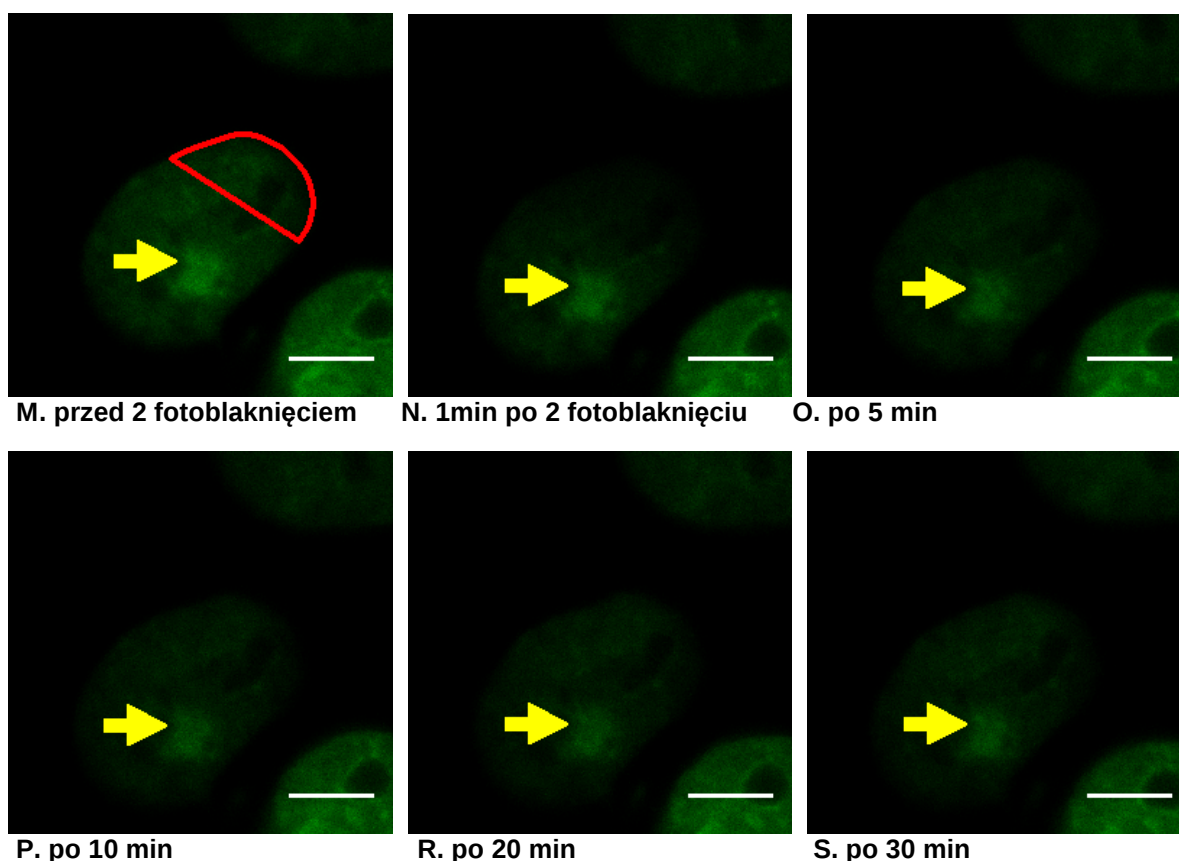
J. po 10 min



K. po 20 min



L. po 29 min



Rycina 4.6. Ruchliwość białka HP1 α w miejscu lokalnego uszkodzenia

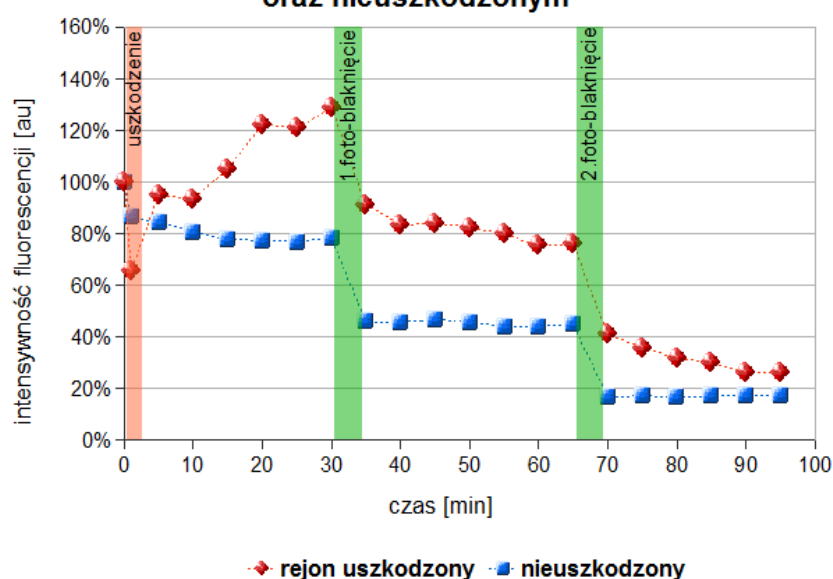
Rycina przedstawia obrazy jądra komórki HeLa, wykazującej ekspresję białka EGFP-LacR-HP1 α , inkubowanej z EtBr (100 nM) i poddanej lokalnemu uszkodzeniu chromatyny. **(A)** Obraz zarejestrowany przed naświetlaniem (514 nm). **(B)** 1 min po naświetlaniu (miejsce naświetlania wskazane żółtą strzałką). **(C)** Po 5 min, **(D)** 10 min, **(E)** 20 min, oraz **(F)** po 30 min od wprowadzenia uszkodzenia. **(G)** Przed wprowadzeniem pierwszego fotoblaknięcia w obszarze o wielkości 1/3 jądra komórkowego (obszar zaznaczony czerwoną linią). **(H)** Po 1 min, **(I)** 5 min, **(J)** 10 min, **(K)** 20 min, oraz **(L)** po 29 min od pierwszego fotoblaknięcia. **(M)** Przed wprowadzeniem drugiego fotoblaknięcia na tym samym obszarze jądra komórkowego (obszar zaznaczony czerwoną linią). **(N)** Po 1 min, **(O)** 5 min **(P)**, 10 min, **(R)** 20 min oraz **(S)** po 30 min od drugiego fotoblaknięcia. Odcinek skalujący 5 μ m.

W miejscu uszkodzenia dochodzi do zwiększenia intensywności fluorescencji na skutek gromadzenia białka HP1 (Ryc. 4.6.C-F). Zauważyć można, że w wyniku pierwszego fotoblaknięcia (1/3 jądra komórkowego) następuje przejściowe zmniejszenie intensywności fluorescencji GFP w obszarze uszkodzonym (Ryc. 4.6.H-L). Dalsze zmniejszenie intensywności fluorescencji w obszarze uszkodzonym następuje również po drugim fotoblaknięciu (Ryc. 4.6.O-S). Zmniejszenie intensywności fluorescencji GFP w obszarze uszkodzonym, które towarzyszy kolejnym cyklom fotoblaknięcia, wynika z mobilności nagromadzonego białka i jego wymiany z pulą rozpuszczalną oraz pulą białka związanego z chromatyną w innych częściach jądra komórkowego. Należy tutaj również zaznaczyć, iż naświetlanie obszaru w prawej górnej połowie jądra, światłem o długości fali 488 nm, w celu wywołania fotoblaknięcia GFP, nie powoduje gromadzenia HP1 w tym obszarze. Pomimo, iż

w jądrze cały czas obecny jest jEt, natężenie światła jest najprawdopodobniej zbyt niskie, zaś długość fali (488 nm) za krótka, aby wzbudzić fotouczulacz na tyle, by w obszarze tym nastąpiło uszkodzenie, objawiające się akumulacją HP1.

Na podstawie uzyskanych wyników sporządzono wykres zmian stężenia białka HP1 (Rys. 4.9), na którym zmiany intensywności fluorescencji EGFP-LacR-HP1 α w obszarze uszkodzonym i nieuszkodzonym przedstawiono w postaci osobnych krzywych.

Intensywność fluorescencji białka HP1 w rejonie uszkodzonym oraz nieuszkodzonym



Rysunek 4.9. Zmiany stężenia białka HP1 po uszkodzeniu oraz fotobłaknięciu
(na podstawie Ryc. 4.6)

Wykres przedstawia zmiany intensywności fluorescencji białka EGFP-LacR-HP1 α w obszarze uszkodzonym (czerwony) oraz w pozostałej, nieuszkodzonej części jądra komórkowego (niebieski). Kolejne cykle fotobłaknięcia (1 i 2) zaznaczono na wykresie linią przerywaną w kolorze zielonym. Wartości intensywności fluorescencji znormalizowano do wartości początkowej (przed uszkodzeniem) i wyrażono je w procentach, przyjmując wartość intensywności fluorescencji przed uszkodzeniem (czas 0 min) jako 100%.

Zauważyć można (Rys. 4.9), że uszkodzenie chromatyny wywołuje lokalną rekrutację białka HP1. Poziom nagromadzonego w ciągu 30 min białka osiągnął 140% wartości początkowej. Po wprowadzeniu pierwszego cyklu fotobłaknięcia dochodzi do zmniejszenia intensywności fluorescencji GFP na terenie jądra komórkowego (niebieska krzywa), czemu towarzyszy również zmniejszenie intensywności fluorescencji GFP w obszarze uszkodzonym (czerwona krzywa). Po kolejnym, drugim cyklu fotobłaknięcia następuje dalsze zmniejszenie

intensywności fluorescencji na terenie całego jądra komórkowego oraz w obszarze uszkodzonym.

Po kolejnych cyklach fotobłaknięcia, w rejonie uszkodzonym zmniejsza się stężenie nagromadzonego białka, jednakże wciąż obecna jest pula nagromadzonego HP1, tzn. lokalne stężenie EGFP-LacR-HP1 α jest wyższe niż w otoczeniu (Rys. 4.9). Obserwacje te sugerują, iż zgromadzone w miejscu uszkodzenia białko podlega ciągłej wymianie z cząsteczkami białka HP1 z puli niezwiązanej. Najprawdopodobniej, HP1 zgromadzone w miejscu uszkodzonym nie jest związane trwale, lecz podlega wymianie z pulą niezwiązaną, podobnie jak HP1 związane ze zmetylowanymi ogonami histonowymi w heterochromatynie, choć mechanizm wiązania może być inny.

4.1.7 Pomiary gromadzenia różnych wariantów białka fuzyjnego HP1 „z zablokowanymi sterycznie końcami”

Wyniki opisanych powyżej doświadczeń dowodzą, że wszystkie trzy izoformy HP1 ulegają gromadzeniu w rejonach lokalnego, fotouczulanego uszkodzenia chromatyny jądrowej. Wiadomo, że białka HP1 zawierają trzy domeny: N-kończową chromodomenę (CD), C-kończową domenę chromoshadow (CSD) oraz znajdujący się pomiędzy domenami region zawiasowy. Pojawia się zatem pytanie, czy w rekrutacji HP1 zaangażowana jest bezpośrednio cała cząsteczka, czy tylko jedna domena białka. Szukając odpowiedzi na to pytanie, w opisanych w tym rozdziale eksperymentach postanowiono sprawdzić, czy dostępność steryczna końców HP1 wpływa na rekrutację białka do rejonów lokalnego uszkodzenia chromatyny.

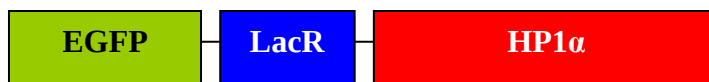
4.1.7.1 Badanie rekrutacji białka „HP1 z zablokowanym N-końcem”

W eksperymentach wykorzystano różne warianty białka fuzyjnego HP1 (Rys. 4.10). Serię doświadczeń rozpoczęto od powtórnego przeprowadzenia doświadczeń nad gromadzeniem białka „HP1 z zablokowanym N-końcem” (Rys. 4.10.a), w którym EGFP oraz LacR znajdują się na N-końcu białka HP1, zaś C-koniec pozostaje wolny.

Komórki HeLa poddano przejściowej transfekcji (*Materiały i metody 3.2.3.1*) plazmidem EGFP-LacR-AscI-HP1 α -NLS (*Materiały i metody 3.1.2*) i wywołano lokalne

uszkodzenie (*Materiały i metody 3.2.4*). W celu śledzenia zmian jądrowego rozkładu białka prowadzono pomiary zmian intensywności fluorescencji GFP. Zarejestrowane obrazy zamieszczono na Ryc. 4.7.

a) białko fuzyjne EGFP-LacR-HP1 α



(N)EGFP(C) - (N)LacR(C) *AscI* - (N-terminus)HP1 β (C-terminus) - NLS

b) białko fuzyjne HP1 β -EGFP-LacR



(N-terminus) HP1 β (C-terminus) - *XhoI* (N)EGFP(C) - (N) LacR (C) - *AscI* - NLS

c) białko fuzyjne EGFP-HP1 β -LacR

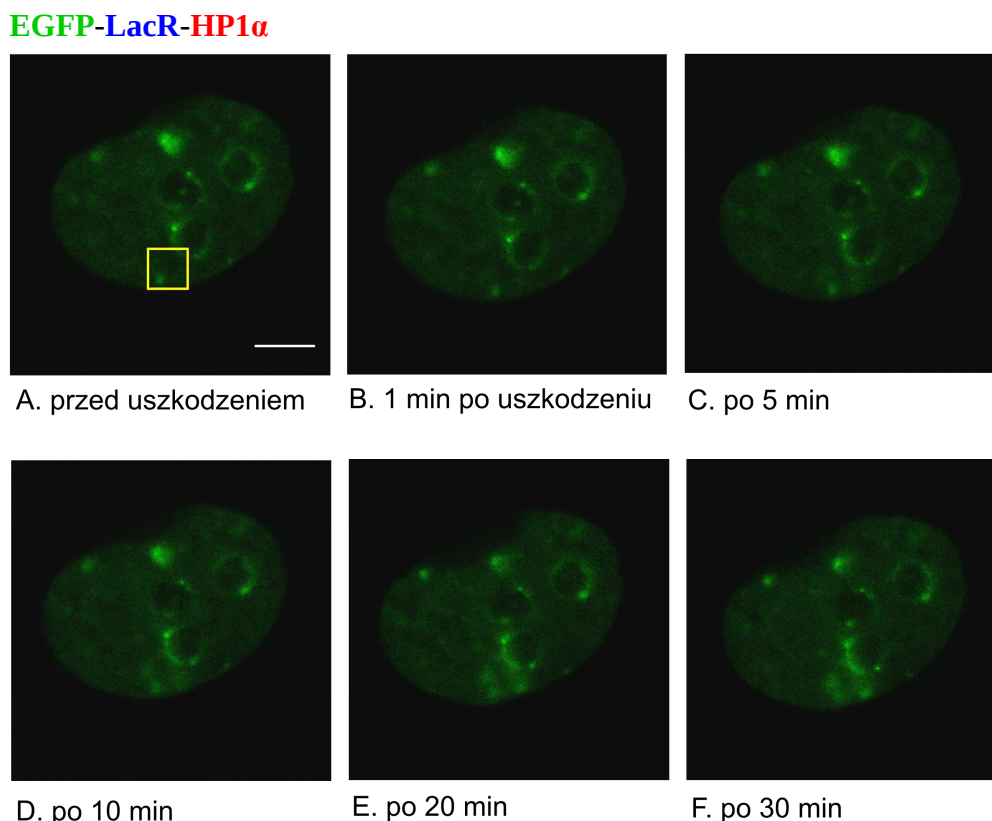


(N)EGFP(C) - *XbaI* - (N-terminus) HP1 β (C-terminus) - *AscI* - (N) LacR (C) - NLS

Rysunek 4.10. Schematy różnych wariantów konstruktów białka fuzyjnego

Schemat użytych do transfekcji plazmidów zawierających różne konstrukty białka fuzyjnego, w których **a)** EGFP oraz LacR znajdują się na N-końcu białka HP1 α , zaś C-koniec pozostaje wolny; **b)** EGFP oraz LacR znajdują się na C-końcu białka HP1 β , zaś N-koniec pozostaje wolny; **c)** EGFP znajduje się na N-końcu zaś LacR na C-końcu białka HP1 β .

Jak można zauważyć na Ryc. 4.7, w miejscu uszkodzenia następuje lokalne zwiększenie intensywności fluorescencji GFP wynikające z gromadzenia białka „HP1 z zablokowanym N-końcem” (EGFP-LacR-HP1 α) w obszarze uszkodzonym.



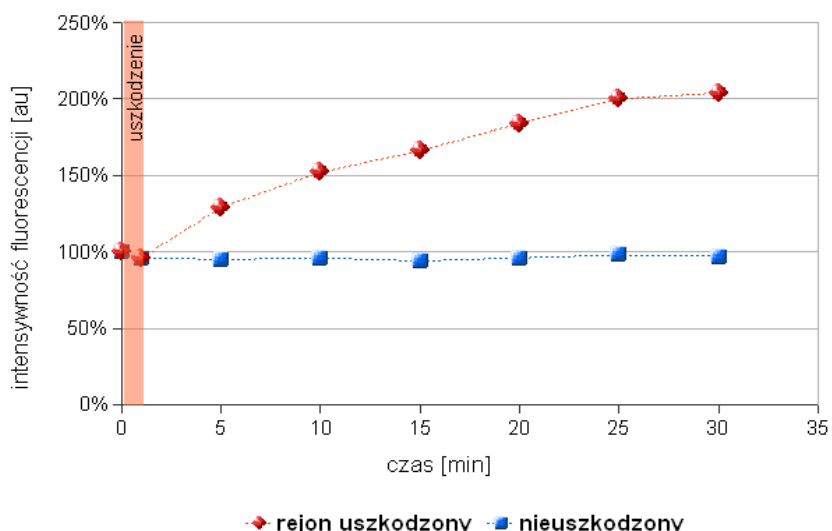
Rycina 4.7. Zmiany rozmieszczenia białka EGFP-LacR-HP1 α po wprowadzeniu uszkodzenia

Rycina przedstawia obrazy jądra komórki wykazujące ekspresję białka EGFP-LacR-HP1 α , inkubowanej z EtBr (100 nM) i poddanej lokalnemu uszkodzeniu jądra. **(A)** Obraz zarejestrowany przed naświetlaniem (514 nm), **(B)** po 1 min od naświetlania niewielkiego (wskazanego żółtym kwadratem) obszaru wewnątrz jądra, **(C)** po 5 min, **(D)** 10 min, **(E)** 20 min, oraz **(F)** 30 min od uszkodzenia. Odcinek skalujący 5 μ m.

Na podstawie uzyskanych wyników sporządzono wykres zmian stężenia białka HP1 (Rys. 4.11), na którym zmiany intensywności fluorescencji EGFP-LacR-HP1 α w obszarze uszkodzonym i nieuszkodzonym przedstawiono w postaci osobnych krzywych.

Rys. 4.11 obrazuje akumulację HP1 α w obszarze uszkodzonym. Po niewielkim spadku intensywności fluorescencji spowodowanym przez fotobłaknięcie następuje odbudowanie intensywności fluorescencji i gromadzenie białka w obszarze uszkodzonym. Zauważyć można, że poziom nagromadzonego białka osiąga wartość 130% już po 5 min od uszkodzenia. Z kolei po 30 min od uszkodzenia stężenie nagromadzonego HP1 wzrosło dwukrotnie w stosunku do poziomu wyjściowego.

Rekrutacja białka EGFP-LacR-HP1 α do miejsc lokalnego uszkodzenia



Rysunek 4.11. Gromadzenie białka EGFP-LacR-HP1 α (na podstawie Ryc. 4.7)

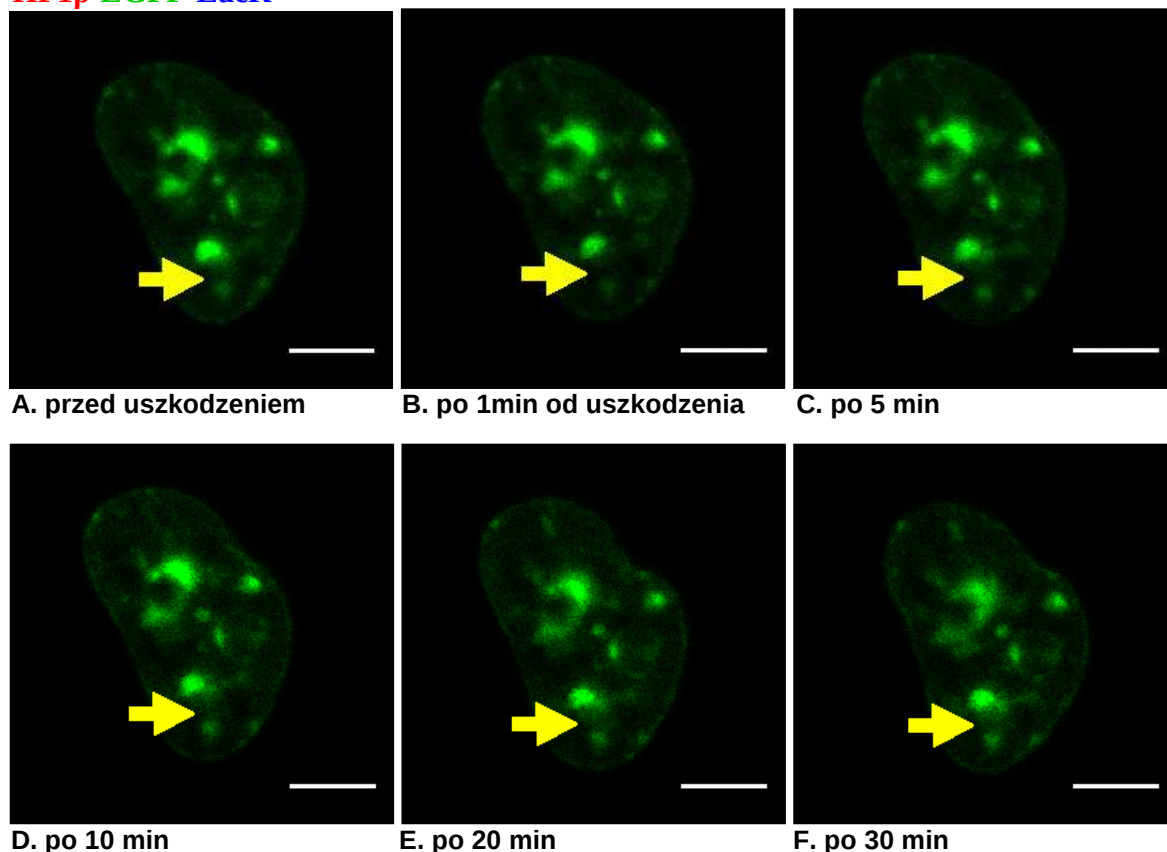
Wykres przedstawia zmiany intensywności fluorescencji białka EGFP-LacR-HP1 α w uszkodzonym (czerwona krzywa) oraz nieuszkodzonym (niebieska krzywa) obszarze jądra komórkowego. Wartości intensywności fluorescencji znormalizowano do wartości początkowej (przed uszkodzeniem) i wyrażono je w procentach, przyjmując wartość intensywności fluorescencji przed uszkodzeniem (czas 0 min) jako 100%.

Białko „HP1 z zablokowanym N-końcem” ulega gromadzeniu w obszarze lokalnego uszkodzenia. Świadczy to zatem o tym, że steryczne osłonięcie N-końca (EGFP-LacR) nie powoduje zahamowania rekrutacji HP1. Dostęp do domeny CD nie jest niezbędny aby zachodziło gromadzenie HP1.

4.1.7.2 Badanie rekrutacji białka „HP1 z zablokowanym C-końcem”

W drugiej serii doświadczeń sprawdzono, jak zachowuje się inny wariant białka fuzyjnego HP1 β -XhoI-EGFP-LacR-AscI-NLS (*Materiały i metody* 3.1.2), tzw. „HP1 z zablokowanym C-końcem”, w którym do C-końca białka dołączone jest EGFP i LacR, zaś N-koniec pozostaje wolny (Rys. 4.10.b).

Komórki HeLa podano przejściowej transfekcji (*Materiały i metody* 3.2.3.1) plazmidem HP1 β -EGFP-LacR, a następnie lokalnie uszkadzano (*Materiały i metody* 3.2.4). W celu śledzenia zmian jądrowego rozkładu białka prowadzono pomiary intensywności fluorescencji GFP. Zarejestrowane obrazy zamieszczono na Ryc. 4.8.

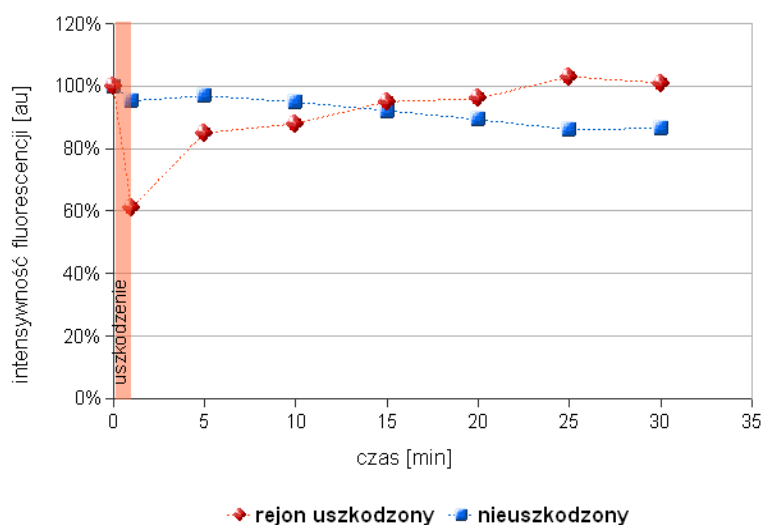
HP1 β -EGFP-LacR

Rycina 4.8. Zmiany rozmieszczenia białka HP1 β -EGFP-LacR po wprowadzeniu uszkodzenia

Rycina przedstawia obrazy jądra komórki HeLa wykazujące ekspresję białka HP1 β -EGFP-LacR, którą inkubowano z EtBr (100 nM) i poddano lokalnemu uszkodzeniu jądra. **(A)** Obraz zarejestrowany przed naświetlaniem, **(B)** po 1 min od naświetlania małego (wskazanego żółtą strzałką) obszaru wewnątrz jądra, **(C)** po 5 min, **(D)** 10 min, **(E)** 20 min, oraz **(F)** 30 min od uszkodzenia. Odcinek skalujący 5 μ m.

Na Ryc. 4.8 zauważyć można, że w miejscu uszkodzenia nie następuje zwiększenie intensywności fluorescencji GFP, a zatem nie zachodzi rekrutacja „HP1 z zablokowanym C-końcem” (HP1 β -EGFP-LacR). Poniżej przedstawiono wykres zmian stężenia białka HP1 β -EGFP-LacR (Rys. 4.12) w uszkodzonym (czerwona krzywa) oraz nieuszkodzonym (niebieska krzywa) obszarze jądra komórkowego.

Brak rekrutacji białka HP1beta-EGFP-LacR do miejsc lokalnego uszkodzenia



Rysunek 4.12. Brak gromadzenia białka HP1β-EGFP-LacR (na podstawie Ryc. 4.8)

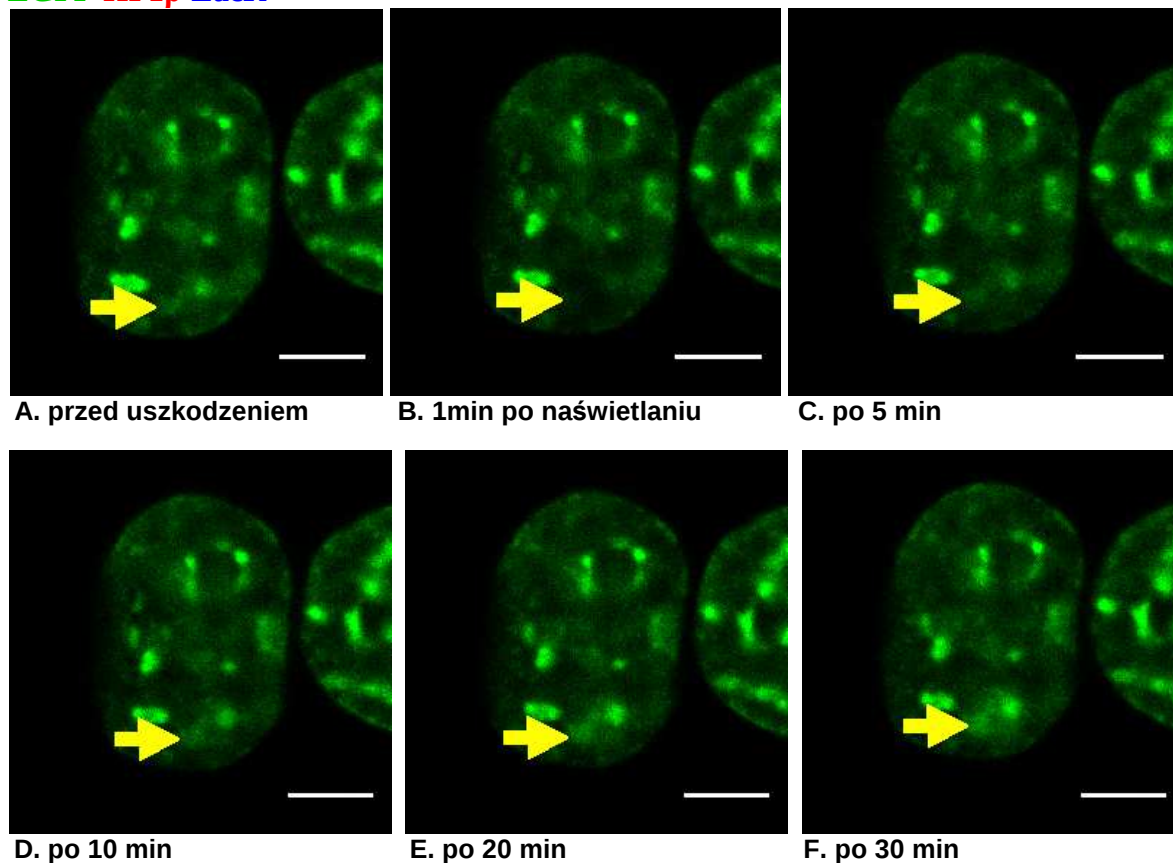
Wykres przedstawia zmiany intensywności fluorescencji białka HP1β-EGFP-LacR w uszkodzonym (krzywa czerwona) oraz nieuszkodzonym (krzywa niebieska) obszarze jądra komórkowego. Wartości intensywności fluorescencji znormalizowano do wartości początkowej (przed uszkodzeniem) i wyrażono je w procentach, przyjmując wartość intensywności fluorescencji przed uszkodzeniem (czas 0 min) jako 100%.

W miejscu uszkodzenia chromatyny nie zachodzi lokalne gromadzenie białka „HP1 z zablokowanym C-końcem” (Rys. 4.12). Po początkowym spadku spowodowanym przez fotobłaknięcie, intensywność fluorescencji HP1β-EGFP-LacR powraca bardzo wolno i dopiero po 15 min osiąga wartość początkową. Lokalne stężenie białka w obszarze uszkodzonym nie wzrasta ponad poziom początkowy. Stwierdzić można, że w obszarach lokalnych uszkodzeń chromatyny jądrowej nie zachodzi gromadzenie białka fuzyjnego „HP1 z zablokowanym C-końcem”. A zatem domena CSD może mieć istotne znaczenie w rekrutacji HP1.

4.1.7.3 Badanie rekrutacji białka „HP1 z zablokowanymi końcami C i N”

Sprawdzono, jak w odpowiedzi na lokalne uszkodzenie chromatyny zachowuje się wariant białka EGFP-*XbaI*-HP1β-*AscI*-LacR-NLS (*Materiały i metody* 3.1.2), tzw. „HP1 z zablokowanymi obydwoma końcami”, w którym EGFP znajduje się na N-końcu, zaś LacR na C-końcu białka HP1 (Rys. 4.10.c).

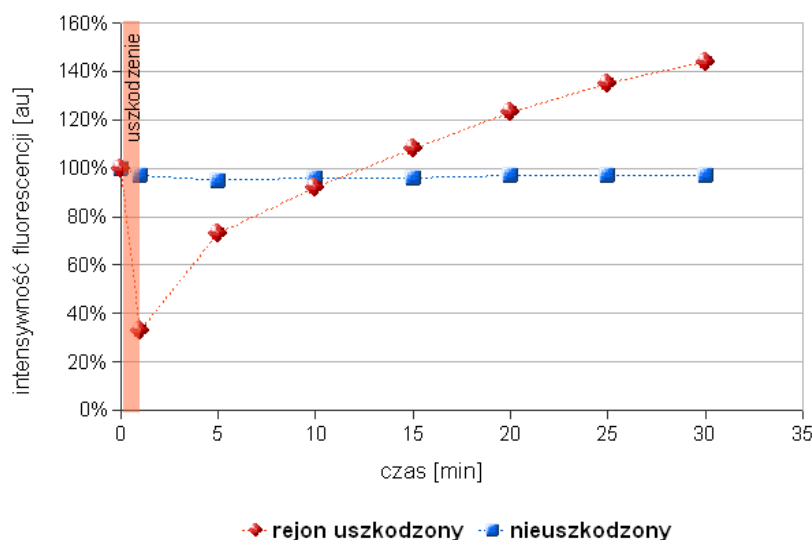
Komórki HeLa ztransfekowano (*Materiały i metody 3.2.3.1*) plazmidem EGFP-HP1 β -LacR, uszkodzono (*Materiały i metody 3.2.4*), a następnie badano zmiany jądrowego rozkładu białka. Uzyskane wyniki zamieszczono poniżej (Ryc. 4.9).

EGFP-HP1 β -LacR

Rycina 4.9. Zmiany rozmieszczenia białka EGFP-HP1 β -LacR po wprowadzeniu uszkodzenia

Rycina przedstawia obrazy jądra komórki HeLa wykazujące ekspresję EGFP-HP1 β -LacR, którą inkubowano z EtBr (100 nM) i poddano lokalnemu uszkodzeniu jądra. **(A)** Obraz zarejestrowany przed naświetlaniem, **(B)** 1 min po naświetlaniu niewielkiego (wskazanego żółtą strzałką) obszaru wewnątrz jądra, **(C)** po 5 min, **(D)** 10 min, **(E)** 20 min, oraz **(F)** 30 min od uszkodzenia. Odcinek skalujący 5 μ m.

Zauważyć można (Ryc. 4.9), że w miejscu uszkodzenia następuje zwiększenie intensywności fluorescencji GFP, a zatem zachodzi rekrutacja białka „HP1 z zablokowanymi obydwoma końcami” (EGFP-HP1 β -LacR). Poniżej przedstawiono wykres zmian stężenia białka EGFP-HP1 β -LacR (Rys. 4.13) w uszkodzonym (czerwona krzywa) oraz nieuszkodzonym (niebieska krzywa) obszarze jądra komórkowego.

Rekrutacja białka EGFP-HP1 β -LacR do miejsc lokalnego uszkodzenia

Rysunek 4.13. Gromadzenie białka EGFP-HP1 β -LacR (na podstawie Ryc. 4.9)

Wykres przedstawia zmiany intensywności fluorescencji białka EGFP-HP1 β -LacR w uszkodzonym (krzywa czerwona) oraz nieuszkodzonym (krzywa niebieska) obszarze jądra komórkowego. Wartości intensywności fluorescencji znormalizowano do wartości początkowej (przed uszkodzeniem) i wyrażono je w procentach, przyjmując wartość intensywności fluorescencji przed uszkodzeniem (czas 0 min) jako 100%.

W obszarze uszkodzonym następuje lokalne gromadzenie białka fuzyjnego EGFP-HP1 β -LacR (Rys. 4.13). Po początkowym spadku intensywności fluorescencji w obszarze uszkodzonym (czerwona krzywa) następuje bardzo powolne odbudowanie intensywności fluorescencji EGFP-HP1 β -LacR, w wyniku wymiany dynamicznej i rekrutacji białka. Znacznie później (około 3x), niż w przypadku wariantu białka EGFP-LacR-HP1 α , gdyż dopiero po 12 min, osiągnięta zostaje wartość początkowa intensywności fluorescencji. Zauważyć można, że w przypadku „HP1 z zablokowanymi obydwoma końcami”, po 30 min od uszkodzenia, intensywność fluorescencji GFP w obszarze uszkodzonym osiąga 140% wartości początkowej. Stwierdzić zatem można, że wariant białka fuzyjnego EGFP-HP1 β -LacR, tzw. „HP1 z zablokowanymi obydwoma końcami” ulega gromadzeniu w uszkodzonym rejonie chromatyny.

W doświadczeniach wykorzystano warianty plazmidu NYE (Nye i wsp., 2002), które zawierały LacR, EGFP oraz HP1 α/β (*Materiały i metody* 3.1.2). Sekwencja polinukleotydowa kodująca białko fluoryzujące EGFP miała długość 717 nukleotydów, LacR – 1034 nukleotydów, HP1 α – 576 nukleotydów, zaś HP1 β 555 nukleotydów. Przypuszczać zatem można, iż rekrutacja białka fuzyjnego HP1 zależy od rozmiaru, albo

kształtu dodatkowej sekwencji peptydowej umieszczonej na C-końcu. W przypadku „HP1 z zablokowanym C-końcem” (HP1 β -EGFP-LacR), w którym na C-końcu znajduje się EGFP-LacR, sekwencja peptydowa, kodowana przez fragment polinukleotydowy o łącznej długości 1751 nukleotydów, rekrutacja HP zostaje zablokowana, najprawdopodobniej ze względu na obecność dodatkowej, długiej sekwencji peptydowej, która stanowi pewnego rodzaju zawadę steryczną. Z kolei w przypadku białka „HP1 z zablokowanymi obydwoma końcami” (EGFP-HP1 β -LacR), na którego C-końcu znajduje się sam LacR (kodowany przez fragment sekwencji polinukleotydowej o długości 1034 nukleotydów), gromadzenie nie ulega zablokowaniu, choć tempo powrotu intensywności fluorescencji jest 3x wolniejsze niż w przypadku białka „HP1 z zablokowanym N-końcem” (EGFP-LacR-HP1 α).

4.1.8 Badanie zmian upakowania chromatyny w miejscu uszkodzenia

W opublikowanej w 2006 roku pracy naukowej (Bekker-Jensen i wsp., 2006) wykazano, że światło laserowe o wysokiej mocy nie tylko generuje olbrzymie uszkodzenie DNA, lecz także wywołuje lokalne uszkodzenie histonów oraz innych zasocjowanych z chromatyną kompleksów białkowych. Tak wielka gęstość oraz złożoność uszkodzenia chromosomów prawdopodobnie przekracza komórkową zdolność do naprawy, w wyniku czego powstają warunki, które mogą stabilizować DNA i przyczyniać się do gromadzenia białek, które niespecyficznym oddziałują z końcami DNA (Lieber i wsp., 2003). W kolejnych eksperymentach postanowiono sprawdzić, czy rekrutacja białek HP1 w badanym układzie może zachodzić jako niespecyficzne następstwo agregacji chromatyny, która towarzyszyć może lokalnemu fotouszkodzeniu chromatyny. Należało bowiem wykluczyć, że zwiększenie stężenia HP1 w miejscu uszkodzenia jest wynikiem lokalnego „obkurczenia” chromatyny, w wyniku czego uszkodzona chromatyna zwija się ciaśniej i w rejonie naświetlanym po około 5-30 min znajduje się więcej DNA niż było na początku. W rejonie tym wówczas znajdowałoby się znacznie więcej białek związanych z DNA, jednakże ich stężenie w przeliczeniu na ilość DNA nie byłoby wyższe. Przypuszczać zatem można, że w takiej sytuacji, w miejscu uszkodzenia znajdowałoby się również znacznie więcej cząsteczek HP1 (oraz innych białek). Proces taki nie byłby jednak akumulacją, czy rekrutacją białka HP1.

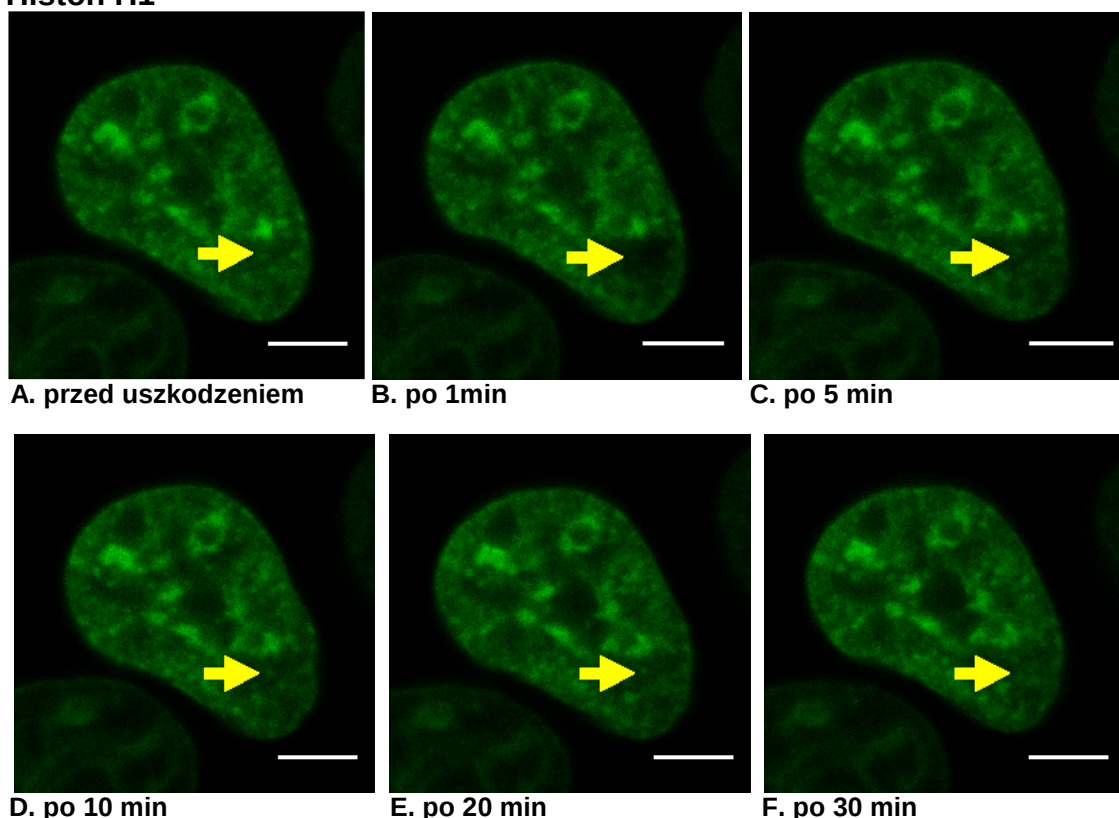
W celu zweryfikowania tej hipotezy, w kolejnych eksperymentach postanowiono zbadać zachowanie innych białek chromatynowych, a mianowicie histonów H1, H2B oraz

H3, w odpowiedzi na lokalne uszkodzenie jądra. Podstawowym zamierzeniem tych eksperymentów była próba potwierdzenia lub wykluczenia zjawiska agregacji, niespecyficznego łączenia białek chromatynowych, czy też lokalnej agregacji chromatyny w miejscu uszkodzenia (Guo i Cole 1989a; Guo i Cole 1989b).

4.1.8.1 Badanie zmian upakowania chromatyny na podstawie lokalnego stężenia histonu H1-GFP

W eksperymentach wykorzystano linie komórkowe HeLa, zawierające białka histonowe sprzężone z GFP. Rozpoczęto od sprawdzenia zachowania histonu H1 w odpowiedzi na uszkodzenie chromatyny. Jądra komórek HeLa z H1-EGFP (*Materiały i metody 3.1.3*) lokalnie uszkadzano (*Materiały i metody 3.2.4.1-3.2.4.4*), a następnie prowadzono pomiary zmian intensywności fluorescencji H1-GFP na obszarze jądra. Zarejestrowane obrazy zamieszczono na Ryc. 4.10.

Histon H1

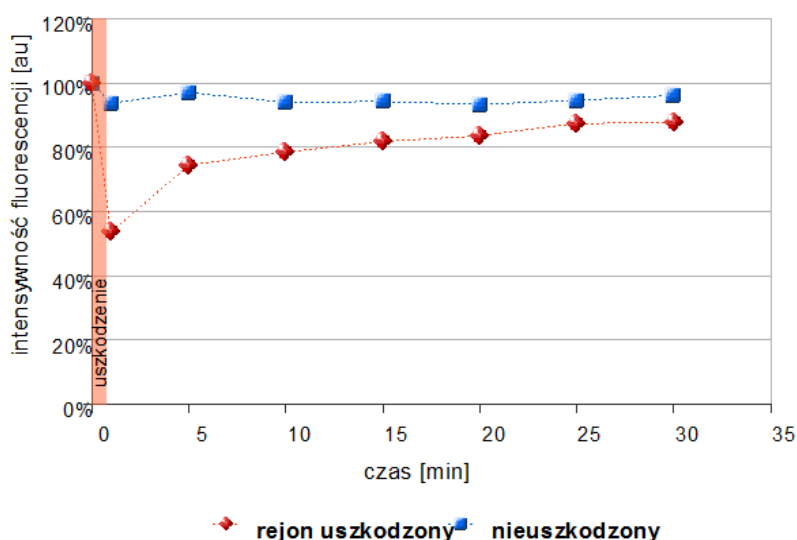


Rycina 4.10. Brak wzrostu stężenia histonu H1 w obszarze uszkodzonym

Rycina przedstawia obrazy jądra komórki HeLa z H1-GFP, którą inkubowano z EtBr (100 nM) i poddano lokalnemu uszkodzeniu jądra. **(A)** Obraz zarejestrowany przed naświetlaniem, **(B)** 1 min po naświetlaniu niewielkiego (wskazanego żółtą strzałką) obszaru wewnątrz jądra, **(C)** po 5 min, **(D)** 10 min, **(E)** 20 min, oraz **(F)** po 30 min od uszkodzenia. Odcinek skalujący 5 µm.

Zauważyć można, że po początkowym spadku intensywności fluorescencji spowodowanym fotobłaknięciem (Ryc. 4.10.B), intensywność fluorescencji H1-GFP wewnątrz obszaru uszkodzonego zostaje odbudowana na skutek wymiany histonu (Ryc. 4.10.F). Jest to wynik szybkiej wymiany histonu H1 (Misteli i wsp., 2000; Lever i wsp., 2000). Zatem w obszarze uszkodzonym nie dochodzi do zwiększenia stężenia histonu H1, nawet 30 min po uszkodzeniu. Uzyskane wyniki przedstawiono również w postaci wykresu zmian stężenia histonu H1-GFP (Rys. 4.14) w uszkodzonym (czerwona krzywa) oraz nieuszkodzonym (niebieska krzywa) obszarze jądra komórkowego.

Stężenie histonu H1 nie rośnie w miejscach lokalnego uszkodzenia



Rysunek 4.14. Zmiany stężenia histonu H1 w miejscu uszkodzenia (na podstawie Ryc. 4.10)

Wykres przedstawia zmiany intensywności fluorescencji białka H1-EGFP w uszkodzonym (krzywa czerwona) oraz nieuszkodzonym (krzywa niebieska) obszarze jądra komórkowego. Wartości intensywności fluorescencji znormalizowano do wartości początkowej (przed uszkodzeniem) i wyrażono je w procentach, przyjmując wartość intensywności fluorescencji przed uszkodzeniem (czas 0 min) jako 100%.

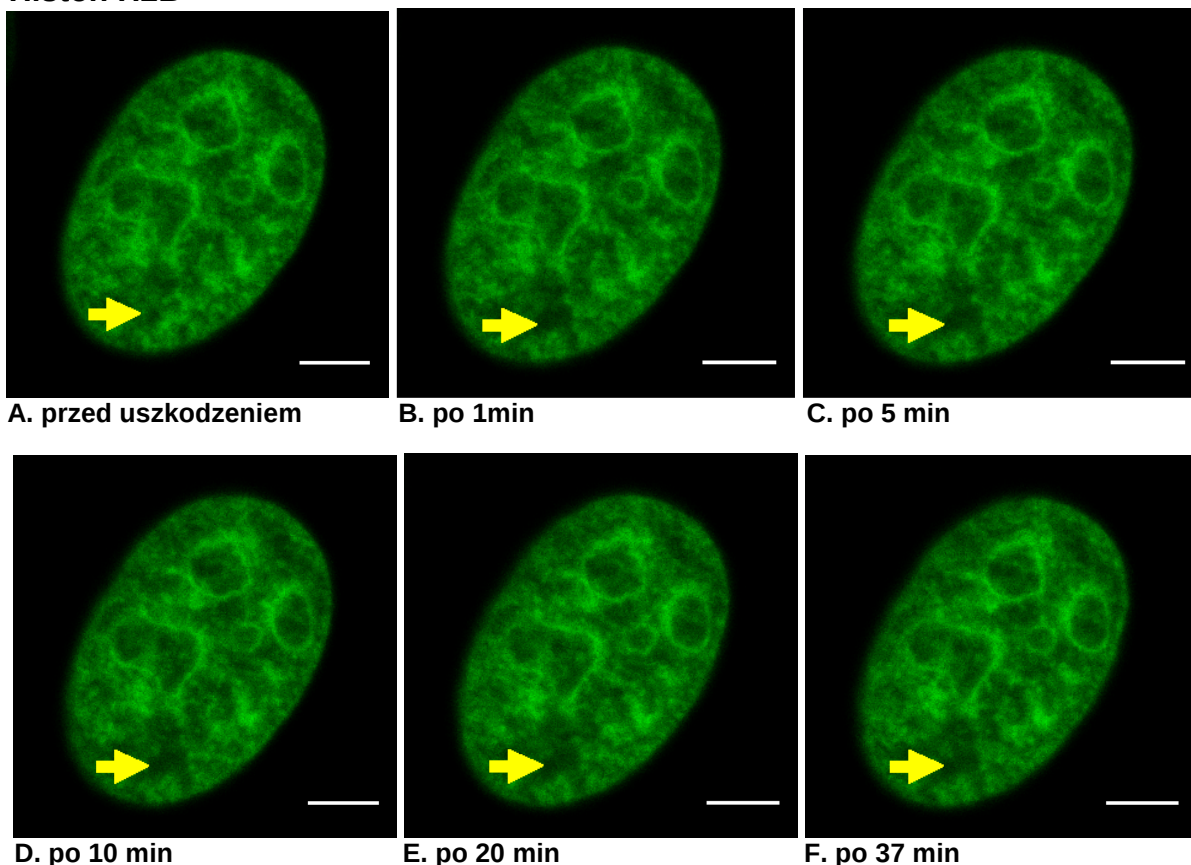
W obszarze uszkodzonym nie następuje wzrost stężenia histonu H1 (Rys. 4.14). Można zatem wnioskować, iż nie zachodzi rekrutacja H1 do miejsc uszkodzonych ani agregacja uszkodzonej chromatyny. Utracona w wyniku fotobłaknięcia fluorescencja ulega odbudowaniu w miejscu uszkodzenia. Pomiary stężenia histonu H1 w obszarze uszkodzonym pozwalają zatem wykluczyć agregację chromatyny oraz niespecyficzną, lokalną asocjację białek chromatynowych w miejscu uszkodzenia. Obserwacja ta jest w zgodzie z hipotezą, iż wzrost stężenia białka HP1 w miejscu uszkodzonym wynika z rekrutacji HP1, a nie z lokalnego wzrostu stężenia chromatyny w tym obszarze.

4.1.8.2 Badanie zmian organizacji chromatyny na podstawie lokalnego stężenia histonu H2B-GFP

Przyjmując podobne rozumowanie, jak opisane na początku rozdziału *Wyniki 4.1.8*, zbadano jądrowy rozkład histonu rdzeniowego H2B, w odpowiedzi na uszkodzenie wywołane wzbudzonym jonem etydowym. H2B jest histonem rdzeniowym, który wchodzi w skład budującego nukleosom oktameru histonowego i nie podlega szybkiej wymianie z pulą rozpuszczalną (Misteli i wsp., 2000).

Jądra komórek HeLa z H2B-EGFP (*Materiały i metody 3.1.3*) lokalnie uszkadzano (*Materiały i metody 3.2.4.1-3.2.4.4*), a następnie dokonywano pomiarów zmian intensywności fluorescencji GFP w funkcji czasu na obszarze całego jądra komórkowego. Zarejestrowane obrazy zamieszczono na Ryc. 4.11.

Histon H2B

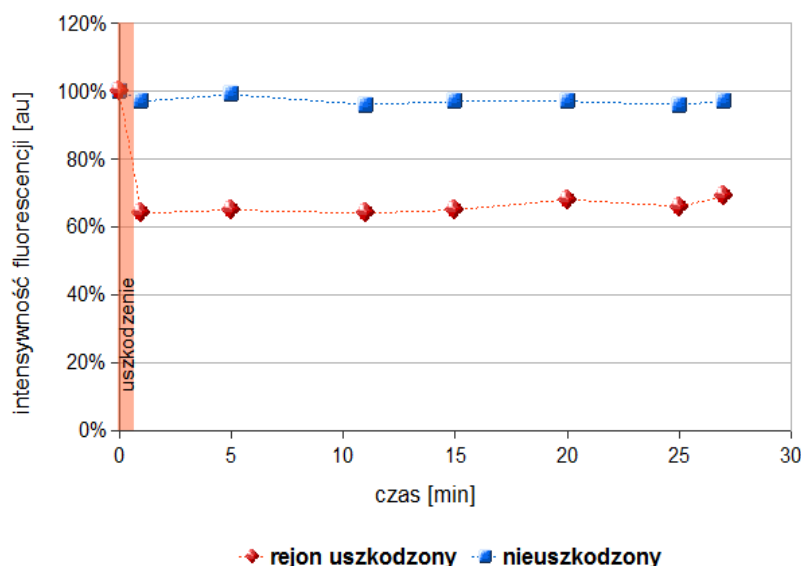


Rycina 4.11. Zmiany lokalnego stężenia histonu H2B w obszarze uszkodzonym

Rycina przedstawia obrazy jądra komórki HeLa z H2B-EGFP, którą inkubowano z EtBr (100 nM) i poddano lokalnemu uszkodzeniu jądra. (A) Obraz zarejestrowany przed naświetlaniem, (B) 1 min po naświetlaniu niewielkiego (wskazanego żółtą strzałką) obszaru wewnątrz jądra, (C) po 5 min, (D) 10 min, (E) 20 min, oraz (F) po 37 min od uszkodzenia. Odcinek skalujący 5 μ m.

W miejscu uszkodzenia nie zachodzi zwiększenie stężenia histonu H2B (Ryc. 4.11). Wnioskować zatem można, iż nie następuje rekrutacja H2B, ani agregacja chromatyny w tym obszarze. Uzyskane wyniki przedstawiono również w postaci wykresu (Rys. 4.15).

Stężenie histonu H2B nie rośnie w miejscach lokalnego uszkodzenia



Rysunek 4.15. Zmiany stężenia histonu H2B w miejscu uszkodzenia (na podstawie Ryc. 4.11)

Wykres przedstawia zmiany intensywności fluorescencji białka H2B-EGFP w uszkodzonym (krzywa czerwona) oraz nieuszkodzonym (krzywa niebieska) obszarze jądra komórkowego. Wartości intensywności fluorescencji znormalizowano do wartości początkowej (przed uszkodzeniem) i wyrażono je w procentach, przyjmując wartość intensywności fluorescencji przed uszkodzeniem (czas 0 min) jako 100%.

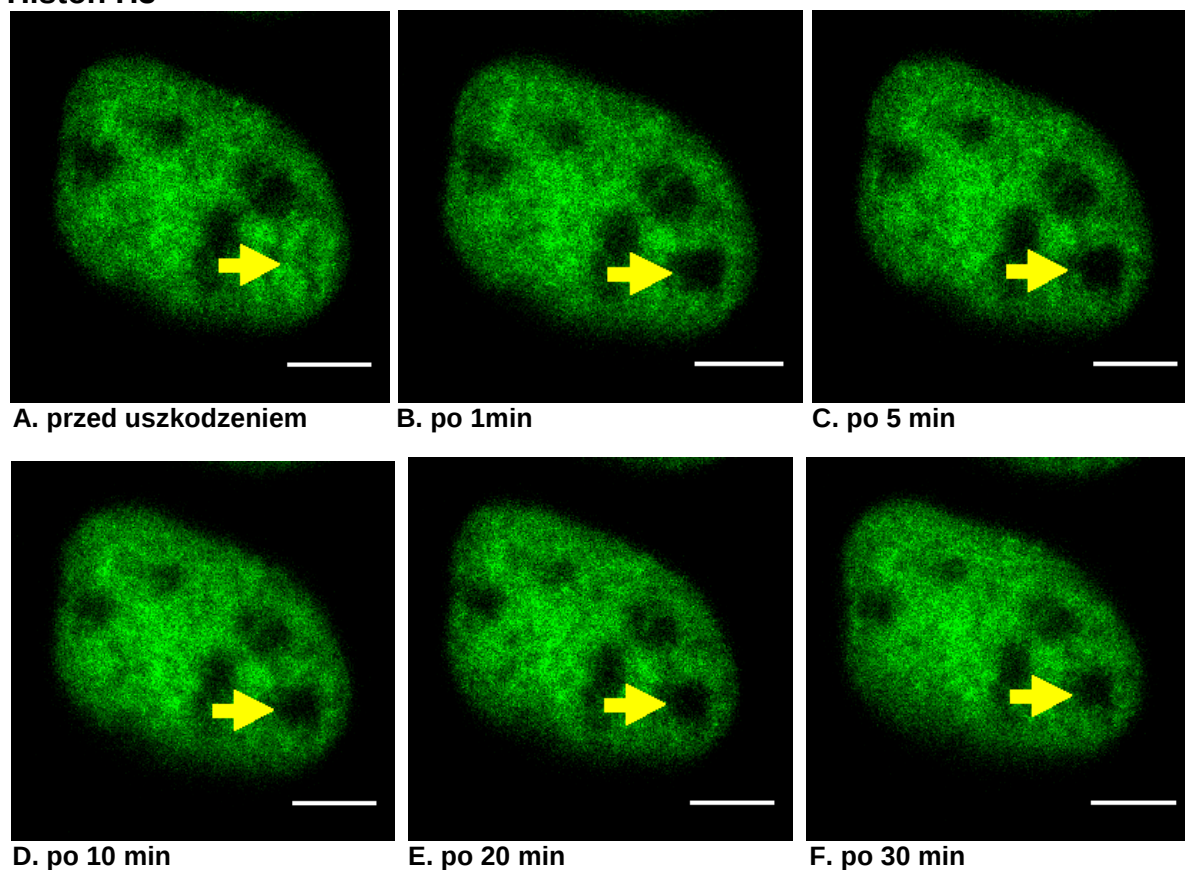
Po początkowej utracie fluorescencji, spowodowanej fotobłaknięciem intensywność fluorescencji H2B-GFP nie zostaje odbudowana (Ryc. 4.11 i Rys. 4.15). Jest to spowodowane bardzo wolną wymianą z pulą histonu H2B z innych rejonów jądra. Z danych literaturowych wiadomo, że histon H2B jest trwale związany w nukleosomie i wymienia się rzadko (Kimura i Cook 2001; Kimura 2005). Wnioskować zatem można, że w miejscu uszkodzenia nie zachodzi lokalna agregacja chromatyny, ani rekrutacja histonu H2B.

4.1.8.3 Badanie zmian organizacji chromatyny na podstawie lokalnego stężenia histonu H3-GFP

Podobny eksperyment, jak opisano powyżej dla histonów H1 i H2B, wykonano dla histonu rdzeniowego H3. Wykorzystano komórki HeLa z H3-EGFP (*Materiały i metody 3.1.3*), które lokalnie uszkadzano (*Materiały i metody 3.2.4.1-3.2.4.4*), a następnie prowadzono pomiary

zmian intensywności fluorescencji GFP w funkcji czasu, na terenie jądra komórkowego. Zarejestrowane obrazy zamieszczono na Ryc. 4.12.

Histon H3

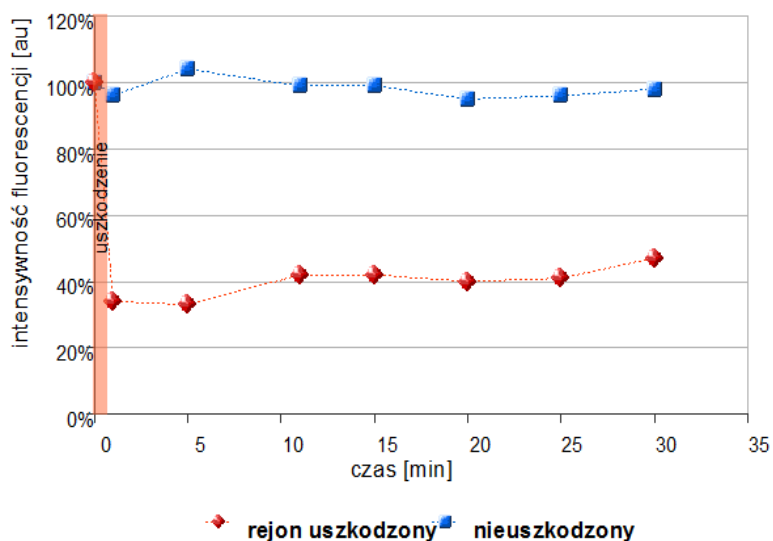


Rycina 4.12. Zmiany lokalnego stężenia histonu H3 w obszarze uszkodzonym

Rycina przedstawia obrazy jądra komórki HeLa z H3-EGFP, którą inkubowano z EtBr (100 nM) i poddano lokalnemu uszkodzeniu chromatyny. **(A)** Obraz zarejestrowany przed naświetlaniem, **(B)** po 1 min od naświetlaniu niewielkiego (wskazanego żółtą strzałką) obszaru wewnątrz jądra, **(C)** 5 min, **(D)** 10 min, **(E)** 20 min, oraz **(F)** po 30 min od uszkodzenia. Odcinek skalujący 5 μm .

W obszarze uszkodzonym natężenie fluorescencji GFP, a zatem stężenie białka H3 nie zmienia się (Ryc. 4.12). Przypuszczać zatem można, iż chromatyna nie ulega agregacji, ani nie następuje gromadzenie histonu H3 w uszkodzonym obszarze jądra. Uzyskane wyniki przedstawiono również w postaci wykresu zmian natężenia fluorescencji białka H3-GFP (Rys. 4.16).

Zmiany stężenia histonu H3 w miejscach lokalnego uszkodzenia



Rysunek 4.16. Zmiany stężenia histonu H3 w miejscu uszkodzenia (na podstawie Ryc. 4.12)

Wykres przedstawia zmiany intensywności fluorescencji białka H3-EGFP w uszkodzonym (czerwona krzywa) oraz nieuszkodzonym (niebieska krzywa) obszarze jądra komórkowego. Wartości intensywności fluorescencji znormalizowano do wartości początkowej (przed uszkodzeniem) i wyrażono je w procentach, przyjmując wartość intensywności fluorescencji przed uszkodzeniem (czas 0 min) jako 100%.

Na Ryc. 4.12 oraz Rys. 4.16 zaobserwować można, iż po początkowej utracie fluorescencji spowodowanej fotoblaknięciem, intensywność fluorescencji H3-EGFP nie zostaje odbudowywana. Wynika to z bardzo wolnej wymiany, jaka zachodzi pomiędzy pulą białka związanego i niezwiązanego (Kimura i Cook 2001). Stwierdzić zatem można, że chromatyna w miejscu uszkodzenia nie ulega agregacji, histon H3 nie ulega rekrutacji i zachowuje się w miejscu uszkodzenia podobnie jak histon H2B.

Brak wzrostu intensywności fluorescencji pochodzącej od znakowanych GFP histonów H1, H2B i H3 sugeruje, iż w obszarze uszkodzonym nie zachodzi agregacja chromatyny. Wnioskować zatem można, iż białko HP1 istotnie się gromadzi w miejscu uszkodzenia, a jego rekrutacja nie wynika z agregacji chromatyny w tym obszarze. W naprawie tej zaangażowane, i tym samym wybiórczo rekrutowane do miejsce uszkodzenia, są zapewne tylko białka uczestniczące w procesie naprawczym.

4.1.9 Pomiary zmian stopnia metylacji lizyny 9 histonu H3 (Me3K9H3) w miejscach rekrutacji białka HP1

Białko HP1 przywoływane jest zapewne w miejsce uszkodzenia przez nieznany jeszcze sygnał i „zatrzymywane” jest w rejonie uszkodzonym. Powstaje pytanie, czy HP1 wiąże się tak, jak zwykle w heterochromatynie - do zmetylowanej lizyny K9H3, czy za wiązanie odpowiedzialny jest inny mechanizm? Postanowiono zatem zbadać, czy poziom metylacji histonu H3 jest wyższy w miejscu uszkodzenia.

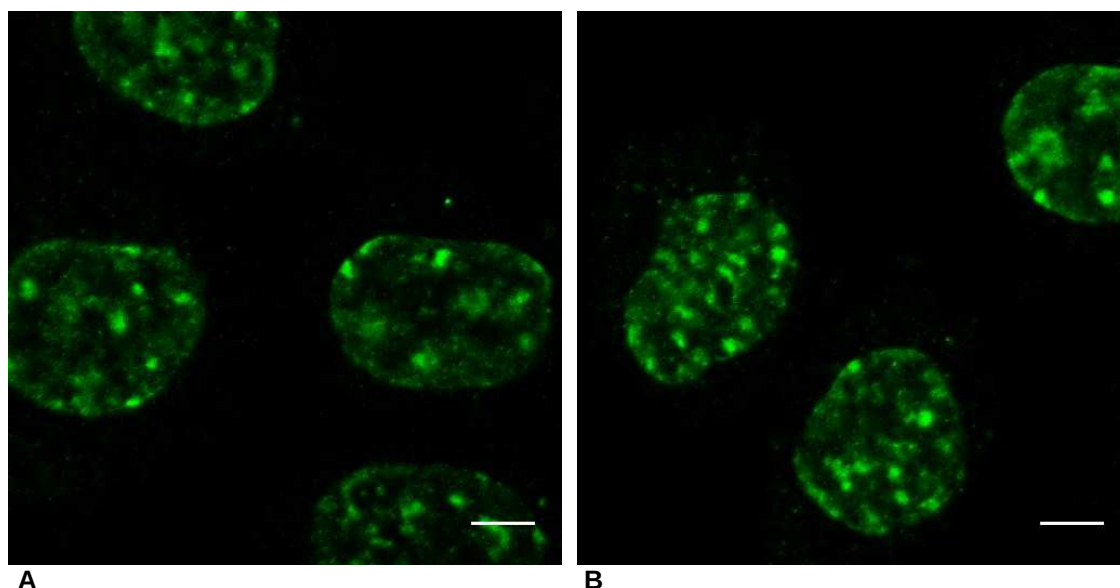
Pojedynczo, podwójnie i potrójnie metylowana reszta lizyny 9 histonu H3 (K9H3) zajmuje charakterystyczne domeny chromosomowe. Na terenie jądra komórkowego występują różnice w stopniu metylacji lizyny 9 histonu H3 (MeK9H3). Pojedyncza metylacja, Me1K9H3 powiązana jest z obszarami wczesno-replikującymi. Szczególnie bogate w Me2K9H3 są rejony otoczki jądrowej, DNA w jąderkach oraz te sekwencje DNA, w obrębie których replikacja zachodzi w środkowej fazie S. Potrójna metylacja, Me3K9H3 dotyczy późno-replikujących sekwencji heterochromatynowych (Wu i wsp., 2005).

Białko HP1 określane jest mianem „białka pomostowego”, ponieważ „łączy” DNA z innymi białkami jądrowymi. N-końcowa chromodomena (CD) białka HP1 wiąże K9H3 zaś C-końcowa domena chromoshadow (CSD) może oddziaływać z licznymi białkami jądrowymi (Li i wsp., 2002). Nie wiadomo jednak, czy rekrutacja białka HP1 do obszaru uszkodzonego również wymaga wiązania HP1 do histonu H3 poprzez K9H3. Postulowano, iż białko HP1 musi być związane z K9H3, aby mogło pełnić swoje funkcje. Naukowcy S.A. Jacobs i S. Khorasanizadeh twierdzą, iż „białko HP1 nie będzie pełnić swej funkcji do momentu, gdy nie nastąpi metylacja” (Jacobs i Khorasanizadeh 2002).

Wyniki ostatnich badań dowodzą, że kierowanie białka HP1 do chromatyny powiązane jest z lokalną kondensacją chromatyny (Verschure i wsp., 2005). Przywoływanie HP1 indukuje rekrutację metylazy HMT SETDB1, która potrójnie metyluje K9H3 i powoduje zwiększenie stężenia Me3K9H3 (Verschure i wsp., 2005). W kolejnych doświadczeniach postanowiono zatem sprawdzić, czy w miejscu lokalnego uszkodzenia chromatyny, gdzie zachodzi rekrutacja białka HP1, dochodzi również do potrójnej metylacji w obrębie K9H3.

Poniższe obrazy (Ryc. 4.13) ukazują typowy rozkład Me3K9H3 w komórkach HeLa, które utrwalono, a następnie wybarwiono immunofluorescencyjnie przy użyciu przeciwciał anty-Me3K9H3 (*Materiały i metody 3.2.5.5 i 3.2.5.7*).

Me3K9H3 w jądrach komórkowych

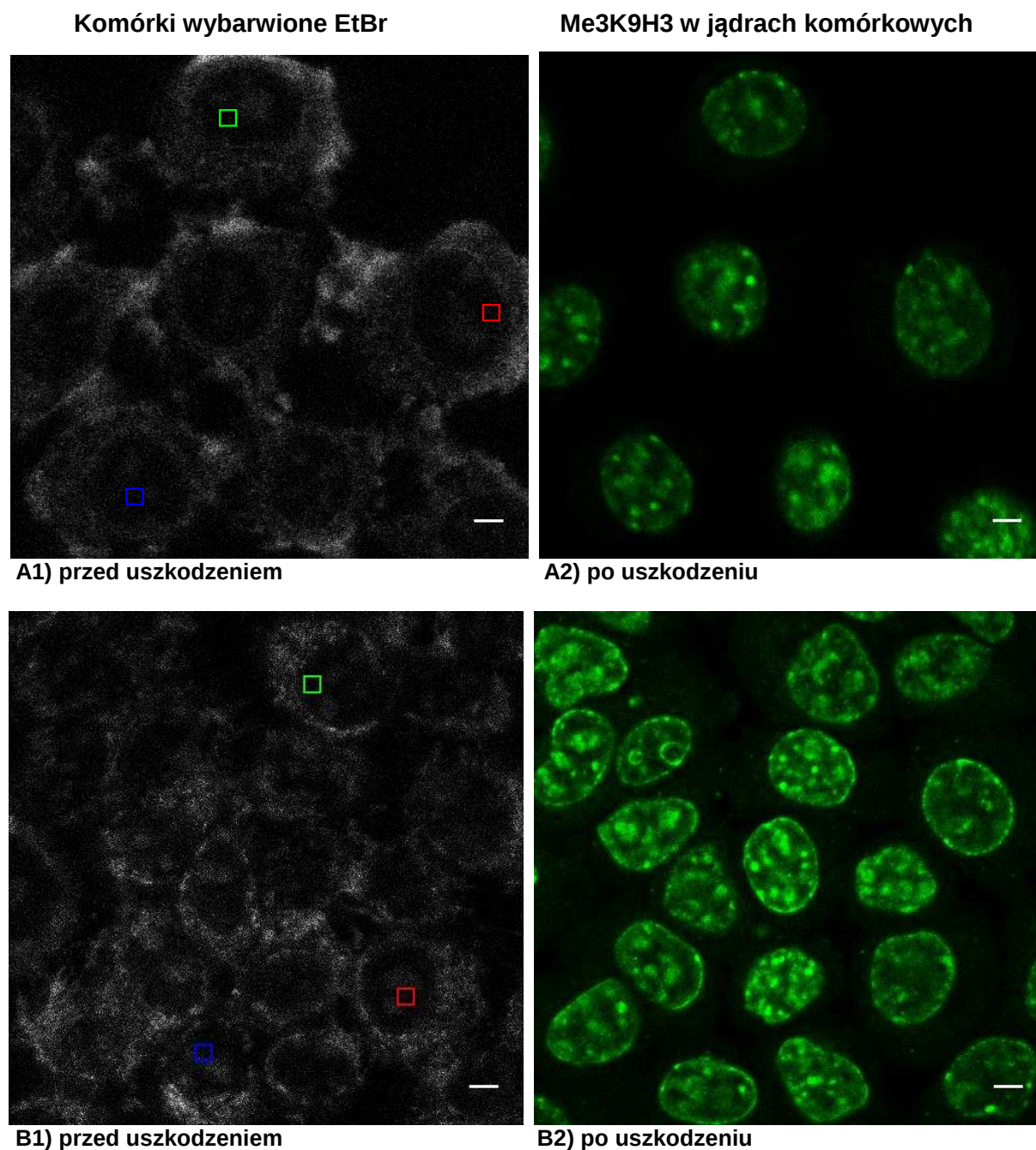


Rycina 4.13. Rozkład Me3K9H3 w jądrach komórek HeLa

Obrazy dwóch różnych grup (**A** i **B**) komórek HeLa wyznakowanych przeciwciałem anty-Me3K9H3, które przedstawiają typowy jądrowy rozkład potrójnej metylacji lizyny 9 histonu H3 (Me3K9H3). Odcinek skalujący 5 μ m.

Na Ryc. 4.13 zauważyć można, że potrójnie metylowana lizyna 9 histonu H3 (Me3K9H3) rozmieszczona jest na terenie całego jądra komórkowego, w postaci skupisk o większym lub mniejszym stężeniu. Obserwowana lokalizacja odpowiada typowemu rozkładowi Me3K9H3 opisanemu w literaturze (Verschure i wsp., 2005; Cowell i wsp., 2002).

Postanowiono sprawdzić, czy w wyniku uszkodzenia chromatyny zachodzą zmiany w jądrowym rozkładzie Me3K9H3. W tym celu wykorzystano komórki HeLa, w których wywoływano lokalne uszkodzenie (*Materiały i metody 3.2.5*), a następnie utrwalano i wyznakowywano immunofluorescencyjnie przy użyciu przeciwciał anty-Me3K9H3 (*Materiały i metody 3.2.5.5*). Poniższe obrazy (Ryc. 4.14) ukazują rozmieszczenie Me3K9H3 przed (*Materiały i metody 3.2.5.1*) oraz po wprowadzeniu lokalnego uszkodzenia (*Materiały i metody 3.2.5.7*).



Rycina 4.14. Rozmieszczenie Me3K9H3 w lokalnie uszkodzonych jądrach komórek HeLa

Rycina przedstawia obrazy dwóch różnych grup komórek (**A** i **B**), które inkubowano z EtBr (200 nM), a następnie naświetlano światłem o długości fali 514 nm (obszary naświetlania wskazano trzema różnokolorowymi kwadratami), aby wprowadzić lokalne uszkodzenie chromatyny. Obrazy **A1)** i **B1)** przedstawiają komórki HeLa uwidocznione przy użyciu EtBr, z kolei **A2)** i **B2)** komórki wybarwione immunofluorescencyjnie, przy użyciu anti-Me3K9H3, które ukazują jądrowy rozkład Me3K9H3, 30-90 min po wprowadzeniu uszkodzenia. Odcinek skalujący 5 μm .

Zauważyć można (Ryc. 4.14), że wywołane wzbudzoną jonem etydium uszkodzenie nie powoduje mierzalnego wzrostu potrójnej metylacji histonu H3 (Me3K9H3). Można zatem wnioskować, że pomimo, iż Me3K9H3 jest miejscem wiązania dla białka HP1,

rekrutacja HP1 w obszarze uszkodzonym nie jest powiązana z potrójną metylacją lizyny 9 histonu H3 i nie dochodzi do zwiększenia poziomu Me3K9H3 w miejscu uszkodzenia.

4.1.10 Badanie akumulacji Ku70 w miejscu uszkodzenia

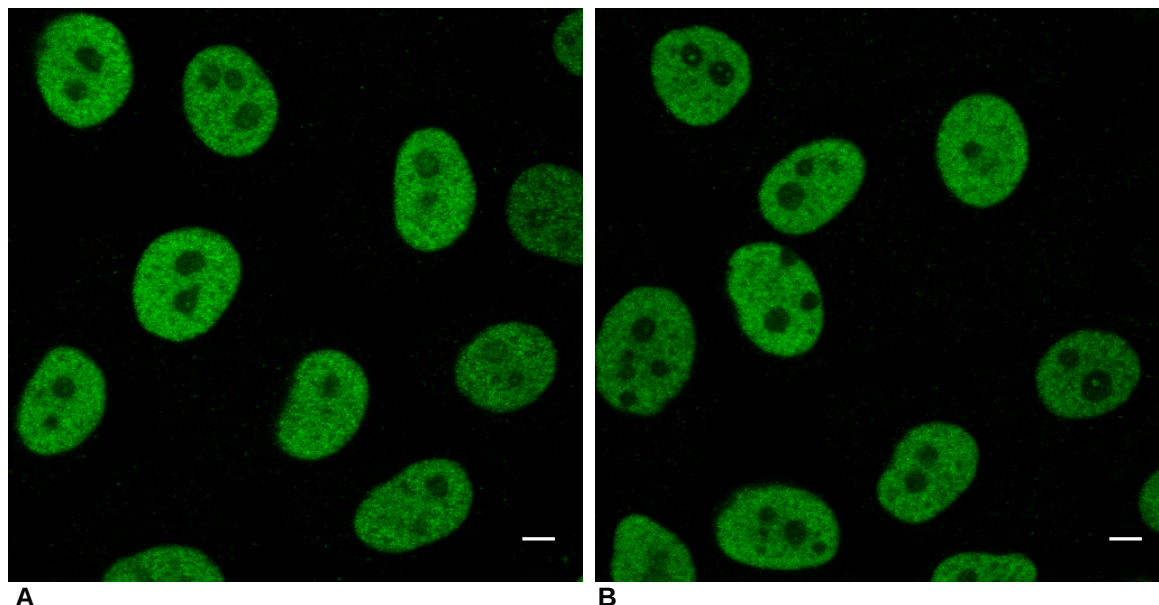
Odkryte jako auto-antygen, Ku70 jest heterodimerycznym białkiem jądrowym, które zbudowane jest z dwóch podjednostek o masach 70 i 80kDa (Mimori i Hardin 1986). Podjednostka Ku70 oddziałuje z końcami DNA w miejscu podwójnych pęknięć nici (DSBs) (Mimori i Hardin 1986). Ponadto, białko to uczestniczy w naprawie DNA, a dokładniej w mechanizmie naprawy DSBs opartym na niehomologicznym łączeniu końców (NHEJ). Ku70 jest ważną podjednostką kinazy białkowej zależnej od DNA (DNA-PK), która fosforyluje czynniki transkrypcyjne (Sp1, Oct-1, p53). Ku70 rekrutuje DNA-PK do DNA (Finnie i wsp., 1995). Podczas naprawy, kompleks Ku/DNA-PK pełni rolę swoistej podpory, która utrzymuje uszkodzone chromosomy razem. Ku70 uczestniczy w wielu procesach jądrowych, takich jak: wewnątrzkomórkowy przekaz sygnału, podział komórkowy, naprawa DNA, replikacja, aktywacja transkrypcji i apoptoza (Song i wsp., 2001). Komórki eukariota cechuje wysoka zawartość białka Ku70, około 4×10^5 cząsteczek białka na komórkę.

Dane literaturowe (Jakob i wsp., 2002; Kim i wsp., 2005) dowodzą lokalnej akumulacji DNA-PK/Ku70 w miejscu DSBs. Zupełnie odmienne wyniki uzyskała grupa innych badaczy (Bekker-Jensen i wsp., 2006), którzy dowodzą, że DNA-PK/Ku70 nie gromadzi się w miejscach podwójnych pęknięć nici (DSBs). Naukowcy ci sugerują, iż duże natężenie światła nie tylko generuje ogromne uszkodzenie DNA, lecz także powoduje lokalną destrukcję histonów i innych zasocjowanych z chromatyną kompleksów białkowych. Tak olbrzymie uszkodzenie chromosomów, prawdopodobnie nie może być naprawione i generuje warunki, które stabilizują nici DNA poprzez niespecyficzną asocjację białek oddziałujących z końcami DNA. Jednym z tych białek jest Ku70.

Postanowiono zatem sprawdzić, czy w indukowanym przez wzbudzony jon etidiowy uszkodzeniu następuje akumulacja Ku70. Badania rozpoczęto od porównania rozmieszczenia Ku70 w komórkach nieuszkodzonych oraz uszkodzonych. Wykorzystano w tym celu komórki HeLa, które utrwalono i wybarwiono immunofluorescencyjnie przy użyciu przeciwciał anti-

Ku70 (*Materiały i metody 3.2.5.6*). Poniżej zamieszczono obrazy (Ryc. 4.15) ukazujące jądrowy rozkład Ku70 w jądrach komórek HeLa (*Materiały i metody 3.2.5.7*).

Ku70 w jądrach komórkowych

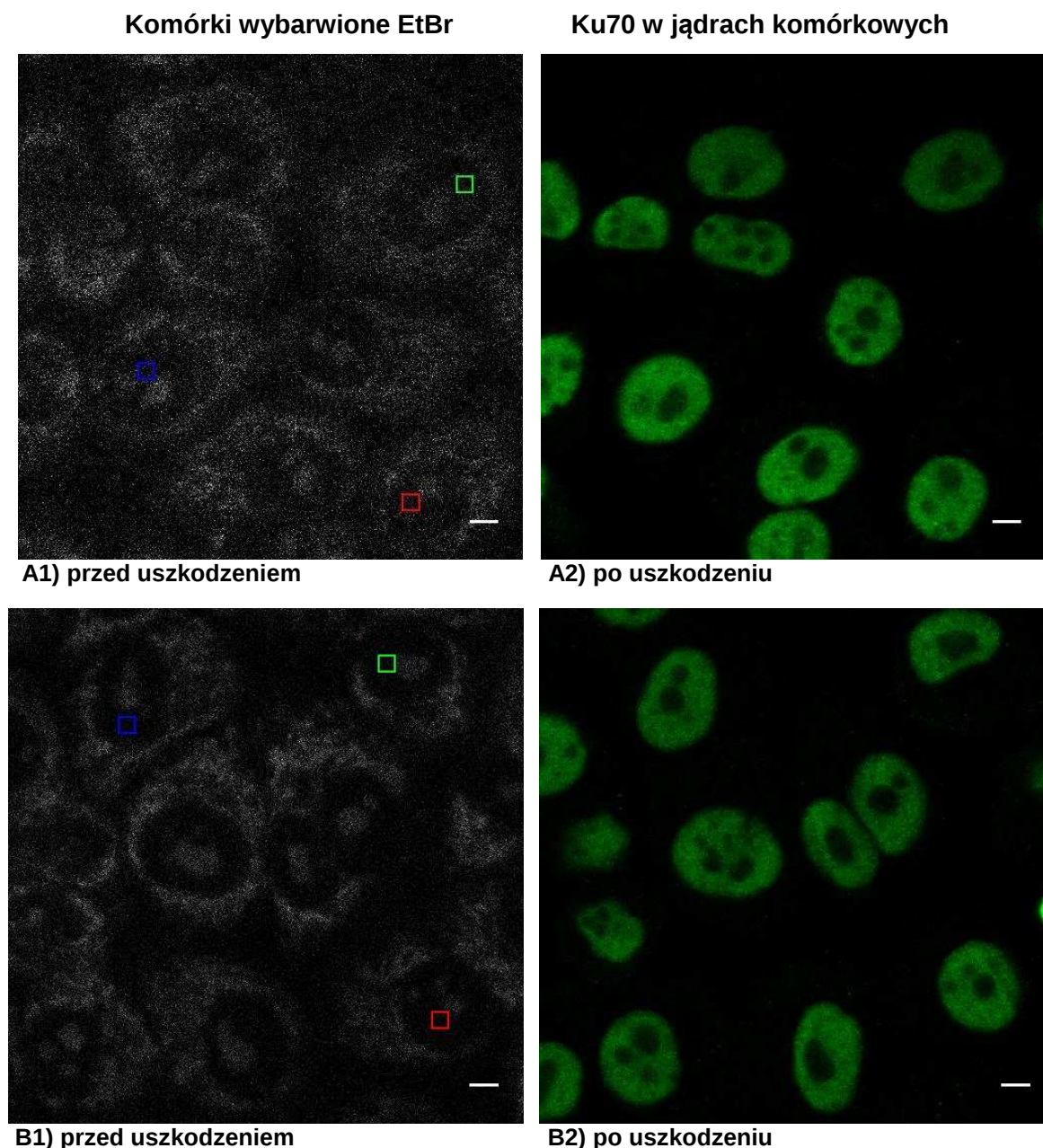


Rycina 4.15. Rozkład Ku70 w jądrach komórek HeLa

Obrazy dwóch różnych grup komórek (**A** i **B**) utrwalonych i wybarwionych immunofluorescencyjnie przy użyciu przeciwciał anti-Ku70, które posiadają typowy rozkład jądrowy Ku70. Odcinek skalujący 5 μm .

Ku70 jest równomiernie rozmieszczone na terenie całego jądra komórkowego, z wyjątkiem jąderek, w których stężenie białka Ku70 jest niższe lub niewykrywalne (Ryc. 4.15). Zarejestrowane obrazy jądrowego rozkładu Ku70 są podobne do obserwowanego przez innych badaczy (Bekker-Jensen i wsp., 2006).

W celu sprawdzenia rozkładu Ku70 po wprowadzeniu lokalnego uszkodzenia chromatyny, komórki HeLa lokalnie uszkodzono (*Materiały i metody 3.2.5*), a następnie utrwalano i wyznakowywano immunofluorescencyjnie przy użyciu przeciwciał anti-Ku70 (*Materiały i metody 3.2.5.6*). Obrazy zarejestrowane przed (*Materiały i metody 3.2.5.1*) oraz po uszkodzeniu (*Materiały i metody 3.2.5.7*) zamieszczono poniżej (Ryc. 4.16).



Rycina 4.16. Rozmieszczenie Ku70 w lokalnie uszkodzonych jądrach komórek HeLa

Rycina przedstawia obrazy dwóch różnych grup komórek (**A** i **B**), które inkubowano z EtBr (200 nM), a następnie naświetlano światłem o długości fali 514 nm (obszary naświetlania wskazano trzema różnokolorowymi kwadratami), aby wprowadzić lokalne uszkodzenie chromatyny. Obrazy **A1**) i **B1**) przedstawiają komórki HeLa uwidocznione przy użyciu EtBr, z kolei **A2**) i **B2**) komórki wybarwione immunofluorescencyjnie, przy użyciu przeciwciał anti-Ku70, które ukazują jądrowy rozkład Ku70, 30-90 min po wprowadzeniu uszkodzenia. Odcinek skalujący 5 μm .

Białko Ku70 nie jest obecne w wyższym stężeniu w miejscach uszkodzonych (Ryc. 4.16). Przypuszczać zatem można, że powstałe DSB nie są usuwane na drodze naprawy opartej na niehomologicznym łączeniu końców (NHEJ). DSB mogą być zatem naprawiane w mechanizmie rekombinacji homologicznej (HR). Możliwe również, że powstałe DSBs powodują aktywację NHEJ, jednakże liczba powstałych uszkodzeń jest na tyle mała,

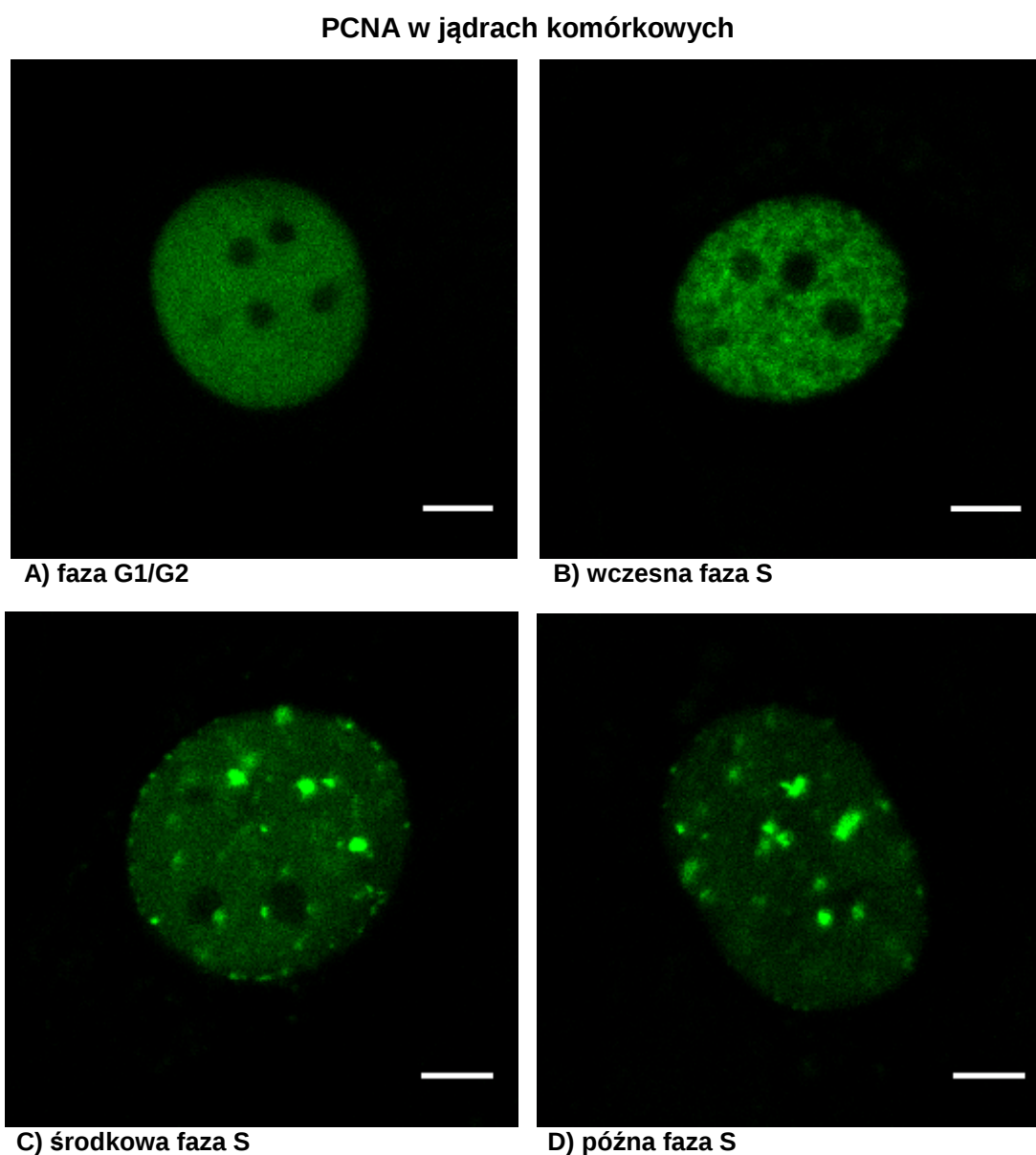
że poziom rekrutowanego Ku70 znajduje się poniżej progu detekcji. Hipoteza ta pozostaje w zgodzie z wnioskami ostatnich badań (Bekker-Jensen i wsp., 2006), które sugerują, iż rekrutacja Ku70 obserwowana jest tylko w przypadku, gdy generowana jest olbrzymia liczba uszkodzeń DSBs.

4.1.11 Badanie akumulacji PCNA w miejscu uszkodzenia

Jądrowy antygen komórek proliferujących, PCNA (ang. *Proliferating Cell Nuclear Antigen*) jest głównym składnikiem maszyneryi replikacyjnej (Somanathan i wsp., 2001; Moldovan i wsp., 2007). PCNA jest pierwszym białkiem, które zidentyfikowane zostało w widełkach replikacyjnych w fazie S i od tego czasu jest ono powszechnie używane jako marker miejsc replikacji (Leonhardt i wsp., 1999). PCNA należy do rodziny tak zwanych „przesuwających się zacisków DNA” (ang. *DNA sliding clamp family*). Trzy identyczne monomery PCNA tworzą pierścień wokół podwójnej helisy DNA, który służy jako przesuwający się zacisk i wiąże polimerazę oraz inne czynniki replikacyjne do DNA, a także działa aktywnie na polimerazę. Dzięki obecności PCNA nie dochodzi do oddysocjowania polimerazy w trakcie replikacji DNA. Wśród białek oddziałujących z PCNA odnaleźć można białka zaangażowane w regulację i kontrolę cyklu komórkowego, różnicowanie komórek, replikację i naprawę DNA (Maga i Hubscher 2003). PCNA pełni centralną rolę w niemal wszystkich mechanizmach naprawy DNA, prawdopodobnie rekrutując poszczególne czynniki naprawcze (Mortusewicz i Leonhardt 2007). W zależności od rodzaju uszkodzenia i fazy cyklu komórkowego PCNA pomaga w tworzeniu optymalnego „okna” akcji ułatwiając w ten sposób dostęp specyficznej grupy białek do powstałego w DNA uszkodzenia. PCNA pełni centralną rolę w replikacji i naprawie DNA, służąc jako wszechstronna platforma ładująca dla enzymów zaangażowanych w syntezę i montaż chromatyny oraz zachowanie informacji epigenetycznej (Mortusewicz i wsp., 2005). Z uwagi na mnogość procesów, w których zaangażowane jest PCNA, stało się ono obiektem licznych badań. Ostatnio wykazano, że PCNA ulega rekrutacji do miejsc uszkodzeń wywołanych przez UV (Essers i wsp., 2005). Postanowiono zatem sprawdzić, czy w rejonach lokalnych uszkodzeń DNA, wywołanych wzbudzoną jEt, zachodzi również gromadzenie PCNA.

4.1.11.1 Rozkład PCNA w jądrze komórkowym

W celu zbadania rozkładu PCNA w jądrach komórkowych użyto mioblastów mysich C2C12 GFP-PCNA (*Materiały i metody 3.1.3*) wykazujących ekspresję GFP-PCNA (Leonhardt i wsp., 2000). Zarejestrowane obrazy (*Materiały i metody 3.2.4.2*) zamieszczono poniżej (Ryc. 4.17).



Rycina 4.17. Rozmieszczenie PCNA zależne od fazy cyklu komórkowego

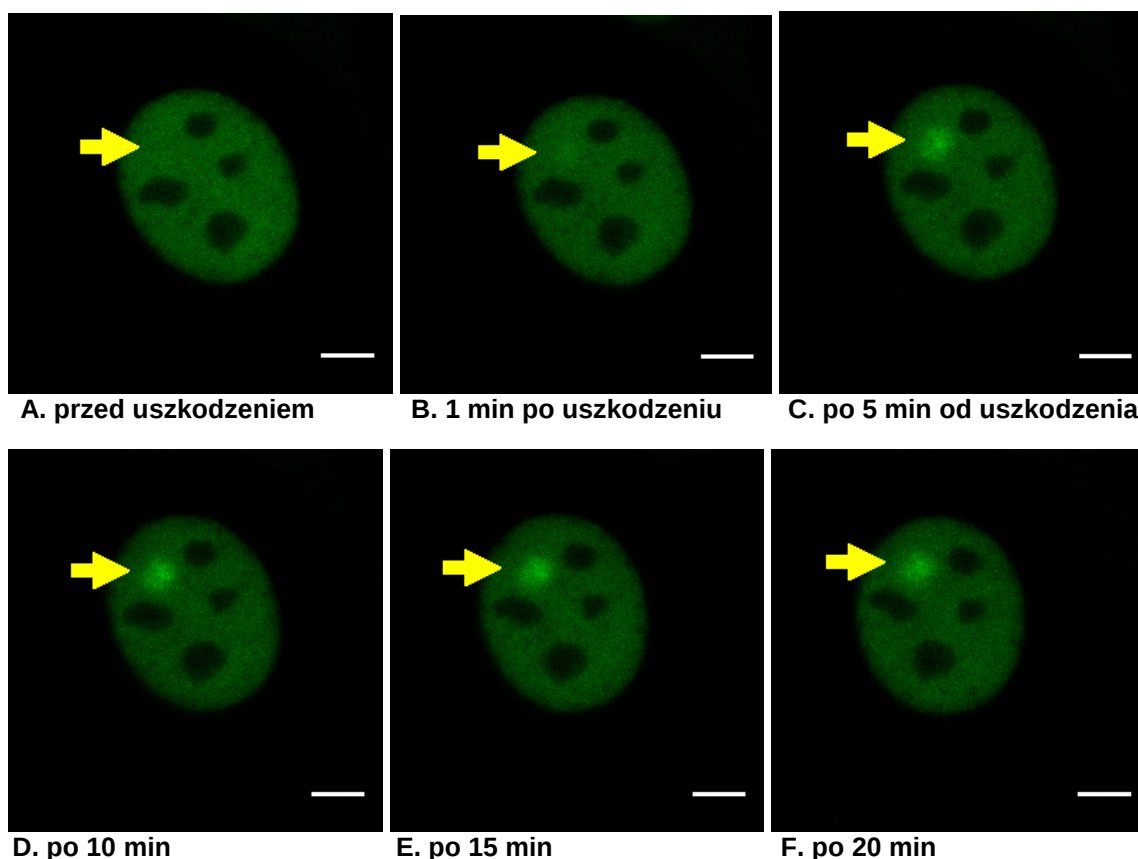
Obrazy komórek mioblastów mysich C2C12 wykazujących ekspresję GFP-PCNA, znajdujących się w różnych fazach cyklu komórkowego (A-D). Różnice w subjądrowym rozkładzie PCNA wynikają z fazy cyklu komórkowego. Odcinek skalujący 5 μm .

Na Ryc. 4.17 zaobserwować można wyraźne różnice w rozmieszczeniu PCNA. Na obrazach przedstawiono komórki z typowym jądrowym rozkładem PCNA. Widoczne różnice w rozmieszczeniu PCNA wynikają z różnych faz cyklu komórkowego, w jakich znajdują się komórki (Essers i wsp., 2005). PCNA rozmieszczone jest równomiernie w jądrach komórek znajdujących się w fazach G_1 , G_0 i G_2 , tzw. komórki poza fazą S (ang. *non-S phase cells*) (Ryc. 4.17.A). Z kolei w jądrach komórek w fazie S następuje zmiana rozkładu jądrowego PCNA (Sporbert i wsp., 2002). W fazie S, PCNA zlokalizowane jest w postaci skupisk, których wielkość oraz wewnątrzjądrowa lokalizacja różni się w zależności od tego, czy komórka znajduje się we wczesnej, środkowej, czy w późnej fazie S (Ryc. 4.17.B-D).

4.1.11.2 Badanie rekrutacji PCNA w miejscu uszkodzenia

W celu sprawdzenia, czy w wyniku uszkodzenia następują zmiany jądrowego rozkładu PCNA użyto komórek C2C12 GFP-PCNA, które lokalnie uszkadzano (*Materiały i metody* 3.2.4), a następnie prowadzono pomiary intensywności fluorescencji GFP na terenie jądra komórkowego. Do eksperymentów wybierano komórki o różnym rozmieszczeniu PCNA, i tym samym znajdujące się w różnych fazach cyklu podziałowego. Zarejestrowane obrazy zamieszczono na Ryc. 4.18.

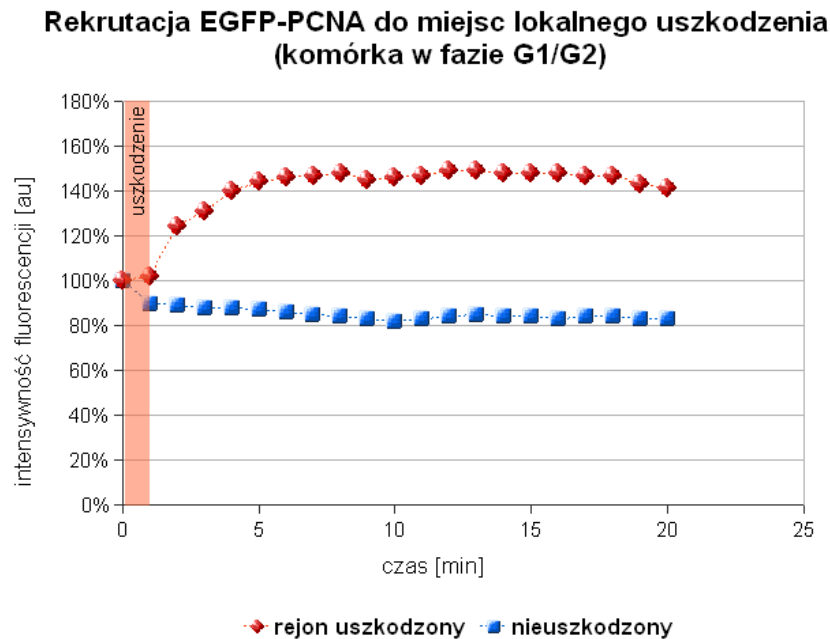
Rozkład PCNA w jądrze w fazie G1/G2



Rycina 4.18. Rekrutacja PCNA do miejsc uszkodzenia w komórce w fazie G1/G2

Rycina przedstawia obrazy komórki C2C12 GFP-PCNA znajdującej się w fazie G1 lub G2, którą inkubowano z EtBr (200 nM) i poddano lokalnemu uszkodzeniu chromatyny. **(A)** Obraz zarejestrowany przed naświetlaniem, **(B)** 1 min po naświetlaniu niewielkiego (wskazanego żółtą strzałką) obszaru wewnątrz jądra, **(C)** po 5 min, **(D)** 10 min, **(E)** 15 min, oraz **(F)** po 20 min od uszkodzenia. Odcinek skalujący 5 μm .

W komórce w fazie G1 lub G2 następuje gromadzenie PCNA w miejscu uszkodzenia (Ryc. 4.18). Rekrutacja PCNA zachodzi bardzo szybko, niewielkie gromadzenie widoczne jest już po 1 min od uszkodzenia (Ryc. 4.18.B). Po 5 min widoczny jest wyraźny wzrost intensywności fluorescencji GFP w obszarze uszkodzonym (Ryc. 4.18.C). Aby dokonać dokładnej charakterystyki procesu gromadzenia PCNA sporządzono wykres zmian natężenia fluorescencji w funkcji czasu (Rys. 4.17).



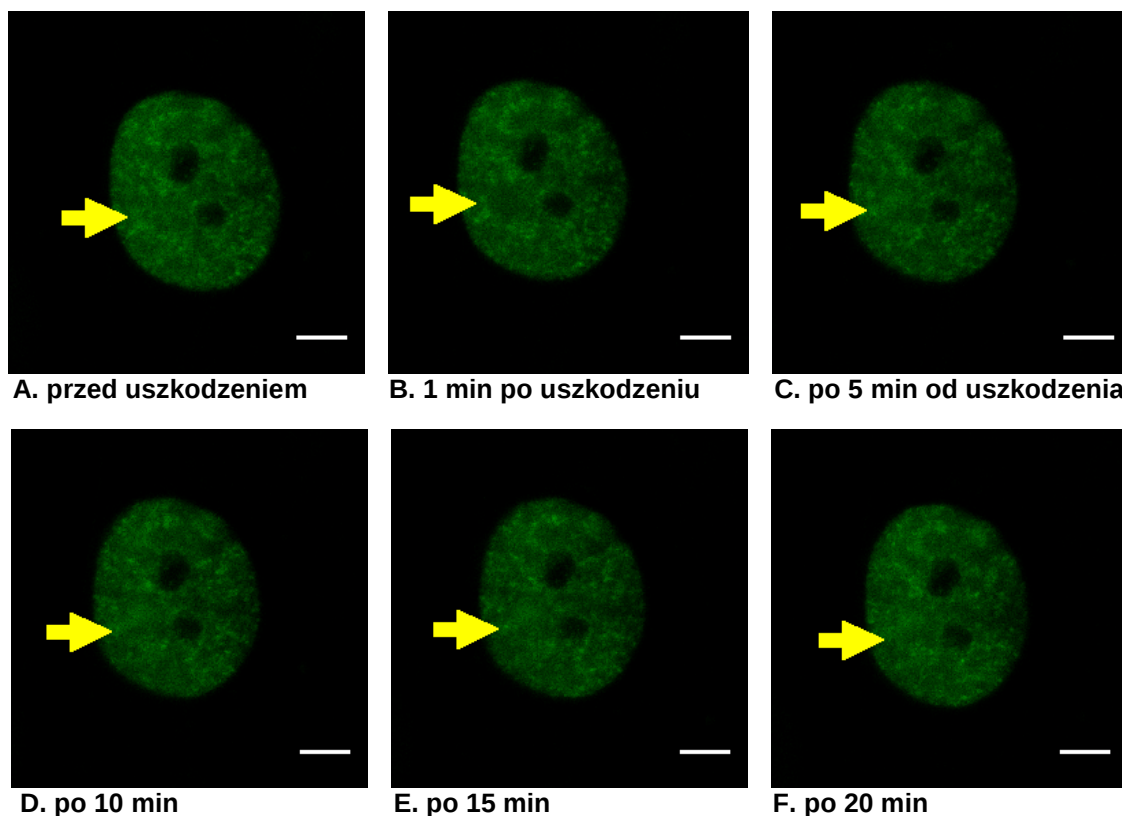
Rysunek 4.17. Gromadzenie PCNA w komórce w fazie G1/G2 (na podstawie Ryc. 4.18)

Wykres przedstawia zmiany intensywności fluorescencji białka EGFP-PCNA w uszkodzonym (czerwona krzywa) oraz nieuszkodzonym obszarze jądra (niebieska krzywa) komórki w fazie G1/G2. Wartości intensywności fluorescencji znormalizowano do wartości początkowej (przed uszkodzeniem) i wyrażono je w procentach, przyjmując wartość intensywności fluorescencji przed uszkodzeniem (czas 0 min) jako 100%.

W obszarze uszkodzonym następuje bardzo szybkie zwiększenie natężenia fluorescencji GFP, a zatem wzrost stężenia PCNA (Rys. 4.17). Już po 2 min od uszkodzenia nagromadzone PCNA osiąga poziom 125%, zaś maksymalne stężenie (na poziomie 150%) nagromadzonego PCNA osiąga się 7 min po uszkodzeniu i utrzymuje się na tym poziomie przez cały czas prowadzenia pomiarów (20 min).

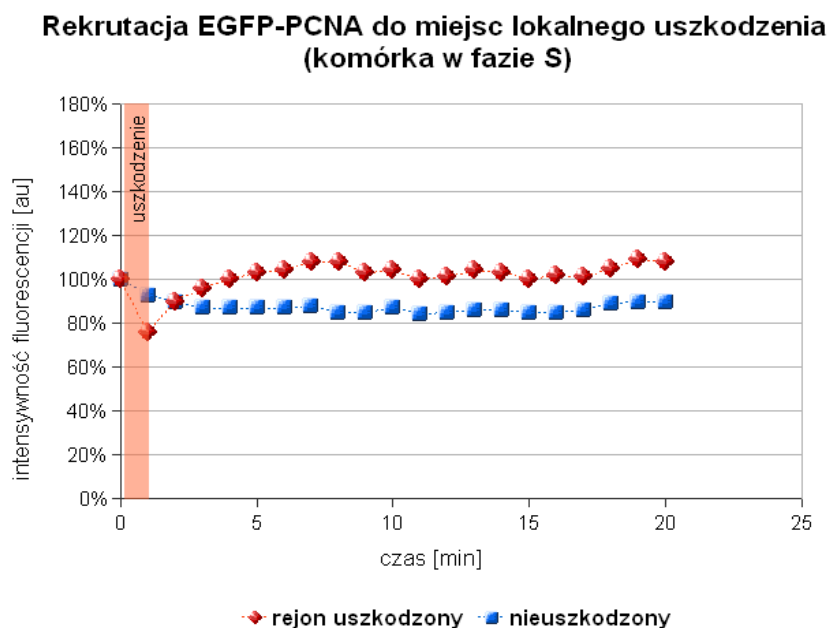
Kolejne doświadczenia wykonano na komórkach z jądrowym rozkładem PCNA typowym dla fazy S. Zarejestrowane obrazy zamieszczono poniżej (Ryc. 4.19).

Rozkład PCNA w jądrze we wczesnej fazie S

**Rycina 4.19. Rekrutacja PCNA do miejsc uszkodzenia w komórce we wczesnej fazie S**

Rycina przedstawia obrazy komórki mioblastów mysich C2C12 GFP-PCNA, we wczesnej fazie S cyklu podziałowego, którą inkubowano z EtBr (200 nM) i poddano lokalnemu uszkodzeniu chromatyny. **(A)** Obraz zarejestrowany przed naświetlaniem, **(B)** 1 min po naświetlaniu niewielkiego (wskazanego żółtą strzałką) obszaru wewnątrz jądra, **(C)** po 5 min, **(D)** 10 min, **(E)** 15 min, oraz **(F)** po 20 min od wprowadzenia uszkodzenia. Odcinek skalujący 5 μm .

W komórce z rozmieszczeniem PCNA typowym dla wczesnej fazy S nie następuje rekrutacja PCNA w miejscu uszkodzenia (Ryc. 4.19). Naświetlanie światłem 514 nm w miejscu uszkodzenia spowodowało fotobłaknięcie GFP. Powrót fluorescencji w tym obszarze zachodzi bardzo szybko, już w pierwszych kilku minutach (Ryc. 4.19.C). W obszarze uszkodzonym nie następuje jednak gromadzenie PCNA, jak to miało miejsce w przypadku komórki w fazie G1 lub G2 (Ryc. 4.18). Aby dokładniej zanalizować indukowane uszkodzeniem zmiany jądrowego rozkładu PCNA we wczesnej fazie S sporządzono wykres zmian natężenia fluorescencji w funkcji czasu (Rys. 4.18).



Rysunek 4.18. Zmiany stężenia PCNA w komórce we wczesnej fazie S (na podstawie Ryc. 4.19)

Wykres przedstawia zmiany intensywności fluorescencji białka GFP-PCNA w uszkodzonym (czerwona krzywa) oraz nieuszkodzonym obszarze jądra (niebieska krzywa) komórki we wczesnej fazie S. Wartości intensywności fluorescencji znormalizowano do wartości początkowej (przed uszkodzeniem) i wyrażono je w procentach, przyjmując wartość intensywności fluorescencji przed uszkodzeniem (czas 0 min) jako 100%.

Powyższy wykres (Rys. 4.18) zmian natężenia fluorescencji GFP, a zatem zmian stężenia PCNA w obszarze uszkodzonym oraz nieuszkodzonym, w komórce we wczesnej fazie S, przedstawia zupełnie inne zachowanie PCNA w porównaniu z tym, jakie obserwowano w przypadku komórki w fazie G1 lub G2 (Rys. 4.17). Istotna różnica to przede wszystkim fakt, iż PCNA nie ulega rekrutacji w miejscu lokalnego uszkodzenia chromatyny. Naświetlanie skupioną wiązką światła zielonego powoduje fotobłaknięcie w miejscu uszkodzenia. Odbudowanie fluorescencji w obszarze fotobłaknięcia, zachodzące w wyniku wymiany z nieuszkodzoną pulą GFP-PCNA, następuje jednak znacznie wolniej i dopiero w czasie 4 min od uszkodzenia intensywność fluorescencji wraca do poziomu początkowego (czerwona krzywa na Rys. 4.18). W miejscu uszkodzenia nie zachodzi jednak akumulacja PCNA. Odmienne zachowanie i wolna wymiana PCNA we wczesnej fazie S wynikać mogą z tego, że PCNA uczestniczy w replikacji i w związku z tym pula „dostępnego” dla innych procesów jądrowych PCNA jest znacznie mniejsza niż w fazach G1 i G2 cyklu podziałowego.

Stwierdzić zatem można, iż gromadzenie PCNA w rejonach uszkodzonej chromatyny zależy od fazy cyklu komórkowego i zachodzi w fazie G1 lub G2, ale nie zachodzi w fazie S, co najprawdopodobniej związane jest z faktem, iż PCNA zaangażowane jest w replikację

DNA. PCNA cechuje się dużą mobilnością. Rekrutacja PCNA zachodzi już w pierwszych kilku minutach od wprowadzenia uszkodzenia. Porównując kinetyki gromadzenia PCNA i HP1 w uszkodzonych obszarach chromatyny, zauważyć można, że PCNA pojawia się w miejscu uszkodzenia znacznie wcześniej, a jego rekrutacja zachodzi znacznie szybciej niż HP1. Szybkie gromadzenie PCNA w miejscu uszkodzonym być może odzwierciedla fakt, iż PCNA uczestniczyć może w rekrutacji innych białek do miejsc uszkodzenia. Nie jest wykluczone, że jednym z tych białek jest HP1.

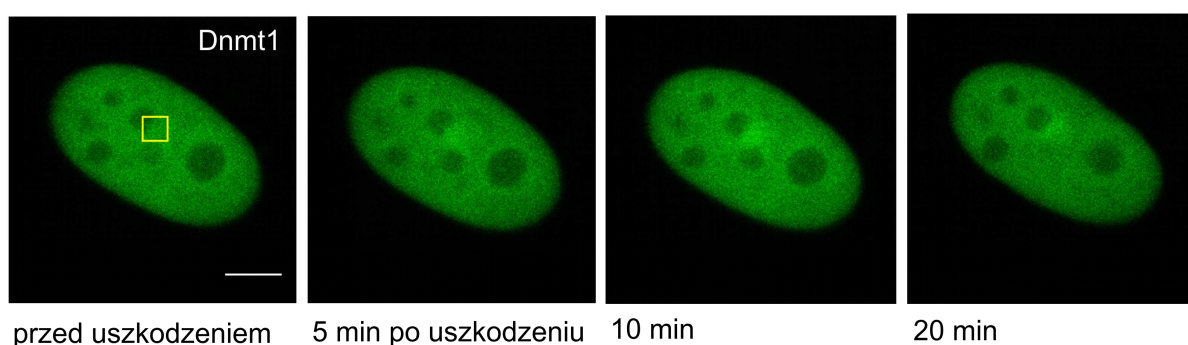
4.1.12 Badanie akumulacji Dnmt1 w miejscu uszkodzenia

Materiał genetyczny komórek ssaczych ulega modyfikacji, która polega na metylacji DNA w pozycji 5 reszt cytozyny w dwunukleotydach CpG (Pradhan i Esteve 2003; Klose i Bird 2006). Ta modyfikacja epigenetyczna odgrywa bardzo ważną rolę, m.in. w regulacji ekspresji genów i struktury chromatyny oraz prawidłowym rozwoju i różnicowaniu komórek (Li i wsp., 1992; Bird 2002). Metylacja DNA w komórkach ssaczych katalizowana jest przez dwa rodzaje enzymów, metylotransferazę Dnmt1 oraz metylotransferazę Dnmt3a i Dnmt3b (Klose i Bird 2006). Wzory metylacji DNA, które są specyficzne dla danego typu komórki, powstają „*de novo*” na etapie wczesnego rozwoju, a w procesie tym uczestniczy Dnmt3a oraz Dnmt3b. Z kolei w zachowaniu tych samych wzorów metylacji w kolejnych fazach cyklu komórkowego uczestniczy metylotransferaza Dnmt1 (Hermann i wsp., 2004; Goll i Bestor 2005). Dominującą metylotransferazą pod względem zawartości, wpływu na globalną aktywność metylotransferaz i stopnia metylacji genomu w komórkach somatycznych jest Dnmt1. Metylotransferaza Dnmt1 wykazuje preferencje w stosunku do hemimetylowanych dwunukleotydów CpG, które powstają podczas replikacji (Bestor 2000). W metylacji nowo syntetyzowanej nici DNA, która zachodzi po replikacji, uczestniczy domena PDB, która znajduje się na N – końcu Dnmt1 i bezpośrednio oddziałuje z PCNA (Chuang i wsp., 1997; Leonhardt i wsp., 1992). Zachowanie informacji epigenetycznej w czasie naprawy DNA wydaje się być kluczowe do tego, by komórka mogła dalej istnieć. W odtworzeniu informacji epigenetycznej w miejscu uszkodzenia uczestniczy rekrutowana przez PCNA metylotransferaza Dnmt1, która w swoisty sposób wiąże proces naprawy DNA i odtworzenie wzorów metylacji w miejscu uszkodzenia (Mortusewicz i wsp., 2005; Schermelleh i wsp., 2007). Metylotransferaza Dnmt1 odgrywa również kluczową rolę w utrzymaniu odpowiednich wzorów modyfikacji w obrębie histonu H3 (Estève i wsp., 2006) oraz wpływa

na zachowanie i właściwą organizację dużych regionów heterochromatynowych (Espada i wsp., 2004).

Opisane w poprzednim podrozdziale (Wyniki 4.1.11) eksperymenty pokazują rekrutację PCNA w obszarach lokalnych uszkodzeń chromatyny. Postanowiono zatem sprawdzić, czy w miejscu uszkodzenia zachodzić będzie również akumulacja Dnmt1. Eksperyment ten pozwoli ustalić, czy uszkodzenie oksydacyjne wywoływane przez wzbudzony jon etidiowy prowadzi do utraty informacji epigenetycznej zawartej w metylacji zasad. Będzie można zatem sprawdzić, czy w badanym układzie eksperymentalnym zachodzi również proces odtworzenia informacji epigenetycznej, a tego dowodem byłaby obecność metylotransferazy Dnmt1. Ponadto, doświadczenia te pozwolą wykazać, czy w rejonach rekrutacji HP1 zachodzi gromadzenie Dnmt1. Wiadomo bowiem, iż metylotransferaza Dnmt1 (ang. *DNA methyltransferase 1*) może oddziaływać bezpośrednio z domeną CSD HP1 (Smallwood i wsp., 2007), zaś ostatnie doniesienia podają, że Dnmt1 ulega akumulacji w miejscach uszkodzeń DNA (Mortusewicz i wsp., 2005). Przypuszczać zatem można, iż zgromadzone białko HP1 mogłoby uczestniczyć w procesie odtworzenia informacji genetycznej w miejscu uszkodzenia.

Komórki HeLa poddano przejściowej transfekcji (Materiały i metody 3.2.3.2) plazmidem GFP-Dnmt1 (Materiały i metody 3.1.2), lokalnie uszkodzono (Materiały i metody 3.2.4), a następnie prowadzono czasowe pomiary zmian stężenia Dnmt1 w funkcji czasu. Zarejestrowane obrazy zamieszczono poniżej (Ryc. 4.20).



Rycina 4.20. Rekrutacja Dnmt1 do miejsc uszkodzenia

Obrazy jądra komórki HeLa wykazujące ekspresję GFP-Dnmt1, którą inkubowano z EtBr (200 nM) i poddano lokalnemu uszkodzeniu chromatyny. Obraz zarejestrowany przed naświetlaniem niewielkiego obszaru wewnątrz jądra (obszar wskazany żółtą ramką). Po 5 min, 10 min, oraz po 20 min od wprowadzenia uszkodzenia. Odcinek skalujący 5 μm .

W miejscu uszkodzenia następuje zwiększenie intensywności fluorescencji GFP (Ryc. 4.20), co świadczy o tym, że w obszarze uszkodzonym następuje gromadzenie metylotransferazy Dnmt1. Rekrutacja Dnmt1 obserwowana była we wszystkich komórkach, które poddano uszkodzeniu. A zatem, jednym z etapów naprawy uszkodzeń oksydacyjnych może być odtworzenie informacji epigenetycznej w miejscu uszkodzenia. Nie jest wykluczone również, iż proces rekrutacji Dnmt1, partnera interakcji HP1, może być powiązany z gromadzeniem białka HP1.

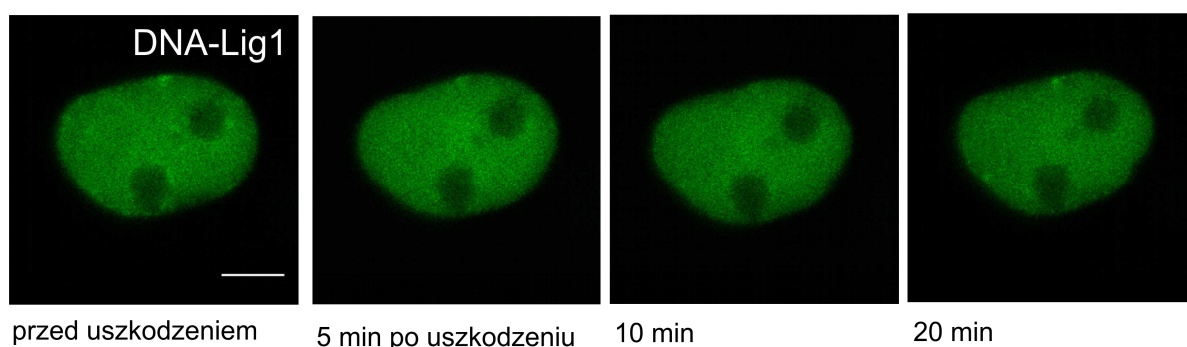
4.1.13 Badanie akumulacji ligazy DNA I w miejscu uszkodzenia

Ligacja DNA jest kluczowa w procesie replikacji, naprawy i rekombinacji DNA. Jednym z ostatnich etapów naprawy DNA jest łączenie pęknięć w fosfodiesterowym rdzeniu DNA. Proces ten katalizowany jest przez rodzinę ligaz DNA, zawierających wysoce konserwatywną domenę katalityczną, która uczestniczy w ligacji. W zależnej od ATP rodzinie ligaz DNA wyróżnić można trzy enzymy: ligazę DNA I, III oraz IV. Pomimo podobnego mechanizmu reakcji, ligazy DNA pełnią odrębne funkcje i nie mogą być wzajemnie przez siebie zastępowane (Mortusewicz i wsp., 2006).

Zarówno ligaza DNA I, jak i ligaza DNA III uczestniczą w procesie naprawy DNA i są one rekrutowane do miejsc uszkodzenia. Proces gromadzenia nie zależy od fazy cyklu komórkowego. Ligaza DNA I rekrutowana jest przy udziale PCNA (Cardoso i wsp., 1997), natomiast rekrutacja ligazy DNA III zachodzi przy udziale XRCC1 (Dulic i wsp., 2001; Beernink i wsp., 2005). Wybiórcza rekrutacja odpowiedniej ligazy najprawdopodobniej wynika ze szczególnych wymogów różnych szlaków naprawczych i może wpływać na efektywność procesu naprawy (Mortusewicz i wsp., 2006).

Zamieszczone w poprzednim podrozdziale wyniki doświadczeń dowodzą gromadzenia PCNA w miejscach uszkodzeń chromatyny, wywołanych przez wzbudzony jon etidiowy. Postanowiono zatem sprawdzić, czy w obszarze uszkodzenia zachodzić będzie również akumulacja ligazy DNA I. W eksperymentach wykorzystano komórki HeLa, które poddano przejściowej transfekcji (*Materiały i metody 3.2.3.2*) plazmidem GFP-Ligaza DNA I (*Materiały i metody 3.1.2*), a następnie lokalnie uszkadzano (*Materiały i metody 3.2.4*). W celu śledzenia indukowanych uszkodzeniem zmian rozmieszczenia ligazy DNA I

przewodzone czasowe pomiary zmian intensywności fluorescencji GFP na obszarze jądra komórkowego. Zarejestrowane obrazy zamieszczono poniżej (Ryc. 4.21).



Rycina 4.21. Brak rekrutacji ligazy DNA I do miejsc uszkodzenia

Obrazy jądra komórki HeLa wykazującej ekspresję GFP-Ligaza DNA I, którą inkubowano z EtBr (200 nM) i poddano lokalnemu uszkodzeniu chromatyny. Obraz zarejestrowany przed naświetlaniem niewielkiego obszaru wewnątrz jądra (obszar wskazany żółtą ramką). Po 5 min, 10 min oraz po 20 min od wprowadzenia uszkodzenia. Odcinek skalujący 5 μ m.

Na powyższych obrazach (Ryc. 4.21) zauważyć można, że w miejscu uszkodzenia nie następuje lokalne zwiększenie intensywności fluorescencji GFP, a zatem w obszarze uszkodzonym nie zachodzi gromadzenie ligazy DNA I, lub ilość nagromadzonego białka znajduje się poniżej progu detekcji.

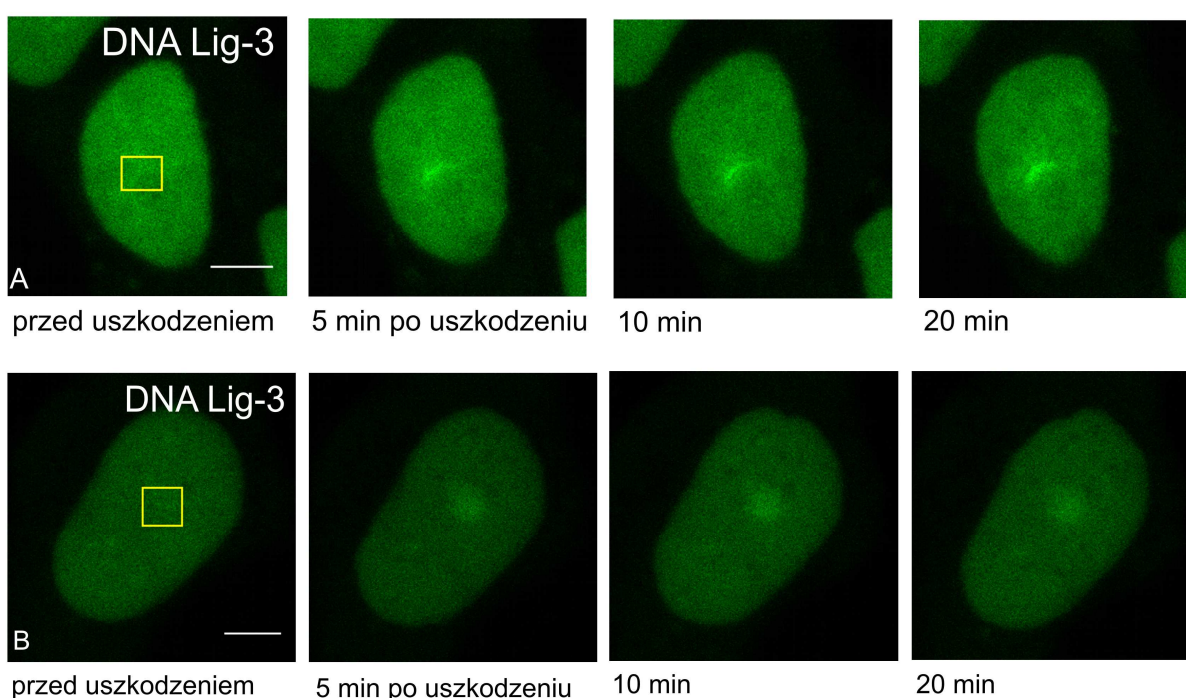
4.1.14 Badanie akumulacji ligazy DNA III w miejscu uszkodzenia

Uszkodzenie wywołane przez wzbudzony jon etidiowy należy do grupy uszkodzeń oksydacyjnych (Wyniki 4.1.1), a te naprawiane są na drodze BER. W procesie naprawy BER zaangażowana jest ligaza DNA I oraz ligaza DNA III. W długiej ścieżce BER (ang. *long patch*) oprócz PCNA i endonukleazy FEN-1 uczestniczy również ligaza DNA I (Fortini i wsp., 2003; Slupphaug i wsp., 2003). Z kolei w krótkiej ścieżce BER (ang. *short patch*) bierze udział białko naprawcze XRCC1 oraz ligaza DNA III (Kubota i wsp., 1996; Caldecott i wsp., 1994; Fortini i wsp., 2003).

Opisane w poprzednim podrozdziale eksperymenty dowodzą, że w miejscu lokalnego uszkodzenia oksydacyjnego nie następuje gromadzenie ligazy DNA I. Przypuszczać zatem można, że powstałe uszkodzenie DNA naprawiane jest z wykorzystaniem krótkiej ścieżki

BER, a w procesie ligacji uczestniczy ligaza DNA III. Postanowiono zatem sprawdzić, czy w obszarze uszkodzenia zachodzić będzie akumulacja ligazy DNA III.

W tym celu komórki HeLa poddano przejściowej transfekcji (*Materiały i metody 3.2.3.2*) plazmidem GFP-Ligaza DNA III (*Materiały i metody 3.1.2*), a następnie lokalnie uszkodzano (*Materiały i metody 3.2.4*). Aby śledzić indukowane uszkodzeniem zmiany rozmieszczenia ligazy DNA III prowadzono pomiary zmian intensywności fluorescencji GFP na obszarze jądra komórkowego w czasie. Zarejestrowane obrazy zamieszczono poniżej (Ryc. 4.22).



Rycina 4.22. Rekrutacja ligazy DNA III do miejsc uszkodzenia

Rycina przedstawia obrazy dwóch (**A i B**) jąder komórek HeLa wykazujących ekspresję GFP-Ligazy DNA III, które inkubowano z EtBr (200 nM) i poddano lokalnemu uszkodzeniu chromatyny. Obraz zarejestrowany przed naświetlaniem niewielkiego (wskazanego żółtą ramką) obszaru wewnątrz jądra, oraz po 5 min, 10 min i 20 min od uszkodzenia. Odcinek skalujący 5 μ m.

W miejscu uszkodzenia następuje lokalne zwiększenie intensywności fluorescencji GFP (Ryc. 4.22), co świadczy o rekrutacji ligazy DNA III do obszaru uszkodzenia. Zatem, indukowane wzbudzonym jonem etidiowym oksydacyjne uszkodzenie DNA naprawiane jest w wyniku aktywacji krótkiej ścieżki BER, a w procesie tym uczestniczy ligaza DNA III. Wciąż jednak pozostaje do rozstrzygnięcia pytanie, jaką rolę w komórkowej odpowiedzi na uszkodzenie DNA pełni białko HP1 – czy może ono oddziaływać z ligazą DNA III?

4.2 HP1 w odpowiedzi komórki na uszkodzenie wywołane przez promieniowanie UV

Z opisanych w poprzednich podrozdziałach doświadczeń wynika, że białko HP1 ulega gromadzeniu w odpowiedzi na indukowane wzbudzonym jonem etidiowym oksydacyjne uszkodzenia chromatyny, które aktywują szlak naprawczy BER (krótka ścieżka) oraz mechanizm naprawy DSBs. Ponieważ w zastosowanej metodzie może być indukowanych kilka rodzajów uszkodzeń (wykryto 8-OHdG oraz DSBs, nie wykluczone jednak, że obecne są również inne rodzaje uszkodzeń) i aktywowany jest więcej niż jeden szlak naprawczy, nie można dać jednoznacznej odpowiedzi, w którym mechanizmie naprawczym uczestniczy nagromadzone białko HP1.

Postanowiono zatem zbadać, czy rekrutacja HP1 jest ogólną odpowiedzią komórki na uszkodzenie DNA i czy zachodzi ona również w innych procesach naprawczych. W pierwszej kolejności postanowiono sprawdzić, czy uszkodzeniom wywołanym przez UV i aktywacji drogi naprawczej NER towarzyszy rekrutacja białka HP1. Ta część pracy badawczej przeprowadzona została podczas półrocznego stypendium, które autorka pracy odbyła w grupie badawczej prof. Roel'a van Driel'a na Uniwersytecie w Amsterdamie, w ramach programu UE Marie Curie EST. Opisane w tym podrozdziale eksperymenty stanowiły część wspólnego projektu badawczego wykonanego we współpracy z Martijn'em Luijsterburg'iem z Uniwersytetu w Amsterdamie oraz z Christoffel'em Dinant'em z EMC w Rotterdamie. Uzyskane wyniki zamieszczone zostały we wspólnej publikacji (Luijsterburg i wsp., 2009).

4.2.1 Wykrywanie uszkodzeń DNA indukowanych przez UV i aktywacji NER

Promieniowanie UV z zakresu 200-380 nm prowadzi do powstawania wiązań kowalencyjnych, w tym również podwójnych wiązań C=C. Dwa powszechnie znane produkty oddziaływania UV na kwasy nukleinowe to cyklobutanowe dimery pirymidynowe (CPD) oraz 6-4 fotoprodukty (6-4PP). Uszkodzenia te wprowadzają zmiany w strukturze DNA oraz hamują działanie polimerazy i powodują zatrzymanie replikacji DNA. Komórki ssaków

wykorzystują NER (ang. *Nucleotide Excision Repair*), aby usunąć z genomu uszkodzenia DNA indukowane promieniowaniem UV (de Laat i wsp., 1999; Hoejmackers 2001). Ogromne znaczenie mechanizmu naprawczego NER zauważyć można w przypadku, gdy naprawa NER nie funkcjonuje prawidłowo, na skutek genetycznych mutacji białek naprawczych NER. Dochodzi wówczas do powstania poważnych schorzeń genetycznych, takich jak: Skóra pergaminowa (łac. *Xeroderma pigmentosum*), czy Zespół Cockayne'a (ang. *Cockayne's Syndrome*).

Uszkodzenia wywoływane promieniowaniem UV wprowadzano przy użyciu dwóch metod (*Materiały i metody* 3.2.6). W pierwszej metodzie wykorzystywano laser UV-C emitujący światło o długości fali 266 nm (Dinant i wsp., 2007). Eksperymenty z wykorzystaniem tej metody przeprowadzone zostały w Erasmus University Medical Center w Rotterdamie. W drugiej metodzie zastosowano lampę UV-C (254 nm) oraz poliwęglanowy filtr (Moné i wsp., 2001; Moné i wsp., 2004; Luijsterburg i wsp., 2007). Obydwie metody wprowadzania uszkodzeń indukowanych promieniowaniem UV uruchamiają jedynie rekrutację białek szlaku naprawczego NER i nie zachodzi gromadzenie czynników zaangażowanych w inne typy naprawy DNA (Houtsmuller i wsp., 1999; Dinant i wsp., 2007).

Metoda wprowadzania uszkodzeń przy użyciu lampy UV-C i poliwęglanowego filtra posiada tę zaletę, że umożliwia lokalne naświetlenie dużej liczby komórek i pozwala uzyskać w monowarstwie komórkowej, w tym samym czasie, zarówno komórki uszkodzone, jak i nieuszkodzone komórki kontrolne (Moné i wsp., 2001). Powstałe po naświetlaniu lampą UV-C uszkodzenia DNA wizualizowano poprzez barwienie immunofluorescencyjne z użyciem przeciwciał TDM-2, które posiadają powinowactwo do dimerów CPD (Moné i wsp., 2001). Doświadczenia te wykazały obecność uszkodzeń DNA w wyraźnie rozpoznawalnych obszarach jądra komórkowego. Liczba lokalnie uszkodzonych jąder komórkowych odpowiadała gęstości porów filtra (4×10^5 porów/cm²). Po naświetlaniu UV uzyskiwano zatem monowarstwę komórek, w której większość jąder komórkowych była albo nienaświetlona, albo uszkodzona w jednym miejscu. Tylko niewielka liczba jąder komórkowych zawierała więcej niż jeden obszar lokalnie uszkodzonego DNA (Moné i wsp., 2001). Średnica uszkodzonego obszaru jądra odpowiadała średnicy porów. Barwienie w nienaświetlonym obszarze uszkodzonego jądra komórkowego dawało sygnał odpowiadający poziomowi tła lub nieuszkodzonym komórkom kontrolnym. Dowodzi

to zatem, że materiał, z którego zbudowany jest filtr (membrana) wydajnie absorbuje promieniowanie UV o długości 254 nm (Moné i wsp., 2001).

Obydwie metody wprowadzania uszkodzeń indukowanych promieniowaniem UV, wykorzystano w eksperymentach, których celem było sprawdzenie, czy HP1 uczestniczy w procesie naprawy NER.

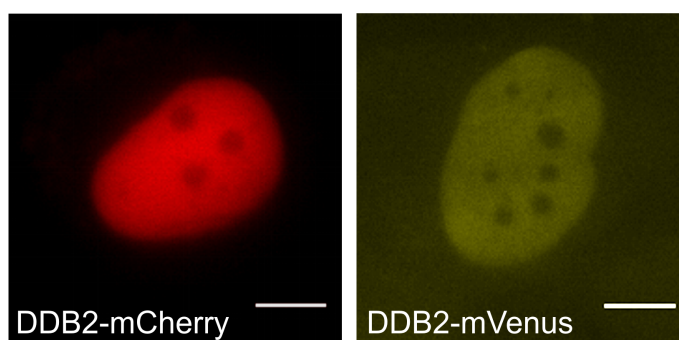
4.2.1.1 Wykrywanie DDB2 i aktywacja naprawy NER w komórkach

Kompleks wiążący DNA uszkodzone promieniowaniem UV (ang. *UV DNA damage binding*, UV-DDB) odgrywa kluczową rolę w detekcji uszkodzenia i jego naprawie. Kompleks ten zawiera dwie podjednostki: DDB1 (p127) oraz DDB2 (p48) (Dualan i wsp., 1995; Takao i wsp., 1993). Mutacje w podjednostce DDB2 odpowiadają za fenotyp XP-E (Nichols i wsp., 2000; Rapić-Otrin i wsp., 2003). Komórki z niedoborem DDB2, tzn. ludzkie komórki XP-E charakteryzują się upośledzoną naprawą CPD oraz opóźnioną naprawą 6-4PP (Hwang i wsp., 1999; Moser i wsp., 2005). Wykazano, że to właśnie DDB2, a nie DDB1, odpowiedzialne jest za wiązanie do uszkodzonego DNA (Hwang i wsp., 1998; Li i wsp., 2006; Tang i wsp., 2000).

Po początkowym związaniu DDB2 do obszarów uszkodzeń DNA wywołanych przez UV, a tym samym wyznakowaniu tych miejsc do naprawy NER, stężenie DDB2 ulega zmniejszeniu, na skutek proteolitycznej degradacji DDB2. Degradacja ta jest bardzo istotna, gdyż w przypadku jej braku wszystkie potencjalne miejsca wiązania dla XPC zajęte byłyby przez DDB2 (Luijsterburg i wsp., 2007). Wiązanie DDB2 do miejsc uszkodzeń, które indukowane są promieniowaniem UV, nie odbywa się za pośrednictwem XPC. Wiązanie DDB2 obserwowano również w nieobecności funkcjonalnego XPC, XPA, XPG oraz XPF (Luijsterburg i wsp., 2007). Chociaż DDB2 nie jest częścią kompleksu utworzonego przed nacięciem DNA (ang. *pre-incision*), odgrywa ono centralną rolę w NER. Prawdopodobnie DDB2 znakując miejsca uszkodzenia przygotowuje chromatynę, w sąsiedztwie uszkodzonego DNA, na złożenie kompleksu „pre-incision” (Luijsterburg i wsp., 2007). Wyniki licznych badań dowodzą oddziaływania DDB2 z kompleksami zmiany struktury chromatyny, takimi jak np. acetylotransferaza histonowa p300 (Datta i wsp., 2001; Rapić-Otrin i wsp., 2002).

Aby badać zachowanie białka HP1 w naprawie NER potrzebowano jakiegoś markera, który specyficznym znakowałby uszkodzenia DNA wywołane promieniowaniem UV. Idealnym kandydatem okazało się białko DDB2, które bierze udział w pierwszym etapie naprawy i tworzy charakterystyczne skupiska w miejscu powstałych, charakterystycznych dla UV uszkodzeń DNA, takich jak: CPD oraz 6-4PP. Białko DDB2 stosowano zatem jako marker uszkodzeń UV, ponieważ gromadzi się ono już w ciągu pierwszych kilkudziesięciu sekund od wprowadzenia uszkodzenia. W opisanych poniżej eksperymentach przedstawiono zachowanie białka DDB2 w odpowiedzi na uszkodzenia wywołane promieniowaniem UV.

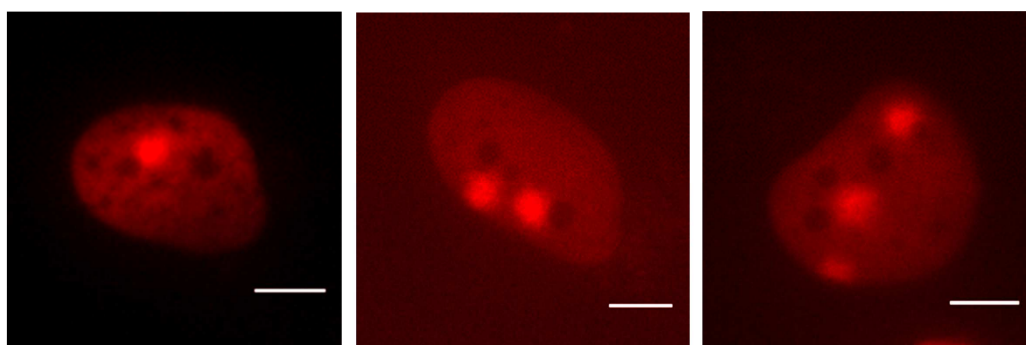
Indukowane UV uszkodzenia wprowadzano w komórkach fibroblastów ludzkich MRC-5, które najpierw poddawano transfekcji (*Materiały i metody 3.2.3.3*) plazmidem DDB2-mCherry lub DDB2-mVenus, a następnie naświetlano promieniowaniem UV-C (254 nm) przez poliwęglanowy filtr z porami o średnicy 5 μm (*Materiały i metody 3.2.6.1*). W wyniku naświetlania w miejscu porów generowane są obszary lokalnych uszkodzeń DNA, w których zachodzi gromadzenie kolejnych białek naprawczych NER. Specyficznym markerem rejonów lokalnego uszkodzenia, wywoływanego przez promieniowanie UV, jest białko DDB2, które bierze udział w pierwszym etapie naprawy. Na poniższych obrazach przedstawiono jądrowy rozkład białka DDB2 w komórkach kontrolnych (nieotraktowanych UV) (Ryc. 4.23) oraz uszkodzonych, naświetlanych UV (Ryc. 4.24).



Rycina 4.23. Rozkład DDB2 w jądrze komórkowym

Obrazy jąder komórek MRC-5 wykazujących ekspresję DDB2-mCherry lub DDB2-mVenus i wykazujących typowy jądrowy rozkład DDB2. Odcinek skalujący 5 μm .

W komórkach fibroblastów ludzkich, które nie zostały uszkodzone promieniowaniem UV, DDB2 wykazuje równomierne rozmieszczone na terenie jądra komórkowego (Ryc. 4.23). Zauważyć jednak można, że stężenie białka DDB2 jest bardzo niskie w jąderkach.



Rycina 4.24. Rekrutacja DDB2 do obszarów lokalnych uszkodzeń UV

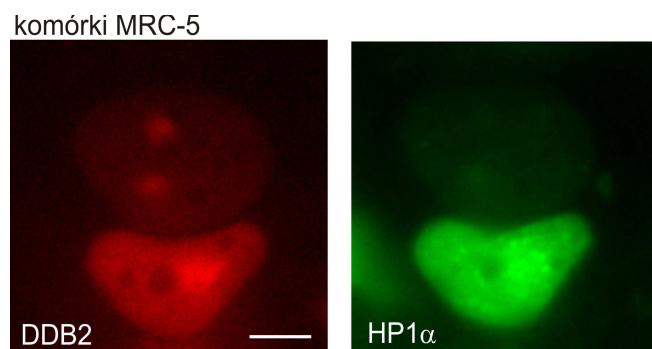
Obrazy jąder komórek MRC-5 wykazujących ekspresję DDB2-mCherry, które poddano lokalnemu uszkodzeniu promieniowaniem UV (dawka 100 J/m^2 , lampa UV-C) przez filtr poliwęglanowy. Obrazy zarejestrowano po 15 minutach od wprowadzenia uszkodzenia. Odcinek skalujący $5 \mu\text{m}$.

Użytą tu metodą wprowadza się 1, 2 lub nawet 3 obszary uszkodzeń w pojedynczym jądrze komórkowym. Zauważyć można, że w komórkach poddanych lokalnemu uszkodzeniu UV zachodzą zmiany w jądrowym rozkładzie białka DDB2 (Ryc. 4.24). W obszarach uszkodzeń, indukowanych promieniowaniem UV, następuje zwiększenie intensywności fluorescencji DDB2-mCherry (lub DDB2-mVenus), które wynika z rekrutacji białka do obszaru uszkodzenia. Wcześniejsze eksperymenty (Luijsterburg i wsp., 2007) wykazały, że gromadzeniu DDB2 towarzyszy zmniejszenie całkowitej jądrowej fluorescencji DDB2-mCherry/DDB2-mVenus (około 6 godzin) w porównaniu z komórkami, które nie zostały uszkodzone. Obserwowane zmniejszenie fluorescencji najprawdopodobniej wynika z proteolitycznej degradacji DDB2, dla której sygnałem jest wiązanie białka w miejscu uszkodzenia (Luijsterburg i wsp., 2007).

4.2.2 Badanie akumulacji białek HP1 w miejscach uszkodzeń wywołanych przez UV

Dysponując metodą wprowadzania w jądrach komórkowych lokalnych uszkodzeń, wywoływanych przez UV, oraz markerem (DDB2) wykrywającym powstałe uszkodzenie, postanowiono sprawdzić, czy białko HP1 ulega rekrutacji w obszarach uszkodzeń DNA, indukowanych promieniowaniem UV. W tym celu wykorzystano komórki MRC-5 EGFP-HP1 α , które poddano przejściowej transfekcji (*Materiały i metody 3.2.3.3*) plazmidem DDB2-mCherry. Po transfekcji, komórki poddano lokalnemu naświetlaniu UV (*Materiały*

i metody 3.2.6.1). W wyniku naświetlania UV generowane były uszkodzenia CPD i 6-4PP, które uruchamiają drogę naprawy NER. Wewnątrzjądrowe obszary uszkodzenia wyznakowane są fluorescencyjnie w postaci skupisk nagromadzonego białka naprawczego DDB2-mCherry. Przeprowadzono pomiary zmian rozmieszczenia białek HP1 α po uszkodzeniu UV. Zarejestrowane obrazy zamieszczono poniżej (Ryc. 4.25).



Rycina 4.25. Rekrutacja białek HP1 do obszarów uszkodzeń UV

Obrazy jąder komórek MRC-5 z EGFP-HP1 α wykazujących ekspresję DDB2-mCherry, które poddano lokalnemu uszkodzeniu promieniowaniem UV (dawka 100 J/m²), przepuszczonym przez filtr poliwęglanowy. Obrazy zarejestrowane po 30 min od wprowadzenia uszkodzenia. Odcinek skalujący 5 μ m.

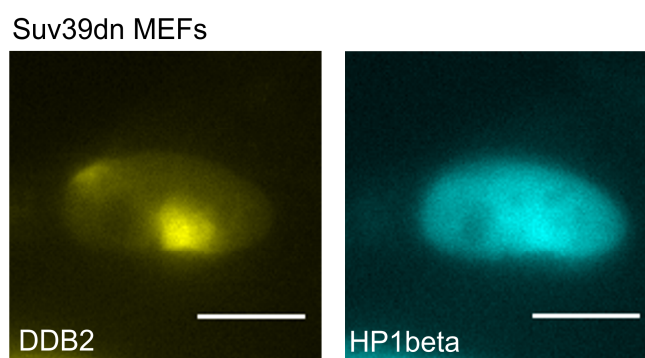
Zauważyć można (Ryc. 4.25), że w miejscach lokalnych uszkodzeń, indukowanych promieniowaniem UV, które wyznakowane są nagromadzonym białkiem naprawczym (DDB2), następuje zwiększenie intensywności fluorescencji wynikające z gromadzenia białka HP1 α . Kolejne eksperymenty pokazały, iż w miejscach uszkodzeń zachodzi gromadzenie wszystkich trzech izoform białka HP1 (Luijsterburg i wsp., 2009). Uzyskane wyniki potwierdzone zostały w doświadczeniach, przeprowadzonych na komórkach nietransfekowanych, z zastosowaniem barwienia immunofluorescencyjnego. Wykazano w nich, że również endogenne białko HP1 ulega akumulacji w miejscach uszkodzeń, które wywołane są promieniowaniem UV (Luijsterburg i wsp., 2009).

4.2.3 Badanie akumulacji białek HP1 β w rejonach uszkodzonej chromatyny w komórkach Suv39dn

Metylotransferaza histonowa SUV39 odpowiedzialna jest za potrójną metylację lizyny 9 histonu H3 (Me3K9H3). Wiadomo, że domena CD białka HP1 wiąże się z DNA poprzez Me3K9H3. Wcześniejsze doświadczenia wykazały, że domena chromoshadow (CSD) jest

niezbędna i wystarczająca w rekrutacji białka HP1 do miejsc uszkodzeń, indukowanych UV (Luijsterburg i wsp., 2009). W celu dalszego potwierdzenia, że rzeczywiście chromodomena (CD) HP1 nie jest potrzebna do rekrutacji białka, postanowiono zbadać akumulację HP1 w komórkach z delecją Suv39, tzn. pozbawionych potrójnej metylacji Me3K9H3.

Komórki MEFs z podwójną delecją Suv39h1 oraz Suv39h2 (MEFs Suv39dn), poddano transfekcji (*Materiały i metody 3.2.3.3*) dwoma wektorami (kotransfekcja), z których jeden zawierał SCFP3a-HP1 β , a drugi DDB2-mCherry. Monowarstwa transfekowanych komórek MEFs Suv39dn pokryta została poliwęglanowym filtrem z porami, przez który naświetlano komórki promieniowaniem UV (*Materiały i metody 3.2.6.1*). W wyniku naświetlania UV generowano uszkodzenia i aktywowana była droga naprawy NER. Wewnątrzjądrowe obszary uszkodzenia wyznakowane zostały fluorescencyjnie nagromadzonym białkiem naprawczym DDB2-mCherry. Na poniższych obrazach przedstawiono jądrową lokalizację białka HP1 w komórkach MEFs Suv39dn, które lokalnie uszkodzono promieniowaniem UV (Ryc. 4.26).



Rycina 4.26. Rekrutacja białka HP1 do obszarów uszkodzeń UV w komórkach z delecją Suv39

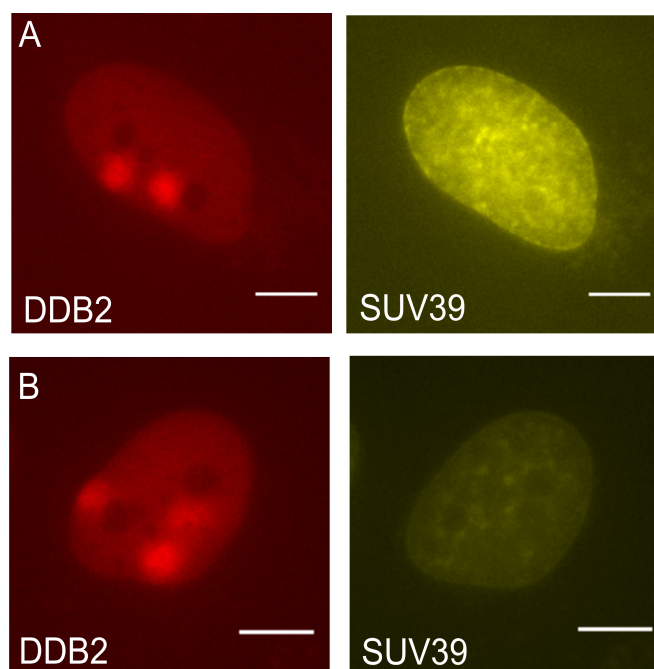
Obrazy jądra komórki MEFs Suv39dn wykazujące ekspresję DDB2-mCherry oraz SCFP3a-HP1 β . Komórkę poddano lokalnemu uszkodzeniu UV (dawka 100 J/m²) przez filtr poliwęglanowy. Obszary lokalnego uszkodzenia UV zaznaczone są miejscami zgromadzonego białka DDB2-mCherry. W tych rejonach zachodzi również akumulacja HP1 β . Obraz zarejestrowano 30 min po wprowadzeniu uszkodzenia. Odcinek skalujący 5 μ m.

Po wprowadzeniu lokalnych uszkodzeń, indukowanych UV, następuje wyraźna rekrutacja białka SCFP3a-HP1 β w komórkach z delecją Suv39 (Ryc. 4.26). Wyniki tych eksperymentów potwierdzają rezultaty wcześniejszych doświadczeń przeprowadzonych na mutantach delecyjnych HP1 (Luijsterburg i wsp., 2009) i wyraźnie wskazują, że w rekrutacji i/lub wiązaniu białka HP1 nie uczestniczy chromodomena. Obserwacja ta sugeruje, iż rekrutacja HP1 zachodzi przy udziale domeny chromoshadow.

4.2.4 Badanie akumulacji SUV39H1 w obszarach uszkodzeń UV

Wyniki opisanych powyżej eksperymentów dowodzą, że w rekrutacji białka HP1 zaangażowana jest domena chromoshadow (CSD). Mutant białka HP1, pozbawiony domeny CSD, nie ulegał gromadzeniu w obszarach uszkodzeń DNA indukowanych UV, z kolei inny mutant, pozbawiony domeny CD, wciąż był rekrutowany (Luijsterburg i wsp., 2009). Wysunięto zatem hipotezę, że chromodomena (CD) HP1 nie uczestniczy w rekrutacji białka do miejsc uszkodzeń DNA, wywołanych promieniowaniem UV. Umieszczona na N-końcu domena CD oddziałuje z potrójnie zmetylowaną lizyną w pozycji 9 histonu H3 (Me3K9H3) i w ten sposób bezpośrednio wiąże białko HP1 z DNA (Jacobs i Khorasanizadeh 2002). Markery epigenetyczne w postaci Me3K9H3 generowane są przez metylotransferazę histonową SUV39 (Schotta i wsp., 2002; Lehnertz i wsp., 2003). Co ciekawe, jednym z partnerów interakcji dla CSD domeny białka HP1 jest również SUV39. Postanowiono zatem sprawdzić, czy metylotransferaza SUV39H1 jest rekrutowana do miejsc indukowanych przez UV uszkodzeń DNA.

W tym celu użyto komórek MRC-5, które poddano transfekcji (*Materiały i metody 3.2.3.3*) dwoma plazmidami (kotransfekcja), z których jeden zawierał gen ludzkiego Suv39H1 sprzężony z białkiem fluoryzującym (EYFP-Suv39H1 lub EGFP-Suv39H1), a drugi DDB2-mVenus lub DDB2-mCherry. Komórki poddano lokalnemu naświetlaniu UV (*Materiały i metody 3.2.6.1*). Wewnątrzjądrowe obszary uszkodzenia wyznakowane zostały fluorescencyjnie w postaci skupisk nagromadzonego białka naprawczego DDB2. Badano zmiany rekrutacji metylotransferazy SUV39H1 po wprowadzeniu lokalnych uszkodzeń DNA indukowanych promieniowaniem UV, w komórkach MRC-5. Zarejestrowane obrazy zamieszczono poniżej (Ryc. 4.27).



Rycina 4.27. Brak gromadzenia SUV39 w obszarach lokalnych uszkodzeń UV

Obrazy jąder komórek MRC-5 wykazujących ekspresję **(A)** EYFP-Suv39H1 i DDB2-mVenus oraz **(B)** EGFP-Suv39H1 i DDB2-mCherry, które poddano lokalnemu uszkodzeniu UV (dawka 100 J/m^2) przez filtr poliwęglanowy. Obszary lokalnego uszkodzenia UV zaznaczone są miejscami zgromadzonego białka DDB2, nie widać jednak rekrutacji SUV39H1. Obrazy zarejestrowano 30 min po wprowadzeniu uszkodzenia. Odcinek skalujący $5 \mu\text{m}$.

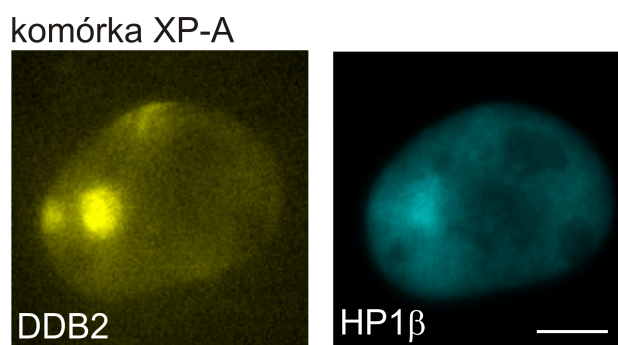
Wyniki eksperymentów pokazanych na Ryc. 4.27 wskazują, iż indukowane przez UV lokalne uszkodzenia DNA nie powodują rekrutacji SUV39H1 lub ilość nagromadzonego białka znajduje się poniżej progu detekcji mikroskopu. Wnioskować zatem można, iż metylacja Me3K9H3 nie jest powiązana z rekrutacją białka HP1 do uszkodzonych rejonów jądra, co jest zgodne z wcześniejszymi obserwacjami (Wyniki 4.2.3).

4.2.5 Badanie zależności rekrutacji HP1 od aktywności NER

W komórkach ssaków, uszkodzenia DNA indukowane przez promieniowanie UV usuwane są wyłącznie na drodze NER. Uszkodzenie uruchamia kilka zachodzących w chromatynie procesów, m.in. rekrutację CAF-1, która zachodzi po wbudowaniu histonu H3.1, czy ubikwitynizację lizyny 119 histonu H2A. Wykazano, że w naprawie NER procesy te są wyraźnie zależne od wiązania i aktywacji białek wchodzących w skład kompleksu utworzonego przed nacięciem DNA (ang. *pre-incision*) (Green i Almouzni 2003; Bergink i wsp., 2006; Polo i wsp., 2006). Odkrycia te dowodzą pewnej sekwencji zdarzeń i wskazują, że reorganizacja chromatyny zachodzi najprawdopodobniej po naprawie NER. Nasuwają się

zatem następujące pytania: czy rekrutacja HP1 zależy od naprawy NER, czy gromadzenie HP1 jest wczesnym, czy może raczej późnym etapem naprawy? Aby uzyskać odpowiedzi na te pytania postanowiono zbadać rekrutację HP1 w komórkach, które były pozbawione poszczególnych białek NER, bądź funkcje tych białek zostały upośledzone.

W doświadczeniach użyta została linia komórkowa XP12RO (XP-A) z upośledzoną naprawą NER. Komórki ztransfekowano (*Materiały i metody* 3.2.3.3) dwoma wektorami (kotransfekcja), z których jeden zawierał HP1 sprzężone z białkiem fluoryzującym (SCFP3a-HP1 β), zaś drugi DDB2-mVenus, a następnie poddano je lokalnemu naświetlaniu UV (*Materiały i metody* 3.2.6.1). Wewnątrzjądrowe obszary uszkodzenia wyznakowane są fluorescencyjnie w postaci skupisk nagromadzonego białka naprawczego DDB2-mVenus. Badano zmiany rozmieszczenia HP1 po wprowadzeniu lokalnych uszkodzeń DNA indukowanych UV, w komórkach z deficytem NER. Zarejestrowane obrazy zamieszczono poniżej (Ryc. 4.28).



Rycina 4.28. Rekrutacja białek HP1 w komórkach z deficytem NER

Obrazy jądra komórki XP12RO (XP-A), wykazujące ekspresję DDB2-mVenus i SCFP3a-HP1 β , którą poddano lokalnemu uszkodzeniu UV w dawce 100 J/m² przez poliwęglanowy filtr przy użyciu lampy UV-C. Obszary lokalnego uszkodzenia UV zaznaczone są miejscami nagromadzonego białka DDB2. Obraz zarejestrowano po 30 min od wprowadzenia uszkodzenia. Odcinek skalujący 5 μ m.

Na powyższych obrazach (Ryc. 4.28) zauważyć można, że akumulacja białka HP1 zachodzi w komórkach z upośledzoną naprawą NER. Rekrutacja HP1 do miejsc uszkodzeń nie zależy zatem od funkcjonalnego białka XPA. Gromadzenie HP1 obserwowane było również w komórkach XP-C, XP-E, XPC-/- oraz CS-B (Luijsterburg i wsp., 2009). A zatem, wiązanie HP1 nie zależy od aktywności białek GG-NER ani TC-NER.

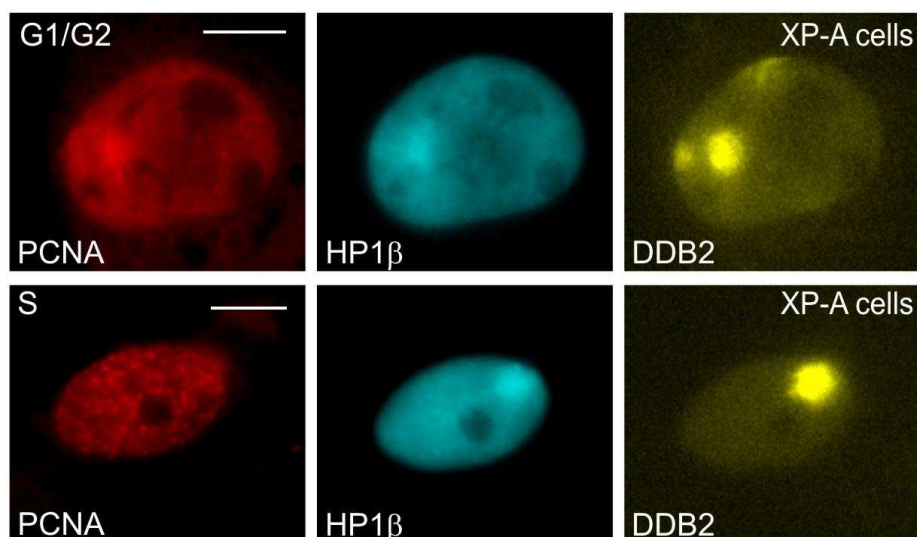
Jednym z możliwych wyjaśnień rekrutacji HP1 do miejsc uszkodzeń DNA w komórkach z upośledzoną naprawą NER jest to, że obserwowane komórki znajdowały się w fazie S cyklu podziałowego. Uszkodzenia indukowane przez UV w fazie S mogą zostać przekształcone podczas replikacji w innego rodzaju uszkodzenia (np. DSBs), a ich naprawa zachodzić może na innej drodze niż NER.

4.2.6 Badanie zależności rekrutacji HP1 od fazy cyklu komórkowego

Opisane we wspólnej publikacji doświadczenia wykazały, że wszystkie trzy izoformy białka HP1 (HP1 α , HP1 β oraz HP1 γ) ulegają rekrutacji do miejsc uszkodzeń DNA indukowanych promieniowaniem UV (Luijsterburg i wsp., 2009). Dalsze eksperymenty pokazały, że rekrutacja HP1 zachodzi również w komórkach z upośledzoną naprawą NER (ang. *NER deficient cells*), a wiązanie HP1 nie zależy od aktywności białek GG-NER ani też TC-NER (Luijsterburg i wsp., 2009). Sugeruje to, iż HP1 nie jest elementem naprawy NER.

Jednym z możliwych wyjaśnień rekrutacji HP1 do miejsc uszkodzeń DNA w komórkach z upośledzoną naprawą NER jest to, że obserwowane komórki znajdowały się w fazie S cyklu podziałowego. Uszkodzenia indukowane przez UV w fazie S mogą zostać przekształcone podczas replikacji w innego rodzaju uszkodzenia (np. DSBs), a ich naprawa zachodzić może na innej drodze niż NER (Ward i Chen 2001; Ward i wsp., 2004; Halicka i wsp., 2005). Postanowiono zatem sprawdzić, czy rekrutacja białka HP1 zależy od fazy cyklu komórkowego. W tym celu użyto PCNA jako markera faz cyklu komórkowego (Essers i wsp., 2005).

W eksperymentach wykorzystano komórki MRC-5 oraz XP12RO (XP-A), które poddano transfekcji (*Materiały i metody* 3.2.3.3) trzema wektorami: SCFP3a-HP1 β , DDB2-mVenus i mCherry-PCNA, a następnie lokalnie naświetlano UV (*Materiały i metody* 3.2.6.1). Wewnątrzjądrowe obszary uszkodzenia wyznakowane zostały fluorescencyjnie przez skupiska nagromadzonego DDB2-mVenus. Zarejestrowane obrazy zamieszczono poniżej (Ryc. 4.29).



Rycina 4.29. Rekrutacja białek HP1 nie zależy od fazy cyklu podziałowego

Obrazy jąder komórek XP12RO (XP-A), wykazujących ekspresję SCFP3a-HP1 β , DDB2-mVenus i mCherry-PCNA, które poddano lokalnemu uszkodzeniu UV (dawka 100 J/m²) przez filtr poliwęglanowy. Obszary uszkodzenia UV zaznaczone są miejscami nagromadzonego DDB2-mCherry, w tych rejonach zachodzi również akumulacja HP1 β . Obrazy zarejestrowano 30 min po wprowadzeniu uszkodzenia. Rozmieszczenie PCNA w jądrze wskazuje, że komórka na górnym panelu znajduje się w fazie **G1/G2**, a komórka na dolnym panelu - w fazie **S**. Odcinek skalujący 5 μ m.

Rekrutacja HP1 do obszarów uszkodzeń DNA, które indukowane są promieniowaniem UV, zachodzi w komórkach w fazie S (Ryc. 4.29) (wzory lokalizacji PCNA typowe dla fazy S) oraz w komórkach znajdujących się poza fazą S, tzn. w fazie G1 lub G2 (Ryc. 4.29), gdzie PCNA posiada jednorodny rozkład w jądrze komórkowym. Stwierdzić zatem można, że gromadzenie HP1 w miejscach uszkodzeń wywołanych światłem UV zachodzi niezależnie od fazy cyklu podziałowego. Dla potwierdzenia uzyskanych wyników sprawdzono również rozmieszczenie endogennego białka HP1 w komórkach nieproliferujących (komórki w fazie G0), które poddano lokalnemu naświetlaniu UV. Wyraźna akumulacja endogennego HP1 obserwowana była również w tych komórkach (Luijsterburg i wsp., 2009).

Obserwowana rekrutacja HP1 do miejsc uszkodzeń, wywołanych przez promieniowanie UV, zachodzi we wszystkich fazach cyklu komórkowego, wnioskować zatem można, że akumulacja białka HP1 występuje w obszarach uszkodzeń DNA indukowanych UV, a nie tylko DSBs, które powstawać mogą w fazie S cyklu podziałowego.

4.2.7 Badanie różnic w procesie akumulacji HP1 w komórkach XP-A i komórkach z funkcjonalną naprawą NER

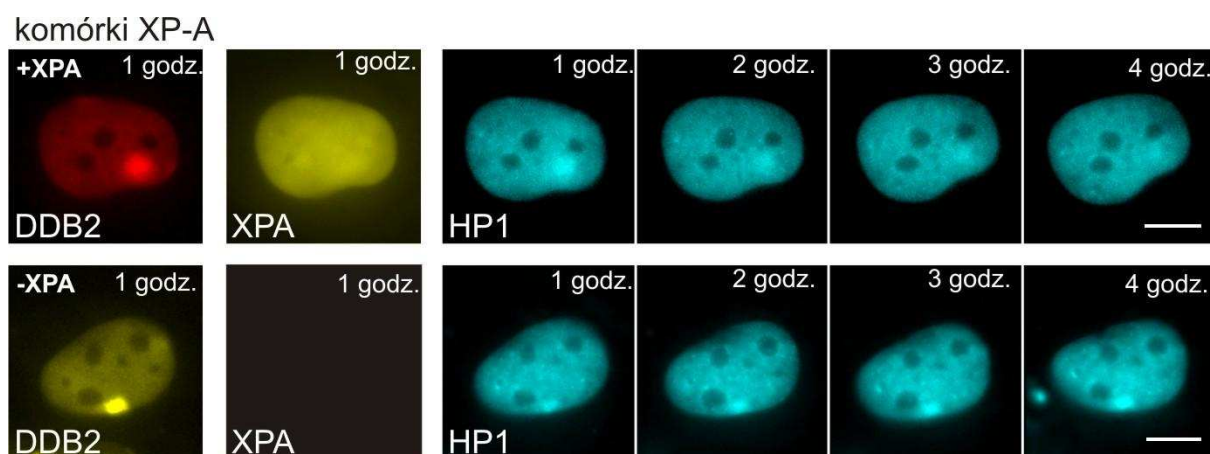
Opisane w rozdziale Wyniki 4.2.6 doświadczenia dowodzą, że indukowane UV gromadzenie HP1 zachodzi we wszystkich fazach cyklu komórkowego. Co więcej, rekrutacja HP1 jest niezależna od aktywności czynników naprawczych NER (Luijsterburg i wsp., 2009). Postanowiono zatem sprawdzić, czy istnieją jakieś różnice w długości czasu pozostania białka HP1 w miejscu uszkodzenia w komórkach, w których brakuje funkcjonalnej naprawy NER, w porównaniu z komórkami, w których naprawa NER przebiega prawidłowo. Aby to zbadać, prowadzono pomiary akumulacji HP1 w funkcji czasu po wprowadzeniu lokalnego uszkodzenia DNA, w komórkach z upośledzoną naprawą NER.

W tym celu użyto komórek XP12RO (XP-A), które poddano transfekcji (*Materiały i metody 3.2.3.3*) dwoma plazmidami SCFP3a-HP1 β i DDB2-mCherry. Jako kontroli użyto tych samych komórek (XP-A), które oprócz SCFP3a-HP1 β i DDB2-mCherry dodatkowo ztransfekowano (*Materiały i metody 3.2.3.3*) trzecim plazmidem mVenus-XPA, aby uzupełnić fenotyp brakujący w naprawie NER. Obydwa rodzaje komórek poddano lokalnemu naświetlaniu UV (*Materiały i metody 3.2.6.1*). Wewnątrzjądrowe obszary uszkodzenia wyznakowane zostały fluorescencyjnie poprzez skupiska nagromadzonego białka naprawczego DDB2-mCherry.

Prowadzono pomiary zmian stężenia białka HP1 po wprowadzeniu lokalnych uszkodzeń, indukowanych promieniowaniem UV, w komórkach XP-A oraz w komórkach z przywróconą zdolnością naprawczą XPA. Zarejestrowane obrazy zamieszczono poniżej (Ryc. 4.30).

Wyniki eksperymentów pokazane na Ryc. 4.30 wskazują na wyraźnie dłuższy czas pozostania w miejscu uszkodzenia nagromadzonego białka HP1 w komórkach z deficytem NER, w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Zauważyć można, że w komórkach XP-A nagromadzone białko HP1 jest wciąż obecne w rejonie uszkodzonym 4 godziny po uszkodzeniu (Ryc. 4.30). Z kolei w komórkach XP-A, które w celu przywrócenia zdolności naprawczej NER poddano transfekcji plazmidem mVenus-XPA, poziom

związanego HP1 stopniowo zmniejsza się w czasie i akumulacja HP1 jest prawie niewidoczna po 4 godzinach od uszkodzenia (Ryc. 4.30).



Rycina 4.30. Dłuższe wiązanie HP1 w komórkach z deficytem NER niż w komórkach z funkcjonalną naprawą NER

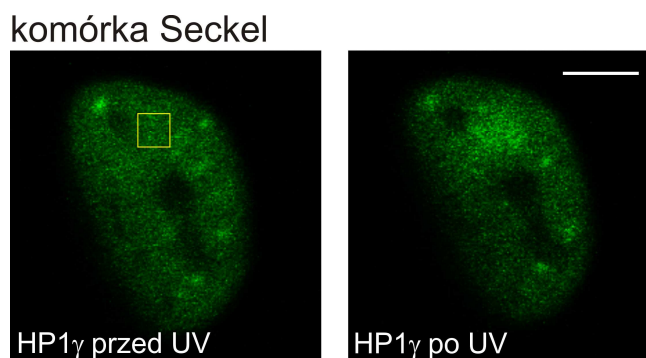
Obrazy jąder komórek XP12RO (XP-A) wykazujących ekspresję SCFP3a-HP1 β , DDB2-mCherry i mVenus-XPA (górny panel **+XPA**) oraz SCFP3a-HP1 β i DDB2-mVenus (dolny panel **-XPA**); które poddano lokalnemu uszkodzeniu UV (dawka 100 J/m²) przez filtr poliwęglanowy. Obszary lokalnego uszkodzenia UV zaznaczone są nagromadzonego DDB2. Obrazy rejestrowano po 1-4 godz. od wprowadzenia uszkodzenia. Stężenie nagromadzonego białka HP1 ulega zmniejszeniu w miejscu uszkodzenia w komórkach z prawidłową naprawą NER, zaś w komórkach z upośledzoną NER stężenie HP1 pozostaje wciąż wysokie, nawet po 4 godz. od uszkodzenia. Odcinek skalujący 5 μ m.

Obserwacje te prowadzą do wniosku, że czas przebywania nagromadzonego białka HP1 w obszarze uszkodzonym zależy od obecności nienaprawionych uszkodzeń DNA.

4.2.8 Badanie akumulacji HP1 w komórkach Seckel

W odpowiedzi na uszkodzenie uruchomiony zostaje proces naprawy DNA i następuje aktywacja szlaku kinaz sygnałowych ATR/ATM/DNA-PK, oraz aktywacja punktów kontrolnych cyklu komórkowego (Chk1, Chk2). W konsekwencji tych zjawisk dochodzi do fosforylacji wielu białek uczestniczących w komórkowej odpowiedzi na uszkodzenie DNA (ang. *DNA damage response*, DDR) (Bartek i Lukas 2007). Dokładny mechanizm aktywacji kinazy ATR nie został jeszcze poznany. Nie wiadomo, czy aktywacja ATR wymaga naprawy uszkodzenia przez NER, a także, czy ATR może wiązać się bezpośrednio do uszkodzonego DNA (Choi i wsp., 2007; O'Driscoll i wsp., 2003). Wcześniejsze doświadczenia wykazały, że rekrutacja HP1 nie wymaga czynników NER (Luijsterburg i wsp., 2009). W kolejnych eksperymentach postanowiono sprawdzić, czy akumulacja HP1 zależy od ATR.

Do eksperymentów wykorzystano komórki Seckel, które posiadają poważnie zredukowaną ekspresję ATR (O'Driscoll i wsp., 2003). Komórki poddano transfekcji (*Materiały i metody 3.2.3.3*) plazmidem EGFP-HP1 γ , a następnie naświetlano pochodzącą z lasera UV-C wiązką światła o długości 266 nm (*Materiały i metody 3.2.6.2*). Zarejestrowane obrazy zamieszczono na Ryc. 4.31.



Rycina 4.31. Rekrutacja białek HP1 w komórkach ze zredukowaną ekspresją ATR

Obrazy jądra komórki Seckel wykazujące ekspresję EGFP-HP1 γ , którą poddano lokalnemu uszkodzeniu przy użyciu lasera UV-C (266 nm); obszar uszkodzenia wskazano żółtym kwadratem. Obrazy zarejestrowano 30 min po wprowadzeniu uszkodzenia. Odcinek skalujący 5 μ m.

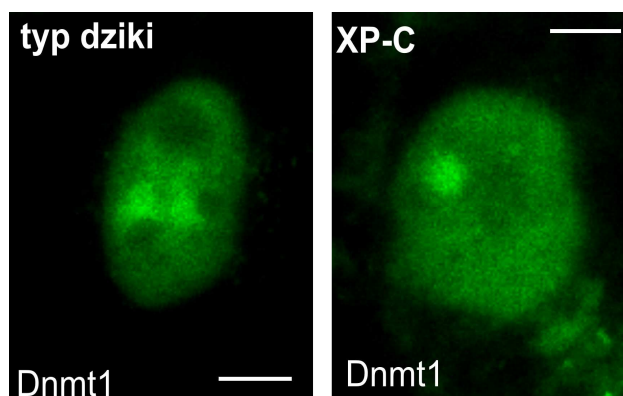
Na powyższych obrazach (Ryc. 4.31) zauważyć można, że gromadzenie białka HP1 zachodzi nadal w komórkach ze zredukowaną ekspresją ATR. Przypuszczać zatem można, że rekrutacja białek HP1 do miejsc uszkodzeń nie wymaga indukcji aktywowanej uszkodzeniem DNA kaskady transdukcji sygnału, w której uczestniczy ATR.

4.2.9 Badanie rekrutacji Dnmt1 w obszarach uszkodzeń UV

Opisane w poprzednich podrozdziałach (*Wyniki 4.2.3 i 4.2.4*) eksperymenty dowodzą, że rekrutacja białek HP1 do miejsc uszkodzeń DNA indukowanych UV zachodzi przy udziale domeny chromoshadow (CSD). Wydaje się zatem logiczne, aby wśród białek oddziałujących z domeną CSD rozpocząć poszukiwania białka odpowiedzialnego za rekrutację HP1. W kolejnych eksperymentach postanowiono zatem sprawdzić, czy białka oddziałujące z domeną CSD są również przywoływane do miejsc uszkodzenia. Jednym z takich białek jest metylotransferaza Dnmt1 (ang. *DNA methyltransferase 1*), która może oddziaływać bezpośrednio z domeną CSD HP1 (Smallwood i wsp., 2007). Ostatnie doniesienia podają, że Dnmt1 ulega akumulacji w miejscach uszkodzeń DNA (Mortusewicz i wsp., 2005). Ponadto, wcześniejsze eksperymenty wykazały, iż Dnmt1 ulega gromadzeniu w obszarach

oksydacyjnych uszkodzeń DNA, indukowanych wzbudzoną jEt (Wyniki 4.1.12). Postanowiono zatem sprawdzić, czy również w miejscach uszkodzeń DNA indukowanych promieniowaniem UV następuje akumulacja Dnmt1.

Komórki HeLa oraz XP-C ztransfekowano (*Materiały i metody 3.2.3.3*) dwoma plazmidami: EGFP-Dnmt1 i DDB2-mCherry. Następnie, komórki poddano lokalnemu naświetlaniu UV (*Materiały i metody 3.2.6.1*). Wewnątrzjądrowe obszary uszkodzenia wyznakowane zostały fluorescencyjnie poprzez skupiska nagromadzonego DDB2. Prowadzono pomiary zmian jądrowego rozkładu Dnmt1 w odpowiedzi na lokalne, wywołane promieniowaniem UV, uszkodzenie DNA w komórkach HeLa i XP-C (komórki z upośledzoną naprawą NER). Zarejestrowane obrazy zamieszczono na Ryc. 4.32.



Rycina 4.32. Rekrutacja Dnmt1 do miejsc uszkodzeń UV

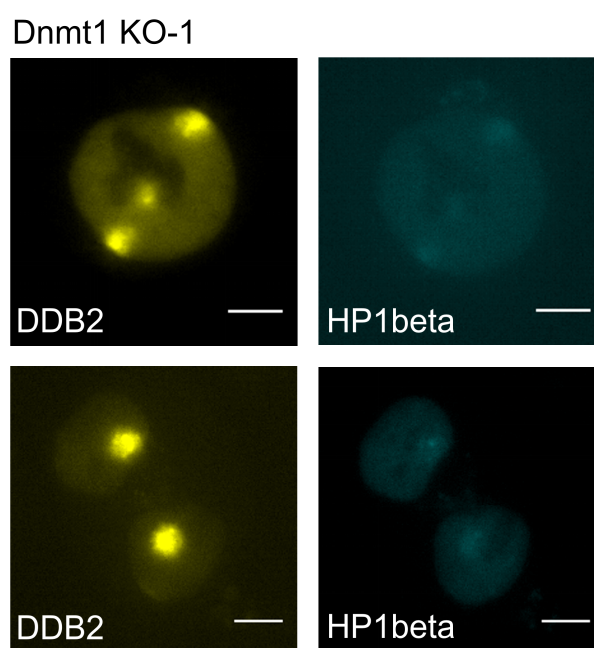
Obrazy jąder komórek HeLa (**typ dziki**) oraz XP4PA (**XP-C**) wykazujących ekspresję EGFP-Dnmt1 i DDB2-mCherry, które poddano lokalnemu uszkodzeniu UV (dawka 100 J/m^2) przez filtr poliwęglanowy. W miejscach uszkodzeń UV widoczna jest rekrutacja Dnmt1. Obrazy zarejestrowano 30 min po wprowadzeniu uszkodzenia. Odcinek skalujący $5 \mu\text{m}$.

Zauważyć można (Ryc. 4.32), że w obszarach uszkodzeń DNA następuje rekrutacja metylotransferazy Dnmt1. Podobnie, jak to miało miejsce w przypadku HP1 (Luijsterburg i wsp., 2009), rekrutacja Dnmt1 nie ulega zahamowaniu w komórkach XP-C, które nie posiadają w pełni funkcjonalnej naprawy NER (Ryc. 4.30). Wskazuje to zatem, że obydwa te procesy, gromadzenie HP1 oraz rekrutacja Dnmt1, zachodzą na drodze niezależnej od samego procesu naprawczego NER. Przypuszczać zatem można, że w niepoznany dotychczas mechanizmie odpowiedzi na uszkodzenie DNA uczestniczy HP1 wraz z Dnmt1.

4.2.10 Badanie akumulacji HP1 w komórkach Dnmt1-/-

Opisane w rozdziale Wyniki 4.2.9 doświadczenia dowodzą, że jedno z białek oddziałujących z domeną chromoshadow HP1, metylotransferaza Dnmt1, ulega rekrutacji w obszarach lokalnych uszkodzeń DNA indukowanych UV. Pojawia się zatem pytanie, czy w rekrutacji HP1 do miejsc uszkodzeń uczestniczy Dnmt1. W kolejnych eksperymentach postanowiono sprawdzić, czy akumulacja HP1 zależy od Dnmt1.

W tym celu użyto komórek HCT116 Dnmt1-/-, które posiadają wyłączoną ekspresję Dnmt1. Komórki poddano transfekcji (*Materiały i metody* 3.2.3.3) dwoma plazmidami: SCFP3a-HP1 β i DDB2-mVenus, a następnie lokalnie naświetlano promieniowaniem UV (*Materiały i metody* 3.2.6.1). Wewnątrzjądrowe obszary uszkodzenia wyznakowane są fluorescencyjnie w postaci skupisk nagromadzonego DDB2. Prowadzono pomiary jądrowego rozkładu białka HP1 po wprowadzeniu lokalnych uszkodzeń w komórkach z deficytem Dnmt1. Zarejestrowane obrazy zamieszczono poniżej (Ryc. 4.33).



Rycina 4.33. Rekrutacja białek HP1 w komórkach Dnmt1-/-

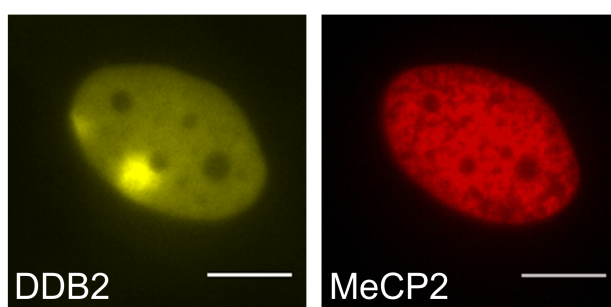
Obrazy jąder komórek HCT116 Dnmt1-/- (Dnmt1 KO-1), wykazujących ekspresję SCFP3a-HP1 β i DDB2-mVenus, które poddano lokalnemu uszkodzeniu UV (dawka 100 J/m²) przez filtr poliwęglanowy. Obszary lokalnego uszkodzenia UV zaznaczone są miejscami nagromadzonego białka DDB2. Obrazy zarejestrowane 30 min po wprowadzeniu uszkodzenia. Odcinek skalujący 5 μ m.

Wyniki eksperymentów pokazanych na Ryc. 4.33 wskazują, iż białko HP1 β ulega rekrutacji do miejsc indukowanych przez UV uszkodzeń DNA w komórkach Dnmt1 $^{-/-}$. Przypuszczać zatem można, że akumulacja białka HP1 w rejonach uszkodzeń DNA indukowanych promieniowaniem UV nie zależy od metylotransferazy Dnmt1.

4.2.11 Badanie akumulacji MeCP2 w obszarach uszkodzeń UV

Opisane w rozdziale Wyniki 4.2.9 eksperymenty pokazały, że metylotransferaza Dnmt1 ulega rekrutacji do miejsc uszkodzeń DNA indukowanych przez UV. MeCP2 (ang. *methyl CpG binding protein 2*) jest białkiem, które wiąże się do zmetylowanego DNA (Nikitina i wsp., 2007; Ho i wsp., 2008), a także, jak podają ostatnie doniesienia naukowe, MeCP2 oddziałuje z HP1 (Agarwal i wsp., 2007). W kolejnych doświadczeniach postanowiono sprawdzić, czy akumulacja Dnmt1 powiązana jest z rekrutacją MeCP2. Jeżeli Dnmt1 powoduje metylację DNA w obszarze uszkodzonym, to obecność zmetylowanego DNA indukować może rekrutację MeCP2, a zatem w miejscu uszkodzenia zachodzić powinno gromadzenie MeCP2.

Komórki MRC-5 ztransfekowano (*Materiały i metody 3.2.3.3*) dwoma plazmidami: EGFP-MeCP2 i DDB2-mCherry, a następnie poddano lokalnemu naświetlaniu UV (*Materiały i metody 3.2.6.1*). Wewnątrzjądrowe obszary uszkodzenia wyznakowane zatem zostały fluorescencyjnie poprzez skupiska nagromadzonego DDB2. Prowadzono pomiary zmian rozmieszczenia MeCP2 po wprowadzeniu lokalnych uszkodzeń DNA indukowanych UV. Zarejestrowane obrazy zamieszczono na Ryc. 4.34.



Rycina 4.34. Brak rekrutacji MeCP2 w obszarach uszkodzeń UV

Obrazy jąder komórek MRC-5 wykazujących ekspresję EGFP-MeCP2 i DDB2-mCherry, które poddano lokalnemu uszkodzeniu UV (dawka 100 J/m²) przez filtr poliwęglanowy. Obszary lokalnego uszkodzenia UV zaznaczone są miejscami nagromadzonego DDB2, nie obserwuje się gromadzenia MeCP2. Obrazy zarejestrowane 30 min po wprowadzeniu uszkodzenia. Odcinek skalujący 5 μ m.

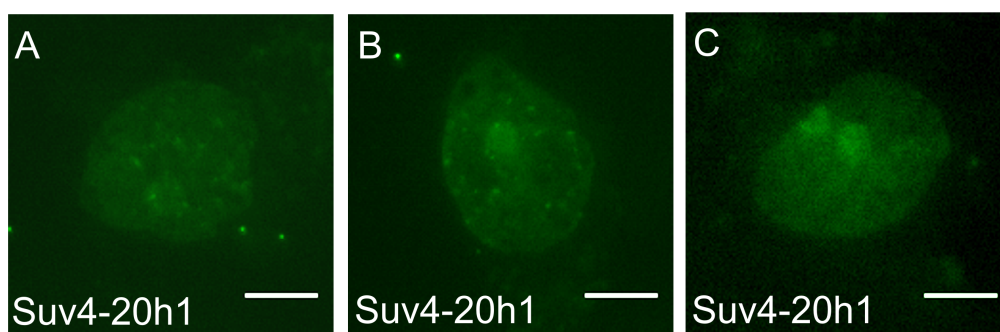
Powyższe obrazy (Ryc. 4.34) pokazują, że MeCP2 nie ulega wykrywalnej akumulacji w obszarach uszkodzeń DNA indukowanych przez UV. Nie można jednak wykluczyć, iż stężenie zmetylowanego DNA lub MeCP2 mogło być zbyt małe, tzn. mogło znajdować się poniżej progu detekcji. Wyniki tego eksperymentu pozwalają jednak przypuszczać, iż MeCP2 nie jest partnerem interakcji dla HP1 w obszarze uszkodzonym.

4.2.12 Badanie akumulacji SUV4-20 w obszarach uszkodzeń UV

Opisane eksperymenty (Wyniki 4.2.4) wykazały, że metylotransferaza histonowa (SUV39H1), która uczestniczy w generowaniu Me3K9H3, tzn. miejsc wiązania dla domeny CD białka HP1 z DNA, nie ulega rekrutacji do obszarów uszkodzeń DNA indukowanych przez UV. Ponadto, w eksperymentach opisanych w rozdziale Wyniki 4.2.3 zaobserwowano, że białko HP1 jest wciąż rekrutowane w komórkach z podwójną delecją, *Suv39h1* oraz *Suv39h2* (MEFs *Suv39dn*). A zatem, metylotransferaza SUV39 nie wydaje się uczestniczyć w rekrutacji HP1 do miejsc uszkodzeń.

Najnowsze badania podają, że zależna od SUV39 metylacja w obrębie histonu 4 (Me3K20H4) powstaje w wyniku aktywności metylotransferazy histonowej SUV4-20 (Schotta i wsp., 2004; Yang i wsp., 2008). Potrójna metylacja w obrębie K20H4 jest markerem epigenetycznym mechanizmu wyciszania genów w chromatynie (Schotta i wsp., 2004). Wykazano również, że wszystkie trzy izoformy białka HP1 oddziałują z SUV4-20 (Schotta i wsp., 2004). Postanowiono zatem sprawdzić, czy metylotransferaza SUV4-20 ulega rekrutacji do obszarów lokalnych uszkodzeń DNA indukowanych promieniowaniem UV, w których nagromadzone jest białko HP1.

W tym celu użyto komórek MRC-5, które poddano transfekcji (*Materiały i metody 3.2.3.3*) dwoma plazmidami EGFP-Suv4-20h1 i DDB2-mCherry, a następnie lokalnie naświetlano UV (*Materiały i metody 3.2.6.1*). Wewnątrzjądrowe obszary uszkodzeń wyznakowane zostały fluorescencyjnie poprzez skupiska nagromadzonego DDB2. Zarejestrowane obrazy zamieszczono poniżej (Ryc. 4.35).



Rycina 4.35. Rekrutacja SUV4-20H1 do miejsc uszkodzeń UV

Obrazy trzech jąder komórek MRC-5 (A, B, C) wykazujących ekspresję EGFP-SUV4-20H1 i DDB2-mCherry, które poddano lokalnemu uszkodzeniu UV (dawka 100 J/m^2) przez filtr poliwęglanowy. W miejscach uszkodzenia widoczna jest rekrutacja SUV4-20H1. Obrazy zarejestrowane 30 min po wprowadzeniu uszkodzenia. Odcinek skalujący $5 \mu\text{m}$.

Metylotransferaza SUV4-20H1 ulega gromadzeniu w obszarach lokalnych uszkodzeń DNA indukowanych promieniowaniem UV (Ryc. 4.35). Przypuszczać zatem można, że rekrutacja SUV4-20 odbywa się na drodze niezależnej od SUV39, a w procesie tym uczestniczyć może białko HP1.

4.2.13 Badanie akumulacji ACF1 w miejscach uszkodzeń UV

Utrzymanie informacji epigenetycznej jest kluczowe w wielu procesach, m.in. w regulacji ekspresji genów, rozwoju organizmów, czy zachowaniu specyficznych funkcji komórek oraz tkanek (Lund i van Lohuizen 2004). Po dzień dzisiejszy nie udało się jednak zrozumieć, jak informacja epigenetyczna jest zachowywana w uszkodzonym obszarze DNA, który podlega naprawie. Ostatnie doniesienia podają, że główną przeszkodą dla naprawy NER w komórkach eukariotycznych jest gęste upakowanie chromatyny, która stanowi przeszkodę dla procesów zachodzących w DNA (Hara i wsp., 2000). Co więcej, inne opracowania naukowe donoszą, iż naprawa w chromatynie przebiega znacznie wolniej niż w nieupakowanej cząsteczce DNA (Wang i wsp., 1991; Ura i wsp., 2001). Oszacowano, iż tempo naprawy DNA nukleosomowego, w porównaniu z nagą cząsteczką DNA, jest 10-krotnie wolniejsze (Hara i wsp., 2000). Komórki jednak potrafią pokonać tę przeszkodę, gdyż w toku ewolucji wykształciły mechanizmy zmiany struktury chromatyny, dzięki którym tworzone są warunki bardziej sprzyjające lokalnej naprawie chromatyny jądrowej.

W procesie naprawy DNA zaangażowane są zależne od ATP czynniki przebudowy chromatyny (ang. *chromatin remodeling*) (Vignali i wsp., 2000; Gangaraju i Bartholomew 2007; Osley i wsp., 2007), takie jak SWI/SNF oraz ACF1 (Eberharder i wsp., 2001; Ura i wsp., 2001; Hara i Sancar 2002). Co ciekawe, ACF1 (ang. *ATP-utilizing chromatin assembly and remodelling factor 1*) oddziałuje bezpośrednio z HP1, a w oddziaływaniu tym uczestniczy domena chromoshadow (Eskeland i wsp., 2007). Postanowiono zatem zbadać, czy w miejscach uszkodzeń DNA wywołanych UV, w których następuje gromadzenie HP1, zachodzi również rekrutacja ACF1.

W tym celu użyto komórek MRC-5, które poddano transfekcji (*Materiały i metody 3.2.3.3*) plazmidem ACF1-EGFP i lokalnie naświetlano (UV-C) skupioną wiązką światła laserowego o długości fali 266 nm (*Materiały i metody 3.2.6.2*). W wyniku naświetlania generowane były lokalne uszkodzenia DNA i uruchomiona została droga naprawy NER. Badano zmiany rozmieszczenia ACF1 indukowane lokalnym naświetlaniem UV.

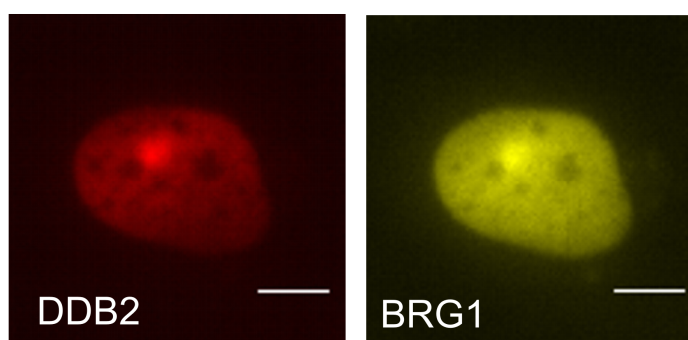
Wykazano, że w miejscu indukowanych przez UV uszkodzeń DNA gromadzony był kompleks remodelingu chromatyny ACF1 (Luijsterburg i wsp., 2009). Niewykluczone, iż rekrutacja białka HP1 może być powiązana z rekrutacją ACF1. Pojawiło się zatem pytanie, czy rekrutacja ACF1 zależy od funkcjonalnej naprawy NER, czy wręcz przeciwnie - jest ona niezależna i podobnie, jak w przypadku białka HP1 zachodzi również w komórkach z upośledzoną naprawą NER. Postanowiono zatem sprawdzić, czy gromadzenie ACF1 w rejonach lokalnych uszkodzeń DNA wywołanych przez UV zachodzić będzie w komórkach XP-A, które posiadają upośledzoną naprawę NER. Wyniki eksperymentów dowodzą, że w komórkach XP-A, w których brakuje funkcjonalnej naprawy NER, rekrutacja ACF1 nadal zachodzi (Luijsterburg i wsp., 2009). Podobne zjawisko akumulacji w komórkach z deficytem NER obserwowano również dla białka HP1 β (*Wyniki 4.2.5*) oraz metylotransferazy Dnmt1 (*Wyniki 4.2.9*). Przypuszczać zatem można, że rekrutacja HP1, Dnmt1 oraz ACF1 w obszarach lokalnych uszkodzeń DNA indukowanych UV przebiegać może na innych zasadach, tzn. mechanizmy przywoływania i gromadzenia tych białek są niezależne od toczącego się procesu naprawczego NER.

4.2.14 Badanie akumulacji BRG1 w obszarach uszkodzeń UV

Wykonane we wspólnym projekcie badawczym z C. Dinantem eksperymenty wykazały, iż kompleks remodelingu chromatyny ACF1 ulega rekrutacji w obszarach uszkodzeń DNA, w których gromadzi się HP1 (Luijsterburg i wsp., 2009). W kolejnych eksperymentach postanowiono sprawdzić, czy inne kompleksy białkowe, które wprowadzają zmiany struktury chromatyny, również będą gromadzić się w uszkodzonych obszarach chromatyny.

BRG1 (ang. *Brahma-Related Gene 1*) należy do rodziny SWI/SNF, kompleksów remodelingu chromatyny, które zależą od ATP (Singh i wsp., 2007; Napolitano i wsp., 2007), i jest jednym z partnerów interakcji dla domeny CSD białka HP1 (Nielsen i wsp., 2002). Postanowiono zatem zbadać, czy BRG1 ulega gromadzeniu w obszarach lokalnych uszkodzeń DNA indukowanych promieniowaniem UV, w których zgromadzone zostało białko HP1.

W tym celu wykorzystano komórki MRC-5, które poddano transfekcji (*Materiały i metody 3.2.3.3*) dwoma plazmidami: EYFP-BRG1 i DDB2-mCherry, a następnie lokalnie naświetlano UV (*Materiały i metody 3.2.6.1*). Wewnątrzjądrowe obszary uszkodzeń wyznakowane zostały fluorescencyjnie przez skupiska DDB2. Badano zmiany jądrowego rozkładu BRG1 po wprowadzeniu lokalnych uszkodzeń DNA. Zarejestrowane obrazy zamieszczono na Ryc. 4.36.



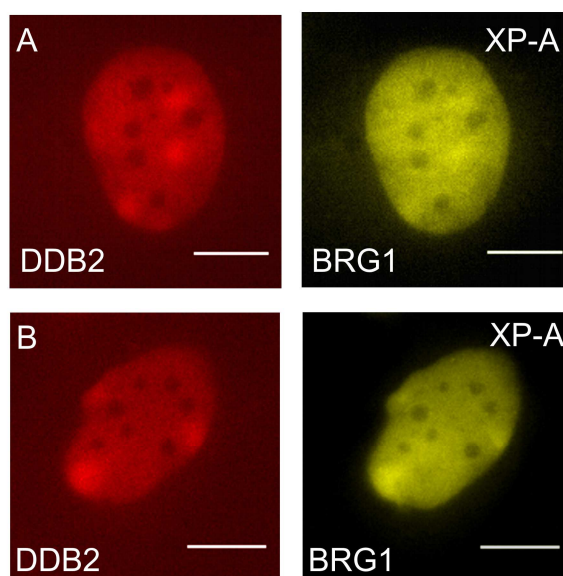
Rycina 4.36. Rekrutacja BRG1 do obszarów uszkodzeń UV

Obrazy jądra komórki MRC-5 wykazującej ekspresję EYFP-BRG1 i DDB2-mCherry, którą poddano lokalnemu uszkodzeniu UV (dawka 100 J/m^2) przez filtr poliwęglanowy. Obszary uszkodzenia zaznaczone są miejscami nagromadzonego DDB2; w rejonach tych zachodzi również akumulacja BRG1. Obrazy zarejestrowane 30 min po wprowadzeniu uszkodzenia. Odcinek skalujący $5 \mu\text{m}$.

Na powyższych obrazach (Ryc. 4.36) zauważyć można, że kompleks remodelingu chromatyny BRG1 ulega akumulacji w obszarach uszkodzeń DNA indukowanych UV, do których również rekrutowane jest HP1. Przypuszczać zatem można, że rekrutacja białka HP1 może być powiązana z rekrutacją BRG1. Jedną z hipotez dotyczących roli białka HP1 w naprawie zakłada, że HP1 może być zaangażowane w odtworzenie wysokorzędowych struktur chromatyny (Zarebski i wsp., 2009).

4.2.14.1 Badanie akumulacji BRG1 w komórkach XP-A

W kolejnych eksperymentach postanowiono sprawdzić, czy rekrutacja BRG1 zależy od funkcjonalnej naprawy NER. Użyto komórek XP-A, które poddano transfekcji (*Materiały i metody 3.2.3.3*) dwoma plazmidami: EYFP-BRG1 i DDB2-mCherry, a następnie lokalnie naświetlano UV (*Materiały i metody 3.2.6.1*). Wewnątrzjądrowe obszary uszkodzenia wyznakowane zostały fluorescencyjnie przez skupiska nagromadzonego DDB2. Badano zmiany w jądrowym rozkładzie BRG1 po wprowadzeniu lokalnych uszkodzeń DNA, w komórkach XP-A. Zarejestrowane obrazy zamieszczono na Ryc. 4.37.



Rycina 4.37. Rekrutacja BRG1 do obszarów lokalnych uszkodzeń UV w komórkach XP-A

Obrazy dwóch jąder (A i B) komórek XP-A wykazujących ekspresję EYFP-BRG1 i DDB2-mCherry, które poddano lokalnemu uszkodzeniu UV (dawka 100 J/m²) przez filtr poliwęglanowy. Obszary uszkodzenia zaznaczone są nagromadzoną DDB2; w rejonach tych zachodzi również akumulacja BRG1. Obrazy zarejestrowane 30 min po wprowadzeniu uszkodzenia. Odcinek skalujący 5 µm.

Wyniki eksperymentów pokazanych na Ryc. 4.37 dowodzą, iż w komórkach XP-A, pomimo braku funkcjonalnej naprawy NER, zachodzi akumulacja BRG1 w miejscach

lokalnych uszkodzeń DNA indukowanych przez UV. Obserwowana rekrutacja HP1, Dnmt1, BRG1 i ACF1 w komórkach z deficytem NER sugeruje, że białka te (HP1, Dnmt1, ACF1, BRG1) uczestniczyć mogą w odpowiedzi na uszkodzenie DNA na innej drodze niż typowa naprawa NER.

4.2.15 Badanie wrażliwości komórek na UV po utracie HP1

Wykazano, że wyłączenie genu (ang. *knock-out*) HP1 w komórkach ssaczych prowadzi do śmierci komórki (Filesi i wsp., 2002). W celu sprawdzenia, czy białko HP1 jest niezbędne w komórkowej odpowiedzi na uszkodzenie DNA (DDR) użyto nicieni *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), u których występują dwa homologi HP1: HPL-1 oraz HPL-2. Utrata obydwu białek HP1 jest również letalna w tych organizmach (Coustham i wsp., 2006; Schott i wsp., 2006). Aby ominąć ten problem użyto *C. elegans*, które utraciły HPL-1, ale zawierają wrażliwy na temperaturę allel HPL-2, który ulega ekspresji w 20°C, ale nie w 25°C (Coustham i wsp., 2006). W celu sprawdzenia, czy utrata HPL-1 oraz HPL-2 spowoduje wzrost wrażliwości na UV, eksponowano jaja, pojedynczych oraz podwójnych (zawierających allel null *hpl-1* i allel *hpl-2*) mutantów rosnących w 25°C, na promieniowanie UV-B o dawce 80 J/m² (Luijsterburg i wsp., 2009). Jaja dzikiego typu, oraz jaja z deficytem NER (*xpa-1*) (Stergiou i wsp., 2007) były również naświetlane promieniowaniem UV-B (80 J/m²). Przeżywalność naświetlanych jaj obliczona została w odniesieniu do przeżywalności jaj nienaświetlanych. Doświadczeń na nicieniach *C. elegans* nie można było przeprowadzić w laboratorium prof. Roel'a van Driel'a z przyczyn technicznych, w związku z tym eksperymenty te wykonane zostały w EMC w Rotterdamie we współpracy z Hannes'em Lans'em, a ich rezultaty nie są ilustrowane w niniejszej rozprawie. Wyniki tych eksperymentów zamieszczone zostały we wspólnej publikacji (Luijsterburg i wsp., 2009).

Wykazano, iż nicienie typu dzikiego oraz nicienie zawierające pojedynczą mutację *hpl-1* lub *hpl-2* nie wykazują zwiększonej wrażliwości na promieniowanie UV-B. Na uwagę zasługuje fakt, że promieniowanie UV-B spowodowało natychmiastowe zahamowanie wzrostu podwójnych mutantów *hpl-2/hpl-1* w porównaniu z mutantami *xpa-1* z upośledzoną naprawą NER. Podobne wyniki uzyskano, gdy zamiast jaj wykorzystano młode osobniki *C. elegans hpl-2/hpl-1* (Luijsterburg i wsp., 2009). Świadczy to zatem o tym, że jedno z dwóch białek, HPL-1 albo HPL-2, jest wystarczające do prawidłowej odpowiedzi na

uszkodzenie DNA. Utrata obydwu białek HP1 u *C. elegans* powoduje zwiększoną wrażliwość na promieniowanie UV. Wyniki tych eksperymentów ujawniają ogromnie ważną rolę białek HP1 w odpowiedzi na uszkodzenie DNA u nicieni *C. elegans*. Asocjacja białek HP1 z różnymi rodzajami uszkodzeń DNA w komórkach ssaczych sugeruje, że mechanizm odpowiedzi na uszkodzenie DNA może być konserwatywny, a zatem podobny zarówno u nicieni *C. elegans*, jak i u człowieka.

4.3 HP1 w procesach towarzyszących naprawie DSBs

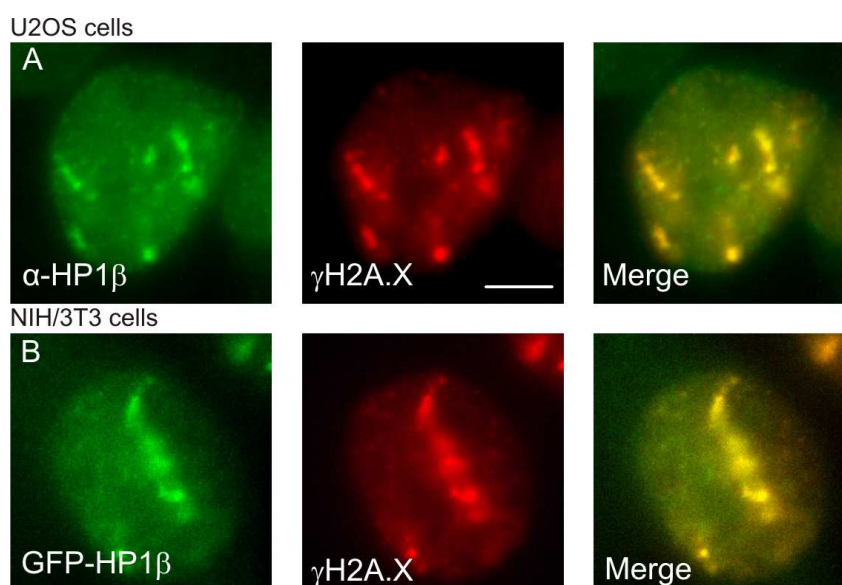
W celu sprawdzenia, czy rekrutacja białka HP1 ograniczona jest tylko do uszkodzeń oksydacyjnych i indukowanych przez UV uszkodzeń DNA, czy jest to powszechna odpowiedź na różnego rodzaju uszkodzenia, postanowiono sprawdzić, czy akumulacja HP1 zachodzi w miejscach podwójnych pęknięć nici DNA, DSBs (ang. *Double Strand Breaks*). Opisane w tym podrozdziale eksperymenty stanowiły część wspólnego projektu badawczego wykonanego we współpracy z Janem Stap'em z centrum AMC Uniwersytetu w Amsterdamie. Wyniki tych doświadczeń zamieszczone zostały we wspólnej publikacji (Luijsterburg i wsp., 2009).

4.3.1 Badanie akumulacji białek HP1 w obszarach formowania DSBs

Podwójne pęknięcia DNA (DSBs) wprowadzane były w wyniku naświetlania komórek cząstkami α , pochodzącymi z radioaktywnego ameryku (AM-241). W ten sposób generowane były liniowe tory DSBs w jądrach komórkowych (Aten i wsp., 2004; Stap i wsp., 2008; Williams i wsp., 2007). Ponieważ doświadczenia z użyciem cząstek α nie mogły zostać wykonane w laboratorium prof. Roel'a van Driel'a z przyczyn technicznych, eksperymenty te przeprowadzone zostały w centrum AMC Uniwersytetu w Amsterdamie.

Użyto ludzkich komórek U2OS oraz mysich fibroblastów NIH/3T3 EGFP-HP1 β , które naświetlono cząstkami α (*Materiały i metody 3.2.7*). W miejscu generowanych uszkodzeń DSBs powstawały liniowe tory, które wyznakowywano immunofluorescencyjnie przeciwciałami anty- γ H2A.X (*Materiały i metody 3.1.1*). W komórkach NIH/3T3

prowadzono pomiary zmian jądrowego rozkładu cząsteczek HP1 β sprzężonych z białkiem fluoryzującym EGFP, zaś do wyznakowywania endogennego HP1 β w komórkach ludzkich (U2OS) stosowano metodę immunofluorescencji z zastosowaniem przeciwciał anti-HP1 β (*Materiały i metody 3.1.1*). Wyniki obserwacji przedstawiono na poniższych obrazach (Ryc. 4.38).



Rycina 4.38. Rekrutacja HP1 do miejsc formowania DSBs

Obrazy jąder komórek **(A)** U2OS oraz **(B)** NIH/3T3 EGFP-HP1 β , które naświetlano strumieniem cząstek α , a następnie wyznakowywano immunofluorescencyjnie przy użyciu przeciwciał anti- γ H2A.X (kolor czerwony). Obszary formowania DSBs zaznaczone są miejscami powstałego γ H2A.X. Jądrowy rozkład EGFP-HP1 β w komórkach NIH/3T3 uwidoczniony został przy pomocy zielonej fluorescencji pochodzącej od EGFP, zaś w przypadku komórek U2OS endogenne białko HP1 β uwidoczniono immunofluorescencyjnie przy użyciu przeciwciał anti-HP1 β . Złożenie obrazów fluorescencyjnych zamieszczono na kolejnym panelu. Odcinek skalujący 5 μ m.

Wyniki eksperymentów pokazanych na Ryc. 4.38 wskazują, iż białko fuzyjne EGFP-HP1 β (w komórkach NIH/3T3), a także endogenne HP1 β (w komórkach U2OS) ulega rekrutacji do miejsc formowania DSBs, które wyznakowane są przy użyciu przeciwciał anti- γ H2A.X. Zaobserwować można wyraźną kolokalizację nagromadzonego HP1 β z γ H2A.X (Ryc. 4.38). Akumulację EGFP-HP1 α oraz EGFP-HP1 γ obserwowano również w komórkach MRC-5 po naświetlaniu strumieniem cząstek α (Luijsterburg i wsp., 2009). A zatem, wszystkie trzy izoformy białka HP1 (HP1 α , β , γ) ulegają rekrutacji do miejsc formowania DSBs.

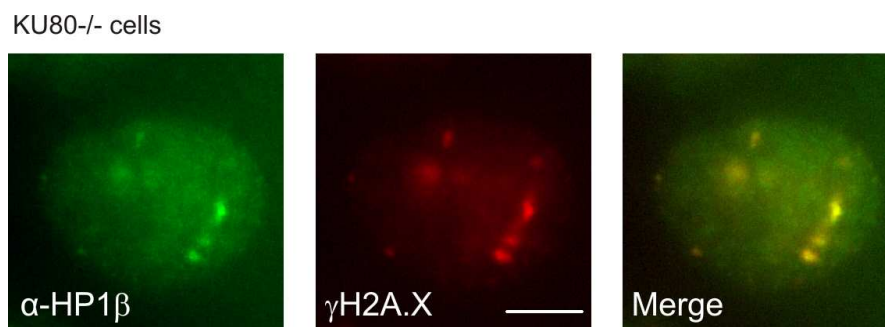
Zaznaczyć tu jednak należy, iż histon H2A.X powszechnie używany jest jako marker podwójnych pęknięć nici DNA, gdyż podlega on szybkiej fosforylacji w dużych domenach

chromatynowych otaczających DSBs. Modyfikacja w obrębie histonu H2A.X stanowi sygnał rekrutacji dla akumulacji białek naprawczych uczestniczących w naprawie DSBs (Celeste i wsp., 2003). Ostatnie doniesienia literaturowe podają jednak, że fosforylacja histonu H2A.X zachodzić może niezależnie od powstałych pęknięć DNA. Wykazano bowiem, iż zmiany w obrębie struktury chromatyny indukować mogą γ H2A.X, w nieobecności DSBs (Baure i wsp., 2009).

4.3.2 Badanie akumulacji HP1 w miejscach uszkodzeń chromatyny w komórkach z deficytem KU80

Wyniki wcześniejszych eksperymentów wykazały, że białko HP1 ulega rekrutacji do miejsc formowania DSBs wyznakowanych przez skupiska γ H2A.X. W kolejnych doświadczeniach postanowiono sprawdzić, czy rekrutacja ta zależy od drogi naprawy DSBs. Komórki ludzkie usuwają powstałe uszkodzenia DSBs na drodze HR (ang. *Homologous Recombination*), która jest aktywna tylko w fazie S oraz G2 cyklu podziałowego. Z kolei, naprawa DSBs oparta na niehomologicznym łączeniu końców NHEJ (ang. *Non-Homologous End Joining*) dominuje w pozostałych fazach cyklu podziałowego (Wyman i Kanaar 2006). Naprawę NHEJ zapoczątkowuje dimer KU70/80 (Mari i wsp., 2006), który oddziałuje z domeną CSD białka HP1 α (Song i wsp., 2001). Postanowiono zatem sprawdzić, czy rekrutacja HP1 w obszarach formowania DSBs zależy od funkcjonalnej naprawy NHEJ, a dokładniej od dimeru KU70/80.

Użyto komórek CHO XR-V15B z deficytem KU80 oraz komórek CHO typu dzikiego, które naświetlano strumieniem cząstek α (*Materiały i metody 3.2.7*). W miejscach uszkodzeń DSBs powstawały liniowe torry γ H2A.X, które wybarwione zostały immunofluorescencyjnie przy użyciu przeciwciał anty- γ H2A.X (*Materiały i metody 3.1.1*). Obserwowano jądrową lokalizację endogennego białka HP1 β , które uwidocznione zostało immunofluorescencyjnie (*Materiały i metody 3.1.1*). Wyniki obserwacji przedstawiono na poniższych obrazach (Ryc. 4.39).



Rycina 4.39. Rekrutacja HP1 β do miejsc formowania DSBs w komórkach z deficytem KU80

Obrazy jąder komórek CHO XR-V15B z deficytem KU80, naświetlanych strumieniem cząstek α , a następnie wyznakowanych immunofluorescencyjnie przy użyciu przeciwciał anti- γ H2A.X (kolor czerwony). Obszary formowania DSBs zaznaczone są miejscami powstałego γ H2A.X. Zmiany rekrutacji endogennego białka HP1 β uwidocznione zostały przy użyciu przeciwciał anti-HP1 β . Złożenie obrazów fluorescencyjnych pokazano na kolejnym panelu. Odcinek skalujący 5 μ m.

Zarówno w komórkach typu dzikiego (Ryc. 4.39), jak i w komórkach z deficytem KU80 (Ryc. 4.39), zauważyć można wyraźną rekrutację endogennego białka HP1 β do rejonów skupisk γ H2A.X. Wnioskować zatem można, że gromadzenie białka HP1 nie zależy od funkcjonalnej naprawy NHEJ. Ponadto, kolokalizacja HP1 z γ H2A.X widoczna była we wszystkich obserwowanych komórkach. Wskazywać to może, iż wiązanie HP1 w obszarach uszkodzeń DSBs nie zależy od fazy cyklu komórkowego i tym samym nie zależy od drogi naprawczej HR.

Rozdział 5**Dyskusja**

5.1	Wprowadzenie.....	174
5.2	Oksydacyjne uszkodzenie chromatyny indukowane wzbudzonym jonem etidiowym powoduje aktywację procesów naprawczych BER oraz powstawanie DSBs.....	175
5.3	Gromadzenie białka HP1 w obszarach lokalnych uszkodzeń chromatyny świadczy o zaangażowaniu HP1 w procesie naprawy DNA.....	181
5.4	W procesie rekrutacji białka HP1 do miejsc uszkodzeń DNA uczestniczy domena CSD.....	187
5.5	Rekrutacja białka HP1 do obszarów uszkodzeń wywoływanych przez UV nie zależy od aktywności białek naprawczych NER.....	190
5.6	Rekrutacja białka HP1 zachodzi we wszystkich fazach cyklu komórkowego.....	192
5.7	Kaskada transdukcji sygnału w której uczestniczy ATR nie wpływa na rekrutację białka HP1.....	193
5.8	Nagromadzone w rejonach uszkodzeń białko HP1 uczestniczy w komórkowej odpowiedzi DDR.....	194
5.9	Podsumowanie.....	202
5.10	Propozycje dalszych doświadczeń.....	204

5.1 Wprowadzenie

Odkryte w połowie lat 70-tych XX wieku, heterochromatynowe białko 1 (HP1) cieszy się dużym zainteresowaniem licznych ośrodków naukowych na całym świecie. Początkowo badania nad HP1 skupiały się głównie na poznaniu szczegółowej budowy, aktywności w trakcie rozwoju organizmów, a także lokalizacji oraz funkcji białka w procesach jądrowych. Badania biochemiczne oraz genetyczne pozwoliły ustalić domenową budowę białka oraz scharakteryzować poszczególne izoformy HP1. Co więcej, poznanie partnerów interakcji HP1 pozwoliło odkryć liczne funkcje tego białka. Obecnie wiadomo, iż HP1 uczestniczy m.in. w formowaniu heterochromatyny, organizacji struktury jądra oraz regulacji transkrypcji. Ze względu na kluczową rolę HP1 w tworzeniu wysokorzędowych struktur chromatyny, wszelkie mutacje w sekwencji genów tego białka prowadzą do śmierci zarodków (Kellum i Alberts 1995; Fanti i wsp., 1998). HP1 jest zatem bardzo ważnym białkiem, które odgrywa istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu komórki.

Do chwili rozpoczęcia niniejszego projektu w literaturze naukowej dostępne były zatem informacje na temat zaangażowania białka HP1 w liczne procesy jądrowe, m.in. organizację chromatyny, tworzenie struktury jądra komórkowego, regulację transkrypcji czy utrzymanie informacji epigenetycznej. Co więcej, w toku licznych badań pojawiły się także ciekawe opracowania naukowe, które dowodzą powiązania białka HP1 z procesem nowotworzenia (Norwood i wsp., 2006; Dialynas i wsp., 2008). Nie było jednak żadnych doniesień, ani nawet sugestii, na temat zaangażowania HP1 w procesach naprawy DNA. W roku 2003 w laboratorium Pracowni Biofizyki Komórki WBBiB UJ rozpoczęte zostały badania, których celem było ustalenie, czy białko HP1 uczestniczy w procesie naprawy uszkodzeń DNA.

Aby ten zamiar zrealizować potrzebna była metoda dokonywania lokalnych uszkodzeń, która pozwoliłaby wykazać rekrutację HP1 do miejsc uszkodzeń DNA. Ponadto, potrzebne były przeciwciała, aby zbadać zachowanie endogennego HP1, a także białko fuzyjne GFP-HP1, by badać zachowanie HP1 w żywej komórce. Stworzenie i opracowanie, w laboratorium Pracowni Biofizyki Komórki Wydziału Biochemii Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, stosunkowo prostej metody uszkodzania DNA, przy użyciu wzbudzonego jonu etydioowego, pozwoliło wprowadzać lokalne oksydacyjne uszkodzenia

chromatyny w żywych komórkach i badać rolę HP1 w procesie naprawy DNA. Dodatkowych argumentów o celowości prowadzenia badań nad białkiem heterochromatynowym 1, w kontekście uszkodzenia DNA, przyniósł rozwój epigenetyki, która wciąż dostarcza kolejnych dowodów, że sposób upakowania DNA w komórce i struktura chromatyny wywierają ogromny wpływ na wszelkie procesy jądrowe.

W projekcie tym skupiono się początkowo na badaniu potencjalnej roli białka HP1 w kontekście indukowanych jonem etidiowym, oksydacyjnych uszkodzeń DNA. W toku prowadzonych badań i współpracy z grupą badawczą prof. Roel'a van Driela (Uniwersytet Amsterdamski, UvA) pojawiła się wspaniała możliwość rozszerzenia tego projektu o inne rodzaje uszkodzeń (fotoprodukty UV oraz DSBs). Podkreślić należy, że głównym celem prowadzonych badań było najpierw wykazanie, a potem zbadanie roli heterochromatynowego białka 1 (HP1) w procesie odpowiedzi komórki na uszkodzenie DNA.

5.2 Oksydacyjne uszkodzenie chromatyny indukowane wzbudzonym jonem etidiowym powoduje aktywację procesów naprawczych BER oraz powstawanie DSBs

W literaturze naukowej odnaleźć można dane, które dowodzą, iż w wyniku oddziaływań jonu etidiowego ze światłem, na skutek reakcji rodnikowych w wyizolowanym DNA, powstają podwójne pęknięcia nici DNA (ang. *DNA double strand breaks*, DSBs) (Deniss i Morgan 1976; Krishnamurthy i wsp., 1990). Co więcej, pokazano, iż przy wyższych stężeniach fotouczulacza w wyizolowanych jądrach komórkowych dochodzi do powstania wiązań krzyżowych pomiędzy składnikami chromatyny (Sheval i wsp., 2002; Sheval i wsp., 2004).

Wykonane w ramach niniejszego projektu eksperymenty wykazały, iż w żywych komórkach wzbudzony jon etidiowy prowadzi do powstania uszkodzeń chromatyny, których rodzaj i wielkość zależą od stężenia tego jonu oraz dawki i natężenia użytego światła wzbudzającego (sumaryczna dawka dostarczanego światła wynosiła od 1102 μJ do 3672 μJ) (Zarębski 2008). Do generowania wyłącznie aktywowanych światłem, subletalnych

(naprawialnych przez komórkę, nie powodujących jej śmierci) uszkodzeń chromatyny użyto fotouczulacza (bromku etydydy) w **niskich stężeniach** rzędu 100-200 nM. W ten sposób udało się ograniczyć uszkodzenie do wybiórczo naświetlanego obszaru chromatyny i nie wywoływać wykrywalnego uszkodzenia w obszarze nienaświetlanym (Wiernasz 2004). Czas inkubacji z fotouczulaczem (20 min w ciemności) dobrano w ten sposób, aby w warunkach tych następowało jedynie nieznaczne opóźnienie cyklu komórkowego (Zarębski 2008). Do naświetlania stosowano emitowane przez laser światło zielone o długości fali 514 nm i mocy wiązki światła w zakresie 35-105 μ W. Przeprowadzone doświadczenia kontrolne wykazały, iż wprowadzając tego rodzaju uszkodzenia komórki zachowują zdolność do podziałów (Zarębski 2008), a powstałe uszkodzenia naprawiane są w wyniku uruchomienia fizjologicznych procesów naprawczych w komórce. Opracowana metoda uszkadzania DNA nadawała się zatem do badania domniemanej roli białka HP1 w komórkowej odpowiedzi na uszkodzenie DNA (ang. *DNA damage response*, DDR).

Wzbudzony jon etydowy powoduje utlenianie zasad

Wiadomo, iż uszkodzenia chromatyny, które powstają w wyniku oddziaływania wzbudzonego światłem jonu etydowego z DNA, zachodzą tylko przy udziale tlenu (Deniss i Morgan 1976; Sheval i wsp., 2004). Przeprowadzone obserwacje mikroskopowe potwierdziły te doniesienia i pokazały duże stężenie reszt utlenionej deoksyguaniny 8-OHdG (8-hydroksy-2'-deoksyguanina) w obszarach uszkodzeń dokonywanych w obecności tlenu, zaś w warunkach beztlenowych nie wykryto 8-OHdG (Zarębski 2008). Co więcej, istnieją dowody, że 8-OHdG powstaje w wyniku oddziaływania czynników utleniających z DNA i zachodzi tylko w warunkach tlenowych (Martinez i wsp., 2003).

Z danych literaturowych wiadomo, że w naprawie opartej na usuwaniu zasad (ang. *Base Excision Repair*, BER) następuje wycięcie zmienionych zasad azotowych, które powstają w wyniku spontanicznej hydrolizy, utlenienia, promieniowania jonizującego czy działania czynników alkilujących. Wspomnieć należy, że najczęściej występujące i wysoce mutagenne formy zmienionych zasad to 8-hydroksy-2'-deoksyguanina i O-6-metylguanina (Lindahl i Wood 1999). W usuwaniu uszkodzeń oksydacyjnych z genomu komórek ssaczych uczestniczą różne glikozylazy DNA, które są specyficzne dla danej zasady. Glikozylaza DNA usuwa zmienioną zasadę i powstaje miejsce apurynowe/apirymidynowe (AP), do którego

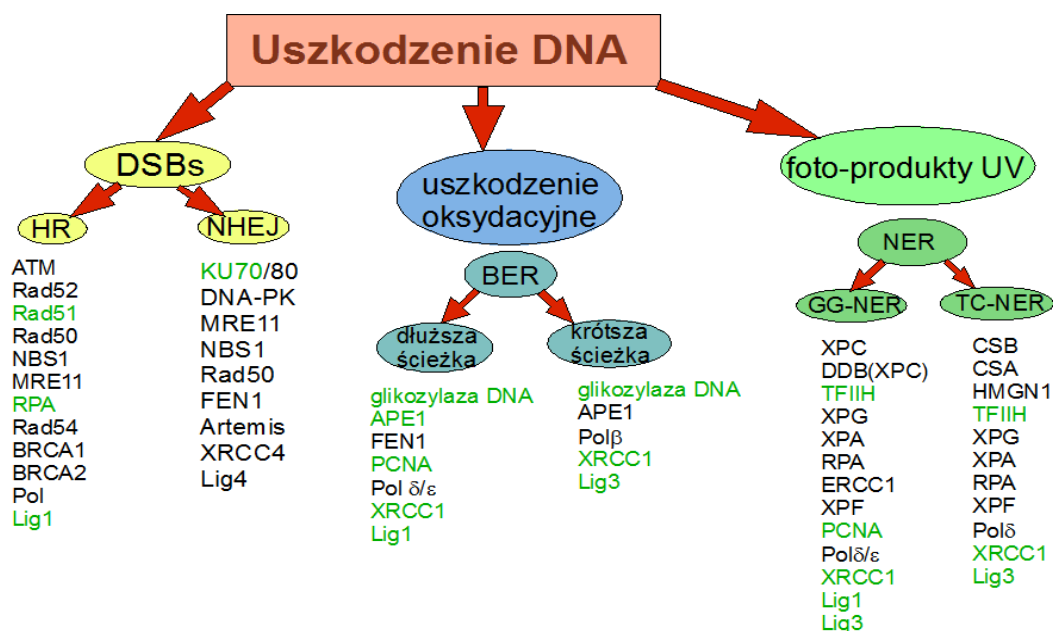
przyłącza się endonukleaza APE (HAP1). Endonukleaza nacina koniec 5' i otwiera rdzeń cukrowo-fosforanowy, a następnie odtwarza grupę hydroksylową 3' i resztę 5-dehydroksorybozo-fosforanową (Hoeijmakers i wsp., 2001). Główną drogą naprawy BER jest tzw. krótka ścieżka (ang. *short patch*), w której polimeraza DNA β dobudowuje pojedynczy nukleotyd i usuwa resztę 5-dehydroksorybozo-fosforanową (Allinson i wsp., 2001). Po nacięciu helisy, wolne odcinki DNA zostają połączone w reakcji ligacji katalizowanej przez kompleks XRCC1- ligaza DNA III. Z kolei w tzw. długiej ścieżce (ang. *long patch*) naprawy BER następuje zastąpienie nici DNA, zawierającej zmienioną zasadę, przez fragment wielkości kilku nukleotydów, w syntezie którego uczestniczy polimeraza DNA δ/ϵ . W procesie tym zaangażowane jest PCNA (stymuluje polimerazę), endonukleaza FEN1 (nacina i przesuwa usuniętą nić DNA) oraz ligaza DNA I. Wybór pomiędzy długą, a krótką ścieżką BER zależy prawdopodobnie od rodzaju uszkodzenia i fazy cyklu komórkowego (Fortini i Dogliotti 2007).

Podsumowując, wykonane we wspólnym projekcie badawczym z dr. M. Zarębskim eksperymenty wykazały, iż **w uszkodzonym obszarze chromatyny następuje utlenianie deoksyguaniny** (Zarębski 2008; Zarebski i wsp., 2009), co świadczy o tym, że **wzbudzony jon etidiowy indukuje oksydacyjne uszkodzenia DNA**. W obszarach tych zaobserwowano również gromadzenie ligazy DNA III (*Wyniki 4.1.14*), nie zaobserwowano natomiast akumulacji ligazy DNA I (*Wyniki 4.1.13*). Wyniki te jednoznacznie wskazują, iż **powstałe uszkodzenia, które prowadzą do rekrutacji HP1, naprawiane są w wyniku aktywacji krótkiej ścieżki procesu naprawczego BER**.

W uszkodzeniu generowane są podwójne pęknięcia nici DNA (DSBs)

W ramach niniejszego projektu badawczego przeprowadzono eksperymenty, w których sprawdzano gromadzenie białek naprawczych, uczestniczących w komórkowych procesach naprawy DNA. Zestawienie wszystkich czynników naprawczych, które uczestniczą w poszczególnych procesach naprawczych zamieszczono na Rys. 5.1, kolorem zielonym wyróżniono te białka, które zbadano w kontekście wprowadzonego uszkodzenia. Celem tych eksperymentów było scharakteryzowanie uszkodzeń generowanych przy użyciu wzbudzonego jonu etidiowego, a także wykazanie, które z mechanizmów naprawczych komórki aktywowane są w procesie naprawy. Przyjęto hipotezę, iż naprawa danego rodzaju

uszkodzeń odbywa się w wyniku aktywacji mechanizmu naprawczego, przy udziale charakterystycznego zestawu czynników, które gromadzą się w miejscu uszkodzenia. A zatem, aktywacja mechanizmu naprawczego wskazuje na obecność danego rodzaju uszkodzeń DNA.



Rysunek 5.1 Diagram komórkowych procesów naprawy DNA

W zależności od rodzaju uszkodzenia, następuje aktywacja odpowiedniego mechanizmu naprawczego. Dwuniciowe pęknięcia DNA (DSBs) naprawiane są na drodze rekombinacji homologicznej (HR) lub niehomologicznego łączenia końców (NHEJ). W procesie naprawy przez wycięcie zasady (BER) usuwane są uszkodzenia oksydacyjne, z kolei naprawa fotoproduktów UV (CPD, 6-4PP) zachodzi w procesie wycinania nukleotydów (NER). Kolorem zielonym zaznaczono te białka naprawcze, które badano w celu scharakteryzowania oksydacyjnych uszkodzeń DNA, wywołanych wzbudzoną (514 nm) jonem etidiowym.

Wykazano, iż w miejscach uszkodzeń DNA, indukowanych wzbudzoną jonem etidiowym, gromadzi się kompleks białkowy RPA, Rad51 oraz zachodzi fosforylacja histonu H2A.X (Zarębski 2008). Prowadzi to do wniosku, iż w badanym układzie doświadczalnym powstają pęknięcia nici DNA. Dokładny mechanizm powstawania DSBs w generowanym uszkodzeniu nie jest jednak znany. Pęknięcia nici DNA powstawać mogą albo bezpośrednio w wyniku działania światła wzbudzającego na jEt, albo pośrednio w wyniku reakcji oksydacyjnych, bez udziału interkalatora. Drugie wyjaśnienie wydaje się bardzo prawdopodobne. Wykazano bowiem, iż pod wpływem silnego utleniacza (H_2O_2), bez obecności interkalatora, następuje wyraźny wzrost liczby DSBs w komórkach (Zhao i wsp., 2007; Zarębski 2008). Dodatkowych argumentów dostarczają inne badania, które dowodzą, iż

endogenne, reaktywne formy tlenu (ang. *Reactive Oxygen Species*, ROS) powodują powstawanie DSBs na drodze pośredniej, w wyniku przekształcenia pojedynczych pęknięć nici DNA w podwójne DSBs (Vilenchik i Knudson 2003).

Przypuszczać zatem można, iż w badanym układzie eksperymentalnym, w którym do generowania lokalnych uszkodzeń chromatyny zastosowano wzbudzony jon etidiowy, powstają uszkodzenia oksydacyjne oraz podwójnoniciowe pęknięcia DNA (DSBs), których powstawanie najprawdopodobniej związane jest z generowaniem lub naprawą utlenionych zasad.

Doniesienia naukowe podają, iż γ -H2A.X jest markerem uszkodzeń DSBs (Rogakou i wsp., 1998; Rogakou i wsp., 1999). Fosforylacja histonu H2A.X prowadzić może do zmian w obrębie całej struktury domeny chromosomowej, w której znajduje się uszkodzone DNA (Paull i wsp., 2000) oraz stanowi sygnał wywołujący akumulację innych białek naprawczych (Celeste i wsp., 2002). Wiadomo jednak, iż inaktywacja H2A.X nie powoduje powstania fenotypu z defektem naprawczym, a zatem fosforylacja H2A.X nie wydaje się być niezbędna w naprawie (Bassing i wsp., 2002; Celeste i wsp., 2002).

Wykonane w ramach niniejszego projektu eksperymenty wykazały, iż **w obszarach lokalnych, indukowanych wzbudzonym jonem etidiowym, uszkodzeń chromatyny występują skupiska γ -H2A.X, które wskazują na obecność DSBs** (Zarębski 2008; Zarebski i wsp., 2009). Powstałe w miejscach uszkodzeń, podwójne pęknięcia nici DNA wydają się być naprawiane w mechanizmie opartym na rekombinacji homologicznej (HR). Hipoteza ta jest zgodna z obserwacją, która wykazała, iż w miejscu uszkodzenia występują ziarnistości RAD51 oraz zachodzi gromadzenie białka RPA (Zarębski 2008). Mechanizm NHEJ nie wydaje się być zaangażowany w naprawie, na co wskazuje brak rekrutacji kompleksu KU70/KU80 w obszarze uszkodzonym (*Wyniki 4.1.10*). Nie można jednak wykluczyć, iż zachodzi aktywacja NHEJ, a liczba powstałych uszkodzeń DSBs jest tak mała, że stężenie nagromadzonego w miejscu uszkodzenia białka KU70 znajduje się poniżej progu detekcji mikroskopu. Doniesienia naukowe podają, iż rekrutacja Ku70 obserwowana jest tylko wówczas, gdy generowana jest olbrzymia liczba uszkodzeń DSBs, nie wykluczone również, że Ku70 może należeć do grupy białek naprawczych, które nie tworzą charakterystycznych skupisk w miejscach powstałych uszkodzeń DSBs (Bekker-Jensen i wsp., 2006).

Nasuwa się tutaj przypuszczenie, iż komórki (60% naświetlanych komórek), w których obserwowane gromadzenie obydwu białek naprawczych: RAD51 i RPA, najprawdopodobniej znajdowały się w fazie S lub G2 cyklu komórkowego, gdyż w fazach tych naprawa DSBs odbywa się przy udziale HR. W hodowli komórkowej, w fazie wzrostu logarytmicznego, około 60% komórek znajduje się w fazie S lub G2 cyklu komórkowego (Zarębski 2008). Możliwe również, iż w usuwaniu generowanych wzbudzonym jonem etidiowym uszkodzeniach DSBs przeważa naprawa HR nad NHEJ, a mechanizm tego swoistego wyboru pomiędzy szlakami naprawczymi nie został jeszcze dokładnie poznany.

W naprawie powstałych uszkodzeń oksydacyjnych nie uczestniczy NER

W indukowanych wzbudzonym jonem etidiowym uszkodzonych obszarach chromatyny obserwowano akumulację glikozylazy OGG1, XRCC1 i ligazy DNA III (Rapp i wsp., 2009 - praca w przygotowaniu). Wyniki te jednoznacznie wskazują na aktywację krótkiej ścieżki szlaku naprawczego BER (Rys. 5.1) (Slupphaug 2003). Doniesienia literaturowe podają jednak, że naprawa utlenionej guaniny zachodzić może nie tylko na drodze BER, lecz również NER (Le Page i wsp., 2000; Sunesen i wsp., 2002). Sugeruje to, iż generowane tą metodą uszkodzenia mogłyby być naprawiane w mechanizmie naprawczym NER. Chociaż możliwość ta wydaje się być prawdopodobna, nie zaobserwowano jednak rekrutacji czynnika transkrypcyjnego TFIIH (ang. *Transcription Factor II H*) (Zarębski 2008; Rapp i wsp., 2009 – praca w przygotowaniu), który uczestniczy w obydwu szlakach naprawy NER, TC-NER i GG-NER (Rys. 5.1). **Wyniki uzyskanych eksperymentów pozwalają zatem wykluczyć udział mechanizmu NER w naprawie indukowanych wzbudzonym jonem etidiowym uszkodzeń DNA, które prowadzą do rekrutacji HP1.**

Naprawa powstałych uszkodzeń oksydacyjnych odbywa się w wyniku aktywacji fizjologicznych procesów naprawczych komórki

Naświetlanie komórek w zoptymalizowanych dla tej metody warunkach powoduje powstawanie jedynie niewielkiej, policzalnej liczby miejsc gromadzenia RPA (Zarębski 2008; Rapp i wsp., 2009 – praca w przygotowaniu) i tym samym metoda ta spełnia warunki stawiane uszkodzeniom subletalnym (Bekker-Jensen i wsp., 2006). Stwierdzić zatem można, iż opracowana dla potrzeb niniejszego projektu metoda wprowadzania indukowanego

wzbudzonym jonem etidiowym, lokalnego i kontrolowanego uszkodzenia chromatyny spełnia podstawowy, stawiany technikom generowania lokalnych uszkodzeń DNA, wymóg aktywacji fizjologicznych mechanizmów naprawczych w komórkach. Można zatem przypuszczać, że również rekrutacja HP1 nie jest artefaktem, lecz elementem odpowiedzi fizjologicznej komórki. Opracowana przez zespół badawczy Pracowni Biofizyki Komórki WBBiB UJ metoda jest stosunkowo prosta w zastosowaniu, co niewątpliwie stanowi olbrzymią jej przewagę, w porównaniu z innymi metodami wprowadzania uszkodzeń DNA. Największą zaletą tej metody jest użycie światła widzialnego, a zatem można przypuszczać, iż w generowanym uszkodzeniu przeważa utlenianie zasad nad innymi uszkodzeniami. Obserwacje wykonane przy użyciu mikroskopu konfokalnego pozwoliły na scharakteryzowanie procesów naprawczych, zaangażowanych w naprawie indukowanych tą metodą uszkodzeń DNA. Wykazano, iż wzbudzony światłem jon etidiowy wywołuje uszkodzenia oksydacyjne i prowadzi do powstania podwójnych pęknięć nici DNA (DSBs), które powodują aktywację homologicznej naprawy (HR) oraz krótkiej ścieżki drogi naprawczej BER.

5.3 Gromadzenie białka HP1 w obszarach lokalnych uszkodzeń chromatyny świadczy o zaangażowaniu HP1 w procesie naprawy DNA

Heterochromatynowe białko HP1 należy do grupy wysoce konserwatywnych, niehistonowych białek chromatynowych, które występują u eukariota. Wszystkie trzy izoformy białka (HP1 α , HP1 β i HP1 γ) posiadają na C-końcu domenę chromoshadow, zawierającą identyczny motyw dimeryzacyjny, który zaangażowany jest w tworzenie homo- oraz heterodimerów (Cowieson i wsp., 2000), a także w oddziaływaniach z białkami zawierającymi konsensusową sekwencję PxVxLx (Smothers i Henikoff 2000). HP1 zawierają N-kończową chromodomenę, która wiąże się niespecyficznie do DNA poprzez Me2K9H3 oraz Me3K9H3 (Jacobs i Khorasanizadeh 2002). Dane literaturowe podają, iż HP1 oddziałuje z dużą grupą białek jądrowych, wśród których odnaleźć można białka zaangażowane w regulację transkrypcji, remodeling chromatyny, replikację i naprawę DNA, a także białka zasocjowane z chromosomami czy strukturalne otoczki jądrowej (Li i wsp., 2002).

Wszechstronność funkcji białek HP1 w różnych procesach jądrowych, nasuwa zatem pytanie, czy białka te uczestniczyć mogą również w mechanizmach odpowiedzi na uszkodzenie DNA. Do czasu rozpoczęcia niniejszego projektu badawczego brak było danych na temat udziału HP1 w procesach naprawy DNA.

Rekrutacja białka HP1 zachodzi w odpowiedzi na uszkodzenie oksydacyjne

Opracowana dla potrzeb niniejszego projektu metoda wprowadzania lokalnych uszkodzeń DNA, indukowanych wzbudzonym jonem etidiowym, użyta została do badania różnic w wewnątrzjądrowym rozkładzie białka HP1 w odpowiedzi na uszkodzenie. Przeprowadzona analiza mikroskopowa wykazała, iż **wszystkie trzy izoformy HP1 (α , β , γ) ulegają rekrutacji do indukowanych wzbudzonym jonem etidiowym obszarów lokalnych uszkodzeń oksydacyjnych**. Odkrycie to wzbudziło duże zainteresowanie, gdyż nie było wcześniejszych doniesień, aby białko HP1 zaangażowane było w jakąkolwiek komórkową odpowiedź na uszkodzenie DNA (Li i wsp., 2002; Singh i Georgatos 2002; Hediger i Gasser 2006; Lomberg i wsp., 2006; Fanti i Pimpinelli 2008; Kwon i Workman 2008). Eksperymenty wykazały, że zarówno endogenne HP1, jak i białko fuzyjne połączone z GFP, ulega akumulacji (*Wyniki 4.1.2*). Co ciekawe, gromadzenie to obserwowano zarówno w euchromatynowych, jak i heterochromatynowych obszarach jądrowych (Zarebski i wsp., 2009). Co więcej, wykonane eksperymenty pokazały, iż proces **gromadzenia białka HP1 jest odwracalny i oddysocjowanie HP1 z obszarów uszkodzeń zachodzi po około 8-10 godzinach od uszkodzenia** (Zarebski i wsp., 2009). Zmniejszenie stężenia białka HP1 w obszarze uszkodzonym zachodzi zapewne po ukończeniu naprawy, w wyniku której następuje usunięcie powstałych uszkodzeń. Co więcej, eksperymenty wykonane na mutantach NER wykazały, iż proces „oddysocjowania” HP1 z miejsc uszkodzenia wywołanego UV wydaje się zachodzić znacznie wolniej w nieobecności funkcjonalnej naprawy NER (*Wyniki 4.2.7*).

Gromadzenie HP1 zachodzi tylko w warunkach tlenowych i w obecności wzbudzonego jEt

Dane literaturowe sugerują, iż oksydacyjne uszkodzenie chromatyny jest następstwem wzbudzenia jonu etidiowego (Krishnamurthy i wsp., 1990). Można zatem przypuszczać, iż obserwowana rekrutacja białka HP1 zachodzić będzie tylko w obecności wzbudzonego jonu etidiowego. Sugestia ta potwierdzona została w przeprowadzonej analizie mikroskopowej. Zaobserwowano bowiem, iż niewzbudzony światłem (514 nm) jon etidiowy, podobnie jak i samo naświetlanie bez fotouczulacza, nie powoduje rekrutacji białka HP1 (*Wyniki 4.1.3*) (Wiernasz 2004). Wynika to z faktu, iż w warunkach tych nie zachodzi uszkodzenie oksydacyjne i potwierdza, iż **gromadzenie HP1 jest odpowiedzią na wywołanie uszkodzenia oksydacyjnego**. Ponadto, kolejne eksperymenty, w których zastosowano metody immunofluorescencji, pokazały, iż w nieobecności tlenu nie zachodzi utlenianie reszt guaniny w DNA (Zarebski i wsp., 2009). Wyniki tych obserwacji potwierdzają postawioną wcześniej hipotezę, że w badanym układzie doświadczalnym, w **generowaniu oksydacyjnych uszkodzeń chromatyny uczestniczy tlen**. W tym kontekście wydaje się prawdopodobne, że w warunkach beztlenowych nie będzie zachodzić uszkodzenie oksydacyjne i tym samym rekrutacja HP1 również nie będzie obserwowana.

Podobną rekrutację HP1 obserwowano w miejscach uszkodzeń wywołanych przez UV

Opisane tu eksperymenty wykazały, że białko HP1 zaangażowane jest w naprawę oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Można zatem podejrzewać, iż skoro HP1 uczestniczy w naprawie BER oraz naprawie DSBs, możliwe, że zaangażowane ono również będzie w naprawie innego rodzaju uszkodzeń, np. wywołanych przez UV. Przypuszczenia te potwierdziły wyniki wstępnych, wykonanych na Uniwersytecie w Amsterdamie eksperymentów, które wykazały, że **białko HP1 ulega rekrutacji do indukowanych przez UV uszkodzeń DNA, które są naprawiane na drodze NER** (Luijsterburg i wsp., 2009). W doświadczeniach tych komórki naświetlano światłem o długości fali 266 nm lub promieniowaniem ultrafioletowym pochodzącym z lampy UV-C i przepuszczanym przez porowaty filtr. W obydwu metodach generowane są lokalne uszkodzenia DNA w postaci CPD oraz 6-4 PP, które powodują aktywację procesu naprawczego NER (Moné i wsp., 2001; Moné

i wsp., 2004; Dinant i wsp., 2007; Luijsterburg i wsp., 2007). Podkreślić należy, iż w obydwu metodach generowania uszkodzeń UV, nie obserwowano rekrutacji białek uczestniczących w naprawie DSBs (Dinant i wsp., 2007; Luijsterburg i wsp., 2009), wnioskować zatem można, że w warunkach tych nie powstają uszkodzenia SSBs, ani też DSBs.

Niezwykłe interesujące wyniki, pokazujące akumulację białka HP1 w odpowiedzi na uszkodzenie wywołane przy pomocy UV (Wyniki 4.2.2), a także możliwość odbycia półrocznego pobytu w laboratorium prof. Roel'a van Driel'a (Uniwersytet Amsterdamski), przyczyniły się do nawiązania współpracy z holenderskimi ośrodkami naukowymi, które specjalizują się w badaniach nad mechanizmami naprawy DNA. Możliwa była zatem kontynuacja dalszych badań nad rolą białka HP1 w kontekście naprawy NER. Przeprowadzone we współpracy z dr. M. Luijsterburg'iem eksperymenty wykazały, iż **wszystkie trzy izoformy HP1 ulegają akumulacji w obszarach lokalnych uszkodzeń wywołanych przez UV**, które wyznakowane są nagromadzonym białkiem naprawczym DDB2. Dalsze doświadczenia, wykonane we wspólnym projekcie badawczym (Luijsterburg i wsp., 2009) pokazały, iż **gromadzenie HP1 obserwowane było w mutantach NER, a zatem proces rekrutacji HP1 zachodzi niezależnie od aktywności mechanizmu naprawczego NER**. Dalsze eksperymenty dowodzą **gromadzenia HP1 w komórkach OGG1-/-**, które nie zawierają genu kodującego glikozylazę OGG1 (Rapp i wsp., 2009 – praca w przygotowaniu), **przypuszczać zatem można, iż proces rekrutacji HP1 jest również niezależny od drogi naprawczej BER**.

Białka HP1 gromadzą się w miejscach podwójnych pęknięć nici DNA

W metodzie wprowadzania lokalnych uszkodzeń chromatyny, indukowanych wzbudzoną jonem etydium, generowane są oksydacyjne uszkodzenia DNA oraz powstają podwójne pęknięcia nici (DSBs) (Zarebski i wsp., 2009). Wydawało się zatem logiczne, aby sprawdzić, czy akumulacja HP1 zachodzić będzie w komórkach naświetlanych cząstkami α , które prowadzą do powstania liniowych torów DSBs na obszarze jąder komórkowych (Aten i wsp., 2004; Williams i wsp., 2007; Stap i wsp., 2008). Wykonane we współpracy z Janem Stap'em eksperymenty pokazały **gromadzenie białka HP1 w komórkach naświetlanych cząstkami α** (Wyniki 4.3.1). Co ciekawe, rekrutacja ta obserwowana była dla wszystkich trzech izoform białka HP1: HP1 α , HP1 β oraz HP1 γ (Luijsterburg i wsp., 2009). Wiadomo, iż

usuwanie podwójnych pęknięć DNA z genomu komórek ssaczych odbywa się na dwóch drogach: HR oraz NHEJ. Doniesienia literaturowe podają, że naprawa oparta na rekombinacji homologicznej (HR) dominuje w fazie S i G2, z kolei naprawa oparta na niehomologicznym łączeniu końców (NHEJ) dominuje w fazie G1 cyklu komórkowego (Wyman i Kanaar 2006). Co więcej, proces NHEJ zainicjowany zostaje przez dimer KU70/80 (Mari i wsp., 2006), którego podjednostka KU70 bezpośrednio oddziałuje z białkiem HP1 α (Song i wsp., 2001). Wykonane w ramach niniejszego projektu eksperymenty wykazały, iż akumulacja białka HP1 do obszarów DSBs nie zależy od dimeru KU70/80 (*Wyniki 4.1.10*). Świadczy to zatem o tym, że akumulacja białek HP1 do miejsc podwójnych pęknięć nici DNA (DSBs) zachodzić może niezależnie od naprawy NHEJ. Podsumowując, stwierdzić zatem można, iż **rekrutacja białek HP1 wydaje się być elementem ogólnej odpowiedzi komórki na różne uszkodzenia DNA**.

Gromadzenie HP1 nie wynika z agregacji chromatyny

W literaturze istnieją doniesienia mówiące, iż światło laserowe o wysokiej mocy nie tylko generuje olbrzymie uszkodzenia DNA, lecz wywołuje również lokalną destrukcję histonów oraz innych, zasocjowanych z chromatyną kompleksów białkowych (Bekker-Jensen i wsp., 2006). Doniesienia takie wydają się prawdopodobne, gdyż można przypuszczać, iż złożoność i ogromna gęstość uszkodzeń chromosomów przewyższać będzie komórkową zdolność do naprawy tych uszkodzeń. W takich warunkach może zachodzić stabilizacja lub agregacja matrycy DNA, co może prowadzić do gromadzenia białek, które specyficznie oddziałują z końcami DNA (Lieber i wsp., 2003). Nasuwają się, zatem wątpliwości, czy obserwowane gromadzenie białka HP1 wynika rzeczywiście z jego udziału w procesach naprawczych, czy jest może wynikiem agregacji i niespecyficznego łączenia się białek chromatynowych lub lokalnej agregacji chromatyny w miejscu uszkodzenia. Eksperymenty wykonane na białkach histonowych połączonych z GFP wydają się rozwiewać powyższe wątpliwości (*Wyniki 4.1.8*). Doświadczenia te wykazały, iż w miejscu uszkodzenia nie następuje zwiększenie lokalnego stężenia budujących chromatynę białek histonowych (H1, H2B, H3). Potwierdza to zatem sugestię, iż wprowadzone uszkodzenie jest subletalne i na tyle małe, że wywołuje tylko naturalne mechanizmy naprawcze komórki. Co więcej, **w obszarze uszkodzonym nie zachodzi lokalna agregacja chromatyny**. Co ciekawe, doniesienia naukowe podają, iż procesom naprawy DNA może towarzyszyć globalna lub lokalna relaksacja struktury chromatyny (Escargueil i wsp., 2008).

Zgromadzone w miejscu uszkodzenia białko HP1 jest mobilne

Wykonana w ramach niniejszego projektu analiza mikroskopowa, w której wykorzystano technikę fotoblaknięcia (Wyniki 4.1.6) wykazała, iż **białko HP1 nagromadzone w miejscu uszkodzenia, indukowanego wzbudzoną jonem etidiową, jest ruchliwe i ulega wymianie z jądrową pulą białka**. Co ciekawe, pomimo, iż HP1 nie jest związane trwale, jego lokalne stężenie w miejscu uszkodzenia pozostaje wyższe niż przed uszkodzeniem. Pojawia się zatem przypuszczenie, że **w miejscu uszkodzenia mogą istnieć dwie subpopulacje białka HP1, natywna (tzn. związana w całości przez „ogony histonowe”) oraz nagromadzona, przywoływana w wyniku uszkodzenia**. Podobne pomiary ruchliwości białka HP1 prowadzono również w komórkach uszkodzanych UV, z tą różnicą, że w tym przypadku komórki poddawano globalnemu naświetlaniu promieniowaniem ultrafioletowym (Luijsterburg i wsp., 2009). Eksperymenty te również wykazały, że w obszarze uszkodzonym następuje immobilizacja cząsteczek białka HP1. Ponadto, analiza porównawcza z komórkami nienaświetlonymi pozwoliła oszacować, że około 15% cząsteczek białka zostaje immobilizowana w miejscu uszkodzenia (Luijsterburg i wsp., 2009). Kwestią otwartą pozostaje jednak to, w jaki sposób odbywa się proces rekrutacji, oraz jak białko HP1 zostaje związane w miejscu uszkodzenia.

Proces gromadzenia HP1 ma charakter enzymatyczny

Cechą charakterystyczną procesów enzymatycznych jest to, że warunki środowiska, a w szczególności temperatura, silnie wpływają na przebieg tych procesów. Natomiast procesy fizyczne zależą od temperatury w skali bezwzględnej. Sprawdzenie zależności temperaturowej akumulacji białka HP1 mogło zatem dostarczyć wskazówek o naturze tego procesu. Przeprowadzone w tym celu eksperymenty wykazały, iż **obniżenie temperatury silnie zmniejsza tempo rekrutacji HP1 lub je hamuje i sprawia, że stężenie nagromadzonego w miejscu uszkodzenia białka jest znacznie niższe** (Wyniki 4.1.5). Tego rodzaju temperaturowa zależność rekrutacji białka sugeruje, iż akumulacja HP1 w miejscu uszkodzenia może być kontrolowana w procesie enzymatycznym i nie wydaje się mieć cech adsorpcji.

Tempo gromadzenia białka HP1 jest znacznie wolniejsze niż innych białek naprawczych

Aby dokładniej scharakteryzować proces gromadzenia białka HP1, wykonano pomiary zmian rozmieszczenia HP1 w uszkodzonych jądrach komórkowych (Wyniki 4.1.4). Przeprowadzono dokładną analizę, która wykazała, iż **po kilku minutach od uszkodzenia następuje zwiększenie lokalnego stężenia HP1 w obszarze uszkodzonym, a maksymalne lokalne stężenie białka, na poziomie 130-160%, osiągane jest po 30-40 min od uszkodzenia.** Co ciekawe, **tempo gromadzenia HP1 jest znacznie wolniejsze w porównaniu z tempem gromadzenia innych, badanych białek naprawczych** (Rys. 5.1), takich jak: RPA, Rad51, APEX, XRCC1 czy PCNA (Rapp i wsp., 2009 - praca w przygotowaniu). Porównując czas obecności HP1 w miejscu uszkodzenia, z wyznaczonymi eksperymentalnie czasami obecności białek naprawczych BER (Hamilton i wsp., 2001; Rapp i wsp., 2009 – praca w przygotowaniu), zauważyć można, że HP1 pozostaje w miejscu uszkodzenia dłużej, i znacznie wolniej przywoływane jest do obszaru uszkodzonego. Obserwacje te pozwalają przypuszczać, iż **białko HP1 może być zaangażowane nie tyle w sam proces naprawy, tzn. odtworzenie sekwencji DNA, lecz raczej inne procesy, które towarzyszą naprawie DNA.** Może to być przekazywanie sygnału o uszkodzeniu. Możliwe jest też, iż HP1 stanowi „platformę do ładowania” innych białek.

5.4 W procesie rekrutacji białka HP1 do miejsc uszkodzeń DNA uczestniczy domena CSD

Białko HP1 zbudowane jest z dwóch konserwatywnych domen: chromodomeny (CD) oraz domeny chromoshadow (CSD), które oddzielone są rejonem zawiasowym (ang. *hinge*) (Eisenberg i Elgin 2000; Lomberg i wsp., 2006). Chromodomena wiąże się bezpośrednio do zmetylowanej lizyny 9 histonu H3 (Jacobs i Khorasanizadeh 2002). Z kolei domena chromoshadow oddziałuje z dużą grupą białek jądrowych (Li i wsp., 2002; Thiru i wsp., 2004).

Opisane w niniejszej rozprawie eksperymenty wykazały, iż białko HP1 ulega gromadzeniu w obszarach lokalnych uszkodzeń oksydacyjnych. Jeżeli założyć, że proces ten

jest związany z bezpośrednim oddziaływaniem HP1 z uszkodzonym DNA, lub z białkami kompleksu naprawczego, można przypuszczać, iż w procesie rekrutacji kluczową rolę odgrywa tylko jedna domena CD, CSD lub "hinge". Przeprowadzone eksperymenty wydają się wskazywać, że proces rekrutacji HP1 zachodzi przy udziale znajdującej się na C-końcu domeny chromoshadow. Co więcej, **dostępność C-końca białka wydaje się być kluczowa w procesie rekrutacji czy wiązania HP1 w uszkodzonym rejonie chromatyny**. Sugestię tę potwierdzają eksperymenty, które wykazały, iż przyłączenie EGFP-LacR do C-końca HP1 powoduje zahamowanie akumulacji białka do obszarów uszkodzeń oksydacyjnych (Wyniki 4.1.7). Nasuwa to przypuszczenie, że fragment EGFP-LacR stanowi pewnego rodzaju zawadę przestrzenną dla oddziaływań domeny chromoshadow z innymi białkami, m.in. zaangażowanymi w rekrutację HP1 do miejsc uszkodzeń DNA. Wskazywałoby to, że za rekrutację HP1 do obszarów uszkodzeń mogą być odpowiedzialne białka oddziałujące z domeną CSD.

Dalszych dowodów, potwierdzających istotną rolę domeny CSD, dostarczyły eksperymenty wykonane na mutantach delecyjnych białka HP1, które nie zawierały domeny CD, CSD lub regionu hinge (Luijsterburg i wsp., 2009). W tym celu wyznakowano fluorescencyjnie mutanty HP1, a następnie sprawdzono ich rekrutację do obszarów uszkodzeń UV. Co ciekawe, wykazano, iż ani delecja w obrębie chromodomeny (CD), ani w obrębie regionu zawiasowego nie wpływają na rekrutację białka. Wyraźny zanik rekrutacji obserwowano natomiast w przypadku mutantów z delecją w obrębie domeny chromoshadow. Wykazano również, że sama domena CSD jest wystarczająca do rekrutacji. W tym celu zbadano mutant delecyjnego, który zawierał jedynie domenę CSD sprzężoną z GFP (Luijsterburg i wsp., 2009). Zauważono, że **domena chromoshadow (CSD) jest niezbędna i wystarczająca w rekrutacji HP1 do obszarów uszkodzeń UV**. Przypuszczać zatem można, że C-koniec białka HP1, a dokładniej znajdująca się na nim domena chromoshadow, pełni istotną rolę w rekrutacji białka HP1 do uszkodzonej chromatyny. A zatem, podobnie jak w przypadku uszkodzeń oksydacyjnych, w procach rekrutacji, czy wiązania HP1 w obszarach uszkodzeń UV, mogą być zaangażowane inne białka, oddziałujące z domeną CSD.

Metylotransferaza SUV39 nie gromadzi się w obszarach uszkodzeń UV

Wiadomo, że metylotransferaza histonowa SUV39 odpowiedzialna jest za potrójną metylację lizyny 9 histonu H3 (Me3K9H3). Doniesienia literaturowe podają, że domena CD białka HP1 wiąże się z DNA poprzez Me2K9H3 oraz Me3K9H3 (Jacobs i Khorasanizahed 2002). Ponadto, metylotransferaza SUV39 nie tylko odpowiada za potrójną metylację K9H3, lecz także jest jednym z partnerów interakcji dla domeny CSD białka HP1 (Aagaard i wsp., 1999; Czvitkovich i wsp., 2001). Nasuwa się zatem sugestia, iż metylotransferaza SUV39 może ulegać akumulacji w miejscach indukowanych przez UV uszkodzeń DNA. Sugestia ta wydaje się o tyle prawdopodobna, że SUV39 generuje miejsca wiązania dla HP1, a wcześniejsze eksperymenty wykazały, iż nagromadzone białko ulega immobilizacji w miejscach uszkodzeń, a zatem musi zostać w tym miejscu jakoś związane. Powyższe wątpliwości wydaje się rozwiewać kolejny eksperyment (*Wyniki 4.2.4*), który dowodzi, iż **w obszarach uszkodzeń UV nie następuje rekrutacja SUV39H1.**

W obszarze uszkodzonym nie zaobserwowano wzrostu poziomu Me3K9H3

Sygnałem „przywołującym” białko HP1 w heterochromatynie jest metylacja Me2K9H3 oraz Me3K9H3. Zatem logiczne jest przypuszczenie, iż metylacja może być również sygnałem do rekrutacji HP1 w miejscu uszkodzenia. Aby sprawdzić tę hipotezę wykonano eksperymenty, w których badano, czy w indukowanym wzbudzonym jonem etydium, uszkodzonym obszarze chromatyny następuje wzrost poziomu metylacji Me3K9H3 (*Wyniki 4.1.9*). Uzyskano wynik negatywny, tzn. w miejscu uszkodzenia nie zaobserwowano zwiększenia poziomu metylacji Me3K9H3. Świadczy to zatem, iż **potrójna metylacja w obrębie lizyny 9 histonu H3 nie jest sygnałem do rekrutacji HP1 w obszarach uszkodzeń.** Ponadto, wydaje się również mało prawdopodobne, aby w miejscu uszkodzenia następowała podwójna metylacja lizyny i Me2K9H3 było miejscem przyłączenia dla nagromadzonego białka HP1. Te obserwacje dostarczają wskazówek, aby przypuszczać, że wiązanie nagromadzonego w miejscu uszkodzenia białka HP1 odbywa się na zupełnie innej zasadzie niż typowe wiązanie białek HP1 w heterochromatynie.

Rekrutację białka HP1 obserwowano w komórkach Suv39-/-

W celu dostarczenia kolejnych dowodów na to, że chromodomena HP1 rzeczywiście nie jest konieczna w rekrutacji białka, sprawdzono czy akumulacja HP1 zachodzi w komórkach MEFs Suv39dn, które nie zawierają obydwu genów metylotransferazy histonowej Suv39h1 i Suv39h2 (Wyniki 4.2.3). Jak już wcześniej wspomniano, białka te są metylotransferazami generującymi potrójną metylację K9H3, która jest miejscem wiązania dla CD HP1 (Cheutin i wsp., 2003). Opisane tu **eksperymenty pokazały wyraźną akumulację białka HP1β w obszarach lokalnych uszkodzeń UV, w komórkach Suv39dn**. Nasuwa się zatem sugestia, że w rekrutacji HP1 nie uczestniczy metylotransferaza SUV39, ani poprzez generowanie miejsc wiązania dla chromodomeny (Me3K9H3), ani też poprzez wiązanie domeny chromoshadow HP1. Prawdopodobnie, w rekrutacji i/lub wiązaniu białka HP1 nie uczestniczy chromodomena, a gromadzenie HP1 zachodzi przy udziale domeny chromoshadow (CSD). Co więcej, białkiem przywołującym HP1 do obszarów uszkodzeń nie wydaje się być metylotransferaza histonowa, lecz może nim być inne białko oddziałujące z domeną CSD. Przypuszczać zatem można, iż **nagromadzone w obszarach uszkodzeń białko HP1 jest wiązane na innej drodze niż w heterochromatynie, tzn. nie poprzez metylowane reszty lizyny histonu H3**.

5.5 Rekrutacja białka HP1 do obszarów uszkodzeń wywołanych przez UV nie zależy od aktywności białek naprawczych NER

Komórki ssaków wyższych wykorzystują proces naprawy NER do usuwania indukowanych przez UV uszkodzeń DNA. Dane literaturowe podają, że uszkodzenia UV powodują uruchomienie procesów takich, jak: rekrutacja CAF-1 (Green i Almouzni 2003) czy ubikwitynizacja lizyny 119 histonu H2A (Bergink i wsp., 2006). Co więcej, procesy te są wyraźnie zależne od wiązania i aktywacji białek wchodzących w skład kompleksu „pre-incision” szlaku naprawy NER (Polo i wsp., 2006). Przypuszczać zatem można, iż towarzysząca uszkodzeniom UV rekrutacja HP1 zależeć będzie od aktywności białek naprawczych NER. Informacji na ten temat dostarczają eksperymenty wykonane na mutantach delecyjnych NER (Wyniki 4.2.5). Przeprowadzone obserwacje mikroskopowe wykazały, iż białko HP1 ulega rekrutacji w dwóch niezależnych mutantach XP-A, DDB2 oraz

XP-C. Sugeruje to, zatem, iż do rekrutacji HP1 nie jest wymagane podwójne wycięcie (ang. *dual incision*). Ponadto, wiązanie HP1 w miejscu uszkodzenia nie wydaje się być ani późnym, ani też wczesnym etapem naprawy DNA. Stwierdzić zatem można, że **wiązanie HP1 nie zależy od aktywności białek GG-NER**.

Wiadomo, że zatrzymanie polimerazy RNAPII jest sygnałem detekcji uszkodzenia w naprawie TC-NER. W kolejnych etapach naprawy następuje gromadzenie czynników NER, które zależą od czynnika sprzęgającego CSB (Fousteri i wsp., 2006). Ponieważ akumulacja HP1 zachodziła w komórkach CS-B (Luijsterburg i wsp., 2009), sugeruje to zatem, iż **rekrutacja białka HP1 nie zależy od aktywnej naprawy TC-NER**. Wnioskować zatem można, że białko HP1 w jakiś sposób uczestniczy w naprawie NER, ale, paradoksalnie, jest ono zupełnie niezależne od NER.

Wiązanie HP1 wywołane jest obecnością 6-4PP

Wykonane w ramach niniejszego projektu eksperymenty wykazały, że gromadzenie białka HP1 jest niezależne od białek naprawczych NER. Kwestią otwartą pozostaje jednak to, czy oddysocjowanie HP1 z miejsca uszkodzenia zależy od istnienia funkcjonalnej naprawy NER. Na tym etapie pracy nie można było wykluczyć, że obecność nienaprawionego uszkodzenia wpływać będzie na zachowanie białka HP1. Na powyższe wątpliwości wydaje się odpowiadać eksperyment wykonany na komórkach XP-A, w których zaobserwowano, że poziom białka HP1, nagromadzonego w miejscu uszkodzeń UV, pozostaje nadal wysoki po 4 godzinach od uszkodzenia (*Wyniki 4.2.7*). Przeciwnie zjawisko zaobserwowano w komórkach XP-A z przywróconą zdolnością naprawy XPA, gdzie poziom związanego HP1 stopniowo zmniejszał się i po 4 godzinach od uszkodzenia lokalne stężenie HP1 osiągnęło wartość poziomu wyjściowego. Sugeruje to zatem, iż **wiązanie HP1 wywoływane jest głównie obecnością 6-4PPs**. Z danych literaturowych wiadomo, że ten rodzaj uszkodzeń (6-4PPs) usuwany jest w czasie około 4 godzin w trakcie trwania naprawy, w przeciwieństwie do CPDs, których poziom nadal pozostaje wysoki (Garinis i wsp., 2005).

Podsumowując, **HP1 wydaje się być pierwszym przykładem białka, którego rekrutacja do miejsc uszkodzeń UV zachodzi niezależnie od któregośkolwiek ze znanych białek naprawczych NER**. Co więcej, **czas pozostania HP1 w miejscu uszkodzenia**

prawdopodobnie zależy od tego, czy uszkodzenie zostało naprawione, czy też nie, co sugeruje jego znaczenie w procesie naprawy chromatyny.

5.6 Rekrutacja białka HP1 zachodzi we wszystkich fazach cyklu komórkowego

Rekrutację HP1 do miejsc uszkodzeń, wywołanych przez UV, w komórkach z upośledzoną naprawą NER, tłumaczyć można tym, iż obserwowane komórki znajdowały się w fazie S cyklu komórkowego. Doniesienia literaturowe podają bowiem, że gdy widełki replikacyjne (faza S cyklu komórkowego) napotkają uszkodzenie UV dochodzi do ich zatrzymania i następuje aktywacja procesu naprawczego HR (Dinant i wsp., 2007). Co więcej, uszkodzenia typu DSBs powstają podczas replikacji, gdy na drodze widełek replikacyjnych znajdują się dimery cyklobutano - pirymidynowe (CPD) (Garinis i wsp., 2005). Jest zatem prawdopodobne, iż gromadzenie HP1 w miejscu uszkodzenia wynikać może z zatrzymania replikacji w fazie S i naprawy fotoproduktów UV w wyniku aktywacji procesu HR, a nie NER. Niejasność tę wydaje się tłumaczyć eksperyment, w którym jako markera faz cyklu komórkowego użyto PCNA – białka, które posiada charakterystyczny dla poszczególnych faz cyklu komórkowego rozkład wewnątrzjądrowy (Wyniki 4.2.6). Obserwacje mikroskopowe wykazały, iż **rekrutacja białek HP1 zachodzi w komórkach typu dzikiego, jak i w komórkach z upośledzoną naprawą NER, zarówno w fazie S, jak i w fazie G1/G2**. Kolejnych dowodów na potwierdzenie tej hipotezy dostarczają obserwacje wykonane na komórkach naświetlanych cząstkami α , w których kolokalizacja HP1 z γ H2A.X widoczna była we wszystkich obserwowanych komórkach (Luijsterburg i wsp., 2009). To z kolei wskazuje, że wiązanie HP1 w obszarach uszkodzonych nie zależy od fazy cyklu komórkowego.

Dodatkowych dowodów na niezależność rekrutacji HP1 od fazy cyklu komórkowego dostarczyły pomiary jądrowego rozkładu białka HP1 w komórkach nieproliferujących (komórki G0; komórki zahamowane w cyklu podziałowym, ang. *quiescent cells*), w których zastosowano antygen Ki67 jako marker proliferacji komórek (Luijsterburg i wsp., 2009). Zaobserwowano wyraźną akumulację HP1 w miejscach uszkodzeń wywołanych przez UV w komórkach G0. Wyniki tych eksperymentów sugerują, iż **akumulacja HP1 nie wynika**

z zahamowania replikacji. Co więcej, **wiązanie HP1 po naświetlaniu UV zachodzi zarówno w komórkach dzielących się, jak i niepostępujących przez cykl podziałowy.** Przypuszczać zatem można, iż podobnie, jak w przypadku indukowanych UV uszkodzeń DNA, niezależne od fazy cyklu komórkowego, gromadzenie HP1 zachodzić również będzie w odpowiedzi na uszkodzenia oksydacyjne, aczkolwiek hipoteza ta wymaga potwierdzenia eksperymentalnego.

5.7 Kaskada transdukcji sygnału w której uczestniczy ATR nie wpływa na rekrutację białka HP1

Doniesienia literaturowe podają, że w odpowiedzi na uszkodzenie, oprócz naprawy DNA, następuje również aktywacja szlaku kinaz sygnałowych oraz punktów kontrolnych cyklu komórkowego, czemu towarzyszy fosforylacja licznych białek uczestniczących w komórkowej odpowiedzi na uszkodzenie DNA (ang. *DNA damage response*, DDR) (Bartek i Lukas 2007). Po wykryciu uszkodzenia DNA, w którymś z punktów kontrolnych komórki (ang. *cell cycle checkpoints*) (G1/S, S, G2/M lub M), następuje zahamowanie postępowania przez cykl podziałowy. Zatrzymanie postępowania przez kolejne fazy cyklu sprawia, że komórka dysponuje dodatkowym czasem potrzebnym na naprawę uszkodzenia, a gdy uszkodzenie jest zbyt duże by mogło zostać naprawione, komórka wchodzi na drogę apoptozy (Zou i Elledge 2000; Bartek i Lukas 2001). Zaobserwowano, że kaskada sygnałowa ATM (ang. *Ataxia Telangiectasia Mutated*) jest głównym regulatorem w odpowiedzi na podwójne pęknięcia nici DNA (DSBs) (Kastan i Lim 2000). Z kolei ATR (ang. *ATM-Related Family*) uczestniczy głównie w odpowiedzi na uszkodzenia UV, zablokowanie transkrypcji czy hipoksję (Costanzo i Gautier 2003). Ponadto, aktywacji szlaku sygnałowego kinazy ATR, indukowanej promieniowaniem UV, towarzyszy charakterystyczna dla UV ubikwitynizacja histonu H2AX (Bergink i wsp., 2006). Dokładny mechanizm aktywacji ATR nie został jeszcze poznany i nie wiadomo, czy ATR wymaga aktywności NER, czy może ATR bezpośrednio oddziałuje z uszkodzonym DNA (O'Driscoll i wsp., 2003; Choi i wsp., 2007).

Wyniki wykonanych w ramach niniejszego projektu doświadczeń dowodzą, iż rekrutacja HP1 nie wymaga aktywności czynników NER. Pojawia się zatem pytanie, czy akumulacja HP1 zależy od aktywności ATR. Odpowiedzi na powyższe pytania wydaje się

dostarczać eksperyment, w którym badano akumulację białka HP1 w komórkach Seckel (Wyniki 4.2.8), które posiadają poważnie zredukowaną ekspresję ATR (O'Driscoll i wsp., 2003). Wykazano bowiem, iż **białko HP1 gromadzi się w rejonie uszkodzonej chromatyny w komórkach Seckel. Sugeruje to zatem, iż rekrutacja HP1 nie zależy od aktywności kinazy ATR.**

Podsumowując, wykonane eksperymenty dowodzą, iż rekrutacja HP1 nie wymaga indukcji aktywowanej uszkodzeniem DNA kaskady sygnałowej, w której uczestniczy ATR, i jak wspomniano wcześniej – nie jest też elementem naprawy NER, ani BER. Nasuwa się zatem przypuszczenie, że HP1 to element nieznanej dotąd ścieżki sygnałowej.

5.8 Nagromadzone w rejonach uszkodzeń białko HP1 uczestniczy w komórkowej odpowiedzi DDR

Po wykonaniu pierwszych eksperymentów, w których zaobserwowano gromadzenie białka HP1, pojawiło się pytanie, jaka jest funkcja HP1 w miejscu uszkodzenia. Kolejne doświadczenia planowano w ten sposób, aby zbadać rolę białka w komórkowej odpowiedzi na uszkodzenie DNA (DDR). Zadanie to okazało się być jednak znacznie trudniejsze niż początkowo zakładano. Ogromna liczba wykonanych eksperymentów dostarczyła bardzo wielu informacji na temat zachowania HP1 w odpowiedzi na uszkodzenie. Dokładny mechanizm, w którym zaangażowane jest HP1, wciąż jednak pozostaje zagadką. W rozdziale tym przedstawione i omówione zostaną eksperymenty, które pozwoliły wykluczyć lub potwierdzić przypuszczalne funkcje białka HP1 w miejscu uszkodzenia.

Utrata białka HP1 powoduje zwiększenie wrażliwości na UV

Na pytanie o to, jak istotne jest HP1 w naprawie uszkodzonej chromatyny, można odpowiedzieć badając komórki pozbawione tego białka. Wykonano zatem eksperyment na nicieniach *C. elegans* (*Caenorhabditis elegans*), które utraciły HPL-1 oraz posiadają wrażliwy na temperaturę allel HPL-2 (Luijsterburg i wsp., 2009). Wykorzystanie tego mutantu *C. elegans* pozwoliło ominąć opisany w literaturze problem letalności nicieni,

wynikającej z utraty obydwu białek HP1 (Coustham i wsp., 2006; Schott i wsp., 2006). Wykonane eksperymenty sugerują, iż rola białka HP1 wydaje się być kluczowa w wydajnej naprawie DNA. Co więcej, zaobserwowano, że w przypadku podwójnych mutantów *hpl-2/hpl-1* promieniowanie UV-B powodowało natychmiastowe zahamowanie wzrostu. Co ciekawe, jeden z dwóch, HPL-1 lub HPL-2, wydawał się być wystarczający do prawidłowej odpowiedzi na uszkodzenie DNA. To z kolei sugeruje, iż **utrata obydwu białek HP1 powoduje wysoką wrażliwość na promieniowanie UV**. Przeprowadzone eksperymenty dowodzą ważnej roli białek HP1 w odpowiedzi na uszkodzenie DNA. Należy wspomnieć, że próby powtórzenia tych eksperymentów na komórkach ssaczych były niemożliwe, gdyż wyłączenie genu (ang. *knock-out*) HP1 w komórkach ssaczych jest letalne (Files i wsp., 2002; Schotta i wsp., 2004).

Zgromadzone przy uszkodzonej chromatynie białko HP1 prawdopodobnie zaangażowane jest w przebudowę chromatyny

W komórkach eukariotycznych, główną przeszkodą w naprawie NER jest upakowanie DNA w postać chromatyny, które działa hamująco na procesy zachodzące w DNA (Hara i wsp., 2000; Ura i wsp., 2001; Wang i wsp., 1991). Komórki posiadają jednak maszynę „remodelingu” chromatyny, dzięki której tworzone jest środowisko bardziej sprzyjające lokalnej naprawie DNA (Linger i Tyler 2007). Wiadomo, że naprawa NER w mono- i dwunukleosomowych fragmentach DNA jest znacząco wzmocniona przez zależne od ATP czynniki remodelingu chromatyny, m.in. SWI/SNF oraz ACF1 (zawierający ISWI) (Hara i Sancar 2002; Ura i wsp., 2001). Z danych literaturowych wiadomo również, iż procesy takie, jak: ubikwitynizacja histonów (Kapetanaki i wsp., 2006; Wang i wsp., 2006a), acetylacja w obrębie białek histonowych (Brand i wsp., 2001; Martinez i wsp., 2001; Rubbi i Milner 2003; Fousteri i wsp., 2006) czy małych białek kwasowych (GADD45, ING) powodują zwiększenie dostępności do nukleosomowego DNA (Carrier i wsp., 1999; Cheung i wsp., 2001). Z innych opracowań naukowych wiadomo, że procesy te powodują wyraźne zwiększenie tempa naprawy NER *in vivo* (Smith i wsp., 1996; Wang i wsp., 2006b; Kuo i wsp., 2007). Uważa się, że w celu zachowania informacji epigenetycznej, po usunięciu uszkodzenia, komórki muszą odtworzyć oryginalną strukturę chromatyny, a w procesie tym uczestniczą specyficzne czynniki (Groth i wsp., 2007). Zaproponowany w literaturze model dostęp – naprawa – odtworzenie zakłada, iż remodeling chromatyny zachodzi przed oraz

po naprawie DNA. Co więcej, model ten okazuje się być bardzo pomocny w zrozumieniu naprawy NER w kontekście chromatyny, gdyż zakłada się w nim, że w procesie remodelingu chromatyny uczestniczą regulatory epigenetyczne (Smerdon 1991; Green i Almouzni 2002).

W literaturze istnieją doniesienia wskazujące, że zależne od ATP czynniki remodelingu chromatyny, takie jak: SWI/SNF oraz ACF1, odgrywają ważną rolę w procesie naprawy DNA (Hara i Sancar 2002; Ura i wsp., 2001). Co więcej, eksperymenty innych ośrodków badawczych wykazały, iż ACF1 oddziałuje bezpośrednio z domeną chromoshadow białka HP1 (Eskeland i wsp., 2007). Powstaje zatem pytanie, czy w miejscu uszkodzenia następuje akumulacja ACF1. Na powyższe pytania odpowiada eksperyment, który pokazał, że w miejscu indukowanych przez UV uszkodzeń DNA zachodzi rekrutacja kompleksu remodelingu chromatyny ACF1 (Luijsterburg i wsp., 2009). To z kolei sugeruje, że **gromadzenie HP1 może być powiązane z rekrutacją ACF1**. Sugestię tę wydaje się potwierdzać fakt, że podobnie jak w przypadku HP1, rekrutację ACF1 obserwowano również w komórkach XP-A, którym brakuje funkcjonalnej naprawy NER. Nasuwa się również przypuszczenie, że **HP1 wraz z ACF1 zaangażowane mogą być w naprawę uszkodzenia, w innym mechanizmie niż typowa droga naprawy NER**.

Innym białkiem wchodzącym w skład kompleksu remodelingu chromatyny jest białko BRG1 (ang. *Brahma-Related Gene 1*), które należy do rodziny SWI/SNF kompleksów remodelingu chromatyny (Singh i wsp., 2007; Napolitano i wsp., 2007). Wykazano, iż BRG1 bezpośrednio oddziałuje z domeną CSD białka HP1 (Nielsen i wsp., 2002). Powstaje zatem pytanie, czy w obszarach uszkodzeń następuje akumulacja BRG1. Wykonane eksperymenty dowodzą, że w miejscu indukowanych przez UV uszkodzeń DNA rekrutowany jest kompleks remodelingu chromatyny BRG1 (Wyniki 4.2.14). To z kolei sugeruje, że **rekrutacja białka HP1 może być powiązana z rekrutacją BRG1**. Co więcej, obserwowana rekrutacja BRG1 w komórkach z upośledzoną naprawą NER (XP-A) pozwala przypuszczać, iż **HP1, ACF1 oraz BRG1 mogą uczestniczyć w odpowiedzi na uszkodzenie DNA w odmiennym mechanizmie niż typowa naprawa NER**.

Ciekawych obserwacji dostarcza eksperyment, w którym wprowadzano liniowe tory DSBs w jądrach komórkowych. W uszkodzonych w ten sposób komórkach zauważyć można wyraźną kolokalizację białka HP1 z obszarami chromatyny wyznakowanymi przez γ -H2AX (Wyniki 4.3.1). Z danych literaturowych wiadomo, że takie rozmieszczenie HP1 jest

odmienne od rozkładu białek uczestniczących w naprawie DSBs (Rad51, DNA-PK), gdyż białka te zlokalizowane są w małych obszarach wewnątrz dużych domen chromatynowych, które zawierają γ -H2AX (Aten i wsp., 2004; Bekker-Jensen i wsp., 2006). To z kolei wydaje się wskazywać, że **białko HP1 asocjuje z dużo większymi domenami chromatynowymi niż sam fragment zawierający uszkodzone DNA.**

Zrekrutowane białko HP1 najprawdopodobniej nie uczestniczy w procesie metylacji DNA

Dokładny mechanizm procesu odtworzenia informacji epigenetycznej w miejscu uszkodzenia DNA nie został jeszcze poznany. Wiadomo jednak, że DNA komórek ssaczych jest metylowane w pozycji 5 reszty cytozyny w dwunukleotydach CpG, a w procesie tym uczestniczy metylotransferaza Dnmt1 oraz Dnmt3a i Dnmt3b. Z doniesień naukowych wiadomo również, iż metylotransferaza Dnmt1 uczestniczy w zachowywaniu wzorów metylacji w nowo zszyntetyzowanej nici DNA (Leonhardt i wsp., 1992; Chuang i wsp., 1997) oraz posiada preferencje w stosunku do częściowo zmetylowanych dwunukleotydów CpG, które powstają w trakcie replikacji DNA (Bestor 2000). Dane literaturowe podają, że metylacja DNA odgrywa bardzo ważną rolę w wielu procesach jądrowych, m.in. w regulacji ekspresji genów oraz struktury chromatynowej, a także w prawidłowym rozwoju i różnicowaniu komórek (Li i wsp., 1992; Bird 2002). Przypuszczać zatem można, iż zachowanie informacji epigenetycznej w czasie naprawy DNA będzie kluczowe dla przeżycia komórki. Odtworzenie informacji epigenetycznej w miejscu uszkodzenia odbywa się przy udziale metylotransferazy Dnmt1, w rekrutacji której uczestniczy PCNA (Mortusewicz i wsp., 2005). Pojawia się zatem pytanie, czy w miejscu uszkodzenia zachodzić będzie gromadzenie metylotransferazy Dnmt1. Wykonane eksperymenty (*Wyniki 4.1.12 i Wyniki 4.2.9*) pokazują, iż zarówno w przypadku oksydacyjnych uszkodzeń DNA, jak i uszkodzeń UV, **metylotransferaza Dnmt1 gromadzi się w obszarach lokalnych uszkodzeń DNA.** Co więcej, zauważono również, że w rejonach uszkodzeń **wraz z Dnmt1 rekrutowane jest również PCNA.** To z kolei sugeruje, że **przywoływanie Dnmt1 do miejsca uszkodzenia może odbywać się przy udziale PCNA.**

Metylacja cytozyny jest niezwykle istotna w rozwoju komórek ssaczych, gdyż powiązana jest ona z procesem wyciszania genów (Bird 2002). Co ciekawe, metylacja DNA

uczestniczy w procesie hamowania transkrypcji genów, częściowo poprzez rekrutację białek zawierających domenę wiążącą się z CpG (ang. *methyl-CpG binding domain proteins*), które wybiórczo rozpoznają zmetylowane dwunukleotydy CpG. Przedstawicielem rodziny tych białek jest MeCP2 (ang. *methyl-CpG binding protein 2*), które zbudowane jest z pojedynczego polipeptydu i zawiera domenę wiążącą się z CpG (Lewis i wsp., 1992; Nan i wsp., 1997) oraz drugą domenę, która uczestniczy w hamowaniu transkrypcji (Ho i wsp., 2008). Na podstawie doświadczeń innych ośrodków badawczych stało się oczywiste, że MeCP2 uczestniczy także w hamowaniu transkrypcji genów, poprzez rekrutację deacetylaz histonowych (HDAC) (Nan i wsp., 1998; Jones i wsp., 1998) oraz metylację histonów (Fuks i wsp., 2003).

Opisane w niniejszej rozprawie eksperymenty wykazały, iż w miejscu uszkodzenia następuje rekrutacja metylotransferazy Dnmt1, a to sugeruje, że zachodzić będzie metylacja DNA. Zatem, jeśli w miejscu uszkodzenia pojawiają się zmetylowane dwunukleotydy CpG, przypuszczać można, że w obszarach lokalnych uszkodzeń DNA zachodzić również będzie rekrutacja MeCP2. W wykonanych eksperymentach (*Wyniki 4.2.11*) **nie zaobserwowano jednak gromadzenia MeCP2 w obszarach lokalnych uszkodzeń UV**. Brak rekrutacji MeCP2 tłumaczyć można tym, że stężenie zmetylowanego DNA, lub ilość rekrutowanego w miejscu uszkodzenia MeCP2, jest zbyt mała, poniżej progu detekcji. Nie jest również wykluczone, że w miejscu uszkodzenia zachodzi rekrutacja innych białek zawierających domenę MBD (ang. *methyl-CpG binding domain family of proteins*), a nieobecność MeCP2 wynika z konkurencji o miejsce wiązania i z różnic w stopniu powinowactwa tych białek do dwunukleotydów CpG (Fraga i wsp., 2003).

Dane literaturowe podają, że jednym z partnerów interakcji dla domeny CSD białka HP1 jest metylotransferaza Dnmt1 (Fuks i wsp., 2003; Brenner i Fuks 2007). Wykonane w ramach niniejszego projektu eksperymenty wykazały, że, podobnie jak to miało miejsce w przypadku HP1, ACF1 oraz BRG1, rekrutacja Dnmt1 obserwowana była również w komórkach XP-A. Zatem, jeśli metylotransferaza Dnmt1 bezpośrednio oddziałuje z HP1, przypuszczać można, że w przywoływaniu białka HP1 do miejsc uszkodzenia uczestniczyć będzie Dnmt1. Powyższego przypuszczenia nie potwierdza jednak eksperyment (*Wyniki 4.2.10*), który pokazuje, iż HP1 wciąż ulega gromadzeniu w komórkach z wyłączonym genem (ang. *knock-out*) Dnmt1. Ta obserwacja dowodzi, że **rekrutacja HP1 nie jest powiązana z aktywnością Dnmt1**. Nasuwa się zatem przypuszczenie, że to właśnie białko HP1 służyć może jako platforma ładująca dla licznych regulatorów epigenetycznych (Brenner i Fuks

2007), które zaangażowane są w mechanizmy komórkowej odpowiedzi na uszkodzenie DNA. Wykazano bowiem, iż białko HP1 odgrywa kluczową rolę w procesie metylacji DNA u *Neurospora* (Freitag i wsp., 2004). Co więcej, w modelu tym **HP1 mogłoby uczestniczyć w rekrutacji takich białek, jak: Dnmt1, ACF1 czy BRG1.**

Nagromadzone białko HP1 prawdopodobnie uczestniczy w regulacji transkrypcji

Powszechnie wiadomo, że w mechanizmie komórkowej odpowiedzi na uszkodzenie DNA (DDR) dochodzi do zahamowania transkrypcji. Na podstawie doświadczeń wielu ośrodków badawczych było jasne, że hamowanie transkrypcji w odpowiedzi na uszkodzenie UV jest niezależne od jakichkolwiek znanych białek NER, wchodzących w skład kompleksu „pre-incision” (Kantor i Hull 1979; Moné i wsp., 2001; Kruhlak i wsp., 2007; Solovjeva i wsp., 2007). Z danych literaturowych wiadomo również, że przywoływanie białka HP1 α oraz HP1 β prowadzi do kondensacji chromatyny, czemu towarzyszy drastyczne zmniejszenie ekspresji genów (van der Vlag i wsp., 2000; Ayyanathan i wsp., 2003; Verschure i wsp., 2005). Opisane niedawno w literaturze zjawisko bezpośredniego oddziaływania białka HP1 z polimerazą II RNA (RNAPII) w komórkach ludzkich (Mateescu i wsp., 2008), wydaje się być bardzo interesujące. Autorzy publikacji podają bowiem, że białko HP1 β oddziałuje z nieaktywną polimerazą II, co prowadzi do hamowania ekspresji genów. Co więcej, związanie HP1 β do chromatyny powoduje zahamowanie składania aktywatorów transkrypcji, takich jak: mediator oraz TFIIB. Opisane powyżej dane literaturowe potwierdzają hamowanie transkrypcji przy udziale HP1 β (Smallwood i wsp., 2008). Z innych doniesień naukowych wiadomo, że aktywacji genów towarzyszy dysocjacja HP1 β i wiązanie HP1 γ do aktywnej polimerazy RNA II. Zaproponowany mechanizm regulacji transkrypcji genów, w którym uczestniczy białko HP1 (Mateescu i wsp., 2008), wydaje się być zatem bardzo ciekawy.

Przypuszczać można, iż rekrutowane w miejscu uszkodzenia HP1 może uczestniczyć w procesie regulacji transkrypcji genów, który następuje po naświetlaniu UV. Przypuszczenia te potwierdzają dane literaturowe, które podają, że indukowane przez UV uszkodzenia DNA prowadzą do zahamowania transkrypcji, która zachodzi niezależnie od funkcjonalnej naprawy NER (Moné i wsp., 2001). Na podstawie doświadczeń innych ośrodków badawczych wiadomo, że czynnik składania chromatyny (CAF-1), który oddziałuje z białkiem HP1,

również gromadzi się w obszarach uszkodzeń UV, ale w sposób zależny od naprawy NER (Green i Almouzni 2003). Doniesienia te są bardzo interesujące, gdyż obydwie białka: CAF-1 i HP1 oddziałują ze sobą w czasie replikacji (Quivy i wsp., 2004). Z uwagi na to, że wiązanie CAF-1 zależy od funkcjonalnej naprawy NER, w przeciwieństwie do wiązania HP1, pojawiają się zatem wątpliwości, czy obydwie te białka również oddziałują ze sobą w trakcie naprawy DNA. Nasuwa się tutaj myśl, że proces odpowiedzi HP1 na uszkodzenie DNA odbywa się na innej drodze niż mechanizm naprawczy, w którym uczestniczy CAF-1.

Wykonane dla potrzeb niniejszego projektu eksperymenty wykazały, że białka HP1 rekrutowane są do wywołanych przez UV obszarów lokalnych uszkodzeń chromatyny, bez udziału któregośkolwiek ze znanych czynników NER, które uczestniczą w rozpoznaniu uszkodzenia. To z kolei sugerować może, że nieznane dotychczas białko rozpoznaje uszkodzenie i zapoczątkowuje mechanizm odpowiedzi na uszkodzenie DNA, w którym uczestniczy HP1. Wydaje się też bardzo prawdopodobne, że HP1 α oraz HP1 β mogą aktywnie hamować transkrypcję w miejscu uszkodzenia UV, z kolei HP1 γ uczestniczyć może w ponownym rozpoczęciu (ang. *re-initiation*) procesu transkrypcji, po naprawie uszkodzenia. Ponadto, doniesienia literaturowe podają, iż promieniowanie UV powoduje proteolityczne uszkodzenie polimerazy RNA II, co prowadzi do zahamowania transkrypcji (Ratner i wsp., 1998). Co więcej, po naświetlaniu UV następuje utrata związanego z chromatyną białka Chk1, czemu towarzyszy defosforylacja H3T11 i deacetylacja histonów, co następnie prowadzi to do zahamowania transkrypcji (Smits i wsp., 2006; Shimada i wsp., 2008). Wydaje się więc prawdopodobne, że komórka uruchamia kilka niezależnych mechanizmów, aby zahamować transkrypcję w uszkodzonej przez UV chromatynie, zaś rekrutacja HP1 może być elementem jednego z nich.

Nagromadzone białko HP1 i Suv4-20 mogą uczestniczyć w mechanizmie wyciszania genów

Modyfikacje potranslacyjne w obrębie białek histonowych (PTMs) odgrywają kluczową rolę w regulacji procesów jądrowych, takich jak: transkrypcja genów, składanie chromatyny, replikacja, rekombinacja oraz naprawa DNA (Berger 2007; Downs i wsp., 2007; Groth i wsp., 2007). „Ogony histonowe” podlegać mogą acetylacji, metylacji, fosforylacji, ubikwitynizacji, a także ADP-rybozylacji (van Holde 1989). Modyfikacje w obrębie białek

histonowych działać mogą jako represory lub aktywatory transkrypcji (Fischle i wsp., 2003; Lachner i wsp., 2003; Vaquero i wsp., 2003).

Jedynym metylowanym aminokwasem w „ogonie” histonu H4 jest lizyna 20 (H4K20), która może podlegać pojedynczej, podwójnej lub potrójnej metylacji (me1, me2, me3). Doniesienia podają, że Me1K20H4 występuje w dużych ilościach w nieaktywnym chromosomie X i jest równomiernie rozmieszczona w euchromatynie oraz heterochromatynie, a także asocjuje z transkrypcyjnie aktywnymi genami (Talaszkiewicz i wsp., 2005; Barski i wsp., 2007). Z kolei Me2K20H4 preferencyjnie lokalizuje z obszarami nieaktywnej euchromatyny, zaś Me3K20H4 dominuje w heterochromatynie konstytutywnej (Kohlmaier i wsp., 2004; Sims i wsp., 2006). Z innych doniesień wiadomo, że metylotransferaza histonowa PR-Set7 powoduje pojedynczą metylację w obrębie K20, a powstałe Me1K20H4 służy jako substrat dla metylotransferazy Suv4-20, która generuje Me2K20H4 oraz Me3K20H4 (Schotta i wsp., 2004). Przed kilkoma laty odkryto, że metylotransferaza SUV4-20 bezpośrednio oddziałuje ze wszystkimi trzema izoformami białka HP1, a w rekrutacji SUV4-20 do obszarów heterochromatyny pericentrycznej uczestniczy HP1 α oraz HP1 β (Schotta i wsp., 2004). Co więcej, badacze podają, iż podwójna metylacja Me2K9H3, która zachodzi przy udziale metylotransferazy SUV39, konieczna jest do indukcji Me3K20H4 (Schotta i wsp., 2004). Co ciekawe, metylacja w obrębie K20H4 wydaje się uczestniczyć w odpowiedzi na uszkodzenie DNA, gdyż zmniejszenie komórkowego poziomu SUV4-20h1/h2 (siRNA) prowadzi do zmniejszenia skupisk nagromadzonego 53BP1 w komórkach naświetlanych promieniowaniem jonizującym (Yang i wsp., 2008). Wydaje się zatem prawdopodobne, że metylotransferaza SUV4-20 uczestniczyć może w komórkowej odpowiedzi na uszkodzenie DNA. Potwierdzenia dla tego przypuszczenia dostarcza eksperyment (Wyniki 4.2.12), który wykazał wyraźną **rekrutację metylotransferazy SUV4-20h1 do obszarów lokalnych uszkodzeń UV**. To z kolei sugeruje, że nagromadzona metylotransferaza uczestniczyć może w zahamowaniu transkrypcji, która towarzyszy uszkodzeniu. Nie można również wykluczyć, że **nagromadzone w miejscu uszkodzenia SUV4-20 i HP1 uczestniczą w procesie modyfikacji struktury chromatyny, który towarzyszy uszkodzeniu i naprawie DNA**.

5.9 Podsumowanie

Niedawno pojawiła się praca badawcza, w której autorzy (Ayoub i wsp., 2008) sugerują, iż w odpowiedzi na powstałe uszkodzenia DSBs następuje oddysocjowanie białka HP1 β z obszarów uszkodzenia, na skutek fosforylacji domeny CD. Hipoteza dysocjacji HP1 jest zupełnie odmienna od obserwacji poczynionych w ramach niniejszego projektu i uzyskanymi wynikami, które wyraźnie wskazują na gromadzenie HP1 w obszarach lokalnych uszkodzeń DNA. Do wprowadzenia uszkodzenia, autorzy publikacji (Ayoub i wsp., 2008) użyli mikro-naświetlania światłem laserowym (405 nm oraz 365 nm), po wcześniejszym uwrażliwieniu komórek barwnikiem interkalującym z DNA (Hoechst), a także globalnej ekspozycji na promieniowanie jonizujące (3 Gy) oraz inhibitora enzymu topoizomerazy II - etopozytu (lek o działaniu cytostatycznym, który powoduje jedno- oraz dwuniciowe pęknięcia DNA). Podkreślić jednak należy, że uzyskane przez nich wyniki nie zostały potwierdzone z użyciem innej, niewymagającej uwrażliwienia komórek metody, co jest istotne w tego typu eksperymentach (Lukas i Bartek 2008).

Nowe światło na ten problem rzuca eksperyment, w którym komórki inkubowano z barwnikiem Hoechst (interkalator DNA), a następnie wykonano mikro-naświetlanie przy użyciu lasera (405 nm), w celu wprowadzenia lokalnych uszkodzeń DSBs (Luijsterburg i wsp., 2009). Doświadczenia te wykazały, że w miejscach powstałych DSBs następuje lokalne gromadzenie białek HP1, bez względu na to, czy obszary lokalnego uszkodzenia obecne były w euchromatynie, czy też w heterochromatynie. Przypomnieć należy, że gromadzenie HP1 w rejonach DSBs obserwowano również w omówionych wcześniej eksperymentach, w których komórki naświetlano cząstkami α . Co więcej, wykonane w ramach niniejszego projektu i również omówione wcześniej eksperymenty pokazały, że wiązanie białka HP1 β , zarówno do jądrowych obszarów naświetlanych promieniowaniem UV, jak i oksydacyjnych uszkodzeń DNA, nie wydają się zależeć od chromodomeny ani tym samym od fosforylacji CD. Wykazano bowiem, iż zmutowane białko HP1 (HP1 β -T51A), które nie zawierało miejsca fosforylacji tyrozyny T51, wciąż było rekrutowane obszarów uszkodzeń DNA wywołanych przez UV (Luijsterburg i wsp., 2009).

Dalszych wyjaśnień na pozornie wykluczające się obserwacje zachowania białka HP1 w odpowiedzi na uszkodzenia DSBs dostarcza najnowsza praca badawcza (Zarebski i wsp.,

2009), w której autorzy sugerują, iż odpowiedź białka HP1 zachodzi w dwóch procesach. W pierwszym procesie następuje bardzo szybka dysocjacja HP1 z uszkodzonego obszaru chromatyny, z kolei w drugim - powolne gromadzenie białka HP1 w miejscu uszkodzenia. Bimodalny model dysocjacji i rekrutacji HP1, który zakłada, iż występują dwie fazy odpowiedzi białka HP1 na uszkodzenie, zaproponowany został również w innej pracy badawczej (Ayoub i wsp., 2009). Autorzy tej publikacji wykazali, iż w fazie pierwszej następuje bardzo szybkie oddysocjowanie HP1 z obszarów uszkodzenia, obecnych zarówno w eu-, jak i heterochromatynie, a w procesie tym uczestniczy kinaza CK2, która fosforyluje HP1 (T51). Fosforylacja HP1 β -T51P powoduje uwolnienie chromodomeny białka z DNA. Naukowcy (Ayoub i wsp., 2009) podkreślają, iż dysocjacja HP1 może być bardziej widoczna w uszkodzonych rejonach heterochromatyny, z uwagi na większe stężenie HP1 w heterochromatynie. Z kolei w fazie II następuje powolna rekrutacja HP1 do miejsc uszkodzeń, a w procesie tym, niezależnym od fosforylacji T51, kluczową rolę odgrywa domena chromoshadow. Ponadto, autorzy (Ayoub i wsp., 2009) wyjaśniają, iż obserwowana kolokalizacja HP1 β -T51P z obszarami DSBs wynika z gromadzenia, w mechanizmie zależnym od domeny CSD, cząsteczek białka zawierających T51P. Dodatkowych dowodów potwierdzających niezależność akumulacji HP1 od fosforylacji T51 dostarczają dalsze eksperymenty, które wykazały, iż inhibitor kinazy CK-2 (TBB) powoduje zahamowanie fosforylacji T51, jednakże nie wpływa on hamująco na proces akumulacji HP1 w rejonie uszkodzonym (Ayoub i wsp., 2009).

Opisane w niniejszej rozprawie doświadczenia nie potwierdzają hipotezy, w której HP1 oddysocjowuje z obszarów uszkodzeń DNA, ale dowodzą, że niezależnie od rodzaju uszkodzenia (UV, DSBs, uszkodzenia oksydacyjne) w miejscach tych następuje rekrutacja białek HP1. Co więcej, proces gromadzenia wydaje się mieć charakter enzymatyczny i nie zależeć od aktywności białek naprawczych NER, ani też naprawy DSBs. Wykazano również, że w gromadzeniu HP1 kluczową rolę odgrywa domena CSD. Zagadką pozostaje jednak to, jak przywoływane jest białko oraz w jaki sposób nagromadzone HP1 oddziałuje z chromatyną. Obserwacje mikroskopowe pokazały bowiem, że metylotransferaza SUV3-9 nie ulega rekrutacji w obszarach uszkodzeń, ani też nie wydaje się być zaangażowana w proces rekrutacji, gdyż gromadzenie HP1 obserwowano w komórkach z wyłączonym genem (ang. *knock-out*) metylotransferazy SUV39. To z kolei świadczy o tym, że w procesie wiązania białka HP1 w obszarze uszkodzonym nie uczestniczy domena CD, co potwierdziły kolejne eksperymenty, które wykazały, że rekrutacji HP1 nie towarzyszy zwiększenie stopnia

metylacji Me3K9H3 w uszkodzonym obszarze chromatyny. Inne doświadczenia pokazały, że wiązanie HP1 nie zależy od obecności metylotransferazy 1 (Dnmt1), która jest jednym z partnerów interakcji dla domeny CSD białka HP1. Ciekawych obserwacji dostarczył również inny eksperyment, który wykazał rekrutację metylotransferazy H4K20 (SUV4-20) w obszarze uszkodzonym. To z kolei sugeruje, że metylotransferaza SUV4-20 może uczestniczyć wraz z białkiem HP1 w modyfikacji struktury chromatyny, która towarzyszy uszkodzeniu DNA. Ponadto, wykryta w miejscu uszkodzenia rekrutacja kompleksów „remodelingu” chromatyny, ACF1 i BRG1, dowodzi toczącego się w tym miejscu procesu przebudowy struktur wysokorzędowych chromatyny. Przypuszczać zatem można, iż nagromadzone w miejscu uszkodzenia HP1 uczestniczyć może w procesach reorganizacji struktury chromatyny, które towarzyszą naprawie DNA.

Wykonane w ramach niniejszego projektu eksperymenty wskazują na niespodziewany, interesujący i wydający się być powszechnym, związek pomiędzy procesem naprawy DNA a rearanżacją struktury chromatyny. Ostatnie doniesienia literaturowe wskazują na bezpośredni udział białek HP1 w regulacji transkrypcji i podają, że białko HP1 β asocjując z nieaktywną polimerazą RNA II powoduje zahamowanie ekspresji genów, z drugiej jednak strony HP1 γ wiąże się do aktywnej, pracującej polimerazy RNA II (Mateescu i wsp., 2008; Smallwood i wsp., 2008). Wydaje się zatem prawdopodobne, że białka HP1 uczestniczą w jednym, albo w dwóch procesach: 1) odtworzeniu struktury chromatyny po zakończeniu naprawy DNA oraz/lub 2) zahamowaniu transkrypcji w uszkodzonych rejonach chromatyny, gdyż, jak podaje literatura, uszkodzenie DNA prowadzi do zahamowania transkrypcji w sposób niezależny od toczącego się procesu naprawczego (Moné i wsp., 2001; Solovjeva i wsp., 2007). Ponadto, opisany w tej pracy eksperyment, w którym obserwowano akumulację HP1 w komórkach ze zredukowaną ekspresją ATR pozwala przypuszczać, że w mechanizmie gromadzenia HP1 zaangażowany jest nieznan dotąd szlak detekcji, który wydaje się przebiegać odmiennie do poznanych szlaków detekcji uszkodzenia.

5.10 Propozycje dalszych doświadczeń

Zaprezentowane i omówione w niniejszej rozprawie eksperymenty opisują interesujące zjawisko, jakim jest udział białek HP1 w procesach naprawy DNA i DDR oraz

stanowią one swego rodzaju zachętę do kontynuacji badań w tym temacie. Pomimo, iż udało się zbadać kinetykę procesu gromadzenia HP1, zagadką wciąż pozostaje jednak wiele aspektów tego zjawiska. Nie wiadomo np. jakie funkcje spełnia nagromadzone w miejscu uszkodzenia białko HP1. Nie poznano również dokładnego, molekularnego mechanizmu rekrutacji HP1. Poniżej przedstawione zatem zostaną propozycje kilku doświadczeń, które w znaczący sposób mogą przyczynić się do rozwiązania zagadki gromadzenia białek HP1 w kontekście uszkodzenia DNA.

W pierwszej kolejności należałoby sprawdzić, czy istnieją jakieś różnice w kinetyce rekrutacji poszczególnych odmian białka HP1. Wykazano, że wszystkie trzy izoformy białka: HP1 α , HP1 β i HP1 γ ulegają akumulacji w uszkodzonych obszarach chromatyny. Zakładając, że rekrutacja HP1 powiązana jest z regulacją transkrypcji, zgodnie z modelem wiązania HP1 z polimerazą RNA II (Mateescu i wsp., 2008; Smallwood i wsp., 2008), sugeruje to zatem, że mogą istnieć różnice w tempie rekrutacji poszczególnych izoform białka. Przypuszczać zatem można, że białka HP1 α oraz HP1 β , jako inhibitory transkrypcji pojawiłyby się w miejscu uszkodzenia najpierw, z kolei HP1 γ , jako aktywator transkrypcji pojawiałby się znacznie później.

Ponadto, zastosowanie techniki ChIP (ang. *chromatin immunoprecipitation*) pokazałoby, w jakich kompleksach białkowych obecne jest HP1 w komórkach uszkodzonych. Tego rodzaju doświadczenia pozwoliłyby odpowiedzieć na pytania, czy białko HP1 występuje w kompleksie z białkami naprawczymi, czynnikami remodelingu chromatyny czy może regulatorami ekspresji genów. Co istotne, pozwoliłoby to nie tylko odnaleźć białko odpowiedzialne za rekrutację HP1 do obszarów uszkodzenia, lecz także odkryć nieopisywaną wcześniej funkcję HP1 w naprawie DNA. Co więcej, powiązanie techniki ChIP z metodą spektrometrii masowej i wykorzystanie ich w analizie białek obecnych w kompleksie z HP1, pozwoliłoby uzyskać znacznie więcej informacji na temat oddziaływań HP1 i mechanizmu odpowiedzi na uszkodzenie, w którym zaangażowane są białka HP1.

Opisane w niniejszej pracy eksperymenty wykazały, że akumulacja HP1 zachodzi w mutantach NER, w nieobecności funkcjonalnej naprawy NER. Pojawia się zatem pytanie, czy gromadzenie białka zachodziłoby również w mutantach BER. Tego rodzaju doświadczenia wykazałyby, czy mechanizm gromadzenia HP1 jest podobny w różnych procesach naprawczych. Co więcej, można byłoby sprawdzić, czy rekrutacja HP1 nie wynika

z aktywności funkcjonalnych szlaków naprawczych, a jedynie z obecności uszkodzonego DNA. W literaturze naukowej opisano mutanty BER (Shen i wsp., 1998; Matsuzaki i wsp., 2002), a zatem wykonanie tego rodzaju doświadczeń, po uzyskaniu tych mutantów, wydaje się być stosunkowo proste.

Doniesienia literaturowe podają, że wyłączenie genu (ang. *knock-out*) HP1 w komórkach ssaczych jest letalne (Filesi i wsp., 2002). Niemożliwe jest zatem uzyskanie osobników, które nie zawierałyby białka HP1. Rozwiązanie w tym przypadku przynosi obecnie powszechnie stosowana technika „*knock-down*”, która polega na obniżeniu ekspresji genów przy pomocy specjalnie w tym celu zaprojektowanych fragmentów oligonukleotydowego RNA. A zatem, obniżenie ekspresji białka wszystkich trzech izoform HP1 (α , β , oraz γ) pozwoliłoby rozwiązać wątpliwości i sprawdzić, czy HP1 w komórkach ludzkich jest niezbędne w naprawie uszkodzeń DNA, a także, czy zmniejszony poziom białka HP1 nie spowoduje zwiększonej wrażliwości na promieniowanie UV oraz jonizujące (IR).

Omówione powyżej propozycje dalszych doświadczeń stanowią tylko część eksperymentów, jakie można, a nawet więcej, jakie należałoby przeprowadzić. Nie ulega wątpliwości, że w trakcie prowadzenia dalszych badań nad HP1, jakie z pewnością kontynuowane będą w Pracowni Biofizyki Komórki WBBiB UJ, pojawią się nowe pomysły na dalsze eksperymenty. W konsekwencji, pozwoli to w pełni odkryć nie tylko funkcję białka HP1, lecz także mechanizm procesu chromatynowej odpowiedzi na uszkodzenie, w którym zaangażowane jest heterochromatynowe białko HP1.

Rozdział 6**Wnioski**

Opisane w niniejszej rozprawie doktorskiej doświadczenia wykazały, iż:

- 1) Indukowane wzbudzonym jonem etidiowym, oksydacyjne uszkodzenie chromatyny jądrowej powoduje gromadzenie białek heterochromatynowych 1 (HP1) w miejscu uszkodzenia. Wszystkie trzy izoformy białka: HP1 α , HP1 β oraz HP1 γ ulegają akumulacji.
- 2) W miejscu uszkodzenia oksydacyjnego nie zaobserwowano zwiększonego lokalnego stężenia białek histonowych (histonu H1, H2B, H3), budujących chromatynę. Obserwacje te świadczą zatem o tym, iż zjawisko rekrutacji HP1 nie jest artefaktem, wynikającym z agregacji chromatyny lub adsorpcji HP1 na chromatynie w miejscu uszkodzenia.
- 3) Zwiększenie lokalnego stężenia białka HP1 w obszarze uszkodzonym następuje już po kilku minutach od uszkodzenia, a maksymalne lokalne stężenie osiągnięte jest po około 30 min. Rekrutacja HP1 zachodzi w miejscach uszkodzenia, które zlokalizowane są zarówno w euchromatynie, jak i heterochromatynie.
- 4) Nagromadzone w miejscu uszkodzenia oksydacyjnego białko heterochromatynowe ulega wymianie z jądrową pulą HP1. Lokalne stężenie HP1 w miejscu uszkodzenia pozostaje wyższe niż przed uszkodzeniem. Wskazuje to zatem, iż w obszarze uszkodzonym powstały nowe miejsca wiązania dla cząsteczek białka HP1.
- 5) Pomiary zależności tempa gromadzenia białka HP1 od temperatury wykazały, iż proces gromadzenia HP1 zależy od temperatury, w sposób charakterystyczny dla reakcji enzymatycznych.

- 6) Akumulacja białka HP1 do rejonów uszkodzonej chromatyny nie zależy od rodzaju uszkodzenia i wydaje się być odpowiedzią komórki na różne uszkodzenia DNA. Prowadzone obserwacje wykazały, iż rekrutacja HP1 zachodzi zarówno w obszarach lokalnych uszkodzeń oksydacyjnych (naprawianych w procesie BER), jak i uszkodzeń wywołanych przez UV, które naprawiane są w mechanizmie NER, a także w rejonach podwójnych pęknięć nici DNA (DSBs).
- 7) Kluczową rolę w procesie gromadzenia HP1 odgrywa znajdująca się na C-końcu domena chromoshadow. Wykazano, iż steryczna blokada C-końca redukuje zdolność gromadzenia HP1.
- 8) Rekrutacja białka HP1 zachodzi w komórkach z deficytem metylotransferazy SUV39, odpowiedzialnej za wprowadzanie metylacji Me3K9H3, która jest miejscem wiązania dla chromodomeny HP1. Metylotransferaza SUV39 nie wydaje się uczestniczyć w tym procesie, co potwierdza brak akumulacji SUV39 w obszarach uszkodzeń wywołanych przez UV. Co więcej, potrójna metylacja w obrębie lizyny 9 histonu H3 (Me3K9H3) nie jest sygnałem dla rekrutacji HP1. Świadczy to zatem o tym, iż wiązanie białka w uszkodzonej chromatynie zachodzi na innej zasadzie niż typowe wiązanie HP1 w heterochromatynie.
- 9) Akumulacja HP1 do obszarów uszkodzeń wywołanych przez UV nie zależy od aktywności białek GG-NER ani TC-NER, a jedynie od obecności uszkodzenia. Jednakże czas pozostania HP1 w miejscu uszkodzenia zależy od tego, czy uszkodzenie zostało naprawione, czy też nie.
- 10) Zjawisko gromadzenia białka HP1 obserwowane było we wszystkich fazach cyklu komórkowego, a także w komórkach nieproliferujących. Rekrutacja HP1 nie wynika zatem z zatrzymania replikacji.
- 11) W miejscu uszkodzenia następuje rekrutacja partnerów domeny CSD białka HP1, takich jak: ACF1 oraz BRG1, które wchodzi w skład zależnych od ATP, wielopodjednostkowych kompleksów remodelingu chromatyny. Gromadzenie HP1 może być powiązane z rekrutacją ACF1 i/lub BRG1 i wraz z nimi uczestniczyć

może w przebudowie struktury chromatyny, która towarzyszy procesom naprawy DNA.

- 12) Białko HP1 wydaje się być zaangażowane w mechanizm odtworzenia informacji epigenetycznej, który towarzyszy uszkodzeniu. Obserwowana akumulacja metylotransferazy Dnmt1 w miejscu uszkodzenia wskazuje, iż HP1 może służyć jako platforma ładująca dla licznych regulatorów epigenetycznych, m.in. dla metylotransferazy Dnmt1. Rekrutacja HP1 nie jest jednak powiązana z aktywnością Dnmt1, o czym świadczy gromadzenie HP1 w komórkach z deficytem Dnmt1.
- 13) W miejscu uszkodzenia następuje akumulacja metylotransferazy SUV4-20. Sugeruje to zatem, iż nagromadzone w obszarze uszkodzonym białko HP1 uczestniczyć może w regulacji transkrypcji. Akumulacja HP1 i metylotransferazy SUV4-20, powiązana może być z procesem hamowania transkrypcji, który towarzyszy uszkodzeniu DNA.
- 14) Gromadzenie HP1 zachodzi w komórkach Seckel, które posiadają wyraźnie zmniejszoną ekspresję ATR. Dowodzi to zatem, iż rekrutacja HP1 w miejscach uszkodzeń UV nie wymaga aktywacji indukowanej uszkodzeniem kaskady sygnałowej ATR.
- 15) Rola białka HP1 w komórkowej odpowiedzi na uszkodzenie (DDR) i wydajnej naprawie DNA wydaje się być kluczowa, o czym świadczy zwiększona wrażliwość *Caenorhabditis elegans* na promieniowanie UV w nieobecności HP1.

Rozdział 7**Spis tabel rycin i rysunków****7.1 Spis tabel****1. Wstęp**

Tabela 1.1.	Białka oddziałujące z HP1.....	33
--------------------	--------------------------------	----

3. Materiały i metody

Tabela 3.1.	Spis odczynników używanych do pracy z komórkami eukariotycznymi.....	62-63
Tabela 3.2.	Wykaz odczynników używanych w hodowlach bakteryjnych.....	64
Tabela 3.3.	Spis odczynników używanych do oczyszczania DNA plazmidowego.....	64
Tabela 3.4.	Wykaz używanych plazmidów.....	65
Tabela 3.5.	Charakterystyka użytych linii komórkowych.....	68-69

7.2 Spis rycin**4. Wyniki**

Rycina 4.1.	Komórki HeLa wybarwione bromkiem etdiowym (EtBr).....	89
Rycina 4.2.	Zmiany w rozmieszczeniu białka HP1 α po wprowadzeniu lokalnego uszkodzenia.....	95
Rycina 4.3.	Zmiany w rozmieszczeniu białka HP1 β po wprowadzeniu lokalnego uszkodzenia.....	97
Rycina 4.4.	Rekrutacja endogennego białka HP1 β do miejsc uszkodzenia.....	98
Rycina 4.5.	Rekrutacja endogennego białka HP1 γ do miejsc uszkodzenia.....	99
Rycina 4.6.	Ruchliwość białka HP1 α w miejscu lokalnego uszkodzenia.....	109-110
Rycina 4.7.	Zmiany rozmieszczenia białka EGFP-LacR-HP1 α po wprowadzeniu uszkodzenia.....	114

Rycina 4.8. Zmiany rozmieszczenia białka HP1 β -EGFP-LacR po wprowadzeniu uszkodzenia.....	116
Rycina 4.9. Zmiany rozmieszczenia białka EGFP-HP1 β -LacR po wprowadzeniu uszkodzenia.....	118
Rycina 4.10. Brak wzrostu stężenia histonu H1 w obszarze uszkodzonym.....	121
Rycina 4.11. Zmiany lokalnego stężenia histonu H2B w obszarze uszkodzonym.....	123
Rycina 4.12. Zmiany lokalnego stężenia histonu H3 w obszarze uszkodzonym.....	125
Rycina 4.13. Rozkład Me3K9H3 w jądrach komórek HeLa.....	128
Rycina 4.14. Rozmieszczenie Me3K9H3 w lokalnie uszkodzonych jądrach komórek HeLa.....	129
Rycina 4.15. Rozkład Ku70 w jądrach komórek HeLa.....	131
Rycina 4.16. Rozmieszczenie Ku70 w lokalnie uszkodzonych jądrach komórek HeLa.....	132
Rycina 4.17. Rozmieszczenie PCNA zależne od fazy cyklu komórkowego.....	134
Rycina 4.18. Rekrutacja PCNA do miejsc uszkodzenia w komórce w fazie G1/G2.....	136
Rycina 4.19. Rekrutacja PCNA do miejsc uszkodzenia w komórce we wczesnej fazie S...	138
Rycina 4.20. Rekrutacja Dnmt1 do miejsc uszkodzenia.....	141
Rycina 4.21. Brak rekrutacji ligazy DNA I do miejsc uszkodzenia.....	143
Rycina 4.22. Rekrutacja ligazy DNA III do miejsc uszkodzenia.....	144
Rycina 4.23. Rozkład DDB2 w jądrze komórkowym.....	148
Rycina 4.24. Rekrutacja DDB2 do obszarów lokalnych uszkodzeń UV.....	149
Rycina 4.25. Rekrutacja białek HP1 do obszarów uszkodzeń UV.....	150
Rycina 4.26. Rekrutacja białka HP1 do obszarów uszkodzeń UV w komórkach z delecją Suv39.....	151
Rycina 4.27. Brak gromadzenia SUV39 w obszarach lokalnych uszkodzeń UV.....	153
Rycina 4.28. Rekrutacja białek HP1 w komórkach z deficytem NER.....	154
Rycina 4.29. Rekrutacja białek HP1 nie zależy od fazy cyklu podziałowego.....	156
Rycina 4.30. Dłuższe wiązanie HP1 w komórkach z deficytem NER niż w komórkach z funkcjonalną naprawą NER.....	158
Rycina 4.31. Rekrutacja białek HP1 w komórkach ze zredukowaną ekspresją ATR.....	159
Rycina 4.32. Rekrutacja Dnmt1 do miejsc uszkodzeń UV.....	160
Rycina 4.33. Rekrutacja białek HP1 w komórkach Dnmt1-/-.....	161
Rycina 4.34. Brak rekrutacji MeCP2 w obszarach uszkodzeń UV.....	162
Rycina 4.35. Rekrutacja SUV4-20H1 do miejsc uszkodzeń UV.....	164
Rycina 4.36. Rekrutacja BRG1 do obszarów uszkodzeń UV.....	166
Rycina 4.37. Rekrutacja BRG1 do obszarów lokalnych uszkodzeń UV w komórkach XP-A.....	167
Rycina 4.38. Rekrutacja HP1 do miejsc formowania DSBs.....	170
Rycina 4.39. Rekrutacja HP1 β do miejsc formowania DSBs w komórkach z deficytem KU80.....	172

7.3 Spis rysunków

1. Wstęp

Rysunek 1.1.	Jądro komórkowe.....	12
Rysunek 1.2.	Dwuniciowa cząsteczka DNA.....	13
Rysunek 1.3.	Komplementarność zasad azotowych w DNA.....	14
Rysunek 1.4.	Nukleosom.....	16
Rysunek 1.5.	Potranslacyjne modyfikacje „ogonów histonowych”.....	18
Rysunek 1.6.	Upakowanie DNA w jądrze komórkowym.....	21
Rysunek 1.7.	Schemat budowy białka HP1.....	25
Rysunek 1.8.	Struktura białka HP1 oraz kodującej go sekwencji.....	26
Rysunek 1.9.	Drzewo filogenetyczne białek HP1.....	29
Rysunek 1.10.	Diagram białek HP1 u <i>Drosophila</i> , myszy, człowieka i <i>S. pombe</i>	30
Rysunek 1.11.	HP1 białkiem pomostowym.....	32
Rysunek 1.12.	Rozmieszczenie heterochromatyny peryferyjnej w obrębie otoczki jądrowej.....	35
Rysunek 1.13.	Białko HP1 w regulacji transkrypcji.....	36
Rysunek 1.14.	Udział kompleksu SU(VAR)39H1/HP1 w propagacji heterochromatyny	38
Rysunek 1.15.	Mechanizm naprawy NER.....	44
Rysunek 1.16.	Dwie drogi naprawy BER: krótsza i dłuższa.....	49
Rysunek 1.17.	Naprawa DSBs w mechanizmie rekombinacji homologicznej (HR)	53
Rysunek 1.18.	Naprawa DSBs w mechanizmie niehomologicznego łączenia końców (NHEJ).....	54
Rysunek 1.19.	Model inicjacji naprawy DSBs.....	55
Rysunek 1.20.	Mechanizm naprawy MMR u <i>E. coli</i>	57
Rysunek 1.21.	Szlak naprawy MMR u człowieka.....	57

3. Materiały i metody

Rysunek 3.1.	Schemat metody FRAP.....	76
Rysunek 3.2.	Schemat metody FRAP/FLIP.....	77
Rysunek 3.3.	Schemat generowania lokalnych uszkodzeń UV.....	81
Rysunek 3.4.	Pozycja filtra względem jąder komórkowych.....	82

4. Wyniki

Rysunek 4.1.	Schemat konstrukt białka fuzyjnego EGFP-LacR-HP1 α	96
Rysunek 4.2.	Schemat konstrukt białka fuzyjnego EGFP-LacR-HP1 β	96
Rysunek 4.3.	Gromadzenie białka HP1 α w uszkodzonym obszarze chromatyny.....	102
Rysunek 4.4.	Gromadzenie białka HP1 β w uszkodzonym obszarze chromatyny.....	103
Rysunek 4.5.	Temperaturowa zależność gromadzenia białka HP1 α w obszarach lokalnego uszkodzenia chromatyny.....	105
Rysunek 4.6.	Temperaturowa zależność lokalnego stężenia HP1 α po 1 min od uszkodzenia.....	106
Rysunek 4.7.	Temperaturowa zależność lokalnego stężenia HP1 α po 10 min od uszkodzenia.....	107
Rysunek 4.8.	Temperaturowa zależność lokalnego stężenia HP1 α po 25 min od uszkodzenia.....	107
Rysunek 4.9.	Zmiany stężenia białka HP1 po uszkodzeniu oraz fotobłaknięciu.....	111
Rysunek 4.10.	Schematy różnych wariantów konstrukt białka fuzyjnego.....	113
Rysunek 4.11.	Gromadzenie białka EGFP-LacR-HP1 α	115
Rysunek 4.12.	Brak gromadzenia białka HP1 β -EGFP-LacR.....	117
Rysunek 4.13.	Gromadzenie białka EGFP-HP1 β -LacR.....	119
Rysunek 4.14.	Zmiany stężenia histonu H1 w miejscu uszkodzenia.....	122
Rysunek 4.15.	Zmiany stężenia histonu H2B w miejscu uszkodzenia.....	124
Rysunek 4.16.	Zmiany stężenia histonu H3 w miejscu uszkodzenia.....	126
Rysunek 4.17.	Gromadzenie PCNA w komórce w fazie G1/G2.....	137
Rysunek 4.18.	Zmiany stężenia PCNA w komórce we wczesnej fazie S.....	139

5. Dyskusja

Rysunek 5.1	Diagram komórkowych procesów naprawy DNA.....	178
--------------------	---	-----

Rozdział 8**Literatura**

1. **Aagaard** L., Laible G., Selenko P., Schmid M., Dorn R., Schotta G., Kuhfittig S., Wolf A., Lebersorger A., Singh P.B., Reuter G., Jenuwein T.; Functional mammalian homologues of the *Drosophila* PEV-modifier Su(var)3-9 encode centromere-associated proteins which complex with the heterochromatin component M31; *EMBO J.* (1999), 18:1923–38.
2. **Abraham** R.T.; Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases; *Genes Dev.* (2001), 15(17):2177–96.
3. **Agarwal** N., Hardt T., Brero A., Nowak D., Rothbauer U., Becker A., Leonhardt H., Cardoso M.C.; MeCP2 interacts with HP1 and modulates its heterochromatin association during myogenic differentiation; *Nucleic Acids Res.* (2007), 35(16):5402–8.
4. **Ainsztein** A.M., Kandels-Lewis S.E., Mackay A.M., Earnshaw W.C.; INCENP centromere and spindle targeting: identification of essential conserved motifs and involvement of heterochromatin protein HP1; *J Cell Biol.* (1998), 143:1763–74.
5. **Alberts** B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.; Molecular Biology of the Cell; Garland Science, Taylor & Francis Group New York (2002), 191–222.
6. **Allinson** S.L., Dianova I.I., Dianov G.L.; DNA polymerase beta is the major dRP lyase involved in repair of oxidative base lesions in DNA by mammalian cell extracts; *EMBO J.* (2001), 20(23):6919–26.
7. **Altat** M., Saksouk N., Côté J.; Histone modifications in response to DNA damage; *Mutat Res.* (2007), 618(1–2):81–90.
8. **Aten** J.A., Stap J., Krawczyk P.M., van Oven C.H., Hoebe R.A., Essers J., Kanaar R.; Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains; *Science* (2004), 303:92–5.
9. **Auth** T., Kunkel E., Grummt F.; Interaction between HP1alpha and replication proteins in mammalian cells; *Exp Cell Res.* (2006), 312(17):3349–59.
10. **Ayoub** N., Jeyasekharan A.D., Bernal J.A., Venkitaraman A.R.; HP1-beta mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response; *Nature* (2008), 453(7195):682–6.
11. **Ayoub** N., Jeyasekharan A.D., Venkitaraman A.R.; Mobilization and recruitment of HP1: A bimodal response to DNA breakage; *Cell Cycle* (2009), 8(18):2945–50.
12. **Ayyanathan** K., Lechner M.S., Bell P., Maul G.G., Schultz D.C., Yamada Y., Tanaka K., Torigoe K., Rauscher F.J. 3rd; Regulated recruitment of HP1 to a euchromatic gene induces mitotically heritable, epigenetic gene silencing: a mammalian cell culture model of gene variegation; *Genes Dev.* (2003), 17:1855–69.
13. **Avramova** Z.V.; Heterochromatin in animals and plants. Similarities and differences; *Plant Physiol.* (2002), 129(1):40–9.

14. **Badugu** R., Shareef M.M., Kellum R.; Novel Drosophila heterochromatin protein 1 (HP1)/origin recognition complex-associated protein (HOAP) repeat motif in HP1/HOAP interactions and chromocenter associations; *J Biol Chem.* (2003), 278:34491–8.
15. **Baguley** B.C., **Falkenbaugh** E.M.; The interaction of ethidium with synthetic double-stranded polynucleotides at low ionic strength; *Nucleic Acids Res.* (1978), 5(1):161–71.
16. **Bakkenist** C.J., **Kastan** M.B.; DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation; *Nature* (2003), 421:499–506.
17. **Bannister** A.J., Zegerman P., Partridge J.F., Miska E.A., Thomas J.O., Allshire R.C., Kouzarides T.; Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain; *Nature* (2001), 410:120–4.
18. **Barski** A., Cuddapah S., Cui K., Roh T.Y., Schones D.E., Wang Z., Wei G., Chepelev I., Zhao K.; High-resolution profiling of histone methylations in the human genome; *Cell* (2007), 129(4):823–37.
19. **Bartek** J., **Lukas** J.; Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage; *Curr Opin Cell Biol.* (2001), 13(6):738–47.
20. **Bartek** J., **Lukas** J.; DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation; *Curr Opin Cell Biol.* (2007), 19:238–45.
21. **Bartek** J., Bartkova J., Lukas J.; DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression; *Oncogene* (2007), 26(56):7773–9.
22. **Bassing** C.H., Chua K.F., Sekiguchi J., Suh H., Whitlow S.R., Fleming J.C., Monroe B.C., Ciccone D.N., Yan C., Vlasakova K., Livingston D.M., Ferguson D.O., Scully R., Alt F.W.; Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX; *Proc Natl Acad Sci USA* (2002), 99(12):8173–8.
23. **Baure** J., Izadi A., Suarez V., Giedzinski E., Cleaver J.E., Fike J.R., Limoli C.L.; Histone H2AX phosphorylation in response to changes in chromatin structure induced by altered osmolarity; *Mutagenesis.* (2009), 24(2):161–7.
24. **Beernink** P.T., Hwang M., Ramirez M., Murphy M.B., Doyle S.A., Thelen M.P.; Specificity of protein interactions mediated by BRCT domains of the XRCC1 DNA repair protein; *J Biol Chem.* (2005), 280(34):30206–13.
25. **Bekker-Jensen** S., Lukas C., Melander F., Bartek J., Lukas J.; Dynamic assembly and sustained retention of 53BP1 at the sites of DNA damage are controlled by Mdc1/NFBD1; *J Cell Biol.* (2005), 170(2):201–11.
26. **Bekker-Jensen** S., Lukas C., Kitagawa R., Melander F., Kastan M.B., Bartek J., Lukas J.; Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks; *J Cell Biol.* (2006), 173:195–206.
27. **Berger** S.L.; The complex language of chromatin regulation during transcription; *Nature* (2007), 447(7143):407–12.
28. **Bergink** S., Salomons F.A., Hoogstraten D., Groothuis T.A., de Waard H., Wu J., Yuan L., Citterio E., Houtsmuller A.B., Neefjes J., Hoeijmakers J.H., Vermeulen W., Dantuma N.P.; DNA damage triggers nucleotide excision repair-dependent monoubiquitylation of histone H2A; *Genes Dev.* (2006), 20:1343–52.
29. **Bernard** P., Maure J.F., Partridge J.F., Genier S., Javerzat J.P., Allshire R.C.; Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres; *Science* (2001), 294:2539–42.
30. **Bernas** T., Zarebski M., Dobrucki J.W., Cook P.R.; Minimizing photobleaching during confocal microscopy of fluorescent probes bound to chromatin: role of anoxia and photon flux; *J Microsc.* (2004), 215(Pt 3):281–96.

31. **Bestor** T.H.; The DNA methyltransferases of mammals; *Hum Mol Genet.* (2000), 9(16):2395-2402.
32. **Bird** A.; Molecular biology. Methylation talk between histones and DNA; *Science* (2001), 294(5549):2113-5.
33. **Bird** A.; DNA methylation patterns and epigenetic memory; *Genes Dev.* (2002), 16(1):6-21.
34. **Birger** Y., West K.L., Postnikov Y.V., Lim J.H., Furusawa T., Wagner J.P., Laufer C.S., Kraemer K.H., Bustin M.; Chromosomal protein HMG1 enhances the rate of DNA repair in chromatin; *EMBO J.* (2003), 22(7):1665-75.
35. **Blackburn** G.M., **Gait** M.J.; Nucleic acids in chemistry and biology; 2nd ed.; Oxford University Press USA (1996), 288-93.
36. **Bradshaw** P.S., Stavropoulos D.J., Meyn M.S.; Human telomeric protein TRF2 associates with genomic double-strand breaks as an early response to DNA damage; *Nat Genet.* (2005), 37(2):193-7.
37. **Brand** M., Moggs J.G., Oulad-Abdelghani M., Lejeune F., Dilworth F.J., Stevenin J., Almouzni G., Tora L.; UV-damaged DNA-binding protein in the TFIIIC complex links DNA damage recognition to nucleosome acetylation; *EMBO J.* (2001), 20:3187-96.
38. **Brasher** S.V., Smith B.O., Fogh R.H., Nietlispach D., Thiru A., Nielsen P.R., Broadhurst R.W., Ball L.J., Murzina N.V., Laue E.D.; The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer; *EMBO J.* (2000), 19:1587-97.
39. **Brenner** C., **Fuks** F.; A methylation rendezvous: reader meets writers; *Dev Cell* (2007), 12(6):843-4.
40. **Brero** A., Easwaran H.P., Nowak D., Grunewald I., Cremer T., Leonhardt H., Cardoso M.C.; Methyl CpG-binding proteins induce large-scale chromatin reorganization during terminal differentiation; *J Cell Biol.* (2005), 169(5):733-43.
41. **Brink** M.C., van der Velden Y., de Leeuw W., Mateos-Langerak J., Belmont A.S., van Driel R., Verschure P.J.; Truncated HP1 lacking a functional chromodomain induces heterochromatinization upon in vivo targeting; *Histochem Cell Biol.* (2006), 125(1-2):53-61.
42. **Bruner** S.D., Norman D.P., Verdine G.L.; Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA; *Nature* (2000), 403(6772):859-66.
43. **Buck** D., Moshous D., de Chasseval R., Ma Y., le Deist F., Cavazzana-Calvo M., Fischer A., Casanova J.L., Lieber M.R., de Villartay J.P.; Severe combined immunodeficiency and microcephaly in siblings with hypomorphic mutations in DNA ligase IV; *Eur J Immunol.* (2006), 36(1):224-35.
44. **Bugs** R., **Cornélio** M.L.; A new biophysics approach using photoacoustic spectroscopy to study the DNA-ethidium bromide interaction; *Eur Biophys J.* (2002), 31(3):232-40.
45. **Burma** S., Chen B.P., Chen D.J.; Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity; *DNA Repair (Amst).* (2006), 5(9-10):1042-8.
46. **Caldecott** K.W., McKeown C.K., Tucker J.D., Ljungquist S., Thompson L.H.; An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA ligase III; *Mol Cell Biol.* (1994) 14(1):68-76.
47. **Campbell** R.E., Tour O., Palmer A.E., Steinbach P.A., Baird G.S., Zacharias D.A., Tsien R.Y.; A monomeric red fluorescent protein; *Proc Natl Acad Sci USA* (2002), 99(12):7877-82.

48. **Cardoso** M.C., Joseph C., Rahn H.P., Reusch R., Nadal-Ginard B., Leonhardt H.; Mapping and use of a sequence that targets DNA ligase I to sites of DNA replication in vivo; *J Cell Biol.* (1997), 139(3):579-87
49. **Carrier** F., Georgel P.T., Pourquier P., Blake M., Kontny H.U., Antinore M.J., Gariboldi M., Myers T.G., Weinstein J.N., Pommier Y., Fornace A.J. Jr; Gadd45, a p53-responsive stress protein, modifies DNA accessibility on damaged chromatin; *Mol Cell Biol.* (1999), 19:1673-85.
50. **Celeste** A., Petersen S., Romanienko P.J., Fernandez-Capetillo O., Chen H.T., Sedelnikova O.A., Reina-San-Martin B., Coppola V., Meffre E., Difilippantonio M.J., Redon C., Pilch D.R., Olaru A., Eckhaus M., Camerini-Otero R.D., Tessarollo L., Livak F., Manova K., Bonner W.M., Nussenzweig M.C., Nussenzweig A.; Genomic instability in mice lacking histone H2AX; *Science* (2002), 296:922-7.
51. **Celeste** A., Fernandez-Capetillo O., Kruhlak M.J., Pilch D.R., Staudt D.W., Lee A., Bonner R.F., Bonner W.M., Nussenzweig A.; Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks; *Nat Cell Biol.* (2003), 5(7):675-9.
52. **Chadée** D.N., Hendzel M.J., Tylipski C.P., Allis C.D., Bazett-Jones D.P., Wright J.A., Davie J.R.; Increased Ser-10 phosphorylation of histone H3 in mitogen-stimulated and oncogene-transformed mouse fibroblasts; *J Biol Chem.* (1999), 274:24914-20.
53. **Chen** W., Turro N.J., Tomalia D.A.; Using ethidium bromide to probe the interactions between DNA and dendrimers; *Langmuir* (2000), 16(1):15-19.
54. **Cheung** K.J. Jr, Mitchell D., Lin P., Li G.; The tumor suppressor candidate p33(ING1) mediates repair of UV-damaged DNA; *Cancer Res.* (2001), 61:4974-7.
55. **Cheutin** T., McNairn A.J., Jenuwein T., Gilbert D.M., Singh P.B., Misteli T.; Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding; *Science* (2003), 299:721-5.
56. **Choi** J.H., Lindsey-Boltz L.A., Sancar A.; Reconstitution of a human ATR-mediated checkpoint response to damaged DNA; *Proc Natl Acad Sci USA* (2007), 104:13301-6.
57. **Chuang** L.S., Ian H.I., Koh T.W., Ng H.H., Xu G., Li B.F.; Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1; *Science* (1997), 277(5334):1996-2000.
58. **Collins** N., Poot R.A., Kukimoto I., Garcia-Jimenez C., Dellaire G., Varga-Weisz, P.D.; An ACF1-ISWI chromatin-remodeling complex is required for DNA replication through heterochromatin; *Nat Genet.* (2002), 32:627-32.
59. **Cooper** G.M.; The Cell: A Molecular Approach, 2nd ed.; Sinauer Associates, Sunderland (2000).
60. **Costa** R.M., Chigancas V., Galhardo Rda S., Carvalho H., Menck C.F.; The eucaryotic nucleotide excision repair patchway; *Biochimie* (2003), 85(11):1083-99.
61. **Costanzo** V., **Gautier** J.; Single-strand DNA gaps trigger an ATR- and Cdc7-dependent checkpoint; *Cell Cycle* (2003), 2(1):17.
62. **Coustham** V., Bedet C., Monier K., Schott S., Karali M., Palladino F.; The *C. elegans* HP1 homologue HPL-2 and the LIN-13 zinc finger protein form a complex implicated in vulval development; *Dev Biol.* (2006), 297:308-22.
63. **Cowell** I.G., Aucott R., Mahadevaiah S.K., Burgoyne P.S., Huskisson N., Bongiorno S., Prantera G., Fanti L., Pimpinelli S., Wu R., Gilbert D.M., Shi W., Fundele R., Morrison H., Jeppesen P., Singh P.B.; Heterochromatin, HP1 and methylation at lysine 9 of histone H3 in animals; *Chromosoma* (2002), 111:22-36.

64. **Cowieson** N.P., Partridge J.F., Allshire R.C., McLaughlin P.J.; Dimerisation of a chromo shadow domain and distinctions from the chromodomain as revealed by structural analysis; *Curr Biol.* (2000), 10:517–25.
65. **Czernin** B., Schotta G., Hulsmann B.B., Brehm A., Becker P.B., Reuter G., Imhof A.; Physical and functional association of SU(VAR)3-9 and HDAC1 in *Drosophila*; *EMBO Rep.* (2001), 2:915–9.
66. **Czvitkovich** S., Sauer S., Peters A.H., Deiner E., Wolf A., Laible G., Opravil S., Beug H., Jenuwein T.; Over-expression of the SUV39H1 histone methyltransferase induces altered proliferation and differentiation in transgenic mice; *Mech Dev.* (2001), 107(1-2):141-53.
67. **Datta** A., Bagchi S., Nag A., Shiyanov P., Adami G.R., Yoon T., Raychaudhuri P.; The p48 subunit of the damaged-DNA binding protein DDB associates with the CBP/p300 family of histone acetyltransferase; *Mutat Res.* (2001), 486(2):89-97.
68. **de Laat** W.L., Jaspers N.G., Hoeijmakers J.H.; Molecular mechanism of nucleotide excision repair; *Genes Dev.* (1999), 13:768-85.
69. **DeLange** R.J., Hooper J.A., Smith E.L.; Histone 3.3. sequence studies on the cyanogen bromide peptides; complete amino acid sequence of calf thymus histone 3; *J Biol Chem.* (1973), 248(9):3261-74.
70. **Deniss** I.S., **Morgan** A.R.; Studies on the mechanism of DNA cleavage by Ethidium; *Nucleic Acids Res.* (1976), 3(2):315-23.
71. **Dialynas** G.K., Terjung S., Brown J.P., Aucott R.L., Baron-Luhr B., Singh P.B., Georgatos S.D.; Plasticity of HP1 proteins in mammalian cells; *J Cell Sci.* (2007), 120(Pt 19):3415-24.
72. **Dialynas** G.K., Vitalini M.W., Wallrath L.L.; Linking Heterochromatin Protein 1 (HP1) to cancer progression; *Mutat Res.* (2008), 647(1-2):13-20.
73. **Diaz** G., Diana A., Setzu M.D., Sogos V., Zucca A.; Nuclear dyes and cytoplasmic staining; *Cytometry* (1997), 29(4):375-6.
74. **Dietzel** S., Zolghadr K., Hepperger C., Belmont A.S.; Differential large-scale chromatin compaction and intranuclear positioning of transcribed versus non-transcribed transgene arrays containing beta-globin regulatory sequences; *J Cell Sci.* (2004), 117:4603–14.
75. **Dillon** N., **Festenstein** R.; Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility; *Trends Genet.* (2002), 18(5):252-8.
76. **Dinant** C., de Jager M., Essers J., van Cappellen W.A., Kanaar R., Houtsmuller A.B., Vermeulen, W.; Activation of multiple DNA repair pathways by sub-nuclear damage induction methods; *J Cell Sci.* (2007), 120:2731-40.
77. **Dobrucki** J.W., Feret D., Noatynska A.; Scattering of exciting light by live cells in fluorescence confocal imaging: phototoxic effects and relevance for FRAP studies; *Biophys J.* (2007), 93(5):1778-86.
78. **Downs** J.A., Nussenzweig M.C., Nussenzweig A.; Chromatin dynamics and the preservation of genetic information; *Nature* (2007), 447(7147):951-8.
79. **Dualan** R., Brody T., Keeney S., Nichols A.F., Admon A., Linn S.; Chromosomal localization and cDNA cloning of the genes (DDB1 and DDB2) for the p127 and p48 subunits of a human damage-specific DNA binding protein; *Genomics* (1995), 29(1):62-9.
80. **Dulic** A., Bates P.A., Zhang X., Martin S.R., Freemont P.S., Lindahl T., Barnes D.E.; BRCT domain interactions in the heterodimeric DNA repair protein XRCC1-DNA ligase III; *Biochemistry* (2001), 40(20):5906-13.

81. **Dupre A.**, Boyer-Chatenet L., Gautier J.; Two-step activation of ATM by DNA and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex; *Nat Struct Mol Biol.* (2006), 13:451–7.
82. **Eberharter A.**, Ferrari S., Längst G., Straub T., Imhof A., Varga-Weisz P., Wilm M., Becker P.B.; Acf1, the largest subunit of CHRAC, regulates ISWI-induced nucleosome remodeling; *EMBO J.* (2001), 16;20(14):3781-8.
83. **Eissenberg J.C.**, Ge Y.W., Hartnett T.; Increased phosphorylation of HP1, a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*, is correlated with heterochromatin assembly; *J Biol Chem.* (1994), 269:21315–21.
84. **Eissenberg J.C.**, **Elgin S.C.**; The HP1 protein family: getting a grip on chromatin; *Curr Opin Genet Dev.* (2000), 10:204-10.
85. **Elgin S.C.**, **Grewal S.I.**; Heterochromatin: silence is golden; *Curr Biol.* (2003), 13(23):R895-8.
86. **Errami A.**, Smider V., Rathmell W.K., He D.M., Hendrickson E.A., Zdzienicka M.Z., Chu G.; Ku86 defines the genetic defect and restores X-ray resistance and V(D)J recombination to complementation group 5 hamster cell mutants; *Mol Cell Biol.* (1996), 16(4):1519-26.
87. **Escargueil A.E.**, Soares D.G., Salvador M., Larsen A.K., Henriques J.A.; What histone code for DNA repair?; *Mutat Res.* (2008), 658(3):259-70.
88. **Eskeiland R.**, Eberharter A., Imhof A.; HP1 binding to chromatin methylated at H3K9 is enhanced by auxiliary factors; *Mol Cell Biol.* (2007), 27:453-65.
89. **Espada J.**, Ballestar E., Fraga M.F., Villar-Garea A., Juarranz A., Stockert J.C., Robertson K.D., Fuks F., Esteller M.; Human DNA methyltransferase 1 is required for maintenance of the histone H3 modification pattern; *J Biol Chem.* (2004), 279(35):37175-84.
90. **Essers J.**, Houtsmuller A.B., van Veelen L., Paulusma C., Nigg A.L., Pastink A., Vermeulen W., Hoeijmakers J.H., Kanaar R.; Nuclear dynamics of RAD52 group homologous recombination proteins in response to DNA damage; *EMBO J.* (2002), 21(8):2030-7.
91. **Essers J.**, Theil A.F., Baldeyron C., van Cappellen W.A., Houtsmuller A.B., Kanaar R., Vermeulen W.; Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair; *Mol Cell Biol.* (2005), 25(21):9350-9.
92. **Estève P.O.**, Chin H.G., Smallwood A., Feehery G.R., Gangisetty O., Karpf A.R., Carey M.F., Pradhan S.; Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication; *Genes Dev.* (2006), 20(22):3089-103.
93. **Fanti L.**, Giovinazzo G., Berloco M., Pimpinelli S.; The heterochromatin protein 1 prevents telomere fusions in *Drosophila*; *Mol Cell.* (1998), 2(5):527-38.
94. **Fanti L.**, **Pimpinelli S.**; HP1: a functionally multifaceted protein; *Curr Opin Genet Dev.* (2008), 18(2):169-74.
95. **Ferlini C.**, Di Cesare S., Rainaldi G., Malorni W., Samoggia P., Biselli R., Fattorossi A.; Flow cytometric analysis of the early phases of apoptosis by cellular and nuclear techniques; *Cytometry* (1996), 24(2):106-15.
96. **Fernandez-Capetillo O.**, Allis C.D., Nussenzweig A.; Phosphorylation of histone H2B at DNA double-strand break; *J Exp Med.* (2004), 199(12):1671–7.
97. **Fernandez-Capetillo O.**, **Nussenzweig A.**; Linking histone deacetylation with the repair of DNA breaks; *Proc Natl Acad Sci USA* (2004), 101(6):1427-8.
98. **Filesi I.**, Cardinale A., van der Sar S., Cowell I.G., Singh P.B., Biocca, S.; Loss of heterochromatin protein 1 (HP1) chromodomain function in mammalian cells by intracellular antibodies causes cell death; *J Cell Sci.* (2002), 115:1803-13.

99. **Finnie** N.J., Gottlieb T.M., Blunt T., Jeggo P.A., Jackson S.P.; DNA-dependent protein kinase activity is absent in xrs-6 cells: implications for site-specific recombination and DNA double-strand break repair; *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1995), 92(1):320-4.
100. **Fischle** W., Wang Y., Jacobs S.A., Kim Y., Allis C.D., Khorasanizadeh S.; Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains; *Genes Dev.* (2003), 17:1870–81.
101. **Fortini** P., Pascucci B., Parlanti E., D'Errico M., Simonelli V., Dogliotti E.; The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility; *Biochimie* (2003), 85(11):1053-71.
102. **Fortini** P., **Dogliotti** E.; Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways; *DNA Repair (Amst).* (2007), 6(4):398-409.
103. **Fousteri** M., Vermeulen W., van Zeeland A.A., Mullenders L.H.; Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo; *Mol Cell.* (2006), 23:471-82.
104. **Fousteri** M., **Mullenders**, L.H.; Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects; *Cell Res.* (2008), 18:73-84.
105. **Fraga** M.F., Ballestar E., Montoya G., Taysavang P., Wade P.A., Esteller M.; The affinity of different MBD proteins for a specific methylated locus depends on their intrinsic binding properties; *Nucleic Acids Res.* (2003), 31(6):1765-74.
106. **Freitag** M., Hickey P.C., Khlafallah T.K., Read N.D., Selker E.U.; HP1 is essential for DNA methylation in neurospora; *Mol Cell.* (2004), 13(3):427-34.
107. **Friedberg** E.C.; How nucleotide excision repair protects against cancer; *Nat Rev Cancer.* (2001), 1:22-33.
108. **Fromme** J.C., Banerjee A., Verdine G.L.; DNA glycosylase recognition and catalysis; *Curr Opin Struct Biol.* (2004), 14(1):43-9.
109. **Fujita** N., Watanabe S., Ichimura T., Tsuruzoe S., Shinkai Y., Tachibana M., Chiba T., Nakao M.; Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) interacts with the Suv39h1-HP1 heterochromatic complex for DNA methylation-based transcriptional repression; *J Biol Chem.* (2003), 278(26):24132–8.
110. **Fuks** F., Hurd P.J., Deplus R., Kouzarides T.; The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase; *Nucleic Acids Res.* (2003), 31:2305–12.
111. **Gangaraju** V.K., **Bartholomew** B.; Mechanisms of ATP dependent chromatin remodeling; *Mutat Res.* (2007), 618(1-2):3-17.
112. **Garinis** G.A., Mitchell J.R., Moorhouse M.J., Hanada K., de Waard H., Vandeputte D., Jans J., Brand K., Smid M., van der Spek P.J., Hoeijmakers J.H., Kanaar R., van der Horst G.T.; Transcriptome analysis reveals cyclobutane pyrimidine dimers as a major source of UV-induced DNA breaks; *EMBO J.* (2005), 24(22):3952-62.
113. **Gellert** M.; V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation; *Annu Rev Biochem.* (2002), 71:101-32.
114. **Goldman** R.D., **Spector** D.L.; Live Cell Imaging: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press (2004), chapter 7, 101-26.
115. **Goll** M.G., **Bestor** T.H.; Eukaryotic cytosine methyltransferases; *Annu Rev Biochem.* (2005), 74:481-514.
116. **Green** C.M., **Almouzni** G.; When repair meets chromatin. First in series on chromatin dynamics; *EMBO Rep.* (2002), 3:28-33.

117. **Green C.M., Almouzni G.**; Local action of the chromatin assembly factor CAF-1 at sites of nucleotide excision repair in vivo; *EMBO J.* (2003), 22(19):5163-74.
118. **Grewal S.I., Elgin S.C.**; Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure; *Curr Opin Genet Dev.* (2002), 12:178-87.
119. **Grewal S.I.S., Jia S.**; Heterochromatin revisited; *Nat Rev Genet.* (2007), 8:35-46.
120. **Groth A., Rocha W., Verreault A., Almouzni G.**; Chromatin challenges during DNA replication and repair; *Cell* (2007), 128:721-33.
121. **Guo X.W., Cole R.D.**; Chromatin aggregation changes substantially as pH varies within the physiological range; *J Biol Chem.* (1989a), 264(20):11653-7.
122. **Guo X.W., Cole R.D.**; Chromatin aggregation depends on the anion species of the salts; *J Biol Chem.* (1989b), 264(28):16873-9.
123. **Halicka H.D., Huang X., Traganos F., King M.A., Dai W., Darzynkiewicz Z.**; Histone H2AX phosphorylation after cell irradiation with UV-B: relationship to cell cycle phase and induction of apoptosis; *Cell Cycle* (2005), 4(2):339-45.
124. **Hamilton M.L., Guo Z., Fuller C.D., Van Remmen H., Ward W.F., Austad S.N., Troyer D.A., Thompson I., Richardson A.**; A reliable assessment of 8-oxo-2-deoxyguanosine levels in nuclear and mitochondrial DNA using the sodium iodide method to isolate DNA; *Nucleic Acids Res.* (2001), 29(10):2117-26.
125. **Hanawalt P.C., Ford J.M., Lloyd D.R.**; Functional characterization of global genomic DNA repair and its implications for cancer; *Mutat Res.* (2003), 544:107-14.
126. **Hara R., Mo J., Sancar A.**; DNA damage in the nucleosome core is refractory to repair by human excision nuclease; *Mol Cell Biol.* (2000), 20:9173-81.
127. **Hara R., Sancar A.**; The SWI/SNF chromatin-remodeling factor stimulates repair by human excision nuclease in the mononucleosome core particle; *Mol Cell Biol.* (2002), 22:6779-87.
128. **Hayakawa T., Haraguchi T., Masumoto H., Hiraoka Y.**; Cell cycle behavior of human HP1 subtypes: distinct molecular domains of HP1 are required for their centromeric localization during interphase and metaphase; *J Cell Sci.* (2003), 116:3327-38.
129. **Hazra T.K., Das A., Das S., Choudhury S., Kow Y.W., Roy R.**; Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: a new perspective; *DNA Repair (Amst).* (2007), 6(4):470-80.
130. **Hediger F., Gasser S.M.**; Heterochromatin protein 1: don't judge the book by its cover!; *Curr Opin Genet Dev.* (2006), 16(2):143-50.
131. **Heitz E.**; Das Heterochromatin der Moose; *Jahrb Wiss Botanik* (1928), 69:762-818.
132. **Hendrickson E.A.**; Cell-cycle regulation of mammalian DNA double-strand-break repair; *Am J Hum Genet.* (1997), 61(4):795-800.
133. **Hentges P., Ahnesorg P., Pitcher R.S., Bruce C.K., Kysela B., Green A.J., Bianchi J., Wilson T.E., Jackson S.P., Doherty A.J.**; Evolutionary and functional conservation of the DNA non-homologous end-joining protein, XLF/Cernunnos; *J Biol Chem.* (2006), 281(49):37517-26.
134. **Hermann A., Goyal R., Jeltsch A.**; The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites; *J Biol Chem.* (2004), 279(46):48350-9.
135. **Heyer W.D., Li X., Rolfsmeier M., Zhang X.P.**; Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination?; *Nucleic Acids Res.* (2006), 34(15):4115-25.
136. **Hiragami K., Festenstein R.**; Heterochromatin protein 1: a pervasive controlling influence; *Cell Mol Life Sci.* (2005), 62(23):2711-26.

137. **Ho** K.L., McNae I.W., Schmiedeberg L., Klose R.J., Bird A.P., Walkinshaw M.D.; MeCP2 binding to DNA depends upon hydration at methyl-CpG; *Mol Cell*. (2008), 29:525-31.
138. **Hoeijmakers** J.H.; Genome maintenance mechanisms for preventing cancer; *Nature* (2001), 411:366-74.
139. **Hoogstraten** D., Nigg A.L., Heath H., Mullenders L.H., van Driel R., Hoeijmakers J.H., Vermeulen W., Houtsmuller A.B.; Rapid switching of TFIIH between RNA polymerase I and II transcription and DNA repair in vivo; *Mol Cell*. (2002), 10:1163-74.
140. **Houtsmuller** A.B., Rademakers S., Nigg A.L., Hoogstraten D., Hoeijmakers J.H., Vermeulen W.; Action of DNA repair endonuclease ERCC1/XPF in living cells; *Science* (1999), 284(5416):958-61.
141. **Huang** X., Okafuji M., Traganos F., Luther E., Holden E., Darzynkiewicz Z.; Assessment of histone H2AX phosphorylation induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors topotecan and mitoxantrone and by the DNA cross-linking agent cisplatin; *Cytometry A*. (2004), 58(2):99-110.
142. **Huen** M.S., **Chen** J.; The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications; *Cell Res*. (2008), 18:8-16.
143. **Hwang** B.J., Toering S., Francke U., Chu G.; p48 Activates a UV-damaged-DNA binding factor and is defective in xeroderma pigmentosum group E cells that lack binding activity; *Mol Cell Biol*. (1998), 18(7):4391-9.
144. **Hwang** B.J., Ford J.M., Hanawalt P.C., Chu G.; Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair; *Proc Natl Acad Sci USA* (1999), 96(2):424-8.
145. **Iftode** C., Daniely Y., Borowiec J.A.; Replication protein A (RPA): the eukaryotic SSB; *Crit Rev Biochem Mol Biol*. (1999), 34(3):141-80.
146. **Iyer** R.R., Pluciennik A., Burdett V., Modrich P.; DNA mismatch repair: functions and mechanisms; *Chem Rev*. (2006), 106(2):302-23.
147. **Jackson** S.P.; Sensing and repairing DNA double-strand breaks; *Carcinogenesis* (2002), 23(5):687-96.
148. **Jacobs** S.A., **Khorasanizadeh** S.; Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail; *Science* (2002), 295(5562):2080-3.
149. **Jakob** B., Scholz M., Taucher-Scholz G.; Characterization of CDKN1A (p21) binding to sites of heavy-ion-induced damage: colocalization with proteins involved in DNA repair; *Int J Radiat Biol*. (2002), 78(2):75-88.
150. **Jasin** M.; Genetic manipulation of genomes with rare-cutting endonucleases; *Trends Genet*. (1996), 12(6):224-8.
151. **Jenuwein** T., **Allis** C.D.; Translating the histone code; *Science* (2001), 293:1074-80.
152. **Johnson** R.D., **Jasin** M.; Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells; *EMBO J*. (2000), 19(13):3398-407.
153. **Jones** P.L., Veenstra G.J., Wade P.A., Vermaak D., Kass S.U., Landsberger N., Strouboulis J., Wolffe A.P.; Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription; *Nat Genet*. (1998), 19(2):187-91.
154. **Jones** D.O., Cowell I.G., Singh P.B.; Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression; *Bioessays*. (2000), 22:124-37.
155. **Joseph** N., Duppatla V., Rao D.N.; Prokaryotic DNA mismatch repair; *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. (2006), 81:1-49.

156. **Kantor** G.J., **Hull** D.R.; An effect of ultraviolet light on RNA and protein synthesis in nondividing human diploid fibroblasts; *Biophys J.* (1979), 27:359-70.
157. **Kapetanaki** M.G., Guerrero-Santoro J., Bisi D.C., Hsieh C.L., Raptic-Otrin V., Levine A.S.; The DDB1-CUL4ADDB2 ubiquitin ligase is deficient in xeroderma pigmentosum group E and targets histone H2A at UV-damaged DNA sites; *Proc Natl Acad Sci USA* (2006), 103(8):2588-93.
158. **Kastan** M.B., **Lim** D.S.; The many substrates and functions of ATM; *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2000), 1(3):179-86.
159. **Kellum** R., **Alberts** B.M.; Heterochromatin protein 1 is required for correct chromosome segregation in *Drosophila* embryos; *J Cell Sci.* (1995), 108:1419-31.
160. **Kim** J.S., Krasieva T.B., LaMorte V., Taylor A.M., Yokomori K.; Specific recruitment of human cohesin to laser-induced DNA damage; *J Biol Chem.* (2002), 277(47):45149-53.
161. **Kim** J.S., Krasieva T.B., Kurumizaka H., Chen D.J., Taylor A.M., Yokomori K.; Independent and sequential recruitment of NHEJ and HR factors to DNA damage sites in mammalian cells; *J Cell Biol.* (2005), 170(3):341-7.
162. **Kimura** H., **Cook** P.R.; Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B; *J Cell Biol.* (2001), 153(7):1341-53.
163. **Kimura** H.; Histone dynamics in living cells revealed by photobleaching; *DNA Repair (Amst).* (2005), 4(8):939-50.
164. **Klose** R.J., **Bird** A.P.; Genomic DNA methylation: the mark and its mediators; *Trends Biochem Sci.* (2006), 31(2):89-97.
165. **Kohlmaier** A., Savarese F., Lachner M., Martens J., Jenuwein T., Wutz A.; A chromosomal memory triggered by Xist regulates histone methylation in X inactivation; *PLoS Biol.* (2004), 2(7):E171.
166. **Kolodner** R.D., **Marsischky** G.T.; Eukaryotic DNA mismatch repair; *Curr Opin Genet Dev.* (1999), 9(1):89-96.
167. **Kourmouli** N., Theodoropoulos P.A., Dialynas G., Bakou A., Politou A.S., Cowell I.G., Singh P.B., Georgatos S.D.; Dynamic associations of heterochromatin protein 1 with the nuclear envelope; *EMBO J.* (2000), 19(23):6558-68.
168. **Kremers** G.J., Goedhart J., van Munster E.B., Gadella T.W. Jr; Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Förster radius; *Biochemistry* (2006), 45(21):6570-80.
169. **Krishnamurthy** G., Polte T., Rooney T., Hogan M.E.; A photochemical method to map ethidium bromide binding sites on DNA: application to a bent DNA fragment; *Biochemistry* (1990), 29:981-8.
170. **Krouwels** I.M., Wiesmeijer K., Abraham T.E., Molenaar C., Verwoerd N.P., Tanke H.J., Dirks R.W.; A glue for heterochromatin maintenance: stable SUV39H1 binding to heterochromatin is reinforced by the SET domain; *J Cell Biol.* (2005), 170:537-49.
171. **Kruhlak** M.J., Celeste A., Dellaire G., Fernandez-Capetillo O., Müller W.G., McNally J.G., Bazett-Jones D.P., Nussenzweig A.; Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks; *J Cell Biol.* (2006), 172(6):823-34.
172. **Kruhlak** M., Crouch E.E., Orlov M., Montano C., Gorski S.A., Nussenzweig A., Misteli T., Phair R.D., Casellas R.; The ATM repair pathway inhibits RNA polymerase I transcription in response to chromosome breaks; *Nature* (2007), 447:730-4.

173. **Kubota** Y., Nash R.A., Klungland A., Schär P., Barnes D.E., Lindahl T.; Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein; *EMBO J.* (1996), 15(23):6662-70.
174. **Kukimoto** I., Elderkin S., Grimaldi M., Oelgeschläger T., Varga-Weisz P.D.; The histone-fold protein complex CHRAC-15/17 enhances nucleosome sliding and assembly mediated by ACF; *Mol Cell.* (2004), 13(2):265-77.
175. **Kunkel** T.A., **Erie** D.A.; DNA Mismatch Repair; *Annu Rev Biochem.* (2005), 74:681-710.
176. **Kuo** W.H., Wang Y., Wong R.P., Campos E.I., Li G.; The ING1b tumor suppressor facilitates nucleotide excision repair by promoting chromatin accessibility to XPA; *Exp Cell Res.* (2007), 313:1628-38.
177. **Kwon** S.H., **Workman** J.L.; The heterochromatin protein 1 (HP1) family: put away a bias toward HP1; *Mol Cells.* (2008), 26(3):217-27.
178. **Lachner** M., O'Sullivan R.J., Jenuwein T.; An epigenetic road map for histone lysine methylation; *J Cell Sci.* (2003), 116(Pt 11):2117-24.
179. **Lahue** R.S., Au K.G., Modrich P.; DNA mismatch correction in a defined system; *Science* (1989), 245(4914):160-4.
180. **Lamond** A.I., **Earnshaw** W.C.; Structure and function in the nucleus; *Science* (1998), 280:547-52.
181. **Lechner** M.S., Schultz D.C., Negorev D., Maul G.G., Rauscher F.J. 3rd; The mammalian heterochromatin protein 1 binds diverse nuclear proteins through a common motif that targets the chromoshadow domain; *Biochem Biophys Res Commun.* (2005), 331(4):929-37.
182. **Le Page** F., Klungland A., Barnes D.E., Sarasin A., Boiteux S.; Transcription coupled repair of 8-oxoguanine in murine cells: the ogg1 protein is required for repair in nontranscribed sequences but not in transcribed sequences; *Proc Natl Acad Sci USA* (2000), 97(15):8397-402.
183. **Lee** J.H., **Paull** T.T.; Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex; *Science* (2004), 304:93-6.
184. **Lee** J.H., **Paull** T.T.; ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex; *Science* (2005), 308:551-4.
185. **Lehnertz** B., Ueda Y., Derijck A.A., Braunschweig U., Perez-Burgos L., Kubicek S., Chen T., Li E., Jenuwein T., Peters A.H.; Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin; *Curr Biol.* (2003), 13(14):1192-200.
186. **Lehninger** A.; Biochemia. Molekularne podstawy struktury i funkcji komórki; Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa (1979).
187. **Leonhardt** H., Page A.W., Weier H.U., Bestor T.H.; A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei; *Cell* (1992), 71(5):865-73.
188. **Leonhardt** H., Rahn H.P., Cardoso M.C.; Functional links between nuclear structure, gene expression, DNA replication, and methylation; *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* (1999), 9(3-4):345-51.
189. **Leonhardt** H., Rahn H.P., Weinzierl P., Sporbert A., Cremer T., Zink D., Cardoso M.C.; Dynamics of DNA replication factories in living cells; *J Cell Biol.* (2000), 149(2):271-80.
190. **Lever** M.A., Th'ng J.P., Sun X., Hendzel M.J.; Rapid exchange of histone H1.1 on chromatin in living human cells; *Nature* (2000), 408(6814):873-6.

191. **Lewis** J.D., Meehan R.R., Henzel W.J., Maurer-Fogy I., Jeppesen P., Klein F., Bird A.; Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA; *Cell* (1992), 69(6):905-14.
192. **Li** E., Bestor T.H., Jaenisch R.; Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality; *Cell* (1992), 69(6):915-26.
193. **Li** Y., Kirschmann D.A., Wallrath L.L.; Does heterochromatin protein 1 always follow code?; *Proc Natl Acad Sci USA* (2002), 99 Suppl. 4:16462-9.
194. **Li** J., Wang Q.E., Zhu Q., El-Mahdy M.A., Wani G., Praetorius-Ibba M., Wani A.A.; DNA damage binding protein component DDB1 participates in nucleotide excision repair through DDB2 DNA-binding and cullin 4A ubiquitin ligase activity; *Cancer Res.* (2006), 66(17):8590-7.
195. **Li** H.H., Aubrecht J., Fornace A.J. Jr; Toxicogenomics: overview and potential applications for the study of non-covalent DNA interacting chemicals; *Mutat Res.* (2007), 623(1-2):98-108.
196. **Lieber** M.R., Ma Y., Pannicke U., Schwarz K.; Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining; *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2003), 4(9):712-20.
197. **Lindahl** T., **Wood** R.D.; Quality control by DNA repair; *Science* (1999), 286(5446):1897-905.
198. **Linger** J.G., **Tyler** J.K.; Chromatin disassembly and reassembly during DNA repair; *Mutat Res.* (2007), 618(1-2):52-64.
199. **Lippincott-Schwartz** J., Altan-Bonnet N., Patterson G.H.; Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells; *Nat Cell Biol.* (2003), Sept;Suppl:S7-14.
200. **Lisby** M., Mortensen U.H., Rothstein R.; Colocalization of multiple DNA double-strand breaks at a single Rad52 repair centre; *Nat Cell Biol.* (2003), 5(6):572-7.
201. **Lisby** M., Barlow J.H., Burgess R.C., Rothstein R.; Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins; *Cell* (2004), 118(6):699-713.
202. **Lomberk** G., Wallrath L.L., Urruita R.; The Heterochromatin Protein I family, *Genome Biol.* (2006), 7(7):228.
203. **Lu** B.Y., Emtage P.C., Duyf B.J., Hilliker A.J., Eissenberg J.C.; Heterochromatin protein 1 is required for the normal expression of two heterochromatin genes in *Drosophila*; *Genetics* (2000), 155:699-708.
204. **Luger** K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J.; Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution; *Nature* (1997), 389(6648):251-60.
205. **Luijsterburg** M.S., Goedhart J., Moser J., Kool H., Geverts B., Houtsmuller A.B., Mullenders L.H., Vermeulen W., van Driel R.; Dynamic in vivo interaction of DDB2 E3 ubiquitin ligase with UV-damaged DNA is independent of damage-recognition protein XPC; *J Cell Sci.* (2007), 120:2706-16.
206. **Luijsterburg** M.S., Dinant C., Lans H., Stap J., Wiernasz E., Lagerwerf S., Warmerdam D.O., Lindh M., Brink M.C., Dobrucki J.W., Aten J., Fouteri M.I., Jansen G., Dantuma N.P., Vermeulen W., Mullenders L.H.F., Houtsmuller A.B., Verschure P.J., van Driel R.; Heterochromatin protein 1 is recruited to various types of DNA damage; *J Cell Biol.* (2009), 185(4): 577-86.
207. **Lukas** C., Falck J., Bartkova J., Bartek J., Lukas J.; Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage; *Nat Cell Biol.* (2003), 5(3):255-60.

208. **Lukas C.**, Bartek J., Lukas J.; Imaging of protein movement induced by chromosomal breakage: tiny 'local' lesions pose great 'global' challenges; *Chromosoma* (2005), 114(3):146-54.
209. **Lukas J.**, **Bartek J.**; DNA damage: a histone-code mediator leaves the stage; *Nat Struct Mol Biol.* (2008), 15(5):430-2.
210. **Lund A.H.**, **van Lohuizen M.**; Epigenetics and cancer; *Genes Dev.* (2004), 18(19):2315-35.
211. **Maga G.**, **Hubscher U.**; Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners; *J Cell Sci.* (2003), 116(Pt 15):3051-60.
212. **Maison C.**, **Almouzni G.**; HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance; *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2004), 5(4):296-304.
213. **Mari P.O.**, Florea B.I., Persengiev S.P., Verkaik N.S., Bruggenwirth H.T., Modesti M., Giglia-Mari G., Bezstarosti K., Demmers J.A., Luijckx T.M., Houtsmuller A.B., van Gent D.C.; Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4; *Proc Natl Acad Sci USA* (2006), 103:18597-602.
214. **Marinus M.G.**; Adenine methylation of Okazaki fragments in *Escherichia coli*; *J Bacteriol.* (1976), 128(3):853-4.
215. **Martinez E.**, Palhan V.B., Tjernberg A., Lyman E.S., Gamper A.M., Kundu T.K., Chait B.T., Roeder R.G.; Human STAGA complex is a chromatin-acetylating transcription coactivator that interacts with pre-mRNA splicing and DNA damage-binding factors in vivo; *Mol Cell Biol.* (2001), 21:6782-95.
216. **Martinez G.R.**, Loureiro A.P.M., Marques S.A., Miyamoto S., Yamaguchi L.F., Onuki J., Almeida E.A., Garcia C.C.M., Barbosa L.F., Medeiros M.H.G., Mascio P.D.; Oxidative and alkylating damage in DNA; *Mutat Res.* (2003), 544:115-27.
217. **Mateescu B.**, Bourachot B., Rachez C., Ogryzko V., Muchardt C.; Regulation of an inducible promoter by an HP1beta-HP1gamma switch; *EMBO Rep.* (2008), 9(3):267-72.
218. **Mateos-Langerak J.**, Brink M.C., Luijsterburg M.S., van der Kraan I., van Driel R., Verschure P.J.; Pericentromeric heterochromatin domains are maintained without accumulation of HP1; *Mol Biol Cell.* (2007), 18:1464-71.
219. **Matsuzaki Y.**, Adachi N., Koyama H.; Vertebrate cells lacking FEN-1 endonuclease are viable but hypersensitive to methylating agents and H₂O₂; *Nucleic Acids Res.* (2002), 30(14):3273-7.
220. **Maul G.G.**, Jensen D.E., Ishov A.M., Herlyn M., Rauscher F.J.; Nuclear redistribution of BRCA1 during viral infection; *Cell Growth Differ.* (1998), 9:743-55.
221. **McGowan C.H.**, **Russell P.**; The DNA damage response: sensing and signaling; *Curr Opin Cell Biol.* (2004), 16(6):629-33.
222. **Mellon I.**, Spivak G., Hanawalt P.C.; Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene; *Cell* (1987), 51:241-9.
223. **Melo J.A.**, Cohen J., Toczyski D.P.; Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo; *Genes Dev.* (2001), 15(21):2809-21.
224. **Melo J.**, **Toczyski D.**; A unified view of the DNA-damage checkpoint; *Curr Opin Cell Biol.* (2002), 14(2):237-45.
225. **Mikhailov A.**, Cole R.W., Rieder C.L.; DNA damage during mitosis in human cells delays the metaphase/anaphase transition via the spindle-assembly checkpoint; *Curr Biol.* (2002), 12(21):1797-806.
226. **Mimori T.**, **Hardin J.A.**; Mechanism of interaction between Ku protein and DNA; *J Biol Chem.* (1986), 261(22):10375-9.

227. **Minc E.**, Allory Y., Worman H.J., Courvalin J.C., Buendia B.; Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells; *Chromosoma* (1999), 108:220–34.
228. **Misteli T.**, Gunjan A., Hock R., Bustin M., Brown D.T.; Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells; *Nature* (2000), 408(6814):877–81.
229. **Moné M.J.**, Volker M., Nikaido O., Mullenders L.H., van Zeeland A.A., Verschure P.J., Manders E.M., van Driel R.; Local UV-induced DNA damage in cell nuclei results in local transcription inhibition; *EMBO Rep.* (2001), 2:1013–7.
230. **Moné M.J.**, Bernas T., Dinant C., Goedvree F.A., Manders E.M., Volker M., Houtsmuller A.B., Hoeijmakers J.H., Vermeulen W., van Driel R.; In vivo dynamics of chromatin-associated complex formation in mammalian nucleotide excision repair; *Proc Natl Acad Sci USA* (2004), 101(45):15933–7.
231. **Morgan T.L.**, Yang D.J., Fry D.G., Hurlin P.J., Kohler S.K., Maher V.M., McCormick J.J.; Characteristics of an infinite life span diploid human fibroblast cell strain and a near-diploid strain arising from a clone of cells expressing a transfected v-myc oncogene; *Exp Cell Res.* (1991), 197(1):125–36.
232. **Mortusewicz O.**, Schermelleh L., Walter J., Cardoso M.C., Leonhardt H.; Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites; *Proc Natl Acad Sci USA* (2005), 102(25):8905–9.
233. **Mortusewicz O.**, Rothbauer U., Cardoso M.C., Leonhardt H.; Differential recruitment of DNA Ligase I and III to DNA repair sites; *Nucleic Acids Res.* (2006), 34(12):3523–32.
234. **Mortusewicz O.**, **Leonhardt H.**; XRCC1 and PCNA are loading platforms with distinct kinetic properties and different capacities to respond to multiple DNA lesions; *BMC Mol Biol.* (2007), 8:81–8.
235. **Moser J.**, Volker M., Kool H., Alekseev S., Vrieling H., Yasui A., van Zeeland A.A., Mullenders L.H.; The UV-damaged DNA binding protein mediates efficient targeting of the nucleotide excision repair complex to UV-induced photo lesions; *DNA Repair (Amst).* (2005), 4(5):571–82.
236. **Moshous D.**, Callebaut I., de Chasseval R., Corneo B., Cavazzana-Calvo M., Le Deist F., Tezcan I., Sanal O., Bertrand Y., Philippe N., Fischer A., de Villartay J.P.; Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency; *Cell* (2001), 105(2):177–86.
237. **Moustacchi E.**; DNA damage and repair: consequences on dose-responses; *Mutat Res.* (2000), 464(1):35–40.
238. **Muchardt C.**, Guilleme M., Seeler J.S., Trouche D., Dejean A., Yaniv M.; Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1alpha; *EMBO Rep.* (2002), 3:975–81.
239. **Murray R.K.**, Granner D.K., Mayes P.A., Rodwell V.W.; Biochemia Harpera; Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa (2005).
240. **Nan X.**, Campoy F.J., Bird A.; MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin; *Cell* (1997), 88(4):471–81.
241. **Nan X.**, Ng H.H., Johnson C.A., Laherty C.D., Turner B.M., Eisenman R.N., Bird A.; Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex; *Nature* (1998), 393(6683):386–9.
242. **Napolitano M.A.**, Cipollaro M., Cascino A., Melone M.A., Giordano A., Galderisi U.; Brg1 chromatin remodeling factor is involved in cell growth arrest, apoptosis and senescence of rat mesenchymal stem cells; *J Cell Sci.* (2007), 120(Pt 16):2904–11.

243. **Nelms** B.E., Mackie T.R., MacKay J.F., Hill C.K., DeLuca P.M. Jr, Lindstrom M.J., Deasy J., Gould M.N.; A comparison of cytotoxicity after whole- or partial-cell irradiation with synchrotron-produced ultrasoft X rays; *Radiat Res.* (1998), 150(5):521-7.
244. **Nichols** A.F., Itoh T., Graham J.A., Liu W., Yamaizumi M., Linn S.; Human damage-specific DNA-binding protein p48. Characterization of XPE mutations and regulation following UV irradiation; *J Biol Chem.* (2000), 275(28):21422-8.
245. **Nielsen** A.L., Ortiz J.A., You J., Oulad-Abdelghani M., Khechumian R., Gansmuller A., Chambon P., Losson R.; Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family; *EMBO J.* (1999), 18:6385–95.
246. **Nielsen** A.L., Sanchez C., Ichinose H., Cerviño M., Lerouge T., Chambon P., Losson R.; Selective interaction between the chromatin-remodeling factor BRG1 and the heterochromatin-associated protein HP1alpha; *EMBO J.* (2002), 21:5797-806.
247. **Nikitina** T., Shi X., Ghosh R.P., Horowitz-Scherer R.A., Hansen J.C., Woodcock C.L.; Multiple modes of interaction between the methylated DNA binding protein MeCP2 and chromatin; *Mol Cell Biol.* (2007), 27(3):864-77.
248. **Norwood** L.E., Moss T.J., Margaryan N.V., Cook S.L., Wright L., Seftor E.A., Hendrix M.J., Kirschmann D.A., Wallrath L.L.; A requirement for dimerization of HP1Hsalpha in suppression of breast cancer invasion; *J Biol Chem.* (2006), 281(27):18668-76.
249. **Nye** A.C., Rajendran R.R., Stenoien D.L., Mancini M.A., Katzenellenbogen B.S., Belmont A.S.; Alteration of large-scale chromatin structure by estrogen receptor; *Mol Cell Biol.* (2002), 22(10):3437-49.
250. **O'Driscoll** M., Ruiz-Perez V.L., Woods C.G., Jeggo P.A., Goodship J.A.; A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome; *Nat Genet.* (2003), 33:497-501.
251. **Ogawa** H., Ishiguro K., Gaubatz S., Livingston D.M., Nakatani Y.; A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells; *Science* (2002), 296:1132–6.
252. **Okamoto** I., Otte A.P., Allis C.D., Reinberg D., Heard E.; Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development; *Science* (2004), 303(5658):644-9.
253. **Osley** M.A., Tsukuda T., Nickoloff J.A.; ATP-dependent chromatin remodeling factors and DNA damage repair; *Mutat Res.* (2007), 618(1-2):65-80.
254. **Paik** W.K., Kim S.; Protein methylation; *Science* (1971), 174(5):114-9.
255. **Pak** D.T., Pflumm M., Chesnokov I., Huang D.W., Kellum R., Marr J., Romanowski P., Botchan M.R.; Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes; *Cell* (1997), 91:311–23.
256. **Pal-Bhadra** M., Leibovitch B.A., Gandhi S.G., Rao M., Bhadura U., Birchler J.A., Elgin S.C.; Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery; *Science* (2004); 303:669-72.
257. **Park** C.J., **Choi**, B.S.; The protein shuffle. Sequential interactions among components of the human nucleotide excision repair pathway; *FEBS J.* (2006), 273:1600-8.
258. **Paull** T.T., Rogakou E.P., Yamazaki V., Kirchgessner C.U., Gellert M., Bonner W.M.; A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage; *Curr Biol.* (2000), 10(15):886-95.

259. **Perrini B.**, Piacentini L., Fanti L., Altieri F., Chichiarelli S., Berloco M., Turano C., Ferraro A., Pimpinelli S.; HP1 controls telomere capping, telomere elongation, and telomere silencing by two different mechanisms in *Drosophila*; *Mol Cell*. (2004), 15:467–76.
260. **Peters A.H.**, O'Carroll D., Scherthan H., Mechtler K., Sauer S., Schöfer C., Weipoltshammer K., Pagani M., Lachner M., Kohlmaier A., Opravil S., Doyle M., Sibilia M., Jenuwein T.; Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability; *Cell* (2001), 107:323–37.
261. **Peters A.H.**, Kubicek S., Mechtler K., O'Sullivan R.J., Derijck A.A., Perez-Burgos L., Kohlmaier A., Opravil S., Tachibana M., Shinkai Y., Martens J.H., Jenuwein T.; Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin; *Mol Cell*. (2003), 12(6):1577–89.
262. **Peterson C.L.**, Côté J.; Cellular machineries for chromosomal DNA repair; *Genes Dev*. (2004), 18(6):602–16.
263. **Peterson C.L.**, Laniel M.A.; Histones and histone modifications; *Curr Biol*. (2004), 14(14):R546–51.
264. **Phair R.D.**, Scaffidi P., Elbi C., Vecerova J., Dey A., Ozato K., Brown D.T., Hager G., Bustin M., Misteli T.; Global nature of dynamic protein-chromatin interactions in vivo: three-dimensional genome scanning and dynamic interaction networks of chromatin proteins; *Mol Cell Biol*. (2004), 24:6393–402.
265. **Plath K.**, Fang J., Mlynarczyk-Evans S.K., Cao R., Worringer K.A., Wang H., de la Cruz C.C., Otte A.P., Panning B., Zhang Y.; Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation; *Science* (2003), 300(5616):131–5.
266. **Polioudaki H.**, Kourmouli N., Drosou V., Bakou A., Theodoropoulos P.A., Singh P.B., Giannakourous T., Georgatos S.D.; Histones H3/H4 form a tight complex with the inner nuclear membrane protein LBR and heterochromatin protein 1; *EMBO Rep*. (2001), 2:920–5.
267. **Polo S.E.**, Roche D., Almouzni G.; New histone incorporation marks sites of UV repair in human cells; *Cell* (2006), 127:481–93.
268. **Pombo A.**, Jones E., Iborra F.J., Kimura H., Sugaya K., Cook P.R., Jackson D.A.; Specialized transcription factories within mammalian nuclei; *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. (2000), 10:21–9.
269. **Pradhan S.**, Esteve P.O.; Mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases and their expression; *Clin Immunol*. (2003), 109(1):6–16.
270. **Quivy J.P.**, Roche D., Kirschner D., Tagami H., Nakatani Y., Almouzni G.; A CAF-1 dependent pool of HP1 during heterochromatin duplication; *EMBO J*. (2004), 23(17):3516–26.
271. **Ramchandani S.**, Bhattacharya S.K., Cervoni N., Szyf M.; DNA methylation is a reversible biological signal; *Proc Natl Acad Sci USA* (1999), 96(11): 6107–12.
272. **Rap A.**, Zarebski M., Wiernasz E., Verschure P., van Driel R., Cook P.R., Dobrucki J.W.; The recruitment of HP1 to sites of photo-oxidative damage: a role for HP1 in BER or the repair of epigenetic information?; (2009) - praca w przygotowaniu.
273. **Rapić-Otrin V.**, McLenigan M.P., Bisi D.C., Gonzalez M., Levine A.S.; Sequential binding of UV DNA damage binding factor and degradation of the p48 subunit as early events after UV irradiation; *Nucleic Acids Res*. (2002), 30(11):2588–98.
274. **Rapić-Otrin V.**, Navazza V., Nardo T., Botta E., McLenigan M., Bisi D.C., Levine A.S., Stefanini M.; True XP group E patients have a defective UV-damaged DNA binding protein complex and mutations in DDB2 which reveal the functional domains of its p48 product; *Hum Mol Genet*. (2003), 12(13):1507–22.

275. **Ratner** J.N., Balasubramanian B., Corden J., Warren S.L., Bregman D.B.; Ultraviolet radiation-induced ubiquitination and proteasomal degradation of the large subunit of RNA polymerase II. Implications for transcription-coupled DNA repair; *J Biol Chem.* (1998), 273:5184-9.
276. **Rhee** I., Jair K.W., Yen R.W., Lengauer C., Herman J.G., Kinzler K.W., Vogelstein B., Baylin S.B., Schuebel K.E.; CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1; *Nature* (2000), 404:1003-7.
277. **Rice** J.C., Briggs S.D., Ueberheide B., Barber C.M., Shabanowitz J., Hunt D.F., Shinkai Y., Allis C.D.; Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains; *Mol Cell.* (2003), 12(6):1591-8.
278. **Robinett** C.C., Straight A., Li G., Willhelm C., Sudlow G., Murray A., Belmont A.S.; In vivo localization of DNA sequences and visualization of large-scale chromatin organization using lac operator/repressor recognition; *J Cell Biol.* (1996), 135:1685-700.
279. **Rogakou** E.P., Pilch D.R., Orr A.H., Ivanova V.S., Bonner W.M.; DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139; *J Biol Chem.* (1998), 273(10):5858-68.
280. **Rogakou** E.P., Boon C., Redon C., Bonner W.M.; Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo; *J Cell Biol.* (1999), 146(5):905-16.
281. **Ronot** X., **Usson** Y.; Imaging of nucleic acids and quantification in photonic microscopy; *Methods in Visualization Vol.5* CRC Press (2001).
282. **Rooney** S., Sekiguchi J., Zhu C., Cheng H.L., Manis J., Whitlow S., DeVido J., Foy D., Chaudhuri J., Lombard D., Alt F.W.; Leaky Scid phenotype associated with defective V(D)J coding end processing in Artemisdeficient mice; *Mol Cell.* (2002), 10(6):1379-90.
283. **Rubbi** C.P., **Milner** J.; p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage; *EMBO J.* (2003), 22:975-86.
284. **Ryan** R.F., Schultz D.C., Ayyanathan K., Singh P.B., Friedman J.R., Fredericks W.J., Rauscher F.J. 3rd; KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Kruppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing; *Mol Cell Biol.* (1999), 19:4366-78.
285. **Saenger** W.; Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg Tokyo (1988), 132-40.
286. **Sambrook** J., **Russell** D.W.; Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001).
287. **Sancar** A.; Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors; *Chem Rev.* (2003), 103(6):2203-37.
288. **Schermelleh** L., Haemmer A., Spada F., Rösing N., Meilinger D., Rothbauer U., Cardoso M.C., Leonhardt H.; Dynamics of Dnmt1 interaction with the replication machinery and its role in postreplicative maintenance of DNA methylation; *Nucleic Acids Res.* (2007), 35(13):4301-12.
289. **Schmiedeberg** L., Weissbart K., Diekmann S., Meyer Zu Hoerste G., Hemmerich P.; High- and low-mobility populations of HP1 in heterochromatin of mammalian cells; *Mol Biol Cell.* (2004), 15:2819-33.
290. **Schott** S., Coustham V., Simonet T., Bedet C., Palladino F.; Unique and redundant functions of *C. elegans* HP1 proteins in post-embryonic development; *Dev Biol.* (2006), 298:176-87.

291. **Schotta** G., Ebert A., Krauss V., Fischer A., Hoffmann J., Rea S., Jenuwein T., Dorn R., Reuter G.; Central role of Drosophila SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing; *EMBO J.* (2002), 21(5):1121-31.
292. **Schotta** G., Lachner M., Sarma K., Ebert A., Sengupta R., Reuter G., Reinberg D., Jenuwein T.; A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin; *Genes Dev.* (2004), 18:1251-62.
293. **Schotta** G., Sengupta R., Kubicek S., Malin S., Kauer M., Callén E., Celeste A., Pagni M., Opravil S., De La Rosa-Velazquez I.A., Espejo A., Bedford M.T., Nussenzweig A., Busslinger M., Jenuwein T.; A chromatin-wide transition to H4K20 monomethylation impairs genome integrity and programmed DNA rearrangements in the mouse; *Genes Dev.* (2008), 22(15):2048-61.
294. **Schultz** D.C., Friedman J.R., Rauscher F.J.^{3rd}; Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2alpha subunit of NuRD; *Genes Dev.* (2001), 15:428-43.
295. **Shaner** N.C., Campbell R.E., Steinbach P.A., Giepmans B.N., Palmer A.E., Tsien R.Y.; Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein; *Nat Biotechnol.* (2004), 22(12):1567-72.
296. **Shen** M.R., Zdzienicka M.Z., Mohrenweiser H., Thompson L.H., Thelen M.P.; Mutations in hamster single-strand break repair gene XRCC1 causing defective DNA repair; *Nucleic Acids Res.* (1998), 26(4):1032-7.
297. **Sheval** E.V., Prusov A.N., Kireev I.I., Fais D., Polyakov V.Y.; Organization of higher-level chromatin structures (chromomere, chromonema and chromatin block) examined using visible light-induced chromatin photo-stabilization; *Cell Biol Int.* (2002), 26:579-91.
298. **Sheval** E.V., Kireev I.I., Polyakov V.Y.; Stabilization of macromolecular chromatin complexes in mitotic chromosomes by light irradiation in the presence of ethidium bromide; *Cell Biol Int.* (2004), 28(12):835-43.
299. **Shiloh** Y.; ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity; *Nat Rev Cancer.* (2003), 3(3):155-68.
300. **Shimada** M., Niida H., Zineldeen D.H., Tagami H., Tanaka M., Saito H., Nakanishi M.; Chk1 is a histone H3 threonine 11 kinase that regulates DNA damage-induced transcriptional repression; *Cell* (2008), 132:221-32.
301. **Shivji** K.K., Kenny M.K., Wood R.D.; Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair; *Cell* (1992), 69(2):367-74.
302. **Silva** J., Mak W., Zvetkova I., Appanah R., Nesterova T.B., Webster Z., Peters A.H., Jenuwein T., Otte A.P., Brockdorff N.; Establishment of histone h3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes; *Dev Cell.* (2003), 4(4):481-95.
303. **Sims** J.K., Houston S.I., Magazinnik T., Rice J.C.; A trans-tail histone code defined by monomethylated H4 Lys-20 and H3 Lys-9 demarcates distinct regions of silent chromatin; *J Biol Chem.* (2006), 281(18):12760-6.
304. **Singh** P.B., **Georgatos** S.D.; HP1: facts, open questions, and speculation; *J Struct Biol.* (2002), 140(1-3):10-6.
305. **Singh** M., Popowicz G.M., Krajewski M., Holak T.A.; Structural ramification for acetyl-lysine recognition by the bromodomain of human BRG1 protein, a central ATPase of the SWI/SNF remodeling complex; *Chembiochem.* (2007), 8(11):1308-16.

306. **Slupphaug** G., Kavli B., Krokan H.E.; The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage; *Mutat Res.* (2003), 531(1-2):231-51.
307. **Smallwood** A., Estève P.O., Pradhan S., Carey M.; Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing; *Genes Dev.* (2007), 21(10):1169-78.
308. **Smallwood** A., Black J.C., Tanese N., Pradhan S., Carey M.; HP1-mediated silencing targets Pol II coactivator complexes; *Nat Struct Mol Biol.* (2008), 15(3):318-20.
309. **Smerdon** M.J., **Libereman** M.W.; Nucleosome rearrangement in human chromatin during UV-induced DNA repair synthesis; *Proc Natl Acad Sci USA* (1978), 75(9):4238-41.
310. **Smerdon** M.J.; DNA repair and the role of chromatin structure; *Curr Opin Cell Biol.* (1991), 3:422-8.
311. **Smith** M.L., Kontny H.U., Zhan Q., Sreenath A., O'Connor P.M., Fornace A.J. Jr; Antisense GADD45 expression results in decreased DNA repair and sensitizes cells to u.v.-irradiation or cisplatin; *Oncogene* (1996), 13:2255-63.
312. **Smith** M.L., Ford J.M., Hollander M.C., Bortnick R.A., Amundson S.A., Seo Y.R., Deng C.X., Hanawalt P.C., Fornace A.J. Jr; p53-mediated DNA repair responses to UV radiation: studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes; *Mol Cell Biol.* (2000), 20:3705-14.
313. **Smits** V.A., Reaper P.M., Jackson S.P.; Rapid PIKK-dependent release of Chk1 from chromatin promotes the DNA-damage checkpoint response; *Curr Biol.* (2006), 16:150-9.
314. **Smothers** J.F., **Henikoff** S.; The HP1 chromo shadow domain binds a consensus peptide pentamer; *Curr Biol.* (2000), 10:27-30.
315. **Solovjeva** L.V., Svetlova M.P., Chagin V.O., Tomilin N.V.; Inhibition of transcription at radiation-induced nuclear foci of phosphorylated histone H2AX in mammalian cells; *Chromosome Res.* (2007), 15:787-97.
316. **Somanathan** S., Suchyna T.M., Siegel A.J., Berezney R.; Targeting of PCNA to sites of DNA replication in the mammalian cell nucleus; *J Cell Biochem.* (2001), 81(1):56-67.
317. **Somasundaram** K.; Breast cancer gene 1 (BRCA1): role in cell cycle regulation and DNA repair - perhaps through transcription; *J Cell Biochem.* (2003), 88:1084-91.
318. **Song** K., Jung Y., Jung D., Lee I.; Human Ku70 interacts with heterochromatin protein 1a; *J Biol Chem.* (2001), 276, 11(16):8321-7.
319. **Sonoda** E., Hohegger H., Saberi A., Taniguchi Y., Takeda S.; Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair; *DNA Repair (Amst).* (2006), 5(9-10):1021-9.
320. **Sporbert** A., Gahl A., Ankerhold R., Leonhardt H., Cardoso M.C.; DNA polymerase clamp shows little turnover at established replication sites but sequential de novo assembly at adjacent origin clusters; *Mol Cell.* (2002), 10(6):1355-65.
321. **Sprague** B.L., **McNally** J.G.; FRAP analysis of binding: proper and fitting; *Trends Cell Biol.* (2005), 15(2):84-91.
322. **Stap** J., Krawczyk P.M., Van Oven C.H., Barendsen G.W., Essers J., Kanaar R., Aten J.A.; Induction of linear tracks of DNA double-strand breaks by alpha-particle irradiation of cells; *Nat Methods.* (2008), 5:261-6.
323. **Stergiou** L., Doukometzidis K., Sendoel A., Hengartner M.O.; The nucleotide excision repair pathway is required for UV-C-induced apoptosis in *Caenorhabditis elegans*; *Cell Death Differ.* (2007), 14(6):1129-38.

324. **Stewart** M.D., Li J., Wong J.; Relationship between histone H3 lysine 9 methylation, transcription repression, and heterochromatin protein 1 recruitment; *Mol Cell Biol.* (2005), 25:2525–38.
325. **Stockert** J.C.; Ethidium bromide fluorescence in living and fixed cells; *Naturwissenschaften* (1974), 61(8):363–4.
326. **Sugasawa** K., Ng J.M., Masutani C., Iwai S., van der Spek P.J., Eker A.P., Hanaoka F., Bootsma D., Hoeijmakers J.H.; Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair; *Mol Cell.* (1998), 2:223–32.
327. **Sun** F.L., Cuaycong M.H., Elgin S.C.; Long-range nucleosome ordering is associated with gene silencing in *Drosophila melanogaster* pericentric heterochromatin; *Mol Cell Biol.* (2001), 21:2867–79.
328. **Sunesen** M., Stevnsner T., Brosh R.M. Jr, Dianov G.L., Bohr V.A.; Global genome repair of 8-oxoG in hamster cells requires a functional CSB gene product; *Oncogene* (2002), 21(22):3571–8.
329. **Szewczyk** K.W.; Bilansowanie i kinetyka procesów biochemicznych; Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa (1993).
330. **Taddei** A., Maison C., Roche D., Almouzni G.; Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases.; *Nat Cell Biol.* (2001), 3:114–20.
331. **Takao** M., Abramic M., Moos M. Jr, Otrin V.R., Wootton J.C., McLenigan M., Levine A.S., Protic M.; A 127 kDa component of a UV-damaged DNA-binding complex, which is defective in some xeroderma pigmentosum group E patients, is homologous to a slime mold protein; *Nucleic Acids Res.* (1993), 21(17):4111–8.
332. **Takata** M., Sasaki M.S., Sonoda E., Morrison C., Hashimoto M., Utsumi H., Yamaguchi-Iwai Y., Shinohara A., Takeda S.; 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(18):5497–508.
333. **Talasz** H., Lindner H.H., Sarg B., Helliger W.; Histone H4-lysine 20 monomethylation is increased in promoter and coding regions of active genes and correlates with hyperacetylation; *J Biol Chem.* (2005), 280(46):38814–22.
334. **Tang** J.Y., Hwang B.J., Ford J.M., Hanawalt P.C., Chu G.; Xeroderma pigmentosum p48 gene enhances global genomic repair and suppresses UV-induced mutagenesis; *Mol Cell.* (2000), 5(4):737–44.
335. **Tashiro** S., Walter J., Shinohara A., Kamada N., Cremer T.; Rad51 accumulation at sites of DNA damage and in postreplicative chromatin; *J Cell Biol.* (2000), 150(2):283–91.
336. **Thiriet** C., **Hayes** J.J.; Chromatin in need of a fix: phosphorylation of H2AX connects chromatin to DNA repair; *Mol Cell.* (2005), 18(6):617–22.
337. **Thiru** A., Nietlispach D., Mott H.R., Okuwaki M., Lyon D., Nielsen P.R., Hirshberg M., Verreault A., Murzina N.V., Laue E.D.; Structural basis of HP1/PXVXL motif peptide interactions and HP1 localisation to heterochromatin; *EMBO J.* (2004), 23:489–99.
338. **Tsukada** Y., Fang J., Erdjument-Bromage H., Warren M.E., Borchers C.H., Tempst P., Zhang Y.; Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins; *Nature* (2006), 439:811–6.
339. **Tumbar** T., Sudlow G., Belmont A.S.; Large-scale chromatin unfolding and remodeling induced by VP16 acidic activation domain; *J Cell Biol.* (1999), 145(7):1341–54.

340. **Turner** B.M.; Chromatin and gene regulation. Mechanisms in Epigenetics; Blackwell Science, Oxford (2001).
341. **Ura** K., Araki M., Saeki H., Masutani C., Ito T., Iwai S., Mizukoshi T., Kaneda Y., Hanaoka F.; ATP-dependent chromatin remodeling facilitates nucleotide excision repair of UV-induced DNA lesions in synthetic dinucleosomes; *EMBO J.* (2001), 20:2004-14.
342. **van den Boom** V., Jaspers N.G., Vermeulen W.; When machines get stuck-obstructed RNA polymerase II: displacement, degradation or suicide; *Bioessays.* (2002), 24:780-4.
343. **van der Vlag** J., den Blaauwen J.L., Sewalt R.G., van Driel R., Otte A.P.; Transcriptional repression mediated by polycomb group proteins and other chromatin-associated repressors is selectively blocked by insulators; *J Biol Chem.* (2000), 275:697-704.
344. **van Dyck** E., Stasiak A.Z., Stasiak A., West S.C.; Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein; *Nature* (1999), 401(6751):403.
345. **van Gent** D.C., Hoeijmakers J.H., Kanaar R.; Chromosomal stability and the DNA double-strand break connection; *Nat Rev Genet.* (2001), 2(3):196-206.
346. **van Hoffen** A., Natarajan A.T., Mayne L.V., van Zeeland A.A., Mullenders L.H., Venema J.; Deficient repair of the transcribed strand of active genes in Cockayne's syndrome cells; *Nucleic Acids Res.* (1993), 21(25):5890-5.
347. **van Holde** K. E.; Chromatin; Springer, New York (1989).
348. **van Holde** K., **Zlatanova** J.; Chromatin higher order structure: chasing a mirage?; *J Biol Chem.* (1995), 270:8373-6.
349. **Vaquero** A., Loyola A., Reinberg D.; The constantly changing face of chromatin; *Sci Aging Knowledge Environ.* (2003), 9(14):RE4.
350. **Vassallo** M.F., **Tanese** N.; Isoform-specific interaction of HP1 with human TAFII130; *Proc Natl Acad Sci USA* (2002), 99:5919-24.
351. **Vaute** O., Nicolas E., Vandel L., Trouche D.; Functional and physical interaction between the histone methyl transferase Suv39H1 and histone deacetylases; *Nucleic Acids Res.* (2002), 30:475-81.
352. **Verschure** P.J., van der Kraan I., de Leeuw W., van der Vlag J., Carpenter A.E., Belmont A.S., van Driel R.; In vivo HP1 targeting causes large-scale chromatin condensation and enhanced histone lysine methylation; *Mol Cell Biol.* (2005), 25:4552-64.
353. **Vignali** M., Hassan A.H., Neely K.E., Workman J.L.; ATP-dependent chromatin-remodeling complexes; *Mol Cell Biol.* (2000), 20(6):1899-910.
354. **Vilenchik** M.M., **Knudson** A.G.; Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer; *Proc Natl Acad Sci USA* (2003), 100(22):12871-6.
355. **Volker** M., Moné M.J., Karmakar P., van Hoffen A., Schul W., Vermeulen W., Hoeijmakers J.H., van Driel R., van Zeeland A.A., Mullenders L.H.; Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo; *Mol Cell.* (2001), 8(1):213-24.
356. **Wallrath** L.L., **Elgin** S.C.; Position effect variegation in Drosophila is associated with an altered chromatin structure; *Genes Dev.* (1995), 9:1263-77.
357. **Walter** J., Cremer T., Miyagawa K., Tashiro S.; A new system for laser-UVA-microirradiation of living cells; *J Microsc.* (2003), 209(Pt 2):71-5.
358. **Wang** Z.G., Wu X.H., Friedberg E.C.; Nucleotide excision repair of DNA by human cell extracts is suppressed in reconstituted nucleosomes; *J Biol Chem.* (1991), 266:22472-8.

359. **Wang H.**, Zhai L., Xu J., Joo H.Y., Jackson S., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Xiong Y., Zhang Y.; Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage; *Mol Cell*. (2006a), 22:383-94.
360. **Wang J.**, Chin M.Y., Li G.; The novel tumor suppressor p33ING2 enhances nucleotide excision repair via inducement of histone H4 acetylation and chromatin relaxation; *Cancer Res*. (2006b), 66:1906-11.
361. **Ward I.M.**, **Chen J.**; Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress; *J Biol Chem*. (2001), 276(51):47759-62.
362. **Ward I.M.**, Minn K., Chen J.; UV-induced ataxia-telangiectasia-mutated and Rad3-related (ATR) activation requires replication stress; *J Biol Chem*. (2004), 279(11):9677-80.
363. **Watson J.D.**, Baker T.A., Bell S.P., Gann A., Levine M., Losick R.; Molecular Biology of the Gene, 5th ed.; Pearson Benjamin Cummings, San Francisco (2004).
364. **Weierich C.**, Brero A., Stein S., von Hase J., Cremer C., Cremer T., Solovei I.; Three-dimensional arrangements of centromeres and telomeres in nuclei of human and murine lymphocytes; *Chromosome Res*. (2003), 11:485–502.
365. **Weterings E.**, **Chen D.J.**; The endless tale of non-homologous end-joining; *Cell Res*. (2008), 1:114-24.
366. **Węgleński P.**; Genetyka molekularna; Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa (2006).
367. **Wiernasz E.**; Akumulacja białek HP1 w rejonach uszkodzeń DNA; Praca magisterska (2004); Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska.
368. **Williams E.S.**, Stap J., Essers J., Ponnaiya B., Luijsterburg M.S., Krawczyk P.M., Ullrich R.L., Aten J.A., Bailey S.M.; DNA double-strand breaks are not sufficient to initiate recruitment of TRF2; *Nat Genet*. (2007), 39:696-9.
369. **Wold M.S.**; Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism; *Annu Rev Biochem*. (1997), 66:61-92.
370. **Wolffe A.P.**, Jones P.L., Wade P.A.; DNA demethylation; *Proc Natl Acad Sci USA* (1999), 96(11):5894-46.
371. **Wood R.D.**, Mitchell M., Sgouros J., Lindahl T.; Human DNA repair genes; *Science* (2001), 291(5507):1284-9.
372. **Wu R.**, Terry A.V., Singh P.B., Gilbert D.M.; Differential subnuclear localization and replication timing of histone H3 lysine 9 methylation states; *Mol Biol Cell*. (2005), 16:2872–81.
373. **Wyman C.**, Ristic D., Kanaar R.; Homologous recombination-mediated double-strand break repair; *DNA Repair (Amst)*. (2004), 3(8-9):827-33.
374. **Wyman C.**, **Kanaar R.**; DNA double-strand break repair: all's well that ends well; *Annu Rev Genet*. (2006), 40:363-83.
375. **Yang W.**; Structure and function of mismatch repair proteins; *Mutat Res*. (2000), 460(3-4):245–56.
376. **Yang H.**, Pesavento J.J., Starnes T.W., Cryderman D.E., Wallrath L.L., Kelleher N.L., Mizzen C.A.; Preferential dimethylation of histone H4-lysine 20 by Suv4-20; *J Biol Chem*. (2008), 283(18):12085-92.
377. **Zarebski M.**, Wiernasz E., Dobrucki J.W.; Recruitment of heterochromatin protein 1 to DNA repair sites; *Cytometry A*. (2009), 75(7):619-25.
378. **Zarębski M.**; Zastosowanie metod lokalnego fotouczulanego uszkodzania składników komórki do badania mechanizmów naprawy błony komórkowej i chromatyny; Praca doktorska (2008); Uniwersytet Jagielloński, Kraków, Polska.

379. **Zdzienicka** M.Z., Tran Q., van der Schans G.P., Simons J.W.; Characterization of an X-ray-hypersensitive mutant of V79 Chinese hamster cells; *Mutat Res.* (1988), 194(3):239-49.
380. **Zhao** T., **Eissenberg** J.C.; Phosphorylation of heterochromatin protein 1 by casein kinase II is required for efficient heterochromatin binding in *Drosophila*; *J Biol Chem.* (1999), 274:15095–100.
381. **Zhao** H., Tanaka T., Halicka H.D., Traganos F., Zarebski M., Dobrucki J., Darzynkiewicz Z.; Cytometric assessment of DNA damage by exogenous and endogenous oxidants reports aging-related processes; *Cytometry A.* (2007), 71(11):905-14.
382. **Zhou** B.B., **Elledge** S.J.; The DNA damage response: putting checkpoints in perspective; *Nature* (2000), 408(6811):433-9.
383. **Zotter** A., Luijsterburg M.S., Warmerdam D.O., Ibrahim S., Nigg A., van Cappellen W.A., Hoeijmakers J.H., van Driel R., Vermeulen W., Houtsmuller A.B.; Recruitment of the nucleotide excision repair endonuclease XPG to sites of UV-induced DNA damage depends on functional TFIIH; *Mol Cell Biol.* (2006), 26:8868-79.
384. **Zou** L., Liu D., Elledge S.J.; Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes; *Proc Natl Acad Sci USA* (2003), 100:13827–32.
385. **Zou** L., **Elledge** S.J.; Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA–ssDNA complexes; *Science* (2003), 300:1542–8.