

CHD7 i 53BP1 jako czynniki regulujące odmienne ścieżki naprawcze prowadzące do religacji dwuniciowych pęknięć DNA

W ciągu doby komórki narażone są na wiele endogennych i egzogennych czynników indukujących dziesiątki tysięcy różnych rodzajów uszkodzeń DNA. Najbardziej niebezpiecznym typem uszkodzeń dla stabilności genomu są dwuniciowe pęknięcia DNA (*DNA double-strand breaks*, DSBs), które nienaprawione lub naprawione nieprecyzyjnie mogą prowadzić do poważnych zaburzeń funkcjonowania cyklu komórkowego i jego zatrzymania, mutacji genomu i kancerogenezy, a nawet do śmierci komórki. W toku ewolucji komórki wykształciły czułe i dokładne mechanizmy naprawcze, niemniej nie są one w pełni poznane. Naprawa uszkodzeń DNA angażuje szereg procesów, w których biorą udział enzymy i białka nieenzymatyczne. Najistotniejszymi zjawiskami niezbędnymi w mechanizmie naprawy DNA są lokalna relaksacja chromatyny, uruchomienie kaskady sygnalizacyjnej, rekrutacja białek naprawczych do miejsca uszkodzenia oraz religacja końców DNA.

W jaki sposób komórka naprawia dwuniciowe pęknięcia DNA?

Mechanizm wczesnej odpowiedzi komórki na dwuniciowe pęknięcie DNA oraz dobór ścieżki naprawczej jest zależny m.in. od fazy cyklu komórkowego, rozległości i typu uszkodzenia oraz dostępności chromatyny dla czynników naprawczych. W fazie G₁ cyklu komórkowego najczęściej uruchamiana jest naprawa na drodze łączenia niehomologicznych końców (ang. *non-homologous end joining*, NHEJ) lub alternatywnego łączenia końców (ang. *alternative end joining*, aEJ), natomiast w późnej fazie S i G₂ preferowaną drogą naprawy jest rekombinacja homologiczna (ang. *homologous recombination*, HR). Każda z tych ścieżek rekrutuje specyficzne czynniki białkowe będące markerami danego typu naprawy i wczesnej odpowiedzi komórki na obecność uszkodzenia DNA – dla NHEJ/aEJ są to białka 53BP1 i opisane w niniejszej pracy białko CHD7, które dotychczas nie było kojarzone z pełnieniem ważnej funkcji regulatorowej w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA; dla ścieżki HR typowe jest białko BRCA1.

Metody eksperymentalne w badaniach uszkodzeń genomu.

W niniejszej pracy Autorzy wykorzystywali szereg metod badawczych począwszy od produkcji mutantów linii ludzkich komórek prawidłowych i nowotworowych – całkowicie unieczynniono geny kodujące znane białka naprawcze oraz białka, które potencjalnie mogą brać udział w naprawie DNA. W tym celu wykorzystywano metodę CRISPR/Cas9, natomiast do obniżenia poziomu ekspresji tych genów wykorzystywano siRNA, z kolei do uzyskania komórek cechujących się podwyższoną ekspresją wybranych genów zastosowano techniki transfekcji wektorów plazmidowych. Dwuniciowe pęknięcia DNA indukowano promieniowaniem X lub laserami UV/VIS w obecności czynników fotouczulających, czy laserami wielofotonowymi. Detekcję badanych białek w jądrze komórkowym wykonywano przy użyciu technik barwienia immunofluorescencyjnego i obrazowania przy użyciu mikroskopii konfokalnej i superrozdzielczej, koimmunoprecypitacji, analizy Western blot i technik proteomicznych. Ponadto, Autorzy pracy wykorzystywali dostępne biblioteki genowe oraz tworzyli własne z izolowanego RNA, w celu identyfikacji genów istotnych w kontekście naprawy uszkodzeń DNA.

Fundamentalne spostrzeżenia i hipotezy wykazane w artykule

Najważniejszym odkryciem Autorów pracy jest nowa funkcja białka reorganizującego chromatynę – CHD7, którego mutacje związane są z zespołem CHARGE i jedynie w tym aspekcie białko to było opisywane wcześniej w literaturze. Autorzy wykazali, że CHD7 jest ważnym regulatorem naprawy DNA na drodze łączenia niehomologicznych końców. Jego rekrutacja do miejsca uszkodzenia zależy od PARP-1, a ogniska CHD7 kolokalizują ze znanymi białkami naprawczymi charakterystycznymi dla ścieżki NHEJ (LIG4, XRCC4, kompleks HDAC1/2, Ku70/Ku80). Ponadto badania Autorów wskazują na brak współwystępowania CHD7 i 53BP1 (białko dotychczas opisywanego w pracach naukowych jako marker NHEJ, ale również pełniącego ważną funkcję w „wyborze” ścieżki naprawczej), co w kontekście wyżej opisanych spostrzeżeń autorów podkreśla nadrzędną rolę CHD7 w regulacji NHEJ. Z kolei białko 53BP1 pozostaje istotnym graczem w maszynerii naprawczej na drodze alternatywnego łączenia końców oraz ograniczający resekcję końców uszkodzonego DNA oraz przypuszczalnie jako czynnik strukturalny i stabilizujący w procesie naprawy. Autorzy wykazali również specyficzność funkcji CHD7 w naprawie dwuniciowych pęknięć DNA na drodze NHEJ, gdyż nie znaleziono interakcji tego białka z markerami HR.

Dlaczego to jest ważne?

Biorąc pod uwagę, że naprawa na drodze NHEJ skutkuje dokładniejszym, niemal bezbłędnym odtworzeniem uszkodzonej sekwencji DNA w porównaniu do mniej precyzyjnej ścieżki naprawczej aEJ oraz znając białka charakterystyczne odróżniające od siebie te ścieżki naprawcze, można wykorzystać wyniki zawarte w niniejszej pracy do szacowania poziomu i stopnia dokładności procesów naprawy w popularnych w ostatniej dekadzie eksperymentach z wykorzystaniem inżynierii genetycznej CRISPR/Cas9, w której równowaga pomiędzy bezbłędną i podatną na błędy naprawą może być istotna w precyzyjnej edycji genomu. Dokładna znajomość mechanizmów naprawy DNA oraz identyfikacja czynników biorących udział w tych procesach może mieć znaczenie w projektowaniu terapii celowanych w konkretne typy nowotworów i schorzeń.

Źródło: Rother MB et al H. *CHD7 and 53BP1 regulate distinct pathways for the re-ligation of DNA double-strand breaks*. Nat Commun. 2020 Nov 13;11(1):5775. doi: 10.1038/s41467-020-19502-5.

Autor tekstu: Julita Wesółowska -

Środowiskowe Laboratorium Obrazowania in vivo i in vitro.

Oprawa graficzna: Bernadeta Pietrzak, Agnieszka Wnuk -
Pracownia Neurofarmakologii i Epigenetyki, Zakład Farmakologii

Grafika: Biorender.com