

# Wpływ słonecznego promieniowania ultrafioletowego (UV) na organizm człowieka. Część II: Mutagenne działanie promieniowania UV i naprawa uszkodzeń DNA\*

## The effect of solar ultraviolet radiation (UVR) on a human organism. Part II: UVR mutagenic activity and repair of DNA lesions

Tomasz Ferenc<sup>1</sup>, Marta Pacholczyk<sup>1</sup>, Jan Czernicki<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biologii i Genetyki Medycznej, Katedra Nauk Podstawowych, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

<sup>2</sup>Wydział Pedagogiki i Promocji Zdrowia – kierunek Fizjoterapia, Wyższa Szkoła Informatyki i Umiejętności w Łodzi

### STRESZCZENIE

Docierające do powierzchni Ziemi promieniowanie ultrafioletowe (UV) o długości fali 280-320 nm (UVB) i 320-400 nm (UVA) wywołuje uszkodzenia struktur komórkowych, w tym kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA). Mechanizmy uszkodzającego działania UVB i UVA na cząsteczki DNA są odmienne. Promieniowanie UVB indukuje powstawanie dwóch rodzajów fotoproduktów: cyklobutylowych dimerów pirymidynowych (CPDs) i fotoproduktów pirymidyno(6-4) pirymidynowych (6,4-PP). Spośród CPDs najbardziej mutagenne są dimery tymina-cytozyna (T-C) i cytozyna-cytozyna (C-C). Fotoprodukty: CPDs i 6,4-PP mogą prowadzić do powstawania wysoce specyficznych mutacji – tandemowej tranzycji CC→TT oraz tranzycji C→T. Promieniowanie UVA uszkadza DNA w sposób pośredni poprzez generowanie reaktywnych form tlenu (ROS). ROS indukują powstanie uszkodzeń oksydacyjnych w postaci modyfikacji zasad azotowych i pęknięć jednoniciowych DNA (DSBs), rzadziej wiązań krzyżowych DNA a DNA i DNA a białka chromatyny. Oksydacyjne uszkodzenia DNA prowadzą głównie do powstawania 7,8-dihydrokso-8-oksoguaniny (8-oxoG). Błędne parowanie 8-oxoG z adeniną (A) lub włączenie uszkodzonego nukleotydu zawierającego 8-oxoG do nowopowstającego łańcucha DNA prowadzi odpowiednio do transwersji (T→G) lub transwersji (C→A). Uszkodzenia DNA powstałe pod wpływem UVA są naprawiane w mechanizmie wycinania zasad azotowych (BER), a powstałe pod wpływem UVB w mechanizmie wycinania nukleotydów (NER). Brak lub niekompletna naprawa uszkodzeń DNA w komórkach skóry wywołanych przez UVB lub UVA może prowadzić do powstawania różnych typów mutacji, a w konsekwencji do rozwoju nowotworów skóry.

**Słowa kluczowe:** promieniowanie UV, dimery pirymidynowe, uszkodzenia oksydacyjne DNA, naprawy DNA

### SUMMARY

Ultraviolet radiation (UV) reaching the surface of the Earth of the wavelength 280-300 nm (UVB) and 320-400 nm (UVA) induces cellular structure damage including deoxyribonucleic acid (DNA). The damaging effects of UVB and UVA on DNA molecules are different. UVB radiation induces the development of two kinds of photoproducts: cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and the pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts (6-4 PPs). Among CPDs, thymine-cytosine (T-C) and cytosine-cytosine (C-C) dimers are most mutagenic. Photoproducts: CPDs and 6,4-PP can lead to the formation of highly specific mutations – tandem transition CC→TT and transition C→T. UVA radiation damages DNA in a direct way through the generation of reactive oxygen species (ROS). ROS induce oxidative damage in the form of nitric base modifications and DNA single strand breaks (DSBs), less frequently DNA-to-DNA and DNA-to-chromatin protein crosslinks. DNA oxidative damages lead mainly to the formation of 7,8-dihydroxy-8-oxoguanine (8-oxoG). Incorrect pairing of 8-oxoG with adenine (A) or inclusion of a damaged nucleotide containing 8-oxoG to a newly formed DNA chain leads respectively to T→G transversion or C→A transversion. UVA-induced DNA lesions are repaired in the mechanism of nitric base excision

\*Część I pracy opublikowana w Acta Balneologica, LVI, 1(135), 2014

repair (BER) and UVB-induced DNA lesions – in nucleotide excision repair mechanism (NER). The lack or incomplete repair of UVB or UVA-induced DNA lesions can lead to the formation of different types of mutations and in consequence to the development of skin carcinomas.

**Key words:** UV radiation, pyrimidine dimers, DNA oxidative damage, DNA repair

Acta Balneol., TOM LVI, Nr 2 (136)/2014, s. 82-87

## WPROWADZENIE

Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA) należy do najważniejszych cząsteczek subkomórkowych, które absorbują fotony promieniowania ultrafioletowego (UV). DNA składa się z dwóch długich łańcuchów polinukleotydowych o strukturze prawoskrętnej helisy. Każdy z łańcuchów zbudowany jest z czterech rodzajów nukleotydów, a każdy nukleotyd składa się z trzech elementów: cukru 2'-deoksyrybozy, grupy fosforanowej, składającej się z jednej, dwóch lub trzech reszt fosforanowych oraz jednej z czterech zasad azotowych – dwupierścieniowej puryny: adeniny (A) lub guaniny (G) i jednopierścieniowej pirymidyny: cytozyny (C) lub tyminy (T). W nukleotydzie zasada azotowa jest połączona z resztą cukrową wiązaniem  $\beta$ -N-glikozydowym, a reszta fosforanowa związana jest z atomem węgla 5' reszty cukrowej. W łańcuchu polinukleotydowym DNA pojedyncze nukleotydy połączone są ze sobą kowalencyjnym wiązaniem 5'-3'-fosfodiesterowym. Dwa łańcuchy polinukleotydowe w cząsteczce DNA biegną antyrównolegle (5'→3' i 3'→5') i są połączone ze sobą wiązaniami wodorowym, które stabilizują podwójną helisę. Wiązania wodorowe tworzą się między zasadami należącymi do przeciwległych łańcuchów. Łączenie się zasad w pary zachodzi według reguły komplementarności, tj. adenina tworzy parę z tyminą (para A-T), a guanina tworzy parę z cytozyną (para G-C) [1, 2]. Czynniki mutagenne (genotoksyczne) oddziałują z DNA i zmieniają strukturę pojedynczych nukleotydów. Zmiany te, jeżeli nie zostaną prawidłowo naprawione, prowadzą do wystąpienia mutacji. Gdy uszkodzenie DNA jest utrwalone może być przekazywane komórkom potomnym. Mutacje mogą zachodzić na różnych poziomach; wyróżnia się mutacje genomowe (zwielokrotnienie haploidalnego zestawu chromosomów), chromosomowe (aberracje liczbowe i strukturalne) i genowe. Mutacje genowe to trwała zmiana sekwencji nukleotydowej krótkiego obszaru genomu – genu. W obrębie genu może dojść do delekcji lub insercji jednego lub więcej nukleotydów. Szczególnym rodzajem mutacji genowych są mutacje punktowe typu tranzykcji lub transwersji polegające na zamianie par zasad azotowych, np. C→T, A→G (tranzycja), A→C, T→G (transwersja) [1, 2].

## MECHANIZMY USZKADZAJĄCEGO DZIAŁANIA PROMIENIOWANIA UV NA DNA

Promieniowanie UV, zwłaszcza o krótkiej fali i wysokiej energii stanowi bezpośrednie zagrożenie dla stabilności cząsteczek biologicznych. Promieniowanie UV wywiera silne

działanie genotoksyczne na DNA komórki, co może prowadzić do jego uszkodzenia i wystąpienia mutacji genowych. Powstające fotouszkodzenia w materiale genetycznym komórek skóry mogą przyczyniać się do rozwoju nowotworów tego narządu [3].

Badania ostatnich lat wskazują, że ryzyko rozwoju nowotworów skóry jest uzależnione głównie od przewlekłej ekspozycji na promieniowanie UV z zakresu UVB. Istnieją również wyniki badań, dotyczące roli promieniowania UVA w kancerogenezie [3, 4]. Uszkodzenia DNA powstają na skutek reakcji fotochemicznej wywołanej UV. Typ uszkodzenia DNA zależy od długości fali UV, co wiąże się z ilością energii pochłoniętej przez pary zasad w łańcuchu DNA [3, 5]. Podział na promieniowanie UVA i UVB jest arbitralny i oba typy promieniowania stanowią część widma fal elektromagnetycznych o stopniowo zmieniających się właściwościach fotofizycznych, fotochemicznych i fotobiologicznych [5].

Działanie promieniowania UV polega na wzbudzeniu elektronów walencyjnych, co wywołuje reakcję fotochemiczną. W wyniku absorpcji energii promieniowania UV, dochodzi do zmiany struktury cząsteczki. Pod wpływem UV mogą powstawać także reaktywne formy tlenu – ROS (*reactive oxygen species* – ROS), które w sposób pośredni wywołują uszkodzenia struktur komórkowych. DNA jest szczególnie narażony na uszkadzające działania UV, w zakresie długości fali <315 nm [4].

Wykazano, że UVA i UVB uszkadzają komórki na drodze dwóch różnych mechanizmów [6]. Zagadnienia te będą omawiane w dalszej części pracy. Działanie promieniowania UV, a zwłaszcza UVB, prowadzi do mutacji w obrębie protoonkogenów regulujących różnicowanie i wzrost komórek. UV wywołuje również mutacje genów supresorowych (anty-onkogenów) hamujących transformację nowotworową, z których najistotniejszą rolę odgrywa gen supresorowy P53. Produkt tego genu – białko p53 jest regulatorem cyklu komórkowego i funkcjonuje jako „strażnik integralności genomu” [1, 4].

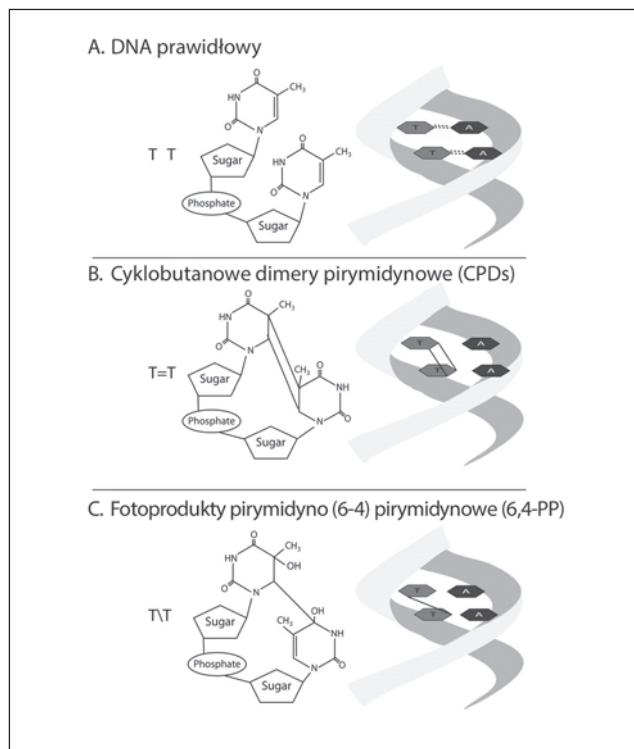
W wyniku uszkodzenia DNA komórki pod wpływem czynnika genotoksycznego, jakim jest promieniowanie UV, dochodzi do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1 przed wejściem w fazę S i uruchomienie enzymatycznych systemów naprawiających uszkodzenia DNA. W kontroli prawidłowości przebiegu cyklu komórkowego niezwykle istotną rolę odgrywa białko p53. W przypadku detekcji powstałego uszkodzenia DNA keratynocytów, po ekspozycji na promieniowanie UV, wzrasta poziom prawidłowego białka p53

w komórce. Dzięki temu cykl komórkowy zostaje zatrzymany w punkcie kontrolnym G1/S do czasu naprawy uszkodzeń w łańcuchu DNA. Jeżeli uszkodzenia DNA zostaną naprawione, cykl komórkowy jest kontynuowany. Jeżeli nie ma możliwości naprawy DNA, keratynocyty z uszkodzonym DNA kierowane są na szlak zaprogramowanej śmierci (apoptozy) [1, 7, 8]. Należy podkreślić, że mutacje indukowane UV mogą wystąpić także w genie *P53*, wówczas podziały komórkowe uszkodzonych keratynocytów ze zmutowanym genem *P53* nie ulegają zatrzymaniu w fazie G1. W tej sytuacji komórka rozpoczyna fazę S, w której ma miejsce replikacja uszkodzonego DNA. Obecność mutacji genu *P53* wykazano w stanach przednowotworowych skóry, a także w komórkach skóry nie ulegających apoptozie po ekspozycji na promieniowanie UV [1, 9, 10]. Białko p53 odgrywa również istotną rolę w procesie ściemnienia skóry pod wpływem UV. Po narażeniu na UV, prawidłowe białko p53 gromadzące się w komórce, w odpowiedzi na uszkodzenie DNA, nasila ekspresję genu proopiomelanokortyny (*POMC*) i genów kodujących cytokiny prozapalne. W wyniku cięcia proteolitycznego *POMC* powstaje m.in. hormon stymulujący melanocyty  $\alpha$ -MSH (*melanocyte stimulating hormone* – MSH), który działając za pośrednictwem receptora melanokortyny 1 (MC1R) pobudza biosyntezę melaniny, różnicowanie melanocytów oraz transport melanosomów do keratynocytów. Stąd powstawanie opalenizny stanowi reakcję obronną organizmu przed szkodliwym wpływem UV, a ponadto stanowi dowód na wystąpienie uszkodzeń DNA w komórkach skóry [10, 11]. Najnowsze doniesienia podkreślają, że ściemnienie skóry pod wpływem UV wskazuje na uszkodzenie DNA komórek skóry [10].

## PROMIENIOWANIE UVB

Promieniowanie UVB o długości fali w zakresie 280–320 (315) nm posiada o wiele większe właściwości genotoksyczne niż promieniowanie UVA [4, 6]. Genotoksyczne działanie promieniowania UVB polega głównie na bezpośrednim pochłanianiu energii tego promieniowania przez DNA. Natomiast promieniowanie o fali >320 nm (UVA) działa na DNA głównie za pośrednictwem ROS [1, 6].

Promieniowanie UVB indukuje dimeryzację sąsiadujących ze sobą zasad pirymidynowych, powodując powstanie cyklobutanowych dimerów pirymidynowych (CPDs – *cyclobutane pyrimidine dimers*). Najczęściej dimeryzacji ulegają dwie tyminy, inne kombinacje pirymidyn również tworzą dimery, w kolejności częstości powstawania są to: 5'-CT-3' > 5'-TC-3' > 5'-CC-3'. Podkreśla się, że 10-krotnie więcej CPDs powstaje przy długości fali 300 nm niż przy długości fali 280 nm [12]. Powstawanie dimerów puryn jest znacznie rzadsze. Powstają one między dwoma sąsiadującymi zasadami adeninowymi (A-A) lub między adeniną a tyminą (A-T). Znaczenie fotoproduktów purynowych jest niewielkie i zwykle jest pomijane w procesie mutagenyzy [13]. CPDs tworzą się w wyniku powstania wiązania kowalencyjnego między atomami węgla C5 i C6 sąsiednich zasad pirymidynowych w łańcuchu DNA. Dimeryzacja wywołana przez UVB z reguły powoduje delecję nukleotydu podczas kopiowania zmodyfikowanej nici. Inny rodzaj fotoproduktu, którego powstawanie jest



**Rycina 1.** Powstawanie cyklobutanowych dimerów pirymidynowych (CPDs) i fotoproduktów pirymidyno (6-4) pirymidynowych (6,4-PP).

Przedrukowano za zgodą Elsevier: *J. Autoimmun., Light, including ultrafiolet.*, 34, 2010; J247-J257; Maverakis E., Miyamura Y., Bowen M.P., Correa G., Ono Y., Goodarzi H., figure 5.

indukowane przez UVB, stanowi uszkodzenie określane jako fotoprodukt pirymidyno (6-4) pirymidynowy (6,4-PP – *pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts*), w którym atomy węgla w pozycjach 4 i 6 sąsiadujących ze sobą pirymidyn tworzą wiązanie kowalencyjne (ryc. 1). Najczęstszym tego rodzaju fotoproduktem jest dimer tymina-cytozyna [1, 5, 6]. Do mutacji indukowanych promieniowaniem UVB najczęściej dochodzi w regionie łańcucha DNA, w którym często występuje 5-metylocytozyna, są to tzw. miejsca gorące (*hot spots*) [14]. Należy zaznaczyć, że maksimum absorpcji dla DNA przypada na fale o długości 245–290 nm. Oznacza to, że w indukcji powstawania fotoproduktów w cząsteczce DNA najbardziej efektywnie (najsilniej) działa nie docierające do powierzchni Ziemi promieniowanie UVC [5]. Wykazano, że spośród CPDs najbardziej mutagenne są dimery tymina-cytozyna (T-C) i cytozyna-cytozyna (C-C). Ponadto są one mniej skutecznie naprawiane w porównaniu do 6,4-PP. Stąd CPDs są uważane za główny czynnik sprawczy powodujący mutacje w komórkach ssaków i odgrywają znaczącą rolę w procesie fotokarcynogenezy [1]. CPDs i 6,4-PP mogą prowadzić do wysoce specyficznych mutacji, tj. tandemowej tranzycji zasad CC→TT oraz tranzycji C→T w miejscu występowania dwóch zasad pirymidynowych. Mutacje te są obrazowo określane jako „odcisk palca pozostawiony przez promieniowanie UV” (*UVR fingerprint*) [6]. Do niedawna uważano, że do rozwoju raków skóry prowadzi jedynie

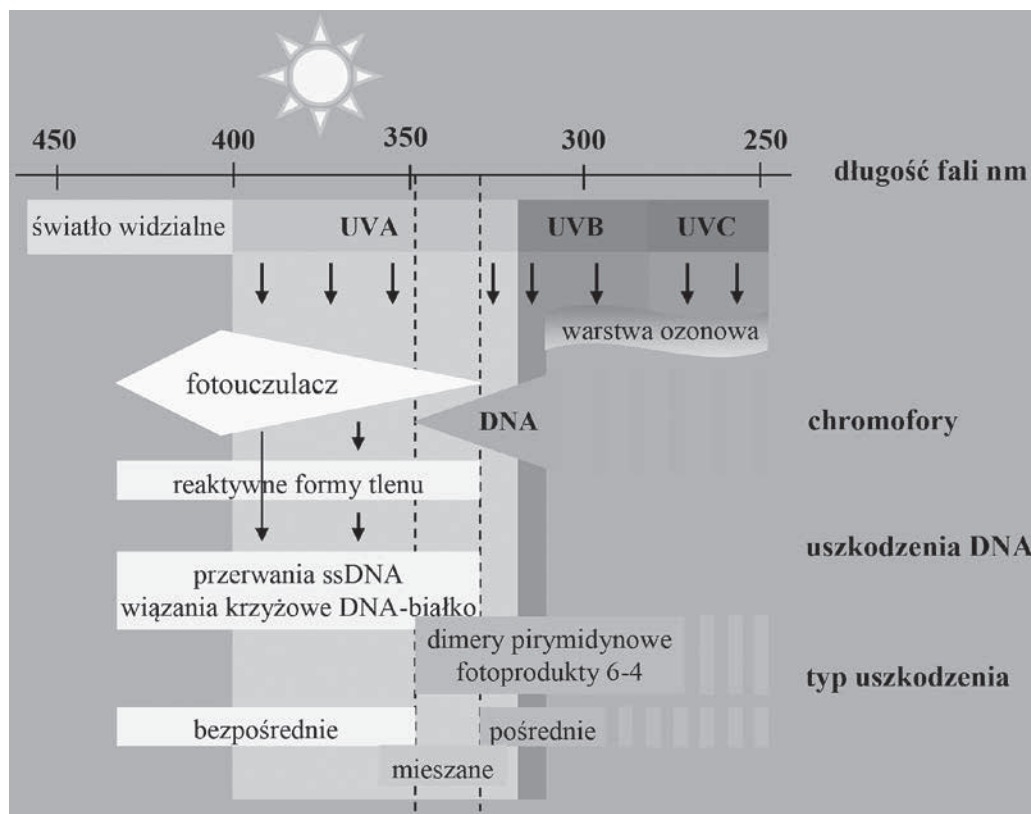
ta część widma promieniowania słonecznego, która odpowiada spektrum UVB, pod wpływem którego tworzą się cyklobutanowe dimery pirymidynowe (CPDs) [5, 10]. Ostatnie doniesienia wskazują, że również promieniowanie UVA w zakresie długości fali 315-327 nm, które w niewielkim stopniu jest absorbowane przez cząsteczki DNA, może indukować powstawanie CPDs i 6,4-PP [5, 9]. Należy także zaznaczyć, że bezpośrednia indukcja fotoproduktów DNA jest zależna również od promieniowania UVC. Maksimum pochłaniania energii fotonów dla DNA w roztworze wynosi 260 nm, to sprawia, że promieniowanie UVC jest najbardziej efektywną długością fali pod względem indukowania fotoproduktów w DNA [12].

### PROMIENIOWANIE UVA

Właściwości mutagenne i kancerogenne UVA są mniej poznane niż UVB. Jednak biorąc pod uwagę fakt, że większą część widma UV docierającego do Ziemi stanowi promieniowanie UVA oraz że ten rodzaj promieniowania UV jest emitowany przez komercyjnie dostępne łóżka opalające (solaria), należy zwrócić szczególną uwagę na mechanizm mutagenyzy i karcynogenyzy indukowany przez UVA. Energia promieniowania UVA pochłonięta przez chromofory subkomórkowe inne niż DNA może być następnie przekazana na cząsteczkę DNA (typ I reakcji fotouczulającej) lub na tlen cząsteczkowy (typ II reakcji fotouczulającej), w wyniku czego

powstają reaktywne formy tlenu (ROS) [5, 13]. Cząsteczki DNA absorbują niewielką ilość promieniowania UVA o długości fali w zakresie 320 (315)-400 nm. W związku z tym promieniowanie UVA uszkadza DNA głównie za pośrednictwem ROS, które powstają w wyniku pochłaniania UVA przez wewnątrzkomórkowe fotouczulacze lub egzogenne substancje uczulające w przypadku terapii fotodynamicznej [13, 15]. ROS indukują powstawanie uszkodzeń oksydacyjnych w postaci modyfikacji zasad azotowych, pęknięć jednoniciowych (SSBs – *single strand breaks*) lub rzadziej dwuniciowych (DSBs – *double strand breaks*) w łańcuchu DNA (ryc. 2). W mniejszym stopniu uszkodzenia oksydacyjne obejmują powstawanie pirymidyno-dioli, jak również tworzenie się wiązań krzyżowych między DNA a DNA i DNA a białkami chromatyny. Powstawanie uszkodzeń oksydacyjnych może prowadzić do mutacji i aberracji chromosomowych i w konsekwencji do rozwoju nowotworów skóry [1, 4, 6, 15, 16].

Do reaktywnych form tlenu (ROS) należą anionorodnik ponadtlenkowy ( $\text{O}_2^-$ ), rodnik hydroksylowy ( $\text{OH}^\bullet$ ) i tlenek azotu ( $\text{NO}^\bullet$ ), które należą do wolnych rodników tlenowych oraz ROS nie będące wolnymi rodnikami (nie posiadające niesparowanego elektronu), tj. tlen singletowy ( $^1\text{O}_2$ ), nad-tlenek wodoru ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), nad-tlenoazotyn ( $\text{ONOO}^-$ ) [5, 13, 17]. Wolne rodniki, jako atomy lub cząsteczki posiadające jeden lub więcej niesparowanych elektronów na zewnętrznej powłoce walencyjnej, są wysoce reaktywne i mogą reagować



Rycina 2. Uszkodzenia DNA indukowane promieniowaniem UV.

Przedrukowano za zgodą Springer Science+Business Media: Adv. Exp. Med. Biol., UV damage and DNA repair in malignant melanoma and nonmelanoma skin cancer, 624, 2008; 162-178; Rass K., Reichrath J., figure 1. ssDNA – przerwanie jednoniciowej DNA.

z innymi rodnikami lub związkami, które rodnikami nie są. Jednym z następstw powstawania ROS jest powstawanie wtórnych wolnych rodników. Przykładem jest powstawanie nadtlenu lipidów ( $\text{LOO}^{\bullet}$ ) w procesie peroksydacji lipidów, będące przyczyną uszkodzenia błon lipidowych. Zwiększone wytwarzanie ROS wywołuje zjawisko określane mianem stresu oksydacyjnego, w wyniku którego dochodzi do oksydacyjnego uszkodzenia nie tylko DNA, ale także błon komórkowych i białek w komórce [5, 17].

Potencjał genotoksyczny UVA w głównej mierze wynika z oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Tlen singletowy i inne rodzaje reaktywnych form tlenu uszkadzają przede wszystkim guaninę. Utlenienie guaniny prowadzi do powstania 7,8-dihydro-8-oksoguaniny (8-oxoG). Najbardziej efektywne w procesie generowania 8-oxoG jest promieniowanie UVA o długości fali powyżej 350 nm. W wyniku błędnego parowania 8-oxoG z adeniną zamiast z cytozyną dochodzi do powstania mutacji punktowej polegającej na zamianie tyminy na guaninę (T→G) (transwersja). Z kolei włączenie uszkodzonego nukleotydu guaninowego 8-oxoG do nowo powstającego łańcucha DNA prowadzi do błędnego parowania zasad i zastąpienia cytozyny adeniną (C→A) w następnej rundzie replikacyjnej. Do rzadziej spotkanych uszkodzeń oksydacyjnych powstających pod wpływem UV należy glikol tyminy, którego wystąpienie w łańcuchu polinukleotydowym może prowadzić do mutacji typu tranzycji T→C [5].

Ostatnio wykazano, że jednym z endogennych antyoksydantów skóry, chroniącym komórki przed stresem oksydacyjnym powstającym pod wpływem UV jest melatonina. Antyoksydacyjne działanie melatoniny polega na bezpośrednim usuwaniu wolnych rodników, a także na aktywacji głównych enzymów eliminujących ROS [18].

### NAPRAWY USZKODZEŃ POWSTAŁE PRZY UDZIALE PROMIENIOWANIA UVA I UVB

Skuteczne usuwanie uszkodzeń DNA indukowanych promieniowaniem UV ma kolosalne znaczenie dla przetrwania wszystkich istot żywych [19]. Uszkodzenia DNA powstałe pod wpływem promieniowania UVA są naprawiane głównie w systemie napraw przez wycinanie zasad azotowych (BER – *Base Excision Repair*) [20-24].

System naprawy BER, jak i omawiany poniżej system NER (*Nucleotide Excision Repair*) typowy dla napraw uszkodzeń DNA indukowanych promieniowaniem UVB są procesami bardzo złożonymi. Stąd w ramach tego artykułu ograniczono się do przedstawienia tylko podstawowych etapów napraw w tych systemach. Należy również zaznaczyć, że w komórkach ssaków system napraw BER i NER nie dotyczy tylko uszkodzeń wywołanych promieniowaniem UV [20, 23].

Naprawa uszkodzonych zasad wywołanych promieniowaniem UVA odbywa się najczęściej tzw. podstawowym szlakiem BER, a w niektórych przypadkach szlakiem alternatywnym [19, 22]. Szlak BER przebiega jako seria działania następowych kompleksów naprawy, które działają w miejscu uszkodzenia DNA [22]. W komórkach ssaków enzymami, które rozpoczynają naprawę DNA przez system BER, są glikozylazy DNA. Wyróżnia się dwa typy N-glikozylaz: gli-

kozyazy monofunkcyjne (typ I) i glikozylazy dwufunkcyjne (typ II). Oba typy N-glikozylaz rozpoznają uszkodzone zasady i usuwają je z DNA przez hydrolizę wiązań N-glikozydowych między uszkodzoną zasadą a cząsteczką deoksyrybozy, co powoduje powstawanie tzw. miejsc apurynowych/apirymidynowych (AP) [7, 20-23]. Na szlaku podstawowym BER (większość napraw zachodzi na tej drodze) dwufunkcyjna glikozylaza DNA (glikozylaza/AP liaza) po usunięciu uszkodzonej zasady powoduje hydrolizę wiązania fosfodiesterowego między nukleotydem po stronie 3' uszkodzenia a deoksyrybozą pozbawioną zasady azotowej. Następnie enzym endonukleaza AP (APE1) usuwa powstałe w reakcji  $\beta$ -eliminacji reszty fosforanowe na końcu 3'. Powstająca jednonukleotydowa luka w łańcuchu DNA z wolną resztą 3'OH zostaje wypełniana przy udziale polimerazy DNA $\beta$ . W końcowym etapie ligaza DNA III w kompleksie z białkiem XRCC1 łączy wolne końce nici DNA i proces naprawy zostaje zakończony [19, 20, 22-24].

### NAPRAWY USZKODZEŃ POWSTAŁYCH PRZY UDZIALE PROMIENIOWANIA UVB

Uszkodzenia DNA powstające pod wpływem promieniowania UVB, takie jak cyklobutanowe dimery pirymidynowe (CPD) czy fotoprodukty [6-4] pirymidyno-pirymidynowe (6-4PP) są naprawiane w uniwersalnym systemie napraw DNA przez wycinanie nukleotydów (NER) [22]. Ustalono, że w komórkach człowieka eliminacja fotoproduktów 6-4PP jest co najmniej 5-krotnie szybsza niż eliminacja CPD [25]. Wykazano, że dimery pirymidynowe zawierające cytozynę (C-C i C-T) są naprawiane o wiele szybciej niż te, które utworzone są przez dwie tymidyny (T-T) [6]. Uszkodzenia DNA powstające pod wpływem promieniowania UVB, takie jak cyklobutanowe dimery pirymidynowe (CPD) czy fotoprodukty [6-4] pirymidyno-pirymidynowe (6-4PP) są naprawiane w uniwersalnym systemie napraw DNA przez wycinanie nukleotydów (NER) [22]. System NER w komórkach ssaków jest procesem bardzo złożonym i bierze w nim udział ponad 25 różnych czynników naprawczych oraz szereg białek pomocniczych [19, 22]. System naprawy NER usuwa uszkodzenia DNA w sposób sekwencyjny, który obejmuje: rozpoznanie uszkodzenia; przyłączenie kompleksu białkowego i rozplecenie podwójnej helisy DNA w miejscu uszkodzenia; podwójne nacięcie uszkodzonej jednej nici w miejscu oddalonym o kilka nukleotydów zarówno po stronie 3', jak i 5'; syntezę naprawczą przez polimerazę DNA; połączenie wolnych końców przy udziale ligazy DNA I [7, 20, 22, 23]. Wśród czynników biorących udział w naprawie szlakiem NER należy wymienić czynniki odgrywające zasadniczą rolę w rozpoznawaniu uszkodzenia DNA (kompleks XPC-HR23B, czynnik RPA, XPA, kompleks XPC-TFIIH) i procesie replikacji – polimeraza DNA *delta* (Pol  $\delta$ ) lub *epsilon* (Pol  $\epsilon$ ) oraz białko PCNA. W procesie naprawy w systemie NER bierze udział również czynnik TFIIH zbudowany z 10 podjednostek, wśród których występują helikazy XPB i HPD. Czynnik TFIIH bierze również udział w tzw. naprawie DNA sprzężoną z transkrypcją (*transcription coupled repair* – TCR), która dotyczy transkrybowanej nici DNA przy udziale polimerazy RNA II [7, 19,

22, 26]. W procesie wycinania uszkodzeń i rekombinacji biorą udział dwie endonukleazy: kompleks XPF-ERCC1 i czynnik XPG, które wycinają około 30-nukleotydowy fragment DNA zawierający fotoprodukt [7, 19]. System NER usuwa fragment DNA obejmujący powstałe dimery pirymidynowe i przywraca prawidłową sekwencję nici uszkodzonej (na zasadzie komplementarności par zasad: A-T, G-C) w oparciu o nić DNA nie uszkodzoną pełniącą funkcję matrycy [20, 22, 23].

W celu monitorowania narażenia populacji ludzkich na działanie genotoksycznych czynników środowiskowych, w tym promieniowania UVA i UVB opracowano testy cytogenetyczne oceniające stopień uszkodzenia DNA powstającego w wyniku ekspozycji na mutageny i kancerogeny środowiskowe. Jednym z najczęściej wykorzystywanych obecnie testów jest test komety (*comet assay*) oparty o elektroforezę pojedynczych komórek w żelu agarozowym. Zaletą testu komety jest jego wysoka czułość, łatwość wykonania oraz możliwość wykorzystania w teście wszystkich typów komórek człowieka. Obecnie test komety znajduje szerokie zastosowanie w badaniach oceniających sprawność mechanizmów naprawy uszkodzeń DNA wywołanych promieniowaniem UV u osób narażonych. Z tego względu może on służyć do określania osób o zwiększonym ryzyku rozwoju nowotworów skóry [27, 28].

## Piśmiennictwo

1. Marrot L., Meunier J.R.: Skin DNA photodamage and its biological consequences. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2008, 58 (5 suppl. 2), S139-S148.
2. Brown T.A.: *Genomy*. Węgleński P. (red.) PWN, Warszawa 2009.
3. Ikehata H., Ono T.: The mechanisms of UV mutagenesis. *J. Radiat. Res.* 2011, 52(2), 115-125.
4. De Grujil F.R.: Photocarcinogenesis: UVA vs UVB. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 2002, 15(5), 316-320.
5. Rüdiger T.M., Kappes U.P.: Mechanisms of mutation formation with long-wave ultraviolet light (UVA). *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 2008, 24(1), 2-10.
6. Brenner M., Hearing V.J.: The protective role of melanoma against UV damage in human skin. *Photochem. Photobiol.* 2008, 84(3), 539-549.
7. Ichihashi M., Ueda M., Budiyo T. et al.: UV-induced skin damage. *Toxicology* 2003, 189(1-2), 21-39.
8. Bachelor M.A., Owens D.M.: Squamous cell carcinoma of the skin: current strategies for treatment and prevention. *Curr. Canc. Ther. Rev.* 2009, 5(1), 37-44.
9. Rass K., Reichrath J.: UV damage and DNA repair in malignant melanoma and nonmelanoma skin cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2008, 624, 162-178.
10. Woo D.K., Eide M.J.: Tanning beds, skin cancer, and vitamin D: an examination of the scientific evidence and public health implications. *Dermatol. Ther.* 2010, 23(1), 61-71.
11. Park H.Y., Kosmadaki M., Yaar M., Gilchrist B.A.: Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009, 66(9), 1493-1506.
12. Timares L., Katiyar S.K., Elmetts C.A.: DNA damage, apoptosis and langerhans cells-activators of UV-induced immune tolerance. *Photochem. Photobiol.* 2008, 84(2), 422-436.
13. Pattison D.I., Davies M.J.: Actions of ultraviolet light on cellular structures. *EXS* 2006, 96, 131-157.
14. von Thaler A.K., Kamenisch Y., Berneburg M.: The role of ultraviolet radiation in melanogenesis. *Exp. Dermatol.* 2010, 19(2), 81-88.
15. Narayanan D.L., Saladi R.N., Fox J.L.: Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int. J. Dermatol.* 2010, 49(9), 978-986.
16. Clauson C., Schärer O.D., Niedernhofer L.: Advances in understanding the complex mechanisms of DNA interstrand cross-link repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013, 5(10), a012732.
17. Al-Gubory K.H.: Maternal nutrition, oxidative stress and prenatal development outcomes. W: Agarwal A., Aziz N., Rizk B.: *Studies on Women's Health, Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice*. Humana Press, New York 2013.
18. Kleszczyński K., Hardkop L.H., Fischer T.W.: Differential effects of melatonin as a broad range UV-damage preventive dermato-endocrine regulator. *Dermatoendocrinol.* 2011, 3(3), 27-31.
19. Moriwaki S., Takahashi Y.: Photoaging and DNA repair. *J. Dermatol. Sci.* 2008, 50(3), 169-176.
20. Sancar A., Lindsey-Boltz L.A., Unsal-Kacmaz K., Linn S.: Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 2004, 73, 39-85.
21. Ridley A.J., Whiteside J.R., Mc Millan T.J., & Allison S.L.: Cellular and sub-cellular responses to UVA in relation to carcinogenesis. *Int. J. Radiat. Biol.* 2009, 85(3), 177-195.
22. Rastogi R.P., Richa, Kumar A., Tyagi M.B., Sinha R.P.: Molecular mechanisms of ultrafiolet radiation – induced DNA damage and repair. *J. Nucleic. Acids.* 2010, 16, 1-32.
23. Drewa G., Ferenc T., Bratkowska W., Witczak M.: Zmienność i mutacje. W: *Genetyka medyczna*. Red. Drewa G., Ferenc T. Wyd. Elsevier Urban&Partner, Wrocław 2011.
24. Krokan HE, Bjørås M.: Base excision repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013, 5(4), a012583.
25. Nakanishi M., Niida H., Murakami H., Shimada M.: DNA damage responses in skin biology – Implications in tumor prevention and aging acceleration. *J. Dermatol. Sci.* 2009, 56(2), 76-81.
26. Schärer O.D.: Nucleotide excision repair in eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013, 5(10), a012609.
27. Speit G., Rothfuss A.: The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol. Biol.* 2012, 920, 79-90.
28. Anderson D., Dhawan A., Laubenthal J.: The comet assay in human biomonitoring. *Methods Mol. Biol.* 2013, 1044, 347-62.

## Wkład autorów:

Według kolejności

## Konflikt interesu:

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów

Pracę nadesłano: 31.10.2013 r.

Zaakceptowano: 12.06.2014 r.

## ADRES DO KORESPONDENCJI:

**Marta Pacholczyk**

Zakład Biologii i Genetyki Medycznej, Katedra Nauk Podstawowych  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

pl. Hallera 1, 90-647 Łódź

tel./fax: (42) 639-33-41

tel. kom. 605-820-179

e-mail: marta.pacholczyk@umed.lodz.pl