

Received: 2008.12.17  
Accepted: 2009.02.16  
Published: 2009.02.27

## $\gamma$ H2AX jako marker dwuniciowych pęknięć DNA\*

### $\gamma$ H2AX in the recognition of DNA double-strand breaks

**Monika Podhorecka**

Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

#### Streszczenie

Dwuniciowe pęknięcia DNA (double-strand breaks – DSB) należą do najbardziej niebezpiecznych uszkodzeń DNA, które mogą prowadzić do powstania aberracji chromosomowych lub apoptozy. DSB wywołują czynniki fizyczne, chemiczne i biologiczne. Pojawienie się DSB w jądrze komórkowym wyzwała fosforylację histonu H2AX w pozycji Ser139, fosforylowana postać H2AX określana jest jako  $\gamma$ H2AX. W wyniku fosforylacji H2AX dochodzi do akumulacji czynników naprawczych w miejscu uszkodzenia DNA. Fosforylacja histonu H2AX odbywa się poprzez enzymy z grupy kinaz białkowych zbliżonych do kinazy fosfatydylo-3-inozytolu (phosphoinositide 3-kinase related kinase – PIKK), do których należy m.in. kinaza ATM (ataxia teleangiectasia mutated). ATM jest uważana za główny fizjologiczny mediator fosforylacji H2AX pojawiającej się wskutek powstawania dwuniciowych pęknięć DNA. Wprowadzenie metod immunocytochemicznej oceny  $\gamma$ H2AX poszerzyło znacznie możliwości badawcze i stało się złotym standardem detekcji DSB. Metody te charakteryzują się dużą czułością i w sposób swoisty pozwalają wyznaczać nawet pojedyncze DSB. Ocena fosforylacji H2AX znalazła zastosowanie w praktyce klinicznej,  $\gamma$ H2AX może być czułym markerem wczesnych nowotworów oraz wskaźnikiem wrażliwości komórek na radioterapię lub chemioterapię.

**Słowa kluczowe:**

**dwuniciowe pęknięcia DNA •  $\gamma$ H2AX • ATM • czynniki genotoksyczne**

#### Summary

Double-strand breaks (DSBs) are highly deleterious DNA lesions because they can lead to chromosome aberrations or apoptosis. Various physical, chemical, and biological factors are involved in DSB induction. The formation of nuclear DSBs triggers phosphorylation of H2AX at Ser139; phosphorylated H2AX is named  $\gamma$ H2AX. It is believed that histone H2AX phosphorylation is required for the concentration of DNA repair proteins to the damaged chromatin. H2AX is phosphorylated by members of phosphoinositide 3-kinase-related protein kinases (PIKKs), such as ATM (ataxia teleangiectasia mutated), which is the main mediator of H2AX phosphorylation in response to DSB induction. The development of immunocytochemical methods of  $\gamma$ H2AX detection provided a convenient tool for research and is considered a gold standard for DSB analysis. These methods are sensitive and specific in the detection of a single DSB. Assessment of H2AX phosphorylation can be used in clinical practice as a marker of premalignant lesions and to predict cell sensitivity to radiotherapy and chemotherapy.

**Key words:**

**DNA double-strand breaks •  $\gamma$ H2AX • ATM • genotoxins**

\* Praca finansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (grant NN402 208 535).



<b>Full-text PDF:</b>	<a href="http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=880000">http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=880000</a>
<b>Word count:</b>	2292
<b>Tables:</b>	1
<b>Figures:</b>	–
<b>References:</b>	68

**Adres autorki:** dr n. med. Monika Podhorecka, Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul S. Staszica 11, 20-081 Lublin; e-mail: monika.podhorecka@am.lublin.pl

## 1. STRUKTURA DNA W KOMÓRCE

W komórkach eukariotycznych DNA, które ma długość około 2 m, upakowane jest w jądrze komórkowym o średnicy 10  $\mu$ m dzięki tworzeniu złożonej struktury – chromatyny. Podstawową jednostką chromatyny jest nukleosom, składający się ze 146 par zasad DNA nawiniętych na okta-mer histonowy. W skład około 100 kDa oktameru histonowego wchodzi cztery rodzaje histonów: H2A, H2B, H3 oraz H4, występujące w dwóch kopiach każdy [11,25,34]. Poszczególne histony rdzeniowe są zbudowane z domen globularnych oraz tzw. „ogonów histonowych”, które ulegają modyfikacji (acetylacja, fosforylacja, metylacja), co zmienia ich wzajemne oddziaływania i układ w stosunku do DNA, umożliwiając reorganizację chromatyny [26]. Poszczególne nukleosomy są oddzielone od siebie łącznikowymi fragmentami DNA o długości 20–70 par zasad. Odcinki te połączone są z histonem H1, którego obecność ułatwia upakowanie poszczególnych nukleosomów w postaci włókna chromatyny o średnicy 30 nm [33,34]. Struktura chromatyny to nie tylko postać upakowania DNA, reguluje ona również procesy replikacji i transkrypcji, stanowi barierę dla czynników niszczących DNA, a także odgrywa istotną rolę w regulacji ekspresji genów [11,16,28].

## 2. DWUNICIOWE PĘKNIECIA DNA

Dwuniciowe pęknięcie DNA (double-strand break – DSB) jest typem uszkodzenia DNA, podczas którego dwie komplementarne nici podwójnej helisy DNA ulegają jednocześnie zniszczeniu w miejscach położonych blisko siebie. DSB należy do najbardziej niebezpiecznych uszkodzeń DNA. Przyjmuje się, że pojedyncze nienaprawione DSB wystarcza do indukcji procesu apoptozy komórki [64,22]. Powstawanie DSB może być wywołane przez czynniki fizyczne lub chemiczne. Tego typu zmiany mogą również zaistnieć w prawidłowych komórkach np. podczas różnicowania limfocytów czy komórek rozrodczych [48]. W komórkach eukariotycznych DSB jest naprawiane przez homologiczną rekombinację (homologic recombination – HR) lub poprzez łączenie końców niehomologicznych (non homologous end – joining – NHEJ). W mechanizmie HR do naprawy DNA jest wykorzystywana informacja genetyczna siostrzanej chromatyny lub homologicznego chromosomu, podczas gdy NHEJ polega na bezpośrednim łączeniu uszkodzonych końców DNA [49].

Ilościowe oznaczanie dwuniciowych pęknięć DNA powstających w komórce opierało się dotychczas na metodach, takich jak elektroforeza żelowa w zmiennym polu elektrycznym (pulse-field gel electrophoresis – PFGE), test elucji DNA czy tzw. test kometowy (single cell gel electrophoresis – SCGE). Były to metody o małej czułości, nie po-

zwalały też na ocenę lokalizacji uszkodzeń DNA w jądrze komórkowym. Kilka lat temu odkryto, że w komórkach ssaków w odpowiedzi na powstanie DSB dochodzi do fosforylacji podtypu histonu H2A, zwanego H2AX, w pozycji Ser139. Powstaje wówczas fosforylowana postać H2AX nazywana  $\gamma$ H2AX [12,43]. Od tego czasu wielu badaczy skupia się na dokładnym poznaniu mechanizmów fosforylacji H2AX i jego roli w procesie reperacji uszkodzeń DNA. Wprowadzenie metod immunocytochemicznej oceny fosforylowanego H2AX ( $\gamma$ H2AX) poszerzyło znacznie możliwości badawcze i stało się złotym standardem detekcji DSB [12,19]. Metody te charakteryzują się dużą czułością i w swoisty sposób pozwalają wyznakować nawet pojedyncze DSB. Cytometryczna ocena  $\gamma$ H2AX połączona z analizą komórkowej zawartości DNA pozwala na analizę stopnia uszkodzenia DNA w odniesieniu do fazy cyklu komórkowego. Zastosowanie techniki mikroskopii fluorescencyjnej pozwala na identyfikowanie pojedynczych ognisk immunofluorescencji  $\gamma$ H2AX odpowiadających obecności pojedynczych DSB w jądrze komórkowym [43,46].

## 3. FOSFORYLACJA H2AX

Pośród czterech głównych histonów rdzeniowych tworzących nukleosom, H2A występuje w największej liczbie wariantów – H2A1, H2A2, H2AZ i H2AX. Histon H2AX stanowi 2–25% całkowitej liczby histonów H2A w komórce, poszczególne histony H2AX układają się równomiernie w obrębie całego genomu [39]. W odpowiedzi na uszkodzenie DNA, a zwłaszcza powstawanie jego dwuniciowych pęknięć, H2AX może ulegać fosforylacji w pozycji Ser139, powstaje wówczas fosforylowana postać H2AX nazywana  $\gamma$ H2AX [43,46]. Fosforylacja histonu H2AX odbywa się poprzez enzymy z grupy kinaz białkowych zbliżonych do kinazy fosfatydylo-3-inozytolu (phosphoinositide 3-kinase related kinase – PIKK), do których należą ATM (ataxia teleangiectasia mutated), ATR (ATM and Rad3-related) i kinaza białkowa zależna od DNA (DNA-dependent protein kinase – DNA-PK).

Kinaza ATM jest uważana za główny fizjologiczny mediator fosforylacji H2AX pojawiającej się na skutek powstawania dwuniciowych pęknięć DNA [18,24]. Aktywacja ATM odbywa się przez jej autofosforylację w pozycji Ser1981, co poprzedzone jest acetylacją z udziałem acetylazy histonowej Tip60 [54,55]. Fosforylacja powoduje rozdział nieaktywnego dimeru lub multimeru ATM na pojedyncze monomery, które wykazują aktywność katalityczną. Główną rolę w procesie aktywacji ATM odgrywa trójbiałkowy kompleks MRN (MRE11-Rad50-NBS), który rozpoznaje uszkodzenie DNA, powoduje przesunięcie ATM do miejsca uszkodzenia, a także indukuje zależne od ATM procesy fosforylacji odpowiednich białek [28,39,53]. Do sub-

stratów, na które działa aktywowane ATM należą oprócz H2AX białko p53 oraz białka zatrzymujące cykl komórkowy Chk2 i Chk1. W miejscu powstawania DSB zaktywowane ATM fosforyluje białka NBS1, SMC1, BRCA1. Procesy te mają na celu zahamowanie postępu cyklu komórkowego oraz aktywację białek odpowiedzialnych za naprawę DNA [50,60].

Wywołana powstawaniem DSB aktywacja ATM prowadzi do fosforylacji histonów H2AX położonych proksymalnie w stosunku do miejsca uszkodzenia DNA. Następnie histon H2AX łączy się z domeną BRCT białka MDC1 (mediator of checkpoint signaling protein 1), co stymuluje dalszą fosforylację H2AX przez hamowanie jego defosforylacji oraz poprzez „przyciąganie” w miejsce zachodzących procesów nowych cząsteczek ATM [52,53].  $\gamma$ H2AX akumuluje się w miejscach uszkodzenia DNA, gdzie uruchamia kaskadę czynników naprawczych – aktywuje białka biorące udział w naprawie DNA, takie jak Rad50, Rad51 i BRCA1 oraz wpływa na przebudowę chromatyny ułatwiając przesunięcie białek naprawczych do miejsca uszkodzenia [6,13]. Ponadto fosforylacja histonu H2AX stanowi sygnał do pojawienia się w miejscu uszkodzenia DNA białka 532BP1 (p53 binding protein 1), które oprócz istotnej roli w procesie akumulacji białka p53, powoduje także zahamowanie postępu cyklu komórkowego (checkpoint) do czasu naprawienia zmian [2]. Procesy te określane są jako odpowiedź na uszkodzenie DNA – DDR (DNA damage response) i mają na celu skuteczną naprawę DNA poprzez HR lub NHEJ lub jeżeli naprawa nie jest możliwa prowadzą do apoptozy komórki [12,16].

H2AX może być również fosforylowany przez kinazę ATR i kinazę DNA-zależną. ATR fosforyluje H2AX w odpowiedzi na jednoniciowe pęknięcia DNA (single-strand break – SSB) i podczas stresu replikacyjnego (zatrzymanie widełek replikacyjnych) [67,68]. DNA-zależna kinaza jest mediatorem fosforylacji H2AX, która pojawia się w komórkach poddanych stresowi hiperosmotycznemu i w odpowiedzi na fragmentację DNA wywołaną procesem apoptozy [35,38,40]. W odpowiedzi na uszkodzenia DNA spowodowane promieniowaniem jonizującym wszystkie kinazy – ATM, ATR i DNA-zależne mogą wspólnie uczestniczyć w fosforylacji H2AX [51,66]. Niedawno odkryto, że oprócz PIKK istnieją inne kinazy fosforylujące H2AX, np. JNK (Jun NH<sub>2</sub> – terminal kinase), która fosforyluje H2AX w odpowiedzi na promieniowanie UVA, a także w komórkach w których zachodzi proces apoptozy [31,47].

#### 4. CZYNNIKI POWODUJĄCE POWSTAWANIE DWUNICIOWYCH PĘKNIĘĆ DNA I FOSFORYLACJĘ H2AX

Wśród czynników powodujących powstawanie DSB, a co za tym idzie fosforylację H2AX, można wyróżnić czynniki fizyczne, chemiczne i biologiczne. H2AX ulega fosforylacji w warunkach fizjologicznych, np. podczas dojrzewania limfocytów w układzie immunologicznym w trakcie rekombinacji genów łańcuchów immunoglobulin VDJ i przełączania klas (class switching) łańcuchów ciężkich, a także w miejscach tworzenia DSB w trakcie mejozy [20,21,57]. Czynniki powodujące tworzenie  $\gamma$ H2AX można podzielić również na czynniki endogenne związane z procesami zachodzącymi w komórce oraz czynniki egzogenne, działające zewnątrzkomórkowo [58,60,61]. Przykłady czynników

uszkodzających DNA i powodujących fosforylację H2AX przedstawiono w tabeli 1.

#### 4.1. Czynniki endogenne

DNA w żywych komórkach podlega stałemu procesowi oksydacyjnego uszkodzenia przez wolne rodniki tlenowe (reactive oxygen species – ROS), które powstają wewnątrz komórki w wyniku procesów przemiany materii [58,61]. Kumulacja tego typu uszkodzeń prowadzi do procesów starzenia się komórki, może być również odpowiedzialna za indukowanie w komórce procesów transformacji nowotworowej [58]. Przyjmuje się, że podczas pojedynczego cyklu komórkowego wskutek działania ROS powstaje przynajmniej 5 000 jednoniciowych pęknięć DNA. Około 1% z nich przekształca się w dwuniciowe pęknięcia DNA (DSB), głównie w czasie trwania procesu replikacji DNA, podczas gdy pozostałe 99% ulega naprawie. Tak więc podczas cyklu komórkowego w ludzkich komórkach powstaje średnio około 50 DSB (tzw. „endogenne” DSB) w odniesieniu do pojedynczego jądra komórkowego. Kumulacja uszkodzeń DNA zwiększa możliwość indukcji procesów nowotworowych w komórce [58,65].

Oceniając fosforylację H2AX, podobnie jak aktywację ATM, w komórkach prawidłowych i nowotworowych liniach komórkowych zaobserwowano, że procesy te zachodzą konstytutywnie, bez udziału czynników egzogennych i różnią się w zależności od aktywności metabolicznej komórek [58]. Ponadto wykazano, że substancje antyutleniające np. N-acetylocysteina znacznie zmniejszają konstytutywną fosforylację H2AX i ATM [58]. Wydaje się że fosforylacja H2AX i aktywacja ATM wyzwalane są przez endogenne oksydacyjne uszkodzenie DNA. Tak więc immunocytochemiczne oznaczanie stężenia  $\gamma$ H2AX i fosforylacji ATM pozwalają na ocenę stopnia endogennego uszkodzenia DNA, a także umożliwiają pomiar ochronnego efektu antyoksydantów.

Konstytutywna aktywacja ATM i fosforylacja H2AX wykazują związek z funkcją białka p53. Uważa się, że p53 indukuje transkrypcję genów związanych z odpowiedzią komórki na stres oksydacyjny [44]. Ponadto fosforylacja p53 w pozycji Ser15 powoduje jego bezpośrednie łączenie się z miejscami pęknięć DNA, ułatwiając prawdopodobnie procesy naprawcze DNA [1]. Komórki zawierające prawidłowe białko p53 mają zazwyczaj podwyższony poziom konstytutywnej fosforylacji H2AX w porównaniu z komórkami, w których białko to jest zmutowane. Może to oznaczać, że p53 ułatwia fosforylację H2AX, co mobilizuje układy naprawcze DNA przeciwko powstawaniu DSB, a przez to przeciwdziała oksydacyjnemu uszkodzeniu DNA [58,62].

#### 4.2. Czynniki egzogenne

Jednym z pierwszych czynników, co do których stwierdzono udział w indukowaniu DSB było promieniowanie jonizujące. Spośród różnych uszkodzeń spowodowanych przez promienie X, właśnie powstawanie DSB wydaje się najbardziej istotne w mechanizmie uszkodzenia komórek rozrodczych, czy też w naruszeniu ciągłości genomu prowadzącym do nowotworzenia [57,60]. Odkrycie, iż spowodowana promieniowaniem ekspresja  $\gamma$ H2AX w komórce wykazuje



Tabela 1. Czynniki powodujące uszkodzenie DNA i fosforylację H2AX

<b>Czynniki fizyczne</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• promieniowanie X</li> <li>• promieniowanie UVA, UVB, UVC</li> <li>• wysoka temperatura</li> <li>• niskie pH</li> <li>• niedotlenienie</li> <li>• wzrost ciśnienia osmotycznego</li> </ul>
<b>Czynniki chemiczne</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ czynniki uszkadzające DNA               <ul style="list-style-type: none"> <li>• bleomycyna</li> <li>• tirapazamina</li> <li>• kalicheamycyna</li> </ul> </li> <li>➤ czynniki alkilujące DNA               <ul style="list-style-type: none"> <li>• cisplatyna</li> </ul> </li> <li>➤ inhibitory syntezy DNA               <ul style="list-style-type: none"> <li>• hydroksykarbamid</li> <li>• afidikolina</li> </ul> </li> <li>➤ inhibitory syntezy RNA               <ul style="list-style-type: none"> <li>• aktynomycyna D</li> </ul> </li> <li>➤ inhibitory topoiizomerazy I i/lub II               <ul style="list-style-type: none"> <li>• kamptotecyna</li> <li>• topotekan</li> <li>• etopozyd</li> <li>• tenipozyd</li> <li>• doksorubicyna</li> <li>• mitoksantron</li> <li>• genisteina</li> <li>• kwercetyna</li> </ul> </li> <li>➤ wolne rodniki tlenowe</li> <li>➤ metale ciężkie</li> <li>➤ dym tytoniowy</li> </ul>
<b>Procesy biologiczne</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ cykl komórkowy</li> <li>➤ mejoza</li> <li>➤ rekombinacja V(D)J</li> <li>➤ przełączenie klas łańcuchów ciężkich immunoglobulin</li> <li>➤ apoptoza</li> <li>➤ procesy starzenia się komórek</li> </ul>

liniową zależność z dawką promieniowania, pozwoliło na rozpoczęcie badań nad zastosowaniem  $\gamma$ H2AX jako markera wrażliwości na radioterapię [43]. Podobnie do promieniowania X uszkodzenia DNA są spowodowane przez promieniowanie UV. Wykazano jednak, iż fosforylacja H2AX wywołana tym rodzajem promieniowania jest indukowana głównie przez ATR i kinazę DNA-zależną, a dopiero wtórnie poprzez zaktywowane ATM [8,60].

Uszkodzenie DNA stanowi podstawowy mechanizm działania wielu leków przeciwnowotworowych, wśród nich najbardziej efektywne wydają się inhibitory topoiizomerazy I (kamptotecyna i topotekan) i topoiizomerazy II (etopozyd, tenipozyd, doksorubicyna, mitoksantron). Mechanizm ich działania polega na stabilizacji kompleksów między topoiizomerazą a DNA, co uniemożliwia ponowne skręcenie nici DNA, a w rezultacie prowadzi do powstania DSB i apoptozy [60]. Bleomycyna i tirapazamina indukują powstawanie DSB przez wytwarzanie wolnych rodników. Powstawanie DSB w wyniku indukowania stresu replikacyjnego stanowi mechanizm działania takich leków, jak hydroksykarbamid czy afidikolin, które powodują powstawanie DSB i  $\gamma$ H2AX w komórkach w fazie S cyklu komórkowego [57]. W przy-

padku działania hydroksykarbamid i afidikoliny, podobnie jak w przypadku promieniowania UV, H2AX ulega fosforylacji głównie poprzez kinazę ATR [66].

### 4.3. Apoptoza

W procesie apoptozy dochodzi do fragmentacji DNA, która prowadzi do powstania wielu DSB [23,36]. Klasyczna metoda identyfikacji komórek apoptotycznych – TUNEL (Terminal deoxynucleotide transferase dUTP Nick End Labeling) opiera się na detekcji pęknięć DNA – enzym terminalna transferaza (TdT) dobudowuje znakowane nukleotydy do wolnych końców wodorotlenkowych w miejscach powstawania DSB [30]. Tworzenie DSB wyzwała fosforylację H2AX, prowadząc do powstania w komórce  $\gamma$ H2AX, który jest uważany za wczesny marker apoptozy [43].  $\gamma$ H2AX pojawia się w komórkach apoptotycznych jednocześnie z aktywacją kaspazy 3 oraz przemieszczeniem fosfatydyloseryny na zewnętrzną błazkę błony komórkowej [42,59,60].

Niedawno opublikowane badania wykazały, że za fosforylację H2AX pojawiającą się w komórkach apoptotycz-

nych odpowiedzialna jest kinaza JNK (Jun NH<sub>2</sub> – terminal kinase) [31,47]. Pod wpływem promieniowania UVA kinaza JNK ulega aktywacji i przemieszczeniu do jądra komórkowego, gdzie fosforyluje H2AX. Jednocześnie JNK aktywuje kaspazę 3 i nukleazę CAD (caspase-activated DNase), która powoduje fragmentację DNA, ale tylko przy współdziałaniu  $\gamma$ H2AX. Tak więc fosforylacja H2AX wydaje się niezbędna w procesie apoptotycznej fragmentacji DNA, a apoptoza zachodzi dzięki współdziałaniu  $\gamma$ H2AX i CAD [31].

Fosforylacja H2AX w komórkach apoptotycznych jest dużo bardziej intensywna w porównaniu z fosforylacją wywołaną przez genotoksyczne czynniki egzogenne. Ta duża różnica w stopniu fosforylacji H2AX pozwala na odróżnienie komórek apoptotycznych od komórek z pierwotnymi uszkodzeniami DNA spowodowanymi przez czynniki uszkadzające, takie jak promieniowanie jonizujące czy czynniki chemiczne [9,19]. Jednak w trakcie postępu procesu apoptozy ekspresja  $\gamma$ H2AX ulega znacznemu zmniejszeniu, a komórki w późnej fazie apoptozy wykazują niski poziom fluorescencji  $\gamma$ H2AX i nie mogą być wyróżniane przez ten marker [58].

## 5. H2AX A NOWOTWORY

Gen kodujący histon H2AX (H2AFX) znajduje się w dystalnym obszarze ramienia q chromosomu 11 (region 11q23.2-23.3) obok innych genów pełniących główną rolę w odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DNA damage repair – DDR), takich jak ATM, MRE11A, CHEK1. Mutacje w tym obszarze genomu, zwłaszcza dotyczące kilku genów, zwiększają ryzyko transformacji nowotworowej [50]. Badania przeprowadzone na myszach wykazały, że ATM i H2AX działają synergistycznie w hamowaniu progresji nowotworowej. Wykazano również, że utrata pojedynczego allelu kodującego H2AX zwiększa podatność na nowotwory u myszy z nieprawidłowościami w obrębie białka p53 [4,5,7]. U ludzi zmiany w liczbie kopii genu H2AFX stwierdzono w raku piersi, a zmiany w obszarze promotorowym H2AFX wiązały się z większym ryzykiem zachorowania na raka piersi i chłoniaki nieziarnicze [32,37]. Podwyższony poziom endogennego  $\gamma$ H2AX, podobnie jak innych białek biorących udział w DDR, takich jak fosforylowana postać Chk2, p53 i 53BP1 obserwowano u ludzi w stanach przednowotworowych [15].

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Al Rashid S.T., Dellaire G., Cuddihy A., Jalali F., Vaid M., Coackley C., Folkard M., Xu Y., Chen B.P., Chen D.J., Lilge L., Prise K.M., Bazett Jones D.P., Bristow R.G.: Evidence for the direct binding of phosphorylated p53 to sites of DNA breaks *in vivo*. *Cancer Res.*, 2005; 65: 10810–10821
- [2] Anderson L., Henderson C., Adachi Y.: Phosphorylation and rapid relocalization of 53BP1 to nuclear foci upon DNA damage. *Mol. Cell Biol.*, 2001; 21: 1719–1729
- [3] Bartkova J., Horejsi Z., Koed K., Krämer A., Tort F., Zieger K., Gulberg P., Sehested M., Nesland J.M., Lukas C., Orntoft T., Lukas J., Bartek J.: DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, 2005; 434: 864–870
- [4] Bassing C.H., Suh H., Ferguson D.O., Chua K.F., Manis J., Eckersdorff M., Gleason M., Bronson R., Lee C., Alt F.W.: Histone H2AX: a dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors. *Cell*, 2003; 114: 359–370
- [5] Celeste A., Difilippantonio S., Difilippantonio M.J., Fernandez-Capetillo O., Pilch D.R., Sedelnikova O.A., Eckhaus M., Ried T., Bonner W.M., Nussenzweig A.: H2AX haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility. *Cell*, 2003; 114: 371–383
- [6] 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: 675–679
- [7] 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., Orlan 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: 922–927
- [8] Cuadrado M., Martinez-Pastor B., Fernandez-Capetillo O.: ATR activation in response to ionizing radiation: still ATM territory. *Cell Div.*, 2006; 1: 7

Ekspozycja na egzogenne lub endogenne mutageny powoduje przypadkową aktywację onkogenów, prowadząc do stresu replikacyjnego (zatrzymania widełek replikacyjnych) i uszkodzenia DNA, co w rezultacie indukuje kaskadę DDR. Przypuszcza się, iż tego typu aktywacja mechanizmów DDR hamuje lub opóźnia rozwój nowotworu działając jako bariera przeciwnowotworowa [3,17]. Jednakże przedłużona aktywacja może czasami stymulować przeżycie takich komórek nowotworowych, które przełamują tę barierę [3,15,50]. Opierając się na obserwacjach tego zjawiska rozpoczęto badania nad rolą elementów układu DDR jako potencjalnych markerów nowotworowych, z których  $\gamma$ H2AX wydaje się najbardziej czułym, wykrywanym prawie w 100% we wczesnych nowotworach [27,45].

Fosforylacja H2AX jest również badana pod kątem zastosowania w ocenie wrażliwości komórek na radioterapię lub chemioterapię. Dzięki oznaczaniu  $\gamma$ H2AX można przewidywać efektywność radio- lub chemioterapii, a także monitorować odpowiedź pacjentów na zastosowane leczenie [10,63]. Badanie fosforylacji H2AX może mieć również zastosowanie do przewidywania, czy określone terapie wykazują działanie toksyczne [14].

## PODSUMOWANIE

H2AX wydaje się jednym z najważniejszych białek odpowiadających za funkcję genomu. Powstająca w wyniku dwuniciowych pęknięć DNA potranslacyjna modyfikacja H2AX (fosforylacja), prowadząca do powstania  $\gamma$ H2AX, czyni z niego główne białko ułatwiające akumulację czynników naprawczych w miejscu uszkodzenia. Nieprawidłowości w obszarze genomu kodującym H2AX (chromosom 11q), zwłaszcza połączone z mutacjami dotyczącymi innych białek odpowiedzialnych za naprawę uszkodzeń DNA, mogą prowadzić do aktywacji procesu nowotworowego. Endogenny  $\gamma$ H2AX, którego zwiększone stężenie obserwuje się w stanach przedrakowych i nowotworach, może służyć jako skuteczny marker nowotworowy. Ocena fosforylacji H2AX może być również czułym wskaźnikiem wrażliwości na radio- lub chemioterapię. Tak więc dokładne poznanie funkcji histonu H2AX może się przyczynić do głębszego zrozumienia nie tylko mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymanie ciągłości genomu, ale również może się okazać istotne pod względem klinicznym w diagnozowaniu nowotworów i terapii przeciwnowotworowej.



- [9] Darzynkiewicz Z., Huang X., Okafuji M.: Detection of DNA strand breaks by flow and laser scanning cytometry in studies of apoptosis and cell proliferation (DNA replication). *Methods Mol. Biol.*, 2006; 314: 81–93
- [10] Downs J.A.: Chromatin structure and DNA double-strand break responses in cancer progression and therapy. *Oncogene*, 2007; 26: 7765–7772
- [11] Escargueil A.E., Soares D.G., Salvador M., Larsen A.K., Henriques J.A.: What histone code for DNA repair? *Mutat. Res.*, 2008; 658: 259–270
- [12] Fernandez-Capetillo O., Lee A., Nussenzweig M., Nussenzweig A.: H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair*, 2004; 3: 959–967
- [13] Furuta T., Takemura H., Liao Z.Y., Aune G.J., Redon C., Sedelnikova O.A., Pilch D.R., Rogakou E.P., Celeste A., Chen H.T., Nussenzweig A., Aladjem M.I., Bonner W.M., Pommier Y.: Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 20303–20312
- [14] Gallmeier E., Winter J.M., Cunningham S.C., Kahn S.R., Kern S.E.: Novel genotoxicity assays identify norethindrone to activate p53 and phosphorylate H2AX. *Carcinogenesis*, 2005; 26: 1811–1820
- [15] Gorgoulis V.G., Vassiliou L.V., Karakaidos P., Zacharatos P., Kotsinas A., Liloglou T., Venere M., Dittullo R.A.Jr., Kastrinakis N.G., Levy B., Kletsas D., Yoneta A., Herlyn M., Kittas C., Halazonetis T.D.: Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature*, 2005; 434: 907–913
- [16] Groth A., Rocha W., Verreault A., Almouzni G.: Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell*, 2007; 128: 721–733
- [17] Halazonetis T.D., Gorgoulis V.G., Bartek J.: An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science*, 2008; 319: 1352–1355
- [18] Helt C.E., Cliby W.A., Keng P.C., Bambara R.A., O'Reilly M.A.: Ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ATM and Rad3-related protein exhibit selective target specificities in response to different forms of DNA damage. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 1186–1192
- [19] Huang X., Halicka D., Traganos F., Tanaka T., Kurose A., Darzynkiewicz Z.: Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis. *Cell. Prolif.*, 2005; 38: 223–243
- [20] Hunter N., Börner G.V., Lichten M., Kleckner N.: Gamma-H2AX illuminates meiosis. *Nat. Genet.*, 2001; 27: 236–238
- [21] Jackson S.P.: Detecting, signalling and repairing DNA double-strand breaks. *Biochem. Soc. Trans.*, 2001; 29: 655–661
- [22] Jackson S.P.: Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*, 2002; 23: 687–696
- [23] Kajstura M., Halicka H.D., Pryjma J., Darzynkiewicz Z.: Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete “sub-G1” peaks on DNA content histograms. *Cytometry A*, 2007; 71: 125–131
- [24] Kastan M.B., Lim D.S.: The many substrates and functions of ATM. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2000; 1: 179–186
- [25] Kinner A., Wu W., Staudt C., Iliakis G.: Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res.*, 2008; 36: 5678–5694
- [26] Kouzarides T.: Chromatin modification and their function. *Cell*, 2007; 128: 693–705
- [27] Kuo L.J., Yang L.X.: Gamma-H2AX – a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo*, 2008; 22: 305–309
- [28] Lee J.H., Paull T.T.: ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*, 2005; 308: 551–554
- [29] Li B., Carey M., Workman J.L.: The role of chromatin during transcription. *Cell*, 2007; 128: 707–719
- [30] Li X., Darzynkiewicz Z.: Labelling DNA strand breaks with BrdUTP. Detection of apoptosis and cell proliferation. *Cell. Prolif.*, 1995; 28: 571–579
- [31] Lu C., Zhu F., Cho Y.Y., Tang F., Zykova T., Ma W.Y., Bode A.M., Dong Z.: Cell apoptosis: requirement of H2AX in DNA ladder formation, but not for the activation of caspase-3. *Mol. Cell.*, 2006; 23: 121–132
- [32] Lu J., Wei Q., Bondy M.L., Brewster A.M., Bevers T.B., Yu T.K., Buchholz T.A., Meric-Bernstam F., Hunt K.K., Singletary S.E., Wang L.E.: Genetic variants in the H2AFX promoter region are associated with risk of sporadic breast cancer in non-Hispanic white women aged < or = 55 years. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2008; 110: 357–366
- [33] Misteli T.: Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell*, 2007; 128: 787–800
- [34] Misteli T., Gunjan A., Hock R., Bustin M., Brown D.T.: Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature*, 2000; 408: 877–881
- [35] Mukherjee B., Kessinger C., Kobayashi J., Chen B.P., Chen D.J., Chatterjee A., Burma S.: DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair*, 2006; 5: 575–590
- [36] Nagata S.: Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.*, 2000; 256: 12–18
- [37] Novik K.L., Spinelli J.J., Macarthur A.C., Shumansky K., Sipahimalani P., Leach S., Lai A., Connors J.M., Gascoyne R.D., Gallagher R.P., Brooks-Wilson A.R.: Genetic variation in H2AFX contributes to risk of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2007; 16: 1098–1106
- [38] Park E.J., Chan D.W., Park J.H., Oettinger M.A., Kwon J.: DNA-PK is activated by nucleosomes and phosphorylates H2AX within the nucleosomes in an acetylation-dependent manner. *Nucleic Acids Res.*, 2003; 31: 6819–6827
- [39] Paull T.T., Lee J.H.: The Mre11/Rad50/Nbs1 complex and its role as a DNA double-strand break sensor for ATM. *Cell Cycle*, 2005; 4: 737–740
- [40] Reitsem T., Klokov D., Banáth J.P., Olive P.L.: DNA-PK is responsible for enhanced phosphorylation of histone H2AX under hypertonic conditions. *DNA Repair*, 2005; 4: 1172–1181
- [41] Rendon C., Pilch D., Rogakou D., Sedelnikova K., Newrock K., Bonner W.: Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2002; 12: 162–169
- [42] Rogakou E.P., Nieves-Neira W., Boon C., Pommier Y., Bonner W.M.: Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 9390–9395
- [43] 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: 5858–5868
- [44] Sablina A.A., Budanov A.V., Ilyinskaya G.V., Agapova L.S., Kravchenko J.E., Chumakov P.M.: The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat. Med.*, 2005; 11: 1306–1313
- [45] Sedelnikova O.A., Bonner W.M.: GammaH2AX in cancer cells: a potential biomarker for cancer diagnostics, prediction and recurrence. *Cell Cycle*, 2006; 5: 2909–2913
- [46] Sedelnikova O.A., Rogakou E.P., Panyutin I.G., Bonner W.M.: Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat. Res.*, 2002; 158: 486–492
- [47] Sluss H.K., Davis R.J.: H2AX is a target of the JNK signaling pathway that is required for apoptotic DNA fragmentation. *Mol. Cell.*, 2006; 23: 152–153
- [48] Smider V., Chu G.: The end-joining reaction in V(D)J recombination. *Semin. Immunol.*, 1997; 9: 189–197
- [49] 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*, 2006; 5: 1021–1029
- [50] Srivastava N., Gochhait S., de Boer P., Bamezai R.N.: Role of H2AX in DNA damage response and human cancers. *Mutat. Res.*, 2009; 681: 180–188
- [51] Stiff T., O'Driscoll M., Rief N., Iwabuchi K., Löbrich M., Jeggo P.A.: ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.*, 2004; 64: 2390–2396
- [52] Stucki M., Clapperton J.A., Mohammad D., Yaffe M.B., Smerdon S.J., Jackson S.P.: MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*, 2005; 123: 1213–1226
- [53] Stucki M., Jackson S.P.:  $\gamma$ H2AX and MDC1: Anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA Repair*, 2006; 5: 534–543
- [54] Sun Y., Jiang X., Chen S., Fernandes N., Price B.D.: A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 13182–13187
- [55] Sun Y., Xu Y., Roy K., Price B.D.: DNA damage-induced acetylation of lysine 3016 of ATM activates ATM kinase activity. *Mol. Cell Biol.*, 2007; 27: 8502–8509

- [56] Suzuki K., Ojima M., Kodama S., Watanabe M.: Radiation-induced DNA damage and delayed induced genomic instability. *Oncogene*, 2003; 22: 6988–993
- [57] Takahashi A., Ohnishi T.: Does gammaH2AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks. *Cancer Lett.*, 2005; 229: 171–179
- [58] Tanaka T., Halicka H.D., Huang X., Traganos F., Darzynkiewicz Z.: Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation, the reporters of DNA damage by endogenous oxidants. *Cell Cycle*, 2006; 5: 1940–1945
- [59] Tanaka T., Halicka H.D., Traganos F., Seiter K., Darzynkiewicz Z.: Induction of ATM activation, histone H2AX phosphorylation and apoptosis by etoposide: relation to cell cycle phase. *Cell Cycle*, 2007; 6: 371–376
- [60] Tanaka T., Huang X., Halicka H.D., Zhao H., Traganos F., Albino A.P., Dai W., Darzynkiewicz Z.: Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents. *Cytometry A*, 2007; 71: 648–661
- [61] Tanaka T., Kajstura M., Halicka H.D., Traganos F., Darzynkiewicz Z.: Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation are strongly amplified during mitogenic stimulation of lymphocytes. *Cell Prolif.*, 2007; 40: 1–13
- [62] Tanaka T., Kurose A., Huang X., Traganos F., Dai W., Darzynkiewicz Z.: Extent of constitutive histone H2AX phosphorylation on Ser-139 varies in cells with different TP53 status. *Cell Prolif.*, 2006; 39: 313–323
- [63] Taneja N., Davis M., Choy J.S., Beckett M.A., Singh R., Kron S.J., Weichselbaum R.R.: Histone H2AX phosphorylation as a predictor of radiosensitivity and target for radiotherapy. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 2273–2280
- [64] van Gent D.C., Hoeijmakers J.H., Kanaar R.: Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat. Rev. Genet.*, 2001; 2: 196–206
- [65] 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: 12871–12876
- [66] Wang H., Wang M., Wang H., Böcker W., Iliakis G.: Complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM and DNA-PK in human cells exposed to ionizing radiation and treated with kinase inhibitors. *J. Cell. Physiol.*, 2005; 202: 492–502
- [67] Ward I.M., Chen J.: Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276: 47759–47762
- [68] 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: 9677–9680

Autorka deklaruje brak potencjalnych konfliktów interesów.

