

FUNKCJE γ H2A.X W KOMÓRKACH ROZRODCZYCH

ROLE OF GAMMA H2A.X IN REPRODUCTIVE CELLS

Łukasz GAŚSIOR, Regina DASZKIEWICZ, Katarzyna MICHNIAK

Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Streszczenie: Podwójne pęknięcia DNA (ang. *Double Strand Break*, DSB) stanowią niebezpieczną grupę uszkodzeń zagrażających integralności genomu, nienaprawione mogą prowadzić do aberracji chromosomowych lub śmierci komórki. Jednym z pierwszych sygnałów powstania DSB w komórce jest fosforylacja histonu H2A.X w pozycji seryny 139. Fosforylacja H2A.X kontrolowana jest przez szereg enzymów będących kinazami białkowymi, takich jak kinaza ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) i ATM-Rad3-zależna (ATR). Proces fosforylacji H2A.X jest pierwszym krokiem do rekrutacji i nagromadzenia białek naprawczych w miejscu powstania uszkodzenia DNA. Nowoufosforylowane białko określane jest jako γ -H2A.X. Forma ta uznawana jest za najczulszy marker wykrywania uszkodzeń DNA związanych z promieniowaniem UV, promieniowaniem jonizującym IR, stresem oksydacyjnym i genotoksycznym. Metody immunofluorescencji z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko ufosforylowanej formie histonu H2A.X pozwalają na wykrycie nawet pojedynczych pęknięć w podwójnej helisie DNA. Obecnie próbuje się konstruować testy pozwalające na określenie stopnia toksyczności substancji, efektywność leczenia nowotworów, czy stanów patologicznych związanych z nieprawidłowościami w funkcjonowaniu komórki w oparciu o ilość, natężenie oraz wzór ułożenia tzw. ognisk (ang. „foci”) γ -H2A.X we wnętrzu jądra komórkowego komórek narażonych na stres genotoksyczny. Coraz większą uwagę zwraca się jednak na możliwości funkcjonowania γ -H2A.X również w komórkach zdrowych, jako elementu kluczowego dla samych podziałów komórkowych oraz mechanizmów związanych z procesami utrzymania potencjału rozwojowego, starzenia i różnicowania się komórek. Niniejszy artykuł prezentuje dotychczasowe osiągnięcia w wyjaśnieniu funkcji γ -H2A.X w komórkach rozrodczych i wskazuje na jego prawdopodobną rolę w podziałach mejjotycznych oraz utrzymaniu płodności.

Słowa kluczowe: podwójne pęknięcia DNA, γ H2A.X, ATM, ATR, stres genotoksyczny, komórki rozrodcze, konfiguracja chromatyny

Summary: Double strand breaks (DSBs) represent dangerous damage of DNA structure threatening the integrity of the genome. If not repaired they may lead to chromosome aberrations or cell death. One of the first signal of DSB formation in the cell is the phosphorylation of histone H2A.X at serine-139 position within damaged region. Phosphorylation of H2A.X is controlled by the series of protein kinases such as ATM kinase (ataxia telangiectasia mutated ATM) and ATM-Rad3-related (ATR). Newly phosphorylated

protein is referred as γ -H2A.X. This form is considered as the most sensitive marker for detection of DNA damage associated with UV radiation, ionizing radiation (IR), as well as oxidative and genotoxic stress. H2A.X phosphorylation process is the first step in the recruitment and accumulation of the proteins necessary for repair of damaged site. It is assumed that analysis of the γ -H2A.X foci within the cell nucleus might serve as a tool to detect various pathological state affecting cell function. A growing body of evidence, however, points at the function of γ -H2A.X in the regulation of the cellular processes in the healthy cells including cell cycle progression, differentiation or aging. In this review, we focus on the recent achievements in the elucidation of the role of γ -H2A.X in germ cells.

Key words: double-strand breaks, γ H2A.X, ATM, ATR, genotoxic stress, reproductive cells, chromatin configuration

WSTĘP

Histon H2A wraz z histonami H2B, H3 i H4 wchodzi w skład oktameru histonowego stanowiącego podstawową jednostkę budulcową chromatyny. Cechuje się on największą zmiennością spośród wszystkich wariantów histonów. Chromatyna ssaków posiada także inne warianty histonu H2A takie jak: H2A.Z, makro-H2A, H2A.X i H2ABbd, które różnią się sekwencjami C-końcowych aminokwasów [16]. Pomimo, że H2A.X stanowi tylko 10% wszystkich wariantów histonu H2A w komórkach ssaków, wydaje się być jednak najpierwotniejszą formą tego histonu [71, 93]. U niezróżnicowanych jednokomórkowych organizmów H2A.X jest dominującą formą H2A [13]. W wyniku ewolucyjnego wyodrębnienia organizmów wielokomórkowych H2A.X został zastąpiony przez H2A oraz inne warianty tego histonu, co prawdopodobnie umożliwiło tworzenie bardziej skomplikowanych struktur regulujących ekspresję genów u bardziej złożonych organizmów.

W ostatnich latach wiele uwagi poświęcono metodom wykrywania ufosforylowanej formy histonu H2A.X, czyli γ H2A.X. Pierwsze wzmianki na temat obecności γ H2A.X w miejscach uszkodzeń i jego roli w rekrutacji białek naprawczych pochodzą sprzed trzech dekad [29]. Forma ta uznawana jest za najczulszy marker służący wykrywaniu uszkodzeń DNA związanych z promieniowaniem UV, promieniowaniem jonizującym IR, stresem oksydacyjnym i genotoksycznym [67]. Jako modyfikacja epigenetyczna struktury chromatyny, histon γ H2A.X stał się ważnym czynnikiem predykcji nowotworów. W oparciu o wzorzec ułożenia histonu γ H2A.X próbuje się tworzyć testy pozwalające nie tylko na określenie obecności samych nowotworów, ale także na określenie stopnia toksyczności, skuteczności stosowanych terapeutyków, czy też samej oceny wrażliwości komórek na stres genotoksyczny podczas wyboru najskuteczniejszej metody leczenia [73, 88, 91].

Wzór ułożenia nukleosomów zawierających γ H2A.X w jądrze komórkowym może stanowić swoisty marker kondycji komórki, a także stanowić źródło infor-

macji o jej dalszych losach. Dla przykładu, specyficzny wzorec ułożenia epigenetycznych markerów zawierających w składzie duże ilości γ H2A.X, który lokuje się pod otoczką jądrową w formie tzw. apoptotycznego pierścienia (ang. *apoptotic ring*) stanowi marker rozpoznawczy początkowych stadiów apoptozy [105]. γ H2A.X wydaje się być kluczową modyfikacją epigenetyczną konieczną dla przebiegu apoptotycznej śmierci komórki bowiem jest konieczną modyfikacją epigenetyczną kluczową dla funkcjonowania aktywowanej kaspazami DNazy CAD (ang. *Caspase-Activated DNase*), która dokonuje fragmentacji DNA w procesie apoptozy. Uważa się, że γ H2A.X odgrywa rolę w funkcjonowaniu CAD poprzez regulację powinowactwa CAD do nukleosomu w wyniku indukowanych przez γ H2A.X zmian w konfiguracji chromatyny [64, 94].

Niedawno określono również kluczową rolę γ H2A.X w innym rodzaju śmierci komórkowej, zwanym programowaną nekrozą, która różni się zasadniczo od klasycznie rozumianej nekrozy będącej procesem niekontrolowanym, biernym, oraz najczęściej będącym konsekwencją fizycznego uszkodzenia komórki i przerwania ciągłości błon biologicznych [4]. Proces ten, podobnie jak apoptoza, jest zaprogramowanym procesem śmierci komórki jednak, w odróżnieniu od apoptozy jest niezależny od zewnętrznego i wewnętrznego szlaku aktywacji kluczowych dla apoptozy białek jakimi są kaspazy. Tak zdefiniowana, niezależna od kaspaz, programowana nekroza odgrywa ważną rolę w organogenezie, rozwoju zarodkowym oraz dojrzewaniu limfocytów T w grasicy, a także w rozwoju wielu chorób, w tym chorób niedokrwiennych, infekcji wirusowych oraz rozwoju nowotworów [45][9]. W procesie programowanej nekrozy ważną rolę odgrywa mitochondrialna oksydoreduktaza AIF, tzw. czynnik indukujący apoptozę AIF (ang. *Apoptosis Inducing Factor*). AIF uwolniony z mitochondriów dostaje się do jądra komórkowego, gdzie rekrutuje białka o aktywności endonukleazy jak cyklofilina A (CypA) czy endonukleaza G (EndoG) [9]. Za przebieg programowanej nekrozy odpowiada interakcja C-końcowej domeny AIF z γ H2A.X, które wspólnie formują kompleks rekrutujący endonukleazy (CypA) i (EndoG). Obecność γ H2A.X, podobnie jak w procesie regulacji apoptozy, jest konieczna dla zajścia fragmentacji DNA [9, 4].

Funkcja γ H2A.X w regulacji programowanej śmierci komórki może odgrywać także znaczącą rolę w regulacji śmierci samych oocytów i pęcherzyków jajnikowych w procesie zwanym atrezją. Proces apoptotycznej śmierci komórek rozrodczych nabiera szczególnego znaczenia w przypadku gonady żeńskiej. Rezerwuar jajnika, jako swoisty magazyn komórek rozrodczych wykorzystywanych przez okres rozrodczy kobiety w kolejnych cyklach owulacyjnych nie podlega odnowie w okresie postnatalnym, ulegając stopniowemu wyczerpywaniu w kolejnych cyklach owulacyjnych, aż do jego wyczerpania, co wiąże się z wejściem kobiet w okres menopauzy [37]. Uważa się, że nawet 99% oocytów obecnych w jajniku w momencie narodzin jest eliminowana w wyniku atrezji [113]. Ponadto, przypuszcza się, że żeńskie komórki rozrodcze posiadają ograniczone zdolności naprawy DNA [23]. Uważa się, że dla zapewnienia

jakości gamet żeńskich, równowaga pomiędzy podjęciem przez komórkę napraw a eliminacją defektywnych komórek, jest mocno przesunięta na korzyść apoptozy [60, 23]. Może mieć to szczególne znaczenie w warunkach narażenia kobiet na stres genotoksyczny związany np. z radioterapią czy chemioterapią, który może prowadzić do utraty rezerwuaru jajnika i przedwczesnej menopauzy w wyniku gwałtownej atrezji uszkodzonych pęcherzyków jajnikowych [104]. Bez wątplenia γ H2A.X jest zaangażowany w procesy eliminacji komórek obciążonych nadmierną ilością uszkodzeń DNA w komórkach somatycznych. Niewykluczony jest więc także jego udział w eliminacji defektywnych oocytów, oraz utracie rezerwuaru pęcherzyków jajnikowych czy pojawianiu się przedwczesnej menopauzy będącej konsekwencją stosowania terapii antynowotworowych o charakterze genotoksycznym [113, 104, 30].

Pojawienie się γ H2A.X ma także swoje odzwierciedlenie w aktywacji i regulacji mechanizmów kontrolujących replikację DNA i aktywację punktów kontrolnych cyklu komórkowego G1/S, intra S, oraz G2/M w odpowiedzi na uszkodzenia DNA czy stres relokacyjny [88]. Jednak, oprócz pełnienia funkcji swoistego ośrodka decyzyjnego podczas wyboru mechanizmów komórkowych stanowiących o przeżyciu lub śmierci komórki, γ H2A.X odpowiada również za wiele różnych, często odmiennych procesów zachodzących w komórce, które są bezpośrednio związane z jej typowym funkcjonowaniem w warunkach fizjologicznych. Między innymi, do takich procesów możemy zaliczyć rolę γ H2A.X w topologicznym ułożeniu telomerów podczas mejozy [41]. Ufosforylowana forma H2A.X stanowi także jeden z kluczowych czynników zapewniających zmienność przeciwciał w układzie odpornościowym [86]. Istnieje również koncepcja według której γ H2A.X może funkcjonować jako komórkowy marker pozwalający na odróżnienie nowosyntetyzowanej chromatyd siostrzanej od chromatyd matrycowej, co pozwalałoby na nielosową segregację chromatyd siostrzanych do komórek potomnych podczas podziałów komórkowych. Nielosowe dziedziczenie starych i nowych nici DNA miałyby oczywiście swoje konsekwencje w różnicowaniu się komórek potomnych, w procesie kontroli proliferacji (regulacja wejścia w stan senescencji), czy w procesie starzenia się komórek. Mechanizm nielosowego dziedziczenia nici DNA pozostaje jednak wciąż w sferze hipotez [114, 92].

Funkcje γ H2A.X w różnych typach komórek wydają się mieć bardzo złożony charakter zależny od kondycji komórki, jej stanu fizjologicznego, funkcji czy fazy cyklu podziałowego. Jednakże, możliwe, że najbardziej złożoną, a jednocześnie najslabiej poznaną funkcją γ H2A.X jest jego rola w komórkach germinalnych, oraz we wczesnych etapach rozwoju zarodkowego.

ROLA γ H2A.X W NAPRAWACH DNA

Podwójne pęknięcia nici DNA (ang. *Double Strand Break*, DSB) stanowią poważne zagrożenie dla utrzymania integralności genomu. Błędy w naprawie DSB

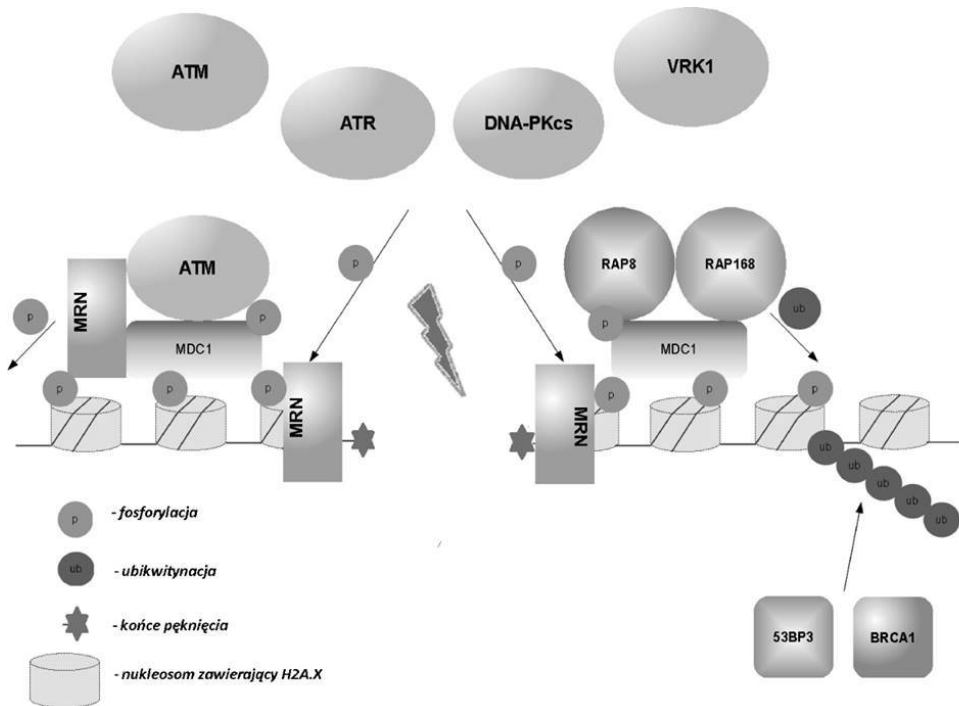
mogą skutkować translokacjami, rearanżacjami genomu i fuzją chromosomów [66]. Szacuje się, że w pojedynczej komórce w następstwie działania czynników fizjologicznych powstaje około 5000 pojedynczych pęknięć DNA (ang. *Single Strand Break* – SSB), a około 1% z tych pęknięć zamienianych jest na pęknięcia podwójne [88]. W komórkach eukariotycznych DSB naprawiane są w procesie homologicznej rekombinacji (ang. *Homologous Recombination*, HR) i niehomologicznego łączenia wolnych końców (ang. *Non Homologous End-Joining*, NHEJ) [19]. Główną rolę w obu tych procesach odgrywa γ H2A.X [61]. Przydatność γ H2A.X jako markera uszkodzeń chromatyny wspiera jego unikatowa właściwość związana z faktem, iż jedno pęknięcie helisy DNA przekłada się na ufosforylowanie wielu nukleosomów zawierających w swoim składzie H2A.X w odległości nawet 1 Mbp od miejsca uszkodzenia. W efekcie każde uszkodzenie otoczone jest wieloma ufosforylowanymi histonami H2A.X tworzącymi ogniska wokół uszkodzenia. Szacuje się, że wielkość każdego z takich ognisk może przekraczać powierzchnię $0.2\mu\text{m}^2$ i w łatwy sposób może być wykryta metodami immunofluorescencyjnymi [98].

Prawidłową równowagę ufosforylowanej formy histonu H2A.X zapewniają enzymy z grupy kinaz białkowych zbliżonych do kinazy fosfatydylo-3-inozytolu (ang. *Phosphoinositide 3-Kinase Related Kinase*, PIKK) do których zalicza się: ATM (ang. *Ataxia Telangiectasia Mutated*), kinazę białkową zależną od DNA (ang. *DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit*, DNA-PKcs) oraz ATR (ang. *ATM- and Rad3-related*) [17]. Najnowsze badania wykazały rolę nowej kinazy VRK1 (ang. *Vaccinia-Related Kinase 1*) w regulacji procesów naprawczych w komórce na drodze fosforylacji H2A.X [110]. Poza rekrutacją białek wprost zaangażowanych w naprawy, γ H2A.X może rekrutować kompleksy białkowe związane z modyfikacjami struktury chromatyny jak TIP60, SWI/SNF, INO80, w ten sposób wpływając na poziom transkrypcji i strukturę chromatyny [35]. W utrzymaniu homeostazy epigenetycznego stanu chromatyny konieczne są enzymy wykazujące zdolność do usuwania modyfikacji epigenetycznych, przywracające chromatynę do stanu początkowego. Funkcję taką pełnią fosfatazy PP2A, PP4, PP6 i WIP1, które prowadzą proces defosforylacji γ H2A.X [34, 62].

W odpowiedzi na powstanie DSB, do ufosforylowanej formy histonu γ H2A.X wiąże się bezpośrednio jego kluczowy partner białko MDC1 (ryc.1.) [106]. Proces ten uruchamia pętlę dodatniego sprzężenia zwrotnego, aktywującą i/lub utrzymującą kinazę ATM w miejscach DSB. W konsekwencji, w obrębie miejsca uszkodzenia dochodzi do rozprzestrzeniania się procesu fosforylacji H2A.X na odległość ponad 1 Mbp [109]. Powyższy mechanizm prowadzi do powstania pewnego rodzaju rusztowania niezbędnego do zainicjowania procesu rekrutacji ligaz ubikwitynowych RNF8 i RNF168 ubikwitynujących histon γ H2A.X. Proces ten jest konieczny do lokalnego remodelowania chromatyny i rekrutacji kolejnych białek naprawczych [124] (ryc. 1). W kolejnym etapie rekrutowane są białka BRCA1 i 53BP1 (ryc. 1), których rolą jest wybór jednego z dwóch mechanizmów

naprawy DSB, homologicznej rekombinacji (HR) lub niehomologicznego łączenia wolnych końców (NHEJ) [100]. Wykazano, że oprócz MDC1, także MCPH1 (znany jako BRIT1), odgrywa rolę w kondensacji oraz przemodelowaniu chromatydy, naprawach HR, a także w regulacji punktów kontrolnych cyklu poprzez bezpośrednie wiązanie się z γ H2A.X [118]. Kolejnym czynnikiem umożliwiającym bezpośrednie rozpoczęcie naprawy HR jest kompleks nukleaz MRE11/RAD50/NBS1, zwany kompleksem MRN, który lokuje się w miejscu powstałego uszkodzenia poprzez bezpośrednie wiązanie NBS1 z γ H2A.X [97]. Funkcja γ H2A.X nie ogranicza się jednak tylko do tworzenia warunków sprzyjających zachodzeniu procesów naprawczych. Wykazano, że γ H2A.X jest również bezpośrednio zaangażowany w utrzymywanie spójności pomiędzy chromatydami siostrzanymi w procesie homologicznej rekombinacji [122] oraz odpowiada za utrzymywanie połączeń końców pęknięcia w procesie napraw NHEJ [12].

Wydaje się, że w komórkach germinalnych naprawa uszkodzeń DNA jest prowadzona głównie przez HR [44, 107]. Wiadomo, że interakcje 53BP1 i BRCA1



RYCINA 1. Organizacja miejsca pęknięcia nici DNA z uwzględnieniem kluczowych białek zaangażowanych w początkowe etapy naprawy

FIGURE 1. Organization of double-strand break site with the key regulator proteins participating in the initial steps of DNA repair

odgrywają ważną rolę w procesie wyboru mechanizmu naprawczego pomiędzy HR i NHEJ [84], a rekrutacja tych białek naprawczych może zachodzić przy udziale γ H2A.X [56, 117]. Faktem jest, że w komórkach germinalnych znacznie częściej zaangażowana jest ścieżka HR, niż generująca więcej błędów ścieżka NHEJ [54]. Świadczyć mogą o tym częste delecje w chromosomie Y, który nie posiada homologicznego partnera do napraw poprzez HR [2]. Zarówno spermatogonia A(s) posiadające zdolności samoodnowy oraz tworzenia spermatogoniów wyższych rzędów (predysponowanych do późniejszego różnicowania się w procesie spermatogenezy), jak i oocyty, posiadają ograniczone zdolności prowadzenia napraw z użyciem mechanizmów NHEJ [44, 90]. Naprawa poprzez NHEJ jest jednak procesem szybszym i zaczyna dominować w spermatogenezie w późnym stadium pachyteny [1, 58]. Prawdopodobnie spowodowane jest to wysoką aktywnością podziałową spermatocytów, które produkowane są w sposób ciągły na masową skalę. Dodatkowo, może być to związane z przygotowaniem się do naprawy DNA wydłużonych spermatyd, w których NHEJ wobec braku chromatydy siostrzanej, niezbędnej dla ścieżki HR jest jedynym dostępnym mechanizmem naprawy uszkodzeń powstających podczas wymiany histonów na protaminy [90].

W komórkach somatycznych pojawiający się w odpowiedzi na uszkodzenia genomu γ H2A.X zaangażowany jest poprzez rekrutację kinaz PIKK w aktywowanie punktów kontrolnych zatrzymujących cykl komórkowy w celu umożliwienia napraw DNA [5, 103]. Niedobór γ H2A.X zaburza regulację punktów kontrolnych cyklu komórkowego, a wraz ze spadkiem ilości γ H2A.X spada też zdolność komórek do naprawy uszkodzeń DNA [6]. Taka sytuacja może prowadzić do niestabilności genomu, co jest przyczyną powstania wielu typów nowotworów [17]. Istnieją dowody świadczące o tym, że γ H2A.X może być również kluczowym regulatorem w ustalaniu równowagi pomiędzy różnymi ścieżkami napraw poprzez hamowanie lub rekrutację białek naprawczych w miejscu uszkodzenia [30,121]. Co więcej, w przypadku nieefektywnych napraw γ H2A.X uczestniczy w procesie eliminacji komórki. Wiadomo bowiem, że sam wzór ułożenia γ H2A.X określony jako pierścień apoptotyczny (ang. *apoptotic ring*), w którym γ H2A.X lokuje się w części peryferycznej jądra komórkowego może odgrywać rolę w procesie apoptozy [105].

γ H2A.X W TELOMERACH

Jednym z przejawów starzenia się komórki jest skracanie się chromosomów w toku kolejnych podziałów komórkowych. W celu ochrony genomu przed utratą ważnych sekwencji umiejscowionych przy końcach chromosomów, chromosomy są flankowane i stabilizowane przez telomery. Taki mechanizm zapewnia stabilność genomu i zabezpiecza przed rozpoznawaniem końców chromosomów

jako DSB oraz ich fuzji [77]. Telomery chronione są przez białka rozpoznające ich charakterystyczne sekwencje i łączące się do nich [82]. Rolę w tym procesie może odgrywać histon γ H2A.X oraz fosforylujące go kinazy ATM i ATR. Wiadomo, że znajdują się one na telomerach o normalnej długości [81]. W komórkach somatycznych mTR^{-/-}, które nie posiadają mRNA jako komponentu telomerazy następuje szybkie skracanie telomerów prowadzące do apoptozy komórek. Procesowi temu towarzyszy gromadzenie się γ H2A.X co sugeruje, że skracanie się telomerów jest odczytywane przez komórkę, jako DSB [51]. Jednocześnie dochodzi do gromadzenia się białek naprawczych na skracających się końcach telomerów podobnie jak to się dzieje w przypadku pęknięć DNA. Również w tym przypadku w proces rekrutacji białek naprawczych zaangażowany może być γ H2A.X [119]. W odniesieniu do komórek germinalnych wykazano, że długość telomerów ma związek z ilością produkowanych plemników [40], a także, że nadmierne skracanie się telomerów jest związane z zaburzeniami w przebiegu mejozy zarówno w oocytach jak i spermatocytach oraz z zaburzeniami we wczesnej fazie rozwoju preimplantacyjnego [63]. Ponadto γ H2A.X odpowiedzialny jest za odpowiednie ułożenie telomerów i właściwe ich parowanie podczas tworzenia się bivalentów w profazie I mejozy [85].

γ H2A.X W PLEMNIKACH

W jądrach występuje szczególnie duży poziom ufosforylowanej formy histonu H2A.X [68]. Ogniska takie mogą być obserwowane w spermatogoniach A i spermatogoniach B oraz w spermatocytach od preleptotenu do stadium spermatyd. γ -H2A.X wykazuje najbardziej homogeniczne ułożenie w jądrze w spermatogoniach A i okrągłych spermatydach [50]. Pierwsza zależna od ATR fala fosforylacji H2A.X pojawia się na skutek premeiotycznej replikacji DNA i utrzymuje się do stadium preleptotenu spermatocytów [68], po czym zanika wraz z parowaniem chromosomów homologicznych (synapsis) w zygotenie [15]. Ponowna fala fosforylacji związana z obecnością wielu małych ognisk γ H2A.X pojawia się, gdy spermatocyty przechodzą z zygotenu do pachytenu i zanika pod koniec fazy pachytenu [15]. Związane jest to z naprawami DSB powstałymi w procesie *crossing-over* [13, 27]. W końcowej fazie pachytenu i w diploteniu γ H2A.X pozostaje związany jedynie z ciałkiem płciowym, obszarem silnie skondensowanej chromatyny odpowiadającej bivalentowi X-Y, który jak wiadomo podlega parowaniu tylko na niewielkim odcinku [68]. Tak więc, w tej fazie mejozy obecność ognisk γ H2A.X ogranicza się do chromosomów, które nie uległy synapsis [96] i jest niezależna od obecności uszkodzeń DNA ponieważ nie obserwuje się jednoczesnego współwystępowania w tej samej lokalizacji białek naprawczych MDC1 i RAD51 oraz białka SPO11 uczestniczącego w generowaniu DSB w procesie *crossing-over*.

Zarówno pęknięcia DNA, jak i obecność białek naprawczych w tym γ H2A.X najprawdopodobniej umożliwia zajście homologicznej rekombinacji w pachytenie, a myszy z nokautem *Atm*^{-/-}, *H2A.X*^{-/-} i *Mdc1*^{-/-} czy defektem kompleksu MRE11 wykazują synapsis pomiędzy niehomologicznymi chromosomami [10,24,26,87]. Co więcej, u myszy *H2A.X*^{-/-} obserwuje się rozpad kompleksów synaptonemalnych, co może zaburzać proces rekombinacji [14,24]. Sugeruje się, że γ H2A.X może wchodzić w interakcje z kohezynami wpływając w ten sposób na prawidłowe parowanie się chromosomów [31]. Należy zwrócić uwagę, że proces formowania się ciała płciowego także wymaga obecności γ H2A.X [42]. Białka BRCA1, ATR oraz TOPBP1 (białko aktywujące ATR) [20] wiążą się do niesparowanych chromosomów X-Y we wczesnym pachytenie i rozprzestrzeniają się w chromatynie biwalentu płci. Proces ten jest zbieżny z fosforylacją H2A.X przez ATM i może być od niego zależny [52]. *Mdc1*- partner H2A.X nie ma wpływu na początkową rekrutację BRCA1, ATR i TOPBP1, jednakże jest niezbędny dla rozprzestrzeniania się tych białek w niesparowanych regionach pary X-Y [52]. W przypadku zaburzeń związanych z formowaniem się ciała X-Y następuje eliminacja spermatocytów na drodze apoptozy zależnej od p53 [65]. Jednakże, ponieważ białka ścieżki odpowiedzi komórki na uszkodzenia DNA-DDR (ang. *DNA Damage Response*) zaangażowane są zarówno w formowanie się ciała płciowego, jak i naprawę uszkodzeń po procesie wymiany odcinków między chromatydami chromosomów homologicznych, trudno jednoznacznie stwierdzić czy utrata spermatocytów w środkowym pachytenie jest wynikiem nieprawidłowego formowania się ciała płciowego, czy braku napraw i aktywacji ewentualnego punktu kontrolnego. Wiadomo, że pewne geny na chromosomach płci, które nie podlegają charakterystycznemu dla biwalentu X-Y wyciszeniu transkrypcji odpowiadają za eliminację spermatocytów w środkowym pachytenie [76,95]. Wykazano, że ekspresja genów związanych z chromosomem Y powoduje zaburzenie mejozy, co może wyjaśniać większą wrażliwość męskich komórek rozrodczych na zaburzenia ekspresji genów naprawczych w porównaniu z komórkami żeńskimi [22,69]. Ponadto w przypadku licznych translokacji następuje zaburzenie w koniugacji autosomów i wyciszenie niesparowanych fragmentów przez γ H2A.X, jednakże nie towarzyszy temu eliminacja spermatocytów [79].

Ogniska γ H2A.X są również obserwowane w okrągłych spermatydach [50] oraz w wydłużających się spermatydach [58]. Uważa się, że w przypadku wydłużających się spermatyd obecność γ H2A.X związana jest z powstaniem DSBs, które generowane są w procesie kondensacji chromatyny [75]. Należy zwrócić uwagę na to, iż pomimo dużej zawartości H2A.X w spermatocytach, a także jego wielorakich funkcji, jest on w stanie aktywować odpowiedź spermatocytów na uszkodzenia DNA. Pachytenowe spermatocyty a także spermatydy są w stanie naprawiać sztucznie zaindukowane promieniowaniem jonizującym uszkodzenia DSB, jednak dynamika tych napraw jest niższa niż w komórkach somatycznych [101].

γ H2A.X A PUNKTY KONTROLNE CYKLU KOMÓRKOWEGO

Niewykluczone, że H2A.X może także pełnić rolę w formowaniu się wrzeciona podziałowego poprzez oddziaływania z białkiem Mad2 w odpowiedzi na uszkodzenia DNA, w ten sposób eliminować defektywne gonocyty o nadmiernej ilości uszkodzeń poprzez aktywację punktu kontrolnego wrzeciona (ang. *Spindle Assembly Checkpoint*, SAC) [33]. Ponadto białka zaangażowane w funkcję SAC: Mad, Bub, Cdc20, INCENP, CENP-F, MCAK, Sgo1 fosforylowane są przez kinazę ATM [72]. U drożdży wykazano, że H2A może zostać ufosforylowany przez jedno z białek SAC-Bub1 [55]. Wydaje się, że w metafazie istnieje zależna od γ H2A.X kontrola kinetochorów (prawdopodobnie monitorująca napięcie w obrębie kinetochorów poddawanych przeciwnie skierowanym siłom przez mikrotubule emanujące z przeciwległych biegunów wrzeciona), gdyż w pobliżu kinetochorów dochodzi do fosforylacji γ H2A.X poprzez rekrutację ATM. Ufosforylowany γ H2A.X rekrutuje z kolei MDC1 wraz z Mad2 i kompleksem pre-Cdc20 gdzie wiążą się one do BubR1 i Bub3, co prowadzi do aktywacji SAC [35]. Tak więc czynniki DDR wraz z γ H2A.X i jego kluczowym partnerem MDC1 mogą wchodzić w interakcje z systemem kontrolującym wrzeciono w metafazie sygnalizując obecność pęknięć w chromosomach metafazowych [33]. Możliwe więc, że MDC1 jako główny partner γ H2A.X stanowi łącznik w dwóch niezależnych procesach związanych z podziałami komórki z jednej strony przyciąga ATM do miejsc uszkodzeń, natomiast w fazie podziałowej “przełącza” funkcję ATM na mechanizm odpowiedzialny za regulację SAC [36]. Prawidłowe funkcjonowanie SAC jest kluczowe dla właściwej segregacji chromosomów w metafazie i zachowania integralności genomu w komórkach germinalnych [89]. Wiedza na temat roli γ H2A.X w tym procesie jest jednak fragmentaryczna i dotyczy głównie podziałów mitotycznych, natomiast wciąż niewiele wiadomo w tym zakresie na temat komórek przechodzących mejozę.

PREFERENCYJNA LOKALIZACJA γ H2A.X POZA OBSZARAMI HETEROCHROMATYNOWYMI

Oprócz rekrutacji białek bezpośrednio zaangażowanych w naprawy, γ H2A.X może rekrutować kompleksy białkowe związane z modyfikacjami chromatyny jak TIP60, SWI/SNF, INO80, w ten sposób wpływając na jej strukturę i poziom transkrypcji [39]. Kompleksy remodelujące chromatynę są kluczowe dla utrzymania jej rozluźnionej konformacji, co bezpośrednio wpływa na dostęp białek naprawczych do miejsca uszkodzenia [83] i stanowi kluczowy mechanizm wpływający na kinetykę napraw DNA. Wykazano, że γ H2A.X jest przemieszczany z regionów heterochromatyny [34] do regionów o niższej kondensacji chromatyny, co sugeruje, że efektywność procesów naprawczych może zależeć od konfiguracji chromatyny.

Badania nad czasoprzestrzennym ułożeniem ognisk H2A.X dowodzą, że ogniska te rzadko formują się w heterochromatynie co więcej, wykazano że heterochromatyna charakteryzuje się niższą efektywnością napraw niż euchromatyna, która częściej ulega uszkodzeniom, ale także jest naprawiana w sposób bardziej efektywny [38]. Singh i Radman w swoich badaniach na spermatocytach potwierdzili mniejszą zdolność zachodzenia napraw w obszarach heterochromatynowych, wykazali również, że uszkodzenia DNA wyplatane są z heterochromatyny i przenoszone do euchromatyny w celu dokonania napraw [102]. Podobne zjawisko obserwowane jest również w komórkach somatycznych [28, 38]. Dodatkowo, aktywne transkrypcyjnie regiony euchromatynowe są bogatsze w wariant histonu H2A.X, co wzmacnia jego ufosforylowanie właśnie w tych miejscach, prawdopodobnie dając pierwszeństwo w naprawach kluczowych dla funkcjonowania genomu komórki [78].

Możliwe, że funkcją mechanizmu przenoszącego miejsca napraw poza obszary heterochromatynowe jest nie tylko ułatwienie dokonywania reparacji lecz także zapobieganie generowaniu mutacji i epimutacji. Sugeruje się, że naprawy HR w obrębie silnie skondensowanych i bogatych w sekwencje repetytywne domen heterochromatynowych mogłyby podnosić ryzyko powstawania mutacji dynamicznych. Ewentualne błędy ułożenia odcinków homologicznych podczas naprawy skutkowałyby bowiem delecją lub insercją i stąd zmianą liczby kopii powtarzalnych sekwencji [28,116]. Ponadto, istnieją koncepcje, według których naprawa w obrębie silnie skondensowanych i bogatych w sekwencje repetytywne domen heterochromatynowych mogłaby prowadzić do mutacji dynamicznych związanych z błędami w procesie napraw poprzez HR. W tym przypadku przestrzenne zaburzenie ułożenia odcinków homologicznych mogłoby skutkować delecją lub insercją wysoce powtarzalnych sekwencji po dokonaniu napraw [28,116]. Dodatkowo, odkryto że w plemnikach w przypadku powstania uszkodzenia DNA następuje usunięcie markera epigenetycznego H3K9me3 z heterochromatyny, co może skutkować zmianą heterochromatyny w euchromatynę w obrębie uszkodzenia [102]. Także kinaza VRK1, zaangażowana w nowo poznany mechanizm fosforylacji H2A.X w miejscu uszkodzenia, promuje usuwanie innego markera heterochromatyny, białka HP1 [110].

Zaobserwowano, że traktowanie oocytów związkami zwiększającymi stres oksydacyjny podnosi ekspresję acetylotransferazy HAT1, która rozluźnia strukturę chromatyny [32]. Z kolei stosowanie inhibitorów acetylotransferaz poważnie ogranicza efektywność napraw DNA [18]. Wszystkie przytoczone powyżej obserwacje wskazują na silny związek pomiędzy stopniem kondensacji chromatyny, a podatnością na uszkodzenia i efektywnością naprawy.

Jak już wspomniano γ H2A.X w zygotenie i na początku pachytenu pełni swoje funkcje w sposób niezależny od DSB. Właśnie na tych etapach γ H2A.X kolokalizuje z heterochromatyną fakultatywną i konstytutywną reprezentowaną odpowiednio przez markery H3K9me3 i H3K27me3. Jest to niespotykane we wszystkich in-

nych typach komórek będących w stadium interfazy i pokazuje wieloraką funkcję γ H2A.X w mejozie. Możliwe więc, że funkcją γ H2A.X na początku pachytenu jest wyciszanie transkrypcji i zabezpieczanie niesparowanych części chromosomów, natomiast pod koniec pachytenu funkcjonuje on jako element DDR związany z naprawą powstałych w procesie *crossing-over* pęknięć DNA i ewentualnej eliminacji spermatocytów w przypadku braku napraw tych uszkodzeń.

γ H2A.X, PLURIPOTENCJA I STARZENIE

Pierwotne komórki płciowe PGCs (ang. *Primordial Germ Cells*) i embrionalne komórki macierzyste ESCs (ang. *Embryonic Stem Cells*) wywodzą się z linii komórek epiblastu i wykazują szereg podobieństw. Najnowsze badania wskazują na występowanie potencjalnie nowej roli γ H2A.X w embrionalnych komórkach macierzystych (ESCs) i indukowanych pluripotentnych komórkach macierzystych (ang. *induced Pluripotent Stem Cells*, iPSCs). Sugeruje się, że ufosforylowana forma H2A.X zapewnia samo-odnawianie się i zdolność podziałową mysich ESCs oraz może utrzymać potencjał komórek macierzystych [8, 115]. Lokalizacja γ H2A.X w pobliżu charakterystycznych sekwencji promotorowych niektórych genów może również pełnić funkcję w wyciszaniu genów odpowiedzialnych za zróżnicowany charakter komórek. Najprawdopodobniej odbywa się to poprzez kontrolę ułożenia sekwencji heterochromatynowych H3K9e3 w obrębie promotorów niektórych genów [120]. Zaburzenie ułożenia γ H2A.X w chromatynie embrionalnych komórek macierzystych, przy jednoczesnym zachowaniu jego poziomu, podnosi ekspresję genów cechujących komórki o wyższym stopniu zróżnicowania [120]. Indukowane pluripotentne komórki macierzyste, w których doszło do prawidłowego przeprogramowania chromatyny cechują się wysoką proporcją ognisk γ H2A.X, co jednocześnie koreluje z dużą ekspresją markera komórek macierzystych Nanog [74]. Wiadomo, że zarodki pozbawione genu Nanog tracą zdolność do wytworzenia komórek germinalnych [25]. Geny konieczne dla utrzymania niezróżnicowanego charakteru komórek jak Nanog czy Oct4, również wymagają utrzymania stanu hipometylacji w obrębie sekwencji promotorowych, a zaburzenie hipometylacji w obrębie tych genów prowadzi do niepłodności [3]. Geny te są intensywnie transkrybowane zarówno w komórkach macierzystych, jak i komórkach linii płciowej, a ich transkrypcja jest niezbędna dla utrzymania kompetencji rozwojowych [53]. Tuinetto i wsp. pokazali, że pozbawione H2A.X embrionalne komórki macierzyste w krótkim czasie tracą zdolności samoodnowy, co wiąże się ze spadkiem ekspresji Nanog i Oct4 [115]. Białka naprawcze uczestniczące w naprawach poprzez homologiczną rekombinację jak Brca1, Brca2 i Rad51, których rekrutacja jest dokonywana przez γ H2A.X, angażują się także w przeprogramowanie chromatyny zachodzące w trakcie generowania indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych [47]. Po-

zbawienie komórek tych białek skutkuje zmniejszeniem ekspresji kluczowego dla komórek macierzystych czynnika Nanog oraz spadkiem poziomu γ H2A.X [47]. Należy podkreślić, że występowanie ognisk naprawczych w komórkach macierzystych nie jest stowarzyszone z występowaniem białek odpowiedzialnych za naprawy DNA jak 53BP1 czy RPA[8]. Świadczy to o niekanonicznej roli γ H2A.X w komórkach macierzystych, gdzie obecność ufosforylowanej formy histonu nie jest bezpośrednio związana z naprawami DNA. Ponadto, niekanoniczna aktywność białek zaangażowanych w DDR może przejawiać się w utrzymaniu stanu pluripotencji, również poprzez kontrolowanie globalnej demetylacji wysepek CpG sekwencjach promotorowych. Zjawisko takie obserwowane jest zarówno w pierwotnych komórkach płciowych, jak i w komórkach embrionalnych [7, 111]. Sugeruje się, że kluczowa dla fosforylacji γ H2A.X kinaza ATM w embrionalnych komórkach macierzystych oraz w indukowanych komórkach macierzystych może również być zaangażowana w kontrolę ekspresji genów i globalną demetylację DNA [8, 43]. Zależny od ATM wysoki poziom γ H2A.X występuje także w komórkach metafazowych w przypadku braku uszkodzeń DNA[71, 50], a także w spermatogoniach myszy [42].

Podsumowując, białka zaangażowane w mechanizm naprawy DNA w komórkach wydają się pełnić funkcję także w utrzymaniu niezróżnicowanego charakteru komórek macierzystych. Spermatogonia oraz oogonia cechują się wyjątkowo dużą zawartością γ H2A.X [15, 99]. Może to świadczyć o wyjątkowej roli tej modyfikacji epigenetycznej w utrzymaniu potencjału rozwojowego komórek macierzystych. Fosforylacja histonu H2A.X może być w tym przypadku związana z wysokim potencjałem rozwojowym. Wiadomo również, że embrionalne komórki macierzyste, podobnie jak pierwotne komórki płciowe (PGCs), wywodzą się z embrionalnych komórek epiblastu (ang. *epi-Stem Cells*, epiSCs) [53]. Zarówno ECS, PGCs jak i epiSCs mają wspólne pochodzenie, przechodzą intensywne przeprogramowanie chromatyny, oraz posiadają wiele wspólnych markerów potencjału rozwojowego jak Nanog czy Oct4 [46][53]. Możliwe, więc, że podobne procesy przeprogramowania chromatyny kontrolowane przez białka naprawcze zachodzą nie tylko w embrionalnych komórkach macierzystych, ale również odpowiadają za charakterystykę samych pierwotnych komórek płciowych. Mimo wszystko rola białek naprawczych w kontroli ekspresji genów, regulacji stopnia kondensacji chromatyny oraz utrzymaniu potencjału rozwojowego komórek macierzystych pozostaje niejasna a ich rola w różnicowaniu pierwotnych komórek płciowych wciąż pozostaje nieznaną.

PODSUMOWANIE

Uszkodzenia DNA, a zwłaszcza najgroźniejsze z nich DSB, mogą powodować fragmentację chromosomów, translokacje, aneuploidie i rearanżacje genomu [57]. γ H2A.X jest niezbędnym w inicjacji procesu szybkiego rozprzestrzeniania się

sygnału DDR realizowanego poprzez rekrutację kluczowych białek naprawczych i białek modyfikujących stan chromatyny [70,108]. Nokauty genów kodujących białka współpracujące z γ H2A.X takich jak MDC1, BRIT1, ATM, BRCA1 powodują całkowitą sterylność osobników niezależnie od płci [11, 59, 80, 87, 123] lub jak w przypadku ATR i BRCA2, są dla nich letalne [21,49]. Spadek ilości γ H2A.X i innych białek naprawczych w oocytach może prowadzić do szybkiej utraty rezerwuaru jajnika i przedwczesnej menopauzy, a także do obniżenia jakości oocytów w wyniku niedostatecznej efektywności napraw i niestabilności genomu, co prowadzi do wzrostu ryzyka aneuploidii i innych obciążeń genetycznych u potomstwa [24, 48, 112].

Przedstawione dane wskazują dobitnie, że γ H2A.X jest wielofunkcyjną modyfikacją epigenetyczną o dużej dynamice zmian w czasie mejozy. Nie ulega wątpliwości, że jest on niezbędny komórkom germinalnym do efektywnej naprawy uszkodzeń związanych z mejotyczną rekombinacją oraz tych powstałych *de novo*. W fazie M zapewnia prawidłowe podziały komórkowe i integralność genomu. Ponadto, wykazano jego zaangażowanie w tworzenie bivalentów w pachytenie, wyciszenie niesparowanych chromosomów, regulację apoptozy, funkcjonowanie punktów kontrolnych cyklu komórkowego, być może także w utrzymywanie stanu pluripotencji i różnicowanie się komórek potomnych.

LITERATURA

- [1] AHMED EA, PHILIPPENS MEP, KAL HB, DE ROOIJ DG, DE BOER P. Genetic probing of homologous recombination and non-homologous end joining during meiotic prophase in irradiated mouse spermatocytes. *Mutat Res – Fundam Mol Mech Mutagen* 2010; **688**: 12-8.
- [2] AITKEN RJ, KRAUSZ C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 2001; **122**: 497-506.
- [3] AL-KHTIB M, BLACHÈRE T, GUÉRIN JF, LEFÈVRE A. Methylation profile of the promoters of Nanog and Oct4 in ICSI human embryos. *Hum Reprod* 2012; **27**: 2948-54.
- [4] ARTUS C, BOUJRAD H, BOUHARROUR A, BRUNELLE M-N, HOOS S, YUSTE VJ, ET AL. AIF promotes chromatinolysis and caspase-independent programmed necrosis by interacting with histone H2AX. *EMBO J* 2010; **29**: 1585-99.
- [5] ASHLEY AK, SHRIVASTAV M, NIE J, AMERIN C, TROKSA K, GLANZER JG ET AL. DNA-PK phosphorylation of RPA32 Ser4/Ser8 regulates replication stress checkpoint activation, fork restart, homologous recombination and mitotic catastrophe. *DNA Repair (Amst)* 2014; **21**: 131-9.
- [6] ATSUMI Y, FUJIMORI H, FUKUDA H, INASE A, SHINOHE K, YOSHIOKA Y ET AL. Onset of quiescence following p53 mediated down-regulation of H2AX in normal cells. *PLoS One* 2011; **6**.
- [7] BAGCI H, FISHER AG. DNA demethylation in pluripotency and reprogramming: the role of tet proteins and cell division. *Cell Stem Cell* 2013; **13**: 265-9.
- [8] BANÁTH JP, BAÑUELOS CA, KLOKOV D, MACPHAIL SM, LANSDORP PM, OLIVE PL. Explanation for excessive DNA single-strand breaks and endogenous repair foci in pluripotent mouse embryonic stem cells. *Exp Cell Res* 2009; **315**: 1505-20.
- [9] BARITAUD M, BOUJRAD H, LORENZO HK, KRANTIC S, SUSIN SA. Histone H2AX: The missing link in AIF-mediated caspase-independent programmed necrosis. *Cell Cycle* 2010; **9**: 3166-73.

- [10] BARLOW AL, HULTÉN MA. Crossing over analysis at pachytene in man. *Eur J Hum Genet* 1998; **6**: 350-8.
- [11] BARLOW C, LIYANAGE M, MOENS PB, TAROUNAS M, NAGASHIMA K, BROWN K ET AL. Atm deficiency results in severe meiotic disruption as early as leptoneura of prophase I. *Development* 1998; **125**: 4007-17.
- [12] BASSING CH, ALT FW. H2AX may function as an anchor to hold broken chromosomal DNA ends in close proximity. *Cell Cycle* 2004; **3**: 149-53.
- [13] BELLANI MA, ROMANIENKO PJ, CAIRATTI DA, CAMERINI-OTERO RD. SPO11 is required for sex-body formation, and Spo11 heterozygosity rescues the prophase arrest of Atm^{-/-} spermatocytes. *J Cell Sci* 2005; **118**: 3233-45.
- [14] BISIG CG, GUIRALDELLI MF, KOUZNETSOVA A, SCHERTHAN H, HÖÖG C, DAWSON DS ET AL. Synaptonemal complex components persist at centromeres and are required for homologous centromere pairing in mouse spermatocytes. *PLoS Genet* 2012; **8**.
- [15] BLANCO-RODRÍGUEZ J. γ H2AX marks the main events of the spermatogenic process. *Microsc Res Tech* 2009; **72**: 823-32.
- [16] BÖNISCH C, HAKE SB. Histone H2A variants in nucleosomes and chromatin: More or less stable? *Nucleic Acids Res* 2012; **40**: 10719-41.
- [17] BONNER WM, REDON CE, DICKEY JS, NAKAMURA AJ, SEDELNIKOVA OA, SOLIER S, ET AL. γ H2AX and cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; **8**: 957-67.
- [18] BOSE P, DAI Y, GRANT S. Histone deacetylase inhibitor (HDACI) mechanisms of action: Emerging insights. *Pharmacol Ther* 2014.
- [19] BRANDSMA I, GENT DC. Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. *Genome Integr* 2012; **3**: 9.
- [20] BROERING TJ, ALAVATTAM KG, SADREYEV RI, ICHIJIMA Y, KATO Y, HASEGAWA K ET AL. BRCA1 establishes DNA damage signaling and pericentric heterochromatin of the X chromosome in male meiosis. *J Cell Biol* 2014; **205**: 663-75.
- [21] BROWN EJ, BALTIMORE D. ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality 2000: 397-402.
- [22] BURGOYNE PS, MAHADEVAIAH SK, TURNER JMA. The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nat Rev Genet* 2009; **10**: 207-16.
- [23] CARROLL J, MARANGOS P. The DNA damage response in mammalian oocytes. *Front Genet* 2013; **4**: 117.
- [24] CELESTE A, PETERSEN S, ROMANIENKO PJ, FERNANDEZ-CAPETILLO O, CHEN HT, SEDELNIKOVA OA ET AL. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 2002; **296**: 922-7.
- [25] CHAMBERS I, SILVA J, COLBY D, NICHOLS J, NIJMEIJER B, ROBERTSON M, ET AL. NANOG safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* 2007; **450**: 1230-4.
- [26] CHERRY SM, ADELMAN CA, THEUNISSEN JW, HASSOLD TJ, HUNT PA, PETRINI JHJ. The Mre11 Complex Influences DNA Repair, Synapsis, and Crossing Over in Murine Meiosis. *Curr Biol* 2007; **17**: 373-8.
- [27] CHICHEPORTICHE A, BERNARDINO-SGHERRI J, DE MASSY B, DUTRILLAUX B. Characterization of Spo11-dependent and independent phospho-H2AX foci during meiotic prophase I in the male mouse. *J Cell Sci* 2007; **120**: 1733-42.
- [28] CHIOLO I, MINODA A, COLMENARES SU, POLYZOS A, COSTES SV, KARPEN GH. Double-strand breaks in heterochromatin move outside of a dynamic HP1a domain to complete recombinational repair. *Cell* 2011; **144**: 732-44.
- [29] CLEAVER JE. Nucleosome structure controls rates of excision repair in DNA of human cells. *Nature* 1977; **270**: 451-3.
- [30] COOK PJ, JU BG, TELESE F, WANG X, GLASS CK, ROSENFELD MG. Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions. *Nature* 2009; **458**: 591-6.
- [31] COURILLEAU C, CHAILLEUX C, JAUNEAU A, GRIMAL F, BRIOIS S, BOUTET-ROBINET E ET AL. The chromatin remodeler p400 ATPase facilitates Rad51-mediated repair of DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* 2012; **199**: 1067-81.

- [32] CUI M-S, WANG X-L, TANG D-W, ZHANG J, LIU Y, ZENG S-M. Acetylation of H4K12 in porcine oocytes during in vitro aging: potential role of ooplasmic reactive oxygen species. *Theriogenology* 2011; **75**: 638-46.
- [33] DOTIWALA F, HARRISON JC, JAIN S, SUGAWARA N, HABER JE. Mad2 Prolongs DNA Damage Checkpoint Arrest Caused by a Double-Strand Break via a Centromere-Dependent Mechanism. *Curr Biol* 2010; **20**: 328-32.
- [34] DOUGLAS P, ZHONG J, YE R, MOORHEAD GBG, XU X, LEES-MILLER SP. Protein phosphatase 6 interacts with the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit and dephosphorylates gamma-H2AX. *Mol Cell Biol* 2010; **30**: 1368-81.
- [35] ELIEZER Y, ARGAMAN L, KORNOWSKI M, RONIGER M, GOLDBERG M. Interplay between the DNA damage proteins MDC1 and ATM in the regulation of the spindle assembly checkpoint. *J Biol Chem* 2014; **289**: 8182-93.
- [36] ELIEZER Y, ARGAMAN L, KORNOWSKI M, RONIGER M, GOLDBERG M. Interplay between the DNA damage proteins MDC1 and ATM in the regulation of the spindle assembly checkpoint. *J Biol Chem* 2014; **289**: 8182-93.
- [37] FADDY MJ, GOSDEN RG, GOUGEON A, RICHARDSON SJ, NELSON JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod* 1992; **7**: 1342-6.
- [38] FALK M, LUKASOVA E, KOZUBEK S. Higher-order chromatin structure in DSB induction, repair and misrepair. *Mutat Res – Rev Mutat Res* 2010; **704**: 88-100.
- [39] FARRELL AW, HALLIDAY GM, LYONS JG. Chromatin Structure Following UV-Induced DNA Damage-Repair or Death? *Int J Mol Sci* 2011; **12**: 8063-85.
- [40] FERLIN A, RAMPAZZO E, ROCCA MS, KEPPEL S, FRIGO AC, DE ROSSI A ET AL. In young men sperm telomere length is related to sperm number and parental age. *Hum Reprod* 2013; **28**: 3370-6.
- [41] FERNANDEZ-CAPETILLO O, CHEN H-T, CELESTE A, WARD I, ROMANIENKO PJ, MORALES JC ET AL. DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat Cell Biol* 2002; **4**: 993-7.
- [42] FERNANDEZ-CAPETILLO O, MAHADEVAIAH SK, CELESTE A, ROMANIENKO PJ, CAMERINI-OTERO RD, BONNER WM ET AL. H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Dev Cell* 2003; **4**: 497-508.
- [43] FILIPPONI D, MULLER J, EMELYANOV A, BULAVIN DV. Wip1 controls global heterochromatin silencing via ATM/BRCA1-dependent DNA methylation. *Cancer Cell* 2013; **24**: 528-41.
- [44] FIORENZA MT, BEVILACQUA A, BEVILACQUA S, MANGIA F. Growing dictyate oocytes, but not early preimplantation embryos, of the mouse display high levels of DNA homologous recombination by single-strand annealing and lack DNA nonhomologous end joining. *Dev Biol* 2001; **233**: 214-24.
- [45] GALLUZZI L, VANDEN BERGHE T, VANLANGENAKKER N, BUETTNER S, EISENBERG T, VANDENABEELE P ET AL. Programmed necrosis from molecules to health and disease. *Int Rev Cell Mol Biol* 2011; **289**: 1-35.
- [46] GILLICH A, BAO S, GRABOLE N, HAYASHI K, TROTTER MWB, PASQUE V ET AL. Epiblast stem cell-based system reveals reprogramming synergy of germline factors. *Cell Stem Cell* 2012; **10**: 425-39.
- [47] GONZÁLEZ F, GEORGIEVA D, VANOLI F, SHI Z-D, STADTFELD M, LUDWIG T ET AL. Homologous recombination DNA repair genes play a critical role in reprogramming to a pluripotent state. *Cell Rep* 2013; **3**: 651-60.
- [48] GOVINDARAJ V, KERALAPURA BASAVARAJU R, RAO AJ. Changes in the expression of DNA double strand break repair genes in primordial follicles from immature and aged rats. *Reprod Biomed Online* 2015; **30**: 303-10.
- [49] HAKEM R, DE LA POMPA JL, MAK TW. Developmental studies of Brca1 and Brca2 knock-out mice. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1998; **3**: 431-45.
- [50] HAMER G, ROEPERS-GAJADIEN HL, VAN DUYN-GOEDHART A, GADEMAN IS, KAL HB, VAN BUUL PPW ET AL. DNA double-strand breaks and gamma-H2AX signaling in the testis. *Biol Reprod* 2003; **68**: 628-34.

- [51] HAO LY, STRONG MA, GREIDER CW. Phosphorylation of H2AX at short telomeres in T cells and fibroblasts. *J Biol Chem* 2004; **279**: 45148-54.
- [52] ICHIJIMA Y, ICHIJIMA M, LOU Z, NUSSENZWEIG A, DANIEL CAMERINI-OTERO R, CHEN J ET AL. MDC1 directs chromosome-wide silencing of the sex chromosomes in male germ cells. *Genes Dev* 2011; **25**: 959-71.
- [53] IRIE N, TANG W, SURANI A. Germ cell specification and pluripotency in mammals: a perspective from early embryogenesis 2014: 203-15.
- [54] JOYCE EF, PAUL A, CHEN KE, TANNETT N, MCKIM KS. Multiple barriers to nonhomologous DNA end joining during meiosis in *Drosophila*. *Genetics* 2012; **191**: 739-66.
- [55] KAWASHIMA SA, YAMAGISHI Y, HONDA T, ISHIGURO K, WATANABE Y. Phosphorylation of H2A by Bub1 prevents chromosomal instability through localizing shugoshin. *Science* 2010; **327**: 172-7.
- [56] KRUM SA, LA ROSA DALUGDUGAN E DE, MIRANDA-CARBONI GA, LANE TF. BRCA1 Forms a Functional Complex with γ -H2AX as a Late Response to Genotoxic Stress. *J Nucleic Acids* 2010; 2010.
- [57] KUJJO LL, LAINE T, PEREIRA RJG, KAGAWA W, KURUMIZAKA H, YOKOYAMA S ET AL. Enhancing survival of mouse oocytes following chemotherapy or aging by targeting Bax and Rad51. *PLoS One* 2010; **5**: e9204.
- [58] LEDUC F, MAQUENNEHAN V, NKOMA GB, BOISSONNEAULT G. DNA damage response during chromatin remodeling in elongating spermatids of mice. *Biol Reprod* 2008; **78**: 324-32.
- [59] LIANG Y, GAO H, LIN S-Y, PENG G, HUANG X, ZHANG P ET AL. BRIT1/MCPH1 is essential for mitotic and meiotic recombination DNA repair and maintaining genomic stability in mice. *PLoS Genet* 2010; **6**: e1000826.
- [60] LIN F, MA X-S, WANG Z-B, WANG Z-W, LUO Y-B, HUANG L ET AL. Different fates of oocytes with DNA double-strand breaks in vitro and in vivo. *Cell Cycle* 2014; **13**: 2674-80.
- [61] LIU B, YIP RK, ZHOU Z. Chromatin remodeling, DNA damage repair and aging. *Curr Genomics* 2012; **13**: 533-47.
- [62] LIU B, XU X. Serine/threonine protein phosphatases in DNA damage response. *Chinese Sci Bull* 2011; **56**: 3122-31.
- [63] LIU L, BLASCO MA, TRIMARCHI JR, KEEFE DL. An Essential Role for Functional Telomeres in Mouse Germ Cells during Fertilization and Early Development. *Dev Biol* 2002; **249**: 74-84.
- [64] LU C, ZHU F, CHO YY, TANG F, ZYKOVA T, MA WY ET AL. Cell Apoptosis: Requirement of H2AX in DNA Ladder Formation, but Not for the Activation of Caspase-3. *Mol Cell* 2006; **23**: 121-32.
- [65] LU W-J, CHAPO J, ROIG I, ABRAMS JM. Meiotic recombination provokes functional activation of the p53 regulatory network. *Science* 2010; **328**: 1278-81.
- [66] LUDWIKÓW G, XIAO Y, HOEBE RA, FRANKEN NAP, DARROUDI F, STAP J ET AL. Induction of chromosome aberrations in unirradiated chromatin after partial irradiation of a cell nucleus. *Int J Radiat Biol* 2002; **78**: 239-47.
- [67] MAH L-J, EL-OSTA A, KARAGIANNIS TC. γ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 2010; **24**: 679-86.
- [68] MAHADEVAIAH SK, TURNER JM, BAUDAT F, ROGAKOU EP, DE BOER P, BLANCO-RODRÍGUEZ J ET AL. Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet* 2001; **27**: 271-6.
- [69] MAHADEVAIAH SK, BOURC'HIS D, DE ROOIJ DG, BESTOR TH, TURNER JM A, BURGUYNE PS. Extensive meiotic asynapsis in mice antagonises meiotic silencing of unsynapsed chromatin and consequently disrupts meiotic sex chromosome inactivation. *J Cell Biol* 2008; **182**: 263-76.
- [70] MAILAND N, BEKKER-JENSEN S, FAUSTRUP H, MELANDER F, BARTEK J, LUKAS C ET AL. RNF8 Ubiquitylates Histones at DNA Double-Strand Breaks and Promotes Assembly of Repair Proteins. *Cell* 2007; **131**: 887-900.
- [71] MANNIRONI C, BONNER WM. H2A.X, a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and polyA 3' processing signals. *Nucleic Acids Res* 2010; **38**: ii.

- [72] MATSUOKA S, BALLIF BA, SMOGORZEWSKA A, MCDONALD ER, HUROV KE, LUO J ET AL. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 2007; **316**: 1160-6.
- [73] MATTHAIOS D, HOUNTIS P, KARAKITSOS P, BOUROS D, KAKOLYRIS S. H2AX a promising biomarker for lung cancer: a review. *Cancer Invest* 2013; **31**: 582-99.
- [74] MATTOU A, BIRAN A, MESHORER E. Global epigenetic changes during somatic cell reprogramming to iPS cells. *J Mol Cell Biol* 2011; **3**: 341-50.
- [75] MEYER-FICCA ML, SCHERTHAN H, BÜRKLE A, MEYER RG. Poly(ADP-ribosyl)ation during chromatin remodeling steps in rat spermiogenesis. *Chromosoma* 2005; **114**: 67-74.
- [76] MUELLER JL, MAHADEVAIAH SK, PARK PJ, WARBURTON PE, PAGE DC, TURNER JM A. The mouse X chromosome is enriched for multicopy testis genes showing postmeiotic expression. *Nat Genet* 2008; **40**: 794-9.
- [77] MURNANE JP. Telomere dysfunction and chromosome instability. *Mutat Res* 2012; **730**: 28-36.
- [78] NATALE F, RAPP A, YU W, DURANTE M, TAUCHER-SCHOLZ G, CARDOSO M. Genome-wide multi-parametric analysis of H2AX or gammaH2AX distributions during ionizing radiation-induced DNA damage response. *Epigenetics Chromatin* 2013; **6**: P58.
- [79] NAUMOVA AK, FAYER S, LEUNG J, BOATENG KA., CAMERINI-OTERO RD, TAKETO T. Dynamics of Response to Asynapsis and Meiotic Silencing in Spermatocytes from Robertsonian Translocation Carriers. *PLoS One* 2013; **8**: 1-13.
- [80] OKTAY K, KIM JY, BARAD D, BABAYEV SN. Association of BRCA1 mutations with occult primary ovarian insufficiency: a possible explanation for the link between infertility and breast/ovarian cancer risks. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 240-4.
- [81] OLIVE PL. Endogenous DNA breaks: γ H2AX and the role of telomeres 2009; **1**: 154-6.
- [82] PALM W, DE LANGE T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet* 2008; **42**: 301-34.
- [83] PALOMERA-SANCHEZ Z, ZURITA M. Open, repair and close again: chromatin dynamics and the response to UV-induced DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 2011; **10**: 119-25.
- [84] PANIER S, BOULTON SJ. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; **15**: 7-18.
- [85] PARK J-H, PARK E-J, HUR S-K, KIM S, KWON J. Mammalian SWI/SNF chromatin remodeling complexes are required to prevent apoptosis after DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 2009; **8**: 29-39.
- [86] PETERSEN S, CASELLAS R, REINA-SAN-MARTIN B, CHEN HT, DIFILIPPANTONIO MJ, WILSON PC ET AL. AID is required to initiate Nbs1/gamma-H2AX focus formation and mutations at sites of class switching. *Nature* 2001; **414**: 660-5.
- [87] PITTMAN DL, COBB J, SCHIMENTI KJ, WILSON L A, COOPER DM, BRIGNULL E ET AL. Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog. *Mol Cell* 1998; **1**: 697-705.
- [88] PODHORECKA M, SKLADANOWSKI A, BOZKO P. H2AX Phosphorylation : Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy 2011; 2011.
- [89] POLANSKI Z. Spindle assembly checkpoint regulation of chromosome segregation in mammalian oocytes. *Reprod Fertil Dev* 2013; **25**: 472-83.
- [90] RÜBE CE, ZHANG S, MIEBACH N, FRICKE A, RÜBE C. Protecting the heritable genome: DNA damage response mechanisms in spermatogonial stem cells. *DNA Repair (Amst)* 2011; **10**: 159-68.
- [91] REDON CE, NAKAMURA AJ, ZHANG YW, Ji J, BONNER WM, KINDERS RJ, ET AL. Histone gammaH2AX and poly(ADP-ribose) as clinical pharmacodynamic biomarkers. *Clin Cancer Res* 2010; **16**: 4532-42.
- [92] RODIER F, MUÑOZ DP, TEACHENOR R, CHU V, LE O, BHAUMIK D ET AL. DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J Cell Sci* 2011; **124**: 68-81.
- [93] ROGAKOU EP, PILCH DR, ORR AH, IVANOVA VS, BONNER WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 1998; **273**: 5858-68.

- [94] ROGAKOU EP, NIEVES-NEIRA W, BOON C, POMMIER Y, BONNER WM. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem* 2000; **275**: 9390-5.
- [95] ROYO H, POLIKIEWICZ G, MAHADEVAIAH SK, PROSSER H, MITCHELL M, BRADLEY A ET AL. Evidence that meiotic sex chromosome inactivation is essential for male fertility. *Curr Biol* 2010; **20**: 2117-23.
- [96] ROYO H, PROSSER H, RUZANKINA Y, MAHADEVAIAH SK, CLOUTIER JM, BAUMANN M ET AL. ATR acts stage specifically to regulate multiple aspects of mammalian meiotic silencing. *Genes Dev* 2013; **27**: 1484-94.
- [97] SAKAMOTO S, IJIMA K, MOCHIZUKI D, NAKAMURA K, TESHIGAWARA K, KOBAYASHI J ET AL. Homologous recombination repair is regulated by domains at the N- and C-terminus of NBS1 and is dissociated with ATM functions. *Oncogene* 2007; **26**: 6002-9.
- [98] SALIMI M, MOZDARANI H. γ -H2AX as a protein biomarker for radiation exposure response in ductal carcinoma breast tumors : Experimental evidence and literature review 2014; **12**: 1-12.
- [99] SHECHTER D, CHITTA RK, XIAO A, SHABANOWITZ J, HUNT DF, ALLIS CD. A distinct H2A.X isoform is enriched in *Xenopus laevis* eggs and early embryos and is phosphorylated in the absence of a checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**: 749-54.
- [100] SHILOH Y, ZIV Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; **14**: 197-210.
- [101] SINGH P, RAMAN MJ. Dynamics of radiation induced γ H2AX foci in chromatin subcompartments of mouse pachytene spermatocytes and round spermatids. *Mol Reprod Dev* 2014; 1-13.
- [102] SINGH P, RAMAN MJ. Dynamics of radiation induced γ H2AX foci in chromatin subcompartments of mouse pachytene spermatocytes and round spermatids. *Mol Reprod Dev* 2014; 1-13.
- [103] SMITH J, THO LM, XU N, GILLESPIE DA. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. vol. 108. 1st ed. *Elsevier Inc.*, 2010.
- [104] SOLEIMANI R, HEYTENS E, DARZYNKIEWICZ Z, OKTAY K. Mechanisms of chemotherapy-induced human ovarian aging: double strand DNA breaks and microvascular compromise. *Aging (Albany NY)* 2011; **3**: 782-93.
- [105] SOLIER S, POMMIER Y. The nuclear γ -H2AX apoptotic ring: Implications for cancers and autoimmune diseases. *Cell Mol Life Sci* 2014; **71**: 2289-97.
- [106] SPYCHER C, MILLER ES, TOWNSEND K, PAVIC L, MORRICE NA, JANSCAK P ET AL. Constitutive phosphorylation of MDC1 physically links the MRE11-RAD50-NBS1 complex to damaged chromatin. *J Cell Biol* 2008; **181**: 227-40.
- [107] SRIVASTAVA N, RAMAN MJ. Homologous recombination-mediated double-strand break repair in mouse testicular extracts and comparison with different germ cell stages. *Cell Biochem Funct* 25: 75-86.
- [108] STUCKI M, JACKSON SP. MDC1/NFBD1: a key regulator of the DNA damage response in higher eukaryotes. *DNA Repair (Amst)* 3: 953-7.
- [109] STUCKI M, JACKSON SP. H2AX and MDC1: Anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA Repair (Amst)* 2006; **5**: 534-43.
- [110] TAYLOR P, SALZANO M, SANZ-GARCÍA M, MONSALVE DM, MOURA DS, PEDRO A ET AL. Required for foci formation induced by DNA damage VRK1 chromatin kinase phosphorylates H2AX and is required for foci formation induced by DNA damage. *Epigenetics* 2015: 37-41.
- [111] TEPEREK-TKACZ M, PASQUE V, GENTSCH G, FERGUSON-SMITH AC. Epigenetic reprogramming: is deamination key to active DNA demethylation? *Reproduction* 2011; **142**: 621-32.
- [112] TITUS S, LI F, STOBEZKI R, AKULA K, UNSAL E, JEONG K ET AL. Impairment of BRCA1-related DNA double-strand break repair leads to ovarian aging in mice and humans. *Sci Transl Med* 2013; **5**: 172ra21.
- [113] TIWARI M, PRASAD S, TRIPATHI A, PANDEY AN, ALI I, SINGH AK ET AL. Apoptosis in mammalian oocytes: a review. *Apoptosis* 2015; **20**: 1019-25.
- [114] TURINETTO V, GIACHINO C. Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions. *Nucleic Acids Res* 2015: 1-10.

- [115] TURINETTO V, ORLANDO L, SANCHEZ-RIPOLL Y, KUMPFMUELLER B, STORM MP, PORCEDDA P ET AL. High basal gammaH2AX levels sustain self-renewal of mouse embryonic and induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2012; **30**: 1414-23.
- [116] VERVER DE, VAN PELT A MM, REPPING S, HAMER G. Role for rodent Smc6 in pericentromeric heterochromatin domains during spermatogonial differentiation and meiosis. *Cell Death Dis* 2013; **4**: e749.
- [117] WARD IM, MINN K, JORDA KG, CHEN J. Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX. *J Biol Chem* 2003; **278**: 19579-82.
- [118] WOOD JL, SINGH N, MER G CJ. MCPH1 functions in an H2AX-dependent but MDC1-independent pathway in response to DNA damage. *Changes* 2012; **29**: 997-1003.
- [119] WRIGHT WE, SHAY JW. Telomere-binding factors and general DNA repair. *Nat Genet* 2005; **37**: 116-8.
- [120] WU T, STADTFELD M, TSENG Z, LIU Y, TAHMASIAN M HK & XA. Histone variant H2A.X deposition pattern serves as a functional epigenetic mark for distinguishing the developmental potentials of iPSCs. *Cell Stem Cell* 2014; **15**: 281-94.
- [121] XIAO A, LI H, SHECHTER D, AHN SH, FABRIZIO LA, ERDJUMENT-BROMAGE H ET AL. WSTF regulates the H2A.X DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity. *Nature* 2009; **457**: 57-62.
- [122] XIE A, PUGET N, SHIM I, ODATE S, JARZYNA I, BASSING CH ET AL. Control of sister chromatid recombination by histone H2AX. *Mol Cell* 2004; **16**: 1017-25.
- [123] XU X, APRELIKOVA O, MOENS P, DENG C-X, FURTH PA. Impaired meiotic DNA-damage repair and lack of crossing-over during spermatogenesis in BRCA1 full-length isoform deficient mice. *Development* 2003; **130**: 2001-12.
- [124] ZHAO Y, BRICKNER JR, MAJID MC, MOSAMMAPARAST N. Crosstalk between ubiquitin and other post-translational modifications on chromatin during double-strand break repair. *Trends Cell Biol* 2014.

Redaktor prowadzący – Michał Nowicki

Otrzymano: 10.08.2015

Przyjęto: 05.11.2015

Regina Daszkiewicz

Zakład Genetyki i Ewolucjonizmu Uniwersytetu Jagiellońskiego

ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków

e-mail: regina.daszkiewicz@uj.edu.pl