

Received: 2011.12.22
Accepted: 2012.05.20
Published: 2012.06.15

Inhibitory polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP) w terapii nowotworów z mutacjami *BRCA1/2**

Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors in *BRCA1/2* cancer therapy

Katarzyna Kluzek, Aneta Białkowska, Aleksandra Koczorowska,
Małgorzata Z. Zdzenicka

Katedra i Zakład Genetyki Molekularnej Komórki, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum
im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

*Pamięci Prof. dr hab. Małgorzaty Z. Zdzenickiej, prawdziwego pasjonata nauki, nieodżałowanego nauczyciela
i opiekuna.*

Streszczenie

W obecnie stosowanych terapiach przeciwnowotworowych wykorzystywane są przede wszystkim związki wprowadzające uszkodzenia do DNA. Skuteczność leczenia nowotworów uzależniona jest więc od wydajności mechanizmów związanych z ich usuwaniem. Wiele substancji używanych w chemioterapii wykazuje silną toksyczność ogólnoustrojową, dlatego też wciąż poszukiwane są nowe leki charakteryzujące się mniejszą szkodliwością oraz przede wszystkim ograniczające swoje działanie do ogniska nowotworowego. Jednym z ostatnich obiecujących osiągnięć jest uzyskanie nowej generacji niskocząsteczkowych inhibitorów polimeraz poli(ADP-rybozy) (PARP), enzymów związanych z naprawą pęknięć DNA. Związki te wykazują ogromną toksyczność i specyficzność szczególnie względem komórek z mutacjami genów *BRCA1* oraz *BRCA2*, co wskazuje na możliwość wykorzystania tych inhibitorów w terapii nowotworów o określonym podłożu genetycznym. Geny *BRCA1* i *BRCA2* związane są z rekombinacją homologiczną, systemem naprawy usuwającym podwójne pęknięcia DNA, a ich uszkodzenia prowadzą do zachorowań na raka piersi/jajnika. W artykule przedstawiono rolę białek *BRCA1*, *BRCA2* i polimeraz poli(ADP-rybozy) w procesach naprawy DNA, ze szczególnym uwzględnieniem ich udziału w rekombinacji homologicznej. Opisano również krótko historię badań, które doprowadziły do opracowania niskocząsteczkowych inhibitorów PARP o wysokiej specyficzności oraz wyniki testów klinicznych najbardziej efektywnych inhibitorów PARP w perspektywie ich potencjalnego zastosowania w leczeniu onkologicznym, przede wszystkim nowotworów piersi *BRCA1* i *BRCA2*.

Słowa kluczowe:

geny *BRCA1/2* • rekombinacja homologiczna • inhibitory PARP • terapia przeciwnowotworowa

Summary

A majority of currently used anticancer drugs belong to a group of chemical agents that damage DNA. The efficiency of the treatment is limited by effective DNA repair systems functioning in cancer cells. Many chemotherapeutic compounds cause strong systemic toxicity. Therefore, there is still a need for new anticancer agents which are less toxic for nontransformed cells and

* Praca finansowana z grantu MNiSW nr N N401 017640.

selectively kill cancer cells. One of the most promising molecular targets in cancer therapy is poly(ADP-ribose) polymerases (PARP). PARP play an essential role in repairing DNA strand breaks. Small molecule inhibitors of these enzymes have been developed and have proved to be extremely toxic for cancer cells that lack the functional BRCA1 and BRCA2 proteins that are involved in homologous recombination, a complex repair mechanism of DNA double strand breaks. Mutations in BRCA1/2 genes are associated with genetically inherited breast and ovarian cancers. Therefore PARP inhibitors may prove to be very effective and selective in the treatment of these cancer types. This review is focused on the function of BRCA1/2 proteins and poly(ADP-ribose) polymerases in DNA repair systems, especially in the homologous recombination process. A short history of the studies that led to synthesis of high specificity small molecule PARP inhibitors is also presented, as well as the results of clinical trials concerning the most effective PARP inhibitors in view of their potential application in oncological treatment, particularly breast cancers.

Key words: **BRCA1/2 • homologous recombination • PARP inhibitors • anticancer therapy**

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1000548>

Word count: 4516

Tables: 2

Figures: 2

References: 118

Adres autorki: dr n. med. Katarzyna Kluzek, Katedra i Zakład Genetyki Molekularnej Komórki, Collegium Medicum, UMK, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85-094 Bydgoszcz; e-mail: kluzek@cm.umk.pl

Wykaz skrótów: **BER** – naprawa przez wycinanie zasad (base excision repair); **BRCA1 i BRCA2** – białka predysponujące do zachorowania na raka piersi 1 i 2 (breast cancer susceptibility 1 and 2); **DSBs** – podwójne pęknięcia DNA (double strand breaks); **HR** – rekombinacja homologiczna (homologous recombination); **PARP** – polimeraza poli(ADP-rybozy); **PIR** – klony odporne na inhibitory PARP (PARP-inhibitor-resistant).

WPROWADZENIE

Białka kodowane przez geny *BRCA1* i *BRCA2* (breast cancer susceptibility 1 and 2) uczestniczą w licznych, podstawowych procesach komórkowych. Biorą udział między innymi w naprawie DNA związanej z replikacją, w której odpowiadają za usuwanie podwójnych pęknięć DNA (double strand breaks – DSBs) przez rekombinację homologiczną (homologous recombination – HR) [38, 113]. Uszkodzenie tych genów może zaburzyć proces naprawy DSBs, co z kolei prowadzi do niestabilności genomu i procesu nowotworzenia. Występowanie mutacji w genach *BRCA1* i *BRCA2* wiąże się także ze szczególnie wysokim ryzykiem zachorowania na uwarunkowane genetycznie nowotwory piersi i jajnika. W obecnie stosowanych terapiach onkologicznych tych nowotworów wykorzystywane są czynniki wprowadzające różnego typu uszkodzenia do DNA (w tym DSBs), np. promieniowanie jonizujące, inhibitory topoizomerazy II (doksorubicyna), związki sieciujące DNA (mitomycyna C, karboplatyna) i antymetabolity (5-fluorouracyl). Niestety, leki te są bardzo toksyczne dla organizmu, a ich skuteczność jest ograniczona, dlatego wciąż poszukiwane są nowe, bardziej efektywne chemioterapeutyki. Badane są między innymi związki blokujące różne szlaki naprawy DNA, takie jak przeciwciała czy inhibitory swoiste względem wybranych białek naprawczych [23,60]. Ogromne zainteresowanie w ostatnich latach wzbudziła duża efektywność działania nowej generacji inhibitorów polimeraz

poli(ADP-rybozy) (PARP), enzymów związanych z naprawą pęknięć DNA. W porównaniu do dotychczas stosowanych chemioterapeutyków, inhibitory PARP charakteryzują się bardzo dużą toksycznością względem nowotworów z mutacjami *BRCA1*^{-/-} i *BRCA2*^{-/-} oraz brakiem toksyczności w komórkach heterozygotycznych. Może to świadczyć o ich dużym potencjale leczniczym i możliwości zastosowania w monoterapii.

FUNKCJA BIAŁEK BRCA1/2 W PROCESIE REKOMBINACJI HOMOLOGICZNEJ

Jedną z pierwszych obserwacji sugerujących potencjalny udział białek BRCA1/2 w procesach naprawy DNA była ich kolokalizacja w jądrowych kompleksach z RAD51, głównym białkiem rekombinacji homologicznej [13,92]. Obecnie wiadomo, że BRCA1/2 odgrywają strategiczną rolę w tym systemie naprawy DNA, który oprócz łączenia niehomologicznych końców (non homologous end joining – NHEJ) jest jednym z dwóch głównych szlaków naprawy podwójnych pęknięć DNA w komórkach ssaków [74]. DSBs należą do najbardziej toksycznych dla komórki uszkodzeń DNA powstających pod wpływem licznych egzogennych czynników genotoksycznych, np. promieniowania jonizującego, czynników alkilujących DNA, inhibitorów topoizomerazy I i II, a także są indukowane w warunkach fizjologicznych, np. po napotkaniu nienaprawionych pojedynczych pęknięć DNA przez widełki replikacyjne [43].

Naprawa DSBs i wznowienie replikacji uwarunkowane są między innymi prawidłowym przebiegiem procesu rekombinacji homologicznej.

HR uważana jest za bezbłędny mechanizm usuwania DSBs, ponieważ do naprawy tych uszkodzeń wykorzystywana jest chromatyda siostrzana, na bazie której następuje reperyacyjna resynteza sekwencji znajdujących się w pobliżu podwójnego pęknięcia DNA [71]. Po rozpoznaniu DSBs przez kompleks MRN (składający się z białek MRE11, RAD50 i NBS1) następuje rekrutacja i aktywacja kinazy ATM, która fosforyluje wiele białek, między innymi histony H2AX oraz białko BRCA1 (ryc. 1A) [27]. Kompleks MRN pełni w HR podwójną rolę, ponieważ nie tylko aktywuje ATM, ale także utrzymuje końce DNA blisko siebie i dzięki egzonukleazowej aktywności białka MRE11 generuje 3'-jednoniciowy fragment DNA (ssDNA), niezbędny w dalszych etapach naprawy DSBs [86]. Formowanie ssDNA jest również uzależnione od bezpośredniej interakcji MRN z kompleksem białek CtIP/BRCA1. CtIP wiąże się z białkiem NBS1 (ryc. 1B) i wzmacnia aktywność białka MRE11 [89,115]. Fosforylacja seryny 327 białka CtIP przez CDK2 (cyclin dependent kinase 2) promuje jego wiązanie do BRCA1 i kompleksu MRN, a dodatkowo wydaje się odgrywać znaczącą rolę w wyborze ścieżki naprawy DSBs w czasie cyklu komórkowego [115,116].

Do utworzonego 3'-ssDNA przyłącza się następnie białko replikacyjne A (RPA), chroniące jednoniciowe fragmenty przed degradacją (ryc. 1B). Kolejnym etapem HR jest tworzenie nukleoproteinowych filamentów przez RAD51, które wiążąc się do ssDNA zastępuje RPA, katalizuje poszukiwanie homologicznych sekwencji oraz wymianę nici DNA [41]. Za wewnątrzkomórkowy transport RAD51 z cytoplazmy do jądra komórkowego i miejsc występowania DSBs odpowiedzialne jest białko BRCA2, które współdziała w tym procesie z FANCD1/PALB2 oraz BRCA1 (ryc. 1C) [76,102]. Transport RAD51 jest możliwy dzięki wiązaniu tego białka do domeny zawierającej powtarzające się motywy BRC, znajdującej się w centralnej części BRCA2 oraz do umiejscowionego na C-końcu białka dodatkowego miejsca wiązania RAD51 [19,102]. Motywy BRC są kluczowe dla funkcji BRCA2 w naprawie DNA, ponieważ do transportu RAD51 i utrzymania stabilności chromosomalnej wystarczający jest fragment BRCA2 zawierający wyłącznie te motywy [87]. BRCA1, w przeciwieństwie do BRCA2, nie wiąże się bezpośrednio z RAD51, ale bierze udział w HR dzięki współdziałaniu z BRCA2 za pośrednictwem białka FANCD1/PALB2 [98,118].

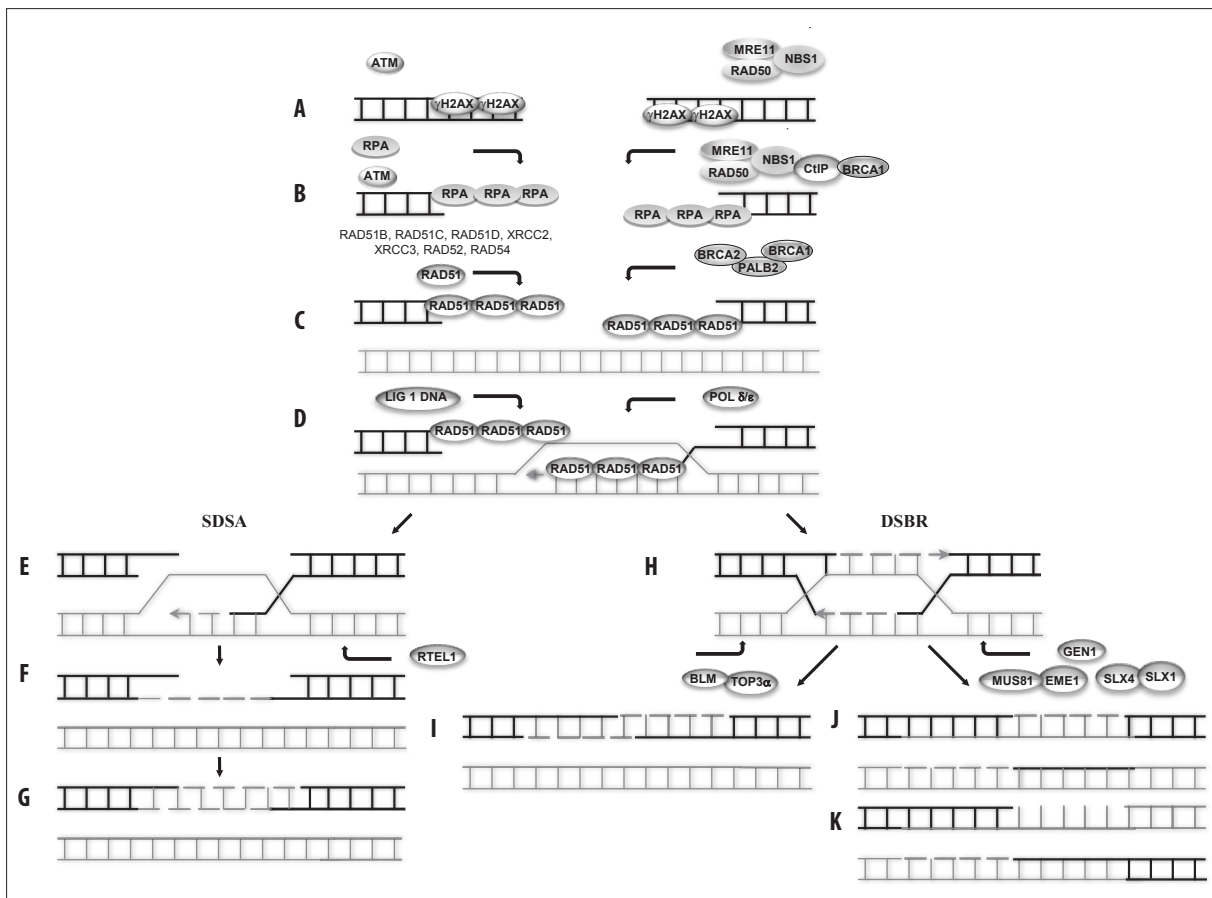
W budowę nukleofilamentów RAD51 zaangażowanych jest także wiele innych białek, do których należą między innymi paralogi RAD51 – RAD51B, FANCD1/RAD51C, RAD51D, XRCC2, XRCC3, a także RAD54 (ryc. 1C) [56,71,74]. W wyniku poszukiwania homologicznych sekwencji i inwazji nici DNA, uwarunkowanej między innymi aktywnością RAD51, powstaje pętla D (displacement loop; ryc. 1D). W obecnie obowiązującym modelu przebiegu rekombinacji homologicznej jest ona wyjściową strukturą kilku niezależnych podtypów HR, między innymi ścieżki związanej z wydłużaniem nici zależnym od syntezy DNA (synthesis-dependent strand annealing – SDSA) oraz naprawą podwójnych pęknięć DNA (double-strand break repair – DSBR).

W SDSA przemieszczona nici ulega wydłużeniu, a po syntezie DNA jest uwalniana przy udziale helikazy RTEL1 (ryc. 1E, F) [109]. Na bazie powstałej matrycy następuje reperyacyjna synteza DNA drugiej nici. W tej ścieżce HR w wyniku naprawy podwójnego pęknięcia DNA nie dochodzi do wymiany fragmentów DNA (non-crossover, ryc. 1G). W odróżnieniu od SDSA, w drugim podtypie rekombinacji homologicznej – DSBR, obydwa końce podwójnego pęknięcia DNA są zaangażowane w naprawę uszkodzenia. Niezależna inwazja nici lub chwytywanie drugiego końca DNA (second end capture) w pętli D prowadzi do formowania podwójnych struktur Holidaya (ryc. 1H) [46,56]. Ich rozdzielenie może następować z udziałem helikazy BLM i topoisomazy III α , w wyniku czego nie dochodzi do wymian fragmentów DNA (ryc. 1I). Struktury Holidaya mogą być także rozdzielone za pomocą resolwaz DNA, do których zalicza się między innymi białko GEN1 oraz kompleksy MUS81/EME1 i SLX4/SLX1. Aktywność tych enzymów prowadzi do formowania produktów naprawy z wymianą fragmentów DNA (ryc. 1J), jak również bez ich wymiany (ryc. 1K) [91,97]. Ciągłość nici w trakcie przebiegu HR jest przywracana z udziałem DNA ligazy I [69].

W przypadku niewłaściwego funkcjonowania BRCA2 dochodzi do obniżenia wydajności HR, natomiast uszkodzenie BRCA1 prowadzi do zaburzeń nie tylko w tym mechanizmie naprawy DNA, ale także w wielu innych procesach komórkowych [58]. Białko BRCA1 zaangażowane jest w wielokierunkową odpowiedź komórki na uszkodzenia DNA, między innymi poprzez regulację ekspresji i funkcji innych białek naprawczych oraz czynników związanych z działaniem punktów kontrolnych [58,106]. Na podstawowe znaczenie białek HR, w tym BRCA1/2, w prawidłowym funkcjonowaniu pojedynczych komórek oraz całego organizmu wskazuje na to, że eliminacja (knockout) genów HR u ssaków jest letalna już we wczesnych stadiach embriogenezy [32]. Ponieważ HR jest procesem warunkującym prawidłowy przebieg replikacji DNA, jej zaburzenia prowadzą do niestabilności genomu, cechy charakteryzującej prawie wszystkie ludzkie nowotwory [71,73].

NOWOTWORY PIERSI UWARUNKOWANE MUTACJAMI GENÓW REKOMBINACJI HOMOLOGICZNEJ

BRCA1 i BRCA2 zaliczane są do genów supresorowych. Cechą charakterystyczną heterozygotycznych nosicieli dziedzicznych mutacji tych genów jest częsta utrata allelu typu dzikiego (loss of heterozygosity – LOH), co w konsekwencji prowadzi do biallelicznej inaktywacji genów BRCA1/2 i nowotworzenia [93,108]. Mutacje *BRCA1* i *BRCA2* mogą być odpowiedzialne nie tylko za rozwój nowotworów piersi/jajnika, ale także prostaty oraz trzustki [59]. Rak piersi jest najpowszechniej występującym nowotworem wśród kobiet i charakteryzuje się znaczną śmiertelnością. Każdego roku na świecie odnotowuje się powyżej miliona nowych zachorowań [14]. Podłoże genetyczne tej choroby zidentyfikowane zostało jedynie na poziomie 5–9% wszystkich przypadków zachorowań, wśród których przeważająca większość związana jest z mutacjami *BRCA1/2* [20]. Geny związane z zachorowaniami na raka piersi dzieli się na geny wysokiej oraz średniej i niskiej penetracji, których klasyfikacja uzależniona jest od poziomu ryzyka rozwoju określonego typu nowotworu w przypadku dziedzicznych predyspozycji.



Rycina 1. Mechanizm i ścieżki rekombinacji homologicznej (HR). Przebieg procesu i udział białek w poszczególnych etapach naprawy opisano w tekście; (A) – rozpoznanie uszkodzenia, (B) – tworzenie wolnych 3' końców DNA, (C) – budowa nukleofilamentu białek RAD51, (D) – transfer nici DNA z wytworzeniem pętli D. Podtypy HR: SDSA (E–G) i DSBR (H–K); (E) Synteza DNA, (F) – powrotna migracja nici i wydłużanie nici DNA, (G) – reparacyjna synteza DNA, (H) – wydłużanie nici z tworzeniem podwójnej struktury Hollidaya, (I oraz J) – rozdzielenie struktur Hollidaya bez wymiany fragmentów DNA, (K) – rozdzielenie struktur Hollidaya z wymianą fragmentów DNA

BRCA1 i *BRCA2* należą do grupy genów wysokiej penetracji i związane są z dużym prawdopodobieństwem rozwoju nowotworów. U nosicieli mutacji w tych genach ryzyko zachorowania na raka piersi wynosi ponad 80% [105]. Prawdopodobieństwo rozwoju raka jajnika stanowi natomiast 30–50% w przypadku mutacji *BRCA1*, a dla nosicieli mutacji *BRCA2*, 15–30% [5].

Uwarunkowane dziedzicznie zachorowania na raka piersi związane są także z mutacjami innych genów kodujących białka rekombinacji homologicznej, np. *ATM* i *RAD50*. Zwiększona predyspozycja do występowania tych nowotworów wiąże się również z mutacjami *FANCO/RAD51C* oraz *FANCN/PALB2*, które jednocześnie są genami rekombinacji homologicznej (zob. rozdz. Funkcja białek *BRCA1/2* w HR) i szlaku anemii Fanconiego (FA). Kolejnym genem FA związanym z nowotworami piersi o podłożu genetycznym jest *FANCI/BACH1/BRIP1*, który współdziała z rekombinacją homologiczną poprzez bezpośrednie oddziaływanie białka *FANCI* z *BRCA1* [55,84]. FA jest chorobą charakteryzującą się na poziomie komórkowym niestabilnością chromosomalną oraz nadwrażliwością na związki wprowadzające wiązania krzyżowe do DNA, a szlak anemii Fanconiego wraz z HR uczestniczy w naprawie tych uszkodzeń [44].

Do zachorowań na raka piersi predysponują również mutacje innych genów, np.: *TP53*, *CHEK2* czy *MAP3K1*, co wskazuje, że procesy obejmujące szeroką odpowiedź komórki na uszkodzenia DNA są ściśle związane z kancerogenezą. Białka kodowane przez te geny odpowiedzialne są za przekazywanie sygnałów w wielu biologicznych procesach, między innymi w apoptozie, aktywacji punktów kontrolnych w obecności uszkodzeń DNA oraz we wzroście i proliferacji komórek [10,84].

WRAZLIWOŚĆ MUTANTÓW *BRCA1/2* NA NOWE INHIBITORY PARP

Obecnie duże nadzieje w leczeniu chorych z nowotworami wiąże się z nowymi terapiami, których działanie oparte jest na blokowaniu mechanizmów naprawy DNA. Do jednych z najbardziej intensywnie badanych w ostatnich latach procesów należy blokowanie aktywności polimeraz poli(ADP-rybozy) poprzez swoiste inhibitory. Ostatnio zainteresowanie wzbudziły doniesienia o ogromnej wrażliwości homozygot *BRCA1/2* na inhibitory PARP trzeciej generacji, AG14361 i KU0058684 (tab.1). W badaniach tych wykorzystane zostały różne modele komórkowe: komórki ludzkie MCF7 i MDA-MB-231 z wyciszoną przez siRNA ekspresją *BRCA2*, mutant komórkowy chomika

chińskiego V-C8 *Brca2*^{-/-}, a także mysie komórki embrionalne *Brca1*^{-/-} oraz *Brca2*^{-/-}. Wszystkie analizowane linie komórkowe były 50–1000 razy bardziej wrażliwe na stosowane inhibitory od komórek typu dzikiego [8,29]. Wyniki te potwierdziły badania *in vivo* przeprowadzone z wykorzystaniem mysich modeli zwierzęcych, którym przeszczepiano komórki z uszkodzonym *Brca2* (V-C8 chomika chińskiego lub mysie komórki embrionalne) w celu indukowania rozwoju nowotworów. Podanie myszom inhibitorów PARP (AG14361 i KU0058684) prowadziło do zahamowania wzrostu guzów [8,29].

Zwiększoną wrażliwość na inhibitory PARP trzeciej generacji (np.: KU0058684 i KU0058948) zaobserwowano także w komórkach chomika chińskiego z uszkodzonymi innymi genami rekombinacji homologicznej, np. *XRCC2* i *XRCC3*. Wyniki te sugerowały, że podatność na toksyczne działanie inhibitorów PARP związana jest raczej z zaburzeniami tego procesu naprawy DNA, a nie mutacjami genów *BRCA1* lub *BRCA2* [8]. Teorię tę potwierdziły dalsze badania, które wykazały niezmiernie dużą wrażliwość na inhibitory PARP komórek z uszkodzonymi kolejnymi genami związanymi z naprawą podwójnych pęknięć DNA przez HR, np.: *ATM*, *RAD51*, *NBS1*, *ATR* [64]. Spośród mutantów z niesprawnymi innymi systemami naprawy DNA, jedynie komórki z uszkodzonym szlakiem anemii Fanconiego (z mutacjami genów *FANCA*, *FANCC* i *FANCD2*) charakteryzowała zwiększona wrażliwość na te związki, jednak w znacznie mniejszym stopniu niż mutanty komórkowe HR [64]. Powodem obserwowanej u mutantów FA nadwrażliwości na inhibicję PARP jest prawdopodobnie ściśle współdziałanie HR ze szlakiem FA w procesie usuwania wiązań krzyżowych, w którym podwójne pęknięcia DNA powstają jako struktury pośrednie.

ROLA PARP-1 W KOMÓRCE

Pierwsze białka PARP zostały opisane już w latach 80. ub.w., jednak dopiero odkrycie potencjalnego znaczenia terapeutycznego inhibitorów PARP zapoczątkowało intensywne badania nad rolą komórkową tych białek. Obecnie znanych jest 18 polimeraz PARP, których charakterystyczną cechą wspólną jest obecność domeny katalitycznej z silnie konserwowanym ewolucyjnie motywem, tzw. „sygaturą PARP”, umożliwiającą przeprowadzanie reakcji poli(ADP-rybozylacji), będącej jedną z posttranslacyjnych modyfikacji białek [77]. Wiadomo, że poli(ADP-rybozylacja) jest procesem związanym z odpowiedzią komórek na uszkodzenia DNA, ale dotychczasowe badania wykazały aktywność enzymatyczną jedynie u 6 polimeraz PARP. Najwyższy poziom aktywności mają PARP-1 oraz PARP-2 i najprawdopodobniej tylko one biorą udział w procesach naprawczych DNA [4]. Białka te mogą tworzyć heterodimery, mają wspólne docelowe białka jądrowe, a ich funkcje częściowo się nakładają, o czym świadczy letalność myszy na etapie embrionalnym wywołana ich jednoczesnym uszkodzeniem [67]. Wyniki badań myszy z nokautem *Parp1* wykazały, że pomimo zaburzenia naprawy pęknięć DNA w ich komórkach, poli(ADP-rybozylacja) była utrzymywana na poziomie ok. 10% [3]. Wskazuje to, że najistotniejszą rolę komórkową pełni PARP-1, natomiast PARP-2 prawdopodobnie działa pomocniczo, częściowo kompensując funkcje PARP-1.

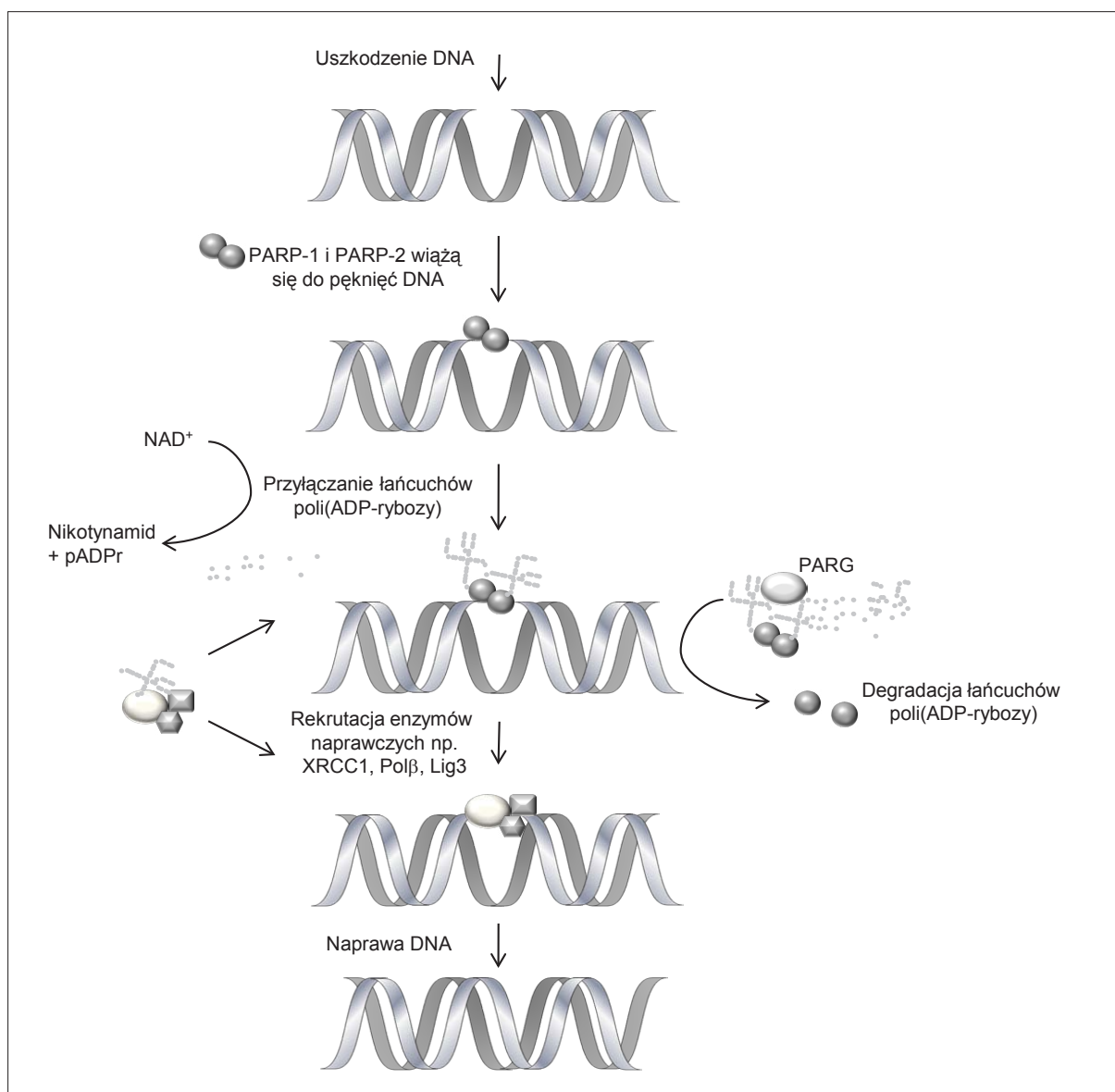
Udział PARP-1 w naprawie DNA

Zaangażowanie PARP-1 w procesy naprawy DNA związane jest przede wszystkim z wykrywaniem oraz sygnalizacją pojedynczych i podwójnych pęknięć DNA. Białko to w postaci dimeru wiąże się z uszkodzonym DNA poprzez domeny typu palca cynkowego znajdujące się na N-końcu, co prowadzi do aktywacji domeny katalitycznej zlokalizowanej na C-końcu. Aktywny PARP-1 katalizuje rozpad NAD⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide) do nikotynamidu i ADP-rybozy (ryc. 2), a następnie przyłącza cząsteczki ADP-rybozy do białek akceptorowych w formie liniowych lub rozgałęzionych łańcuchów polimeru poli ADP-rybozy (PAR), osiągających w badaniach *in vitro* długość nawet 200–400 jednostek [65,78]. Aktywność PARP-1 wzrasta bardzo gwałtownie (prawie 500-krotnie) po związaniu z uszkodzonym DNA, a tworzenie PAR jest procesem niezmiernie dynamicznym. Polimery te powstają w ciągu zaledwie paru sekund i już po kilku minutach ulegają degradacji przez glikohydrolazę poli(ADP-rybozy) (poly(ADP)ribose glycohydrolase – PARG) [2,18]. W przypadku dużej ilości uszkodzeń DNA, silna aktywacja PARP-1 prowadzi do uszczuplenia puli NAD⁺ i ATP, co w konsekwencji może prowadzić do nieprawidłowego funkcjonowania komórki, a nawet jej śmierci przez nekrozę [62].

Poli(ADP-rybozylacji) ulega przede wszystkim sam PARP-1 (ok. 90%) oraz wiele innych białek jądrowych. Przyłączenie PAR zmniejsza powinowactwo PARP-1 do DNA, a badania *in vitro* wskazują, że usunięcie PARP-1 z miejsca uszkodzenia umożliwia dostęp białek naprawczych do DNA i jednocześnie hamuje dalszą syntezę PAR [90,103,104,117]. PARP-1 poza detekcją uszkodzeń, przekazuje także za pośrednictwem PAR informację o obecności uszkodzenia DNA do białek efektorowych [1]. Poli(ADP-rybozylacji) ulegają białka biorące udział w metabolizmie DNA oraz w odpowiedzi komórki na uszkodzenia DNA, m.in. histony, topoizomeraza I i II, helikazy DNA, czynniki transkrypcyjne i białka naprawy DNA np. *XRCC1* [16,51,53,57,94]. Białka modyfikowane przez PARP-1 zawierają motyw konsensusowy wiążący PAR (PAR-binding consensus motif), który często leży w obrębie ich domen funkcjonalnych, odpowiedzialnych np. za wiązanie do DNA lub innych białek [80]. Przyłączenie PAR może zatem modulować aktywność białek docelowych, ze względu na silnie ujemny ładunek i duży rozmiar polimeru. PAR może też stanowić miejsce wiązania innych białek [6,51,80].

Ważną rolą PARP-1 związaną z naprawą DNA jest regulacja struktury chromatyny. Histony i inne białka związane z chromatyną ulegają poli(ADP-rybozylacji), ponadto PAR w postaci wolnej lub połączonej z PARP-1 może również niekwalencyjnie oddziaływać z tymi białkami. Prowadzi to do destabilizacji nukleosomów lub do lokalnej relaksacji chromatyny, co umożliwia rekrutację oraz wiązanie białek naprawczych do miejsca uszkodzenia DNA [16,50,52,57,80,81,83,85].

Po związaniu z uszkodzonym DNA, PARP-1 nie tylko przeprowadza reakcję poli(ADP-rybozylacji), ale wchodzi również w bezpośrednie interakcje z białkami naprawczymi DNA. Najlepiej zbadane jest powiązanie PARP-1 z enzymami systemu naprawy DNA przez wycinanie zasad (base



Rycina 2. Aktywacja PARP w odpowiedzi na pęknięcia DNA. Opis w tekście

excision repair – BER), np. ligazą III czy XRCC1, z którymi tworzy kompleks w odpowiedzi na oksydacyjne uszkodzenia DNA [21,54,79]. W komórkach z nieaktywnym PARP-1 wydajność BER jest obniżona, co wskazuje na znaczącą rolę PARP-1 w tym systemie naprawy DNA [17].

Aktywacja PARP-1 zachodzi również w odpowiedzi na podwójne pęknięcia DNA, sugerując związek tego białka z procesami ich naprawy, między innymi z rekombinacją homologiczną. Wykazano, że PARP-1 promuje aktywację MRE11, NBS1 oraz ATM w odpowiedzi na DSBs [39,40]. Ponadto PARP-1 zaangażowana jest w kontrolę postępu widełek replikacyjnych związanego z naprawą DSBs przez rekombinację homologiczną, najprawdopodobniej poprzez regulację rekrutacji białka MRE11, co umożliwia ponowny start widełek replikacyjnych [45,96]. Dotychczasowe dane dotyczące udziału PARP-1 w tym systemie naprawy DNA są jednak niejednoznaczne i wskazują zarówno na hamowanie, jak i promowanie przebiegu HR przez ten enzym [25].

Proponowany mechanizm molekularny odpowiadający za niezwykłą wrażliwość mutantów HR na inhibitory PARP zakłada, że inhibicja PARP prowadzi do zaburzenia efektywnej naprawy pojedynczych pęknięć DNA przez BER, czego skutkiem jest ich nagromadzenie w komórkach. Napotkanie SSB przez widełki replikacyjne może spowodować ich pęknięcie, ponieważ polimeraza replikacyjna trafia na przerwę w matrycy, co w konsekwencji prowadzi do utworzenia DSBs z jednym wolnym końcem. W prawidłowych komórkach DSBs są usuwane przez HR, jednak w komórkach z defektywnymi genami rekombinacji homologicznej uszkodzenia te nie są wydajnie naprawiane, co skutkuje fragmentacją DNA i śmiercią komórki przez apoptozę. Inhibicja PARP w komórkach z uszkodzoną HR jest więc przykładem możliwości wykorzystania w terapii przeciwnowotworowej, zjawiska tzw. „sprzężonej letalności” (synthetic lethality), w którym uszkodzenie pojedynczego szlaku naprawy DNA jest tolerowane przez komórki, natomiast zahamowanie kolejnego, współdziałającego z nim mechanizmu naprawczego, wywołuje efekt letalny [49].

Inhibitory PARP

Pierwszymi inhibitorami PARP stosowanymi w badaniach laboratoryjnych były strukturalne analogi nikotynamidu, m.in. 3-aminobenzamid (3-AB) i inne pochodne benzamidu, o działaniu kompetycyjnym względem substratu reakcji poli(ADP-rybozylacji), NAD^+ (tab. 1) [82]. Pomimo niewielkiej toksyczności dla komórek *in vitro* oraz dobrej tolerancji *in vivo*, charakteryzowała je mała swoistość, ponieważ były aktywne względem wszystkich białek z rodziny PARP [110]. Wynikało to z bardzo podobnej budowy domeny katalitycznej i sposobu wiązania NAD^+ przez wszystkie białka z rodziny PARP. Dzięki badaniom molekularnym wykazano, że aby zatrzymać naprawę DNA przez BER, wystarczy zablokować aktywność PARP-1 i PARP-2, dlatego przy projektowaniu nowych inhibitorów PARP kładzie się duży nacisk na to, aby były swoiste tylko względem tych dwóch enzymów i jednocześnie nietoksyczne dla komórek w stężeniach wywołujących ich inhibicję (tab. 1).

Uzyskanie pożądanej skuteczności terapeutycznej inhibitorów PARP jest ściśle związane z ich swoistością, na co wskazują między innymi badania komórek raka trzustki CAPAN-1 z uszkodzonym genem *BRCA2*. Komórki te są wrażliwe jedynie na bardzo specyficzny inhibitor PARP KU0058948, a nie na słabsze związki, takie jak 3-AB czy NU1025 [33,63]. Wieloletnie poszukiwania prowadzone przez liczne grupy badaczy doprowadziły do identyfikacji nowych inhibitorów PARP charakteryzujących się znacznie wyższą selektywnością i efektywnością wykazywaną *in vitro*, a tym samym bardziej odpowiednich do prób ich zastosowania w badaniach przedklinicznych i klinicznych [15]. W latach 90. ub. w. opracowane zostały inhibitory drugiej generacji, dwu- i trójcykliczne laktamy, imidazole oraz karboksyamidy benzoksazolu [30]. Zdecydowana większość stosowanych obecnie niskocząsteczkowych inhibitorów PARP trzeciej generacji to pochodne tych związków, nawet 1000-krotnie efektywniejsze od pierwszego dostępnego inhibitora 3-AB (tab. 1). Wszystkie te związki są inhibitorami kompetycyjnymi, z wyjątkiem iniparibu (BSI-201), który oddziałuje z domeną wiążącą DNA, a nie miejscem aktywnym PARP-1 [30].

Pomimo różnego mechanizmu blokowania aktywności PARP przez inhibitory trzeciej generacji, ich skuteczność w stosunku do komórek z mutacjami *BRCA1/2* jest podobna oraz porównywalna z efektem zniesienia aktywności PARP-1 w komórkach poprzez wyciszenie jego ekspresji przy pomocy siRNA (siParp-1). Zastosowanie siParp-1 *in vitro* w komórkach mysich z uszkodzonym *Brcal* lub *Brc2* prowadzi tak samo jak w przypadku inhibitorów PARP do obniżenia ich przeżywalności [8,29]. Skuteczność siParp-1 została także potwierdzona w badaniach *in vivo*, w których podawanie nanocząsteczek zawierających siParp-1 myszom z nowotworami jajnika o podłożu *Brcal* istotnie wydłużało czas ich życia, a w wyizolowanych komórkach guzów tych zwierząt poziom apoptozy był dwukrotnie wyższy niż w komórkach kontrolnych [35]. Wydaje się natomiast, że różne metody eliminacji obecności PARP w komórkach mają odmienny wpływ na poziom indukcji pojedynczych pęknięć DNA i efektywność ich naprawy. Hamowanie aktywności PARP-1 za pomocą inhibitorów prowadzi do obniżenia wydajności naprawy SSBs wnioskowanej na podstawie ilości pojedynczych pęknięć DNA, czego przyczyną jest

prawdopodobnie pozostawanie tego enzymu po inhibicji w formie związanej do DNA, co z kolei blokuje przyłączenie się innych białek naprawczych do miejsca uszkodzenia DNA. Natomiast w komórkach, w których do wyciszenia ekspresji PARP-1 zastosowano siPARP-1 naprawa SSBs jest wydajniejsza, co sugeruje, że brak ekspresji PARP-1 może być kompensowany przez aktywację innej ścieżki naprawy uszkodzenia DNA, którą z dużym prawdopodobieństwem jest HR [34,95].

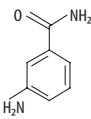
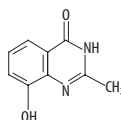
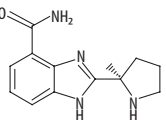
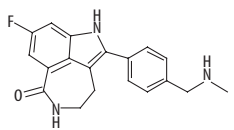
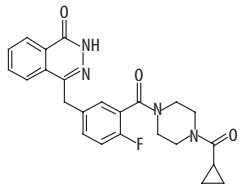
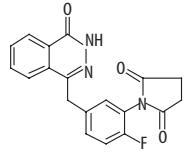
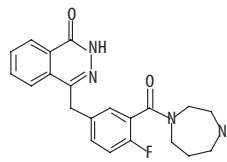
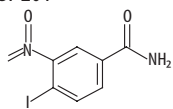
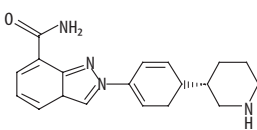
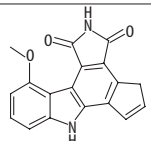
ZASTOSOWANIE INHIBITORÓW PARP W TERAPII PRZECIWNOWOTWOROWEJ

Selektywność inhibitorów PARP w stosunku do komórek z niesprawnym systemem HR, zwłaszcza homozygotycznych komórek *BRCA1/2*^{-/-}, wskazuje że mogą być skutecznym lekiem przeciwnowotworowym. Dodatkowym, niezwykle istotnym argumentem sugerującym możliwość terapeutycznego wykorzystania tych związków jest niewrażliwość heterozygot *BRCA1/2* na inhibitory PARP. Z tego względu, w przypadku nowotworów z homozygotycznymi mutacjami genów *BRCA1/2*, aktywność inhibitorów PARP zawężona jest do obszaru guza. Znacznie zmniejsza to ryzyko ogólnoustrojowej cytotoksyczności, stanowiącej ogromny problem obecnie stosowanych terapii i przede wszystkim umożliwia ich bezpieczne stosowanie w przypadku nowotworów o podłożu genetycznym *BRCA1/2*.

Bardzo obiecujące wyniki badań przedklinicznych inhibitorów PARP nowej generacji w monoterapii nowotworów z mutacjami w genach *BRCA1* i *BRCA2* umożliwiły przejście tych związków do badań klinicznych (tab. 2). Niedawno opublikowano wyniki badań klinicznych fazy pierwszej dla olaparibu (AZD2281/KU0059436), doustnego inhibitora PARP, podawanego nosicielkom mutacji genu *BRCA1* lub *BRCA2* z zaawansowanym rakiem piersi. Lek ten wykazywał pożądaną aktywność kliniczną i dobrą tolerancję, a poprawę stanu zdrowia zaobserwowano u 63% (u 12 z 19 badanych) pacjentek [31]. Równie obiecujące są wyniki II fazy oceny klinicznej, w której zastosowano olaparib w monoterapii u kobiet z mutacjami w *BRCA1* i/lub *BRCA2* w przerzutowym raku piersi. Standardowa chemioterapia u tych pacjentek nie przyniosła oczekiwanych efektów, natomiast u prawie 25% kobiet otrzymujących dwa razy dziennie 100 mg olaparibu oraz u 41% otrzymujących 400 mg (maksymalna bezpieczna dawka) zaobserwowano zmniejszenie rozmiarów guza piersi. Toksyczność ogólnoustrojowa olaparibu w obu grupach była niewielka [107].

Ze względu na udział PARP-1 i PARP-2 w naprawie uszkodzeń DNA indukowanych przez promieniowanie jonizujące i niektóre leki przeciwnowotworowe, inhibitory PARP są również intensywnie badane jako czynnik zwiększający wrażliwość nowotworów na chemio- i radioterapię [99,100]. W różnych ludzkich liniach nowotworowych zaobserwowano, że łączenie chemio- lub radioterapii z inhibitorami PARP niszczy komórki skuteczniej od pojedynczo stosowanych czynników genotoksycznych [37,100]. Nowe inhibitory PARP znacznie poprawiają też wynik terapeutyczny np. temozolomidu, cisplatyny, inhibitorów topoizomerazy I, związków powszechnie stosowanych w leczeniu klinicznym, dzięki czemu stają się atrakcyjnym nowym lekiem w terapiach kombinowanych [9,37]. Bardzo pozytywne rezultaty otrzymano w II fazie badań klinicznych inhibitora

Tabela 1. Efektywność wybranych inhibitorów PARP szacowana na podstawie wartości IC_{50} lub K_i

Inhibitor PARP	Producent	IC_{50}/K_i	Piśmiennictwo
3-AB 	dostępny komercyjnie	IC_{50} 5,4 μ M (nieswoisty)	[82]
NU1025 	dostępny komercyjnie	IC_{50} 0,4 μ M (PARP-1)	[7]
veliparib/ABT88 	Abbot Laboratories	K_i 5,2 nM (PARP-1); 2,9 nM (PARP-2)	[26]
rucaparib/AG014699/PF-01367338/AG14361 	Pfizer Inc.	K_i 1,4 nM (PARP-1) K_i <5 nM (PARP-2)	[101] [9,71]
olaparib/AZD2281/KU0059436 	AstraZeneca Plc, KuDOS Pharmaceuticals Ltd.	IC_{50} 5 nM (PARP-1); 1 nM (PARP-2)	[66]
KU0058648 		IC_{50} 3.2nM (PARP-1)	[64]
KU0058948 		IC_{50} 3.4nM (PARP-1)	[64]
iniparib/BSI-201 	Sanofi-aventis/BiPar Sciences	brak danych	–
MK-4827 	Merck	IC_{50} 3,8 nM (PARP-1); 2,1 nM (PARP-2)	[48]
CEP-9722 	Cephalon	IC_{50} 20 nM (PARP-1); 6 nM (PARP-2)	[68]

IC_{50} (inhibitory concentration) – stężenie związku, przy którym zachodzi 50% inhibicja aktywności katalitycznej enzymu; K_i – stała inhibicji enzymu.

Tabela 2. Przykładowe próby kliniczne z wykorzystaniem inhibitorów PARP w monoterapii

Inhibitor PARP	Stopień zaawansowania badań klinicznych	Typ nowotworu
MK4827	faza I, w trakcie	zaawansowane guzy lite, rak jajnika i prostaty
Olaparib/AZD2281/KU0059436	faza I, w trakcie faza I, w trakcie faza II, zakończone faza II, zakończone	guzy lite rak jajnika <i>BRCA</i> pozytywny rak jajnika <i>BRCA</i> pozytywny rak piersi <i>BRCA</i> pozytywny
Iniparib/BSI-201	faza II, w trakcie	rak jajnika
Rucaparib/AG014699/ PF-01367338	faza II, w trakcie	rak jajnika i piersi, nowotwory <i>BRCA</i> pozytywne

Na podstawie <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=parp>.

PARP iniparibu (BSI-201), zastosowanego w leczeniu kobiet z przerzutowym, potrójnie negatywnym rakiem piersi. Nowotwory te występują u ok. 15% chorych, charakteryzuje je brak ekspresji receptorów estrogenów, progesteronu i HER2, agresywny przebieg oraz gorsze rokowania w porównaniu do innych typów nowotworów sutka [22]. W testach wzięło udział 116 kobiet – połowie z nich podano standardowe chemioterapeutyki, gemcytabinę i karboplatynę, natomiast dla pozostałych terapia poszerzona została o iniparib. Zastosowanie iniparibu nie wpłynęło na toksyczność chemioterapii, natomiast zwiększyło odsetek pacjentek odnoszących korzyści z leczenia z 21 do 62%, a czas życia wolny od nawrotów choroby wydłużył się średnio o ponad trzy miesiące [75]. Iniparib jest pierwszym inhibitorem PARP zakwalifikowanym do III fazy badań klinicznych u kobiet z potrójnie negatywnym rakiem piersi, w kombinacji z gemcytabiną i karboplatyną.

Dotychczasowe badania dotyczące potencjalnego terapeutycznego zastosowania inhibitorów PARP skupiają się głównie na nowotworach piersi, zwłaszcza z uszkodzonymi genami *BRCA1* i *BRCA2*. Uwzględniając jednak wyniki badań *in vitro* jednoznacznie wykazujących wrażliwość komórek z uszkodzonymi innymi białkami rekombinacji homologicznej na inhibitory PARP przypuszczać można, że związki te mogą mieć znacznie szerszy zakres terapeutyczny i znaleźć zastosowanie w terapii onkologicznej przynajmniej kilkunastu różnych typów nowotworów warunkowanych mutacjami genów HR [12]. Mutacje genów rekombinacji homologicznej, takich jak RAD54 i CtIP związane są między innymi z występowaniem chłoniaka Hodgkina i nowotworów okrężnicy, a RAD51B – tłuszczaka oraz mięśniaka gładkokomórkowego macicy [42].

Dostępne dane literaturowe często prezentują wyniki badań przeprowadzonych na niewielkich grupach pacjentów, dlatego trudno jest ocenić jaki procent ogólnej liczby nowotworów mogą stanowić przypadki związane z zaburzeniami procesu HR (wynikającymi z mutacji genów innych niż *BRCA1/2*). Badania obejmujące większe grupy pacjentów (powyżej 80. osób) wykazały prawie całkowity brak ekspresji ATM, ATR i RAD51 u ponad połowy chorych na płaskokomórkowego raka głowy i szyi, obniżoną ekspresję RAD51 w 30% nowotworów piersi oraz częstą utratę heterozygotyczności (LOH) w rejonie genów RAD51 (32%), RAD52 (16%) i RAD54 (20%) [36,70,114]. Z kolei analiza całogenomowa 489 przypadków zaawansowanego

surowiczego raka jajnika wykazała zaburzenia ekspresji, regulacji lub mutacje genów HR u prawie połowy badanych pacjentek. Dotyczyły one głównie genów *BRCA1* i *BRCA2* (20%), jednak wykazano też m.in. hipermetylację RAD51C (3%), mutacje ATM lub ATR (2%) oraz mutacje współdziałających z HR genów FA (5%) [11]. Zaburzenia ekspresji FANCF (jednego z genów FA) poprzez metylację promotora wykazano także u 15% pacjentów z płaskokomórkowym rakiem głowy i szyi, u 14% z niedrobnokomórkowym rakiem płuc oraz u 30% pacjentek z rakiem szyjki macicy [61, 72]. Dane te wskazują, że ze względu na obecność mutacji genów HR w różnych nowotworach i przede wszystkim opisaną wcześniej selektywność inhibitorów PARP wobec komórek z mutacjami genów tego systemu naprawy DNA, dalsze badania nad terapeutycznym wykorzystaniem tych związków znajdują uzasadnienie kliniczne.

REWERSJA MUTACJI *BRCA2* JAKO MECHANIZM OPORNOŚCI NA LEKI PRZECIWNOWOTWOROWE

Poważnym problemem klinicznym jest nabyta w trakcie terapii oporność nowotworów na leki, szczególnie ze względu na konieczność zaniechania dotychczasowego leczenia i częsty brak skutecznych leków zastępczych. Ostatnio opublikowane dane wskazują, że w przypadku nowotworów o podłożu genetycznym *BRCA1/2*, przyczyną rozwinięcia oporności może być rewersja oryginalnej mutacji. Również nasze badania z wykorzystaniem modelowego mutantu *Brca2*^{-/-} komórek chomika chińskiego (V-C8) wykazały, że rewersja mutacji w genie *Brca2* prowadzi do przywrócenia fenotypu komórek dzikich, co wiąże się z nabyciem oporności na mitomycynę C i cisplatynę [111]. Podobnie selekcja komórek raka trzustki CAPAN-1 ze zmutowanym *BRCA2* pod wpływem cisplatyny doprowadziła do powstania 5 różnych wtórnych mutacji, które przywróciły otwartą ramkę odczytu (open reading frame – ORF) typu dzikiego [28,88]. Analogiczny mechanizm zaobserwowano także w komórkach nowotworowych odpornej na cisplatynę linii raka piersi HCC1428, jak również w nawrotowych nowotworach jajnika z mutacjami w *BRCA2*. Dane te wskazują, że powrotne mutacje przywracające ORF typu dzikiego *BRCA2* mogą być jedną z głównych przyczyn nabytej oporności na leczenie oparte na cisplatynie [88].

Badania z wykorzystaniem systemów modelowych wykazały, że po traktowaniu wysokimi dawkami KU0058948

możliwe jest uzyskanie klonów CAPAN-1 z ORF BRCA2 typu dzikiego, opornych na inhibicję PARP (PARP-inhibitor-resistant – PIR) [28]. W komórkach PIR następuje przywrócenie funkcjonalności szlaku HR, o czym świadczy prawidłowe formowanie kompleksów jądrowych RAD51, będących wyznacznikiem niezakłóconego działania tego systemu naprawy DNA, a dodatkowo rozwijają one również oporność krzyżową na cisplatynę. Wyniki te sugerują zatem, że podobnie jak w przypadku cisplatyny, długotrwałe traktowanie komórek *BRCA2* inhibitorami PARP mogłoby prowadzić do tworzenia klonów PIR, które na skutek presji selekcyjnej mnożyłyby się szybciej niż komórki *BRCA2*^{-/-}, prowadząc do oporności na zastosowane leczenie. Korzystnym czynnikiem przemawiającym przy najmniej za częściową możliwością oszacowania ryzyka rozwoju oporności na inhibitory PARP jest zróżnicowana częstość rewersji, która zależy od rodzaju mutacji. Duże delecje/insercje mogą nie być podatne na ten mechanizm oporności, a właściwe zaprojektowanie terapii (dawkowania leku i czasu jego stosowania) może znacznie obniżyć ryzyko pojawienia się opornych klonów.

UWAGI KOŃCOWE

Dzięki postępowi w dziedzinach biologii molekularnej oraz chemii medycznej możliwy stał się rozwój terapii celowanych nowotworów, opracowywanych na podstawie biochemicznych i molekularnych cech komórek guza. Przedstawione w artykule wyniki badań wskazują, że bardzo dobrymi markerami selekcyjnymi sugerującymi włączenie inhibitorów PARP do terapii przeciwnowotworowej mogą być mutacje genów rekombinacji homologicznej. Podejmowane są już próby oceny sprawności HR wykorzystując metody oparte na macierzach np. badanie profili ekspresji genów lub porównawcza hybrydyzacja genomowa do analizy profili *BRCA1/2* oraz zastosowania immunofluorescencyjnego wykrywania agregatów białek RAD51 lub γ H2AX w postaci tzw. foci [112]. Indukcja foci RAD51 jest zaburzona u większości mutantów HR,

a utrzymujący się podwyższony poziom foci γ H2AX wskazuje na niesprawną naprawę DSBs. Wstępne wyniki badań guzów jajnika i piersi sugerują, że analiza tych markerów pozwala z dużym prawdopodobieństwem wykryć komórki z uszkodzoną HR, potencjalnie wrażliwe na działanie inhibitorów PARP. Jako ewentualny biomarker mógłby również służyć poziom ekspresji jądrowego PARP-1 w komórkach nowotworu, ponieważ najnowsze badania wykazały, że jest on znacznie zwiększony w wielu przypadkach podstawopodobnych (basal-like) i potrójnie negatywnych nowotworów piersi z uszkodzonym *BRCA1* [24].

Włączenie inhibitorów PARP do terapii nowotworów lub ich stosowanie w chemioprotekcyjnej wiąże się z cyklicznym i często długotrwałym podawaniem tych preparatów. Ponieważ poza naprawą DNA PARP-1 bierze również udział w ważnych procesach komórkowych, takich jak replikacja, transkrypcja czy apoptoza, długotrwała farmakologiczna modulacja aktywności tego enzymu poprzez inhibitory może stanowić potencjalne niebezpieczeństwo pojawienia się trudnych do przewidzenia aktualnie działań niepożądanych [47]. Rezultaty dotychczasowych doświadczeń klinicznych z udziałem inhibitorów PARP są obiecujące, jednak były prowadzone na małych grupach pacjentów i najważniejsze znaczenie dla wdrożenia tych leków do terapii będą miały dopiero wyniki badań klinicznych III fazy, do której na razie zakwalifikowano tylko jeden inhibitor PARP, iniparib (BSI-201). Niezbędne są również dalsze badania na poziomie podstawowym, które pozwolą dokładniej zbadać funkcje komórkowe PARP-1 i PARP-2 oraz mechanizmy molekularne indukowane po zahamowaniu aktywności tych enzymów, co pozwoli na dalsze udoskonalenie terapii przeciwnowotworowych z wykorzystaniem inhibitorów PARP.

PODZIĘKOWANIA

Serdecznie dziękujemy prof. dr hab. M. Hryniewicz za krytyczne uwagi i pomocne komentarze dotyczące manuskryptu.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Althaus F.R., Kleczkowska H.E., Malanga M., Muntener C.R., Pleschke J.M., Ebner M., Auer B.: Poly ADP-ribosylation: a DNA break signal mechanism. *Mol. Cell. Biochem.*, 1999; 193: 5–11
- [2] Altmeyer M., Messner S., Hassa P.O., Fey M., Hottiger M.O.: Molecular mechanism of poly(ADP-ribosylation) by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites. *Nucleic Acids Res.*, 2009; 37: 3723–3738
- [3] Amé J.C., Rolli V., Schreiber V., Niedergang C., Apiou F., Decker P., Muller S., Höger T., Ménissier-de Murcia J., de Murcia G.: PARP-2, a novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Biol. Chem.*, 1999; 274: 17860–17868
- [4] Amé J.C., Spelnhauer C., de Murcia G.: The PARP superfamily. *Bioessays*, 2004; 26: 882–893
- [5] Bast R.C.Jr., Hennessy B., Mills G.B.: The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nat. Rev. Cancer*, 2009; 9: 415–428
- [6] Beneke S., Bürkle A.: Poly(ADP-ribosylation), PARP, and aging. *Sci. Aging Knowledge Environ.*, 2004; 49: re9
- [7] Boulton S., Pemberton L.C., Porteous J.K., Curtin N.J., Griffin R.J., Golding B.T., Durkacz B.W.: Potentiation of temozolomide-induced cytotoxicity: a comparative study of the biological effects of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Br. J. Cancer*, 1995; 72: 849–856
- [8] Bryant H.E., Schultz N., Thomas H.D., Parker K.M., Flower D., Lopez E., Kyle S., Meuth M., Curtin N.J., Helleday T.: Specific killing of *BRCA2*-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*, 2005; 434: 913–917
- [9] Calabrese C.R., Almassy R., Barton S., Batey M.A., Calvert A.H., Canan-Koch S., Durkacz B.W., Hostomsky Z., Kumpf R.A., Kyle S., Li J., Maegley K., Newell D.R., Notarianni E., Stratford I.J., Skaltitzky D., Thomas H.D., Wang L.Z., Webber S.E., Williams K.J., Curtin N.J.: Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2004; 96: 56–67
- [10] Campeau P.M., Foulkes W.D., Tischkowitz M.D.: Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. *Hum. Genet.*, 2008; 124: 31–42
- [11] Cancer Genome Atlas Research Network: Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*, 2011; 474: 609–615
- [12] Cerbinskaite A., Mukhopadhyay A., Plummer E.R., Curtin N.J., Edmondson R.J.: Defective homologous recombination in human cancers. *Cancer Treat. Rev.*, 2012; 38: 89–100
- [13] Chen J., Silver D.P., Walpita D., Cantor S.B., Gazdar A.F., Tomlinson G., Couch F.J., Weber B.L., Ashley T., Livingston D.M., Scully R.: Stable interaction between the products of the *BRCA1* and *BRCA2* tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol. Cell*, 1998; 2: 317–328
- [14] Coughlin S.S., Ekwueme D.U.: Breast cancer as a global health concern. *Cancer Epidemiol.*, 2009; 33: 315–318
- [15] Curtin N.J.: PARP inhibitors for cancer therapy. *Expert Rev. Mol. Med.*, 2005; 7: 1–20

- [16] D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I., Poirier G.G.: Poly(ADP-ribose)ylation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem. J.*, 1999; 342: 249–268
- [17] Dantzer F., de La Rubia G., Ménissier-De Murcia J., Hostomsky Z., de Murcia G., Schreiber V.: Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry*, 2000; 39: 7559–7569
- [18] Davidovic L., Vodenicharov M., Affar E.B., Poirier G.G.: Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp. Cell Res.*, 2001; 268: 7–13
- [19] Davies O.R., Pellegrini L.: Interaction with the BRCA2 C terminus protects RAD51-DNA filaments from disassembly by BRC repeats. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2007; 14: 475–483
- [20] de Jong M.M., Nolte I.M., te Meerman G.J., van der Graaf W.T., Oosterwijk J.C., Kleibouker J.H., Schaapveld M., de Vries E.G.: Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. *J. Med. Genet.*, 2002; 39: 225–242
- [21] de Murcia J.M., Niedergang C., Trucco C., Ricoul M., Dutrillaux B., Mark M., Oliver F.J., Masson M., Dierich A., LeMour M., Walzinger C., Chambon P., de Murcia G.: Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 7303–7307
- [22] Dent R., Trudeau M., Pritchard K.I., Hanna W.M., Kahn H.K., Sawka C.A., Lickley L.A., Rawlinson E., Sun P., Narod S.A.: Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin. Cancer Res.*, 2007; 13: 4429–4434
- [23] Di Cosimo S., Baselga J.: Targeted therapies in breast cancer: where are we now? *Eur. J. Cancer*, 2008; 44: 2781–2790
- [24] Domagala P., Huzarski T., Lubinski J., Gugała K., Domagala W.: PARP-1 expression in breast cancer including BRCA1-associated, triple negative and basal-like tumors: possible implications for PARP-1 inhibitor therapy. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2011; 127: 861–869
- [25] Dominguez-Bendala J., Masutani M., McWhir J.: Down-regulation of PARP-1, but not of Ku80 or DNA-PKcs, results in higher gene targeting efficiency. *Cell Biol. Int.*, 2006; 30: 389–393
- [26] Donawho C.K., Luo Y., Luo Y., Penning T.D., Bauch J.L., Bouska J.J., Bontcheva-Diaz V.D., Cox B.F., DeWeese T.L., Dillehay L.E., Ferguson D.C., Ghoreishi-Haack N.S., Grimm D.R., Guan R., Han E.K., Holley-Shanks R.R., Hristov B., Idler K.B., Jarvis K., Johnson E.F., Kleinberg L.R., Klinghofer V., Lasko L.M., Liu X., Marsh K.C., McGonigal T.P., Meulbroek J.A., Olson A.M., Palma J.P., Rodriguez L.E., Shi Y., Stavropoulos J.A., Tsurutani A.C., Zhu G.D., Rosenberg S.H., Giranda V.L., Frost D.J.: ABT-888, an orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor that potentiates DNA-damaging agents in preclinical tumor models. *Clin. Cancer Res.*, 2007; 13: 2728–2737
- [27] Dupré A., Boyer-Chatenet L., Gautier J.: Two-step activation of ATM by DNA and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2006; 13: 451–457
- [28] Edwards S.L., Brough R., Lord C.J., Natrajan R., Vatcheva R., Levine D.A., Boyd J., Reis-Filho J.S., Ashworth A.: Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2. *Nature*, 2008; 451: 1111–1115
- [29] Farmer H., McCabe N., Lord C.J., Tutt A.N., Johnson D.A., Richardson T.B., Santarosa M., Dillon K.J., Hickson I., Knights C., Martin N.M., Jackson S.P., Smith G.C., Ashworth A.: Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*, 2005; 434: 917–921
- [30] Ferraris D.V.: Evolution of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors. From concept to clinic. *J. Med. Chem.*, 2010; 53: 4561–4584
- [31] Fong P.C., Boss D.S., Yap T.A., Tutt A., Wu P., Mergui-Roelvink M., Mortimer P., Swaisland H., Lau A., O'Connor M.J., Ashworth A., Carmichael J., Kaye S.B., Schellens J.H., de Bono J.S.: Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N. Engl. J. Med.*, 2009; 361: 123–134
- [32] Friedberg E.C., Meira L.B.: Database of mouse strains carrying targeted mutations in genes affecting biological responses to DNA damage Version 7. *DNA Repair*, 2006; 5: 189–209
- [33] Gallmeier E., Kern S.E.: Absence of specific cell killing of the BRCA2-deficient human cancer cell line CAPAN1 by poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Biol. Ther.*, 2005; 4: 703–706
- [34] Godon C., Cordeliers F.P., Biard D., Giocanti N., Mégnin-Chanet F., Hall J., Favaudon V.: PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility. *Nucleic Acids Res.*, 2008; 36: 4454–4464
- [35] Goldberg M.S., Xing D., Ren Y., Orsulic S., Bhatia S.N., Sharp P.A.: Nanoparticle-mediated delivery of siRNA targeting Parp1 extends survival of mice bearing tumors derived from Brca1-deficient ovarian cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 745–750
- [36] Gonzalez R., Silva J.M., Dominguez G., Garcia J.M., Martinez G., Vargas J., Provencio M., Espana P., Bonilla F.: Detection of loss of heterozygosity at RAD51, RAD52, RAD54 and BRCA1 and BRCA2 loci in breast cancer: pathological correlations. *Br. J. Cancer*, 1999; 81: 503–509
- [37] Graziani G., Szabó C.: Clinical perspectives of PARP inhibitors. *Pharmacol. Res.*, 2005; 52: 109–118
- [38] Gudmundsdottir K., Ashworth A.: The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene*, 2006; 25: 5864–5874
- [39] Haince J.F., Kozlov S., Dawson V.L., Dawson T.M., Hendzel M.J., Lavin M.F., Poirier G.G.: Ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling network is modulated by a novel poly(ADP-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA-damaging agents. *J. Biol. Chem.*, 2007; 282: 16441–16453
- [40] Haince J.F., McDonald D., Rodrigue A., Déry U., Masson J.Y., Hendzel M.J., Poirier G.G.: PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 1197–1208
- [41] Helleday T.: Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mutat. Res.*, 2003; 532: 103–115
- [42] Helleday T.: Homologous recombination in cancer development, treatment and development of drug resistance. *Carcinogenesis*, 2010; 31: 955–960
- [43] Helleday T., Lo J., van Gent D.C., Engelward B.P.: DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair*, 2007; 6: 923–935
- [44] Hinz J.M.: Role of homologous recombination in DNA interstrand crosslink repair. *Environ. Mol. Mutagen.*, 2010; 51: 582–603
- [45] Hochegger H., Takeda S.: Phenotypic analysis of cellular responses to DNA damage. *Subcell. Biochem.*, 2006; 40: 313–325
- [46] Holthausen J.T., Wyman C., Kanaar R.: Regulation of DNA strand exchange in homologous recombination. *DNA Repair*, 2010; 9: 1264–1272
- [47] Jagtap P., Szabó C.: Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2005; 4: 421–440
- [48] Jones P., Altamura S., Boueres J., Ferrigno F., Fonsi M., Giomini C., Lamartina S., Monteagudo E., Ontoria J.M., Orsale M.V., Palumbi M.C., Pesci S., Roscilli G., Scarpelli R., Schultz-Fademrecht C., Toniatti C., Rowley M.: Discovery of 2-{4-[(3S)-piperidin-3-yl]phenyl}-2H-indazole-7-carboxamide (MK-4827): a novel oral poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor efficacious in BRCA-1 and -2 mutant tumors. *J. Med. Chem.*, 2009; 52: 7170–7185
- [49] Kaelin W.G.Jr.: The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 2005; 5: 689–698
- [50] Kiliańska Z.M., Żołnierczyk J., Węsierska-Gądek J.: Biologiczna aktywność polimerazy poli(ADP-rybozy)-I. *Postepy Hig. Med. Dośw.*, 2010; 64: 344–363
- [51] Kim M.Y., Zhang T., Kraus W.L.: Poly(ADP-ribose)ylation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes Dev.*, 2005; 19: 1951–1967
- [52] Kraus W.L., Lis J.T.: PARP goes transcription. *Cell*, 2003; 113: 677–683
- [53] Lautier D., Lagueux J., Thibodeau J., Ménard L., Poirier G.G.: Molecular and biochemical features of poly(ADP-ribose) metabolism. *Mol. Cell. Biochem.*, 1993; 122: 171–193
- [54] Leppard J.B., Dong Z., Mackey Z.B., Tomkinson A.E.: Physical and functional interaction between DNA ligase IIIα and poly(ADP-ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.*, 2003; 23: 5919–5927
- [55] Levy-Lahad E.: Fanconi anemia and breast cancer susceptibility meet again. *Nat. Genet.*, 2010; 42: 368–369
- [56] Li X., Heyer W.D.: Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res.*, 2008; 18: 99–113
- [57] Lindahl T., Satoh M.S., Poirier G.G., Klungland A.: Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends Biochem. Sci.*, 1995; 20: 405–411
- [58] Liu Y., West S.C.: Distinct functions of BRCA1 and BRCA2 in double-strand break repair. *Breast Cancer Res.*, 2002; 4: 9–13
- [59] Lord C.J., Ashworth A.: Targeted therapy for cancer using PARP inhibitors. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2008; 8: 363–369
- [60] Madhusudan S., Hickson I.D.: DNA repair inhibition: a selective tumour targeting strategy. *Trends Mol. Med.*, 2005; 11: 503–511

- [61] Marsit C.J., Liu M., Nelson H.H., Posner M., Suzuki M., Kelsey K.T.: Inactivation of the Fanconi anemia/BRCA pathway in lung and oral cancers: implications for treatment and survival. *Oncogene*, 2004; 23: 1000–1004
- [62] Martin D.R., Lewington A.J., Hammerman M.R., Padanilam B.J.: Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase attenuates ischemic renal injury in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2000; 279: R1834–R1840
- [63] McCabe N., Lord C.J., Tutt A.N., Martin N.M., Smith G.C., Ashworth A.: BRCA2-deficient CAPAN-1 cells are extremely sensitive to the inhibition of Poly(ADP-Ribose) polymerase: an issue of potency. *Cancer Biol. Ther.*, 2005; 4: 934–936
- [64] McCabe N., Turner N.C., Lord C.J., Kluzek K., Bialkowska A., Swift S., Giavara S., O'Connor M.J., Tutt A.N., Zdzienicka M.Z., Smith G.C., Ashworth A.: Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Res.*, 2006; 66: 8109–8115
- [65] Mendoza-Alvarez H., Alvarez-Gonzalez R.: Poly(ADP-ribose) polymerase is a catalytic dimer and the automodification reaction is intermolecular. *J. Biol. Chem.*, 1993; 268: 22575–22580
- [66] Menear K.A., Adcock C., Boulter R., Cockcroft X.L., Copsey L., Cranston A., Dillon K.J., Drzewiecki J., Garman S., Gomez S., Javai H., Kerrigan F., Knights C., Lau A., Loh V.M.Jr., Matthews I.T., Moore S., O'Connor M.J., Smith G.C., Martin N.M.: 4-[3-(4-cyclopropanecarbonylpiperazine-1-carbonyl)-4-fluorobenzyl]-2H-phthalazin-1-one: a novel bioavailable inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J. Med. Chem.*, 2008; 51: 6581–6591
- [67] Ménissier de Murcia J., Ricoul M., Tartier L., Niedergang C., Huber A., Dantzer F., Schreiber V., Amé J.C., Dierich A., LeMour M., Sabatier L., Chambon P., de Murcia G.: Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *EMBO J.*, 2003; 22: 2255–2263
- [68] Miknyoczki S., Chang H., Grobely J., Pritchard S., Worrell C., McGann N., Ator M., Husten J., Deibold J., Hudkins R., Zulli A., Parchment R., Ruggeri B.: The selective poly(ADP-ribose) polymerase-1(2) inhibitor, CEP-9883, increases the sensitivity of chemoresistant tumor cells to temozolomide and irinotecan but does not potentiate myelotoxicity. *Mol. Cancer Ther.*, 2007; 6: 2290–2302
- [69] Misteli T., Soutoglou E.: The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2009; 10: 243–254
- [70] Moeller B.J., Yordy J.S., Williams M.D., Giri U., Raju U., Molkentine D.P., Byers L.A., Heymach J.V., Story M.D., Lee J.J., Sturgis E.M., Weber R.S., Garden A.S., Ang K.K., Schwartz D.L.: DNA repair biomarker profiling of head and neck cancer: Ku80 expression predicts locoregional failure and death following radiotherapy. *Clin. Cancer Res.*, 2011; 17: 2035–2043
- [71] Moynahan M.E., Jasin M.: Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2010; 11: 196–207
- [72] Narayan G., Arias-Pulido H., Nandula S.V., Basso K., Sugitharaj D.D., Vargas H., Mansukhani M., Vilella J., Meyer L., Schneider A., Gissmann L., Dürst M., Pothuri B., Murty V.V.: Promoter hypermethylation of FANCF: disruption of Fanconi Anemia-BRCA pathway in cervical cancer. *Cancer Res.*, 2004; 64: 2994–2997
- [73] Negrini S., Gorgoulis V.G., Halazonetis T.D.: Genomic instability – an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2010; 11: 220–228
- [74] O'Donovan P.J., Livingston D.M.: BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. *Carcinogenesis*, 2010; 31: 961–967
- [75] O'Shaughnessy J., Osborne C., Pippen J.E., Yoffe M., Patt D., Rocha S., Koo I.C., Sherman B.M., Bradley C.: Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2011; 364: 205–214
- [76] Oliver A.W., Swift S., Lord C.J., Ashworth A., Pearl L.H.: Structural basis for recruitment of BRCA2 by PALB2. *EMBO Rep.*, 2009; 10: 990–996
- [77] Otto H., Reche P.A., Bazan F., Dittmar K., Haag F., Koch-Nolte F.: In silico characterization of the family of PARP-like poly(ADP-ribosyl) transferases (pARTs). *BMC Genomics*, 2005; 6: 139
- [78] Panzeter P.L., Althaus F.R.: DNA strand break-mediated partitioning of poly(ADP-ribose) polymerase function. *Biochemistry*, 1994; 33: 9600–9605
- [79] Petermann E., Helleday T.: DNA replication-associated lesions: importance in early tumorigenesis and cancer therapy. *Biochem. Soc. Trans.*, 2007; 35: 1352–1354
- [80] Pleschke J.M., Kleczkowska H.E., Strohm M., Althaus F.R.: Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 40974–40980
- [81] Quénet D., Gasser V., Fouillen L., Cammas F., Sanglier-Cianferani S., Losson R., Dantzer F.: The histone subcode: poly(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1) and Parp-2 control cell differentiation by regulating the transcriptional intermediary factor TIF1 β and the heterochromatin protein HP1 α . *FASEB J.*, 2008; 22: 3853–3865
- [82] Rankin P.W., Jacobson E.L., Benjamin R.C., Moss J., Jacobson M.K.: Quantitative studies of inhibitors of ADP-ribosylation *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 1989; 264: 4312–4317
- [83] Realini C.A., Althaus F.R.: Histone shuttling by poly(ADP-ribosylation). *J. Biol. Chem.*, 1992; 267: 18858–18865
- [84] Ripberger T., Gadzicki D., Meindl A., Schlegelberger B.: Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counselling. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2009; 17: 722–731
- [85] Rouleau M., Aubin R.A., Poirier G.G.: Poly(ADP-ribosyl)ated chromatin domains: access granted. *J. Cell Sci.*, 2004; 117: 815–825
- [86] Rupnik A., Lowndes N.F., Grenon M.: MRN and the race to the break. *Chromosoma*, 2010; 119: 115–135
- [87] Saeki H., Siaud N., Christ N., Wiegant W.W., van Buul P.P., Han M., Zdzienicka M.Z., Stark J.M., Jasin M.: Suppression of the DNA repair defects of BRCA2-deficient cells with heterologous protein fusions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 8768–8773
- [88] Sakai W., Swisher E.M., Karlan B.Y., Agarwal M.K., Higgins J., Friedman C., Villegas E., Jacquemont C., Farrugia D.J., Couch F.J., Urban N., Taniguchi T.: Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature*, 2008; 451: 1116–1120
- [89] Sartori A.A., Lukas C., Coates J., Mistrik M., Fu S., Bartek J., Baer R., Lukas J., Jackson S.P.: Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*, 2007; 450: 509–514
- [90] Satoh M.S., Lindahl T.: Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature*, 1992; 356: 356–358
- [91] Schwartz E.K., Heyer W.D.: Processing of joint molecule intermediates by structure-selective endonucleases during homologous recombination in eukaryotes. *Chromosoma*, 2011; 120: 109–127
- [92] Scully R., Chen J., Plug A., Xiao Y., Weaver D., Feunteun J., Ashley T., Livingston D.M.: Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell*, 1997; 88: 265–275
- [93] Scully R., Xie A.: BRCA1 and BRCA2 in breast cancer predisposition and recombination control. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 2004; 9: 237–246
- [94] Skaltitzky D.J., Marakovits J.T., Maegley K.A., Ekker A., Yu X.H., Hostomsky Z., Webber S.E., Eastman B.W., Almasy R., Li J., Curtin N.J., Newell D.R., Calvert A.H., Griffin R.J., Golding B.T.: Tricyclic benzimidazoles as potent poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors. *J. Med. Chem.*, 2003; 46: 210–213
- [95] Ström C.E., Johansson F., Uhlén M., Szegarty C.A., Erixon K., Helleday T.: Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) is not involved in base excision repair but PARP inhibition traps a single-strand intermediate. *Nucleic Acids Res.*, 2011; 39: 3166–3175
- [96] Sugimura K., Takebayashi S., Taguchi H., Takeda S., Okumura K.: PARP-1 ensures regulation of replication fork progression by homologous recombination on damaged DNA. *J. Cell Biol.*, 2008; 183: 1203–1212
- [97] Svendsen J.M., Harper J.W.: GEN1/Yen1 and the SLX4 complex: Solutions to the problem of Holliday junction resolution. *Genes Dev.*, 2010; 24: 521–536
- [98] Sy S.M., Huen M.S., Chen J.: PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009; 106: 7155–7160
- [99] Tentori L., Graziani G.: Chemopotentiation by PARP inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol. Res.*, 2005; 52: 25–33
- [100] Tentori L., Portarena I., Torino F., Scerrati M., Navarra P., Graziani G.: Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor increases growth inhibition and reduces G(2)/M cell accumulation induced by temozolomide in malignant glioma cells. *Glia*, 2002; 40: 44–54
- [101] Thomas H.D., Calabrese C.R., Batey M.A., Canan S., Hostomsky Z., Kyle S., Maegley K.A., Newell D.R., Skaltitzky D., Wang L.Z., Webber S.E., Curtin N.J.: Preclinical selection of a novel poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor for clinical trial. *Mol. Cancer Ther.*, 2007; 6: 945–956
- [102] Thorslund T., West S.C.: BRCA2: a universal recombinase regulator. *Oncogene*, 2007; 26: 7720–7730

- [103] Timinszky G., Till S., Hassa P.O., Hothorn M., Kustatscher G., Nijmeijer B., Colombelli J., Altmeyer M., Stelzer E.H., Scheffzek K., Hottiger M.O., Ladurner A.G.: A macrodomain-containing histone re-arranges chromatin upon sensing PARP1 activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2009; 16: 923–929
- [104] Tulin A., Spradling A.: Chromatin loosening by poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) at *Drosophila* puff *loci*. *Science*, 2003; 299: 560–562
- [105] Turnbull C., Hodgson S.: Genetic predisposition to cancer. *Clin. Med.*, 2005; 5: 491–498
- [106] Turner N., Tutt A., Ashworth A.: Targeting the DNA repair defect of BRCA tumours. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2005; 5: 388–393
- [107] Tutt A.: Phase II trial of the oral PARP inhibitor olaparib in BRCA-deficient advanced breast cancer 2009 ASCO Annual Meeting 2009
- [108] Tutt A., Ashworth A.: The relationship between the roles of BRCA genes in DNA repair and cancer predisposition. *Trends Mol. Med.*, 2002; 8: 571–576
- [109] Uringa E.J., Youds J.L., Lisaingo K., Lansdorp P.M., Boulton S.J.: RTEL1: an essential helicase for telomere maintenance and the regulation of homologous recombination. *Nucleic Acids Res.*, 2011; 39: 1647–1655
- [110] Virág L., Szabó C.: The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol. Rev.*, 2002; 54: 375–429
- [111] Wiegant W.W., Overmeer R.M., Godthelp B.C., van Buul P.P., Zdzienicka M.Z.: Chinese hamster cell mutant, V-C8, a model for analysis of Brca2 function. *Mutat. Res.*, 2006; 600: 79–88
- [112] Yap T.A., Sandhu S.K., Carden C.P., de Bono J.S.: Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors: Exploiting a synthetic lethal strategy in the clinic. *CA Cancer J. Clin.*, 2011; 61: 31–49
- [113] Yoshida K., Miki Y.: Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci.*, 2004; 95: 866–871
- [114] Yoshikawa K., Ogawa T., Baer R., Hemmi H., Honda K., Yamauchi A., Inamoto T., Ko K., Yazumi S., Motoda H., Kodama H., Noguchi S., Gazdar A.F., Yamaoka Y., Takahashi R.: Abnormal expression of BRCA1 and BRCA1-interactive DNA-repair proteins in breast carcinomas. *Int. J. Cancer*, 2000; 88: 28–36
- [115] You Z., Bailis J.M.: DNA damage and decisions: CtIP coordinates DNA repair and cell cycle checkpoints. *Trends Cell Biol.*, 2010; 20: 402–409
- [116] Yun M.H., Hiom K.: CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature*, 2009; 459: 460–463
- [117] Zahradka P., Ebisuzaki K.: A shuttle mechanism for DNA-protein interactions. The regulation of poly(ADP-ribose) polymerase. *Eur. J. Biochem.*, 1982; 127: 579–585
- [118] Zhang F., Fan Q., Ren K., Andreassen P.R.: PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2. *Mol. Cancer Res.*, 2009; 7: 1110–1118

Autorki deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.