

Received: 2010.04.06
Accepted: 2010.07.09
Published: 2010.07.30

Biologiczna aktywność polimerazy poli(ADP-rybozy)-1*

Biological activity of poly(ADP-ribose)polymerase-1

Zofia M. Kiliańska¹, Jolanta Żołnierczyk¹, Józefa Węsierska-Gądek²

¹ Zakład Biochemii Medycznej, Katedra Cytochemii Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź

² Institute of Cancer Research, Department of Medicine I, Medical University of Vienna, Wien, Austria

Streszczenie

Polimeraza poli(ADP-rybozy) – PARP-1 katalizuje polimeryzację jednostek ADP-rybozy wykorzystując jako ich źródło cząsteczki NAD⁺ i dokonuje ich transferu na białka docelowe i przyłączenia polimerów liniowych lub rozgałęzionych. Ostatnio PARP-1 i łańcuchy ADP-rybozy (PAR) przyciągają znaczną uwagę, ponieważ uczestniczą w wielu procesach komórkowych m.in. modyfikacjach chromatyny, metabolizmie kwasów nukleinowych, regulacji transkrypcji i śmierci komórki. Przegląd podsumowuje ostatnie badania nad modułową strukturą cząsteczki PARP-1 uwzględniającą sześć domen funkcjonalnych (A–F), w kontekście trzech klasycznych domen, tj. wiążącej DNA (DBD), automodyfikacyjnej (AD) i katalitycznej (CD), uwalnianych przez enzymy proteolityczne. Szczególną uwagę zwrócono na subkomórkową lokalizację i potranslacyjne modyfikacje PARP-1 [poli(ADP-rybozylacja), fosforylacja, acetylacja, sumoilaacja]. Ponadto przedyskutowano główne funkcje PARP-1 skupiając uwagę na roli tego enzymu w detekcji uszkodzeń DNA i jego naprawie, stabilności genomu i śmierci komórki.

Słowa kluczowe:

PARP-1 • budowa domenowa • modyfikacje potranslacyjne • naprawa DNA • śmierć komórkowa

Summary

Poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1) catalyzes the polymerization of ADP-ribose units from NAD⁺ modules on target proteins, resulting in the attachment of linear or branched polymers. PARP-1 and its product poly(ADP-ribose) – PAR have recently received considerable attention because of their involvement in a wide range of cellular processes including chromatin modification, metabolism of nucleic acids, transcription regulation, and cell death. This review summarizes recent work on modular structure of six functional domains (A–F) of PARP-1 molecule in the context of three classic domains, i.e., DNA binding (DBD), automodification (AD) and catalytic (CD) released by proteolytic enzymes. A special attention is paid to subcellular localization and molecular mechanisms of PARP-1 posttranslational modifications, such as: poly(ADP-ribosylation), phosphorylation, acetylation and sumoylation. In addition, main functions of PARP-1 are discussed, focusing on the activity of this enzyme in DNA damage detection and repair, genome stability, and cell death.

Key words:

PARP-1 • domain structure • posttranslational modifications • DNA repair • cell death

* Praca finansowana z grantu objętego decyzją MNiSzW nr 298/N-Austria/2008/0 oraz w ramach umowy o międzynarodowej współpracy naukowo-technicznej z Austrią na lata 2010–2011.

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=915606>

Word count: 9740

Tables: 1

Figures: 3

References: 134

Adres autorki: prof. dr hab. Zofia M. Kiliańska, Zakład Biochemii Medycznej, Katedra Cytobiochemii Uniwersytetu Łódzkiego, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: zkilian@biol.uni.lodz.pl

Wykaz skrótów: **aa** – aminokwas (amino acid); **AD** – domena automodyfikacyjna (automodification domain); **ADPRT/PARP/PPOL** – gen kodujący enzym – polimerazę (ADP-rybozy); **AIF** – czynnik indukujący apoptozę (apoptosis inducing factor); **A-NHEJ, Alt-NHEJ, B-NHEJ** – alternatywny/zapasowy szlak naprawy DNA w wyniku łączenia końców niehomologicznych (alternative/backup nonhomologous end joining); **AP2** – czynnik transkrypcyjny (activating protein 2); **ARH3** – hydrolaza ADP-rybozy 3 (ADP-ribose hydrolase 3); **ATM** – gen (i kodowana przez niego kinaza), którego mutacja związana jest z wystąpieniem ataksji teleangiektazji (ataxia-telangiectasia mutated gene); **ATR** – gen homologiczny do *ATM* i *Rad3* (ATM- and Rad3- related); **BER** – mechanizm naprawy DNA przez wycinanie zasad (base excision repair); **BRCA1/2** – białko uczestniczące m.in. w naprawie uszkodzonego DNA, kodowane przez gen supresorowy, którego defekt predysponuje do rozwoju nowotworów piersi (breast cancer); **BRCT** – C-końcowa domena białka BRCA1; **CB** – ciała Cajala lub „ciałka zwinięte” (coiled bodies); **CBP/p300** – białka koaktywatorowe o aktywności acetylotransferazy histonowej; **CD** – domena katalityczna (catalytic domain); **CDK** – kinaza zależna od cyklin (cyclin-dependent kinase); **DBD** – domena wiążąca DNA (DNA binding domain); **DNA-PK** – kinaza zależna od DNA (DNA-dependent protein kinase); **DNA-PKcs** – podjednostka katalityczna kinazy DNA-PKs (DNA-PK catalytic subunit); **D-NHEJ** – szlak naprawy DNA zależny od DNA-PK; **Dnmt1** – DNA metylotransferaza 1 (DNA methyltransferase 1); **DSB** – dwuniciowe pęknięcie DNA (double-strand break); **DSE** – dwuniciowy koniec DNA (double-strand end); **ERK1/2** – kinazy aktywowane sygnałami zewnętrznymi; **HDAC 1–4** – deacetylaza histonowa 1–4 (histone deacetylase 1–4); **HR** – rekombinacja homologiczna (homologous recombination); **HRR** – szlak naprawy DNA w procesie rekombinacji homologicznej (homologous recombination repair); **HMG** – białko o dużej ruchliwości elektroforetycznej (high mobility protein group); **hnRNP** – heterogenna rybonukleoproteina jądrowa (heterogeneous nuclear protein); **MNNG** – N-metylo-N'-nitro-N-nitrozoguanidyna (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine); **Mre11** – białko odpowiedzialne za wycinanie fragmentu DNA; **MRN** – kompleks naprawczy złożony z białek Mre11, Rad50, NBS1; **mtDNA** – mitochondrialny DNA; **NAD⁺** – dinukleotyd nikotynoamidowy (nicotinamid dinucleotide); **NER** – mechanizm naprawy DNA przez wycinanie nukleotydów (nucleotide excision repair); **NF-κB** – czynnik jądrowy κB (nuclear factor κB); **NLS** – sygnał lokalizacji jądrowej (nuclear localization signal); **PAR** – polimery poli(ADP-rybozy) (poly(ADP-ribose) polymer); **PARG** – glikohydrolaza poli(ADP-rybozy); **PARP-1** – polimeraza poli(ADP-rybozy) (poly(ADP-ribose) polymerase-1); **PCNA** – antygen jądrowy komórki proliferującej (proliferating cell nuclear antigen); **PKC** – kinaza białkowa C (protein kinase C); **PLX** – kompleks naprawczy złożony z białek PARP-1, ligazy DNA III i XRCC1 uczestniczący w BER; **Rad-18** – enzym naprawczy DNA o aktywności ligazy ubikwitylowej; **Rad-51** – enzym naprawczy DNA uczestniczący w rekombinacji homologicznej homologiczny do prokaryotycznego białka RecA; **siRNA** – małe interferencyjne RNA (small interference RNA); **SMC1** – rodzina konserwatywnych białek o aktywności ATP-azowej; **SP1** – czynnik transkrypcyjny (stimulatory or specificity protein 1); **SSB** – jednoniciowe pęknięcie DNA (single-strand break); **SUMO** – małe ubikwitynopodobne białko (small ubiquitin-like modifier); **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (vascular endothelial growth factor); **WGR** – motyw sekwencyjny wzbogacony w tryptofan, glicynę, argininę występujący w domenie katalitycznej hPARP-1; **XRCC1,4** – białko uczestniczące w naprawie DNA (X-ray repair cross-complementing group 1,4); **Zn I, II, III** – palec cynkowy I, II, III.

WSTĘP

Na początku lat sześćdziesiątych ubiegłego stulecia w laboratorium Paula Mandela [16] wykryto enzym odpowiedzialny za syntezę poli(ADP-rybozy). Liczne badania wykazały, że poli- bądź mono-ADP-rybozylacji białek dokonują odpowiednio polimerazy poli(ADP-rybozy) – PARPs oraz transferazy mono(ADP-rybozy) – MARTs [35,117]. W genomie człowieka zidentyfikowano 17 genów *PARP/MARTs*, których *loci* znajdują się na 10 chromosomach [2,82]. Dotychczas wykryto ortologi 16 genów tej rodziny w genomach myszy, szczura, słodkowodnej ryby *Pufferfisch* i roślin (*Arabidopsis*) [82].

Uznaje się, że ta potranslacyjna modyfikacja, w głównej mierze katalizowana przez polimerazę poli(ADP-rybozy)-1 – PARP-1 (EC 2.4.2.30), odgrywa istotną rolę m.in. w sygnalizacji komórkowej, naprawie DNA i utrzymaniu stabilności genomu, w remodelingu chromatyny, regulacji transkrypcji, w procesach proliferacji, różnicowania, transformacji nowotworowej i śmierci komórki [19,42,72,98]. PARP-1 może ponadto uczestniczyć w regulacji cytoszkieletu [54,55,132]. Polimery poli(ADP-rybozy) – PAR stanowią źródło energii wykorzystywanej w naprawie DNA wykorzystującej mechanizm wycinania zasad – BER (base excision repair) [78]. Akceptuje się, że produkt enzymatycznej aktywności tego enzymu – PAR stanowi bardzo ważną cząsteczkę sygnalizacyjną, uczestniczącą w transferze informacji między jądrem komórkowym i mitochondriami [20]. Cząsteczka ta wpływa na zmianę przepuszczalności błon mitochondrialnych uwalniając z tych organelli m.in. czynnik indukcji apoptozy – AIF (apoptosis inducing factor) [3,119].

W komórkach prawidłowych podstawowa aktywność PARP-1 jest bardzo mała i ulega gwałtownej stymulacji w warunkach stresu genotoksycznego czy oksydacyjnego [19,50]. Aktywacja tego enzymu, m.in. czynnikami uszkadzającymi DNA powoduje 10–500-krotny wzrost poziomu PARP-1 [35].

Przez lata uznawano, że aktywacja PARP-1 jest głównie stymulowana uszkodzeniami DNA [19,21,22,29,30,62]. Należy jednak zwrócić uwagę na doniesienia sygnalizujące, że pewne szczególnie struktury DNA [„hairpin” (szpilka do włosów), „cruciforms” (struktury krzyżowe) lub „supercoiled” (superzwinięcie)] mogą stanowić czynniki aktywujące PARP-1 [32,49,56].

STRUKTURA DOMENOWA POLIMERAZY POLI(ADP-RYBOZY)-1 – PRZEDSTAWICIELA WIELOGENOWEJ RODZINY PARP

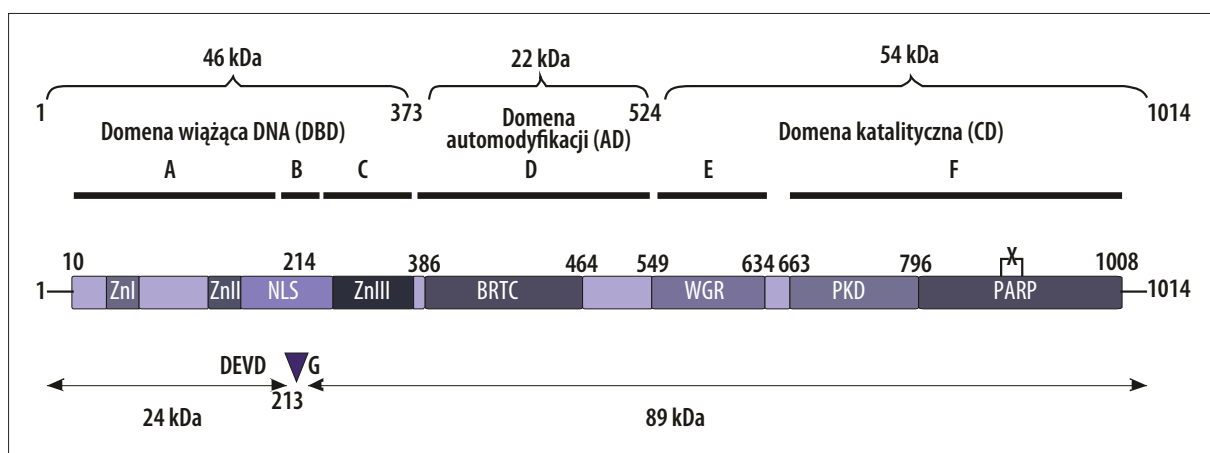
Gen *PARP-1* o długości około 43 kbp (23 eksony), opisywany również symbolami *ADPRT/PPOL* znajduje się na chromosomie 1.(1q41q42) komórek ludzkich, natomiast jego pseudogeny zidentyfikowano na chromosomach 13. i 14. [4,17,57,82,135]. Wskazuje się, że niewielka ekspresja *PARP-1* jest związana z obniżoną stabilnością genomu komórek ulegających transformacji np. w przebiegu raka piersi [10]. Spadek poziomu *PARP-1* i zmiany w strukturze tego enzymu odnotowano w kilku liniach komórkowych ludzkich guzów zarodkowych [105].

Jak dotąd sklonowano promotorowe sekwencje genu *PARP-1* kilku gatunków ssaków (człowiek, mysz, szczur) i wykazano, że dzielą one strukturalne podobieństwo charakterystyczne dla genów funkcji podstawowych (house keeping genes) m.in. nie zawierają sekwencji TATA box, wykazują dużą zawartość sekwencji GC i obecność sekwencji inicjatorowej (Inr), która pokrywa się z miejscem inicjacji transkrypcji. W regionie promotorowym *hPARP-1* wykazano miejsca wiązania dla wielu czynników transkrypcyjnych, m.in. SP1, AP-2, NF-1, YY, Ets [35,36,132]. Uważa się, że w odróżnieniu od aktywności enzymatycznej PARP-1, transkrypcja kodującego ten enzym genu nie jest aktywowana uszkodzeniami DNA, a pula cząsteczek mRNA dla tego enzymu jest regulowana na poziomie zdarzeń potranskrypcyjnych. Cząsteczka mRNA dla PARP-1 występuje powszechnie w tkankach, choć na różnym poziomie. Najwyższy poziom odnotowano w jądrach, śledzionie, mózgu i grasicy [72].

W komórkach ludzkich produktem ekspresji *PARP-1* jest enzym hPARP-1 o długości 1014 aa (113 kDa) i w pełni poznanej sekwencji [17,57]. Po biosyntezie inicjująca łańcuch reszta metioniny zostaje odcięta [135]. W połowie lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku, stosując ograniczoną proteolizę cząsteczek PARP-1 grasicy cielęcia za pomocą papainy i α -chymotrypsyny, określono w enzymie trzy funkcjonalne domeny: 1° N-końcową wiążącą DNA (DNA binding domain; **DBD**; m.cz. 46 kDa), 2° centralną – automodyfikacyjną (automodification domain; **AD**; m.cz. 22 kDa) i 3° C-końcową, katalityczną (catalytic domain; **CD**; m.cz. 54 kDa) [46]. Wnikliwa analiza struktury pierwszorzędowej potwierdziła, że ładunek domeny DBD i automodyfikacyjnej jest zasadowy, co wynika z dużej zawartości reszt lizyny [19,57]. Dziesięć lat później w laboratorium G. de Murcia [21] zaproponowano wyróżnienie w łańcuchu PARP-1 6 mniejszych regionów opisywanych literami od A do F, na podstawie obecności modułów funkcjonalnych (ryc. 1).

DOMENA WIĄŻĄCA DNA

Domena DBD hPARP-1 obejmuje N-końcowy segment cząsteczki (1–373 aa; domeny A–C). Początkowo w domenie A zidentyfikowano dwa palce cynkowe (Zn I; 21–56 aa i Zn II; 125–166 aa) o unikatowej budowie: $CX_2CX_{28,30}H_2X_2C$ [19,30,43,104]. W wiązaniu jonów Zn^{2+} uczestniczą Cys21, Cys24, His53 i Cys56 oraz Cys125, Cys128, His159 i Cys162 odpowiednio w Zn I i Zn II. Palce te spina 68-aminokwasowy fragment [19]. Unikatowość opisanych motywów wynika z tego, że są one dłuższe niż klasyczne palce cynkowe (28–30 aa), rozpoznają strukturę DNA raczej niż specyficzne jego sekwencje i mogą uczestniczyć w oddziaływaniach białko–białko [72]. Polimeraza PARP-1 silnie wiąże się, w formie dimeru, do jedno- i dwuniciowych pęknięć DNA, które powstają w wyniku bezpośredniego uszkodzenia helisy (oksydacja, alkilacja, deaminacja, depurynacja, promieniowanie jonizujące) albo pośrednio przez enzymatyczne usunięcie zasad w procesie naprawy [19]. Wyniki doświadczeń genetycznych (delecje, mutacje punktowe) regionów kodujących potencjalne palce cynkowe wskazują, że palec Zn I uczestniczy w aktywacji PARP-1 zarówno przez jedno-, jak i dwuniciowe pęknięcia w DNA, natomiast Zn II funkcjonuje głównie jako sensor jednoniciowych pęknięć [30,43].



Ryc. 1. Struktura domenowa PARP-1 uwzględniająca domeny: wiążącą DNA (DBD), automodyfikacyjną (AD) i katalityczną (CD) oraz moduły funkcjonalne: A–F. Na rycinie wskazano ponadto miejsce ataku kaspazy, które tną cząsteczkę PARP-1 uwalniając C-końcowy fragment o m.c. 89 kDa i N-końcowy – o m.c. 24 kDa. Pozostałe objaśnienia w tekście. Opracowano na podstawie [1,54,110,117]

Ostatnio, wykorzystując metody spektroskopii i krystalografii, wykryto w domenie C PARP-1 kolejny palec cynkowy – Zn III; (ryc. 1) [60,113]. Struktura kryształu tego motywu ujawnia zwinienie typu „zinc ribbon”, co sugeruje jego oddziaływanie międzydomenowe. Zwinienie opisane między 216. a 366. aa łańcucha zawiera N-końcowy helikalny region (225–289 aa), centralne zwinienie „zinc ribbon” (290–332 aa) i tzw. C-końcowy ogon (333–359 aa). Subdomeny „zinc ribbon” z resztami Cys295 i Cys298 tworzą tzw. „kciuk”, a region między Cys311 i Cys321 buduje tzw. pętlę rozciągniętą. Langelier i wsp. [60] sugerują, że nowo wykryty motyw Zn III może asocjować formując sieć kryształu, przez oddziaływanie głowa–ogon. Jego obecność wydaje się ważna w interakcjach białko–białko, które są nieodzowne w procesie aktywacji katalitycznej PARP-1.

Domena B zawiera klasyczny sygnał lokalizacji jądrowej – NLS (nuclear localization signal). Ten dwuczęściowy motyw (207–226 aa) – KRK(X₁₁)KKKSCKK zapewnia transport nowo syntetyzowanych cząsteczek enzymu do jądra komórkowego [2]. Na uwagę zasługuje obserwacja, że w obrębie NLS znajduje się sekwencja aminokwasowa DEVD, która stanowi miejsce ataku kaspazy 3 (lub 7) podczas apoptozy, tnąc PARP-1 na fragmenty o m.c. 89 i 24 kDa [47,110]. To cięcie przez kaspazy cząsteczek PARP-1 służy jako marker apoptozy [28]. W C-końcowym fragmencie DBD występują dwa motywy (220–220 i 280–285 aa) pętla – skręt – pętla (HTH; helix-turn-helix), które odpowiadają za wiązanie enzymu z DNA [19,123].

DOMENA AUTOMODYFIKACYJNA

W centralnie usytuowanej domenie automodyfikacyjnej PARP-1 (motyw D; 374–525 aa) występuje aż 15 potencjalnych miejsc przyłączenia łańcucha PAR na resztach Glu [135]. W N-końcu domeny AD zidentyfikowano motyw zamka leucynowego, który prawdopodobnie odpowiada za homo- i/albo heterodimeryzację, a zatem za interakcję z innymi białkami [19]. Bardzo ważnym motywem AD, umiejscowionym między 386. a 464. aa, jest domena BRTC (C-terminal domain of breast cancer protein BRCA1). Taki motyw występuje w niektórych białkach uczestniczących w naprawie DNA, a także jest

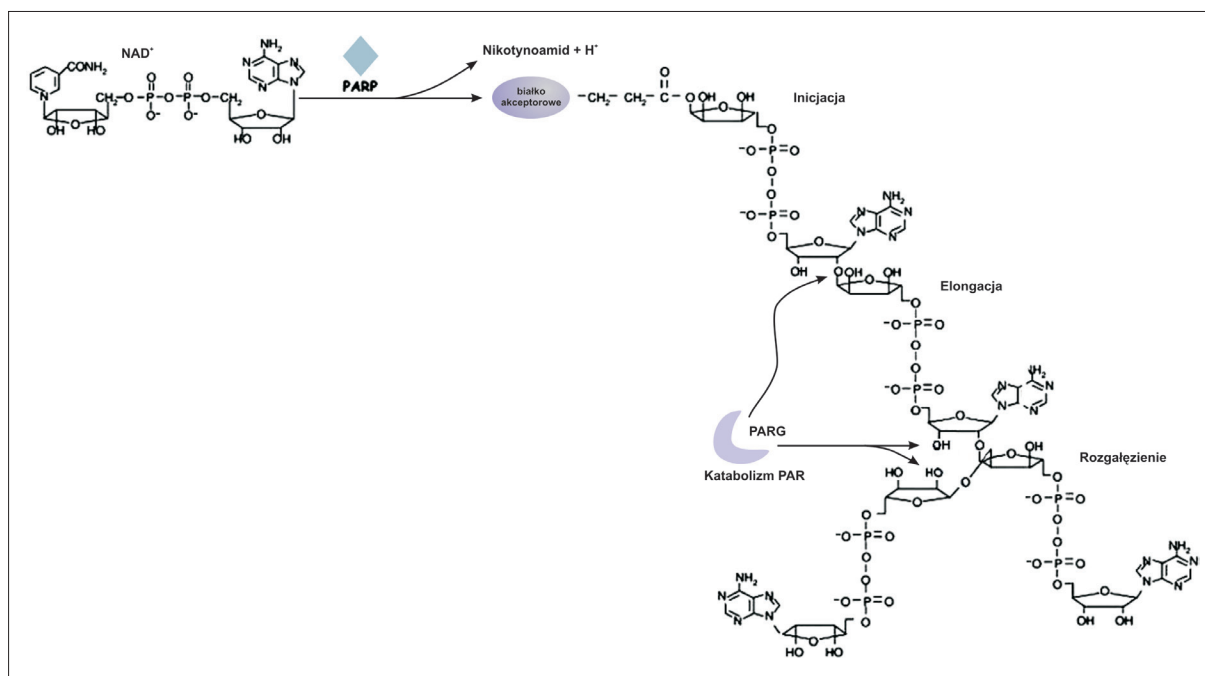
najważniejszy w oddziaływaniach PARP-1 z białkowymi partnerami, w tym z PARP-2 [35,36,98,99,123]. Okazało się, że klon cDNA wydzielony z *D. melanogaster*, który kodował wariant PARP-1 pozbawiony AD nie wykazywał zdolności interakcji np. z białkiem XRCC1 (X-ray repair cross-complementing group-1), które zawiera domenę BRCT i wraz z PARP-1 tworzy kompleks uczestniczący w naprawie DNA przez wycinanie zasad BER [68].

DOMENA KATALITYCZNA

Domena katalityczna hPARP-1 rozciąga się od 526. do 1014. aa (m.c. 54) i obejmuje motywy funkcjonalne E i F (ryc. 1). W nowych badaniach w jej N-końcu opisano słabo dotąd poznany motyw sekwencyjny WGR, wzbogacony w tryptofan, glicynę i argininę, który prawdopodobnie stanowi region oddziaływania enzymu z kwasami nukleinowymi [35,36,117]. Aktywność katalityczną hPARP-1 wiąże się z tzw. rdzeniem katalitycznym bądź minimalną domeną katalityczną usytuowaną między 663. a 1014. aa o m.c. około 40 kDa [93,117]. Centrum katalityczne opisywane jako „signature PARP” reprezentuje bardzo konserwatywny odcinek około 50 aa występujący u poznanych dotąd przedstawicieli PARP [2,36]. W PARP-1 komórek ludzkich zidentyfikowano je między 859. a 908. aa. W tym regionie znajduje się miejsce akceptorowe dla NAD⁺ oraz odbywa się zakotwiczenie pierwszej cząsteczki ADP-rybozy (przy automodyfikacji czy modyfikacji substratu), a następnie wydłużenie i rozgałęzienie polimeru PAR [19,93]. Uważa się, że dla przebiegu poli(ADP-rybozylacji) krytyczne aminokwasy to Asn868, Gly871, Leu877, Phe897, Lys903 i Cys908 [36]. Wyniki badań nad strukturą rdzenia domeny katalitycznej z wykorzystaniem specyficznych inhibitorów PARP-1 (m.in. PD128763) wykazały, że w wiązaniu NAD⁺ istotną rolę odgrywają reszty Glu988 i His862 [93]. Za region regulatorowy reakcji katalizowanej przez hPARP-1 uznaje się odcinek między 663. a 796. aa – PRD (PARP regulatory domain) [35,117].

AKTYWNOŚĆ ENZYMATYCZNA PARP-1

Polimeraza poli(ADP-rybozy) wykorzystuje jako źródło jednostek ADP-rybozy koenzym – dinukleotyd nikotynoamidowy



Ryc. 2. Poli(ADP-rybozylacja) białek katalizowana przez PARPs. W modyfikacji białek dochodzi do transferu ADP-rybozy z NAD⁺, głównie na reszty Gln substratu. Reakcja może przebiegać z przyłączeniem kolejnych monomerów ADP-rybozy tworząc polimery ADP-rybozy (PAR) proste lub rozgałęzione. Katalizę degradacji PAR dokonuje glikohydrolaza PARG; opracowano wg [14,113]

(NAD⁺) i katalizuje transfer 2'-(5''-fosforybozylo)-5-AMP na miejsce akceptorowe – głównie grupę karboksylową kwasu glutaminowego (E), rzadziej kwasu asparaginowego (D) [50,55], w reakcji opisywanej jako inicjacja (ryc. 2). Polimeryzacja reszt ADP-rybozy następuje przez tworzenie wiązań glikozydowych między C1 rybozy monomeru ADP-rybozy (powstającego z NAD⁺ po odłączeniu amidu kwasu nikotynowego), a C2' rybozy kolejnego przyłączonego monomeru (ryboza – ryboza 1'' → 2''). Formowanie wiązań między kolejnymi przyłączanymi monomerami ADP-rybozy prowadzi do powstania oligomerów, a następnie polimerów w tzw. reakcji elongacji. Polimery mogą osiągnąć *in vitro* 200–400 jednostek; wykazują strukturę helikoidalną. W wydłużającym się polimerze ADP-rybozy (PAR) co 20–50 jednostek występują rozgałęzienia [19,37].

Modyfikacja PARP-1 *per se* bądź licznych innych białek jest reakcją odwracalną, w której uczestniczy glikohydrolaza poli(ADP-rybozy) – PARG. Ta glikohydrolaza w komórkach ludzkich jest kodowana przez jeden gen (*PARG*; chromosom 10q11.23) i wykazuje aktywność egzo- i endoglikozydazy, która zapewnia usuwanie odpowiednio pojedynczych jednostek ADP-rybozy od końca polimerów i rozgałęzień polimeru [19,50]. PARG odgrywa główną rolę w recyklingu automodyfikowanych cząsteczek PARP-1 i w utrzymaniu prawidłowego poziomu cząsteczek PAR w komórkach. Usuwanie cząsteczek ADP-rybozy z polimerów PAR może również katalizować ostatnio wykryty enzym hydrolaza ADP-rybozy – ARH3 (m.cz. 39 kDa), który wykazuje częściową homologię z PARG [81]. Usuwanie pierwszej cząsteczki ADP-rybozy związanej z substratem dokonuje liaza, a sam mechanizm tej reakcji jest słabo poznany [32].

Jak dotąd dobrze scharakteryzowano kilka enzymów z tej rodziny [35,36,82,108, 117]. Wyniki obserwacji wskazują,

że dwa z nich – PARP-1 i PARP-2 ulegają aktywacji w wyniku pęknięć helisy DNA [73]. W większości *Eukaryota* PARP-1 jest powszechnie występującym enzymem, choć nie stwierdzono jej u drożdży. Ocenia się, że enzym ten występuje w 0,2–2×10⁶ cząsteczek w komórce [104,123]. Nazwa enzymów odpowiedzialnych za syntezę PAR (poliADP-rybozylacja/PARYLacja) zmieniła się w czasie od ich wykrycia, od transferaz poli(ADP-rybozy) – ADPRTs, syntetaz PAR – PARs do ostatnio najczęściej stosowanej – polimeraz PAR – PARPs. Enzymy należące do PARPs syntetyzują polimery PAR o różnej długości, których przyłączanie do licznych substratów (około 200) jest istotne dla przebiegu procesów fizjologicznych i patologicznych [7,12,73].

POLI(ADP-RYBOZYLACJA)/PARYLACJA SUBSTRATÓW BIAŁKOWYCH

W warunkach prawidłowych tylko niewielka liczba cząsteczek PARP-1 ulega automodyfikacji wypełniając funkcję produktu genu „house-keeping”. Obecność nieaktywnych, nie-ADP-rybozylowych cząsteczek zapewnia natychmiastową odpowiedź na uszkodzenia materiału genetycznego [19]. Jeśli komórki znajdują się w niekorzystnych, stresowych warunkach enzym ten syntetyzuje łańcuchy PAR i ich poziom wzrasta około 500-krotnie. Okres połowicznego rozpadu PAR spada zwykle szybko z 6–7 minut do kilku sekund.

PARP-1, a także przedstawiciele tzw. „bona fide” rodziny PARP, przyłączają kowalencyjnie jednostki ADP-rybozy albo do własnych cząsteczek (automodyfikacja) albo katalizują ich transfer na inne białka (heteromodyfikacja) [36,117]. Uważa się, że cząsteczki PAR występujące w postaci wolnej, a także związanej kowalencyjnie z białkami

są zdolne oddziaływać z substratami niekowalencyjnie [14,35]. Łańcuchy PAR mogą tworzyć swoiste struktury przez wewnętrzcząsteczkowe oddziaływania; struktury te wykazują zdolność przyciągania niekowalencyjnego czy odpychania innych cząsteczek [14,46,84]. W takiej interakcji ważny jest dwuczłoniowy motyw sekwencyjny, zawierający dwa konserwatywne regiony zapewniające utworzenie „kieszeni” dla niekowalencyjnego wiązania PAR [84]. Wykryty motyw jest wzbogacony w reszty aminokwasów zasadowych i hydrofobowych i zwykle zawiera: hxbxhhb-bhhh (h, b, x oznacza odpowiednio aminokwas hydrofobowy, zasadowy czy dowolny) [14].

PARP-1, najczęściej ulegający ekspresji enzym z rodziny PARP obejmującej 17 różnych białek, należy do tzw. prawdziwych „bona fide” polimeraz obok PARP-2, PARP-3, PARP-4 (vault), tankyrazy 1 (PARP-5a) i tankyrazy 2 (PARP-5b) [32,35,117]. W budowie prawdziwych „bona fide” PARPs występuje w domenie CD tzw. katalityczna reszta Glu988 oraz motyw sekwencyjny HYE [51]. Wśród wszystkich przedstawicieli rodziny PARP zidentyfikowano domenę katalityczną, zwykle umiejscowioną w C-końcu łańcucha (z wyjątkiem PARP-4/vault) z konserwatywnym motywem „PARP signature” [35,117]. W strukturze pierwszorzędowej PARP, oprócz domen opisanych w PARP-1 (por. ryc. 1), mogą występować dodatkowe domeny funkcjonalne związane z pełnionymi aktywnościami, m.in. tzw. powtórzenia ankrynowe, makrodomeny, nietypowe palce cynkowe, domena oddziaływań z RNA (RNA binding motif) czy WWE (z konserwatywnymi resztami Trp i Glu) [32].

W grupie przedstawicieli PARPs poza „bone fide” występują enzymy uczestniczące przede wszystkim w mono-ADP-rybozylacji białek (PARP 6–8; PARP 10–12 i PARP 14–16), bądź niewykazujące takiej aktywności (np. PARP-9 i PARP-13) [51,117]. Jak dotąd, wydaje się, że poza PARP-1 i PARP-2, aktywność pozostałych członków omawianej rodziny nie jest aktywowana uszkodzeniami DNA [1].

ROLA NIEKOWALENCYJNEGO WIĄZANIA ŁAŃCUCHÓW PAR PRZEZ BIAŁKA CHROMATYNOWE

Pogląd, że łańcuchy PAR występujące w postaci wolnej, a także związanej kowalencyjnie z białkami są zdolne *per se* oddziaływać z substratami niekowalencyjnie opiera się na wynikach badań przeprowadzonych w latach 80. ub.w. [96,124]. Łańcuchy PAR wykazują zdolność łączenia się z dodatnio naładowanymi białkami, przede wszystkim z histonami. Interakcje te prawdopodobnie nie polegają na prostym elektrostatycznym przyciąganiu, gdyż ujawniono różnice w oddziaływaniu histonów H1, H3 oraz H4 z wolnymi łańcuchami PAR [124]. Dodatkowo stwierdzono, że w odróżnieniu od pozostałych histonów, histon H4 cechuje silniejsze powinowactwo do łańcuchów PAR aniżeli do DNA. Stąd łańcuchy ADP-rybozy mogą konkurować z DNA w wiązaniu się z histonem H4 oraz okazują zdolność do „wypychania” DNA z uprzednio utworzonych kompleksów, co potwierdzono w doświadczeniach z rozdzielonymi nukleosomami [124; dane niepublikowane]. Należy podkreślić, że histon H1 charakteryzuje się znacznie wyższym powinowactwem do DNA niż do PAR, podczas gdy H3 nie wykazuje takich różnic. Wyniki tych obserwacji pozwoliły na zaproponowanie modelu regulacji struktury chromatyny na poziomie nukleosomów [124].

Strukturę nukleosomów w głównym stopniu warunkują interakcje DNA z histonami H3 i H4 [52,103]. Obydwa wspomniane histony pozostają w bardzo ścisłym kontakcie z DNA w chromatynie nieulegającej replikacji [25]. Z kolei oddziaływania histonów H2A i H2B z kwasem nukleinowym są znacznie słabsze, co umożliwia ich łatwą wymianę z cząsteczkami spoza nukleosomów [63]. Zgodnie z tą koncepcją relaksacji struktury chromatyny na poziomie mononukleosomów, łańcuchy PAR zsyntetyzowane w regionach z uszkodzeniami DNA byłyby zdolne do miejscowego odłączania cząsteczek H4 i DNA, umożliwiając tym samym dostęp „maszynerii” kompleksu naprawczego do pęknięć nici DNA. Zaproponowany model udziału łańcuchów PAR w relaksacji chromatyny potwierdzają wyniki obserwacji ujawniające nierównomierne rozmieszczenie powstających podczas naprawy DNA „łatek” (repair patches), głównie w miejscach wiązania cząsteczek H4 [59]. Model ten dobrze wpisuje się w koncepcję regulacji struktury chromatyny przez PAR na wyższych poziomach jej organizacji. Koncepcja ta dotycząca relaksacji polinukleosomów przez łańcuchy PAR, kowalencyjnie przyłączone do histonów H1, stanowi atrakcyjne wyjaśnienie szybkich i łatwo odwracalnych zmian w chromatynie na wyższym poziomie jej uporządkowania [86].

LOKALIZACJA PARP-1 W KOMÓRCIE

Najwcześniej poznane funkcje PARP-1 jako enzymu dokonującego poli(ADP-rybozylacji) białek jądrowych oraz sensora uszkodzeń DNA były przyczyną uznawania tej polimerazy za składnik jądrowy. Główna pula PARP-1 wiąże się z chromatyną i gromadzi w jąderkach [69,74]. Stymulacja określonych swoistych domen koreluje z aktywnością PARP-1 przez automodyfikację, która prowadzi do jej oddysocjowania z tych miejsc i utraty zdolności syntezy przez ten enzym cząsteczek PAR [50].

W jąderkach fibroblastów myszy oraz komórkach HeLa PARP-1 (a także PARP-2) oddziałuje z fosfoproteiną – nukleofosminą/B23 i asocjacja ta ma charakter konserwatywny. Okazuje się, że obydwie polimerazy i nukleofosmina/B23 są usuwane z jąderek w obecności inhibitorów polimerazy RNA I, ale nie w przypadku hamowania polimerazy RNA II [69]. W komórkach pozbawionych PARP-1 i PARP-2 nie odnotowano zmian w poziomie transkrypcji rRNA. Białko PARP-1 gromadzi się w skupiskach gęsto składnika włóknistego jąderka. W nukleoplazmie poziom tego enzymu wydaje się pozytywnie korelować ze stopniem upakowania chromatyny, natomiast przestrzenie międzychromatynowe wydają się jego pozbawione [74]. Obecność PARP-1 potwierdzono w strukturze utrzymującej właściwy kształt jądra komórkowego i odpowiedzialnej za wiele procesów jądrowych, tj. w matriksie jądrowej [123].

W 2009 roku doniesiono z laboratorium Scovassi [83] o wiązaniu się PARP-1 z centromerami komórek HeLa. Opublikowane dane są potwierdzeniem wcześniejszych doświadczeń wskazujących, że enzym ten asocjuje z centromerami różnych komórek ssaków eksponowanych na promieniowanie γ , katalizując ADP-rybozylację białek tych struktur jądrowych, m.in. CENP-A, CENP-B i BuB3 [97]. Opisująca polimeraza prawdopodobnie jest regulatorem białkowego kompleksu centromerowego, który oddziałuje z centromerowym DNA. Porównywalna analiza oceny

fluorescencji użytych przeciwciał rozpoznających PARP-1 i składniki kompleksu (CENP-B, -E i -F) za pomocą konfokalnego mikroskopu skaningowego w komórkach żywych i apoptotycznych potwierdziła m.in. kolokalizację enzymu naprawczego z CENP-B tylko w czasie interfazy. Białko CENP-E zidentyfikowano jednocześnie z PARP-1 podczas późnej fazy G1 oraz mitozy, zarówno w wrzecionie mitotycznym, jak i cytoplazmie. Z kolei składnik CENP-E nie wykazywał wspólnej lokalizacji z PARP-1 i wykrywano go w komórkach mitotycznych wokół chromosomów. W komórkach HeLa indukowanych do apoptozy etopozydem lub aktynomycyną D obserwowano, że CENP-B i PARP-1 ulegają „wyrzuceniu” poza jądro komórkowe i odnajduje się je w cytoplazmie w pęcherzykach apoptotycznych (apoptotic blebs). W komórkach apoptotycznych odnotowano produkt proteolizy PARP-1 o m.c. 89 kDa, który był później usuwany poza jądro komórkowe. Pozostałe składniki kompleksu centromerowego – CENP-E i CENP-F w komórkach apoptotycznych wykazywały podobny wzór barwienia immunochemicznego [83].

Ostatnio zwrócono uwagę, że w subjądrowych sferycznych organellach opisywanych jako ciała Cajala lub „ciałka zwinięte” (coiled bodies; CB), obecne w jądrach proliferujących czy metabolicznie aktywnych komórek zwierząt i roślin umiejscowione są PARP-1 [53]. Struktury te są często powiązane z jąderkami i wykazują w swoim składzie wspólne białka m.in. fibrylarynę i p80 – koilinę. Wykazano, że PARP-1 wchodzi w interakcję z głównymi składnikami CB, tj. koiliną (marker CB) i sn-RNP LSM11 (marker tzw. HLBS; histone locus bodies) w tkankach *D. melanogaster* i kontroluje ich umiejscowienie w tych strukturach.

Od dawna toczy się dyskusja czy PARP-1 może występować poza jądrem komórkowym, np. w mitochondriach [13,74,101]. W mitochondriach znajduje się pula NAD, który może stanowić substrat dla PARP-1. Ponadto potrzeba naprawy autonomicznego mtDNA, narażonego na uszkodzenia oksydacyjne wskazuje na taką możliwość [101]. Wykorzystanie immunomikroskopii elektronowej i techniki wykorzystującej koloidalne złoto pozwoliło na wykrycie PARP-1 w części mitochondriów komórek Sertolego i HeLa [74]. Po raz pierwszy lokalizację PARP-1 zasygnalizowano w tych strukturach wydzielonych z gruczołu jądrowego szczura, wołu i chomika wskazując na współwystępowanie tego enzymu z reduktazą cytochromu c. Traktowanie digitoniną frakcji mitochondrialnej wskazywało na obecność opisywanej polimerazy w mitoplaście [13].

Wyniki badań ostatnich lat potwierdzają detekcję PARP-1 w mitochondriach, a także wewnątrzmitochondrialną poli(ADP-rybozylację) białek tego organellum i znajdują zarówno zwoleńników [24,58,92], jak i przeciwników [18,87,129]. Adwersarze tej koncepcji uważają, że przejawy mitochondrialnej aktywności tego enzymu to zanieczyszczenia enzymem jądrowym. W świetle tych doniesień należy podkreślić wyniki doświadczeń Rossiego i wsp. [92], którzy wykorzystując spektrometrię masową współwytraconych precipitatów lizatów komórkowych i oczyszczonych mitochondriów (ludzkie fibroblasty FB1829 i komórki HeLa) za pomocą przeciwciał rozpoznających PARP-1 i składnik mitochondrialny – mitofilinę potwierdzili mitochondrialne umiejscowienie tych białek. Cytowani badacze stosując podwójne barwienie immunofluorescencyjne i mikroskopię

skaningową przedstawili dowody, że PARP-1 i mitofilina współwystępują w mitochondriach. Potwierdzeniem mitochondrialnej lokalizacji PARP-1 była obecność markera tych struktur, tj. HSP70 i mitofiliny. Natomiast wykluczeniem zanieczyszczeń jądrowych i cytoplazmatycznych była negatywna reakcja w wydzielonych mitochondriach obecności jądrowego czynnika transkrypcyjnego – SP1 i cytoplazmatycznego białka α -tubuliny. Mitochondrialne usytuowanie PARP-1 wydaje się być regulowane obecnością mitofiliny, składnika błony wewnętrznej tego organellum. Odnotowano, że zahamowanie syntezy PARP-1 przez siRNA powoduje nagromadzenie uszkodzeń DNA. Ponadto dostarczono eksperymentalnych dowodów, że PARP-1 wiąże się z mtDNA i wchodzi w skład kompleksu naprawczego, oprócz ligazy DNA III, co przemawia za udziałem tej polimerazy w utrzymaniu integralności mtDNA [92]. Poza tym ujawniono, że wysoki poziom aktywacji PARP-1 promuje kaskadę zdarzeń prowadzących do zależnej od PAR dysfunkcji mitochondriów i szybkiego uwalniania z tych organelli czynnika proapoptotycznego AIF [129] i jego przemieszczenia do jądra komórkowego. Ta translokacja indukuje aktywację PARP-1 i jest zależna od jej aktywności katalitycznej. Uwolniony w sposób zależny od PARP-1, a niezależny od kaspaz – AIF indukował śmierć neuronów eksponowanych na H₂O₂, N-metylo-N-nitrozoguanidynę (MNNG) czy N-metyloasparaginian (NMDA). Zdarzenia te odwracał inhibitor poli(ADP-rybozylacji): INH2BP czy FP15 [24]. Inhibicja mitochondrialnej poli(ADP-rybozylacji) zapobiega dysfunkcji mitochondriów, indukowanych stresem oksydacyjnym, uwalnianiu AIF i śmierci neuronów. Podejrzewa się, że polimerazy poli(ADP-rybozy) mogą stanowić sygnał do spadku poziomu NAD⁺/ATP i inicjować przemieszczenie glikohydroazy PARG do jądra komórkowego i jej udział w katabolizmie PAR [87]. Na podkreślenie zasługuje detekcja aktywności enzymatycznej enzymów degradujących PAR, tj. PARG i ARH3 w macierzy mitochondriów komórek embrionalnych nerki ludzkiej linii 293 [76].

Lai i wsp. [58] wykazali wysoki poziom poli(ADP-rybozylacji) wielu białek w mitochondriach izolowanych z mózgu szczurów, u których wywoływano urazowe uszkodzenie mózgu przez hipoksemię. Autorzy ci potwierdzili obecność PARP-1 w mitochondriach, jak i jej aktywność w modyfikacji wielu białek tych organelli, w tym: VDAC (voltage-dependent anion channel-1), mitofiliny, oksydazy cytochromowej, reduktazy cytochromowej, podjednostki β F₁F₀ ATP-azy, dehydrogenazy aldehydu 3'-fosfoglicerynowego i HSP60. Na tym etapie badań wydaje się, że znaczna aktywacja mtPARP może wpływać na spadek NAD⁺ i osłabione wytwarzanie ATP przez zahamowanie łańcucha oddechowego, co prowadzi do dysfunkcji mitochondriów i śmierci komórek.

MODYFIKACJE PARP-1

Modyfikacje potranslacyjne PARP-1 stanowią ważny mechanizm kontroli funkcji tego enzymu.

Poli(ADP-rybozylacja)

Wcześniejsze doniesienia wskazywały, że w cząsteczce PARP-1 występuje 4-28 miejsc akceptorowych dla łańcuchów PAR, umieszczonych głównie w domenie AD [46].

Wyniki badań nad ADP-rybozylacją histonu H1 sugerowały, że głównym miejscem modyfikacji przez PARP-1 są reszty Glu domeny AD [80,99]. Ze względu na to, że automodyfikacja domeny AD PARP-1 wpływa na interakcję z licznymi białkami, miejsca akceptorowe nie były długo potwierdzone doświadczalnie testami genetycznymi [1,114].

W 2009 r. Altmeyer i wsp. [1] wykorzystując delecje domen funkcjonalnych czy substytucje w genie *PARP-1* użycia chimery cząsteczek PARP-1/PARP-2/PARP-3, a śledząc zdolność do syntezy PAR w obecności DNA przez otrzymane białka stanowiące dotychczas przekonanie, że to reszty Glu stanowią główne miejsce automodyfikacji polimerazy. Okazało się, że otrzymane za pomocą inżynierii genetycznej cząsteczki enzymu, w którym usunięto region BRTC (N-końcowy odcinek domeny AD z 9 resztami Glu), a także substytucja 8 reszt Glu w pozostałej domenie AD, w pełni zachowywały zdolność do automodyfikacji analogiczną do białka „dzikiego”. Te wyniki wskazały, że reszty Glu domeny AD polimerazy nie są akceptorami PAR. Kolejne doświadczenia, wykorzystujące mutanty delecyjne *PARP-1* wykazały, że brak odcinka między 466. a 525. aa domeny AD w sposób istotny ograniczał poziom automodyfikacji enzymu. Stopień automodyfikacji był ograniczony w białku pozbawionym fragmentu między 1. a 214. aa domeny DBD, głównie odcinków kodujących palce cynkowe Zn I i Zn II. Głównym odkryciem cytowanego doniesienia [1] było wskazanie, że reszty Lys498, Lys521 i Lys524 stanowią miejsca akceptorowe PAR w polimerazie. Ich substytucja resztami Arg ograniczała automodyfikację PARP-1. Na tym etapie badań sprawą otwartą jest czy inne reszty Lys, np. w domenie DBD enzymu mogą stanowić miejsca akceptorowe PAR.

W tym samym czasie, zespół Liu [114,115] opublikował wyniki analizy funkcjonalnej domeny cząsteczki D PARP-1, wykorzystując produkt mutacji z substytucją Glu/Gln (E988Q), który może katalizować mono(ADP-rybozylację) (bez reakcji elongacji). Oczyszczony produkt sklonowanego w *E. coli* konstrukt kodującego domenę D (354–525 aa) oraz dodatkowo 21 aminokwasów z nią sąsiadujących, a także mutanta E988Q inkubowano z NAD⁺, po czym rozdzielono za pomocą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC). W uzyskanych po tej chromatografii dwóch polipeptydach identyfikowano miejsce (ADP)-rybozylacji techniką spektrometrii masowej. Okazały się nimi reszty Asp387, Glu488 i Glu491. Ich podstawienie cząsteczkami Ala powodowało spadek poziomu (ADP)-rybozylacji produktu zmutowanego genu, najwyższy w przypadku substytucji trzech ww. aminokwasów. Z kolei ocena zdolności automodyfikacji przez produkt ekspresji konstrukt, który był pozbawiony domeny D, czyli białko PARP-1 zawierające w strukturze domeny funkcjonalne ABCEF zachowywało tylko około 30% mniejszą aktywność w przyłączaniu PAR w porównaniu z białkiem enzymatycznym typu „dzikiego”.

Wyniki przedstawione przez obydwa zespoły badawcze [1,114] sugerują, że potencjał do przyłączania ADP-rybozy, czy jej polimerów „wykracza” poza domenę AD opisywanego enzymu i wymaga dalszych badań. Automodyfikacja PARP-1 wywołuje hamowanie jej aktywności katalitycznej i upośledza zdolność wiązania do DNA [19].

Fosforylacja

Fosforylacja należy do potranslacyjnych zdarzeń, które modulują przebieg wielu procesów fizjologicznych. Fosforylacja białek, poza regulacją aktywności substratów, jest powiązana z innymi modyfikacjami, które odpowiadają za kontrolę licznych dróg sygnalizacji komórkowej (cross-talk).

W bogato udokumentowanej publikacji zespołu Swansona [48] badano korelację między szlakiem z udziałem kinaz rodziny MAPK (mitogen activated protein kinases) – **ERK1** i **ERK2** (ERK1/2; extracellular signal-regulated kinase1/2) a śmiercią neuronów i astrocytów zależną od PARP-1. Farmakologiczne hamowanie aktywności kinaz ERK1/2 zapobiegało aktywacji PARP-1 *in vitro* i *in vivo* i przyczyniało się do spadku poziomu umierających komórek nerwowych. Zależna od PARP-1 śmierć komórek eksponowanych na MNNG, MNDA czy nadtlenoazotyn była całkowicie blokowana przez dwa inhibitory ERK1/2 (PD98059 i U0126) oraz inhibitor PARP-1 (DPQ). Natomiast inhibitory kinazy p38 i JNK1 w hodowli komórek nie okazywały wpływu na śmierć komórek neuronalnych. Ujawniono, że obniżona przez siRNA ekspresja ERK1/2, a głównie ERK2 ochraniała astrocyty przed zależną od PARP-1 śmiercią indukowaną przez MNNG. Bezpośrednim dowodem aktywacji PARP-1 przez ERK1/2 był, potwierdzony immunohistochemicznie i techniką western blotting, spadek aktywności polimerazy w tworzeniu PAR w komórkach inkubowanych w obecności alkilatora DNA – MNNG, inhibitorów ERK1/2, a także siRNA – wyciszającego ekspresję ERK2. Zastosowanie rekombinowanego białka hPARP-1 wykorzystano do potwierdzenia jego fosforylacji przez ERK1/2 w obecności ATP oraz wyznaczenia miejsc tej modyfikacji metodą spektrometrii masowej. Wykazano, że fosforylacja PARP-1 dotyczy reszt Ser372 i Thr373, które są usytuowane w odcinku łańcucha między Zn III a domeną BRTC (por. ryc. 1). Substytucja reszt Ser372 i Thr373 przez Ala zapobiegała fosforylacji PARP-1 i hamowała aktywność polimerazy w syntezie PAR, w odpowiedzi na uszkodzenie DNA. Wydaje się, że spadek aktywności PARP-1 może wynikać ze zmian konformacyjnych cząsteczki enzymu spowodowanych substytucją [48]. Ponadto zasugerowano, że fosforylacja ww. aminokwasów może stanowić mechanizm kontrolujący aktywność PARP-1 poprzez regulację oddziaływań między domenami enzymu [60].

Wśród istotnych aspektów fosforylacji PARP-1 należy wymienić doniesienie wskazujące, że insulinopodobny czynnik wzrostu I – IGF1 (insulin-like growth factor), wzmacniająca ekspresję naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu – VEGF (vascular endothelial growth factor) i proces angiogenezy hamuje fosforylację PARP-1. Odnotowano, że inhibicja PARP przez 3-aminobenzamid oraz nikotynamid stymulują ekspresję VEGF w sposób zależny od dawki [5].

Inkubacja lizatów komórek śródbłonka żyły pępowinowej – HUVEC w obecności ATP, inhibitora i aktywatorów kinazy białkowej C (PKC) – odpowiednio staurosporyny i TPA (13-octan-12-O-mirystynian forbolu) oraz HCNS (N-heptylo-5-chloronaftylenosulfono-amid), a także fosfatazy PP1 wskazuje na udział kinazy PKC w fosforylacji PARP-1. Dodanie egzogenego ATP ułatwiało fosforylację

PARP-1, a jednocześnie hamowało jej aktywność ocenianą stopniem włączania $[^{14}C]$ -NAD⁺. Ta inhibicja była znoszona przez staurosporynę i fosfatazę PP1, a TPA i HCNS dodawane indywidualnie, obniżały aktywność PARP-1 ponad 60%. Z kolei wyniki elektroforezy białek jądrowych wydzielanych z komórek HUVEC znakowanych $[^3H]$ -H₃PO₄ (przez 20 godz.) w obecności IGF-1 potwierdziły obecność ufosforylowanego białka PARP-1 o m.cz. ~120 kDa i produktu jego proteolizy o m.cz. 85 kDa oraz modulowanie przez IGF-1 fosforylacji enzymu naprawczego.

W 2009 roku międzynarodowy zespół badawczy pod kierunkiem G. Poiriera [27] opublikował dane wskazujące na nowe miejsca fosforylacji PARP-1 (oraz PARG). W cytowanych badaniach potwierdzono, że *in vitro* w rekombinowanym hPARP-1 w obecności ATP, kilka kinaz może fosforylować ten enzym i są to: PKCα, PKCβ, ERK-1, ERK-2, CK II, JNK-1, CaMK II oraz kinaza związana z przebiegiem cyklu komórkowego CDK-5. Najwyższy poziom fosforylacji odnotowano w przypadku PKCβ. W dalszych doświadczeniach rozdzielone za pomocą SDS-PAGE pasmo hPARP-1, po inkubacji w obecności badanych kinaz, wycinano z żelu, poddawano trawieniu za pomocą trypsyny i frakcjonowano za pomocą kapilarnej chromatografii HPLC. Następnie poszczególne fosfopeptydy analizowano za pomocą spektrometrii masowej. W uzyskanych fosfopeptydach ujawniono miejsce endogennej fosforylacji, obok nowych czy potwierdzonych miejsc tej modyfikacji PARP-1, a także skorelowano ich występowanie z budową domenową analizowanego enzymu. W krótkim streszczeniu tych obszernych badań należy zwrócić uwagę na detekcję lub potwierdzenie specyficznych miejsc fosforylacji przez:

- **PKCβ** – (Thr368/Ser372/Thr373/Ser374; w regionie wyprzedzającym mostek leucynowy; Ser504, Ser519 i Thr565 w domenie katalitycznej);
- **ERK-1** – (Ser41, Ser177 i Thr420/Thr422, Ser455 i Ser542 odpowiednio w obrębie palca Zn I i Zn II oraz domeny AD na jej pograniczu z motywem WGR; por. ryc. 1).

Ponadto wykazano modyfikację reszt Ser/Thr katalizowaną przez **ERK-1**, **CaMK-II** i **JNK-1** (Ser257/Thr258 i Ser 782/Ser785/Ser786 – odpowiednio w domenie DBD i CD) oraz niejednoznaczne wyniki dotyczące transferu reszty fosforanowej na PARP-1 przez **CK II** (Ser257/Thr258, Ser782/Ser785) i **CDK5** (Ser782/Ser785/Ser786). Zidentyfikowane *in vitro* nowe potencjalne miejsca fosforylacji muszą zapewne zostać zweryfikowane *in vivo*. Obserwacje potwierdzające fosforylacje opisanego enzymu w większości istotnych regionach funkcjonalnych PARP-1 przemawiają za ich ważną rolę w aktywności opisywanego białka.

Acetylacja

W ostatnich latach wykazano, że polimeraza poli(ADP-rybozy)-1 w warunkach stresu ulega acetylacji, a ta modyfikacja wzmacnia jej aktywność katalityczną [33,34,90]. W 2006 r. Hassa i wsp. [34] donieśli, że PARP-1 ulega modyfikacji przez **acetylazę p300** i **CBP** (cAMP-response element-binding protein); p300/CPB. W szeroko udokumentowanym doniesieniu badacze ci wykazali, że acetylacji ulegają reszty: Lys498, Lys505, Lys508, Lys521 i Lys524 umieszczone między 373. a 524. aa cząsteczki polimerazy. Ich wyniki sugerują również możliwość acetylacji

w odcinku N-końcowym łańcucha między 1. a 214. aa. Acetylacja PARP-1 przez p300/CBP promuje zdolność tego enzymu do regulacji transkrypcji genów zależnych od NF-κB (nuclear factor kappa B). Stwierdzono, że PARP-1 i acetylaaza p300 synergistycznie aktywują ekspresję genów zależnych od wspomnianego czynnika transkrypcyjnego w odpowiedzi na czynniki wywołujące stan zapalny [33]. Okazało się, że część domeny AD i C-końcowy odcinek domeny CD, a nie tzw. minimalna domena CD oddziałuje z acetylazą w pełnej koaktywacji NF-κB w odpowiedzi na stymulację TNF-α i liposacharydem [33,34]. Acetylacja PARP-1 na wymienionych resztach Lys jest nieodzowna w interakcji polimerazy z podjednostką p50 NFκB i synergistycznej aktywacji tego czynnika przez acetylazę p300 i tzw. kompleks Mediatora, jako odpowiedź na stymulatory stanu zapalnego [34]. Doświadczenia, w których przeprowadzono koimmunoprecypitację kompleksów PARP-1 z ekstraktów jądrowych kontrolnych komórek HEK293 z ekspresją deacetylaz histonowych klasy I (HDAC 1–6) wykazały, że polimeraza ulega deacetylacji przez HDAC 1, 2 i 3. Ponadto odnotowano, że HDAC 1–3 dokonują represji transkrypcji genów zależnych od NF-κB (np. *MIP-2* i *iNOS*) częściowo przez deacetylację PARP-1 [34]. Niedawno doniesiono, że acetylacja PARP-1 przez **acetylazę PCAF** (p300/CBP-associated factor) w kardiomiocytach myszy pod wpływem stresu (naprężenia mechanicznego) prowadzi do aktywacji polimerazy, niezależnej od uszkodzeń DNA [90]. Modyfikacja ta jest odwracalna i katalizowana np. przez SIRT1, należąca do III klasy deacetylaz histonowych, opisywanych jako sirtuiny. Ze względu na to, że zarówno PARP-1, jak i SIRT1, wykorzystują jako kosubstrat NAD⁺ wydaje się, że obydwie enzymy uczestniczą we wspólnych ścieżkach sygnalizacyjnych i mogą decydować o życiu bądź śmierci komórek, które znajdują się w warunkach stresu. PARP-1 wpływa m.in. na transkrypcję czynnika jądrowego NF-κB, natomiast deacetylaza SIRT1 hamuje jego aktywność [35,36].

Ponadto przedstawiono wyniki doświadczeń potwierdzających, że PARP-1 i SIRT1 wiążą się ze sobą i dokonują deacetylacji polimerazy, zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [90]. Zsyntetyzowane *in vitro* cząsteczki PARP-1 po inkubacji z acetylazą PCAF i $[^3H]$ -acetyloCoA poddawano immunoprecypitacji. Następnie próby inkubowano z cząsteczkami SIRT1 opłaszczonymi na ziarnach, równolegle przeprowadzając doświadczenia kontrolne z deacetylazą HDAC1 i HDAC4 – odpowiednio jako kontrolą pozytywną i negatywną. Okazało się, że SIRT1 i HDAC1 katalizowały deacetylację PARP-1, natomiast HDAC4 nie przejawiała takiej aktywności. Enzym SIRT1 okazuje zdolność deacetylacji odcinków: 1–214 i 477–524 aa PARP-1, a HDAC4 – głównie regionu między 477. a 524. aa.

In vivo potwierdzono deacetylację Myc-PARP-1 w obecności SIRT1 oraz HDAC1 w komórkach Cos7. Deacetylacja przez te enzymy blokuje aktywność katalityczną PARP-1. Potwierdzeniem, że endogenny enzym SIRT1 usuwa reszty acetylowe PARP-1 było wykazanie, że kardiomiocyty transfekowane adenowirusowym wektorem, syntetyzującym mutant i dziki typ cząsteczki SIRT1, potraktowane inhibitorem tej deacetylazy – splitomycyną, stymulowały acetylację polimerazy. Natomiast aktywator SIRT1 – resweratrol działał przeciwnie. Te interesujące wyniki sugerują, że PARP-1 może stanowić cząsteczkę „docelową” stresu wywołanego

m.in. hipertrofią i prowadzić do śmierci kardiomiocytów. W warunkach stresu PARP-1 ulega aktywacji przez acetylację, co prowadzi do rozległej poli(ADP-rybozylacji) wielu białek. Niewielka aktywacja PARP-1 reguluje różne funkcje fizjologiczne przez modulację odmiennych komórkowych mechanizmów, tj. zmiany struktury chromaty, transkrypcji genów czy metabolizmu komórkowego. Natomiast w warunkach silnego stresu znaczna aktywacja PARP-1 może wyczerpywać zapasy komórkowego NAD⁺, prowadząc do hamowania aktywności SIRT1 i szlaków zależnych od NAD⁺. W tej sytuacji wydaje się, że SIRT1 blokując aktywność PARP-1 przez deacetylację tego enzymu „pomaga” utrzymać poziom komórkowego NAD⁺.

Sumoilacja

Wykorzystanie osiągnięć wynikających z poznania ludzkiego genomu wskazało, że PARP-1 może ulegać modyfikacji przez sumoilację polegającą na przyłączeniu do reszt lizyny tego enzymu małych białek SUMO (small ubiquitin-like modifiers), w strukturze których występuje podobieństwo do ubikwityny. Modyfikacja ta, podobnie jak ubikwitylacja, przebiega w trzech etapach, jednakże maszynerie enzymatycznej (E1, E2 i E3) w sumoilacji i ubikwitylacji są różne [112]. W skrócie – białko SUMO (1 z 4 poznanych dotąd), po usunięciu C-końcowych aminokwasów, odsłania dwie reszty Gly. Następnie ulegając aktywacji przez enzym E1 (heterodimer Sua1/hUba2) w obecności ATP, wiąże się tioestrowo z podjednostką hUba2 enzymu. W kolejnym etapie SUMO ulega przeniesieniu na enzym koniugujący E2 (Ubc9) z wytworzeniem wiązania izopeptydowego między grupą karboksylową C-końcowej Gly i grupą ε-aminową Lys białka akceptorowego. Sumoilowane białko uwalnia ligaza E3 SUMO [112].

Messner i wsp. [70] podjęli próbę weryfikacji *in vivo* sumoilacji PARP-1. W komórkach HEK293 przeprowadzono koekspresję PARP-1 oraz SUMO1 lub SUMO3, a w otrzymanych ekstraktach tych komórek potwierdzono elektroforycznie obecność monosumoilowanej polimerazy. *In vitro* wykazano, że sumoilacja przez rekombinowane składniki, które ją przeprowadzają dotyczy Lys486. Okazało się, że substytucja Lys486 arginina – zapewne w istotnym miejscu cząsteczki, zapobiega sumoilacji *in vitro* i *in vivo*. Reszta Lys486 znajduje się w domenie AD – w łączniku spinającym motywy funkcjonalne BRCT i WGR (por. ryc. 1). Wydaje się ważnym, że modyfikacja polimerazy przez SUMO1/3 przebiega w sąsiedztwie reszt Lys, które mogą ulegać acetylacji/deacetylacji [34,90].

Na podkreślenie zasługuje obserwacja, że modyfikacja PARP-1 przez SUMO1 czy SUMO3 nie zmienia aktywności enzymu w syntezie łańcuchów PAR oraz w wiązaniu do uszkodzonego DNA. Natomiast sumoilacja PARP-1 w pełni znosi efekty acetylacji tego enzymu przez acetylazę p300, co zapewne stanowi istotne wydarzenie w „cross-talk”, w którym on uczestniczy. Ponadto udowodniono, że sumoilacja PARP-1 osłabia jej funkcje jako koaktywatora transkrypcji niektórych genów [70].

PARP-1 A METYLACJA DNA

Pod koniec ostatniej dekady ubiegłego wieku opublikowano wyniki doświadczeń wskazujące, że blokowanie

poli(ADP-rybozylacji) przez kompetycyjne hamowanie 3-benzamidem enzymów PARP indukuje *in vivo* zmiany metylacji DNA wysp CpG promotora genu *Htf* w mysich fibroblastach linii L929 [133]. W laboratorium P. Cai'afy zasugerowano, że PARP-1 po automodyfikacji, bądź łańcuchy PAR, przyczyniają się do inaktywacji metylotransferazy DNA-*Dnmt1* i nieefektywnej metylacji DNA [134]. Automodyfikowana polimeraza z dużym ujemnym ładunkiem wiąże się z *Dnmt1*, wyciszając jej aktywność katalityczną. Na taką sugestię wskazują obserwacje ujawniające, że dwie domeny potencjalnego wiązania PAR metylotransferazy wykazują silniejsze powinowactwo do łańcuchów PAR niż do DNA. Ponadto na taką możliwość wskazują wyniki doświadczeń wykorzystujące koimmunoprecypitację obydwu enzymów i potwierdzenie w utworzonym kompleksie obecności automodyfikowanej postaci PARP-1 [14,91]. Uważa się, że stosunek między automodyfikowanymi i niezmodyfikowanymi cząsteczkami PARP-1, zależny od dynamiki aktywności PARP-1/PARG determinuje wzory metylacji DNA [14]. Spadek bądź wzrost automodyfikacji PARP-1 wydaje się odpowiadać odpowiednio za „rozproszoną” hipermetylację bądź hipometylację DNA. Jeśli PARP-1 pozostaje w wolnej postaci metylotransferaza *Dnmt1* może metylować DNA. Z kolei wysoki poziom automodyfikacji PARP-1 wycisza aktywność *Dnmt1* zapobiegając utrzymaniu metylacji widełek replikacyjnych, czego skutkiem jest hipometylacja DNA. Ostatnio wykazano, że w wyniku ektopowej nadekspresji glikohydrołazy PARG w fibroblastach linii L929 (po ich transfekcji wektorem zawierającym *Myc-PARG*), ekspresja *Dnmt1* ulega spadkowi, a wyspy CpG promotora tego genu ulegają metylacji [131]. Wyniki tych doświadczeń sugerują, że wyspy CpG promotora *Dnmt1* są ochraniające przed metylacją przez automodyfikowany PARP-1 bądź ADP-rybozylowany czynnik transkrypcyjny. Ważnym odkryciem wydaje się stwierdzenie, że w komórkach prawidłowych automodyfikowane cząsteczki PARP-1, a także łańcuchy PAR wiążą się z promotorem *Dnmt1* „znacząc” te sekwencje i ochraniając je przed metylacją. Na obecnym etapie badań można oczekiwać, że ochronna rola promotora *Dnmt1* stanowi istotną funkcję w epigenetycznej regulacji ekspresji tego genu.

SUBSTRATY I GŁÓWNE FUNKCJE PARP-1

PARP-1 *in vivo* jest najczęściej akceptorem łańcuchów PAR [19,35]. Liczne badania wskazują, że głównymi substratami dla PARP-1 są białka jądrowe, których modyfikacja przez przyłączenie PAR moduluje strukturę chromaty, wpływa na metabolizm i naprawę DNA oraz jego stabilność, reguluje transkrypcję genów [49,50,54,99,123]. Enzym ten przez palce cynkowe, występujące w jego domenie DBD może oddziaływać ze specyficznymi sekwencjami w promotorach różnych genów [132]. Ponadto PARP-1 może modylować poziom transkrypcji genów przez jej zdolność do poli(ADP-rybozylacji) licznych czynników transkrypcyjnych m.in. NF-κB, TFIIF, Oct YY1 i AP2, przez co zapobiega wiązaniu z ich specyficznymi miejscami w promotorach genów [77,132]. Związane z PARP-1 polimery ADP-rybozy, a także wolne PAR są zdolne do wiązania się niekwalencyjnie z konserwatywnymi domenami substratów, a to stabilne oddziaływanie jest rozpowszechnione w komórkach modulując funkcją licznych białek [35,84,91,97]. Ostatnio w laboratorium Tulina [45] potwierdzono *in vivo* interakcję PARP-1 z dwoma białkami *Drosophila* z rodziny hnRNPs,

Tabela 1. Podstawowe substraty PARP-1; znaczenie ich poli(ADP-rybozylacji) w głównych procesach komórkowych

Substrat/Komórki	Funkcja	Piśmiennictwo
PARP-1, PARP-2 Histony: H1, H2A, H2B, H3, H4 Białka HMG Topoizomerazy I, II	upakowanie i dekondensacja chromatyny; modulacja struktury chromatyny	[2,33,34,35,36] [2,35,61,79,80,86,123] [19,35,61,89] [101]
Polimerazy DNA a, b, e Ligazy DNA Topoizomeraza II Endonukleaza Fen PARP-1, PARP-2 Kinazy ATM, ATR Kinaza DNA-PK Histony Białko p53 XXCC1	metabolizm DNA; naprawa DNA	[26,84,107] [2,40,84,118] [26] [19] [1,11,62,98,122] [31] [44,84,94] [2,35] [65,85] [68,98]
Polimerazy RNA Topoizomerazy I, II Histony hnRNPs Czynniki transkrypcyjne (NFκB, TF IIF, Oct, YY 1, AP2, SP1)	transkrypcja	[36,76] [102] [36,61] [36,45] [35,77,132]
Białko p53 PCNA	cykl komórkowy	[65,84,116,122,125] [107]
Komórki hematopoetyczne	różnicowanie	[9]

tj. Squid/hrp40 i Hrb98DE/hrp38. Związanie PAR przez te białka hamuje ich zdolność wiązania z RNA. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wskazują, że modyfikacja tych hnRNPs reguluje ich interakcję z RNA i moduluje szlak alternatywnego składania premRNA.

Wśród białek ulegających poli(ADP-rybozylacji) przez PARP-1 należą m.in. p53 czy PCNA (proliferating cell nuclear antigen) uczestniczące w przebiegu cyklu komórkowego [109,122].

W tabeli 1 przedstawiono główne akceptory polimerów ADP-rybozy uwzględniając efekty biologiczne tej modyfikacji.

W dalszej części przeglądu zwrócono uwagę na rolę PARP-1 w naprawie DNA oraz w utrzymaniu stabilności genomu oraz funkcji tego enzymu w procesie śmierci komórek.

UDZIAŁ PARP-1 W NAPRAWIE DNA I UTRZYMANIU STABILNOŚCI GENOMU

Na rolę PARP-1 w usuwaniu uszkodzeń DNA wskazywały m.in. badania z zastosowaniem syntetycznych inhibitorów tego enzymu, a także technik inżynierii genetycznej [19,41]. Nadekspresja domeny DBD białka PARP-1 w transfekowanych komórkach (konstytutywnie oddziałującej z DNA, a przez to blokującej dostęp do miejsca jego uszkodzenia endogennemu enzymowi), czy użycie antysensownych oligonukleotydów – hamujących jego ekspresję, obniżało efektywność naprawy uszkodzeń materiału genetycznego indukowanych czynnikami genotoksycznymi. W konsekwencji prowadziło to do zatrzymania

komórek na granicy faz G₂/M cyklu komórkowego oraz ich wzmoczonej apoptozy. Ponadto w komórkach eksponowanych na czynniki karcynogenne, obserwowano wzrost częstości wymian chromatyd siostrzanych w chromosomach, zwiększoną liczbę mikrojąder i nasiloną amplifikację genów, wskazującą na zmniejszoną stabilność genomu [19,41,118,120]. Udział PARP-1 w naprawie DNA potwierdziły także doświadczenia z wykorzystaniem modyfikowanych genetycznie organizmów. W laboratorium G. de Murcia [22] udało się wyhodować myszy po „nokaucie” genu *parp-1*, które okazały się nadwrażliwe na promieniowanie γ i N-metylonitrozomocznik – czynniki wywołujące ich śmierć. Wykazano, że fibroblasty wydzielone z zarodków tak zmutowanych myszy, traciły zdolność do przejścia przez cykl komórkowy. Natomiast splenocyty tych gryzoni, eksponowane na N-metylonitrozomocznik, cechował wzrost poziomu apoptozy w porównaniu z komórkami pochodzącymi z organizmów typu „dzikiego”.

Na uwagę zasługują doniesienia wskazujące, że uszkodzeniom DNA towarzyszy wzrost aktywności PARP-1 oraz powiązanej z nią funkcjonalnie glikohydrolazy PARG, która przemieszcza się z cytosolu do jądra komórkowego [19,50]. W tym organellum PARG atakuje wiązania glikozydowe polimerów ADP-rybozy oraz odcina wolne jednostki ADP-rybozy (ryc. 2). Uwolnione cząsteczki w procesie nieenzymatycznej glikacji lub glikooksydacji mogą modyfikować liczne białka komórkowe, wpływając na naprawę i metabolizm DNA. Szacuje się, że czynniki uszkadzające DNA indukują prawie 9-krotny wzrost zawartości adduktów mono-(ADP-ryboza)-białko w jądrze komórkowym. Czas połowicznego rozpadu powstałych adduktów w komórce okazuje się dłuższy niż wolnych polimerów

PAR i wynosi średnio 8–10 min, podczas gdy około 6 minut dla polimeru rozgałęzionego i poniżej 1 minuty – dla polimeru prostego [19].

Powszechnie akceptuje się pogląd, że cząsteczki PARP-1 wchodzi w skład kompleksu opisywanego jako PLX (PARP-1/ligaza DNA III/XRCC1), który stymuluje naprawę DNA przez wycinanie zasad – BER oraz uczestniczy w przebiegu naprawy dwuniciowych pęknięć DNA (double-strand breaks; DSBs) [40,41,108,118].

BER

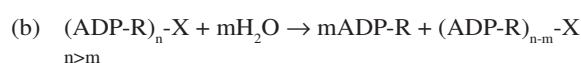
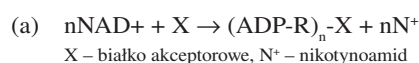
BER to mechanizm wytworzony przez organizmy w toku ewolucji w celu zapobiegania mutacjom spowodowanym uszkodzeniami zasad azotowych oraz naprawy jednoniciowych pęknięć DNA (single-strand breaks; SSBs), które powstają w komórce m.in. w konsekwencji wolnorodnikowych reakcji chemicznych [39]. Sugeruje się, że BER może przebiegać przynajmniej dwoma sposobami, z udziałem różnych polimeraz i ligaz.

W obydwu mechanizmach wyróżnia się kilka etapów, wśród których główną rolę odgrywa faza wycinania uszkodzonej zasady azotowej przez glikozylazę DNA z wytworzeniem tzw. miejsca AP (apurynowego/apirymidynowego). Następnie miejsce to jest trawione przez AP endonukleazę, tworząc SSB w DNA. Celem kolejnych etapów jest naprawa powstałej przerwy w DNA przez wygenerowanie właściwych zakończeń nici („end cleaning”), wbudowanie pojedynczego nukleotydu (w przypadku drogi klasycznej, tzw. SP-BER; short-patch repair), bądź zsyntetyzowanie „łatki” o długości 2–8 nukleotydów, z następczą nukleolizą odsuniętego fragmentu starej nici (w LP-BER; long-patch BER). Ostatecznie dochodzi do odtworzenia brakujących wiązań fosfodiesterowych [8,39].

Jak dotąd rola zarówno PARP-1, jak i PARP-2, w naprawie typu BER jest słabo poznana. Sugeruje się, że obydwa te enzymy funkcjonują jako „czujniki” (tzw. model sygnalizacyjny), rozpoznające pęknięcia w DNA, przejściowo wiążące się do jego końców, a następnie przekazujące informację o uszkodzeniu na inne białka. Przy użyciu mikroskopii elektronowej wykazano, że PARP-1 w postaci homodimeru oddziałuje elektrostatycznie z DNA, obejmując 7 nukleotydów w górę i w dół od miejsca uszkodzenia [19]. W oddziaływaniu tym uczestniczy domena DBD enzymu naprawczego. Po związaniu DNA dochodzi do znacznego (nawet 500-krotnego) wzrostu aktywności enzymatycznej polimeraz i automodyfikacji PARP-1. Automodyfikacja polimerazy prowadzi do jej odłączenia od DNA, a przyłączony polimer PAR może modyfikować inne substraty, w tym p53 lub ulegać degradacji [62] (ryc. 3). Akceptorem ADP-rybozy stają się m.in. histony (głównie H1 i H2B modyfikowane preferencyjnie, odpowiednio przez PARP-1 i PARP-2) oraz białka rodziny HMG (1,2, 14,17). Przyłączenie do białek chromatyny ujemnie naładowanych polimerów PAR zapewnia niezbędne do naprawy DNA rozluźnienie jej struktury, co odgrywa zasadniczą rolę w naprawie upakowanej, nietranskrybowanej chromatyny (model naprawy zależnej od chromatyny) [2,85].

Kolejny model, tzw. rekrutacyjny zakłada, że aktywne cząsteczki PARP-1 wraz z długimi polimerami ADP-rybozy

funkcjonują jako „przyręty”, ułatwiające enzymom naprawczym dotarcie do miejsc uszkodzenia DNA. ADP-rybozylacja białka XRCC1 zwiększa jego powinowactwo do innych składników szlaku BER, tj. ligazy DNA III i endonukleazy AP. Ponadto katalizowana przez PARP-1 modyfikacja polimerazy DNA β i endonukleazy Fen-1 (Flap endonuclease-1), odpowiedzialnej za usuwanie „odstającej” nici DNA w LP-BER stymuluje ich aktywność [19]. Dodatkowo wykazano, że oddziaływanie ligazy DNA III, zarówno z aktywnym enzymem PARP-1, jak i uwolnionym polimerem PAR zwiększało efektywność ligacji DNA [2]. Wydaje się możliwe, że łańcuchy PAR, w warunkach niedoboru ATP – niezbędnego do aktywności ligazy, mogą stanowić substrat do jego syntezy, reagując z pirofosforanem, uwalnianym w czasie wbudowywania brakującego nukleotydu do uszkodzonej nici DNA wg ciągu reakcji [66,67,78]:



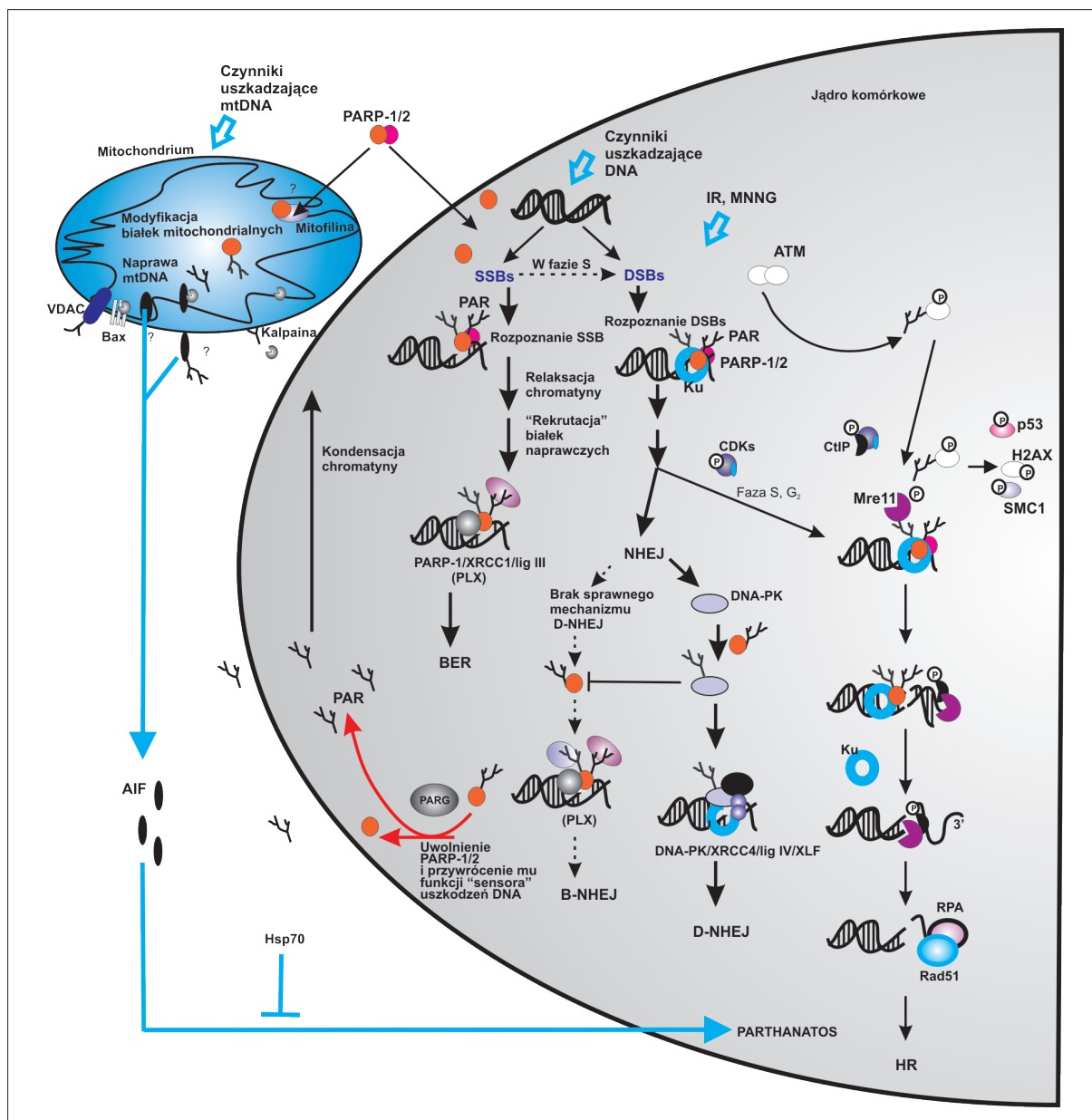
Wraz ze wzrostem ujemnego ładunku PARP-1, na skutek automodyfikacji enzymu, dochodzi do jego odłączenia z miejsca pęknięcia nici DNA, co pozwala na wniknięcie w jego miejsce białek związanych z naprawą [41,108]. Z kolei zmodyfikowane cząsteczki PARP-1 podlegają działaniu glikohydrolazy PARG, która odcina od nich polimery PAR, przywracając funkcję białka „sensorowego” [85].

Mimo iż zdecydowana większość aktywności enzymatycznej (nawet 90%) przypisywana jest PARP-1, polimeraza ta jest wspomagana w swej funkcji naprawczej przez kolejny enzym – PARP-2, który wydaje się niezbędny w przebiegu BER [41,126].

NHEJ

Dodatkowo wskazuje się na udział wspomnianego wcześniej kompleksu PLX w słabo poznanym szlaku naprawy DSBs w procesie tzw. alternatywnego/zapasowego łączenia końców niehomologicznych (alternative/backup non-homologous end joining; Alt-NHEJ, A-NHEJ/B-NHEJ) [1,35,88,118]. Dwuniciowe pęknięcia DNA powstają w komórce zarówno pod wpływem czynników egzogennych, np. promieniowania jonizującego, stresu oksydacyjnego, leków przeciwnowotworowych, jak i endogennych – specyficznych nukleaz uczestniczących np. w programowanej rearanzacji genów immunoglobulin. Ponadto DSBs mogą stanowić wynik zaburzonej segregacji nieprawidłowych, dicentrycznych chromosomów w czasie mitozy [106].

Klasyczny mechanizm naprawy NHEJ, opisywany również jako D-NHEJ, od nazwy holoenzymu odgrywającego główną rolę w jego przebiegu – DNA-PK (DNA-dependent protein kinase), reprezentuje dominujący u ssaków szlak usuwania DSBs [44,88]. Poza kinazą DNA-PK, oprócz innych dodatkowych składników, uczestniczą w nim ligaza DNA IV, nukleaza Artemis, białko XRCC4 i czynnik XLF (XRCC4 like factor), opisywany również jako



Ryc. 3. Schemat uwzględniający udział PARP-1 (oraz PARP-2) w naprawie jedno- (SSBs) i dwuniciowych (DSBs) pęknięć DNA oraz w śmierci komórek (opracowano na podstawie [2,31,38,85,119,128]). Po syntezie na rybosomach, enzym PARP-1 jest transportowany do jądra komórkowego i mitochondriów, w których enzym ten uczestniczy w naprawie DNA. Przyłączenie PARP-1/2 do jądrowego DNA w miejscu jego uszkodzenia prowadzi do aktywacji polimeraz, poli(ADP-rybozylacji) białek chromatyny i relaksacji włókna 30-nanometrowego chromatyny, co pozwala na funkcjonowanie kompleksu naprawczego. Rozpoznanie SSBs w DNA skutkuje „rekrutacją” i wzrostem aktywności białek kompleksu PLX, uczestniczącego w BER. DSBs rozpoznawane są przez białka PARP-1/2 i heterodimer Ku, które przez pewien czas współwystępują w miejscu uszkodzenia. Głównym mechanizmem naprawy DSBs u ssaków jest D-NHEJ (gruba, ciągła linia). Umiejscowiona w pobliżu uszkodzenia polimeraza PARP-1 katalizuje poli(ADP-rybozylację) katalitycznej podjednostki holoenzymu DNA-PK i stymuluje jej aktywność, sama będąc przez ten hamowana. W ten sposób blokowana jest droga alternatywna/zapasowa (B-NHEJ) (przerwana strzałka), a naprawa przebiega na szlaku klasycznym (D-NHEJ) z udziałem m.in. DNA-PK, XRCC4, ligazy IV i czynnika XLF. W przypadku niefunkcjonalnego szlaku D-NHEJ naprawa DSBs odbywa się m.in. z udziałem kompleksu PLX. W pewnych warunkach naprawa może przebiegać w wyniku naprawy rekombinacyjnej. Promieniowanie jonizujące lub niektóre karcynogeny np. N-metylo-N'-nitro-nitrozoguanidyna (MNNG) indukują uszkodzenia DNA, w odpowiedzi na które dochodzi do aktywacji najpierw PARP-1, a następnie kinazy ATM. Powstałe w komórce cząsteczki PAR stymulują aktywność ATM, prowadząc do wzrostu stopnia fosforylacji wielu białek (w tym składników kompleksu MRN, p53, SMC1, histonu H2AX), czego konsekwencją jest zatrzymanie cyklu komórkowego i indukcja naprawy DNA. Automodyfikacja PARP jest czynnikiem przyciągającym Mre11 (składnik MRN) w sąsiedztwo uszkodzenia. Białko to współdziałając z CtIP degraduje dostępny fragment DNA, generując jednoniciowy odcinek, który prawdopodobnie nie wystarcza do stabilnego utrzymania heterodimeru Ku70/Ku80 na DNA. Białko Ku odłącza się od DNA – a wystający, jednoniciowy koniec 3' rozpoznawany jest przez główne białka naprawcze uczestniczące w rekombinacji homologicznej (cienka, ciągła linia). PARP-1/2 znosi zatem hamujący efekt Ku podczas naprawy rekombinacyjnej i w tym kontekście wydaje się promować HR. Usytuowany w mitochondriach enzym PARP-1 może prawdopodobnie uczestniczyć, wraz z ligazą DNA III, w naprawie uszkodzeń mitochondrialnego DNA. Rozległa naprawa zarówno

jądrowego, jak i mitochondrialnego DNA, skutkuje nagromadzeniem w komórce polimerów PAR powstających pod wpływem glikohydrolazy PARG. Polimery te mogą przedostawać się do mitochondriów, gdzie w niewyjaśniony dotąd sposób indukują translokację czynnika AIF do jądra komórkowego lub też mobilizują pulę AIF związaną z zewnętrzną błoną mitochondrialną. W jądrze komórkowym AIF oddziałuje z DNA prowadząc do jego kondensacji i fragmentacji do fragmentów o m.c. około 50 000 pz., będących znacznikiem zależnej od PARP i AIF śmierci komórek, określanej terminem *parthanatos*. Czynniki AIF może pozostać w cytosolu w kompleksie z białkiem szoku cieplnego Hsp 70

Cernunnos [64,106,128]. W przeciwieństwie do D-NHEJ, w szlaku Alt-NHEJ nie odnotowano aktywności enzymów DNA-PK oraz ligazy IV.

Dwuniciowe pęknięcia w helisie DNA mogą być usuwane również w wyniku naprawy rekombinacyjnej/rekombinacji homologicznej (homologous recombination repair; HRR). Wybór sposobu naprawy DSBs nie jest znany i prawdopodobnie zależy od wielu czynników, w tym ekspresji, aktywności i dostępności składników kompleksów naprawczych, co podlega regulacji m.in. w wyniku ich posttranslacyjnych modyfikacji (fosforylacja czy poliubikwitylacja), jak również od dostępności matrycy do syntezy DNA [106,128]. W fazie G_0 i G_1 cyklu komórkowego naprawa dwuniciowych pęknięć DNA przebiega preferencyjnie zależnie od NHEJ, zaś w późnej fazie S i G_2 , ze względu na obecność w chromosomie siostrzanych chromatyd, możliwy jest udział w tym procesie rekombinacji homologicznej [85,88,95,106,128]. Z kolei pęknięcia widełek replikacyjnych generuje dwuniciowy koniec DNA (double-strand end; DSE), niestanowiący DSBs *sensu stricto*, wykluczając wręcz naprawę uszkodzenia zależnie od NHEJ [106].

Wydaje się, że wzajemne oddziaływania między składnikami kompleksów naprawczych mogą również regulować wybór drogi eliminacji pęknięć DNA [106,118]. W tych zdarzeniach wydaje się uczestniczyć m.in. polimeraza PARP-1, której oddziaływanie z DSBs wykazano mikroskopowo już w 1987 r. [19]. Częsteczki PARP-1 rozpoznają DSBs i wiążą się do nich, podobnie jak czyni to złożona z podjednostki katalitycznej i białek Ku70 i Ku80 (podjednostka regulatorowa) białkowa kinaza serynowo-treoninowa zależna od DNA – DNA-PK, uczestnicząca w klasycznym szlaku łączenia końców niehomologicznych (ryc. 3) [106,118]. Sugeruje się, że przez pewien czas składniki obydwu kompleksów naprawczych współwystępują w obrębie miejsca uszkodzenia DNA, po czym podejmowana jest decyzja dotycząca sposobu jego naprawy [118]. W komórkach o sprawnym mechanizmie D-NHEJ aktywny enzym PARP-1 usytuowany w pobliżu uszkodzenia DNA stymuluje kinazę białkową DNA-PK, a właściwie jego podjednostkę katalityczną – DNA-PKcs (DNA-PK catalytic subunit), sam będąc przezeń hamowany [94,118]. W ten sposób dochodzi do zablokowania drogi alternatywnej/zapasowej – preferowana jest naprawa klasyczna, która przebiega szybciej (5–30 min w porównaniu z 2–20 godz.) i bardziej precyzyjnie, w porównaniu z mechanizmem alternatywnym. Z kolei naprawa w sposób alternatywny/zapasowy szlaku NHEJ funkcjonuje zwykle w sytuacji, w której dochodzi do inaktywacji klasycznego mechanizmu NHEJ. Zatem wbrew nazwie, szlak ten powinien być rozpatrywany wyłącznie jako „wsparcie” dla drogi klasycznej, nie zaś jej alternatywa [118].

Poza wspomnianą wyżej aktywnością „przełącznika” między klasycznym a alternatywnym/zapasowym szlakiem NHEJ, prawdopodobny wydaje się także udział PARP-1

w wyborze pomiędzy NHEJ a naprawą DNA w wyniku rekombinacji homologicznej [27,95,106].

REKOMBINACJA HOMOLOGICZNA

Naprawa DSBs za pośrednictwem HR (homologous recombination) jest najbardziej precyzyjnym, właściwie wolnym od błędów, aczkolwiek czasochłonnym, sposobem eliminacji tych uszkodzeń. Najczęściej mechanizm ten funkcjonuje w dzielących się komórkach wykorzystując wysoką homologię sekwencyjną między uszkodzonym DNA a DNA służącym jako matryca [84,105]. W tym typie naprawy uczestniczą kinazy ATM (kinaza ATM kodowana przez *ATM*; ataxia-teleangiectasia mutated gene) lub ATR (ATM- and Rad3-related). Ich aktywacja w odpowiedzi na uszkodzenia DNA prowadzi do fosforylacji licznych białek komórkowych, takich jak białka Chk1/2 (checkpoint homolog 1/2), FANCD2 (Fanconi anemia complementation group D2), BRCA1/2, składniki kompleksu MRN (Mre11/Rad50/NBS1), p53, SMC1 (structural maintenance of chromosomes proteins 1) czy histonu H2AX. W następstwie uruchomienia kaskady fosforylacji dochodzi do zatrzymania cyklu komórkowego i indukcji procesu naprawy DNA [31,85].

Haince i wsp. [31] wykazali niedawno związek między syntezą cząsteczek PAR a aktywnością kinazy ATM w komórkach poddanych promieniowaniu jonizującemu lub niektórych karcynogenów środowiskowych, np. MNNG. Autorzy ci donieśli, że łańcuchy PAR wydają się funkcjonować jako cząsteczki sygnałowe, które oddziałując niekwalencyjnie z odpowiednimi domenami wiążącymi w ATM (ale nie ATR), modulują aktywność tej kinazy i promują fosforylację jej substratów. W komórkach różnych linii inkubowanych w obecności inhibitorów PARP – PJ-34 i DPQ wykazano kilkukrotny spadek poziomu fosforylacji białka p53 w odpowiedzi na obecność MNNG. W pierwszej godzinie inkubacji z PJ-34 i MNNG odnotowano znaczny 26% spadek poziomu fosforylacji histonu H2AX na Ser139. Zmiany w poziomie fosforylacji substratów dla ATM przebiegały z kinetyką odpowiadającą zmianom w syntezie PAR. Ekspozycja komórek na promieniowanie jonizujące powodowała również gwałtowny wzrost poziomu fosforylacji białek p53, SMC1 i H2AX. Natomiast inkubacja komórek w obecności PJ-34 wywoływała znacznie słabszy efekt.

Udział PARP-1 w naprawie homologicznej uszkodzeń DNA pozostaje jednak wciąż mało poznany [100,111]. Wyniki badań z zastosowaniem komórek z niefunkcyjnym enzymem PARP-1, przeprowadzonych w kilku laboratoriach i z wykorzystaniem różnych modeli doświadczalnych pozostają w sprzeczności. W pewnych warunkach ten enzym naprawczy wydaje się promować rekombinację homologiczną, w innych – hamować ten proces [23,95]. Wyniki doświadczeń opublikowane przez laboratorium Takedy [40,95] ujawniły dużą wrażliwość na inhibitor

topoizomerazy I – kamptotecynę ptasich komórek kurzych limfocytów B linii DT-40 i ludzkich komórek raka jelita linii SW480sn3 bez ekspresji PARP-1 (i wielokrotnie wyższą podwójnie zmutowanych komórek *parp-1/rad18* w porównaniu z komórkami prawidłowymi z funkcjonalnymi genami *PARP-1/RAD-18*). Uznaje się, że kamptotecyna blokuje przesuwanie się widełek replikacyjnych, generując uszkodzenia wymagające naprawy rekombinacyjnej. Wykazano, że jednoczesny defekt w genie kodującym Ku70 obniżał toksyczne działanie kamptotecyny, sugerując, że jego przyczyną był powodujący uszkodzenia DNA przebieg NHEJ w zablokowanych widełkach replikacyjnych. Cytowani badacze zasugerowali, że białko PARP-1 (i Rad-18) znosi niekorzystny efekt NHEJ w opisanych warunkach, uniemożliwiając składnikom kompleksu naprawczego NHEJ dostęp do DSBs i promując rekombinację homologiczną.

Jednocześnie prowadzone badania z wykorzystaniem modyfikacji genów za pośrednictwem rekombinacji homologicznej („gene targeting”), wykazały 3-krotny wzrost częstości zdarzeń rekombinacyjnych w komórkach macierzystych myszy ze znokautowanym genem *parp-1* [23]. Uzyskane wyniki sugerują ograniczanie naprawy homologicznej z udziałem enzymu i tłumaczą „hiperrekombinacyjny” fenotyp komórek *parp-1^{-/-}*, przejawiający się m.in. częstszą wymianą siostrzanych chromatyd, wzrostem liczby mikrojąder, tetraploidią [100]. Hipotezę dotyczącą zdolności PARP-1 do hamowania szlaku HRR potwierdzają ponadto doniesienia o spadku częstości wymian siostrzanych chromatyd w embrionalnych komórkach chomika chińskiego linii COMF10, stabilnie transfekowanych cDNA *PARP-1*, indukowanych czynnikami uszkodzającymi DNA [71].

Na podkreślenie zasługuje, że supresorową aktywność PARP-1 w przebiegu procesu HRR zasugerowano już kilkanaście lat temu [62]. Taka aktywność miała stanowić element mechanizmu ograniczającego niewłaściwą rekombinację DNA. Jeden z zaproponowanych wówczas modeli zakładał, że związany z DNA enzym PARP-1 uniemożliwia rozpoznanie DSBs przez utworzony kompleks rekombinacyjny, a drugi – uwzględniał efekt ujemnego ładunku wydłużającego się polimeru PAR na odpychanie przyległych sekwencji rekombinowanego DNA [100].

Udział PARP-1 w HRR *in vivo* wciąż wzbudza kontrowersje, choć „hiperrekombinacyjny” fenotyp komórek z defektywnym PARP-1 zdaje się potwierdzać antyrekombinacyjny model aktywności enzymu. Wyniki te pozostają w sprzeczności z opublikowanymi doniesieniami wskazującymi na oddziaływanie między PARP-1 a składnikami masynerii naprawczej, tj. białkiem WRN (Werner syndrome protein) i helikazą RecQ (supresor Rad51) *in vitro* [111].

Schulz i wsp. [100] wykluczyli możliwość bezpośrednio uczestnictwa PARP-1 w procesie rekombinacji homologicznej. Brak wspomnianej polimerazy w skupiskach (nuclear foci), utworzonych w jądrze komórkowym przez białko uczestniczące w naprawie rekombinacyjnej – Rad-51, które promuje wymianę nici między siostrzanymi chromatydami, podważa rolę tego enzymu w przebiegu HRR *per se*. Ponadto wykazano, że brak PARP-1 nie zaburza rekombinacji homologicznej genów w komórkach fibroblastów płuc chomika chińskiego linii V79(SPD8), wykazujących ekspresję endonukleazy I-SceI, generującej

DSB w DNA. Rozważa się, że „hiperrekombinacyjny” fenotyp komórek *PARP-1^{-/-}* nie wynika z inhibitorowej aktywności enzymu na przebieg HRR, lecz zaburzenia naprawy SSBs przez niewydolny mechanizm BER. Wydaje się, że powstałe uszkodzenia DNA mogą następnie ulec przekształceniu w widełkach replikacyjnych w DSB, naprawiane przez HR DSBs, stanowiąc przyczynę wymian chromatyd siostrzanych.

W laboratorium Wanga [127] wykazano, że PARP-1 nie odgrywa istotnej roli w przebiegu HRR w immortalizowanych fibroblastach zarodków myszy linii A11 i A12 (*PARP-1^{-/-}*), z ekspresją I-SceI, ani w ukierunkowanej HR w komórkach macierzystych myszy (ES6-I i ES17-2), transfekowanych wektorem *hprt-DRGFP*. Badacze ci wykazali także, że brak PARP-1 w fibroblastach inkubowanych w obecności hydroksymocznika – związku zatrzymującego ruch widełek replikacyjnych (wsłutek obniżania puli dNTP niezbędnych do syntezy DNA) – znacząco ograniczał ich przeżycie w porównaniu z komórkami typu „dzikięgo”. Z kolei usunięcie tego czynnika z podłoża hodowlanego przyczyniało się do nagromadzenia białka Rad-51 w zablokowanych widełkach komórek *PARP-1^{-/-}*, a także opóźniało ponowne podjęcie przez nie replikacji i przejście komórek do fazy G_2 cyklu komórkowego. Obserwacje te wydają się sugerować udział PARP-1 w ponownym starcie widełek replikacyjnych. Ponadto mechanizm działania tego enzymu wiązano ze stymulacją helikazy Srs2 (usuwiającej Rad-51 z miejsc rekombinacji), bądź jego wpływem na aktywność replisomu/primosomu [127]. Sugerowano również, że opóźnione wejście w fazę G_2/M komórek pozabawionych tej polimerazy, po usunięciu czynnika blokującego syntezę DNA, może wynikać z braku modulacji przez ten enzym funkcji białek punktu kontroli fazy S cyklu komórkowego.

Wyniki doświadczeń z wykorzystaniem konstruktów DNA, naśladujących strukturę zatrzymanych widełek replikacyjnych sugerują, że PARP-1 (przy współdziałaniu PARP-2), poza DSBs w widełkach replikacyjnych, swoiście rozpoznaje i wiąże kilkunukleotydowe odcinki ssDNA znajdujące się w zablokowanych widełkach. Interakcja ta prowadzi do aktywacji i automodyfikacji PARP-1, co „przyciąga” w jego sąsiedztwo białko Mre11 (składnik kompleksu MRN zawierającego czynniki: Mre11, Rad-50, Nbs), odpowiedzialne za wycinanie fragmentu DNA [11]. Etap ten wydaje się niezbędny do późniejszej naprawy DNA przez HR i ponownego startu widełek replikacyjnych. W tym kontekście enzym PARP-1 promuje HRR, w przeciwieństwie do wcześniejszych doniesień kwestionujących jego rolę w naprawczej rekombinacji homologicznej, indukowanej przez dwuniciowe pęknięcia DNA, generowane niezależnie od procesu replikacji. Ujawniono także, że obecność tej polimerazy jest niezbędna do przebiegu HRR w zatrzymanych widełkach replikacyjnych. Okazało się, że inkubacja fibroblastów płuc chomika chińskiego linii SPD8 w obecności inhibitorów PARP, tj. 1,5-dihydroksyizochinoliny (ISQ), 4-amino-1,8-naftalimidu lub NU102, bądź wyciszenie ekspresji PARP-1/2 przez siRNA w komórkach raka jelita człowieka zmniejszało częstość zdarzeń rekombinacyjnych, indukowanych przez hydroksymocznik. Natomiast fibroblasty zarodków myszy z inaktywowanym enzymem (lub przy jego braku) cechowała niewielka liczba skupisk białka Rad-51, świadcząca o spadku aktywności

rekombinacyjnej. W przebiegu homologicznej rekombinacji w zatrzymanych widełkach replikacyjnych niezbędne wydają się obie polimerazy, tj. PARP-1 i PARP-2.

Zaprezentowane dane, a także wyniki doświadczeń z inhibitorami PARP [122] wskazują, że modyfikacja katalizowana przez PARP stanowi ważny czynnik mechanizmów naprawy DNA, których sprawność warunkuje stabilność materiału genetycznego. Uważa się ponadto, że aktywność katalityczna PARP-1 koreluje z długością życia, którą zapewniają mechanizmy ochraniające DNA [12].

Potwierdzenie w kilku laboratoriach obecności PARP-1 w mitochondriach [24,58,74], w których białko to, współdziałając z ligazą DNA III, promuje prawdopodobnie naprawę mtDNA i wpływa na jego integralność wydaje się godne podkreślenia. Ponadto wykazano, że aktywność polimerazy usytuowanej w mitochondriach przewyższa tę, która występuje w jądrze komórkowym [92].

UDZIAŁ PARP-1 W ŚMIERCI KOMÓREK

Badania z zastosowaniem znokautowanych organizmów wykazały, że oprócz funkcji ochronnej pełnionej przez PARP-1 po uszkodzeniu DNA, białko to prawdopodobnie odgrywa rolę czynnika promującego śmierć komórek, m.in. w przebiegu ostrego i przewlekłego stanu zapalnego [2]. Okazało się, że polimeraza ta, aktywowana w odpowiedzi na hormony steroidowe, stres, infekcje bakteryjne, poprzez wpływ na organizację chromatyny np. w miejscach docelowych czynnika NF- κ B, reguluje transkrypcję genów układu odpornościowego i syntezę cząsteczek prozapalnych [33,34]. Wysoka ekspresja PARP-1 zwiększa wrażliwość komórek na działanie reaktywnych form tlenu (RFT), generowanych rozwojem procesów zapalnych. Początkowo niekorzystne skutki nadmiernej aktywności tego enzymu i rozległej syntezy PAR wiązano z zużyciem źródeł energii w postaci NAD⁺ (a zatem pośrednio ATP) i tzw. „katastrofą energetyczną” (hipoteza samobójstwa), prowadzącą do nekrozy komórek [8,38]. Okazało się, że nadmierna aktywacja PARP-1 skutkująca śmiercią neuronów może być także spowodowana ischemią (niedokrwienie) i reperfuzyją komórek, jak również ekscytotoksycznością glutaminianu, towarzyszącą udarom czy chorobom neurodegeneracyjnym [130].

Wyniki badań z ostatnich lat sugerują jednak, że spadek wewnątrzkomórkowego poziomu NAD⁺ rzadko stanowi sygnał do zainicjowania śmierci. Za inicjację tego procesu bezpośrednio odpowiedzialne wydają się cząsteczki PAR, gromadzące się w komórkach, w których doszło do znacznych uszkodzeń DNA. Polimery te pełnią funkcję przekazników sygnału o zagrażających integralności genomu uszkodzeniach, których rozległość przewyższa zdolności naprawcze komórek oraz indukują programowaną śmierć, zapobiegając dalszej utracie energii na nieefektywną naprawę DNA [38,119].

Śmierć komórek zależna od PARP-1, opisywana terminem *parthanatos* (od głównej cząsteczki sygnałowej tego szlaku – polimeru ADP-rybozy oraz imienia greckiego boga uosabiającego śmierć – Thanatosa), wykazuje właściwości odmienne zarówno dla apoptozy, jak i nekrozy, jednocześnie łącząc cechy obydwu szlaków. W tym typie śmierci

nie obserwuje się fragmentacji DNA do odcinków oligonukleosomalnych, ani też formowania ciałek apoptotycznych. Fragmentacja DNA prowadzi do odcinków o m.c. około 50 000 pz. oraz przemieszczenie się fosfatydyloseryny do zewnętrznej warstwy błony komórkowej. Tak jak w nekrozie śmierci komórek zależnej od PARP-1 towarzyszy utrata integralności jej błony komórkowej. Z kolei podobnie jak w apoptozie, dochodzi do spadku potencjału międzybłonowego mitochondriów. Na podstawie wyników doświadczeń przeprowadzonych na komórkach różnych linii w obecności inhibitora kaspaz (z-VAD-fmk) wykazano, że proces ten nie wymaga udziału tych proteaz cysteinowych, ani nie wydaje się regulowany przez białka rodziny Bcl-2 [2,119].

Uznaje się, że głównym efektem śmierci zależnej od PARP-1 jest mitochondrialny czynnik indukujący apoptozę – AIF. AIF jest flawoproteiną o aktywności dehydrogenazy NADH, która jest naturalnym składnikiem przestrzeni międzybłonowej mitochondriów komórek żywych [6]. Pod wpływem docierających do mitochondriów sygnałów o uszkodzeniu DNA w niewyjaśniony dotąd sposób opuszcza on organellum i przemieszcza się do jądra komórkowego. Z kolei w jądrze pośrednio uczestniczy we fragmentacji DNA (chromatoliza) i kondensacji chromatyny [2,119]. W *parthanatos* uwalnianie AIF jest zdarzeniem wczesnym i wyprzedza wpływ cytochromu c z mitochondriów [130]. Wiadomo, że białko AIF nie wykazuje aktywności endonukleazowej; jego rola sprowadza się prawdopodobnie do „rekrutowania” enzymów nukleolitycznych do DNA i zwiększaniu wrażliwości DNA na ich działanie.

Sygnałem śmierci komórkowej zależnej od AIF okazały się polimery PAR [3]. Obecność takich polimerów w mitochondriach wykazano już po około 30 min od ekspozycji neuronów na NMDA. Natomiast po około 1 godzinie stężenie PAR w tych organellach osiągało prawie 80 nM, czemu towarzyszyła śmierć komórek [119]. Główną rolę cząsteczek PAR w uwalnianiu AIF z mitochondriów po raz pierwszy wykazały badania z użyciem proteiny K. Później wykazano także, że wprowadzenie do żywych komórek polimerów PAR indukowało uwalnianie AIF z mitochondriów i jego translokację do jądra komórkowego [130].

Jak dotąd nie wyjaśniono, w jaki sposób dochodzi do translokacji AIF z mitochondriów pod wpływem PAR. Określono, że główna pula AIF (m.c. 62 kDa) umiejscowiona jest w wewnętrznej błonie mitochondriów a uwolnienie tego białka do przestrzeni międzybłonowej wymaga jego proteolizy do rozpuszczalnej postaci (m.c. 57 kDa), która może opuścić mitochondria [119]. W 2007 roku Moubarak i wsp. [75] zasugerowali, że za aktywację proapoptotycznego białka Bax i translokację AIF z mitochondriów pod wpływem nadmiernej stymulacji PARP-1 mogą odpowiadać kalpajny – proteazy cysteinowe zależne od Ca²⁺, których obecność stwierdzono ostatnio w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów [38,119].

Z kolei Yu i wsp. [130] opublikowali, że endogenne AIF w komórkach mózgu można wykryć w odmiennych regionach mitochondriów. Oprócz puli białka umiejscowionej w błonie wewnętrznej organellum pewna jego porcja (około 30%) – znajduje się po cytosolowej stronie mitochondriów luźno oddziałując z OMM (outer mitochondria

membrane). Wydaje się prawdopodobne, że to właśnie te cząsteczki AIF, pod wpływem sygnału śmierci przemieszczają się do jądra komórkowego, w którym indukują *parthanatos* w komórkach nerwowych [119,129]. Hipotezę tę potwierdzają obserwacje, że indukowaną NMDA śmierć neuronów poprzedza szybki napływ do jądra komórkowego cząsteczek AIF, nieulegających uprzedniej proteolizie (m.c. 62 kDa). Pojawiły się również dane podważające konieczność występowania kalpajny w komórkach ulegających *parthanatos* [129].

Zasadniczą rolę w ochronie wielokomórkowego organizmu przed transformacją nowotworową i klonalnym wzrostem komórek, których DNA uległo licznym mutacjom, odgrywa utrzymanie sprawnych mechanizmów „przełączających” rozległą naprawę DNA na indukcję śmierci [8]. Jednak niezbędne wydaje się zapewnienie sąsiadującym tkankom ochrony przed rozwojem stanu zapalnego, który mógłby powstać na skutek nekrozy uszkodzonych komórek. Jednym z takich mechanizmów ochronnych może być szybka degradacja białek naprawczych intensywnie wykorzystujących ATP, w tym PARP-1, natychmiast po „podjęciu decyzji” o śmierci komórek. Cięcie PARP zapobiega „katastrofie energetycznej” i zapewnia właściwe zużycie energii na procesy niezbędne do przeprowadzenia apoptozy czy *parthanatos* oraz utrzymanie funkcji pomp jonowych, które poprzez kontrolę właściwego stężenia jonów Ca^{2+} i K^{+} w komórkach, zapobiegają ich pęcznieniu i lizie [8].

Proteolizy PARP-1 mogą dokonywać różne enzymy proteolityczne [6,15,119]. Ujawniono np., że kalpajny dokonują cięcia tej polimerazy na fragmenty o m.c. 40–70 kDa, natomiast granzym B generuje produkty o m.c. 64 i 54 kDa. Preferencyjne cięcia PARP-1 przez kaspazy (3, 7) z wytworzeniem produktów o m.c. 89 i 24 kDa uważa się powszechnie za marker zależnego od kaspaz procesu apoptotycznego, podczas gdy nieswoista fragmentacja tego białka wiązana jest z innymi postaciami śmierci komórki (ryc. 2) [47].

Utworzony przez kaspazy N-końcowy fragment PARP-1 zawiera domenę DBD, która nieodwracalnie wiąże końce DNA (lub RNA) (frozen ends) i uniemożliwia wiązanie

się funkcjonalnego enzymu do miejsc jego uszkodzenia. Z kolei dłuższy produkt cięcia polimerazy – p89 zachowuje domenę katalityczną enzymu, którą jednak z powodu braku interakcji z DNA, cechuje mała aktywność. Dodatkowo peptyd ten oddziałuje z innymi cząsteczkami PARP-1 uniemożliwiając ich homodimeryzację i blokując ich funkcje [110].

PODSUMOWANIE

Od wykrycia w 1963 roku enzymu o aktywności polimerazy poli(ADP-rybozy) opisano jej kompleksową charakterystykę i przedstawiono, na poziomie molekularnym, dowody świadczące o licznych jej aktywnościach, zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i procesach patofizjologicznych [7,12,16,35,36,50,109]. Poli(ADP-rybozylacja) wielu białek jądrowych i mitochondrialnych, przez wprowadzenie ujemnego ładunku związanego z łańcuchem PAR, zwykle ogranicza bądź hamuje ich aktywność oraz blokuje ich zdolność do wiązania się z DNA.

D'Amours i wsp. [19] dla podkreślenia istotnej roli cząsteczek PAR w przebiegu procesów życiowych zaproponowali wprowadzenie dla nich terminu „trzeci typ kwasów nukleinowych”. W świetle nowych doniesień podkreśla się, że subkomórkową lokalizację PARP-1 można powiązać z jej udziałem w sygnalizacji komórkowej.

Wysoki stopień aktywacji enzymu katalizującego poli(ADP-rybozylację) w komórkach/narządach, który towarzyszy wielu chorobom (w tym nowotworom, chorobom sercowo-naczyniowym, metabolicznym czy neurodegeneracyjnym) może być blokowany przez liczne inhibitory, które mogą funkcjonować jako leki.

Rozwój badań nad budową i molekularnym mechanizmem aktywności licznej grupy inhibitorów PARP będzie przedmiotem kolejnego opracowania.

PODZIĘKOWANIE

Autorki składają podziękowanie mgr Janowi Gierakowi za pomoc w przygotowaniu niniejszej pracy.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Altmeyer M., Messner S., Hassa P.O., Fey M., Hottiger M.O.: Molecular mechanism of poly(ADP-ribosylation) by PARP-1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites. *Nucleic Acids Res.*, 2009; 37: 3723–3738
- [2] Amé J.C., Spenlehauer C., de Murcia G.: The PARP superfamily. *Bioessays*, 2004; 26: 882–893
- [3] Andrabi S.A., Kim N.S., Yu S.W., Wang H., Koh D.W., Sasaki M., Klaus J.A., Otsuka T., Zhang Z., Koehler R.C., Hurn P.D., Poirier G.G., Dawson V.L., Dawson T.M.: Poly(ADP-ribose) (PAR) polymer is a death signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 18308–18313
- [4] Baumgartner M., Schneider R., Auer B., Herzog H., Schweiger M., Hirsch-Kauffmann M.: Fluorescence *in situ* mapping of the human nuclear NAD⁺ADP-ribosyltransferase gene (ADPRT) and two secondary sites to human chromosomal bands 1q42, 13q34, and 14q24. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1992; 61: 172–174
- [5] Beckert S., Farrahi F., Ghani Q.P., Aslam R., Scheuestuhl H., Coerper S., Königsrainer A., Hunt T.K., Hussain M.Z.: IGF-1-induced VEGF expression in HUVEC involves phosphorylation and inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2006; 341: 67–72
- [6] Bednarek J., Kiliańska Z.M.: Białka przestrzeni międzybłonowej mitochondriów uczestniczące w procesie apoptozy. *Postepy Biochem.*, 2005; 51: 447–458
- [7] Beneke S.: Poly(ADP-ribose) polymerase activity in different pathologies – the link to inflammation and infarction. *Exp. Gerontol.*, 2008; 43: 605–614
- [8] Bernstein C., Bernstein H., Payne C.M., Garewal H.: DNA repair/proapoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 2002; 511: 145–178
- [9] Bhatia M., Kirkland J.B., Meckling-Gill K.A.: Modulation of poly(ADP-ribose) polymerase during neutrophilic and monocytic differentiation of promyelocytic (NB4) and myelocytic (HL-60) leukemia cells. *Biochem. J.*, 1995; 308: 131–137
- [10] Bièche L., de Murcia G., Lidereau R.: Poly(ADP-ribose) polymerase gene expression status and genomic instability in human breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 1996; 2: 1163–1167
- [11] Bryant H.E., Petermann E., Schultz N., Jemth A.S., Loseva O., Issaeva N., Johansson F., Fernandez S., McGlynn P., Helleday T.: PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination. *EMBO J.*, 2009; 28: 2601–2615

- [12] Bürkle A., Brabeck C., Diefenbach J., Beneke S.: The emerging role of poly(ADP-ribose)polymerase-1 in longevity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2005; 37: 1043–1053
- [13] Burzio L.O., Sáez L., Cornejo R.: Poly (ADP-ribose) synthetase activity in rat testis mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1981; 103: 369–375
- [14] Caiafa P., Guastafierro T., Zampieri M.: Epigenetics: poly(ADP-ribose)ylation of PARP-1 regulates genomic methylation patterns. *FASEB J.*, 2009; 23: 672–678
- [15] Chaitanya G.V., Babu P.P.: Differential PARP cleavage: an indication of heterogeneous forms of cell death and involvement of multiple proteases in the infarct of focal cerebral ischemia in rat. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 2009; 29: 563–573
- [16] Chambon P., Weill J.D., Mandel P.: Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1963; 11: 39–43
- [17] Cherney B.W., McBride O.W., Chen D.F., Alkhatib H., Bhatia K., Hensley P., Smulson M.E.: cDNA sequence, protein structure, and chromosomal location of the human gene for poly (ADP-ribose) polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987; 84: 8370–8374
- [18] Cipriani G., Rapizzi E., Vannacci A., Rizzuto R., Moroni F., Chiarugi A.: Nuclear poly(ADP-ribose) polymerase-1 rapidly triggers mitochondrial dysfunction. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 17227–17234
- [19] 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
- [20] Dawson V.L., Dawson T.M.: Deadly conversations: nuclear-mitochondrial cross-talk. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2004; 36: 287–294
- [21] de Murcia G., Menissier de Murcia J.: Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem. Sci.*, 1994; 19: 172–176
- [22] de Murcia J.M., Niedergang C., Trucco C., Ricoul M., Dutrillaux B., Mark M., Oliver F.J., Masson M., Dierich A., LeMeur M., Waltzinger 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
- [23] 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
- [24] Du L., Zhang X., Han Y.Y., Burke N.A., Kochanek P.M., Watkins S.C., Graham S.H., Carcillo J.A., Szabó C., Clark R.S.: Intra-mitochondrial poly(ADP-ribose)ylation contributes to NAD⁺ depletion and cell death induced by oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 18426–18433
- [25] Ebralidse K.K., Mirzabekov A.D. One-domain interaction of histone H4 with nucleosomal core DNA is restricted to a narrow DNA segment. *FEBS Lett.*, 1986; 194: 69–72
- [26] Eki T.: Poly (ADP-ribose) polymerase inhibits DNA replication by human replicative DNA polymerase α , δ and ϵ *in vitro*. *FEBS Lett.*, 1994; 356: 261–266
- [27] Gagné J.P., Moreel X., Gagné P., Labelle Y., Droit A., Chevalier-Paré M., Bourassa S., McDonald D., Hendzel M.J., Prigent C., Poirier G.G.: Proteomic investigation of phosphorylation sites in poly(ADP-ribose) polymerase-1 and poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *J. Proteome Res.*, 2009; 8: 1014–1029
- [28] Garnier P., Ying W., Swanson R.A.: Ischemic preconditioning by caspase cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J. Neurosci.*, 2003; 23: 7967–7973
- [29] Gradwohl G., Mazon A., de Murcia G.: Poly(ADP-ribose) polymerase forms loops with DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987; 148: 913–919
- [30] Gradwohl G., Ménissier de Murcia J.M., Molinete M., Simonin F., Koken M., Hoeijmakers J.H., de Murcia G.: The second zinc-finger domain of poly(ADP-ribose) polymerase determines specificity for single-stranded breaks in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990; 87: 2990–2994
- [31] 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
- [32] Hakmé A., Wong H.K., Dantzer F., Schreiber V.: The expanding field of poly(ADP-ribose)ylation reactions. *EMBO Rep.*, 2008; 9: 1094–1100
- [33] Hassa P.O., Buerki C., Lombardi C., Imhof R., Hottiger M.O.: Transcriptional coactivation of nuclear factor- κ B-dependent gene expression by p300 is regulated by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 45145–45153
- [34] Hassa P.O., Haenni S.S., Buerki C., Meier N.I., Lane W.S., Owen H., Gersbach M., Imhof R., Hottiger M.O.: Acetylation of poly(ADP-ribose)polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF- κ B-dependent transcription. *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 40450–40464
- [35] Hassa P.O., Haenni S.S., Elser M., Hottiger M.O.: Nuclear ADP-riboseylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2006; 70: 789–829
- [36] Hassa P.O., Hottiger M.O.: The diverse biological roles of mammalian PARPs, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. *Front. Biosci.*, 2008; 13: 3046–3082
- [37] Hayashi K., Tanaka M., Shimada T., Miwa M., Shimura T.: Size and shape of poly(ADP-ribose): examination by gel filtration, gel electrophoresis and electron microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983; 112: 102–107
- [38] Heeres J.T., Hergenrother P.J.: Poly(ADP-ribose) makes a date with death. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2007; 11: 644–653
- [39] Hegde M.L., Hazra T.K., Mitra S.: Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res.*, 2008; 18: 27–47
- [40] Hochegger H., Dejsuphong D., Fukushima T., Morrison C., Sonoda E., Schreiber V., Zhao G.Y., Saberi A., Masutani M., Adachi N., Koyama H., de Murcia G., Takeda S.: Parp-1 protects homologous recombination from interference by Ku and ligase IV in vertebrate cells. *EMBO J.*, 2006; 25: 1305–1314
- [41] Horton J.K., Wilson S.H.: Hypersensitivity phenotypes associated with genetic and synthetic inhibitor-induced base excision repair deficiency. *DNA Repair*, 2007; 6: 530–543
- [42] Huang J.Y., Chen W.H., Chang Y.L., Wang H.T., Chuang W.T., Lee S.C.: Modulation of nucleosome-binding activity of FACT by poly(ADP-ribose)ylation. *Nucleic Acids Res.*, 2006; 34: 2398–2407
- [43] Ikejima M., Noguchi S., Yamashita R., Ogura T., Sugimura T., Gill D.M., Miwa M.: The zinc fingers of human poly(ADP-ribose) polymerase are differentially required for the recognition of DNA breaks and nicks and the consequent enzyme activation. Other structures recognize intact DNA. *J. Biol. Chem.*, 1990; 265: 21907–21913
- [44] Iliakis G., Wang H., Perrault A.R., Boecker W., Rosidi B., Windhofer F., Wu W., Guan J., Terzoudi G., Pantelias G.: Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet. Genome Res.*, 2004; 104: 14–20
- [45] Ji Y., Tulin A.V.: Poly(ADP-ribose)ylation of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins modulates splicing. *Nucleic Acids Res.*, 2009; 37: 3501–3513
- [46] Kameshita I., Matsuda Z., Taniguchi T., Shizuta Y.: Poly (ADP-ribose) synthetase. Separation and identification of three proteolytic fragments as the substrate-binding domain, the DNA-binding domain, and the automodification domain. *J. Biol. Chem.*, 1984; 259: 4770–4776
- [47] Kaufmann S.H., Desnoyers S., Ottaviano Y., Davidson N.E., Poirier G.G.: Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.*, 1993; 53: 3976–3985
- [48] Kauppinen T.M., Chan W.Y., Suh S.W., Wiggins A.K., Huang E.J., Swanson R.A.: Direct phosphorylation and regulation of poly(ADP-ribose)polymerase-1 by extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 7136–7141
- [49] Kim M.Y., Mauro S., Gérvy N., Lis J.T., Kraus W.L.: NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell*, 2004; 119: 803–814
- [50] 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
- [51] Kleine H., Poreba E., Lesniewicz K., Hassa P.O., Hottiger M.O., Litchfield D.W., Shilton B.H., Lüscher B.: Substrate-assisted catalysis by PARP10 limits its activity to mono-ADP-riboseylation. *Mol. Cell*, 2008; 32: 57–69
- [52] Klug A., Rhodes D., Smith J., Finch J.T., Thomas J.O.: A low resolution structure for the histone core of the nucleosome. *Nature*, 1980; 287: 509–516
- [53] Kotova E., Jarnik M., Tulin A.V.: Poly (ADP-ribose) polymerase 1 is required for protein localization to Cajal body. *PLoS Genet.*, 2009; 5: e1000387
- [54] Kraus W.L.: Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2008; 20: 294–302
- [55] Kraus W.L., Lis J.T.: PARP goes transcription. *Cell*, 2003; 113: 677–683

- [56] Kun E., Kirsten E., Ordahl C.P.: Coenzymatic activity of randomly broken or intact double-stranded DNAs in auto and histone H1 trans-poly(ADP-ribosylation), catalyzed by poly(ADP-ribose)polymerase (PARP1). *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 39066–39069
- [57] Kurosaki T., Ushiro H., Mitsuuchi Y., Suzuki S., Matsuda M., Matsuda Y., Katunuma N., Kangawa K., Matsuo H., Hirose T., Inayama S., Shizuta Y.: Primary structure of human poly(ADP-ribose) synthetase as deduced from cDNA sequence. *J. Biol. Chem.*, 1987; 262: 15990–15997
- [58] Lai Y., Chen Y., Watkins S.C., Nathaniel P.D., Guo F., Kochanek P.M., Jenkins L.W., Szabó C., Clark R.S.: Identification of poly-ADP-ribosylated mitochondrial proteins after traumatic brain injury. *J. Neurochem.*, 2008; 104: 1700–1711
- [59] Lan S.Y., Smerdon M.J.: A nonuniform distribution of excision repair synthesis in nucleosome core DNA. *Biochemistry*, 1985; 24: 7771–7783
- [60] Langelier M.F., Servent K.M., Rogers E.E., Pascal J.M.: A third zinc-binding domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 4105–4114
- [61] Levy-Wilson B.: ADP-ribosylation of trout testis chromosomal proteins: distribution of ADP-ribosylated proteins among DNaseI-sensitive and -resistant chromatin domains. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1981; 208: 528–534
- [62] 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
- [63] Louters L., Chalkley R.: Exchange of histones H1, H2A, and H2B *in vivo*. *Biochemistry*, 1985; 24: 3080–3085
- [64] Mahaney B.L., Meek K., Lees-Miller S.P.: Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem. J.*, 2009; 417: 639–650
- [65] Malanga M., Pleschke J.M., Kleczkowska H.E., Althaus F.R.: Poly(ADP-ribose) binds to specific domains of p53 and alters its DNA binding functions. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 11839–11843
- [66] Maruta H., Matsumura N., Tanuma S.: Role of (ADP-ribose)n catabolism in DNA repair. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997; 236: 265–269
- [67] Maruta H., Okita N., Takasawa R., Uchiyama F., Hatano T., Tanuma S.: The involvement of ATP produced via (ADP-ribose)n in the maintenance of DNA replication apparatus during DNA repair. *Biol. Pharm. Bull.*, 2007; 30: 447–450
- [68] Masson M., Niedergang C., Schreiber V., Muller S., Menissier-de Murcia J., de Murcia G.: XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose)polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol. Cell. Biol.*, 1998; 18: 3563–3571
- [69] Meder V.S., Boeglin M., de Murcia G., Schreiber V.: PARP-1 and PARP-2 interact with nucleophosmin/B23 and accumulate in transcriptionally active nucleoli. *J. Cell Sci.*, 2005; 118: 211–222
- [70] Messner S., Schuermann D., Altmeyer M., Kassner I., Schmidt D., Schär P., Müller S., Hottiger M.O.: Sumoylation of poly(ADP-ribose) polymerase I inhibits its acetylation and restrains transcriptional coactivator function. *FASEB J.*, 2009; 23: 3978–3989
- [71] Meyer R., Müller M., Beneke S., Küpper J.H., Bürkle A.: Negative regulation of alkylation-induced sister-chromatid exchange by poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity. *Int. J. Cancer*, 2000; 88: 351–355
- [72] Meyer-Ficca M.L., Meyer R.G., Jacobson E.L., Jacobson M.K.: Poly(ADP-ribose) polymerases: managing genome stability. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2005; 37: 920–926
- [73] Miwa M., Masutani M.: PolyADP-ribosylation and cancer. *Cancer Sci.*, 2007; 98: 1528–1535
- [74] Mosgoeller W., Steiner M., Hozák P., Penner E., Węsierska-Gądek J.: Nuclear architecture and ultrastructural distribution of poly(ADP-ribose)transferase, a multifunctional enzyme. *J. Cell Sci.*, 1996; 109: 409–418
- [75] Moubarak R.S., Yuste V.J., Artus C., Bouharrour A., Greer P.A., Ménissier-de Murcia J., Susin S.A.: Sequential activation of poly(ADP-ribose) polymerase 1, calpains, and Bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis. *Mol. Cell. Biol.*, 2007; 27: 4844–4862
- [76] Niere M., Kernstock S., Koch-Nolte F., Ziegler M.: Functional localization of two poly(ADP-ribose)-degrading enzymes to the mitochondrial matrix. *Mol. Cell. Biol.*, 2008; 28: 814–824
- [77] Oei S.L., Griesenbeck J., Schweiger M., Ziegler M.: Regulation of RNA polymerase II-dependent transcription by poly(ADP-ribose)ylation of transcription factors. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 31644–31647
- [78] Oei S.L., Ziegler M.: ATP for the DNA ligation step in base excision repair is generated from poly(ADP-ribose). *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 23234–23239
- [79] Ogata N., Ueda K., Hayaishi O.: ADP-ribosylation of histone H2B. Identification of glutamic acid residue 2 as the modification site. *J. Biol. Chem.*, 1980; 255: 7610–7615
- [80] Ogata N., Ueda K., Kagamiyama H., Hayaishi O.: ADP-ribosylation of histone H1. Identification of glutamic acid residues 2, 14, and the COOH-terminal lysine residue as modification sites. *J. Biol. Chem.*, 1980; 255: 7616–7620
- [81] Oka S., Kato J., Moss J.: Identification and characterization of a mammalian 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281: 705–713
- [82] 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
- [83] Perdoni F., Bottone M.G., Soldani C., Veneroni P., Alpini C., Pellicciari C., Scovassi A.I.: Distribution of centromeric proteins and PARP-1 during mitosis and apoptosis. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 2009; 1171: 32–37
- [84] 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
- [85] Plummer E.R., Calvert H.: Targeting poly(ADP-ribose) polymerase: a two-armed strategy for cancer therapy. *Clin. Cancer Res.*, 2007; 13: 6252–6256
- [86] Poirier G.G., de Murcia G., Jongstra-Bilen J., Niedergang C., Mandel P.: Poly(ADP-ribosylation) of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982; 79: 3423–3427
- [87] Poirier M.F., Koh D.W., Yu S.W., Andrabi S.A., Mandir A.S., Poirier G.G., Dawson V.L., Dawson T.M.: Spatial and functional relationship between poly(ADP-ribose) polymerase 1 and poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the brain. *Neuroscience*, 2007; 148: 198–211
- [88] Poplawski J., Błasiak J.: Naprawa DNA przez rekombinację homologiczną w komórkach ssaków. *Postepy Biochem.*, 2006; 52: 180–193
- [89] Quesada P., Farina B., Jones R.: Poly(ADP-ribosylation) of nuclear proteins in rat testis correlates with active spermatogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1989; 1007: 167–175
- [90] Rajamohan S.B., Pillai V.B., Gupta M., Sundaresan N.R., Birukov K.G., Samant S., Hottiger M.O., Gupta M.P.: SIRT1 promotes cell survival under stress by deacetylation-dependent deactivation of poly(ADP-ribose) polymerase 1. *Mol. Cell. Biol.*, 2009; 29: 4116–4129
- [91] Reale A., Matteis G.D., Galleazzi G., Zampieri M., Caiafa P.: Modulation of DNMT1 activity by ADP-ribose polymers. *Oncogene*, 2005; 24: 13–19
- [92] Rossi M.N., Carbone M., Mostocotto C., Mancone C., Tripodi M., Maione R., Amati P.: Mitochondrial localization of PARP-1 requires interaction with mitofilin and is involved in the maintenance of mitochondrial DNA integrity. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 31616–31624
- [93] Ruf A., Ménissier de Murcia J., de Murcia G., Schulz G.E.: Structure of the catalytic fragment of poly(ADP-ribose) polymerase from chicken. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 7481–7485
- [94] Ruscetti T., Lehnert B.E., Halbrook J., Le Trong H., Hoekstra M.F., Chen D.J., Peterson S.R.: Stimulation of the DNA-dependent protein kinase by poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 14461–14467
- [95] Saberi A., Hochegger H., Szuts D., Lan L., Yasui A., Sale J.E., Taniguchi Y., Murakawa Y., Zeng W., Yokomori K., Helleday T., Teraoka H., Arakawa H., Buerstedde J.M., Takeda S.: RAD18 and poly(ADP-ribose) polymerase independently suppress the access of nonhomologous end joining to double-strand breaks and facilitate homologous recombination-mediated repair. *Mol. Cell. Biol.*, 2007; 27: 2562–2571
- [96] Saueremann G., Węsierska-Gądek J.: Poly(ADP-ribose) effectively competes with DNA for histone H4 binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986; 139: 523–529
- [97] Saxena A., Saffery R., Wong L.H., Kalitsis P., Choo K.H.: Centromere proteins Cenpa, Cenpb, and Bub3 interact with poly(ADP-ribose) polymerase-1 protein and are poly(ADP-ribosylated). *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 26921–26926
- [98] Schreiber V., Amé J.C., Dollé P., Schultz I., Rinaldi B., Fraulob V., Ménissier-de Murcia J., de Murcia G.: Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 23028–23036
- [99] Schreiber V., Dantzer F., Ame J.C., de Murcia G.: Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2006; 7: 517–528

- [100] Schultz N., Lopez E., Saleh-Gohari N., Helleday T.: Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) has a controlling role in homologous recombination. *Nucleic Acids Res.*, 2003; 31: 4959–4964
- [101] Scovassi A.I.: Mitochondrial poly(ADP-ribosylation): from old data to new perspectives. *FASEB J.*, 2004; 18: 1487–1488
- [102] Scovassi A.I., Mariani C., Negroni M., Negri C., Bertazzoni U.: ADP-ribosylation of nonhistone proteins in HeLa cells: modification of DNA topoisomerase II. *Exp. Cell Res.*, 1993; 206: 177–181
- [103] Shick V.V., Belyavsky A.V., Bavykin S.G., Mirzabekov A.D. Primary organization of the nucleosome core particles. Sequential arrangement of histones along DNA. *J. Mol. Biol.*, 1980; 139: 491–517
- [104] Shieh W.M., Amé J.C., Wilson M.V., Wang Z.Q., Koh D.W., Jacobson M.K., Jacobson E.L.: Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 30069–30072
- [105] Shiokawa M., Masutani M., Fujihara H., Ueki K., Nishikawa R., Sugimura T., Kubo H., Nakagama H.: Genetic alteration of poly(ADP-ribose) polymerase in human germ cell tumors. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 2005; 35: 97–102
- [106] Shrivastav M., De Haro L.P., Nickoloff J.A.: Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res.*, 2008; 18: 134–147
- [107] Simbulan-Rosenthal C.M., Rosenthal D.S., Boulares A.H., Hickey R.J., Malkas L.H., Coll J.M., Smulson M.E.: Regulation of the expression or recruitment of components of the DNA synthesome by poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochemistry*, 1998; 37: 9363–9370
- [108] Śledziński T.: Polimeraza poli(ADP-rybozy) i jej udział w naprawie DNA. *Postepy Biochem.*, 2003; 49: 239–249
- [109] Smith H.M., Grosovsky A.J.: Poly ADP-ribose-mediated regulation of p53 complexed with topoisomerase I following ionizing radiation. *Carcinogenesis*, 1999; 20: 1439–1443
- [110] Soldani C., Scovassi A.I.: Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis*, 2002; 7: 321–328
- [111] Süsse S., Scholz C.J., Bürkle A., Wiesmüller L.: Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) and p53 independently function in regulating double-strand break repair in primate cells. *Nucleic Acids Res.*, 2004; 32: 669–680
- [112] Synowicz E., Książek D., Błasiak J., Woźniak K.: Rola modyfikacji SUMO w utrzymaniu stabilności genomu. *Postepy Biochem.*, 2008; 54: 234–241
- [113] Tao Z., Gao P., Hoffman D.W., Liu H.W.: Domain C of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 is important for enzyme activity and contains a novel zinc-ribbon motif. *Biochemistry*, 2008; 47: 5804–5813
- [114] Tao Z., Gao P., Liu H.W.: Identification of the ADP-ribosylation sites in the PARP-1 automodification domain: analysis and implications. *J. Am. Chem. Soc.* 2009; 131: 14258–14260
- [115] Tao Z., Gao P., Liu H.W.: Studies of the expression of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of PARP-1 substrates by yeast proteome microarray screening. *Biochemistry*, 2009; 48: 11745–11754
- [116] Thibodeau J., Gradwohl G., Dumas C., Clairoux-Moreau S., Brunet G., Penning C., Poirier G.G., Moreau P.: Cloning of rodent cDNA coding the poly(ADP-ribose) polymerase catalytic domain and analysis of mRNA levels during the cell cycle. *Biochem. Cell Biol.*, 1989; 67: 653–660
- [117] Till S., Diamantara K., Ladurner A.G.: PARP: a transferase by any other name. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2008; 15: 1243–1244
- [118] Wang M., Wu W., Wu W., Rosidi B., Zhang L., Wang H., Iliakis G.: PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res.*, 2006; 34: 6170–6182
- [119] Wang Y., Dawson V.L., Dawson T.M.: Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Expt. Neurol.*, 2009; 218: 193–202
- [120] Wang Z.Q., Stingl L., Morrison C., Jantsch M., Los M., Schulze-Osthoff K., Wagner E.F.: PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes Dev.*, 1997; 11: 2347–2358
- [121] Węsierska-Gądek J., Bugajska-Schretter A., Cerni C.: ADP-ribosylation of p53 tumor suppressor protein: mutant but not wild-type p53 is modified. *J. Cell. Biochem.*, 1996; 62: 90–101
- [122] Węsierska-Gądek J., Ranftler C., Schmid G.: Physiological ageing: role of p53 and PARP-1 tumor suppressors in the regulation of terminal senescence. *J. Physiol. Pharmacol.*, 2005; 56(Suppl.2): 77–88
- [123] Węsierska-Gądek J., Sauermaun G.: Modification of nuclear matrix proteins by ADP-ribosylation. Association of nuclear ADP-ribosyltransferase with the nuclear matrix. *Eur. J. Biochem.*, 1985; 153: 421–428
- [124] Węsierska-Gądek J., Sauermaun G.: The effect of poly(ADP-ribose) on interactions of DNA with histones H1, H3 and H4. *Eur. J. Biochem.*, 1988; 173: 675–679
- [125] Węsierska-Gądek J., Schmid G., Cerni C.: ADP-ribosylation of wild-type p53 *in vitro*: binding of p53 protein to specific p53 consensus sequence prevents its modification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996; 224: 96–102
- [126] Woodhouse B.C., Dianov G.L.: Poly ADP-ribose polymerase-1: an international molecule of mystery. *DNA Repair*, 2008; 7: 1077–1086
- [127] Yang Y.G., Cortes U., Patnaik S., Jasin M., Wang Z.Q.: Ablation of PARP-1 does not interfere with the repair of DNA double-strand breaks, but compromises the reactivation of stalled replication forks. *Oncogene*, 2004; 23: 3872–3882
- [128] Yano K., Morotomi-Yano K., Akiyama H.: Cernunnos/XLF: a new player in DNA double-strand break repair. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2009; 41: 1237–1240
- [129] Yu S.W., Wang H., Poitras M.F., Coombs C., Bowers W.J., Federoff H.J., Poirier G.G., Dawson T.M., Dawson V.L.: Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science*, 2002; 297: 259–263
- [130] Yu S.W., Wang Y., Frydenlund D.S., Ottersen O.P., Dawson V.L., Dawson T.M.: Outer mitochondrial membrane localization of apoptosis-inducing factor: mechanistic implications for release. *ASN Neuro.*, 2009; 1. pii: e00021
- [131] Zampieri M., Passananti C., Calabrese R., Perilli M., Corbi N., De Cave F., Guastafierro T., Bacalini M.G., Reale A., Amicosante G., Calabrese L., Zlatanova J., Caiafa P.: Parp1 localized within the Dnmt1 promoter and protects its unmethylated state by its enzymatic activity. *PLoS One*, 2009; 4: e4717
- [132] Zaniolo K., Desnoyers S., Leclerc S., Guérin S.L.: Regulation of poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1) gene expression through the post-translational modification of SP1: a nuclear target protein of PARP-1. *BMC Mol. Biol.*, 2007; 8: 96
- [133] Zardo G., Caiafa P.: The unmethylated state of CpG islands in mouse fibroblast depends on the poly(ADP-ribosylation) process. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273: 16517–16520
- [134] Zardo G., Reale A., Passananti C., Pradhan S., Buontempo S., de Matteis G., Adams R.L., Caiafa P.: Inhibition of poly(ADP-ribosylation) induces DNA hypermethylation: a possible molecular mechanism. *FASEB J.*, 2002; 16: 1319–1321
- [135] Źródło internetowe: UniProtKB/Swiss-Prot P09874(PARP1 HUMAN) Sept 1, 2009, Version BO

Autorki deklaruja brak potencjalnych konfliktow interesow.