

ОГЛЯДИ

УДК 577.151.3+577.151.63

РОЛЬ PARP ТА ПРОЦЕСУ ПОЛІ-ADP-РИБОЗИЛЮВАННЯ ПРОТЕЇНІВ У РЕГУЛЮВАННІ КЛІТИННИХ ФУНКЦІЙ

В. Р. ДРЕЛЬ¹, І. О. ШИМАНСЬКИЙ², Н. О. СИБІРНА¹, М. М. ВЕЛИКИЙ²

¹Львівський національний університет імені Івана Франка, Україна;

²Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;

e-mail: drelvictor@gmail.com; ishytmansk@inbox.ru

В огляді розглянуто біологічну роль ензимів, залучених до посттрансляційної модифікації протеїнів шляхом їх полі-ADP-рибозилювання. Детально проаналізовано структурну організацію та основні функції полі(ADP-рибозо)полімерази-1 (PARP-1) та ізоформ полі(ADP-рибозо)полімераз в біологічних системах. Викладено сучасні погляди на роль ензимів родини PARP та процесів полі-ADP-рибозилювання протеїнів у ремоделюванні структури хроматину, репарації ушкоджень ДНК, регулюванні експресії генів, інтеграції клітинних сигнальних шляхів. Значну увагу приділено залученню PARP у реалізації клітинних функцій, зокрема у поділі клітин, внутрішньоклітинному транспортуванні макромолекул, протеасомній деградації протеїнів, реалізації імунної відповіді, програмі клітинної загибелі (некроптоз) тощо. Узагальнено результати досліджень ролі PARP-1 у розвитку деяких патологій та застосування різних класів інгібіторів PARP-1 як терапевтичних засобів.

Ключові слова: полі(ADP-рибозо)полімераза, полі-ADP-рибозилювання, репарація ДНК, транскрипційна регуляція, клітинне сигналізування, поділ клітин, програма клітинної загибелі, інгібітори PARP.

З а останні півтора десятиліття у дослідженні біологічної ролі процесів полі-ADP-рибозилювання досягнуто значних успіхів. Не лише зросла кількість відкритих ензимів, що каталізують реакції полі-ADP-рибозилювання протеїнів з 1 до 18 у різних клітинних компартментах, але й постійно розширюється коло клітинних процесів та функцій, що регулюються за участю цієї посттрансляційної модифікації протеїнів [1–4]. Важливою є загальна тенденція, яка підкреслює, що дослідження, орієнтовані спочатку виключно на з'ясування фундаментальних аспектів полі-ADP-рибозилювання, зараз все більше набувають прикладного значення, потенціал яких відкриває шлях для практичного застосування здобутих знань у медицині [5, 6].

Полі-ADP-рибозилювання є процесом посттрансляційної модифікації протеїнів, що здійснюється полі(ADP-рибозо)полімеразами (PARPs). Полі(ADP-рибозо)полімераза 1 (PARP-1 EC 2.4.2.30), перший з відкритих представників родини PARP, є найпоширенішим та найдослідженішим

хроматинасоційованим ензимом, який характеризується високим рівнем експресії в усіх типах клітин: на одну клітину вміст PARP-1 коливається в межах від 0,2 до 2,0 мільйонів молекул [1, 7]. Цей ензим знайдено в усіх представників еукаріот, але не виявлено у дріжджах та прокариотах. PARP-1 використовує NAD^+ як субстрат у процесі ковалентного приєднання залишків ADP-рибози до акцепторних протеїнів, які зазвичай асоційовані з ДНК (гетеромодифікація) або до самої PARP-1 (автомодифікація). Високу каталітичну активність ензим виявляє у присутності дволанцюгової ДНК, яка має вільні кінці або односторонні розриви. Детекція та трансляція сигналу про появу розривів ДНК, а також його ампліфікація внаслідок утворення полі-ADP-рибози (PAR) є головними функціями PARP-1, яка відіграє ключову роль у забезпеченні ефективною репарацією одноланцюгових розривів ДНК та ексцизійної репарації ушкоджених пуринових та піримідинових основ [1–3, 7, 8].

На початку ензим був охарактеризований як ключовий фактор у процесах репарації

ДНК, однак у подальших дослідженнях було виявлено участь PARP-1 у регуляції генної експресії як за нормальних (базальних) умов, так і за умов сигнальної та стресової активації клітин [1–3, 9, 10]. PARP-1 може регулювати транскрипційну активність щонайменше трьома шляхами: через модуляцію структури хроматину; завдяки прямій взаємодії з факторами транскрипції та/або їхніми ділянками взаємодії на ДНК, а також шляхом активації клітинних сигнальних систем, що реалізуються за участю PARP-1 в ядрі. Очевидним також стало і те, що для реалізації біологічної дії ензиму далеко не завжди потрібна наявність розривів ДНК, а регуляція клітинних функцій здійснюється завдяки прямим протеїн-протеїновим взаємодіям [1, 3, 7, 11].

Дослідження з використанням інгібіторів PARP та нокаутних за геном *Parp* мишей показали, що PARP-1 виконує роль фактора виживання, функція якого полягає у відстеженні та підтриманні структурно-функціональної цілісності геному [12]. Активація синтезу полі-ADP-рибози завжди передуює початку репарації ушкоджень ДНК. Великі затрати енергії на біосинтез цього полімеру вказують на його важливу, хоча і не до кінця зрозумілу, роль у забезпеченні виходу клітин із стресового стану, зумовленого премутаційними пошкодженнями ДНК. У разі необоротних змін у клітинному геномі PARP-1 задіяна в реалізації певних форм загибелі клітин, зокрема надмірна каталітична активність ензиму є вирішальною у разі переключення програми апоптичної елімінації клітин на некротичну, а також у реалізації загибелі, опосередкованої апоптозіндукуючим фактором [13, 14]. Участь PARP як у механізмах виживання клітин, так і загибелі їх стимулює пошук селективних інгібіторів цих ензимів як засобів хімотерапевтичного лікування широкого кола захворювань [6, 15]. Так, відомо, що порушення процесів полі-ADP-рибозилування може бути патогенетичним чинником у розвитку різних захворювань, зокрема хронічних та гострих запалень [15, 16], нейродегенеративних захворювань [17], цукрового діабету та його ускладнень [18], порушення перфузії тканин [6], травматичних пошкоджень [19], болювого синдрому [18] та пухлинного росту [5, 13].

Відкриття нових членів надродина PARP та виявлення інших індукторів синтезу PAR, окрім розривів ДНК, значно розширило уявлення про біологічну роль цієї унікальної посттрансляційної модифікації протеїнів. Здебільшого функція нових PARP пов'язана

з роботою мітотичного апарату та контролюванням цілісності геному під час клітинного поділу [20]. З'ясування нових функцій цих ензимів безумовно сприятиме подальшому розвитку фундаментальних та прикладних досліджень у біології та медицині.

В огляді проаналізовано, яким чином полі-ADP-рибозилування протеїнів внаслідок прояву каталітичної активності численних представників родини PARP, забезпечує не лише першу лінію захисту проти дії генотоксичних агентів та ушкоджень ДНК, але й сприяє регулюванню різноманітних біологічних процесів та клітинних функцій за участю різних PARP як у нормі, так і за деяких патологій.

Метаболізм полі-ADP-рибози

Полі-ADP-рибозилування є реакцією посттрансляційної модифікації протеїнів, що здійснюється полі(ADP-рибозо)полімеразами (PARP), родина яких нараховує 18 протеїнів, які кодуються різними генами. Майже 90% полімерів ADP-рибози, що синтезуються в клітинах ссавців, утворюються полі(ADP-рибозо)полімеразою 1 (PARP-1) [4, 21, 22]. У клітинах PARP-1 експресується конститутивно, але за наявності розривів ДНК ензиматична активність може зростати у 500 разів [2, 7, 23]. У процесі полі-ADP-рибозилування залишки ADP-рибози, які утворюються під час ензиматичного розщеплення глікозидного зв'язку між нікотинамідом та рибозою в молекулі NAD^+ , зв'язуючись із протеїнами-акцепторами, формують лінійні або розгалужені аніонні полімери (рис. 1) [1, 3]. Перший мономер ADP-рибози приєднується до γ -карбоксихильної групи залишків глутамінової кислоти протеїнів-мішеней через утворення ефірного зв'язку, а наступні зв'язуються за рахунок глікозидних ($1''-2''$)-, рідше ($1'''-2''$)-зв'язків [24]. Таким шляхом утворюється ковалентно прикріплений до протеїну полімер, що містить від 2 до 200 ADP-рибозних одиниць та який може мати точки галузнення після кожних 20–50 залишків ADP-рибози [25]. Приєднання одного залишку ADP-рибози до полімеру супроводжується вивільненням молекули нікотинаміду. Останній включається в реакцію ресинтезу NAD^+ , що відбувається в ядрі [22, 26]. Також було показано, що вільні молекули ADP-рибози, утворювані в NAD -глікогідролазній (NAD -азній) реакції, яку здатна проявляти PARP-1, взаємодіють із лізиновими залишками протеїнів з утворенням адуктів шифових основ та наступною їх перебудовою в кетоамінні

похідні [27]. Протеїнів'язані кетоамінні похідні можуть бути елонговані за дії PARP-1 з утворенням ADP-рибозних полімерів, з'єднаних із протеїнами через лізинові залишки [28].

На сьогодні ідентифіковані численні ядерні мішені для реакцій ензиматичного полі-ADP-рибозилування, зокрема корові гістони, лінкерні гістони H1 [24, 29], негістонові структурні компоненти хроматину [30], ензими, залучені в метаболізм ДНК [31, 32], а також різні транскрипційні фактори [33]. Однак одним із головних акцепторів у реакції PARP-1-залежного полі-ADP-рибозилування *in vivo* є сама PARP-1 [1–3, 34]. Завдяки великому негативному заряду полімеру, він значно змінює фізико-хімічні та біохімічні властивості модифікованих протеїнів, зокрема їхню афінність по відношенню до ДНК та здатність до протеїн-протеїнових взаємодій, необхідних для здійснення регуляторних функцій [35].

Полі-ADP-рибозилування є динамічним процесом, що забезпечується коротким (у серед-

ньому <1–2 хв) періодом напівжиття полімеру *in vivo*, деградація якого значно посилюється за перевищення концентрації PAR у клітинному ядрі понад 15 μM . [36]. Оборотність реакцій полі-ADP-рибозилування підтримується функціонуванням двох катаболітичних ензимів, полі(ADP-рибозо)глікогідролази (PARG, EC 3.2.1.143) та ADP-рибозил-протеїнліази. PARG виявляє ендоглікозидазну активність поряд з екзоглікозидазною, розщеплюючи рибозо-рибозні зв'язки як лінійних, так і розгалужених ділянок полі-ADP-рибози [37, 38]. ADP-рибозил-протеїнліаза видаляє проксимальний ADP-рибозильний мономер з акцепторного протеїну та вивільняє 5'-ADP-3''-деоксипент-2''-енофуранозу [39].

У ссавців відомо декілька ізоформ PARG, які є сплайсинговими варіантами одного і того самого гену. Дані ізоформи розташовані в різних клітинних компартементах, відповідно до локалізації самої PARP. Крім дуже активного ядерного протеїну PARG (110 кДа) і

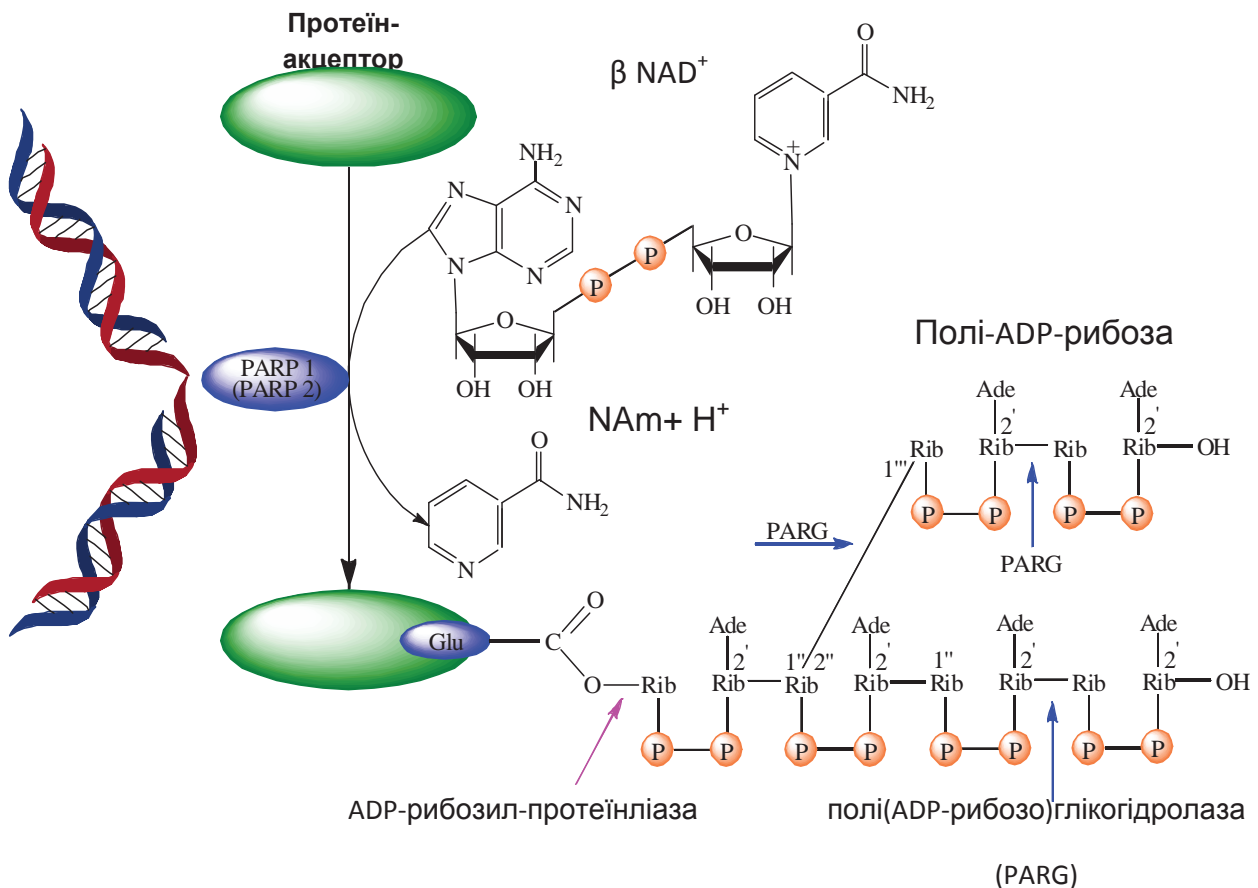


Рис. 1. Синтез лінійних та розгалужених ланцюгів полі-ADP-рибози за дії PARP-1 (PARP-2) в процесі репарації ушкодженої ДНК. Ковалентна модифікація з використанням NAD^+ здійснюється за залишком глутамату (Glu) акцепторного протеїну. Вказано сайти розщеплення полімерного ланцюга за дії полі(ADP-рибозо)глікогідролази та ADP-рибозил-протеїнліази

короткої мітохондріальної ізоформи (65 кДа), які є переважаючими ізоформами, існує декілька проміжних форм (102–99 кДа), роль яких мало вивчена [40]. Продуктами реакції є вільні полі-ADP-рибоза та ADP-рибозні мономери.

Вільні полімери ADP-рибози, що утворюються в полі(ADP-рибозо)глікогідролазній реакції здатні нековалентно взаємодіяти зі специфічними (ADP-рибозо)-зв'язувальними мотивами акцепторних протеїнів, що позначається на їхніх властивостях. Через нековалентне зв'язування з протеїнами PAR може впливати на активність та конформацію протеїнів, а у вільному стані ініціювати вивільнення апоптозіндукуючого фактора з мітохондрій [41]. Встановлено, що полі(ADP-рибозо)-зв'язувальними мотивами протеїнів є послідовності приблизно з 20 амінокислотних залишків, які містять дві консервативні ділянки: 1) позитивно заряджений кластер і 2) НХВХННВВННВ-ділянку, де Н – гідрофобний залишок, В – позитивно заряджений (основний) залишок, а Х – будь-яка амінокислота [42]. Використання цієї послідовності дає можливість виявити і охарактеризувати нові протеїни, які здатні взаємодіяти з PAR. До відомих на сьогодні протеїнів-акцепторів PAR належать: ДНК-лігаза III, XRCC (X-ray repair cross-complementing group 1), ДНК-полімераза ϵ , NF- κ B, індукбельна та нейрональна NO-синтаза (iNOS, nNOS), проапоптичний протеїн p53, ДНК-залежні протеїнкінази (DNA-PKcs), ДНК-аза, залежна від каспази, інгібітор циклінзалежної кінази-1 (p21CIP1/WAF1) та низка інших протеїнів [36, 42]. Таким чином, вільні полімери ADP-рибози можуть значно розширювати та ускладнювати спектр дії PARP у реалізації клітинних функцій.

Полі(ADP-рибозо)глікогідролаза є єдиним клітинним ферментом, здатним каталізувати гідроліз ADP-рибозних полімерів до вільної ADP-рибози [43]. Цей продукт реакції є потенційним глікуючим моносахаридом, який може спричинювати неензиматичну модифікацію і пошкодження протеїнів [27]. ADP-рибозопірофосфатаза забезпечує розщеплення вільних молекул ADP-рибози на AMP та рибозо-5-фосфат, який значно меншою мірою індукує процес глікування [44]. Нещодавно встановлено кристалічну структуру ADP-рибозопірофосфатази людини NUDT9 (Nucleoside diphosphate-linked moiety X motif 9) [45]. Картина катаболізму PAR ще більше ускладнюється завдяки не-

щодавно ідентифікованому альтернативному шляху деградації полімеру. Він здійснюється ADP рибозиларгінін гідролазою-3 (ARH3), протеїном з молекулярною масою 39 кДа, який не має структурної подібності з PARP, але виявляє PAR-гідролізуючу активність [46].

Представники надродини PARP, молекулярна організація їх та загальна характеристика функцій

Молекулярна організація PARP-1

PARP-1(113 кДа) – це перший з відкритих та на сьогодні найдослідженіших представників надродини полі-ADP-рибозилуючих ферментів. Як вже зазначалось, у відповідь на пошкодження ДНК, PARP-1 синтезує полімери ADP-рибози, акцепторами яких є різні протеїни клітинних ядер, зазвичай асоційовані з хроматином (гетеромодифікація) або сама PARP-1, що здатна до аутомодифікації [1–3, 28]. Цей фермент може взаємодіяти з різноманітними структурами ДНК: суперспіралізованою, одно- і двонитковими розривами, «ДНК-шпильками» і «хрестоподібними структурами».

Модульна структура молекули ферменту складається із шести основних доменів, функції чотирьох з яких добре вивчено (рис. 2) [1, 7, 8]. N-кінцевий ДНК-зв'язувальний домен А (DBD) містить два «цинкових пальці» (F1, F2), що функціонують як молекулярні сенсори розривів ДНК та взаємодіють із протеїновими партнерами. «Цинкові пальці» мають характерну Zn^{2+} -зв'язувальну послідовність C-X₂-C-X_{28,30}-H-X₂-C, де Х – будь-який амінокислотний залишок. Однак, на відміну від інших протеїнів з «цинковими пальцями» (транскрипційні фактори і деякі ферменти, які здатні взаємодіяти з ДНК), в молекулі PARP-1 вони містять набагато більшу кількість амінокислотних залишків (рис. 2, Б). Подібну до PARP-1 структуру «цинкових пальців» має лише ДНК-лігаза III та 3'-ДНК-фосфоестераза з *Arabidopsis thaliana* [23, 47].

У структурі домену В є дві ділянки типу «спіраль-поворот-спіраль» та двостороння сигнальна послідовність ядерної локалізації (NLS), залучена в механізм розпізнавання ферменту та його наступного транспортування за участю протеїнів ядерної пори з цитоплазми в ядро. Слід зазначити, що у структурі цієї послідовності знаходиться також сайт для протеолітичної дії каспази 3 [48]. Аутомодифікуючий домен D (AMD) містить п'ять консервативних залишків глутамінової кислоти, які є сайтами автополі-ADP-рибозилування, залученого до негативного

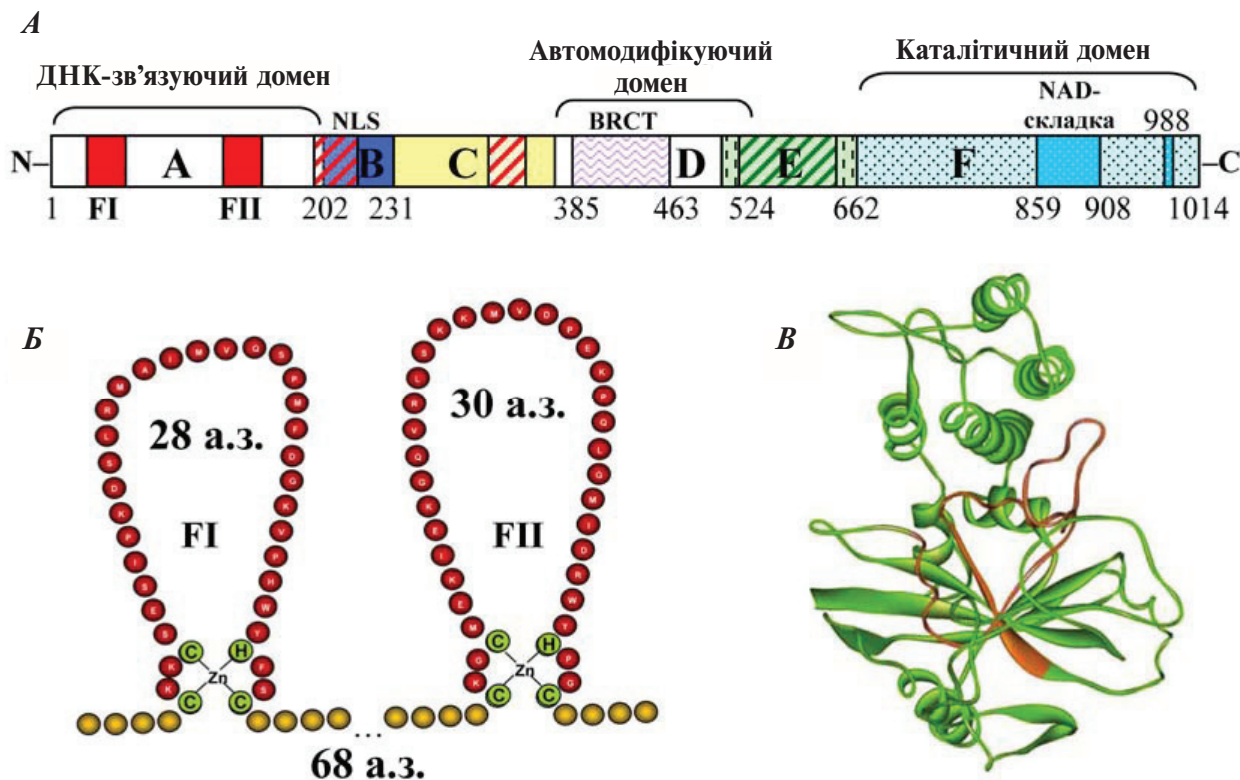


Рис. 2. Структурна організація ензиму PARP-1: доменна будова (А); будова «цинкових пальців» (Б); тривимірна будова каталітичного домену (з 656 по 1014 а.з.), здійснена за допомогою програми RasMol (В). А.з. — амінокислотний залишок; FI (II) — «цинковий палець» I (II) [7]

регулювання взаємодії між PARP та ДНК [49]. Крім того, мотив BRCT (C-terminal domain of a breast cancer susceptibility protein) виконує регуляторну роль, забезпечуючи протеїн-протеїнові взаємодії в клітинних ядрах [1, 50]. Каталітична активність PARP-1 забезпечується С-кінцевим доменом F з високо консервативною амінокислотною послідовністю. За порівняння кристалічних структур каталітичного домену PARP-1 з активним центром дифтерійного токсину встановлено ідентичну організацію NAD-зв'язувальної ділянки, що включає: β -складчатий шар— α -спіраль—петля— β -складчатий шар— α -спіраль. Ця структура є унікальною і слугує маркером молекул, які належать до родини PARP (їхнім своєрідним «автографом») (рис. 2, В) [7, 51]. Крім того у структурі каталітичного домену PARP-1 є додаткова α -спіраль, яка забезпечує передачу сигналу на інші молекули у разі взаємодії з пошкодженою ДНК. До цих пір бракує відомостей стосовно функцій доменів С та Е [1, 7]. В цілому, подібна доменна організація дозволяє PARP-1 взаємодіяти з ДНК та хроматином, полі-ADP-рибозилувати відповідні протеїнові молекулярні мішені в

клітинних ядрах, що забезпечує підтримання структурно-функціональну цілісність геному та тонке регулювання експресії генів.

Загальна характеристика підгруп ензимів надродини PARP

На основі будови NAD-зв'язувальної ділянки, ідентифікованої в структурі PARP-1 та цілої низки бактеріальних токсинів [52], було проведено пошук гомологів PARP людини в базі даних Національного центру біотехнологічної інформації США (NCBI), що дозволило ідентифікувати 18 членів надродини PARP (PARP-1 — PARP-18), рис. 3, таблиця [1, 7]. Слід відмітити, що деякі з протеїнів виявились вже відомими під іншими назвами, наприклад BAL1 та 2 (B-aggressive lymphoma), ZAP (Zinc-finger antiviral protein) тощо. Отже, таким протеїнам було запропоновано згідно з номенклатурою PARP нову назву (таблиця).

Детальне дослідження структури каталітичного домену представників родини PARP показало, що консервативний залишок Glu988, характерний для PARP-1 та більшості гомологів, виявився або зміщеним у PARP-8 та PARP-16 або заміненим на Asp у PARP-15.

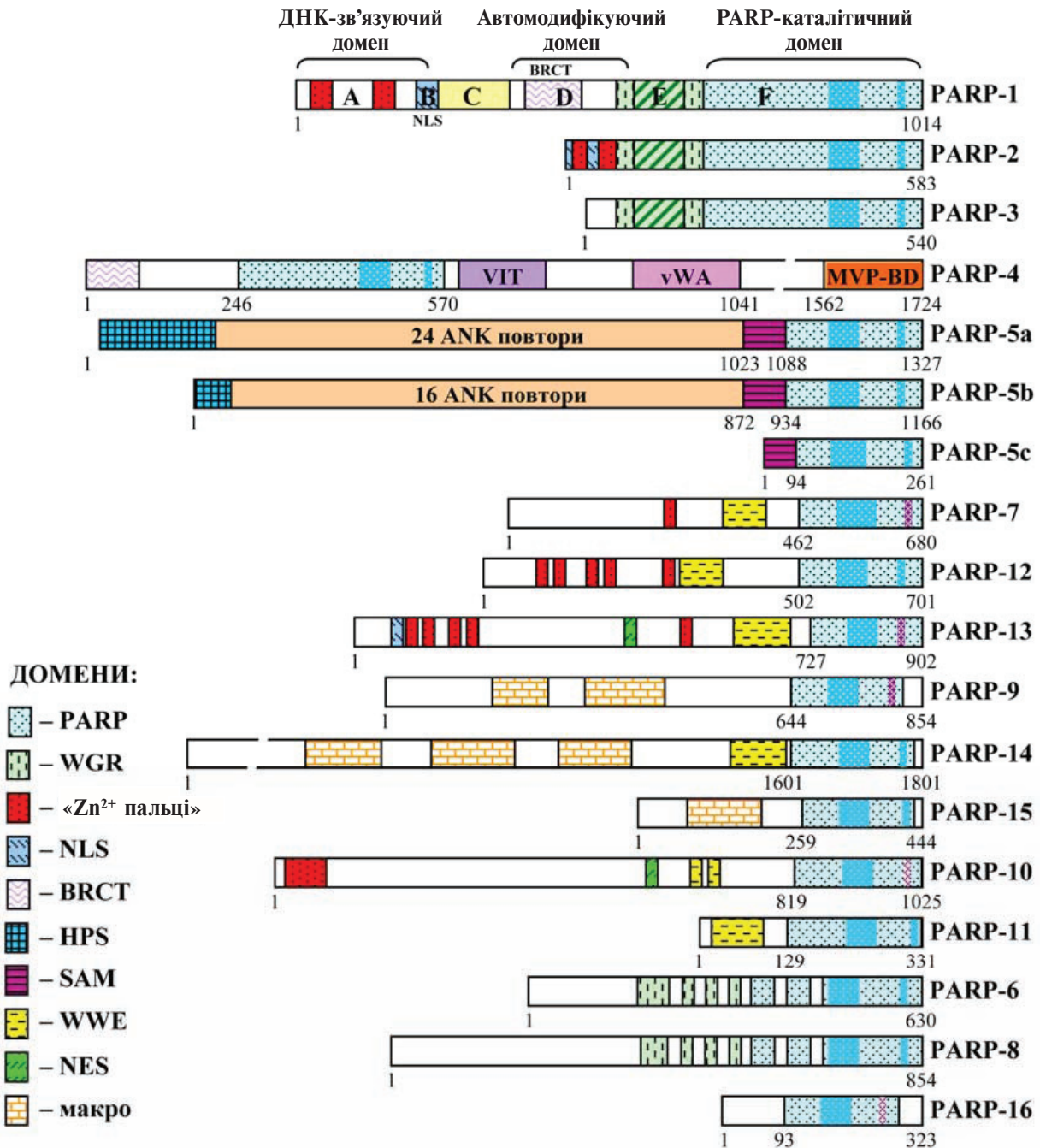


Рис. 3. Доменна організація ізоформ родини PARP (згідно з базою даних програми Pfam 19.0) [7]. PARP – каталітичний домен наведених ізоформ містить NAD-зв'язувальну ділянку, гомологічну PARP-1 (з 859 по 908 амінокислотні залишки), та еквівалент консервативного залишку Glu988, характерний для PARP-1 та більшості гомологів; WGR – наявні консервативні Trp, Gly і Arg, однак властивості не відомі; «Zn²⁺ пальці» – забезпечують зв'язування з ДНК; NLS – сигнал ядерної локалізації протеїну; BRCT – залучений до протеїн-протеїнових взаємодій; vWA (фактор фон Віллібранда, тип A) – сприяє формуванню мультипротеїнових комплексів; MVP-BD – забезпечує взаємодію з основним протеїном «бочкоподібних часточок» рибонуклеопротеїнового комплексу (MVP); VIT – інтер-α-трипсинова послідовність, функції не відомі; HPS – гомополімерні повтори His, Pro і Ser, функції не відомі; SAM («стерильна» α-послідовність) та ANK (анкірин) – залучені до протеїн-протеїнових взаємодій; WWE (наявність послідовності Trp-Trp-Glu) – залучений до протеїн-протеїнових взаємодій за убіквітинуювання або полі-ADP-рибозилування; NES – сигнал експорту протеїну з ядра в цитоплазму; макро – відповідає за взаємодію з ADP-рибозою

Основні характеристики протеїнів родини PARP

Історична та запропонована назви [1, 7]	Молекулярна маса, кДа	Кількість амінокислотних залишків	Номер протеїну в базі даних NCBI	Хромосомна локалізація
PARP-1	113	1014	NP_001609.2	1q41-42
PARP-2	66	583	NP_005475.2	14q11.2
PARP-3	60	540	NP_001003931.2	3p21.1
vPARP (PARP-4)	193	1724	NP_006428	13q11
Танкіраза 1 (PARP-5a)	142	1327	NP_003738.2	8p23.1
Танкіраза 2 (PARP-5b)	127	1166	NP_079511.1	10q23.03
PARP-5c (танкіраза 3)	29	261	BAB14665.1	10q23.03
PARP-6	71	630	NP_064599.2	15q22.23
tiPARP (PARP-7)	76	680	NP_056323	3q25.31
PARP-8	96	854	NP_078891	5q11.2
PARP-9 (BAL1)	96	854	NP_113646	3q13-q21
PARP-10	110	1025	NP_116178	8q24.3
PARP-11	39	331	NP_065100	12p13.3
PARP-12	79	701	NP_073587	7q34
PARP-13 (ZAP)	101	902	NP_064504	7q34
PARP-14 (BAL2/CoaSt6)	203	1801	NP_060024.2	3q21.1
PARP-15 (BAL3)	50	444	NP_689828.1	3q21.1
PARP-16	36	323	NP_060321.3	15q22.2

Пошук здійснювався за допомогою бази NCBI (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html); молекулярна маса обраховувалась за допомогою програми ExPASy (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/protein>)

У деяких представників він заміщений на неконсервативний залишок (PARP-7/tiPARP, PARP-9/BAL1, PARP-10, PARP-13 та PARP-16), що поставило під сумнів наявність в них моно- або полі-ADP-рибозилувальної активності [1]. Однак повна відсутність ензиматичної активності продемонстрована лише для PARP-9, тоді як PARP-7/tiPARP та PARP-10 виявляють полі(ADP-рибозо) полімеразну активність [7]. За виключенням PARP-4/vPARP, каталітичний домен у решти протеїнів локалізований в С-кінцевій частині молекули. Він суміжний з іншими доменами, які залучені до зв'язування ДНК та РНК, протеїн-протеїнових взаємодій або клітинного сигналіну. Каталітичний домен у деяких ензимів іде за макро H2A доменом (подібний до домену гістонів H2A), або WWE доменом (характеризується наявністю консервативної послідовності Trp-Trp-Glu) [53].

Грунтуючись на особливостях структурної організації доменів та встановлених функціях представників родини PARP, виділяють

такі підгрупи ензимів: ДНК-залежні PARP; танкірази; PARP СССН-типу «цинкового пальця» та макроPARP. PARP-3, PARP-4/vPARP, PARP-6, PARP-8, PARP-10, PARP-11 та PARP-16 завдяки своїм індивідуальним особливостям зайняли окрему позицію (рис. 3) [7]. Деякі дослідники танкіразу-3 до родини PARP не відносять. У таблиці наведено узагальнені дані щодо молекулярної маси, довжини амінокислотної послідовності, номери протеїну в банку даних NCBI та локалізації генів ізоформ у хромосомах.

ДНК-залежні PARP. До цього часу PARP-1 (розглянуто вище) та PARP-2 є єдиними ідентифікованими представниками цієї підродини, ензиматична активність яких може стимулюватись *in vitro* та *in vivo* розривами ДНК [1, 54]. Відкриттю PARP-2 сприяла наявність залишкової ДНК-залежної полі(ADP-рибозо)полімеразної активності в ембріональних фібробластах, ізольованих із мишей, дефіцитних за PARP-1. Амінокислотна послідовність каталітичного домену цього

ензиму має 69%-у гомологію з PARP-1 [55]. Ензими відрізняються своєю субстратною специфічністю. PARP-2 переважно спричинює модифікацію гістонів H2B, тоді як PARP-1 модифікує гістони H1 [56]. ДНК-зв'язувальний домен забезпечує ядерну локалізацію протеїну та демонструє певну аналогію з доменом SAP (SAF-A/B, Acinus, and PIAS), знайденим у різних ядерних протеїнах, зокрема AP-ендонуклеази та Ku70, що залучені до хромосомної організації та репарації ДНК [57]. Мішенями дії ензиму є пропуски (гепи) у структурі ДНК, але не розриви в нуклеотидній послідовності, з якими переважно зв'язується PARP-1 [1]. PARP-2 взаємодіє з PARP-1 та має з останньою спільних партнерів, що залучаються до процесів репарації одностаних розривів ДНК (SSBR, Single-strand break repair) та ексцизійної репарації основ (BER, Base excision repair) зокрема: XRCC1, ДНК полімераза- β та ДНК лігаза III [54]. Крім того, ДНК-залежні PARP беруть активну участь в епігенетичній та транскрипційній регуляції експресії генів, що значно впливає на важливі клітинні функції. PARP-1 та PARP-2 також взаємодіють із протеїнами, які є у структурі кінетохора та беруть участь у контролюванні утворення веретена поділу. Наявність специфічних партнерів PARP-2, зокрема таких, як теломерний протеїн TRF2 (TTAGGG repeat factor 2), свідчить про його залучення до механізмів контролювання цілісності теломер [58].

Танкірази (PARP-5a, -5b, -5c). Ці протеїни складаються з трьох типів доменів: анкіринового (повторювані ділянки первинної структури протеїну, які містять 33 амінокислотних залишки і беруть участь у протеїн-протеїнових взаємодіях), SAM (Sterile alpha motif) та каталітичного. Завдяки SAM-домену танкіраза утворює олігомери, які діють як одна функціональна одиниця [59]. Субстратами танкірази 1 (PARP-5a) є TRF1 (TTAGGG repeat factor 1, один із компонентів теломерного комплексу та негативний регулятор довжини теломери), інсулінзалежна амінопептидаза (IRAP), протеїн Mcl1 (ML1 myeloid cell leukemia 1, належить до родини антиапоптичних протеїнів Bcl-2 – (B-cell lymphoma-leukemia 2), ядерний антиген вірусу Епштейна-Барра-1 (EBNA1), протеїни ядерного і мітохондріального апарату (NuMA) та інші [60, 61]. На сьогодні танкіразу 1 вважають сигнальною молекулою, локалізованою в декількох клітинних компартментах (ядерні пори, апарат Гольджі та мітохондріальні центросоми), яка бере

участь у процесі старіння клітини. Вивчення механізмів передачі внутрішньоклітинних сигналів за участю танкірази 1 може свідчити про нові регуляторні шляхи, що, зокрема, опосередковують вплив інсуліну та факторів росту на теломери [62]. Танкіразу-2 (PARP-5b) також знаходять у мембранах різних субклітинних структур. За своїми функціями вона подібна до танкірази-1 і також взаємодіє з більшістю її протеїнів-партнерів [61]. Однак у досліджах із використанням нокаутних по гену танкірази-2 тварин було показано, що ензим не впливає на довжину теломерів, але зменшується розмір тіла мишей, що свідчить про загальні порушення метаболізму [63]. Вважається, що цей ензим бере участь у засвоєнні поживних речовин у кишечнику та у процесах реабсорбції клубочкового фільтрату нирок.

PARPs CCCH-типу «цинкового пальця»

До підродини PARP CCCH-типу належать PARP-7 (tiPARP), PARP-12 і PARP-13. Вони характеризуються наявністю WWE-домену (властивий для класів протеїнів, функція яких пов'язана з процесом убіквітування) та специфічного різновиду «цинкових пальців» із високою спорідненістю до РНК із структурою: C-X7-11-C-X3-9-C-X3-H [7]. Ген *tiPARP* індукується 2,3,7,8-тетрахлородибензо-*p*-діоксином (TCDD) та знаходиться під контролем діоксинзв'язувального арилгідрокарбонowego рецептора (AHR) [64]. Вважають, що ця ізоформа є функціонально важливою в забезпеченні нервово-психічних функцій (поведінки, навчання і пам'яті) [64].

PARP-13 вперше ідентифіковано в щурів та названо ZAP (Zinc-finger antiviral protein) і охарактеризовано як протеїн, що забезпечує стійкість клітин до ретровірусної інфекції [65]. ZAP через свої «цинкові пальці» зв'язується з вірусною РНК та спричинює її інактивацію [65]. Щодо функціонування PARP-12, яка є близькою за структурою до PARP-13, відомо дуже мало [7].

МакроPARP. До цієї підродини належать протеїни PARP-9/BAL1, PARP-14/BAL2/CoaSt6 і PARP-15/BAL3. Вони характеризуються наявністю від 1 до 3 макро-H2A доменів, які знаходяться перед каталітичним доменом [1, 7]. Цей домен задіяний в репресії транскрипції і Х-хромосомній інактивації у ссавців [66]. Припускають, що макроPARP через модифікацію кінців PAR, можуть зупиняти їхнє подовження, таким чином контролюючи розмір полімеру. Крім того, вважають, що макроPARP виявляють властивості транскрипційних кофакторів

[7, 67]. Надекспресію PARP-9/BAL1 було виявлено у В-лімфоцитарних лімфомах (DLB-CL). Здатність спричинювати міграцію лімфоцитів *in vitro* вказує на можливість функціонування протеїну як чинника, що сприяє поширенню злоякісних В-лімфоцитів [68].

Інші члени надродини PARP. PARP-3 було ідентифіковано як ключовий компонент центросоми, переважно локалізований в дочірній центріолі впродовж клітинного циклу [20, 53]. Серед усіх PARP у цього ензиму один із найменших N-кінцевих доменів, який складається лише з 54 амінокислотних залишків, відповідальних за його центросомну локалізацію. Домени E та F молекули PARP-3 виявляють 61%-ну гомологію з PARP-1. Надекспресія PARP-3 в умовах експерименту не мала жодного ефекту на подвоєння центросом, але пригнічувала перехід від G1 до S фази клітинного циклу. Тому було зроблено припущення, що функція PARP-3 може полягати у стимулюванні «дозрівання» дочірніх центріолей до точки переходу G1-S клітинного циклу [53].

PARP-4/vPARP є каталітичним компонентом цитоплазматичних «бочкоподібних часточок», які являють собою рибонуклепротеїнові комплекси з молекулярною масою приблизно 13 мДа, залучені у формування стійкості пухлин до множинної дії лікарських препаратів та у внутрішньоклітинне транспортування [69]. Крім того, PARP-4/vPARP виявлений в ядрах, а також асоціюється з веретеном поділу під час мітозу (рис. 3). Цей ензим може взаємодіяти з теломераза-асоційованим протеїном-1 (TERP1) «бочкоподібних часточок» рибонуклеопротеїнового комплексу, однак його вплив на функціонування теломер не встановлено [70]. Дослідження, проведені на нокаутних мишах *Parp-4/vParp*^{-/-}, засвідчують участь ензиму у відповіді клітини на дію генотоксичних чинників [71].

PARP-10 є партнером у взаємодії з протонкогенним протеїном с-Мус — ключовим регулятором транскрипції, який контролює проліферацію клітин [72, 73]. Крім того, PARP-10 може полі-ADP-рибозилувати гістони H2A, що вказує на можливу його роль у регулюванні структури та функцій хроматину [72].

На цей час відомості щодо біологічних функцій PARP-6, PARP-8, PARP-11 і PARP-16 практично відсутні [7].

Надзвичайно цікава особливість членів родини PARP полягає у здатності більшості її представників взаємодіяти один з одним,

як у разі взаємодії PARP-1 з PARP-2 [54] й PARP-3 та танкірази 1 із танкіразою 2 [23, 74, 75]. Сенс утворення подібних асоціатів протеїнів полягає у виникненні (формуванні) нових властивостей, а саме здатності діяти в різних субклітинних компартментах на субстрати, які зазвичай не є мішенями дії кожного окремого ензиму. Це може свідчити про існування нового рівня організації для представників надродини PARP, що забезпечує значну диверсифікацію біологічних відповідей через комбінаторні взаємодії. Цьому ж сприяє модульна організація та поява додаткових доменів у більшості представників родини PARP, функції яких полягають у забезпеченні цілеспрямованої дії різних полі-ADP-рибозилувальних ензимів, залучених у численних сигнальних каскадах.

Роль PARP та процесів ADP-рибозилування протеїнів у ремоделюванні структури хроматину та у репарації ушкоджень ДНК

Відкриття феномену активації PARP-1 розривами ДНК стало передумовою для дослідження ролі цього ензиму в процесах репарації ушкоджень ДНК. Синтез PAR у відповідь на ушкодження ДНК є подією, яка сигналізує про порушення цілісності ДНК, що дозволяє клітині оцінити масштаб ушкодження, а також забезпечує швидку концентрацію ключових факторів репараційного комплексу SSB/BER в місцях одониткових розривів ДНК. PARP-1 не бере участі в каталітичних етапах репарації, але роль ензиму є критичною у забезпеченні ефективності та точності цього процесу. Така участь реалізується через послідовну координацію розпізнавання (детекції) розривів ДНК ензимом та сигналювання про такі ушкодження, що призводить до активації систем репарації.

Найперші охарактеризовані ефекти PARP-1 у контексті репарації ушкоджень ДНК стосувалися полі-ADP-рибозилування гістонів та ремоделювання структури хроматину [1–3, 7, 9, 29]. Вплив PARP-1 на структурну організацію хроматину було з'ясовано та детально охарактеризовано завдяки біохімічним дослідженням останніх років [1, 29, 76]. Наявність «цинкових пальців» у PARP-1 забезпечує моніторинг структури ДНК [77]. Нещодавно ідентифіковано додатковий Zn-зв'язувальний домен, який локалізується між другим «цинковим пальцем» та автомодифікувальним доменом і забезпечує спряження процесів зв'язування з

ДНК та алостеричної активації PARP-1 [78]. Активація PARP-1 та синтез PAR відбувається у відповідь на утворення одониткових розривів ДНК, зумовлених безпосереднім розщепленням дезоксирибозо-фосфатного остова або пошкодженням основи, які репаруються шляхами зшивання одониткових розривів та ексцизійної репарації основ (SSBR/BER) відповідно [1, 7]. Дві молекули PARP-1 формують гомодимери у місцях розривів ДНК, що супроводжується істотним зростанням полі-ADP-рибозополімеразної активності. Значний негативний заряд ADP-рибозних полімерів (кожен залишок ADP-рибози приносить два негативні заряди) сприяє тому, що полі-ADP-рибозильовані протеїни, які беруть участь в архітектурній організації хроматину – гістони H1 та H2B, негістонові протеїни HMG (High-mobility-group) та ламін B [29] – або у метаболізмі ДНК (фактори реплікації ДНК), втрачають свою афінність до ДНК, що супроводжується релаксацією хроматину, і, таким чином, підвищується доступ до розривів та звільняється місце для репараційних факторів [56, 79, 80]. Вважають, що поряд з полі-ADP-рибозильованням гістонів, відбувається суттєва автомодифікація самої PARP-1 (ензими у складі гомодимеру полі-ADP-рибозильовують один одного за автомодифікаційним доменом). Як тільки ступінь автомодифікації досягає певного критичного рівня комплекс ензиму з ДНК розпадається, і PARP-1 знову переходить в неактивний стан [49]. Розщеплення полі-ADP-рибозних ланцюгів та повернення PARP-1 у вихідну немодифіковану форму здійснює вже згадуваний ензим полі(ADP-рибозо)глікогідролаза [40].

Передача та посилення сигналу про пошкодження реалізується через полі-ADP-рибозильовання N- та C-кінцевих ділянок гістонів H1 та H2B, селективні взаємодії цих протеїнів із вільними PAR або автомодифікованою PARP-1 та пов'язану з цими модифікаціями релаксацію хроматинових фібрил (30 нм). Така послідовність взаємодій забезпечує PAR-залежне залучення ключового гравця у процесі репарації одониткових розривів у клітинах ссавців – протеїну «риштування» XRCC1 [81, 82]. Крім мобілізації XRCC1, утворення полімеру сприяє залученню інших факторів системи SSBR/BER до місць пошкодження та репарації розривів, таких як ДНК-лігаза III (LIG3), кіназа полінуклеотиду (PNK), ДНК-полімераза β (POL β) флепендону-клаза-1 (FEN1), а також PARP-2 [54, 83–85].

Відтоді як було виявлено можливість полі-ADP-рибозильовання XRCC1 *in vitro*,

можна було передбачити, що PARP-1 регулює активність репараційного комплексу через модифікацію XRCC1 *in vivo* і його здатність взаємодіяти з іншими компонентами комплексу. Було показано, що XRCC1 переважно взаємодіє з полі-ADP-рибозильованою PARP-1 [86]. Хоча протеїн «риштування», XRCC1, і не виявляє власної ензиматичної активності, він відіграє важливу роль у координуванні послідовності, за якою ефекторні ензими шляху BER залучаються до процесу репарації ДНК. XRCC1 діє як своєрідне «молекулярне риштування», формуючи репараційний комплекс через індивідуальну взаємодію з кожним компонентом [85]. Інгібування активності PARP-1 повністю запобігало динамічній мобілізації XRCC1 до сайтів пошкодження та порушувало процес репарації [87]. Це значною мірою пояснює затримку у відновленні розривів, яка спостерігається у PARP-дефіцитних (*Parp-1^{-/-}*) клітинах, та негативно впливає на геномну стабільність і виживання клітин [88]. Слід також додати, що конденсин I – комплекс, який бере участь в організації хроматину, – взаємодіє з PARP-1 та XRCC1 у відповідь на ушкодження основ і, таким чином, долучається до модифікації локальних ділянок хроматину та до організації структури ДНК, що сприяє ефективній ексцизійній репарації основ [81].

PARP-2 подібно до PARP-1 взаємодіє з XRCC1 та іншими факторами SSBR/BER (ДНК-полімераза β та ДНК-лігаза III) [54]. *Parp-2^{-/-}* дефіцитні клітини надзвичайно чутливі до дії генотоксичних агентів та характеризуються уповільненою швидкістю репарації одониткових розривів [12, 18]. Однак PARP-2 не є фактором мобілізації XRCC1 і не розпізнає одониткові розриви, натомість впізнає відсутні ділянки одного з ланцюгів дволанцюгової ДНК (гепи) та флеп-структури [1]. Отже, PARP-2 імовірно залучається на пізнішому етапі репараційного процесу.

Відомо, що у разі пошкодження деякі ділянки ДНК не несуть кодуючих основ і таких помилок може виникати в геномі до декількох сотень тисяч на клітину. Нещодавно було показано, що в регулюванні репарації цього пошкодження бере участь полі(ADP-рибозо)полімераза 1. Ензим здатен взаємодіяти з ділянкою молекули ДНК, яка не містить кодуючої основи (так званим апуриновим/апиридиновим (AP) сайтом) [89]. Активація синтезу полімеру ADP-рибози найімовірніше відбувається після розриву дезоксирибозо-фосфатного остова ДНК глікогідролазами – AP-ліазами або APE-1 (апуринова/апиримідинова

АР-ендонуклеаза 1) [89]. Було показано, що полімеризаційний етап LPR (Long Patch Repair, репарація основ з утворенням довгих латок) істотно порушується у дефіцитних по PARP-1 клітинах [90, 91]. Більше того, PARP-1 асоціюється з ДНК POL β [90, 92] та ефективно зв'язується з інтермедіатами репарації, що містять flap5'-апуриновий/апиримідиновий сайти, які формуються до вибору субшляху: SPR (Short Patch Repair, репарація основ з утворенням коротких латок) або LPR [92, 93]. Стадія лігації також зазнає змін у присутності PARP-1. Було продемонстровано, що пряма фізична взаємодія між PARP-1 та ДНК-лігазою III спостерігається через ділянку амінокислотної послідовності, безпосередньо прилеглої до N-кінцевого «цинкового пальця» ДНК LIG3 [94]. Крім того, було встановлено, що ДНК LIG3 також прямо зв'язується з PAR та полі-ADP-рибозильованою PARP-1, забезпечуючи краще зв'язування з ДНК. Ці події опосередковують механізм залучення комплексу ДНК LIG3-XRCC1 до місця ушкодження ДНК [94].

Серед багатьох питань, які чекають на своє вирішення, надзвичайно важливим є те, яким чином PARP-1 знаходить гени-мішені та активується за відсутності генотоксичного стресу, тобто в умовах, коли хроматин не є ушкодженим [23]. Беручи до уваги, що топоізомераза I (ToroI) необхідна для транскрипції та є молекулярним партнером PARP-1, імовірно, що за активації процесу транскрипції можуть утворюватись індуковані топоізомеразою I транз'єнтні 5'-ДНК кінці, здатні активувати PARP-1 [95]. Спонтанна активація PARP-1, як це, наприклад, спостерігається в пафах на політенних хромосомах *Drosophila melanogaster*, цілком може бути результатом виникнення тимчасових пауз в активності ToroI. Нещодавно було з'ясовано, що саме утворення PAR в періоди зниження активності ToroI, індукує процес зшивання розривів ДНК [96].

Рання летальність ембріонів мишей з подвійними мутаціями *Parp-1^{-/-} ATM^{-/-}*, *Parp-1^{-/-} Ku86^{-/-}* та *Parp-2^{-/-} ATM^{-/-}*, що пов'язана із синергізмом одночасних дефектів у шляхах репарації одно- та двониткових розривів ДНК [97–99], ставить питання стосовно можливості прямого залучення PARP-1, PARP-2 та PAR у процес репарації подвійних розривів ДНК. Як виявилось, PARP-1 може відігравати певну роль у репарації дволанцюгових розривів негомологічним з'єднанням розривів подвійної спіралі через залучення

та полі-ADP-рибозилування факторів, які беруть участь у негомологічному з'єднанні кінців [100]. Так, полі-ADP-рибозилування факторів Ku70 та ДНК-PKcs (каталітична субодиниця ДНК-протеїнкінази) веде до блокування їхньої здатності зв'язувати вільні кінці ДНК. Крім того, ензим може бути задіяний в альтернативних шляхах [101]. Відомо, що двониткові розриви ідентифікуються в клітині за їх епігенетичним маркуванням внаслідок фосфорилування варіанта корових гістонів H2AX (γ H2AX) (62) протеїнкіназами ATM (ataxia telangiectasia mutated) або ATR (ataxia-telangiectasia and Rad3 related) [102, 103]. Активація протеїнкінази ATM через індуковану автофосфорилуванням дисоціацію на мономери та наступне фосфорилування гістонів H2AX виявилась чутливою до конформаційних змін хроматину [104]. І хоча модифікація цих гістонів у процесі фосфорилування може відбуватись незалежно від синтезу PAR та активності PARP-1 чи PARP-2, надзвичайно швидка локальна деконденсація хроматину, що відбувається без залучення γ H2AX в місцях двониткових розривів ДНК, цілком може бути пов'язана з локальною активацією PARP-1 та утворенням PAR [105]. Це узгоджується з даними про асоціацію PARP-1 з γ H2AX за дії γ -опромінення [105].

Участь PARP-1 у регуляції експресії генів

Роль PARP-1 у функціонуванні геному. Репарація ДНК тісно пов'язана з участю PARP у процесах регуляції експресії генів. Фактично з моменту відкриття PARP-1 було ідентифіковано як транскрипційний фактор ТФІІС, який пригнічував індуковану розривами ДНК випадкову транскрипцію за участю РНК-полімерази II, але при цьому не впливав за промотор-специфічну базальну транскрипцію [106]. Крім того, роль PARP у транскрипційній регуляції у разі порушення цілісності ДНК полягає в мобілізації репресивних транскрипційних комплексів до сайтів ушкодження з метою запобігання транскрипції ушкоджених генів. Серед транскрипційних репресорів, які мобілізуються до ділянок ушкодженої ДНК у PARP-1/2 залежний спосіб, зазначимо протеїни групи polycomb (PcG), відомі своєю участю в сайленсингу *homeobox (Hox)* генів у процесі онтогенезу [107], та комплекс NuRD (nucleosome remodelling and histone deacetylation), який складається з багатьох протеїнів, у тому числі з двох деацетилаз гістонів, HDAC1 та 2, які також гальмують транскрипцію [108]. Опосередковане PARP-1/2

залучення протеїнів PcG та NuRD до сайтів пошкодження хроматину вказує на їхню пряму роль у клітинній відповіді на порушення цілісності ДНК та на дію генотоксичного стресу.

Останні дослідження ролі PARP-1 у генній регуляції дозволили ідентифікувати та розмежувати геномні компоненти, з якими зв'язується PARP-1 та гени, які безпосередньо регулюються ензимом. Зокрема, застосування методу хроматинової імунопреципітації, спряженої з гібридизацією з геномними мікрочипами дозволило показати, що зв'язування PARP-1 є вищим у промоторах, які впізнаються РНК-полімеразою II (Pol II). Саме такими є щонайменше 90 відсотків транскрибованих генів у клітинах раку молочної залози MCF-7 [109]. Виявлено закономірність, згідно з якою збільшення кількості PARP-1 у цих промоторах корелює зі зниженням вмісту лінкерних гістонів H1, а високе співвідношення PARP-1/H1 вказує на гени, які активно транскрибуються. Однак зв'язування не обов'язково означає активаторну дію PARP-1 на промотори, а скоріше свідчить про локалізацію PARP-1 в сайтах поточної транскрипції, де ензим може здійснювати як стимуляторні, так і інгібіторні ефекти [109]. Характер локалізації PARP-1 в промоторах, що активно транскрибуються, може не повністю збігатися з локалізацією активної (тобто фосфорильованої) Pol II у конкретному гені [80]. Зазвичай PARP-1 розташовується вище стартового сайту транскрипції (приблизно – 250 пар нуклеотидів), тоді як активна Pol II знаходиться в ділянці транскрипційного старту та в самому гені [109].

З'являється все більше повідомлень стосовно функції транскриптому, що регулюється PARP-1 у клітинах та тканинах мишей, дефіцитних за PARP-1 (*Parp-1^{-/-}*) [110–112]. Зокрема, було вивчено профілі генної експресії в ембріональних стовбурових клітинах та клітинах печінки мишей *Parp-1^{-/-}* і встановлено, що утворення близько 3,5% транскриптів контролюється PARP-1; при цьому щонайменше 60–70% генів позитивно регулюються PARP-1 [110]. Регульовані набори генів відіграють роль у контролюванні таких важливих клітинних процесів, як відповідь на стрес, сигнальна трансдукція, метаболізм, регулювання клітинного циклу та транскрипція, що добре узгоджується з відомими функціями PARP-1 [1, 7, 110].

Невідповідність між великою кількістю промоторів, з якими зв'язується PARP-1, та

обмеженим, за даними генної експресії, числом генів, що регулюються ензимом, не є насправді несподіваною. У різних геномних дослідженнях для численних факторів було виявлено набагато більше геномних сайтів зв'язування, ніж генів, що регулюються цими факторами. У разі з PARP-1 ця обставина може вказувати на те, що й інші чинники, включаючи представників надродина PARP (зокрема PARP-2) [1], відіграють додатковий регуляторний вплив на PARP-1-зв'язані промотори і маскують ефекти PARP-1 [8]. Альтернативним поясненням може бути й те, що PARP-1-залежна регуляція деяких промоторів може відбуватись лише в певних типах клітин або у відповідь на дію специфічних клітинних сигналів. Крім того, локалізація PARP-1 в активно транскрибованих промоторах може спостерігатись як наслідок певного епігенетичного транскрипційного процесу (наприклад, модифікації гістонів, розщеплення або окислення промоторної ДНК без залучення PARP-1 у ролі специфічного регулятора цих промоторів [113, 114]. У цьому разі PARP-1 може мати альтернативне значення в локалізованому у промоторах та спряженому із транскрипцією процесом репарації ДНК, відмінним від регуляції ініціації транскрипції [12, 81, 113, 114].

Останні дослідження з використанням різноманітних експериментальних підходів свідчать про щонайменше чотири важливих способи транскрипційної регуляції у відповідь на вплив біологічних, хімічних або фізичних стимулів, що реалізуються за участю PARP-1, в яких ензим виступає як: 1) модулятор структури хроматину через зв'язування з нуклеосомами, модифікацію гістонів та вплив на композицію хроматину, 2) енхансерзв'язувальний фактор, який функціонує у спосіб, подібний до дії класичних, специфічних за послідовністю ДНК-зв'язувальних активаторів або репресорів, 3) транскрипційний корегулятор, який функціонує подібно до класичних коактиваторів та корепресорів та 4) компонент транскрипційних інсуляторів.

PARP-1, структура хроматину та регуляція транскрипції. Достатньо добре відомо, що полі-ADP-рибозилування як регуляторний процес у ремоделюванні структури хроматину впливає на генну експресію, оскільки пострасляційні модифікації гістонів зумовлюють зміни доступності ДНК, і, тим самим, регулюють важливі клітинні процеси, включаючи репарацію та транскрипцію [3, 9, 115]. Зокрема, PARP-1 діє таким чином, щоб вида-

лити H1 із промоторів деяких контрольованих ензимом генів [109], імовірно, конкуруючи з H1 за зв'язування з нуклеосомами [80] або полі-ADP-рибозилуючи ці гістони [116]. Полі-ADP-рибозилування корових гістонів призводить до зниження щільності позитивних зарядів на «хвостових» ділянках гістонів та до локального розкривання структури хроматину, що є ознакою транскрипційно активних генів. З іншого боку, відомо, що вільні кінці гістонів тісніше взаємодіють з ДНК, забезпечуючи репресивний стан хроматину.

Більше того, під час естрогеніндукованої транскрипції гену супресії пухлин *TFF1* (Trefoil factor 1), PARP-1 не тільки сприяє видаленню H1, але й підвищує вміст HMGB1 (High-mobility group box 1), архітектурного протеїну у складі хроматину, який посилює транскрипцію генів [113]. Також PARP-1-залежне полі-ADP-рибозилування протоонкогенного фосфопроїну DEK, достатньо поширеного компонента хроматину, що впливає на його топологію, посилює вивільнення останнього із хроматину, сприяє формуванню Медіаторного корегуляторного комплексу та активує транскрипцію [117]. Було також показано, що взаємодія між PARP-1 та варіантом гістону H2A, масгоH2A, який містить велику С-кінцеву негістонову ділянку, названу «макро-доменом», може забезпечувати ще один спосіб геномної регуляції за участю ензиму [10, 118, 119]. Зв'язування PARP-1 із «негістоновим» доменом масгоH2A (сплайсингові варіанти 1.1 або 1.2) інгібує ензиматичну активність PARP-1 [119]. Опосередковане інтерферуючими РНК зниження рівня масгоH2A або PARP-1 блокує індуковану тепловим шоком експресію гену *HSP70.1* в клітинах HeLa [118], але сприяє реактивації експресії неактивного Х (Xi)-щепленого GFP (Green fluorescent protein)-трансгену у фібробластах мишачих ембріонів [119], що свідчить про функціональний зв'язок між PARP-1 та масгоH2A.

У дослідженнях як *in vivo*, так і *in vitro* показано, що полі-ADP-рибозилування є ензиматичним процесом, залученим до регулювання інших видів епігенетичної модифікації хроматину з важливими наслідками для активації або пригнічення певних хромосомних ділянок та генів. Зокрема, тісний функціональний зв'язок між PARP та SIRT1 (Silent information regulator 1), який є тваринним ортологом SIRT2, забезпечує формування гетерохроматину за участю NAD⁺-залежного деацетилювання гістонів [120]. Останні повідомлення вказують на те, що у разі фізіологічного або обмеженого

пошкодження ДНК процес деконденсації хроматину забезпечується синергічною дією двох чинників: помірною активацією PARP-1 (а також PARP-2) з локальним утворенням PAR та інгібуванням деацетилазної активності SIRT1 за дії вивільненого нікотинаміду, що підтримує високий рівень ацетилювання гістонів [121].

Відомо, що метилювання ДНК промоторних ділянок генів «домашнього господарства» призводить до їх сайленсингу. Додаткові епігенетичні події, такі як метилювання та ацетилювання гістонів, також відіграють роль в остаточній репресії генів під впливом метилювання ДНК [122]. Дані літератури свідчать про те, що процес полі-ADP-рибозилування може бути частиною механізму контролювання процесу метилювання ДНК, адже інгібування PARP призводить до гіперметилювання ДНК [123]. Останні дослідження вказують на здатність полі-ADP-рибозильованої PARP-1 нековалентно взаємодіяти з ДНК-метилтрансферазою-1 (Dnmt1) та блокувати її ензиматичну активність, тим самим запобігаючи метилюванню геномної ДНК [124]. Крім того, зміни активності PARG, через вплив на рівень полі-ADP-рибозильованої PARP-1, також можуть бути визначальними у контролюванні процесу метилювання. Тандемна взаємодія PARP-1 і Dnmt1 може впливати на деякі процеси функціонування ДНК, зокрема: експресію ключових генів «домашнього господарства», активацію та інактивацію генів у відповідь на різні стимули тощо [2, 123].

PARP-1 як енхансерзв'язувальний фактор. Перші дослідження, в яких було описано прямі ефекти PARP-1 на транскрипційну регуляцію генів-мішеней, зосереджувались на вивченні зв'язування PARP-1 зі специфічними послідовностями ДНК або структурами регуляторних ділянок генів, що дозволяють ензиму діяти як класичному енхансерзв'язувальному фактору [125–127]. Дійсно, пряме зв'язування PARP-1 зі шпильками може лежати в основі авторегуляторного механізму керування експресією власного гену *PARP-1* [128]. У нещодавніх дослідженнях було з'ясовано роль прямого зв'язування PARP-1 з ДНК у регулюванні двох генів-мішеней ензиму, таких як *CXCL1* [129] та *BCL6* [130]. PARP-1 зв'язується зі специфічними послідовностями безпосередньо перед промотором *CXCL1* та у першому інтроні *BCL6*, що призводить до репресії транскрипції. У разі з *CXCL1* зв'язування PARP-1 інгібує експресію через запобігання зв'язування NF-κB із суміжним елементом. Цей ефект стає оборотним внаслідок активації та

автомодифікації PARP-1, що спричинює зниження зв'язування PARP-1 із промотором [129]. Поширеність процесу зв'язування лігандів з енхансерами як способу транскрипційної регуляції вивчена недостатньо. З огляду на те, що детермінанти зв'язування PARP-1 з ДНК з'ясовані, біоінформаційні підходи можуть сприяти ідентифікації нових генних мішеней PARP-1, які підлягають цьому виду контролю.

Функція PARP-1 як специфічного корегулятора промотору. Встановлено, що PARP-1 може діяти як специфічний корегулятор промотору (як коактиватор, так і корепресор) для значної кількості різних специфічних за послідовністю ДНК-зв'язувальних транскрипційних регуляторів, таких як NF- κ B, активаторний протеїн-1 (AP-1), ядерні рецептори, HES1, B-Myb, Oct-1, HTLV Tax-1, Sp1, NFAT, Elk1 та ін. [8, 131–136]. Вважається, що зазвичай ДНК-зв'язувальний фактор залучає PARP-1 до зв'язування з відповідним промотором-мішенню. Ензиматична активність PARP-1 не є обов'язковою для прояву корегуляторної активності цього протеїну по відношенню до NF- κ B, B-Myb та HTLV Tax-1 [8, 131, 134]. У деяких випадках (HES1, Sp1, NFAT та Elk1) ДНК-зв'язувальний фактор або інші компоненти корегуляторного комплексу є мішенями для PARP-1-залежного полі-ADP-рибозилування [132, 135, 136].

Ключове питання стосовно корегуляторної активності PARP-1 полягає у з'ясуванні механізмів дії ензиму на транскрипційні комплекси, які збираються на промоторних мішенях. Низкою досліджень встановлено, що PARP-1 може діяти як специфічний до промотору «обмінний фактор», котрий сприяє вивільненню інгібіторних та мобілізації стимуляторних факторів під час реалізації транскрипційних відповідей, що регулюються сигналом [113, 132, 133]. Зокрема, було показано, що PARP-1 сприяє заміні TLE1 (Transducin-like Enhancer of Split 1) корепресорного комплексу на коактиваторний комплекс з HES1 (Hairy and Enhancer of Split 1), що містить ацетилтрансферазу гістонів (HAT), під час сигналзалежної активації у нейрональних клітинах [132]. Подібним чином PARP-1 може спричинювати заміну неактивного Cdk8-позитивного Медіатору на активний Cdk8-негативний Медіатор під час активації, яка регулюється ретиноевою кислотою [133].

Нещодавно було з'ясовано роль PARP-1 у регульованій естрогеном транскрипційній активації гену *TFF1* [113, 137, 138]. До активації промотор цього гену зв'язується PARP-1-

корепресорним комплексом, що містить корепресор NCoR (nuclear receptor corepressor) та гістонову деацетилазу HDAC3. За дії естрогену відбувається швидка заміна корепресорного комплексу на PARP-1-коактиваторний комплекс, який містить топоізомеразу П β (TopoII β), корегулятор ASC2 (activating signal co-integrator 2), протеїни репарації ДНК Ku86/70 та ДНК-ПК. Це зумовлює транз'єнтний TopoII β -залежний розрив промоторної ДНК поблизу зв'язувального сайту рецептора естрогену, що імовірно знімає топологічний бар'єр та забезпечує сприятливі структурні зміни у промоторі. Мобілізація PARP-1 коактиваторного комплексу також сприяє вивільненню гістону H1, залученню HMGB1/2, змінам в архітектурі хроматину та в кінцевому рахунку посиленню транскрипції гену [113, 137, 138]. Разом ці дослідження розкривають різноманітні механізми корегуляторної функції PARP-1, які імовірно варіюють у спосіб, залежний від специфіки гену та активатора.

PARP-1 як компонент транскрипційних інсуляторів. Інсулятори (або ізолятори) є елементами ДНК, які допомагають організувати геном у дискретні регуляторні одиниці для обмеження ефектів енхансерів на промотори або виконують бар'єрну функцію, запобігаючи розповсюдженню конденсованого хроматину (гетерохроматину) [139]. Інсулятори є сайтами зв'язування особливих інсуляторних протеїнів, зокрема CCCTC-зв'язувального фактора (CTCF). Встановлено залучення PARP-1-залежного полі-ADP-рибозилування CTCF у забезпечення доступу фактора до відповідних ділянок ДНК, тоді як інгібітор PARP 3-амінобензамід блокує інсуляторну функцію [140, 141]. Дія PARP-1 в інсуляторах може також реалізовуватись через асоціацію ензиму з ядерним матриксом та шляхом регулювання інтенсивності метилювання ДНК [139, 141]. Відзначимо, зокрема, що CTCF, PARP-1 та асоційовані з PARP-1 протеїни (нуклеофозмін, топоізомераза II, Ku, ДНК-ПК) об'єднані з компонентами ядерного матриксу [140, 142, 143]. Крім того, як вже зазначалось, PARP-1 через регулювання активності ДНК-метилтрансферази вірогідно впливає на метилювання ДНК, що може модулювати зв'язування CTCF з інсуляторами [144–146].

Хоча останнім часом і було з'ясовано деякі з молекулярних механізмів зазначених способів транскрипційної регуляції, уніфікована модель регуляції генної експресії за дії PARP-1 поки що не розроблена. Необхідні подальші дослідження з метою перевірки поширеності

цих типів регуляції, їх взаємодії та регулювання за участю клітинних сигнальних механізмів. Цікаво, що й інші представники родини PARP залучаються до транскрипційної регуляції – PARP-2, крім участі у мобілізації транскрипційних репресорів до сайтів ушкодження ДНК [107], також взаємодіє з тироїдним транскрипційним фактором-1 (TTF1) та регулює експресію сурфактантного протеїну В у легенях [147]. PARP-14/BAL2/CoaSt6 співактивує STAT6 (Signal Transducer and Activator of Transcription 6) у Т-лімфоцитах, оброблених ІЛ-4 [148]. Залишається не до кінця зрозумілим, наскільки необхідним є прояв ензиматичної активності PARP у реалізації цих процесів.

Роль PARP в реалізації клітинних функцій

Клітинний поділ. Субклітинна локалізація та асоціація ензимів родини PARP із центросомами, теломерами, центромерами та мікротрубочками свідчить про можливу фізіологічну роль полі-ADP-рибозилування у регулюванні процесу поділу клітин (рис. 4). Першим важливим свідченням стало виявлення PARP-1 та PARP-2 у центромерах, де вони взаємодіють із протеїнами кінетохора CENPA (Centromere protein A), CENPB та BUB3 (Budding uninhibited by benzimidazole) [149]. Присутність декількох видів PARP у кінетохорах забезпечує їхню здатність миттєво

переривати процес захоплення хромосом мікротрубочками та запобігати помилкам під час мітозу у відповідь на порушення цілісності ДНК та ушкодження хромосом. Цікаво, що миші з подвійним нокаутом (*Parp-1^{-/-} Parp-2^{-/-}*) не є життєздатними та гинуть на початковій стадії гастрюляції внаслідок численних ушкоджень ДНК та дефектів кінетохора [150].

Регулювання функції центросоми є ключовою ланкою в механізмі точної передачі хромосом дочірнім клітинам під час мітозу. Виявлені у центросомах PARP-1 та PARP-3 формують стабільний комплекс та полі-ADP-рибозилують протеїн p53, який також локалізований у центросомах та задіяний у процесі подвоєння центросоми [53, 74, 151, 152]. Хоча конкретне значення ензимів у цьому локусі на сьогодні залишається не до кінця зрозумілим, вони можуть сприяти інтегруванню системи відстеження ушкоджень ДНК із клітинними механізмами забезпечення точності мітотичного поділу. Цей зв'язок додатково підтверджується інгібуванням за дії полі-ADP-рибозилування хромосомної серинтреонінової кінази Аутога В у відповідь на ушкодження ДНК, а також взаємодією PARP-1 з BUBR1 – компонентом, що контролює утворення веретена поділу [7, 153]. Інактивація центросом під впливом PARP-1 може скласти частину мітотичної відповіді на ушкодження ДНК, що блокує розділення хромосом

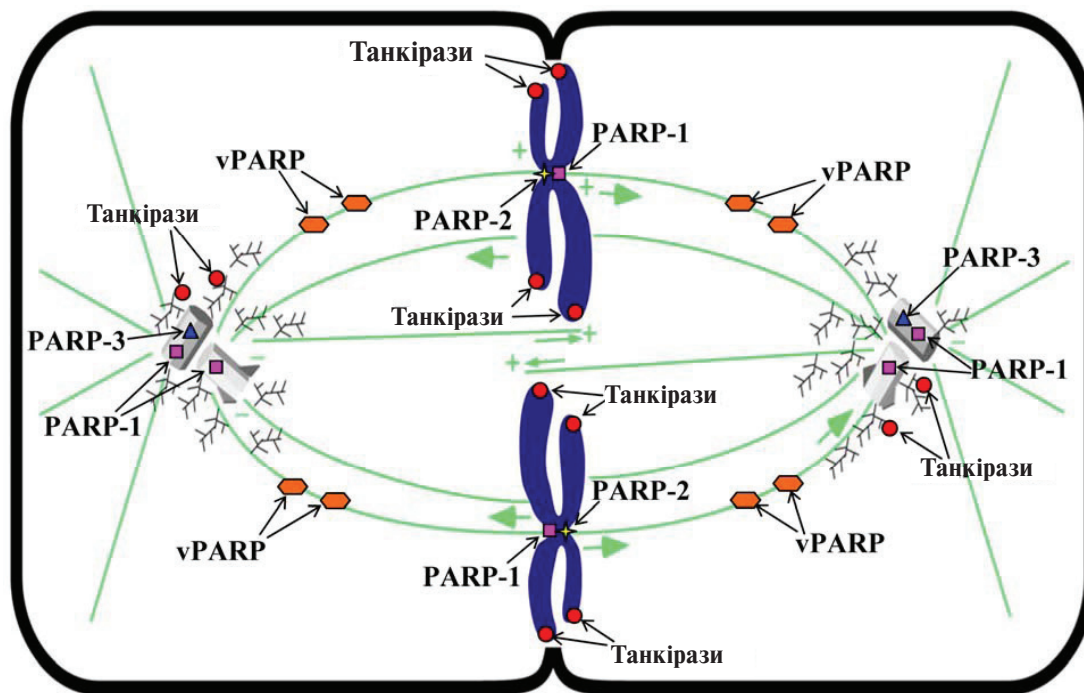


Рис. 4. Схема локалізації основних ізоформ PARP під час мітотичного поділу клітини (телофаза)

та запобігає проліферації клітин з геномною нестабільністю.

Останні дані стосовно асоціації PAR та PARG з мікротрубочками мітотичного веретена, полюсами веретена та кінетохором в яйцеклітинах *Xenopus laevis* підтверджують роль PAR у регулюванні організації мікротрубочок [7, 154]. Виявилось, що танкіраза-1 є ензимом, необхідним для полімеризації зв'язаної з протеїнами веретена полі-ADP-рибози [155]. Полі-ADP-рибозилувальна активність танкірази-1 важлива для точного формування та підтримання біполярності веретена, частково завдяки ковалентній модифікації протеїну полюсів веретена NuMA (Nuclear Mitotic Apparatus Protein), який зшиває кінці мікротрубочок на полюсах веретена. Полі-ADP-рибозилування NuMA танкіразою-1 також забезпечує координування розходження теломер сестринських хроматид під час мітозу [156].

Полі-ADP-рибозилування відіграє виняткову роль у регулюванні довжини теломерів та пов'язаних з цією довжиною обмежень на число клітинних поділів. Було показано, що надекспресія танкірази-1 у клітинних ядрах спричиняє подовження теломер. Передбачається, що танкіраза-1 регулює доступність теломерного комплексу для теломерази через модулювання TRF1 у ході полі-ADP-рибозилування [63].

Отже, наявність численних локусів для різних PARP під час мітозу переконливо свідчить про потенційну роль ензимів у підтриманні геномної стабільності та забезпеченні точності сегрегації хромосом під час поділу клітин, а також у регулюванні числа клітинних поділів.

Функціонування мітохондрій. У деяких дослідженнях повідомляється не лише про ядерну локалізацію PARP-1, але і мітохондріальну, де ензим, імовірно, регулює функції цих органел [157]. Нещодавно виявлено протеїн мітофілін, який забезпечує локалізацію PARP-1 у мітохондріях [158]. PARP-1 бере участь у підтриманні мітохондріального гомеостазу передусім шляхом епігенетичного регулювання генів, залучених у репарацію та транскрипцію мітохондріальної ДНК. Показано, що супресія PARP-1 негативно впливає на цілісність мітохондріальної ДНК, а також експресію таких компонентів дихального комплексу, як Cox (Cytochrome c oxidase subunit I)-1, Cox-2 та ND-2 (Nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase (ND) groups of genes), що кодуються мітохондріальною ДНК.

Крім того відомо, що PARP-1 локалізується в промоторах ядерних генів, продуктами яких є як протеїни репарації (UNG1, MYN1 та APE1), ДНК-лігаза III, так і транскрипційні фактори мітохондріальної ДНК, зокрема TFB1M (mitochondrial transcription factor B1) та TFB2M. Цікаво, що дефіцит TFB1M та пов'язане з ним порушення функції мітохондрій сприяє зниженню секреції інсуліну та підвищує ризик розвитку діабету 2-го типу [159]. Процес полі-ADP-рибозилування відіграє також важливу роль у забезпеченні ядерної експресії генів значених мітохондріальних протеїнів.

Нарешті, мітохондрії виявились задіяними у механізмі клітинної загибелі, асоційованому з надмірною активацією PARP-1 за різних патологічних станів. Зокрема, було встановлено, що за розвитку оксидативного стресу та енергетичного дефіциту полі-ADP-рибозилування протеїнів у мітохондріях спостерігається порушення функції мітохондрій кортикальних нейронів і фібробластів та індукує їхню загибель [160]. При цьому інгібування саме мітохондріальної PARP-1 та процесів полі-ADP-рибозилування сприяло підтриманню трансмембранного мітохондріального потенціалу та відновленню клітинного дихання, підвищенню синтезу АТФ та вмісту NAD^+ , запобігало вивільненню апоптозіндукуючого фактора та клітинній загибелі.

Деградація протеїнів. Протеасома є великим мультикаталітичним протеїновим комплексом, який існує в усіх еукаріотичних клітинах та відповідає за внутрішньоклітинний протеоліз. Процес протеасомного протеолізу забезпечує фізіологічну утилізацію регуляторних протеїнів з коротким періодом життя, а тому залучається у клітинну відповідь на різні види стресу (оксидативний, нітрозативний, стрес ендоплазматичного ретикулума тощо) [161]. Встановлено, що аутомодифікована PARP-1 здатна активувати протеасоми та сприяти селективній деградації оксидативно пошкоджених гістонів. Це підкреслює провідну роль PARP-1 як у видаленні окислених нуклеопротеїдів, так і у відновленні нативної структури хроматину, порушеної внаслідок оксидативного та нітрозативного стресів [162, 163].

Транспорт ендосомних везикул. Ендцитозні везикули в міоцитах та адипоцитах містять глюкозний транспортер GLUT4 та IRAP (Insulin-regulated aminopeptidase). Зворотна транслокація GLUT4 з цих везикул до цитоплазматичної мембрани за участю апарату

ту Гольджі знаходиться під контролем інсуліну та дозволяє гормону тонко регулювати процес утилізації глюкози [164]. Виявилось, що танкіраза-1 є важливою мішенню у сигналінгу інсуліну, адже вона є не лише протеїном, що взаємодіє з IRAP у GLUT4-вмісних везикулах в апараті Гольджі, але й стехіометрично фосфорилується за дії мітогенактивованої протеїнкінази (МАРК) внаслідок стимуляції інсуліном. Танкіраза-1 полі-ADP-рибозилує IRAP, а також саму себе. Зростання активності внаслідок фосфорилування, індукованого МАРК, вказує на те, що танкіраза-1 здатна опосередковувати тривалу регуляцію GLUT4-вмісних везикул за активації сигнального каскаду МАРК [62, 75].

Реалізація імунної відповіді. Результати досліджень, що ґрунтуються на застосуванні інгібіторів PARP-1, свідчать про залучення ензиму в реалізацію імунної відповіді. Відомо, що активація процесу полі-ADP-рибозилування протеїнів в моноцитах та макрофагах призводить до посилення експресії генів індукцибельної NO-синтази (iNOS), інтерлейкіну-6 (IL-6) та фактора некрозу пухлин α (TNF- α) [16, 165, 166]. Обробка макрофагів кісткового мозку ліпополісахаридом (LPS) індукує утворення NO, синтез якого блокується нікотинамідом, 3-амінобензамідом та 3-метоксибензамідом [167]. Більше того, інгібітори PARP попереджають індукцію iNOS у клітинах L929 за дії TNF- α [166]. Показано також, що миші, дефіцитні по PARP-1, виявились значною мірою захищеними проти токсичної дії LPS [168]. Крім того, у PARP-1^{-/-} тварин, яким вводили LPS, синтез iNOS не відбувався, пригнічувалось утворення оксиду азоту (II), TNF- α та інтерферону- γ (IFN- γ) [168]. Аналогічно було виявлено, що у дефіцитних за PARP-1 мишей не розвивається ендотоксичний шок [166]. Встановлено також, що важливою складовою механізму розвитку прозапальних процесів є вплив PARP-1 на біосинтез простагландинів через транскрипційну регуляцію експресії циклооксигенази-2 [169].

PARP-1 відіграє істотну роль у підтриманні балансу між прозапальними/ефекторними та протизапальними/регуляторними відповідями. Показано, що інгібування ензиматичної активності PARP-1 знижує секрецію прозапальних цитокінів та покращує стан організму при деяких експериментальних аутоімунних захворюваннях. При цьому інгібування PARP-1 впливає на диференціацію Т-клітин, сприяючи перетворенню простих (naïv) Т-клітин CD4⁺ у регуляторні Т-клітини [170].

Існують переконливі докази функціонального зв'язку між PARP-1 та ядерним фактором (NF)- κ B, що пояснюють залучення ензиму в реалізацію імунної відповіді [33, 131, 171]. Показано, що інгібування PARP-1 порушує функціонування NF- κ B як транскрипційного фактора в експресії гену iNOS, а також встановлено, що NF- κ B та PARP-1 здатні формувати стійкий імунопреципітаційний комплекс [172]. Як відомо, до родини ядерних факторів NF- κ B належать 5 протеїнів, які можуть утворювати гетеро- та гомодимери в різних комбінаціях. Найпоширенішою з них є гетеродимер p50/p65. Транскрипційний фактор NF- κ B важливий для реалізації багатьох процесів [173], включаючи репарацію ДНК та імунну відповідь. Численні агенти, такі як TNF- α , мітогени, форболові ефіри, іонізуюча радіація та ультрафіолет сприяють активації цього фактора [174]. NF- κ B також є важливим чинником у запобіганні індукції апоптозу, що свідчить про його залучення у механізм онкогенезу [175].

В імунній відповіді NF- κ B регулює експресію TNF- α , iNOS, інтерлейкінів IL-1 β , IL-2, IL-6 та IL-8, а також молекул адгезії ICAM-1 та E-селектину [176]. Дефіцитні за PARP-1 миші виявились захищеними від запального пошкодження, яке пов'язане з посиленою транскрипцією деяких прозапальних генів, що знаходяться під контролем NF- κ B (iNOS та MIP2 (запальний протеїн макрофагів-2), але не IkBa (інгібітор NF- κ B- α або IL-6) [131, 171]. У дослідженнях на нокаутів за геном PARP-1 мишах продемонстровано неспроможність імунних клітин індукувати експресію NF- κ B після внесення TNF- α [177]. При цьому було встановлено, що у клітинах PARP-1^{-/-} транслокація NF- κ B до ядра нічим не відрізняється від норми, що свідчить про контролювання активності NF- κ B, яке має місце після транслокації фактора до ядра і в якому саме PARP-1 відіграє ключову роль [166]. Природа цього контролю не є остаточно зрозумілою, хоча зазначається його здатність зв'язуватись з вигинами ДНК, подібно до тих, які індукуються в NF- κ B-енхансосоми за дії протеїну HMG I(Y) [178]. Припускають, що PARP-1 могла б зв'язуватись з HMG I(Y) і, таким чином, впливати на конформацію транскрипційного комплексу. Останні дослідження продемонстрували ацетилювання PARP-1 *in vivo* після того, як клітини піддавались дії прозапальних стимулів. Крім того, було виявлено ацетилювання *in vitro* гістоновими ацетилтрансфера-

зами p300 та CREB-зв'язувальним протеїном (CBP), що сприяло асоціації PARP-1 з NF-κB та синергічній коактивації NF-κB за дії p300 та Медіаторного комплексу [171]. Таким чином, наведені дані свідчать про безпосередню участь PARP-1 як кофактора активації NF-κB у контролюванні імунної відповіді, що здійснюється, імовірно, завдяки прямій взаємодії із транскрипційним фактором в ядрі.

Останнім часом встановлено, що PARP-1 бере участь у забезпеченні молекулярних механізмів імунної відповіді через регуляцію активності ще одного важливого транскрипційного фактора – активаторного протеїну-1 (AP-1) [179]. Комплексний (димерний) транскрипційний фактор AP-1, складовими якого є протеїни Jun (c-Jun, JunB та JunD) та Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 та Fra-2), вважається одним із ключових регуляторів клітинних функцій, таких як проліферація, диференціація, міграція, клітинна трансформація, апоптоз. PARP-1-опосередкована активація та наступне зв'язування димерів AP-1 зі специфічними нуклеотидними послідовностями ДНК може індукувати експресію генів IL-2, IL-3, фактора стимуляції колонії гранулоцитів-макрофагів, IL-4, IL-5, IL-13, IFN-γ, TNF-α, CD40L, FasL, CD5, Igκ, CD25, а також хемокінів IL-8 та MIP1α [180]. Біосинтез переважної більшості цих цитокінів та хемокінів є важливою складовою механізму запального процесу. Більше того, на сьогодні продемонстровано можливість перехресного спряження між NF-κB та AP-1, яке приводить до синергічного підвищення транскрипційної активності як NF-κB, так і AP-1. Численні агенти, які спричинюють інгібування NF-κB, також інгібують і AP-1, що є додатковим свідченням взаємозв'язку між цими родинними транскрипційних факторів, який може реалізовуватись як на рівні протеїн-протеїнових взаємодій, так і опосередковано через сигнальні шляхи [181]. Активація обох факторів за деяких захворювань може зумовлювати набагато вираженіше запалення, ніж за дії кожного з них окремо. У низці робіт показано, що зниження експресії прозапальних медіаторів у разі інгібування активності PARP або у нокаутних за геном PARP-1 тварин чітко корелює зі зниженням транскрипційної активності AP-1 та NF-κB [182, 183].

Забезпечення виживання та реалізації програми загибелі клітин. Поява розривів ДНК у клітинах вищих еукаріот активує сигнальні шляхи, які спричиняють затримку клітинного циклу та включення механізмів репарації, що

сприяє в кінцевому рахунку виживанню клітин або запуску програми загибелі залежно від ступеня ушкодження геному та ефективності репаративних процесів. Як вже зазначалось, один із центральних механізмів, який забезпечує підтримання цілісності геному, полягає у дуже швидкій модифікації гістонів та інших ядерних протеїнів полімерами ADP-рибози, утворення яких каталізується полі(ADP-рибозо)полімеразами [1–3]. З іншого боку, надмірна ензиматична активність PARP-1, індукована високою кількістю розривів ДНК, робить PARP-1 фактором ризику подальшої деградації геному клітини в ході клітинної загибелі. Завдяки цьому еволюційно виробився механізм інактивації PARP-1 шляхом її розщеплення каспазою, який обмежує непотрібну репарацію ДНК під час апоптозу та сприяє збереженню клітинного пулу NAD⁺ та АТФ [184]. Специфічне розщеплення PARP-1 за дії каспази-3 у NLS-ділянці ензиму давно відоме як один із маркерів апоптозу.

Зовсім інша послідовність подій має місце під час розвитку гострих патофізіологічних процесів, таких як некроз або незалежна від каспаз загибель клітин (хроматиноліз або некроптоз), за яких PARP-1 виконує ефекторну роль. Некротичний механізм загибелі клітин, що супроводжується надмірною активацією PARP-1 та незворотним критичним зниженням вмісту субстрату цього ензиму – NAD⁺, був вперше запропонований більше двох десятиліть тому [185]. Цей механізм відіграє важливу роль у розвитку великої кількості патофізіологічних станів, включаючи ушкодження при ішемії–реперфузії та численні запальні процеси [6, 16].

Останнім часом одержано докази того, що PARP-1 залучається до механізмів загибелі клітин опосередковано, через вивільнення мітохондріального проапоптичного протеїну – фактора, що індукує апоптоз (Apoptosis-inducing factor, AIF) [186]. Встановлено, що AIF є флавопротеїном, який міститься в міжмембранному просторі мітохондрій нормальних клітин. За індукції клітинної загибелі різними апоптогенними чинниками, AIF разом з ендонуклеазою G транслокується до ядра, де індукує конденсацію хроматину і утворення фрагментів ДНК великих розмірів (близько 50 тис. пар нуклеотидів), що сприяє надактивації PARP-1. Внаслідок цього реалізується активний каспазанезалежний некротичний шлях загибелі клітин, який на сьогодні визначають як некроптоз (запрограмований некроз) [187, 188]. AIF також запускає

процес вивільнення мітохондріального цитохрому *c* та індукує активність каспази. Однак каспаза не є ключовим фактором, оскільки інгібування її активності не усуває AIF-залежну загибель клітин, тоді як антитіла, які нейтралізують AIF, виявились надзвичайно ефективними [189]. Більше того, надекспресія Bcl-2, одного з найпотужніших ідентифікованих на даний час антиапоптичних протеїнів, затримувала, однак не запобігала розвитку PARP-1-опосередкованого некроптозу [190]. Разом з тим, залишається нерозв'язаним ключове питання щодо природи сигналу, який безпосередньо надходить із клітинних ядер до мітохондрій та запускає вивільнення AIF. Передбачається, що такими сигнальними молекулами могли б бути вільні полімери ADP-рибози. Цей тип клітинної загибелі, пов'язаний з надмірною активацією PARP-1 та зниженням пулу NAD⁺, також може частково залежати від супутнього зниження деацетилазної активності SIRT1, зумовленого дефіцитом субстрату та високим рівнем утвореного нікотинаміду [191]. Це, у свою чергу, спричиняє гіперацетилювання проапоптичних факторів, зокрема p53, що посилює клітинну загибель [192].

Очевидно, що активація PARP-1 має два протилежних наслідки для клітин залежно від типу та ступеня ушкодження ДНК. Якщо в клітинах, особливо під час реплікації, мають місце обмежені ушкодження ДНК та помірна активація PARP-1, то остання забезпечує ефективну репарацію і сприяє виживанню клітин. Реалізація шляху апоптозу спостерігається за вираженішого генотоксичного стресу після активації p53, хоча молекулярні детермінанти, які переключають шляхи репарації ДНК та затримки клітинного циклу на шлях апоптозу ще не до кінця зрозумілі [36]. За індукування апоптозу, PARP-1 та PARP-2 як фактори виживання, розщеплюються каспазами і у такий спосіб інактивуються. У постмітотичних клітинах активні форми кисню, ушкоджуючи ДНК, активують PARP та запускають транслокацію AIF до ядра. Подальша фрагментація ДНК сприяє надмірній активації PARP-1, спричинює конденсацію хроматину ядра та індукує клітинну загибель [99, 187, 188]. Розуміння механізму переключення цих процесів за участю PARP могло б сприяти здійсненню направленої регуляції їх та, у кінцевому рахунку, розробці фармакологічних підходів для підвищення як протипухлинної активності препаратів, так і для терапії різних запальних та нейродегенеративних захворювань.

Роль PARP-1 в інтеграції клітинних сигнальних шляхів

За біологічною дією PARP належать до тих важливих молекул, які знаходяться на перехресті метаболічних та сигнальних шляхів, а тому їх функціонування може відігравати критичну роль у клітині за різних фізіологічних та патологічних умов. Зокрема, численні внутрішньоклітинні сигнальні шляхи конвергують на PARP-1-залежних транскрипційних процесах, регулювання яких позначається на клітинних функціях. Сигнальними посередниками є месенджерні молекули (стероїдні гормони та гормонально-активні похідні вітамінів) [113, 133], фактори теплового шоку [118] та внутрішньоклітинні кінази (CaM кіназа Пδ, ERK2 та JNK1) [132, 136]. Завершальним етапом клітинного сигналіну може бути посттрансляційна модифікація PARP-1 шляхом автополі-ADP-рибозилування [136], ацетилювання [171] або фосфорилування [191, 192], що змінює активність PARP-1 з геноспецифічними або іншими регуляторними наслідками для клітини.

Результати експериментальних досліджень свідчать про наявність альтернативних (прямо не пов'язаних з пошкодженнями ДНК) внутрішньоклітинних механізмів регуляції активності PARP. Продемонстровано здатність протеїнкінази С фосфорилувати PARP-1 в системах *in vitro* [193]. Інгібування активності PARP-1, опосередковане фосфорилуванням протеїнкіназою С і виявлене на інтактних тимоцитах, може бути механізмом цитопротекторних ефектів активаторів РКС [194]. Також продемонстровано сигналзалежний механізм активації ензиматичної активності PARP-1, який не опосередковується зв'язуванням з ДНК [136]. Зв'язування ERK2 з PARP-1 значно стимулює ензиматичну активність останньої і, як результат, посилює автополі-ADP-рибозилування PARP-1. Активація PARP-1 сприяє ERK2-залежному фосфорилуванню ДНК-зв'язувального транскрипційного фактора Elk1, що призводить до посилення ацетилювання гістонів та експресії гену-мішені [136]. Пряме фосфорилування PARP-1 за дії ERK1/2 також може підвищувати активність PARP-1, однак при цьому не виявлено змін транскрипції [191]. Важливим є встановлення механізмів, за допомогою яких промотор-локалізовані ефекти сигналіну можуть сприяти залежній від окиснення ДНК активації PARP-1 у промоторах [114]. Зумовлене естрогеном деметилювання гістонів за дії LSD1 в гені *BCL-2* та утворення H₂O₂, спричинює

окислення у промоторній ДНК, індукуючи мобілізацію компонентів апарату ексцизійної репарації (зокрема OGG1) та ТороII β [114], що імовірно сприяє залученню та активації PARP-1. Механізм нагадує розглянуту вище естрогеніндуковану мобілізацію ТороII β до промотору гену *TFF1* [113]. Однак не було встановлено, чи передбачає такий механізм залучення також і PARP-1.

Численні регуляторні впливи PARP-1 на клітинні процеси (експресія генів, поділ клітин, диференціювання та апоптоз) можуть опосередковуватись мітогенактивованими протеїнкіназами (МАР-кіназами), які відповідають на позаклітинні стимули (мітогени) та залучені в роботу багатьох неядерних протеїнів – продуктів онкогенів [195]. Було показано, що оксидативний стрес спричинює залежну від ASK-1 (кіназа 1, що регулює апоптичний сигнал) активацію с-Jun N-термінальної кінази JNK (належить до однієї з гілок МАР кіназ) [196], а також виявлено здатність інгібіторів PARP-1 пригнічувати активацію JNK [197, 198]. Схожі механізми були описані за індукції активності PARP-1 метилуючим агентом N-метил-N'-нітро-нітрозоганідином (MNNG). Встановлено, що активація PARP-1 через RIP1 (Receptor-interacting protein 1) та, асоційований з рецептором фактора некрозу пухлин, фактор 2 (TRAF2, Tumor necrosis factor receptor-associated factor 2) активує JNK і такий механізм виявився відповідальним за мітохондріальну дисфункцію та індукцію клітинної загибелі в умовах цих експериментів [199].

Механізм загибелі пухлинних клітин, індукованої TNF- α , також включає PARP-1-опосередковану активацію JNK1, яка обумовлює деполаризацію мітохондрій, вивільнення цитохрому *c* та підвищення активності каспази-9 [200]. Крім того було показано, що JNK1 може активувати PARP-1 шляхом протеїн-протеїнових взаємодій та фосфорилування [192]. Інгібування PARP-1 здатне знижувати спричинену оксидативним стресом активацію JNK1 та p38 мітогенактивованої протеїнкінази, а також попереджає загибель клітин за різних патологічних умов. Це вказує на важливу роль опосередкованої PARP-1 активації JNK1 у клітинній загибелі за низки захворювань [8, 197, 198, 201]. І хоча розглянуті факти вказують на роль PARP-1 у регулюванні JNK, все ще залишається нез'ясованим механізм, за яким сигнал від ядерного ензиму передається в цитоплазму та модулює активність JNK та p38 МАР-кіназ.

Один із важливих аспектів участі PARP-1 у сигнальній регуляції клітинних функцій пов'язаний з ефектами ензиму на процеси транскрипційної регуляції та передбачає залучення МАР-кіназ. Зокрема, показано, що PARP-1 як *in vivo*, так і *in vitro* регулює фактор транскрипції – активаторний протеїн-1, який відіграє важливу роль у регулюванні проліферації клітин та апоптозу [202]. Індукція с-Jun та його N-кінцеве фосфорилування за залишками серину 63 та 73 під впливом Jun N-термінальної кінази/стрес-активованої протеїнкінази (JNK/SAPK) посилює апоптоз нейронів [203]. Показано, що інгібітори PARP можуть регулювати активність ензиму та шляху JNK/AP-1 і, таким чином, пригнічувати індукований ДНК-метилуючими агентами апоптоз клітин. Зокрема, встановлено, що нікотинамід блокує індукований N-метил-N'-нітрозосечовиною апоптоз фоторецепторних клітин щурів через інгібування активності PARP та шляху JNK/AP-1 [204].

Відомо, що активність МАР-кіназ регулюється їх фосфорилуванням протеїнкіназами та дефосфорилуванням за участю членів родини фосфатаз МАР-кіназ (МКР) [195]. Показано, що інгібування в умовах оксидативного стресу активності PARP-1 призводить до зниження активності мітогенактивованих протеїнкіназ, зокрема за рахунок підвищення експресії та цитоплазматичної локалізації МКР-1. Отже, встановлено важливу роль посилення експресії МКР-1 в опосередкованні захисних ефектів за інгібування PARP-1 [205].

Участь NAD⁺ у PARP-опосередкованих клітинних процесах, імовірно, є тією об'єднуючою ланкою, яка забезпечує функціонування клітини як цілісної системи. Регулювання синтезу ядерного NAD⁺ та катаболізм PAR репрезентують додаткові можливості контролю генної регуляції, залежного від PARP-1. Як відомо, утворення NAD⁺ у клітинному ядрі здійснюється ядерною NAD-синтазою (нікотинамідмононуклеотид-аденілілтрансферазою-1, NMNAT-1), а деградація PAR головним чином опосередковується полі(ADP-рибозо)глікогідролазою [8, 37]. NMNAT-1 не лише каталізує утворення NAD⁺, який використовується в реакціях полі-ADP-рибозилування, але й активує PARP-1 та зв'язується з PAR, регулюючи, таким чином, PARP-1-залежні процеси [206]. Процес катаболізму полімерів PAR за дії PARG є надзвичайно швидким і закінчується утворенням мономерів ADP-рибози (ADPR). Це може сприяти: 1) інгібуванню залежних від полі-

ADP-рибозилування процесів, 2) повторно-му проходженню PAR-залежних процесів для підтримання тривалої регуляції або 3) утворенню вторинного месенджера – мономерної аденозин дифосфатрибози (ADPR), яка може мати сигнальні функції в клітинному ядрі [8, 131]. Зокрема, недавно було показано, що ADPR є лігандом макромолекули mG2A1.1, але не 1.2 сплайс-варіанта [207], що може мати значення у хроматинзалежному ядерному сигналінгу, хоча функціональні наслідки такої дії не встановлено. Крім того, високий рівень ADPR індукує відкриття TRPM2 кальцієвих каналів та надходження Ca^{2+} [208]. Вважається, що формування комплексу репарації ДНК та утворення вторинного месенджера ADPR є паралельними механізмами, за якими активована PARP-1 сигналізує про наявність та ступінь оксидативно-нітрозативного стресу в клітині.

Регуляція розподілу клітинного пулу NAD^+ між двома головними його споживачами – SIRT1 та PARP-1, а також їхній взаємний вплив, мають важливе функціональне значення. На ембріональних фібробластах, ізольованих із SIRT1-дефіцитних (*Sirt1*^{-/-}) мишей, було показано посилену активацію PARP-1 у відповідь на ушкодження ДНК, що спричиняло AIF-залежну клітинну загибель [209]. Аналогічно активація SIRT1 за дії ресвератролу, який підвищував гістон-деацетилюючу активність SIRT1, значно знижувала активність PARP-1 [210]. Результати узгоджуються з відомими фактами про те, що посилене споживання NAD^+ у процесі репарації ДНК, поряд з інгібуванням деацетилазної активності SIRT1, сприяє кращій доступності хроматину. Крім того, унікальна роль SIRT1 у NAD^+ -залежному деацетилюванні протеїнів передбачає його функціонування як сенсора енергетичного стану клітин, або редокс-сенсора, який поєднує енергетичний метаболізм із транскрипційною регуляцією [121]. Інші компоненти, наприклад згадувана вище NMNAT-1, яка залучається до «рятівного» шляху біосинтезу NAD^+ , та PARG також можуть забезпечувати локальне тонке регулювання та неперервність сигналінгу PAR в сайтах транскрипційної активності або репарації ушкоджень ДНК.

PARP у патогенезі та терапії захворювань

Запальні процеси та нейродегенеративні захворювання. На трьох лініях дефіцитних по PARP-1 мишей, створених за допомогою гомологічної рекомбінації, було цілковито підтверджено захисну функцію цього ензиму в клітинах ссавців, що піддаються впли-

ву різних генотоксинів, які прямо чи опосередковано спричиняють ушкодження ДНК [168, 211]. Несподіваним стало те, що стратегія створення нокаутних тварин сприяла виявленню участі PARP-1 у механізмах клітинної загибелі, обумовлених численними гострими та хронічними запальними процесами [166].

Як відомо, хронічні запальні процеси є надзвичайно поширеними в різних популяціях людей. Крім того, патогенез ракових та навіть метаболічних захворювань, зокрема діабету, атеросклерозу, остеопорозу тощо, обов'язково має запальну складову. З'явилась достатня кількість доказів, які підтверджують залучення PARP-1 до запальної відповіді щонайменше на двох різних рівнях: 1) через згадувану вище коактивацію NF- κ B та AP-1, що сприяє посиленому утворенню медіаторів запалення [2, 33, 171]; 2) через підвищення чутливості клітин (особливо ендотеліальних) до дії вільних радикалів, що утворюються під час запалення та порушують цілісність ДНК [176]. Внаслідок активації PARP-1 може відбуватись індукція каспазанезалежної загибелі клітин, що потребує вивільнення з мітохондрій флавопротеїну AIF [186–188]. Оскільки каспази не залучені у цьому процесі, то PARP-1 (а також PARP-2) залишаються інтактними та активуються за дії фрагментованої ДНК, що зумовлює масоване утворення PAR, істотне зниження внутрішньоклітинного вмісту NAD^+ та АТФ та, зрештою, спричинює загибель клітини. Важлива роль PARP-1 розвитку гострих та хронічних запальних процесів підтверджується також резистентністю тварин, яким вводили інгібітори PARP, до різних форм запалення [115, 16], стрептозотоциніндукованого діабету [212] та септичного шоку, зумовленого ліпополісахаридом [166, 167].

Було показано, що схожа надмірна активація PARP та пов'язане з цим вивільнення AIF, відіграє ключову роль у клітинній загибелі нейронів [213] та міокардіоцитів за гострої ішемії та наступної реперфузії [214]. Натомість фенантридіоновий інгібітор PARP PJ34 здатен запобігати розвитку дисфункцій ендотелію за експериментального цукрового діабету і зменшувати нейрональний некроз на моделі ішемії мозку в мишей та щурів [215]. Аналогічна закономірність спостерігається у дефіцитних по PARP-1 та PARP-2 тварин [216]. З іншого боку, акумулювання PAR у центральній нервовій системі мутантів *Drosophila melanogaster* з неактивним геном, що кодує ензим деградації PAR – полі(ADP-рибозо)глікогідролазу, супроводжувалось

прогресуючою нейродегенерацією, зниженням локомоторної активності та скороченням тривалості життя [217]. В цілому, розглянуті факти вказують на те, що PARP може бути потенційною терапевтичною мішенню за комплексного лікування зазначених захворювань. Фармакологічні дослідження підтверджують терапевтичну ефективність різних класів інгібіторів PARP на моделях запалення, нейродегенеративних, судинних захворювань та є основою їх клінічних випробувань [6, 15].

Діабет. Відомо, що інсулінзалежний цукровий діабет розвивається внаслідок руйнування острівцевих β -клітин підшлункової залози. Сучасний погляд на захворювання полягає в тому, що загибель інсулінпродукуючих клітин спричинюється запальною автоімунною реакцією. Введення тваринам стрептозотоцину (STZ) або алоксану також зумовлює масовану загибель β -клітин підшлункової залози [218], індукуючи розвиток цукрового діабету. Враховуючи структурну схожість STZ з нітрозосечовиною, не є дивним, що ця сполука також індукує швидке виснаження пулу NAD^+ в острівцевих клітинах, яке може бути попереджене введенням нікотинаміду або 3-амінобензаміду [212]. Інгібування PARP-1, спричинене цими сполуками, гальмує подальший розвиток цукрового діабету так само як це відбувається у тварин, нокаутних за PARP-1 [211]. Слід, однак, наголосити на тому, що хоча діабет і не розвивається у тварин внаслідок захисту острівцевих клітин від руйнування за інгібування надмірно активованої PARP-1, але негативним наслідком такого інгубування є висока частота утворення β -клітинних пухлин панкреатичних острівців [219].

Хронічна гіперглікемія є основним патогенетичним чинником при цукровому діабеті, що обумовлює утворення активних форм кисню, активацію iNOS, продукування NO з наступним утворенням пероксинітриду та високореактивних гідроксильних радикалів, які, у свою чергу, спричинюють інтенсивне пошкодження ДНК у клітинах-мішенях. Надмірне утворення пероксинітриду (ONOO^-) внаслідок гіперглікемії в ряді клітин і тканин організму при діабеті (незалежно від його типу) зумовлює низку патологічних змін: стимуляцію пероксидного окислення ліпідів, окисну модифікацію протеїнів, ушкодження ДНК тощо [18]. У відповідь на порушення цілісності ДНК за дії активних форм кисню та ONOO^- активується PARP-1, а оскільки цукровий діабет характеризується хронічною гіперглікемією, то і ушкодження ДНК бу-

дуть тривалими, що врешті-решт призводить до енергетичного виснаження клітин, індукції апоптозу або некрозу. Описаний розвиток ушкоджень отримав експериментальне підтвердження, однак роль PARP-1 за цієї патології виявилась набагато складнішою і різноманітнішою.

Так, було показано, що ензим гліколізу гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа (GAPDH (E.C. 1.2.1.12)) транслокується в ядро у разі появи ранніх апоптичних сигналів, та у зворотному напрямі, коли такі сигнали зникають [220]. В ядрі GAPDH може полі-ADP-рибозилуватися, втрачаючи при цьому свою ензиматичну активність [221]. Пригнічення активності GAPDH, поряд із високим вмістом глюкози у клітині, призводить до накопичення проміжних продуктів катаболізму глюкози в гліколітичному шляху її розщеплення до стадії утворення гліцеральдегіду-3-фосфату. Як наслідок активуються альтернативні шляхи, зокрема поліоловий та гексозамінний шляхи катаболізму глюкози, накопичуються попередники і продукти неензиматичного глікозилування протеїнів, активується РКС, що в кінцевому рахунку, посилює патологічні зміни при цукровому діабеті [222]. Виявлена здатність PARP-1 активувати фактор NF- κ B незалежним від ензиматичної активності ензиму шляхом також посилює розвиток запальних процесів у тканинах організму, навіть за відсутності ушкоджень ДНК.

Розглянуті процеси лежать в основі патогенезу діабетичних ускладнень (кардіоміопатії, нефропатії, нейропатії та ретинопатії) і пов'язані з надактивацією PARP. Дослідження виявили істотне зростання вмісту полі-ADP-рибозильованих протеїнів у сідничному нерві, дорсальних спинно-мозкових гангліях, спинному мозку, нирках і сітківці ока тварин при експериментальній діабетичній нейропатії (за 1-го і 2-го типів діабету) [222–224]. Показано також підвищення активності PARP в ізольованих клітинних ядрах головного мозку при STZ-індукованому діабеті [225]. Свідченням важливої ролі оксидативно-нітрозативного стресу та надактивації PARP у розвитку діабетичних ускладнень є те, що індукована гіперглікемією активація ізоформ РКС, гексозамінового шляху та утворення кінцевих продуктів глікування ефективно блокується інгібуванням PARP та/або у разі введення сполук, що гальмують утворення NO [223, 224, 226].

Інгібітори PARP у терапії раку. Дослідження, проведені з використанням гомо-

зиготних *PARP-1*^{-/-}-нокаутних мишей показали, що репарація ушкодженої ДНК у клітинах відбувається зі значним запізненням, що, у свою чергу, призводить до зростання рівня гомологічних рекомбінацій, обміну між сестринськими хроматидами та супроводжується виникненням мутацій і втратою генів ампліфікації [88, 227]. Оскільки інгібування ензиму фармакологічними препаратами також здатне спричиняти аналогічну нестабільність геному, такий підхід почав знаходити практичне застосування для лікування ракових захворювань. Розробка 3-заміщених похідних бензамідів як інгібіторів *PARP-1* в 1980-х роках виявила виняткову цитотоксичність їх у проліферуючих клітинах, які піддавались дії генотоксичних агентів [228]. Це узгоджується з раніше одержаними даними, що *PARP-1* запобігає рекомбінації ДНК, стимульованої генотоксичними сполуками. Встановлено, що інгібітори *PARP* як у культурі ракових клітин людини, так і у ксенотрансплантатах у мишей посилюють антипроліферативну активність ДНК-метилуючого агента темозоломід, іонізуючої радіації, інгібіторів топоізомерази-1 (топотекану та іринотекану) [229]. Комбінована терапія інгібіторами *PARP* та темозоломідом знаходиться на етапі клінічних випробувань.

Застосування інгібіторів *PARP* продемонструвало надзвичайну ефективність їх у селективній дії на злоякісні клітини, які є дефіцитними по супресорах пухлин *BRCA1* або *BRCA2*. Ці супресорні протеїни кодуються генами, мутації в яких найпоширеніші в осіб із сімейним раком молочної залози та які залучені в гомологічну рекомбінацію [228, 230, 231]. Запропонований механізм передбачає, що однострункові розриви, які накопичуються внаслідок інгібування *PARP* конвертуються у двострункові розриви під час реплікації ДНК, але вони не можуть бути надалі репаровані через неефективність шляху гомологічної рекомбінації. Саме це і призводить до загибелі канцерогенної клітини. Несподіваним стало те, що інгібування *PARP* здатне істотно підвищувати чутливість дефіцитних по *BRCA2* неракових клітин, що дозволяє розглядати інгібітори *PARP* як ефективні профілактичні засоби для осіб, які є гетерозиготними за геном *BRCA2* [231, 232]. Наведені дослідження підтвердили перспективність застосування інгібіторів *PARP* як сполук із протипухлинною активністю у хіміо- та радіотерапії.

Слід також зазначити, що роль *PARP-1* у клітинній трансформації може здійснюватись через регулювання транскрипційних факторів *Elk1* і *c-fos*, які є потенційними онкогенами.

Як вже зазначалось, стимульоване факторами росту кортикальних нейронів і кардіоміоцитів фосфорилування *PARP-1* *ERK1-2* призводить до *ERK1-2*-залежного фосфорилування та активації *Elk1*, що, у свою чергу, індукуює транскрипцію фактора *c-fos* [233].

Інгібування *PARP-1* вірогідно пояснює цитотоксичні ефекти протиракових препаратів, оскільки аналогічний хіміосенсибілізуючий ефект спостерігається в клітинах, нокаутних за *Parp-1*. Однак залишається не до кінця зрозумілим, до якої міри інгібування інших представників родини *PARP* може відповідати за клітинні ефекти препаратів з огляду на відсутність специфічних інгібіторів для різних представників родини *PARP*. Крім того, недостатньо дослідженою є роль інших ензимів надродини *PARP* в онкогенезі. Так, відомо, що *PARP-10* є партнером протоонкогенного протеїну *c-Myc* – ключовим регулятором транскрипції в умовах проліферації клітини – в їх взаємодії [72]. Цей ензим є потужним інгібітором злоякісного перетворення клітини за дії онкопротеїну *HA-Ras* на *c-Myc*, причому такі його властивості не потребують полі-ADP-рибозилуючої активності [72, 73]. З іншого боку, показано, що танкіраза 2, наприклад, є пухлинним антигеном, а у В-лімфоцитарних лімфомах (*DLB-CL*) виявлено значну надекспресію *PARP-9/BAL1* [68, 9, 234].

Таким чином полі(ADP-рибозо) полімераза-1 – найпоширеніший ядерний ензим, який завдяки своїм біохімічним властивостям є унікальним регулятором функціонально важливих процесів у клітинах. Дані, наведені в огляді, формують уявлення про *PARP-1* як фактор, який бере участь у підтриманні цілісності та стабільності геному. *PARP-1* одним із перших розпізнає ушкодження ДНК і тому є ідеальним завдяки тому, що він керує запуском механізму репарації ДНК у живих клітинах за місцем ушкодження ДНК. Через прямі протеїн-протеїнові взаємодії в асоціатах або полі-ADP-рибозилування протеїнових партнерів, у тому числі в складі комплексів, які містять функціонально важливі ядерні транскрипційні фактори, *PARP-1* модулює структуру хроматину та регулює метаболізм ДНК. Як виявилось, взаємодії з цими протеїновими партнерами, обумовлюючи локалізацію та ефекти *PARP-1* у генній регуляції, далеко не завжди потребують прояву ензиматичної активності *PARP*. Наявність численних локусів зв'язування для різних представників надродини *PARP* під час мітозу переконливо свідчить про

потенційну роль цих ензимів у підтриманні геномної стабільності та забезпеченні точності сегрегації хромосом під час поділу клітин через здійснення контролю за проходженням різних стадій клітинного циклу.

Процес полі-ADP-рибозилування на сьогодні уявляється як ключова посттрансляційна модифікація протеїнів, здатна регулювати не лише фізіологічні процеси, пов'язані з підтриманням цілісності ДНК, транскрипцією генів та клітинним поділом, але й впливати на рівновагу між виживанням та загибеллю клітин за різних патофізіологічних умов. Переважна більшість досліджень щодо фізіологічної ролі PARP-1 та PARP-2 у реалізації клітинних функцій, засвідчують унікальну властивість цих ензимів у детекції порушень цілісності та у репарації ушкоджень ДНК, що забезпечує здійснення програми клітинного виживання. На противагу цьому виявилось, що у разі клітинної відповіді, за якої AIF та ендонуклеаза G мігрують із мітохондрій до клітинного ядра, реалізується протилежна функція PARP-1 та PARP-2, а саме вони беруть активну участь у клітинній загибелі.

Механізм, що дозволяє відрізнити «фізіологічне» залучення PAR у репарацію та транскрипційну регуляцію від його унікальної здатності в разі значного ушкодження ДНК здійснювати вибір між виживанням клітини або запуском програми клітинної загибелі, може обумовлюватись, найімовірніше, наявністю певного порога полі-ADP-рибозилування (рівня накопичення полі-ADP-рибози), досягнення якого сприяє переключенню клітинних процесів на шлях індукованої AIF загибелі. Оскільки AIF є ключовим ефектором опосередкованої PARP-1 та PARP-2 клітинної загибелі, AIF та зазначені ензими можуть бути новими терапевтичними мішенями для лікування захворювань, які супроводжуються запальними процесами. При цьому інгібітори PARP можуть використовуватись як для запобігання розвитку запалення та надмірної загибелі клітин за деяких захворювань, так і для посилення геномної нестабільності у ракових клітинах, зокрема у разі їх сумісного застосування із протипухлинними препаратами.

Інше ключове досягнення в біології PARP полягає у з'ясуванні епігенетичної ролі маркування протеїнів шляхом полі-ADP-рибозилування. Ця ковалентна модифікація гістонів представниками родини PARP привносить ще більшу складність у розуміння реалі-

зації гістонового коду, який використовується багатоклітинними організмами для регулювання зворотних конформаційних змін хроматину. В останніх ґрунтовних дослідженнях з'ясувалося, що в контексті нормальної клітинної фізіології асоціація PAR із хроматином не вимагає традиційно обов'язкової наявності розривів ДНК. Особливі структури ДНК, такі як шпильки, хрестоподібні структури та пухирці, які можуть утворюватись у промоторах, також є потенційними тригерами активації PARP-1. Крім того встановлено, що різні посттрансляційні модифікації PARP-1 також є індукторами активації ензиму. У свою чергу ще залишається з'ясувати, яким чином різноманітність субклітинної локалізації нових представників родини PARP, а також тригерів їх активації та мішеней, пояснює здатність клітини під час формування одного і того самого гомополімеру полі-ADP-рибози диференціювати сигнали, які регулюють численні кінцеві біологічні відповіді.

РОЛЬ PARP И ПРОЦЕССОВ ПОЛИ-ADP-РИБОЗИЛИРОВАНИЯ ПРОТЕИНОВ В РЕГУЛИРОВАНИИ КЛЕТОЧНЫХ ФУНКЦИЙ

*В. Р. Дрель¹, И. А. Шиманский²,
Н. А. Сибирная¹, Н. Н. Великий²*

¹Львовский национальный университет имени Ивана Франко, Украина;

²Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;

e-mail: drelvictor@gmail.com; ishymanisk@inbox.ru

В обзоре рассмотрена биологическая роль энзимов, вовлеченных в посттрансляционную модификацию протеинов путем их поли-ADP-рибозилирования. Детально проанализированы структурная организация и основные функции поли(ADP-рибозо)полимеразы-1 (PARP-1) и изоформ поли(ADP-рибоза)полимераз в биологических системах. Изложены современные взгляды на роль энзимов семейства PARP и процессов поли-ADP-рибозилирования протеинов в ремоделировании структуры хроматина, репарации поврежденных ДНК, регуляции экспрессии генов, интеграции клеточных сигнальных путей. Значительное внимание уделено участию PARP в реализации клеточных функций, в частности в делении клеток, внутриклеточном транспорте макромолекул, протеасомной деградации протеинов, реализации иммунного ответа, запрограммированной клеточной гибели (некроп-

тоз) и т.п. Обобщены результаты исследований роли PARP-1 в развитии некоторых патологий и применения различных классов ингибиторов PARP-1 как терапевтических средств.

Ключевые слова: поли(ADP-рибозо) полимеразы, поли-ADP-рибозилирование, репарация ДНК, регуляция транскрипции, клеточное сигнализирование, деление клеток, программа клеточной гибели, ингибиторы PARP.

ROLE OF PARP AND PROTEIN POLY-ADP-RIBOSYLATION PROCESS IN REGULATION OF CELL FUNCTIONS

V. R. Drel', I. O. Shymanskyi²,
N. O. Sybirna¹, M. M. Veliky²

¹Ivan Franko National University of Lviv, Ukraine;

²Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: drelvictor@gmail.com; ishymansk@inbox.ru

Summary

This review focuses on the biological role of enzymes involved in posttranslational modification of proteins by their poly-ADP-ribosylation, a NAD-consuming process with an emerging key role in providing fundamental cell functions. To this end, detailed analysis of structural organization in relation to basic functions of the poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1), the founding member of the PARP family, and other poly(ADP-ribose) polymerase isoforms is presented here. These include the current views on the role of PARP family enzymes and processes of poly-ADP-ribosylation of proteins in chromatin structure remodeling, DNA damage repair, regulation of gene expression, and integration of cellular signaling pathways. Considerable attention is paid to the involvement of PARP in cellular functions, particularly in cell division, intracellular transport of macromolecules, proteasomal protein degradation, immune response and caspase-independent necrotic pathways defined as necroptosis (programmed necrosis). In the light of the remarkable successes that have been reported for treating inflammatory disorders and cancer with different classes of PARPs inhibitors, we discuss the prospects of targeting PARPs with therapeutic purposes.

Key words: poly(ADP-ribose)polymerases, poly-ADP-ribosylation, DNA damage repair, transcriptional regulation, cell signaling, programmed cell death, PARP inhibitors.

1. Amé J. C., Spenlehauer C., de Murcia G. // *Bioessays*. — 2004. — **26**, N 8. — P. 882–893.
2. Hassa P. O., Hottiger M. O. // *Front. Biosci.* — 2008. — **13**. — P. 3046–3082.
3. Krishnakumar R., Kraus W. L. // *Mol. Cell.* — 2010. — **39**, N 1. — P. 8–24.
4. Hottiger M. O., Hassa P. O., Lüscher B. et al. // *Biochem. Sci.* — 2010. — **35**, N 4. — P. 208–219.
5. Mangerich A., Bürkle A. // *Int. J. Cancer.* — 2011. — **128**, N 2. — P. 251–265.
6. Sodhi R. K., Singh N., Jaggi A. S. // *Vascul. Pharmacol.* — 2010. — **53**, N 3–4. — P. 77–87.
7. Schreiber V., Dantzer F., Ame J. C., de Murcia G. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* — 2006. — **7**, N 7. — P. 517–528.
8. Kim M. Y., Zhang T., Kraus W. L. // *Genes Dev.* — 2005. — **19**, N 17. — P. 1951–1967.
9. Wacker D. A., Frizzell K. M., Zhang T., Kraus W. L. // *Subcell. Biochem.* — 2007. — **41**. — P. 45–69.
10. Timinszky G., Till S., Hassa P. O. et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2009. — **16**, N 9. — P. 923–929.
11. Droit A., Hunter J. M., Rouleau M. et al. // *BMC Bioinformatics.* — 2007. — **8**. — P. 483–498.
12. Malanga M., Althaus F. R. // *Biochem. Cell. Biol.* — 2005. — **83**. — P. 354–364.
13. Heitz F., Harter P., Ewald-Riegler N. et al. // *Expert. Rev. Anticancer. Ther.* — 2010. — **10**, N 7. — P. 1125–1136.
14. Kondo K., Obitsu S., Ohta S. et al. // *J. Biol. Chem.* — 2010. — **285**, N 17. — P. 13079–13091.
15. Peralta-Leal A., Rodriguez-Vargas J. M., Aguilar-Quesada R. et al. // *Free Radic. Biol. Med.* — 2009. — **47**, N 1. — P. 13–26.
16. Giansanti V., Dona F., Tillhon M., Scovassi A. I. // *Biochem. Pharmacol.* — 2010. — **80**, N 12. — P. 1869–1877.
17. Chaitanya G. V., Steven A. J., Babu P. P. // *Cell Commun. Signal.* — 2010. — **8**. — P. 31–41.
18. Negi G., Kumar A., Sharma S. S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2010. — **391**, N 1. — P. 102–106.
19. Besson V. C. // *Br. J. Pharmacol.* — 2009. — **157**, N 5. — P. 695–704.
20. Boehler C., Gauthier L. R., Mortusewicz O. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2011. — **108**, N 7. — P. 2783–2788.
21. Citarelli M., Teotia S., Lamb R. S. // *BMC Evol. Biol.* — 2010. — **10**. — P. 308–334.
22. Чаговец Р. В., Шушевич С. И., Халмуродов А. Г. // *Укр. біохім. журн.* — 1975. — **47**, № 5. — С. 635–648.
23. D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I., Poirier G. G. // *Biochem. J.* — 1999. — **342**, Pt 2. — P. 249–268.

24. Ogata N., Ueda K., Hayaishi O. // J. Biol. Chem. – 1980. – **255**, N 16. – P. 7610–7615.
25. Alvarez-Gonzalez R., Jacobson M. K. // Biochemistry. – 1987. – **26**, N 11. – P. 3218–3224.
26. Bogan K. L., Brenner C. // Annu. Rev. Nutr. – 2008. – **28**. – P. 115–130.
27. Cervantes-Laurean D., Jacobson E. L., Jacobson M. K. // J. Biol. Chem. – 1996. – **271**, N 18. – P. 10461–10469.
28. Altmeyer M., Messner S., Hassa P. O. et al. // Nucleic Acids Res. – 2009. – **37**, N 11. – P. 3723–3738.
29. Adamietz P., Rudolph A. // J. Biol. Chem. – 1984. – **259**, N 11. – P. 6841–6846.
30. Bártová E., Krejch J., Harnicarová A. et al. // J. Histochem. Cytochem. – 2008. – **56**, N 8. – P. 711–721.
31. Scovassi A. I., Mariani C., Negroni M. et al. // Exp. Cell Res. – 1993. – **206**, N 1. – P. 177–181.
32. Ruscetti T., Lehnert B. E., Halbrook J. et al. // J. Biol. Chem. – 1998. – **273**, N 23. – P. 14461–14467.
33. Aldinucci A., Gerlini G., Fossati S. et al. // J. Immunol. – 2007. – **179**, N 1. – P. 305–312.
34. Mendoza-Alvarez H., Alvarez-Gonzalez R. // J. Biol. Chem. – 1993. – **268**, N 30. – P. 22575–22580.
35. Rouleau M., Aubin R. A., Poirier G. G. // J. Cell Sci. – 2004. – **117**, Pt 6. – P. 815–825.
36. Whitacre C.M., Hashimoto H., Tsai M. L. et al. // Cancer Res. – 1995. – **55**, N 17. – P. 3697–3701.
37. Bonicalzi M. E., Haince J. F., Droit A., Poirier G. G. // Cell Mol. Life Sci. – 2005. – **62**, N 7–8. – P. 739–750.
38. Blenn C., Wyrsh P., Althaus F. R. // Molecules. – 2011. – **16**, N 2. – P. 1854–1877.
39. Oka J., Ueda K., Hayaishi O. // J. Biol. Chem. – 1984. – **259**, N 2. – P. 986–995.
40. Meyer-Ficca M. L., Meyer R. G., Coyle D. L. et al. // Exp. Cell Res. – 2004. – **297**, N 2. – P. 521–532.
41. Fahrner J., Kranaster R., Altmeyer M. et al. // Nucleic Acids Res. – 2007. – **35**, N 21. – e143.
42. Pleschke J. M., Kleczkowska H. E., Strohm M., Althaus F. R. // J. Biol. Chem. – 2000. – **275**, N 52. – P. 40974–40980.
43. Davidovic L., Vodenicharov M. D., Affar E. B., Poirier G. G. // Exp. Cell Res. – 2001. – **268**, N 1. – P. 7–13.
44. Bernet D., Pinto R. M., Costas M. J. et al. // Biochem. J. – 1994. – **299**, Pt 3. – P. 679–682.
45. Shen B. W., Perraud A. L., Scharenberg A., Stoddard B. L. // J. Mol. Biol. – 2003. – **332**, N 2. – P. 385–398.
46. Oka S., Kato J., Moss J. // J. Biol. Chem. – 2006. – **281**, N 2. – P. 705–713.
47. Petrucco S. // Nucleic Acids Res. – 2003. – **31**, N 23. – P. 6689–6699.
48. Kaufmann S. H., Desnoyers S., Ottaviano Y., et al. // Cancer Res. – 1993. – **53**, N 17. – P. 3976–3985.
49. Tao Z., Gao P., Liu H. W. // J. Am. Chem. Soc. – 2009. – **131**, N 40. – P. 14258–14260.
50. Buki K. G., Bauer P. I., Hakam A., Kun E. // J. Biol. Chem. – 1995. – **270**, N 7. – P. 3370–3377.
51. Ruf A., Mennissier de Murcia J., de Murcia G., Schulz G. E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. – **93**, N 15. – P. 7481–7485.
52. Сенько Л. Н., Великий Н. Н. // Усп. совр. биол. – 1991. – **111**, № 4. – С. 560–576.
53. Augustin A., Spenlehauer C., Dumond H. et al. // J. Cell Sci. – 2003. – **116**, Pt 8. – P. 1551–1562.
54. Schreiber V., Ame J.C., Dolle P. et al. // J. Biol. Chem. – 2002. – **277**, N 25. – P. 23028–23036.
55. Oliver A. W., Ame J. C., Roe S. M. et al. // Nucleic Acids Res. – 2004. – **32**, N 2. – P. 456–464.
56. Poirier G. G., de Murcia G., Jongstra-Bilen J. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1982. – **79**, N 11. – P. 3423–3427.
57. Aravind L., Koonin E. V. // Trends Biochem. Sci. – 2000. – **25**, N 3. – P. 112–114.
58. Dantzer F., Giraud-Panis M.J., Jaco I. et al. // Mol. Cell Biol. – 2004. – **24**, N 4. – P. 1595–1607.
59. De Rycker M., Venkatesan R. N., Wei C., Price C. M. // Biochem. J. – 2003. – **372**. – P. 87–96.
60. Smith S., Giriat I., Schmitt A., de Lange T. // Science. – 1998. – **282**, N 5393. – P. 1484–1487.
61. Hsiao S. J., Smith S. // Biochimie. – 2008. – **90**, N 1. – P. 83–92.
62. Chi N. W., Lodish H. F. // J. Biol. Chem. – 2000. – **275**, N 49. – P. 38437–38444.
63. Cook B. D., Dynek J. N., Chang W. et al. // Mol. Cell Biol. – 2002. – **22**, N 1. – P. 332–342.
64. Ma Q., Baldwin K. T., Renzelli A. J. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2001. – **289**, N 2. – P. 499–506.
65. Gao G., Guo X., Goff S. P. // Science. – 2002. – **297**, N 5587. – P. 1703–1706.
66. Ladurner A. G. // Mol. Cell. – 2003. – **12**, N 1. – P. 1–3.

67. Goenka S., Boothby M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2006. — **103**, N 11. — P. 4210–4215.
68. Aguiar R. C., Yakushijin Y., Kharbanda S., Salgia et al. // Blood. — 2000. — **96**, N 13. — P. 4328–4334.
69. Kickhoefer V. A., Siva A. C., Kedersha N. L. et al. // J. Cell Biol. — 1999. — **146**, N 5. — P. 917–928.
70. Liu Y., Snow B. E., Kickhoefer V. A. et al. // Mol. Cell Biol. — 2004. — **24**, N 12. — P. 5314–5323.
71. Raval-Fernandes S., Kickhoefer V. A., Kitchen C., Rome L. H. // Cancer Res. — 2005. — **65**, N 19. — P. 8846–8852.
72. Yu M., Schreek S., Cerni C. et al. // Oncogene. — 2005. — **24**, N 12. — P. 1982–1993.
73. Chou H. Y., Chou H. T., Lee S. C. // J. Biol. Chem. — 2006. — **281**, N 22. — P. 15201–15207.
74. Kanai M., Tong W. M., Sugihara E. et al. // Mol. Cell Biol. — 2003. — **23**, N 7. — P. 2451–2462.
75. Sbodio J. I., Lodish H. F., Chi N. W. // Biochem. J. — 2002. — **361**, Pt 3. — P. 451–459.
76. Bouchard V. J., Rouleau M., Poirier G. G. // Exp. Hematol. — 2003. — **31**, N 6. — P. 446–454.
77. Skalizky D. J., Marakovits J. T., Maegley K. A. et al. // J. Med. Chem. — 2003. — **46**, N 2. — P. 210–213.
78. Langelier M. F., Servent K. M., Rogers E. E., Pascal J. M. // J. Biol. Chem. — 2008. — **283**, N 7. — P. 4105–4114.
79. Althaus F. R., Höfferer L., Kleczkowska H. E., et al. // Mol. Cell Biochem. — 1994. — **138**, N 1–2. — P. 53–59.
80. Kim M. Y., Mauro S., Gevry N. et al. // Cell. — 2004. — **119**, N 6. — P. 803–814.
81. Heale J. T., Ball A. R. Jr., Schmiesing J. A., et al. // Mol. Cell. — 2006. — **21**, N 6. — P. 837–848.
82. Okano S., Lan L., Caldecott K. W. et al. // Mol. Cell Biol. — 2003. — **23**, N 11. — P. 3974–3981.
83. Caldecott K. W. // DNA Repair (Amst). — 2003. — **2**, N 9. — P. 955–969.
84. Marsin S., Vidal A. E., Sossou M. et al. // J. Biol. Chem. — 2003. — **278**, N 45. — P. 44068–44074.
85. Tainer J. A. // Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. — 2001. — **68**. — P. 299–304.
86. Masson M., Niedergang C., Schreiber V. et al. // Mol. Cell Biol. — 1998. — **18**, N 6. — P. 3563–3571.
87. Ström C. E., Johansson F., Uhlén M. et al. // Nucleic Acids Res. — 2011. — **39**, N 8. — P. 3166–3175.
88. de Murcia J. M., Niedergang C., Trucco C. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1997. — **94**, N 14. — P. 7303–7307.
89. Sukhanova M. V., Khodyreva S. N., Lebedeva N. A. et al. // Nucleic Acids Res. — 2005. — **33**, N 4. — P. 1222–1229.
90. Dantzer F., de la Rubia G., Menissier-De Murcia J. et al. // Biochemistry. — 2000. — **39**, N 25. — P. 7559–7569.
91. Sukhanova M., Khodyreva S., Lavrik O. // Mutat. Res. — 2010. — **685**, N 1–2. — P. 80–89.
92. Lavrik O. I., Prasad R., Sobol R. W. et al. // J. Biol. Chem. — 2001. — **276**, N 27. — P. 25541–25548.
93. Prasad R., Lavrik O. I., Kim S. J. et al. // J. Biol. Chem. — 2001. — **276**, N 35. — P. 32411–32414.
94. Leppard J. B., Dong Z., Mackey Z. B., Tomkinson A. E. // Mol. Cell Biol. — 2003. — **23**, N 16. — P. 5919–5927.
95. Pion E., Bombarda E., Stiegler P. et al. // Biochemistry. — 2003. — **42**, N 42. — P. 12409–12417.
96. Malanga M., Althaus F. R. // J. Biol. Chem. — 2004. — **279**, N 7. — P. 5244–5248.
97. Ménissier-de Murcia J., Mark M., Wendling O., et al. // Mol. Cell Biol. — 2001. — **21**, N 5. — P. 1828–1832.
98. Espejel S., Klatt P., Ménissier-de Murcia J., et al. // J. Cell Biol. — 2004. — **167**, N 4. — P. 627–638.
99. Huber A., Bai P., de Murcia J. M., de Murcia G. // DNA Repair (Amst). — 2004. — **3**, N 8–9. — P. 1103–1108.
100. Shrivastav M., De Haro L. P., Nickoloff J. A. // Cell Res. — 2008. — **18**, N 1. — P. 134–147.
101. Wang M., Wu W., Wu W. et al. // Nucleic Acids Res. — 2006. — **34**, N 21. — P. 6170–6182.
102. Goodarzi A. A., Noon A. T., Deckbar D. et al. // Mol. Cell. — 2008. — **31**, N 2. — P. 167–177.
103. Rogakou E. P., Pilch D. R., Orr A. H. et al. // J. Biol. Chem. — 1998. — **273**, N 110. — P. 5858–5868.
104. Bakkenist C. J., Kastan M. B. // Nature. — 2003. — **421**, N 6922. — P. 499–506.
105. Redon C. E., Nakamura A. J., Zhang Y. W. et al. // Clin. Cancer Res. — 2010. — **16**, N 18. — P. 4532–4542.
106. Slattery E., Dignam J. D., Matsui T., Roeder R. G. // J. Biol. Chem. — 1983. — **258**, N 9. — P. 5955–5959.
107. Chou D. M., Adamson B., Dephoure N. E. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2010. — **107**, N 43. — P. 18475–18480.
108. Denslow S. A., Wade P. A. // Oncogene. — 2007. — **26**, N 37. — P. 5433–5438.
109. Krishnakumar R., Gamble M. J., Frizzel K. M. et al. // Science. — 2008. — **319**, N 5864. — P. 819–821.

110. *Ogino H., Nozaki T., Gunji A. et al.* // BMC Genomics. – 2007. – **8**. – P. 41.
111. *Simbulan-Rosenthal C. M., Ly D. H., Rosenthal D. S. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – **97**, N 21. – P. 11274–11279.
112. *Zingarelli B., Hake P. W., O'Connor M. et al.* // Mol. Med. – 2003. – **9**, N 5–8. – P. 143–153.
113. *Ju B. G., Lunyak V. V., Perissi V. et al.* // Science. – 2006. – **312**, N 5781. – P. 1798–1802.
114. *Perillo B., Ombra M. N., Bertoni A. et al.* // Ibid. – 2008. – 319, N 5860. – P. 202–206.
115. *Aguilar-Quesada R., Mucoz-Gámez J.A., Martín-Oliva D. et al.* // Curr. Med. Chem. – 2007. – **14**, N 11. – P. 1179–1187.
116. *Huletsky A., de Murcia G., Muller S. et al.* // J. Biol. Chem. – 1989. – **264**, N 15. – P. 8878–8886.
117. *Gamble M. J., Fisher P. P.* // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2007. – **14**, N 6. – P. 548–555.
118. *Ouararhni K., Hadj-Slimane R., Ait-Si-Ali S. et al.* // Genes Dev. – 2006. – **20**, N 23. – P. 3324–3336.
119. *Nusinow D. A., Hernandez-Munoz I., Fazzio T. G. et al.* // J. Biol. Chem. – 2007. – **282**, N 17. – P. 12851–12859.
120. *El Ramy R., Magroun N., Messadecq N. et al.* // Cell Mol. Life Sci. – 2009. – **66**, N 19. – P. 3219–3234.
121. *Zhang T., Kraus W. L.* // Biochim. Biophys. Acta. – 2010. – **1804**, N 8. – P. 1666–1675.
122. *Fuks F., Burgers W. A., Brehm A. et al.* // Eur. Mol. Biol. Organ. J. – 2001. – **20**, N 10. – P. 2536–2544.
123. *Zardo G., Reale A., De Matteis G. et al.* // Biochem. Cell Biol. – 2003. – **81**, N 3. – P. 197–208.
124. *Caiafa P., Guastafierro T., Zampieri M.* // FASEB J. – 2009. – **23**, N 3. – P. 672–678.
125. *Huang K., Tidyman W. E., Le K. U. et al.* // Biochemistry. – 2004. – **43**, N 1. – P. 217–223.
126. *Nirodi C., NagDas S., Gygi S. P. et al.* // J. Biol. Chem. – 2001. – **276**, N 12. – P. 9366–9374.
127. *Zhang Z., Hildebrandt E. F., Simbulan-Rosenthal C. M., Anderson M. G.* // Virology. – 2002. – **296**, N 1. – P. 107–116.
128. *Soldatenkov V. A., Chasovskikh S., Potaman V. N. et al.* // J. Biol. Chem. – 2002. – **277**, N 1. – P. 665–670.
129. *Amiri K. I., Ha H. C., Smulson M. E., Richmond A.* // Oncogene. – 2006. – **25**, N 59. – P. 7714–7722.
130. *Ambrose H. E., Papadopoulou V., Beswick R. W., Wagner S. D.* // Ibid. – 2007. – **26**, N 42. – P. 6244–6252.
131. *Kraus W. L., Lis J.* // Cell. – 2003. – **113**, N 6. – P. 677–683.
132. *Ju B. G., Solum D., Song E. J. et al.* // Ibid. – 2004. – **119**, N 6. – P. 815–829.
133. *Pavri R., Lewis B., Kim T. K. et al.* // Mol. Cell. – 2005. – **18**, N 1. – P. 83–96.
134. *Hassa P. O., Hottiger M. O.* // Cell Mol. Life Sci. – 2002. – **59**, N 9. – P. 1534–1553.
135. *Olabisi O. A., Soto-Nieves N., Nieves E. et al.* // Mol. Cell Biol. – 2008. – **28**, N 9. – P. 2860–2871.
136. *Cohen-Armon M., Visochek L., Rozensal D. et al.* // Mol. Cell. – 2007. – **25**, N 2. – P. 297–308.
137. *Ju B. G., Rosenfeld M. G.* // Cell Cycle. – 2006. – **5**, N 22. – P. 2557–2560.
138. *Lis J. T., Kraus W. L.* // Cell. – 2006. – **125**, N 7. – P. 1225–1227.
139. *Wallace J. A., Felsenfeld G.* // Curr. Opin. Genet. Dev. – 2007. – **17**, N 5. – P. 400–407.
140. *Yusufzai T. M., Tagami H., Nakatani Y., Felsenfeld G.* // Mol. Cell. – 2004. – **13**, N 2. – P. 291–298.
141. *Klenova E., Ohlsson R.* // Cell Cycle. – 2005. – **4**, N 1. – P. 96–101.
142. *Yusufzai T. M., Felsenfeld G.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – **101**, N 23. – P. 8620–8624.
143. *Vidakovic M., Koester M., Goetze S. et al.* // J. Cell Biochem. – 2005. – **96**, N 3. – P. 555–568.
144. *Althaus F. R.* // Oncogene. – 2005. – **24**, N 1. – P. 11–12.
145. *Reale A., Matteis G. D., Galleazzi G. et al.* // Ibid. – P. 13–19.
146. *Bell A.C., Felsenfeld G.* // Nature. – 2000. – **405**, N 6785. – P. 482–485.
147. *Maeda Y., Hunter T. C., Loudy D. E. et al.* // J. Biol. Chem. – 2006. – **281**, N 14. – P. 9600–9606.
148. *Mehrotra P., Riley J. P., Patel R. et al.* // Ibid. – 2011. – **286**, N 3. – P. 1767–1776.
149. *Saxena A., Saffery R., Wong L. H. et al.* // Ibid. – 2002. – **277**, N 30. – P. 26921–26926.
150. *Menissier de Murcia J., Ricoul M. et al.* // Embo J. – 2003. – **22**, N 9. – P. 2255–2263.
151. *Boehler C., Gauthier L. R., Mortusewicz O. et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2011. – **108**, N 7. – P. 2783–2788.
152. *Tarapore P., Tokuyama Y., Horn H. F., Fukasawa K.* // Oncogene. – 2001. – **20**, N 47. – P. 6851–6863.
153. *Fang Y., Liu T., Wang X. et al.* // Ibid. – 2006. – **25**, N 25. – P. 3598–3605.
154. *Chang P., Jacobson M. K., Mitchison T. J.* // Nature. – 2004. – **432**, N 7017. – P. 645–649.
155. *Smith S., de Lange T.* // J. Cell Sci. – 1999. – **112**, Pt 21. – P. 3649–3656.

156. *Sbodio J. I., Chi N. W.* // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**, N 35. – P. 31887–31892.
157. *Lapucci A., Pittelli M., Rapizzi E. et al.* // *Mol. Pharmacol.* – 2011. – **79**, N 6. – P. 932–940.
158. *Rossi M.N., Carbone M., Mostocotto C. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2009. – **284**, N 46. – P. 31616–31624.
159. *Koeck T., Olsson A. H., Nitert M. D. et al.* // *Cell Metab.* – 2011. – **13**, N 1. – P. 80–91.
160. *Du L., Zhang X., Han Y. Y. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**, N 20. – P. 18426–18433.
161. *Coux O., Tanaka K., Goldberg A. L.* // *Annu. Rev. Biochem.* – 1996. – **65**. – P. 801–847.
162. *Arnold J., Grune T.* // *Bioessays.* – 2002. – **24**, N 11. – P. 1060–1065.
163. *O’Connel B. C., Harper J. W.* // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2007. – **19**, N 2. – P. 206–214.
164. *Martinez-Arca S., Lalioti V. S., Sandoval I. V.* // *J. Cell Sci.* – 2000. – **113**, Pt 10. – P. 1705–1715.
165. *Olszanecki R., Gebaska A., Jawień J., et al.* // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2006. – **57**, N 1. – P. 109–117.
166. *Oliver F.J., Menissier-de Murcia J., Nacci C. et al.* // *EMBO J.* – 1999. – **18**, N. 16. – P. 4446–4454.
167. *Hauschildt S., Scheipers P., Bessler W. G.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1991. – **179**, N 2. – P. 865–871.
168. *Zerfaoui M., Naura A. S., Errami Y. et al.* // *J. Leukoc. Biol.* – 2009. – **86**, N 6. – P. 1385–1392.
169. *Lin Y., Tang X., Zhu Y. et al.* // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2011. – **505**, N 1. – P. 123–129.
170. *Laudisi F., Sambucci M., Pioli C.* // *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets.* – 2011. – (ahead of print)
171. *Hassa P. O., Haenni S. S., Buerki C. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2005. – **280**, N 49. – P. 40450–40464.
172. *Chang W. J., Alvarez-Gonzalez R.* // *Ibid.* – 2001. – **276**, N 50. – P. 47664–47670.
173. *Zheng C., Yin Q., Wu H.* // *Cell Res.* – 2011. – **21**, N 1. – P. 183–195.
174. *Carlsen H., Alexander G., Austenaa L. M. et al.* // *Mutat. Res.* – 2004. – **551**, N 1–2. – P. 199–211.
175. *Li Y., Xing D., Chen Q., Chen W. R.* // *Int. J. Cancer.* – 2010. – **127**, N 2. – P. 462–473.
176. *Wullaert A., Bonnet M. C., Pasparakis M.* // *Cell Res.* – 2011. – **21**, N 1. – P. 146–158.
177. *Hassa P. O., Buerki C., Lombardi C. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278**, N 46. – P. 45145–45153.
178. *Zhang X. M., Verdine G. L.* // *Ibid.* – 1999. – **274**, N 29. – P. 20235–20243.
179. *Aguilar-Quesada R., Mucoz-Gámez J.A., Martín-Oliva D. et al.* // *Curr. Med. Chem.* – 2007. – **14**, N 11. – P. 1179–1187.
180. *Zenz R., Eferl R., Scheinecker C. et al.* // *Arthritis Res. Ther.* – 2008. – **10**, N 1. – P. 201.
181. *Cooper S. J., Bowden G. T.* // *Curr. Cancer Drug Targets.* – 2007. – **7**, N4. – P. 325–334.
182. *García S., Bodaco A., Pablos J. L. et al.* // *Ann. Rheum. Dis.* – 2008. – **67**, N 5. – P. 631–637.
183. *Zingarelli B., O’Connor M., Hake P. W.* // *Eur. J. Pharmacol.* – 2003. – **469**, N 1–3. – P. 183–194.
184. *Chaitanya G. V., Steven A. J., Babu P. P.* // *Cell Commun. Signal.* – 2010. – **8**. – P. 31–41.
185. *Berger N. A.* // *Radiat. Res.* – 1985. – **101**, N 1. – P. 4–15.
186. *Heitz F., Harter P., Ewald-Riegler N.* // *Expert. Rev. Anticancer Ther.* – 2010. – **10**, N 7. – P. 1125–1136.
187. *Wang Y., Kim N.S., Haince J. F. et al.* // *Sci. Signal.* – 2011. – **4**, N 167. – P. 20.
188. *Delavallée L., Cabon L., Galán-Malo P. et al.* // *IUBMB Life.* – 2011. – **63**, N 4. – P. 221–232.
189. *Candé C., Vahsen N., Garrido C., Kroemer G.* // *Cell Death Differ.* – 2004. – **11**, N 6. – P. 591–595.
190. *Cregan S. P., Dawson V. L., Slack R. S.* // *Oncogene.* – 2004. – **23**, N. 16. – P. 2785–2796.
191. *Kauppinen T. M., Chan W. Y., Suh S. W. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – **103**, N 18. – P. 7136–7141.
192. *Zhang S., Lin Y., Kim Y. S. et al.* // *Cell Death Differ.* – 2007. – **14**, N 15. – P. 1001–1010.
193. *Szabo C., Pacher P., Swanson R. A.* // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2006. – **27**, N 12. – P. 626–630.
194. *Hegedus C., Lakatos P., Olah G. et al.* // *FEBS Lett.* – 2008. – **582**, N 12. – P. 1672–1678.
195. *Wu G. S.* // *Cancer Metastasis Rev.* – 2007. – **26**, N 3–4. – P. 579–585.
196. *Matsuzawa A., Ichijo H.* // *J. Biochem.* – 2001. – **130**, N 1. – P. 1–8.
197. *Mester L., Szabo A., Atlasz T. et al.* // *Neurotox. Res.* – 2009. – **16**, N 1. – P. 68–76.
198. *Bartha E., Solti I., Kereskai L. et al.* // *Cardiovasc. Res.* – 2009. – **83**, N 3. – P. 501–510.
199. *Xu Y., Huang S., Liu Z., Han J.* // *J. Biol. Chem.* – 2006. – **281**, N 13. – P. 8788–8795.

200. Mathieu J., Flexor M., Lanotte M., Besançon F. // *Oncogene*. – 2008. – **27**, N 24. – P. 3361–3370.
201. Alano C. C., Swanson R. A. // *Trends Biochem.* – 2006. – **31**, N 6. – P. 309–311.
202. Zingarelli B., Hake P. W., Burroughs T. J. et al. // *Immunology*. – 2004. – **113**, N 4. – P. 509–517.
203. Xia Z., Dickens M., Raingeaud J., et al. // *Science*. – 1995. – **270**, N 5240. – P. 1326–1331.
204. Uehara N., Miki K., Tsukamoto R., et al. // *Experimental Eye Res.* – 2006. – **82**, N 3. – P. 488–495.
205. Racz B., Hanto K., Tapodi A. et al. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2010. – **49**, N 12. – P. 1978–1988.
206. Berger F., Lau C., Ziegler M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2007. – **104**, N 10. – P. 3765–3770.
207. Kustatscher G., Hothorn M., Pugieux C., et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2005. – **12**, N 7. – P. 624–625.
208. Sumoza-Toledo A., Penner R. // *J. Physiol.* – 2011. – **589**, Pt 7. – P. 1515–1525.
209. Hwang J. W., Chung S., Sundar I. K. et al. // *Arch. Biochem. Biophys.* // 2010. – **500**, N 2. – P. 203–209.
210. Kolthur-Seetharam U., Dantzer F., McBurney M. W. et al. // *Cell Cycle*. – 2006. – **5**, N 8. – P. 873–877.
211. Masutani M., Suzuki H., Kamada N. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1999. – **96**, N 5. – P. 2301–2304.
212. Pandya K. G., Patel M. R., Lau-Cam C. A. // *J. Biomed. Sci.* – 2010. – **17**, Suppl. 1. – S16.
213. Egi Y., Matsuura S., Maruyama T. et al. // *Brain Res.* – 2011. – **1389**. – P. 169–176.
214. Kim G. T., Chun Y. S., Park J. W., Kim M. S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – **309**, N 3. – P. 619–624.
215. Arrick D. M., Sharpe G. M., Sun H., Mayhan W. G. // *Microvasc. Res.* – 2007. – **73**, N 1. – P. 1–6.
216. Moroni F. // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2008. – **8**, N 1. – P. 96–103.
217. Hanai S., Kanai M., Ohashi S. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2004. – **101**, N 1. – P. 82–86.
218. Lenzen S. // *Diabetologia*. – 2008. – **51**, N 2. – P. 216–226.
219. Takasawa S., Yamamoto H., Terazono K., Okamoto H. // *Diabetes*. – 1986. – **35**, N 10. – P. 1178–1180.
220. Schmidt H. D. // *Eur. J. Cell. Biol.* – 2001. – **80**, N 6. – P. 419–427.
221. Du X., Matsumura T., Edelstein D. et al. // *J. Clin. Invest.* – 2003. – **112**, N 7. – P. 1049–1057.
222. Drel V. R., Pacher P., Stevens M. J., Obrosova I. G. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2006. – **40**, N 8. – P. 1454–1465.
223. Drel V. R., Xu W., Zhang J. et al. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2009. – **50**, N 4. – P. 1778–1790.
224. Obrosova I. G., Xu W., Lyzogubov V. V. et al. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2008. – **44**, N 6. – P. 972–981.
225. Kuchmerovska T., Shymanskyi I., Donchenko G. et al. // *J. Diabetes Complications*. – 2004. – **18**, N 4. – P. 198–204.
226. Shevalye H., Stavniichuk R., Xu W. et al. // *Biochem. Pharmacol.* – 2010. – **79**, N 7. – P. 1007–1014.
227. Masutani M., Nakagama H., Sugimura T. // *Cell Mol. Life Sci.* – 2005. – **62**, N 7–8. – P. 769–783.
228. Dantzer F., Noel G., Schreiber V. // *Bull. Cancer*. – 2011. – **98**, N 3. – P. 277–290.
229. Calabrese C. R., Almasy R., Barton S. et al. // *J. Natl. Cancer. Inst.* – 2004. – **96**, N 1. – P. 56–67.
230. Dedes K. J., Wilkerson P. M., Wetterskog D., et al. // *Cell Cycle*. – 2011. – **10**, N 8. – P. 1192–1199.
231. Comen E. A., Robson M. // *Cancer J.* – 2010. – **16**, N 1. – P. 48–52.
232. Michalak E. M., Jonkers J. // *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. – 2011. – **16**, N 1. – P. 41–50.
233. Cohen-Armon M. // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2007. – **28**, N 11. – P. 556–560.
234. Zhao F., Vermeer B., Lehmann U. et al. // *Immunology*. – 2009. – **128**, N 1. – P. 134–140.

Отримано 12.07.2011