Regulacija apoptoze pod utjecajem poli[ADP-riboza] polimeraze-1

Kekić, Tadija

Undergraduate thesis / Završni rad

2012

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:948110

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-26**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Seminarski rad

Regulacija apoptoze pod utjecajem poli[ADP-riboza] polimeraze-1

Regulation of apoptosis under influence of poly[ADP-ribose] polymerase-1

Student: Tadija Kekić

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: doc.dr. sc. Maja Matulić

Zagreb, 2012.

Sadržaj

1.Uvod 3
2. Protein Poli(ADP-riboza)polimeraza (PARP-1) i porodica proteina PARP 3
3. Struktura i biokemijska aktivnost PARP-1 7
4. Katalitička aktivnost proteina PARP-1 9
4.1. Vezni partneri proteina PARP-1 9
4.2. Posttranslacijska modifikacija proteina PARP-1 10
5. Metabolizam Poli(ADP-riboze) u apoptozi 12
5.1 Poli(ADP-riboza)polimeraza-1 (PARP-1) i faktor indukcije apoptoze (AIF) 15
6. Inhibitori PARP-1 18
7. Budućnost istraživanja 19
7.1. Upotrijeba inhibitora PARP-1 u modulaciji odgovora na kemoterapiju 19
8. Literatura 20
9. Sažetak 26
9. Summary 27

1.Uvod

Stanični ciklus, rast, diferencijacija i konačno smrt strogo su regulirani procesi u normalnom razvoju stanice. Promatranjem stanične smrti utvrđena su dva različita procesa umiranja: nekroza i programirana stanična smrt. Ovi procesi su fundamentalno različiti u svojoj prirodi, te ulozi u nekom organizmu.

Nekrozu smatramo pasivnom,“slučajnom“ staničnom smrću koju uzrokuju ekstremne traume i ozlijede stanice, npr. unos toksina, hipertermija ili hipoksija. Tijekom nekroze, DNA stanice se razgrađuje nasumično što prepoznajemo kao razmaz nastao elektroforetskim putovanjem fragmenata DNA različite molekulske težine prilikom analize agaroznom gel elektroforezom.

Glavna značajka nekroze je gubitak funkcija stanične membrane i kontrole protoka iona i promjeni osmotskog tlaka protokom iona Na +, K +, Ca 2+ i Mg 2+ niz koncentracijski gradijent. Ovakva promjena dovodi do unosa vode, bubrenja organela i same stanice. Bubrenje uzrokuje lizu stanice, te ispuštanje sadržaja citoplazme u izvanstanični prostor što konačno uzrokuje upalu tkiva.

Koncept programirane stanične smrti, u drugu ruku, podrazumjeva tip smrti stanice koji se pojavljuje u specifično vrijeme tokom razvoja organizma. Prvo zapažanje takvog fenomena je zabilježeno 1951 g., a do 1960. koncept je prihvaćen od strane mnogih istraživačkih grupa koje su ga prepoznale u nizu različitih okolnosti i eksperimentalnih uvijeta. Naknadno su otkriveni hormoni i faktori rasta koji imaju ulogu kemijskih signala potrebnih za poticanje ovakvog tipa stanične smrti, uz izostanak toksičnog učinka na okolne stanice.

Prvi direktni dokaz dvaju odvojenih tipova stanične smrti dolazi od histokemijskog istraživanja lizosomalnih promjena u ishemiji jetre koje je J.F.R. Kerr radio sa suradnicima 60-tih i 70-tih godina 20. stoljeća. Kerr je promatrao kružne tvorbe u mrtvim jetrenim stanicama i bilježio morfološke razlike između ovakve stanične smrti i nekroze. Zabilježene promjene prvotno su objašnjene kao varijanta nekroze- tzv. „shrinkage necrosis“, a 1972 su Kerr, Wyllie i Currie predložili ime apoptoza.

Klasična apoptoza uključuje marginaciju i kondenzaciju nuklearnog kromatina na samom početku procesa, skupljanje citoplazme, fragmentaciju jezgre i konačno formaciju

apoptotičkih tijela. Dolazi i do značajnih biokemijskih promjena, kako bi se provelo uredno formiranje apoptotičkih tijela i njihovo odvođenje k susjednim stanicama, makrofagima.

Degradacija proteina tijekom programirane smrti smatramo važnim markerom i dokazom apoptoze. Dokazano je cijepanje velikog broja proteina, uključujući poli(adp-riboza) polimerazu.

Broj stanica nekog organizma također je reguliran ravnotežom između proliferacije, rasta i smrti stanice. Stoga programiranu staničnu smrt smatramo važnim mehanizmom održavanja homeostaze cjelokupnog organizma. Apoptoza je posebno važna u nekim fiziološkim razvojnim procesima i uvjetima, kao što je razdvajanje prstiju u embrija, specijalizacija imunološkog sustava, spolna diferencijacija, metamorfoza i atrofija. Također, apoptoza igra važnu ulogu i u razvoju tumora, onkogenezi.

Nekoliko uobičajenih lijekova u kemoterapiji potiču program apoptoze. Posljedično, bolje razumjevanje apoptotičkih puteva može nam pomoći u moduliranju odgovora neoplazmatskih stanica na antitumorske komponente lijekova.

Apoptoza se aktivira vanjskim (preko receptora smrti) ili unutrašnjim (preko mitohondrija) signalnim putevima. Vanstanični signali uključuju hormone i faktore rasta koji se vežu na receptor stanične membrane kako bi pokrenuli odgovor. Primjer takvih receptora smrti je FasR koji veže Fas ligand (FasL). Vezanjem FasL dolazi do trimerizacije Fas receptora (FasR). Nakon aktivacije, unutar stanice se na njega veže adaptorna molekula zvana Fas-pridružen protein s domenom smrti (FADD) koji svojom domenom smrti veže domenu smrti receptora Fas. FADD također sadrži i tzv. „death effector“ domenu (DED) blizu svog amino kraja, a ona veže „death effector“ domenu proteina kaspaze-8. Kaspaza-8 se tada samostalno aktivira cijepanjem na dvije podjedinice, p10 i p18, koje čine aktivne enzime te se otpušta od kompleksa DISC u citosol. Ovdje, tako aktivirana, cijepa druge efektorne kaspaze što vodi do degradacije DNA i ostalih karakterističnih procesa stanične smrti.

Drugi, unutarstanični apoptotski put pokreće se kod oštećenja DNA, hipoksije ili prekomjerne ekspresije onkogena, a karakterističan je po permeabilizaciji mitohondrija i otpuštanju citokroma c u citoplazmu. Točnije, aktivacija p53 ili drugih proteina mijenja ravnotežu pro i anti-apoptotskih molekula porodice Bcl-2 na molekuli mitohondrija što rezultira formacijom mitohondrijskih kanala induciranih apoptozom (MAC). Takva promjena dovodi do oslobađanja citokroma c, koji uz molekulu Apaf-1 formira apoptosom. Jednom formiran

apoptosom može aktivirati efektorsku kaspazu, pro-kaspazu 9 koja tada započinje kaskadnu reakciju aktiviranjem drugih kaspaza što vodi do događaja koji čine apoptozu.

2. Protein Poli(ADP-riboza)polimeraza (PARP-1) i porodica proteina PARP

Stanice se u višestaničnim organizmima međusobno razlikuju, iako im je DNA jednaka. Osnova diferencijacije je različita ekspresija RNA i proteina koja je vrlo precizno regulirana, od razine transkripcije, procesiranja RNA, njenog transporta do regulacije translacije i posttranslacijskih promjena te aktivnosti proteina. DNA, s druge strane, u stanici postoji u obliku kromatina i specifičnom modifikacijom histona i drugih proteina mogu se regulirati procesi transkripcije, popravka oštećene DNA, replikacije itd. Jedan od proteina koji sudjeluje u regulaciji transkripcije i popravaka je poli(ADP)riboza polimeraza, PARP-1

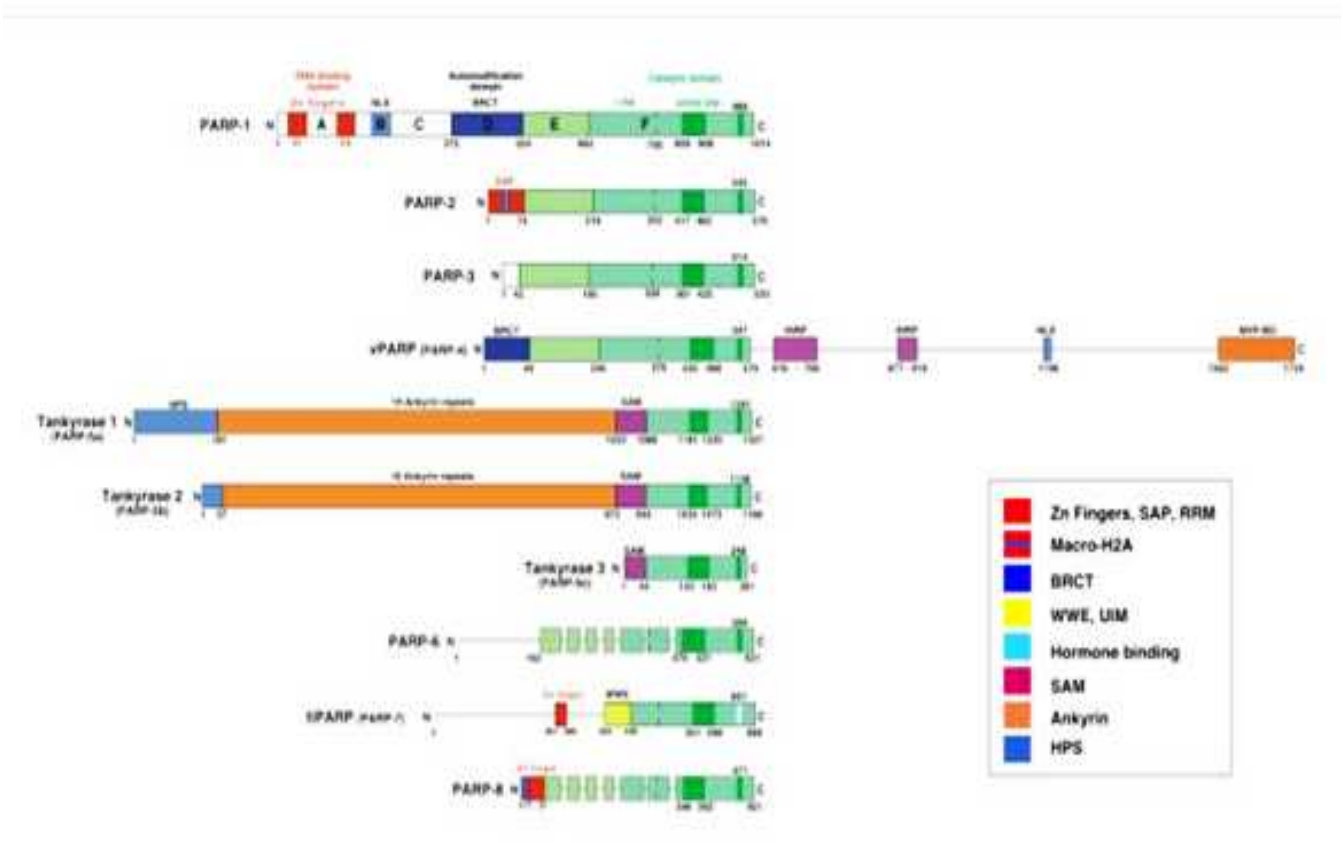
Jezgreni procesi koji uključuju pristup i modifikaciju genoma, kao što su transkripcija i popravak DNA, zahtijevaju od domaćina niz strukturnih i regulatornih proteina. Poli(ADP-riboza) polimeraza-1 (PARP-1) je jezgreni protein kojeg nalazimo u izobilju unutar stanica, a koji posjeduje niz biokemijskih uloga koje ga čine vrlo pogodnim za strukturnu i regulatornu ulogu u čitavom genomu. (Hassa i Hottiger, 2008.; Kim i sur.,2005.; Schreiber i sur.,2006.).

Protein PARP-1 ima sposobnost vezanja na različite strukture DNA i nukleosome, a sadrži katalitički aktivno mjesto ovisno o NAD^+ koje sintetizira negativno nabijen polinukleotid na ciljnom mjestu proteina, tzv. poli(ADP-ribozu) ili PAR. Iako je najčešće proučavan u smislu prepoznavanja oštećenja DNA i popravka DNA, PARP-1 se u zadnje vrijeme povezuje s regulacijom kromatinskih struktura i transkripcijom, DNA metilacijom, genomskim upisom, aktivnošću kao izolator i sa samom organizacijom kromosoma.

Poli(ADP-ribozil)acijske reakcije i PARP-u srodni geni pronađeni su među mnogim eukariotima, od gljiva i biljaka do sisavaca, a mogu se pronaći i u nekih eubakterija, arhebakterija i dvolančanih DNA virusima (Hassa i sur., 2006.; Otto i sur., 2005.). U stanicama sisavaca pojava poliADPribozilacije posredovana je enzimima PARP.

U zadnjih desetak godina, istraživanja su otkrila više od 17 proteina koji dijele homologiju s katalitičkim domenama PARP-1 (Ame i sur.,2004.; Hakme i sur., 2008.; Hassa i Hottiger, 2008.; Schreiber i sur., 2006.). Uz domenu sličnu PARP-u (eng. *PARP-like domain*), članovi porodice PARP sadrže širok spektar drugih strukturalnih i funkcionalnih domena: DNA vezne domene (DBDs), RNA vezne domene, substanične lokalizacijske signale, makrodomene,

motive BRCT, ankirinska ponavljanja, zinkove prste, a oni određuju njihovu biološku aktivnost.



Slika 1.Natporodica PARP.

Nedavno je predložena zajednička nomenklatura te porodice proteina kao ADP-ribozil transferaze (ARTs), kako bi se istaknulo da:

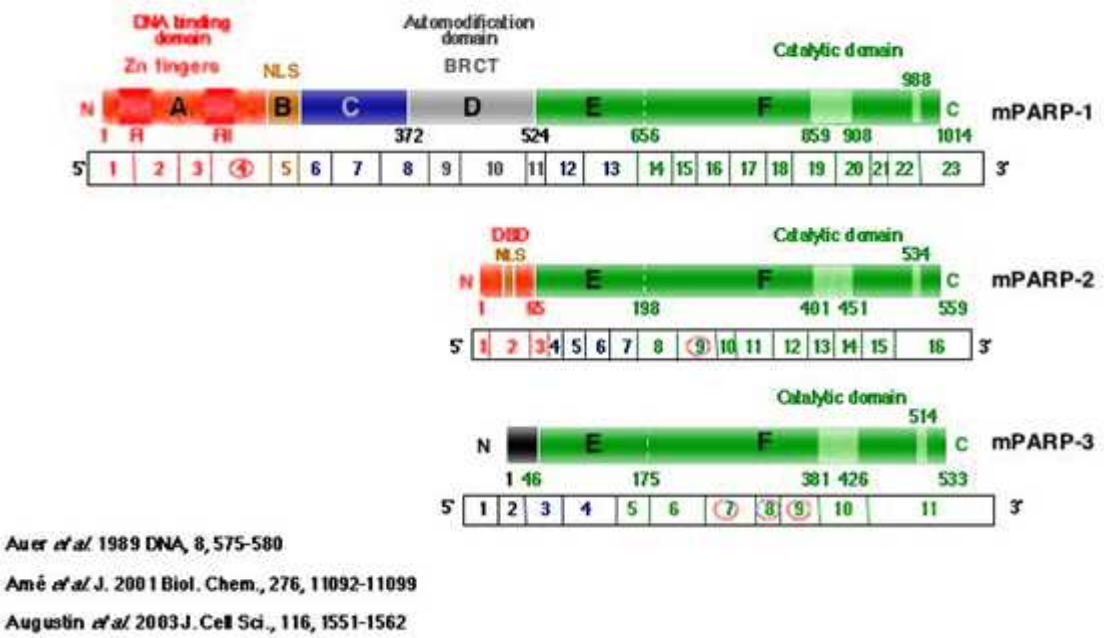
1.) Svi enzimi porodice kataliziraju transferazne reakcije, polimerazne reakcije neovisne o kalupu
2.) svi članovi porodice nemaju aktivnost poliADP ribozilacije - neki funkcioniraju samo kao mono(ADP-ribozil) transferaze (mARTs) (Hottiger i sur., 2001).

Takva nova nomenklatura temeljena na strukturnoj klasifikaciji članove porodice PARP dijeli u tri grupe, ovisno o katalitičkim domenama:

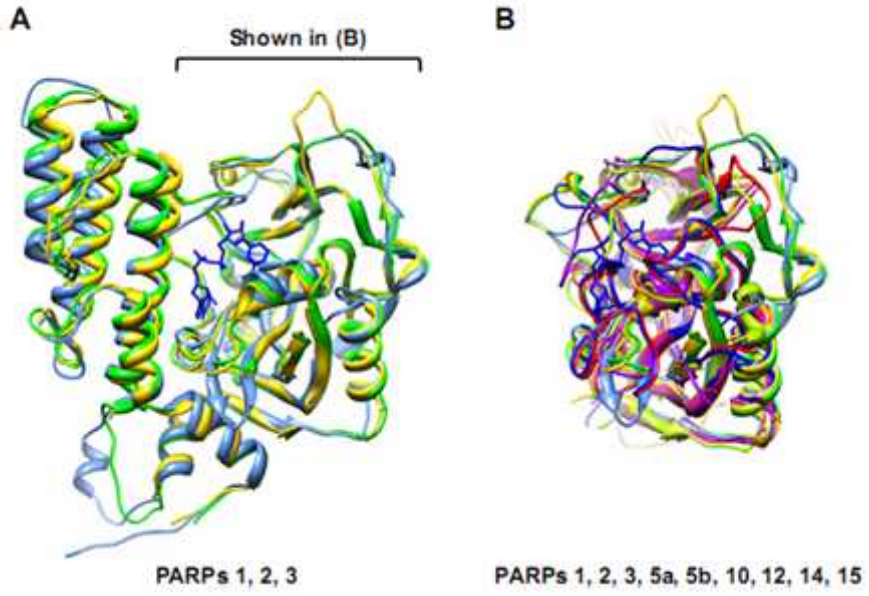
1.) PARP 1-5 – sadržavaju dobro konzerviran glutamat koji definira poli(ADP-ribozil) polimeraznu katalitičku aktivnost (Glu 988 u PARP-1).
2.) PARP 6-8, 10-12, 14-16 – zasad već jesu potvrđeni ili su vjerojatno ART, mono(ADP-ribozil) transferaze.
3.) PARP 9, 13 – nedostaje im ključno mjesto vezanja NAD+ i katalitički glutamat te su vjerojatno inaktivni (Kleine i sur.,2008).

Članovi porodice PARP locirani su u različitim staničnim odjeljcima (jezgri, citoplazmi i mitohondriju), iako njihova funkcija i substanična lokalizacija uglavnom ostaju nepoznate (Ame i sur.,2004.;Hassa i Hottiger, 2008.). Primarni jezgreni PARP-ovi su PARP-1, PARP-2 (najbliži paralog PARP-1), PARP-3 i tankiraza 1 i 2 (PARP5) (Ame i sur.,2004.; Hassa i Hottiger, 2008.; Schreiber i sur., 2006.). Također, u jezgri možemo pronaći i v-PARP (PARP-4), PARP-6, PARP-8, PARP-9, proteine Bal 1-3 (PARP-13, -14, -15) i PARP-10.

Funkcije članova porodice PARP uključuju širok spektar staničnih događaja: popravak DNA oštećenja, transkripciju, staničnu signalizaciju, regulaciju staničnog ciklusa i mitozu (Ame i sur., 2004.; Chang i sur., 2004.; Hakme i sur., 2008.;Hassa i Hottiger, 2008.; Schreiber i sur.,2006.). Ovaj široki spektar funkcija igra ključnu ulogu u različitim biološkim procesima, uključujući diferencijaciju, razvoj, odgovor na stres, upalu i rak.



Slika 2. Struktura mišjih gena PARP1, 2 i 3.



Slika 3. Katalitička domena PARP je jako konzervirana u porodici PARP

(A) Struktura katalitičkih domena PARP-1 (zeleno), PARP-2 (žuto), i PARP-3 (plavo) u sisavaca.
(B) Struktura katalitičke domena PARP 1, 2, 3, 5a, 5b, 10, 12, 15

3. Struktura i biokemijska aktivnost PARP-1

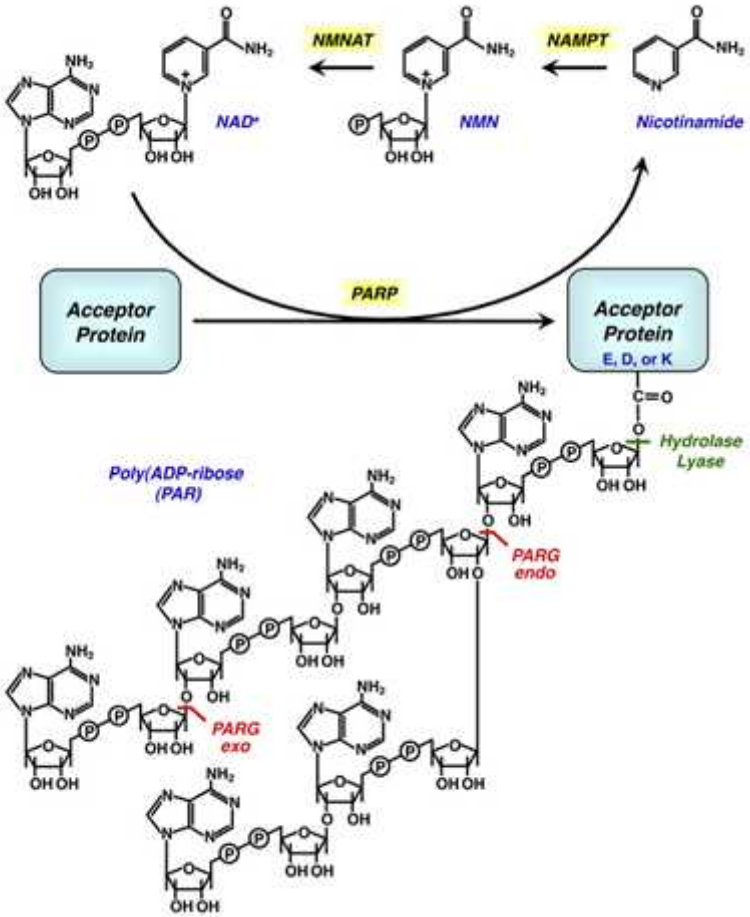
PARP-1 je veoma konzerviran protein od 116 kDa (D'Amours i sur., 1999.). Kao i mnogi drugi proteini povezani s kromatinizacijom i transkripcijom, PARP-1 ima strukturu koja sadržava mnoge samostalno-smatajuće domene. Glavne funkcionalne jedinice PARP-1 su N-terminalna DNA vezujuća domena (DBD), centralna automodificirajuća domena (AMD) i C-terminalna domena (CD) (Hakmen i sur., 2008.; Schreiber i sur., 2006.). Zajedno sve strukturne i funkcionalne domene PARP-1 ostvaruju visoku aktivnost u širokom spektru funkcija koje PARP-1 ima u jezgri.

Domena DBD sadrži dvije strukture cinkovog prsta Cys-Cys-His-Cys (FI/Zn1 i FII/Zn2) koje posreduju u vezanju za DNA te treću strukturu cinkova prsta (FIII/Zn3) ovisnu o DNA, posrednika u interdomenskom vezanju što je bitno za enzimsku aktivnost (Langelier i sur., 2008,2010). Ova se domena nastavlja na jezgreni lokalizacijski signal (NLS) i mjesto cijepanja koje prepoznaje kaspaza-2 (Hakme i sur., 2008; Schreiber i sur., 2006).

Domena AMD sadrži nabor BRCT (BRCA1 C-terminalni) koji posreduje u međuproteinskim interakcijama (npr. s enzimima popravka DNA).

CD, koja je najviše konzervirana domena u porodici PARP, sadrži motiv koji veže NAD+. Osim toga CD sadrži i motiv „WGR" (slijed koje obavezno ima sačuvane aminokiseline Trp, Gly i Arg - WGR), a čija je uloga još uvijek nije poznata.

U zadnje vrijeme je pokazano da se PARP-1 veže na specifične uzorke na kromatinu, a koji su povezani s njegovom funkcijom (Kraus, 2008.; Kraus i Lis, 2003.; Tulin i sur.,2003.). Ta veza je podržana interakcijama s DNA, nukleosomima i drugim proteinima koji vežu kromatin. PARP-1 veže različite strukture DNA, uključujući jednolančane i dvolančane lomove, „crossing over", ukriženja (eng. *cruciforms*), superzavojnice, itd., kao i neke specifične dvolančane sljedove DNA (Kraus, 2008.; Kraus i Lis, 2003.). PARP-1 također veže nukleosome na specifičan način – stvara interakcije s DNA i histonima na mjestu gdje DNA ulazi i izlazi iz nukleosoma (Kim i sur., 2004.). PARP-1 može stvarati interakcije s nizom proteina koji vežu kromatin – komponentama transkripcijske mašinerije, transkripcijskim faktorima specifičnim za sljedove DNA, enzimima koji modificiraju kromatin i varijantama histona. Interakcije s ovim proteinima omogućuju indirektnu suradnju PARP-1 i kromatina.



Slika 4. Biosinteza NAD+ I PAR

Prikazana je kemijska struktura NAD+, PAR i metabolita. Također, prikazani su enzimi koji kataliziraju sintezu NAD+ u putu spašavanja. Označena je i enzimska aktivnost PARP, PARG, (ADP-ribozil) proteinske hidrolaze i (ADP-ribozil) protein liaze.

Vezujući se, PARP-1 može promijeniti strukturu nukleosoma, kao i stanje kompaktnosti i kompoziciju kromosoma (Kim i sur., 2004.; Kraus, 2008.; Kraus i Lis, 2003.; Langelier i sur., 2010.; Tulin i sur., 2003.; Wacker i sur., 2007.). Te promjene se događaju preko ciljane modifikacije proteina putem PARP-1 ili kompeticijom za vezna mjesta na nukleosomu.

PARP-1 može premjestiti linker H1 histon s nukleosoma PARpilacijom ili kompeticijom za preklapajuće vezno mjesto na nukleosomu (Ju i sur., 2006.; Kim i sur., 2004.; Krishnakumar i sur., 2008.).

Također, nedavno je dokazano da se PARP-1 lokalizira unutar genoma na promotorskim regijama najčešće transkribiranih gena (Krish-nakumar i sur., 2008.). Vezanje PARP-1 na

promotor je povezano s vezanjem Pol II, ekspresijom gena i prisutnošću histon H3-lizin-4-trimetilacije (modifikacije histona koja označava aktivne promotore). Dodatno PARP-1 veže kromatin izvan promotorskih regija uključujući pojačivače (Krishnakumar i sur., 2008.). Kao odgovor na genotoksični stres, PARP-1 se premješta na mjesta oštećenja DNA (Haince i sur., 2008; Mortusewicz i sur.,2007.). Zasad se ne zna je li takva relokalizacija zbog oštećenja DNA utječe na globalnu relokalizaciju PARP-1 s promotora, no takav model bi odgovarao globalnoj redukciji transkripcije koja je zapažena kod oštećenja DNA.

4. Katalitička aktivnost proteina PARP-1

Poli(ADP-ribozni) lanci su veliki, negativno nabijeni polimeri koji djeluju kao posttranslacijska modifikacija ili u obliku slobodnog polimera. Većina PAR-a u stanici nastaje uslijed katalitičke aktivnosti PARP-1 koji polimerizira jedinice ADP-riboze pomoću donorske molekule NAD+ na ciljanom proteinu. Jedinice ADP-riboze su spojene međusobno glikozidnim vezama riboza-riboza zbog čega konačni polimer PAR može biti linearan ili razgranat (D'Amours i sur., 1999.). Modifikacije najčešće nastaju na ograncima glutamata, aspartata ili lizina, iako nema mnogo dokaza koji potvrđuju kovalentne modifikacije ogranaka. U prilog tome postoje istraživanja koja predlažu jaka nekovalentna vezanja polimera PAR (Hassa i Hottiger, 2008.).

Katalitička aktivnost PARP-1 je regulirana kroz alosteričke mehanizme koja uključuju niz veznih parova, od oštećene DNA, histona i nukleosoma do cijelog niza jezgrenih proteina (D'Amours i sur., 1999.; Kraus i Lis, 2003.; Tulini sur., 2003.). PARP-1 katalitička aktivnost je također regulirana posttranslacijskim modifikacijama. AutoPARpilacija PARP-1 inhibira njegovu katalitičku aktivnost, dok je fosforilacija preko kinaze Erk ½ pojačava (Kauppinen i sur., 2006.). Aktivnost PARP-1 također može biti regulirana nikotinamid mononukleotid adeniltransferazom-1 (NMNAT-1), sintetazom jezgrenog NAD+, koja može lokalno producirati NAD+ za potrebe jezgrenih enzima, kao što su PARP-1 i Sirt1 (Kim i sur., 2004; Zhang i sur., 2009; Zhang i Kraus, 2009.).

4.1. Vezni partneri proteina PARP-1

Parp-1, kao komponenta, pronađen je u mnogim jezgrenim proteinskim kompleksima, npr. onima koji popravljaju oštećenu DNA (npr. kondenzin I/XRCC1), reguliraju transkripciju (Mediator, kofaktor TLE itd.), imaju ulogu inzulatora (npr. CTCF) i metiliraju DNA (npr.

DNMT-1) (Caiafa i sur., 2009.; Caiafa i Zlatanova, 2009.; El-Khamisy i sur., 2003.; Farrar i sur., 2010; Guastafierro i sur., 2008.; Hassa i sur., 2005.; Heale i sur., 2006.; Ju i sur., 2004.; Malanga i Althaus, 2005.; Pavri i sur., 2005.; Pleschke i sur., 2000.; Zampieri i sur., 2009.). Mnogi od tih proteina su PARpilirani pomoću enzima PARP-1 (Kim i sur., 2005.; Kraus, 2008.; Kraus i Lis, 2003.). Smatra se da kovalentna vezanja PAR mijenjaju aktivnost ciljnog proteina kroz sterički efekt i naboj, čime utječu na interakcije protein-protein i između proteina i nukleinskih kiselina, enzimatsku aktivnost ili unutarstaničnu lokalizaciju (Hassa i Hottiger, 2008.; Schreiber i sur., 2006.).

Najčešći ciljni proteini PARP-1 katalitičke aktivnosti uključuju histone, transkripcijske faktore, jezgrene enzime i jezgrene strukturne proteine. PARP-1 može PARilirati histone, pogotovo H1, H2A i H2B, što ima ulogu u regulaciji kromatinskih struktura, iako sam doseg histonskih modifikacija i njihov utjecaj na jezgrene procese ostaje nedovoljno razjašnjen (D'Amours i sur., 1999.; Kim i sur., 2005.; Kraus, 2008.; Kraus i Lis, 2003.).

PARP-1 također PARilira neke proteine vezane uz popravak DNA, uključujući p53 (Kanai i sur., 2007.; Mendoza-Alvarez i Alvarez-Gonzalez, 2001.), te tako utječe na procese ovisne o p p53. Iako PARilacija p53 nije potpuno razjašnjena, postoje dokazi da PARilacija specifičnih regija (Glu 255, Asp 256 i Glu 268) može spriječiti izlazak p53 iz jezgre blokirajući njegovu interakciju s jezgrenim eksportnim receptorom Crm1, zaslužnim za transport samog proteina p53 (Kanai i sur., 2007.).

Inhibicija različitih transkripcijskih faktora (npr. CTCF, AP-1, YY1, NF-κB, itd.), kao i drugih jezgrenih proteina (npr. aurora kinaze B) PARilacijom pomoću PARP-1 ukazuje da PARilacija ima ulogu u regulaciji transkripcije.

4.2. Posttranslacijska modifikacija proteina PARP-1

Kao i drugi proteini s ulogama u regulatornim procesima, PARP-1 je podvrgnut različitim posttranslacijskim modifikacijama kao završnim točkama signalnih puteva. Ovo uključuje PARilaciju, acetilaciju, fosforilaciju, ubikvitilaciju i SUMOlaciju.

PARP-1 je PARiliran sam sa sobom, s PARP-2 ili potencijalno s nekim drugim članom porodice PARP. AutoPARilacija PARP-1 može nastati kao višestruko dodavanje ADP-riboze u lancu većem od 200 jedinica ili kao dodavanje jedne ili nekoliko (do 20) jedinica u lanac

(mono- ili oligo-PARilacija) (D'Amours i sur., 1999.; Mendoza-Alvarez i Alvarez-Gonzalez, 1999.). Intenzivna autoPARilacija PARP-1 (npr. kao odgovor na oštećenje DNA) inhibira njegovu DNA-vezajuću i katalitičku aktivnost (D'Amours i sur., 1999.). In vitro i in vivo testovi su pokazali da aktivacija i autoPARilacija PARP-1 rezultira njegovim otpuštanjem s kromatina. (Kim i sur.,2004.; Petesch i Lis, 2008.; Tulin i Spradling, 2003.; Wacker i sur., 2007.). Umjerena autoPARilacija PARP-1 mijenja njegovu aktivnost, ali ne utječe na njegovo odvajanje od kromatina, dok je efekt slabe autoPARilacije na PARP-1 još uvijek nepoznat.

PARP-1 je fosforiliran putem kinaze ERK 1/2 na Ser 372 i Thr 373 ili kinaze JNK1 na još nepoznatim mjestima. ERK 1/2 je potrebna za maksimalnu aktivaciju PARP-1 nakon oštećenja DNA, dok JNK1 aktivira neprekidnu aktivaciju PARP-1 prilikom neapoptotičke stanične smrti inducirane s H_2O_2 (Kauppinen i sur., 2006.; Zhang i sur., 2007.). Nedavne analize su otkrile dodatna fosforilacijska mjesta na PARP-1, ali to je potrebno dodatno istražiti.

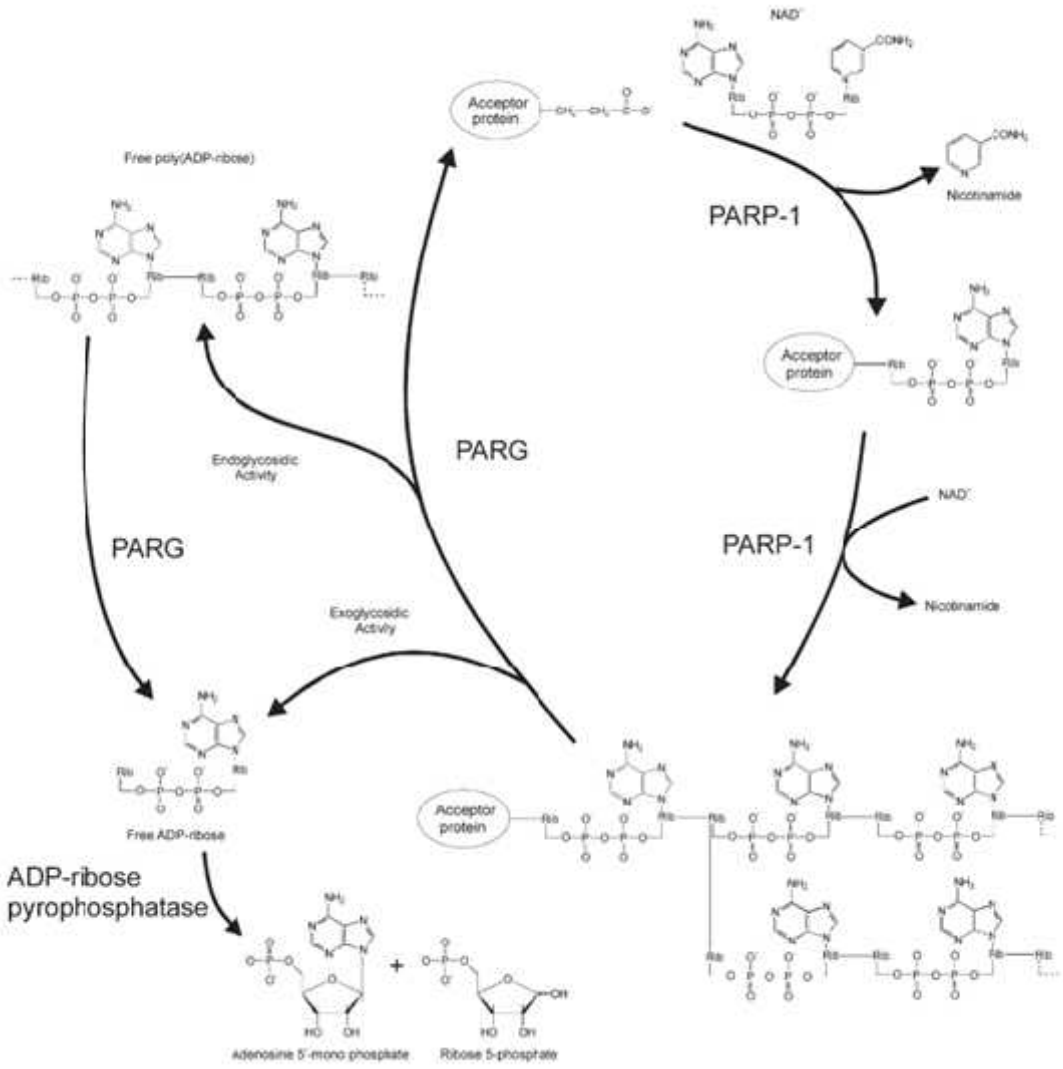
PARP-1 je acetiliran preko acetiltransferaza p300/CBP i PCAF (Hassa i sur., 2003., 2005.; Rajamohan i sur., 2009.), dok povratnu reakciju provodi niz deacetilaza uključujući Sirt1 (Hassa i sur., 2005.; Rajamohan i sur., 2009.). Acetilacija PARP-1 se, među ostalim, događa kao završna točka odgovora na stres i rezultira aktivacijom PARP-1 bez oštećenja DNA. Acetilacija PARP-2 smanjuje njegovu DNA-veznu i enzimatsku aktivnost, kao i intenzitet auto-mono(ADP-ribozil)acije (Rajamohan i sur.,2009.; Haenni i sur., 2008.).

Ubikvitinacija i SUMOilacija su tek nedavno otkrivene, a time i slabo istražene (Cohen-Armon i sur., 2007.; Hassa i sur., 2005.; Kauppinen i sur., 2006.; Martin i sur., 2009.;Messner i sur., 2009.;Wang i sur., 2008.). No, ta istraživanja su pokazala da ovi procesi dodavanja malih proteina ubikvitina i SUMO ipak moduliraju ulogu PARP-1 kao regulatora kromatinskih struktura i transkripcije. PARP-1 je SUMOiliran pomoću enzima PIASy, SUMO E3 ligaze (Martin i sur., 2009.; Stilmann i sur., 2009.). SUMOilacija i p300/CBP-ovisna acetilacija na Lys 486 PARP-1 se međusobno isključuju. (Messner i sur., 2009.). S obzirom da je acetilacija PARP-1 potrebna za aktivaciju transkripcije na nekim ciljnim promotorima (Hassa i sur., 2003., 2005.), SUMOilacija PARP-1 mogla bi modulirati transkripcijski ishod PARP-1-ovisnog puta.

5. Metabolizam poli(ADP-riboze) u apoptozi

Apoptotska smrt stanice je aktivan proces koji uključuje specifične enzime sposobne cijepati DNA u fragmente veličine nukleosoma. Ovaj proces bi mogli pripisati Ca 2+/ Mg 2+ -ovisnim endonukleazama, reguliranim promjenama unutarstanične razine kalcija, a kao što je potvrđeno različitim radovima, druge aktivnosti također potiču fragmentaciju DNA. U stanicama u kojima nema mnogo jednolančanih i dvolančanih lomova, poli(ADP-ribozil)acija je vrlo rijedak događaj koji se događa do 100 puta češće nakon unosa oštećenja DNA (Sallmann i sur., 2000.). U takvim okolnostima više od 90% poli (ADP-riboze) je sintetizirano pomoću PARP-1 (Sallmann i sur., 2000.).

PARP-1 je konstitutivno eksprimiran, ali enzimatski se aktivira preko DNA lomova. Katalizira formaciju ADP-riboze pomoću cijepanja glikozidne veze između nikotinamida i riboze. Glutamat, aspartat i lizin (Ogata i sur., 1980.) ciljnog proteina su tada kovalentno promijenjeni dodatkom podjedinice ADP-riboze, pomoću formiranja esterske veze između nje i proteina. Nakon toga PARP-1 katalizira reakciju elongacije i granjanja koristeći dodatne jedinice ADP-riboze koje donira NAD+. Ovo stvara novu ribozil-ribozil poveznicu i konačno dovodi do formiranja polimernog lanca dugog oko 200 podjedinica ADP-riboze, s nekoliko mjesta granjanja (Alvarez-Gonzalez i Jacobson, 1987.) (Slika 5.).



Slika 5. Metabolizam poli(ADP-riboze)

PARP-1 cijepa glikozidnu veze NAD+ između nikotinamida i riboze i dovodi do kovalentne modifikacija, uglavnom glutamata, na akceptorskom proteinu s jedinicima ADP-riboze. Tako nastaje esterska veza između proteina i svake jedinice ADP-riboze. PARP-1 također katalizira reakcije elongacije i granjanja kojim nastaju polimeri dugi do 200 jedinica ADP-riboze. PARG je jedini, dosad otkriven, protein koji katalizira hidrolizu (ADP-riboza) polimera čime se stvaraju slobodne ADP-riboze, a to radi pomoću svoje endoglikozidne i egzoglikozidne aktivnosti.

Slobodne molekule ADP-riboze stvorene NAD glikohidrolaznom (NADaze) aktivnošću PARP-1 su također pokazale reaktivnost s lizinskim mjestima proteina formirajući ketoaminske derivate (Cervantes-Laurean i sur., 1993.). Takvi ketoaminski derivati vezani za proteine također mogu biti modificirani s PARP-1 koji stvara polimer ADP-riboze vezan na protein. Ipak, najvažniji ciljni protein takve poli(APD-ribozil)acije je upravo PARP-1 (Cervantes-Laurean i sur., 1996.), iako je opisano mnogo drugih veznih proteina, poput p53 (Mendoza-Alvarez and Alvarez-Gonzalez, 2001.), obje podjedinice nuklearnog faktora kappa B (NF-kB) (Kameoka i sur., 2000.), histoni (Adamietz i sur., 1984.), DNA ligaza (Ohashi i sur., 1983.), DNA polimeraza (Yoshihara i sur., 1985.), DNA-topoizomeraza (Scovassi i sur., 1993.) i DNA-ovisna protein kinaza (Ruscetti i sur., 1998.). Zbog jakog negativnog naboja ovog polimera takva modifikacija znatno utječe na fizička i biokemijska svojstva modificiranog proteina. Izmijenjena svojstva uključuju promjenu u afinitetu vezanja DNA, što može imati regulatornu ulogu u interakciji s drugim proteinima. Poli(ADP-riboza)glikohidrolaza (PARG) je jedini poznati enzim za kojeg je znano da katalizira hidrolizu polimera ADP-riboze na slobodnu ADP ribozu (Davidovic i sur., 2001.) (Slika 5.) (Tablica 1.).

Tablica 1. Enzimi uključeni u formaciju i degradaciju poli (ADP-riboze)

Human gene*	Chromosomal location	Enzyme designation	Size	Refs
ADPRT	1q41-q42	NAD+ ADP-ribosyltransferase (polymerizing); NB. Common alternative designations are: poly(ADP-ribose) polymerase-1 **[PARP-1]**; poly(ADP-ribose) synthetase [PARS]	1014 aa (113 kDa)	44
ADPRTL1	13q11	vault poly(ADP-ribose) polymerase or NAD+ poly(ADP-ribose) polymerase-4 [**vPARP**]	1724 aa (192.8 kDa)	70, 71
ADPRTL2	14q11.2-q12	NAD+ poly(ADP-ribose) polymerase-2 [**PARP-2**]	583 aa (66 kDa)	64, 65
ADPRTL3	3p22.2-p21.1	NAD+ poly(ADP-ribose) polymerase-3 [**PARP-3**]	532 aa (60 kDa); alternative splicing variant: 539 aa (60.8 kDa)	63
TNKS	8p23.1	Tankyrase-1 or NAD+ poly(ADP-ribose) polymerase-5a [PARP-5a]	1327 aa (142 kDa)	39, 75
TNKS2	10q23.3	Tankyrase-2 or NAD+ poly(ADP-ribose) polymerase-5b [PARP-5b]	1166 aa (126.9 kDa)	82, 83
PARG	10q11.23	poly(ADP-ribose) glycohydrolase [**PARG**]	Three different splice variants: 976 aa (111 kDa); 893 aa (102 kDa); 866 aa (99 kDa)	87

*Approved Human Gene Organization gene nomenclature committee symbol.

Prvotnu hipotezu da lomovi DNA, metabolizam NAD+ i programirana stanična smrt mogu biti povezani prvi su indirektno potvrdili eksperimenti u kojima je aktivacija PARP-1 pratila administraciju antitumorskih lijekova. Poveznica između digestije DNA i aktivnosti PARP-1 prvi put je direktno dokazana u eksperimentu smanjivanja aktivnosti PARP-1 preko blokiranja fragmentacije DNA djelovanjem cinka.

Prisutnost DNA fragmenata tijekom apoptoze mogla bi regulirati proces ADP-ribozilacije. Stoga bi apoptotsko cijepanje DNA bilo dobar kandidat stimulacije enzimske aktivnosti PARP-1, a sinteza poli(ADP-riboze), preko korištenja NAD+, može biti iskorištena za identifikaciju apoptotskiih stanica.

Sinteza polimera koja se odvija u stanici prije proteolize PARP-1 možemo interpretirati kao brzi odgovor ADP-ribozilacijske mašinerije na prisutnost DNA slobodnih krajeva. Ovu hipotezu potvrđuju i radovi koji opisuju ranu sintezu poli(ADP-riboze) stanica ljudskog osteosarkoma koje prolaze apoptozu. Nadalje, korištenjem pročišćenih DNA vezujućih domena (DBD) PARP-1, kao probe za detekciju lomova lanaca DNA, imunoflourescencijski je pokazano da DBD prepoznaje apoptotske lomove DNA. Pod drugim eksperimentalnim uvjetima, aktivnost PARP-1 je bila popraćena akumulacijom specifičnih mRNA, a sinteza poli(ADP-riboze) je povezana s autoribozilacijom PARP-1 pod utjecajem kemoterapeutskih lijekova.

Na temelju mnogih radova, možemo zaključiti da kao prvi odgovor na oštećenje, tj. jednolančane i dvolančane lomove DNA, aktivnost PARP-1 raste sve dok ne dođe do cijepanja i inaktivacije samog PARP-1, kao jednog od 50tak proteina koji se cijepaju pri apoptozi.

S obzirom da je metabolizam poli(ADP-roboze) strogo reguliran unutar stanice zajedničkim djelovanjem PARP i poli(ADP-riboza) glikohidrolaze (PARG) aktivnost oba enzima je proučavana tijekom apoptoze. Zaključeno je da aktivnost PARG prati sintezu poli(ADP-riboze). Kasnije, kada se PARP inaktivira proteolitičkim cijepanjem, aktivnost PARG opada.

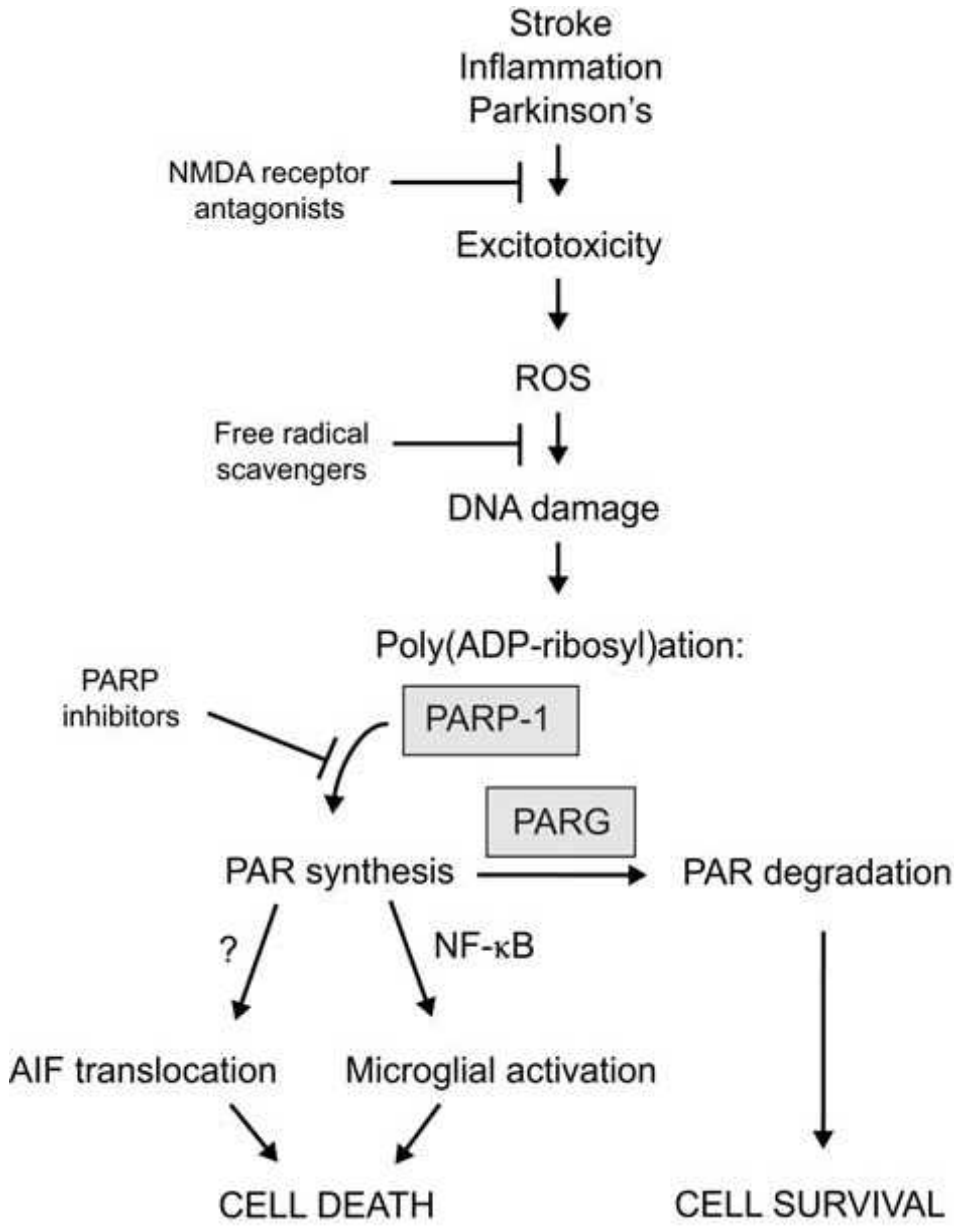
5.1 Poli(ADP-riboza)polimeraza-1 (PARP-1) i faktor indukcije apoptoze (AIF)

Poli(ADP-riboza)polimeraza-1 je uključena u put stanične smrti koji je ovisan o kaspazama, ali i u onaj koji je neovisan, u kojem važnu ulogu imai faktor indukcije apoptoze (AIF). U

putu ovisnom o kaspazama, u egzekucijskoj fazi, PARP-1 je inaktiviran i pocijepan kaspazama 3 i 7 koje razdvajaju PARP-1 DNA veznu domenu od njegove katalitičke domene. Inaktivacija PARP-1 je način uštede energije jer se tako smanjuje potrošnja NAD+ i ATP-a. Ukoliko bi stanica aktivirala PARP-1, a ne bi imala dovoljno energije za izvršenje procesa apoptoze, tada je moguće da bi PARP-1 usmjerio stanicu u nekrozu, posljedično ugrozilo susjedne stanice ili započelo upalnu reakciju.

Faktor indukcije apoptoze (AIF) je flavoprotein od 67-kDa uključen u inicijaciju puta stanične smrti neovisnog o kaspazama koji uzrokuje fragmentaciju DNA i kondenzaciju kromatina. Nedavna istraživanja su ga prepoznala kao važnog efektorskog signalnog faktora u PARP-1-ovisnoj staničnoj smrti. AIF također ima ulogu u regulaciji permeabilnosti membrane mitohondrija za vrijeme apoptoze, a u normalnim uvjetima ima važnu ulogu u dišnom lancu mitohondrija i redoks reakcijama metabolizma, kao NADH oksidaza.Tada se nalazi unutar vanjske membrane mitohondrija i tako je prostorno odvojen od jezgre. Ukoliko dođe do oštećenja stanice i mitohondrija, AIF prolazi kroz membranu mitohondrija i odlazi u jezgru stanice gdje daje signal stanici za kondenzaciju kromosoma i fragmentaciju DNA.

Istraživanjem je postalo jasno da je AIF pro-apoptotički faktor. Radovi na AIF-deficijentnim embrionalnim matičnim stanicama pokazali su da su takve stanice otporne na indukciju apoptoze uskraćivanjem seruma. PARP-1 aktivatori uključujući N-metil-N’-nitro-N-nitroguanidin (MNNG), vodikov peroksid i NMDA induciraju translokaciju AIF iz mitohondrija u nukleus što dovodi do stanične smrti. Biokemijski markeri koje povezujemo s apoptozom poput izlaganja fosfatidil serina, parcijalna kondenzacija kromatina i kondenzacija jezgre su prisutni i bez aktiviranja kaspaza, u AIF putu stanične smrti. Svi ovi događaji nisu blokirani inhibitorima kaspaza, ali ih blokiraju inhibitori PARP-1 ili nedostatak enzima PARP-1. Stoga je stanična smrt uzrokovana translokacijom AIF ovisna o poli(ADP-ribozil)aciji. Na koji način poli(ADP-ribozil)acija regulira AIF, preko nedostatka NAD+ ili PAR ili otpuštanjem iz mitohondrija, još nije poznato.



Slika 6. Uloga poli(ADP-ribozil)acije u životu i smrti stanica neurona

6. Inhibitori PARP-1

Od otkrića poli(ADP-riboze) i poli(ADP-riboza) polimeraze-1 1960-tih godina, napredak u otkrivanju njihovih bioloških funkcija je bio spor. Prvo veliko otkriće je napravljeno u otkrivanju inhibitora PARP, 3-aminobenzamida (3AB), koji se od tad koristi za pojačavanje efekta pri ciljanom oštećivanju DNA kemoterapeuticima.

Različitim pristupima se pokušalo odgonetnuti uloga PARP-1 u nekim fiziološkim procesima uključujući apoptozu. Aktivnost enzima je zaustavljana kemikalijama, prekomjenom ekspresijom PARP DNA veznih domena, utišavanjem gena i korištenjem antisense RNA.

Korištenje inhibitora PARP može dati samo indirektan dokaz uloge poli(ADP-ribozilacije) u biološkom procesu apoptoze. Usprkos mnogim radovima na ovom području, rezultati su još uvijek dvojbeni.

U nekim eksperimentima inhibicija poli(ADP-riboza) polimeraze pomoću 3-aminobenzamida (3AB) onemogućuje apoptozu stanice koja posjeduje stanične parametre koji službeno označuju apoptozu. Doduše, u drugim staničnim linijama 3AB nije spriječila stanicu da završi apoptozu.

Postoje dokazi koji upućuju da razina NAD+ u stanicama igra važnu ulogu u modulaciji djelovanja inhibitora, te konačnom rezultatu inhibicije enzima PARP-1.

7. Budućnost istraživanja

Proteoliza PARP-1 je određena kao jedna od glavnih oznaka apoptoze u raznim staničnim tipovima i pod različitim induktorima apoptoze, uključujući i fizičke i psihičke induktore.

Prvi radovi na tu temu su naglašavali važnost proteolize PARP-1 u inicijacijskoj fazi apoptoze. Kasnije, nakon otkrića drugih meta proteaza i velikog broja proteolitičkih enzima, zaključeno je da proteliza PARP-1, kao i cijepanje drugih enzima i strukturnih proteina, spada u egzekucijsku fazu apoptoze.

Danas se vode mnoga istraživanja koja analiziraju poveznicu između različitih procesa unutar apoptoze, ali na temelju trenutnih informacija dobivenih temeljenih na proučavanju aktivnosti PARP-1 pod utjecajem različitih stimulansa apoptoze ne možemo formirati generalni model apoptoze.

Daljni rad na ovoj temi je potreban kako bismo bolje razumjeli dva puta proteinske degradacije te proučiti moguću modulaciju metabolizma poli(ADP-riboze) tijekom nekroze.

7.1. Upotreba inhibitora PARP-1 u modulaciji odgovora na kemoterapiju

PARP se koristi za regulaciju staničnog odgovora u kemoterapijama već skoro pola stoljeća. Osnovnu primjenu nalazi kod tumora dojke koji su defektni u popravku jednolančanih oštećenja jer nemaju protein BRCA. Kako PARP-1 sudjeluje u alternativnom putu popravka, dokidanje njegove funkcije specifičnim inhibitorima čini takve stanice podložnijim apoptozi.

S druge strane, citotoksičnost inhibitora PARP-1 mora se pomno proučiti kako bi se zaobišli neželjeni nusprodukti potencijalnih lijekova. Također, kako bi se regulirala ravnoteža između aktivnosti PARP i PARG, pa tako i metabolizma poli(ADP-riboze), mogu se koristiti i inhibitori PARG.

Poznati spektar funkcija enzima PARP-1 u stanici svakodnevno se povećava brojnim istraživanjima i postaje sve jasnije da je uključen u modulaciju brojnih osnovnih procesa. Usporedno se razvija i primjena njegovih inhibitora u liječenju različitih tipova tumora.

8. Literatura

J.Diefenbach, A.Bürkle (2005) Introduction to poly(ADP-ribose) metabolism. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 62, 721-730

A.Ivana Scovassi, Guy G. Poirier (1999). Poly(ADP-ribosylation) and apoptosis. Molecular and Cellular Biochemistry 199, 125-137

Hassa, P.O., and Hottiger, M.O. (2002). The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders. Cell. Mol. Life Sci. 59, 1534–1553.

Kim, M.Y., Mauro, S., Gevry, N., Lis, J.T., and Kraus, W.L. (2004). NAD+-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. Cell 119, 803–814.

Kim,M.Y., Zhang, T., and Kraus,W.L. (2005). Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD+ into a nuclear signal. Genes Dev. 19, 1951–1967.

Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.C., and de Murcia, G. (2006). Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7, 517–528.

Hassa, P.O., Haenni, S.S., Elser, M., and Hottiger, M.O. (2006). Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70, 789–829.

Otto, H., Reche, P.A., Bazan, F., Dittmar, K., Haag, F., and Koch-Nolte, F. 2005). In silico characterization of the family of PARP-like poly(ADP-ribosyl)-transferases (pARTs). BMC Genomics 6, 139.

Ame, J.C., Spenlehauer, C., and de Murcia, G. (2004). The PARP superfamily. Bioessays 26, 882–893.

Hakme, A., Wong, H.K., Dantzer, F., and Schreiber, V. (2008). The expanding field of poly(ADP-ribosyl)ation reactions. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' Review Series. EMBO Rep. 9, 1094–1100.

Alvarez-Gonzalez, R., and Jacobson, M.K. (1987). Characterization of polymers of adenosine diphosphate ribose generated in vitro and in vivo. Biochemistry 26, 3218–3224.

D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., and Poirier, G.G. (1999). Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. Biochem. J. 342, 249–268.

Langelier, M.F., Servent, K.M., Rogers, E.E., and Pascal, J.M. (2008). A third zinc-binding domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coordinates

DNA-dependent enzyme activation. J. Biol. Chem. 283, 4105–4114.

Langelier, M.F., Ruhl, D.D., Planck, J.L., Kraus, W.L., and Pascal, J.M. (2010). The Zn3 domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) functions in both DNA-dependent poly(ADP-ribose) synthesis activity and chromatin compaction. J. Biol. Chem. 285, 18877–18887.

Kraus, W.L., and Lis, J.T. (2003). PARP goes transcription. Cell 113, 677–683.
Kraus, W.L. (2008). Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. Curr. Opin. Cell Biol. 20, 294–302.

Kim, M.Y., Mauro, S., Gevry, N., Lis, J.T., and Kraus, W.L. (2004). NAD+-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. Cell 119, 803–814.

Tulin, A., Chinenov, Y., and Spradling, A. (2003). Regulation of chromatin structure and gene activity by poly(ADP-ribose) polymerases. Curr. Top. Dev. Biol. 56, 55–83.

Wacker, D.A., Ruhl, D.D., Balagamwala, E.H., Hope, K.M., Zhang, T., and Kraus, W.L. (2007). The DNA binding and catalytic domains of poly(ADP- ribose) polymerase 1 cooperate in the regulation of chromatin structure and transcription. Mol. Cell. Biol. 27, 7475–7485.

Ju, B.G., Lunyak, V.V., Perissi, V., Garcia-Bassets, I., Rose, D.W., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2006). A topoisomerase IIbeta-mediated dsDNA break required for regulated transcription. Science 312, 1798–1802.

Krishnakumar, R., Gamble, M.J., Frizzell, K.M., Berrocal, J.G., Kininis, M., and Kraus,W.L. (2008). Reciprocal binding of PARP-1 and histone H1 at promoters specifies transcriptional outcomes. Science 319, 819–821.

Mortusewicz, O., Ame, J.C., Schreiber, V., and Leonhardt, H. (2007). Feedback-regulated poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells. Nucleic Acids Res. 35, 7665–7675.

Kauppinen, T.M., Chan, W.Y., Suh, S.W., Wiggins, A.K., Huang, E.J., and Swanson, R.A. (2006). Direct phosphorylation and regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by extracellular signal-regulated kinases 1/2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 7136–7141.

Zhang, T., and Kraus, W.L. (2009). SIRT1-dependent regulation of chromatin and transcription: linking NAD(+) metabolism and signaling to the control of cellular functions. Biochim. Biophys. Acta. 1804, 1666–1675.

Zhang, T., Berrocal, J.G., Frizzell, K.M.,Gamble,M.J., DuMond,M.E., Krishnakumar, R., Yang, T., Sauve, A.A., and Kraus,W.L. (2009). Enzymes in the NAD+ salvage pathway regulate SIRT1 activity at target gene promoters. J. Biol. Chem. 284, 20408–20417.

Caiafa, P., Guastafierro, T., and Zampieri, M. (2009). Epigenetics: poly(ADP-ri-bosyl)ation of PARP-1 regulates genomic methylation patterns. FASEB J. 23, 672–678.

Ogata N., Ueda K., Kagamiyama H. and Hayaishi O. (1980) ADP-ribosylation of histone H1. Identification of glutamic acid residues 2, 14, and the COOH-terminal lysine residue as modification sites. J. Biol. Chem. 255: 7616–7620

Ogata N., Ueda K. and Hayaishi O. (1980) ADP-ribosylation of histone H2B. Identification of glutamic acid residue 2 as the modification site. J. Biol. Chem. 255: 7610–7615

Alvarez-Gonzalez R. and Jacobson M. K. (1987) Characteri-zation of polymers of adenosine diphosphate ribose generated in vitro and in vivo. Biochemistry 26: 3218–3224

Cervantes-Laurean D., Minter D. E., Jacobson E. L. and Jacobson M. K. (1993) Protein glycation by ADP-ribose: studies of model conjugates. Biochemistry 32: 1528–1534

Cervantes-Laurean D., Jacobson E. L. and Jacobson M. K. (1996) Glycation and glycoxidation of histones by ADP-ribose. J. Biol. Chem. 271: 10461–10469

Mendoza-Alvarez H. and Alvarez-Gonzalez R. (1993) Poly(ADP-ribose) polymerase is a catalytic dimer and the automodification reaction is intermolecular. J. Biol. Chem. 268: 22575–22580

Mendoza-Alvarez H. and Alvarez-Gonzalez R. (2001) Regu-lation of p53 sequence-specific DNA-binding by covalent poly(ADP-ribosyl)ation. J. Biol. Chem. 276: 36425–36430

Kameoka M., Ota K., Tetsuka T., Tanaka Y., Itaya A., Okamoto T. et al. (2000) Evidence for regulation of NF-kappaB by poly(ADP-ribose) polymerase. Biochem. J. 346 Pt 3: 641–649

Adamietz P. and Rudolph A. (1984) ADP-ribosylation of nu-clear proteins in vivo. Identification of histone H2B as a major acceptor for mono- and poly(ADP-ribose) in dimethyl sulfate-treated hepatoma AH 7974 cells. J. Biol. Chem. 259: 6841–6846

Ohashi Y., Ueda K., Kawaichi M. and Hayaishi O. (1983) Activation of DNA ligase by poly(ADP-ribose) in chromatin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3604–3607

30 Yoshihara K., Itaya A., Tanaka Y., Ohashi Y., Ito K., Teraoka H. et al. (1985) Inhibition of DNA polymerase alpha, DNA

polymerase beta, terminal deoxynucleotidyl transferase, and DNA ligase II by poly(ADP-ribosyl)ation reaction in vitro. Biochem. Biophys. Res. Commun. 128: 61–67

Caiafa, P., and Zlatanova, J. (2009). CCCTC-binding factor meets poly(ADP-ribose) polymerase-1. J. Cell. Physiol. 219, 265–270.

El-Khamisy, S.F., Masutani, M., Suzuki, H., and Caldecott, K.W. (2003). A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. Nucleic Acids Res. 31, 5526–5533.

Farrar, D., Rai, S., Chernukhin, I., Jagodic, M., Ito, Y., Yammine, S., Ohlsson, R., Murrell, A., and Klenova, E. (2010). Mutational analysis of the poly(ADP-ribosyl)ation sites of the transcription factor CTCF provides an insight into the mechanism of its regulation by poly(ADP-ribosyl)ation. Mol. Cell. Biol. 30, 1199–1216.

Guastafierro, T., Cecchinelli, B., Zampieri, M., Reale, A., Riggio, G., Sthandier, O., Zupi, G., Calabrese, L., and Caiafa, P. (2008). CCCTC-binding factor activates PARP-1 affecting DNA methylation machinery. J. Biol. Chem. 283, 21873–21880.

Hassa, P.O., Haenni, S.S., Buerki, C., Meier, N.I., Lane, W.S., Owen, H., Gersbach, M., Imhof, R., and Hottiger, M.O. (2005). Acetylation of poly(ADP-bose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation f NF-kappaB-dependent transcription. J. Biol. Chem. 280, 40450–40464.

Hassa, P.O., Haenni, S.S., Elser, M., and Hottiger, M.O. (2006). Nuclear ADP-bosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70, 789–829.

Heale, J.T., Ball, A.R., Jr., Schmiesing, J.A., Kim, J.S., Kong, X., Zhou, S., Hudson, D.F., Earnshaw,W.C., and Yokomori, K. (2006). Condensin I interacts with the PARP-1-XRCC1 complex and functions in DNA single-strand break epair. Mol. Cell 21, 837–848.

Mendoza-Alvarez, H., and Alvarez-Gonzalez, R. (2001). Regulation of p53 sequence-specific DNA-binding by covalent poly(ADP-ribosyl)ation. J. Biol. Chem. 276, 36425–36430.

Cohen-Armon, M., Visochek, L., Rozensal, D., Kalal, A., Geistrikh, I., Klein, R., Bendetz-Nezer, S., Yao, Z., and Seger, R. (2007). DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation. Mol. Cell 25, 297–308.

Martin, N., Schwamborn, K., Schreiber, V.,Werner, A.,Guillier, C., Zhang, X.D., Bischof, O., Seeler, J.S., and Dejean, A. (2009). PARP-1 transcriptional activity s regulated by sumoylation upon heat shock. EMBO J. 28, 3534–3548.

Messner, S., Schuermann, D., Altmeyer, M., Kassner, I., Schmidt, D., Schar, P.,Muller, S., and Hottiger,M.O. (2009). Sumoylation of poly(ADP-ribose) poly-

merase 1 inhibits its acetylation and restrains transcriptional coactivator function. FASEB J. 23, 3978–3989.

Wang, T., Simbulan-Rosenthal, C.M., Smulson, M.E., Chock, P.B., and Yang, D.C. (2008). Polyubiquitylation of PARP-1 through ubiquitin K48 ismodulated by activated DNA, NAD+, and dipeptides. J. Cell. Biochem. 104, 318–328.

Wacker, D.A., Ruhl, D.D., Balagamwala, E.H., Hope, K.M., Zhang, T., and Kraus, W.L. (2007). The DNA binding and catalytic domains of poly(ADP- ribose) polymerase 1 cooperate in the regulation of chromatin structure and transcription. Mol. Cell. Biol. 27, 7475–7485.

Rajamohan, S.B., Pillai, V.B., Gupta, M., Sundaresan, N.R., Birukov, K.G., Samant, S., Hottiger, M.O., and Gupta, M.P. (2009). SIRT1 promotes cell survival under stress by deacetylation-dependent deactivation of poly(ADP-ribose) polymerase 1. Mol. Cell. Biol. 29, 4116–4129.

Hassa, P.O., Haenni, S.S., Buerki, C., Meier, N.I., Lane, W.S., Owen, H., Gersbach, M., Imhof, R., and Hottiger, M.O. (2005). Acetylation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF-kappaB-dependent transcription. J. Biol. Chem. 280, 40450–40464.

Haenni, S.S., Hassa, P.O., Altmeyer, M., Fey,M., Imhof, R., and Hottiger, M.O. (2008). Identification of lysines 36 and 37 of PARP-2 as targets for acetylation and auto-ADP-ribosylation. Int. J. Biochem. Cell Biol. 40, 2274–2283.

Stilmann, M., Hinz, M., Arslan, S.C., Zimmer, A., Schreiber, V., and Scheidereit, C. (2009). A nuclear poly(ADP-ribose)-dependent signalosome confers DNA damage-induced IkappaB kinase activation. Mol. Cell 36, 365–378.

Hassa, P.O., and Hottiger, M.O. (2002). The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders. Cell. Mol. Life Sci. 59, 1534–1553.

Hassa, P.O., and Hottiger, M.O. (2008). The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. Front. Biosci. 13, 3046–3082.

Hassa, P.O., Buerki, C., Lombardi, C., Imhof, R., and Hottiger, M.O. (2003). Transcriptional coactivation of nuclear factor-kappaB-dependent gene expression by p300 is regulated by poly(ADP)-ribose polymerase-1. J. Biol. Chem. 278, 45145–45153.

Bouchard, V.J., Rouleau, M., and Poirier, G.G. (2003). PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. Exp. Hematol. 31, 446–454.

Woodhouse, B.C., and Dianov, G.L. (2008). Poly ADP-ribose polymerase-1: an international molecule of mystery. DNA Repair (Amst.) 7, 1077–1086.

Schreiber, V., Ame, J.C., Dolle, P., Schultz, I., Rinaldi, B., Fraulob, V., Menissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. J. Biol. Chem. 277, 23028–23036.

Yelamos, J., Schreiber, V., and Dantzer, F. (2008). Toward specific functions of poly(ADP-ribose) polymerase-2. Trends Mol. Med. 14, 169–178.

de Murcia, J.M., Niedergang, C., Trucco, C., Ricoul, M., Dutrillaux, B., Mark, M., Oliver, F.J.,Masson,M., Dierich, A., LeMeur,M., et al. (1997). Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 7303–7307.

Bryant, H.E., Petermann, E., Schultz, N., Jemth, A.S., Loseva, O., Issaeva, N., Johansson, F., Fernandez, S., McGlynn, P., and Helleday, T. (2009). PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination. EMBO J. 28, 2601–2615.

Chang, P., Coughlin, M., and Mitchison, T.J. (2005). Tankyrase-1 polymerization of poly(ADP-ribose) is required for spindle structure and function. Nat. Cell Biol. 7, 1133–1139.

Cohen-Armon, M., Visochek, L., Rozensal, D., Kalal, A., Geistrikh, I., Klein, R., Bendetz-Nezer, S., Yao, Z., and Seger, R. (2007). DNA-independent PARP-1activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation. Mol. Cell 25, 297–308.

Zampieri, M., Passananti, C., Calabrese, R., Perilli, M., Corbi, N., De Cave, F., Guastafierro, T., Bacalini, M.G., Reale, A., Amicosante, G., et al. (2009). Parp1 localizes within the Dnmt1 promoter and protects its unmethylated state by its enzymatic activity. PLoS ONE 4, e4717.

Caiafa, P., and Zlatanova, J. (2009). CCCTC-binding factor meets poly(ADP-ribose) polymerase-1. J. Cell. Physiol. 219, 265–270.

Caiafa, P., Guastafierro, T., and Zampieri, M. (2009). Epigenetics: poly(ADP-ribosyl)ation of PARP-1 regulates genomic methylation patterns. FASEB J. 23, 672–678.

9. Sažetak

Apoptotička smrt stanice je aktivan proces koji uključuje specifične enzime sposobne da cijepaju DNA u fragmente veličine nukleosoma.

Poli(ADP-ribozilacija) je post-translacijska modifikacija koja vrši ulogu u popravku oštećenja DNA, DNA replikaciji, viralnoj integraciji, a modulacija ovog procesa događa se tijekom programirane stanične smrti.

Poli(ADP-riboza)polimeraza-1 je uključena u put stanične smrti koji je ovisan o kaspazama, ali i u onaj koji je neovisan, u kojem važnu ulogu imai faktor indukcije apoptoze (AIF).

U kaspaza-ovisnom putu, u egzekucionoj fazi, PARP-1 je inaktiviran i pocijepan kaspazama 3 i 7 koje razdvajaju PARP-1 DNA veznu domenu od njegove katalitičke domene. Inaktivacija PARP-1 je način uštede energije jer se tako smanjuje potrošnja NAD+ i ATP-a. Ukoliko bi stanica aktivirala PARP-1, a ne bi imala dovoljno energije za izvršenje procesa apoptoze, tada je moguće da bi PARP-1 usmjerio stanicu u nekrozu.

PARP-1 aktivatori uključujući N-metil-N'-nitro-N-nitroguanidin (MNNG), vodikov peroksid i NMDA induciraju translokaciju AIF iz mitohondrija u nukleus što dovodi do stanične smrti.

U AIF putu stanične smrti ne dolazi do zaustavljanja karakterističnih događaja od strane inhibitora kaspaza, već od inhibitora PARP-1 ili u PARP-1 knockout staničnim linijama. Stoga, je stanična smrt uzrokovana translokacijom AIF ovisna o poli(ADP-ribozil)aciji. Kako poli(ADP-ribozil)acija regulira AIF, preko nedostatka NAD+ ili PAR ili otpuštanjem iz mitohondrija, još nije poznato.

Aktivnost enzima PARP-1 se može zaustavljati kemikalijama, overekspresijom PARP DNA veznih domena, utišavanjem gena i korištenjem antisense RNA. Saznanja o ovim vrstama inhibice može pomoći prilikom stvaranja novih, efikasnijih lijekova u kemoterapiji.

Danas se vode mnoga istraživanja koja analiziraju poveznicu između različitih procesa unutar apoptoze, ali na temelju trenutnih informacija dobivenih proučavanjem aktivnosti PARP-1 pod utjecajem različitih stimulansa apoptoze ne možemo formirati generalni model apoptoze.

9.Summary

Apoptotic cell death is an active process involving specific enzymes capable of cleaving DNA into nucleosome-sized fragments.

Poly (ADP-ribosylation) is a post-translational modification, which performs a role in repair of DNA damage, DNA replication, viral integration and modulation of this process which occurs during programmed cell death.

Poly (ADP-ribose)polymerase-1 is involved in the path of cell death which is caspase-dependent, but also in one that is independent, in which an important role belongs to apoptosis induction factor (AIF).

In the caspase-dependent way, in the egzecution stage, PARP-1 is inactivated and cleaved by caspase 3 and 7 that separate the PARP-1 DNA binding domain from its catalytic domain. Inactivation of PARP-1 is a way to save energy because it reduces consumption of NAD + and ATP. If the cells activated PARP-1, and would not have enough energy to carry out a process of apoptosis, it is possible that PARP-1 will lead the cell towards necrosis.

PARP-1 activators, including N-methyl-N'-nitro-N-nitroguanidin (MNNG), hydrogen peroxide and NMDA, induces translocation of AIF from mitochondria to nucleus, leading to cell death.

The AIF-cell death pathway does not halt characteristic events by caspase inhibitors, but rather by inhibitors of PARP-1 or PARP-1 knockout cell lines. Therefore, the cell death caused by translocation of AIF-dependent poly(ADP-ribozyl)ation.

How poly(ADP-ribozyl)ation regulates AIF, through lack of NAD + or PAR, or AIF release from mitochondria is not yet known.

Activity of the enzyme PARP-1 can be stoped by chemicals, overexpression of PARP DNA binding domains, and gene silencing using antisense RNA. Learning about these types of inhibition can assist in the creation of new, more effective drugs in chemotherapy.

Today it has many studies that analyze the link between the various processes in apoptosis, but based on current information obtained by studying the activities of PARP-1 is influenced stimuli we can not form a general model of apoptosis.