

საჯარო სამართლის იურიდიული პირი
მოლეკულური ბიოლოგიისა და ბიოლოგიური ფიზიკის ინსტიტუტი

ზ უ რ ა ზ რ ე ვ ა ზ ი ს ძ ე ც ე ც ხ ლ ა ძ ე

ეუკარიოტული უჯრედების ბირთვული მატრიქსის
პოლი(ADP-რიბოზა)პოლიმერაზის თვისებებისა
და ბიოლოგიური როლის შესწავლა

ბიოლოგიის მეცნიერებათა კანდიდატის
სამეცნიერო ხარისხის მოსაპოვებლად წარმოდგენილი

დ ი ს ე რ ტ ა ც ი ა

03.00.03 – მოლეკულური ბიოლოგია

სამეცნიერო ხელმძღვანელები: თენგიზ ზაალიშვილი,

ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი,

საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის

წევრ-კორესპონდენტი, პროფესორი

გიორგი ზაალიშვილი,

ბიოლოგიის მეცნიერებათა კანდიდატი

თბილისი
2006

ს ა რ ზ ე ვ ი

შესავალი.

თავი I ლიტერატურის მიმოხილვა.

- 1.1 ბირთვული მატრიქსი.
- 1.2 რგოლური დნმ და დნმ-ის ტოპოლოგია.
- 1.3 დნმ-ტოპოიზომერაზები.
- 1.4 pADPr-ის ფერმენტული სინთეზი და დეგრადაცია.
- 1.5 PARP-ული აქტივობის მქონე ცილების ოჯახი.
- 1.6 პოლი-ADP-რიბოზილირების ბიოლოგიური როლი.
- 1.7 უჯრედის სიკვდილის ფორმები.

თავი II ექსპერიმენტული ნაწილი.

- 2.1 რეაქტივები.
- 2.2 ქსოვილებიდან ბირთვების გამოყოფა.
- 2.3 ცილის კონცენტრაციის განსაზღვრა.
- 2.4 ბირთვული მატრიქსის მიღება.
- 2.5 ბირთვებსა და ბირთვულ მატრიქსებში PARP-ული აქტივობის განსაზღვრა.
- 2.6 ბირთვებსა და ბირთვულ მატრიქსებში დნმ-პოლიმერაზული აქტივობის განსაზღვრა.
- 2.7 ადამიანის პერიფერიული სისხლისაგან მონონუკლეარული ლეიკოციტების მიღება.
- 2.8 ვირთაგვას თავის ტვინის ქერქისაგან ნეირონებით გამდიდრებული ფრაქციის მიღება.
- 2.9 უჯრედების შემცველი აგაროზის ბლოკების მიღება.
- 2.10 აგაროზის ბლოკებში დაფიქსირებული უჯრედების პერმეაბილიზაცია. PARP-ული და დნმ-ტოპოიზომერაზული რეაქციები.
- 2.11 გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში.

თავი III მიღებული შედეგები და მათი განხილვა.

- 3.1 ADP-რიბოზილირება აძლიერებს დნმ-ის მარყუქების დახლეჩას ბირთვულ მატრიქსში.

3.2 Mg^{2+} -ის, Cu^{2+} -ის, Zn^{2+} -ის კათიონების და ბიოგენური პოლიამინების ზემოქმედება ვირთაგვას ღვიძლის უჯრედების ბირთვული მატრიქსის პოლი(ADP-რიბოზა)პოლიმერაზულ აქტივობაზე.

3.3 პოლი(ADP-რიბოზა)პოლიმერაზის ეფექტური ინჰიბიტორების პროექტირება ინდოლის ბირთვის შემცველი ნაერთების საფუძველზე.

3.4 ADP-რიბოზილირების გავლენა რენტგენის სხივებით დასხივებული ვირთაგვების თავის ტვინის ბირთვებისა და ბირთვული მატრიქსის ენდოგენურ დნმ-პოლიმერაზულ აქტივობაზე.

დასკვნები.

ლიტერატურის ნუსხა.

შესავალი

ეუკარიოტულ ბირთვებში დნმ-ის გრძელი მოლეკულების კომპაქტურად ჩალაგება ისე, რომ შესაძლებელი იყოს გენომის გაორმაგება და მისგან ინფორმაციის ამოკითხვა, თანამედროვე ბიოლოგიის ერთ-ერთ ძირითად პრობლემას წარმოადგენს.

ცნობილია, რომ ბირთვში დნმ სხვა ცილოვან კომპლექსებთან ერთად წარმოდგენილია ზესპირალური, 30nm დიამეტრის მქონე ფიბრილების სახით, რომლებიც ბირთვულ მატრიქსთან პერიოდული მიმაგრებით წარმოქმნიან მარყუჟებს. ისინი ტოპოლოგიურად დამოუკიდებელი ერთეულებია, რომელთა ტოპოლოგია მარყუჟების მატრიქსთან მიმაგრების უბნებთან ასოცირებული ცილა-ფერმენტების დნმ-ტოპოიზომერაზების საშუალებით განისაზღვრება. რადგან, ტოპოლოგიური გარდაქმნები უმნიშვნელოვანესია ბიოლოგიური პროცესების წარმართვისათვის დნმ-ტოპოიზომერაზები მკვლევართა ყურადღების ცენტრში იმყოფებიან.

ეუკარიოტულ უჯრედებში ბირთვული ცილების პოსტრანსლაციური მოდიფიკაცია ასევე მჭიდროდ არის დაკავშირებული გენეტიკურ პროცესებთან. ერთ-ერთ ასეთ, ცილების შექცევად, პოსტრანსლაციურ მოდიფიკაციას ახდენს

ფერმენტი პოლი(ADP-რიბოზა)პოლიმერაზა (PARP), რომელიც NAD-ის მოლეკულებს გარდაქმნის (ADP-რიბოზა)_n-ში და ახდენს მათ კოვალენტურ (ან არაკოვალენტურ) გადატანას სხვადასხვა ცილებზე. პოლიმერის დიდი უარყოფითი მუხტის გამო მნიშვნელოვნად იცვლება სამიზნე ცილების ფუნქცია.

წინამდებარე სადისერტაციო ნაშრომი აღრმავებს ცოდნას, ბირთვული მატრიქსის, მასთან ასოცირებული PARP-ის და დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ის (TOPO II) შესახებ. შესწავლილია სხვადასხვა ბივალენტური იონების და ზოგიერთი ახლადსინთეზირებული ნაერთის გავლენა PARP-ულ აქტივობაზე. ნაჩვენებია, რომ ADP-რიბოზილირება ახდენს TOPO II-ის აქტივობის რეგულაციას. მიღებულია მონაცემები, რომლებიც მიუთითებენ ADP-რიბოზილირების როლზე ბირთვულ მატრიქსთან ასოცირებული დნმ-ის რეპარაციაში.

ლიტერატურის მიმოხილვა

1.1 ბირთვული მატრიქსი

დღეისათვის არსებობს უამრავი ექსპერიმენტული მონაცემები, რომლებიც გენეტიკური მასალის მაღალი რიგის ორგანიზაციის მისივე ფუნქციონირებაში მნიშვნელოვან როლზე მიუთითებენ [1]. ბირთვული დნმ-ის ასეთი მაღალი რიგის ორგანიზაციის ფორმირებაში და მის ფუნქციონირებაში მონაწილეობას ღებულობს ბირთვის ნარჩენი სტრუქტურები– ბირთვული მატრიქსი [2].

ტერმინი „ბირთვული მატრიქსი“ პირველად ბერეზნისა და კოფის მიერ იქნა გამოყენებული [3] იმ სტრუქტურების მიმართ, რომლებიც ბირთვის არაიონური დეტერგენტით, ნუკლეაზებით და მაღალი იონური ძალის მქონე ხსნარით თანმიმდევრობითი დამუშავებისას მიიღებოდა. ბირთვების ასეთი დამუშავების შემდეგ ნარჩენი სტრუქტურები წარმოდგენილი იყო თხელი ცილოვანი შრით, რომელიც შიგნიდან ეკვროდა ბირთვის გარსს (ბირთვული ლამინა), ნარჩენი ბირთვაკით და შიდა ფიბრილარულ-გრანულარული ბადით (შიგა მატრიქსი).

ბირთვული მატრიქსის შემადგენლობაში შემავალი კომპონენტები დაახლოებით ასეა განაწილებული: დნმ - 0.1%, რნმ - 1,2%, არაპისტონური ცილები - 98% და ფოსფოლიპიდები - 1.1% [4]. თუმცა მათი რაოდენობრივი თანაფარდობა მნიშვნელოვნადაა დამოკიდებული ბირთვული მატრიქსის გამოყოფის პირობებზე.

ქუკისა და ბრაზელის შემოთავაზებული იქნა ბირთვული მატრიქსის მიღების კიდევ ერთი მეთოდი [5]. უჯრედების ან ბირთვების ლიზირება ხდებოდა საქაროზას გრადიენტში არაიონური დეტერგენტის თანაობისას მაღალ იონურ ძალაზე. ამის შემდეგ ბირთვული დნმ-ის ნუკლეაზებით დამუშავებისას მიიღებოდა ბირთვული მატრიქსი. ამ მეთოდის ვარიაციას წარმოადგენს ბირთვული დნმ-ის ეგზოგენური და ენდოგენური ნუკლეაზებით ჰიდროლიზი და 2M NaCl-ის ხსნარით ბირთვული ცილების ექსტრაქცია. ზოგ შემთხვევაში ბირთვული მატრიქსის გამოყოფის თითოეულ ეტაპზე ახდენენ პრეპარატის რნმ-აზით დამუშავებას.

ბირთვული მატრიქსის შემადგენელი კომპონენტებიდან ყველაზე მეტად ბირთვული ლამინა არის შესწავლილი [6]. ძუძუმწოვრებში იგი სამი პოლიპეპტიდითაა (A, B და C ლამინები) წარმოდგენილი. რომელთა მოლეკულური მასა ვარირებს 60-70 kDa ფარგლებში. A და C ლამინები B ტიპის ლამინასაგან განსხვავებით იმუნოლოგიური და პეპტიდური შემადგენლობით ძალიან მსგავსია. B ტიპის ლამინები მჭიდროდ არის დაკავშირებული ბირთვის გარსთან. შესაძლოა სწორედ ის არის პასუხისმგებელი ბირთვულ ლამინასა და შიგაბირთვულ მემბრანას შორის კავშირზე [7]. ბირთვული ლამინა მონაწილეობს დებულობს დნმ-ის სივრცული ორგანიზაციის ფორმირებაში ინტერფაზის სტადიაზე [8]. არ არის გამორიცხული, რომ A ტიპის ლამინა ურთიერთქმედებდეს უშუალოდ დნმ-თან [9]. ზოგადად, ლამინის შემადგენელი პოლიპეპტიდები უპირატესად დნმ-ის AT წყვილებით მდიდარ უბნებს უკავშირდებიან. მიტოზის დროს ბირთვული ლამინის დეპოლიმერიზირება შექცევადია, რომელიც ბირთვული მემბრანის რღვევა-რეკონსტრუქციასთან და დნმ-ის ინტერფაზური ორგანიზაციის მეტაფაზურში გადასვლასთან კორელირებს. ასე, რომ თუ

ინტერფაზაში ცილა-ლამინები ბირთვის შიგა მემბრანებთანაა ლოკალიზებული, მიტოზის დროს ისინი თავისუფლად დიფუნდირებენ უჯრედში. ასეთი სურათი ტელოფაზამდე არის შენარჩუნებული, სანამ ეს ცილები თავს არ მოიყრიან შვილობილი ქრომატიდების ირგვლივ [10].

იზოლირებული ბირთვებიდან ლიპიდებისა და ქრომატინის ექსტრაქციის შემდეგ დნმ-თან ერთად ბირთვულ მატრიქსთან დაკავშირებული რჩება თითქმის მთელი რნმ. ბირთვული ცილების მაღალიონური ხსნარით ექსტრაქციამდე, ბირთვების რნმ-აზით დამუშავებისას ქრება შიგაბირთვული მატრიქსი, მაშინ როდესაც იგი შენარჩუნებულია ექსტრაქციის შემდეგ რნმ-აზით დამუშავებისას. ეს მონაცემები შიდა მატრიქსში რიბონუკლეოპროტეინების (RNP) არსებობაზე მიუთითებენ [11]. მეორე შემთხვევაში შიგაბირთვული კომპონენტების შენარჩუნება სავარაუდოდ რნმ-ის, მატრიქსის შემადგენელი ზოგიერთი კომპონენტების მიერ, გადაფარვით არის განპირობებული. თუმცა ზოგიერთი ავტორის აზრით ბირთვების მატრიქსული პრეპარატი, რნმ-აზით დამუშავებისაგან დამოუკიდებლად, ყოველთვის შეიცავს როგორც პერიფერიულ შრეს ასევე შიგაბირთვულ ფიბრილარულ-გრანულარულ ბადეს [12].

დიდი ხნის განმავლობაში მატრიქსის შემადგენელი კომპონენტები—ლიპიდები რჩებოდა მკვლევართა ყურადღების გარეშე. ბირთვების გამოყოფის მეთოდების არა სრულყოფილების გამო ფიქრობდნენ, რომ მატრიქსის პრეპარატებში ლიპიდები წარმოადგენდნენ ციტოპლაზმური მემბრანის ან ბირთვის გარსის ნარჩენ კომპონენტებს. თუმცა პირველი მონაცემები ბირთვის შიგნით ლიპიდების არსებობაზე ჯერ კიდევ 70-იანი წლების დასაწყისში იქნა მიღებული. ნაჩვენებია, რომ ლიმონმჟავაში გამოყოფილი ღვიძლის უჯრედის ბირთვებს არ გააჩნიათ ბირთვული მემბრანა, მაგრამ მოიცავენ ფოსფოლიპიდების დიდ რაოდენობას. ბირთვული ფოსფოლიპიდები შემადგენლობით მკვეთრად განსხვავდებიან მიტოქონდრიული და მიკროსომული ფოსფოლიპიდებისაგან, ამიტომ მათი მემბრანული წარმომავლობა ნაკლებად სავარაუდოა. მოგვიანებით ჯექსონმა და თანაავტორებმა [13] აჩვენეს, რომ ბირთვული დნმ-ის ~1% დაკავშირებულია ლიპიდის შემცველ მასალასთან, როგორც ჩანს

ლიპოპროტეინთან. ამაზე მიუთითებს ჰეთფილდის [14] ნაშრომი, სადაც ნაჩვენებია, რომ EDTA_ბუთანოლის ნარევით, რომელიც იწვევს სწორედ ლიპოპროტეინული კომპლექსის რღვევას, ადგილი აქვს დნმ_ლიპიდის კომპლექსის დაშლას. ბოლო პერიოდში შიგაბირთვული ლიპიდის შემცველი სტრუქტურების არსებობამ ფართო აღიარება მოიპოვა.

ისევე როგორც ლიპიდებმა, ბირთვის პოლისაქარიდებმაც შედარებით გვიან მიიქციეს მეცნიერთა ყურადღება. ერთერთი პირველი იყო ბიჩკოვის და თანაავტორების შრომა, რომელშიც ნაჩვენებია იქნა ჰექსოზამინების არსებობა ბირთვულ პრეპარატებში. არსებობენ მონაცემები რომლებიც მიუთითებენ ბირთვში გლიკოპროტეინებისა და გლიკოზამინოგლიკანების არსებობაზე, რომლებიც ქონდროიტინების კლასს მიეკუთვნებიან. ხოლო მოგვიანებით გამოჩნდნენ შრომები რომლებიც უშუალოდ ბირთვული მარიქის გლიკოპროტეინებს შეეხებიან [15].

ინტერფაზულ ბირთვში დნმ წარმოდგენილია ტოპოლოგიურად დამოუკიდებელი მარყუჟ-დომენების სახით, რომელთა ზომა 5 kb-დან 200 kb-მდე მერყეობს. პირველად მარყუჟების (ყულფების) არსებობა დამტკიცდა, მარილის მაღალ კონცენტრაციებზე, ეთიდიუმ ბრომიდის თანაობისას, ბირთვებზე ჩატარებული სედიმენტაციური გაზომვებიდან. ჰისტონების მოცილების შემდეგ ბირთვულ ლამინასთან მიმაგრებული დნმ-ის ყულფები კარგად ჩანდა ელექტრონულ მიკროსკოპში [16].

იმ უჯრედების, ავტორადიოგრაფიულმა კვლევებმა, რომლებიც შეიცავდნენ [^3H] მონიშნულ თიმიდინს, ახლად რეპლიცირებული დნმ-ის, ყულფების მატრიქსთან მიმაგრების უბნებიდან ყულფების პერიფერიისაკენ გადაადგილება დაადასტურეს. რაც იმას მოწმობდა, რომ დნმ-ის რეპლიკაცია იწყებოდა ქრომატინის ყულფების ფუძეებიდან, ბირთვულ მატრიქსთან მიმაგრებული დნმ-პოლიმერაზული კომპლექსების საშუალებით. რეპლიცირებადი დნმ-ყულფები „მიძვრებიან“ მატრიქსთან დაფიქსირებულ პოლიმერაზულ კომპლექსებში. ჯერ-ჯერობით ცოცხალ უჯრედებში არ არის

ნანახი რეპლიცირებადი დნმ-ის ბირთვულ მატრიქსთან მყარად მიმაგრების უბნები [17].

მარყუქების მიმაგრების ადგილებში დნმ შეიცავს დაახლოებით 150-200 bp (წყვილი ნუკლეოტიდი) მქონე უბნებს რომელთაც MARs (Matrix-Attachment Regions) ან SARs (Scaffold-Attachment Regions) უწოდეს. ეს უბნები ტორსიული დამაბულობის გამო შეიძლება ერთჯაჭვიან მდგომარეობაშიც კი იყვნენ. *Drosophila*-ს გენომში MARs ერთმანეთისაგან 26 000-112 000 წყვილი ნუკლეოტიდითაა დაშორებული, რაც კარგ შესაბამისობაში მოდის ყულფების ნავარაუდევ ზომებთან [18]. ჩვეულებრივ, ბირთვულ მატრიქსთან MARs-ის კავშირი აძლიერებს ტრანსკრიპციას, თუმცა ზოგიერთი მონაცემების თანახმად, ზოგჯერ გენის ექსპრესიის რეპრესიაც ხდება [19]. ის, რომ MARs/SARs თანმიმდევრობები ადვილად ღღვებიან იმაზე მიუთითებს, რომ ისინი AAT-წყვილებით მდიდარ ფრაგმენტებს წარმოადგენენ.

SARs/MARs-ის კიდევ ერთი დამახასიათებელი თავისებურებაა, მათ შემადგენლობაში დიდი რაოდენობით თანმიმდევრობების არსებობა, რომლებსაც ახასიათებთ დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ის კონსენსუს თანმიმდევრობებთან მაღალი მსგავსება (70%-ზე მეტი ჰომოლოგია). *In vitro* ექსპერიმენტებში ნაჩვენებია, რომ თავგების და *Drosophila*-ს SARs სპეციფიკურად უკავშირდებიან საფუარის დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ს, და ამ ურთიერთქმედებას გააჩნია კოოპერატიული ხასიათი. დისტამიცინი აგრეთვე poly(dA) და poly (dT) თრგუნავს SARs-სა და დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ს შორის კავშირის სპეციფიკურობას. ეს შედეგები მიესადაგებიან მოდელს, რომლის მიხედვითაც დნმ-ტოპოიზომერაზა II ასრულებს სტრუქტურულ როლს, ამაგრებს რა ქრომოსომული დნმ-ის ყულფებს სკეფოლდთან, SARs-თან და სკეფოლდის ცილებთან სპეციფიკური ურთიერთქმედების გზით.

MARs/SARs სპეციფიკურ ცილების საშუალებით უკავშირდება ბირთვულ მატრიქსს. ამ ცილების უმრავლესობა წარმოდგენილია ყველა ტიპის უჯრედებში. მათგან საუკეთესოდ შესწავლილი MAR-დაკავშირებადი ცილაა-SATB1, რომელიც უპირატესად თიმოციტებში ექსპრესირდება. SATB1-ნოკაუტირებული თავგები

დაზადებიდან მალევე ილუპებოდა და არ ხდებოდა T უჯრედების ნორმალური განვითარება [20]. უჯრედებში SATB1 ცილების არყოფნა იწვევს მთელი გენების მინიმუმ 2%-ის დერეპრესიას და გენების (მათ შორის აპოპტოზთან დაკავშირებული გენების) ასეთი არანორმალური (inappropriate) ექსპრესია ახდენს T უჯრედების ნორმალური განვითარების ბლოკირებას. SATB1-დაკავშირებადი MAR თანმიმდევრობა ქრომატინის ყულფების ფუძეებში არის ლოკალიზებული მხოლოდ იმ უჯრედებში, რომლებშიც SATB1 ცილების ექსპრესია ხდება, ხოლო იმ უჯრედებში სადაც არ ხდება ამ ცილების ექსპრესია ისინი ყულფების პერიფერიებშია განლაგებული.

ბირთვული მატრიქსის პრეპარატების, ორგანოზომილებიან გელ-ელექტროფორეგრამაზე 200-მდე ზოლი ჩანს. გელში ზოლების ადგილმდებარეობა უჯრედის ტიპზეა დამოკიდებული, ხოლო ზოგიერთი ზოლის არსებობა არ არსებობა კორელირებს ავთვისებიანი გადაგვარების პროგრესირებასთან. დიდ ინტერესს იწვევს ბირთვული აქტინი იგი უკავშირდება ბირთვულ ცილებს, მათ შორის მიოზინს და სტრუქტურულ ცილა 4.1-ს [21], რომლებიც შეიძლება დაუკავშირდეს NuMA (nuclear mitotic apparatus) ცილებს. ამ ურთიერთქმედებას შესაძლოა კავშირი ჰქონდეს აქტინ-დაკავშირებად ბირთვულ სტრუქტურებსა და NuMA-დაკავშირებად სტრუქტურებს შორის. თუმცა, ბირთვული მატრიქსის შემადგენლობაში შემავალი აქტინის როლი ჯერ-ჯერობით უცნობი რჩება. არსებობს ვარაუდი თითქოს ბირთვული აქტინი ურთიერთქმედებს ბირთვულ რნმ-თან. შედარებით ახალი მონაცემების თანახმად კი აქტინ-დაკავშირებული ცილები ნანახი იქნა ქრომატინის მარეკონსტრუქტირებად კომპლექსებში [22].

მონაცემები იმის შესახებ, რომ ბირთვულ მატრიქსთან ასოცირებულია ზუსტად ის გენები, რომლებიც მოცემულ უჯრედებში აქტიურად ტრანსკრიბირდებიან, მიუთითებენ ბირთვული მატრიქსის მონაწილეობაზე დნმ-ის ტრანსკრიფციაში. ასე მაგალითად ნაჩვენები იქნა, რომ ბატის და ქათმის ერითრობლასტებში ბირთვულ მატრიქსთან დაკავშირებულია გლობინის გენები. არსებობს მონაცემები, რომლის თანახმადაც ქათმის ერითრობლასტებში ბირთვულ მატრიქსთან დაკავშირებულია 90%-ზე მეტი გლობინური მრნმ-ები და

მათი წინამორბედები, აგრეთვე მცირე ზომის რნმ-ები. მაშინ, როდესაც ერთროციტების ბირთვული მატრიქსი არ შეიცავს გლობინურ ორნმ-ებს. ქათმის კვერცხსავალში კი ბირთვულ მატრიქსთან შერჩევითად დაკავშირებული იყო ოვალბუმინის და ოვომუკოიდის ორნმ-ბი და მისი წინამორბედები. ამ მონაცემებზე დაყრდნობით გამოთქმულია მოსაზრება, რომ არამარტო ბიოსინთეზი არამედ ორნმ-ბის მომწიფებაც ხორციელდება ბირთვულ მატრიქსთან მჭიდრო ასოციაციაში. დნმ-თან დაკავშირებული რნმ-პოლიმერაზა II-ის განაწილების შესწავლამ აჩვენა, რომ მატრიქსიდან 10-დან 98%-მდე დნმ-ის მოცილების შემდეგ, მასთან ასოცირებული რჩებოდა რნმ-პოლიმერაზა II, რომლის ხვედრითი აქტივობა (გადათვლილი დნმ-ის ერთეულზე) იზრდებოდა 50-ჯერ [23]. რაც ასევე მიუთითებს მატრიქსის როლზე რნმ-ის სინთეზში.

მატრიქსთან მტკიცედ დაკავშირებადი დნმ-ის ფრაგმენტების და ჰისტონ-მოცილებული ქრომოსომების ორგანიზაციის ელექტრონულ-მიკროსკოპული შესწავლის საფუძველზე შემოთავაზებულია ინტერფაზური ქრომოსომების სტრუქტურულ-ფუნქციური ორგანიზაციის მოდელი [24]. ამ მოდელის მიხედვით ინტერფაზურ ქრომოსომებს გააჩნიათ დნმ-ის სტრუქტურული ორგანიზაციის ორი ტიპი: დნმ-ის ორგანიზაცია როზეტისმაგვარ სტრუქტურებში, რომლებიც დაკავშირებულია მატრიქსის ცილოვან გულგულთან და დნმ-ის ორგანიზაცია მარყუჟებად რომლებიც მიმაგრებულნი არიან ბირთვის მემბრანაზე. ფიქრობენ, რომ არააქტიური ქსოვილსპეციფიკური გენები ლოკალიზებულნი არიან როზეტისმაგვარ სტრუქტურებში, რაც განაპირობებს მათ მედეგობას დნმ-აზა I-ის მიმართ. ამ გენთა აქტივაციის დროს ადგილი აქვს როზეტების «გაშლას», რის შედეგადაც ქრომატინი ხელმისაწვდომი ხდება დნმ-აზა I-სთვის. რაც შეეხება კონსტიტუციურად ექსპრესირებად გენებს, ისინი ლოკალიზებულნი არიან ბირთვის შიგა მემბრანასთან მიმაგრებულ მარყუჟებში. ასეთ დომენებს ალბათ გააჩნიათ ტრანსკრიფციის უნარი ინტერფაზის ნებისმიერ პერიოდში.

TOPO II ალბათ წარმოადგენს ერთერთ ძირითად ცილას, რომელიც უნდა მონაწილეობდეს ქრომოსომული დნმ-ის მარყუჟული სტრუქტურის ორგანიზაციაში. მონაცემები მიუთითებენ, რომ ეს ფერმენტი ასოცირებულია

მატრიქსის შიგა ელემენტებთან [25]. ამავე დროს არის მონაცემები TOPO II-ის მონაწილეობის შესახებ ქრომოსომების კონდენსაციაში. რაც განპირობებული უნდა იყოს მისი უნარით შეცვალოს ქრომოსომული დნმ-ის ტოპოლოგიური მდგომარეობა და არა მისი «სტრუქტურული» ფუნქციით. ასე რომ მატრიქსის TOPO II შესაძლოა მონაწილეობდეს გენომის ფუნქციონირების რეგულაციაში დნმ-ის ტოპოლოგიის შეცვლის მეშვეობით.

1.2 რგოლური დნმ და დნმ-ის ტოპოლოგია

თავდაპირველად ბიოფიზიკურ კვლევებში ითვლებოდა, რომ ყოველთვის საქმე ჰქონდათ დნმ-ის ხაზოვან მოლეკულებთან. თუმცა ავტორადიოგრაფიულმა ანალიზმა აჩვენა, რომ ზოგიერთი ბაქტერიული დნმ შეკრული არის რგოლად.

პირველად რგოლური დნმ აღმოჩენილი იქნა ბაქტერიოფაგ ϕ X174-ზე მუშაობისას. ამ დნმ-ის შემადგენლობა იყო არასტანდარტული: $X_A \neq X_T$, $X_G \neq X_C$. გარდა ამისა ისინი ამჟღავნებდნენ მდგრადობას ეგზონუკლეაზების მიმართ. აქედან გამომდინარეობდა, რომ ϕ X174 ფაგის დნმ წარმოადგენდა ერთჯაჭვიან რგოლურ მოლეკულას რომელიც ელექტრონულ-მიკროსკოპულმა კვლევებმაც დაადასტურა.

სხვა ტიპის რგოლური დნმ პირველად აღმოჩენილი იქნა ბაქტერიოფაგ λ -ზე მუშაობისას. λ ფაგის დნმ-ის ულტრაცენტრიფუგირებით კვლევისას აღმოჩნდა, რომ იგი წარმოადგენს სხვადასხვა სედიმენტაციის კოეფიციენტის მქონე კომპონენტების ერთობლიობას. ზონალური ცენტრიფუგირების საშუალებით გამოყოფილი იქნა ერთ-ერთი კომპონენტი, რომელიც გარკვეული დროის შემდეგ გადადიოდა კომპონენტთა წონასწორულ ნარევიში. სხვადასხვა მეთოდების გამოყენებით ნაჩვენები იქნა, რომ ყველაზე ნელა ძვრადი 21S და 24S კომპონენტები წარმოადგენენ დნმ-ის ორჯაჭვიან წრფივ და ორჯაჭვიან რგოლურ ფორმებს შესაბამისად, რომელთა ერთმანეთში გადასვლა ხდებოდა დნმ-ის მოლეკულაში მოკლე ერთჯაჭვიანი კომპლემენტარული ბოლოების საშუალებით.

უკვე ნანახია დიდი რაოდენობით ცხოველური, ასევე ბაქტერიული და ვირუსული, პლაზმიდური და მიტოქონდრიული წარმოშობის რგოლური დნმ-

ები. მათი უმრავლესობა არ არის ერთჯაჭვიანი (როგორც $\phi X174$), არ აქვთ წყვეტები ერთ-ერთ ჯაჭვში და არ იმყოფებიან წონასწორობაში ხაზოვან ფორმასთან. პირიქით ისინი წარმოადგენენ რგოლურ ორჯაჭვიან დნმ-ებს უწყვეტი ჯაჭვებით. მათ შეკრულ ორჯაჭვიან რგოლურ სტრუქტურებს უწოდებენ λ ფაგის დნმ-ის მაგვარს კი ღია ორჯაჭვიან რგოლურ სტრუქტურებს. რგოლური ორჯაჭვიანი მოლეკულების, რომელთა ერთ-ერთ ჯაჭვში არის წყვეტა, ტუტე გარემოში ცენტრიფუგირებისას მიიღება წრფივი ჯაჭვი და ერთჯაჭვიანი რგოლი. pH-ის მაღალ მნიშვნელობაზე შესაძლებელია მოხდეს ფუძეებს შორის წყალბადური კავშირების რღვევა ჩაკეტილ ორჯაჭვიან რგოლურ სტრუქტურებშიც კი, მაგრამ ამ შემთხვევაში მიღებული ორი ერთჯაჭვიანი რგოლის განცალკევება შეუძლებელია. ისინი ხდებიან იმდენად ერთმანეთზე გადაჯაჭვულნი, რომ მიიღება გორგალი ერთმანეთში გადახლართული დნმ-ის ერთმაგი ჯაჭვებით.

შეკრული, რგოლური, ორჯაჭვიანი სტრუქტურების კოლაფსი ტუტე pH-ზე განპირობებულია ამ სტრუქტურებში არსებული ტოპოლოგიური შეზღუდვებით. ტოპოლოგიური თვალსაზრისით წრიული შეკრული დნმ ექვივალენტურია ორი კონტურისა, რომლებიც იმდენჯერაა ერთმანეთზე გადაჯაჭვული რამდენი ხვიაცაა ორმაგ სპირალში.

მათემატიკური თვალსაზრისით წრიული, შეკრული დნმ-ის მოლეკულა ორი ერთმანეთზე გადაჯაჭვული ზოლის ექვივალენტურია. რომლისთვისაც სამართლიანია შემდეგი ტოლობა:

$$Lk=Tw+Wr \quad (1)$$

ზოლების თეორია შემუშავებული იქნა ფულერის [26], ხოლო დნმ-ის შემთხვევაში გამოყენებულ იქნა კრიკის მიერ [27].

(1) ტოლობაში Lk (Linking)-შეჭიდულობის რიგი განისაზღვრება, ერთი კონტურის მიერ მეორე კონტურზე გადაჭიმული წარმოსახვითი ზედაპირის გადაკვეთათა ალგებრული რიცხვით. იგი ტოპოლოგიურად ინვარიანტული სიდიდეა და უცვლელია სანამ არ გავჭრით ზოლს დნმ-ის შემთხვევაში კი ერთ-

ერთ ან ორივე ჯაჭვს. მიღებულია, რომ L მარჯვენა სპირალებისთვის დადებითია, მარცხენა სპირალებისთვის კი უარყოფითი.

Tw (Twisting) წარმოადგენს ორი, ერთმანეთზე გადაჯაჭვული კონტურით შემოსაზღვრული ზოლის გრეხას და რიცხობრივად ზოლის სიბრტყის მართობული ვექტორის ბრუნვათა რიცხვის ტოლია, მისი ზოლის ღერძის მთელ სიგრძეზე გადაადგილებისას.

$$Tw = 1/2\pi \oint \omega ds \quad (2)$$

სადაც ω ღერძის სიგრძის ერთეულზე მოსული კუთხური სიჩქარეა. ხოლო ds ღერძის გასწვრივ სიგრძის ნაზრდი.

Wr (Writhing) ზოლის რაიზინგი, ზოლის ღერძის სივრცული ტრაექტორიით განისაზღვრება. დნმ-ის მოლეკულაში კი ორმაგი ჯაჭვის ღერძის სივრცული მდგომარეობით და სწორედ ეს სიდიდე განსაზღვრავს დნმ-ის ორჯაჭვიანი მოლეკულების ზესპირალიზაციას. ზოგადად ზეხვიების წარმოქმნას მიჰყავართ როგორც დნმ-ის გრეხასთან ასევე რაიზინგის წარმოქმნასთან, რომელიც ზეხვეულთა τ რიცხვით ხასიათდება $\tau = Lk - N/\gamma$. სადაც N ფუძეთა წყვილების რიცხვია მთელ მოლეკულაში, ხოლო γ ფუძეთა წყვილების რიცხვი ერთ ბიჯზე. იგი არ არის ტოპოლოგიურად ინვარიანტული სიდიდე და γ -ს განმსაზღვრელ გარემო პირობებზეა დამოკიდებული. γ -ს მცირედი შეცვლა τ -ს მნიშვნელოვან ცვლილებებს იწვევს. მოლეკულებს რომელთაც აქვთ ერთნაირი ქიმიური სტრუქტურა და განსხვავდებიან მხოლოდ ზეხვეულთა რიცხვით ეწოდებათ ტოპოიზომერები. ზესპირალური დნმ ხასიათდება σ ზეხვეულთა სიმკვრივით (დნმ-ის სიგრძის ერთეულზე მოსული ზეხვეულთა რიცხვით) და როცა $\sigma > 0$ დნმ ზესპირალიზებულია.

$$\sigma = \gamma\tau/N \quad (3)$$

ლიგანდების არარსებობისას ზესპირალიზებულ მოლეკულებს გააჩნიათ შედარებით დიდი თავისუფალი ენერგია, ვიდრე ორმაგი სპირალის ღია ფორმებს. ამის დამადასტურებელია ის ფაქტი, რომ ერთ-ერთ ჯაჭვში წყვეტის წარმოქმნისას ზეხვიები სპონტანურად ქრება. რის შედეგადაც მოლეკულა რელაქსირებულ მდგომარეობაში გადადის. ამ შემთხვევაში დიდი თავისუფალი ენერგია

განპირობებულია დნმ-ის მოლეკულის უფრო კომპაქტურ და უფრო მოწესრიგებულ-ზესპირალიზებულ მდგომარეობაში გადასვლით გამოწვეული ენტროპიის შემცირებით. ასევე მოლეკულის დეფორმაციისა და დამაბულობისას წარმოქმნილი ენტალპიის ნაზრდით.

უარყოფითი ზესპირალიზაცია ხელს უწყობს ორმაგი სპირალის ლღობას. ამ გზით ის უფრო აქტიურია, აქვს მიდრეკილება ურთიერთქმედებაში შევიდეს იმ მოლეკულებთან, რომლებიც ამცირებენ თავისუფალ ენერგიას. ესენია რეგულატორული და სტრუქტურული ცილები, ფერმენტები რომლებიც მონაწილეობენ დნმ-ის სინთეზში, ტრანსკრიფციაში, რეპარაციასა და რეკომბინაციაში. მათი ფუნქციონირება მნიშვნელოვნად განისაზღვრება დნმ-ის ზესპირალიზაციით და ზესპირალიზაციის ნიშნით.

ფერმენტებს, რომლებიც დნმ-ის ზესპირალიზაციის ხარისხს ცვლიან უწოდეს დნმ-ტოპოიზომერაზები.

1.3 დნმ-ტოპოიზომერაზები

სამ ათეულ წელზე მეტია რაც ტოპოიზომერაზების უჯრედულ როლზე ინფორმაცია გროვდება და ამის მიუხედავად არსებობს მხოლოდ ზოგადი წარმოდგენები მათი ბიოლოგიურ პროცესებში მონაწილეობის შესახებ. დღესდღეობით ტოპოიზომერაზები განიხილებიან როგორც უმნიშვნელოვანესი კომპონენტები როგორც უჯრედული ორგანიზმებისათვის ასევე უამრავი ვირუსებისათვის.

დნმ-ტოპოიზომერაზები შესანიშნავი სიზუსტითა და სისწრაფით ახორციელებენ დნმ-ის გახლეჩას და შემდგომ მანიპულაციებს რომლის ენერგოუზრუნველყოფა ხდება დნმ-ის ზესპირალიზაციის ან ATP-ის ჰიდროლიზის ხარჯზე.

დნმ-ტოპოიზომერაზები იყოფიან ოთხ განსხვავებულ ჯგუფად, რომლებშიც თითოეულს გააჩნია უნიკალური სტრუქტურა და ფუნქცია [28].

IA ტიპის ტოპოიზომერაზები დნმ-ის დუბლექსში ერთ-ერთი ჯაჭვის გაწყვეტითა და მასში მეორე ჯაჭვის გატარებით ცვლის შეჭიდულობის რიგს ეტაპობრივად +1 სიდიდით $\Delta Lk=+1$ [29].

IB ტიპის ტოპოიზომერაზები დუბლექსის ერთ-ერთ ჯაჭვს წყვეტს და მეორე ინტაქტური, ფოსფოდიეთერული კავშირის გასწვრივ ხდება ერთ-ერთი დუბლექსის ბრუნვა მეორე ნახევრის მიმართ (ერთი ციკლის დროს შესაძლებელია მოხდეს ხუთზე მეტი ტრიალი). შეჭიდულობის რიგის ცვლილება ამ შემთხვევაში ჯამურ ბრუნვათა რიცხვით განისაზღვრება. ზოგადად $\Delta Lk=+/-n$ [30].

IIA ტიპის ტოპოიზომერაზების ფუნქციონირების მექანიზმი პრინციპულად განსხვავდება I ტიპის ტოპოიზომერაზების მოქმედების მექანიზმისაგან. ისინი მოიხმარენ ATP-ს აქტიური ტრანსპორტისთვის და დნმ-ის ერთი დუბლექსი გააქვთ მეორე, გაწყვეტილ და ფერმენტ-დაკავშირებულ დუბლექსში. თუ ორთავე დუბლექსი ერთიდაიმავე დნმ-ს ეკუთვნის მაშინ ტოპოიზომერაზული რეაქცია შეჭიდულობის რიგს ცვლის $\Delta Lk=+/-2$ [31].

IIB ტიპის ტოპოიზომერაზები შედარებით ახალი აღმოჩენილია და საერთო დომენები და კატალიზური თვისებები აქვთ IIA ტიპის ტოპოიზომერაზებთან. თუმცა მათი გლობალური სტრუქტურა მაინც განსხვავებულია.

ყველა ეს ტოპოიზომერაზები გამოიყენებენ თიროზინის ნაშთს იმისათვის, რომ იერიში მიიტანონ და გაწყვიტონ დნმ-ის ფოსფატური ჯაჭვი. გარდა ამისა ფერმენტის თიროზინის ნაშთსა და დნმ-ის ჰიდროქსილის ჯგუფს შორის კოვალენტურ კავშირში ხდება ფოსფოდიეთერული ბმის ენერგიის გადასვლა და ცილა-დნმ-ის ასეთ მტკიცე კავშირს მინიმუმამდე დაჰყავს დნმ-ის მოლეკულის შემთხვევითი დაზიანების შესაძლებლობა [32].

IA, IIA, IIB ტიპის ტოპოიზომერაზებს აქვთ ორი საერთო დომენი, რომელიც აუცილებელია დნმ-თან დასაკავშირებლად და მის გასახლეჩად [33]. ამათგან პირველი 5Y-CAP დომენი შეიცავს „winged-helix“ ნაკვეთ სტრუქტურას, რომელიც ნანახია სხვა უამრავ დნმ-დაკავშირებად ცილებში. ამ დომენის თიროზინის კატალიზური ნაშთი ფოსფოდიეთერული, ნუკლეოფილური შეტევის

შემდეგ კოვალენტურად უკავშირდება დნმ-ის 5' ბოლოს მეორე „toprim“ დომენი კი ახდენს დნმ-ის გახლეჩას. იგი შეიცავს ოთხ ან ხუთ პარალელურად განლაგებულ β -შრებს რომელთა შორისაც განლაგებულია α -სპირალები.

ორი ან სამი კონსერვატული, მჟავური ნაშთისაგან შედგენილი კლასტერი ლოკალიზებულია დომენის ერთ-ერთ უბანში სხვადასხვა ყულფებს შორის, რომლებიც ერთმანეთთან აკავშირებენ მეორეული სტრუქტურის ელემენტებს. ეს კლასტერი ქმნის Mg^{2+} იონებისათვის დაკავშირებად უბანს, რომელიც ფერმენტის სრული კატალიზური აქტივობისთვის აუცილებელი კოფაქტორია [34].

IB ტიპის ტოპოიზომერაზებს არ გააჩნიათ სხვა ტოპოიზომერაზებთან საერთო სტრუქტურული ელემენტები მაგრამ გააჩნიათ საერთო კატალიზური დომენი თიროზინ-რეკომბინაზებთან. ეს დომენი შეიცავს რვიდან ათამდე α -სპირალს და მოკლე ანტიპარალელურ β -შრეს. განსხვავებით 5Y-CAP/toprim ტოპოიზომერაზებისაგან IB ტიპის ფერმენტები დნმ-ის გახლეჩის შემდეგ კოვალენტურად უკავშირდებიან გახლეჩილი დნმ-ის 3'-ბოლოს და ამისათვის არ სჭირდებათ ბივალენტური მეტალის იონები როგორიცაა Mg^{2+} [35].

ATP-სთან დაკავშირებას და მის ჰიდროლიზს მოითხოვს ყველა II ტიპის ტოპოიზომერაზა დნმ-ის ერთი დუპლექსის მეორეში გასატარებლად. ATP-აზური უბანი შეიცავს ორ განსხვავებულ დომენს, რომელიც როგორც ახლახან აღმოჩნდა კონსერვატულია IIA და IIB ტიპის ტოპოიზომერაზებში [36].

ATP-აზური უბნის N-ტერმინალური დომენი შეიცავს რვადნაკეც ანტიპარალელურ β -შრეს, რომლის ერთ მხარეს განლაგებულია ხუთი α -სპირალი. ეს დომენი მოიცავს GHKL ნაკეცს, რომელიც თავის მხრივ შეიცავს გლიცინით გამდიდრებულ P-მარყუჟოვან მოტივს. II ტიპის ტოპოიზომერაზებში ATP-ის დაკავშირება იწვევს GHKL დომენის დიმერიზაციას.

E.coli-ს დნმ-გირაზაზე ჩატარებული კვლევები გვიჩვენებენ, რომ C-ტერმინალური დომენი მნიშვნელოვანია ATP-ის ჰიდროლიზისათვის.

IA ტიპის ტოპოიზომერაზების ოჯახი შეცავს ზოგიერთ კარგად შესწავლილ ფერმენტებს. ესენია E.coli-ს ტოპოიზომერაზა I და III აგრეთვე ეუკარიოტული ტოპოიზომერაზა III. სტრუქტურული კვლევები გვიჩვენებს, რომ

ამ ცილების კატალიზური უბნის შუა ნაწილი შედგება ოთხი დომენისაგან რომლებიც ერთად ქმნიან ტოროიდალურ არქიტექტურას [37].

ახლანდელი წარმოდგენების თანახმად E.coli-ს ტოპოიზომერაზა III უკავშირდება დნმ-ის ერთ ჯაჭვს ორი CAP-ის მსგავსი დომენის ზედაპირის გასწვრივ. ამას მოჰყვება დნმ-ის ერთ-ერთი ჯაჭვის გახლეჩა და მეორე ჯაჭვის ამ ჭრილში გატარება (ერთჭიმვრიანი მექანიზმი) [38].

აღსანიშნავია, რომ ტოპოიზომერაზა III/დნმ კომპლექსი არ ამჟღავნებს Mg^{2+} იონებთან დაკავშირების აუცილებლობას. მიუხედავად იმისა, რომ IA ტიპის ტოპოიზომერაზები არ საჭიროებენ მეტალის იონებს დნმ-ის გასახლეჩად, Mg^{2+} -ის იონები ზრდიან დნმ-ის გახლეჩის სიჩქარეს და აუცილებელია დნმ-ის სუპერსპირალის რელაქსაციისათვის [39].

IIA ტიპის ტოპოიზომერაზების ოჯახს მიეკუთვნება E.coli-ს დნმ-გირაზა და ტოპოიზომერაზა IV, ეუკარიოტული ტოპოიზომერაზა II და ბაქტერიოფაგის ტოპოიზომერაზა II. ამ ფერმენტებში სუბერთეულების კომპოზიცია მრავალფეროვანია. ეუკარიოტული IIA ტიპის ტოპოიზომერაზები ჰომოდიმერებია, ხოლო ბაქტერიული ფერმენტებისა კი ჰეტეროტეტრამერები. ზოგიერთი ფაგის IIA ტიპის ტოპოიზომერაზები კი არიან ჰეტეროჰექსამერები, თუმცა მათ აქვთ საერთო ფუნქციონალური დომენები სხვა IIA ტიპის ფერმენტებთან [40]. უნდა აღინიშნოს, რომ არ არსებობს ჯერ-ჯერობით სურათი რომელიც სრულად წარმოგვიდგენს IIA ტიპის ტოპოიზომერაზების ნატიურ სტრუქტურას. ბიოქიმიური და სტრუქტურული კვლევები იძლევა მხოლოდ უხემ მონახაზს მთლიანი ფერმენტის სტრუქტურის (არქიტექტურის) შესახებ.

IIA ტიპის ტოპოიზომერაზები შედგებიან სხვადასხვა კატალიზური მოდულებისაგან, რომლებიც შედარებით მოქნილი უბნებით უკავშირდებიან ერთმანეთს. არსებობს მინიმუმ სამი განსხვავებული ჯგუფი, განცალკევებული ცილა-ცილოვანი ინტერფეისებისა რომლებიც უზრუნველყოფენ სხვადასხვა სუბერთეულებში არსებულ მოდულებს შორის ურთიერთ კავშირს. ამ სამი ინტერფეისის ურთიერთქმედება ქმნის ორ ღრუს ფერმენტის შიგნით, რომლებშიც სავარაუდოდ დროებით ყოვნდებიან (განთავსდებიან) დნმ-სეგმენტები რეაქციის

დროს [41]. ფერმენტის ATP-აზური უბნის მიერ ინიცირებული კონფორმაციული ცვლილებები ვრცელდება მთელ ცილაზე, რომელიც 5Y-CAP და toprim დომენების ერთობლივი მოქმედებით იწვევს G-სეგმენტის გახლეჩას, რასაც გახლეჩილი G-სეგმენტის ბოლოების განცალკევება და მასში T-სეგმენტის „გათრევა“ მოჰყვება. ჯერ კიდევ გასარკვევია თუ როგორ ახდენენ ასეთ კოორდინაციულ, ურთიერთშეთანხმებულ მოქმედებას ATP-აზური, 5Y-CAP და toprim უბნები იმისათვის, რომ ასე ზუსტად აკონტროლონ G-სეგმენტის გახლეჩა და გახსნა.

დღეისათვის ცნობილია, რომ ATP-ის დაკავშირება ახდენს GHKL დომენის ინტერფეისის ჩაკეტვას და ATP-ის ჰიდროლიზი აუცილებელია ფერმენტის რეციკლიზაციისათვის [42]. ვინაიდან IIA ტიპის ტოპოიზომერაზებს შეუძლიათ შეასრულონ ჯაჭვის გადატანის ერთი ციკლი მაშინაც კი როცა ATP შეცვლილია არაჰიდროლიზებადი ანალოგით (ADPNP), შეიძლება ვივარაუდოდ, რომ ATP-ის ჰიდროლიზს არ აქვს ან მცირე როლი აქვს ჯაჭვის გადატანისას.

IIA ტიპის ტოპოიზომერაზები არიან ჰეტეროტეტრამერები, რომლებიც IIA ტიპის ტოპოიზომერაზების მსგავსად დნმ-ის ერთ-ერთი დუბლექსის მეორეში ATP-ზე დამოკიდებულ ტრანსპორტს ანხორციელებენ. ამ ტიპის ფერმენტების ერთ-ერთი წარმომადგენელის-ტოპოიზომერაზა IV-ის სტრუქტურული კვლევები გვიჩვენებს, რომ IIA ტიპის ფერმენტებს აქვთ იგივე კატალიზური დომენები როგორც IIA ტიპის ტოპოიზომერაზებს. კერძოდ ტოპოიზომერაზა IV-ის B სუბერთეულები ძალიან მსგავსია IIA ტიპის ტოპოიზომერაზის ATP-აზური უბნის, ხოლო A სუბერთეულები, რომლებიც G-სეგმენტის დაკავშირებასა და გახლეჩაზე პასუხისმგებელი, მსგავსია IA და IIA ტიპის ტოპოიზომერაზების 5Y-CAP და toprim დომენებისა. მიუხედავად ამისა გლობალური არქიტექტურა IIA ტიპის ტოპოიზომერაზებისა სრულიად განსხვავებულია სხვა ტოპოიზომერაზებისაგან IIA ტიპის ფერმენტების ჩათვლით [43].

1.4 pADPr-ის ფერმენტული სინთეზი და დეგრადაცია

უჯრედში არსებული NAD-ის კონცენტრაცია ძალზე არამდგრადია. ის შეიძლება გამოყენებული იქნას არა მარტო როგორც სხვადასხვა ჟანგვა-აღდგენითი რეაქციების კოფერმენტი, არამედ როგორც სუბსტრატი ADP-რიბოზას ტრანსფერ-რეაქციებისა. სამიზნე ცილების (აქცეპტორი ცილები); გლუტამინის მჟავის, ასპარაგინის მჟავის და ლიზინის ამინომჟავურ ნაშთებზე ADP-რიბოზას ნაშთების გადატანისას ფორმირდება ADP-რიბოზას პოლიმერი (pADPr), რომელიც NAD-ის უპირველეს მეტაბოლიტად მიიჩნევა [44].

დაახლოებით 40 წლის წინ (1963 წ) შამბონის, ვეილისა და მანდელის მიერ გამოქვეყნებულ ნაშრომში „Nicotinamide mononucleotide activation of a new DNA-dependent poly-adenylic acid synthesizing nuclear enzyme“ სწორად იქნა ნაგარაუდები ფერმენტული აქტივობის მთავარი თვისება_დნმ-ზე დამოკიდებული NAD-ის გარდაქმნა. მათ მიერ ჩატარებულ ექსპერიმენტებში წიწილას ღვიძლის ბირთვულ პრეპარატში $[^{14}\text{C}]$ ნიშანდებული ATP-ის ჩართვა 1000-ჯერ სტიმულირდებოდა NMN-ით (ნიკოტინამიდ მონონუკლეოტიდი) [45]. თავდაპირველი მოსაზრებით მჟავაუხსნად პროდუქტს წარმოადგენდა poly(A), მაგრამ მოგვიანებით იგივე ჯგუფის მიერ დადგენილი იქნა, რომ ეს პროდუქტი იყო პოლი-ADP-რიბოზა. მათგან დამოუკიდებლად ორი იაპონური ჯგუფის მიერ ბირთვულ პრეპარატში NMN-ის დამატებით სტიმულირებული მჟავაუხსნადი მასალის ანალიზმა დაადასტურა მანდელის მიერ აღმოჩენილი პოლი-ADP-რიბოზას არსებობა [46].

პოლი-ADP-რიბოზას ჰიდროლიზის პროდუქტების შესწავლამ საფუძველი დაუდო მოსაზრებას, რომლის მიხედვითაც უჯრედის ბირთვში NMN-ის და ATP-საგან ფერმენტ NMN-ადენილილტრანსფერაზით წარმოიქმნება NAD (ნიკოტინამიდ ადენინ დინუკლეოტიდი) რომელიც გარდაიქმნება პოლი-ADP-რიბოზაში. ფერმენტს, რომელიც NAD-საგან ნიკოტინამიდის მოცილების გზით ახდენს პოლი-ADP-რიბოზის სინთეზს და პოლიმერის აქცეპტორულ ცილებზე გადატანას, ეწოდება პოლი-ADP-რიბოზა-პოლიმერაზა (PARP). ამ ცილის ორმაგი ფერმენტული აქტივობა უდევს საფუძვლად მის სახელწოდებებს,

რომლებიც გამოიყენება ლიტერატურაში. მაგ: ADP-რიბოზილ ტრანსფერაზა ან პოლი-ADP-რიბოზილ სინთეტაზა.

In vitro პოლი(ADP-რიბოზ)ილირება არის დინამიკური პროცესი, რადგან პოლი-ADP-რიბოზის პოლიმერი სწრაფად დეგრადირდება ფერმენტ პოლი(ADP-რიბოზა)გლიკოჰიდროლაზით (PARG) და ADP-რიბოზა-პროტეინ ლიაზით. პოლიმერის სიცოცხლის ნახევარპერიოდი 1 წთ-ზე ნაკლებია. რაც პოლი-ADP-რიბოზას სინთეზსა და დეგრადაციაზე პასუხისმგებელი ფერმენტების შეთანხმებულ მოქმედებაზე მიუთითებს. თავდაპირველად PARG-ის შესწავლა ისე ინტენსიურად ვერ ხერხდებოდა რაც ფერმენტის, უჯრედული კონცენტრაციის სიმცირესა და გამოყოფისას პროტეაზების მიმართ ზემოქმედებლობაში მდგომარეობდა [47]. PARG-ს შეუძლია პოლი-ADP-რიბოზასაგან როგორც ტერმინალური ADP-რიბოზას ერთეულების ჰიდროლიზი, ეგზოგლიკოზიდური აქტივობის ხარჯზე, ასევე მოზრდილი ოლიგო-ADP-რიბოზას ფრაგმენტების მოცილება ენდოგლიკოზიდური აქტივობის ხარჯზე [48]. ვინაიდან PARG-ის K_m სიდიდე ბევრად დაბალია დიდი ზომის პოლიმერებისათვის, ამიტომ სავარაუდოდ თავდაპირველად ფერმენტი პოლი-ADP-რიბოზას, ADP-რიბოზას ნაშთებისაგან შემდგარ მოზრდილ ფრაგმენტებს აცილებს. რომლის შემდეგაც ფერმენტი გადადის ეგზოგლიკოზიდურ რეჟიმში და სათითაოდ ახდენს ADP-რიბოზას ნაშთების მოხლეჩას. ხოლო ბოლო ADP-რიბოზას ნაშთს, რომელიც აქცეპტორულ ცილასთან კოვალენტურად არის დაკავშირებული ADP-რიბოზა-პროტეინ ლიაზა ჩამოხლეჩს [49]. PARG-ის მაღალსპეციფიკური აქტივობა უჯრედში მათი მცირე კონცენტრაციით არის განპირობებული. დაახლოებით 90%-იანი ინჰიბირებაა საჭირო, რომ უჯრედში პოლი-ADP-რიბოზას დაგროვება მოხდეს [50].

დღისათვის ნანახია მხოლოდ ერთი გენი რომელიც PARG-ის კოდირებას ახდენს [51]. თუმცა არსებობს ადამიანის PARG-ის სამი სხვადასხვა იზოფორმა რომელიც სპლაისინგის შედეგად მიიღება [52]. ექსპერიმენტებმა, რომლებშიც გაძლიერებული იყო PARG-ის ექსპრესია აჩვენა, რომ ყველაზე დიდი იზოფორმა

(111 kDa) ბირთვებში, ხოლო შედარებით პატარა იზოფორმები (102 kDa, 99 kDa) კი ძირითადად ციტოპლაზმაშია ლოკალიზებული.

PARG მუტანტები შესწავლილი იქნა *D.melanogaster*-ის მაგალითზე. ბუზებს რომელთა PARG-ებსაც არ გააჩნდათ კატალიზური დომენი, იმ ტემპერატურაზე (25°C) რომელზეც ნორმალურად ვითარდებიან ლარვები, ილუპებოდნენ [53]. მაშინ როდესაც პოპულაციის მეოთხედი აგრძელებდა განვითარებას და ზრდასრულ ფორმას აღწევდა 29°C-ზე. თუმცა ასეთ ბუზებში ხდებოდა ნეიროდეგენერაციული დაავადებებისათვის დამახასიათებელი ნიშნების განვითარება. ასეთი მუტანტების ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში ხდებოდა პოლი-ADP-რიბოზას ინტენსიური დაგროვება რაც ნერვული უჯრედების ფუნქციონირებისათვის, პოლი-ADP-რიბოზას ნორმალური მეტაბოლიზმის აუცილებლობაზე მიუთითებს.

ახლახან იქნა გამოყვანილი თავგებიც PARG-ის მუტანტური გენებით. ეგზონ 1-ის ამოკვეთით სრულად იკარგება PARG-ს აქტივობა რაც ზრდის ციტოტოქსიურ მგრძნობელობას და ემბრიონის ადრეულ ეტაპზე სიკვდილიანობას [54]. ხოლო 2 და 3 ეგზონების კომბინირებული ამოკვეთა თავგების სიცოცხლესთან და ნაყოფიერებასთან თავსებადი აღმოჩნდა, თუმცა იზრდებოდა მგრძნობელობა გენოტოქსიკური და ენდოტოქსიკური სტრესის მიმართ [55].

1.5 PARP-ული აქტივობის მქონე ცილების ოჯახი

პოლი-ADP-რიბოზილირება ეუკარიოტულ უჯრედებში არსებული ცილების ერთ-ერთ ძირითად პოსტტრანსლაციურ მოდიფიკაციას წარმოადგენს. რომელიც ფერმენტ პოლი(ADP-რიბოზა)პოლიმერაზას (PARP) მეშვეობით ხორციელდება.

დღეისათვის ადამიანის გენომში ნაპოვნია 18 სხვადასხვა გენი რომლებიც სავარაუდოდ პოლი(ADP-რიბოზა)პოლიმერაზული აქტივობის მქონე ცილების

კოდირებას ახდენენ. შესაბამისად დღეისათვის PARP-ების ოჯახი შედგება 18 სხვადასხვა PARP-ის ჰომოლოგიური ჯგუფისაგან.

PARP1-არის PARP-ების ოჯახის ძირითადი წევრი რომელიც ყველაზე მეტადაა შესწავლილი. დნმ-ის დაზიანების საპასუხოდ, იყენებს რა NAD-ს, ახდენს ADP-რიბოზების წრფივი ან დატოტვილი პოლიმერების გადატანას სხვადასხვა ბირთვულ ცილებზე, რომლებიც ჩვეულებრივ ქრომატინთანაა ასოცირებული. თუმცა ზოგჯერ თვით PARP-ების პოლი-ADP-რიბოზილირებასაც აქვს ადგილი (ავტომოდირეგაციური რეაქცია). PARP1-ის სტრუქტურასა და ფუნქციას შორის კავშირი კარგად არის შესწავლილი. იგი შედგება სამი დომენისაგან, რომლებიც თავის მხრივ A-F მოდულებად იყოფიან [56]. N-ტერმინალური დნმ-დაკავშირებადი დომენი (DBD, 42 kDa), რომელიც შეიცავს ბირთვული ლოკალიზაციის უბანს (NLS, B მოდული), ესაზღვრება ცენტრალურ ავტომოდირეგაციის დომენს (16kDa). კატალიზური დომენი (55kDa), რომელიც აქტიურ საიტებს შეიცავს მოთავსებულია C-ტერმინალურ ნაწილში. PARP1-ის DBD დომენი თუთიის თითების (Z F1 და ZF2, A მოდული) მეშვეობით მაღალი აფინურობით უკავშირდება დნმ-ის ერთ ან ორჯაჭვიან წყვეტებს. პირველი თუთიის თითი აუცილებელია PARP1-ის აქტივაციისათვის დნმ-ის ჯაჭვების ერთი ან ორჯაჭვიანი წყვეტისას, მაშინ როდესაც მეორე თუთიის თითი საჭიროა დნმ-ის მხოლოდ ერთჯაჭვიანი წყვეტებით გამოწვეული PARP1-ის აქტივაციისათვის. დნმ-ში წყვეტების არ არსებობისას PARP1 ამჟღავნებს ძალიან დაბალ, ბაზალურ აქტივობას. მოლეკულური მექანიზმი, რომელსაც შესაბამისობაში მოჰყავს დნმ-თან დაკავშირება კატალიზურ აქტივობასთან ჯერ-ჯერობით უცნობია!

ზოგიერთმა ჯგუფმა მიიღო მონაცემები PARP1-ის დნმ-ის წყვეტებზე დამოუკიდებელი, ალტერნატიული აქტივაციის მექანიზმის შესახებ. ამ მონაცემების თანახმად PARP1 ამოიცნობს დნმ-ის ჯვრისებრ სტრუქტურებში არსებულ გამრუდებებს და უკავშირდება გაუწყვილებელ უბნებს [57].

ამგვარად PARP1 შესაძლოა არ დაუკავშირდეს დნმ-ის B ფორმას და შესაბამისად დნმ-ის თავისუფალი ბოლოების არ არსებობის პირობებშიც კი

ხდებოდა მისი კატალიზური აქტივობის გამოვლენა. ყოველივე აქედან გამომდინარე ჯვრის მაგვარ სტრუქტურებში არსებული გაუწყვილებელი, სტაბილური უბნები არიან PARP1-ის ავტომოდირეგაციის და H1 ჰისტონების პოლი-ADP-რიბოზილირების ეფექტური კოაქტივატორები. ეს მონაცემები ფიზიოლოგიურ პირობებში, ქრომატინის სტრუქტურის ლოკალური მოდულაციის დინამიკაში, PARP1-ის არასტანდარტული გზით მონაწილეობაზე მიუთითებს [58].

PARP1-ის ავტომოდირეგაციის დომენი მდიდარია გლუტამინის მჟავის ნაშთებით, რომლებზეც ხდება ADP-რიბოზის ნაშთების გადატანა აქცეპტორულ ცილებში. C-ტერმინალური კატალიზური დომენი შეიცავს ამინომჟავებს რომლებიც მნიშვნელოვანია NAD-ის დასაკავშირებლად, ADP-რიბოზის გადატანისა და მისი პოლიმერიზაციისათვის. კატალიზური დომენის კრისტალური სტრუქტურა ძალიან მსგავსია ბაქტერიული ტოქსინების, რომლებიც მოქმედებენ როგორც მონო- ADP-რიბოზილ ტრანსფერაზები [59].

პოლი-ADP-რიბოზილირება არის დაუყოვნებლივი პასუხი დნმ-დაზიანებებზე, რომელიც შეიძლება იყოს გამოწვეული მაიონიზირებელი რადიაციით, მაალკილირებელი აგენტებით და დამჟანგავებით. დნმ-დაზიანებების დროს PARP-ული აქტივობა 100-ჯერ და უფრო მეტად იზრდება ბაზალურ აქტივობასთან შედარებით [60]. ამ დროს სინთეზირებული პოლი-ADP-რიბოზების 90% PARP1-ის მიერ ხორციელდება [61].

ეუკარიოტებში PARP-ული აქტივობის მქონე ცილების პირველადი სტრუქტურა მაღალ კონსერვატულია. ადმიანის და თაგვის ფერმენტებს ახასიათებთ 92%-იანი მსგავსება ამინომჟავური თანმიმდევრობის მიხედვით. კატალიზური დომენი კი ამჟღავნებს უმაღლესი ხარისხის მსგავსებას სხვადასხვა სახეობებს შორისაც კი. იგი შეიცავს 50 ამინომჟავას, რომელიც ინარჩუნებს 100%-იან მსგავსებას ხერხემლიანებს შორის.

პოლი-ADP-რიბოზილირებისას სამიზნე ცილები შეიძლება იყვნენ: თვით PARP1, p53, NF-κB-ს ორივე სუბერთეული [62], დნმ-ტოპოიზომერაზები და დნმ-ზე დამოკიდებული პროტეინკინაზას კატალიზური სუბერთეული (DNA-PK_{cs}).

პოლიმერის დიდი უარყოფითი მუხტის გამო ამ ტიპით ცილების მოდიფიკაცია მნიშვნელოვნად ცვლის მათ ფიზიკურ და ბიოქიმიურ თვისებებს.

PARP1 ნოკაუტირებული თაგვები (PARP1^{-/-}) ჰიპერმგრძნობიარენი [63] არიან მაიონიზირებელი რადიაციის და მაალკილირებელი აგენტებით ზემოქმედების მიმართ და მოკლებულნი არიან გენომურ სტაბილურობას. თუმცა ასეთმა ცხოველებმა მოულოდნელად გამოამჟღავნეს მდგრადობა სხვადასხვა ანთებითი პროცესების (ცერებრალური და კარდიოლოგიური იშემიების) მიმართ, განსაკუთრებით კი სეფსისური შოკის მიმართ.

PARP2 არის PARP-ის სხვა იზოფორმა, რომელიც ასევე დნმ-ში წყვეტებით აქტიურდება [64] და რომელიც აღმოჩენილი იქნა როგორც, PARP1 დეფიციტური თაგვების ემბრიონებისაგან მიღებულ ფიბრობლასტებში, დნმ-წყვეტებზე დამოკიდებული ნარჩენი PARP-ული აქტივობა. იგი PARP1-ს მსგავს ავტომოდიფიკაციურ თვისებებს ამჟღავნებს. მისი DBD დომენი განსხვავებულია PARP1-ის DBD დომენისაგან (შეიცავს მხოლოდ 64 ამინომჟავას). მას აკლია დნმ-დაკავშირებადი მოტივები, მაგრამ მიუხედავად PARP1-ისა და PARP2-ის ზომების ასეთი მნიშვნელოვანი სხვაობისა, მიუხედავად იმისა, რომ PARP2-ს არ გააჩნია არც თუთიის თითები და არც BRCT მოტივი ორივენი ბირთვშია ლოკალიზებული და ორივენი აქტიურდებიან დნმ-ის დნმ-აზა1-ით დამუშავების შემდეგ. ორთავე PARP2-სა და PARP1-ს შეუძლიათ წარმოქმნან ჰომო და ჰეტეროდიმერები. ასევე ორთავე ღებულობს მონაწილეობას ფუძეთა ექსციზიურ რეპარაციაში (BER) XRCC1-თან (X-ray cross-complementing factor1) კომპლექსის წარმოქმნის გზით. PARP2 კი აქტიურად არის ჩაბმული ერთჯაჭვიანი წყვეტების რეპარაციაში (SSBR). ერთდროულად PARP1^{-/-} და PARP2^{-/-} მუტანტური თაგვები ილუპებიან გასტრულაციისას (onset gastrulation) რომლებიც ნათელს ხდის, რომ PARP1-ის და PARP2-ის ექსპრესია ან/და დნმ-ის ჯაჭვების წყვეტაზე დამოკიდებული პოლი-ADP-რიბოზილირება არის მნიშვნელოვანი ადრეული ემბრიოგენეზის დროს.

PARP3-ის დომენების სტრუქტურა ძალიან ჰგავს PARP2-ისას. იგი შეიცავს ყველაზე მოკლე N-ტერმინალურ დომენს. ეს დომენი შედგება 54 ამინომჟავისაგან

და პასუხისმგებელია ცენტროსომაში ლოკალიზაციაზე [65]. PARP3-ს აქვს PARP1-თან საერთო ორი E და F მოდული თუმცა არ ინჰიბირდება 3-ამინობენზამიდიტ. PARP3 ურთიერთქმედებს PARP1-თან, რაც მიტოზის სწორად წარმართვაში მათ მნიშვნელოვან როლზე მიუთითებს.

vPARP (PARP-4), ყველაზე დიდი მოლეკულური მასის მქონე (192,6 kDa) წევრი PARP სუბოჯახის, ციტოპლაზმურ რიბონუკლეოპროტეინულ კომპლექსებთან (vault particles) ასოცირებულ მდგომარეობაში იქნა აღმოჩენილი. გარდა vPARP-ისა ეს კომპლექსი შეიცავს კიდევ ორ მაღალკონსერვაციულ ცილას, major vault protein (MVP) და ტელომერ-ასოცირებულ ცილას (TEP1), ასევე არატრანსლირებად მცირე ზომის რნმ-ს (vRNA). ამ უჩვეულო კომპლექსების ფუნქცია ჯერ-ჯერობით უცნობია. შესაძლოა ისინი უჯრედებში გარკვეულ ტრანსპორტულ ფუნქციას ასრულებენ [66]. ასევე როგორც ჩანს იგი ჩართულია უჯრედის დეტოქსიკაციაში. რადგან ნანახია, რომ ადამიანის უჯრედული კულტურების შხამებით დამუშავებისას იზრდება კომპლექსში შემავალი ცილების, მათ შორის PARP4-ის, ექსპრესიის დონე. იმუნოფლუორესცენციული და ბიოქიმიური კვლევები აჩვენებს, რომ PARP4 ასევე შესაძლოა ლოკალიზებული იყოს ბირთვის ფორებში და მიტოზურ თითისტარაში.

ტანკირაზა1 (TRF1-interacting, ankyrin-related ADP-ribose polymerase) იდენტიფიცირებული იქნა ადამიანის ქრომოსომის ტელომერ-დაკავშირებად ფაქტორ 1-თან (TRF1) კომპლექსში. ტანკირაზას N-ბოლო შეიცავს ჰისტიდინის, პროლინისა და სერინისაგან შემდგარ ე.წ. His-Pro-Ser (HPS) მდიდარ დომენს, რომელსაც ანკირინ განმეორებები მოჰყვება და რომელიც მხოლოდ ტანკირაზა1 და ტანკირაზა2-სთვისაა დამახასიათებელი. ტანკირაზას C-ბოლო PARP1-ის კატალიზური ნაწილის მსგავსია. რადგან იგი არ შეიცავს DBD დომენს მისი აქტივობა არ არის დამოკიდებული დნმ-ის ჯაჭვების წყვეტებზე. თუმცა მისი აქტივობა მნიშვნელოვნად სტიმულირდება HPS დომენში არსებული MAP კინაზა კონსესუს მოტივის ფოსფორილირებით [67]. ტანკირაზა1-ის ზეექსპრესია აძლიერებს TRF1 ფაქტორების ADP-რიბოზილირებას რის შემდეგაც ისინი სცილდებიან ტელომერებს (TRF1 ფაქტორების ნეგატიური რეგულაცია) და ხელს

უწყობენ დნმ-ის ტელომერების-3' ერთმანეთთან ბოლოების ელონგაციას რის შემდეგაც ხდება ტანკირაზას უბიქვითინირება და პროტეოსომების საშუალებით მათი დეგრადაცია.

ტანკირაზა2 თავდაპირველად აღმოჩენილი იქნა ზოგიერთი სიმსივნით დაავადებულ პაციენტებში, რომლებიც ანტისხეულების პასუხზე ჩნდებოდნენ [68]. მიუხედავად იმისა, რომ ტანკირაზა2 სხვა გენიდან კოდირდება მისი ამინომჟავური თანმიმდევრობა ძალიან მსგავსია ტანკირაზა1-ის ამინომჟავური თანმიმდევრობისა (85%-იანი მსგავსება) გარდა N-ბოლოში მოთავსებული HPS დომენისა, რომელიც ტანკირაზა2-ს არ გააჩნია. ტანკირაზა2-ის ზეექსპრესია იწვევს უჯრედების სწრაფ, პოლი-ADP-რიბოზილირებაზე დამოკიდებულ, სიკვდილს.

2,3,7,8-ტეტრაქლორიდბენზო-p-დიოქსინი (TCDD), დიოქსინების ჯგუფის წარმომადგენელი, იწვევს პლეოტროპულ ეფექტს ძუძუმწოვრებში გენის ექსპრესიის მოდულირების გზით. TiPARP (PARP7) არის TCDD-ის მიერ ინდუცირებული წვერი PARP სუბოჯახის, რომელიც სულ რამდენიმე წლის წინათ იქნა იდენტიფიცირებული [69]. მისი ფუნქცია ჯერ-ჯერობით უცნობია. სავარაუდოდ იგი T-უჯრედების ფუნქციონირებასთან უნდა იყოს დაკავშირებული. In vitro ტრანსკრიბირებულ/ტრანსლირებულ ცილებს შესწევთ უნარი მოახდინონ ჰისტონების პოლი-ADP-რიბოზილირება მიუხედავად კატალიზურ უბანში Glu ნაშთის არ არსებობისა, რომელიც აუცილებელია PARP1-ისათვის მის მიერ ჰისტონების ADP-რიბოზილირებისას.

სულ ახლახან იქნა აღმოჩენილი C-myc გენთან ურთიერთქმედებადი PARP-ული აქტივობის მქონე ცილა (PARP10) [70]. იგი მხოლოდ ბიოქიმიურ დონეზეა შესწავლილი. PARP10 150 kDa მასის მქონე ცილაა, რომელიც ურთიერთქმედებს Myc-თან და ფლობს რნმ ამომცნობი მოტივების მსგავს დომენებს. PARP10-ს შეუძლია მოახდინოს თვით PARP10-ის და კორ-ჰისტონების პოლი-ADP-რიბოზილირება.

რაც შეეხება PARP სუბოჯახის დანარჩენ წევრებს, თეორიულად არის ნაწინასწარმეტყველები მათი PARP-ული აქტივობა. ცნობილია შესაბამისი გენები,

რომელთა ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობა აუცილებლად შეიცავს უბანს, რომელიც PARP-ის კატალიზური დომენის კოდირებას ახდენს. ასევე თეორიულად განიხილება დომენტა პოტენციური ორგანიზაცია (Pfam მონაცემთა ბაზა [71]) და მათი შესაძლო ბიოლოგიური როლი. დიდ ინტერესს იწვევს ამ ცილებში ახალი დომენების არსებობა, რომლებიც კატალიზურ დომენტთან უნდა იყვნენ ასოცირებული და სავარაუდოდ სხვადასხვა ბიოლოგიურ პროცესებში უნდა იყვნენ ჩართულნი.

PARP-ული აქტივობის მქონე ცილების ასეთი მრავალფეროვნება, მათი სხვადასხვა პროცესებში მონაწილეობა, ფუნქციონირების სხვადასხვა მექანიზმი ეუკარიოტული უჯრედებისათვის და მთლიანად ორგანიზმებისათვის მათ მნიშვნელოვან როლზე მიუთითებს.

აღსანიშნავია, რომ უჯრედში PARP-ული აქტივობის, ასევე სხვადასხვა პროცესებში მათი მონაწილეობის შესწავლისას მნიშვნელოვანია გათვალისწინებული იქნას კოაქტივატორი ფაქტორები. აგრეთვე უნდა იქნას გათვალისწინებული, რომ ინჰიბიტორები, რომლებიც თრგუნავენ რომელიმე ერთი PARP-ის აქტივობას ასევე თრგუნავენ სხვა რომელიმე PARP-ის აქტივობასაც. კერძოდ 3-AB PARP1-ისა და PARP2-ის ინჰიბიტორი ასევე ტანკირაზა2-ის აქტივობასაც თრგუნავს.

1.6 პოლი-ADP-რიბოზილირების ბიოლოგიური როლი

პოლი-ADP-რიბოზილირების ბიოლოგიური როლი ბოლომდე გარკვეული არ არის. თუმცა დღეისათვის არსებული მონაცემები მიუთითებს მის ისეთ უჯრედულ პროცესებში მონაწილეობაზე როგორებიცაა: ტრანსკრიფციის რეგულაცია, დნმ-ის რეპლიკაცია, რეპარაცია, და ა. შ.

დღეისათვის არსებული მონაცემები ტრანსკრიფციის რეგულაციაში PARP1-ის მონაწილეობის ორ განსხვავებულ მექანიზმზე მიუთითებენ. ჰისტონების მოდიფიცირების გზით იცვლება: (1)ქრომატინის სტრუქტურა და (2)

ენჰანსერ/პრომოტორებთან დაკავშირებადი კომპლექსების, ასევე მათთან ერთად სხვა დნმ-დაკავშირებადი ფაქტორების და კოაქტივატორების ფუნქცია.

1980-იან და 1990-იანი წლების დასაწყისში *in vitro* კვლევებმა გამოავლინა მექანიზმები, რომლის საშუალებითაც PARP1 და მისი პროდუქტი პოლი-ADP-რიბოზა მნიშვნელოვნად ცვლის ქრომატინის სტრუქტურას. პირველ რიგში PARP1 ახდენს უშუალოდ ქრომატინის შემადგენელი ცილების მოდიფიცირებას [72]. ქრომატინის ცილების პოლი-ADP-რიბოზილირებას დიდი გავლენა აქვს ნუკლეოსომების მიერ წარმოქმნილი მაღალ-ორგანიზაციული სტრუქტურების და თვით ცალკეული ნუკლეოსომების სტაბილურობაზე. *In vivo* H1 და H2B ჰისტონები ყველაზე მეტად პოლი-ADP-რიბოზილირდებიან და *in vitro* ძირითადად PARP1-ის საუკეთესო სამიზნეები არიან თუმცა ნაწილობრივ ყველა ჰისტონის მოდიფიცირება ხდება. გასუფთავებული PARP1-ის მიერ ნატიური პოლინუკლეოსომების პოლი-ADP-რიბოზილირება ქრომატინის მაღალი რიგის სტრუქტურებიდან H1 ჰისტონების ჩამოცილებას და ქრომატინის დეკონდენსაციას იწვევს, რაც უშუალოდ ელექტრონული მიკროსკოპის საშუალებით დაიშვიათება. პოლი-ADP-რიბოზის პოლიანიონის ჰისტონებთან დაკავშირება იწვევს დნმ-ის ჰისტონებისაგან მოცილებას, რაც ზრდის ტრანსკრიფციისა და სხვა გენეტიკური პროცესების წარმართვისათვის საჭირო ცილების დნმ-თან მისაწვდომობას.

ტრანსკრიფციის რეგულაცია PARP1-ს შეუძლია ასევე ენჰანსერებისა და პრომოტორების აქტივობის მოდულირებით. უამრავმა კვლევებმა აჩვენა, რომ PARP1 როცა ის მოქმედებს ენჰანსერებზე და პრომოტორებზე, ფუნქციონირებს როგორც ტრანსკრიფციული კოაქტივატორი ასტიმულირებს რა დნმ-დაკავშირებადი ფაქტორების აქტივობას [73]. არსებობს მონაცემები რომლებიც, ზოგიერთი ტიპის უჯრედებში, PARP1-ის ტრანსკრიფციის რეპრესიაში მონაწილეობაზე მიუთითებს. PARP1-მა სამიზნე პრომოტორზე შესაძლოა გავლენა იქონიოს დნმ-დაკავშირებად ფაქტორებთან ურთიერთქმედების გზით. ასევე PARP1-ს შეუძლია დამოუკიდებლად ან სხვა დნმ-დაკავშირებადი ფაქტორების საშუალებით დაუკავშირდეს დნმ-ის ენჰანსერულ და პრომოტორულ უბნებს [74].

ზოგიერთ შემთხვევაში PARP1-ის ფერმენტული აქტივობა არ არის აუცილებელი ტრანსკრიფციის რეგულაციისათვის. მაგალითად *D. melanogaster*-ში PARP1-ის სამიზნე გენების ექსპრესიისათვის არ არის აუცილებელი კატალიზური დომენი. In vitro PARP1-ს შეუძლია ზოგიერთი ტრანსკრიფციის ფაქტორების (YY1, NF- κ B, TBP) პოლი-ADP-რიბოზილირება და მათი დნმ-თან დაკავშირების უნარის შესუსტება.

ტულონმა და სფრედლინგმა [75] აჩვენეს, რომ *Drosophila*-ს ქრომოსომებში როზეტის მსგავსი სტრუქტურების წარმოქმნაში PARP1 მნიშვნელოვან როლს თამაშობს. ჩვეულებრივ მდგომარეობაში PARP1 თანაბრად არის გადანაწილებული ქრომოსომაში და არააქტიურ მდგომარეობაში იმყოფება. თუმცა სითბური შოკით სტიმულაციისას ფერმენტები სწრაფად კონცენტრირდებიან სითბური შოკის ლოკუსთან სადაც პოლი-ADP-რიბოზას ინტენსიური სინთეზი მიმდინარეობს. ტრანსკრიფცია და როზეტის მსგავსი სტრუქტურების ფორმირება მნიშვნელოვნად მცირდება PARP1-ის მუტაციისას ან ინჰიბიტორ 3-AB-ის გამოყენებისას. ჩატარებული ექსპერიმენტები პოლი-ADP-რიბოზას აკუმულაციასა და როზეტების წარმოქმნას შორის ძლიერ კორელაციაზე მიუთითებენ. გარდა ამისა აღმოჩნდა, რომ PARP-მუტანტური *Drosophila* იმუნური რეაქციის კონტროლში ჩართული გენების დამახინჯებული აქტივაციის გამო ძალიან მგრძნობიარენი არიან ბაქტერიული ინფექციების მიმართ. თუ როგორ ამოიცნობს PARP1 სამიზნე გენებს და ხელს უწყობს ნორმალური, დაუზიანებელი გენების ექსპრესიას დღესათვის უცნობია!

ახლახან მიღებულ იქნა მონაცემები, რომლებიც ამყარებენ მოსაზრებას, PARP-ის დნმ-ის რეპლიკაციაში მონაწილეობის შესახებ. კერძოდ, ნანახი იქნა, რომ PARP ფიზიკურად ურთიერთქმედებს დნმ პოლიმერაზა α -პრაიმზას ტეტრამერის კატალიზურ სუბერთეულთან. აგრეთვე ნანახი იქნა, რომ PARP ასოცირებულია მულტიპროტეინულ, დნმ-ის რეპლიკაციის კომპლექსის ძირითად კომპონენტთან დნმ სინთესომასთან, რომელიც მოიცავს დნმ პოლიმერაზა α -ს. ამ კომპლექსში PARP-ის არსებობა წარმოშობს მოსაზრებას, რომ PARP-ს შეუძლია დაარეგულიროს დნმ სინთესომის შემადგენლობა ან აქტივობა

პოლი-ADP-რიბოზილირების მეშვეობით. მართლაც ნანახი იქნა, რომ დნმ-ის რეპლიკაციის კომპლექსის ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი რეგულატორული ცილა PCNA პოლი-ADP-რიბოზილირდება. გარდა ამისა *in vitro* PARP-ის არსებობა ახდენს გასუფთავებული დნმ პოლიმერაზა α -ს აქტივობის სტიმულიაციას. აღსანიშნავია, რომ ეს ეფექტი არ არის დამოკიდებული მხოლოდ PARP-ის დნმ-თან დაკავშირებაზე, რადგან მარტო მის DBD-ის მომცველ ფრაგმენტს არ ძალუღეს მთლიანად გამოავლინოს სტიმულატორული ეფექტი, რომელიც შეინიშნება ინტაქტური PARP-ის თანაობისას [76]. მთლიანობაში ეს მონაცემები მკაფიოდ მიუთითებენ, რომ PARP მჭიდროდ არის დაკავშირებული დნმ-ის რეპლიკაციის პროცესთან *in vivo* და, რომ მას ძალუღეს დნმ სინთესომის ზოგიერთი ძირითადი კომპონენტის აქტივობის რეგულირება პოლი-ADP-რიბოზილირების მეშვეობით.

შესწავლილი იქნა ბირთვული ცილების პოლი-ADP-რიბოზილირება უჯრედულ ციკლთან დამოკიდებულებაში. სინქრონიზებული HeLa-ს უჯრედებში ნანახი იქნა მოდიფიცირებული ბირთვული ცილების სპეციფიკური ჯგუფი. ინტერფაზულ ბირთვებში ნანახი იქნა 100-ზე მეტი მოდიფიცირებული ცილა, მაშინ როცა მეტაფაზის დროს მხოლოდ თვით პოლი-ADP-რიბოზა-პოლიმერაზაა მოდიფიცირებული. შრეიბერის მიხედვით HeLa-ს უჯრედებში G ფაზის დროს პოლი-ADP-რიბოზა-გლიკოჰიდროლაზის აქტივობა გაორმაგებულია. გენოტოქსიკური აგენტებით დამუშავებული HeLa-ს PARP დეფიციტური უჯრედები G+M ფაზაში გროვდებიან, რაც G ფაზაში ამ ფერმენტის აუცილებლობაზე მიუთითებს [77]. ნანახი იქნა, რომ PARP-ის შემცველობა გაცილებით დაბალი იყო მოსვენების ფაზაში ვიდრე უჯრედებში, რომლებიც იმყოფებოდნენ G ფაზაში. რაც მიგვანიშნებს PARP-ის უჯრედულ ციკლზე დამოკიდებულ ექსპრესიაზე G+M ფაზის წინ. შესწავლილი იქნა PARP-ის m-რნმ-ის სინთეზის დონე უჯრედული ციკლის მიმდინარეობისას და აღმოჩნდა, რომ იგი G ფაზაში აღწევს მაქსიმუმს. უჯრედულ ციკლზე დამოკიდებული PARP-ის შესაძლო სინთეზი ნავარაუდევია იქნა თავის SV40-3T3 უჯრედებში. როგორც ჩანს, PARP საჭიროა G ფაზის შეკავებისათვის და ასევე წარმოადგენს G ფაზის რეგულაციაში.

მრავალი ავტორი მიუთითებს, რომ მაალკილირებელი აგენტები და მაიონიზირებელი რადიაცია ამცირებს NAD-ის შიგაუჯრედულ დონეს. რადიაციული დამუშავების შემდგომ NAD-ის დონის შემცირება დაკავშირებული იყო დნმ-ის ერთჯაჭვიანი ნახლეჩების წარმოქმნით გამოწვეული PARP-ული აქტივობის ზრდასთან. 1980 წელს დურკასის მიერ ნავარაუდევო იქნა PARP-ულ რექციასა და დნმ-ის ექსციზიურ რეპარაციას შორის მჭიდრო კავშირი. PARP-ის როლის შესასწავლად განსხვავებულ სისტემებზე ჩატარებული დაკვირვებებით გამოვლინდა, რომ დნმ-ის რეპარაციაში PARP არ ყოფილა აუცილებელი კომპონენტი, თუმცა იგი საჭიროა ექსციზიური რეპარაციის ჩართვის სტიმულირებისათვის [78]. ენდოგენური დნმ-ის და PARP-საგან თავისუფალ HeLa-ს უჯრედულ ექსტრაქტებში NAD-ის გარეშე ხდებოდა γ -დასხივებული პლაზმიდური დნმ-ის რეპარაცია, მაშინ როცა გასუფთავებული PARP-ის დამატებით NAD-ის თანაობისას ძლიერდება დნმ-ის რეპარაცია.

In vitro სისტემებში დნმ-ის რეპარაციის დროს შესწავლილი იქნა პოლიმერის სინთეზი, PARP-ის როლი და დაზიანებული უბნების აღდგენა. დნმ-ის დაზიანებაზე დამოკიდებული PARP-ული აქტივობის შესწავლით დადგინდა, რომ in vivo იზრდება PARP-ის მეტაბოლიზმი და განსაკუთრებით მისი დატოტვილი ფორმის სინთეზი. ანტისენს რნმ-ით და ტრანსდომინანტური ინჰიბიტორებით ჩატარებულმა გამოკვლევებმა აჩვენა, რომ არსებობს კორელაცია in vivo γ -დასხივებით და მაალკილირებელი აგენტებით გამოწვეულ დნმ-ის რეპარაციასა და PARP-ულ აქტივობას შორის.

რამდენიმე წლის წინათ ნანახი იქნა, რომ PARP ჩართულია ხანგრძლივი მეხსიერების ჩამოყალიბებაში. ნაჩვენებია, რომ PARP-ის მიერ ქრომატინის სწრაფი და გარდამავალი დეკონდენსაცია ხელს უწყობს იმ ცილების ტრანსკრიფციას, რომელებიც ხანგრძლივი მეხსიერების ფორმირებისათვის არის აუცილებელი [79].

PARP-ის სხვადასხვა ბიოლოგიურ პროცესებში შესაძლო ფუნქციების შესასწავლად იყენებენ PARP-ის ინჰიბიტორებს. In vitro ასეთმა კვლევებმა აჩვენა, რომ ქიმიური ინჰიბიტორები ასუსტებენ NAD-ის ხარჯვას და უჯრედები ჰიპერმგრძნობიარენი ხდებიან დნმ-დამაზიანებელი აგენტების მიმართ. თუმცა

ასეთი მიდგომის დროს ხდება უჯრედში მიმდინარე სხვა, NAD-ზე დამოკიდებული პროცესების შეზღუდვაც. ინჰიბიტორებით გამოწვეული გვერდითი ეფექტების გამოსარიცხად მიღებული იქნა სელექციურად მუტანტური უჯრედული ხაზები რომლებშიც შეზღუდული იყო PARP-ის ექსპრესია. გარდა ამისა ახდენდნენ PARP-ის ანტისენს m-რნმ-ის ექსპრესიას რითაც მნიშვნელოვნად იზღუდებოდა ფერმენტის სინთეზი.

კანცეროგენთა ციტოტოქსიური ეფექტი იზრდება PARP-ის ინჰიბიტორთა ზემოქმედებით. ისინი თრგუნავენ კანცეროგენ-ინდუცირებულ უჯრედულ ტრანსფორმაციას რაც ხელს უშლის სიმსივნის განვითარებას იწვევს ქრომატინში სტრუქტურულ ცვლილებას, რომელიც განაპირობებს მოქმედი გენების ამპლიფიკაციას. ამ თვალთახედვით მკვლევართა მიზანია PARP-ის ახალი, ძლიერმოქმედი, სპეციფიკური ინჰიბიტორების აღმოჩენა [80].

1.7 უჯრედის სიკვდილის ფორმები

აპოპტოზი და ნეკროზი წარმოადგენს უჯრედის სიკვდილის ორ ფორმას, განსხვავებული მორფოლოგიური და ფიზიოლოგიური მახასიათებლებით. აპოპტოზი არის მკაცრად მოწესრიგებული და თანმიმდევრული პროცესი, რომლისთვისაც დამახასიათებელია უჯრედის რღვევა, რის შედეგადაც წარმოქმნილი უჯრედის შიგთავსის შემცველი აპოპტოზური სხეულები ფაგოციტირდებიან მაკროფაგებით ან მეზობელი უჯრედებით. ბირთვული დნმ-ის რღვევა, ოლიგონუკლეოსომურ და/ან მაღალი მოლეკულური მასის მქონე (HMW) ფრაგმენტებად ასევე აპოპტოზისათვის დამახასიათებელი ერთ-ერთი ნიშანია.

ბოლო წლებში აპოპტოზში მონაწილე უამრავი მოლეკულა იქნა იდენტიფიცირებული, მათ შორის ცისტეინ პროტეაზები-კასპაზები. ამ ჯგუფის ფერმენტების ერთ-ერთ საუკეთესო სამიზნეებს წარმოადგენენ PARP-ული აქტივობის მქონე ცილების ოჯახი.

კასპაზა-7 და კასპაზა-3 ხლეჩს PARP1-ს ორ p89 და p24 ფრაგმენტად [81]. ეს პროტეაზები PARP1-ის ბირთვული ლოკალიზაციის მოდულში DEVD მოტივს ამოიცინობს, ხლეჩს და ერთმანეთს აცილებს დნმ-დაკავშირებად და კატალიზურ დომენს. ამ ფრაგმენტებს მივყავართ PARP-ული აქტივობის სუპრესიასთან ვინაიდან p89 და p24 აინჰიბირებს ინტაქტური PARP1-ის ჰომოასოციაციას და შესაბამისად დნმ-თან დაკავშირებას [82]. როგორც ჩანს ამ მექანიზმით PARP1-ის აქტივობის ბლოკირება მნიშვნელოვანია აპოპტოზის წარმართვისათვის. ამ მოსაზრების თანახმად PARP-ის დახლეჩით ხდება მისი გააქტიურების თავიდან აცილება, რაც თან ახლავს დნმ-ის ფრაგმენტაციას. შესაბამისად ხდება უჯრედის ენერგო რეზერვის, ზოგიერთი აპოპტოზის ATP-მგრძნობიარე ეტაპებისაგან, დაცვა. მართლაც ექსპერიმენტული მონაცემები, რომლებიც მიღებული იქნა ჰერცივისა და ვანგის (1999) მიერ, ამყარებენ ამ ჰიპოთეზას. ნაჩვენები იქნა, რომ «caspase-uncleavable»-მოდულიზებული PARP1-ის ექსპრესიისას PARP1 ნოკაუტირებულ, TNF- α -თ დამუშავებულ ფიბრობლასტებში NAD-ის დონე მკვეთრად ვარდება და ადგილი აქვს უჯრედების ნეკროზს. PARP1-ის აქტივობის 3-AB-ით ინჰიბირებისას ხდება NAD-ის ხარჯვის და შესაბამისად უჯრედთა სიკვდილის ბლოკირება. აღმოჩნდა, რომ აპოპტოზის დროს PARP1-ის გახლეჩით ხდება არა მარტო NAD-ის და ATP-ის ინტენსიური ხარჯვის თავიდან აცილება არამედ ადამიანის Ca^{2+} -ზე და Mg^{2+} -ზე დამოკიდებული ენდონუკლეაზების (DNASIL3) განთავისუფლება, რომლებიც PARP1-ით ინჰიბირდებიან [83]. PARP-ის სხვა იზოფორმების დახლეჩაზე ძალიან მწირი ინფორმაციაა. თუმცა რამდენიმე წლის წინ აჩვენეს, რომ PARP2-ის გახლეჩაც ხდება კასპაზა-8-ის მიერ. კასპაზა-8 მიიჩნევა როგორც აპოპტოზის მაინიცირებელი კასპაზა, რომლის პროფორმა ასოცირებულია უჯრედის ზედაპირთან არსებულ სიკვდილის რეცეპტორებთან. ნეირონებში იშემიით გამოწვეული აპოპტოზის დროს კასპაზა-8 გადაადგილდება ბირთვში და ხლეჩს PARP2-ს LQMD უბანში. PARP2-ის გახლეჩისას, ისე როგორც PARP1-ის შემთხვევაში, წარმოიქმნება DBD და კატალიზური ფრაგმენტები რომლებიც თრგუნავს ფერმენტის აქტივობას. PARP1-თან და PARP2-თან ერთად ხდება PARG-ის დახლეჩაც აპოპტოზის ადრეულ სტადიაზე [84]. თუმცა PARP2-ის

და PARP-ის დახლეჩის ბიოლოგიური როლი ჯერ-ჯერობით არ არის დეტალურად შესწავლილი.

PARP1-ის ანტისენს რნმ-ის ექსპრესია ან მისი გენის ამოკვეთა ფიბრობლასტებში იწვევს პოლი-ADP-რიბოზილირების ბლოკირებას და შესაბამისად FAS ლიგანდებით გამოწვეული აპოპტოზის ინჰიბირებას. ეს მონაცემები გვიჩვენებს, რომ PARP1-ის მიერ ბირთვული ცილების პოლი-ADP-რიბოზილირება მნიშვნელოვანია აპოპტოზისათვის. არსებობს ახალი მონაცემები რომლებიც ადასტურებს, რომ PARP1 ასევე მონაწილეობს აპოპტოზის გამომწვევი ფაქტორით (AIF) გამოწვეულ, კასპაზებისაგან დამოუკიდებელ აპოპტოზში. ნეირონებში და ფიბრობლასტებში, რომლებიც დამუშავებული იყო სხვადასხვა დნმ-დაზიანებების (MNNG, NMDA ან წყალბადის ზეჟანგი) მასტიმულირებელი აგენტებით, AIF-ის მიტოქონდრიიდან ბირთვში გადაადგილება განისაზღვრებოდა PARP-ული აქტივობით [85].

ადამიანის მონობლასტურ ლეიკემიურ უჯრედებში (NB-2a) ჩატარებულმა ექსპერიმენტებმა აჩვენა, რომ ამ უჯრედებში, აპოპტოზი მიმდინარეობს დნმ-ის, ნუკლეოსომათშორისი ფრაგმენტაციით ან მის გარეშე, იმის და მიხედვით თუ რომელი აპოპტოზის გამომწვევი აგენტებითაა დამუშავებული უჯრედები. თუმცა ნებისმიერ შემთხვევაში სახეზეა დნმ-ის HMW (50-100 kb) ფრაგმენტების ფორმირება. როგორც ჩანს HMW ფრაგმენტების წარმოქმნა ხორციელდება დნმ-ის ყულფების ჩაჭრით, მატრიქსთან მიმაგრების უბნებში. ეს მონაცემები აპოპტოზის ადრეულ სტადიაზე HMW ფრაგმენტების ფორმირებაში TOPO II-ის მონაწილეობაზე მიუთითებს [86].

უჯრედების სიკვდილის მეორე, ბიოქიმიურად და მორფოლოგიურად განსხვავებული ფორმას წარმოადგენს ნეკროზი. ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი განსხვავება ის არის, რომ ნეკროზულ უჯრედებში აპოპტოზურისაგან განსხვავებით ხდება პლაზმური მემბრანის რღვევა, უჯრედის შიგთავსის გადმოდიდება და ირგვლივ მყოფ უჯრედებში გავრცელება. რის შედეგადაც ზიანდება ქსოვილები ან მთლიანი ორგანოები.

ნეირონების NMDA-თი ან პეროქსინიტრიტით დამუშავებისას, ლიფთონისა და ნიკოტერას ჯგუფის მიერ ნაჩვენები იქნა, რომ აპოპტოზი და ნეკროზი არის ერთი და იგივე პროცესის განსხვავებული დასასრული. აპოპტოზი გამოწვეულია შედარებით სუსტი სტიმულაციით, ხოლო მისი გაზრდა იწვევს უჯრედთა ნეკროზულ სიკვდილს. მათ აჩვენეს, რომ ATP და NAD მნიშვნელოვან როლს თამაშობენ უჯრედების სიკვდილის დროს. განსაკუთრებით დამუშავებით დაზიანებულ უჯრედებში [87]. ეს მონაცემები გვიჩვენებს, რომ PARP როგორც NAD-ის მაკატაბოლიზირებელი ფერმენტი ასრულებს „გადამრთველის“ ფუნქციას აპოპტოზსა და ნეკროზს შორის. მართლაც ჩატარებული იქნა ექსპერიმენტები PARP1^{+/+} და PARP1^{-/-} თაგვებიდან გამოყოფილ თიმოციტებზე. ერთმანეთს შეადარეს პეროქსინიტრიტით და წყალბადის ზეჟანგით, ასევე დექსამეტაზონითა და ანტი-Fas დამუშავებით გამოწვეული შედეგები. არაგენოტოქსიური სტიმულაცია (დექსამეტაზონი და ანტი-Fas) იწვევდა აპოპტოზურ რეაქციას რომელიც გამოიხატებოდა კასპაზების გააქტიურებაში, დნმ-ის ფრაგმენტაციასა და პლაზმური მემბრანიდან ფოსფატიდილსერინის ექსპოზიციაში (ნორმალურ მდგომარეობაში ეს ფოსფოლიპიდები ჩაფლულნი არიან მემბრანებში) როგორც ველური ტიპის, ასევე PARP1-დეფიციტურ თიმოციტებში. მნიშვნელოვნად განსხვავებული შედეგები იქნა მიღებული თიმოციტების დნმ-დამაზიანებელი დამუშავები (პეროქსინიტრიტი, წყალბადის ზეჟანგი) აგენტებით დამუშავებისას. პეროქსინიტრიტისა და წყალბადის ზეჟანგის დაბალი კონცენტრაციები ორთავე PARP1^{+/+} და PARP1^{-/-} უჯრედებში იწვევს აპოპტოზს, თანაც 3-AB დამატება არ ცვლის სურათს. დამუშავების მაღალი კონცენტრაციები კი აპოპტოზური ნიშნების (კასპაზების გააქტიურება და დნმ-ის ფრაგმენტაცია) გაქრობას და ნეკროზის გამოვლენას იწვევს. ამ შემთხვევაში კი ნეკროზის თავიდან აცილება 3-AB-ის საშუალებით შეიძლება, რაც მართლაც PARP-ის აპოპტოზსა და ნეკროზს შორის გადამრთველის ფუნქციაზე მიუთითებს.

ექსპერიმენტული ნაწილი

2.1 რეაქტივები

ექსპერიმენტებში გამოყენებული იქნა შემდეგი რეაქტივები: თიმიდინი, 3-ამინობენზამიდი, პროტეინაზა-K, კუმასის ბრილიანტის ლურჯი G-250, ეთიდიუმ ბრომიდი, პანკრეასული დნმ-აზა I (2000 unit/mg), ფენილმეთილსულფონილფტორიდი (PMSF), ფიკოლ-400, Nonidet P-40, RPMI-1640 L-გლუტამინით, ATP („Sigma“ აშშ). ნატრიუმის დოდეცილსულფატი, Tris, EDTA, საქაროზა, β -NAD, dATP, dGTP, dCTP, β -მერკაპტოეთანოლი, („Serva“ აშშ), ბრომფენოლის ლურჯი („Koch-light“ Ltd). $[C^{14}]$ NAD (252 mCi/mmol), $[^3H]$ dTTP (50 Ci/mmol) („Amersham“ ინგლისი). λ ფაგის კონკატემერიზირებული დნმ („Bio-Labs“ აშშ), GF-C მინის ფილტრები („Whatman“ ინგლისი), SeaKem Gold აგაროზა („FMC BioProducts“ აშშ) ყველა დანარჩენ რეაქტივებს ჰქონდათ ქიმიურად სუფთა და ქიმიურად ძალზე სუფთა რეაქტივთა კვალიფიკაცია.

2.2 ქსოვილებიდან ბირთვების გამოყოფა

ექსპერიმენტებში ვიყენებდით 150_170 გრ წონის მქონე ზრდასრულ, თეთრ, არახაზოვან ვირთაგვებს, რომლებიც იმყოფებოდნენ ვივარიუმის სტანდარტულ პირობებში. ცხოველების ტოტალურ დასხივებას ვახდენდით რენტგენის დანადგარის PYM 17-ის (რუსეთი) საშუალებით, შემდეგ პირობებში: დოზის სიმძლავრე დაახლოებით 0.6 Gy/წთ, დენის ძალა 15 მა, ძაბვა 200 კვ, ფილტრები 1 მმ Al და 0.5 მმ Cu, ფოკუსური მანძილი 40 სმ. ვიყენებდით ერთჯერად დასხივებას (4.2 Gy დოზით).

საკვლევ მასალად ვიღებდით ღვიძლისა და ტვინის ქსოვილს. ვირთაგვების დეკაპიტაციის შემდეგ ღვიძლის და თავის ტვინის ქსოვილებიდან ჯამურ ბირთვულ პრეპარატს ვიღებდით შოვოს და თანაავტორების მეთოდის მიხედვით [88] მცირე მოდიფიკაციებით. ვწონდით ვირთაგვების ღვიძლს ან თავის ტვინს, ვაქუცმაცებდით და ვაჰომოგენიზირებდით ხუთმაგ (წონის მიხედვით) მოცულობა 2.2 M საქაროზაში, რომელიც შეიცავდა 3 mM $MgCl_2$ -ს და 0.1 mM PMSF-ს.

ჰომოგენიზაცია ხდებოდა პოტერის ჰომოგენიზატორით („B.Braun Melsungen AG“ დასავლეთ გერმანია) 0°C-ზე, რომლის ღერძის ბრუნვის სიჩქარეა იყო 1 500 ბრ/წთ, ჰომოგენატს ვფილტრავდით ექვს ფენა მარლაში და ვაცენტრიფუგირებდით 15 000xg-ზე 60 წთ. სუპერნატანტს ვაცილებდით, ხოლო მიღებულ ნალექს ვასუსპენზირებდით 3 mM MgCl₂-ის და 0.1 mM PMSF-ის შემცველ 0.32 M საქაროზას ხსნარში, ვაცენტრიფუგირებდით 4 000xg-ზე 10 წთ, მიღებულ ნალექს ისევ ვასუსპენზირებდით იმავე ხსნარში და ვიმეორებდით იგივე პროცედურას. ვსაზღვრავდით ცილის კონცენტრაციას, ხოლო ბირთვების სისუფთავის ხარისხს მას შემდეგ რაც ბირთვები იღებებოდა მეთილენის ლურჯით, ვაფასებდით სინათლის და ფაზოკონტრასტული მიკროსკოპის საშუალებით.

2.3 ცილის კონცენტრაციის განსაზღვრა

ცილის კონცენტრაციას ვსაზღვრავდით ბრედფორდის მეთოდით [89]. ბრედფორდის ხსნარის დასამზადებლად ვიყენებდით კუმასის ბრილიანტის ლურჯს G-250_0.01% (w/v), ეთანოლს 4.7% და ფოსფორმჟავას 8.5 % (w/v).

ვიღებდით 10 მკლ ცილების შემცველ სუსპენზიას და ვამატებდით 90 მკლ ბიდისტილირებულ წყალს, ხოლო კონტროლად ვიღებდით 100 მკლ ბიდისტილირებულ წყალს. ვამატებდით 5_5 მლ ბრედფორდის ხსნარს (წინასწარ დაახლოებით ვიცოდით რა რაოდენობის ცილა გვექონდა) კარგად ვანჯღრევდით და 2 წთ-ის შემდეგ 595 ნმ-ზე ვსაზღვრავდით შთანთქმას ფოტოელექტროკოლორიმეტრზე („CARLZEISS JENA“ გერმანია). შთანთქმის მნიშვნელობის მიხედვით ვადგენდით ცილის კონცენტრაციას.

2.4 ბირთვული მატრიქსის მიღება

ვირთავკვას ღვიძლის და თავის ტვინის ბირთვული მატრიქსის მისაღებად ბირთვებს ვასუსპენზირებდით ბუფერულ ხსნარში, რომელიც შეიცავდა 50 mM Tris-HCl pH~7.4; 0.15 M საქაროზას 50 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM β მერკაფტოეთანოლს, (ბირთვული ცილის კონცენტრაცია სუსპენზიაში 2 მგ/მლ) და

ვამუშავებდით პანკრეასული დნმ-აზა I-ით (10 ერთეული 1 მგ დნმ-ზე) 20°C-ზე 15 წთ-ის განმავლობაში მუდმივი ნჯღრევის პირობებში. ამის შემდეგ ბირთვების სუსპენზიას სწრაფად ვაცივებდით ყინულის აბაზანაში და ვაცენტრიფუგირებდით 10 წთ 4 000xg-ზე. ბირთვული ნალექის ექსტრაქციას ვახდენდით შემდეგი ბუფერული ხსნარით: 10 mM Tris-HCl pH~7.4; 2 M NaCl; 0.2 mM MgCl₂; 1 mM β მერკაფტოეთანოლი, ვაყოვნებდით 15_20 წთ (ბირთვული ნალექის სუსპენზირებას ვახდენდით ფრთხილი პიპეტირებით). შემდეგ ვაცენტრიფუგირებდით 12 000xg-ზე 15 წთ-ის განმავლობაში. ამ პროცედურას ვიმეორებდით ორჯერ. ექსტრაქციის შემდეგ დარჩენილ ნალექს ვრეცხავდით შემდეგი ბუფერული ხსნარით: 10 mM Tris-HCl pH~7.4; 0.2 mM MgCl₂; 1 mM β მერკაფტოეთანოლი, 0.5% ტრიტონ X-100, და ვაცენტრიფუგირებდით 4 000 g-ზე 10 წთ. მიღებულ ნალექს ვრეცხავდით იგივე ბუფერული ხსნარით ტრიტონის გარეშე. სუსპენზიას ვაცენტრიფუგირებდით 4 000xg-ზე 10 წთ. ეს პროცედურა მეორდებოდა სამჯერ (ბირთვული მატრიქსის მიღების ყოველი ეტაპი, ნუკლეაზებით დამუშავების გარდა, სრულდებოდა 0°C-ზე) [90].

2.5 ბირთვებსა და ბირთვულ მატრიქსებში PARP-ული აქტივობის განსაზღვრა

ბირთვებისა და ბირთვული მატრიქსის პრეპარატებში PARP-ულ აქტივობას ვსაზღვრავდით ადენინის რგოლში ნებისმიერად მონიშნული რადიოაქტიური [¹⁴C] NAD-ის ჩართვით მჟავაუხსნად პროდუქტში [91]. პოლიმერაზული რეაქციის წარმართვის არე (0.2 მლ) შეიცავდა 50 mM Tris_HCl-ს pH~8.0 (ზოგიერთ შემთხვევაში ვიყენებდით 50 mM Hepes-NaOH pH~8.0); 20 mM MgCl₂-ს; 0.5 mM β-მერკაფტოეთანოლს; 0.1 mM [¹⁴C] NAD-ს და ბირთვულ ან ბირთვული მატრიქსის სუსპენზიას_100 მკგ ცილა. სინჯებს ვაინკუბირებდით 25°C-ზე 10 წთ. პოლიმერაზულ რეაქციას ვაჩერებდით სინჯის სწრაფი ჩაცივებით ყინულის აბაზანაში და ათჯერადი მოცულობის 10%-ანი CCl₃COOH-ის თანადროული დამატებით. მჟავაუხსნად ნალექს ვაგროვებდით მინის_GF/C ფილტრებზე, ვრეცხავდით რამდენჯერმე 10%-ანი CCl₃COOH-ით და ეთილის სპირტით.

რადიოაქტივობას ვზომავდით თხევად სცინცილაციურ მთვლელზე (SL-30 “Intertechnique” საფრანგეთი), ტოლუოლში რომელიც შეიცავდა 5% PPO-ს და 0.3% POPOP-ს.

2.6 ბირთვებსა და ბირთვულ მატრიქსებში დნმ-პოლიმერაზული აქტივობის განსაზღვრა

ვირთვას თავის ტვინის ბირთვებისა და ბირთვული მატრიქსის პრეპარატებში დნმ-პოლიმერაზულ აქტივობას ვსაზღვრავდით რადიოაქტიური $[^3\text{H}]$ dTMP-ის ჩართვით მჟავაუხსნად პროდუქტში [92]. პოლიმერაზული რეაქციის წარმართვის არე (3 მლ) შეიცავდა 50 mM Tris_HCl-ს pH~7.5; 5 mM MgCl_2 -ს; 5 mM β -მერკაფტოეთანოლს; 0.1 mM dATP-ს, dGTP-ს, dCTP-ს, $[^3\text{H}]$ dTTP-ს (2Ci/mmol) და ბირთვებს ან ბირთვული მატრიქსის პრეპარატს (3 მგ ცილა). სინჯებს ვაინკუბირებდით 37°C -ზე 30 წთ. პოლიმერაზულ რეაქციას ვაჩერებდით სინჯის ჩაცივებით ყინულის აბაზანაში და ათჯერადი მოცულობის 5%-ანი CCl_3COOH -ის თანადროული დამატებით. მჟავაუხსნად ნალექს ვაგროვებდით GF/C ფილტრებზე და ვრეცხავდით რამდენჯერმე 5%-ანი CCl_3COOH -ით და ეთილის სპირტით. რადიოაქტივობას ვზომავდით თხევად სცინცილაციურ მთვლელზე (SL-30 “Intertechnique” საფრანგეთი).

2.7 ადამიანის პერიფერიული სისხლისაგან მონონუკლეარული ლეიკოციტების მიღება

მონონუკლეარული ლეიკოციტების მიღება, რომელიც წარმოდგენილია ლიმფოციტებისაგან (მთელი ლეიკოციტების 30%) და მონოციტებისაგან (მთელი ლეიკოციტების 1-3%) ხორციელდებოდა ბოიუმის მიერ შემოთავაზებული, პერიფერიული სისხლისაგან მონონუკლეარული უჯრედების სიმკვრივის გრადიენტში ცენტრიფუგირებით, სწრაფი გამოყოფის მეთოდით [93]. ეს მეთოდი იძლევა სისხლის მონონუკლეარული უჯრედების კარგ (მთელი ლეიკოციტების დაახლოებით 50%-იან) გამოსავალს.

ვილებდით ჯანმრთელი დონორის ახალ, ჰეპარინიზებულ (სისხლის შედედების თავიდან ასაცილებლად), ვენურ სისხლს და ვანზავედით იმავე მოცულობის საკვებ არეში (RPMI 1640 L_გლუტამინით, $\text{pH} \sim 7.3$). ამის შემდეგ 15 მლ-იან სინჯარებში ვასხამდით 3-3 მლ ფიკოლ-ვეროგრაფინის (9%-იანი ფიკოლის ხსნარში ვეროგრაფინის თანდათანობითი დამატებით ნარევის სიმკვრივე მიგვყავდა 1.078 გ/მლ-ამდე) ნარევს და ველოდებოდით მანამ, სანამ ტემპერატურა არ გაუთანაბრდებოდა ოთახის ტემპერატურას. ამის შემდეგ პასტერის პიპეტის საშუალებით ფრთხილად ვაფენდით უკვე განზავებულ სისხლს ფიკოლ-ვეროგრაფინის ზედაპირზე ისე, რომ არ მომხდარიყო მათი ერთმანეთში შერევა.

ოთახის ტემპერატურაზე, 1500xg-ზე, 15 წთ-ით ცენტრიფუგირების შემდეგ ერითროციტები და გრანულოციტები ილექებოდნენ სინჯარის ფსკერზე, ხოლო ფაზათა გამყოფზე მიიღებოდა მონონუკლეარული უჯრედებისგან შემდგარი ფენა. ვაცილებდით ამ ფენის ზემოთ მოთავსებულ გამჭვირვალე ნაწილს და ფრთხილად ვილებდით მონონუკლეარულ ლეიკოციტებს. ამის შემდეგ ვანზავედით შეგროვებულ ლეიკოციტებს არა ნაკლებ ოთხჯერად მოცულობა საკვებ არეში და საბოლოოდ მათი კონცენტრირებისათვის ვაცენტრიფუგირებდით 300xg-ზე 10 წთ-ის განმავლობაში. მიღებული პრეპარატის სისუფთავეს ვამოწმებდით ფაზოკონტრასტული მიკროსკოპით.

2.8 ვირთაგვას თავის ტვინის ქერქისაგან ნეირონებით გამდიდრებული ფრაქციის მიღება

ვირთაგვას თავის ტვინის ქერქისაგან ნეირონებით გამდიდრებულ ფრაქციას ვღებულობდით ფარუხისა და თანაავტორების მიერ მოდიფიცირებული მეთოდის გამოყენებით [94].

ვირთაგვას დეკაპიტაციის შემდეგ (ცდებში ვიყენებდით 150-170 გრ წონის მქონე ზრდასრულ, თეთრ, არახაზოვან ვირთაგვებს, რომლებიც ვივარიუმის სტანდარტულ პირობებში იმყოფებოდნენ). ვილებდით თავის ტვინს ფრთხილად ვაცილიდით ქერქს და ქერქის დაქუცმაცებულ მასას ვასხამდით 7%-იან ფიკოლ_400-ის შემცველ ბუფერს: 10 mM KH_2PO_4 -NaOH $\text{pH} \sim 7.4$ (3.5 მლ/ქერქზე) და ვატარებდით

თანმიმდევრობით 500 მკმ, 100მკმ და 75 მკმ ფორის მქონე ნეილონის საცრებში. მიღებულ სუსპენზიას ვაცენტრიფუგირებდით 280xg-ზე 5-10 წთ. ნალექს, რომელიც გამდიდრებული იყო ნეირონებით (90-95%), ვასუსპენზირებდით სასურველი მოცულობის საკვებ არეში (RPMI 1640 L-გლუტამინით).

პრეპარატის სისუფთავეს გამოწმებით ფაზოკონტრასტული მიკროსკოპით.

2.9 უჯრედების შემცველი აგაროზის ბლოკების მიღება

მიღებული უჯრედების (ადამიანის პერიფერიული სისხლის მონონუკლეარული უჯრედები და ვირთაგვას თავის ტვინის ქერქის ნეირონები) დათვლას ვახდენდით გორიაევის კამერის საშუალებით. რომელსაც ჰქონდა შემდეგი ტექნიკური მახასიათებლები:

1. მცირე ზომის კვადრატის გვერდის სიგრძე- 0.05 ± 0.001 მმ.
2. დიდი ზომის კვადრატის გვერდის სიგრძე- 0.2 ± 0.0015 მმ.
3. ბადის გვერდის სიგრძე- 3 ± 0.005 მმ.
4. კამერის სიღრმე- 0.1 ± 0.008 მმ.
5. ბადის ფართობი-9 მმ².
6. ბადის მოცულობა-0.9 მმ³.
7. კამერის მასა-0.04 კგ.

უჯრედებს ვითვლიდით ოთხ, დიდი ზომის ($0.2\text{მმ} \times 0.2\text{მმ} \times 0.1\text{მმ}$) პარალელეპიპედში. თუ მათ რაოდენობას აღვნიშნავთ n-ით მაშინ- $n/16 \times 10^6$ გვაძლევს 1 მლ-ში არსებულ უჯრედების რაოდენობას.

დიდი ზომის დნმ-ის მოლეკულები (ქრომოსომების ზომის და მათი რიგის) ძალიან მგრძნობიარენი არიან მექანიკური ზემოქმედების (მაგალითად პიპეტირების) მიმართ და ადვილად წყდებიან. ამიტომ დნმ-ის ძაფების წყვეტის თავიდან ასაცილებლად ახდენენ აგაროზში შელღობილი ინტაქტური უჯრედების

in situ ლიზირებას და დეპროტეინიზაციას. აგაროზის მატრიქსი იცავს აგაროზის ბლოკებში ამგვარად განთავსებულ დნმ-ს დაზიანებისაგან და ადვილად შეიძლება მათზე სხვადასხვა მანიპულაციების ჩატარება. ვინაიდან ჩვენს ექსპერიმენტებში საქმე გვქონდა საკმაოდ დიდი ზომის დნმ-ის მოლეკულებთან (5_200kb) უჯრედების შემცველ სუსპენზიას ვაცენტრიფუგირებდით 1500xg-ზე 5 წთ-ის განმავლობაში, ნალექს ვასუსპენზირებდით RPMI 1640-ში (L-გლუტამინით) რომელიც წინასწარ გამთბარი იყო 37°C-მდე და ვურევდით თანაბარ რაოდენობა 1.5%-იან ასევე 37°C ტემპერატურის მქონე დაბალ ტემპერატურაზე ლობად აგაროზას, რომელიც იმავე არეში იყო მომზადებული. მიღებულ ნარევს ვათავსებდით სპეციალურ ფორმებში (10მმx5მმx1.5მმ) და ვტოვებდით დაახლოებით 10 წთ 2 °C-ზე. საბოლოოდ ვღებულობდით აგაროზაში შელღობილ უჯრედებიან ბლოკებს. თითოეული ბლოკი შეიცავდა დაახლოებით 4×10^6 უჯრედს.

2.10 აგაროზის ბლოკებში დაფიქსირებული უჯრედების პერმეაბილიზაცია. PARP-ული და დნმ-ტოპოიზომერაზული რეაქციები

აგაროზის ბლოკებში დაფიქსირებული უჯრედების პერმეაბილიზაციას ვახდენდით 2 M NaCl-ით. ბლოკებს ვაინკუბირებდით ბუფერში: 20 mM Tris-HCl pH~7.5, 2 mM Na-EDTA, 0.2% Nonidet P-40, 2 M NaCl, 1mM PMSF 2°C-ზე 1 სთ-ის განმავლობაში ნელი ნჯღრევით. ამის შემდეგ 3-ჯერ, ვრეცხავდით 10 მლ ბუფერული ხსნარით, რომელიც შეიცავდა: 20 mM Tris-HCl pH~7.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂ და 0.1 mM Na-EDTA 30 წთ-ით [95]. ამგვარად, ვღებულობდით აგაროზის ბლოკებში მყარად ჩამაგრებულ ციტოქრომჩხს მასში ინტაქტურად (ან თითქმის ინტაქტურად) დაფიქსირებული გენომით. ამის შემდეგ ვატარებდით ADP-რიბოზილირებისა და დნმ-ტოპოიზომერაზულ რეაქციებს. რეაქციები მიგვყავდა 25°C-ზე 40 წთ-ით 5_5 მლ იმავე ბუფერში, რომელსაც ბლოკების გასარეცხად ვიყენებდით 1 mM ATP-ის და NAD-ის თანაობისას. PARP-ული რეაქციის დასაინჰიბირებლად ვიყენებდით თიმიდინს და 3-ამინობენზამიდს, რომლებთანაც ბლოკების პრეინკუბაციას ვახდენდით 15 წთ-ის განმავლობაში. რეაქციას ვაჩერებდით ბლოკების stop-ბუფერში (0.4 M EDTA pH~8.0, 1% SDS)

ჩაშვებით და პროტეინაზა K-სთან (0.5 მგ/მლ) ერთად ვაინკუბირებდით იმავე არეში ცილების გადამუშავებისათვის 36 სთ-ის განმავლობაში, 55°C-ზე ნჯღრევის გარეშე. ამის შემდეგ ბლოკებს ვრეცხავდით 0.2 M Na-EDTA-ს pH~8.0 ხსნარში და ვატარებდით ელექტროფორეზს პულსირებად ველში.

2.11 გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში

გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში (PFGE) გამოიყენება ქრომოსომული და მაღალმოლეკულური დნმ-ების განსაცალკავებლად. ელექტრული ველის მიმართულების ცვლილების გამო მოლეკულები იცვლიან ორიენტაციას და ზომების მიხედვით სხვადასხვა სისწრაფით გადაადგილდებიან აგაროზის გელის ფორებში. დიდი ზომის მოლეკულებს რეორიენტაციისათვის უფრო მეტი დრო სჭირდებათ, შესაბამისად აქვთ უფრო ნაკლები დრო პულსირებისას ველის რომელიმე ერთი მიმართულებით გადასადგილებლად. ამიტომაც ისინი ჩამორჩებიან შედარებით ნაკლები ზომის მოლეკულებს და ამგვარად მიიღება გელში დნმ-ის მოლეკულების ზომების მიხედვით განაწილება.

ჩვენს ექსპერიმენტებში ვიყენებდით CHEF-DR II სისტემას (Bio-Rad), რომელიც აკმაყოფილებს PFGE ხელსაწყოებისათვის აუცილებელ ორივე მოთხოვნას:

1. ველის გასწვრივ ქმნის მაღალი ხარისხის ერთგვაროვან ელექტრულ ველს.

2. CHEF-DR II ქმნის ველის სარეორიენტაციო 120°-იან კუთხეს ჰექსაგონალური გეომეტრიის მქონე მეზობელ (მის გაგრძელებას) და მოპირდაპირე გვერდებზე განლაგებულ ელექტროდებს შორის, რომელიც არის ოპტიმალური კუთხე 100kb_6mb ზომის დნმ-ის მოლეკულების დასაყოფად.

PFGE-ის დროს დნმ-ის მოლეკულების აგროზის გელში ზომების მიხედვით დაყოფის ხარისხი მნიშვნელოვნად განისაზღვრება თვით აგაროზის კონცენტრაციით, ბუფერის კონცენტრაციით და ტემპერატურით, ძაბვით,

ელექტრული ველის მიმართულების გადართვის საწყისი და საბოლოო დროებით და ფორეზის მიმდინარეობის სრული დროით.

	დნმ 1-1000kb	დნმ 1-2.0 mb	დნმ 2-4 mb	დნმ >4kb
% აგაროზა	1.0-1.2	0.8-1.2	0.6-1	0.5-0.8
ბუფერი	0.5xTBE	.5xTBE	.0xTAE	1.0xTAE
ტემპერატურა	14°C	14°C	14°C	14°C
ძაბვა	6 ვ/სმ	5-6 ვ/სმ	2-3ვ/სმ	5-2.5 ვ/სმ
პულსირების პარამეტრები	05-10 წმ	0-200 წმ	00-1800 წმ	0-60 წთ
ფორეზის მიმდინარეობის დრო	2-15 სთ	5-30 სთ	4-72 სთ	2-144 სთ

ჩვენ ვიყენებდით 1%-იან აგაროზის გელს, 0.5x TBE pH~8.3 (Tris-borate-EDTA) ბუფერს: 45 mM Tris, 45 mM borate, 1.0 mM EDTA. პულსირების დრო იცვლებოდა წრფივად (ფორეზის მიმდინარეობის სრული დროის მიხედვით) 10 წმ-დან 90 წმ-მდე. პოტენციალთა სხვაობა ორ მოპირდაპირე ელექტროდს შორის იყო 6 ვ/სმ. ფორეზის მსვლელობის სრული დრო 20 სთ, ხოლო ბუფერის ტემპერატურა 14 °C. მარკერად ვიყენებდით λ ფაგის კონკატემერიზირებულ დნმ-ს (48.5 , 97 , 145.5 , . . . kb).

ელექტროფორეზის დასრულების შემდეგ გელს ვღებავდით 0.5 მკგ/მლ ეთიდიუმ ბრომიდის ბიდისტილირებულ წყალხსნარში 30 წთ-ით. დნმ-თან დაუკავშირებელი ეთიდიუმ ბრომიდის გამორეცხვას ვახორციელებდით ბიდისტილირებულ წყალში 1 სთ-ის განმავლობაში. დნმ-ის ვიზუალიზაციისათვის ვიყენებდით ულტრაიისფერ ტრანსლუმინატორს და ვახდენდით ფოტოგრაფირებას ნარინჯისფერი შუქფილტრის გამოყენებით.

მიღებული შედეგები და მათი განხილვა

3.1 ADP-რიბოზილირება აძლიერებს დნმ-ის მარყუქების დახლეჩას ბირთვულ მატრიქსში

ეუკარიოტული ბირთვები წარმოადგენენ რთულ სისტემებს, რომელთა არქიტექტურა წარმოდგენილია ორი ერთმანეთთან მჭიდროდ დაკავშირებული და ერთმანეთში გარდამავალი სტრუქტურის-ქრომატინისა და ბირთვული მატრიქსის-სახით. ქრომატინში შემავალი დნმ-ის მესამე დონე განისაზღვრება 30 nm-იანი ფიბრილების ჩალაგებით მარყუქებში, რომლებიც ბირთვულ მატრიქსთან პერიოდული მიმაგრებით წარმოქმნიან 5–200 kb ზომის ტოპოლოგიურად დამოუკიდებელ ერთეულებს. ტოპოლოგიური იზომერების ურთიერთგარდამქმნელი ფერმენტი-დნმ-ტოპოიზომერაზა II ასოცირებულია მარყუქების ბირთვულ მატრიქსთან მიმაგრების უბნებში. დნმ-ტოპოიზომერაზა II ATP-აზური აქტივობის ხარჯზე ახორციელებს ორჯაჭვიანი დნმ-ის გაწყვეტას, მასში ტოპოლოგიური ცვლილების შეტანას და რელიგირებას. აქედან გამომდინარე დიდია მისი წვლილი გენეტიკური პროცესების წარმართვაში.

ბირთვული დნმ-ის რღვევას ნუკლეოსომების ზომის ფრაგმენტებად წინ უსწრებს უფრო დიდი ზომის (50–100 kb) ფრაგმენტების წარმოქმნა. ზოგიერთი ავტორის აზრით ამ ზომის დნმ-ის ფრაგმენტები წარმოიქმნებიან დნმ-ის ყულფების ჩაჭრით, მისი მატრიქსთან მიმაგრების უბნებში და არის დნმ-ის რღვევის ადრეული ეტაპი აპოპტოზის დროს [86]. აგრეთვე ნაჩვენებია, რომ აპოპტოზის ადრეულ სტადიაზე მაღალი მოლეკულური მასის მქონე ფრაგმენტების წარმოქმნაში მონაწილეობას ღებულობს დნმ-ტოპოიზომერაზა II.

როგორც აღვნიშნეთ ADP-რიბოზილირება წამოადგენს ცილების შექცევად, კოვალენტურ, პოსტტრანსლაციურ მოდიფიკაციას, რომელიც უჯრედის ბირთვში ფერმენტ-PARP-ის საშუალებით ხორციელდება, რომლის მოლეკულების მნიშვნელოვანი ნაწილი ლოკალიზებულია ბირთვულ მატრიქსში. ნაჩვენებია, რომ ADP-რიბოზილირება ჩართულია სხვადასხვა გენეტიკურ პროცესებში: რეპლიკაცია, ტრანსკრიპცია, რეპერაცია და ა. შ [44]. ამიტომ ADP-რიბოზილირების პროცესის

შესწავლა სულ უფრო დიდ მნიშვნელობას იძენს. გასუფთავებული ფერმენტის გამოყენებით ნაჩვენებია, რომ PARP ახდენს დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ის ADP-რიბოზილირებას და აინჰიბირებს მის აქტივობას [96].

ყოველივე აქედან გამომდინარე ჩვენს მიზანს წარმოადგენდა შეგვესწავლა ADP-რიბოზილირების გავლენა დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ის აქტივობის მოდულაციაში ადამიანის მონონუკლეარული ლეიკოციტების და ვირთაგვას თავის ტვინის ქერქის ნეირონების ბირთვულ მატრიქსში.

მატრიქსის დნმ-ტოპოიზომერაზულ აქტივობაზე ADP-რიბოზილირების გავლენის შესაფასებლად ჩვენ ვიყენებდით ბირთვული მატრიქსის პრეპარატს, რომელსაც ვღებულობდით ბოლო დროს შემუშავებული მეთოდით [97]. ადამიანის პერიფერიული სისხლის მონონუკლეარული ლეიკოციტებს და ვირთაგვას თავის ტვინის ქერქის ნეირონებს ვსვამდით აგაროზის ბლოკებში და პერმეაბილიზირებული უჯრედების ბირთვებს ვაექსტრაგირებდით კონცენტრირებული ბუფერული მარილხსნარით, რაც განაპირობებდა არამატრიქსული დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ის და PARP-ის მოშორებას და საშუალებას იძლეოდა მიგვეღო მატრიქსის პრეპარატი დნმ-ის ინტაქტური მარყუჟებით (ნუკლეოიდი). ვინაიდან მატრიქსის დნმ-ტოპოიზომერაზა II ლოკალიზებულია დნმ-ის მარყუჟების ფუძეებში, ფერმენტის აქტივობა შესაძლებელია განისაზღვროს მისი უნარით ექსპერიმენტის განსაზღვრულ პირობებში გახლიჩოს და რელიგირება გაუკეთოს დნმ-ს იმ უბნებში, რომლებითაც მარყუჟები მიმაგრებულია ბირთვულ მატრიქსზე.

ADP-რიბოზილირების და დნმ-ტოპოიზომერაზული რეაქციების ჩასატარებლად ბლოკებს ვაინკუბირებდით 25°C-ზე 40 წთ-ის განმავლობაში ბუფერულ ხსნარში: 20 mM Tris-HCl pH~7.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂ და 0.1 mM EDTA, რომელიც შეიცავდა 1 mM ATP-ს. რეაქციას ვაჩერებდით ბლოკების განთავსებით სტოპ-ბუფერში: 0.4M EDTA pH~8.0, 1% SDS, პროტეინაზა K-ს თანაობისას (0,5მგ/მლ). ბლოკებს ცილების გადამუშავებისათვის ვაინკუბირებდით იმავე არეში 36 სთ-ის განმავლობაში 55 °C-ზე. ბლოკებს ვრეცხავდით 0.2M EDTA pH 8.0 ხსნარში და ვიყენებდით ელექტროფორეზისათვის პულსირებად ველში.

სურათ 1-ზე წარმოდგენილია მონაცემები, რომლებიც გვიჩვენებენ თუ როგორ გავლენას ახდენს ადამიანის პერიფერიული სისხლის მონონუკლეარული ლეიკოციტების ბირთვულ მატრიქსში ADP-რიბოზილირება გენომური დნმ-ის გახლეჩაზე დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ით. ჩანს, რომ პულსირებად ველში დნმ-ის ელექტროფორეზული განაწილების სურათი იცვლება ნუკლეოიდების NAD-თან ინკუბაციით. NAD-ის 1 mM კონცენტრაცია იწვევს მაღალმოლეკულური გენომური დნმ-ის გახლეჩის გაძლიერებას. ამ დროს შეინიშნება იმ დნმ-ის რაოდენობის გაზრდა, რომელიც იმყოფება 50–500 kb არეში. ყოველივე ამას თან ახლავს დნმ-ის რაოდენობის საგრძნობი შემცირება გელის სტარტზე და კომპრესიის ზონაში. როგორც სურათიდან ჩანს PARP-ის ინჰიბიტორი, თიმიდინი_20 mM გავლენას არ ახდენს დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ის მიერ გენომის გახლეჩაზე NAD-ის არყოფნისას და მთლიანად ხსნის NAD-ის გავლენას გახლეჩის ეტაპზე. ეს გამორიცხავს თიმიდინის და NAD-ის უშუალო ზეგავლენას დნმ-ტოპოიზომერაზულ აქტივობაზე და იმავედროულად მიუთითებს იმაზე, რომ ADP-რიბოზილირება ახდენს გავლენას ფერმენტის აქტივობაზე. ანალოგიური სურათი (სურ.2) შეინიშნება ვირთაგვას თავის ტვინის ქერქის ნეირონებით გამდიდრებული ფრაქციის ნუკლეოიდებში. დნმ-ის რაოდენობა 50–150 kb არეში თანდათანობით იზრდება NAD-ის კონცენტრაციის გაზრდასთან ერთად (0.5–1.5 mM) და კონცენტრაციის ზრდის პარალელურად მცირდება დნმ-ის რაოდენობა გელის სტარტზე და კომპრესიის ზონაში. PARP-ის ინჰიბიტორი–თიმიდინი (20 mM) ხსნის NAD-ის ეფექტს დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ით დნმ-ის გახლეჩაზე. ეს კი ისევ როგორც მონონუკლეარული ლეიკოციტების შემთხვევაში მიუთითებს ADP-რიბოზილირების როლზე ბირთვული მატრიქსის დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ის აქტივობაში. უნდა აღინიშნოს, რომ ასეთივე შედეგები იყო მიღებული PARP-ის სხვა ინჰიბიტორის–3-ამინობენზამიდის (4 mM) გამოყენების დროს.

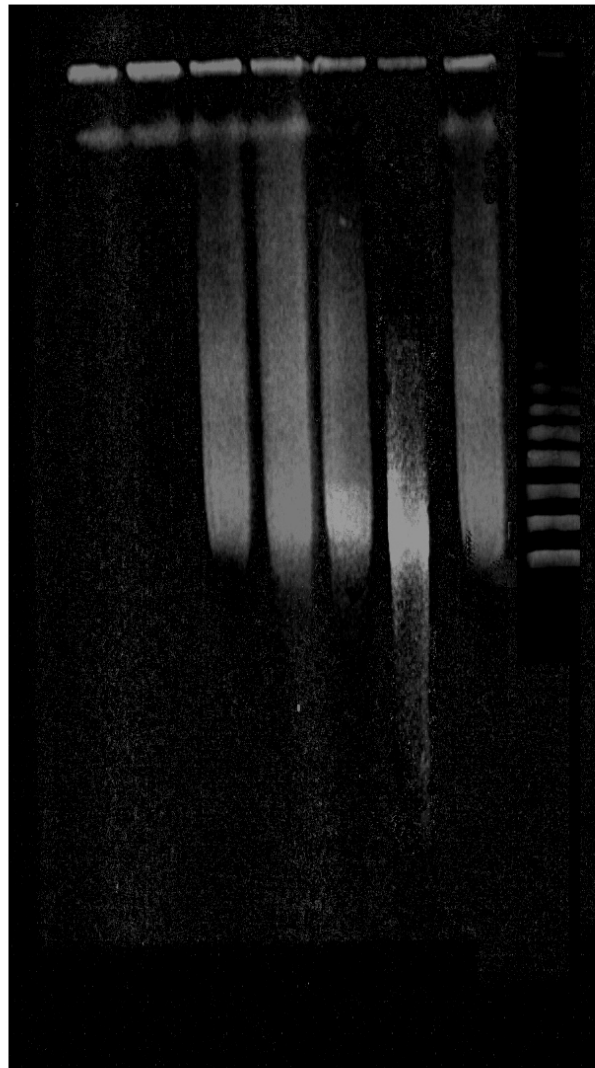
როგორც ადრე აღვნიშნავდით ტოპოლოგიური იზომერიზაციის დროს დნმ-ტოპოიზომერაზა II დნმ-ში წარმოქმნის დროებით ორჯაჭვიან ნახლეჩებს, რის შემდეგაც ფერმენტი არელიგირებს მოლეკულას. ჩვენს შემთხვევაში მონონუკლეარული ლეიკოციტების და ნეირონების გენომის, მაღალი მოლეკულური

მასის მქონე ფრაგმენტებად დახლეჩა, ნუკლეოიდების NAD-თან ინკუბირების დროს ალბათ გამოწვეულია იმით, რომ ADP-რიბოზილირება აინჰიბირებს ტოპოიზომერაზულ რეაქციას. კერძოდ აფიქსირებს დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ს იმ მომენტში როცა ის კოვალენტურად არის დაკავშირებული გაწყვეტილი ორჯაჭვიანი დნმ-ის ბოლოებთან და აღარ ხდება დნმ-ის რელიგირება. რაც ხელს უწყობს ზემოაღნიშნული მარყუქების ზომის ფრაგმენტების ფორმირებას. ამის მიზეზი შეიძლება იყოს დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ის ADP-რიბოზილირება. მაგრამ არ არის გამორიცხული, რომ რაიმე სხვა ცილის (ცილების) ADP-რიბოზილირება ალოსტერულ ზეგავლენას ახდენდეს ფერმენტით დნმ-ის რელიგირების პროცესზე.

ამგვარად, ჩვენი მონაცემების საფუძველზე შეგვიძლია ვივარაუდოთ, რომ ეუკარიოტულ უჯრედებში, ბირთვულ მატრიქსთან ასოცირებული PARP მონაწილეობს მატრიქსის დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ის აქტივობის რეგულაციაში. ყოველივე აქედან გამომდინარე არ არის გამორიცხული, რომ აპოპტოზის ადრეულ სტადიაზე მაღალი მოლეკულური მასის (50–100 kb) მქონე დნმ-ის ფრაგმენტების წარმოქმნა დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ის მიერ აღნიშნული მექანიზმით ხორციელდებოდეს.



სურ.1. ADP-რიბოზილირების გავლენა ადამიანის მონონუკლეარული ლეიკოციტების ბირთვული მატრიქსის დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ით გენომური დნმ-ის გახლეჩაზე. აგაროზის გელის პულსელექტროფორეგრამა. 1-ნუკლეოიდების დნმ; 2-4-ნუკლეოიდების დნმ ინკუბირებული 40 წთ-ის განმავლობაში 25°C-ზე ბუფერში PARP-ული და დნმ-ტოპოიზომერაზული რეაქციების ჩასატარებლად (2), 20 mM თიმიდინის (3), 1 mM NAD-ის (4) და 1 mM NAD და 20 mM თიმიდინის (5) თანაობისას; 6-ლ ფაგის კონკატემერიზებული დნმ (48,5 , 97 , 145,5 . . . kb).



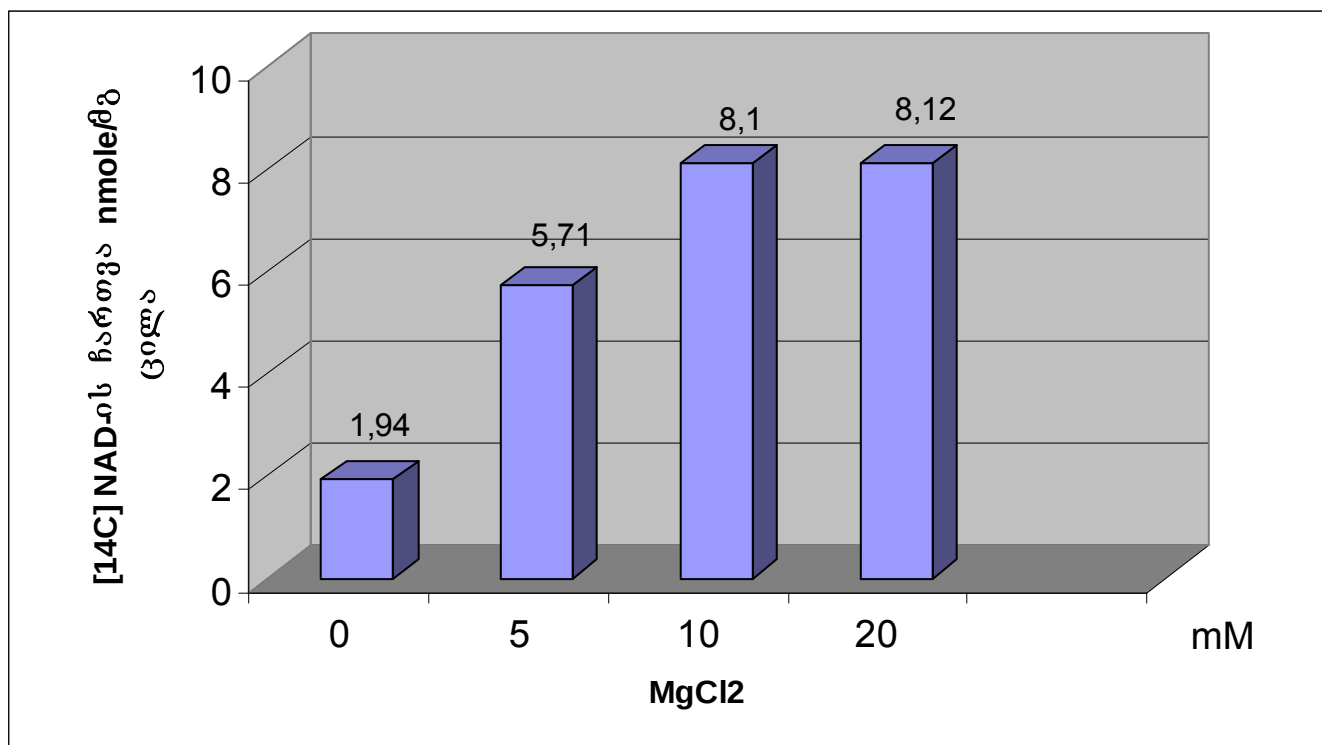
1 2 3 4 5 6 7 8

სურ.2. ADP-რიბოზილირების გავლენა ვირთაგვას თავის ტვინის ქერქის ნეირონების ბირთვული მატრიქსის დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ით გენომური დნმ-ის გახლეჩაზე. აგაროზის გელის პულსელექტროფორეგრამა. 1-ლიზირებული უჯრედების დნმ სტოპ-ბუფერში. 2-ნუკლეოიდების დნმ; 3-7-ნუკლეოიდების დნმ დაინკუბირებული 40 წთ 25 °C-ზე ბუფერში PARP-ული და დნმ-ტოპოიზომერაზული რეაქციების ჩასატარებლად, NAD-ის თანაობისას კონცენტრაციებით 0 , 0,5 , 1 , 1,5 mM (3-6); 1,5 mM NAD და 20 mM თიმიდინის (7); 8- λ ფაგის კონკატემერიზებული დნმ (48,5 , 97 , 145,5 . . . kb).

3.2 Mg^{2+} -ის, Cu^{2+} -ის, Zn^{2+} -ის კათიონების და ბიოგენური პოლიამინების ზემოქმედება ვირთაგვას ღვიძლის უჯრედების ბირთვული მატრიქსის პოლი(ADP-რიბოზა)პოლიმერაზული აქტივობაზე.

მეტალთა იონები გავლენას ახდენენ ქრომატინის სტრუქტურაზე, ურთიერთქმედებენ რა უშუალოდ მის ცალკეულ კომპონენტებთან ან ქრომატინთან, როგორც ზემოლექულურ სტრუქტურასთან. გარდა ამისა არსებობს შესაძლებლობა მეტალთა იონების არაპირდაპირი ზემოქმედების ქრომატინის სტრუქტურასა თუ ფუნქციაზე. მეტალთა იონების შესწავლას ეუკარიოტული გენომის სტრუქტურულ-ფუნქციურ ორგანიზაციაში განსაკუთრებული მნიშვნელობა აქვს იქიდან გამომდინარე, რომ სხვადასხვა დაავადებების ფორმირება დაკავშირებულია მეტალთა ჰომეოსტაზის დარღვევასთან [98].

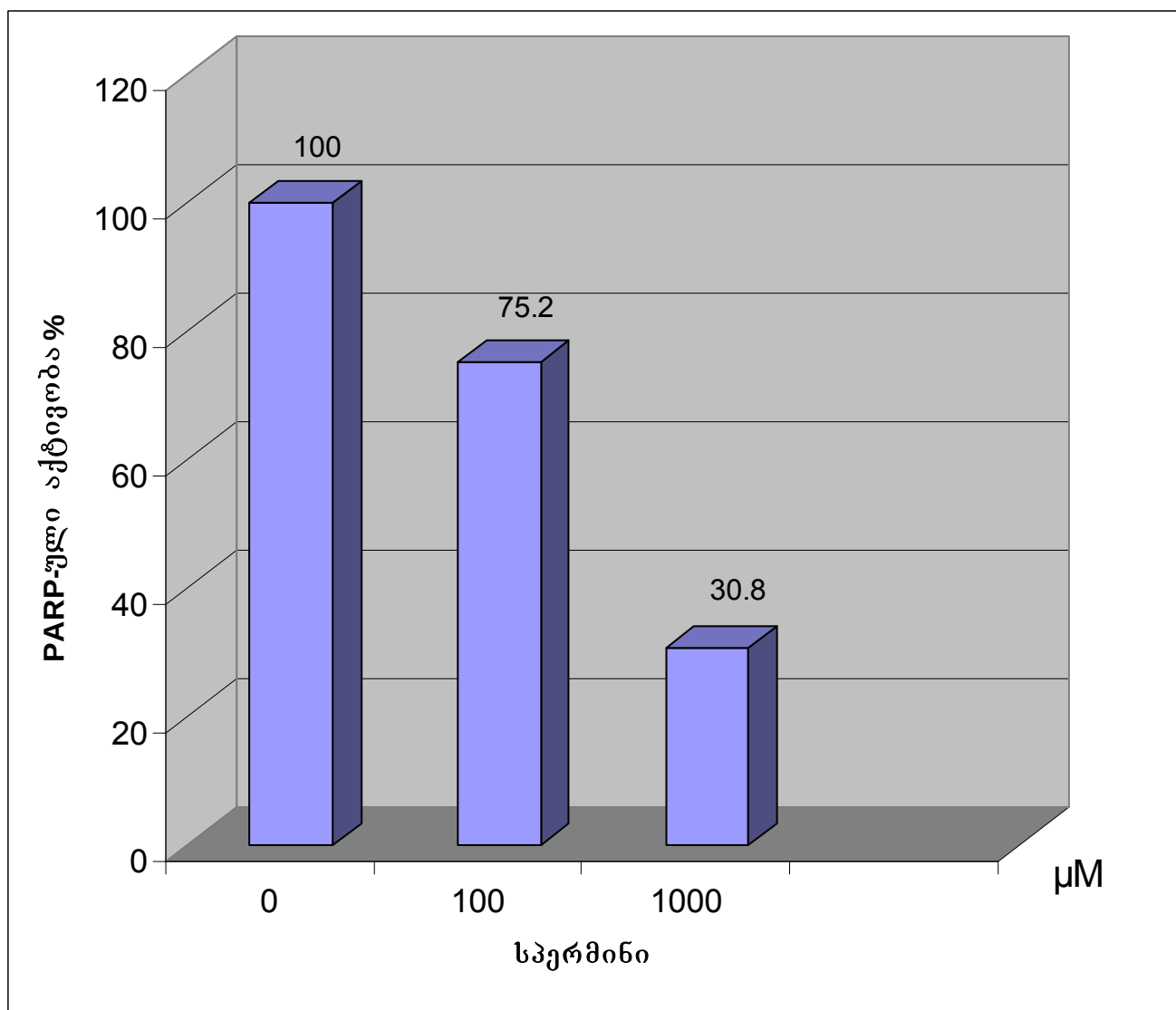
მეტალთა კათიონების გარდა გარკვეულ ყურადღებას იმსახურებენ ბიოგენური პოლიამინები. ლიტერატურაში მოიპოვება მონაცემები, რომლებიც მიუთითებენ ბიოგენური პოლიამინების მონაწილეობაზე დნმ-ის რეპლიკაციაში, ტრანსკრიპციაში და ცილის სინთეზში. არ არის გამორიცხული პოლიამინების მონაწილეობა დნმ-ის მარყუჟულ ორგანიზაციაშიც [99]. მეტალთა კათიონების (Mg^{2+} , Cu^{2+} და Zn^{2+}) და აგრეთვე პოლიამინების (სპერმინი და სპერმიდინი) ზეგავლენა მატრიქსის პოლი(ADP-რიბოზა)პოლიმერაზულ აქტივობაზე შეუსწავლელია. ზემოაღნიშნულიდან გამომდინარე ჩვენს მიერ შესწავლილ იქნა ბივალენტური კათიონების: Mg^{2+} -ის, Cu^{2+} -ის, Zn^{2+} -ის და პოლიამინების: სპერმინისა და სპერმიდინის ზემოქმედება ბირთვული მატრიქსის PARP-ულ აქტივობაზე. ამ მიმართულებით კვლევა



სურ.3. MgCl₂-ის გავლენა ვირთაგვას ღვიძლის უჯრედების, ბირთვული მატრიქსის PARP-ულ აქტივობაზე. რეაქციას ვატარებდით 25 °C-ზე 10 წთ საინკუბაციო არეში (0,2 მლ), რომელიც შეიცავდა: 50 mM Tris-HCl pH~8.0, 0.1 mM [¹⁴C] NAD (6.1 mCi/mm) და ბირთვული მატრიქსის პრეპარატს (100 მკგ ცილა). რადიოაქტივობას ვსაზღვრავდით თხევად სცინცილაციურ მთვლელებზე.

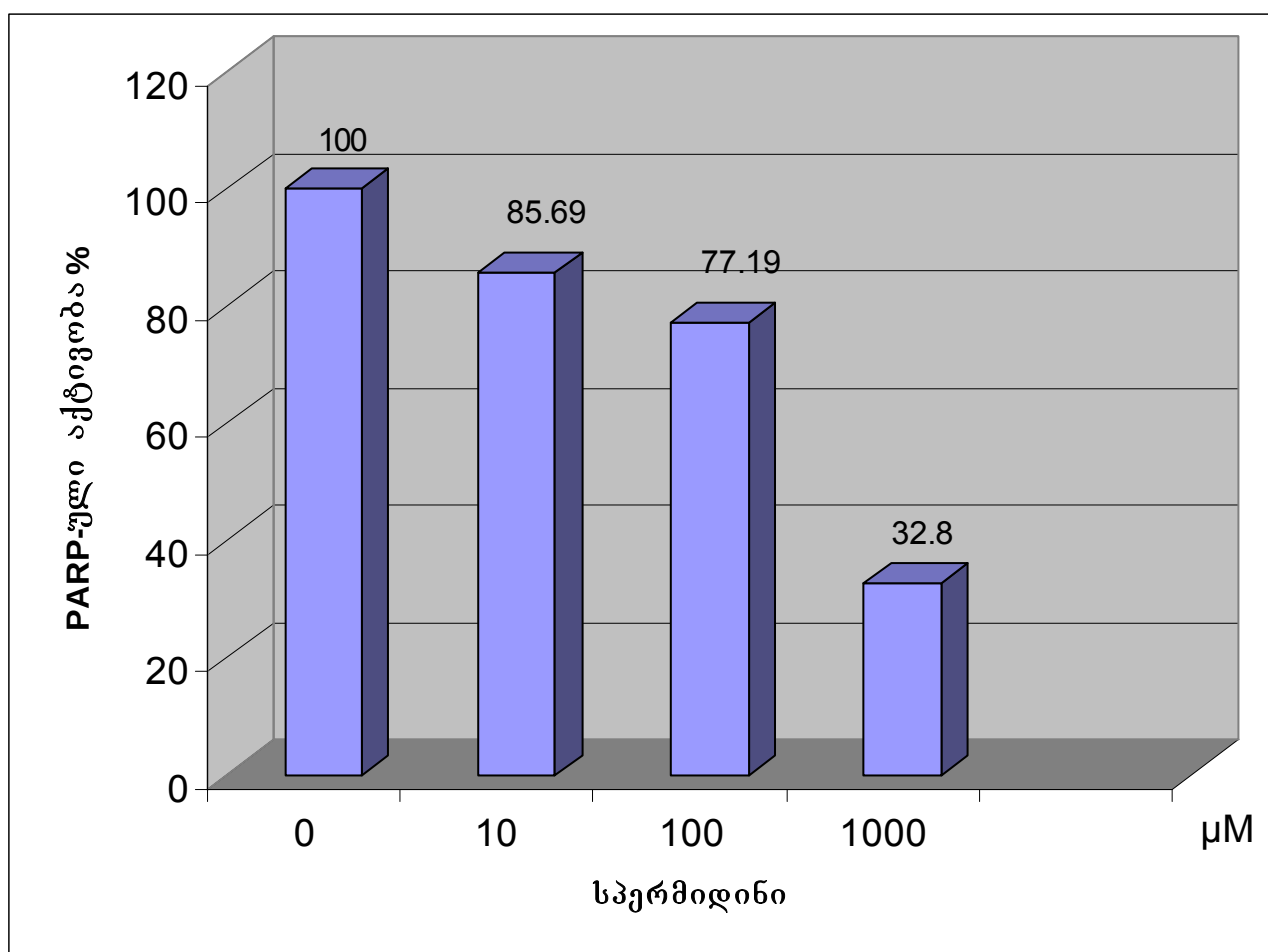
გამართლებულია, რადგან როგორც ირკვევა PARP მონაწილეობს სხვადასხვა გენეტიკურ პროცესებში და ჩართულია ისეთი დაავადებების პათოგენეზში, როგორიცაა ავთვისებიანი გადაგვარება, დიაბეტი, პარკინსონის დაავადება და სხვა [100].

ექსპერიმენტში გამოყენებული იყო ~150 გ. წონის ვირთაგვების ღვიძლი. იზოლირებული მატრიქსის PARP-ულ აქტივობას ვსაზღვრავდით ადენინის რგოლში ნებისმიერად მონიშნული [¹⁴C] NAD-ის ჩართვით მჟავაუხსნად პროდუქტში. სურ.3-დან ჩანს, რომ MgCl₂ მნიშვნელოვნად აძლიერებს ღვიძლის ბირთვული მატრიქსის



სურ 4. სპერმინის გავლენა ვირთაგვას ღვიძლის უჯრედების, ბირთვული მატრიქსის PARP-ულ აქტივობაზე. რეაქციას ვატარებდით 25 °C-ზე 10 წთ საინკუბაციო არეში (0,2 მლ), რომელიც შეიცავდა: 50 mM Tris-HCl pH~8.0, 20 mM MgCl₂, 0.1 mM [¹⁴C] NAD (6.1 mCi/mm) და ბირთვული მატრიქსის პრეპარატს (100 მკგ ცილა). რადიოაქტივობას ვსაზღვრავდით თხევად სცინტილაციურ მთვლელზე.

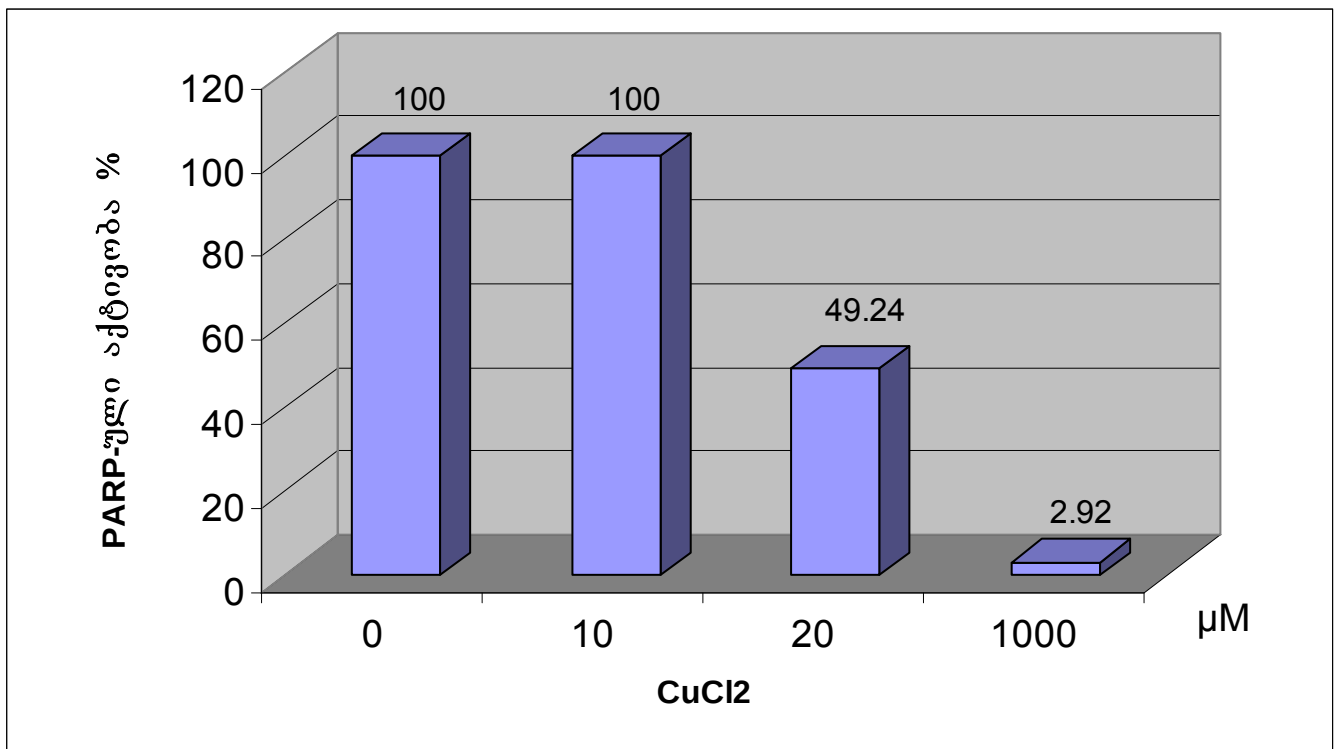
PARP-ულ აქტივობას. MgCl₂ 10 mM და 20 mM კონცენტრაციებში დაახლოებით 4,2-ჯერ ზრდის ფერმენტულ აქტივობას. არ არის გამორიცხული, რომ MgCl₂ PARP-ულ აქტივობას ასტიმულირებდეს უფრო მეტად, რაც ჩვენს შემთხვევაში ვერ აღინუსხებოდა.



სურ 5. სპერმიდინის გავლენა ვირთაგვას ღვიძლის უჯრედების, ბირთვული მატრიქსის PARP-ულ აქტივობაზე. რეაქციას ვატარებდით 25 °C-ზე 10 წთ საინკუბაციო არეში (0,2 მლ), რომელიც შეიცავდა: 50 mM Tris-HCl pH~8.0, 20 mM MgCl₂, 0.1 mM [¹⁴C] NAD (6.1 mCi/mm) და ბირთვული მატრიქსის პრეპარატს (100 მკგ ცილა). რადიოაქტივობას ვსაზღვრავდით თხევად სცინცილაციურ მთვლელებზე.

ამის მიზეზი კი შესაძლოა იყოს მატრიქსის პრეპარატის გამოყოფის პროცესში ისეთი ბუფერული ხსნარების გამოყენება, რომლებიც შეიცავან MgCl₂-ს, რაც ალბათ განაპირობებს Mg²⁺-ის ასოცირებას იზოლირებულ მატრიქსთან და ზრდის PARP-ულ აქტივობას საკონტროლო პრეპარატში.

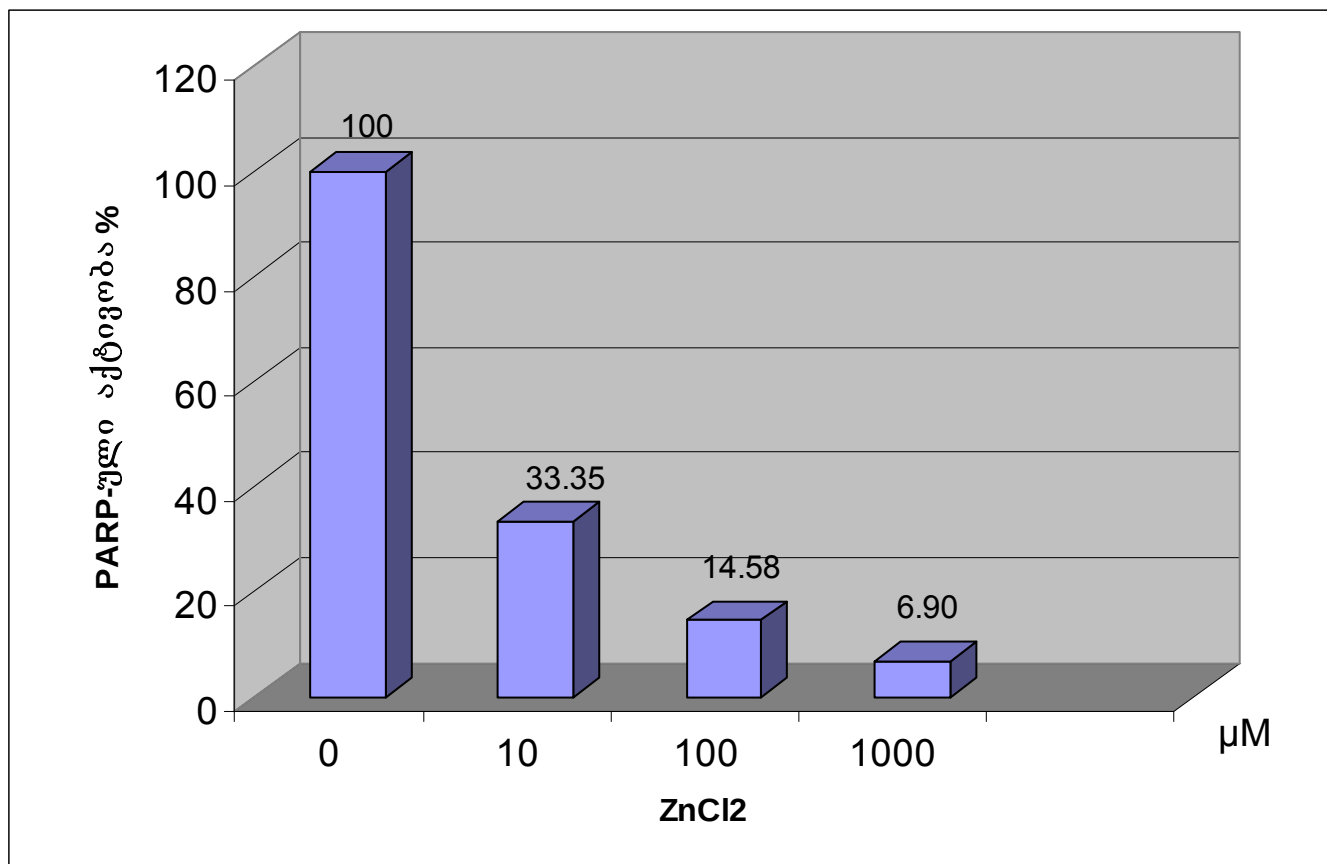
რაც შეეხება ბიოგენურ პოლიამინებს (სპერმინი და სპერმიდინი), ისინი ხასიათდებიან დამთრგუნველი ეფექტით PARP-ულ აქტივობაზე როგორც სპერმინი სურ.4, ასევე სპერმიდინი სურ.5



სურ.6. CuCl₂-ის გავლენა, ვირთაგვას ღვიძლის უჯრედების, ბირთვული მატრიქსის PARP-ულ აქტივობაზე. რეაქციას ვატარებდით 25 °C-ზე 10 წთ საინკუბაციო არეში (0,2 მლ), რომელიც შეიცავდა: 50 mM Hepes-NaOH pH~8.0, 20 mM MgCl₂, 0.1 mM [¹⁴C] NAD (6.1 mCi/mm) და ბირთვული მატრიქსის პრეპარატს (100 მკგ ცილა). რადიოაქტივობას ვსაზღვრავდით თხევად სცინცილაციურ მთვლელზე.

კონცენტრაციაზე დამოკიდებულებით აინჰიბირებენ ფერმენტულ აქტივობას. 1 mM კონცენტრაციით სპერმინი და სპერმიდინი PARP-ულ აქტივობას აინჰიბირებენ დაახლოებით 69% და 67%-ით შესაბამისად. ეს მონაცემები განსხვავდება ღვიძლის ბირთვულ პრეპარატზე მიღებული მონაცემებისაგან რომლის თანახმადაც პოლიამინები ხასიათდებიან მასტიმულიზირებელი ეფექტით PARP-ულ აქტივობაზე ბირთვებში.

Cu²⁺-ის, Zn²⁺-ის კათიონები Mg²⁺-ის კათიონებისაგან განსხვავებით, ხასიათდებიან დამორგუნველი ეფექტით PARP-ულ აქტივობაზე, კონცენტრაციაზე დამოკიდებულებით. 1 mM



სურ. 7. ZnCl₂-ის გავლენა, ვირთაგვას ღვიძლის უჯრედების, ბირთვული მატრიქსის PARP-ულ აქტივობაზე. რეაქციას ვატარებდით 25 °C-ზე 10 წთ საინკუბაციო არეში (0,2 მლ), რომელიც შეიცავდა: 50 mM Hepes-NaOH pH~8.0, 20 mM MgCl₂, 0.1 mM [¹⁴C] NAD (6.1 mCi/mm) და ბირთვული მატრიქსის პრეპარატს (100 მკგ ცილა). რადიოაქტივობას ვსაზღვრავდით თხევად სცინტილაციურ მთვლელზე.

კონცენტრაციით CuCl₂ დაახლოებით 97%-ით (სურ. 6), ხოლო ZnCl₂ 93%-ით (სურ. 7) აინჰიბირებენ ფერმენტულ აქტივობას. CuCl₂ და ZnCl₂ გაცილებით დაბალი კონცენტრაციებიდან (10-20 μM) მნიშვნელოვნად აკავებდნენ ფერმენტულ აქტივობას. უნდა აღინიშნოს, რომ როგორც ბივალენტური კათიონები ასევე პოლიამინები იგივე ზემოქმედებას ახდენდნენ თავის ტვინის ბირთვული მატრიქსის PARP-ულ აქტივობაზეც.

Cu^{2+} -ის და Zn^{2+} -ის კათიონები ეფექტურად ურთიერთქმედებენ გოგირდშემცველ ლიგანდებთან. აქედან გამომდინარე შესაძლოა აღნიშნული კათიონები ურთიერთქმედებენ PARP-ის სულფჰიდრილის ჯგუფებთან, რაც იწვევს ფერმენტული აქტივობის დაქვეითებას.

ამგვარად მოცემული სამუშაოს შედეგები აჩვენებენ, რომ Mg^{2+} -ის, Cu^{2+} -ის, Zn^{2+} -ის კათიონები და აგრეთვე ბიოგენური პოლიამინები წარმოადგენენ ნივთიერებებს რომლებსაც გააჩნიათ ბირთვული მატრიქსის PARP-ული აქტივობის მოდულაციის შესაძლებლობა.

3.3 პოლი(ADP-რიბოზა)პოლიმერაზის ეფექტური ინჰიბიტორების პროექტირება ინდოლის ბირთვის შემცველი ნაერთების საფუძველზე

PARP-ის ეფექტური ინჰიბიტორების მოძიებას, მათ სინთეზსა და მოქმედების მექანიზმების შესწავლას ბოლო ხანს მეცნიერთა ძალიან დიდი ძალისხმევა ეთმობა, რადგან დადგენილ იქნა მნიშვნელოვანი ფაქტი PARP-ის მონაწილეობა მრავალ პათოლოგიის ფორმირებაში.

როგორც აღვნიშნეთ PARP მულტიფუნქციური ფერმენტია, რომელიც არეგულირებს მთელ რიგ პროცესებს. იგი მონაწილეობს დნმ-ის რეპარაციაში, ქრომოსომების სტაბილიზაციაში, უჯრედების დიფერენციაციაში, ტრანსკრიპციის რეგულაციაში და სხვ.

დნმ-ის ძლიერი დაზიანებისას (ძლიერი გენოტოქსიკური სტრესის შედეგად) ადგილი აქვს PARP-ის ჰიპერაქტივაციას, NAD-ის კონცენტრაციის სწრაფ შემცირებას, რაც იწვევს უჯრედში ATP-ის კონცენტრაციის დაქვეითებას, ენერგეტიკულ კრიზისს და უჯრედის ნეკროზს.

1979 წელს N. Berger-მა გამოთქვა მოსაზრება, რომ დნმ-ის ძლიერი დაზიანებისას, PARP-ის ჰიპერაქტივაციის დროს, გენოტოქსიკურ სტრესს უჯრედი პასუხობს თვითგანადგურების მექანიზმის ჩართვით და იღუპება მანამ, სანამ მოხდება მუტაციის დაფიქსირება.

განსაკუთრებული ყურადღება მიაქცევს PARP-ს 1994 წლიდან, რადგან გაირკვა, რომ იგი აქტიურ მონაწილეობას იღებდა ნეიროტოქსინებით გამოწვეულ

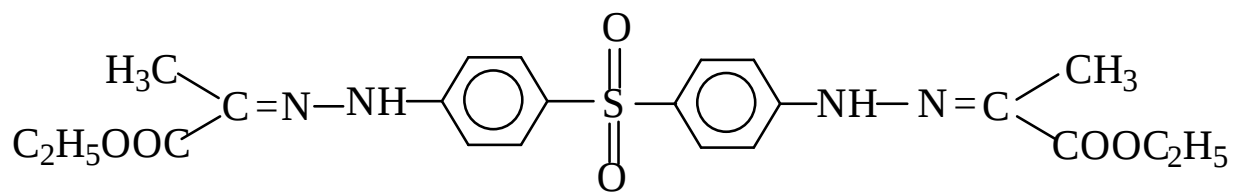
ნეირონების ნეკროზში. PARP-დეფიციტური თაგვების ნეირონები მდგრადი აღმოჩნდნენ ნეიროტოქსინების ზემოქმედებისადმი [101]. ამჟამად დადგენილია PARP-ის მონაწილეობა სხვადასხვა დაავადებათა პათოგენეზში: ცერებრალურ, კარდიალურ, თირკმლის, ზადურის იშემიებში, ნეიროდეგენერაციულ გადაგვარებებში, ალცჰეიმერისა და პარკინსონის დაავადებებში, გლაუკომის, შოკის, სხვადასხვა ანთებითი პროცესების, ართრიტის, ავტოიმუნური დაავადებების, ვირუსული ინფექციების განვითარებაში და ა. შ.

აქედან გამომდინარე მსოფლიოს წამყვან ფირმებსა და ლაბორატორიებში ინტენსიურად მიმდინარეობს PARP-ის ინჰიბიტორების სინთეზი და მათი მოქმედების მექანიზმების შესწავლა [102]. მათ მოეთხოვებათ რიგი თვისებებისა, რომელთაგანაც უმთავრესია არატოქსიკურობა და ფერმენტის ძლიერი ინჰიბირების უნარი. გამოცდილ იქნა სხვადასხვა ნაერთები: მაგ. 3-ამინობენზამიდი როგორც ანტისიმსივნური პრეპარატი, ინფარქტის საწინააღმდეგოდ, იშემიისაგან დასაცავად, 5(H)-ფენანტრიდინონი რადიაციისაგან დამცავ საშუალებად, ნაფტალინამიდი კარდიალური იშემიის საწინააღმდეგოდ, ბენზოპირონი გამოცდილ იქნა ართრიტზე, ლაქტამინდოლები ანტისიმსივნურ აგენტებად და სხვ. მიმდინარეობს ამ პრეპარატების მრავალმხრივი შესწავლა, თუმცა PARP-ის როგორც თერაპიული სამიზნის რეალიზაცია ჯერ-ჯერობით მიღწეული არაა.

ინდოლის ბირთვის ბუნების, მისი ბიოლოგიურ სისტემებში გავრცელებისა და ამავე დროს სინთეზური შესაძლებლობების გათვალისწინებით PARP-ის ინჰიბიტორების სახით მისი ნაერთების გამოცდას საინტერესო შედეგების მიღების შესაძლებლობა უნდა მოეცა.

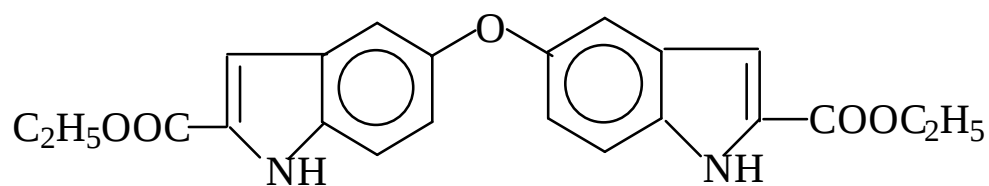
ყოველივე ზემოაღნიშნულიდან გამომდინარე განხორციელებულ იქნა ინდოლის ბირთვის შემცველი რამდენიმე ნაერთის სინთეზი და შევისწავლეთ მათი თვისებები.

1. პიროლვინისმჟავას ეთილისეთერის 4,4'-დიფენილენსულფონ-ჰიდრაზონის სინთეზი



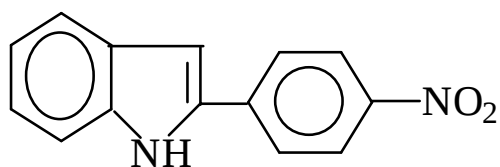
(VDSH)

2. 2,2'-დი(ეთოქსიკარბონილ)-ბის(5-ინდოლილ) ოქსიდი



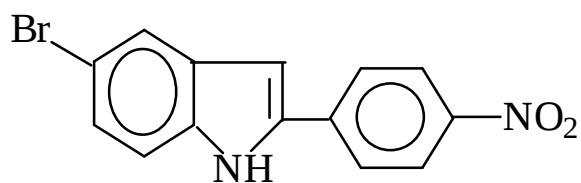
(DEIO)

3. 2(3-ნიტროფენილ)ინდოლი



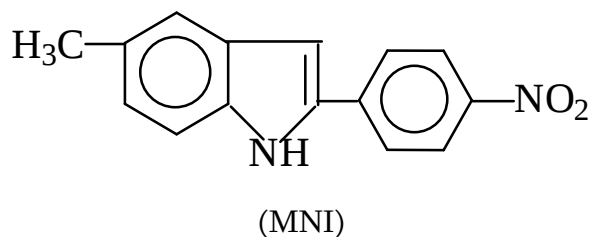
(NI)

4. 6-ბრომ-2(3-ნიტროფენილ)ინდოლი

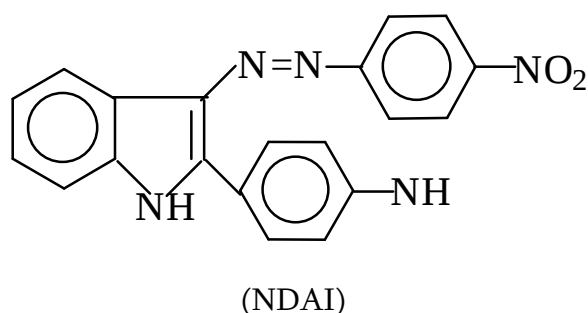


(BNI)

5. 6-მეთილ-2(3-ნიტროფენილ)ინდოლი



6. 3-ნიტროფენილდიაზო-2(3-ამინოფენილ)ინდოლი

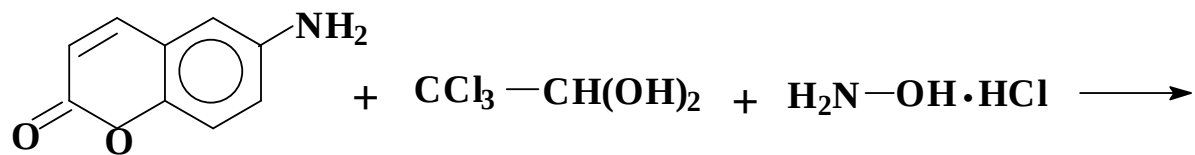


7. 1,2-დიოქსო-1,2-დიჰიდრო- α -პირონო [3,2] ინდოლი (PI), რომლის სინთეზი განვახორციელეთ 6-ამინო- α -კუმარინის გამოყენებით **Zandmeyer**-ის ცნობილი რეაქციით, 6-ამინო- α -კუმარინის ურთიერთმოქმედებით ქლორალ-ჰიდრატთან და ჰიდროქსილამინჰიდროქლორიდთან $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ თანაობისას და მიღებული 6-იზონიტროზოაცეტამიდო- α -კუმარინის შემდგომი ციკლიზაციით 98% გოგირდმჟავით. გამოსავალი 56%. ლღ. ტემპ. $255-257^\circ\text{C}$ შემდეგი სურ. 8 (A) მოცემული სქემის შესაბამისად. ანალოგიურად განვახორციელეთ 5-მეთილ-2,3-დიკეტონდოლინილის (MI) სინთეზი სურ. 8 (B).

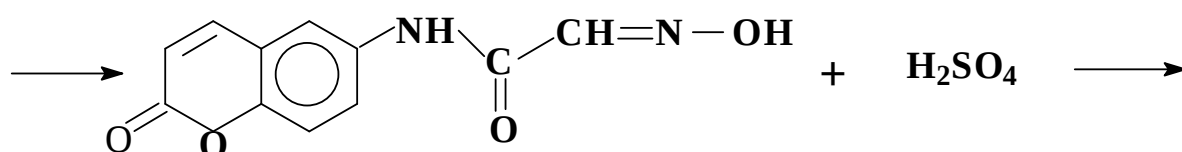
მიღებული ნაერთების PARP-ინჰიბიტორული აქტივობა შევისწავლეთ ვირთაგვების ღვიძლისა და ტვინის უჯრედებიდან გამოყოფილ ბირთვებზე. ბირთვების PARP-ულ აქტივობას ვსწავლობდით რადიოაქტიური, ადენინის რგოლში ნებისმიერად მონიშნული $[^{14}\text{C}]$ NAD-ის ჩართვით მჟავა უხსნად პროდუქტში. სარეაქციო არე (0,2მლ) შეიცავდა: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM MgCl_2 , 1 mM β -მერკაპტოეთანოლს, 50% DMSO, 0,1 mM $[^{14}\text{C}]$ NAD (6,1 mCi/mmol) და 100 μg ცილას. სინჯების ინკუბირებას ვახდენდით 25°C -ზე 10 წთ. მიღებული

ნაერთების წყალსა და სპირტში უხსნადობის ან/და შეზღუდული ხსნადობის გამო გამხსნელად ვიყენებდით DMSO-ს, რომელშიც ყველა კარგად იხსნებოდა.

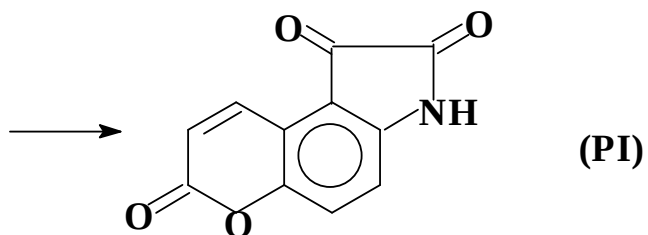
ცხრილში ¹¹ მოყვანილია ვირთაგვების ღვიძლის ბირთვების PARP-ულ აქტივობაზე ინდოლის ბირთვის შემცველი ნაერთების, ზეგავლენის მონაცემები.



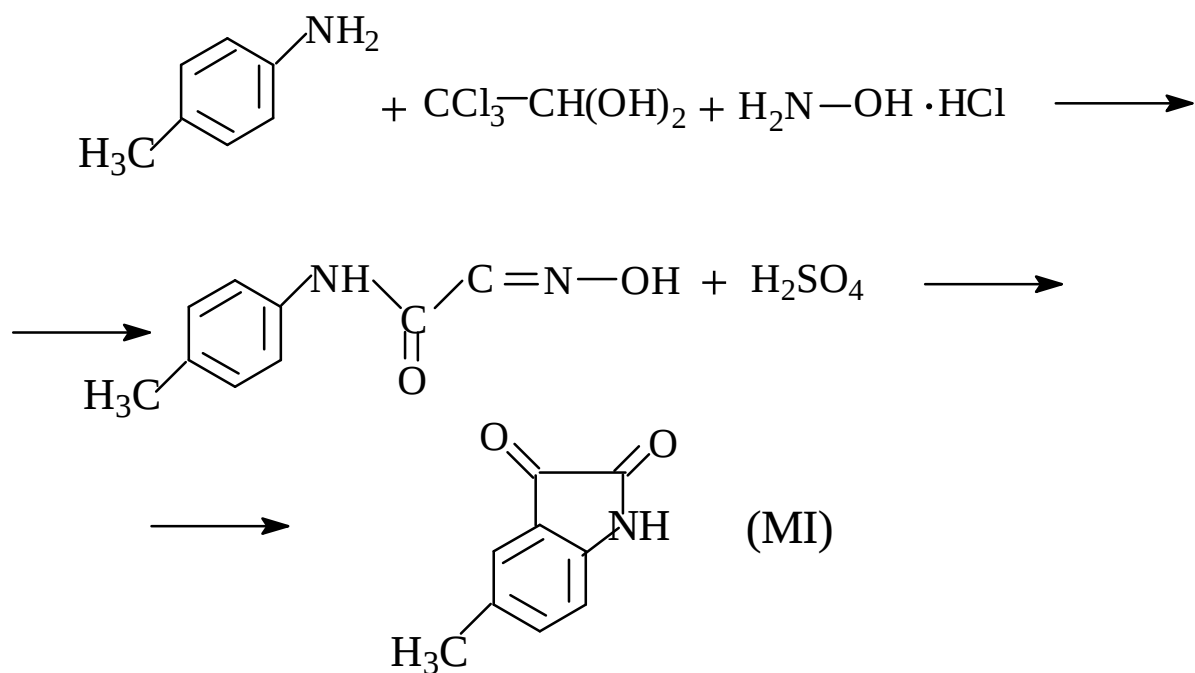
(1)



(2)



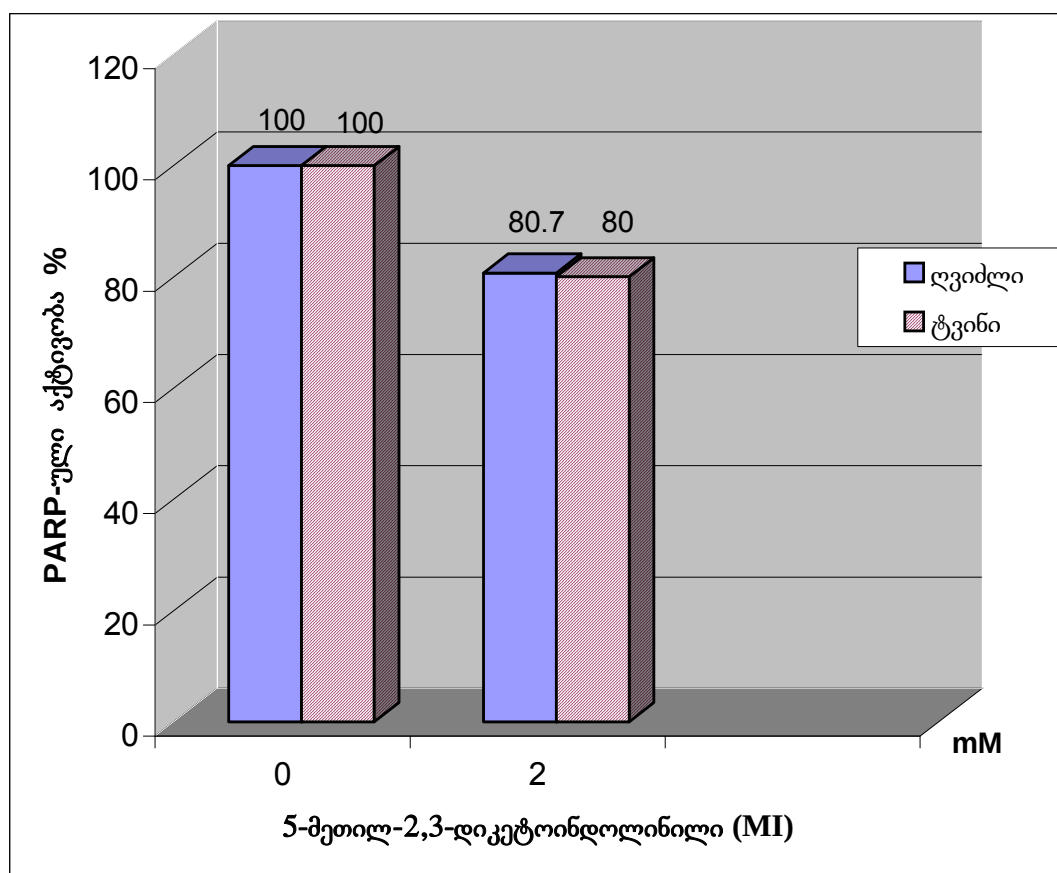
A



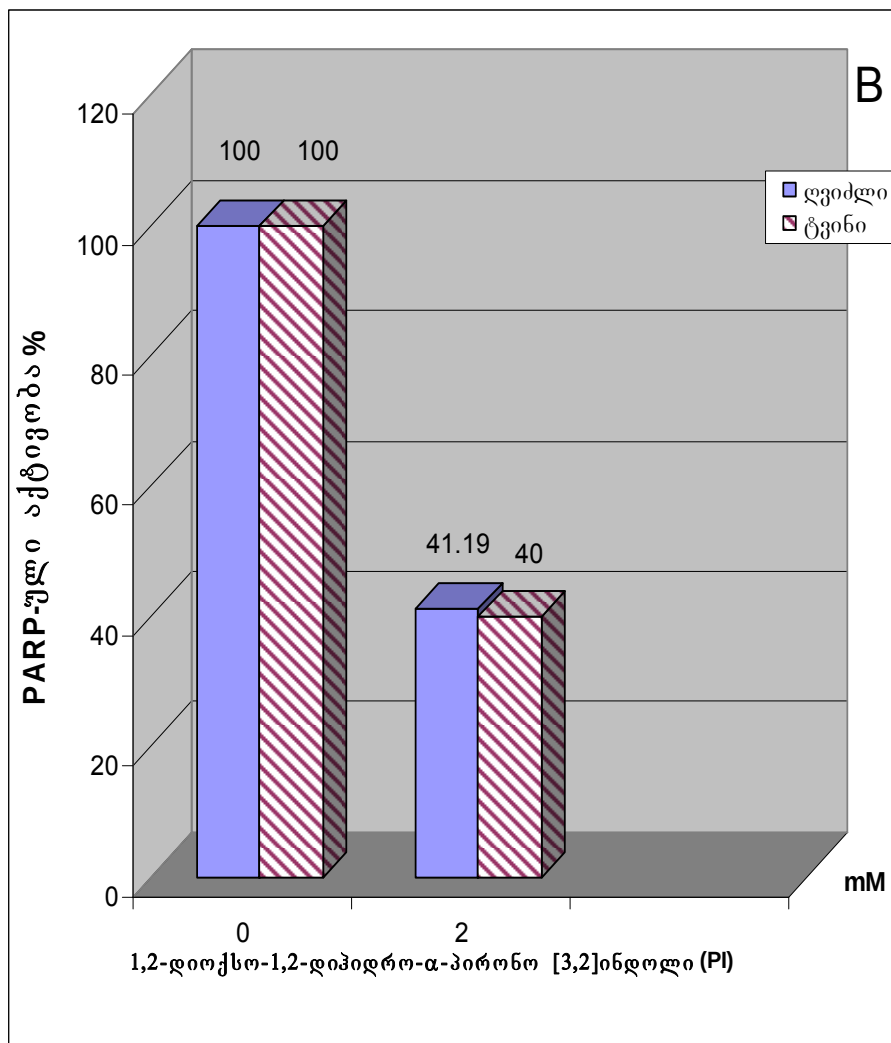
სურ. 8. (A) 1,2-დიოქსო-1,2-დიჰიდრო-- α -პირონო [3,2] ინდოლის (PI) და (B) 5-მეთილ-2,3-დიკეტონდოლინის (MI) სინთეზი. **Zandmeyer**-ის ცნობილი რეაქცია.

ცხრილი 1. ზოგიერთი ახლადსინთეზირებული, ინდოლის ბირთვის შემცველი ნაერთის მაინჰიბირებელი გავლენა ვირთაგვას ღვიძლის ბირთვულ PARP-ულ აქტივობაზე.

ნაერთები	^[14C] NAD-ის ჩართვა მჟავა უხსნად პროდუქტში	
	nmole / მგ ცილა	%
0	5,39	100
VDSH	5,39	100
DEIO	4,95	85,26
NI	5.08	94,35
BNI	4,05	85,14
MNI	5,48	92,80
NDAI	4,92	83,40



სურ. 9. ახლადსინთეზირებული ინდოლის ბირთვის შემცველი ნაერთის_5-მეთილ-2,3-დიკეტონდოლინილის (MI) გავლენა ვირთაგვას ღვიძლის და თავის ტვინის ბირთვულ პოლი(ADP-რიბოზა)პოლიმერაზულ აქტივობაზე.



სურ. 10. ახლადსინთეზირებული ინდოლის ბირთვის შემცველი ნაერთის_1,2-დიოქსო-1,2-დიჰიდრო- α -პირონო [3,2] ინდოლის (PI) გავლენა ვირთაგვას ღვიძლის და თავის ტვინის ბირთვულ პოლი(ADP-რიბოზა)პოლიმერაზულ აქტივობაზე.

როგორც მიღებული შედეგებიდან ჩანს პიროლვინისმჟავას ეთილის ეთერის-4,4'-დიფენილენსულფონ-ჰიდრაზონის (VDSH) ინჰიბიტორული აქტივობა კონტროლის დონეზეა, მცირეოდენი აქტივობა (6-8 %) აღინიშნება 2(პ-ნიტროფენილ)ინდოლისა (NI) და 6-მეთილ-2(პ-ნიტროფენილ)ინდოლის (MNI)

შემთხვევაში. 3-ნიტროფენილდიაზო-2(პ-ამინოფენილ)ინდოლის (NDAI), 2,2'-დი(ეთოქსიკარბონილ)-ბის(5-ინდოლილ) ოქსიდის (DEIO) და 6-ბრომ-2(პ-ნიტროფენილ)ინდოლის (BNI) PARP-ინჰიბიტორული აქტივობა დაახლოებით თანაბარია (~15%). ყველაზე მაღალი ინჰიბიტორული უნარი 5-მეთილ-2,3-დიკეტიონდოლინილმა (MI) 19% (სურ. 9) და 1,2-დიოქსო-1,2-დიჰიდრო-- α -პირონო ინდოლმა (PI) [3,2] 59% გამომჟღავნეს (სურ. 10). დაახლოებით ანალოგიური შედეგები იქნა მიღებული ვირთაგვების ტვინიდან გამოყოფილ ბირთვებზეც (სურ. 9, 10).

მიღებული შედეგები ინდოლის ბირთვის შემცველი ნაერთების სტრუქტურასა და ინჰიბიტორულ აქტივობას შორის გარკვეული კორელაციის ვარაუდის შესაძლებლობას გვაძლევს. კერძოდ, რომ მეთილის ჰიდროფობური ჯგუფების ჩანაცვლება პოლარული, წყალბადური კავშირების წარმოქმნის უნარის მქონე ჯგუფებითა და აგრეთვე ციკლური არომატული ბირთვებით ხელს უნდა უწყობდეს ფერმენტ-ინჰიბიტორის შედარებით სტაბილური კომპლექსების წარმოქმნას და აქედან გამომდინარე ნაერთის ინჰიბიტორულ აქტივობას.

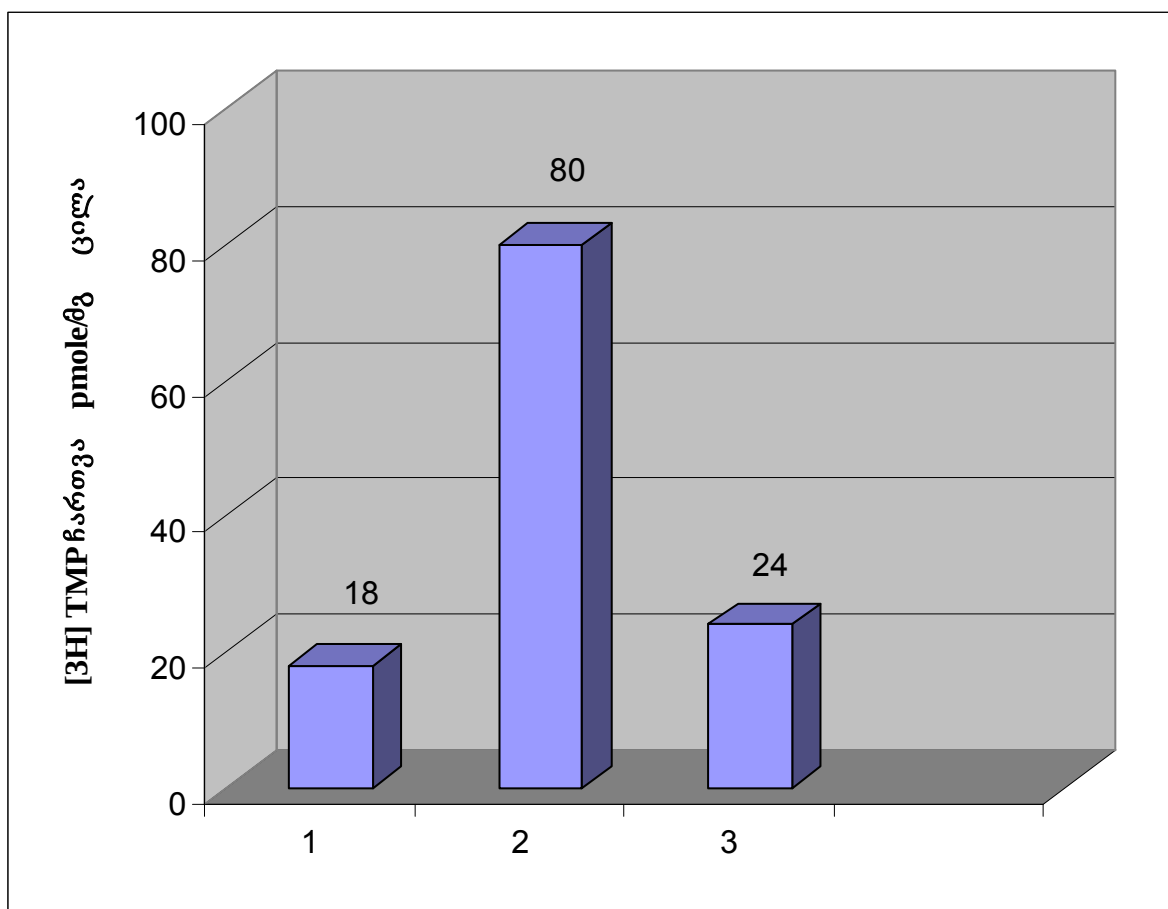
3.4 ADP-რიბოზილირების გავლენა რენტგენის სხივებით დასხივებული ვირთაგვების თავის ტვინის ბირთვებისა და ბირთვული მატრიქსის ენდოგენურ დნმ-პოლიმერაზულ აქტივობაზე

ლიტერატურული მონაცემების თანახმად ეუკარიოტული უჯრედების ბირთვულ მატრიქსს მნიშვნელოვანი როლი უნდა ჰქონდეს დნმ-ის რეპლიკაციისა და ტრანსკრიპციის პროცესებში [1, 2].

ჩვენს ლაბორატორიაში ნაჩვენები იყო, რომ ვირთაგვებზე რენტგენის სხივებით ზემოქმედება იწვევს თავის ტვინის უჯრედების ბირთვული დნმ-პოლიმერაზა β -ს გადანაწილებას ბირთვის არამატრიქსული უბნებიდან მატრიქსში და მატრიქსთან ასოცირებული დნმ-პოლიმერაზული აქტივობის ზრდას [103] მიღებული შედეგები ლიტერატურაში არსებულ სხვა მონაცემებთან ერთად მიგვანიშნებენ ბირთვული მატრიქსის მონაწილეობაზე დნმ-ის რეპარაციაში. ასევე ნაჩვენები იყო, რომ ADP-რიბოზილირება ზრდის ენდოგენურ დნმ-პოლიმერაზულ

აქტივობას ვირთაგვას თავის ტვინიდან იზოლირებულ ბირთვებში. 1,7 Gy დოზით დასხივებული ვირთაგვებიდან იზოლირებული ბირთვების ინკუბაცია 1 mM NAD-თან 1.5-ჯერ ზრდის დნმ-პოლიმერაზულ აქტივობას, მაშინ როდესაც ვირთაგვების 6,7 Gy დოზით დასხივების შემთხვევაში დნმ-პოლიმერაზული აქტივობა იზრდება 4,7-ჯერ. გარდა ამისა ნაჩვენებია ვირთაგვების რენტგენის სხივებით დასხივების დროს ეუკარიოტული უჯრედების ბირთვულ მატრიქსთან ასოცირებული PARP-ის აქტივობის ზრდა დასხივების დოზაზე დამოკიდებულებით [104], რაც მიუთითებს მატრიქსის PARP-ის მონაწილეობაზე დნმ-ის ექსციზიურ რეპარაციაში.

ყოველივე აქედან გამომდინარე, ბირთვული მატრიქსის დონეზე მიმდინარე ADP-რიბოზილირების, ექსციზიურ რეპარაციაში მონაწილეობის გამოსავლენად ჩვენს მიერ ჩატარებული იქნა შემდეგი ექსპერიმენტი: დაახლოებით 150 გრ წონის ვირთაგვების დასხივებიდან 1 სთ-ის შემდეგ ვახდენდით თავის ტვინის ბირთვების იზოლირებას და მათ ინკუბირებას NAD-თან (ADP-რიბოზილირების რეაქციის წარმართვისათვის) და დეზოქსირიბონუკლეოზიდ ტრიფოსფატებთან (რომელთაგანაც ერთ-ერთი იყო მონიშნული- ^3H]-dTTP), რითაც ხორციელდებოდა დნმ-ის ბიოსინთეზი [104]. ამის შემდეგ ვახდენდით მატრიქსების იზოლირებას და მათში რადიოქტიური dTMP-ის ჩართვას ვსაზღვრავდით თხევად სცინცილაციურ მთვლელობაში [103].

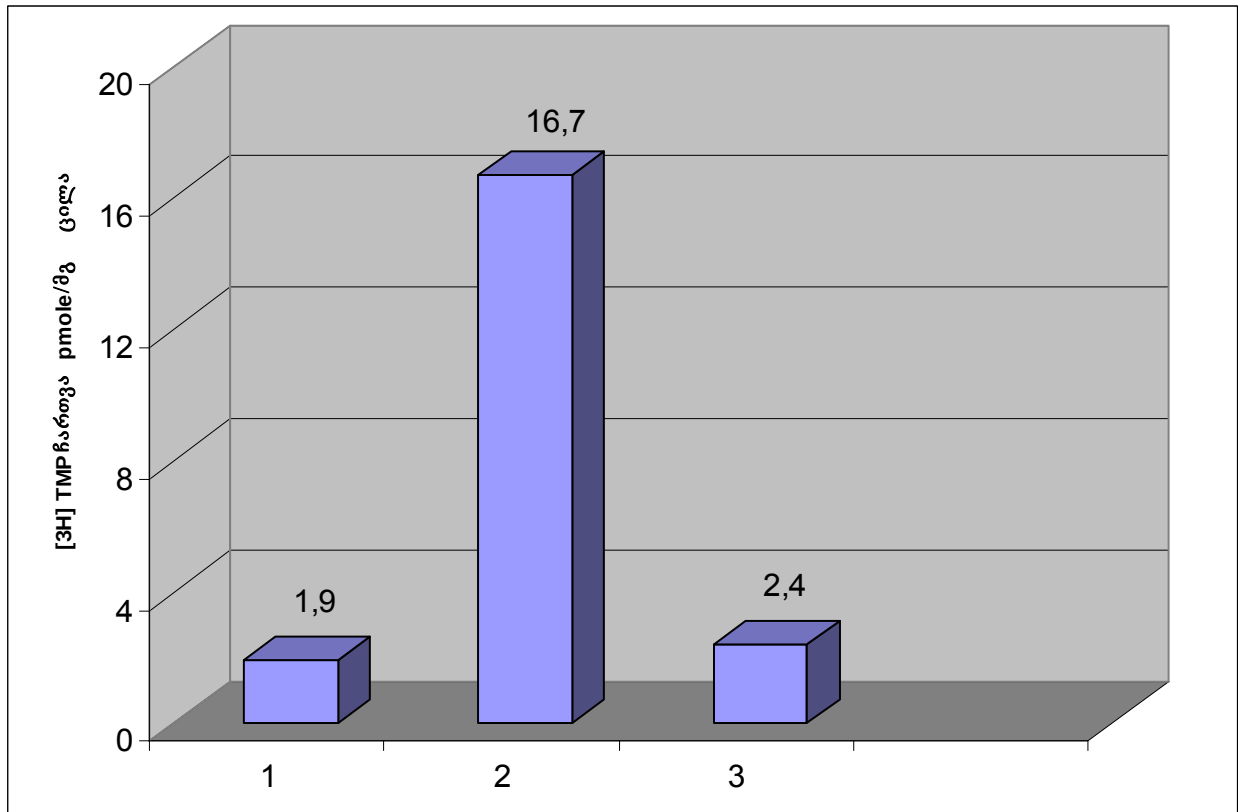


სურ.11. X-დასხივებულ ვირთაგვებში ADP-რიბოზილირების გავლენა თავის ტვინის ბირთვულ დნმ-პოლიმერაზულ აქტივობაზე.

1. დნმ-პოლიმერაზული აქტივობა;
2. დნმ-პოლიმერაზული აქტივობა 0.1 mM NAD-ის თანაობისას;
3. დნმ-პოლიმერაზული აქტივობა 0.1 mM NAD-ის და 4 mM 3-ამინობენზამიდის თანაობისას.

რეაქციას ვატარებდით 37°C-ზე 30 წთ არეში (3 მლ): 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 5 mM β-მერკაპტოეთანოლი, 0.1 mM dATP, dGTP, dCTP, [³H]dTTP (2 Ci/mmol) და ბირთვები (3 mg ცილა).

ჩატარებულმა ექსპერიმენტებმა გვიჩვენა, რომ 0,1 mM NAD-თან ბირთვების ინკუბაციის დროს 4,2 Gy დოზით დასხივებული ვირთაგვების ბირთვებში რადიოაქტიური dTMP-ის ჩართვა მჭავა-უხსნად პროდუქტში იზრდება დაახლოებით 4,4-ჯერ NAD-თან დაუინკუბირებელ ბირთვებში



სურ.12. X-დასხივებულ ვირთაგვებში ADP-რიბოზილირების გავლენა თავის ტვინის ბირთვული მატრიქსის დნმ-პოლიმერაზულ აქტივობაზე.

1. დნმ-პოლიმერაზული აქტივობა;
2. დნმ-პოლიმერაზული აქტივობა 0.1 mM NAD-ის თანაობისას;
3. დნმ-პოლიმერაზული აქტივობა 0.1 mM NAD-ის და 4 mM 3-ამინობენზამიდის თანაობისას.

რეაქციას ვატარებდით 37°C-ზე 30 წთ არეში (3 მლ): 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 5 mM β-მერკაპტოეთანოლი, 0.1 mM dATP, dGTP, dCTP, [³H]dTTP (2 Ci/mmol) და ბირთვები (3 mg ცილა).

ხოლო ბირთვულ მატრიქსში 8,8-ჯერ სურ. 12. იგი შეადგენდა ბირთვებში ჩართული რადიოაქტიუბის დაახლოებით 20,9%.NAD-თან დაუინკუბირებელი

ბირთვების მატრიქსთან კი ასოცირებული იყო ბირთვებში ჩართული რადიოაქტივობის მხოლოდ 10,5%. უნდა აღინიშნოს, რომ ბირთვული მატრიქსები შეიცავდნენ ბირთვული ცილის 5,2% და ბირთვული დნმ-ის 2,7%. PARP-ის ინჰიბიტორი 4 mM 3-ამინობენზამიდი ხსნიდა NAD-ით გამოწვეულ ეფექტს. რაც გამორიცხავს NAD-ის უშუალო ზემოქმედებას დნმ-ის ბიოსინთეზზე და მიუთითებს ADP-რიბოზილირების როლზე ამ პროცესში. აქვე ხაზი უნდა გაესვას იმ გარემოებას, რომ დნმ-პოლიმერაზა α -ს ინჰიბიტორი აფიდიკოლინი გავლენას არ ახდენდა [^3H] dTMP-ის ჩართვაზე მჟავაუხსნად პროდუქტში, რაც დნმ-ის რეპარაციაში უშუალოდ დნმ-პოლიმერაზა β -ს მონაწილეობაზე მიუთითებს.

ვინაიდან ცნობილია, რომ ქრომატინი განიცდის სტრუქტურულ ცვლილებას დნმ-ის იმ უბნებში სადაც მიმდინარეობს ექსციზიური რეპარაცია [105] ჩვენს მიერ მიღებული მონაცემები მიუთითებენ იმაზე, რომ ალბათ დასხივების შემდეგ PARP-ის გააქტივება იწვევს მატრიქსთან ასოცირებული ქრომატინის კონფორმაციულ ცვლილებას, რაც აადვილებს დნმ-პოლიმერაზის გადაადგილებას დნმ-მატრიცაზე და შესაბამისად განაპირობებს დნმ-ის ბიოსინთეზის გაძლიერებას.

დასკვნები

1. პულს-ელექტროფორეზის მეთოდის გამოყენებით ნაჩვენებია, რომ ეუკარიოტული უჯრედების ბირთვულ მატრიქსში ADP-რიბოზილირებით ცილების პოსტტრანსლაციურ მოდიფიკაციას შესაძლოა მარეგულირებელი ზემოქმედება ჰქონდეს დნმ-ის ტოპოლოგიის განმსაზღვრელი ფერმენტის, დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ის აქტივობაზე. კერძოდ, გამოვლენილია ADP-რიბოზილირების შესაძლო მონაწილეობა ეუკარიოტული უჯრედების ბირთვულ მატრიქსში ლოკალიზებული ფერმენტის, დნმ-ტოპოიზომერაზა II-ის აქტივობის მოდულაციაში, მისი ფრაგმენტირებული დნმ-ის რელიგაციის რეაქციაზე მაინჰიბირებელი ზემოქმედების გზით.

2. დადგენილია, რომ Mg^{2+} -ის კათიონები ასტიმულირებენ ღვიძლისა და თავის ტვინის ბირთვული მატრიქსის პოლი(ADP-რიბოზა)პოლიმერაზულ აქტივობას მაშინ, როდესაც Cu^{2+} -ის, Zn^{2+} -ის კათიონები და აგრეთვე ბიოგენური პოლიამინები (სპერმინი და სპერმიდინი) Mg^{2+} -ის კათიონების თანაობისას მნიშვნელოვნად თრგუნავენ პოლიმერაზულ აქტივობას.

3. სინთეზირებულია პოლი-ADP-რიბოზილირების რეაქციის ინჰიბირების უნარის მქონე ინდოლის ბირთვის შემცველი ნაერთები – 5-მეთილ-2,3-დიკეტოინდოლინილი (MI) და 1,2-დიოქსო-1,2-დიჰიდრო- α --პირონო ინდოლი (PI), რომლთა საფუძველზეც მომავალში შესაძლოა უფრო მაღალეფექტური ინჰიბიტორული ბუნების მქონე ნაერთების დიზაინი.

4. ADP-რიბოზილირება აძლიერებს რენტგენის სხივებით დასხივებული ვირთაგვებიდან იზოლირებულ ბირთვებში ენდოგენურ დნმ-პოლიმერაზულ აქტივობას და განსაკუთრებით მკვეთრად ზრდის მას ბირთვულ მატრიქსში, რაც მიუთითებს ADP-რიბოზილირების მნიშვნელობაზე ბირთვულ მატრიქსთან ასოცირებულ დნმ-ის ექსციზიურ რეპარაციაში.

ლიტერატურის ნუსხა

1. Nickerson J, Experimental observations of a nuclear matrix, J. Cell Sci., 2001, 114:463-474.
2. Razin S, The nuclear matrix and chromosomal DNA loops: is there any correlation between partitioning of the genome into loops and functional domains? Mol. Cell. Biol., 2001, 6, 59-69.
3. Berezney R, and Coffy D, Identification of a nuclear protein matrix, Biochem., Biophys., Res., Commun., 1974, 60, 1410-1417.
4. Berezney R, Organization and functions of the nuclear matrix. In chromosomal nonhistone proteins, Boca Raton, FL: CRC Press., 1984, vol.IV, 119-180.
5. Cook P, and Brazell I, Supercoils in human DNA,

- J. Cell Sci., 1975, 19, 261-279.
6. Gruenbaum Y, Wilson K, Harel A, Goldberg M, and Cohen M, Nuclear lamins-structural proteins with fundamental functions,
J. Struct. Biol., 2000, 129, 313-323.
7. Hozak P, Sasseville A, Raymond Y, Cook P, Lamin proteins form an internal nucleoskeleton as well as a peripheral lamina in human cells,
J. Cell Sci., 1995, 108, 635-644.
8. He D, Martin T, Penman S, Localization of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein in the interphase nuclear matrix core filaments and on perichromosomal filaments at mitosis,
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1991, 88, 7469-7473.
9. Goldberg M, Harel A, Gruenbaum Y, The nuclear lamina: molecular organization and interaction with chromatin,
Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. 1999, 9, 285-293.
10. He D, Zeng C, Brinkley B, Nuclear matrix proteins as structural and functional components of the mitotic apparatus,
Int. Rev. Cytol, 1995, 1-74.
11. Tan J, Wooley J, LeStourgeon W, Nuclear matrix-like filaments and fibrogranular complexes form through the rearrangement of specific nuclear ribonucleoproteins,
Mol. Biol. Cell, 2000, 11, 1547-1554.
12. Pederson T, Half a century of the 'nuclear matrix',
Mol. Biol. Cell. 2000, 11, 799-805.
13. Jackson V, Earnhardt J, Chalkley R, A DNA-lipid protein containing material isolated from calf thymus nuclear chromatin,
Biochem. Biophys. Res. Commun, 1968, 33:2 253-259.
14. Hatfield J, Investigation of a complex associated with replicating DNA in L cell nuclei,
Exp Cell Res., 1972, 72:2, 591-595.
15. Engelhardt P, Plagens U, Zbarsky I, Filatova L, Granules 25-30 nm in diameter: basic constituent of the nuclear matrix, chromosome scaffold, and nuclear envelope,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, 79:22 6937-6940.

16. Vogelstein B, Pardoll D, Coffey D, Supercoiled loops and eucaryotic DNA replication, *Cecl*, 1980, 22, 79-85.
17. Leonhardt H, Rahn H, Weinzierl P, Sporberr A, Cremer T, Zink D, Cardoso M, Dynamics of DNA replication factories in living cells, *J. cell Biol*, 2000, 149, 271-280.
18. Benyajati C, Worcel A, Isolation, characterization, and structure of the folded interphase genome of *Drosophila melanogaster*, *Cell*, 1976, 9, 393-407.
19. Boulikas T, Chromatin domains and predication of MAR sequences, *Int. Rev. Cytol.* 1995, 162A, 279-388.
20. Alvarez J, Yasui D, Niida H, Joh D, Loh D, Kohwi-Shigematsu T, The MAR-binding protein SATB1 orchestrates temporal and spatial expression of multiple genes during T-cell development, *Genes. Dev.* 2000, 14, 521-535.
21. Krauss S, larabell C, lockett S, Gascard P, Penman S, Mohandas N, Chasis J, Structural protein 4.1 in the nucleus of human cells: dynamic rearrangements during cell division, *J. cell Biol.* 1997, 137, 275-289.
22. Rando O, Zhao K, Crabtree G, Searching for a function for nuclear actin, *Trends Cell Biol*, 2000, 10, 92-97.
23. Гены высших организмов и их экспрессия, Георгиев ГП М., Наука 1989.
24. Глазков М, Киреева Н, Клейманс А, Специфичность ДНК-белковых взаимодействий при формировании розеткоподобных (элементарных хромомеров) и при ассоциации интерфазных хромосом с ядерной оболочкой, *Молекулярная биология*, 1998, 32:5, 869-74.
25. Fajkus J, Nicklas J, Hancock R, DNA loop domains in a 1.4-Mb region around the human hprt gene mapped by cleavage mediated by nuclear matrix-associated topoisomerase II, *Mol. Gen. Genet.*, 1998, 260, 410-416.

26. Fuller F. B. The writhing number of a space curve,
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, 68, 815.
27. Crick F. Linking numbers and nucleosomes,
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1976, 73, 2639.
28. Corbett K, Berger M, Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships
in DNA topoisomerases,
Biophys. Biomol. Struct, 2004, 33:95-118.
29. Brown P, Cozzarelli N, Catenation and knotting of duplex DNA by type I
topoisomerases: a mechanistic parallel with type 2 topoisomerases,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78:843-47.
30. Sttivers J, Harris T, Mildvan A, Vaccinia DNA topoisomerase I: evidence supporting a
free rotation mechanism for DNA supercoil relaxation.
Biochemistry, 1997, 36:5212-22.
31. Gellert M, Mizuuchi K, O'Dea M, Nash H, DNA gyrase: an anzyme that introduces
superhelical turns into DNA,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1976, 73:3872-76.
32. Tse Y, Kirkegaard K, Wang J, Covalent bonds between protein and DNA. Formation of
phosphotyrosine linkage between certain DNA topoisomerases and DNA,
J. Biol. Chem. 1980, 255:5560-65.
33. Nichols M, DeAngelis K, Keck J, Berger J, Structure and function of an archaeal
topoisomerase VI subunit with homology to the meiotic recombination factor Spo 11,
EMBO J, 1999, 18:6177-88.
34. Goto T, Wang J, Yeast DNA topoisomerase II. An ATP-dependent type II
topoisomerase that catalyzes the catenation, decatenation, unknotting, and relaxation of
double-stranded DNA rings.
J. Biol. Chem. 1982, 257:5866-72.
35. Champoux J, Dulbecco R, An activity from mammalian cells that antwists superhelical
DNA-a possible swivel for DNA replication,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1972, 69:143-46.

36. Corbett K, Berger J, Structure of the topoisomerase VI B subunit: implications for type II topoisomerase mechanism and evolution, EMBO J, 2003, 22:151-63.
37. Changela A, DiGate R, Mondragon A, Crystal structures of a complex of a type IA DNA topoisomerase with a single-stranded DNA molecule, Nature, 2001, 411:1077-81.
38. Lima C, Wang J, Mondragon A, Three-dimensional structure of the 67K N-terminal fragment of *E. coli* DNA topoisomerase I, Nature, 1994, 367:138-146.
39. Domanico P, Tse-Dinh Y, Mechanistic studies on *E. coli* DNA topoisomerase I: divalent ion effects, J. Inorg. Biochem. 1991, 42:87-96.
40. Seasholtz A, Greenberg G, Identification of bacteriophage T4 gene 60 product and a role for this protein in DNA topoisomerase, J. Biol. Chem. 1983, 258:1221-1226.
41. Wigley D, Davies G, Dodson E, Maxwell A, Dodson G., Crystal structure of an amino-terminal fragment of the DNA gyrase B protein, Nature. 1991, 351, 624-629.
42. Worland S, Howells A, Maxwell A, Locking the ATP-operated clamp of DNA gyrase: probing the mechanism of strand passage, J. Mol. Biol. 2001, 306:969-984.
43. Nichols M, DeAngelis K, Keck J, Berger J, Structure and function of an archaeal topoisomerase VI subunit with homology to the meiotic recombination factor Spo11, EMBO J, 1999, 18:6177-6188.
44. Burkle A, Poly(ADP-ribose) The most elaborate metabolite of NAD, FEBS Journal, 2005, 272, 4576-4589.
45. Chambon P, Weill J, Mandel P, Nicotinamide mononucleotide activation of a new DNA-dependent polyadenilic acid synthesizing nuclear enzyme, Biochem. Biophys. Res. Commun, 1963, 11, 39-43.

46. Nishizuka Y, Ueda K, Nakarawa K, Hayaishi O, Studies on the polymer of adenosine diphosphate ribose. Enzymatic formation from nicotinamide adenine dinucleotide in mammalian nuclei,
J. Biol. Chem. 1967, 242, 3164-3171.
47. Davidovic L, Vodenicharov M, Affar E, and Poirier G, Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism,
Exp. Cell Res, 2001, 268:7–13.
48. Brochu G, Duchaine C, Thibeault L, Lagueux J, Shah G, and Poirier GG Mode of action of poly(ADP-ribose) glycohydrolase.
Biochim. Biophys. Acta, 1994, 1219:342–350.
49. Oka J, Ueda K, Hayaishi O, Komura H, and Nakanishi K, ADP-ribosyl proteinlyase. Purification, properties and identification of the product.
J. Biol. Chem. 1984, 259:986–995.
50. Jonsson G, Menard L, Jacobson E, Poirier G, and Jacobson M, Effect of hyperthermia on poly(adenosine diphosphate-ribose)glycohydrolase.
Cancer Res, 1988, 48:4240–4243.
51. Amer J, Apiou F, Jacobson E, Jacobson M, Assignment of the poly(ADP-ribose) glycohydrolase gene (PARG) to human chromosome 10q11.23 and mouse chromosome 14B by in situ hybridization,
Cytogenet Cell Genet, 1999, 85, 269–270.
52. Meyer-Ficca M, Meyer R, Coyle D, Jacobson E & Jacobson M, Human poly(ADP-ribose) glycohydrolase is expressed in alternative splice variants yielding isoforms that localize to different cell compartments,
Exp. Cell. Res, 2004, 297, 521–532.
53. Hanai S, Kanai M, Ohashi S, Okamoto K, Yamada M, Takahashi H & Miwa M, Loss of poly(ADP-ribose) glycohydrolase causes progressive neurodegeneration in *Drosophila melanogaster*,
Proc Natl Acad Sci USA, 2004,101, 82–86.

54. Koh D, Lawler A, Poitras M, Sasaki M, Wattler S, Nehls M, et al Failure to degrade poly (ADP-ribose) causes increased sensitivity to cytotoxicity and early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2004, 101, 17699–17704.
55. Cortes U, Tong W, Coyle D, Meyer-Ficca M, Meyer R, Petrilli V et al. Depletion of the 110-kilodalton isoform of poly (ADP-ribose) glycohydrolase increases sensitivity to genotoxic and endotoxic stress in mice. *Mol Cell Biol*, 2004, 24, 7163–7178.
56. de Murcia G & Menissier de Murcia J, Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nicksensor. *Trends Biochem Sci*, 1994, 19, 172–176.
57. Lonskaya I, Potaman V, Shlyakhtenko L, Oussatcheva E, Lyubchenko Y & Soldatenkov V, Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by DNA structure-specific binding. *J Biol Chem*, 2005, 280, 17076–17083.
58. Kim M, Mauro S, Gevry N, Lis J & Kraus W, NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell*, 2004, 119, 803–814.
59. Ruf A, Menissier de Murcia J, de Murcia G & Schulz G, Structure of the catalytic fragment of poly(ADP-ribose) polymerase from chicken. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93, 7481–7485.
60. Juarez-Salinas H, Sims J & Jacobson M, Poly(ADP-ribose) levels in carcinogen-treated cells. *Nature*, 1979, 282, 740–741.
61. Shieh W, Amer J, Wilson M, Wang Z, Koh D, Jacobson M & Jacobson E, Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers. *J Biol Chem*, 1998, 273, 30069–30072.
62. Kameoka M, Ota K, Tetsuka T, Tanaka Y, Itaya A, Okamoto T & Yoshihara K, Evidence for regulation of NF- κ B by poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem J*, 2000, 346 Part 3, 641–649.

63. de Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M et al. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells.
Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94, 7303–7307.
64. Amer J, Rolli V, Schreiber V, Niedergang C, Apiou F, Decker P et al. PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase.
J Biol Chem, 1999, 274, 17860–17868.
65. Augustin A, Spenlehauer C, Dumond H, Mer nissier-De Murcia J, Piel M, Schmit A et al. PARP-3 localizes preferentially to the daughter centriole and interferes with the G1/S cell cycle progression.
J Cell Sci, 2003, 116, 1551–1562.
66. van Zon A, Mossink M, Schoester M, Houtsmuller A, Scheffer G, Scheper R et al., The formation of vault-tubes: a dynamic interaction between vaults and vault PARP.
J Cell Sci, 2003, 116, 4391–4400.
67. Chi N & Lodish H, Tankyrase is a golgiassociated mitogen-activated protein kinase substrate that interacts with IRAP in GLUT4 vesicles.
J Biol Chem, 2000, 275, 38437–38444.
68. Kuimov A, Kuprash D, Petrov V, Vdovichenko K, Scanlan M, Jongeneel C et al. Cloning and characterization of TNKL, a member of tankyrase gene family.
Genes Immun, 2001, 2, 52–55.
69. Ma Q, Induction and superinduction of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-rho-dioxin-inducible poly(ADP-ribose) polymerase: role of the aryl hydrocarbon receptor / aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator transcription activation domains and a labile transcription repressor,
Arch Biochem Biophys, 2002, 404, 309–316.
70. Yu M, Schreek S, Cerni C, Schamberger C, Lesniewicz K, Poreba E et al. PARP-10, a novel Mycinteracting protein with poly(ADP-ribose) polymerase activity, inhibits transformation.
Oncogene, 2005, 24, 1982–1993.

71. Bateman A, Birney E, Cerruti L, Durbin R, Etwiller L, et al. The Pfam protein families database.
Nucleic Acids Res, 2002, 30:276–280.
72. Hassa P & Hottiger M, The functional role of poly(ADP-ribose) polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders.
Cell Mol Life Sci, 2002, 59, 1534–1553.
73. Anderson M, Scoggin K, Simbulan-Rosental C, and Stedman J, Identification of poly(ADP-ribose) polymerase as a transcriptional coactivator of the human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein,
J. Virol, 2000, 74, 2169-2177.
74. Akiyama T, Takasawa S, Nata K, Kobayashi S, Abe M, Shervani N, Ikeda T, Nakagawa K, Unno M, Matsuno S, and Okamoto H, Activation of Reg gene, a gene for insulin producing β -cell regeneration: poly(ADP-ribose) polymerase binds Reg promoter and regulates the transcription by autopoly(ADP-rybosil)ation,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, 94, 2261–2265.
75. Tulin A, Spradling A. Chromatin loosening by poly(ADP)-ribose polymerase (PARP) at *Drosophila* puff loci.
Science, 2003, 299:560–562.
76. Simbulan C, Suzuki M, Izuta S, Sakurai T, Savovsky E, Kojima K, Miyahara K, Shizuta Y, Yoshida S., Poly(ADP-ribose) polymerase stimulates DNA polymerase alpha by physical association,
FEBS Letters 1999, 446:6-8.
77. Schreiber V, Hunting D, Trucco C, Growans B, Grunwald d, de Murcia G, de Murcia J, A dominant-negative mutant of human poly(ADP-ribose)polymerase affects cell recovery, apoptosis, and sister chromatind exchange following DNA damage,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92, 4753-4757.
78. Lindahi T, Masahiko S, Guy G, Klungland A, Post translational modification of poly(ADP-ribose)polymerase induced by DNA strand breaks,
TIBS, 1995, 10, 405-411.

79. Cohen-Armon M, Visochek L, katzoff A, Levitan D, Susswein A, Klein R, Valbrun M, Schwartz J, Long-term memory requires polyADP-ribosilation, Science, 2004, 304, 1820-1822.
80. Miknyoczki S, Jones-Bolin S, pritchard S, Hunter K, Zhao H, Wan W, Ator M, Bihovsky R, Hudkins R, Chatterjee S, Klein-Szanto A, Dionne C, et al., Chemopotential of temozolomide, irinotecan, and cisplatin activity by CEP-6800, a poly(ADP-ribose)polymerase inhibitor. Mol. Cencer Ther., 2003, 2:371-382.
81. Germain M, Affar E, D'Amours D, Dixit V, Salvesen G, and Poirier G, Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7. J Biol Chem, 1999, 274:28379–28384.
82. D'Amours D, Sallmann F, Dixit V, and Poirier G, Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. J Cell Sci, 2001, 114:3771–3778.
83. Boulares A, Zoltoski A, Contreras F, Yakovlev A, Yoshihara K, and Smulson M, Regulation of DNAS1L3 endonuclease activity by poly(ADPriboseyl) ation during etoposide-induced apoptosis. Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage in endonuclease activation. J Biol Chem, 2001, 277:372–378.
84. Davidovic L, Vodenicharov M, Affar E, and Poirier G, Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. Exp Cell Res, 2001, 268:7–13.
85. Yu S, Wang H, Poitras M, Coombs C, Bowers W, Federoff H, Poirier G, Dawson T, and Dawson V, Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. Science (Wash DC), 2002, 297:259–263.
86. Solovyan V, bezvenyuk Z, Salminen A, Austin C, and Courtney M, The role of topoisomerase II in the excision of DNA loop domains during apoptosis,

J. Biological Chemistry, 2002, 277, 21458-21467.

87. Crowley C, Payne C, Bernstein H, Bernstein C, and Roe D The NAD precursors, nicotinic acid and nicotinamide protect cells against apoptosis induced by a multiple stress inducer, deoxycholate.

Cell Death Differ, 2000, 7:314–326.

88. Chauveau J, Moule Y, Rouiller C, Isolation of pure and unaltered liver nuclei, morphology and biochemical composition,

Expt. Cell Res, 1956, 11, 317-321.

89. Bradford M, a rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding,

Anal.Biochem. 1976, 72, 248-254.

90. Berezney R, Buchholtz L, Isolation and characterization of rat liver nuclear matrices containing high molecular weight deoxyribonucleic acid,

Biochemistry, 1981, 18, 20:17, 4995-5002.

91. Заалишвили Т. М, Маргани Д, Тамазиани А. С, Поли(ADP-рибоза) Полимеразная активность неирональных и глиальных ядер мозга крыс,

Изв. АН Грузии, Серия Биол., 1980, Т. 6, С 141-146.

92. Zaalishvili TM, Dzhabaridze NSh, Sabelashvili DSh, Michilashvili RD, The effect of Cu^{2+} , Zn^{2+} cations and biogenic amines on the nuclear poly(ADP-ribose) polymerase activity in the rat brain,

Biokhimiia, 1990, 55:4, 659-64.

93. Lymphocytes. A practical approach. G. G. B. Klaus, IRL Press, Oxford, WashingtonDC, 1987.

94. Farooq M, Norton W, A modified procedure for isolation of astrocyte and neuron-enriched fractions from rat brain.

J. Neurochem, 1978, 31, 887-894.

95. Iarovaia O.V., Razin S. V., Comparison of position of attachment sites of DNA loops nuclear matrix, MAR-elements, and autonomously replicating sequences in the elongated region of *Drosophila melanogaster* X-chromosome.

Molecular Biology, (in Russian), 1996, 30, 1184-1192.

96. Darby M, Schmitt B, Jongstra-Bilen J, Vosberg H, Inhibition of calf thymus type II DNA topoisomerase by poly(ADP-ribosylation).

EMBO J., 1985, 4, 2129-2134.

97. Gromova I.I., Tomsen B., Rasin S.V, Different topoisomerase II antitumor drugs direct similar specific long-range fragmentation of an amplified c-MYC gene locus in living cells and in high-salt-extracted nuclei.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, 92, 102-106.

98. Thompson KJ, Shoham S, Connor JR, Iron and neurodegenerative disorders Brain Research Bulletin, 2001, 55:2 155-164.

99. Basu HS, Wright WD, Deen DF, Roti_Roti J, Marton LJ, Treatment with a polyamine analog alters DNA-matrix association in HeLa cell nuclei: a nucleoid halo assay, Biochemistry, 1993, 20, 32:15, 4073-4076.

100. Herceg Z, Wang Z, Functions of poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death, Mutation Researc, 2001, 477, 97-110.

101. Zhang C, et al, Effects of basic fibroblast growth factor in retinal ischemia. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1994, v.35, p.3163.

102. PARP as a Therapeutic Target, edited by Jie Zhang, CRC PTESS 2004.

103. Заалишвили Т. М, Джапаридзе Н. Щ, Анчавадзе В. А, Изучение роли ядерного матрикса в репараций дик нервной ткани.,

Изв. А. Н. СССР., Серия Биол., 1991, Т. 17, С 394-398.

104. Т. М. Заалишвили, Н. Щ. Джапаридзе, Р. Д. Мичелашвили, М. М. Заалишвили, Изучение роли Поли(АДФ-рибоза) Полимеразы в нервной ткани, Доклады АН. СССР, 1989, Т. 309, №3 С 737-740.

105. Poirier G, de Murcia G, Jongstra-Bilen J, Niedergang C, and Mandel P, Poly(ADP-ribosyl)ation of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, 79, 3423-3427.

L