

1. Einleitung

Lebende Zellen sind fortwährend chemischem und physikalischem Stress ausgesetzt. Die molekularen Bestandteile der Zelle werden dabei häufig in ihrer Struktur geschädigt. Vor allem die dauerhafte Schädigung der DNA kann fatale Folgen für die Zelle haben. Die Reparatur von DNA-Schäden ist daher ein essentieller Prozess, in den viel Material und Energie investiert wird. Es gibt eine Vielzahl komplexer Reparaturmechanismen für alle Arten von DNA-Schäden. Die häufig auftretenden Schäden Basenmodifizierung und Basenverlust werden durch „base excision repair“ (BER) repariert. Dieser lebenswichtige Mechanismus wird durch die Entstehung einer abasischen Stelle durch spontane Hydrolyse oder die Aktivität von Reparaturenzymen (DNA-Glykosylasen) initiiert. Im weiteren Verlauf der Reparatur wird die abasische Stelle dann von einer DNA-Polymerase durch ein intaktes Nukleotid ersetzt. Dabei existieren zwei Mechanismen: Bei „short patch BER“ wird nur ein Nukleotid eingebaut, während bei „long patch BER“ ein aus mehreren Nukleotiden bestehender DNA-Strang neu synthetisiert wird. In beiden Fällen verbleibt zum Schluss ein Einzelstrangbruch, der durch eine DNA-Ligase in einer Adenosintriphosphat (ATP)-abhängigen Reaktion geschlossen wird (Ligation). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war weitgehend unbekannt, wie die Selektion zwischen „short patch BER“ und „long patch BER“ in der Zelle reguliert wird.

Am BER-Mechanismus ist neben verschiedenen Reparaturproteinen auch das Enzym Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) beteiligt. PARP-1 verwendet Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD^+) als Ausgangsstoff, um Proteine mit Ketten aus Poly(Adenosindiphosphat-Ribose) (PAR) zu modifizieren (Poly(ADP-Ribosyl)ierung). Die Funktion von PARP-1 bei der DNA-Reparatur ist trotz intensiver internationaler Forschung noch unzureichend geklärt.

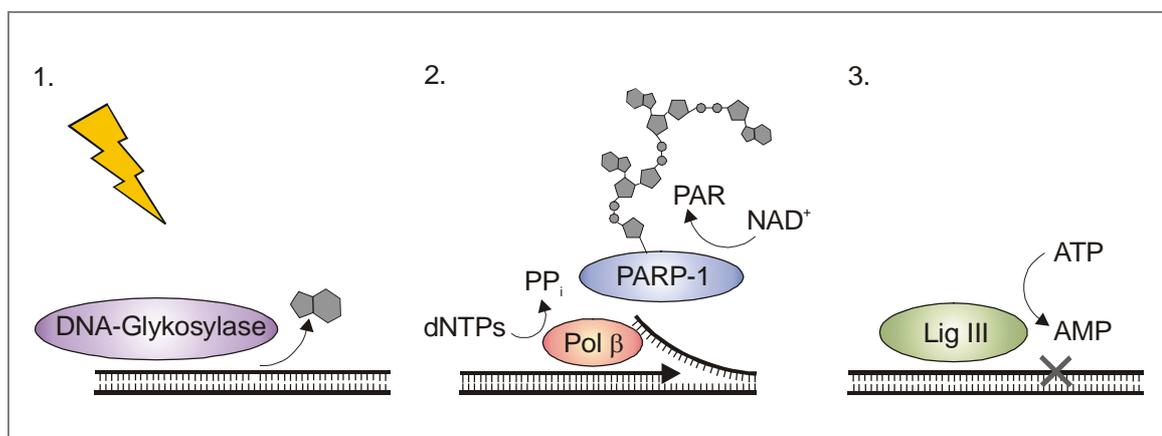


Abbildung 1.1: Der BER-Mechanismus. 1. Nach Schädigung der DNA wird eine geschädigte Base entfernt. 2. Eine DNA-Polymerase (Pol β) baut intakte Nukleotide ein. Die Poly(ADP-Ribosyl)ierung durch PARP-1 wird aktiviert. 3. Zum Schluss bleibt ein DNA-Einzelstrangbruch, den eine ATP-abhängige DNA-Ligase (Lig III) verschließt.

Interessanterweise wurde gezeigt, dass PAR als Quelle für das im BER-Mechanismus zur Ligation benötigte ATP dienen kann. Dabei wird angenommen, dass für die Erzeugung von ATP aus PAR das Pyrophosphat verwendet wird, das während der Reparatur-DNA-Synthese freigesetzt wird. In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, dass menschliche Zellen, die unter ATP-Mangel leiden, eine deutlich erhöhte PARP-Aktivität im BER-Mechanismus aufweisen. Gleichzeitig war die DNA-Synthese-Aktivität während BER deutlich erhöht. Dies wurde als ein Wechsel von „short patch BER“ zu „long patch BER“, ausgelöst durch den zellulären ATP-Mangel, interpretiert. Aus diesen Beobachtungen ergab sich erstmals die Möglichkeit, einen Mechanismus aufzuklären, bei dem die Energiesituation der Zelle die Selektion zwischen „short patch BER“ und „long patch BER“ beeinflusst.

1.1 Die DNA-Reparaturmechanismen BER und SSBR

1.1.1 Überblick über die DNA-Reparatur

Wenn Biomoleküle wie Proteine oder Lipide ihre Funktion wegen struktureller Schädigung nicht mehr erfüllen können, werden sie abgebaut und durch neu synthetisierte Moleküle ersetzt. Die DNA besitzt jedoch als Träger der Erbinformation eine konservatorische Funktion. Wenn ihre molekulare Struktur geschädigt ist, wird sie daher durch aufwändige Reparaturprozesse wieder instandgesetzt. Die DNA-Struktur kann sowohl endogen durch zelleigene Prozesse als auch exogen durch zellfremde Einflüsse beschädigt werden. Dabei ist gleichermaßen die nukleäre DNA wie die DNA von Mitochondrien und Chloroplasten betroffen. Wichtige endogene oder exogene Verursacher von DNA-Schäden sind nicht-enzymatische Hydrolyse, reaktive Sauerstoffverbindungen, alkylierende oder quervernetzende Agenzien sowie kurzwellige elektromagnetische Strahlung. Sie erzeugen drei große Gruppen von Schäden: räumlich kleine DNA-Modifizierungen, die sich nicht auf die Struktur der Doppelhelix auswirken, räumlich große DNA-Modifizierungen, welche die dreidimensionale Struktur der Doppelhelix stören, und DNA-Strangbrüche. Die direkten Auswirkungen solcher Schäden reichen von der Blockierung von Transkription oder Replikation über Mutagenese bis hin zum Zelltod. Zu ihrer Behebung existiert eine Vielzahl komplexer Mechanismen von teilweise redundanter Funktion, von denen hier nur die wichtigsten Mechanismen der höheren Eukaryoten angesprochen werden sollen. Für die Reparatur von kleinen DNA-Modifizierungen ist vor allem der BER-Mechanismus zuständig (Seeberg et al., 1995). Großräumige DNA-Modifizierungen werden vor allem durch „nucleotide excision repair“ (NER) entfernt (Hanawalt, 2002). Einzelstrangbrüche werden durch „single strand break repair“ (SSBR) geschlossen (Caldecott, 2001). Doppelstrangbrüche werden abhängig vom Zellzyklus durch „non-homologous end joining“ (NHEJ, G1-Phase) oder „homologous recombination“ (HR, S/G2-Phase) repariert (Hoeijmakers, 2001). Der DNA-Reparaturmechanismus „mismatch repair“ (MMR) korrigiert weniger die Folgen von DNA-Schädigung als von Replikationsfehlern (Young et al., 2003). Die Existenz einer Vielzahl von genetisch bedingten Syndromen, bei denen die DNA-Reparatur gestört ist, unterstreicht die Bedeutung dieser Mechanismen (Christmann et al., 2003).

1.1.2 „Base excision repair“ (BER)

Die räumlich „kleinen“ chemischen Modifikationen von DNA-Basen sind vielfältigen und meist endogenen Ursprungs (für eine Übersicht siehe Seeberg et al., 1995). Die Oxidation von Basen wird hauptsächlich von zelleigenen reaktiven Sauerstoffverbindungen („reactive oxygen species“, ROS) verursacht, die im aeroben Stoffwechsel entstehen. Die exogene Schädigung von Zellen durch ionisierende Strahlung (Röntgen- und Gammastrahlung) oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2) führt ebenfalls zur Oxidation von DNA-Basen. Häufige Produkte der Basenoxidation sind u.A. 7,8-Dihydro-8-Oxoguanin (8-Oxo-G) oder 2,5-Amino-5-Formamidopyridin (Breen und Murphy, 1995). Die Alkylierung von Basen wird meist endogen durch Stoffwechselintermediate wie S-Adenosylmethionin verursacht, kann aber auch exogen durch alkylierende Agenzien wie z.B. N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG) ausgelöst werden. Dabei entstehen fehlerhafte Basen wie 3-Methyladenin oder 7-Methylguanin. Auch UV-Strahlung kann modifizierte Basen erzeugen (z.B. 8-Oxo-G, Thyminglykol). Spontane Hydrolysereaktionen bewirken oft den Verlust ganzer Basen, was zu abasischen Stellen in der DNA führt. Außerdem können Basen durch spontane Hydrolyse deaminiert werden, wodurch DNA-fremde Basen wie Uracil (Deaminierung von Cytosin) oder Hypoxanthin (Deaminierung von Adenin) entstehen. Uracil kann auch während der Replikation durch Einbau von dUMP statt dTMP in die DNA gelangen (Krokan et al., 2002).

Wegen ihres vorwiegend endogenen Ursprungs treten diese Arten von DNA-Schäden sehr häufig auf. Die Entstehung von abasischen Stellen wird z.B. auf fast 10.000 Fälle pro Tag und Zelle geschätzt (Nakamura et al., 1998). Die Schädigung durch Basenoxidation spielt in eukaryotischen Zellen weniger im Kern als in Mitochondrien und Chloroplasten eine Rolle, wo die oxidative Belastung mit ROS besonders hoch ist (Allen und Raven, 1996; Bohr, 2002). Fehlbasen und abasische Stellen können teilweise Transkription oder Replikation blockieren, wirken aber in erster Linie durch ihre Unfähigkeit zur korrekten Basenpaarung Mutationen induzierend (Hoeijmakers, 2001). Entfernt werden sie durch BER. BER ist ein ubiquitärer Mechanismus, der in allen bekannten Organismen vorkommt (Gros et al., 2002; Izumi et al., 2003; Seeberg et al., 1995). Im Unterschied zu anderen DNA-Reparaturmechanismen sind keinerlei genetisch bedingte Syndrome bekannt, die auf Störungen von BER beruhen. Solche Störungen scheinen aufgrund der essentiellen Bedeutung dieses Mechanismus für die Zellfunktion grundsätzlich letal zu sein (Hoeijmakers, 2001). Im folgenden wird sich auf den BER-Mechanismus bei Säugetieren und, soweit bekannt, beim Menschen bezogen (siehe Abbildung 1.2).

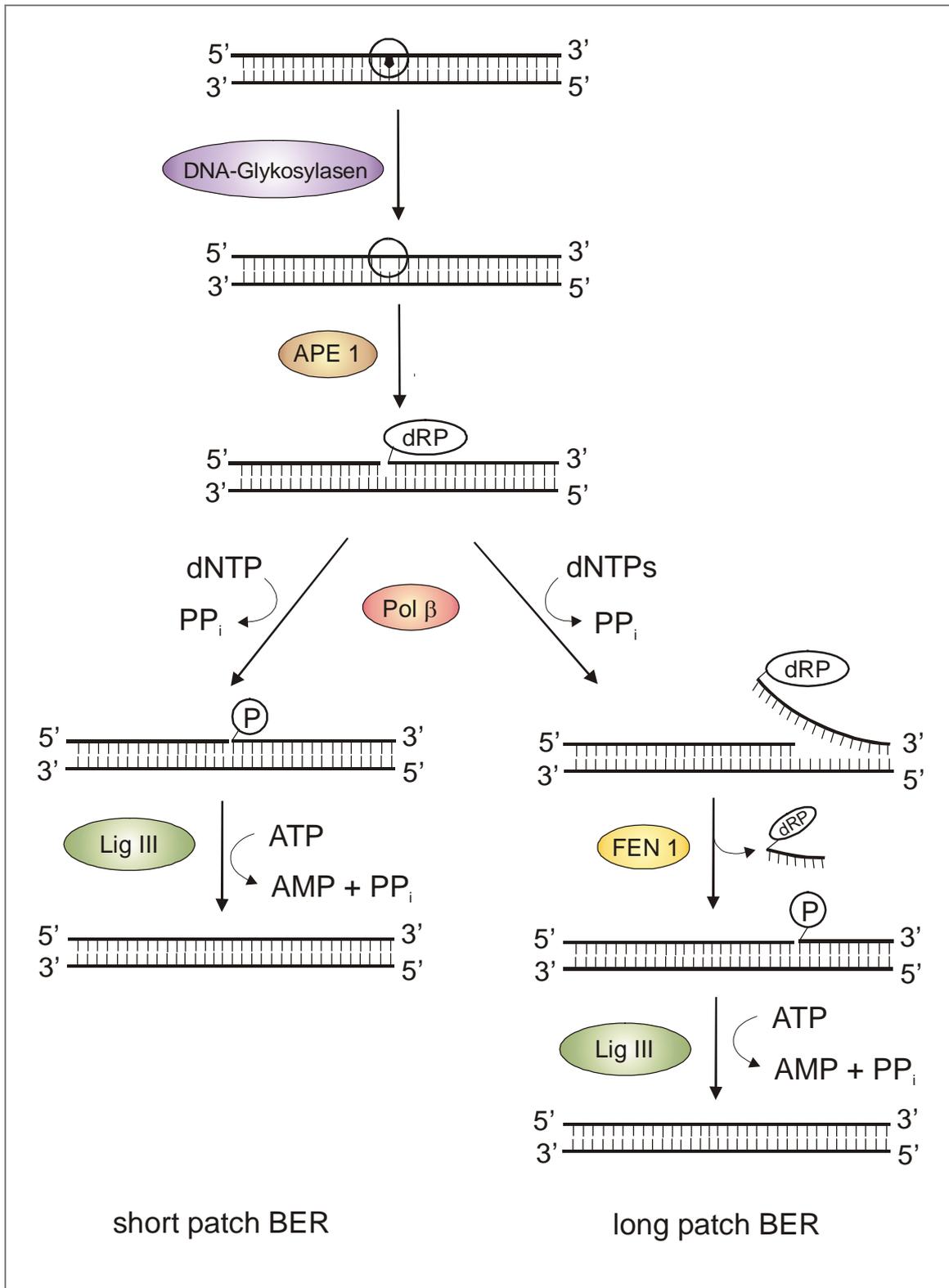


Abbildung 1.2: Mechanismus von „short patch BER“ und „long patch BER“. Dargestellt sind die Enzymreaktionen ohne Berücksichtigung von PARP-1 und XRCC1. Nachdem eine DNA-Glykosylase die geschädigte Base entfernt hat, schneidet APE 1 die AP-Stelle endonukleolytisch ein. „**Short patch BER**“: Pol β baut ein Nukleotid ein und entfernt den dRP-Rest. „**Long patch BER**“: Pol β baut mehrere Nukleotide ein. FEN 1 entfernt den ersetzten DNA-Einzelstrang. Zum Schluss wird der DNA-Einzelstrangbruch durch Lig III verschlossen.

Im BER-Mechanismus werden die fehlerhaften Basen von substratspezifischen DNA-Glykosylasen detektiert und entfernt, wodurch abasische oder apurine/apyrimidine (AP-) Stellen entstehen (siehe 1.3.1). Bei spontanem Basenverlust entfällt dieser Schritt. Die AP-Stelle wird von einer Endonuklease detektiert, welche den DNA-Einzelstrang am 5'-Ende der AP-Stelle einschneidet. In Säugerzellen wird diese Reaktion hauptsächlich von AP-Endonuklease 1 (APE 1) katalysiert (siehe 1.3.2). Eine DNA-Polymerase baut an der eingeschnittenen Stelle ein neues Nukleotid ein. Diese Reaktion wird hauptsächlich von DNA-Polymerase β (Pol β) katalysiert (siehe 1.3.3). Der verbleibende Einzelstrangbruch wird durch eine DNA-Ligase geschlossen (Ligation). Im BER-Mechanismus wird die Ligation vor allem von DNA-Ligase III (Lig III) katalysiert (siehe 1.3.5). Neben dem oben beschriebenen „short patch BER“-Mechanismus existiert ein „long patch BER“-Mechanismus, bei dem vor der Ligation mehr als ein Nukleotid eingebaut wird. Dabei wird der DNA-Einzelstrang, der sich in 3'-Richtung von der Schadensstelle befindet, durch einen neu synthetisierten Einzelstrang ersetzt. Dieser DNA-Einzelstrang wird durch das Enzym Flap-Endonuklease 1 (FEN 1) entfernt (siehe 1.3.4). Danach verbleibt ebenfalls ein Einzelstrangbruch, der ligiert wird. Außer den genannten Reparaturenzymen ist auch das Enzym PARP-1 am BER-Mechanismus beteiligt (siehe 1.2). PARP-1 synthetisiert aus NAD^+ verzweigte PAR-Ketten und modifiziert damit Proteine, wobei die Automodifikation überwiegt. Die genaue Funktion von PAR bei der DNA-Reparatur ist noch unzureichend geklärt. Fast alle oben genannten Enzyme des BER-Mechanismus interagieren mit dem Reparaturprotein „X-ray repair cross-complementing 1“ (XRCC1, siehe 1.3.6). XRCC1 besitzt keine bekannte Enzymaktivität, scheint aber von zentraler Bedeutung für die Koordination des BER-Mechanismus zu sein.

Neben dem oben beschriebenen BER-Komplex, der von XRCC1 koordiniert wird, existiert ein alternativer BER-Komplex, der sich hauptsächlich aus Enzymen der DNA-Replikation zusammensetzt (Matsumoto et al., 1994). Die DNA-Synthese wird dabei von den replikativen DNA-Polymerasen δ und ϵ katalysiert, der DNA-Einzelstrangbruch wird von der ebenfalls an der DNA-Replikation beteiligten DNA-Ligase I (Lig I) geschlossen. Die Reparatur durch diesen BER-Komplex verläuft über „long patch BER“ und benötigt daher die Aktivität von FEN 1. Die Funktion der Replikationsenzyme ist von den Aktivierungsproteinen „proliferating cell nuclear antigen“ (PCNA), „replication protein A“ (RPA) und „replication factor C“ (RFC) abhängig, man spricht daher auch vom „PCNA-abhängigen BER-Mechanismus“ (Dianov et al., 1999a; Matsumoto, 2001). Die beiden BER-Komplexe arbeiten nicht völlig isoliert voneinander, sondern es gibt Überschneidungen. Pol β interagiert z.B. mit PCNA und Lig I (siehe 1.3.3). Es ist noch unklar, ob der PCNA-abhängige BER-Mechanismus eine spezielle Funktion erfüllt und unter welchen Umständen er aktiv ist. Möglicherweise spielt er vor allem während der S-Phase eine Rolle, wenn die Replikationsenzyme ohnehin aktiviert sind (Caldecott, 2001; Fortini et al., 2003).

1.1.3 „Single strand break repair“ (SSBR)

Die meisten Proteine des XRCC1-koordinierten Komplexes sind außer an BER auch an einem zweiten Reparaturmechanismus beteiligt: „single strand break repair“ zur Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen (für eine Übersicht siehe Caldecott, 2001; 2003). Spontane Einzelstrangbrüche („single strand breaks“, SSBs oder „nicks“) können durch oxidative Schädigung der DNA entstehen, wie sie durch zelleigene ROS oder Behandlung von Zellen mit ionisierender Strahlung oder H₂O₂ verursacht wird. Das zentrale Agens der oxidativen Schädigung, das Hydroxyl-Radikal (OH•), initiiert dabei eine Kettenreaktion im DNA-Molekül, die zum Bruch des DNA-Rückgrats führt (Breen und Murphy, 1995). Freie Einzelstrangbrüche können auch entstehen, wenn sich BER-Intermediate vom Proteinkomplex des BER lösen. Unrepariert werden solche Einzelstrangbrüche während der Replikation zu Doppelstrangbrüchen und können dann letal sein. Die einfachste Möglichkeit zur Reparatur von Einzelstrangbrüchen besteht in ihrer Ligation durch Lig III. Die Ligationsreaktion erfordert jedoch das Vorhandensein von einer 3'-Hydroxyl- und einer 5'-Phosphatgruppe am Einzelstrangbruch (Tomkinson und Levin, 1997). Spontane Einzelstrangbrüche haben selten diese Struktur und erlauben daher die Ligation oft nicht. Häufig ist die Entstehung von Einzelstrangbrüchen auch mit dem Verlust eines Nukleotids verbunden, so dass eine Lücke von einem Nukleotid („gap“) im DNA-Einzelstrang entsteht. In diesen Fällen werden Enzyme benötigt, die einen Einzelstrangbruch mit korrekter Struktur erzeugen. APE 1 entfernt z.B. 3'-Phosphat- und 3'-Phosphoglykolatreste (Evans et al., 2000). Die Kombination der Aktivitäten von Pol β und FEN 1 führt ebenfalls zu einem am 5'-Ende phosphorylierten Einzelstrangbruch. Polynukleotid-Kinase/Phosphatase (PNKP) überträgt Phosphatreste vom 3'- auf das 5'-Ende von Einzelstrangbrüchen (Whitehouse et al., 2001). Auch an SSBR ist folglich ein ganzer Reparaturkomplex beteiligt. Eine zentrale Rolle bei diesem Mechanismus spielen offenbar PARP-1 und XRCC1. Die Bindung von PARP-1 und XRCC1 an Einzelstrangbrüche sowie die Synthese von PAR scheinen die initiiierenden Schritte dieses Reparaturmechanismus zu sein (Okano et al., 2003; Tartier et al., 2003). Ein entscheidender Unterschied zwischen SSBR und BER besteht darin, dass bei SSBR freie DNA-Einzelstrangbrüche in der Zelle vorliegen, die von Proteinen des Reparaturkomplexes detektiert werden müssen (PARP-1, XRCC1). Bei BER dagegen entstehen Einzelstrangbrüche als enzymatisch erzeugte Intermediate während der Reparatur, wenn der Schaden (fehlerhafte Base, AP-Stelle) bereits durch DNA-Glykosylasen und AP-Endonukleasen detektiert ist.

1.2 PARP-1 und DNA-Reparatur

1.2.1 Poly(ADP-Ribosyl)ierung

Die Poly(ADP-Ribosyl)ierung von Proteinen ist einer der rätselhaftesten Prozesse in eukaryotischen Zellen. Seit die Reaktion in den frühen sechziger Jahren entdeckt und die erste Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP, EC 2.4.2.30) isoliert wurde, ist dieses Phänomen intensiv erforscht worden. Poly(ADP-Ribosyl)ierung findet in erster Linie im Zellkern statt und ist an vielen wichtigen zellulären Mechanismen beteiligt (D'Amours et al., 1999). Dennoch sind viele Aspekte der Funktion von PARP und PAR nach wie vor unklar.

Anfang der sechziger Jahre beobachtete die Gruppe von P. Mandel, dass Nikotinamid-Mononukleotid in Zellkernpräparationen den Einbau von markiertem ATP in die säureunlösliche Fraktion stimuliert (Chambon et al., 1963). Das Produkt dieser Reaktion wurde einige Zeit später als PAR identifiziert. Das verantwortliche Enzym PARP-1 wurde 1966 aus Rattenleber isoliert (Sugimura et al., 1967).

PARP-1 hydrolysiert NAD^+ zu ADP-Ribose und Nikotinamid und überträgt die ADP-Ribose auf ein Akzeptorprotein (für eine Übersicht siehe Oei, 1999).

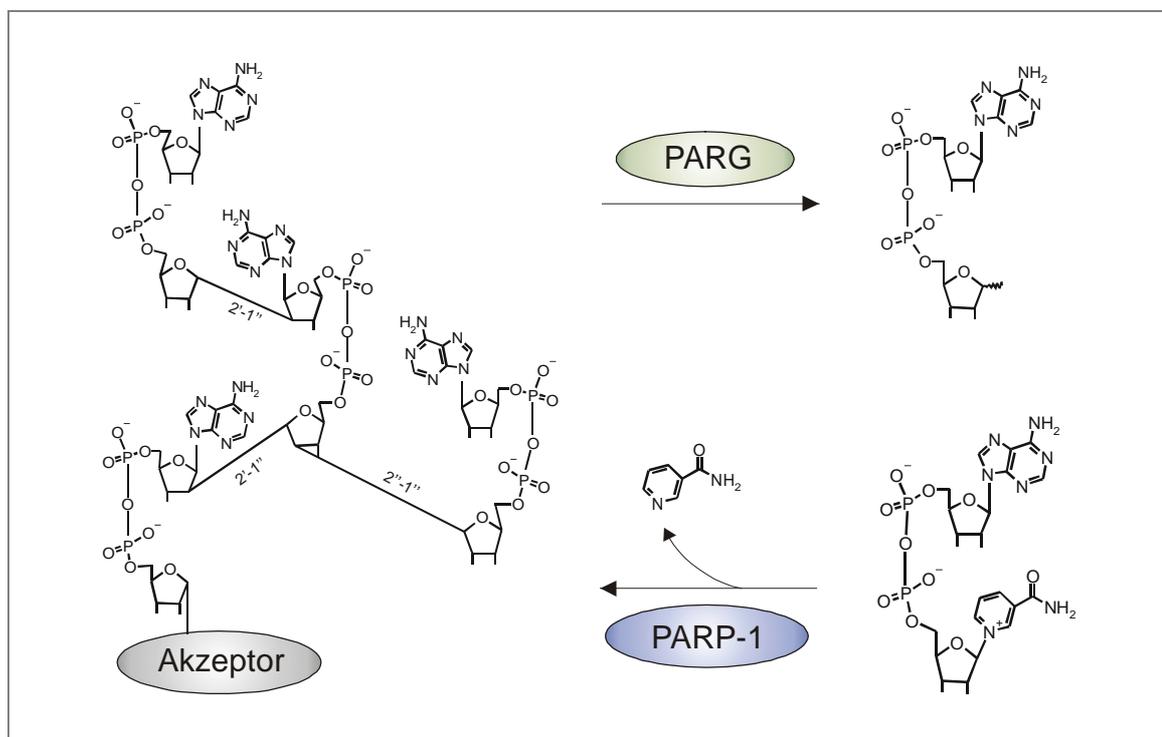


Abbildung 1.3: Poly(ADP-Ribosyl)ierung. PARP-1 spaltet NAD^+ zu ADP-Ribose und Nikotinamid. Die ADP-Ribose wird auf ein Akzeptorprotein übertragen. Durch Wiederholen der ADP-Ribosylierung entsteht ein verzweigtes PAR-Polymer. Das Polymer wird durch PARG wieder zu ADP-Ribose hydrolysiert.

Dabei wird eine Bindung zwischen der 1''-Hydroxylgruppe der ADP-Ribose und einer Aminosäureseitenkette des Akzeptorproteins (Aspartat, Glutamat oder Lysin) geknüpft. Diese Reaktion wird so lange wiederholt, bis ein langes Polymer entstanden ist. Im Polymer sind die ADP-Ribose-Reste über 1''-2'-glykosidische Ribose-Ribose-Bindungen verknüpft. Die PAR-Kette kann über 1''-2''-glykosidische Ribose-Ribose-Bindungen mehrfach verzweigt werden. Die Polymere besitzen in der Zelle nur eine geringe Halbwertszeit von wenigen Minuten. Der Grund dafür ist die Aktivität des Enzyms Poly(ADP-Ribose)-Glykohydrolase (PARG), das PAR zu ADP-Ribose hydrolysiert (Davidovic et al., 2001).

1987 wurde die für PARP-1 kodierende cDNA kloniert und die Primärstruktur des Proteins charakterisiert (Alkhatib et al., 1987; Cherney et al., 1987). PARP-1 ist ein kernlokalisiertes Protein von ca. 116 kDA Größe, das aus drei Domänen besteht: der aminoterminalen DNA-Bindedomäne (DBD), der Automodifikationsdomäne und der carboxyterminalen katalytischen Domäne. Die DBD enthält eine Kernlokalisierungsequenz („nuclear localisation signal“, NLS) und zwei Zinkfinger-Motive. Zinkfinger sind verbreitete DNA-Bindungsmotive, die ihre Struktur durch die Komplexierung von Zn^{2+} erhalten. Die Zinkfinger von PARP-1 besitzen ein ungewöhnliches $CX_2CX_{28/30}HX_2C$ -Motiv, das auch bei Lig III gefunden wurde (Mackey et al., 1999). Sie vermitteln die spezifische Bindung des Enzyms an DNA-Einzelstrangbrüche (Ikejima et al., 1990). Die Automodifikationsdomäne beinhaltet ein sog. „BRCA-1 carboxyterminus“ (BRCT)-Motiv. BRCT-Motive vermitteln Protein-Protein-Interaktionen und sind in DNA-Reparaturproteinen weit verbreitet (Huyton et al., 2000).

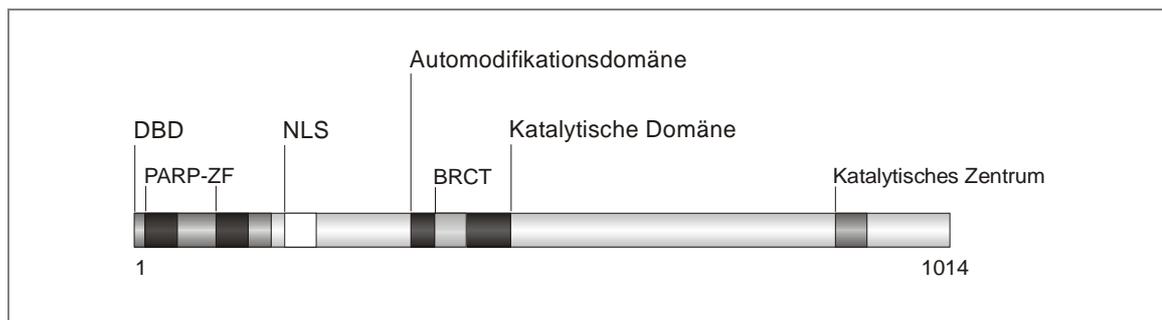


Abbildung 1.4: Funktionelle Domänen von PARP-1.

Homologe PARP-Enzyme wurden bereits in allen Arten von Eukaryoten mit Ausnahme der Hefen gefunden. Nachdem PARP-1 für lange Zeit als einzige PARP in Säugerzellen galt, wurden in jüngster Zeit weitere Enzyme dieser Art charakterisiert: PARP-2 und PARP-3 (Johansson, 1999), Tankyrase 1 (Smith et al., 1998), Tankyrase 2 (Lyons et al., 2001) und das cytoplasmatisch lokalisierte Enzym „vault“-PARP (vPARP, Kickhoefer et al., 1999). Dennoch ist der größte Teil der PARP-Aktivität in Säugerzellen auf PARP-1 zurückzuführen.

PARP-1 modifiziert in erster Linie sich selbst und wird dadurch inaktiviert. Aber auch Histone und viele andere Kernproteine werden durch PARP-1 modifiziert (D'Amours et al., 1999). Der vorübergehende Charakter der Modifizierung legt nahe, dass es sich dabei um einen Regulationsprozess handelt (Shall, 2002). PARP-1 beeinflusst vor allem die Aktivität von DNA-bindenden oder -modifizierenden Proteinen. Der Mechanismus besteht vermutlich darin, dass diese Proteine durch Modifizierung mit PAR eine negative Nettoladung erhalten und dadurch von der DNA dissoziieren. Dieses Modell gilt z.B. für PARP-1 selbst und für Histone, bei denen mit der Histon-Acetylierung bereits ein ähnlicher Regulationsmechanismus bekannt ist (Althaus, 1992; Zahradka und Ebisuzaki, 1982). Außerdem könnten PAR-Ketten die DNA-Bindung auch aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit Nukleinsäuren hemmen.

PARP-1 ist an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt. Dazu gehören die DNA-Reparaturmechanismen BER und SSB (siehe 1.2.2) sowie die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (Schultz et al., 2003). Außerdem ist PARP-1 über die Modifizierung von Histonen an der Regulation der Chromatinstruktur beteiligt (Kraus und Lis, 2003). Auch die Aktivität verschiedenster Transkriptionsfaktoren wird durch PARP-1 reguliert (Kraus und Lis, 2003; Ziegler und Oei, 2001). Eine weitere wichtige Rolle spielt das Enzym beim gesteuerten Zelltod (Apoptose). PARP-1 wird im Verlauf der Caspase-abhängigen Apoptose durch proteolytische Spaltung inaktiviert (Soldani und Scovassi, 2002). Andererseits ist die PARP-1-Aktivität an einem Caspase-unabhängigen Apoptose-Mechanismus beteiligt (Yu et al., 2002). Die Überaktivierung von PARP-1 durch starke Schädigung der DNA kann auch zum Zelltod führen. Es wird vermutet, dass die exzessive PAR-Synthese die zellulären NAD^+ -Vorräte verbraucht. Das führt zum Zusammenbruch der Atmungskette und zum Verbrauch der ATP-Vorräte, woraus schließlich Zelltod resultiert (Bürkle, 2001). Außerdem ist das Enzym an Entzündungsreaktionen beteiligt, was sowohl auf die Induktion von Zelltod als auch auf die Regulation von an Entzündungsprozessen beteiligten Transkriptionsfaktoren zurückgeführt wird (Chiarugi, 2002).

PARP-2 wird wie PARP-1 durch Bindung an DNA-Einzelstrangbrüche aktiviert und ebenfalls als DNA-Reparaturfaktor angesehen. PARP-2 interagiert im BER-Komplex mit PARP-1 und XRCC1 (Schreiber et al., 2002). Auch eine gemeinschaftliche Rolle von PARP-1 und -2 in der Embryonalentwicklung wird vermutet (Menissier de Murcia et al., 2003). Die PARP-Enzyme Tankyrase 1 und Tankyrase 2 sind an den Telomeren lokalisiert und scheinen eine Rolle bei der Regulation der Telomerstruktur zu spielen (Cook et al., 2002). Die Funktion von PARP-3 ist weitestgehend unbekannt. Das Protein ist in den Zentriolen lokalisiert und könnte eine Rolle bei der Regulation der Zellteilung spielen (Augustin et al., 2003). Auch die Funktion von vPARP, die in cytoplasmatischen Proteinkomplexen von unbekannter Funktion („vaults“) lokalisiert ist, ist noch nahezu unerforscht (van Zon et al., 2003).

1.2.2 PARP-1 und BER/SSBR

In der Zelle wird die katalytische Aktivität von PARP-1 nach DNA-Schädigung aktiviert. Dieser Effekt basiert auf der Aktivierung des Enzyms durch Bindung an DNA-Einzelstrangbrüche (Lindahl et al., 1995). Wegen dieses Phänomens wurde schon früh eine Rolle von PARP-1 bei den Reparaturmechanismen BER und SSBR vermutet (Durkacz et al., 1980). Anfangs wurde der PARP-Inhibitor 3-Aminobenzamid (3-ABA) verwendet, um den Einfluss der PAR-Synthese auf die DNA-Reparatur, vor allem auf den Ligationsschritt, zu untersuchen. Dabei wurden widersprüchliche Ergebnisse erhalten. Die PAR-Synthese hatte oft einen positiven, manchmal aber auch einen negativen Einfluss auf die Ligation, was möglicherweise auf die Verwendung sehr unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen zurückzuführen ist (Cleaver et al., 1985; Durkacz et al., 1980; James und Lehmann, 1982; Satoh et al., 1993). Durch diese Untersuchungen wurde jedoch in jedem Fall eine enge Beziehung zwischen PARP-Aktivität und DNA-Ligation gezeigt.

Ende der neunziger Jahre wurde dann in der Gruppe von de Murcia eine Linie von Mäusen etabliert, deren PARP-1-Gen gentechnisch inaktiviert worden war. Der Verlust von PARP-1 scheint teilweise durch die Aktivität von PARP-2 ausgeglichen zu werden und ist für die Mäuse nicht letal. Die Tiere sind jedoch hypersensibel gegenüber alkylierenden Agenzien und Gammastrahlung. Dies deutet wiederum auf eine Rolle von PARP-1 bei BER und SSBR hin (Dantzer et al., 1999; Trucco et al., 1998). In den aus diesen Mäusen gewonnenen Zelllinien weist der BER-Mechanismus eine beeinträchtigte DNA-Ligation (Trucco et al., 1998) und DNA-Synthese auf (Dantzer et al., 2000; Le Page et al., 2003; Menissier de Murcia et al., 2003). Dabei ist vor allem „long patch BER“ gestört, was auf eine spezifische Rolle von PARP-1 bei diesem Mechanismus hinweist (Dantzer et al., 2000; Sanderson und Lindahl, 2002). Im Gegensatz dazu wurde bei anderen Untersuchungen an diesen Zelllinien überhaupt keine Beeinträchtigung von BER und SSBR beobachtet (Allinson et al., 2003; Vodenicharov et al., 2000).

Aber auch andere zellbiologische Untersuchungen zeigen eine Beteiligung an BER und SSBR. Dabei wurden direkte DNA-Einzelstrangbrüche lokal begrenzt in lebenden Zellen induziert. Dabei zeigte sich, dass die PAR-Synthese spezifisch an den Schadensstellen induziert wird. Die PARP-1-Aktivität bewirkt dabei offenbar u.A. die Rekrutierung von XRCC1 an die Einzelstrangbrüche (Okano et al., 2003; Tartier et al., 2003). Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Induktion von oxidativen DNA-Schäden erhalten (El-Khamisy et al., 2003).

Untersuchungen an rekombinanten Proteinen ergaben ebenfalls Hinweise für eine Rolle von PARP-1 im BER/SSBR-Mechanismus. PARP-1 interagiert direkt oder funktionell mit den BER-Proteinen XRCC1 (Masson et al., 1998), Pol β (Prasad et al., 2001) und Lig III (Leppard et al., 2003). XRCC1 wird von PARP-1 modifiziert. PARP-1 interagiert auch mit dem mutmaßlichen DNA-Reparaturprotein „Werner syndrome protein“ (WRN), das anscheinend die Poly(ADP-Ribosyl)ierung anderer Kernproteine durch PARP-1 stimuliert

(von Kobbe et al., 2003). Außerdem wurden Interaktionen von PARP-1 mit zwei Proteinen beschrieben, die an der Steuerung der zellulären Antwort auf DNA-Schädigung beteiligt sind: p21^{waf1/cip1} (Frouin et al., 2003) und p53 (Wieler et al., 2003).

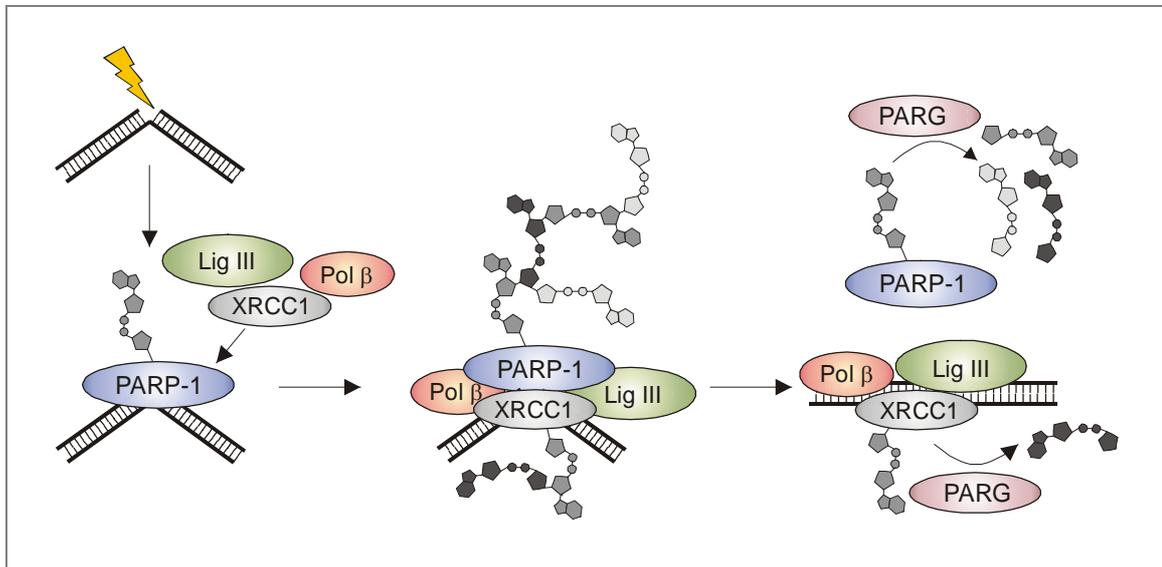


Abbildung 1.5: Mögliche Rolle von PARP-1 im SSBR-Mechanismus. Durch Schädigung der DNA entstehen Einzelstrangbrüche. PARP-1 bindet daran und wird aktiviert. Poly(ADP-Ribosylierte) PARP-1 rekrutiert XRCC1, das ebenfalls an den Einzelstrangbruch bindet und mit PAR modifiziert wird. Lig III und Pol β interagieren sowohl mit XRCC1 als auch mit PARP-1. Ein Proteinkomplex entsteht, der den Einzelstrangbruch repariert. Durch die Automodifizierung wird PARP-1 inaktiviert und dissoziiert von der DNA. PARG baut die PAR-Ketten schließlich zu ADP-Ribose ab.

An unserem Institut wurde eine besondere Rolle der PAR-Synthese während der DNA-Reparatur beobachtet. Die von PARP-1 synthetisierten Polymere können als Energiequelle für den BER- bzw. SSBR-Mechanismus dienen. In Zellkernextrakten wird PAR während des Reparaturprozesses durch eine Pyrophosphorylase-Aktivität zu Ribose-5-Phosphat und ATP gespalten. Diese Reaktion erfolgt nur in Anwesenheit von DNA-Synthese, wo Pyrophosphat freigesetzt wird. Auch frühere Untersuchungen hatten bereits Hinweise auf die Entstehung von ATP aus PAR in Zellen gegeben. Die Funktion dieses ATP war damals allerdings noch unklar (Maruta et al., 1997). An unserem Institut wurde gezeigt, dass das aus PAR entstandene ATP den Ligationsschritt im BER- bzw. SSBR-Mechanismus ermöglichen kann. Das ATP wird spezifisch von Lig III verwendet, um den DNA-Einzelstrangbruch zu schließen (Oei und Ziegler, 2000). In diesem Zusammenhang wurde auch die durch DNA-Schädigung in menschlichen Zellen induzierte PARP-Aktivität untersucht. Zellen, die mit dem Glykolyse-Inhibitor Desoxyglucose (DOG) behandelt wurden, weisen einen erniedrigten ATP-Gehalt und verringerte Adenylierung sowie Aktivität von DNA-Ligasen auf. In diesen Zellen ist die schadensinduzierte PARP-Aktivität deutlich höher als in Kontrollzellen mit normalem ATP-Gehalt. Dies deutet auf eine Regulation von PARP-1 abhängig von der ATP-Konzentration hin (Petermann et al., 2003).

Im Verlauf von BER ist es wichtig, dass keine Einzelstrangbrüche verbleiben, die für die Zelle letal sein können. Der ATP-abhängige Ligationsschritt ist daher entscheidend für den Erfolg der Reparatur. In Situationen, in denen der ATP-Spiegel der Zelle stark erniedrigt ist, kann die Verfügbarkeit von ATP für die DNA-Reparatur überlebenswichtig sein. Der neu entdeckte Mechanismus der ATP-Generierung könnte in solchen Situationen eine bedeutende Rolle spielen.

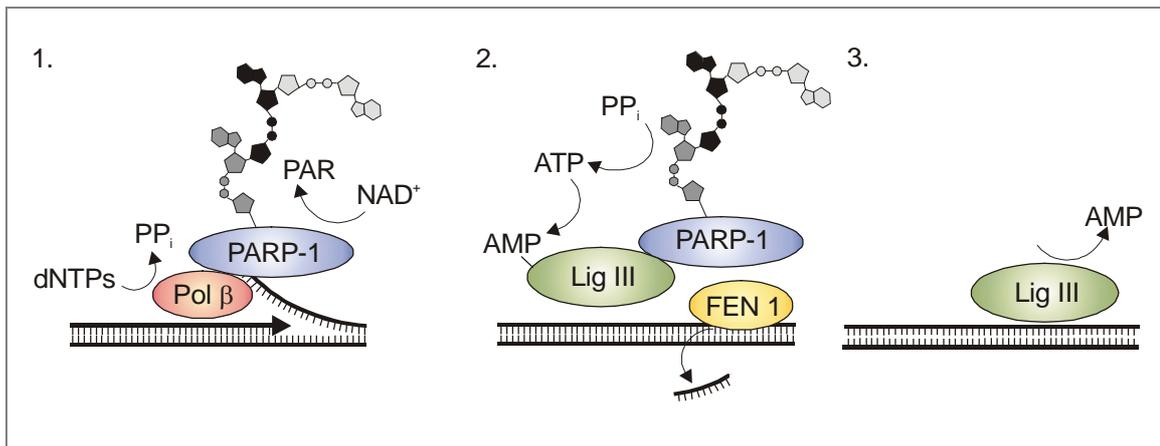


Abbildung 1.6: Mechanismus der Gewinnung von ATP aus PAR. 1. Im BER-Mechanismus (hier: „long patch BER“) baut Pol β Nukleotide in die DNA ein, wobei Pyrophosphat freigesetzt wird. Die Poly(ADP-Ribosyl)ierung ist aktiviert. 2. PAR wird pyrophosphorylytisch zu ATP gespalten. Lig III hydrolysiert das ATP und modifiziert sich selbst kovalent mit dem entstandenen AMP. FEN 1 entfernt den ersetzten Einzelstrang. 3. Zum Schluss verschließt Lig III den DNA-Einzelstrangbruch, wobei das AMP freigesetzt wird.

1.3 Die Reparaturproteine des BER/SSBR-Komplexes

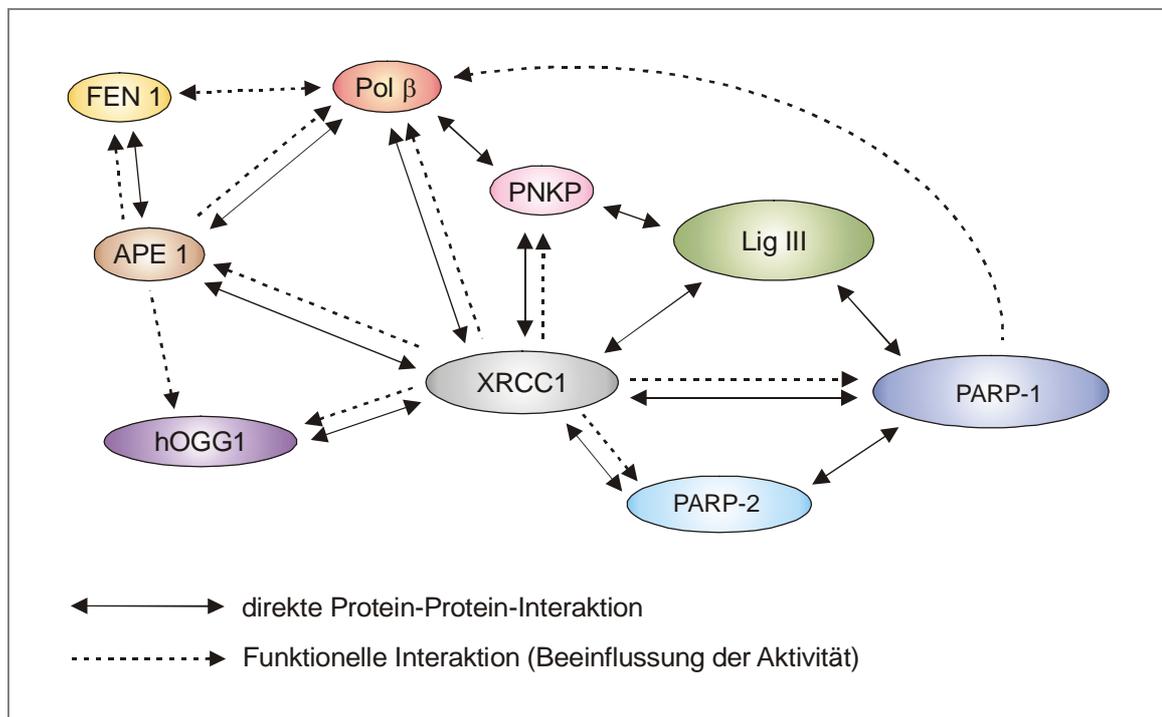


Abbildung 1.7: Derzeit bekannte Interaktionen innerhalb des BER/SSBR-Komplexes.

hOGG1: humane 8-OxoG-DNA-Glykosylase 1; **PNKP:** Polynukleotidkinase /Phosphatase.

1.3.1 DNA-Glykosylasen

Der erste Schritt im BER-Mechanismus wird von der Enzymgruppe der DNA-Glykosylasen katalysiert (EC 3.2.2.-). Sie erkennen beschädigte oder DNA-fremde Basen und entfernen sie durch Hydrolyse der aminoglykosidischen Bindung zwischen Base und Desoxyribose. Dabei entsteht eine abasische oder AP-Stelle (für eine Übersicht siehe Gros et al., 2002). In Säugerzellen sind 11 verschiedene DNA-Glykosylasen bekannt. Dabei werden zwei Klassen unterschieden: Monofunktionale DNA-Glykosylasen entfernen nur die Base, bifunktionale DNA-Glykosylasen spalten zusätzlich das DNA-Rückgrat auf der 3'-Seite der AP-Stelle (AP-Lyase-Aktivität). Als Produkt dieser Reaktion entstehen DNA-Einzelstrangbrüche mit einem 5'-Phosphatrest und einem 3'-4-Hydroxy-2-Pentalrest. Eine monofunktionale DNA-Glykosylase ist z.B. UNG (erkennt Uracil). hOGG1 (erkennt 7,8-Dihydro-8-Oxoguanin) besitzt dagegen eine bifunktionale Aktivität. In neuester Zeit zeigte sich, dass die AP-Lyase-Aktivität bifunktionaler DNA-Glykosylasen in Gegenwart von APE 1 unterdrückt sein kann, so dass auch diese Enzyme dann vorwiegend monofunktional agieren (Vidal et al., 2001). Für einige DNA-Glykosylasen wurde bereits eine partiell mitochondriale Lokalisierung nachgewiesen (Takao et al., 1998).

1.3.2 AP-Endonuklease 1

AP-Endonukleasen (EC 4.2.99.18) sind wichtige Schlüsselenzyme im BER-Mechanismus, da sie das gemeinsame Intermediat aller BER-Prozesse umsetzen (für eine Übersicht siehe Evans et al., 2000). AP-Endonukleasen erkennen abasische Stellen in doppelsträngiger DNA und spalten den DNA-Einzelstrang auf deren 5'-Seite. Dadurch entsteht ein Einzelstrangbruch zwischen einer 3'-Hydroxylgruppe und einem 5'-Desoxyribosephosphatrest (dRP-Rest). Außerdem entfernen AP-Endonukleasen durch ihre zusätzliche 3'-Phosphodiesterase-Aktivität die von bifunktionellen DNA-Glykosylasen erzeugten 3'-4-Hydroxy-2-Pentalreste aus der DNA. AP-Endonukleasen werden durch Mg^{2+} stimuliert.

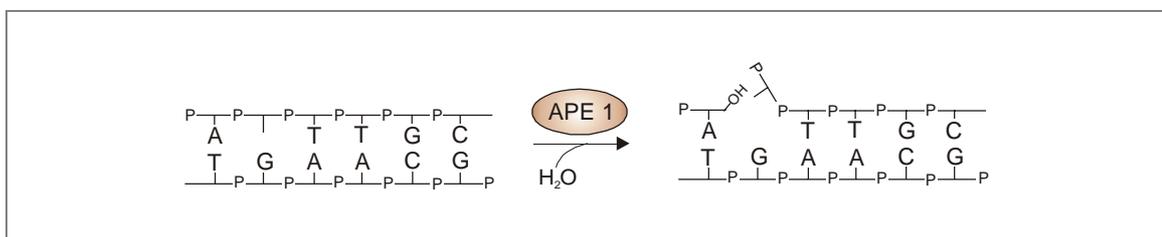


Abbildung 1.8: Endonukleolytische Spaltung einer abasischen Stelle durch APE 1.

Die AP-Endonuklease-Aktivität in Säugerzellen ist vorwiegend auf APE 1 (auch als HAP 1 oder APE 1/Ref-1 bezeichnet) zurückzuführen (Demple et al., 1991). Daneben existiert eine AP-Endonuklease 2 (APE 2), deren Aktivität jedoch deutlich schwächer ist (Hadi und Wilson, 2000). Obwohl nur APE 2 ein Mitochondrien-Lokalisierungssignal besitzt, wird beiden Enzymen eine partielle mitochondriale Lokalisierung zugeschrieben (Tell et al., 2001; Tsuchimoto et al., 2001). APE 1 ist ein ca. 36 kDa großes Protein, das aus zwei Domänen besteht und eine aminoterminal Kernlokalisationssequenz besitzt. Die AP-Endonuklease-Aktivität sowie 3'-Phosphatase- und 3'-Phosphodiesteraseaktivitäten sind in der carboxyterminalen APE-1-Domäne lokalisiert.

APE-1/Ref-1 ist ein multifunktionales Protein. Die Redoxfaktor-1 (Ref-1)-Aktivität ist in der aminoterminalen Domäne lokalisiert. Durch die Ref-1-Aktivität moduliert APE 1/Ref-1 den Redoxstatus von Transkriptionsfaktoren (u.A. Fos, Jun, NF- κ B) und damit deren Aktivität. Auch andere Signalfunktionen wie z.B. Kontrolle von p53 werden der Ref-1-Aktivität zugeschrieben. Die Aktivität von APE 1/Ref-1 wird komplex reguliert. Oxidativer Stress induziert sowohl die Expression als auch die Translokation des Proteins in den Kern und in die Mitochondrien (Frossi et al., 2002). Die Regulation der Aktivität durch Phosphorylierung oder Modulation des Redoxstatus wurde ebenfalls beschrieben. APE 1 interagiert direkt oder funktionell mit mehreren DNA-Glykosylasen wie hOGG1 (Hill et al., 2001), mit den DNA-Reparaturproteinen XRCC1 (Vidal et al., 2001), Pol β (Bennett et al., 1997), Lig I (Ranalli et al., 2002), FEN 1 und PCNA (Dianova et al., 2001) sowie mit dem Hitzeschockprotein Hsp70 (Kenny et al., 2001).

1.3.3 DNA-Polymerase β

DNA-Polymerasen (EC 2.7.7.7) katalysieren die Synthese von DNA-Einzelsträngen in 5'-3'-Richtung. Dazu benötigen sie die freie 3'-Hydroxylgruppe eines DNA-Einzelstranges („primer“), der an einen längeren, mit seinem 5'-Ende überhängenden DNA-Einzelstrang (Matrize) angelagert ist. Als Nukleotidsubstrate dienen Desoxynukleosintriphosphate (dNTPs), die komplementär zur Sequenz der Matrize eingebaut werden. Nach einem nukleophilen Angriff der 3'-Hydroxylgruppe des „primers“ auf den Triphosphat-Teil des Nukleotids werden zwei Phosphatreste als Pyrophosphat abgespalten. Das Nukleotid wird folglich als Desoxynukleosinmonophosphat-Rest eingebaut. Diese Reaktion, die abhängig von zweiwertigen Kationen (Mg^{2+} , Mn^{2+}) ist, wird als Nukleotidyltransferase-Reaktion bezeichnet. Je nach Art der Substratbindung unterscheidet man zwischen prozessiven und distributiven DNA-Polymerasen. Prozessive DNA-Polymerasen synthetisieren, wenn sie das DNA-Substrat einmal gebunden haben, einen langen DNA-Strang. Distributive DNA-Polymerasen dissoziieren nach dem Einbau eines Nukleotids wieder von der DNA und müssen für die Verlängerung des Strangs erneut an das DNA-Substrat binden.

In Säugerzellen wurden mittlerweile 13 verschiedene DNA-Polymerasen beschrieben. Die meisten davon erfüllen DNA-Reparaturfunktionen (Burgers et al., 2001; Hübscher et al., 2000). Die erste DNA-Polymerase mit reiner DNA-Reparaturfunktion, die entdeckt wurde, war Pol β . Die Aktivität von Pol β trägt maßgeblich zur gesamten DNA-Polymerase-Aktivität in Säugerzellen bei. Das Enzym wurde daher bereits Mitte der siebziger Jahre beschrieben (Chang, 1974; Hecht, 1975). Pol β wird nicht durch die DNA-Polymerase-Inhibitoren Aphidicolin (Ichikawa et al., 1980) und N-Ethylmaleimid (Bhattacharya und Basu, 1978) beeinflusst und lässt sich so von den replikativen DNA-Polymerasen α , γ , δ und ϵ unterscheiden. Die cDNA wurde 1986 kloniert (SenGupta et al., 1986). Eine Funktion von Pol β beim BER-Mechanismus wurde schon früh angenommen (Hübscher et al., 1979; Siedlecki et al., 1980). Bestätigt wurde diese Auffassung durch Studien an Mäusezellen, die keine funktionelle Kopie des Pol β -Gens mehr enthalten (Sobol et al., 1996). Diese „Pol β -Null-Zellen“ zeigen starke Defekte im BER-Mechanismus (Horton et al., 2002; Horton et al., 2000; Sobol und Wilson, 2001). Daneben wurde eine Funktion von Pol β beim Einbau von Nukleotiden gegenüber von UV-Schäden wie Pyrimidin-Dimeren beschrieben (Servant et al., 2002). Bisher wurde keine mitochondrial lokalisierte Form von Pol β beschrieben. Die Rolle von Pol β wird im mitochondrialen BER-Mechanismus offenbar von DNA-Polymerase γ übernommen (Longley et al., 1998).

Die strukturellen und enzymologischen Eigenschaften von Pol β wurden bereits umfangreich untersucht (Maitra et al., 2002; Pelletier et al., 1996b; Prasad et al., 1994; Singhal und Wilson, 1993; Tsoi und Yang, 2002), und die Röntgenkristallstruktur wurde gelöst (Pelletier et al., 1996a).

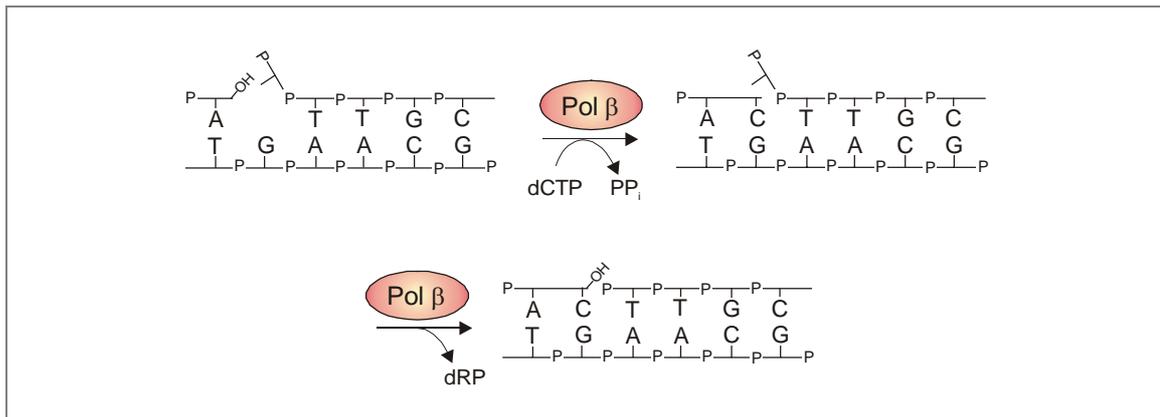


Abbildung 1.9: Pol β: Nukleotidyltransferase- und dRP-Lyase-Aktivität. Pol β baut zuerst ein Nukleotid ein, bevor der dRP-Rest entfernt wird.

Pol β ist ein ca. 39 kDa großes Protein, das aus zwei Domänen besteht (Beard und Wilson, 2000). Die carboxyterminale Domäne besitzt die Nukleotidyltransferase-Aktivität. Durch diese Aktivität baut Pol β an der von APE 1 gespaltenen AP-Stelle neue Nukleotide ein. Wie alle reinen Reparatur-Polymerasen ist Pol β ein distributives Enzym und baut daher meist nur ein einziges Nukleotid ein. Seltener werden kurze DNA-Stränge von etwa 2-10 Nukleotiden Länge synthetisiert. In diesem Fall wird der auf der 3'-Seite der AP-Stelle befindliche DNA-Einzelstrang durch den neu synthetisierten Einzelstrang ersetzt („strand displacement“-DNA-Synthese, SDDS) (Nowak et al., 1987). Die aminoternale Domäne von Pol β besitzt eine dRP-Lyase-Aktivität. Sie ermöglicht dem Enzym, nach Einbau eines Nukleotids den 5'-dRP-Rest durch β-Eliminierung zu entfernen (Prasad et al., 1998). Diese Reaktion hinterlässt einen freien 5'-Phosphatrest am Einzelstrangbruch, der für die anschließende Ligrationsreaktion benötigt wird. Da ein DNA-Einzelstrangbruch mit einem 5'-dRP-Rest nicht ligierbar ist, ist die dRP-Lyase-Aktivität von Pol β für den „short patch BER“-Mechanismus von großer Bedeutung (Podlutzky et al., 2001b; Sobol et al., 2000).

Pol β interagiert mit vielen verschiedenen Proteinen. Zur Zeit sind direkte oder funktionelle Interaktionen mit PARP-1, APE 1, XRCC1 (Caldecott et al., 1996), FEN 1 (Prasad et al., 2000), PNKP (Whitehouse et al., 2001), Lig I (Prasad et al., 1996), PCNA (Kedar et al., 2002), WRN (Harrigan et al., 2003) und mit dem Hitzeschockprotein Hsp70 bekannt (Mendez et al., 2003).

Die Aktivität von Pol β wird auf zellulärer Ebene über die Proteinexpression reguliert, die durch alkylierende Agenzien wie MNNG induziert werden kann (He et al., 2003).

1.3.4 Flap-Endonuklease 1

Durch die SDDS-Aktivität von Pol β entsteht eine sogenannte „flap“-Struktur, d.h. der ersetzte DNA-Einzelstrang ragt aus der doppelsträngigen DNA heraus. Solche Strukturen entstehen sowohl bei der DNA-Reparatur als auch bei der DNA-Replikation (nach Ersetzen der RNA- und DNA-„primer“). Sie werden durch die strukturspezifische Endonuklease

FEN 1 (EC 3.-.-., früherer Name: DNase IV) prozessiert (Lindahl et al., 1969). Dieses Enzym ist evolutionär stark konserviert. FEN 1 wurde früher ausschließlich als Enzym der DNA-Replikation angesehen, bis seine Beteiligung an verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen entdeckt wurde (für eine Übersicht siehe Henneke et al., 2003). FEN 1 ist ein ca. 43 kDa großes Protein, dessen Aktivität abhängig von Mg^{2+} und der direkten Interaktion mit PCNA ist (Chen et al., 1996). Reguliert wird die Aktivität durch Acetylierung oder Phosphorylierung des Proteins. Die Röntgenkristallstruktur von archaebakterieller FEN 1 wurde bereits gelöst (Hwang et al., 1998).

Im „long patch BER“-Mechanismus entfernt FEN 1 den durch SDDS ersetzten DNA-Einzelstrang (Kim et al., 1998; Klungland und Lindahl, 1997). Im BER-Komplex interagiert das Enzym direkt oder funktionell mit APE 1 und Pol β .

1.3.5 DNA-Ligase III

DNA-Ligasen (EC 6.5.1.1) sind Enzyme, die DNA-Einzelstrangbrüche durch Knüpfen einer Phosphoesterbindung zwischen 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppe schließen. Diese Reaktion ist mit der Spaltung einer energiereichen Bindung gekoppelt und dadurch irreversibel.

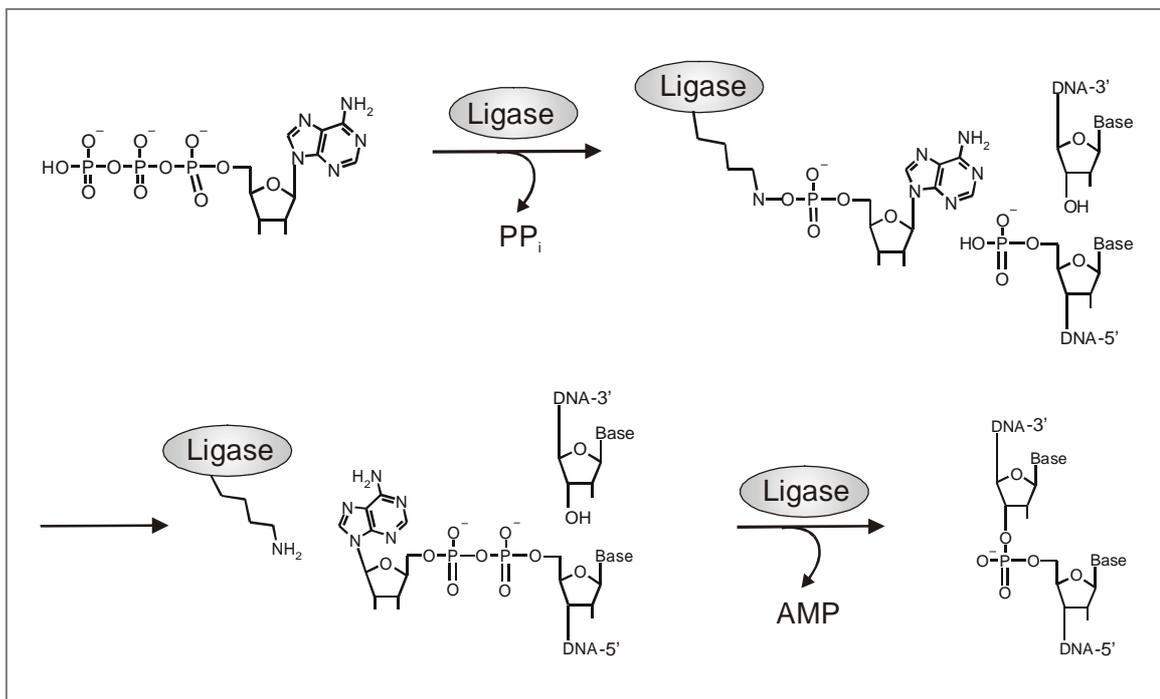


Abbildung 1.10: Katalysemechanismus von ATP-abhängigen DNA-Ligasen. ATP wird durch die Ligase zu AMP und Pyrophosphat hydrolysiert. Mit dem AMP wird eine Lysin-Seitenkette der Ligase modifiziert (adenyliert). Dieser Adenylatrest wird auf den 5'-Phosphatrest eines DNA-Einzelstrangbruchs übertragen, so dass eine 5'-5'-Dinukleotidstruktur entsteht. Danach wird der Strangbruch durch die Ligase geschlossen und das AMP freigesetzt.

Während die meisten eubakteriellen DNA-Ligasen NAD^+ zu Nikotinamid-Mononukleotid (NMN) und Adenosinmonophosphat (AMP) hydrolysieren, verwenden die DNA-Ligasen von anderen Organismen, Bakteriophagen und Viren ATP, das zu AMP und Pyrophosphat hydrolysiert wird. Diese Reaktion ist Mg^{2+} -abhängig. In beiden Fällen wird mit dem entstandenen AMP (Adenylatrest) eine Lysin-Seitenkette der Ligase kovalent modifiziert (Adenylierung). Der Adenylatrest wird in der Folgereaktion auf den 5'-Phosphatrest des DNA-Einzelstrangbruchs übertragen, so dass eine 5'-5'-Dinukleotidstruktur entsteht. Der Strangbruch wird durch einen nukleophilen Angriff der 3'-Hydroxylgruppe der DNA auf das 5'-5'-Diphosphat geschlossen, wobei AMP freigesetzt wird (für eine Übersicht siehe Martin und MacNeill, 2002; Timson et al., 2000).

Alle ATP-abhängigen DNA-Ligasen besitzen eine charakteristische katalytische Domäne, deren Primärstruktur sechs evolutionär konservierte Motive aufweist (Timson et al., 2000). Der relativ komplizierte Katalysemechanismus wurde in der Vergangenheit vor allem an viralen DNA-Ligasen untersucht. Die Röntgenkristallstruktur der DNA-Ligase des Bakteriophagen T7 wurde bereits gelöst (Subramanya et al., 1996). Die konservierten Motive sind an der ATP-Bindung beteiligt und bilden das aktive Zentrum. Bei den DNA-Ligasen von Vaccinia-Virus und *Chlorella*-Virus PBCV-1 sowie bei humaner Lig I ist der konservierte Lysinrest im Motiv I essentiell für die Adenylierung der Enzyme (Kodama et al., 1991; Sekiguchi und Shuman, 1997; Sriskanda und Shuman, 1998). Durch Austausch des konservierten Aspartatrestes im Motiv I von PBCV-1-Ligase und humaner Lig I gegen andere Aminosäuren entstanden Mutanten, die sich adenylieren, aber die Ligation nicht katalysieren konnten (Kodama et al., 1991; Sriskanda und Shuman, 1998). Der Mechanismus der DNA-Bindung von DNA-Ligasen ist noch weitgehend unerforscht und die an der DNA-Bindung beteiligten Aminosäurereste sind nicht bekannt (Timson et al., 2000).

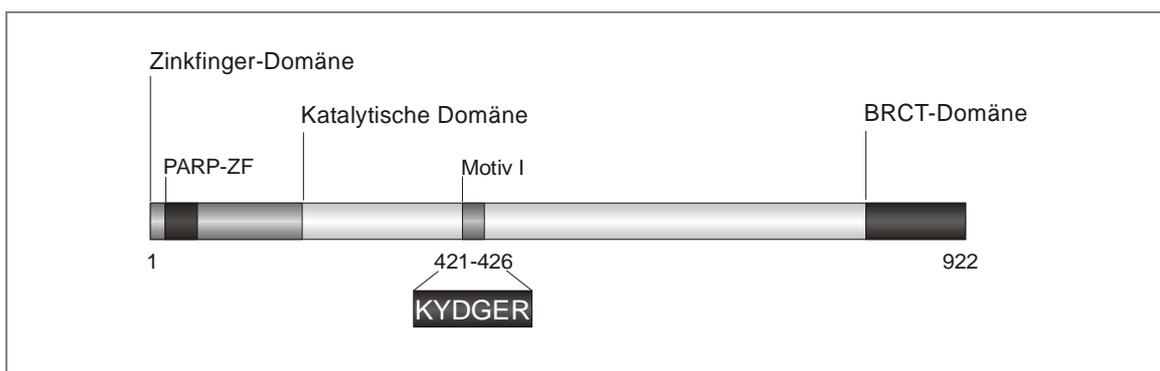


Abbildung 1.11: Funktionelle Domänen von Lig III. Das konservierte Motiv I (Lysin 421 bis Arginin 426) ist hervorgehoben.

Säugetiere besitzen drei verschiedene DNA-Ligase-Gene, deren Produkte als DNA-Ligasen I, III und IV bezeichnet werden (Tomkinson und Levin, 1997). Lig III wurde Mitte der neunziger Jahre isoliert und charakterisiert (Husain et al., 1995). Gleichzeitig wurde die

cDNA kloniert (Chen et al., 1995; Wei et al., 1995). Lig III bindet spezifisch an DNA-Einzelstrangbrüche (Caldecott et al., 1996). Die Rolle des Enzyms im BER-Mechanismus wurde durch Studien an Hamsterzelllinien mit erniedrigtem Lig III-Gehalt nachgewiesen (Cappelli et al., 1997). Die bereits früher isolierte DNA-Ligase II (Teraoka et al., 1986) erwies sich bald als identisch mit der katalytischen Domäne von DNA-Ligase III. Eine physiologische Funktion von DNA-Ligase II ist nicht bekannt (Tomkinson und Levin, 1997). Das Lig III-Gen kodiert vier verschiedene Proteine. Lig III α , ein Protein von ca. 103 kDa Größe, besitzt eine aminoternale Zinkfingerdomäne, die ein PARP-Zinkfinger-Motiv enthält (Mackey et al., 1999). Lig III ist die einzige bekannte DNA-Ligase, die ein Zinkfinger-Motiv besitzt. In der Mitte befindet sich die katalytische Domäne und am Carboxyterminus eine BRCT-Domäne (Thornton et al., 2001). Durch alternatives Spleißen entsteht eine mRNA, die für eine verkürzte Lig III ohne die BRCT-Domäne kodiert (Lig III β). Bisher wurde diese mRNA nur in Keimbahnzellen beschrieben (Chen et al., 1995; Mackey et al., 1997). Von beiden Proteinen existiert neben der nukleären auch eine mitochondriale Form, die durch alternative Initiation der Translation eine aminoternale Mitochondrien-Lokalisierungssequenz erhält (Lakshmiathy und Campbell, 1999; Perez-Jannotti et al., 2001).

Lig III α (im Folgenden als Lig III bezeichnet) interagiert im BER-Komplex direkt mit XRCC1 (Caldecott et al., 1994). Diese Interaktion gilt als stabilste Protein-Protein-Wechselwirkung im BER-Mechanismus, weshalb die beiden Proteine auch als „XRCC1/Lig III-Komplex“ bezeichnet werden. In Hamsterzellen, die kein XRCC1 besitzen (siehe 1.3.6), ist die Proteinmenge an Lig III etwa vierfach reduziert, was auf eine Stabilisierung von Lig III durch XRCC1 hindeutet (Caldecott et al., 1995). Da diese Interaktion über die BRCT-Domäne vermittelt wird, interagiert Lig III β nicht mit XRCC1 (Nash et al., 1997). Auch eine direkte Wechselwirkung zwischen PARP-1 und der Zinkfingerdomäne von Lig III wurde beschrieben, wobei Lig III bevorzugt mit PAR-modifizierter PARP-1 interagiert (Leppard et al., 2003).

1.3.6 XRCC1

Im Jahre 1980 wurden aus der Hamsterzelllinie „chinese hamster ovary“ (CHO) AA8 zwei mutierte Zelllinien isoliert (CHO EM7 und CHO EM9), die eine erhöhte Sensibilität gegenüber DNA-Schädigung, vor allem gegenüber bestimmten alkylierenden Agenzien, aufweisen. Die Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen ist in diesen Zellen stark reduziert (Thompson et al., 1982). Anfang der Neunziger wurden die CHO-Zelllinien EM-C11 und EM-C12 isoliert, die den gleichen Phänotyp zeigen (Zdzienicka et al., 1992). Der Phänotyp dieser Zellen kann durch eine funktionelle Kopie des Gens „*X-ray repair cross-complementing 1*“ (*Xrcc1*) normalisiert werden. Alle vier hypersensiblen Zelllinien weisen Mutationen im genannten Gen auf, die zum völligen Verlust des codierten Proteins XRCC1 führen (Shen et al., 1998). 1995 wurde die für XRCC1 kodierende cDNA kloniert (Caldecott

et al., 1995). Das Protein wurde bisher vor allem in Säugetieren untersucht, aber auch in Insekten (*Drosophila melanogaster*) und Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*) finden sich Homologe (Taylor et al., 2002). Eine mitochondriale Form ist nicht bekannt. XRCC1 besitzt weder Enzymaktivität noch bekannte konservierte Enzymdomänen. Stattdessen besteht das ca. 71 kDa große Protein aus mehreren Interaktionsdomänen (Abbildung 1.12) und zeichnet sich durch Wechselwirkungen mit einer Vielzahl von DNA-Reparaturenzymen aus (Tabelle 1.1).

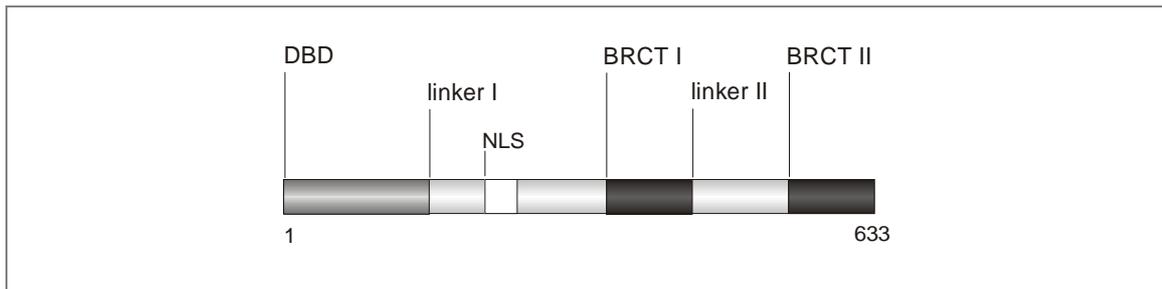


Abbildung 1.12: Funktionelle Domänen von XRCC1.

Die meisten dieser Enzyme werden durch Interaktion mit XRCC1 in ihrer Aktivität stimuliert, einige werden aber auch gehemmt (siehe Tabelle 1.1). Außerdem wurde eine Interaktion von XRCC1 mit dem onkogenen Protein E6 aus humanen Papillomaviren (HPV-1, -8 und -16) beschrieben, welches den BER-Mechanismus offenbar inhibiert (Iftner et al., 2002). Am Aminoterminus von XRCC1 befindet sich eine DBD, deren Struktur mittels Kernmagnetresonanz gelöst wurde (Marintchev et al., 1999). Diese Domäne ist zur Bindung an DNA-Einzelstrangbrüche und für die Interaktion mit Pol β erforderlich (Marintchev et al., 2000). Offenbar bindet XRCC1 gleichzeitig an DNA-Einzelstrangbrüche und an Pol β , die auf der gegenüberliegenden Seite des DNA-Moleküls an den selben Strangbruch bindet (Marintchev et al., 1999). Auch die Interaktion mit dem HPV-Protein E6 wird über die DBD vermittelt. An die DNA-Bindedomäne schließt eine sogenannte „linker“-Domäne an, die eine NLS-Sequenz enthält. Am Übergang zwischen dieser Sequenz und der darauffolgenden BRCT I-Domäne finden die Interaktionen mit APE 1 und der DNA-Glykosylase hOGG1 statt (Marsin et al., 2003; Vidal et al., 2001). Die BRCT I-Domäne ist für die Interaktion von XRCC1 mit PARP-1 und PARP-2 verantwortlich. XRCC1 bindet vorzugsweise an automodifizierte PARPs und wird selbst von PARP-1 modifiziert (Masson et al., 1998; Schreiber et al., 2002). Eine weitere BRCT-Domäne (BRCT II) befindet sich am Carboxyterminus von XRCC1. Die Sequenz, die zwischen den beiden BRCT-Domänen liegt („linker“-Domäne II), ist für die Interaktion mit PNKP erforderlich (Whitehouse et al., 2001). Über die BRCT II-Domäne wird die Interaktion mit Lig III vermittelt (Nash et al., 1997). Außerdem wurde eine direkte Interaktion zwischen XRCC1 und dem DNA-Reparaturprotein Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase (Tdp1) beschrieben (Plo et al., 2003)

XRCC1-Domäne	Partner	Domäne des Partners	Effekt
DBD	Pol β	C-terminale Domäne	SDDS wird inhibiert
	HPV E6	Gesamtprotein	BER wird inhibiert
„linker“ I	APE 1	N-Terminus	APE1 wird stimuliert
	hOGG1	n.f.	OGG1 wird stimuliert
BRCT I	PARP-1	BRCT-Domäne & DBD	XRCC1 wird modifiziert/ PARP-1 wird inhibiert
	PARP-2	„E“-Domäne	XRCC1 wird modifiziert/ PARP-2 wird inhibiert
„linker“ II	PNKP	n.f.	PNKP wird stimuliert
BRCT II	Lig III	BRCT-Domäne	Lig III wird stabilisiert
n.f.	Tdp1	n.f.	Tdp1 wird stimuliert

Tabelle 1.1: Die Protein-Protein-Interaktionen von XRCC1. n.f.: nicht festgestellt.

Aufgrund der Vielzahl von funktionellen Interaktionen wird XRCC1 als das zentrale Koordinationsprotein von BER und SSBR angesehen und spielt daher eine bedeutende Rolle bei der Erforschung dieser Mechanismen. Es wird angenommen, dass XRCC1 die an der Reparatur beteiligten Enzyme reguliert und ihre Aktivitäten zeitlich koordiniert und aufeinander abstimmt. Bisher wurde jedoch noch keine solche Koordination von BER oder SSBR nachgewiesen, sondern lediglich die Stimulierung einzelner Enzymaktivitäten gezeigt.

Das menschliche *Xrcc1*-Gen weist mehrere Polymorphismen auf, die zu Aminosäureaustauschen im Protein führen. Einige davon wurden mit erhöhten Anfälligkeiten für verschiedene Arten von Krebs in Verbindung gebracht (Goode et al., 2002).

1.4 „Short patch BER“ und „long patch BER“

Der „short patch BER“-Mechanismus, bei dem nur ein Nukleotid eingebaut und der dRP-Rest eliminiert wird, ist der vorherrschende BER-Mechanismus. Dennoch wurde Mitte der neunziger Jahre in Säugerzellen ein BER-Mechanismus gefunden, bei dem mehr als ein Nukleotid eingebaut wird („long patch BER“). Von der AP-Stelle aus werden dabei 6 bis 14 Nukleotide eingebaut (Frosina et al., 1994; Frosina et al., 1996). Es zeigte sich, dass für die Ligation bei diesem Mechanismus die Aktivität von FEN 1 erforderlich ist (siehe 1.3.4). „Long patch BER“ ist vorherrschend in Pol β -defizienten Zelllinien und wird durch PCNA stimuliert (Fortini et al., 1998). Deshalb wird angenommen, dass „long patch BER“ hauptsächlich von Replikationsenzymen (DNA-Polymerasen δ und ϵ , Lig I) katalysiert wird. Gleichzeitig wurde aber auch eine Rolle von Pol β bei „long patch BER“ beschrieben (Dianov et al., 1999b; Klungland und Lindahl, 1997). Die Fähigkeit von Pol β zur SDDS war damals bereits bekannt (Nowak et al., 1987). Darüber hinaus zeigt die funktionelle Interaktion von Pol β mit FEN 1, dass Pol β an „long patch BER“ beteiligt ist. Während FEN 1 sonst nur im Komplex mit PCNA aktiv ist, wurde eine alternative Aktivierung von FEN 1 durch die SDDS-Aktivität von Pol β beschrieben (Kim et al., 1998). Dadurch ist FEN 1 auch im PCNA-unabhängigen BER-Mechanismus aktiv. Umgekehrt stimuliert FEN 1 die SDDS-Aktivität von Pol β (Prasad et al., 2000). Andere Studien zeigten, dass auch PARP-1 die SDDS-Aktivität von Pol β stimuliert, wobei dieser Effekt nur in Anwesenheit von FEN 1 auftritt. PARP-1 und FEN 1 interagieren dabei offenbar funktionell (Prasad et al., 2001). Untersuchungen an PARP-1-defizienten Zellen zeigten ebenfalls eine spezifische Rolle von PARP-1 bei „long patch BER“ (Dantzer et al., 2000). Auch das mutmaßliche DNA-Reparaturprotein WRN, das direkt mit PARP-1 interagiert, stimuliert die SDDS-Aktivität von Pol β (Harrigan et al., 2003). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass „long patch BER“ sowohl vom PCNA-abhängigen als auch vom XRCC1-vermittelten BER-Komplex katalysiert werden kann. Zwischen beiden Komplexen gibt es Überschneidungen. Es wurde beschrieben, dass Pol β im PCNA-abhängigen „long patch BER“ das erste Nukleotid einbauen kann (Podlutzky et al., 2001a). Außerdem interagiert Pol β direkt mit Lig I und PCNA (Kedar et al., 2002; Prasad et al., 1996). Die Bedeutung dieser Beobachtungen ist allerdings noch ungeklärt.

Das Auftreten von „long patch BER“ wird wahrscheinlich je nach Art des Reparaturkomplexes unterschiedlich reguliert. Der PCNA-abhängige BER-Komplex ist vermutlich abhängig vom Zellzyklus aktiv (Caldecott, 2001). Dieser Komplex katalysiert fast immer „long patch BER“, was auf die fehlende dRP-Lyase-Aktivität und die hohe Prozessivität der beteiligten DNA-Polymerasen zurückzuführen ist. Der XRCC1-vermittelte BER-Komplex (mit Pol β) dagegen ist immer aktiv und kann beide BER-Mechanismen

katalysieren. Daher stellt sich gerade in Bezug auf diesen BER-Komplex die Frage nach der Regulation des Wechsels zwischen „short patch BER“ und „long patch BER“.

Untersuchungen an Bakterienzellen hatten schon früh gezeigt, dass die Reparatur durch eine Alternative zu „short patch BER“ erfolgt, wenn die dRP-Reste nicht eliminiert werden können (Dianov et al., 1994). In Säugerezellen kann „long patch BER“ aktiviert werden, indem künstliche Reparatursubstrate mit oxidierten oder reduzierten AP-Stellen eingesetzt werden. Bei diesen modifizierten AP-Stellen kann der dRP-Rest nach dem Einschnitt durch APE 1 nicht von Pol β eliminiert werden (Klungland und Lindahl, 1997). Ein nicht eliminierbarer dRP-Rest aktiviert direkt die SDDS-Aktivität von Pol β (Prasad et al., 2001). *In vivo* können AP-Stellen durch ROS modifiziert werden (Evans et al., 2000). In diesem Zusammenhang zeigten Untersuchungen an menschlichen Zellextrakten, dass der Verlauf des BER-Mechanismus abhängig von der beteiligten DNA-Glykosylase ist. Der DNA-Schaden 8-Oxo-G, der von der bifunktionalen DNA-Glykosylase hOGG1 erkannt wird, wird hauptsächlich über „short patch BER“ repariert, während Schäden, die von monofunktionalen DNA-Glykosylasen erkannt werden, über beide Wege repariert werden (Fortini et al., 1999). Die Begründung ist, dass bifunktionale DNA-Glykosylasen den dRP-Rest durch ihre AP-Lyase-Aktivität entfernen, so dass die Eliminierung durch Pol β nicht mehr nötig ist.

Während diese ersten Untersuchungen sich auf die von Pol β katalysierte Reaktion konzentrierten, wurden an unserem Institut Hinweise auf den Einfluss der ATP-Konzentration und damit des Ligationsschrittes auf den BER-Mechanismus gefunden. Wie unter 1.2.2 beschrieben, wird DNA-Synthese benötigt, um ATP aus PAR zu generieren. In diesem Zusammenhang wurde die Pol β -Aktivität in menschlichen Zellen untersucht, deren DNA mit MNNG geschädigt worden war. Während der anschließenden Reparatur ist die Aktivität von Pol β in Zellen mit durch DOG erniedrigtem ATP-Gehalt deutlich höher als in Kontrollzellen mit normalem ATP-Gehalt (Petermann et al., 2003). Die erhöhte Pol β -Aktivität wurde als Wechsel von „short patch BER“ zu „long patch BER“, ausgelöst durch den zellulären ATP-Mangel, interpretiert. Dies deutete auf eine ATP-abhängige Regulation des BER-Mechanismus hin. Als Vermittler dieser Regulation kam vor allem der Lig III/XRCC1-Komplex in Frage, da Lig III ATP als Substrat verwendet und XRCC1 den BER-Mechanismus koordiniert. Interessanterweise wurde bereits beschrieben, dass Lig I im PCNA-abhängigen BER-Komplex die SDDS-Aktivität der DNA-Polymerasen δ und ϵ reguliert (Pascucci et al., 1999).

1.5 Zielsetzung

Die Beobachtungen an menschlichen Zellen mit erniedrigtem ATP-Gehalt zeigten die Möglichkeit auf, erstmals einen Mechanismus aufzuklären, bei dem die Energiesituation der Zelle die Selektion zwischen „short patch BER“ und „long patch BER“ beeinflusst.

Daher sollte der Einfluss der ATP-Konzentration auf den BER-Mechanismus untersucht werden. Es sollte festgestellt werden, inwieweit die Entscheidung zwischen „short patch BER“ und „long patch BER“ durch die Verfügbarkeit von ATP beeinflusst wird. Besonderes Augenmerk sollte dabei der SSDS-Aktivität von Pol β gelten, die charakteristisch für „long patch BER“ ist. Es sollte ermittelt werden, ob diese Aktivität von Pol β energieabhängig reguliert wird und inwieweit diese Regulation durch den BER-Komplex vermittelt wird. Dementsprechend galt es, den Einfluss von ATP auf die Aktivität von Pol β am isolierten Enzym und in Anwesenheit anderer BER-Proteine zu untersuchen. Außerdem sollte der Einfluss von ATP auf die Aktivität von PARP-1 im BER-Komplex genauer untersucht werden. Dafür waren *in vitro*-Versuche mit isolierten rekombinanten Proteinen vorgesehen. In solchen Versuchen konnte die Zusammensetzung des Reparaturkomplexes und des umgebenden Milieus nach Belieben variiert werden. Die Rekonstruktion des BER-Mechanismus, insbesondere der DNA-Synthese, mit rekombinanten humanen Proteinen war dementsprechend ein zentrales Ziel der vorliegenden Arbeit.

Dabei sollte die Bedeutung ausgewählter BER-Proteine für die Regulation zwischen „short patch BER“ und „long patch BER“ analysiert werden. Besonderes Interesse galt dabei Lig III, da dieses Enzym ATP als Substrat umsetzt, und XRCC1, da dieses Protein eine indirekte Interaktion zwischen Lig III und Pol β vermittelt. Die Bedeutung der katalytischen Aktivität von Lig III für die Regulation des BER-Mechanismus sollte aufgeklärt werden. Ferner sollte die Rolle von XRCC1 bei der Regulation von „short patch BER“ und „long patch BER“ untersucht werden. Dabei sollte vor allem festgestellt werden, inwieweit XRCC1 die Aktivitäten von Pol β und Lig III koordiniert.