

4 Diskussion

Bei der Poly (ADP-Ribosyl)ierung handelt es sich um eine posttranslationale Modifikationsreaktion, die in die Regulation zahlreicher basaler zellulärer Prozesse eingebunden ist. Die Synthese der Poly (ADP-Ribose) Polymere wird durch die mittlerweile gut charakterisierten Proteine der PARP-Superfamilie, hauptsächlich durch das zellkernlokalisierte Enzym PARP-1, katalysiert. Im Vergleich dazu ist die Funktion und Regulation des Schlüsselenzyms des Polymerabbaus die Poly (ADP-Ribose) Glycohydrolase (PARG) deutlich weniger untersucht und verstanden. Zum Beginn der Arbeit waren die grundlegenden Mechanismen des Abbaus von PAR durch die Aktivitäten der PARG, (ADP-Ribose)-Pyrophosphatasen und (ADP-Ribose)-Protein-Lyase bekannt (D'Amours *et al.*, 1999). Obwohl die PARG bis zu diesem Zeitpunkt aus zahlreichen Geweben erfolgreich gereinigt wurde, lagen widersprüchliche Befunde zum genauen Molekulargewicht und der zellulären Lokalisation des Enzyms vor (Davidovic *et al.*, 2001). Durch die Klonierung der PARG- cDNAs aus dem Rind (Lin *et al.*, 1997) und der Ratte (Shimokawa *et al.*, 1999) waren zum ersten Mal Informationen zur kompletten Primärstruktur dieses Enzyms vorhanden. Mit der Identifizierung einzelner PARG-inhibitorischer Moleküle (Tsai *et al.*, 1992, Slama *et al.*, 1995a, b) waren die Grundlagen für Experimente zur zellulären Funktion der PARG gelegt. Dennoch waren zum Beginn der Dissertation dahingehend nur wenige Daten publiziert. In den Arbeiten von Maruta *et al.* (1997) und unserer Arbeitsgruppe (Oei *et al.*, 2000) wurden erste Hinweise zur Beteiligung der PARG in Prozessen der DNA-Reparatur (BER) erbracht. Die Experimente zur Bedeutung der Poly (ADP-Ribosyl)ierung für die Regulation des Zelltodes infolge von genotoxischen Stresssituationen hatten gezeigt, dass die vermehrte Synthese von PAR die Induktion sowohl der Nekrose als auch der Apoptose fördert (Berger, 1985, Ha & Snyder, 1999). Unklarheit waren die genauen Funktionen der PARP-1 und PARG in der Regulation des Zelltodes.

Ziel war es, mit der Identifizierung von Interaktionspartnern und in daran anschließenden funktionellen Studien, das Verständnis für die Funktion der PARG im PAR-Metabolismus und der Regulation des Zelltodes infolge akuter genotoxischer Stresssituationen näher zu untersuchen. Im Zuge der Arbeit wurde dabei erstmalig eine direkte Wechselwirkung zwischen PARP-1 und der PARG nachgewiesen. Die funktionellen Studien zeigen, dass PARG in der Lage ist die katalytische Aktivität der PARP-1 in humanen Kernextrakten direkt zu beeinflussen. Desweiteren wurde das DNA-Reparaturprotein XRCC1 als direkter Interaktionspartner der PARG identifiziert. Unter Verwendung von XRCC1-defizienten (EM9-V) und XRCC1-überexprimierenden Hamsterzellen (EM9-XH), wurde für dieses Protein hier erstmals eine Funktion in der Regulation des Poly (ADP-Ribose) Metabolismus und folgend in der Kontrolle des AIF-vermittelten, caspase-unabhängigen Zelltodes gezeigt.

4.1 Strategien zur rekombinanten Expression und Immobilisierung von PARG₁₁₀ in *E. coli*

Obwohl seit der Entdeckung der PARG 35 Jahre vergangen sind (Miwa *et al.*, 1971), ist die Handhabung dieses Proteins für biochemische Studien aufgrund der geringen zellulären Menge (Davidovic *et al.*, 2001) und der extrem hohen Anfälligkeit gegenüber Proteasen (Bonicalzi *et al.*, 2005) äusserst schwierig. Mit der Klonierung der PARG- cDNAs aus dem Rind (Lin *et al.*, 1997) und der Ratte (Shimikowa *et al.*, 1999) wurden alternative heterologe Expressionssysteme für dieses Enzym entwickelt. Während sich die rekombinante Expression und Reinigung der PARG der Ratte als Histidinfusionsprotein in *E. coli* als unproblematisch erwies (Shimikowa *et al.*, 1999, Kim *et al.*, 2004), ergaben sich grössere Probleme für die Reinigung der jeweiligen Proteine aus dem Rind (Lin *et al.*, 1997, Ame *et al.*, 1999) und *C. elegans* (Desnoyers *et al.*, 2005). Eine Überexpression der vollständigen Rinder-PARG (PARG₁₁₀) war als unfusioniertes Protein in eukaryotischen Zellen (COS7) (Winstall *et al.*, 1999) bzw. als Polyhistidinfusionsprotein in *E. coli* (Lin *et al.*, 1997) möglich. In anschliessenden Reinigungen wurden jedoch keine akzeptablen Ausbeuten erzielt (Ame *et al.*, 1999). Nur die katalytische Domäne der Rinder-PARG (AS 380-977) konnte als rekombinantes Polyhistidinfusionsprotein erfolgreich durch Chromatographie an Ni-NTA-Sepharose gereinigt werden (Ame *et al.*, 1999).

Die Klonierung der cDNA der humanen PARG erfolgte zeitgleich aus mRNA von HeLa Zellen (Keil *et al.*, 2004, siehe Abb. 3.1 und Abb. 10.1) der kanzerogenen Myelozytenvorläuferzelllinie HL-60 (Uchiumi *et al.*, 2004) sowie von CF3-Hautfibroblasten (Meyer *et al.*, 2003). Eine Expression der humanen PARG wurde bisher nur unter Verwendung eines *in vitro* Transkriptions-/Translationssystems bzw. rekombinant in HEK293-Zellen (Meyer *et al.*, 2003, Meyer-Ficca *et al.*, 2004) gezeigt. Da zumindest die Expression aller bisher klonierten PARG- cDNAs in *E. coli* erfolgreich verlief, wurde dieser Organismus auch in der vorliegenden Arbeit als Wirt zur Etablierung eines rekombinanten Expressions- und Reinigungssystems der aus HeLa mRNA klonierten PARG gewählt. In den ersten Experimenten wurde die Expression der PARG mit N-terminaler Hexahistidinfusion unter Verwendung des Vektorsystems pQE31 untersucht. Unproblematisch erwies sich dabei die heterologe Anreicherung der katalytischen PARG-Domäne (His-PARG₆₅) in *E. coli* M15 (siehe Abb. 3.8, vgl. Ame *et al.*, 1999). Versuche zur Expression des Gesamtproteins (His-PARG₁₁₀) scheiterten in den Stämmen *E. coli* NM522, M15 und JM 109 (siehe Tab. 3.1). Eine Analyse der Nukleinsäuresequenz des aus HeLa cDNA klonierten PARG-Gens ergab, dass die Kodierung der Aminosäuren Arginin, Isoleuzine und Leuzin innerhalb der cDNA der regulatorischen Domäne der PARG über die von *E. coli* selten genutzten Codons AGG/AGA (Arginin), AUA (Isoleuzin) und CUA (Leuzin) erfolgt. Als Alternative bot sich die Koexpression der seltenen tRNAs zusammen mit dem Zielprotein (Rosenberg *et al.*, 1993) an. Unter Verwendung des Stammes *E. coli* BL21 Codon⁺ RIL, in welchem eine konstitutive Expression der

tRNA Gene *argU ileY* und *leuW* erfolgt (Verweis in Makrides, 1996), war es hier erstmals möglich, die komplette humane PARG rekombinant zu exprimieren. Es zeigte sich allerdings, dass die Überexpression der PARG₁₁₀ in *E. coli* Codon⁺ RIL zu einer Aggregation in Form von *inclusion bodies* führte (siehe Tab. 3.1 und Abb. 3.3). Von Makrides (1996) wurde berichtet, dass durch eine verringerte Gesamtexpression der Anteil löslich exprimierten Proteins deutlich erhöht werden kann. Dies ist einerseits durch ein Absenken der Expressionstemperatur (Schein 1991, Strandberg & Enfors 1991), aber auch durch die Zugabe von osmolytischen Substanzen (Blackwell *et al.*, 1991, Makrides, 1996) möglich. Bei der Expression der His-PARG₁₁₀ in *E. coli* Codon⁺ RIL wurde hier durch keine der beiden Methoden eine Erhöhung des Anteils löslich exprimierten Proteins erreicht (siehe Tab. 3.1). Es ist zudem bekannt, dass die Proteinexpression über die Regulation der Transkriptionsinitiation (Promotorstärke) kontrolliert werden kann. Der zunächst eingesetzte Vektor pQE31 gehört zur Familie der pDS-Plasmide und verfügt über ein Promotor-Operator-Element, bestehend aus dem Promotor des Phagen T5 und zwei *lac*-Operator Sequenzen, die in Abwesenheit des Induktors eine effiziente Bindung des Transkriptionsrepressors LacI ermöglichen (Bujard *et al.*, 1987). Die Zugabe von IPTG führt zum Ablösen des Repressors und damit zur Induktion der Transkription durch die *E. coli* RNA-Polymerase II. Experimente von Austin *et al.* (2004) und Weickert *et al.* (1996) zeigen, dass bei einer Koexpression des Transkriptionsrepressors LacI mit dem Zielprotein oder durch eine Verringerung der Induktorkonzentration IPTG (< 1 mM), die Menge an löslich exprimiertem Protein deutlich erhöht werden kann. Erfolgte die Expression von His-PARG₁₁₀ in *E. coli* BL21 Codon⁺ (pREP4) (die Gegenwart des Plasmides pREP4 erlaubt die Koexpression des Repressors LacI), zusammen mit der Zugabe von Betain/ Sorbitol, konnte tatsächlich die Menge löslich exprimierten Proteins auf 40 % erhöht werden (siehe Tab. 3.1). Die anschließende Reinigung des Proteins durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie führte nur zu sehr geringen Ausbeuten. Um die Bindungsprobleme bei der Chromatographie an Ni-NTA-Sepharose zu umgehen, bot sich als Alternative die Expression und Reinigung als Streptag-Fusionsprotein an. StreptagII ist ein Oktapeptid (WSHPQFEK), dessen Affinität zu Streptaktin vergleichsweise höher ist als der Penta-Histidin-tag an die Ni-NTA-Sepharose (Voss & Skerra, 1997). Versuche, die PARG₁₁₀ als lösliches Protein mit N-terminaler Streptag-Fusion in *E. coli* BL21 Codon⁺ zu exprimieren, verliefen jedoch trotz Variationen der Temperatur oder der Zusammensetzung des Expressionsmediums (Zugabe von Osmolytika) nicht erfolgreich. In dem eingesetzten Vektor pASK7 erfolgt die Initiation der Transkription durch ein *tetA*-Promotor-Operator-Element (Skerra, 1994). Dieses beinhaltet keinerlei Operatorelemente, die eine Regulation durch die Transkriptionsrepressoren LacI oder CRP (cAMP Rezeptor Protein, Katabolitrepession) erlauben. Daher wurde auch im Falle einer Koexpression von LacI und Strep-PARG₁₁₀ in *E. coli* BL21 Codon⁺ (pREP4) keine Erhöhung des Anteils löslich exprimierten Proteins erreicht (siehe Tab. 3.1). Als Alternative zur konventionellen Reinigung von Streptag-Proteinen wurde eine Isolation von *inclusion bodies* aus Expressionskulturen von *E. coli* BL21 Codon⁺ pASK7-PARG₁₁₀ vorgenommen und diese dann schrittweise renaturiert. Unter diesen Bedingungen wurde im Zuge der Rückfaltung eine

unspezifische Proteolyse von Strep-PARG₁₁₀ beobachtet, die nachfolgend keine Reinigung an Streptaktin-Sepharose erlaubte.

Da eine Reinigung der PARG₁₁₀ unter Verwendung konventioneller Affinitätschromatographien nicht möglich war, wurde alternativ die Verwendung einer PARG-spezifischen Affinitätsmatrix in Erwägung gezogen. In der Literatur sind Sepharosen mit kovalent gekoppelter PAR (Thomassin *et al.*, 1990, Panzeter *et al.*, 1992) oder dem PARG-Inhibitor ADP-HPD (siehe Tab. 4.1, Slama *et al.*, 1995 a, b) bekannt, die erfolgreich im Zuge der Reinigung von endogener PARG aus der Ratte (Shimikowa *et al.*, 1999) bzw. rekombinanter boviner GST-PARG₆₅ (Koh *et al.*, 1997) eingesetzt wurden. Unter dem Gesichtspunkt einer späteren Nutzung des Affinitätssepharose-PARG₁₁₀-Komplexes zur Identifikation von PARG Interaktionspartnern aus humanen Kernextrakten, erschien die Verwendung dieser beiden Matrices nicht sinnvoll. ADP-HPD enthält innerhalb des Moleküls eine verknüpfende Pyrophosphateinheit, die durch endogene Phosphodiesterasen zu ADP und Hydroxymethyl-Pyrroldindiol (HDP) gespalten wird (siehe Abb. 1.8). Beide Moleküle sind einzeln nicht in der Lage, die PARG zu hemmen (Slama *et al.*, 1995a). Eine mögliche Spaltung von ADP-HPD im Verlauf von Interaktionsexperimenten hätte den Verlust des Affinitätssepharose-PARG₁₁₀-Komplexes zur Folge. Die Verwendung der PAR-Sepharose zur Immobilisierung der His-PARG₁₁₀ erschien aus den gleichen Gründen nicht sinnvoll. Zudem wurde für einige nukleäre Proteine, die eine zentrale Funktion im BER-Komplex (XRCC1, Polymerase β , Ligase III), in der Regulation des Zellzyklus (p53, p21) (Pleschke *et al.*, 2000, Malanga *et al.*, 2005) bzw. in der Prozessierung von RNA's (Gagné *et al.*, 2003) spielen, eine erhöhte Affinität zu freien PAR-Polymeren nachgewiesen. Diese könnten bevorzugt und PARG-unabhängig an die PAR-Sepharose binden.

Als Alternative wurde in der hier vorliegenden Arbeit eine Affinitätsmatrix auf der Basis von kovalent an Sepharose gekoppelten PARG-Inhibitoren, den Gallotanninen, etabliert (siehe Abb. 3.10). Die zuvor mit HeLa S3- Kernextrakten und dem rekombinanten His-PARG₆₅ durchgeführten Experimente hatten eine Hemmung der humanen PARG durch Gallotannine gezeigt (siehe Abb. 3.6 und Abb. 3.9). Sowohl für die katalytische Domäne als auch die komplette PARG konnte anschliessend auch eine Bindung an die Tannin-Sepharose nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.11 und Abb. 3.12). Eine Elution der Proteine erfolgte weder durch Zugabe von 1 M NaCl noch durch PAR-Analoga. Hingegen wurde durch die Zugabe von 0,05 % (w/v) N- P40 der inhibitorische Effekt der Gallotannine auf His-PARG₆₅ und His-PARG₁₁₀ aufgehoben (siehe Abb. 3.11). Dieses Ergebnis zeigte, dass die Immobilisierung des Proteins an die Tannin-Matrix nicht in einer irreversiblen Hemmung des Enzyms resultierte.

Mit der Etablierung eines optimierten Expressionsprotokolls war es im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit erstmals überhaupt möglich, die vollständige humane PARG (PARG₁₁₀) als Polyhistidininfusionsprotein in grösseren Mengen (40 %) als cytoplasmatisches, lösliches Protein in *E. coli* heterolog zu exprimieren. Mit der Generierung der Tannin-Sepharose und der anschliessenden Immobilisierung der PARG wurde zudem der Grundstein für weitere Experimente zur erstmaligen Identifikation von Interaktionspartnern dieses Proteins gelegt.

4.2 Regulation des PAR-Metabolismus durch PARG-Inhibitoren

4.2.1 Funktionalität publizierter PARG-Inhibitoren

Die bisher publizierten Studien zur Hemmung der PARG wurden mit den gereinigten Enzymen aus unterschiedlichen Spezies durchgeführt (siehe Tab. 4.1). In der hier vorliegenden Arbeit wurden das synthetische Molekül GPI 16552 sowie die zur Klasse der Tannine zugehörigen Moleküle (-) EGCG und Gallotannine (siehe Tab. 4.1) hinsichtlich ihrer inhibitorischen Funktion für die endogene HeLa S3-PARG bzw. die rekombinant exprimierte katalytische Domäne der HeLa-PARG (His-PARG₆₅) untersucht. Von Lu *et al.* (2003) und Tentori *et al.* (2005) wurde eine Hemmung der Ratten-PARG bzw. dem endogenen Enzym aus der murinen Melanomzelllinie B16 durch GPI 16552 gezeigt. Innerhalb dieser Arbeit konnte eine Hemmung der endogenen PARG in HeLa S3-Kernextrakten durch Zugabe von GPI 16552 nicht festgestellt werden (siehe Abb. 3.4). Eine beobachtete Abnahme der Aktivität von rekombinantem His-PARG₆₅ durch Zugabe von GPI 16552 konnte auf den Effekt des Lösungsmittels DMSO zurückgeführt werden (siehe Abb. 3.9). Entsprechende Kontrollen wurden in den von Lu *et al.* (2003) und Tentori *et al.* (2005) veröffentlichten Experimenten nicht durchgeführt. Die Möglichkeit, dass es sich bei GPI 16552 um einen zelltypspezifischen PARG-Inhibitor handelt, kann dadurch jedoch nicht ausgeschlossen werden. Hingegen wurde in der vorliegenden Arbeit eine Hemmung sowohl der endogenen PARG in HeLa S3-Kernextrakten als auch der rekombinanten katalytischen Domäne durch Gallotannine und (-) EGCG beobachtet (siehe Abb. 3.4, Abb. 3.6 und Abb. 3.9). Während die Zugabe von 5 µM Gallotanninen in einer nahezu vollständigen Inhibierung von His-PARG₆₅ resultierte, wurde in Anwesenheit von 40 µM (-) EGCG nur eine 50 %ige Hemmung des Enzyms gemessen (siehe Abb. 3.9). Von Tsai *et al.* (1992) erfolgte im Vergleich zu Gallotanninen auch eine deutlich geringere Hemmung der murinen PARG durch (-) EGCG (vgl. IC₅₀-Werte Tab. 4.1). Anhand der von Aoki *et al.* (1993) durchgeführten Struktur-Aktivitätsstudien wurde postuliert, dass der Grundeffekt der kompetitiven Inhibierung der PARG durch Gallotannine auf einer Konkurrenz von Tanninsäuremolekülen und PAR-Ketten um die Bindung im aktiven Zentrum basiert. Durch eine Verknüpfung der Gallotanninsäuremoleküle mit Glukose (Gallotannine) kann der Effekt der Inhibierung aufgrund der stärkeren Ähnlichkeit zu PAR-Polymeren verstärkt werden. Unterstützend dazu wurde tatsächlich ein noch stärkerer inhibitorischer Effekt von höhermolekularen verknüpften Gallotanninen (Ellagitannine) beobachtet (Tsai *et al.*, 1992, vgl. Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Übersicht zu publizierten Inhibitoren der PARG

Komponente		Inhib. Stärke^a	Inhibierungs- typ	Organismus	Referenz^b
DNA-Interkalatoren	Proflavin	K _i 36 µM	n.u.	Schwein	1
	Tilorone R10,556 DA	K _i 7,3 µM	n.u.	Schwein	1
	Daunomyzin	n.u.	n.u.	Schwein	1
	Elliptizin	n.u.	n.u.	Schwein	1
Tannine	a) Gallotannine				
	Trigalloyl-Glukose	IC ₅₀ 33 µM	kompetitiv/ nichtkompetitiv	Maus Mensch	2, 3 4
	Tetragalloyl-Glukose	IC ₅₀ 25 µM	kompetitiv/ nichtkompetitiv	Maus	3
	Pentagalloyl-Glukose	IC ₅₀ 18 µM	kompetitiv	Maus	3
	b) Ellagitannine				
	Nobotannin B	IC ₅₀ 5 µM	kompetitiv	Maus	3
	Nobotannin E	IC ₅₀ 1,5 µM	kompetitiv	Maus	3
	Oenothain B	IC ₅₀ 3,8 µM	kompetitiv	Maus Mensch	3, 5 6, 7
	(-) EGCG	IC ₅₀ >100 µM	n.u.	Maus	3
Antibiotika	PD124,966	IC ₅₀ 40 µg/ml	n.u.	Ratte	8
	Pargamizin	IC ₅₀ 28 µg/ml	n.u.	Ratte	8
Adenosin-Derivate	ADP-HPD	IC ₅₀ 0,12 µM	nichtkompetitiv	Rind	9, 10
	ADP-Ribose	IC ₅₀ 0,12 mM	n.u.	Rind	9
	cAMP	n.u.	n.u.	Schwein	11
Polymethoxyphenole	Lignin	K _i 18 mg/ml	kompetitiv	Meerschwein	12 13
Tiloron-Familie	GPI 16552	IC ₅₀ 1,7 µM	n.u.	Ratte	14
	GPI 18214	IC ₅₀ 4,2 µM	n.u.	Ratte	15

a) Der gemessene Inhibierungstyp bezieht sich auf eine Hemmung hinsichtlich des Substrates PAR.

b) 1-Tavassoli *et al.* (1985), 2-Tsai *et al.* (1991), 3- Tsai *et al.* (1992), 4-Tanuma *et al.* (1989a), 5-Uchiumi *et al.* (1996), 6-Aoki *et al.* (1995), 7-Maruta *et al.* (1997), 8-Masutani *et al.* (2002), 9-Slama *et al.* (1995a), 10-Slama *et al.* (1995b), 11-Tavassoli *et al.* (1983), 12-Tanuma *et al.* (1989b), 13- Tanuma *et al.* (1990), 14-Lu *et al.* (2003), 15-Genovese *et al.* (2004)

n.u.-nicht untersucht

Unabhängig von einer möglichen Hemmung von Enzymen ist das generelle Phänomen der Komplexierung der Tannine mit Proteinen bekannt und gut beschrieben (Haslam, 1996, Smith *et al.*, 2005). Prinzipiell beruht es auf zwei Effekten. Zum einen erfolgen hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den phenolischen Strukturen innerhalb des Tanninmoleküls und aromatischen Aminosäuren auf der Oberfläche des jeweiligen Proteins (Haslam, 1996, Hagermann & Klucher *et al.*, 1986, Bennick

2002). Zum anderen sind Wasserstoffbrückenbindungen, formiert zwischen den phenolischen Hydroxylgruppen der Tannine und der Carbonylgruppe von Prolinmolekülen, für die Komplexierung von Proteinen durch Gallotannine von Bedeutung (Hagermann & Klucher, 1986, Haslam 1996, Bennick 2002). Hinsichtlich der Aminosäureverteilung innerhalb der PARG zeigten sich keine auffälligen Anhäufungen der Aminosäure Prolin bzw. hydrophoben oder aromatischen Aminosäuren (Analyse mit dem Programm „Protparam“, www.expasy.org/tools/protparam.html), die auf eine generelle Komplexierung der Tannine hinweisen würden.

Die höchsten Affinitäten von Gallotanninen wurden zu den im tierischen und menschlichen Schleim vorkommenden *proline-rich proteins* (PRPs) beobachtet (Haslam, 1996, Bennick 2002). Charakteristisches Merkmal dieser Proteine ist das vermehrte Vorkommen (bis zu 88 %) der Aminosäuren Prolin, Glyzin und Glutamin. Die zur Unterfamilie der basischen und glykosylierten PRP's zugehörigen Proteine PRB 1-4 enthalten zentral bis zu 10 repetitive Aminosäureabfolgen (siehe Abb. 4.1), für die experimentell die Gallotanninbindung nachgewiesen wurde (Bennick, 2002). Aus spektroskopischen Studien geht hervor, dass die Bindung zwischen einem solchen repetitiven Peptid und den Gallotanninen hauptsächlich über die Prolinmoleküle und die unmittelbar N- und C-terminal verknüpften Aminosäuren erfolgt (Bennick, 2002). Vergleicht man das anhand der Homologien aller bekannten humanen basischen PRPs abgeleitete Gallotanninbindemotiv (Bennick, 2002) mit der Sequenz der humanen PARG, so finden sich im N-Terminus des Enzyms 2 Abschnitte mit grosser Ähnlichkeit (AS 50-70 und 283-303 siehe Abb. 4.1). Falls tatsächlich eine Interaktion der Gallotannine mit der PARG innerhalb dieses Abschnittes erfolgt, könnte dies eine Erklärung für den durch Tsai *et al.* (1991 und 1992) sowie Aoki *et al.* (1993) beobachteten nichtkompetitiven inhibitorischen Effekt dieser Polyphenole sein.

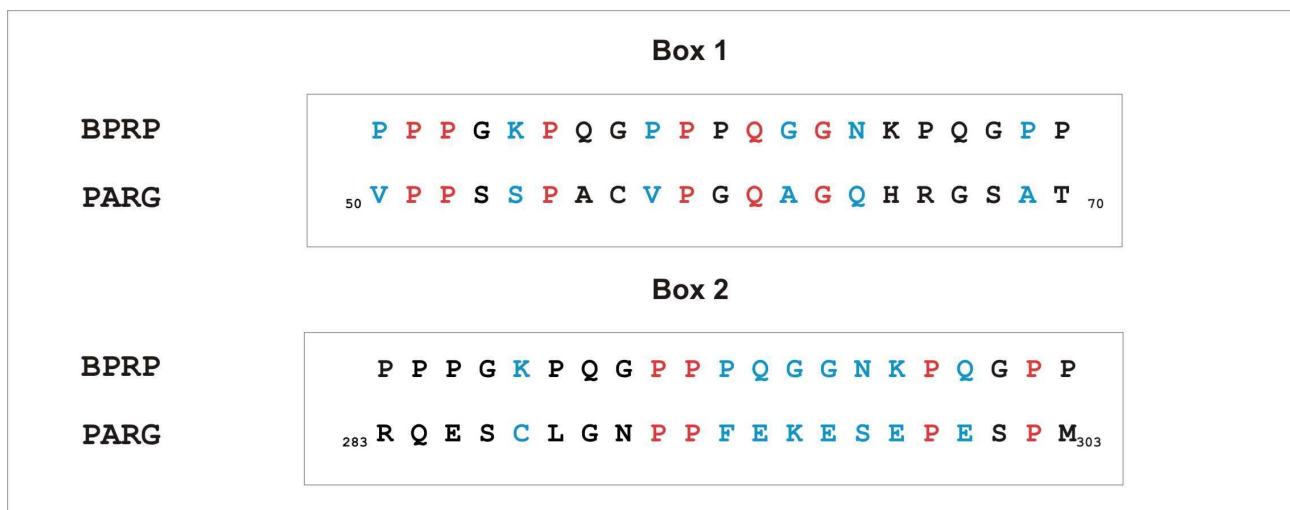


Abb. 4.1: Vergleich des Tanninbindemotivs von basischen PRPs mit ausgewählten Sequenzabschnitten der PARG.

Das aus dem Vergleich aller bekannten humanen basischen PRPs (BPRP) abgeleitete Konsensusmotiv für die Bindung von Gallotanninen (entnommen aus Bennick 2002) wurde mit ausgewählten Sequenzabschnitten der PARG unter Zuhilfenahme des Programmes „LALIGN“ (www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html) verglichen. Identische Aminosäuren wurden rot, ähnliche Aminosäuren blau hervorgehoben.

In voneinander unabhängigen Studien wurde nachgewiesen, dass Gallotannine neben der PARG *in vitro* die Aktivität anderer extrazellulärer und intrazellulärer Enzyme beeinflussen können (siehe Tab. 4.2). Hinsichtlich des NAD⁺-Metabolismus zeigte sich, dass alle drei Isoformen des Enzyms NMNAT (ATP:Nikotinamid-Nukleotid Adenyltransferase) direkt durch Gallotannine inhibiert werden (Berger *et al.*, 2004 und 2005, siehe Tab. 4.2). Die NMNAT katalysiert im terminalen Schritt der NAD⁺-Synthese die Übertragung einer Adenyl-Einheit von ATP auf die Mononukleotide NMN (Nikotinamid-Mononukleotid) und NAMN (Nikotinsäure-Mononukleotid), wobei Pyrophosphat freigesetzt wird.

Tab. 4.2: Übersicht zu Proteinen die durch Gallotannine gehemmt werden^a

Protein	Inhibierungstyp	IC ₅₀	Verweis
Rezeptoren			
Insulin-Rezeptor	n. u.	n. u.	Li <i>et al.</i> , 2005
Stoffwechsellenzyme			
α-Amylase	kompetitiv/ nichtkompetitiv	n. u.	Kandra <i>et al.</i> , 2004
Aldose-Reduktase	kompetitiv/ nichtkompetitiv	70 nM	Sawada <i>et al.</i> , 1989
Alkalische Phosphatase	n. u.	n. u.	Tebib <i>et al.</i> , 1994/95
NADH-Dehydrogenase	kompetitiv/ nichtkompetitiv	20 μM	Adachi <i>et al.</i> , 1989
Na ⁺ , K ⁺ -ATPase	kompetitiv/ nichtkompetitiv	2,5 μM	Murakami <i>et al.</i> , 1992 Sato <i>et al.</i> , 1997
NAD⁺-Metabolismus			
NMNAT 1	n. u.	10 μM	Berger <i>et al.</i> , 2005
NMNAT 2	n. u.	55 μM	Berger <i>et al.</i> , 2005
NMNAT 3	n. u.	2 μM	Berger <i>et al.</i> , 2005
Cholera-Toxin	n. u.	n. u.	Morinaga <i>et al.</i> , 2005
PARG	kompetitiv/ nichtkompetitiv	18-33 μM	siehe Tab. 4.1
Kinasen			
cAMP-abh. Kinase	n. u.	200 nM	Wang <i>et al.</i> , 1996
PKC	n. u.	700 nM	Wang <i>et al.</i> , 1996
MLCK	n. u.	24 μM	Wang <i>et al.</i> , 1996
DNA-Reparatur			
DNA-Ligase I	n. u.	216 μM	Tan <i>et al.</i> , 1996
DNA-Topoisomerase II	n. u.	n. u.	Kashiwada <i>et al.</i> , 1993

a) Innerhalb der Übersicht wurden nur Proteine berücksichtigt, bei denen die Hemmung im zellfreien System beobachtet wurde. n.u.-nicht untersucht

Je nach Mononukleotid entstehen bei dieser Reaktion NAD^+ oder NAAD^+ (Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotid). Letzteres kann in einer weiteren Aminierungsreaktion (NAD^+ -Synthetase) ebenfalls zu NAD^+ umgesetzt werden. Die Tatsache, dass Gallotannine nicht nur den Abbau von PAR sondern durch die Hemmung der NMNAT's auch die Synthese des Substrates der Poly (ADP-Ribosyl)ierung NAD^+ beeinflussen, macht ihren Einsatz als spezifischen PARG-Inhibitor äusserst fraglich.

4.2.2 Bedeutung der Gallotannine für die Regulation des zellulären PAR-Metabolismus

In einer Kooperation mit den Arbeitsgruppe von Prof. Leist (H. Lundbeck, Dänemark) und Prof. Bürkle (Universität Konstanz, Deutschland) wurden hier Gallotannine hinsichtlich ihrer Eignung zur Inhibierung der endogenen PARG von humanen Krebszellen (HeLa S3) im Zellkultursystem untersucht. Modellhaft wurde dabei der PAR-Metabolismus in diesen Zellen nach oxidativem Stress (H_2O_2) oder in Gegenwart von alkylierenden Agenzien (MNNG) verfolgt.

Nach Zugabe von 1 mM H_2O_2 wurde in Abwesenheit eines Inhibitors eine massive Synthese von PAR in den Zellen beobachtet. In Gegenwart eines wirkungsvollen PARG-Inhibitors hätte man entweder eine deutlich stärkere Akkumulation von PAR oder aber wenigstens die Verzögerung des PAR-Abbaus erwartet. Keiner der beiden Effekte, sondern vielmehr eine deutliche verringerte PAR-Synthese wurde bei oxidativer Schädigung von HeLa-Zellen beobachtet (siehe 3.2.3, Falsig *et al.*, 2004). Durch Bakondi *et al.* (2004) wurde dieses Resultat auch für oxidativ gestressten HaCat-Zellen (Keratinozyten) gezeigt. Die verminderte PAR-Synthese konnte sowohl innerhalb der Studie von Bakondi *et al.* (2004) als auch in den Experimenten von Falsig *et al.* (2004) auf die antioxidativen Eigenschaften der Gallotannine zurückgeführt werden. Die im Gallotanninmolekül vorhandenen phenolischen OH-Gruppen (Tri-O-Galloyl- bis Penta-O-Galloyl-Glukose) können unter Verbrauch von bis zu 25 Molekülen H_2O_2 pro Gallotanninmolekül oxidiert werden (Mitic *et al.*, 2003). Dies führt enzymunabhängig, extrazellulär zum Abbau dieses Peroxids. In zahlreichen weiteren Studien wurden ebenfalls die antioxidativen Eigenschaften von unkonjugierten Gallotanninsäuremolekülen (Gallotanninsäure, (-) EGC, (-) EGCG) oder Glukose-konjugierten Gallotanninsäuremolekülen (Gallotannine, Ellagitannine) nachgewiesen (Nakagawa & Yokozawa., 2002, Labieniec *et al.*, 2003, Wu *et al.*, 2004). Es zeigte sich, dass Gallotannine mit Zellmembranen verstärkt in der polaren Zone der Zellmembran über direkte Wechselwirkungen mit den polaren Kopfgruppen der Phospholipide interagieren (Simon *et al.*, 1994, Huh *et al.*, 1996, Smith *et al.*, 2005). Zelltypabhängig resultierte diese Interaktion in einer Erhöhung (Labieniec & Gabryelak., 2003, Vertstraeten *et al.*, 2004) bzw. Erniedrigung (Tsuchiya 1999, Simon *et al.*, 1994) der Membranfluidität. In Versuchen an rekonstituierten Liposomen sowie mit humanen Zellen (Jurkat, Cacao-2) wurde gezeigt, dass eine direkte Aufnahme der Gallotannine nicht erfolgt (Nunez-Duran 1980, Falsig *et al.*, 2004, Smith *et al.*, 2005). Die von Erdelyi *et al.* (2005) publizierten

Ergebnisse weisen zudem auch darauf hin, dass die protektive Wirkung der Gallotannine im H_2O_2 -Modell lediglich auf die extrazellulär vermittelten antioxidativen Eigenschaften zurückzuführen sind.

In dem zweiten Modellsystem, der MNNG-induzierten PAR-Synthese, wurde in Anwesenheit von Gallotanninen in HeLa S3-Zellen ebenfalls nicht die erwartete vermehrte Akkumulation von PAR oder eine verzögerte PAR-Degradierung beobachtet (siehe Abb. 3.7). Im Gegensatz dazu wurde von Ying *et al.* (2000 und 2001) berichtet, dass unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen bei einer Schädigung von murinen Astrozyten mit 100 μM MNNG eine vermehrte PAR-Synthese in Anwesenheit von 100 μM Gallotanninen erfolgte. Die Quantifizierung des zellulären NAD^+ -Gehaltes nach der Schädigung in Anwesenheit der Polyphenole zeigte, dass diese Akkumulation von PAR nicht auf eine Aktivierung der PARP-1 zurückzuführen war (Ying *et al.*, 2001). Obwohl die bisherigen Untersuchungen eine direkte Aufnahme der Gallotanninen in die Zelle nicht belegen, wurden dahingehende Experimente weder für HeLa-Zellen noch für die murinen Astrozyten durchgeführt. Ein Unterschied zwischen den beiden Zelllinien ist jedoch aufgrund der verschiedenen Zusammensetzung der Zellmembranen von Astrozyten und HeLa S3-Zellen (Geyer *et al.*, 1962, Norton *et al.*, 1971) möglich. Die extrazelluläre Inaktivierung der Gallotannine durch MNNG kann anhand der Ergebnisse von Jain *et al.* (1989) ausgeschlossen werden.

Die kontroversen und offensichtlich zelltypabhängigen Effekte von Gallotanninen macht ihre Verwendung in zellulären Experimenten fraglich. Eine komplette genetische Inaktivierung der PARG in *Drosophila melanogaster* und der Maus resultierten im Zelltod, hervorgerufen durch eine vermehrte Akkumulation von PAR (Hainai *et al.*, 2004, Koh *et al.*, 2005). Die dauerhafte 85 %ige Depletion des Enzyms mittels RNAi hatte selbst nach MNNG-Behandlung keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen (Blenn *et al.*, 2006). Für eine zelluläre Akkumulation von PAR müsste ein wirkungsvoller, membranpermeabler PARG-Inhibitor demnach in der Lage sein, die Aktivität des endogenen Enzyms zu mehr als 85% zu hemmen (Jonsson *et al.*, 1988, Cuzzocrea & Wang, 2005, Hong *et al.*, 2004). Keiner der derzeit bekannten PARG-Inhibitoren (siehe Tab. 4.1) erfüllt diese Anforderungen (Bonicalzi *et al.*, 2005), sodass zelluläre Experimente zur Funktion der katalytischen Aktivität der PARG zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich sind.

4.3 PARP-1 und XRCC1: Interaktionspartner der PARG

Alle Modelle zur Bedeutung der Poly (ADP-Ribosyl)ierung in zellulären Prozessen beruhen auf dem Prinzip des gerichteten Zusammenspiels der enzymatischen Aktivitäten von PARP-1 und PARG, um den Gehalt an PAR streng zu kontrollieren (D'Ámours, 1999). Kommt es zu einer Störung dieses Gleichgewichts, hat dies extreme Konsequenzen für die Zelle. Sowohl die synchrone genetische Deletion der beiden hauptverantwortlichen PAR-synthetisierenden Enzyme PARP-1 und PARP-2 (Menissier de Murcia *et al.* 2003), als auch die Eliminierung der PARG (Koh *et al.*, 2005) führen in

Mäusen zum Abbruch der Embryonalentwicklung in frühen Stadien. Erstmals konnte innerhalb dieser Arbeit gezeigt werden, dass neben dem gerichteten Zusammenspiel der Enzymaktivitäten eine direkte Interaktion zwischen PARP-1 und PARG unabhängig von den Substraten NAD⁺ und PAR besteht (Keil *et al.*, 2004, siehe Abb. 3.12, Abb. 3.14 und Abb. 3.16). Diese Interaktion wurde zu einem späteren Zeitpunkt in den Experimenten von Gagné *et al.* (2005) bestätigt. Die Interaktion der beiden Proteine erfolgt über die katalytische Domäne der PARG. Hinsichtlich von PARP-1 wurde die Wechselwirkung auf die Automodifikationsdomäne (AMD) eingegrenzt (siehe Abb. 4.2). Innerhalb der AMD befindet sich eine BRCT I- Domäne, über welche vornehmlich die Interaktion von PARP-1 mit anderen zellulären Proteinen wie Histonen (Buki *et al.*, 1995, Griesenbeck *et al.*, 1997), Transkriptionsfaktoren (YY1 (Oei *et al.*, 1997), p53 (Wesierska-Gadek *et al.*, 2003), E2F-1 (Simbulan-Rosenthal *et al.*, 2003)) bzw. Proteinen der DNA-Reparatur wie PARP-2 und DNA-Ligase III (Schreiber *et al.*, 2002) sowie XRCC1 (Caldecott *et al.*, 1996, Masson *et al.*, 1998, Dantzer *et al.*, 2002) erfolgt. Durch die Wechselwirkung von PARP-1 mit den genannten Proteinen werden zelluläre Mechanismen wie die Organisation des Chromatins, die Transkription und DNA-Reparatur kontrolliert (Schreiber *et al.* 2006).

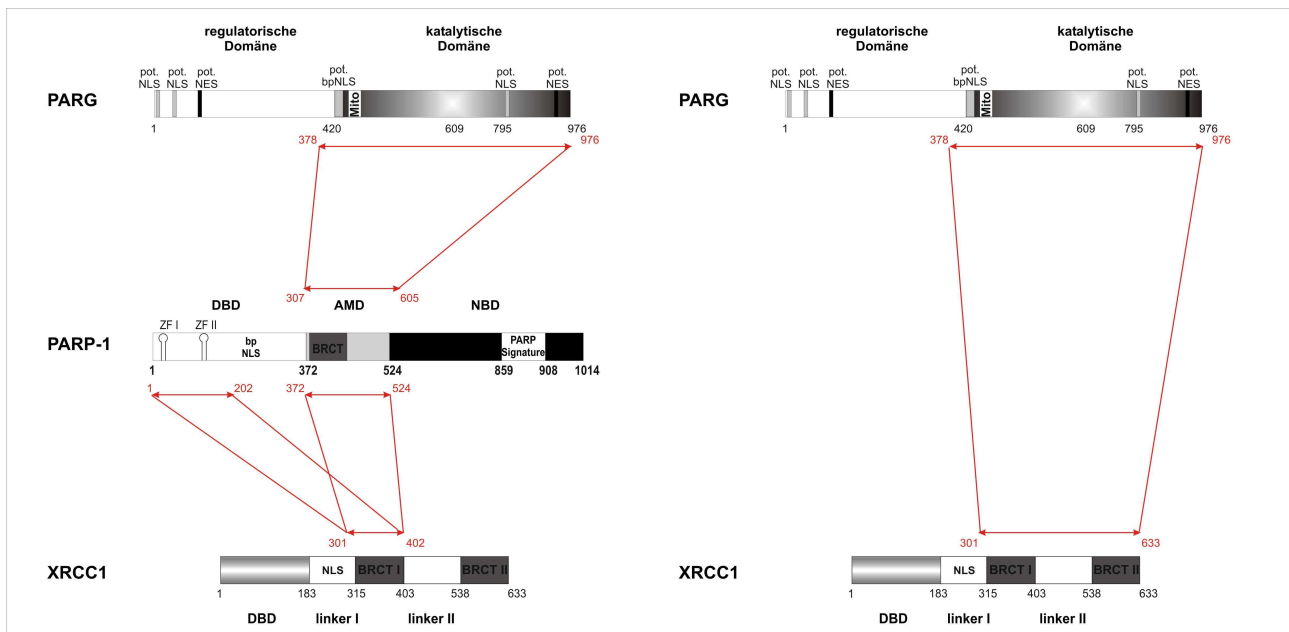


Abb. 4.2: Modell der Interaktion von PARG mit PARP-1 und XRCC1

Schematisch sind die drei interagierenden Proteine, inklusive der derzeit bekannten relevanten strukturellen und funktionellen Merkmale dargestellt. Der Bereich der hinsichtlich der Interaktion eingegrenzt werden konnte wurde mit roten Linien dargestellt. Die Daten für die Interaktion von PARP-1 und XRCC1 wurden Masson *et al.* (1998) entnommen

Von Althaus (1992) wurde ein Modell zur Regulation der Chromatinstruktur im Zusammenhang mit der Poly (ADP-Ribosyl)ierung von Histonen postuliert (*Histon-Shuttle* Model). Der vorgeschlagene Mechanismus besteht darin, dass Histone aufgrund einer Modifizierung mit PAR eine negative Nettoladung erhalten und von der DNA dissoziieren (Althaus *et al.*, 1992). Zusätzlich kann eine Interaktion zwischen Histonen und PAR-Polymeren die Bindung der Histone an die DNA hemmen. Dies resultiert in einer Relaxierung des Chromatins, bereits gezeigt in zahlreichen

elektronenmikroskopischen Studien (Rouleau *et al.*, 2004). In den Experimente von Tulin *et al.* (2003, 2006) wurde sowohl bei der Expression einer enzymatisch inaktiven PARP-1-Mutante oder einer Überexpression der PARG in *D. melanogaster* Veränderungen in der Organisation und der Zusammensetzung des Chromatins nachgewiesen. Die Ergebnisse von Kim *et al.* (2004) belegen, dass auch in humanen Kernextrakten eine Modulation der Chromatinstruktur durch die PARP-1 abhängige PAR-Modifizierung von Histonen erfolgen kann.

Für die Regulation der Transkription wurde gezeigt, dass infolge einer Poly (ADP-Ribosyl)ierung die Bindung von Transkriptionsfaktoren an Promotorelemente und die Formation transkriptionsaktiver Komplexe unterbunden werden kann (Oei *et al.* 1998). Dadurch sind Unterschiede in der Expression sowohl von funktionellen als auch regulatorischen Proteinen möglich. Tatsächlich zeigten die Studien von Simbulan-Rosenthal *et al.* (2000), dass in Mausfibroblasten mit genetisch depletierter PARP-1 eine verminderte Expression von Genen mit Bedeutung für den Ablauf der DNA-Reparatur, der Mitose, der Zellzyklusregulation sowie der Induktion des Zelltodes erfolgte. Interessanterweise wurde die Poly (ADP-Ribosyl)ierungs-abhängige Regulation der Transkriptionsinitiation auch für den Transkriptionsfaktor und Zellzyklusregulator p53 beobachtet (Oei *et al.* 1998, Mendoza-Alvarez & Alvarez-Gonzalez, 2001). Von Wieler *et al.* (2003) wurde gezeigt, dass bei einer Bestrahlung von humanen Epithelzellen infolge der Poly (ADP-Ribosyl)ierung von p53 die p53-abhängige Transkription wichtiger zellzyklusregulatorischer Gene (*p21*, *mdm2*) unterbunden wurde. Die Zellen arrestierten in der G₁-Phase, um die Vollendung des DNA-Reparaturprozesses zu ermöglichen. Von Tong *et al.*, (2001) wurde in p53^{+/-}- Mäusen nach genetischer Depletion der PARP-1 das vermehrte Auftreten von Tumoren beobachtet. Die Funktion von p53 als Zellzyklusregulator und Tumorsuppressor kann damit massgeblich durch die Poly (ADP-Ribosyl)ierung beeinflusst werden.

Unabhängig von einer über PARP-1 vermittelten Wechselwirkung wurde XRCC1 als zweiter direkter Interaktionspartner der PARG identifiziert (siehe Abb. 4.2). Die Interaktion der katalytischen Domäne der PARG mit XRCC1 konnte auf die beiden BRCT-Domänen von XRCC1 eingegrenzt werden. Für XRCC1 wurde für diesen Bereich des Proteins bereits eine Interaktion mit den für die BER oder SSBR-Mechanismen wichtigen Proteine Polynukleotidkinase/phosphatase (PNKP) sowie DNA-Ligase III gezeigt (siehe Tab. 1.2, Whitehouse *et al.*, 2001, Caldecott *et al.*, 1994). Kürzlich wurde publiziert, dass eine CK2-vermittelte Phosphorylierung von XRCC1 die Interaktion mit PNKP (Loizou *et al.*, 2004) und auch Aprataxin (Luo *et al.*, 2004) kontrolliert. Anhand der von Beausoleil *et al.* (2004) durchgeführten Experimenten zur Identifikation von Phosphoproteinen in HeLa-Kernextrakten, ergeben sich auch Hinweise auf eine mögliche Phosphorylierung der PARG. Von Gagne *et al.* (2006) wurde aus computergestützten Datenbankrecherchen eine Phosphorylierung der PARG an Position Serin 316, ebenfalls durch die Proteinkinase CK2, postuliert. Dass die Interaktion der PARG mit XRCC1 oder PARP-1 durch diese Phosphorylierung möglicherweise auch beeinflusst wird, kann zum jetzigen Zeitpunkt nur vermutet werden.

4.4 Regulation der PAR-Synthese durch PARG und XRCC1

Obwohl die Untersuchungen zur Poly (ADP-Ribosyl)ierung seit mehr als 40 Jahren durchgeführt werden, herrscht immer noch Unklarheit darüber, welche Faktoren genau zur Regulation der katalytischen Aktivität von PARP-1 beitragen. Bekannt ist, dass die Dimerisierung der PARP-1, induziert durch die Bindung an geschädigte DNA (Pion *et al.*, 2005), in der Aktivierung des Enzyms (Benjamin & Gill, 1980, Bauer *et al.*, 1990) resultiert. Dabei ergeben sich Unterschiede in der Induktion von PARP-1, abhängig vom vorhandenen DNA-Schaden (D'Àmours *et al.*, 1999, Kun *et al.*, 2004). Desweiteren wurde gezeigt, dass die Konkurrenz zwischen PARP-1 und weiteren DNA-bindenden Proteinen (DNA-PKc (Ruscetti *et al.*, 1998), APE-1 (Cistulli *et al.*, 2004, Peddi *et al.*, 2006), AMPK (Walker *et al.*, 2006)) zur Inhibierung von PARP-1 führen könnten (siehe Abb. 4.3 Nr. 2). In Experimenten von Mendoza-Alvarez *et al.* (1993 und 2003) wurde beobachtet, dass eine Minimierung der NAD⁺-Konzentrationen mit einer Verringerung der Länge und des Verzweigungsgrades der durch PARP-1 synthetisierten Polymere einhergeht (siehe Abb. 4.3 Nr. 1). Histone (Naegeli & Althaus, 1991, Kun *et al.*, 2004) sowie die Transkriptionsfaktoren YY1 und p53 (Oei *et al.*, 1998, Mendoza-Alvarez *et al.*, 2001) wurden als direkte Aktivatoren der PARP-1 identifiziert (siehe Abb. 4.3 Nr. 4). Als inhibierende Interaktionspartner von PARP-1 sind das antiapoptotische Molekül bcl-2 (Song *et al.*, 2002) sowie die DNA-Reparaturproteine DNA-PKc (Ariumi *et al.*, 1999) und XRCC1 (Masson *et al.*, 1998) beschrieben (siehe Abb. 4.3 Nr.5).

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde mit der PARG ein weiterer Interaktionspartner von PARP-1 entdeckt, der in der Lage ist, die Automodifizierungsaktivität des Enzyms zu hemmen. Die hier durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass bei einer Zugabe von steigenden Mengen katalytisch aktiver PARG zu HeLa S3-Kernextrakten vornehmlich kürzere PAR-Ketten synthetisiert werden. Erfolgte die Analyse des PAR-Metabolismus in Gegenwart von erhöhten Dosen katalytisch inaktivierter PARG, so wurde ebenfalls eine Verkürzung der synthetisierten PAR-Polymere beobachtet (siehe Abb. 3.20). In der Schlussfolgerung bedeutet dies, dass PARG, unabhängig von seiner PAR-hydrolysierenden Aktivität, offensichtlich durch Protein-Protein-Wechselwirkungen die PAR-Synthese in nukleären Kernextrakten beeinflusst. Dies führt dann zur Bildung von verkürzten PAR-Polymeren. Damit übereinstimmende Daten wurden in PARG₁₁₀ *knock-out*-Mäusen (siehe Abb. 1.7) gefunden (Cortes *et al.*, 2004).

Eine Möglichkeit der Hemmung der Poly (ADP-Ribosyl)ierung könnte in der Konkurrenz zwischen PARP-1 und PARG um das Substrat NAD⁺ bestehen (siehe Abb. 4.3 Nr. 1). Von Oliveira *et al.* (2001) wurde auf die Existenz einer PARP-Domäne (siehe Abb. 1.3) innerhalb der katalytischen Domäne der Rinder-PARG hingewiesen. Die Bindung von NAD⁺ und eine Wirkung als Effektor bzw. Substrat der Rinder-PARG konnte jedoch ausgeschlossen werden (Hatakeyama *et al.*, 1986). Eine verringerte PAR-Synthese der PARP-1 aufgrund limitierter NAD⁺-Konzentrationen ist daher unwahrscheinlich.

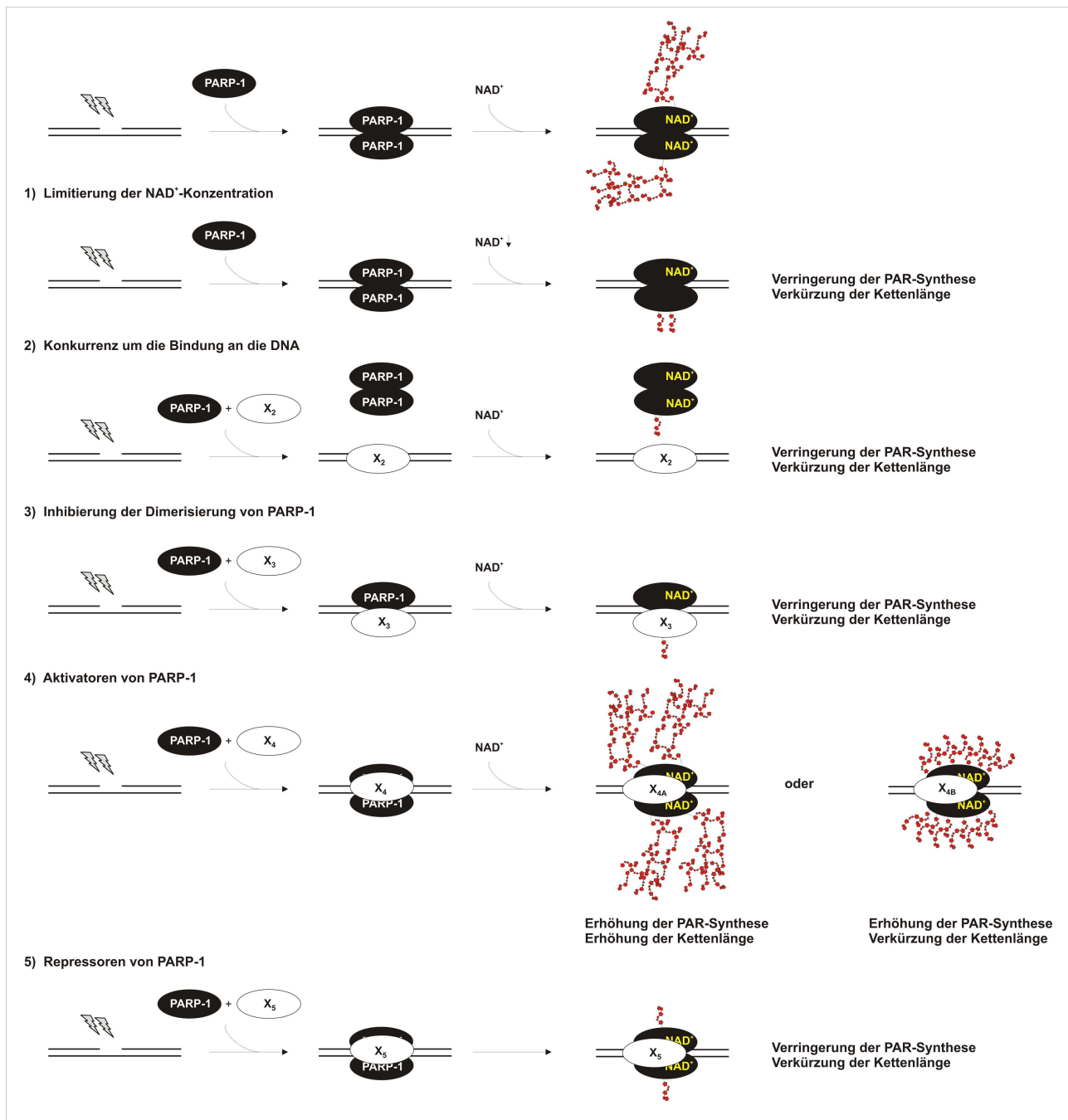


Abb. 4.3: Mechanismen zur Regulation der Synthese von Poly (ADP-Ribose)

Induziert durch geschädigte DNA erfolgt eine Dimerisierung von PARP-1 am Ort des DNA-Schadens. Nach der Bindung von NAD⁺ im katalytischen Zentrum erfolgt die Synthese von PAR durch die schrittweise Anknüpfung von ADP-Ribose-Molekülen (dargestellt ganz oben). Eine Regulation dieses Prozesses kann erfolgen durch:

1) limitierte NAD⁺-Konzentrationen (Mendoza-Alvarez *et al.*, 2000)

2) die Konkurrenz eines Proteins um die Bindung an der geschädigten DNA, X₂-PARP-DBD (Schreiber *et al.*, 1995), Ligase III (Caldecott *et al.*, 1996), DNA-PK_c (Ruscetti *et al.*, 1998), APE-1 (Cistulli *et al.*, 2004, Peddi *et al.*, 2006), AMPK (Walker *et al.*, 2006)

3) eine fehlende Homodimerisierung von PARP-1, hervorgerufen durch Protein X₃, X₃-89- kDa apoptotisches PARP-Fragment (Kim *et al.* 2000, D'Ámours *et al.*, 2001),

4) eine direkte Aktivierung von PARP-1 durch ein Protein X₄, X_{4A}-YY1 (Oei *et al.*, 1998) p53 (Oei *et al.*, 1998, Mendoza-Alvarez *et al.*, 2001), TBP +TFIIB (Oei *et al.*, 1998), X_{4B}-Histone (Naegli & Althaus, 1991, Kun *et al.*, 2004)

5) eine direkte Repression von PARP-1 durch ein Protein X₅, X₅- DNA-PK_c (Ariumi *et al.*, 1999), bcl-2 (Song *et al.*, 2002), XRCC1 (Masson *et al.*, 1998)

Weiterhin ist eine Hemmung der Poly (ADP-Ribosyl)ierung aufgrund einer Konkurrenz von PARP-1 und PARG um die Bindung an die DNA denkbar (siehe Abb. 4.3 Nr. 2). Die Analysen der Primärstruktur der klonierten PARG- cDNAs aus Maus, Rind und *Drosophila* ergaben, dass innerhalb der regulatorischen Domäne gehäuft saure Aminosäuren (27 %, Ame *et al.*, 1999) auftreten. Typische DNA-Bindungsmotive wurden bisher jedoch nicht identifiziert (Davidovic *et al.*, 2001). Ein Inhibierungsmechanismus, basierend auf einer Konkurrenz um das Substrat DNA (siehe Abb. 4.3 Nr. 2), ist daher ebenfalls unwahrscheinlich. In der Schlussfolgerung müsste die Inhibierung von PARP-1 durch die PARG entweder auf eine direkte Repression (siehe Abb. 4.3 Nr. 5) oder aber indirekt durch eine Verdrängung von Aktivatoren wie Histonen oder Transkriptionsfaktoren (siehe Abb. 4.3 Nr. 4) erklärbar sein (siehe Abb. 4.4 A).

Die Rolle der PARG für den PAR-Metabolismus ist durch dieses Ergebnis dualistisch zu betrachten. Zum einen ist sie essentiell für den Abbau von PAR-Polymeren (Koh *et al.*, 2004). Zum anderen hemmt sie die Synthese von PAR. Im Vergleich zur PARG finden sich deutlich mehr Moleküle an PARP-1 im Zellkern (D'Amours *et al.*, 1999, Davidovic *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang wurde postuliert, dass die hohe spezifische Aktivität der PARG die geringe Molekülzahl kompensiert (Menard *et al.*, 1990). Möglicherweise verhindert das Gleichgewicht von PAR-Synthese und Abbau die Akkumulation von PAR in Situationen mit geringen DNA-Schäden. Die hier gezeigte duale Wirkung der PARG auf den PAR-Metabolismus könnte erklären, wieso limitierte DNA-Schäden nicht zu einer Akkumulation von PAR führen. Im Einklang mit dieser Hypothese wurde nach einer Behandlung von humanen Keratinozyten mit moderaten Dosen des alkylierenden Agens MNNG (15 μ M) nur eine limitierte PAR-Synthese detektiert (Malanga & Althaus, 1994). Hingegen erfolgte eine massive PAR-Akkumulation nach Schädigung von Zellen mit höheren Dosen an MNNG (500 μ M) bzw. mit 10 mM H₂O₂ (Yu *et al.*, 2002, El-Khamisy *et al.*, 2003). Für eine Anhäufung der PAR-Polymere in Gegenwart von übermässigen, irreparablen DNA-Schäden müsste entweder eine Hemmung der PARG oder aber die Aktivierung der PARP-1 erfolgen. Zusätzlich zu PARP-1 wurde in der vorliegenden Arbeit mit XRCC1 ein zweiter Interaktionspartner der PARG identifiziert. XRCC1 ist als essentielles koordinatisches Protein für die Systeme des BER und SSBR beschrieben (Caldecott, 2003). Mit den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit wurde für dieses Protein erstmals eine Funktion in der Regulation des PAR-Metabolismus gezeigt. XRCC1 bindet *in vivo* bevorzugt an automodifizierte PARP-1 (Masson *et al.*, 1998, Dantzer *et al.*, 2000, Schreiber *et al.*, 2002), bedingt durch die Interaktion mit den Polymeren über ein innerhalb der BRCT I-Domäne befindliches PAR-Bindemotiv (siehe Abb. 1.12, Masson *et al.*, 1998, Pleschke *et al.*, 2000). Desweiteren wurde gezeigt, dass im Zuge des Auftretens von DNA-Schäden XRCC1, vermittelt durch automodifizierte PARP-1, an diese Läsionen rekrutiert wird (siehe Abb. 1.9, Okano *et al.*, 2003, Lan *et al.*, 2004). Unter Verwendung der XRCC1-defizienten und XRCC1-überexprimierenden Hamsterzelllinien EM9-V- und EM9-XH- konnte innerhalb der vorgelegten Arbeit gezeigt werden, dass bei einer Behandlung der Zellen mit der letalen Dosis des alkylierenden Agens MNNG in Anwesenheit von XRCC1 (EM9-XH) eine verstärkte Akkumulation von PAR erfolgt (Abb.

3.26 und Abb. 3.27). In den Aktivitätsstudien mit rekombinanten Proteinen wurde kein Einfluss von XRCC1 auf die PARG, jedoch eine deutliche Hemmung von PARP-1 gemessen (siehe Abb. 3.30 und Abb. 3.31). Diese Inhibierung von PARP-1 wurde bereits von Masson *et al.* (1998) beobachtet. Unter dem Aspekt, dass XRCC1 in der Lage ist direkt an Nukleinsäureeinzelstrangbrüche zu binden (Marintchev *et al.*, 1999), könnte die Konkurrenz von unmodifizierter PARP-1 und XRCC1 um das Substrat geschädigte DNA die Hemmung erklären (siehe Abb. 4.3 Nr. 2). Die Experimente innerhalb der vorliegenden Arbeit zur Stabilisierung von PARP-1 und PARG sowie der Regulation der Enzymaktivitäten durch XRCC1 unter zellulären Bedingungen zeigen jedoch, dass XRCC1 keinen direkten Effekt auf die PARP-1 oder PARG-Aktivität ausübt (siehe Abb. 3.28 und Abb. 3.32). In diesem Zusammenhang wurde bereits von Ikejima *et al.* (1984) auf einen vergleichbaren NAD⁺-Gehalt und PAR-Metabolismus in den hier eingesetzten EM9-Hamsterzelllinien hingewiesen.

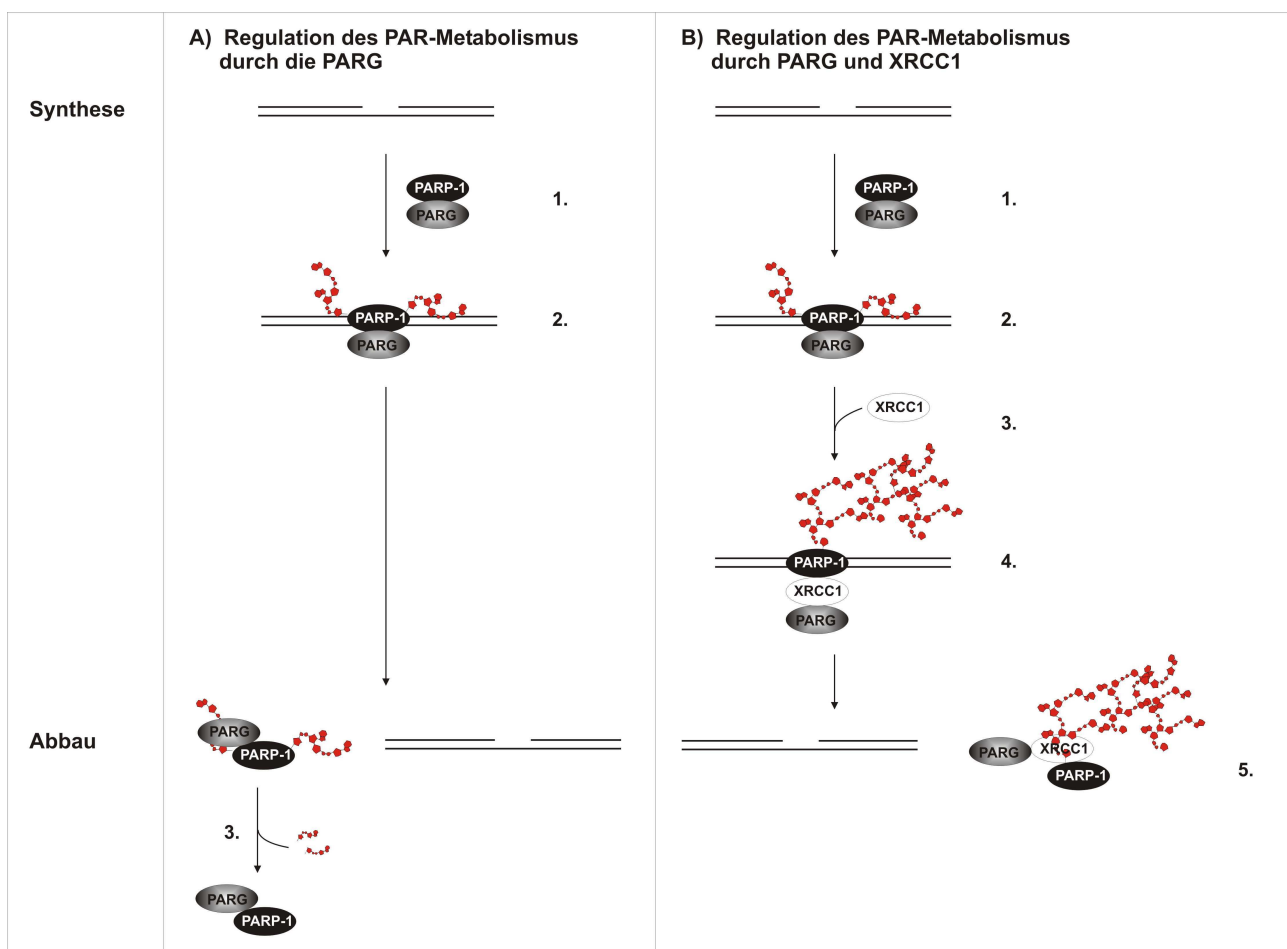


Abb. 4.4: Regulation des PAR-Metabolismus durch PARG und XRCC1

A) Der Komplex aus PARP-1 und PARG (1.) wird durch die Bindung an irreparable DNA-Schäden aktiviert. Die Hemmung von PARP-1 durch die PARG resultiert in der Synthese von verkürzten PAR-Ketten (2.). Durch die katalytische Aktivität der PARG erfolgt der Abbau der Polymere unter Freisetzung von ADP-Ribose und der Regenerierung der unmodifizierten PARP-1 (3.).

B) Der Komplex aus PARP-1 und PARG (1.) bindet an irreparable DNA-Schäden. Dies induziert die Synthese von PAR (2.). XRCC1 wird durch automodifizierte PARP-1 an den Schadensort rekrutiert (3.) und verdrängt den Repressor PARG aus dem bestehenden Komplex. Dadurch werden deutlich mehr PAR-Polymere mit grösserer Kettenlänge synthetisiert (4.). Aufgrund der Affinität von XRCC1 zu PAR-Polymeren kann deren Bindung ins katalytische Zentrum der PARG unterbunden werden. Dies verzögert weiter den Abbau von PAR (5.).

Da *in vivo* XRCC1 durch automodifizierte PARP-1 rekrutiert wird (Okano *et al.*, 2003, Lan *et al.*, 2004), erfolgten zusätzliche Experimente zur *in vitro*-Simulation dieser Rekrutierung. Durch Zugabe von rekombinantem XRCC1 zu Kernextrakten aus XRCC1-defizienten EM9-Zellen wurde in PAR-Synthesemessungen tatsächlich eine vermehrte Akkumulation von PAR nachgewiesen (siehe Abb. 3.33 bis Abb. 3.36). Die Rekrutierung von XRCC1 an automodifizierte PARP-1 scheint daher essentiell für die Wirkung von XRCC1 als Regulator des PAR-Metabolismus zu sein. Die durch XRCC1 hervorgerufene Anhäufung von PAR wäre auf zwei verschiedene Ursachen zurückführbar. Zum einen, könnte das Protein aufgrund seiner Affinität zu PAR-Polymeren an diese binden und damit den Abbau bereits formierter Polymere durch die PARG hemmen. Zum anderen wäre auch eine XRCC1-vermittelte Hemmung der PAR-Synthese, durch die Verdrängung von PARP-1-inhibierenden Proteinen wie z. Bsp. PARG, denkbar (siehe Abb. 4.4 B). In weiterführenden Experimenten muss geklärt werden welcher der beiden Mechanismen stärker zur PAR-Akkumulation beiträgt.

4.5 Die Interaktion von PARP-1, PARG und XRCC1 kontrolliert den MNNG-abhängigen Zelltod

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass durch ein Wechselspiel von PARP-1 mit PARG und XRCC1 eine Regulation des PAR-Metabolismus erfolgen kann (siehe Abb. 4.4). Dabei wurde beobachtet, dass im Vergleich zu den EM9-V- Zellen in der XRCC1-überexprimierenden Hamsterzelllinie EM9-XH infolge einer massiven Schädigung (500 μ M MNNG) eine verstärkte Synthese von PAR-Polymeren mit deutlich grösserer Kettenlänge erfolgt (siehe Abb. 3.26 und Abb. 3.27). Die Experimenten von Yu *et al.* (2002) hatten gezeigt, dass in HeLa-Zellen nach einer Schädigung mit der letalen Dosis von 500 μ M MNNG Poly (ADP-Ribosyl)ierungsabhängig die Induktion des caspase-unabhängigen Zelltodes erfolgt. Dies wurde vermittelt durch die Translokation des proapoptischen Proteins AIF vom Mitochondrium in den Zellkern sowie die Chromatinolyse des Zellkerns (vgl. auch Abb. 1.13 und Abb. 1.15). Die aus der Hyperaktivierung von PARP-1 durch MNNG-Schädigung resultierende Depletion der zellulären Energiespeicher verhinderte in HeLa-Zellen die Aktivierung von Caspasen (Yu *et al.*, 2002) und damit die terminale Degradierung des Chromatins durch die caspase-aktivierte DNase CAD. Stattdessen erfolgt lediglich eine initiale Chromatinolyse durch eine postulierte AIF-assoziierte DNase (Cregan *et al.*, 2004, Modjtahedi *et al.*, 2006). In der hier vorgelegten Arbeit wurde, induziert durch hohe MNNG-Dosen, in den EM9-XH-Zellen Poly (ADP-Ribosyl)ierungsabhängig ebenfalls die Translokation von AIF in den Zellkern (siehe Abb. 3.37) sowie eine Chromatinolyse des Zellkerns (siehe Abb. 3.38) beobachtet. In der XRCC1-defizienten Zelllinie EM9-V erfolgte nach MNNG-Behandlung aufgrund des Wechselspiels von PARP-1 und PARG die Synthese deutlich kürzerer PAR-Polymere, welche die Freisetzung von AIF aus dem Mitochondrium

nicht erlaubte (siehe Abb. 3.26 und Abb. 3.27). Im Gegensatz zu den EM9-XH-Zellen wurden in den EM9-V-Zellen die zellulären Energiespeicher ATP und NAD^+ deutlich stärker depletiert (siehe Abb. 3.40). In gleicher Weise wurde in den Experimenten von Nakamura *et al.* (2003) nach einer Behandlung der beiden Zelllinien mit dem alkylierenden Agens Methylmethanosulfat (MMS) eine deutlich stärkere Abnahme des NAD^+ -Gehaltes in den EM9-V-Zellen gemessen.

Die Ergebnisse von Goth-Goldstein & Hughes (1987) zeigen, dass die Wirkung von einzelnen alkylierenden Agenzien auf die Vitalität von CHO-Zellen wesentlich von der Verweildauer in den Zellen, der jeweilig eingesetzten Dosis aber auch vom zellulären Status (zellzyklusabhängige Regulation) abhängt. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass nur in XRCC1-überexprimierenden Zellen (EM9-XH) infolge einer zytotoxischen Behandlung mit MNNG eine vermehrte PAR-Akkumulation, verbunden mit einem apoptotischen Zelltod, erfolgt. Von El-Khamisy *et al.* (2003) wurde bei einer Behandlung mit 20 mM H_2O_2 eine Anhäufung von DNA-Einzelstrangbrüchen, verbunden mit einer Formation von PAR, in beiden EM9-Zelllinien gefunden. Die Synthese dieser PAR-Foci erfolgte daher offensichtlich unabhängig von XRCC1. Als Ursache dafür könnte vermutet werden, dass nach massivem oxidativen Stress (20 mM H_2O_2) die deutlich geringere Anzahl an PARG-Molekülen nicht in der Lage ist, die vermehrt vorhandenen, aktivierten PARP-1-Moleküle zu reprimieren (vgl. Abb. 4.4 A). Unterstützend zu dieser Hypothese wurde in Experimenten zur vorgelegten Arbeit eine Chromatinolyse des Zellkerns XRCC1-unabhängig sowohl in EM9-V- als auch EM9-XH Zellen nach Behandlung mit 1 mM H_2O_2 beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die Bedeutung von XRCC1 sowohl für die Regulation der PAR-Synthese als auch der Induktion des AIF-vermittelten Zelltodes in den EM9-Zellen scheint daher ein spezifischer MNNG-abhängiger Effekt zu sein.

Wenn eine Schädigung der DNA erfolgt, so muss zellulär ein Entschluss über eine mögliche Reparatur oder dem Zelltod getroffen werden. Infolge einer irreparablen Schädigung ist zudem die Entscheidung über die Induktion des Zelltodes durch Apoptose oder Nekrose von Wichtigkeit. Während die Apoptose als programmierter Zelltod mit wenigen physiologischen Belastungen für den Organismus einhergeht, kommt es im Zuge der Nekrose vermehrt zu akuten inflammatorischen Prozessen (Viràg *et al.*, 2005). Die Entscheidung für den apoptotischen Zelltod kann mit der Aktivierung von Caspasen oder auf einem caspase-unabhängigen Weg durch die Aktivierung von alternativen proapoptotischen Proteinen (AIF, EndoG) getroffen werden. Während der Ablauf der AIF-vermittelten Apoptose nicht an vorhandene endogene Energiereserven gekoppelt ist (Daugas *et al.*, 2000), sind sowohl die Aktivierung der Initiatorcaspase 9 als auch caspase-vermittelte terminale Prozesse von der Verfügbarkeit an ATP abhängig (Chiarugi, 2005, Skulachev, 2006). Im Zusammenhang damit wurde in den Experimenten von Leist *et al.* (1997) und Nicotera *et al.* (1998) gezeigt, dass eine 50 % ige Depletion des zellulären ATPs und NAD^+ s innerhalb der initialen Prozesse zum Abort der Apoptose und der Induktion der Nekrose führt. Obwohl die drastische ATP- und NAD^+ -Abnahme in den EM9-XH-Zellen infolge der MNNG-Behandlung die caspase-vermittelte Apoptose verhinderte, wurde mit der Synthese der hochmolekularen PAR-Polymere die Grundlage für den AIF-vermittelten, caspase-unabhängigen Zelltod gelegt. In den den

EM9-V- Zellen hingegen erfolgte die Freisetzung von AIF aus dem Mitochondrium nicht. Die Minimierung des zellulären ATP (36 % der Kontrolle, siehe Abb. 3.40) unterband hier jedoch auch den Weg des caspase-vermittelten Zelltodes. In der Konsequenz starben die EM9-V- Zellen nach MNNG-Behandlung nekrotisch (siehe Abb. 3.41 und Abb. 4.5).

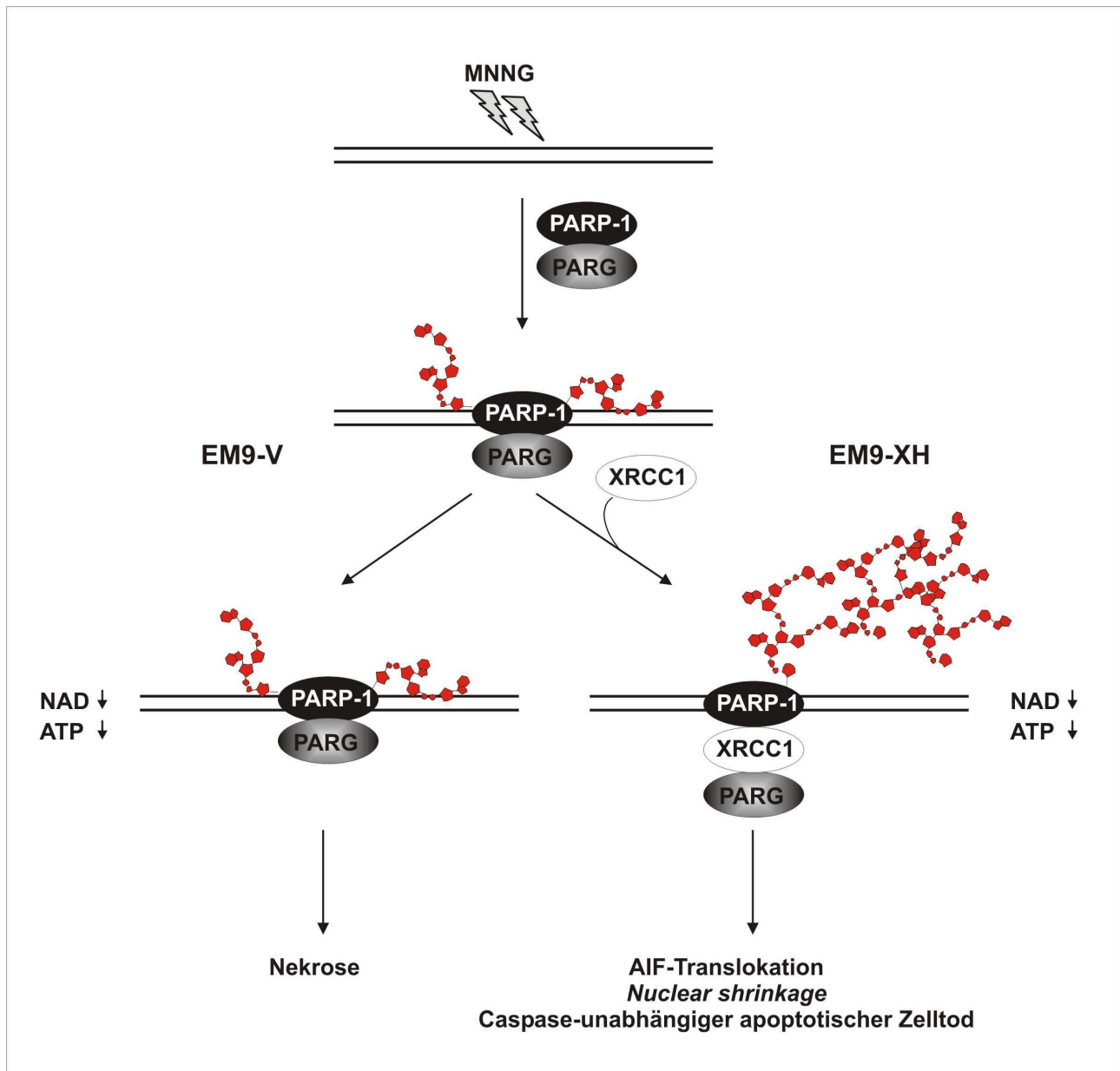


Abb. 4.5: XRCC1 reguliert die Induktion der AIF-vermittelten Apoptose durch die Koordination der Aktivitäten von PARP-1

Die durch hohe Dosen an MNNG hervorgerufene Akkumulation von irreparablen DNA-Schäden führt zur Induktion der Synthese und des Abbaus von Poly (ADP-Ribose) durch den PARP-1-PARG-Komplex.

In EM9-XH- Zellen (rechts) wird XRCC1 durch automodifizierte PARP-1 rekrutiert. Dies führt zu einer Verdrängung von PARG aus dem PARP-1-PARG-Komplex. Es erfolgt eine vermehrte Synthese von PAR-Polymeren mit deutlich grösserer Kettenlänge. Die akkumulierenden PAR-Polymeren vermitteln dann einen Weg der Caspase-unabhängigen Apoptose durch Translokation des proapoptischen Proteins AIF und die Chromatinolyse des Zellkerns.

In XRCC1-defizienten EM9-V- Zellen führt die Aktivierung von PARP-1 und PARG zur Depletion des zellulären ATP und NAD⁺. Infolgedessen sterben die Zellen nekrotisch.

PARP-1 spielt damit eine duale Rolle in der Induktion des Zelltodes. Die Polymerase verbraucht im Zuge der Poly (ADP-Ribosyl)ierung permanent NAD^+ als Substrat. Pro *de novo* Synthese oder Regenerierung von einem Molekül NAD^+ werden mehr als 2 Moleküle ATP verbraucht (Berger *et al.*, 2004). Der mit einer vermehrten Poly (ADP-Ribosyl)ierung einhergehende Verbrauch von NAD^+ führt zu einer rapiden energetischen Depletion und zur Induktion der Nekrose (Berger, 1985, Ha & Snyder, 1999, Chiarugi, 2002, Viràg, 2005). Mit der Synthese der PAR-Polymere vermittelt sie jedoch zugleich die caspase-unabhängige Apoptose. Die in der hier vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse haben gezeigt, dass in XRCC1-positiven Hamsterfibroblasten nach einer massiven Schädigung (500 μM MNNG) PAR-vermittelt der apoptotische Zelltod intiiert wird. Ohne XRCC1 kommt es infolge der energetischen Depletion zur Nekrose. In Studien mit kortikalen Neuronen auch beobachtet, dass die Akkumulation der PAR-Polymere in Zellen als bedeutsam für die Initiation der AIF-vermittelten Apoptose anzusehen sind (Tanaka *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu stehen die von Zhong *et al.* (2004) publizierten Ergebnisse. In deren Experimenten wurde bei einer Behandlung von Maus-Fibroblasten (PARP-positiv, XRCC1-positiv) mit 500 μM MNNG ein nekrotischer Zelltod beschrieben. Als Hinweis auf die Nekrose wurden innerhalb dieser Studie jedoch nicht typische Kennzeichen wie der Verlust der Zellintaktheit untersucht, sondern lediglich die Exklusion des Chromatinproteins HMGB1 in den Zellüberstand. Ausserdem wurden keine Untersuchungen zur Lokalisation des proapoptotischen Proteins AIF durchgeführt.

Mit den Ergebnissen der hier vorgelegten Arbeit, konnte erstmals gezeigt werden, dass XRCC1 als Regulator im PAR-Metabolismus agieren kann und damit gleichzeitig eine wichtige Funktion hinsichtlich einer Entscheidung des Zelltodes durch Apoptose oder Nekrose übernimmt. Im Falle einer Akkumulation von irreparablen DNA-Schäden führt die Rekrutierung von XRCC1 an den Schadensort zur vermehrten Synthese von PAR-Polymeren. Infolgedessen kommt es zur Induktion der AIF-vermittelten caspase-unabhängigen Apoptose erfolgt. In Abwesenheit von XRCC1 sterben die Zellen nekrotisch, vermittelt durch die PARP-1-abhängige energetische Depletion (siehe Abb. 4.5).

4.6 Bedeutung der Poly (ADP-Ribosyl)ierung für pathophysiologische Veränderungen

Die intensiven Studien zur Poly (ADP-Ribosyl)ierung zeigen, dass dieser Prozess zum einen essentiell für den Erhalt der zellulären Homöostase, zugleich aber von Bedeutung in der Regulation pathophysiologischer Prozesse ist. Die zahlreichen Untersuchungen mit PARP-1 *knock-out*-Mäusen (Herceg & Wang, 2001) oder der Einsatz von PARP-1-Inhibitoren (Viràg & Szabó, 2002) verdeutlichen, dass eine massive Aktivierung der PARP-1, verbunden mit dem Abfall an zellulären ATP und NAD^+ , die Ausprägungen von Krankheitsbildern wie *Diabetis mellitus* sowie koronare oder

neuronale Veränderungen (Alzheimer, Parkinson, Schlaganfälle, Herzinfarkt) fördert (Viràg & Szabó, 2000). Hinsichtlich der Bedeutung der Poly (ADP-Ribosyl)ierung in der Therapie von Krebserkrankungen wurde bereits der klinische Einsatz von PARP-Inhibitoren gezeigt (Bryant *et al.*, 2005, Farmer *et al.*, 2005, Curtin, 2005). Im Bezug zu einer Prädisposition für bestimmte Krebsformen, wurden sowohl für das humane Gen der PARP-1 als auch für XRCC1 innerhalb der letzten Jahre intensive epidemiologische Studien durchgeführt (Frosina, 2004, Ladiges, 2006). Auffälligkeiten für das vermehrte Auftreten von Polymorphismen des *PARP-1*-Gens, verbunden mit der gehäuften Ausprägung bestimmter Krebsarten, ergaben sich nicht (Frosina *et al.*, 2004, Zhai *et al.*, 2006). Hinsichtlich der genetischen Variation von XRCC1 wurde in den jeweilig untersuchten Populationen vermehrt die Präsenz von drei Varianten mit Polymorphismen an den Aminosäurepositionen 194 (R194W), 399 (R399Q) sowie 280 (R280H) festgestellt (Ladiges 2006). Im Zuge einer Expression der Proteinvariante XRCC1 (R280H) wurde dabei gehäuft die Ausprägung von Lungen-, Darm- und Eileiterkrebs (Frosina *et al.*, 2004) beobachtet. Die Studien von Takanami *et al.* (2005) zeigen sowohl eine verminderte Reparatur von MMS-induzierten DNA-Schäden in EM9-Zellen nach stabiler Transfektion mit XRCC1(R280H) als auch eine verzögerte Rekrutierung von XRCC1 an den Schadensort. Gleichzeitig wurde verglichen zu den AA8-Zellen eine vermehrte NAD(P)-Depletion gemessen. Dahingehend wurde ein Zusammenhang zwischen der Expression von XRCC1 (R280H), einer genetischen Instabilität, einer veränderten PAR-Synthese und der Tendenz zur Prädisposition bestimmter Krebsformen postuliert (Takanami *et al.*, 2005).

Desweiteren wurde ein Korrelation zwischen dem Auftreten von bestimmten Formen des Brust- und Prostatakrebses mit der Expression der XRCC1-Variante (R399W) beobachtet (Frosina *et al.*, 2004). Die Experimente zur Reparaturkapazität von EM9-Zellen mit stabiler Transfektion der XRCC1 (R399W)-Variante wiesen nicht auf Defekte von MMS-induzierten DNA-Schäden hin (Taylor *et al.*, 2002). In den Untersuchungen von Au *et al.* (2003) korrelierte jedoch das vermehrte Auftreten von chromosomalen Deletionen nach UV-Bestrahlung von isolierten, humanen Lymphozyten mit der Expression dieser XRCC1 (R399W)-Variante. Zwei Systeme sind essentiell für den Erhalt der genomischen Stabilität: die DNA-Reparatur und die Apoptose. Zellen mit Defekten in der DNA-Reparatur tendieren zur übermässigen Akkumulation von DNA-Schäden. Zellen mit Defekten in der Apoptose überleben trotz der angehäuften DNA-Schäden, sodass im Zuge der Replikation und Zellteilung eine Manifestierung der Mutationen erfolgt. Eine multiple Anhäufung genetischer Veränderungen kann schliesslich die Ausprägung von Krebs fördern (Bernstein *et al.*, 2002). Bisher wurde die Funktion von XRCC1 nur als essentiell hinsichtlich der DNA-Reparatur betrachtet. Die Tatsache, dass humane Lymphozyten mit Expression der XRCC1 (R399W)-Variante nach UV-Bestrahlung trotz massiver genetischer Veränderungen überleben, lässt jedoch vermuten, dass in diesen Zellen nicht nur ein genereller DNA-Reparatur-Defekt, sondern auch eine Störung im Ablauf der Apoptose vorliegt. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Modell für die Kontrolle der Induktion des PAR-abhängigen Apoptose durch die Wechselwirkung zwischen PARP-1, PARG und XRCC1

postuliert. PARP-1 und PARG interagieren mit Bereichen, welche die BRCT-Domänen von XRCC1 umfassen. Die Position des Polymorphismus XRCC1 (R399W) befindet sich innerhalb der BRCT I-Domäne und könnte sich auf die Interaktion zwischen PARP-1, PARG und XRCC1 auswirken. Dies hätte unter Umständen Auswirkungen auf den PAR-Metabolismus und die Induktion des AIF-vermittelten Zelltodes. In Folge würden solche Zellen trotz massiver DNA-Schäden überleben und damit die Ausprägung maligner Veränderungen fördern.

5 Ausblick

Für XRCC1 wurde phosphorylierungsabhängig durch die Proteinkinase CK2 die Interaktion mit den DNA-Reparatur-Proteinen Aprataxin und Polynukleotidkinase/phosphatase nachgewiesen. Aus der Tatsache, dass in der Aminosäuresequenz der PARG auch eine Phosphorylierungsstelle für diese Proteinkinase identifiziert wurde, ergibt sich die Möglichkeit einer Regulation der PARG-XRCC1-Interaktion durch den Phosphorylierungsstatus dieser Proteine. In der Arbeitsgruppe von Prof. K. Caldecott wurde eine EM9-Zelllinie mit stabiler Expression einer CK2-unphosphorylierbaren XRCC1-Mutante (EM9-XRCC1^{CKM}) etabliert (Loizou *et al.*, 2004). In diesen Zellen erfolgte nach Schädigung mit 10 mM H₂O₂ keine Rekrutierung von XRCC1 an den DNA-Schadensort. Im Bezug auf die multiple Phosphorylierung von XRCC1 durch CK2 an Aminosäurepositionen 459-494 und 503-546 wäre es interessant festzustellen, ob in den EM9-XRCC1^{CKM}-Zellen die Interaktion von PARG und XRCC1 unterbunden wird und inwiefern sich möglicherweise daraus Veränderungen auf den PAR-Metabolismus ergeben.

Desweiteren wurde in der hier vorgelegten Arbeit gezeigt, dass aufgrund des Wechselspiels zwischen PARP-1, PARG und XRCC1 eine Regulation des PAR-Metabolismus erfolgen kann. Bedingt durch die Rekrutierung von XRCC1 an automodifizierte PARP-1 erfolgte eine vermehrte Akkumulation von PAR-Polymeren. Diese Anhäufung könnte zum einen darauf zurückgeführt werden, dass XRCC1 PARP-1-inhibierende Proteine verdrängt und damit die PAR-Synthese induziert. Zum anderen könnte XRCC1 aufgrund seiner Affinität zu PAR-Polymeren diese stabilisieren und deren Abbau durch die PARG unterbinden. Die Interaktion von Proteinen mit PAR-Polymeren, vermittelt über das PAR-Bindemotiv, ist bereits bekannt. Auf molekularer Ebene sind für einige Proteine die dafür essentiellen Aminosäuren identifiziert. In folgenden Versuchen sollen durch gerichtete Mutationen die XRCC1-Varianten C389A und RR394/395AA konstruiert und deren Interaktionsvermögen mit PAR-Polymeren überprüft werden. Anschliessend wären Experimenten zum Einfluss dieser XRCC1-Mutanten auf den PAR-Metabolismus sinnvoll.

Bei humanen Lymphozyten mit Expression der XRCC1 (R399W)-Variante wurde nach Bestrahlungen eine Anhäufung von chromosomalen Deletionen festgestellt. Desweiteren korrelierten in epidemiologischen Studien das Auftreten des R399W-Polymorphismus mit dem Vorkommen von bestimmten Formen des Brust- und Prostatakrebses. Die Tatsache, dass Zellen trotz der genetischen Instabilität überleben, lässt vermuten, dass hier neben einer ineffizienten DNA-Reparatur auch ein Defekt in der Induktion des Zelltodes vorliegt. Dies kann im Folgenden die Ausprägung von malignen Veränderungen fördern. Die Position des Aminosäureaustausches R399W befindet sich in einem Proteinabschnittes von XRCC1, der entscheidend für die Interaktion mit PARP-1 und der PARG ist. Daher sollen Experimente durchgeführt werden, in denen die Funktionalität der XRCC1 (R399W)-

Variante für die Regulation des PAR-Metabolismus und des PAR-induzierten AIF-vermittelten Zelltodes untersucht wird.