4. Diskussion und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Art der Regulation des DNA-Reparaturmechanismus BER nachgewiesen. Es wurde gezeigt, dass die Entscheidung zwischen den beiden Teilprozessen "short patch BER" und "long patch BER" abhängig von der Energiesituation ist. Die SDDS-Aktivität von Pol β ist in Gegenwart von ATP reduziert. Damit geht bevorzugte Reparatur durch "short patch BER" einher. Bei ATP-Mangel dagegen katalysiert Pol ß SDDS und die Reparatur erfolgt verstärkt durch "long patch BER". "Long patch BER" begünstigt bei ATP-Mangel die PAR-vermittelte DNA-Ligation. ATP reguliert die Aktivität von Pol β nicht direkt, sondern diese Regulation wird über den BER-Komplex vermittelt. Eine zentrale Rolle spielt dabei die ATP-abhängige katalytische Aktivität von Lig III. Durch Mutagenese des aktiven Zentrums von Lig III wurden neue Erkenntnisse über Katalyse und Substratbindung dieses wichtigen DNA-Reparaturenzyms gewonnen. Zudem wurde eine bisher unbekannte Funktion des zentralen BER-Koordinationsproteins XRCC1 gezeigt. XRCC1 stimuliert die "strand displacement"-DNA-Synthese durch Pol β und stimmt die Aktivitäten von Pol β und Lig III in komplexer Weise aufeinander ab. Darüber hinaus wurde auch ein hemmender Einfluss von ATP auf die Aktivität von PARP-1 im BER-Komplex nachgewiesen. Die hier präsentierten Ergebnisse stellen einen bedeutenden Fortschritt für das Verständnis der komplizierten Regulation des BER-Mechanismus und der vielfältigen Funktionen von XRCC1 und PARP-1 dar.

4.1 Die ATP-abhängige Regulation des BER-Mechanismus

4.1.1 Die Entscheidung zwischen "short patch BER" und "long patch BER"

Die Frage nach der Entscheidung zwischen "short patch BER" und "long patch BER" spielt eine zentrale Rolle für das Verständnis von BER. Zu Beginn waren die Bedingungen, die in der Zelle zur Wahl eines der beiden Mechanismen führen, weitgehend unbekannt. Es existierte lediglich ein Modell, demzufolge der BER-Mechanimsus durch die molekulare Struktur der Schadensstelle beeinflusst wird (siehe 1.4). In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich eine völlig andere Art der Regulation gezeigt, bei der die Verfügbarkeit von ATP zur Bevorzugung von "short patch BER" führt, während in Abwesenheit von ATP verstärkt "long patch BER" erfolgt. Entscheidend für den Verlauf der Reparatur ist die Aktivität von Pol β, die sich in Anwesenheit von ATP vorwiegend auf den Einbau von einem Nukleotid beschränkt. Darauf folgt die Ligation und somit Reparatur durch "short patch BER". In Abwesenheit von ATP werden dagegen durch "strand displacement"-DNA-Synthese mehrere Nukleotide eingebaut (siehe Kapitel 3.3). Die Produkte dieser SDDS werden durch

FEN 1 prozessiert und durch Lig III ligiert, was der Reparatur durch "long patch BER" entspricht (Abbildung 3.14).

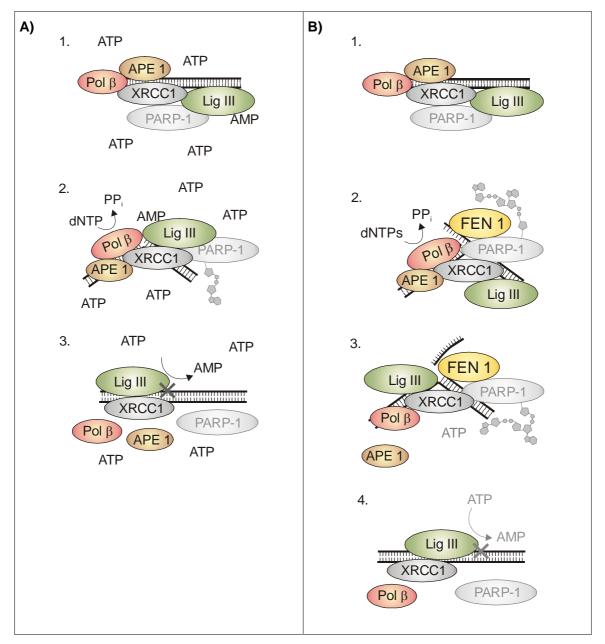


Abbildung 4.1: Einfluss der Energiesituation auf den BER-Mechanismus. XRCC1 rekrutiert die BER-Enzyme und koordiniert den Reparaturkomplex. Die Beteiligung von PARP-1 vor allem an "long patch BER" ist angedeutet. A): BER-Mechanismus bei Verfügbarkeit von ATP. Lig III ist adenyliert (AMP) und es erfolgt hauptsächlich "short patch BER. 1. Die AP-Stelle wird von APE 1 eingeschnitten. 2. Pol β baut ein neues Nukleotid ein. 3. Lig III verschließt den verbleibenden Einzelstrangbruch. B) BER-Mechanismus bei ATP-Mangel. Lig III ist nicht adenyliert und "long patch BER" überwiegt. 1. Die AP-Stelle wird von APE 1 eingeschnitten. 2. Pol β katalysiert SDDS. 3. FEN 1 entfernt den ersetzten DNA-Einzelstrang. Die Gewinnung von ATP aus Poly(ADP-Ribose) ist angedeutet. 4. Lig III kann den verbleibenden Einzelstrangbruch nur verschließen, wenn doch noch ATP mobilisiert werden konnte.

Die Reaktionen der Zelle auf DNA-Schädigung sind vielfältig und äußerst komplex. Daher ist die Erforschung der Mechanismen, welche die unterschiedlichen Reparatuprozesse regulieren, von besonderer Bedeutung für das Verständnis der DNA-Reparatur. Bei der hier nachgewiesenen ATP-abhängigen Regulation handelt es sich um einen Mechanismus, bei dem die DNA-Reparatur von der Energiesituation der Zelle beeinflusst wird.

Bei der zweiten bekannten Form der Regulation von BER spielt die Eliminierung des dRP-Restes eine zentrale Rolle (siehe 1.4). In diesem Zusammenhang ist vorstellbar, dass der dRP-Rest in der lebenden Zelle nach Oxidierung durch ROS nicht eliminiert werden kann. Dies setzt eine oxidative Belastung voraus. Bei der hier gezeigten ATP-abhängigen Regulation handelt es sich dagegen eindeutig um einen Mechanismus, der nicht abhängig von der Art der DNA-Schädigung ist.

Die zelluläre Bedeutung von "long patch BER" bei ATP-Mangel zeigen die durchgeführten Untersuchungen an menschlichen Kernextrakten. Die PAR-vermittelte Ligation, die auf der Gewinnung von ATP aus PAR beruht, ist nur möglich, wenn "long patch BER" erfolgt (Abbildung 3.15). Dies zeigt, warum Reparatur durch "long patch BER" bei ATP-Mangel von Vorteil sein kann. Zellen, deren ATP-Gehalt z.B. nach Behandlung mit DOG reduziert ist, weisen eine verringerte Adenylierung von DNA-Ligasen und verringerte DNA-Ligationsaktivität auf (Petermann et al., 2003). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eindeutig gezeigt, dass DOG-behandelte Zellen normale Proteinmengen an Lig III enthalten (Abbildung 3.4). Diesen Zellen fehlt für die Ligationsaktivität demzufolge nur das ATP. Bei zellulärem ATP-Mangel, der die Adenylierung von DNA-Ligasen beeinträchtigt, handelt es sich sicherlich um eine physiologische Extremsituation. Außerdem wird ein solcher extremer ATP-Mangel wahrscheinlich meist nicht auf Gesamtzellebene, sondern eher lokal im Zellkern und an DNA-Schadenstellen auftreten und könnte dort z.B. durch die Aktivität ATP-verbrauchender Enzyme hervorgerufen weden. Im Rahmen von BER könnte dieser ATP-Mangel durch "long patch BER" und Gewinnung von ATP aus PAR ausgeglichen werden.

Da DNA-Schädigung und Energiesituation in reger Beziehung zueinander stehen (siehe 4.4), könnte eine ATP-abhängige Regulation außer für den BER-Mechanismus durchaus auch für andere DNA-Reparaturmechanismen von Bedeutung sein.

4.1.2 Die Bedeutung der Proteine des BER-Komplexes für die Regulation

Es wurde gezeigt, dass ATP keinen direkten Einfluss auf die Aktivität von Pol β hat (Abbildung 3.6). Die Aktivität von Pol β wird nur in Anwesenheit von Lig III durch ATP beeinflusst (Abbildung 3.7). Wahrscheinlich beruht diese Regulation auf einer Hemmung der SDDS-Aktivität von Pol β in Gegenwart von ATP, die durch Lig III vermittelt wird (vgl. 4.2.1). Die Mutagenese des katalytischen Zentrums von Lig III zeigt, dass die Fähigkeit des Enzyms zur Adenylierung und zur Ligation für die ATP-abhängige Hemmung von SDDS erforderlich ist (vgl. 4.2.1).

XRCC1 fördert den Wechsel zwischen den beiden BER-Mechanismen zwar deutlich, vermittelt aber keine ATP-abhängige Regulation (vgl. 4.3). Lig III wäre somit der zentrale Faktor der Regulation zwischen "short patch BER" und "long patch BER". Lig III kann als Sensor für die ATP-Konzentration angesehen werden, da das Enzym ATP als Co-Substrat umsetzt. Bei der zweiten Form der Regulation von BER über die Eliminierung des dRP-Restes (siehe 1.4) ist dagegen nicht die Aktivität von Lig III, sondern die Aktivität von Pol β der ausschlaggebende Faktor. Hier erfolgt die Regulation der Pol β -Aktivität über die dRP-Lyase-Domäne von Pol β (Prasad et al., 2001).

In dem hier vorgestellten Modell wird "long patch BER" nicht bei ATP-Mangel aktiviert, sondern vielmehr umgekehrt in Anwesenheit von ATP inhibiert. Ein Mechanismus, der die SDDS durch Pol β hemmt, war bisher nur von Kubota et al. beschrieben worden. Hier hatte die Zugabe von XRCC1 zu rekonstruierten BER-Ansätzen die SDDS-Aktivität von Pol β inhibiert (Kubota et al., 1996). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte dieses Resultat nicht reproduziert werden, sondern es wurde im Gegenteil wiederholt eine Stimulierung von Pol β durch XRCC1 nachgewiesen. Lig III wäre damit der einzige bekannte Faktor, der SDDS durch Pol β hemmen kann.

Weiterhin wurde gezeigt, dass auch die Aktivität von PARP-1 in Gegenwart von ATP inhibiert ist (vgl. 4.4). Dies stellt angesichts der Bedeutung von PARP-1 für "long patch BER" einen wichtigen Aspekt dar. Es wurde wiederholt berichtet, dass PARP-1 "long patch BER" begünstigt (Dantzer et al., 2000; Prasad et al., 2001). Daher ist es interessant, dass sowohl PARP-1 als auch Pol β bei ATP-Mangel eine erhöhte Aktivität aufweisen. Durch die erhöhte PARP-1-Aktivtät könnte "long patch BER" bei ATP-Mangel noch zusätzlich stimuliert werden.

Auch in einem ganz anderen Zusammenhang wurde eine reziproke Korrelation zwischen ATP-Gehalt der Zelle und zellulärer PARP- und Pol β -Aktivität beschrieben (Mishra et al., 2003). In dieser Untersuchung sollte die Schädigung der DNA durch Hypoxie in neuronalem Gewebe von Ferkeln analysiert werden, und dabei wurden erhöhte PARP- und Pol β -Aktivitäten bei zellulärem ATP-Mangel beobachtet. Interessanterweise war die Aktivität von Pol β , die aus Gewebe mit ATP-Mangel isoliert worden war, *in vitro* auch nach Zugabe von ATP noch erhöht. Dies deutet möglicherweise auf eine aktivierende Modifikation des Enzyms hin. Eine solche Art der Aktivierung von Pol β bei ATP-Mangel wäre zusätzlich zu der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Regulation denkbar.

4.2 Die Rolle der katalytischen Aktivität von Lig III

4.2.1 Die Regulation des BER-Mechanismus durch Lig III

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine zentrale Rolle von Lig III für die ATPabhängige Regulation zwischen "short patch BER" und "long patch BER" nachgewiesen. Die Aktivität von Pol β wird nur in Anwesenheit von Lig III durch ATP beeinflusst (Abbildung 3.7). Dabei wird die SDDS-Aktivität von Pol β in Anwesenheit von Lig III inhibiert, und diese Inhibierung ist bei Verfügbarkeit von ATP verstärkt (Abbildung 3.9, Abbildung 3.20).

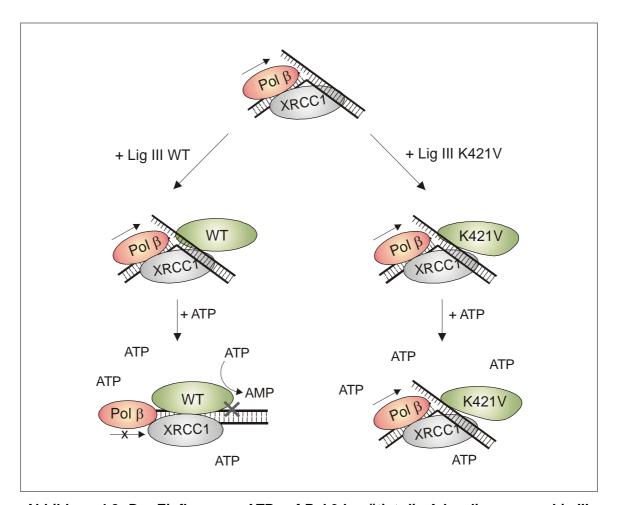


Abbildung 4.2: Der Einfluss von ATP auf Pol β benötigt die Adenylierung von Lig III.

Oben: Pol β im Komplex mit XRCC1 katalysiert SDDS (dargestellt durch einen Pfeil). **Mitte:** Lig III Wildtyp (WT) oder die Mutante Lig IIII K421V werden zugegeben. In Abwesenheit von ATP ändert sich die Aktivität von Pol β nicht. **Unten:** In Anwesenheit von ATP verhalten sich die Ansätze mit Wildtyp oder Mutante unterschiedlich. **Unten links:** In Anwesenheit des Wildtyps wird SDDS durch Pol β verhindert und der Einzelstrangbruch wird ligiert ("short patch BER"). **Unten rechts:** In Anwesenheit der nicht adenylierbaren Mutante Lig III K421V erfolgt auch bei Verfügbarkeit von ATP keine Ligation, und SDDS durch Pol β ist unbeeinträchtigt.

Die Inhibierung von Pol β in Gegenwart von Lig III beruht nicht auf einem Effekt von freiem ATP, sondern wird eindeutig durch die Adenylierung von Lig III vermittelt. Dies zeigen die Versuche mit der nicht adenylierbaren Mutante Lig III K421V. In Gegenwart dieser Mutante hat ATP keinerlei Einfluss auf die SDDS-Aktivität von Pol β (Abbildung 3.17).

Die Versuche mit der adenylierungsfähigen und ligationsinaktiven Mutante Lig III D423A zeigen, dass außer der Adenylierung auch die Ligationsaktivität für die Hemmung von SDDS in Anwesenheit von ATP verantwortlich ist. In Anwesenheit von XRCC1 reicht die Adenylierung allein nicht aus, um die Aktivität von Pol β zu hemmen (Abbildung 3.20, vgl. 4.3.2). Es ist anzunehmen, dass im Falle des Wildtyps die Ligationsaktivität ausschlaggebend für die Hemmung von SDDS in Anwesenheit von ATP Wahrscheinlich beruht der hemmende Effekt der Ligation darauf, dass Pol β das Substrat für die SDDS entzogen wird. Interessanterweise besitzt die Mutante Lig III D423N eine deutlich nachweisbare Ligationsaktivität (Abbildung 3.18). Es ist bekannt, dass der hier ausgetauschte konservierte Aspartatrest an der Übertragung des Adenylatrestes vom Enzym auf DNA beteiligt ist (Sriskanda und Shuman, 1998). Der Reaktionsmechanismus ist noch nicht bekannt. Die entsprechende Mutante von humaner Lig I, bei der Aspartat gegen Asparagin ausgetauscht wurde, wurde als ligationsinaktiv beschrieben (Kodama et al., 1991). Im Fall der DNA-Ligase von Chlorella-Virus PBCV-1 wies eine solche Mutante jedoch noch nachweisbare Aktivität auf (Sriskanda und Shuman, 1998). Da die Aktivität von PBCV-1-Ligase mit wesentlich genaueren Methoden bestimmt wurde und für Lig III nun das gleiche Ergebnis vorliegt, ist anzunehmen, dass alle ATP-abhängigen DNA-Ligasen nicht unbedingt eine Säurefunktion an dieser Aminosäureposition benötigen.

Lig III kann als Sensor für die Verfügbarkeit von ATP angesehen werden, der die ATP-abhängige Regulation des BER-Mechanismus vermittelt. Interessanterweise wurde bereits in der Literatur beschrieben, dass auch Lig I die Länge der Reparaturintermediate im PCNA-abhängigen BER-Mechanismus verringert. Lig I inhibiert dabei offenbar die SDDS-Aktivität der DNA-Polymerasen δ und ϵ (Pascucci et al., 1999). Die hier präsentierten Ergebnisse erweitern das Wissen über die regulatorischen Funktionen von DNA-Ligasen bei der DNA-Reparatur erheblich.

4.2.2 Rolle des katalytischen Zentrums von Lig III bei der DNA-Bindung

Auch in Abwesenheit von ATP inhibiert Lig III die Aktivität von Pol β (Abbildung 3.9). Dabei handelt es sich offenbar um einen Effekt, der unabhängig von der Adenylierung und damit unabhängig von der katalytischen Aktivität ist. Erstaunlicherweise ist diese ATP-unabhängige Inhibierung jedoch bei den untersuchten Mutanten wesentlich schwächer ausgeprägt als beim Wildtyp (Abbildungen 3.17, 3.20, 3.21). Die Mutante Lig III D423A ist zwar in der Lage, Pol β in Anwesenheit von ATP, d.h. im adenylierten Zustand, zu hemmen (Abbildung 3.20, Bahn 7). Dieser Effekt konnte beim Wildtyp aufgrund der Ligationsaktivität

nicht isoliert beobachtet werden. In Abwesenheit von ATP hemmt Lig III D423A die Pol β -Aktivität jedoch in weit geringerem Maße als der Wildtyp (Abbildung 3.20, Bahn 8). Diese Inhibierung durch Lig III D423A ist unabhängig von der Ligation, aber offenbar nicht unabhängig von der Adenylierung. All diese Formen der ligationsunabhängigen Inhibierung könnten auf einer Kompetition um die Bindung an DNA-Einzelstrangbrüche beruhen, wobei Lig III die Bindung von Pol β und damit die weitere DNA-Synthese verhindert. Die unterschiedlichen Effekte bei Wildtyp und Mutanten könnten auf unterschiedlichen Affinitäten zur DNA beruhen, die abhängig von der Adenylierung und den entscheidenden Aminosäuren im aktiven Zentrum sind.

In diesem Zusammenhang sind die beobachteten Unterschiede in der DNA-Bindung zwischen den Mutanten von Lig III und Lig III Wildtyp aufschlussreich (Abbildung 3.22). Die Mutanten binden schlechter an DNA-Einzelstrangbrüche als der Wildtyp, und Lig III K421V zeigt zudem eine reduzierte Bindung im Vergleich zu Lig III D423A. Die schlechtere Bindung dürfte nicht aus einer insgesamt geringeren Aktivität oder Fehlfaltung der Mutanten resultieren, da Lig III D423A und Lig III D423N sogar eine höhere Adenylierungsaktivität besitzen als der Wildtyp (Abbildungen 3.18, 3.19). Dies deutet darauf hin, dass die Aminosäurereste im katalytischen Zentrum eine Rolle bei der Bindung von DNA-Einzelstrangbrüchen spielen. Der Mechanismus der DNA-Bindung von DNA-Ligasen ist noch weitgehend unerforscht. Lig III besitzt als einzige bekannte DNA-Ligase mit dem Zinkfinger ein regelrechtes DNA-Bindemotiv, dass jedoch nicht für die Enzymaktivität benötigt wird (Mackey et al., 1999). Lig III bindet offenbar wie alle anderen DNA-Ligasen das zu ligierende Substrat mit der katalytischen Domäne. Über die daran beteiligten Aminosäuren ist noch wenig bekannt (Timson et al., 2000). Für die DNA-Ligasen von Vaccinia-Virus und Chlorella-Virus PBCV1 wurde beschrieben, dass die Adenylierung die Bindung an DNA-Einzelstrangbrüche deutlich verbessert. Dabei kann entweder das Enzym oder die DNA adenyliert sein (Sekiguchi und Shuman, 1997; Sriskanda und Shuman, 1998). Die Adenylierung induziert eine Konformationsänderung der Ligase und der Adenylatrest interagiert mit dem 5'-Phosphat des DNA-Einzelstrangbruchs (Odell et al., 2000). Dies erklärt jedoch nicht die Bindung von nicht adenylierter Lig III an Einzelstrangbrüche, die in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde (Abbildung 3.16 C). Die Resultate mit den Mutanten von Lig III weisen darauf hin, dass an diesem unbekannten Bindungsmechanismus offenbar auch Aminosäuren des aktiven Zentrums, Lysin 421 und Aspartat 423, beteiligt sind. Dies würde erklären, warum nur der Wildtyp die SDDS-Aktivität von Pol β in Abwesenheit von ATP inhibiert.

Ungeklärt bleibt jedoch der Einfluss der Adenylierung auf die Bindung von Lig III an Einzelstrangbrüche. Eine erhöhte Affinität von adenylierter Lig III zu Einzelstrangbrüchen würde zu den Literaturdaten passen und den ATP-abhängigen Einfluss der Mutante Lig III D423A auf die SDDS-Aktivität von Pol β erklären (Abbildung 3.20, Bahn 7). Ein solcher

Einfluss der Adenylierung auf die DNA-Bindung von Lig III war jedoch durch EMSA nicht nachweisbar (Abbildung 3.22).

Die hier beschriebenen Ergebnisse stellen einen neuen Aspekt hinsichtlich der DNA-Bindung von DNA-Ligasen dar. Der Austausch von einzelnen Aminosäuren hat deutliche Auswirkungen nicht nur auf die katalytische Aktivität, sondern auch auf die DNA-Bindung von Lig III und damit wahrscheinlich auch von anderen DNA-Ligasen. Offenbar spielt das katalytische Zentrum auch hier eine wichtige Rolle. Bisher wurde der Mechanismus der DNA-Bindung von DNA-Ligasen vorwiegend anhand von Röntgenkristallstrukturen untersucht (Odell et al., 2003; Odell et al., 2000). In Zukunft könnte auch gerichtete Mutagenese einen bedeutenden Beitrag zur Aufklärung des Katalysemechanismus dieser wichtigen Enzymklasse leisten.

4.3 Die koordinierende Rolle von XRCC1

4.3.1 Stimulierung der Pol β-Aktivität

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Stimulierung der SDDS-Aktivität von Pol β durch XRCC1 nachgewiesen (siehe 3.4.1). Diese Stimulierung ist unabhängig von der ATP-Konzentration (Abbildung 3.6). XRCC1 bindet gleichzeitig an Pol β und DNA-Einzelstrangbrüche und ist dadurch in einer günstigen Lage, um die Aktivität oder DNA-Bindung von Pol β zu beeinflussen (Bhattacharyya und Banerjee, 2001; Marintchev et al., 1999).

Bei der beobachteten Stimulierung handelt es sich um einen für XRCC1 spezifischen Mechanismus, wie der Vergleich mit dem Einfluss von FEN 1 auf Pol β zeigt. Der positive Einfluss von FEN 1 auf die SDDS durch Pol β (Abbildung 3.11) wurde bereits in der Literatur beschrieben (Prasad et al., 2000). In Gegenwart von Lig III fällt diese Stimulierung von Pol β durch FEN 1 wesentlich schwächer aus (Abbildung 3.12). Lig III selbst inhibiert die SDDS-Aktivität von Pol β (vgl. 4.2.1), was der Grund für den schwächeren Einfluss von FEN 1 unter diesen Bedingungen sein könnte.

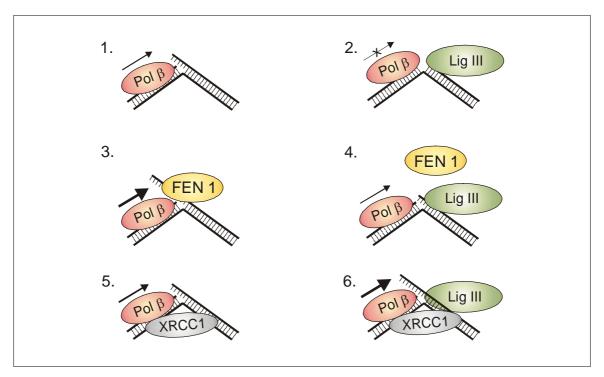


Abbildung 4.3: Unterschiedliche Einflüsse von Lig III, FEN 1 und XRCC1 auf die Aktivität von Pol β . 1. Isolierte Pol β katalysiert SDDS (Pfeil). 2. Die Anwesenheit von Lig III inhibiert die SDDS-Aktivität von Pol β . 3. FEN 1 stimuliert SDDS durch Pol β stark. 4. In Anwesenheit von Lig III ist die Stimulierung durch FEN 1 reduziert. 5. XRCC1 stimuliert SDDS durch Pol β relativ schwach. 6. In Anwesenheit von Lig III stimuliert XRCC1 die SDDS deutlich stärker. Pol β wird nicht durch Lig III inhibiert.

Im Vergleich zum Effekt von FEN 1 ist die direkte Stimulierung von Pol β durch XRCC1 schwach (Abbildung 3.11). Dagegen stimuliert XRCC1 Pol β in Anwesenheit von Lig III deutlich stärker als FEN 1 (Abbildung 3.12). Da Lig III die Pol β -Aktivität inhibiert, kann es sich hier nicht um einen additiven stimulierenden Effekt von XRCC1 und Lig III handeln. Der Einfluss von XRCC1 auf Pol β könnte allerdings durch Lig III verstärkt werden, wenn die Affinität von XRCC1 zur DNA und/oder Pol β im Komplex mit Lig III erhöht sein sollte. Über einen solchen Einfluss von Lig III auf die DNA-Bindung von XRCC1 ist bisher noch nichts bekannt (Caldecott, 2003).

Die Gesamtmenge an Ligationsprodukten ist in BER-Ansätzen, die außer ATP auch XRCC1 enthalten, erhöht (u.A. Abbildungen 3.7 und 3.8). XRCC1 stimuliert jedoch die Ligationsaktivität von Lig III nicht direkt (Abbildung 3.13). Folglich muss es sich um einen Effekt der Stimulierung von Pol β durch XRCC1 handeln, wobei der verstärkte Einbau eines Nukleotids die Menge an Ligationsubstraten und damit auch die Menge an Ligationsprodukten erhöht. In Anwesenheit von ATP stimuliert XRCC1 demnach den Einbau des ersten Nukleotids durch Pol β . Danach erfolgt sofort die Ligation und somit "short patch BER".

4.3.2 Koordination der Aktivitäten von Pol β und Lig III

Die Ergebnisse zeigen, dass XRCC1 die Inhibierung von SDDS durch Lig III aufheben kann (Abbildung 3.12). Dies könnte zum Teil eine Erklärung für den besonders starken Effekt von XRCC1 auf die Pol β -Aktivität in Anwesenheit von Lig III sein. XRCC1 interagiert sowohl mit Pol β (Caldecott et al., 1996) als auch mit Lig III (Caldecott et al., 1994) und kann daher beide Enzyme gleichzeitig beeinflussen. Die Ligationsaktivität von Lig III wird nicht von XRCC1 stimuliert und nur durch einen starken Überschuss von XRCC1 gehemmt (Abbildung 3.13). Bei der durch XRCC1 aufgehobenen Inhibierung von Pol β handelt es sich wahrscheinlich um jene Form der Inhibierung, die unabhängig von der Ligationsaktivität ist (vgl. 4.2.2). Möglicherweise kann XRCC1 die Affinität von Lig III an DNA-Einzelstrangbrüche verändern, ohne dabei die Ligation zu beeinflussen.

XRCC1 stimuliert in Abwesenheit von ATP die SDDS durch Pol β und damit "long patch BER". In Anwesenheit von ATP wird dagegen nur den Einbau von einem Nukleotid stimuliert und gleichzeitig die Ligation ermöglicht, was einer Stimulierung von "short patch BER" gleichkommt (vgl. 4.3.1). Auch dies spricht dafür, dass XRCC1 zwar eine Inhibierung der Pol β -Aktivität durch Lig III aufheben kann, gleichzeitig aber nicht die Ligation beeinträchtigt.

Außerdem ist interessant, dass der hemmende Einfluss von adenylierter Lig III D423A auf Pol β nur in Abwesenheit von XRCC1 zu beobachten ist (Abbildung 3.20). XRCC1 vermittelt demnach keine adenylierungsabhängige Regulation der Pol β -Aktivität, sondern hebt diese im Gegenteil wieder auf. Vermutlich beruht auch dieser Effekt auf einem

Einfluss von XRCC1 auf die Affinität von adenylierter Lig III D423A zu DNA-Einzelstrangbrüchen.

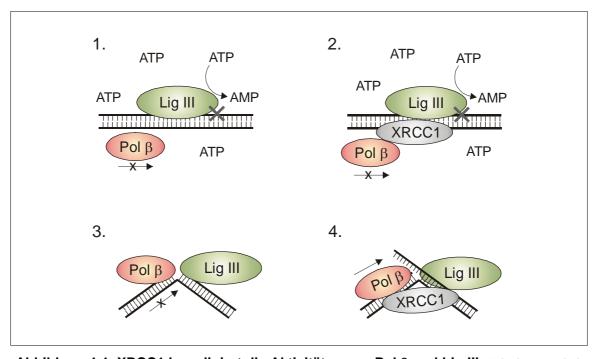


Abbildung 4.4: XRCC1 koordiniert die Aktivitäten von Pol β und Lig III. 1. In Anwesenheit von ATP inhibiert die Ligationsaktivität von Lig III die SDDS-Aktivität von Pol β (dargestellt durch einen Pfeil). 2. Auch nach Zugabe von XRCC1 ist die SDDS-Aktivität von Pol β durch die Anwesenheit von Lig III unterdrückt. 3. Auch in Abwesenheit von ATP kann Lig III die SDDS-Aktivität von Pol β inhibieren. 4. Diese Inhibierung in Abwesenheit von ATP wird durch XRCC1 aufgehoben.

All dies spricht dafür, dass XRCC1 die Bindung von Lig III an DNA-Einzelstrangbrüche moduliert, dies jedoch unabhängig vom Adenylierungsstatus des Enzyms. Außerdem sprechen die Ergebnisse für eine entscheidende Rolle der Ligationsaktivität bei der Inhibierung von SDDS in Anwesenheit von XRCC1. Es scheint eine sehr komplexe Koordination von Pol β und Lig III durch XRCC1 zu existieren, die zur erfolgreichen Reparatur der größtmöglichen Menge an DNA-Schäden führt. Dies wird eindrucksvoll dadurch belegt, dass die Reparaturansätze mit XRCC1 immer die im Vergleich größte Menge an Ligationsprodukt hervorbringen.

Seit der Entdeckung von XRCC1 hat das Wissen um die zahlreichen Interaktionspartner dieses Proteins und seinen Einfluss auf die Aktivität vieler DNA-Reparaturenzyme ständig zugenommen. Es herrscht Übereinstimmung darüber, dass es sich aufgrund der vielen Interaktionen bei XRCC1 um ein Koordinationsprotein handeln muss, dass unterschiedliche Prozesse von BER und SSBR aufeinander abstimmt (Caldecott, 2003). Die tatsächliche Koordination verschiedener BER-Aktivitäten über eine einfache Stimulierung oder Inhibierung hinaus wurde bisher aber noch nicht beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals nachgewiesen, dass XRCC1 die Aktivität eines Enzyms (Lig III) auf die

eines anderen (Pol β) abstimmen kann. Die hier präsentierten Ergebnisse stellen daher einen bedeutenden Fortschritt für das Verständnis dieses wichtigen DNA-Reparaturproteins dar.

Das humane XRCC1-Gen wird intensiv im Rahmen der Krebs-Epidemologie untersucht und einige Polymorphismen in diesem Gen wurden bereits mit erhöhter Krebsanfälligkeit in Verbindung gebracht (Goode et al., 2002). Auf zellulärer Ebene konnten jedoch noch keine DNA-Reparatur-Defekte auf einen dieser Polymorphismen zurückgeführt werden (Taylor et al., 2002). Die genauere Erforschung von Funktion und Art der Interaktionen, die XRCC1 eingeht, könnte die Auswirkungen dieser Mutationen auf den BER-Mechanismus erhellen.

4.4 PARP-1-Aktivität und ATP

4.4.1 Poly(ADP-Ribosyl)ierung, BER und Energiesituation

In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass die katalytische Aktivität von PARP-1 im BER-Komplex in Gegenwart von ATP gehemmt ist (Abbildung 3.5). Dieses Ergebnis unterstützt die Beobachtungen an Säugerzellen. Nach Absenken des ATP-Gehalts menschlicher Zellen durch Behandlung mit DOG war eine erhöhte PARP-Aktivität nachgewiesen worden (Petermann et al., 2003). Auch Untersuchungen an neuronalem Gewebe von Ferkeln zeigten einen Anstieg der PARP-Aktivität bei ATP-Mangel (Mishra et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Aktvität von PARP-1 bei DOG-induziertem ATP-Mangel erhöht ist. Dabei verändert sich der zelluläre Gehalt an PARP-1 nicht (Abbildung 3.4).

Die Beteiligung von PARP-1 am XRCC1-koordinierten BER/SSBR-Komplex ist durch zahlreiche Literaturdaten belegt (siehe 1.2.2). Die Funktion von PARP-1 und Poly(ADP-Ribosyl)ierung bei der DNA-Reparatur ist nach wie vor unklar. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um mehrere Funktionen. PARP-1 bindet mit hoher Affinität an DNA-Einzelstrangbrüche und könnte diese so vor unerwünschten Angriffen, z.B. vor exonukleolytischem Abbau, schützen. PAR scheint außerdem ein Signal darzustellen, das BER-Proteine an Einzelstrangbrüche rekrutiert (Okano et al., 2003). Die Poly(ADP-Ribosyl)ierung von BER-Proteinen wie XRCC1 könnte deren DNA-Bindung oder Aktivität beeinflussen (Masson et al., 1998). Schließlich kann das ATP für die DNA-Ligation im BER-Mechanismus direkt aus PAR gewonnen werden (Oei und Ziegler, 2000).

Der hier gezeigte hemmende Einfluss von ATP auf die PARP-1-Aktivität hebt die Beziehung zwischen Poly(ADP-Ribosylierung) im BER-Mechanismus und zellulärer Energiesituation hervor. Bei den Prozessen, mit denen die Zelle auf DNA-Schädigung reagieren kann (DNA-Reparatur oder programmierter Zelltod durch Apoptose), spielen die Beziehungen zwischen Poly(ADP-Ribosyl)ierung und ATP eine wichtige Rolle. Einerseits kann ATP aus PAR gewonnen werden. Andererseits kann die Überaktivierung von PARP-1 nach extremer DNA-Schädigung die zellulären ATP-Vorräte dramatisch reduzieren (Carson et al., 1986). So wie die Ligation im BER-Mechanismus hängen sehr viele DNA-Reparaturprozesse von der ATP-Hydrolyse ab. Das gleiche gilt für die Apoptose, die als Reaktion auf irreparable DNA-Schäden eingeleitet werden kann. Wichtige die Apoptose initiierende Prozesse benötigen ATP, und an der Zellmembran, deren Integrität während der Apoptose lange bestehen bleibt, wird der elektrochemische Gradient unter ATP-Hydrolyse aufrechterhalten (für eine Übersicht siehe Bernstein et al., 2002). Offenbar wegen des Energiebedarfs dieses Prozesses werden im frühen Stadium der Apoptose etliche Enzyme proteolytisch inaktiviert, die NAD+ oder ATP verbrauchen, darunter auch PARP-1 (Soldani und Scovassi, 2002) und Lig III (Bordone und Campbell, 2002). Bei dramatischer Reduzierung der zellulären ATP-Vorräte durch Hemmung der Atmungskette oder Überaktivierung von PARP-1 tritt dementsprechend ein Zelltod ein, dem die Charakteristika der Apoptose fehlen und der daher als Nekrose angesehen wird. Zwischen diesem nekrotischen Zelltod und der Aktivität von PARP-1 wurden bereits wiederholt Verbindungen aufgezeigt (Bürkle, 2001). Klar ist, dass die Poly(ADP-Ribosyl)ierung und der Energiehaushalt der Zelle in enger Verbindung miteinander stehen.

4.4.2 Beziehung zwischen ATP und der Aktivität von PARP-1

Die ATP-abhängige Regulation von PARP-1 muss nun in dieses komplizierte Beziehungsgeflecht eingeordnet werden. Wenn erhöhte PARP-1-Aktivität die zellulären Energievorräte verbraucht, erscheint es rätselhaft, dass das Enzym durch ATP-Mangel noch zusätzlich aktiviert werden soll. Interessanterweise veröffentlichte die Gruppe von E. Kun kürzlich Ergebnisse, nach denen die Inhibierung von isolierter PARP-1 durch ATP durch einen nicht-kompetitiven Mechanismus erfolgt. ATP inhibierte in dieser Untersuchung vor allem die – auch in der vorliegenden Arbeit analysierte – Automodifikation, weniger die Trans-Poly(ADP-Ribosyl)ierung von Histonen (Kun et al., 2004). Möglicherweise wird durch ATP-Mangel nur eine bestimmte Form der PARP-Aktivität, oder auch eine bestimmte Form der Automodifizierung, stimuliert, die vergleichsweise gering ist und nicht zum Verbrauch der zellulären Energievorräte beiträgt. Statt dessen könnte es sich dabei um die PARP-Aktivität handeln, die im BER-Komplex für die Bereitstellung von ATP benötigt wird.

Bei diesen Energiemangelsituationen, unter denen ATP für die DNA-Ligation aus PAR gewonnen wird, handelt es sich wohl nicht um Situationen von extremem ATP-Mangel auf Gesamtzellebene, die ohnehin zum Zelltod führen würden, sondern vielmehr um einen lokalen ATP-Mangel im Zellkern an den DNA-Schadenstellen. Unter solchen Bedingungen könnte diese spezielle Funktion der Poly(ADP-Ribosyl)ierung für die Bereitstellung von ATP eine wichtige Rolle spielen.

Bei dem hier gezeigten hemmenden Einfluss von ATP auf die PARP-1-Aktivität handelt es sich um einen weiteren wichtigen Aspekt der energieabhängigen Regulation des BER-Mechanismus. Eine zukünftige Identifizierung der Enzyme, welche die Gewinnung von ATP aus PAR ermöglichen, wird die Beziehung zwischen Poly(ADP-Ribosyl)ierung und Energiesituation weiter erhellen.