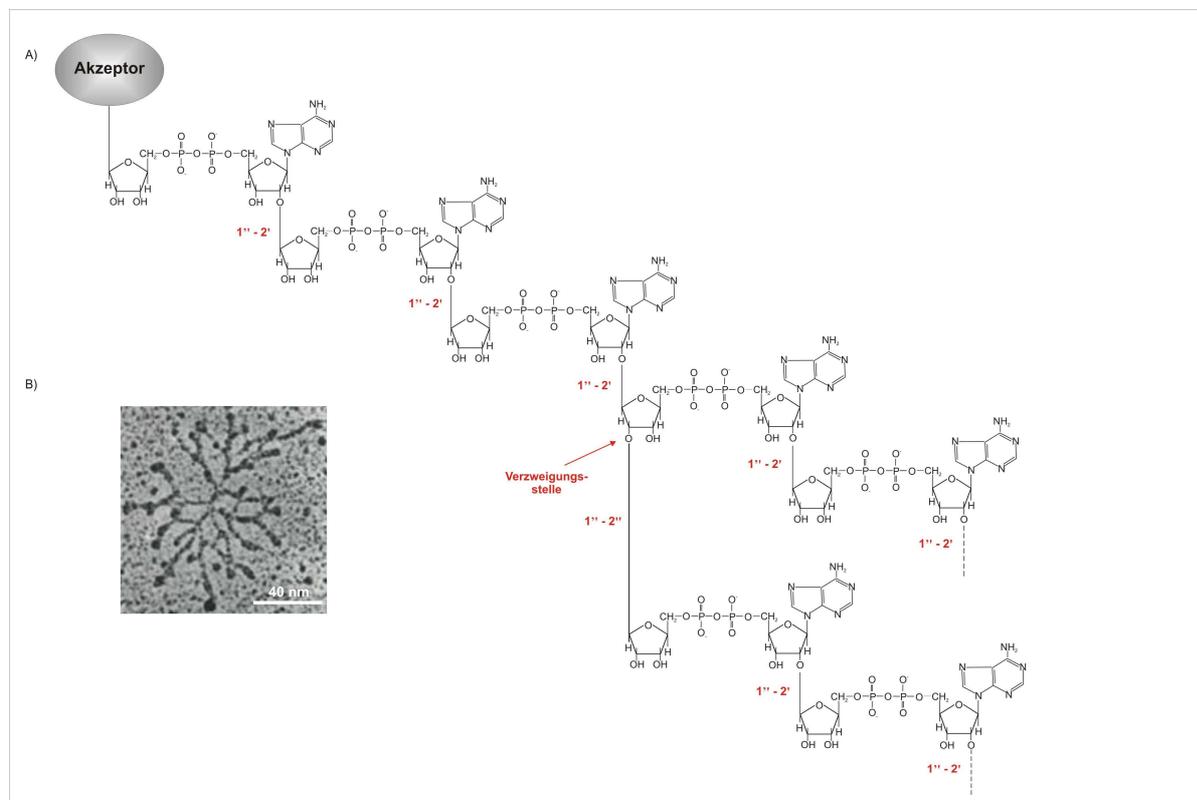


# 1 Einleitung

Bei der Poly (ADP-Ribosyl)ierung handelt es sich um eine reversible posttranslationale Modifikationsreaktion, die an der Regulation basaler zellulärer Prozesse wie der Kontrolle der genomischen Stabilität und dem zellulären Überleben beteiligt ist. Poly (ADP-Ribosyl)ierungsreaktionen wurden mit Ausnahme von *S. cerevisiae* bisher in allen niederen und höheren Eukaryoten sowie in dem prokaryotischen Archeon *Sulfolobus solfataricus* nachgewiesen (zur Übersicht Althaus & Richter, 1987, Oei *et al.*, 1997, D'Ámours *et al.*, 1999).

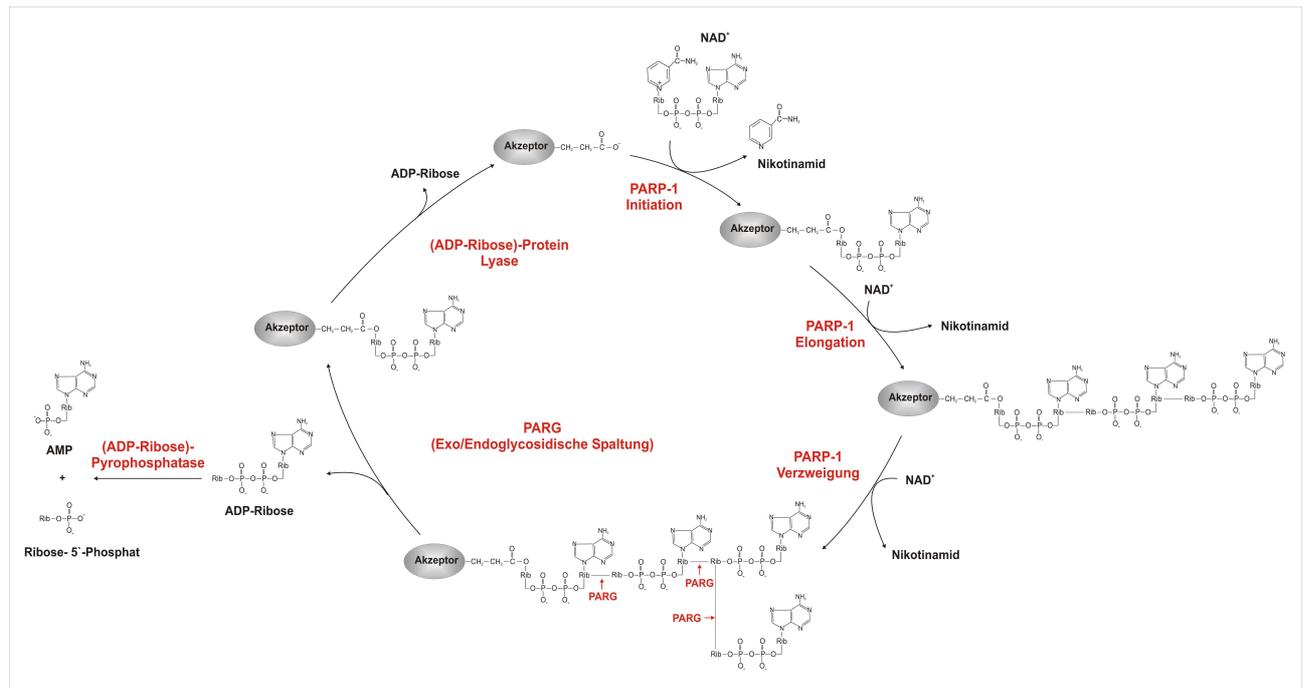


**Abb. 1.1: Struktur von Poly (ADP-Ribose)**

**A)** Schematische Darstellung der Struktur von PAR. Die Verknüpfung der einzelnen ADP-Ribose-Einheiten erfolgt über  $\alpha$ -O-glykosidische Bindungen. Die linearen (1''-2'') sowie die verzweigenden (1''-2'') Verknüpfungen sind gekennzeichnet. **B)** Elektronenmikroskopische Aufnahme von isolierten PAR-Polymeren (aus de Murcia *et al.*, 1983)

Hauptverantwortlich für die Synthese von Poly (ADP-Ribose) ist das im Zellkern lokalisierte Enzym Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1 (PARP-1). Als Substrat der Poly (ADP-Ribosyl)ierung dient die oxidierte Form des Pyridindinukleotids  $\text{NAD}^+$ . Während der Reaktion erfolgt im  $\text{NAD}^+$ - Molekül zunächst die Spaltung der N-glykosidischen Bindung zwischen Nikotinamid und Ribose. Anschliessend wird ein ADP-Ribose Monomer auf die Carboxylatgruppen von Akzeptorproteinen übertragen. Durch die weitere Addition von ADP-Ribose Einheiten werden Poly (ADP-Ribose)-Polymere (PAR) synthetisiert (siehe Abb. 1.1 und Abb. 1.2). Der Hauptakzeptor von PAR *in vivo* ist PARP-1 selbst.

Desweiteren ist die Heteromodifikation zahlreicher anderer Kernproteine beschrieben. PARP-1 weist eine hohe Affinität zu Nukleinsäuren auf und wird durch die Bindung an DNA aktiviert. Kommt es infolge einer genotoxischen Schädigung zur Anhäufung von DNA-Schäden, so resultiert dies in einer gesteigerten Poly (ADP-Ribosyl)ierung. Die Polymere besitzen in der Zelle nur eine geringe Halbwertszeit von wenigen Minuten. Der Grund dafür ist die Aktivität des Enzyms Poly (ADP-Ribose) Glycohydrolase (PARG), welche PAR zu ADP-Ribose Monomeren hydrolysiert. Im Unterschied zur PARP-1 ist die Funktion dieses abbauenden Proteins deutlich weniger untersucht und verstanden.



**Abb. 1.2: Schematische Zusammenfassung des PAR-Metabolismus** (modifiziert nach Diefenbach & Burkle, 2005)

PARP-1 spaltet innerhalb von  $\text{NAD}^+$ -Molekülen die N-glykosidische Bindung zwischen Nikotinamid und der Ribose. Anschliessend erfolgt durch die sukzessive Übertragung von formierten ADP-Ribose-Einheiten auf Akzeptorproteine, wodurch diese mit langen, verzweigt-kettigen PAR-Molekülen modifiziert werden. Beim Abbau erfolgt die exo- und endoglykosidische Spaltung der PAR-Moleküle in ADP-Ribose-Monomere durch die PARG. Die Abspaltung der proximalen ADP-Ribose-Einheit wird vornehmlich durch die (ADP-Ribose)-Protein-Lyase katalysiert. ADP-Ribose-Moleküle werden letztlich durch (ADP-Ribose)-Pyrophosphatasen in AMP und Ribose-5'-Phosphat gespalten.

In der Vergangenheit wurden mehrfache Untersuchungen für die *in vivo* Funktion der Poly (ADP-Ribosyl)ierung durchgeführt. Die Bedeutung dieses Prozesses für die Integrität des Genoms resultiert aus der Koordination von Prozessen wie der DNA-Reparatur und der Apoptose.

## 1.1 Struktur und Eigenschaften von Poly (ADP-Ribose)

Unmittelbar nach der Entdeckung der Poly (ADP-Ribosyl)ierung durch Chambon *et al.* (1963) wurde in derselben Arbeitsgruppe die Primärstruktur von PAR aufgeklärt (Chambon *et al.*, 1966, Sugimura *et al.*, 1967). Es handelt sich hierbei um ein Homopolymer, indem bis zu 200 ADP-Ribose-Einheiten miteinander verbunden sind (siehe Abb. 1.1 A). Im Unterschied zu DNA oder RNA erfolgt die Verknüpfung der Monomere jedoch über 1''-2'- $\alpha$ -O-glykosidische Ribose-Ribose-Bindungen (siehe Abb. 1.1 A, Miwa *et al.*, 1977, Ueda & Hayaishi, 1985). Desweiteren kann in grösseren PAR-Polymeren eine Verzweigungen des Moleküls durch eine Verknüpfung der ADP-Ribose Einheiten über 1''-2''- $\alpha$ -O-glykosidische Bindungen erfolgen (siehe Abb. 1.1 A) (Miwa *et al.*, 1977, Kanai *et al.*, 1982). Die Häufigkeit der Verzweigung beläuft sich auf ca. 1 pro 30-50 ADP-Ribose Moleküle (Miwa & Sugimura, 1984). Die verzweigt-kettige Struktur der Polymere wurde sowohl in elektronenmikroskopischen Studien an *in vitro* synthetisierten PAR-Ketten (siehe Abb. 1.1 B, de Murcia *et al.*, 1983, Hayashi *et al.*, 1983) als auch an aus Zellen isolierten PAR-Polymeren (Malanga & Althaus, 1994) bestätigt. Von Minaga & Kun (1983) wurde für grössere PAR-Polymere eine helikale Sekundärstruktur ähnlich zur DNA postuliert. Mit der Generierung spezifische  $\alpha$ -PAR-Antikörper (Kawamitsu *et al.*, 1984, Affar *et al.*, 1998) war es möglich, den zellulären Gehalt an PAR zu bestimmen. Es zeigte sich, dass in Zellen latent nur geringe Mengen oligomerer (ADP-Ribose)-Ketten (3-15 ADP-Ribose Einheiten) vorhanden sind (3-30 ng/mg DNA, Ueda, 1985). Erfolgt eine Induktion der PAR-Synthese durch die Schädigung von Zellen mit genotoxischen Agenzien, so kann sich der Gehalt der Polymere im Zellkern um das 100-500-fache steigern (D'Ámours *et al.*, 1999).

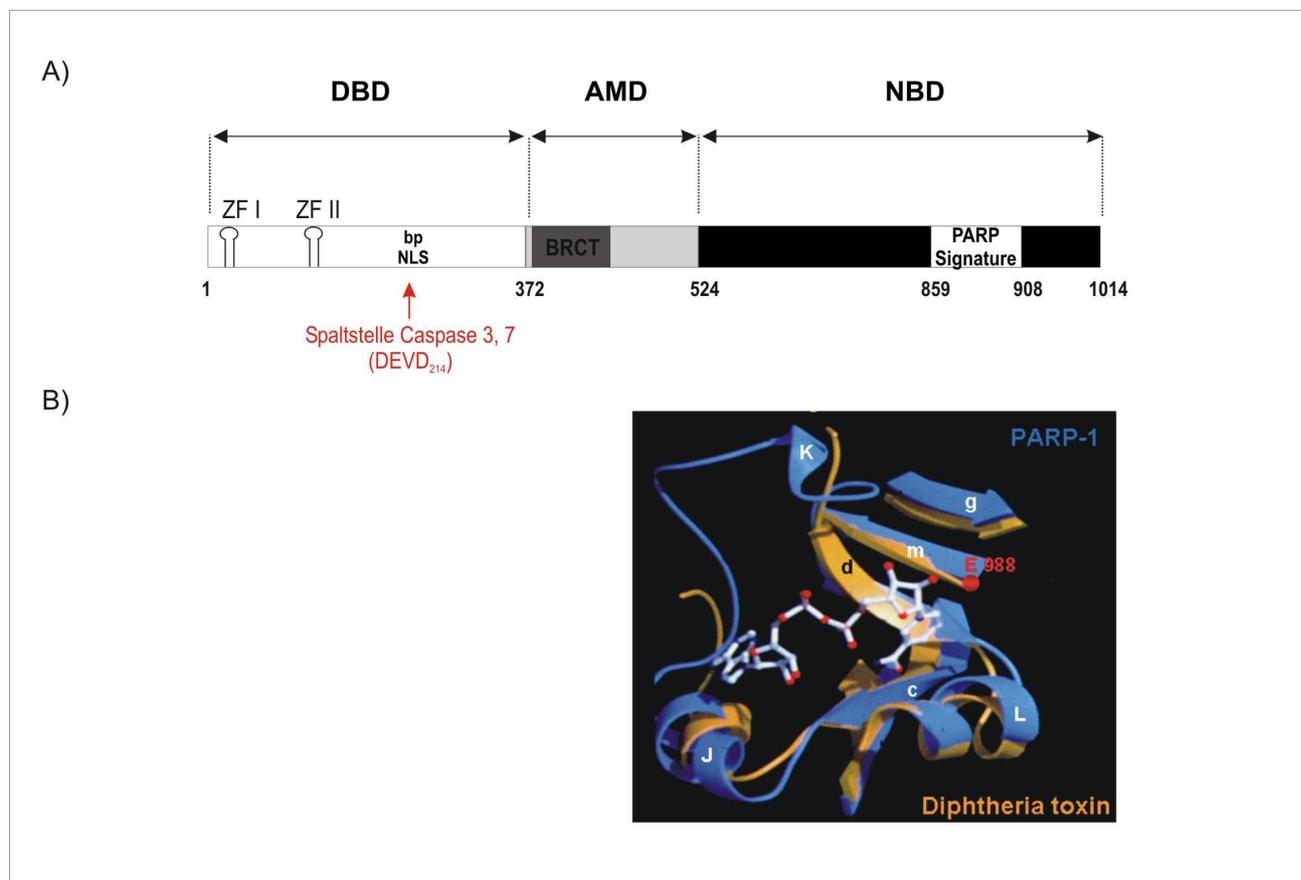
Die Untersuchungen der letzten Jahre haben zunehmend gezeigt, dass auch zelluläre Abläufe in anderen Kompartimenten wie dem GOLGI (Chi & Lodish, 2000, Lyons *et al.*, 2001), der Zellmembran (Dumitriu *et al.*, 2003, Yeh *et al.*, 2006) oder im Mitochondrium (Du *et al.*, 2003) durch Poly (ADP-Ribosyl)ierungsreaktionen reguliert werden können. Noch unklar ist, wie sich diese Polymere strukturell von den im Zellkern synthetisierten Molekülen unterscheiden.

## 1.2 Die Synthese von Poly (ADP-Ribose)

### 1.2.1 PARP-1

Bei dem für die Synthese von PAR hauptverantwortlichen Enzym PARP-1 handelt es sich um ein 113-kDa grosses kernlokalisiertes Metalloenzym (Schreiber *et al.*, 1992, Desnoyers *et al.*, 1996). Durch limitierte Proteolyse wurde die strukturelle Organisation der PARP-1 (siehe Abb. 1.3), bestehend aus der aminoterminalen DNA-bindenden Domäne (DBD), einer zentralen Automodifikationsdomäne

(AMD) und der carboxyterminalen katalytischen Domäne aufgeklärt (Kameshita *et al.*, 1984, D'Ámours *et al.*, 1999). Die DBD enthält eine bipartite Kernlokalisationssequenz (*nuclear localisation signal/ NLS*) und zwei Zinkfinger-Motive. Zinkfinger motive sind in DNA-bindenden Proteinen verbreitet, die ihre Struktur durch die Komplexierung von  $Zn^{2+}$  erhalten. Die Zn-Finger von PARP-1 besitzen ein ungewöhnliches  $CX_2C-X_{28/30}-WHX_2C$ -Motiv, indem die Komplexierung des  $Zn^{2+}$  über drei Cysteinreste und ein Histidinmolekül erfolgt (de Murcia *et al.*, 1994). Neben PARP-1 wurde dieser Zn-Fingertyp noch bei der humanen DNA-Ligase III (Mackey *et al.*, 1999, Leppard *et al.*, 2003) und der DNA-3'-Phosphoesterase (AtZDP) aus *Arabidopsis thaliana* (Petrucco, 2003) gefunden wurde. Die Zn-Finger binden an die DNA und beeinflussen dadurch die enzymatische Aktivität dieser Enzyme. Für PARP-1 wurde die Aktivierung sowohl durch DNA-Einzelstrangbrüche (de Murcia *et al.*, 1994, El-Khamisy *et al.*, 2003, Okanon *et al.*, 2003) als auch DNA-Doppelstrangbrüche (Audebert *et al.*, 2004, Kun *et al.*, 2004, Lonskaya *et al.*, 2005) gezeigt.



**Abb. 1.3: Funktionelle Domänen von PARP-1**

A) Schematische Darstellung von PARP-1. Gekennzeichnet wurden die Lage und Aminosäureposition der drei distinkten Domänen DBD (DNA-bindende Domäne), AMD (Automodifikationsdomäne) und NBD (katalytische Domäne) sowie die bipartite Kernlokalisationssequenz (bp NLS). Die Aminosäurepositionen wurden aus D'Ámours *et al.* (1999) entnommen. B) Vergleich der Kristallstrukturen der katalytischen Domäne von PARP-1 (blau) und dem Diphtheria Toxin (*Corynebacterium diphtheriae*), gebunden mit dem NAD-Analogen Carba-NAD<sup>+</sup>. Die Position der für die Katalyse essentiellen Aminosäure E<sub>988</sub> ist gekennzeichnet. (Abbildung modifiziert entnommen von [http://parplink.u-strasbg.fr/information/family/2\\_1\\_12.html](http://parplink.u-strasbg.fr/information/family/2_1_12.html), vgl. auch Ruf *et al.*, 1996)

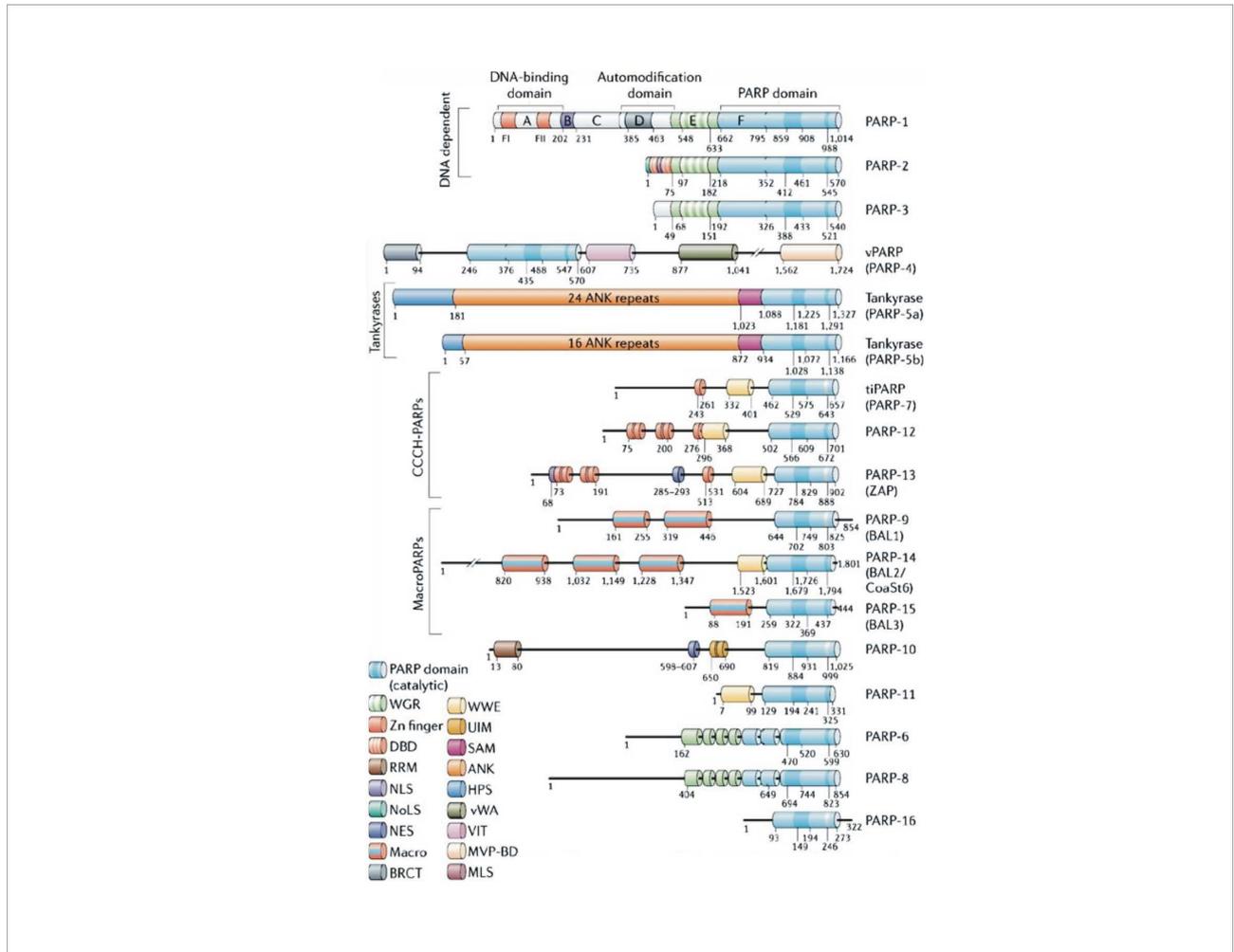
Die Automodifikationsdomäne ist jene Domäne der PARP-1, die vornehmlich als Akzeptor während der Automodifizierung mit PAR fungiert (Desmarais *et al.*, 1991). Über das in dieser Domäne befindliche BRCT-Motiv (*BRCA-1 carboxyterminus motif*) wurde eine Interaktion von PARP-1 mit zahlreichen nuklearen Proteinen gezeigt (vgl. auch Kapitel 1.5). Neben der Interaktion trägt die durch PARP-1 katalysierte Heteromodifikation von Transkriptionsfaktoren, DNA-Reparaturproteinen und Chromatin-assoziierten Proteinen mit PAR zur Regulation DNA-vermittelter Prozesse bei (D'Ámours *et al.*, 1999, Diefenbach & Burkle, 2005).

Die katalytische NAD<sup>+</sup>-bindende Domäne der PARP-1 befindet sich im C-terminalen Bereich (AS 524-1014). Ein Vergleich aller bisher klonierten PARP-1 cDNAs aus Eukaryoten weist die höchsten Homologien im Bereich dieser Domäne auf (Ame *et al.*, 2004). Insbesondere in dem für die Katalyse essentiellen Proteinabschnitt (AS 859-908, *PARP-Signature*) finden sich kaum Aminosäureaustausche zwischen den Enzymen der einzelnen Spezies (Ame *et al.*, 2004, Schreiber *et al.*, 2006). 1996 wurde von Ruf *et al.* die Kristallstruktur der katalytischen Domäne der PARP-1 (Huhn) mit dem NAD<sup>+</sup>-Analogon Carba-NAD<sup>+</sup> aufgeklärt (siehe Abb. 1.3 B). Die Auswertung ergab für die NBD keinerlei Ähnlichkeiten zu Sekundärstrukturen von metabolischen, NAD<sup>+</sup>-bindenden Enzymen (*Rossmann-fold*). Vielmehr zeigte sich eine hohe Homologien zum katalytischen Zentrum der bakteriellen Mono-(ADP-ribosylierenden) Toxine, wie dem Cholera-toxin (siehe Abb. 1.3 B, Ruf *et al.*, 1996). Die isolierte NBD ist in der Lage sämtliche Teilschritte der enzymatischen Reaktion (NAD<sup>+</sup>-Bindung, Abspaltung von Nikotinamid, ADP-Ribosetransfer) durchzuführen (Simonin *et al.*, 1993). Sie kann allerdings nicht an Nucleinsäuren binden und ist demzufolge nicht durch DNA-Strangbrüche aktivierbar (Simonin *et al.*, 1990).

## 1.2.2 Die PARP-Superfamilie

PARP-1-homologe Proteine wurden mit Ausnahme der Hefe in allen Eukaryoten gefunden (Schreiber *et al.*, 2006). Allen gemein ist die Präsenz der für den Katalysemechanismus essentiellen *PARP-Signature*. In Säugerzellen ist der grösste Teil der PARP-Aktivität (85%) auf PARP-1 zurückzuführen (Shieh *et al.*, 1998, Ame *et al.*, 1999). Eine Recherche in Datenbanken ergab, dass im humanen Genom 16 weitere PARPs codiert werden (siehe Abb. 1.4, Ame *et al.*, 2004, Schreiber *et al.*, 2006). Strukturell weist dabei PARP-2 die grössten Ähnlichkeiten zur PARP-1 auf und kann ebenso wie diese durch die Bindung an DNA aktiviert werden (Schreiber *et al.*, 2002 und 2006). PARP-2 interagiert mit PARP-1 und XRCC1 im Zellkern und übernimmt darüber eine Funktion in der DNA-Reparatur (Schreiber *et al.*, 2002). Desweiteren wird eine gemeinschaftliche Rolle von PARP-1 und PARP-2 in der Embryonalentwicklung vermutet (Menissier de Murcia *et al.*, 2003). Die PARP-Enzyme Tankyrase 1 und 2 sind am Telomer lokalisiert (Cook *et al.*, 2002) und scheinen zusammen mit PARP-2 (Dantzer *et al.*, 2004) eine Rolle bei der Regulation der Telomerstruktur zu spielen. Ausserdem wurde gezeigt, dass

eine Poly (ADP-Ribosyl)ierung, vermittelt durch Tankyrase I, essentiell für die Trennung der Chromatiden während der Mitose ist (Dynek & Smith., 2004, Chang *et al.*, 2005a, b). Die Funktion von PARP-3 ist noch weitgehend ungeklärt. Das Protein ist in Zentriolen lokalisiert und könnte eine Rolle bei der Zellteilung spielen (Augustin *et al.*, 2003, Rouleau *et al.*, 2006). Auch die Rolle der vPARP, die in cytoplasmatischen Proteinkomplexen mit derzeit noch unbekannter Funktion (*vaults*) lokalisiert ist, ist noch ungeklärt. PARP-10 wurde als Partner des Proto-Oncoproteins c-Myc identifiziert und eine regulatorische Funktion in der Zellproliferation postuliert (Yu *et al.*, 2005).

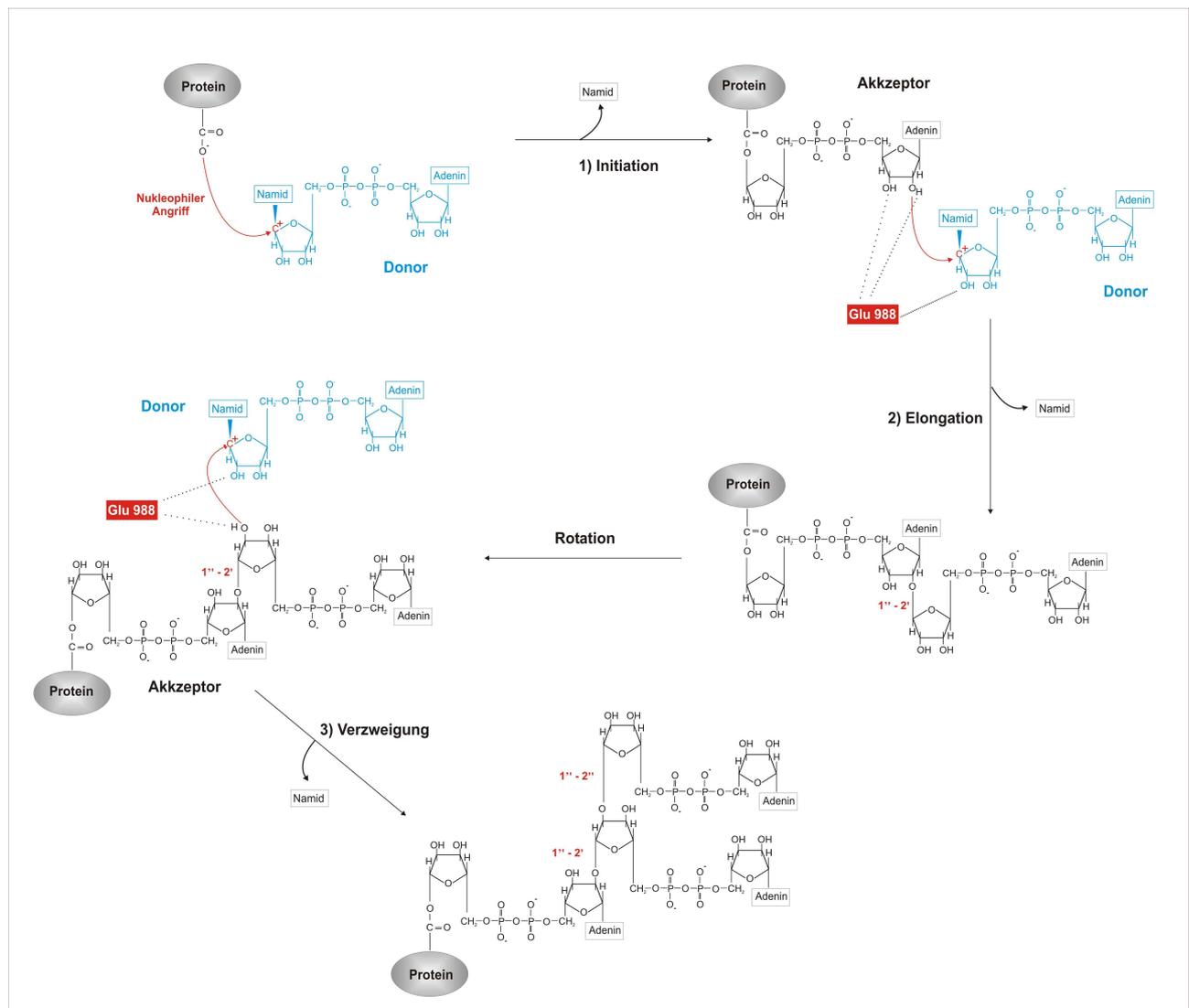


**Abb. 1.4: Die PARP-Superfamilie** (Abbildung modifiziert entnommen aus Schreiber *et al.*, 2006)  
 Schematischer Vergleich der 17 Mitglieder der PARP-Superfamilie. Innerhalb der katalytischen Domäne (PARP-Domäne) wurden die zur *PARP-Signature* (AS 859-908 der PARP-1) homologen Bereiche sowie ggf. die Äquivalente des für die Katalyse essentiellen Aminosäurerestes E<sub>988</sub> hervorgehoben. Zusätzlich wurden funktionelle Domänen dargestellt, denen eine Funktion zugeschrieben wird bei:  
**der Bindung von DNA:** Zn finger (Vermittelt durch Zn-Finger kann eine Bindung der jeweiligen PARPs an DNA (PARP-1) bzw. RNA (PARP-13 und tiPARP) erfolgen.)  
**Protein-Protein-Interaktionen:** RRM-RNA (RNA-Bindemotiv), BRCT-(BRCA1 *Carboxyterminus* Domäne), UIM (Interaktion mit Ubiquitin), SAM (*sterile α-motif*), ANK (*Ankyrin repeat*), HPS (Poly (His-Pro-Ser) Peptid), vWA (von Willebrandt Factor Typ A-Domäne), MVP-BD (Bindestelle des *major vault proteins*) zugeschrieben wird.  
**der zellulären Lokalisation:** MLS (mitochondriale Lokalisationssequenz), NLS (Zellkernimportsequenz), NoLs (nukleolare Lokalisationssequenz), NES (Zellkernexportsequenz)

### 1.3 Mechanismus der Poly (ADP-Ribosyl)ierung

Zur genauen Aufklärung des molekularen Mechanismus der Poly (ADP-Ribosyl)ierung wurden zahlreiche Studien durchgeführt. Mit der Erkenntnis, dass es sich bei PAR um ein verzweigt-kettiges Polymer handelt (siehe Abb. 1.1, Miwa *et al.*, 1979) gab es einen ersten Hinweis auf die Komplexität dieser Reaktion. Initiiert wird die Poly (ADP-Ribosyl)ierung durch die Übertragung eines ADP-Ribose Monomers auf die Carboxylatgruppe (Glutamat- bzw. Aspartat) des jeweiligen Akzeptorproteins (Kawaichi *et al.*, 1980, Desmarais *et al.*, 1991). Die prozessive distale Addition weiterer ADP-Ribose Einheiten über 1''-2'- $\alpha$ -O-glykosidische Bindungen bzw. 1''-2''-  $\alpha$ -O-glykosidische Bindungen führt zur schrittweisen Verlängerung und Verzweigung der PAR-Ketten (siehe Abb. 1.2 ) (Althaus & Richter, 1987, Alvarez-Gonzalez *et al.*, 1994). Enzymkinetische Messungen ergaben, dass im Vergleich zu der Initiation die Elongationsreaktion bevorzugt und mit deutlich grösserer Effizienz abläuft (Mendoza-Alvarez *et al.*, 2000). Durch enzymatische Untersuchungen mit mutierten Varianten der PARP-1 (de Murcia *et al.*, 1994) sowie anhand der von Ruf *et al.* (1996) gewonnenen Kristallstrukturdaten wurde für die Synthese von PAR das in Abb. 1.5 dargestellte Modell postuliert. Demnach erfolgt die Bindung des Donor-NAD<sup>+</sup>s in der katalytischen Domäne in einer solchen Form, dass die N-glykosidische Bindung destabilisiert und im Übergangszustand die Formation eines ADP-Ribosyloxocarbenium-Ions stabilisiert wird (Bellocchi *et al.*, 2006). Eine wesentliche Funktion dafür wird dem Aminosäurerest Glu<sub>988</sub> zugeschrieben, der diesen Übergangszustand durch nichtkovalente Wechselwirkungen mit der 2'-OH-Gruppe des Nikotinamidribosemoleküls fördert (siehe Abb. 1.5). Zugleich erhöht Glu<sub>988</sub> aufgrund seiner Interaktion mit dem Akzeptormolekül (2' und 3'-OH-Gruppe) dessen Nukleophilie und erlaubt damit den nukleophilen Angriff des Akzeptormoleküls auf das C<sub>1</sub>-Atom des Donors und die Knüpfung der 1'-2''- $\alpha$ -O-glykosidischen Ribose-Ribose-Bindung. Um die Verzweigungsreaktion zu ermöglichen, wurde von Ruf *et al.* (1998) eine Rotation des Akzeptormoleküls um 180° postuliert. Dadurch rückt die Nikotinamidribose-Einheit in die Akzeptorposition und wird anschliessend um eine ADP-Ribose-Einheit verlängert (siehe Abb. 1.5). Dieser Mechanismus stimmt sehr gut mit dem S<sub>N</sub>2-vermittelten Mono (ADP-Ribosyl)transfer von prokaryotischen Toxinen überein (Ruf *et al.*, 1998).

Die kinetischen Analysen mit dem Volllängenprotein zeigten, dass für eine vollständige Aktivierung der PARP-1 die Dimerisierung des Enzyms erforderlich ist. Die dafür verantwortlichen interagierenden Regionen befinden sich sowohl in der DNA-bindenden Domäne als auch der Automodifikationsdomäne der PARP-1. Im Zuge der anschliessenden PAR-Synthese wurde die Automodifizierung des Enzyms über einen intermolekularen Mechanismus nachgewiesen (Mendoza-Alvarez & Alvarez-Gonzalez 1993, Buki 1995, Griesenbeck *et al.*, 1997).



**Abb. 1.5:** Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der PAR-Synthese (modifiziert nach Ruf *et al.*, 1998)

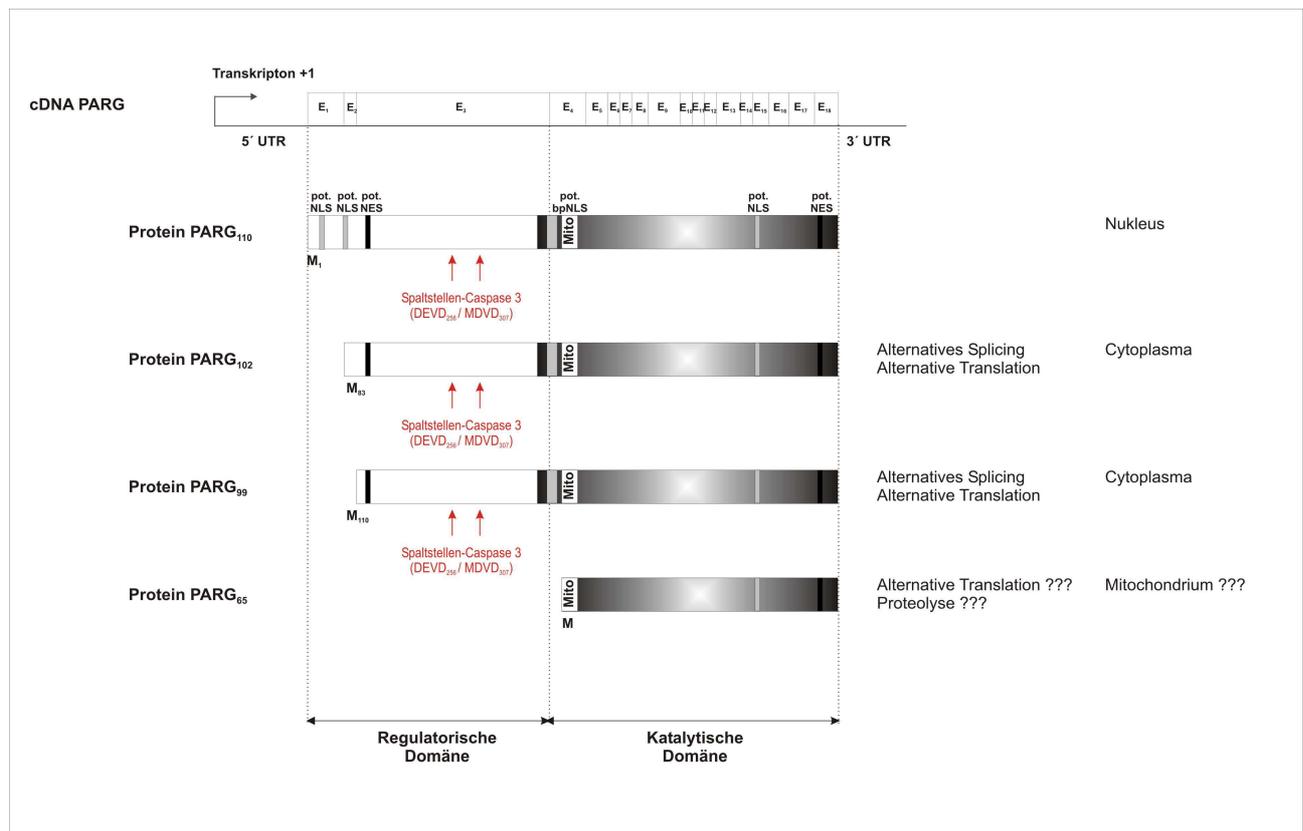
**1)** In der Initiationsreaktion erfolgt der nukleophile Angriff (roter Pfeil) der Akzeptoraminosäure (Glu, Asp) auf das C<sub>1</sub>-Atom des NAD<sup>+</sup>-Donormoleküls (blau) und die Knüpfung einer Esterbindung. **2)** Während der Elongation wird unter Zuhilfenahme des Aminosäurerestes Glu988 im Übergangszustand im NAD<sup>+</sup>-Donormolekül ein ADP-Ribosyloxocarbenium-Ion (+) stabilisiert. Die Nucleophilie des NAD<sup>+</sup>-Akzeptormoleküls wird aufgrund einer nichtkovalenten Wechselwirkung zwischen dem Glu988 und den 2'- und 3'-OH-Gruppen der ADP-Einheit erhöht. Es erfolgt die Verknüpfung der beiden ADP-Ribose-Moleküle durch 1''-2'-α-glykosidische Bindungen. **3)** Um die Elongation zu ermöglichen, rotiert das Akzeptormolekül um 180°. Dadurch rückt die Nikotinamidriboseeinheit in die Akzeptorposition und kann um eine ADP-Ribose-Einheit verlängert werden. Nucleophil (N) wird freigesetzt.

## 1.4 Der Abbau von Poly (ADP-Ribose)

### 1.4.1 Poly (ADP-Ribose) Glycohydrolase

Der physiologische Gegenspieler zu den PARPs ist die PARG. Das Enzym spaltet die linearen und verzweigten Ribose-Ribose-Verknüpfungen von PAR-Molekülen unter Freisetzung von ADP-Ribose-Monomeren (siehe Abb. 1.2). *In vitro* Studien zeigten dass der Abbau der Polymere in einem biphasischen Reaktionsmodus erfolgt, indem zunächst langkettige PAR-Moleküle durch

endoglykosidische Spaltungen degradiert werden. Danach erfolgt der deutlich langsamere Abbau der PAR-Oligomeren zu ADP-Ribose-Monomeren durch exo- und endoglykosidische Spaltungen (Hatakeyima *et al.*, 1986, Ikejima & Gill, 1988). Die Aktivität der PARG wurde erstmals vor 35 Jahren von Miwa *et al.* (1971) in Kernextrakten präpariert aus dem Rinderthymus nachgewiesen. Anschliessende Versuche zur Anreicherung der PARG aus unterschiedlichen Organismen und Geweben ergaben widersprüchliche Befunde zum Molekulargewicht (48-115 kDa) und der zellulären Lokalisation des Enzyms. Während der Reinigung des Enzyms aus Zellen vom Rind (Miwa *et al.*, 1971, Hatakeyama *et al.*, 1986), der Maus (Tsai *et al.*, 1992), der Ratte (Burzio *et al.*, 1976, Shimokowa *et al.*, 1999) und humaner Plazenta (Uchida *et al.*, 1993), wurde das Protein aus Fraktionen des Zellkerns angereichert. Daneben wurde eine cytoplasmatische PARG-Aktivität in humanen Erythrocyten und HeLa-Zellen (Tanuma *et al.*, 1986a, Rossi *et al.*, 2002) sowie in Leberextrakten aus dem Meerschwein (Tanuma *et al.*, 1986b, Maruta *et al.*, 1991) gezeigt. Auf der Grundlage der gereinigten Enzyme erfolgte die Klonierung der kodierenden cDNAs der Rinder-PARG (Lin *et al.*, 1997) und Ratten-PARG (Shimokawa *et al.*, 1999). Entsprechend den Analysen der jeweiligen Primärsequenzen handelt es sich bei beiden um 110 kDa grosse Proteine, die sowohl über nukleäre Import- als auch Exportsequenzen verfügen (Shimokowa *et al.*, 1999). In indirekten Fluoreszenzuntersuchungen wurde die Expression und Lokalisierung des GFP-fusionierten Rinderenzym sowohl im Nukleus als auch im Cytoplasma bestätigt (Winstall *et al.*, 1999b, Bonicalzi *et al.*, 2003, Haince *et al.*, 2006a). Nach rekombinanter Expression des Rinder- und Ratten-Enzyms wurde neben der vollständigen 110 kDa grossen PARG (PARG<sub>110</sub>) ein zusätzliches verkürztes Protein mit einer Grösse von ca. 65 kDa detektiert (Lin *et al.*, 1997, Shimokawa *et al.*, 1999, Winstall *et al.*, 1999a). Zeitgleich zu der hier vorliegenden Arbeit wurde das Gen der humanen PARG identifiziert und charakterisiert (Meyer *et al.*, 2003). Die Arbeiten zeigten, dass der für die humane PARG kodierende offene Leserahmen aus 18 Exonen und 17 Intronen besteht, von denen die ersten drei Exonen die putativ regulatorische Domäne und Exon 4-18 die katalytische Domäne formieren (siehe Abb. 1.6). Untersuchungen zur Expression des Proteins ergaben, dass bedingt durch alternative Splicemechanismen oder sekundäre Translationsstarts neben dem vollständigen 110 kDa grossen Protein zwei verkürzte Varianten von 102 bzw. 99 kDa gebildet werden können (siehe Abb. 1.6) (Meyer-Ficca *et al.*, 2004). Bei der partiellen Anreicherung der humanen PARG aus Jurkat-Zellen, wurde neben der 110 kDa grossen PARG, ein zusätzliches 65 kDa grosses cytoplasmatisches Protein mit PAR-Glycohydrolaseaktivität identifiziert (Thomassin *et al.*, 1990). Unklar ist zum jetzigen Zeitpunkt ob es sich hierbei um ein C-terminales proteolytisches Spaltprodukt der vollständigen PARG oder das Resultat einer alternativen Translationsinitiation handelt (Cortes *et al.*, 2004, Bonicalzi *et al.*, 2005). Im Zusammenhang mit der Induktion des apoptotischen Zelltodes wurde eine Spaltung der humanen und Rinder-PARG durch die Effektorcaspase 3 gezeigt (Affar *et al.*, 2001). Desweiteren wurde kürzlich das humane 39 kDa grosse Protein ARH3 charakterisiert, welches über eine Glycohydrolaseaktivität verfügt, strukturell jedoch keinerlei Ähnlichkeiten zu konventionellen PARG's aufweist (Oka *et al.*, 2006).

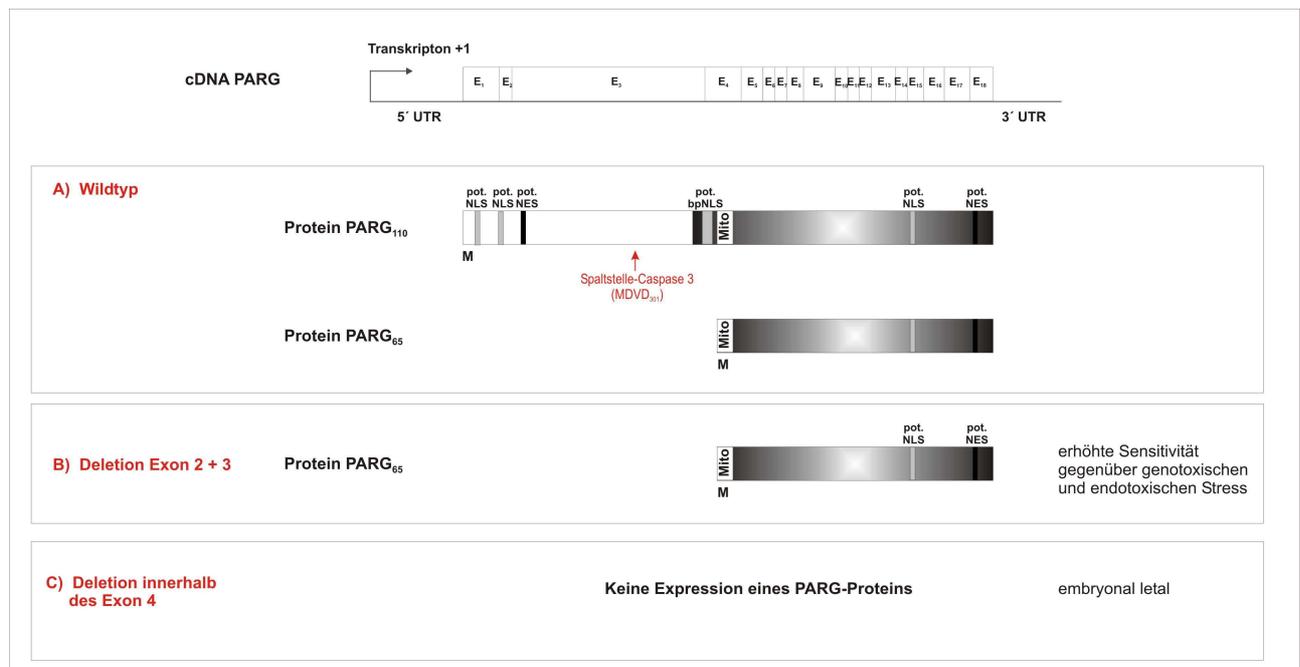


**Abb. 1.6: Schematische Darstellung der humanen PARG** (modifiziert nach Bonicalzi *et al.*, 2005)

Dargestellt ist die Struktur der humanen der PARG- cDNA und die des daraus resultierenden PARG- Proteins. Die putativ regulatorische Domäne wird durch die Exonen 1-3, die katalytische Domäne durch die Exonen 4-18 codiert. Signalsequenzen, denen eine Rolle in der zellulären Verteilung der PARG zugeschrieben wird (pot. NLS, pot. bpNLS, pot. NES, Mito) sowie die Positionen der Caspase-3-Schnittstellen wurden gekennzeichnet. Von Meyer-Ficca *et al.* (2004) wurde die Expression der N-terminal verkürzten Proteine PARG<sub>102</sub> und PARG<sub>99</sub> infolge eines alternativem Splicing oder einer alternativen Tranlationsinitiation gezeigt. Desweiteren wurde in allen humanen Zellen ein ca. 65 kDa grosses Protein mit PARG-Aktivität nachgewiesen, dessen genaue Herkunft und Lokalisation bisher noch nicht geklärt werden konnte.

NLS-Zellkernimportsequenz, bpNLS-bipartite Zellkernimportsequenz, NES-Zellkernexportsequenz, Mito-mitochondriale Lokalisationssequenz)

Zum besseren Verständnis der zellulären Funktion, wurden Versuche unternommen, die Expression der PARG in der Maus und in Insekten zu unterbinden. Die vollständige Deletion des Proteins in *Drosophila melanogaster* resultierte in einer vermehrten Akkumulation von PAR in neuronalen Zellen und dem Tod in larvalen Stadien (Hanai *et al.*, 2004). In Mäusen führte eine komplette genetische Deletion der PARG zum Abbruch der Embryonalentwicklung im Stadium der Blastozyste, bedingt durch eine Anhäufung von PAR-Polymeren (siehe Abb. 1.7 C). Eine Isolation von embryonalen Zellen aus den PARG<sup>-/-</sup>-Trophoblasten war möglich. Diese überlebten nur in Gegenwart hoher Dosen an PARP-Inhibitoren, wodurch die Akkumulation von PAR unterbunden wurde (Koh *et al.*, 2004). Von Cortes *et al.* (2004) wurde ein alternatives Mausmodell etabliert, indem statt des vollständigen Proteins nur noch die Expression eines verkürzten, katalytisch aber aktiven PARG-Moleküls (PARG<sub>65</sub>) erfolgt. Der Verlust des PARG<sub>110</sub>-Proteins führt in diesen Mäusen zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber genotoxischen und endotoxischem Stress (siehe Abb. 1.7 B).



### Abb. 1.7: Zusammenfassung der etablierten PARG *knock-out* Mausmodelle

Schematische Darstellung der PARG- cDNA der Maus sowie der vorhandenen PARG-Proteine der jeweiligen Maus *knock-out* Modelle. **A)** In Mäusen ohne genetische Manipulation wird die PARG als 110 kDa und 65 kDa-Protein exprimiert. **B)** Bei einer Deletion der Exonen 2 und 3 ist nur noch das 65 kDa-Protein mit PARG-Aktivität nachweisbar. Dies führt zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber exogenen und endogenen Stimuli (Cortes *et al.*, 2004). **C)** Eine Deletion innerhalb des Exons 4 hat den Verlust der PARG-Expression zur Folge. Dies resultiert in einer frühen embryonalen Letalität (Koh *et al.*, 2004).

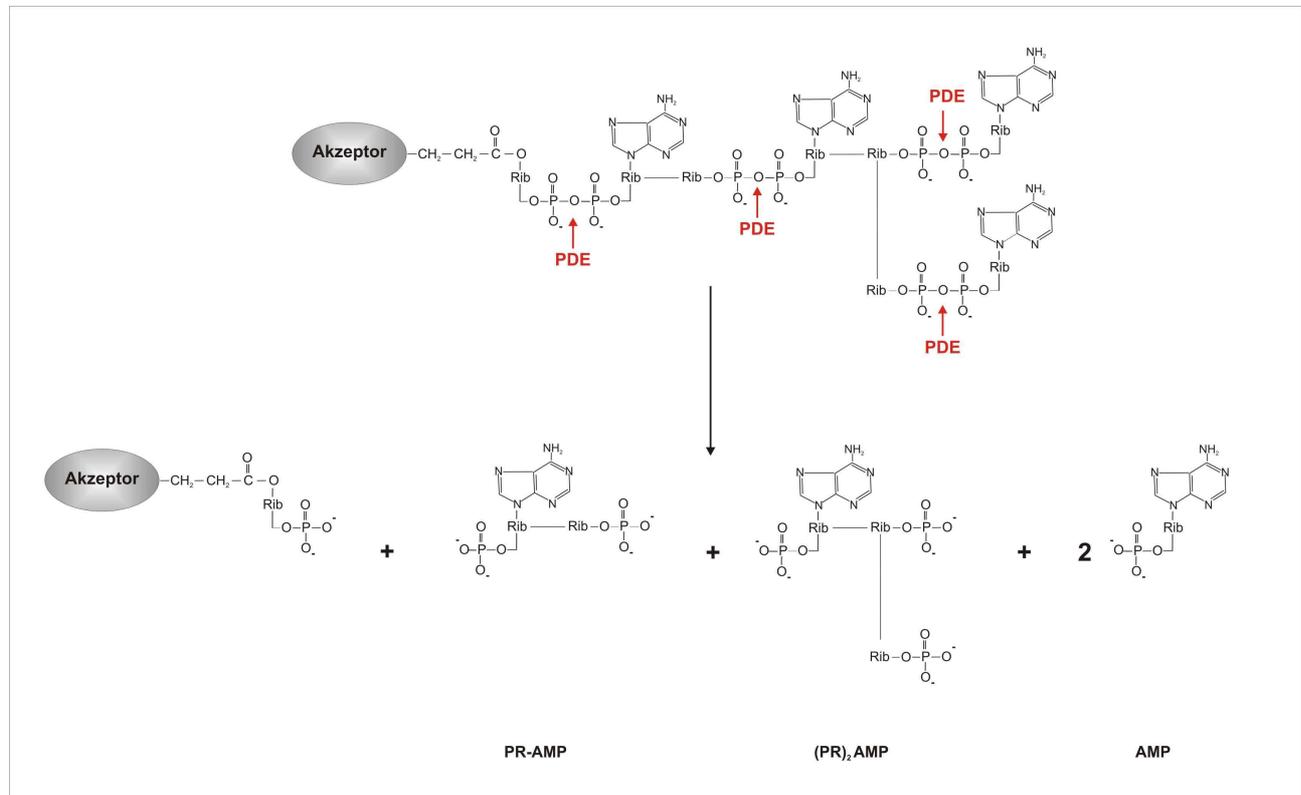
Als Alternative zum genetischen *knock-out* werden seit 20 Jahren Versuche unternommen, spezifische PARG-Inhibitoren zu isolieren oder zu synthetisieren. Mit Tanninen, pflanzliche Polyphenole isoliert aus Blättern des grünen Tees, wurde eine Hemmung des gereinigten Enzyms gezeigt (Tsai *et al.*, 1992, Bertram *et al.*, 2003, Bonicalzi *et al.*, 2005). Desweiteren ist das ADP-Analogon Adenosindiphosphat-Hydroxymethyl-Pyrrolidinediol (ADP-HPD), aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu PAR-Polymeren, als wirkungsvoller PARG-Inhibitor beschrieben (Slama *et al.*, 1995 a, b). Von Lu *et al.* (2003) wurde eine Hemmung der PARG im Tierkulturmodell durch das synthetische PAR-analoge Tiloronmolekül GPI 16552 gezeigt.

Als dritte Möglichkeit der Regulation des zellulären Gehalts und der Aktivität der PARG wurde von Blenn *et al.* (2006) der Einsatz von spezifischen siRNAs etabliert. Dabei zeigte sich, dass infolge einer dauerhaften Depletion des Enzyms um 85% die Vitalität der Zellen weder unter stressfreien Bedingungen noch nach Zugabe DNA-alkylierenden Agenzien beeinflusst wurde.

## 1.4.2 Phosphodiesterasen/Pyrophosphatasen

Der Abbau der PAR-Polymeren kann zusätzlich zur PARG auch durch Phosphodiesterasen erfolgen. Dabei werden die verknüpfenden Pyrophosphatbindungen gespalten, wobei als Reaktionsprodukte AMP, Phosphoribose-AMP [PR-AMP] und Di-Phosphoribose-AMP [(PR)<sub>2</sub>-AMP] entstehen (siehe

Abb. 1.8). Phosphodiesterasen mit einer solchen Funktion wurden bereits in Rattenleberhomogenaten sowie in humanen und murinen Zellen nachgewiesen (Hayaishi & Ueda, 1977, Boulikas, 1992, Rossi *et al.*, 2002). Die für einen optimalen Reaktionsablauf erforderlichen basischen Bedingungen (pH 8,5- 9,0) lassen jedoch vermuten, dass diese Enzyme beim Abbau von PAR nur von untergeordneter Bedeutung sind (Hayaishi & Ueda, 1977, Rossi *et al.*, 2002, Blenn *et al.*, 2006).



### Abb. 1.8: Der Abbau von PAR durch Phosphodiesterasen

Phosphodiesterasen (PDE) spalten die Pyrophosphatverknüpfungen im PAR-Molekül wobei als Reaktionsprodukte AMP, Phosphoribose-AMP [PR-AMP] und Di-Phosphoribose-AMP [(PR)<sub>2</sub>-AMP] gebildet werden.

Zusätzlich zu den PAR-degradierenden Proteinen wurden beim Menschen und der Maus Phosphodiesterasen identifiziert, welche die Spaltung des Dinukleotids ADP-Ribose in AMP und Ribose-5'-Phosphat katalysieren ((ADP-Ribose)-Pyrophosphatasen) (siehe Abb. 1.2, Rossi *et al.*, 2002, Diefenbach & Burkle, 2005, McLennan, 2006). ADP-Ribose-Moleküle können enzymunabhängig Addukte mit Proteinen formieren (Protein-Glykation) und sie dadurch irreversibel verändern (Jacobson *et al.*, 1997). Der Abbau des Dinukleotids trägt damit zur strukturellen Stabilisierung von Proteinen bei. Desweiteren ist bekannt, dass ADP-Ribose über eine Bindung an den kationischen TRP-Kanal TRPM2 die intrazelluläre Aufnahme des Signalmoleküls Ca<sup>2+</sup> reguliert. Der Abbau von ADP-Ribose wirkt sich daher nachhaltig auf den zellulären Ablauf Ca<sup>2+</sup>-vermittelter Prozesse aus (Kuhn *et al.*, 2005, McLennan, 2006).

### 1.4.3 (ADP-Ribose)-Protein Lyase

1984 wurde aus Rattenleberextrakten ein Protein gereinigt, welches in der Lage ist, den proximalen ADP-Ribose-Rest von PAR-Akzeptoren abzuspalten. Dieses als (ADP-Ribose)-Protein Lyase bekannte Enzym regeneriert unter Freisetzung des ungesättigten Zuckermoleküls 5'-ADP-3''-Deoxypent-2''-Enofuranose das unmodifizierte Akzeptorprotein (Oka *et al.*, 1984). Von Williams *et al.* (1984) wurden im Zusammenhang mit einem Defekt der (ADP-Ribose)-Protein Lyase vermehrte neuronale und renale Störungen beobachtet (*Glutamyl-Ribose-5'-Phosphat storage disease*). Begründet wurden diese Veränderungen mit der Anhäufung von mono-(ADP-ribosyl)ierten Proteinen und deren Abbauprodukte (Glutamyl-Ribose-5'-Phosphat) in den Lysosomen. Inwieweit die (ADP-Ribose)-Protein Lyase tatsächlich für den zellulären PAR-Abbau von Bedeutung ist, bleibt vorerst ungeklärt. Untersuchungen von Desnoyers *et al.* (1995) belegen, dass die Abspaltung des proximalen ADP-Ribose Monomers auch von der PARG katalysiert werden kann.

## 1.5 Biologische Bedeutung der Poly (ADP-Ribosyl)ierung

Die biologischen Funktionen der Poly (ADP-Ribosyl)ierung sind äusserst komplex und vielseitig (siehe Tab. 1.1).

Durch die Beteiligung an verschiedensten DNA-Reparaturmechanismen (zur Übersicht Shall & Murcia, 2000, Petermann *et al.*, 2005, Schreiber *et al.*, 2006) sowie der Protektion der Telomere (d'Adda di Fagagna *et al.*, 1999, Smith, 2001, Oei *et al.*, 2005, Gomez *et al.*, 2006) trägt PARP-1 zur genomischen Stabilität bei (Tong *et al.*, 2001).

Über die Modifikation von Histonen wurde PARP-1-abhängig eine Regulation der Struktur und Zusammensetzung des Chromatins gezeigt (Tulin *et al.*, 2003, Roleau *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2005). Vermittelt über die Wechselwirkung mit Proteinen des Replikationskomplexes (Simbulan-Rosenthal *et al.*, 1996, Dantzer *et al.*, 1998, Petermann *et al.*, 2005) sowie der Integration im Centrosom (Kanai *et al.*, 2003, Diefenbach *et al.*, 2005) und Centromer (Saxena *et al.*, 2002) kann PARP-1 die Replikation und korrekte Verteilung der genetischen Erbinformation kontrollieren.

Desweiteren ist PARP-1 über die Poly (ADP-Ribosyl)ierung von Transkriptionsfaktoren in die Regulation der Transkription eingebunden (Ziegler & Oei, 2001, Kraus & Lis, 2003).

**Tab. 1.1: Ausgewählte Funktionen von PARP-1**

<b>Partner</b>	<b>Effekt</b>	<b>Referenz</b>
<b>A) Modulation der Chromatinstruktur</b>		
Histone H1-H4	Wechselwirkung mit PARP-1, Heteromodifikation mit PAR, PAR-Affinität, Relaxierung des Chromatins durch Poly (ADP-Ribosyl)ierung	Tulin <i>et al.</i> , 2003 Roleau <i>et al.</i> , 2004, Kim <i>et al.</i> , 2005
HMG-Proteine	Heteromodifizierung mit PAR	D'Ámours <i>et al.</i> , 1999
Topoisomerase I und II	Wechselwirkung mit PARP-1, Hemmung durch PAR-Heteromodifizierung	Yung <i>et al.</i> , 2004 Park <i>et al.</i> , 2005
<b>B) DNA-Reparatur</b>		
DNA-Ligase III	Wechselwirkung mit PARP-1, PAR-Affinität, Hemmung durch PAR-Heteromodifizierung	Leppard <i>et al.</i> , 2003
DNA-Polymerase $\beta$	Wechselwirkung mit PARP-1, Hemmung BER in PARP <sup>-/-</sup> -Zellen	Dantzer <i>et al.</i> , 2000
PARP-2	Wechselwirkung mit PARP-1, Heteromodifikation mit PAR, Stimulation BER	Schreiber <i>et al.</i> , 2002
XRCC1	Wechselwirkung mit PARP-1, PAR-Affinität, Heteromodifikation mit PAR,	siehe 1.5.1.3 Masson <i>et al.</i> , 1998
<b>C) Transkription</b>		
NF $\kappa$ B	Wechselwirkung mit PARP-1 aktiviert die Transkription	Hassa <i>et al.</i> , 2003
YY1	Wechselwirkung mit PARP-1, Heteromodifikation mit PAR hemmt die Transkription	Oei <i>et al.</i> , 1998
p53	Wechselwirkung mit PARP-1, PAR-Affinität, Heteromodifikation mit PAR hemmt die Transkription	Oei <i>et al.</i> , 1998
<b>D) Replikation</b>		
DNA-Polymerase $\alpha$	Wechselwirkung mit PARP-1, Blockierung Replikation in PARP <sup>-/-</sup> -Zellen	Simbulan-Rosenthal <i>et al.</i> , 1996
DNA-Ligase I	Wechselwirkung mit PARP-1, Blockierung Replikation in PARP <sup>-/-</sup> -Zellen	Simbulan-Rosenthal <i>et al.</i> , 1996
<b>E) Apoptose</b>		
Bcl-2	Wechselwirkung mit PARP-1, Inhibierung der Apoptose	Song <i>et al.</i> , 2002
CAD/DFF40	PAR-Affinität hemmt Bindung von CAD an DNA, Inhibierung der Apoptose	West <i>et al.</i> , 2005
<b>F) Telomer</b>		
TRF2	Wechselwirkung mit PARP-1, Heteromodifikation mit PAR verhindert Bindung am Telomer, verkürzte Telomere in PARP <sup>-/-</sup> -Zellen	Gomez <i>et al.</i> , 2006, d'Adda di Fagagna <i>et al.</i> , 1999

## 1.5.1 Poly (ADP-Ribosyl)ierung und die DNA-Reparatur

### 1.5.1.1 Überblick über die DNA-Reparatur

Die genomische Stabilität ist von extremer Bedeutung für alle Lebewesen. Während Biomoleküle mit vermittelnder Funktion wie Proteine und Lipide bei Schädigung jederzeit wieder neu synthetisiert werden können, muss die DNA als Träger der genetischen Erbinformation in einem möglichst fehlerfreien Zustand erhalten werden. Schäden in der DNA entstehen dabei sowohl durch zelleigene Prozesse als auch infolge störender exogener Einflüsse. Dazu zählen die nichtenzymatische Hydrolyse des Phosphodiesterückrates der Nukleinsäuren, reaktive Sauerstoffverbindungen, alkylierende und quervernetzende Agenzien sowie kurzweilige, elektromagnetische Strahlungen. Im Resultat entstehen drei grosse Gruppen von DNA-Schäden, die je nach Stärke der Veränderung durch unterschiedliche Reparatursysteme behoben werden (Hoeijmakers *et al.*, 2001). Kleinere DNA-Modifikationen, wie die Oxidation oder Methylierung von DNA-Basen sowie DNA-Einzelstrangbrüche werden durch die Systeme der *Base Excision Repair* (BER) und *Single Strand Break Repair* (SSBR) entfernt (Caldecott, 2001, Fan & Wilson, 2005). Die Beseitigung grossräumigere DNA-Veränderungen, wie Pyrimidindimere erfolgt durch die *Nucleotid excision repair* (NER, Park & Choi, 2006). Angehäufte DNA-Doppelstrangbrüche werden zellzyklusabhängig durch *Nonhomologous End Joining* (NHEJ, G1-Phase) oder *Homologous Recombination* (HR, S/G2-Phase) repariert (Hoeijmakers *et al.*, 2001, Cahill *et al.*, 2006). Für die Beseitigung von DNA-Replikationsfehlern ist das System der *Mismatch Repair* (MMR) verantwortlich (Christmann *et al.*, 2003). Jede Störungen in einem dieser Mechanismen führt zur Anhäufung von unreparierten DNA-Schäden und hat die Ausprägung von malignen Veränderungen zur Folge. Die Bedeutung der DNA-Reparatur zeigt sich in der Vielzahl von genetisch bedingten Syndromen mit mutierten DNA-Reparaturgenen (Hoeijmakers *et al.*, 2001)

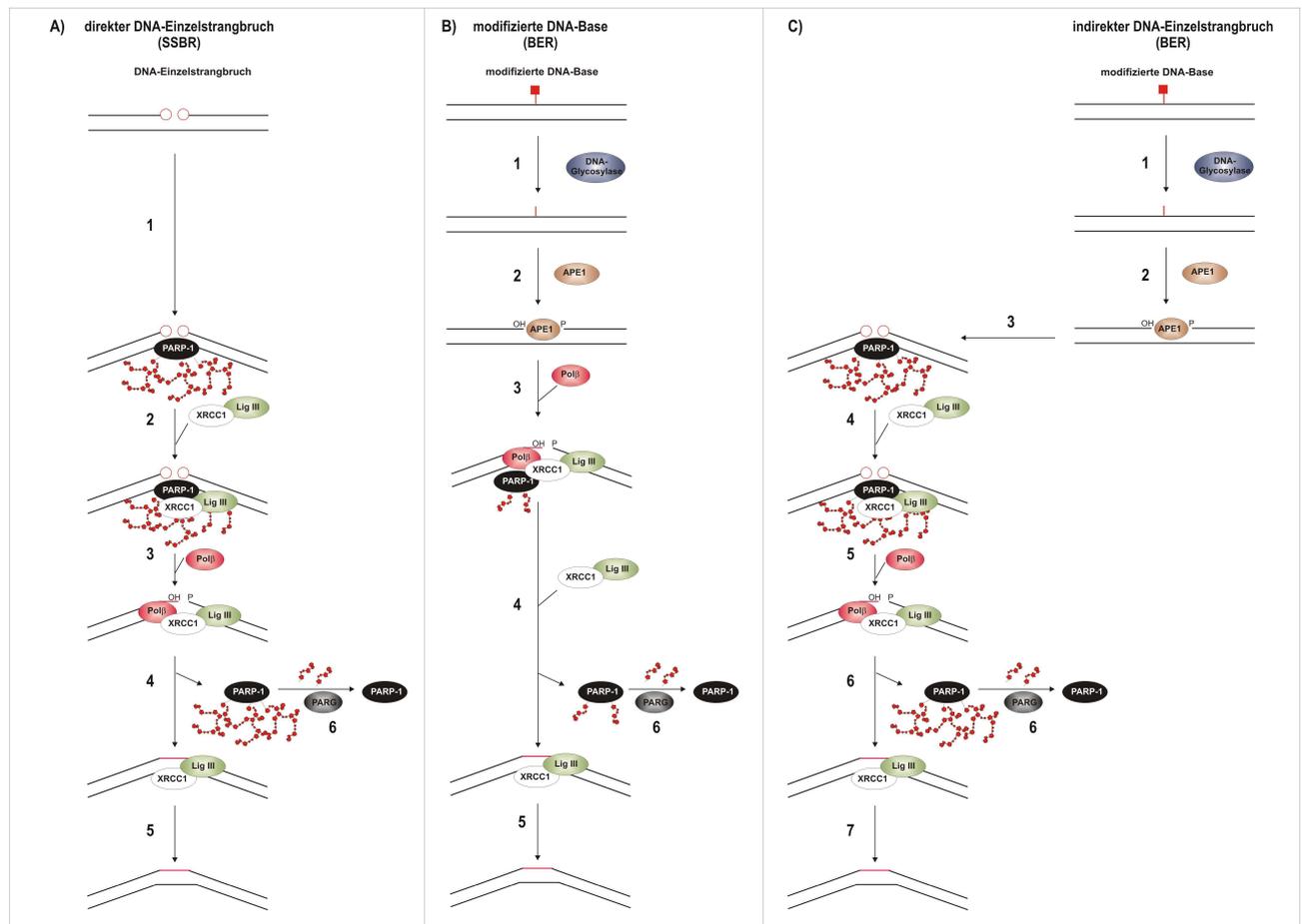
### 1.5.1.2 Funktion von PARP-1 in BER und SSBR

BER und SSBR sind für die Beseitigung von DNA-Einzelstrangbrüchen und Nukleotiden mit modifizierten DNA-Basen verantwortlich. Oxidativ veränderte Basen wie z. Bsp. 7,8-Dihydro-8-Oxoguanin (8-Oxo-G) oder 5,6-Dihydroxycystein werden sowohl durch reaktive endogene als auch exogene Sauerstoffspezies gebildet (ionisierende Strahlung,  $H_2O_2$ ,  $OH^\bullet$ ,  $NOO^\bullet$ ) (Cooke *et al.*, 2003). Die Alkylierung von Basen kann endogen durch die Übertragung von Methyl- und Ethylgruppen durch den Cofaktor S-Adenosylmethionin erfolgen (Drabløs *et al.*, 2004). Als exogene Alkyldonoren sind unter anderem die monofunktionellen Agenzien N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanin (MNNG), Ethylmethansulfat (EMS) und Methylmethanosulfat (MMS) bekannt (Goth-Goldstein & Hughes, 1987, Drabløs *et al.*, 2004). MNNG methyliert dabei bevorzugt Adenin- und Guaninmoleküle, wobei

gehäuft die modifizierten Basen N<sup>3</sup>-Methyladenin und O<sup>6</sup>-Methylguanin entstehen (Beardsley *et al.*, 2005). Wegen ihres vorwiegend endogenen Ursprungs treten diese Arten von DNA-Schäden sehr oft (10.000 pro Tag) auf (Drabløs *et al.*, 2004).

An der Beseitigung von direkten DNA-Einzelstrangbrüchen ist ein ganzer Reparaturkomplex (SSBR-Komplex) beteiligt (siehe Abb. 1.9 A, zur Übersicht Caldecott, 2001 und 2003). Die initiale Rolle wird den zwei Proteinen PARP-1 und XRCC1 zugeschrieben. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass PARP-1 an lokal bestehende Einzelstrangbrüche bindet und dadurch spezifisch aktiviert wird (El-Khamisy *et al.*, 2003, Tartier *et al.*, 2003, Okano *et al.*, 2003, Lan *et al.*, 2004). Die anschließende Automodifizierung des Enzyms mit PAR-Ketten induziert die Rekrutierung des zentralen DNA-Reparaturproteins XRCC1 an den DNA-Schadensort. Unter Beteiligung der Enzyme Polynukleotid-Kinase/Phosphatase, DNA-Polymerase  $\beta$  (Pol $\beta$ ) und DNA-Ligase III (Ligase III) erfolgt die Prozessierung des Einzelstrangbruchs und die anschließende Ligation (Caldecott 2001 und 2003, Whitehouse *et al.*, 2001).

Im Unterschied zum SSBR-Mechanismus treten beim BER keine unmittelbaren freien Einzelstrangbrüche auf, die zur Aktivierung der PARP-1 führen (siehe Abb. 1.9 B). Im BER-Komplex erfolgt die Detektion und Abspaltung der oxidierten bzw. alkylierten DNA-Basen über spezifische DNA-Glykosylasen, wodurch apurine/apyrimidine Stellen (AP-Stellen) gebildet werden. Die Endonuklease APE-1 schneidet anschliessend die abasische Stelle am 5'-Ende ein und es erfolgt der Einbau von einem oder mehreren Nukleotiden durch Pol $\beta$  sowie die Ligation des Strangbruchs durch Ligase III (siehe Abb. 1.9 B, Christmann *et al.*, 2003, Fan *et al.*, 2005). PARP-1 scheint für den unmittelbaren Ablauf des BER damit nicht von essentieller Bedeutung zu sein (Vodenicharov *et al.*, 2000). Bereits die ersten Studien unter Verwendung von PARP-Inhibitoren wie 3-Aminobenzamid (3-ABA) zeigten jedoch, dass die Aktivierung der Poly (ADP-Ribosyl)ierung wesentlich zur Effizienz der Reparatur beiträgt (Durkacz *et al.*, 1980, Shall & Murcia, 2000). Ende der neunziger Jahre wurden dann drei unterschiedliche Mausmodelle mit genetisch inaktivierter PARP-1 etabliert (Wang *et al.*, 1995, Menissier de Murcia *et al.* 1997, Masutani *et al.* 1999). Der Verlust der PARP-1 konnte durch die Restaktivität der PARP-2 ausgeglichen werden und war für die Mäuse nicht letal. Die Tiere aller drei Modelle zeigten jedoch eine erhöhte Sensitivität gegenüber alkylierenden Agenzien und Gammastrahlen, was wiederum auf eine Rolle der PARP-1 beim BER hindeutet (Shall & Murcia, 2000). In Interaktionsstudien wurde die direkte Wechselwirkung von PARP-1 mit den BER-Reparaturproteinen XRCC1 (Caldecott *et al.*, 1996, Masson *et al.*, 1998), Pol $\beta$  (Prasad *et al.*, 2001) und Ligase III (Leppard *et al.*, 2003) gezeigt. Biochemische Untersuchungen zum genauen molekularen Ablauf des BER in zellulären Extrakten zeigten schliesslich erhebliche Defizite in der Prozessierung der Intermediate durch Pol $\beta$  und der anschließenden Ligation in Abwesenheit von PARP-1 (Trucco *et al.*, 1998, Dantzer *et al.*, 2000).



**Abb. 1.9: Mögliche Funktionen von PARP-1 im BER und SSBR-Mechanismus**

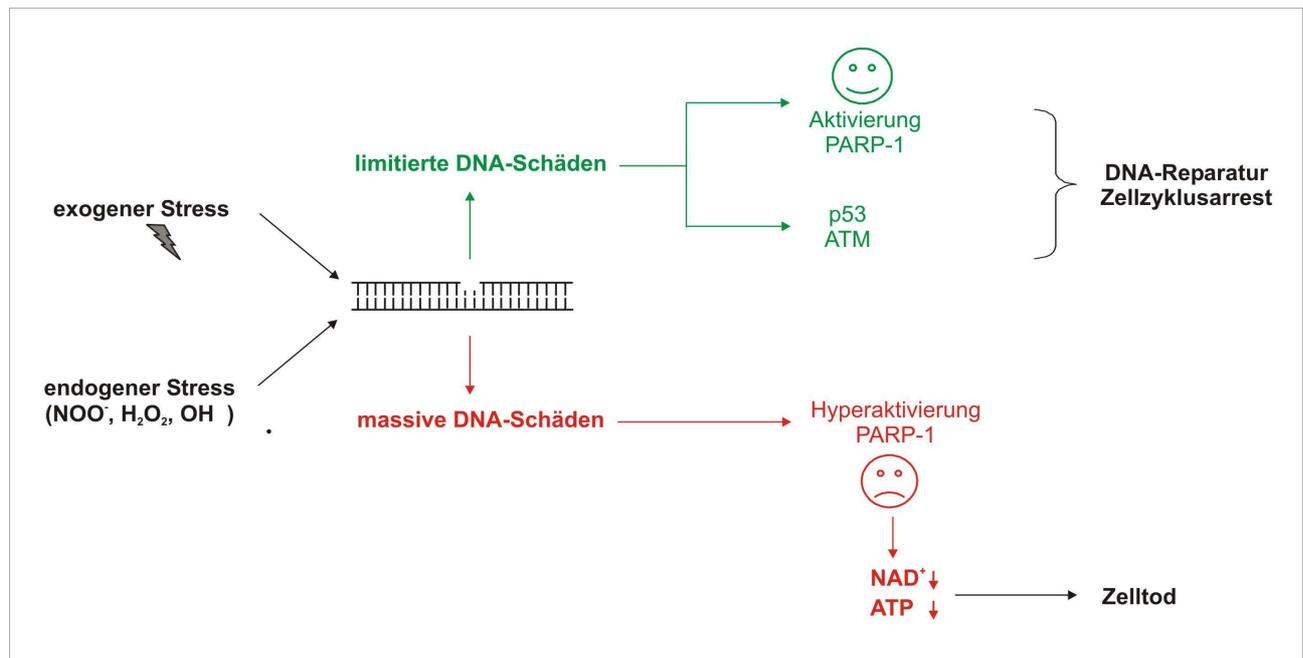
**A) Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen:** PARP-1 wird infolge der Bindung an DNA-Einzelstrangbrüche aktiviert (1). Die poly (ADP-ribosylierte) PARP-1 rekrutiert anschließend den XRCC1-Ligase III Komplex (2). Polβ gelangt über die Interaktion mit XRCC1 und PARP-1 in den Reparaturkomplex, sodass ein Verschluss des Einzelstrangbruchs möglich ist (4 + 5). Die automodifizierte PARP-1 dissoziiert von der DNA und PARG baut die PAR-Polymere zu ADP-Ribose ab.

**B) Direkte Reparatur modifizierter DNA-Basen:** Nach Entfernung der geschädigten Base durch DNA-Glykosylasen (1) schneidet APE-1 die abasische Stelle endonukleolytisch ein (2). Anschließend erfolgt der Einbau von einem oder mehreren Nukleotiden durch Polβ (3) und die Ligation des Strangbruchs (4 + 5). PARP-1 unterstützt den Reparaturprozess durch die Interaktion mit Polβ und Ligase III.

**C) Indirekte Reparatur modifizierter DNA-Basen:** Eine Anhäufung von modifizierten DNA-Basen führt zur Überlastung des BER-Systems und zur indirekten Generierung von DNA-Einzelstrangbrüchen (3). Wie beim SSBR-Mechanismus erfolgt deren Reparatur vermittelt über die Aktivierung von PARP-1 und die Rekrutierung des XRCC1-Ligase III Komplexes.

Von Parson & Dianov (2004) wurde ein alternativer Ablauf des BER postuliert, wobei die Rekrutierung von PARP-1 an den Schadensort zeitlich vor XRCC1 und Polβ erfolgt (siehe Abb. 1.9 C). Über diesen Mechanismus der Reparatur könnte der Anhäufung indirekter DNA-Einzelstrangbrüche aufgrund eines überlasteten BER-Systems entgegengewirkt werden. Unrepariert würden diese Einzelstrangbrüche im folgenden Replikationszyklus in die für Zellen extrem toxischen und letalen DNA-Doppelstrangbrüche umgewandelt werden (Bryant *et al.*, 2005, Farmer *et al.*, 2005).

Übersteigt die Anhäufung der DNA-Schäden das generelle Reparaturvermögen der Zelle, so wird der Akkumulation von genetischen Instabilitäten mit der Induktion des Zelltodes entgegengewirkt. PARP-1 unterstützt diesen Weg, indem sie mit der Spaltung des Substrates NAD<sup>+</sup> einen wichtigen zellulären Metaboliten entfernt (siehe Abb. 1.10 sowie 1.5.2.2).

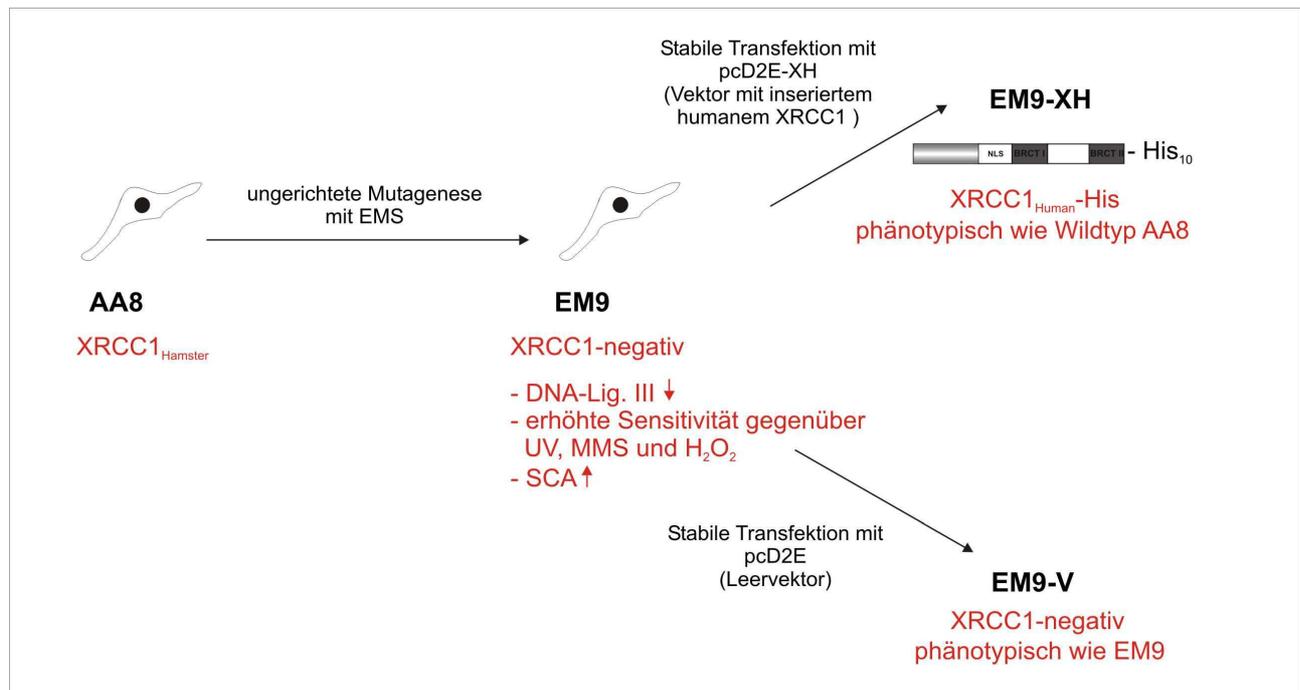


**Abb. 1.10: Das „Janusgesicht“ von PARP-1** (modifiziert nach Shall & Murcia, 2000)

In Gegenwart limitierter DNA-Schäden fördert PARP-1 das Überleben der Zelle, indem es den p53-vermittelten Zellzyklusarrest ermöglicht und die Reparatur der Läsionen über den BER und SSBR-Mechanismus verbessert. Übersteigen die akkumulierenden DNA-Schäden das Reparaturvermögen der Zelle verursacht die massive Poly (ADP-Ribosyl)ierung eine Depletion der zellulären ATP und NAD<sup>+</sup>-Speicher und induziert damit den Zelltod.

### 1.5.1.3 XRCC1

1982 wurden durch ungerichtete Mutagenese mit Ethylmethanosulfat aus der Hamsterzelllinie CHO AA8 (*chinese hamster ovary*) die zwei Zelllinien CHO EM7 und CHO EM9 etabliert, die eine erhöhte Sensitivität gegenüber ionisierenden Strahlen sowie DNA-alkylierenden und -oxidierenden Agenzien zeigten. Phänotypisch hatten beide Zelllinien einen Defekt in der Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen und wiesen infolgedessen eine erhöhte Rate an Schwesterchromatidaustauschen auf (siehe Abb. 1.11) (Thompson *et al.*, 1982). Durch Komplementations-Experimente mit humanen Cosmid-Banken wurde 1990 das für den Reparaturdefekt verantwortliche Gen identifiziert und als *X-ray repair cross-complementing 1* (XRCC1) bezeichnet. 1994 erfolgte die vollständige Klonierung der humanen XRCC1- cDNA (Caldecott *et al.*, 1994). Ein Vergleich der XRCC1-cDNAs vom Mensch und den beiden hypersensitiven Hamsterzelllinien ergab, dass es infolge von Mutationen zum völligen Verlust des Proteins in den EM7- und EM9-Zellen kommt (Shen *et al.*, 1998). 1995 wurde durch stabile Transfektion von humanem XRCC1 in EM9-Zellen die Linie EM9-XH etabliert (Caldecott *et al.*, 1995). Durch die Überexpression des humanen XRCC1 in EM9-Zellen konnte der DNA-Reparaturdefekt in den Hamsterzellen tatsächlich wieder behoben werden (siehe Abb. 1.11).



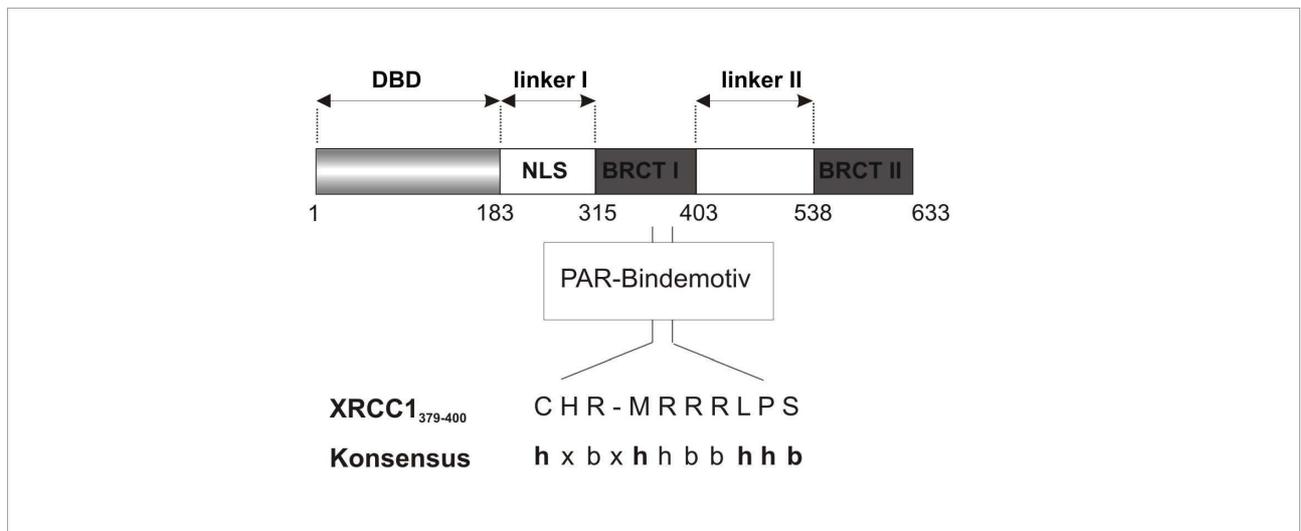
**Abb. 1.11: Eigenschaften der XRCC1-defizienten oder überexprimierenden Hamsterzelllinien AA8, EM9, EM9-V und EM9-XH**

Schematisch wurde der experimentelle Ablauf zur Generierung der vier Zelllinien zusammengefasst. Desweiteren wurden die Charakteristika hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber genotoxischen Agenzien sowie der Stabilität von DNA-Ligase III angefügt.

EMS-Ethylmethanosulfat, MMS-Methylmethanosulfat, UV-ultraviolette Strahlung, SCA↑- erhöhte Anzahl von Schwesterchromatidaustauschen, DNA-Lig. III↓-Instabilität der DNA-Ligase III

Eine genetische Deletion von XRCC1 in Mäusen führte ebenfalls zur vermehrten Anhäufung von DNA-Einzelstrangbrüchen und Schwesterchromatidaustauschen (Tebbs *et al.*, 1999). Durch die transgene XRCC1-Komplementierung (*knock-in mouse*) konnte der frühe Abbruch der Embryonalentwicklung verhindert werden (Tebbs *et al.*, 2003, Ladiges, 2006).

Bisher wurde keine enzymatische Aktivität von XRCC1 festgestellt (Caldecott, 2003). Das 71 kDa grosse Protein wechselwirkt über die mehrfachen Interaktionsdomänen (siehe Abb. 1.12) mit einer Vielzahl von Reparaturproteinen (siehe Tab. 1.2) und koordiniert darüber die Abläufe der SSBR und BER (Caldecott, 2003) und auch der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (Audebert *et al.*, 2004, Levy *et al.*, 2006). Obwohl die am N-Terminus befindliche DNA-bindende Domäne (DBD) keine typischen DNA-Bindungsmotive aufweist, konnte darüber vermittelt die Bindung des Proteins an DNA-Einzelstrangbrüchen gezeigt werden (Marintchev *et al.*, 1999). Ausserdem erfolgt über die DBD die Wechselwirkung mit Pol  $\beta$  (Kubota *et al.*, 1996). Desweiteren enthält XRCC1 zwei als „linker“ bezeichnete Domänen, worüber die Interaktion mit den für die SSBR und BER wichtigen Enzyme DNA-Glykosylase hOGG1, der Endonuklease APE-1 sowie der Polynukleotid-Kinase/Phosphatase PNKP erfolgt. Die Aktivität all dieser Proteine wird in Gegenwart von XRCC1 stimuliert, um eine effektive Prozessierung und Beseitigung bestehender DNA-Schäden zu ermöglichen (siehe Tab. 1.2).



**Abb. 1.12: Funktionelle Domänen von XRCC1**

Schematisch ist die Struktur von XRCC1 mit der Lage der einzelnen funktionellen Domänen dargestellt. Die Position des PAR-Bindemotivs sowie der Vergleich mit der von Malanga *et al.* (2000) postulierte Konsensussequenz wurden gekennzeichnet.

NLS-Zellkernimportsequenz, BRCT –BRCA1 Carboxyterminus Domäne

Die BRCT I-Domäne ist für die Interaktion von XRCC1 mit PARP-1 und PARP-2 verantwortlich. In Gegenwart von XRCC1 ist die PAR-Synthese durch PARP-1 oder PARP-2 gehemmt (Masson *et al.*, 1998, Schreiber *et al.*, 2002). XRCC1 bindet dabei bevorzugt an automodifizierte PARPs und wird selbst von PARP-1 und PARP-2 modifiziert (Masson *et al.*, 1998, Dantzer *et al.*, 2000, Schreiber *et al.*, 2002). In der Aminosäuresequenz von XRCC1 wurde innerhalb der BRCT I-Domäne ein als PAR-Bindemotiv beschriebenes Peptid nachgewiesen, worüber die nichtkovalente Interaktion von XRCC1 mit PAR-Polymeren erfolgt (Pleschke *et al.*, 2000, El-Khamisy *et al.*, 2003). Bei diesem PAR-Bindemotiv handelt es sich um eine Abfolge von bis zu 20-26 Aminosäuren, mit vornehmlich hydrophoben und basischen Charakter. Die aus diesem Motiv resultierende lokale positive Ladung erlaubt die Interaktion des jeweiligen Proteins mit der negativ geladenen, PAR-modifizierter PARP-1. Zusätzlich zu XRCC1 wurde das PAR-Bindemotiv in anderen DNA-Reparaturproteinen (DNA-Ligase III, Topoisomerase I), zellzyklusregulatorischen Proteinen (p21, p53) sowie DNA-assoziierten Proteinen (Histon H1-4, CenpA und B) identifiziert. Da sich die Position des PAR-Bindemotivs zumeist mit den jeweiligen funktionellen Domänen des Proteins überlagert, wird dessen Funktion durch die Wechselwirkung mit den Polymeren erheblich beeinflusst (Malanga & Althaus, 2005). Über die BRCT II-Domäne wird die Interaktion mit Ligase III vermittelt (Caldecott *et al.*, 1995, Nash *et al.*, 1997, Beernink *et al.*, 2005). Unter Verwendung der EM9-V- und EM9-XH-Zellen wurde gezeigt, dass XRCC1 erheblich zur Stabilisierung der Ligase III beiträgt (siehe Abb. 1.11). Aufgrund der gesteigerten Ligationseffizienz wird die Reparaturkapazität von Zellen erheblich verbessert (Caldecott *et al.*, 1995, Cappelli *et al.*, 1997, Wong *et al.*, 2005).

**Tab. 1.2 Interaktionspartner von XRCC1**

<b>XRCC1-Domäne</b>	<b>Partner</b>	<b>Domäne des Partners</b>	<b>Effekt</b>	<b>Verweis</b>
<b>DBD</b>	Polβ	C-Terminus	Polβ wird stimuliert	Kubota <i>et al.</i> , 1996
	HPV6	Gesamtprotein	verbesserte BER	Iftner <i>et al.</i> , 2002
<b>Linker I</b>	APE1	N-Terminus	APE1 wird stimuliert	Vidal <i>et al.</i> , 2001
	hOGG1	n. b.	hOGG1 wird stimuliert	Marsin <i>et al.</i> , 2003
	MutyH	n. b.	n. b.	Ladiges <i>et al.</i> , 2006
	PCNA	n. b.	n. b.	Fan <i>et al.</i> , 2004
<b>BRCT I</b>	PARP-1	BRCT	Modifikation von XRCC1 PARP-1 wird inhibiert	Masson <i>et al.</i> , 1998
	PARP-2	„E-Domäne“	Modifikation von XRCC1 PARP-2 wird inhibiert	Schreiber <i>et al.</i> , 2002
	DNA-PK <sub>C</sub>	n. b.	Phosphorylierung von XRCC1 DNA-PK <sub>C</sub> wird stimuliert	Levy <i>et al.</i> , 2006
<b>linker II</b>	PNKP	n. b.	PNK wird stimuliert	Whitehouse <i>et al.</i> , 2001
<b>BRCT II</b>	Lig III	BRCT-Domäne	Lig III wird stabilisiert	Caldecott <i>et al.</i> , 1994
<b>n.b.</b>	Aprataxin	FHA-Domäne	Interaktion mit phosphoryliertem XRCC1, verbesserte SSB-Reparatur	Clements <i>et al.</i> , 2004, Gueven <i>et al.</i> , 2004
	Tdp1	n. b.	Tdp1 wird stimuliert	Plo <i>et al.</i> , 2003
	TRF2	n. b.	n. b.	Muftuoglu <i>et al.</i> , 2006

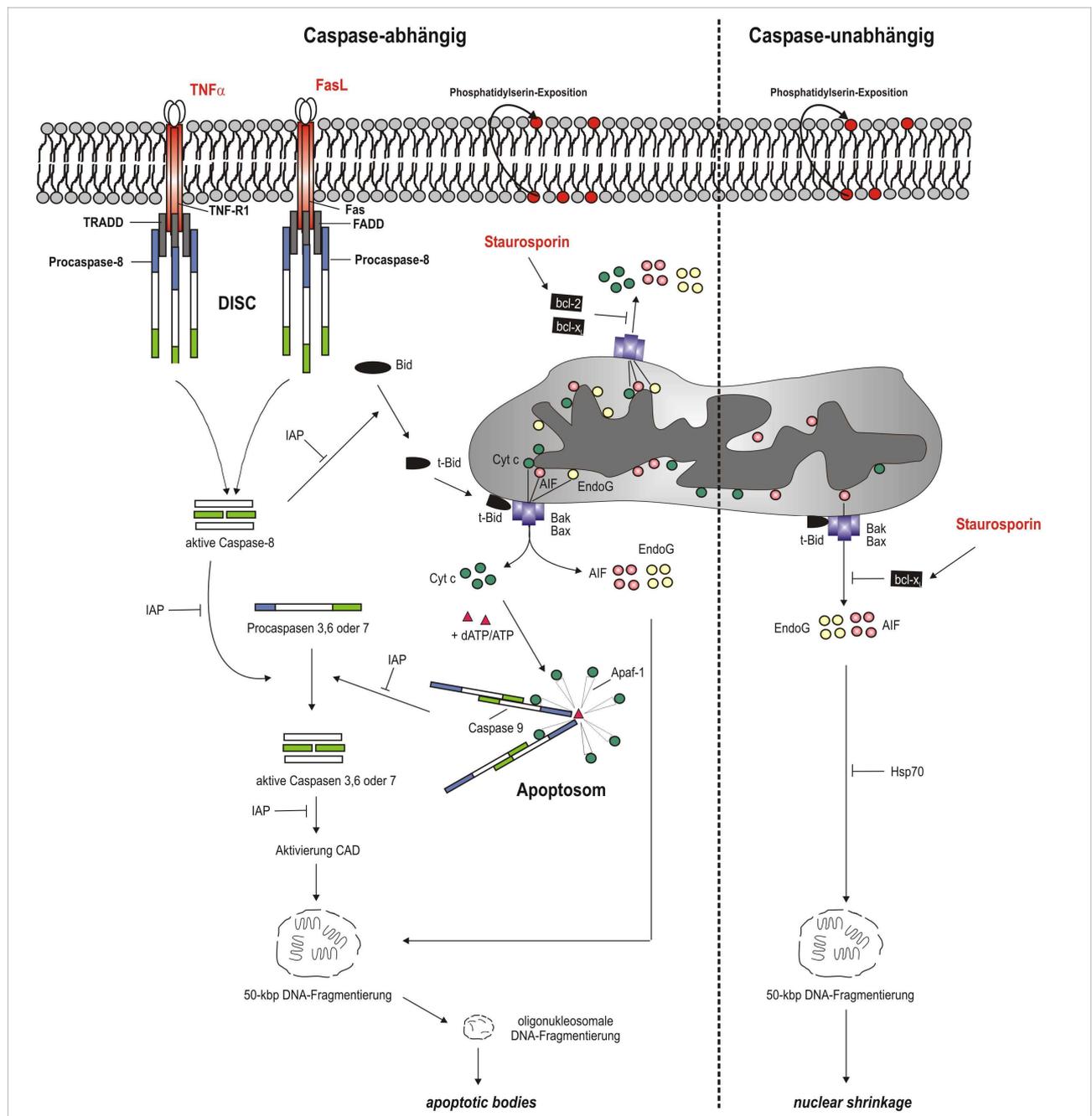
Begründet durch die Vielzahl von funktionellen Interaktionen wird XRCC1 als zentrales Koordinationsprotein von BER und SSBR angesehen und spielt eine grosse Rolle bei der Erforschung dieser Mechanismen. Im menschlichen XRCC1-Gen wurden mehrere Polymorphismen identifiziert. Einige davon resultieren in Aminosäureaustauschen, die mit einer erhöhten Anfälligkeit für verschiedenen Krebsarten in Zusammenhang gebracht wurden (Frosina *et al.*, 2004, Ladiges *et al.*, 2006). Unklar ist jedoch, ob dies ausschliesslich auf eine Fehlfunktion von XRCC1 während der DNA-Reparatur zurückzuführen ist.

## 1.5.2 Regulation des Zelltodes durch Poly (ADP-Ribosyl)ierung

### 1.5.2.1 Apoptose und Nekrose als Formen des Zelltodes

Um die Homöostase in multizellulären Organismen aufrechtzuerhalten, ist es erforderlich, geschädigte oder funktionsuntüchtige Zellen zu eliminieren. Die Beseitigung der Zellen kann prinzipiell über den kontrollierten Weg der Apoptose oder dem eher unorganisierten Prozess der Nekrose ablaufen (Edinger & Thompson, 2004). Beiden Abläufen können charakteristische zelluläre Veränderungen zugeordnet werden. Die Apoptose ist morphologisch und biochemisch durch das Schrumpfen der Zelle, die Ausstülpungen der Plasmamembran (*Blebbing*), der Aktivierung von speziellen Cysteinproteasen (Caspasen) sowie der Kondensation und Fragmentierung der DNA beschrieben. Die Bildung sogenannter apoptotischer Körperchen (*apoptotic bodies*) und die Externalisierung von Phosphatidylserin-Lipiden an die äussere Seite der Zellmembran markieren diese Zellen anschliessend für die Phagozytose durch Makrophagen oder Lymphozyten (Kerr *et al.*, 1972, Hengartner, 2000). Bei der Nekrose kommt es durch die Aktivierung lysosomaler Proteasen und DNasen zum Abbau von Proteinen sowie der chromosomalen DNA. Bedingt durch das Anschwellen aller Zellorganellen erfolgen die Ruptur der Zytoplasmamembran und die Freisetzung des Zellinhalts, verbunden mit inflammatorischen Prozessen (Edinger & Thompson, 2004).

Apoptotische Stimuli können funktionell in extrinsische oder intrinsische Faktoren eingeteilt werden, jenachdem ob sie den apoptotischen Prozess durch die Interaktion mit extrazellulären oder intrazellulären Proteinen initiieren (siehe Abb. 1.13). Beim extrinsischen Weg kommt es infolge der Stimulation von membranständigen Rezeptoren der TNF-Familie (Apo-1/Fas, TNF-R1, DR3-5) durch extrazelluläre Liganden (TNF $\alpha$ , FasL, TRAIL) zur Aggregation der Rezeptoren und einer anschliessenden Rekrutierung von Adaptorproteinen, wie dem *Fas-associated death domain adaptor protein* (FADD) oder dem *TNF receptor-associated death domain adaptor protein* (TRADD). Diese Adaptorproteine binden die Proenzyme der Initiatorproteasen Caspase-8 und 2 im DISC-Komplex (*death inducing signaling complex*) und induzieren dadurch deren Autoaktivierung (Krammer, 2000, Peter & Krammer, 2003). Die aktiven Initiatorcaspasen werden als Heterotetramer von je zwei kleinen und grossen Untereinheiten aus dem DISC entlassen. Sie können im Folgenden die Proproteine der Effektorcaspasen 3, 6 und 7 spalten und diese dadurch ebenfalls aktivieren (Bratton & Cohen, 2001, Riedl & Shi, 2004). Zusätzlich wird das bcl-2-Protein Bid durch die Caspasen 2 oder 8 gespalten. Das aktivierte Protein t-Bid verbindet als proapoptisches Protein den extrinsischen Weg der Apoptose mit dem des intrinsischen Prozesses (Hengartner, 2000). Die zentralen Vermittler des intrinsischen Weges der Apoptose bilden die Mitochondrien. Unter stressfreien Bedingungen ist dieses Organell essentiell, sowohl für Biosyntheseprozesse als auch den Abbau von Makromolekülen ( $\beta$ -Oxidation, Harnstoffzyklus, Citratzyklus). Die Intaktheit der Mitochondrien ermöglicht den Aufbau eines elektro-



**Abb. 1.13: Mechanismen zur Vermittlung der Apoptose**

**Caspase-abhängig:** Die Induktion der Effektorcaspasen (Caspase 3, 6, 7) kann extrinsisch vermittelt durch die Stimulation von Todesrezeptoren (Fas), oder intrinsisch durch die Aktivierung der Initiatorcaspase 9 über das Apoptosom (Cytc-Apaf-1-Procaspase 9) erfolgen. In beiden Fällen werden letztendlich durch die Effektorcaspasen Proteine gespalten, die in die Organisation der Zellstruktur und dem Ablauf sowie von regulatorischen und metabolischen Prozessen eingebunden sind. Unter anderem erfolgen dadurch die Aktivierung der DNase CAD und anschliessend die Spaltung der chromosomalen DNA in oligonukleosomale Fragmente sowie die Formation der typischen apoptotischen Körperchen (*apoptotic bodies*). **Caspase-unabhängig:** Ohne Beteiligung von Caspasen werden alternative, proapoptische Proteine (EndoG, AIF) aus dem Mitochondrium transportiert. Diese translokieren in den Zellkern und induzieren zusammen mit assoziierten DNasen die initiale Fragmentierung der DNA in 50 kbp-Fragmente. Dabei kommt es jedoch nicht zur kompletten Kondensation des Chromatins, sondern nur zur partiellen Chromatinolyse (*nuclear shrinkage*)

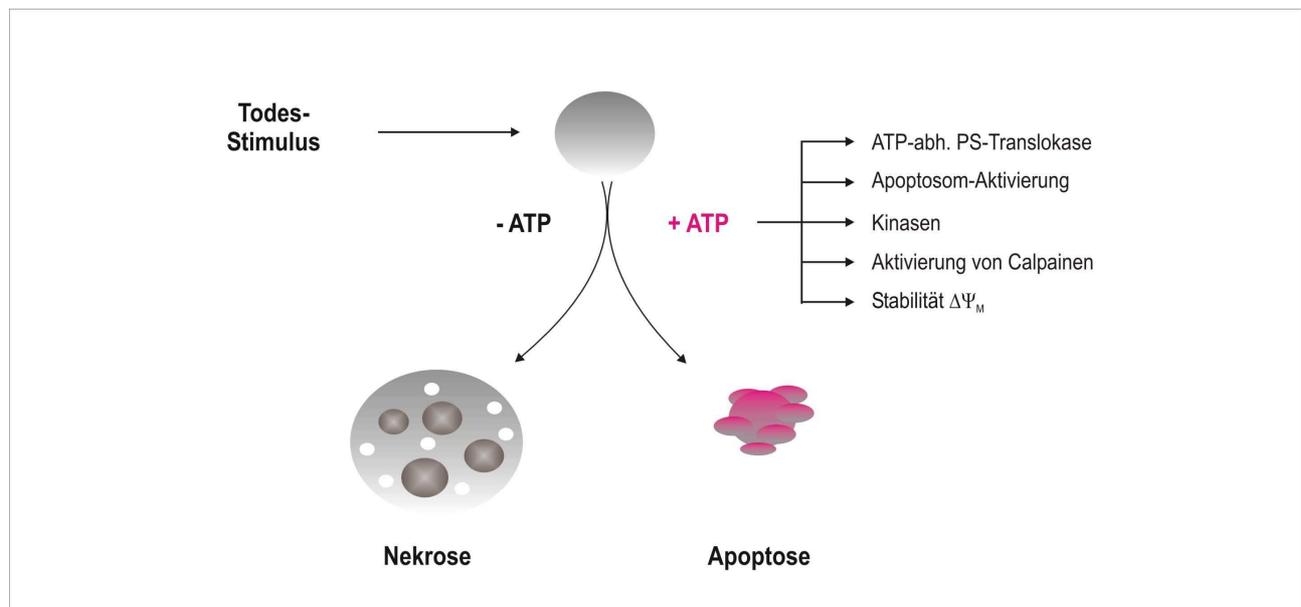
chemischen Membranpotentials an der inneren Mitochondriemembran und daran gekoppelt die Generierung von ATP. Durch intrinsische apoptotische Stimuli wird das Membranpotential aufgehoben (Bratton & Cohen, 2001, Newmeyer & Ferguson-Miller, 2003) und es erfolgt die Freisetzung

proapoptotischer Moleküle wie Cytochrom *c*, *Apoptosis inducing factor* (AIF), Smac, Endonuklease G und Omi/HtrA2 ins Cytosol (Ferri & Kroemer, 2001, Saelens *et al.*, 2004, Munoz-Pinedo *et al.*, 2006). Dieser Prozess obliegt einer strikten Kontrolle durch Proteine der Bcl2-Familie (Reed, 1998, Newmeyer & Ferguson-Miller, 2003). Anschliessend wird ein cytosolischer Komplex bestehend aus Cytochrom *c*, Apaf-1, dATP und der Procaspase 9 (Apoptosom) gebildet, der in Analogie zum extrinsischen Weg (DISC) die Autoprozessierung und Aktivierung der Caspase 9 bewirkt (Bratton & Cohen, 2001, Schafer & Kornbluth, 2006). Caspase 9 spaltet dann ebenfalls die Procaspasen 3, 6 oder 7 und leitet damit wie beim intrinsischen Weg die Exekutionsphase der Apoptose ein. In den terminalen Prozessen werden Proteine mit zentralen zellulären Funktionen in der Organisation des Cytoskeletts (Lamin A/B, NuMa, hRNP's), der DNA-Reparatur (PARP-1/2, DNA-Ligase III, DNA-PK<sub>c</sub>), sowie der Zellzyklusregulation (p21<sup>Waf1/Cip1</sup>, PKC) durch die Effektorcaspasen an spezifischen Peptidsequenzen (D↓EVD, I↓ETD, VD↓AD) gespalten und dadurch inaktiviert (Earnshaw *et al.*, 1999, Riedl & Shi, 2004). Morphologisches Merkmal von apoptotischen Zellen ist im Unterschied zur Nekrose die Kondensation des Chromatins, verbunden mit der Fragmentierung des Zellkerns. Für diesen Prozess werden spezifische apoptotische Nucleasen aktiviert, welche die Spaltung der Chromosomen zunächst in grössere DNA-Fragmente von 50-300 kbp (HMW-Fragmente) und anschliessend durch internukleosomale Spaltungen in 180 bp-Fragmente (*DNA-ladder*) katalysieren (Scovassi & Torriglia, 2003, Samejima & Earnshaw, 2005). Hauptverantwortlich dafür ist die Mg<sup>2+</sup>-abhängige caspase-aktivierte DNase CAD/DFF40. Normalerweise liegt diese Nuklease aufgrund der Interaktion mit dem Inhibitor ICAD/DFF45 als inaktives Enzym vor. Werden durch apoptotische Stimuli Effektorcaspasen aktiviert, wird ICAD durch diese gespalten und die Degradierung der chromosomalen DNA durch CAD katalysiert (Widlak & Garrard, 2005, Samejima & Earnshaw, 2005).

Neben dem caspase-vermittelten Suizid wurde in Zellen noch eine zweite Form der intrinsischen Apoptose beschrieben, die unabhängig von der Aktivierung dieser Proteasen abläuft. Eine zentrale Funktion in diesem caspase-unabhängigen Zelltod (siehe Abb. 1.13) spielen die Proteine AIF und EndoG (Susin *et al.*, 2000, Kroemer & Martin, 2005). Bei AIF handelt es sich um ein 67 kDa grosses Protein, welches Homologien zu bakteriellen und pflanzlichen Oxidoreduktasen aufweist (Susin *et al.*, 1999, Modjtahedi *et al.*, 2006). Unter physiologischen Bedingungen ist AIF in der inneren Mitochondrienmembran verankert (Susin *et al.*, 1999, Otera *et al.*, 2005) und katalysiert als Flavoenzym die Oxidation von NAD(H)<sub>2</sub> (Miramar *et al.*, 2001, Vahsen *et al.*, 2004). Infolge apoptotischer Stimuli wird AIF aus dem Mitochondrium freigesetzt, transloziert in den Zellkern und bewirkt dort die initiale Kondensation des Chromatins (Susin *et al.*, 1999, Daugas *et al.*, 2000, Cande *et al.*, 2002). Die Studien von Ye *et al.* (2002) und Vahsen *et al.* (2006) belegen eine Bindung von AIF an chromosomale DNA, geben jedoch keinerlei Hinweise auf eine unmittelbare DNase-Aktivität dieses Proteins. Bisher wurde in humanen Zellen noch keine Nuklease identifiziert, welche AIF-assoziiert für die Spaltung der DNA verantwortlich ist (Cregan *et al.*, 2004, Modjtahedi *et al.*, 2006). In *C. elegans* wurde die Degradierung

der chromosomalen DNA durch den AIF-EndoG-Komplex und einen AIF-Cyclophilin A-Komplex gezeigt (Cregan *et al.*, 2004).

Mit der Entdeckung der Apoptose und Nekrose als mögliche Formen des Zelltodes stellte sich gleichzeitig die Frage der Regulation dieser Prozesse. Die umfangreichen Studien zur Induktion der caspase-vermittelten Apoptose zeigen, dass für den Ablauf dieser Form des Zelltodes zum einen die Verfügbarkeit von ATP und zum anderen die Aktivierung von Caspasen von Bedeutung ist. Wird eine der beiden Parameter eingeschränkt, stirbt die Zelle durch caspase-unabhängige Mechanismen oder nekrotisch (Kroemer *et al.*, 1998, Nicotera & Melino, 2004). Während die Nekrose passiv und energieunabhängig abläuft, sind die Hydrolyse von ATP oder die Integration des Trinukleotids in Proteinkomplexe (Apoptosom) für den Fortgang der Apoptose erforderlich (siehe Abb. 1.14) (Nicotera & Melino, 2004, Chiarugi, 2005, Bratton & Cohen, 2001, Schafer & Kornbluth, 2006). Zudem wurde in Experimenten von Leist *et al.*, (1997a) gezeigt, dass bei vergleichbarer apoptotischer Stimulation in ATP-minimierten Zellen anstelle des apoptotischen Zelltodes die Nekrose abläuft.



**Abb. 1.14: Regulation des Zelltodes durch ATP** (modifiziert nach Nicotera & Melino, 2004)

Einzelne Schritte der Apoptose sind ATP-abhängig. Unabhängig von der Art des Stimulus entscheidet der zelluläre ATP-Spiegel ob eine ATP-abhängige Apoptose ablaufen kann oder die Zelle nekrotisch stirbt.

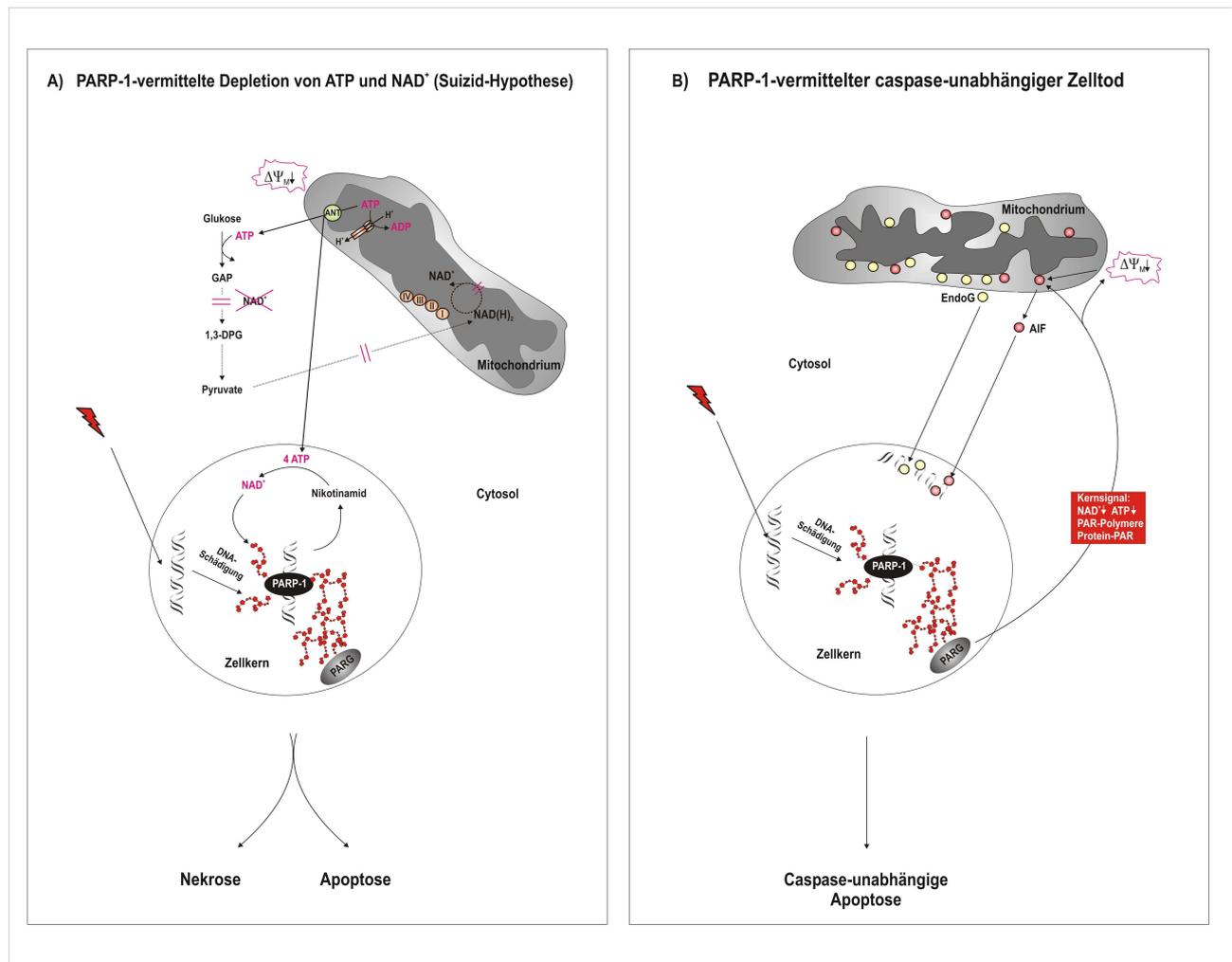
Für die Regulation der proteolytischen Aktivität der Caspasen ist bekannt, dass Zellen über endogene caspaseinhibitorische Proteine verfügen, welche die Aktivität dieser Proteasen kontrollieren. Die zur IAP-Familie (*Inhibitor of apoptosis proteins*) zugehörigen Proteine DIAP, IAP oder XIAP steuern die Aktivierung sowohl von Initiator- als auch Effektorcaspasen, indem sie entweder im katalytische Zentrum der Caspasen binden oder alternativ deren Dimerisierung verhindern (siehe Abb. 1.13, Bratton & Cohen, 2001, Saelens *et al.*, 2004). Für die Regulation des caspase-unabhängigen Zelltodes wurde eine spezifische Kontrolle der AIF-Translokation durch das Hitzeschockprotein Hsp70 beschrieben (Cregan *et al.*, 2004, Modjtahedi *et al.*, 2006).

### 1.5.2.2 PARP-1 und die Regulation des Zelltodes

Unterschiedliche Beobachtungen lieferten Hinweise auf eine Beteiligung des PAR-Metabolismus an der Regulation des Zelltodes. 1985 wurde von Berger *et al.* gezeigt, dass ein durch UV-Bestrahlung induzierter Zelltod in Anwesenheit von PARP-Inhibitoren unterbunden werden kann. In anderen Studien zeigte sich, dass PARP-1 im Verlauf der Apoptose durch die Effektorcaspasen 3 und 7 in ein 24 kDa grosses DNA-bindendes Fragment und ein C-terminales 89 kDa-Fragment, ein für Analysezwecke typischerweise genutzter Apoptosemarker, gespalten wird (siehe Abb. 1.3 A) (Kaufmann *et al.*, 1993, Lazebnik *et al.*, 1994, Tewari *et al.*, 1995). Dieses apoptotische PARP-1-Fragment vermag nicht zu homodimerisieren und kann nicht durch DNA-Brüche katalytisch aktiviert werden (Kim *et al.*, 2000, D'Amours *et al.*, 2001, Soldani & Scovassi, 2002).

Unter Verwendung von PARP-Inhibitoren, caspase-unspaltbaren PARP-Mutanten oder in Zellen mit genetisch depletierter PARP-1 wurden unterschiedliche Strategien verfolgt, um die Funktion des PAR-Metabolismus für einzelne apoptotische Stimuli zu klären (Herceg & Wang, 2001, Bouchard *et al.*, 2003, Viràg, 2005). Bei einer Induktion der Apoptose durch extrinsische, nichtgenotoxische Stimuli (FasL und TNF $\alpha$ ) wurde in Zellen eine zeitlich frühe PAR-Synthese beobachtet (Simbulan-Rosenthal *et al.*, 1998, Simbulan-Rosenthal *et al.*, 1999, Herceg & Wang, 2001). Die Bedeutung dieser Poly (ADP-Ribosyl)ierung für die unmittelbare Induktion des Zelltodes ist jedoch bis jetzt unklar. Ein Vergleich der FasL- oder TNF $\alpha$ - induzierten Apoptoseraten zeigte keine deutlichen Unterschiede zwischen PARP-1-depletierten und Wildtypzellen. Es wurde lediglich eine Verzögerung des Zelltodes in Abwesenheit von PARP-1 beobachtet (Leist *et al.*, 1997b, Wang *et al.*, 1997, Viràg, 2005). Desweiteren wird PARP-1 im Zuge der TNF $\alpha$ - induzierten Apoptose frühzeitig durch Caspasen gespalten. Dadurch kann die Aktivierung in späten Stadien des Zelltodes nicht erfolgen (Herceg & Wang, 1999, Boulares *et al.*, 2001). Von Germain *et al.* (1999) wurden Untersuchungen zur Spaltung der PARP-1 durch die Caspase 7 in Abhängigkeit von der Modifikation mit PAR-Ketten durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass im Vergleich zum unmodifizierten Enzym die Proteolyse der Poly (ADP-Ribosyl)ierten PARP-1 deutlich schneller und effizienter erfolgt. Möglicherweise handelt es sich daher bei der durch FasL- und TNF $\alpha$ - induzierten PAR-Synthese um einen positiven Regulationsmechanismus um die Rate der PARP-1 Spaltung zu verbessern (Germain *et al.*, 1999).

Genotoxische Behandlungen z. Bsp. mit alkylierenden Agenzien (EMS, MMS und MNNG) oder oxidativer Stress (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Peroxynitrite) führen zu einer massiven Schädigung der DNA und damit verbunden zur Aktivierung von PARP-1. In unterschiedlichen Studien wurde eine direkte Korrelation zwischen der PARP-1-Aktivierung und dem Auslösen von Apoptose oder Nekrose beobachtet (Herceg & Wang, 2001, Viràg, 2005). Zur Beschreibung des Zelltodes nach genotoxischer Schädigung existieren zwei verschiedene Modelle (siehe Abb. 1.15).



**Abb. 1.15: PARP-1 als Mediator des Zelltodes**

**A)** In der Suizidhypothese nach Berger *et al.* (1985) verursacht die vermehrte Poly (ADP-Ribosyl)ierung ein Absinken des zellulären NAD<sup>+</sup>-Gehalts. Infolgedessen ist die Bildung von ATP über glykolytische und mitochondriale Prozesse (Atmungskette) blockiert. Die Resynthese von NAD<sup>+</sup> im Zellkern verstärkt die ATP-Absenkung. Je nach Stärke des genotoxischen Stimulus resultiert daraus der apoptotische oder nekrotische Zelltod.

**B)** Nach den Ergebnissen von Yu *et al.* (2002) induziert die vermehrte Aktivierung von PARP-1 einen caspase-unabhängigen Zelltod durch die Translokation des proapoptischen Proteins AIF aus dem Mitochondrium in den Zellkern und die Chromatinolyse des Zellkerns.

In der von Berger *et al.* (1985) postulierten „Suizid-Hypothese“ wird der Zelltod nach einer vermehrten Aktivierung der PAR-Synthese auf die massive Depletion des zellulären NAD<sup>+</sup>s zurückgeführt (siehe Abb. 1.15 A). Die Minimierung des cytosolischen NAD<sup>+</sup>s unterbindet den Ablauf essentieller Schritte der Glykolyse und damit die Generierung von ATP und NAD(H)<sub>2</sub>. Der Mangel an reduzierten Reduktionsäquivalenten resultiert schliesslich in einer Destabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials und trägt damit zur ATP-Depletion bei. Im Zuge der Resynthese von NAD<sup>+</sup> im Zellkern wird zusätzlich ATP verbraucht (Rongvaux *et al.*, 2003), was letztendlich zum Zelltod führt (Berger *et al.*, 1985, Chiarugi, 2002, Hong *et al.*, 2004). Bezüglich der „Suizid-Hypothese“ (siehe Abb. 1.15 A) wurde gezeigt, dass die Intensität des genotoxischen Stimulus zur Entscheidung für oder gegen die Apoptose beiträgt. Während eine vermehrte PAR-Synthese infolge einer massiven DNA-Schädigung nahezu alles zelluläre ATP und NAD<sup>+</sup> und dadurch den nekrotischen Zelltod initiiert (Zhang *et al.*, 1994b, Viràg *et al.*, 1998, Ha & Snyder, 1999, Viràg & Szabó, 2002), erlaubt die

Anwesenheit verbleibender ATP-Ressourcen nach verringerter genotoxischer Schädigung den Fortgang des apoptotischen caspase-vermittelten Zelltodes (Viràg, 2005).

Von Yu *et al.* (2002) wurde ein alternatives Modell des Zelltodes, vermittelt durch PARP-1 Aktivierung vorgeschlagen. In diesem Modell signalisiert die PARP-1 abhängige Poly (ADP-Ribosyl)ierung die Translokation des proapoptotischen Proteins AIF in den Zellkern (siehe Abb. 1.13 und Abb. 1.15 B). Die anschliessende Chromatinolyse des Zellkerns initiiert den caspase-unabhängigen Zelltod (Yu *et al.*, 2002, Hong *et al.*, 2004, Koh *et al.*, 2005). Die Tatsache, dass der AIF-vermittelte Zelltod nicht nur an die Gegenwart der PARP-1, sondern auch an dessen katalytische Aktivierung geknüpft ist, lässt schliessen, dass durch die Poly (ADP-Ribosyl)ierung entscheidende Signale ausgelöst werden. Der molekulare Mechanismus, wie die Freisetzung von AIF ausgelöst wird, ob freie PAR-Moleküle oder PAR-Modifikationen daran beteiligt sind, ist noch ungeklärt (Hong *et al.*, 2004, Koh *et al.*, 2005).

## 1.6 Zielsetzung

Biologische Zellsysteme sind stetig exogenen und endogenen erbgutschädigenden Einflüssen ausgesetzt. Die betroffenen Zellen reagieren darauf mit komplexen Reaktionen, um bestehende DNA-Schäden möglichst zu beseitigen. Ist das Reparaturvermögen der Zelle überschritten, so kann der Zelltod eingeleitet werden, um dem Auftreten von genetischer Instabilität und der Entwicklung von Krebs entgegenzuwirken. Eine wichtige Schalterfunktion spielt dabei die Poly(ADP-Ribosyl)ierungsreaktion. Poly (ADP-Ribose) kann in Zellen multiple Reaktionen auslösen. Einerseits trägt die Poly (ADP-Ribosyl)ierung über die Beteiligung an DNA-Reparaturprozessen zum Erhalt der genomischen Stabilität bei. Andererseits signalisiert die Anwesenheit von Poly (ADP-Ribose) Polymeren unmittelbar die Induktion des Zelltodes. Während die Poly (ADP-Ribose) Polymerasen recht gut charakterisiert wurden, sind nur wenige Informationen zum Schlüsselenzym des Polymer-Abbaus, der Poly (ADP-Ribose) Glycohydrolase (PARG), vorhanden. Ziel der Arbeit war es deshalb, erstmalig Interaktionspartner der humanen PARG zu identifizieren und anschliessend die funktionellen Aspekte dieser Protein-Protein-Wechselwirkungen im Detail zu studieren. Dafür sollte zunächst die Klonierung der cDNA der humanen PARG erfolgen. In anschliessenden Experimenten war die Etablierung eines Systems zur rekombinanten Expression und Affinitätsimmobilisierung des Enzyms erforderlich. Auf dieser Basis sollte die Identifikation von PARG-Interaktionspartnern erfolgen. Anschliessende funktionelle Untersuchungen sollten zeigen, wie sich die PARG-Protein-Interaktionen auf den Ablauf des Poly (ADP-Ribose) Metabolismus auswirken und welche Konsequenzen sich daraus für den Ablauf zellulärer Prozesse wie der Induktion des programmierten Zelltodes ergeben.