

6 Zusammenfassung

Bei der Poly (ADP-Ribosyl)ierung handelt es sich um eine posttranslationale Modifikationsreaktion, deren Bedeutung für zahlreiche zelluläre Prozesse wie der Regulation des Zellzyklus, der DNA-Reparatur sowie dem Zelltod gezeigt wurde. Während die Synthese von Poly (ADP-Ribose) (PAR) und die Poly (ADP-Ribose) Polymerasen (PARPs) intensiv untersucht wurden, sind nur wenige Informationen zur Funktion des Polymer-abbauenden Enzyms, der Poly (ADP-Ribose) Glycohydrolase (PARG) vorhanden. Ziel der Arbeit war es, mit der Identifizierung von Interaktionspartnern und in daran anschliessenden funktionellen Studien, das Verständnis für die Funktion der PARG grundlegend zu erweitern.

Dafür erfolgte zunächst die Klonierung der humanen PARG- cDNA aus der Krebszelllinie HeLa S3. Die Analyse der Primärstruktur der PARG zeigte, dass alle für die zelluläre Verteilung und den Katalysemechanismus essentiellen Aminosäuren enthalten waren. In den folgenden Experimenten zur heterologen Anreicherung des Proteins in *E. coli*, wurde zum ersten Mal die Expression sowohl der katalytische Domäne (PARG₆₅) als auch der vollständigen humanen PARG (PARG₁₁₀) als lösliche Polyhistidininfusionsproteine gezeigt. Die anschliessende Reinigung der katalytischen Domäne durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie ermöglichte ausserdem die erstmalige Gewinnung eines polyklonalen Antikörpers, gerichtet gegen die humane PARG.

Da eine Reinigung der kompletten PARG₁₁₀ als Polyhistidininfusionsprotein mittels Ni-NTA-Chromatographie nicht möglich war, wurde als Alternative eine Affinitätsmatrix mit Gallotanninen, beschriebene Inhibitoren der PARG, entwickelt. Die erfolgreiche Immobilisierung der humanen PARG an diese Matrix ermöglichte anschliessende Protein-Protein-Interaktionsstudien. Dabei konnte erstmalig eine spezifische Protein-Protein-Interaktion zwischen den Enzymen PARP-1 und PARG gezeigt werden. Durch den Einsatz von Deletionsmutanten wurde der Bereich der Interaktion auf die katalytische Domäne der PARG und die Automodifikationsdomäne der PARP-1 eingegrenzt. In weiteren Experimenten zeigte sich, dass die PARG in der Lage ist die katalytische Aktivität der PARP-1 in humanen Kernextrakten direkt zu beeinflussen.

Ausserdem wurde eine Interaktion der PARG mit *X-ray repair cross-complementing 1* (XRCC1), einem für die DNA-Reparatur essentiellen Protein nachgewiesen. Da XRCC1 sowohl mit PARP-1 als auch der PARG interagiert, wurde die zelluläre Funktion dieses Proteins für den PAR-Metabolismus modellhaft in Hamsteroovarienzellen mit Expression von XRCC1 (EM9-XH) und ohne Expression von XRCC1 (EM9-V) untersucht. Erfolgte eine Schädigung beider Zelllinien mit einer letalen Dosis des alkylierenden Agens N-Methy-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG), so wurde eine deutlich stärkere Akkumulation von PAR in den EM9-XH- Zellen beobachtet. Die Relevanz der XRCC1-abhängigen PAR-Induktion wurde anschliessend hinsichtlich der Induktion des Zelltodes untersucht. In den

XRCC1-exprimierenden Zellen erfolgte MNNG-abhängig die Translokation des Apoptose induzierenden Proteins AIF (*apoptosis inducing factor*) vom Mitochondrium in den Zellkern. Die folgende Chromatinolyse (*nuclear shrinkage*) des Zellkerns führte caspase-unabhängig zum Zelltod. Im Unterschied dazu starben die XRCC1-defizienten EM9-V- Zellen infolge der Absenkung der zellulären ATP- und NAD⁺-Spiegel nekrotisch, ohne vorhergehende AIF-Translokation und Chromatinolyse.

In allen höheren Organismen wird der Erhalt des Genoms durch funktionierende DNA-Reparaturprozesse gewährleistet. Sind diese Mechanismen überlastet, kann eine gezielte Einleitung des Zelltodes erfolgen, um der genetischer Instabilität entgegenzuwirken und die Entwicklung von Krebs zu verhindern. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die funktionellen Interaktionen zwischen PARG, PARP-1 und XRCC1 von fundamentaler Relevanz für die genomische Integrität sind.