

Poly(ADP-Ribosyl)ierung, genomische Stabilität und Alterung

Poly(ADP-Ribosyl)ierung ist eine post-translationale Protein-Modifikation, die diverse Zellfunktionen reguliert [siehe auch: (1-5)]. Hierzu zählen DNA-Reparatur, Mitose, Transkription, Replikation und Telomerlängenregulation. Stark gesteigert wird die Bildung der Poly(ADP-Ribose) (PAR) durch Applikation von genotoxischen Agenzien wie Alkylanzien, oxidativem Stress oder gamma- bzw. Röntgenstrahlung. Dafür verantwortlich sind die Mitglieder der Familie der Poly(ADP-Ribose) Polymerasen (PARPs) PARP1 und PARP2, wobei PARP1 das weitaus aktivere Enzym ist. Bei der Poly(ADP-Ribosyl)ierung wird das Substrat NAD⁺ in Nicotinamid und ADP-Ribose gespalten, wobei letzteres zur Synthese des entsprechenden, teilweise verzweigten Polymers genutzt wird. Je nach dem, welche PARP aktiv ist und welcher Proteinakzeptor modifiziert wird, kann die Struktur der PAR unterschiedlich sein. Zu den kovalent modifizierten Proteinen zählen z.B. Histone, nucleäre Strukturproteine wie DEK und High-Mobility-Group proteins, der Tumorsuppressor p53, diverse Transkriptionfaktoren und viele mehr. In der Regel führt diese Art der Modifikation zu einer Inaktivierung, wahrscheinlich bedingt durch die hohe negative Ladung des Polymers. Viele DNA-interagierende Proteine können die PAR aber auch über eine schwach-konservierte Abfolge von basischen und hydrophoben Aminosäuren binden. Die Auswirkungen dieser Interaktion sind noch nicht vollständig verstanden. Es kann zum Einen zu einer Kompetition zwischen PAR und DNA kommen, zum Anderen rekrutiert das Polymer aber auch das Plattform-Protein XRCC1, das eine wichtige Rolle in der Basen-Exzisionsreparatur der DNA spielt, in dem es die essentiellen Faktoren DNA-Polymerase β und DNA-Ligase III zum Schadensort transportiert. Weitere bindende Proteine sind z.B. [siehe auch (6)]: Die Protein-Untereinheit der Telomerase (TERT), einem Enzymkomplex, der die Chromosomenenden (Telomere) in der Keimbahn, in Stammzellen und in den meisten Tumorzellen stabil hält,

XPA (Xeroderma Pigmentosum Komplementationsgruppe A Protein) aus dem Nucleotid-Excisionsreparaturweg, das in der Erkennung von DNA-Struktur verändernden Schäden eine wichtige Rolle spielt,

der Tumorsuppressor p53 (auch „Guardien of the Genome“), der die Reaktion der Zelle auf unterschiedliche Stressinduktoren koordiniert,

Histone, die Poly(ADP-Ribose) mit einer höheren Affinität binden als DNA, sowie ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), die Initiator kinase der DNA Doppelstrangbruch-Reparatur, welche nur verzögert und nicht vollständig aktivierbar ist, wenn Poly(ADP-Ribosyl)ierung unterdrückt wird.

Wir konnten zeigen, dass eine Erhöhung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung nach DNA-Schädigung in Zellen zu einer erhöhten genomischen Stabilität führt (gemessen an Hand von Schwesterchromatid-Austauschen, SCE), und eine Verringerung dementsprechend zu einer Erhöhung der genomischen Instabilität, ein Kennzeichen der Tumorigenese (7).

Verschiedene Erkrankungen, die ein vorzeitiges Altern des Patienten bedingen, sind neben der klassischen Progerie vor allem solche, welche durch Mutationen von Proteinen hervorgerufen werden, die in der DNA-Schadenserkennung bzw. der DNA-Prozessierung eine Rolle spielen. Zu nennen wären hier das bereits erwähnte ATM (8), die Helicase WRN (9), sowie Proteine aus der Xeroderma Pigmentosum (XP) Gruppe (10) neben vielen weiteren Proteinen. Unsere Gruppe konnte zeigen, dass in Blutzellen von Säugern die Poly(ADP-Ribosyl)ierungskapazität mit der maximalen Lebensspanne korreliert, d.h. je langlebiger eine Spezies, desto aktiver die PARP (11).

In dieser Studie konnte auch gezeigt werden, dass die PARP-Aktivität invers-korreliert ist zum Lebensalter des Organismus. Außerdem zeigte sich, dass langlebige Personen (centenerians) eine erhöhte Aktivität im Vergleich zur Durchschnittsbevölkerung aufweisen (12).

Wir konnten die Spezies-bedingte Differenz in der Poly(ADP-Ribosyl)ierungskapazität zumindest zum Teil auf direkte Unterschiede in der Primärsequenz der evolutionär hochkonservierten PARP1 zurückführen (13,14). Rekombinant exprimierte und aufgereinigte Ratten-PARP1 zeigte eine ca. zweifach erniedrigte Aktivität im Vergleich zur humanen PARP1. Behandlung von Zellen mit dem Parkinson-Medikament Selegilin, das im Tiermodell neuroprotektiv und Lebensspannen verlängernd ist, wirkte stimulierten die PARP-Aktivität nach DNA-Schädigung. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Alterung und PARP-Aktivität verknüpft sind, möglicherweise über die Aufrechterhaltung der Integrität des Erbguts. Kürzlich konnten wir nachweisen, dass PARP1 auch noch auf eine weitere Weise ausser durch Regulierung von DNA-Reparatur und Unterdrückung der SCE-Häufigkeit die genomische Stabilität beeinflusst. Suppression der PARP1-Aktivität entweder durch pharmakologische Inhibition oder spezifisch durch siRNA (small interfering RNA) führt zu einer beschleunigten Verkürzung der Telomere (15). Dies ist reversibel bei Telomerase-exprimierenden Zellen, jedoch irreversibel in den meisten humanen Körperzellen, die dieses Enzym nicht besitzen und deren Telomerlänge deswegen bei jeder Teilung entsprechend um ca. 150 Basenpaare abnimmt. Durch PARP-Inhibition erhöht sich dieser Telomerverlust signifikant. Zu kurze Telomere können ihre Funktion als essentielle Stabilisatoren der Chromosomen nicht mehr erfüllen, es wird eine DNA-Schadenssignal initiiert, welches entweder zu einem irreversiblen Stop der Zellteilung (auch als zelluläre Seneszenz bezeichnet) oder genomischer Instabilität führen kann (16). Letzteres wird durch den Versuch der Zelle induziert, den Schaden durch DNA-Doppelstrangbruch Reparatur zu beheben. Das führt in den meisten humanen Zellen zum apoptotischen Zelltod, kann jedoch auch zu deregulierter Zellteilung und dem Beginn der Kanzerogenese führen. Die PARP1-medierte Stabilisierung der Telomere ist auch dahingehend von Bedeutung, dass PARP-Inhibitoren in der klinischen Phase II der Erprobung zur Krebsbekämpfung stehen. Zum einen werden sie zusammen mit Alkylanzien in der Chemotherapie verwendet, um die Reparatur der dadurch hervorgerufenen DNA-Läsionen zu unterdrücken (17,18). Zum anderen werden sie in Tumoren, die keine DNA-Doppelstrangbruch aufweisen (z.B. im erblichen Mamma-Karzinom durch Mutation der Proteine BRCA1 oder BRCA2), genutzt, um in diesen selektiv Apoptose zu induzieren (19,20). Während der Replikation der DNA entstehen Einzelstrangbrüche, die in der Regel PARP-abhängig repariert werden. Unterdrückt man nun die PARP-Aktivität, so führen diese Einzelstrangbrüche im weiteren Verlauf zu Doppelstrangbrüchen, die in den oben genannten Tumorzellen irreparabel sind und zum Absterben führen. Unter dem Gesichtspunkt, dass die PARP1-Inhibition sich allerdings auch negativ auf die Telomerlänge als Chromosomen-Stabilisator auswirkt, muss dieser Therapieansatz vielleicht kritisch hinterfragt werden. Z.B. könnte die behandlungsbedingte Regression der Tumormasse die Zellteilung im umliegenden Gewebe induzieren, um den freien Raum wieder aufzufüllen. Die durch Suppression der PARP-Aktivität bereits irreversibel verkürzten Telomere könnten bei dieser Proliferation schnell ihre Schutzfunktion für die Chromosomen verlieren mit den bereits genannten Folgen: Zelluläre Seneszenz, durch genomische Instabilität bedingter Zelltod oder Entstehung von sekundären Tumoren. Diese Hypothese wird von uns zur Zeit eingehend untersucht.

Referenzen

1. Bürkle, A. (2001) Poly(ADP-ribosylation), a DNA damage-driven protein modification and regulator of genomic instability. *Cancer Lett*, **163**, 1-5.
2. Bürkle, A. (2005) Poly(ADP-ribose). The most elaborate metabolite of NAD⁺. *FEBS J*, **272**, 4576-4589.
3. Diefenbach, J. and Bürkle, A. (2005) Introduction to poly(ADP-ribose) metabolism. *Cell Mol Life Sci*, **62**, 721-730.
4. Beneke, S. and Bürkle, A. (2007) Poly(ADP-ribosylation) in mammalian ageing. *Nucleic Acids Res*, **35**, 7456-7465.
5. Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.C. and de Murcia, G. (2006) Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 517-528.
6. Pleschke, J.M., Kleczkowska, H.E., Strohm, M. and Althaus, F.R. (2000) Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J Biol Chem*, **275**, 40974-40980.
7. Meyer, R., Müller, M., Beneke, S., Küpper, J.H. and Bürkle, A. (2000) Negative regulation of alkylation-induced sister-chromatid exchange by poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity. *Int J Cancer*, **88**, 351-355.
8. Mavrou, A., Tsangaris, G.T., Roma, E. and Kolialexi, A. (2008) The ATM gene and ataxia telangiectasia. *Anticancer Res*, **28**, 401-405.
9. Ouyang, K.J., Woo, L.L. and Ellis, N.A. (2008) Homologous recombination and maintenance of genome integrity: cancer and aging through the prism of human RecQ helicases. *Mech Ageing Dev*, **129**, 425-440.
10. Niedernhofer, L.J. (2008) Tissue-specific accelerated aging in nucleotide excision repair deficiency. *Mech Ageing Dev*, **129**, 408-415.
11. Grube, K. and Bürkle, A. (1992) Poly(ADP-ribose) polymerase activity in mononuclear leukocytes of 13 mammalian species correlates with species-specific life span. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 11759-11763.
12. Muiras, M.L., Müller, M., Schächter, F. and Bürkle, A. (1998) Increased poly(ADP-ribose) polymerase activity in lymphoblastoid cell lines from centenarians. *J Mol Med*, **76**, 346-354.
13. Beneke, S., Alvarez-Gonzalez, R. and Bürkle, A. (2000) Comparative characterisation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 from two mammalian species with different life span. *Exp Gerontol*, **35**, 989-1002.
14. Beneke, S., Kappler, R., Bürkle, A. and Scherthan, H. (2002) Genomic structure, conservation and FISH mapping of the *Rattus norvegicus* Adprt gene. *Cytogenet Genome Res*, **98**, 298-301.
15. Beneke, S., Cohausz, O., Malanga, M., Boukamp, P., Althaus, F. and Bürkle, A. (2008) Rapid regulation of telomere length is mediated by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Nucleic Acids Res*, **36**, 6309-6317.
16. d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P. and Jackson, S.P. (2003) A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, **426**, 194-198.
17. Curtin, N.J. (2005) PARP inhibitors for cancer therapy. *Expert Rev Mol Med*, **7**, 1-20.
18. Tentori, L. and Graziani, G. (2005) Chemopotentiation by PARP inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol Res*, **52**, 25-33.
19. Lord, C.J. and Ashworth, A. (2008) Targeted therapy for cancer using PARP inhibitors. *Curr Opin Pharmacol*, **8**, 363-369.
20. Ratnam, K. and Low, J.A. (2007) Current development of clinical inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase in oncology. *Clin Cancer Res*, **13**, 1383-1388.

Lebenslauf Sascha Beneke

3.4.1970	Geburt in Hamburg
1976.1980	Grundschule Posthausen/Niedersachsen
1980.1982	Orientierungsstufe in Ottersberg/Niedersachsen
1982.1989	Ratsgymnasium Rotenburg (Wümme)/Niedersachsen
1989.1994	Diplomstudiengang Biologie Philipps Universität Marburg/Hessen
1994.1996	Zivildienst am Deutschen Krebsforschungszentrum (dkfz), Heidelberg/Baden-Württemberg
1996.1999	Promotion an der Ruprecht-Karls-Universität / dkfz, Angewandte Tumorstudiologie, Heidelberg/Baden-Württemberg
1999.2001	Postdoctoral Associate, Medical School/Pediatrics Yale-University, New Haven, CT, USA
2001.2003	Wiss. Angest. am Deutschen Krebsforschungszentrum (dkfz), Abt. Genetik der Hautkarzinogenese Heidelberg/Baden-Württemberg
2003-2004	Wiss. Angest. Molekulare Toxikologie, Universität Konstanz, Konstanz/Baden-Württemberg
seit 2004	Wiss. Assistent Molekulare Toxikologie ,Universität Konstanz, Konstanz/Baden-Württemberg