

Zusammenfassung

Ein Durchbruch bei der Aufklärung der genom-stabilisierenden Wirkung von p53 wurde erzielt, als man zeigen konnte, dass p53 Rekombinationsprozesse unterdrückt, insbesondere wenn bestimmte Basenfehlpaarungen auf der nach Strangaustausch erzeugten Heteroduplex (DNA-Doppelstrang aus Einzelsträngen unterschiedlicher Herkunft) auftauchen. Weiterhin gelang es durch Mutantenanalysen herauszuarbeiten, dass Rekombinations- und Wachstumskontrolle zwei unterscheidbare Aktivitäten von p53 darstellen, welche möglicherweise unabhängig voneinander zur Tumor supprimierenden Wirkung beitragen.

Darauf aufbauend gelang es in dieser Arbeit unter Anwendung biochemischer Analyseverfahren zu zeigen, dass p53 und die Rekombinase hRad51 an rekombinativen DNA-Strukturen physikalisch und funktionell miteinander wechselwirken. So konnte in Strangtransfer-Experimenten und Exonukleaseaktivitäts-Tests gezeigt werden, dass strangtransfer-aktives hRad51 den p53-vermittelten nukleolytischen DNA-Abbau durch die Erzeugung von Rekombinationsintermediaten stimuliert. Durch Bindungsstudien konnte herausgearbeitet werden, dass hRad51 oligomer in Assoziation mit künstlichen, dreisträngigen Rekombinationsintermediaten die Bildung stabiler Komplexe aus p53 und diesen 3-Strang-Strukturen fördert. Mechanistische Studien ergaben weiterhin, dass rekombinative DNA-Strukturen bevorzugte Substrate für die exonukleolytische Korrektur durch p53 insbesondere dann darstellen, wenn die genannten Basenfehlpaarungen in der Heteroduplex vorliegen, was die Hypothese einer aktiven Fehlerbeseitigung durch p53 stützt. Es zeigte sich weiter, dass diese exonukleolytische Korrekturaktivität mit zunehmender Entfernung von der Strangkreuzungsregion abnimmt, also gegen frühe Rekombinationsintermediate gerichtet zu sein scheint.

Die krebs-assoziierte Mutante p53(273H) war und ist von allergrößtem Interesse, da sie als 3'->5' Exonuklease inaktiv ist und keine Rekombinationskontrolle ausübt, jedoch noch Teilaktivitäten in der transkriptionellen Transaktivierung und Wachstumskontrolle aufweist. Im Vergleich zu Wtp53 erwies sich die Mutante p53(273H) genau in den die Rekombination betreffenden biochemischen Eigenschaften, d.h. in der Bindung und exonukleolytischen Degradierung von Rekombinationsintermediaten und in der kooperativen Wechselwirkung mit hRad51-Filamenten als defekt. Dadurch konnte zur Klärung der Ursachen des DNA-Reparaturdefektes dieser Mutante und möglicherweise auch seiner kanzerogenen Wirkung beigetragen werden. Demgegenüber führten Untersuchungen zur Rolle der Tetramerisierung bei diesen sequenz-unabhängigen DNA-Interaktionen von p53 zu

dem Ergebnis, dass die Ausbildung stabiler, tetramerer p53-Komplexe in Nachbarschaft von DNA-Kreuzungsstrukturen für den effizienten exonukleolytischen Angriff von 3-Strang-DNA-Strukturen notwendig zu sein scheint. Aufgrund dieser Daten konnte ein mechanistisches Modell vorgeschlagen werden, bei welchem es zu einer frühzeitigen p53-Rekrutierung nach der initialen Stranginvasion durch hRad51 kommt und p53 als Fehlerkorrekturmechanismus für Strangaustauschereignisse fungiert.

Aufgrund der vermuteten Rolle von posttranslationalen Modifikationen bei der Generierung von p53-Subpopulationen mit multiplen Funktionen bei der Vermeidung der Krebsentstehung, befasste sich diese Arbeit weiterführend mit der Analyse der Poly-ADP-Phosphoribosyl-Transferase (PARP-1) als Bestandteil einer Signaltransduktionskette zwischen DNA-Strangbrucherkenkung und p53-Modifikation. Um zu verstehen, in welcher Weise PARP-1 die Rekombinationskontrolle von p53 beeinflusst, wurden in gezielt veränderten zellulären Systemen Rekombinationsmessungen mit Hilfe des auf SV40 und des auf *EGFP*-Rekonstitution basierenden Testsystems mit einer Serie von episomal und chromosomal integrierten DNA-Substraten zur *I-SceI*-Meganuklease induzierten Doppelstrangbruchreparatur durchgeführt. Die Ergebnisse aus Wtp53-freien Zellsystemen nach Expression von PARP-1 oder der PARP-1-DNA-Binde-Domäne (PARP-DBD) demonstrierten eine dosisabhängige Rekombinationsinhibition durch PARP-1 und veranschaulichten die Bedeutung von Strangbrüchen als Voraussetzung für die von der PARP-1 bei der Rekombination ausgeübte Funktion. Nach transienter Expression von PARP-1 oder PARP-DBD in wtp53-haltigen Zellen zeigte sich ein synergistischer Effekt bzgl. der Inhibition der homologen Rekombination. Dies bedeutet, dass die Wirkung von PARP-1 auch vor dem Hintergrund von Wtp53 über die Blockierung von DNA-Enden erklärt werden kann, wobei Wtp53 über den Abbruch früher Rekombinationsereignisse komplementär der homologen Rekombination entgegenwirkt. Die Daten sprechen also in Bezug auf die DNA-Rekombination gegen eine mögliche Rolle von PARP-1 als ein Molekül, welches DNA-Brüche erkennt und nachfolgend die Schadenssignale mittels Poly(ADP-Ribosylierung) an p53 als das die Rekombinationsinhibition ausführende Molekül überträgt. Überraschenderweise kehrte sich jedoch die Wirkung von PARP-1 nach stabiler Koexpression von PARP-1 und Wtp53 um. Hier konnte ein Zusammenhang zwischen der Einleitung der Apoptose, möglicherweise über Signalübertragung via p53 und der unerwarteten Zunahme der DNA-Austauschfrequenzen beobachtet werden. Dies veranschaulicht, dass für die Analyse der molekularen Wirkungsweise von PARP-1 in der DNA-Reparatur transiente Expressionssysteme vorzuziehen sind, um Abweichungen aufgrund indirekter Effekte auf Wachstum und Tod der Zellen zu vermeiden.