

# **Mechanismen der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch genotoxischen Stress**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

**vorgelegt von**  
**Michael Stilmann**

geboren in Grosny, Russland

Berlin, im Juli 2009

Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von August 2006 bis Juni 2009 unter der Leitung von Prof. Dr. Claus Scheidereit am Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin in Berlin-Buch angefertigt

1. Gutachter: Prof. Dr. Claus Scheidereit

2. Gutachter: Prof. Dr. Udo Heinemann

Disputation am: 22.10.2009

Die vorliegende Arbeit wurde von mir selbstständig unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt.

Berlin, 03.07.2009

---

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>5</b>
1.1. Grundlegende Charakteristika des NF- $\kappa$ B-Signalnetzwerks .....	6
1.1.1. Vertreter der NF- $\kappa$ B/Rel Transkriptionsfaktor- und der I $\kappa$ B-Proteinfamilie.....	6
1.1.2. Grundlegende Mechanismen der NF- $\kappa$ B-Aktivierung.....	8
1.1.3. Der IKK-Komplex – Konvergenzpunkt des NF- $\kappa$ B Signalnetzwerks.....	10
1.2. Der kanonische Modus der NF- $\kappa$ B-Aktivierung .....	11
1.2.1. TNF $\alpha$ /TNFRI-Signaltransduktion .....	14
1.2.2. Interleukin-1-Rezeptor/Toll-like Rezeptor Signaltransduktion .....	16
1.3. NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch genotoxische Einwirkungen.....	18
1.3.1. Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen .....	18
1.3.2. ATM als zentraler Mediator zellulärer Reaktionen auf DSB .....	19
1.3.3. NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch DSB-Induktoren erfolgt über eine ATM-IKK-Signalachse.....	20
1.3.4. Sumoylierung von IKK $\gamma$ als ein intermediärer Schritt auf dem Weg zur IKK-Aktivierung durch DSB .....	21
1.3.5. Konvergenzpunkt der IKK $\gamma$ -Sumoylierung und ATM-abhängiger Prozesse .....	22
1.3.6. Biologische Konsequenzen der DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Antwort .....	24
1.4. Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1 – ein multifunktionales Enzym .....	24
1.4.1. Chemie der Poly-ADP-Ribosylierung .....	26
1.4.2. Struktur und enzymatische Aktivität von PARP-1 .....	27
1.4.3. Molekulare und zelluläre Funktionen von PARP-1 und Poly-ADP-Ribosylierung .....	28
1.4.3.1. Bedeutung von PARP-1 für DNA-Schaden-induzierten Zelltod .....	29
1.4.3.2. PARP-1 agiert als DNA-Schadensensor für DNA-Reparatur und genomische Stabilität .....	30
1.4.3.3. PARP-1 und Transkriptionsregulation .....	32
<b>2. Zielstellung .....</b>	<b>35</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>36</b>
3.1. Geräte und Zubehör .....	36
3.2. Chemikalien .....	37
3.3. Enzyme und Kits.....	38
3.4. Bakterien.....	38
3.5. Eukaryontische Zelllinien und Viren.....	39
3.6. Mäusestämme .....	40
3.7. Rekombinante Proteine.....	40
3.8. Peptide .....	40
3.9. Vektoren und Oligonukleotide .....	40
3.10. Antikörper .....	43
3.11. Allgemeine Puffer und Lösungen.....	44
3.12. Zellbiologische Methoden .....	46
3.12.1. Kultivierung adhärenter Zellen .....	46
3.12.2. Kultivierung von Suspensionszellen.....	46
3.12.3. Kryokonservierung von Zellen .....	46

---

---

3.12.4. Präparation von Knochenmarkzellen aus Mäusen und Differenzierung von Makrophagen .....	47
3.12.5. Präparation von Dünndarmepithelzellen aus Mäusen.....	47
3.12.6. Isolation von B-Zellen aus der Milz von Mäusen.....	48
3.12.7. Stimulation .....	48
3.12.8. Transiente Transfektion .....	49
3.12.9. Immunfluoreszenzmikroskopie.....	50
3.12.10. Laser-Mikrobestrahlungsexperimente und Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie ....	51
3.12.11. Untersuchung der Apoptose mittels Durchflusszytometrie .....	52
3.12.12. NF- $\kappa$ B-Reportergen-Assay .....	52
3.12.13. Messung intrazellulärer Ca <sup>2+</sup> -Konzentration .....	53
3.13. Molekularbiologische Methoden .....	53
3.13.1. Polymerase-Kettenreaktion.....	53
3.13.2. Reinigung von PCR-Produkten und Restriktionsverdau .....	54
3.13.3. Dephosphorylierung von Vektor-DNA.....	54
3.13.4. Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion.....	54
3.13.5. Ligation .....	55
3.13.6. Herstellung kompetenter Bakterien .....	55
3.13.7. Transformation kompetenter Bakterien .....	55
3.13.8. Präparation von Plasmid-DNA .....	56
3.13.9. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	56
3.13.10. Kapillar-Sequenzierung von DNA.....	56
3.13.11. Semiquantitative RT-PCR-Analyse der Expression von NF- $\kappa$ B-Zielgenen.....	57
3.13.12. Radioaktive Endmarkierung von DNA-Fragmenten .....	58
3.14. Biochemische Methoden.....	59
3.14.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	59
3.14.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	59
3.14.3. Coomassiefärbung.....	59
3.14.4. Westernblot .....	60
3.14.5. Immunologischer Proteinnachweis .....	60
3.14.6. Bakterielle Expression rekombinanter Proteine.....	60
3.14.7. Expression rekombinanter Proteine in Sf9-Zellen .....	61
3.14.8. Affinitätsreinigung rekombinanter Strep-Tag-Fusionsproteine.....	61
3.14.9. (Ko)-Immunopräzipitationen .....	62
3.14.10. Nachweis von SUMO- und Ubiquitin-modifizierten Proteinen .....	63
3.14.11. Protein-Protein-Interaktionsstudien <i>in vitro</i> .....	63
3.14.12. Poly-(ADP-Ribose)-Bindungsstudien.....	64
3.14.13. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).....	65
3.14.14. <i>In vitro</i> -Immunkomplex-Kinasereaktionen.....	65
3.14.15. Zellfraktionierung .....	66
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>68</b>
4.1. Regulation der IKK $\gamma$ -Sumoylierung durch eine nukleäre PARP-1-PIASy-Signalachse .....	68
4.1.1. Identifikation von PARP-1 als IKK $\gamma$ -Interaktionspartner .....	68

---

---

4.1.2.	Selektive Rolle von PARP-1 für die Induktion des NF- $\kappa$ B-Signalwegs nach DNA-Schädigung.....	69
4.1.3.	PARP-1 ist ein zelltypspezifischer Aktivator des DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalwegs .....	73
4.1.4.	Die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch DNA-Schäden ist von der enzymatischen Aktivität von PARP-1 abhängig .....	74
4.1.5.	Induzierbare Komplexbildung zwischen IKK $\gamma$ und PARP-1 .....	76
4.1.6.	Analyse der subzellulären Lokalisation von IKK $\gamma$ und PARP-1 nach Laser-Mikrobestrahlung .....	78
4.1.7.	Die SUMO1-Ligase PIASy ist für DNA-Schaden-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung erforderlich.....	81
4.1.8.	PIASy-vermittelte IKK $\gamma$ -Sumoylierung ist von enzymatisch aktiver PARP-1 abhängig .....	82
4.1.9.	PIASy bildet mit PARP-1 und IKK $\gamma$ ein PAR-abhängiges Signalosom .....	83
4.1.10.	PIASy bindet freie PAR-Polymere über konservierte PAR-Bindemotive.....	85
4.1.11.	ATM wird in Abhängigkeit von PARP-1 an das nukleäre Signalosom rekrutiert....	89
4.1.12.	PARP-1-abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung vermittelt zelluläre Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung .....	91
4.1.13.	Regulation der IKK $\gamma$ -Sumoylierung durch ein PAR-abhängiges Signalosom - Zusammenfassung.....	93
4.2.	ATM induziert eine Lys63-Polyubiquitin-abhängige TRAF6-TAK1-IKK-Signalachse .....	94
4.2.1.	Genotoxischer Stress induziert eine Assoziation von ATM mit der Plasmamembran unabhängig vom PARP-Signalosom.....	95
4.2.2.	Ca <sup>2+</sup> -Abhängigkeit der ATM-Rekrutierung an die Plasmamembran und der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch genotoxischen Stress.....	100
4.2.3.	RNAi-basierte Suche nach weiteren Komponenten des DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalwegs .....	103
4.2.4.	IKK-Aktivierung durch genotoxischen Stress wird durch den TAK1-Kinasekomplex vermittelt .....	105
4.2.5.	TRAF6 und Ubc13 sind als Komponenten der Lys63-Ubiquitinierungsmaschinerie für TAK1-Aktivierung durch $\gamma$ -IR notwendig.....	108
4.2.6.	Dominant-negative Mutanten von TRAF6 und TAK1 inhibieren $\gamma$ -IR-induzierte NF- $\kappa$ B-abhängige Transkription .....	109
4.2.7.	$\gamma$ -Bestrahlung bewirkt eine Aktivierung der Ubiquitin-Ligaseaktivität von TRAF6 .....	110
4.2.8.	Das TRAF6-TAK1-Modul wird von ATM angesteuert .....	111
4.2.9.	ATM-Rekrutierung an die Plasmamembran korreliert mit einer TAB2-Zunahme im Zytosol und der zytoplasmatischen Aktivierung von TAK1 .....	114
4.2.10.	Die Bindung von IKK $\gamma$ an Polyubiquitin-Ketten ist Voraussetzung für NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch genotoxischen Stress.....	116
4.2.11.	$\gamma$ -Bestrahlung induziert eine Ubiquitinierung von IKK $\gamma$ .....	117
4.2.12.	IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung ist von einer intakten Zinkfinger-Domäne abhängig und erfordert die Bindung von IKK $\gamma$ an Polyubiquitin.....	118

---

4.2.13. TRAF6-vermittelte Synthese von Lys63-Polyubiquitin ist Voraussetzung für IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung .....	120
4.2.14. IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung bildet den Konvergenzpunkt des ATM-TRAF6-TAK1- und des PARP-1-PIASy-Signalmoduls.....	121
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>123</b>
5.1. Die Aktivierung des IKK-NF- $\kappa$ B-Systems durch DNA-Strangbrüche ist von PARP-1-vermittelter PAR-Synthese abhängig.....	124
5.2. PIASy-vermittelte IKK $\gamma$ -Sumoylierung ist durch PARP-1 reguliert .....	125
5.3. Automodifizierte PARP-1 assembliert IKK $\gamma$ , PIASy und ATM in einem nukleären Signalosom.....	126
5.4. Steuerung der IKK $\gamma$ -Sumoylierung durch das PARP-1-Signalosom .....	129
5.5. Die Translokation von ATM an die Plasmamembran erfolgt unabhängig vom PARP-Signalosom .....	130
5.6. Der TAK1-Kinasekomplex ist für die IKK-Aktivierung durch genotoxischen Stress verantwortlich.....	132
5.7. Zentrale Rolle von Lys63-verknüpften Ubiquitin-Polymeren für TAK1- und IKK-Aktivierung.....	134
5.8. ATM aktiviert die Ubiquitin-Ligase TRAF6.....	136
5.9. IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung als Konvergenzpunkt des DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalnetzwerks.....	138
5.10. Integration der NF- $\kappa$ B-DNA-Schadenskaskade in das Netzwerk pro- und anti-apoptotischer Signale.....	143
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>147</b>
<b>7. Abkürzungen .....</b>	<b>150</b>
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>153</b>
<b>9. Anhang .....</b>	<b>164</b>
9.1. Lebenslauf.....	164
9.2. Danksagung .....	166

## 1. Einleitung

Biologische Systeme zeichnen sich einerseits durch eine bemerkenswerte Robustheit und andererseits hohe Anpassungsfähigkeit gegenüber Einflüssen der Umwelt aus. Auf zellulärer Ebene manifestiert sich die Anpassungsfähigkeit unter anderem in der Plastizität genregulatorischer Netzwerke, die signalabhängig von Transkriptionsfaktoren gesteuert werden. Die Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B/Rel-Familie sind pleiotrope Genregulatoren eines evolutionär konservierten Signalmoduls, die in vielfältiger Weise zelluläre Reaktionen auf sich verändernde Umweltbedingungen vermitteln. Neben der Regulation angeborener und erworbener Immunantworten beeinflusst NF- $\kappa$ B fundamentale zelluläre Vorgänge wie Zellwachstum, Proliferation und Apoptose. Da diese Transkriptionsfaktorfamilie multiple Aspekte der Physiologie und Pathophysiologie eines Organismus steuert, steht sie im Mittelpunkt grundlagenwissenschaftlicher und klinisch relevanter Forschung.

Neben der Rezeptor-vermittelten Aktivierung durch humorale Faktoren, kann NF- $\kappa$ B durch physiologische und pathologische Stressfaktoren, wie z.B. oxidativen oder genotoxischen Stress, induziert werden. Zelluläre Reaktionen, hervorgerufen durch DNA-Schäden, sind komplex und beruhen auf zeitgleicher Aktivierung verschiedener Signalnetzwerke. Diese Reaktionen umfassen DNA-Schadenserkennung und DNA-Reparaturvorgänge, aber auch die Induktion von Signalkaskaden, die zur Aktivierung von Zellzyklus-Kontrollpunkten und Apoptose führen können. Die finale Entscheidung über das Schicksal der geschädigten Zelle wird durch die Balance zwischen pro- und anti-apoptotischen Stimuli determiniert. In diesem Szenario nimmt die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch die Induktion anti-apoptotischer Gene eine überlebensfördernde Funktion ein. Durch eine Verzögerung des apoptotischen Programms könnte NF- $\kappa$ B der Zelle ein Zeitfenster für die Möglichkeit der Schadensreparatur gewähren und auf diese Weise zum Erhalt der zellulären Integrität beitragen.

In der Tumorthherapie kommen Zytostatika und ionisierende Strahlung zum Einsatz, die ihre toxische Wirkung durch eine Schädigung der DNA entfalten. Folglich verursachen beide Therapieformen genotoxischen Stress und ziehen eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B nach sich, das wiederum der Apoptose, dem eigentlichen Therapieziel, entgegenwirkt. Dieser Sachverhalt ist insofern von klinischer Relevanz, als dass die NF- $\kappa$ B-Aktivierung Strahlen- bzw. Chemoresistenz von Tumoren vermitteln könnte und daher einen potentiellen therapeutischen Angriffspunkt darstellt. Demzufolge ist eine detaillierte Erforschung molekularer

Mechanismen, die der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch DNA-Schäden zugrunde liegen, nicht nur von grundlagenwissenschaftlicher sondern auch von medizinischer Relevanz.

## 1.1. Grundlegende Charakteristika des NF- $\kappa$ B-Signalnetzwerks

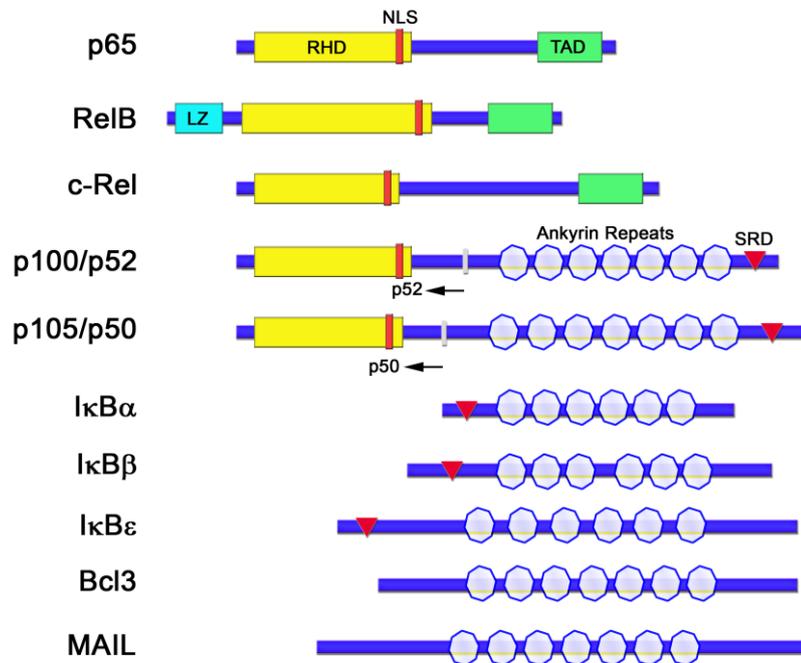
### 1.1.1. Vertreter der NF- $\kappa$ B/Rel Transkriptionsfaktor- und der I $\kappa$ B-Proteinfamilie

NF- $\kappa$ B (*nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B cells*) wurde erstmals 1986 als eine aus reifen B-Zellen gewonnene biochemische Aktivität beschrieben, die in der Lage ist, an den sog.  $\kappa$ B-Enhancer des Immunglobulin- $\kappa$ -Leichtkettenpromotors zu binden [1]. 1988 wurde NF- $\kappa$ B aus B-Zellen gereinigt und durch *in-vitro*-Transkriptionsassays analysiert [2]. Anknüpfende Studien enthüllten ein komplexes Bild der funktionalen Bedeutung dieses Faktors, das weit über die Regulation der Transkription in B-Zellen hinausreicht. Stimulierbar durch eine Vielzahl von Induktoren reguliert NF- $\kappa$ B, als ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsfaktor, ein komplexes Repertoire an Zielgenen und nimmt dadurch Einfluss auf multiple Aspekte der zellulären Physiologie.

NF- $\kappa$ B ist ein Oberbegriff für eine Transkriptionsfaktorfamilie, die in Mammalia fünf strukturell verwandte Proteine umfasst: RelA (p65), p50, p52, RelB und c-Rel [3, 4]. Die Einteilung in eine Familie erfolgte anhand eines gemeinsamen ca. 300 Aminosäuren umfassenden Strukturmotivs, das als Rel-Homologie-Domäne (RHD) bezeichnet wird (Abbildung 1.1). Die Bezeichnung Rel geht auf v-Rel, ein Oncogen des Retikuloendotheliose Virus, zurück, das in verschiedenen Vogelarten Leukämien induziert [5]. c-Rel ist das zelluläre Homolog des viralen Proteins [6]. Die Rel-Homologie-Domäne ist für die Ausbildung verschiedener Homo- bzw. Heterodimere aus einzelnen NF- $\kappa$ B-Proteinen und für die Bindung an spezifische DNA-Response-Elemente verantwortlich. Darüberhinaus wird die Interaktion mit inhibitorischen Proteinen (I $\kappa$ Bs) durch dieses Strukturmodul vermittelt.

Die NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren binden spezifisch an DNA-Elemente mit der Konsensussequenz 5' GGGRNWYYCC-3' (R, Purin; N, beliebige Base; W, A oder T; Y, Pyrimidin) [7]. Die Aufklärung der Kristallstruktur verschiedener NF- $\kappa$ B-DNA-Komplexe offenbarte ein einzigartiges Prinzip der spezifischen DNA-Bindung [8-10]. Der N-terminale Teil der Rel-Homologie-Domäne faltet sich zu zwei Immunglobulin-ähnlichen  $\beta$ -Fass-Subdomänen, wobei die Schleifen der gestapelten  $\beta$ -Faltblätter spezifische Kontakte zu den Basen des DNA-Elements eingehen. Der C-terminale Teil der Rel-Homologie-Domäne ist für

die Dimerisierung und die Ausbildung unspezifischer DNA-Kontakte verantwortlich. Abgesehen von RelB sind alle NF- $\kappa$ B-Faktoren in der Lage Homo- bzw. Heterodimere untereinander auszubilden, wobei der prototypische p50-p50-Komplex in den meisten Zelltypen vorkommt. RelB kann lediglich mit p50 oder p52 dimerisieren.



**Abbildung 1.1. Domänenstruktur von Vertretern der NF- $\kappa$ B- und der I $\kappa$ B-Proteinfamilie.**

Die Rel-Homologie-Domäne (RHD) ist das gemeinsame strukturelle Merkmal der NF- $\kappa$ B-Proteine. Dieses Modul ist für DNA-Bindung und Dimerisierung der Transkriptionsfaktoren verantwortlich. Das Kernlokalisierungssignal (NLS) befindet sich am C-terminalen Ende der RHD. p65, RelB und c-Rel besitzen eine Transaktivierungsdomäne (TAD) am C-Terminus, die für transkriptionelle Aktivierung erforderlich ist. p105 und p100 sind Vorläuferproteine, die an markierten Stellen zu p50 bzw. p52 proteolytisch prozessiert werden. Die „*ankyrin repeat*“-Motive, die auch in den Vorläufermolekülen vorkommen, sind für NF- $\kappa$ B-Inhibitoren (I $\kappa$ Bs) kennzeichnend und verhindern durch die Interaktion mit RHD die DNA-Bindung und den Kernimport von NF- $\kappa$ B-Vertretern. Die „*signal response*“-Domäne (SRD) beherbergt Phosphorylierungsstellen, die von Kinasen des IKK-Komplexes phosphoryliert werden. Dadurch werden die Inhibitorproteine für den Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System markiert.

Die Fähigkeit spezifischer Transkriptionsfaktoren entsprechende DNA-Elemente in Zielgenpromotoren zu erkennen, reicht für eine Initiation der Transkription nicht aus. Die Transkriptionsfaktoren müssen dafür zusätzlich über eine Transaktivierungsdomäne verfügen. Aus der NF- $\kappa$ B/Rel-Proteinfamilie besitzen nur p65, RelB und c-Rel eine solche Domäne im C-terminalen Bereich des Proteins [11-13]. Daher können ausschließlich die NF- $\kappa$ B-Dimere als transkriptionelle Aktivoren wirken, die diese Untereinheiten enthalten. Die NF- $\kappa$ B-Vertreter p50 und p52 werden durch limitierte Proteolyse aus Vorläufermolekülen p105 bzw. p100 generiert und enthalten keine Transaktivierungsdomäne [14-16]. Daher können Homodimere von p50 bzw. p52 als transkriptionelle Repressoren von NF- $\kappa$ B-Zielgenen agieren [17]. Die Zielgenspezifität einzelner Transkriptionsfaktoren der NF- $\kappa$ B/Rel-Familie

wird durch die kombinatorische Vielfalt der möglichen NF- $\kappa$ B-Homo- und Heterodimere, die zelltypabhängig exprimiert werden und leicht unterschiedliche Zielsequenzaffinitäten aufweisen, erreicht. Darüberhinaus spielen dabei Protein-Protein-Interaktionen mit verschiedenen Koaktivatoren und posttranslationale Modifikationen im Chromatinkontext eine entscheidende Rolle.

Die Aktivität von NF- $\kappa$ B-Dimeren wird durch die Interaktion mit Proteinen der I $\kappa$ B-Familie (Inhibitoren von NF- $\kappa$ B) reguliert, die als gemeinsames strukturelles Merkmal das „*ankyrin repeat*“-Motiv (AR) aufweisen (Abb. 1.1). In unstimulierten Zellen liegen NF- $\kappa$ B-Vertreter in einem Komplex mit I $\kappa$ B-Molekülen vor und werden dadurch in einem inaktiven Zustand gehalten. Die Assemblierung der Komplexe erfolgt durch die Interaktion der „*ankyrin repeat*“-Domäne der I $\kappa$ Bs mit der RHD der NF- $\kappa$ B-Proteine, wodurch die NF- $\kappa$ B-Kernlokalisierungs- sowie die DNA-Bindedomäne maskiert und die nukleäre Anreicherung der Komplexe verhindert wird [18]. Die I $\kappa$ B-Familie umfasst die zytosolischen Vertreter I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , und I $\kappa$ B $\epsilon$  sowie die nukleären I $\kappa$ Bs Bcl-3 und Mail [19-23] (Abb. 1.1). Die NF- $\kappa$ B-Vorläuferproteine p100 sowie p105 weisen ebenfalls I $\kappa$ B-Merkmale auf, da sie die RHD und das AR-Motiv in einem Molekül vereinen. Somit bleiben die Komplexe p65-p105 und RelB-p100 durch die AR-Motive der Vorläufer inaktiviert und werden erst nach der Prozessierung zu p65-p50 bzw. RelB-p52 zu potenten Transkriptionsfaktoren umgewandelt [14-16, 24, 25].

Röntgenstrukturanalysen von I $\kappa$ B $\alpha$  gebunden an das p65-p50 Heterodimer zeigten, dass nur die Kernlokalisierungssequenz von p65 maskiert wird, während die von p50 exponiert bleibt [26-28]. Dies und das Vorhandensein von Kernexportsequenzen in I $\kappa$ B-Proteinen hat zur Folge, dass NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B-Komplexe in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen dem Zytoplasma und dem Kern pendeln, wobei das Gleichgewicht zum Kernexport hin verschoben ist. Alle bekannten NF- $\kappa$ B-aktivierenden Signalkaskaden kulminieren im induzierten Abbau der I $\kappa$ Bs und führen zur Freisetzung von NF- $\kappa$ B. Dadurch verschiebt sich die Balance zum Kernimport, NF- $\kappa$ B reichert sich im Zellkern an und aktiviert die entsprechenden Zielgene.

### **1.1.2. Grundlegende Mechanismen der NF- $\kappa$ B-Aktivierung**

NF- $\kappa$ B kann durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli, wie z.B. Zytokine, Mitogene, Besetzung von T- oder B-Zell-Rezeptoren, bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), UV- und ionisierende Strahlung, oxidativen Stress und doppelsträngige RNA, aktiviert werden [29]

(Tabelle 1). Das Prinzip der NF- $\kappa$ B-Aktivierung beruht stets auf der induzierten proteolytischen Degradation der entsprechenden I $\kappa$ B-Proteine [4]. Dieses strikt kontrollierte Ereignis wird von einem Schlüsselenzymkomplex, dem I $\kappa$ B-Kinasekomplex (IKK-Komplex) reguliert. Der IKK-Komplex besteht aus den katalytischen Kinaseuntereinheiten IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  sowie der regulatorisch wirkenden Untereinheit NEMO (*NF- $\kappa$ B essential modulator*) alias IKK $\gamma$  [30].

Der überwiegende Teil der NF- $\kappa$ B-Signalkaskaden kann unter dem Aspekt des Modus der NF- $\kappa$ B-Aktivierung und der selektiven Erforderung der IKK-Kinasen in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die meisten physiologischen Stimuli aktivieren NF- $\kappa$ B über den so genannten kanonischen Signalweg (Abschnitt 1.2, Tabelle 1). Dieser Modus der NF- $\kappa$ B-Induktion ist strikt von IKK $\beta$  und IKK $\gamma$  abhängig und zeichnet sich durch schnelle Kinetiken und die Unabhängigkeit von „*de novo*“-Proteinsynthese aus [30]. IKK $\beta$  ist für die Stimulus-induzierte Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  an den Serinen 32 und 36 (I $\kappa$ B $\beta$  an Serinen 19 und 23) verantwortlich [31, 32]. Dies resultiert in der Rekrutierung der E3-Ubiquitin-Ligase SCF $^{\beta\text{-TRCP}}$  (*Skp1/Cull1/F-Box-protein,  $\beta$ -transducin repeat containing protein*), die über eine WD40-Domäne das Strukturmotiv DS<sup>P</sup>G $\Psi$ XS<sup>P</sup> ( $\Psi$  hydrophobe AS, X beliebige AS) der phosphorylierten I $\kappa$ Bs erkennt [33, 34]. Anschließend katalysiert SCF $^{\beta\text{-TRCP}}$  eine Lys48-verknüpfte Polyubiquitinierung von I $\kappa$ Bs an konservierten Lysin-Resten und markiert sie somit für proteasomalen Abbau. Die Induktion der kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalkaskade resultiert in der nukleären Translokation von überwiegend p65 enthaltenden NF- $\kappa$ B-Heterodimeren. Die Bedeutung von IKK $\alpha$  für diesen Modus der NF- $\kappa$ B-Aktivierung ist nicht hinreichend geklärt. Neuere Studien weisen auf eine mögliche nukleäre Rolle dieser Kinase bei der Steuerung der zytokininduzierten Genexpression durch Phosphorylierung von Histonen und transkriptionellen Regulatoren hin [35-37].

Der nicht-kanonische Signalweg wird durch die Aktivierung einer limitierten Anzahl von Rezeptoren wie dem Lymphotoxin- $\beta$ -, dem BAFF- oder dem CD40-Rezeptor initiiert [30]. Dieser Modus der NF- $\kappa$ B-Aktivierung ist unabhängig von IKK $\beta$  und IKK $\gamma$ . Nach gegenwärtigem Kenntnisstand spielt hier IKK $\alpha$  die entscheidende Rolle bei der Phosphorylierung und der dadurch vermittelten limitierten Proteolyse von p100 zu p52 [30]. Kennzeichnend für diesen Prozess sind deutlich langsamere Kinetiken und die Abhängigkeit von „*de novo*“-Proteinsynthese.

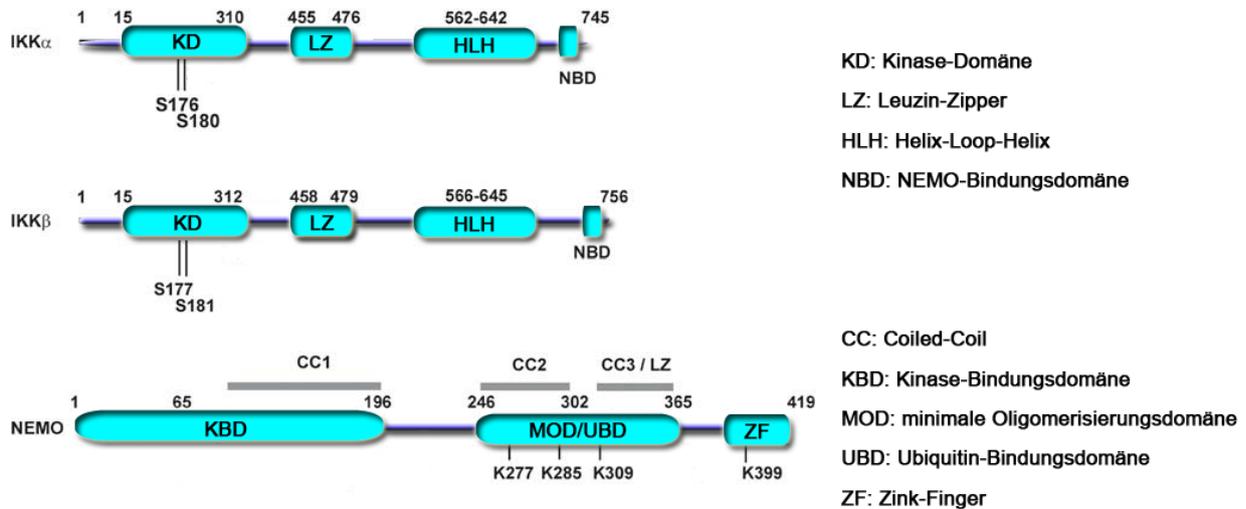
---

### 1.1.3. Der IKK-Komplex – Konvergenzpunkt des NF- $\kappa$ B Signalnetzwerks

Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch alle bisher bekannten physiologischen Stimuli erfordert die Phosphorylierung von I $\kappa$ B-Proteinen. Diese Reaktion wird von einem 700-900 kDa großen I $\kappa$ B-Kinasekomplex (IKK-Komplex) katalysiert [38]. IKK $\alpha$  (IKK1) und IKK $\beta$  (IKK2) sind die beiden katalytischen Untereinheiten des IKK-Komplexes [39-42]. Die dritte Komplexkomponente, IKK $\gamma$ /NEMO, erfüllt strukturgebende und regulatorische Funktionen [43, 44]. Da die meisten NF- $\kappa$ B-Signalkaskaden in der Induktion des IKK-Komplexes kulminieren, stellt er eine wichtige Schaltstelle der NF- $\kappa$ B-Aktivierung dar.

Die katalytischen Kinaseuntereinheiten IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  weisen eine hohe Sequenzhomologie auf und ihre Kinasedomänen sind zu 65 % identisch [30]. Bei beiden Kinasen handelt es sich um Serin/Threonin-Kinasen, die aus einer N-terminalen Kinasedomäne, einem im mittleren Molekülteil liegenden Leucin-Zipper, einer Helix-Loop-Helix-Domäne und einer C-terminalen IKK $\gamma$ -Interaktionsregion zusammengesetzt sind (Abb. 1.2). Eine Phosphorylierung der Serin-Reste im Aminosäuremotiv SLCTS, der so genannten Aktivierungsschleife der Kinasedomäne, führt zu einer Aktivierung der Kinasen. Die Leucin-Zipper-Domäne dient der Homo- und Heterodimerisierung der beiden Moleküle und ist essentiell für ihre Aktivität. Die Helix-Loop-Helix-Domäne ist ihrerseits für eine volle und transiente Kinase-Aktivität erforderlich.

Die dritte IKK-Untereinheit, IKK $\gamma$ , besitzt keine enzymatische Aktivität, ist jedoch als strukturgebende Komponente für die Induktion der Kinaseaktivität im kanonischen Signalweg unerlässlich [30]. IKK $\gamma$  setzt sich aus drei Coiled-Coil-Domänen zusammen, gefolgt von einem Leucin-Zipper-Motiv und einer C-terminalen Zinkfinger-Domäne (Abb. 1.2). Die Bindung von IKK $\gamma$  an Kinasen erfordert eine Region in der ersten Coiled-Coil-Domäne. Die zweite Coiled-Coil-Domäne und der Leucin-Zipper sind verantwortlich für die Oligomerisierung von IKK $\gamma$  sowie seine Bindung an Lys63-verknüpfte Polyubiquitin-Ketten [45, 46]. Die Funktion der C-terminalen Zinkfinger-Domäne ist weniger gut verstanden. Anfängliche Untersuchungen ergaben, dass diese Domäne ausschließlich für IKK-Aktivierung durch genotoxischen Stress erforderlich ist [47]. Spätere Studien belegten jedoch die Notwendigkeit eines intakten Zinkfingers für eine potente IKK-Aktivierung durch proinflammatorische Stimuli [48].



**Abbildung 1.2. Domänenstruktur von IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  und IKK $\gamma$ /NEMO.**

Die Nummern geben die Aminosäuren an den jeweiligen Positionen der humanen Proteine wieder. Die angegebenen Serin-Reste von IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  gehören zur Aktivierungsschleife der Kinasemoleküle und werden während der Aktivierung der Kinasen phosphoryliert. Die gekennzeichneten Lysin-Reste der strukturegebenden Untereinheit IKK $\gamma$  werden durch Konjugation von Ubiquitin oder SUMO1 modifiziert: K399 durch MALT1 [49], Lys285 durch NOD2/RIP2[50], SUMO1 und Ubiquitin an K277 und K309 durch genotoxischen Stress [51]

Ein IKK-Komplex, der aus rekombinanten IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  und IKK $\gamma$  *in vitro* aufgebaut oder durch Expression in Hefe rekonstituiert wurde, besitzt ein apparentes Molekulargewicht von 700-900 kDa, das dem des zellulären Komplexes nahe kommt [52, 53]. Der rekombinante IKK-Komplex enthält äquimolare Mengen an IKK $\gamma$  und den Kinasemolekülen. Basierend auf hydrodynamischen Untersuchungen und chemischen Cross-Linking-Experimenten mit zellulärem und rekombinantem IKK $\gamma$  wurde eine tetramere Stöchiometrie für den IKK-Komplex vorgeschlagen [54]. Das Modell betrachtet IKK $\gamma$  als einen Dimer von Dimeren, dessen Assemblierung durch die Dimerisierung der minimalen Oligomerisierungsdomäne (MOD) und einer weiteren N-terminalen Region in einem Tetramer resultiert. Das tetramere IKK $\gamma$  kann jeweils zwei Moleküle IKK $\alpha$  und zwei Moleküle IKK $\beta$  binden.

## 1.2. Der kanonische Modus der NF- $\kappa$ B-Aktivierung

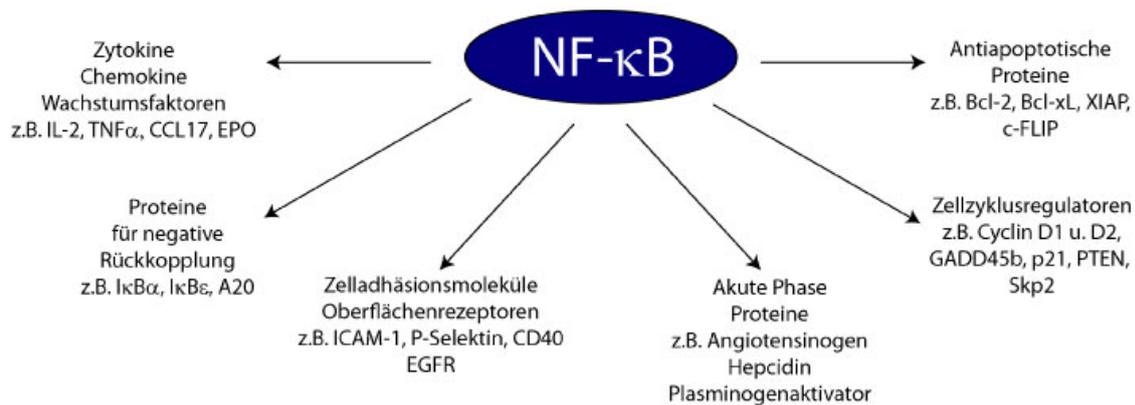
Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B kann durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli aktiviert werden (Tabelle 1). Diese Induktoren setzen spezifische Signaltransduktionskaskaden in Gang, die in der Aktivierung des IKK-Komplexes, dem I $\kappa$ B-Abbau und der transkriptionellen Aktivierung von NF- $\kappa$ B-Vertretern kulminieren.

Stimulus	Kanonischer Modus	Nicht-kanonischer Modus	Atypischer Modus
<b>Bakterielle Produkte</b>			
LPS	+	+	
CpG	+		
Flagellin	+		
<b>Virale Produkte</b>			
EBV: LMP1	+	+	
HTLV-I: Tax	+	+	
<b>Zytokine/Wachstumsfaktoren</b>			
TNF $\alpha$	+		
IL-1	+		
Lymphotoxin- $\alpha/\beta$	+	+	
CD30	+	+	
CD40	+	+	
BAFF	+	+	
RANKL	+	+	
<b>Antigene</b>			
TCR-Aktivierung	+		
BCR-Aktivierung	+		
<b>Chemische Induktoren</b>			
Phorbolster	+		
Etoposid	+		
Camptothecin	+		
ROS			+
<b>Physikalische Noxen</b>			
UV-Strahlung			+
Ionisierende Strahlung	+		

**Tabelle 1. Übersicht ausgewählter NF- $\kappa$ B-aktivierender Stimuli.**

Über 200 verschiedene NF- $\kappa$ B-induzierende Faktoren wurden bisher beschrieben [29]. Diese können anhand ihrer Eigenschaften in verschiedene Kategorien eingeteilt werden. So ist die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch bakterielle oder virale Produkte unabdingbar für eine effektive Immunantwort. Viele Zytokine steuern über NF- $\kappa$ B wichtige physiologische Prozesse, die im Zusammenhang mit Immunregulation, Entzündungsreaktionen, Differenzierungs- und Wachstumsvorgängen stehen. Im Verlauf der erworbenen Immunantwort wird NF- $\kappa$ B in B- und T-Zellen durch Antigene aktiviert. Die Induktion von NF- $\kappa$ B durch chemische oder physikalische Noxen, die genotoxische oder oxidative Schäden verursachen, ist wichtiger Bestandteil zellulärer Stressantwort. Hinsichtlich des Modus der NF- $\kappa$ B-Aktivierung können die in der Tabelle aufgeführten Stimuli in drei Gruppen eingeteilt werden. Die Induktoren, die abhängig von IKK $\beta$ -IKK $\gamma$  zum Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  führen, werden in die Gruppe der kanonischen Stimuli eingeteilt. Die Zytokine, die eine Prozessierung von p100 zu p52 induzieren, stimulieren NF- $\kappa$ B über den nicht-kanonischen Weg. Einige wenige Faktoren, die NF- $\kappa$ B unabhängig von IKK-Komponenten induzieren zählen zur atypischen Gruppe

Zwar erfolgt der intrazelluläre Signalfluss dieser verschiedenen Kaskaden oberhalb des IKK-Komplexes zum Teil über unterschiedliche Signalproteine, in ihrem Grundschema stimmen jedoch die NF- $\kappa$ B-aktivierenden Signalwege überein. Charakteristisch sind Prozessschritte wie sensorische Signalaufnahme (Ligand-Rezeptor-Interaktionen, Detektion von intrazellulären Stressreizen), Rekrutierung von speziellen Adapterproteinen, Ubiquitin-Ligasen und Proteinen mit Kinaseaktivität.



**Abbildung 1.3. NF-κB-Zielgene.**

Bisher wurden über 200 Gene beschrieben, die von Transkriptionsfaktoren der NF-κB-Familie reguliert werden (siehe <http://people.bu.edu/gilmore/nf-kb/target/index.html>). Die Zielgene lassen sich nach ihrer Funktion in verschiedenen Kategorien einteilen. Für jede Kategorie sind in der Abbildung Beispiele angegeben. Interessanterweise aktiviert NF-κB auch Gene, die für seine Inhibitoren kodieren (z.B. IκBα). Auf diese Weise entsteht eine negative Rückkopplungsschleife, die für die Terminierung der NF-κB-Antwort verantwortlich ist.

Abhängig vom Stimulus und dem jeweiligen Zelltyp löst NF-κB eine distinkte zelluläre Reaktion aus, die sich aus dem spezifischen Repertoire von induzierten Zielgenen ergibt. Bisher wurden über 200 NF-κB-Zielgene identifiziert, die multiple Aspekte der zellulären Physiologie beeinflussen können (Abb. 1.3). Wie sind aber verschiedene Stimuli in der Lage, durch die Aktivierung derselben Transkriptionsfaktorfamilie verschiedene biologische Reaktionen auszulösen? Einerseits ist eine NF-κB-Signalkaskade, die durch einen ganz bestimmten Stimulus induziert wird, durch differenzielle Expression IKK-vorgesalteter Signalproteine zelltypspezifisch. Demzufolge kann nicht jede Zelle auf denselben Stimulus mit einer NF-κB-Aktivierung reagieren. Andererseits exprimieren verschiedene Zelltypen unterschiedliche Vertreter der NF-κB-Transkriptionsfaktorfamilie, die wiederum distinkte Homo- und Heterodimere mit einer Selektivität gegenüber speziellen Zielgenen ausbilden. Diese kombinatorische Regulationsebene wird durch andere Möglichkeiten zur Feinregulation erweitert. So kann die transkriptionelle Aktivität der NF-κB-Vertreter durch posttranslationale Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierung und Acetylierung, oder durch Interaktion mit verschiedenen Koaktivatoren in Zelltyp- und Promotor-spezifischer Weise moduliert werden [55]. Folgerichtig könnte ein und der gleiche Stimulus in unterschiedlichen Zelltypen abweichende Genexpressionsprofile und damit zelluläre Reaktionen hervorrufen.

Wie aus der Tabelle 1 ersichtlich ist, aktivieren die meisten Stimuli NF-κB über das kanonische Signalmodul. Die grundlegenden Charakteristika dieses Modus der NF-κB-Aktivierung sind bereits im Abschnitt 1.1.2 angeschnitten worden. Da bestimmte Aspekte der

kanonischen NF- $\kappa$ B-Signaltransduktion relevant für das Verständnis der bearbeiteten Fragestellung sind, wird im Folgenden der TNF $\alpha$ -induzierte Signalweg, stellvertretend für die TNF-Rezeptorfamilie, und der IL1-induzierte Signalweg für die IL-1/Toll-like-Rezeptor-Signaltransduktion, besprochen.

### **1.2.1. TNF $\alpha$ /TNFRI-Signaltransduktion**

TNF $\alpha$  ist der am besten charakterisierte Ligand der TNF-Rezeptorsuperfamilie. Dieses Liganden-Rezeptor-System umfasst im menschlichen Organismus mindestens 19 Liganden und 29 Rezeptoren, die in gewebe- und zelltypspezifischer Weise exprimiert werden und eine Vielfalt an biologischen Prozessen steuern [56]. Der überwiegende Teil der von diesem System induzierten Prozesse wird auf zellulärer Ebene über die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 vermittelt.

TNF $\alpha$  wird vorrangig von Zellen des Immunsystems nach Stimulation durch andere Zytokine oder aber bakterielle Lipopolysaccharide sekretiert und fungiert als multifunktionales Signalmolekül des Immunsystems [56]. Es ist entscheidend an der Regulation des Entzündungsgeschehens und der angeborenen Immunabwehr beteiligt. Abhängig vom physiologischen Kontext kann TNF $\alpha$  apoptotisch oder proliferationsfördernd wirken. Darüberhinaus kann es in bestimmten Geweben eine Zelldifferenzierung und Ausschüttung anderer Zytokine auslösen. Durch Aktivierung von NF- $\kappa$ B, führt der TNF $\alpha$ -Signalweg unter anderem zur Expression von anti-apoptotischen Genen und hemmt dadurch den programmierten Zelltod [57]. Die physiologische Bedeutung der NF- $\kappa$ B-vermittelten Überlebensantwort wird besonders dadurch verdeutlicht, dass TNF $\alpha$ , bei einer Inhibition von NF- $\kappa$ B, ausgeprägte Kaspase-vermittelte apoptotische Reaktion auslöst.

Das lösliche TNF $\alpha$  ist ein trimeres Protein, das an die Rezeptoren TNFRI sowie TNFRII bindet und deren Trimerisierung hervorruft. Zellbiologischen Studien zufolge wird der überwiegende Teil der TNF $\alpha$ -Aktivität über TNFRI vermittelt [58]. Nach TNFRI-Trimerisierung wird TRADD (*TNFR associated death domain protein*) an seine zytoplasmatische Todesdomäne-Domäne (*death domain, DD*) rekrutiert [59] und schafft eine Andockungsplattform für weitere Adaptermoleküle wie z.B. TRAF2/TRAF5 (*TNFR associated factors*) und RIP1 (*receptor interacting protein 1*) [60] (Abb. 1.4). Verschiedene Studien weisen auf redundante Funktionen von TRAF2 und TRAF5 im TNF $\alpha$ -Signalweg hin [61-63].

Als Vertreter der TRAF-Familie besitzen TRAF2 und TRAF5 eine N-terminale RING-Domäne auf, die für die E3-Ubiquitin-Ligaseaktivität dieser Signalmoleküle unerlässlich ist [64]. Diese Ubiquitin-Ligasen kooperieren mit dem Ubc13-Uev1A Ubiquitin-konjugierenden E2-Enzymkomplex bei der Synthese einer spezifischen Lysin63-verknüpften Polyubiquitin-Kette (Lys63-Polyubiquitin). Lys63-Ubiquitin-Polymere werden in Form einer Autoubiquitinierung an TRAFs selbst, aber auch an solche Schlüsselproteine des NF- $\kappa$ B-Signalwegs wie RIP1 und IKK $\gamma$ , konjugiert [65]. Im Gegensatz zu Lys48-verknüpften Polyubiquitin-Ketten, die in der Regel als Markierung für proteasomalen Abbau des Zielproteins fungieren, stellt die Lys63-Polyubiquitinierung eine Modifikation dar, die zelluläre Signale unabhängig vom Proteasomsystem überträgt. Es wird angenommen, dass die E3-Aktivität der TRAFs durch deren Oligomerisierung nach Liganden-induzierter Rekrutierung an Rezeptoren induziert wird (Abb. 1.4). Die daraus resultierende Autoubiquitinierung von TRAF2/TRAF5 und die Modifikation von RIP1 schaffen eine Rezeptor-proximale Interaktionsplattform für das Andocken von Signalmolekülen, die über Ubiquitin-Bindedomänen (UBD) verfügen. Dazu zählen die Untereinheiten des TAK1-Kinasekomplexes, TAB2 und TAB3, sowie die IKK-Untereinheit IKK $\gamma$  [45, 46, 66, 67]. IKK $\gamma$  nimmt nicht nur die Funktion eines Polyubiquitin-erkennenden Adaptermoleküls wahr, sondern wird selbst im Prozess der TNF-Signaltransduktion durch Lys63-Polyubiquitin-Ketten modifiziert [48]. Verschiedene Studien weisen auf die Existenz eines rezeptorproximalen Signalosoms hin, das RIP1, TRAF2/5, TAK1-Kinasekomplex und den IKK-Komplex enthält und dessen Assemblierung von Lys63-Polyubiquitinierung abhängig ist [45, 66] (Abb. 1.4). In einer kürzlich erschienenen Arbeit wurde demonstriert, dass die TRAF2-Interaktionspartner cIAP1 und cIAP2, für die K63-Polyubiquitinierung von RIP1 nach TNF $\alpha$ -Stimulation erforderlich sind und damit eine wichtige Rolle für die Assemblierung des Signalosoms spielen könnten [68].

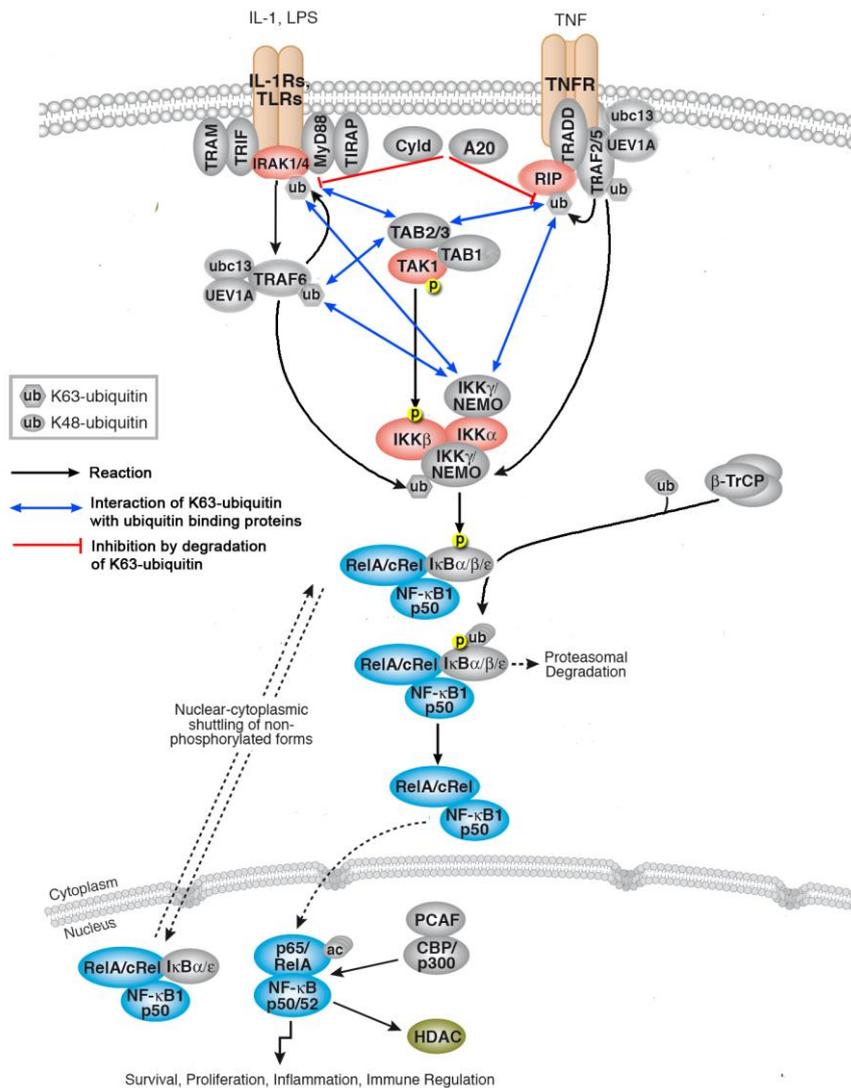
Der Mechanismus der IKK-Aktivierung innerhalb des Signalosoms ist bisher nicht hinreichend verstanden. Ein in der Literatur diskutiertes Konzept beruht auf der Möglichkeit der IKK-Aktivierung durch eine von vorgeschalteten IKK-Kinasen katalysierte Phosphorylierung der kritischen Serin-Reste in den Aktivierungsschleifen der I $\kappa$ B-Kinasen [30]. Paradoxerweise ist die Kinaseaktivität von RIP1 für die TNF $\alpha$  induzierte IKK-Aktivierung entbehrlich, nicht jedoch dessen Ubiquitinierung, womit das Protein eher strukturgebende Adapterfunktion erfüllt [69]. Hingegen ist die Bedeutung der Kinaseaktivität von TAK1 (*transforming growth factor- $\beta$  activated kinase 1*) für die Induktion der IKK-

Aktivität durch *in vitro*- und *in vivo*-Experimente mehrfach demonstriert worden [70, 71]. So ist zum Beispiel TAK1 in der Lage die kritischen Serin-Reste der Aktivierungsschleife von IKK $\beta$  *in vitro* zu phosphorylieren und die Kinase zu aktivieren (Abb. 1.4). In Zellen bildet TAK1 einen Komplex mit TAK1-Bindeproteinen TAB1, TAB2 und TAB3. TAB1 ist ein Regulator der TAK1-Kinaseaktivität und kann TAK1 *in vitro* aktivieren. *In vivo* hingegen ist der TAK1-TAB1-Komplex inaktiv. Zur TAK1-Aktivierung in Zellen bedarf es zusätzlich der Anwesenheit von TAB2 und TAB3, zwei strukturell homologer und funktional redundanter Proteine. Wie eingangs erwähnt, verfügen TAB2 und TAB3 über Ubiquitin-Bindedomänen und bewirken die TAK1-Aktivierung nur in Gegenwart von Lys63-Polyubiquitin-Ketten [72]. Der gegenwärtigen Vorstellung zufolge wird der TAK1-Kinasekomplex über TAB2/TAB3 an Lys63-polyubiquitinierte Strukturen innerhalb des Rezeptor-proximalen Signalosoms rekrutiert. Daraufhin kommt es zu einer Aktivierung der TAK1-Kinase (vermutlich durch trans-Autophosphorylierung). Die katalytischen IKKs werden durch die UBD von IKK $\gamma$  an das Signalosom rekrutiert, woraufhin TAK1 das in räumlicher Nähe befindliche IKK $\beta$  phosphorylieren und aktivieren kann.

### **1.2.2. Interleukin-1-Rezeptor/Toll-like Rezeptor Signaltransduktion**

Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch Stimulation von Rezeptoren der Interleukin-1/Toll-Superfamilie ist maßgeblich an der Regulation der angeborenen und erworbenen Immunantworten beteiligt [73-75].

IL-1 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das seine Wirkung durch Stimulation von T- und B-Lymphozyten entfaltet [73]. Die Vertreter der Toll-Superfamilie (TLR) stellen eine evolutionär konservierte und mit dem IL-1-Rezeptor verwandte Rezeptorsuperfamilie dar. Durch die Erkennung von Oberflächenmustern mikrobieller Pathogene (PAMPs, *pathogen associated microbial patterns*) und die Induktion einer NF- $\kappa$ B-Antwort in Immunzellen spielen diese Rezeptoren ebenfalls eine zentrale Rolle bei der Erkennung und Abwehr von Infektionen. Zu den am besten charakterisierten PAMPs gehören LPS, dsRNA, nicht-methylierte CpG DNA und Flagellin [74, 75]. Die zytoplasmatische Domäne der TLRs weist eine hohe Homologie zu der des IL-1-Rezeptors auf. Dieses gemeinsame Strukturmotiv wird als TIR (Toll-IL1R Domäne) bezeichnet. Die Bindung eines Liganden an einen TLR führt zur Rekrutierung von Adaptermolekülen, wie z.B. MyD88, an die zytoplasmatische TIR-Domäne. Diese Signalkoppler verfügen ebenfalls über eine TIR-Domäne (Abb 1.4) [76].



**Abbildung 1.4. Schematische Darstellung der klassischen NF-κB-Signalwege.**

Die Stimulation von IL-1/Toll-like- bzw. TNF-Rezeptoren aktiviert das kanonische NF-κB-Signalmodul. Die Besetzung der Rezeptoren durch entsprechende Liganden führt zur Rekrutierung von Adapterproteinen wie TRIF, MyD88 und IRAK1/4 (IL1/Toll-like-R) bzw. TRADD und RIP (TNFR). Daraufhin kommt es zu einer Oligomerisierung und Aktivierung von E3-Ubiquitin-Ligasen der TRAF-Familie (TRAF6 im IL-1/Toll-like-Signalweg bzw. TRAF2/5 im TNFR-Signalweg). TRAFs katalysieren in Kooperation mit dem E2-Enzymkomplex UEV1A/Ubc13 die Synthese von Lys63-verknüpften Polyubiquitin-Ketten, die an TRAFs selbst oder aber an Adapterproteine wie IRAK1 oder RIP1 konjugiert werden. Durch die Interaktion der Ubiquitinbindenden Proteine TAB2/3 bzw. IKKγ mit den Lys63-polyubiquitinierten Regulatoren werden sowohl der TAK1-Kinasekomplex als auch der IKK-Komplex an das Rezeptor-proximale Signalosom rekrutiert. Aktivierte TAK1 phosphoryliert und aktiviert das sich in räumlicher Nähe befindende IKKβ, welches für die Phosphorylierung der IκB-Proteine verantwortlich ist. Phosphorylierte IκB-Proteine werden durch SCF<sup>βTRCP</sup> mit degradativen Lys48-Polyubiquitin-Ketten modifiziert und durch das Proteasom abgebaut. Daraufhin kann NF-κB in den Zellkern translozieren und im Zusammenspiel mit Koaktivatoren Zielgene aktivieren.

Die N-terminale Todesdomäne von MyD88 rekrutiert nachgeschaltete Faktoren wie die DD-haltigen Serin/Threonin-Kinasen der IRAK-Familie [77]. Diesbezüglich erinnern diese DD-vermittelten Interaktionen im IL-1/TLR-Signalweg an die der TNFα-Signaltransduktion (Interaktion der DDs von TNFR, TRADD und RIP1). Die Kinase IRAK4 wirkt vermutlich oberhalb von IRAK1, wobei die Kinaseaktivität von IRAK1, wie die von RIP1, für die NF-

$\kappa$ B-Aktivierung entbehrlich ist [78, 79]. Die Stimulus-induzierte Einbeziehung von IRAK-1 in den Rezeptorproximalen Komplex ist für die Rekrutierung und Aktivierung von TRAF6 notwendig. So wie im TNF $\alpha$ -Signalweg TRAF2/TRAF5-Aktivierung in der Lys63-Polyubiquitinierung der E3-Ligasen selbst sowie von RIP1 resultiert, führt TRAF6-Aktivierung zu einer Autoubiquitinierung und der Modifikation von IRAK1 [72]. Die Aktivierung von I $\kappa$ B-Kinasen läuft daraufhin analog zu den im vorangegangenen Abschnitt erläuterten mechanistischen Prinzipien. Demnach würden die Lys63-Polyubiquitin-Ketten an TRAF6 bzw. IRAK1 sowohl den TAK1- als auch den IKK-Kinasekomplex rekrutieren und die Aktivierung der I $\kappa$ B-Kinasen durch TAK1 einleiten.

### **1.3. NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch genotoxische Einwirkungen**

#### **1.3.1. Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen**

Das Genom eines Organismus ist permanent genotoxischer Wirkung chemischer und physikalischer Noxen ausgesetzt. Die Liste DNA-schädigender Einflüsse umfasst sowohl natürlich in der Umwelt vorkommende bzw. in der Zelle selbst entstehende Noxen (UV- und ionisierende Strahlung (IR), reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Replikationsfehler) als auch die durch individuelle Lebensbedingungen künstlich zugeführte Noxen (aromatisierte Amine, N-Nitrosoverbindungen, polyzyklische aromatisierte Kohlenwasserstoffe). Um der Beeinträchtigung der genomischen Integrität, die von diesen Agenzien ausgeht, zu begegnen, haben biologische Systeme im Verlauf der Evolution Schutzmechanismen entwickelt, die solche Prozesse wie z.B. DNA-Reparatur, Zellzyklusarrest, Apoptose und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren umfassen.

Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch genotoxische Einwirkungen, wie z.B. UV, ROS, Topoisomerase-Inhibitoren und IR, ist in der Literatur mehrfach dokumentiert [80, 81]. Weniger Konsens herrscht über die Wirkungsweise der einzelnen Signalkaskaden, die durch diese Agenzien induziert werden, sowie über die physiologische Rolle der NF- $\kappa$ B-Aktivierung [82]. Da die Erforschung von Mechanismen der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bildet, wird im Folgenden ausschließlich diese Art von DNA-Läsionen besprochen.

Obwohl DSB unter normalen Bedingungen relativ selten vorkommen, sind sie äußerst zytotoxisch und verursachen chromosomale Aberrationen, genetische Instabilität und führen schließlich zu Apoptose oder aber zu transformierenden genetischen Veränderungen, die zur

Krebsentstehung beitragen können. Trotz ihrer kanzerogenen Eigenschaften werden DSB-induzierende Agenzien (IR und Topoisomerase-Inhibitoren) wegen ihrer zytotoxischen Wirkung im Rahmen von Tumortherapien angewandt. Das Ziel besteht dabei in der Auslösung von Apoptose in schnell proliferierenden Tumorzellen.

Die zellulären Reaktionen auf DSB, ausgelöst durch IR oder Topoisomerase-Inhibitoren, gleichen sich auf physiologischer Ebene. Die Mechanismen der DSB-Entstehung sind hingegen unterschiedlich. Topoisomerase-I-Inhibitoren wie Camptothecin (CPT) und seine Derivate stabilisieren den kovalenten Topo-I-DNA-Komplex, bei dem das 3'-Ende der DNA mit dem reaktiven Tyrosin-Rest des Enzyms eine Phosphoesterbindung eingeht und die 5'-OH-Gruppe frei ist. Dieser Komplex entsteht im Verlauf des enzymatischen Zyklus der Topo-I, um die Torsionsspannung in der DNA zu lösen, die sich während der DNA-Replikation oder Transkription aufbaut. Durch die Stabilisierung des Topo-I-DNA-Konjugats entsteht zunächst ein DNA-Einzelstrangbruch. Zur Bildung eines Doppelstrangbruchs kommt es erst während der S-Phase des Zellzyklus, wenn eine Replikationsgabel an dem Konjugat kollabiert [83]. Topoisomerase-II-Inhibitoren wie z.B. Etoposid (VP16) stabilisieren das Topo-II-DNA-Konjugat während der S-, G2- und M-Phase, wenn das Enzym hochreguliert wird und für das Auflösen der Torsionsspannung während der Replikation, Rekombination, chromosomalen Kondensation und Segregation sorgt [84]. Im Gegensatz zu Topo-I geht Topo-II eine kovalente Phosphotyrosin-Bindung mit dem 5'-Ende der DNA ein, während die 3'-OH-Gruppe frei bleibt. Ionisierende Strahlung führt zu einer massiven DNA-Schädigung, unter anderem zu Einzelstrangbrüchen, durch Desintegration von Desoxyribose-Phosphat-Einheiten. DSB entstehen dabei vermutlich aus Clustern von benachbarten Einzelstrangbrüchen [85].

### **1.3.2. ATM als zentraler Mediator zellulärer Reaktionen auf DSB**

Das ATM-Gen (*ataxia telangiectasia mutated*) wurde ursprünglich als ein mutiertes Allel in Patienten, die unter dem Ataxie-Telangiectasie-Syndrom leiden, identifiziert [86]. Die beschriebenen Mutationen führen entweder zum Verlust der Kinase-Aktivität oder der Proteinexpression und verursachen ein komplexes klinisches Bild, das durch zerebelläre Ataxie, Telangiectasie, Entwicklungsdefekte, progressive Neurodegeneration, Immundefizienz, chromosomale Instabilität, vorzeitiges Altern und Prädisposition gegenüber bestimmten Tumorarten, charakterisiert ist [87].

Die ATM-Kinase ist eine nukleäre Ser/Thr-Kinase, die in die Phosphoinositol-3-Kinasefamilie einzuordnen ist. Unter basalen Bedingungen liegt ATM inaktiv, vermutlich in Form von Homodimeren, im Zellkern vor. Eines der frühesten Ereignisse bei der Induktion zellulärer Signalkaskaden durch DSB ist die Rekrutierung sensorischer Faktoren an DNA-Läsionen. Die Bindung des trimeren DNA-Schadensensors Mre11-Rad50-NBS (MRN-Komplex) an einen DSB ist eine Voraussetzung für ATM-Aktivierung [88]. Der gegenwärtigen Vorstellung zufolge wird das inaktive ATM-Dimer an die NBS-Untereinheit des aktivierten MRN-Komplexes rekrutiert, was zu einer intermolekularen ATM-Autophosphorylierung an Ser1981 führt (p-ATM). Diese Modifikation wird mit der Dissoziation des ATM-Dimers und der Induktion der Kinase-Aktivität in Verbindung gebracht. Aktives ATM wurde mittels Immunfluoreszenzanalysen an zwei unterschiedlichen subnukleären Orten lokalisiert. Während ein Teil der Moleküle in IR-induzierte DNA-Schadensfoci integriert ist, diffundiert der Großteil des p-ATM frei im Nukleoplasma. In Abhängigkeit von seiner Lokalisation phosphoryliert ATM unterschiedliche Substratproteine, von denen die meisten an der Zellzyklus-Kontrollpunkt-Regulation und DNA-Reparatur beteiligt sind. Zu ATM-Substraten, die sich in Foci nachweisen lassen gehören Histon H2AX, NBS, 53BP1, MDC1, BRCA1 sowie Chk2, wohingegen p53 und CREB im Nukleoplasma phosphoryliert werden [89].

### **1.3.3. NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch DSB-Induktoren erfolgt über eine ATM-IKK-Signalachse**

Zahlreiche experimentelle Evidenzen belegen, dass die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch DSB in Abhängigkeit vom IKK-Komplex erfolgt. So führt  $\gamma$ -Bestrahlung von HeLa Zellen zur Aktivierung von IKK $\beta$  und I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau, wobei die S32/36A-Mutante sich als degradationsresistent erweist [90]. Darüberhinaus hemmt eine dominant-negative IKK $\beta$ -Mutante bestrahlungsinduzierte I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradation und NF- $\kappa$ B-Aktivierung nach transienter Transfektion in HeLa Zellen. IKK-Aktivierung konnte ebenfalls in Geweben  $\gamma$ -bestrahlter Wildtyp- nicht jedoch ATM<sup>-/-</sup>-Mäuse nachgewiesen werden [91]. Mittlerweile belegt eine ganze Reihe von Befunden die Notwendigkeit der ATM-Aktivierung für die Induktion der IKK-NF- $\kappa$ B-Kaskade durch verschiedene DSB-Induktoren wie IR, CPT und VP16 [51, 91, 92].

---

### 1.3.4. Sumoylierung von IKK $\gamma$ als ein intermediärer Schritt auf dem Weg zur IKK-Aktivierung durch DSB

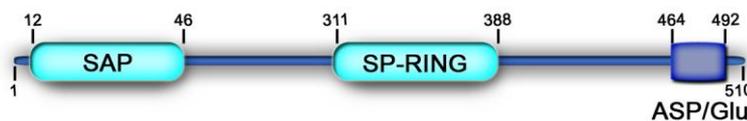
Die mammalischen SUMO-Proteine (*small ubiquitin like modifier*) SUMO-1 und SUMO-2/3 sind etwa 100 AS lange Proteine. SUMO-2 und SUMO-3 sind zu 95 % homolog, wohingegen SUMO-1 zu den erstgenannten nur 50 % Sequenzidentität aufweist. Obwohl SUMO-Proteine nur eine begrenzte Sequenzähnlichkeit zu Ubiquitin aufweisen, zeichnen sie sich durch eine für Ubiquitin charakteristische  $\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha$ -Faltung aus [93]. Darüberhinaus ähnelt der Prozess der SUMO-Konjugation an Substratproteine in seinem Ablauf dem des Ubiquitin-Systems. Zunächst wird SUMO durch ein E1-Enzym (Heterodimer aus SAE1 und SAE2) aktiviert und auf das E2-Enzym Ubc9 (SUMO-konjugierendes Enzym) transferiert. Die Substratspezifität der Sumoylierungsreaktion wird durch E3-SUMO-Ligasen der PIAS-Familie sichergestellt, die analog zu E3-Ubiquitin-Ligasen vom RING-Typ als Adapterproteine zwischen dem Ubc9-SUMO-Intermediat und dem Substratprotein fungieren.

Huang *et al.* demonstrierten, dass DSB-Induktoren CPT und VP16 zu einer selektiven Modifikation von IKK $\gamma$  mit SUMO-1 an K277 und K309 führen [51]. Die Lys $\rightarrow$ Ala Mutationen dieser kritischen Stellen verhindern die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch genotoxischen Stress. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Sumoylierung von IKK $\gamma$  eine regulatorische Funktion für die IKK und NF- $\kappa$ B-Aktivierung im Verlauf der zellulären DNA-Schadensreaktion erfüllt. Viele in der Literatur beschriebene sumoylierte Proteine akkumulieren im Zellkern [94]. Huang *et al.* postulierten, dass die Sumoylierung die nukleäre Akkumulation von singulärem IKK $\gamma$  reguliert [51] (Abb. 1.6).

In einer RNAi-Studie wurde PIASy als das E3-Enzym für IKK $\gamma$ -Sumoylierung identifiziert (Abb. 1.6) [95]. PIASy (PIAS4) gehört einer konservierten Familie von SUMO-E3-Ligasen an, der in Mammalia ebenfalls PIAS1, PIASx (PIAS2) und PIAS3 zugeordnet werden. Benannt wurden diese Faktoren nach ihrer Fähigkeit, mit STAT-Transkriptionsfaktoren zu interagieren und diese zu inhibieren (*protein inhibitor of activated STAT*). Studien der letzten Jahre offenbarten eine Vielfalt an Interaktionen und Funktionen der PIAS-Proteine sowohl im Zusammenhang mit Transkriptionsregulation als auch mit anderen zellulären Vorgängen, die weit über die Regulation der STAT-Aktivität hinausgehen [96]. Das humane PIASy-Protein ist ein 510 Aminosäuren langes Polypeptid, das aus drei konservierten Domänen besteht (Abb. 1.5). Die N-terminale SAP-Domäne kommt in vielen Chromatin-assoziierten Proteinen vor und ist vermutlich für sequenz- und strukturspezifische DNA-Bindung verantwortlich [97]. Für PIASy wurde gezeigt, dass es abhängig von seiner SAP-Domäne an DNA-

Sequenzen binden kann, die in Matrix-assoziierten Regionen vorkommen [98]. Dies deutet auf einen Zusammenhang zwischen PIASy und der Modulation der Chromatinstruktur und –dynamik hin.

Ein weiteres wichtiges strukturelles Modul stellt die RING-Finger-Domäne vom SP-Typ (*Siz/PIAS*) dar (Abb. 1.5). Diese Domäne ähnelt den Zn-kordinierenden RING-Fingern, die in E3-Ubiquitin-Ligasen vorkommen und ist für die Interaktion der E3-Ligase mit SUMO-Substratproteinen verantwortlich [96]. Somit stellt das SP-RING-Modul die Substratselektivität sicher. C-terminal vom RING-Finger liegt ein Serin/Threonin- und Glutamat/Aspartat-reicher Bereich (ASP/Glu), der für die Interaktion mit Ubc9, dem E2-Enzym des SUMO-Systems, wichtig ist [99].



**Abbildung 1.5. Schematische Darstellung der Domänenstruktur von PIASy.**

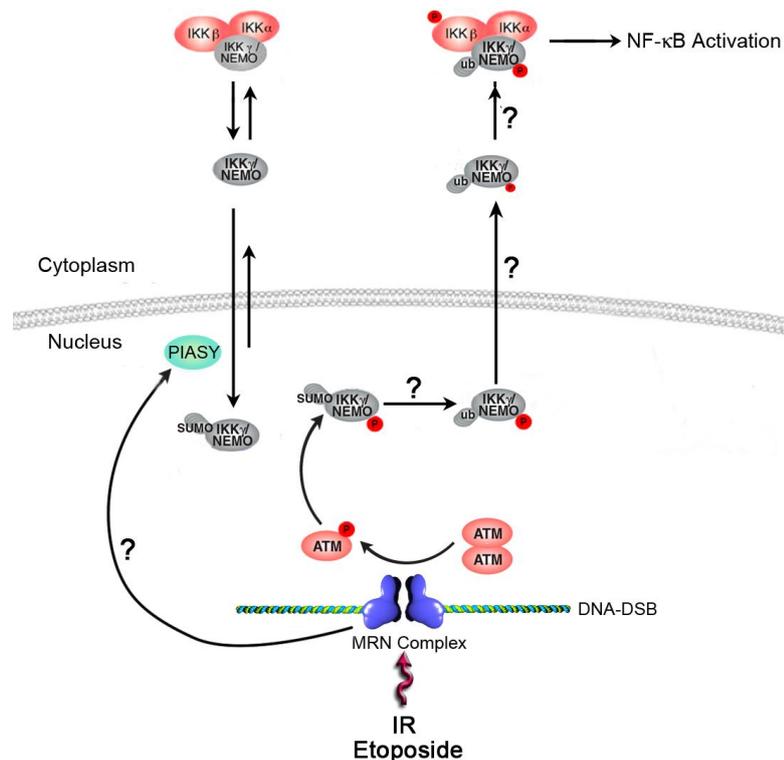
PIASy ist verantwortlich für die Modifikation von IKK $\gamma$  mit SUMO1. Die N-terminale SAP-Domäne (*scaffold attachment factor-A/B/acinus/PIAS*) ist verantwortlich für die Interaktion des Proteins mit DNA aber auch mit Substratproteinen wie Lef-1 [98]. Die SP-RING-Finger-Domäne (*Siz/PIAS*) ist für die Funktion von PIASy als E3-SUMO-Ligase erforderlich. Das Aspartat/Glutamat-reiche Motiv (Asp/Glu) am C-Terminus ist für die Interaktion von PIASy mit dem E2-Enzym Ubc9 verantwortlich [99].

Interessanterweise scheint die ATM-Aktivierung, obwohl notwendig für DSB-ausgelöste NF- $\kappa$ B-Induktion, für IKK $\gamma$ -Sumoylierung nicht erforderlich zu sein. Dies deutet auf ein komplexes molekulares Szenario mit zwei parallelen Signalwegen hin (Abb. 1.6) [51]. Die Frage nach dem Mechanismus der Signalweiterleitung vom DSB zu PIASy und damit zu IKK $\gamma$ -Sumoylierung bleibt dabei weiterhin unbeantwortet. Zwar sind die Proteine RIP1 und PIDD als positive Regulatoren der IKK $\gamma$ -Sumoylierung vorgeschlagen worden, ihre funktionale Stellung in der Signalkaskade bezüglich PIASy muss jedoch durch künftige Studien genauer geklärt werden [100].

### 1.3.5. Konvergenzpunkt der IKK $\gamma$ -Sumoylierung und ATM-abhängiger Prozesse

Die Tatsache, dass sowohl IKK $\gamma$ -Sumoylierung durch PIASy als auch ATM-Aktivierung, die von einander unabhängig ablaufen, für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch genotoxischen Stress notwendig sind, legt die Existenz eines molekularen Konvergenzpunktes für beide Prozesse nahe. Wu *et al.* schlugen ein Model vor, das einen Zusammenhang zwischen SUMO-IKK $\gamma$  und ATM herstellt [101]. Diesem Konzept zufolge bildet SUMO-IKK $\gamma$  einen induzierbaren

Komplex mit aktiviertem ATM und wird von dieser Kinase am Ser85 phosphoryliert (Abb. 1.6). Ein experimenteller Nachweis dieses Komplexes wurde allerdings bisher nicht erbracht. Die Notwendigkeit dieser Ser85-Phosphorylierung für NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch VP16 wurde dadurch untermauert, dass dieser Signalweg durch die Mutation Ser85Ala in IKK $\gamma$  blockiert wird.



**Abbildung 1.6. Hypothetisches Modell der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch DNA-Doppelstrangbrüche.**

Das oben dargestellte Modell wurde anhand von Literaturdaten zusammengestellt und repräsentiert keinesfalls ein allgemein akzeptiertes Konzept. IKK $\gamma$  gebunden an die Kinasen IKK $\alpha$ /IKK $\beta$  liegt in einem Gleichgewicht mit freien IKK $\gamma$ -Molekülen im Zytoplasma vor. Freies IKK $\gamma$  ist in der Lage zwischen dem zytoplasmatischen und nukleären Kompartiment zu pendeln. Nach Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch  $\gamma$ -Bestrahlung oder Etoposid katalysiert die E3-Ligase PIASy die Konjugation von SUMO1 an IKK $\gamma$ , welches daraufhin im Zellkern akkumuliert [95]. Der Mechanismus der Signalübertragung vom DNA-Schaden zu PIASy ist unbekannt. In einem parallelen Signalweg wird der DNA-Schaden von einem Komplex aus Mre11, Rad50 und NBS (MRN) erkannt. MRN aktiviert ATM durch die Induktion der ATM-Autophosphorylierung. Es wird vermutet, dass ATM sumoyliertes IKK $\gamma$  erkennt und es am Ser85 phosphoryliert [101]. Daraufhin soll es zu einem Austausch der SUMO1-Modifikation gegen Ubiquitin an gleichen Lysin-Resten kommen. Ubiquitiniertes und phosphoryliertes IKK $\gamma$  wird vermutlich zusammen mit ATM aus dem Zellkern exportiert, was auf ungeklärte Weise zu einer Aktivierung des IKK-Holoenzymes führt.

Den Ergebnissen von Huang *et al.* zufolge wird die IKK $\gamma$ -Sumoylierung von einer Mono-Ubiquitinierung an gleichen Lysin-Resten abgelöst [51]. Dieser SUMO-Ubiquitin-Austausch scheint abhängig von der Ser85-Phosphorylierung zu sein, da sowohl eine Hemmung der ATM-Expression als auch die Ser85Ala-Mutation den Ubiquitinierungsschritt verhindern [101].

Bisher ist in der Literatur keine überzeugende Erklärung auf die Frage geliefert worden, wie monoubiquitiniertes NEMO zu einer Aktivierung des IKK-Komplexes führt. Wu *et al.* schlugen vor [101], dass ATM im Komplex mit ubiquitiniertem NEMO ins Zytoplasma translozieren und mit dem IKK-Komplex assoziieren kann. Nach diesem Modell soll ATM durch Phosphorylierung von IKK $\beta$  den IKK-Komplex direkt aktivieren. Die von Wu *et al.* präsentierten Evidenzen für diese Hypothese sind jedoch nicht ausreichend, um andere molekulare Szenarien auszuschließen.

### **1.3.6. Biologische Konsequenzen der DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Antwort**

Die Aufklärung der physiologischen Bedeutung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung im Verlauf zellulärer DNA-Schadensantwort ist sowohl von grundlagenwissenschaftlicher als auch von klinischer Bedeutung. Die Letztere ergibt sich aus dem Bestreben, die Ursachen der oft auftretenden Resistenz von Tumoren bei Strahlen- oder Chemotherapie zu verstehen. Ionisierende Strahlung und Chemotherapeutika, die routinemäßig bei Krebstherapien eingesetzt werden, verursachen eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B, die ihrerseits durch die Induktion eines ganzen Repertoires anti-apoptotischer Gene (Bcl-xL, c-FLIP, cIAPs, XIAP, Gadd45 $\beta$ , und Mn-SOD ) dem eigentlichen Ziel, der Beseitigung von Tumorzellen, entgegenwirkt [102]. Eine kürzlich publizierte Genexpressionsstudie, die an Lymphknoten  $\gamma$ -bestrahlter Mäuse durchgeführt wurde, bestätigte, dass NF- $\kappa$ B einer der wichtigsten anti-apoptotischen Überlebensfaktoren ist [103]. Einige Tumorarten, wie z.B. das Hodgkin-Lymphom oder das diffus großzellige B-Zell-Lymphom, weisen eine konstitutive nukleäre NF- $\kappa$ B-Aktivität auf und nutzen die überlebensfördernde Wirkung dieses Transkriptionsfaktors, um der Apoptose zu entgehen [104-107]. Somit könnten Prozesse, die in Tumorzellen zu einer NF- $\kappa$ B-Aktivierung beitragen, einen pharmakologischen Angriffspunkt im Rahmen einer künftigen Tumorbegleittherapie bilden [108, 109].

## **1.4. Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1 – ein multifunktionales Enzym**

Die mammalischen Poly-(ADP-Ribose)-Polymerasen (PARPs) bilden eine Proteinfamilie, deren Kategorisierung anhand der Homologie ihrer katalytischen Domänen erfolgt ist und die funktional durchaus differieren können. Namensgebend für diese Gruppe von Proteinen ist die von ihnen katalysierte Synthese von verzweigten Poly-(ADP-Ribose)-Polymeren (PAR) (Abb. 1.7). Die Entdeckung von PAR-Molekülen als eine „neue Art von Nukleinsäuren“ im Zellkern von Säugetierzellen geht auf die bereits im Jahr 1963 publizierte Arbeit von Chambon *et al.* zurück [110]. Die Aufklärung der zellulären Funktionen dieses Moleküls und

die Charakterisierung der für seine Synthese verantwortlichen Enzyme begann in den 1980ern mit der Klonierung des prototypischen PARP-Enzyms, der PARP-1 [111]. PARP-1 (EC 2.4.2.30) ist der am besten charakterisierte und der abundanteste Vertreter der PARP-Familie (Abb. 1.8), dessen enzymatische Aktivität durch Bindung an DNA-Läsionen erheblich gesteigert wird. Dieses Enzym spielt eine entscheidende Rolle für die Regulation multipler zellulärer Vorgänge wie z.B. der DNA-Schadensantwort und -Reparatur, der Transkriptionsregulation und des Zelltodes (siehe unten).

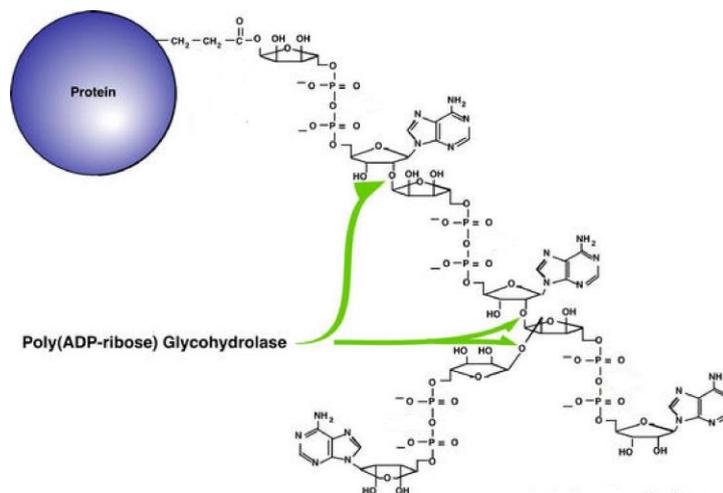
Inzwischen sind anhand von Homologie-Recherchen 17 neue Mitglieder der PARP-Familie vorgeschlagen worden. Für einige wenige PARP-Familienvertreter liegen bereits biochemische und funktionale Erkenntnisse vor [112]. So ist z.B. PARP-2 ein nukleäres Enzym, das PARP-1 funktional am nächsten steht und ebenfalls eine wichtige Rolle für die zelluläre DNA-Schadensantwort spielt (Abb. 1.8). Die katalytische Domäne von PARP-2 weist die höchste Sequenzhomologie zu PARP-1 auf. Dieses Enzym ist neben PARP-1 das einzige bekannte PARP-Familienmitglied das durch DNA-Strangbrüche aktiviert wird [113]. Die DNA-Bindedomäne von PARP-2 differiert hingegen beträchtlich von der der PARP-1, was eventuell auf unterschiedliche Substratspezifität von PARP-2 hindeutet. Es wird vermutet, dass die Rest-PARP-Aktivität, die durch DNA-schädigende Agenzien in PARP-1<sup>-/-</sup>-Zellen induziert wird, auf PARP-2 zurückzuführen ist.

Tankyrase ist ein weiteres Mitglied der PARP-Familie mit nachgewiesener PARP-Aktivität, das als Komponente des humanen Telomerkomplexes identifiziert wurde (Abb. 1.8) [114]. Dieser PARP-Vertreter PARYliert TRF1, den negativen Regulator der Telomerlänge, wodurch dieser von der Telomer-DNA dissoziiert. Dadurch wird vermutlich die Telomerstruktur aufgelockert und der Telomerase ein Zugang zur Telomer-DNA gewährt.

Da die im Rahmen der vorgelegten Dissertation durchgeführten experimentellen Arbeiten sich ausschließlich mit PARP-1 befassen, werden die strukturellen Eigenschaften und zellbiologische Funktionen dieses Enzyms in nachfolgenden Abschnitten eingehend behandelt.

### 1.4.1. Chemie der Poly-ADP-Ribosylierung

Bei Poly-ADP-Ribosylierung handelt es sich um eine posttranslationale Modifikation von Glutamat-, Aspartat- und Lysin-Resten nukleärer Substratproteine, die von Poly-(ADP-Ribose)-Polymerasen katalysiert wird. Bei dieser Reaktion wird das PAR-Polymer sequentiell aus ADP-Ribose-Einheiten von  $\text{NAD}^+$  über eine einzigartige Ribose(1'' $\rightarrow$ 2')Ribose-Phosphat-Phosphat-Bindung unter Abspaltung von Nicotinamid synthetisiert. Dabei entstehen PAR-Moleküle, die bis zu 200 ADP-Ribose-Einheiten lang sein können und alle 20-50 Einheiten Verzweigungsstellen über eine Ribose(1''' $\rightarrow$ 2'')Ribose-Bindung enthalten [115].



#### Abbildung 1.7. Struktur von Poly-(ADP-Ribose)-Polymeren.

DNA-Schaden-abhängige Poly-(ADP-Ribose)-Polymerasen wie PARP-1 und PARP-2 werden durch DNA-Strangbrüche aktiviert. Diese Enzyme hydrolysieren  $\text{NAD}^+$  und katalysieren, unter Freisetzung von Nikotinamid, den sukzessiven Transfer von ADP-Ribose-Einheiten auf sich selbst oder andere nukleäre Proteine. Die Reaktion wird durch die Bildung einer Esterbindung zwischen der Carboxylgruppe von sauren Aminosäuren und dem 1'-OH der Ribose initiiert. Die Elongation der Polymere erfolgt durch Bildung einer (1'' $\rightarrow$ 2') glykosidischen Bindung. Verzweigung der Polymere erfolgt nach durchschnittlich 20 ADP-Ribose-Einheiten durch Bildung von (1''' $\rightarrow$ 2'') glykosidischen Bindungen. Das Enzym Poly-(ADP-Ribose)-Glykohydrolase besitzt endo- und exoglykolytische Aktivität, die für den Abbau von Poly-(ADP-Ribose)-Polymeren durch Spaltung von glykosidischen Bindungen zwischen ADP-Ribose-Einheiten verantwortlich ist.

Die posttranslationale Modifikation von Proteinen mit PAR (PARylierung) führt durch die Einführung einer stark negativen Ladung zu einer drastischen Veränderung ihrer physikochemischen Eigenschaften und moduliert damit ihre biochemische Aktivität [116].

Die PARylierung ist mit einer Halbwertszeit von ungefähr einer Minute eine außerordentlich transiente Modifikation [117]. Für den schnellen Abbau von PAR-Polymeren zu freier ADP-Ribose ist das nukleäre Enzym Poly-(ADP-Ribose)-Glykohydrolase verantwortlich [118]. Da die katalytische Aktivität von PARG etwa 50-70-mal höher ist als die PAR-Syntheserate von PARP-1, ist das Enzym in der Lage, ohne kinetische

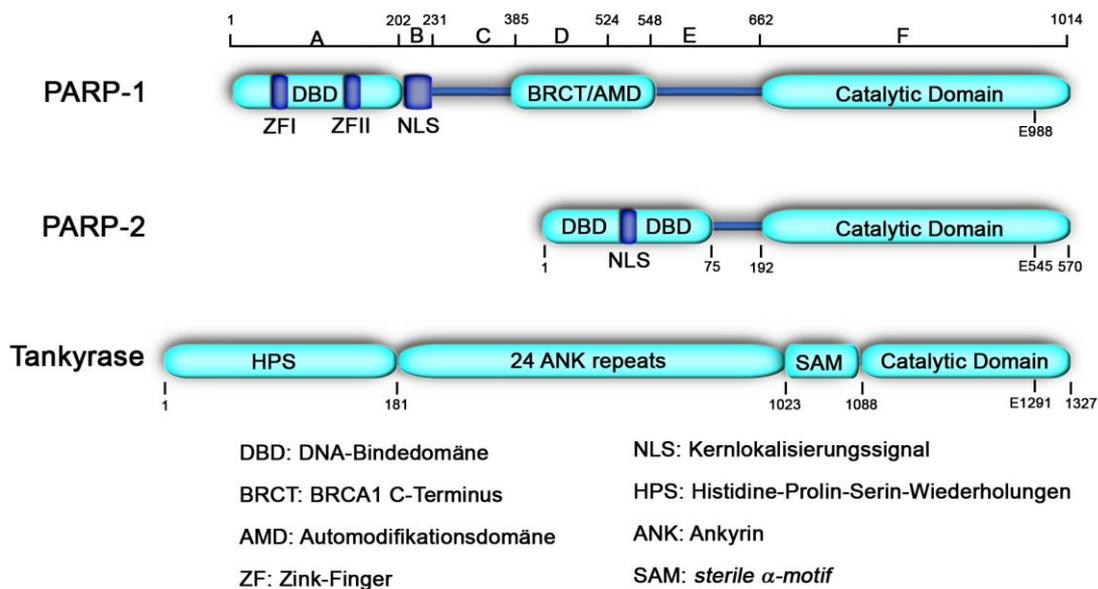
Einschränkungen Poly-(ADP-Ribose) abzubauen [119]. Der transiente Charakter der PARylierung kennzeichnet das regulatorische Potential dieser Proteinmodifikation für zelluläre Signaltransduktion.

#### **1.4.2. Struktur und enzymatische Aktivität von PARP-1**

Das mammalische PARP-1-Protein ist ein abundantes, 113 kDa großes nukleäres Enzym, das bis zu niederen Eukaryonten evolutionär stark konserviert ist und für den überwiegenden Anteil der PARP-Aktivität in Zellen verantwortlich ist. Das Enzym bildet Homodimere und weist eine charakteristische Drei-Domänenstruktur auf (siehe Abb. 1.8), die in strukturelle Module A-F eingeteilt werden kann [120]. Die 42 kDa große N-terminale DNA-Bindedomäne verfügt über zwei Zink-Finger-Motive (FI und FII), die für die Erkennung und Bindung an DNA-Strangbrüche verantwortlich sind. Darüberhinaus enthält sie eine zweiteilige Kernlokalisierungssequenz gefolgt von Helix-Turn-Helix-Motiven (HTH), die vermutlich für eine nieder-affine Interaktion von PARP-1 mit intakter DNA verantwortlich sind. Schätzungen zufolge kommt im Zellkern einer Säugetierzelle je ein PARP-1-Molekül pro 1000 Basenpaare vor, was etwa eine Million Moleküle pro Zelle ergibt [121]. PARP-1 ist ein DNA-Schaden-abhängiges Enzym, dessen Aktivität nach Bindung an DNA-Doppel- und -Einzelstrangbrüche um das 500-fache gesteigert wird [122]. Neueren Berichten zufolge kann PARP-1 auch durch Verzerrungen im DNA-Rückgrat und nicht-B-DNA-Strukturen, wie Haarnadel- und Kreuzstrukturen sowie ungepaarte DNA-Bereiche in Abwesenheit freier DNA-Enden aktiviert werden [123]. Die Aktivierung von PARP-1 durch lokal begrenzte Veränderungen in der DNA-Struktur liefert eine mögliche Erklärung dafür, wie das Enzym unter normalen physiologischen Bedingungen durch Modifikation chromatinassoziierter Proteine regulierend in die Dynamik der Chromatinstruktur eingreifen könnte (Abschnitt 1.4.3.3).

Bemerkenswerterweise ist das Hauptsubstrat der PARP-1 *in vivo* das Enzym selbst, wobei die Automodifikation an einer 16 kDa großen Automodifikationsdomäne erfolgt. Diese Domäne besitzt 15 konservierte Glutamat-Reste als mögliche Akzeptorstellen für PAR [115]. Die Automodifikationsdomäne wird strukturell weiter in einen Leucin-Zipper-Motiv und eine BRCA1-carboxyterminale Domäne (BRCT) unterteilt. Während der Leucin-Zipper vermutlich für Homodimerisierung von PARP-1 verantwortlich ist, bietet die BRCT-Domäne eine Oberfläche für heterotypische Interaktionen.

Die Bindung von PARP-1 an aktivierende DNA-Strukturen führt mittels eines bisher nicht verstandenen allosterischen Mechanismus zur Aktivierung ihrer katalytischen Domäne, die sich im C-terminalen Teil des Enzyms befindet. Diese 55 kDa große Domäne enthält alle für NAD<sup>+</sup>-Bindung, ADP-Ribosyl-Transfer und Verzweigungsreaktionen notwendigen Strukturen. Die Kristallstruktur des C-terminalen katalytischen Fragments von PARP-1 offenbarte eine bemerkenswerte strukturelle Ähnlichkeit zu bakteriellen Toxinen (Cholera- und Pertussistoxin), die als Mono-(ADP-Ribosyl)-Transferasen agieren [124].



**Abbildung 1.8. Domänenstruktur von prototypischen Vertretern der PARP-Familie.**

Von 17 bekannten Mitgliedern der PARP-Familie sind hier die DNA-Schaden-abhängigen Enzyme PARP-1 und PARP-2 sowie die für Telomer-Längenregulation wichtige Tankyrase abgebildet. Das gemeinsame Kennzeichen der PARP-Proteine ist die ca. 50 AS umfassende PARP-Signatur, die vom aktiven Zentrum der PARP-1 abgeleitet wurde. Die Zahlen geben die Positionen der Aminosäuren an den Grenzen der jeweiligen Domänen wieder. Die Glutamat-Reste im aktiven Zentrum der jeweiligen Enzyme sind angegeben. Für PARP-1 sind die strukturellen Module A-F schematisch gekennzeichnet.

### 1.4.3. Molekulare und zelluläre Funktionen von PARP-1 und Poly-ADP-

#### Ribosylierung

Abgesehen von einigen wenigen Ausnahmen [125, 126] übt PARP-1 ihre molekularen Funktionen durch direkte kovalente Modifikation von Substratproteinen (Heteromodifizierung) oder durch die nichtkovalente Bindung von PAR-Polymeren der automodifizierten PARP-1 an Effektorproteine aus. Die Konjugation eines langen anionischen Polymers an ein Protein hat weitreichende Konsequenzen für seine physiko- und biochemischen Eigenschaften. Jede ADP-Ribose-Einheit in PAR enthält zwei negativ geladene Phosphat-Reste und einen Adenin-Rest, der zu „base stacking“ und zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen befähigt ist. Damit ist PAR in der Lage, definierte

dreidimensionale Strukturen auszubilden, die das Potential haben attraktive bzw. repulsive Interaktionen mit anderen Molekülen einzugehen. So wird zum Beispiel die DNA-Bindung von PARP-1 durch Automodifikation inhibiert, was entweder auf sterische Maskierung der DNA-Bindedomäne oder auf elektrostatische Abstoßung zwischen PAR und DNA zurückzuführen sein könnte [115].

#### **1.4.3.1. Bedeutung von PARP-1 für DNA-Schaden-induzierten Zelltod**

Grundsätzlich wird zwischen zwei verschiedenen Modi des zellulären Todes unterschieden. Dem nekrotischen Tod unterliegt die Zelle als Konsequenz auf eine akute und exzessive pathologische Schädigung der zellulären Integrität. Die Nekrose ist durch eine Zersetzung der Zellmembran und Freisetzung des Zellinhalts charakterisiert, wodurch inflammatorische Reaktionen im umliegenden Gewebe verursacht werden. Während der Apoptose, auch als programmierter Zelltod bezeichnet, wird der Zellinhalt in Form von membranumhüllten Vesikeln abgeschnürt und von Makrophagen aufgenommen, ohne nachteilige Effekte auf benachbarte Zellen auszuüben. Apoptose ist ein Energie-abhängiger Vorgang, der über bestimmte Effektorproteine zu einer regulierten Inaktivierung zellulärer Prozesse führt [127, 128].

Wenn die DNA einer Zelle geschädigt ist, kann die Läsion repariert oder ein Todesprogramm eingeleitet werden. Welche der beiden Optionen gewählt wird, hängt vom Ausmaß des DNA-Schadens ab. Exzessive Schäden, die nicht adäquat repariert werden können, haben ein größeres mutagenes Potential und können zu einer malignen Transformation beitragen. Um eine mögliche klonale Expansion transformierter Zellen zu verhindern, wird die geschädigte Zelle durch das apoptotische Programm beseitigt. Bereits vor 20 Jahren ist ein Zusammenhang zwischen PARP-1-Aktivierung und nekrotischem Zelltod durch akute übermäßige DNA-Schädigung beschrieben worden [129]. Massive Aktivierung von PARP-1 kann in wenigen Minuten durch PAR-Synthese zu einer Erschöpfung von 80 % des zellulären NAD<sup>+</sup>-Pools führen und damit zu einer Depletion der NAD<sup>+</sup>-Vorstufe ATP. Dies bewirkt unweigerlich eine mitochondriale Dysfunktion und damit einen Zusammenbruch der zellulären Energieversorgung, wodurch die betroffene Zelle durch Nekrose abstirbt. In den vergangenen Jahren wurden einige Evidenzen dafür erbracht, dass dieser Mechanismus eine wichtige Rolle bei einer ganzen Reihe pathologischer Zustände, wie z.B. Ischämie-Reperfusion- sowie inflammatorischen Schäden, spielt [130].

Im Verlauf der Apoptose wird PARP-1 durch Effektor-kaspasen proteolytisch gespalten. Nach ihrer Aktivierung schneiden die Kaspasen 3 und 7 PARP-1 an dem DEVD-Motiv in der Kernlokalisierungssequenz und produzieren ein 24 kDa und ein 89 kDa Fragment. Durch die Beseitigung von PARP-1 kann eine exzessive PAR-Synthese, die normalerweise durch die während der Apoptose auftretende DNA-Fragmentierung induziert werden würde, verhindert werden. Es wird daher angenommen, dass die PARP-1-Spaltung den Erhalt des zellulären ATP-Niveaus für energiekonsumierende Prozesse sicherstellt, die während des programmierten Zelltods ablaufen [131].

#### **1.4.3.2. PARP-1 agiert als DNA-Schadensensor für DNA-Reparatur und genomische Stabilität**

Die ersten Berichte über eine überlebensfördernde Rolle von PARP-1 bei der zellulären Verarbeitung von genotoxischem und oxidativem Stress, schienen zunächst im Widerspruch zu der vorher beschriebenen Funktion eines metabolischen Tod verursachenden Proteins zu stehen [132]. Mittlerweile gilt es jedoch als gesichert, dass DNA-Schaden-induzierte Poly-ADP-Ribosylierung einen entscheidenden Beitrag zum Überleben proliferierender Zellen leistet, die geringe oder moderate DNA-Schäden durch Alkylantien, Oxidantien oder ionisierende Strahlung erlitten haben [131].

Durch Laser-Mikrobestrahlungsexperimente konnte demonstriert werden, dass PARP-1 als einer der ersten Faktoren in wenigen Sekunden an DNA-Läsionen rekrutiert wird [133]. Dieses molekulare Charakteristikum von PARP-1 bestimmt ihre Funktion als DNA-Strangbruchsensor und legt nahe, dass die unmittelbare PAR-Synthese am DNA-Schadensort ein initiiertes Ereignis der zellulären DNA-Schadensantwort ist und eine Bedeutung für die Orchestrierung nachfolgender Prozesse hat.

Auf Grundlage systematischer *in vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen zur Bedeutung von PARP-1 für verschiedene DNA-Reparaturmechanismen konnte eine eindeutige Beteiligung dieses Schlüsselenzyms bei der Doppel- (DSBR) und Einzelstrangbruchreparatur (SSBR) sowie der Basen-Excisionsreparatur (BER) nachgewiesen werden [134]. DSB und SSB werden direkt durch Desintegration des Ribosephosphat-Rückgrats infolge radioaktiver oder oxidativer Einwirkungen hervorgerufen. Der BER-Weg wird durch moderate Basen-Schäden, wie Oxidationen, Alkylierungen, Deaminierungen und Basenhydrolyse induziert, wobei als Intermediate des Reparaturvorgangs SSB entstehen, die in PARP-1-Aktivierung resultieren.

Zu den ersten identifizierten Substraten von PARP-1 zählen die Histone H1 und H2B [135]. Dem vorherrschenden Modell zufolge reguliert PARP-1 durch PARylierung von Histonen bzw. durch Mitnahme von Histonen bei der Abdiffusion vom DNA-Schaden (Histone gehen nicht-kovalente Interaktionen mit PAR-Ketten des automodifizierten Enzyms ein) zur Relaxation der 30 nm-Chromatinsfaser. Dadurch wird die Zugänglichkeit der DNA-Läsion für DNA-Reparaturenzyme erhöht. Gleichzeitig bilden die PAR-Ketten der an die DNA-Schadenstelle rekrutierten PARP-1 eine Interaktionsplattform für Faktoren der SSB/BER-Reparatursysteme und für Proteine, die an der Regulation der Zellzyklus-Kontrollpunkte beteiligt sind. So interagiert XRCC1, das Adaptermolekül der SSB/BER-Reparaturwege, präferentiell mit automodifizierter PARP-1 [136]. Durch Laser-Mikrobestrahlungsstudien konnte nachgewiesen werden, dass die Rekrutierung von XRCC1 *in vivo* strikt von der PAR-Synthese durch PARP-1 abhängig ist [133]. Neben XRCC1 können auch weitere Komponenten der Reparaturmaschinerie, wie z.B. DNA-Ligase-III und DNA-Polymerase- $\epsilon$ , mit PAR interagieren und somit zusammen mit XRCC1 an DNA-Läsionen rekrutiert werden. Anhand eines Aminosäuresequenzvergleichs ausgewählter DNA-Reparatur-Proteine, die an PAR direkt binden können, und anschließender biochemischer Untersuchungen wurde ein 20 AS-langes PAR-Bindungsmotiv vorgeschlagen [137]. Dieses Motiv zeichnet sich durch einen Cluster an basischen Aminosäuren aus, dem aliphatische und aromatische Aminosäuren folgen, die wiederum von basischen Aminosäuren unterbrochen werden können.

Die zelluläre DNA-Schadensantwort beinhaltet neben der Aktivierung von DNA-Reparaturprozessen auch die Induktion von Signalkaskaden, die an der Steuerung des Zellzyklusarrests, der zellulären Todesprogramme und der Transkription beteiligt sind. In dieser Hinsicht ist besonders der Zusammenhang zwischen PARP-1 und dem wichtigsten DNA-Schaden-Transduktor, der Kinase ATM, von großem Interesse. Die Tatsache, dass ATM- und PARP-1-defiziente Zellen und Mäuse ähnliche Phänotypen in Bezug auf ihre Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien aufweisen und ein ATM<sup>-/-</sup>-PARP-1<sup>-/-</sup>-Doppelknockout im Gegensatz zu ATM<sup>-/-</sup>- und PARP-1<sup>-/-</sup>-Tieren letal ist, suggeriert einen funktionalen Synergismus der beiden Faktoren [138]. In der Tat konnten Haince *et al.* eine physische Interaktion zwischen automodifizierter PARP-1 und ATM nachweisen [139]. Diese Wechselwirkung wird offenbar durch zwei in ATM vorhandene PAR-Bindungsmotive vermittelt. Des Weiteren ist der Phosphorylierungsstatus von ATM-Substratproteinen wie p53, SMC1 und  $\gamma$ H2AX nach Behandlung von PARP-1-defizienten Zellen mit dem Alkylanz

MNNG (N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin) oder  $\gamma$ -Bestrahlung im Vergleich zu Wildtyp-Zellen deutlich reduziert. Obwohl die mechanistischen Aspekte der funktionalen Wechselwirkung von PARP-1 mit ATM weiterhin ungeklärt bleiben, deuten diese Studien darauf hin, dass PARP-1 einen Einfluss auf ATM/p53-abhängige Prozesse, wie Zellzyklusarrest, Apoptose und Transkriptionsregulation nehmen könnte.

### **1.4.3.3. PARP-1 und Transkriptionsregulation**

Die Bedeutung von PARP-1 für die Transkriptionsregulation spezifischer Gene wurde in zahlreichen Studien mit unterschiedlichen experimentellen Ansätzen wie *in vitro*-Transkriptionsassays, zellbasierten Reporter-Gen-Experimenten, „*loss-of-function*“-Ansätzen und genomweiten Genexpressionsanalysen demonstriert [140-146]. Die Transkriptionsregulation durch PARP-1 kann auf zwei Arten erfolgen: 1) Modulation der Chromatinstruktur durch Modifikation von Histonen und 2) Steuerung der Genexpression als Bestandteil von Enhancer/Promotor-bindenden Proteinkomplexen in Verbindung mit Koaktivatoren.

Wie im vorangegangenen Abschnitt dargelegt, erfolgt die Auflösung der Chromatinstruktur höherer Ordnung an DNA-Strangbrüchen durch PARP-1-katalysierte Poly-ADP-Ribosylierung von Histonen [146]. Obwohl die durchschnittliche Länge und Abundanz von PAR-Polymeren in Zellen, die nicht DNA-schädigenden Agenzien ausgesetzt wurden, geringer sind, kann PARP-1-Aktivierung durch bestimmte transkriptionelle Signale an spezifischen Loci Polymere von ausreichender Länge und Abundanz hervorbringen, um lokale Chromatindekondensation zu bewirken [134]. Eine kürzlich veröffentlichte genomweite Untersuchung der promotorspezifischen Assoziationsprofile von Histon H1 und PARP-1 ergab, dass sich die Bindungsmuster der beiden Proteine reziprok verhalten und legte somit nahe, dass PARP-1 mit vielen transkriptionell aktiven RNA-Polymerase-II-Promotoren assoziiert ist [141]. Diese Befunde lassen die Vermutung zu, dass durch die PARP-1 vermittelte H1-Dissoziation der Transkriptionsmaschinerie der Zugang zu regulatorischen DNA-Elementen erleichtert und Transkriptionsinitiation an den jeweiligen Loci ermöglicht wird.

PARP-1 ist allerdings kein essentieller Bestandteil der transkriptionsregulatorischen Maschinerie, da PARP-1-defiziente Mäuse lebensfähig sind und unter nicht pathogenen Bedingungen einen schwachen Phänotyp aufweisen [132]. Somit wird die PARP-1-Defizienz entweder durch redundante Organisation des Transkriptionsgeschehens aufgefangen, oder die Funktion dieses Proteins beschränkt sich auf die Transkriptionsregulation eines ganz

bestimmten Sets von Genen im Kontext eines spezifischen Zelltyps. Für die letztere Möglichkeit sprechen zahlreiche *in-vivo*-Studien, die PARP-1 in Verbindung mit einer charakteristischen, unter spezifischen Bedingungen und in bestimmten Zelltypen ausgelösten, Transkriptionsantwort bringen. So wurde z.B. in Abwesenheit von PARP-1 eine Veränderung von Genexpressionsprofilen inflammatorischer und immunmodulatorischer Gene in Makrophagen, Glia-Zellen, T- und B-Lymphozyten festgestellt [142, 144, 147, 148].

Neben der Modulation der Chromatinstruktur durch die Modifikation von Histonen kann PARP-1 auch durch direkte Interaktion mit speziellen Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren Einfluss auf die Transkription nehmen. Das Protein wurde in zahlreichen Arbeiten als ein die Aktivität vieler Transkriptionsfaktoren (PAX6, AP-2, b-Myb, NF- $\kappa$ B, RAR/RXR, NFAT) positiv stimulierender Koaktivator identifiziert [134]. Interessanterweise ist die enzymatische Aktivität von PARP-1, mit Ausnahme von NFAT, nicht für die Koaktivierung mit den beschriebenen Transkriptionsfaktoren erforderlich. Basierend auf Reporter-gen-Studien beschrieben Hassa *et al.* erstmals die Koaktivatorfunktion von PARP-1 für die NF- $\kappa$ B-abhängige Transkription [140]. Eine DNA-Bindemutante und eine enzymatisch inaktive Mutante von PARP-1 sind hinsichtlich der Rekonstitution der NF- $\kappa$ B-Transkriptionsaktivität in PARP-1<sup>-/-</sup>-Zellen genauso potent wie das Wildtyp-Protein [126]. Diese Tatsache legt den Schluss nahe, dass PARP-1 die NF- $\kappa$ B-abhängige Transkription unabhängig von PAR-Synthese stimuliert. Nach Behandlung mit LPS oder der Induktion von Schlaganfall- bzw. Ischämie-Reperfusion-Zuständen zeigen PARP-1-defiziente Mäuse eine beeinträchtigte Expression bestimmter inflammatorischer NF- $\kappa$ B-Zielgene wie TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , P-Selektin und iNOS [149]. Diese Eigenschaft ruft eine Resistenz von PARP-1-Knockout-Tieren gegenüber LPS-induziertem septischem Schock, Streptozotocin-induzierter Diabetes und Ischämie-Reperfusion-abhängigen Organschäden hervor [147, 150, 151]. Ein umfassendes Bild vom Mechanismus der Koaktivatorfunktion von PARP-1 für die NF- $\kappa$ B-abhängige Transkription kann aus Mangel an systematischen Untersuchungen noch nicht skizziert werden. Es ist lediglich bekannt, dass PARP-1 sowohl mit p65 als auch mit p50 *in vitro* interagiert und in Zelllysaten einen immunpräzipitierbaren Komplex bildet [140]. Des Weiteren demonstrierten Hassa *et al.* anhand von Reporter-gen-Assays, dass p300 nur in Anwesenheit von PARP-1 die NF- $\kappa$ B-getriebene Reporter-genexpression induzieren kann und dass p300/CBP in der Lage ist PARP-1 zu acetylieren. Die PARP-1-Acetylierung begünstigt die Assoziation des Proteins mit NF- $\kappa$ B und die Koaktivierung von NF- $\kappa$ B durch p300/CBP und Mediator-komplex [143, 152]. Da p300/CBP jedoch als ein genereller Koaktivator für NF- $\kappa$ B angesehen wird, können diese

Daten nicht erklären, warum *in vivo* PARP-1 nur für die Expression einer kleinen Untergruppe von NF- $\kappa$ B-Zielgenen benötigt wird.

Die Regulation von Promotoraktivitäten durch PARP-1 ist nicht ausschließlich auf Koaktivierung beschränkt. Es liegen auch Berichte über PARP-1-vermittelte Transkriptionsrepression in bestimmten Zell- und Promotorkontexten vor. So kann das Enzym durch PARylierung von Transkriptionsfaktoren wie PPAR $\gamma$ , p53 und Sry ihre DNA-Bindeaktivität beträchtlich verringern und damit in Bezug auf die Aktivierung der jeweiligen Promotoren als Korepressor fungieren [153-155].

Zusammenfassend lässt sich feststellen dass, PARP-1 auf eine komplexe und mannigfaltige Weise in die Regulation der Genexpression eingreift.

## 2. Zielstellung

DNA-Schäden setzen komplexe zelluläre Reaktionen in Gang. Diese bestimmen, ob die betroffene Zelle durch Apoptose beseitigt wird oder nach erfolgreicher DNA-Reparatur den normalen Lebenszyklus wieder aufnimmt. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B sorgt in diesem Kontext für die Induktion anti-apoptotischer Gene und trägt so zum Schutz vor dem programmierten Zelltod bei. Im Gegensatz zu Rezeptor-vermittelter NF- $\kappa$ B-Aktivierung ist die durch genotoxischen Stress induzierte NF- $\kappa$ B-Signalkaskade nur in Teilaspekten verstanden.

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, die molekularen Mechanismen der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch genotoxischen Stress zu erforschen. Als kritischer Schritt für die Aktivierung des IKK-Komplexes im Zytoplasma wurde die PIASy-vermittelte Sumoylierung von IKK $\gamma$  im Zellkern beschrieben. Allerdings ist der Mechanismus der PIASy-Aktivierung durch DNA-Schäden bisher unbekannt. Ein Schwerpunkt dieser Dissertation wird deshalb auf die Identifizierung des DNA-Schadensensors gelegt, der den Signalweg im Nukleus initiiert und das Signal auf PIASy überträgt.

Ein weiteres Charakteristikum dieses NF- $\kappa$ B-Signalwegs ist die Aktivierung der Kinase ATM. In früheren Studien wurde vorgeschlagen, dass die Translokation von ATM ins Zytoplasma für die Induktion des IKK-NF- $\kappa$ B-Systems nach DNA-Schädigung erforderlich ist. Deshalb sollen auch die bisher unbekannt zyttoplasmatischen Mechanismen und Proteinfaktoren identifiziert werden, die den Signalfluss von ATM zum IKK-Holo-komplex steuern. Dabei stellt sich die Frage, ob Komponenten klassischer NF- $\kappa$ B-Signalwege, wie z.B. Lys63-verknüpftes Polyubiquitin, an der DNA-Schaden-induzierten Kaskade beteiligt sind.

Um die genannten Ziele zu verfolgen, werden zwei unabhängige experimentelle Strategien eingeschlagen. Zum einen sollen neue Interaktionspartner von IKK $\gamma$  identifiziert und ihre Bedeutung für die besagte Signalkaskade beleuchtet werden. Zum anderen werden bereits bekannte NF- $\kappa$ B-Regulatoren in RNAi-basierten „*loss of function*“-Studien hinsichtlich ihrer Beteiligung an der DNA-Schaden-induzierten Kaskade überprüft. Durch funktionale Untersuchungen sollen identifizierte Faktoren in ein Signalflossschema eingeordnet werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Geräte und Zubehör

Agarosegelkammern	BioRad
autoMACS-Separator	Miltenyi Biotec
Brutschränke	Memmert
CO2 Inkubator	Binder
Drehrad	Herolab
Durchflusszytometer	FACScalibur BD Biosciences
Elektroporationsküvetten	Biorad
Elektrotransfer-Apparatur	PHASE
Feinwaagen	Sartorius BP 310S
	Sartorius AC 210P
	Scaltec SP061
Gefriergefäße	Nalgene
Geldokumentation	Herolab
Geltrockner	Hoefer Slab Gel Dryer GD2000
Heizblöcke	Techne DB3
Kühlzentrifugen	Eppendorf 5417R
	Eppendorf 5402
Kunststoffküvetten	Sarstedt
Magnetrührer	Heidolph
Mikroskop Axioplan 2	Zeiss
Mikroskop TCS SP5	Leica
Mikroskop Zellkultur	Zeiss TELAVAL 31
Mikrotiterplatten	TPP
Mikrowelle	Privileg 9029GD
Mithras LB940	Berthold Technologies
N <sub>2</sub> -Behälter	CRONOS
Petrischalen	Peske Medizintechnik
pH-Meter	Knick
Photometer	Pharmacia Biotech GeneQuant II
	Pharmacia Biotech Novaspec II
Poly-Prep-Chromatographie-Säulen	Bio-Rad
Präzisionsküvetten	Hellma
Proteingelkammern	Biorad Mini Protean II Cell
PVDF-Membran	Millipore
Sequenzierautomat	Applied Biosystems 310
Spannungsquellen	Biorad Model 200/2.0 Power Supply
	ST305 Pharmacia Electrophoresis Power Supply
	EPS3500
Sterilbank	BDK
Szintillationszähler	Beckmann LS 6000LL
Thermocycler	Biometra T3
Thermomixer	Eppendorf 5436
Tiefkühlchränke	Forma Scientific
Tischzentrifugen	Eppendorf 5416
	IEC MicroMax

---

Überkopffrotator	Neolab
UV-Tisch	Biometra TI 2
Vortex	Heidolph Reax 2000
Warmluftschüttler	Infors HT
Wasserbäder	Haake F3
	Julabo MP
Zellkulturschalen	TPP
Zentrifugen	Beckmann Avanti J-25
	Beckmann J6-HC
Bestrahlungsgerät	STS OB 29, <sup>137</sup> Cs-Quelle

### 3.2. Chemikalien

[ <sup>32</sup> P]- $\alpha$ -dATP	NEN (Perkin Elmer)
[ <sup>32</sup> P]- $\gamma$ -ATP	NEN (Perkin Elmer)
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth
Agarose	Invitrogen
3-Aminobenzamid	Alexis
Ampicillin	Roche
Anhydrotetrazyklin	IBA BioTAGnology
Anti-Biotin MicroBeads	Miltenyi Biotec
Bacto-Agar	Roth
Bacto-Hefeextrakt	Roth
Bacto-Trypton	Roth
$\beta$ -Glycerophosphat	Sigma
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck
Bradford Reagenz	Biorad
BrdU	Biomol
Bromphenolblau	Biorad
D-Desthiobiotin	IBA BioTAGnology
diverse Chemikalien	Roth, Sigma
DMEM	PAA
DMSO	Sigma
DNA (genomisch, geschert)	Bioline
DNA-Längenstandard	Invitrogen
dNTPs	Amersham Biosciences
DTT	Sigma
EB-47	Alexis
Ethidiumbromid	Roche
Etoposid	Biomol
EX-Cell 420 Isektenzell-Medium	SAFC Biosciences
Fötales Kälberserum (FCS)	GibcoBRL, PAA
IL-1 $\beta$	Alexis
Kanamycin	PAA
KU55933	Calbiochem
L-Glutamin	PAA
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma
diverse Lösungsmittel	Roth
M-CSF	Biomol

---

---

NEM	Roth
Na-Pyruvat	PAA
NAD <sup>+</sup>	Biomol
[ <sup>32</sup> P]-NAD <sup>+</sup>	NEN (Perkin Elmer)
NP-40	Fluka
Pefabloc	Roche
Penicillin/Streptomycin	PAA
Poly-dIdC	Roche
Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche
Proteinmolekulargewichtsmarker	MBI Fermentas
Protein-A-Sepharose CL-4B	Amersham Biosciences
Protein-G-Sepharose	Amersham Biosciences
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth
Röntgenfilmentwickler	Sigma
Röntgenfilmfixierer	Sigma
RPMI 1640	PAA
TEMED	Biorad
TNF $\alpha$	Biomol
Transfectin	Biorad
Trypanblau	Sigma
Trypsin/EDTA	PAA
Tween 20	Sigma

### 3.3. Enzyme und Kits

BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v2.0/ v1.1	Applied Biosystems
BioTAQ	Bioline
Dual Luciferase Reporter Assay System Kit	Promega
Fluo-4 NW Calcium Assay Kit	Invitrogen
Klenow-Polymerase	usb
Pfu-Ultra Polymerase	Stratagene
Restriktionsendonukleasen	Amersham Biosciences
	New England Biolabs
Shrimp Alkaline Phosphatase	usb
T4-DNA Ligase	usb
Immobilon-HRP Western Detection System	Millipore
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Qiaquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen

### 3.4. Bakterien

#### *E.coli* DH5 $\alpha$

Genotyp: *supE44*,  $\Delta$ *lacU169* ( $\pi$ 80 *lacZ*  $\Delta$ M15),

*hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*

Gibco

#### *E.coli* BL21(DE3)pLysS

Genotyp: F<sup>-</sup>, *hsdS*, *gal*, *ompT*, r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>

Novagen

LB-Kulturmedium

10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 5 g/l NaCl

LB/Agar

LB mit 15 g/l Agar

SOB-Kulturmedium

20 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>;  
10 mM MgSO<sub>4</sub>; pH 6,7 – 7

TB-Puffer

10 mM PIPES pH 6,7; 55 mM MnCl<sub>2</sub>; 15 mM CaCl<sub>2</sub>; 250 mM KCl

**3.5. Eukaryontische Zelllinien und Viren**

HEK293	Humane Nierenepithel-Zelllinie
HeLa	Humane Epithelzelllinie aus Zervixkarzinom
WT MEF	embryonale Fibroblasten aus Wildtyp-Mäusen
IKK $\gamma$ <sup>-/-</sup> MEF	embryonale Fibroblasten aus IKK $\gamma$ <sup>-/-</sup> -Mäusen, zur Verfügung gestellt von Dr. Manolis Pasparakis (Institut für Genetik, Universität zu Köln)
PARP-1 <sup>-/-</sup> MEF	embryonale Fibroblasten aus PARP-1 <sup>-/-</sup> -Mäusen, zur Verfügung gestellt von Dr. Valérie Schreiber (Université Strasbourg, Institut Gilbert Laustriat, Frankreich)
PIASy <sup>-/-</sup> MEF	embryonale Fibroblasten aus PIASy <sup>-/-</sup> -Mäusen, zur Verfügung gestellt von Dr. Rudolf Grosschedl (Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg)
1.3E2	IKK $\gamma$ -defizientes Derivat der 70Z3 murinen prä-B-Lymphomzelllinie, zur Verfügung gestellt von Dr. Carol Sibley (University of Washington, Seattle, USA)
stabile Transfektanten von 1.3E2	zur Verfügung gestellt von Seda Coel Arslan
Sf9	Insektenzelllinie, die dem Ovariumgewebe von <i>Spodoptera frugiperda</i> (Nachtfalterart) entstammt
PARP-1 Baculovirus	zur Expression von Strep-PARP-1 in Sf9-Zellen, zur Verfügung gestellt von Annette Becker

### 3.6. Mäusstämme

Wildtyp Stamm: 129/C57BL6,

PARP-1 (-/-) Stamm: 129/C57BL6 zur Verfügung gestellt von Dr. Valérié Schreiber

### 3.7. Rekombinante Proteine

IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  affinitätsgereinigt aus SF9-Zellen von Rudolf Dettmer

Strep-IKK $\gamma$  affinitätsgereinigt aus *E.coli* BL21(DE3)pLysS von Dr. Buket Yilmaz

Strep-PIASy Vollängen-Protein

und Deletionsmutanten: 1-246,1-400,

350-510, 200-429, 246-510 affinitätsgereinigt aus *E.coli* BL21(DE3)pLysS

Strep-PARP-1 affinitätsgereinigt aus SF9-Zellen

GST-I $\kappa$ B $\alpha$  (1-53) affinitätsgereinigt aus *E.coli* BL21(DE3)pLysS

BSA (Rinderserumalbumin) Sigma

Histon 2A Roche

### 3.8. Peptide

Sämtliche verwendeten Peptide wurden im Milligramm-Maßstab und mit einer Reinheit von 85-95 % bei Biosyntan GmbH in Auftrag gegeben.

PIASy-1 EEGPRPKRRCPFGKGLVPAC

PIASy-1M EEGPRPKRRAPAGKGLAPAC

PIASy-2 ATTGVRVSLICPLVKMRLSVPCRA

PIASy-2M ATTGVRVSLICPAVKARASAPCRA

### 3.9. Vektoren und Oligonukleotide

pcDNA3-Flag-GAT

Flag-Sequenz zwischen HindIII/BamHI Restriktionsstellen in pcDNA3.1 (Invitrogen)

kloniert, N-terminaler Tag (Dr. Daniel Krappmann)

6xNF $\kappa$ B Reporter-Vektor

Ein Tandem von sechs NF- $\kappa$ B-Erkennungsstellen wurde in pGL2-Basic kloniert (Dr. Martin Bergmann). Expression des Reportergens *firefly*-Luciferase erfolgt in Abhängigkeit von NF- $\kappa$ B

TKluc Reporter-Vektor

Das Gen für *renilla*-Luciferase steht unter Kontrolle des Thymidin-Kinase-Promotors von *Herpes-Simplex*-Virus.

GFP-PARP-1 Wildtyp und die Mutanten E988K, C21/125G

humane PARP-1 cDNA, PstI-Klonierung in pEGFP-C3 (Dr. Valerié Schreiber)

pFAST-BAC1-ST

2xStrep-Sequenz zwischen NheI/NotI Restriktionsstellen in pFAST-Bac1 (Invitrogen) kloniert, N-terminaler Tag (Annette Becker)

pFAST-BAC1-ST-PARP-1

PCR-Klonierung der humanen PARP-1 cDNA zwischen NotI/XhoI Restriktionsstellen von pFAST-Bac1-ST

hPARP-1-NotI sense-Primer:

ATAAGAATGCGGCCGCAGCCATGGCGGAGTCTTCGGATAA

hPARP-1-XhoI-antisense-Primer:

CCGCTCGAGTTACCACAGGGAGGTCTTAAAATT

GFP-IKK $\gamma$

humane IKK $\gamma$  cDNA in pEGFP (Dr. Sebastian Tegethoff)

pASK-IBA-17+IKK $\gamma$

PCR-Klonierung der humanen IKK $\gamma$  cDNA zwischen SacII/NcoI Restriktionsstellen von pASK-IBA-17+ (IBA GmbH), N-terminaler Strep-Tag (Seda Coel Arslan)

pRFP-PCNA

pEN-mRFPCNAL2, kodiert für eine N-terminale Fusion von RFP und PCNA (Dr. Cristina Cardoso)

pASK-IBA-17+ Fl-PIASy, Deletionsmutanten 1-246, 1-400, 350-510, 200-429, 246-510

PCR-Klonierung der humanen PIASy cDNA zwischen EcoRI/BamHI Restriktionsstellen von pASK-IBA-17+ (IBA GmbH), N-terminaler Strep-Tag

Fl-PIASy-EcoRI sense-Primer:

TCAGTAGAATTTCGATGGCGGCCGGAGCTGGTGGAGGCC

Fl-PIASy-BamHI antisense-Primer:

GATCAAGGATCCTCAGCAGGCCGGCACCAGGCCCTT

(1-246)-PIASy-BamHI antisense-Primer:

GATCAAGGATCCTCAAGTGAGGTTGATGGGGCGGCACGG

(1-400)-PIASy-BamHI antisense-Primer:

GATCAAGGATCCTCACACCAGGTACTCGATCTCGTCGGC

(350-510)-PIASy-EcoRI sense-Primer:

TCAGTAGAATTTCGATGGTCTTCTACCTGCAGATGAACGAG

(200-492)-PIASy-EcoRI sense-Primer:

TCAGTAGAATTTCGATGAGCTGCCCTCAGGAGGACCAGTAC

(200-492)-PIASy-BamHI antisense-Primer:

GATCAAGGATCCTCACTCTTCGTCCTCGTCTTCCTCCTC

(246-510)-PIASy-EcoRI sense-Primer:

TCAGTAGAATTTCGATGCACCTCATGTACCTGTCCTCGGCC

HA-TAK1-K63W (Kinase-defizient)

EcoRI/SalI-Klonierung in pCMV-HA, N-terminaler Tag (Dr. Kuni Matsumoto)

Flag-TRAF6

SalI/NotI-Klonierung in pRK5, N-terminaler Tag (Dr. Patrick Baeuerle, Tularik)

Flag-TRAF6-ΔN

Deletion der RING-Domäne, AS 289-522, SalI/NotI-Klonierung in pRK5, N-terminaler Tag (Dr. Patrick Baeuerle)

MALT1-2EA

E642/795A-Mutante von MALT1 in pEF4 3xFlag, BamHI/NotI-Klonierung (Dr. Andrea Oeckinghaus)

Primer für RT-PCR

Bcl-xL sense: 5' CCCAGAAAGGATACAGCTGG 3'

Bcl-xL antisense: 5' GCAATCCGACTCACCAATAC 3'

XIAP sense: 5' GCTAACTTCCCAAGTAGTAG 3'

XIAP antisense: 5' CCACACAGTTTTTCAGATTTG 3'

β-Aktin sense: 5' ATGGGTCAGAAGGATTCCTATGTG 3'

β-Aktin antisense: 5' CTTCATGAGGTAGTCAGTCAGGTC 3'

Sequenzierungsprimer

Sp6-primer 5' ATTTAGGTGACACTATAG 3'

T7-primer 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

pASK\_IBA\_Nter\_sequencing 5' GAGTTATTTTACCACTCCCT 3'

pASK\_IBA\_Cter\_sequencing 5' CGCAGTAGCGGTAAACG 3'

NF-κB-Sonde für EMSA

H-2K κB (aus dem MHC I-Promoter)

5'-GATCCAGGGCTGGGGATTCCCCATCTCCACAGG-3'

3'-GTCCCGACCCCTAAGGGGTAGAGGTGTCCCTAG-5'

---

Oct-1-Oligonukleotid als Sonde für EMSA

H2B (aus dem humanen Histon H2B-Promotor )

5' GATCCTATAGAATCGCTTATGCAAATAAGTGAAGAGTTGG 3'

3' GATATCTTAGCGAATACGTTTATTCACTTCTCAACCCTAG 5'

siRNAs

Synthetische siRNA-Moleküle wurden von Eurogentec S.A. (Belgien) bezogen. Angegeben sind die Sequenzen des sense-Strangs.

si-ATM	5' CCAUGGAAGUGAUGAGAAA 3'
si-PARP-1	5' AAGCCUCCGCUCCUGAACAAU 3'
si-Ubc13	5' CAGUUCUGCUAUCGAUCCA 3'
si-TRAF6	5' CCACGAAGAGAUAAUGGAU 3'
si-Kontr.	5' CAAUCGUCAUGCAAUUUUAU 3'
si-TAK1	5' UGGCUUAUCUUACACUGGA 3'
si-TAB2	5' GGAAGUAGGAUGAAUGGAA 3'
si-TAB1	5' CCACAGAGAACGAGGAUGA 3'
si-RIP1	5' GCAAAGACCUUACGAGAAU 3'
si-TRAF2	5' GGCCAGUCAACGACAUGAA 3'
si-MALT1	5' TCACUGUGUUACUGGAUGA 3'
si-Bcl10	5' AGAAGACACTGAAGAAATT 3'
si-IRAK1	5' CGAAGAAAGTGATGAATTT 3'

**3.10. Antikörper**Primäre Antikörper

PARP-1	F2 (Santa Cruz), 288 (V. Schreiber), CII-10 (V. Schreiber)
PAR	LP96-10 (BD Pharmingen)
IKK $\alpha$	14A231 (Imgenex)
IKK $\gamma$	Fl-419 (Santa Cruz), M-18 (Santa Cruz), C54 (BD Transduction Labs)
P105/p50	H-119 (Santa Cruz)
p65	C-20 (Santa Cruz)
I $\kappa$ B $\alpha$	C-21 (Santa Cruz)
p-I $\kappa$ B $\alpha$	Ser32/36, Cell Signaling
Aktin	AC-15 (Sigma)
PIASy	P-18 (Santa Cruz)
SUMO	anti-GMP 1 (Zymed)

ATM	A300-136 (Bethyl Laboratories), 2C1 (Genetex)
p-ATM	Ser1981, 10H11.E12 (Cell Signaling), 600-401-398 (Rockland)
TAK1	M-579 (Santa Cruz)
p-TAK1	Thr184/187, 90C7 (Cell Signaling)
TAB1	Cell Signaling
TAB2	E20 (Santa Cruz)
IKK $\beta$	Cell Signaling
p-IKK $\alpha/\beta$	Ser176/180, 16A6 (Cell Signaling)
TRAF6	H-274 (Santa Cruz)
Ubc13	4E11 (Zymed)
Ubiquitin	FK2 (Biomol)
TNFRI	H5 (Santa Cruz)
$\beta$ -Tubulin	Klon 2-28-33 (Sigma)
Flag	M2 (Sigma)
CD45R/B220	Biotin-gekoppelt, Klon RA3-6B2 (BD Pharmingen)
FITC-CD19	Miltenyi Biotec
PE-CD3	Miltenyi Biotec

#### Sekundäre Antikörper

anti-Kaninchen HRP-Konjugat	JacksonImmunoResearch
anti-Maus HRP-Konjugat	JacksonImmunoResearch
anti-Ziege HRP-Konjugat	JacksonImmunoResearch
Alexa Fluor 488 anti-Maus (FITC)	Molecular Probes, Invitrogen

### **3.11. Allgemeine Puffer und Lösungen**

#### **Molekularbiologie**

##### TBE

50 mM TRIS; 50 mM Borsäure; 1 mM EDTA

##### DNA-Probenpuffer (6x)

1 % (w/v) Bromphenolblau; 1 % (w/v) Xylencyanol; 40 % Glycerin (v/v)

##### TE-Puffer

10 mM Tris-HCl pH 7,6; 0,1 mM EDTA

## **SDS-Poly-Acrylamid-Gelelektrophorese**

### Sammelgel

125 mM Tris (pH 6,8); 5 % Acrylamid; 0,1 % SDS; 0,1 % APS; 0,1 % TEMED

### Trenngel

375 mM Tris (pH 8,8); 6-12 % Acrylamid; 0,1 % SDS; 0,075 % APS; 0,05 % TEMED

### SDS-PAGE Laufpuffer

25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS; pH 7,3

### 6x SDS-Probenpuffer

10 % (w/v) DTT; 12 % (w/v) SDS; 300 mM Tris pH 6,8; 12 mM EDTA; 40 % (v/v) Glycerol;  
1 % (w/v) Bromphenolblau

## **Westernblot**

### Blotting-Puffer

48 mM Tris (pH 8,3); 39 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol; 0,037 % SDS (w/v)

### TBST

25 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween 20

### Blokierungspuffer

1X TBS; 5 % (w/v) Trockenmilchpulver

### Antikörper-Verdünnungspuffer

1X TBS; 1 % (w/v) Trockenmilchpulver

### Stripping-Puffer

100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol; 2 % SDS; 62,5 mM Tris-Cl pH 6,8

### ECL-Lösung A

50 mg Luminol in 200 ml 0,1 M Tris pH 8,6

### ECL-Lösung B

11 mg Para-Hydroxy-Kumarsäure in 10 ml DMSO

## **Zellkultur**

### PBS

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1,7 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

### HBSS

137 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 0,25 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0,44 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1,3 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 1,0 mM  $\text{MgSO}_4$ ; 4,2 mM  $\text{NaHCO}_3$

## 3.12. Zellbiologische Methoden

### 3.12.1. Kultivierung adhärenter Zellen

Die adhärenenten Zelllinien wurden je nach Anwendung auf Zellkulturschalen verschiedener Größe ausplattiert und in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C, 90 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> (v/v) in folgenden Medien kultiviert.

#### HeLa

DMEM (PAA), 10 % fötales Kälberserum (FCS, Gibco), 2 mM L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin

#### MEFs

DMEM-GlutaMAX I-Pyruvate (Gibco), 10 % FCS (PAA Gold), 1 % Penicillin/ Streptomycin

#### HepG2

RPMI (PAA), 10 % FCS (Gibco), 2mM L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin

Die Zellen wurden jeden zweiten bis dritten Tag passagiert und dadurch bei einer Konfluenz von 30 bis 90 % gehalten. Zum Passagieren wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA (0,5 % Trypsin/0,5 % EDTA in PBS) von der Platte abgelöst und anschließend im entsprechenden Volumen frischen Mediums aufgenommen, um das Trypsin zu inaktivieren. Nach adäquater Verdünnung mit Kulturmedium wurde die Zellsuspension erneut ausplattiert.

### 3.12.2. Kultivierung von Suspensionszellen

Die Anzucht von 70Z3 und dem IKK $\gamma$ -defizienten Derivat 1.3E2 erfolgte in RPMI 1640 (PAA); 2 mM L-Glutamin; 8 % FCS (Gibco); 0,05 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol; 1 % Penicillin/Streptomycin. Um die Zellen in einem Dichtebereich von  $0,1 \times 10^6$  bis  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml zu halten, wurden die Kulturen jeden zweiten bis dritten Tag verdünnt.

### 3.12.3. Kryokonservierung von Zellen

Die Vorräte sämtlicher Zelllinien wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Um Zellen in Kultur zu nehmen, wurden die eingefrorenen Aliquots in einem Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut, mit Kulturmedium gewaschen und ausgesät. Zur Konservierung wurden die Zellen einer 100 mm Zellkulturschale bei einer Konfluenz von 75 % oder  $1 \times 10^7$  Suspensionszellen in 1 ml Aufbewahrungsmidium (das entsprechende Zellkulturmedium, versetzt mit 20 % FCS und 15 % DMSO) aufgenommen und in Kryogefäßen (Nalgene) über Nacht in einem Gefriercontainer (Nalgene) auf -80°C abgekühlt. Anschließend wurden die gefrorenen Zellaliquots in flüssigen Stickstoff überführt.

### **3.12.4. Präparation von Knochenmarkzellen aus Mäusen und Differenzierung von Makrophagen**

Zur Entnahme von Knochenmark wurden Wildtyp- und PARP-1<sup>-/-</sup>-Mäuse durch zervikale Dislokation euthanisiert. Das Knochenmark wurde aus beiden Femuren und Tibien mittels einer Spritze mit PBS herausgespült. Die Erythrozyten wurden durch 5 min Inkubation im ACK-Puffer (0,15 M NH<sub>4</sub>Cl; 1 mM KHCO<sub>3</sub>; 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA; pH to 7,4) lysiert und anschließend die Zelldichte bestimmt. Die Knochenmarkzellen wurden in DMEM (PAA) (versetzt mit 10 % FCS (Gibco); 2 mM L-Glutamin; 0,05 mM β-Mercaptoethanol; 1 % Penicillin/Streptomycin) bei einer Zelldichte von 1x10<sup>6</sup> Zellen/ml auf Petri-Schalen ausgesät. Die Differenzierung der Knochenmarkvorläuferzellen zu Makrophagen erfolgte nach Zugabe von 20 ng/ml M-CSF bei 37°C im Brutschrank. Am dritten Tag wurden die noch im Überstand befindlichen Zellen pelletiert, im frischen Medium mit M-CSF aufgenommen und auf die ursprüngliche Platte gegeben. Am sechsten Tag wurde diese Prozedur wiederholt. Am Tag 8 wurde der Kulturüberstand verworfen, die Zellen trypsiniert, gezählt und auf neue Platten ausplattiert. Die erfolgreiche Differenzierung von Makrophagen wurde durch FACS-Analyse der Expression des Makrophagen-Oberflächenmarkers CD11b bestätigt.

### **3.12.5. Präparation von Dünndarmepithelzellen aus Mäusen**

Unbehandelte oder γ-bestrahlte Wildtyp- und PARP-1<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden durch zervikale Dislokation euthanisiert. Das Abdomen wurde geöffnet, ca. 15-20 cm des Jejunum entnommen und in eiskaltes EBSS gelegt (Earles Balanced Salt Solution, Gibco, Invitrogen). Das Jejunum wurde in ca. 5 cm lange Abschnitte zerteilt und längs geöffnet. Die Fäzes wurden abgespült und die Gewebefragmente mehrmals mit eiskaltem EBSS gewaschen. Die Epithelzellen wurden unter langsamer Rotation in EBSS, welches mit 30 mM EDTA, 1 mM DTT und 0,2 % (w/v) Trypsin (Difco Trypsin 250m BD Biosciences) komplementiert wurde, bei 37°C für 25 min abgelöst. Das abgelöste Zellmaterial wurde durch Pipettieren zerkleinert und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit EBSS gewaschen und die Zellen durch einen 70 µm-Filter vereinzelt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und lysiert.

### 3.12.6. Isolation von B-Zellen aus der Milz von Mäusen

Wildtyp- und PARP-1<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden durch zervikale Dislokation euthanisiert und die Milzen herauspräpariert. Zum Aufschließen wurden die Organe durch einen Metallsieb in 5 ml Lymphozyten-Kulturmedium (RPMI 1640; 10 % FCS; 2 mM L-Glutamin; 0,05 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol; 1 % Penicillin/Streptomycin) homogenisiert. Um eine Einzelzellsuspension zu erhalten, wurde das zerkleinerte Gewebe durch eine 21 G-Kanüle in eine Spritze gezogen und wieder herausgedrückt. Dieser Vorgang wurde 3-mal wiederholt. Nach Vereinzeln wurden die Zellen pelletiert und zur Lyse von Erythrozyten im ACK-Puffer aufgenommen. Nach 5-minütiger Inkubation wurde die Lyse durch Medium-Zugabe gestoppt und die Zellen abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde einmal mit Medium gewaschen und die Zellsuspension durch einen 70  $\mu$ m-Filter filtriert.  $1 \times 10^8$  Splenozyten wurden in einem Volumen von 5 ml mit 50  $\mu$ g Biotin-gekoppelten B220-Antikörper für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert, in 30 ml MACS-Puffer (PBS, 2 % FCS, 2 mM EDTA) resuspendiert und mit 150  $\mu$ l magnetischen anti-Biotin MicroBeads versetzt. Durch eine 15-minütige Inkubation auf Eis wurden die B-Zellen auf den magnetischen Partikeln immobilisiert. Die immobilisierten B-Zellen wurden mit Hilfe eines autoMACS-Separators (Miltenyi Biotec) nach Angaben des Herstellers von anderen Splenozyten getrennt. Zur Beurteilung der Trennungsqualität wurde die erhaltene Zellsuspension mit einem FITC-gekoppelten Antikörper gegen CD19 (B-Zellmarker) und einem PE-gekoppelten Antikörper gegen CD3 (T-Zellmarker) mittels FACS analysiert. Die isolierten B-Zellen wurden gezählt und mit einer Zelldichte von  $7-8 \times 10^5$  Zellen/ml im Lymphozyten-Kulturmedium auf Zellkulturschalen ausplattiert. Bis zur Stimulation und Lyse wurden die Zellen bei 37°C im Inkubator gehalten.

### 3.12.7. Stimulation

Die Stimulation von Zellen mit chemischen NF- $\kappa$ B-Induktoren erfolgte durch Zugabe von Agenzien direkt ins Kulturmedium. Wenn nicht anders angegeben wurden folgende Endkonzentrationen eingesetzt: TNF $\alpha$  20 ng/ml, IL-1 $\beta$  10 ng/ml, LPS 0,5  $\mu$ g/ml und Etoposid 100  $\mu$ M. Die  $\gamma$ -Bestrahlung von Zellen bzw. Mäusen erfolgte mit einem OB 29 Blutbestrahlungsgerät (STS), das mit einer <sup>137</sup>Cs-Quelle ausgestattet ist und über eine Dosisleistung von 10,5 Gy/min verfügt. MEFs wurden mit 80 Gy und HepG2-Zellen mit 40 Gy bestrahlt. Die Ganzkörperbestrahlung von Mäusen erfolgte mit 10 Gy. In der Regel wurden die Zellen am Tag vor der Stimulation auf serumfreies Medium umgesetzt. Die Dauer der Stimulation richtete sich nach dem jeweiligen Experiment und ist in der Beschreibung der

Ergebnisse angegeben. Zur Inhibierung von PARP-1 erfolgte vor der eigentlichen Stimulation eine 90-minütige Vorbehandlung der Zellen mit 10 mM 3-Aminobenzamid (3-AB) bzw. 15  $\mu$ M EB-47.

### **3.12.8. Transiente Transfektion**

#### **Plasmid-Transfektion von MEFs mit Transfectin**

$8 \times 10^5$ -Zellen wurden auf eine 100 mm Kulturschale ausgesät und am nächsten Tag mittels Lipofektion mit Plasmiden transfiziert. Dazu wurden eine DNA-Gesamtmenge von 30  $\mu$ g und 60  $\mu$ l Transfectin (Biorad) separat in jeweils 1 ml OptiMEM (Invitrogen) aufgenommen, 5 min inkubiert und anschließend gemischt. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Liposom/DNA-Komplex auf die Zellen gegeben, die vorher auf frisches Medium umgesetzt worden sind. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion geerntet. Für die Transfektion von Zellen auf 60 mm bzw. 150 mm Platten wurden die Mengen an DNA, Transfectin und OptiMEM entsprechend angepasst.

#### **Plasmid-Transfektion von HepG2-Zellen mit Lipofectamine 2000**

HepG2-Zellen wurden in antibiotikafreiem Medium in 6-well-Platten so ausgesät, dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von 90 % aufwiesen. Pro well einer 6-well-Platte wurden 4  $\mu$ g Gesamt-DNA und 10  $\mu$ l Lipofectamine 2000 (Invitrogen) separat in jeweils 250  $\mu$ l OptiMEM (Invitrogen) aufgenommen, 5 min inkubiert und anschließend vereinigt. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Liposom/DNA-Komplex auf die Zellen gegeben, die vorher auf frisches Medium umgesetzt worden sind. Am nächsten Tag wurden die Zellen auf serumfreies Medium umgesetzt. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion für Stimulationsexperimente verwendet.

#### **siRNA-Transfektion von HepG2-Zellen mit Atufect01**

Zur Expressionshemmung bestimmter Gene mittels RNA-Interferenz (RNAi) wurden korrespondierende siRNA-Sequenzen mit Hilfe des siRNA-Design-Tools von Dharmacon identifiziert und als synthetische doppelsträngige, 19-nt lange siRNA-Oligonukleotide von Eurogentec S.A. bezogen.

$5 \times 10^5$  HepG2-Zellen wurden auf eine 100 mm Kulturschale ausgesät und am nächsten Tag mittels Lipofektion mit siRNAs transfiziert. Dazu wurden 20  $\mu$ l einer 10  $\mu$ M siRNA-Lösung und 10  $\mu$ l Atufect01-Transfektionslipid (1 mg/ml, Silence Therapeutics) separat in jeweils

1 ml OptiMEM (Invitrogen) aufgenommen, 5 min inkubiert und anschließend gemischt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurde der Lipid/siRNA-Komplex auf die Zellen gegeben, die vorher auf frisches Medium umgesetzt worden sind. Im Kulturmedium betrug die Endkonzentration der siRNA 20 nM und des Lipids 1 µg/ml. 48 h nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden 72 h nach der Transfektion geerntet. Für die Transfektion von Zellen auf 60 mm bzw. 150 mm Platten wurden die Mengen an siRNA, Atufect01 und OptiMEM entsprechend angepasst.

### **Transfektion von HEK293-Zellen nach der Ca<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Methode**

Bei der Bildung von Ca<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Kristallen kann die in der Lösung enthaltene DNA an die Kristalle adsorbiert werden. Zellen sind in der Lage die DNA-Ca<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Komplexe endozytotisch aufzunehmen und daraufhin die Plasmid-kodierten Proteine zu exprimieren. Am Tag vor der Transfektion wurden HEK293-Zellen so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 40-50 % aufwiesen. Für eine 100 mm Kulturplatte wurden 10 µg Gesamt-DNA mit 37 µl 2 M CaCl<sub>2</sub> versetzt und das Volumen mit ddH<sub>2</sub>O auf 300 µl aufgefüllt. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurden 300 µl 2x HBS vorgelegt und das DNA/CaCl<sub>2</sub>-Gemisch tröpfchenweise zugegeben. Die Suspension wurde 15 min bei RT inkubiert und anschließend gleichmäßig auf die Zellen pipettiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden 36-48 h nach der Transfektion geerntet.

#### **3.12.9. Immunfluoreszenzmikroskopie**

Für den Nachweis der subzellulären Lokalisation von phospho-ATM wurden HeLa-Zellen auf Deckgläschen angezogen. Nach Bestrahlung mit 10 Gy wurden die Zellen für weitere 30 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und mit 4 %iger Paraformaldehydlösung für 10 min bei RT fixiert. Danach wurde dreimal mit PBS gewaschen und die Membranen mit 0,1 %iger Lösung von Triton X-100 in PBS für 5 min bei RT permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1 % BSA/PBS wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit 10 %iger Eselserumlösung in 0,1 % BSA/PBS für 30 min bei RT blockiert.

Anschließend wurden die Proben mit dem primären Antikörper (phospho-ATM Ser1981 Antikörper produziert in Kaninchen; Rockland; Verdünnung 1:200 in 0,1 % BSA/PBS) für 1-2 h bei RT inkubiert, danach dreimal mit 0,1 % BSA/PBS gewaschen und mit einem Alexa-Fluor-488-gekoppelten sekundären Esel-anti-Kaninchen Antikörper (Invitrogen; Verdünnung 1:400 in 0,1 % BSA/PBS) für 1 h bei RT im Dunklen inkubiert. Zellen wurden einmal mit

0,1 % BSA/PBS gewaschen, 5 min mit einer 0,5 µg/ml DAPI-Lösung in 0,1 % BSA/PBS inkubiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden mit Mowiol auf Objektträgern eingebettet und zum Trocknen für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Fluoreszenzbilder wurden mit dem Mikroskop Axioplan 2 (Zeiss) aufgenommen.

### **3.12.10. Laser-Mikrobestrahlungsexperimente und Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie**

Durch Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie sollte die subzelluläre Lokalisation von IKK $\gamma$  und PARP-1 nach Laser-induzierter lokal begrenzter DNA-Schädigung untersucht werden. Der experimentelle Aufbau basierte auf der von Mortusewicz *et al.* publizierten Arbeit [133].

Pro Vertiefung einer 4-well Lab-Tek II Deckglaskammer (Nalge Nunc International) wurden  $7 \times 10^3$  IKK $\gamma^{-/-}$ - bzw. PARP-1 $^{-/-}$ -MEFs ausgesät. Am nächsten Tag wurden die PARP-1 $^{-/-}$ -Zellen mit GFP-PARP-1-Konstrukten und IKK $\gamma^{-/-}$ -Zellen mit GFP-IKK $\gamma$  transfiziert. Zur internen Positivkontrolle der Bildung von DNA-Schadensfoci wurde RFP-PCNA mit den GFP-Fusionskonstrukten kotransfiziert. Die Zellen wurden nach dem Ausplattieren in Gegenwart von BrdU (5-Brom-2'-Desoxyuridin, 10 µg/ml) kultiviert. Als Thymidinanalog wird BrdU während der Replikation in die DNA der Zellen eingebaut. Aufgrund der physikochemischen Eigenschaften von BrdU führt die Bestrahlung von Zellen mit einem 405 nm-Diodenlaser zur Entstehung von DNA-Strangbrüchen. Laser-Mikrobestrahlungsexperimente wurden 24 h nach der Transfektion mit Hilfe eines 405 nm-Diodenlasers, dessen Strahl in ein Leica TCS SP5 DMI 600 CS konfokales Laser-Scanning-Mikroskop eingekoppelt war, durchgeführt. Dazu wurde der Laserstrahl (maximale Intensität) durch ein UV-durchlässiges Leica HCX PL APO 63x/1.40–0.60 Öl-Objektiv auf einen ausgewählten Punkt im Zellkern der zu untersuchenden Zelle für 2 sec fokussiert. Anschließend wurden konfokale Zeitserienaufnahmen einer zentralen z-Ebene durch alternierende Anregung mit einem 488 nm-Argon-Laser und einem 561 nm-DPSS-Laser erstellt. Die ersten 30 Bilder nach Bestrahlung wurden im Intervall von 2 sec aufgenommen. Die Aufnahme der darauf folgenden 90 Bilder erfolgte im Abstand von 20 sec.

### 3.12.11. Untersuchung der Apoptose mittels Durchflusszytometrie

Ein Charakteristikum der Apoptose stellt die vermehrte Exposition von Phosphatidylserin an der Außenseite der Plasmamembran dar. AnnexinV ist ein Protein, das in Abhängigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$  selektiv Phosphatidylserin bindet. Mit Hilfe von Fluorophor-gekoppeltem AnnexinV ist es somit möglich den Anteil apoptotischer Zellen in einer Zellpopulation mittels Durchflusszytometrie zu bestimmen.

Die zu untersuchenden Zellen wurden pelletiert, im AnnexinV-Bindungspuffer (10 mM Hepes/NaOH pH 7,4; 140 mM NaCl; 5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) gewaschen und in 100  $\mu\text{l}$  AnnexinV-Färbelösung (20  $\mu\text{l}$  AnnexinV-FITC (ALX-209-256, Alexis) in 1 ml AnnexinV-Bindungspuffer) aufgenommen. Nach 15 min Inkubation bei RT wurden die Zellen zweimal mit AnnexinV-Bindungspuffer gewaschen und der Anteil an fluoreszierenden Zellen im Durchflusszytometer (FACScalibur BD) ermittelt.

### 3.12.12. NF- $\kappa$ B-Reportergen-Assay

Zur Bestimmung der transkriptionellen Aktivität von NF- $\kappa$ B wurde das Dual-Luciferase-Reportergen-System (Promega) verwendet. Das Prinzip dieses Assays beruht auf der simultanen Expression und Aktivitätsmessung zweier verschiedener Luciferase-Enzyme, die aus unterschiedlichen Spezies stammen und demnach über abweichende biochemische Eigenschaften verfügen. Das Gen für die *firefly*-Luciferase steht in dem Reportergenkonstrukt 6xNF $\kappa$ B unter Kontrolle von sechs NF- $\kappa$ B-Response-Elementen. Die gemessene Aktivität der *firefly*-Luciferase reflektiert die transkriptionelle Aktivität von NF- $\kappa$ B. Der Kontroll-Vektor TKluc kodiert für die *renilla*-Luciferase. Dieses Luciferase-Enzym wird ausgehend vom Thymidin-Kinase-Promotor konstitutiv exprimiert und sollte von Experiment zu Experiment unbeeinflusst bleiben. Durch Normierung der *firefly*-Luminiszenz auf die Werte der *renilla*-Luciferase können variierende experimentelle Parameter, wie z.B. Transfektionseffizienz oder Überlebensrate der Zellen, ausgemittelt werden.

Die Zellen wurden zusätzlich zu Leervektor-DNA bzw. Expressionvektoren für die zu untersuchenden Proteine mit 100 ng 6xNF $\kappa$ B und 5 ng TKluc pro Well einer 6-well Zellkultur-Platte transfiziert. Die Gesamt-DNA-Menge betrug 4  $\mu\text{g}$ . Jedes Transfektionsexperiment erfolgte in dreifacher Ausführung. 24-48 h nach der Transfektion wurden die Zellen in 250  $\mu\text{l}$  Passive-Lysepuffer (Promega) für 15 bis 30 min bei RT lysiert. 5  $\mu\text{l}$  der Lysate wurden im Luminiszenz-Plattenleser (Mithras LB 940, Berthold Technologies) eingesetzt, um beide Luciferase-Aktivitäten in einem Ansatz hintereinander zu messen. Das

Dual-Glo Luciferase-Reagenz (Promega) wurde zuerst injiziert und das *Firefly*-Luminiszenz-Signal gemessen. Anschließend wurde die Stop&Glo-Lösung (Promega) appliziert, die zum Quenchen der *Firefly*-Luminiszenz führte und das Substrat für die *renilla*-Luciferase enthielt. Für die drei unabhängigen experimentellen Ansätze wurden die Signalwerte der *firefly*-Luciferase auf die der *renilla*-Luciferase normiert und ein Mittelwert gebildet. Die auf diese Weise berechneten relativen Lichteinheiten (RLU) sind ein Maß für die transkriptionelle Aktivität von NF- $\kappa$ B und damit für vorgeschaltete Signaltransduktionsereignisse.

### **3.12.13. Messung intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Konzentration**

Zur Messung von Veränderungen intrazellulärer Kalzium-Konzentration wurde das „Fluo-4 NW Calcium Assay“ Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben eingesetzt. Der Kit basiert auf der zellpermeablen Substanz Fluo-4 AM. Dieser Farbstoff besitzt die Eigenschaften eines fluoreszierenden Kalzium-Chelators (Anregungsmaximum bei 494 nm und Emissionsmaximum bei 516 nm), dessen Fluoreszenz-Intensität nach Kalzium-Komplexierung um Faktor 100 erhöht wird. Vor der eigentlichen Messung wurden die Zellen mit Fluo-4 AM (gelöst in HBSS) für 20 min in 96-well Platten bei 37°C beladen. Anschließend wurde die Farbstofflösung entfernt und mit HBSS-Lösung ersetzt. Die Messung des Fluoreszenzsignals von Fluo-4 erfolgte mit einem Fluoreszenz-Platten-Messgerät (Mithras LB 940, Berthold Technologies) bei 530 nm nach Anregung bei 488 nm.

## **3.13. Molekularbiologische Methoden**

### **3.13.1. Polymerase-Kettenreaktion**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifizierung doppelsträngiger DNA-Abschnitte verwendet. Die PCR-Primer wurden so ausgewählt, dass sich am 5'-Ende des komplementären Bereichs spezifische Restriktionsschnittstellen befinden, die für die anschließende Klonierung der PCR-Produkte in Expressionsvektoren verwendet werden können. Die verwendeten Vektoren und Primer sind im Abschnitt 3.9 aufgelistet. Die Zusammensetzung der PCR-Reaktionen entsprach den Angaben in Tabelle 3.1. Das Standard-PCR-Programm ist in Tabelle 3.2 wiedergegeben.

Ingredienzien	Menge
Matrizen DNA	50-100 ng
10x Pfu Ultra Puffer	5 µl
Sense-Primer	25 pmol
Antisense-Primer	25 pmol
dNTPs (10 mM)	1 µl
Pfu Ultra (2.5 U/µl)	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	Ad 50 µl

**Tabelle 3.1** Zusammensetzung einer PCR-Reaktion

Zyklenzahl	Temp.	Zeit	Prozess
1	94° C	4 min	Denaturierung
35	94° C	30 sec	Denaturierung
	56° C	45 sec	Annealing
	72° C	2 min/kb	Elongation
1	72° C	10 min	Elongation

**Tabelle 3.2** Standard-PCR-Programm

### 3.13.2. Reinigung von PCR-Produkten und Restriktionsverdau

PCR-Produkte wurden mit Hilfe des „*PCR Purification*“-Kits (QIAGEN) nach dem Protokoll des Herstellers aus PCR-Reaktionen aufgereinigt. Die isolierten PCR-Fragmente und die Vektoren, in die sie gerichtet kloniert werden sollten, wurden simultan mit zwei unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen für 4-16 h bei 37°C nach dem folgenden Protokoll behandelt (Tabelle 3.3).

Ingredienzien	Menge
PCR-Reaktion/Vektor	40 µl/ 5 µg
10x Restriktionspuffer	5 µl
Enzym 1 (10-20 U/µl)	2 µl
Enzym 2 (10-20 U/µl)	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	Ad 50 µl

**Tabelle 3.3** Standard-Restriktionsreaktion

### 3.13.3. Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um die Religation eines Vektors zu verhindern, wurde die gespaltene Vektor-DNA dephosphoryliert. Dazu wurde 1 U SAP (*shrimp alkaline phosphatase*) pro 5 µg Vektor-DNA direkt zum Restriktionsansatz gegeben und die Reaktion für 1-2 h bei 37°C durchgeführt.

### 3.13.4. Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion

DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe wurden mittels nicht-denaturierender Agarosegelelektrophorese (0,8-1 % Agarose in TBE) bei 100 V in horizontalen Flachbettgelen aufgetrennt. Um die Visualisierung der DNA zu ermöglichen, wurde dem Gel Ethidiumbromid (0,2 µg/ml) zugesetzt. Die Proben wurden mit einer entsprechenden Menge

an 6-fachem DNA-Probenladepuffer versetzt und zur Abschätzung der Fragmentgröße zusammen mit einem DNA-Längenstandard aufgetragen. Die entsprechende Bande wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA mit dem „*QIAquick Gel Extraction*“-Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers extrahiert.

### **3.13.5. Ligation**

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten in Expressionsvektoren wurden ca. 100 ng des jeweiligen linearisierten und dephosphorylierten Vektors zusammen mit einem 3- bis 4-fachen molaren Überschuss an Insert in Gegenwart von 3 U T4-DNA-Ligase im entsprechenden Reaktionspuffer für 16 h bei 16°C inkubiert.

### **3.13.6. Herstellung kompetenter Bakterien**

Die Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien erfolgte nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode. Hierzu wurden 250 ml SOB-Medium mit 10 ml einer *E.coli*-Übernachtskultur (LB/10 µg Tetracyclin) angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bei 20°C im Schüttler inkubiert. Die Bakterienkultur wurde für 10 min im Eisbad abgekühlt, die Zellen bei 4°C abzentrifugiert und in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde für weitere 10 min auf Eis inkubiert, erneut zentrifugiert, in 20 ml eiskaltem TB-Puffer aufgenommen und mit DMSO versetzt (7 % v/v). 200 µl Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### **3.13.7. Transformation kompetenter Bakterien**

Die Transformation chemisch kompetenter Bakterien erfolgte durch Hitzeschock. Hierfür wurde entweder die Hälfte eines Ligationsansatzes oder 50-100 ng Plasmid-DNA zu 90 µl kompetenter *E.coli*-Zellen gegeben. Dieser Ansatz wurde dann für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeschockbehandlung für 1 min bei 42°C, wonach die Transformationsansätze sofort wieder auf Eis gestellt wurden. Nach der Abkühlung wurden die Zellsuspensionen mit 900 µl Antibiotika-freiem LB-Medium versetzt und für 40 min bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. 100 µl der jeweiligen Transformationsansätze wurden auf Agarplatten (LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum) ausplattiert und für 14-16 h bei 37°C inkubiert. Einzeln gewachsene Kolonien wurden gepickt und mit ihnen weitere Bakterienkulturen angeimpft.

### 3.13.8. Präparation von Plasmid-DNA

Das Miniprep-Verfahren liefert Plasmid-DNA in hinreichender Menge und Qualität, um sie zur Analyse und Verifizierung von Klonierungsprodukten einzusetzen. Für eine Mini-Präparation wurden 3 ml LB-Medium (versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum) mit einer Einzelkolonie steril inokuliert. Diese Kulturen wurden über Nacht bei 37°C und unter Schütteln bei 225 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden die angezogenen Bakterien bei 14000 rpm sedimentiert und die Zellpellets mit Hilfe des „*QIAprep Spin Miniprep*“-Kits (QIAGEN) nach dem Herstellerprotokoll aufgearbeitet. Im letzten Verfahrensschritt wurde die an die Silikamembran der Spinsäule gebundene Plasmid-DNA mit 30 µl EB-Puffer eluiert. Dabei betragen die typischen Ausbeuten 5 bis 15 µg DNA. Die Verifizierung des Inserteinbaus verlief über einen Restriktionsverdau der Miniprep-DNA mit gleichen Enzymen, die zur Prozessierung der jeweiligen Ligationsedukte dienten und eine anschließende gelelektrophoretische Analyse der Spaltprodukte.

Zur Aufreinigung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde das „*Plasmid Purification Maxi*“-Kit (QIAGEN) verwendet. Hierzu wurde eine 150 ml Übernachtkultur des transformierten Bakterienklons angezogen und zur Plasmid-DNA-Reinigung über tip500 Säulen nach der Vorschrift des Herstellers eingesetzt. Die im letzten Verfahrensschritt gefällte DNA wurde in 400 µl TE-Puffer gelöst. Die typischen Ausbeuten der Maxi-Plasmid-Präparation betragen 400-800 µg DNA.

### 3.13.9. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm ( $1,0 A_{260}$  entspricht ca. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA) bestimmt. Die Messung der Konzentration von Gesamt-RNA-Präparationen, die für reverse Transkription bestimmt waren, erfolgte ebenfalls photometrisch bei 260 nm, wobei in diesem Fall  $1,0 A_{260}$  etwa 40 µg/ml einzelsträngiger RNA entspricht.

### 3.13.10. Kapillar-Sequenzierung von DNA

Sämtliche Klonierungsprodukte wurden durch Sequenzierung verifiziert. Dazu wurden DNA-Produkte ausgehend von der zu sequenzierenden Matrize in einer Polymerisationsreaktion nach der Kettenabbruch-Methode unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide hergestellt (Tabelle 3.4. und 3.5.) Die Sequenzierungsprodukte wurden durch Ethanol-fällung aufgereinigt, in Template Suppression Reagent (Applied Biosystems) aufgenommen und 2 min zur Denaturierung bei 90°C inkubiert. Die Auftrennung und Analyse der fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente erfolgte

unter Einsatz des ABI310 Kapillarelektrophorese-Sequenzierautomats (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers.

Ingredienzien	Menge
Matrizen DNA	200-300 ng
BigDye Terminator v1.1	0,5 µl
5x Sequenzierungspuffer	2 µl
Sequenzierungsprimer	5 pmol
ddH <sub>2</sub> O	Ad 10 µl

**Tabelle 3.4.** Zusammensetzung einer Sequenzierungsreaktion

Zyklenzahl	Temp.	Zeit	Prozess
1	95° C	3 min	Denaturierung
25	96° C	35 sec	Denaturierung
	50° C	12 sec	Annealing
	60° C	4 min	Elongation

**Tabelle 3.5.** Temperaturregime für eine Sequenzierungsreaktion

### 3.13.11. Semiquantitative RT-PCR-Analyse der Expression von NF-κB-Zielgenen

Die Induktion NF-κB-abhängiger Gene nach Bestrahlung von Zellen wurde mittels semiquantitativer RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) untersucht. Hierzu wurde die Gesamt-RNA aus den zu untersuchenden Zellen mit Hilfe des „*RNeasy Mini*“-Kits (QIAGEN) nach dem Herstellerprotokoll isoliert. Die Erststrangsynthese der cDNA erfolgte unter Verwendung von Oligo-dT-Primern nach folgendem Protokoll:

1. Folgende Komponenten wurden in einem RNase-freien Reaktionsgefäß vereinigt:  
1,5 µg Gesamt-RNA  
1 µl Oligo(dT)<sub>15</sub> Primer (500 µg/ml, Invitrogen)  
ddH<sub>2</sub>O ad 12 µl  
Der Mix wurde auf 75°C für 5 min erwärmt und auf Eis abgekühlt.
2. Anschließend wurden folgende Reagenzien dem Ansatz zugesetzt:  
5 µl 5X M-MLV Reaction Buffer  
1,25 µl dNTP (10 mM)  
0,5 µl M-MLV RT (200 U/µl)  
ad ddH<sub>2</sub>O 13 µl
3. Die Reaktion wurde bei 42°C für 50 min inkubiert und anschließend bei 70°C für 15 min hitzeinaktiviert
4. Die Reaktion wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf 50 µl verdünnt

Der Anteil spezifischer cDNAs, die ausgehend von NF-κB-induzierten Transkripten generiert wurden, an der Gesamt-cDNA-Menge kann unter Verwendung genspezifischer Primer-Paare durch PCR detektiert werden. In dieser Arbeit wurden exemplarisch die

Transkripte der anti-apoptotischen NF-κB-Zielgene Bcl-xL und XIAP analysiert. Die verwendeten Primer sind unter 3.9 aufgelistet. Zur relativen Quantifizierung der Bcl-xL und XIAP cDNA-Menge wurde die β-Aktin cDNA, als Transkript eines konstitutiv exprimierten Gens, herangezogen. Die verdünnten RT-Ansätze konnten im nachfolgenden PCR-Schritt direkt als Matrizen eingesetzt werden (Tabelle 3.6 und 3.7). Nach Ablauf der Reaktion wurden 16 µl der PCR mit 4 µl 6x DNA-Probenpuffer versetzt und in einem 1,2 %-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Ingredienzien	Menge
cDNA	2 µl
10X NH <sub>4</sub> Puffer (Bioline)	5 µl
Sense-Primer	25 pmol
Antisense-Primer	25 pmol
dNTPs (10 mM)	1 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2,3 µl
BioTAQ (5 U/µl)	0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	Ad 50 µl

**Tabelle 3.6.** PCR zur Amplifizierung spezifischer cDNAs

Zyklenzahl	Temp	Zeit	Prozess
1	95° C	5 min	Denaturierung
Aktin 20 Bcl-xL, XIAP 28	95° C	30 sec	Denaturierung
	55° C	30 sec	Annealing
	72° C	45 sec	Elongation
1	72° C	10 min	Elongation

**Tabelle 3.7.** PCR-Programm zur Amplifizierung spezifischer cDNAs

### 3.13.12. Radioaktive Endmarkierung von DNA-Fragmenten

Zur radioaktiven Markierung von doppelsträngigen DNA-Oligonukleotiden, die als EMSA-Sonden eingesetzt werden sollten, wurden deren 5'-überhängenden Enden mit Hilfe des Klenow-Fragments von *E.coli* DNA-Polymerase I in Anwesenheit eines radioaktiven Desoxynukleotids aufgefüllt. Die Zusammensetzung der Reaktion ist in Tabelle 3.8 angegeben.

Ingredienzien	Menge
dsDNA-Oligo	200 ng
10X Klenow-Puffer	2,5 µl
dCTP, dGTP, dTTP	250 µM
α[ <sup>32</sup> P]dATP	40 µCi
Klenow-Fragment	1 U
ddH <sub>2</sub> O	Ad 25 µl

**Tabelle 3.8.** PCR zur Amplifizierung spezifischer cDNAs

Nach 30 min Inkubation bei 30°C wurde das markierte Fragment mit dem „*QIAquick Nucleotide Removal*“-Kit (Qiagen) von freien Nukleotiden getrennt und die Strahlungsintensität im Szintillationszähler bestimmt.

### **3.14. Biochemische Methoden**

#### **3.14.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

Die kolorimetrische Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in Zelllysaten erfolgte nach der Bradford-Methode. Dafür wurde das Bradford-Reagenz-Konzentrat (Biorad) 1:5 mit Wasser verdünnt. Zu 1 ml dieser Messlösung wurden in der Regel 2-4 µl des Zellextraktes gegeben und die Extinktion bei 595 nm in einem Photometer gemessen. Zur Ermittlung absoluter Proteinkonzentrationen wurde eine Eichkurve herangezogen, die mit bekannten BSA-Konzentrationen erstellt worden ist.

#### **3.14.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgte unter Verwendung eines diskontinuierlichen Gel- und Puffersystems nach dem Laemmli-Verfahren. Die Gele wurden durch Kopolymerisation von Acrylamid und des Crosslinkers N,N'-Methylenbisacrylamid in Gegenwart des Startradikal-Lieferanten Ammonium-Peroxodisulfat (APS) und des Katalysators Tetramethylethyldiamin (TEMED). Je nach experimentellen Erfordernissen wurde die Porengröße der verwendeten Gele durch Variation der Acrylamid/Bisacrylamid-Prozentigkeit angepasst. Die zu analysierenden Proben wurden mit dem entsprechenden Volumen an 6X SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und auf ein Gel aufgetragen. Zur Abschätzung des Molekulargewichts wurden vorgefärbte Molekulargewicht-Standards aufgetragen. Die Fokussierung der Proteine im Sammelgel erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V und die Separierung im Trenngel bei 150 V.

#### **3.14.3. Coomassiefärbung**

Um Aussagen über die Reinheit und Menge eines gereinigten, rekombinanten Proteins treffen zu können, wurde dieses zusammen mit einer BSA-Verdünnungsreihe einer SDS-PAGE unterzogen und die elektrophoretisch getrennten Proteine mit Hilfe der Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Hierzu wurde das Gel für 30-60 min mit der „*Imperial Protein Staining*“-Lösung (modifizierte kolloidale Coomassie-Färbung, Pierce) angefärbt und anschließend die Hintergrundfärbung durch Waschen mit Wasser entfernt.

### 3.14.4. Westernblot

Vor dem immunologischen Nachweis erfolgte ein Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf PVDF-Membranen. Der Transfer wurde im sog. „*semi dry*“-Verfahren unter Verwendung einer speziellen Blotting-Apparatur (PHASE) durchgeführt. Hierzu wurden das PAA-Gel und ein Methanol-aktiviertes Membranstück in seiner Größe für 10 min im Transferpuffer geschwenkt. Anschließend wurde ein Stapel aus drei, in Transferpuffer getränkten, Filterpapieren (Whatman 3MM) auf die Kathode der horizontalen Blotting-Apparatur gelegt. Darauf folgten das PAA-Gel, die Membran und schließlich drei weitere, in Transferpuffer getränkte, Filterpapiere. Nach dem Aufbringen der Anodenplatte erfolgte der Elektrotransfer von Proteinen für 1 h bei einer konstanten Stromstärke von 70 mA pro Gel.

### 3.14.5. Immunologischer Proteinnachweis

Der Nachweis eines bestimmten Proteins auf der Membran erfolgte mit Hilfe eines antigenspezifischen Primärantikörpers und eines Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörpers, der die Fc-Region des Primärantikörpers erkennt. Nach dem Elektrotransfer wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran durch einstündiges Schwenken im Blockierungspuffer abgesättigt. Die Bindung des im Antikörper-Verdünnungspuffer verdünnten Primärantikörpers erfolgte in der Regel über Nacht bei 4°C. Durch fünfmaliges Waschen für jeweils 5 min wurde der Überschuss an nicht gebundenem Primärantikörper entfernt und die Membran für 1 h mit dem im Antikörper-Verdünnungspuffer verdünnten Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen (5 X 5 min) wurde der Blot zur Detektion der Peroxidaseaktivität für 1 min in der HRP-Substratlösung (10 ml ECL-Lösung A, 1 ml ECL -Lösung B, 3 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) geschwenkt und einem Röntgenfilm exponiert (Biorad). Nach dem Ablösen der Antikörper durch Inkubation in einem Stripping-Puffer bei 60°C für 40 min kann die Membran erneut verwendet werden.

### 3.14.6. Bakterielle Expression rekombinanter Proteine

IKK $\gamma$ , PIASy sowie die PIASy-Deletionsmutanten wurden als Strep-Tag-Fusionsproteine in *E.coli* BL21(DE3)pLysS exprimiert. Zum Ansetzen der Expressionskultur wurden 500 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) mit 5 ml einer Vorkultur transformierter BL21 inokuliert und bei 37°C sowie 225 rpm solange geschüttelt, bis die Zelldichte eine OD<sub>550nm</sub> von 0,5-0,6 erreicht hat. Die Expression der rekombinanten Proteine wurde durch Zugabe von

Anhydrotetrazyklin (AHT) (200 ng/ml Endkonzentration) induziert und die Expressionskulturen bei 30°C und 225 rpm für weitere 6 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und in 15 ml *E.coli*-Lysepuffer (150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; Complete Protease Inhibitor Cocktail; 0,4 mM Pefabloc) resuspendiert. Der Aufschluss der Bakterienzellen erfolgte durch Ultraschallbehandlung (0,8 Zyklus; 80 % Intensität, 5x 45 sec) auf Eis. Die Bakterienlysate wurden durch Ultrazentrifugation bei 4°C und 30000 xg von Zelltrümmern befreit und die geklärten Zentrifugationsüberstände für die Reinigung der Proteine verwendet.

### 3.14.7. Expression rekombinanter Proteine in Sf9-Zellen

PARP-1 wurde als Strep-Tag-Fusionsprotein in Sf9-Zellen exprimiert. Dabei kam das *Bac-to-Bac* Baculovirus-Expressionssystem (Invitrogen) zum Einsatz. Sf9-Zellen sind Insektenzellen, die dem Ovargewebe von *Spodoptera frugiperda* (Nachtfalterart) entnommen wurden und sich hervorragend zur Expression rekombinanter Proteine mit hohem Molekulargewicht eignen. Um das Protein von Interesse in Sf9-Zellen zu exprimieren, werden diese mit rekombinanten Baculoviren infiziert. Das Genom der Baculoviren wird durch rekombinative Techniken so verändert, dass es für das heterologe Protein kodiert.

Sf9-Zellen wurden in Spinnerflaschen unter permanentem Rühren (75 rpm) bei 25,5°C im EX-Cell 420 Serum-freien Insektenzell-Medium (SAFC Biosciences) kultiviert. Durch regelmäßiges Verdünnen wurden die Zellen bei einer Dichte zwischen  $0,5 \times 10^6$  und  $2 \times 10^6$  Zellen/ml gehalten. Zur Proteinexpression wurden 300 ml Sf9-Zellen bei einer Dichte von  $1,5-2 \times 10^6$  Zellen/ml mit 4 ml PARP-1-Baculovirus (zur Verfügung gestellt von Annette Becker) infiziert und weiter kultiviert. 96 h nach Infektion wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und in 15 ml Insektenzell-Lysispuffer (10 mM Tris-HCl (pH 7,5); 130 mM NaCl; 0,2 % Triton X-100; 10 mM NaF; 10 mM  $\text{Na}_3\text{PO}_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ; 10 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ; 1 mM DTT; Complete Protease Inhibitor Cocktail; 0,4 mM Pefabloc ) aufgenommen und in einem Dounce-Homogenisator durch 10 Auf- und Abbewegungen mit Pistill B lysiert. Das Lysat wurde bei 4°C und 30000xg von Zelltrümmern befreit und die geklärten Zentrifugationsüberstände für die Proteinreinigung eingesetzt.

### 3.14.8. Affinitätsreinigung rekombinanter Strep-Tag-Fusionsproteine

Der 8 Aminosäuren lange Strep-Tag (WSHPQFEK) bindet in der Biotin-Bindungstasche des Strep-Tactin, einer modifizierten Form von Streptavidin. Nach Immobilisierung von Strep-Tactin an einer Polymermatrix können Strep-markierte Proteine durch

Affinitätschromatographie gereinigt werden. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgt durch Konkurrenz mit D-Desthiobiotin.

Als Affinitätsmaterial für die Proteinreinigung diente Strep-Tactin-Sepharose (IBA BioTAGnology). 300 µl Strep-Tactin-Sepharose (Bettvolumen) wurden in Poly-Prep-Chromatographie-Säulen (0,8x4 cm, Bio-Rad) mit dem Puffer äquilibriert, der für die Lyse der Zellen verwendet wurde (*E.coli*- bzw. Insektenzell-Lysispuffer). Die geklärten Zentrifugationsüberstände, die das rekombinante Protein enthalten, wurden in der Säule mit Strep-Tactin-Sepharose für 2 h unter Rotation bei 4°C inkubiert. Nach dem Absetzen der Affinitätsmatrix wurde dreimal mit dem entsprechenden Lysispuffer gewaschen. Die Elution des rekombinanten Proteins erfolgte mit 5 mM D-Desthiobiotin gelöst im Lysispuffer (6-fache Elution mit 300 µl). Die Konzentration und Reinheit der eluierten Proteine wurde nach SDS-PAGE durch Coomassie-Färbung bestimmt. Die Fraktionen mit der höchsten Reinheit und Konzentration wurden mit Glycerin (Endkonzentration 15 %) versetzt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

### **3.14.9. (Ko)-Immunpräzipitationen**

Immunpräzipitationen beruhen auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion. Durch Einsatz von Protein-A- bzw. Protein-G-Sepharose, können Protein-Antikörper-Komplexe aus der Lösung gefällt und angereichert werden. Wird ein Protein durch Immunpräzipitation aus Proteingemischen bzw. Zellysaten isoliert, können bei geeigneten Pufferbedingungen assoziierte Bindungspartner koimmunoprecipitiert werden. Durch nachfolgende SDS-PAGE und Westernblot können Protein-Protein-Interaktion analysiert werden.

Die hier durchgeführten Koimmunoprecipitationsstudien betreffen z.T. Kernproteine wie z.B. PARP-1, PIASy und ATM. Um eine effektive Extraktion von Kernproteinen sicherzustellen, wurden die Zellen in einem Hochsalz-Lysispuffer (20 mM Tris-HCl (pH 7,9); 25 % Glycerol; 0,42 M NaCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM EDTA; 0,5 mM DTT; Protease Inhibitor Cocktail; 0,4 mM Pefabloc; 10 mM NaF; 20 mM β-Glycerophosphat; 300 µM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) lysiert. Sollte die PARP-Aktivität nach der Lyse der Zellen gehemmt bleiben, wurde 10 mM 3-AB dem Lysispuffer zugesetzt. Nach 20-30 min Inkubation auf Eis wurden die Lysate mit einem Verdünnungspuffer (gleiche Zusammensetzung wie Hochsalz-Lysispuffer, nur kein NaCl) auf eine NaCl-Konzentration von 150 mM eingestellt. Durch physiologische Salzkonzentration sollte eine effektivere Koimmunoprecipitation von Bindungspartnern gewährleistet werden. Das unlösliche Material wurde abzentrifugiert (10 min, 14000 rpm,

4°C) und der Überstand (ca. 2 mg Gesamtproteinmenge) zur Abtrennung unspezifisch bindender Komponenten ohne Zugabe des Antikörpers 30 Minuten bei 4°C mit 40 µl Protein G/A-Sepharose inkubiert. Die Sepharose wurde anschließend durch Zentrifugation entfernt (1 min, 1000 rpm, 4°C). Der gereinigte Extrakt wurde mit 2 µg des Antikörpers und 20 µl Protein G/A-Sepharose versetzt und die Immunopräzipitation für 4 h bei 4°C unter Rotation durchgeführt. Nach der Bindungsreaktion wurde die Sepharose abzentrifugiert und viermal mit eiskaltem Waschpuffer (20 mM Tris-HCl (pH 7,9); 25 % Glycerol; 150 mM NaCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 0,4 mM Pefabloc) gewaschen. Anschließend wurde die Sepharose in 12 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen, für 3 min bei 95°C erhitzt und die erhaltenen Proben nach SDS-PAGE durch Westernblot analysiert.

#### **3.14.10. Nachweis von SUMO- und Ubiquitin-modifizierten Proteinen**

Für den Nachweis von SUMO- bzw. Ubiquitin-Konjugaten wurde das Protein von Interesse immunopräzipitiert und die Modifikation mit einem entsprechenden Antikörper im Westernblot detektiert. Dabei ist es entscheidend sicherzustellen, dass ausschließlich das zu untersuchende Protein und nicht dessen Interaktionspartner immunopräzipitiert werden. Um dies zu gewährleisten, werden die Zellen in einem denaturierenden Ubiquitinierungs-Lysispuffer (50 mM Hepes (pH 7,5); 150 mM NaCl; 0,5 % Nonidet P-40; 3 mM EDTA; 10 % Glycerol; 0,1 % SDS; 5 mM NEM; 1 mM DTT; Protease Inhibitor Cocktail; 0,4 mM Pefabloc) lysiert und dadurch nicht-kovalente Protein-Protein-Interaktionen aufgehoben. Um die oft transienten Proteinmodifikationen mit SUMO bzw. Ubiquitin zu stabilisieren, wird dem Lysispuffer NEM (N-Ethylmaleimide) zugesetzt. NEM alkyliert SH-Gruppen von Proteinen und inhibiert dadurch unter anderem auch Deubiquitinasen. Die erhaltenen Lysate wurden analog zu 3.14.9 einer Immunopräzipitation unterzogen. Nach SDS-PAGE und Westernblotting wurde die Sumoylierung bzw. Ubiquitinierung des jeweiligen Proteins mit einem entsprechenden Antikörper nachgewiesen.

#### **3.14.11. Protein-Protein-Interaktionsstudien *in vitro***

Für die Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen rekombinanten Proteinen *in vitro* wurde gereinigtes Strep-markiertes IKK $\gamma$ , PIASy und PARP-1 verwendet. Jeweils 3 µg der zu untersuchenden Bindungspartner wurden in 400 µl IP-Puffer (150 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl, pH 7,9; 10 % Glycerol; 0,1 % NP-40) für 90 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 2 µg eines Antikörpers, der gegen einen der Interaktionspartner gerichtet ist, zugegeben. Die Antigen-Antikörper-Reaktion wurde für 90 min bei 4°C

durchgeführt und die Immunkomplexe durch Zugabe von 20 µl Protein-A/G-Sepharose gefällt. Die weitere Aufbereitung der Proben erfolgte analog zum Protokoll für eine Koimmunopräzipitation (Abschnitt 3.14.9).

### 3.14.12. Poly-(ADP-Ribose)-Bindungsstudien

Zur Synthese von Poly-ADP-Ribose wurde eine PARP-1-Automodifikationsreaktion durchgeführt. Die Reaktion wurde im PAR-Synthesepuffer (100 mM Tris-HCl pH7,9; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT) nach folgendem Schema zusammengesetzt (Tabelle 3.9)

Ingredienzien	Menge
rek. PARP-1	5 µg
NAD <sup>+</sup>	150 µM
[ <sup>32</sup> P]-NAD <sup>+</sup>	37,5 µCi
gescherte DNA	20 ng/µl
Reaktionspuffer	Add 500 µl

**Tabelle 3.9.** PARP-1-Automodifikationsreaktion

Die Reaktion wurde für 30 min bei 25°C durchgeführt und anschließend die automodifizierte PARP-1 durch Zusatz von eiskalter Trichloressigsäure (Endkonzentration 20 % (v/v)) bei 14000 rpm für 10 min präzipitiert. Das Pellet wurde einmal mit 5 %-iger (v/v) Trichloressigsäure und zweimal mit Diethylether gewaschen. Das getrocknete Präzipitat wurde in 300 µl 1 M KOH/ 50 mM EDTA gelöst und die Poly-ADP-Ribose durch eine zweistündige Inkubation bei 60°C von PARP-1 abgespalten. Anschließend wurde die Lösung durch Zugabe von 6 M HCl neutralisiert und mit Tris-HCl pH 7,9 (12 mM Endkonzentration) gepuffert. Das in der Reaktion enthaltene PARP-1-Enzym wurde durch eine zweistündige Behandlung mit Proteinase-K (0,1 mg/ml Endkonzentration) bei 37°C hydrolysiert. Die Poly-ADP-Ribose wurde zweimal mit 350 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und in 10 ml TBST-Puffer aufgenommen.

Zur Untersuchung von Protein-PAR- bzw. Peptid-PAR-Interaktionen wurden 50 pmol des jeweiligen rekombinanten Proteins bzw. 1 nmol des synthetischen Peptids mit Hilfe einer Slot-Blot-Apparatur auf einer Nitrozellulosemembran (Protran BA 79; Porendurchmesser 0,1 µm; Sigma) immobilisiert. Durch einstündige Inkubation der Membran mit 5 % Milchpulver in TBST wurden die unspezifischen Bindungsstellen abgesättigt. Anschließend wurde die Membran mit Poly-ADP-Ribose in TBST für 1 h bei RT inkubiert. Das nicht gebundene Polymer wurde durch zweimaliges Waschen der Membran mit TBST, gefolgt von einem Waschschrift mit 500 mM NaCl in TBST, entfernt. Nach dem Trocknen der Membran

wurde die spezifisch gebundene, radioaktiv markierte Poly-ADP-Ribose durch Autoradiographie detektiert.

### 3.14.13. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

EMSA dient dem Nachweis spezifischer Protein-DNA-Interaktionen. Dabei werden radioaktiv markierte DNA-Oligonukleotide (Abschnitt 3.13.12) eingesetzt, welche die Erkennungssequenz eines DNA-bindenden Proteins enthalten. Im elektrischen Feld wandert die DNA-Sonde durch ein natives Polyacrylamidgel zur Anode. Die Bindung eines Proteins resultiert in einem retardierten Migrationsverhalten der DNA-Sonde und kann durch Autoradiographie visualisiert werden.

Zur Präparation von Gesamtzellextrakten wurden die Zellen in einem Hochsalz-Puffer (20 mM HEPES pH7,9; 350 mM NaCl; 20 % Glycerol; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM EDTA; 0,1 mM EGTA; 1 % NP-40) lysiert. Die Zusammensetzung der Bindungsreaktionen ist in Tabelle 3.10 angegeben.

Ingredienzien	Menge
Gesamtprotein	2-8 µg
radioaktiv-markiertes Oligonukleotid	25.000 cpm
BSA	2 µg
DTT	2 mM
Poly-(dI-dC)	100 ng
2x EMSA-Puffer (40 mM HEPES-NaOH pH 7,9; 120 mM KCl; 8 % Ficoll)	10 µl
ddH <sub>2</sub> O	Ad 20 µl

**Tabelle 3.10.** EMSA-Bindungsansatz

Die Bindungsansätze wurden für 30 min bei RT inkubiert und auf ein natives Polyacrylamidgel (5 % Polyacrylamid in TBE) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit 25 mA in TBE als Laufpuffer. Anschließend wurde das Gel auf Filterpapier getrocknet und mittels Autoradiographie analysiert.

### 3.14.14. *In vitro*-Immunkomplex-Kinasereaktionen

Durch *in vitro*-Immunkomplex-Kinaseassays wurde die Fähigkeit der katalytisch aktiven IKKs ermittelt, rekombinantes GST-IκBα (1-53) zu phosphorylieren. Dazu wurde der IKK-Komplex aus den zu untersuchenden Zellen nach deren Lyse mit Kinase-Lysis-Puffer (50 mM HEPES pH 7,5; 150 mM NaCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM EDTA; 1 % Triton X-100; 10 %

Glycerin; 1 mM DTT; 10 mM NaF; 80 mM  $\beta$ -Glycerophosphat; 100  $\mu$ M  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ; 0,4  $\mu$ M Pefabloc; Complete Proteaseinhibitor Cocktail) mit Hilfe eines IKK $\gamma$ -Antikörpers immunopräzipitiert. Anschließend wurde die Protein-A-Sepharose zweimal mit Kinase-Lysis-Puffer und einmal mit Kinase-Reaktionspuffer (20 mM HEPES pH 7,5; 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 20 mM  $\beta$ -Glycerophosphat; 50  $\mu$ M  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ; 1 mM DTT und 20  $\mu$ M ATP) gewaschen. Die auf den Sepharose-Beads vorliegenden Kinasen wurden in 15  $\mu$ l Kinase-Reaktionspuffer, das 0,5  $\mu$ g GST-I $\kappa$ B $\alpha$  (1-53) und 3  $\mu$ Ci [ $^{32}$ P]- $\gamma$ ATP enthielt, aufgenommen. Die Reaktion wurde für 20 min bei 37°C durchgeführt und anschließend durch Zugabe von SDS-Probenpuffer abgestoppt. Die Proteine wurden durch 5-minütiges Erhitzen auf 95°C von den Beads abgelöst und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Das phosphorylierte und dadurch radioaktiv markierte GST-I $\kappa$ B $\alpha$  (1-53) wurde durch Autoradiographie visualisiert.

### **3.14.15. Zellfraktionierung**

Zur Isolation von Zellbestandteilen und Organellen wurden verschiedene Zellfraktionierungstechniken eingesetzt.

#### **Präparation von Zytoplasma- und Kernextrakten nach der NP-40 Methode**

Die Zellen einer 100-mm Schale wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und durch Abschaben in 1 ml PBS geerntet. Nach dem Pelletieren (1.300 rpm, 2 min, 4°C) wurden die Zellen in 1 ml Puffer A (10 mM Tris-HCl (pH 7,9); 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 10 mM KCl; 0,5 mM DTT; 0,4 mM Pefabloc) aufgenommen und für 15 min auf Eis geschwollen. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und in 250  $\mu$ l Puffer A, das mit NP-40 versetzt wurde, aufgenommen. Die Konzentration von NP-40 richtete sich nach dem Zelltyp (Hela: 0,2 %; HepG2: 0,25 %; MEFs: 0,625 %). Die Zellsuspension wurde für 10 sec gevortext und für 15 sec bei 8.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde als Zytoplasma-Extrakt abgenommen. Das Zellkernpellet wurde einmal mit Puffer A (ohne NP-40) gewaschen und Kernproteine mit 80  $\mu$ l Puffer B (20 mM Tris-HCl (pH 7,9); 25 % Glycerol; 0,42 M NaCl; 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,2 mM EDTA; 0,5 mM DTT; Protease Inhibitor Cocktail; 0,4 mM Pefabloc; 10 mM NaF; 20 mM  $\beta$ -Glycerophosphat; 300  $\mu$ M  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) extrahiert. Unlösliche Kernbestandteile wurden durch Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C abgetrennt und der Überstand als Kernextrakt abgenommen.

**Präparation von Zytoplasma-, Membran- und Kernextrakten durch mechanische Zerstörung der Plasmamembran**

Die Zellen einer 150-mm Schale wurden mit eiskaltem Puffer A gewaschen und durch Abschaben in 400 µl Puffer A geerntet. Die Zellen wurden in einem Dounce-Homogenisator durch 35 Auf- und Abbewegungen mit Pistill B aufgeschlossen. Um Zellkerne zu pelletieren, wurde die Suspension bei 1.300 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand, der Zytoplasma und Membran-Vesikel enthält, wurde abgenommen und bei 100.000 xg und 4°C in einer Ultrazentrifuge für 1 h zentrifugiert. Das Kernpellet wurde dem NP-40-Verfahren entsprechend weiterverarbeitet. Nach der Ultrazentrifugation erhält man im Überstand das Zytoplasma-Extrakt und im Pellet Membran-Vesikel. Das Pellet wurde in Puffer B (versetzt mit 0,5 % NP-40 und 0,1 % SDS) aufgenommen und Membranproteine unter Schütteln bei 4°C für 30 min solubillisiert. Unlösliche Membranbestandteile wurden durch Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C abgetrennt und der Überstand als Membran-Extrakt abgenommen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Regulation der IKK $\gamma$ -Sumoylierung durch eine nukleäre PARP-1-PIASy-Signalachse

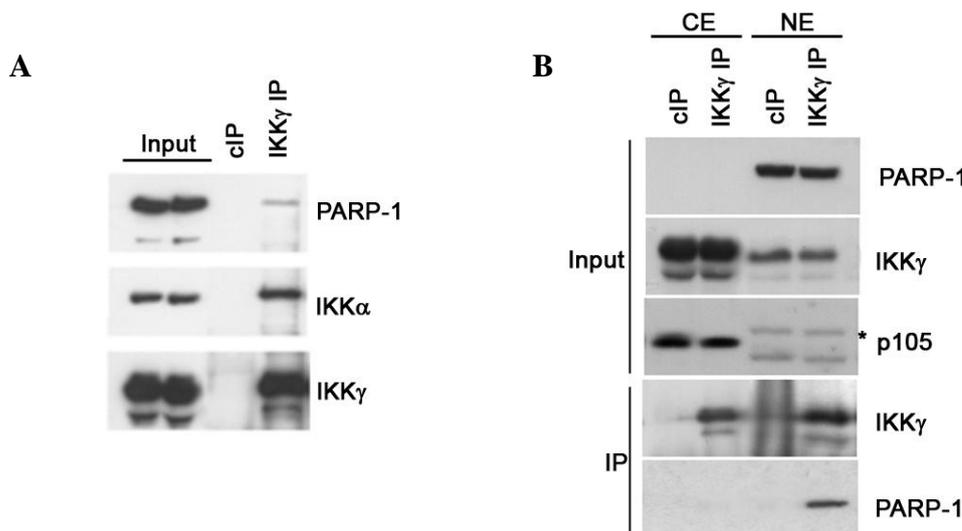
#### 4.1.1. Identifikation von PARP-1 als IKK $\gamma$ -Interaktionspartner

Die posttranslationalen Modifikationen von IKK $\gamma$  (Sumoylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung; siehe Abschnitte 1.3.3-1.3.5) werden als zentrale regulatorische Ereignisse im Verlauf der DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalkaskade betrachtet. Der Mechanismus der Signalweiterleitung von DNA-Läsionen zu IKK $\gamma$ -Modifikationen und die daran beteiligten Regulatorproteine sind jedoch weitestgehend unbekannt.

Mit dem Ziel neue Interaktionspartner von IKK $\gamma$  zu identifizieren, die an den oben angesprochenen Prozessen beteiligt sein könnten, wurden Pull-Down-Experimente durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde rekombinantes, gereinigtes strep-IKK $\gamma$  an einer Streptactin-Affinitätsmatrix immobilisiert und Lysate verschiedener Zelllinien als Quelle von möglichen Interaktionspartnern verwendet. Im Rahmen mehrerer unabhängig durchgeführter Interaktionsstudien wurde PARP-1 wiederholt als IKK $\gamma$ -assoziiertes Protein identifiziert (Daten nicht gezeigt). PARP-1 fungiert als ein DNA-Schadenssensor und wichtiger Regulator zellulärer DNA-Schadensreaktionen (Abschnitt 1.4.3). Im Folgenden wurde deshalb untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen PARP-1 und der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch DNA-Schäden besteht.

Um die *in vitro* nachgewiesene IKK $\gamma$ -PARP-1-Assoziation zu verifizieren, wurden Koimmunopräzipitationsanalysen (Ko-IPs) mit endogenen Proteinen angestellt. Dazu wurde IKK $\gamma$  aus HeLa-Zellextrakten mit einem Antikörper präzipitiert und das Präzipitat mittels Westernblot auf die Anwesenheit von PARP-1 untersucht. Wie in Abbildung 4.1A demonstriert, konnte PARP-1 spezifisch mit IKK $\gamma$  koimmunopräzipitiert werden, während die entsprechende Kontrollreaktion kein PARP-1-Signal lieferte. Koimmunopräzipitationsanalysen mit Zytoplasma- und Kernextrakten zeigen, dass die PARP-1-IKK $\gamma$ -Interaktion ausschließlich im Nukleus stattfindet (Abb. 4.1B).

Als regulatorische Untereinheit des IKK-Komplexes ist IKK $\gamma$  essentiell für den durch DNA-Strangbrüche induzierten NF- $\kappa$ B-Signalweg. Die nachgewiesene nukleäre Interaktion von IKK $\gamma$  mit PARP-1 liefert, unter Berücksichtigung der Tatsache, dass PARP-1 ein DNA-Schaden-abhängiges Enzym ist, einen korrelativen Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von PARP-1 an der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch genotoxischen Stress.

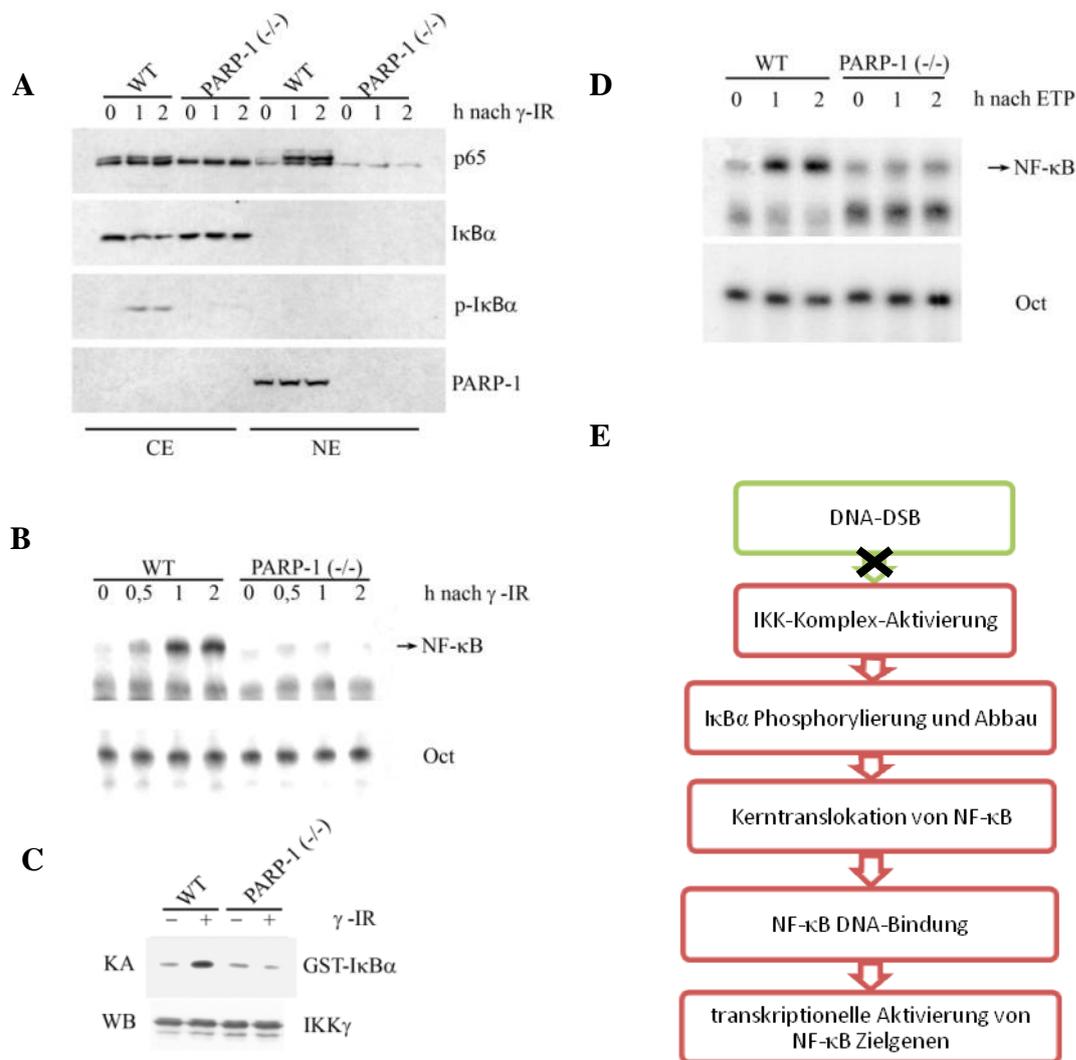


**Abbildung 4.1. PARP-1 bildet einen nukleären Komplex mit IKK $\gamma$ .**

(A) IKK $\gamma$  wurde mit einem spezifischen Antikörper aus HeLa-Zellextrakten immunopräzipitiert. Als Negativkontrolle wurde eine Immunopräzipitation mit einem Isotyp-gleichen Antikörper mitgeführt. Die Anwesenheit von IKK $\gamma$  und der koimmunopräzipitierten PARP-1 im Immunopräzipitat wurde mittels Westernblot-Analyse bestätigt. (B) Zytoplasma- (CE) und Kernextrakte (NE) von HeLa-Zellen wurden analog zu (A) einer IKK $\gamma$ -Immunopräzipitation unterworfen. Der Nachweis von PARP-1 (Kern-Markerprotein) und p105 (Zytoplasma-Markerprotein, Asterisk) im Input schließt eine Kreuzkontamination der Extrakte aus. Obwohl IKK $\gamma$  sowohl aus dem Zytoplasma- als auch aus dem Kernextrakt erfolgreich immunopräzipitiert werden konnte, erfolgte die Koimmunopräzipitation von PARP-1 nur aus dem Kernextrakt.

#### 4.1.2. Selektive Rolle von PARP-1 für die Induktion des NF- $\kappa$ B-Signalwegs nach DNA-Schädigung

Im Rahmen einer vergleichenden „*loss-of-function*“-Studie mit embryonalen Fibroblasten (MEFs), die aus Wildtyp- (WT) bzw. PARP-Knockout-Mäusen isoliert worden sind, sollte geklärt werden, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen PARP-1- und IKK-Aktivierung durch DNA-Strangbrüche besteht. Dazu wurden WT- und PARP-1<sup>-/-</sup>-Zellen  $\gamma$ -Strahlen ( $\gamma$ -IR) ausgesetzt und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung Kern- und Zytoplasmaextrakte präpariert (Abb. 4.2A). Eine Stunde nach  $\gamma$ -Bestrahlung konnte im Zytoplasmaextrakt von WT-Zellen eine Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  an Serinen 32 und 36 des Degradationsmotivs und ein Abbau des NF- $\kappa$ B-Inhibitors beobachtet werden. Das dadurch freigesetzte NF- $\kappa$ B transloziert in den Zellkern, wie exemplarisch für die NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 demonstriert wurde.



**Abbildung 4.2. PARP-1 ist für die Aktivierung des IKK-Komplexes im DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalweg essentiell.** (A) WT- und PARP-1<sup>-/-</sup>-MEFs wurden einer  $\gamma$ -Strahlendosis von 80 Gy ausgesetzt und zu verschiedenen Zeiten nach Stimulation einer Zellfraktionierungsprozedur (NP-40-Methode) unterworfen. Die erhaltenen Zytoplasma-(CE) und Kernextrakte (NE) wurden nach SDS-PAGE mit Antikörpern gegen p65, I $\kappa$ B $\alpha$ , phospho-I $\kappa$ B $\alpha$  und PARP-1 im Westernblot analysiert. Das PARP-1-Signal konnte nur in Kernextrakten von WT-MEFs detektiert werden. Dies bestätigt die hohe Trennungsqualität der Zellfraktionierung und den Genotyp der PARP-1<sup>-/-</sup>-MEFs. (B) Die  $\gamma$ -IR-induzierte DNA-Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B in Kernextrakten wurde mittels EMSA analysiert. Als Kontrolle wurde die DNA-Bindung von Oct1 an die entsprechende DNA-Probe analysiert. Freie DNA ist hier und in anderen EMSA-Experimenten nicht gezeigt. (C) IKK-Immunkomplex-Kinase-Assay: der IKK-Komplex wurde mit einem IKK $\gamma$ -Antikörper aus Extrakten von unbehandelten oder bestrahlten WT- bzw. PARP-1<sup>-/-</sup>-MEFs immunopräzipitiert. Als Substrat für IKK-Kinasen (IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ ) diente rekombinantes GST-I $\kappa$ B $\alpha$  (1-53). Westernblot mit IKK $\gamma$ -Antikörper bestätigt äquivalenten Einsatz an Lysatmengen für jede Kinasereaktion. (D) WT- und PARP-1<sup>-/-</sup>-MEFs wurden mit Etoposid (ETP) behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlung wurden Kernextrakte präpariert und NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität durch EMSA ermittelt. Oct-EMSA diente als Kontrolle. (E) Die molekularen Schritte der NF- $\kappa$ B-Aktivierung sind schematisch dargestellt. Das Kreuz kennzeichnet den Prozess in der Signalkaskade, der in Abwesenheit von PARP-1 beeinträchtigt ist.

Wie die EMSA-Analyse von Kernextrakten aus WT-MEFs aufzeigt, ist das in den Nukleus translozierte NF- $\kappa$ B in der Lage an seine Erkennungssequenz (in einem radioaktiv markierten Oligonukleotid) (Abb. 4.2B) zu binden. Bemerkenswerterweise ist die  $\gamma$ -IR-induzierte

---

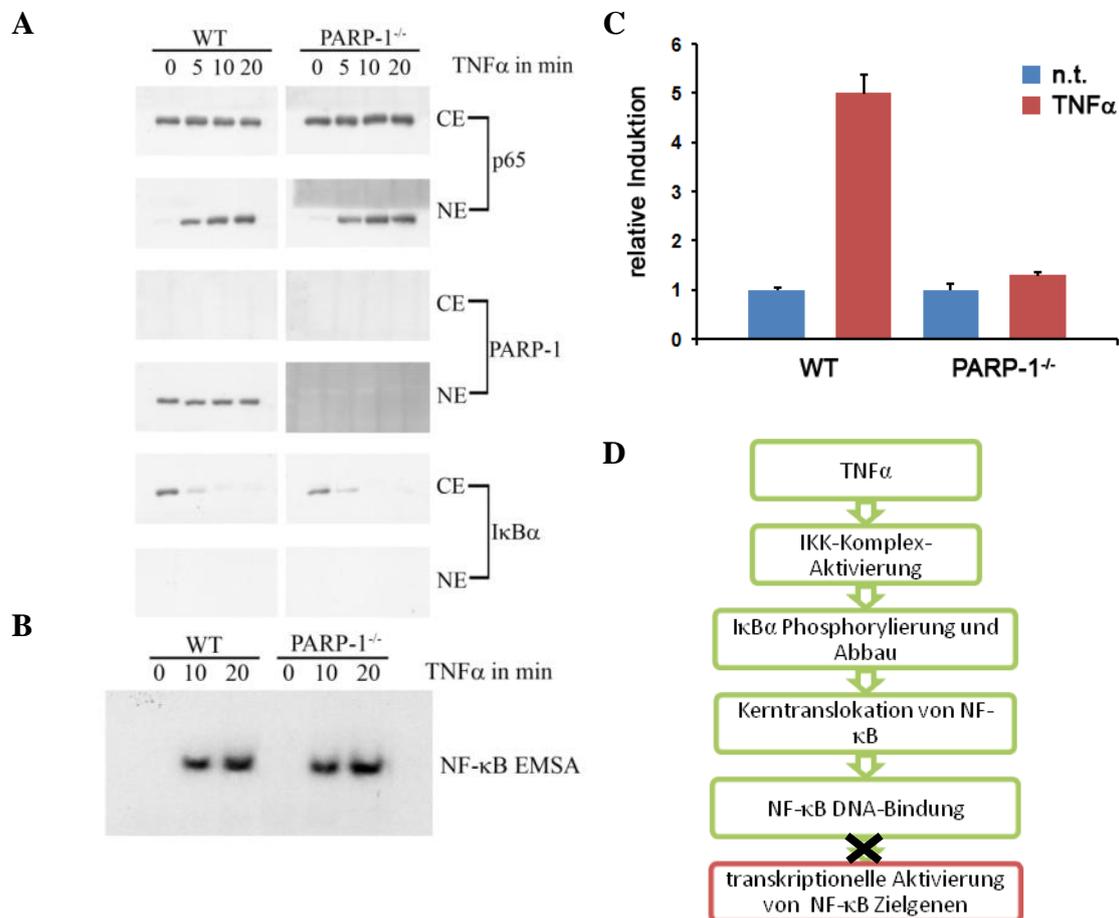
Phosphorylierung und der Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  im Zytoplasma PARP-1-defizienter Zellen beeinträchtigt (Abb. 4.2A). Demzufolge bleibt die Translokation von p65 in den Zellkern (Abb. 4.2A) und die damit verbundene Aktivierung der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindung in Abwesenheit von PARP-1 unterbunden (Abb. 4.2B). Die Hemmung des DNA-Schadengenerierten Signalflusses zu NF- $\kappa$ B in PARP-1<sup>-/-</sup>-MEFs weist auf defekte Aktivierung des IKK-Komplexes hin. Dies konnte in der Tat durch Kinase-Experimente mit immunopräzipitiertem IKK-Komplex und rekombinantem GST-I $\kappa$ B $\alpha$ (1-53) als Substrat bestätigt werden (Abb. 4.2C).

Um zu verifizieren, dass dieses Phänomen sich nicht auf die  $\gamma$ -IR-induzierte NF- $\kappa$ B-Signalkaskade beschränkt, wurden WT- und PARP-1<sup>-/-</sup>-MEFs mit dem Topoisomerase-II-Inhibitor und DSB-Induktor Etoposid behandelt und die Induktion der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindung in Lysaten dieser Zellen bestimmt. Auch unter Bedingungen der chemisch induzierten DNA-Doppelstrangbrüche erwies sich PARP-1 als essentiell für NF- $\kappa$ B-Aktivierung (Abb. 4.2D).

Im Folgenden sollte geklärt werden, ob PARP-1 ein spezifischer Regulator der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch genotoxischen Stress ist oder auch eine Rolle für Rezeptor-vermittelte Signalkaskaden spielt. Hierfür wurde der Einfluss von PARP-1 auf den TNF $\alpha$ -induzierten NF- $\kappa$ B-Signalweg untersucht. Sowohl in WT- als auch in PARP-1<sup>-/-</sup>-MEFs ist bereits 10 min nach TNF $\alpha$ -Stimulation ein kompletter I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau im Zytoplasma und eine Translokation der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 in den Zellkern sichtbar (Abb. 4.3A). Das EMSA-Experiment belegt, dass die TNF $\alpha$ -induzierte DNA-Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B in WT- und PARP-1<sup>-/-</sup>-MEFs gleich stark ausgeprägt ist (Abb. 4.3B). Folglich hat PARP-1 keinen Einfluss auf die Aktivierung des IKK-Komplexes durch TNF $\alpha$  und somit auf Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  und die Induktion der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindeaktivität (Abb. 4.3D).

Um zu klären, ob PARP-1 regulierend in den Prozess der NF- $\kappa$ B-abhängigen Transkription eingreift, wurde die Aktivatorfunktion von NF- $\kappa$ B nach TNF $\alpha$ -Stimulation von WT- und PARP-1<sup>-/-</sup>-MEFs mit Hilfe eines Dual-Luciferase-Reportergen-Systems untersucht (Abb. 4.3C). Interessanterweise ist die NF- $\kappa$ B-abhängige Expression des Reportergens in Abwesenheit von PARP-1 stark beeinträchtigt. Diese Beobachtung weist auf eine Koaktivatorfunktion von PARP-1 für die TNF $\alpha$ -induzierte NF- $\kappa$ B-vermittelte Transkription hin und steht im Einklang mit den Ergebnissen von Hassa *et al.* [140].

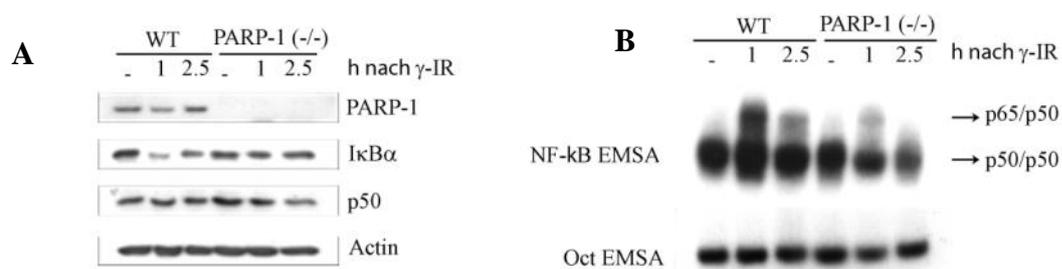
Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass PARP-1 und damit vermutlich die im Abschnitt 4.1.1 demonstrierte IKK $\gamma$ -PARP-1-Interaktion eine spezifische Funktion für die Aktivierung des IKK-NF- $\kappa$ B-Systems durch DNA-Strangbrüche ausübt. (Abb. 4.2E).



**Abbildung 4.3. Im TNF $\alpha$ -induzierten NF- $\kappa$ B-Signalweg spielt PARP-1 eine Rolle unterhalb des IKK-Komplexes auf der Ebene der Transkription.** WT- und PARP-1<sup>-/-</sup>-MEFs wurden für verschiedene Zeiten mit TNF $\alpha$  stimuliert und anschließend einer Zellfraktionierungsprozedur (NP-40-Methode) unterworfen. (A) Die erhaltenen Zytoplasma-(CE) und Kernextrakte (NE) wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung mit Antikörpern gegen p65, I $\kappa$ B $\alpha$  und PARP-1 im Westernblot analysiert. Das PARP-1-Signal konnte nur in Kernextrakten von WT-MEFs detektiert werden. Dies bestätigt die hohe Trennungsqualität der Zellfraktionierung und den Genotyp der PARP-1<sup>-/-</sup>-MEFs. (B) Die TNF $\alpha$ -induzierte DNA-Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B in Kernextrakten wurde mittels EMSA analysiert. (C) WT- und PARP-1<sup>-/-</sup>-MEFs wurden mit dem für *firefly*-Luziferase kodierenden NF- $\kappa$ B-Reportergen-Vektor pGL2-6 $\kappa$ B und dem für *renilla*-Luciferase kodierenden Kontrollvektor pRL-TK transfiziert. Jedes Transfektionsexperiment wurde in dreifacher Ausführung angesetzt. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion lysiert und die Aktivitäten der beiden Luciferasen durch das Dual-Luciferase-Verfahren gemessen. Der Quotient aus der *firefly*- und der *renilla*-Luciferase-Aktivität ergab für jede Messbedingung eine normierte Luciferase-Aktivität, deren Wert die transkriptionelle Aktivität von NF- $\kappa$ B reflektiert. Die aus der Dreifachbestimmung resultierende mittlere normierte Luciferase-Aktivität von unstimulierten WT-Zellen wurde auf eins gesetzt und alle anderen Werte darauf bezogen. Die Fehlerbalken wurden aus der einfachen Standardabweichung von normierten Luciferase-Aktivitäten der drei unabhängigen Transfektionsexperimente berechnet. (D) Die molekularen Schritte der NF- $\kappa$ B-Aktivierung sind schematisch dargestellt. Das Kreuz kennzeichnet den Prozess in der Signalkaskade, der in Abwesenheit von PARP-1 beeinträchtigt ist.

### 4.1.3. PARP-1 ist ein zelltypspezifischer Aktivator des DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalwegs

Anhand von *in vivo*-Studien mit  $\gamma$ -bestrahlten Mäusen wurde demonstriert, dass die Induktion des NF- $\kappa$ B-Signalwegs eine bemerkenswerte Gewebe- und Zelltypselektivität besitzt. So ist die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch  $\gamma$ -IR in Zellen der Niere, der Lymphknoten, des Rückenmarks und des intestinalen Epitheliums besonders stark ausgeprägt [156, 157].

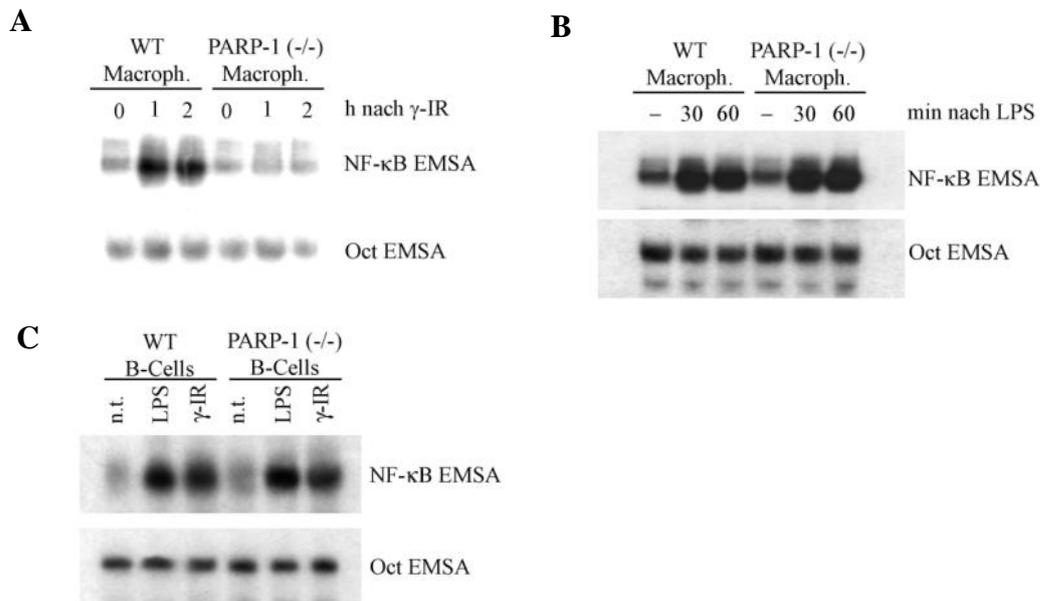


**Abbildung 4.4. NF- $\kappa$ B-Aktivierung in Dünndarm-Epithelzellen  $\gamma$ -bestrahlter Mäuse ist strikt von PARP-1 abhängig.** (A) Lebende WT- bzw. PARP-1<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden einer  $\gamma$ -Strahlendosis von 10 Gy ausgesetzt. Zu verschiedenen Zeiten nach Bestrahlung wurden die Mäuse getötet, Dünndarm-Epithelzellen (sIEC) präpariert und Proteinextrakte hergestellt. Die Proteinmengen von PARP-1, I $\kappa$ B $\alpha$ , p50 und Actin wurden im Westernblot analysiert. Die Abwesenheit des PARP-1-Signals in Extrakten aus PARP-1<sup>-/-</sup>-Mäusen bestätigt den Knockout-Genotyp. p50 -und Actin-Westernblot demonstrieren den Einsatz äquivalenter Proteinmengen in den einzelnen Proben (B) Dieselben Proteinextrakte wurden für die Analyse der NF- $\kappa$ B-Aktivierung mittels EMSA eingesetzt. sIEC verfügen über eine starke konstitutive DNA-Bindung von p50-Homodimeren und eine durch  $\gamma$ -IR induzierbare p65-p50-Bindeaktivität. Oct-EMSA diente als Kontrolle.

Um die bisher unter Zellkulturbedingungen demonstrierte Bedeutung von PARP-1 für den DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalweg *in vivo* zu verifizieren, wurden Untersuchungen an verschiedenen primären Zelltypen von Mäusen vorgenommen. Zunächst wurden WT- und PARP-1<sup>-/-</sup>-Mäuse einer Ganzkörperbestrahlung unterzogen und anschließend die Dünndarmepithelzellen (sIEC) isoliert. Die strahlungsinduzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung wurde in gewonnenen Proteinextrakten anhand der Analyse des I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbaus im Westernblot (Abb. 4.4A) und mittels EMSA (Abb. 4.4B) untersucht. Eine Stunde nach Bestrahlung zeigen sIEC von WT-Mäusen eine I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradation (Abb. 4.4A) und maximale DNA-Bindung von p65-p50 NF- $\kappa$ B-Heterodimeren (Abb. 4.4B). Im Gegensatz dazu ist die NF- $\kappa$ B-Aktivierung in sIEC aus PARP-1<sup>-/-</sup>-Mäusen stark beeinträchtigt (Abb. 4.4A, B). Folglich verhalten sich primäre Dünndarm-Epithelzellen analog zu MEF-Zellen und zeigen eine strikte Abhängigkeit der DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung von PARP-1.

Weiterhin wurden primäre B-Zellen sowie Makrophagen von WT- und PARP-1<sup>-/-</sup>-Mäusen hinsichtlich der  $\gamma$ -IR-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung mittels EMSA analysiert. In

Makrophagen erwies sich PARP-1, wie auch in MEFs und sIEC, hierfür als essenziell (Abb. 4.5A).



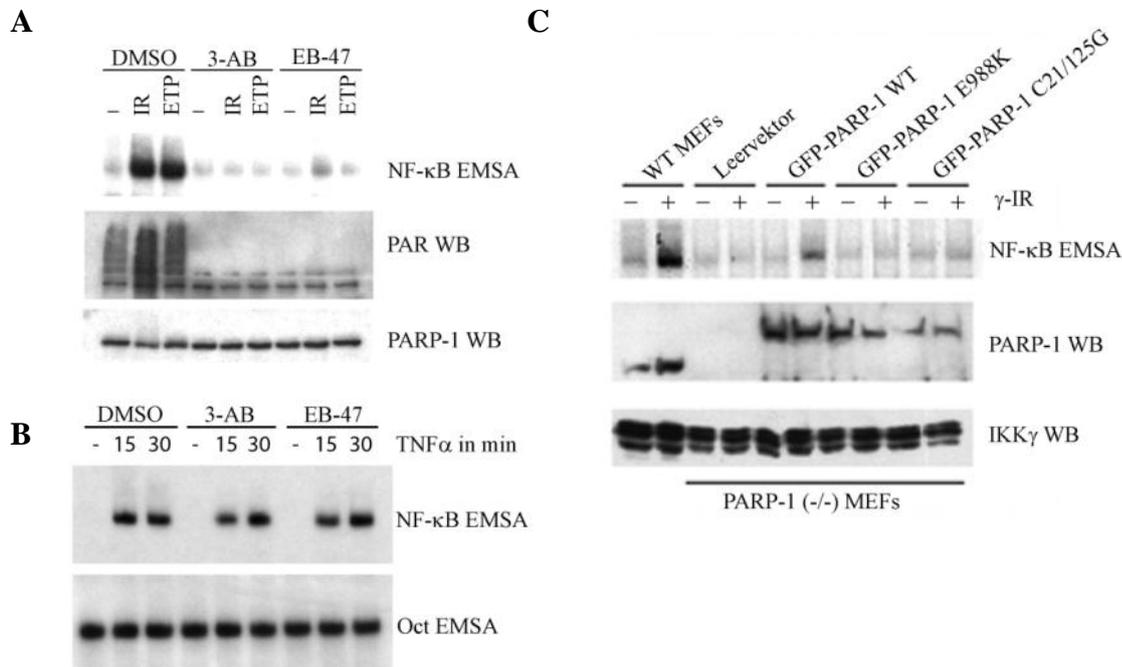
**Abbildung 4.5. Analyse der NF- $\kappa$ B-Aktivierung in primären Makrophagen und B-Zellen von WT bzw. PARP-1<sup>-/-</sup>-Mäusen.** (A) Makrophagen wurden aus Knochenmarkvorläuferzellen von WT- bzw. PARP-1<sup>-/-</sup>-Mäusen mittels M-CSF in Zellkultur differenziert. Nach  $\gamma$ -Bestrahlung der Zellen mit 10 Gy wurden zu verschiedenen Zeiten Proteinextrakte präpariert und NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch EMSA untersucht. Oct-EMSA wurde zur Kontrolle durchgeführt. (B) Makrophagen wurden für 20 min mit LPS (0,5  $\mu$ g/ml) stimuliert und wie in (A) analysiert. (C) Primäre B-Zellen wurden aus der Milz von WT- bzw. PARP-1<sup>-/-</sup>-Mäusen isoliert und für 20 min mit LPS (0,5  $\mu$ g/ml) bzw. für 2 h mit 10 Gy  $\gamma$ -IR stimuliert. Die erhaltenen Zelllysate wurden analog zu (A) analysiert.

Im Gegensatz dazu hat der Verlust von PARP-1 keinen Einfluss auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch LPS (Toll-like-Rezeptor-Signalweg) (Abb. 4.5B). Dieser Befund hebt die spezifische Rolle von PARP-1 für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung im Verlauf der zellulären DNA-Schadensantwort hervor. Interessanterweise blieb die  $\gamma$ -IR-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung in primären B-Zellen durch PARP-1-Defizienz unbeeinflusst (Abb 4.5C). Das abweichende Verhalten von B-Zellen lässt vermuten, dass hier entweder ein anderer Aktivierungsmechanismus vorliegt, oder dass innerhalb der PARP-Familie eine zelltypspezifische Redundanz (z.B. durch PARP-2) existiert.

#### 4.1.4. Die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch DNA-Schäden ist von der enzymatischen Aktivität von PARP-1 abhängig

Wie eingangs dargelegt, wird die enzymatische Aktivität von PARP-1 durch das Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen um ein Vielfaches gesteigert. Deshalb ist die Frage nach ihrer Bedeutung für die DNA-Schaden-induzierte NF- $\kappa$ B-Signalkaskade von zentralem Interesse.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden WT-MEFs entweder mit dem Lösungsmittel DMSO oder mit zwei strukturell verschiedenen PARP-1-Inhibitoren 3-Aminobenzamid (3-AB) oder EB-47 vorbehandelt. Zur Induktion von DSBs wurden die Zellen  $\gamma$ -Strahlung ausgesetzt bzw. mit dem Topoisomerase-II-Inhibitor Etoposid (ETP) inkubiert.



**Abbildung 4.6. Die Synthese von Poly-(ADP-Ribose)-Polymeren durch aktivierte PARP-1 ist entscheidend für die Induktion der NF-κB-Signalkaskade durch DNA-Strangbrüche.**

(A) WT-MEFs wurden mit dem Lösungsmittel DMSO bzw. den darin gelösten PARP-1-Inhibitoren 3-AB oder EB-47 für 90 min vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 80 Gy  $\gamma$ -bestrahlt (IR) bzw. mit Etoposid (ETP, 100  $\mu$ M) behandelt und nach 90 min lysiert. Die Induktion der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindeaktivität in gewonnenen Proteinextrakten wurde mittels EMSA bestimmt. Die Inhibition der PARP-Enzymaktivität wurde anhand der Reduktion von Gesamt-Poly-(ADP-Ribose)-Signalen (PAR) im Westernblot verifiziert. Das Auftreten des PAR-Signals in unstimulierten Zellen ist auf die Aktivierung von PARP-1 während der Zelllyse zurückzuführen. Die Visualisierung von PARP-1-Proteinmengen im Westernblot diente als Kontrolle. (B) WT-MEFs wurden mit wie in (A) mit PARP-1-Inhibitoren vorbehandelt und für verschiedene Zeiten mit TNF $\alpha$  (20 ng/ml) stimuliert. Die DNA-Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B und Oct (Kontrolle) wurde durch EMSA bestimmt. (C) PARP-1<sup>-/-</sup>-MEFs wurden mit dem Leervektor oder verschiedenen PARP-1-Expressionskonstrukten (WT, E988K: enzymatisch inaktive Mutante, C21/125G: DNA-Bindungsmutante) transient transfiziert. Die transfizierten PARP-1<sup>-/-</sup>-MEFs wurden zusammen mit WT-MEFs einer Strahlendosis von 80 Gy ausgesetzt und nach 90 min lysiert. NF- $\kappa$ B-Aktivierung wurde durch EMSA visualisiert. Die Expression von endogener PARP-1 und den ektopisch exprimierten Proteinen wurde mittels Westernblot analysiert. IKK $\gamma$ -Westernblot diente als Kontrolle für den Einsatz äquivalenter Proteinmengen. Das Experiment wurde in Kooperation mit Dr. Michael Hinz durchgeführt.

Die EMSA-Analyse der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch die verwendeten genotoxischen Noxen zeigte eine robuste Hemmung der induzierbaren NF- $\kappa$ B-DNA-Bindeaktivität durch die beiden PARP-1-Inhibitoren (Abb. 4.6A). Ein unspezifischer Effekt der PARP-1-Inhibitoren auf die NF- $\kappa$ B-Aktivierung per se konnte ausgeschlossen werden, da die TNF $\alpha$ -induzierte NF- $\kappa$ B-DNA-Bindeaktivität durch die Inhibitoren unbeeinflusst blieb (Abb. 4.6B). Die effiziente Inhibition der PARP-1-Aktivität konnte anhand der erheblichen Reduktion der zellulären

---

Gesamt-PAR-Level mittels Westernblot-Analyse verifiziert werden (Abb 4.6A). Um die Bedeutung der PARP-1-vermittelten PAR-Synthese für die Induktion von NF- $\kappa$ B im Verlauf genotoxischer DNA-Schadensantwort weiter zu untermauern, wurden Rekonstitutionsexperimente mit Expressionskonstrukten durchgeführt, die für die Wildtyp-Form bzw. enzymatisch inaktive sowie DNA-bindungsdefiziente Mutante von PARP-1 kodieren. Dazu wurden diese Vektoren transient in PARP-1<sup>-/-</sup>-MEFs transfiziert und ihre Fähigkeit, die  $\gamma$ -IR-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung wiederherzustellen, mittels EMSA evaluiert (Abb 4.6C). Es zeigte sich, dass nur die Expression des Wildtyp-Proteins den Signalweg zu reaktivieren vermochte.

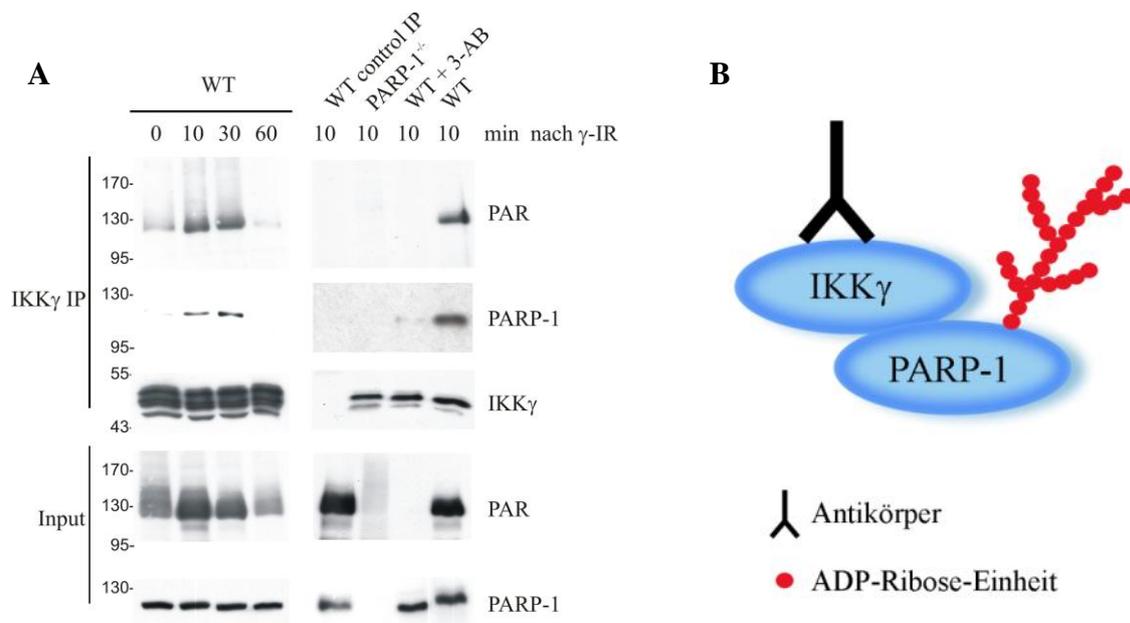
Somit stellt die PARP-1-katalysierte Synthese von PAR-Polymeren einen notwendigen mechanistischen Schritt im Prozess der PARP-1-abhängigen Regulation der NF- $\kappa$ B-DNA-Schadensantwort dar.

#### **4.1.5. Induzierbare Komplexbildung zwischen IKK $\gamma$ und PARP-1**

Die im Abschnitt 4.1.1 beschriebene IKK $\gamma$ -PARP-1-Wechselwirkung wurde unter basalen Bedingungen beobachtet und das im IKK $\gamma$ -Immunopräzipitat nachgewiesene PARP-1-Signal war im Vergleich zum Input relativ schwach. Um zu klären, ob die Assoziation von IKK $\gamma$  mit PARP-1 signalabhängig verstärkt werden kann, wurden Lysate von  $\gamma$ -bestrahlten WT-MEFs einer IKK $\gamma$ -Immunopräzipitation unterzogen. Koimmunopräzipitierte PARP-1 wurde im Westernblot nachgewiesen. Tatsächlich zeigte die PARP-1-Bindung an IKK $\gamma$  ein dynamisches Verhalten mit einem Maximum zwischen 10 und 30 min nach Bestrahlung. Bei 60 min war das Basalniveau wieder erreicht (Abb. 4.7A linkes Panel). Die bei 10 und 30 min nach  $\gamma$ -IR detektierbare Intensitätszunahme von PAR-Signalen im Input reflektiert die Stimulation der enzymatischen Aktivität von PARP-1 durch DNA-Schäden. Somit stimmt das Zeitfenster der Bildung des induzierbaren Komplexes zwischen IKK $\gamma$  und PARP-1 mit der Kinetik der strahlungsinduzierten PARP-1-Aktivierung überein. Da PARP-1 das abundanteste PAR-modifizierte Protein ist und das elektrophoretische Migrationsverhalten eines Großteils von PAR-Spezies im Input mit dem des PARP-1-Proteins übereinstimmt, handelt es sich bei diesen PAR-Signalen höchstwahrscheinlich um automodifizierte PARP-1. Es erscheint zunächst unerwartet, dass die Konjugation hochmolekularer PAR-Polymere an PARP-1 nur eine geringe Änderung des elektrophoretischen Migrationsverhaltens verursacht. Dieses Phänomen kann jedoch dadurch erklärt werden, dass die poly-anionische Natur der PAR-Polymere zu einer Mobilitätsbeschleunigung der auto-modifizierten PARP-1 im elektrischen

Feld führt und auf diese Weise dem Retardationseffekt durch das erhöhte Molekulargewicht entgegenwirkt.

Damit stellt sich die Frage, ob es automodifizierte PARP-1-Spezies sind, die mit IKK $\gamma$  induzierbar koimmunopräzipitiert werden. In der Tat konnten im IKK $\gamma$ -Immunopräzipitat PAR-Spezies nachgewiesen werden, deren zeitliches Auftreten mit dem des PARP-1-Proteins korrelierte.



**Abbildung 4.7. IKK $\gamma$  bildet einen induzierbaren Komplex mit automodifizierter PARP-1.**

(A links) WT-MEFs wurden mit 80 Gy bestrahlt. Zu verschiedenen Zeiten nach Stimulation wurden Proteinextrakte präpariert und einer IKK $\gamma$ -Immunopräzipitation unterworfen. Die Immunopräzipitate wurden mit Antikörpern gegen Poly-(ADP-Ribose) (PAR), PARP-1 und IKK $\gamma$  im Westernblot analysiert. Als Input-Kontrolle wurden die Gesamtmengen von PAR bzw. PARP-1 im Lysat bestimmt. (A rechts) WT-MEFs, die mit DMSO bzw. 3-AB vorbehandelt worden sind, wurden mit 80 Gy bestrahlt und 10 min nach Stimulation lysiert. Die erhaltenen Proteinextrakte wurden der gleichen Prozedur wie in (A links) zugeführt. Parallel dazu wurden Lysate von bestrahlten WT-MEFs einer Immunopräzipitation mit einem Kontroll-Antikörper bzw. Lysate von PARP-1<sup>-/-</sup>-MEFs einer IKK $\gamma$ -Immunopräzipitation unterzogen. (B) Schematische Darstellung der Koimmunopräzipitation von IKK $\gamma$  und automodifizierter PARP-1.

Im Gegensatz zu WT-MEFs konnte in PARP-1<sup>-/-</sup>-MEFs oder in WT-MEFs, die mit dem PARP-1-Inhibitor 3-AB vorbehandelt worden sind, keine Interaktion zwischen IKK $\gamma$  und automodifizierter PARP-1 beobachtet werden. (Abb. 4.7A rechtes Panel). Dabei handelt es sich um Bedingungen, unter denen keine automodifizierte PARP-1 vorliegt.

Zusammengefasst beschreiben die erhobenen Daten die Bildung eines induzierbaren Komplexes aus IKK $\gamma$  und automodifizierter PARP-1 im Nukleus von bestrahlten Zellen.

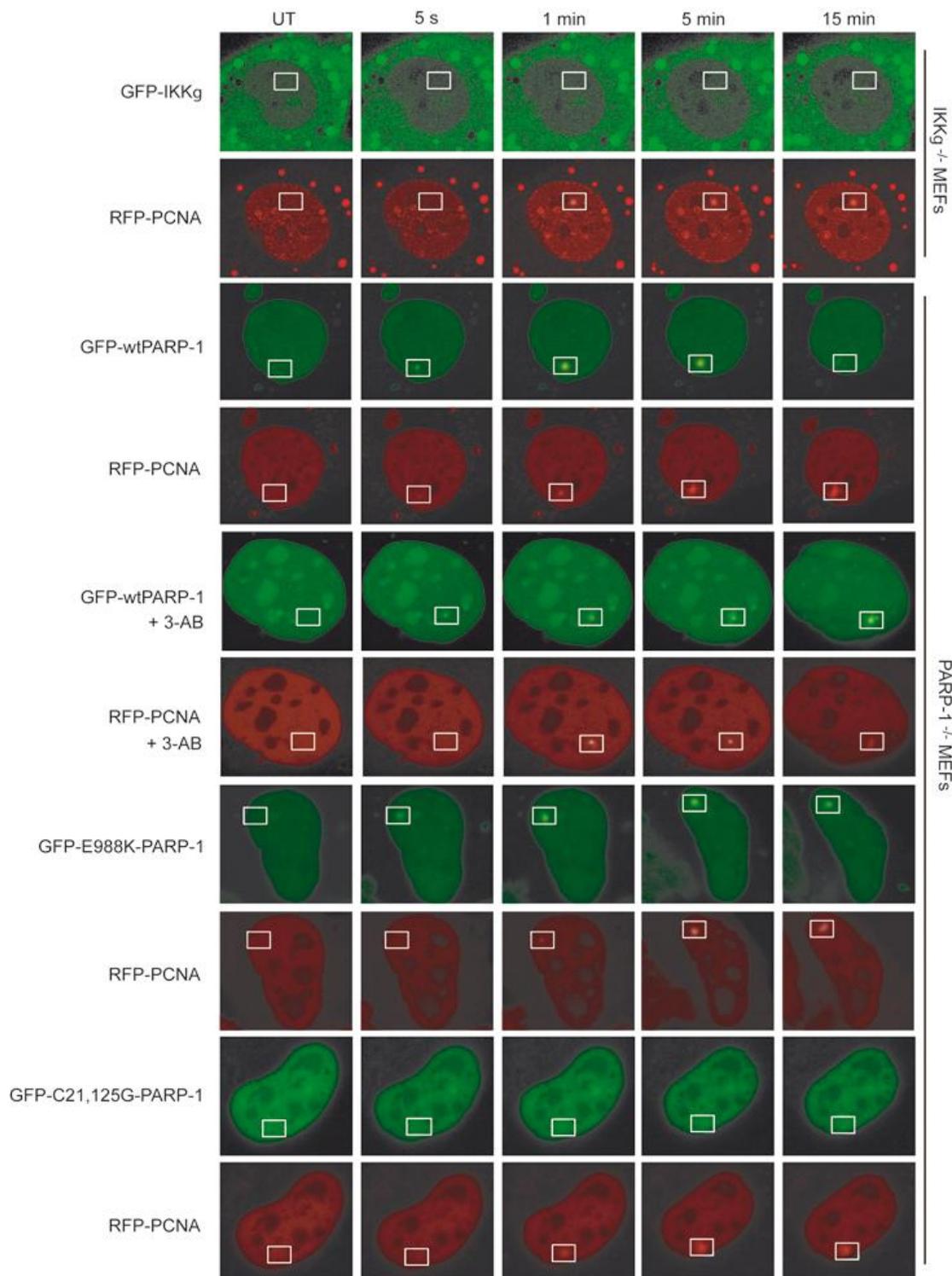
---

#### 4.1.6. Analyse der subzellulären Lokalisation von IKK $\gamma$ und PARP-1 nach Laser-Mikrobestrahlung

Die enzymatische Aktivierung von PARP-1 erfolgt durch die Bindung des Enzyms an DNA-Strangbrüche [122]. Folglich stellt sich die Frage, ob die Assemblierung des IKK $\gamma$ -PARP-1-Komplexes ebenfalls an DNA-Läsionen erfolgt.

Um zu untersuchen, ob IKK $\gamma$  und PARP-1 an DNA-Schadensfoci kolokalisieren würden, wurden Laser-Mikrobestrahlungsstudien durchgeführt. Der zugrundeliegende experimentelle Aufbau basierte auf einem Laserscanning-Mikroskopiesystem, mit dem es möglich ist, die subzelluläre Lokalisation fluoreszenzmarkierter Proteine nach Laser-vermittelter lokaler Induktion von DNA-Schäden in lebenden Zellen zu verfolgen.

Die Detektion von IKK $\gamma$  und PARP-1 mittels Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie wurde durch deren Fusion an GFP (*green fluorescent protein*) ermöglicht. Als interne Positivkontrolle sollte PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) verwendet werden, das an RFP (*red fluorescent protein*) fusioniert wurde und dessen Rekrutierung an DNA-Schadensfoci in der Literatur beschrieben worden ist [133]. Um zu gewährleisten, dass die ektopisch exprimierten fluoreszenzmarkierten Proteine nicht mit ihren endogenen Pendanten um die Rekrutierung an DNA-Schadenstellen konkurrieren, sind als experimentelles System die entsprechenden *knock-out*-MEFs gewählt worden. Somit wurde GFP-markiertes IKK $\gamma$  zusammen mit RFP-getagtem PCNA als Positivkontrolle in IKK $\gamma^{-/-}$ -MEFs exprimiert. In Parallelansätzen wurde Wildtyp-GFP-PARP-1 oder die enzymatisch inaktive bzw. die DNA-Bindungsmutante von PARP-1 mit RFP-PCNA in PARP-1 $^{-/-}$ -Zellen kotransfiziert. Um die DNA gegenüber UV-Strahlung zu sensibilisieren und die Einführung von DNA-Strangbrüchen mittels Laser-Mikrobestrahlung zu ermöglichen, wurden die Zellen in Anwesenheit des Thymidinanalogs Bromdesoxyuridin kultiviert. Mit Hilfe eines 405-nm-Diodenlasers wurden ausgewählte Spots im Zellkern einer transfizierten Zelle bestrahlt und dort DNA-Strangbrüche generiert. Unmittelbar nach der Bestrahlung wurden im Laserscanning-Modus konfokale Zeitserienaufnahmen der subzellulären Lokalisation fluoreszenzmarkierter Proteine erstellt. Ausgewählte Fragmentaufnahmen der Zeitserien sind in Abbildung 4.8 dargestellt. GFP-IKK $\gamma$  befindet sich überwiegend im zytoplasmatischen Kompartiment und nur ein geringer Teil des Proteins weist nukleäre Lokalisation auf. Diese Beobachtung ist konsistent mit den Ergebnissen der zellulären Fraktionierung (Abb. 4.1B).



**Abbildung 4.8. Kinetische Untersuchungen der Rekrutierung von PARP-1, PARP-1-Mutanten, IKK $\gamma$  und PCNA an DNA-Schadensfoci.** Für die Analyse der IKK $\gamma$ -Lokalisation nach Laser-Mikrobestrahlung wurden IKK $\gamma$ <sup>-/-</sup>-MEFs mit GFP-IKK $\gamma$  und RFP-PCNA transfiziert. Rekrutierung von WT-PARP-1, enzymatisch inaktiv (E988K) bzw. DNA-bindungsdefizienter (C21,125G) PARP-1-Mutanten wurde in PARP-1<sup>-/-</sup> MEFs nach Kotransfektion entsprechender GFP-Fusionskonstrukte mit RFP-PCNA untersucht. Der Effekt der enzymatischen Inhibition von PARP auf Rekrutierungskinetiken des Enzyms wurden nach Vorbehandlung der transfizierten Zellen mit 3-AB (10 mM, 90 min) evaluiert. Für Laser-Mikrobestrahlung wurde ein 405 nm Diodenlaser-Strahl auf ausgewählte Punkte im Zellkern einer transfizierten lebenden Zelle fokussiert. Daraufhin wurden konfokale Zeitserienbilder mit einem Intervall von 20 sec und einer Gesamtzeit von 30 min aufgenommen. Dargestellt sind repräsentative Fragmentaufnahmen der Zeitserien, die vor und nach Mikrobestrahlung aufgezeichnet wurden (UT, 5 sec, 1 min, 5 min und 15 min).

---

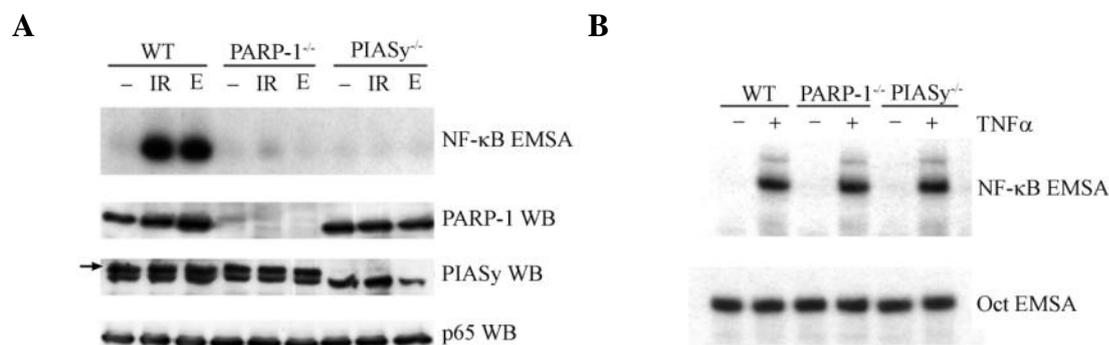
Obwohl RFP-PCNA 1 min nach Bestrahlung in DNA-Schadensfoci akkumuliert, zeigt GFP-IKK $\gamma$  keine Veränderung der nukleären Lokalisation. Hingegen weist GFP-Wildtyp-PARP-1 eine äußerst schnelle Rekrutierungskinetik an DNA-Läsionen auf: bereits 5 sec nach der Bestrahlung konnte eine GFP-Fluoreszenz in der entsprechenden Region des Zellkerns beobachtet werden. Somit wird PARP-1 vor PCNA an DNA-Schadensfoci rekrutiert, verweilt dort jedoch kürzer als PCNA, da das entsprechende Fluoreszenzsignal im Gegensatz zum RFP-Signal von PCNA 15 min nach Bestrahlung nicht mehr detektierbar ist.

Im Gegensatz zur WT-Form zeigt die enzymatisch inaktive Mutante von PARP-1 ein abweichendes dynamisches Verhalten und verbleibt während der untersuchten Zeitspanne an DNA-Schadensfoci. Dasselbe Ergebnis wurde mit Wildtyp-PARP-1 erzielt, wenn die Zellen mit dem PARP-Inhibitor 3-AB vorbehandelt worden sind. Diese Resultate sind konform mit den von Mortusewicz *et al.* [133] publizierten Befunden und lassen die Schlussfolgerung zu, dass die PARP-1-katalysierte PAR-Synthese (vermutlich Automodifizierung) für die Dissoziation des Enzyms von DNA-Schadenstellen nach Verrichtung seiner DNA-Reparaturfunktionen verantwortlich ist. Wie erwartet, konnte im Fall der DNA-Bindungsmutante von PARP-1 keine Akkumulation der GFP-Fluoreszenz in der bestrahlten Region festgestellt werden.

Wie die im Abschnitt 4.1.4 präsentierten Rekonstitutionsexperimente zeigen, bedarf es für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch  $\gamma$ -IR der DNA-Bindungs- und der enzymatischen Aktivität von PARP-1 (Abb. 4.6A und C). Darüberhinaus geht aus den Laser-Mikrobestrahlungsstudien hervor, dass die enzymatische Aktivität von PARP-1 für die schnelle Dissoziation des Enzyms von DNA-Strangbrüchen erforderlich ist. Zusammengenommen legen diese Beobachtungen die Schlussfolgerung nahe, dass PARP-1 für eine effiziente Induktion der NF- $\kappa$ B-Signalkaskade an DNA-Läsionen binden, diese aber auch wieder verlassen muss. Aufgrund der Tatsache, dass IKK $\gamma$  nicht an DNA-Schadensfoci rekrutiert wird (Abb. 4.8) und die PAR-abhängige Interaktion von IKK $\gamma$  mit PARP-1 zwischen 10 und 30 min nach Bestrahlung stattfindet (Abb. 4.7A), zu einem Zeitpunkt also, wenn automodifizierte PARP-1 die Schadenstelle bereits verlassen hat, erfolgt die Bildung des IKK $\gamma$ -PARP-1-Komplexes vermutlich im Nukleoplasma.

#### 4.1.7. Die SUMO1-Ligase PIASy ist für DNA-Schaden-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung erforderlich

Huang *et al.* beschrieben erstmals eine SUMO1-Modifikation von IKK $\gamma$  als notwendigen Schritt im Prozess der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch genotoxischen Stress [51]. In einer späteren Arbeit wurde im Rahmen eines in HEK293-Zellen durchgeführten RNAi-Screens die SUMO1-Ligase PIASy als das für IKK $\gamma$ -Sumoylierung verantwortliche Enzym identifiziert [95]. Hierbei sind jedoch „*off target*“-Effekte der siRNA nicht auszuschließen. Deswegen wurde die Abhängigkeit der durch DNA-Schäden ausgelösten NF- $\kappa$ B-Signalkaskade von PIASy unter Verwendung von PIASy-*knock-out* MEFs untersucht. Im Gegensatz zu WT-Zellen blieb die Induktion der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindeaktivität durch  $\gamma$ -IR bzw. Etoposid in PIASy<sup>-/-</sup> wie in PARP-1<sup>-/-</sup>-MEFs aus (Abb. 4.9A). Dabei kann davon ausgegangen werden, dass PIASy eine spezifische Funktion für den DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalweg übernimmt, da der Verlust dieses Enzyms keinen Effekt auf die TNF $\alpha$ -stimulierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung zeigte (Abb. 4.9B).

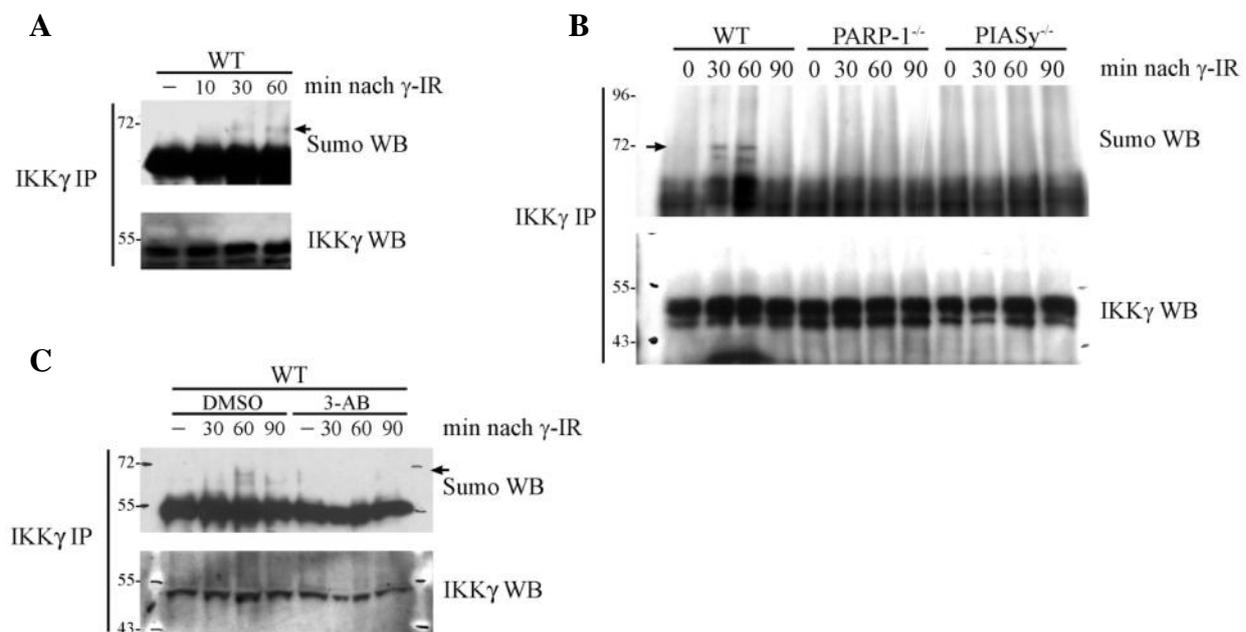


**Abbildung 4.9. PIASy ist an der Regulation der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch genotoxische Stimuli beteiligt.** (A) WT-, PARP-1<sup>-/-</sup>- und PIASy<sup>-/-</sup>-MEFs wurden entweder mit 80 Gy bestrahlt (IR) oder mit Etoposid (ETP, 100  $\mu$ M) behandelt. Nach 90 min wurden Proteinextrakte präpariert und NF- $\kappa$ B-Aktivierung mittels EMSA ermittelt. Der Genotyp der jeweiligen Zelllinie wurde durch Westernblot-Analyse mit PARP-1- bzw. PIASy-Antikörper verifiziert. Spezifisches PIASy-Signal ist mit einem Pfeil markiert. p65-Westernblot diente als Ladekontrolle. (B) Die gleichen MEFs wie in (A) wurden mit TNF $\alpha$  (20 ng/ml) für 20 min stimuliert und NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch EMSA untersucht. Als Kontrolle wurde Oct-EMSA durchgeführt.

#### 4.1.8. PIASy-vermittelte IKK $\gamma$ -Sumoylierung ist von enzymatisch aktiver PARP-1 abhängig

Für ein besseres Verständnis der Funktion von PARP-1 bei der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch genotoxische Stimuli, ist die Frage nach einem funktionalen Zusammenhang zwischen PARP-1 und PIASy von entscheidender Bedeutung.

Zunächst wurde der zeitliche Verlauf der IKK $\gamma$ -Sumoylierung nach  $\gamma$ -Bestrahlung in WT-MEFs analysiert (Abb. 4.10A). Durch eine Westernblot-Analyse des IKK $\gamma$ -Immunpräzipitats mit einem SUMO1-Antikörper konnten induzierbare SUMO1-Spezies nachgewiesen werden, deren elektrophoretische Migration dem Addukt eines SUMO1-Proteins an IKK $\gamma$  entsprach. Die induzierten SUMO1-Signale waren erst 30 min nach Bestrahlung sichtbar und nahmen bis 60 min an Intensität zu. Dass diese Signale von einem IKK $\gamma$ -koprizipitierten Protein stammen, kann ausgeschlossen werden, da die Zellysate in Gegenwart von 1 %-SDS präpariert worden sind und dabei nicht-kovalente Protein-Protein-Interaktionen verloren gehen.



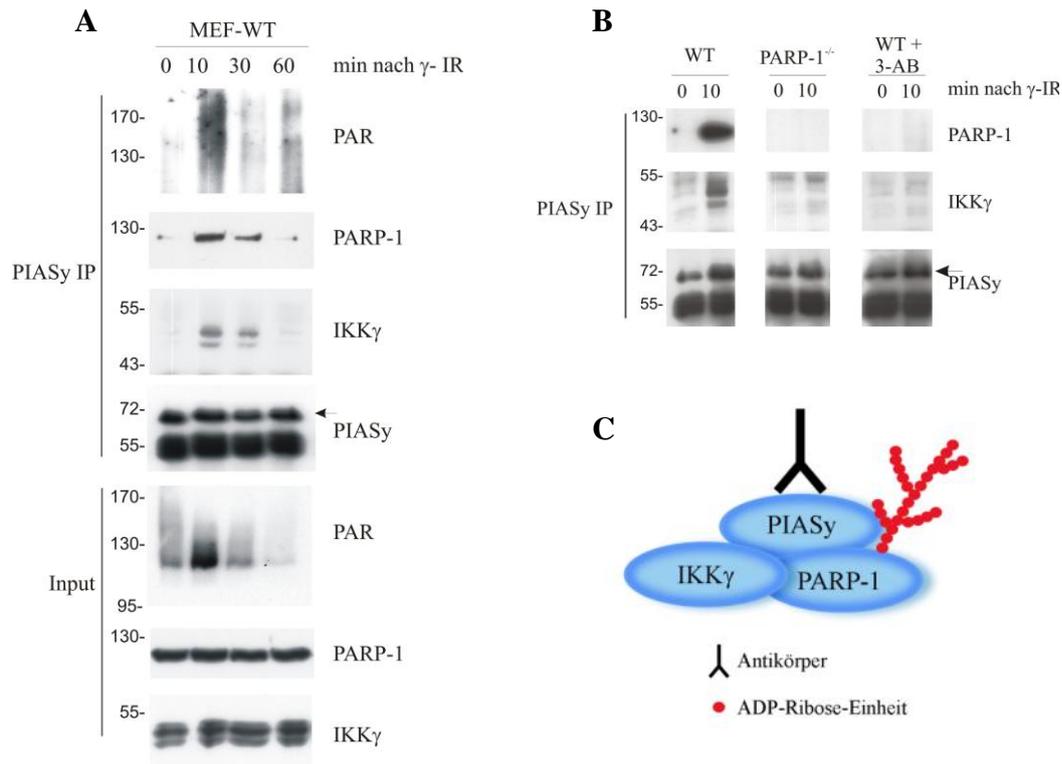
**Abbildung 4.10. PARP-1 und die Synthese von Poly-ADP-Ribose sind für PIASy-vermittelte IKK $\gamma$ -Sumoylierung unerlässlich.** Für die Analyse der IKK $\gamma$ -Sumoylierung wurden  $\gamma$ -bestrahlte Zellen in einem stringenten, 1 % SDS haltigen Puffer lysiert, die Lysate für 15 min gekocht und somit sichergestellt, dass alle nicht-kovalenten Protein-Protein-Interaktionen aufgehoben werden. Nach dem Einstellen der SDS-Konzentration im Lysat auf 0,1% wurde IKK $\gamma$  immunopräzipitiert. Das Präzipitat wurde nach SDS-PAGE mit einem SUMO1- und anschließend einem IKK $\gamma$ -Antikörper im Westernblot analysiert. **(A)** Der zeitliche Verlauf der IKK $\gamma$ -Sumoylierung wurde in WT-MEFs untersucht. Der Pfeil kennzeichnet die  $\gamma$ -IR-induzierten SUMO1-Spezies. **(B)** Vergleichende Analyse der IKK $\gamma$ -Sumoylierung in WT-, PIASy<sup>-/-</sup>- und PARP-1<sup>-/-</sup>-MEFs. **(C)** WT-MEFs wurden vor  $\gamma$ -Bestrahlung für 90 min mit 3-AB (10 mM) inkubiert und der Effekt der enzymatischen Inhibition von PARP-1 auf IKK $\gamma$ -Sumoylierung evaluiert.

---

Um zu klären, ob PARP-1 an der Regulation des Sumoylierungsprozesses beteiligt ist, wurden PARP-1<sup>-/-</sup>-MEFs hinsichtlich der Induzierbarkeit der IKK $\gamma$ -Sumoylierung mit WT- und PIASy<sup>-/-</sup>-MEFs verglichen. In Übereinstimmung mit der von Mabb *et al.* publizierten Studie [95], die einen gegen PIASy gerichteten RNAi-Ansatz in HEK293-Zellen verfolgte, zeigte die genetische Ablation von PIASy in MEFs eine vollständige Beeinträchtigung der IKK $\gamma$ -Sumoylierung (Abb. 4.10B). Bemerkenswerterweise konnten im IKK $\gamma$ -Präzipitat aus PARP-1<sup>-/-</sup>-Zellen ebenfalls keine SUMO1-Spezies nachgewiesen werden. Ein Verlust der induzierten IKK $\gamma$ -Sumoylierung konnte ebenfalls in WT-MEFs nach Inhibition von PARP durch 3-AB beobachtet werden (Abb. 4.10C). Zusammenfassend deuten diese Befunde darauf hin, dass PARP-1 und Poly-ADP-Ribosylierung funktional der IKK $\gamma$ -Sumoylierung vorgeschaltet sind und möglicherweise direkt die Aktivität von PIASy steuern.

#### **4.1.9. PIASy bildet mit PARP-1 und IKK $\gamma$ ein PAR-abhängiges Signalosom**

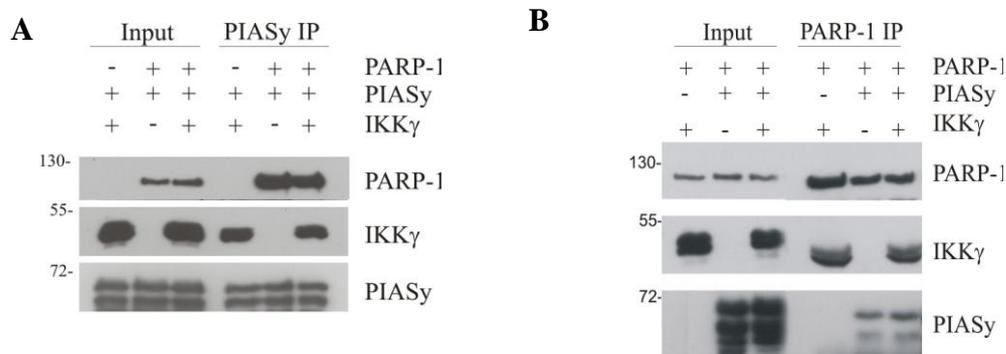
Die Beobachtung, dass aktivierte PARP-1 für PIASy-vermittelte IKK $\gamma$ -Sumoylierung unerlässlich ist, zieht die Frage nach sich, ob PIASy mit PARP-1 interagiert. Um dies zu klären, wurden WT-MEFs für verschiedene Zeiten bestrahlt und die gewonnenen Extrakte einer PIASy-Immunopräzipitation unterworfen. In der Tat konnte eine induzierbare und transiente Bindung von PARP-1 an PIASy festgestellt werden, wobei die Interaktionsintensität zwischen 10 und 30 min nach Bestrahlung ein Maximum erreichte (Abbildung 4.11A). Die Anwesenheit von PAR-Spezies im PIASy-Immunopräzipitat zeigte ein ähnliches dynamisches Verhalten wie das PARP-1-Protein, was wiederum, wie im Abschnitt 4.1.5 diskutiert, darauf hindeutet, dass es sich um automodifizierte PARP-1 handelt. Interessanterweise wurde neben PAR/PARP-1 auch IKK $\gamma$  mit gleicher Kinetik mit PIASy kopräzipitiert. Unter Einbeziehung der IKK $\gamma$ -PARP-1-Interaktionsstudien (Abschnitt 4.1.5), die ebenfalls die gleiche Assoziationskinetik offenbarten, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass PARP-1, IKK $\gamma$  und PIASy ein Signalosom bilden. Da die Interaktionen zwischen PIASy, IKK $\gamma$  und PARP-1 nach PARP-Inhibition mit 3-AB verloren gehen (Abb. 4.7A rechts; Abb. 4.11B), kann postuliert werden, dass die Assemblierung des Signalosoms von PARP-1-vermittelter PAR-Synthese abhängt.



**Abbildung 4.11.  $\gamma$ -Bestrahlung fördert die Bildung eines PAR-abhängigen Signalosoms aus PARP-1, IKK $\gamma$  und PIASy.** Die Experimente wurden in Kooperation mit Dr. Michael Hinz durchgeführt. **(A)** WT-MEFs wurden mit 80 Gy bestrahlt und zu verschiedenen Zeiten lysiert. Die erhaltenen Proteinextrakte wurden einer PIASy-Immunopräzipitation unterzogen. Die Immunopräzipitate wurden mit Antikörpern gegen Poly-ADP-Ribose (PAR), PARP-1, IKK $\gamma$  und PIASy im Westernblot analysiert. Das spezifische PIASy-Signal ist mit einem Pfeil markiert. Als Input-Kontrolle wurden die Gesamtmengen von PAR bzw. PARP-1 und IKK $\gamma$  im Lysat bestimmt. **(B)** WT-MEFs, die mit DMSO bzw. 3-AB vorbehandelt worden sind, wurden mit 80 Gy bestrahlt und 10 min nach Stimulation lysiert. Die erhaltenen Proteinextrakte wurden der gleichen Prozedur wie in **(A)** zugeführt. Parallel dazu wurden Lysate von bestrahlten PARP-1<sup>-/-</sup>-MEFs einer PIASy-Immunopräzipitation unterzogen. **(C)** Schematische Darstellung der Bildung eines Signalosoms aus automodifizierter PARP-1, IKK $\gamma$  und PIASy.

Um zu überprüfen, ob PARP-1, IKK $\gamma$  und PIASy direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen eingehen können, wurden *in vitro*-Bindungsstudien mit Hilfe gereinigter rekombinanter Proteine durchgeführt. Hierzu wurde rekombinantes PIASy separat mit rekombinantem IKK $\gamma$  bzw. PARP-1, oder mit einem Gemisch aus beiden Proteinen, inkubiert und anschließend immunopräzipitiert. Nach einer extensiven Waschprozedur wurde die Bindung von IKK $\gamma$  bzw. PARP-1 an das immunopräzipitierte PIASy im Westernblot analysiert. Sowohl IKK $\gamma$  als auch PARP-1 bildeten direkte Protein-Protein-Kontakte zu PIASy aus (Abb. 4.12A). Dabei war die Bindung von IKK $\gamma$  an PIASy in An- bzw. Abwesenheit von PARP-1 gleich stark. Die Assoziation von PARP-1 mit PIASy war ebenfalls unabhängig von IKK $\gamma$ . Übereinstimmende Ergebnisse lieferte ein analog durchgeführtes Experiment, bei dem PARP-1 immunopräzipitiert wurde (Abb. 4.12B).

Die Ergebnisse der *in vitro*-Interaktionsanalysen deuten an, dass *in vivo* direkte Protein-Protein-Interaktionen innerhalb des PARP-1/IKK $\gamma$ /PIASy-Signalosoms ausgebildet werden, die allerdings die Gegenwart von PAR-Polymeren benötigen, um den Komplex zu stabilisieren.



**Abbildung 4.12. *In-vitro*-Interaktionsstudien mit rekombinantem PARP-1, PIASy und IKK $\gamma$ .**

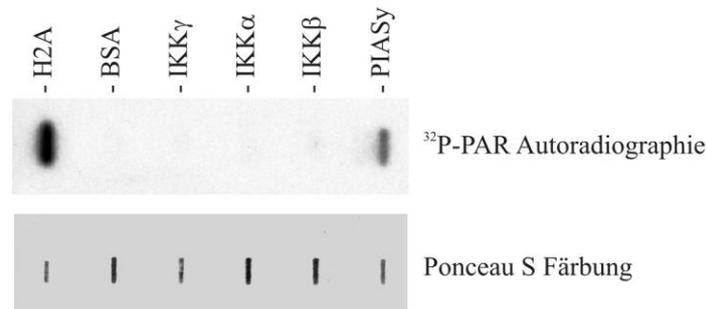
PARP-1 wurde in Sf9-Insektenzellen, IKK $\gamma$  sowie PIASy in *E.coli* als Strep-Fusionsproteine exprimiert und mit Hilfe von Streptactin-Affinitätsmatrix gereinigt. Jeweils 25 pmol der einzelnen rekombinanten Proteine wurden für die Interaktionsstudien eingesetzt. Nach einer 2-stündigen Inkubation wurde eines der Proteine immunopräzipitiert und die Anwesenheit der anderen Interaktionspartner im Präzipitat im Westernblot untersucht. (A) Analyse der Bindung von PARP-1 und IKK $\gamma$  an immunopräzipitiertes PIASy. (B) Analyse der Bindung von IKK $\gamma$  und PIASy an immunopräzipitiertes PARP-1.

#### 4.1.10. PIASy bindet freie PAR-Polymere über konservierte PAR-Bindemotive

Die in den Abschnitten 4.1.5 und 4.1.9 präsentierten Daten beschreiben die kinetischen und biochemischen Charakteristika eines durch  $\gamma$ -IR induzierbaren Komplexes aus PARP-1, IKK $\gamma$  und PIASy, dessen Assemblierung der DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung vorangeht (Abb. 4.2B) und von PARP-1-vermittelter PAR-Synthese abhängt. Hinsichtlich der Frage nach der mechanistischen Bedeutung der PAR-Polymere bei der Assemblierung des Signalosoms und der Steuerung der PIASy-vermittelten IKK $\gamma$ -Sumoylierung kommen zwei alternative, sich gegenseitig jedoch nicht ausschließende, Szenarien in Betracht. Zum einen ist es vorstellbar, dass PARP-1 entweder IKK $\gamma$  oder PIASy PARyliert und auf diese Weise die vorgenannten Prozesse steuert. Andererseits könnten die PAR-Ketten der automodifizierten PARP-1 als Interaktionsplattform für IKK $\gamma$  oder PIASy dienen und die dabei entstehenden nicht-kovalenten Interaktionen für nachgeschaltete Signalübertragungsschritte entscheidend sein.

Bei der Westernblot-Analyse von IKK $\gamma$ - bzw. PIASy-Immunopräzipitaten, die unter denaturierenden Bedingungen gewonnen wurden (unter denen keine Koimmunopräzipitation von automodifizierter PARP-1 möglich ist), konnten keine PAR-Signale in dem

entsprechenden Molekulargewichtsbereich nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Somit konnten keine Evidenzen für eine PARylierung von IKK $\gamma$  bzw. PIASy *in vivo* erbracht werden.



**Abbildung 4.13. PIASy geht direkte Wechselwirkungen mit freien PAR-Polymeren ein.**

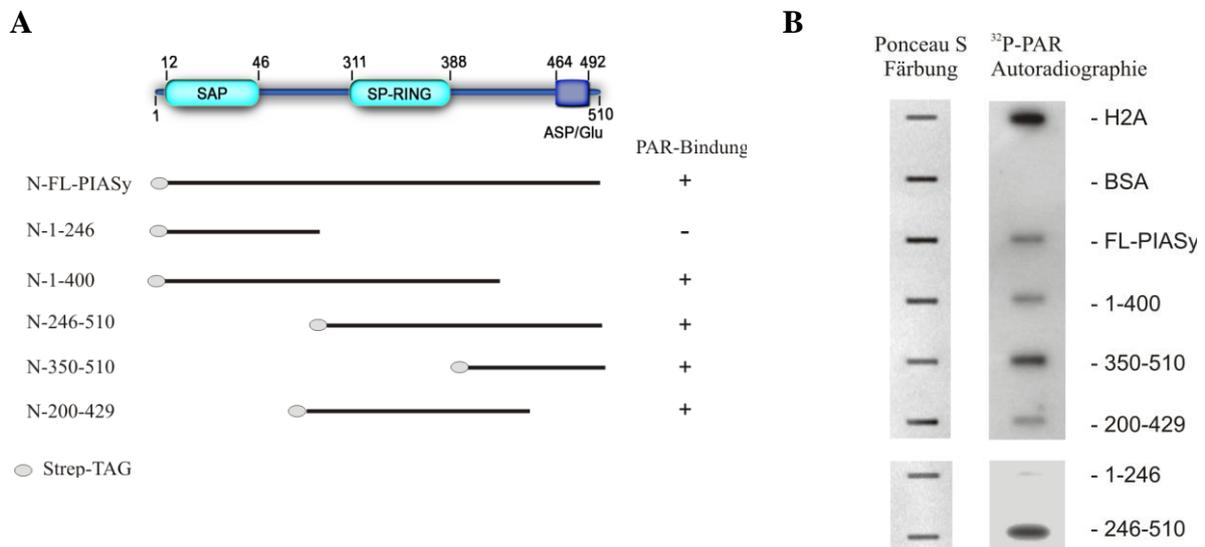
Jeweils 20 pmol von Histon H2A (H2A), Rinderserumalbumin (BSA) und rekombinanten gereinigtem IKK $\gamma$ , IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  und PIASy wurden auf eine Nitrozellulose-Membran aufgebracht. H2A sollte als Positivkontrolle für PAR-Bindung und BSA als Negativkontrolle dienen. Die Membran wurde mit radioaktiven und PARP-1-freien poly-(ADP-Ribose)-Polymeren inkubiert. Nach einer intensiven Waschprozedur unter stringenten Bedingungen (0.5 M NaCl) wurde die Bindung von PAR an die immobilisierten Proteine durch Autoradiographie nachgewiesen. Die Gleichmäßigkeit der Immobilisierung der einzelnen Proteine wurde nach der Autoradiographie durch Ponceau S Färbung bestätigt.

Um die Möglichkeit eines Beitrags nicht-kovalenter PAR-Protein-Interaktionen zur Assemblierung des PARP-1-Signalosoms zu prüfen, wurden rekombinante gereinigte IKK-Untereinheiten und PIASy auf einer Nitrozellulose-Membran immobilisiert und auf Interaktion mit radioaktiv markierten PAR-Polymeren getestet (Abb. 4.13). Bemerkenswerterweise konnte für PIASy eine direkte Interaktion mit freien PAR-Polymeren demonstriert werden. Hingegen zeigte weder IKK $\gamma$  noch die katalytischen IKK-Untereinheiten eine Bindung an poly-ADP-Ribose.

Zur weiterführenden molekularen Analyse der Wechselwirkungen von PIASy mit PAR-Ketten sollte geklärt werden, welche Strukturen in PIASy mit PAR interagieren. Um die PAR-Bindungsregion einzugrenzen, wurden verschiedene Deletionsmutanten der SUMO-Ligase in *E.coli* exprimiert und als Strep-Fusionsproteine gereinigt (Abb. 4.14A). Die rekombinanten PIASy-Mutanten wurden zusammen mit dem Wildtyp-Protein hinsichtlich der Bindung an radioaktiv markierte PAR-Ketten analysiert (Abb. 4.14B).

Mit Ausnahme des N-terminalen Fragments 1-246 zeigten alle Deletionsmutanten von PIASy eine Bindung an PAR. Die erhobenen Daten deuten auf eine oder mehrere PAR-Bindestellen im C-terminalen Bereich hin.

Um die PAR-Bindungsregion von PIASy weiter einzugrenzen, wurde ein bioinformatischer Ansatz verfolgt. Dazu wurde die PIASy-Aminosäuresequenz mit Hilfe des ClustalW2-Algorithmus nach Regionen durchsucht, die homolog zu einem Alignment experimentell validierter PAR-Bindemotive anderer Proteine sind (Abb. 4.15) [137, 139].

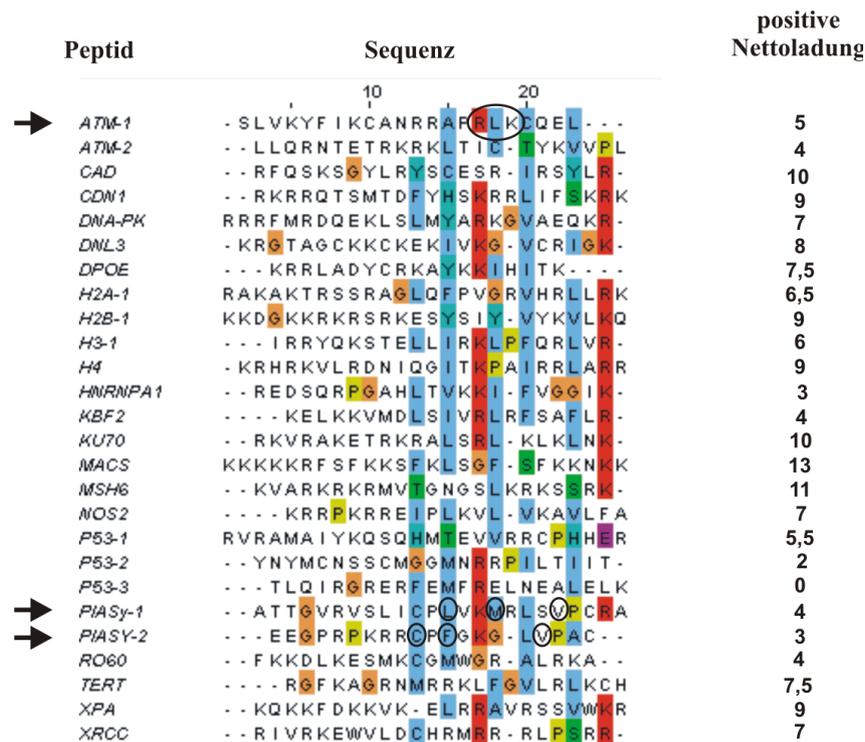


**Abb. 4.14. PAR-Bindungsstudien mit PIASy Deletionsmutanten.**

(A) Verschiedene Deletionsmutanten von PIASy wurden als Strep-Fusionsproteine in *E.coli* exprimiert und mit Streptactin-Säulenmaterial durch Affinitätschromatographie gereinigt. Die Primärstruktur der Deletionsmutanten ist relativ zum Volllängen-Protein (FL-PIASy) und dessen Domänenstruktur schematisch wiedergegeben. Zur besseren Übersicht ist mit „+“ bzw. „-“ die Fähigkeit der Deletionsmutanten an PAR zu binden, gekennzeichnet. (B) Interaktion von freien PAR-Ketten mit PIASy-Deletionsmutanten wurde analog zum in Abb. 4.13 beschriebenen Experiment untersucht.

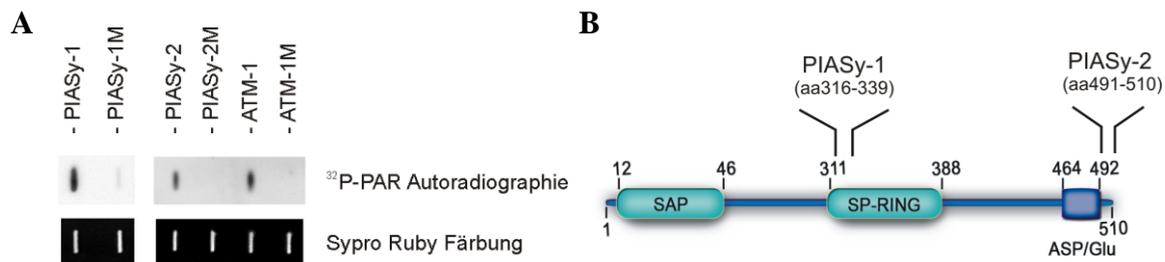
Das Alignment zeigte zwar keine starke Aminosäurekonservierung zwischen den einzelnen Sequenzen, offenbarte jedoch charakteristische Gemeinsamkeiten. In der linken Hälfte wird eine Präferenz gegenüber basischen Aminosäuren deutlich. Die rechte Hälfte der Motive ist durch ein Muster an hydrophoben und aliphatischen Aminosäuren geprägt, die von basischen Resten unterbrochen werden. Darüberhinaus sind diese Sequenzabschnitte durch eine positive Nettoladung gekennzeichnet. Dieses Verfahren lieferte zwei mögliche PAR-Bindungsregionen in PIASy (PIASy-1: AS 316-339; PIASy-2: AS 491-510), deren Position in der Primärstruktur konsistent mit den Ergebnissen der Deletionsanalysen ist.

Um die Gültigkeit der bioinformatischen Vorhersage experimentell zu überprüfen, wurden die PIASy-Regionen 316-339 (PIASy-1) und 491-510 (PIASy-2) als Peptide synthetisiert und im Slot-Blot-Assay auf PAR-Bindung getestet (Abb. 4.16).



**Abbildung 4.15. Multiples Sequenz-Alignment experimentell validierter PAR-Bindemotive mit der Aminosäuresequenz von PIASy.** Die Aminosäuresequenz des humanen PIASy Proteins wurde mit einem Datensatz experimentell bestätigter PAR-Bindemotive verschiedener Proteine [137, 139] unter Einsatz des ClustalW2-Algorithmus (<http://www.ebi.ac.uk>) verglichen. Dabei wurden zwei PIASy-Regionen mit höchster Homologie zu diesem Datensatz identifiziert: PIASy-1: AS 316-339; PIASy-2: AS 491-510. Die Pfeile kennzeichnen die PAR-Bindemotive, die in nachfolgenden Experimenten als Peptide auf PAR-Bindung getestet wurden. Die eingekreisten Aminosäuren wurden zu Alaninen umgewandelt, um mutierte Derivate dieser möglichen PAR-Interaktionsregionen zu generieren.

Pleschke *et al.* (2000) zufolge sind weniger die positiv geladenen, sondern vielmehr die großen aliphatischen oder aromatischen Aminosäuren für die Bindung eines PAR-Bindungsmotivs an PAR verantwortlich [137]. Um die Spezifität der Bindung der Peptide PIASy-1 und PIASy-2 an PAR einschätzen zu können, wurden durch Austausch großer Aliphaten zu Alaninen an konservierten Positionen mutierte Derivate generiert (Abb. 4.15, mit Kreisen markierte AS wurden zu Alaninen mutiert). Zusätzlich wurde ein von Haince *et al.* beschriebenes PAR-Bindemotiv von ATM und die entsprechende Mutante als Positiv- bzw. Negativkontrolle in die Studie einbezogen [139]. Beide PIASy-Peptide zeigten eine robuste Bindung an PAR, die mit der des publizierten ATM-Peptids vergleichbar ist. Die Mutation der konservierten Positionen zu Alaninen verhinderte oder schwächte diese Interaktion stark ab (Abb. 4.16A).



**Abbildung 4.16. Analyse der PAR-Bindung von PIASy- und ATM-abgeleiteten Peptiden.**

(A) Die putativen PAR-Bindemotive von PIASy (PIASy-1 und PIASy-2), die durch bioinformatische Homologieuntersuchung identifiziert worden waren (Abb. 4.15), wurden zusammen mit einer publizierten PAR-Interaktionsregion von ATM [139] (ATM-1) hinsichtlich der Bindung an freie PAR-Ketten getestet. Zur Kontrolle der Spezifität der PAR-Peptid-Interaktionen wurden mutierte Derivate in das Experiment einbezogen (PIASy-1M, PIASy-2M und ATM-1M). Es wurden jeweils 2 µg Peptid eingesetzt. Um die gleichmäßige Immobilisierung der Peptide auf Nitrozellulose zu verifizieren, wurde die Membran nach dem Experiment mit Sypro-Ruby-Farbstoff angefärbt. (B) Die relative Lage der identifizierten PAR-Bindemotive von PIASy im Gesamtprotein ist schematisch dargestellt.

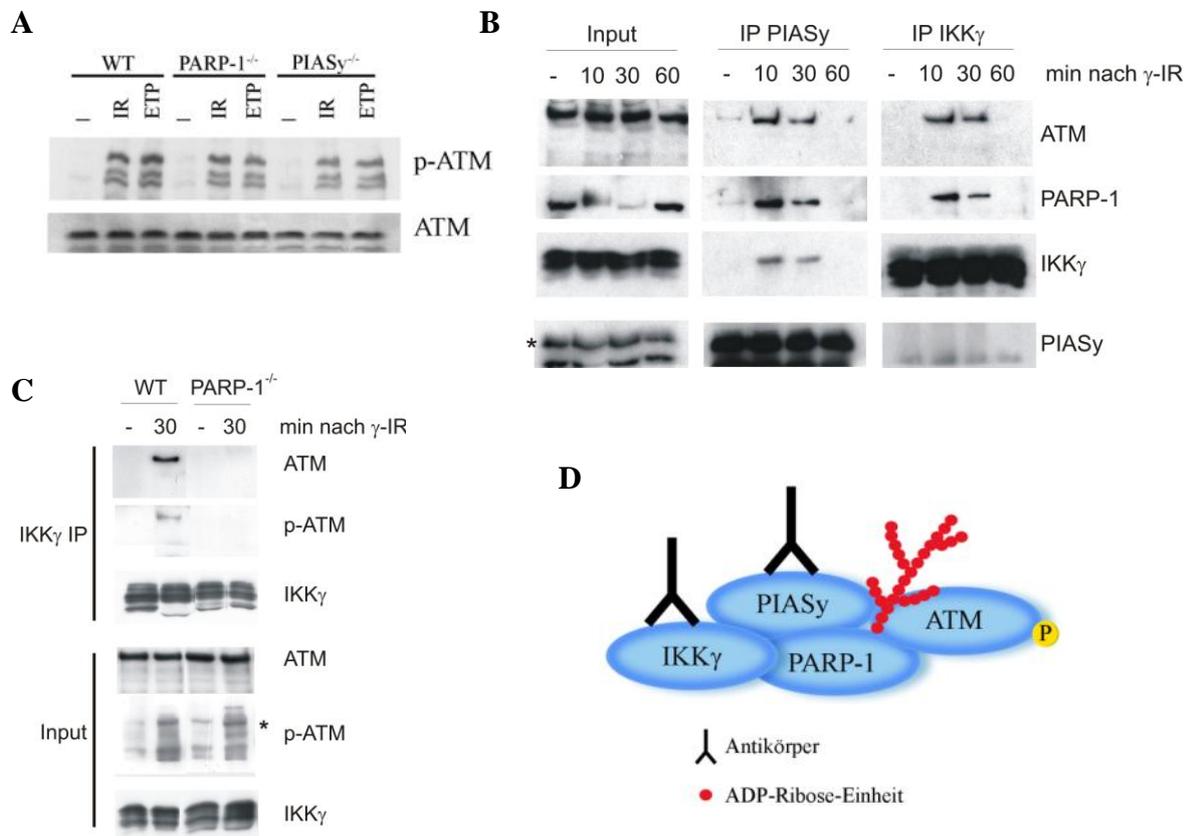
Zusammenfassend ist festzuhalten, dass PIASy im Gegensatz zu IKK $\gamma$  über zwei PAR-Bindemotive verfügt. Das eine Motiv (PIASy-1) überlappt mit der RING-Finger-ähnlichen Zink-bindenden Domäne, die für SUMO1-Konjugation an Substratproteine verantwortlich ist. Das zweite Motiv umfasst die letzten zwanzig Aminosäuren des Proteins und folgt einer Region, die reich an sauren Aminosäureresten ist (Abb. 4.16B).

#### 4.1.11. ATM wird in Abhängigkeit von PARP-1 an das nukleäre Signalosom rekrutiert

Die Kinase ATM ist einer der zentralen Mediatoren zellulärer DNA-Schadensreaktionen (Abschnitt 1.3.2). ATM wird durch DNA-Strangbrüche aktiviert und steuert durch Phosphorylierung wichtiger Regulatorproteine grundlegende zelluläre Funktionen, wie DNA-Reparatur, Zellzyklus und Genexpression [158]. Die Aktivierung dieser Schlüsselkinase ist eine Voraussetzung für die Induktion des NF- $\kappa$ B-Signalwegs im Verlauf zellulärer DNA-Schadensantwort [159]. Darüberhinaus wurde eine physische Assoziation von ATM mit IKK $\gamma$  beschrieben, die in einem Zusammenhang mit IKK-Aktivierung stehen könnte [101]. Andererseits liegen Berichte über eine funktionale und physische Interaktion zwischen ATM und PARP-1 vor, wobei die Bindung von poly-(ADP-Ribose)-Ketten an PAR-Bindemotive von ATM entscheidend zu sein scheint [139]. Angesichts der in vorangegangenen Abschnitten erörterten Sachverhalte und dieser Evidenzen aus der Literatur sollte im Folgenden überprüft werden, ob ein möglicher Zusammenhang zwischen ATM und der Bildung des IKK $\gamma$ /PARP-1/PIASy-Signalosoms besteht.

Zunächst wurde der Einfluss von PARP-1 und PIASy auf DNA-Schaden-induzierte ATM-Aktivierung untersucht. Dazu wurden WT-, PARP-1<sup>-/-</sup>- und PIASy<sup>-/-</sup>-MEFs  $\gamma$ -bestrahlt oder

mit Etoposid (ETP) behandelt und die mit ATM-Aktivierung assoziierte Autophosphorylierung an Ser-1981 ermittelt. Aus der Westernblot-Analyse ging hervor, dass weder PARP-1 noch PIASy einen Einfluss auf ATM-Aktivierung haben (Abb. 4.17A).



**Abbildung 4.17. ATM ist Bestandteil des nukleären IKKγ/PARP-1/PIASy-Signalosoms.**

(A) WT-, PARP-1<sup>-/-</sup>- und PIASy<sup>-/-</sup>-MEFs wurden mit 80 Gy bestrahlt bzw. mit Etoposid (ETP, 100 μM) behandelt und nach 60 min lysiert. Gewonnene Proteinextrakte wurden nach SDS-PAGE mit Antikörpern gegen phospho-ATM (Ser-1981) und Pan-ATM im Westernblot analysiert. (B) WT-MEFs wurden γ-IR ausgesetzt und zu verschiedenen Zeiten Proteinextrakte präpariert. PIASy und IKKγ wurden mit entsprechenden Antikörpern immunopräzipitiert. Die Immunopräzipitate wurden zusammen mit Input-Proben auf die Anwesenheit von ATM, PARP-1, IKKγ und PIASy im Westernblot untersucht. Asterisk kennzeichnet das spezifische PIASy-Signal. PIASy konnte nicht in IKKγ-Immunopräzipitaten nachgewiesen werden. Möglicherweise interferiert die Bindung des Antikörpers an IKKγ sterisch mit der IKKγ-PIASy-Interaktion. (C) WT- und PARP-1<sup>-/-</sup>-MEFs wurden mit 80 Gy bestrahlt und nach 30 min lysiert. Proteinextrakte wurden analog zu (B) analysiert. Asterisk markiert das spezifische phospho-ATM-Signal. (D) Schematische Darstellung der Koimmunopräzipitation von aktivierter ATM-Kinase mit dem nukleären IKKγ/PARP-1/PIASy-Signalosom. Experimente (B) und (C) wurden in Kooperation mit Dr. Michael Hinz durchgeführt.

Um zu klären, ob ATM an das nukleäre IKKγ/PARP-1/PIASy-Signalosom rekrutiert wird, wurde IKKγ bzw. PIASy aus Extrakten bestrahlter WT-MEFs immunopräzipitiert (Abb. 4.17B). Neben der Anwesenheit von bereits beschriebenen Signalosomkomponenten konnten in den IKKγ- und PIASy-Immunopräzipitaten induzierbare ATM-Signale zwischen 10 und 30 min nach γ-IR nachgewiesen werden. Die Assoziationskinetik von ATM mit den immunopräzipitierten Signalosomkomponenten stimmt mit dem zeitlichen Verlauf der in den

---

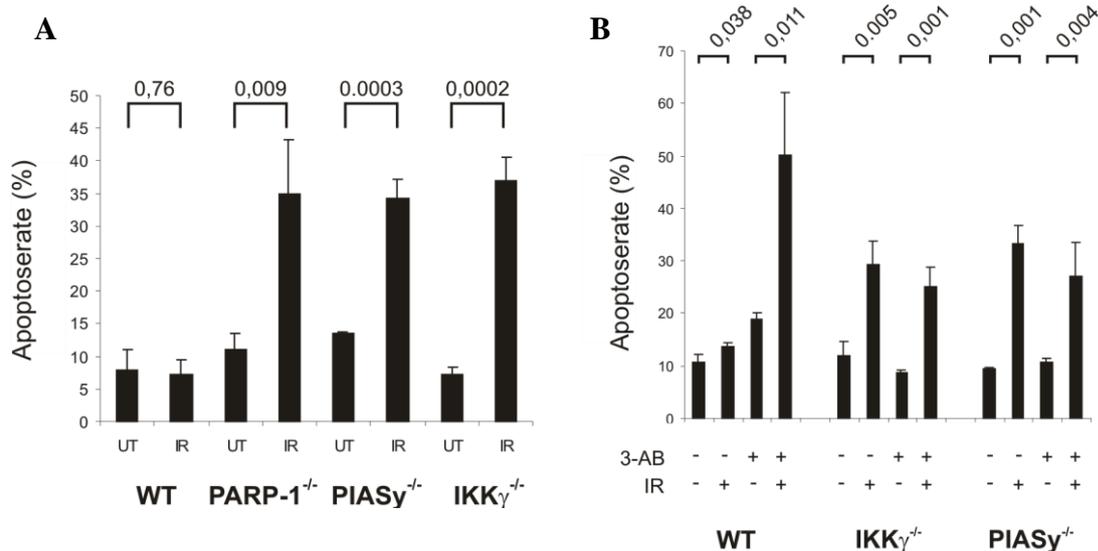
Abschnitten 4.1.5 und 4.1.9 beschriebenen Assemblierung des Signalosoms überein und legt nahe, dass ATM einen Komplex mit IKK $\gamma$ , PARP-1 und PIASy bildet.

Anschließend wurden WT-MEFs mit PARP-1<sup>-/-</sup>-Zellen hinsichtlich der Bindung von ATM an IKK $\gamma$  verglichen (Abb. 4.17C). Wie im Abschnitt 4.1.9 für die PIASy-IKK $\gamma$ -Interaktion demonstriert, hängt auch die physische Assoziation von ATM mit IKK $\gamma$  von PARP-1 ab. Somit assembliert PARP-1 mit PIASy, ATM und IKK $\gamma$  wichtige Regulatoren der IKK-Aktivierung durch genotoxischen Stress in einem Signalosom und steuert dadurch nachgeschaltete Prozesse.

#### **4.1.12. PARP-1-abhängige NF- $\kappa$ B-Aktivierung vermittelt zelluläre Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung**

Eine überlebensfördernde Wirkung von PARP-1 und poly-ADP-Ribosylierung auf Zellen, die einem moderaten genotoxischen Stress ausgesetzt worden sind, ist in der Literatur belegt [131]. Andererseits wirkt die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch Induktion anti-apoptotischer Gene ebenfalls dem Zelltod im Verlauf einer DNA-Schadensantwort entgegen [102]. Somit besteht eine funktionale Korrelation zwischen den beiden Faktoren, die durch die in vorangegangenen Abschnitten präsentierten mechanistischen Erkenntnisse weiter erhärtet wird. Im Folgenden sollte durch eine Analyse des programmierten Zelltods in WT- und verschiedenen *knock-out*-MEF-Zelllinien die Bedeutung der PARP-1-NF- $\kappa$ B-Signalkaskade für die physiologische Reaktion der Zelle auf genotoxischen Stress ermittelt werden.

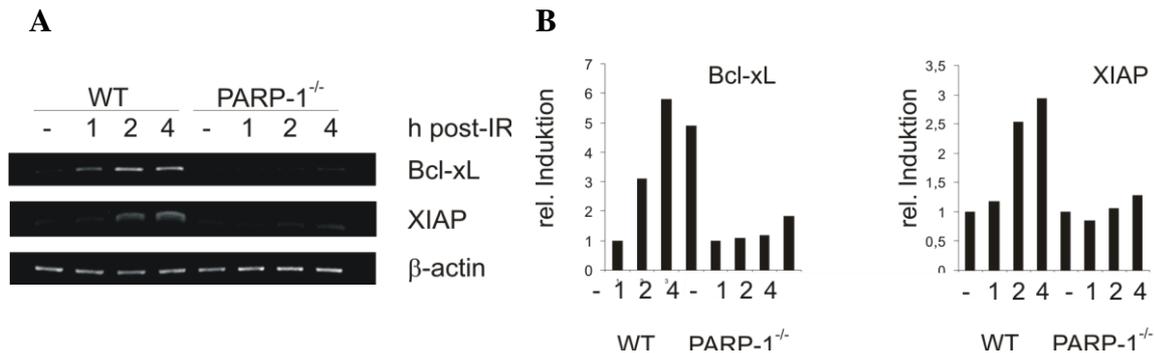
Während die  $\gamma$ -Bestrahlung von WT-MEFs keine Erhöhung der Apoptose zufolge hatte, wiesen die PARP-1-, PIASy- und IKK $\gamma$ -defizienten Zellen eine signifikant und äquivalent gesteigerte Sensitivität gegenüber IR-induziertem Zelltod auf (Abb. 4.18A). Die Tatsache, dass die Apoptoserate in den einzelnen *knock-out*-MEFs vergleichbare Werte erreicht, weist auf ein funktionales Zusammenspiel der betreffenden Faktoren in einem Signalweg hin. Ein experimenteller Ansatz um diese These zu prüfen, besteht darin, die Auswirkung der PARP-1-Inhibition auf die Apoptoseraten in IKK $\gamma$ <sup>-/-</sup>- und PIASy<sup>-/-</sup>-MEFs zu ermitteln. Sollten IKK $\gamma$  und PIASy durch Aktivierung von NF- $\kappa$ B unabhängig von PARP-1 einen Beitrag zum Überleben der Zelle im Verlauf der genotoxischen Stressantwort leisten, müsste sich das Ausmaß der Apoptose durch PARP-1-Inhibition aufgrund der Summierung der Effekte weiter erhöhen. Die Behandlung von IKK $\gamma$ - und PIASy-defizienten MEFs mit 3-AB vermochte jedoch die Apoptoserate im Gegensatz zu WT-Zellen nicht zu steigern (Abb. 4.18B).



**Abbildung 4.18. Einfluss von PARP-1, PIASy und IKK $\gamma$  auf die Auslösung von Apoptose nach  $\gamma$ -Bestrahlung.** (A) WT-, PARP-1<sup>-/-</sup>-, PIASy<sup>-/-</sup>- und IKK $\gamma$ <sup>-/-</sup>-MEFs wurden einer  $\gamma$ -IR-Dosis von 80 Gy ausgesetzt. 24 h nach Bestrahlung wurde der relative Anteil apoptotischer Zellen nach Färbung mit Annexin-V-FITC mittels FACS bestimmt. Parallel wurden nicht bestrahlte Zellen analysiert. Jedes Experiment wurde in dreifacher Ausführung angesetzt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung des jeweiligen Messpunkts an. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des t-Tests für gepaarte Stichproben errechnet. Die p-Werte für die miteinander verglichenen Messpunkte sind über diesen angegeben. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. (B) WT-, PIASy<sup>-/-</sup>- und IKK $\gamma$ <sup>-/-</sup>-MEFs wurden entweder mit DMSO oder PARP-Inhibitor 3-AB (10 mM) für 90 min vorbehandelt und dann mit 80 Gy bestrahlt. Die Analyse der Apoptoseraten und die Auswertung der Daten erfolgte wie in (A). Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Hinz durchgeführt.

Die Überlebensfaktor-Funktion von NF- $\kappa$ B wird auf seine Fähigkeit zurückgeführt, als transkriptioneller Aktivator ein breites Repertoire an anti-apoptotischen Genen (Bcl-XL, c-FLIP, cIAPs, XIAP, Gadd45 $\beta$ , and Mn-SOD) zu regulieren. Um zu klären, ob die Sensitivierung von MEFs gegenüber  $\gamma$ -IR-induzierter Apoptose in Abwesenheit von PARP-1 zum Teil durch Beeinträchtigung der Expression NF- $\kappa$ B-abhängiger anti-apoptotischer Gene bedingt ist, wurden RT-PCR-Analysen durchgeführt. In der Tat war die Induktion der anti-apoptotischen Gene Bcl-xL und XIAP in PARP-1<sup>-/-</sup>-MEFs im Vergleich zu WT-Zellen stark reduziert, was die oben geäußerte Annahme untermauert (Abb. 4.19).

Die Ergebnisse der Apoptose-Studien legen die Schlussfolgerung nahe, dass PARP-1, IKK $\gamma$  und PIASy in einem Signalweg agieren und die Zelle nach DNA-Schädigung vor Apoptose schützen.



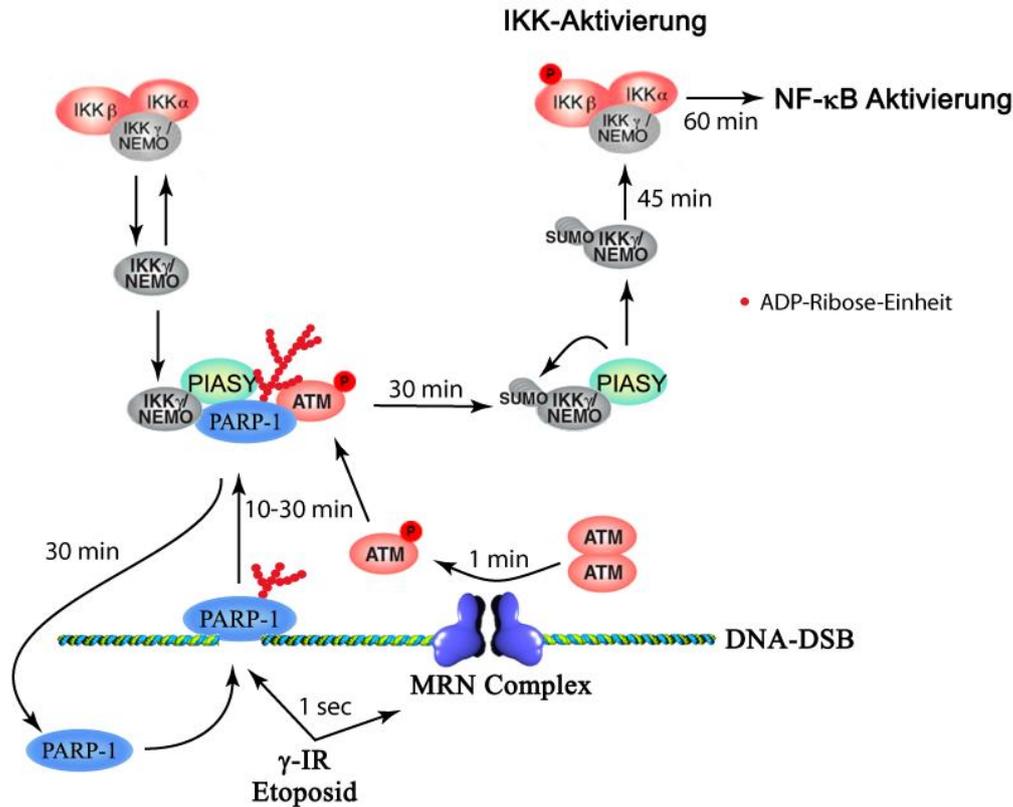
**Abbildung 4.19. PARP-1 ist für die Expression anti-apoptotischer NF-κB-Zielgene erforderlich.**

(A) Aus WT- und PARP-1<sup>-/-</sup>-MEFs wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach  $\gamma$ -IR (80 Gy) RNA-isoliert und zu cDNA revers transkribiert. Die mRNA-Profile der anti-apoptotischen NF-κB-Zielgene Bcl-xL und XIAP wurden unter Einsatz genspezifischer Primerpaare mit Hilfe von PCR bestimmt. Parallele Durchführung einer RT-PCR für das Haushaltsgen  $\beta$ -actin diente als Kontrolle. (B) Die Intensität von einzelnen Bcl-xL- bzw. XIAP-Banden wurde densitometrisch mit Hilfe der *Image J* Software bestimmt und zur Normierung auf die Intensität der jeweiligen  $\beta$ -actin-Kontrolle bezogen. Die normierte Intensität des Signals von unstimulierten WT-MEFs wurde auf eins gesetzt und alle anderen Signale darauf bezogen.

#### 4.1.13. Regulation der IKK $\gamma$ -Sumoylierung durch ein PAR-abhängiges

##### Signalosom - Zusammenfassung

In den vorangegangenen Abschnitten konnte anhand vergleichender Untersuchungen von WT- und PARP-1<sup>-/-</sup>-Zellen sowie durch Einsatz von PARP-1-Inhibitoren demonstriert werden, dass PARP-1-vermittelte Synthese von poly-(ADP-Ribose)-Polymeren entscheidend für NF-κB-Aktivierung durch genotoxischen Stress ist (Abb. 4.2-4.6). In Abbildung 4.20 werden die bisher erarbeiteten Erkenntnisse schematisch zusammengefasst. PARP-1 wird in wenigen Sekunden an DNA-Schadensfoci rekrutiert und enzymatisch aktiviert (Abb. 4.8). Die fortschreitende Automodifizierung von PARP-1 resultiert in der Dissoziation des Enzyms von DNA-Läsionen. Dadurch wird das Stresssignal vermutlich ins Nukleoplasma transportiert. Gleichzeitig wird ATM durch den sensorischen MRN-Komplex (Mre11-Rad50-NBS) aktiviert. Zwischen 10 und 30 min nach Bestrahlung wird ein nukleärer Komplex aus automodifizierter PARP-1, IKK $\gamma$ , PIASy und ATM assembliert (Abb. 4.7, 4.11, 4.17). Dabei spielen sowohl direkte Protein-Protein- als auch Protein-PAR-Wechselwirkungen eine Rolle (Abb. 4.12-4.16). Nach 30 min kommt es zu einer Destabilisierung des Signalosoms (vermutlich nach Abbau von PAR-Ketten durch PARG) gefolgt von PIASy-vermittelter IKK $\gamma$ -Sumoylierung (Abb. 4.10). Die genaue Rolle von ATM innerhalb des Signalosoms kann derzeit noch nicht genau beurteilt werden. Es ist jedoch denkbar, dass die beschriebene Ser85-Phosphorylierung von IKK $\gamma$  in diesem Signalosom stattfindet [101]. Die PARP-1-abhängige IKK $\gamma$ -Sumoylierung durch PIASy ist eine Voraussetzung für die IKK-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB.



**Abbildung 4.20. Hypothetisches Modell der PARP-1-abhängigen NF-κB-Aktivierung durch DNA-Strangbrüche.** Die bisherigen Ergebnisse wurden in Form eines Ablaufschemas zusammengefasst. Bei den angegebenen Zeiten für bestimmte Prozesse handelt es sich um Näherungswerte, die entweder in dieser Arbeit vorgestellten oder nicht gezeigten Experimenten entnommen wurden.

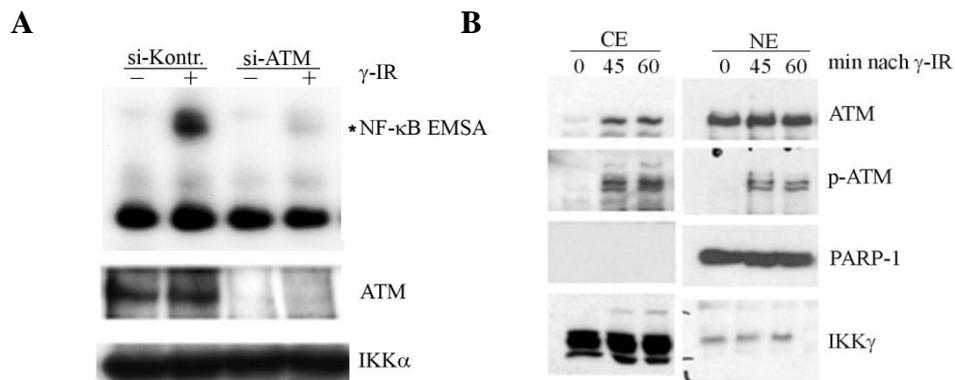
## 4.2. ATM induziert eine Lys63-Polyubiquitin-abhängige TRAF6-TAK1-IKK-Signalachse

Die im Abschnitt 4.1 präsentierten Erkenntnisse beschreiben bisher unerforschte DNA-proximale Vorgänge im DNA-Schaden-induzierten NF-κB-Signalweg. Mit dem DNA-Schadensensor PARP-1, konnte somit eine mechanistische Verbindung zwischen dem DNA-Schaden und PIASy-vermittelter IKK $\gamma$ -Sumoylierung hergestellt werden. Die Tatsache, dass in PIASy-defizienten Zellen die NF-κB-Aktivierung durch DSB-Induktoren beeinträchtigt ist (Abb. 4.10), legt einen kausalen Zusammenhang zwischen IKK $\gamma$ -Sumoylierung und IKK-Komplexaktivierung nahe. Das in Abbildung 4.20 vorgestellte Modell erlaubt vorerst jedoch keine präzisen Aussagen über den Mechanismus der IKK-Aktivierung. Im zweiten Abschnitt der Arbeit wird ein Konzept der zytoplasmatischen IKK-Aktivierung durch die oben beschriebenen nukleären Komponenten des Signalwegs erarbeitet.

#### 4.2.1. Genotoxischer Stress induziert eine Assoziation von ATM mit der Plasmamembran unabhängig vom PARP-Signalsom

Neben der Sumoylierung von IKK $\gamma$  stellt die Aktivierung der Kinase ATM ein Schlüsselereignis des DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalwegs dar [159]. Dementsprechend wird durch RNAi-vermittelte Depletion von ATM die NF- $\kappa$ B-Aktivierung nach  $\gamma$ -Bestrahlung von HepG2-Zellen blockiert (Abb. 4.21A). Allerdings ist die genaue Funktion der Kinase ATM in diesem Signalweg nicht hinreichend geklärt.

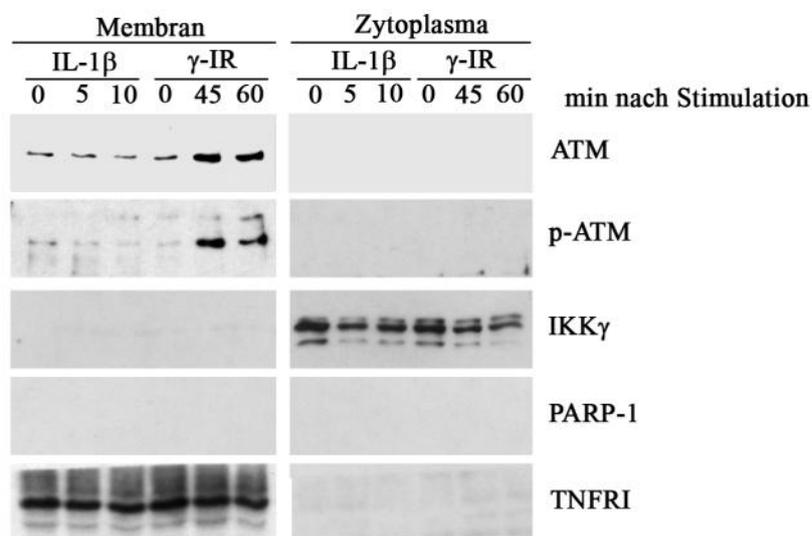
Bei Untersuchungen der subzellulären Lokalisation bekannter Regulatorproteine konnte eine substantielle Akkumulation von ATM im Zytoplasma von  $\gamma$ -bestrahlten Zellen beobachtet werden (Abb. 4.21B). Die gleiche Beobachtung wurde von Wu *et al.* nach Behandlung von Zellen mit dem Topoisomerase-II-Inhibitor Etoposid gemacht [101]. Der Nachweis mit einem phospho-ATM-Antikörper belegt, dass es sich dabei um die enzymatisch aktivierte Form der Kinase handelt. Hingegen weisen IKK $\gamma$  und PARP-1 keine Veränderungen der subzellulären Lokalisation auf.



**Abbildung 4.21. ATM ist für NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch  $\gamma$ -Bestrahlung erforderlich und wird nach Stimulation aus dem Zellkern exportiert.** (A) HepG2-Zellen wurden mit einer siRNA gegen ATM bzw. einer Kontroll-siRNA transfiziert. 72 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 40 Gy bestrahlt und 60 min danach lysiert. Die Induktion der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindeaktivität wurde durch EMSA bestimmt. Zur Bestätigung des ATM-Knockdowns wurden die Proteinextrakte im Westernblot mit einem ATM-Antikörper untersucht. Der Westernblot-Nachweis von IKK $\alpha$  diente als Ladekontrolle. (B) HepG2-Zellen wurden bestrahlt und zu verschiedenen Zeiten Zytoplasma- (CE) und Kernextrakte (NE) nach der NP-40-Methode präpariert. Die erhaltenen Extrakte wurden mit Antikörpern gegen ATM, phospho-ATM (Ser1981), PARP-1 und IKK $\gamma$  im Westernblot analysiert.

ATM gehört zur PI3-Kinasefamilie, einer Gruppe von Proteinen, die an der Signaltransduktion von Rezeptor-Tyrosinkinase und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren beteiligt ist [158]. Im Prozess der Signalweiterleitung werden die klassischen PI3-Kinasen an die innere Seite der Zytoplasmamembran rekrutiert [160]. Das experimentelle Prozedere, das

für die Zellfraktionierung in Abb. 4.21B befolgt wurde, basiert auf der Lyse der Plasmamembran mit Hilfe eines Detergenz und erlaubt daher keine Unterscheidung zwischen Membran- und Zytoplasmaproteinen. Um zu klären, ob das infolge von DNA-Schäden ins Zytoplasma translozierende ATM sich ausschließlich im Zytosol befindet oder auch an die Plasmamembran rekrutiert wird, wurde ein Zellfraktionierungsprotokoll verwendet, das auf mechanischer Zerstörung der Zellmembran beruht. Da dabei kein Detergenz eingesetzt wird, bleiben die Transmembranproteine und periphere Membranproteine meist mit den entstehenden Membranvesikeln assoziiert und können durch Ultrazentrifugation von zytoplasmatischen Proteinen separiert werden. Dieses Verfahren wurde auf HepG2-Zellen angewendet, die zu verschiedenen Zeiten nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  oder  $\gamma$ -IR geerntet worden sind (Abb. 4.22). Die Behandlung der Zellen mit IL-1 $\beta$  sollte als Kontrolle für die

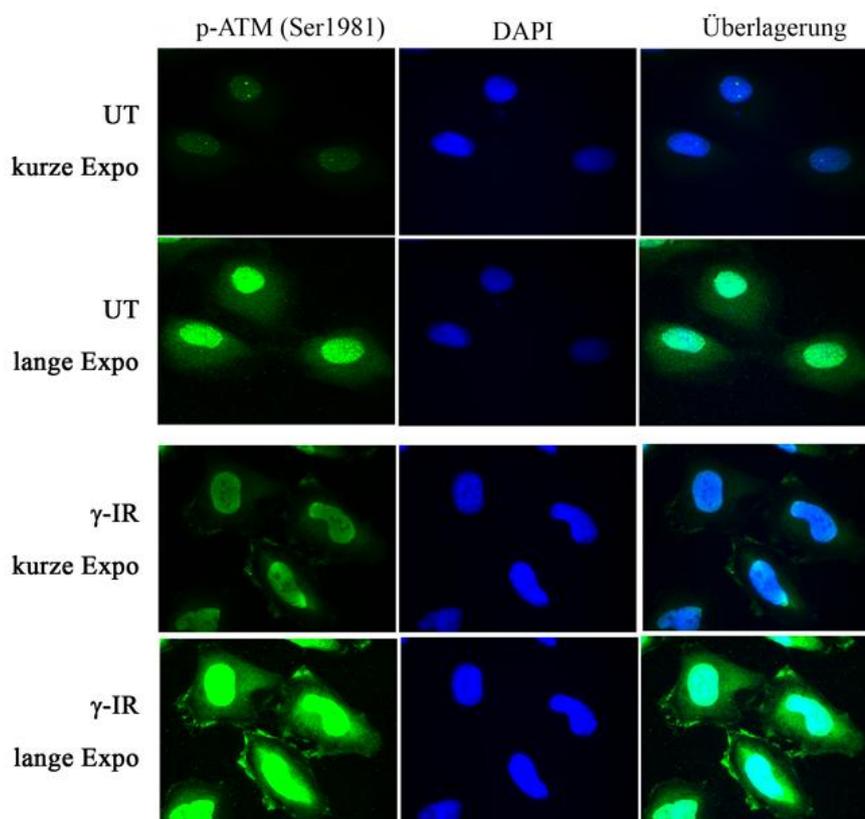


**Abbildung 4.22.  $\gamma$ -Bestrahlung induziert eine Rekrutierung von ATM an die Zytoplasmamembran.**

HepG2-Zellen wurden für verschiedene Zeiten mit IL-1 $\beta$  bzw.  $\gamma$ -IR stimuliert. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch IL-1 $\beta$  weist schnellere Kinetik als nach Stimulation durch DNA-Schäden auf. Folglich wurde die Zeitreihenanalyse so durchgeführt, dass der erste Zeitpunkt der initialen Aktivierung des IKK-Komplexes durch den jeweiligen Stimulus entspricht. Die Zellfraktionierungsprozedur beruhte auf mechanischer Zerstörung der Plasmamembran. Die erhaltenen Membran- und Zytoplasmaextrakte wurden mit Antikörpern gegen ATM, phospho-ATM (Ser 1981) und IKK $\gamma$  im Westernblot analysiert. Die Abwesenheit von PARP-1 in Zytoplasma- und Kernextrakten schließt eine Kontamination dieser Extrakte mit Kernproteinen aus. TNFR1 wurde als Membran-Markerprotein visualisiert.

Spezifität der  $\gamma$ -IR-induzierten ATM-Translokation dienen. Interessanterweise wurden beträchtliche Mengen an ATM in der Membranpräparation detektiert, die nach  $\gamma$ -Bestrahlung der Zellen anstiegen. Durch Westernblot-Analyse mit einem phospho-ATM-Antikörper konnte gezeigt werden, dass die enzymatisch aktivierte Form der Kinase in der Tat an die Plasmamembran rekrutiert wird. Dieses Phänomen ist ein spezifisches Charakteristikum der zellulären DNA-Schadensantwort, da die Proteinmengen der Kinase nach IL-1 $\beta$ -Stimulation auf dem Basalniveau blieben und keine p-ATM-Signale zu beobachten waren. Im

Zytoplasmaextrakt waren die  $\gamma$ -IR-induzierten ATM- und p-ATM-Signale, bei gleich geladenen Proteinmengen, erst nach sehr langen Expositionszeiten detektierbar (nicht gezeigt). Dies bedeutet jedoch nicht, dass das zytoplasmatische ATM-Niveau um Größenordnungen geringer ist, da aufgrund niedriger Proteinkonzentration 3-mal weniger an Zelläquivalenten von Zytoplasmaextrakten als von Membranextrakten aufgetragen werden konnte. Dennoch ist ATM in einem konzentrierteren Zustand an die Membran gebunden und könnte für die Regulation wichtiger Membran-assoziiierter physiologischer Prozesse verantwortlich sein.

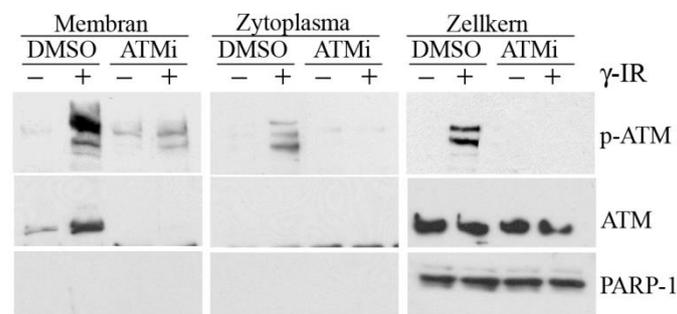


**Abbildung 4.23. Immunfluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Rekrutierung von ATM an die Zytoplasmamembran.** HeLa-Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt und 30 min nach Stimulation mit Paraformaldehyd fixiert. Für die indirekte Immunfluoreszenzanalyse wurden die fixierten Zellen mit Triton-X-100 permeabilisiert und mit einem Antikörper gegen phospho-ATM (Ser1981) inkubiert. Der Bindung des primären Antikörpers an das Antigen folgte eine Inkubation mit einem Alexa-Fluorophor-488 gekoppelten sekundären Antikörper (grüne Fluoreszenz). Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blaue Fluoreszenz). Von gleichen Zellen wurde jeweils ein Bild mit kurzer und langer Expositionszeit aufgenommen.

Alternativ zum biochemischen Nachweis der ATM-Assoziation mit der Zytoplasmamembran von  $\gamma$ -bestrahlten Zellen wurde eine immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der subzellulären Lokalisation aktiver ATM-Kinase mit Hilfe eines phospho-ATM-Antikörpers (Ser1981) vorgenommen (Abb. 4.23). Im Nucleus nicht bestrahlter Zellen (UT) ist bereits ein p-ATM-Signal sichtbar, welches jedoch nach  $\gamma$ -Bestrahlung an Intensität

stark zunimmt. Bemerkenswerterweise ließ sich in  $\gamma$ -bestrahlten Zellen die aktive ATM-Form im Bereich der Plasmamembran nachweisen. Es konnte also durch zwei alternative Verfahren gezeigt werden, dass aktiviertes ATM nach Bestrahlung von Zellen an die Plasmamembran transloziert.

ATM wird im Zellkern durch Autophosphorylierung an Ser-1981 nach Rekrutierung an den MRN-Komplex, der DNA-DSBs erkennt, aktiviert. Da die Assoziation von ATM mit der Plasmamembran Stimulus-abhängig ist, stellt sich die Frage, ob die durch ionisierende Strahlung induzierte Kinaseaktivität von ATM für dessen nukleären Export verantwortlich ist. Durch Behandlung von HepG2-Zellen mit einem spezifischen ATM-Inhibitor wurde die Translokation von ATM an die Plasmamembran vollständig blockiert (Abb. 4.24). Interessanterweise hatte die Inhibition der ATM-Aktivität sowohl eine Abnahme basaler als auch  $\gamma$ -IR-induzierter ATM-Signale im Membran-Extrakt zufolge. Folglich führen auch die unter basalen Bedingungen auftretenden DNA-Schäden zu einer gewissen Translokation von ATM an die Plasmamembran. Die Ergebnisse der ATM-Inhibitorstudien demonstrieren, dass die enzymatische Aktivität von ATM für den Export der Kinase aus dem Zellkern ins Zytoplasma erforderlich ist.

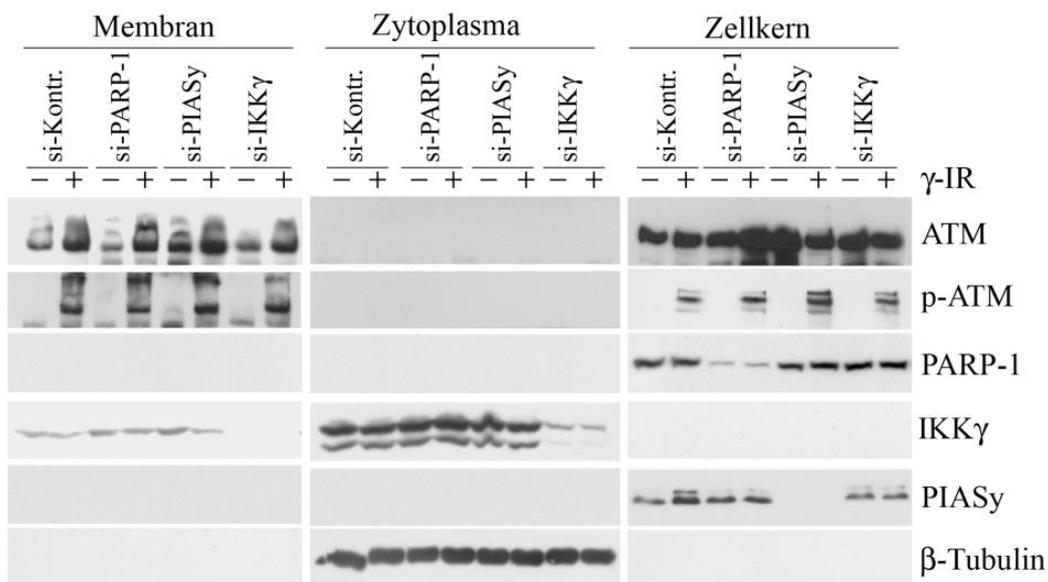


**Abbildung 4.24. Die Kinaseaktivität von ATM ist für deren Kernexport erforderlich.**

HepG2-Zellen wurden für 30 min mit dem ATM-Inhibitor Ku-55933 (10  $\mu$ M) bzw. DMSO vorbehandelt und anschließend einer Strahlendosis von 40 Gy ausgesetzt. 45 min nach Bestrahlung wurden die Zellen einer Zellfraktionierungsprozedur unterzogen, die auf mechanischer Zerstörung der Plasmamembran basiert. Die erhaltenen Membran-, Zytoplasma- und Kernextrakte wurden mit Antikörpern gegen ATM, phospho-ATM (Ser 1981) und PARP-1 im Westernblot analysiert. Die Abwesenheit von PARP-1 in Zytoplasma- und Kernextrakten schließt eine Kontamination dieser Extrakte mit Kernproteinen aus. Die Wirksamkeit des ATM-Inhibitors konnte anhand der Reduktion von phospho-ATM-Signalen bestätigt werden.

Wu *et al.* schlugen vor, dass sumoyliertes IKK $\gamma$  von ATM erkannt und an Ser85 phosphoryliert wird [101]. Daraufhin soll der Komplex aus IKK $\gamma$  und ATM ins Zytoplasma translozieren und auf eine nicht verstandene Weise zu einer Aktivierung des IKK-Komplexes führen. Das im ersten Teil dieser Arbeit beschriebene PAR-abhängige Signalosom schafft vermutlich die molekularen Voraussetzungen für die Sumoylierung von IKK $\gamma$  und enthält

andererseits die Kinase ATM. Ausgehend von der von Wu *et al.* formulierten Hypothese, stellt sich die Frage, ob die Inkorporierung von ATM in das nukleäre Signalosom für den nukleären Export und die anschließende Assoziation der Kinase mit der Plasmamembran erforderlich ist. Zur Klärung dieser Möglichkeit wurde der Einfluss einer RNAi-vermittelten Depletion der Signalosom-Komponenten PARP-1, PIASy und IKK $\gamma$  auf die Assoziation von ATM mit der Plasmamembran untersucht (Abb. 4.25). Die strahleninduzierte Translokation von ATM war durch den Verlust von IKK $\gamma$  oder den anderen Signalosom-Komponenten nicht beeinträchtigt. Darüberhinaus konnten, mit Ausnahme von ATM, keine Stimulus-abhängigen Konzentrationsänderungen von Signalosom-Komponenten in den untersuchten Kompartimenten festgestellt werden (Abb. 4.21B, 4.22, 4.24, 4.25). Zusammengenommen belegen diese Ergebnisse, dass der nukleäre Export von ATM unabhängig vom Einbau der Kinase in das PARP-Signalosom sowie von IKK $\gamma$  und dessen Sumoylierung ist. Somit stellt sich die Frage, ob die Translokation von ATM überhaupt an der Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch genotoxischen Stress beteiligt ist.



**Abbildung 4.25. Die Membran-Translokation von ATM erfolgt unabhängig vom PARP-Signalosom.** HepG2-Zellen wurden entweder mit einer Kontroll-siRNA bzw. siRNAs gegen PARP-1, PIASy oder IKK $\gamma$  transfiziert. 72 h nach Transfektion wurden die Zellen bestrahlt und zu verschiedenen Zeiten Membran-, Zytoplasma- und Kernextrakte präpariert. Die erhaltenen Extrakte wurden mit Antikörpern gegen ATM, phospho-ATM (Ser1981), PARP-1, IKK $\gamma$  und PIASy im Westernblot analysiert. Die Immunoblot-Analyse von  $\beta$ -Tubulin diente als Ladekontrolle.

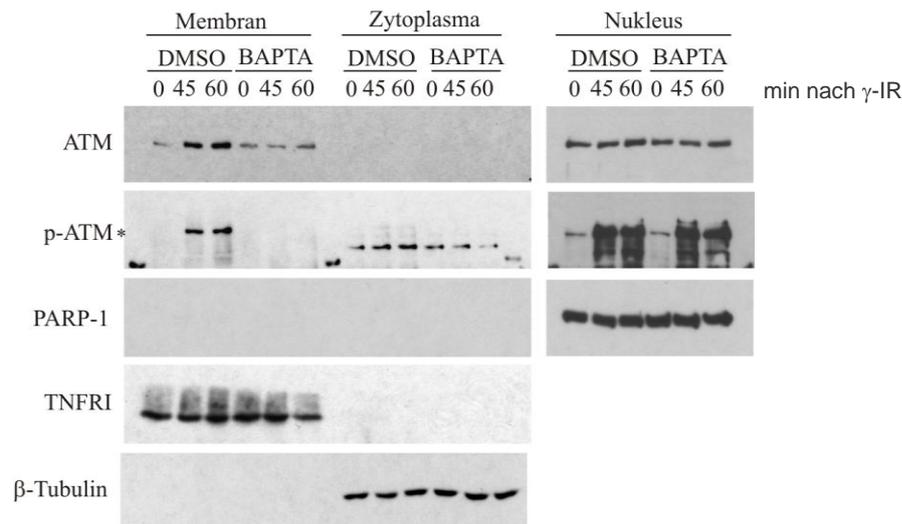
---

#### 4.2.2. $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der ATM-Rekrutierung an die Plasmamembran und der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch genotoxischen Stress

Der Kernexport von Makromolekülen mit einem Molekulargewicht größer als 30 kDa ist ein Energie-verbrauchender Vorgang, der von Kernexport-Rezeptoren (Exportinen) in Kooperation mit RanGTP bewerkstelligt wird [161]. Da ATM ein Molekulargewicht von ca. 350 kDa aufweist, sollte dessen nukleärer Export nach einem solchen Mechanismus erfolgen. Der Kernexport vieler Proteine (z.B. p53, FOXO, I $\kappa$ B $\alpha$ ) wird vom Exportin Crm1 reguliert [162]. Da sich jedoch die Translokation von ATM als insensitiv gegenüber dem Crm1-Inhibitor Leptomycin B erwies, konnte Crm1 als Export-Rezeptor für ATM ausgeschlossen werden (Daten nicht aufgeführt). Der Kern-Zytoplasma-Transport des Glukokortikoid-Rezeptors verläuft ebenfalls unabhängig vom Crm1-System und wird vom  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Exportin Calreticulin gesteuert [163].

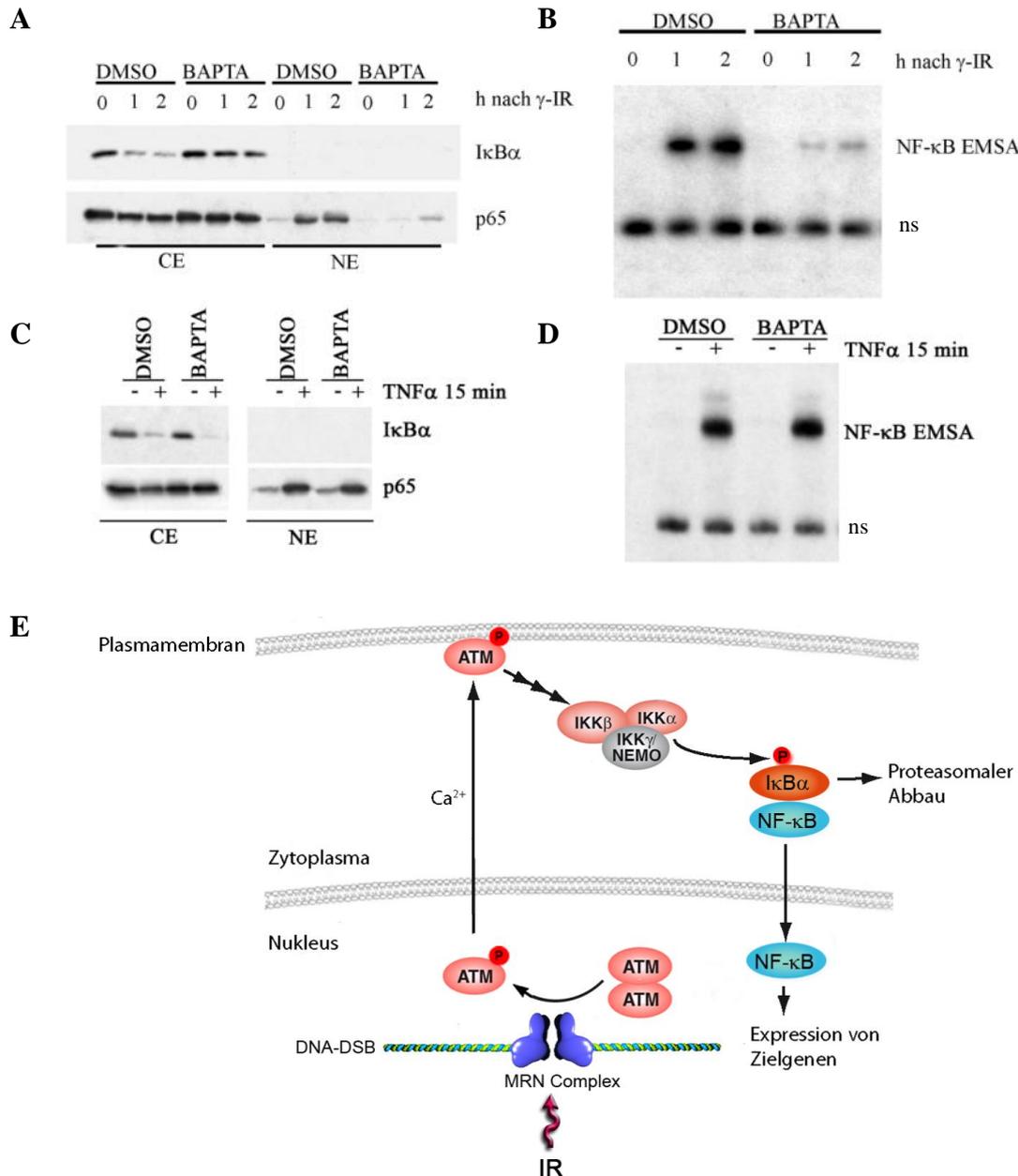
Um zu klären, ob der ATM-Kernexport von der Verfügbarkeit freier  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen abhängt, wurden Zellen mit dem membranpermeablen  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelator BAPTA-AM behandelt (Abb. 4.26). Bemerkenswerterweise war die  $\gamma$ -IR induzierbare Akkumulation von ATM an der Plasmamembran nach der Herabsetzung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration inhibiert. Diese Beobachtung legt nahe, dass der Export von ATM aus dem Nukleus ins Zytoplasma als  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Vorgang von Calreticulin gesteuert werden könnte.

Die Tatsache, dass der ATM-Kernexport von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen abhängig ist, wirft die Frage auf, ob genotoxischer Stress messbare Veränderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bewirkt. Um dies zu klären, wurden Zeitverläufe der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach  $\gamma$ -Bestrahlung von HepG2-Zellen mit Hilfe des Zell-permeablen  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikators Fluo-4-AM aufgenommen. Es konnten jedoch keine signifikanten Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration festgestellt werden (Daten nicht aufgeführt). Es wird daher angenommen, dass nicht ein induzierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, sondern die Verfügbarkeit freier  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen für die Regulation des Kern-Zytoplasma-Transports von ATM entscheidend ist.



**Abbildung 4.26.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sind für den nukleären Export und die Rekrutierung von ATM an die Plasmamembran erforderlich.** (A) HepG2-Zellen wurden entweder mit DMSO oder BAPTA-AM (30  $\mu\text{M}$ ) für 30 min präinkubiert und anschließend  $\gamma$ -Strahlen ausgesetzt (40 Gy). Zu verschiedenen Zeiten nach Stimulation wurden die Zellen einer Zellfraktionierungsprozedur unterworfen (mechanische Zerstörung der Plasmamembran). Die erhaltenen Membran- und Zytoplasmaextrakte wurden mit Antikörpern gegen ATM, phospho-ATM (Ser 1981, markiert durch Asterisk),  $\beta$ -Tubulin, TNFRI und PARP-1 analysiert. Für die Kernproteine ATM/phospho-ATM und PARP-1 wurden Kernextrakte in die Untersuchung einbezogen. Die Analyse der Fraktionen mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Tubulin (zytoplasmatischer Marker), TNFRI (Membran-Marker) und PARP-1 (nukleärer Marker) wurde zur Evaluierung der Trennungsqualität der Fraktionierung vorgenommen.

Sollte die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Assoziation von ATM mit der Plasmamembran eine kritische Rolle für den DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalweg spielen, müsste die Depletion von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ebenfalls zu einer Inhibition der NF- $\kappa$ B-Aktivierung führen. In der Tat bewirkte die Applikation von BAPTA-AM eine robuste Hemmung des strahlungsinduzierten I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbaus im Zytoplasma und verhinderte dadurch die Translokation der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 in den Zellkern (Abb. 4.27A). Folglich wurde auch die durch  $\gamma$ -IR induzierte NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität durch intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Depletion reprimiert (Abb. 4.27B). Bemerkenswerterweise zeigte BAPTA-AM keinen hemmenden Effekt auf den TNF $\alpha$ -induzierten NF- $\kappa$ B-Signalweg (Abb. 4.27C und D). Ähnliche Befunde im Hinblick auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch genotoxischen Stress wurden durch Berchtold *et al.* erhoben [164]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige ATM-Translokation ins Zytoplasma und anschließende Assoziation der Kinase mit der Plasmamembran eine spezifische Funktion für die Aktivierung des IKK-NF- $\kappa$ B-Systems durch  $\gamma$ -IR erfüllt (Abb. 4.27E).



**Abbildung 4.27. Selektive  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der IKK- und NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch  $\gamma$ -IR.**

(A) HEK293T-Zellen wurden entweder mit dem Lösungsmittel DMSO oder dem membranpermeablen  $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexbildner BAPTA-AM (30  $\mu\text{M}$ ) für 30 min präinkubiert und anschließend  $\gamma$ -Strahlen ausgesetzt (10 Gy). Eine bzw. zwei Stunden nach Bestrahlung wurden die Zellen einer Zellfraktionierungsprozedur unterworfen (NP-40-Methode). Die Zytoplasma- und Kernextrakte wurden mit Antikörpern gegen I $\kappa$ B $\alpha$  und die NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 im Westernblot analysiert. (B) Die  $\gamma$ -IR-induzierte DNA-Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B wurde in Kernextrakten aus (A) durch EMSA bestimmt. ns: unspezifische Bande. (C) HEK293T-Zellen wurden wie in (A) mit BAPTA-AM vorbehandelt, für 15 min mit TNF $\alpha$  (20 ng/ml) stimuliert und anschließend analog zu (A) analysiert. (D) NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität in Kernextrakten aus (C) wurde durch EMSA ermittelt. (E) Signalschema der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Translokation von ATM an die Plasmamembran.

Die Beobachtung, dass die Translokation von ATM an die Plasmamembran unabhängig vom PARP-Signalosom abläuft (Abb. 4.25), jedoch gleichermaßen für die Aktivierung des IKK-NF- $\kappa$ B-Systems nach DNA-Schädigung erforderlich ist, wirft die Frage auf, ob eine zusätzliche NF- $\kappa$ B-Signaltransduktionsachse existiert, die von ATM an der Plasmamembran

---

ausgelöst wird. Diese Signalkaskade könnte parallel und unabhängig vom PARP-1-PIASy-IKK $\gamma$ -Weg ablaufen und gleichwohl essentiell für die IKK-Aktivierung sein.

#### **4.2.3. RNAi-basierte Suche nach weiteren Komponenten des DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalwegs**

Der überwiegende Teil Rezeptor-vermittelter NF- $\kappa$ B-Signalwege wird durch Bindung eines Liganden an einen korrespondierenden Rezeptor an der Zytoplasmamembran initiiert. Die Mechanismen der Signalweiterleitung ausgehend von Oberflächenrezeptoren zum IKK-NF- $\kappa$ B-System im Zytoplasma sind relativ gut verstanden. Charakteristisch sind Prozesse wie die Rekrutierung von Adapterproteinen und daraus resultierende Oligomerisierung und Aktivierung von E3-Ubiquitin-Ligasen der TRAF-Familie, die Lys63-verknüpfte Polyubiquitin-Ketten an Substratproteine konjugieren, Bindung von vorgeschalteten IKK-Kinasen sowie des IKK-Komplexes über Lys63-Ubiquitin-bindende Komponenten an Polyubiquitin-Ketten und daraus resultierende IKK-Aktivierung (Abschnitt 1.2). In vorangegangenen Abschnitten wurde demonstriert, dass die Translokation von ATM an die Plasmamembran entscheidend für die Signalübertragung im DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalweg ist. Die von ATM an der Membran ausgelöste Signalkaskade könnte auf molekularen Prinzipien basieren, die analog zur Signalweiterleitung in klassischen NF- $\kappa$ B-Kaskaden sind. Deshalb wurden Komponenten der Rezeptor-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalwege auf ihre eventuelle Beteiligung an der DNA-Schadenskaskade im Rahmen eines RNAi-Screens getestet.

Gegen ausgewählte Komponenten der klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwege wurden synthetische siRNAs generiert und in verschiedenen Zelllinien getestet. Der Einfluss der Depletion der untersuchten Faktoren auf NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch  $\gamma$ -Strahlen wurde mittels EMSA ermittelt. Der Knockdown der Proteine selbst wurde durch Westernblot-Analysen bestätigt. Die Ergebnisse dieser Studie sind in Abbildung 4.28 zusammengefasst.

Als Adapterproteine bzw. E3-Ubiquitin-Ligasen des TNF-Signalwegs wurden RIP1 und TRAF2 untersucht. Für beide Proteine konnte eine Beteiligung an der DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalkaskade ausgeschlossen werden. Eine Expressionshemmung von MALT1 und Bcl10, den Adapterproteinen der T-Zell-Rezeptor-Signalkaskade bzw. von IRAK1, dem Adapterprotein des IL-1-Signalwegs, hatte ebenfalls keinen Effekt auf die untersuchte Signalkaskade. Hingegen konnte für TRAF6, die E3-Ubiquitin-Ligase der IL-1-, Toll-like- und T-Zell-Rezeptor-Signalwege, eine eindeutige Beteiligung an der NF- $\kappa$ B-Aktivierung infolge genotoxischer Stressantwort nachgewiesen werden.

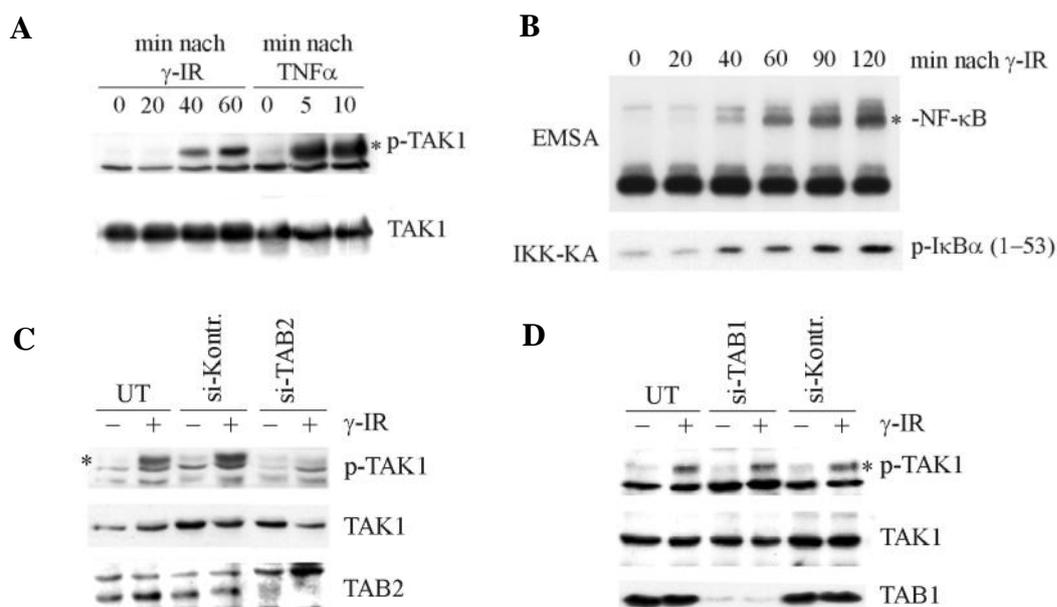
Protein	Inhibition der NF- $\kappa$ B-Aktivierung nach $\gamma$ -IR
RIP1	-
TRAF2	-
MALT1	-
Bcl10	-
IRAK1	-
TRAF6	+
TAK1	+
TAB1	-
TAB2	+
TAB3	+
Ubc13	+

**Abbildung 4.28. RNAi-Screen zur Identifikation von Regulatoren des DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalwegs.** Die aufgeführten Schlüsselregulatoren klassischer NF- $\kappa$ B-Signalwege wurden mittels RNAi depletiert und ihr Einfluss auf NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch  $\gamma$ -Bestrahlung mittels EMSA untersucht. Um eventuelle unspezifische Effekte der siRNAs auszuschließen, wurden mindestens zwei verschiedene synthetische siRNAs gegen jeden untersuchten Faktor eingesetzt. Darüberhinaus wurden die Experimente in HeLa, HEK293T sowie HepG2 Zellen durchgeführt, um zelllinienspezifische Effekte auszumitteln. Der RNAi-Screen wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Hinz durchgeführt.

Ubc13, die E2-Ubiquitin-Ligase der Lys63-Ubiquitinierungsmaschinerie, erwies sich ebenfalls als essentiell für die DNA-Schaden-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung, was die Schlussfolgerung nahe legt, dass TRAF6-vermittelte Lys63-Polyubiquitinierung eine entscheidende Rolle in diesem Signalweg spielt. Darüberhinaus war die  $\gamma$ -Strahlen-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung von der IKK-vorgeschalteten Kinase TAK1 abhängig. TAK1 bildet mit den Proteinen TAB1, TAB2 bzw. TAB3 den sogenannten TAK-Kinasekomplex. Die Bindung der Adapterproteine TAB2/TAB3 an Lys63-Polyubiquitin-Ketten ist für die Aktivierung von TAK1 und damit von IKK unabdingbar. Die Analyse dieser Faktoren im Rahmen des RNAi-Screens ergab, dass TAB2, nicht jedoch TAB1, benötigt wird. Eine Depletion von TAB3 führte ebenfalls zu einer starken Beeinträchtigung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Allerdings konnte mangels verfügbarer funktionierender Antikörper kein Knockdown für TAB3 untersucht werden.

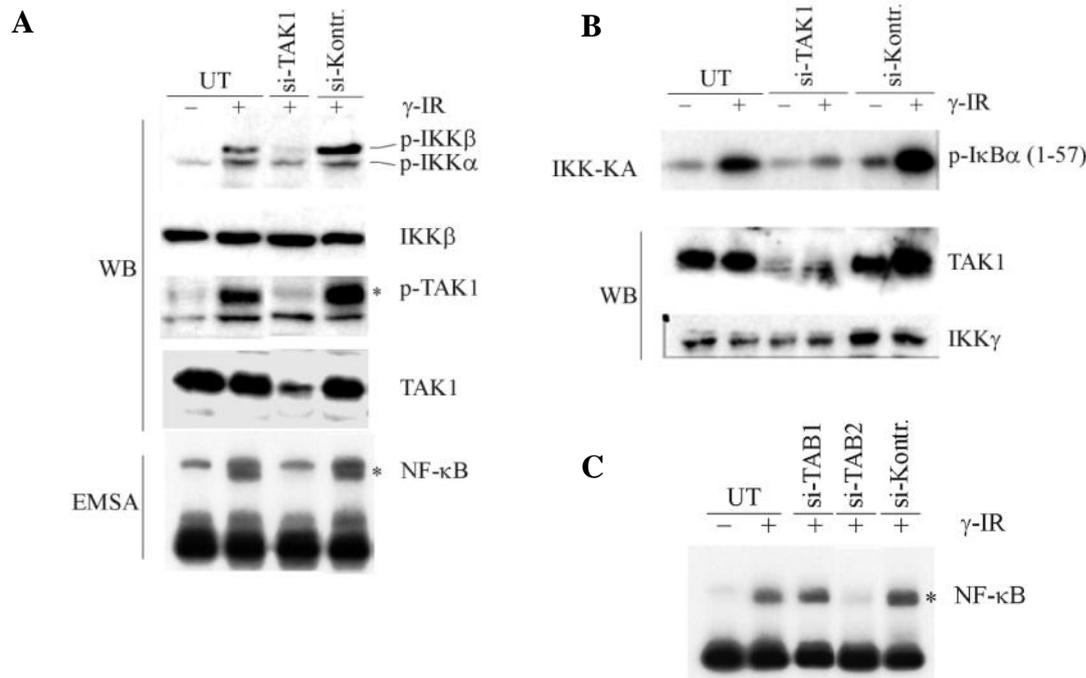
#### 4.2.4. IKK-Aktivierung durch genotoxischen Stress wird durch den TAK1-Kinasekomplex vermittelt

Angesichts der Identifizierung der TAK1-Kinase als einen Regulator der DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Antwort stellt sich die Frage, ob diese Kinase auch tatsächlich durch genotoxischen Stress aktiviert wird. Eine trans-Autophosphorylierung von TAK1 an Thr-187 gilt als eine Voraussetzung für die Induktion der Kinaseaktivität. Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers, der diese phosphorylierte Form erkennt, ist es somit möglich, den Aktivitätsstatus der Kinase in Zelllysaten zu verfolgen. TAK1 wird bekanntlich durch TNF $\alpha$  induziert und ist für die Aktivierung des IKK-Komplexes in diesem Signalweg erforderlich [71]. Bereits 5 min nach Stimulation von HepG2-Zellen mit TNF $\alpha$  ist aktivierte TAK1 nachzuweisen (Abb. 4.29A). Bemerkenswerterweise wird TAK1 ebenfalls durch  $\gamma$ -IR aktiviert, allerdings mit verzögerter Kinetik. Die phospho-TAK1-Signale sind 40 min nach  $\gamma$ -



**Abbildung 4.29. Aktivierung des TAK1-Kinasekomplexes durch  $\gamma$ -IR stimmt zeitlich mit der Aktivierung von IKK und NF- $\kappa$ B überein.** (A) HepG2-Zellen wurden mit 40 Gy bestrahlt bzw. mit TNF $\alpha$  (20 ng/ml) stimuliert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation wurden Proteinextrakte hergestellt und der Aktivitätsstatus von TAK1 mit einem Antikörper gegen phospho-TAK1 (Thr187, Asterisk) analysiert. Anschließend wurde die Gesamt-TAK1-Menge in jeder Probe mit einem pan-TAK1-Antikörper visualisiert. (B) Proteinextrakte von  $\gamma$ -bestrahlten HepG2-Zellen wurden hinsichtlich der Induktion von NF- $\kappa$ B-DNA-Bindeaktivität mittels EMSA untersucht (oben, spezifische NF- $\kappa$ B-Bande mit einem Asterisk markiert). Parallel dazu wurde die Aktivierung der IKK-Kinasen durch IKK-Immunkomplex-Kinaseassay analysiert. Dazu wurde der IKK-Komplex mit einem IKK $\gamma$ -Antikörper immunopräzipitiert. Als Substrat für IKK-Kinasen (IKK $\alpha$ /IKK $\beta$ ) diente rekombinantes GST-I $\kappa$ B $\alpha$  (1-53). Phosphoryliertes GST-I $\kappa$ B $\alpha$  (1-53) wurde nach SDS-PAGE durch Autoradiographie visualisiert. Das Experiment wurde in Kooperation mit Dr. Michael Hinz durchgeführt. (C) HepG2-Zellen wurden mit einer TAB2- bzw. einer Kontroll-siRNA transfiziert. 72 h nach Transfektion wurden diese Zellen zusammen mit nicht-transfizierten Zellen (UT) mit 40 Gy bestrahlt. Proteinextrakte, die 60 min nach Bestrahlung gewonnen wurden, sind mit Antikörpern gegen phospho-TAK1 (Thr187, Asterisk), pan-TAK1 und TAB2 analysiert worden. (D) Der Effekt eines TAB1-Knockdowns auf TAK1-Aktivierung wurde analog zu (C) untersucht.

Bestrahlung sichtbar und nehmen bis 60 min an Intensität zu. In Abbildung 4.29B ist der Zeitverlauf der IKK-Aktivierung und der Induktion der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindeaktivität durch  $\gamma$ -IR dargestellt. Aus diesen Experimenten wird deutlich, dass die Kinetik der TAK1-Aktivierung mit der Induktion der IKK-Aktivität und der Aktivierung von NF- $\kappa$ B zeitlich kongruent ist.



**Abbildung 4.30. TAK1 ist der Aktivierung von IKK $\beta$  und damit NF- $\kappa$ B im DNA-Schadensignalweg vorgeschaltet.** (A) HepG2-Zellen wurden mit einer siRNA gegen TAK1 bzw. einer Kontroll-siRNA transfiziert. 72 h nach Transfektion wurden diese Zellen zusammen mit nicht-transfizierten Zellen (UT) mit 40 Gy bestrahlt und 60 min danach lysiert. Proteinextrakte wurden mit Antikörpern gegen phospho-IKK $\alpha$  (Ser176/180)/IKK $\beta$  (Ser177/181), pan-IKK $\beta$ , phospho-TAK1 (Thr187, markiert mit Asterisk) und pan-TAK1 analysiert. Parallel dazu wurde die Induktion der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindeaktivität durch EMSA bestimmt. Der Asterisk markiert das spezifisch induzierte NF- $\kappa$ B-Signal. (B) Die Transfektion von siRNAs und  $\gamma$ -Bestrahlung wurde analog zu (A) durchgeführt. Die Induktion der IKK-Aktivität wurde mittels IKK-Immunkomplex-Kinaseassay mit GST-IkBa als Substrat bestimmt. Die Depletion von TAK1 mittels RNAi wurde im Westernblot kontrolliert. Westernblot-Analyse von IKK $\gamma$  bestätigt äquivalenten Einsatz an Lysatmengen für jede Kinasereaktion. Das Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Hinz durchgeführt. (C) DNA-Schaden-induzierte NF- $\kappa$ B-DNA-Bindeaktivität wurde nach Expressionshemmung von TAB1 bzw. TAB2 mittels EMSA untersucht.

Das TAK1-Bindeprotein TAB2 und das homologe TAB3 sind für die Aktivierung der TAK1-Kinase durch TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  erforderlich [165, 166]. Um zu prüfen, ob die Induktion dieser Kinase durch DNA-Schäden ebenfalls von Untereinheiten des TAK1-Kinasekomplexes abhängt, wurden TAB2 (Abb. 4.29C) und TAB1 (Abb. 4.29D) mittels RNAi depletiert. Im Gegensatz zu TAB1 hatte der TAB2-Knockdown eine deutliche Reduktion der TAK1-Phosphorylierung zufolge. Demnach kann TAB2 als eine essentielle Komponente des DNA-

---

Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalwegs definiert werden, das der TAK1-Aktivierung vorgeschaltet ist. Hingegen scheint TAB1 für diese Signalkaskade keine Rolle zu spielen.

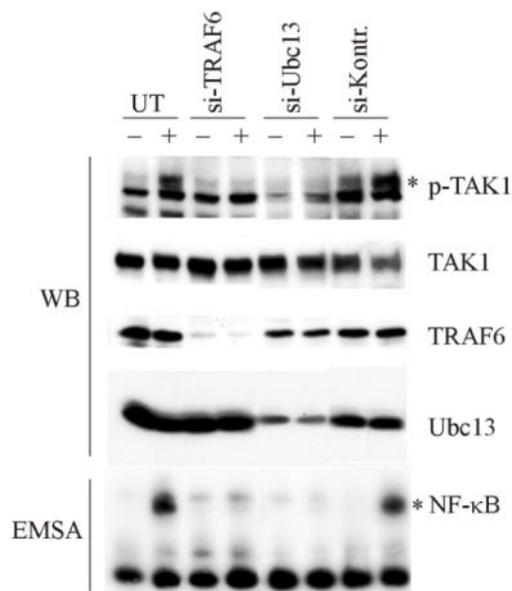
Biochemische Untersuchungen von Wang *et al.* belegen, dass TAK1 *in vitro* IKK $\beta$  an Serinen 177 und 181 der Aktivierungsschleife phosphorylieren und aktivieren kann [167]. Die zeitliche Übereinstimmung der Induktion der TAK1-Kinase durch  $\gamma$ -IR und der Aktivierung des IKK-Komplexes legt nahe, dass TAK1 für die IKK-Aktivierung *in vivo* verantwortlich sein könnte. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden HepG2-Zellen mit Kontroll- bzw. TAK1-siRNAs transfiziert. Der TAK1-Knockdown hatte konsequenterweise eine starke Reduktion des phospho-TAK1-Signals zufolge (Abb. 4.30A, WB). Die Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von IKK $\beta$ /IKK $\alpha$  ergab, dass die Aktivierung von IKK $\beta$  durch Depletion von TAK1 erheblich beeinträchtigt wird. Dieser Effekt spiegelt sich auch in der Analyse der IKK-Aktivität mittels Kinaseassay (Abb. 4.30B, IKK-KA) oder der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch EMSA (Abb. 4.30A, EMSA) wieder. Da TAB2, nicht jedoch TAB1, für die Aktivierung von TAK1 erforderlich ist (Abb. 4.30C), hängt auch die Induktion der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindeaktivität durch  $\gamma$ -IR von dieser Untereinheit des TAK1-Kinasekomplexes ab (Abb. 4.30C).

De facto demonstrieren diese Ergebnisse, dass der TAK1-Kinasekomplex *in vivo* für die Phosphorylierung und Aktivierung von IKK $\beta$  im Rahmen genotoxischer Stressantwort verantwortlich ist und damit eine zentrale regulatorische Rolle in dieser NF- $\kappa$ B-aktivierenden Kaskade übernimmt. Das Adapterprotein TAB2 verfügt über Ubiquitin-Bindedomänen und kann TAK1 *in vitro* nur in Anwesenheit von Lys63-verknüpften Ubiquitin-Polymeren aktivieren [167]. Bei klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegen ist die Modifikation von vorgeschalteten Signalproteinen durch Lys63-Polyubiquitin für die Aktivierung des TAK1-IKK-NF- $\kappa$ B-Systems entscheidend (Abschnitt 1.2.1). Es stellt sich also die Frage, ob nicht-degradative Polyubiquitinierung eine Rolle für die DNA-Schaden-induzierte NF- $\kappa$ B-Signalkaskade spielt.

#### 4.2.5. TRAF6 und Ubc13 sind als Komponenten der Lys63-Ubiquitinierungsmaschinerie für TAK1-Aktivierung durch $\gamma$ -IR notwendig

Die Konjugation von Lys63-vernetzten Ubiquitin-Polymeren an Substratproteine wird durch E3-Ubiquitin-Ligasen der TRAF-Familie in Kooperation mit dem dimeren E2-Enzymkomplex Ubc13-Uev1A bewerkstelligt [72]. Während TRAF2 und TRAF5 für Lys63-Polyubiquitinierung im TNF $\alpha$ -Signalweg verantwortlich sind, ist TRAF6 das zentrale E3-Protein der IL-1/Toll-Signalkaskade.

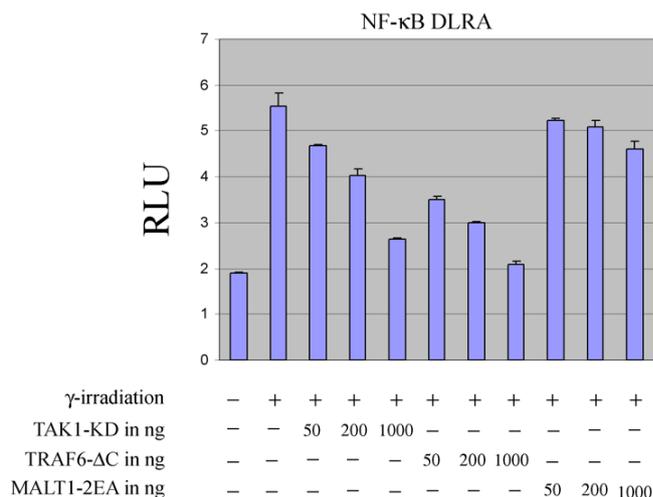
Um zu beurteilen, ob die durch DNA-Schäden verursachte TAK1- und IKK-Aktivierung von Lys63-Ubiquitin-Polymeren abhängt, wurden Ubc13, TRAF2 und TRAF6 mittels RNAi depletiert. Der Verlust von TRAF2 hatte keinen Einfluss auf NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch  $\gamma$ -Bestrahlung (Daten nicht aufgeführt). Hingegen bewirkte der Knockdown von Ubc13 und TRAF6 eine massive Beeinträchtigung der TAK1- (Abb. 4.31 WB) und NF- $\kappa$ B-Aktivierung (Abb. 4.31 EMSA, siehe auch Abb. 4.28). Diese Daten liefern eine weitere Evidenz dafür, dass Lys63-Polyubiquitinierung eine zentrale Rolle für die Aktivierung des IKK-NF- $\kappa$ B-Systems im Verlauf genotoxischer Stressantwort spielt.



**Abbildung 4.31. TRAF6 und Ubc13 sind als Komponenten der Lys63-Ubiquitinierungsmaschinerie für NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch  $\gamma$ -IR erforderlich.** Der Effekt eines RNAi-vermittelten Knockdowns von TRAF6 und Ubc13 auf  $\gamma$ -IR-induzierte TAK1- und NF- $\kappa$ B-Aktivierung wurde in HepG2-Zellen analysiert. TAK1-Aktivitätsstatus wurde durch Westernblot-Analyse mit einem Antikörper gegen phospho-TAK1 (Thr187, gekennzeichnet durch Asterisk) bestimmt. Visualisierung von pan-TAK1 bestätigt gleichmäßige Beladung des Gels. Die Depletion von TRAF6 und Ubc13 wurde durch Westernblot-Analyse nachgewiesen. Der Einfluss der Expressionshemmung von TRAF6 und Ubc13 auf DNA-Schaden-induzierte NF- $\kappa$ B-DNA-Bindeaktivität (Asterisk) wurde mittels EMSA untersucht.

#### 4.2.6. Dominant-negative Mutanten von TRAF6 und TAK1 inhibieren $\gamma$ -IR-induzierte NF- $\kappa$ B-abhängige Transkription

Alle bisher getroffenen Aussagen zur Rolle von Ubc13, TRAF6, TAB2 und TAK1 für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch DNA-Schäden beruhen auf RNAi-basierten experimentellen Ansätzen. Der Einsatz von Mutanten der zu untersuchenden Faktoren, die nach Überexpression dominant-negativ auf die endogenen Pendanten wirken, stellt einen alternativen „*loss of function*“-Ansatz dar. Im Fall von TRAF6 wird durch Deletion der N-terminalen RING-Domäne eine dominant-negative Mutante generiert [168]. Diese Mutante ist nicht in der Lage die Synthese von Lys63-Polyubiquitin-Ketten zu vermitteln und hemmt durch kompetitive Verdrängung von endogenem TRAF6 den Signalfluss. Für TAK1 ist mit der Kinase-inaktiven K63W-Punktmutante ebenfalls eine dominant-negative Form beschrieben worden [169]. Um die mittels RNAi-Technologie erhobenen Daten weiter zu



**Abbildung 4.32.  $\gamma$ -IR-induzierte NF- $\kappa$ B-abhängige Transkription wird von dominant-negativen TRAF6- und TAK1-Mutanten inhibiert.** HepG2-Zellen wurden in getrennten Ansätzen mit ansteigenden Mengen von Vektoren für dominant-negatives TRAF6 (TRAF6- $\Delta$ C), TAK1 (TAK1-KD) oder MALT1 (MALT-2EA) transfiziert. Zusätzlich enthielt jeder Transfektionsansatz einen für *firefly*-Luciferase kodierenden NF- $\kappa$ B-Reportergen-Vektor und einen für *renilla*-Luciferase kodierenden Kontrollvektor. Jedes Transfektionsexperiment wurde in dreifacher Ausführung angesetzt. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion  $\gamma$ -IR (40 Gy) ausgesetzt und 6 h danach lysiert. Die Aktivitäten der beiden Luciferasen wurden durch das Dual-Luciferase-Verfahren gemessen. Der Quotient aus der *firefly*- und der *renilla*-Luciferase-Aktivität ergab für jede Messbedingung eine relative Luciferase-Aktivität (RLU), deren Wert die transkriptionelle Aktivität von NF- $\kappa$ B reflektiert. Die Fehlerbalken wurden aus der einfachen Standardabweichung von normierten Luciferase-Aktivitäten der drei unabhängigen Transfektionsexperimente berechnet.

untermauern, wurden die für diese Mutanten kodierenden Vektoren zusammen mit einem NF- $\kappa$ B-respondiven Luciferase-Genreportersystem in HepG2-Zellen transfiziert. Als Negativkontrolle wurde die 2EA-Mutante von MALT1 verwendet, die nicht in der Lage ist an

---

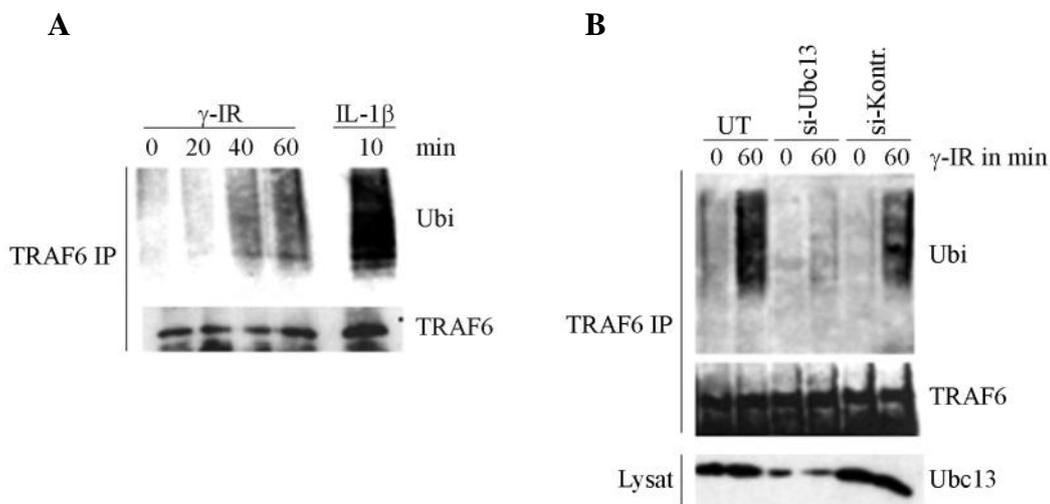
TRAF6 zu binden und als dominant-negative Form spezifisch Antigen-Rezeptor-induzierte NF- $\kappa$ B-Signalwege hemmt [170]. Nach  $\gamma$ -Bestrahlung wurde die transkriptionelle Aktivität von NF- $\kappa$ B mit Hilfe eines Dual-Luciferase-Reportergen-Systems bestimmt (Abb. 4.32). Die Transfektion zunehmender Mengen der dominant-negativen Mutanten von TRAF6 und TAK1 führt zu einer graduellen Abnahme der  $\gamma$ -IR-induzierten NF- $\kappa$ B-Transaktivierung. Die dominant-negative MALT1-Mutante weist hingegen keinen Einfluss auf die NF- $\kappa$ B-getriebene Expression des Reportergens auf, was die spezifische Rolle von TRAF6 und TAK1 in dem hier untersuchten Signalweg hervorhebt.

Damit stimmen die in diesem Abschnitt präsentierten Ergebnisse eines alternativen „*loss of function*“-Ansatzes mit den Befunden der RNAi-basierten Studien überein und unterstreichen die Signifikanz bisher getroffener Aussagen.

#### **4.2.7. $\gamma$ -Bestrahlung bewirkt eine Aktivierung der Ubiquitin-Ligaseaktivität von TRAF6**

Die im Abschnitt 4.2.5 besprochenen Ergebnisse belegen, dass mit TRAF6 und Ubc13 Komponenten der Lys63-Ubiquitinierungsmaschinerie an der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch genotoxischen Stress beteiligt sind. Die Aktivierung der Ubiquitin-Ligasefunktion von TRAF6 wird von einer Autoubiquitinierungsreaktion begleitet [72]. Folglich wurde zunächst untersucht, ob TRAF6-Autoubiquitinierung durch  $\gamma$ -IR induziert werden kann. Die Analyse von TRAF6-Immunopräzipitaten, die aus bestrahlten HepG2-Zellen gewonnen wurden, ergab, dass genotoxischer Stress in der Tat eine TRAF6-Polyubiquitinierung hervorruft (Abb. 4.33A). In Übereinstimmung mit Literaturdaten wurde TRAF6-Automodifikation auch nach Stimulation von Zellen mit IL-1 $\beta$  induziert [72]. Im zeitlichen Verlauf der genotoxischen Stressantwort erfolgt die Aktivierung von TRAF6 zwischen 20 und 40 min nach  $\gamma$ -IR. Somit zeigt die TRAF6-Polyubiquitinierung eine zeitliche Übereinstimmung mit der Induktion der Kinaseaktivität von TAK1 und IKK sowie der NF- $\kappa$ B-DNA-Bindungsaktivität (siehe Abb. 4.29). Auch die TRAF6-Polyubiquitinierung, die 10 min nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  beobachtet werden konnte, stimmt mit der schnellen Aktivierung von TAK1 und IKK überein (Daten nicht gezeigt). Die Tatsache, dass die Gesamtmengen an TRAF6 durch  $\gamma$ -IR nicht reduziert werden, deutet auf einen nicht-degradativen Charakter dieser TRAF6-Modifikation hin.

Um zu bestätigen, dass es sich bei dieser Modifikation um eine Lys63-verknüpfte Polyubiquitinierung handelt, wurde der Einfluss einer RNAi-vermittelten Depletion von Ubc13, der Untereinheit des zuständigen E2-Enzyms, auf  $\gamma$ -IR-induzierte TRAF6-Polyubiquitinierung untersucht (Abb. 4.33B). Der Knockdown von Ubc13 hatte tatsächlich eine massive Beeinträchtigung dieser Modifikation zufolge, was de facto auf Lys63-Verknüpfung der beobachteten Ubiquitin-Ketten schließen lässt. Die vorliegenden Evidenzen deuten darauf hin, dass TRAF6 durch Autoubiquitinierung oder durch Konjugation von Lys63-Polyubiquitin an bisher unbekannte Faktoren eine aktivierende Gerüststruktur für den TAK1-Kinasekomplex bereitstellt.

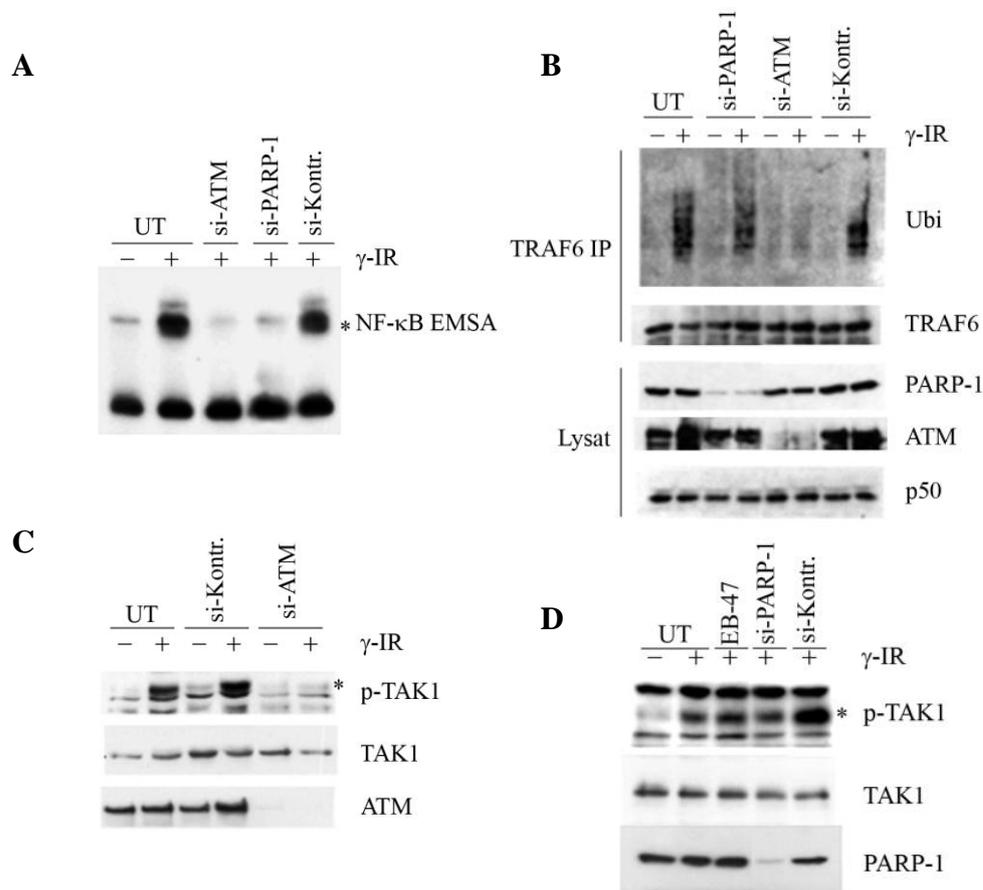


**Abbildung 4.33.  $\gamma$ -Strahlung induziert eine Automodifikation von TRAF6 durch Lys63-vernetzte Ubiquitin-Polymere in Abhängigkeit von Ubc13.** Für die Analyse der TRAF6-Ubiquitinierung wurden  $\gamma$ -bestrahlte HepG2-Zellen in einem stringenten, 0,1% SDS haltigen Puffer lysiert, die Lysate für 5 min gekocht und somit sichergestellt, dass alle nicht-kovalenten Protein-Protein-Interaktionen aufgehoben werden. TRAF6 wurde immunopräzipitiert und das Präzipitat nach SDS-PAGE mit einem Ubiquitin- und anschließend einem TRAF6-Antikörper im Westernblot analysiert. **(A)** Zeitverlauf der TRAF6-Autoubiquitinierung nach  $\gamma$ -IR. Als Kontrolle wurde TRAF6-Autoubiquitinierung in Lysaten von IL-1 $\beta$ -stimulierten HepG2-Zellen untersucht. **(B)** Der Einfluss von Ubc13 auf  $\gamma$ -IR-induzierte TRAF6-Autoubiquitinierung wurde nach RNAi-vermittelter Depletion analysiert. Der Knockdown von Ubc13 wurde durch Immunoblot-Analyse des Lysats verifiziert. Die Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Hinz durchgeführt.

#### 4.2.8. Das TRAF6-TAK1-Modul wird von ATM angesteuert

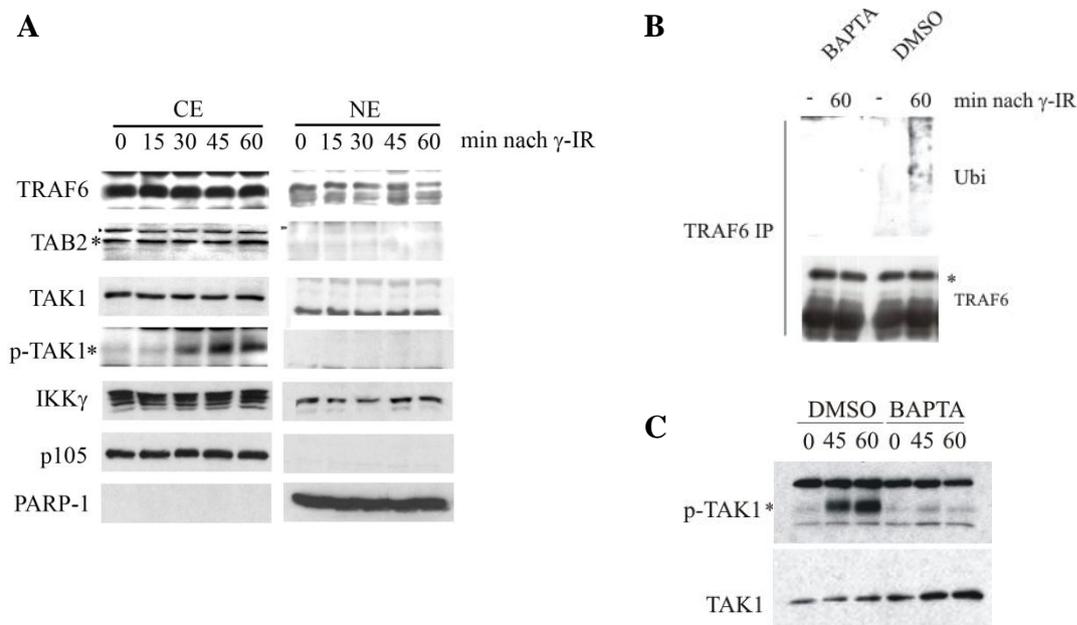
Mit ATM und PARP-1 sind bisher zwei dem initiierten Ereignis der zellulären DNA-Schadensantwort proximal stehende Schlüsselregulatoren als essentiell für NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch DNA-Strangbrüche identifiziert worden. Da diese NF- $\kappa$ B-Kaskade auch von einem Signalfuss über eine TRAF6-TAB2-TAK1-Achse abhängig ist, stellt sich die Frage, ob ATM oder PARP-1 dieses Modul als vorgeschaltete Regulatoren ansprechen. Nach einer RNAi-vermittelter Depletion beider DNA-Schadensmediatoren ist die  $\gamma$ -IR-induzierte

NF- $\kappa$ B-Aktivierung verhindert (Abb. 4.34A). Allerdings resultierte nur der ATM-Knockdown in einem kompletten Verlust der induzierbaren TRAF6-Polyubiquitinierung (Abb. 4.34B). Somit übernimmt ATM und nicht PARP-1 die Funktion eines Mediators des Stresssignals, das über TRAF6-Polyubiquitinierung auf den TAK1-Kinasekomplex und damit auf IKK $\beta$  übertragen wird. Erwartungsgemäß sollte ein ATM-Knockdown durch die Hemmung der TRAF6-Aktivierung ebenfalls die TAK1-Induktion durch  $\gamma$ -IR verhindern. Diese Annahme konnte in der Tat bestätigt werden (Abb. 4.34C). Umgekehrt zeigt eine gegen PARP-1 gerichtete siRNA oder die Inhibition der PARP-1-Polymeraseaktivität durch EB-47 keinen Effekt auf TAK1-Aktivierung nach  $\gamma$ -IR (Abb. 4.34D). Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass auch der vorgeschaltete Schritt der TRAF6-Polyubiquitinierung nicht von PARP-1 abhängt (Abb. 4.34B).



**Abbildung 4.34. Das TRAF6-TAK1-Signalmodul wird durch ATM induziert.** (A) Nicht-transfizierte (UT) oder mit ATM- bzw. PARP-1-siRNAs transfizierte HepG2-Zellen wurden mit 40 Gy bestrahlt und NF- $\kappa$ B-Aktivierung (Asterisk) mittels EMSA bestimmt. (B) Der Einfluss eines ATM- bzw. PARP-1-Knockdowns auf  $\gamma$ -IR-induzierte TRAF6-Autoubiquitinierung wurde wie in Abb. 4.33 untersucht. Die RNAi-vermittelte Depletion von ATM und PARP-1 wurde durch Westernblot-Analyse bestätigt. Das Experiment wurde in Kooperation mit Dr. Michael Hinz durchgeführt. (C) Analyse des TAK1-Aktivitätsstatus (phospho-TAK1 Thr187, Asterisk) in bestrahlten HepG2-Zellen, die mit ATM-siRNA bzw. Kontroll-siRNA transfiziert wurden. ATM-Knockdown wurde im Westernblot verifiziert. (D) Der Effekt einer RNAi-vermittelten Expressionshemmung von PARP-1 bzw. einer enzymatischen Hemmung ihrer Polymeraseaktivität durch EB-47 auf TAK-1-Aktivierung wurde wie in (C) ermittelt.

Eine Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Komponenten des TRAF6-TAB2-TAK1-Signalmoduls ergab, dass sich diese vorrangig im zytoplasmatischen Kompartiment befinden und ihre Lokalisation sich im Verlauf der genotoxischen Stressantwort nicht ändert (Abb. 4.35A). Da aktiviertes TAK1 (phospho-TAK1) sich ausschließlich im Zytoplasma befindet, kann davon ausgegangen werden, dass ATM das TRAF6-TAB2-TAK1-Signalmodul außerhalb des Zellkerns ansteuert. Im Abschnitt 4.2.2 wurde demonstriert, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Translokation von ATM an die Plasmamembran eine entscheidende Rolle bei der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch DNA-Schäden spielt. Andererseits bedarf es für die ATM-abhängige Aktivierung von TRAF6 (Abb. 4.35B) und TAK1 (Abb. 4.35C) ebenfalls der Verfügbarkeit freier  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Zusammenfassend legen diese Daten nahe, dass die zytoplasmatische Signalachse der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch genotoxischen Stress von ATM an der Plasmamembran initiiert wird.



**Abbildung 4.35. Zeitverlauf der subzellulären Lokalisation von Komponenten des TRAF6-TAB2-TAK1-Signalmoduls nach  $\gamma$ -Bestrahlung.**

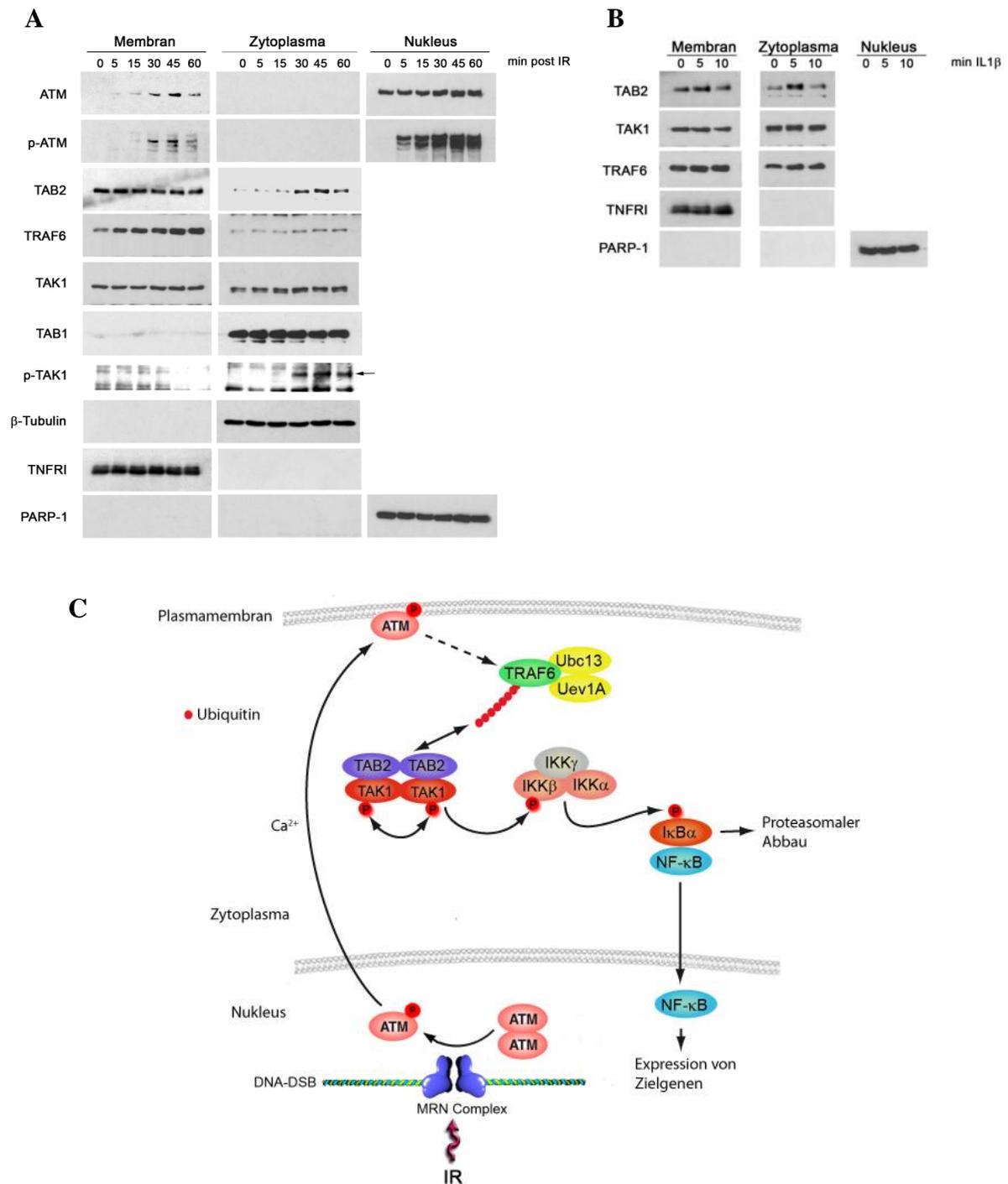
(A) HepG2-Zellen wurden einer  $\gamma$ -IR-Dosis von 40 Gy ausgesetzt. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation einer Zellfraktionierungsprozedur (NP-40-Methode) unterworfen. Die erhaltenen Zytoplasma- (CE) und Kernextrakte (NE) wurden mit Antikörpern gegen TRAF6, TAB2 (Asterisk), TAK1 (Asterisk), p-TAK1 (Thr187, Asterisk) und IKK $\gamma$  im Westernblot analysiert. Der Nachweis von p105 (Zytoplasma-Marker) und PARP-1 (Kern-Marker) belegt eine hohe Trennungsqualität der Fraktionierungsprozedur. (B) HepG2-Zellen wurden entweder mit DMSO oder BAPTA-AM (30  $\mu$ M) für 30 min präinkubiert und anschließend  $\gamma$ -Strahlen ausgesetzt (40 Gy). 60 min nach Bestrahlung wurde die Induktion der TRAF6-Autoubiquitinierung nach TRAF6-IP aus denaturierten Extrakten mittels Westernblot mit einem Ubiquitin-Antikörper analysiert. Das spezifische TRAF6-Signal ist mit einem Asterisk gekennzeichnet. Das Experiment wurde in Kooperation mit Dr. Michael Hinz durchgeführt. (C) HepG2-Zellen wurden wie in (B) mit DMSO oder BAPTA-AM behandelt. Zu verschiedenen Zeiten nach Bestrahlung wurden die Zellen lysiert und mit Antikörpern gegen phospho-TAK1 (Thr187, markiert durch Asterisk) und TAK1 im Westernblot untersucht.

---

#### 4.2.9. ATM-Rekrutierung an die Plasmamembran korreliert mit einer TAB2-Zunahme im Zytosol und der zytoplasmatischen Aktivierung von TAK1

Um weitere Evidenzen für die Abhängigkeit des TRAF6-TAB2-TAK1-Signalmoduls von der ATM-Rekrutierung an die Plasmamembran zu erhalten, wurde eine detaillierte Zeitreihenuntersuchung der subzellulären Lokalisation beteiligter Faktoren in  $\gamma$ -bestrahlten Zellen durchgeführt (Abb. 4.36A). Während die ATM-Aktivierung im Zellkern bereits 5 min nach Bestrahlung ein signifikantes Niveau erreicht, konnte phospho-ATM erst nach 30 min im Membran-Extrakt detektiert werden. Diese zeitliche Verzögerung deutet darauf hin, dass der ATM-Export aus dem Zellkern, der erst 30 min nach Bestrahlung seinen „*steady-state*“-Zustand erreicht, geschwindigkeitsbestimmend für nachgeschaltete Prozesse ist. Bemerkenswerterweise ist TAB2 zum größten Teil Membran-gebunden und zeigt eine  $\gamma$ -IR-induzierte Mengenzunahme im Zytoplasma. Der Anstieg der TAB2-Level im Zytoplasma könnte das Resultat einer Translokation dieser Untereinheit des TAK1-Kinasekomplexes von der Membran ins Zytoplasma oder einer Erhöhung der TAB2-Proteinstabilität im Zytoplasma sein. Auffällig ist, dass der früheste Zeitpunkt der TAB2-Zunahme (30 min nach  $\gamma$ -IR) mit dem frühesten Zeitpunkt der ATM-Rekrutierung an die Membran zusammenfällt. Diese Tatsache legt die Existenz einer funktionalen Korrelation zwischen beiden Vorgängen nahe und deutet an, dass ATM-Rekrutierung an die Plasmamembran für die Erhöhung der TAB2-Konzentration verantwortlich sein könnte. Die Analyse von TAK1 zeigt, dass die IKK-Kinase zwischen Membran und Zytoplasmafraktion gleichverteilt ist. Allerdings konnte phospho-TAK1 hauptsächlich im Zytosol detektiert werden, wobei der früheste Zeitpunkt der TAK1-Aktivierung (30 min nach  $\gamma$ -IR) mit dem der TAB2-Zunahme übereinstimmt. TAB1, die andere Untereinheit des TAK1-Kinasekomplexes ist überwiegend im Zytoplasma lokalisiert. TRAF6 ist hingegen in der Membranfraktion stärker konzentriert.

Interessanterweise wurde eine stimulusabhängige Membran-Zytoplasma-Translokation von TAB2 für IL-1 $\beta$ -stimulierte Zellen beschrieben [171]. Diese TAB2-Translokation scheint essentiell für zytosolische TAK1-Aktivierung nach IL-1 $\beta$ -Stimulation zu sein. Zur Durchführung dieser Experimente benutzten Takaesu *et al.* eine artifiziell generierte HEK293-Zelllinie, die den IL-1 $\beta$ -Rezeptor überexprimiert und aufgrund dessen einen übermäßig starken Signalfluss nach IL-1 $\beta$ -Stimulation aufweist.



**Abbildung 4.36. ATM-Rekrutierung an die Plasmamembran korreliert mit TAB2-Zunahme im Zytoplasma und TAK1-Aktivierung.** (A) HeLa-Zellen wurden mit einer Dosis von 20 Gy bestrahlt und zu verschiedenen Zeiten nach Stimulation einer Zellfraktionierungsprozedur unterworfen (mechanische Zerstörung der Plasmamembran). Die erhaltenen Membran- und Zytoplasmaextrakte wurden mit Antikörpern gegen ATM, phospho-ATM (Ser 1981), TAB2, TAB1, TRAF6, TAK1, phospho-TAK1 (Thr187, markiert durch Pfeil),  $\beta$ -Tubulin, TNFR1 und PARP-1 analysiert. Für die Kernproteine ATM/phospho-ATM und PARP-1 wurden Kernextrakte in die Untersuchung einbezogen. Die Analyse der Fraktionen mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Tubulin (zytoplasmatischer Marker), TNFR1 (Membran-Marker) und PARP-1 (nukleärer Marker) bestätigt, dass keine Verunreinigungen der Fraktionen untereinander vorliegen und schließt damit eventuelle Artefakte aus. (B) HeLa-Zellen wurden für verschiedene Zeiten mit IL-1 $\beta$  stimuliert und analog zu (A) analysiert. (C) Signalschema:  $\gamma$ -IR-induzierte Rekrutierung von ATM an die Plasmamembran führt zur Aktivierung von TRAF6. Durch Bindung an TRAF6-synthetisierte Lys63-Ubiquitin-Polymere wird der TAK1-Kinasekomplex aktiviert. TAK1 phosphoryliert und aktiviert IKK $\beta$ , wodurch das IKK-NF- $\kappa$ B-System induziert wird.

---

Um zu klären, ob TAB2 dieses Verhalten nach IL-1 $\beta$ -Gabe auch in genetisch nicht-manipulierten Zelllinien zeigt, wurden HeLa- bzw. HepG2-Zellen für verschiedene Zeiten mit IL-1 $\beta$  stimuliert und einer Zellfraktionierungsprozedur unterworfen (Abb. 4.36B). In der Tat konnte bereits 5 min nach IL-1 $\beta$ -Gabe eine Akkumulation von TAB2 im Zytoplasma von HeLa-Zellen beobachtet werden. Hingegen ergab die Analyse von TAK1- und TRAF6-Mengen keine signifikanten Veränderungen in den untersuchten Kompartimenten. Analoge Daten wurden in HepG2-Zellen erhoben (Daten nicht gezeigt).

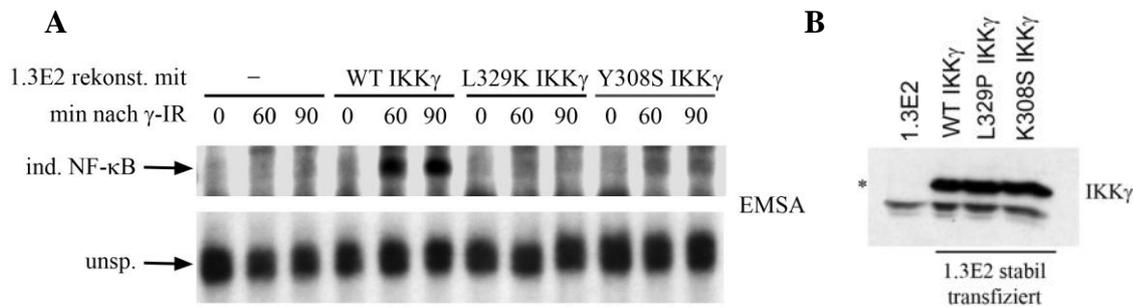
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der DNA-Schaden-induzierte NF- $\kappa$ B-Signalweg, neben dem Signalfluss über eine Lys63-Polyubiquitin-abhängige TRAF6-TAB2-TAK1-Achse, mit Stimulus-induzierter TAB2-Translokation durch ein weiteres dem IL-1 $\beta$ -Signalweg inhärentes Charakteristikum gekennzeichnet ist. Aus der zeitlichen Kongruenz der ATM-Rekrutierung an die Plasmamembran, der TAB2-Translokation ins Zytoplasma und der zytoplasmatischen TAK1-Aktivierung ergibt sich eine weitere Evidenz dafür, dass das TRAF6-TAB2-TAK1-Signalmodul von ATM an der Plasmamembran ausgelöst wird. (Abb. 4.36C).

#### **4.2.10. Die Bindung von IKK $\gamma$ an Polyubiquitin-Ketten ist Voraussetzung für NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch genotoxischen Stress**

In vorangegangenen Abschnitten wurden die kinetischen und biochemischen Charakteristika einer ATM-abhängigen TRAF6-TAB2-TAK1-Signalachse beschrieben, die essentiell für IKK und folglich auch NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch  $\gamma$ -Bestrahlung ist. Es ist anzunehmen, dass der TAK1-Kinasekomplex über TAB2 nach ATM-vermittelter TRAF6-Aktivierung an TRAF6-synthetisierte Lys63-Polyubiquitin-Ketten rekrutiert und aktiviert wird. Neben TAB2 kann auch IKK $\gamma$  an Lys63-Polyubiquitin-Ketten binden [45, 46, 66]. Die Region von IKK $\gamma$ , die für diese Interaktion verantwortlich ist, konnte auf die zweite Coiled-Coil-Domäne und den Leucin-Zipper eingegrenzt werden. Darüberhinaus resultieren die Mutationen Y308S der Coiled-Coil-Domäne oder L329P des Leucin-Zippers in einer signifikanten Reduktion der Affinität von IKK $\gamma$  zu Lys63-Polyubiquitin.

Es stellt sich deshalb die Frage, ob die Bindung von IKK $\gamma$  an Lys63-Polyubiquitin-Ketten für die Aktivierung des IKK-NF- $\kappa$ B-Systems durch DNA-Schäden erforderlich ist. Um dies zu klären, wurden IKK $\gamma$ -defiziente 1.3E2 prä-B-Zellen mit WT-IKK $\gamma$  oder den Ubiquitin-Bindungsmutanten L329P und Y308S stabil transfiziert und die Rekonstitution der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch  $\gamma$ -IR untersucht (Abb. 4.37A). Die nicht rekonstituierten 1.3E2-Zellen

zeigen keine NF- $\kappa$ B-Aktivierung, da IKK $\gamma$  für die Induktion der IKK-Aktivität durch  $\gamma$ -IR erforderlich ist. Im Gegensatz zu WT-IKK $\gamma$  sind die Ubiquitin-Bindungsmutanten nicht oder viel schwächer in der Lage die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch  $\gamma$ -IR in diesen Zellen wiederherzustellen. Die Expressionsniveaus der stabil transfizierten IKK $\gamma$ -Formen sind untereinander vergleichbar (Abb. 4.37B).



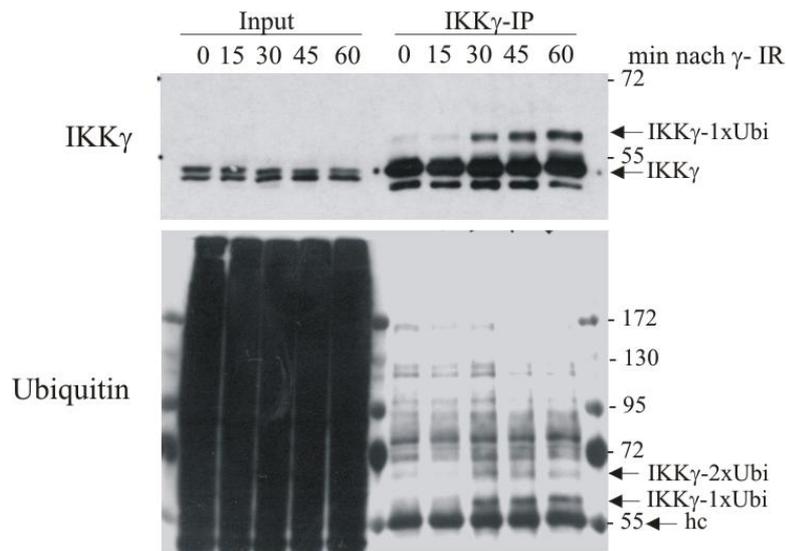
**Abbildung 4.37. Die Bindung von IKK $\gamma$  an Lys63-Polyubiquitin-Ketten ist Voraussetzung für NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch  $\gamma$ -IR.** (A) IKK $\gamma$ -defiziente 1.3E2-Zellen wurden mit Wildtyp-IKK $\gamma$  (WT) bzw. den Ubiquitin-Bindungsmutanten L329P und Y308S transfiziert. Nicht transfizierte 1.3E2-Zellen und die stabilen Transfektanten wurden mit 80 Gy bestrahlt und die NF- $\kappa$ B-Aktivierung zu verschiedenen Zeiten nach Stimulation mittels EMSA analysiert. Das spezifische  $\gamma$ -IR-induzierbare NF- $\kappa$ B-Signal ist durch einen Pfeil markiert. Darunter ist zur Kontrolle der Gelbelastung ein unspezifisches EMSA-Signal dargestellt. (B) Zur Evaluierung äquivalenter IKK $\gamma$ -Expressionslevel wurden 1.3E2-Zellen und die stabilen Transfektanten mit einem IKK $\gamma$ -Antikörper im Westernblot untersucht. Asterisk markiert das spezifische IKK $\gamma$ -Signal. Die stabilen Transfektanten von 1.3E2-Zellen wurden von Seda Coel Arslan zur Verfügung gestellt.

Somit spielt die Bindung von IKK $\gamma$  an Lys63-Polyubiquitin-Ketten eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des IKK-Komplexes durch  $\gamma$ -IR. Vermutlich ist diese Interaktion dafür zuständig, dass der IKK-Komplex in räumliche Nähe zum TAK1-Kinasekomplex, der über TAB2 ebenfalls an Lys63-Polyubiquitin rekrutiert werden kann, gebracht und aktiviert wird.

#### 4.2.11. $\gamma$ -Bestrahlung induziert eine Ubiquitinierung von IKK $\gamma$

Die Modifikation von IKK $\gamma$  durch Ubiquitin ist mit der Aktivierung des IKK-Komplexes durch verschiedene Stimuli in Verbindung gebracht worden [48-51, 172]. Es wurde eine detaillierte Zeitreihenstudie der IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung nach Bestrahlung von HepG2-Zellen durchgeführt. Die Westernblot-Analyse von IKK $\gamma$ -Immunopräzipitaten mit einem Ubiquitin-Antikörper offenbarte in der Tat zwei induzierbare Ubiquitin-Signale, deren elektrophoretische Migration dem Addukt eines bzw. zweier Ubiquitin-Proteine an IKK $\gamma$  entsprach (Abb. 4.38). Wenn die gleichen IKK $\gamma$ -Immunopräzipitate mit einem IKK $\gamma$ -Antikörper untersucht wurden, konnte nur eine, dem Addukt eines Ubiquitin-Proteins entsprechende, langsamer migrierende IKK $\gamma$ -Bande nachgewiesen werden. Diese Diskrepanz kann dadurch erklärt werden, dass die Konjugation eines zusätzlichen Ubiquitins an IKK $\gamma$  das Epitop für den IKK $\gamma$ -Antikörper maskiert. Die Ubiquitinierung von IKK $\gamma$  wurde bei 30 min

induziert und blieb bis 60 min nach Bestrahlung bestehen. Da in diesem Zeitraum keine detektierbaren Veränderungen der IKK $\gamma$ -Menge festzustellen waren, kann davon ausgegangen werden, dass es sich nicht um eine degradative Modifikation handelt. Interessanterweise weist die Induktion der IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung bei 30 min nach  $\gamma$ -IR eine zeitliche Übereinstimmung mit anderen Signaltransduktionsereignissen der hier untersuchten NF- $\kappa$ B-Kaskade auf (z.B. ATM-Rekrutierung an Plasmamembran, TRAF6-Autoubiquitinierung, TAK1-Aktivierung).



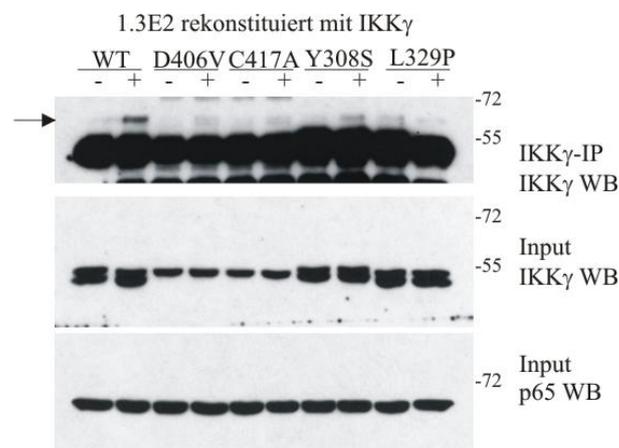
**Abbildung 4.38. Zeitverlauf der IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung nach  $\gamma$ -Bestrahlung von HepG2-Zellen.**

Für die Analyse der IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung wurden HepG2-Zellen mit 40 Gy bestrahlt. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung wurden die Zellen in einem 0,1% SDS haltigen Puffer lysiert und somit sichergestellt, dass alle nicht-kovalenten Protein-Protein-Interaktionen aufgehoben werden. IKK $\gamma$  wurde immunopräzipitiert und das Präzipitat mit einem Ubiquitin- und anschließend einem IKK $\gamma$ -Antikörper im Westernblot analysiert. Signale, die IKK $\gamma$  bzw. dem Addukt eines (IKK $\gamma$ -1xUbi) oder zweier Ubiquitin-Einheiten (IKK $\gamma$ -2xUbi) entsprechen, sind durch Pfeile gekennzeichnet. Mit hc ist das Signal der schweren Kette des IKK $\gamma$ -Antikörpers bezeichnet.

#### 4.2.12. IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung ist von einer intakten Zinkfinger-Domäne abhängig und erfordert die Bindung von IKK $\gamma$ an Polyubiquitin

Verschiedene Studien weisen auf eine regulatorische Funktion der C-terminalen Zinkfinger-Domäne von IKK $\gamma$  im Prozess der IKK-Aktivierung durch verschiedene Stimuli, unter anderem auch genotoxischen Stress, hin [47, 48, 173, 174]. Die physiologische Bedeutung dieser Domäne wird außerdem dadurch hervorgehoben, dass verschiedene Zinkfinger-Mutationen in IKK $\gamma$  mit erblichen Erkrankungen, wie der anhidrotischen ektodermalen Dysplasie mit Immundefekt und der Incontinentia pigmenti, assoziiert sind [30].

Im Folgenden sollte durch Struktur-Funktionsanalysen geklärt werden, ob ein intakter Zinkfinger für  $\gamma$ -IR-induzierte IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung von Bedeutung ist. Eine weitere interessante Frage betrifft eine mögliche Abhängigkeit der IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung von der Bindung dieser regulatorischen Untereinheit des IKK-Komplexes an Lys63-Polyubiquitin-Ketten. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden IKK $\gamma$ -defiziente 1.3E2-Zellen mit WT-IKK $\gamma$ , den Zinkfinger-Mutanten D406V und C417A sowie den Ubiquitin-Bindungsmutanten Y308S und L329P transfiziert. 1.3E2-Klone, die diese verschiedenen IKK $\gamma$ -Formen stabil exprimieren, wurden hinsichtlich der  $\gamma$ -IR-induzierten IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung miteinander verglichen (Abb. 4.39). Sowohl die Zinkfinger- als auch die Ubiquitin-Bindungsmutanten von IKK $\gamma$  zeigen im Gegensatz zur WT-Form drastisch reduzierte  $\gamma$ -Strahlen-induzierte Ubiquitinierung.

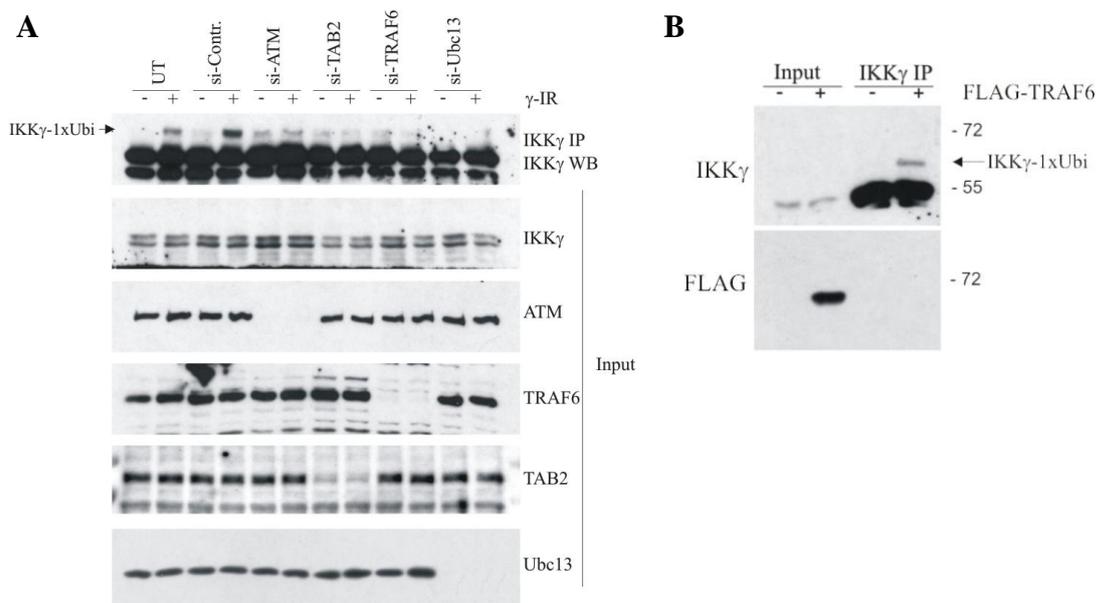


**Abbildung 4.39. Zinkfinger- und Ubiquitin-Bindungsmutanten von IKK $\gamma$  weisen Ubiquitinierungsdefekte auf.** IKK $\gamma$ -defiziente 1.3E2-Zellen wurden mit Wildtyp-IKK $\gamma$  (WT), den Zinkfinger-Mutanten D406V und C417A sowie den Ubiquitin-Bindungsmutanten L329P und Y308S transfiziert. Die stabilen Transfektanten wurden mit 80 Gy bestrahlt und IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung 45 min nach Bestrahlung, wie in Abb. 4.36 dargelegt, untersucht. Das IKK $\gamma$ -1xUbi-Signal im IKK $\gamma$ -Westernblot des Immunopräzipitats ist mit einem Pfeil markiert. Die Signale der Zinkfinger-Mutanten im Input weisen ein abweichendes Erscheinungsbild auf. Dies deutet darauf hin, dass das typische Duplett-Bandenmuster von IKK $\gamma$  auf eine intakte Zinkfinger-Domäne zurückzuführen ist. p65-Westernblot bestätigt den Einsatz äquivalenter Proteinmengen.

Die in diesem Abschnitt präsentierten Ergebnisse zeigen, dass die Zinkfinger-Domäne von IKK $\gamma$  eine wichtige regulatorische Funktion für  $\gamma$ -IR-induzierte IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung erfüllt. Andererseits ist es bekannt, dass diese Domäne für NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch genotoxischen Stress erforderlich ist [47]. Auf der Grundlage dieser Korrelation kann angenommen werden, dass IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung eine Rolle im Prozess der IKK-Aktivierung durch  $\gamma$ -IR spielt. Darüberhinaus deuten die Struktur-Funktionsanalysen darauf hin, dass die Bindung von IKK $\gamma$  an Lys63-polyubiquitinierte Strukturen eine Voraussetzung für die IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung selbst darstellt.

#### 4.2.13. TRAF6-vermittelte Synthese von Lys63-Polyubiquitin ist Voraussetzung für IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung

In den Abschnitten 4.2.3 – 4.2.10 wurde die Identifizierung einer TRAF6-TAB2-TAK1-Signalachse beschrieben, die von ATM im Verlauf genotoxischer Stressantwort angesteuert wird und IKK- sowie NF- $\kappa$ B-Aktivierung bedingt. Ein entscheidendes molekulares Ereignis in diesem Signalmodul ist die TRAF6-vermittelte Konjugation von Lys63-vernetzten Ubiquitin-Polymeren an TRAF6 selbst und möglicherweise an bisher noch nicht beschriebene Faktoren (siehe Abschnitt 4.2.7). Andererseits wurde im Abschnitt 4.2.12 dargelegt, dass die mit IKK-Aktivierung assoziierte Ubiquitinierung von IKK $\gamma$  von dessen Bindung an Lys63-polyubiquitinierte Strukturen abhängt. Sollte es sich dabei um von TRAF6 synthetisierte Ubiquitin-Polymere handeln, müsste eine Störung der Signalübertragung im ATM-TRAF6-Modul die  $\gamma$ -IR-induzierte IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung blockieren. In der Tat konnten in IKK $\gamma$ -Immunopräzipitaten nach einer RNAi-vermittelten Depletion von ATM, TAB2, TRAF6 oder Ubc13 keine  $\gamma$ -IR-induzierbaren Ubiquitin-Signale mehr nachgewiesen werden (Abb. 4.40A).



**Abbildung 4.40. IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung steht unter Kontrolle des ATM-TRAF6-Signalmoduls.**

(A) HepG2-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA bzw. siRNAs gegen ATM, TAB2, TRAF6 und Ubc13 transfiziert. 72 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 40 Gy bestrahlt, 45 min nach Bestrahlung lysiert und IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung, wie in Abb. 4.36 beschrieben, untersucht. Der Knockdown von ATM, TAB2, TRAF6 und Ubc13 wurde durch Westernblot-Analyse mit entsprechenden Antikörpern verifiziert. (B) HEK293T-Zellen wurden mit einem Kontroll-Vektor bzw. FLAG-TRAF6 transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert, IKK $\gamma$  immunopräzipitiert und IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung mit einem IKK $\gamma$ -Antikörper analysiert. Die Expression von FLAG-TRAF6 wurde mit einem FLAG-Antikörper visualisiert.

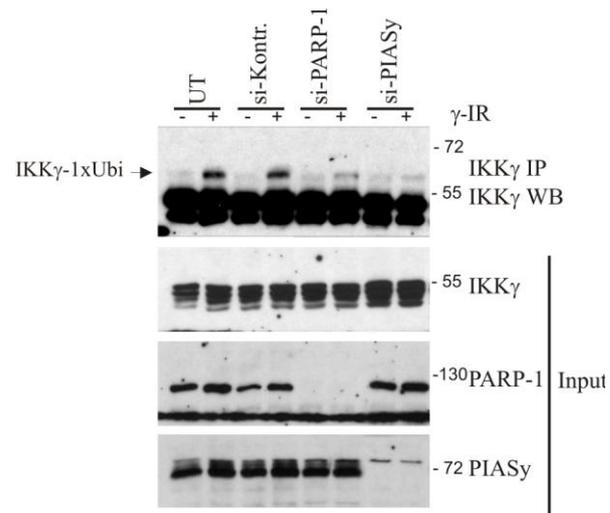
---

Eine Überexpression von TRAF6 führt, wahrscheinlich durch Selbstaggregation und Aktivierung der E3-Funktion, auch in Abwesenheit physiologischer Stimulatoren zu einer Induktion nachgeschalteter NF- $\kappa$ B-aktivierender Signaltransduktionsereignisse [168]. Um die Bedeutung von TRAF6 für IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung weiter zu untermauern, wurde TRAF6 in HEK293-Zellen überexprimiert. Dies führte, wie in Abbildung 4.40B demonstriert, tatsächlich zu einer Induktion der Ubiquitinierung von endogenem IKK $\gamma$ .

Im Hinblick auf IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung könnte TRAF6 zwei Funktionen erfüllen. Einerseits vermittelt die E3-Ubiquitin-Ligase in Kooperation mit Ubc13-Uev1A die Synthese von Lys63-Ubiquitin-Polymeren, die als eine Interaktionsplattform für die Rekrutierung von IKK $\gamma$  und assoziierten IKK-Kinasen an aktivierende Strukturen agieren und eine Voraussetzung für darauffolgende IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung darstellen. Andererseits könnte TRAF6 selbst als das E3-Enzym für die Konjugation von Ubiquitin an IKK $\gamma$  fungieren.

#### **4.2.14. IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung bildet den Konvergenzpunkt des ATM-TRAF6-TAK1- und des PARP-1-PIASy-Signalmoduls**

Im Abschnitt 4.2.8 wurde demonstriert, dass das DNA-Schadensignal von ATM und nicht von PARP-1 auf das TRAF6-TAB2-TAK1-Signalmodul übertragen wird. Die PARP-1-PIASy-Signalachse, die in der Sumoylierung von IKK $\gamma$  kulminiert, ist jedoch ebenfalls für die IKK- und NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch DNA-Schäden unerlässlich. Die Existenz zweier paralleler Signalmodule, die durch  $\gamma$ -IR induziert werden und auf das gleiche molekulare Ereignis einwirken, deutet darauf hin, dass beide Informationsflüsse an einem Konvergenzpunkt integriert werden. So führt RNAi-vermittelte Expressionshemmung von PARP-1 und PIASy ebenfalls zu einer Beeinträchtigung der  $\gamma$ -IR-induzierten IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung (Abb. 4.41). Somit befindet sich der Konvergenzpunkt des ATM-TRAF6-TAK1- und des PARP-1-PIASy-Signalmoduls auf der Ebene der IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung. Welchen Beitrag die PIASy-vermittelte IKK $\gamma$ -Sumoylierung zur IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung leistet und welche Rolle die IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung im Prozess der IKK-Komplexaktivierung spielt, muss durch künftige Studien geklärt werden.



**Abbildung 4.41. IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung ist vom PARP-1-PIASy-Signalmodul abhängig.**

HepG2-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA bzw. siRNAs gegen PARP-1 und PIASy transfiziert. 72 h nach Transfektion wurden die Zellen zusammen mit nicht-transfizierten Zellen mit 40 Gy bestrahlt, 45 min nach Bestrahlung lysiert und IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung, wie in Abb. 4.38 beschrieben, untersucht. Der Knockdown von PARP-1 und PIASy wurde durch Westernblot-Analyse mit entsprechenden Antikörpern verifiziert.

## 5. Diskussion

Zelluläre Systeme sind permanent exogenen und endogenen DNA-schädigenden Einflüssen ausgesetzt. DNA-Läsionen gefährden die zelluläre Homöostase und genomische Integrität. Darüberhinaus können sie zu Mutationen führen, die der betroffenen Zelle einen Wachstumsvorteil verschaffen und deren maligne Transformation fördern. Um den Erhalt der genomischen Integrität sicherzustellen und mögliche Krebsentstehung zu verhindern, müssen Zellen adäquat auf genotoxischen Stress reagieren. Die zelluläre DNA-Schadensantwort ist ein komplexes Netzwerk ineinander greifender Prozesse, die Einfluss auf DNA-Reparatur, Zellzyklus-Regulation sowie Genexpression nehmen und im Fall exzessiver DNA-Schäden für die Induktion von Apoptose sorgen.

In diesem Signalnetzwerk spielt der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B eine zentrale Rolle bei der Aktivierung eines zellulären Überlebensprogramms, das, im Fall moderater DNA-Schädigung, Apoptose verhindert und die Wiederaufnahme des normalen zellulären Lebenszyklus ermöglicht. Im Gegensatz zu klassischen Signalwegen wird die durch genotoxischen Stress induzierte NF- $\kappa$ B-Kaskade im Zellkern initiiert und das Signal zum IKK-NF- $\kappa$ B-System im Zytoplasma übertragen. Obwohl einige Komponenten dieses Kern-Zytoplasma-Signalwegs beschrieben wurden, blieben wichtige grundlegende Fragen zu mechanistischen Zusammenhängen unbeantwortet.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein komplexes Signalnetzwerk aufgedeckt werden, dem zwei parallele, auf der Ebene des IKK-Komplexes konvergierende Signalketten zugrunde liegen. Das eine Signalmodul wird im Nukleus durch das DNA-Schaden-abhängige Enzym Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) initiiert und resultiert in einer Modifikation von IKK $\gamma$  mit dem Ubiquitin-ähnlichen Protein SUMO-1. Die Sumoylierung der regulatorischen IKK-Untereinheit, die durch die E3-SUMO-Ligase PIASy vermittelt wird, gilt als eine Voraussetzung für die Aktivierung des IKK-Komplexes durch genotoxischen Stress. Die zweite Signalachse wird durch die Kinase ATM nach deren Translokation an die Plasmamembran ausgelöst. Kennzeichnend für diesen Prozess ist die Synthese von Lys63-verknüpften Ubiquitin-Polymeren durch die E3-Ligase TRAF6. Lys63-polyubiquitinierte Strukturen aktivieren die Kinase TAK1, die schließlich IKK $\beta$  phosphoryliert. Parallel dazu erfolgt die Ubiquitinierung von IKK $\gamma$ , ein Prozess, der sowohl vom PARP-1-PIASy-Modul als auch vom ATM-TRAF6-Modul abhängt. Sowohl die IKK $\beta$ -Phosphorylierung als auch die

---

IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung sind notwendig, um den IKK-Komplex und damit NF- $\kappa$ B zu aktivieren.

### **5.1. Die Aktivierung des IKK-NF- $\kappa$ B-Systems durch DNA-Strangbrüche ist von PARP-1-vermittelter PAR-Synthese abhängig**

Das im Zellkern lokalisierte IKK $\gamma$  nimmt eine zentrale Stellung im NF- $\kappa$ B-Signalweg ein, der durch DNA-Schäden ausgelöst wird (Abschnitt 1.3.4). Allerdings liegen nur wenige Informationen zu nukleären Bindungspartnern von IKK $\gamma$  vor, die im Zusammenhang mit der Aktivierung des IKK-NF- $\kappa$ B-Systems stehen.

In dieser Arbeit wurde PARP-1 als ein nukleärer Interaktionspartner von IKK $\gamma$  durch Pull-Down-Experimente mit rekombinantem IKK $\gamma$  (Daten nicht aufgeführt) und durch Koimmunopräzipitationsstudien mit endogenen Proteinen identifiziert (Abschnitt 4.1.1). Da PARP-1 als ein DNA-Schadensensor agiert, wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen PARP-1 und der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch genotoxischen Stress besteht. Es konnte gezeigt werden, dass durch Verlust von PARP-1 bzw. durch Hemmung ihrer enzymatischen Aktivität die NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch  $\gamma$ -Bestrahlung in transformierten embryonalen Fibroblasten, in primären adulten Dünndarmepithelzellen und Makrophagen blockiert wird (Abschnitt 4.1.2 – 4.1.4). Interessanterweise hatte der Verlust von PARP-1 in primären B-Zellen im Unterschied zu anderen untersuchten Zelltypen keinen Einfluss auf die NF- $\kappa$ B-Aktivierung (Abschnitt 4.1.4). Im Verlauf des Reifungsprozesses unterliegen B-Zellen einem Rearrangement der Gene für den B-Zell-Rezeptor. Bei diesem rekombinatorischen Prozess kommt es zur Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen, die durch Reparaturproteine der nicht-homologen Endverknüpfung (*non homologous end-joining*) repariert werden [175]. In Anbetracht natürlich auftretender DNA-Doppelstrangbrüche während der B-Zell-Entwicklung, könnte in diesem speziellen Zelltyp ein anderer PARP-1-unabhängiger Mechanismus der NF- $\kappa$ B-Aktivierung vorliegen. Andererseits könnte der Verlust von PARP-1 durch eine zelltypspezifische Redundanz mit anderen DNA-Schaden-abhängigen Mitgliedern der PARP-1-Familie (z.B. PARP-2) aufgefangen werden.

Durch eine Wiedereinführung des PARP-1-Gens in PARP-1-defiziente MEFs konnte die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch  $\gamma$ -Bestrahlung rekonstituiert werden (Abschnitt 4.1.5). Dies bestätigt, dass die Beeinträchtigung des Signalwegs in PARP-1-Knockout-Zellen allein auf den Verlust von PARP-1 und nicht auf sekundäre Effekte zurückzuführen ist. Die Unfähigkeit der enzymatisch-inaktiven sowie der DNA-bindungsdefizienten Mutante von PARP-1 die NF-

---

$\kappa$ B-Aktivierung zu rekonstituieren, legt nahe, dass sowohl die Bindung des Enzyms an DNA-Strangbrüche als auch die daraus resultierende Synthese von PAR essentiell für den DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalweg sind.

Der Verlust von PARP-1 hatte keinen Einfluss auf die Aktivierung des IKK-NF- $\kappa$ B-Systems durch TNF $\alpha$  (Abschnitt 4.1.2) und LPS (Abschnitt 4.1.3). Allerdings kam es in Abwesenheit von PARP-1 zu einer Hemmung der TNF $\alpha$ -induzierten NF- $\kappa$ B-abhängigen Reporterexpression. Diese Beobachtung ist ebenfalls von Hassa *et al.* gemacht worden und deutet auf eine Koaktivatorfunktion von PARP-1 für die NF- $\kappa$ B-abhängige Transkription hin [126]. Im Gegensatz zu der hier beschriebenen Funktion von PARP-1 als DNA-Schadenssensor für das IKK-NF- $\kappa$ B-System, scheint das Protein die NF- $\kappa$ B-abhängige Transkription unabhängig von PAR-Synthese zu regulieren. *In-vivo*-Untersuchungen zeigen, dass lediglich die Expression einer kleinen Anzahl an inflammatorischen NF- $\kappa$ B-Zielgenen in Abwesenheit von PARP-1 beeinträchtigt ist [149]. Dies deutet darauf hin, dass PARP-1 als ein Promotor-spezifischer Koaktivator von NF- $\kappa$ B agiert. Diese Koaktivatorfunktion ist aber unabhängig von der hier beschriebenen Rolle von PARP-1 als IKK-vorgeschalteter Regulator der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch genotoxischen Stress.

Die Erforschung der molekularen Funktionen von PARP-1 konzentrierte sich bislang vorrangig auf die Rolle dieses DNA-Schadensensors für DNA-Reparaturprozesse bzw. Transkriptionsregulation. Der hier beschriebene Zusammenhang zwischen PARP-1-vermittelter PAR-Synthese und dem durch DNA-Strangbrüche ausgelösten NF- $\kappa$ B-Signalweg liefert neue Erkenntnisse zur Bedeutung dieses Enzyms für zelluläre Signaltransduktion.

## **5.2. PIASy-vermittelte IKK $\gamma$ -Sumoylierung ist durch PARP-1 reguliert**

Durch Konjugation von Proteinen der *Small Ubiquitin-like Modifier* (SUMO)-Familie an wichtige Regulatorproteine wird eine ganze Reihe grundlegender zellulärer Vorgänge reguliert [176]. So ist das SUMO-System unter anderem an der Steuerung der DNA-Reparaturprozesse beteiligt und trägt auf diese Weise zur Erhaltung der genomischen Integrität bei.

In früheren Studien wurde die Sumoylierung von IKK $\gamma$  an K277 und K309 als ein intermediärer Signalschritt im Prozess der IKK-Komplexaktivierung durch genotoxischen Stress beschrieben [51]. In einem RNAi-Screen wurde PIASy als die für IKK $\gamma$ -Sumoylierung zuständige E3-SUMO-Ligase identifiziert [95]. Der Mechanismus der Signalweiterleitung vom DNA-Schaden zu PIASy blieb jedoch ungeklärt.

---

In dieser Arbeit konnte unter Einsatz von PIASy-Knockout-Zellen die Funktion von PIASy als E3-SUMO-Ligase für IKK $\gamma$  verifiziert werden (Abschnitt 4.1.8). Ferner zeigen diese Zellen Defekte hinsichtlich der NF- $\kappa$ B-Aktivierung infolge von  $\gamma$ -Bestrahlung (Abschnitt 4.1.7). Diese Daten bestätigen, dass die IKK $\gamma$ -Sumoylierung für die Aktivierung des IKK-NF- $\kappa$ B-Systems durch genotoxischen Stress erforderlich ist.

Da die Induktion des IKK-NF- $\kappa$ B-Systems durch DNA-Schäden sowohl von PARP-1-Aktivierung als auch von IKK $\gamma$ -Sumoylierung abhängt, wurde untersucht, ob ein funktionaler Zusammenhang zwischen beiden Prozessen besteht. In der Tat konnte in Abwesenheit von PARP-1 keine induzierbare IKK $\gamma$ -Sumoylierung nachgewiesen werden (Abschnitt 4.1.8). Folglich ist die Aktivierung von PARP-1 in der Hierarchie der Signalkette der PIASy-vermittelten IKK $\gamma$ -Sumoylierung vorgeschaltet.

Viele in der Literatur beschriebene sumoylierte Proteine akkumulieren im Zellkern [94]. Eine artifizielle N-terminale Fusion von IKK $\gamma$  mit SUMO1 führt verstärkt zu einer Kern-Lokalisation des Fusionsprodukts [51]. Außerdem wurde in Zellen, die stabil eine getaggte Form von IKK $\gamma$  exprimieren, nach Stimulation mit dem DNA-DSB-Induktor Etoposid eine gewisse Zunahme der IKK $\gamma$ -Mengen im Zellkern beobachtet. Deshalb nahmen Huang *et al.* an, dass die Funktion der IKK $\gamma$ -Sumoylierung im nukleären Targeting der regulatorischen Untereinheit des IKK-Komplexes besteht [51]. In dieser Arbeit durchgeführte Zeitreihenuntersuchungen der subzellulären Lokalisation von IKK $\gamma$  zeigen jedoch, dass die Gesamtmengen des endogenen IKK $\gamma$  sich weder im Zytoplasma noch im Nukleus von  $\gamma$ -bestrahlten Zellen ändern (Abb. 4.21 und Abb. 4.30). Da eine signifikante Menge an IKK $\gamma$  unabhängig vom Stimulus permanent im Zellkern vorliegt, wird hier die These vertreten, dass das Protein in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen Zytoplasma und Zellkern pendelt. Da PIASy sich ausschließlich im Zellkern befindet (Abb. 4.25), kann davon ausgegangen werden, dass nur das nukleäre IKK $\gamma$  sumoyliert wird.

### **5.3. Automodifizierte PARP-1 assembliert IKK $\gamma$ , PIASy und ATM in einem nukleären Signalosom**

Um die mechanistische Bedeutung von PARP-1 für die IKK $\gamma$ -Sumoylierung und IKK-Komplexaktivierung zu klären, wurden verschiedene zellbiologische und biochemische Untersuchungen durchgeführt. Durch die Kopplung von Laser-Mikrobestrahlung mit Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie konnte demonstriert werden, dass PARP-1 bereits

---

wenige Sekunden nach Laser-vermittelter DNA-Schädigung an die betroffene Stelle im Zellkern rekrutiert wird (Abb. 4.8). Die Akkumulation von PARP-1 an DNA-Schadensfoci ist transient und 15 min nach Bestrahlung nicht mehr detektierbar. Die Dissoziation von PARP-1 von DNA-Schadensorten wird nach Behandlung von Zellen mit PARP-Inhibitoren bzw. bei Verwendung einer enzymatisch inaktiven Mutante stark verzögert bzw. verhindert. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die enzymatische Aktivität von PARP-1 weniger für die Erkennung des DNA-Schadens sondern viel mehr für die Dissoziation des Enzyms von der Läsion verantwortlich ist. Ähnliche Befunde wurden von Mortusewicz *et al.* erhoben [133]. Durch *in vitro*-Studien der PARP-1-Bindung an DNA-Strangbrüche wurde demonstriert, dass die Auto-Poly-ADP-Ribosylierung von PARP-1 die Affinität des Enzyms zu DNA stark herabsetzt [115]. Diese Hemmung der DNA-Bindung kann durch elektrostatische Abstoßung zwischen der negativ geladenen Poly-ADP-Ribose und ebenfalls negativ geladener DNA, oder aber durch sterische Maskierung der DNA-Bindedomäne bedingt sein.

Im Unterschied zu PARP-1 konnte im gesamten Untersuchungszeitraum keine Anreicherung von IKK $\gamma$  in den DNA-Schadensfoci beobachtet werden. Somit ist es naheliegend, dass die unter 4.1.1 beschriebene nukleäre Interaktion von IKK $\gamma$  mit PARP-1 nach der Dissoziation des Enzyms im Nukleoplasma stattfindet. Da die enzymatische Aktivität von PARP-1 sowohl für deren Ablösung von DNA-Schäden (Abschnitt 4.1.6) als auch für die NF- $\kappa$ B-Aktivierung (Abschnitt 4.1.4) erforderlich ist, könnte die automodifizierte PARP-1 durch die Interaktion mit IKK $\gamma$  im Nukleoplasma die Kern-Zytoplasma-Signalkaskade der NF- $\kappa$ B-Aktivierung in Gang setzen. In der Tat konnte durch Koimmunopräzipitationsstudien gezeigt werden, dass automodifizierte PARP-1 für die Assemblierung eines Multiproteinkomplexes aus IKK $\gamma$ , PIASy und ATM verantwortlich ist (Abschnitt 4.1.5, 4.1.9, 4.1.11). Da dieser Komplex durch  $\gamma$ -Bestrahlung induziert wird und die bisher bekannten Signalmoleküle der DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Kaskade enthält, wird dafür der Begriff Signalosom verwendet. Das Signalosom konnte innerhalb einer Zeitspanne zwischen 10 und 30 min nach  $\gamma$ -Bestrahlung nachgewiesen werden, also zu einem Zeitpunkt, als PARP-1 von der DNA-Läsion bereits abdissoziiert ist. Nach der Initiation des Reparaturvorgangs verlässt PARP-1 offensichtlich die DNA-Läsion infolge der Automodifizierung und transportiert das Signal zu nukleären Komponenten der DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Kaskade durch Bildung eines Signalosoms. Für den schnellen Abbau von PAR-Polymeren zu freier ADP-Ribose ist das nukleäre Enzym Poly-ADP-Ribose-Glykohydrolase (PARG) verantwortlich [118]. PARG sorgt dafür, dass im Zeitfenster

---

zwischen 30 und 60 min nach  $\gamma$ -Bestrahlung die Menge an automodifizierter PARP-1 wieder auf das Basalniveau sinkt (Abb. 4.7). Vermutlich ist der von PARG katalysierte Abbau von PAR-Polymeren auch dafür verantwortlich, dass im gleichen Zeitfenster eine Auflösung des Signalosoms zu beobachten ist. In künftigen Studien wird es daher von Interesse sein, die Bedeutung von PARG für die Dynamik der Signalosom-Bildung und NF- $\kappa$ B-Aktivierung zu untersuchen.

Interessanterweise konnten weder IKK $\alpha$  noch IKK $\beta$  als Komponenten des Signalosoms nachgewiesen werden (Daten nicht aufgeführt). Folglich wird IKK $\gamma$ , das nicht an die katalytischen Untereinheiten des IKK-Komplexes gebunden ist, aus dem nukleären Pool in das Signalosom eingebaut. Dies steht im Einklang mit früheren Berichten, denen zufolge nur singuläres IKK $\gamma$  von PIASy sumoyliert werden kann [95]. Für das Verständnis der Funktion des IKK-Komplexes wird es in Zukunft entscheidend sein, zu klären, wie ein Pool an singulärem IKK $\gamma$  generiert wird, und ob ausschließlich Kinase-ungebundenes IKK $\gamma$  der Pendelbewegung zwischen Zytoplasma und Zellkern unterliegt.

Die strikte Abhängigkeit der Signalosom-Bildung von der Anwesenheit automodifizierter PARP-1 deutet an, dass Signalosom-Komponenten Wechselwirkungen zu Poly-ADP-Ribose-Ketten eingehen. Nicht-kovalente Interaktionen mit PAR-Ketten automodifizierter PARP-1 wurden für einige DNA-Reparaturfaktoren und Zellzyklusregulatoren beschrieben und sind für die Regulation ihrer Aktivität entscheidend [137]. So ist z.B. das PAR-Bindemotiv des DNA-Reparaturproteins XRCC1 für seine Rekrutierung an DNA-Läsionen verantwortlich [133, 136]. Histonproteine können ebenfalls nicht-kovalente Interaktionen zu PAR-Polymeren eingehen [134]. In dieser Arbeit wurde PIASy als ein PAR-erkennendes Protein identifiziert (Abschnitt 4.1.10). In Übereinstimmung mit Literaturdaten konnten unter Verwendung von Peptiden auch Hinweise auf eine mögliche ATM-PAR-Interaktion erhalten werden [139]. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass spezifische PAR-Protein-Wechselwirkungen bei der Assemblierung des Signalosoms einen stabilisierenden Beitrag leisten. Aus *in vitro*-Interaktionsstudien mit rekombinanten IKK $\gamma$ , PIASy und PARP-1 geht hervor, dass die Komponenten des Signalosoms auch unabhängige direkte Protein-Protein-Kontakte ausbilden können (Abschnitt 4.1.9). Unter *in vivo*-Bedingungen gewährleisten diese Wechselwirkungen vermutlich eine Spezifität bei der Zusammenlagerung der Proteine an Poly-ADP-Ribose als Gerüststruktur. Es ist anzunehmen, dass sowohl Protein-PAR- als auch Protein-Protein-Kontakte ein Netzwerk an Interaktionen erzeugen, das für Spezifität und Stabilität bei der Signalosom-Assemblierung sorgt. In dieser Hinsicht weisen Poly-ADP-Ribose-Ketten eine

---

funktionale Ähnlichkeit zu Lys63-Ubiquitin-Polymeren auf, die eine gerüstbildende Funktion in den kanonischen NF- $\kappa$ B-Signalwegen erfüllen [177]. In beiden Fällen kommt es zu einer Stimulus-abhängigen Synthese von Polymeren, die an wichtige Regulatorproteine konjugiert werden und als Gerüststruktur für die Assemblierung von Multiproteinkomplexen dienen. Die Signalosom-Komponenten verfügen über Polymer-erkennende Strukturen (Ubiquitin-Bindedomänen, PAR-Bindemotive), gehen aber auch spezifische Protein-Protein-Interaktionen zu anderen Untereinheiten ein. Innerhalb der Signalosome werden die Signale integriert und an nachgeschaltete Effektoren weitergegeben. Infolge des Abbaus von Polymeren durch spezifische Enzyme (Deubiquitinasen, PARG) werden die Multiproteinkomplexe destabilisiert und der Signalfluss beendet.

#### **5.4. Steuerung der IKK $\gamma$ -Sumoylierung durch das PARP-1-Signalosom**

Die enzymatische Aktivität von PARP-1 ist sowohl für die IKK $\gamma$ -Sumoylierung (Abschnitt 4.1.8) als auch für die Assemblierung des Signalosoms, der sowohl die E3-SUMO-Ligase PIASy als auch das Substrat IKK $\gamma$  enthält (Abschnitt 4.1.5, 4.1.9, 4.1.11), erforderlich. Es kann daher angenommen werden, dass aktivierte PARP-1 innerhalb des Signalosoms molekulare Voraussetzungen für die nachfolgende IKK $\gamma$ -Sumoylierung durch PIASy schafft. Eine entscheidende Frage betrifft das Prinzip der Signalübertragung von PARP-1 auf PIASy. Ein Aktivierungsmechanismus, dem eine PARylierung von PIASy bzw. IKK $\gamma$  zugrunde liegt, konnte experimentell ausgeschlossen werden (Daten nicht aufgeführt). Interessanterweise war 10 min nach  $\gamma$ -IR, also zu einem Zeitpunkt als sich die Assemblierung des Signalosoms bereits vollzogen hat, keine Sumoylierung von IKK $\gamma$  nachweisbar (Abb. 4.10A). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass PIASy und dessen Substrat IKK $\gamma$  als Komponenten des Signalosoms sich zwar in räumlicher Nähe befinden, es jedoch eines zusätzlichen verzögerten Signals bedarf, um die IKK $\gamma$ -Sumoylierung auszulösen. Interessanterweise überlappen die hier identifizierten PAR-Bindemotive von PIASy mit wichtigen funktionalen Bereichen der E3-SUMO-Ligase (Abb. 4.16). Die eine PAR-Bindungsstelle befindet sich in der SP-RING-Finger-Domäne, die für die Interaktion von PIASy mit Substratproteinen verantwortlich ist. Die andere Region umfasst die letzten 20 Aminosäuren am C-Terminus des Proteins und schließt sich direkt an einen Glutamat/Aspartat-reichen Bereich an, der für die Interaktion mit Ubc9, dem E2-Enzym des SUMO-Systems, wichtig ist. Somit könnte die Inkorporierung von PIASy in das PAR-abhängige Signalosom durch Maskierung dieser funktionalen Regionen mit der E3-SUMO-Ligaseaktivität zunächst interferieren. Der zwischen 10 und 30 min

---

einsetzende PARG-katalysierte Abbau von PAR-Polymeren (Abb. 4.7) könnte zu einer strukturellen Umlagerung innerhalb des Komplexes und damit zu einer Derepression der PIASy-Aktivität führen, wodurch sich die beobachtete Verzögerung der IKK $\gamma$ -Sumoylierung erklären ließe.

Die Kinase ATM, die über mehrere PAR-Bindungsregionen verfügt (Abschnitt 4.1.10, [139]), wird ebenfalls an das PAR-abhängige Signalosom rekrutiert (4.1.11). Es wird angenommen, dass die von ATM katalysierte Ser85-Phosphorylierung von IKK $\gamma$  einen wichtigen Schritt im Prozess der IKK-Komplexaktivierung durch genotoxischen Stress darstellt [101]. Andererseits wurde vorgeschlagen, dass die Interaktion von ATM mit PAR-Ketten automodifizierter PARP-1 wichtig für die Phosphorylierung von ATM-Substraten, wie z.B. p53 und H2AX, ist [139]. Diese Proteine verfügen ebenfalls über PAR-Bindemotive und es ist denkbar, dass deren Phosphorylierung durch ATM nach Korekrutierung an PAR-Ketten begünstigt wird. Gleichmaßen könnte die Ser85-Phosphorylierung von IKK $\gamma$  durch ATM innerhalb des PAR-abhängigen Signalosoms katalysiert werden und möglicherweise zur Induktion der IKK $\gamma$ -Sumoylierung beitragen.

### **5.5. Die Translokation von ATM an die Plasmamembran erfolgt unabhängig vom PARP-Signalosom**

Die Funktion von ATM in der DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalkaskade ist nicht hinreichend verstanden. Als zentraler Mediator der zellulären DNA-Schadensantwort ist diese Kinase und der überwiegende Teil ihrer Substrate vorrangig im Zellkern lokalisiert. Andererseits weisen Zellen von AT-Patienten Abnormalitäten in der Regulation des Plasmamembran-Potentials, Defekte des Zytoskeletts und erhöhte Anzahl von Lysosomen auf [158]. Diese Befunde deuten darauf hin, dass ATM an der Regulation von zellulären Vorgängen auch außerhalb des Zellkerns beteiligt ist. In Übereinstimmung mit dieser Annahme konnte nach  $\gamma$ -Bestrahlung von Zellen eine Translokation von ATM aus dem Zellkern ins Zytoplasma nachgewiesen werden (Abb. 4.21). Diese Beobachtung deckt sich mit Berichten von einem ATM-Kernexport nach einer Behandlung von Zellen mit dem Topoisomerase-II-Inhibitor Etoposid [101] und legt die Möglichkeit nahe, dass der Export von ATM aus dem Nukleus in einem Zusammenhang mit der Aktivierung des IKK-Komplexes im Zytoplasma stehen könnte.

ATM weist eine Sequenzhomologie zur katalytischen Domäne von Proteinen der Phosphatidylinositol-3-Kinasefamilie auf [158]. Die klassischen Vertreter dieser

---

Proteinfamilie sind an der Signalweiterleitung ausgehend von Rezeptor-Tyrosinkinasen und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren beteiligt und werden durch Adapterproteine an die innere Seite der Plasmamembran rekrutiert [160]. In dieser Arbeit konnte mittels Zellfraktionierung und Immunfluoreszenzmikroskopie erstmals demonstriert werden, dass der ATM-Kernexport in einer substantiellen Assoziation der aktivierten Kinase mit der Plasmamembran resultiert (Abschnitt 4.2.1). Es ist vorstellbar, dass die Rekrutierung von ATM an die Plasmamembran analog zu klassischen PI3-Kinasen durch spezielle Adapterproteine reguliert wird. CKIP-1 (*casein kinase-2 interacting protein-1*), ein Phospholipid-bindendes Protein mit einer „*pleckstrin homology*“-Domäne, ist für die Membran-Rekrutierung der Casein-Kinase-II verantwortlich [178]. In einer kürzlich erschienenen Arbeit wurde gezeigt, dass die Überexpression von CKIP-1 zu einer verstärkten Membran-Lokalisation von ATM führt [179]. In künftigen Studien soll daher überprüft werden, ob CKIP-1 als Adapterprotein für die  $\gamma$ -Strahlen-induzierte Assoziation von ATM mit der Plasmamembran fungiert.

Der Kernexport von ATM und die daraus resultierende Rekrutierung der Kinase an die Plasmamembran sind Stimulus-induzierte Vorgänge und müssten deshalb strengen Regulationsmechanismen unterliegen. In der Tat ist der Kernexport von ATM strikt von der katalytischen Aktivität der Kinase abhängig (Abb. 4.24). Nach Aktivierung im Zellkern veranlasst ATM, möglicherweise durch Phosphorylierung einer Komponente der Kernexport-Maschinerie, ihren eigenen Export aus dem Nukleus. Eine detaillierte Zeitreihenanalyse ergab, dass der Kernexport von ATM gegenüber der Aktivierung der Kinase mit einer Zeitverzögerung von ca. 15 min einsetzt (Abb. 4.36). Diese Verzögerung könnte dazu dienen, eine effektive Phosphorylierung von nukleären ATM-Substraten (DNA-Reparaturfaktoren, Zellzyklusregulatoren) sicherzustellen, bevor die Kinase aus dem Kern exportiert wird.

Der Transport vieler Proteine aus dem Zellkern wird vom Exportin Crm1 in Kooperation mit RanGTP gesteuert [162]. Da jedoch der Export von ATM nicht durch den Crm1-Inhibitor Leptomycin B beeinträchtigt wird (Daten nicht aufgeführt), erfolgt der ATM-Kernexport unabhängig vom Crm1-System. Hingegen konnte gezeigt werden, dass für den Transport von ATM durch die Kernporen ins Zytoplasma und die anschließende Assoziation der Kinase mit der Plasmamembran freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen eine entscheidende Rolle spielen (Abschnitt 4.2.2). Der Kernexport des Glukokortikoid-Rezeptors ist ebenfalls insensitiv gegenüber Leptomycin B und wird vom  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Exportin Calreticulin reguliert [163]. Somit kommt Calreticulin auch als Export-Rezeptor für ATM in Frage.

---

So wie der ATM-Kernexport, wird auch die NF- $\kappa$ B-Aktivierung nach  $\gamma$ -Bestrahlung selektiv durch eine Depletion von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen inhibiert (Abb. 4.27 und [164]). Deshalb ist es naheliegend, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Rekrutierung von ATM an die Plasmamembran eine kritische Rolle für die zytoplasmatische Induktion des IKK-NF- $\kappa$ B-Systems im Verlauf der genotoxischen Stressantwort spielt.

Das bisher in der Literatur diskutierte Modell der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch DNA-Schäden betrachtete IKK $\gamma$  als den direkten und einzigen Empfänger von Signalen, die zur Aktivierung der katalytischen IKKs führen (Sumoylierung durch PIASy, Phosphorylierung durch ATM) [180]. Diesem Konzept zufolge soll IKK $\gamma$  für den nukleären Export von ATM erforderlich sein. Es wurde vorgeschlagen, dass der ATM-IKK $\gamma$ -Komplex nach dem Kernexport an der Aktivierung der katalytischen IKKs beteiligt ist. Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse belegen jedoch eindeutig, dass obwohl ATM ein Bestandteil des nukleären PARP-Signalosoms ist (Abschnitt 4.1.11), sein Kernexport dennoch unabhängig von IKK $\gamma$  und anderen Komponenten dieses Multiproteinkomplexes verläuft (Abb. 4.25). Folglich erfüllt ATM eine duale Funktion innerhalb des DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalwegs. Einerseits könnte ATM als Komponente des PARP-Signalosoms regulierend in den Prozess der IKK $\gamma$ -Sumoylierung eingreifen. Andererseits induziert die Schlüsselkinase der DNA-Schadensantwort nach deren Rekrutierung an die Plasmamembran simultan eine zweite Signalachse, die gleichermaßen für die Induktion des IKK-NF- $\kappa$ B-Systems essentiell ist.

## **5.6. Der TAK1-Kinasekomplex ist für die IKK-Aktivierung durch genotoxischen Stress verantwortlich**

So wie der durch genotoxischen Stress ausgelöste Signalweg, konvergieren fast alle bekannten NF- $\kappa$ B-Signalkaskaden auf der Ebene des IKK-Komplexes, der somit die Funktion eines molekularen Integrators verschiedener Stimuli wahrnimmt und NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch I $\kappa$ B-Abbau steuert [30]. Ein Schlüsselereignis bei der Aktivierung des IKK-Komplexes in klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegen stellt die Phosphorylierung der T-Loop-Serine der katalytischen IKKs durch vorgeschaltete IKK-Kinasen dar [30]. Es ist naheliegend, dass der IKK-Aktivierung durch genotoxischen Stress ebenfalls eine Phosphorylierung der Aktivierungsschleifen vorausgeht. Angesichts der Identifizierung einer parallelen PARP-unabhängigen Signalachse, die durch ATM an der Plasmamembran ausgelöst wird, stellt sich die Frage, ob ATM die katalytischen IKKs direkt phosphorylieren kann. Die in der Literatur vorgebrachten Evidenzen für die Funktion von ATM als vorgeschaltete IKK-Kinase sind

---

allerdings nicht überzeugend [101]. Eine plausiblere Möglichkeit besteht darin, dass ATM an der Plasmamembran eine Kette von Ereignissen in Gang setzt, die zu einer IKK-Phosphorylierung führt.

Um diese zytoplasmatische Signalachse der IKK-Aktivierung durch DNA-Schäden näher zu charakterisieren, wurde ein RNAi-Screen durchgeführt und dabei die TGF $\beta$ -aktivierte Kinase 1 (TAK1) als positiver Regulator identifiziert (Abschnitt 4.2.3). TAK1, ein Mitglied der MAP3K-Kinasefamilie, wurde ursprünglich im Zusammenhang mit dem durch *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF $\beta$ ) ausgelösten Signalweg beschrieben [169]. Eine ganze Reihe kürzlich erschienener *in vitro*- und *in vivo*-Studien belegt jedoch, dass TAK1 ebenfalls eine wichtige Rolle für die Aktivierung des IKK-NF- $\kappa$ B-Systems durch diverse Stimuli (TNF $\alpha$ , LPS, IL-1, Antigene) spielt [72]. Darüberhinaus ist TAK1 in der Lage, die Serin-Reste in der Aktivierungsschleife von IKK $\beta$  zu phosphorylieren und damit als vorgeschaltete IKK-Kinase zu agieren. Die hier präsentierten Daten zeigen erstmals, dass TAK1 durch genotoxischen Stress aktiviert wird und für die Phosphorylierung von IKK $\beta$  und damit für die Induktion des IKK-NF- $\kappa$ B-Systems in diesem Kern-Zytoplasma-Signalweg verantwortlich ist (Abschnitt 4.2.3 und 4.2.5). Durch anknüpfende RNAi-Experimente und Ca<sup>2+</sup>-Chelator-Studien konnte demonstriert werden, dass die Translokation von ATM an die Plasmamembran und nicht die nukleäre PARP-1-PIASy-Signalachse für die Aktivierung von TAK1 verantwortlich ist (Abschnitt 4.2.8). Die ATM-Rekrutierung an die Plasmamembran setzt zwischen 20 und 30 min nach Bestrahlung ein (Abb. 4.36). Genau in dem gleichen Zeitraum findet die TAK1-Aktivierung im Zytoplasma statt. Die zeitliche Kongruenz dieser Vorgänge liefert eine weitere Evidenz für den kausalen Zusammenhang zwischen ATM-Translokation und TAK1-Aktivierung. Aufgrund der zeitlichen Verzögerung gegenüber der enzymatischen Aktivierung ist der Kernexport von ATM vermutlich geschwindigkeitsbestimmend für die Induktion von TAK1.

Weiterhin konnte durch RNAi-Studien demonstriert werden, dass die TAK1-Aktivierung von der Untereinheit des TAK1-Kinasekomplexes TAB2 abhängt (Abschnitt 4.2.4). Interessanterweise spielt TAB1, die andere nicht-katalytische Untereinheit des TAK1-Kinasekomplexes, keine Rolle für die durch DNA-Strangbrüche ausgelöste Aktivierung von TAK1 und damit für die Induktion des IKK-NF- $\kappa$ B-Systems. Die Bedeutung von TAB1 für die Regulation der TAK1-Aktivität ist in der Tat unzureichend verstanden. So ist ein ektopisch exprimierter TAK1-TAB1-Komplex inaktiv und bedarf der Koexpression von TAB2 um aktiviert zu werden [72]. Außerdem bleibt in Abwesenheit von TAB1 die NF- $\kappa$ B-

---

Aktivierung durch TNF $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  analog zur DNA-Schaden-induzierten Kaskade unbeeinflusst. Möglicherweise spielt TAB1 in anderen Signalwegen (z.B. TGF $\beta$ ) eine Rolle für die Regulation von TAK1.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalweg, analog zu klassischen Kaskaden, der TAK1-Kinasekomplex für die Phosphorylierung von IKK $\beta$  verantwortlich ist. Die Phosphorylierung der katalytischen IKK-Untereinheit an den Serin-Resten der Aktivierungsschleife versetzt die Kinase in eine aktive Konformation [30]. Für eine effektive Aktivierung des IKK-Komplexes durch DNA-Schäden bedarf es jedoch, neben dieser bisher in diesem Zusammenhang nicht beschriebenen Modifikation, offensichtlich der Sumoylierung und Phosphorylierung von IKK $\gamma$  durch die nukleäre Achse des Signalwegs.

### **5.7. Zentrale Rolle von Lys63-verknüpften Ubiquitin-Polymeren für TAK1- und IKK-Aktivierung**

Für ein besseres Verständnis der identifizierten zytoplasmatischen ATM-TAK1-Signalachse war es wichtig zu klären, wie ATM das DNA-Schadensignal auf TAK1 überträgt. Das Konzept der Lys63-Polyubiquitin-vermittelten Signalübertragung wird im Fall der Rezeptor-vermittelten NF- $\kappa$ B-Signalwege durch zahlreiche *in vitro*- und *in vivo*-Evidenzen untermauert [177]. Wie im vorangegangenen Abschnitt dargelegt, hängt die TAK1-Aktivierung vom TAK1-assoziierten Protein TAB2 ab. TAB2 verfügt über Ubiquitin-Bindedomänen mit einer Selektivität gegenüber Lys63-verknüpftem Polyubiquitin und erwirkt TAK1-Aktivierung nur in Anwesenheit dieser nicht-degradativen Art von Ubiquitin-Polymeren [166]. Demnach ist es naheliegend, dass ATM den TAK1-Kinasekomplex mittels eines Mechanismus aktiviert, dem die Synthese von Lys63-Ubiquitin-Polymeren zugrunde liegt. Diese Annahme wird dadurch untermauert, dass in Abwesenheit von Ubc13, der E2-Enzymuntereinheit der Lys63-Ubiquitinierungsmaschinerie, die TAK1- und NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch genotoxischen Stress verhindert wird (Abb. 4.31).

Wie im Abschnitt 1.2.1. näher ausgeführt, erfüllt Lys63-Polyubiquitin eine gerüstbildende Funktion bei der Assemblierung von Signalosomen in klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegen. Interessanterweise wurde die Synthese von Lys63-verknüpften Ubiquitin-Polymeren erstmals in Studien an *Saccharomyces cerevisiae* im Zusammenhang mit DNA-Reparatur beschrieben [181]. Hefestämme, die eine Lys63Arg-Mutation in Ubiquitin tragen oder denen das Gen für Ubc13 bzw. Mms2/Uev1A fehlt, sind hochgradig sensitiv gegenüber UV-Strahlung und

---

weisen DNA-Reparaturdefekte auf. Mit Hilfe einer Ubc13-defizienten DT40-Zelllinie wurde demonstriert, dass Ubc13 auch in Vertebraten für die Reparatur unterschiedlicher Arten von DNA-Schäden erforderlich ist [182]. Mittlerweile sind mehrere DNA-Reparaturfaktoren, darunter PCNA, RNF8 und die Histonvariante  $\gamma$ H2AX beschrieben, die durch Lys63-Polyubiquitin modifiziert werden [183-185]. Die Konjugation spezieller Ubiquitin-Polymere an wichtige strukturelle Komponenten der DNA-Reparaturmaschinerie führt zur Rekrutierung nachgeschalteter Faktoren (z.B. BRCA1-RAP80-Komplex) mit Ubiquitin-Bindedomänen und dient der zeitlich-räumlichen Organisation des Reparaturvorgangs. Analog zu NF- $\kappa$ B-aktivierenden Signalwegen besteht also die Funktion der Lys63-Polyubiquitinierung im Prozess der DNA-Reparatur in der Schaffung einer spezifischen Interaktionsplattform zur Signal-induzierten Assemblierung von Multiproteinkomplexen. Aus diesem gemeinsamen Charakteristikum der DNA-Reparatur und der Rezeptor-vermittelten Signalwege ergibt sich eine weitere bemerkenswerte Implikation. Die Prozesse der DNA-Reparatur sind in der Evolution früher entstanden als die Rezeptor- bzw. Stress-vermittelten NF- $\kappa$ B-Signalwege. Dementsprechend muss die Synthese von Lys63-Ubiquitin-Polymeren zunächst zur Erhaltung der genomischen Integrität genutzt und dann später bei der Entstehung bestimmter Klassen von Metazoa zur Regulation von NF- $\kappa$ B-Signalwegen adaptiert worden sein. Die in dieser Arbeit beschriebene Abhängigkeit der NF- $\kappa$ B-Aktivierung von der Synthese dieser nicht-degradativen Polyubiquitin-Ketten im Verlauf genotoxischer Stressantwort könnte eine Übergangsform für die Implementierung Lys63-Polyubiquitin-gesteuerter Prozesse in Rezeptor-vermittelte Signalwege darstellen.

Eine entscheidende Frage betrifft den Mechanismus der Lys63-Polyubiquitin-vermittelten TAK1- und IKK-Aktivierung im Verlauf genotoxischer Stressantwort. Vermutlich wird der TAK1-Komplex analog zu Rezeptor-vermittelten Signalwegen über TAB2 an Lys63-Polyubiquitin-Ketten rekrutiert, die an Adapterproteine konjugiert werden [186]. Dadurch werden mehrere TAK1-Moleküle in räumliche Nähe zu einander gebracht und die TAK1-Kinaseaktivität durch trans-Autophosphorylierung an Thr-187 der Aktivierungsschleife induziert. Als regulatorische Untereinheit des IKK-Komplexes verfügt IKK $\gamma$  ebenfalls über Ubiquitin-Bindedomänen [45, 46, 66]. Durch Rekonstitutionsexperimente konnte gezeigt werden, dass die Bindung von IKK $\gamma$  an Lys63-Polyubiquitin-Ketten eine entscheidende Rolle für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch DNA-Schädigung spielt (Abschnitt 4.2.10). Folglich könnte die Aktivierung des IKK-NF- $\kappa$ B-Systems im Verlauf genotoxischer Stressantwort nach einem Prinzip ablaufen, dem eine Korekrutierung der TAK1- und IKK-Komplexe an

---

eine aktivierende Polyubiquitin-Gerüststruktur zugrunde liegt. TAK1 wird dadurch in die Lage versetzt das in räumlicher Nähe befindliche IKK $\beta$  zu phosphorylieren und zu aktivieren.

## 5.8. ATM aktiviert die Ubiquitin-Ligase TRAF6

Aus der Identifizierung des Lys63-Polyubiquitin-abhängigen Mechanismus der Signalweiterleitung im DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalweg resultiert die Frage nach dem Ursprung der nicht-degradativen Ubiquitin-Polymere. In allen bisher charakterisierten NF- $\kappa$ B-Signalwegen kooperieren die Proteine der TRAF-Familie als E3-Ubiquitin-Ligasen vom RING-Typ mit Ubc13-Uev1A bei der Übertragung von Lys63-Ubiquitin-Polymeren an Signalproteine [30]. Durch RNAi-Untersuchungen und Experimente mit einer dominant-negativen Mutante, der die RING-Domäne fehlt, konnte TRAF6 als die E3-Ubiquitin-Ligase identifiziert werden, die für die Aktivierung des TAK1-IKK-NF- $\kappa$ B-Systems durch DNA-Schäden zuständig ist (Abschnitt 4.2.5 und 4.2.6).

Aus Untersuchungen am IL-1 $\beta$ -Signalweg ist bekannt, dass die Aktivierung von TRAF6 von einer Autoubiquitinierung begleitet wird [72]. Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen, dass  $\gamma$ -Bestrahlung ebenfalls eine TRAF6-Autoubiquitinierung induziert und diese von Ubc13 abhängt (Abschnitt 4.2.7). Somit ist TRAF6 das Schlüsselmolekül des DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalwegs, das durch die Synthese von Lys63-Polyubiquitin-Ketten eine aktivierende Gerüststruktur für die Korekrutierung und Aktivierung von TAK1 und IKK bereitstellt. Eine entscheidende Frage besteht darin, ob das autoubiquitinierte TRAF6 selbst als dieses aktivierende Gerüstmolekül fungiert, oder ob diese Funktion einem noch nicht identifizierten spezifischen Adapterprotein zukommt. Bei kanonischen NF- $\kappa$ B-Kaskaden, wie z.B. dem IL-1 $\beta$ /Toll-Signalweg oder dem TCR-Signalweg, konjugiert TRAF6 Lys63-Ubiquitin-Polymere an Adapterproteine IRAK1 bzw. MALT1, an denen anschließend die Assemblierung des TAK1-IKK-Signalosoms erfolgt [170, 187]. Durch RNAi-Analysen konnte jedoch eine Beteiligung dieser Adaptermoleküle an der DNA-Schadenskaskade ausgeschlossen werden (Abschnitt 4.2.3). Die physiologische Bedeutung der TRAF6-Autoubiquitinierung wurde durch die Ergebnisse einer kürzlich erschienenen Untersuchung relativiert [188]. In dieser Studie wurde gezeigt, dass nicht die TRAF6-Autoubiquitinierung, jedoch die E3-Funktion der RING-Domäne, für eine effektive NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch IL-1 $\beta$  erforderlich ist. Diese Daten deuten darauf hin, dass TRAF6 das Signal eher durch Polyubiquitinierung von Adapterproteinen als durch Autoubiquitinierung weiterleitet. In

---

künftigen Studien wird es deshalb von zentralem Interesse sein, das TRAF6-Substrat des DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalwegs zu identifizieren.

Die Ergebnisse der RNAi-Studien (Abb. 4.34) sowie der Ca<sup>2+</sup>-Chelator- (Abb. 4.35) und Zellfraktionierungsexperimente (Abb. 4.35 und 4.36) legen nahe, dass TRAF6 durch das aus dem Zellkern exportierte und mit der Plasmamembran assoziierte ATM aktiviert wird. So wie der ATM-Kernexport und die TAK1-Aktivierung wird auch die E3-Ligaseaktivität von TRAF6 unabhängig vom nukleären PARP-1-PIASy-Signalmodul induziert (Abb. 4.34).

Eine wichtige Fragestellung betrifft den Mechanismus der ATM-vermittelten Aktivierung von TRAF6. Bemerkenswerterweise weist die Kinetik der ATM-Anreicherung an der Membran eine zeitliche Kongruenz mit einer Zunahme von TAB2 im Zytoplasma und der zytosolischen TAK1-Aktivierung auf (Abb. 4.36). Aus Untersuchungen am IL-1 $\beta$ -Signalweg ist es bekannt, dass Stimulus-induzierte TAB2-Translokation ins Zytoplasma und die zytosolische TAK-1-Aktivierung mit der Aktivierung von TRAF6 einhergehen [189]. Angesichts dieser gemeinsamen Eigenschaft könnte die TRAF6-Aktivierung im Verlauf der DNA-Schadensantwort nach analogen Prinzipien erfolgen wie im IL-1 $\beta$ -Signalweg. Allerdings ist es auch im Fall Rezeptor-vermittelter NF- $\kappa$ B-Signalkaskaden nicht genau verstanden, wie TRAF6-Aktivität gesteuert wird. Es wird vermutet, dass eine Signal-induzierte Oligomerisierung von TRAF6 dessen Ubiquitin-Ligaseaktivität stimuliert. In der Tat kann eine chemisch-induzierte Dimerisierung von chimären TRAF6-Molekülen in Abwesenheit jeglicher zusätzlicher Stimuli zu einer TRAF6-Polyubiquitinierung und NF- $\kappa$ B-Aktivierung führen [167, 190]. Bezüglich der Frage, wie die Oligomerisierung von TRAF6 unter physiologischen Bedingungen erzielt wird, existieren noch keine experimentell gesicherten Erkenntnisse. Es wird vermutet, dass nach Stimulation von Zellen mit IL-1 $\beta$  TRAF6 in ein IL-1 $\beta$ -Rezeptor-proximales Signalosom inkorporiert wird. Dieser Multiproteinkomplex unterliegt dynamischen Veränderungen an der Plasmamembran und schafft vermutlich die molekularen Voraussetzungen für TRAF6-Oligomerisierung und Aktivierung [191]. Zellfraktionierungsexperimente ergaben, dass ein wesentlicher Teil von TRAF6 Membran-gebunden ist (Abb. 4.36). Andererseits hängt die TRAF6-Aktivierung durch genotoxischen Stress von der ATM-Translokation an die Plasmamembran ab (Abschnitt 4.2.8). Somit ist es naheliegend, dass ATM-vermittelte TRAF6-Aktivierung in Übereinstimmung mit dem IL-1 $\beta$ -Signalweg an der Plasmamembran abläuft. Dass ATM die Ubiquitin-Ligaseaktivität von TRAF6 durch eine direkte Phosphorylierung stimuliert, kann ausgeschlossen werden, da keine ATM-Phosphorylierungsstellen in der TRAF6-Sequenz

gefunden werden konnten. ATM bewirkt die Oligomerisierung und Aktivierung von TRAF6 vermutlich indirekt durch Phosphorylierung eines TRAF6-aktivierenden Faktors. Im IL-1 $\beta$ -Signalweg phosphoryliert IRAK4 innerhalb des Rezeptor-proximalen Signalosoms IRAK1 [192, 193]. Es wird angenommen, dass das phosphorylierte IRAK1 mit TRAF6 interagiert und möglicherweise dessen Oligomerisierung und Aktivierung bewirkt. Gleichmaßen wie IRAK4, könnte ATM an der Plasmamembran ein TRAF6-aktivierendes Adapterprotein phosphorylieren, das IRAK1 funktional nahe steht.

### **5.9. IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung als Konvergenzpunkt des DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalnetzwerks**

Neben der Phosphorylierung der T-Loop-Serine von IKK $\beta$  scheint die Ubiquitinierung von IKK $\gamma$  eine zentrale Rolle bei der Aktivierung des IKK-Komplexes durch diverse Stimuli zu spielen [48, 49, 51]. So induziert TNF $\alpha$  eine cIAP-1-vermittelte Polyubiquitinierung von IKK $\gamma$ , die abhängig von einer intakten Zink-Finger-Domäne ist [48]. Durch Überexpression von Ubiquitinmutanten zusammen mit IKK $\gamma$  und cIAP-1 wurde gezeigt, dass die Ubiquitin-Polymere, die von cIAP-1 an IKK $\gamma$  geknüpft werden, eine Lys6-Verknüpfung aufweisen. Andererseits soll TRAF6/MALT-1 nach Stimulation des T-Zellrezeptors IKK $\gamma$  an Lys399 mit Lys63-Polyubiquitin modifizieren. Agonisten des Nod2-Signalwegs bewirken hingegen eine Lys63-Polyubiquitinierung von IKK $\gamma$  am Lys-285 [50].

Im Unterschied zur IKK $\gamma$ -Polyubiquitinierung bei klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegen, wurde eine Mono- bzw. Diubiquitinierung der IKK-Untereinheit an Lys 277/309 nach Behandlung von Zellen mit Topoisomerase-Inhibitoren beschrieben [51]. Die hier präsentierten Daten belegen, dass diese IKK $\gamma$ -Modifikation ebenfalls durch  $\gamma$ -Bestrahlung induziert wird (Abschnitt 4.2.12). Die Kinetik der IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung weist eine zeitliche Übereinstimmung mit anderen Signaltransduktionsereignissen der TRAF6-TAK-1-IKK-Signalachse auf (ATM-Rekrutierung an Plasmamembran, TRAF6-, TAK-1-, IKK- und NF- $\kappa$ B-Aktivierung; vgl. Abb. 4.36 mit 4.23B, 4.27A, 4.32A). Außerdem führt die Mutation der kritischen Lysin-Reste 277 und 309 zu einer Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch DNA-Schäden [51]. Deshalb kann angenommen werden, dass die Ubiquitinierung von IKK $\gamma$  im Verlauf der genotoxischen Stressantwort eine Voraussetzung für die IKK-Aktivierung darstellt.

Bisher waren die molekularen Mechanismen, die der Regulation der IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung nach genotoxischer Stresseinwirkung zugrunde liegen, nicht hinreichend verstanden. Im

---

Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass die Bindung von IKK $\gamma$  an Lys63-Polyubiquitin für die Aktivierung des IKK-Komplexes durch genotoxischen Stress erforderlich ist (Abb. 4.2.10). Eine weiterführende Analyse der Ubiquitin-Bindemutanten von IKK $\gamma$  ergab, dass diese Mutanten Defekte hinsichtlich der DNA-Schaden-induzierten IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung aufweisen (Abschnitt 4.2.14). Demzufolge erfüllt die Ubiquitin-Bindung von IKK $\gamma$  eine duale Funktion im Prozess der IKK-Aktivierung. Einerseits ist sie dafür verantwortlich, dass der IKK-Komplex in räumliche Nähe zum TAK1-Komplex gebracht wird, welches über TAB2 ebenfalls an das Polyubiquitin-Gerüst rekrutiert wird. Andererseits wird IKK $\gamma$  nach Bindung an aktivierende Ly63-polyubiquitinierte Strukturen selbst ubiquitiniert – ein Schritt, der neben der IKK $\beta$ -Phosphorylierung ebenfalls eine Voraussetzung für die Aktivierung von IKK und damit NF- $\kappa$ B darstellt.

Mutationen in der Zink-Finger-Domäne von IKK $\gamma$  kommen in Patienten mit der Erkrankung „anhidrotische ektodermale Dysplasie mit Immundefekt“ vor [30]. Da diese Mutationen die Aktivierbarkeit des IKK-Komplexes durch genotoxischen Stress, aber auch durch TNF $\alpha$  und LPS, verringern, wird angenommen, dass die Zink-Finger-Domäne eine grundlegende regulatorische Funktion im Prozess der IKK-Aktivierung ausübt (Daten nicht aufgeführt und [30]). Die hier präsentierten Daten belegen, dass die IKK $\gamma$ -Zink-Finger-Mutanten D406V und C417A (Abb. 1.2) nach  $\gamma$ -Bestrahlung nicht ubiquitiniert werden können (Abschnitt 4.2.13). Die Tatsache, dass sowohl die IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung als auch die IKK-Aktivierung von einer intakten Zink-Finger-Domäne abhängen, liefert einen weiteren Hinweis auf einen kausalen Zusammenhang zwischen beiden Vorgängen. In einer kürzlich erschienenen Arbeit wurde gezeigt, dass die Zink-Finger-Domäne in der Lage ist, niederaffine Protein-Protein-Wechselwirkungen mit Ubiquitin einzugehen [194]. Damit verfügt IKK $\gamma$  zusätzlich zu der CC2-LZ-Domäne über eine zweite Ubiquitin-Bindedomäne. Dementsprechend weisen die Zink-Finger-Mutanten den gleichen Phänotyp auf wie die Ubiquitin-Bindungsmutanten der CC2-LZ-Domäne. Die Mutation von kritischen Aminosäureresten in beiden strukturellen Modulen führt dazu, dass die IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung und IKK-Komplexaktivierung verhindert werden (Abb. 4.37, 4.39 und Daten nicht aufgeführt). Möglicherweise steuern beide Domänen die Bindung von IKK $\gamma$  an Lys63-Polyubiquitin kooperativ, wodurch eine bessere Erkennung dieser Art von Ubiquitin-Polymeren sichergestellt werden könnte.

---

Da die Ubiquitinierung von IKK $\gamma$  funktional an seine Ubiquitin-Bindungsfähigkeit geknüpft ist, stellt sich die Frage nach dem Ursprung der Polyubiquitin-Ketten. Wie bereits diskutiert, ist TRAF6 für die Synthese von Lys63-verknüpften Ubiquitin-Polymeren im DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalweg verantwortlich (Abschnitt 4.2.7). Sollte die Bindung von IKK $\gamma$  an die durch TRAF6 synthetisierten Ubiquitin-Ketten ausschlaggebend für die IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung sein, müsste eine Inhibition der TRAF6-Aktivierung auch dazu führen, dass IKK $\gamma$  nicht mehr ubiquitiniert werden kann. Nach einer RNAi-vermittelten Depletion von Komponenten der ATM-TRAF6-Signalachse ist dies in der Tat der Fall (Abschnitt 4.2.13). Darüberhinaus kann die Modifikation von IKK $\gamma$  mit Ubiquitin durch eine Überexpression von TRAF6 erzielt werden. Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die Rekrutierung von IKK $\gamma$  an die durch TRAF6 synthetisierten Polyubiquitin-Ketten zur Konjugation von Ubiquitin an IKK $\gamma$  selbst führt. Ob TRAF6 diese Reaktion katalysiert oder eine andere Ubiquitin-Ligase, soll in künftigen Studien geklärt werden.

Die bisher beschriebenen posttranslationalen Modifikationen, die im Verlauf der genotoxischen Stressantwort an IKK-Untereinheiten vorgenommen werden, umfassen: die Sumoylierung von IKK $\gamma$  durch PIASy, die Phosphorylierung von IKK $\gamma$  durch ATM, die IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung und IKK $\beta$ -Phosphorylierung durch TAK1. Diese Vielfalt an Modifikationen deutet darauf hin, dass die IKK-Aktivierung durch DNA-Schäden einer komplexen und strengen Kontrolle unterliegt. Eine für das Verständnis dieser Regulationsmechanismen wichtige Frage besteht darin, ob die einzelnen Modifikationen einander bedingen oder unabhängig von einander auftreten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein durch genotoxischen Stress induzierbares NF- $\kappa$ B-Signalnetzwerk identifiziert, das aus zwei simultan ablaufenden Modulen besteht. Das nukleäre PARP-1-PIASy-Modul beruht auf der Assemblierung eines PAR-abhängigen Signalosoms aus PARP-1, IKK $\gamma$ , PIASy und ATM und resultiert in der Modifikation von IKK $\gamma$  mit SUMO1 (Abb. 5.1). Wie im Abschnitt 5.4 diskutiert, könnte die Ser85-Phosphorylierung von IKK $\gamma$  durch ATM innerhalb des Signalosoms ablaufen und die PIASy-vermittelte IKK $\gamma$ -Sumoylierung regulieren. Die ATM-TRAF6-TAK1 Signalachse wird nach dem Kernexport von ATM an der Plasmamembran initiiert und kulminiert in der Phosphorylierung von IKK $\beta$  (Abb. 5.1). Da weder ATM-Translokation noch TAK1-Aktivierung vom PARP-Signalosom abhängen, ist es naheliegend, dass die IKK $\beta$ -Phosphorylierung unabhängig von IKK $\gamma$ -Sumoylierung abläuft. Die IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung bedarf eines Signalfusses über die ATM-TRAF6-Signalachse, da IKK $\gamma$  hierfür an die von TRAF6 synthetisierten Ubiquitin-Polymere binden muss (Abb. 5.1).

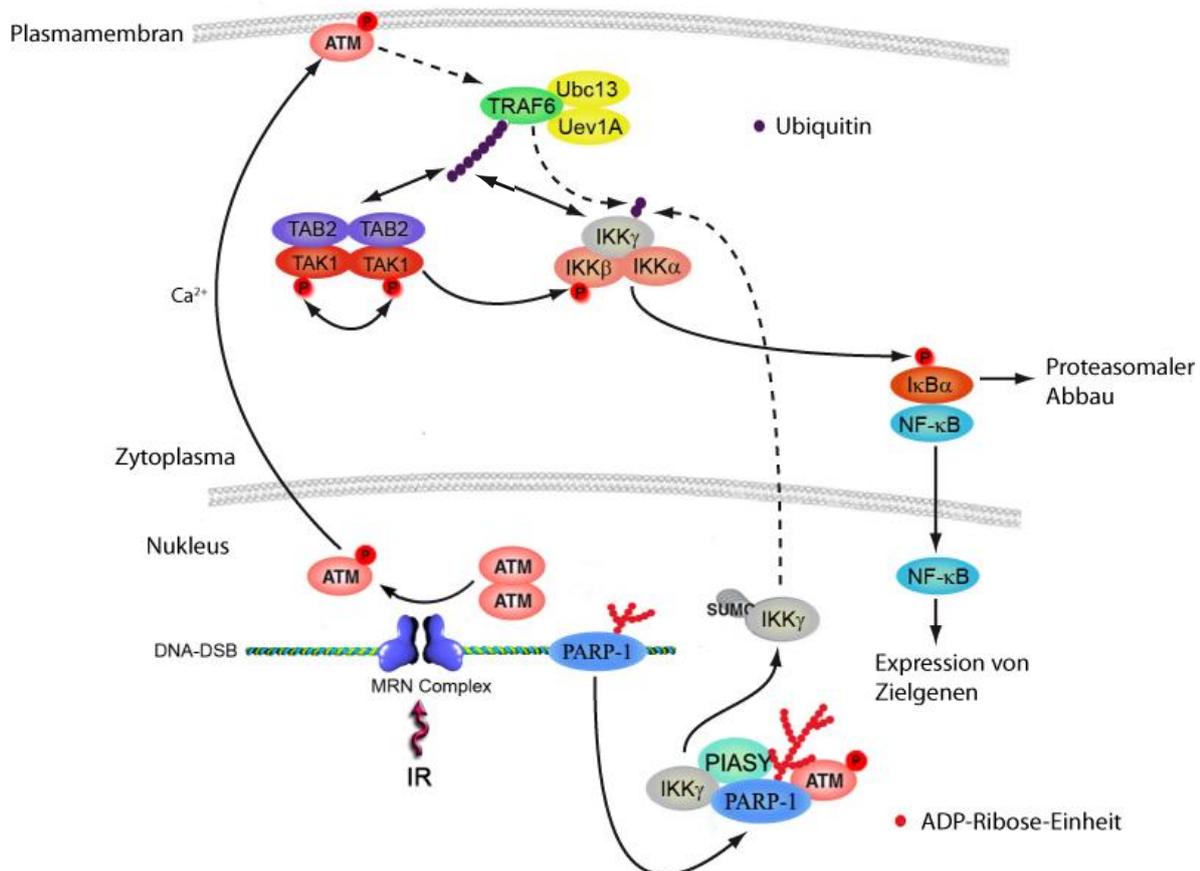
---

Eine RNAi-vermittelte Blockade der PARP-1-PIASy-Signalachse hatte bemerkenswerterweise ebenfalls eine Hemmung der IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung zufolge (Abschnitt 4.2.14). Demnach scheint die Sumoylierung von IKK $\gamma$ , in Übereinstimmung mit Huang *et al.*, eine Voraussetzung für die IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung zu sein [51]. Huang *et al.* schlugen vor, dass die Ubiquitinierung von IKK $\gamma$  die SUMO-Modifikation an den gleichen Lysin-Resten ablöst. Da jedoch der Zeitverlauf der Sumoylierung mit dem der Ubiquitinierung übereinstimmt, ist es auch möglich, dass beide Modifikationen zeitgleich vorliegen. Auf der Grundlage der vorliegenden Daten kann postuliert werden, dass die Ubiquitinierung der regulatorischen IKK-Untereinheit den Konvergenzpunkt der ATM-TRAF6-TAK1- und der PARP-1-PIASy-Achse des DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalnetzwerks bildet (Abb. 5.1).

Eine entscheidende Frage betrifft den Mechanismus, der die IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung im Zytoplasma in Abhängigkeit von der Sumoylierung im Zellkern reguliert. Obwohl die Kernlokalisierung vieler Proteine durch Sumoylierung gefördert wird, existieren auch Beispiele dafür, dass die SUMO-Konjugation zu einem verstärkten Kernexport des Substrats führt. So beruht ein Kontrollmechanismus des TGF $\beta$ -Signalwegs darauf, dass Smad3 durch PIASy sumoyliert und aus dem Zellkern exportiert wird [195]. Med, das *Drosophila* Ortholog des SMAD4 in Vertebraten, wird ebenfalls im Zellkern sumoyliert und anschließend ins Zytoplasma exportiert [196]. Möglicherweise resultiert die Sumoylierung von IKK $\gamma$  in einem nukleären Export der modifizierten Form. Es ist durchaus vorstellbar, dass SUMO die Assoziation von IKK $\gamma$  mit Faktoren begünstigt, die für die Ubiquitinierung im Zytoplasma zuständig sind.

Die genaue regulatorische Funktion der IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung für die Aktivierung des IKK-Komplexes durch DNA-Schäden wird im Mittelpunkt künftiger Studien stehen. Nach dem gegenwärtigen Kenntnisstand kommen dafür folgende Möglichkeiten in Betracht. Die Ubiquitinierung von IKK $\gamma$  könnte die Assoziation des IKK-Komplexes mit dem TAK1-Kinasekomplex begünstigen und dadurch die Phosphorylierung von IKK $\beta$  positiv beeinflussen. Andererseits könnte die Ubiquitin-Konjugation an die regulatorische IKK-Untereinheit durch allosterische Effekte die Kinaseaktivität von IKK $\beta$  modulieren. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass das an IKK $\gamma$  kovalent gebundene Ubiquitin eine intramolekulare Interaktion mit der Ubiquitin-Bindedomäne eingeht. Dies würde die Bindung von IKK $\gamma$  an andere polyubiquitinierte Proteine kompetitiv hemmen. Wenn man bedenkt, dass der IKK-Komplex über IKK $\gamma$  an Lys63-polyubiquitinierte Strukturen rekrutiert wird, könnte die IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung dafür verantwortlich sein, den IKK-Komplex von diesen

aktivierenden Multiproteinkomplexen wieder abzulösen. Auf diese Weise könnte der IKK-Komplex durch erhöhte Diffusionsfähigkeit einerseits seine Substrate effektiver erreichen. Andererseits würde dieser Mechanismus einen höheren Turnover der IKK-Aktivierung an polyubiquitinierten Gerüststrukturen ermöglichen.



**Abbildung 5.1. Modell des DNA-Schaden-induzierten NF-κB-Signalwegs.**

DNA-Strangbrüche induzieren zwei parallele Signalachsen, die auf der Ebene der IKK-Aktivierung konvergieren. Die ATM-TRAF6-TAK1-Signalachse wird von ATM an der Plasmamembran ausgelöst, nach dem die Kinase  $Ca^{2+}$ -abhängig aus dem Zellkern exportiert wurde. ATM induziert die Ubiquitin-Ligaseaktivität von TRAF6, die Lys63-verknüpfte Ubiquitin-Polymere synthetisiert. Der TAK1-Kinasekomplex wird über TAB2 an Lys63-polyubiquitinierte Strukturen rekrutiert und TAK1 durch trans-Autophosphorylierung aktiviert. Durch Bindung von  $IKK\gamma$  an Lys63-Polyubiquitin wird der IKK-Komplex in räumliche Nähe zum TAK1-Kinasekomplex gebracht und  $IKK\beta$  von TAK1 phosphoryliert. Neben der Phosphorylierung von  $IKK\beta$  an den Serinen der Aktivierungsschleife erfordert die Aktivierung des IKK-Komplexes eine Ubiquitinierung von  $IKK\gamma$ . Dieser Schritt ist sowohl von TRAF6 und der Bindung von  $IKK\gamma$  an Lys63-Ubiquitin-Polymere als auch von einer zweiten Signalachse, der PARP-1-PIASy-Signalachse, abhängig. Dieses nukleäre Signalmodul ist durch die Assemblierung von PARP-1, PIASy,  $IKK\gamma$  und ATM in einem PAR-abhängigen Signalosom gekennzeichnet und resultiert in der Modifikation von  $IKK\gamma$  mit SUMO1. Die nukleäre Sumoylierung von  $IKK\gamma$  scheint für den nachfolgenden Schritt der Ubiquitinierung im Zytoplasma erforderlich zu sein. Der aktivierte IKK-Komplex phosphoryliert  $I\kappa B\alpha$  und markiert den NF- $\kappa B$ -Inhibitor für proteasomalen Abbau. Daraufhin wird NF- $\kappa B$  freigesetzt, transloziert in den Zellkern und aktiviert seine Zielgene.

---

## 5.10. Integration der NF- $\kappa$ B-DNA-Schadenskaskade in das Netzwerk pro- und anti-apoptotischer Signale

In dieser Arbeit wurden erstmals zwei separate Signalachsen der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch genotoxischen Stress näher beschrieben. Diese simultan ablaufenden Signalmodule werden von ATM und PARP-1, den beiden Hauptmediatoren der zellulären DNA-Schadensantwort, initiiert. Eine gemeinsame phänotypische Eigenschaft von ATM- und PARP-1-defizienten Zellen ist ihre erhöhte Sensitivität gegenüber DNA-Schäden ([138] und Abschnitt 4.1.12). Andererseits führt eine Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität ebenfalls zur Induktion von Apoptose durch genotoxischen Stress (Abschnitt 4.1.12 und [180])

Die Fähigkeit von PARP-1, ATM und NF- $\kappa$ B als Überlebensfaktoren zu agieren, wurde bisher nicht in einem Zusammenhang betrachtet. Die hier präsentierten Daten erweitern die Vorstellung, dass die erhöhte Strahlensensitivität von PARP-1<sup>-/-</sup>- und ATM<sup>-/-</sup>-Zellen hauptsächlich auf beeinträchtigte DNA-Reparaturvorgänge in Abwesenheit dieser Regulatoren der DNA-Reparatur zurückzuführen ist [138]. Eine RT-PCR-Analyse strahleninduzierter NF- $\kappa$ B-Zielgene ergab, dass der Verlust von PARP-1 die Expression der anti-apoptotischen NF- $\kappa$ B-Zielgene Bcl-xL und XIAP verhindert (Abschnitt 4.1.12). Es kann davon ausgegangen werden, dass die Expression dieser Gene in ATM-defizienten Zellen ebenfalls beeinträchtigt ist. Folglich tragen PARP-1 und ATM aktiv zur Induktion eines NF- $\kappa$ B-abhängigen Überlebensprogramms bei, indem sie das DNA-Schadensignal an das IKK-NF- $\kappa$ B-System transduzieren. Die PARP-1-abhängige Signalachse ist durch die Assemblierung eines PAR-abhängigen Signalosoms gekennzeichnet. Durch eine Analyse von PARP-1-, PIASy- und IKK $\gamma$ - Knockout-Zellen konnte gezeigt werden, dass ein Verlust von Komponenten des Signalosoms zu erhöhten Apoptoseraten führt. Da die Apoptose-Sensitivität in den einzelnen Zelllinien gleich stark ausgeprägt ist (Abb. 4.18A) und die Behandlung von IKK $\gamma$ - und PIASy-defizienten Zellen mit einem PARP-Inhibitor im Gegensatz zu WT-Zellen keinen weiteren Anstieg Strahlen-induzierter Apoptoserate zufolge hat (Abb. 4.18B), kann angenommen werden, dass die Signalosom-Komponenten funktional in einem Signalweg agieren. Andererseits legen diese Ergebnisse nahe, dass ein wesentlicher Teil der überlebensfördernden Wirkung von PARP-1 über die NF- $\kappa$ B-Aktivierung vermittelt wird.

Das DNA-Schaden-induzierte NF- $\kappa$ B-Signalnetzwerk besitzt zwei Knotenpunkte, an denen die ATM- und PARP-1-abhängigen Signale integriert werden. Der eine Knotenpunkt befindet

---

sich auf der Ebene des PAR-abhängigen Signalosoms, wobei ATM und PARP-1 als dessen Komponenten möglicherweise kooperativ die Sumoylierung von IKK $\gamma$  durch PIASy steuern. Den zweiten Konvergenzpunkt der ATM-TRAF6- und der PARP-1-PIASy-Signalachse bildet die Ubiquitinierung von IKK $\gamma$ . Woraus ergibt sich aber die Notwendigkeit eines so komplexen Regulationssystems mit zwei DNA-Schadensensoren und Konvergenzpunkten? Zum einen geht mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B im Verlauf genotoxischer Stressantwort die Induktion eines multi-funktionalen Genexpressionsprogramms einher, das nicht nur der Apoptose entgegenwirkt, sondern auch andere kritische Aspekte der zellulären Physiologie beeinflusst [197]. Ein Vorgang, der fundamentale zelluläre Reaktionen steuert und das Schicksal der Zelle bestimmt, muss strengen Kontrollmechanismen unterliegen. Zum anderen wird ATM ausschließlich durch DNA-Doppelstrangbrüche aktiviert [134, 198, 199], wohingegen PARP-1 sowohl Doppel- als auch Einzelstrangbrüche erkennt [200]. Experimente mit dem Topoisomerase-I-Inhibitor Camptothecin, der zunächst DNA-Einzelstrangbrüche generiert, die anschließend während der Replikation in Doppelstrangbrüche umgewandelt werden, zeigen, dass NF- $\kappa$ B wie ATM ausschließlich durch DNA-Doppelstrangbrüche aktiviert wird [201]. DNA-Einzelstrangbrüche kommen relativ häufig vor und können im Gegensatz zu Doppelstrangbrüchen schnell und effektiv repariert werden [198]. Da unter diesen verhältnismäßig harmlosen Bedingungen mit PARP-1 nur einer der beiden DNA-Schadensmediatoren aktiviert wird, bleibt die Induktion des NF- $\kappa$ B-abhängigen genetischen Programms aus und die Zelle behält den jeweiligen physiologischen Zustand bei. DNA-Doppelstrangbrüche stellen für die zelluläre Homöostase eine größere Gefahr dar. In diesem Fall wird sowohl PARP-1 als auch ATM aktiviert und beide Faktoren tragen zur Induktion des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B bei. Die NF- $\kappa$ B-abhängige DNA-Schadensreaktion verzögert das Einsetzen der Apoptose und gewährt der Zelle ein Zeitfenster zur Reparatur von DNA-Läsionen. Das NF- $\kappa$ B-Signalnetzwerk offenbart somit ein Prinzip der multiplen Kontrolle, das sich in der Biologie zur Steuerung entscheidender zellulärer Prozesse bewährt hat. Ein weiteres Beispiel hierfür ist der Mechanismus der Kostimulation bei der Aktivierung von T-Zellen [202]. In diesem Fall werden ebenfalls zwei simultane Signale (TCR/Antigen-MHC-Interaktion und B7/CD28-Interaktion) benötigt, um eine Signalkaskade auszulösen, die durch Modulation der Genexpression den physiologischen Zustand der T-Zelle nachhaltig verändert.

Im Fall extensiver DNA-Schäden, die von der DNA-Reparaturmaschinerie nicht beseitigt werden können, könnte das PAR-abhängige Signalosom der NF- $\kappa$ B-Aktivierung entgegenwirken. Bei einer massiven Schädigung des Genoms kommt es zu einer Überaktivierung des Enzyms, wodurch höhere Konzentrationen an automodifizierter PARP-1 für einen längeren Zeitraum vorliegen. Wenn die Hypothese von einer Hemmung der E3-SUMO-Ligaseaktivität von PIASy durch die Interaktion mit PAR-Ketten zutrifft, würde PIASy unter diesen Bedingungen weiterhin im PARP-1-Signalosom sequestriert bleiben und IKK $\gamma$ -Sumoylierung und IKK-Aktivierung verhindert sein (Abschnitt 5.4). Durch das Ausbleiben der NF- $\kappa$ B-Aktivierung und damit der Induktion anti-apoptotischer Gene könnten pro-apoptotische Prozesse überwiegen und die betroffene Zelle durch programmierten Zelltod entfernt werden. Mehrere Studien weisen in der Tat auf einen Zusammenhang zwischen der Überaktivierung von PARP-1 und dem zellulären Tod hin [131]. So kann massive DNA-Schädigung zu einer übermäßigen Verwertung des PARP-1-Substrats NAD<sup>+</sup> führen, wodurch das zelluläre Niveau an NAD<sup>+</sup> und damit an ATP unter physiologisch tolerierbare Grenzen absinkt und die betroffene Zelle durch Nekrose eliminiert wird [131].

Interessanterweise ist sowohl ATM als auch PARP-1 an der Aktivierung des Tumorsuppressors p53, eines funktionalen Gegenspielers von NF- $\kappa$ B, beteiligt. ATM phosphoryliert p53 und erhöht dadurch dessen Stabilität [200]. Durch Poly-ADP-Ribosylierung von p53 hemmt PARP-1 die Interaktion des Tumorsuppressors mit dem Kernexportrezeptor Crm1 und fördert dadurch dessen Akkumulation im Nukleus [203]. Im Gegensatz zu NF- $\kappa$ B reguliert p53 die Expression von Zellzyklusinhibitoren sowie pro-apoptotischen Genen und fördert damit Zellzyklusarrest oder induziert Apoptose. Folglich wirken beide Mediatoren der zellulären DNA-Schadensantwort simultan auf zwei Transkriptionsfaktoren ein, welche durch die Induktion scheinbar gegensätzlicher genetischer Programme die Balance zwischen pro- und anti-apoptotischen Signalen regulieren. Dieses Beispiel für die Induktion antagonistischer zellulärer Reaktionen durch ein und denselben Stimulus ist keine Ausnahme. So kann TNF $\alpha$ , abhängig vom physiologischen Kontext, durch die Induktion von NF- $\kappa$ B das zelluläre Überleben fördern oder durch Aktivierung von Caspasen den programmierten Zelltod auslösen [204].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die NF- $\kappa$ B-aktivierende Kaskade in ein übergeordnetes zelluläres Signalnetzwerk eingebettet ist, welches die finale physiologische Reaktion der Zelle auf DNA-Schäden determiniert. Die Tatsache, dass NF- $\kappa$ B durch Induktion von anti-apoptotischen Genen das zelluläre Überleben fördert, ist auch von

klinischer Relevanz. Da die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch DNA-Schäden mit der Entwicklung einer Tumorzellresistenz gegenüber Strahlen- und Chemotherapie assoziiert ist, stellt dieser Transkriptionsfaktor einen wichtigen pharmakologischen Angriffspunkt dar. In der vorliegenden Arbeit wurde demonstriert, dass PARP-Inhibitoren den DNA-Schaden-induzierten NF- $\kappa$ B-Signalweg blockieren (Abb. 4.6). In der Tat werden PARP-Inhibitoren bereits in vorklinischen Studien auf ihre Eignung als Begleittherapeutikum im Rahmen von Chemo- bzw. Radiotherapien getestet [205]. Die hier präsentierten Daten leisten somit einen Beitrag zum mechanistischen Verständnis der Wirkungsweise dieser Inhibitoren.

## 6. Zusammenfassung

Bei der zellulären DNA-Schadensantwort führt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zur Induktion anti-apoptotischer Gene. Es wird angenommen, dass dieses Überlebensprogramm im Zusammenspiel mit Zellzyklus-Regulation und DNA-Reparaturvorgängen dafür sorgt, dass im Fall mäßiger DNA-Schädigung der zelluläre Lebenszyklus wieder aufgenommen werden kann.

Im Rahmen der vorgelegten Dissertation wurde ein komplexes Signalnetzwerk aufgedeckt, das der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch DNA-Strangbrüche zugrunde liegt. Die zentralen Mediatoren zellulärer DNA-Schadensreaktionen PARP-1 und ATM induzieren zwei Signalachsen, die auf der Ebene der IKK-Aktivierung im Zytoplasma konvergieren. Nach Rekrutierung an DNA-Strangbrüche wird PARP-1 automodifiziert und ins Nukleoplasma freigesetzt. Daraufhin bildet das PARylierte Enzym einen transienten Komplex mit IKK $\gamma$ , PIASy und ATM, wobei Protein-PAR-Wechselwirkungen eine stabilisierende Funktion wahrnehmen. Anschließend wird IKK $\gamma$  durch PIASy mit SUMO1 modifiziert. Dieser Signalschritt ist für die Aktivierung des IKK-NF- $\kappa$ B-Systems erforderlich. Simultan wird ATM Ca<sup>2+</sup>-abhängig aus dem Zellkern exportiert und induziert nach Assoziation mit der Plasmamembran eine zweite Signalachse. Diese besteht aus einer Kette von Prozessen, die Ähnlichkeiten zu einigen klassischen NF- $\kappa$ B-Signalwegen, wie dem IL-1/Toll-Weg, aufweist. ATM bewirkt eine Aktivierung der Ubiquitin-Ligase TRAF6, die in Kooperation mit dem E2-Enzymkomplex Ubc13/Uev1A Lys63-verknüpfte Polyubiquitin-Ketten an sich selbst und eventuell an noch nicht identifizierten Signalkomponenten konjugiert. Nach der gegenwärtigen Vorstellung werden TAK1- und IKK-Komplexe an diese nicht-degradativen Ubiquitin-Polymere rekrutiert und in räumliche Nähe zu einander gebracht. Daraufhin kommt es zu einer trans-Autophosphorylierung und Aktivierung der Kinase TAK1, die für die Phosphorylierung und Aktivierung von IKK $\beta$  verantwortlich ist.

IKK $\gamma$  wird nach der Rekrutierung des IKK-Komplexes an Lys63-polyubiquitinierte Strukturen mono- und diubiquitiniert. Neben IKK $\beta$ -Phosphorylierung und IKK $\gamma$ -Sumoylierung stellt diese Modifikation eine weitere Voraussetzung für die Aktivierung des IKK-Komplexes durch genotoxischen Stress dar. Da auch PARP-1 und PIASy neben ATM für Mono-/Diubiquitinierung von IKK $\gamma$  erforderlich sind, stellt diese IKK $\gamma$ -Modifikation den Konvergenzpunkt des ATM- und des PARP-1-ausgelösten Signalmoduls dar.

Die präsentierten Ergebnisse ergeben ein neues Konzept der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch genotoxischen Stress. Neben der Identifikation neuer Schlüsselfaktoren des Signalwegs (PARP-1, TRAF6, TAB2, TAK1) konnten grundlegende Regulationsmechanismen dieser Kern-Zytoplasma-Signalkaskade aufgedeckt werden. Charakteristisch ist die Synthese von gerüstbildenden Polymeren (PAR und Lys63-Ubiquitin-Polymeren), an denen Multiproteinkomplexe assembliert werden (PARP-Signalosom und TAK1-IKK-Signalosom). In diesen supramolekularen Strukturen wird der Signalfluss integriert und an Enzyme weitergeleitet, die post-translationale Modifikationen an IKK-Untereinheiten vornehmen (IKK $\gamma$ -Sumoylierung, IKK $\gamma$ -Ubiquitinierung, IKK $\beta$ -Phosphorylierung). Diese Modifikationen beeinflussen sich zum Teil gegenseitig und tragen gemeinsam zur Aktivierung des IKK-Komplexes durch genotoxischen Stress bei.

Activated as part of the cellular response to DNA-damage, the transcription factor NF- $\kappa$ B regulates the expression of anti-apoptotic genes. Thus, in case of moderate genotoxic stress, this survival program, in cooperation with cell cycle regulation and DNA repair, facilitates the resumption of cellular life cycle.

The present thesis reveals a complex signaling network leading to NF- $\kappa$ B activation by DNA strand breaks. PARP-1 and ATM, as the central mediators of cellular responses to DNA damage, induce two signaling cascades, which converge on the activation of the IKK complex in the cytoplasm. Upon recruitment to DNA strand breaks, automodified PARP-1 is released into the nucleoplasm and forms a transient complex with IKK $\gamma$ , PIASy and ATM. This signalosome is stabilized by protein-PAR-interactions and promotes PIASy mediated sumoylation of IKK $\gamma$ , a modification necessary for the activation of the IKK-NF- $\kappa$ B system by genotoxic stress. Simultaneously, ATM is exported out of the nucleus in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner and induces the second identified signaling cascade at the plasma membrane. This pathway exhibits some characteristics of the classical NF- $\kappa$ B activation cascades, e.g. IL-1/Toll receptor signaling. ATM activates the ubiquitin ligase TRAF6, which functions in concert with the E2 enzyme complex Ubc13/Uev1A and conjugates Lys63-linked poly-ubiquitin chains to itself and possibly to still unidentified signaling factors. According to the current model, non-degradative ubiquitin polymers recruit TAK1 and IKK complexes, thereby bringing them into close proximity. Subsequently, TAK1 kinase is activated by trans-autophosphorylation, leading to phosphorylation and activation of IKK $\beta$ .

Upon recruitment to Lys63-polyubiquitinated structures, IKK $\gamma$  becomes mono- and diubiquitinated. Along with IKK $\beta$  phosphorylation and IKK $\gamma$  sumoylation, this modification is prerequisite for the activation of the IKK complex by genotoxic stress. As in addition to ATM, PARP-1 and PIASy are also required for mono/diubiquitination of IKK $\gamma$ , the ATM and the PARP-1 triggered signaling modules converge at the level of this IKK $\gamma$  modification.

The present work establishes a new concept of NF- $\kappa$ B activation by genotoxic stress. In addition to the identification of new key regulators (PARP-1, TRAF6, TAB2, TAK1) fundamental regulatory mechanisms of this nuclear-to-cytoplasmic signaling network could be uncovered. One hallmark is the synthesis of polymers with scaffolding function (PAR and Lys63-ubiquitin polymers), which facilitate the assembly of multiprotein complexes (PARP signalosome and TAK1-IKK signalosome, respectively). Within these supramolecular structures, the signaling information is integrated and transduced to enzymes, which post-translationally modify IKK subunits (IKK $\gamma$  sumoylation, IKK $\gamma$  ubiquitination and IKK $\beta$  phosphorylation). These modifications are in part interdependent and contribute cooperatively to the activation of the IKK complex by genotoxic stress.

---

## 7. Abkürzungen

3-AB	3-Aminobenzamid
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
AP-1	Activator Protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
ARD	Ankyrin Repeat Domain
AS	Aminosäure
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
BAFF	B-cell Activating Factor TNF Family
BAPTA-AM	1,2-bis-(o-Aminophenoxy)-Ethan-N,N,N',N'-Tetraacetoxymethylester
BCR	B-cell Receptor
BER	Base Excision Repair
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CE	Zytoplasmaextrakt
Ci	Curie
cIAP	Cellular Inhibitor of Apoptosis
CK	Casein Kinase
cpm	Counts Per Minute
CpG	Cytidin-Guanosin-Dinukleotidwiederholungen
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DD	Death Domain
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-DSB	DNA-Doppelstrangbruch
DNA-SSB	DNA-Einzelstrangbruch
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
G	Guanosin
GFP	Green Fluorescent Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunden
HA	Hämagglutinin
HBS	HEPES buffered saline (HEPES gepufferte Kochsalzlösung)
HEK	Human Embryonic Kidney
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HLH	Helix-Loop-Helix

---

HRP	Horseradish Peroxidase
HTLV	Humanes T-lymphotropes Virus
I $\kappa$ B	Inhibitor of NF- $\kappa$ B
IKK	I $\kappa$ B Kinase
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
IL-1R	IL-1-Rezeptor
IP	Immunopräzipitation
IR	ionisierende Strahlung
IRAK	IL-1 Receptor Associated Kinase
KA	Kinase-Assay
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LB	Luria-Bertani Medium
LPS	Lipopolysaccharid
MAIL	Molecule Possessing Ankyrin Repeats Induced By Lipopolysaccharide
Malt1	Mucosa Associated Lymphoid Tissue 1
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MEF	Murine Embryonic Fibroblasts
min	Minute
MRN	Mre11-Rad50-NBS-Komplex
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NE	Kernextrakt
NEM	N-Ethylmaleimide
NEMO	NF- $\kappa$ B Essential Modulator
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor $\kappa$ B
NLS	Kernlokalisierungssignal
NP-40	Nonidet P-40
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAR	Poly(ADP-Ribose)
PARG	Poly(ADP-Ribose)-Glykohydrolase
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI3K	Phosphoinositide 3 Kinase
PIASy	Protein Inhibitor of Activated STAT y
RANKL	Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand
RFP	Red Fluorescent Protein
RHD	Rel Homology Domain
RING	Really Interesting New Gene
RIP	Receptor Interacting Protein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions Per Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde
SRD	Signal Response Domain
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier

---

---

T	Thymidin
TAB	TAK1 Binding Protein
TAK1	Transforming Growth Factor $\beta$ Activated Kinase 1
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TCR	T-Cell Receptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll Like Receptor
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
TNFR1	TNF Rezeptor 1
TRADD	TNF Receptor Associated Death Domain
TRAF	TNF-Rezeptor Associated Factor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
Ubi	Ubiquitin
UV	ultraviolette Strahlung
WB	Western Blot
WT	Wildtyp

---

## 8. Literaturverzeichnis

1. Sen, R. and D. Baltimore, *Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences*. Cell, 1986. **46**(5): p. 705-16.
2. Kawakami, K., C. Scheidereit, and R.G. Roeder, *Identification and purification of a human immunoglobulin-enhancer-binding protein (NF-kappa B) that activates transcription from a human immunodeficiency virus type 1 promoter in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(13): p. 4700-4.
3. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Signaling to NF-kappaB*. Genes Dev, 2004. **18**(18): p. 2195-224.
4. Wulczyn, F.G., D. Krappmann, and C. Scheidereit, *The NF-kappa B/Rel and I kappa B gene families: mediators of immune response and inflammation*. J Mol Med, 1996. **74**(12): p. 749-69.
5. Stephens, R.M., N.R. Rice, R.R. Hiebsch, et al., *Nucleotide sequence of v-rel: the oncogene of reticuloendotheliosis virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(20): p. 6229-33.
6. Brownell, E., S.J. O'Brien, W.G. Nash, et al., *Genetic characterization of human c-rel sequences*. Mol Cell Biol, 1985. **5**(10): p. 2826-31.
7. Baeuerle, P.A., *The inducible transcription activator NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits*. Biochim Biophys Acta, 1991. **1072**(1): p. 63-80.
8. Ghosh, G., G. van Duyne, S. Ghosh, et al., *Structure of NF-kappa B p50 homodimer bound to a kappa B site*. Nature, 1995. **373**(6512): p. 303-10.
9. Muller, C.W., F.A. Rey, M. Sodeoka, et al., *Structure of the NF-kappa B p50 homodimer bound to DNA*. Nature, 1995. **373**(6512): p. 311-7.
10. Chen, Y.Q., S. Ghosh, and G. Ghosh, *A novel DNA recognition mode by the NF-kappa B p65 homodimer*. Nat Struct Biol, 1998. **5**(1): p. 67-73.
11. Hannink, M. and H.M. Temin, *Transactivation of gene expression by nuclear and cytoplasmic rel proteins*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(10): p. 4323-36.
12. Bull, P., K.L. Morley, M.F. Hoekstra, et al., *The mouse c-rel protein has an N-terminal regulatory domain and a C-terminal transcriptional transactivation domain*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(10): p. 5473-85.
13. Schmitz, M.L., M.A. dos Santos Silva, H. Altmann, et al., *Structural and functional analysis of the NF-kappa B p65 C terminus. An acidic and modular transactivation domain with the potential to adopt an alpha-helical conformation*. J Biol Chem, 1994. **269**(41): p. 25613-20.
14. Fan, C.M. and T. Maniatis, *Generation of p50 subunit of NF-kappa B by processing of p105 through an ATP-dependent pathway*. Nature, 1991. **354**(6352): p. 395-8.
15. Palombella, V.J., O.J. Rando, A.L. Goldberg, et al., *The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B*. Cell, 1994. **78**(5): p. 773-85.
16. Betts, J.C. and G.J. Nabel, *Differential regulation of NF-kappaB2(p100) processing and control by amino-terminal sequences*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(11): p. 6363-71.
17. Schmitz, M.L. and P.A. Baeuerle, *The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B*. EMBO J, 1991. **10**(12): p. 3805-17.
18. Hatada, E.N., M. Naumann, and C. Scheidereit, *Common structural constituents confer I kappa B activity to NF-kappa B p105 and I kappa B/MAD-3*. EMBO J, 1993. **12**(7): p. 2781-8.
19. Haskill, S., A.A. Beg, S.M. Tompkins, et al., *Characterization of an immediate-early gene induced in adherent monocytes that encodes I kappa B-like activity*. Cell, 1991. **65**(7): p. 1281-9.

- 
20. Wulczyn, F.G., M. Naumann, and C. Scheidereit, *Candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a subunit-specific inhibitor of transcription factor NF-kappa B*. *Nature*, 1992. **358**(6387): p. 597-9.
  21. Thompson, J.E., R.J. Phillips, H. Erdjument-Bromage, et al., *I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B*. *Cell*, 1995. **80**(4): p. 573-82.
  22. Whiteside, S.T., J.C. Epinat, N.R. Rice, et al., *I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity*. *EMBO J*, 1997. **16**(6): p. 1413-26.
  23. Kitamura, H., K. Kanehira, K. Okita, et al., *MAIL, a novel nuclear I kappa B protein that potentiates LPS-induced IL-6 production*. *FEBS Lett*, 2000. **485**(1): p. 53-6.
  24. Xiao, G., A. Fong, and S.C. Sun, *Induction of p100 processing by NF-kappaB-inducing kinase involves docking IkappaB kinase alpha (IKKalpha) to p100 and IKKalpha-mediated phosphorylation*. *J Biol Chem.*, 2004. **279**(29): p. 30099-105. Epub 2004 May 11.
  25. Mordmuller, B., D. Krappmann, M. Esen, et al., *Lymphotoxin and lipopolysaccharide induce NF-kappaB-p52 generation by a co-translational mechanism*. *EMBO Rep.*, 2003. **4**(1): p. 82-7.
  26. Huxford, T., D.B. Huang, S. Malek, et al., *The crystal structure of the IkappaBalpha/NF-kappaB complex reveals mechanisms of NF-kappaB inactivation*. *Cell*, 1998. **95**(6): p. 759-70.
  27. Jacobs, M.D. and S.C. Harrison, *Structure of an IkappaBalpha/NF-kappaB complex*. *Cell*, 1998. **95**(6): p. 749-58.
  28. Malek, S., D.B. Huang, T. Huxford, et al., *X-ray crystal structure of an IkappaBbeta x NF-kappaB p65 homodimer complex*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(25): p. 23094-100.
  29. Pahl, H.L., *Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors*. *Oncogene*, 1999. **18**(49): p. 6853-66.
  30. Scheidereit, C., *IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription*. *Oncogene*, 2006. **25**(51): p. 6685-705.
  31. Brockman, J.A., D.C. Scherer, T.A. McKinsey, et al., *Coupling of a signal response domain in I kappa B alpha to multiple pathways for NF-kappa B activation*. *Mol Cell Biol*, 1995. **15**(5): p. 2809-18.
  32. Brown, K., S. Gerstberger, L. Carlson, et al., *Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation*. *Science*, 1995. **267**(5203): p. 1485-8.
  33. Yaron, A., A. Hatzubai, M. Davis, et al., *Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin ligase*. *Nature*, 1998. **396**(6711): p. 590-4.
  34. Heissmeyer, V., D. Krappmann, E.N. Hatada, et al., *Shared pathways of IkappaB kinase-induced SCF(betaTrCP)-mediated ubiquitination and degradation for the NF-kappaB precursor p105 and IkappaBalpha*. *Mol Cell Biol.*, 2001. **21**(4): p. 1024-35.
  35. Anest, V., J.L. Hanson, P.C. Cogswell, et al., *A nucleosomal function for IkappaB kinase-alpha in NF-kappaB-dependent gene expression*. *Nature.*, 2003. **423**(6940): p. 659-63.
  36. Yamamoto, Y., U.N. Verma, S. Prajapati, et al., *Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression*. *Nature.*, 2003. **423**(6940): p. 655-9.
  37. Hoberg, J.E., A.E. Popko, C.S. Ramsey, et al., *IkappaB kinase alpha-mediated derepression of SMRT potentiates acetylation of RelA/p65 by p300*. *Mol Cell Biol.*, 2006. **26**(2): p. 457-71.
  38. Chen, Z.J., L. Parent, and T. Maniatis, *Site-specific phosphorylation of IkappaBalpha by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity*. *Cell*, 1996. **84**(6): p. 853-62.
-

- 
39. DiDonato, J.A., M. Hayakawa, D.M. Rothwarf, et al., *A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB*. *Nature.*, 1997. **388**(6642): p. 548-54.
  40. Mercurio, F., H. Zhu, B.W. Murray, et al., *IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation*. *Science.*, 1997. **278**(5339): p. 860-6.
  41. Regnier, C.H., H.Y. Song, X. Gao, et al., *Identification and characterization of an IkappaB kinase*. *Cell.*, 1997. **90**(2): p. 373-83.
  42. Zandi, E., D.M. Rothwarf, M. Delhase, et al., *The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation*. *Cell.*, 1997. **91**(2): p. 243-52.
  43. Rothwarf, D.M., E. Zandi, G. Natoli, et al., *IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex*. *Nature.*, 1998. **395**(6699): p. 297-300.
  44. Yamaoka, S., G. Courtois, C. Bessia, et al., *Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation*. *Cell.*, 1998. **93**(7): p. 1231-40.
  45. Wu, C.J., D.B. Conze, T. Li, et al., *NEMO is a sensor of Lys 63-linked polyubiquitination and functions in NF-kappaB activation*. *Nat Cell Biol.*, 2006. **8**(4): p. 398-406. Epub 2006 Mar 19.
  46. Lo, Y.C., S.C. Lin, C.C. Rospigliosi, et al., *Structural basis for recognition of diubiquitins by NEMO*. *Mol Cell*, 2009. **33**(5): p. 602-15.
  47. Huang, T.T., S.L. Feinberg, S. Suryanarayanan, et al., *The zinc finger domain of NEMO is selectively required for NF-kappa B activation by UV radiation and topoisomerase inhibitors*. *Mol Cell Biol.*, 2002. **22**(16): p. 5813-25.
  48. Tang, E.D., C.Y. Wang, Y. Xiong, et al., *A role for NF-kappaB essential modifier/IkappaB kinase-gamma (NEMO/IKKgamma) ubiquitination in the activation of the IkappaB kinase complex by tumor necrosis factor-alpha*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(39): p. 37297-305. Epub 2003 Jul 16.
  49. Zhou, H., I. Wertz, K. O'Rourke, et al., *Bcl10 activates the NF-kappaB pathway through ubiquitination of NEMO*. *Nature*, 2004. **427**(6970): p. 167-71. Epub 2003 Dec 24.
  50. Abbott, D.W., A. Wilkins, J.M. Asara, et al., *The Crohn's disease protein, NOD2, requires RIP2 in order to induce ubiquitylation of a novel site on NEMO*. *Curr Biol.*, 2004. **14**(24): p. 2217-27.
  51. Huang, T.T., S.M. Wuerzberger-Davis, Z.H. Wu, et al., *Sequential modification of NEMO/IKKgamma by SUMO-1 and ubiquitin mediates NF-kappaB activation by genotoxic stress*. *Cell*, 2003. **115**(5): p. 565-76.
  52. Miller, B.S. and E. Zandi, *Complete reconstitution of human IkappaB kinase (IKK) complex in yeast. Assessment of its stoichiometry and the role of IKKgamma on the complex activity in the absence of stimulation*. *J Biol Chem.*, 2001. **276**(39): p. 36320-6. Epub 2001 Jul 24.
  53. Krappmann, D., E.N. Hatada, S. Tegethoff, et al., *The I kappa B kinase (IKK) complex is tripartite and contains IKK gamma but not IKAP as a regular component*. *J Biol Chem.*, 2000. **275**(38): p. 29779-87.
  54. Tegethoff, S., J. Behlke, and C. Scheidereit, *Tetrameric oligomerization of IkappaB kinase gamma (IKKgamma) is obligatory for IKK complex activity and NF-kappaB activation*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(6): p. 2029-41.
  55. Hoffmann, A., G. Natoli, and G. Ghosh, *Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module*. *Oncogene*, 2006. **25**(51): p. 6706-16.
  56. Aggarwal, B.B., *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(9): p. 745-56.
-

- 
57. Kucharczak, J., M.J. Simmons, Y. Fan, et al., *To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis*. *Oncogene*, 2003. **22**(56): p. 8961-82.
  58. Medvedev, A.E., A. Sundan, and T. Espevik, *Involvement of the tumor necrosis factor receptor p75 in mediating cytotoxicity and gene regulating activities*. *Eur J Immunol*, 1994. **24**(11): p. 2842-9.
  59. Jiang, Y., J.D. Woronicz, W. Liu, et al., *Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains*. *Science*, 1999. **283**(5401): p. 543-6.
  60. Dempsey, P.W., S.E. Doyle, J.Q. He, et al., *The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003. **14**(3-4): p. 193-209.
  61. Yeh, W.C., A. Shahinian, D. Speiser, et al., *Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice*. *Immunity*, 1997. **7**(5): p. 715-25.
  62. Nakano, H., S. Sakon, H. Koseki, et al., *Targeted disruption of Traf5 gene causes defects in CD40- and CD27-mediated lymphocyte activation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(17): p. 9803-8.
  63. Tada, K., T. Okazaki, S. Sakon, et al., *Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation and protection from cell death*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(39): p. 36530-4.
  64. Deng, L., C. Wang, E. Spencer, et al., *Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain*. *Cell*, 2000. **103**(2): p. 351-61.
  65. Chen, Z.J., *Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway*. *Nat Cell Biol*, 2005. **7**(8): p. 758-65.
  66. Ea, C.K., L. Deng, Z.P. Xia, et al., *Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO*. *Mol Cell.*, 2006. **22**(2): p. 245-57. Epub 2006 Apr 6.
  67. Li, H., M. Kobayashi, M. Blonska, et al., *Ubiquitination of RIP is required for tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation*. *J Biol Chem.*, 2006. **281**(19): p. 13636-43. Epub 2006 Mar 16.
  68. Mahoney, D.J., H.H. Cheung, R.L. Mrad, et al., *Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNFalpha-mediated NF-kappaB activation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(33): p. 11778-83.
  69. Lewis, J., A. Devin, A. Miller, et al., *Disruption of hsp90 function results in degradation of the death domain kinase, receptor-interacting protein (RIP), and blockage of tumor necrosis factor-induced nuclear factor-kappaB activation*. *J Biol Chem.*, 2000. **275**(14): p. 10519-26.
  70. Sato, S., H. Sanjo, K. Takeda, et al., *Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses*. *Nat Immunol.*, 2005. **6**(11): p. 1087-95. Epub 2005 Sep 25.
  71. Shim, J.H., C. Xiao, A.E. Paschal, et al., *TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo*. *Genes Dev.*, 2005. **19**(22): p. 2668-81. Epub 2005 Oct 31.
  72. Adhikari, A., M. Xu, and Z.J. Chen, *Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK*. *Oncogene*, 2007. **26**(22): p. 3214-26.
  73. Dinarello, C.A., *Biologic basis for interleukin-1 in disease*. *Blood*, 1996. **87**(6): p. 2095-147.
  74. Kopp, E. and R. Medzhitov, *Recognition of microbial infection by Toll-like receptors*. *Curr Opin Immunol*, 2003. **15**(4): p. 396-401.
-

- 
75. Takeda, K. and S. Akira, *Toll receptors and pathogen resistance*. Cell Microbiol, 2003. **5**(3): p. 143-53.
  76. Adachi, O., T. Kawai, K. Takeda, et al., *Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function*. Immunity, 1998. **9**(1): p. 143-50.
  77. Janssens, S. and R. Beyaert, *Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members*. Mol Cell, 2003. **11**(2): p. 293-302.
  78. Knop, J. and M.U. Martin, *Effects of IL-1 receptor-associated kinase (IRAK) expression on IL-1 signaling are independent of its kinase activity*. FEBS Lett., 1999. **448**(1): p. 81-5.
  79. Li, X., M. Commane, C. Burns, et al., *Mutant cells that do not respond to interleukin-1 (IL-1) reveal a novel role for IL-1 receptor-associated kinase*. Mol Cell Biol., 1999. **19**(7): p. 4643-52.
  80. Li, N. and M. Karin, *Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress?* FASEB J, 1999. **13**(10): p. 1137-43.
  81. Simon, M.M., Y. Aragane, A. Schwarz, et al., *UVB light induces nuclear factor kappa B (NF kappa B) activity independently from chromosomal DNA damage in cell-free cytosolic extracts*. J Invest Dermatol, 1994. **102**(4): p. 422-7.
  82. Janssens, S. and J. Tschopp, *Signals from within: the DNA-damage-induced NF-kappaB response*. Cell Death Differ, 2006. **13**(5): p. 773-84.
  83. Pommier, Y., *Camptothecins and topoisomerase I: a foot in the door. Targeting the genome beyond topoisomerase I with camptothecins and novel anticancer drugs: importance of DNA replication, repair and cell cycle checkpoints*. Curr Med Chem Anticancer Agents, 2004. **4**(5): p. 429-34.
  84. Wang, J.C., *Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(6): p. 430-40.
  85. Friedberg, E.C., A. Aguilera, M. Gellert, et al., *DNA repair: from molecular mechanism to human disease*. DNA Repair (Amst), 2006. **5**(8): p. 986-96.
  86. Savitsky, K., A. Bar-Shira, S. Gilad, et al., *A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase*. Science, 1995. **268**(5218): p. 1749-53.
  87. Lavin, M.F. and Y. Shiloh, *The genetic defect in ataxia-telangiectasia*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 177-202.
  88. Lisby, M., J.H. Barlow, R.C. Burgess, et al., *Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins*. Cell, 2004. **118**(6): p. 699-713.
  89. Kurz, E.U. and S.P. Lees-Miller, *DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**(8-9): p. 889-900.
  90. Li, N. and M. Karin, *Ionizing radiation and short wavelength UV activate NF-kappaB through two distinct mechanisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(22): p. 13012-7.
  91. Li, N., S. Banin, H. Ouyang, et al., *ATM is required for IkappaB kinase (IKKk) activation in response to DNA double strand breaks*. J Biol Chem, 2001. **276**(12): p. 8898-903.
  92. Piret, B., S. Schoonbroodt, and J. Piette, *The ATM protein is required for sustained activation of NF-kappaB following DNA damage*. Oncogene., 1999. **18**(13): p. 2261-71.
  93. Hay, R.T., *SUMO: a history of modification*. Mol Cell., 2005. **18**(1): p. 1-12.
  94. Gill, G., *SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms?* Genes Dev, 2004. **18**(17): p. 2046-59.
-

- 
95. Mabb, A.M., S.M. Wuerzberger-Davis, and S. Miyamoto, *PIASy mediates NEMO sumoylation and NF-kappaB activation in response to genotoxic stress*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(9): p. 986-93.
  96. Palvimo, J.J., *PIAS proteins as regulators of small ubiquitin-related modifier (SUMO) modifications and transcription*. Biochem Soc Trans, 2007. **35**(Pt 6): p. 1405-8.
  97. Aravind, L. and E.V. Koonin, *SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(3): p. 112-4.
  98. Sachdev, S., L. Bruhn, H. Sieber, et al., *PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies*. Genes Dev, 2001. **15**(23): p. 3088-103.
  99. Azuma, Y., A. Arnaoutov, T. Anan, et al., *PIASy mediates SUMO-2 conjugation of Topoisomerase-II on mitotic chromosomes*. EMBO J, 2005. **24**(12): p. 2172-82.
  100. Janssens, S., A. Tinel, S. Lippens, et al., *PIDD mediates NF-kappaB activation in response to DNA damage*. Cell, 2005. **123**(6): p. 1079-92.
  101. Wu, Z.H., Y. Shi, R.S. Tibbetts, et al., *Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli*. Science, 2006. **311**(5764): p. 1141-6.
  102. Dutta, J., Y. Fan, N. Gupta, et al., *Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6800-16.
  103. Rashi-Elkeles, S., R. Elkon, N. Weizman, et al., *Parallel induction of ATM-dependent pro- and antiapoptotic signals in response to ionizing radiation in murine lymphoid tissue*. Oncogene, 2006. **25**(10): p. 1584-92.
  104. Bargou, R.C., C. Leng, D. Krappmann, et al., *High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells*. Blood, 1996. **87**(10): p. 4340-7.
  105. Krappmann, D., F. Emmerich, U. Kordes, et al., *Molecular mechanisms of constitutive NF-kappaB/Rel activation in Hodgkin/Reed-Sternberg cells*. Oncogene, 1999. **18**(4): p. 943-53.
  106. Hinz, M., P. Loser, S. Mathas, et al., *Constitutive NF-kappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells*. Blood, 2001. **97**(9): p. 2798-807.
  107. Davis, R.E., K.D. Brown, U. Siebenlist, et al., *Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells*. J Exp Med, 2001. **194**(12): p. 1861-74.
  108. Orłowski, R.Z. and A.S. Baldwin, Jr., *NF-kappaB as a therapeutic target in cancer*. Trends Mol Med, 2002. **8**(8): p. 385-9.
  109. Naugler, W.E. and M. Karin, *NF-kappaB and cancer-identifying targets and mechanisms*. Curr Opin Genet Dev, 2008. **18**(1): p. 19-26.
  110. Chambon, P., J.D. Weill, and P. Mandel, *Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme*. Biochem Biophys Res Commun, 1963. **11**: p. 39-43.
  111. Alkhatib, H.M., D.F. Chen, B. Cherney, et al., *Cloning and expression of cDNA for human poly(ADP-ribose) polymerase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(5): p. 1224-8.
  112. Ame, J.C., C. Spenlehauer, and G. de Murcia, *The PARP superfamily*. Bioessays, 2004. **26**(8): p. 882-93.
  113. Ame, J.C., V. Rolli, V. Schreiber, et al., *PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase*. J Biol Chem, 1999. **274**(25): p. 17860-8.
  114. Smith, S., I. Gariat, A. Schmitt, et al., *Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres*. Science, 1998. **282**(5393): p. 1484-7.
-

- 
115. D'Amours, D., S. Desnoyers, I. D'Silva, et al., *Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions*. Biochem J, 1999. **342** ( Pt 2): p. 249-68.
  116. Realini, C.A. and F.R. Althaus, *Histone shuttling by poly(ADP-ribosylation)*. J Biol Chem, 1992. **267**(26): p. 18858-65.
  117. Alvarez-Gonzalez, R. and F.R. Althaus, *Poly(ADP-ribose) catabolism in mammalian cells exposed to DNA-damaging agents*. Mutat Res, 1989. **218**(2): p. 67-74.
  118. Miwa, M. and T. Sugimura, *Splitting of the ribose-ribose linkage of poly(adenosine diphosphate-ribose) by a calf thymus extract*. J Biol Chem, 1971. **246**(20): p. 6362-4.
  119. Hatakeyama, K., Y. Nemoto, K. Ueda, et al., *Purification and characterization of poly(ADP-ribose) glycohydrolase. Different modes of action on large and small poly(ADP-ribose)*. J Biol Chem, 1986. **261**(32): p. 14902-11.
  120. de Murcia, G., V. Schreiber, M. Molinete, et al., *Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase*. Mol Cell Biochem, 1994. **138**(1-2): p. 15-24.
  121. Ludwig, A., B. Behnke, J. Holtlund, et al., *Immunoquantitation and size determination of intrinsic poly(ADP-ribose) polymerase from acid precipitates. An analysis of the in vivo status in mammalian species and in lower eukaryotes*. J Biol Chem, 1988. **263**(15): p. 6993-9.
  122. Krupitza, G. and P. Cerutti, *ADP-ribosylation of ADPR-transferase and topoisomerase I in intact mouse epidermal cells JB6*. Biochemistry, 1989. **28**(5): p. 2034-40.
  123. Lonskaya, I., V.N. Potaman, L.S. Shlyakhtenko, et al., *Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by DNA structure-specific binding*. J Biol Chem, 2005. **280**(17): p. 17076-83.
  124. Ruf, A., J. Menissier de Murcia, G. de Murcia, et al., *Structure of the catalytic fragment of poly(AD-ribose) polymerase from chicken*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(15): p. 7481-5.
  125. Ha, H.C., L.D. Hester, and S.H. Snyder, *Poly(ADP-ribose) polymerase-1 dependence of stress-induced transcription factors and associated gene expression in glia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(5): p. 3270-5.
  126. Hassa, P.O., M. Covic, S. Hasan, et al., *The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NF-kappa B coactivator function*. J Biol Chem, 2001. **276**(49): p. 45588-97.
  127. McConkey, D.J., *Biochemical determinants of apoptosis and necrosis*. Toxicol Lett, 1998. **99**(3): p. 157-68.
  128. Raff, M., *Cell suicide for beginners*. Nature, 1998. **396**(6707): p. 119-22.
  129. Berger, N.A., *Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage*. Radiat Res, 1985. **101**(1): p. 4-15.
  130. Virag, L. and C. Szabo, *The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors*. Pharmacol Rev, 2002. **54**(3): p. 375-429.
  131. Bouchard, V.J., M. Rouleau, and G.G. Poirier, *PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage*. Exp Hematol, 2003. **31**(6): p. 446-54.
  132. de Murcia, J.M., C. Niedergang, C. Trucco, et al., *Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(14): p. 7303-7.
  133. Mortusewicz, O., J.C. Ame, V. Schreiber, et al., *Feedback-regulated poly(ADP-ribosylation) by PARP-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(22): p. 7665-75.
  134. Schreiber, V., F. Dantzer, J.C. Ame, et al., *Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(7): p. 517-28.
-

- 
135. Poirier, G.G., G. de Murcia, J. Jongstra-Bilen, et al., *Poly(ADP-ribosyl)ation of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(11): p. 3423-7.
  136. Masson, M., C. Niedergang, V. Schreiber, et al., *XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(6): p. 3563-71.
  137. Pleschke, J.M., H.E. Kleczkowska, M. Strohm, et al., *Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins*. J Biol Chem, 2000. **275**(52): p. 40974-80.
  138. Menisser-de Murcia, J., M. Mark, O. Wendling, et al., *Early embryonic lethality in PARP-1 Atm double-mutant mice suggests a functional synergy in cell proliferation during development*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(5): p. 1828-32.
  139. Haince, J.F., S. Kozlov, V.L. Dawson, et al., *Ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling network is modulated by a novel poly(ADP-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA-damaging agents*. J Biol Chem, 2007. **282**(22): p. 16441-53.
  140. Hassa, P.O. and M.O. Hottiger, *A role of poly (ADP-ribose) polymerase in NF-kappaB transcriptional activation*. Biol Chem, 1999. **380**(7-8): p. 953-9.
  141. Krishnakumar, R., M.J. Gamble, K.M. Frizzell, et al., *Reciprocal binding of PARP-1 and histone H1 at promoters specifies transcriptional outcomes*. Science, 2008. **319**(5864): p. 819-21.
  142. Ambrose, H.E., S. Willimott, R.W. Beswick, et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (Parp-1)-deficient mice demonstrate abnormal antibody responses*. Immunology, 2008.
  143. Hassa, P.O., S.S. Haenni, C. Buerki, et al., *Acetylation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF-kappaB-dependent transcription*. J Biol Chem, 2005. **280**(49): p. 40450-64.
  144. Ha, H.C., *Defective transcription factor activation for proinflammatory gene expression in poly(ADP-ribose) polymerase 1-deficient glia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(14): p. 5087-92.
  145. Pavri, R., B. Lewis, T.K. Kim, et al., *PARP-1 determines specificity in a retinoid signaling pathway via direct modulation of mediator*. Mol Cell, 2005. **18**(1): p. 83-96.
  146. Kraus, W.L., *Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation*. Curr Opin Cell Biol, 2008. **20**(3): p. 294-302.
  147. Oliver, F.J., J. Menissier-de Murcia, C. Nacci, et al., *Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice*. Embo J, 1999. **18**(16): p. 4446-54.
  148. Saenz, L., J.J. Lozano, R. Valdor, et al., *Transcriptional regulation by poly(ADP-ribose) polymerase-1 during T cell activation*. BMC Genomics, 2008. **9**: p. 171.
  149. Hassa, P.O. and M.O. Hottiger, *The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(9): p. 1534-53.
  150. Masutani, M., H. Suzuki, N. Kamada, et al., *Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption conferred mice resistant to streptozotocin-induced diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2301-4.
  151. Pieper, A.A., T. Walles, G. Wei, et al., *Myocardial postischemic injury is reduced by polyADPribose polymerase-1 gene disruption*. Mol Med, 2000. **6**(4): p. 271-82.
  152. Hassa, P.O., C. Buerki, C. Lombardi, et al., *Transcriptional coactivation of nuclear factor-kappaB-dependent gene expression by p300 is regulated by poly(ADP)-ribose polymerase-1*. J Biol Chem, 2003. **278**(46): p. 45145-53.
-

- 
153. Huang, D., C. Yang, Y. Wang, et al., *PARP-1 suppresses adiponectin expression through poly(ADP-ribosylation) of PPAR gamma in cardiac fibroblasts*. Cardiovasc Res, 2009. **81**(1): p. 98-107.
  154. Simbulan-Rosenthal, C.M., D.S. Rosenthal, R.B. Luo, et al., *Poly(ADP-ribosylation) of p53 in vitro and in vivo modulates binding to its DNA consensus sequence*. Neoplasia, 2001. **3**(3): p. 179-88.
  155. Li, Y., H.J. Oh, and Y.F. Lau, *The poly(ADP-ribose) polymerase 1 interacts with Sry and modulates its biological functions*. Mol Cell Endocrinol, 2006. **257-258**: p. 35-46.
  156. Wang, Y., A. Meng, H. Lang, et al., *Activation of nuclear factor kappaB In vivo selectively protects the murine small intestine against ionizing radiation-induced damage*. Cancer Res, 2004. **64**(17): p. 6240-6.
  157. Zhou, D., S.A. Brown, T. Yu, et al., *A high dose of ionizing radiation induces tissue-specific activation of nuclear factor-kappaB in vivo*. Radiat Res, 1999. **151**(6): p. 703-9.
  158. Lavin, M.F., *Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(10): p. 759-69.
  159. Lee, S.J., A. Dimtchev, M.F. Lavin, et al., *A novel ionizing radiation-induced signaling pathway that activates the transcription factor NF-kappaB*. Oncogene, 1998. **17**(14): p. 1821-6.
  160. Gillham, H., M.C. Golding, R. Pepperkok, et al., *Intracellular movement of green fluorescent protein-tagged phosphatidylinositol 3-kinase in response to growth factor receptor signaling*. J Cell Biol, 1999. **146**(4): p. 869-80.
  161. Pemberton, L.F. and B.M. Paschal, *Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export*. Traffic, 2005. **6**(3): p. 187-98.
  162. Kutay, U. and S. Guttinger, *Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(3): p. 121-4.
  163. Holaska, J.M., B.E. Black, D.C. Love, et al., *Calreticulin Is a receptor for nuclear export*. J Cell Biol, 2001. **152**(1): p. 127-40.
  164. Berchtold, C.M., Z.H. Wu, T.T. Huang, et al., *Calcium-dependent regulation of NEMO nuclear export in response to genotoxic stimuli*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(2): p. 497-509.
  165. Ishitani, T., G. Takaesu, J. Ninomiya-Tsuji, et al., *Role of the TAB2-related protein TAB3 in IL-1 and TNF signaling*. Embo J, 2003. **22**(23): p. 6277-88.
  166. Kanayama, A., R.B. Seth, L. Sun, et al., *TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains*. Mol Cell, 2004. **15**(4): p. 535-48.
  167. Wang, C., L. Deng, M. Hong, et al., *TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK*. Nature, 2001. **412**(6844): p. 346-51.
  168. Ishida, T., S. Mizushima, S. Azuma, et al., *Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region*. J Biol Chem, 1996. **271**(46): p. 28745-8.
  169. Yamaguchi, K., K. Shirakabe, H. Shibuya, et al., *Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction*. Science, 1995. **270**(5244): p. 2008-11.
  170. Oeckinghaus, A., E. Wegener, V. Welteke, et al., *Malt1 ubiquitination triggers NF-kappaB signaling upon T-cell activation*. EMBO J, 2007. **26**(22): p. 4634-45.
  171. Takaesu, G., S. Kishida, A. Hiyama, et al., *TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway*. Mol Cell, 2000. **5**(4): p. 649-58.
-

- 
172. Sun, L., L. Deng, C.K. Ea, et al., *The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALTI in T lymphocytes*. Mol Cell, 2004. **14**(3): p. 289-301.
173. Yang, F., J. Yamashita, E. Tang, et al., *The zinc finger mutation C417R of I-kappa B kinase gamma impairs lipopolysaccharide- and TNF-mediated NF-kappa B activation through inhibiting phosphorylation of the I-kappa B kinase beta activation loop*. J Immunol., 2004. **172**(4): p. 2446-52.
174. Jain, A., C.A. Ma, S. Liu, et al., *Specific missense mutations in NEMO result in hyper-IgM syndrome with hypohydrotic ectodermal dysplasia*. Nat Immunol., 2001. **2**(3): p. 223-8.
175. Puebla-Osorio, N. and C. Zhu, *DNA damage and repair during lymphoid development: antigen receptor diversity, genomic integrity and lymphomagenesis*. Immunol Res, 2008. **41**(2): p. 103-22.
176. Ulrich, H.D., *The fast-growing business of SUMO chains*. Mol Cell, 2008. **32**(3): p. 301-5.
177. Chen, Z.J. and L.J. Sun, *Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling*. Mol Cell, 2009. **33**(3): p. 275-86.
178. Bosc, D.G., K.C. Graham, R.B. Saulnier, et al., *Identification and characterization of CKIP-1, a novel pleckstrin homology domain-containing protein that interacts with protein kinase CK2*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14295-306.
179. Zhang, L., Y. Tie, C. Tian, et al., *CKIP-1 recruits nuclear ATM partially to the plasma membrane through interaction with ATM*. Cell Signal, 2006. **18**(9): p. 1386-95.
180. Wu, Z.H. and S. Miyamoto, *Many faces of NF-kappaB signaling induced by genotoxic stress*. J Mol Med, 2007. **85**(11): p. 1187-202.
181. Hofmann, R.M. and C.M. Pickart, *Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair*. Cell, 1999. **96**(5): p. 645-53.
182. Zhao, G.Y., E. Sonoda, L.J. Barber, et al., *A critical role for the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 in initiating homologous recombination*. Mol Cell, 2007. **25**(5): p. 663-75.
183. Kolas, N.K., J.R. Chapman, S. Nakada, et al., *Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase*. Science, 2007. **318**(5856): p. 1637-40.
184. Huen, M.S., R. Grant, I. Manke, et al., *RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly*. Cell, 2007. **131**(5): p. 901-14.
185. Hoegge, C., B. Pfander, G.L. Moldovan, et al., *RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO*. Nature, 2002. **419**(6903): p. 135-41.
186. Chen, Z.J., V. Bhoj, and R.B. Seth, *Ubiquitin, TAK1 and IKK: is there a connection?* Cell Death Differ., 2006. **13**(5): p. 687-92.
187. Windheim, M., M. Stafford, M. Peggie, et al., *Interleukin-1 (IL-1) induces the Lys63-linked polyubiquitination of IL-1 receptor-associated kinase 1 to facilitate NEMO binding and the activation of IkappaBalpha kinase*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(5): p. 1783-91.
188. Walsh, M.C., G.K. Kim, P.L. Maurizio, et al., *TRAF6 autoubiquitination-independent activation of the NFkappaB and MAPK pathways in response to IL-1 and RANKL*. PLoS ONE, 2008. **3**(12): p. e4064.
189. Qian, Y., M. Commane, J. Ninomiya-Tsuji, et al., *IRAK-mediated translocation of TRAF6 and TAB2 in the interleukin-1-induced activation of NFkappa B*. J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 41661-7.
190. Baud, V., Z.G. Liu, B. Bennett, et al., *Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and*
-

- 
- target gene induction via an amino-terminal effector domain.* Genes Dev, 1999. **13**(10): p. 1297-308.
191. Jiang, Z., J. Ninomiya-Tsuji, Y. Qian, et al., *Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-dependent IL-1-induced signaling complexes phosphorylate TAK1 and TAB2 at the plasma membrane and activate TAK1 in the cytosol.* Mol Cell Biol, 2002. **22**(20): p. 7158-67.
192. Li, S., A. Strelow, E.J. Fontana, et al., *IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(8): p. 5567-72.
193. Kollwe, C., A.C. Mackensen, D. Neumann, et al., *Sequential autophosphorylation steps in the interleukin-1 receptor-associated kinase-1 regulate its availability as an adapter in interleukin-1 signaling.* J Biol Chem, 2004. **279**(7): p. 5227-36.
194. Cordier, F., O. Grubisha, F. Traincard, et al., *The zinc finger of NEMO is a functional ubiquitin-binding domain.* J Biol Chem, 2009. **284**(5): p. 2902-7.
195. Imoto, S., N. Ohbayashi, O. Ikeda, et al., *Sumoylation of Smad3 stimulates its nuclear export during PIASy-mediated suppression of TGF-beta signaling.* Biochem Biophys Res Commun, 2008. **370**(2): p. 359-65.
196. Miles, W.O., E. Jaffray, S.G. Campbell, et al., *Medea SUMOylation restricts the signaling range of the Dpp morphogen in the Drosophila embryo.* Genes Dev, 2008. **22**(18): p. 2578-90.
197. Bredemeyer, A.L., B.A. Helmink, C.L. Innes, et al., *DNA double-strand breaks activate a multi-functional genetic program in developing lymphocytes.* Nature, 2008. **456**(7223): p. 819-23.
198. Caldecott, K.W., *Single-strand break repair and genetic disease.* Nat Rev Genet, 2008. **9**(8): p. 619-31.
199. Kim, M.Y., T. Zhang, and W.L. Kraus, *Poly(ADP-ribosylation) by PARP-1: 'PAR-laying' NAD+ into a nuclear signal.* Genes Dev, 2005. **19**(17): p. 1951-67.
200. Shiloh, Y., *ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity.* Nat Rev Cancer, 2003. **3**(3): p. 155-68.
201. Huang, T.T., S.M. Wuerzberger-Davis, B.J. Seufzer, et al., *NF-kappaB activation by camptothecin. A linkage between nuclear DNA damage and cytoplasmic signaling events.* J Biol Chem, 2000. **275**(13): p. 9501-9.
202. Lenschow, D.J., T.L. Walunas, and J.A. Bluestone, *CD28/B7 system of T cell costimulation.* Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 233-58.
203. Kanai, M., K. Hanashiro, S.H. Kim, et al., *Inhibition of Crm1-p53 interaction and nuclear export of p53 by poly(ADP-ribosylation).* Nat Cell Biol, 2007. **9**(10): p. 1175-83.
204. Heyninck, K. and R. Beyaert, *Crosstalk between NF-kappaB-activating and apoptosis-inducing proteins of the TNF-receptor complex.* Mol Cell Biol Res Commun, 2001. **4**(5): p. 259-65.
205. Curtin, N.J., *PARP inhibitors for cancer therapy.* Expert Rev Mol Med, 2005. **7**(4): p. 1-20.
-

## **9. Anhang**

### **9.1. Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version  
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

Der Lebenslauf ist in der Online-Version  
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

## 9.2. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. Claus Scheiderei, der mich durch seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt hat. Die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen in seinem Labor haben maßgeblich zum Gelingen des Forschungsvorhabens beigetragen. Des Weiteren möchte ich mich bei ihm für die Begutachtung meiner Arbeit herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Udo Heinemann danke ich herzlich für die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Dr. Michael Hinz für die fachliche Unterstützung und Hilfe bei der praktischen Umsetzung einiger Fragestellungen der vorliegenden Arbeit bedanken. Er war mir jederzeit und in jeder Hinsicht ein kompetenter Ansprechpartner.

Anja Zimmer und Lydia Blankenstein danke ich für die zeitweilige Übernahme einiger Routineaufgaben während ihrer Ausbildung zu Biologie-Laboranten.

Jan Ebert hat mich durch viele praktische Tipps am Beginn meiner Doktorandentätigkeit tatkräftig unterstützt.

Seda Coel Arslan danke ich für viele anregende Gespräche, zahlreiche gute Ratschläge und die Überlassung der stabilen 1.3E2-Transfektanten.

Bei den weiteren derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Labors, Dr. Annette Ahlers, Dr. Meike Brömer, Rudolf Dettmer, Karin Ganzel, Dr. Norbert Henke, Sabine Jungmann, Dr. Eva Kärgel, Daniela Keyner, Inge Krahn, Dr. Andrea Oeckinghaus, Kivia A Pontes de Oliveira, Dr. Giulietta Roel, Dr. Ruth Schmidt-Ullrich, Dr. Yoshiaki Sunami, Philip Tomann, Sarah Ugowski, Dr. Elmar Wegener, Dr. Buket Yilmaz bedanke ich mich für die vielen fruchtbaren Diskussionen, ihre Hilfsbereitschaft im Labor und ein hervorragendes Arbeitsklima.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern und meiner Freundin Jane Wenzel, die mir zur Seite gestanden, alle meine Entscheidungen mitgetragen und mich bedingungslos ideell unterstützt haben.