

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Molekularbiologische Enzyme und Reagenzien

| | |
|---|---|
| AccI + Reaktionspuffer | New England Biolabs, Frankfurt/M |
| Anansa Fast 'n' Easy DNA Purification Kit | Tebu-Bio, Offenbach |
| 100x BSA-Lösung (10 mg/ml) | New England Biolabs, Frankfurt/M |
| DNA-100 bp-Marker | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| DNA-1 kb-Marker | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| Desoxynukleotide (dNTPs) | Gibco, Karlsruhe |
| <i>HindIII</i> , <i>MluI</i> , <i>NdeI</i> , <i>NheI</i> , <i>NotI</i> , <i>XhoI</i> (jeweils + Reaktionspuffer) | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| Invisorb Spin Plasmid Mini Kit | Invitek, Berlin |
| <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase + Reaktionspuffer | Promega, Madison, WI, USA |
| Quikchange XL Site-Directed Mutagenesis Kit | Stratagene, Heidelberg |
| Sequitheer Excel II DNA Sequencing Kit-LC | Epicentre Technologies, Madison, WI, USA |
| T4-DNA-Ligase + Reaktionspuffer | TaKaRa, Gennevilliers, Frankreich |
| T4 Polynukleotidkinase + Reaktionspuffer | New England Biolabs, Frankfurt/M |
| TOPO TA Cloning Kit | Invitrogen, Karlsruhe |
| Uracil-DNA-Glykosylase aus <i>E. coli</i> (+ Reaktionspuffer) | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |

2.1.2 Zelllinien

2.1.2.1 Bakterienstämme

| | |
|------------------------------|------------------------|
| <i>E. coli</i> BL21(DE3) | Stratagene, Heidelberg |
| <i>E. coli</i> M15(pREP4) | Qiagen, Hilden |
| <i>E. coli</i> OneShot-TOP10 | Invitrogen, Karlsruhe |
| <i>E. coli</i> XL1-Blue | Stratagene, Heidelberg |
| <i>E. coli</i> XL10-Gold | Stratagene, Heidelberg |

2.1.2.2 Humane Zelllinien

| | |
|------------------------------|--|
| HeLa S3 (Suspension) | DSMZ, Heidelberg |
| HeLa S3 (adherent) | DSMZ, Heidelberg |
| Lymphoblastoide (Suspension) | freundlicherweise überlassen von Dr. Nikolai Tomilin |

2.1.3 Plasmide

Es wurden folgende kommerziell erhältliche Plasmide verwendet:

| | |
|-------------|-----------------------|
| pCR2.1-TOPO | Invitrogen, Karlsruhe |
| pET16b(+) | Novagen, Bad Soden |
| pET22b(+) | Novagen, Bad Soden |
| pET28b,c(+) | Novagen, Bad Soden |
| pQE-31 | Qiagen, Hilden |

Der Expressionsvektor für humane PARP-1 stand in der Arbeitsgruppe bereits zur Verfügung (Oei et al., 1996). Die übrigen Vektorkonstrukte, die für Reparaturproteine kodierende Sequenzen enthielten, sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

| Protein | Konstrukt | freundlicherweise überlassen von |
|-------------|---|---|
| XRCC1 | pET16b(+)-XRCC1 (Caldecott et al., 1995) | Dr. Keith W. Caldecott, Dr. Tomas Lindahl |
| Lig III | pET16b(+)-Lig III (Caldecott et al., 1996) | Dr. Keith W. Caldecott, Dr. Tomas Lindahl |
| Pol β | pWL9-Pol β (Patterson et al., 2000) | Dr. Samuel H. Wilson |
| FEN 1 | pcDNA3.1-TOPO-FEN 1 | Dr. Nikolai Tomilin |
| APE 1 | pET28c(+)-APE 1 (Hardeland et al., 2002) | Dr. Primo Schär |

Tabelle 2.1: Vektorkonstrukte mit für Reparaturproteine kodierenden Sequenzen

Die Expressionsvektoren, die für die Überexpression rekombinanter Proteine verwendet wurden, sind im Anhang beschrieben.

2.1.4 Oligonukleotide

Die als Primer für PCR und gerichtete Mutagenese verwendeten Oligonukleotide wurden von Biotex, Berlin bezogen. Die für die Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide stammten von MWG Biotech, Ebersberg.

2.1.4.1 PCR-Primer

| | |
|------------|---|
| pET22Nterm | 5'-GGA ATT CCA TAT GAG CAA GCG GAA GGC GCC GCA-3' |
| pET22Cterm | 5'-CCC AAG CTT TTC GCT CCG GTC CTT GGG TTC C-3' |
| FenNTerm | 5'-GGA ATT CCA TAT GGG AAT CCA GGG CGT GGC C-3' |
| FenCTerm | 5'-CCG CTC GAG CTT TCC CCT CTT GAA CTT CCC TGC-3' |
| LigNterm | 5'-CTA GCT AGC ATG GCT GAG CAA CGG TTC-3' |

LigCTerm 5'-ATA GTT TAG CGG CCG CTT ATT AGC AGG GAG CTA CCA GTC
T-3'

2.1.4.2 Sequenzierprimer

Die Sequenzierprimer waren am 5'-Ende mit IR800 fluoreszenzmarkiert. In Klammern stehen die Sequenzen bzw. Vektoren, die mit diesen Primern sequenziert wurden.

| | | |
|---------|-----------------------------|-----------------------------------|
| Lig3Seq | (DNA Ligase III intern) | 5'-GAA AAG CCT GGG GAA TGT-3' |
| M13 rev | (pCR2.1-TOPO) | 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3' |
| T7-Prom | (pCR2.1-TOPO, pET-Vektoren) | 5'-CGA AAT TAA TAC GAC TCA-3' |
| T7-Term | (pET-Vektoren) | 5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG-3' |

2.1.4.3 Vorwärtsprimer für die gerichtete Mutagenese

Die Rückwärtsprimer waren komplementär zu den Vorwärtsprimern. Den Aminosäureaustausch bewirkende Codons sind unterstrichen. Für die Selektion eingeführte Schnittstellen sind fett hervorgehoben (K421V: *Accl*; D423N/A: *MluI*)

| | |
|-------|--|
| K421V | 5'-GGC ATG TTC TCT GAG ATC <u>GTA TAC</u> GAT GGA GAG CGA GTC-3' |
| D423N | 5'-CTG AGA TCA AGT <u>ACA ATG</u> GAG AAC GCG TCC AGG TGC ATA AG-3' |
| D423A | 5'-CTG AGA TCA AGT <u>ACG CTG</u> GAG AAC GCG TCC AGG TGC ATA AG-3' |

2.1.4.4 Oligonukleotide für DNA-Reparaturansätze

Kleine Buchstaben in der Sequenz bezeichnen Nukleotide, die durch Phosphothioat-Bindungen verknüpft waren.

| | |
|--------------|---|
| Nick-1 | 5'-CTT TGG CCA AAG TCG AAT TCG A-3' |
| Nick-2 | 5'-TCT TGG CCA AGA TCG AAT TCG A-3' |
| Gap-TTA | 5'-TTA AAG CTT TAA GTC GAA TTC GA-3' |
| Gap-GTT | 5'-GTT AAG CTT CAA GTC GAA TTC GA-3' |
| Gap-3er | 5'-TGT GAA GCT TCA CAT CGA ACT AGT T-3' |
| Gap-5er | 5'-TGA AGC TTC ACA TCG AAC TAG TT-3' |
| U-16 | 5'-CGT GAC CTA ATG CGC UTT TAA GTC TGA AGG CTG-3' |
| U-16-PT | 5'-cgT GAC CTA ATG CGC UTT TAA GTC TGA AGG Ctg-3' |
| G-16 | 5'-CAG CCT TCA GAC TTA AAG GCG CAT TAG GTC ACG-3' |
| G-16-PT | 5'-caG CCT TCA GAC TTA AAG GCG CAT TAG GTC Acg-3' |
| Kompetitor 1 | 5'-CCA GCG CAC GAC GCA TGC ACG ACG ACC GGG-3' |
| Kompetitor 2 | 5'-CCC GGT CGT CGT GCA TGC GTC GTG CGC TGG-3' |

2.1.5 Nährmedien, Antibiotika und Medienzusätze

| | |
|--------------------------|--|
| LB-Medium: | 1% (w/v) NaCl / 1% (w/v) Pepton / 0,5% (w/v) Hefeextrakt |
| LB-Agar: | LB-Medium incl. 20% (w/v) Agar-Agar |
| LB ⁺ -Medium: | 1% (w/v) NaCl / 1% (w/v) Pepton / 0,5% (w/v) Hefeextrakt / 12,5 mM MgCl ₂ / 12,5 mM MgSO ₄ / 0,4% (w/v) Glucose (alles: Roth, Karlsruhe) |

| | |
|---|---------------------------|
| Ampicillin-Natriumsalz | Roth, Karlsruhe |
| Desoxyglucose | Sigma, Taufkirchen |
| DMEM, high Glucose, mit Pyruvat | Gibco, Karlsruhe |
| DMEM, high Glucose, mit Pyruvat und GlutaMAX I | Gibco, Karlsruhe |
| DMEM ohne Glucose und Pyruvat | Gibco, Karlsruhe |
| 2,5 M Glucoselösung, steril | Sigma, Taufkirchen |
| Fötale Kälberserum (FCS) | Biochrom, Berlin |
| Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) | GERBU Biotechnik, Gaiberg |
| Kanamycinsulfat | GERBU Biotechnik, Gaiberg |
| 10.000 U/ml Penicillin/10 mg/ml Streptomycin-Lösung | Gibco, Karlsruhe |
| RPMI 1640-Medium | Sigma, Taufkirchen |

2.1.6 Antikörper und Proteine

Der polyklonale Antikörper (IgG) gegen die DNA-Bindedomäne von humaner PARP-1 stand in der Arbeitsgruppe bereits zur Verfügung (Griesenbeck et al., 1997). Der monoklonale Antikörper (IgG) gegen Poly(ADP-Ribose), Mouse-mAb 10H (Kawamitsu et al., 1984) wurde freundlicherweise von Claudia Keil zur Verfügung gestellt. Der polyklonale Antikörper gegen DNA Polymerase β, Rabbit-Anti-Pol β-IgG, und der polyklonale Antikörper gegen DNA Lig III, Rabbit-Anti-Lig III-IgG, wurden in Auftragsarbeit von der Firma Pineda-Antikörper, Berlin, hergestellt. Rabbit-Anti-Pol β-IgG und Rabbit-Anti-Lig III-IgG wurden wie unter 3.2.3.3.3 beschrieben gereinigt. Folgende kommerziell erhältliche Antikörper und Proteine wurden verwendet:

| | |
|----------------------------|--------------------------------------|
| Anti-Mouse-IgG-AP | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| Anti-Mouse-IgG-HRP | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| Anti-Rabbit-IgG-AP | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| Anti-Rabbit-IgG-HRP | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| DNase I | Sigma, Taufkirchen |
| Proteinmarker für SDS-PAGE | Sigma, Taufkirchen |
| Lysozym | Biomol, Hamburg |
| Mouse Anti-PentaHis-IgG | Qiagen, Hilden |

10x Trypsin/EDTA-Lösung

Biochrom, Berlin

2.1.7 Puffer und Lösungen

| | |
|--|--|
| AK-Elutionspuffer: | 200 mM Glycin pH 3,0 / 0,3 M NaCl |
| Alkalische Phosphatase-Puffer: | 100 mM Tris/HCl pH 9,5 / 100 mM NaCl / 5 mM MgCl ₂ |
| BCIP-Lösung: | 5% (w/v) BCIP in Dimethylformamid |
| Blockinglösung: | TBS incl. 4% (w/v) Magermilchpulver |
| CaCl ₂ -Lösung: | 0,1 M CaCl ₂ / 10% (v/v) Glycerol |
| Coomassie-Färbelösung: | 10% (v/v) Essigsäure / 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250 |
| Coomassie-Fixierer: | 10% (v/v) Essigsäure / 25% (v/v) Isopropanol |
| EDTA-Puffer: | PARP-Aufschlusspuffer incl. 100 mM EDTA |
| IB-Lysepuffer: | 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 / 1 mM EDTA |
| IB-Solubilisierungspuffer: | 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 / 6 M Gdm-HCl / 100 mM DTT / 1 mM EDTA |
| IB-Waschlösung 1: | 60 mM EDTA pH 8,0 / 6% (v/v) Triton X-100 / 1,5 mM NaCl |
| IB-Waschlösung 2: | 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 / 20 mM EDTA |
| Imidazol-Elutionspuffer: | 50 mM Natriumphosphat pH 8,0 / 250 mM Imidazol / 300 mM NaCl / 1 mM DTT |
| Imidazol-Lysepuffer: | 50 mM Natriumphosphat pH 8,0 / 10 mM Imidazol / 0,3 M NaCl / 1 mM DTT |
| Imidazol-Waschpuffer: | 50 mM Natriumphosphat pH 8,0 / 20-40 mM Imidazol / 0,3-2 M NaCl / 1 mM DTT |
| KE-Puffer A: | 10 mM HEPES pH 7,9 / 10 mM KCl / 0,1 mM EDTA / 0,1 mM EGTA / 1 mM DTT / 0,5 mM PMSF |
| KE-Puffer C: | 20 mM HEPES pH 7,9 / 0,4 M NaCl / 1 mM EDTA / 1 mM EGTA / 1 mM DTT / 1 mM PMSF |
| Lysepuffer: | 50 mM Natriumphosphat pH 8,0 / 0,3 M NaCl |
| NBT-Lösung: | 5% (w/v) NBT in 70% (v/v) Dimethylformamid |
| NH ₂ -freier Dialysepuffer: | 50 mM Natriumphosphat pH 7,5 / 0,3 M NaCl / 5 mM MgCl ₂ |
| PARP-Aufschlusspuffer: | 50 mM Tris/HCl pH 7,5 / 1 M NaCl / 10 mM β-Mercaptoethanol / 2 mM PMSF |
| PARP-Elutionspuffer: | 50 mM Tris/HCl pH 7,5 / 0,1 M NaCl / 5 mM β-Mercaptoethanol / 40 mM Nikotinamid |
| PBS: | 18 mM Dinatriumhydrogenphosphat pH 7,5 / 2 mM Kaliumdihydrogenphosphat / 140 mM NaCl |

| | |
|--------------------------|--|
| Ponceau S-Lösung: | 2% (w/v) Ponceaus S / 30% (w/v) TCA / 30% (w/v) Sulfosalicylsäure |
| Proteinpuffer: | 50 mM Tris/HCl pH 7,5 / 5 mM MgCl ₂ / 0,3 M NaCl / 10% (v/v) Glycerin |
| 10x Reaktionspuffer: | 660 mM Tris/HCl pH 8,0 / 66 mM MgCl ₂ / 100 mM DTT |
| Rückfaltungspuffer 1: | 50 mM Tris/HCl pH 7,3 / 1 M Gdm-HCl / 5 mM MgCl ₂ / 0,15 M NaCl / 0,05% (v/v) Nonidet P40 / 10% (v/v) Glycerin / 50 µM ZnCl ₂ / 1 mM DTT |
| Rückfaltungspuffer 2 : | 50 mM Tris/HCl pH 7,3 / 5 mM MgCl ₂ / 1,15 M NaCl / 0,05% (v/v) Nonidet P40 / 10% (v/v) Glycerin / 50 µM ZnCl ₂ / 1 mM DTT |
| Rückfaltungspuffer 3+4 : | 50 mM Tris/HCl pH 7,3 / 5 mM MgCl ₂ / 0,7 bzw. 0,4 M NaCl / 0,05% (v/v) Nonidet P40 / 10% Glycerin / 1 mM DTT |
| SDS-Probenpuffer: | 125 mM Tris/HCl pH 6,8 / 6,25% (w/v) SDS / 40% (v/v) Glycerin / 2% (v/v) β-Mercaptoethanol / Bromphenolblau |
| Stopplösung: | 0,3 M Tris-Base / 0,3 M Natriumacetat pH 5,0 / 5% (w/v) SDS / 2 mM EDTA |
| TAE-Puffer: | 40 mM Tris-Acetat pH 8,0 / 1 mM EDTA |
| TAE-Probenpuffer: | TAE-Puffer / 50% Glycerin / Bromphenolblau |
| TBE-Puffer: | 90 mM Tris-Borat pH 8,0 / 20 mM EDTA |
| TBE-Probenpuffer: | TBE-Puffer incl. 7 M Harnstoff und Bromphenolblau |
| TBE-Probenpuffer nativ: | TBE-Puffer incl. 10% (v/v) Glycerin und Bromphenolblau |
| TBS: | 50 mM Tris/HCl pH 7,5 / 150 mM NaCl |
| TBST: | TBS incl. 0,2% (v/v) Tween 20 |
| Transferpuffer: | 25 mM Tris/HCl pH 8,3 / 150 mM Glycin / 10% (v/v) Methanol |

2.1.8 Nukleotide, Säulenmaterialien und Chemikalien

| | |
|--|--|
| [α-P ³²]-ATP, [α-P ³²]-dATP, [α-P ³²]-dCTP | Hartmann Analytic, Braunschweig |
| [α-P ³²]-NAD ⁺ | Amersham Biosciences, Freiburg |
| 3-Aminobenzamid | Alexis, Grünberg |
| 3-ABA-Sepharose | Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Gerhard Buchlow |
| Adenosintriphosphat (ATP) | Boehringer, Mannheim |
| (+)-Aphidicolin | Alexis, Grünberg |
| BCA-Reagens | Pierce, Bonn |
| Biorad Protein Assay Reagent | Bio-Rad, München |
| 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p- | Roth, Karlsruhe |

| | |
|--|--------------------------------------|
| toluidinsalz (BCIP) | |
| Coomassie Brilliant Blue G250 | Serva, Heidelberg |
| Dithiothreitol (DTT) | GERBU Biotechnik, Gaiberg |
| [γ -P ³²]-ATP | Hartmann Analytic, Braunschweig |
| Hydroxyapatit | Riedel-de Haën, Seelze |
| Luminol-Reagens | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD ⁺) | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Nitrotetrazoliumblausulfat (NBT) | Roth, Karlsruhe |
| Nickel-NTA-Agarose | Qiagen, Hilden |
| Ponceau S | Roth, Karlsruhe |
| BrCN-aktivierte Sepharose 4B | Sigma, Taufkirchen |
| Sephadex-G50 | Amersham Biosciences, Freiburg |

Alle übrigen verwendeten Chemikalien stammten von Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Taufkirchen) oder Merck (Darmstadt) und waren von höchster Reinheit.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolierung und Reinigung von DNA

2.2.1.1.1 Plasmidpräparation

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgte aus Übernachtskulturen (5 ml LB-Medium, 2.1.3) mit dem Invisorb Spin Plasmid Mini Kit (2.1.1) nach den Angaben des Herstellers.

2.2.1.1.2 Reinigung von Oligonukleotiden über Sephadex-G50

Oligonukleotide wurden durch Ausschlusschromatographie über eine Sephadex-G50-Säule gereinigt. Dafür wurde 1 ml Sephadex-G50 (2.1.8) in eine kleine Säule gefüllt und mit 50 mM Tris/HCl pH 8.0 äquilibriert. Anschließend wurde die Säule mit der DNA-Lösung (100 μ l) überschichtet und 5 min bei 1000x g zentrifugiert. Das Eluat enthielt das gereinigte Oligonukleotid.

2.2.1.1.3 Ethanol-Fällung von DNA

Um DNA zu fällen, wurden die Proben mit 10% (v/v) 3 M Natriumacetat pH 5,0 und 200% (v/v) absolutem Ethanol versetzt. Die Fällung erfolgt für mindestens 30 min bei -20°C . Die Ansätze wurden 30 min bei 15.000x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 70% (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und in Probenpuffer oder H_2O resuspendiert.

2.2.1.2 Analyse von DNA

2.2.1.2.1 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von Plasmid-DNA wurde spektroskopisch anhand der Absorption bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ bestimmt ($\epsilon_{260} = 0,02 \text{ cm}^2/\mu\text{g}$). Linearisierte DNA-Fragmente wurden einer analytischen Agarosegelelektrophorese (2.2.1.2.2) unterzogen und die Konzentration wurde durch Vergleich der Intensität von Proben- und Markerbanden abgeschätzt.

2.2.1.2.2 Agarosegelelektrophorese

Für die Analyse von PCR-Produkten wurden Gele aus 1,3% (w/v) Agarose in TAE-Puffer und der 100 bp-DNA-Marker (2.1.1) verwendet. Für die Analyse von Restriktionsverdaus und für präparative Elektrophorese wurden Gele aus 1% (w/v) Agarose in TAE-Puffer und der 1 kb-DNA-Marker (2.1.1) verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 20% (v/v) TAE-Probenpuffer (2.1.7) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei

einer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 200 mA in TAE-Puffer (2.1.7). Die DNA wurde anschließend mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) angefärbt und im UV-Licht detektiert. In der präparativen Agarosegelelektrophorese wurden die gewünschten DNA-Fragmente mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA mit dem Anansa Fast 'n' Easy DNA Purification Kit (2.1.1) nach Herstellerangaben aus dem Gel isoliert.

2.2.1.2.3 Denaturierende PAGE

Für die Analyse von radioaktiv markierten Oligonukleotiden wurde eine denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt. Die mit Ethanol gefällten Pellets (2.2.1.1.3) wurden in 10-20 µl TBE-Probenpuffer (2.1.7) aufgenommen und für 10 min auf 90°C erhitzt. Davon wurden 10 µl-Aliquots auf das Gel aufgetragen. Soweit nicht anders angegeben, wurden Gele aus 16% Polyacrylamid und 7M Harnstoff in 1x TBE-Puffer (2.1.7) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 600 V und einer Stromstärke von maximal 30 mA in TBE-Puffer (2.1.7). Das Gel wurde anschließend auf eine Plastikfolie übertragen und mit einer Plastikhülle geschützt. Die radioaktiv markierte DNA wurde mittels Autoradiographie (2.2.4.1.2) detektiert.

2.2.1.2.4 Analytischer Restriktionsverdau

Der analytische Restriktionsverdau diente zur Analyse der Produkte von TOPO-Klonierung (2.2.1.3.2), Ligation (2.2.1.3.4) oder gerichteter Mutagenese (2.2.1.5). Die Produkte von TOPO-Klonierung und Ligation wurden jeweils mit den beiden Restriktionsenzymen geschnitten, die für die Umklonierung verwendet worden waren (vgl. Tabelle 2.2). Die Produkte der Mutagenese wurden jeweils mit dem Restriktionsenzym geschnitten, dessen Schnittstelle durch den Mutageneseprimer eingefügt worden war (vgl. 2.1.4.3).

Die Reaktionsansätze enthielten:

- 5 µl Plasmid-DNA
- 1x Reaktionspuffer je nach Enzym (2.1.1)
- 1x BSA-Lösung (3.1.1)
- 5 U je Restriktionsenzym (2.1.1)
- ad 20 µl H₂O

Der analytische Restriktionsverdau erfolgte für 2 h bei 37°C. Danach wurden den Ansätzen 10 µl-Aliquots entnommen und durch Agarosegelelektrophorese analysiert (2.2.1.2.2).

2.2.1.2.5 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde freundlicherweise von Gerhard Buchlow mit Hilfe des Sequitherm Excel II DNA Sequencing Kit-LC (2.1.1) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Sequenzierprimer dienten je nach Konstrukt die unter 2.1.4.2

angegebenen Oligonukleotide. Die Nukleotidsequenz wurde mit dem LI-COR DNA Sequencer 4000L (MWG Biotech, Ebersberg) nach Angaben des Herstellers ermittelt. Die Sequenzierungen wurden mit dem Programm „Blast 2 Sequences“ ausgewertet (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html).

2.2.1.3 Umklonierung von Pol β , FEN 1 und Lig III

Die kodierenden Sequenzen von Pol β , FEN 1 und Lig III wurden aus bereits vorliegenden Vektorkonstrukten in die Expressionsvektoren pET22b(+) (Pol β , FEN 1) oder pET28b(+) (Lig III) umkloniert. Die Umklonierung erfolgte über PCR (2.2.1.3.1).

2.2.1.3.1 PCR

Mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden die kodierenden cDNA-Sequenzen amplifiziert. Als DNA-Matrize dienten Vektorkonstrukte, welche die kodierenden Sequenzen bereits enthielten (2.1.3). Mit den in der PCR eingesetzten Primern (2.1.4.1) wurden jeweils zwei flankierende, unikale Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen hinzugefügt (Tabelle 2.2).

| Sequenz | Schnittstellen | 5'-Primer | 3'-Primer | Matrizenkonstrukt |
|-------------|------------------------------|--------------|--------------|---------------------|
| Pol β | <i>NdeI</i> , <i>HindIII</i> | „pET22Nterm“ | „pET22Cterm“ | pWL9-Pol β |
| FEN 1 | <i>NdeI</i> , <i>XhoI</i> | „FenNTerm“ | „FenCTerm“ | pcDNA3.1-TOPO-FEN 1 |
| Lig III | <i>NheI</i> , <i>NotI</i> | „LigNterm“ | „LigCTerm“ | pET16b(+)-LigIII |

Tabelle 2.2: Durch die PCR eingefügte Restriktionsschnittstellen

Die Reaktionsansätze enthielten:

- 10 ng Template-DNA
- je 25 pmol N- und C-terminaler Primer
- 30 nmol dNTPs (2.1.1)
- 1x Reaktionspuffer für *Pfu*-DNA-Polymerase
- 10% (v/v) DMSO
- 1,5 U *Pfu*-DNA-Polymerase (2.1.1)
- ad 50 μ l H₂O

Das verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 2.3 zusammengestellt. Den PCR-Ansätzen wurden 10 μ l-Aliquots entnommen und durch Agarosegelelektrophorese auf Produkte in der richtigen Größe untersucht (2.2.1.2.2).

| Schritt | Zahl der Zyklen | Temperatur | Zeit |
|---------|-----------------|------------|----------|
| 1 | 1 | 95°C | 5 min |
| 2 | 30 | 95°C | 1 min |
| | | 55°C | 1 min |
| | | 72°C | 1 min/kb |
| 3 | 1 | 72°C | 10 min |

Tabelle 2.3: Programm für die PCR

2.2.1.3.2 Klonierung in den TOPO-Vektor (TOPO-Klonierung)

Die in der PCR (2.2.1.3.1) erhaltenen Produkte wurden mithilfe des TOPO TA Cloning Kit nach Herstellerangaben in den Vektor pCR2.1-TOPO (2.1.3) kloniert. Das Konstrukt wurde anschließend nach Herstellerangaben durch Hitzeschock in chemokompetente *E. coli* OneShot-TOP10-Zellen (2.1.2.1) transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf ampicillin- und kanamycinhaltigem LB-Agar (2.1.5) selektiert. Die aus einzelnen Zellklonen isolierten Plasmide (2.2.1.1.1) wurden einem analytischen Restriktionsverdau unterzogen (2.2.1.2.4) und anschließend sequenziert (2.2.1.2.5).

2.2.1.3.3 Präparativer Restriktionsverdau

Positiv sequenzierte Produkte der TOPO-Klonierung (2.2.1.3.2), aus denen Gensequenzen („inserts“) ausgeschnitten werden sollten, wurden einem präparativen Verdau mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (2.1.1) unterzogen. Die pET-Vektoren, denen die „inserts“ eingefügt werden sollten, wurden ebenfalls auf diese Weise geschnitten. Die Größe des Reaktionsansatzes variierte mit der eingesetzten DNA-Menge.

Die Reaktionsansätze enthielten:

- 10-20 µl Plasmid-DNA
- 1x Reaktionspuffer je nach Enzym (2.1.1)
- 1x BSA-Lösung (2.1.1)
- 20 U *Nde*I + 2 U *Hind*III (Umklonierung Pol β)
- 25 U *Nde*I + 15 U *Xho*I (Umklonierung FEN 1)
- 10 U *Nhe*I + 20 U *Not*I (Umklonierung Lig III)
- ad 20-30 µl H₂O

Der präparative Restriktionsverdau wurde über Nacht bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurde der gesamte Ansatz einer präparativen Agarosegelelektrophorese unterzogen (2.2.1.2.2). Das isolierte „insert“ und der geschnittene Zielvektor wurden aus dem Gel isoliert (2.2.1.2.2) und für die DNA-Ligation (2.2.1.3.4) eingesetzt.

2.2.1.3.4 DNA-Ligation

Die Ligation von cDNA-Sequenzen in die Expressionsvektoren erfolgte mithilfe der T4-DNA-Ligase (2.1.1). Das molare Verhältnis von Plasmid zu einzufügender Sequenz („insert“) betrug 1:4 bei eingesetzter „insert“-Menge von 200 fmol. Die Konzentration von linearer DNA wurde durch Agarosegelelektrophorese bestimmt (2.2.1.2.1).

Die Reaktionsansätze enthielten:

- 2-3 μl „insert“
- 2-7 μl Vektor
- 1x T4-Ligase-Puffer
- 350 U T4-DNA-Ligase
- ad 20 μl H₂O

Die Reaktion verlief über Nacht bei 16°C. Anschließend wurden 10 μl -Aliquots durch Hitzeschock in *E. coli* XL1-Blue (2.1.2.1) transformiert (2.2.1.4.2).

2.2.1.4 Transformation von DNA in Bakterienzellen

2.2.1.4.1 Herstellung chemokompetenter Bakterienzellen

Zur Gewinnung chemokompetenter Zellen wurden *E. coli* unterschiedlicher Stämme (3.1.2.1) in 50 ml LB-Medium (3.1.5) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Die Kultur wurde 10 min auf Eis gekühlt und anschließend 10 min bei 5000x g pelletiert. Das Pellet wurde in 50 ml CaCl₂-Lösung (3.1.7) resuspendiert und erneut pelletiert. Dieses Pellet wurde in 2 ml CaCl₂-Lösung resuspendiert und in 100 μl -Aliquots bei -80°C gelagert.

2.2.1.4.2 Transformation durch Hitzeschock

Für die Transformation wurde ein Aliquot chemokompetenter *E. coli* (2.2.1.4.1) auf Eis aufgetaut und 30 min mit 0,5-10 μl DNA auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 90 sec auf 42°C erhitzt. Anschließend wurden 400 μl TB⁺-Medium (2.1.5) zugegeben und der Ansatz 1 h bei 37°C geschüttelt. Zur Selektion wurden die Zellen auf ampicillin- oder kanamycinhaltigem LB-Agar (2.1.5) ausplattiert.

2.2.1.5 Gerichtete Mutagenese

Die gerichtete Mutagenese wurde mit dem Quikchange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (2.1.1) durchgeführt. DNA-Matrize war das Expressionskonstrukt pET28b(+)-Lig III/WT. Durch die jeweiligen Mutageneseprimer (2.1.4.3) wurden der Aminosäureaustausch und eine neue Restriktionsschnittstelle zur Kontrolle eingeführt.

Die Reaktionsansätze enthielten:

- 1x Puffer für *Pfu*-Turbo-DNA-Polymerase
- 30 ng pET28b(+)-Lig III/WT
- 25 pmol Vorwärtsprimer
- 25 pmol Rückwärtsprimer
- 1 µl dNTP-Mix
- 10% (v/v) QuikSolution
- 2,5 U *Pfu*-Turbo-DNA-Polymerase
- ad 50 µl H₂O

Die Mutagenesereaktion wurde nach dem in Tabelle 2.4 dargestellten Programm durchgeführt.

| Schritt | Zyklenzahl | Temperatur | Zeit |
|---------|------------|------------|--------|
| 1 | 1 | 95°C | 30 s |
| 2 | 16 | 95°C | 30 s |
| | | 55°C | 1 min |
| | | 68°C | 16 min |

Tabelle 2.4: Programm für die gerichtete Mutagenese

Im Anschluss an die Reaktion wurde der Reaktionsansatz 1 h bei 37°C mit der Endonuklease *DpnI* (10 U) inkubiert, um die DNA-Matrize spezifisch abzubauen. Danach wurde ein 2 µl-Aliquot des Ansatzes nach Herstellerangaben in chemokompetente *E. coli* XL10-Gold (2.1.2.1) transformiert. Die Zellen wurden auf kanamycinhaltigem LB-Agar selektiert. Die erhaltenen Klone wurden durch analytischen Restriktionsverdau (2.2.1.2.4) analysiert und mit dem geninternen Primer „Lig3Seq“ (2.1.4.2) sequenziert (2.2.1.2.5).

2.2.1.6 Modifizierung von DNA

2.2.1.6.1 Phosphorylierung des 5'-Endes von Oligonukleotiden

Reparatursubstrate („Nick-1“, „Nick-2“, „Gap-TTA“, „Gap-GTT“, „Gap-3er“, „Gap-5er“, 3.1.4.4) wurden am 5'-Ende mit Hilfe von T4-Polynukleotidkinase (2.1.1) phosphoryliert.

Die Reaktionsansätze enthielten:

- 1 nmol Oligonukleotid
- 1 µmol ATP (2.1.8)
- 1x T4-PNK-Reaktionspuffer
- 10 U T4-PNK
- ad 100 µl H₂O

Die Ansätze wurden für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Oligonukleotide über Sephadex-G50 gereinigt (2.2.1.1.2).

2.2.1.6.2 Radioaktive Markierung des 5'-Endes von Oligonukleotiden

Die radioaktive 5'-Markierung von Oligonukleotiden erfolgte durch Phosphorylierung mit [γ -P³²]-ATP (3.1.8).

Die Reaktionsansätze enthielten:

- 2 nmol Oligo
- 160 pmol [γ -P³²]-ATP
- 1x T4-PNK-Reaktionspuffer
- 10 U T4-PNK (2.1.1)
- ad 100 μ l H₂O

Die Ansätze wurden für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Oligonukleotide über Sephadex-G50 gereinigt (2.2.1.1.2).

2.2.1.6.3 Erzeugung von AP-Substraten mit Uracil-DNA-Glykosylase

Um Reparatursubstrate mit einer apyrimidinen Stelle (AP-Stelle) zu erhalten, wurde ein desoxyuracilhaltiges Oligonukleotid („U-16“, 2.1.4.4) mit Uracil-DNA-Glykosylase aus *E. coli* (2.1.1) behandelt.

Die Reaktionsansätze enthielten:

- 2 nmol „U-16“
- 1x UDG-Reaktionspuffer
- 5 U UDG
- ad 100 μ l H₂O

Die Ansätze wurden für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit H₂O auf 200 μ l aufgefüllt (Endkonzentration des AP-Oligonukleotids: 10 μ M). Aus „U-16“ wurde so „AP-16“, (Abbildung 2.1). Um ein doppelsträngiges AP-Substrat zu erhalten, wurde das AP-Oligo mit dem komplementären Oligonukleotid „G-16“ (2.1.4.4) gemischt.

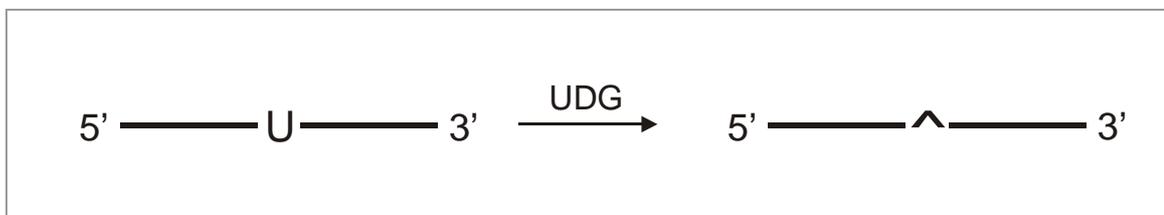


Abbildung 2.1: Erzeugung von AP-Substraten mit UDG. [^] bezeichnet die AP-Stelle.

2.2.1.6.4 Erzeugung von $[\alpha\text{-P}^{32}]$ -dCTP-markierten Ligasesubstraten

Um ein spezifisches Substrat für Lig III zu erhalten, wurden doppelsträngige AP-Substrate (2.2.1.6.3) mit APE 1, Pol β und $[\alpha\text{-P}^{32}]$ -dCTP (2.1.8) behandelt. Endonukleolytische Spaltung durch APE 1 und Einbau eines radioaktiven Nukleotids durch Pol β ergaben ein radioaktiv markiertes Oligonukleotid mit einem 5'-phosphorylierten Einzelstrangbruch (Ligasesubstrat, Abbildung 2.2).

Die Reaktionsansätze enthielten:

- 50 pmol „AP-16“
- 50 pmol „G-16“
- 6 μg APE 1
- 0,6 μg Pol β
- 1x Reaktionspuffer (2.1.7)
- 40 pmol dCTP (2.1.1)
- 6 pmol $[\alpha\text{-P}^{32}]$ -dCTP
- ad 30 μl H₂O

Die Ansätze wurden für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend Ethanol gefällt (2.2.1.1.3) und mehrmals gewaschen.

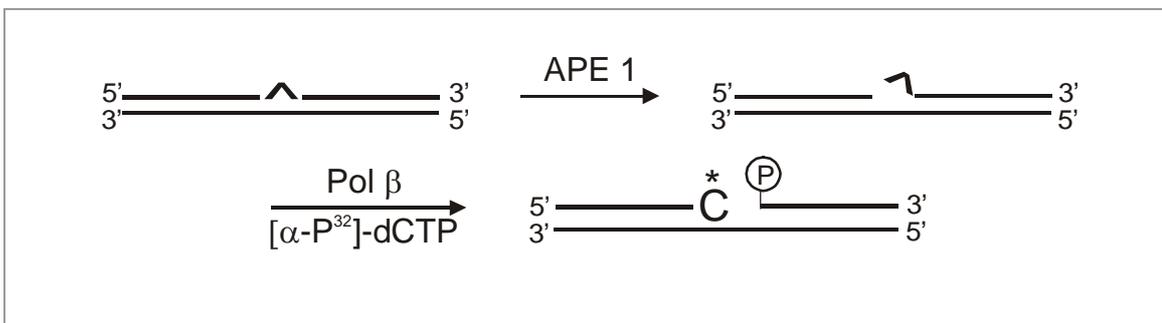


Abbildung 2.2: Erzeugung eines Ligasesubstrats. [^] bezeichnet die AP-Stelle. [*] bezeichnet die radioaktive Markierung.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Zellkultur

HeLa S3-Zellen (2.1.2.2) wurden in DMEM oder „DMEM mit GlutaMAX I“ mit 10% (v/v) FCS und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung (2.1.5) kultiviert. Lymphoblastoide (2.1.2.2) wurden in „RPMI 1640“-Medium (2.1.5) mit 10% (v/v) FCS und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung kultiviert. Die Zellen wurden in 75 cm²-Kulturflaschen (Corning, Schiphol-Rijk, NL) im Brutschrank bei 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5% kultiviert.

Für den Medienwechsel wurden die Suspensionszellen 5 min bei 800x g abzentrifugiert. Der Überstand (verbrauchtes Medium) wurde entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Die adherenten HeLa S3-Zellen wurden zum Umsetzen in neue Kulturflaschen 1x mit 5 ml 37°C warmem PBS (2.1.7) gewaschen und mit 5 ml 37°C warmer 1x Trypsin/EDTA-Lösung (2.1.6) versetzt. Die Lösung wurde sofort wieder entfernt und die Zellen wurden 5 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen in 5 ml 37°C warmem Medium resuspendiert und in Verdünnungen von 1:2 bis 1:5 in neue Kulturflaschen umgefüllt.

2.2.2.2 Behandlung von Zellen mit Desoxyglucose

Um die zelluläre ATP-Konzentration abzusenken, wurden HeLa S3-Zellen und Lymphoblastoide mit Desoxyglucose (DOG, 2.1.5) behandelt. Hierfür wurden 40 ml dicht gewachsener Suspensionszellkultur oder eine 75 cm²-Kulturflasche nicht konfluenter adherenter Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden 2x mit DMEM ohne Glucose und Pyruvat (2.1.5) gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 5 ml DMEM ohne Glucose und Pyruvat versetzt, dem 50 mM DOG (Kontrolle: 50 mM Glucose, 2.1.5) zugegeben wurde. Die Zellen wurden 15 min im Brutschrank inkubiert. Zum Beenden der Behandlung wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden mit PBS (2.1.7) gewaschen. Im Anschluss wurden Kernextrakte präpariert (2.2.2.3).

2.2.2.3 Präparation von Kernextrakten

Kernextrakte wurden nach der Methode von Schreiber (Schreiber et al., 1984) präpariert. Dazu wurden Suspensionszellen aus 40 ml dicht gewachsener Kultur oder adherente Zellen aus einer 75 cm²-Kulturflasche für 5 min bei ca. 800x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS (2.1.7) resuspendiert und ca. 1 min bei 1000x g zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 400 µl KE-Puffer A (2.1.7) aufgeschlämmt und 10-15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 25 µl 10% (v/v) N-P40 zugegeben und 10 sec gevortext. Der Ansatz wurde ca. 1 min bei 5000x g zentrifugiert und das Pellet in 50 µl KE-Puffer C (2.1.7) resuspendiert. Der Ansatz wurde 10-15 min bei 4°C stark geschüttelt und 10-15 min bei

4°C und 15.000x g abzentrifugiert. Der Überstand war der fertige Kernextrakt. Die Proteinkonzentration im Extrakt wurde mit dem Bradford-Assay bestimmt (2.2.3.4.2).

2.2.3 Proteinchemische Methoden

2.2.3.1 Proteinexpression

Für die Überexpression rekombinanter Proteine wurden *E. coli*-Expressionskulturen in LB-Medium (2.1.5) angezogen. Die Expressionskulturen wurden im Verhältnis von 1:100 mit einer Übernachtskultur inokuliert und bei 37°C geschüttelt. Nach dem Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG (2.1.5) induziert. Expressionsvektoren (siehe Anhang), *E. coli*-Wirtsstämme (2.1.2.1), Antibiotika (2.1.5), IPTG-Konzentrationen und Expressionsdauer sind in Tabelle 2.5 aufgelistet.

| Protein | Vektor | Wirtsstamm | Selektion | IPTG | Dauer |
|---------|----------------------|------------|-------------------------------|--------|-------|
| APE 1 | pET28c(+)-APE 1 | BL21(DE3) | 50 µg/ml Kan | 0,5 mM | 3 h |
| FEN 1 | pET22b(+)-FEN 1 | BL21(DE3) | 100 µg/ml Amp | 0,5 mM | 3 h |
| PARP-1 | pQE-31-PARP-1 | M15(pREP4) | 100 µg/ml Amp 50 µg/ml Kan | 1 mM | 3 h |
| Pol β | pET22b(+)-Pol β | BL21(DE3) | 100 µg/ml Amp | 0,5 mM | 3 h |
| Lig III | 1. pET16b(+)-Lig III | BL21(DE3) | 100 µg/ml Amp | 0,5 mM | 3 h |
| | 2. pET28b(+)-Lig III | BL21(DE3) | 50 µg/ml Kan | 0,5 mM | 3 h |
| XRCC1 | pET16b(+)-XRCC1 | BL21(DE3) | 100 µg/ml Amp | 0,5 mM | 1,5 h |

Tabelle 2.5: Bedingungen für die Proteinexpression

Zum Beenden der Expression wurde die Kultur 15 min bei 5000x g, 4°C, zentrifugiert und das Pellet bei -20°C eingefroren.

2.2.3.2 Zellaufschluss

2.2.3.2.1 Analytischer Zellaufschluss

Um den Verlauf der Proteinexpression in der SDS-PAGE (2.2.3.6.1) verfolgen zu können, wurden der Expressionskultur (2.2.3.1) zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen (Tabelle 2.6).

| Zeitpunkt nach Expressionsinduktion | Volumen der entnommenen Probe |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| 0h | 1 ml |
| 1h | 0,5 ml |
| 2h | 0,25 ml |
| 3h | 0,25 ml |

Tabelle 2.6: Entnahme von Proben für die Expressionskontrolle

Die Proben wurden 1 min bei 15.000x g abzentrifugiert. Die Pellets wurden bei -20°C eingefroren und wieder aufgetaut. Jedes Pellet wurde in 50 μl SDS-Probenpuffer (2.1.7) resuspendiert und 1 min gevortext. Danach wurden die Pellets 10 min auf 85°C erhitzt und 10 min bei 15.000x g zentrifugiert. Vom Überstand wurden 5 μl auf ein SDS-Gel aufgetragen.

2.2.3.2.2 Zellaufschluss mit der French Press

Für den Zellaufschluß wurde das Pellet in 20-40 ml des entsprechenden Aufschlusspuffers (2.1.7) resuspendiert. Der Suspension wurde mit 5 mg Lysozym (2.1.6) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Aufschluss in der SLM AMINCO French Press (G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch Gmünd) mit drei Durchgängen bei je 40.000 Psi.

2.2.3.3 Gewinnung von Lig III aus „inclusion bodies“

2.2.3.3.1 Präparation von „inclusion bodies“

Für die „inclusion body“ (IB)-Präparation wurde das Protokoll von (Rudolph et al., 1997) verwendet. Dabei wurde das Zellpellet aus 250 ml Expressionskultur in 20 ml IB-Aufschlusspuffer (2.1.7) resuspendiert und in der French Press wie unter 2.2.3.2.2 beschrieben aufgeschlossen. MgCl_2 und DNase I wurden bis zu einer Endkonzentration von 3 mM bzw. 10 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben und die Lösung 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml IB-Waschlösung 1 (2.1.7) wurde die Lösung für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die „inclusion bodies“ 10 min bei 31.000x g, 4°C , abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 ml IB-Waschlösung 2 (2.1.7) resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Das gewaschene Pellet wurde in Aliquots bei -20°C eingefroren.

2.2.3.3.2 Renaturierung von „inclusion bodies“

Ein Aliquot aus der IB-Präparation (2.2.3.3.1), entsprechend 80 ml Expressionskultur, wurde in 10 ml IB-Solubilisierungspuffer entweder 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C geschwenkt. Anschließend wurde für 10 min bei 31.000x g zentrifugiert und der Überstand wurde bei 4°C gegen Rückfaltungspuffer dialysiert. Die Konzentration von Gdm-HCl wurde dabei schrittweise verringert. Die Dialysepuffer enthielten 5 mM Mg^{2+} und 50 μM Zn^{2+} . Mg^{2+} wird von Lig III als Kofaktor für die Katalyse benötigt, Zn^{2+} ist als Strukturelement für die Zinkfinger-Domäne erforderlich. Diese Metallionen wurden zur Unterstützung der Rückfaltung zugesetzt. Durch Zugabe von 1 mM Dithiothreitol wurde ein reduzierendes Milieu aufrecht erhalten, um die Bildung von Disulfidbrücken zu verhindern. Außerdem wurden 10% Glycerin, 0,05% Nonidet P40 und mindestens 300 mM NaCl als stabilisierende Zusätze verwendet. Die Dialyse erfolgte in vier Schritten in den Rückfaltungspuffern 1-4 (2.1.7, 1 Liter pro Puffer). Es wurde jeweils 2x für 1,5 h gegen 500

ml Puffer dialysiert oder 1x über Nacht gegen 1 l Puffer. Der Dialyseschritt über Nacht wurde für gewöhnlich mit den Rückfaltungspuffern 3 oder 4 durchgeführt. Anschließend wurde das Dialysat über Ni-NTA-Agarose gereinigt (2.2.3.4.1).

2.2.3.4 Proteinreinigung

2.2.3.4.1 Proteinreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie

APE 1, Pol β , FEN 1, Lig III und XRCC1 wurden durch Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose (2.1.8) gereinigt. Expressions- und Säulenvolumen sind in Tabelle 2.7 aufgelistet.

| Protein | Expressionsvolumen | Säulenvolumen |
|-------------|--------------------|---------------|
| APE 1 | 250 ml | 1 ml |
| FEN 1 | 250 ml | 1 ml |
| Pol β | 250 ml | 1 ml |
| Lig III | IBs aus 80 ml | 2 ml |
| XRCC1 | 2 l | 0,5 ml |

Tabelle 2.7: Expressions- und Säulenvolumen für die Proteinreinigung

Im Falle von APE 1, Pol β , FEN 1 und XRCC1 wurden die Zellen mit Imidazol-Lysepuffer (2.1.7) in der French Press (2.2.3.2.2) aufgeschlossen. Der Aufschluss wurde 2x 10 min bei 31.000x g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand mit Ni-NTA-Agarose versetzt. Im Falle von Lig III wurde das Dialysat aus der „inclusion body“-Renaturierung (2.2.3.3.2) auf 10 mM Imidazol gebracht mit Ni-NTA-Agarose versetzt. Die Proteine wurden 1 h bei 4°C mit dem Säulenmaterial geschüttelt (über Kopf-Rotation). Danach wurde das Säulenmaterial in eine Glassäule gefüllt. Die Säule wurde bei 4°C mit 10 Säulenvolumen Imidazol-Waschpuffer (2.1.7, 20 mM Imidazol) gewaschen. Der zweite Waschschrift variierte je nach Protein (Tabelle 2.8).

| Protein | 2. Waschschrift (10 Säulenvolumen) |
|-------------|--|
| APE 1 | Imidazol-Waschpuffer mit 20 mM Imidazol |
| FEN 1 | Imidazol-Waschpuffer mit 20 mM Imidazol |
| Pol β | Imidazol-Waschpuffer mit 20 mM Imidazol |
| Lig III | Imidazol-Waschpuffer mit 1 M NaCl und 40 mM Imidazol |
| XRCC1 | Imidazol-Waschpuffer mit 2 M NaCl und 40 mM Imidazol |

Tabelle 2.8: Waschbedingungen für die Proteinreinigung

Danach wurden die Proteine mit 6x 1 Säulenvolumen Imidazol-Elutionspuffer (2.1.7) eluiert. Gewöhnlich befand sich das gereinigte Protein in der zweiten Elutionsfraktion. Die Proteinkonzentration wurde mit dem BCA-Assay bestimmt (2.2.3.5.1). Für APE 1, Pol β und FEN 1 betrug sie gewöhnlich 2 mg/ml, für XRCC1 um 500 μ g/ml. Die Konzentration von Lig III variierte mit dem Expressionskonstrukt: Expression mit pET16b(+)-Lig III ergab 500 μ g/ml, Expression mit pET28b(+)-Lig III ergab 1 mg/ml. APE 1, Pol β und FEN 1 wurden mit 10% (v/v) Glycerin versetzt und in Aliquots bei -80°C eingefroren. Lig III und XRCC1 wurden bei 4°C gegen 2x 0,5 l Proteinpuffer (2.1.7) mit 1 mM DTT dialysiert und danach in Aliquots bei -80°C eingefroren.

2.2.3.4.2 Reinigung von rekombinanter PARP-1

Rekombinante PARP-1 wurde durch Affinitätschromatographie an zwei unterschiedlichen Matrices gereinigt: Ni-NTA-Agarose (2.1.8) und 3-ABA-Sepharose (2.1.8). Die Reinigung erfolgte bei 4°C mit Hilfe einer automatischen Flüssigchromatographie-Anlage (Amersham Biosciences, Freiburg). Zellen aus 500 ml Expressionskultur wurden mit PARP-Aufschlusspuffer (2.1.7) in der French Press (2.2.3.2.2) aufgeschlossen. Der Aufschluss wurde 2 x 10 min bei 30.000x g und 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde auf eine mit PARP-Aufschlusspuffer äquilibrierte Ni-NTA-Säule aufgetragen (Säulenvolumen: 3 ml, Flussgeschwindigkeit: 0,5 ml/min). Danach wurde mit 30 ml PARP-Aufschlusspuffer gewaschen (Flussgeschwindigkeit: 1ml/min). Die Elution erfolgte mit ca. 20 ml EDTA-Puffer (2.1.7, Flussgeschwindigkeit: 1,25 ml/min). Das Volumen der Elutionsfraktionen betrug 2 ml.

Die proteinhaltigen Elutionsfraktionen (Proteindetektion durch Absorptionsmessung bei $\lambda = 280$ nm) wurden vereinigt und auf eine mit EDTA-Puffer äquilibrierte 3-ABA-Säule aufgetragen (Säulenvolumen: 5 ml, Flussgeschwindigkeit 0,5 ml/min). Die Säule wurde mit 50 ml EDTA-Puffer gewaschen (Flussgeschwindigkeit 0,5 ml/min) und das Protein wurde mit ca. 20 ml PARP-Elutionspuffer (2.1.7) eluiert (2 ml pro Elutionsfraktion). Da das im Elutionspuffer enthaltene Nikotinamid bei $\lambda = 280$ nm absorbiert, wurden die Elutionsfraktionen mit SDS-PAGE (2.2.3.6.1) auf ihren Proteingehalt untersucht. Proteinhaltige Fraktionen wurden vereinigt und an einer Hydroxyapatit-Säule (2.1.8, Säulenvolumen: 0,5 ml) aufkonzentriert. Das Eluat wurde auf die Hydroxyapatit-Säule aufgetragen und die Säule wurde mit 5 ml 20mM Tris/HCl pH 7,5, 5mM β -Mercaptoethanol gewaschen. Das Protein wurde mit 1 M Natriumphosphat pH 7,5, 5 mM β -Mercaptoethanol in 0,5 ml-Fraktionen eluiert. Die Proteinkonzentration wurde mit dem BCA-Assay bestimmt (2.2.3.5.1). Sie betrug für PARP-1 500 μ g - 2 mg/ml. Das Protein wurde in Aliquots bei -80°C eingefroren.

2.2.3.4.3 Reinigung von Antikörpern

Die polyklonalen Antikörper Rabbit-Anti-Pol β -IgG und Rabbit-Anti-Lig III-IgG wurden aus den von Pineda-Antikörper, Berlin, gelieferten Immunsereen aufgereinigt. Dazu wurde jeweils eine Affinitätschromatographie mit Hilfe des an eine Sepharosematrix gekoppelten Antigens durchgeführt. Die für beide Antikörper unterschiedlichen eingesetzten Mengen an Antigen, Roh-Sepharosematrix, Antiserum und fertiger Affinitätsmatrix sind in Tabelle 9 aufgeführt.

| gereinigter Antikörper | Antigen | eingesetztes Antigen | eingesetzte Rohmatrix | eingesetztes Serum | eingesetzte Affinitätsmatrix |
|------------------------------|-------------|----------------------|-----------------------|--------------------|------------------------------|
| Rabbit-Anti-Pol β -IgG | Pol β | 10 mg | 280 mg (1 ml) | 40 ml | 0,5 ml |
| Rabbit-Anti-Lig III-IgG | Lig III | 2,8 mg | 140 mg (0,5 ml) | 20 ml | 0,25 ml |

Tabelle 2.9: Mengen an Protein und Säulenmatrix für die Antikörperreinigung

Die Proteine wurden zunächst gegen 4 l NH₂-freien Dialysepuffer (2.1.7) dialysiert. Zur Herstellung der Affinitätsmatrix wurde BrCN-Sepharose 4B (2.1.8) 30 min bei 4°C in Lysepuffer (2.1.7) quellen gelassen. Danach wurde die Matrix 3x mit Lysepuffer gewaschen. Die dialysierten Proteine (5 ml) wurden zugegeben und die Mischung wurde 2 h bei Raumtemperatur rotiert (über Kopf-Rotation). Anschließend wurde 3x mit Lysepuffer gewaschen und die Säule wurde zum Absättigen 1 h bei Raumtemperatur mit 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 rotiert. Danach wurde die Affinitätsmatrix 3x mit TBST (2.1.7) gewaschen. Zum Reinigen der Antikörper wurde die Affinitätsmatrix mit dem entsprechenden Antiserum 1 h bei Raumtemperatur rotiert. Anschließend wurde 3x mit TBST gewaschen. Die Antikörper wurden mit AK-Elutionspuffer (2.1.7) in 500 μ l-Fractionen eluiert. Dabei wurden in den Auffanggefäßen 50 μ l 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 vorgelegt, um den pH der Elutionsfraktionen so schnell wie möglich wieder zu neutralisieren. Um den Antikörpergehalt der Elutionsfraktionen festzustellen, wurde ein Dot Blot (2.2.3.6.3) durchgeführt. Der Dot Blot wurde nur mit einem sekundären Antikörper (Anti-Rabbit-IgG-AP, 2.1.6) hybridisiert und dann entwickelt (2.2.3.6.4). Antikörperhaltige Elutionsfraktionen wurden mit 0,6‰ (w/v) Natriumazid versetzt und im Kühlschrank gelagert.

2.2.3.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

2.2.3.5.1 Konzentrationsbestimmung mit dem BCA-Assay

50 µl der Proteinprobe wurden nach Herstellerangaben mit 1 ml BCA-Reagens (2.1.8) versetzt und die Proteinkonzentration wurde spektroskopisch bei $\lambda = 562$ nm ermittelt. Als Standard diente eine BSA-Eichreihe.

2.2.3.5.2 Konzentrationsbestimmung mit dem Bradford-Assay

25 µl der Proteinprobe wurden nach Herstellerangaben mit 1,25 ml Biorad Protein Assay Reagent (2.1.8) versetzt und die Proteinkonzentration wurde spektroskopisch bei $\lambda = 595$ nm ermittelt. Als Standard diente eine BSA-Eichreihe.

2.2.3.6 Analyse von Proteinen

2.2.3.6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Proteintrennung wurde durch SDS-PAGE nach Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1970), wobei die Sammelgelkonzentration 5% und die Trenngelkonzentration 12% (Pol β , FEN 1, APE 1) oder 6-8% (Lig III, XRCC1, PARP-1) betrug. Die Schichtdicke der Gele betrug 75 µm. Die Proteinproben wurden für die PAGE mit mindestens 20% (v/v) SDS-Probenpuffer (2.1.7) versetzt und 10 min auf 85°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 25 mA/Gel. Anschließend wurden die Gele zur Detektion der Proteinbanden mit 10 min mit Coomassie-Fixierer und 15 min mit Coomassie-Färbelösung (2.1.7) behandelt.

2.2.3.6.2 Western Blot

Im Anschluss an eine SDS-PAGE wurden die Proteine durch das „semi dry“-Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran (Macherey-Nagel, Düren) transferiert. Gel und Membran waren zuvor mit Transferpuffer (2.1.7) getränkt worden. Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 2,5 mA/cm². Nach dem Transfer wurden die Proteinbanden durch Schwenken der Membran in Ponceau S-Lösung (2.1.7) angefärbt, dokumentiert und durch Waschen in Wasser wieder entfärbt. Die Membran wurde wie folgt weiterbehandelt:

- in H₂O spülen
- 1 h in Blockinglösung (2.1.7) schwenken
- 3 x 5 min in TBST (2.1.7) waschen
- 2 h mit dem primären Antikörper (2.1.6), Verdünnung 1:1000 in TBS, schwenken
- 3 x 5 min in TBST waschen
- 20 min in Blockinglösung schwenken
- 1 h 20 min mit dem sekundären Antikörper (2.1.6), Verdünnung 1:10.000 in TBS, schwenken

- 3 x 5 min in TBST waschen

Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend erfolgte die Detektion (2.2.3.6.4 und 2.2.3.6.5).

2.2.3.6.3 Dot Blot

Für den Dot Blot wurde ein 3 µl-Aliquot einer Proteinlösung punktförmig auf eine Nitrocellulose-Membran (Macherey-Nagel, Düren) getropft. Nach dem Trocknen wurden Proteine durch Schwenken der Membran in Ponceau S-Lösung (2.1.7) angefärbt, dokumentiert und durch Waschen in Wasser wieder entfärbt. Die Membran wurde wie unter 2.2.3.6.2 beschrieben weiterbehandelt.

2.2.3.6.4 Detektion mittels Alkalischer Phosphatase-Aktivität

Sekundäre Antikörper, die mit alkalischer Phosphatase konjugiert waren, wurden mit NBT/BCIP (2.1.8) detektiert. Dafür wurde die Membran im Anschluss an die Hybridisierung (2.2.3.6.2) 5 min in 10 ml Alkalische Phosphatase-Puffer (2.1.7) gewaschen. 10 ml Alkalische Phosphatase-Puffer wurden mit 66 µl NBT-Lösung (2.1.7) und 33 µl BCIP-Lösung (2.1.7) versetzt und auf die Membran gegeben. Die Nachweisfärbung entwickelte sich direkt auf der Membran.

2.2.3.6.5 Detektion mittels HRP-Aktivität

Sekundäre Antikörper, die mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert waren, wurden durch Chemolumineszenz mit Luminol-Reagens nachgewiesen (2.1.8). Dafür wurden 0,5 ml Luminol-Reagens A mit 0,5 ml Luminol-Reagens B gemischt. Die Membran wurde im Anschluss an die Hybridisierung (2.2.3.6.2) mit dem Gemisch bedeckt, in Frischhaltefolie eingewickelt und 2 min inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch abgegossen und die Membran wurde erneut in Frischhaltefolie gewickelt. Die Chemolumineszenz wurde wie unter 2.2.4.1.2 beschrieben detektiert. Der Film wurde allerdings nur wenige Minuten bei Raumtemperatur belichtet.

2.2.4 Radiochemische Methoden

2.2.4.1 Nachweis von radioaktiver Markierung

2.2.4.1.1 Cerenkov-Messung

Radioaktivität wurde mit Hilfe des Flüssigszintillationszählers Beckman LS 6000SC (Beckman Coulter, Krefeld) durch Cerenkov-Messung quantifiziert. Die Messung erfolgte spezifisch für Phosphor-32 und für 1x 30 sec je Probe.

2.2.4.1.2 Autoradiographie

Im Anschluss an eine PAGE wurden radioaktiv markierte Nukleinsäuren oder Proteine durch Autoradiographie detektiert. Dazu wurde ein Röntgenfilm (Kodak Biomax MR oder Kodak X-OMAT AR, Roth, Karlsruhe) in einer Röntgenkassette auf das Polyacrylamidgel gelegt und belichtet. Die Belichtung erfolgte für mehrere Stunden bei -80°C. Die belichteten Filme wurden in der automatischen Entwicklungsanlage Konica SRX-101A (Konica, Hohenbrunn) entwickelt.

2.2.5 DNA-Reparatur-Ansätze

2.2.5.1 Bestimmung der PARP-Aktivität

Um die enzymatische Aktivität von PARP-1 zu bestimmen, wurden PARP-1-Reaktionsansätze mit Einzelstrangbrüche enthaltender DNA (Oligonukleotid „Nick-1“) und [α -P³²]-NAD⁺ inkubiert. Die Proteine wurden mit TCA gefällt und die Proteinmodifizierung mit PAR anschließend durch Cerenkov-Messung quantifiziert. Die Ansätze enthielten die in Tabelle 2.10 angegebenen Komponenten. Die Proteinkonzentrationen sind im Ergebnisteil angegeben. Alle Ansätze wurden unabhängig von der Proteinkombination auf 32% (v/v) Proteinpuffer eingestellt. Die Proteine wurden 10 min bei 30°C mit oder ohne ATP vorinkubiert, bevor die Poly(ADP-Ribosyl)ierungs-Reaktion mit DNA und NAD⁺ gestartet wurde.

| Komponente | Volumen | Menge | Konzentration |
|---|--------------|----------|---------------|
| PARP-1 | 3 μ l | variabel | variabel |
| BER-Proteine | 0–13 μ l | variabel | variabel |
| Proteinpuffer (2.1.7) | 13 μ l | - | 32% (v/v) |
| 10x Reaktionspuffer (2.1.7) | 4 μ l | - | 1x |
| +/- 15 mM ATP (2.1.8) | 3 μ l | 45 nmol | 1,125 mM |
| Start: 5 μ M Oligo „Nick-1“ (2.1.4.4) | 1 μ l | 5 pmol | 125 nM |
| 6 mM dNTPs (2.1.1) | 1 μ l | 6 nmol | 150 μ M |
| 30 μ M NAD ⁺ (2.1.8) | 1 μ l | 30 pmol | 750 nM |
| [α -P ³²]-NAD ⁺ 1:30 (2.1.8) | 1 μ l | 0,3 pmol | 7,5 nM |
| Ansatzvolumen: 40 μ l | | | |

Tabelle 2.10: Bestimmung der PARP-Aktivität

Nach dem Start lief die Reaktion für 20 min bei 30°C ab. Um Proteine und PAR zu fällen, wurden die Ansätze mit 40 μ l 40% (w/v) TCA versetzt und für mindestens 20 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die gesamte Radioaktivität in den Ansätzen durch Cerenkov-Messung quantifiziert (2.2.4.1.1). Die Ansätze wurden 30 min bei 15.000x g zentrifugiert und die Pellets wurden mit 100 μ l 5% (w/v) TCA gewaschen. Die Ansätze wurden erneut zentrifugiert und die Pellets wurden mit 100 μ l 70% (w/v) Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde die verbliebene Radioaktivität der Pellets durch Cerenkov-Messung quantifiziert. Aus dem Verhältnis von Restradioaktivität der Pellets und Gesamtradioaktivität der Ansätze ergab sich der prozentuale Einbau von NAD⁺ in PAR-Ketten.

2.2.5.2 Bestimmung der Aktivität von APE 1

Um die endonukleolytische Aktivität von APE 1 nachzuweisen, wurde ein radioaktiv markiertes Oligonukleotid verwendet, das eine AP-Stelle enthielt. Dazu wurde das Oligonukleotid „U-16“ (2.1.4.4) am 5'-Ende radioaktiv markiert (2.2.1.6.2). Nach der Säulenreinigung wurde durch Behandlung mit UDG eine AP-Stelle erzeugt (2.2.1.6.2). Der Ansatz wurde mit Ethanol gefällt und im gleichen Volumen H₂O resuspendiert. Das Produkt, [5'-P³²]-„AP-16“, wurde wie unten angegeben in APE 1-Aktivitätsansätzen verwendet.

Die Reaktionsansätze enthielten:

- 12,5 pmol APE 1 (200 nM)
- 25% (v/v) Proteinpuffer (2.1.7)
- 1x Reaktionspuffer (2.1.7)
- 30 pmol [5'-P³²]-„AP-16“ (500 nM)
- 30 pmol „G-16“ (500 nM)
- ad 60 µl H₂O

In Klammern stehen die Endkonzentrationen der Komponenten. Die Reaktion lief für 10 min bei 30°C ab. Danach wurde die DNA mit Ethanol gefällt (2.2.1.1.3). Nach dem Trocknen wurden die Pellets in 10 µl TBE-Probenpuffer (2.1.7) aufgenommen, für 10 min auf 90°C erhitzt und einer denaturierenden PAGE unterzogen (2.2.1.2.3). Die radioaktiv markierten Oligonukleotide wurden durch Autoradiographie (2.2.4.1.2) detektiert.

2.2.5.3 Bestimmung der Aktivität von Lig III

2.2.5.3.1 Adenylierungsaktivität von Lig III

Um die Adenylierungsaktivität von Lig III nachzuweisen, wurde das Protein mit [α-P³²]-ATP (2.1.8) inkubiert.

Die Reaktionsansätze enthielten:

- 50 pmol Lig III (2,5 µM)
- 50% (v/v) Proteinpuffer
- 1x Reaktionspuffer
- 6 pmol [α-P³²]-ATP (300 nM)
- ad 20 µl H₂O

In Klammern stehen die Endkonzentrationen der Komponenten. Die Reaktion verlief für 10 min bei 30°C und wurde durch Zugabe von 20% (v/v) SDS-Probenpuffer (2.1.7) abgestoppt. Die Ansätze wurden für 10 min auf 85°C erhitzt und anschließend durch SDS-PAGE (2.2.3.6.1) in einem 8%igen Gel aufgetrennt. Adenylierte Lig III wurde durch Autoradiographie (2.2.4.1.2) detektiert.

2.2.5.3.2 Ligationsaktivität von Lig III

Um die Ligationsaktivität von Lig III zu detektieren, wurde das Oligonukleotid „AP-16“ wie unter 2.2.1.6.4 beschrieben verwendet, um ein markiertes Ligasesubstrat zu erzeugen. In Klammern stehen die Endkonzentrationen im Ansatz. Die eingesetzten Mengen an Lig III sind im Ergebnisteil angegeben.

Die Reaktionsansätze enthielten:

- var. Mengen Lig III
- var. Mengen XRCC1
- 37% (v/v) Proteinpuffer (2.1.7)
- 1x Reaktionspuffer (2.1.7)
- 30 nmol ATP (0,75 mM, 2.1.8))
- 3 pmol Ligasesubstrat (80 nM)
- ad 40 μ l H₂O

In Klammern stehen die Endkonzentrationen der Komponenten. Die Reaktion verlief für 10 min bei 30°C. Danach wurde die DNA mit Ethanol gefällt (2.2.1.1.3). Nach dem Trocknen wurden die Pellets in 10 μ l TBE-Probenpuffer (2.1.7) aufgenommen, für 10 min auf 90°C erhitzt und einer denaturierenden PAGE unterzogen (2.2.1.2.3). Die radioaktiv markierten Oligonukleotide wurden durch Autoradiographie (2.2.4.1.2) detektiert. Das markierte Produkt der Ligationsreaktion wies eine geringere elektrophoretische Mobilität auf als der markierte Teil des Ligasesubstrates (vgl. 2.2.1.6.4 und Abbildung 2.3).

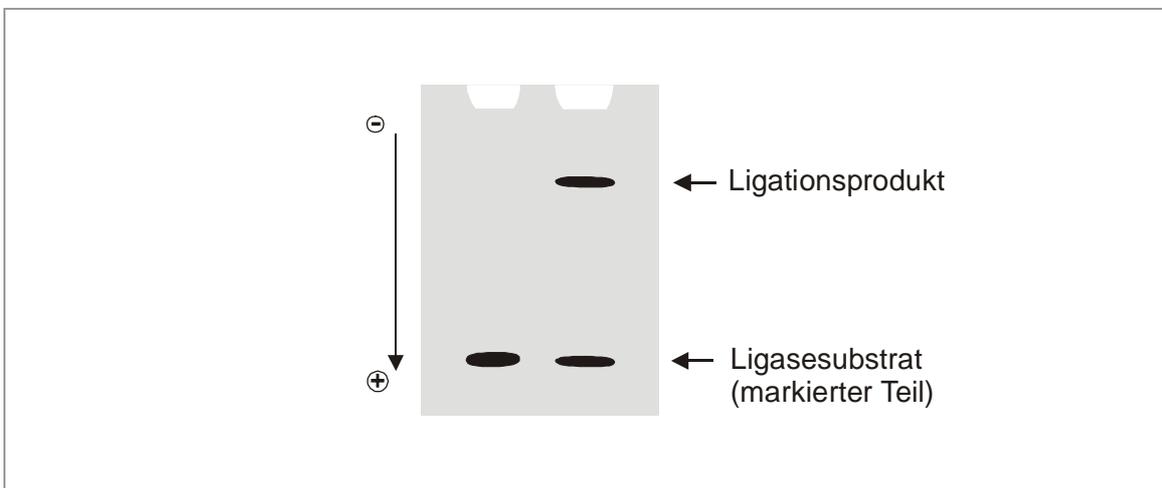


Abbildung 2.3: Analyse der Ligationsaktivität durch denaturierende PAGE. links: Ansatz ohne Ligationsaktivität; rechts: Ansatz mit Ligationsaktivität

2.2.5.3.4 „Electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA)

Der EMSA wurde eingesetzt, um die Bindung von Lig III an genickte DNA zu untersuchen. Hierfür wurde das Oligonukleotid „AP-16“ wie unter 2.2.1.6.4 beschrieben verwendet, um ein markiertes Ligasesubstrat zu erzeugen.

Die Reaktionsansätze enthielten:

- var. Mengen Lig III
- 25% (v/v) Proteinpuffer (2.1.7)
- 1x Reaktionspuffer (2.1.7)
- 10 nmol ATP (2.1.8, 1 mM)
- 160 fmol Ligasesubstrat (16 nM)
- 2,5 pmol „Kompetitor-1“ (250 nM)
- 2,5 pmol „Kompetitor-2“ (250 nM)
- ad 10 μ l H₂O

Um unspezifische DNA-Protein-Wechselwirkungen abzusättigen, wurde ungeschädigte dsDNA, bestehend aus den komplementären Oligonukleotiden „Kompetitor-1“ und „Kompetitor-2“ (2.1.4.4), im Überschuss zugegeben. Die eingesetzten Mengen an Lig III sind im Ergebnisteil angegeben. In Klammern stehen die Endkonzentrationen der Komponenten. Die Ansätze wurden 20 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 2,5 μ l TBE-Probenpuffer nativ (2.1.7) versetzt. Die Proben wurden durch native PAGE in einem Gel aus 5% (w/v) Polyacrylamid in TBE-Puffer (2.1.7) aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 150 V in TBE-Puffer. Das Gel wurde anschließend auf eine Plastikfolie übertragen und in einem Plastikbeutel verstaut. Die radioaktiv markierten Oligonukleotide wurden durch Autoradiographie (2.2.4.1.2) detektiert.

2.2.5.4 Rekonstruierte DNA-Reparaturansätze mit rekombinanten Proteinen

2.2.5.4.1 DNA-Reparaturansätze mit Nick- oder Gap-Substraten

Für diese Variante von DNA-Reparaturansätzen wurden Oligonukleotide verwendet, die selbstkomplementär waren und durch Anlagerung untereinander dsDNA mit einem künstlichen „nick“ oder „gap“ bildeten (2.1.4.4, Abbildung 2.4). Soweit nicht anders angegeben, wurden diese Oligonukleotide wie unter 2.2.1.6.1 beschrieben am 5'-Ende phosphoryliert, um die Ligation zu ermöglichen.

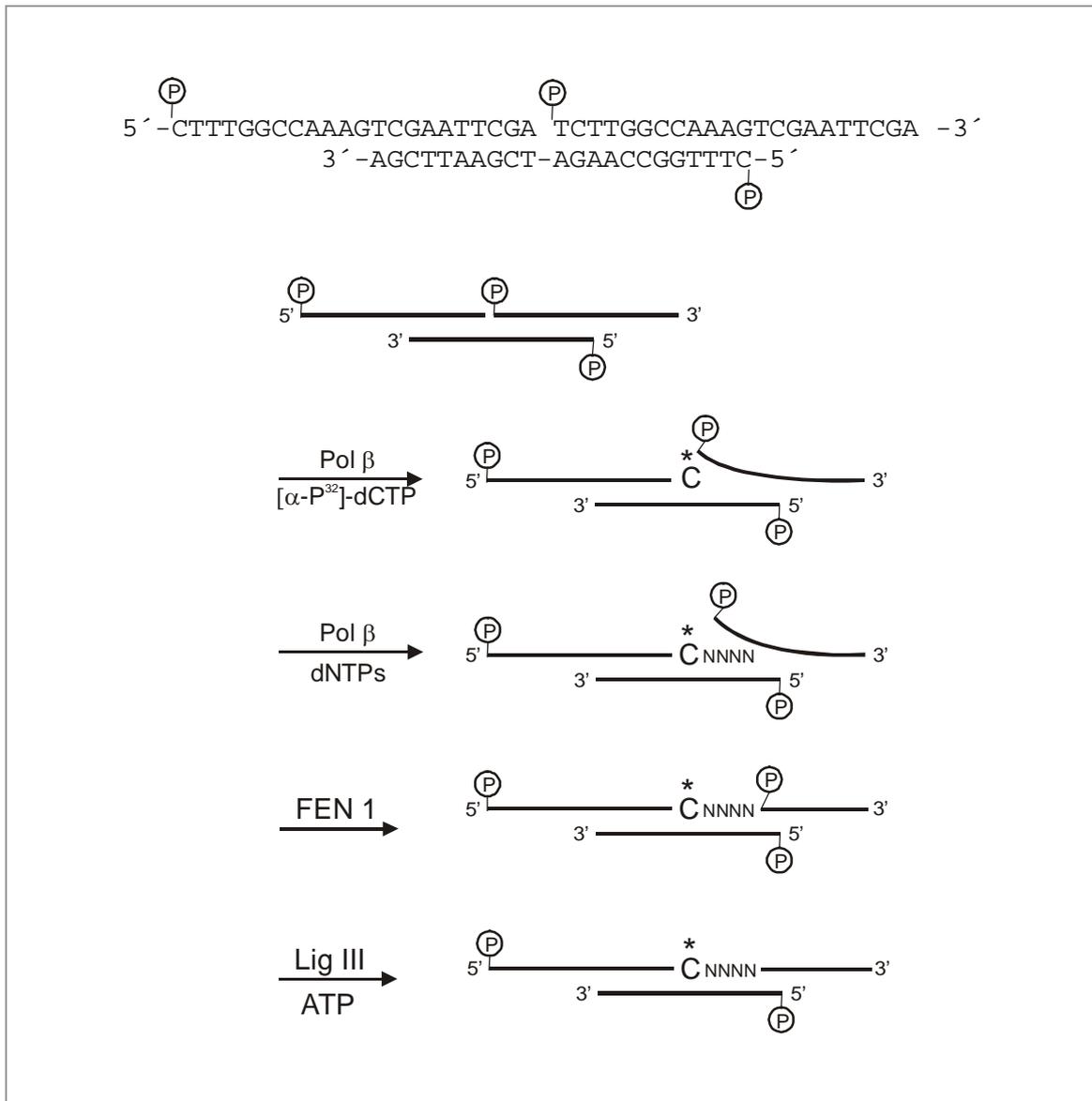


Abbildung 2.4: Reparatur von künstlichen Nick- oder Gap-Substraten. „long patch“-Mechanismus an einem Nick-Substrat („Nick-2“, 2.1.4.4). [*] bezeichnet die radioaktive Markierung

Alle Ansätze wurden unabhängig von der Proteinkombination auf 25% (v/v) Puffer eingestellt. Die Proteine wurden 10 min bei 30°C mit oder ohne ATP vorinkubiert, bevor die eigentliche Reaktion mit DNA und Nucleotiden gestartet wurde. Die Proteinkonzentrationen

sind im Ergebnisteil angegeben. Nach dem Start lief die Reaktion für 30 min bei 30°C ab. Danach wurde die DNA mit Ethanol gefällt (2.2.1.1.3). Nach dem Trocknen wurden die Pellets in 20 µl TBE-Probenpuffer (2.1.7) aufgenommen und für 10 min auf 90°C erhitzt. 10 µl-Aliquots wurden einer denaturierenden PAGE unterzogen (2.2.1.2.3). Die radioaktiv markierten Oligonukleotide wurden durch Autoradiographie (2.2.4.1.2) detektiert.

| Komponente | Volumen | Menge | Konzentration |
|--|---------|----------|---------------|
| BER-Proteine | 0–13 µl | variabel | variabel |
| Proteinpuffer (2.1.7) | 14 µl | - | 25% (v/v) |
| 10x Reaktionspuffer (2.1.7) | 6 µl | - | 1x |
| +/- 15 mM ATP (2.1.8) | 4 µl | 45 nmol | 1 mM |
| Start: 5 µM Oligonukleotid | 1 µl | 5 pmol | 80 nM |
| 6 mM dNTPs (2.1.1) <u>ohne</u> dCTP | 1 µl | 6 nmol | 100 µM |
| [α-P ³²]-dCTP 1:10 (2.1.8) | 1 µl | 0,3 pmol | 5 nM |
| Ansatzvolumen: 60 µl | | | |

Tabelle 2.11: DNA-Reparaturansätze mit Nick- oder Gap-Substraten

2.2.5.4.2 DNA-Reparaturansätze mit AP-Substraten

Für diese Variante von DNA-Reparaturansätzen wurde das Oligonukleotid „AP16“ (2.2.1.6.3) verwendet.

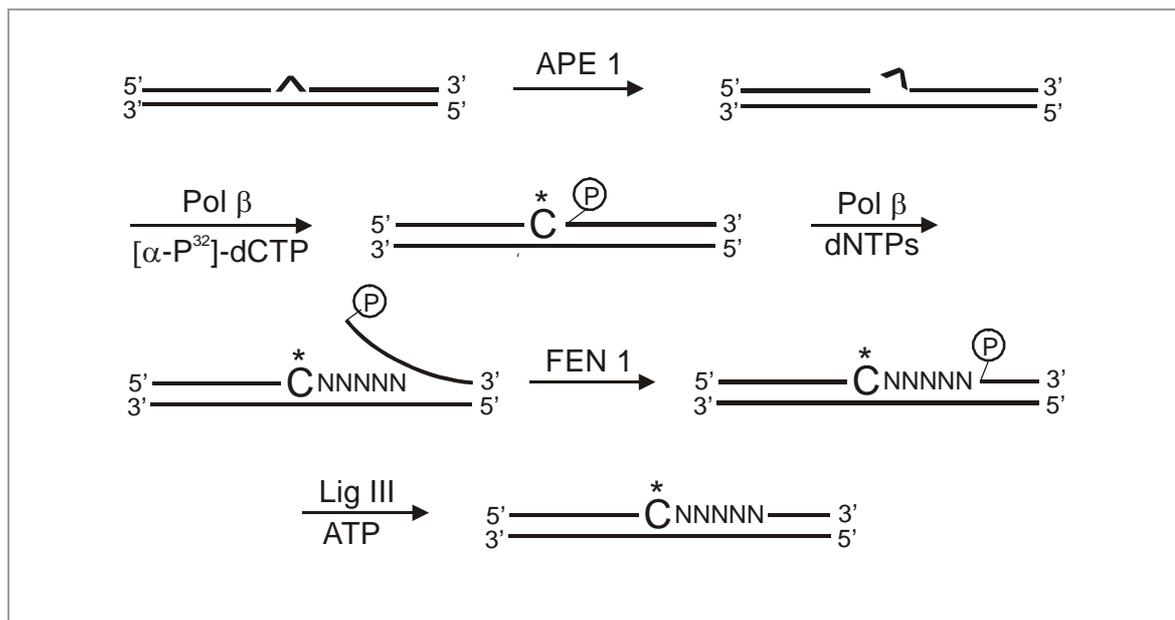


Abbildung 2.5: Prinzip der Reparatur von AP-Substraten. Dargestellt ist der „long patch BER“-Mechanismus. [^] bezeichnet die AP-Stelle. [*] bezeichnet die radioaktive Markierung.

„AP-16“ bildete mit dem komplementären Oligonukleotid „G16“ (2.1.4.4) doppelsträngige DNA, die eine apyrimidine Stelle enthielt (Abbildung 2.5). APE 1, Pol β und FEN 1 wurden in Proteinpuffer (2.1.7) verdünnt und, soweit im Ergebnisteil nicht anders angegeben, in den genannten Konzentrationen eingesetzt. Die eingesetzten Mengen an Lig III und XRCC1 wurden variiert und sind im Ergebnisteil angegeben.

| Komponente | Volumen | Menge | Konzentration |
|---|--------------|----------|---------------|
| APE 1 | 1,5 μ l | 3 pmol | 50 nM |
| Pol β | 1,5 μ l | 1,5 pmol | 25 nM |
| Lig III | 0–15 μ l | variabel | variabel |
| XRCC1 | 0–15 μ l | variabel | variabel |
| +/- FEN 1 | 1,5 μ l | 15 pmol | 250 nM |
| Proteinpuffer (2.1.7) | 21 μ l | - | 35% (v/v) |
| 10x Reaktionspuffer (2.1.7) | 6 μ l | - | 1x |
| +/- 15 mM ATP (2.1.8) | 4 μ l | 60 nmol | 1 mM |
| Start: 10 μ M „AP-16“ | 0,5 μ l | 5 pmol | 80 nM |
| 10 μ M „G-16“ | 0,5 μ l | 5 pmol | 80 nM |
| 12 mM dNTPs (2.1.1) <u>ohne</u> dCTP | 0,5 μ l | 6 nmol | 100 μ M |
| [α -P ³²]-dCTP 1:10 (2.1.8) | 1 μ l | 0,3 pmol | 5 nM |
| Ansatzvolumen: 60 μ l | | | |

Tabelle 2.12: DNA-Reparaturansätze mit AP-Substraten

Alle Ansätze wurden unabhängig von der Proteinkombination auf 35% (v/v) Proteinpuffer eingestellt. Die Proteine wurden 10 min bei 30°C mit oder ohne ATP vorinkubiert, bevor die eigentliche Reaktion mit DNA und Nukleotiden gestartet wurde. Nach dem Start lief die Reaktion für 30 min bei 30°C ab. Danach wurde die DNA mit Ethanol gefällt (2.2.1.1.3). Nach dem Trocknen wurden die Pellets in 20 μ l TBE-Probenpuffer (2.1.7) aufgenommen und für 10 min auf 90°C erhitzt. 10 μ l-Aliquots wurden einer denaturierenden PAGE unterzogen (2.2.1.2.3). Die radioaktiv markierten Oligonukleotide wurden durch Autoradiographie (2.2.4.1.2) detektiert.

2.2.5.5 DNA-Reparaturansätze mit Kernextrakten

Die Reparaturreaktionen mit Kernextrakten wurden in Anwesenheit von 10 μ g/ml des DNA-Polymerase-Inhibitors Aphidicolin (2.1.8) durchgeführt, um spezifisch Pol β -Aktivität zu detektieren. Die Kernextrakte wurden 10 min bei 30°C mit oder ohne NAD⁺ und ATP vorinkubiert, bevor die eigentliche Reaktion mit DNA und Nukleotiden gestartet wurde. Für

Reparaturreaktionen mit Kernextrakten wurden nur durch terminale Phosphothioat-Bindungen geschützte Oligonukleotide verwendet (2.1.4.4). Durch Start mit [α -P³²]-dCTP und dGTP wurde nur „short patch BER“ ermöglicht. Um „long patch BER“ zu ermöglichen, wurde mit [α -P³²]-dCTP, dATP, dGTP und dTTP gestartet.

| Komponente | Volumen | Menge | Konzentration |
|--|-------------|-------------|---------------|
| Kernextrakt | 1 μ l | 3,5 μ g | 60 μ g/ml |
| Proteinpuffer (2.1.7) | 9 μ l | - | 15% (v/v) |
| 10x Reaktionspuffer (2.1.7) | 6 μ l | - | 1x |
| 5 M NaCl | 1,2 μ l | 350 μ g | 100 mM |
| (+)-Aphidicolin (2.1.8) | 6 μ l | 600 ng | 10 μ g/ml |
| +/- 15 mM ATP (2.1.8) | 4 μ l | 60 nmol | 1 mM |
| +/- 30 mM NAD ⁺ (2.1.8) | 1 μ l | 30 nmol | 0,5 mM |
| Start: 10 μ M „AP-16-PT“ | 1 μ l | 10 pmol | 160 nM |
| 10 μ M „G-16-PT“ | 1 μ l | 10 pmol | 160 nM |
| +/-12 mM dGTP (2.1.1) | 1 μ l | 12 nmol | 200 μ M |
| +/-12 mM dNTPs (2.1.1) <u>ohne</u> dCTP | 1 μ l | 12 nmol | 200 μ M |
| [α -P ³²]-dCTP 1:5 (2.1.8) | 1 μ l | 0,6 pmol | 10 nM |
| Ansatzvolumen: 60 μ l | | | |

Tabelle 2.13: DNA-Reparaturansätze mit Kernextrakten

Die Reaktion lief nach dem Start für 30 min bei 30°C ab und wurde dann durch Zugabe von 100 μ l Stopplösung (2.1.7) beendet. Die Proteine wurden mit 150 μ l Phenol/Chloroform extrahiert. Danach wurde die DNA mit Ethanol gefällt (2.2.1.1.3). Nach dem Trocknen wurden die Pellets in 10 μ l TBE-Probenpuffer (2.1.7) aufgenommen, für 10 min auf 90°C erhitzt und einer denaturierenden PAGE unterzogen (2.2.1.2.3). Die radioaktiv markierten Oligonukleotide wurden durch Autoradiographie (2.2.4.1.2) detektiert.