



Erster Gutachter: Priv. Doz. Dr. Shiao Li Oei

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Ferdinand Hucho

Tag der Disputation: 10. 03. 2004

# Inhalt

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 DIE DNA-REPARATURMECHANISMEN BER UND SSBR .....	3
1.1.1 Überblick über die DNA-Reparatur .....	3
1.1.2 „Base excision repair“ (BER) .....	4
1.1.3 „Single strand break repair“ (SSBR) .....	7
1.2 PARP-1 UND DNA-REPARATUR .....	8
1.2.1 Poly(ADP-Ribosyl)ierung.....	8
1.2.2 PARP-1 und BER/SSBR .....	11
1.3 DIE REPARATURPROTEINE DES BER/SSBR-KOMPLEXES .....	14
1.3.1 DNA-Glykosylasen .....	14
1.3.2 AP-Endonuklease 1.....	15
1.3.3 DNA-Polymerase $\beta$ .....	16
1.3.4 Flap-Endonuklease 1.....	17
1.3.5 DNA-Ligase III .....	18
1.3.6 XRCC1 .....	20
1.4 „SHORT PATCH BER“ UND „LONG PATCH BER“ .....	23
1.5 ZIELSETZUNG.....	25
<b>2. MATERIALIEN UND METHODEN.....</b>	<b>26</b>
2.1 MATERIALIEN .....	26
2.1.1 Molekularbiologische Enzyme und Reagenzien .....	26
2.1.2 Zelllinien .....	26
2.1.2.1 Bakterienstämme .....	26
2.1.2.2 Humane Zelllinien .....	26
2.1.3 Plasmide.....	27
2.1.4 Oligonukleotide.....	27
2.1.4.1 PCR-Primer .....	27
2.1.4.2 Sequenzierprimer .....	28
2.1.4.3 Vorwärtsprimer für die gerichtete Mutagenese .....	28
2.1.4.4 Oligonukleotide für DNA-Reparaturansätze.....	28
2.1.5 Nährmedien, Antibiotika und Medienzusätze .....	29
2.1.6 Antikörper und Proteine.....	29
2.1.7 Puffer und Lösungen .....	30
2.1.8 Nukleotide, Säulenmaterialien und Chemikalien .....	31
2.2 METHODEN .....	33
2.2.1 Molekularbiologische Methoden .....	33
2.2.1.1 Isolierung und Reinigung von DNA.....	33
2.2.1.1.1 Plasmidpräparation .....	33
2.2.1.1.2 Reinigung von Oligonukleotiden über Sephadex-G50 .....	33
2.2.1.1.3 Ethanol-Fällung von DNA.....	33
2.2.1.2 Analyse von DNA.....	33
2.2.1.2.1 Konzentrationsbestimmung von DNA .....	33
2.2.1.2.2 Agarosegelelektrophorese .....	33
2.2.1.2.3 Denaturierende PAGE .....	34
2.2.1.2.4 Analytischer Restriktionsverdau .....	34
2.2.1.2.5 DNA-Sequenzierung .....	34
2.2.1.3 Umklonierung von Pol $\beta$ , FEN 1 und Lig III .....	35
2.2.1.3.1 PCR .....	35
2.2.1.3.2 Klonierung in den TOPO-Vektor (TOPO-Klonierung).....	36
2.2.1.3.3 Präparativer Restriktionsverdau .....	36
2.2.1.3.4 DNA-Ligation.....	37
2.2.1.4 Transformation von DNA in Bakterienzellen .....	37
2.2.1.4.1 Herstellung chemokompetenter Bakterienzellen.....	37
2.2.1.4.2 Transformation durch Hitzeschock.....	37

2.2.1.5 Gerichtete Mutagenese .....	37
2.2.1.6 Modifizierung von DNA .....	38
2.2.1.6.1 Phosphorylierung des 5'-Endes von Oligonukleotiden .....	38
2.2.1.6.2 Radioaktive Markierung des 5'-Endes von Oligonukleotiden .....	39
2.2.1.6.3 Erzeugung von AP-Substraten mit Uracil-DNA-Glykosylase .....	39
2.2.1.6.4 Erzeugung von [ $\alpha$ -P <sup>32</sup> ]-dCTP-markierten Ligasesubstraten .....	40
2.2.2 Zellbiologische Methoden .....	41
2.2.2.1 Zellkultur .....	41
2.2.2.2 Behandlung von Zellen mit Desoxyglucose .....	41
2.2.2.3 Präparation von Kernextrakten .....	41
2.2.3 Proteinchemische Methoden .....	43
2.2.3.1 Proteinexpression .....	43
2.2.3.2 Zellaufschluss .....	43
2.2.3.2.1 Analytischer Zellaufschluss .....	43
2.2.3.2.2 Zellaufschluss mit der French Press .....	44
2.2.3.3 Gewinnung von Lig III aus „inclusion bodies“ .....	44
2.2.3.3.1 Präparation von „inclusion bodies“ .....	44
2.2.3.3.2 Renaturierung von „inclusion bodies“ .....	44
2.2.3.4 Proteinreinigung .....	45
2.2.3.4.1 Proteinreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie .....	45
2.2.3.4.2 Reinigung von rekombinanter PARP-1 .....	46
2.2.3.4.3 Reinigung von Antikörpern .....	47
2.2.3.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	48
2.2.3.5.1 Konzentrationsbestimmung mit dem BCA-Assay .....	48
2.2.3.5.2 Konzentrationsbestimmung mit dem Bradford-Assay .....	48
2.2.3.6 Analyse von Proteinen .....	48
2.2.3.6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	48
2.2.3.6.2 Western Blot .....	48
2.2.3.6.3 Dot Blot .....	49
2.2.3.6.4 Detektion mittels Alkalischer Phosphatase-Aktivität .....	49
2.2.3.6.5 Detektion mittels HRP-Aktivität .....	49
2.2.4 Radiochemische Methoden .....	50
2.2.4.1 Nachweis von radioaktiver Markierung .....	50
2.2.4.1.1 Cerenkov-Messung .....	50
2.2.4.1.2 Autoradiographie .....	50
2.2.5 DNA-Reparatur-Ansätze .....	51
2.2.5.1 Bestimmung der PARP-Aktivität .....	51
2.2.5.2 Bestimmung der Aktivität von APE 1 .....	52
2.2.5.3 Bestimmung der Aktivität von Lig III .....	52
2.2.5.3.1 Adenylierungsaktivität von Lig III .....	52
2.2.5.3.2 Ligationsaktivität von Lig III .....	53
2.2.5.3.4 „Electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA) .....	53
2.2.5.4 Rekonstruierte DNA-Reparaturansätze mit rekombinanten Proteinen .....	55
2.2.5.4.1 DNA-Reparaturansätze mit Nick- oder Gap-Substraten .....	55
2.2.5.4.2 DNA-Reparaturansätze mit AP-Substraten .....	56
2.2.5.5 DNA-Reparaturansätze mit Kernextrakten .....	57
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>59</b>
3.1 REKOMBINANTE ÜBEREXPRESSION VON PROTEINEN DES BER-KOMPLEXES .....	59
3.1.1 Expression und Reinigung von PARP-1 .....	59
3.1.2 Expression und Reinigung von APE 1 und XRCC1 .....	60
3.1.3 Umklonierung, Expression und Reinigung von Pol $\beta$ und FEN 1 .....	60
3.1.4 Expression, Rückfaltung und Reinigung von Lig III .....	61
3.2 EINFLUSS VON ATP AUF PARP-1 .....	63
3.2.1 Einfluss des zellulären ATP-Gehalts auf PARP-1 und Lig III .....	63
3.2.2 Einfluss von ATP auf PARP-1 im rekonstruierten BER-Komplex .....	64
3.3 POL $\beta$ IM REKONSTRUIERTEN BER-KOMPLEX .....	66
3.3.1 SDDS am AP-Substrat .....	66

3.3.2 SDDS am Nick-Substrat.....	69
3.4 XRCC1 IM REKONSTRUIERTEN BER-KOMPLEX .....	72
3.4.1 Einfluss von XRCC1 auf die Aktivität von Pol $\beta$ .....	72
3.4.2 Einfluss von XRCC1 auf die Aktivität von Lig III .....	74
3.5 EINFLUSS VON ATP AUF DAS VERHÄLTNIS VON „LONG PATCH BER“ ZU „SHORT PATCH BER“ .....	75
3.6 EINFLUSS VON SDDS AUF DIE PAR-VERMITTELTE DNA-LIGATION IM KERNEXTRAKT .....	77
3.7 DER EINFLUSS DER AKTIVITÄT VON LIG III AUF DEN BER-MECHANISMUS .....	79
3.7.1 Einfluss der Adenylierung auf den BER-Mechanismus .....	79
3.7.1.1 Mutagenese von Lysin 421 zu Valin .....	79
3.7.1.2 Einfluss der Adenylierung auf den BER-Mechanismus.....	81
3.7.2 Einfluss der Ligationsaktivität auf den BER-Mechanismus.....	83
3.7.2.1 Mutagenese von Aspartat 423 zu Asparagin .....	83
3.7.2.2 Mutagenese von Aspartat 423 zu Alanin .....	84
3.7.2.3 Einfluss der Ligationsaktivität auf den BER-Mechanismus .....	85
3.7.2.4 Einfluss der Mutationen und der Adenylierung auf die Substratbindung von Lig III.....	87
<b>4. DISKUSSION UND AUSBLICK.....</b>	<b>89</b>
4.1 DIE ATP-ABHÄNGIGE REGULATION DES BER-MECHANISMUS .....	89
4.1.1 Die Entscheidung zwischen „short patch BER“ und „long patch BER“ .....	89
4.1.2 Die Bedeutung der Proteine des BER-Komplexes für die Regulation .....	91
4.2 DIE ROLLE DER KATALYTISCHEN AKTIVITÄT VON LIG III .....	93
4.2.1 Die Regulation des BER-Mechanismus durch Lig III.....	93
4.2.2 Rolle des katalytischen Zentrums von Lig III bei der DNA-Bindung.....	94
4.3 DIE KOORDINIERENDE ROLLE VON XRCC1 .....	97
4.3.1 Stimulierung der Pol $\beta$ -Aktivität.....	97
4.3.2 Koordination der Aktivitäten von Pol $\beta$ und Lig III .....	98
4.4 PARP-1-AKTIVITÄT UND ATP .....	101
4.4.1 Poly(ADP-Ribosyl)ierung, BER und Energiesituation .....	101
4.4.2 Beziehung zwischen ATP und der Aktivität von PARP-1.....	102
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>103</b>
<b>6. ABSTRACT.....</b>	<b>104</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>105</b>
<b>8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>116</b>
<b>9. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>118</b>
<b>10. ANHANG: EXPRESSIONSKONSTRUKTE .....</b>	<b>120</b>
<b>11. LEBENS LAUF.....</b>	<b>122</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>123</b>

## 5. Zusammenfassung

Die DNA-Reparatur durch „base excision repair“ (BER) schützt die Zelle vor allgegenwärtigen DNA-Schäden. Dabei werden beschädigte DNA-Basen durch neu synthetisierte DNA ersetzt. Es existieren zwei Teilmechanismen von BER, die sich in der DNA-Synthese unterscheiden. Bei „short patch BER“ baut DNA-Polymerase  $\beta$  (Pol  $\beta$ ) nur ein Nukleotid ein. Bei „long patch BER“ synthetisiert Pol  $\beta$  einen längeren DNA-Strang. DNA-Ligase III (Lig III) verschließt den verbleibenden DNA-Einzelstrangbruch in einer ATP-abhängigen Reaktion. Die Regulation des Wechsels zwischen den beiden BER-Mechanismen war noch weitgehend ungeklärt. Das Enzym Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) und das Protein „x-ray repair cross-complementing 1“ (XRCC1) sind ebenfalls an BER beteiligt, ihre Funktionen bei diesem Prozess sind jedoch nur unzureichend erforscht. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde beobachtet, dass zellulärer ATP-Mangel mit erhöhten Aktivitäten von PARP-1 und Pol  $\beta$  einhergeht. Dies wies erstmals auf eine energieabhängige Regulation des BER-Mechanismus hin.

Die vorliegende Arbeit befasst sich daher mit dem Einfluss der Energiesituation auf den BER-Mechanismus. Die Proteine des BER-Komplexes wurden rekombinant überexprimiert und isoliert (Pol  $\beta$ , Lig III, XRCC1, PARP-1; zusätzlich AP-Endonuklease 1 und Flap-Endonuklease 1). Die DNA-Reparatur durch BER wurde mit diesen Proteinen *in vitro* rekonstruiert. Der Einfluss von ATP auf die Aktivitäten von PARP-1 und Pol  $\beta$  sowie auf den BER-Mechanismus wurde analysiert. Dabei wurde speziell die Bedeutung von Lig III und XRCC1 für die Regulation des BER-Mechanismus untersucht. Um die Rolle der Lig III-Aktivität zu analysieren, wurden durch gerichtete Mutagenese zwei katalytisch inaktive Mutanten von Lig III erzeugt. Anhand von menschlichen Zellkernextrakten wurde die Bedeutung von „long patch BER“ bei Energiemangel untersucht.

Auf diese Weise konnte eine neuartige, energieabhängige Regulation von BER nachgewiesen werden. Bei Verfügbarkeit von ATP überwiegt Reparatur durch „short patch BER“, bei ATP-Mangel erfolgt dagegen verstärkt „long patch BER“. Bei Energiemangel begünstigt „long patch BER“ die DNA-Ligation. ATP hemmt sowohl die PARP-1-Aktivität als auch die DNA-Synthese durch Pol  $\beta$ . Die ATP-abhängige Hemmung von Pol  $\beta$  wird durch die katalytische Aktivität von Lig III vermittelt, die ATP benötigt. Zudem zeigte die gerichtete Mutagenese von Lig III erstmals eine Rolle von Lysin 421 und Aspartat 423 bei der DNA-Bindung dieses Enzyms. XRCC1 stimuliert die „strand displacement“-DNA-Synthese durch Pol  $\beta$  und koordiniert die Aktivitäten von Pol  $\beta$  und Lig III. Aufgrund dieser Koordinationsfunktion stimuliert XRCC1 „short patch BER“ bei Verfügbarkeit von ATP und „long patch BER“ bei ATP-Mangel.

Die hier präsentierten Ergebnisse stellen einen bedeutenden Fortschritt für das Verständnis der Regulation des BER-Mechanismus und der Funktionen der beteiligten Proteine dar.

## 6. Abstract

DNA repair by base excision repair (BER) protects cells from regularly occurring DNA damage. This mechanism replaces damaged DNA bases with newly synthesized DNA. Two sub-pathways of BER are known which differ in the DNA synthesis step. During short patch BER, DNA polymerase  $\beta$  (Pol  $\beta$ ) incorporates only one nucleotide. During long patch BER, Pol  $\beta$  synthesizes a longer DNA strand. The remaining DNA single strand break is sealed by DNA ligase III (Lig III) in an ATP-dependent reaction. The regulation of the switch between the two BER mechanisms was largely unexplored. The enzyme poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) and the protein x-ray repair cross-complementing 1 (XRCC1) also participate in BER. Their functions in this process still deserve study. Prior to this study it was observed that cellular ATP depletion is accompanied by increased activities of PARP-1 and Pol  $\beta$ . This indicated an energy-dependent regulation of the BER mechanism for the first time.

This study deals with the influence of the energy situation on the BER mechanism. Recombinant proteins of the BER complex were overexpressed and isolated (Pol  $\beta$ , Lig III, XRCC1, PARP-1; additionally AP endonuclease 1 and flap endonuclease 1). Using these proteins, repair of DNA by BER was reconstituted *in vitro*. Thereby the influence of ATP on the activities of PARP-1 and Pol  $\beta$  and on the BER mechanism was analyzed. The respective impacts of Lig III and XRCC1 on the regulation of BER were investigated. In order to clearly analyze the influence of the Lig III activity, two inactive mutants of Lig III were generated by site directed mutagenesis. Using nuclear extracts of human cells, the relevance of long patch BER in situations of energy depletion was investigated.

Thus a novel energy-dependent regulation of BER could be demonstrated. If ATP is available, repair through short patch BER predominates. If ATP is lacking, repair through long patch BER is increased. Long patch BER facilitates DNA ligation in situations of energy depletion. ATP inhibits the activity of PARP-1 as well as DNA synthesis by Pol  $\beta$ . The ATP-dependent inhibition of Pol  $\beta$  is mediated through the catalytic activity of Lig III which depends on ATP. In addition, the site directed mutagenesis of Lig III revealed novel roles for lysine 421 and aspartate 423 in the binding of this enzyme to DNA. XRCC1 stimulates strand displacement DNA synthesis by Pol  $\beta$  and coordinates the activities of Pol  $\beta$  and Lig III. By means of this coordinating function, XRCC1 is able to stimulate short patch BER if ATP is available and long patch BER if ATP is lacking.

The data presented here represent a substantial progress in understanding the regulation of BER and the functions of the participating proteins.

## 11. Lebenslauf

---

Eva Petermann  
\* 24.09.1976 in Frankfurt am Main

### Schulabschluss

---

1996 Abitur am Bettina-Gymnasium in Frankfurt am Main mit der Note 1,6

### Akademischer Werdegang

---

09/ 1998 Vordiplom in Biochemie an der Universität Halle-Wittenberg (Halle/Saale) mit der Note 2,3

11/ 2001 – 06/ 2001 Diplomarbeit am Institut für Biotechnologie der Universität Halle-Wittenberg (Leitung: Prof. Dr. R. Ulbrich-Hofmann)  
Thema: „Gewinnung einer proteolytisch inaktiven Neutralen Protease aus *Bacillus stearothermophilus* durch gerichtete Mutagenese für Studien der Strukturstabilität“

07/ 2001 Diplom in Biochemie an der Universität Halle-Wittenberg mit der Note 1,0

ab 10/ 2001 Dissertation am Institut für Chemie/Biochemie, Fachbereich Chemie/Biologie/Pharmazie der Freien Universität Berlin (Leitung: PD Dr. S. L. Oei)  
Thema: „Ein ATP-abhängiger Regulationsmechanismus in einem Proteinkomplex der DNA-Reparatur“

### Besuchte Konferenzen

---

19.-20. 04. 2002 „Workshop Enzymology of DNA Repair“ des Deutschen DNA-Reparatur-Netzwerks in Göttingen (Vortrag)

17.-20. 09. 2002 7. Symposium des Deutschen DNA-Reparatur-Netzwerks in Karlsruhe (Posterbeitrag)

27.-30. 08. 2003 „FEBS Advanced Course: Poly-ADP-ribosylation in health and disease“ in Debrecen, Ungarn (Posterbeitrag)

### Lehrtätigkeiten

---

10/ 2002 – 11/ 2002 Betreuung eines Fortgeschrittenenpraktikums für Studenten im Biochemie-Hauptstudium

### Förderungen

---

10/ 2001 – 09/ 2003 Förderung der Promotion durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Projekt OE 209/6)

10/ 2003 – 03/ 2004 Promotionsstipendium der Sonnenfeld-Stiftung Berlin (Stiftung des privaten Rechts)