

**Untersuchungen zur Regulation des Zelltodes
durch Wechselwirkungen zwischen Proteinen des
Poly (ADP-Ribose) Metabolismus**

Dissertation

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

Eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dipl. Biol. Claudia Keil

Institut für Chemie-Biochemie

Berlin, 2006

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

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Petra Knaus

Tag der Disputation: 08.12.2006

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Struktur und Eigenschaften von Poly (ADP-Ribose)	3
1.2	Die Synthese von Poly (ADP-Ribose)	3
1.2.1	PARP-1	3
1.2.2	Die PARP-Superfamilie	5
1.3	Mechanismus der Poly (ADP-Ribosyl)ierung	7
1.4	Der Abbau von Poly (ADP-Ribose)	8
1.4.1	Poly (ADP-Ribose) Glycohydrolase	8
1.4.2	Phosphodiesterasen/Pyrophosphatasen	11
1.4.3	(ADP-Ribose)-Protein Lyase	13
1.5	Biologische Bedeutung der Poly (ADP-Ribosyl)ierung	13
1.5.1	Poly (ADP-Ribosyl)ierung und die DNA-Reparatur	15
1.5.1.1	Überblick über die DNA-Reparatur	15
1.5.1.2	Funktion von PARP-1 in BER und SSBR	15
1.5.1.3	XRCC1	18
1.5.2	Regulation des Zelltodes durch Poly (ADP-Ribosyl)ierung	22
1.5.2.1	Apoptose und Nekrose als Formen des Zelltodes	22
1.5.2.2	PARP-1 und die Regulation des Zelltodes	26
1.6	Zielsetzung	29
2	Materialien und Methoden	30
2.1	Materialien	30
2.1.1	Enzyme, Proteine und Reagenzien	30
2.1.2	Nukleotide, Säulenmaterialien und Chemikalien	31
2.1.3	Zellstämme	32
2.1.3.1	Bakterienstämme	32
2.1.3.2	Hefestämme	33
2.1.3.3	Eukaryotische Zelllinien	33
2.1.4	Plasmide	34
2.1.5	Oligonukleotide	34
2.1.5.1	siRNAs	34
2.1.5.2	PCR-Oligonukleotide	35
2.1.5.3	Oligonukleotide für Sequenzierungen	35
2.1.6	Konstrukte	36
2.1.7	Nährmedien, Antibiotika und Medienzusätze	37
2.1.7.1	Nährmedien für <i>E. coli</i>	37
2.1.7.2	Nährmedien für die Zellkultur	38
2.1.7.3	Nährmedien für <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
2.1.8	Antikörper und zellbiologische Markersubstanzen	39
2.1.8.1	Antikörper	39
2.1.8.2	Zellbiologische Markersubstanzen	40
2.2	Molekularbiologische Methoden	41
2.2.1	Isolation von Nukleinsäuren	41
2.2.1.1	Isolation von RNA	41
2.2.1.2	Reverse Transkription	41
2.2.1.3	Reinigung von Plasmid-DNA nach der Boil-Prep-Methode	41
2.2.1.4	Präparative Reinigung von Plasmid-DNA	42
2.2.1.5	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	42
2.2.1.6	Ethanol-Fällung von DNA	42

2.2.2	Analyse von Nukleinsäuren.....	42
2.2.2.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	42
2.2.2.2	Agarosegelelektrophorese	43
2.2.2.3	DNA-Sequenzierung.....	43
2.2.3	Modifikation von Nukleinsäuren.....	43
2.2.3.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	43
2.2.3.2	Klonierung in die Vektoren pCR2.1 TOPO (TOPO-Klonierung)	45
2.2.3.3	Restriktionsverdau von DNA.....	45
2.2.3.4	Dephosphorylierung von DNA	45
2.2.3.5	Ligation	45
2.2.4	Methoden im Umgang mit <i>E. coli</i>	46
2.2.4.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	46
2.2.4.2	Gewinnung von Stammkulturen	46
2.2.4.3	Transformation von DNA in <i>E. coli</i>	46
2.2.5	Methoden im Umgang mit <i>S. cerevisiae</i>	47
2.2.5.1	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	47
2.2.5.2	Gewinnung von Stammkulturen	47
2.2.5.3	Transformation von DNA in <i>S. cerevisiae</i>	47
2.2.6	Zellbiologische Methoden.....	48
2.2.6.1	Generelle Zellkulturmethoden.....	48
2.2.6.2	Gewinnung des Antikörpers Maus-mAb 10H.....	49
2.2.6.3	Transfektion von siRNA´s	49
2.2.6.4	Transfektion von Plasmiden.....	49
2.2.6.5	Protokolle zur Schädigung von eukaryotischen Zellen.....	50
2.2.6.6	Immunfluoreszenz.....	50
2.2.6.7	Nachweis nekrotischer Zellen.....	51
2.2.6.8	Bestimmung der Überlebensrate mittels Trypanblaufärbung	51
2.2.6.9	Alkalischer Comet Assay.....	51
2.2.7	Proteinchemische Methoden.....	53
2.2.7.1	Proteinexpression	53
2.2.7.2	Zellaufschluss.....	54
2.2.7.2.1	Analytischer Zellaufschluss von Bakterienzellen.....	54
2.2.7.2.2	Zellaufschluss mit der French Press	55
2.2.7.3	Fraktionierung von Zellen.....	55
2.2.7.3.1	Präparation von Gesamtzellextrakt	55
2.2.7.3.2	Präparation von Kernextrakten nach Schreiber <i>et al.</i> (1989).....	55
2.2.7.3.3	Präparation von Kernextrakten nach der Methode von Dignam <i>et al.</i> (1983).....	56
2.2.7.4	Reinigung von Proteinen mittels Ni-NTA-Chromatographie	57
2.2.7.4.1	Reinigung von His-PARG ₆₅	57
2.2.7.4.2	Reinigung von His-XRCC1	57
2.2.7.4.3	Reinigung der XRCC1-Deletionsproteine	58
2.2.7.4.4	Reinigung von His-Ligase	58
2.2.7.4.5	Reinigung von PARP-Deletionsproteinen	59
2.2.7.5	Reinigung von PARP-1	60
2.2.7.6	Reinigung von Proteinen mittels GSH-Sepharose	61
2.2.7.7	Reinigung von PARG-Antikörpern.....	61
2.2.7.8	Analytische affinitätschromatographische Methoden.....	62
2.2.7.8.1	Präparation der Tannin-Sepharose.....	62
2.2.7.8.2	Affinitätspräzipitation mit Tannin-Sepharose.....	63
2.2.7.8.3	<i>In vitro</i> Präzipitation mittels GSH-Sepharose.....	63
2.2.7.8.4	<i>In vivo</i> Präzipitation mittels Ni-NTA-Sepharose	63
2.2.7.8.5	Immunpräzipitation.....	64

2.2.7.9	Analyse von Proteinen	65
2.2.7.9.1	Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Assay (Bradford <i>et al.</i> , 1976).....	65
2.2.7.9.2	SDS-PAGE	65
2.2.7.9.3	Western-Blot und Detektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	66
2.2.7.9.4	Dot-Blot	67
2.2.7.9.5	Detektion mittels Alkalischer Phosphatase.....	67
2.2.7.9.6	Detektion mittels Meerrettich-Peroxidase (HRP)	67
2.2.7.10	Radiochemische Methoden	68
2.2.7.10.1	Cerenkov Messung	68
2.2.7.10.2	Autoradiographie	68
2.2.7.10.3	Phosphoimager.....	68
2.2.7.11	Enzymatische Methoden	68
2.2.7.11.1	Synthese von ³² P-markierter Poly (ADP-Ribose).....	68
2.2.7.11.2	Bestimmung der PARG-Aktivität.....	69
2.2.7.11.3	Bestimmung der Poly (ADP-Ribosyl)ierungsaktivität	71
2.2.7.11.4	Kettenlängenanalyse von ³² P-markierten ADP-Ribosepolymeren	72
2.2.7.11.5	<i>In vitro</i> Poly (ADP-Ribosyl)ierung von Proteinen	72
2.2.7.11.6	Bestimmung des zellulären NAD ⁺ und ATP-Gehaltes	73
2.2.7.11.7	Bestimmung der Adenylierungsaktivität von Ligase III.....	74
3	Experimente.....	75
3.1	Klonierung und Expression humaner PARG	75
3.1.1	Klonierung des Gens der humanen Poly (ADP-Ribose) Glycohydrolase	75
3.1.2	Expressions- und Reinigungsversuche der humanen PARG ₁₁₀	77
3.2	Etablierung einer Affinitätsmatrix zur Immobilisierung der PARG	80
3.2.1	Wirkung verschiedener PARG-Inhibitoren in humanen Kernextrakten	80
3.2.2	Regulation des Poly (ADP-Ribose)-Katabolismus durch Gallotannine.....	82
3.2.3	Gallotannine eignen sich nicht als <i>in vivo</i> PARG-Inhibitoren	84
3.2.4	Expression und Reinigung von His-PARG ₆₅	86
3.2.5	Gallotannine hemmen die Aktivität rekombinanter His-PARG ₆₅	87
3.2.6	His-PARG ₆₅ bindet an Tannin-Sepharose	88
3.3	PARG interagiert mit PARP-1 und reguliert die PAR-Synthese	90
3.3.1	Identifizierung von PARP-1 als Interaktionspartner von PARG.....	90
3.3.2	Herstellung eines PARG-Antikörpers	92
3.3.3	PARP-1 und PARG liegen als Komplex in HeLa S3-Kernextrakten vor	93
3.3.4	Direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen PARP-1 und PARG.....	94
3.3.5	PARP-1 interagiert über die Automodifikationsdomäne mit PARG.....	96
3.3.6	PARG als Akzeptor von Poly (ADP-Ribose).....	98
3.3.7	Einfluss von PARG auf den Poly (ADP-Ribose) Metabolismus in humanen Kernextrakten	99
3.4	XRCC1 interagiert mit PARG und reguliert die PAR-Synthese.....	101
3.4.1	Nachweis der direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen PARG und XRCC1 in einem <i>Yeast-Two-Hybrid</i> -Experiment.....	101
3.4.2	Nachweis der direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen PARG und XRCC1 durch GSH-Präzipitation	103
3.4.3	PARG und XRCC1 liegen als Komplex in EM9-XH-Extrakten vor	104
3.4.4	Bedeutung von XRCC1 für die DNA-Reparatur in humanen Zellen.....	106
3.4.5	XRCC1 reguliert die Synthese von Poly (ADP-Ribose).....	108
3.4.6	Expression von XRCC1 beeinflusst nicht die Stabilität und zelluläre Verteilung von PARP-1 und PARG	110
3.4.7	Einfluss von XRCC1 auf die katalytische Aktivität von PARP-1 und PARG	112
3.4.8	Eine Rekrutierung von XRCC1 an den Ort der DNA-Schädigung führt zu einer vermehrten Bildung von Poly (ADP-Ribose).....	114

3.4.9	Ein C-terminales Fragment von XRCC1 induziert die vermehrte Poly (ADP-Ribosyl)ierung	118
3.5	Die XRCC1-abhängige Akkumulation von Poly (ADP-Ribose) induziert eine Caspase-unabhängige Apoptose.....	119
3.5.1	Die XRCC1-abhängige PAR-Akkumulation fördert die Translokation des proapoptotischen Proteins AIF und die Chromatinolyse des Zellkerns	119
3.5.2	Staurosporin induziert XRCC1-unabhängig die Apoptose in EM9-Zellen.....	122
3.5.3	EM9-V- Zellen sterben nekrotisch nach MNNG-Behandlung.....	123
4	Diskussion	126
4.1	Strategien zur rekombinanten Expression und Immobilisierung von PARG ₁₁₀ in <i>E. coli</i>	127
4.2	Regulation des PAR-Metabolismus durch PARG-Inhibitoren.....	130
4.2.1	Funktionalität publizierter PARG-Inhibitoren.....	130
4.2.2	Bedeutung der Gallotannine für die Regulation des zellulären PAR-Metabolismus	134
4.3	PARP-1 und XRCC1: Interaktionspartner der PARG.....	135
4.4	Regulation der PAR-Synthese durch PARG und XRCC1	138
4.5	Die Interaktion von PARP-1, PARG und XRCC1 kontrolliert den MNNG-abhängigen Zelltod	142
4.6	Bedeutung der Poly (ADP-Ribosyl)ierung für pathophysiologische Veränderungen.....	145
5	Ausblick.....	148
6	Zusammenfassung.....	150
7	Summary	152
8	Literaturverzeichnis.....	153
9	Abkürzungsverzeichnis.....	176
10	Anhang	179
10.1	Sequenz der HeLa S3 PARG-cDNA.....	179
10.2	Expressionskonstrukte.....	183
11	Publikationsliste	186
12	Lebenslauf	188
13	Danksagung	190
14	Förderungen	191