

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Alle Materialien, wenn nicht anders unter 2.1.1 und 2.1.2 aufgeführt wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt) bezogen und waren von höchstem Reinheitsgrad.

2.1.1 Enzyme, Proteine und Reagenzien

Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
Aprotonin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ATP-Determination Kit	Molecular Probes, Leiden
BSA	Roth, Karlsruhe
Lachsspermien-DNA	Roth, Karlsruhe
Desoxyribonukleotide (dNTP's)	Gibco, Karlsruhe
DNaseI	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNA-1 kb-Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Expand TM High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim
Fast'n Easy DNA Purification Kit	Tebu-Bio, Offenbach
High Fidelity PCR Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Invisorb Spin Plasmid Mini-Kit	Invitek, Berlin
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Luminol-Reagenz	Santa Cruz, Heidelberg
Lysozym	Roth, Karlsruhe
Pepstatin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
peqGOLD Protein-Marker IV (prestained)	Peqlab, Erlangen
<i>Pfu</i> -DNA Polymerase + Puffer	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Plasmid-Maxi-Kit	QIAGEN, Hilden
ProFectin® Mammalian Transfection	
System-Calcium Phosphate	Promega, Madison
Protease-Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim
Rapid Ligation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
RNAi-Transfectin-Kit	QIAGEN, Hilden
RNaseA	GERBU Biotechnik, Gaiberg
RNeasy® Mini-Kit	QIAGEN, Hilden

SDS-PAGE Proteinmarker SDS 6-H	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sequitherm Excel II DNA	
Sequencing Kit-LC	Epicentre Technologies, Madison
RevertAid™ First Strand cDNA	
Synthesis Kit	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
siRNA Transfectin-Kit	QIAGEN, Hilden
SlowFade® Light Antifade Kit	Molecular Probes, Leiden
Staurosporin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TOPO-TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
pET100/ D-TOPO Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.2 Nukleotide, Säulenmaterialien und Chemikalien

3-Aminobenzamid	Alexis, Grünberg
Ampizillin	Roth, Karlsruhe
[α -P ³²]-ATP	Amersham Bioscience, Freiburg
[α -P ³²]-NAD ⁺	Amersham Bioscience, Freiburg
BCIP	Roth, Karlsruhe
BrCN-Sepharose 4B	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
DABCO	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	GERBU Biotechnik, Gaiberg
1,3-Butadien-Diepoxid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
3-Aminobenzamid	Alexis, Grünberg
3-ABA-Sepharose	freundlicherweise bereitgestellt von G. Buchlow (Freie Universität Berlin)
(-)-EGCG	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanolamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GPI-16552	freundlicherweise bereitgestellt von J. Falsig (Lundbeck; Dänemark) und Dr. J. Zhang (Guilford Pharmaceuticals Inc., Baltimore, MD)
GSH-Sepharose	Amersham Bioscience, Freiburg
Hydroxyapatit	Riedel-de Häen, Seelze
IPTG	GERBU Biotechnik, Gaiberg
Kanamycin Sulfat	GERBU Biotechnik, Gaiberg
Agarose LM-MP	Roche Diagnostics, Mannheim
MNNG	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Mowiol 4-88	Merck, Darmstadt
MTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NAD ⁺	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumborhydrid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nickel-NTA-Sepharose	QIAGEN, Hilden
Nitrotetrazoliumblauschlorid (NBT)	Roth, Karlsruhe
N-Octyl-β-D-Glukosid	GLYCON Biochemicals GmbH, Luckenwalde
PMSF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel30	Roth, Karlsruhe
Sepharose 2B-Cl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Serva Blau G250	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gallotannine	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
z-VAD(OMe)-fmk	Bachem, Bubendorf

2.1.3 Zellstämme

2.1.3.1 Bakterienstämme

In der Arbeit eingesetzte *Escherichia coli* Stämme sind in Tab. 2.1 aufgeführt.

Zur Generierung des Stammes *E. coli* BL21 Codon⁺ RIL (pREP4) wurde das Plasmid pREP4 aus *E. coli* M15 isoliert und in *E. coli* BL21 Codon⁺ RIL transfiziert.

Tab. 2.1: Genotypische Merkmale und Herkunft der eingesetzten Bakterienstämme

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Herkunft
BL21(DE3)	F ⁻ ompT [dcm] [lon] hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3)	Stratagene, Heidelberg
BL21 Codon⁺ RIL	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) dcm ⁺ Tet ^R gal λ(DE3) endA Hte (argZ ileY leuW Cm ^R)	Stratagene, Heidelberg
BL21 StarTM (DE3)	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm rne131 (DE3)	Invitrogen, Karlsruhe
JM109	recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 (r _k ⁻ m _k ⁺) supE44 Δ (lac-proAB) relA1 [F ⁻ traD36 proAB ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15] λ ⁻	NEB, Frankfurt/Main
M15	Nal ^S Str ^S Rif ^S Thi ⁻ Lac ⁻ Ara ⁺ Gal ⁺ Mtl ⁻ RecA ⁺ Uvr ⁺ Lon ⁺	Qiagen, Hilden

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Herkunft
NM522	F ⁻ <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q Δ(<i>lacZ</i>)M15/Δ(<i>lac-proAB</i>) <i>glnV thi-1</i> Δ(<i>hsdS-mrcB</i>)5	NEB, Frankfurt/Main
One Shot TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mrcBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 deoR araD139</i> Δ(<i>ara-</i> <i>leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe
TG1	F ⁻ <i>traD36 lacI</i> ^q Δ(<i>lacZ</i>)M15 <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ / <i>supE</i> Δ(<i>hsdS-mrcB</i>)5 (r _k ⁻ m _k ⁺ McrB-) <i>thi</i> Δ (<i>lac-</i> <i>proAB</i>)	Stratagene, Heidelberg
XL1-blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1, hsdR17 supE44</i> <i>relA1 lac</i> [F ⁻ <i>proAB lacI</i> ^q Δ(<i>lacZ</i>)M15 Tn10 (Tet ^R)]	Stratagene, Heidelberg

2.1.3.2 Hefestämme

Für die *Yeast Two-Hybrid* Experimente wurde der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* PJ 69-4A (MATa *trp1-901 leu2-3,112 ura 3-52 his3-200 gal4Δ gal80* Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 *met2::GAL7-lacZ*) eingesetzt (James *et al.*, 1996).

2.1.3.3 Eukaryotische Zelllinien

Alle in der Arbeit eingesetzten Zelllinien sind in Tab. 2.2 aufgeführt. Die CHO-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. K. Caldecott (Sussex University, Brighton) und die Hybridomazelllinie 10-H von Prof. A. Bürkle (Universität Konstanz, Konstanz) bereitgestellt.

Tab. 2.2 Zusammenfassung der in der Arbeit eingesetzten eukaryotischen Zelllinien

Zellen	Medium	Herkunft
HeLa S3 (Suspension)	DMEM	DSMZ, Heidelberg
HeLa S3 (adhärent)	DMEM	DSMZ, Heidelberg
HeLa (adhärent)	RPMI 1640	DSZM, Heidelberg
10-H (Suspension)	DMEM	Kawamitsu <i>et al.</i> (1984),
CHO AA8 (adhärent)	α-MEM	Thompson <i>et al.</i> (1990)
CHO EM9 (adhärent)	α-MEM	Thompson <i>et al.</i> (1990)
CHO EM9-V (adhärent)	α-MEM +Genetizin (1mg/ml)	Caldecott <i>et al.</i> (1995)
CHO EM9-XH (adhärent)	α-MEM +Genetizin (1mg/ml)	Caldecott <i>et al.</i> (1995)

2.1.4 Plasmide

Die in der Arbeit eingesetzten kommerziell erhältlichen Plasmide sind in Tab. 2.3 zusammengefasst.

Tab. 2.3 Zusammenfassung in der Arbeit genutzter Plasmide

Plasmid	Resistenz	„Tag“	Position des „Tags“	Anwendung	Referenz
pCR2.1-TOPO	Amp	-	-	<i>E. coli</i>	Invitrogen, Karlsruhe
pET100/D-TOPO	Amp	His	N-Terminus	<i>E. coli</i>	Invitrogen, Karlsruhe
pQE31	Amp	His	N-Terminus	<i>E. coli</i>	QIAGEN, Hilden
pASK-7	Amp	Strep-II	N-Terminus	<i>E. coli</i>	IBA, Göttingen
pGEX-5X-3	Amp	GST	N-Terminus	<i>E. coli</i>	Amersham Biosciences, Freiburg
pEGFP-C2	Kan, Neo	GFP	N-Terminus	Eukaryonten	Clontech, Heidelberg
pGADT-7	Amp	GAL4 AD HA Epitop	N-Terminus	<i>S. cerevisiae</i>	Clontech, Heidelberg
pAS	Amp	GAL4 BD	N-Terminus	<i>S. cerevisiae</i>	Clontech, Heidelberg

2.1.5 Oligonukleotide

2.1.5.1 siRNAs

Die siRNAs wurden von der Firma Santa Cruz, Heidelberg bezogen und sind in Tab. 2.4 aufgeführt.

Tab. 2.4: Verwendete siRNA´s

Name	Herkunft
si-Control	Kat-Nr. sc-37007
si-XRCC1	Kat-Nr. sc-36859

2.1.5.2 PCR-Oligonukleotide

Die als Primer für PCR verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Biotex (Berlin) bezogen und sind in Tab. 2.5 zusammengefasst.

Tab. 2.5: Übersicht der in PCR-Experimenten eingesetzten Oligonukleotide

Name	Sequenz	Orientierung
PARG f	5`-CGCAGTCCATCTCTCTCAGG-3`	<i>fwd.</i>
PARG r	5`-GGTGGGAGGAGATGCTATTC-3`	<i>rev.</i>
PARG-1	5`- <u>CGTCGACA</u> ATGCGGGCCCCGGCTG-3`	<i>fwd</i>
PARG-2	5`- <u>CGTCGAC</u> GGTCCCTGTCCTTTGCC-3`	<i>rev.</i>
PARG-3	5`- <u>AGTCGAC</u> ATGAATGATTTAAATGC-3`	<i>fwd</i>
EGFP PARG f	5`- <u>CGAATTCA</u> ATGCGGGCCCCGGCTG-3`	<i>fwd</i>
EGFP PARG r	5`- <u>CCCCGGGG</u> GTCCCTGTCCTTTGCC-3`	<i>rev.</i>
XRCC1 f1	5`-CACCATGCCGGAGATCCGCCTC-3`	<i>fwd</i>
XRCC1 f2	5`-CACCGGAGAAGGCACCGAGCCC-3`	<i>fwd</i>
XRCC1 f3	5`-CACCATGGCAGGGCCAGGTTCC-3`	<i>fwd</i>
XRCC1 r1	5`-TCATCGGGGTCGTCTGGGCTC-3`	<i>rev.</i>
XRCC1 r3	5`-TCAGGCTTGCGGCACCACCCC-3`	<i>rev.</i>

Resultierende Restriktionsschnittstellen, die in Klonierungen genutzt wurden, sind unterstrichen

fwd.-vorwärts, *rev.*-rückwärts

2.1.5.3 Oligonukleotide für Sequenzierungen

Alle eingesetzten Sequenzierprimer (siehe Tab. 2.6) waren am 5'-Ende mit IR800 (MWG Biotech, Ebersberg) bzw. DY-781 (Biomers.net GmbH, Ulm) fluoreszenzmarkiert.

Tab. 2.6: Übersicht der verwendeten Sequenzierprimer

Name	Sequenz	Vektor/ sequenziertes Gen
M13-rev	5`-CAGGAAACAGCTATGACC-3`	pCR2.1-TOPO
T7-Prom	5`-TAATACGACTCACTATAGGG-3`	pCR2.1-TOPO pGADT7
T7-Terminator	5`-GCTAGTTATTGCTCAGCGGTG -3`	pET100/D-TOPO
pQE forward	5`-TTGCTTTGTGAGCGGATAAC-3`	pQE31
pQE reverse	5`-GGCAACCGAGCGTTCTGAAC-3`	pQE31

Name	Sequenz	Vektor/ sequenziertes Gen
pASK-IBA forward	5`-AGAGTTATTTTACCACTCCCT-3`	pASK-7
pASK-IBA reverse	5`-GACGCAGTAGCGGTAAACG-3`	pASK-7
pEGFP-C Seq forward	5`-CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG-3`	pEGFP-C2
pEGFP-C Seq reverse	5`-TATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAG-3`	pEGFP-C2
3`-AD seq primer	5`-AGATGGTGCACGATGCACAG-3`	pGADT7
GAL4 DNA-BD seq primer	5`-TCATCGGAAGAGAGTAG-3`	pAS
pAS rev seq primer	5`-CAATAAGAGCGACCTCATGC-3`	pAS
PARG Seqf2	5`-GTTGGCTCTGAGGATGTTGG-3`	PARG
PARG Seqr2	5`-AATGTCACCAACCCAGTAGG-3`	PARG

2.1.6 Konstrukte

Die im Rahmen der Arbeit generierten bzw. eingesetzten Konstrukte sind in Tab. 2.7 aufgeführt.

Tab. 2.7: Übersicht über die in der Arbeit eingesetzten Konstrukte

Protein	Konstrukt	Vektor	Restriktions- schnittstelle	Klonierungs- primer	Referenz
PARG	TOPO-TA PARG 5	pCR2.1- TOPO	AT-Klonierung	PARG f PARG r	diese Arbeit
	pQE31 PARG ₁₁₀	pQE31	<i>SalI</i> / <i>SalI</i>	PARG-1 PARG-2	diese Arbeit
	pASK PARG ₁₁₀	pASK-7	<i>SalI</i> / <i>SalI</i>	PARG-1 PARG-2	diese Arbeit
	TOPO-TA pEGFP PARG ₁₁₀	pCR2.1- TOPO	AT-Klonierung	EGFP PARG f EGFP PARG f	diese Arbeit
	pGADT7 PARG ₁₁₀	pGADT7	Restriktionsverdau von TOPO-TA pEGFP PARG mit <i>EcoRI</i> , Ligation als <i>EcoRI</i> - Fragment in den Vektor pGADT7	-	diese Arbeit
	pEGFP-C2-PARG ₁₁₀	pEGFP- C2	<i>EcoRI</i> / <i>SmaI</i>	EGFP PARG f EGFP PARG f	diese Arbeit

Protein	Konstrukt	Vektor	Restriktions- schnittstelle	Klonierungs- primer	Referenz
PARG	pQE31 PARG ₆₅	pQE31	<i>SalI/SalI</i>	PARG-3 PARG-2	diese Arbeit
	pGEX PARG ₆₅	pGEX-5X3	<i>SalI/SalI</i>	PARG-3 PARG-2	diese Arbeit
Ligase III	pET16b(+) Lig III	pET16b(+)	-	-	Caldecott <i>et al.</i> , 1996
PARP-1	pQE31 PARP	pQE31	-	-	Oei <i>et al.</i> , 1996
	pQE31 PARP-DBD	pQE31	-	-	Griesenbeck <i>et al.</i> , 1997
	pQE31 PARP-AMD	pQE31	-	-	Griesenbeck <i>et al.</i> , 1997
	pQE31 PARP-NBD	pQE31	-	-	Griesenbeck <i>et al.</i> , 1997
XRCC1	pET16b(+) XRCC1	pET16b(+)	-	-	Caldecott <i>et al.</i> , 1995
	pAS XRCC1	pAS	-	-	Caldecott <i>et al.</i> , 1996
	pET100/D-TOPO XRCC1 ₁₋₃₁₀	pET100/D- TOPO	-	XRCC1 f1 XRCC1 r1	diese Arbeit
	pET100/D-TOPO XRCC1 ₃₁₀₋₆₃₃	pET100/D- TOPO	-	XRCC1 f1 XRCC1 r3	diese Arbeit
	pET100/D-TOPO XRCC1 ₄₀₂₋₆₃₃	pET100/D- TOPO	-	XRCC1 f2 XRCC1 r3	diese Arbeit

2.1.7 Nährmedien, Antibiotika und Medienzusätze

2.1.7.1 Nährmedien für *E. coli*

LB: 1 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) NaCl, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, pH 7,0

LB-Agar: LB-Medium + 1,5 % (w/v) Agar-Agar

LB⁺: 1 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) NaCl, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt,
12,5 mM MgSO₄, 12,5 mM MgCl₂, 0,4 % (w/v) Glukose

Alle Medien wurden zunächst für 25 min bei 125°C und 1,4 bar autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Lösungen unter 55°C wurden ggf. Glukose oder Medienzusätze (sterilfiltriert) zugefügt.

Tab. 2.8: Medienzusätze

Medienzusatz	Stammlösung	Endkonzentration
Ampizillin	100 mg/ml in 50 % (v/v) Ethanol	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O	25 µg/ml
Chloramphenicol	40 mg/ml in 96 % (v/v) Ethanol	40 µg/ml
IPTG	1 M in H ₂ O	0,1 – 1 mM

2.1.7.2 Nährmedien für die Zellkultur

α-MEM (- Ribonukleoside, -Desoxyribonnukleoside, + Glutamax)	Gibco, Karlsruhe
DMEM (+ Glukose, + L-Glutamin)	Biochrom, Berlin
RPMI 1640	Biochrom, Berlin
Hybridoma-SFM	Gibco, Karlsruhe
NCTC-135 (+ L-Glutamin)	Gibco, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
10.000 U/ml Penicillin/ 10 mg/ml Streptomycin-Lösung (PenStrep)	Gibco, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Gibco, Karlsruhe
100 x nichtessentielle Aminosäurezusatz	Gibco, Karlsruhe
10 x Trypsin-Lösung	Gibco, Karlsruhe
Trypanblau- Lösung (0,4% w/v)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.7.3 Nährmedien für *Saccharomyces cerevisiae*

Die Herstellung der Nährmedien für *S. cerevisiae* erfolgte prinzipiell nach den Hinweisen des „Yeast Protocols Handbook“ der Firma Clontech (www.clontech.com).

10x Aminosäuren-Supplement:	L-Isoleuzin	300 mg/l
	L-Valin	1500 mg/l
	L-Adenin Hemisulfat	200 mg/l
	L-Arginin/HCl	200 mg/l
	L-Histidin/HCl H ₂ O	200 mg/l
	L-Leuzin	1000 mg/l
	L-Lysin/HCl	300 mg/l

L-Methionin	200 mg/l
L-Phenylalanin	500 mg/l
L-Threonin	2000 mg/l
L-Tryptophan	200 mg/l
L-Tyrosin	300 mg/l
L-Urazil	200 mg/l

Zur Herstellung des 10x Aminosäuresupplements wurden die jeweiligen Zusätze eingewogen, in 1 L H₂O (dest.) gelöst und autoklaviert. Um in den SD-Medien eine Selektion zu erreichen wurden spezifisch einzelne Zusätze in den 10x Aminosäuresupplement weggelassen (z. B. -Trp/-Leu-Supplement enthält alle oben genannten Stoffe ausser Tryptophan und Leuzin). Die Lösungen konnten für 1 Jahr bei Raumtemperatur gelagert werden.

YPD:	2 % (w/v) Pepton, 1 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Glukose, pH 5,8
YPDA:	YPD-Medium + 0,003 % (w/v) Adenin Hemisulfat
YPDA-Agar:	YPDA-Medium + 2 % (w/v) Agar-Agar
SD-Medium:	0,67 % (w/v) Hefe-Nitrogen Base (ohne Aminosäuren), 18,2 % (w/v) D-Sorbitol, 2 % (w/v) Glukose, 1/10 VE der jeweiligen 10x Aminosäuresupplementlösung (-Leu, -Leu/-Trp, -Leu/-Trp/-His), pH 5,8
SD-Agar:	SD-Medium + 2 % (w/v) Agar

2.1.8 Antikörper und zellbiologische Markersubstanzen

2.1.8.1 Antikörper

Primäre und sekundäre Antikörper, die während der Arbeit im Zuge von Western-Blot (WB) und Immunfluoreszenzexperimenten (IF) eingesetzt wurden, sind in Tab. 2.9 zusammengefasst. Im Rahmen von Western-Blot Analysen eingesetzte sekundäre Antikörper wurden als AP- (Alkalische Phosphatase) bzw. HRP-gekoppelte (Horse radish peroxidase/ Meerrettich Peroxidase) Proteine erworben. Für Immunfluoreszenzexperimente genutzten Antikörper waren an fluoreszierenden Farbstoffen (Alexa 488, Alexa 594) gekoppelt.

Tab. 2.9: Übersicht über die in der Arbeit eingesetzten Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Herkunft
primäre Antikörper			
α -PARP-1 AMD	Kaninchen	1: 1000 (WB)	Oei <i>et al.</i> , 1998
α -PARP-1 DBD	Kaninchen	1: 1000 (WB)	Oei <i>et al.</i> , 1998
α -PARP-1 (A-20)	Ziege	1: 500 (WB)	Santa Cruz, Heidelberg
α -PARP-1 (gesamt)	Ziege	1: 1000 (WB)	Griesenbeck <i>et al.</i> , 1997
α -His-PARG ₆₅	Kaninchen	1: 1000 (WB) 1: 300 (IF)	diese Arbeit (siehe 2.2.7.7)
mAb α -GFP, clone GFP-20	Maus	1: 300 (IF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
α -EGFP	Kaninchen	1: 400 (IF)	Molecular Probes, Leiden
mAb α -GST, clone GST-2	Maus	1: 1500 (WB)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
α -AIF (H-300)	Kaninchen	1: 400 (WB) 1: 50 (IF)	Santa Cruz, Heidelberg
α -XRCC1 (H-300)	Kaninchen	1: 1000 (WB)	Santa Cruz, Heidelberg
α -DNA Ligase III	Kaninchen	1: 1000 (WB)	Petermann <i>et al.</i> , 2003
α -YY1 (C-20)	Kaninchen	1: 1000 (WB)	Santa Cruz, Heidelberg
α -RGS (His) ₄	Maus	1: 1500 (WB)	QIAGEN, Hilden
mAb α -Poly (ADP-Ribose)/ 10H	Maus	1: 2 (IF)	Kawamitsu <i>et al.</i> (1984), diese Arbeit (siehe 2.2.6.2)
α -Poly (ADP-Ribose)/ 96-10-04	Kaninchen	1: 5000 (WB) 1: 2000 (IF)	Alexis, Grünberg
α -alpha-Tubulin/ DM 1A	Maus	1: 1000 (WB)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
sekundäre Antikörper			
α -Kaninchen-IgG-AP	Ziege	1: 10.000 (WB)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
α -Maus-IgG-AP	Kaninchen	1: 10.000 (WB)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
α -Maus -IgG-HRP	Esel	1: 10.000 (WB)	Santa Cruz, Heidelberg
α -Kaninchen-IgG-HRP	Esel	1: 10.000 (WB)	Santa Cruz, Heidelberg
α -Kaninchen-IgG-Alexa 488	Ziege	1: 400 (IF)	Molecular Probes, Leiden
α -Kaninchen-IgG-Alexa 594	Ziege	1: 400 (IF)	Molecular Probes, Leiden
α -Maus -IgG-Alexa 488	Ziege	1: 400 (IF)	Molecular Probes, Leiden
α -Maus-IgG-Alexa 594	Ziege	1: 400 (IF)	Molecular Probes, Leiden

2.1.8.2 Zellbiologische Markersubstanzen

DAPI	Molecular Probes, Leiden
MitoTracker Red CMXRos	Molecular Probes, Leiden
Propidiumjodid	Molecular Probes, Leiden

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolation von Nukleinsäuren

2.2.1.1 Isolation von RNA

Zur Isolation von RNA aus HeLa S3 (adhärent) Zellen wurden diese in je zwei Zellkulturschalen (ø 10-cm-Schalen) zu 80 %iger Zelldichte angezogen. Die Reinigung der RNA erfolgte mit dem RNeasy®-Kit Mini nach den Angaben des Herstellers.

2.2.1.2 Reverse Transkription

Die Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA erfolgte mit dem RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas). Das Protokoll des Herstellers wurde wie folgt modifiziert:

Je 2 µg gereinigte RNA wurde mit 200 ng Random Hexamer Primer und 10 µl DEPC-H₂O gemischt und für 5 min bei 70°C inkubiert. Der Ansatz wurde auf Eis abgekühlt und 4 µl 5x Reaktionspuffer, 1 µl Ribonukleaseinhibitor (1 U) sowie 2 µl 10 mM dNTP-Mix zugegeben. Die Probe wurde für 5 min bei 25°C inkubiert und 200 U Reverse Transkriptase zugegeben. Die Reaktion wurde zunächst für 10 min bei 25°C, danach für 60 min bei 42°C fortgesetzt. Durch eine 10minütige Inkubation bei 70°C wurde die reverse Transkription beendet und auf 4°C abgekühlt. Die so synthetisierte cDNA konnte unmittelbar in einer PCR zur Amplifikation eingesetzt werden.

2.2.1.3 Reinigung von Plasmid-DNA nach der Boil-Prep-Methode (Berghammer & Auer, 1993)

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* nach der Boil-Prep-Methode wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur 2 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 40 µl Boil-Prep-Puffer resuspendiert und nacheinander 10 min bei 37°C inkubiert, 1 min bei 95°C und 5 min auf Eis inkubiert. Anschliessend wurde 15 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die im Überstand befindliche Plasmid-DNA konnte direkt in Restriktionsexperimenten eingesetzt werden.

Boil-Prep-Puffer: 15 % (w/v) Saccharose, 0,01 % (w/v) BSA, 0,01 % (w/v) RNaseA
3 mg/ml Lysozym, 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

2.2.1.4 Präparative Reinigung von Plasmid-DNA

Die präparative Reinigung von Plasmid-DNA erfolgte aus 5 ml Übernacht-Kultur mit dem Invisorb Spin Plasmid Mini-Kit bzw. aus 250- 600 ml einer *E. coli* Übernacht-Kultur mit dem Plasmid Maxi Kit nach den Angaben des Hersteller.

2.2.1.5 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das entsprechende Fragment, bei kurzer Anregung mit UV-Licht, aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die anschließende Reinigung an Glasmilch erfolgte unter Zuhilfenahme des Fast`n Easy DNA Purification Kit nach den Angaben des Herstellers. Die Elution wurde mit H₂O (dest.) oder TE vorgenommen.

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

2.2.1.6 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 erfolgte für 1 h bei -20°C. Die Ansätze wurden 30 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschliessend wurde das Pellet getrocknet und in H₂O (dest.) oder TE gelöst.

2.2.2 Analyse von Nukleinsäuren

2.2.2.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Bei einer Absorption von 1 wurde von folgenden Konzentrationen ausgegangen (Sambrook, 1989):

Doppelsträngige DNA	50 µg/ ml
RNA	40 µg/ ml

2.2.2.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese diente zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNA-Fragmenten. Alle Agarosegele wurden in TAE-Puffer polymerisiert. Ihre Konzentration lag je nach Anwendung zwischen 0,8 und 1,25 % (w/v). Die DNA-Proben wurden mit 20 % (v/v) TAE-Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zum Grössenvergleich wurde ein 1 kb-DNA-Marker verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 200 mA in TAE-Puffer. Anschliessend wurde die DNA mit Ethidiumbromid (1 µg/ ml) angefärbt, im UV-Licht detektiert und dokumentiert (UVT-20 M/V, Herolab).

TAE-Puffer: 40 mM Tris/Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0
TAE-Probenpuffer: 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol
40 % (v/v) Glyzerin

2.2.2.3 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde freundlicherweise von Gerhard Buchlow (Freie Universität Berlin, Berlin) mit dem Sequitherm Excel II DNA Sequencing Kit-LC nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Sequenzierprimer dienten je nach Konstrukt die unter Tab. 2.6 angegebenen Oligonukleotide.

Die Sequenzierungen wurden mit den Programmen „BLAST 2 Sequences“, „TBLASTN“, „TBLASTX“ (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) und „JavaScript DNA Translator 1.1“ (www.bioinformatics.vg/bioinformatics_tools/JVT.shtml) ausgewertet.

2.2.3 Modifikation von Nukleinsäuren

2.2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) diente der Amplifikation einzelner cDNA-Sequenzen. Als Matrize wurden entweder direkt cDNA oder Vektorkonstrukte, welche die kodierenden Sequenzen bereits enthielten, eingesetzt. Alle Konstrukte wurden unter Zuhilfenahme der DNA-Polymerase *Pfu* bzw. des ExpandTM High Fidelity PCR System generiert. Das allgemeine Protokoll für beide Systeme enthielt folgende Zusammensetzung:

	Endkonzentration
Mix1:	
Template DNA	0,1- 0,75 µg
Primer (<i> fwd</i>)	50 pmol
Primer (<i> rev</i>)	50 pmol
dNTP's	200 µM
H ₂ O	ad. 25 µl
Mix2:	
10x Reaktionspuffer (-MgCl ₂)	5 µl
MgCl ₂	2-6 mM
DNA-Polymerase	0,75 µl
H ₂ O	ad. 25 µl

Der HF-DNA-Polymerase-Mix ist ein Gemisch aus *Taq*-DNA-Polymerase und *Pwo*-DNA-Polymerase, um die Geschwindigkeit der DNA-Synthese zu erhöhen, was zu einer verbesserten Amplifikation längerer DNA-Abschnitte führt. Da sowohl die *Pfu*- als auch die *Pwo*-Polymerase über eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität verfügen, mussten im Reaktionsansatz Mix1 und Mix2 jeweils getrennt auf Eis zusammenpipettiert werden, um einen frühzeitigen Abbau der dNTP's und der Primer zu verhindern. Der PCR-Cycler (Primus Thermocycler, MWG-Biotech) wurde auf 95°C vorgeheizt und unmittelbar nach dem Vermischen von Mix1 und Mix2 das PCR-Programm nach dem in Tab. 2.10 aufgeführten Programm gestartet.

Beim Einsatz des ExpandTM High Fidelity PCR System wurde im Schritt 3 des Amplifikationszyklus durch die *Taq*-DNA-Polymerase an die amplifizierten DNA-Fragmente ein 3'-A-Überhang angefügt, sodass die erhaltenen PCR-Produkte unmittelbar nach einer Reinigung an Glasmilch (siehe 2.2.1.5) sowohl einer direkten Klonierung über Restriktionsschnittstellen als auch einer TOPO-TA-Klonierung zur Verfügung standen.

Mit der DNA-Polymerase *Pfu* amplifizierte Fragmente wurden nach einer Reinigung an Glasmilch für die Klonierung in den Vektor pET100/D-TOPO eingesetzt.

Tab. 2.10: Programm für die PCR

Schritt	Zahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	5 min
2	40	95°C	1 min
		48°C- 55°C	1 min
		68°C	1 min/1,5 kb
3	1	72°C	10 min
4	1	4°C	10 min- 5 h

2.2.3.2 Klonierung in die Vektoren pCR2.1 TOPO (TOPO-Klonierung)

Mittels PCR erhaltene Produkte (siehe 2.2.3.1) konnten direkt unter Zuhilfenahme eines TOPO-Cloning Kits nach den Angaben des Herstellers in die Vektoren pCR2.1-TOPO und pET100/D-TOPO kloniert werden. Die Konstrukte wurden unmittelbar danach in chemokompetente *E. coli* Oneshot-TOP10-Zellen transformiert. Transfizierte Zellen wurden auf Ampizillin-LB-Platten selektiert. Der Erfolg der Klonierung wurde durch analytischen Restriktionsverdau und anschließender Sequenzierung überprüft.

2.2.3.3 Restriktionsverdau von DNA

Für den Restriktionsverdau wurden ca. 5 U Restriktionsenzym pro μg zu spaltender DNA eingesetzt. Die Restriktionsendonukleasen und entsprechende Puffer stammten von den Firmen MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bzw. New England Biolabs (Frankfurt/Main). Der Verdau erfolgte über Nacht oder für mindestens 2 h bei der von den Herstellern angegebenen Temperatur. Die Restriktion mit 2 Enzymen erfolgte entweder gleichzeitig unter Verwendung des Y^+ -Puffersystems von MBI Fermentas oder alternativ nacheinander, unter den für die einzelnen Restriktionsendonukleasen spezifischen Bedingungen.

2.2.3.4 Dephosphorylierung von DNA

Die Dephosphorylierung von Vektor-DNA erfolgte im Zuge von Klonierungsexperimenten. Dabei wurden Über-Nacht-Restriktionsansätze zunächst bei 65°C für 15 min inkubiert, um die Restriktionsendonukleasen zu inaktivieren. Anschliessend wurde 1/10 Volumen des 10x Reaktionspuffers sowie 10 U Alkalische Phosphatase zugefügt und die Ansätze für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach der Reinigung der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel standen die Vektoren für die Ligation zur Verfügung.

2.2.3.5 Ligation

Ligationsreaktionen wurden unter Verwendung des Rapid Ligation Kits nach den Angaben des Herstellers für 30 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Die für die Ligation nötige Vektor-DNA sowie das zu ligierende DNA-Fragment wurden nach einer entsprechenden Restriktion und ggf. Dephosphorylierung zunächst aus dem Agarosegel gereinigt.

Gewöhnlich enthielt ein Ligations-Reaktionsansatz folgende Komponenten:

Vektor-DNA	25- 100 ng
Insert-DNA	250- 500 ng
5 x DNA-Puffer	4 μ l
H ₂ O (dest.)	ad. 10 μ l
2x Ligationspuffer	10 μ l
T4 DNA-Ligase	1 μ l

2.2.4 Methoden im Umgang mit *E. coli*

2.2.4.1 Kultivierung von *E. coli*

Zum Auftauen von Glyzerinstammkulturen wurde Zellmaterial des jeweiligen Stammes steril entnommen, auf LB-Platten mit den entsprechenden antibiotischen Zusätzen ausgestrichen und für 20 h bei 37°C inkubiert. Regelmässig (aller 4- 6 Wochen) wurden die entsprechenden Kulturen überimpft. Die Flüssiganzucht erfolgte in LB-Medium in sterilen Erlenmeyerkolben bei 25- 37°C und 200 rpm in einem Schüttelinkubator.

2.2.4.2 Gewinnung von Stammkulturen

Zur Herstellung von Stammkulturen wurden Flüssigkulturen der jeweiligen *E. coli*-Kultur über Nacht in LB-Medium mit den nötigen antibiotischen Zusätzen angezogen. 500 μ l einer solchen Kultur wurden mit 500 μ l 40 % (v/v) sterilem Glyzerin versetzt und anschliessend bei -70 °C eingefroren.

2.2.4.3 Transformation von DNA in *E. coli*

Zur Gewinnung chemokompetenter Zellen wurden die unterschiedlichen *E. coli* Stämme in 50 ml LB-Medium mit den nötigen antibiotischen Zusätzen bis zu einer OD₆₀₀ 0,5 angezogen. Die Kultur wurde 10 min auf Eis gekühlt und anschliessend 10 min bei 4000 rpm (4°C) zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 50 ml CaCl₂-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 2 ml CaCl₂-Lösung resuspendiert und in 100 μ l-Aliquots bei -70°C gelagert.

Für die Transformation wurde ein Aliquot chemokompetenter *E. coli*-Zellen auf Eis getaut und 30 min mit 500 ng- 4 μ g DNA auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 40 sec bei 42°C inkubiert. Anschliessend wurden die Ansätze für 2 min auf Eis abgekühlt, 400 μ l LB⁺-Medium (siehe 2.1.7.1)

zugefügt und für 1 h bei 37°C geschüttelt. Zur Selektion wurden die Zellen auf LB-Platten mit den nötigen antibiotischen Zusätzen ausplattiert.

CaCl₂-Lösung: 100 mM CaCl₂, 10 % (v/v) Glycerin

2.2.5 Methoden im Umgang mit *S. cerevisiae*

2.2.5.1 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Zellmaterial des entsprechenden untransformierten Hefestammes wurde aus einer Glycerinstammkultur steril entnommen, in 500 µl YPD (siehe 2.1.7.3) resuspendiert und kräftig durchmischt. Anschliessend wurde mit einer Impföse auf YPDA-Platten ausgestrichen und die Platten bei 30°C für 2- 4 Tage inkubiert bis die Kolonien eine Grösse von ca. 1-2 mm aufwiesen. Regelmässig aller 4 Wochen wurden die entsprechenden Kulturen überimpft.

Zellmaterial von bereits transformierten Hefen wurde in SD-Medium (siehe 2.1.7.3) resuspendiert und auf SD-Platten mit den entsprechenden Selektionsbedingungen (-Trp, -Leu, -Trp/-Leu, -Trp/-Leu/-His) ausgestrichen und kultiviert.

2.2.5.2 Gewinnung von Stammkulturen

Zum Anlegen von Stammkulturen von *S.cerevisiae* wurden Flüssigkulturen der jeweiligen Hefekultur über Nacht in YPDA oder SD-Medium mit den entsprechenden Selektionsbedingungen angezogen. 500 µl einer solchen Anzucht wurde mit 500 µl 50 % (v/v) sterilem Glycerin gemischt, kräftig geschüttelt und anschliessend bei -70 °C eingefroren.

2.2.5.3 Transformation von DNA in *S. cerevisiae*

300 ml YPDA-Medium (2.1.7.3) wurde mit einer Übernachtskultur (in YPDA-Medium bzw. SD-Selektionsmedium) bis zu einer OD₆₀₀ 0,2- 0,3 verdünnt und die Ansätze für 3- 6 h bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4- 0,6 inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert (2000 rpm, 5 min, 20°C), in 50 ml sterilem TE vorsichtig resuspendiert und erneut zentrifugiert (2000 rpm, 5 min, 20°C). Das Pellet wurde in 1,5 ml steriler Lithiumacetat-Lösung resuspendiert und bei Raumtemperatur für max. 3 h gelagert.

Für die Transformation wurde pro Ansatz 100 ng- 5 µg Plasmid-DNA mit 100 µg Lachsspermien-DNA (Stammlösung 2 mg/ml) gemischt, 100 µl kompetente Hefezellen zugegeben und kräftig geschüttelt.

Nach der Zugabe von 600 µl PEG/Lithiumacetat-Lösung wurde erneut kräftig gevortext und für 30 min bei 30°C inkubiert. 70 µl DMSO wurden zugefügt und anschliessend vorsichtig gemischt. Nach einem Hitzeschock (15 min, 42°C) wurden die Zellen 2 min auf Eis abgekühlt und danach kurz zentrifugiert (10 sec., 14.000 rpm). Das resultierende Pellet wurde in 100 µl TE resuspendiert und zur Selektion auf den jeweiligen SD-Platten (-Trp, -Leu, -Trp/-Leu, -Trp/-Leu/-His, siehe 2.1.7.3) ausplattiert.

Lithiumacetatlösung:	100 mM Lithiumacetat, 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5
PEG/Lithiumacetatlösung:	100 mM Lithiumacetat, 40 % (w/v) PEG 4000, 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5
TE:	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5

2.2.6 Zellbiologische Methoden

2.2.6.1 Generelle Zellkulturmethoden

Alle Zellen wurden im Brutschrank (Corning, Schiphol-Rijk, NL) bei 37°C und Begasung mit 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden aus eingefrorenen Aliquots aufgetaut, in die in der Tabelle Tab. 2.2 angegebenen Medien überführt und in 25 cm²-Flaschen (Biochrom, Berlin) ausgestreut. Routinemässig wurden die Zellen 2- 3 mal pro Woche passagiert. Im Falle von adhärennten Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschliessend für 5 min in PBS/Trypsin inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in Medium in 15 ml-Röhrchen überführt, abzentrifugiert in Medium aufgenommen und in neuen Zellkulturgefässen verteilt. Suspensionszellen wurden durch leichtes Klopfen gelöst und konnten dann direkt in neue Zellkulturgefässe überführt werden.

Zum Einfrieren von Zellen wurden logarithmisch wachsende Zellen aus einer 150 cm²-Flasche (Biochrom, Berlin) wie oben beschrieben gelöst und pelletiert. Das Zellpellet wurde dann in 4 ml des jeweiligen Mediums in Anwesenheit von 20 % (v/v) FCS und 10 % (v/v) DMSO resuspendiert und in 1,5 ml Kryoröhrchen bei -80°C kontrolliert eingefroren.

PBS:	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ (7 H ₂ O), 1,4 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,2
PBS/Trypsin:	PBS + 1% (v/v) Trypsin

2.2.6.2 Gewinnung des Antikörpers Maus-mAb 10H

Bei den Zellen 10-H (Kawamitsu *et al.* (1984)) handelt es sich um eine Hybridomazelllinie, die zur Gewinnung des monoklonalen Antikörpers Mouse-mAb 10H gegen Poly(ADP-Ribose) diente. Die Zellen wurden in Auftaumedium_{10H} aufgetaut und umgesetzt. Gut proliferierende Zellen wurden dann auf DMEM + 10 % (v/v) FCS + 1 % (v/v) PenStrep umgesetzt und passagiert.

Zur Gewinnung des monoklonalen Antikörpers Mouse-mAb 10H gegen Poly(ADP-Ribose) wurden die Hybridomazellen in dem speziell optimiertem Hybridoma-SFM-Medium (siehe 2.1.7.2) gezüchtet. Mikroskopisch erfolgte die regelmässige Kontrolle der Kulturen. In der späten stationären Wachstumsphase wurden die in den Zellkulturüberstand segregierten Antikörpermoleküle durch Zentrifugation von totem Zellmaterial abgetrennt, der Überstand mit 0,1 % (v/v) Natriumazid versetzt und bei -20°C eingefroren. Jedes gewonnene Aliquot wurde sowohl mittels Immunfluoreszenz (siehe 2.2.6.6) als auch im Western-Blot (siehe 2.2.7.9.3) auf den Gehalt von Antikörpern getestet.

Auftaumedium_{10H}: 50 % (v/v) DMEM (+ FCS/PenStrep), 48 % (v/v) RPMI 1640,
2 % (v/v) NCTC, 1x essentielle Aminosäuren, 50 µM β-Mercaptoethanol

2.2.6.3 Transfektion von siRNA's

Für die Transfektion der siRNA's im Rahmen der Comet-Experimente (siehe 2.2.6.9) wurden je 2×10^5 HeLa Zellen pro *well* einer 6-*well*-Platte auf Deckgläschen (12 mm ø, Roth, Karlsruhe) ausgesät. Am nächsten Tag wurden die siRNAs mit dem Transfectin-Kit der Firma QIAGEN transfiziert. Dazu wurden 7 µl der jeweiligen siRNA-Lösung mit 100 µl DMEM (mit Antibiotika und 10 % (v/v) FCS) gemischt und 7,5 µl des Transfektionsreagenz zugegeben. Der Ansatz wurde für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschliessend auf die Zellen getropft. Nach 6 h erfolgte ein Medienwechsel, da eine längere Inkubation mit dem siRNA-Transfectin-Komplex zytotoxische Folgen hatte.

2.2.6.4 Transfektion von Plasmiden

Für die Transfektion von Plasmiden wurden die Zellen auf Deckgläschen in Zellkulturgefässen (12 mm/18 mm ø, Roth, Karlsruhe) ausgesät. Die Transfektion von Plasmiden in humane Zellen erfolgte mit dem ProFectin® Mammalian Transfection System-Calcium Phosphate nach den Angaben des Herstellers.

2.2.6.5 Protokolle zur Schädigung von eukaryotischen Zellen

Für die Schädigung von eukaryotischen Zellen wurden je 2×10^5 Zellen pro *well* einer 6-*well*-Platte auf Deckgläschen (12 mm ϕ , Roth, Karlsruhe) bzw. 1×10^6 Zellen in einer 10 cm-Schale ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit dem alkylierenden Agens MNNG (Endkonzentration 500 μ M) für 10 min in BBS-Lösung geschädigt. Wurde den Ansätzen der PARP 1-Inhibitor 3-Aminobenzamid (3-ABA, Endkonzentration 2 mM) zugesetzt, so wurden die Zellen zuvor 20 min mit diesem präinkubiert. Nach Ablauf der Schädigung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschliessend für die im Ergebnisteil angegebenen Zeiten mit frischem Medium, ggf. in Anwesenheit von 3-ABA inkubiert.

Für die Schädigung der CHO-Zellen mit Staurosporin wurde das Medium abgesaugt, Staurosporin (Endkonzentration 800 nm) in Medium ohne FCS verdünnt und für die im Ergebnisteil angegebenen Zeiten auf den Zellen verteilt.

BBS-Lösung: 0,25 mM KH_2PO_4 , 15,7 mM NaHCO_3 , 3,1 mM KCl , 134 mM NaCl , 1,2 mM CaCl_2 , 1,2 mM MgSO_4 , 2 mM Glukose, pH 7,2

2.2.6.6 Immunfluoreszenz

Immunfluoreszenzfärbungen wurden sowohl mit transfizierten als auch untransfizierten Zellen durchgeführt. Zum Fixieren mittels Formaldehyd wurden die Zellen mit PBS gewaschen und zunächst für 45 min auf Eis mit 3,7 % (v/v) Formaldehyd in PBS inkubiert. Anschliessend wurde mehrfach mit PBS gewaschen und die Zellen für 25 min auf Eis mit 0,25 % (v/v) Triton-X 100 in PBS permeabilisiert. Nach mehreren Waschschritten mit PBS erfolgte eine Blockierung mit 5 % (v/v) FCS in PBS für 15 min bei Raumtemperatur. Alternativ wurden die Zellen für 10 min auf Eis mit eiskaltem Methanol (100% v/v) und anschliessend für 1 Minute mit eiskaltem Aceton (100% v/v) fixiert. Die Deckgläschen wurden anschliessend getrocknet, in PBS rehydratisiert und die Zellen analog mit 5% (v/v) FCS in PBS blockiert. Die Blockierungslösung wurde abgenommen und der erste Antikörper in den angegebenen Verdünnungen (siehe Tab. 2.9 in PBS) für 1 h bei 37°C auf die Zellen gegeben. Es wurde 3x mit PBS gewaschen und erneut mit 5 % (v/v) FCS in PBS blockiert. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper (siehe Tab. 2.9 in PBS) wurde ggf. die DNA mit DAPI (3 μ M in PBS) angefärbt. Die Zellen wurden 3x mit PBS gewaschen und anschliessend die Deckgläschen in H_2O (dest.) und Ethanol gespült. Nach dem Trocknen wurden die Deckgläschen auf Objektträger überführt, in Mounting-Lösung eingebettet und über Nacht bei 4°C getrocknet. Danach konnten die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leica, Wetzlar) beobachtet und fotografiert werden. Eine Quantifizierung

der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte unter Zuhilfenahme des Programmes „Image Compact“ (Matrix Vision GmbH, Oppenweiler).

Mounting-Lösung: 100 mM Tris/HCl, pH 8,5, 0,6 % (w/v) Mowiol 4-88, 1,5 % (w/v) Glycerin,
25 mg/ml DABCO

2.2.6.7 Nachweis nekrotischer Zellen

Zum Nachweis der Nekrose wurden die Zellen mit dem membranpermembablen Farbstoff DAPI (blaue Fluoreszenz) und dem membranimpermeablen Farbstoff Propidiumjodid (rote Fluoreszenz) angefärbt. Das im Zuge der Nekrose hervorgerufene „Platzen“ der Zelle führt zu einer passiven Aufnahme beider Farbstoffe. Daher zeigen nekrotische Zellen unter dem Mikroskop eine intensive blaue und rote Färbung, während apoptotische und ungeschädigte Zellen nur eine schwache Blaufärbung aufweisen.

Zum Nachweis der Nekrose wurden die Zellen geschädigt und nach der im Ergebnisteil angegebenen Zeit für 10 min in BBS-Lösung mit Propidiumjodid (Endkonzentration 100 µg/ml) sowie DAPI (Endkonzentration 50 µM) inkubiert, mit PBS gewaschen, danach in SlowFade[®] Light Antifade-Lösung eingebettet und unmittelbar am Fluoreszenzmikroskop (Leica, Wetzlar) ausgewertet.

2.2.6.8 Bestimmung der Überlebensrate mittels Trypanblaufärbung

Zur Bestimmung der Überlebensrate nach genotoxischer Schädigung wurde das Zellkulturmedium nach der im Ergebnisteil angegebenen Zeit von den Zellen vorsichtig abgesaugt, die Zellen abtrypsinisiert, zentrifugiert und das Zellelett in 200 µl Zellkulturmedium + Trypanblau (0,01% w/v) resuspendiert. Trypanblau wird als membranimpermeabler Farbstoff nur von toten Zellen aufgenommen. Anschliessend wurde die Anzahl lebender, trypanblau-negativer Zellen mittels einer Neubauer-Zellkammer (Roth, Karlsruhe) bestimmt.

2.2.6.9 Alkalischer Comet Assay

Mittels Comet Assay können vorhandene bzw. induzierte DNA-Schäden (alkalilabile Stellen, Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüche) direkt *in vivo* in einzelnen Zellen nachgewiesen werden. Das Prinzip des Comet Assays beruht darauf, dass Zellen in Agarose eingebettet, lysiert und einem elektrischen Feld ausgesetzt werden. Während der Elektrophorese trennen sich hierbei DNA-Fragmente ihrer Grösse nach auf. Die chromosomale DNA stagniert aufgrund ihrer Grösse während

geschädigte/fragmentierte DNA in der Lage ist, den Kernverband zu verlassen. Dadurch bildet sich eine Cometform, die sich nach Färbung mit DAPI oder Propidiumjodid unter dem Mikroskop quantifizieren lässt.

In dieser Arbeit wurde der alkalische Comet-Assay nach dem Protokoll von McKelvey-Martin *et al.* (1993) durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden Glasobjektträger (Roth, Karlsruhe) mit 1 % (w/v) Agarose in H₂O beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

In den durchgeführten siRNA-Experimenten wurde 2×10^5 HeLa (adhärent) Zellen in 6-well Schälchen ausgestreut und mit Kontroll-siRNA oder XRCC1-siRNA transfiziert (siehe 2.2.6.3). 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen wie in den Abbildungen angegeben geschädigt, zweimal mit Medium gewaschen und anschliessend in frischem Medium bei 37°C inkubiert. Ab diesem Schritt wurden alle Experimente unter geringen Lichtverhältnissen durchgeführt, um die Ergebnisse nicht durch tageslichtinduzierte DNA-Schäden zu verfälschen. Zu unterschiedlichen Zeiten nach der Schädigung wurden die Zellen abtrypsinisiert und in 200 µl PBS vorsichtig resuspendiert. 20 µl dieser Zellen wurden mit 80 µl 0,75 % (w/v) Agarose LM-MP (in PBS) gemischt, auf die vorbereiteten Objektträger getropft, mit einem Glasplättchen (20 x 20 mm, Roth, Karlsruhe) bedeckt und im Dunkeln bei 4°C bis zur Polymerisation der Agarose gelagert. Die Glasplättchen wurden vorsichtig abgezogen und die Objektträger in Lysepuffer für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach der Denaturierung in Elektrophoresepuffer für 20 min bei 4°C erfolgte eine Elektrophorese in derselben Lösung für 20 min bei 0,73 V/cm und 280 mA. Anschliessend wurden die auf den Objektträger befindlichen Mikrogele mit Neutralisierungspuffer mehrfach gewaschen und die DNA mit DAPI (2 µg/ml in PBS) angefärbt. Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Leica, Wetzlar). Dabei wurde die Länge des Cometen als Indikator für den vorhandenen DNA-Schaden gemessen und die Cometen auf einer Skala von 0 (kein Comet) bis III (max. Cometlänge) klassifiziert. Diese Methode gilt neben der Software gesteuerten Vermessung als anerkannte Variante der Auswertung für Comet-Daten (Atorino *et al.*, 2001). Für die statistische Auswertung der siRNA-Experimente wurden jeweils drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt und pro Probe jeweils mindestens 200 Cometen ausgezählt und klassifiziert.

Lysepuffer: 10 mM Tris, 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 % (v/v) DMSO,
1 % (v/v) Triton-X 100, pH 10,0

Elektrophoresepuffer: 300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13,0

Neutralisierungspuffer: 0,4 M Tris/HCl, pH 7,4

2.2.7 Proteinchemische Methoden

2.2.7.1 Proteinexpression

Zur rekombinanten Expression von Proteinen wurden die prokaryotischen Expressionskonstrukte in die jeweiligen *E. coli*-Wirtstämme transformiert (siehe Tab. 2.11).

Tab. 2.11: Bedingungen für die Proteinexpression in *E. coli*

Protein	Konstrukt	<i>E. coli</i> Stamm	Expressionsvolumen	Medium	Selektion
PARG	pQE31 PARG ₁₁₀	BL21 Codon ⁺ RIL (pREP4)	400 ml	LB+Sorbitol +Betain ^{a)}	Amp, Kan, Chl
	pQE31 PARG ₆₅	M15	5 l	LB	Amp, Kan
	pASK-7 PARG ₁₁₀	BL21 Codon ⁺ RIL (pREP4)	400 ml	LB	Amp, Kan, Chl
	pGEX PARG ₆₅	BL21 Codon ⁺ RIL (pREP4)	2 l	LB	Amp, Kan, Chl
PARP	pQE31 PARP	M15	400 ml	LB	Amp, Kan
	pQE31 DBD	TG1	400 ml	LB	Amp
	pQE31AMD	M15	400 ml	LB	Amp, Kan
	pQE31 NBD	M15	400 ml	LB	Amp, Kan
Ligase	pET16b(+)Lig III	BL21 (DE3)	200 ml	LB	Amp
XRCC1	pET16b(+)XRCC1	BL21 (DE3)	2 l	LB	Amp
	pET100/D-TOPO XRCC1- Deletionsproteine	BL21 Star TM (DE3)	300 ml	LB	Amp
GST	pGEX-5X-2	BL21 Codon ⁺ RIL (pREP4)	100 ml	LB	Amp, Kan, Chl

a) Expression nach Blackwell *et al.* (1991)

Die Expression erfolgte in LB-Medium in Anwesenheit der jeweiligen Antibiotika (siehe Tab. 2.11). Gegebenenfalls wurden die osmolytischen Substanzen Betain (EK 1,5 mM) und Sorbitol (EK 0,5 M) zugefügt (siehe Tab. 2.11), um den Anteil der Proteine zu erhöhen, die in löslicher Form exprimiert werden (Blackwell *et al.*, 1991). Die Expressionskulturen wurden 1:100 bzw. 1:500 mit einer Übernachtskultur in den entsprechenden Medien verdünnt und bei der in Tab. 2.12 angegebenen Temperatur geschüttelt. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von IPTG bzw. AHT (siehe Tab. 2.12).

Tab. 2.12: Ablauf der Expression in *E. coli*

Protein	Konstrukt	Bedingungen bis zur Induktion			Induktor	Bedingungen während der Expression	
		Verd. der VK	Temp.	Dauer bis zur Ind.		Temp.	Zeit
PARG	pQE31 PARG	1:100	37°C	OD ₆₀₀ = 0,5	1 mM IPTG	25°C	3 h
	pQE31 PARG ₆₅	1: 100	37°C	OD ₆₀₀ = 0,5	1 mM IPTG	37°C	3 h
	pASK-7 PARG ₁₁₀	1: 100	37°C	OD ₆₀₀ = 0,5	0,2 µg/ml AHT	37°C	3 h
	pGEX PARG ₆₅	1: 500	25°C	ÜN	0,1mM IPTG	25°C	2 h
PARP	pQE31 PARP	1: 100	37°C	OD ₆₀₀ = 0,5	1 mM IPTG	37°C	3 h
	pQE31 DBD	1: 500	25°C	ÜN	1 mM IPTG	25°C	3 h
	pQE31 AMD	1: 500	25°C	ÜN	1 mM IPTG	25°C	3 h
	pQE31 NBD	1: 500	25°C	ÜN	1 mM IPTG	25°C	3 h
Ligase	pET16b(+) Lig III	1: 100	37°C	OD ₆₀₀ = 0,5	1 mM IPTG	37°C	2 h
XRCC1	pET16b(+) XRCC1	1: 100	37°C	OD ₆₀₀ = 0,5	1 mM IPTG	37°C	3 h
	pET100/D-TOPO XRCC1-Delprot.	1: 100	37°C	OD ₆₀₀ = 0,5	1 mM IPTG	37°C	3 h
GST	pGEX-5X-2	1: 100	37°C	OD ₆₀₀ = 0,5	0,1 mM IPTG	37°C	3 h

Verd. der VK-Verdünnung der Vorkultur, Temp.-Temperatur, Ind.-Induktion, ÜN-über Nacht, XRCC1-Delprot.-XRCC1-Deletionsproteine

Zum Beenden der Expression wurden die Kulturen 15 min bei 4000 rpm, 4°C zentrifugiert und das Pellet bei -20°C eingefroren.

2.2.7.2 Zellaufschluss

2.2.7.2.1 Analytischer Zellaufschluss von Bakterienzellen

Um den Verlauf der Proteinexpression in der SDS-PAGE verfolgen zu können, wurde die Expression zu verschiedenen Zeitpunkten unterbrochen und Aliquots der Expressionskultur entnommen. Die Proben wurden 2 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Die Pellets wurden in 50 µl SDS-Probenpuffer gelöst. Anschliessend erfolgte die Denaturierung der Proteine bei 95°C für 5 min und die Analyse mittels SDS-PAGE.

2.2.7.2.2 Zellaufschluss mit der French Press

Für den Aufschluss von Bakterienzellen mittels French Press wurde das jeweilige Pellet in 20- 50 ml des entsprechenden Aufschlusspuffers resuspendiert. Die Suspension wurde mit DNaseI (Endkonzentration 0,1 mg/g Zellen) versetzt und 15 min bei 30°C inkubiert. Danach erfolgte der Aufschluss in der SLM AMINCO French Press (G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch Gmünd) in drei Durchgängen bei je 40.000 Psi.

2.2.7.3 Fraktionierung von Zellen

2.2.7.3.1 Präparation von Gesamtzellextrakt

Zur Präparation von Gesamtzellextrakten wurden CHO-Zellen (siehe 2.1.3.3) aus je einer 150-cm² Flasche eingesetzt. Dazu wurden die Zellen abtrypsinisiert und in dem entsprechenden Medium für 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in eiskaltem PBS gewaschen, danach in 1 ml Lysepuffer resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde für 1 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschliessend auf Eis wieder aufgetaut. Die Prozedur wurde dreimal wiederholt und Zelltrümmer danach abzentrifugiert (5 min, 4°C). Die Konzentration der im Überstand befindliche Proteine wurden mittels Bradford-Assay (siehe 2.2.7.9.1) bestimmt.

Lysepuffer: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) Triton-X 100, 1x Proteaseinhibitor-Cocktail, 1 mM PMSF, pH 7,5

2.2.7.3.2 Präparation von Kernextrakten nach Schreiber *et al.* (1989)

Zur Präparation der Kernextrakte nach der Methode von Schreiber *et al.* (1989) wurden 30 ml dicht gewachsener Suspensionszellkultur (HeLa S3 Suspension) bzw. die adhärenenten Zellen (HeLa S3, AA8, EM9, EM9-V, EM9-XH) aus einer 150-cm² Flasche eingesetzt. Dazu wurden die Zellen ggf. abtrypsinisiert und in dem entsprechenden Medium für 5 min bei 1000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert und erneut für 2 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 800 µl KE-Puffer A gelöst und für 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 50 µl 10% (v/v) NP-40 zugegeben und für ca. 30 sec gevortext. Nach der anschliessenden Zentrifugation (1 min, 3000 rpm) wurde das im Überstand befindliche Zytoplasma entfernt und das Pellet in 50 µl KE-Puffer C resuspendiert. Der Ansatz wurde bei 4°C für 10- 15 min kräftig geschüttelt

und 10 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand enthielt den Kernextrakt. Die Proteinbestimmung erfolgte mittels Bradford-Assay (siehe 2.2.7.9.1).

KE-Puffer A: 10 mM HEPES, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT,
0,5 mM PMSF, pH 7,9

KE-Puffer C: 20 mM HEPES, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT,
1 mM PMSF, pH 7,9

2.2.7.3.3 Präparation von Kernextrakten nach der Methode von Dignam *et al.* (1983)

Zur Präparation von Kernextrakten nach der Methode von Dignam *et al.* (1983) wurden ca. 1×10^9 HeLa S3-Suspensionszellen eingesetzt. Die Zellen wurden bei 1000 rpm für 5 min abzentrifugiert, in 20 ml eiskaltem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (4°C, 2000 rpm, 10 min). Das Pellet wurde in 15 ml kaltem Dig-Puffer A resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (10 min, 4°C, 20000 rpm) wurde das Pellet in 10 ml Dig-Puffer A gelöst und mittels Dounce-Homogenisator (10x 10 Stöße, abwechselnd gekühlt auf Eis) aufgeschlossen. Das Homogenat wurde mikroskopisch auf die Effizienz des Aufschlusses untersucht und wiederum zentrifugiert (10 min, 4°C, 2000 rpm). Zur Entfernung des restlichen zytoplasmatischen Materials erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (20 min, 4°C, 18.000 rpm, Sorvall SS34 Rotor). Das resultierende Pellet wurde in 4 ml Dig-Puffer C aufgeschlämmt, mittels Dounce-Homogenisator (5x 10 Stöße, abwechselnd gekühlt auf Eis) resuspendiert und anschliessend für 30 min auf Eis vorsichtig gerührt. Der nach der anschliessenden Zentrifugation (30 min, 4°C, 18.000 rpm, Sorvall SS34 Rotor) erhaltene Überstand wurde für 5 Stunden gegen 5 L Dig-Puffer D dialysiert. Der so erhaltene Kernextrakt wurde mittels Bradford-Assay (siehe 2.2.7.9.1) hinsichtlich seiner Proteinkonzentration untersucht und portioniert bei -80 °C gelagert.

Dig-Puffer A: 10mM HEPES, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,5 mM DTT,
0,5 mM PMSF, pH 7,9

Dig-Puffer C: 20 mM HEPES, 25% (v/v) Glyzerin, 0,42 M NaCl, 1,5 mM MgCl₂,
0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF, pH 7,9

Dig-Puffer D: 20 mM HEPES, 20% (v/v) Glyzerin, 0,1 M KCl, 0,2 mM EDTA,
0,5 mM DTT 0,5 mM PMSF, pH 7,5

2.2.7.4 Reinigung von Proteinen mittels Ni-NTA-Chromatographie

Ligase III, XRCC1, XRCC1-Deletionsproteine, die Teilbereiche von PARP-1 sowie die katalytische Domäne von PARG (His-PARG₆₅) wurden als Poly-His-Fusionsproteine exprimiert und konnten somit durch Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose gereinigt werden.

2.2.7.4.1 Reinigung von His-PARG₆₅

Das Bakterienpellet aus 5 L Expressionskultur wurde in 50 ml His-Lysepuffer + 20 mM Imidazol resuspendiert, mittels French Press (siehe 2.2.7.2.2) aufgeschlossen und zentrifugiert (2x 10 min, 4°C, 18.000 rpm). Der Überstand wurde mit 2 ml Ni-NTA-Agarose versetzt und für 1 Stunde bei 4°C geschüttelt (Über-Kopf-Rotation). Danach wurde das Säulenmaterial in eine Glassäule gefüllt, zunächst mit 20 ml His-Lysepuffer + 20 mM Imidazol und danach mit 50 ml Waschpuffer_{PARG} gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem Gradient von 25 bis 250 mM Imidazol in His-Lysepuffer. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bradford-Assay (siehe 2.2.7.9.1) bestimmt und die Aktivität des Enzymes nach der Methode von Tsai *et al.* (1992) ermittelt (siehe 2.2.7.11.2).

His-Lysepuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 0,3 M NaCl, pH 8,0

Waschpuffer_{PARG}: 50 mM NaH₂PO₄, 1,5 M NaCl, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 25 mM Imidazol, pH 8,0

2.2.7.4.2 Reinigung von His-XRCC1

Im Falle von XRCC1 wurde das Pellet in 20 ml His-Lysepuffer + 10 mM Imidazol/ 1 mM DTT aufgeschlossen, mittels French Press aufgeschlossen und zentrifugiert (siehe 2.2.7.9.1). Der Überstand wurde an 0,5 ml Ni-NTA gebunden. Die Matrix wurde im ersten Waschschriff mit 10 ml His-Lysepuffer + 10 mM Imidazol und 1 mM DTT, im zweiten Waschschriff mit His-Lysepuffer mit 2 M NaCl und 40 mM Imidazol gewaschen. Danach wurden die Proteine mit 6x 1 ml His-Elutionspuffer eluiert.

XRCC1 wurde bei 4°C gegen 2x 1 L Proteinpuffer mit 1 mM DTT dialysiert und dann in Aliquots bei -80°C eingefroren. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bradford-Assay bestimmt (siehe 2.2.7.9.1).

His-Lysepuffer: siehe 2.2.7.4.1

His-Elutionspuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 0,3 M NaCl, 250 mM Imidazol, 1 mM DTT, pH 8,0

Proteinpuffer: 50 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl₂, 0,3 M NaCl, 10 % (v/v) Glycerin, pH 7,5

2.2.7.4.3 Reinigung der XRCC1-Deletionsproteine

Zur Reinigung der XRCC1-Deletionsproteine wurden die einzelnen Bakterienpellets jeweils in 20 ml HEPES-Lysepuffer + 1mM DTT und PMSF (Endkonzentration 1 mM) resuspendiert, mittels French Press aufgeschlossen und zentrifugiert. Die einzelnen Überstände wurden je an 1,5 ml Ni-NTA gebunden. Die Matrizes wurden zuerst mit 40 ml komplettem HEPES-Puffer, anschliessend mit 20 ml Waschpuffer + 1 mM DTT gewaschen. Danach erfolgte die Elution der Proteine jeweils mit 6x 1 ml Waschpuffer + 40 mM Imidazol. Die XRCC1-Deletionsproteine wurden getrennt bei 4°C gegen 2x 1 L Proteinpuffer mit 1 mM DTT dialysiert und dann in Aliquots bei -80°C eingefroren. Die Proteinkonzentration wurde jeweils mit dem Bradford-Assay bestimmt (siehe 2.2.7.9.1).

HEPES-Puffer: 50 mM HEPES, 0,5 M NaCl, 100 µM EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, pH 8,0

Waschpuffer: 50 mM HEPES, 0,1 M NaCl, 100 µM EDTA, 10 % (v/v) Glycerin, 5 mM Imidazol pH 8,0

2.2.7.4.4 Reinigung von His-Ligase

Ligase III wurde nach einem Protokoll von Petermann *et al.* (2003) präpariert. Da die Expression dieses Proteins nur in unlöslicher Form erfolgte, wurden zunächst *inclusion bodies* (IB) nach einem Protokoll von Rudolph *et al.* (1997) isoliert. Dazu wurde das Zellpellet der Expressionskultur in 20 ml IB-Lysepuffer resuspendiert, 2 mg Lysozym zugegeben und mittels French Press aufgeschlossen. MgCl₂ und DNase I wurden bis zu einer Endkonzentration von 3 mM bzw. 10 µg/ml zugegeben und die Lösung 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml IB-Waschlösung 1 wurde das Gemisch für 30 min auf Eis inkubiert. Anschliessend wurden die *inclusion bodies* abzentrifugiert (10 min, 4°C, 18.000 rpm, Sorvall SS 34-Rotor). Das Pellet wurde in 30 ml IB-Waschlösung 2 resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Die erhaltenen Pellets wurden bei -20°C eingefroren.

Ein Aliquot aus der IB-Präparation, entsprechend 125 ml Expressionskultur, wurde für 2 h bei Raumtemperatur in 10 ml IB-Solubilisierungspuffer geschwenkt und anschliessend für 10 min und 18.000 rpm (Sorvall SS 34-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde schrittweise bei 4°C dialysiert. Die Konzentration Gdm-HCl wurde dabei schrittweise verringert und Ligase III so rückgefaltet. Die Rückfaltung erfolgte in vier Schritten in den Rückfaltungspuffern 1-4. Es wurde jeweils 2 x für 1 h gegen 500 ml Puffer dialysiert. Der Dialyseschritt über Nacht wurde mit dem Rückfaltepuffer 3 oder 4 durchgeführt. Für die anschliessende Reinigung wurde dem Dialysat Imidazol (Endkonzentration 10 mM) und 2 ml Ni-NTA-Agarose zugesetzt. Nach der Bindung der Proteine an die Affinitätsmatrix (1 h, 4°C) wurde das Säulenmaterial in eine Säule gefüllt, im ersten Waschschriff mit His-Lysepuffer + 10 mM Imidazol/ 1 mM DTT, im zweiten Waschschriff mit His-Lysepuffer mit 1 M NaCl und 40 mM

Imidazol gewaschen. Die Elution erfolgte wie bei XRCC1 mit 6x 1 ml His-Elutionspuffer. Ligase III wurde ebenfalls bei 4°C gegen 2x 1 Liter Proteinpuffer mit 1 mM DTT dialysiert und dann in Aliquots bei -80°C eingefroren.

IB-Lysepuffer:	0,1 M Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
IB-Waschlösung 1:	60 mM EDTA, 6 % (v/v) Triton-X100, 1,5 mM NaCl, pH 8,0
IB-Waschlösung 2:	0,1 M Tris/HCl, 20 mM EDTA, pH 8,0
Rückfaltungspuffer 1:	50 mM Tris/HCl, 1 M Gdm-HCl, 5 mM MgCl ₂ , 0,15 M NaCl, 0,05% (v/v) NP-40, 10% (v/v) Glycerin, 50µM ZnCl ₂ , 1mM DTT, pH 7,3
Rückfaltungspuffer 2:	50 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl ₂ , 1,15 M NaCl, 0,05% (v/v) NP-40, 10% (v/v) Glycerin, 50µM ZnCl ₂ , 1mM DTT, pH 7,3
Rückfaltungspuffer 3:	50 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl ₂ , 0,7 M NaCl, 0,05% (v/v) NP-40, 10% (v/v) Glycerin, 1mM DTT, pH 7,3
Rückfaltungspuffer 4:	50 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl ₂ , 0,4 M NaCl, 0,05% (v/v) NP-40, 10% (v/v) Glycerin, 1mM DTT, pH 7,3
His-Lysepuffer:	siehe 2.2.7.4.1
His-Elutionspuffer:	siehe 2.2.7.4.2

2.2.7.4.5 Reinigung von PARP-Deletionsproteinen

Sowohl die DNA-Bindedomäne (His-DBD) als auch die Automodifikationsdomäne (His-AMD) der PARP-1 konnten in löslicher Form exprimiert werden und standen somit direkt zur Reinigung mittels Ni-NTA-Chromatographie zur Verfügung. Dazu wurde das jeweilige Bakterienpellet in 10 ml Puffer A resuspendiert, mittels French Press aufgeschlossen und zentrifugiert (2x 10 min, 4°C, 18.000 rpm). Der Überstand wurde jeweils an 1,5 ml Ni-NTA gebunden (Über-Kopf-Rotation/1h, 4°C) und anschliessend in drei Waschrissen (je 3x 10 ml Puffer A, B und C) gewaschen. Proteine wurde zum Schluss mit 5x 1,5 ml Puffer A + 100 mM EDTA eluiert.

Da die Expression der NAD⁺-bindenden katalytischen Domäne (His-NBD) nur in unlöslichen *inclusion bodies* erfolgte, wurden diese entsprechend dem Protokoll für His-Ligase III (siehe 2.2.7.4.4) aus 400 ml Expressionskultur gereinigt. Das gesamte Pellet wurde für 2 h bei Raumtemperatur in 10 ml IB-Solubilisierungspuffer geschwenkt und anschliessend für 10 min und 18.000 rpm (Sorvall SS 34-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde schrittweise bei 4°C dialysiert. Die Rückfaltungspuffer wurden dabei entsprechend den Stabilitäten von PARP-1 verändert. Für die anschliessende Reinigung wurde dem Dialysat 1,5 ml Ni-NTA-Agarose zugesetzt. Nach der Bindung der Proteine an die Affinitätsmatrix (1 h, 4°C) wurde das Säulenmaterial in eine Säule gefüllt und anschliessend in drei Waschrissen (je 3 x

10 ml Puffer A,B und C) gewaschen. Proteine wurde zum Schluss mit 5x 1,5 ml Puffer A + 100 mM EDTA eluiert.

PufferA:	50 mM Tris/HCl, 1 M NaCl, 5 mM β -Mercaptoethanol, 2 mM PMSF, pH 7,4
PufferB:	50 mM Kaliumphosphat, 1 M NaCl, 5 mM β -Mercaptoethanol, 0,1 mM PMSF, pH 6,0
PufferC:	5 mM Kaliumphosphat, 5 mM β -Mercaptoethanol, 0,1 mM PMSF pH 8,0
Rückfaltungspuffer 1:	50 mM Tris/HCl, 1 M Gdm-HCl, 5 mM MgCl ₂ , 0,15 M NaCl, 0,05% (v/v) NP-40, 10% (v/v) Glycerin, 10 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,5
Rückfaltungspuffer 2:	50 mM Tris/HCl, 0,5 M Gdm-HCl, 5 mM MgCl ₂ , 1 M NaCl, 0,05% (v/v) NP-40, 10% (v/v) Glycerin, 10 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,5
Rückfaltungspuffer 3:	50 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl ₂ , 1,5 M NaCl, 0,05% (v/v) NP-40, 10% (v/v) Glycerin, 10 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,5
Rückfaltungspuffer 4:	50 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl ₂ , 0,5 M NaCl, 0,05% (v/v) NP-40, 10% (v/v) Glycerin, 10 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,5

2.2.7.5 Reinigung von PARP-1

PARP-1 wurde in Anlehnung an das Protokoll von Griesenbeck *et al.* (1997) durch Affinitätsreinigung an zwei verschiedenen Matrices gereinigt: Ni-NTA-Agarose und 3-Aminobenzamid-Sepharose (3-ABA-Sepharose). Dazu wurden die Zellen aus 500 ml Expressionskultur mit PARP-Aufschlusspuffer in der French Press aufgeschlossen. Der Aufschluss wurde 2x 10 min bei 18.000 rpm und 4°C zentrifugiert, anschliessend durch Über-Kopf-Rotation (1 h, 4°C) an 2 ml Ni-NTA-Matrix gebunden und das Säulenmaterial in eine Glassäule gefüllt. Nach einem Waschschrift mit 40 ml PARP-Aufschlusspuffer wurden mit 20x 1,5 ml EDTA-Puffer eluiert und der Proteingehalt mittels Bradford-Assay bestimmt. Proteinhaltige Fraktionen wurden erneut durch Über-Kopf-Rotation (1 h, 4°C) an 3 ml einer mit EDTA-Puffer äquilibrierten 3-ABA-Säule gebunden. Das Säulenmaterial wurde wiederum in eine Glassäule gefüllt, mit 50 ml EDTA-Puffer gewaschen und das Protein mit 10x 1 ml PARP-Elutionspuffer eluiert. Da das im Elutionspuffer enthaltene Nikotinamid bei einer Wellenlänge von 280 nm absorbiert, konnten die Elutionsfraktionen nur durch SDS-PAGE auf ihren Proteingehalt untersucht werden. Proteinhaltige Fraktionen wurden vereinigt und an einer Hydroxyapatit-Säule (Säulenvolumen 0,5 ml) aufkonzentriert. Dazu wurde das Eluat der 3-ABA-Säule auf die Hydroxyapatit-Säule

aufgetragen und die Säule mit 7 ml 20 mM Tris/HCl pH 7,5 + 5 mM β -Mercaptoethanol gewaschen. Das Protein wurde mit 7 x 0,5 ml 0,5 M Kaliumphosphat pH 7,5 + 5 mM β -Mercaptoethanol eluiert. Die Proteinkonzentration von PARP-1 wurde in einer SDS-PAGE durch Vergleich mit einem BSA-Standard ermittelt. Anschliessend wurden die Proben portioniert und bei -80°C eingefroren.

PARP-Aufschlusspuffer:	50 mM Tris/HCl, 1M NaCl, 5 mM β -Mercaptoethanol, 2 mM PMSF, pH 7,5
EDTA-Puffer:	PARP-Aufschlusspuffer + 100 mM EDTA
PARP-Elutionspuffer:	50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 40 mM Nikotinamid, 5 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,5

2.2.7.6 Reinigung von Proteinen mittels GSH-Sepharose

Die Reinigung von GST (Glutathion-S-Transferase) und dem Fusionsprotein GST-PARG₆₅ war mittels Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose möglich. Dazu wurden die Expressionspellets jeweils in PBS resuspendiert und mittels French Press aufgeschlossen. Dem Lysat wurde Triton X-100 bis zu einer Endkonzentration von 1 % (v/v) zugesetzt. Im Falle von GST-PARG₆₅ musste zudem DTT (Endkonzentration 5 mM) zugegeben werden, um die Bindung an die GSH-Sepharose zu ermöglichen. Die Ansätze wurden für 30 min bei 4°C über Kopf rotiert und anschliessend zentrifugiert (15 min, 4°C, 18.000 rpm). Die im Überstand befindlichen Proteine wurden an GSH-Matrix (GST /1,5 ml, GST-PARG₆₅/0,5 ml) gebunden (30 min, RT). Nach einem Waschschrift mit 50 ml PBS (GST) bzw. PBS + 5 mM DTT (GST-PARG₆₅) erfolgte die Elution der Proteine mit 5x 1 ml GSH-Elutionspuffer.

GSH-Elutionspuffer _{GST} :	PBS + 10 mM GSH _{red.} , pH 8,0
GSH-Elutionspuffer _{GST-PARG 65} :	PBS + 40 mM GSH _{red.} + 10 mM DTT + 2 % N-Octyl- β -D-Glukosid, pH 8,0

Beide Proteine wurden über Nacht bei 4°C jeweils gegen 2 L PBS mit 1 mM DTT und 10 % (v/v) Glycerin dialysiert und dann portioniert bei -80°C eingefroren.

2.2.7.7 Reinigung von PARG-Antikörpern

Der polyklonale Antikörper Kaninchen-anti-PARG wurde von der Firma Pineda-Antikörper (Berlin) gegen an Ni-NTA gereinigtes His-PARG₆₅ (siehe 2.2.7.4.1) generiert. Zur Aufreinigung der gelieferten Seren wurde an GSH-Sepharose gereinigtes GST-PARG₆₅ (siehe 2.2.7.6) auf einer Cyanogenbromid aktivierten Agarose immobilisiert. GST-PARG₆₅ wurde dafür zunächst über Nacht gegen 5 L PBS + 5 mM DTT dialysiert. Zur Herstellung der Affinitätsmatrix wurden 100 mg BrCN-Sepharose 4B in

Quellpuffer für 30 min bei 4°C gequollen. Danach wurde die Matrix 3x mit Quellpuffer gewaschen. Die dialysierten Proteine (ca. 1,5 mg) wurden zugegeben und die Mischung wurde 2 h bei Raumtemperatur rotiert (Über-Kopf-Rotation). Danach wurde 3x mit Quellpuffer gewaschen und die Säule zum Absättigen 1 h mit 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 rotiert. Danach wurde die Matrix 3x mit TBST gewaschen. Nach Zugabe des Antiserums wurde das Säulenmaterial 1 h bei Raumtemperatur rotiert und erneut dreimal mit TBST gewaschen. Die Elution der gereinigten Antikörper erfolgte durch Zugabe von AK-Elutionspuffer (je 0,5 ml-Fractionen). Dabei wurden in den Auffanggefässen 50 µl 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 vorgelegt, um den pH-Wert der Elutionsfraktionen so schnell wie möglich zu neutralisieren. Zur Sicherheit wurden Elutionsfraktionen mittels pH-Papier auf ihren pH-Wert untersucht und gegebenenfalls mit Tris/HCl pH 8,0 nachtitriert.

Um den Antikörpergehalt der Elutionsfraktionen zu ermitteln wurde ein Dot Blot (siehe 2.2.7.9.4) durchgeführt. Antikörperhaltige Fraktionen wurden mit 0,05 % Natriumazid versetzt und bei 4°C gelagert.

Quellpuffer: 50 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, pH 8,0

AK-Elutionspuffer: 200 mM Glyzin, 300 mM NaCl, pH 3,0

2.2.7.8 Analytische affinitätschromatographische Methoden

2.2.7.8.1 Präparation der Tannin-Sepharose

Gallotannine können aufgrund der zahlreich vorhandenen Hydroxylgruppen innerhalb des Moleküls unter Zuhilfenahme von Bisepoxirane nach einer Methode von Sundberg & Porath (1974) an Matrices gekoppelt werden. Dafür wurden 6 ml Sepharose 2B-Cl 3 x mit 15 ml H₂O (dest.) gewaschen und anschliessend in 4 ml H₂O (dest.) und 1,6 ml 1,3-Butadien-Dieoxid resuspendiert. Nach der Zugabe von 1,8 ml 2 M NaOH und 12 mg Natriumborhydrid wurde die Matrix 12 h bei 30°C inkubiert und anschliessend intensiv mit Wasser gewaschen. In der folgenden Kopplungsreaktion wurde das Säulenmaterial mit 6 ml 50 mM Kaliumphosphat + 100 mM Gallotannine/ pH 9,0 bei 65°C für 24 h inkubiert. Anschliessend wurde intensiv mit 50 mM Kaliumphosphat pH 9,0 gewaschen und die Matrix zum Absättigen freier Bindungsstellen 3 h bei 4°C mit 6 ml 0,1 M Ethanolamin in 50 mM Kaliumphosphat/pH 7,5-8,0 rotiert. Nach erneutem Waschen (5x 15 ml 50 mM Kaliumphosphat/pH 7,5) wurde die Tannin-Sepharose in 50 mM Kaliumphosphat + 0,1 % Natriumazid/pH 7,5 resuspendiert und bei 4°C gelagert.

2.2.7.8.2 Affinitätspräzipitation mit Tannin-Sepharose

Zur Affinitätspräzipitation mittels Tannin-Sepharose wurden Bakterienpellets aus 400 ml der Expression von His-PARG₁₁₀ bzw. Kontrollzellen (Vektor) in 10 ml Inkubationspuffer resuspendiert, mittels French Press (siehe 2.2.7.2.2) aufgeschlossen und zentrifugiert (2x 10 min, 4°C, 18.000 rpm). Der Überstand wurde durch Über-Kopf-Rotation (1 h, 4°C) an je 500 µl der Tannin-Sepharose gebunden und das Affinitätsmaterial anschliessend mit 5x 1 ml Inkubationspuffer + 1 M NaCl gewaschen. Zur Identifikation von Interaktionspartnern wurden 150 µl der so präparierten Affinitätsmatrix mit 1 mg Kernextrakten aus HeLa S3 (adhärent) Zellen (siehe 2.2.7.3.2) in 1 ml Bindepuffer inkubiert (1 h, 4°C). Nach mehreren Waschschritten (5x 1 ml) mit Bindepuffer wurden gebundene Proteine mit 300 µl Bindepuffer + 600 mM NaCl eluiert, mittels Hexan/Isopropanol (3/2 (v/v)) gefällt, im SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose-Membranen transferiert. Die Identifikation interagierender Proteine erfolgte mittels Western-Analysen (siehe 2.2.7.9.3).

Inkubationspuffer: 50 mM Kaliumphosphat, 5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, pH 7,2

Bindepuffer: 10 mM Tris/HCl, 7 mM MgCl₂, 50 µM ZnCl₂, 0,05 % (v/v) NP-40, 1 mM DTT, pH 8,0

2.2.7.8.3 *In vitro* Präzipitation mittels GSH-Sepharose

Um eine Interaktion von Proteinen *in vitro* nachzuweisen, wurde eine Präzipitation an GSH-Sepharose durchgeführt. Dafür wurden jeweils 7,5 µg gereinigtes GST-Fusionsprotein (siehe 2.2.7.6) zusammen mit 30 µl GSH-Matrix und entweder 20 µg gereinigtem His-XRCC1 (siehe 2.2.7.4.2) oder 30 µg His-PARP-1 (Elutionsfraktion der Reinigung an Ni-NTA, siehe 2.2.7.5) in 500 µl Bindepuffer (siehe 2.2.7.8.2) + 150 mM NaCl für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation (12.000 rpm, 5 min) wurde ungebundenes Protein in den Überständen nach der Methode von Rodriguez-Vico *et al.* (1989) gefällt. Die GSH-Matrix wurde 5x mit 1 ml Bindepuffer + 150 mM NaCl gewaschen. Gebundene Proteine wurden entweder durch ansteigende Salzkonzentrationen oder aber mit SDS-PAGE Probenpuffer eluiert. Alle Fraktionen wurden im SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mittels Western-Blot-Analysen untersucht.

2.2.7.8.4 *In vivo* Präzipitation mittels Ni-NTA-Sepharose

In EM9-XH Zellen wird XRCC1 als Polyhistidininfusionsprotein stabil überexprimiert (Caldecott *et al.*, 1995). Folglich können interagierende Proteine aus diesen Zellen relativ leicht durch Affinitätschromatographie an Ni-NTA angereichert werden. Dazu wurden die Zellen von EM9-V- bzw.

EM9-XH aus je drei 150 cm²-Flaschen abtrypsinisiert, zentrifugiert und mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellpellets wurden jeweils in 1 ml Aufschlusspuffer_{Ni-NTA} resuspendiert und mittels Ultraschall (6x 10 Sekunden, jeweils 30 Sekunden Pause auf Eis) aufgeschlossen und für 30 min bei 4°C rotiert (Überkopf-Rotation). Nach einer Zentrifugation (30 min, 4°C, 14.000 rpm) wurde der Proteingehalt der im Überstand befindlichen Proteine mittels Bradford-Assay (siehe 2.2.7.9.1) bestimmt. Jeweils 3,8 mg Protein wurden an 100 µl äquilibrierte Ni-NTA-Sepharose gebunden (1 h, 4°C). Nach einer Zentrifugation (12.000 rpm, 5 min) wurde ungebundenes Protein in den Überständen nach der Methode von Rodriguez-Vico *et al.* (1989) gefällt. Die Ni-NTA-Matrix wurde zunächst mit 3x 1 ml Aufschlusspuffer_{Ni-NTA} ohne Proteaseinhibitoren und anschliessend mit 3x 1 ml Waschpuffer_{Ni-NTA} gewaschen. Die Elution gebundener Proteine erfolgte stufenweise mit Aufschlusspuffer_{Ni-NTA-30}, Aufschlusspuffer_{Ni-NTA-80} bzw. Aufschlusspuffer_{Ni-NTA-250}. Alle Fraktionen wurden im SDS-PAG aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mittels Western-Blot-Analysen untersucht.

Aufschlusspuffer _{Ni-NTA} :	40 mM HEPES, 0,5 M NaCl, 0,8 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerin, 5 mM β-Mercaptoethanol, pH 8,0, + Proteaseinhibitoren
Waschpuffer _{Ni-NTA} :	Aufschlusspuffer _{Ni-NTA} + 10 mM Imidazol
Aufschlusspuffer _{Ni-NTA-30} :	Aufschlusspuffer _{Ni-NTA} + 30 mM Imidazol
Aufschlusspuffer _{Ni-NTA-80} :	Aufschlusspuffer _{Ni-NTA} + 80 mM Imidazol
Aufschlusspuffer _{Ni-NTA-250} :	Aufschlusspuffer _{Ni-NTA} + 250mM Imidazol
Proteaseinhibitoren:	Leupeptin (0,5 µg/ml), Pepstatin (0,5 µg/ml), PMSF (1 mM) Aprotinin (2 µg/ml)

2.2.7.8.5 Immunpräzipitation

Zum Nachweis der Interaktion zwischen PARP-1 und PARG wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Zunächst wurden 150 µg Kernextrakte aus unbehandelten HeLa S3 (adhärent) Zellen präpariert (siehe 2.2.7.3.2), 1:4 in KE-Verdünnungspuffer verdünnt und eine Präabsorption dieser Extrakte an Protein A Sepharose mit kovalent gebundenem Ziegen Serum (8 mg Serum/100 µl Protein A-Sepharose) durchgeführt (30 min, 4°C). Der Überstand wurde erneut an Protein A Sepharose mit kovalent gebundenem Ziegen Serum präabsorbiert. Anschliessend wurde der Überstand einer Immunpräzipitation an Protein A-Sepharose mit kovalent gebundenem Ziegen Serum (26 µg Serum/ 70 µl Protein A Sepharose, Negativkontrolle) bzw. Protein A-Sepharose mit kovalent gebundenem PARP-1 Antikörper (10 µg α-PARP-1 (A-20)/ 70 µl Protein A Sepharose) unterzogen (30 min, 4°C). Danach wurden die Sepharosepartikel dreifach mit 3x 1 ml IP-Waschpuffer gewaschen und die im letzten Waschschrift enthaltenen Proteine nach der Methode von Rodriguez-Vico *et al.* (1996) gefällt. Alle

Fraktionen wurden im SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mittels Western-Blot-Analysen untersucht.

KE-Verdünnungspuffer: 20 mM HEPES, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, pH 7,5

IP-Waschpuffer: 20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, pH 7,5

2.2.7.9 Analyse von Proteinen

2.2.7.9.1 Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Assay (Bradford *et al.*, 1976)

1- 5 μ l der Proteinprobe wurden mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt und die Proteinkonzentration wurde spektroskopisch bei $\lambda = 595$ nm ermittelt. Als Referenz diente eine BSA-Eichreihe.

Bradford-Reagenz: 0,007 % (w/v) Serva Blau G250, 5 % (v/v) Ethanol, 8,5 % (v/v) H_3PO_4

2.2.7.9.2 SDS-PAGE

Die Proteintrennung wurde durch SDS-PAGE nach Laemmli durchgeführt (Laemmli, 1970).

Trenngel:

Acrylamidkonzentration (%)	8	10	12,5	15	%
Rotiphorese Gel30	3	7,5	4,5	5,0	ml
Trenngelpuffer	2,8	2,8	2,8	2,8	ml
H ₂ O (dest.)	5,4	4,6	3,9	2,3	ml
20 % (v/v) SDS-Lösung	56	56	56	56	μ l
TEMED	5	5	5	5	μ l
10 % (v/v) APS-Lösung	50	50	50	50	μ l

Die Lösung wurde gut gemischt, gleichmässig zwischen die Glasplatten gegossen und mit wassergesättigtem Butanol überschichtet. Nach dem Ablauf des Polymerisationsprozess wurde die Geloberfläche getrocknet, die Sammelgellösung aufgetragen und der Kamm luftblasenfrei eingesetzt.

Sammelgel:

Acrylamidkonzentration (%)	5
Rotiphorese Gel30	0,625 ml
Sammelgelpuffer	0,625 ml
H ₂ O	2,47 ml
20 % (v/v) SDS-Lösung	25 µl
TEMED	3 µl
10 % (v/v) APS-Lösung	20 µl

Die Proteinproben wurden mit 20 % (v/v) SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C erhitzt und im Gel bei einer Stromstärke von 25 mA/Gel aufgetrennt. Zur Detektion wurden die Gele zunächst 20 min in Coomassie-Färbelösung und anschliessend 10 min in Entfärbelösung geschwenkt.

Trenngelpuffer:	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
2x SDS-Probenpuffer:	10 ml 1,5 M Tris/HCl, 6 ml 20 % (v/v) SDS-Lösung, 30 ml Glycerin 15 ml β-Mercaptoethanol, 1,8 mg Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer:	0,3 % (w/v) Tris, 1,44 % (w/v) Glyzin, 0,1 % (w/v) SDS
Coomassie-Färbelösung:	0,16 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250, 40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung:	40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure

2.2.7.9.3 Western-Blot und Detektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Zum Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern wurden die Proteine im Anschluss an eine SDS-PAGE durch das *semi dry*-Verfahren auf Nitrozellulosemembranen (Macherey-Nagel, Düren) übertragen. Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 2,5A/cm² für 1,5-6 Stunden. Nach dem Transfer wurden die Proteine durch Schwenken der Membran in Ponceau S-Lösung angefärbt und wieder mit H₂O (dest.) wieder entfärbt. Anschliessend wurde die Membran für mindestens 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C blockiert (α-RGS (His)₄: 5 % BSA (w/v) in TBS, alle anderen Antikörper: 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS). Die Blockierungslösung wurde abgegossen und der Blot mit dem ersten Antikörper (siehe Tab. 2.9), verdünnt in TBS, für mindestens 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde 3x 10 min mit TBS (α-RGS (His)₄) oder TBST (alle weiteren Antikörper) gewaschen. Anschliessend wurde erneut in Blockierungslösung für 20 min geschwenkt und der Blot für mindestens 1 h mit dem zweiten Antikörper (siehe Tab. 2.9), verdünnt in TBS, geschwenkt. Nach den letzten Waschschritten für 3 x 10 min mit TBST erfolgte die Detektion.

Ponceau S-Lösung:	0,02 % (w/v) Ponceau S, 0,3 % (w/v) Trichloressigsäure, 0,3 % (w/v) Sulfosalicylsäure
TBS:	50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5
TBST:	TBS + 0,05 % (v/v) Tween 20

2.2.7.9.4 Dot-Blot

Für den Dot Blot wurden 3 µl einer Proteinlösung auf eine Nitrozellulosemembran aufgebracht, mit Ponceau S-Lösung angefärbt und anschliessend wieder entfärbt.

Für den Nachweis der Antikörper-Reinigung (siehe 2.2.7.7) wurde die Membran nur mit dem sekundären anti-Kaninchen IgG-AP hybridisiert und dann entwickelt.

2.2.7.9.5 Detektion mittels Alkalischer Phosphatase

Membranen bei denen die Hybridisierung mit AP-gekoppelten sekundären Antikörpern erfolgte, wurden nach dem letzten Waschschrift für 10 min in AP-Puffer geschwenkt. Zur Detektion wurden 10 ml AP-Puffer mit 66 µl NBT und 33 µl BCIP-Lösung versetzt und für 1-10 min im Dunkeln auf die Membran gegeben. Die Nachweisfärbung erfolgte direkt auf der Membran. Anschliessend wurden die Membranen mit Wasser gewaschen.

AP-Puffer : 100 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9,5

2.2.7.9.6 Detektion mittels Meerrettich-Peroxidase (HRP)

Der Nachweis von sekundären Antikörpern die mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert waren, erfolgte mittels Chemolumineszenz. Dazu wurden 0,5 ml Luminol-Reagenz A mit 0,5 ml Luminol-Reagenz B gemischt und auf den gewaschenen Blot gegeben. Die Membran wurde in Frischhaltefolie eingepackt und für 1 min inkubiert. Anschliessend wurde das Gemisch abgegossen, die Membran erneut in Frischhaltefolie verpackt und die Chemolumineszenz detektiert. Dazu wurden ein Film (Kodak X-Omat) aufgelegt und 2-10 min exponiert. Anschliessend wurde der Film wie unter 2.2.7.10.2 beschrieben entwickelt.

2.2.7.10 Radiochemische Methoden

2.2.7.10.1 Cerenkov Messung

Radioaktivität wurde mit Hilfe des Flüssigszintillationszählers Beckmann LS 6000SC (Beckmann Coulter, Krefeld) durch Cerenkov-Messung quantifiziert. Die Messung erfolgte spezifisch für ^{32}P für 1 x 60 Sekunden

2.2.7.10.2 Autoradiographie

Im Anschluss an eine PAGE oder eine Dünnschichtchromatographie wurden radioaktiv markierte Proteine oder Nukleotide durch Autoradiographie detektiert. Dazu wurde ein Röntgenfilm (Kodak X-Omat AR, Roth, Karlsruhe) in einer Röntgenkassette auf das Gel oder die Dünnschichtchromatographie-Platte gelegt und für unterschiedliche Zeiten bei -80 °C belichtet. Anschliessend wurden die Filme in der automatischen Entwicklungsanlage Konica SRX-101A (Konica, Hohnbrunn) entwickelt.

2.2.7.10.3 Phosphoimager

Im Anschluss an eine Dünnschichtchromatographie wurden radioaktiv markierte Nukleotide mit dem Phosphoimager FUJI FLA-500 (Raytest, Straubenhardt) detektiert. Die Auswertung erfolgte unter Zuhilfenahme des Programmes „AIDA“ (Raytest, Straubenhardt).

2.2.7.11 Enzymatische Methoden

2.2.7.11.1 Synthese von ^{32}P -markierter Poly (ADP-Ribose)

Ca. 50 μg gereinigte His-PARP-1 (Elution der Ni-NTA-Sepharose, siehe 2.2.7.5) wurde über Nacht bei 30 °C in 500 μl 1x Bindepuffer in Anwesenheit von 30 μg Histonen und 10 μg sonifizierter Lachsspermien-DNA inkubiert. Um grosse Mengen ^{32}P -radioaktiv markierter Poly (ADP-Ribose) zu synthetisieren, enthielten die Reaktionsansätze zusätzlich 10 μM NAD^+ und 10 μCi $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$ (spez. Aktivität 10 mCi/ml). Alternativ wurden die Ansätze in Gegenwart von 1 mM NAD^+ und 0,2 μCi $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$ (spez. Aktivität 10 mCi/ml) durchgeführt, um hochkonzentrierte unmarkierte Poly (ADP-Ribose) zu erhalten. Am nächsten Tag wurde die DNA durch Zugabe von DNase (Endkonzentration 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und 5 mM MgCl_2 bei 37 °C für 45 min entfernt. Die PAR-Ketten wurden anschliessend nach der

Methode von Panzeter und Althaus (1990) aufgereinigt. Dazu wurden ^{32}P -markierte Proteine mit 25 % (w/v) TCA bei 4°C für 20 min gefällt. Das Protein wurde bei 13.000 rpm, Raumtemperatur für 20 min sedimentiert. Das Präzipitat wurde mit 5 % (w/v) TCA und anschliessend mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. ^{32}P -markierte PAR-Ketten wurden durch alkalische Lyse bei 60°C in TE pH 12,0 unter Schütteln vom Protein abgetrennt. Zur Entfernung der Proteine erfolgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion. Anschliessend wurden die PAR-Polymere über Nacht bei -20°C durch Ethanolfällung (siehe 2.2.1.6) präzipitiert. Nach einem Waschschrift mit 70 % (v/v) Ethanol wurde das Pellet getrocknet und in TE-Puffer pH 8,0 aufgenommen. Die Menge inkorporierter ADP-Ribose konnte aus dem prozentualen Einbau des ^{32}P -markierten NAD^+ bestimmt werden.

TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 oder 12,0

2.2.7.11.2 Bestimmung der PARG-Aktivität

Bei der Bestimmung der PARG-Aktivität nach der Methode von Tsai *et al.* (1992), wurde der Abbau radioaktiv markierter $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -Poly (ADP-Ribose) zu $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -ADP-Ribose gemessen (siehe Abb. 2.1).

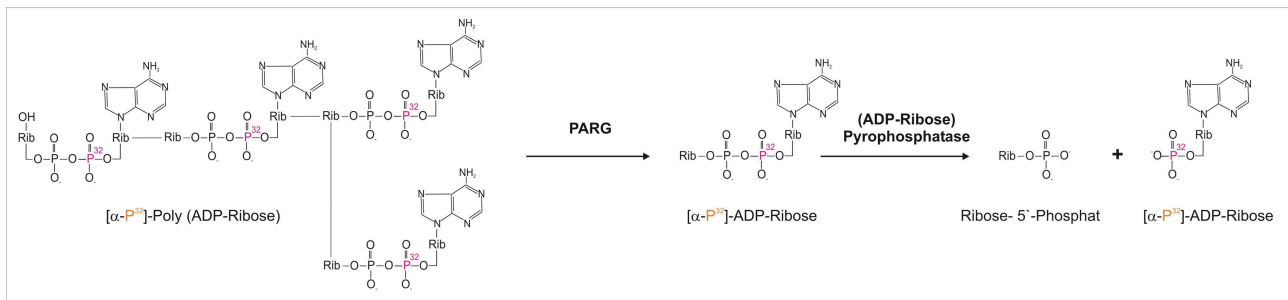


Abb. 2.1: Prinzip der Bestimmung der PARG-Aktivität

Wurde die Aktivität des Enzyms in Kernextrakten bzw. von rekombinanter PARG bestimmt, enthielten die Reaktionsansätze folgende Zusammensetzung:

		Volumen	Konzentration
Mix 1:	Kernextrakt oder	0-5 μl	5- 15 μg
	rekombinante PARG	0-2 μl	0- 250 ng
	PARG-Puffer	ad. 25 μl	-
Mix 2:	Poly (ADP-Ribose)	variabel	3 μM
	^{32}P -Poly (ADP-Ribose)	variabel	-
	PARG-Reaktionspuffer	ad. 5 μl	-
	Ansatzvolumen: 30 μl		

Wurde die Wirksamkeit potenzieller PARG-Inhibitoren auf rekombinante PARG (His-PARG₆₅) bzw. in Kernextrakten untersucht, so enthielten die Reaktionsansätze folgende Zusammensetzung:

		Volumen	Konzentration
Mix 1:	Kernextrakt oder	0-5 µl	5- 15 µg
	rekombinante PARG	0-2 µl	0- 250 ng
	+/- PARG-Inhibitoren (in PARG-Puffer)	0- 5 µl	0- 400 µM
	PARG-Puffer	ad. 25 µl	-
Mix 2:	Poly (ADP-Ribose)	variabel	3 µM
	³² P-Poly (ADP-Ribose)	variabel	-
	PARG-Reaktionspuffer	ad. 5 µl	-
Ansatzvolumen: 30 µl			

In beiden Fällen wurde der Mix 1 zunächst für 5 min bei 30°C inkubiert und die Reaktion anschliessend durch Zugabe von Mix 2 für die im Ergebnisteil angegebene Zeit gestartet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Aceton beendet und radioaktiv markierte Substanzen für 1 h bei -20°C gefällt. Nach einer Zentrifugation (13.000 rpm, 25°C, 20 min) wurde das Pellet getrocknet, in TE-Puffer (pH 8,0) gelöst und am Flüssigszintillationszähler ausgezählt (siehe 2.2.7.10.1). Gleiche Mengen an Radioaktivität wurden auf POLYGRAM[®] CEL 300 PEI/UV₂₅₄-Dünnschichtplatten aufgetragen. Der Vorlauf der Dünnschichtchromatographie wurde in 0,1 M LiCl/1 M Essigsäure, der Hauptlauf in 0,3 M LiCl/1 M Essigsäure vorgenommen. Anschliessend wurden die Platten getrocknet und mit einer Plastikhülle geschützt. Radioaktiv markierte Produkte wurden mittels Autoradiographie detektiert und die Menge an gebildeter ADP-Ribose mittels eines Phosphoimagers (siehe 2.2.7.10.3) quantifiziert. Alternativ wurden die radioaktivmarkierten Bereiche einzeln ausgeschnitten und die Menge inkorporierter Radioaktivität mittels Cerenkov-Messung quantifiziert.

PARG-Reaktionspuffer: 50 mM Kaliumphosphat, 5 mM MgCl₂ 100 µg/ml BSA,
10 mM β-Mercaptoethanol, pH 7,2

Für Messungen mit Kernextrakten bei denen die Aktivität der ADP-Ribose Pyrophosphatase gehemmt werden sollte, wurde dem Reaktionsansatz kein MgCl₂ zugesetzt.

2.2.7.11.3 Bestimmung der Poly (ADP-Ribosyl)ierungsaktivität

Um die Gesamt-Poly (ADP-Ribosyl)ierungsaktivität in Kernextrakten zu bestimmen, wurden diese mit sonifizierter Lachsspermien-DNA und NAD^+ inkubiert und die Menge inkorporierter Poly (ADP-Ribose) nach TCA-Fällung bestimmt:

		Volumen	Konzentration
Mix 1:	Kernextrakt	0- 5 μl	5- 15 μg
	PARG-Puffer (- MgCl_2)	ad. 25 μl	-
Mix 2:	DNA (10 mg/ml)	1,2 μl	400 $\mu\text{g/ml}$
	100 μM NAD^+	3	10 μM
	$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$	variabel	-
	PARG-Puffer (- MgCl_2)	ad. 5 μl	-
Ansatzvolumen: 30 μl			

Wurde die Wirksamkeit potenzieller PARG-Inhibitoren auf rekombinante PARP-1 bzw. auf Proteine in Kernextrakten untersucht, so enthielten die Reaktionsansätze folgende Zusammensetzung:

		Volumen	Konzentration
Mix 1:	Kernextrakt oder	0- 5 μl	5- 15 μg
	rekombinante PARP	0- 5 μl	0- 200 ng
	+/- PARG-Inhibitoren (in PARG-Puffer)	0- 5 μl	0- 400 μM
	PARG-Puffer (- MgCl_2)	ad. 25 μl	-
Mix 2:	DNA (10 mg/ml)	1,2 μl	400 $\mu\text{g/ml}$
	100 μM NAD^+	3	10 μM
	$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$	variabel	-
	PARG-Puffer (- MgCl_2)	ad. 5 μl	-
Ansatzvolumen: 30 μl			

In beiden Fällen wurde der Mix 1 zunächst für 5 min bei 30°C inkubiert und die Reaktion mit dem Mix 2 gestartet. Nach dem Ablauf der Reaktion (Angaben siehe Ergebnisteil) bei 30°C wurden ^{32}P -markierte Proteine mit 25 % (w/v) TCA bei 4°C für 20 min gefällt und die Ansätze wurden für 20 min bei 13.000 rpm (Raumtemperatur) zentrifugiert. Das Präzipitat wurde mit 5 % (w/v) TCA und anschliessend mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Die verbliebene Menge Radioaktivität wurde mittels Cerenkov-Messung (siehe 2.2.7.10.1) quantifiziert. Die Menge inkorporierter ADP-Ribose konnte damit aus dem prozentualen Einbau des ^{32}P -markierten NAD^+ bestimmt werden.

Sollte die Poly (ADP-Ribosyl)ierungsaktivität rein qualitativ bestimmt werden, wurde der Reaktionsansatz mit 20% (v/v) SDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE separiert (siehe 2.2.7.9.2). Der Einbau von [α - ^{32}P]-ADP-Ribose wurde durch Autoradiographie (siehe 2.2.7.10.2) sichtbar gemacht.

2.2.7.11.4 Kettenlängenanalyse von ^{32}P -markierten ADP-Ribosepolymeren

Zur Kettenlängenanalyse von ^{32}P -markierten (ADP-Ribose)-Polymeren wurden diese wie in 2.2.7.11.1 beschrieben isoliert, ohne jedoch die ethanolische Fällung durchzuführen. Unmittelbar nach der Chloroform-Extraktion wurden die Proben am Flüssigszintillationszähler ausgezählt (siehe 2.2.7.10.1), mit 40 % (v/v) PAR-Probenpuffer versetzt und in einem Sequenziergel (20 % (w/v) Polyacrylamid in TBE-Puffer bzw. 8 % (w/v) Polyacrylamid + 7 M Harnstoff in TBE-Puffer) aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte für 1,5 h bei 30 mA und 600 V. Das Gel wurde anschliessend auf eine Plastikfolie übertragen und durch eine Plastikhülle geschützt. Radioaktiv markierte Polymere wurden mittels Autoradiographie (siehe 2.2.7.10.2) detektiert.

TBE-Puffer: 90 mM Tris/HCl, pH 8,3, 90 mM Borat, 2 mM EDTA

PAR-Probenpuffer: 7 M Harnstoff, 25 mM NaCl, 4 mM EDTA, 0,02 % (w/v) Bromphenol-Blau, 0,02 % (w/v) Xylencyanol

2.2.7.11.5 *In vitro* Poly (ADP-Ribosyl)ierung von Proteinen

Zum Nachweis der Poly (ADP-Ribosyl)ierung der PARG wurden rekombinant exprimierte GST-PARG₆₅ entsprechend dem Protokoll der *in vitro* GST-Präzipitation an GSH-Matrix gebunden (siehe 2.2.7.8.3). Die Poly (ADP-Ribosyl)ierung erfolgte danach für 20 min bei 30°C durch die Zugabe von:

100 ng PARP-1

400 $\mu\text{g/ml}$ DNA

10 μCi [α - ^{32}P]-NAD⁺ (spez. Aktivität 10 mCi/ml)

ad. 35 μl Bindepuffer (siehe 2.2.7.8.2)

Anschliessend wurde die GSH-Matrix abzentrifugiert (2 min, 4000 rpm), zweimal mit Bindepuffer gewaschen und in SDS-Probenpuffer resuspendiert. Als Kontrolle wurde eine direkte Poly (ADP-Ribosyl)ierung mit Histonen bzw. BSA durchgeführt. Alle Proben wurden erhitzt (95°C, 2 min) und im SDS-PAG aufgetrennt. Poly (ADP-Ribosyl)ierte Produkte wurden mittels Autoradiographie (siehe 2.2.7.10.2) sichtbar gemacht.

2.2.7.11.6 Bestimmung des zellulären NAD⁺ und ATP-Gehaltes

Zur Bestimmung des ATP- und NAD⁺-Gehaltes in Extrakten von CHO-Zellen nach genotoxischer Schädigung wurden die Zellen aus je einer 10 cm-Schale mittels eines Schabers abgekratzt und abzentrifugiert (1500 rpm, 5 min). Das resultierende Pellet wurde mit PBS gewaschen, danach in 400 µl 3 % (v/v) Perchlorsäure resuspendiert und für 15 min bei 4°C kräftig geschüttelt. Nach einer Zentrifugation (10 min, 4°C, 13.000 rpm) wurde der Überstand durch Zugabe von 20 µl 1 M Tris/HCl (pH 7,0) und 120 µl 2 M KOH auf pH 7,5 eingestellt.

Die Bestimmung des NAD⁺-Gehaltes erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Jacobson & Jacobson (1997). Dazu wurden folgende Lösungen in eine Halbmikroküvette pipettiert:

		Volumen	Endkonzentration
Mix 1:	600 mM Tris/HCl (pH 7,5)	100 µl	60 mM
	1 mM MTT	100 µl	100 µM
	9 mM PMS	100 µl	900 µM
	1 M Nikotinamid	100 µl	100 mM
	57 % (v/v) Ethanol	100 µl	5,7 % (v/v)
	Alkohol-Dehydrogenase (2500 U/ml)	5 µl	12,5 U/ml
	H ₂ O (dest.)	445 µl	-
Mix 2:	Zellextrakt	50 µl	-
	Ansatzvolumen: 1000 µl		

Es wurde die Grundabsorption des Mix1 bei 560 nm bestimmt und die Reaktion durch die Zugabe von 50 µl Zellextrakt (Mix2) gestartet. Nach einer Reaktionszeit von 10 min (25°C) wurde erneut die Absorption bestimmt und $\Delta A_{560}/10$ min ermittelt. Anhand einer zuvor erstellten NAD⁺-Referenzreihe konnte aus dem Extinktionsunterschied die absolute NAD⁺-Konzentration ermittelt werden.

Die Bestimmung des ATP-Gehaltes erfolgte mit dem ATP-Determination-Kit entsprechend den Hinweisen des Herstellers. Dazu wurden folgende Lösungen in ein Messgefäß pipettiert:

		Volumen	Endkonzentration
Mix 1:	20x Reaktionspuffer	500 µl	1x
	100 mM DTT	100 µl	1 mM
	10 mM Luciferin	500 µl	0,5 mM
	Luciferase (5 mg/ml)	2,5 µl	1,25 µg/ml
	H ₂ O (dest.)	8900 µl	-
Mix 2:	Zellextrakt	5- 10 µl	-

Das Messgefäß wurde in ein Luminometer (LumacounterTM M2080, Abimed/Düsseldorf) gestellt und die Grundlumineszenz des Mix1 bestimmt. Nach Zugabe von 5- 10 μ l Zellextrakt wurde die Lumineszenz für 10 Minuten gemessen. Anhand einer zuvor erstellten ATP-Referenzreihe konnte der absolute ATP-Gehalt ermittelt werden.

20x Reaktionspuffer: 500 mM Trizin, 100 mM MgSO₄, 2 mM EDTA, 2 mM Natriumazid, pH 7,8

2.2.7.11.7 Bestimmung der Adenylierungsaktivität von Ligase III

Zum Nachweis der Adenylierungsaktivität gereinigter Ligase (His-Lig III, siehe 2.2.7.4.4) wurde gereinigtes Protein mit [α -³²P]-ATP inkubiert.

Die Reaktionsansätze enthielten:

- 50 pmol His-Ligase III
- 50 % (v/v) Proteinpuffer
- 1x Ligase-Reaktionspuffer
- 6 pmol [α -³²P]-ATP
- ad. 20 μ l H₂O

Die Reaktion verlief für 20 min bei 30°C und wurde durch Zugabe von SDS-Probenpuffer beendet. Die Proben wurden erhitzt (10 min, 85°C) und im SDS-Gel aufgetrennt. Adenylierte Ligase wurde mittels Autoradiographie detektiert (siehe Abb. 2.2)

Ligase-Reaktionspuffer: 66 mM Tris, 6,6 mM MgCl₂, 10 mM DTT, pH 8,0

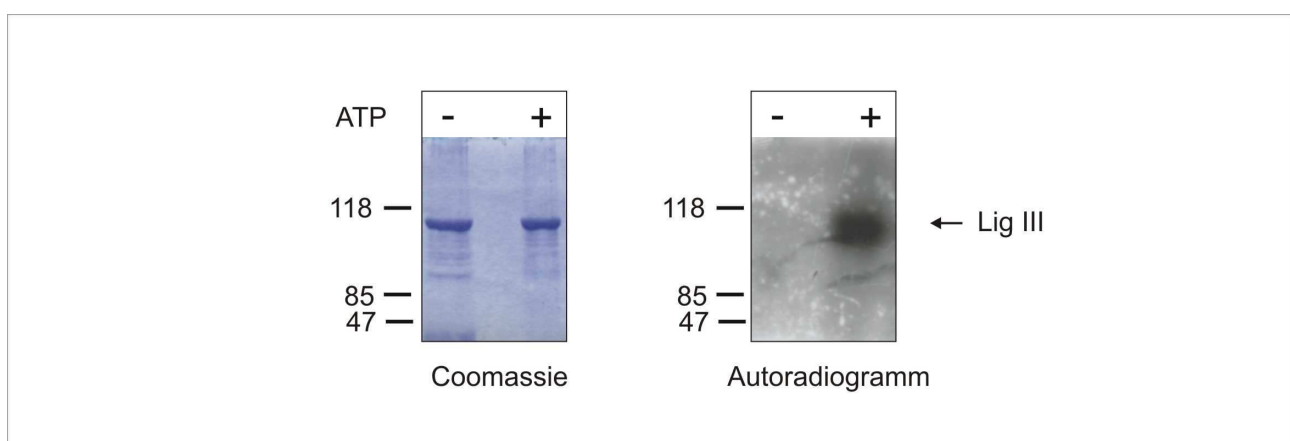


Abb. 2.2: Nachweis der Autoadenylierung gereinigter His-Lig III