

10 Anhang

10.1 Sequenz der HeLa S3 PARG-cDNA

1 CGCAGTCCATCTCTCTCAGGGTTAGTGAATGAGGCTCTCCGCCCGGGCCGGCCCGGGGAC 60

61 AGTGCCTGCTGGTCCCAGC**ATGA**ATGCGGGCCCCGGCTGTGAACCC**CTKR**P 120
M N A G P G C E P

121 **NLS** CCCGCTGGGGCGCCGCTACA**ACTTCGCCGGCTGCTTCGGACGCCCGGAGCTTT****pot.** 180
R W G A A T T S P A A S D A R S F **PSR**

181 **NLS** GGCAGAGGCGCGTCC**CTCGACCCCAAGGACGCTCACGTGCAGTTCAGGGTCCCACCGTCCT** 240
Q R R V L D P K D A H V Q F R V P P S S

241 CGCCAGCCTGCGTCCCAGGGCGGGCGGGACAGCACAGAGGCAGCGCCACCTCGCTTGTTT 300
P A C V P G R A G Q H R G S A T S L V F

301 TCAAACAAAAGACTATTACCAGTTGG**ATG**GACACTAAAGGAATCAAGACAGCGGAATCAG 360
K Q K T I T S W M D T K G I K T A E S E

361 AAAGTTTGGATAGTAAAGAAAACAACAATACAAGAATAGAATCCATG**ATG**AGTTCTGTAC 420
S L D S K E N N N T R I E S M M S S V Q

421 AAAAAGATAACTTTTACCAACATAATGTAGAAAA**AT**TAGAAAATGTTTCTCAGCTAAGTC 480
K D N F Y Q H N V E K **LENVSQLSL**

481 **TT**GATAAGTCACCCACTGAAAAAAGTACACAGTATTTGAACCAGCATCAGACTGCAGCAA 540
D K S P T E K S T Q Y L N Q H Q T A A M

541 TGTGTAAGTGGCAAAATGAAGGGAAACACACGGAGCAGCTTTTGGAAAGTGAACCTCAAA 600
C K W Q N E G K H T E Q L L E S E P Q T

601 CAGTAACCCTGGTACCAGAGCAGTTT**AGTAATGCTAACATTGATCGGT**CACCTCAAAATG 660
V T L V P E Q F S N A N I D R S P Q N D

661 ATGATCACAGTGACACAGATAGTGAAGAGAATAGAGACAATCAACAGTTTCTCACA**ACTG** 720
D H S D T D S E E N R D N Q Q F L T T V

721 TAAAGCTTGCAAATGCAAAGCAGACTACAGAAGATGAACAGGCCAGAGAAGCCAAAAGCC 780
K L A N A K Q T T E D E Q A R E A K S H

781 ACCAGAAGTGCAGCAAGTCTTGGCGATCCTGGGGAAGACTGTGCAAGTTGTCAGCAAGATG 840
 Q K C S K S C D P G E D C A S C Q Q **D E**
↑
Caspase-Schnittstelle

841 AGATAGATGTGGTGCCAGAGAGTCCATTGTCAGATGTTGGCTCTGAGGATGTTGGTACTG 900
I D V V P E S P L S D V G S E D V G T G

901 GGTCAAAAAATGACAACAAATTGACTAGACAAGAAAGTTGCCTAGGAAATTCTCCTCCAT 960
 S K N D N K L T R Q E S C L G N S P P F

961 TTGAGAAGGAAAGTGGACCCGAGTCACCGATGGATGTGGATAATTCTAAAAATAGTTGTC 1020
 E K E S G P E S P **M D V D** N S K N S C Q
↑
Caspase-Schnittstelle

1021 AAGACTCAGAAGCAGATGAGGAGACAAGTCCAGGTTTTGATGAACAAGAAGATGGTAGTT 1080
 D S E A D E E T S P G F D E Q E D G S S

1081 CCTCCCAAACAGCAAATAAACCTTCAAGGTTCCAAGCAAGAGACGCTGACATTGAATTTA 1140
 S Q T A N K P S R F Q A R D A D I E F R

1141 GGAAACGGTACTCTACTAAGGGCGGTGAAGTTAGATTACATTTCCAATTTGAAGGAGGAG 1200
 K R Y S T K G G E V R L H F Q F E G G E

1201 AGAGTCGCACTGGAATGAATGATTTAAATGCTAAACTACCTGGAAATATTTCTAGCCTGA 1260
 S R T G M N D L N A K L P G N I S S L N

1261 ATGTAGAATGCAGAAATTCTAAGCAACATGGAAAAAAGGATTCTAAAATCACAGATCATT 1320
 V E C R N S K Q H G K K D S K I T D H F

pot. bipartite NLS

1321 TCATGAGACTGCCCAAAGCAGAGGACAGAAGAAAAGAACAGTGGGAAACCAAACATCAAA 1380
M R L P K A E D R R K E Q W E T K H Q R

T E R K I P K Y V P P H L S P D K K W L

pot. mitochondriale Lokalisations-

1441 TTGGAACTCCCATGAGGAGATGAGAAGAATGCCTCGGTGTGGGATCCGGCTGCCTCTCT 1500
 G T P I E E **M R R M P R C G I R L P L L**

Sequenz

1501 **TGAGACCA**TCTGCCAATCACACAGTAACTATTCGGGTAGATCTTTTGCAGCAGGAGAAG 1560
R P S A N H T V T I R V D L L R A G E V

1561 TTCCTAAACCTTTTCCAACACATTATAAAGTTTTGTGGGATAACAAGCATGTTAAAATGC 1620
 P K P F P T H Y K G L W D N K H V K M P

1621	CTTGTTTCAGAACAAAATTTGTACCCAGTGGAAAGATGAGAATGGTGAGCGAACTGCGGGGA C S E Q N L Y P V E D E N G E R T A G S	1680
1681	GCCGGTGGGAGCTCATTCACTGCACCTTCTCAACAAAATTTACACGACCCAAAACCTTGA R W E L I Q T A L L N K F T R P Q N L K	1740
1741	AGGATGCTATTCTGAAATACAATGTGGCATATTCTAAGAAATGGGACTTTACAGCTTTGA D A I L K Y N V A Y S K K W D F T A L I	1800
1801	TCGATTTCTGGGATAAGGTACTTGAAGAAGCAGAAGCTCAACATTTATATCAGTCCATCT D F W D K V L E E A E A Q H L Y Q S I L	1860
1861	TGCCTGATATGGTGAAAATTGCACTCTGTCTGCCAAATATTTGCACCCAGCCAATACCAC P D M V K I A L C L P N I C T Q P I P L	1920
1921	TCCTGAAACAGAAGATGAATCATTCCATCACAATGTCGCAGGAACAGATTGCCAGTCTTT L K Q K M N H S I T M S Q E Q I A S L L	1980
1981	TAGCTAATGCTTTCTTCTGCACATTTCCACGACGAAATGCTAAGATGAAATCGGAGTATT A N A F F C T F P R R N A K M K S E Y S	2040
2041	CTAGTTACCCAGACATTAACCTCAATCGATTGTTTGAGGGACGTTTCATCAAGGAAACCGG S Y P D I N F N R L F E G R S S R K P E	2100
2101	AGAACTTAAAACGCTCTTCTGCTACTTTAGAAGAGTCACAGAGAAAAACCTACTGGGT K L K T L F C Y F R R V T E K K P T G L	2160
2161	TGGTGACATTTACAAGACAGAGTCTTGAAGATTTTCCAGAATGGGAAAGATGTGAAAAAC V T F T R Q S L E D F P E W E R C E K P	2200
2221	CCTTGACACGATTGCATGTCACCTTACGAAGGTACCATAGAAGAAAATGGCCAAGGCATGC L T R L H V T Y E G T I E E N G Q G M L	2280
2281	* TACAGGTGGATTTTGCAAATCGTTTTGTTGGAGGTGGTGTAAACCAGTGCAGGACTTGTGC Q V D F A N R F V G G G V T S A G L V Q	2340
2341	* * AAGAAGAAATCCGCTTTTTAATCAATCCTGAGTTGATTATTTACGGCTCTTCACTGAGG E E I R F L I N P E L I I S R L F T E V	2400
2401	TGCTGGATCACAATGAATGTCTAATTATCACAGGACTGAGCAGTACAGTGAATACACAG L D H N E C L I I T G T E Q Y S E Y T G	2460
2461	* GCTATGCTGAGACATATCGTTGGTCCCGGAGCCACGAAGATGGGAGTGAAAGGGACGACT Y A E T Y R W S R S H E D G S E R D D W	2520
2521	GGCAGCGGCGCTGCACTGAGATCGTTGCCATCGATGCTCTTCACTTCAGACGCTACCTCG Q R R C T E I V A I D A L H F R R Y L D	2580

	pot. NLS	
2581	ATCAGTTTGTGCCTGAGAAAATGAGACGCGAGCTGAACAAGGCTTACTGTGGATTTCTCC Q F V P E K M R R E L N K A Y C G F L R	2640
2641	GTCCTGGAGTTTCTTCAGAGAATCTTTCTGCAGTGGCCACAGGAAACTGGGGCTGTGGTG P G V S S E N L S A V A T G N W G C G A	2700
	pot. NES	
2701	CCTTTGGGGGTGATGCCAGGTTAAAAGCCTTAATACAGATATTGGCAGCTGCTGCAGCTG F G G D A R L K A L I Q I L A A A A A E	2760
2761	AGCGAGATGTGGTTTATTTACCTTTGGGGACTCAGAATTGATGAGAGACATTTACAGCA R D V V Y F T F G D S E L M R D I Y S M	2820
2821	TGCACATTTTCCCTTACTGAAAGGAAACTCACTGTTGGAGATGTGTATAAGCTGTTGCTAC H I F L T E R K L T V G D V Y K L L L R	2880
2881	GATACTACAATGAAGAATGCAGAAACTGTTCCACCCCTGGACCAGACATCAAGCTTTATC Y Y N E E C R N C S T P G P D I K L Y P	2940
2941	CATTCATATAACCATGCTGTGCGAGTCCTGTGCAGAGACCGCTGACCATTTCAGGGCAAAGGA F I Y H A V E S C A E T A D H S G Q R T	3000
3001	CAGGGACCTGAAGGAGCCGAGCGAATAGCATCTCCTCCCACC G T *	3041

Abb. 10.1: Nukleotid- und Aminosäuresequenz der aus HeLa S3 cDNA klonierten PARG

Gezeigt ist der nichtkodierende DNA Strang der klonierten cDNA der Poly (ADP-Ribose) Glycohydrolase aus HeLa S3. Die Sequenz wurde in der NCBI-Datenbank unter der *accesssion number* DQ867088 hinterlegt. Die aus der Nukleotidabfolge abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind im Einbuchstabencode angegeben. Identifizierte potenzielle Startcodonen (blau) und Stopcodonen (blau, Stern) sind hervorgehoben. Anhand der Aminosäuresequenz identifizierte Lokalisationssequenzen wurden in Kästchen gekennzeichnet:

NLS-nukleare Lokalisationssequenz (dunkelgrau), NES- nukleare Exportsequenz (schwarzumrandet), mitochondriale Lokalisationssequenz (rot).

Aminosäuren, denen eine Funktion bei der Katalyse der Reaktion zugeschrieben wurde (Patel *et al.*, 2005) sind mit hellgrauen Kästchen unterlegt und durch einen Stern markiert. Caspase-Schnittstellen wurden mit einem Pfeil gekennzeichnet.

10.2 Expressionskonstrukte

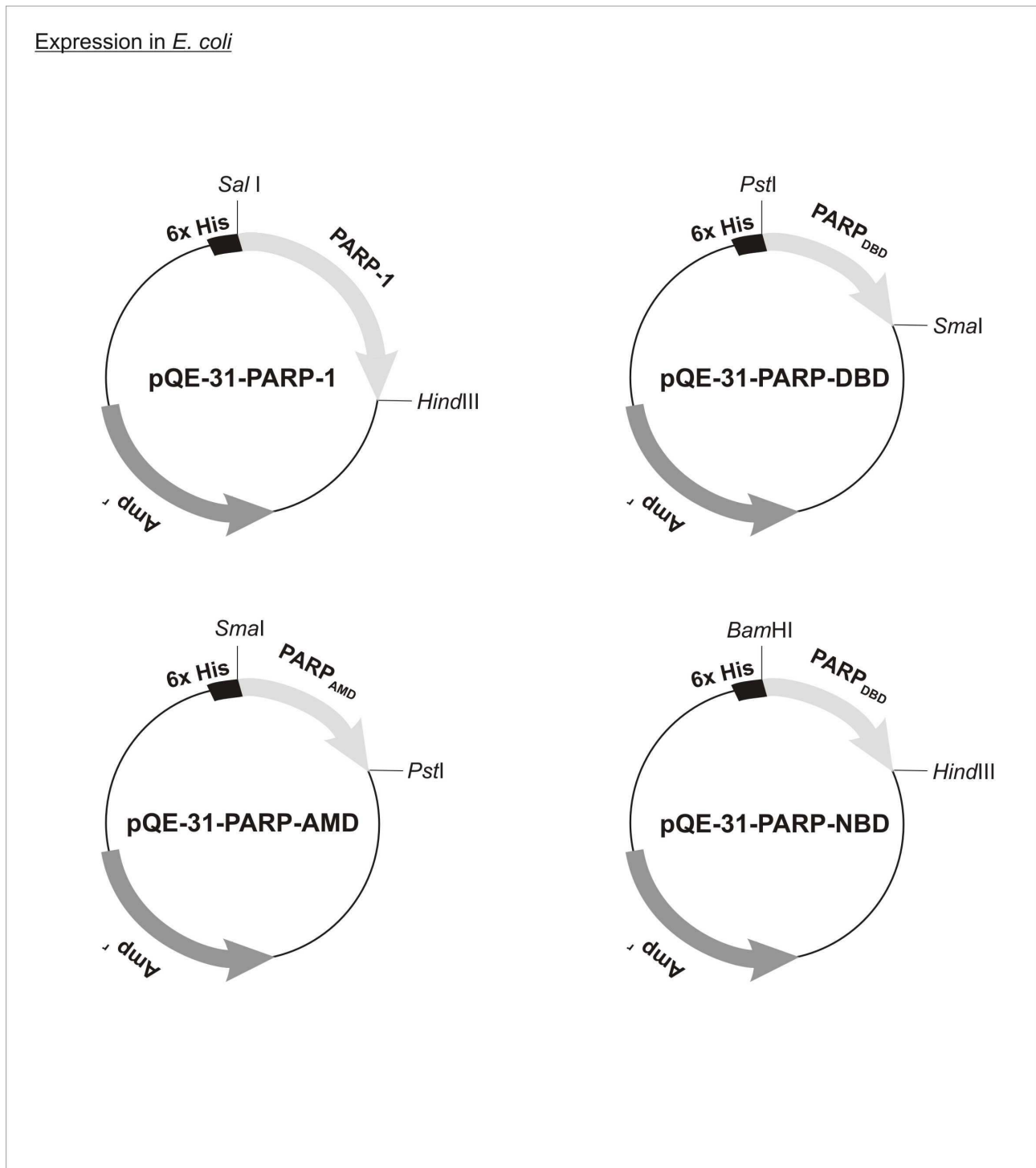


Abb. 10.2: Vektorkonstrukte zur Expression von PARP-1 und den PARP-Deletionsproteinen

Die für die Klonierung eingesetzten Restriktionsschnittstellen sowie übrige kodierende Sequenzen der Vektoren sind angegeben. Die Pfeile zeigen die Orientierung der kodierenden Sequenzen an. Auf den Expressionswirt ist verwiesen. **Amp^r**-Ampizillinresistenz; **6xHis**-Hexahistidin-Tag, **DBD**-DNA-bindende Domäne der PARP-1; **AMD**-Automodifikationsdomäne der PARP-1; **NBD**-katalytische Domäne der PARP-1

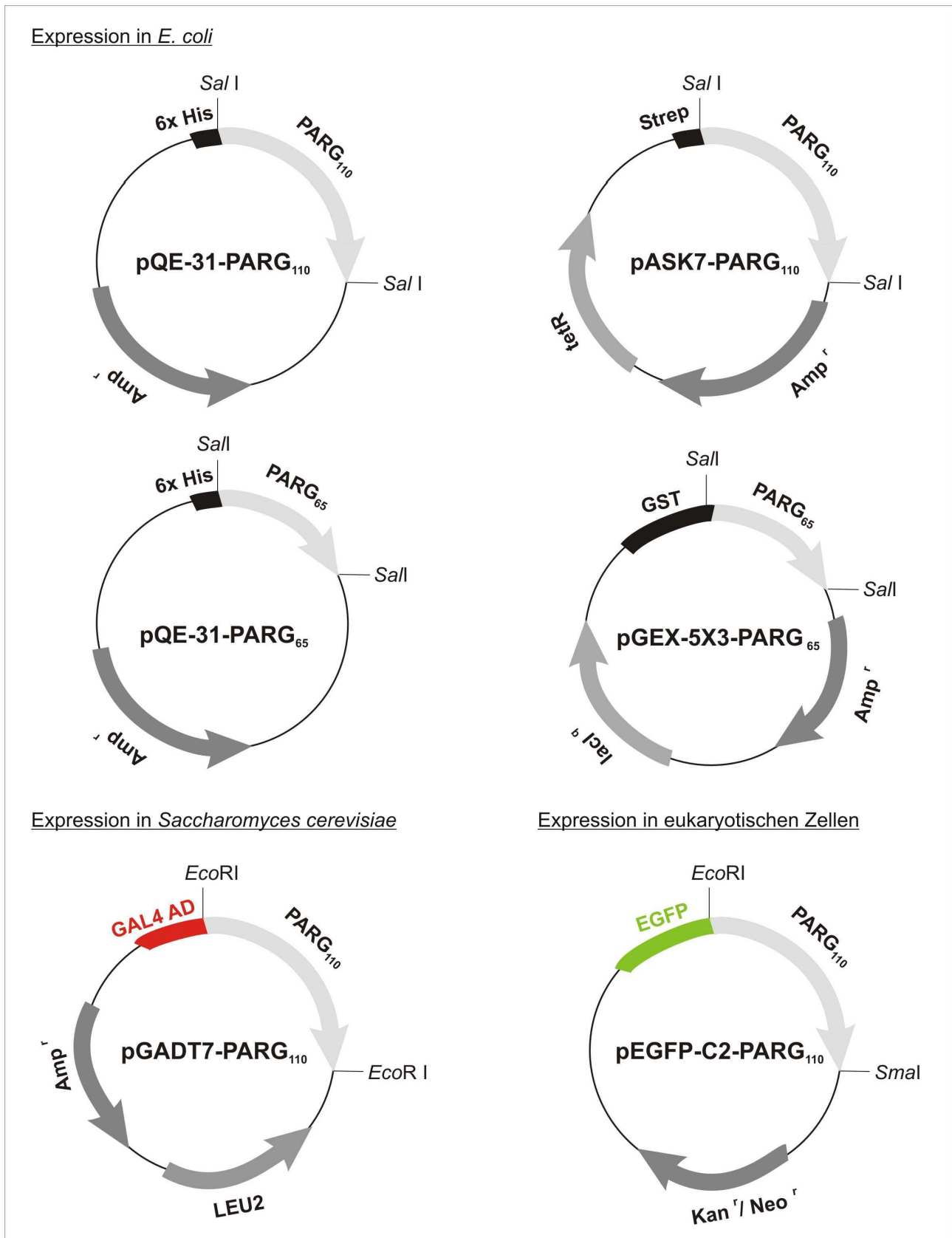


Abb. 10.3: Vektorkonstrukte zur Expression der PARG

Die für die Klonierung eingesetzten Restriktionsschnittstellen sowie übrige kodierende Sequenzen der Vektoren sind angegeben. Die Pfeile zeigen die Orientierung der kodierenden Sequenzen an. Zusätzlich wurde auf den Expressionswirt verwiesen.

Amp^r-Ampizillinresistenz; **Kan^r**-Kanamycinresistenz; **Neo^r**-Neomycinresistenz; **6xHis**-Hexahistidin-Tag, **GST**-Glutathion-S-Transferase; **GAL4 AD**-GAL4 Aktivator-domäne; **EGFP**-Enhanced green fluorescent protein; **Strep**-StreptagII; **lacI**-Lac-Inhibitor; **LEU2**-β-Isopropylmalat-Dehydrogenase

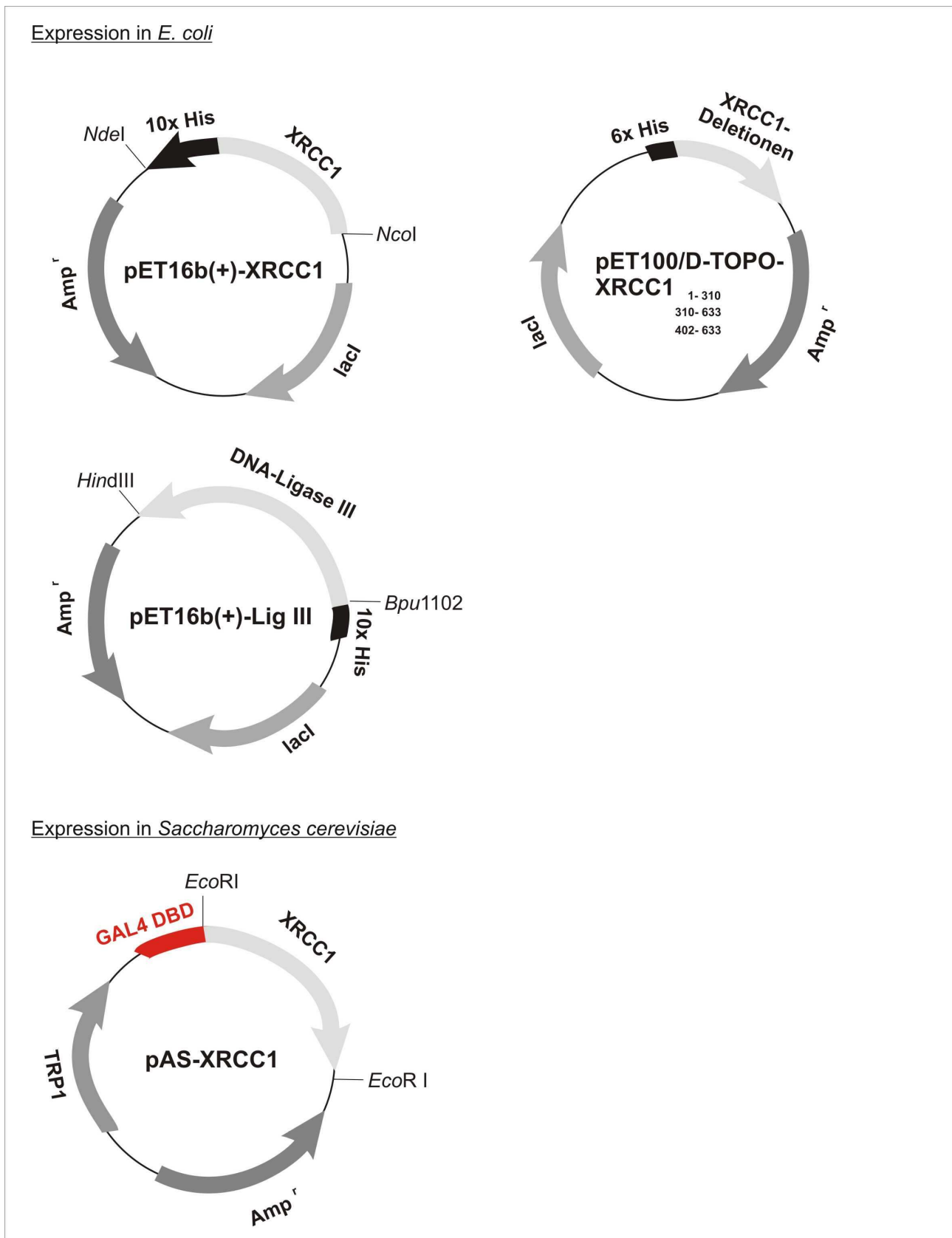


Abb. 10.4: Vektorkonstrukte zur Expression von XRCC1 und Ligase III

Die für die Klonierung eingesetzten Restriktionsschnittstellen sowie übrige kodierende Sequenzen der Vektoren sind angegeben. Die Pfeile zeigen die Orientierung der kodierenden Sequenzen an. Zusätzlich wurde auf den Expressionswirt verwiesen.

Amp^r-Ampizillinresistenz; **6xHis**-Hexahistidin-Tag, **GAL4 DBD**-GAL4 DNA-bindende Domäne; **lacI**-Lac-Inhibitor; **TRP1**-N-(5'-Phosphoribosyl)-anthranilat-Isomerase

11 Publikationsliste

Originalarbeiten

Claudia Keil, Eva Petermann and Shiao Li Oei

Tannins elevate the level of poly (ADP-ribose) in HeLa cell extracts. 2004, *Arch. Biochem. Biophys.*, **425**, 115-121

Jeppe Falsig, Soren Hofmann Christiansen, Sascha Feuerhahn, Alexander Bürkle, Shiao Li Oei, **Claudia Keil**, Marcel Leist

Poly (ADP-ribose) glycohydrolase as a target of neuroprotective intervention: assessment of currently available pharmacological tools. 2004, *Eur. J. Pharmacol.*, **497**, 7-16

Eva Petermann, **Claudia Keil**, Shiao Li Oei

Importance of poly (ADP-ribose) polymerases in the regulation of DNA-dependent processes. 2005, *Cell. Mol. Life Sci.*, **62**, 1-8

Shiao Li Oei, **Claudia Keil**, Mathias Ziegler

Poly (ADP-ribosylation) and genomic stability. 2005, *Biochem Cell. Biol.*, **83(3)**, 263-269

Claudia Keil, Tina Gröbe, Shiao Li Oei

Interactions of Poly (ADP-ribose) glycohydrolase with PARP-1 and XRCC1. 2005, *Int. Med. J. Exp. Clin. Res.*, **11**, 22

Eva Petermann, **Claudia Keil**, Shiao Li Oei

Roles of DNA ligase III and XRCC1 in regulating the switch between short patch and long patch BER. 2006, *DNA Repair*, **5**, 544-555

Claudia Keil, Tina Gröbe, Shiao Li Oei

MNNG-Induced Cell Death is Controlled by Interactions between PARP-1, Poly (ADP-Ribose) Glycohydrolase and XRCC1. *J. Biol. Chem.*, im Druck seit 08.09.2006

Tagungsbeiträge

Claudia Keil & Shiao Li Oei. (2002)

Specific induction of apoptosis in HeLa cells depending on poly(ADP-ribosyl)ation. (**Cell Signalling, Transcription and Translation as Therapeutic Targets, Luxembourg**), Posterbeitrag.

Claudia Keil, Tina Gröbe, Shiao Li Oei (2004)

“Inhibitors of Poly (ADP-ribose) glycohydrolase elevate the level of poly (ADP-ribose) in HeLa Cells” (**DNA repair 2004, 8th Meeting of the German DNA Repair Network, Ulm**), Posterbeitrag

Claudia Keil, Tina Gröbe, Shiao Li Oei (2005)

“Poly-ADP-Ribose Glycohydrolase interagiert mit Proteinen der DNA Reparatur.“ (**8. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung**), Vortrag

Claudia Keil, Tina Gröbe, Shiao Li Oei (2005)

“Functional Interaction of Poly (ADP-ribose) glycohydrolase with PARP-1.” (**workshop “Molecular Interactions”, Berlin**), Posterbeitrag

Claudia Keil, Tina Gröbe, Shiao Li Oei (2005)

“Functional Interactions of Poly (ADP-ribose) glycohydrolase with PARP-1 and XRCC1” (**EMBO workshop “Chromosome structure elements: from DNA sequence to function”, Rom**), Posterbeitrag

Claudia Keil, Tina Gröbe, Shiao Li Oei

“Interactions of Poly (ADP-ribose) glycohydrolase with PARP-1 and XRCC1.” (**PARP conference 2005 “Poly (ADP-Ribose) Polymerases: Bench to Bedside”, Newcastle**), Vortrag von PD Dr. SL. Oei (Publikation in *Int. Med. J. Exp. Clin. Res.*, **11**, 22, siehe oben)

Claudia Keil, Tina Gröbe, Shiao Li Oei (2006)

“Interactions of Poly (ADP-ribose) glycohydrolase with PARP-1 and XRCC1” (**FEBS workshop “Biology and Pathophysiology of Poly (ADP-Ribosyl)ation, Granada**), Vortrag

Claudia Keil, Tina Gröbe, Shiao Li Oei (2006)

“Interactions between PARP-1, Poly (ADP-Ribose) Glycohydrolase and XRCC1 control MNNG-Induced cell death.” (**DNA repair 2006, 9th Meeting of the German DNA Repair Network, Hamburg**), Vortrag

13 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein erster Dank gilt Dr. Shiao Li Oei, die mich in Ihre Arbeitsgruppe aufgenommen hat und auf dem Weg zur Dissertation begleitet hat. Ich danke Ihr sehr für das stetige Interesse am Fortgang der Arbeit und die andauernde Diskussionsbereitschaft in den ganz eigenen Labormeetings im Office und zwischen Otto-Hahn-Bau und Breitenbachplatz. Zudem danke ich Ihr dafür, dass Sie mir die nötigen Freiräume gab, den Laboralltag mit dem Familienleben zu verbinden.

Professor Dr. Petra Knaus danke ich für die Übernahme der Verantwortung als zweiter Gutachter meiner Arbeit zu fungieren.

Ich danke Prof. Dr. Mathias Ziegler für die stetige Unterstützung und Hilfe.

Mein Dank gilt weiterhin den Professoren und Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Knaus, Prof. Dr. Hucho, Prof. Dr. Multhaupt und Prof. Dr. Erdmann für den bereitwillig gewährten Zugang zu den Geräten Ihrer Laboratorien und die dafür nötige Hilfe und Unterstützung.

Bei Gerd Buchlow bedanke ich mich für die Durchführung der vielzähligen Sequenzierungen, die Unterstützung zur Etablierung der Tanninmatrix und für die unendlich vielen Computertips in Sachen Corel und Co.

Ein Dankeschön geht ausserdem an alle ehemaligen und jetzigen Arbeitskollegen, egal ob in Berlin, Bergen, Bogota oder Brighton- Danke Antje, Feli, Eva, Corinna, Nadine, Maria-Helena, Christian und Thomas.

Danke aber auch an Raphaela für die schöne gemeinsame wissenschaftliche und semiwissenschaftliche Zeit.

Ein Dank geht an meine nie versiegenden Literaturquellen. Danke Ute und Denise

Tina, dir kann ich nicht genug danken: für deine theoretische und praktische Hilfe auf meinem bisherigen wissenschaftlichen Weg, die Vielzahl der abendlichen und nunmehr kinderfreundlichen, nachmittäglichen Ablenkungsmanöver aber vor allem für deine Freundschaft.

Mein abschliessender Dank geht an meine Familie und Freunde, für die immerdauernde Unterstützung und den Glaube an ein *gutes Ende*.

Jörg, dir danke ich für deinen Rückhalt und die Unterstützung während der langen Zeit.

14 Förderungen

Die vorliegende Arbeit wurde durch ein Promotionsstipendium des Berliner Programms zur Förderung der Chancengleichheit für Frauen in Forschung und Lehre im Bereich der Natur- und Technikwissenschaften (Humboldt-Universität Berlin) gefördert.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel verfasst habe.

Diese Arbeit wurde bisher noch an keiner anderen Universität vorgelegt.

Berlin, 29.08.2006

Claudia Keil