# 3. Ergebnisse

# 3.1 Rekombinante Überexpression von Proteinen des BER-Komplexes

Die wichtigsten Komponenten des bekannten humanen BER-Komplexes wurden als rekombinante Proteine in *E. coli* überexprimiert und aufgereinigt: PARP-1, APE 1, XRCC1, Pol  $\beta$ , FEN 1 und Lig III.



**Abbildung 3.1: Die isolierten rekombinanten Proteine des BER-Komplexes.** Die BER-Proteine PARP-1, Lig III, XRCC1, APE 1, FEN 1 und Pol  $\beta$  wurden rekombinant in *E. coli* überexprimiert und mittels Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose (und zusätzlicher Affinitätschromatographie an 3-ABA-Sepharose bei PARP-1) zur Homogenität gereinigt. Die gereinigten Proteine wurden einer 8prozentigen (links) oder 12-prozentigen (rechts) SDS-PAGE unterzogen und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. **1:** PARP-1; **2:** Lig III; **3:** XRCC1; **4:** APE 1; **5:** FEN 1; **6:** Pol  $\beta$ .

# 3.1.1 Expression und Reinigung von PARP-1

Die Expression und Reinigung von rekombinanter humaner PARP-1 war in der Arbeitsgruppe bereits etabliert. Die für PARP-1 kodierende Sequenz lag in dem prokaryotischen Expressionsvektor pQE-31 vor. PARP-1 wurde in Fusion mit einem N-terminalen Pentahistidin-"tag" in *E. coli* überexprimiert. Das Protein wurde durch aufeinanderfolgende Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose und 3-Aminobenzamid-Sepharose zur Homogenität gereinigt (Abbildung 3.1, Bahn 1). Die Poly(ADP-Ribosyl)ierungsaktivität des gereinigten Proteins wurde wie unter 2.2.5.1 beschrieben getestet.

### 3.1.2 Expression und Reinigung von APE 1 und XRCC1

Die rekombinanten humanen Proteine XRCC1 und APE 1 wurden ebenfalls in *E. coli* überexprimiert. Die für XRCC1 kodierende Sequenz lag in dem prokaryotischen Expressionsvektor pET16b+ vor. Die Sequenz war so in den Vektor kloniert worden, dass das Protein in Fusion mit einem C-terminalen Dekahistidin-"tag" überexprimiert wurde. Die für APE 1 kodierende Sequenz lag in dem prokaryotischen Expressionsvektor pET28c+ vor. Hierdurch wurde das Protein in Fusion mit einem N-terminalen Hexahistidin-"tag" überexprimiert. XRCC1 und APE 1 wurden in löslicher Form aus den Zellen gewonnen und durch Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose zur Homogenität gereinigt (Abbildung 3.1, Bahnen 3 und 4). Die enzymatische Aktivität von APE 1 wurde wie unter 2.2.5.2 beschrieben getestet (Abbildung 3.2).



**Abbildung 3.2: Die Enzymaktivität von isolierter rekombinanter APE 1.** Das Oligonukleotid "AP-16" wurde am 5'-Ende radioaktiv markiert. 500 nM markiertes Oligonukleotid "AP-16" und 500 nM "G-16" wurden mit APE 1 inkubiert. Denaturierende PAGE von den Aktivitätsansätzen (Autoradiogramm). Oben das AP-Substrat, unten die endonukleolytisch eingeschnittenen Produkte der APE 1-Aktivität. Die Proteinkonzentration betrug 2: 200 nM APE 1; 3: 100 nM APE 1.

### 3.1.3 Umklonierung, Expression und Reinigung von Pol $\beta$ und FEN 1

Die kodierenden Sequenzen für die humanen Reparaturproteine Pol  $\beta$  und FEN 1 lagen in Plasmiden vor, die für die prokaryotische Expression in Fusion mit einem Polyhistidin-"tag" nicht geeignet waren. Die Sequenzen wurden daher zunächst in den prokaryotischen Expressionsvektor pET22b+ umkloniert. Nach Expression mit diesem Vektor waren die Proteine mit einem C-terminalen Hexahistidin-"tag" versehen. Pol  $\beta$  und FEN 1 wurden in *E. coli* als lösliche Proteine überexprimiert und durch Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose zur Homogenität gereinigt (Abbildung 3.1, Bahnen 5 und 6). Die enzymatische Aktivität von Pol  $\beta$  wurde wie unter 2.2.5.4.1 beschrieben getestet. Die Aktivität von Pol  $\beta$ ,

vor allem die SDDS-Aktivität, wurde durch bestimmte Puffersubstanzen (Natriumphosphat, Imidazol, Natriumacetat) gehemmt. Stimuliert wurde die SDDS-Aktivität durch Mn<sup>2+</sup> und durch Erhöhung der Konzentration an dNTPs (nicht gezeigt).

## 3.1.4 Expression, Rückfaltung und Reinigung von Lig III

Rekombinante humane Lig III wurde in E. coli überexprimiert. Die für Lig III kodierende Sequenz lag in dem prokaryotischen Expressionsvektor pET16b+ vor. Lig III wurde dadurch in Fusion mit einem N-terminalen Dekahistidin-"tag" überexprimiert. Das Protein fiel bei der Expression in Form von unlöslichen Aggregaten ("inclusion bodies") an. Die "inclusion bodies" wurden wie unter 2.2.3.3 beschrieben solubilisiert und durch Dialyse renaturiert. Lig III wurde anschließend durch Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose zur Homogenität gereinigt (Abbildung 3.1, Bahn 2). Um den Erfolg der Rückfaltung zu überprüfen, wurde die Adenylierungsaktivität von gereinigter Lig III wie unter 2.2.5.3.1 bodies" rückgefaltete beschrieben getestet. Aus "inclusion Lig III zeigte in Reparaturansätzen ohne exogenes ATP keine signifikante Ligationsaktivität (Abbildung 3.3 A, Bahn 2). Dies weist darauf hin, dass die isolierte Lig III nicht prä-adenyliert vorlag, d.h. dass das Enzym während der Expression in E. coli nicht mit endogenem ATP adenyliert worden war.



**Abbildung 3.3:** Ligationsaktivität von isolierter rekombinanter Lig III. Das Reparatursubstrat "AP-16"/ "G-16" wurde mit BER-Proteinen,  $[\alpha - P^{32}]$ -dCTP und dNTPs mit oder ohne 1 mM ATP wie unter 2.2.5.4.2 beschrieben inkubiert. Denaturierende PAGE von den Reparaturansätzen (Autoradiogramm). Unten die unligierten Reparaturintermediate nach Einbau von  $[\alpha - P^{32}]$ -dCTP und weiteren dNTPs, oben die Ligationsprodukte. Alle Ansätze enthielten 50 nM APE 1 und 50 nM Pol  $\beta$ . A) 400 nM Lig III, aus hoher Überexpression renaturiert; **B)** 500 nM Lig III, aus geringer Überexpression renaturiert.

Die Überexpression von Lig III unter Verwendung von pET16b+ erfolgte im Verlauf der Arbeit nicht reproduzierbar gut. Lig III, die nach geringer Überexpression isoliert und renaturiert worden war, besaß in den Aktivitätstests auch ohne exogenes ATP eine deutliche Ligationsaktivität (Abbildung 3.3 B, Bahn 2). Dies weist darauf hin, dass die Prä-Adenylierung von rekombinanter Lig III abhängig vom Grad der Überexpression war. Das Problem der geringen Überexpression konnte durch Umklonieren der für Lig III kodierenden Sequenz in den Expressionsvektor pET28b+ behoben werden. Unter Verwendung von pET28b+ wurde Lig III in Fusion mit einem N-terminalen Hexahistidin-"tag" überexprimiert und wie oben beschrieben renaturiert und gereinigt.

# 3.2 Einfluss von ATP auf PARP-1

#### 3.2.1 Einfluss des zellulären ATP-Gehalts auf PARP-1 und Lig III

Der Einfluss des zellulären ATP-Gehalts auf die Aktivität von PARP-1 und DNA-Ligasen war untersucht worden, indem man den ATP-Gehalt von Zellen mit dem Glykolyse-Inhibitor Desoxyglucose (DOG) abgesenkt hatte (siehe 1.2.2). Nun sollte die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass eine Behandlung mit Desoxyglucose den zellulären Proteingehalt an PARP-1 und Lig III beeinflusst. Daher wurde der PARP-1-Gehalt von DOG-behandelten Zellen mit dem PARP-1-Gehalt von Kontrollzellen verglichen. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen mit 50 mM DOG oder zur Kontrolle mit 50 mM Glucose behandelt, Kernextrakte aus den Zellen präpariert und ein Western Blot mit diesen Kernextrakten durchgeführt. Als primärer Antikörper diente ein monoklonaler Antikörper gegen die DNA-Bindungsdomäne von PARP-1. Es wurde kein Unterschied im PARP-1-Gehalt zwischen Kontrollzellen und DOG-behandelten Zellen gefunden (Abbildung 3.4 A). In DOG-behandelten Zellen wurde PARP-1 allerdings als Doppelbande detektiert (Abbildung 3.4 B). Ein Western Blot mit einem monoklonalen Antikörper gegen PAR zeigte, dass PARP-1 in DOG-Zellen automodifiziert vorlag (Abbildung 3.4 C). Die Modifizierung mit PAR hatte vermutlich zu einer veränderten elektrophoretischen Mobilität und damit zum Entstehen der Doppelbande geführt.



**Abbildung 3.4: Proteingehalt von PARP-1 und Lig III in DOG-behandelten Zellen.** HeLa-Zellen wurden für 15 min mit 50 mM DOG oder zur Kontrolle mit 50 mM Glucose behandelt. Anschließend wurden Kernextrakte präpariert und im Western Blot analysiert (15 μg). Die Detektion erfolgte über die Aktivität von Alkalischer Phosphatase (A, B) oder über Chemolumineszenz (C, D). **1:** Kontrollzellen; **2:** DOG-behandelte Zellen. **A)** Nachweis von PARP-1; **B)** Vergrößerung von A; **C)** Nachweis von PAR; **D)** Nachweis von Lig III.

Um Lig III im Western Blot nachweisen zu können, wurde zunächst ein polyklonaler Antikörper, gerichtet gegen rekombinante humane Lig III, generiert. Dazu wurde Lig III wie unter 3.1.4 beschrieben überexprimiert und zur Homogenität gereinigt. Kaninchen wurden mit dem isolierten Protein immunisiert. Der Antikörper wurde aus dem erhaltenen Immunserum gereinigt und als primärer Antikörper in einem Western Blot mit Kernextrakten von Kontrollzellen und DOG-behandelten Zellen eingesetzt. Zwischen Kontrollzellen und DOG-behandelten Zellen wurde kein Unterschied im Lig III-Gehalt gefunden (Abbildung 3.4 D).

#### 3.2.2 Einfluss von ATP auf PARP-1 im rekonstruierten BER-Komplex

Als nächstes wurde der Einfluss der ATP-Konzentration auf isolierte rekombinante PARP-1 untersucht.



**Abbildung 3.5: Die PARP-1-Aktivität ist in Abwesenheit von ATP erhöht.** PARP-1, Pol  $\beta$ , Lig III, XRCC1 und FEN 1 wurden mit [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-NAD<sup>+</sup>, Oligonukleotid "Nick-1" und dNTPs inkubiert. Den Ansätzen wurde entweder 1 mM ATP oder kein ATP zugegeben. Proteine und entstandene PAR wurden mit TCA gefällt. Der Menge an [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-ADP-Ribose in der säureunlöslichen Fraktion wurde durch Cerenkov-Messung quantifiziert und auf das gesamte eingesetzte [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-NAD<sup>+</sup> bezogen. **A:** Quantifizierung des Einflusses von ATP auf den Einbau von ADP-Ribose und die relative PARP-Aktivität; **B:** Darstellung der Werte im Balkendiagramm. Die Werte repräsentieren fünf unabhängige Experimente. Die Proteinkonzentrationen betrugen: PARP-1 225 nM; Pol  $\beta$  250 nM; Lig III, XRCC1 und FEN 1 500 nM.

Um die Poly(ADP-Ribosyl)ierung zu quantifizieren, wurde PARP-1 mit einem Oligonukleotid, das einen künstlichen Einzelstrangbruch aufwies (Nick-Substrat, siehe 2.2.5.4.1) und [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-NAD<sup>+</sup> wie unter 2.2.5.1 beschrieben inkubiert. Der Einbau von [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-ADP-Ribose aus [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-NAD<sup>+</sup> in PAR wurde anschließend durch Cerenkov-Messung quantifiziert. Es zeigte sich, dass die Aktivität von isolierter PARP-1 grundsätzlich durch

ATP inhibiert wurde. Interessanter war jedoch die Frage, ob diese Regulation auch in einem Reparaturkomplex auftreten würde. Daher wurden PARP-Aktivitätstests mit einem Reparaturkomplex aus PARP-1, Pol  $\beta$ , Lig III, XRCC1 und FEN 1 durchgeführt. Anders als im gewöhnlichen PARP-Aktivitätstest wurden dem Komplex auch dNTPs zugegeben, um die katalytische Aktivität von Pol  $\beta$  und FEN 1 einzubeziehen. In diesem rekonstruierten Komplex war die PARP-1-Aktivität in Abwesenheit von ATP um den Faktor 1,25 erhöht (Abbildung 3.5).

# 3.3 Pol β im rekonstruierten BER-Komplex

#### 3.3.1 SDDS am AP-Substrat

Um den Einfluss von ATP auf die Pol  $\beta$ -Aktivität im BER-Komplex zu untersuchen, wurde die Reparatur einer abasischen Stelle mit isolierten rekombinanten BER-Proteinen nachvollzogen. Dafür wurde ein Reparatursubstrat, das eine AP-Stelle aufwies (AP-Substrat, Abbildung 3.6 A) wie unter 2.2.5.4.2 beschrieben mit verschiedenen Kombinationen von Reparaturproteinen inkubiert. Allen Ansätzen wurde APE 1 zugegeben. Im einfachsten Fall wurde das Oligonukleotid nur mit APE 1, Pol  $\beta$  und dNTPs inkubiert. Die Analyse der Reaktion wurde durch radioaktive Markierung der Oligonukleotide mit [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-dCTP ermöglicht. Der Einbau des ersten Nukleotids diente daher gleichzeitig zum Nachweis der Pol  $\beta$ -Aktivität und zur Markierung des Substrats (Abbildung 3.6 B). Die Verfügbarkeit von ATP hatte keinen signifikanten Einfluss auf die DNA-Synthese durch Pol  $\beta$  (Abbildung 3.6 B, Bahnen 1 und 2).



**Abbildung 3.6:** Die Pol  $\beta$ -Aktivität wird nicht direkt durch ATP beeinflusst. Das Reparatursubstrat "AP-16"/ "G-16" wurde mit BER-Proteinen, [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-dCTP und dNTPs mit oder ohne 1 mM ATP inkubiert. A): Schema von "AP-16"/ "G-16". ^ bezeichnet die AP-Stelle. B): Denaturierende PAGE von den Reparaturansätzen (Autoradiogramm). Unten die markierten Oligonukleotide nach Einbau von [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-dCTP und weiteren dNTPs durch Pol  $\beta$ . Die Zahlen geben die Menge der eingebauten dNTPs an. 1+2: 50 nM APE 1 und 50 nM Pol  $\beta$ ; 3+4: 50 nM APE 1, 50 nM Pol  $\beta$  und 640 nM XRCC1.

Wenn XRCC1 zugegeben wurde, wurde die Pol  $\beta$ -Aktivität stimuliert und SDDS nahm zu. Auch in Anwesenheit von XRCC1 wurde die SDDS-Aktivität durch Pol  $\beta$  nicht von ATP beeinflusst (Abbildung 3.6 B, Bahnen 3 und 4). Ein Unterschied zwischen ATP-haltigen und ATP-freien Ansätzen zeigte sich mit der Zugabe von Lig III. Die Ligation des verbleibenden Einzelstrangbruchs war nur in Anwesenheit von ATP möglich (Abbildung 3.7, Bahn 1). Die Ligationsprodukte entsprachen dabei Produkten der Reparatur durch "short patch BER", da die Ligation nur nach dem Einbau von einem einzigen Nukleotid erfolgen konnte. Wenn kein ATP im Ansatz vorhanden war, verblieb das gesamte eingesetzte AP-Substrat in Form von nicht ligierten Reparaturintermediaten. Die Reparaturintermediate in den ATP-freien Ansätzen wiesen teilweise um mehrere Nukleotide verlängerte Sequenzen auf (Abbildung 3.7, Bahn 2). Diese verlängerten Oligonukleotide waren durch SDDS durch Pol  $\beta$ entstanden und entsprachen Intermediaten von "long patch BER". Die Zugabe von XRCC1 stimulierte die SDDS in den ATP-freien Ansätzen deutlich (Abbildung 3.7, Bahn 4). Durch die weitere Zugabe von FEN 1 wurde die SDDS in den ATP-freien Ansätzen noch zusätzlich stimuliert (vgl. in Abbildung 3.7 Bahnen 4 und 6).



**Abbildung 3.7: BER und SDDS am AP-Substrat.** Das Reparatursubstrat "AP-16"/ "G-16" wurde mit BER-Proteinen und dNTPs mit oder ohne 1 mM ATP inkubiert. Denaturierende PAGE von den Reparaturansätzen (Autoradiogramm). Unten die Reparaturintermediate nach Einbau von  $[\alpha-P^{32}]$ -dCTP und weiteren dNTPs, die Zahlen geben die Menge der eingebauten dNTPs an. Oben die Ligationsprodukte. Alle Ansätze enthielten 50 nM APE 1 und 50 nM Pol  $\beta$ , weitere eingesetzte Proteine sind oberhalb des Autoradiogramms angegeben. Die Proteinkonzentrationen betrugen: 400 nM Lig III; 640 nM XRCC1; 125 nM FEN 1.

In Anwesenheit von FEN 1 konnten "long patch BER"-Intermediate in den ATP-haltigen Ansätzen ligiert werden (vgl. in Abbildung 3.7 Bahnen 3 und 5). Die Bedeutung von XRCC1 für die SDDS-Aktivität von Pol  $\beta$  wird auch aus Abbildung 3.8 ersichtlich. Das AP-Substrat wurde in Reparaturansätzen mit oder ohne XRCC1 eingesetzt. Um alle Intermediate von "long patch BER" nachweisen zu können, wurde diesen Ansätzen keine FEN 1 zugegeben. Es wurden absteigende ATP-Konzentrationen von 1 mM bis 10 nM verwendet oder auch keinerlei exogenes ATP zugegeben (Abbildung 3.8, Bahnen 7 und 14). Mit sinkender ATP-Konzentration nahm die SDDS-Aktivität von Pol  $\beta$  zu. In den Ansätzen, die XRCC1 enthielten, war dieser Effekt weitaus stärker ausgeprägt als in den Ansätzen ohne XRCC1 (vgl. Abbildung 3.8 die Bahnen 1-7 und 8-14).



**Abbildung 3.8: Stimulierung von SDDS durch XRCC1.** Das Reparatursubstrat "AP-16"/ "G-16" wurde bei absteigenden ATP-Konzentrationen mit BER-Proteinen,  $[\alpha-P^{32}]$ -dCTP und weiteren dNTPs inkubiert. Denaturierende PAGE von den Reparaturansätzen (Autoradiogramm). Unten die Reparaturintermediate nach Einbau von  $[\alpha-P^{32}]$ -dCTP und weiteren dNTPs, die Zahlen geben die Menge der eingebauten dNTPs an. Oben die Ligationsprodukte. Alle Ansätze enthielten 50 nM APE 1, 50 nM Pol  $\beta$  und 400 nM Lig III. **1-7:** Ansätze mit 640 nM XRCC1; **8-14:** Ansätze ohne XRCC1. Die Ansätze enthielten jeweils (1-7 und 8-14): 1 mM, 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 100 nM, 10 nM und kein ATP.

Außer dem beschriebenen AP-Substrat wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch doppelsträngige Oligonukleotidsubstrate, die in einem Strang eine künstliche Lücke von einem Nukleotid aufwiesen, verwendet (Gap-Substrate, siehe 2.1.4.4 und 2.2.5.4.1). Diese Lücke war am 5'-Ende phosphoryliert, so dass der verbleibende Einzelstrangbruch nach Einbau eines Nukleotids durch Pol  $\beta$  von Lig III ligiert werden konnte. Mit den Gap-Substraten wurden ähnliche Resultate erzielt wie in den Untersuchungen mit dem AP-Substrat.

#### 3.3.2 SDDS am Nick-Substrat

Eine andere Möglichkeit zur Untersuchung von "long patch BER" bot ein Oligonukleotid, das einen künstlichen Einzelstrangbruch enthielt (Nick-Substrat, Abbildung 3.9 A). Dieses Substrat wurde wie unter 2.2.5.4.1 beschrieben mit verschiedenen Kombinationen von Reparaturproteinen inkubiert. Das Nick-Substrat simulierte sowohl ein Substrat des SSBR als auch ein Intermediat des BER. Hier musste jeglicher Einbau von Nukleotiden durch SDDS erfolgen. Zudem erfolgte die radioaktive Markierung des Substrates durch [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-dCTP nur bei Einbau von mindestens zwei Nukleotiden. Daher waren auch ausschließlich Intermediate von "long patch BER" radioaktiv markiert und konnten detektiert werden. Weil SDDS erfolgen musste, war der Nukleotideinbau durch Pol  $\beta$  beim Nick-Substrat geringer als beim AP-Substrat (nicht gezeigt).





Die Zugabe von Lig III zu den Ansätzen verringerte die Einbaurate stark (vgl. Abbildung 3.9 B, Bahnen 1, 2 und 3). Durch Zugabe von XRCC1 und FEN 1 wurde die SDDS-Aktivität auch in Anwesenheit von Lig III wieder stimuliert (Abbildung 3.9 B, Bahnen 4 und 5). Die Zugabe von FEN 1 ermöglichte außerdem die Ligation von "long patch BER"-Intermediaten (Abbildung 3.9 B, Bahn 4). Ligationsprodukte waren daher nur in Anwesenheit von Lig III und FEN 1 nachweisbar. Daraus kann jedoch nicht geschlossen werden, dass in den Ansätzen, die keine FEN 1 enthielten, keine Ligation erfolgte. Die Ligationsprodukte waren lediglich nicht radioaktiv markiert. "Short patch BER" war daher nicht nachweisbar. Mit dem Nick-Substrat war es demnach nicht möglich, alle Schritte der Reparatur zu verfolgen, aber es erlaubte eine einfache Quantifizierung der SDDS-Aktivität von Pol  $\beta$ . Die Versuche mit dem Nick-Substrat ergaben ähnliche Ergebnisse wie die vorhergegangenen mit den AP-Substraten.



**Abbildung 3.10: Einfluss von ATP auf SDDS durch Pol**  $\beta$  **am Nick-Substrat.** Das Oligonukleotid "Nick-2" wurde mit 100 nM Pol  $\beta$ , 400 nM Lig III, FEN 1 und XRCC1, [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-dCTP und weiteren dNTPs inkubiert. **A:** Die Ansätze wurden einer denaturierende PAGE unterzogen. Radioaktiv markierte Oligonukleotide wurden durch Autoradiographie detektiert. **B:** Die einzelnen Bahnen wurden aus dem Gel ausgeschnitten. Die Radioaktivität wurde durch Cerenkov-Messung quantifiziert, um den relativen Einbau von [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-dCTP zu bestimmen; **C:** Darstellung der Werte im Balkendiagramm. Die Werte repräsentieren fünf unabhängige Experimente.

Im BER-Komplex bestehend aus den Proteinen Pol  $\beta$ , Lig III, XRCC1 und FEN 1 war die SDDS-Aktivität in Abwesenheit von ATP etwa 2,3 mal so hoch wie die SDDS-Aktivität in Anwesenheit von 1 mM ATP (Abbildung 3.10).

Ingesamt war die SDDS-Aktivität von Pol $\beta$  an allen verwendeten Reparatursubstraten in Abwesenheit von ATP deutlich erhöht bzw. in Anwesenheit von ATP verringert. Dieser Effekt trat jedoch nicht am isolierten Enzym, sondern nur in Gegenwart von Lig III auf. Die Bedeutung von XRCC1 für die Verstärkung dieses Effekts wird unter 3.4.1 näher beleuchtet.

# 3.4 XRCC1 im rekonstruierten BER-Komplex

### 3.4.1 Einfluss von XRCC1 auf die Aktivität von Pol $\beta$

Die oben beschriebenen Untersuchungen hatten in mehreren unabhängigen Experimenten gezeigt, dass die SDDS-Aktivität von Pol  $\beta$  in Anwesenheit von XRCC1 erhöht war (Abbildung 3.7, Abbildung 3.8). Insofern stellte sich als nächstes die Frage, ob XRCC1 die Pol  $\beta$ -Aktivität direkt stimuliert. Zusätzlich sollte die Stimulierung von Pol  $\beta$  durch XRCC1 mit der Stimulierung durch FEN 1 verglichen werden. In rekonstruierten Reparaturansätzen wurde die Pol  $\beta$ -Aktivität ohne XRCC1 oder FEN 1 im Ansatz mit der Pol  $\beta$ -Aktivität in Anwesenheit von XRCC1 oder FEN 1 verglichen. Dabei wurden sowohl das Nick-Substrat als auch das AP-Substrat wie unter 2.2.5.4 beschrieben untersucht. Die Stimulierung der SDDS-Aktivität sogar durch äquimolare Mengen an FEN 1 war dabei offensichtlich (Abbildung 3.11 A, Bahn 2; B, Bahn 3). XRCC1 stimulierte die SDDS-Aktivität ebenfalls, aber schwächer als FEN 1 (Abbildung 3.11 A, Bahnen 3 und 4; B, Bahn 2). Wenn zusätzlich Lig III in die Ansätze gegeben wurde, zeigte sich ein anderes Bild (Abbildung 3.12).



**Abbildung 3.11: FEN 1 und XRCC1 stimulieren die SDDS durch Pol**  $\beta$ . Reparatursubstrate wurden mit BER-Proteinen und dNTPs inkubiert. Denaturierende PAGE von den Reparaturansätzen (Autoradiogramm). Zu sehen sind die Reparaturintermediate nach Einbau von [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-dCTP und weiteren dNTPs, die Zahlen geben die Menge der eingebauten dNTPs an. **A:** Das Oligonukleotid "Nick-2" wurde mit BER-Proteinen inkubiert. **1:** 50 nM Pol  $\beta$ ; **2:** 50 nM Pol  $\beta$ , 50 nM FEN 1; **3:** 50 nM Pol  $\beta$ , 50 nM XRCC1; **4:** 50 nM Pol  $\beta$ , 400 nM XRCC1. **B:** Das Reparatursubstrat "AP-16"/ "G-16" wurde mit BER-Proteinen inkubiert. **1:** 17 nM Pol  $\beta$ ; **2:** 17 nM Pol  $\beta$ , 200 nM XRCC1; **3:** 17 nM Pol  $\beta$ , 200 nM FEN 1.

In Anwesenheit von Lig III stimulierte XRCC1 die SDDS-Aktivität von Pol $\beta$  stärker (Abbildung 3.12 A Bahnen 5 und 6 unten, B Bahnen 1 und 2 unten) als die gleiche Menge an FEN 1 (Abbildung 3.12 A Bahnen 3 und 4 unten, B Bahnen 3 und 4 unten). Die SDDS-Aktivität von Pol $\beta$  wurde in dieser Weise nicht nur wie in Abbildung 3.12 gezeigt durch einen Überschuss, sondern auch durch äquimolare Mengen an XRCC1 stimuliert (nicht gezeigt). XRCC1 trug in den Reparaturansätzen somit entscheidend zum Anstieg der SDDS bei ATP-Mangel bei. Isoliertes rekombinantes XRCC1 wies selbst keinerlei DNA-Polymerase-Aktivität auf (nicht gezeigt).





**von Lig III.** Reparatursubstrate wurden mit BER-Proteinen und dNTPs inkubiert. Denaturierende PAGE von den Reparaturansätzen (Autoradiogramm). Unten die Reparaturintermediate nach Einbau von  $[\alpha-P^{32}]$ -dCTP und weiteren dNTPs, die Zahlen geben die Menge der eingebauten dNTPs an. Oben die Ligationsprodukte **A:** Das Oligonukleotid "Nick-2" wurde mit 50 nM Pol  $\beta$  und 400 nM Lig III inkubiert. 400 nM FEN 1 oder XRCC1 wurden wie oberhalb des Autoradiogramms angegeben zugefügt. **B:** Das Reparatursubstrat "AP-16"/ "G-16" wurde mit 50 nM Pol  $\beta$  und 400 nM Lig III inkubiert. 400 nM FEN 1 oder XRCC1 wurde mit 50 nM Pol  $\beta$  und 400 nM Lig III inkubiert.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass XRCC1 ebenso wie FEN 1 die SDDS durch Pol  $\beta$  stimulierte. Im Gegensatz zu FEN 1 stimulierte XRCC1 die Pol  $\beta$ -Aktivität jedoch vor allem in Anwesenheit von Lig III.

## 3.4.2 Einfluss von XRCC1 auf die Aktivität von Lig III

Die oben beschriebenen Untersuchungen hatten wiederholt gezeigt, dass in Ansätzen, die Lig III und XRCC1 enthielten, die Gesamtmenge an Ligationsprodukten größer war als in Ansätzen, die Lig III, aber kein XRCC1 enthielten (Abbildung 3.7, Abbildung 3.8 und Abbildung 3.12 B). Insofern stellte sich die Frage, ob XRCC1 die Ligationsaktivität von Lig III direkt stimuliert. In der Literatur war dergleichen noch nicht beschrieben worden. Daher wurde die Ligationsaktivität von Lig III wie unter 2.2.5.3.2 beschrieben untersucht und mit der Ligationsaktivität von Lig III in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von XRCC1 verglichen (Abbildung 3.13). Dabei konnte jedoch keine Stimulierung der Aktivität von Lig III durch XRCC1 nachgewiesen werden. Eine solche Stimulierung trat auch dann nicht auf, wenn XRCC1 in mehr als 60-fachem Überschuss eingesetzt wurde (Abbildung 3.13, Bahn 6).



Abbildung 3.13: Die Ligationsaktivität von Lig III wird nicht durch XRCC1 stimuliert. Ein radioaktiv markiertes Ligasesubstrat (2.2.1.6.4) wurde mit unterschiedlichen Mengen an Lig III und XRCC1 inkubiert. Denaturierende PAGE von den Reparaturansätzen (Autoradiogramm). Unten das unligierte Substrat, oben das Ligationsprodukt. Die Proteinkonzentrationen sind oberhalb des Autoradiogramms angegeben. Der Stern (\*) markiert ein Fragment des Ligasesubstrats.

# 3.5 Einfluss von ATP auf das Verhältnis von "long patch BER" zu "short patch BER"

Um das Verhältnis von "short patch BER" zu "long patch BER" abhängig von der ATP-Konzentration zu analysieren, wurde untersucht, ob bei ATP-Mangel vermehrt Ligationsprodukte aus SDDS-Intermediaten entstehen. Um diese Ligationsprodukte gezielt nachweisen zu können, wurden die Reparatur eines AP-Substrats wie unter 2.2.5.4.2 beschrieben rekonstruiert. In den Reparaturansätzen wurde [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-dCTP durch [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]dATP ersetzt. Als Kontrolle wurden die BER-Reaktionen mit dem Reparaturkomplex aus APE 1, Pol  $\beta$ , Lig III, XRCC1 und FEN 1 und [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-dCTP als Markierung durchgeführt (Abbildung 3.14, Bahnen 1-7). Wie erwartet zeigten die Kontrollreaktionen, dass bei ATP-Konzentrationen von 1 mM und 100  $\mu$ M fast das gesamte Substrat ligiert wurde (Bahnen 1 und 2). Mit absteigender ATP-Konzentration nahm die Ligationsaktivität ab, während die durchschnittliche Länge der Reparaturintermediate zunahm (Bahnen 3-7).



Abbildung 3.14: Das Verhältnis von "long patch BER" zu "short patch BER" ändert sich mit der ATP-Konzentration. Das Reparatursubstrat "AP-16"/ "G-16" wurde bei absteigenden ATP-Konzentrationen mit BER-Proteinen, dNTPs und  $[\alpha-P^{32}]$ -dCTP oder  $[\alpha-P^{32}]$ -dATP inkubiert. Denaturierende PAGE von den Reparaturansätzen (Autoradiogramm). Unten die Reparaturintermediate nach Einbau von  $[\alpha-P^{32}]$ -dCTP oder  $[\alpha-P^{32}]$ -dATP und weiteren dNTPs, die Zahlen geben die Menge der eingebauten dNTPs an. Oben die Ligationsprodukte. Alle Ansätze enthielten 50 nM APE 1, 50 nM Pol  $\beta$ , 400 nM Lig III, 250 nM FEN 1 und 640 nM XRCC1. **1-7:** Ansätze mit  $[\alpha-P^{32}]$ -dCTP; **8-14:** Ansätze mit  $[\alpha-P^{32}]$ -dATP. Die ATP-Konzentration betrug jeweils (1-7 und 8-14): 1 mM, 100  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 100 nM, 10 nM, ohne ATP.

Gleichzeitig wurden die identischen Reparaturreaktionen unter Markierung mit  $[\alpha - P^{32}]$ dATP durchgeführt (Abbildung 3.14, Bahnen 8-14). Im Oligonukleotid AP-16 wird, von der AP-Stelle ausgehend, der erste Adenosinrest nach fünf Nukleotiden eingebaut. Das Reparatursubstrat war also erst nach dem Einbau von mindestens fünf Nukleotiden radioaktiv markiert. Daher waren im Autoradiogramm ausschließlich Intermediate und Produkte von "long patch BER" nachweisbar. Eine Zunahme der nachweisbaren Ligationsprodukte entsprach damit einer Zunahme von "long patch BER". Hier zeigte sich bei einer ATP-Konzentration von 1 mM keinerlei Markierung, d.h. es wurden grundsätzlich weniger als fünf Nukleotide eingebaut (Bahn 8). Mit absteigenden ATP-Konzentrationen nahm die Markierung mit [α-P<sup>32</sup>]-dATP, d.h. der Einbau von mindestens fünf Nukleotiden, deutlich zu. In den Ansätzen mit den niedrigsten ATP-Konzentrationen fiel die  $[\alpha-P^{32}]$ dATP-Markierung der Substrate am stärksten aus (Bahnen 9-14). Gleichzeitig mit der Markierungsintensität der Substrate nahm auch die Markierungsintensität der Ligationsprodukte zunächst zu (Bahnen 9-12), dann jedoch bei den niedrigsten ATP-Konzentrationen wieder ab (Bahnen 13 und 14). In den Proben mit  $[\alpha-P^{32}]$ -dCTP-Markierung kann man erkennen, dass diese niedrigen ATP-Konzentrationen kaum noch Ligation zuließen (Bahnen 6 und 7). Aus der Kombination der Ergebnisse beider Versuchsreihen lässt sich schließen, dass die Reparatur bei hohen ATP-Konzentrationen über kurze Reparaturintermediate bzw. "short patch BER" verlief, während ein beträchtlicher Anteil der Ligationsprodukte in den Ansätzen mit niedrigen ATP-Konzentrationen durch "long patch BER" entstanden war.

# 3.6 Einfluss von SDDS auf die PAR-vermittelte DNA-Ligation im Kernextrakt

Die oben beschriebenen Untersuchungen hatten eine klare Bevorzugung von "long patch BER" bei ATP-Mangel aufgezeigt. Auch Untersuchungen an humanen Zellen und Kernextrakten hatten auf eine solche Präferenz für "long patch BER" hingewiesen (siehe 1.4). Es wurde vermutet, dass dies auf der spezifischen Bedeutung von SDDS für die PAR-vermittelte DNA-Ligation beruht. Bei diesem Mechanismus wird ATP aus PAR und dem bei DNA-Synthese anfallenden Pyrophosphat gewonnen (siehe 1.2.2). In Kernextrakten, denen ATP fehlt, lässt sich die PAR-vermittelte Ligation nach Zugabe von NAD<sup>+</sup> beobachten.

Um die Bedeutung von verstärktem "long patch BER" bei ATP-Mangel näher zu analysieren, wurde daher der Einfluss von SDDS auf die PAR-vermittelte DNA-Ligation untersucht. Die Reparatur eines AP-Substrats durch BER wurde dafür *in vitro* mit menschlichen Kernextrakten nachvollzogen. Kernextrakte wurden verwendet, da sie für die PAR-vermittelte Ligation benötigte Faktoren enthielten, die rekombinant nicht alle zugänglich waren. Das Reparatursubstrat "AP-16-PT"/ "G-16-PT" (Abbildung 3.15 A) wurde wie unter 2.2.5.5 beschrieben mit Kernextrakten aus HeLa S3-Zellen und dNTPs inkubiert. Wenn den Reparaturansätzen ATP zugegeben wurde, wurde das gesamte Substrat ligiert (Abbildung 3.15 B, Bahnen 1 und 4 oben). Ohne exogen zugegebenes ATP erfolgte nahezu keine Ligation (Bahnen 2, 3 und 5). Bei Zugabe von NAD<sup>+</sup> wiesen auch die Ansätze Ligationsaktivität auf, die kein exogenes ATP enthielten (Bahn 6). Dies entsprach der PAR-vermittelten Ligation.

Um die Bedeutung von "long patch BER" für diesen Mechanismus zu untersuchen, wurde SDDS durch Pol  $\beta$  gezielt ermöglicht oder verhindert, indem den Ansätzen verschiedene Kombinationen von dNTPs zugegeben wurden. Um SDDS zu verhindern, wurde lediglich [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-dCTP und dGTP zugegeben (Bahnen 1-3). Dabei wurde die Sequenz des verwendeten Reparatursubstrats berücksichtigt. Im Oligonukleotid "AP-16-PT" wird ein Guanosinrest erst an sechster Position nach der AP-Stelle eingebaut. Mit dieser Nukleotidkombination konnte daher keine SDDS erfolgen. In diesen Ansätzen konnte auch nach Zugabe von NAD<sup>+</sup> keinerlei PAR-vermittelte Ligation beobachtet werden (Bahn 3).

Um SDDS zu ermöglichen, wurden [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-dCTP und alle übrigen dNTPs zugefügt (dATP, dGTP und dTTP, Bahnen 4-6). In diesem Fall traten um mehrere Nukleotide verlängerte, unligierte Oligonukleotide auf, bei denen es sich um Intermediate von "long patch BER" handelte (Bahn 4 unten). Die PAR-vermittelte Ligation war nur zu beobachten, wenn die Ansätze außer NAD<sup>+</sup> sämtliche dNTPs enthielten und somit SDDS und "long patch BER" erfolgen konnten (Bahn 6).



**Abbildung 3.15: SDDS und NAD<sup>+</sup> ermöglichen die Ligation im Kernextrakt.** Das AP-Substrat "AP-16-PT"/ "G-16-PT" wurde mit Kernextrakten (3,5 µg) aus HeLa S3-Zellen und dNTPs für 30 min bei 30°C inkubiert. Den Repraturansätzen wurde teilweise 1 mM ATP oder 0,5 mM NAD<sup>+</sup> zugegeben. **A):** Schema des AP-Substrates "AP-16-PT"/ "G-16-PT". Kleine Buchstaben bezeichnen durch Phosphothioat-Bindungen verknüpfte Nukleotide. **^** bezeichnet die AP-Stelle. **B):** Die Reparaturansätze wurden einer denaturierenden PAGE unterzogen und radioaktiv markierte Oligonukleotide wurden durch Autoradiographie detektiert. Unten die Reparaturintermediate nach Einbau von [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-dCTP und weiteren dNTPs. Die Zahlen geben die Menge der eingebauten dNTPs an. Oben die Ligationsprodukte. **1-3:** "long patch BER"; **4-6:** "short patch BER".

Der Mechanismus der PAR-vermittelten Ligation war demnach auf SDDS angewiesen. Dies zeigte die besondere Bedeutung von "long patch BER" bei ATP-Mangel, auf welche die unter 3.3 und 3.5 beschriebenen Ergebnisse bereits hingedeutet hatten.

# 3.7 Der Einfluss der Aktivität von Lig III auf den BER-Mechanismus

#### 3.7.1 Einfluss der Adenylierung auf den BER-Mechanismus

### 3.7.1.1 Mutagenese von Lysin 421 zu Valin

Die beobachtete ATP-äbhangige Regulation zwischen "short patch BER" und "long patch BER" konnte aus einem direkten Einfluss von freiem ATP auf den BER-Komplex resultieren. Andererseits konnte die ATP-abhängige Regulation aber auch dadurch zustande kommen, dass adenylierte Lig III einen hemmenden Einfluss auf "long patch BER" ausübte. Um diese Frage zu beantworten, wurde eine Variante von Lig III erzeugt, die sich auch in Anwesenheit von ATP nicht mehr adenylieren konnte. Aus der Literatur waren bereits Beispiele von solchen Mutationen in anderen ATP-abhängigen DNA-Ligasen bekannt (siehe 1.3.5). Dem für die Adenylierung notwendigen Lysinrest entspricht in der Sequenz von humaner Lig III das Lysin 421. Dieser Lysinrest wurde daher durch gerichtete Mutagenese gegen Valin ausgetauscht. Zuvor wurde jedoch die für Lig III-Wildtyp kodierende Sequenz in den prokaryotischen Expressionsvektor pET28b(+) umkloniert, wodurch eine reproduzierbar hohe Überexpression von Lig III erreicht werden konnte (vgl. 3.1.4). Die unten beschriebenen Untersuchungen wurden alle mit Lig III-Wildtyp und - Mutanten durchgeführt, die unter Verwendung des Konstruktes pET28b(+)-Lig III überexprimiert worden waren.

Lysin 421 von Lig III wurde durch gerichtete Mutagenese wie unter 2.2.1.5 beschrieben gegen Valin ausgetauscht (Lig III K421V). Das mutierte Protein wurde wie für den Wildtyp beschrieben exprimiert, rückgefaltet und gereinigt (vgl. in Abbildung 3.16 A Bahnen 1 und 2). Anschließend wurden die enzymatischen Aktivitäten von Lig III K421V untersucht. Als Positivkontrolle diente der Wildtyp. Die Adenylierungsaktivität der Mutante wurde wie unter 2.2.5.3.1 beschrieben getestet. Lig III K421V zeigte keinerlei Adenylierungsaktivität (Abbildung 3.16 B). Um die Ligationsaktivität der Mutante zu untersuchen, wurde sie an Stelle des Wildtyps im rekonstruierten BER-Komplex (siehe 2.2.5.4.2) eingesetzt. Lig III K421V zeigte, wie erwartet, keinerlei Ligationsaktivität. Um zu überprüfen, ob Lig III K421V korrekt renaturiert war und die native Struktur aufwies, wurde die Bindung des Proteins an ein DNA-Substrat wie unter 2.2.5.3.4 beschrieben in einem "electrophoretic mobility shift assay" (EMSA) untersucht. Dazu wurde ein molarer Überschuss von Lig III WT oder K421V mit einem doppelsträngigen Oligonukleotid, das einen ligierbaren Einzelstrangbruch enthielt, inkubiert. Die Änderung der elektrophoretischen Mobilität des Oligonukleotids durch Bindung von Lig III wurde anhand von nativer PAGE analysiert. Lig III K421V band dabei ebenso gut an die Einzelstrangbrüche wie der Wildtyp (Abbildung 3.16 C und D). Wenn den EMSA-Ansätzen ATP zugegeben wurde, zeigte der Wildtyp eine verringerte

DNA-Bindung, da einige Einzelstrangbrüche ligiert und daher nicht mehr gebunden wurden (Abbildung 3.16 C, Bahn 3). Bei der Mutante geschah dies aufgrund der fehlenden Ligationsaktivität nicht (Abbildung 3.16 D, Bahn 3).



**Abbildung 3.16: Die inaktive Mutante Lig III K421V.** Das Lysin 421 von Lig III wurde durch gerichtete Mutagenese gegen Valin ausgetauscht (Lig III K421V). **A:** Um die Adenylierungsaktivitäten von Lig III WT und K421V zu testen, wurden die Proteine mit radioaktiv markiertem  $[\alpha-P^{32}]$ -ATP inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze einer 6-prozentigen SDS-PAGE unterzogen und die Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. **B:** Die Adenylierung wurde durch Autoradiographie detektiert. **C+D:** Die Bindung von Lig III an DNA-Einzelstrangbrüche wurde mittels EMSA untersucht. 1  $\mu$ M Lig III WT **(C)** oder 1  $\mu$ M Lig III K421V **(D)** wurden mit einem radioaktiv markierten Ligasesubstrat inkubiert. Die Ansätze wurden einer nativen PAGE unterzogen und die markierten Oligonukleotide durch Autoradiographie detektiert. Unten im Autoradiogramm ist die freie DNA, oben die proteingebundene DNA zu sehen.

#### 3.7.1.2 Einfluss der Adenylierung auf den BER-Mechanismus

Um den Einfluss der Adenylierung von Lig III auf die SDDS durch Pol  $\beta$  zu untersuchen, wurde der BER-Komplex jeweils mit dem Wildtyp oder der Mutante rekonstruiert (siehe 2.2.5.4.2). Den Ansätzen wurde keine FEN 1 beigefügt, um alle "long patch BER"-Intermediate detektieren zu können. Der Einfluss der ATP-Konzentration auf die SDDS-Aktivität in den beiden Komplexen wurde verglichen (Abbildung 3.17). In den Reaktionen mit dem Wildtyp zeigte sich das bereits unter 3.3.1 beschriebene Muster. In Anwesenheit von 1 mM ATP wurde das Substrat ligiert und "short patch BER" dominierte (Abbildung 3.17, Bahnen 1 und 3). In Abwesenheit von ATP nahm die SDDS-Aktivität zu und Intermediate von "long patch BER" akkumulierten (Bahn 2). Die Zugabe von XRCC1 erhöhte die SDDS-Aktivität zusätzlich, vor allem in Abwesenheit von ATP (vgl. Bahnen 2 und 4). Wenn Lig III WT durch Lig III K421V ersetzt wurde, erfolgte auch in Gegenwart von ATP keine Ligation (Bahnen 5 und 7). In Anwesenheit von Lig III K421V zeigte Pol  $\beta$  eine stärkere SDDS-Aktivität als in Anwesenheit des Wildtyps (vgl. Bahnen 5 und 6 mit Bahnen 1 und 2). Die ATP-Konzentration hatte dabei keinen wesentlichen Einfluss auf die Aktivität von Pol  $\beta$  (vgl. Bahnen 5-8).



Abbildung 3.17: Der ATP-abhängige Wechsel zwischen "short patch BER" und "long patch BER" tritt in Gegenwart von Lig III K421V nicht auf. Das Reparatursubstrat "AP-16"/ "G-16" wurde mit BER-Proteinen, [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-dCTP und dNTPs mit oder ohne 1 mM ATP inkubiert. Dabei wurde entweder Lig III WT oder Lig III K421V eingesetzt. Denaturierende PAGE von den Reparaturansätzen (Autoradiogramm). Unten die Reparaturintermediate nach Einbau von [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-dCTP und weiteren dNTPs, die Zahlen geben die Menge der eingebauten dNTPs an. Oben die Ligationsprodukte (die Doppelbanden entstanden während der Gelelektrophorese). Alle Ansätze enthielten 50 nM APE 1 und 25 nM Pol  $\beta$ , weitere eingesetzte Proteine sind oberhalb des Autoradiogramms angegeben. Die Proteinkonzentrationen betrugen: 780 nM Lig III; 375 nM XRCC1. XRCC1 stimulierte die SDDS in diesen Ansätzen unabhängig von der ATP-Konzentration (Bahnen 7 und 8).

Demnach handelte es sich bei der ATP-abhängigen Regulation zwischen "short patch BER" und "long patch BER" nicht um einen direkten Effekt von ATP auf den BER-Komplex, sondern der ATP-Effekt bedurfte der Adenylierung von Lig III.

#### 3.7.2 Einfluss der Ligationsaktivität auf den BER-Mechanismus

#### 3.7.2.1 Mutagenese von Aspartat 423 zu Asparagin

Zum Abschluss der oben beschriebenen Untersuchungen sollte überprüft werden, ob außer der Adenylierung auch die Ligationsaktivität von Lig III für den Einfluss von ATP auf den BER-Mechanismus ausschlaggebend ist. Dazu wurde eine Mutante von Lig III erzeugt, die sich noch adenylieren, aber die DNA nicht mehr ligieren konnte. Dem aus der Literatur bekannten Aspartatrest, nach dessen Mutation solche Varianten von DNA-Ligasen entstanden waren, entspricht in der Sequenz von humaner Lig III das Aspartat 423 (siehe 1.3.5). Dieses Aspartat 423 wurde durch gerichtete Mutagenese gegen Asparagin ausgetauscht (Lig III D423N). Das mutierte Protein wurde wie für den Wildtyp beschrieben exprimiert, rückgefaltet und gereinigt (Abbildung 3.18 A, Bahn 2). Anschließend wurden die enzymatischen Aktivitäten von Lig III D423N untersucht (Abbildung 3.18). Als Positivkontrolle diente der Wildtyp. Die Adenylierungsaktivität wurde wie unter 2.2.5.3.1 beschrieben analysiert.



**Abbildung 3.18: Die Enzymaktivität der Mutante Lig III D423N.** Das Aspartat 423 von Lig III wurde durch gerichtete Mutagenese gegen Asparagin ausgetauscht (Lig III D423N). **A:** Um die Adenylierungsaktivität von Lig III D423N zu testen, wurde das Protein mit radioaktiv markiertem  $[\alpha - P^{32}]$ -ATP inkubiert. Lig III WT wurde als Kontrolle eingesetzt. Anschließend wurden die Ansätze einer 6-prozentigen SDS-PAGE unterzogen und die Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. **B:** Die Adenylierung wurde durch Autoradiographie detektiert. **C:** Das Reparatursubstrat "AP-16"/ "G-16" wurde mit BER-Proteinen,  $[\alpha - P^{32}]$ -dCTP und dNTPs inkubiert. Denaturierende PAGE von den Reparaturansätzen (Autoradiogramm). Unten die Reparaturintermediate nach Einbau von  $[\alpha - P^{32}]$ -dCTP und weiteren dNTPs, die Zahlen geben die Menge der eingebauten dNTPs an. Oben die Ligationsprodukte. Die Ansätze enthielten 50 nM APE 1, 25 nM Pol  $\beta$  und 780 nM Lig III WT (1) oder D423N (2).

Die Mutante Lig III D423N zeigte Adenylierungsaktivität, die im Vergleich zum Wildtyp sogar etwas erhöht war (Abbildung 3.18 B). Anschließend wurde die Mutante wie unter 2.2.5.4.2 beschrieben in rekonstruierten BER-Ansätzen eingesetzt. Wider Erwarten zeigte Lig III D423N eine deutliche, wenn auch reduzierte, Ligationsaktivität (Abbildung 3.18 C). Der Austausch von Aspartat gegen Asparagin reichte offensichtlich nicht aus, um das Enzym zu inaktivieren.

#### 3.7.2.2 Mutagenese von Aspartat 423 zu Alanin

Um die vollständige Inaktivierung der Ligationsaktivität zu erreichen, wurde das Aspartat 423 von Lig III gegen Alanin ausgetauscht (Lig III D423A). Das mutierte Protein wurde wie für den Wildtyp beschrieben exprimiert, rückgefaltet und gereinigt (Abbildung 3.19 A, Bahn 2). Die enzymatischen Aktivitäten von Lig III D423A wurden wie für Lig III D423N beschrieben untersucht. Wie schon Lig III D243N zeigte diese Mutante im Vergleich zum Wildtyp erhöhte Adenylierungsaktivität (Abbildung 3.19 B).



**Abbildung 3.19: Die Enzymaktivität der Mutante Lig III D423A.** Das Aspartat 423 von Lig III wurde durch gerichtete Mutagenese gegen Alanin ausgetauscht (Lig III D423A). **A:** Um die Adenylierungsaktivität von Lig III D423A zu testen, wurde das Protein mit radioaktiv markiertem  $[\alpha$ -P<sup>32</sup>]-ATP inkubiert. Lig III WT wurde als Kontrolle eingesetzt. Anschließend wurden die Ansätze einer 6-prozentigen SDS-PAGE unterzogen und die Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. **B:** Die Adenylierung wurde durch Autoradiographie detektiert. **C:** Das Reparatursubstrat "AP-16"/ "G-16" wurde mit BER-Proteinen,  $[\alpha$ -P<sup>32</sup>]-dCTP und dNTPs inkubiert. Denaturierende PAGE von den Reparaturansätzen (Autoradiogramm). Unten die Reparaturintermediate nach Einbau von  $[\alpha$ -P<sup>32</sup>]-dCTP und weiteren dNTPs, die Zahlen geben die Menge der eingebauten dNTPs an. Oben das Ligationsprodukt. Die Ansätze enthielten 50 nM APE 1, 25 nM Pol  $\beta$  und 780 nM Lig III WT (1) oder D423A (2).

Im Gegensatz zu Lig III D243N besaß Lig III D423A in rekonstruierten BER-Ansätzen keinerlei Ligationsaktivität (Abbildung 3.19 C).

#### 3.7.2.3 Einfluss der Ligationsaktivität auf den BER-Mechanismus

Um den Einfluss der Ligationsaktivität von Lig III auf die SDDS durch Pol  $\beta$  zu untersuchen, wurde der BER-Komplex wie unter 2.2.5.4.2 beschrieben jeweils mit dem Wildtyp oder der Mutante Lig III D423A rekonstruiert. Auch hier wurde den Ansätzen keine FEN 1 beigefügt, um alle "long patch BER"-Intermediate detektieren zu können. Der Einfluss der ATP-Konzentration auf die SDDS-Aktivität in den beiden Komplexen wurde verglichen (Abbildung 3.20).

In Abwesenheit von Lig III hatte die ATP-Konzentration keinen Einfluss auf die SDDS-Aktivität von Pol  $\beta$  (Abbildung 3.20, Bahnen 1 und 2). Die Zugabe von Lig III WT ergab die gleichen Ergebnisse wie unter 3.3.1 beschrieben. Die SDDS-Aktivität von Pol  $\beta$  war in Anwesenheit von Lig III WT reduziert (vgl. Bahnen 3 und 4 mit Bahnen 1 und 2).



Abbildung 3.20: Der ATP-abhängige Wechsel zwischen "short patch BER" und "long patch BER" in Gegenwart von Lig III D423A. Das Reparatursubstrat "AP-16"/ "G-16" wurde mit BER-Proteinen, [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-dCTP und dNTPs mit oder ohne 1 mM ATP inkubiert. Dabei wurde entweder Lig III WT oder Lig III D423A eingesetzt. Denaturierende PAGE von den Reparaturansätzen (Autoradiogramm). Unten die Reparaturintermediate nach Einbau von [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-dCTP und weiteren dNTPs, die Zahlen geben die Menge der eingebauten dNTPs an. Oben die Ligationsprodukte. Alle Ansätze enthielten 50 nM APE 1 und 25 nM Pol  $\beta$ , weitere eingesetzte Proteine sind oberhalb des Autoradiogramms angegeben. Die Proteinkonzentrationen betrugen: 780 nM Lig III; 500 nM XRCC1.

In Gegenwart von 1 mM ATP erfolgte die Ligation und "short patch BER" überwog (Bahnen 3 und 5). Im Vergleich dazu war die SDDS-Aktivität in Abwesenheit von ATP erhöht (Bahn 4). Die Zugabe von XRCC1 stimulierte die SDDS-Aktivität von Pol $\beta$ , vor allem in Abwesenheit von ATP (vgl. Bahnen 4 und 6).

Wenn Lig III WT durch Lig III D423A ersetzt wurde, erfolgte auch in Anwesenheit von ATP keine Ligation (Bahnen 7 und 9). Obwohl Lig III D423A zur Adenylierung fähig war, fiel hier der Einfluss der ATP-Konzentration auf die SDDS-Rate schwächer aus als in den Ansätzen mit dem Wildtyp. In Ansätzen, die kein XRCC1 enthielten, war die SDDS-Aktivität von Pol  $\beta$  in Gegenwart von ATP reduziert (Bahnen 7 und 8). In Anwesenheit von XRCC1 war dieser Einfluss von ATP deutlich schwächer (Bahnen 9 und 10).

Schließlich wurde auch die Mutante Lig III D423N, die Adenylierungsaktivität und eine verminderte Ligationsaktivität aufwies, untersucht (Abbildung 3.21). Dazu wurde der BER-Komplex, wie für die Mutante Lig III D423A beschrieben, jeweils mit dem Wildtyp oder der Mutante Lig III D423N rekonstruiert. Der Einfluss der ATP-Konzentration auf die SDDS-Aktivität in den beiden Komplexen wurde verglichen. Die BER-Reaktionen mit dem Wildtyp ergaben die gleichen Ergebnisse wie bereits beschrieben (Abbildung 3.21, Bahnen 1-4).



Abbildung 3.21: Der ATP-abhängige Wechsel zwischen "short patch BER" und "long patch BER" in Gegenwart von Lig III D423N. Das Reparatursubstrat "AP-16"/ "G-16" wurde mit BER-Proteinen, [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-dCTP und dNTPs mit oder ohne 1 mM ATP inkubiert. Dabei wurde entweder Lig III WT oder D423N eingesetzt. Denaturierende PAGE von den Reparaturansätzen (Autoradiogramm). Unten die Reparaturintermediate nach Einbau von [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]-dCTP und weiteren dNTPs, die Zahlen geben die Menge der eingebauten dNTPs an. Oben die Ligationsprodukte. Alle Ansätze enthielten 50 nM APE 1 und 25 nM Pol  $\beta$ , weitere eingesetzte Proteine sind oberhalb des Autoradiogramms angegeben. Die Proteinkonzentrationen betrugen: 780 nM Lig III; 375 nM XRCC1.

Obwohl die Mutante Lig III D423N die Ligation katalysieren konnte, unterschieden sich die Ergebnisse der BER-Reaktionen mit dieser Mutante deutlich von den Ergebnissen der BER-Reaktionen mit dem Wildtyp. Der Anteil der Ligationsprodukte war geringer (Abbildung 3.21, Bahnen 5 und 7). Wie in den BER-Reaktionen mit der Mutante Lig III K421V hatte auch in diesen Reaktionen die ATP-Konzentration keinen deutlichen Einfluss auf die SDDS-Aktivität (Bahnen 5-8).



3.7.2.4 Einfluss der Mutationen und der Adenylierung auf die Substratbindung von Lig III

**Abbildung 3.22: Bindung von Lig III WT, D423A und K421V an DNA-Einzelstrangbrüche.** Die Bindung von Lig III an DNA-Einzelstrangbrüche wurde mittels EMSA untersucht. Lig III WT (2-7), Lig III D423A (8-13) oder Lig III K421V (14-19) wurden in absteigendern Konzentrationen mit einem radioaktiv markierten Ligasesubstrat inkubiert. Den Ansätzen wurde teilweise 1 mM ATP zugegeben. Die Ansätze wurden einer nativen PAGE unterzogen und die markierten Oligonukleotide durch Autoradiographie detektiert. Unten im Autoradiogramm ist die freie, oben die proteingebundene DNA zu sehen. Die Proteinkonzentrationen betrugen: 1μM, 500 nM und 250 nM. In Bahn 12 konnte nur die Hälfte des Probenvolumens aufgetragen werden.

In einem abschließenden Kontrollexperiment wurde untersucht, ob die Adenylierung die Affinität von Lig III zu DNA-Einzelstrangbrüchen erhöht. Der Grund dafür war die Bevorzugung von "short patch BER" in Anwesenheit von ATP in den BER-Ansätzen mit der Mutante Lig III D423A (vgl. Abbildung 3.20 Bahnen 5 und 6). Daraus ergab sich die Frage,

ob der Effekt aus einer verstärkten Substratbindung des Enzyms in Anwesenheit von ATP resultieren könnte.

Daher wurde die Bindung der verschiedenen Mutanten von Lig III an DNA-Einzelstrangbrüche in Abhängigkeit von ATP untersucht. Die Analyse durch EMSA erfolgte wie unter 2.2.5.3.4 beschrieben. Um Aussagen über die Substratbindung von Lig III machen zu können, wurden die Proteinkonzentrationen variiert.

Wider Erwarten hatte die Anwesenheit von ATP in diesen Versuchen keinen signifikanten Einfluss auf die Substratbindung von Lig III WT oder einer der Mutanten (vgl. in Abbildung 3.22 z.B. Bahnen 2-4 mit 5-7). Statt dessen zeigte sich ein Unterschied in der Substratbindung zwischen Wildtyp und Mutanten. Lig III Wildtyp band das Substrat am besten (Abbildung 3.22, Bahnen 2-7). Die Substratbindung von Lig III D423A war etwas geringer als die des Wildtyps (Bahnen 8-13). Die Mutante Lig III K421V wies unter den drei untersuchten Proteinen die geringste Substratbindung auf (Bahnen 14-19).

Zusammengefasst spielte demnach außer der Adenylierung von Lig III auch die Ligationsaktivität eine wichtige Rolle für die ATP-abhängige Regulation der Pol β-Aktivität. Außerdem hatten die durchgeführten Aminosäureaustausche im katalytischen Zentrum von Lig III Auswirkungen auf die DNA-Bindungseigenschaften des Enzyms.