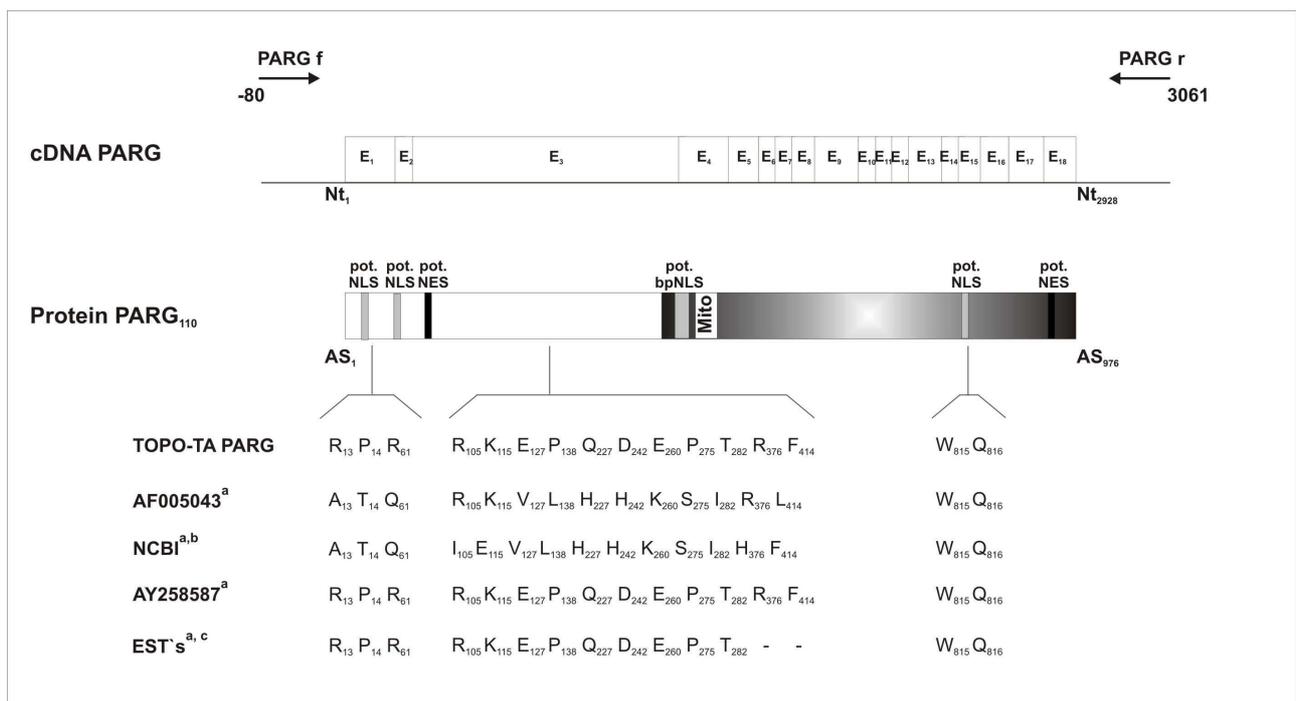


### 3 Experimente

#### 3.1 Klonierung und Expression humaner PARG

##### 3.1.1 Klonierung des Gens der humanen Poly (ADP-Ribose) Glycohydrolase

Ein Ziel der Arbeit war es, Interaktionspartner der humanen Poly (ADP-Ribose) Glycohydrolase (PARG) zu identifizieren. Zur Klonierung des Gens der humanen PARG wurde eine cDNA Synthese an HeLa S3 Gesamt-RNA und anschliessend eine PCR mit den Primern PARG f und PARG r (siehe Tab. 2.5) durchgeführt. Das entstandene PCR-Produkt wurde in den Vektor TOPO TA 2.1 kloniert. Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Restriktionsanalysen bestätigt und anschliessend das inserierte DNA-Fragment mehrerer Plasmide doppelsträngig sequenziert. Die aus dieser Nukleotidsequenz abgeleitete Aminosäureabfolge wurde mit Daten aus vorhandenen Genbanken ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) verglichen.



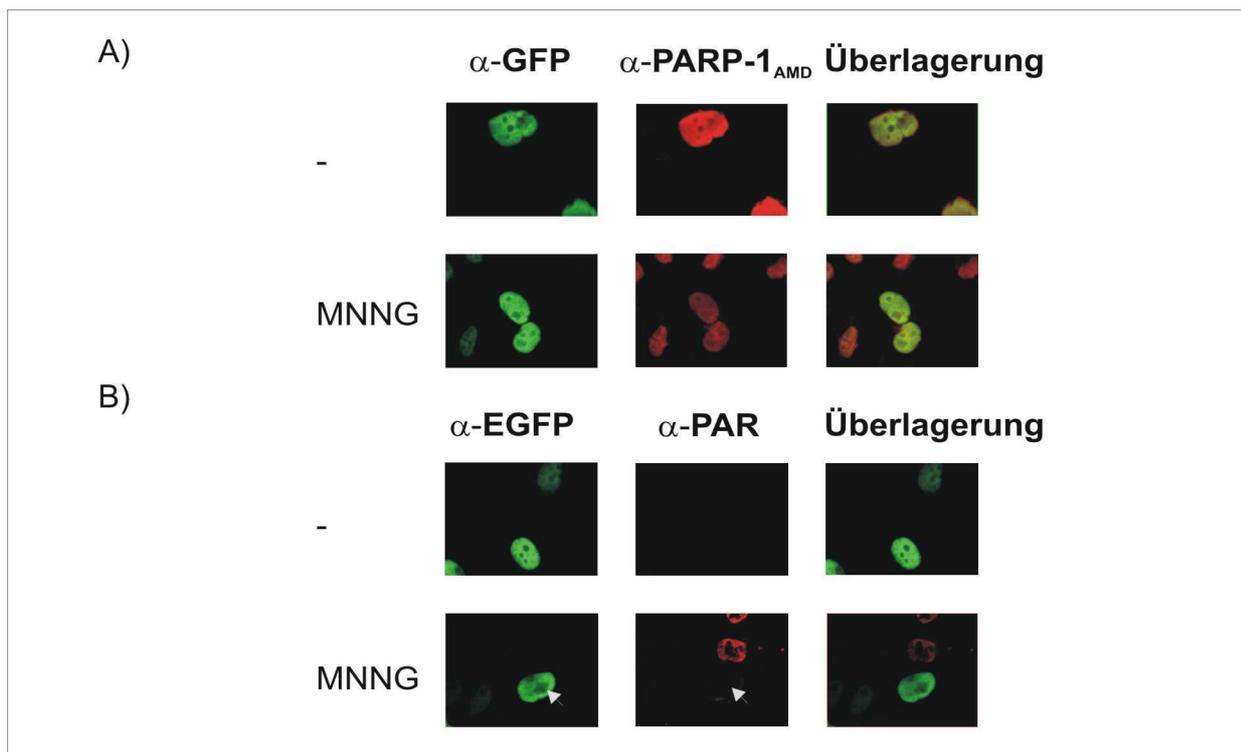
**Abb. 3.1 Polymorphismenanalyse der aus HeLa S3 cDNA klonierten PARG**

Schematische Darstellung der HeLa S3 PARG- cDNA und die des daraus resultierende PARG Protein. Die von Meyer *et al.* (2003) postulierte Exonenstruktur (E<sub>1</sub>-E<sub>18</sub>) wurde übernommen. Die Lage der Polymorphismen (übertragen auf das Protein) ist gekennzeichnet. Die Positionen der zur Klonierung eingesetzten Primer PARG f und PARG r relativ zum Translationsstart und Translationsstop sind angegeben **a** Daten aus Meyer *et al.* (2003), **b** NCBI-Referenz: NT\_033898.2, NT\_035036, XM\_011844 **c** EST-Klone: BU429712.1, AW861896.1, BG719380.1, BU430589.1, BU601350.1

Nt-Nukleotide, AS-Aminosäure

Die aus HeLa S3 Zellen amplifizierte PARG-Nukleotidsequenz codiert demnach für ein Protein von 976 Aminosäuren (siehe Abb. 10.1, desweiteren hinterlegt bei NCBI unter der *accession number* DQ867088). Alle Aminosäuren, die essentiell für den Katalysemechanismus (D<sub>737</sub>, E<sub>755</sub>, E<sub>756</sub>, Y<sub>795</sub>) und die zelluläre Verteilung (pot. NLS: C<sub>15</sub>-W<sub>16</sub>, P<sub>32</sub>-V<sub>38</sub>, V<sub>837</sub>-L<sub>845</sub>, (pot. bipartite NLS: M<sub>415</sub>-K<sub>438</sub>, (pot. NES: L<sub>126</sub>-L<sub>134</sub>, L<sub>881</sub>-L<sub>888</sub>) sind, wurden identifiziert. Bereits durch Meyer *et al.* 2003 nachgewiesene Polymorphismen in Sequenzen postulierter humaner PARG-cDNAs fanden sich auch in der aus HeLa-cDNA klonierten PARG wieder (siehe Abb. 3.1).

Um die katalytische Aktivität der klonierte PARG zu überprüfen, wurde die gesamte kodierende Nukleinsäuresequenz in den Vektor pEGFP-C2 kloniert und anschliessend eine Expression in HeLa S3 Zellen durchgeführt. Immunfluoreszenzanalysen zeigten eine Kolokalisation von endogener PARP-1 und exprimierter GFP-PARG<sub>110</sub> im Nukleus (siehe Abb. 3.2 A). Die katalytische Aktivität der PARG wurde indirekt durch den Nachweis der formierten PAR nach Schädigung mit MNNG gemessen. Während in untransfizierten Zellen 15 min nach genotoxischer Schädigung grosse Mengen an PAR detektierbar waren, konnten diese in Zellen mit exprimierter GFP-PARG nicht mehr nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.2 B).



### Abb. 3.2: Die aus HeLa S3 cDNA klonierte PARG ist katalytisch aktiv

HeLa S3-Zellen wurden mit dem Plasmid pEGFP PARG<sub>110</sub> transfiziert. Nach einer Expressionszeit von 24 h wurde die Synthese von Poly (ADP-Ribose) durch Schädigung der Zellen mit 500  $\mu$ M MNNG (15 min) induziert und die Zellen anschliessend mit Formaldehyd/Triton fixiert. **A:** Der Nachweis der Kernlokalisierung von PARP-1 und GFP-PARG erfolgte durch Immunfluoreszenz mit den primären Antikörper  $\alpha$ -PARP-1 AMD und  $\alpha$ -GFP sowie den sekundären Antikörpern  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Alexa 594 (rot) und  $\alpha$ -Maus-IgG-Alexa 488 (grün). **B:** Die Expression von GFP-PARG wurde mit dem polyklonalen Antikörper  $\alpha$ -EGFP nachgewiesen. Formierte PAR-Polymere wurden mit dem Antikörper mAb  $\alpha$ -Poly (ADP-Ribose)/10H identifiziert. Als sekundäre Antikörper wurden  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Alexa 488 (grün) und  $\alpha$ -Maus-IgG-Alexa 594 (rot) eingesetzt. Pfeile kennzeichnen transfigierte Zellen mit katalytisch aktiver PARG.

### 3.1.2 Expressions- und Reinigungsversuche der humanen PARG<sub>110</sub>

Zur rekombinanten Expression der PARG wurde die gesamte kodierende Nukleinsäuresequenz unter Verwendung der Primer PARG-1 und PARG-2 (siehe Tab. 2.5) in den Vektor pQE31 kloniert. Das resultierende Plasmid pQE31 PARG<sub>110</sub> wurde anschliessend in *E. coli* Expressionsstämme transformiert und Expressionsversuche unternommen. Zunächst wurden die Stämme *E. coli* NM 522 bzw. M15 gewählt. Trotz variabler Expressionsbedingungen war in keinem dieser beiden Zellstämme eine erfolgreiche Expression von His-PARG<sub>110</sub> möglich (siehe Tab. 3.1).

**Tab. 3.1: Optimierung der Bedingungen zur rekombinanten Expression der PARG<sub>110</sub> in *E. coli***

<i>E. coli</i> - Stämme	Variation der Expressionstemperatur <sup>a)</sup>						Expression nach Blackwell <i>et al.</i> (1991) <sup>b)</sup>	
	37°C		30°C		25°C		Expr. <sub>ges.</sub>	Expr. <sub>lösl.</sub>
	Expr. <sub>ges.</sub>	Expr. <sub>lösl.</sub>	Expr. <sub>ges.</sub>	Expr. <sub>lösl.</sub>	Expr. <sub>ges.</sub>	Expr. <sub>lösl.</sub>	Expr. <sub>ges.</sub>	Expr. <sub>lösl.</sub>
	<b>pQE31 PARG<sub>110</sub></b>							
NM522	-	0 %	-	0 %	-	0 %	n. u.	n. u.
M15	-	0 %	-	0 %	-	0 %	n. u.	n. u.
JM109	++	5 %	-	0 %	-	0 %	n. u.	n. u.
BL21 Codon <sup>+</sup> RIL	++++	2 %	+	5 %	-	0 %	+++	2 %
BL21 Codon <sup>+</sup> RIL (pREP4)	++++	2 %	+	5 %	-	0 %	+++	40 %
	<b>pASK7 PARG<sub>110</sub></b>							
M15	-	0%	-	0%	-	0%	n. u.	n. u.
JM109	-	0%	-	0%	-	0%	n. u.	n. u.
BL21 Codon <sup>+</sup> RIL	++++	2 %	++	2 %	-	0 %	-	0 %
BL21 Codon <sup>+</sup> RIL (pREP4)	++++	2 %	++	2 %	-	0 %	-	0 %

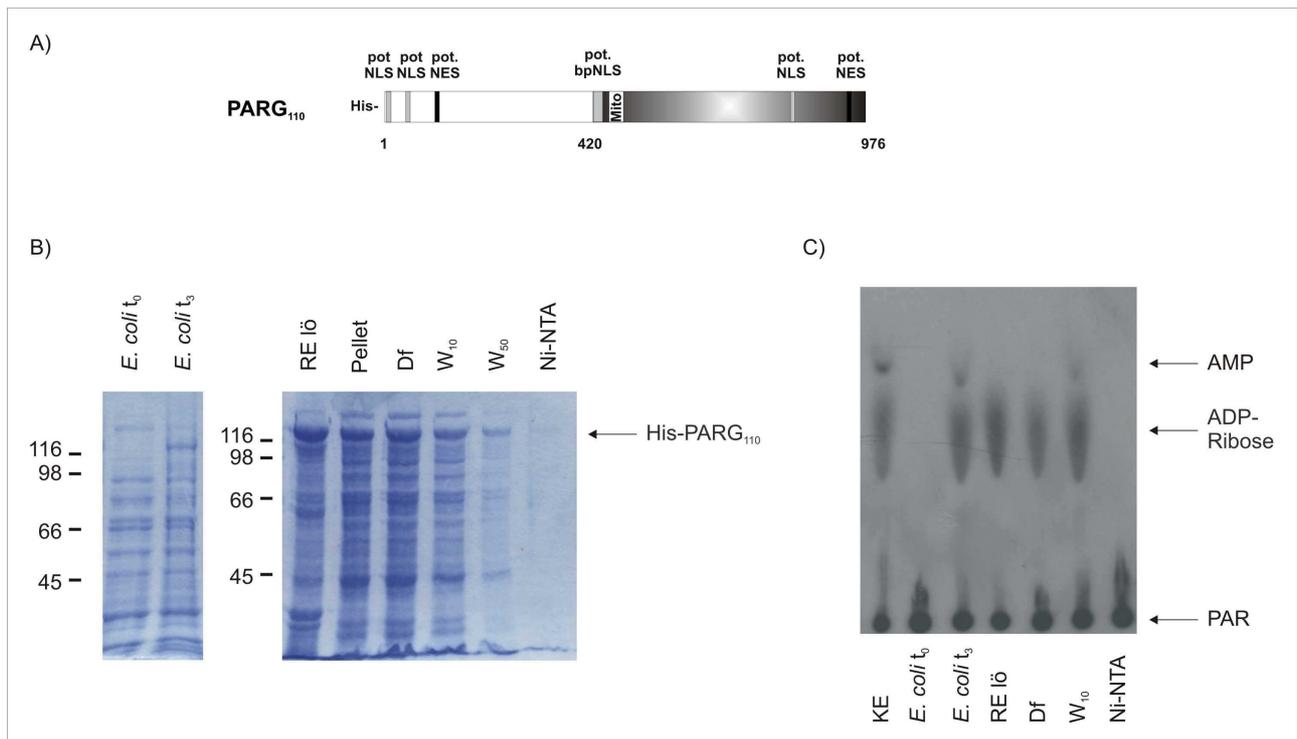
a) Expression in LB in Anwesenheit der entsprechenden Antibiotika (siehe Tab. 2.11)

b) Expression in LB + 1 mM Betain + 0,5 M Sorbitol (Blackwell *et al.*, 1991) in Anwesenheit der entsprechenden Antibiotika (siehe 2.2.7.1)

Die Expression wurde mittels SDS-PAGE und Western-Blot ( $\alpha$ -His bzw.  $\alpha$ -Streptactin) untersucht und graduiert nach keine Expression (-), geringe Expression (+), gute Expression (++) , sehr starke Expression (+++), nicht untersucht (n.u.)

Eine Analyse der Nukleinsäuresequenz der aus HeLa-cDNA klonierten PARG-cDNA ergab, dass die Kodierung der Aminosäuren Arginin, Isoleuzine und Leuzin in diesem Gen gehäuft über die von *E. coli* selten genutzten Codons AGG bzw. AGA (Arginin), AUA (Isoleuzin) und CUA (Leuzin) erfolgt. Daher wurde das Plasmid pQE31 PARG<sub>110</sub> alternativ in den Stamm *E. coli* BL21 Codon<sup>+</sup> RIL transformiert, welcher zusätzlich die zuvor genannten seltenen Codons plasmidkodiert besitzt, und die Expression wiederholt. In diesem Fall wurde unter Standard-Expressionbedingungen (37°C, 1 mM IPTG, 3 h) His-PARG<sub>110</sub> deutlich exprimiert. Nach dem Aufschluss der Zellen verblieb das Fusionsprotein jedoch grösstenteils im Pellet in Form von unlöslichen *inclusion bodies* (siehe Tab. 3.1). Eine Verringerung der Expressionstemperatur hatte lediglich eine geringere Gesamtexpressionsrate, nicht jedoch die Erhöhung des Anteils löslich exprimierten Proteins zur Folge (siehe Tab. 3.1). Um die Expression von His-PARG<sub>110</sub> noch weiter beeinflussen zu können, wurde der Transkriptionsrepressor LacI, kodiert auf dem Plasmid pREP4, zusätzlich in *E. coli* BL21 Codon<sup>+</sup> RIL koexprimiert. Die beabsichtigte Verringerung der Gesamtexpression und daraus resultierende Erhöhung des Anteils löslich exprimierten Proteins wurde aber auch damit nicht erreicht (siehe Tab. 3.1). In einer Studie von Blackwell *et al.* (1991) wurde gezeigt, dass bei einer Zellanzucht unter osmotischen Stressbedingungen in Gegenwart von Sorbitol und Glyzylbetainen die Bildung von *inclusion bodies* minimiert und die Proteinfaltung verbessert werden konnte. Daher wurde diese Methode für die Expression von His-PARG<sub>110</sub> in *E. coli* BL21 Codon<sup>+</sup> RIL auch getestet. Es zeigt sich, dass die Gesamtexpression von His-PARG<sub>110</sub> unter diesen Bedingungen geringfügig verringert wurde (siehe Tab. 3.1). Wurde zudem der Transkriptionsrepressor LacI koexprimiert (*E. coli* BL21 Codon<sup>+</sup> RIL (pREP4)), konnte der Anteil löslich exprimierten Proteins auf 40 % erhöht werden (siehe Tab. 3.1 und Abb. 3.3 B).

Das löslich exprimierte His-PARG<sub>110</sub> wurde anschliessend einer Chromatographie an Ni-NTA-Chromatographie unterzogen. His-PARG<sub>110</sub> zeigte nur eine geringe Affinität gegenüber der Sepharose auf. Daher wurde die Bindung des Proteins an die Ni-NTA-Matrix unter sehr unspezifischen Bedingungen (kein Imidazol, 100 mM NaCl, pH 8,5) vorgenommen. Dennoch konnten nur geringe Mengen His-PARG<sub>110</sub> an die Sepharose gebunden werden, die zusammen mit einigen bakteriellen Proteinen bereits bei 10 mM Imidazol eluierten (siehe Abb. 3.3). Ebenso scheiterten Reinigungsversuche an Ni-NTA-Sepharose, in denen zur strukturellen Stabilisierung von His-PARG<sub>110</sub> zusätzlich Inhibitoren der PARG (Gallotannine, vgl Kapitel 3.2.1 und 3.2.2) eingesetzt wurden (Daten nicht gezeigt).



### Abb. 3.3: His-PARG<sub>110</sub> bindet nicht an Ni-NTA-Sepharose

Die gesamte kodierende Nukleinsäuresequenz der humanen PARG wurde in den Vektor pQE31 kloniert und nach der Methode von Blackwell *et al.* (1991) in *E. coli* BL21 Codon<sup>+</sup> RIL, zusammen mit dem Transkriptionsrepressor LacI, exprimiert. Anschliessend erfolgte eine Chromatographie an Ni-NTA-Sepharose **A**: Schematische Darstellung des Fusionsproteins **B**: Proben der jeweiligen Reinigungsschritte wurden in einem 8% SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. **C**: Proben des Reinigungsprotokolls wurden auf PARG Aktivität untersucht. Gekennzeichnet wurde die Position von PAR, ADP-Ribose und AMP.

*E. coli* t<sub>0</sub>-*E. coli* vor Induktion, *E. coli* t<sub>3</sub>-*E. coli* 3 h nach Induktion, RE lö-*E. coli* Extrakt (lösliche Proteine), Pellet-unlösliche Fraktion nach Zellaufschluss, Df-Durchfluss an Ni-NTA-Sepharose, W-Waschfraktionen mit 5 bzw. 50 mM Imidazol, Ni-NTA-an Ni-NTA-Sepharose gebundene Proteine

Um die Bindungsprobleme bei der Chromatographie an Ni-NTA-Sepharose zu umgehen, bot sich als Alternative die Expression und Reinigung als Streptag-Fusionsprotein an. StreptagII ist ein Oktapeptid (WSHPQFEK), dessen Affinität zu Streptaktin vergleichsweise höher ist als der Penta-Histidintag an die Ni-NTA-Sepharose. Die Elution erfolgt mit Desthiobiotin unter milden Bedingungen, so dass die Aktivität des untersuchten Proteins nicht beeinflusst werden sollte. Zur Nutzung dieses Expressionssystems wurde die gesamte kodierende Nukleinsäuresequenz der humanen PARG unter Verwendung der Primer PARG-1 und PARG-2 (siehe Tab. 2.5) in den Vektor pASK-7 kloniert (pASK7-PARG<sub>110</sub>) und erneut in verschiedene *E. coli* Expressionsstämme transformiert. Damit erfolgte Expression der PARG<sub>110</sub> mit N-terminalem Streptag. Wie im Falle von His-PARG<sub>110</sub> war trotz variabler Bedingungen keine Expression in *E. coli* M15 bzw. JM109 möglich. Wurde der Stamm *E. coli* BL21 Codon<sup>+</sup> RIL genutzt, erfolgte die Expression ebenfalls vornehmlich in Form von unlöslichen *inclusion bodies*. Die Koexpression von LacI als auch die Zugabe von osmolytischen Substanzen führten nicht zu einer Erhöhung des Anteils löslich exprimierten Proteins. Versuche, das Protein in Form von *inclusion bodies* aus *E. coli* zu isolieren, schrittweise rückzufalten und dann unter nativen Bedingungen an Streptaktin-Sepharose zu reinigen scheiterten ebenfalls. Zum einen wurde während der Rückfaltung das

Protein unspezifisch gespalten. Aus früheren Publikationen ist zudem bekannt, dass die Zugabe des Substrates PAR (250 nM PAR-modifizierte PARP-1) essentiell für die Renaturierung ist (Shah *et al.*, 1995). Diese Mengen standen im Rahmen einer Dialyse (mindestens 1 L) nicht zur Verfügung.

Da eine Reinigung von PARG<sub>110</sub> als Fusionsprotein auf diesem Wege nicht möglich war, wurden in den folgenden Experimenten *E. coli* Rohextrakte, in denen entweder His-PARG<sub>110</sub> oder zur Kontrolle Vektorproteine (pQE31) überexprimiert vorlagen, eingesetzt.

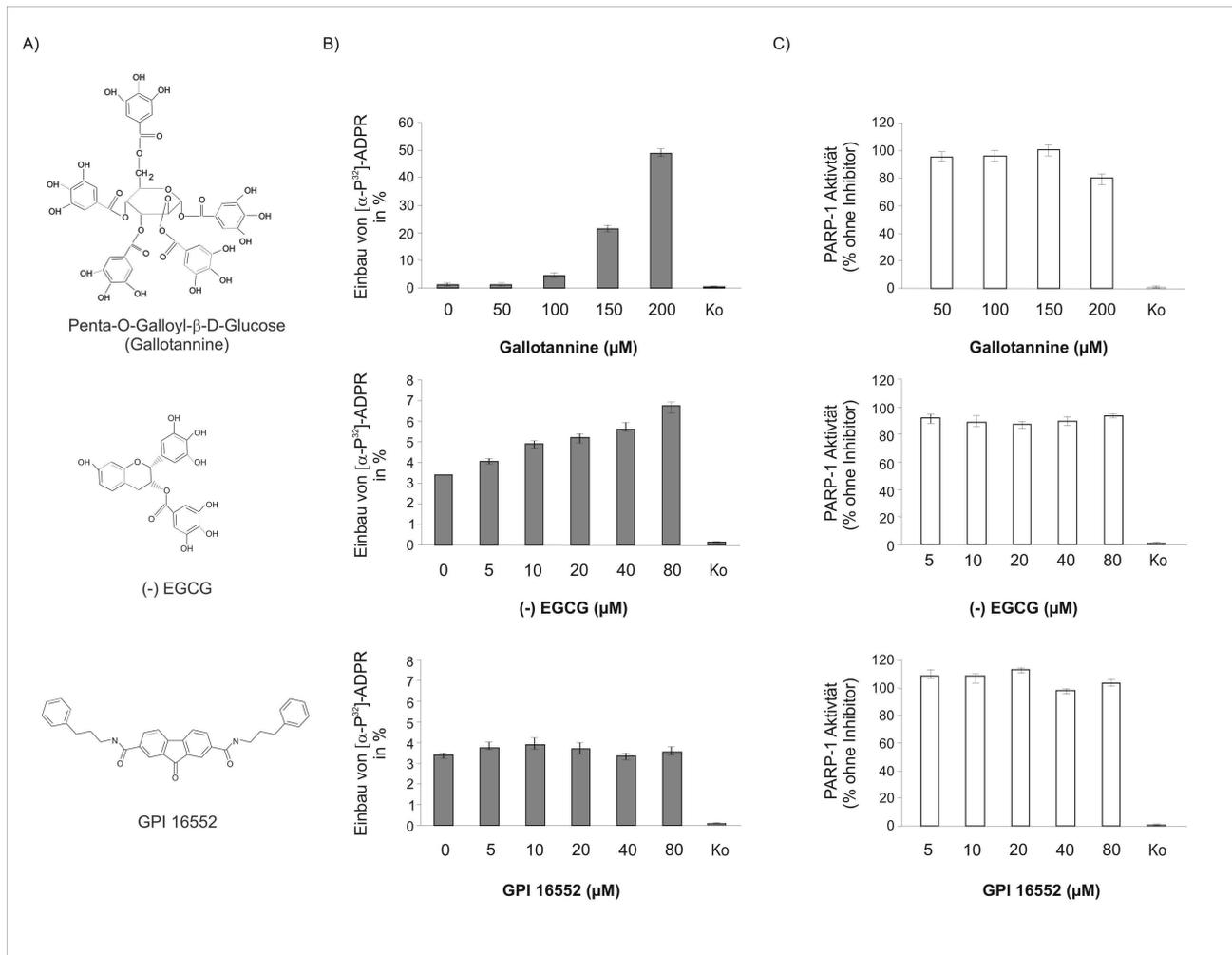
## 3.2 Etablierung einer Affinitätsmatrix zur Immobilisierung der PARG

Die im Kapitel 3.1.2 beschriebenen Experimente hatten gezeigt, dass durch den Einsatz konventioneller Affinitätschromatographien eine Reinigung bzw. Rekrutierung der humanen PARG nicht möglich war. Es sollte als Alternative überprüft werden, inwiefern sich eine spezifische Affinitätsmatrix unter Verwendung von PARG-Inhibitoren zur Immobilisierung der PARG eignete.

### 3.2.1 Wirkung verschiedener PARG-Inhibitoren in humanen Kernextrakten

Während die Entwicklung und Anwendung von Inhibitoren für PARP-1 bereits sehr weit fortgeschritten ist, sind in der Literatur nur wenige Moleküle beschrieben, welche die Aktivität der PARG hemmen. Ziel war es, einen PARG-Inhibitor zu finden, der zum einen die humane PARG effektiv inhibiert, sich zudem aufgrund seiner chemischen Eigenschaften auch für eine Immobilisierung an Sepharosen eignet. Durch Bertram *et al.* (2003) wurde gezeigt, dass der Gehalt an Poly (ADP-Ribose) in humanen Lymphozyten durch das pflanzliche Polyphenol (-) Epigallocatechin-3-Gallat (-) EGCG reguliert werden kann. Desweiteren wurde für Gallotannine, die zur Klasse der hydrolysierbaren Tannine gehören, nachgewiesen, dass sie aus Mauszellen bzw. aus humaner Plazenta isolierte PARG hemmen (Tsai *et al.*, 1992, Aoki *et al.*, 1993). Daneben wurde in Experimenten im Tierkulturmodell von Lu *et al.* (2003) der Einsatz von symmetrisch substituierten Tilorenverbindungen als PARG-Inhibitoren (GPI 16552 [(N-Bis-Phenyl-Propyl)-9-Oxo-Fluoren-2,7-Diamid]) beschrieben. Aufgrund der chemischen Eigenschaften und der kommerziellen Verfügbarkeit sollte geprüft werden, inwiefern diese drei Substanzen die Anforderungen zur Hemmung der PARG und deren Immobilisierungseignung erfüllen. Zunächst wurde in einem *in vitro* Poly (ADP-Ribosyl)ierungs-Experiment überprüft, ob die drei genannten Substanzen einen Einfluss auf den PAR-Metabolismus in HeLa S3-Extrakten ausüben. Dazu wurden Kernextrakte aus HeLa S3 Zellen isoliert und mit sonifizierter DNA und [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-NAD<sup>+</sup> in Gegenwart steigender Mengen bekannter, physiologisch relevanter Konzentrationen von Gallotanninen, (-) EGCG bzw. GPI 16552 inkubiert. Der Einbau von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ADP-Ribose aus [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-NAD<sup>+</sup> in PAR

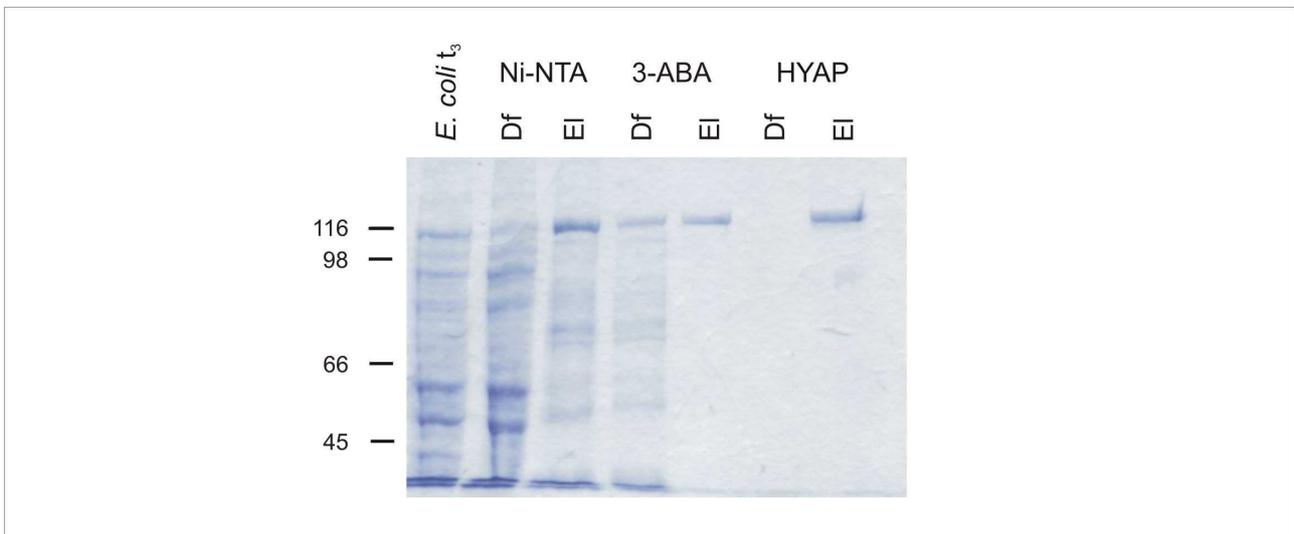
wurde anschliessend durch Cerenkov-Zählung quantifiziert. Es zeigte sich, dass die Anwesenheit von Gallotanninen zu einer Akkumulation von PAR führte. Bei einer Gallotanninkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  wurde eine Erhöhung des PAR-Gehaltes um den Faktor 40 erreicht (siehe Abb. 3.4 B). Höhere Konzentrationen ( $> 400 \mu\text{M}$ ) führten zu einer dramatischen Hemmung der PAR-Synthese in HeLa Kernextrakten (Daten nicht gezeigt). Die Inkubation mit (-) EGCG steigerte den PAR-Gehalt um den Faktor 1,9, während GPI 16552 keinerlei Wirkung auf den PAR-Metabolismus in HeLa S3-Kernextrakten zeigte (siehe Abb. 3.4 B).



**Abb. 3.4: Effekt potenzieller PARP-Inhibitoren auf den Poly (ADP-Ribose) Metabolismus in HeLa S3-Kernextrakten**

**A:** Struktur potenzieller PARP-Inhibitoren. **B:** 15  $\mu\text{g}$  HeLa S3-Kernextrakte unterschiedlicher Präparationen (präpariert nach 2.2.7.3.2) bzw. **C:** 200 ng rekombinante PARP-1 wurden mit sonifizierter DNA und 10  $\mu\text{M}$   $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$  in PARP-Puffer (+  $\text{MgCl}_2$ ) in der Gegenwart von Gallotanninen, (-) EGCG bzw. GPI-16552 inkubiert. Nach 3 h wurden Proteine und gebildete PAR mit TCA gefällt. Die Menge an  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ADP-Ribose}$  in der säureunlöslichen Fraktion wurde quantifiziert und die Menge inkorporierter ADP-Ribose aus dem prozentualen Einbau des  $^{32}\text{P}$ -markierten  $\text{NAD}^+$  bestimmt. In die Kontrollreaktionen (Ko) wurde kein Protein zugeben.

Als nächstes sollte ausgeschlossen werden, dass die Akkumulation der PAR durch Gallotannine und (-) EGCG in HeLa S3-Kernextrakten auf eine Aktivierung der Synthese von Polymeren durch PARP-1 zurückzuführen war. Dazu wurde humane PARP-1 als Protein mit N-terminaler Poly-Histidinfusion in *E. coli* M15 exprimiert, gereinigt (siehe Abb. 3.5) und dessen katalytische Aktivität bestimmt (siehe 2.2.7.11.3).



**Abb. 3.5: Reinigungsprofil der rekombinanten His-PARP-1**

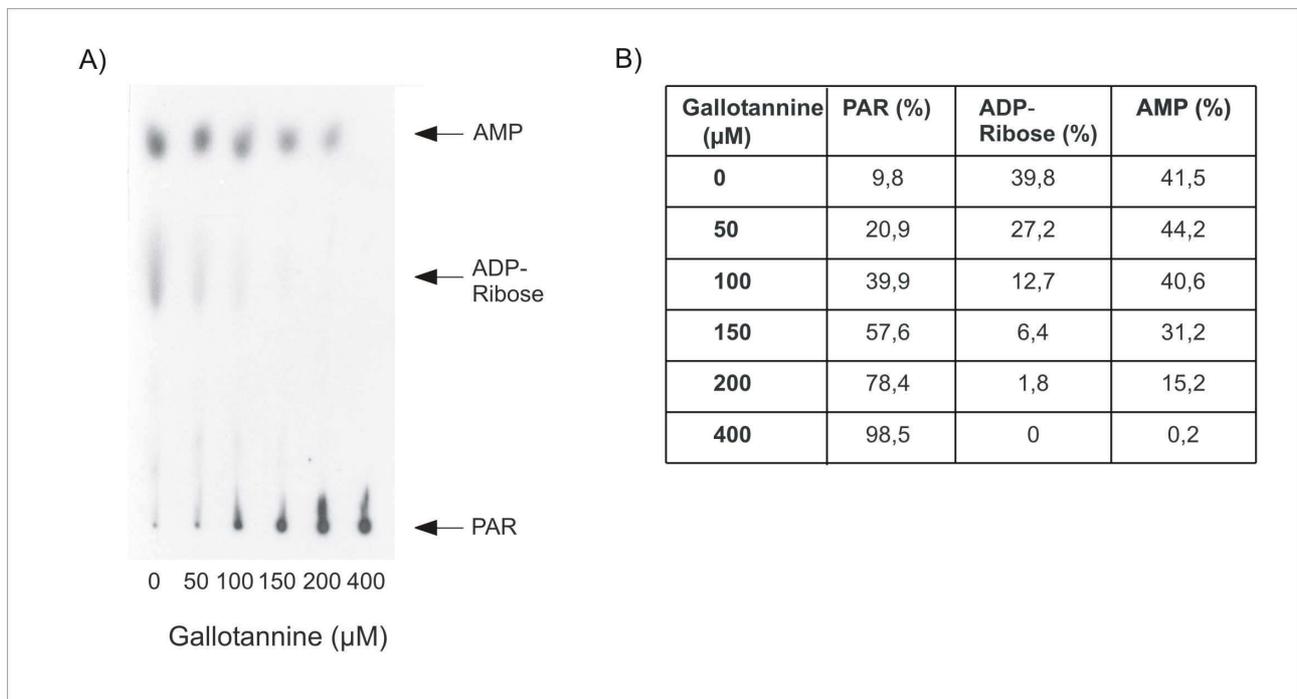
His-PARP-1 wurde in *E. coli* M15 exprimiert (siehe 2.2.7.1) und durch Chromatographie an Ni-NTA-Sepharose (Ni-NTA), 3-ABA-Sepharose (3-ABA) und Hydroxyapatit (HYAP) gereinigt (siehe 2.2.7.5). Proben der jeweiligen Reinigungsschritte wurden in einer 8 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. *E. coli*  $t_3$ -*E. coli* 3 h nach Induktion, Df-Durchfluss, El-Elution

Wurde anschliessend die Poly (ADP-Ribosyl)ierungsaktivität von PARP-1 in Gegenwart von steigenden Mengen an Gallotanninen durchgeführt, so zeigte sich keinerlei aktivierende Wirkung im Bereich von 0- 200  $\mu$ M (siehe Abb. 3.4 C). Folglich musste die im *in vitro* Poly (ADP-Ribosyl)ierungsexperiment beobachtete Akkumulation der PAR (siehe Abb. 3.4 B) auf eine Hemmung des PAR-Abbau zurückzuführen sein. Für (-) EGCG und GPI 16552 wurde ebenfalls kein aktivierender Einfluss im Bereich von 0- 80  $\mu$ M auf die katalytische Aktivität von PARP-1 festgestellt (siehe Abb. 3.4 C).

### 3.2.2 Regulation des Poly (ADP-Ribose)-Katabolismus durch Gallotannine

Der Abbau der Poly (ADP-Ribose) ist prinzipiell auf zwei verschiedenen Wegen möglich. Zum einen können durch die Aktivität der PARG (ADP-Ribose)-Monomere gebildet werden, die in einer folgenden Reaktion durch (ADP-Ribose)-Pyrophosphatasen zu AMP und Ribosephosphat gespalten werden (Abb. 1.2). Alternativ könnten Phosphodiesterasen PAR unmittelbar zu AMP, Phosphoribose-AMP [PR-AMP] und Di-Phosphoribose-AMP [(PR)<sub>2</sub>-AMP] umsetzen (siehe Abb. 1.8). Um den Einfluss der Gallotannine auf die jeweiligen katabolen Reaktionswege zu untersuchen, wurden erneut Kernextrakte

aus HeLa S3-Zellen präpariert und mit deproteinierter [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-PAR in Gegenwart steigender Mengen Gallotannine inkubiert. Die gebildeten Produkte wurden mittels Dünnschichtchromatographie separiert und anschliessend durch Autoradiographie detektiert. Als Produkte der katabolen Prozesse wurden lediglich ADP-Ribose und AMP detektiert, was darauf hinweist, dass in Kernextrakten von HeLa S3-Zellen der Abbau der Polymere vornehmlich durch die gekoppelten Aktivitäten der PARG und einer (ADP-Ribose)-Pyrophosphatase erfolgt. Bereits durch Rossi *et al.* (2002) wurde eine solche gekoppelte Reaktion in HeLa-Extrakten postuliert. Um den Einfluss der Gallotannine auf die beiden Enzymaktivitäten zu ermitteln, wurde die Menge gebildeter [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-ADP-Ribose und [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-AMP aus [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-PAR quantifiziert (siehe Abb. 3.6 B).



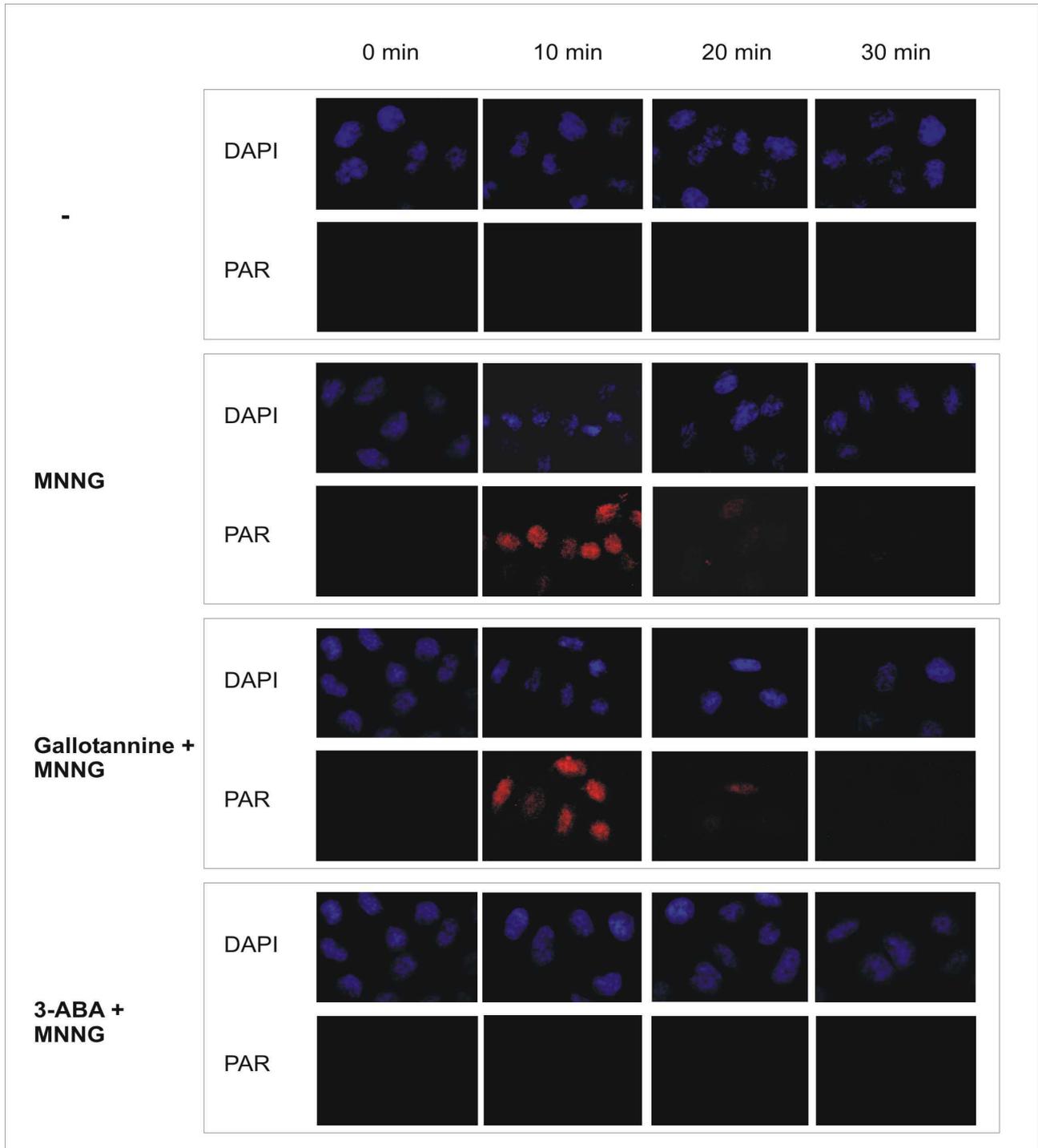
### Abb. 3.6: Gallotannine hemmen den PAR-Abbau in HeLa S3-Kernextrakten

15  $\mu$ g HeLa S3-Kernextrakte (präpariert nach 2.2.7.3.2) wurden in PARG-Puffer (+  $MgCl_2$ ) mit radioaktiv markierter deproteinierter [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-PAR in der Gegenwart steigender Mengen GalloGallotannine inkubiert. Nach 30 min wurden Proteine und Nucleotide mit Aceton gefällt und anschliessend mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. **A:** Autoradiogramm der separierten Nucleotide. Die Position von PAR, ADP-Ribose und AMP sowie die Konzentration der eingesetzten Gallotannine sind angegeben. **B:** Das Autoradiogramm wurde mit einem Phosphoimager ausgewertet. Dabei wurde die Menge gebildeter ADP-Ribose, AMP sowie der verbleibenden PAR bestimmt. Die in der Tabelle angegebenen Werte repräsentieren das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

Die Bildung von ADP-Ribose, also die Aktivität der PARG, konnte durch die Zugabe von 100  $\mu$ M Gallotannine effizient gehemmt werden. Dahingegen wurde die Aktivität der (ADP-Ribose)-Pyrophosphatasen erst durch Zugabe von 200  $\mu$ M Gallotanninen deutlich vermindert (siehe Abb. 3.6 B). Durch Rossi *et al.* (2002) wurde gezeigt, dass es sich bei dem ADP-Ribose spaltenden Enzym um ein  $Mg^{2+}$ -abhängiges Enzym handelt. Tatsächlich wurde bei einer Poly (ADP-Ribosyl)ierung von HeLa S3-Kernextrakten in Gegenwart von 200  $\mu$ M Gallotanninen und 20 mM EDTA eine weitere Erhöhung der gebildeten PAR beobachtet (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.3 Gallotannine eignen sich nicht als *in vivo* PARG-Inhibitoren

Da sich Gallotannine *in vitro* als effektive Inhibitoren des PAR-Katabolismus erwiesen (siehe Abb. 3.4 B und Abb. 3.6), sollte untersucht werden, inwiefern sie sich *in vivo* ebenfalls zur Regulation des PAR-Metabolismus eignen. Ein zunächst durchgeführter Zytotoxizitätstest ergab keine Hinweise auf ein vermindertes Überleben der Zellen in Anwesenheit von 0- 300  $\mu\text{M}$  Gallotanninen (Daten nicht gezeigt). Entsprechend wurden HeLa S3-Zellen anschliessend für 20 min mit 150  $\mu\text{M}$  Gallotanninen präinkubiert. Danach erfolgte eine Schädigung mit dem alkylierenden Agens MNNG, welches als Induktor der Synthese von PAR beschrieben ist. Die gebildeten PAR-Polymere wurden in einer Immunfluoreszenz mit einem spezifischen anti-PAR-Antikörper nachgewiesen. In Abwesenheit von Inhibitoren wurden 10 min nach Schädigung mit MNNG grosse Mengen von PAR im Zellkern von HeLa S3 Zellen detektiert (siehe Abb. 3.7). Durch die Aktivitäten der PARG und (ADP-Ribose)-Pyrophosphatasen erfolgte ein schneller Abbau der Polymere, so dass nach 20 und 30 min nur noch wenige PAR-Signale im Zellkern nachweisbar waren (siehe Abb. 3.7). Als Kontrolle wurde eine Schädigung in Anwesenheit des PARP-1 Inhibitors 3-Aminobenzamid (3-ABA) durchgeführt. In Anwesenheit von 3-ABA wurde in MNNG-behandelten Zellen keinerlei PAR nachgewiesen (siehe Abb. 3.7). Die Zugabe von Gallotanninen hatte erstaunlicherweise keinerlei Auswirkung auf den durch MNNG induzierten PAR-Metabolismus in HeLa S3- Zellen. Ein selektiver PARG-Inhibitor sollte in Zellen entweder eine Akkumulation der Polymere, wenigstens aber eine Verzögerung des Abbaus von PAR bewirken. Keiner dieser beiden Effekte wurde bei einer Koinkubation mit MNNG und Gallotanninen in HeLaS3- Zellen beobachtet (siehe Abb. 3.7). Daher muss davon ausgegangen werden dass sich Gallotannine *in vivo* nicht eignen, den PAR-Metabolismus in HeLa S3- Zellen zu regulieren. In einer Kooperation mit den Arbeitsgruppe von Prof. Leist (H. Lundbeck, Dänemark) und Prof. Bürkle (Universität Konstanz, Deutschland) wurden Gallotannine als potenzielle PARG-Inhibitoren in einem weiteren Modellsystem untersucht (Falsig *et al.*, 2004). Dabei erfolgte die Induktion der PAR- Synthese in primären Astrozyten bzw. HeLa- Zellen durch Schädigung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ebenso wie bei genotoxischer Schädigung mit MNNG konnten Gallotannine in diesen Zellen nicht den Abbau der Polymere verhindern bzw. verzögern. Im Gegenteil, im Falle einer Koinkubation mit Gallotanninen und  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurde die PAR-Synthese sogar gehemmt (Falsig *et al.*, 2004). Vermutlich übernahmen Gallotannine aufgrund ihrer zahlreichen Hydroxylgruppen hier eher die Funktion eines Radikalfängers und verringerten damit die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in der Zelle, die im Folgenden die Synthese von PAR hätten induzieren können (Falsig *et al.*, 2004). Zudem wurde durch J. Falsig in einem *in vitro* Transportexperiment die Membranpermeabilität der Gallotannine an intestinalen Epithelzellen (Caco-2) untersucht. Es ergaben sich keinerlei Hinweise dafür, dass Gallotannine die Zellmembran von Caco-2 passieren können (Falsig *et al.*, 2004).

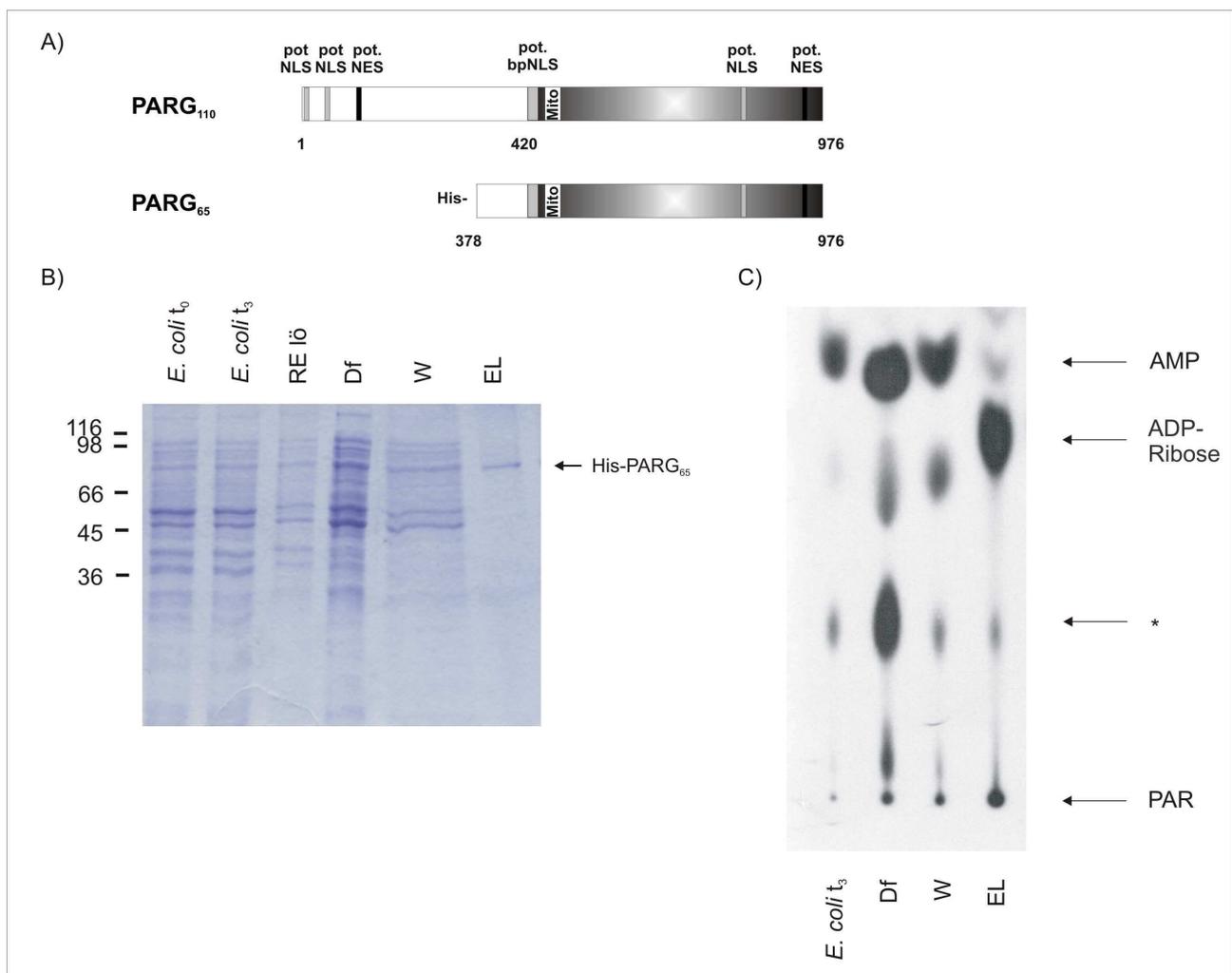


**Abb. 3.7: Gallotannine zeigen keinen Effekt auf den Poly (ADP-Ribose)-Metabolismus in kultivierten HeLa S3- Zellen**

HeLa S3-Zellen wurden mit 3-ABA (2 mM) bzw. Gallotanninen (150  $\mu$ M) für 20 min präinkubiert. Die Synthese von PAR wurde durch Zugabe von 500  $\mu$ M MNNG für 10 min induziert und die Zellen anschliessend in frischem Medium, ggf. in Anwesenheit von 3-ABA bzw. Gallotanninen, inkubiert. Zu Beginn (0 min) bzw. 10, 20 und 30 min nach der Schädigung wurden die Zellen fixiert und gebildete PAR-Polymere mittels Immunfluoreszenz mit dem Antikörper  $\alpha$ -Poly (ADP-Ribose)/96-10-04 und dem sekundären Antikörper  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Alexa 594 identifiziert. Zur Lokalisation der Zellkerne wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt.

### 3.2.4 Expression und Reinigung von His-PARG<sub>65</sub>

Von Tanuma *et al.* (1989) und Uchida *et al.* (1993) wurde ein 71 kDa grosses Protein aus humaner Plazenta gereinigt, welches über eine PARG-Aktivität verfügte. Die Aktivität dieses Proteins konnte *in vitro* effizient durch die Zugabe von Gallotanninen inhibiert werden (Tanuma *et al.*, 1989). Von Miwa *et al.* (1974) wurde ein Protein mit ähnlicher Grösse aus Rinderthymus isoliert, welches ebenfalls über PARG-Aktivität verfügte.



#### Abb. 3.8: Reinigung katalytisch aktiver His-PARG<sub>65</sub>

Die katalytische Domäne der HeLa S3- PARG (AS 378-976) wurde in den Vektor pQE31 kloniert, als Histidininfusionsprotein in *E. coli* M15 exprimiert und mittels Ni-NTA-Chromatographie gereinigt.

**A:** Schematische Darstellung des Fusionsproteins. **B:** Proben der jeweiligen Reinigungsschritte wurden in einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. **C:** Proben des Reinigungsprotokolls wurden auf PARG Aktivität untersucht. Gekennzeichnet wurde die Position von PAR, ADP-Ribose und AMP. Der Stern (\*) markiert ein Abbauprodukt von PAR, vermutlich Oligo (ADP-Ribose).

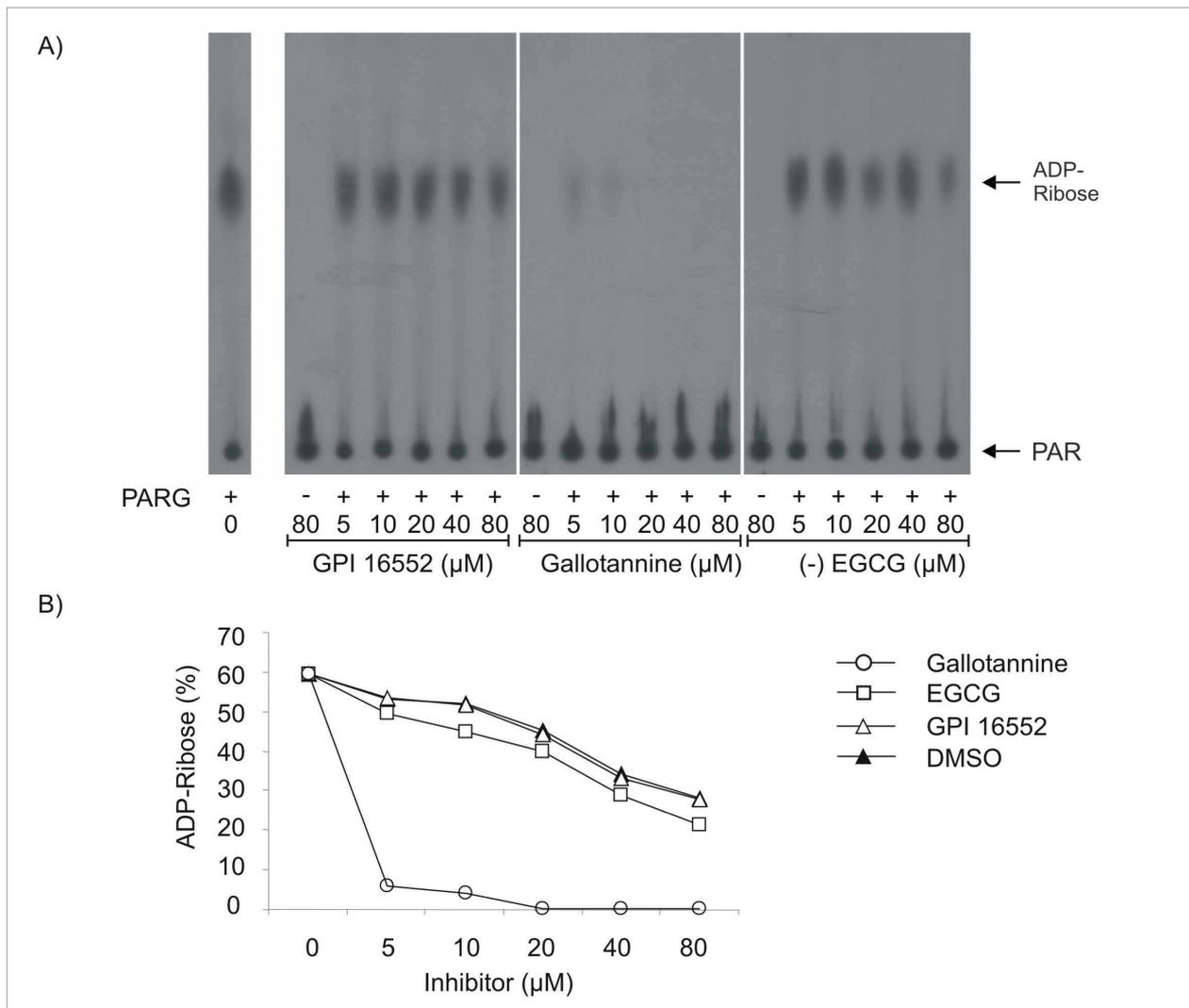
*E. coli* t<sub>0</sub>-*E. coli* vor Induktion, *E. coli* t<sub>3</sub>-*E. coli* 3 h nach Induktion, RE lö-*E. coli* Extrakt (lösliche Proteine), Df-Durchfluss an Ni-NTA-Sepharose, W-Waschfraktion Ni-NTA, EL-Elutionsfraktion Ni-NTA-Sepharose (60 mM Imidazol)

Eine spätere Klonierung des *parg*-Gens aus Rinder- cDNA (Winstall *et al.*, 1998) ergab jedoch, dass das aus der Nukleotidsequenz abgeleitete Protein ein Molekulargewicht von 110 kDa aufweist und möglicherweise eine Proteolyse zur Bildung eines verkürzten Proteins mit PARG-Aktivität (ca. 65 kDa) führt. Aufgrund dessen wurde spekuliert, dass das von Miwa *et al.* (1974) gereinigte Protein der katalytischen Domäne der aus Rinder cDNA klonierten PARG entsprach (Winstall *et al.*, 1999). Zur Etablierung der Affinitätsimmobilisierung von rekombinanter humaner PARG an Tannin-Sepharose wurde zunächst die cDNA, welche die katalytische Domäne codiert (AS 378-976) in den Vektor pQE31 kloniert (siehe Abb. 3.8 A). Nach Überexpression in *E. coli* M15 wurde diese PARG-Domäne als Pentahistidininfusionsprotein an Ni-NTA-Sepharose gereinigt (siehe 2.2.7.4.1). Da His-PARG<sub>65</sub> eine geringe Affinität an Ni-NTA-Sepharose besass, wurden sowohl die Bindung als auch die Waschschrte mit niedrigen Imidazolkonzentrationen durchgeführt. In der anschliessenden Elution mit steigenden Imidazolkonzentrationen wurde ein Protein der erwarteten Grösse von 70 kDa mit 50 bis 100 mM Imidazol eluiert (siehe Abb. 3.8 B). Der entsprechende Aktivitätstest zeigte, dass das gereinigte Protein über eine PARG-Aktivität verfügt (siehe Abb. 3.8 C).

### 3.2.5 Gallotannine hemmen die Aktivität rekombinanter His-PARG<sub>65</sub>

Die inhibitorischen Eigenschaften der Gallotannine auf die Aktivität der PARG wurden bisher nur mit aus Gewebe isolierten Enzymen gemessen (Tanuma *et al.*, 1989, Tsai *et al.*, 1992). Vor der Affinitätsimmobilisierung von His-PARG<sub>65</sub> an Gallotannin-Sepharose musste sichergestellt werden, dass diese Hemmung auch mit rekombinant exprimiertem Enzym erfolgt. Dazu wurde His-PARG<sub>65</sub> mit deproteinierter [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-PAR in Gegenwart steigender Mengen Gallotannine inkubiert und die Menge gebildeter [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ADP-Ribose bestimmt. In der Abwesenheit jeglicher Inhibitoren wurden innerhalb von 20 min 60 % der eingesetzten Polymere zu [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ADP-Ribose umgesetzt. Die Zugabe von Gallotanninen (5- 10  $\mu$ M) führte zu einer nahezu vollständigen Inhibition des PAR-Abbaus (siehe Abb. 3.9). Damit zeigte sich dass Gallotannine auch die Aktivität von His-PARG<sub>65</sub> hemmen.

Desweiteren wurden die bereits unter 3.2.1 beschriebenen Moleküle (-) EGCG und GPI 16552 hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkung auf die Aktivität von His-PARG<sub>65</sub> getestet. Die Inkubation mit physiologisch relevanten Konzentrationen von (-) EGCG führte zu einer 50% igen Hemmung der Aktivität von His-PARG<sub>65</sub>. Das synthetische Molekül GPI 16552 zeigte einen vergleichbaren inhibitorischen Effekt wie (-) EGCG. Anhand eines Kontroll-experiments wurde offensichtlich, dass die Hemmung durch GPI 16552 auf den Einfluss des Lösungsmittels DMSO zurückzuführen war (siehe Abb. 3.9 B).

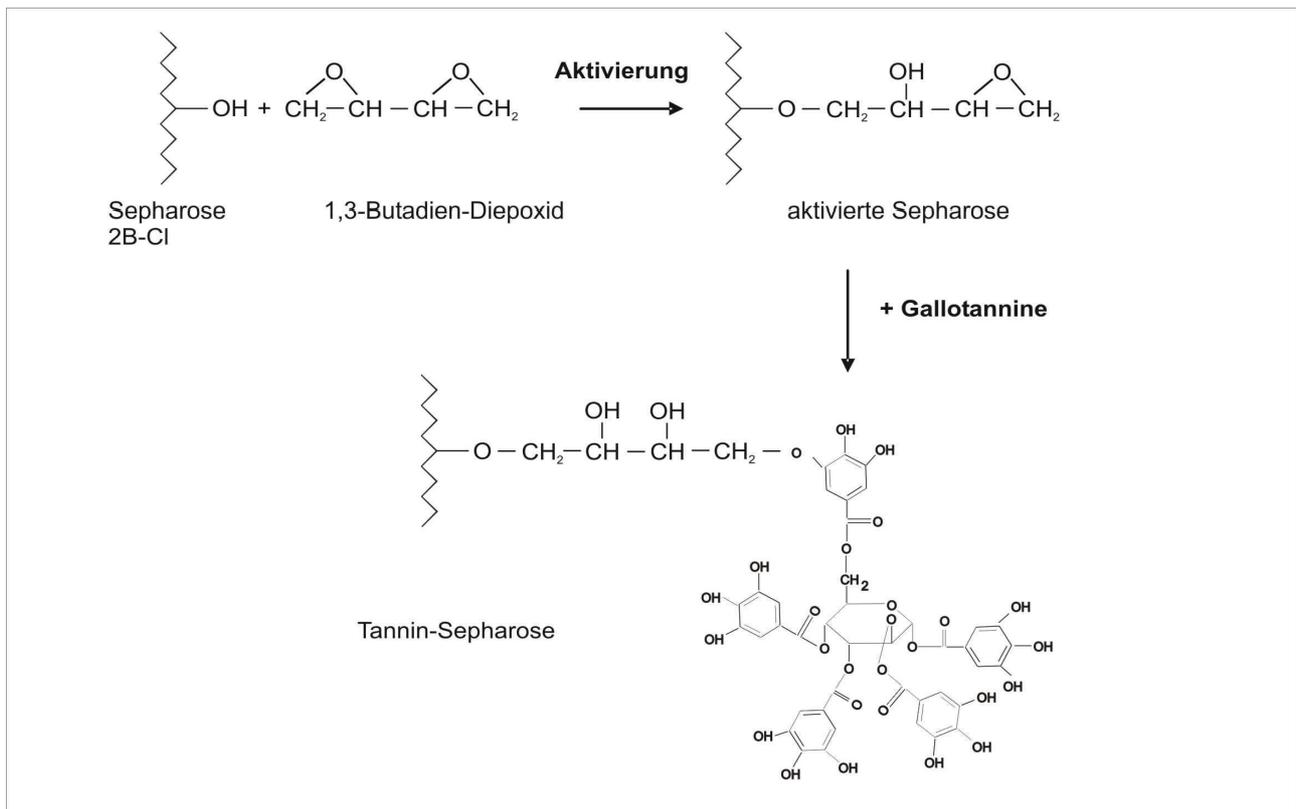


### Abb. 3.9: Einfluss potenzieller PARG-Inhibitoren auf His-PARG<sub>65</sub>

100 ng rekombinante His-PARG<sub>65</sub> wurden in PARG-Puffer (+MgCl<sub>2</sub>) mit deproteinierter PAR in Gegenwart steigender Mengen potenzieller PARG-Inhibitoren (Gallotannine, (-) EGCG, GPI-16552) bzw. DMSO inkubiert. Nach 20 min wurden Proteine und Nukleotide mit Aceton gefällt und anschliessend mittels DÜNNESCHICHTCHROMATOGRAPHIE separiert. **A:** Autoradiogramm der separierten Nukleotide. Die Position von PAR und ADP-Ribose ist gekennzeichnet. **B:** Das Autoradiogramm wurde mittels eines Phosphoimagers ausgewertet. Dabei wurde die Menge gebildeter ADP-Ribose quantifiziert. Die im Diagramm dargestellten Werte repräsentieren das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

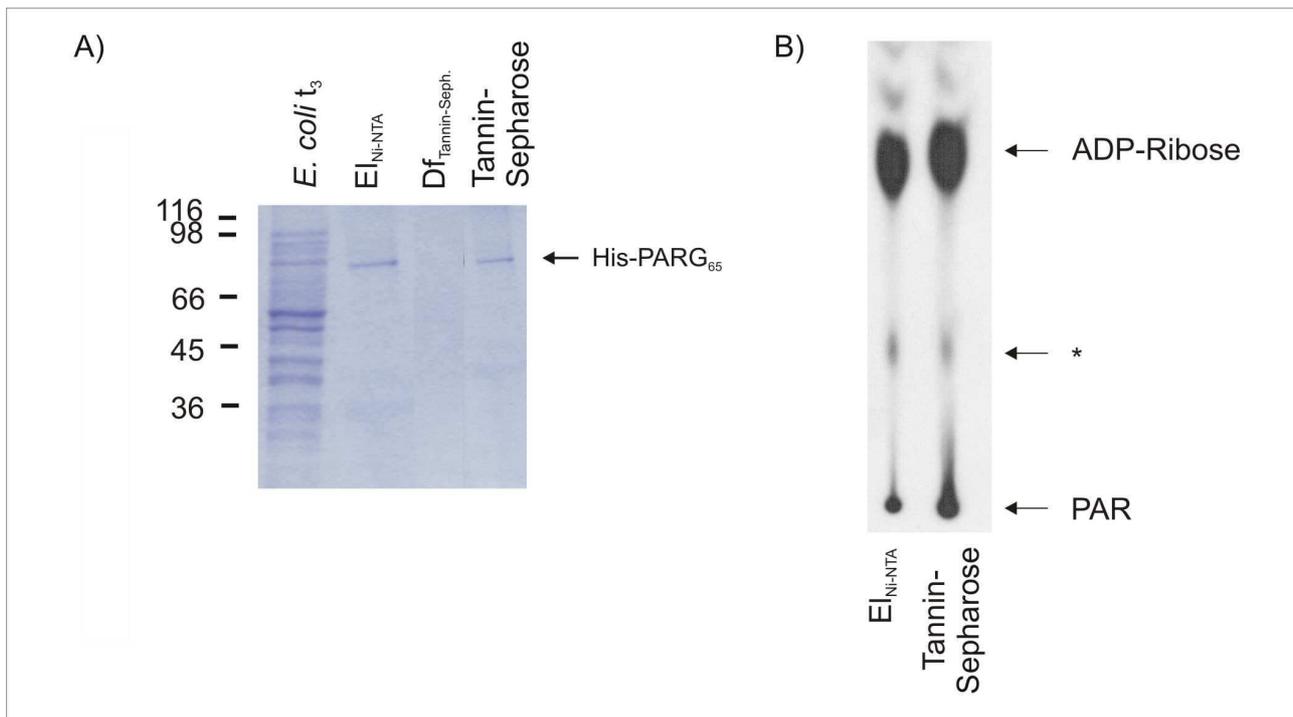
### 3.2.6 His-PARG<sub>65</sub> bindet an Tannin-Sepharose

Gallotannine besitzen innerhalb des Moleküls zahlreiche phenolische Hydroxylgruppen (siehe Abb. 3.4 A), die eine kovalente Kopplung an Sepharosepartikel nach Aktivierung mit Epoxiden (Bisepoxiran-aktivierte Kopplung, Sundberg & Porath, 1974) oder Diazoniumsalzen (Diazoniumsalz-aktivierte Kopplung, Finlay *et al.*, 1978) erlauben. Aufgrund der Stabilität der Gallotannine bei hohen Temperatur- und basischen pH-Werten wurde diese Variante der Kopplung an Sepharose 2B-Cl nach Bisepoxiranaktivierung favorisiert (siehe 2.2.7.8.1, Abb. 3.10).



**Abb. 3.10: Prinzip der Kopplung von Gallotanninen an Sepharose 2B-Cl**

Zur Immobilisierung der katalytischen Domäne der PARG wurden Elutionsfraktionen der Ni-NTA-Chromatographie von His-PARG<sub>65</sub> mit Tannin-Sepharose inkubiert und der Erfolg der Bindung mittels SDS-PAGE untersucht. Es zeigte sich, dass die katalytische Domäne der PARG mit hoher Effizienz an die Tannin-Sepharose bindet (siehe Abb. 3.11 A). Versuche, His-PARG<sub>65</sub> von der Tanninsäule durch Erhöhung der Salzkonzentration (1 M NaCl) oder durch Zugabe von ADP-Ribose bzw. ADP (je 100 mM) zu eluieren, scheiterten (Daten nicht gezeigt). In früheren Studien (Tebib *et al.* 1994/1995), die sich mit der Hemmung der alkalischen Phosphatase aus Ratten durch Gallotannine beschäftigten, wurde beobachtet, dass diese Hemmung partiell durch Zugabe von Detergentien (Triton X-100) verhindert werden konnte. Um zu testen, ob dieser Effekt auf die PARG übertragbar war, wurden Kernextrakte aus HeLa S3- Zellen mit [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-PAR in Anwesenheit von 200  $\mu$ M Gallotanninen und steigenden Mengen Detergenz (NP-40) inkubiert und die Menge gebildeter [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ADP-Ribose bestimmt. Bereits durch Zugabe von 0,05 % (v/v) NP-40 konnte der inhibitorische Effekt der Gallotannine auf die PARG-Aktivität in Kernextrakten aufgehoben werden (Daten nicht gezeigt). Anschliessend wurde die Aktivität des an Tannin-Sepharose gebundenen His-PARG<sub>65</sub> unter Zugabe von Detergenz in einem Test bestimmt. Ebenso wie in Kernextrakten konnte durch die Zugabe von NP-40 der inhibitorische Effekt Gallotannine auf His-PARG<sub>65</sub> aufgehoben werden (siehe Abb. 3.11 B). Dieses Ergebnis zeigte, dass die Immobilisierung von His-PARG<sub>65</sub> an der Tannin-Matrix nicht in einer irreversiblen Hemmung des Enzyms resultierte.



### Abb. 3.11: His-PARG<sub>65</sub> bindet an Tannin-Sepharose

50 µg der von Ni-NTA eluierten His-PARG<sub>65</sub> wurden gegen Inkubationspuffer dialysiert und für 1 h an 100 µl Tannin-Sepharose gebunden. Nach mehreren Waschschritten (Inkubationspuffer + 1 M NaCl) wurden die Bindung mittels **A**: SDS-PAGE (12 %) bzw. **B**: PARG- Aktivitätstest nachgewiesen. Zum Nachweis der Aktivität wurden die PARG-Tanninsepharosepartikeln in PARG-Puffer (+MgCl<sub>2</sub>) in Anwesenheit von 0,05 % (v/v) NP-40 inkubiert. Die Position von PAR und ADP-Ribose ist gekennzeichnet. Der Stern (\*) markiert ein Abbauprodukt von PAR, vermutlich Oligo (ADP-Ribose).

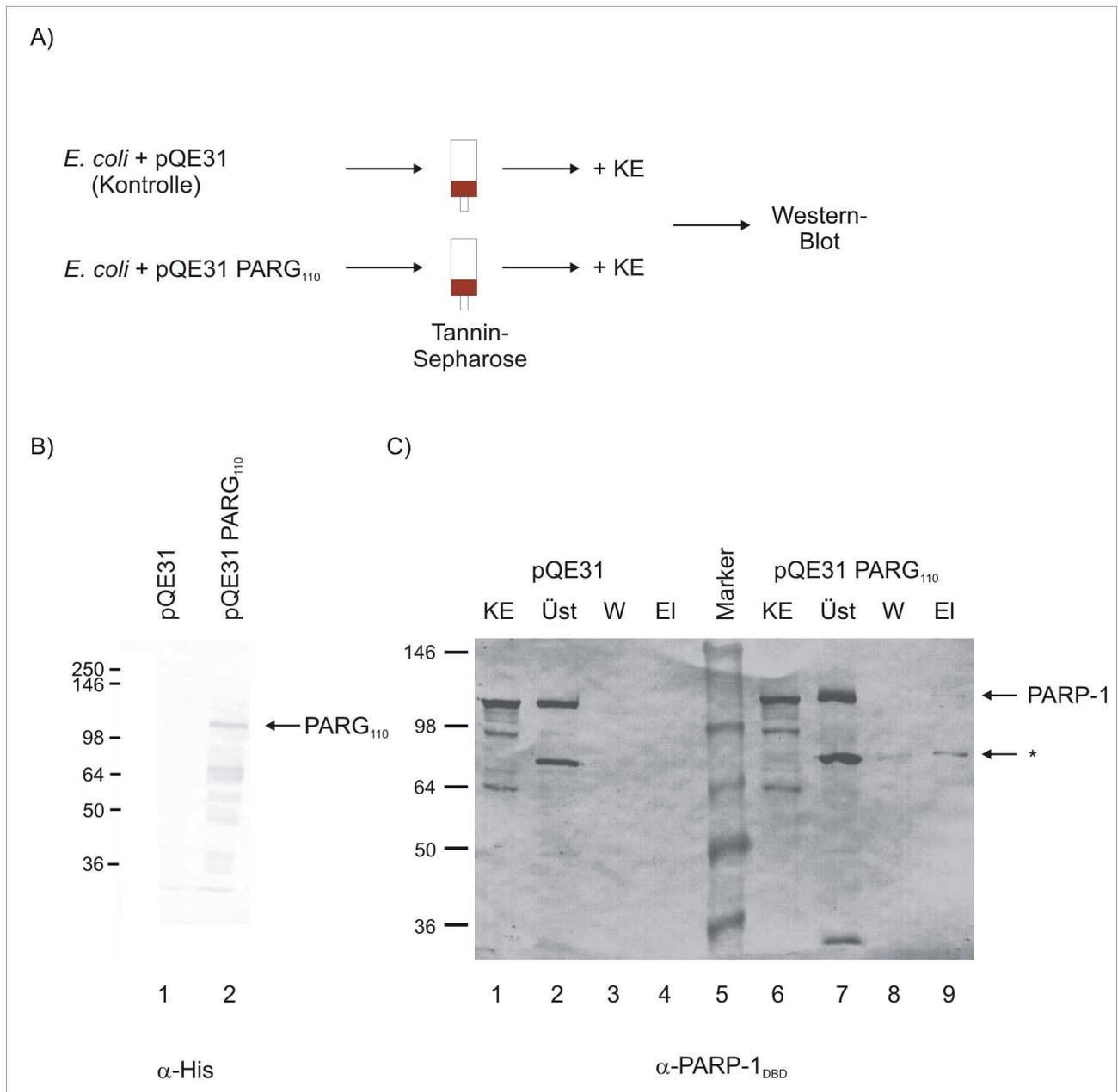
*E. coli* t<sub>3</sub>-*E. coli* 3 h nach Induktion, El<sub>Ni-NTA</sub>-Elutionsfraktion Ni-NTA Sepharose, Df<sub>Tannin-Septh.</sub>-Durchfluss Tannin-Sepharose

## 3.3 PARG interagiert mit PARP-1 und reguliert die PAR-Synthese

### 3.3.1 Identifizierung von PARP-1 als Interaktionspartner von PARG

Im Rahmen der Arbeit sollten Proteine identifiziert werden, die eine direkte Protein-Protein-Interaktion mit der PARG eingehen, unabhängig von der Anwesenheit von PAR. Nachdem die Tannin-Sepharose als geeignet zur Immobilisierung von His-PARG<sub>65</sub> erschien (siehe Abb. 3.11), wurde unter Verwendung dieser Matrix eine modifizierte Variante einer Affinitätspräzipitation von PARG-Interaktionspartnern entwickelt (schematische Beschreibung siehe Abb. 3.12 A). Hierfür wurden Rohextrakte von *E. coli*, in denen entweder His-PARG<sub>110</sub> oder Vektorproteine (Kontrolle) überexprimiert vorlagen, an Tannin-Sepharose immobilisiert. Die Effizienz der Bindung wurde durch einen Western-Blot mit einem α-RGS (His)<sub>4</sub> nachgewiesen. Während in den Kontrollexperimenten keine Bindung von Pentahistidininfusionsproteinen an die Tannin-Sepharose nachweisbar war (siehe Abb. 3.12 B Spur 1), erfolgte die Immobilisierung von His-PARG<sub>110</sub> mit hoher Effizienz. Ebenso wie zuvor für His-PARG<sub>65</sub> gezeigt (siehe 3.2.6) wurde die Immobilisierung unter Erhalt der katalytischen Aktivität vorgenommen

(Daten nicht gezeigt). Anschliessend wurden die so erhaltenen Matrices jeweils mit Kernextrakten aus unbehandelten HeLa S3- Zellen inkubiert. Nach einigen Waschschritten wurden gebundene Proteine mit erhöhten Salzkonzentrationen (600 mM NaCl) eluiert und durch Immundektion mit spezifischen Antikörpern identifiziert.



### Abb. 3.12: Interaktion zwischen rekombinanter His-PARG<sub>110</sub> und PARP-1 aus HeLa Kernextrakten

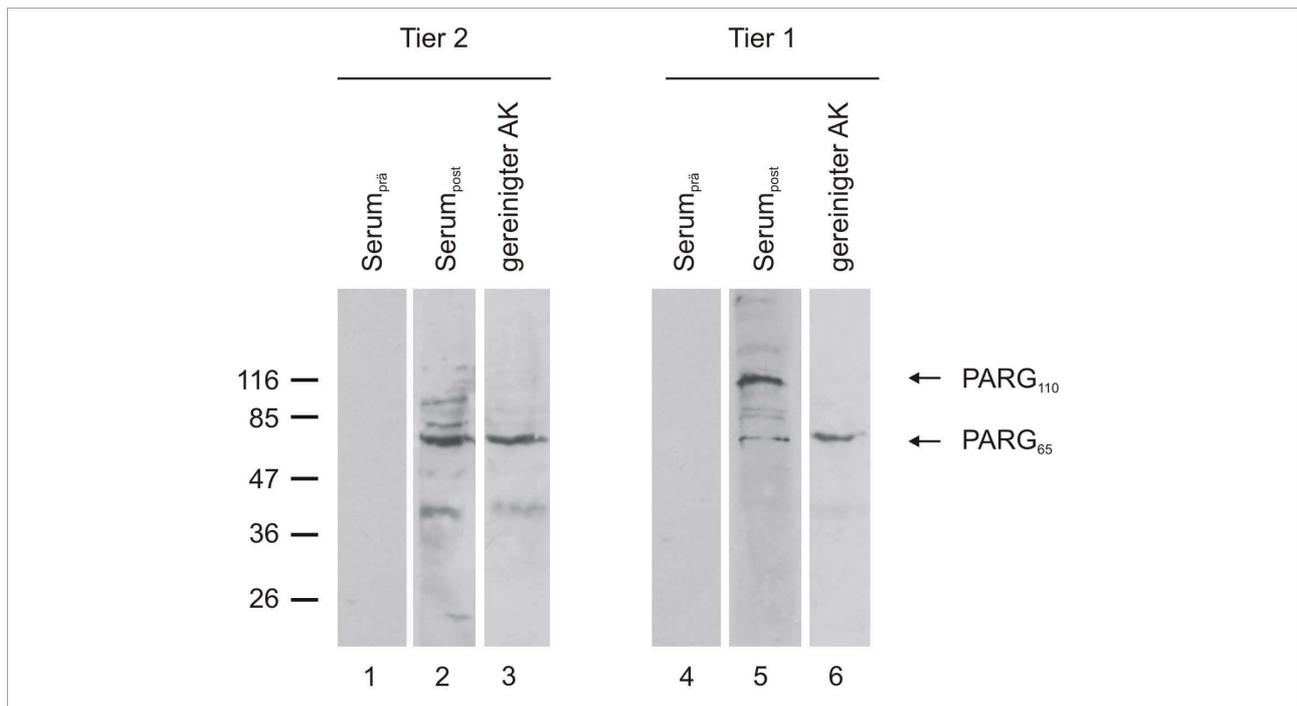
**A:** Schematische Darstellung vom Ablauf des Interaktionsexperiments **B:** Rohextrakte von *E. coli*- Zellen, in welchen His-PARG<sub>110</sub> bzw. Vektorproteine (Kontrolle) überexprimiert vorlagen, wurden an Tannin-Sepharose gebunden. Anschliessend wurden an Tannin-Sepharose gebundene Proteine durch Immundetektion mit dem Antikörper  $\alpha$ -RGS (His)<sub>4</sub> nachgewiesen. Die Position von His-PARG<sub>110</sub> ist gekennzeichnet. **C:** PARG-Tanninsepharosepartikel bzw. Kontroll-Tanninsepharosepartikel wurden mit HeLa-Kernextrakten (präpariert aus unbehandelten Zellen nach 2.2.7.3.2) inkubiert wie in 2.2.7.8.2 beschrieben. Alle Fraktionen wurden in einer SDS-PAGE (8 %) aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und anschliessend in einer Immundetektion mit dem  $\alpha$ -PARP-1 DBD analysiert. Die Position von PARP-1 und einem PARP-Fragment (\*) ist gekennzeichnet. KE-Kernextrakt, Üst-Überstand, W-Waschfraktion (150 mM NaCl), El-Elution (600 mM NaCl)

Erfolgte eine solche Immundetektion unter Verwendung des PARP-1 Antikörpers  $\alpha$ -PARP-1 DBD, wurden sowohl Gesamt-PARP-1 als auch proteolytische PARP-1-Fragmente in den Kernextrakten nachgewiesen (siehe Abb. 3.12 C Spur 1 und 6). In Anwesenheit von His-PARG<sub>110</sub> wurde eine Bindung von PARP-1 sowie eines PARP-1-Fragment (ca. 80 kDa) an die Tannin-Sepharosepartikel beobachtet (siehe Abb. 3.12 C Spur 9). Dahingegen zeigte PARP-1 keinerlei Affinität zur Kontroll-Tannin-Sepharose. Hier wurden entsprechende Signale in der Immundetektion nur in den Fraktionen des Kernextraktes und des Durchflusses detektiert (siehe Abb. 3.12 C Spur 2 und 4). Wurde die Affinitätspräzipitation mit an Tannin-Sepharose immobilisierten His-PARG<sub>65</sub> durchgeführt, so zeigte sich ebenfalls eine Bindung von PARP-1 an die katalytische Domäne der PARG (Daten nicht gezeigt).

### 3.3.2 Herstellung eines PARG-Antikörpers

Um den Komplex von PARG und PARP-1 *in vivo* nachzuweisen, sollte eine Immunpräzipitation durchgeführt werden. Hierfür wurde zunächst ein polyklonaler Antikörper, gerichtet gegen gereinigte His-PARG<sub>65</sub> (siehe 2.2.7.4), in Kaninchen generiert. Aus den Seren des Tieres 2 wurde danach der  $\alpha$ -His-PARG<sub>65</sub> Antikörper durch Affinitätschromatographie aufgereinigt (2.2.7.7). In einem anschliessenden Western-Blot wurden die jeweiligen Fraktionen der Antikörperreinigung gegen auf Nitrozellulose transferierte HeLa S3- Kernextrakte hybridisiert. Bereits unter Verwendung des Rohserums des dreifach immunisierten Kaninchens wurde hauptsächlich ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 65 kDa detektiert. Entsprechend der Grösse handelt es sich dabei um das bereits bekannte N-terminal verkürzte Protein der PARG (PARG<sub>65</sub>). Zusätzlich wurden mit diesem  $\alpha$ -PARG-Serum zwei weitere Proteine mit Molekulargewichten zwischen 80 und 100 kDa detektiert (siehe Abb. 3.13 Spur 2). Nach der Aufreinigung der Seren unterblieb diese Kreuzreaktivität (siehe Abb. 3.13 Spur 3), sodass die mit den Seren beobachtete Erkennung der höhermolekularen Proteine als unspezifisch angesehen werden muss. Die aufgereinigten  $\alpha$ -PARG-Antikörper von Tier 2 wurden in den in Kapitel 3.3.3 und 3.4.6 beschriebenen Experimenten eingesetzt.

Zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit wurden weitere  $\alpha$ -PARG-Seren hinsichtlich ihrer Spezifität untersucht. Dabei zeigte das Serum des immunisierten Kaninchens 1 sowohl eine Kreuzreaktivität mit dem 65 kDa N-terminal verkürzten Protein (PARG<sub>65</sub>) als auch dem 110 kDa Gesamtprotein (PARG<sub>110</sub>) (siehe Abb. 3.13 Spur 5). Während der Aufreinigung der IgGs durch Affinitätschromatographie an GST-PARG<sub>65</sub> gingen die mit PARG<sub>110</sub>-kreuzreaktiven Immunglobuline verloren (siehe Abb. 3.13 Spur 6). Daher wurde für die in Kapitel 3.4.6 dargestellten Experimente auf die  $\alpha$ -PARG-Seren von Kaninchen 1 zurückgegriffen.

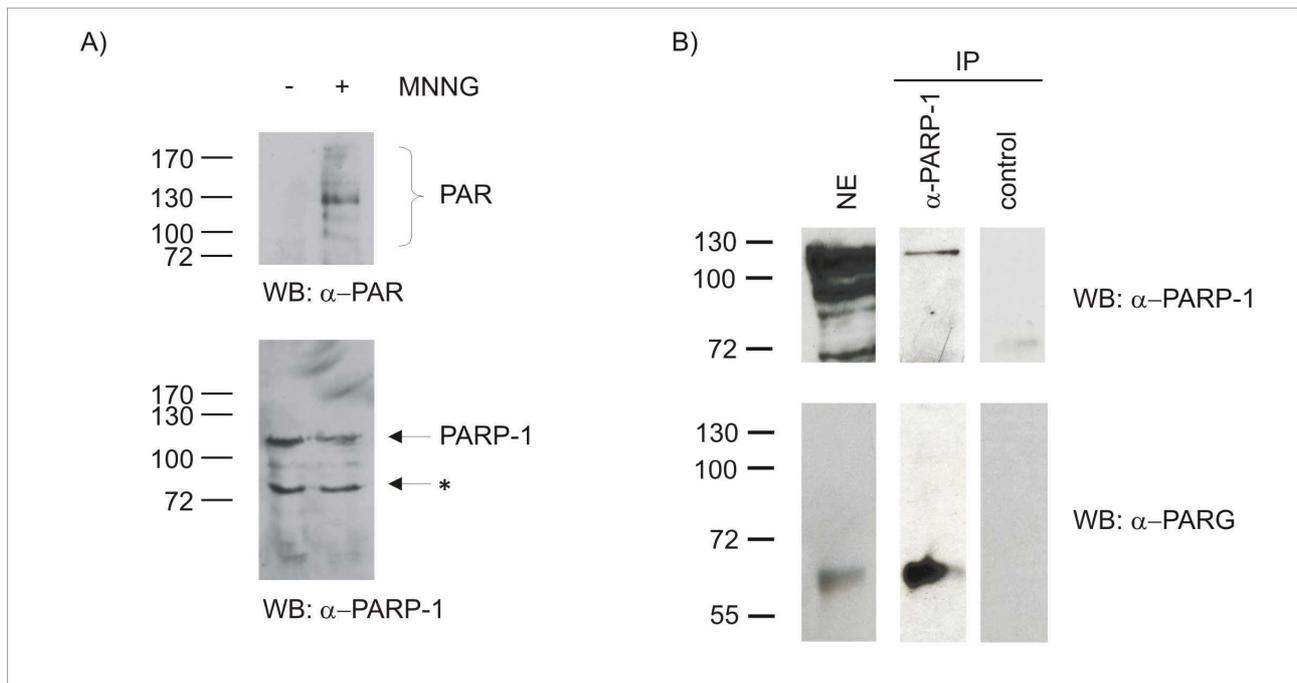


### Abb. 3.13: Charakterisierung von zwei polyklonalen $\alpha$ -PARG-Antikörpern

Jeweils 50  $\mu$ g Kernextrakte von HeLa S3- Zellen wurden in einer SDS-PAGE (10 %) separiert und anschliessend einer Immundetektion mit den Fraktionen der Antikörperreinigung von zwei verschiedenen  $\alpha$ -His-PARG<sub>65</sub>-Antikörpern unterzogen. Es wurden jeweils die folgenden Verdünnungen in der Immundetektion eingesetzt: Serum<sub>prä</sub>-Kaninchenserum vor der ersten Immunisierung (1: 1000), Serum<sub>prä</sub>-Kaninchenserum nach der dritten Immunisierung (1: 1000), gereinigter Antikörper (1: 500)

### 3.3.3 PARP-1 und PARG liegen als Komplex in HeLa S3-Kernextrakten vor

Zum Nachweis des Komplexes zwischen PARP-1 und PARG *in vivo* wurde eine Koimmunpräzipitation durchgeführt. Hierfür wurden Kernextrakte aus HeLa S3- Zellen, ohne genotoxische Schädigung (-MNNG) präpariert. Eine Immundetektion mit dem Antikörper  $\alpha$ -Poly (ADP-Ribose)/96-10-04 zeigte keine nachweisbare PAR-Synthese während der Präparation. (siehe Abb. 3.14 A). Die so hergestellten Kernextrakte wurden mit an Protein A-Sepharose gekoppelten  $\alpha$ -PARP-1 (A-20)- Antikörpern inkubiert. Damit konnte PARP-1 präzipitiert werden, während sie nicht im Kontrollpräzipitat nachweisbar war (siehe Abb. 3.14 B). Zum Nachweis der Kopräzipitation von PARG wurde ein Western-Blot mit dem zuvor beschriebenen  $\alpha$ -His-PARG<sub>65</sub> Antikörper (Tier2) durchgeführt. Es konnte die verkürzte Form der PARG (PARG<sub>65</sub>) sowohl in den Fraktionen des Kernextraktes als auch des Präzipitates mit dem  $\alpha$ -PARP-1 Antikörper nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.14 B). Dies weist darauf hin, dass in HeLa S3-Kernextrakten ein präformierter Komplex aus PARP-1 und PARG existiert, unabhängig von der Anwesenheit von PAR in Kernextrakten aus HeLa S3- Zellen.

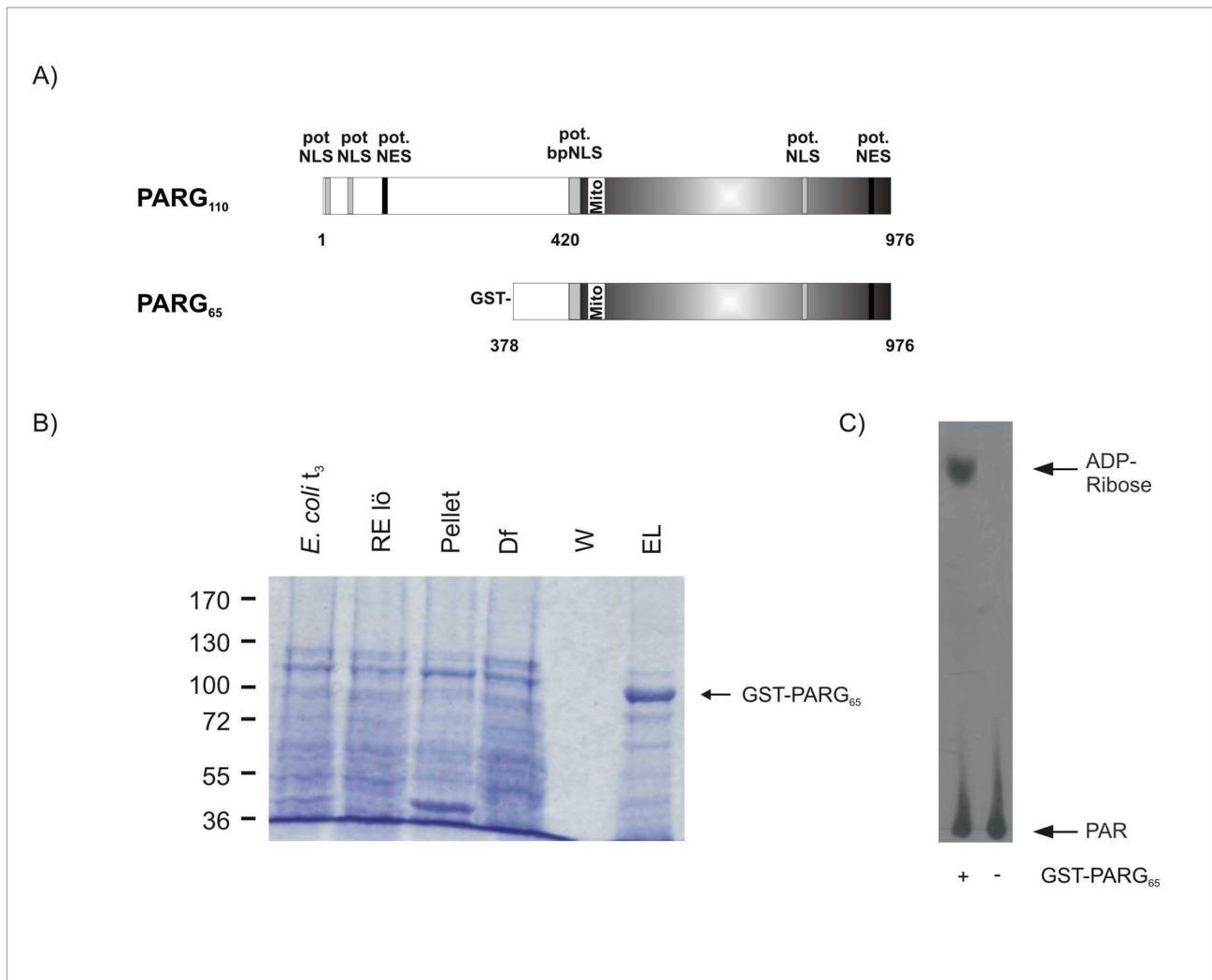


### Abb. 3.14: Koimmunpräzipitation von PARG und PARP-1

**A:** 50 µg Kernextrakte aus ungeschädigten bzw. MNNG-behandelten (500 µM MNNG, 10 min) HeLa S3- Zellen (präpariert nach 2.2.7.3.2) wurden in einer SDS-PAGE (8 %) separiert und einer Immundetektion mit den Antikörpern α-Poly (ADP-Ribose)/96-10-04 bzw. als Kontrolle α-PARP-1 (gesamt) unterzogen. **B:** Kernextrakte, präpariert aus ungeschädigten HeLa S3- Zellen, wurden mit α-PARP-1 (A-20) Antikörper bzw. einem Präimmunziegenserum präzipitiert und anschliessend einer Immundetektion mit α-PARP-1 AMD bzw. α-His-PARG<sub>65</sub> (Tier 2) unterzogen. IP-Immunpräzipitation, WB-Western-Blot

### 3.3.4 Direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen PARP-1 und PARG

Um festzustellen, ob eine direkte Interaktion zwischen PARP-1 und PARG besteht, wurden *in vitro* GST-Affinitätspräzipitationen durchgeführt. Dafür wurde die katalytische Domäne der PARG als Fusionsprotein mit GST (Glutathion-S-Transferase) kloniert (siehe Abb. 3.15 A) und in *E. coli* BL21 Codon<sup>+</sup> RIL mit dem Transkriptionsrepressor LacI koexprimiert (siehe Tab. 2.11). Es ergab sich erneut das Problem der Expression in Form von *inclusion bodies*, welches sich auch nicht durch den Zusatz von osmolytischen Substanzen während der Expression veränderte. Eine verkürzte Induktion bei niedriger Temperatur und erhöhter Zelldichte (siehe 2.2.7.1) ergab schliesslich eine Verschiebung zur Expression von vorwiegend löslichem Protein. Die Reinigung des Fusionsproteins erfolgte durch Chromatographie an Glutathion-S-Sepharose. Es zeigte sich, dass GST-PARG<sub>65</sub> unter Standardbedingungen lediglich eine geringe Affinität zu dieser Matrix besass. Eine Bindung konnte nur erreicht werden, wenn die Konzentration des reduzierenden Agens DTT im Lyse- und Waschpuffer auf 5 mM erhöht wurde (nach Frangioni & Neel, 1993, siehe 2.2.7.6). Die Elution des katalytisch aktiven GST-PARG<sub>65</sub> (siehe Abb. 3.4 B) erfolgte ebenfalls nur unter modifizierten Bedingungen in Anwesenheit von 2 % N-Octyl-β-D-Glukosid und erhöhten Konzentrationen an reduziertem Glutathion im Elutionspuffer (nach Frangioni & Neel, 1993, siehe 2.2.7.6).

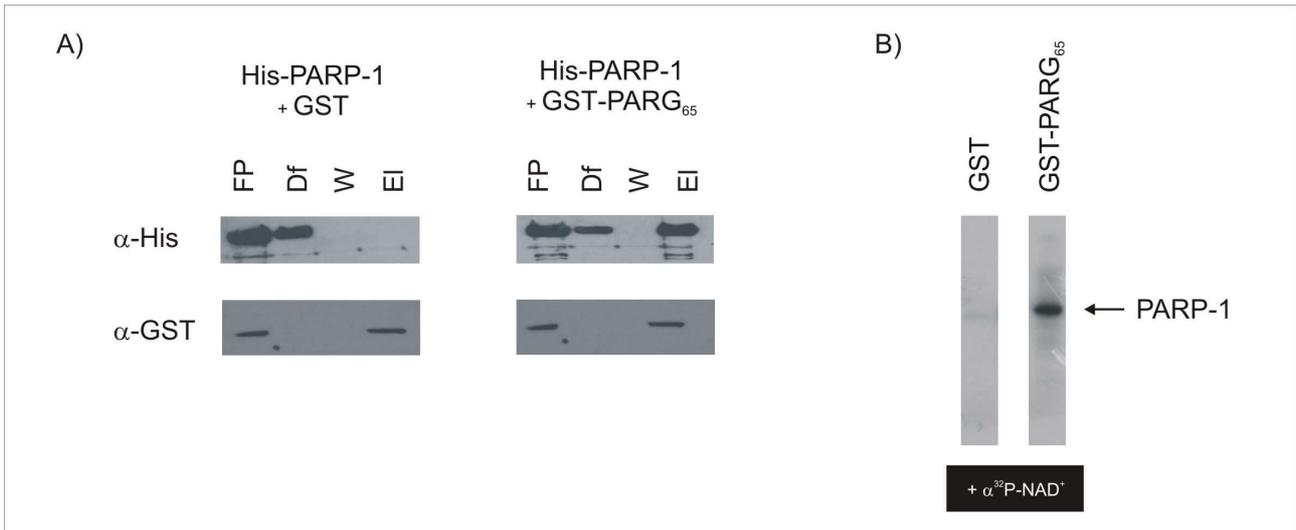


### Abb. 3.15: Reinigung katalytisch aktiver GST-PARG<sub>65</sub>

Die katalytische Domäne der klonierten PARG (AS 378-976) wurde in den Vektor pGEX-5X-3 kloniert, als GST-Fusionsprotein in *E. coli* BL21 Codon<sup>+</sup> RIL (pREP4) exprimiert und mittels Chromatographie an GSH-Sepharose gereinigt. **A:** Schematische Darstellung des Fusionsproteins **B:** Proben der jeweiligen Reinigungsschritte wurden in einer 8 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. **C:** PARG- Aktivitätstest der gereinigten GST-PARG<sub>65</sub>

*E. coli* t<sub>3</sub>-*E. coli* 3 h nach Induktion, RE lö-*E. coli* Extrakt (lösliche Proteine), Pellet-unlösliche Fraktion nach Zellaufschluss, Df-Durchfluss an GSH-Sepharose, W-Waschfraktionen, El-Elution

Für die GST-Affinitätspräzipitation wurde gereinigte GST-PARG<sub>65</sub> sowie die rekombinant als Pentahistidininfusionsprotein gereinigte humane PARP-1 (Elutionsfraktionen der Ni-NTA-Sepharose, siehe Abb. 3.5) eingesetzt. His-PARP-1 zeigte eine deutliche Bindung an die GSH-Matrix in Gegenwart von GST-PARG<sub>65</sub>, jedoch nicht in Anwesenheit des Kontrollproteins GST (siehe Abb. 3.16 A). Die entsprechenden Sepharosepartikel wurden anschliessend in einem *in vitro* Poly (ADP-Ribosyl)ierungsexperiment eingesetzt. Es zeigte sich, dass His-PARP-1 unter Erhalt der katalytischen Aktivität an GST-PARG<sub>65</sub> gebunden wurde. Korrespondierend zu dem vorangegangenen Experiment wurde in Anwesenheit von GST keine Poly (ADP-Ribosyl)ierungsaktivität an der GSH-Sepharose nachgewiesen (siehe Abb. 3.16 B).



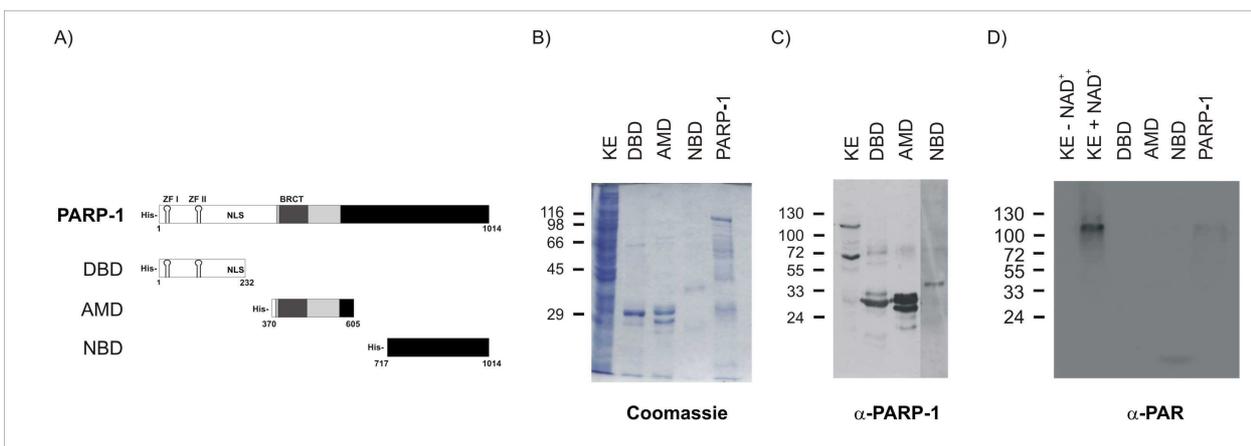
**Abb. 3.16: PARG bindet PARP-1 direkt**

**A:** Gereinigte His-PARP-1 wurde in einer *in vitro* Präzipitation an GSH-Sepharose mit GST-PARG<sub>65</sub> bzw. GST eingesetzt. Gebundene Proteine wurden in einer Immundetektion mit mAb  $\alpha$ -GST bzw.  $\alpha$ -RGS (His)<sub>4</sub> nachgewiesen. **B:** Im Anschluss an die *in vitro* Präzipitation von His-PARP-1 mit GST-PARG<sub>65</sub> bzw. GST an GSH-Sepharose wurde zum Nachweis der Rekrutierung von PARP-1 eine *in vitro* Poly (ADP-Ribosylierung) wie in 2.2.7.11.5 beschrieben, durchgeführt.

FP-eingesetzte Fusionsproteine, Df-Durchfluss, W-Waschfraktion, El-Elution mit SDS-Probenpuffer

### 3.3.5 PARP-1 interagiert über die Automodifikationsdomäne mit PARG

Um den Bereich der Interaktion von PARP-1 mit GST-PARG<sub>65</sub> näher einzugrenzen, wurden Deletionskonstrukte, welche für die drei distinkten Domänen der PARP-1 kodieren (siehe Abb. 3.17 A), in die jeweiligen *E. coli* Expressionstämme (siehe Tab. 2.11) transformiert.

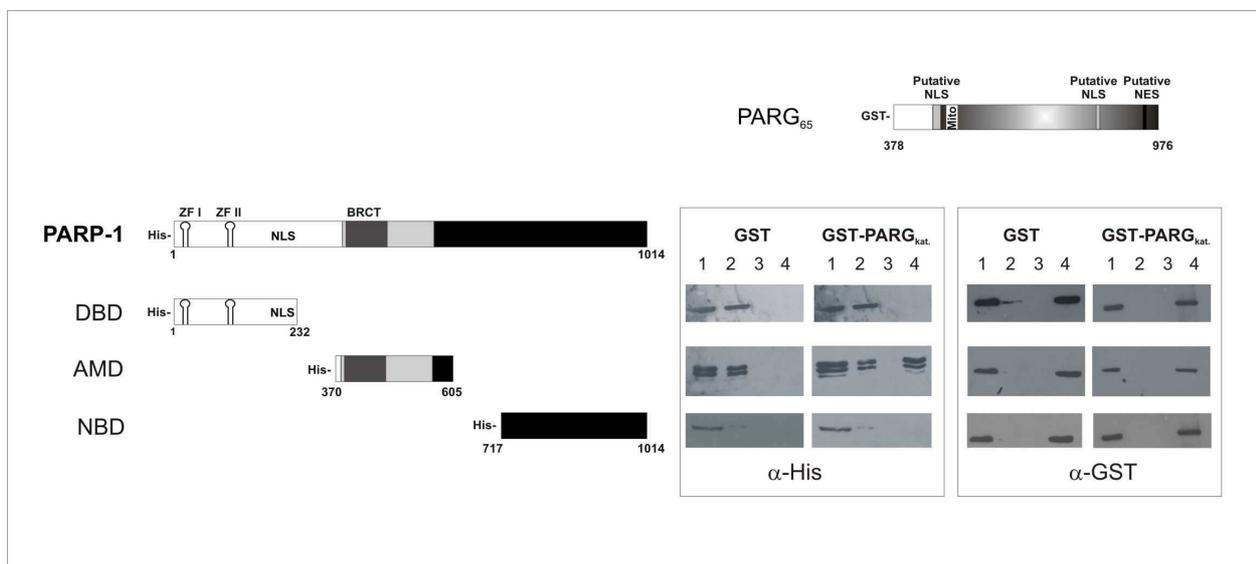


**Abb. 3.17: Reinigung der PARP-Deletionsproteine**

Die DNA-bindende (DBD), Automodifikations- (AMD) und katalytische Domäne (NBD) von PARP-1 wurden in *E. coli* exprimiert und durch Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Chromatographie gereinigt. **A:** Schematische Darstellung der Fusionsproteine. Proben der jeweiligen Reinigungsschritte wurden in einer 8 % SDS-PAGE aufgetrennt und **B:** mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt bzw. einer Immundetektion mit dem **C:**  $\alpha$ -PARP-1 (gesamt) oder **D:**  $\alpha$ -Poly (ADP-Ribose)/ 96-10-04 unterzogen. Zur Kontrolle wurden Kernextrakte nach einer *in vitro* Poly (ADP-Ribosylierung) in Abwesenheit (- NAD<sup>+</sup>) oder Anwesenheit (+ NAD<sup>+</sup>) eingesetzt.

Nach der Expression wurden die DNA-bindende- (AS 1-232), Automodifikations- (AS 370- 605) und katalytische Domäne (AS 717-1014) als Proteine mit N-terminaler Poly-Histidinfusion durch Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Sepharose gereinigt (siehe Abb. 3.17 B und 2.2.7.4.5). Durch einen Western-Blot mit einem  $\alpha$ -PAR Antikörper wurde gezeigt, dass alle drei PARP-Domänen nach der Reinigung ohne PAR-Modifikation vorlagen (siehe Abb. 3.17 D).

Anschliessend wurden diese PARP-Domänen in einer *in vitro* GST-Affinitätspräzipitation, wiederum zusammen mit GST-PARG<sub>65</sub> bzw. GST, eingesetzt. Weder die DNA-bindende- noch die katalytische Domäne zeigten eine Bindung an die PARG. Dahingegen wurde eine Interaktion zwischen GST-PARG<sub>65</sub> und His-AMD nachgewiesen.



**Abb. 3. 18: Die Automodifikationsdomäne von PARP-1 interagiert mit GST-PARG<sub>65</sub>**

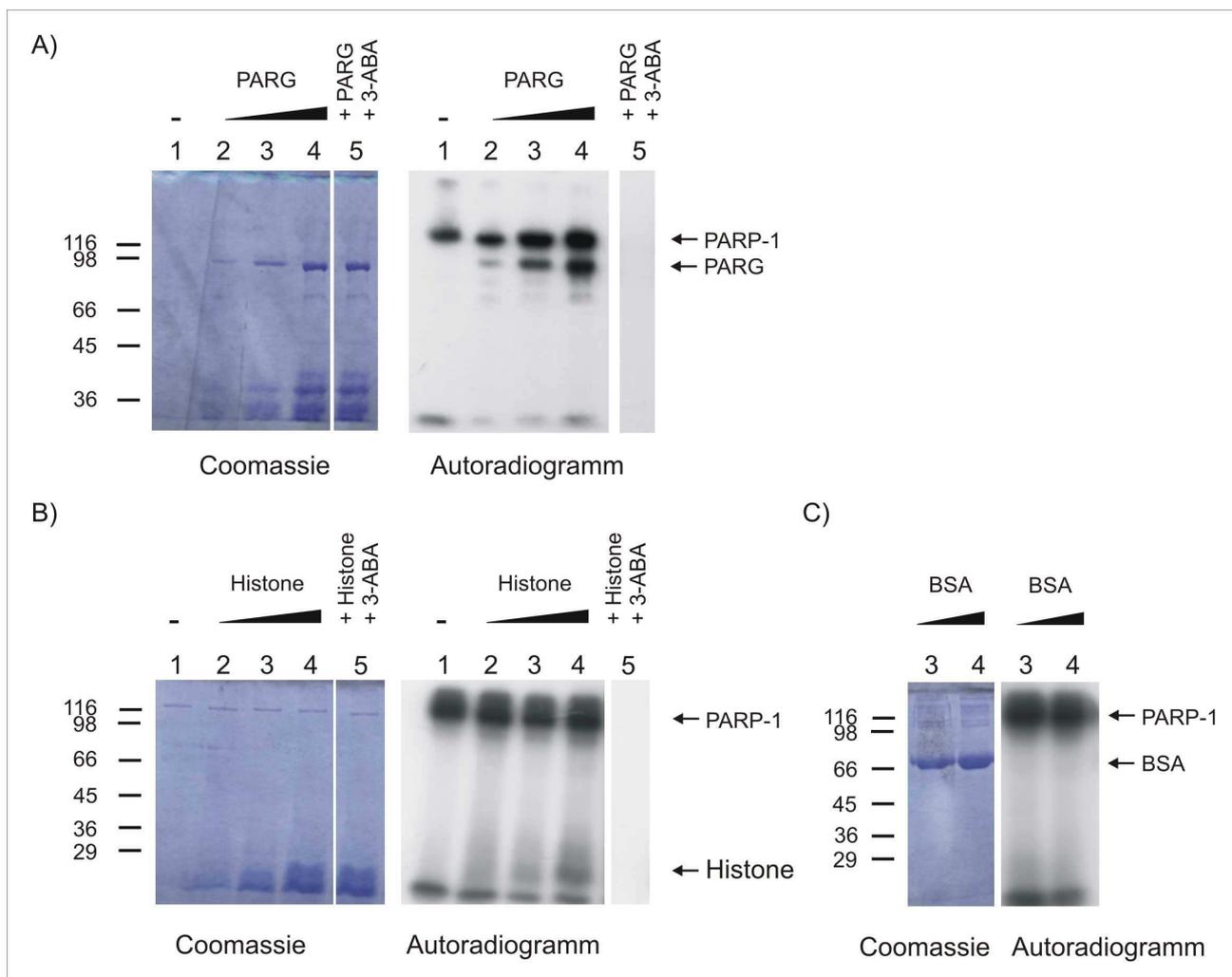
Gereinigte His-PARP-1-Domänen (DBD-DNA-bindende Domäne, AMD-Automodifikationsdomäne, NBD-katalytische Domäne) wurden in einer *in vitro* Präzipitation an GSH-Sepharose mit GST-PARG<sub>65</sub> bzw. GST eingesetzt. Gebundene Proteine wurden in einer Immundetektion mit mAb  $\alpha$ -GST bzw.  $\alpha$ -RGS (His)<sub>4</sub> nachgewiesen.

1-ingesetzte Fusionsproteine, 2-Durchfluss, 3-Waschfraktion, 4-Elution mit SDS-Probenpuffer

Offensichtlich interagiert die katalytische Domäne der PARG direkt mit der Automodifikationsdomäne von PARP-1. Die AMD wurde bereits als hinreichend für die Interaktion mit anderen Proteinen wie XRCC1 bzw. Histonen beschrieben (Masson *et al.*, 1998, Griesenbeck *et al.*, 1994). Da die Automodifikationsdomäne ohne PAR-Modifikation vorlag (siehe Abb. 3.17 D) konnte erneut gezeigt werden, dass es sich bei der Interaktion zwischen PARG und PARP-1 um eine PAR-unabhängige, direkte Protein-Protein-Wechselwirkung handelt.

### 3.3.6 PARG als Akzeptor von Poly (ADP-Ribose)

Für mehr als 30 Proteine, zumeist lokalisiert im Nukleus und Interaktionspartner von PARP-1, wurde gezeigt, dass sie als Akzeptoren in Poly (ADP-Ribosyl)ierungsreaktionen fungieren (D'Àmours *et al.*, 1999). In den vorangegangenen Experimenten wurde die Interaktion zwischen PARP-1 und PARG eingehend charakterisiert. Es stellte sich nunmehr die Frage, inwiefern PARG ebenfalls durch PAR modifiziert werden kann. Um dies zu untersuchen, wurden steigende Mengen der katalytisch aktiven GST-PARG<sub>65</sub> an GSH-Sepharose gebunden und anschliessend einer *in vitro* Poly (ADP-Ribosyl)ierung durch His-PARP-1 unterzogen. Zur Kontrolle wurden alternativ Histone bzw. BSA als PAR-Akzeptoren eingesetzt.



#### Abb. 3.19: PARG als Akzeptor von Poly (ADP-Ribose)

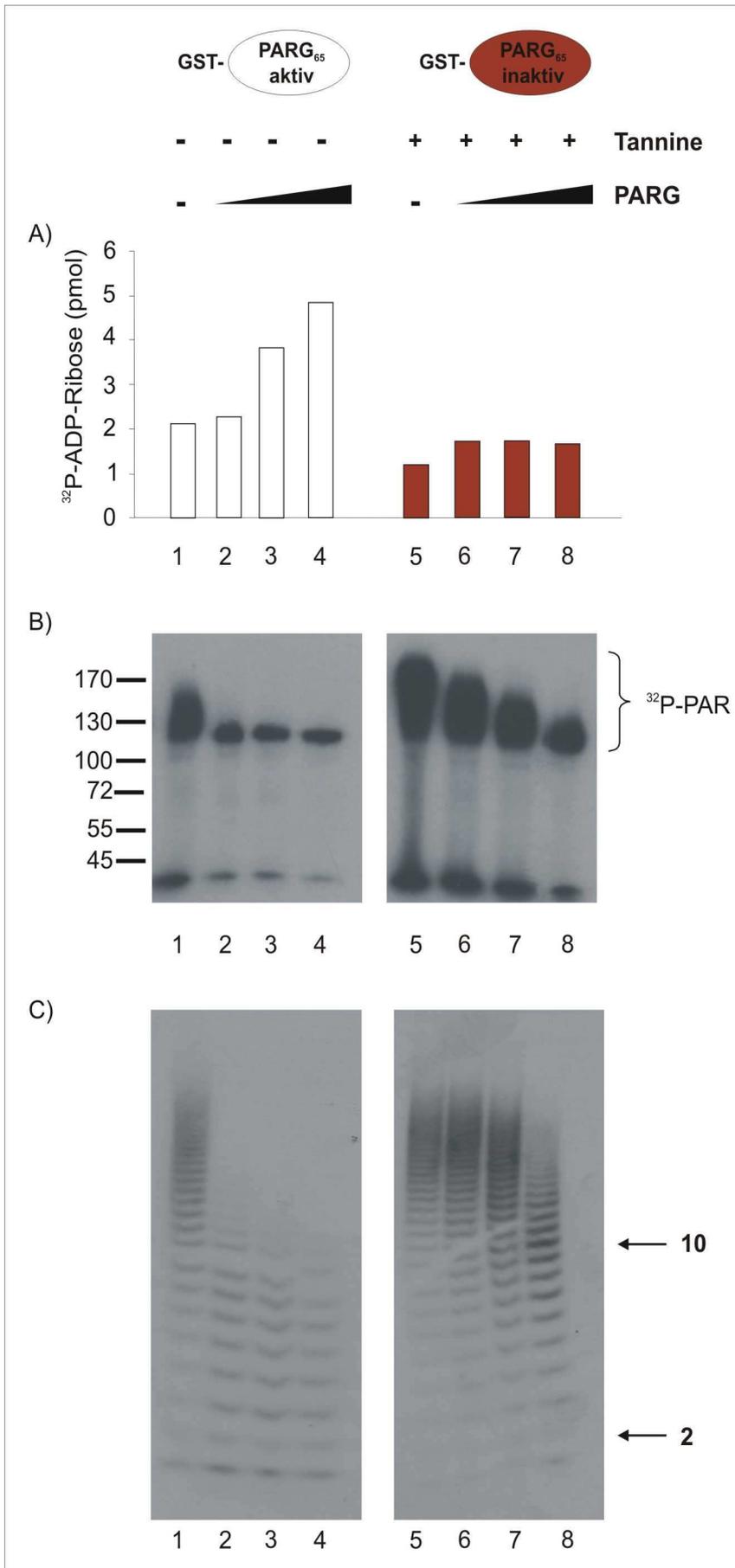
Steigende Mengen (1:0 µg, 2:4 µg, 3:8 µg, 4:16 µg) an **A:** GST-PARG<sub>65</sub> **B:** Histonen **C:** BSA wurden einer *in vitro* Poly (ADP-Ribosyl)ierung durch PARP-1 unterzogen. Im Ansatz 5 wurde die Poly (ADP-Ribosyl)ierung von 16 µg GST-PARG<sub>65</sub> oder Histonen in Anwesenheit von 1 mM 3-ABA durchgeführt. Proteine und Nukleotide wurden einer SDS-PAGE (8 %) unterzogen und die eingebaute Radioaktivität in Form von <sup>32</sup>P-PAR durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Die bereits beschriebene Modifikation der Histone durch PAR (Althaus *et al.*, 1987) konnte hier bestätigt werden (siehe Abb. 3.19 B). BSA hingegen fungierte nicht als PAR-Akzeptor (siehe Abb. 3.19 C). Wurde in einem Poly (ADP-Ribosyl)ierungsexperiment His-PARP-1 gegenüber GST-PARG<sub>65</sub> im Überschuss eingesetzt, erfolgte vornehmlich die Automodifikation von PARP-1 (siehe Abb. 3.19 A Spur 2, vgl auch Abb. 3.16 B). Die Übertragung von PAR-Polymeren auf die katalytische Domäne der PARG konnte nur beobachtet werden, wenn diese relativ zu PARP-1 im Überschuss vorlag (siehe Abb. 3.19 A Spur 3-4). Erfolgte die Poly (ADP-Ribosyl)ierung in Anwesenheit des PARP Inhibitors 3-ABA, so wurde die PAR-Modifizierung unterbunden (siehe Abb. 3.19 A Spur 5).

### **3.3.7 Einfluss von PARG auf den Poly (ADP-Ribose) Metabolismus in humanen Kernextrakten**

Aus der Literatur war bekannt, dass die Aktivität von PARP-1 durch die Anwesenheit von DNA (Benjamin & Gill, 1980), bivalenten Kationen (Kun *et al.*, 2004) oder die jeweiligen Interaktionspartner (Masson *et al.*, 1998, Oei *et al.*, 1998) reguliert werden kann. Daher stellte sich die Frage, ob auch PARG die katalytische Aktivität der PARP-1 direkt reguliert, unabhängig von seiner katalytischen Aktivität. Um dies zu untersuchen, wurden Kernextrakte aus HeLa S3- Zellen präpariert, mit steigenden Mengen katalytisch aktiver (ohne Gallotannine) bzw. inaktivierter GST-PARG<sub>65</sub> (+ 150  $\mu\text{M}$  Gallotannine) inkubiert und die Poly (ADP-Ribosyl)ierung durch Zugabe von DNA und [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-NAD<sup>+</sup> induziert. Alle Reaktionen wurden in der Gegenwart von 200  $\mu\text{M}$  EDTA und der Abwesenheit von Mg<sup>2+</sup> durchgeführt. Dies sollte die Aktivität der bereits zuvor erwähnten endogenen Phosphodiesterasen hemmen, die PAR oder ADP-Ribose spalten würden (Rossi *et al.*, 2002, siehe 3.2.2). Nach 20 min wurde die Reaktion gestoppt und die gebildeten ADP-Ribose Metaboliten mittels SDS- PAGE und Dünnschichtchromatographie analysiert.

Wie erwartet, hatte die Zugabe von steigenden Mengen katalytisch aktiver GST-PARG<sub>65</sub> zu Kernextrakten eine vermehrte Bildung von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ADP-Ribose zur Folge (siehe Abb. 3.20 A, Spur 1-4). Dies führte daher zu einer sukzessiven Verkürzung der formierten PAR-Polymere, wie sich anhand von SDS-PAGE- Analysen zeigte (siehe Abb. 3.20 B, Spur 1-4). In einem Parallelexperiment wurden nach Ablauf der Reaktion die PAR-Polymere isoliert und in einem Acrylamidgel separiert. Es bestätigte sich auch hier die sukzessive Verkürzung der Polymere (siehe Abb. 3.20 C Spur 1-4). Während in Abwesenheit von exogener rekombinanter PARG in HeLa S3-Kernextrakten vornehmlich PAR-Polymere mit mehr als 50 ADP-Ribose-Einheiten gebildet wurden (siehe Abb. 3.20 C, Spur 1), führte die Zugabe steigenden Mengen katalytisch aktiver GST-PARG<sub>65</sub> zur Synthese von deutlich kürzeren PAR-Ketten (siehe Abb. 3.20 C, Spur 2-4).



**Abb. 3.20: PARG beeinflusst die Poly (ADP-Ribosyl)ierung in HeLa Kernextrakten**

15 µg HeLa S3-Kernextrakte (präpariert nach 2.2.7.3.3) wurden in PARG-Puffer (-MgCl<sub>2</sub>) mit sonifizierter DNA und 10 µM [α-<sup>32</sup>P]-NAD<sup>+</sup> für 20 min bei 30°C in der Gegenwart steigender Mengen katalytisch aktiver (-Gallotannine) bzw. katalytisch inaktiver (+ 150 µM Gallotannine) GST-PARG<sub>65</sub> inkubiert.

**A:** Proteine und Nukleotide wurden danach mit Aceton gefällt, mittels Dünnschichtchromatographie separiert und anschliessend die Menge gebildeter ADP-Ribose (PARG-Aktivität) unter Verwendung eines Phosphoimagers bestimmt.

**B:** Proteine und Nukleotide wurden einer SDS-PAGE (8 %) unterzogen und die eingebaute Radioaktivität in Form von <sup>32</sup>P-PAR durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

**C:** Nach Ablauf der Reaktion wurden <sup>32</sup>P-markierte PAR Polymere von den Proteinen abgespalten und in einem PAG (20%) aufgetrennt. Die Anzahl der ADP-Riboseeinheiten pro Kette gekennzeichnet.

Spur 1;5- ohne GST-PARG<sub>65</sub>

Spur 2;6- 150 nM GST-PARG<sub>65</sub>

Spur 3;7- 300 nM GST-PARG<sub>65</sub>

Spur 4;8- 600 nM GST-PARG<sub>65</sub>

Um den direkten Einfluss von GST-PARG<sub>65</sub>, unabhängig von seiner enzymatischen Aktivität, auf die PARP-1 Aktivität zu untersuchen, wurde der PAR-Metabolismus in Anwesenheit von Gallotanninen analysiert. Die Zugabe von 150 µM Gallotanninen führte zu einer Inhibition, sowohl der endogenen (aus HeLa S3-Kernextrakte) PARG-Aktivität als auch der rekombinanten GST-PARG<sub>65</sub> (siehe Abb. 3.20 A, Spur 5-8, vgl. auch Abb. 3.4 und Abb. 3.9). Wurde anschliessend die Grösse der gebildeten PAR-Polymere im PAG untersucht, so zeigte sich erstaunlicherweise trotz Inaktivierung der PARG-Aktivität eine deutliche Verkürzung der formierten Polymere (siehe Abb. 3.20 B und C, Spur 5-8). In der Schlussfolgerung bedeutet dies, dass PARG<sub>65</sub> ganz unabhängig von seiner PAR-hydrolysierenden Aktivität, offensichtlich durch Protein-Protein-Wechselwirkungen die PAR-Synthese von PARP-1 in nukleären Kernextrakten beeinflusst. Dies führt dann zur Bildung von verkürzten PAR-Polymeren.

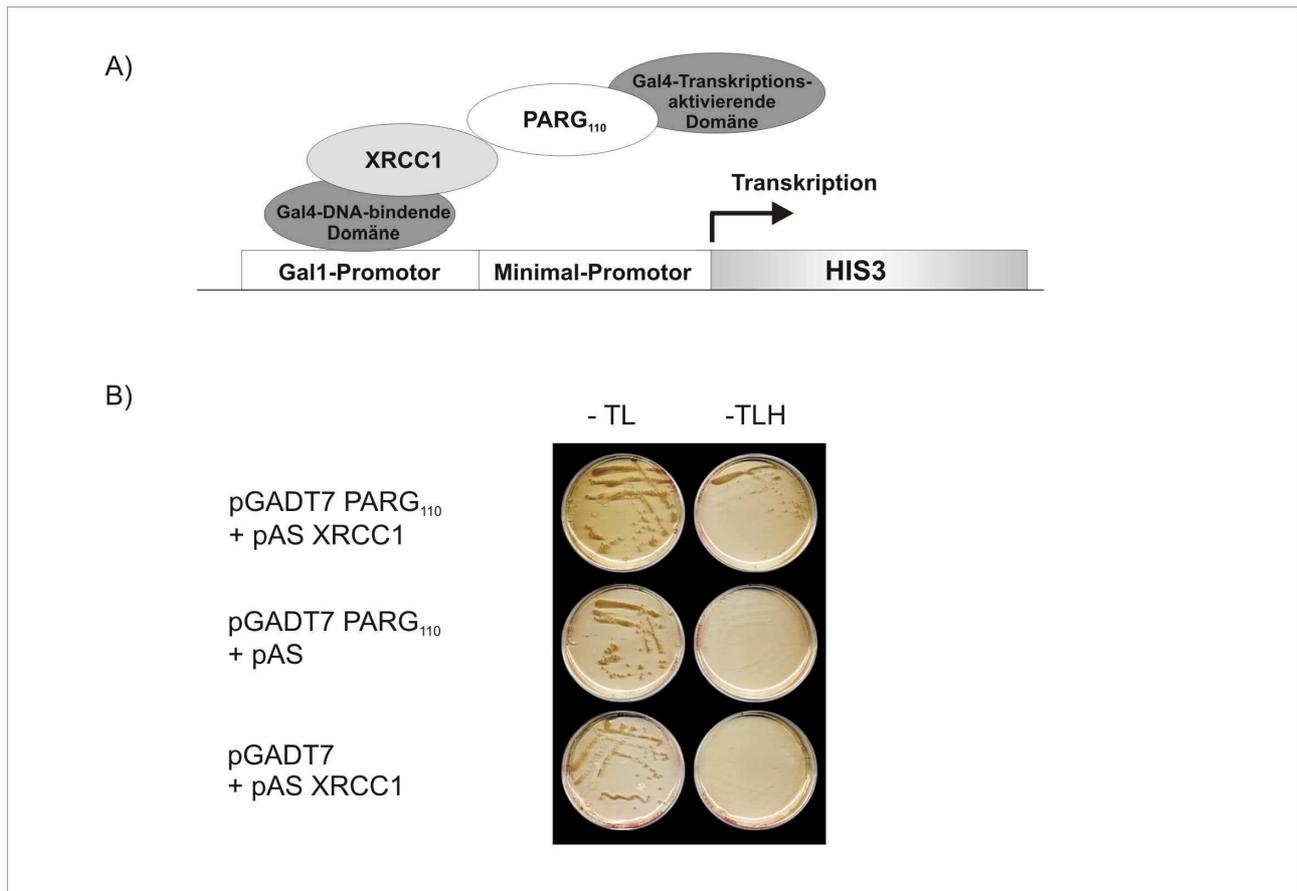
### **3.4 XRCC1 interagiert mit PARG und reguliert die PAR-Synthese**

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass PARG mit PARP-1 über die Automodifikationsdomäne interagiert. Diese PARP-1 Domäne enthält ein BRCT1-Motiv, welches für die Interaktion mit anderen Proteinen von Bedeutung ist. Unter anderem wurde gezeigt, dass darüber die Interaktion mit dem DNA-Reparaturprotein XRCC1 erfolgt (siehe Tab. 1.2, Masson *et al.*, 1998). Daher wurde in weiteren Experimenten untersucht, ob auch eine Interaktion zwischen PARG und XRCC1 besteht.

#### **3.4.1 Nachweis der direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen PARG und XRCC1 in einem *Yeast-Two-Hybrid*-Experiment**

Um die direkte Interaktion zwischen PARG und XRCC1 zu überprüfen, wurde zunächst ein *Yeast-Two-Hybrid*-Experiment durchgeführt. Dazu wurde die gesamte kodierende Sequenz der PARG in den Vektor pGADT7 kloniert, sodass die Expression der PARG als Fusionsprotein mit der Transkriptionsaktivierenden Domäne des Transkriptionsfaktors GAL4 erfolgt (*Prey*-Plasmid). Das Konstrukt pAS-XRCC1 zur Expression von XRCC1 als Fusionsprotein mit der DNA-bindenden Domäne des Transkriptionsfaktors GAL4 (*Bait*-Plasmid) wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. K. Caldecott zur Verfügung gestellt (Caldecott *et al.*, 1996). Zur Kontrolle wurden die jeweiligen Vektoren ohne inserierte DNA-Fragmente (pAS, pGADT7) eingesetzt. *Prey*- und *Bait*-Plasmide wurden sequentiell in den Hefestamm *S. cerevisiae* PJ 69-4A transformiert. In diesem Hefestamm erfolgt unter anderem die Expression des Reportergens HIS3 unter Kontrolle des Transkriptionsfaktors GAL4,

welches der Hefe ein Überleben auf Histidinmangelmedien ermöglicht (siehe Abb. 3.21 A). Tatsächlich wurde ein Wachstum der transformierten Hefen im Falle einer Koexpression von PARG<sub>110</sub> und XRCC1 auf den TLH-Mangelmedien beobachtet (siehe Abb. 3.21 B). Dahingegen war für Hefen, in denen nur einer der beiden Bindungspartner exprimiert wurde (siehe Abb. 3.21 B) oder für untransformierte Hefestämme (Daten nicht gezeigt) ein Überleben auf TLH-Mangelmedien nicht möglich.

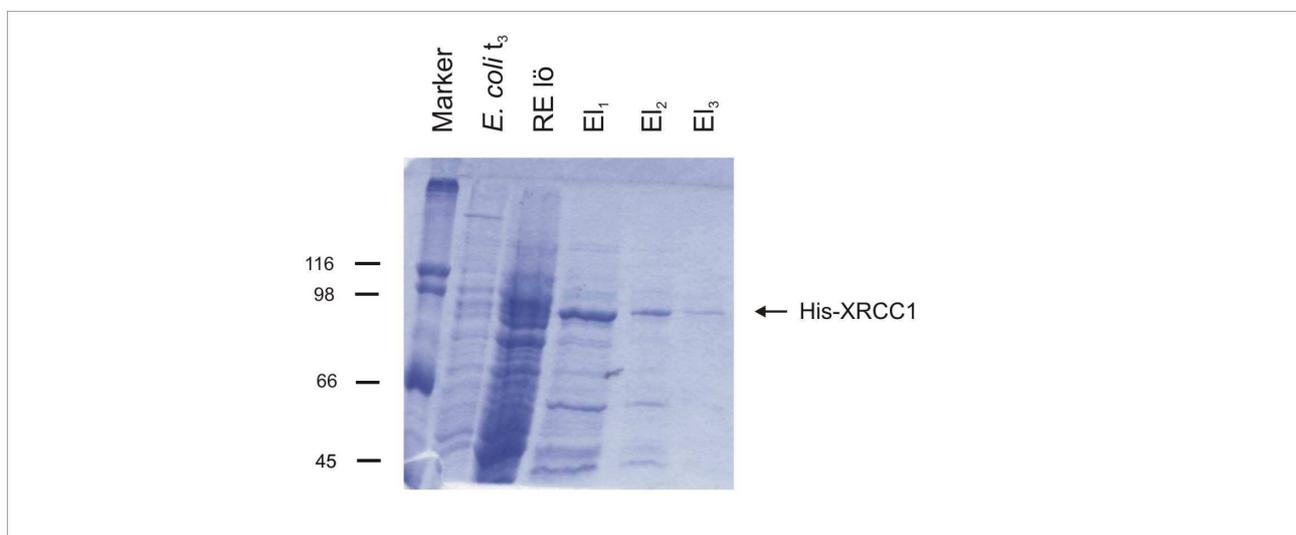


**Abb. 3.21: Nachweis der Interaktion von PARG und XRCC1 im Yeast-Two-Hybrid-System**

**A:** Schematische Darstellung des Prinzips des *Yeast-Two-Hybrid-Systems* **B:** Zur Expression von PARG und XRCC1 wurden die entsprechenden Plasmide in *S. cerevisiae* PJ 69-4A transfiziert und diploide Klone auf Selektionsmedien ohne Tryptophan und Leuzin (-TL) selektiert. Zum Nachweis der Interaktion wurden die entsprechenden Klone auf Selektionsmedien ohne Tryptophan, Leuzin und Histidin (-TLH) angezogen.

### 3.4.2 Nachweis der direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen PARG und XRCC1 durch GSH-Präzipitation

Um die Interaktion zwischen XRCC1 und PARG mit einer zweiten Methode zu bestätigen und den Bereich der Interaktion hinsichtlich der PARG einzugrenzen, wurde eine *in vitro* Affinitätspräzipitation an GSH-Sepharose durchgeführt. Hierfür wurde zunächst XRCC1 rekombinant in *E. coli* BL21 (DE3) als Protein mit C-terminalen Dekahistidin-Tag exprimiert und durch Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Sepharose gereinigt (siehe 2.2.7.4.2 und Abb. 3.22). Auf die nach der Elution zu beobachtende Fragmentierung von XRCC1 wurde bereits zuvor von Caldecott *et al.* (1994) hingewiesen. Da XRCC1 über keine bekannte katalytische Aktivität verfügt, war eine Kontrolle des gereinigten Proteins mittels Aktivitätstest nicht möglich.

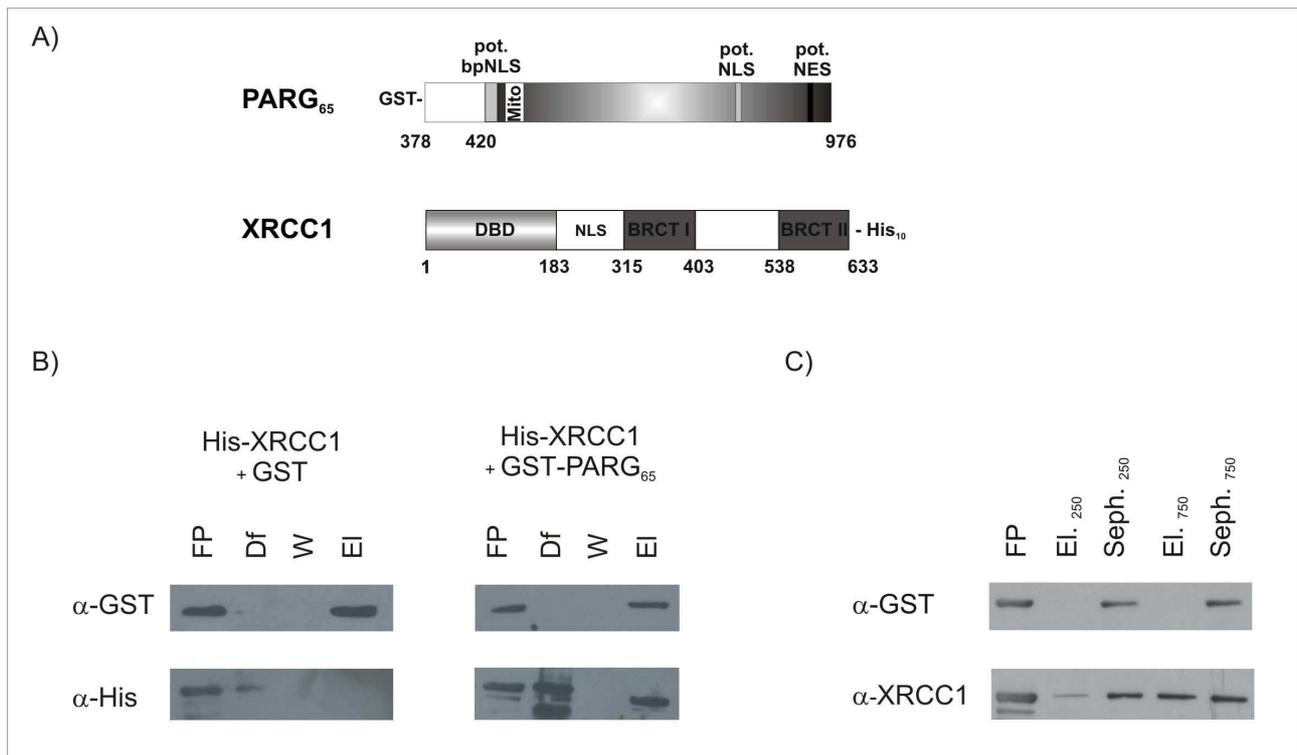


#### Abb. 3.22: Reinigung von rekombinant exprimiertem His-XRCC1

His-XRCC1 wurde in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert und durch Chromatographie an Ni-NTA-Sepharose gereinigt. Proben der jeweiligen Reinigungsschritte wurden in einer 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt.

*E. coli* t<sub>3</sub>- *E. coli* 3 h nach Induktion, RE lö- *E. coli* Extrakt (lösliche Proteine), El<sub>1-3</sub>- Elutionsfraktionen 1 bis 3 der Ni-NTA-Sepharose

In der anschließenden *in vitro* Affinitätspräzipitation wurde das gereinigte His-XRCC1 zusammen mit der katalytischen Domäne der PARG als GST-Fusionsprotein (GST-PARG<sub>65</sub>) bzw. zur Kontrolle mit unfusioniertem GST eingesetzt (siehe Abb. 3.23 A). Die bereits im *Yeast-Two-Hybrid*- System beobachtete Interaktion zwischen PARG und XRCC1 konnte durch dieses Experiment bestätigt werden. Während für XRCC1 in Anwesenheit von GST-PARG<sub>65</sub> eine Bindung an die GSH Sepharose erfolgte, wurde dies nicht in der Gegenwart des Kontrollproteins GST beobachtet (siehe Abb. 3.23 B). Gleichzeitig konnte dadurch gezeigt werden, dass für diese Interaktion ebenfalls die katalytische Domäne der PARG ausreichend ist.



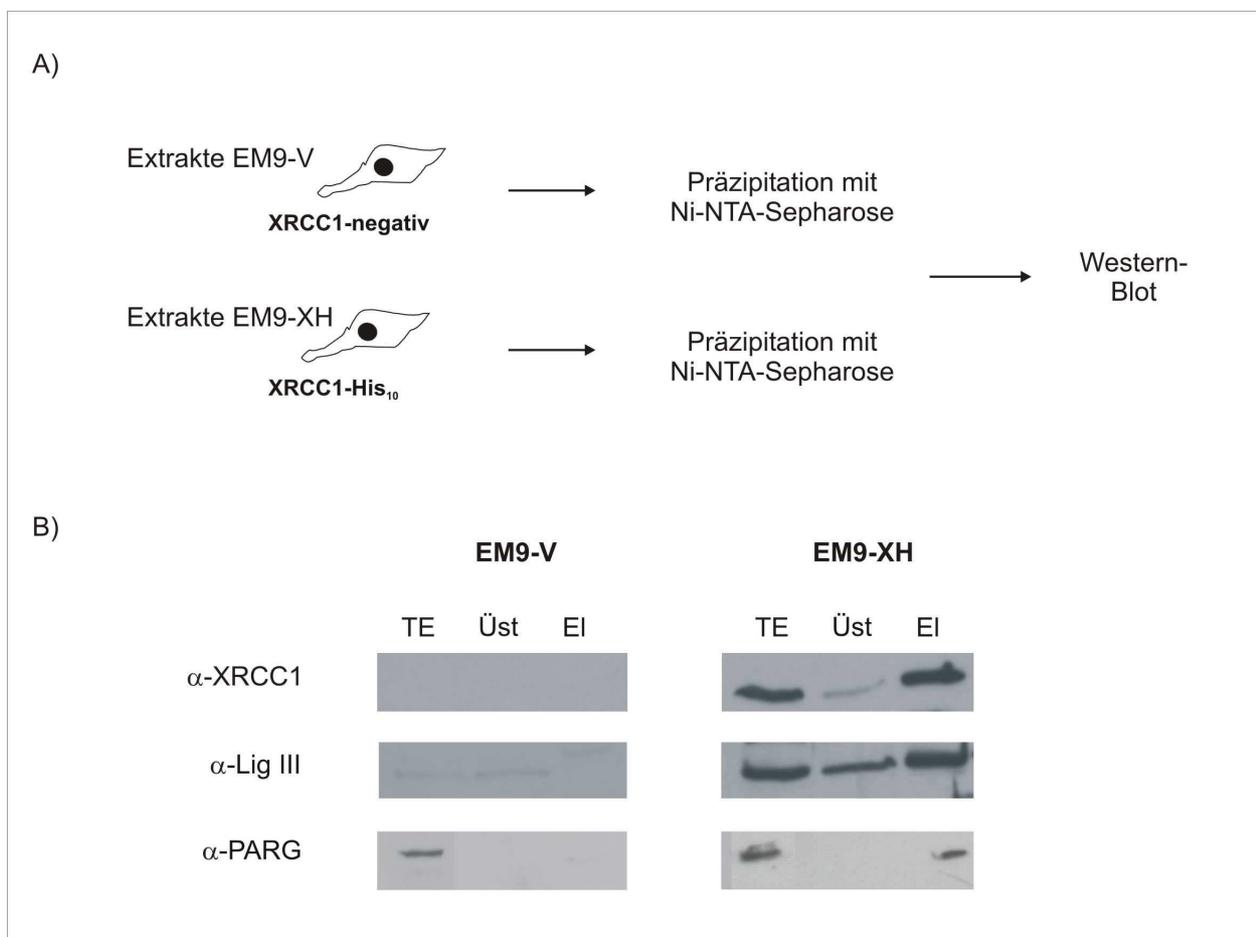
**Abb. 3.23: *In vitro* Affinitätspräzipitation von GST-PARG<sub>65</sub> und His-XRCC1 an GSH-Sepharose**  
**A:** Schematische Darstellung der Fusionsproteine. **B:** Gereinigtes His-XRCC1 wurde in einer *in vitro* Präzipitation an GSH-Sepharose mit GST-PARG<sub>65</sub> bzw. GST eingesetzt. Gebundene Proteine wurden in einer Immundetektion mit mAb  $\alpha$ -GST bzw.  $\alpha$ -XRCC1 nachgewiesen. **C:** Einfluss der Salzkonzentration auf die Interaktion zwischen GST-PARG<sub>65</sub> und His-XRCC1. Im Anschluss an die *in vitro* Präzipitation von His-XRCC1 mit GST-PARG<sub>65</sub> bzw. GST wurden gebundene Proteine durch die Zugabe von steigenden Mengen NaCl (250 mM bzw. 750 mM) in Bindungspuffer eluiert. Noch an GSH-Sepharose gebundene und im Überstand befindliche Proteine wurden in einer Immundetektion mit den Antikörpern  $\alpha$ -XRCC1 und  $\alpha$ -GST nachgewiesen.

Die Bindung von XRCC1 an GST-PARG<sub>65</sub> erwies sich als stabil gegenüber Konzentrationen von 150 mM NaCl. Eine weitere Erhöhung der Salzkonzentration während der *in vitro* Affinitätspräzipitation auf 750 mM NaCl führte dosisabhängig zu einer Dissoziation des PARG-XRCC1-Komplexes (siehe Abb. 3.23 C). Daher kann vermutet werden, dass die Interaktion beider Proteine über nichtkovalente Wechselwirkungen erfolgt.

### 3.4.3 PARG und XRCC1 liegen als Komplex in EM9-XH-Extrakten vor

Um die in Kapitel 3.4.1 und 3.4.2 beschriebene Interaktion zwischen PARG und XRCC1 *in vivo* zu bestätigen, wurden die Hamsterzelllinien CHO EM9-V- bzw. EM9-XH (siehe Abb. 1.11) genutzt. In EM9-XH Zellen wird XRCC1 als Polyhistidin-fusionsproteine stabil überexprimiert (Caldecott *et al.*, 1995). Folglich können interagierende Proteine aus diesen Zellen relativ leicht durch Affinitätschromatographie an Ni-NTA angereichert werden. Zelllysate beider Zelllinien wurden mit der Ni-NTA-Sepharose inkubiert, intensiv gewaschen und gebundene Proteinkomplexe durch Elution mit erhöhten Imidazolkonzentrationen (80 mM) eluiert. In der anschließenden Immundetektion wurde die

Bindung von XRCC1-His an die Ni-NTA-Matrix nachgewiesen (siehe Abb. 3.24 B). Desweiteren wurde die bereits bekannte Interaktion zwischen XRCC1 und Ligase III in den EM9-XH Zellen bestätigt (siehe Abb. 3.24 B, Caldecott *et al.*, 1995). Die Abwesenheit von XRCC1 in den EM9-V-Zellen führt zu einer Destabilisierung und Degradierung von Ligase III (siehe Abb. 3.24 B), wie zuvor schon mehrfach gezeigt wurde (Caldecott *et al.*, 1995, Cappelli *et al.*, 1997). Hinsichtlich des PARG-XRCC1-Komplexes konnte gezeigt werden, dass die Expression der PARG sowohl in EM9-V- als auch EM9-XH Zellen erfolgt. Eine Bindung der endogenen PARG an die Ni-NTA-Sepharose erfolgte jedoch nur in Gegenwart von His-XRCC1. Eine unspezifische Interaktion der PARG mit der Affinitätsmatrix wurde durch ein Kontrolllexperiment mit EM9-V-- Zelllysaten ausgeschlossen (siehe Abb. 3.24 B). Im Unterschied zu den Ergebnissen der *in vitro* GST-Affinitätsexperimente (siehe Abb. 3.23 C und 2.2.7.8.4) erwies sich der endogene Komplex aus XRCC1 und PARG stabil gegenüber Salzkonzentrationen von 500 mM NaCl.



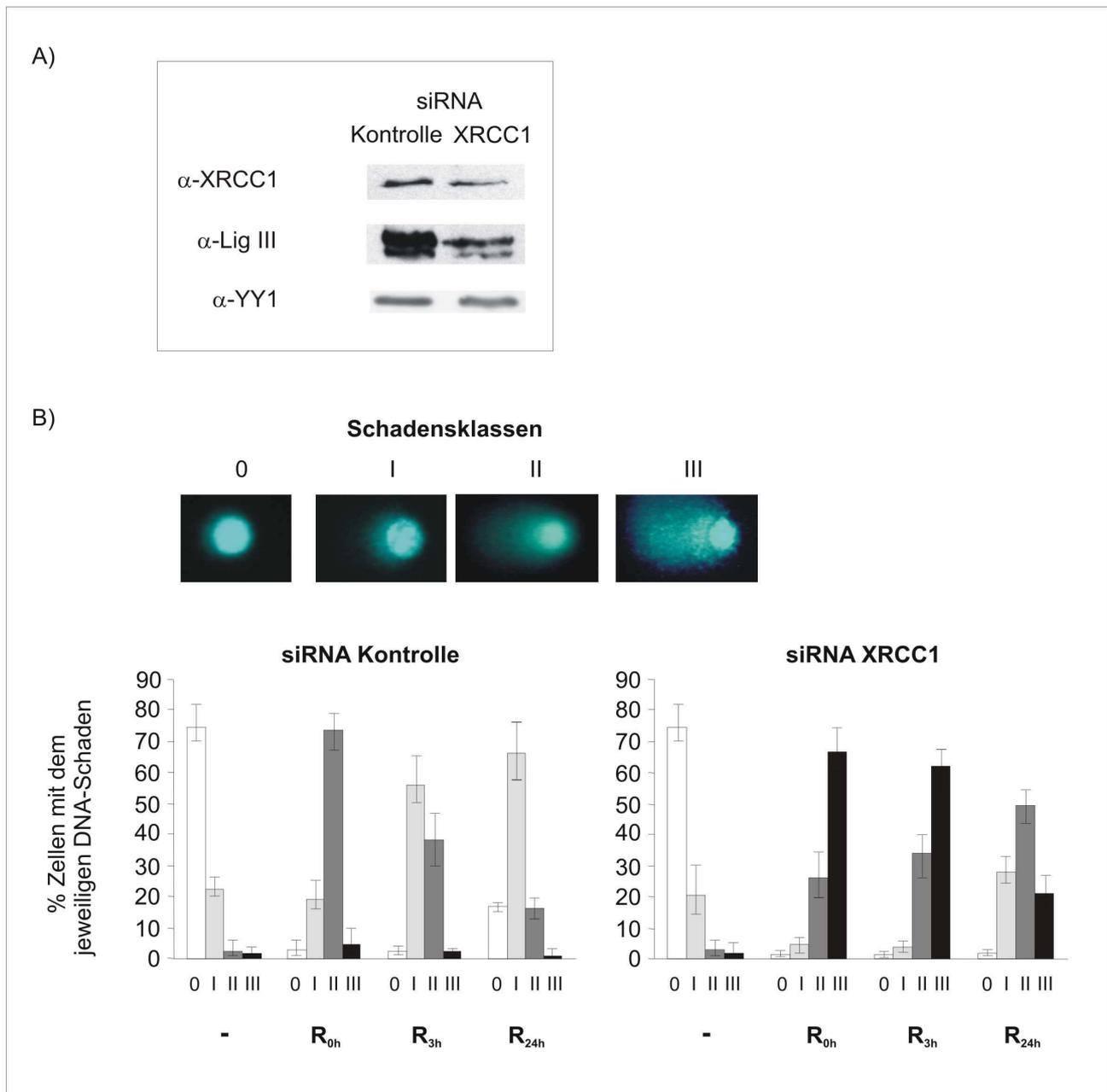
### Abb. 3.24: Nachweis des PARG-XRCC1- Komplexes in EM9-XH Zellen

**A:** Ablauf der *in vivo* Ni-NTA-Affinitätspräzipitation **B:** Die einzelnen Fraktionen wurden in einer SDS-PAGE (10 %) separiert und einer Immundetektion mit den Antikörpern  $\alpha$ -XRCC1 (H-300),  $\alpha$ -Ligase III und  $\alpha$ -His-PARG<sub>65</sub> (Tier 2) unterzogen.

### 3.4.4 Bedeutung von XRCC1 für die DNA-Reparatur in humanen Zellen

Da XRCC1 sowohl ein Interaktionspartner von PARP-1 (siehe Tab. 1.2) als auch der PARG ist (siehe 3.4.1-3.4.3), erschien es möglich, dass das Protein regulierend in den PAR-Metabolismus eingreift. Um diesen Effekt *in vivo* zu überprüfen, standen die beiden schon zuvor genannten Hamsterzelllinien EM9-V- und EM9-XH zur Verfügung. Die unter 3.3.3-3.3.5 und 3.4.1-3.4.3 beschriebenen Experimente wurden jedoch mit den humanen Varianten der drei Proteine durchgeführt. Daher musste zunächst geklärt werden, inwiefern die Funktionen von XRCC1 in den Hamsterzellen und im humanen System vergleichbar sind. Dafür wurde die Expression von XRCC1 in HeLa-Zellen durch Transfektion mit einer XRCC1- siRNA vermindert (siehe 2.2.6.3). 24 h nach der Transfektion zeigte sich eine deutlich verringerte Expression von XRCC1, verglichen mit der entsprechenden Kontroll- siRNA. Eine verlängerte Transfektion mit der XRCC1- siRNA und damit eine weitere Reduktion der Proteinexpression hatten zytotoxische Folgen. Auf die Tatsache, dass XRCC1 assoziiert mit Ligase III vorliegt und für dessen Stabilität unabdinglich ist, wurde bereits zuvor hingewiesen (siehe Abb. 3.24). Ebenso wie bereits in Kernextrakten von EM9-V- Zellen beobachtet (siehe Abb. 3.24), führte eine verringerte Expression von XRCC1 aufgrund einer siRNA-Transfektion zu einer Destabilisierung von Ligase III. Während XRCC1 keinen Einfluss auf die Stabilität des Transkriptionsfaktors YY1 ausübt, waren in den mit XRCC1- siRNA behandelten Zellen deutlich geringere Mengen an Ligase III nachweisbar (siehe Abb. 3.25 A).

In einem zweiten Experiment wurde die DNA-Reparaturkapazität von HeLa- Zellen nach verringerter XRCC1- Expression untersucht. Dazu wurden die Zellen wiederum für 24 h mit Kontroll-siRNA's bzw. siRNA's gerichtet gegen XRCC1 transfiziert. Anschliessend erfolgte eine Schädigung mit MNNG. Die durch MNNG induzierten alkylierten Basenveränderungen in der DNA werden vornehmlich durch das BER-System repariert, in dem XRCC1 von zentraler Bedeutung ist (siehe Abb. 1.9). Die Reparatureffizienz wurde danach zu unterschiedlichen Zeiten nach genotoxischer Schädigung anhand eines alkalischen Comet-Assay (siehe 2.2.6.9) gemessen. In ungeschädigten Zellen wurden jeweils nur geringfügige alkalilabile DNA-Schäden detektiert, die unabhängig von der Präsenz der Kontroll- oder XRCC1- siRNA auftraten (siehe Abb. 3.25 B). Die Reduktion von XRCC1 *per se* führte daher nicht zu einer Akkumulation von DNA-Schäden. Eine Zugabe von 5  $\mu$ M MNNG führte in beiden Fällen zur Induktion von DNA Läsionen unmittelbar nach Schädigung, gemessen anhand der Zunahme der Grösse und Breite der Cometen. Während in den mit Kontroll siRNA behandelten Zellen eine effiziente Reparatur der DNA-Schäden stattfand (Reduktion der Zellen mit DNA-Schaden Klasse II und III innerhalb von 24 h), akkumulierten in den mit XRCC1- siRNA behandelten Zellen viel mehr DNA-Schäden (Klasse III unmittelbar nach MNNG-Behandlung), deren Reparatur deutlich weniger effizient erfolgte (siehe Abb. 3.25 B).



**Abb. 3.25: Eine Verringerung von XRCC1 mittels RNAi führt zur Destabilisierung von Ligase III und einer verminderten DNA-Reparaturkapazität in HeLa- Zellen**

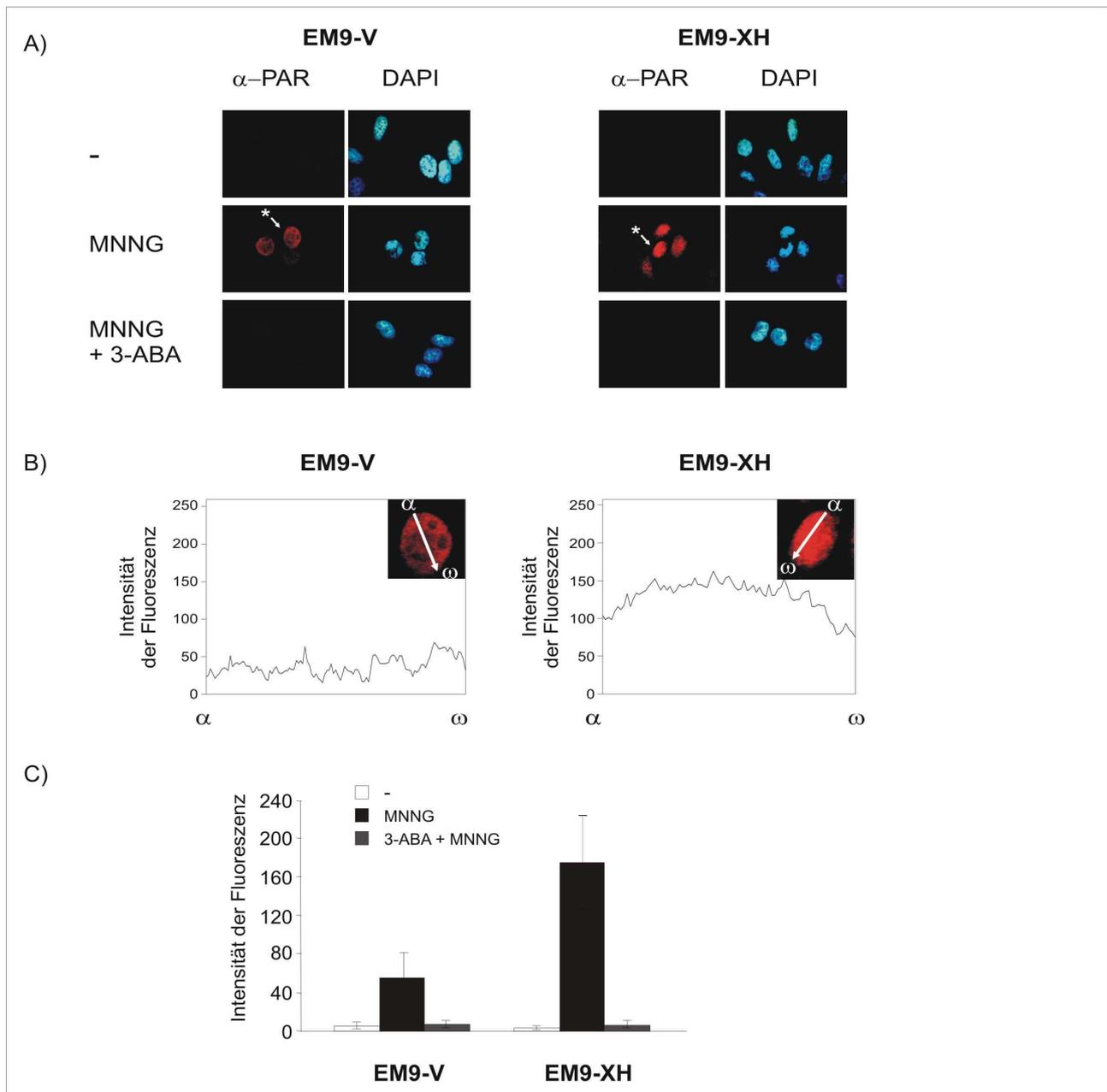
HeLa- Zellen wurden mit Kontroll- bzw. XRCC1-siRNA's gerichtet gegen XRCC1 (siehe Tab. 2.4) transfiziert.

**A:** Nach 24 h wurden Kernextrakte präpariert (siehe 2.2.7.3.2) und anschliessend Western-Blots mit den Antikörpern  $\alpha$ -XRCC1 (H-300),  $\alpha$ -Ligase und  $\alpha$ -YY1 (C-20) (Kontrolle) durchgeführt. **B:** 24 h nach der Transfektion der siRNA's wurden die Zellen für 10 min mit 5  $\mu$ M MNNG geschädigt und ein Alkalischer Comet-Assay zur Quantifizierung vorhandener DNA-Schäden durchgeführt. Zunächst wurde der Grad des induzierten DNA-Schadens entsprechend der Länge und Breite des Comets auf einer Skala von 0- III definiert. Anschliessend wurden die DNA-Schädigungen in Proben von Zellen ohne Behandlung mit MNNG (-), unmittelbar nach der Schädigung (R<sub>0h</sub>), 3 h (R<sub>3h</sub>) bzw. 24 h (R<sub>24h</sub>) nach Schädigung mit MNNG quantifiziert.

Anhand dieser beiden Experimente konnte geschlossen werden, dass XRCC1 hinsichtlich der Stabilität von Ligase III und einer Funktion im BER-System in den Hamsterzellen und in humanen Zellen eine vergleichbare Bedeutung hat. Zur Aufklärung der Rolle von XRCC1 für den PAR-Metabolismus wurde deshalb in den folgenden Experimenten mit den CHO EM9-Hamsterzelllinien gearbeitet.

### 3.4.5 XRCC1 reguliert die Synthese von Poly (ADP-Ribose)

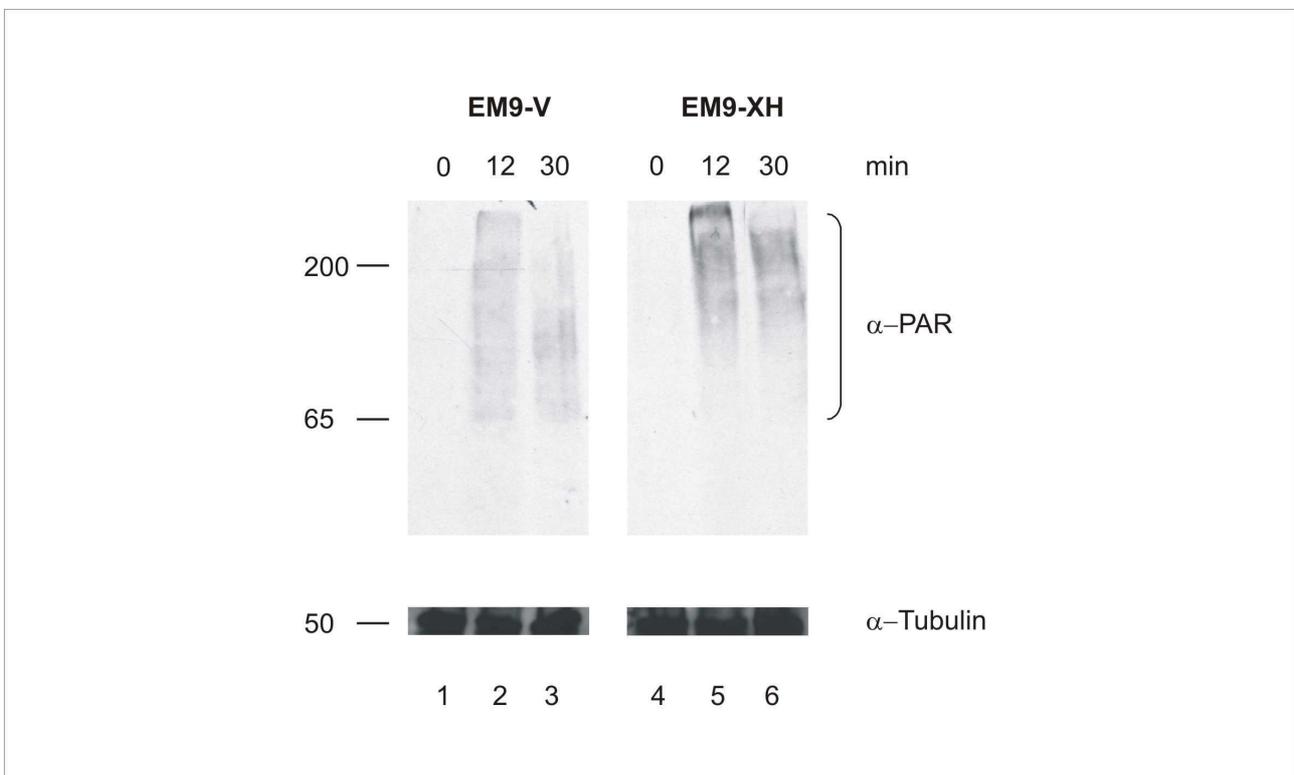
Um die Bedeutung von XRCC1 für den PAR-Metabolismus *in vivo* zu analysieren, wurden EM9-V- und EM9-XH mit einer letalen Dosis des alkylierenden Agens MNNG behandelt. Anschliessend erfolgte der Nachweis der gebildete PAR durch Immunfluoreszenz mit dem Antikörper  $\alpha$ -Poly (ADP-Ribose)/96-10-04 (siehe Abb. 3.26).



**Abb. 3.26: Quantifizierung der PAR-Synthese in EM9-Zellen nach Schädigung mit MNNG**

EM9-V- und EM9-XH- Zellen wurden für 12 min mit 500  $\mu$ M MNNG geschädigt. Ggf. wurde 3-ABA (2 mM) zugefügt. **A:** Nach der Schädigung wurden die Zellen fixiert (Formaldehyd/Triton) und gebildete PAR durch Immunfluoreszenz mit den Antikörpern  $\alpha$ -Poly (ADP-Ribose)/96-10-04 und  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Alexa 594 nachgewiesen. Zur Kontrolle erfolgte eine DAPI-Färbung. **B:** Repräsentative Quantifizierung der Intensität der Immunfluoreszenz der jeweiligen in A) gekennzeichneten EM9-V- und EM9-XH Zellen (Pfeile mit \*). **C:** Statistische Auswertung der in B) gemessenen Fluoreszenzintensitäten. Es wurden die Intensitätsmaxima der Fluoreszenzen in die Messung einbezogen. Die im Diagramm dargestellten Werte repräsentieren das Ergebnis von je 300 Zellen.

In Abwesenheit der genotoxischen Schädigung wurden weder in den XRCC1-negativen noch in den XRCC1-überexprimierenden Zellen PAR-Polymere detektiert (siehe Abb. 3.26 A und C). Unmittelbar nach MNNG-Behandlung akkumulierten in den EM9-XH Zellen deutlich mehr PAR, verglichen zu den EM9-V- Zellen (siehe Abb. 3.26 A- C). Eine Quantifizierung der Immunfluoreszenz ergab eine 3-4fach erhöhte Polymerbildung in EM9-XH Zellen verglichen zu den EM9-V- Zellen (siehe Abb. 3.26 B und C). Anhand von Western-Analysen zeigte sich, dass noch 30 min nach genotoxischer Schädigung deutlich grössere Mengen an hochmolekularen PAR-modifizierten Proteinen in den EM9-XH Zellen nachweisbar waren, verglichen zu EM9-V- Zellen (siehe Abb. 3.26). Erfolgte im Kontrollexperiment die MNNG-Behandlung in Anwesenheit des PARP-1 Inhibitors 3-ABA, so wurde die Polymersynthese in den CHO-Zellen komplett unterbunden (siehe Abb. 3.26 A und C). Dies erlaubt den Schluss, dass die gemessene XRCC1-regulierte PAR-Synthese PARP-vermittelt erfolgte.



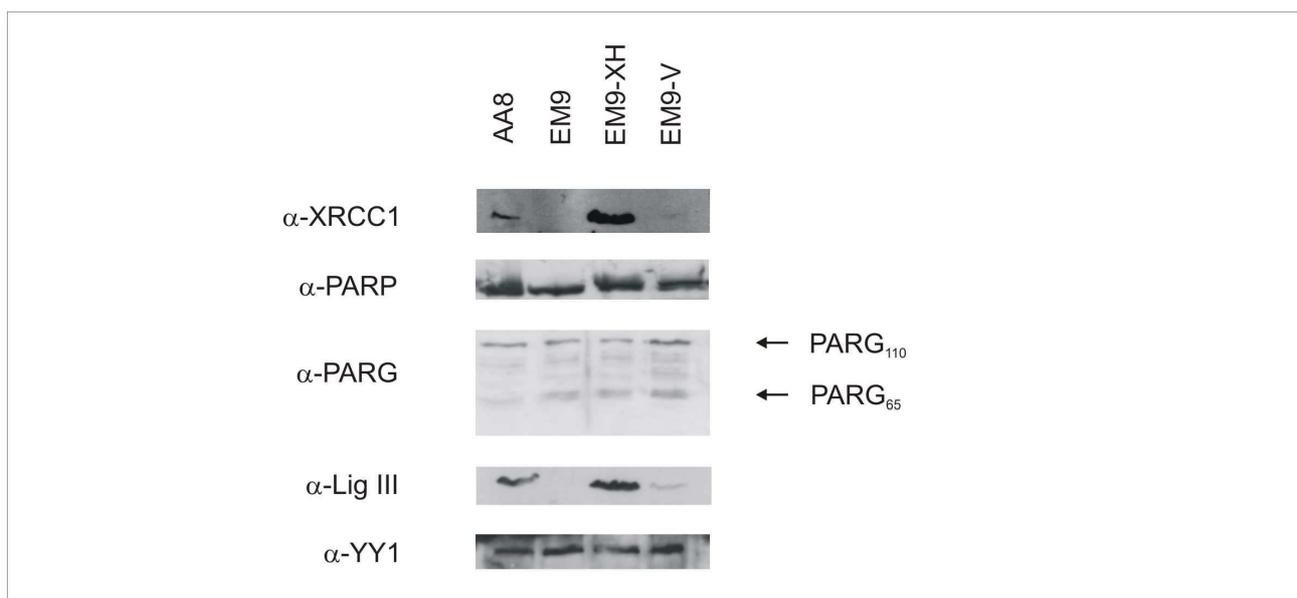
**Abb. 3.27: Nachweis von Poly (ADP-Ribose) in EM9-Zellen zu unterschiedlichen Zeiten nach Schädigung mit MNNG**

EM9-V- und EM9-XH Zellen wurden für 12 min mit 500  $\mu$ M MNNG geschädigt oder verblieben ungeschädigt. Zu unterschiedlichen Zeiten nach Schädigung mit MNNG wurden Gesamtzellextrakte präpariert und einer Immundetektion mit den Antikörpern  $\alpha$ -Poly (ADP-Ribose)/96-10-04 bzw.  $\alpha$ -alpha-Tubulin/DM 1A unterzogen.

1;4-Extrakte von unbehandelten Zellen, 2;5-Extrakte von Zellen unmittelbar nach MNNG-Behandlung für 12 min, 3;6-Extrakte von Zellen, die für 10 min mit MNNG behandelt wurden und anschliessend für 20 min in komplettem DMEM verblieben.

### 3.4.6 Expression von XRCC1 beeinflusst nicht die Stabilität und zelluläre Verteilung von PARP-1 und PARG

Um die Gründe für die erhöhte PAR-Bildung in den EM9-XH Zellen zu identifizieren, wurde zunächst die Expression von PARG und PARP-1 in verschiedenen XRCC1-defizienten oder überexprimierenden Hamsterzelllinien AA8, EM9, EM9-V und EM9-XH (siehe Abb. 1.11) analysiert. Hierfür wurden Kernextrakte aus unbehandelten Zellen präpariert und diese mittels Western-Blot untersucht. Hinsichtlich von XRCC1 zeigte sich eine Überexpression des Proteins in den EM9-XH Zellen verglichen zu der Linie AA8. Dies ist jedoch vermutlich auf die Spezifität des eingesetzten Antikörpers ( $\alpha$ -XRCC1-human<sub>AS 1-300</sub>) zurückzuführen. Während in Abwesenheit von XRCC1 nur sehr geringe Mengen an Ligase III in Kernextrakten nachweisbar waren, ergaben sich keine Unterschiede für die Expression von PARP-1 und PARG in den vier Hamsterzelllinien (siehe Abb. 3.28 und vgl. auch Abb. 3.24 B). XRCC1 ist folglich nicht wichtig, um die beiden zuletzt genannten Proteine zellulär zu stabilisieren.

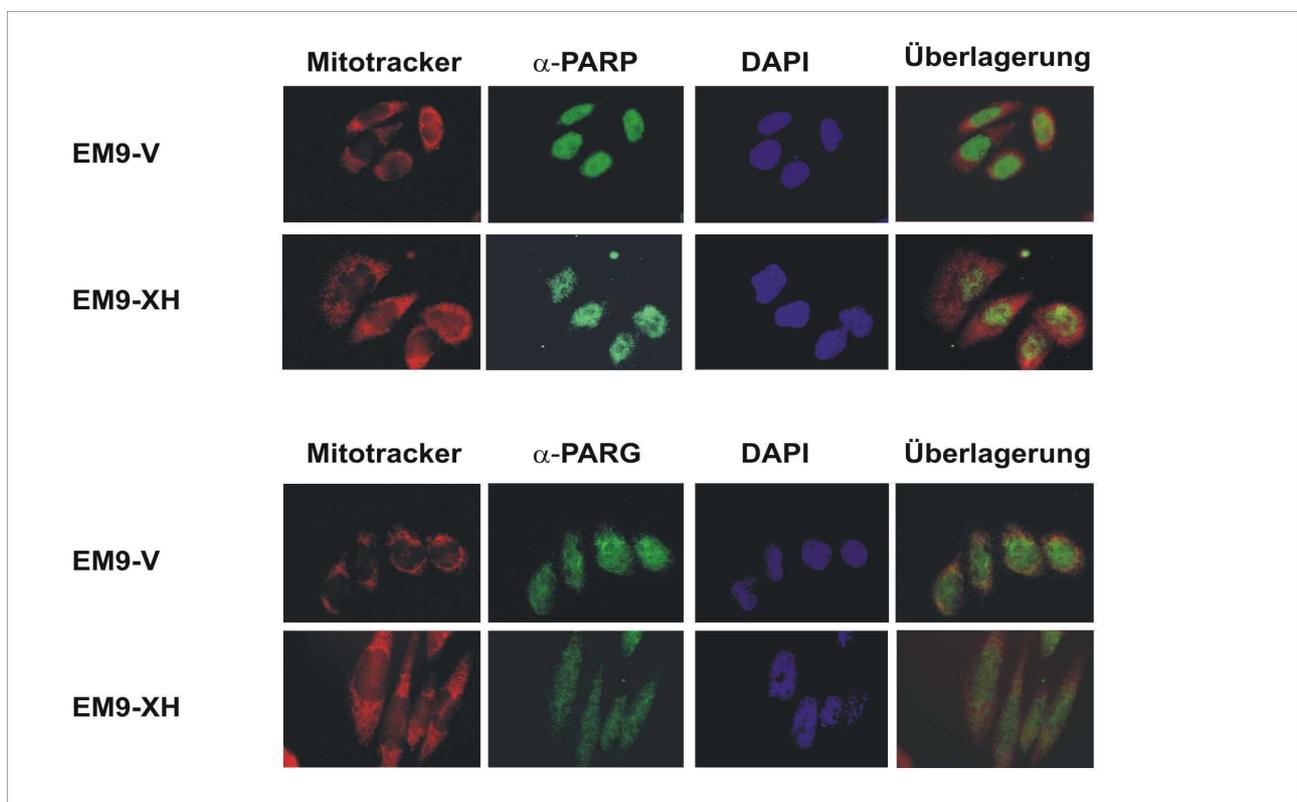


**Abb. 3.28: XRCC1 beeinflusst nicht die Stabilität von PARP-1 und PARG**

Jeweils 50  $\mu$ g Kernextrakte verschiedener CHO-Zelllinien wurden in einer SDS-PAGE (10 %) separiert und anschliessend einer Immundetektion mit den Antikörpern  $\alpha$ -XRCC1 (H-300),  $\alpha$ -PARP AMD,  $\alpha$ -His-PARG<sub>65</sub> (Serum Tier 1),  $\alpha$ -Ligase III und  $\alpha$ -YY1 (C-20) unterzogen.

Um eine mögliche veränderte zelluläre Verteilung von PARP-1 und PARG zu untersuchen, wurden EM9-V- und -XH Zellen mittels Immunfluoreszenz analysiert. PARP-1 ist als zellkernlokalisiertes Protein beschrieben (Desnoyer *et al.*, 1996). In Abhängigkeit vom Transkriptionsstatus befindet sich PARP-1 in den Nukleoli (transkriptionspositive Zellen) oder bevorzugt der Kernmatrix (transkriptionsnegative Zellen) (Desnoyer *et al.*, 1996). Von der PARG ist bekannt, dass sie sowohl im Zellkern- als auch Cytoplasma vorkommt (Bonicalzi *et al.*, 2005). Desweiteren findet sich eine

mitochondriale Lokalisationssequenz innerhalb des Proteins (siehe Abb. 1.6 und Oei *et al.*, 2005). Um ggf. die Lokalisation der PARG in den Mitochondrien besser zuordnen zu können, wurden diese durch Zugabe des fluoreszierenden MitoTracker Red CMXRos markiert. MitoTracker Red CMXRos akkumuliert in Abhängigkeit des mitochondrialen Membranpotentials in diesen Organellen. Durch eine Bindung an freie Thiolgruppen entstehen formaldehydfixierbare Konjugate, die anschliessend im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden können. In ungeschädigten CHO-Zellen wurden die PARP-1-Signale, unabhängig von der Anwesenheit von XRCC1, im Zellkern, vornehmlich in der Kernmatrix detektiert (siehe Abb. 3.29). Ebenso fanden sich keine Unterschiede in der zellulären Lokalisation der PARG (Zellkern, Cytoplasma und partiell Mitochondrien) in den beiden Hamsterzelllinien (siehe Abb. 3.29).



**Abb. 3.29: XRCC1 beeinflusst nicht die zelluläre Verteilung von PARP-1 und PARG**

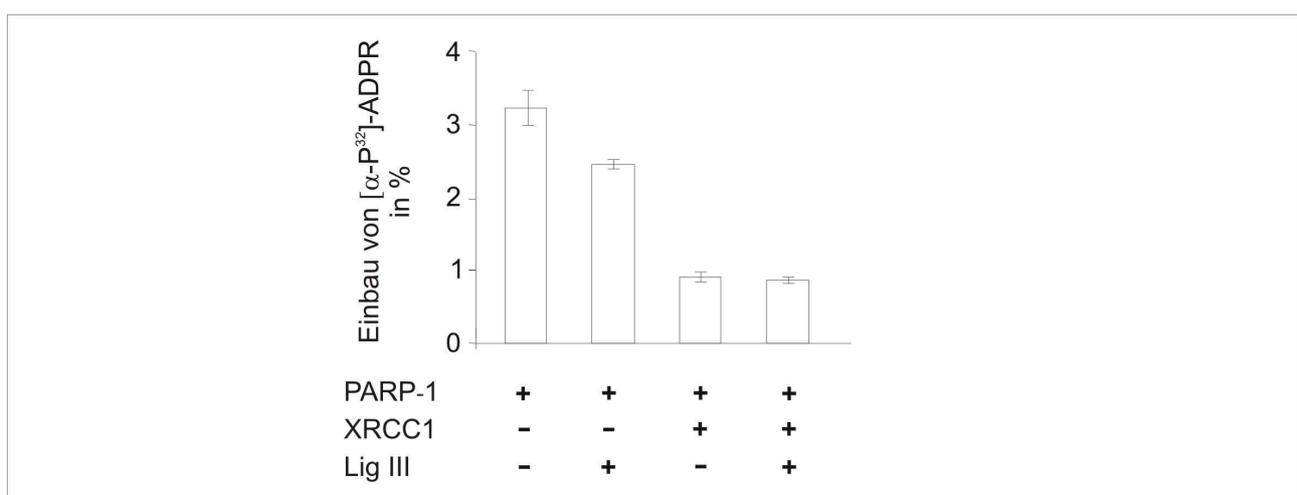
EM9-V- und EM9-XH Zellen wurden für 25 min in Medium in Anwesenheit vom fluoreszierenden Mitochondrienmarkers MitoTracker Red CMXRos (50 nM) inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen fixiert (Formaldehyd/Triton) und einer Immunfluoreszenz mit den primären Antikörpern α-PARP AMD bzw. α-His-PARG<sub>65</sub> (Tier 2) durchgeführt. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper α-Kaninchen-IgG-Alexa 488 wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt.

Nach der zellulären Fraktionierung der EM9-V- und EM9-XH Zellen (Kern- und Cytoplasmafraktionierung) bestätigten sich diese Befunde in Western-Analysen (Daten nicht gezeigt). In einem weiteren Experiment zeigte sich, dass auch einer Induktion der PAR-Synthese durch Zugabe von 500 μM MNNG kein Unterschied in der zellulären Verteilung von PARP-1 und PARG zwischen den beiden Zelllinien zu beobachten war (Daten nicht gezeigt).

### 3.4.7 Einfluss von XRCC1 auf die katalytische Aktivität von PARP-1 und PARG

Die zuletzt beschriebenen Experimente hatten gezeigt, dass die vermehrte PAR-Bildung in EM9-XH Zellen nicht auf einen proteinstabilisierenden Einfluss von XRCC1 auf PARP-1 bzw. PARG zurückzuführen war. Daher sollte nun untersucht werden, inwieweit die katalytischen Aktivitäten der beiden Proteine von XRCC1 direkt beeinflusst werden. Die ersten Experimente dazu wurden mit gereinigten rekombinanten Proteinen durchgeführt. XRCC1 liegt *in vivo* assoziiert mit Ligase III vor. Um den XRCC1-Ligase III-Komplex *in vitro* rekonstituieren zu können, wurde zunächst Ligase III als Protein mit C-terminaler Dekahistidinfusion in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert und schrittweise durch Isolation von *inclusion bodies*, Renaturierung und Chromatographie an Ni-NTA-Sepharose gereinigt (siehe 2.2.7.4.4). Der Erfolg der Renaturierung wurde durch den Nachweis der Adenylierungsaktivität der gereinigten Ligase III (siehe Abb. 2.2) überprüft.

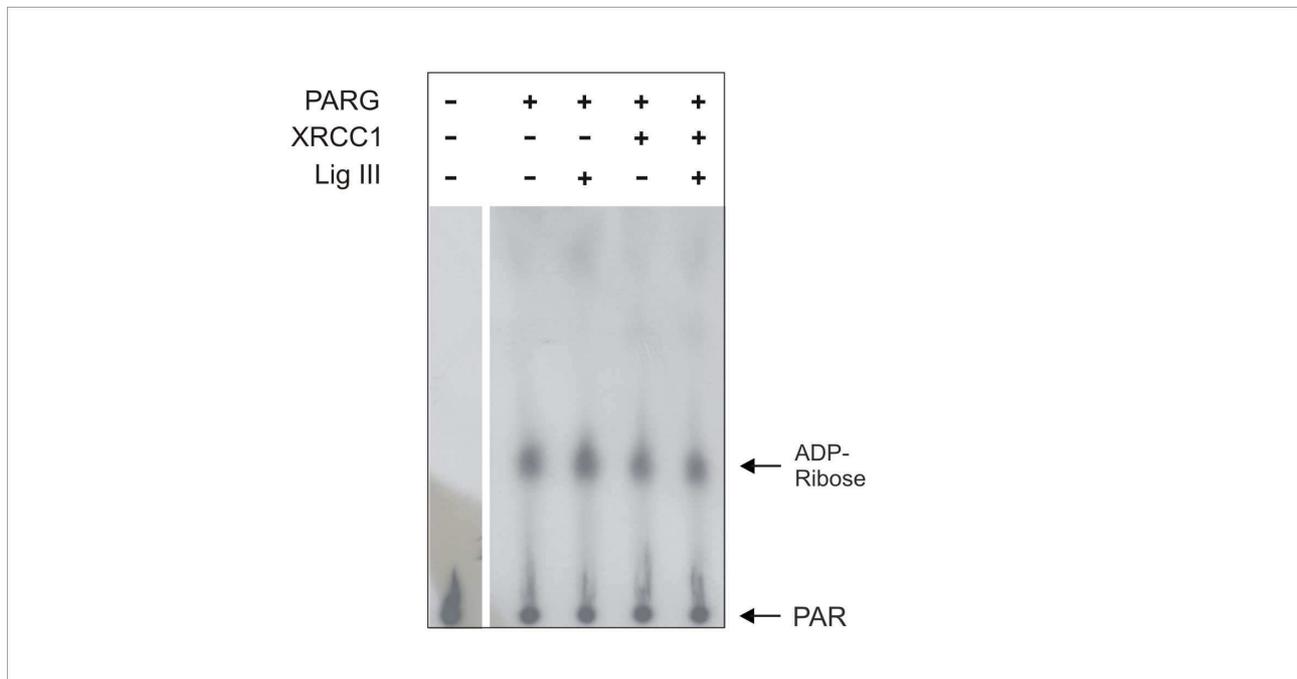
Um anschliessend den Einfluss von XRCC1 auf die PARP-1 Aktivität zu untersuchen, wurde gereinigte His-PARP-1 (Elutionsfraktionen der Hydroxyapatitsäule, siehe Abb. 3.5) in Gegenwart von sonifizierter DNA jeweils mit rekombinantem His-XRCC1 oder His-Ligase III bzw. dem rekonstituierten XRCC1-Ligase III-Komplex im Überschuss inkubiert und der Einbau von  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ADP-Ribose}$  aus  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$  in PAR anschliessend durch Cerenkov-Zählung quantifiziert. Durch die Zugabe von XRCC1 wurde erstaunlicherweise nicht die erwartete Aktivierung, sondern vielmehr eine deutliche Hemmung der Poly (ADP-Ribosyl)ierung beobachtet (siehe Abb. 3.30). In Anwesenheit von Ligase III wurde ebenfalls eine Hemmung der PARP-1-Aktivität gemessen (siehe Abb. 3.30). Dies ist möglicherweise auf eine Kompetition um das Substrat sonifizierte DNA zurückzuführen.



**Abb. 3.30: XRCC1 beeinflusst die Aktivität von rekombinant exprimierter PARP-1.**

50 nM His-PARP-1 wurde in PARG-Puffer (-MgCl<sub>2</sub>) mit 400 nM His-XRCC1 bzw. 100 nM His-Ligase III sowie sonifizierter DNA und 10  $\mu\text{M}$   $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$  inkubiert. Nach 20 min wurden Proteine und gebildete PAR mit TCA gefällt. Die Menge an  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ADP-Ribose}$  in der säureunlöslichen Fraktion wurde quantifiziert und die Menge inkorporierter ADP-Ribose aus dem prozentualen Einbau des  $^{32}\text{P}$ -markierten  $\text{NAD}^+$  bestimmt.

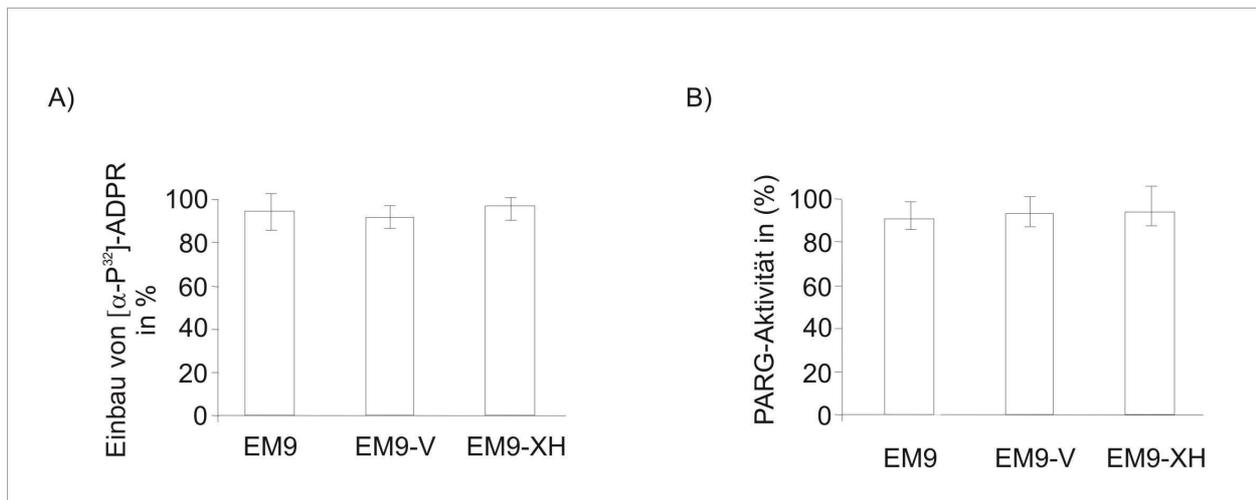
In einem weiteren Experiment wurde ein möglicher Einfluss von XRCC1 und Ligase III auf die Aktivität der PARG untersucht. Dafür wurde rekombinante PARG (GST-PARG<sub>65</sub>) mit His-XRCC1 und/oder His-Ligase III inkubiert und der Abbau von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-PAR verfolgt. Anhand der Quantifizierung der gebildeten [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ADP-Ribose ergaben sich keine Hinweise auf einen regulatorischen Einfluss von XRCC1 und Ligase III auf die Aktivität der PARG (siehe Abb. 3.31).



**Abb. 3.31: Die katalytische Aktivität von rekombinant exprimierter PARG wird durch XRCC1 nicht direkt beeinflusst.**

50 nM GST-PARG<sub>65</sub> wurde in PARG-Puffer (-MgCl<sub>2</sub>) mit 400 nM His-XRCC1 bzw. 100 nM His-Ligase III sowie radioaktiv markierter deproteinierter [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-PAR inkubiert. Nach 20 min wurden Proteine und Nukleotide mit Aceton gefällt und mittels DÜNNESCHICHTCHROMATOGRAPHIE separiert. Dargestellt ist das Autoradiogramm der separierten Nukleotide. Die Position von PAR und ADP-Ribose ist gekennzeichnet.

Um den Einfluss von XRCC1 auf die Aktivitäten von PARP-1 und PARG unter zellulären Bedingungen zu analysieren, wurden Kernextrakte aus den vier Hamsterzelllinien AA8, EM9, EM9-V und EM9-XH präpariert. Anschliessend erfolgte sowohl die Bestimmung der PARG-Aktivität als auch der Gesamt-Poly (ADP-Ribosyl)ierungsaktivität in diesen Extrakten. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich beider Aktivitäten in allen vier Hamsterzelllinien (siehe Abb. 3.32 A und B). Eine von Ikejima *et al.* (1984) zuvor publizierten Studie hatte bereits darauf hingewiesen, dass sich die CHO AA8 und EM9 Zellen sowohl im zellulären Gehalt von NAD<sup>+</sup> als auch der Gesamt-Poly (ADP-Ribosyl)ierungsaktivität nicht unterscheiden.

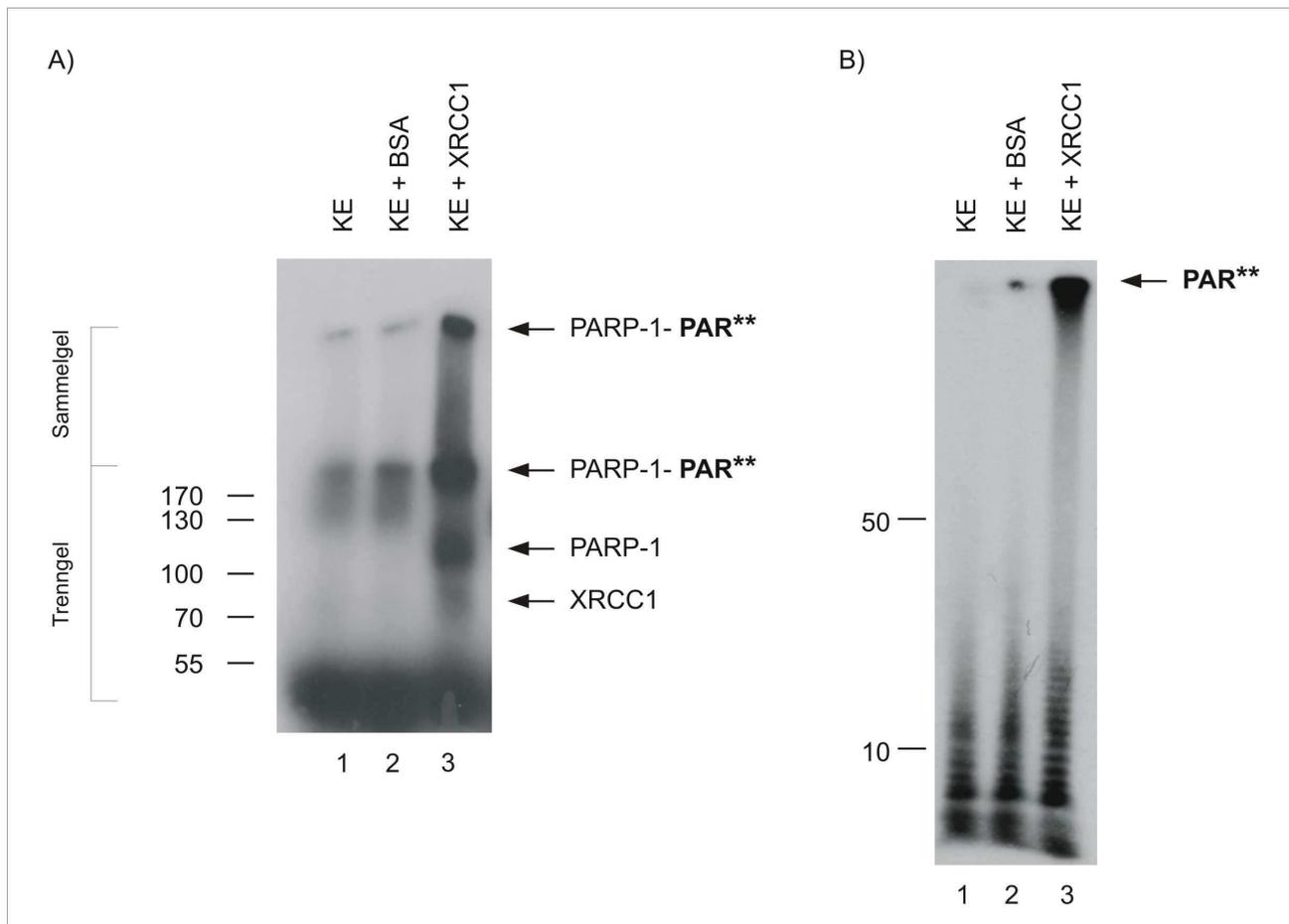


**Abb. 3.32: Der Gesamt Poly (ADP-Ribose) Metabolismus ist unverändert in EM9-Zellen.**

10  $\mu\text{g}$  Kernextrakte von AA8, EM9, EM9-XH und EM9-V- Zellen (präpariert nach 2.2.7.3.2) wurden für 20 min in PARG-Puffer (- $\text{MgCl}_2$ ) mit **A:** sonifizierter DNA und 10  $\mu\text{M}$   $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$  inkubiert und die Menge inkorporierter ADP-Ribose aus dem prozentualen Einbau des  $^{32}\text{P}$ -markierten  $\text{NAD}^+$  bestimmt **B:** radioaktiv markierter deproteinierter  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-PAR}$  inkubiert und die Menge gebildeter  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ADP-Ribose}$  quantifiziert. Die relativen Aktivitäten wurden in % zur Aktivität in Kernextrakten der XRCC1-Wildtyp Hamsterzelllinie AA8 angegeben.

### 3.4.8 Eine Rekrutierung von XRCC1 an den Ort der DNA-Schädigung führt zu einer vermehrten Bildung von Poly (ADP-Ribose)

Es ist bekannt, dass infolge einer genotoxischen Behandlung entstandene DNA-Einzelstrangbrüche zu einer Rekrutierung von XRCC1 an den Schadensort *in vivo* führen, um den Reparaturvorgang einzuleiten (siehe Abb. 1.9, Okano *et al.*, 2003). Diese Rekrutierung von XRCC1 ist streng an eine initiale Synthese von PAR gebunden. Im Vergleich zu PARP-1 ist die Menge an XRCC1 in der Zelle geringer (Leppard *et al.*, 2003). Daher kann vermutet werden, dass durch eine gezielte Rekrutierung von XRCC1 an den Ort des DNA-Schadens, vermittelt durch automodifizierte PARP-1, die Konzentration von XRCC1 lokal erhöht wird, um die Reparatureffizienz zu erhöhen. Um diese Rekrutierung *in vitro* nachzuahmen, wurden Kernextrakte von XRCC1-negativen EM9-Zellen präpariert und mit rekombinantem His-XRCC1 im Überschuss in Gegenwart von sonifizierter DNA und  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$  inkubiert. Die Menge gebildeter  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-PAR}$  wurden nach einer Auftrennung im SDS-PAG durch Autoradiographie bestimmt (siehe 2.2.7.11.3). In EM9-Kernextrakten bzw. Extrakten supplementiert mit BSA wurden unter diesen Bedingungen nur wenige Proteine durch PAR modifiziert (siehe Abb. 3.33 A Spur 2). Eine genauere Analyse der isolierten PAR-Polymere nach Separierung im Acrylamidgel ergab eine Kettenlänge zwischen 1-50 (ADP-Ribose)-Einheiten (siehe Abb. 3.33 B Spur 2). Wurde den Kernextrakten His-XRCC1 im Überschuss zugefügt, führte dies zu einer extremen Steigerung der Polymersynthese. Die Analyse im SDS-PAG zeigte eine deutliche Zunahme, von  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-PAR}$ -markierten Proteinen zwischen 130 und 170 kDa. Desweiteren wurden radioaktiv markierte Proteine detektiert, die aufgrund ihrer hochmolekularen PAR-Modifizierung im Sammelgel verblieben (siehe

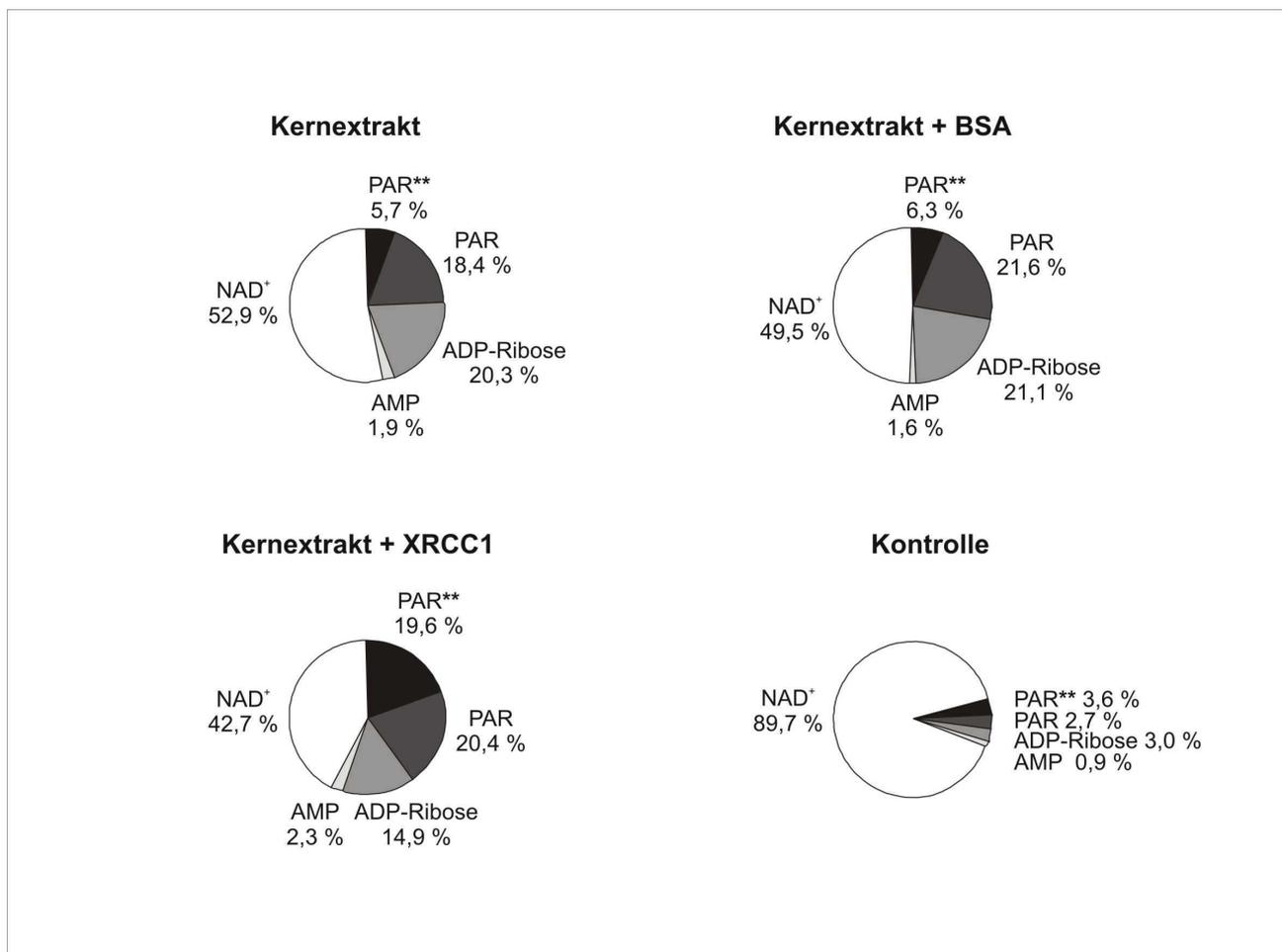


**Abb. 3.33: Supplementierung von EM9-Kernextrakten mit rekombinantem XRCC1 führt zu einer erhöhten Synthese von Poly (ADP-Ribose)**

10 µg Kernextrakte von EM9-Zellen (präpariert nach 2.2.7.3.2) wurden in PARG-Puffer (-MgCl<sub>2</sub>) mit 1 µg His-XRCC1 (in Proteinpuffer -MgCl<sub>2</sub>), BSA oder Proteinpuffer (-MgCl<sub>2</sub>) sowie sonifizierter DNA und 10 µM [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-NAD<sup>+</sup> für 20 min bei 30°C inkubiert. **A:** Proteine und Nukleotide wurden einer SDS-PAGE (8 %) unterzogen und die eingebaute Radioaktivität in Form von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-PAR durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Positionen von PARP-1, PARP-1 mit höhermolekularen PAR-Modifikationen (PARP-1-PAR<sup>\*\*</sup>) und XRCC1 sind gekennzeichnet. **B:** Nach Ablauf der Reaktion wurden [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-markierte PAR Polymere isoliert und in einem PAG (8 %) aufgetrennt. Die Anzahl der ADP-Riboseeinheiten pro Kette (10 und 50) sowie die Position der hochmolekularen PAR-Polymere (PAR<sup>\*\*</sup>) ist gekennzeichnet.

Abb. 3.33 A Spur 3). Die Auftrennung aller, in Anwesenheit von XRCC1 gebildeten PAR-Polymere im Acrylamidgel ergab sowohl eine vermehrte Bildung von Ketten mit 1-50 (ADP-Ribose)-Einheiten, als auch das Auftreten von deutlich höhermolekularen/verzweigten Polymeren (PAR<sup>\*\*</sup>) (siehe Abb. 3.33 B Spur 3). Es stellte sich nunmehr die Frage, worauf die vermehrte PAR-Synthese in diesem Experiment zurückzuführen war: auf eine Hemmung der PARG oder auf eine aktivierende Wirkung von XRCC1 auf PARP-1. Um das zu klären, wurden erneut EM9-Kernextrakte, supplementiert mit BSA oder His-XRCC1, in Gegenwart von sonifizierter DNA und [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-NAD<sup>+</sup> inkubiert. Nach Ablauf der Reaktion wurden die Proteine, das eingesetzte [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-NAD<sup>+</sup> und alle [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-markierten Metabolite durch Zugabe von Aceton gefällt und in TE gelöst. Die Fraktion der hochmolekularen/verzweigt-kettigen, in TE-unlöslichen [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-PAR-Polymere wurde als PAR<sup>\*\*</sup> definiert und durch Cerenkov-Messung quantifiziert. Die löslichen [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-markierten Metabolite konnten mittels Dünnschichtchromatographie

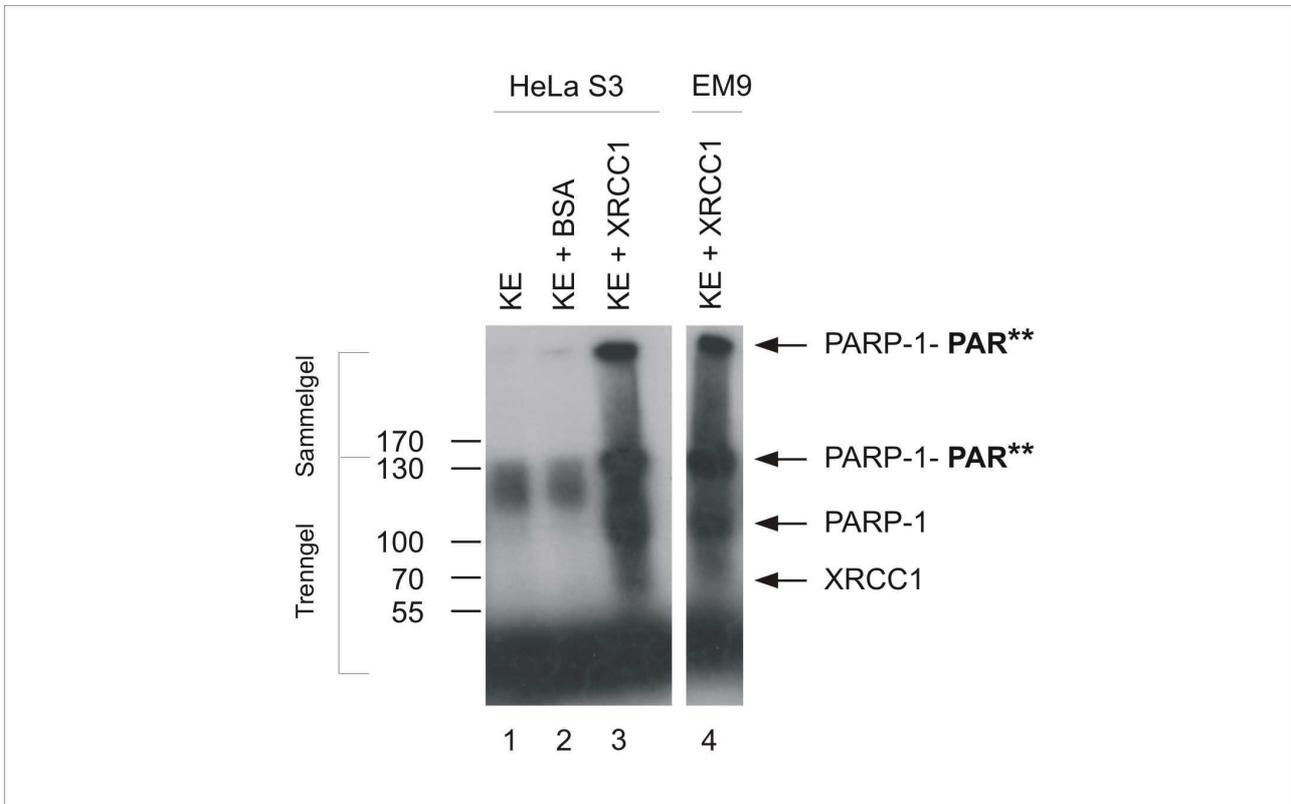
separiert und anschliessend ebenfalls durch Cerenkov-Messung quantifiziert werden. Die Auswertung des gesamten PAR-Metabolismus ergab eine vermehrte Akkumulation von hochmolekularen/verzweigt-kettigen  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-PAR}$ -Polymeren (PAR<sup>\*\*</sup>) sowie eine deutlich verringerte Bildung von  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ADP-Ribose}$  (65 %) in Anwesenheit von XRCC1 (siehe Abb. 3.34). Daher konnte die vermehrte PAR-Bildung in Anwesenheit von XRCC1 zumindest teilweise auf eine Hemmung der PARG zurückgeführt werden. Jedoch musste XRCC1 auch direkt die Synthese von PAR stimuliert haben, da in Anwesenheit von XRCC1 deutlich grössere Mengen an  $\text{NAD}^+$  (Substrat von PARP-1) umgesetzt wurden (20 %, siehe Abb. 3.34).



**Abb. 3.34: Analyse des Poly (ADP-Ribose) Metabolismus in EM9-Kernextrakten nach Supplementierung mit rekombinantem XRCC1**

10  $\mu\text{g}$  Kernextrakte von EM9-Zellen (präpariert nach 2.2.7.3.2) wurden in PARG-Puffer (- $\text{MgCl}_2$ ) mit 1  $\mu\text{g}$  His-XRCC1 (in Proteinpuffer - $\text{MgCl}_2$ ), BSA oder Proteinpuffer (- $\text{MgCl}_2$ ) sowie sonifizierter DNA und 10  $\mu\text{M}$   $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$  für 20 min bei 30°C inkubiert. Proteine und Nukleotide wurden mit Aceton gefällt und in TE gelöst. Die Menge ungelöster proteingebundener, hochmolekularer  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-PAR}$  (PAR<sup>\*\*</sup>) wurde mittels Cerenkov-Messung bestimmt. Lösliche  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-Metabolite}$  wurden mittels DÜNN-SCHICHTCHROMATOGRAPHIE separiert und die Signale von  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-PAR}$  (PAR), -ADP-Ribose, -AMP und - $\text{NAD}^+$  quantifiziert.

Die vermehrte Synthese von  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-PAR}$  in Gegenwart von überschüssigem XRCC1 wurde auch beobachtet, wenn in einem *in vitro* Rekrutierungsexperiment Kernextrakte von HeLa- S3 Zellen eingesetzt wurden (siehe Abb. 3.35, vgl Spur 2, 3 und 4).



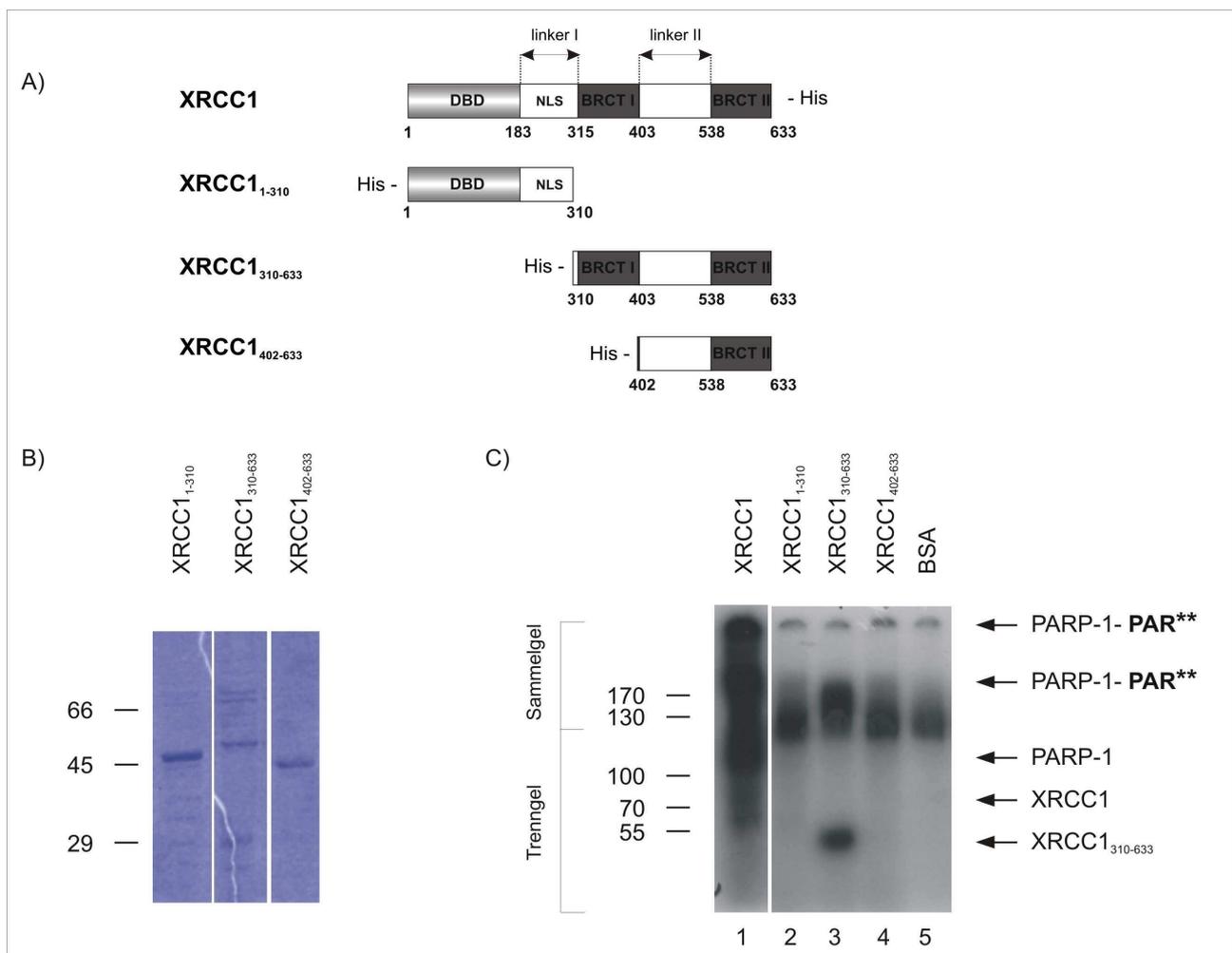
**Abb. 3.35: Supplementierung von HeLa S3-Kernextrakten mit rekombinantem XRCC1 führt ebenfalls zu einer erhöhten Synthese von Poly (ADP-Ribose)**

Kernextrakte von HeLa S3- (5  $\mu\text{g}$ ) bzw. EM9-Zellen (10  $\mu\text{g}$ ) (präpariert nach 2.2.7.3.2) wurden in PARG-Puffer (-MgCl<sub>2</sub>) mit 1  $\mu\text{g}$  His-XRCC1 (in Proteinpuffer -MgCl<sub>2</sub>), BSA oder Proteinpuffer (-MgCl<sub>2</sub>) sowie sonifizierter DNA und 10  $\mu\text{M}$   $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$  für 20 min bei 30°C inkubiert. Proteine und Nukleotide wurden einer SDS-PAGE (10 %) unterzogen und die eingebaute Radioaktivität in Form von  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-PAR}$  durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Positionen der PARP-1, PARP-1 mit höhermolekularen PAR-Modifikationen (PARP-1-PAR<sup>\*\*</sup>) und XRCC1 sind gekennzeichnet.

Die Experimente in den Kapiteln 3.4.5 bis 3.4.8 haben eindeutig bewiesen, dass infolge einer Rekrutierung, oder durch Supplementierung von XRCC1, eine deutlich vermehrte PAR-Synthese erfolgt. Die Ergebnisse von Abb. 3.28 bis Abb. 3.32 zeigen, dass XRCC1 weder einen Effekt auf die Stabilität noch die katalytische Aktivität von PARP-1 oder PARG ausübt. Eine mögliche alternative Erklärung könnte sein, dass XRCC1 indirekt einen Einfluss auf den PAR-Metabolismus ausübt: zum einen, indem eine Bindung von PARG an das Substrat PAR unterbunden wird. Andererseits wäre auch eine Verdrängung von Proteinen, welche die PAR-Synthese inhibieren (z. B. PARG, siehe 3.3.7,) denkbar.

### 3.4.9 Ein C-terminales Fragment von XRCC1 induziert die vermehrte Poly (ADP-Ribosyl)ierung

Im Folgenden sollte der Proteinabschnitt von XRCC1 näher eingegrenzt werden, der für die vermehrte PAR-Bildung in Kernextrakten hinreichend ist. Dafür wurden Deletionsmutanten unter Verwendung des pET100/D-TOPO-Vektorsystem kloniert. Abb. 3.36 A zeigt die benutzten Konstrukte schematisch. XRCC1<sub>1-310</sub> beinhaltet den gesamten N-Terminus von XRCC1 bis zur BRCT-Domäne I, XRCC1<sub>310-633</sub> umfasst die BRCT I-Domäne (mit dem PAR-Bindemotiv, siehe Abb. 1.12), dem linker II sowie die zweite BRCT-Domäne. XRCC1<sub>402-633</sub> kodiert den C-Terminus beginnend ab Aminosäure 402.



**Abb. 3.36: Analyse von XRCC1-Deletionsproteinen hinsichtlich ihrer PAR-Induktionsfähigkeit in EM9-Kernextrakten**

**A:** Schematische Darstellung der XRCC1-Deletionsmutanten **B:** Proben der gereinigten XRCC1-Deletionsmutanten wurden in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. **C:** 10 µg Kernextrakte von EM9-Zellen (präpariert nach 2.2.7.3.2) wurden in PARG-Puffer (-MgCl<sub>2</sub>) mit 1 µg BSA, His-XRCC1 bzw. den jeweiligen XRCC1-Deletionsproteinen sowie sonifizierter DNA und 10 µM [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-NAD<sup>+</sup> für 20 min bei 30°C inkubiert. Proteine und Nukleotide wurden einer SDS-PAGE (10 %) unterzogen und die inkooperierte Radioaktivität in Form von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-PAR durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Positionen der PARP-1, PARP-1 mit höhermolekularen PAR-Modifikationen (PARP-1-PAR<sup>\*\*</sup>) und XRCC1/XRCC1<sub>310-633</sub> sind gekennzeichnet.

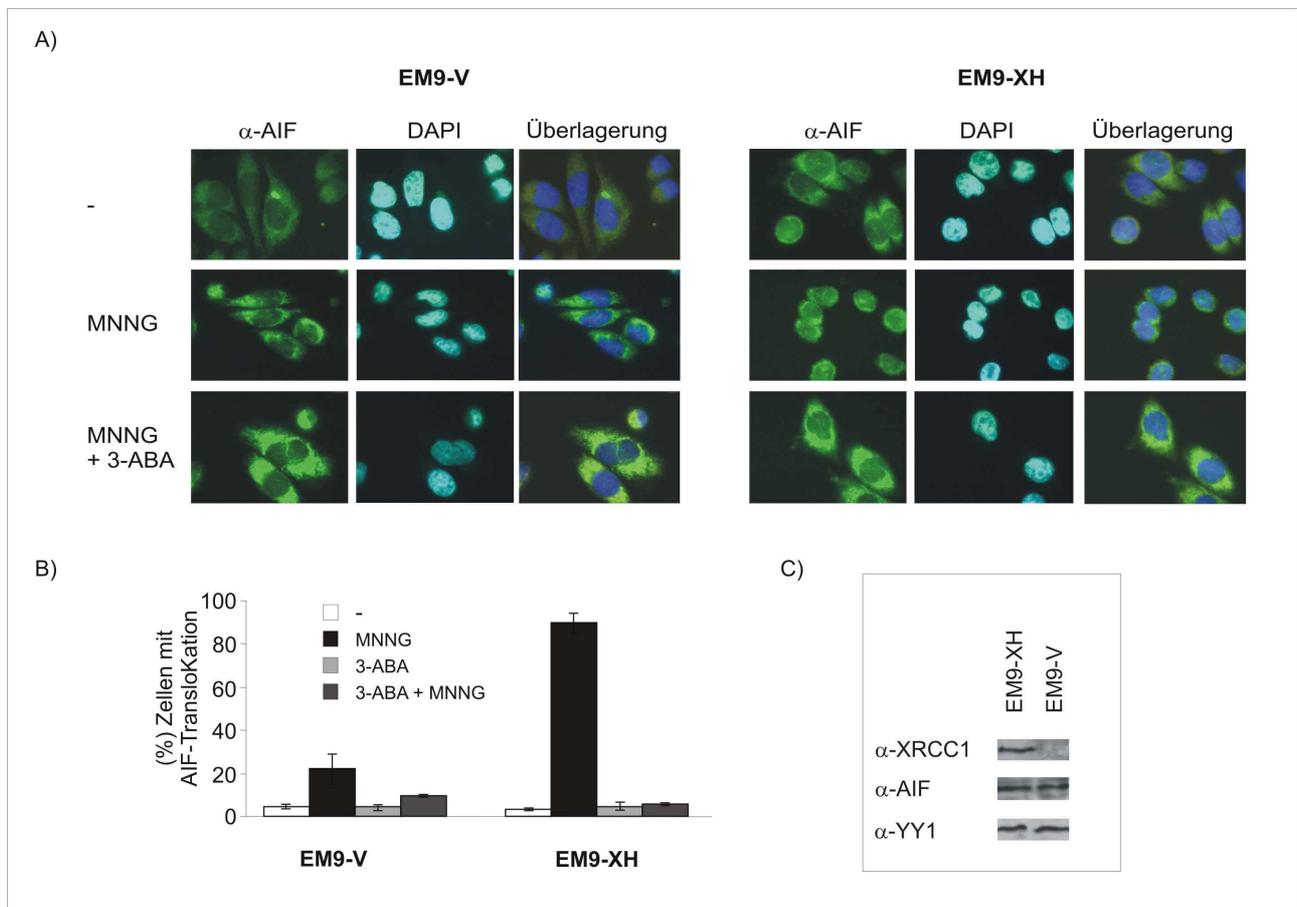
Die resultierenden Plasmide wurden in *E. coli* BL21 Star™ (DE3) transformiert, die drei Deletionsmutanten als Proteine mit N-terminaler Poly-Histidininfusion exprimiert und mittels Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Sepharose gereinigt (siehe Abb. 3.36 B). Anschliessend wurden Kernextrakte von XRCC1-negativen EM9-Zellen mit rekombinanten His-XRCC1 bzw. den einzelnen XRCC1-Deletionsmutanten in Gegenwart von sonifizierter DNA und [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-NAD<sup>+</sup> inkubiert. Die Menge gebildeter [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-PAR wurde nach einer Auftrennung im SDS-PAG durch Autoradiographie bestimmt. Wie bereits zuvor gezeigt (siehe Abb. 3.33), führte die Zugabe von XRCC1 zu einer vermehrten Bildung von hochmolekularer PAR (siehe Abb. 3.36 C Spur 1). Erfolgte das *in vitro* Rekrutierungsexperiment in Gegenwart der einzelnen Deletionsproteine, so ergab sich kein verändertes Poly (ADP-Ribosyl)ierungsmuster für XRCC1<sub>1-310</sub> im Vergleich zu BSA (siehe Abb. 3.36 C Spur 2). Wurde die Deletionsmutante XRCC1<sub>310-633</sub> eingesetzt, war eine deutliche Zunahme von höhermolekularen PAR-modifizierten Proteinen zu detektieren (siehe Abb. 3.36 C Spur 3). Desweiteren wurde, vergleichbar zum Gesamtprotein XRCC1, eine signifikante Heteromodifikation von XRCC1<sub>310-633</sub> beobachtet (siehe Abb. 3.36 C Spur 1 und 3). Eine Zugabe des um die BRCT I-Domäne verkürzten Proteins XRCC1<sub>402-633</sub> führte nicht zur Steigerung der PAR-Synthese (siehe Abb. 3.36 C Spur 4). Obwohl mit XRCC1<sub>310-633</sub> nicht eine zum Gesamtprotein XRCC1 vergleichbare Stimulierung der PAR-Synthese erzielt wurde, konnte davon ausgegangen werden, dass dieser Proteinbereich hinreichend für diese Funktion ist. Desweiteren erlaubte dieses Experiment indirekt den Schluss, dass die Interaktion von XRCC1 mit der PARG wahrscheinlich innerhalb der Aminosäuren 310 bis 633 erfolgt.

### **3.5 Die XRCC1-abhängige Akkumulation von Poly (ADP-Ribose) induziert eine Caspase-unabhängige Apoptose**

#### **3.5.1 Die XRCC1-abhängige PAR-Akkumulation fördert die Translokation des proapoptotischen Proteins AIF und die Chromatinolyse des Zellkerns**

Die in den Kapiteln 3.4.5 bis 3.4.8 dargestellten Ergebnisse hatten die Relevanz von XRCC1 für den PAR-Metabolismus gezeigt. Von Yu *et al.* (2002) wurde gezeigt, dass in HeLa- Zellen nach Behandlung mit dem alkylierenden Agens MNNG PAR akkumuliert. Dies führt unmittelbar zur Induktion des Zelltodes vermittelt durch die Translokation des proapoptotische Protein AIF und der Chromatinolyse des Zellkerns (*nuclear shrinkage*). Es stellte sich daher die Frage, ob die XRCC1-defizienten und XRCC1-komplementierten CHO-Zellen aufgrund ihrer verschiedenen PAR-Bildung (siehe Abb. 3.26 und Abb. 3.27) Unterschiede hinsichtlich der Induktion des AIF-vermittelten Zelltodes aufweisen. Um das zu analysieren, wurden EM9-V- und EM9-XH Zellen zur Induktion der PAR-Synthese mit einer für beide Linien letalen Dosis von 500  $\mu$ M MNNG behandelt. Nach 3 h wurden die

Zellen fixiert und durch Immunfluoreszenz die Lokalisierung von AIF nachgewiesen. Während in Apoptose-negativen Zellen AIF in den Mitochondrien lokalisiert ist, kann das Protein in apoptotischen Zellen im Zellkern nachgewiesen werden (Susin *et al.*, 2000). Ein Vergleich des Gehalts an AIF in Gesamtzellextrakten mittels Western-Blot ergab keinen Unterschied zwischen den beiden CHO-Linien (siehe Abb. 3.37 C). Während AIF jedoch in 90 % der EM9-XH- Zellen 3 h nach genotoxischer Schädigung im Zellkern detektiert wurde, erfolgte die Translokation nur in 10 % der EM9-V- Zellen (siehe Abb. 3.37 A und B). Eine MNNG-Behandlung der EM9-XH- Zellen in Anwesenheit des PARP Inhibitors 3-ABA, unterband die AIF-Translokation (siehe Abb. 3.37 A und B). Dies bedeutet, dass die AIF-Translokation an eine Synthese von PAR gekoppelt war, also PARP-abhängig erfolgte.

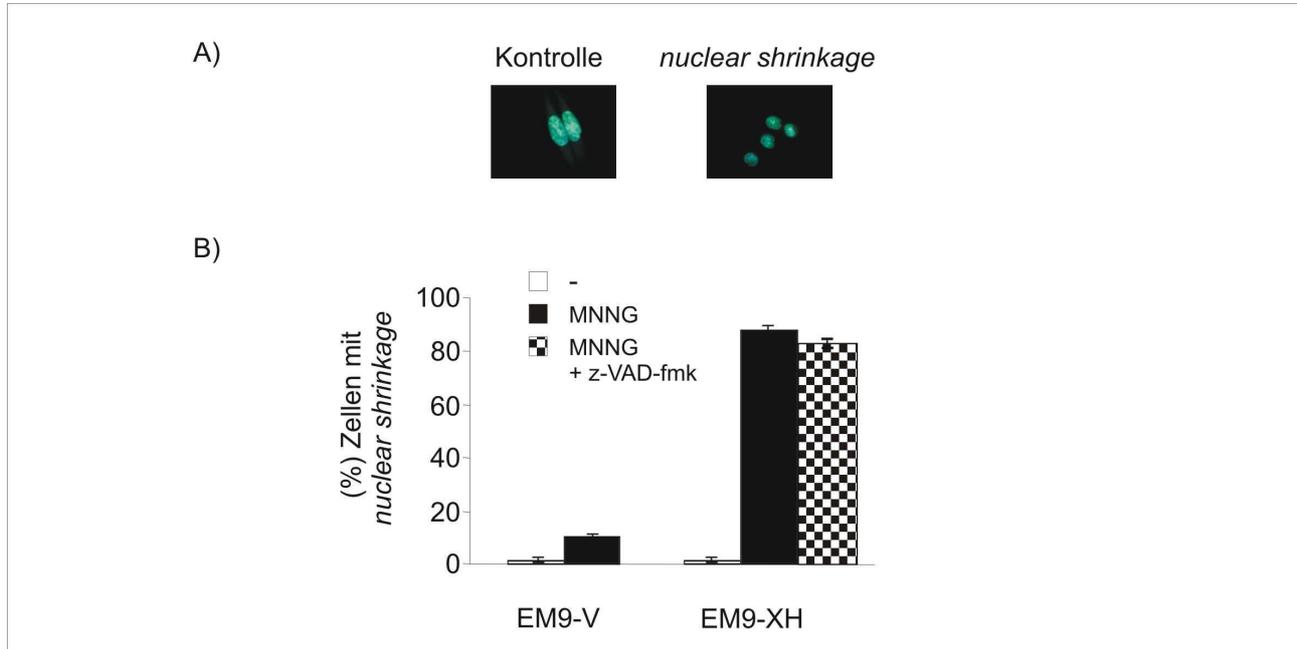


### Abb. 3.37: Die XRCC1-abhängige Akkumulation von PAR fördert die Translokation von AIF

EM9-V- und EM9-XH- Zellen wurden für 10 min in HBS (-) bzw. 500  $\mu$ M MNNG inkubiert. Gegebenenfalls wurde 3-ABA (2 mM) zugefügt. Anschliessend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in frischem Medium inkubiert.

**A:** 3 h nach der Schädigung wurden die Zellen fixiert ((Formaldehyd/Triton) und eine Immunfluoreszenz mit dem Antikörper  $\alpha$ -AIF (H-300) durchgeführt. Im Anschluss an die Inkubation mit dem sekundären Antikörper  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Alexa 488 erfolgte eine DAPI-Färbung. **B:** Die Immunfluoreszenz aus A wurde quantifiziert. Zellen, in denen die AIF-Fluoreszenz nicht mehr im Mitochondrium sondern in/um den Zellkern zu beobachten war, wurden mit „AIF-Translokation-positiv“ bewertet. Pro Versuch wurden jeweils 300 Zellen ausgezählt. Die im Diagramm dargestellten Werte repräsentieren das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten. **C:** Die Expression von XRCC1, AIF und YY1 in den EM9-XH- und EM9-V- Zellen wurde durch Immundetektion mit den Antikörpern  $\alpha$ -XRCC1 (H-300),  $\alpha$ -AIF (H-300) und  $\alpha$ -YY1 (C-20) untersucht.

Gleichermassen wurde 6 h nach der MNNG-Behandlung in über 80 % der EM9-XH- Zellen eine deutliche Verkleinerung (*nuclear shrinkage*), jedoch keine komplette Kondensation des Zellkerns beobachtet (siehe Abb. 3.38, vgl auch Abb. 1.13). Die caspase-abhängige Apoptose unter Beteiligung der caspase-aktivierten DNase CAD führt terminal zu einer vollständigen Fragmentierung der DNA mit anschließender Chromatinkondensation. Dieser Zelltod kann jedoch nur bei genügend hohen ATP-Konzentrationen ausgelöst werden (siehe Abb. 1.14). Da die durch MNNG-induzierte, vermehrte PAR-Synthese mit einem rapiden Absinken des zellulären Energiegehalts einhergeht (siehe auch Kapitel 3.5.3), war die caspase-abhängige Apoptose auf diesem Weg nicht möglich. Stattdessen erfolgte in EM9-XH- Zellen die Initiation der AIF-vermittelten Apoptose mit partieller Chromatinolyse des Zellkerns (Abb. 1.13). In den EM9-V- Zellen erfolgte das *nuclear shrinkage* nur in jeder zehnten Zelle nach der MNNG-Behandlung (siehe Abb. 3.38). Wurde die parentale Linie CHO AA8 (XRCC1<sub>Hamster</sub>-positiv) eingesetzt, so ergaben sich hinsichtlich der Chromatinolyse des Zellkerns zu EM9-XH- Zellen vergleichbare apoptotische Eigenschaften (Daten nicht gezeigt). Die Zugabe des Pancaspaseinhibitors z-VAD(OMe)-fmk (Inhibitor sowohl der Initiator- als auch Effektorcaspasen) während der genotoxischen Schädigung von EM9-XH- Zellen konnte die Chromatinolyse des Zellkerns nicht unterbinden (siehe Abb. 3.38). Dies weist darauf hin, dass die durch MNNG hervorgerufene Induktion der Apoptose in EM9-XH- Zellen unabhängig von der Aktivität von Caspasen erfolgt.



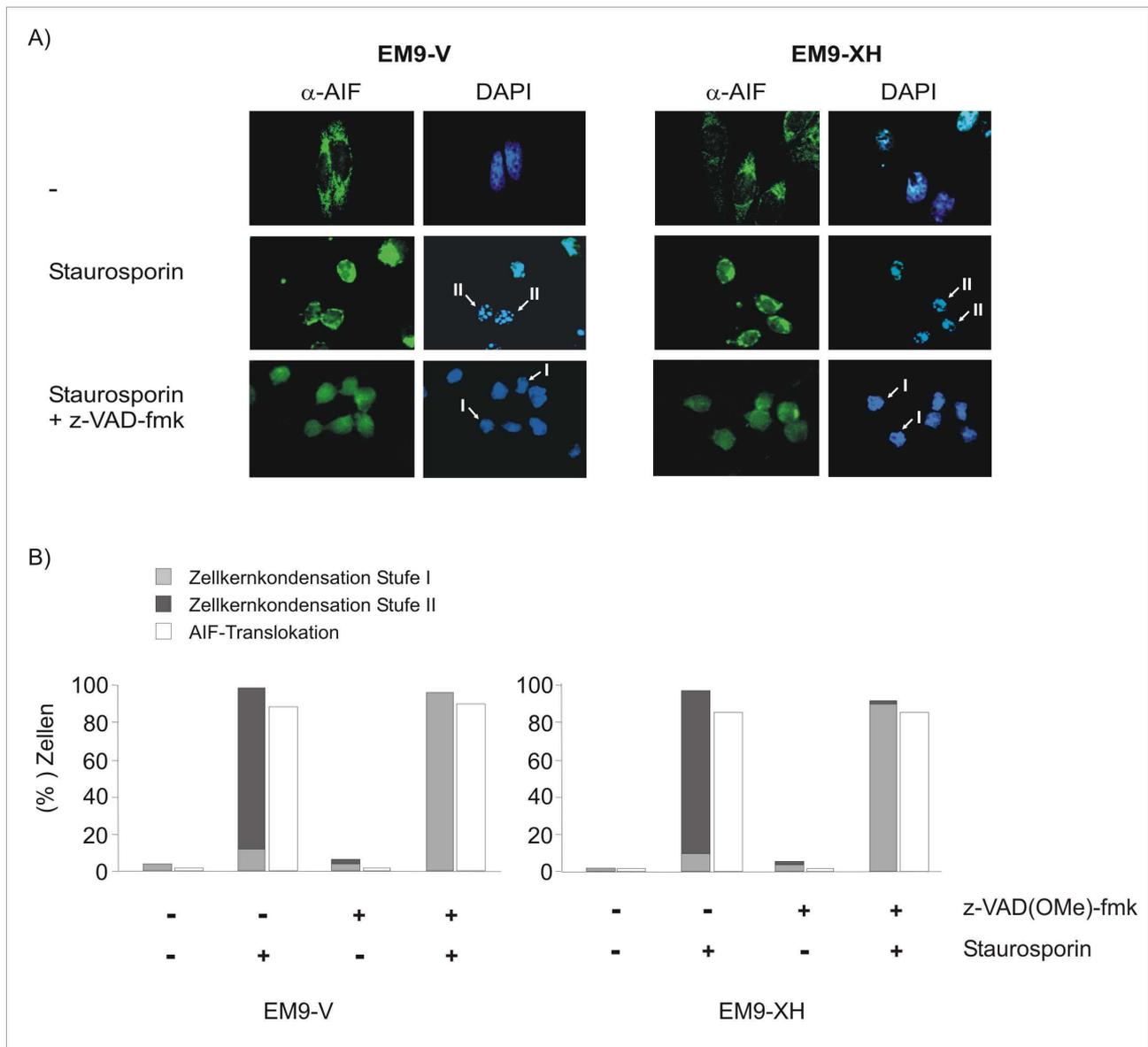
**Abb. 3.38: Die XRCC1-abhängige Akkumulation von PAR führt zur Chromatinolyse des Zellkerns (*nuclear shrinkage*)**

EM9-V- und EM9-XH- Zellen wurden für 10 min in HBS (-) bzw. 500  $\mu$ M MNNG inkubiert. Gegebenenfalls wurde der Caspase-Inhibitor z-VAD(oMe)-fmk (100  $\mu$ M) zugefügt. Anschliessend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in frischem Medium inkubiert. Nach 6 h wurden die Zellen fixiert (Methanol/Aceton) und eine DAPI-Färbung durchgeführt. Zellen mit deutlicher Verkleinerung des Zellkerns wurden als „*nuclear shrinkage* positiv“ klassifiziert. **A:** Beispielhaft sind Zellkerne ohne (Kontrolle) und mit Chromatinolyse (*nuclear shrinkage*) dargestellt. **B:** Zur Quantifizierung wurden jeweils 300 Zellen hinsichtlich der definierten Veränderungen des Zellkerns ausgezählt. Die im Diagramm dargestellten Werte repräsentieren das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

### 3.5.2 Staurosporin induziert XRCC1-unabhängig die Apoptose in EM9-Zellen

In einem Kontrollexperiment sollte ausgeschlossen werden, dass die XRCC1-defizienten EM9-V-Zellen nicht generell unfähig sind, eine AIF-vermittelten Apoptose zu initiieren. Dafür wurden die EM9-V- und EM9- XH- Zellen mit Staurosporin behandelt. Staurosporin ist als ein vielseitiger Proteinkinase-Inhibitor und daher Apoptoseinduktor in zahlreichen Zellen beschrieben (Giuliano *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 2004). Obwohl der genaue Wirkmechanismus von Staurosporin als Induktor des Zelltodes noch nicht eindeutig geklärt wurde, spielen die Mitochondrien für die Vermittlung der Apoptose durch dieses Agens eine essentielle Rolle (Giuliano *et al.*, 2004). Eine zentrale Funktion in vielen bisher postulierten Modellen für die Wirkung von Staurosporin wird den antiapoptotischen Proteinen der bcl2-Familie (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>) zugeschrieben. Die Annahme besteht darin, dass eine durch Staurosporinbehandlung hervorgerufene unterbundene Phosphorylierung die Funktionalität dieser antiapoptotischen Proteine hemmt. Die daraus resultierende Dimerisierung von proapoptotischen bcl-2-Proteinen (Bax, Bak, t-Bid) in der äusseren mitochondrialen Membran hat die Permabilisierung dieser Membran und die Freisetzung von apoptotischen Effektormolekülen wie Cytochrom c und AIF zur Folge (Giuliano *et al.*, 2004). Im Zuge der anschliessenden Aktivierung von Caspasen (Caspase 9 im Apoptosom sowie Caspase 3, 6 und 7 als Effektorcaspasen) kann sowohl die Translokation von AIF in den Zellkern, als auch die Spaltung der DNA durch die caspase-aktivierte DNase (CAD) erfolgen. Dies äussert sich in der Formation der typischen apoptotischen Körperchen (*apoptotic bodies*) mit Zellkernkondensation der Stufe II (siehe Abb. 3.39 A). Wird die Aktivierung von CAD durch eine Hemmung von Caspasen unterbunden, so erfolgt lediglich eine initiale Zellkernkondensation (Stufe I, siehe Abb. 3.39 A) bedingt durch die Translokation von AIF und die Spaltung der DNA durch eine AIF-assoziierte DNase (siehe 3.5.1).

Wie schon zuvor gezeigt (siehe Abb. 3.37 A) wurde AIF sowohl in unbehandelten XRCC1-defizienten als auch positiven CHO-Zellen vornehmlich im Mitochondrium detektiert (siehe Abb. 3.39 A und B). Hingegen erfolgte die Translokation des Proteins in den Zellkern in über 80 % der EM9-V- und der EM9 -XH- Zellen nach Behandlung mit Staurosporin. Gleichzeitig wurde in allen diesen Zellen eine Formierung der *apoptotic bodies* und Kernkondensation der Stufe II beobachtet (siehe Abb. 3.39 A und B). Die Zugabe des Pancaspaseinhibitors z-VAD(OMe)-fmk während der Staurosporinbehandlung konnte eine vollständige Kondensation des Zellkerns unterbinden. Es hatte jedoch keinen negativen Einfluss auf die AIF-Translokation (siehe Abb. 3.39 A und B) und eine dadurch hervorgerufene Induktion der Apoptose. Damit wurde gezeigt, dass XRCC1 für die Vermittlung des Staurosporin-induzierten Zelltodes nicht von Bedeutung ist, jedoch eine essentielle Rolle in der Vermittlung der MNNG-induzierten caspase-unabhängige Apoptose übernimmt.



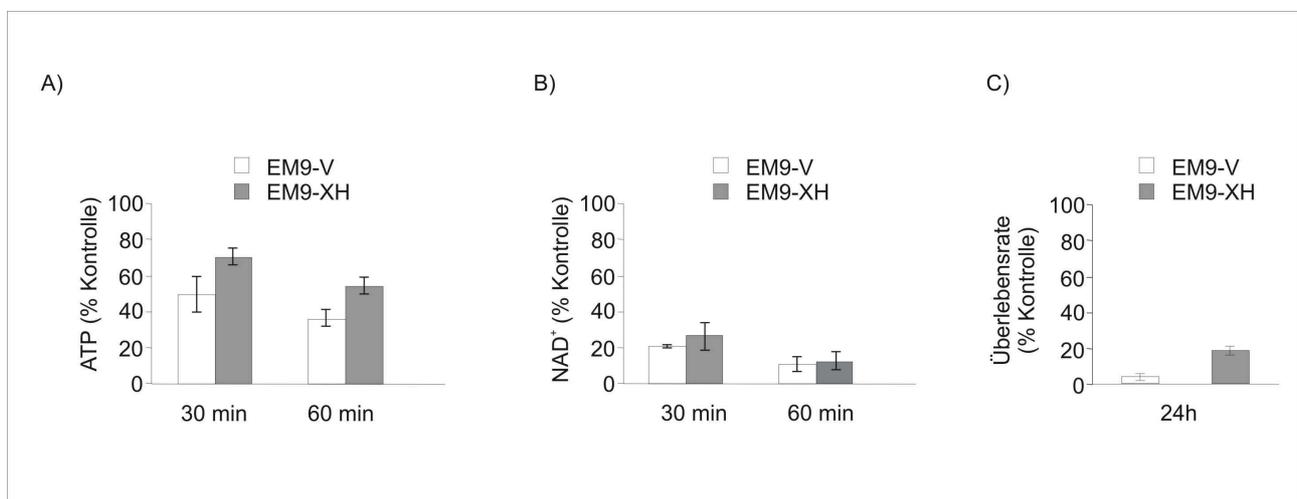
### Abb. 3.39: Staurosporin induziert XRCC1-unabhängig die Translokation von AIF und strukturelle Veränderungen des Zellkerns

EM9-V- und EM9-XH- Zellen wurden für 6 h in Medium mit 800 nM Staurosporin inkubiert. Gegebenenfalls wurde der Caspase-Inhibitor z-VAD(oMe)-fmk (100  $\mu$ M) zugefügt. Anschliessend wurden die Zellen fixiert (Formaldehyd/Triton) und eine Immunfluoreszenz mit dem Antikörper  $\alpha$ -AIF (H-300) durchgeführt. Nach der Inkubation des sekundären Antikörpers  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Alexa 488 erfolgte eine DAPI-Färbung. Beispielhaft wurden Zellkerne mit Kondensation der Stufe I bzw. II mit Pfeilen gekennzeichnet. **B:** Quantifizierung der Immunfluoreszenz aus A. Bestimmt wurden die Anzahl der Zellen mit AIF-Translokation (siehe Abb. 3.37) sowie die Anzahl der Zellkerne mit Kondensation Stufe I bzw. Stufe II. Die im Diagramm dargestellten Werte repräsentieren das Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten.

### 3.5.3 EM9-V- Zellen sterben nekrotisch nach MNNG-Behandlung

Werden Zellen mit dem alkylierenden Agens MNNG in den zuvor verwendeten Dosen von 500  $\mu$ M behandelt, so hat dies auf alle Fälle letale Konsequenzen für die Zelle. In den vorangegangenen Experimenten wurde in den MNNG-behandelten EM9-V- Zellen keine AIF-vermittelte Apoptose

beobachtet (siehe Abb. 3.37 A und B). Es stellte sich nun die Frage, wie diese Zellen stattdessen sterben. Im Zuge der Poly (ADP-Ribosyl)ierung wird als Substrat  $\text{NAD}^+$  verbraucht. Da für die Resynthese eines  $\text{NAD}^+$ -Moleküls 2-4 ATP benötigt werden, führt eine vermehrte PAR-Synthese zum rapiden Absinken des zellulären Energiegehalts. Entsprechend wurde sowohl in den EM9-XH- als auch den EM9-V Zellen eine deutliche Abnahme der zellulären  $\text{NAD}^+$ - und ATP-Konzentrationen nach MNNG-Behandlung gemessen. In beiden Hamsterzelllinien war 60 min nach Schädigung nur noch ca. 10 % des  $\text{NAD}^+$ s vorhanden, verglichen zu ungeschädigten Zellen (siehe Abb. 3.40 B). Ebenso sanken die ATP-Konzentrationen auf 54 % (EM9-XH) bzw. 36 % (EM9-V) innerhalb von 60 min nach MNNG-Behandlung (siehe Abb. 3.40 A). Folglich überlebten nur 5 % der EM9-V- bzw. 18 % der EM9-XH- Zellen diese Schädigung (siehe Abb. 3.40 C).

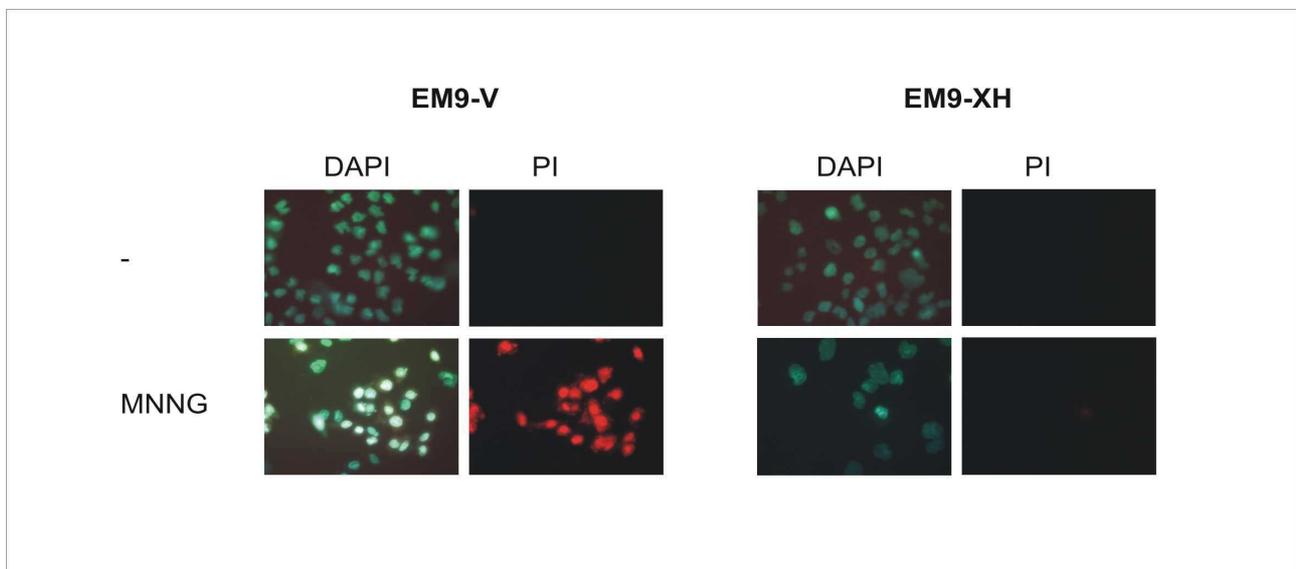


**Abb. 3.40: EM9-Zellen reduzieren den ATP- und  $\text{NAD}^+$ -Gehalt nach Schädigung mit MNNG**

EM9-V- und EM9-XH- Zellen wurden für 10 min mit HBS (Kontrolle) bzw. 500  $\mu\text{M}$  MNNG behandelt. Anschliessend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für **A:** 30 min bzw. 60 min in frischem Medium inkubiert. Danach erfolgte die Bestimmung des zellulären ATP und  $\text{NAD}^+$ -Gehaltes. **B:** 24 h in frischem Medium inkubiert. Danach erfolgte die Bestimmung der Überlebensrate.

Vorangegangene Arbeiten haben gezeigt, dass die Initialisierung der caspase-abhängigen Apoptose über den intrinsischen Weg (vermittelt durch den Caspase 9-Apaf1-Cytochromc-Komplex/Apoptosom) nur bei genügend hohen ATP-Konzentrationen (> 65 %) möglich ist (Eguchi *et al.*, 1999, Skulachev, 2006). Aufgrund der Limitierung von ATP- und  $\text{NAD}^+$  in den MNNG-behandelten EM9-XH- Zellen (Abb. 3.40 A), war ein apoptotischer Zelltod unter Beteiligung von Caspasen nicht möglich. Als Alternative wurde deshalb eine Form der caspase-unabhängige Apoptose vermittelt durch AIF-Translokation mit anschliessender Chromatinolyse (*nuclear shrinkage*) des Zellkerns initiiert (siehe Abb. 3.37 A und B). Die Experimente von Eguchi *et al.* (1999) und Leist *et al.* (1997) haben ausserdem gezeigt, dass ein stressbedingter Abfall der zelluläre ATP-Konzentration (unter 50 %) innerhalb der ersten 60 min sowohl die caspase-abhängig als auch die caspase-unabhängige Apoptose verhindert. Der niedrige ATP-

Spiegel (36 %, siehe Abb. 3.40 A) und die fehlende PAR-Synthese in den EM9-V- Zellen nach MNNG-Behandlung unterbanden damit den über die Aktivierung von Caspase 9-vermittelten intrinsischen Weg der Apoptose sowie auch den AIF-vermittelten caspase-unabhängigen Zelltod. Als Alternative wurde deshalb überprüft, ob die EM9-V- Zellen nekrotisch starben. Dazu wurden EM9- V- und EM9- XH Zellen nach MNNG-Behandlung im unfixierten Zustand mit DAPI und dem membranimpermeablen Farbstoff Propidiumjodid (PI) angefärbt. Nekrotische Zellen sind im Gegensatz zu apoptotischen Zellen aufgrund ihrer zerstörten Plasmamembran in der Lage diesen aufzunehmen und erscheinen unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einer intensiven Rotfärbung. Tatsächlich erwiesen sich die EM9-V- Zellen 13 h nach der Schädigung als Propidiumjodid-permeabel (siehe Abb. 3.41). Währenddessen wurden aufgrund des rascheren, AIF-vermittelten Zelltodes 13 h nach MNNG Schädigung kaum noch EM9-XH- Zellen detektiert. Diese zeigten jedoch keine Permeabilität für Propidiumjodid (siehe Abb. 3.41).



**Abb. 3.41: EM9-V- Zellen induzieren die Nekrose nach Schädigung mit MNNG**

EM9-V- und EM9-XH- Zellen wurden für 10 min mit HBS (-) bzw. 500  $\mu$ M MNNG behandelt. Anschliessend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in frischem Medium inkubiert. 13 h nach der Schädigung erfolgte der Nachweis auf Nekrose durch Doppelfärbung mittels Propidiumjodid (PI) und DAPI.

Aus den Ergebnissen von Kapitel 3.5.1 bis 3.5.3 kann zusammenfassend geschlussfolgert werden, dass die durch MNNG-Schädigung hervorgerufene Akkumulation von PAR in XRCC1-positiven Zellen eine AIF-vermittelte Apoptose initiiert. Die in Abwesenheit von XRCC1 verursachte Depletion von ATP und  $\text{NAD}^+$  resultiert in einem nekrotischen Zelltod für die EM9-V- Zellen.