

**Analyse der biologischen Funktionen der Gene
hUBC13 und *TRAF6* des Ubiquitinmetabolismus in
Säugerzellen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
an der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Vorgelegt von
Marita Angermeier

März 2008

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Eckardt-Schupp
2. Berichterstatter: PD Dr. A. Böttger

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Juli 2008

1	Einleitung	1
1.1	DNA-Schäden.....	1
1.2	DNA-Reparaturprozesse.....	2
1.2.1	Exzisionsreparaturmechanismen	3
1.2.2	DNA-Doppelstrangbruchreparatur: HR und NHEJ	4
1.3	Postreplikationsreparatur	5
1.3.1	Die <i>RAD6</i> -Gruppe im Organismus <i>S. cerevisiae</i>	5
1.3.2	Schadenstoleranz der Transläsionssynthese – TLS.....	6
1.3.3	Fehlerfreier Reparaturweg der PRR.....	7
1.4	RAD6-Gruppe im Menschen.....	8
1.4.1	hUbc13	8
1.4.2	TRAF6.....	10
1.4.3	Mechanismus des NFκB-Weges	11
1.5	TNF-Rezeptor	13
1.5.1	Mechanismus des TNFR1-Weges.....	14
1.5.2	Regulation des TNFR1-Weges.....	15
1.6	Apoptose.....	17
1.6.1	Caspasen.....	17
1.6.2	Mitochondrien-Weg	18
1.6.3	Todesrezeptor-Weg	19
1.6.4	Regulation der Apoptose.....	19
1.7	Zielsetzung	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Material.....	22
2.1.1	Abkürzungen	22
2.1.2	Geräte, Membranen und Filme.....	24
2.1.3	Computerprogramme	25
2.1.4	Chemikalien	26
2.1.5	Antikörper, Inhibitoren.....	27
2.1.6	Kits, Substrate	28
2.1.7	Längenstandard	28
2.1.8	Lösungen und Puffer	28
2.1.9	Säugerzelllinien und Zellkulturmedien	33
2.1.10	Chemisch synthetisierte siRNAs.....	34
2.1.11	Oligonukleotide zur PCR	34
2.1.12	Vektoren.....	35
2.1.12.1	pDSon-Neo	35
2.1.12.2	Mutationsvektoren.....	36
2.2	Methoden.....	37
2.2.1	Mikrobiologische Methoden	37
2.2.1.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen zur Transformation	37
2.2.1.2	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mittels Hitzeschock	37
2.2.1.3	Anlegen von Gefrierkulturen	38
2.2.1.4	Flüssigkultur zur Anzucht und Plasmidpräparation von <i>E. coli</i>	38
2.2.1.5	Isolierung von Plasmid-DNA in großem Maßstab.....	38
2.2.1.6	Präzipitation von DNA.....	39
2.2.2	Zellbiologische Methoden.....	39
2.2.2.1	Kultur von Säugerzellen.....	39
2.2.2.2	Zellzahlbestimmung.....	39
2.2.2.3	Gefrierkultur von Säugerzellen.....	40
2.2.2.4	Bestimmung des Überlebens von Zellen.....	40

2.2.2.4.1	<i>Koloniebildungstest</i>	40
2.2.2.4.2	<i>Aktivitätsstest mit MTT nach Roche</i>	40
2.2.2.5	Genspezifischer <i>knockdown</i> durch chemisch synthetisierte siRNAs	41
2.2.2.5.1	<i>siRNA-Hybridisierung</i>	42
2.2.2.5.2	<i>Transfektion von Säugerzellen</i>	43
2.2.2.5.2.1	<i>Transfektion von hTERT-RPE-Zellen mit chemisch synthetisierter siRNA und Biorad SiLent Lipid Fect</i>	43
2.2.2.5.2.2	<i>Transfektion von Hela-Zellen mit chemisch synthetisierter siRNA und Dharmafect</i>	43
2.2.2.5.2.3	<i>PolyFect Transfection Reagent von Qiagen zur Transfektion von hTERT-RPE-Zellen mit Plasmid-DNA</i>	43
2.2.2.5.2.4	<i>Lipofectamin Reagent von Invitrogen zur Transfektion von Hela-Zellen mit Plasmid-DNA</i>	44
2.2.2.6	Analyse im Durchflusszytometer	44
2.2.2.7	<i>TUNEL Assay</i>	45
2.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	46
2.2.3.1	RNA-Methoden.....	46
2.2.3.1.1	<i>RNA-Isolation aus Säugerzellen</i>	46
2.2.3.1.1.1	<i>RNA-Isolation mit Trizol</i>	46
2.2.3.1.1.2	<i>RNA-Isolation mit RNeasy</i>	46
2.2.3.1.2	<i>Fotometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration</i>	46
2.2.3.2	cDNA-Synthese.....	47
2.2.3.2.1	<i>cDNA-Synthese mit Superscript</i>	47
2.2.3.2.2	<i>cDNA- Synthese mit Quantitect</i>	47
2.2.3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	48
2.2.3.4	Quantitative RT-PCR am <i>Light Cycler</i>	48
2.2.3.5	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	51
2.2.4	Proteinchemische Arbeiten	52
2.2.4.1	Proteinisolation aus Säugerzellen.....	52
2.2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	52
2.2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen.....	53
2.2.4.4	Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose ...	53
2.2.4.5	Immundetektion von Proteinen	53
2.2.4.6	Entfernen von Antikörper.....	54
2.2.4.7	Enzymatische Caspaseaktivität	54
2.2.5	Immunfluoreszenz	55
2.2.5.1	Nachweis von Proteinaggregaten (Foci)	55
2.2.5.2	Lokalisierung von Proteinen	56
2.2.5.3	TNFR1-Clustering.....	56
2.2.6	Alkalischer <i>Comet Assay</i>	57
3	Ergebnisse.....	59
3.1	Abschaltung der Genexpression mittels RNAi.....	59
3.1.1	Auswahl der siRNA-Sequenzen.....	59
3.1.2	Regulierung der Expression mit chemisch synthetisierten siRNAs.....	61
3.1.2.1	<i>Knockdown</i> von <i>hUBC13</i> in hTERT-RPE-Zellen.....	61
3.1.2.2	<i>Knockdown</i> von <i>TRAF6</i> in hTERT-RPE-Zellen	63
3.1.2.3	<i>Knockdown</i> von <i>hUBC13</i> und <i>TRAF6</i> in Hela-Zellen	64
3.1.2.4	<i>Knockdown</i> von <i>hRAD18</i> als Kontrolle	65
3.2	Überleben von hTERT-RPE-Zellen in Abhängigkeit von TRAF6 und hUbc13. 67	
3.2.1	Zellüberleben nach UV- und gamma-Bestrahlung.....	67
3.2.2	Überleben nach Behandlung mit chemischen Substanzen.....	69

3.3	Reparatur- und Rekombinationsverhalten in hTERT-RPE-Zellen.....	71
3.4	Mutationsverhalten nach knockdown von hUBC13.....	74
3.5	Stimulierung des NFκB-Signaltransduktionsweg über TNFα.....	76
3.5.1	Abbau von IκB nach Stimulation mit TNFα.....	76
3.5.2	Stimulierung von Hela-Zellen mit TNFα.....	77
3.5.2.1	p65-Lokalisierung nach TNFα-Stimulation in Abhängigkeit von hUbc13 77	
3.5.2.2	Expression von NFκB-Zielgenen nach Reduktion von hUbc13.....	78
3.5.2.3	Induktion von Apoptose durch TNFα-Stimulation.....	79
3.5.2.3.1	<i>Nachweis der Apoptose durch PARP-Spaltung</i>	79
3.5.2.3.2	<i>Caspase-3-Aktivität als Nachweis der Apoptose</i>	80
3.6	Behandlung von Hela-Zellen mit γ-Strahlung.....	81
3.6.1	Nachweis der Apoptose nach γ-Bestrahlung durch PARP-Spaltung.....	81
3.6.2	Zellüberleben nach γ-Bestrahlung.....	82
3.7	Behandlung von Hela-Zellen mit UV-Strahlung.....	83
3.7.1	Induktion des NFκB-Weges durch UV-Strahlung.....	83
3.7.2	Induktion von Apoptose nach UV-Bestrahlung.....	84
3.7.2.1	PARP-Spaltung als apoptotischer Nachweis.....	84
3.7.2.2	Caspase-3-Aktivität zum Nachweis von Apoptose.....	85
3.7.2.3	Nachweis der Apoptose durch den <i>TUNEL Assay</i>	86
3.7.3	Zellüberleben nach UV-Bestrahlung.....	87
3.8	Einfluss von hUbc13 auf den TNFR1.....	88
3.8.1	Beteiligung von hUbc13 am Todesrezeptorweg.....	88
3.8.2	Untersuchung von TNFR1 nach <i>hubc13-knockdown</i>	89
3.8.3	TNFR1- <i>Clustering</i> in Abhängigkeit von hUbc13.....	90
4	Diskussion.....	92
4.1	Abschaltung der Genexpression mittels siRNAs.....	94
4.1.1	Auswahl der Sequenzen zum spezifischen und effizienten <i>knockdown</i> von <i>hUBC13</i> und <i>TRAF6</i>	94
4.1.2	<i>Knockdown</i> von <i>hRAD18</i>	96
4.2	Funktionelle Untersuchungen in hTERT-RPE-Zellen in Abhängigkeit von hUbc13 und TRAF6.....	98
4.2.1	Zellüberleben nach Induktion von DNA-Schäden.....	98
4.2.2	Reparatur- und Mutationsverhalten.....	99
4.2.3	Gründe für die geringen Unterschiede im phänotypischen Verhalten nach <i>knockdown</i> von <i>hUBC13</i> und <i>TRAF6</i>	100
4.3	Funktioneller Vergleich humane Gene mit Hefegenen.....	102
4.4	Überleben von <i>hubc13-knockdown</i> -Hela-Zellen nach Bestrahlung.....	103
4.5	NFκB-Aktivierung in Abhängigkeit von hUbc13.....	104
4.5.1	Stimulation des NFκB-Weges durch TNFα.....	104
4.5.2	Induktion der Apoptose durch UV-Bestrahlung.....	106
4.6	Einfluss von hUbc13 auf den TNFR1-Todesrezeptor.....	108
5	Ausblick.....	110
6	Zusammenfassung.....	111
7	Literaturverzeichnis.....	113

1 Einleitung

1.1 DNA-Schäden

Die DNA ist der Träger der Erbinformation eines Organismus. Da die Information für alle zellulären Strukturen und Funktionen und deren Regulation auf der DNA gespeichert sind, muss die Erhaltung ihrer strukturellen und funktionellen Integrität garantiert werden. Sowohl Umwelteinflüsse, wie z.B. UV-, γ -, Röntgen-Strahlung oder mutagene Chemikalien, aber auch spontan auftretende, endogene Prozesse, die im normalen Zellmetabolismus stattfinden, können die DNA-Struktur verändern. So entstehen in jeder Zelle täglich tausende von DNA-Läsionen spontan, d.h. ohne äußere Einflüsse (Helleday *et al.* 2007). Auch Proteine und Lipide, und somit auch Zellmembranen, werden durch Strahlung geschädigt (Agrawal *et al.* 2005). Solange jedoch deren Information auf der DNA ungeschädigt vorliegt, können geschädigte Moleküle degradiert werden und neue, intakte synthetisiert werden (Friedberg *et al.* 2006).

Ionisierende Strahlung (Röntgen- und γ -Strahlung) verursacht viele verschiedene Schädigungen in der Zelle, wie z.B. Strangbrüche (Doppel- (DSB) und Einzelstrangbrüche (SSB)), sowie Zucker- und Basenschäden in der DNA. Ein im Vergleich zu SSB und Basenschäden und ihren funktionellen Konsequenzen seltener, aber schwerwiegender Schaden ist der DSB (Helleday *et al.* 2007). DSB können ebenso spontan bei der Replikation, Rekombination und durch freie Radikale entstehen, die z.B. als Nebenprodukte des Sauerstoffmetabolismus auftreten (Burma *et al.* 2006, Helleday *et al.* 2007). Werden DSB nicht oder falsch repariert, ist die Integrität des Genoms gefährdet, was in vielzelligen Organismen langfristig zu Tumoren führen kann (Friedberg *et al.* 2006).

Durch UV-Strahlung entstehen ebenso vielfältige Schäden in der Zelle. In der DNA treten durch UV-C- (200 - 280 nm) und UV-B-Strahlung (280 - 320 nm) neben Basenschäden häufig Pyrimidindimere auf, und zwar Cyclobutanpyrimidindimere (CPD) und Pyrimidin-(6-4)-Pyrimidon-Photoprodukte (Marquart und Schäfer 2004, Garinis *et al.* 2005, Strozyk *et al.* 2006). Beide sog. *bulky lesions* beeinflussen zelluläre Funktionen wie Transkription, Replikation und Zellzyklusprogression. Werden Dimere nicht repariert, können vermehrt Mutationen entstehen, was wiederum das Risiko der Krebsentstehung erhöht (Nakajima *et al.* 2004, Garinis *et al.* 2005, Friedberg *et al.* 2006). Durch die Bestrahlung mit UV-A (320

- 380 nm) entstehen keine Pyrimidindimere, sondern es werden reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* - ROS) induziert, wodurch oxidative Schäden, wie 8-oxo-Guanin, und Strangbrüche in der DNA entstehen können (Garinis *et al.* 2005, Strozyk *et al.* 2006).

Schädigungen der Makromoleküle in Zellen und Geweben, insbesondere der DNA, bewirken komplexe zelluläre Antworten. Sie erfordern eine Vielzahl von Proteinen, die an der Schadenserkennung, Signalweitergabe und der koordinierten Durchführung eines Netzwerkes der zellulären Reaktionen auf Strahlenschäden (*DNA damage response network*) beteiligt sind (Rai *et al.* 2007). Dieses Netzwerk umfasst verschiedene Reparatur- und Toleranzmechanismen, Kontrolle der Replikation geschädigter DNA, des Zellzyklus sowie Zelltodprogramme (Rai *et al.* 2007). Die subtil regulierte Balance zwischen diesen Prozessen gewährleistet die genomische und physiologische Integrität bestrahlter Zellen und Gewebeverbände. Nachhaltige, chronische Störungen führen langfristig zu Krebs, Kataraktbildung, Immunsuppression und vorzeitiger Hautalterung (Kulms und Schwarz 2000, Chow und Tron 2005, Strozyk *et al.* 2006).

1.2 DNA-Reparaturprozesse

Zur Wahrung der genomischen Integrität haben Organismen eine Reihe von Mechanismen für die korrekte Reparatur schadhafter Veränderungen der DNA entwickelt. Werden die Schäden nicht behoben oder falsch repariert, kommt es zum vermehrten Auftreten von chromosomalen Aberrationen, Translokationen und Deletionen, so wie Mutationen, die das Risiko der Tumorentstehung erhöhen. Dies kann auch zum Verlust genetischer Informationen und zur Apoptose führen (Dudas und Chovanec 2004, Hefferin und Tomkinson 2004, Chow und Tron 2005, Burma *et al.* 2006). Die Wege zur Reparatur von DNA-Schäden sind hoch konserviert von Bakterien bis zum Menschen, deren Bedeutung ändert sich aber von Organismus zu Organismus (Helleday 2003).

Wurden Schäden übersehen bzw. vor der Replikation nicht repariert oder sind Reparaturprozesse überlastet, hat dies einen Stopp der Replikation und möglicherweise den Zelltod zur Folge (Masuyama *et al.* 2005). Dafür hat die Zelle Mechanismen entwickelt, den Schaden zu umgehen und anschließend die DNA-Replikation zu reinitiiieren (Broomfield *et al.* 2001).

1.2.1 Exzisionsreparaturmechanismen

Die Exzisionsreparaturmechanismen der Zelle greifen dann, wenn nur ein Strang der DNA geschädigt ist. Es gibt verschiedene Mechanismen der Exzisionsreparatur: *Mismatch-Reparatur* (MMR), Nukleotidexzisionsreparatur (NER) und Basenexzisionsreparatur (BER), bei denen unterschiedliche Proteine an den Prozessen beteiligt sind.

Bei der MMR werden falsch gepaarte Basen, kleine Insertionen oder Deletionen, die während der Replikation entstanden sind, nach der Replikation repariert. In eukaryotischen Zellen sind MutS Homologe für die MMR verantwortlich. Zwei wichtige Proteine dabei sind Msh2 und Msh6, die z.B. UV-geschädigte DNA erkennen und diese nach DNA-Läsionen absuchen (Hsieh 2001, Kunkel und Erie 2005).

Durch die NER werden Schäden repariert, die DNA-Konformationsänderungen nach sich ziehen würden, wie z.B. UV-induzierte CPDs oder 6-4-Photoprodukte. Nach der Erkennung des Schadens wird die DNA-Helix durch Helikasen und Endonukleasen geöffnet und mehrere Basen um die Läsion herum ausgeschnitten. Der Strang wird durch Polymerisation und Ligation wieder repariert. In Säugerzellen sind die wichtigsten Faktoren dafür Proteine der XP (*Xeroderma pigmentosum*) - Gruppe (Costa *et al.* 2003).

Die BER ist der wichtigste Mechanismus für die Reparatur alkylierter DNA und oxidativer Schäden, wie 8-oxo-Guanin. Zunächst werden die fehlerhaften Basen durch Glycosylasen entfernt, in Säugerzellen sind hierfür z.B. Ogg1 und Nth1 verantwortlich. An der resultierenden abasischen Stelle wird ein Einschnitt durch eine AP-Endonuklease eingeführt und das ausgeschnittene Nukleotid ersetzt. Durch Auffüllen der Lücken und Wiederversiegeln der DNA-Enden entsteht ein vollständig reparierter DNA-Strang.

Für den BER-Mechanismus werden zwei Wege unterschieden: *short-patch* und *long-patch*, die sich in der Größe der zu reparierenden Lücke und den daran beteiligten Enzymen unterscheiden. Während im *short-patch*-Weg Polymerase β , Xrcc1 und Ligase 3 die wichtigsten Proteine darstellen, wird der *long-patch*-Weg durch Polymerase ϵ oder δ , die von PCNA an die Läsion gebracht werden, der Endonuklease FEN1 und der Ligase 1 vermittelt (Fortini *et al.* 2003, Fortini und Dogliotti 2007, Hazra *et al.* 2007, Wilson III und Bohr 2007).

1.2.2 DNA-Doppelstrangbruchreparatur: HR und NHEJ

DSB-Reparaturprozesse werden in homologieabhängige und homologieunabhängige Mechanismen unterschieden. In Säugerzellen ist die Gewichtung der Reparaturwege zellzyklusabhängig und es überwiegt die nichthomologe Endverknüpfung (NHEJ) (Helleday 2003, Saleh-Gohari und Helleday 2004, Jeggo und Löbrich 2006).

Die nichthomologe Endverknüpfung ist ein relativ einfacher Mechanismus, bei dem die gebrochenen Enden zusammen gebracht und direkt miteinander verknüpft werden. Dies macht den Prozess allerdings fehleranfällig, da DNA-Enden oftmals degradiert werden oder eine Verknüpfung nicht zueinander gehörender Stränge stattfinden kann (Hefferin und Tomkinson 2005, Burma *et al.* 2006). Zuerst werden die freien DNA-Enden von spezifischen Proteinen (Ku-Proteine) gebunden, um diese vor nukleolytischer Degradation zu schützen. Dann wird die Serin-Threonin-Proteinkinase DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) an die Bruchstelle rekrutiert und bildet mit den Ku-Proteinen an der DNA einen Komplex. Zusammen mit dem Komplex aus Mre11, Rad50 und Nbs1 (MRN-Komplex) werden die DNA-Enden in räumliche Nähe zueinander gebracht. Weitere Proteine werden rekrutiert und aktiviert, so z.B. DNA-Polymerasen, die die Lücke auffüllen, und der Komplex LigaseIV / Xrcc4, durch den die Bruchenden miteinander verknüpft werden (Hefferin und Tomkinson 2005, Burma *et al.* 2006).

Bei der homologen Rekombination wird zur Reparatur der geschädigten DNA eine Matrize benötigt, welche die verlorenen Sequenzinformationen enthält (Helleday *et al.* 2007). Durch eine 5'→3' Resektion an den Bruchenden durch den MRN-Komplex wird der Reparaturprozess initiiert. Nach Prozessierung der Enden werden die Überhänge von Rad52 erkannt und gebunden. Außerdem binden *replication protein A* (RPA) und Rad51, wobei Rad51 die Stranginvasion und den Strangaustausch mit der homologen Sequenz fördert. Nach der Stranginvasion, bei der noch weitere Proteine wie z.B. Rad54 beteiligt sind, sind homologe Sequenzen gepaart und die DNA-Synthese wird über eine DNA-Polymerase initiiert. Die freien Enden werden ligiert und die entstandene Hollidaystruktur wird über Resolvasen und Dissolvasen aufgelöst, womit wieder zwei vollständig reparierte Stränge entstehen (Helleday 2003, Aylon und Kupiec 2004, Krogh und Symington 2004).

1.3 Postreplikationsreparatur

In der Regel werden DNA-Schäden bereits vor der Replikation sehr effektiv über verschiedene Reparaturmechanismen entfernt. Ist dies nicht der Fall, kann der Prozess der Replikation blockiert werden, und es entsteht eine Lücke in dem neusynthetisierten Strang. Dies führt zum Zellzyklusarrest und anschließend zum Zelltod. Allerdings können solche Schäden durch homologieabhängige Mechanismen, wie Matrizenwechsel (*template switching*), oder aber durch Transläsionssynthese (TLS) repariert werden. Dies wird auch als Postreplikationsreparatur (PRR) bezeichnet (Friedberg 2005, Minesinger und Jinks-Robertson 2005). Außerdem können so entstandene Schäden auch über die homologe Rekombination repariert werden (1.2.2).

1.3.1 Die *RAD6*-Gruppe im Organismus *S. cerevisiae*

In *S. cerevisiae* ist die *RAD6*-Epistasiegruppe für die Regulation und Ausführung der PRR verantwortlich. Die Komponenten des *RAD6*-Weges sind hochkonserviert von der Hefe bis zum Menschen. Die wichtigsten Mitglieder dieser Gruppe in *S. cerevisiae* sind *RAD6*, *RAD18*, *RAD5*, *RAD30* (DNA Polymerase η), *REV3* / *REV7* (DNA Polymerase ζ), *MMS2* und *UBC13* (Friedberg 2005). Es werden verschiedene fehlerfreie und fehlerhafte Wege der PRR beschrieben (Prakash *et al.* 1993, 2005, Lawrence 1994, Xiao *et al.* 2000, Minesinger und Jinks-Robertson 2005).

Rad6 und Rad18 spielen eine zentrale Rolle in der PRR. Rad18 ist eine einzelstrangbindende Ubiquitinligase (E3) mit einer charakteristischen RING-Finger-Domäne und bildet einen Komplex mit Rad6, einem ubiquitin-konjugierendem Enzym (E2). Rad18 erkennt und bindet den Einzelstrang an der Läsion und bringt Rad6 in räumliche Nähe zu dem Schaden. Dort ist Rad6 für die Monoubiquitinierung von PCNA an Lysin-164 zuständig (s. Punkt 1.3.2, Bailey *et al.* 1994, 1997).

Ein weiteres wichtiges Protein in der PPR ist Rad5, ein Mitglied der SWI / SNF ATPasen-Familie und ebenfalls ein E3-Protein mit einer RING-Finger-Domäne. Durch die Interaktion mit dem Komplex aus Ubc13 und Mms2, einem ubiquitin-konjugierenden Enzym, wird die Verknüpfung von Lysin-63-Polyubiquitinketten katalysiert (Johnson *et al.* 1992, 1994, Hoege *et al.* 2002, Tsui *et al.* 2005, Gangaparavu *et al.* 2006).

Ein Modell für die Einteilung der Proteinkomplexe in die einzelnen Wege der PRR ist in Abbildung 1 gezeigt. Die fehlerhaften Wege sind von der Polymerase ζ abhängig, wobei es einen Rad5- und einen Rad6 / Rad18-abhängigen Weg gibt. Für den fehlerfreien Weg sind die Proteine Rad5, Ubc13 und Mms2 verantwortlich (Minesinger und Jinks-Robertson 2005, Chiu *et al.* 2006).

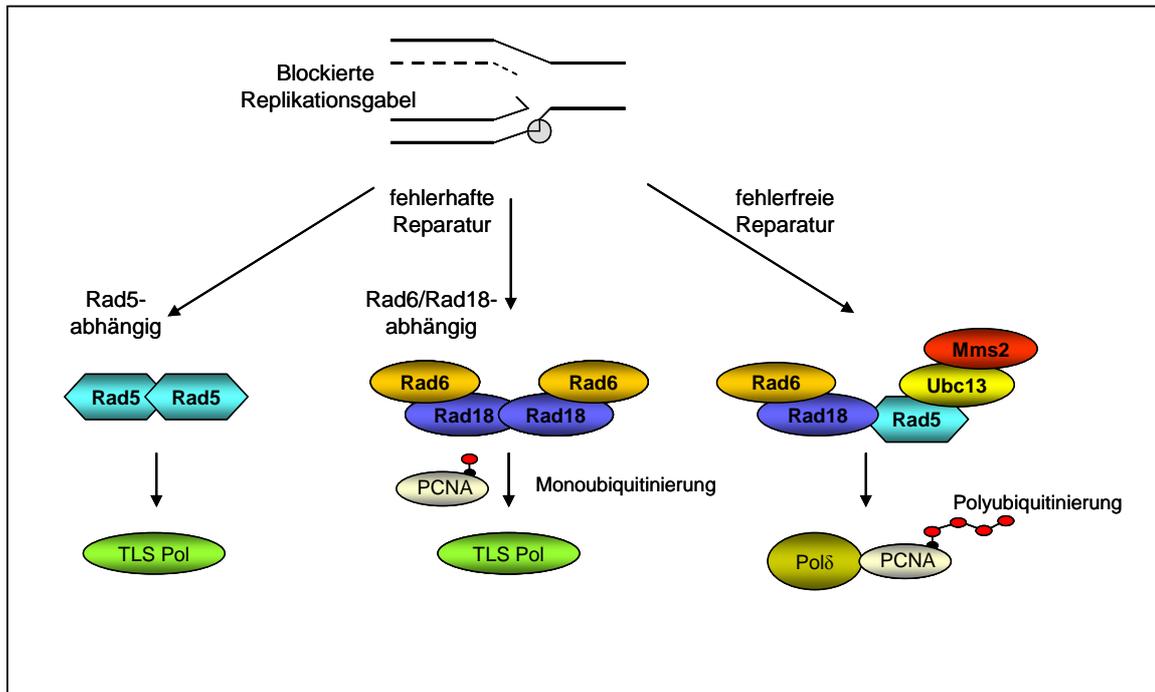


Abbildung 1: Modell für die PRR durch die RAD6-Gruppe (modifiziert nach Minesinger und Jinks-Robertson 2005 und Chiu *et al.* 2006); Nach dem Entstehen eines DNA-Schadens gibt es die Möglichkeit der fehlerhaften oder der fehlerfreien Reparatur. Verschiedene Proteinkomplexe der RAD6-Gruppe sind dafür verantwortlich, welcher Weg eingeschlagen und welche Polymerase aktiviert wird.

1.3.2 Schadenstoleranz der Transläsionssynthese – TLS

Bei der Transläsionssynthese (TLS) wird der DNA-Schaden einfach übergangen. Der Schaden wird also nicht repariert, sondern nur toleriert und die Zelle kann überleben (Broomfield *et al.* 2001). Hierbei kommen Transläsionspolymerasen zum Einsatz, die über die Läsion hinweg polymerisieren. Eine dieser Polymerasen ist die DNA-Polymerase ζ . Sie besitzt keine 3' - 5' *proofreading*-Aktivität, hat nur eine niedrige Reparaturgenauigkeit und ist wenig prozessiv. Die Entscheidung über den Einsatz der Polymerase ζ unterliegt der Regulation durch die RAD6-Gruppe. Eine weitere Transläsionspolymerase ist die DNA-Polymerase η , die vor allem über CPD hinweg synthetisieren kann und ebenso wenig prozessiv und ungenau arbeitet wie die Polymerase ζ (Kunz *et al.* 2000, Kannouche und Lehmann 2004, Prakash *et al.* 2005, Chiu *et al.* 2006).

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) bildet ein Trimer um die DNA (*sliding clamp*) und ist für die Beladung der DNA mit Polymerasen und deren Prozessivität verantwortlich. Nach der Induktion von DNA-Schäden wird PCNA vom Komplex Rad6 / Rad18 am Lysin-164 monoubiquitiniert (Abbildung 2; Hoege *et al.* 2002, Lehoczky *et al.* 2007). Dies scheint notwendig für die Tolerierung des Schadens zu sein, da es als Signal für die fehlerhafte DNA-Reparatur dient und Transläsionspolymerasen an den Schaden rekrutiert (Stelter und Ulrich 2003, Watanabe *et al.* 2004). So wird z.B. die hochreplikative DNA-Polymerase δ gegen TLS-Polymerasen ausgetauscht (Tsui *et al.* 2005, Haracska *et al.* 2006).

1.3.3 Fehlerfreier Reparaturweg der PRR

Für den fehlerfreien Reparaturweg der PRR ist die Polyubiquitinierung von PCNA erforderlich. Monoubiquitinierung von PCNA kann als Signal für die Polyubiquitinierung durch den Komplex Rad5 / Ubc13 / Mms2 dienen. In einer enzymatischen Reaktion werden Lysin-63-verknüpfte Polyubiquitinketten an PCNA gebunden (Abbildung 2). Dies dient im Gegensatz zu Lysin-48-Polyubiquitinketten, die zur Degradierung von Proteinen im Proteasom führen, zur Aktivierung von PCNA (Hofmann und Pickart 1999). Das aktivierte Protein kann damit die DNA-Polymerase δ an die arretierte Replikationsgabel rekrutieren. Diese Polymerase weist eine hohe Prozessivität auf, was zu einer fehlerfreien Reparatur führt (Hoege *et al.* 2002).

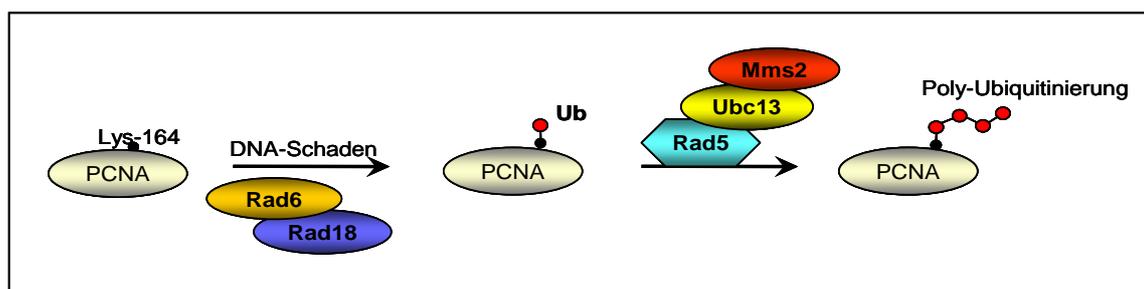


Abbildung 2: Schema für die Ubiquitinierung von PCNA (modifiziert nach Hoege *et al.* 2002); Nach DNA-Schaden wird PCNA an Lysin-164 durch Rad6 / Rad18 ubiquitiniert. Dies kann als Signal für den Komplex Mms2 / Ubc13 / Rad5 dienen, PCNA mit Lysin-63-Polyubiquitinketten zu versehen.

Um eine fehlerfreie Reparatur zu gewährleisten, muss zusätzlich eine identische Sequenz genutzt werden können. Der Mechanismus des sog. *template switchings* steht hier zur Diskussion. Dabei wird die ungeschädigte komplementäre Sequenz des neusynthetisierten Tochterstranges genutzt (Gangavarapu *et al.* 2007).

1.4 RAD6-Gruppe im Menschen

Fast alle Gene der *RAD6*-Gruppe aus dem Organismus *S. cerevisiae* treten als Homologe im Menschen auf (Huang und D'Andrea 2006). Für *RAD6* gibt es zwei Homologe, *hRAD6A* und *hRAD6B*, für *RAD18* ist mit *hRAD18* ein Homolog beschrieben (Koken *et al.* 1991, Van der Laan *et al.* 2000, Tateishi *et al.* 2000, 2003). Auch in menschlichen Zellen wird aus hRad18 und hRad6 ein Komplex gebildet, der PCNA ubiquitiniert und dadurch die DNA-Polymerase η an arretierte Replikationsgabeln rekrutiert (Xin *et al.* 2000, Tateishi *et al.* 2000, 2003, Watanabe *et al.* 2004, Saberi *et al.* 2007). Für das Gen *UBC13* ist nur ein Homolog identifiziert, *hUBC13*, während für *MMS2* wiederum zwei Homologe bekannt sind, *hMMS2* und *UEV1A*, wobei beide Proteine, wie auch in der Hefe, einen Komplex mit hUbc13 bilden, der die Ubiquitinierung von Proteinen katalysiert (Xiao *et al.* 1998). Lediglich für *RAD5* ist bisher kein eindeutiges Homolog identifiziert worden (Simpson und Sale 2005, Chiu *et al.* 2006). In diesem Zusammenhang stehen derzeit die Proteine TRAF6 (Deng *et al.* 2000, Wang *et al.* 2001) und SHPRH (Motegi *et al.* 2006, Unk *et al.* 2006) zur Diskussion.

1.4.1 hUbc13

Die Sequenz und die Struktur von Ubc13 sind hochkonserviert von der Hefe bis zum Menschen. Die Aminosäuresequenz des Hefeproteins Ubc13 ist zu über 90 % identisch mit der des humanen Proteins (Abbildung 3; Ashley *et al.* 2002, Adhikari *et al.* 2007). Auch funktionelle Homologien sind vorhanden. So konnte nachgewiesen werden, dass mUbc13 die komplette Funktion des Hefeproteins in einer *ubc13*-Hefenullmutante in der PRR ersetzen kann (Ashley *et al.* 2002). Wie sein Hefehomolog ist hUbc13 bisher das einzig bekannte E2-Enzym, welches die Polyubiquitinierung mit Lysin-63-verknüpften Ketten katalysiert (Eddins *et al.* 2006, Petroski *et al.* 2007).

	1		40
yeast	MASLPKRIIK	ETEKLVSDPV	PGITAEPHDD NLRVFQVTIE
human	MAGLPRRIIK	ETQRLLAEPV	PGIKAEPDES NARYFHVIA
	41		80
yeast	GPEQSPYEDG	IFELELYLPD	DYPMEAPKVR FLTKIYHPNI
human	GPQDSPFEGG	TFKLELELPE	EYPMAAPKVR FMTKIYHPNV
	81		120
yeast	DRLGRICLDV	LKTNWSPALQ	IRTVLLSIQA LLASPNPNDP
human	DKLGRICLDI	LKDKWSPALQ	IRTVLLSIQA LLSAPNPDDP
	121		153
yeast	LANDVAEDWI	KNEQGAKAKA	REWTKLYAKK KPE
human	LANDVAEQWK	TNEAQAIETA	RAWTRLYAMN NI.

Abbildung 3: Alignment der Aminosäuresequenz von Ubc13 aus Mensch und *S. cerevisiae* (nach Ashley *et al.* 2002); Die Aminosäuresequenz von Ubc13 weist sehr hohe Homologie auf, wobei rote Buchstaben gleiche Aminosäuren, orange Aminosäuren mit gleicher Funktion und schwarze Buchstaben unterschiedliche Aminosäuren darstellen.

hUbc13 bildet einen Komplex mit Mitgliedern der *UEVs* (*ubiquitin-conjugating enzyme variant*), wozu *hMMS2* und *UEV1A* zählen, die beiden humanen Homologe des Hefegens *MMS2* (Xiao *et al.* 1998, Moraes *et al.* 2001, VanDenmark *et al.* 2001, McKenna *et al.* 2003, Pastushok *et al.* 2005).

Bildet hUbc13 einen Komplex mit hMms2, ist es an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt. Dabei wird eine Doppelfunktion von hUbc13 sowohl in der HR als auch in der PPR postuliert, wobei beide Funktionen unabhängig voneinander sind (Zhao *et al.* 2007). Ähnlich wie in der Hefe konnte nach UV-Bestrahlung und auch nach Behandlung mit dem DNA-schädigenden Agens Cisplatin die Polyubiquitinierung von PCNA in menschlichen Zelllinien nachgewiesen werden. Dadurch kann der fehlerfreie Mechanismus zur Reparatur von DNA-Schäden aktiviert werden und die Zellen werden gegenüber Mutationen geschützt, die durch die fehlerhaft arbeitenden TLS-Polymerasen entstehen würden (Chiu *et al.* 2006).

Eine Beteiligung von hUbc13 an der homologen Rekombination konnte ebenfalls detektiert werden. Nach Induktion eines DSB konnten hUbc13-Foci an der neusynthetisierten DNA nachgewiesen werden. Außerdem wird die Focus-Bildung von BRCA1, einer Ubiquitinligase, die die Rad51-Rekrutierung an DNA-Schäden reguliert, durch hUbc13 vermittelt. Somit wird auch die Bildung von Rad51-Foci, einem essentiellen Faktor der HR, von hUbc13 gesteuert (Andersen *et al.* 2005, Kolas *et al.* 2007, Wang und Elledge 2007, Zhao *et al.* 2007 in DT40).

Eine Interaktion mit Uev1a trägt zur Aktivierung des NFκB-Weges bei. Sie wird aber nicht für Reparaturmechanismen benötigt (Andersen *et al.* 2005). Dabei wird durch den Komplex hUbc13 / Uev1a TRAF6 polyubiquitiniert und somit eine Signalkaskade gestartet, durch die der Transkriptionsfaktor NFκB aktiviert wird (s. Punkt 1.4.3).

Ein vollständiger *knockout* von *hUBC13* konnte bisher nicht erreicht werden. Die Embryonen sterben sehr früh ab oder können sich nicht mehr weiterentwickeln, meist schon bevor sie sechs Tage alt sind (Fukushima *et al.* 2007). Da humane Zellen ohne hUbc13 nicht überleben können, spricht dies durchaus für eine Beteiligung des Proteins an der DNA-Reparatur. Da der *knockout* von *hUBC13* lethal ist, kommen verschiedene Systeme zur Untersuchung der Funktion von *hUBC13* zur Anwendung. Neben einem *knockout* in der Hühner-B-Zelllinie DT40 (Zhao *et al.* 2007), wurden konditionale *Ubc13*^{-/-}-Mäuse (Yamamoto *et al.* 2006) und *Ubc13*^{+/-}-Mäuse (Fukushima *et al.* 2007) verwendet.

1.4.2 TRAF6

TRAF6 war zu Beginn der Arbeit das einzige bekannte postulierte Homolog zu *RAD5* der Hefe (Deng *et al.* 2000, Wang *et al.* 2001). Die Sequenzähnlichkeit auf Proteinebene ist mit knapp 30 % nicht ausnehmend hoch. TRAF6 weist strukturelle Ähnlichkeiten zu Rad5 lediglich in Bezug auf seine RING-Finger-Domäne auf (Abbildung 4). Zusammen mit hUbc13 katalysiert TRAF6 als Ubiquitinligase die Verknüpfung von Lysin-63-Polyubiquitinketten. Diese funktionelle Homologie wird als Argument verwendet, TRAF6 als Homolog zu Rad5 zu diskutieren.

Die Proteinfamilie der *tumor necrosis factor receptor (TNFR) associated factors* (TRAF) besitzen C-terminal eine *coiled-coil*-Domäne und eine hochkonservierte TRAF-C-Domäne, die zur Interaktion mit sich selber, Rezeptoren oder anderen Signalproteinen dienen. Am N-Terminus befindet sich eine Zink-bindende-Domäne, eine RING-Finger-Domäne mit mehreren Zink-Fingern, die wichtig sind für die Aktivierung der weiterführenden Signalkaskade (Abbildung 4; Wu und Arron 2003, Ea *et al.* 2004, Kobayashi *et al.* 2004, Yang *et al.* 2004).

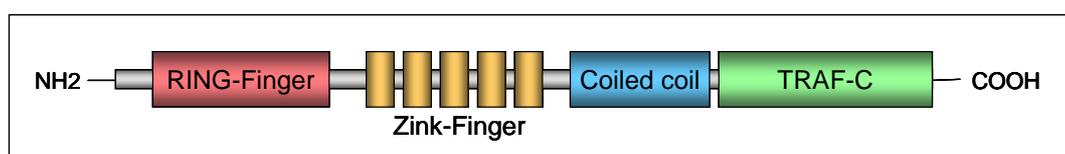


Abbildung 4: Struktur des TRAF6-Proteins (nach Ishida *et al.* 1996 und Yang *et al.* 2004); TRAF6 besitzt N-terminal eine RING-Finger-Domäne gefolgt von einem Zink-Finger Motiv. Am C-Terminus befindet sich die TRAF-C-Domäne und eine *Coiled-coil*-Domäne.

TRAF-Proteine sind an der Signaltransduktion über TNFR und Interleukin-1-Rezeptoren (IL-1R) / Toll-ähnliche Rezeptoren (*toll-like receptors – TLRs*) beteiligt. Dabei dienen die TRAF-Proteine zur Verbindung von aktivierten Rezeptoren und den weiterführenden Signalwegen (Wu und Arron 2003, Ea *et al.* 2004).

TRAF6 verhält sich unter allen TRAF-Proteinen einzigartig, da sich die Bindung an Rezeptoren, wie CD40 oder RANK (*receptor activator of NFκB*), von den anderen TRAF-Proteinen unterscheidet. Außerdem kann nur TRAF6 sowohl mit TNF-Rezeptoren als auch mit IL-1R und TLR interagieren. Dies könnte an der Sequenz der sonst hochkonservierten TRAF-C-Domäne liegen, die für diese Bindung verantwortlich ist, da die des TRAF6-Proteins sich von denen der anderen TRAF-Proteinen unterscheidet (Kobayashi *et al.* 2004, Chung *et al.* 2007).

Die Analyse von *traf6-knockout*-Mäusen gestaltet sich schwierig, da diese multiple Funktionsstörungen in verschiedenen Organen entwickeln. Die Bildung und Funktion der Osteoklasten ist gestört, die Mäuse besitzen keine Lymphknoten, und Defekte in der Entwicklung des zentralen Nervensystems treten auf. Außerdem ist die Entwicklung von epidermalen Anhängen gestört, so dass eine ektodermale Dysplasie entsteht. All diese Defekte führen zu einem frühen Tod der Embryonen innerhalb von zwei bis drei Wochen (Kobayashi *et al.* 2004, Inoue *et al.* 2007). Es gibt aber Untersuchungen in *traf6^{-/-} mouse embryonic fibroblasts* (MEF), die überlebens- und teilungsfähig sind. Dabei wird TRAF6 als kritisches Protein zum Schutz vor Zelltod beschrieben (Ichikawa *et al.* 2006).

1.4.3 Mechanismus des NFκB-Weges

TRAF6 ist an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB beteiligt, wodurch Gene exprimiert werden, die eine Vielzahl biologischer Prozesse regulieren. Dazu gehören u.a. die primäre und die adaptive Immunantwort, die Regulation von Zelltod und -überleben, die Steuerung von Entzündungsprozessen und anderen Stresssituationen, die einer schnellen und anpassungsfähigen Genexpression bedürfen (Ben-Neriah 2002, Magné *et al.* 2006).

Unter normalen Bedingungen wird der NFκB-Signaltransduktionsweg über extrazelluläre Signale, wie TNF, Interleukine, UV-Strahlung oder Infektionen aktiviert (Wu und Arron 2003, Graham und Gibson 2005, Syed *et al.* 2006). Das Heterodimer Uev1a / hUbc13 ist an der Aktivierung über TRAF6 / TRAF2 beteiligt (Deng *et al.* 2000, Wang *et al.* 2001, Adhikari *et al.* 2007).

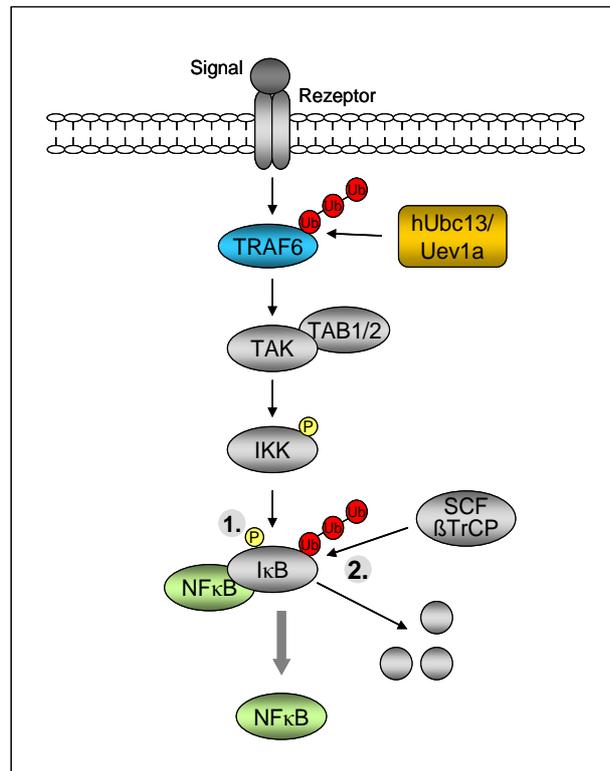


Abbildung 5: Schematische Darstellung des NFκB-Signaltransduktionsweges; Eine genaue Erklärung ist im Text zu finden.

Nach der extrazellulären Stimulation wird eine Signalkaskade in der Zelle gestartet. TRAF6 oligomerisiert und geht über seine RING-Finger-Domäne eine Bindung mit hUbc13 / Uev1a ein (Wooff *et al.* 2004). Zusammen mit diesem Komplex katalysiert TRAF6 als Ubiquitinligase (E3) seine Autoubiquitinierung (Deng *et al.* 2000, Wooff *et al.* 2004, Yang *et al.* 2004, Fukushima *et al.* 2007, Petroski *et al.* 2007). Ubiquitiniertes TRAF6 dient zur Initiierung einer Signalkaskade. So wird TAK1 (*transforming growth factor β-activated kinase*) mit seinen regulatorischen Untereinheiten TAB1 und TAB2 aktiviert (Wang *et al.* 2001, Lamothe *et al.* 2007). Die Kinase TAK1 phosphoryliert die regulatorische Untereinheit IKK γ (NEMO) der IκB Kinase IKK, wodurch deren katalytische Untereinheiten IKK α und IKK β aktiviert werden. IKK phosphoryliert ihrerseits den NFκB-Inhibitor IκB, was wiederum als Signal für dessen Ubiquitinierung an Lysin-48 über den SCF (Skp1-Cullin F box)-βTrCP-E3-Komplex dient. Ubiquitiniertes IκB wird proteasomal degradiert und NFκB wird freigesetzt. Es kann vom Zytoplasma in den Zellkern gelangen, wo es als Regulator der Genexpression wirkt (Abbildung 5; Ea *et al.* 2004, Chen 2005, Yamamoto *et al.* 2006, Adhikari *et al.* 2007).

Proteine der NFκB-Familie besitzen alle eine *Rel*-Domäne, in der ein Kernlokalisierungssignal (NLS) enthalten ist. Diese Domäne wird außerdem zur Interaktion mit anderen Mitgliedern der Familie, mit der DNA oder mit IκB benötigt. Den wichtigsten Transkriptionsfaktor bildet das Heterodimer p50 / p65 (RelA), wobei p65 der aktive Teil ist und nach der Degradierung von IκB im Kern seine Funktion ausüben kann (Inoue *et al.* 2007).

Bei einer abnormalen Regulation der NFκB-Aktivierung kann es zu malignen Transformationen kommen, besonders zu Leukämien und Lymphomen, z.B. verursacht durch verschiedene chromosomale Translokationen oder durch eine Infektion mit dem Retrovirus REV-T, bei dem das Onkoprotein v-Rel produziert wird und als negativer Repressor von NFκB agiert (Gilmore 1999, Inoue *et al.* 2007). Ist der Weg der NFκB-Aktivierung über RANK und TRAF6 gestört, so kommt es u.a. zu Knochenmetastasen und zur Osteoklastogenese (Inoue *et al.* 2007).

1.5 TNF-Rezeptor

Eine Möglichkeit der Aktivierung des NFκB-Weges ist die extrazelluläre Stimulation des *tumor necrosis factor receptor* (TNFR). Dieser kann nach Stimulierung trimerisieren und verschiedene Signalkaskaden in der Zelle induzieren.

TNFRs gehören zu der TNFR-Superfamilie, deren Rezeptoren eine Schlüsselrolle in der Signaltransduktion in Lymphozyten spielen. Neben den TNF-Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 gehört auch der Fas-Rezeptor (CD95) dazu. Diese TypI-Transmembranrezeptoren haben normalerweise ein bis fünf cysteinreiche Wiederholungen in ihrer extrazellulären Domäne. Sie besitzen außerdem eine *death domain* (DD) am zytoplasmatischen Ende, wodurch Apoptose vermittelt wird. Diese DD fehlt allerdings bei dem Rezeptor TNFR2, weshalb dieser vorwiegend für Signale des Zellüberlebens verantwortlich ist (Chen und Goeddel 2002, Gupta 2002). TNFR1 dagegen vermittelt mit der vorhandenen DD proapoptotische Signalwege. Außerdem können über TNFR1 mehrere intrazelluläre Signalkaskaden gesteuert werden, die zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFκB und c-Jun führen, die für die Expression unterschiedlichster Gene und die Steuerung antiapoptotischer Signale verantwortlich sind (Abbildung 6).

1.5.1 Mechanismus des TNFR1-Weges

Es können sich verschiedene Komplexe aus unterschiedlichen Proteinkomponenten bilden. Komplex I, gebildet aus TNFR1, TRADD, TRAF2 und RIP, ist für die Aktivierung des NF κ B-Weges und somit für die Übermittlung von Überlebenssignalen verantwortlich, während Komplex II aus FADD und Caspase-8 / -10-Apoptosesignale vermittelt (Micheau und Tschopp 2003, Sheikh und Huang 2003).

Nach der Bindung von TNF an die extrazelluläre Domäne von TNFR1 wird das inhibitorische Protein *silencer of death domains* (SODD) an der intrazellulären Domäne (ICD) freigesetzt. Diese daraus resultierende aggregierte Domäne TNFR1-ICD wird von dem Adaptorprotein *TNFR associated death domain* (TRADD) erkannt. TRADD kann nun weitere Adaptorproteine rekrutieren, wie *receptor interacting protein 1* (RIP1), TRAF2 oder *Fas-associated death domain* (FADD) (Chen und Goeddel 2002). Zur Aktivierung des NF κ B-Weges wird zuerst die Polyubiquitinierung von RIP1 veranlasst. TAB2 erkennt und bindet polyubiquitiniertes RIP1 und rekrutiert dieses zur Kinase TAK1. Somit wird dessen Kinasefunktion aktiviert, was durch die Phosphorylierung von IKK zur Aktivierung von NF κ B führt (s. Punkt 1.4.3 und Abbildung 6; Chen 2005, Chen *et al.* 2006, Li *et al.* 2006).

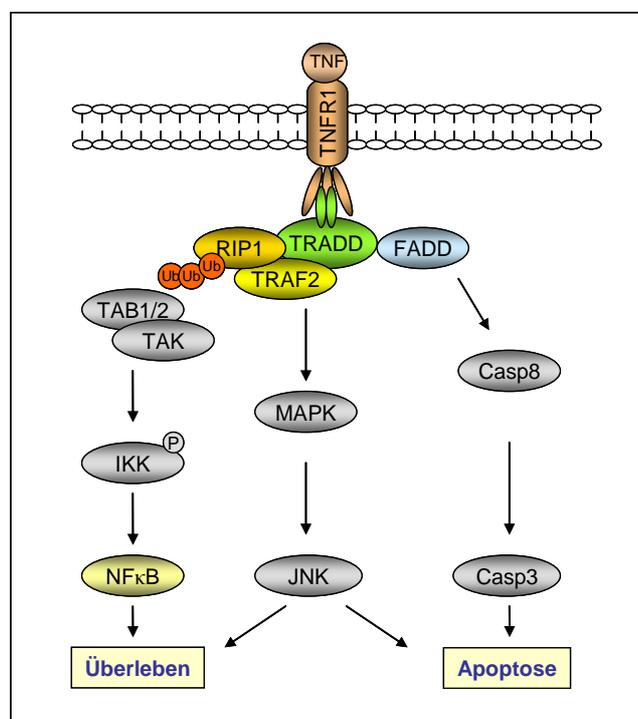


Abbildung 6: TNFR1-Signaltransduktionsweg (nach Gupta 2002 und Chen *et al.* 2006); Nach der Bindung von TNF trimerisiert der TNFR1, bindet TRADD an dessen intrazelluläre Domäne und rekrutiert mehrere Proteine. Über FADD wird Apoptose eingeleitet, über TRAF2 / RIP1 der NF κ B-Weg aktiviert und das Überleben der Zellen gesteuert. TRAF2 kann außerdem die Kinase JNK aktivieren.

TRADD kann aber nicht nur als Adaptorprotein für TRAF2 / RIP1 fungieren, sondern auch *Fas-associated death domain* (FADD) durch eine Interaktion der Todesdomänen (DD) rekrutieren. Dieses wiederum bindet Caspase-8 über Proteininteraktion mit dessen homologer *death effector domain* (DED), wodurch der so genannte *death induced signaling complex* (DISC) entsteht. Während der Komplexbildung wird Procaspase-8 autokatalytisch gespalten. Aktivierte Caspase-8 wird vom DISC ins Zytoplasma freigesetzt, um anschließend Effektorcaspasen wie Caspase-3 zu aktivieren, was irreversibel zur Apoptose führt (Abbildung 6; Gupta 2002, Sheikh und Huang 2003).

Des Weiteren kann TRAF2 mitogen aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinasen (MAPKKK) aktivieren, um eine Signalkaskade über verschiedene Kinasen zu starten. Dadurch wird die Kinase JNK (c-Jun aminoterminal Kinase) aktiviert, die c-Jun phosphoryliert und dessen transkriptionelle Aktivität erhöht (Chen und Goeddel 2002). JNK kann an der Aktivierung beider Wege beteiligt sein, wobei die Suppression der Apoptose in ihren molekularen Details noch nicht ganz zu erklären ist. Am besten untersucht ist die proapoptotische Funktion von JNK, indem es die Suppressoren der Apoptosewege hemmt. Diese Hemmung kann wiederum von TNF-induzierter NFκB-Aktivierung aufgehoben werden, so dass das Überleben erhöht wird (Liu und Lin 2005).

1.5.2 Regulation des TNFR1-Weges

In Abbildung 7 sind die bisherigen Kenntnisse des Zusammenwirkens der verschiedenen Wege dargestellt. Wird TNFR1 aktiviert, können zunächst alle in 1.5.1 genannten Proteine an TRADD binden und die verschiedenen Wege können aktiviert werden. TRAF2 wird vermehrt exprimiert und dient zur positiven Rückkopplung der Aktivierung des NFκB-Überlebensweges. Bcl-x_L hemmt die Ausführung der mitochondrial gesteuerten Apoptose und *inhibitor of apoptosis proteins* (IAPs) hemmen u.a. Caspase-3-Aktivität. Ein sehr wichtiges Protein für die Regulation ist *Flice-inhibitory protein* (FLIP). Zur Hemmung der Apoptose werden zwei Mechanismen eingesetzt. Zum einen kann es mit einer eigenen DED an FADD binden und so dessen Interaktion mit Caspase-8 verhindern, zum anderen wird der NFκB-Weg durch die Rekrutierung der Adaptorproteine, v.a. RIP1, an TRADD aktiviert. Alle diese Mechanismen dienen zur Aktivierung des Überlebens über den NFκB-Weg und zum Verhindern der Apoptose (Gupta 2002, Vermeulen *et al.* 2005, Magné *et al.* 2006).

Im Gegensatz zu den oben dargestellten Faktoren scheint RIP1 eine kritische Rolle für die Regulation der TNF-induzierten Apoptose darzustellen. Es dient als Substrat für Caspase-8, wobei das Spaltprodukt RIPc entsteht. RIPc erhöht die Interaktion zwischen TRADD und FADD, im Gegensatz zu RIP1, das diese Bindung inhibiert. Auch die Interaktion von RIP1 mit TRADD verlängert sich und die Signalweiterleitung ist gestört, was zu einer erhöhten Apoptose führt (Lin *et al.* 1999, Gupta 2002).

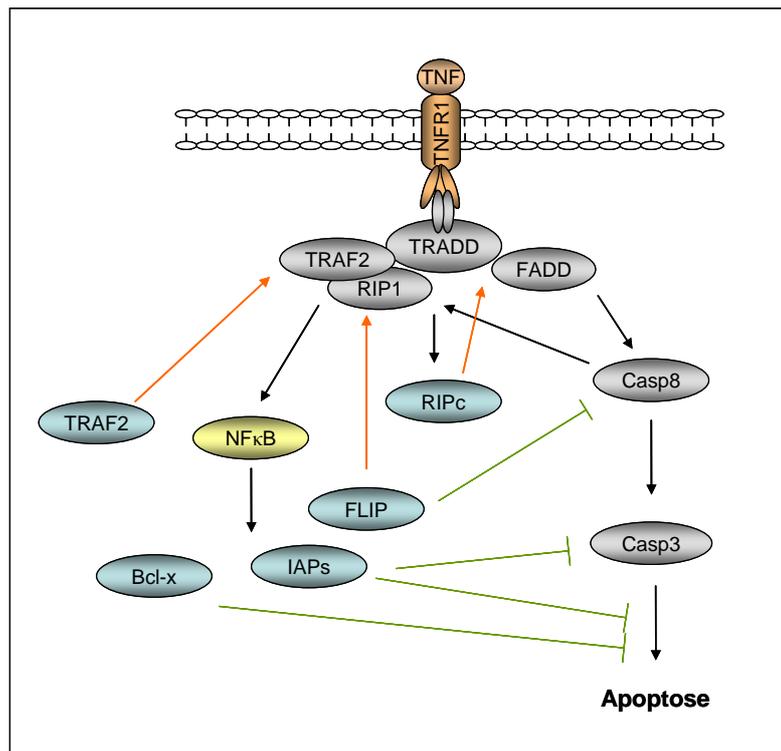


Abbildung 7: Regulation von Apoptose / NFκB durch TNFR1 (modifiziert nach Gupta 2002 und Magné *et al.* 2006); Welche einzelnen Proteine Funktion an der Regulation von Apoptose und Überleben übernehmen, ist im Text erläutert.

1.6 Apoptose

Der Zelltod ist ein essentieller Vorgang in lebenden Systemen. Dabei sind mehrere Mechanismen bekannt, wie Apoptose, Nekrose (Soldani und Scovassi 2002) und autophagischer Zelltod (Ferraro und Cecconi 2007, Maiuri *et al.* 2007).

Apoptose, der programmierte Zelltod, ist ein genau regulierter, evolutionär konservierter, physiologischer oder aber auch potentiell pathologischer Prozess, der in fast allen lebenden Zellen stattfindet. Während der Embryogenese spielt Apoptose eine sehr wichtige Rolle bei der Entwicklung vieler Organe. Außerdem können mittels Apoptose Zellen eliminiert werden, die eine Gefahr für den Organismus darstellen, wie z.B. viral infizierte Zellen oder hoch geschädigte Zellen (Vermeulen *et al.* 2005, Wang *et al.* 2005).

Der Mechanismus der Apoptose ist ein aktiver, energieabhängiger Prozess mit typischen zellulären, morphologischen und biochemischen Eigenschaften. Dazu gehören das Schrumpfen der Zelle, Entstehen von Membranblasen und die Kondensation und Fragmentierung des Chromatins. Außerdem können die Zellen in membranumgebene Vesikel zerfallen, die sog. *apoptotic bodies*, die anschließend von Phagozyten (Makrophagen) aufgenommen werden können (Soldani und Scovassi 2002, Vermeulen *et al.* 2005, Wang *et al.* 2005).

1.6.1 Caspasen

Sowohl bei der Einleitung als auch im gesamten Ablauf der Apoptose spielen Caspasen eine zentrale Rolle, indem sie Schlüsselproteine spalten. Normalerweise liegen Caspasen als Proenzyme vor und können über Autokatalyse oder Spaltung durch andere Caspasen an spezifischen Aspartatresten aktiviert werden. Caspasen werden in zwei Gruppen eingeteilt: Initiatorcaspasen (Caspase-2, -8, -9, -10) und Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, -7). Initiatorcaspasen vermitteln über ihre langen Prodomänen, die *death effector domains* (DED) oder eine *caspase recruitment domain* (CARD) enthalten, Proteininteraktionen mit Adaptorproteinen. Sie fungieren als Signaltransduktoren und aktivieren Effektorcaspasen. Durch die Effektorcaspasen werden verschiedenste Substrate gespalten, z.B. *Poly(ADP-ribose) polymerase* (PARP), Lamin, *caspase-activated DNase* (CAD), *inhibitor of caspase-activated DNase* (ICAD), Zellzyklusregulatoren, Transkriptionsfaktoren oder Signalproteine, was letztendlich zur Proteolyse zellulärer Proteine und nukleolytischen Spaltung der DNA führt. Die dadurch entstehenden zellulären, biochemischen und

morphologischen Veränderungen führen ultimativ zum Zelltod (Debatin und Krammer 2004, Fulda und Debatin 2004, Vermeulen *et al.* 2005, Wang *et al.* 2005).

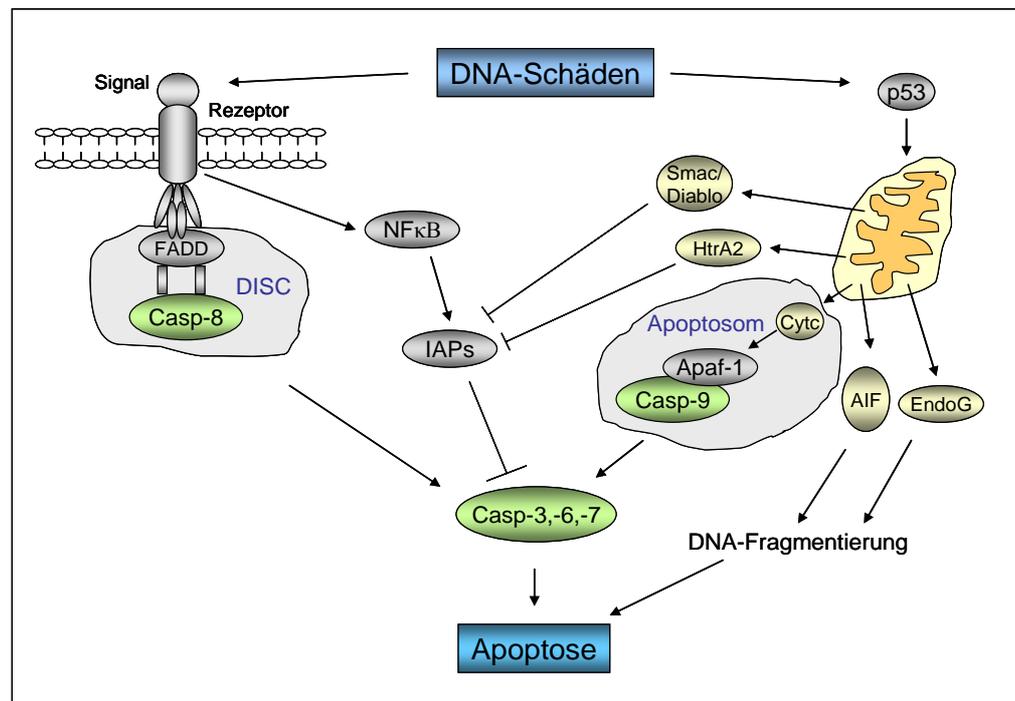


Abbildung 8: Übersicht der Wege zur Aktivierung der Apoptose; Links dargestellt ist der Todesrezeptor-Weg über den DISC-Komplex, rechts die verschiedenen Möglichkeiten der mitochondrialen Mechanismen.

Die Aktivierung der Caspasen kann über verschiedene Wege erfolgen. Die wichtigsten sind der extrinsische über die Aktivierung von Rezeptoren durch externe Stimulatoren (Todesrezeptor-Weg) und der intrinsische Weg über mitochondriale Signale (Mitochondrien-Weg) (Abbildung 8).

1.6.2 Mitochondrien-Weg

Aufgrund von DNA-Schäden wird das Tumorsuppressorprotein p53 stabilisiert, was zu einer Erhöhung der Konzentration von zellulärem p53 Protein führt. Darauf folgt eine Aktivierung des proapoptotischen Proteins Bax und durch dessen Interaktion mit den antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie wird deren Stabilisierung gehemmt. Außerdem wird ein Teil des stabilisierten p53 sehr schnell nach der Schädigung in die Mitochondrien transloziert und sorgt zusammen mit Bax für die Permeabilisierung der äußeren Membran (Shen und White 2001, Vousden und Lu 2002, Moll *et al.* 2005). So gelangen Proteine, die normalerweise zwischen äußerer und innerer Membran der Mitochondrien vorkommen, in das Zytoplasma der Zelle. Ein Beispiel dafür ist Cytochrom c. Gelangt es ins Zytoplasma, interagiert es mit Apaf-1, Procaspase-9 und desoxy-Adenosintriphosphat (dATP), wodurch das so genannte Apoptosom entsteht. Dadurch wird

Caspase-9 aktiviert und spaltet die Effektorcaspasen Caspase-3, -6, und -7, die wiederum ihre Substrate spalten und die Apoptose wird eingeleitet (Thornburn 2004, Wang *et al.* 2005). Neben Cytochrom c werden auch andere Proteine freigesetzt wie *apoptosis inducing factor* (AIF), Smac / Diablo, Omi / HtrA2, Endonuklease G, Caspase-2 oder -9, welche die Apoptose aktivieren. Durch Smac / Diablo und Omi / HtrA2 findet die Neutralisierung von IAPs statt. AIF und Endonuklease G können direkt Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung auslösen (Abbildung 8; Fulda und Debatin 2004, Wang *et al.* 2005).

1.6.3 Todesrezeptor-Weg

Apoptose über den Todesrezeptorweg wird durch die Bindung von Liganden an membrangebundene Rezeptoren ausgelöst. Die sechs bekannten Rezeptoren, Fas (Apo-1 oder CD95), TNFR1, DR3 (*death receptor 3*; Apo-3 oder TRAMP (*TNFR related apoptosis-mediating protein*)), TRAIL-R1 (*TNF related apoptosis inducing ligand receptor 1*; DR4), TRAIL-R2 (DR5 oder Apo-2), und DR6 gehören der TNFR-Superfamilie an. Charakteristisch ist allen Rezeptoren gemeinsam eine Todesdomäne (DD) am zytoplasmatischen Ende, die mit dem Adaptorprotein FADD interagieren kann. FADD, ein bifunktionales Protein, interagiert nach Stimulierung mit dem Rezeptor. Gleichzeitig bindet es an Procaspase-8, wodurch der sogenannte DISC ausgebildet wird. Durch die resultierende Aktivierung der Caspase-8 werden Effektorcaspasen wie Caspase-3 aktiviert und die Apoptose wird unmittelbar angeschaltet (Abbildung 8; Debatin und Kramer 2004, Thornburn 2004, Vermeulen *et al.* 2005, Wang *et al.* 2005).

1.6.4 Regulation der Apoptose

Da die meisten Zellen die Fähigkeit besitzen in Apoptose zu gehen, ist es für sie wichtig, auch inhibitorische Regulationsmechanismen zur Verfügung zu haben. Proteine der FLIP-Familie gehören zu den wichtigsten endogenen Inhibitoren (s. auch Punkt 1.5). Sie besitzen eine DED-Region und konkurrieren so um die Bindung an die DEDs von Caspase-8, -10 oder der Adaptorproteine TRADD und FADD. Dadurch kann der DISC nicht mehr entstehen und Apoptose wird verhindert (Vermeulen *et al.* 2005).

Auch die evolutionär hochkonservierten *inhibitor of apoptosis proteins* (IAPs) können sowohl den mitochondrialen als auch den extrinsischen Weg hemmen. Im Menschen wurden die Analoge XIAP, cIAP1, cIAP2, BRUCE (*B(aculo)I(AP)R(epeats) repeat containing ubiquitin-conjugating enzyme*), NAIP (*neuronal apoptosis inhibitory protein*),

Survivin und Livin nachgewiesen. IAPs inhibieren direkt die aktiven Caspasen-3 und -7 und blockieren die Aktivierung von Caspase-9. cIAP1 und cIAP2 können über NFκB exprimiert werden, was zu einer positiven Rückkopplung führt (s. auch Punkt 1.5.2). Eine negative Regulation der IAPs findet über Smac / Diablo und Omi / HtrA2, die beide bei der Initiation der Apoptose aus den Mitochondrien ins Zytoplasma gelangen und dort antagonistisch auf IAPs einwirken (Fulda und Debatin 2004, Vermeulen *et al.* 2005).

Bcl-2-Proteine spielen eine große Rolle bei der Regulation des mitochondrialen Weges. Die Proteinfamilie beinhaltet sowohl proapoptotische (Bax, Bak, Bad) als auch antiapoptotische (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1) Mitglieder und Moleküle mit nur einer BH3-Domäne (*BH3 domain only molecules*), Bid, Bim, Puma und Noxa, die den mitochondrialen Weg mit dem Todesrezeptorweg verknüpfen. Nach der Induktion der Apoptose werden proapoptotische Proteine vom Zytoplasma an die äußere Mitochondrienmembran rekrutiert, wo sie oligomerisieren und porenähnliche Strukturen bilden, die das Freisetzen von Cytochrom c erleichtern. Im Gegensatz dazu verhindern antiapoptotische Proteine die Freisetzung mitochondrialer Proteine (Fulda und Debatin 2004).

1.7 Zielsetzung

Mutationen in den Genen der *RAD6*-Epistasisgruppe im Organismus *S. cerevisiae* verursachen hohe Sensitivitäten gegenüber Bestrahlung und alkylierenden Substanzen, was mit einem veränderten Reparatur-, Rekombinations- und Mutationsverhalten der betreffenden Mutanten erklärt werden kann (Brusky *et al.* 2000, Xiao *et al.* 2000, Broomfield *et al.* 2001).

Die humanen Gene *hUBC13* und *TRAF6* besitzen Homologien zu den *RAD6*-Gruppenmitgliedern *UBC13* und *RAD5*, wobei *TRAF6* eine gleiche funktionelle Domäne (RING-Finger) mit *RAD5* aufweist und *hUBC13* eine ausgeprägte Sequenzhomologie zu *UBC13* der Hefe zeigt. Für beide humanen Gene sind wenige Funktionen in der DNA-Reparatur, lediglich im NFκB-Signalweg beschrieben (Deng *et al.* 2000, Wang *et al.* 2001, Andersen *et al.* 2005, Syed *et al.* 2006).

In dieser Arbeit sollte die Rolle von hUbc13 und TRAF6 in der DNA-Reparatur untersucht werden. Dazu sollte die Expression dieser Gene mittels RNA-Interferenz-Technik posttranskriptionell stillgelegt werden, um anschließend funktionelle Untersuchungen zu ermöglichen. Neben dem Vergleich der Überlebensdaten nach UV- und gamma-Bestrahlung und der Behandlung mit chemischen Agenzien mit entsprechenden Daten der Hefe, sollte auch das Reparatur-, Rekombinations- und Mutationsverhalten nach *knockdown* überprüft und Parallelen zur Hefe untersucht werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Rolle der Gene im NFκB-Signalweg genauer analysiert werden, inwiefern sie eine Rolle für das Gleichgewicht zwischen dem Überleben der Zellen und der Apoptoseinduktion spielen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin -5'-triphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Cp	<i>Crossing point</i>
CPD	Cyclobutandimere
CPT	Camptothecin
d	Tage (<i>days</i>)
Da	Dalton
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DSB	Doppelstrangbruch (<i>double strand break</i>)
DTT	Dithiothexitol
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
FACS	<i>Fluorescent Activated Cell Scanner/Sorter</i>
FCS	fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
fw	<i>forward</i>
G	Guanin
g	Gramm
Gy	Gray
h	Stunde (<i>hour</i>)
HCl	Salzsäure
HKG	Haushaltsgen (<i>house keeping gene</i>)
HR	Homologe Rekombination
HRP	<i>horse redish peroxidase</i>

k-	kilo-
l	Liter
λ	Wellenlänge (<i>lambda</i>)
LB	Luria-Bertani
LM	<i>low melting</i>
LSM	<i>Laser Scanning Microscope</i>
M	Molar (mol/l)
m-	Milli- (10^{-3})
μ -	Mikro- (10^{-6})
min	Minute
MMS	Methylmethansulfonat
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n-	Nano- (10^{-9})
NaAc	Natriumacetat
NaOH	Natronlauge
NP-40	Nonylphenyl-Polyethylenglycol
NHEJ	nicht homologe Endverknüpfung
NOV	Natriumorthovanadat
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PRR	Postreplikative Reparatur
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
RPE	Retinale Pigmentepithelzellen
Rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Real-time</i> PCR
s	siehe
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SLS	<i>sodium lauryl sarcosinate</i>
sek	Sekunde
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
sog	so genannt
SSB	Einzelstrangbruch (<i>single strand break</i>)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TLS	Transläsionssynthese (<i>translesion synthesis</i>)
T_M	Schmelztemperatur (<i>melting temperature</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100 [®]	Oktylphenylpoly-(ethylenglykolether) _n
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan Monolaurat
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt

Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
x g	-fache Erdbeschleunigung
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein (<i>yellow fluorescent protein</i>)

2.1.2 Geräte, Membranen und Filme

Agarosegelelektrophorese-Apparatur	(Wide-Mini-) Sub Cell GT, Biorad, München
Blotting-Apparatur	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Biorad, München
Bestrahlungsanlagen	HWM-D 2000 (Cs ¹³⁷)
Blotting-Papier	UV-Lampe (254 nm), Schütt Labortechnik, Göttingen
Cryoröhrchen	Whatmann 3 mm, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Deckgläser	Kisker-Biotech, Mühlhausen
Durchflusszytometer	Menzel, Braunschweig
Feinwaagen	BD LSR II, Becton Dickinson, USA
Fotometer	Sartorius, Göttingen
Geldokumentation	BioFotometer, Eppendorf, Hamburg
Glaswaren	GelDoc 2000, Biorad, München
Inkubationsschränke	Braun, Melsungen
Kanülen	Schott, Mainz
Kühl- und Gefriergeräte	Heraeus, Hanau
Küvetten	Sanyo, Japan
<i>Light Cycler</i>	Braun, Melsungen
Loch-Platten	Liebherr GmbH, Lienz
Magnetrührer	Sanyo, Japan
<i>Microplate Reader</i>	Brand, Wertheim
Mikroskope	Roche Molecular Diagnostics, Mannheim
Nitrozellulose-Membran	96, 24, 6; Falcon, USA
Objektträger	Ikamag RCT, IKA-Labortechnik, Staufen i.Br.
PAGE-Apparatur	Modell 550, Biorad, München
PCR-Geräte	Axiovert 25CF, Zeiss, Jena
Pipetten	LSM 510, Zeiss, Jena
Pipettenspitzen	Olympus LH50A, Olympus Optical Co., Hamburg
pH-Meter	Protran 0,2 mm, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Reaktionsgefäße	Super Frost (Plus), Menzel, Braunschweig
Röntgenfilme Wicorex	Hofer Mighty Small™ SE245, Dual Gel Caster, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Röntgenfilmentwicklermaschine	Cyclone gradient, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
	Eppendorf, Hamburg
	Aerosol resistant, Molecular Bioproducts, USA
	Eppendorf, Hamburg
	InoLab pH Level 1, UK
	0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml Eppendorf Hamburg
	15 ml, 20 ml Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
	FACS-Röhrchen, Falcon, USA
	PCR-Gefäße, Biozym Diagnostik GmbH, Hess-Oldendorf
	Linhardt, München
	Optimax Typ TR, MS Laborgeräte, Wiesloch

Scanner	Umax, PowerLook 1000, Willich
Schüttler	KS 250 Kreisschüttler, IKA Labortechnik,Staufen Roto-Shake Genial, Scientific Industries Inc., USA Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg Vortex, Bender & Hobein AG, Schweiz
Spannungsquellen	Biorad, München
Spritzen	Becton Dickinson, USA
Sterilbänke	Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau Laminar Flow, BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Vakuumpumpe	VacUbrad RS-4, F.Schultheiss, München
Wasserbad	Frigomix U1, Braun, Melsungen
Wipptisch	Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau
Zellkulturflaschen	Greiner Labortechnik Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturschalen	Nunc, Dänemark quadriperms, Greiner Labortechnik Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellzahl-Messgerät	Coulter Z1, Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Zentrifugen	Eppendorf centrifuge 5415c, Eppendorf, Hamburg Multifuge 3SR, Heraeus, Hanau Sigma 2K15, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz Zytospin, Hettich, Tuttlingen

2.1.3 Computerprogramme

Abbildungen	Adobe Photoshop CS, Adobe Inc. Adobe Image Ready CS, Adobe Inc. Microsoft® Power Point 2002, Microsoft
Abgleich von Sequenzen (<i>alignment</i>)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html
Auswertung von LSM-Bildern	Image Browser, Zeiss, Jena
Literaturrecherchen	http://www4.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/
Oligonukleotid-Konstruktion	http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer
Quantitative Auswertung von Western Blots	ImageMaster TotalLab, Amersham, UK
Sequenzsuche	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Software FACS	FACSNET, Becton Dickinson, USA
Tabellenkalkulation und Diagramme	Microsoft® Excel 2002, Microsoft
Textverarbeitung	Microsoft® Word 2002, Microsoft

2.1.4 Chemikalien

Agarose SeaKem LE	Biozym, Hess. Oldendorf
Agarose 0,1 % <i>Comet Assay</i>	Serva, Heidelberg
Agarose 0,5 % <i>Comet Assay</i>	amresco, USA
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Ammoniumacetat	Merck KG aA, Darmstadt
APS	Merck KG aA, Darmstadt
Bacto-Agar	Difco, Hamburg
Bacto-Trypton	Difco, Hamburg
Bacto-Yeast Extract	Difco, Hamburg
Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk	Biorad, München
Borsäure	Merck KG aA, Darmstadt
Bradfordreagenz	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Bromphenolblau	Molecular Diagnostics, Mannheim
BSA	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Calciumchlorid	Merck KG aA, Darmstadt
Chloroform	Merck KG aA, Darmstadt
Cisplatin	medac, Wedel
CPT	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Cycloheximid	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Desoxycholat	Merck KG aA, Darmstadt
DEPC	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
DMEM-F12	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
DMSO	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
DTT	Serva, Heidelberg
EDTA	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Essigsäure	Merck KG aA, Darmstadt
Ethanol absolut	Merck KG aA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
FCS	PAA Laboratories, Österreich
Formaldehyd	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Giensa	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Glycin	Merck KG aA, Darmstadt
Glycerin	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Hoechst 33342	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Isopropanol	Merck KG aA, Darmstadt
Luminol	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
2-Mercaptoethanol	Merck KG aA, Darmstadt
Methanol	Merck KG aA, Darmstadt
MMS	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Natriumacetat	Merck KG aA, Darmstadt
Natriumbicarbonat	Merck KG aA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KG aA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck KG aA, Darmstadt
Natriumpyruvat	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Natriumorthovanadat	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Paraformaldehyd	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Karlsruhe
Phosphate Buffered Saline	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

PMSF	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ponceau S	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Propidiumiodid	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Protogel TM	National Diagnostics, Atlanta, USA
Restore TM Western Blot Stripping Buffer	Pierce, USA
RPMI 1640	PAA Laboratories, Österreich
Roti-Puffer	Roth GmbH, Karlsruhe
Saccharose	Merck KG aA, Darmstadt
Salzsäure	Merck KG aA, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg
SLS	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
SYBR Green	Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe
TEMED	Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
TNF α	Biomol, Hamburg
Trichloressigsäure	Merck KG aA, Darmstadt
Tris	Merck KG aA, Darmstadt
Triton X-100	Merck KG aA, Darmstadt
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin	GibcoBRL, Karlsruhe
Tween-20	Merck KG aA, Darmstadt
Vectashield – <i>mounting medium</i>	Linaris, Wertheim
Wasserstoffperoxid	Merck KG aA, Darmstadt

2.1.5 Antikörper, Inhibitoren

Anti-Aktin (Ziege)	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
Anti-IkappaB (Kaninchen)	Cell Signaling, USA
Anti-p65 (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
Anti-PARP (Kaninchen)	Cell Signaling, USA
Anti-PCNA (Maus)	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
Anti-Phospho-Histon H2A(Ser139)X (Maus)	Upstate, BioMol, Hamburg
Anti-Rad18 (Maus)	Abcam, UK
Anti-TNFR1 (Maus)	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
Anti-TRAF6 (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
Anti-Tubulin Ab-2 (Maus)	NeoMarkers, USA
Anti-UBC13 (Maus)	Zymed, Invitrogen, Karlsruhe
Caspase8-Inhibitor-GranzymB-Inhibitor III (Z-IE(OMe)TD(OMe)-FMK)	Calbiochem, Darmstadt
Affe-anti-Ziege, IgG, HRP-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
NFkB-Inhibitor SN50	Biomol, Hamburg
Schaf-anti Maus, Alexa488 konjugiert	Invitrogen, Karlsruhe
Ziege-anti-Kaninchen, Cy3 konjugiert	Jackson Immuno Research, USA
Ziege-anti-Kaninchen, IgG, HRP-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA
Ziege-anti-Maus, IgG, HRP-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology Inc., USA

2.1.6 Kits, Substrate

Caspase-3-Substrat, colorimetrisch	Calbiochem, Darmstadt
Cell Proliferation Kit I	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
DharmaFECT	Dharmacon, USA
ECL Advance Western Blot Detection Kit	Amersham Biosciences, USA
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe
MTT - Cell Proliferation Kit	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Polyfect Transfection Reagent	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAprep Maxiprep Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Quantitect	QIAGEN GmbH, Hilden
RNeasy	QIAGEN GmbH, Hilden
RNAi Starter Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
SiLentFect Lipid	Biorad, München
Taq Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
TUNEL	Promega, USA

2.1.7 Längenstandard

1 kb DNA-Längenstandard	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
Prestained SDS-PAGE-Standard	Biorad, München

2.1.8 Lösungen und Puffer

0,8 % Agarose für Gelelektrophorese

4 g Agarose einwiegen

500 ml TBE-Puffer während des Aufkochens in der Mikrowelle nach und nach zugeben, dreimal aufkochen lassen, zwischendurch rühren, flüssige Agarose bei 60° C lagern

Ammonium-Ethanol-Lösung

5 ml 10 M Ammoniumacetat

45 ml 100 % Ethanol

Assay-Puffer für Caspaseaktivität

100 mM HEPES, pH 7.5

0,5 mM EDTA

20 % Glycerol

50mM DTT

Blockpuffer für Antikörperdetektion (Western Blot)

8 % Magermilchpulver in 1 x TBS-T lösen

0,1 M CaCl₂ / 0,01 M Tris-Lösung für kompetente *E.coli* Zellen

14,7 g CaCl₂ x H₂O

1,2 g Tris-Base

in 1 l Wasser lösen, pH 8,0 einstellen und autoklavieren

DEPC-Wasser

0,1 % (v/v) DEPC in bidest. Wasser, autoklavieren

6 x DNA-Auftragspuffer in TE-Puffer

50 % (w/v) Saccharose

0,1 % (w/v) Bromphenolblau

dNTP-Mix

dATP-, dCTP-, dGTP-, dTTP-Stammlösungen zu gleichen Teilen mischen

Konzentrationen der dNTPs im Mix: [dATP] = [dCTP] = [dGTP] = [dTTP] = 10 mM

Färbelösung für *Comet Assay*

60 µl DMSO

950 µl bidest. Wasser

200 µl Vectashield

1 µl SYBR-Green

für mehrere Tage bei 4 °C lager- und verwendbar

Laemmli-Auftragspuffer

100 mM Tris-HCl pH 6,8

4 % SDS

0,2 % Bromphenolblau

20 % Glycerin

200 mM DTT immer frisch zugeben

5 x Laemmli-Laufpuffer für SDS-PAGE

25 mM Tris-Base

250 mM Glycin

0,1 % SDS

Laufpuffer für *Comet Assay*

300 mM NaOH

2 % DMSO

10 mM EDTA, pH 10

LB (Luria Bertani) -Medium

10 g Trypton

5 g Yeast – Extract

10 g NaCl

in Wasser lösen, pH 7 einstellen, auf 1 l auffüllen, autoklavieren

Für Plattenmedium 20 g Bacto-Agar zugeben, autoklavieren, im Wasserbad auf 50 °C abkühlen lassen.

Lysepuffer I für Säugerzellen, Caspaseaktivitäten

25 mM Tris-HCl, pH 7.5

120 mM NaCl

0,3 % Triton X-100

Lysis-Hochsalzpuffer für Säugerzellen, IκB-Nachweis

20 mM HEPES/NaOH, pH 7.9

350mM NaCl

1mM MgCl₂

0,2 mM EDTA

0,1 mM EGTA

1 % NP-40

20 % Glycerin

Lysispuffer I (Comet Assay)

2,5 M NaCl

100 mM EDTA, pH 10

10 mM Tris-HCl, pH 10

1 % SLS

1 % Triton-X 100

Lysispuffer II (Comet Assay)

2,5 M NaCl

100 mM EDTA, pH 10

10 mM Tris-HCl, pH 10

3 M Natriumacetat

24,6 g NaAc in Wasser lösen, pH 5,8 mit Essigsäure einstellen, auf 100 ml auffüllen

NOV- Stammlösung (100 mM)

18,3 mg / ml Wasser

2 % Paraformaldehyd

1,5 g Paraformaldehyd

75 ml PBS

lösen bei 72 °C

PBS (Phosphate buffered saline)

9,6 g PBS lösen in 1 l Wasser, autoklavieren

1 % PBS + (Blockpuffer für Immuncytochemie)

100 ml PBS

1 % BSA

PMSF-Stammlösung (100 mM)

17,4 mg PMSF / ml Isopropanol

PonceauRotS-Färbelösung

0,2 % (w/v) PonceauRotS in 5 % Trichloressigsäure lösen

RIPA-Puffer – Lysepuffer für Säugerzellen

150 mM NaCl

10 mM Tris-Lösung, pH 7.2

0,1 % SDS

1 % Triton X-100

1 % Desoxycholat

5 mM EDTA

SDS-PAGE

10 % Trenngel

375 mM Tris-Lösung pH 8,8

10 % Acrylamid / Bisacrylamid (37,5 / 1) (Protogel™)

0,1 % SDS-Lösung

0,1 % APS

0,01 % TEMED

5 % Sammelgel

125 mM Tris-Lösung pH 6,8

5 % Acrylamid / Bisacrylamid (37,5 / 1) (Protogel™)

0,1 % SDS-Lösung

0,1 % APS

0,01 % TEMED

10 x TBS-T

20 mM Tris-Base (2,4 g / l)

137 mM NaCl (8 g / l)

0,1 % Tween 20 (1 ml / l)

pH 7,6

10 x TBE

1 M Tris-Base (121,1 g / l)

2 mM EDTA (0,8 g / l)

Borsäure bis pH 8,3 zugeben, auf 1 l mit Wasser auffüllen

10 x TE

50 ml 1 M Tris-Base

10 ml 0,5 M EDTA

auf 500 ml mit Wasser auffüllen

Towbin-Puffer

3 g Tris-Base

14,4 g Glycin

in H₂O lösen

200 ml Ethanol

auf 1 l mit Wasser auffüllen

1 M Tris (pH je nach Wunsch)

121,1 g Tris-Base auf 1 l mit Wasser auffüllen

pH mit HCl einstellen

2.1.9 Säugerzelllinien und Zellkulturmedien

Zelllinie	Bezugsquelle	Mediumzusammensetzung
HeLa	H. Eichholtz-Wirth, ISB	RPMI 1640 10 % FCS 40 U / ml Penicillin, 40 µg / ml Streptomycin
hTERT-RPE	Clontech Invitrogen; L. Hieber, GSF	DMEM-F12 (1:1) 10 % FCS 17,3 ml 7,5 % Natriumbicarbonatlösung 40 U / ml Penicillin, 40 µg / ml Streptomycin

2.1.10 Chemisch synthetisierte siRNAs

Negative Kontrolle (Qiagen)

5' - UUCUCCGAACGUGUCACGUt - 3'
3' - ttAAGAGGCUUGCACAGUGCA - 5'

Negative Kontrolle – Cy3 markiert (Qiagen)

siUBC13-1 (Ambion)

5' - GGCUAUAUGCCAUGAAUAAt - 3'
3' - ttCCGAUAUACGGUACUUAUU - 5'

siUBC13-2 (Ambion)

5' - GCUUGUGUGUCAUCAGAAAt - 3'
3' - ttCGAACACACAGUAGTCUUU - 5'

siTRAF6 Kontrolle (Invitrogen)

5' - GCAACGGUGAACGGUUAUUCAAUA - 3'
3' - CGUUGCCACUUGCCAAUUAAGUUUAU - 5'

siTRAF6 (Invitrogen)

5' - GCACAGCAGUGCAAUGGAAUUUAUA - 3'
3' - CGUGUCGUCACGUUACCUUAAAUAU - 5'

2.1.11 Oligonukleotide zur PCR

Berechnung der Anlagerungstemperatur T_A nach der Wallace-Regel

$$T_A = [m \times 2^\circ\text{C} + n \times 4^\circ\text{C}] - 5^\circ\text{C}$$

m = Anzahl von A und T

n = Anzahl von C und G

Die Schmelztemperatur T_M liegt 5°C über der berechneten Anlagerungstemperatur.

Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	T_M ($^\circ\text{C}$)
Actin fw	5' - CCATCATGAAGTGTGACGTGG -3'	59,8
Actin rev	5' - GCCATGCCAATCTCATCTTGT -3'	57,9
Beta2M	Keine Sequenzangabe der Fa Qiagen	
IL6 fw	5' - TACATCCTCGACGGCATCTC -3'	60,0
IL6 rev	5' - CCTCTTTGCTGCTTTCACAC -3'	58,0
IL8 fw	5' - CAGAGGGTTGTGGAGAAGTTT -3'	59,0

IL8 rev	5'- GCTTGAAGTTTCACTGGCAT -3'	56,0
Rad18	Keine Sequenzangabe der Fa Qiagen	
TNFfw	5'- CCATGTTGTAGCAAACCCTCA -3'	57,9
TNFrev	5'- AGATAGTCGGGCCGATTGAT -3'	57,3
TRAF6 fw	5'- TGAAAGTGACTGCTGTGTGGC -3'	61,3
TRAF6 rev	5'- TGTGACCTGCATCCCTTATTG -3'	59,4
UBC13 fw	5'- CCTTTGAGGGAGGGACTTTTA -3'	59,4
UBC13 rev	5'- TGCAAACAAAGAGGAGGAAGT-3'	57,4

2.1.12 Vektoren

2.1.12.1 pDSon-Neo

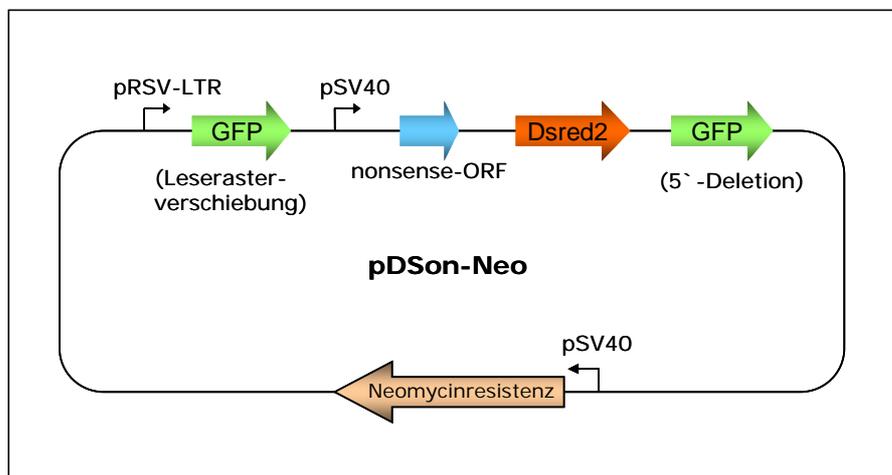


Abbildung 9: Der Vektor pDSon-Neo (nach A. Rickinger)

In Abbildung 9 wird der Vektor pDSon-Neo dargestellt. Dieser Vektor enthält zwei mutierte GFP-Allele (mit einer Leserasterverschiebung bzw. mit einer 5'-Deletion), die miteinander zu einem funktionellen Allel rekombinieren können. Dadurch können Zellen das grün fluoreszierende Protein synthetisieren, welches dann durchflusszytometrisch nachgewiesen werden kann. Die kodierte Neomycinresistenz wird zur Selektion von positiv transfizierten Zellen genutzt. Der *nonsense ORF* und das dazugehörige Dsred2 sind für die Untersuchung der spontanen homologen Rekombination irrelevant. Für Untersuchungen der homologen Rekombination wurden freundlicherweise bereits positive selektionierte hTERT-RPE-Zellen mit integriertem Vektor von A. Rickinger, GSF, zur Verfügung gestellt.

2.1.12.2 Mutationsvektoren

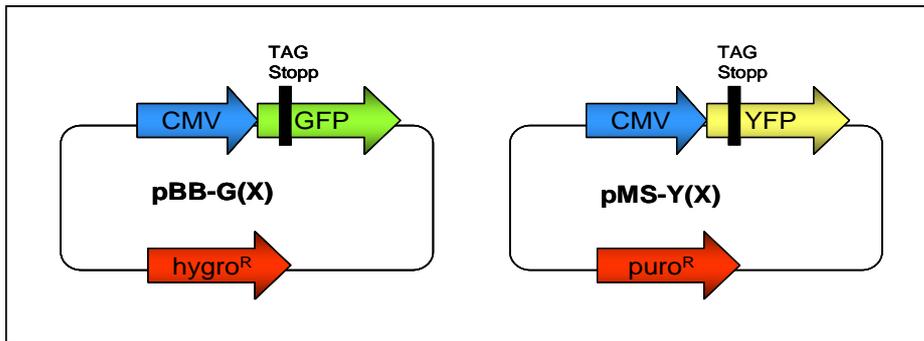


Abbildung 10: Die Vektoren pBB-G(X) und pMS-Y(X)

Beide Vektoren, pBB-G(X) und pMS-Y(X), freundlicherweise von Dr. J. Bachl, GSF Großhadern, zur Verfügung gestellt, kodieren jeweils für ein fluoreszierendes Protein, das aufgrund des Stoppcodons TAG nicht exprimiert werden kann. Durch Mutation kann das Stoppcodon revertiert werden. Zellen können die fluoreszierenden Proteine über den starken CMV-Promotor exprimieren. So kann der Anteil der fluoreszierenden Zellen im Durchflusszytometer nachgewiesen werden. Außerdem wird zur Selektion von transfizierten Zellen eine Antibiotikumsresistenz kodiert. Aufgrund einer bereits vorhandenen Hygromycinresistenz von hTERT-RPE-Zellen wurden diese mit pMS-Y(X) transfiziert. Da das gelb fluoreszierende YFP aber schlechter zu detektieren ist, als GFP, wurden HeLa-Zellen mit pBB-G(X) transfiziert.

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz und der Einstellung im Durchflusszytometer wurden Zellen auch mit den zugehörigen Kontrollvektoren transfiziert. Dabei sind die kodierten Sequenzen der fluoreszierenden Proteine nicht durch ein Stoppcodon durchbrochen, sondern GFP (pBB-GFP) und YFP (pMS-YFP) können ohne Stimulus exprimiert werden.

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen zur Transformation

Damit fremde Plasmid-DNA von Bakterienzellen aufgenommen wird, muss die Zellwand partiell durchlässig gemacht werden. Diese sog. kompetenten Zellen wurden nach der Kalziumchlorid-Methode nach Sambrook *et al.* 1989 hergestellt.

Von dem gewünschten Bakterienstamm wurde mit einer sterilen Impföse eine ÜN-Kultur in sterilem LB-Medium angelegt. Diese wurde dann in LB-Medium 1:100 verdünnt, und solange bei 37 °C geschüttelt, bis eine optische Dichte von 0,3 bis 0,4 bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) erreicht war. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4000 rpm, 4 °C, 15 min) geerntet, der Überstand verworfen und die Zellen sofort auf Eis gestellt. Das Sediment wurde in 245 ml eiskalter Kalziumchlorid-Tris-Lösung gründlich resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (15 min, 4000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand wieder verworfen, das Sediment in 5 ml Kalziumchlorid-Tris-Lösung aufgenommen und 2 h auf Eis inkubiert. Schließlich wurde Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 15 % zugegeben und die Suspension in 200 µl Aliquots aufgeteilt. Wurde die Zellsuspension nicht sofort weiter verwendet, wurden Aliquots bei – 80 °C gelagert.

2.2.1.2 Transformation von *E. coli*-Zellen mittels Hitzeschock

Kompetente *E. coli*-Zellen können fremde Plasmid-DNA aufnehmen, wenn sie einem Hitzeschock ausgesetzt werden (Lederberg *et al.* 1974).

Die kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, mit 0,1 – 1 µg DNA versetzt und vorsichtig gemischt. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 2 min 42 °C ausgesetzt (Hitzeschock) und wieder auf Eis gestellt. Im Anschluss wurde 800 µl LB – Medium zugegeben und bei 37 °C 1 h geschüttelt, um Resistenzbildung zu ermöglichen. Von der Suspension wurden 0,1 %, 1 %, 10 % und 88,9 % auf Agarplatten, die das entsprechende Selektionsantibiotikum enthielten, ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.3 Anlegen von Gefrierkulturen

Da Flüssigkulturen nur kurz und Agarplatten im Kühlschrank nur bis zu vier Wochen gelagert werden können, wurden zur längerfristigen Aufbewahrung Gefrierkulturen angelegt. Dazu wurden Zellen aus einer ÜN-Flüssigkultur 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment in 800 µl LB-Medium aufgenommen. Die Kultur wurde mit 200 µl sterilem 87 %igem Glycerin versetzt, gemischt und bei – 80 °C eingefroren.

2.2.1.4 Flüssigkultur zur Anzucht und Plasmidpräparation von *E. coli*

Um Plasmid-DNA aus Zellen zu isolieren, wurden diese in Flüssigkultur angezüchtet. Die Bakterien wurden mit einer sterilen Impföse von der Oberfläche einer Gefrierkultur abgenommen und in das benötigte Volumen LB-Medium überführt. Wurden *E. coli* kultiviert, die mit einem Plasmid transformiert sind, musste dem Medium das entsprechende Antibiotikum in geeigneter Konzentration zur Selektion zugefügt werden. Die Zellen wurden 12 – 16 h bei 160 – 200 rpm und 37 °C geschüttelt.

2.2.1.5 Isolierung von Plasmid-DNA in großem Maßstab

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu erhalten, erfolgten der Zellaufschluss und die Plasmidisolierung mittels des *QIAprep Maxiprep Kit*.

Es wurde eine ÜN-Kultur (500 ml) von *E. coli*, die das gewünschte Plasmid enthält, angelegt. Am nächsten Tag wurden die Zellen geerntet (6000 rpm, 15 min, 4°C), der Überstand verworfen und das Zellsediment in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 10 ml Puffer P2 wurden die Zellen lysiert (5 min, RT). Dann wurden 10 ml Puffer P3 zugegeben und 20 min auf Eis präzipitiert und schließlich bei 13000 rpm, 4°C, 30 min abzentrifugiert. In dieser Zeit wurde die Säule mit Puffer QBT äquilibriert, auf die nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 min, 15000 rpm) der Überstand geladen wurde. Danach wurde die Säule zweimal mit Puffer QC gewaschen und die DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert. Um überschüssige Salze zu entfernen wurden 10,5 ml Isopropanol zum Eluat gegeben und die DNA bei 13000 rpm, 4 °C 30 min gefällt. Das entstandene Sediment wurde in 500 µl Wasser gelöst und anschließend mit 3 M NaAc-Lösung und Ethanol noch mal gefällt (siehe 2.2.1.6.).

2.2.1.6 Präzipitation von DNA

Um DNA stärker zu konzentrieren oder zu reinigen, kann mit Ethanol und Natrium-Acetat gefällt werden. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 1/10 Vol 3 M NaAc (pH 5,0) und anschließend mit 2,5 Vol 100 % Ethanol versetzt. Diese Lösung wurde 20 min bei – 20 °C präzipitiert und danach 15 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 500 µl 70 % Ethanol 10 min bei 15000 rpm gewaschen, an der Luft getrocknet und im gewünschten Volumen Wasser gelöst.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Kultur von Säugerzellen

Säugerzellen wurden je nach gewünschter Zellzahl in Zellkulturschalen bzw. -flaschen mit der benötigten Größe kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂.

Um adhärente Zellen zu passagieren, ernten oder einzufrieren, wurden sie mit Trypsin behandelt, damit sie sich vom Schalenboden ablösen. Da das FCS-haltige Medium dazu vollständig entfernt werden musste, wurde mit PBS gewaschen, bevor Trypsin zugegeben werden konnte. Nach Zugabe von Trypsin wurde je nach Zelllinie 1 – 5 min bei 37 °C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde Medium oder PBS, das 10 % FCS enthält, in mindestens vierfacher Menge zugegeben. Durch Abspülen des Bodens mit der Zellsuspension wurden die restlichen Zellen vom Boden gelöst und gleichzeitig eventuelle Zellhaufen vereinzelt. Je nach Verwendungszweck wurden die Zellen zur weiteren Kultivierung in neue Kulturgefäße oder zur Ernte in 15 ml Röhrchen, in denen dann zentrifugiert wurde (300 x g, 5 min), überführt.

2.2.2.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl pro ml wurde bestimmt, indem 500 µl Zellsuspension mit 19,5 ml 0,9 M NaCl vermischt und im *Coulter Counter Z1* gemessen wurde. Das Gerät gab die Zellzahl pro ml Ausgangssuspension an, da die Verdünnung und andere Parameter bereits berücksichtigt waren.

2.2.2.3 Gefrierkultur von Säugerzellen

Zur Lagerung von Zellen wurde das abzentrifugierte Sediment in 1 ml Einfriermedium (Kulturmedium mit 10 % DMSO versetzt) resuspendiert und in *Cryoröhrchen* überführt. Da Säugerzellen langsam eingefroren werden sollen, wurden die Röhrchen in einen *Nalgene Cryo 1 °C Freezing Container* gegeben, der mit Isopropanol gefüllt wurde und bei – 80 °C ÜN inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zellen aus eingefrorenen Kulturen wurden in den *Cryoröhrchen* aufgetaut, in 10 ml kaltes Kulturmedium überführt und bei 300 x g 5 min abzentrifugiert um DMSO zu entfernen. Anschließend wurde das Zellsediment in 15 ml kaltes Medium gegeben, ausgesät und unter entsprechenden Kulturbedingungen inkubiert.

2.2.2.4 Bestimmung des Überlebens von Zellen

2.2.2.4.1 Koloniebildungstest

Um die Überlebensfähigkeit von Zellen nach Bestrahlung oder Behandlung mit chemotherapeutischen Agenzien nachzuweisen, wurden Zellen so dünn in 6 cm Schalen ausgesät, z.B. 100 und 200 Zellen bei der unbehandelten Kontrolle, dass sie ohne Kontakt zu den Nachbarzellen waren. Einen Tag nach dem Aussäen wurden die Zellen entsprechend behandelt und 7-10 d wachsen lassen, wobei drei Tage nach Behandlung das Medium gewechselt wurde. In dieser Zeit vermehrten sich die Einzelzellen und bildeten so genannte Kolonien, die sich aus einer einzigen Ausgangszelle gebildet haben und nun mit Giemsa angefärbt werden konnten. Zuerst wurde dafür das Medium entfernt, mit PBS gewaschen und 10-15 min mit 100 % Ethanol eine Fixierung der Zellen durchgeführt. Nach einer zehnminütigen Inkubation in einer 1:20 mit PBS verdünnten Giemsalösung wurden die Kolonien mit Wasser gewaschen, die Schalen getrocknet und unter dem Mikroskop ausgezählt.

2.2.2.4.2 Aktivitätstest mit MTT nach Roche

Metabolisch aktive Zellen können das im Test eingesetzte MTT (3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) umsetzen. Dabei entstehen aus dem gelben Tetrazoliumsalz MTT violette Formazankristalle, die in den Zellen eingelagert werden und erst mit Hilfe eines Reagenz, das SDS enthält, in Lösung gebracht werden. Das

Verschieben des Absorptionsspektrums kann genutzt werden, um die metabolische Aktivität der Zellen fotometrisch zu ermitteln.

hTERT-RPE-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in 24-well-Platten ($1 - 5 \times 10^3$ Zellen) ausgesät und inkubiert. 48 h nach der Transfektion mit siRNA wurden die Zellen bestrahlt und weitere 48 h inkubiert. In dieser Zeit hatten sie die Möglichkeit sich mindestens einmal zu teilen, da die Generationszeit von hTERT-RPE-Zellen bei etwa 40 h liegt. Nach diesen 48 h wurde das MTT-Reagenz zugegeben (1/10 Vol des Kulturmediums) und 3 – 4 h damit inkubiert. Metabolisch aktive Zellen konnten das Reagenz umsetzen und einlagern, inaktive nicht. Spätestens nach 4 h wurde die *solubilization solution* zugegeben (1 Vol des Kulturmediums), um die Zellen aufzulösen und die eingeschlossenen Kristalle in Lösung zu bringen. Noch einmal wurde ÜN inkubiert und am nächsten Morgen die Absorption bei 595 nm gemessen.

2.2.2.5 Genspezifischer *knockdown* durch chemisch synthetisierte siRNAs

Die RNA-Interferenz-Technik beruht auf sequenzspezifischer RNA-Degradation, induziert durch doppelsträngige RNA und ist mittlerweile ein etabliertes System zur schnellen und effizienten Herunterregulierung von Genexpression.

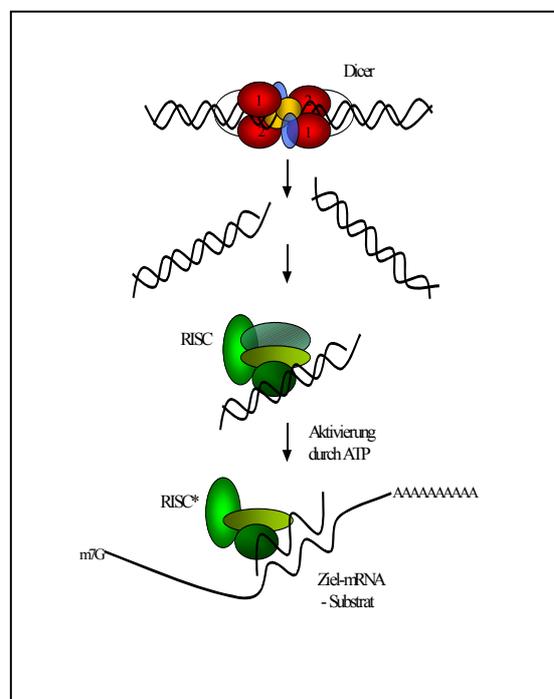


Abbildung 11: Mechanismus des RNA-Interferenzsystems (nach Hannon, 2002); Dicer bildet aus dsRNA 21-23 nt lange Fragmente, die von RISC erkannt werden. Nach Aktivierung von RISC und Paarung mit der homologen Ziel-mRNA wird diese durch endonukleolytische Spaltung degradiert.

In Abbildung 11 ist der Mechanismus dargestellt. Der erste Schritt, nachdem die doppelsträngige RNA in die Zelle eingebracht wurde, ist die Spaltung in etwa 22 nt lange Fragmente, den sogenannten siRNAs (*short interfering RNAs*). Der Initiator dieses Schrittes ist der Enzymkomplex Dicer, der aus einer Helikase und einem RNaseIII Enzym besteht. Dicer erkennt und bindet an die dsRNA, entwindet den Doppelstrang über seine Helikaseaktivität und spaltet sie in 21-23 nt lange dsRNA-Fragmente. Der Effekt der RNA-Interferenz wird durch die Bindung der siRNAs an verschiedene Proteine vermittelt, wodurch der sogenannte siRNP-Komplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) entsteht. Eine Untereinheit ist die siRNA, über die der Komplex die komplementäre Ziel-mRNA erkennt. Helikaseuntereinheiten entwinden die ds-siRNA unter ATP-Verbrauch und ermöglichen die Paarung des *antisense*-Stranges mit der Ziel-mRNA, der *sense*-Strang wird degradiert. Somit ist ein aktiver RISC-Komplex gebildet worden, der über endonukleolytische Spaltung die homolog gepaarte mRNA degradiert (Sharp, 2001, Hannon, 2002 und Szweykowska-Kulinska *et al.*, 2003).

2.2.2.5.1 siRNA-Hybridisierung

Je nach Firma wurden verschiedene Methoden verwendet, um siRNAs zu hybridisieren. Die Firma Qiagen (Kontroll-siRNA, siRAD18) lieferte einen *suspension buffer* mit, in welchem die lyophilisierte siRNA zuerst gelöst wurde (250 µl um eine 20 µM Lösung zu erhalten). Diese Lösung wurde eine Minute auf 90 °C erhitzt und danach eine Stunde im abgeschalteten Heizblock inkubiert, wobei eine Abkühlung auf 37 °C erreicht wurde. Die so hybridisierte siRNA wurde aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Bei der Firma Ambion (siUBC13) wurden *sense*- und *antisense*-RNA-Oligonukleotide in verschiedenen Gefäßen geliefert und mussten zunächst in 100 µl RNase freiem Wasser gelöst werden, um sie anschließend zu vereinigen. Dazu wurden 50 µl 5 x *annealing buffer* gegeben und für eine Minute auf 90 °C erhitzt, wobei eine 160 µM Lösung entstand. Dann wurde hier ebenfalls eine Stunde im abgeschalteten Heizblock inkubiert und die nun hybridisierte siRNA aliquotiert und zu -20 °C gegeben. Zur Transfektion wurde die Lösung noch 1:8 verdünnt, um eine 20 µM Lösung zu erhalten.

Die siRNAs der Firma Invitrogen (siTRAF6) wurden bereits hybridisiert bestellt und mussten nur noch in 1 ml RNase freiem Wasser gelöst werden, was dann einer Gebrauchslösung von 20 µM entspricht. So konnten sie sofort verwendet oder aliquotiert und bei -20 °C gelagert werden.

2.2.2.5.2 Transfektion von Säugerzellen

Säugerzellen können mit verschiedenen Methoden behandelt werden, damit sie DNA oder RNA aufnehmen. Für die Transfektion mit siRNA wurde liposomvermittelte Endozytose mit Reagenzien verschiedener Anbieter verwendet.

2.2.2.5.2.1 Transfektion von hTERT-RPE-Zellen mit chemisch synthetisierter siRNA und Biorad SiLent Lipid Fect

Im Folgenden beziehen sich die Mengen auf 6-Loch-Platten, für andere Größen muss entsprechend mehr oder weniger verwendet werden. Am Tag vor der Transfektion wurden etwa 5×10^4 Zellen pro Ansatz ausgesät, so dass sie am nächsten Tag eine Konfluenz von 50 – 70 % erreicht haben. Das Medium wurde 15 – 60 min vor Transfektion durch 1,25 ml frisches ersetzt. 3 μ l Reagenz und 10 nM siRNA wurden jeweils mit 125 μ l serumfreien Medium verdünnt, vereinigt und gemischt. Nach 20 min Inkubation bei RT wurden 250 μ l des gebildeten Komplexes auf die Zellen gegeben und gemischt. Weiterführende Versuche wurden etwa 96 h Stunden nach Transfektion und Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ durchgeführt.

2.2.2.5.2.2 Transfektion von Hela-Zellen mit chemisch synthetisierter siRNA und Dharmafect

Pro Transfektionsansatz wurden am Tag vorher 6×10^4 Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät. 50 nM (5 μ l) siRNA wurden in 195 μ l serumfreien Medium verdünnt, 4 μ l Transfektionsreagenz in 195 μ l. Beides wurde vereinigt, gemischt und 20 min bei RT inkubiert. Danach wurde 1,6 ml Kulturmedium dazu gegeben und diese 2 ml Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben. 4 – 6 h nach Zugabe wurden noch mal 2 ml Kulturmedium zugegeben und 72 h inkubiert. 3 d nach Transfektion wurden die Zellen neu aufgeteilt in 6 cm Schalen und 24 h später bestrahlt oder entsprechend behandelt.

2.2.2.5.2.3 PolyFect Transfection Reagent von Qiagen zur Transfektion von hTERT-RPE-Zellen mit Plasmid-DNA

Am Vortag wurden etwa 10^5 Zellen in 6-Loch-Platten eingesät, damit am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 40 – 80 % erreicht wurde. Die DNA (4 μ g) wurde mit serumfreien Medium (100 μ l) verdünnt und mit dem Transfektionsreagenz (8 μ l) vermischt. In der fünfminütigen Inkubationszeit wurden die Zellen mit 2 ml PBS

gewaschen und mit 1,5 ml frischem Medium bedeckt. Das Gemisch aus Reagenz und verdünnter DNA wurde mit 0,6 ml Medium vermischt und auf die Zellen gegeben.

2.2.2.5.2.4 Lipofectamin Reagent von Invitrogen zur Transfektion von HeLa-Zellen mit Plasmid-DNA

HeLa-Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in 12 Loch Platten ausgesät, so dass sie am Transfektionstag eine Konfluenz von 90 – 95 % erreichen. Zuerst wurde das Medium durch 1 ml frisches ersetzt und die Zellen wieder im Brutschrank inkubiert. 1,6 µg DNA und 4 µl Lipofectamin wurden je in 100 µl serumfreien Medium verdünnt, 5 min inkubiert und miteinander vereint. Nach 20 min Inkubation bei RT wurde der Transfektionsansatz zu den Zellen gegeben. Bei Transfektion mit einem Plasmid, welches eine Resistenz kodiert, wurde 24 h nach Transfektion das entsprechende Selektionsmedium zugegeben.

2.2.2.6 Analyse im Durchflusszytometer

Zur Analyse von Zellen im Durchflusszytometer wurden adhärenente Zellen entsprechend mit Trypsin behandelt und in PBS mit 10 % FCS aufgenommen. Die Zellen wurden bei 300 x g 5 min sedimentiert und in 0,5 – 1 ml PBS aufgenommen.

Die Analyse der Proben erfolgte im Durchflusszytometer. Dabei werden Zellen durch einen Mantelflüssigkeitsstrom als Einzelzellen durch einen Laserstrahl geleitet. Die Zellen streuen Licht in Abhängigkeit ihrer Zellgröße und der Zellstruktur. Das Streulicht wird von zwei Detektoren erfasst. Einer misst das so genannte Vorwärtsstreulicht (FSC = *forward scatter*) in Richtung des Laserstrahls, der zweite misst das Seitwärtsstreulicht (SSC = *side scatter*) in einem Winkel von 90 °C relativ zum Laserstrahl. Die gemessene Intensität des Vorwärtsstreulichts ist proportional zur Zellgröße, die des Seitwärtsstreulichts ist abhängig von der Granularität und Oberflächenbeschaffenheit der Zellen. Des Weiteren werden Fluoreszenzfarbstoffe durch den Laserstrahl angeregt und können Licht einer größeren Wellenlänge als die des Lasers emittieren, was zur Zunahme der Lichtintensität führt. Die Fluoreszenzsignale werden über einen Fotoverstärker erfasst und genauso wie die Streulichtintensitäten an das Computerprogramm weitergegeben und ausgewertet.

Wurden Zellen mit einem Plasmid transfiziert, über das ein Fluoreszenzfarbstoff exprimiert werden konnte (pMS-GFP / pBB-YFP oder Dson), oder mit der Kontroll-siRNA, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert war, konnte der Anteil der Zellen, die fluoreszieren, an der Gesamtpopulation ermittelt werden.

2.2.2.7 *TUNEL Assay*

Mittels *TUNEL* (*TdT-mediated dUTP Nick End Labeling*) kann fragmentierte DNA in apoptotischen Zellen nachgewiesen werden. Dabei werden über einen terminale Desoxynuklotidyl-Transferase (TdT) die an Bruchenden entstehenden freien 3'-OH-Enden mit einem fluoreszenz markierten dUTP markiert. Dies kann im Mikroskop oder durchflusszytometrisch nachgewiesen werden.

Transfizierte Zellen wurden zunächst geerntet und mit PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden sie in 1 % Formaldehyd 20 min auf Eis inkubiert. Nach zehnminütiger Zentrifugation (500 x g, 4 °C), wurden sie noch zweimal 5 min mit PBS gewaschen und anschließend ÜN bei -20 °C in 70 % Ethanol gelagert. Ethanol wurde wieder abzentrifugiert und das Sediment gewaschen mit PBS (500 x g, 4 °C, 5 min). Dann wurden 80 µl Equilibrationspuffer zugegeben, 5 min inkubiert bei RT und wieder abzentrifugiert. Nach Zugabe von 45 µl Equilibrationspuffer, 5 µl Nukleotidmix und 1 µl TdT Enzym, wurde der Ansatz im Dunkeln inkubiert, wobei alle 15 min eine Durchmischung der Probe stattfand. Die Reaktion wurde nach 60 min gestoppt mit 1 ml 20 mM EDTA, abzentrifugiert und zweimal mit einer Lösung aus 0,1 % Triton X-100 und 5 mg / ml BSA in PBS gewaschen. Anschließend wurden Zellen noch 30 min im Dunkeln mit Propidiumjodid inkubiert, welches sowohl apoptotische als auch nekrotische Zellen anfärbt. Die Analyse erfolgte bei 610 nm (PI positiv) und 530 nm (*TUNEL* positiv, apoptotisch) im Durchflusszytometer.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 RNA-Methoden

2.2.3.1.1 RNA-Isolation aus Säugerzellen

2.2.3.1.1.1 RNA-Isolation mit Trizol

Wurde RNA aus kultivierten Zellen isoliert, wurde das Trizol-Reagenz verwendet. Trizol enthält Phenol und Guanidinisothiocyanat und dient zur Lyse der Zellen.

Die Zellsedimente wurden mit 1 ml Trizol versetzt und durch auf- und abpipettieren lysiert. Dazu wurden 0,2 ml Chloroform zur Phasentrennung zugegeben und gemischt. Nach einem Zentrifugationsschritt (12000 x g, 15 min, 4 °C) befand sich die RNA in der oberen wässrigen Phase, die abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Die RNA wurde mit 0,5 ml Isopropanol präzipitiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das RNA-Sediment mit 75 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Die Sedimente wurden in 20 µl DEPC-Wasser bei 60 °C 10 min gelöst und bei -20 °C gelagert oder weiterverwendet.

2.2.3.1.1.2 RNA-Isolation mit RNeasy

Bei eingefrorenen Zellsedimenten oder bei geringer Zellzahl wurde zur RNA-Isolierung der *RNeasy Kit* verwendet. Die Sedimente wurden auf Eis aufgetaut und mit 350 µl RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol versetzt. Die Suspension wurde gemischt und die Lyse erfolgte mittels mechanischen Scherens durch eine Kanüle mit einem Durchmesser von 0,9 mm. Das Lysat wurde mit 350 µl 70 % Ethanol versetzt, mit der Pipette gemischt und 700 µl auf eine RNA-Säule gegeben. Um die RNA an die Säule zu binden, wurde 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Die Säule wurde einmal mit Puffer RW1 und zweimal mit Puffer RPE gewaschen. Dann wurde die Säule trocken zentrifugiert und damit Ethanol vollständig entfernt und mit 30 µl RNase freiem Wasser eluiert.

2.2.3.1.2 *Fotometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration*

Bei der fotometrischen Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration nutzt man das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei 280 nm. Bestimmt man das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm, lässt sich die Reinheit der Nukleinsäuren abschätzen. In einer reinen DNA- bzw. RNA-Lösung sollte der Quotient 260 nm / 280 nm zwischen

1,8 und 2,0 liegen. Liegt eine Kontamination mit Proteinen vor, ist der Wert kleiner. Eine Absorption bei 260 nm von 1,0 entspricht in einer DNA-Lösung 50 µg / ml, in einer RNA-Lösung 40 µg / ml.

Die zu untersuchende RNA-Lösung wurde mit 1 x TE-Puffer verdünnt und in einer Küvette gegen 1 x TE-Puffer gemessen.

2.2.3.2 cDNA-Synthese

2.2.3.2.1 cDNA-Synthese mit Superscript

RNA kann mit Hilfe der *Superscript II RNase H- Reverse Transcriptase* in cDNA übersetzt werden. Dazu werden dT-Oligonukleotide benutzt, die an den Poly-A-Schwanz der mRNA binden. Zu den Oligonukleotiden wurde 1 µg isolierter Gesamt-RNA, höchstens aber 10 µl und 1 µl 10mM dNTP-Mischung gegeben und auf 12 µl mit Wasser aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde 5 min auf 65 °C erhitzt, um die Sekundärstrukturen in der RNA aufzulösen, und sofort wieder auf Eis abgekühlt. Dann wurden 4 µl 5 x *FirstStrand Buffer*, 3 µl 0,1 M DTT und 1 µl *RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor* gegeben und gut gemischt. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 42 °C, in der sich die dT-Oligonukleotide an den polyA-Schwanz der mRNA anlagern konnten, wurde die *Superscript II RT* zugegeben (1 µl) und weitere 50 min bei 42 °C zur Transkription inkubiert. Durch 15 min Erhitzen auf 70 °C wurde die reverse Transkriptase inaktiviert. Die entstandene cDNA wurde zur Amplifikation (PCR) oder zur Quantifizierung im *Light Cycler* weiterverwendet.

2.2.3.2.2 cDNA- Synthese mit Quantitect

Auch hier wird cDNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase (*Quantiscript*) hergestellt. Zuerst wurden, um Verunreinigungen durch genomische DNA zu entfernen, zu 1 µg RNA 2 µl *gDNA Wipeout buffer* gegeben, auf 12 µl mit RNase freiem Wasser aufgefüllt und 2 min bei 42 °C inkubiert. Der Ansatz wurde sofort wieder auf Eis gestellt und dazu 1 µl *Quantiscript reverse transcriptase*, 4 µl *Quantiscript RT Puffer* und 1 µl *RT Primer Mix* gegeben. Danach wurde eine weitere halbe Stunde zur Transkription bei 42 °C inkubiert. Durch dreiminütiges Erhitzen auf 95 °C wurde die reverse Transkriptase inaktiviert.

2.2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch PCR können Nukleotidsequenzen in millionenfacher Kopie hergestellt werden. Dazu werden kurze Oligonukleotide (*Primer*) benötigt, die sequenzspezifisch an die DNA-Matrize hybridisieren (*annealing*) und das zu amplifizierende Stück einschließen. Vom 3'-Ende der Oligonukleotide synthetisiert die hitzestabile Taq-Polymerase den neuen Strang (Elongation). Durch Erhitzen wird der entstandene DNA-Doppelstrang getrennt (Denaturierung) und die Oligonukleotide können sich erneut an die DNA (Matrize oder Amplifikat) anlagern. Durch zyklisches Wiederholen dieses Prozesses kann die DNA somit exponentiell vermehrt werden.

Die Matrizen - DNA (0,1 µl – 1 µl) wurde mit 1/10 Endvolumen 10 x PCR-Puffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP-Mischung, je 0,5 mM des 3'- und 5'- Oligonukleotids und 1 U *Taq-Polymerase* versetzt und mit Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt.

Die Reaktion wurde nach folgendem Grundschemata im *Thermocycler* durchgeführt:

	95 °C	10 min
25 – 35 x	$\left\{ \begin{array}{l} 95\text{ °C} \\ 55\text{-}63\text{ °C} \\ 72\text{ °C} \end{array} \right.$	1 min (Denaturierung)
		40 sek (Temperatur abhängig vom GC-Gehalt der Oligonukleotide) (Anlagerung)
		30 sek / 500 bp erwarteter Produktlänge (Elongation)
	72 °C	10 min

2.2.3.4 Quantitative RT-PCR am *Light Cycler*

Um einen quantitativen Nachweis der Herunterregulierung des Zielgens zu liefern, wurde mittels quantitativer *realtime*-PCR die Menge an RNA gemessen und mit der RNA-Menge eines sogenannten Haushaltsgens (HKG – *house keeping gene*) – β-Aktin oder β-2-Mikroglobulin – verglichen. Bei der RT-PCR wird mit der *Faststart*-Taq-DNA-Polymerase gearbeitet, die hitzelabile Modifikationsgruppen besitzt und bei RT inaktiv ist. Deshalb wird die Reaktion erst bei Erhitzen auf 95 °C gestartet. Das macht die Reaktion genauer, da vorher keine unspezifische Elongation stattfinden kann. Die Oligonukleotide sollten exonübergreifend gewählt werden, um zu vermeiden, dass eventuelle Verunreinigungen mit genomischer DNA-Amplifikationsprodukte bilden. Außerdem wird

der DNA-doppelstrang-spezifische Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green I* benutzt. Dieser bindet spezifisch an die kleine Furche doppelsträngiger DNA, wobei sich die Fluoreszenz des Farbstoffs um das hundertfache steigert. So können bei der Amplifikation entstehende Produkte mittels ihrer Fluoreszenz detektiert werden. Die Fluoreszenz, die während der Amplifikation mit steigender Zykluszahl zunimmt, wird im *Light Cycler* von *Roche* gemessen und als Kurve dargestellt. Darüber bestimmt das Programm den so genannten *Cp – crossing point*, an dem eine definierte Menge an PCR-Produkt vorhanden ist. Je mehr Kopien des untersuchten Gens schon beim Start der RT-PCR vorhanden sind, desto früher wird die definierte Menge an PCR-Produkt erreicht und desto niedriger ist der Cp-Wert.

Um die Effizienz der PCR zu bestimmen bzw. diese untereinander vergleichen zu können, wie z.B. das HKG mit dem Zielgen, wurde eine Kalibrierungskurve erstellt. Dazu wurde ein PCR-Produkt im *Thermocycler* oder im *Light Cycler* hergestellt und daraus eine Verdünnungsreihe (10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} und 10^{-9}) erstellt (Abbildung 12).

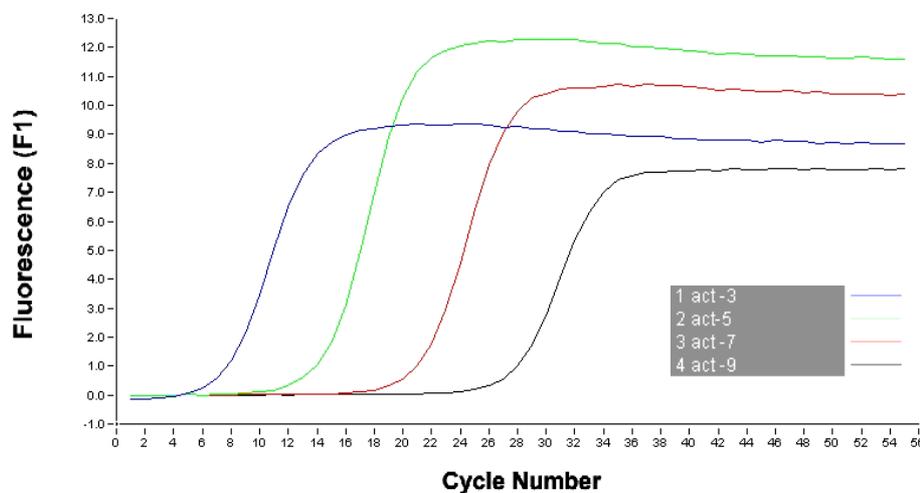


Abbildung 12: Amplifikationskurven einer Verdünnungsreihe; Aktin wurde in den Verdünnungen 10^{-3} (blau), 10^{-5} (grün), 10^{-7} (rot), 10^{-9} (schwarz) gemessen und bei jeder Kurve der Cp ermittelt.

Trägt man den Logarithmus der relativen Konzentrationen gegen die jeweiligen Cp-Werte auf (Abbildung 13), kann über die Steigung der Kalibrierungskurve die Effizienz berechnet werden:

$$E = 10^{-1/m}$$

Aktin	Cp
-3	7,45
-5	14,28
-7	21,13
-9	27,68

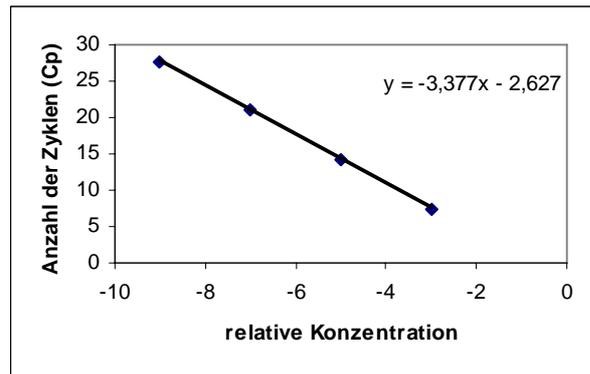


Abbildung 13: Beispiel einer Kalibrierungskurve für Aktin; Die Kalibrierungskurve für Aktin entsteht durch Auftragen der relativen Konzentrationen (10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9}) gegen den *crossing point* Cp.

Um eine relative Quantifizierung durchzuführen, wurde die Expression des Zielgens mit der Expression eines nicht regulierten Haushaltgens (HKG – *house keeping gene*) (β -Aktin oder β -2-Mikroglobulin) verglichen.

Stellt K die Menge an PCR-Produkt dar, die am Cp vorhanden ist, T_0 die Ausgangskonzentration der Probe und Cp die Anzahl der Zyklen, die nötig sind, um eine bestimmte Menge an PCR-Produkt zu erhalten, ergibt sich folgende Gleichung:

$$K = T_0 (E)^{Cp}$$

Die Menge an PCR-Produkt am Cp ist für alle Proben gleich. Setzt man nun zur Normierung T_0 der Haushaltsgenreaktion gleich 100 %, ergibt sich für die Berechnung der relativen Kopienzahl der PCR des Zielgens folgender Ansatz:

$$T_{0 \text{ Zielgen}} = 100 \times \frac{(E_{\beta\text{-Aktin}})^{Cp_{\beta\text{-Aktin}}}}{(E_{\text{Zielgen}})^{Cp_{\text{Zielgen}}}}$$

Zur Charakterisierung der PCR-Produkte dienen einerseits die im *Light Cycler*-Programm erstellten Schmelzkurven, wobei nur ein definierter Schmelzpunkt je Produkt entsteht. Unspezifische Amplifikate sind durch wesentlich tiefere Schmelzpunkte zu identifizieren.

Andererseits konnte auch das Auftragen der entstandenen PCR-Produkte auf ein Agarosegel zur Charakterisierung der Amplifikate verwendet werden (Abbildung 14).

Durch Amplifikation entstehen PCR-Produkte einer bestimmten Größe. Ist ein Schmier oder mehrere Banden zu detektieren liegt eine Verunreinigung vor.

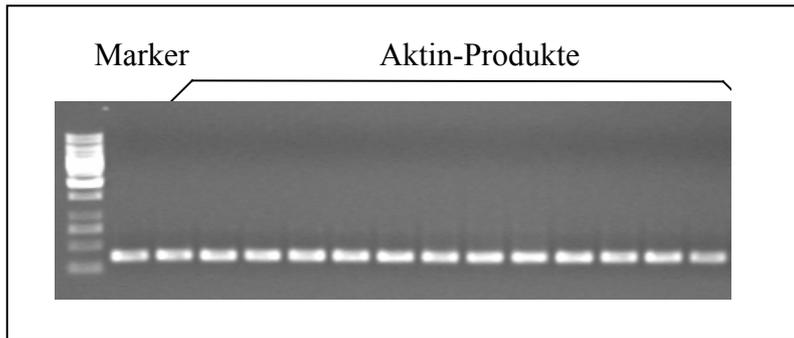


Abbildung 14: Charakterisierung der PCR-Produkte im Agarosegel; Hier zeigen Aktin-PCR-Produkte nur eine definierte Bande, die bei etwa 350 bp liegt.

Zur Durchführung der RT-PCR diente die cDNA als Matrize, davon wurde 1 μ l eingesetzt. Dazu kam 1 μ l Roche-Mix, 0,8 μ l 25 mM $MgCl_2$, 2 μ l je 2,5 mM Oligonukleotide und 3,2 μ l Wasser. Die Reaktionsansätze wurden in spezielle Kapillaren überführt, abzentrifugiert und in den *Light Cycler* gegeben.

Die Reaktion lief nach folgendem Schema ab:

	95 °C	10 sek - Denaturierung der DNA und Aktivierung der Polymerase
45 – 55 Zyklen	95 °C	1 sek - Denaturierung
	63 °C	10 sek - Anlagerung
	72 °C	26 sek - Elongation
	70-97 °C	10 sek - Aufschmelzen
	40 °C	15 sek - Abkühlen

2.2.3.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente werden in Agarosegelen nach ihrer Größe aufgetrennt. Je kleiner die Fragmente sind, desto höherprozentig sollte das Gel sein, für Fragmente zwischen 500 – 8000 bp eignen sich 0,8 % Agarosegele. Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1 x TBE-Puffer in einer Mikrowelle aufgekocht und nach Abkühlung auf etwa 60 °C in eine Horizontalappartur gegossen. Nach dem Erstarren wurde das Gel in die Gelkammer überführt und diese mit Laufpuffer (1 x TBE) befüllt. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Vol 6 x Auftragspuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Daneben wurde zur

Abschätzung der DNA-Längen ein Standard mit bekannten Größen aufgetragen. Eine Spannung von etwa 12 V/cm Gel wurde angelegt und nach etwa 1 h wird das Gel in einer Ethidiumbromid-Puffer-Lösung 15 – 30 min gefärbt.

2.2.4 Proteinchemische Arbeiten

2.2.4.1 Proteinisolation aus Säugerzellen

Zur Isolation des Gesamtzellproteins wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin behandelt. Die Reaktion wurde mit PBS / 10 % FCS gestoppt und die Zellen 5 min bei 300 x g abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit kaltem PBS gewaschen, anschließend in 30-50 µl RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitoren (PMSF und NOV) aufgenommen und zur Zellyse 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 15000 rpm) wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C gelagert.

Für die Isolation von TNFR1, ein Protein an der Zelloberfläche, wurde das geerntete und gewaschene Sediment direkt in 20 µl 4x Lämmli aufgekocht (s.u.).

2.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Um die Proteinkonzentration zu bestimmen, wurde die Methode nach Bradford benutzt. Der im Reagenz enthaltene Farbstoff Brilliant-Blau G bildet mit Proteinen einen Komplex. Dabei wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 auf 595 nm verschoben. Aus der Absorption bei 595 nm kann man somit auf die vorhandene Proteinmenge schließen.

Zuerst wurde eine Kalibrierungskurve mit BSA erstellt. Aus einer 1 µg / µl BSA-Lösung wurden Verdünnungen hergestellt und 2 µl RIPA-Puffer zugegeben, da dieser auch in den Proteinextrakten enthalten war und evtl. das Ergebnis verändert.

Nach Zugabe von 1 ml Bradfordreagenz wurde 5 - 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert und danach die Absorption im Fotometer bei 595 nm bestimmt.

Über die Kalibrierungskurve konnte die tatsächliche Konzentration der Proben ermittelt werden.

2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

Proteinextrakte wurden mittels der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Dazu wurde die Gelapparatur von *Pharmacia Biotech* gesäubert, zusammengebaut und mit Wasser auf Dichtheit getestet. Dann wurde das Trenngel eingefüllt und mit Isopropanol überschichtet, um einen glatten Übergang zwischen Trenn- und Sammelgel zu erreichen. Nachdem das Trenngel polymerisiert ist, wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel mit Kamm, für die später benötigten Einfülltaschen, darauf gegossen. Sobald das Sammelgel polymerisiert war, wurde das Gel in die Gelkammer eingespannt und diese mit 1x Lämmli-Laufpuffer gefüllt.

Von den Proben wurden 10 - 20 µg mit 4 x Lämmli-Puffer versetzt. Der Ansatz wurde 5 Minuten auf 95 °C erhitzt, um Proteine zu denaturieren. Danach wurden sie zusammen mit einem Proteinmarker, der farblich markierte Proteine mit bekanntem Gewicht enthält, auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 25 mA bis die Lauffront, gekennzeichnet durch Bromphenolblau im Auftragspuffer der Proben, das Ende des Gels erreicht hat.

2.2.4.4 Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose

Die aufgetrennten Proteine wurden mittels Semi-Dry-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Western Blot nach Towbin *et al.*, 1992). Dazu wurde das Trenngel in 1x Transferpuffer 5 - 10 min äquilibriert. In 1x Towbin-Transferpuffer getränktes extra dickes Filterpapier wurde auf die Elektrode gelegt, darauf kamen die Nitrozellulosemembran, das Gel und ein weiteres getränktes Filterpapier. Der Transfer erfolgte 1 h in der Blotting-Apparatur bei 12 V.

Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran 1 - 2 min mit PonceauS-Lösung gefärbt, um die Proteine sichtbar zu machen. Überschüssiges PonceauS wurde mit Wasser abgespült. Anschließend erfolgte eine Immundetektion mit entsprechenden Antikörpern.

2.2.4.5 Immundetektion von Proteinen

Die transferierten Proteine können mittels spezifischer Antikörper auf der Nitrozellulosemembran nachgewiesen werden. Zuerst wurde die Membran 1 h mit Block-Puffer geschüttelt, um unspezifische Antikörper-Bindungsstellen abzusättigen. Dabei wurde auch PonceauS wieder entfernt. Danach wurde die Membran 1 h bis ÜN bei 4 °C

mit dem spezifischen Primär-Antikörper inkubiert. Die Membran wurde anschließend dreimal 10 min mit TBS-T gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Der Primär-Antikörper wurde durch einen sekundären Antikörper detektiert. Dieser war mit dem Enzym HRP (*horse redish peroxidase*) konjugiert und konnte somit durch eine Chemolumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht werden. Die Membran wurde 1 h mit dem Sekundär-Antikörper (bei α -Maus: 0,5 μ l AK, bei α -Kaninchen 0,2 μ l AK jeweils in 20 ml TBS-T / 8 % Magermilch) inkubiert und dann dreimal 10 min mit TBS-T gewaschen.

Danach erfolgte der Chemolumineszenz-Nachweis, bei dem ein Röntgenfilm exponiert wurde. Die Membran wurde 1 min mit einer Mischung von Lösung A (Luminol) und B (Wasserstoffperoxid) im Verhältnis 1:1 inkubiert. Die Flüssigkeit wurde vollständig entfernt, die Membran in eine Folie überführt und ein Röntgenfilm ausreichend exponiert (je nach Signalstärke 5 sek bis 30 min) und entwickelt.

2.2.4.6 Entfernen von Antikörper

Um eine Membran für die Detektion mit mehreren Antikörpern verwenden zu können, müssen die gebundenen Antikörper vor der nächsten Detektion wieder entfernt werden. Dazu wurden die Membranen 15 min mit *stripping buffer* gewaschen, dreimal fünf Minuten mit 1 x TBST gewaschen und eine halbe Stunde mit 8 % Milchpulver in TBST noch einmal geblockt. Anschließend stand die Membran zur Detektion mit einem neuen Antikörper zur Verfügung.

2.2.4.7 Enzymatische Caspaseaktivität

Durch Lyse der Zellen können intrazelluläre Caspasen freigesetzt werden. Ihre Aktivität kann über den Umsatz eines Substrates bestimmt werden. Gibt man ein Substrat zu, aus dem durch die enzymatische Aktivität der Caspasen ein farbiges Produkt entsteht, kann diese Aktivität über die Intensität der Absorption des entstandenen Produktes bestimmt werden.

Das Verfahren zur Isolation des Gesamtzellproteins gleicht Punkt 2.2.4.1. Allerdings wurde statt RIPA-Puffer 40 μ l Lysepuffer I ohne Zusatz an Inhibitoren eingesetzt. Nach der Inkubation auf Eis und dem letzten Zentrifugationsschritt (10 min, 15000 rpm) wurden für eine Doppelbestimmung zweimal 18 μ l des Überstands in je ein Loch einer 96-Loch-Platte gegeben, 80 μ l Assay-Puffer zugegeben und mit 1 μ l 200 mM Caspasesubstrat die Reaktion gestartet. Nach sofortigem Messen im *Microplate Reader* bei einer Wellenlänge

von 405 nm gegen einen Leerwert, der nur den Assay-Puffer und Substrat enthält, wurde die Platte bei 37 °C inkubiert und alle 30 min erneut gemessen.

Nach einer Bestimmung der Proteinmenge nach Bradford konnte eine Rückrechnung auf die Aktivität bei gleicher Menge gemacht werden.

2.2.5 Immunfluoreszenz

Mithilfe spezifischer Primärantikörper und fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern können Proteine über Immunfluoreszenz in der Zelle detektiert werden.

Zellen konnten entweder bereits auf Objektträgern kultiviert werden oder wurden geerntet, zusammen mit dem Überstand des Kulturmediums, und punktförmig auf Objektträger zentrifugiert (*spinning*). Dazu wurden 100000 Zellen abzentrifugiert und das Sediment in 80 µl PBS aufgenommen. In der so genannten Zytospin wurden die Zellen dann auf Objektträger aufgebracht.

2.2.5.1 Nachweis von Proteinaggregaten (Foci)

Zuerst wurden die Objektträger einmal mit PBS gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurde 15 min mit 2 % Paraformaldehyd inkubiert. Das Fixativ wurde durch 5 min Waschen mit PBS entfernt. Nun wurden die Zellen dreimal 5 min mit PBS + 0,15 % Triton-X 100 gewaschen, um die Zellwände zu permeabilisieren. Unspezifische Antikörperbindestellen wurden durch 30 min Inkubation mit PBS+ geblockt. Dann wurde der in PBS+ verdünnte primäre Antikörper zugegeben und ÜN bei 4 °C inkubiert. Die Antikörperlösung wurde durch Waschen mit PBS entfernt. Erneute Behandlung mit PBS + 0,15 % Triton-X 100 für 10 min permeabilisierte die Zellwände noch einmal und ungebundener Antikörper konnte ausdiffundieren. Über Waschen mit PBS wurde diese Lösung wieder entfernt und unspezifische Antikörperbindestellen noch einmal 7 min mit PBS+ geblockt. Der Sekundärantikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, wurde in einer entsprechenden Verdünnung (in PBS+) zugegeben und 45 min im Dunkeln inkubiert. Dreimal Waschen mit PBS + 0,15 % Triton-X 100 entfernte ungebundenen Sekundärantikörper. Zweimal Waschen mit PBS, 10 und 7 min, entfernte Triton-X 100. Die Kerngegenfärbung fand durch 90 sek Inkubation in Hoechst-Lösung statt. Durch zweimal 2 min Waschen mit PBS wurde überschüssiges Hoechst 33342 entfernt. Das Präparat wurde mit 8 µl *Vectashield* pro Objektträger und einem Deckglas versehen. Nach einer Diffusionszeit von mindestens einer halben Stunde bei 4 °C wurden die Objekte am LSM analysiert.

2.2.5.2 Lokalisierung von Proteinen

Die Zellen auf den Objektträgern wurden zuerst mit 4 % Paraformaldehyd 15 min bei RT fixiert und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung wurde 5 min in 0,2 % Triton-X 100 bei RT inkubiert, dann zweimal mit PBS gewaschen. Unspezifische Antikörperbindestellen wurden mittels Blocken für eine Stunde mit PBS+ abgesättigt. Der entsprechend verdünnte primäre Antikörper wurde auf die Objektträger gegeben und ÜN bei 4 °C in der feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde der sekundäre Antikörper zugegeben und eine Stunde im Dunkeln bei RT inkubiert. Erneut wurde dreimal mit PBS gewaschen und danach eine Kerngegenfärbung mit Hoechst 33342 durchgeführt. Waschen, eindecken und analysieren erfolgte wie oben (2.2.5.1).

2.2.5.3 TNFR1-Clustering

Die Fixierung der Zellen auf Objektträgern wurde in drei Schritten durchgeführt. Dazu wurde zunächst in 3,7 % Formaldehyd 12 min inkubiert, dann 5 min in eiskaltem Methanol und schließlich 30 sec in Aceton. Nach dem durch zweimaliges Waschen mit PBS die Fixative entfernt waren, wurde 30 min mit PBS+ 30 min bei RT geblockt. Der verdünnte erste Antikörper wurde auf die Zellen gegeben, eine Stunde bei RT inkubiert und anschließend in der feuchten Kammer ÜN bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde dreimal mit PBS gewaschen, dann der sekundäre Antikörper zugegeben und eine Stunde im Dunkeln bei RT inkubiert. Nachdem zweimal 2 min mit PBS gewaschen wurde, wurden die Zellen mit *Vectashield* und einem Deckglas versehen.

Tabelle 1: Verdünnungen der verwendeten Antikörper; Aufgelistet sind die Verdünnungen der verwendeten Antikörper. Um diese zu erreichen werden die Stammlösungen mit PBS+ verdünnt.

Antikörper	Verdünnung mit PBS+
Anti-p65	1:200
Anti-phospho-Histon-H2AX	1:500
Anti-TNFR1	1:100
Schaf-anti-Maus-Cy3	1:500
Ziege-anti-Kaninchen-Alexa488	1:200

2.2.6 Alkalischer *Comet Assay*

Mit Hilfe der Einzelzell-Gelelektrophorese (*Comet Assay*) können DNA-Strangbrüche in einzelnen kernhaltigen Zellen gemessen werden. Die aus DNA-Strangbrüchen resultierenden Fragmente werden bei fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung als Kometenschweife erfasst. In der alkalischen Version des *Comet Assay* können sowohl Einzel- und Doppelstrangbrüche detektiert werden, da dabei durch einen alkalischen Puffer ein Entwinden der DNA stattfindet (Protokoll modifiziert nach Singh *et al.* 1988).

Zur Versuchsvorbereitung mussten zunächst Objektträger mit 70 % Ethanol gereinigt werden und anschließend mit 0,1 % Agarose mit Hilfe und eines Kunststoffspatels beschichtet werden. Außerdem mussten Deckgläser mit einer 0,1 % Triton-X 100 Lösung vorbehandelt werden.

Herrunterregulierte Zellen wurden geerntet und 20000 Zellen pro Ansatz in 10 µl isotoner NaCl-Lösung gelöst. Die Proben wurden auf Eis mit einer Dosis von 5 Gy bestrahlt und im Anschluss bei 37 °C im Heizblock inkubiert, um den Zellen die Möglichkeit zur Reparatur der induzierten Schäden zu geben. Nach 0, 10, 30 und 60 min wurden die Aliquots in 100 µl 0,5 % Agarose aufgenommen, auf einen Objektträger gegeben und mit einem mit Triton vorbehandelten Deckglas abgedeckt. Zum Aushärten wurden die Objektträger für ca. 5 min Kälteplatte gelegt und danach das Deckglas wieder entfernt. Die Objektträger wurden zur Zelllyse ÜN bei 4 °C in Lysispuffer I und am nächsten Morgen 1 h in Lysispuffer II bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Objektträger zur DNA-Entwindung für 20 min in vorgekühltem Elektrophorese-Puffer äquilibriert. Die anschließende Elektrophorese erfolgte für 30 min bei 24 V in einer gekühlten Kammer. Zur Neutralisation wurden die Objektträger im Anschluss in einer Küvette mit einer Ammoniumacetat-Ethanol-Lösung für 30 min inkubiert und ÜN in 100 % Ethanol im Dunkeln dehydriert. Bevor die Objektträger gefärbt wurden, erfolgte eine Rehydrierung in 70 % Ethanol für 5 min und 15 min in dest. Wasser. Danach wurden 50 µl Färbelösung auf jeden Objektträger gegeben, mit einem Deckglas versehen.

Die Auswertung erfolgte im Fluoreszenzmikroskop und durch die Software *Viscomet* von TILL Phototonics.

Im *Comet Assay* entstehen durch die aufgetrennten DNA Fragmente sog. Kometen, die sich in Kopf und Schweif einteilen lassen. Durch die Software werden verschiedene Fluoreszenzintensitäten und Längen von der ganzen Zelle, Kopf und Schweif gemessen.

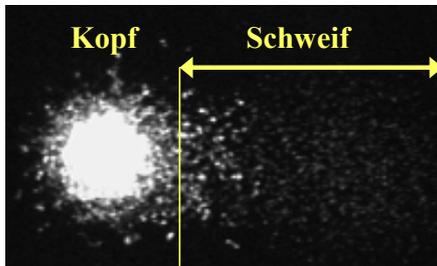


Abbildung 15: Einteilung der Kompartimente von lysierten Zellen im *Comet Assay*; Die kometenähnlich geformten DNA Fragmente werden in Kopf und Schweif eingeteilt.

Als Meßgröße zur Klassifizierung von geschädigten und ungeschädigten bzw. reparierten Zellen dient das sog. *tail olive moment*. Dieses wird berechnet aus dem Produkt der Hauptintensität (CG) von Kopf und Schweif und dem DNA-Gehalt im Schweif:

$$\text{TOM} = (\text{CG}_{\text{Schweif}} - \text{CG}_{\text{Kopf}}) * \text{DNA}_{\text{Schweif}}/100$$

3 Ergebnisse

3.1 Abschaltung der Genexpression mittels RNAi

Zur gezielten Abschaltung der Genexpression in Säugerzellen wurde die RNA-Interferenz-Technik genutzt (RNAi). Durch Transfektion einer Zelle mit dsRNA kann eine Degradierung der komplementären mRNA bewirkt werden. Dabei wird in den meisten Fällen allerdings keine vollständige Abschaltung der Expression erreicht, so dass eine Herunterregulierung des Gens auf etwa 10 – 20 % Restgehalt beschränkt ist (Tuschl *et al.* 1999). Diese Methode ist wesentlich schneller und weniger aufwändig, als die Mutation oder Deletion (*knockout*) von Genen. Außerdem konnte bisher kein überlebensfähiger *knockout* von *hUBC13* nachgewiesen werden, da das Gen essentiell ist (Fukushima *et al.* 2007). Die Methode der Herunterregulierung erscheint also äußerst sinnvoll, da ein Rest an aktiviertem Gen im Gegensatz zu *knockouts* erhalten bleibt.

3.1.1 Auswahl der siRNA-Sequenzen

Zuerst wurden verschiedene siRNA-Sequenzen nach bekannten Kriterien (Elbashir *et al.* 2002 und Tuschl *siRNA user guide* 2003) erstellt, um am Ende die effektivste siRNA weiterzuverwenden. Die Ergebnisse wurden mit einer zweiten siRNA bestätigt.

Mithilfe der Internetseiten der Firmen Dharmacon (www.dharmacon.com) und Invitrogen (www.invitrogen.com) wurden geeignete Sequenzen im kodierenden Bereich der Zielgene gesucht. Es wurden Sequenzen gewählt, die 50 - 100 nt hinter dem Startcodon liegen. Dabei sollte die Lage in UTRs (*untranslated regions*) oder nahe dem Startcodon vermieden werden, da in diesen Regionen möglicherweise vermehrt Bindestellen für regulatorische Proteine auftreten. Die Anheftung von UTR-Bindeproteinen und / oder Komplexen zur Initiation der Translation könnte evtl. die Bindung von RISC an die Ziel-RNA verhindern. Außerdem wurden die Sequenzen so ausgewählt, dass sie einen GC-Gehalt von 35 - 52 % aufwiesen. Ein höherer GC-Gehalt wurde vermieden, da sich dadurch eher Sekundärstrukturen bilden können, die ebenfalls die Bildung von RISC verhindern könnten. Statistiken haben gezeigt, dass siRNAs ausgewählt nach diesen Kriterien eine Effektivität von über 90 % aufweisen (Elbashir *et al.* 2002).

Zu Beginn der Arbeit wurden über die Internetseiten nur geeignete 19 nt-Sequenzen gefunden. Für eine möglichst erfolgreiche Herunterregulierung sind aber 21 nt lange Sequenzen erforderlich (Elbashir *et al.* 2001 a, b), weshalb die siRNAs in der kodierenden Sequenz danach manuell weiter ausgewählt wurden.

Für die effiziente Degradierung der Ziel-mRNA ist es wichtig, dass der *antisense*-Strang der dsRNA bevorzugt in den RISC-Komplex eingebaut wird. Deshalb wurde darauf geachtet, dass die letzten Basenpaare am 3'-Ende AT-reich sind, evtl. sogar Fehlpaarungen aufweisen und das 5'-Ende GC-reich ist. Durch diese Konstellation wird gewährleistet, dass Helikasen, die ein Bestandteil von RISC sind, eher das 3'-Ende aufwinden, als das 5'-Ende, da die Nukleotide AT nur über zwei Wasserstoffbrücken verbunden sind, GC-Nukleotide hingegen durch drei (Khvorova *et al.* 2003, Schwarz *et al.* 2003). Um eine siRNA aus 21 nt mit GC-reichem 5'-Ende und AT-reichem 3'-Ende zu erhalten, wurde in der cDNA nach einer Sequenz gesucht, die am 5'-Ende ein zusätzliches G und am 3'-Ende ein zusätzliches A enthält.

Sehr von Vorteil ist es auch, wenn die ausgewählten Sequenzen der siRNAs über den Leserahmen des Gens verteilt sind, da der Grad der Regulierung möglicherweise von der Lage der siRNA abhängt. Es könnte die Bindung der siRNA durch gebildete Sekundärstrukturen verhindert werden, die an anderer Stelle nicht auftreten.

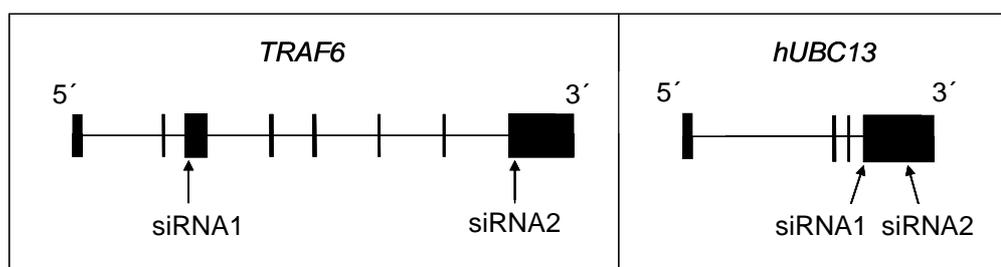


Abbildung 16: Lage der ausgewählten siRNAs in den Genen von *TRAF6* und *hUBC13*; Die Längsbalken stellen Exons der Gene dar. Links dargestellt ist die Lage der zwei siRNAs im *TRAF6*-Gen, rechts die zwei siRNAs des *hUBC13*-Gens, die aufgrund der geringen Größe von *hUBC13* nicht in verschiedenen Exons liegen, sondern beide in Exon 4.

In Abbildung 16 kann die Lage der siRNAs in den beiden untersuchten Genen betrachtet werden. Die ausgewählten Sequenzen für den *knockdown* von *TRAF6* sind über das Gen verteilt und liegen in verschiedenen Exons. *hUBC13* ist ein sehr kleines Gen, das nur aus 4 Exons besteht. In Exon 1 - 3 liegen keine geeigneten Sequenzen vor, so dass beide siRNAs an die Sequenzen aus Exon 4 binden.

3.1.2 Regulierung der Expression mit chemisch synthetisierten siRNAs

Die Transfektion zur Herunterregulierung der Genexpression wurde durch liposomvermittelte Endozytose durchgeführt. Die Transfektionseffizienz wurde mit einer nicht regulierenden, fluoreszenzmarkierten siRNA überprüft und beläuft sich auf nahezu 100 % (Angermeier 2004). Der Grad der Regulierung wurde durch chemisch synthetisierte siRNA und deren zeitlicher Verlauf sowohl auf mRNA- (Quantifizierung mittels *real time* PCR) als auch auf Proteinebene (Western Blot mit anschließender Immundetektion) untersucht. Eine *scrambled* siRNA, die aus einer Mischung von siRNAs besteht, deren Sequenzen ohne Homologie zu humanen Sequenzen sind, wurde als negative Kontrolle verwendet. Diese wurde zu jedem Zeitwert und bei allen Experimenten mitgeführt. Da diese *scrambled* siRNA kein Gen herunterreguliert, wurde der mRNA-Gehalt des Zielgens in der Negativkontrolle als 100 % angesetzt und der Gehalt an mRNA der regulierten Gene dazu ins Verhältnis gesetzt. Im Weiteren wird diese negative Kontrolle nur als Kontrolle bezeichnet.

3.1.2.1 Knockdown von *hUBC13* in hTERT-RPE-Zellen

Nach Auswahl der Sequenzen (3.1.1) wurden mit humaner Telomerase immortalisierte (hTERT) RPE-Zellen transfiziert. Diese Zelllinie wurde verwendet, da sie im Gegensatz zu Tumorzellen und viral immortalisierten Zellen einen diploiden Chromosomensatz und eine hohe genomische Stabilität aufweist.

Das Ergebnis der Bestimmung von mRNA und Protein nach *knockdown* von *hUBC13* mit zwei verschiedenen Sequenzen ist in Abbildung 17 und Abbildung 18 dargestellt.

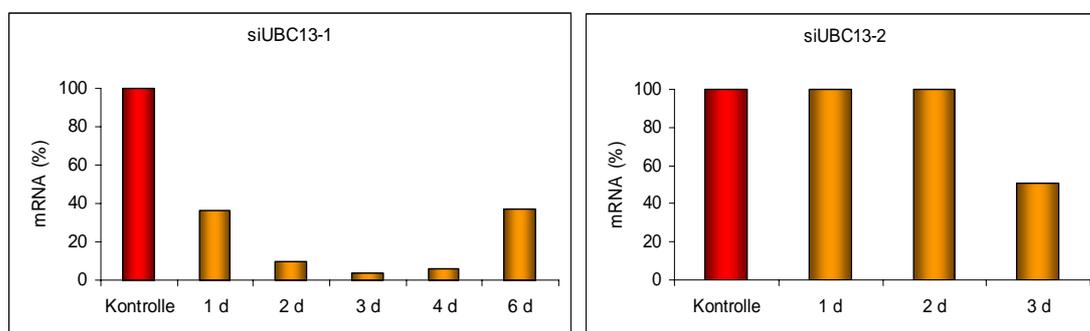


Abbildung 17: Gehalt an *hUBC13*-mRNA nach *knockdown* mit chemisch synthetisierter siRNA in hTERT-RPE-Zellen; Dargestellt ist der Gehalt an *hUBC13*-mRNA zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion, bezogen auf die Kontrolle, in der der Gehalt des Zielgens als 100 % gesetzt wurde. Durch die siRNA siUBC13-1 (links) war nach 2 d schon eine deutliche Reduktion des mRNA-Gehaltes zu verzeichnen, nach 6 d erfolgte wieder ein Anstieg. In der rechten Grafik ist die nicht sehr stark ausgeprägte Herunterregulierung von *hUBC13* nach *knockdown* mit siUBC13-2 bis zu 3 d nach Transfektion dargestellt. Hier dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von fünf durchgeführten Versuchen.

Nach dem *knockdown* von *hUBC13* mit der siRNA siUBC13-1 war die mRNA-Expression bereits nach 1 d deutlich reduziert und sank auf ein Minimum von 5 – 10 % an Tag 3 und 4 nach der Transfektion. Danach stieg die Expression langsam an, trotzdem war nach sechs Tagen noch eine Herunterregulierung um mehr als 50 % zu detektieren. Die zweite Sequenz (siUBC13-2) zum *knockdown* wurde ebenfalls analysiert, allerdings konnte der mRNA-Gehalt nur um maximal 50 % 3 d nach Transfektion reduziert werden (Abbildung 17).

Die Bestimmung des Proteingehaltes nach *knockdown* wurde ebenfalls für beide Sequenzen durchgeführt. hTERT-RPE-Zellen wurden mit den unterschiedlichen siRNAs transfiziert (+), die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert und die Zelllysate anschließend mittels Western Blot mit anschließender Immundetektion analysiert. Dazu wurde zu jedem Zeitpunkt auch eine Kontrolle (-) mitgeführt.

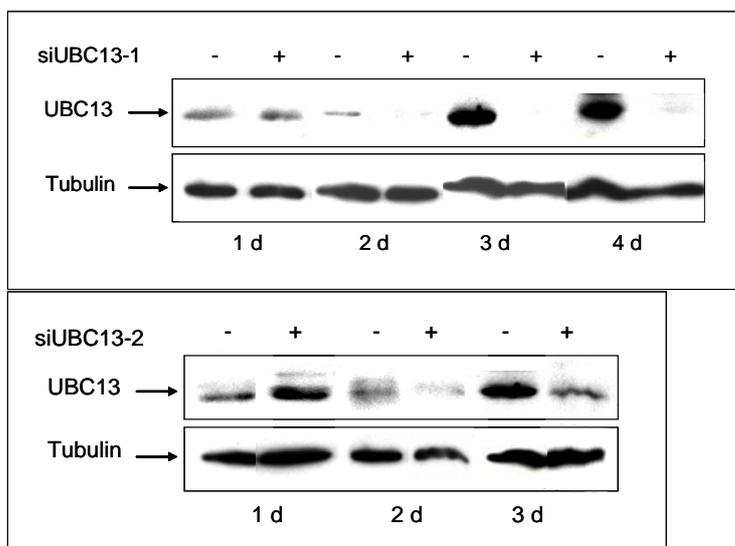


Abbildung 18: Immundetektion des *knockdowns* von *hUBC13* in hTERT-RPE-Zellen; Zu jedem Zeitwert ist der Proteinextrakt der negativen Kontrolle (-), hTERT-RPE-Zellen, die mit der Kontroll-siRNA transfiziert wurden, aufgetragen, daneben der Proteinextrakt aus *huc13* herunterregulierten Zellen (+). Die Detektion von Tubulin diente als Beladungskontrolle des Gels. Durch die siRNA siUBC13-1 konnte eine starke Reduktion von hUbc13 zwischen Tag 2 und Tag 4 nachgewiesen werden. Nach *knockdown* mit siUBC13-2 wurde der Proteingehalt etwas vermindert an Tag 2 und 3. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für vier voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

Mit der siRNA siUBC13-1 konnte zwischen Tag 2 und Tag 4 nach der Transfektion kein hUbc13-Protein mehr in Lysaten aus hTERT-RPE-Zellen detektiert werden. Im Vergleich mit den Kontrollen (-), konnte nach *knockdown* durch die Sequenz siUBC13-2 an Tag 2 und 3 nach Transfektion eine deutliche Verringerung von hUbc13 nachgewiesen werden (Abbildung 18). Allerdings war der *knockdown* nicht so stark wie durch siUBC13-1.

3.1.2.2 Knockdown von TRAF6 in hTERT-RPE-Zellen

Auch der Grad der Regulierung mit den beiden verschiedenen Sequenzen zum *knockdown* von *TRAF6* wurde in hTERT-RPE-Zellen auf mRNA- und Proteinebene überprüft.

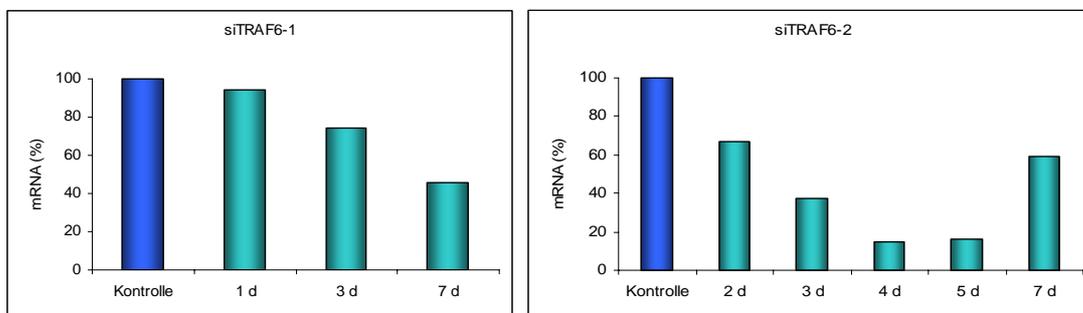


Abbildung 19: Gehalt an mRNA nach *knockdown* von *TRAF6* mit zwei verschiedenen siRNAs in hTERT-RPE-Zellen; In der linken Grafik ist der geringe *knockdown* von *TRAF6* durch die siRNA siTRAF6-1 dargestellt. Rechts präsentiert ist der Verlauf der *TRAF6*-mRNA-Expression nach *traf6 knockdown* mit siTRAF6-2. Der mRNA-Gehalt sank nach 4 d auf etwa 20 % und stieg dann wieder an. Hier dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von drei durchgeführten Versuchen.

Der *TRAF6*-mRNA-Gehalt war nach Transfektion der Zellen mit siTRAF6-1 wenig reduziert, erst nach 7 d ist ein Effekt zu sehen. Nach *knockdown* mit siTRAF6-2 war eine Reduktion von *TRAF6* nach 3 d auf etwa 40 % zu verzeichnen. 4 d nach Transfektion lag der geringste Gehalt vor, nur noch etwa 20 % der mRNA-Menge im Vergleich zur Kontrolle war vorhanden, danach erfolgte wieder ein Anstieg (Abbildung 19).

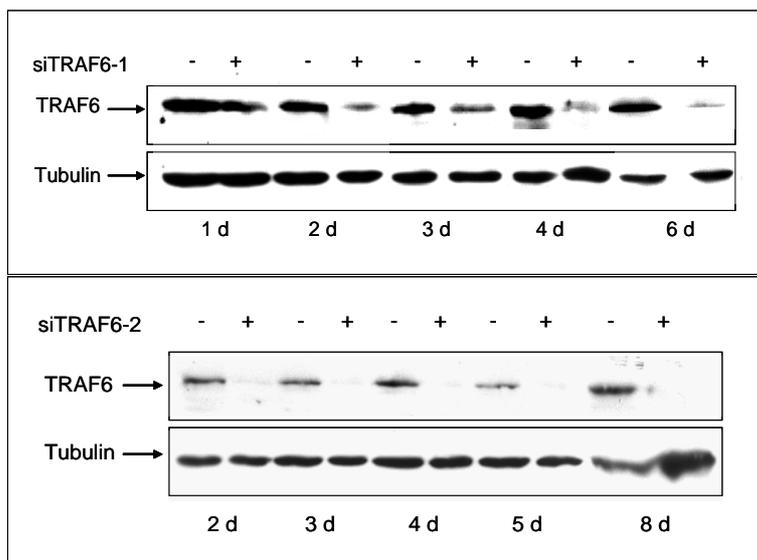


Abbildung 20: Immundetektion des *traf6*-knockdowns in hTERT-RPE-Zellen; hTERT-RPE-Zellen wurden mit zwei unterschiedlichen siRNAs transfiziert und durch Immundetektion analysiert. Aufgetragen sind die Proteinextrakte der kontrolltransfizierten Zellen (-) und der siTRAF6-regulierten Zellen (+), mit Detektion von Tubulin als Beladungskontrolle. Nach Transfektion mit siTRAF6-1 konnte der Gehalt an TRAF6-Protein über mehrere Tage vermindert werden, allerdings war zu allen Zeitpunkten Protein nachweisbar. Durch den *knockdown* mit siTRAF6-2 konnte eine starke Reduktion des TRAF6-Proteins nachgewiesen werden, welches zwischen dem Tag 1 und Tag 8 nach Transfektion nicht zu detektieren war. Hier dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei durchgeführten Versuchen.

Nach der Transfektion von hTERT-RPE-Zellen mit siRNAs zum *knockdown* von *TRAF6* wurde ebenfalls der Proteingehalt zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Mit beiden siRNAs konnte eine Reduktion der Proteinmenge erreicht werden. Der Gehalt an TRAF6-Protein war zwischen Tag 2 und Tag 6 nach Transfektion mit siTRAF6-1 erniedrigt. Zu einem deutlicheren *knockdown* führte die Transfektion mit siTRAF6-2. Hier konnte zu keinem Zeitpunkt in dem hier dargestellten Zeitrahmen von 1 - 8 d TRAF6 Protein nachgewiesen werden, in den Kontrollzellen waren jedoch deutliche Proteinbanden detektierbar (Abbildung 20). Damit konnte ein sehr effizienter *knockdown* über einen längeren Zeitraum erreicht werden.

Zunächst wurde für jedes Gen diejenige siRNA zur funktionellen Analyse in Säugerzellen ausgewählt, die jeweils die bessere Wirkung gezeigt hat. Wesentliche Analysen wurden dann mit der zweiten Sequenz verifiziert. Alle Experimente wurden an Tag 4 nach der Transfektion gestartet, da eine optimale Herunterregulierung als Voraussetzung nötig ist.

3.1.2.3 *Knockdown* von *hUBC13* und *TRAF6* in Hela-Zellen

Neben hTERT-RPE-Zellen wurden die in der Literatur eingehend charakterisierten Hela-Zellen als weiteres experimentelles System verwendet. Mit dem für hTERT-RPE-Zellen erarbeiteten Transfektionsprotokoll konnte kein *knockdown* erzielt werden, weshalb die Etablierung eines neuen Protokolls nötig war. Nach dem Austesten verschiedener liposomvermittelnder Reagenzien wurde *Dharmafect1* der Firma Dharmacon verwendet. Für einen möglichst effizienten *knockdown* war mit 30 - 50 nM deutlich mehr siRNA nötig, als für die Herunterregulierung in hTERT-RPE-Zellen, die mit einem Reagenz von Biorad mit 10 - 20 nM siRNA transfiziert wurden. Auf die Quantifizierung der mRNA wurde verzichtet und nur der Nachweis des Proteingehaltes über Immundetektion durchgeführt. Außerdem wurden zunächst nur die effizienteren siRNAs überprüft.

Mit diesen neuen Bedingungen konnte auch in Hela-Zellen ein sehr effizienter *knockdown* sowohl von *TRAF6* als auch von *hUBC13* erreicht werden. Die Proteinexpression wurde bis zu sechs Tage nach Transfektion im Western Blot analysiert. Dabei konnte nur in den Kontrollen (-) hUbc13- bzw. TRAF6-Protein nachgewiesen werden. In den Lysaten der *knockdown* Zellen (+) konnte fast zu keinem Zeitpunkt Protein detektiert werden, nur etwas TRAF6-Protein einen Tag nach Transfektion (Abbildung 21).

Alle folgenden Experimente wurden, wie in hTERT-RPE-Zellen, 4 d nach Transfektion gestartet, um das optimale Zeitfenster der Herunterregulierung zu nutzen.

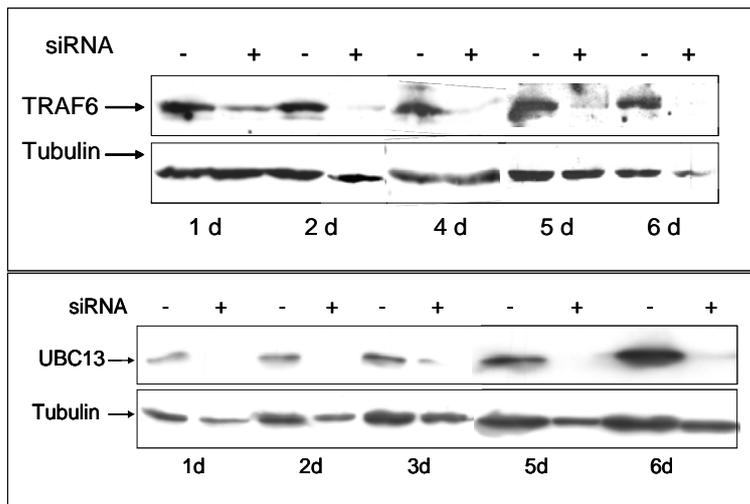


Abbildung 21: Immundetektion des Proteingehaltes nach *knockdown* von *TRAF6* und *hUBC13* in HeLa-Zellen; Nach Transfektion mit siRNAs (+) konnte eine deutliche Reduktion des Proteingehaltes sowohl von hUbc13 als auch von TRAF6 im Vergleich zu den Kontrollen (-) erreicht werden. Beide Proteine liessen sich über einen Zeitraum von 6 d nach Transfektion nicht nachweisen. Hier dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von drei durchgeführten Versuchen.

3.1.2.4 *Knockdown* von *hRAD18* als Kontrolle

RAD18 ist ebenso wie *UBC13* ein Mitglied der *RAD6*-Gruppe in Hefe (Prakash 1981, Prakash *et al.* 1993, Lawrence 1994, Bailley *et al.* 1997, Broomfield *et al.* 2001, Friedberg *et al.* 2006). *rad18* Mutanten in *S. cerevisiae* sind hochempfindlich gegenüber verschiedenen Mutagenen wie UV-Licht und chemische Agenzien (Lawrence *et al.* 1976, 1994). Außerdem zeigen *rad18*-Mutanten eine erhöhte spontane Mutationshäufigkeit (Kunz *et al.* 1992, 2000, Brusky *et al.* 2000). Auch in der Hühnerzelllinie DT40 konnten Sensibilitäten gegenüber ähnlich vielen DNA-schädigenden Substraten nach *rad18-knockout* festgestellt werden. Dies geht einher mit nachweisbaren Defekten in der homologen Rekombination (Saber *et al.* 2007). *RAD18* ist in Säugerzellen das funktionelle Homolog zum Hefegen *RAD18* und am postreplikativen Reparaturweg beteiligt. hRad18 bildet einen Komplex mit hRad6, wodurch die Ubiquitinierung von PCNA ausgelöst wird (Watanabe *et al.* 2004, Nakajima *et al.* 2006). Auch Empfindlichkeiten gegenüber UV-Licht und Chemikalien wie Cisplatin, MMS und MMC (Mitomycin) wurden bereits in *hrad18* und *mrad18 knockout* Zellen gezeigt (Tateishi *et al.* 2000, 2003, Miyase *et al.* 2005). Eine erniedrigte Mutagenese in *hrad18-knockout* Zellen nach UV-Bestrahlung und MMS-Behandlung konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Desweiteren wurde eine erhöhte Rekombinationsrate detektiert und sowohl ein vermehrter spontaner als auch induzierter Schwesterchromatidaustausch (SCE - *sister chromatid exchange*), Zeichen einer erhöhten genomischen Instabilität (Tateishi *et al.* 2003).

hRAD18 sollte ebenfalls mit Hilfe der RNAi-Technik herunterreguliert werden und als Kontrolle in funktionellen Experimenten dienen. So z.B. sollten die bereits publizierten Empfindlichkeiten auf UV-Licht und MMS überprüft werden, um eine weitere Kontrolle für die verwendeten experimentellen Systeme zu haben, mit denen die Funktionen von hUbc13 und TRAF6 für genomische Prozesse analysiert werden sollten.

Insgesamt wurden vier verschiedene siRNAs der Firma Qiagen getestet, darunter auch eine, die von der Firma als validiert verkauft wurde, also schon erfolgreich überprüft worden war. hTERT-RPE- und auch HeLa-Zellen wurden mit den jeweils unterschiedlichen Sequenzen transfiziert und nach verschiedenen Tagen der Grad der Regulation sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene untersucht. Die drei zuerst ausgewählten Sequenzen zeigten kaum einen Abbau der mRNA und keinen Proteinverlust. Die besten Ergebnisse wurden mit der validierten Sequenz in HeLa-Zellen erzielt, dargestellt in Abbildung 22.

Die mRNA-Expression konnte zwischen Tag 1 und Tag 4 nach Transfektion bis auf etwa 20 % reduziert werden. Auf Proteinebene sieht man aber kaum Effekte. Ansatzweise ist ein leichter *knockdown* 3 Tage nach Transfektion zu verzeichnen (Abbildung 22).

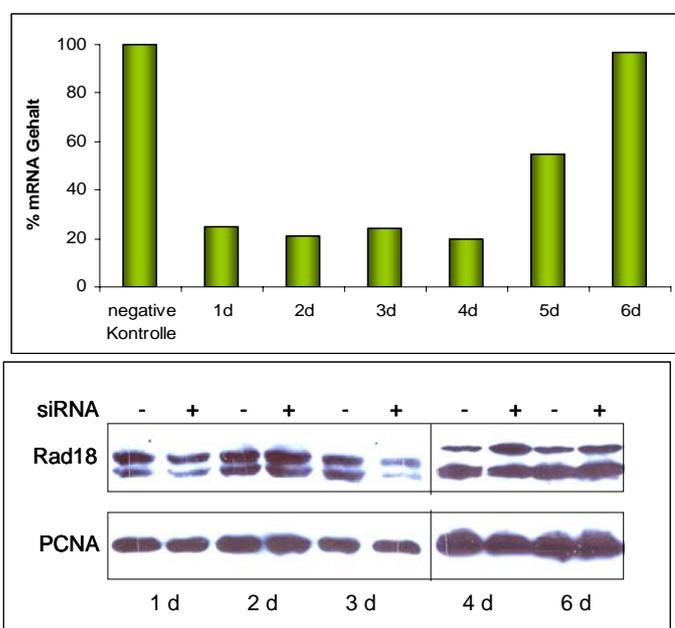


Abbildung 22: Herunterregulierung von *hRAD18* auf RNA- und Proteinebene; Der Nachweis für einen *knockdown* von *hRAD18* erfolgte auf mRNA-Ebene mittels quantitativer *realtime*-PCR (oben) und auf Proteinebene über Immundetektion (unten). Die mRNA konnte zwischen 1 und 4 d nach Transfektion auf etwas mehr als 20 % reduziert werden. Die Menge an hRad18-Protein wurde nur wenig verringert, nur an Tag drei (Spur 6) war etwas weniger vorhanden. Hier dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei durchgeführten Versuchen.

Protein konnte immer nachgewiesen werden und offenbar auch in ausreichender Menge, um die volle Funktion zu übernehmen. Im Weiteren wurde darauf verzichtet eine positive Kontrolle mittels *hrad18-knockdown* zu verwenden, da für funktionelle Experimente eine deutlichere Reduktion an hRad18 vonnöten wäre.

3.2 Überleben von hTERT-RPE-Zellen in Abhängigkeit von TRAF6 und hUbc13

3.2.1 Zellüberleben nach UV- und gamma-Strahlung

Da Deletionen und Mutationen in den Hefegenen *ubc13* bzw. *rad5* erhöhte Strahlensensitivität, v. a. nach UV-Bestrahlung, aufzeigen (Johnson *et al.* 1992, Brusky *et al.* 2000, Xiao *et al.* 2000, Broomfield *et al.* 2001), wurden die entsprechend herunterregulierten hTERT-RPE-Zellen auf Strahlenempfindlichkeit getestet. Nach der Transfektion wurden die Zellen mit den entsprechenden Dosen bestrahlt und nach 2 d im MTT-Test analysiert. Bei diesem wird die metabolische Aktivität der Zellen bestimmt, was als Indiz für das Überleben der Zellen herangezogen werden kann.

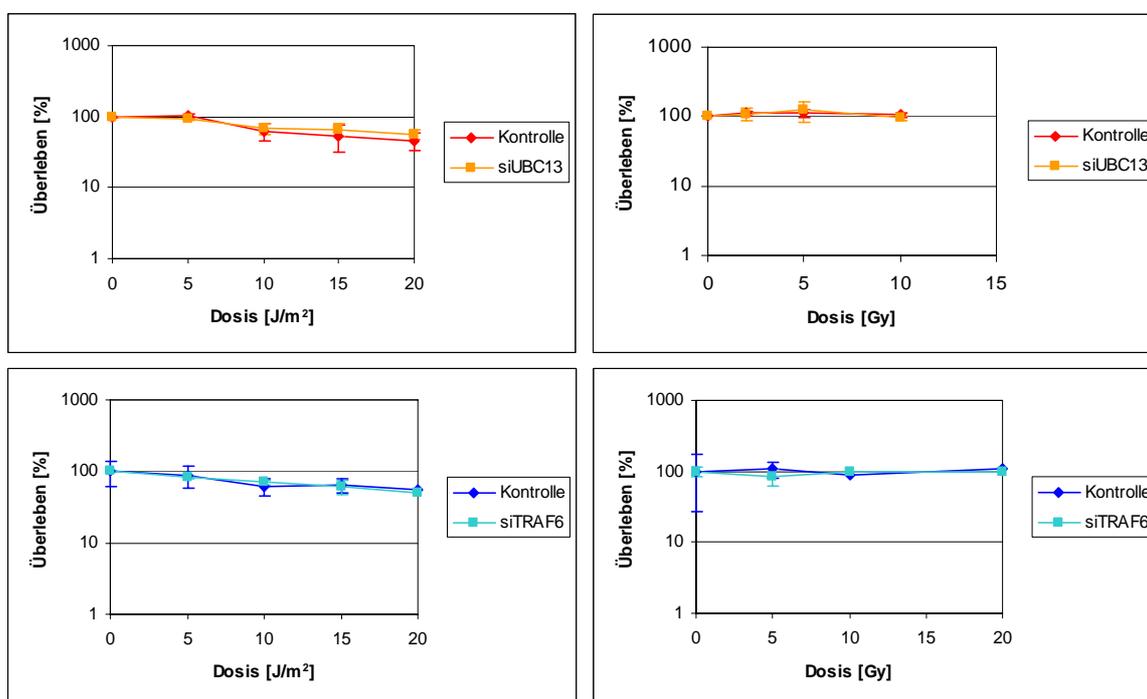


Abbildung 23: Analyse des Überlebens nach UV- und γ -Bestrahlung im MTT-Test; Das Überleben nach verschiedenen Dosen UV-C- (links) bzw. gamma-Bestrahlung (rechts) nach *knockdown* wurde in drei voneinander unabhängigen Versuchen durchgeführt (Mittelwert +/- Standardabweichung). Dargestellt ist der prozentuale Anteil an metabolisch aktiven Zellen bei unterschiedlichen Dosen. Es ergab sich kein Unterschied zwischen Kontroll- und herunterregulierten Zellen, weder in Abhängigkeit von der Dosis, die sogar bis in den hohen Bereich von 20 Gy bzw. 20 J/m^2 ging, noch von der siRNA (oben, rot siUBC13, unten, blau siTRAF6). Die transfizierten Zellen waren alle in etwa gleich unempfindlich.

Dabei konnte aber weder nach einem *knockdown* von *hUBC13* noch von *TRAF6* und den entsprechend transfizierten Kontrollzellen ein Unterschied nach verschiedenen Dosen UV-C- und gamma-Bestrahlung festgestellt werden (Abbildung 23). Allerdings zeigten die Kontrollzellen selbst bei 20 Gy nahezu 100 % der Zellen metabolische Aktivität. Somit stellte sich die Frage nach der Aussagekraft dieses Tests, da weder in Kontrollen noch nach *knockdown* eine Reduktion auftrat. Möglicherweise war auch das Zeitfenster des Experiments zu kurz, da bereits 48 h nach Transfektion gemessen wurde.

Deshalb wurde die Überlebensfähigkeit der Zellen über einen längeren Zeitraum auch in einem Koloniebildungsexperiment bestimmt. Dabei wurden herunterregulierte Zellen ausgesät, bestrahlt und eine Woche unter optimalen Bedingungen kultiviert. In dieser Zeit konnten sich die Zellen teilen und Kolonien bilden, die dann als Anhaltspunkt für das Überleben herangezogen werden konnten.

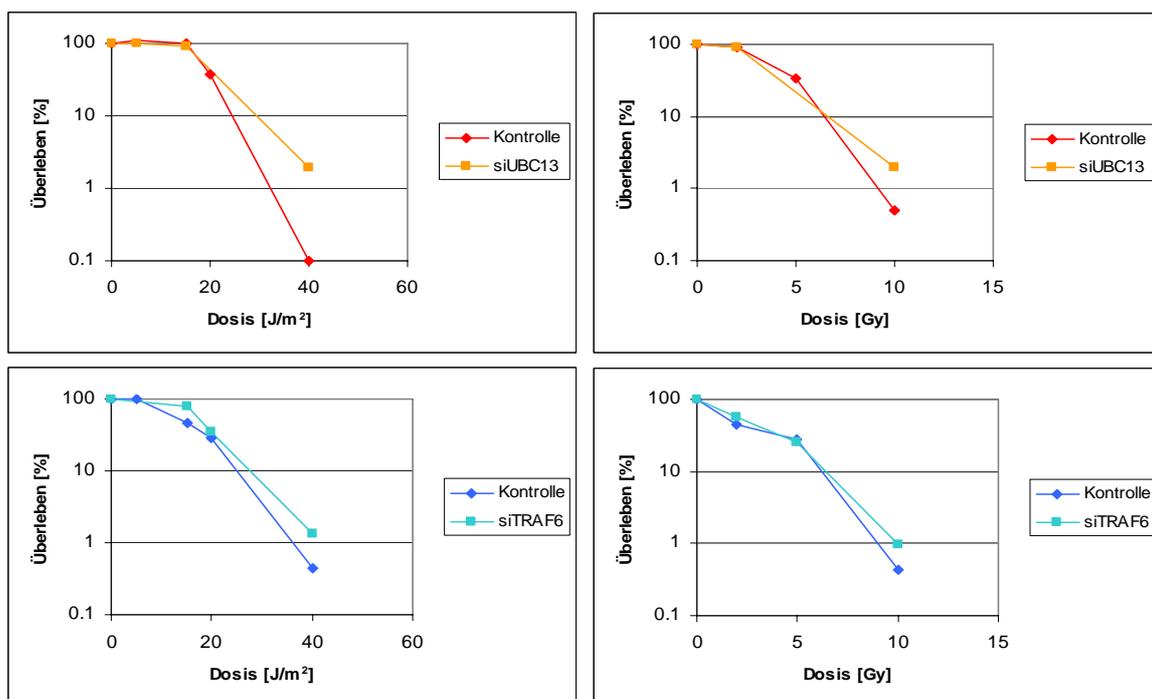


Abbildung 24: Nachweis des Zellüberlebens nach *knockdown* und UV-C- bzw. γ -Bestrahlung im Koloniebildungstest; Die Zellen wurden nach *knockdown* mit unterschiedlichen Dosen UV-C- (links) oder γ -Strahlung (rechts) behandelt. Die Darstellung umfasst den prozentualen Anteil an überlebenden Zellen mit der Fähigkeit Kolonien zu bilden. Es konnten kaum Unterschiede zwischen den Kontrollen und den siRNA-regulierten Zellen (oben, rot siUBC13, unten, blau siTRAF6) festgestellt werden. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei durchgeführten Versuchen.

Im Koloniebildungstest konnten, ebenso wie durch den MTT-Test, keine Unterschiede im Überleben von hTERT-RPE-Zellen nach UV-C- oder γ -Bestrahlung in Abhängigkeit von hUbc13 oder TRAF6 festgestellt werden. Zellen die mit der Kontroll-siRNA transfiziert wurden, überlebten die Bestrahlung eher etwas schlechter als *hubc13*- oder *traf6*-*knockdown*-Zellen (Abbildung 24). Im Gegensatz zum MTT-Test konnte aber hier die Empfindlichkeit der Zellen nachgewiesen werden. Die Teilungsfähigkeit nahm mit höheren Dosen deutlich ab. Ein Einfluss der Bestrahlung auf die Überlebensfähigkeit von hTERT-RPE-Zellen konnte somit nachgewiesen werden, aber kein Einfluss durch die Herunterregulierung der Gene *hUBC13* und *TRAF6*.

3.2.2 Überleben nach Behandlung mit chemischen Substanzen

Mutationen in Hefegenen der *RAD6*-Gruppe führen zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber alkylierenden Substanzen (Friedberg 1988, Scheller *et al.* 2000, Xiao *et al.* 2000, Lyakhovich und Shekhar 2004). Herunterregulierte hTERT-RPE-Zellen wurden deshalb ebenfalls nach Behandlung mit verschiedenen chemischen Agenzien auf eine unterschiedliche Überlebensfähigkeit mittels Koloniebildungstest untersucht. Dabei wurde Methylmethansulfonat (MMS) verwendet, ein Strahlenmimetikum, welches DNA methyliert (Grzesiuk 1998, Wyatt und Pittman 2006). Ebenfalls eingesetzt wurden Cisplatin, ein chemisches Agens, das die DNA quervernetzt (Zwelling und Kohn 1979) und Camptothecin (CPT), ein Inhibitor der Topoisomerase I. Topoisomerase I führt gezielte, reversible Unterbrechungen in der DNA ein. Eine Hemmung bewirkt irreguläre, nicht behebbare DNA-Brüche und die Religierung von DNA kann nicht mehr stattfinden (Liu *et al.* 2000).

hTERT-RPE-Zellen wurden nach *knockdown* und Vereinzelung der Zellen mit den jeweiligen Reagenzien behandelt. Diese wurden in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, die über Richtwerte aus der Literatur oder Erfahrungswerte im eigenen Labor ermittelt wurden.

Im Koloniebildungstest konnten keine signifikanten Unterschiede nach *traf6*-*knockdown* für keine der verwendeten Chemikalien festgestellt werden. *hubc13* herunterregulierte Zellen zeigten eine leicht erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Cisplatin, nicht aber gegen MMS oder CPT, hier waren nur sehr geringe Unterschiede zu verzeichnen (Abbildung 25).

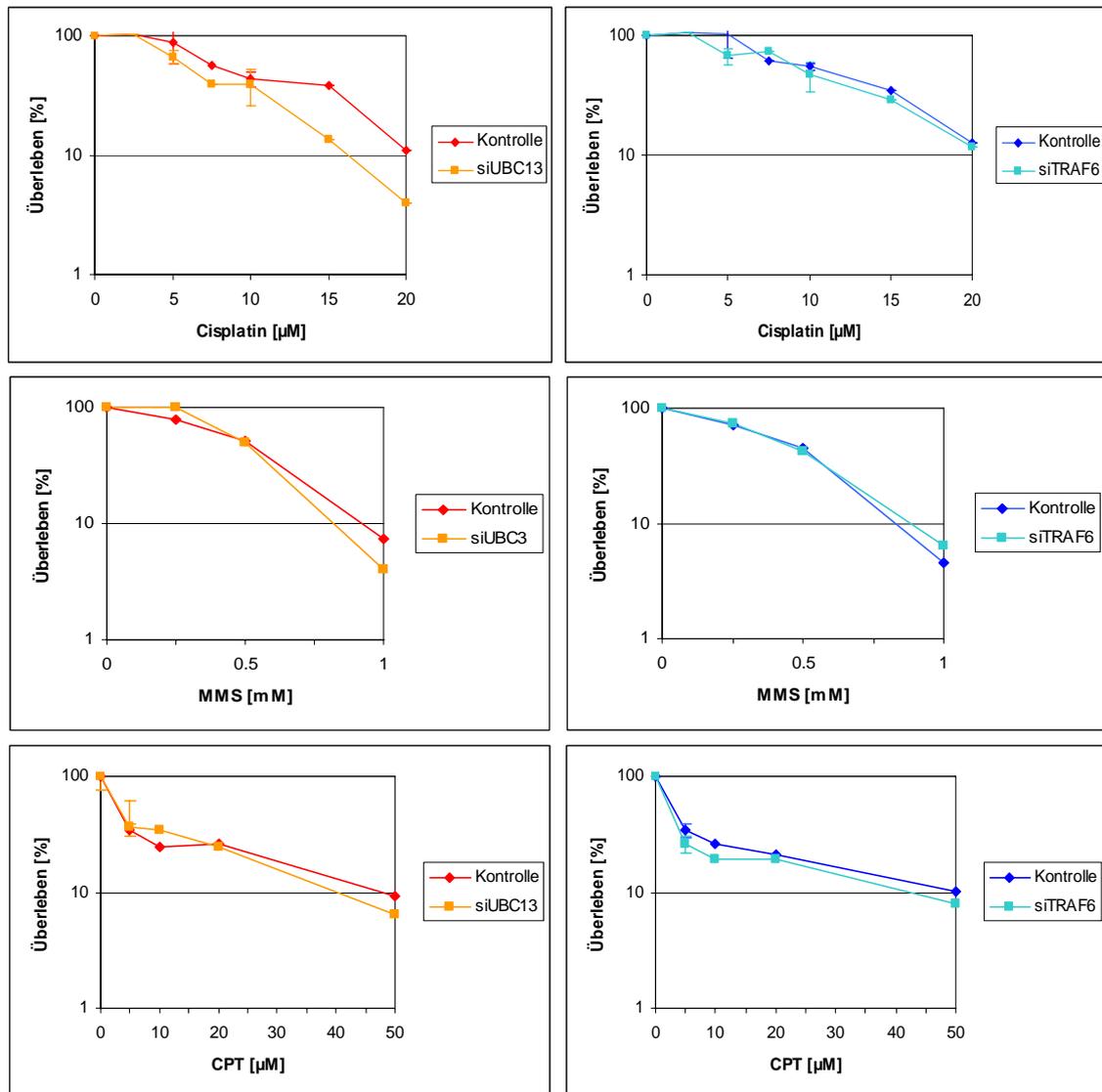


Abbildung 25: Überleben nach Behandlung mit chemischen Substanzen; Die Zellen wurden nach *knockdown* mit verschiedenen Agenzien (oben Cisplatin, mittig MMS, unten CPT) in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt und dann im Koloniebildungstest untersucht. Dargestellt ist für die Cisplatin-Behandlung der Mittelwert (+/- Standardabweichung) von drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen, nach MMS-Behandlung ein repräsentatives Ergebnis von drei durchgeführten Experimenten und nach CPT-Behandlung der Mittelwert (+/- Standardabweichung) von zwei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Dabei konnten kaum Unterschiede zwischen den Kontrollen und den herunterregulierten Zellen (links, rot siUBC13, rechts, blau siTRAF6) festgestellt werden. Lediglich nach Cisplatin-Behandlung konnte nach *huc13 knockdown* ein leichter Unterschied zu den Kontrollen nachgewiesen werden (oben links).

3.3 Reparatur- und Rekombinationsverhalten in hTERT-RPE-Zellen

Hefemutanten der *RAD6*-Gruppe zeigen ein verändertes DNA-Reparatur- und Rekombinationsverhalten (Liefshitz *et al.* 1998, Friedl *et al.* 2001). Über ein im Labor etabliertes Plamidsystem kann die Reparatur von Mikrodeletionen untersucht werden (Ahne *et al.* 1997, Steininger 2005), wobei der Anteil von HR und NHEJ differentiell erfasst werden kann. Außerdem ist dieses Plasmidsystem geeignet, durch den Vergleich der Transformationseffizienz von geschnittenem zu ungeschnittenem Plasmid, die Reparaturreffizienz zu untersuchen (Ahne *et al.* 1997). Hefe-Wildtypzellen reparieren nahezu ausschließlich über HR, während *rad5*, *mms2* und *ubc13* Mutanten verstärkt NHEJ verwenden, wobei die Effizienz aber gleich bleibt (Ahne *et al.* 1997, Mörtl *et al.* 2008).

Deshalb wurde der Einfluss von hUbc13 und TRAF6 auf die DNA-Reparatur im *Comet assay* (2.2.6) und durch die Bestimmung von γ H2AX-Foci (2.2.5.1) untersucht. Bei der Untersuchung von γ H2AX-Foci werden DSB detektiert, durch die die Phosphorylierung von H2AX hervorgerufen wird. Im Gegensatz dazu können im alkalischen *Comet assay* DSB und SSB untersucht werden. Während der Elektrophorese herrschen stark alkalische Bedingungen, wodurch doppelsträngige DNA denaturiert wird und somit auch die Brüche, die auf nur einem Strang vorkommen, nachgewiesen werden können.

Im *Comet assay* wurden die Zellen sofort nach der Bestrahlung geerntet oder unter normalen Wachstumsbedingungen bis zu 60 min inkubiert, um eine Reparatur der induzierten DNA-Strangbrüche zu ermöglichen. Die Zellen werden auf Agarose beschichtete Objektträger aufgebracht und lysiert. Nach der anschließenden Elektrophorese und der DNA-Färbung können die entstandenen Fragmente der DNA, die sich durch die elektrophoretische Auftrennung hinter dem Kern (Kopf) gesammelt haben (Schweif), gemessen werden. Als Messgröße dient das sog. *tail olive moment* (TOM). Dabei wird der Abstand zwischen der Hauptintensität von Kopf und Schweif und die Dichte der DNA im Schweif, der durch die gewanderte DNA entstanden ist, berücksichtigt (2.2.6).

In Abbildung 26 ist der Schadensmarker TOM nach *knockdown* und γ -Bestrahlung als Beispiel der durchgeführten Versuche dargestellt. Die Bestrahlung erfolgte mit 5 Gy, der Initialschaden wurde sofort (0 min) gemessen und die Reparatur der Schäden nach verschiedenen Zeitpunkten bis zu 60 min nach Bestrahlung bestimmt. Nach 30 min war schon fast das Ausgangsniveau von unbestrahlten Zellen erreicht (TOM bei etwa 100, Daten nicht gezeigt). Zwar war der Initialschaden in *hubc13-knockdown*-Zellen etwas

höher, aber die Reduktion der Schäden verläuft in gleicher Kinetik. Nach *knockdown* von *TRAF6* entsprach der Ausgangsschaden dem der Kontrolle ebenso wie der Verlauf der Reparatur der DNA-Schäden. Somit konnten durch die Bestimmung im *Comet assay* keine Auffälligkeiten in der DNA-Reparatur nach gamma-Bestrahlung in Abhängigkeit von hUbc13 oder TRAF6 aufgedeckt werden.

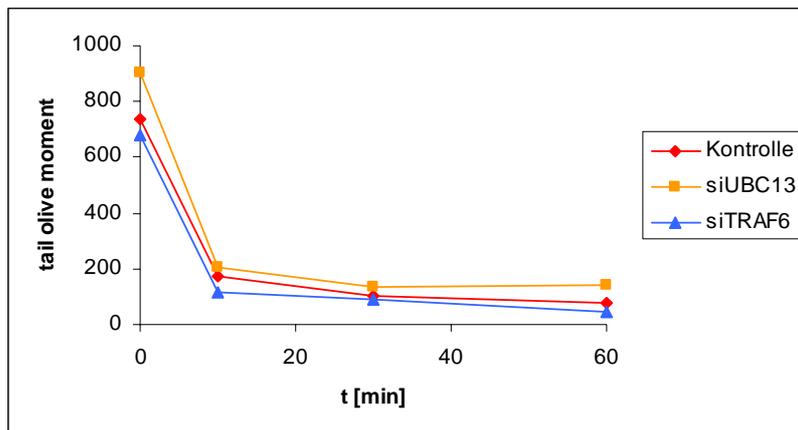


Abbildung 26: Bestimmung von DNA-Schäden durch TOM nach *knockdown* im *Comet assay* nach γ -Bestrahlung; Transfizierte Zellen wurden mit 5 Gy bestrahlt und die Reparatur der induzierten Schäden bis 60 min nach Bestrahlung bestimmt. Dargestellt ist der induzierte Schaden durch die Messgröße *tail olive moment*. Bereits nach 10 min konnte sowohl in den Kontrollen (rot), als auch in den herunterregulierten Zellen (orange, blau) eine deutliche Reduktion der Schäden nachgewiesen werden. Ein Unterschied im Reparaturverhalten zwischen den beiden Zellen konnte nicht ermittelt werden. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von drei durchgeführten Versuchen.

Des Weiteren wurde auch durch die Bestimmung von γ H2AX-Foci untersucht, ob sich Veränderungen in der DNA-Reparatur finden. Dabei kann nicht nur die Reparatur von induzierten Doppelstrangbrüchen nach γ -Bestrahlung untersucht werden. UV-Bestrahlung kann ebenfalls H2AX-Phosphorylierung induzieren, was als γ H2AX-Foci nachweisbar ist (Limoli *et al.* 2002, Marti *et al.* 2006).

Nach der Bestrahlung der herunterregulierten hTERT-RPE-Zellen wurden diese zu bestimmten Zeitpunkten fixiert und γ H2AX mittels Immunfluoreszenz angefärbt und analysiert (2.2.5.1). Die Anzahl der Foci pro Zelle wurde bestimmt und zur Ermittlung der Induktion und Reparatur von DSBs herangezogen.

Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede nach γ - noch nach UV-C-Bestrahlung in *hubc13*- oder *traf6*-*knockdown*-Zellen im Vergleich mit den entsprechend transfizierten Kontrollen gezeigt werden.

Nach Deletion von *UBC13* und *RAD5* ändert sich auch das Rekombinationsverhalten in Hefen. So zeigt sich z.B. eine erhöhte spontane Rekombinationshäufigkeit (Liefshitz *et al.* 1998, Helleday 2003).

Zur Untersuchung, ob eine erhöhte spontane Rekombinationshäufigkeit vorliegt, wurde ein Plasmid-Reportersystem verwendet, das zwei GFP-Allele (*green fluorescent protein*) enthält, die an verschiedenen Stellen mutiert sind. Über HR kann aus den beiden nicht funktionellen Allelen ein funktionelles entstehen, dessen grüne Fluoreszenzintensität im Durchflusszytometer nachgewiesen werden kann (s. auch Punkt 2.1.12.1).

hTERT-RPE-Zellen, die das Plasmid ins Genom integriert haben (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A. Rickinger), wurden mit siRNA transfiziert und an verschiedenen Tagen nach Transfektion im Durchflusszytometer untersucht. Die Funktionalität des Experimentes wurde von A. Rickinger bereits nachgewiesen. Dabei konnte festgestellt werden, dass nach *knockdown* von *NBS1* eine deutlich erhöhte spontane Rekombination auftritt (Rickinger 2006).

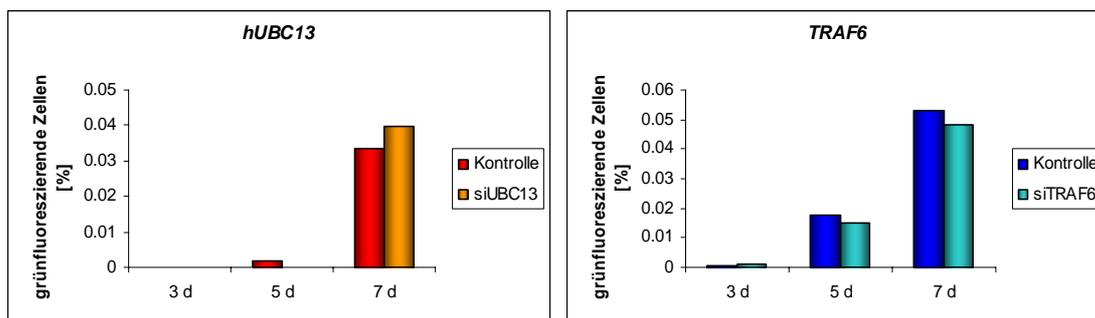


Abbildung 27: Rekombinationsverhalten nach *hubc13*- und *traf6*-knockdown; Aufgetragen wurde der prozentuale Anteil der grün fluoreszierenden Zellen an der im Durchflusszytometer analysierten Gesamtpopulation zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion. In *knockdown*-Zellen konnten genauso wenige fluoreszierende Zellen nachgewiesen werden wie in den entsprechend transfizierten Kontrollen, so dass sich keine Unterschiede durch eine Reduktion der Genexpression ergaben. Hier ist ein Experiment von drei durchgeführten Versuchen repräsentativ dargestellt.

Zellen, die eine grüne Fluoreszenz zeigen, haben die mutierten GFP-Allele zu einem funktionierenden Allel rekombiniert. In allen Ansätzen war nur ein sehr geringer Anteil an grün fluoreszierenden Zellen zu detektieren, was auf ein geringes Ausmaß an spontaner Rekombinationshäufigkeit hindeutet. *hubc13* und *traf6*-herunterregulierte Zellen zeigten im untersuchten Zeitfenster von 7 d keine erhöhte spontane Rekombinationsfrequenz, da keine Unterschiede in der durchflusszytometrischen Messung gegenüber den entsprechenden Kontrollen detektiert werden konnte (Abbildung 27). So konnten weder für *hUBC13* noch für *TRAF6* ein Einfluss auf spontane homologe Rekombination festgestellt werden.

3.4 Mutationsverhalten nach *knockdown* von *hUBC13*

Charakteristisch für die *ubc13*-Hefemutante ist eine extrem erhöhte spontane und auch strahleninduzierte Mutationshäufigkeit (Lawrence 1994, Friedberg 1995, Brusky *et al.* 2000).

Zur Untersuchung der Mutationshäufigkeit wurden hTERT-RPE-Zellen mit dem Vektor pMS-Y(X) transfiziert. Dieser enthält ein mutiertes YFP (*yellow fluorescent protein*), das aufgrund des Stoppcodons TAG nicht exprimiert werden kann. In Hela-Zellen wurde der Mutationsvektors pBB-G(X) verwendet, welcher ein mutiertes GFP (*green fluorescent protein*) enthält (2.1.12.2). Durch Mutation kann das Stoppcodon revertiert werden und somit kann ein funktionelles fluoreszierendes Protein exprimiert werden. Die entstandene Fluoreszenzintensität kann durchflusszytometrisch bestimmt werden.

Zellen, die den Vektor aufgenommen hatten, wurden mit siRNA transfiziert und nach verschiedenen Zeitpunkten wurde die Fluoreszenzintensität im Durchflusszytometer gemessen. Zusätzlich wurden diese Zellen auch 1,5 d nach Transfektion mit UV- bzw. gamma-Strahlung behandelt und ebenfalls im Durchflusszytometer analysiert. Die Mutationshäufigkeit wurde bestimmt, indem die Anzahl der fluoreszierenden Zellen durch die Gesamtzellzahl geteilt wurde. Vergleicht man die Kontrollen mit den siRNA herunterregulierten Zellen ergibt sich ein Induktionsfaktor, über den die Erhöhung der Anzahl der mutierten Zellen betrachtet werden kann.

In Tabelle 2 ist die Mutationshäufigkeit und der resultierende Induktionsfaktor nach *knockdown* von *hubc13* als Beispiel in hTERT-RPE-Zellen dargestellt. Die Analyse 3 und 5 d nach Transfektion mit der siRNA zeigte eine leicht erhöhte spontane Mutationshäufigkeit und nach gamma-Bestrahlung eine leicht erhöhte induzierte Mutationshäufigkeit in den *hubc13*-herunterregulierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen. Nach UV-C- Bestrahlung konnten keine Unterschiede zwischen Kontrollzellen und *hubc13*-herunterregulierten Zellen festgestellt werden. Die Analyse in Hela-Zellen ergab ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Kontrollen und *hubc13*-herunterregulierten Zellen. Auch ein *knockdown* von *TRAF6* lieferte keine Auffälligkeiten im Mutationsverhalten spontan oder nach UV-C- oder γ -Bestrahlung (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 2: Induktion der Mutationshäufigkeit nach *huc13*-knockdown in hTERT-RPE-Zellen; Nach der siRNA-Transfektion von Zellen, die das Plasmid-Detektionssystem enthalten, wurde die Mutationsfrequenz und der daraus resultierende Induktionsfaktor bestimmt. Spontan konnte 3 und 5 d nach Herunterregulierung von *huc13* eine leicht erhöhte Mutationsfrequenz gegenüber den Kontrollen festgestellt werden. So war die Mutationsfrequenz nach 3 d etwa 1,5 x und nach 5 d fast doppelt so hoch wie in den Kontrollen. Dies gilt ebenso für den Vergleich von Zellen nach gamma-Bestrahlung, der Faktor ist allerdings niedriger. Nach UV-C-Bestrahlung der Zellen mit 15 J/m² konnte in der Summe kein Unterschied festgestellt werden, da die Mutationshäufigkeit 3 d nach Bestrahlung erniedrigt, 5 d nach Bestrahlung aber erhöht ist. Dargestellt ist der Mittelwert von jeweils drei voneinander unabhängigen Versuchen.

	3d	5d	3d 15J	5d 15J	3d 10 Gy	5d 10 Gy
Kontrolle	7.8 x 10 ⁻⁵	1.6 x 10 ⁻⁴	1.3 x 10 ⁻⁴	7.4 x 10 ⁻⁵	1.5 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻⁴
siUBC13	1.9 x 10 ⁻⁴	3 x 10 ⁻⁴	6.4 x 10 ⁻⁵	1.3 x 10 ⁻⁴	2.2 x 10 ⁻⁴	1.3 x 10 ⁻⁴
Induktionsfaktor	1.51	1.85	0.49	1.76	1.47	1.3

Die Untersuchungen zum Überleben nach DNA-Schädigung und im Rekombinations- und Mutationsverhalten ergaben in den gewählten experimentellen Systemen keine funktionellen Homologien zwischen hUbc13 und TRAF6 und den entsprechenden Hefegenen. So konnten keine Unterschiede in der DNA-Reparatur durch *Comet assay*, γ H2AX-Foci oder PCNA-Polyubiquitinierung in reproduzierbaren Experimenten (Daten nicht gezeigt) zwischen herunterregulierten Zellen und ihren entsprechenden Kontrollen nachgewiesen werden. Auch eine Erhöhung der Mutationshäufigkeit um einen Faktor von knapp 2 ist im Vergleich mit der Hefe sehr gering. Dort betragen die Faktoren das 10fache (Rad5, Cejka *et al.* 2001) bzw. 100 - 200fache (Ubc13, Brusky *et al.* 2000).

Daher sollte im zweiten Teil der Arbeit die Funktion von hUbc13 im NF κ B-Signaltransduktionsweg und Funktionen für die Einleitung von Apoptose genauer untersucht werden. Dabei ist bekannt, dass hUbc13 nach Stimulation die Verknüpfung von Lysin-63-Polyubiquitinketten katalysiert (Eddins *et al.* 2006, Petroski *et al.* 2007). Diese Modifikation ist für die Aktivierung des NF κ B-Weges nötig (Adhikari *et al.* 2007, s. Punkt 1.4.3 und 1.5.1). Da die Funktion von TRAF6 in der Aktivierung des NF κ B-Weges schon eingehend untersucht wurde (Deng *et al.* 2000, Wang *et al.* 2001, Wu und Arron 2003, Ea *et al.* 2004, Woof *et al.* 2004, Yang *et al.* 2004, Adhikari *et al.* 2007), wurden im Folgenden nur noch Analysen zur Aufklärung der Funktionen von hUbc13 durchgeführt.

3.5 Stimulierung des NF κ B-Signaltransduktionsweg über TNF α

3.5.1 Abbau von I κ B nach Stimulation mit TNF α

Unter physiologischen Bedingungen wird der NF κ B-Weg durch extrazelluläre Signale wie TNF, Interleukine, UV-Bestrahlung oder bakterielle und virale Infektionen aktiviert. Dazu wird über eine Signalkaskade der NF κ B-Inhibitor I κ B degradiert (Magné *et al.* 2006, Syed *et al.* 2006).

hTERT-RPE-Zellen wurden sowohl mit TNF α (25 ng/ml) als auch mit IL-1 β (10 ng/ml) stimuliert. Nach verschiedenen Zeitpunkten, bis zu 120 min nach Behandlung, wurden die Zellen isoliert und lysiert. Durch die Immundetektion konnte allerdings keine I κ B-Degradierung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

In HeLa-Zellen konnte dagegen eine deutliche Reaktion gezeigt werden. Nach Zugabe von TNF α wurden HeLa-Zellen nach 0, 15, 30 und 90 min isoliert, lysiert und im Western Blot mit anschließender Immundetektion wurde die Proteinexpression nachgewiesen.

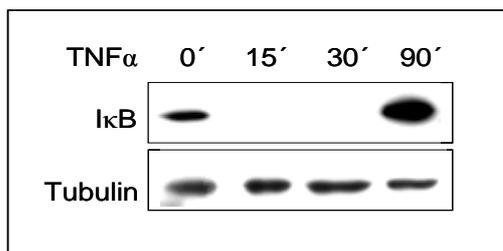


Abbildung 28: Immundetektion der I κ B-Degradierung in HeLa-Zellen nach TNF α -Stimulation; HeLa-Zellen wurden mit TNF α (25 ng/ml) behandelt. 15, 30 und 90 min nach Zugabe wurden die Zellen lysiert und die Proteinexpression von I κ B mittels Immundetektion nachgewiesen. Als Beladungskontrolle diente die Detektion von Tubulin. Ein deutlicher Abbau von I κ B fand statt (Spur 2 und 3), 90 min nach Behandlung war das Protein wieder nachweisbar (Spur 4). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus zwei durchgeführten Versuchen.

Ein vollständiger Abbau von I κ B war für die Zeitwerte 15 und 30 min nach Stimulation zu erkennen, nach 90 min konnte das Protein wieder in großer Menge nachgewiesen werden (Abbildung 28).

Aufgrund dieses Ergebnisses sind hTERT-RPE-Zellen ungeeignet zur Untersuchung des NF κ B-Weges, weshalb alle weiteren Experimente in HeLa-Zellen durchgeführt wurden. Ein *knockdown* von *hUBC13* konnte in diesen Zellen sehr effektiv mit dem Reagenz *Dharmafect1* erreicht werden (Punkt 3.1.2.3).

3.5.2 Stimulierung von HeLa-Zellen mit TNF α

3.5.2.1 p65-Lokalisierung nach TNF α -Stimulation in Abhängigkeit von hUbc13

Für die Analyse der Aktivierung von NF κ B wurde nicht nur die I κ B-Degradierung untersucht, sondern auch die Lokalisation der aktiven NF κ B-Untereinheit p65, die nach Stimulierung in den Kern verlagert wird. Dieser Nachweis erfolgte 60 min nach TNF α -Behandlung mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (2.2.5.2).

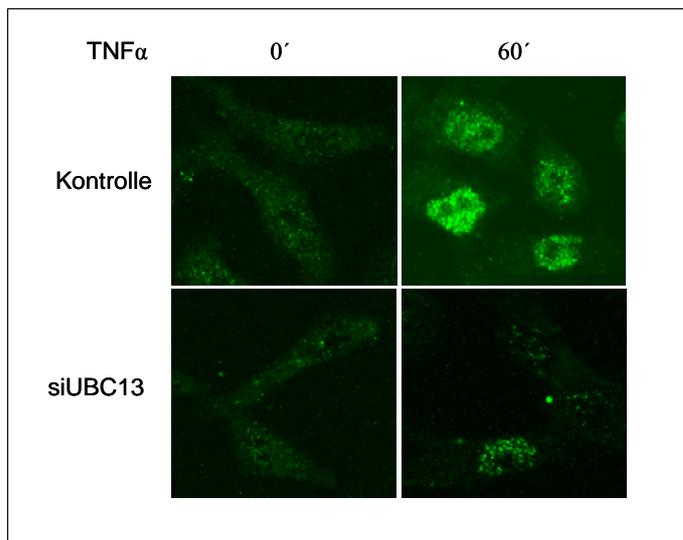


Abbildung 29: Lokalisation von p65 nach TNF α -Stimulation und *knockdown* von *hUBC13*; Wurden HeLa-Zellen mit TNF α stimuliert, konnte in den Kontrollen 60 min nach Stimulation die Translokation von p65 in den Kern beobachtet werden (oben). In siUBC13-regulierten Zellen fand kaum Translokation von p65 statt (unten). Hier dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus vier durchgeführten Versuchen.

Wie in Abbildung 29 gut zu erkennen ist, hat sich p65 in den Kontrollen 60 min nach Stimulation mit TNF α in den Zellkern verlagert, wo es als Transkriptionsfaktor aktiv werden kann. Im Gegensatz dazu wurde in *huc13*-herunterregulierten Zellen kaum p65 in den Kern transloziert.

Hier findet sich die erste Bestätigung, dass hUbc13 am NF κ B-Weg beteiligt ist, da bei reduzierter Menge des hUbc13-Proteins keine Aktivierung von NF κ B stattfinden kann.

3.5.2.2 Expression von NFκB-Zielgenen nach Reduktion von hUbc13

Ist p65, die aktive Untereinheit von NFκB, in den Kern gelangt, wirkt es als Transkriptionsfaktor auf verschiedene Gene. Hierbei handelt es sich zumeist um Entzündungsgene. Da diese fast ausschließlich in lymphoiden Zellen gebildet werden, ist es in HeLa-Zellen im Allgemeinen schwierig, deren Expression zu überprüfen. Die Expression von IL-6 und IL-8 kann aber auch in HeLa-Zellen nachgewiesen werden (Schwarz 1998, Kulms *et al.* 2000).

Mittels *realtime PCR* wurde nach *knockdown* von *hUBC13* in HeLa-Zellen 21 h nach Stimulation mit TNFα die Expression dieser Gene gemessen und mit der mRNA-Menge in Kontrollzellen verglichen. In drei voneinander unabhängigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass sowohl die mRNA-Menge von IL-6, als auch die von IL-8 nach Stimulation mit TNFα anstieg. In den Kontrollzellen war dieser Anstieg höher als in den *hubc13*-herunterregulierten Zellen (Abbildung 30).

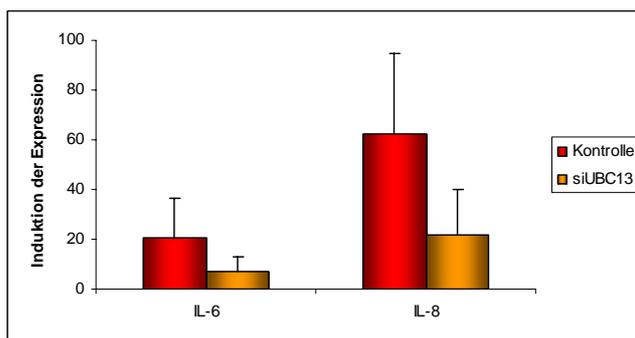


Abbildung 30: Expression der Gene IL-6 und IL-8 nach *hubc13*-knockdown; Nach der Transfektion und Stimulation mit TNFα wurde mittels *realtime PCR* die Expression von IL-6 und IL-8 ermittelt. In Kontrollzellen (rot) war die mRNA-Menge nach Stimulierung in beiden Genen höher als in *hubc13*-herunterregulierten (orange) Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei voneinander unabhängigen Versuchen (+/- Standardabweichung).

Dies liefert für HeLa-Zellen eine weitere Bestätigung für die Beteiligung von hUbc13 am NFκB-Weg. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit publizierten Daten (Andersen *et al.* 2005, Adhikari *et al.* 2007).

3.5.2.3 Induktion von Apoptose durch TNF α -Stimulation

3.5.2.3.1 Nachweis der Apoptose durch PARP-Spaltung

Findet eine Aktivierung von TNFR1 durch TNF α statt, kann neben antiapoptotischen Prozessen über den NF κ B-Weg auch Apoptose induziert werden. Bei intaktem NF κ B-Weg überwiegt der antiapoptotische Weg. Ist dieser Weg beeinträchtigt, kommt es zur vermehrten Apoptose. Die gestörte NF κ B-Aktivierung nach *hubc13 knockdown* (Punkt 3.5.2.1 und 3.5.2.2) könnte somit auch eine erhöhte Apoptose nach sich ziehen.

Hela-Zellen, die mit siUBC13-1 herunterreguliert waren, wurden mit TNF α behandelt. 21 h Stunden nach Stimulation wurden Zellysate hergestellt und die PARP-Spaltung, die als Indikator für Apoptose gilt (Lazebnik *et al.* 1994, Aragane *et al.* 1998), im Western Blot mit anschließender Immundetektion untersucht. Nach dem Herunterregulieren von *hUBC13* konnte in TNF α -behandelten Zellen PARP-Spaltung nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu verhielten sich die Kontrollen wie unbehandelte Zellen, die unabhängig vom Gehalt an hUbc13, keine PARP-Spaltprodukte aufwiesen (Abbildung 31).

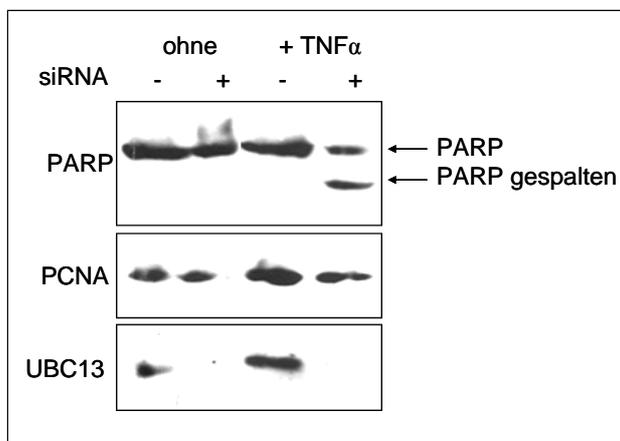


Abbildung 31: Immundetektion der PARP-Spaltung nach *hubc13-knockdown* und TNF α -Behandlung; Herunterregulierte Zellen wurden mit TNF α behandelt und die Spaltung des Proteins PARP daraufhin mittels Immundetektion untersucht. Die Detektion von PCNA diente als Beladungskontrolle, mit der Detektion von UBC13 wurde der *knockdown* überprüft. Unbehandelte Zellen, unabhängig von dem Gehalt an hUbc13, zeigten keine PARP-Spaltprodukte (Spuren 1 und 2). Auch in den Kontrollen konnte nach Behandlung keine Spaltung von PARP nachgewiesen werden (Spur 3). Im Gegensatz dazu zeigte sich in den herunterregulierten, behandelten Zellen PARP-Spaltung (Spur 4). Hier dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus vier durchgeführten Versuchen.

3.5.2.3.2 Caspase-3-Aktivität als Nachweis der Apoptose

PARP-Spaltung wird durch die Effektorcaspase-3 vermittelt. Nachdem in *huc13*-herunterregulierten Hela-Zellen nach TNF α -Stimulation vermehrt PARP gespalten wurde, sollte sich auch eine erhöhte enzymatische Aktivität von Caspase-3 zeigen. Deshalb wurde die Caspase-3-Aktivität 21 h nach Stimulation mit TNF α gemessen. Dabei wurde zunächst die intrazelluläre Caspase-3 durch den Aufschluss der Zellen freigesetzt. Die Umsetzung des zugesetzten synthetischen Substrats (Caspase-3-Substrat I, Ac-DEVD) konnte fotometrisch verfolgt werden und als Hinweis für die Aktivität herangezogen werden.

In Abbildung 32 ist der zeitliche Verlauf der Umsetzung des Caspase-3-Substrats (Caspase-3-Substrat I, Ac-DEVD) dargestellt. Die Umsetzungsgeschwindigkeit wurde als Indiz für die Aktivität der Caspase-3 verwendet, je höher die Geschwindigkeit, desto höher die Aktivität. Zum Vergleich der Geschwindigkeiten dient die Steigung der Absorption (OD₅₉₅) des umgesetzten Substrats aufgezeichnet über den Verlauf der Zeit.

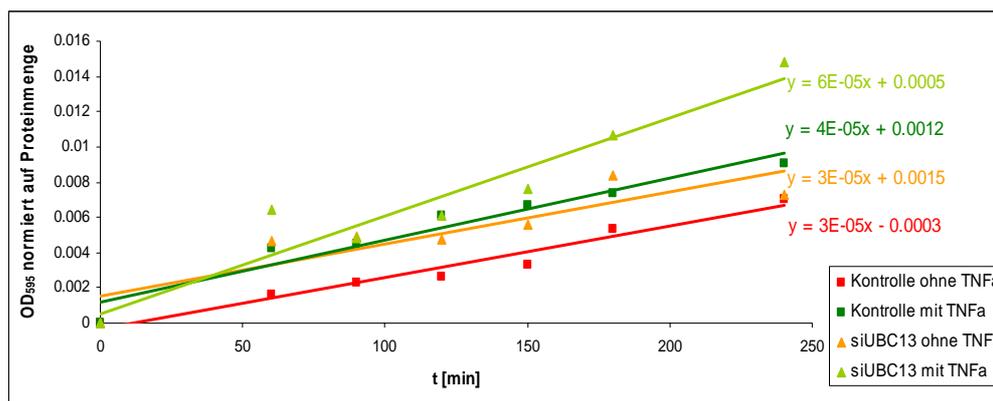


Abbildung 32: Messung der Caspase-3-Aktivität nach knockdown und TNF α -Stimulation; Nach *knockdown* wurde die enzymatische Aktivität von Caspase-3 durch die Bestimmung der Umsatzgeschwindigkeit eines synthetischen Substrats (Caspase-3-Substrat I, Ac-DEVD) gemessen. In den unbehandelten Zellen war ein geringer Anstieg der Absorption (OD₅₉₅) zu verzeichnen, bei gleicher Proteinmenge und unabhängig vom hUbc13-Status der Zellen. Nach TNF α -Stimulation war in herunterregulierten Zellen (hellgrün) ein deutlich erhöhter Anstieg zu verfolgen, im Gegensatz zu den Kontrollen (dunkelgrün), deren Geschwindigkeit sich kaum von der der unbehandelten Zellen (rot und orange) unterschied. Hier dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus drei durchgeführten Versuchen.

In unbehandelten Kontrollen und *knockdown* Zellen stieg die Umsatzgeschwindigkeit nur leicht an und verhielt sich in etwa gleich. Die Caspase-3-Aktivität war in unbehandelten Zellen nicht sehr hoch, unabhängig vom hUbc13-Gehalt der Zellen. Eine Stimulation von Kontrollen mit TNF α hatte ebenfalls kaum Auswirkungen auf die Aktivität der Caspase-3. Wurden herunterregulierte Zellen mit TNF α behandelt, verdoppelte sich die Aktivität von Caspase-3. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der PARP-Spaltung (Punkt 3.5.2.3.1) weisen diese Ergebnisse auf eine vermehrte Apoptose nach *huc13*-*knockdown* hin.

3.6 Behandlung von HeLa-Zellen mit γ -Strahlung

Nachdem in HeLa-Zellen nach $\text{TNF}\alpha$ -Behandlung klare Unterschiede zwischen *hucb13 knockdown* und den entsprechenden Kontrollen in ihrem apoptotischen Verhalten festgestellt werden konnten, wurde nun die Induktion der Apoptose nach γ -Bestrahlung untersucht.

3.6.1 Nachweis der Apoptose nach γ -Bestrahlung durch PARP-Spaltung

Zur Untersuchung der Apoptose wurde der Nachweis der PARP-Spaltung herangezogen. Nach *knockdown* von *hUBC13* wurden HeLa-Zellen mit verschiedenen Dosen ^{137}Cs - γ -Strahlung behandelt und 48 h nach Behandlung wurde aus den hergestellten Zelllysaten durch Immundetektion gespaltenes PARP nachgewiesen (s. auch Punkt 3.5.2.3.1).

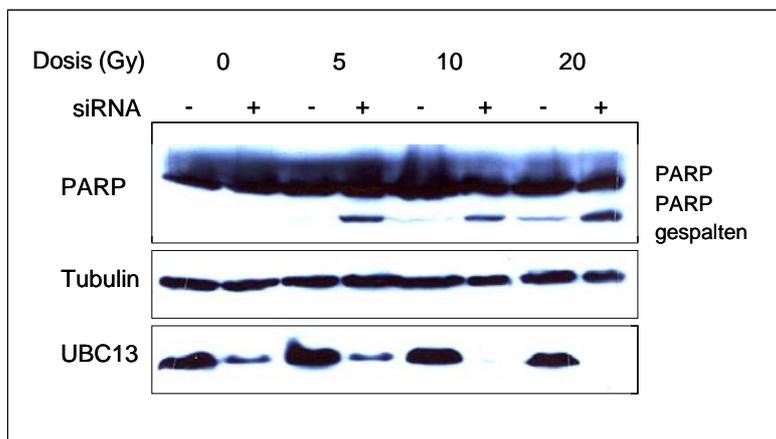


Abbildung 33: Immundetektion der PARP-Spaltung nach γ -Bestrahlung von *hucb13-knockdown*-Zellen; Durch Immundetektion wurde die Spaltung von PARP nach *hucb13-knockdown* und γ -Bestrahlung nachgewiesen. Die Detektion von Tubulin diene als Beladungskontrolle, durch die Detektion von UBC13 wurde der *knockdown* überprüft. In den Kontrollen (-) konnte kaum PARP-Spaltung nachgewiesen werden, erst bei hohen Dosen von 10 und 20 Gy (Spur 5 und 7) konnten leichte Banden detektiert werden. Bestrahlte *hucb13*-herunterregulierte Zellen (+) zeigten schon bei 5 Gy deutlich gespaltenes PARP (Spur 4) und eine erhöhte PARP-Spaltung im Vergleich mit den Kontrollen bei jeder Dosis. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus zwei durchgeführten Versuchen.

Abbildung 33 zeigt eine erhöhte PARP-Spaltung in *hucb13-knockdown*-Zellen (+) nach γ -Bestrahlung gegenüber den Kontrollen (-). Schon bei 5 Gy war gespaltenes PARP in Form einer deutlichen Bande nachweisbar. Die Kontrollen wiesen wesentlich geringere Mengen Spaltprodukte auf, erst bei relativ hohen Dosen waren leichte Banden an gespaltenem PARP zu detektieren.

Dies ist ein Hinweis auf erhöhte Apoptose in *hucb13-knockdown*-Zellen nach γ -Bestrahlung.

3.6.2 Zellüberleben nach γ -Bestrahlung

Da eindeutige Unterschiede in der Apoptoseinduktion nach γ -Bestrahlung nachzuweisen waren, wurde auch das Zellüberleben nach γ -Bestrahlung untersucht.

In HeLa-Zellen wurde durch siUBC13-1 die *hUBC13*-Genexpression reduziert. Anschließend wurden die Zellen mit verschiedenen Dosen ^{137}Cs - γ -Strahlung behandelt. Mittels Koloniebildungstest wurde die Überlebens- und Teilungsfähigkeit nach den unterschiedlichen Dosen untersucht (Abbildung 34).

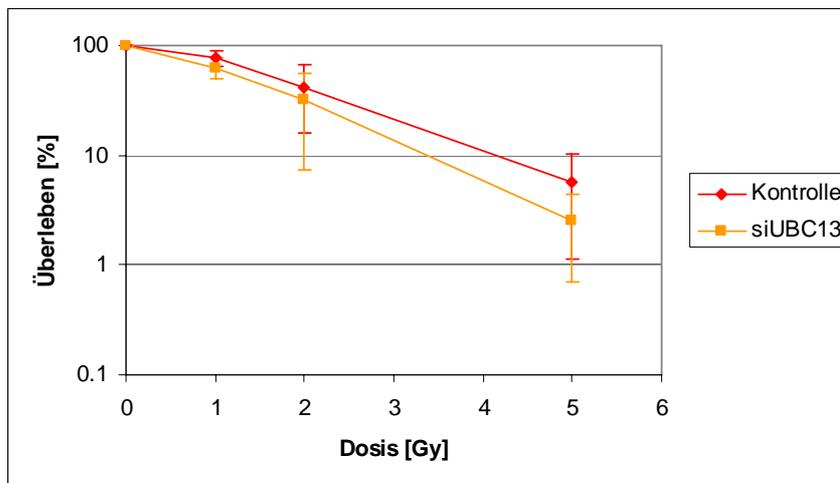


Abbildung 34: Zellüberleben nach *huc13*-knockdown und γ -Bestrahlung; Mittels Koloniebildungstest wurde die Überlebensfähigkeit von *huc13* herunterregulierten HeLa-Zellen und ihren Kontrollen nach verschiedenen Dosen γ -Bestrahlung untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier voneinander unabhängigen Experimenten (+/- Standardabweichung). Beide Zellpopulationen zeigten eine dosisabhängige Überlebenskurve, je höher die Dosis, desto weniger Zellen konnten überleben. *huc13*-knockdown-Zellen (orange) überlebten minimal schlechter als ihre Kontrollzellen (rot).

Das Überleben der Zellen war dosisabhängig und reduzierte sich mit steigender Dosis, bei 5 Gy überlebten weniger als 10 % der Zellen, eine noch höhere Dosis von 7,5 und 10 Gy überlebten nur noch ein Bruchteil von 0,1 % und weniger der Zellen (Daten nicht gezeigt). Wurden HeLa-Zellen mit der siRNA gegen *hUBC13* transfiziert und bestrahlt, zeigte sich eine minimal schlechtere, nicht signifikante Überlebensfähigkeit als in den Kontrollen.

3.7 Behandlung von Hela-Zellen mit UV-Strahlung

Rosette und Karin haben 1996 gefunden, dass UV-Strahlung die Aktivierung von NF κ B über die Aggregation und Aktivierung von TNFR1 induziert. Sheikh *et al.* (1998) konnten nachweisen, dass UV-induzierte Apoptose ebenfalls durch die Aktivierung von TNFR1 erfolgen kann. Da in dieser Arbeit bereits ein Bezug zwischen hUbc13 und NF κ B bzw. Apoptose nach TNF α -Behandlung und γ -Bestrahlung nachgewiesen werden konnte (3.5.2, 3.6.1), folgte nun die Untersuchung des möglichen Einflusses von UV-Strahlung.

3.7.1 Induktion des NF κ B-Weges durch UV-Strahlung

Die aktivierende Wirkung von UV-Strahlung auf NF κ B wurde bereits nachgewiesen (Rosette und Karin 1996, Graham und Gibson 2005). In diesem Experiment wurde bestimmt, ob hUbc13 eine Rolle in der UV-induzierten NF κ B-Aktivierung spielt, die durch die Expression der NF κ B-Zielgene IL-6 und IL-8 nachgewiesen wird (3.5.2.2).

Dazu wurden *huc13*-herunterregulierte Zellen bestrahlt und 48 h nach Bestrahlung wurde die IL-6 und IL-8 mRNA-Menge bestimmt. In Abbildung 35 ist das Ergebnis dargestellt.

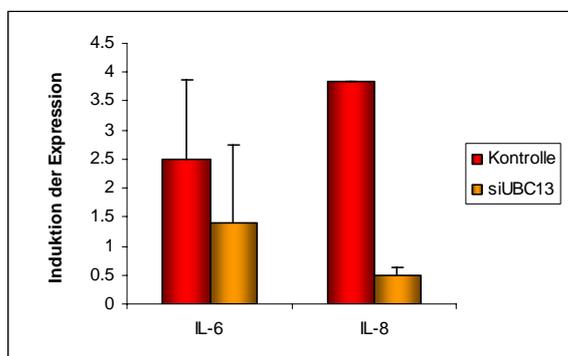


Abbildung 35: Expression von IL-6 und IL-8 nach UV-C-Bestrahlung; Dargestellt sind die Mittelwerte zwei voneinander unabhängiger Versuche (+/- Standardabweichung), wobei für die Untersuchung von IL-8 in der Kontrolle nur ein Experiment vorlag. In den Kontrollen (rot) erhöhte sich die Expression von IL-6 und IL-8 nach UV-Bestrahlung, während sich in *huc13*-knockdown-Zellen (orange) keine Expressionserhöhung zeigte.

Auch nach UV-C-Strahlung erhöhte sich die Expression von IL-6 und IL-8, ähnlich wie nach TNF α -Stimulierung (Abbildung 30), in den Kontrollzellen, während nach *huc13*-knockdown keine Zunahme der Expression der Gene IL-6 und IL-8 stattfand.

Dies ist ein deutlicher Hinweis auf die Beteiligung von hUbc13 am NF κ B-Weg auch nach Stimulation durch UV-Strahlung.

3.7.2 Induktion von Apoptose nach UV-Bestrahlung

3.7.2.1 PARP-Spaltung als apoptotischer Nachweis

Zunächst wurde der Nachweis der UV-induzierten Apoptose durch die Detektion der PARP-Spaltung durchgeführt.

Die behandelten Zellen wurden mit verschiedenen Dosen an UV-C-Strahlung (5, 10 und 20 J/m²) behandelt und 48 h nach Bestrahlung geerntet. Lysate wurden erzeugt und über Western Blot mit anschließender Immundetektion wurden verschiedene Proteine nachgewiesen.

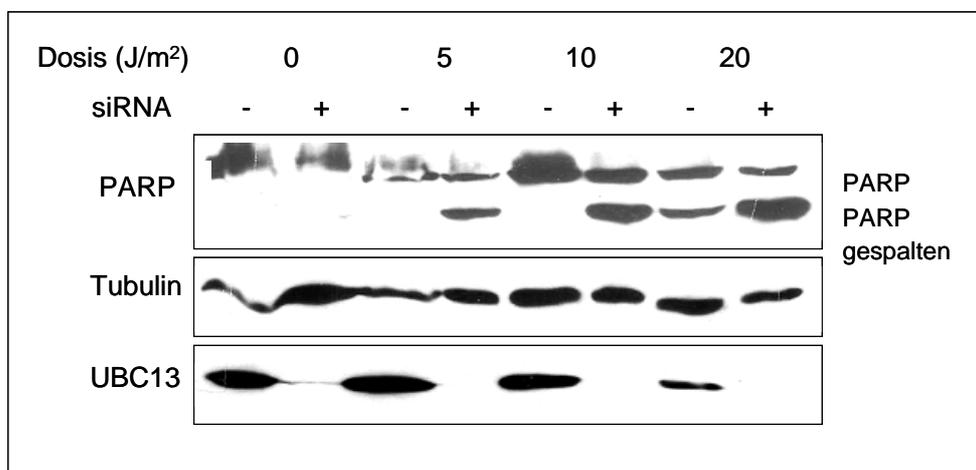


Abbildung 36: Immundetektion der PARP-Spaltung nach UV-C-Bestrahlung; Nach *huc13* knockdown wurde in Zelllysaten mittels Immundetektion PARP-Spaltung nachgewiesen. Die Detektion von Tubulin diente als Beladungskontrolle des SDS-Gels und mit der Detektion von UBC13 wurde der knockdown überprüft. Die behandelten *huc13*-herunterregulierten Zellen (+) zeigten ein dosisabhängiges Auftreten der PARP-Spaltprodukte, je höher die Dosis, desto mehr gespaltenes PARP konnte nachgewiesen werden. In den Kontrollen (-) konnte erst bei 20 J/m² PARP-Spaltung detektiert werden. Hier dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus vier durchgeführten Versuchen.

Mit steigender Dosis konnten vermehrt PARP-Spaltprodukte detektiert werden, in den Kontrollen (-) allerdings erst bei 20 J/m², in den *huc13*-herunterregulierten Zellen (+) dagegen bereits bei 5 J/m² (Abbildung 36).

Diese Ergebnisse belegen eine erhöhte Apoptose in *huc13*-knockdown-Zellen nach UV-Bestrahlung.

3.7.2.2 Caspase-3-Aktivität zum Nachweis von Apoptose

Zur Bestätigung der Daten der PARP-Spaltung wird, wie nach TNF α -Behandlung, die Aktivität der Effektorcaspase-3 getestet.

Aus *hubc13*-herunterregulierten Zellen wurde 48 h nach Bestrahlung ein Lysat hergestellt. Die enthaltene Caspase-3 kann das im Test eingesetzte synthetische Substrat (Caspase-3-Substrat I, Ac-DEVD) umsetzen und der Umsatz fotometrisch bestimmt werden. Je mehr Substrat umgesetzt, d.h. je höher die gemessene Absorption ist, desto höher ist die Aktivität der Caspase-3 (s. Punkt 3.5.2.3.2).

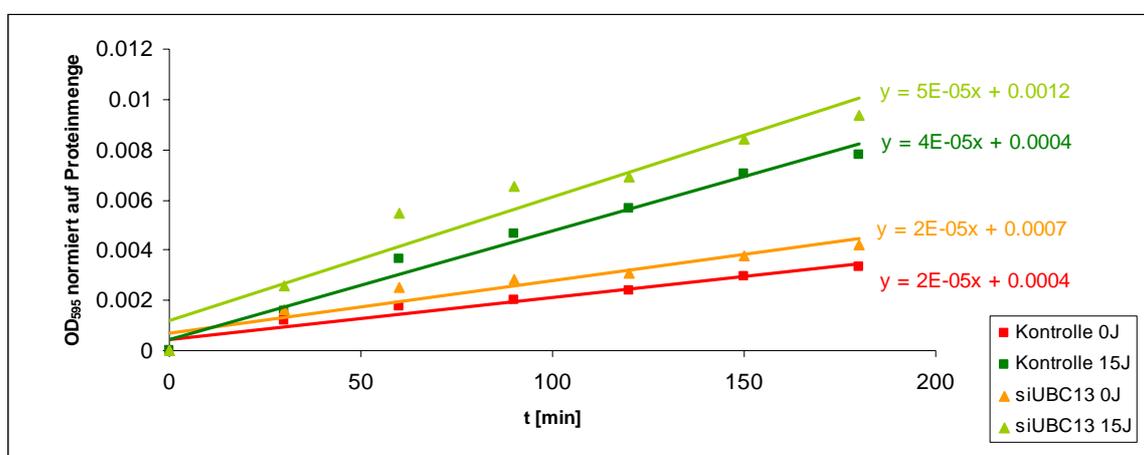


Abbildung 37: Caspase-3-Aktivität nach *hubc13*-knockdown und UV-C-Bestrahlung; Dargestellt ist die Absorptionsänderung (OD_{595}) bei gleicher Proteinmenge, über einen Zeitraum von 180 min. In den unbestrahlten Zellen (rot, orange), unabhängig vom hUbc13-Status der Zellen, zeigte sich kaum Caspase-3-Aktivität. Wurden die Zellen einer Bestrahlung von 15 J/m^2 ausgesetzt (grün), erhöhte sich die Caspase-3-Aktivität, in den *hubc13*-herunterregulierten Zellen (hellgrün) etwas mehr als in den Kontrollen (dunkelgrün). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus drei durchgeführten Versuchen.

Durch die Behandlung der Zellen mit UV-C-Licht stieg die Caspase-3-Aktivität an. Dieser Anstieg war in den *hubc13*-herunterregulierten Zellen etwas steiler als in den Kontrollen (Abbildung 37).

Dies deutet wiederum auf eine erhöhte Apoptose in *hubc13*-knockdown-Zellen hin und ist in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der PARP-Spaltung (Abbildung 36).

3.7.2.3 Nachweis der Apoptose durch den *TUNEL Assay*

Da eine Steigerung der Apoptose nach UV-Bestrahlung offensichtlich eine Abhängigkeit von hUbc13 zeigt und dies einen neuen Befund darstellt, wurde der Nachweis von Apoptose mit einem dritten Test durchgeführt.

Ein Charakteristikum von Apoptose ist die Fragmentierung der DNA als relativ später Indikator. An den Bruchenden entstehen freie 3'-OH-Gruppen, an die im *TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling assay)* durch eine terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) fluoreszenzmarkierte dUTPs angehängt werden können.

48 h nach Bestrahlung wurden die Kontrollen und *hubc13-knockdown*-Zellen fixiert und mit den Reagenzien des *TUNEL Assays* behandelt. Je mehr fragmentierte DNA vorhanden ist, desto höher ist die im Durchflusszytometer gemessene Fluoreszenzintensität.

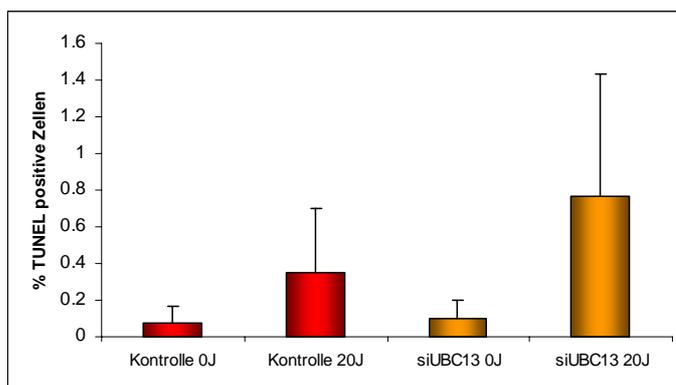


Abbildung 38: Nachweis der Apoptose nach *hubc13-knockdown* und UV-C-Bestrahlung durch den *TUNEL Assay*; In den unbestrahlten Kontrollen wurden kaum *TUNEL*-positive Zellen nachgewiesen. Wurden Zellen mit UV-C-Licht bestrahlt, erhöhte sich die DNA-Fragmentierung, in den siUBC13-behandelten Zellen mehr als in den bestrahlten Kontrollen. Dargestellt sind die Mittelwerte drei voneinander unabhängigen Versuchen (+/- Standardabweichung).

In unbestrahlten Zellen waren kaum *TUNEL*-positive Zellen zu finden, der Anteil der fluoreszierenden Zellen betrug etwa 0,1 %. Nach Bestrahlung konnte ein deutlich erhöhter Anteil an fluoreszierenden Zellen gezeigt werden, sowohl in den Kontrollen, als auch in den *hubc13-knockdown*-Zellen. In den *hubc13*-herunterregulierten Zellen ist der Anteil noch wesentlich höher als in den Kontrollzellen (Abbildung 38).

Da über die Fluoreszenzintensität ein Rückschluss auf die DNA-Fragmentierung und somit auf einen Apoptosemarker gezogen werden kann, geben die Ergebnisse einen eindeutigen Hinweis auf eine erhöhte UV-induzierte Apoptose in den *hubc13-knockdown*-Zellen. Dies stimmt auch mit vorig erzielten Ergebnissen überein (Abbildung 36, Abbildung 37).

3.7.3 Zellüberleben nach UV-Bestrahlung

Nach *knockdown* von *hUBC13* wurden HeLa-Zellen mit verschiedenen Dosen UV-C-Strahlung behandelt und im Koloniebildungstest auf Überlebens- und Teilungsfähigkeit untersucht.

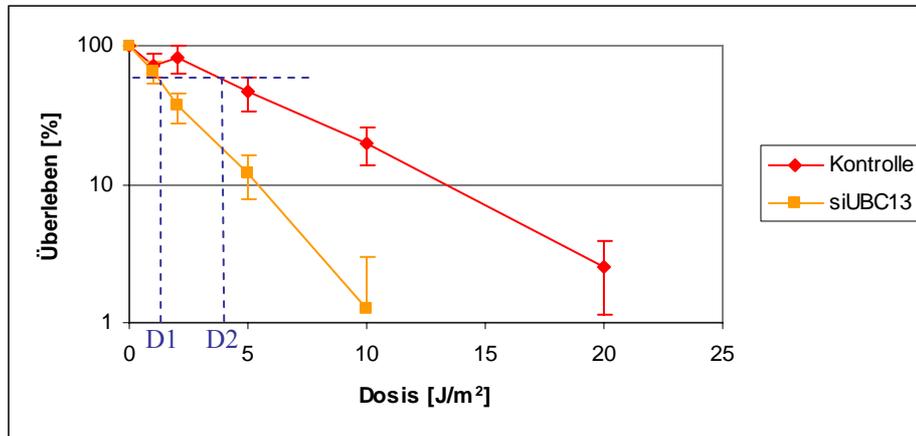


Abbildung 39: siRNA regulierte HeLa-Zellen im Koloniebildungstest nach UV-Bestrahlung; HeLa-Zellen wurden mit verschiedenen Dosen UV-C-Licht bestrahlt und mittels Koloniebildungstest untersucht. *hubc13*-herunterregulierte Zellen (orange) sind wesentlich empfindlicher auf UV-Strahlung als ihre Kontrollen (rot). Dargestellt sind die Mittelwerte von vier voneinander unabhängigen Versuchen (+/- Standardabweichung).

Mit dem Koloniebildungstest ist das Überleben von HeLa-Zellen in Abhängigkeit von der Dosis gut zu analysieren (Abbildung 39). Nach *hubc13-knockdown* war das Überleben dosisabhängig wesentlich geringer als in Kontrollzellen. Schon bei einer Dosis von 10 J/m² besaß nur noch ein Bruchteil der Zellen die Fähigkeit Kolonien zu bilden, wobei die Kontrollzellen eine 10-fach höhere Überlebensfähigkeit zeigten (20 % zu 2 %). Eine Dosis von 20 J/m² überlebten etwa 2,5 % der Kontrollzellen, während bei den *hubc13-knockdown*-Zellen kaum Zellen überlebten (weniger als 0,001 %; Daten nicht gezeigt).

Quantitativ kann die reduzierte Überlebensfähigkeit mit dem Dosisreduktionsfaktor (DRF) ausgedrückt werden. Dieser gibt an, um welchen Faktor die *hubc13-knockdown*-Zellen empfindlicher gegenüber UV-Strahlung im Vergleich zu den Kontrollzellen sind. Die Berechnung erfolgt über die Dosis, die notwendig ist, dass in der Kontrolle noch 50 % (DRF₅₀) der Zellen überleben (D2) geteilt durch die Dosis, die nötig ist, dass in den siRNA regulierten Zellen noch 50 % überleben (D1) (Abbildung 39). Für den DRF₁₀ werden die entsprechenden Dosen verwendet, bei denen noch 10 % der Zellen überleben.

$$\text{DRF} = \text{D2/D1}$$

Der Dosisreduktionsfaktor beträgt hier zwischen 2,5 (DRF₁₀) und 3,2 (DRF₅₀), d.h. *hubc13-knockdown*-Zellen sind um den Faktor 2,5 - 3,2 empfindlicher auf UV-Strahlung als ihre Kontrollen, die eine genügende Menge funktionsfähiges hUbc13-Protein besitzen.

3.8 Einfluss von hUbc13 auf den TNFR1

3.8.1 Beteiligung von hUbc13 am Todesrezeptorweg

Mit drei verschiedenen Methoden wurde eine Erhöhung der Apoptose in *hubc13-knockdown*-Zellen nach UV-Bestrahlung nachgewiesen. Außerdem wurde eine verringerte Aktivierung des NFκB-Weges nach UV-Bestrahlung festgestellt. Nun stellt sich die Frage, ob die erhöhte Apoptose nach *hubc13-knockdown* durch eine gestörte Aktivierung des NFκB-Weges und eine daraus resultierende geringere Expression von antiapoptotischen Genen oder durch die verstärkte Apoptoseinduktion durch die Aktivierung von Todesrezeptoren hervorgerufen wird. Deshalb wurde die Abhängigkeit der Apoptoseinduktion von Caspase-8 untersucht. Caspase-8 gehört zu den Schlüsselproteinen bei der Aktivierung der Apoptose über den Todesrezeptorweg. Sie wird nach Rezeptorstimulation aktiviert, wodurch z.B. Caspase-3 aktiviert wird, was wiederum u.a. zur Spaltung von PARP führt. Wird nun Caspase-8 über einen spezifischen Inhibitor gehemmt (Z-IE(OMe)TD(OMe)-FMK), kann die Apoptose nicht mehr eingeleitet werden.

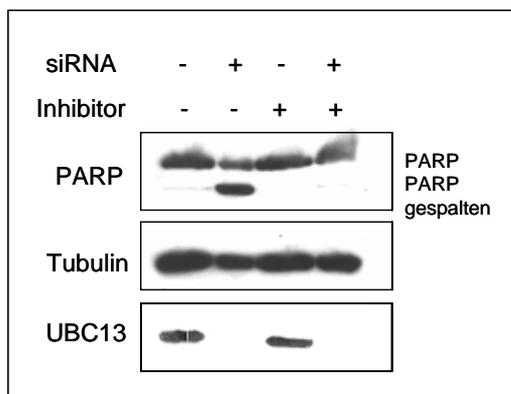


Abbildung 40: Immundetektion der PARP-Spaltung nach Inhibition von Caspase-8 und UV-C-Bestrahlung; Zellen wurden nach Hemmung von Caspase-8 mit UV-C-Licht (15 J/m^2) bestrahlt und die Spaltung von PARP detektiert. Die Detektion von Tubulin diente als Beladungskontrolle, mit UBC13 wurde der *knockdown* überprüft. Nach Bestrahlung mit 15 J/m^2 zeigten *hubc13 knockdown* Zellen erhöhte PARP-Spaltung (Spur 2), die sich nach Zusatz des spezifischen Inhibitors für Caspase-8 (Z-IE(OMe)TD(OMe)-FMK) aufheben lässt (Spur 4). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei Experimenten.

Hela-Zellen wurden nach *hubc13-knockdown* mit und ohne spezifischen Caspase-8-Inhibitor (Z-IE(OMe)TD(OMe)-FMK) mit UV-C-Strahlung (15 J/m^2) behandelt. Ohne Inhibitor erhöhte sich nach Bestrahlung die PARP-Spaltung in *hubc13-knockdown*-Zellen. Nach spezifischer Hemmung der Caspase-8-Aktivität verhielten sich die *hubc13-knockdown*-Zellen wie ihre Kontrollen, es war keine PARP-Spaltung zu detektieren (Abbildung 40). Dies gibt den Hinweis, dass hUbc13 eine Rolle bei der aktiven Induktion der Apoptose über Caspase-8 und den Todesrezeptorweg spielt.

3.8.2 Untersuchung von TNFR1 nach *hubc13-knockdown*

Mit den nächsten Experimenten sollte die Frage verfolgt werden, an welcher hUbc13 seine Funktion für die rezeptorvermittelte Apoptose ausübt. Bereits publiziert ist die Beteiligung von hUbc13 als E2-Enzym an der Ubiquitinierung von RIP1, wodurch die Signalkaskade zur Aktivierung des NF κ B-Weges gestartet wird (O'Donnell *et al.* 2007).

Zunächst wurde der Proteingehalt von TNFR1 nach *hubc13-knockdown* untersucht. Die herunterregulierten Zellen wurden mit 20 J/m² bestrahlt, nach 48 h lysiert, wodurch die Proteine in die lösliche Fraktion gebracht wurden und schließlich im Western Blot über Immundetektion analysiert. Ein Beispiel dafür ist in Abbildung 41 dargestellt.

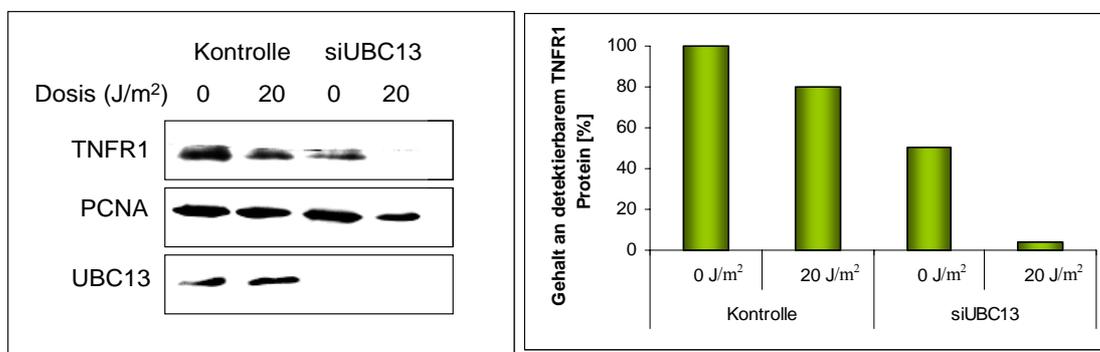


Abbildung 41: Nachweis von TNFR1 nach UV-C-Bestrahlung und *knockdown* von *hUBC13*; In Zellysaten wurde der Proteingehalt von TNFR1 vor und nach Bestrahlung mit 20 J/m² untersucht. Zusätzlich wurde PCNA als Beladungskontrolle und UBC13 zur Überprüfung des *knockdowns* detektiert. Der Gehalt des TNFR1-Proteins erniedrigte sich nach UV-C-Bestrahlung, in den *hubc13-knockdown*-Zellen ließ sich kein Protein mehr nachweisen (Spur 4). Der detektierbare Gehalt an TNFR1 war bereits in unbehandelten *hubc13-knockdown*-Zellen verringert (Spur 3). Im rechten Bild ist die quantitative densitometrische Auswertung dazu graphisch dargestellt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von fünf Experimenten.

Der *knockdown* von *hUBC13* hatte bereits in unbehandelten Zellen einen Einfluss auf den detektierbaren Proteingehalt von TNFR1. Hier war nur noch etwa die Hälfte an Protein in der löslichen Fraktion nachweisbar im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen, deren TNFR1-Gehalt 100 % gesetzt wurde. Durch Bestrahlung mit UV-C-Licht reduzierte sich die Menge an nachweisbarem TNFR1-Protein, und zwar etwas in den Kontrollzellen, in den herunterregulierten Zellen sehr deutlich (Abbildung 41). In keinem der Versuche mit unterschiedlichen Pufferbedingungen, um das Protein in die lösliche Fraktion zu bringen, wie z.B. mit RIPA-Puffer oder nur durch Aufkochen mit konzentriertem Lämmli-Puffer, konnte nach *knockdown* und Bestrahlung TNFR1-Protein in die lösliche Fraktion gebracht und somit nachgewiesen werden.

Hier wurde gezeigt, dass hUbc13 einen Einfluss auf die Löslichkeit von TNFR1 aus der Zellmembran ausübt.

3.8.3 TNFR1-Clustering in Abhängigkeit von hUbc13

Werden Rezeptoren über ihre extrazelluläre Domäne stimuliert, kommt es zur Oligomerisierung und Aggregation der Rezeptoren. Diese Aggregation in der Membran wird auch als *Clustering* bezeichnet. Der Prozess benötigt die Anhäufung von Lipiden, wie Sphingolipide oder Cholesterol und die daraus resultierende Ansammlung von Ceramiden in der Membran (*lipid rafts*) als Plattform (Grassmé *et al.* 2001, 2002, Gulbins und Grassmé 2002). In diesen Ceramid-haltigen Plattformen entsteht eine hohe Dichte von Rezeptormolekülen, wodurch nicht nur das *Clustering* vermittelt wird, sondern auch die Bindung und Aktivierung von Signalmolekülen erleichtert wird. Dadurch kann die rezeptorvermittelte Signaltransduktion spezifisch aktiviert werden (Gulbins und Grassmé 2002).

Die Aggregation von TNFR1 wurde nach UV-C-Bestrahlung in *hubc13-knockdown*-Zellen und ihren Kontrollen durch Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen (2.2.5.3). Angelehnt an publizierte Ergebnisse (Sheikh *et al.* 1998) war eine höhere Dosis (40 J/m^2) als in den vorangegangenen Experimenten zur effizienten Visualisierung nötig.

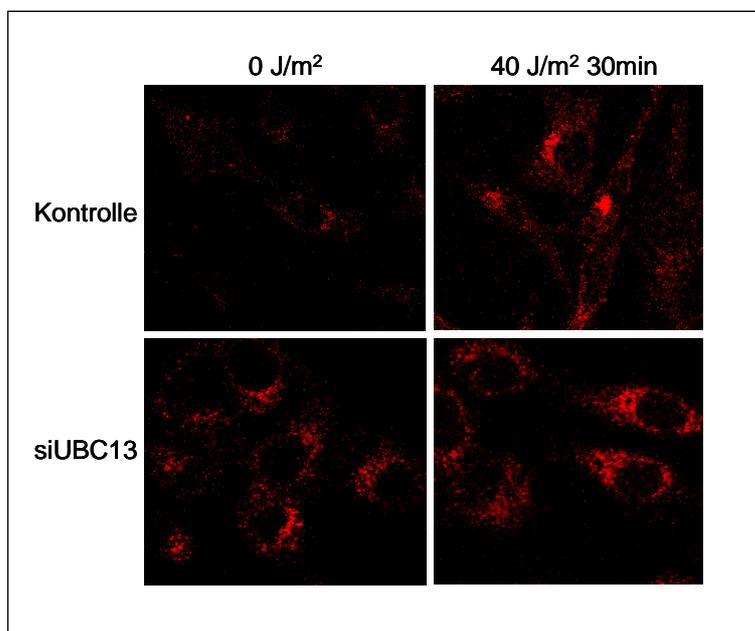


Abbildung 42: TNFR1-Cluster-Bildung nach UV-C-Bestrahlung; Die Aggregation von TNFR1 nach einer Bestrahlung von 40 J/m^2 wurde mittels Immunfluoreszenz (Ziege-anti-Kaninchen, Cy3 konjugierter Antikörper) nachgewiesen. Kontrollzellen zeigten nach Bestrahlung aggregierte TNF-Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Im Gegensatz dazu wiesen die *hubc13-knockdown*-Zellen bereits unbestrahlt *Clustering* auf, das nach Bestrahlung noch verstärkt war, möglicherweise auch stärker als in den bestrahlten Kontrollen. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für vier voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

Die Kontrollzellen zeigten unbestrahlt keine Aggregation des TNF-Rezeptors, erst nach Bestrahlung bildeten sich *Cluster* an der Zellmembran. *hubc13-knockdown*-Zellen dagegen wiesen schon ohne Bestrahlung deutliche *Cluster*-Bildung auf, die sich nach Bestrahlung noch verstärkte, möglicherweise auch mehr als in den bestrahlten Kontrollen (Abbildung 42).

Vergleicht man dieses Ergebnis mit 3.8.2, ergeben sich auf den ersten Blick Widersprüche. Obwohl in der löslichen Proteinfraction der *hubc13-knockdown*-Zellen kein TNFR1-Protein nach Bestrahlung nachweisbar war, konnte es durch Immunfluoreszenz auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Eine offensichtliche Erklärung dafür wäre eine stärkere Verankerung von TNFR1 nach dessen Aktivierung in *hubc13*-herunterregulierten Zellen in der Membran, so dass es durch die Lysebedingungen nicht in die lösliche Fraktion gebracht werden kann.

Beide Experimente, die Immundetektion des TNFR1-Proteins in der löslichen Fraktion (3.8.2) und die Analyse des Rezeptor-*Clustering* (3.8.3), zeigen deutlich einen Einfluss von hUbc13 auf die Verankerung von TNFR1. Möglicherweise ist hUbc13 an der Regulation des *Clustering* von TNFR1 oder an der anschließenden Internalisierung des Rezeptors beteiligt.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine hUbc13 und TRAF6, beide als potentielle Homologe zu den Hefeproteinen Ubc13 und Rad5 diskutiert, untersucht.

Ubc13 ist ein Protein, das in seiner Sequenz hochkonserviert von der Hefe bis zum Menschen vorliegt (Ashley *et al.* 2002, Adhikari *et al.* 2007). In der Hefe gehört es zur Rad6-Gruppe und ist dort an der postreplikativen Reparatur (PRR) beteiligt (Minesinger und Jinks-Robertson 2005). Durch seine ubiquitin-konjugierende Funktion (E2) wird PCNA polyubiquitiniert, wodurch der fehlerfreie Weg der PRR eingeleitet wird (Hoeye *et al.* 2002, Ulrich 2007). Das menschliche Protein hUbc13 zeigt eine hohe Sequenzidentität von über 90 % zum Hefeprotein (Ashley *et al.* 2002). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass Ubc13 aus der Maus die Defekte einer *ubc13*-Hefenullmutante vollständig komplementieren kann (Ashley *et al.* 2002). Aufgrund dieser Tatsachen stellte sich die Frage, ob hUbc13 in menschlichen Zellen ähnliche Funktionen ausübt wie das Hefehomolog.

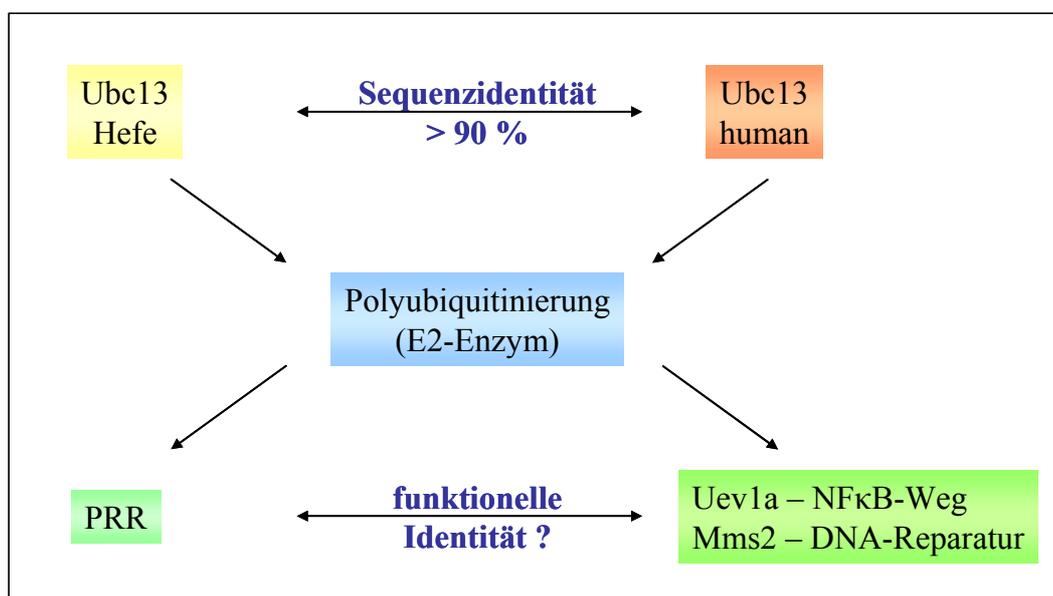


Abbildung 43: Vergleich von humanem Ubc13 mit dem Hefeprotein; Vergleicht man die Proteinsequenzen von Ubc13 aus Hefe und Mensch, ist eine Sequenzidentität von über 90 % festzustellen. Beide üben Funktion in der Polyubiquitinierung von Proteinen als E2-Enzym aus. Funktionelle Homologien in der DNA-Reparatur und die Rolle von hUbc13 im NFκB-Signalweg wurden untersucht.

Bekannt ist bisher eine ebenfalls vorhandene Funktion zur Polyubiquitinierung von Proteinen (Andersen *et al.* 2005). Dabei wird durch die Interaktion mit hMms2 Einfluss auf die DNA-Reparatur genommen (Andersen *et al.* 2005). Eine Beteiligung ist sowohl an der HR als auch an der PRR gezeigt (Zhao *et al.* 2007). Die Wechselwirkung mit Uev1a führt durch die Polyubiquitinierung von RIP1 oder TRAF6 zur Aktivierung des NFκB Weges (Andersen *et al.* 2005, O'Donnell *et al.* 2007). In dieser Arbeit wurden zum einen funktionelle Homologien zwischen hUbc13 und dem Hefehomolog bezüglich DNA-Reparatur untersucht. Zum anderen wurde die molekulare Rolle von hUbc13 im NFκB-Signalweg weiter analysiert (Abbildung 43).

TRAF6 ist ein Protein mit einer weniger ausgeprägten Sequenzähnlichkeit, aber mit einer ähnlich funktionellen Domäne (RING-Finger) zum Hefeprotein Rad5 (Deng *et al.* 2000, Wang *et al.* 2001). Beide, TRAF6 und Rad5, üben die Funktion einer Ubiquitinligase (E3-Enzym) aus und vermitteln zusammen mit Ubc13 die Polyubiquitinierung von Proteinen. Im Fall von Rad5 wird die Ubiquitinierung von PCNA zur Aktivierung des fehlerfreien Weges der PRR vermittelt (Hoege *et al.* 2002, Ulrich 2007), TRAF6 dagegen leitet durch seine Autoubiquitinierung den NFκB-Weg ein (Deng *et al.* 2000, Wooff *et al.* 2004, Yang *et al.* 2004). Aufgrund dieser funktionellen Ähnlichkeit als E3 bei der Polyubiquitinierung soll, in Parallelität zum potentiellen Hefehomolog Rad5, TRAF6 auf Funktionen in der menschlichen DNA-Reparatur überprüft werden (Abbildung 44).

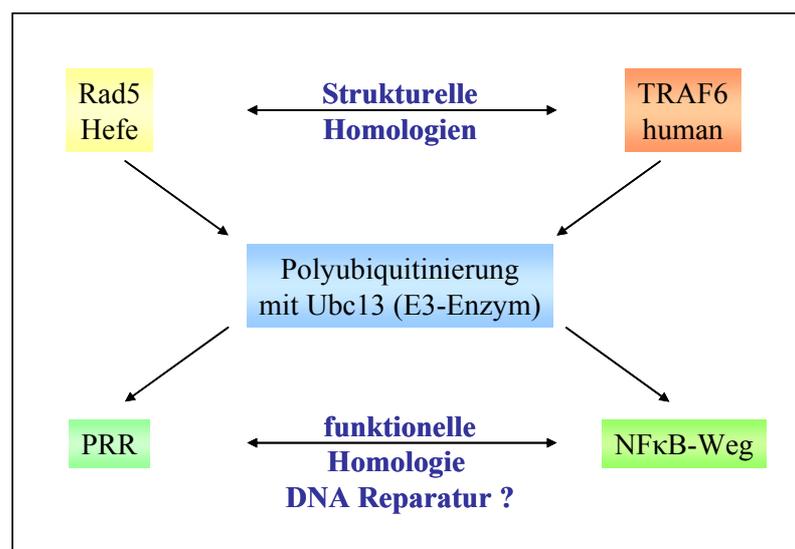


Abbildung 44: Homologien des Hefeproteins Rad5 und des humanen TRAF6-Proteins; Die Proteine Rad5 aus der Hefe und TRAF6 aus dem Menschen zeigen strukturelle und funktionelle Homologien (E3-Enzyme). Durch die Polyubiquitinierung, zusammen mit Ubc13, werden in der Hefe die PRR und im Menschen der NFκB-Weg gesteuert. Funktionelle Homologien im Bereich der DNA-Reparatur sollten analysiert werden.

4.1 Abschaltung der Genexpression mittels siRNAs

Zur funktionellen Untersuchung von Genen kann deren Expression mit verschiedenen Methoden abgeschaltet werden. Durch einen *knockout* kommt es zur vollständigen Abschaltung der Genexpression. Bei konditionalen *knockouts* wird die Expression nur unter bestimmten Bedingungen verhindert. Beide Methoden sind relativ langwierig und aufwändig, da komplexe Klonierungen erforderlich sind. Eine schnellere Methode ist die RNA-Interferenz (RNAi). Dabei werden entweder lange dsRNAs in die Zelle eingeführt, die von dem intrazellulären Enzym Dicer in 21-23 nt lange siRNAs gespalten werden, oder diese kurzen siRNAs werden direkt in die Zellen gebracht. siRNAs verursachen über die Bindung an verschiedene Proteine (RISC) den Abbau der komplementären mRNA, wodurch deren Translation weitgehend gehemmt werden kann. Diese Methode ist besonders geeignet für Gene, deren *knockout* lethal ist, da keine vollständige Abschaltung der Expression erreicht wird (Tuschl *et al.* 1999, Hannon 2002, Szweykowska-Kulinska *et al.* 2003). Ein weiterer Vorteil der RNAi ist die Verwendung isogener Ausgangszellen, in denen der *knockdown* mit einer kontrolltransfizierten Zellpopulation verglichen wird. Somit hat man den großen Vorteil, dass im gleichen genetischen Hintergrund gearbeitet wird.

4.1.1 Auswahl der Sequenzen zum spezifischen und effizienten *knockdown* von *hUBC13* und *TRAF6*

Bei der Auswahl der Sequenzen wurden die gleichen Grundregeln beachtet (Tuschl *et al.* 1999), dennoch war die Effizienz der siRNAs sehr unterschiedlich. So konnten trotz Beachtung der Auswahlkriterien, wie der Vermeidung der Lage im Bereich von UTRs und die Wahl eines AT-reichen 3'-Endes (3.1.1), deutliche Effektivitätsunterschiede in der Qualität des *knockdowns* festgestellt werden. Es werden nicht nur die verschiedenen Gene unterschiedlich gut reguliert, auch zwischen den beiden ausgewählten Sequenzen für *hUBC13* gab es beispielsweise große Unterschiede (3.1.2.1). Dies kann darin begründet sein, dass sich z.B. der GC-Gehalt unterscheidet oder dass die siRNAs am Übergang zwischen zwei Exons liegen. Auch SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), die in der cDNA-Sequenz des Zielgens enthalten sind, können Auswirkungen haben, da die siRNA-Sequenzen sehr kurz sind und somit ein einzelner Nukleotidaustausch schon die Spezifität der Bindung beeinflusst (Yuan *et al.* 2004).

Die Effektivität der siRNA zeigt auch eine Abhängigkeit vom Zelltyp. Sowohl in hTERT-RPE-Zellen, als auch in Hela-Zellen konnte, wenn auch mit unterschiedlichen Bedingungen, ein effizienter *knockdown* erreicht werden. Obwohl die Transfektionseffizienz beider Zelllinien, getestet durch die Transfektion mit einer nicht regulierenden siRNA, die fluoreszenz markiert ist, bei nahezu 100 % lag (Angermeier 2004; für Hela Daten nicht gezeigt), konnte in Hela-Zellen meist eine längere und oft auch eine noch effizientere Herunterregulierung stattfinden (3.1.2.3). Möglicherweise liegt das am RNA-Metabolismus der Zellen, der in Tumorzellen evtl. höher liegt als in hTERT-immortalisierten Zellen.

Nach dem Austesten der siRNA-Sequenzen wurde jeweils die effektivere gewählt, um funktionelle Experimente durchzuführen. Zu jedem Experiment wurden auch Zellen mit einer *scrambled* siRNA transfiziert, die keine Homologie zu einer humanen Sequenz aufweist, um *off target*-Effekte auszuschließen. Damit soll ausgeschlossen werden, dass die auftretenden Effekte nach *knockdown* allein durch die Transfektion und / oder das Einbringen der fremden, chemisch synthetisierten RNA-Oligonukleotide hervorgerufen wird. Manche Experimente wurden zusätzlich mit einer zweiten, etwas weniger effizienten siRNA durchgeführt. Da diese zweite Sequenz eine niedrigere Effizienz in der Herunterregulierung aufwies, konnte außerdem gezeigt werden, dass die funktionellen Prozesse auch schon bei einer geringeren Reduktion der Genexpression gestört werden können und somit ein aufwändiger *knockout*, wenn er überhaupt möglich ist, nicht vonnöten ist.

Mittels chemisch synthetisierter siRNA konnte die Genexpression meist sehr gut und teilweise auch relativ lange, d.h. über mehrere Tage, unterdrückt werden. Trotzdem wurde für jedes Experiment eine neue Transfektion durchgeführt und erst nach 4 d wurden funktionelle Untersuchungen begonnen.

Für zukünftige Versuche wäre es besonders effektiv, ein ständig verfügbares System zu etablieren, das stabil in der Zelle erhalten bleibt, indem es z.B. einen episomalen Ursprung nutzt oder in das Genom integrieren kann. Dazu stehen bereits käufliche Systeme und auch in unserer Gruppe erstellte Vektoren zur Verfügung, durch die so genannte shRNAs exprimiert werden, die dann intrazellulär durch Dicer zu 21 - 23 nt langen siRNAs prozessiert werden. Optimal wäre es, die Expression dieser shRNAs über einen induzierbaren Promotor zu steuern, so z.B. über Tet-abhängige Promotoren. Dabei könnten zuerst die positiven Klone selektioniert werden und der beste, abhängig beispielsweise von

Art und Lage der Integration ins Genom, zum Anschalten des *knockdowns* benutzt werden (Lin *et al.* 2004, Wang *et al.* 2007). Trotz längerer aufwändiger Vorarbeiten könnte hier ein optimales experimentelles System zur Reduktion der Genexpression entstehen.

4.1.2 *Knockdown von hRAD18*

Wie aus der Literatur bereits bekannt, ist hRad18 ein funktionelles Homolog zum Hefeprotein Rad18 (Tateishi *et al.* 2000, 2003). Aufgrund dessen sollte mittels *hrad18-knockdown* eine Kontrolle generiert werden, mit der die neu etablierten funktionellen Tests für die Analyse der postreplikativen Reparatur überprüft werden sollten.

In dieser Arbeit konnte in Hela-Zellen die Genexpression von *TRAF6* und von *hUBC13* erfolgreich über einen längeren Zeitraum reduziert werden. Im Labor konnten bisher einige weitere Gene bereits erfolgreich herunterreguliert werden, so z.B. *NBS1*, *MRE11*, *RAD50*, *XRCC1*, *SULT1A1* oder *ATM*. Außerdem konnte eine Transfektionseffizienz der Zellen von nahezu 100 % erreicht werden. Deshalb war zu erwarten, dass auch eine erfolgreiche Reduktion der Expression von *hRAD18* mit diesem methodischen Ansatz möglich ist. Es wurden mehrere verschiedene *hRAD18* siRNA-Sequenzen der Firma Qiagen getestet. Allerdings konnte weder mit drei der angebotenen, aber nicht getesteten Sequenzen, noch mit einer sog. *validated siRNA*, die bereits erfolgreich getestet wurde, eine ausreichende Reduktion der Genexpression erreicht werden. Eine Erniedrigung des mRNA-Gehaltes nach Transfektion mit der *validated siRNA* konnte hier auf 20 % über mehrere Tage detektiert werden, dies hatte aber offensichtlich keinen Einfluss auf den Gehalt an Protein (3.1.2.4, Abbildung 22). Von der Firma wurde zwar eine Reduktion der Genexpression, ebenfalls in Hela-Zellen, nachgewiesen, aber eine Analyse des Proteingehaltes wurde nicht durchgeführt. In dieser Arbeit konnte auf Proteinebene immer genügend hRad18-Protein nachgewiesen werden, so dass diese Restmengen vermutlich die volle Funktion im Organismus erfüllen können.

Eine Erklärung für dieses Phänomen ist nicht ganz einfach, zumal uns ähnliche Fälle bisher nicht bekannt sind. Auch die Firma konnte keine Erklärung dafür finden. Masuyama *et al.* konnten feststellen, dass das Protein hRad18 eine relativ kurze Halbwertszeit von 4 - 5 h aufweist und weder zellzyklusspezifisch noch durch den Einfluss genotoxischer Substanzen reguliert ist (Masuyama *et al.* 2005). Daher ist auch eine erhöhte Proteinstabilität oder eine zusätzliche Regulation als Ursache der nicht ausreichenden Proteinreduktion unwahrscheinlich.

Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass ein zweites, bisher nicht bekanntes humanes Rad18-Homolog existiert, wie es beim Interaktionspartner Rad6 der Fall ist, bei dem zwei Homologe, hRad6A und hRad6B, im Menschen bekannt sind. Dagegen spricht allerdings, dass *hrad18^{-/-}-knockout*-Mäuse und daraus abgeleitete MEF etabliert sind und untersucht wurden. Hierbei konnten auch phänotypische Eigenschaften nachgewiesen werden, wie z.B. die Abhängigkeit der Monoubiquitinierung von PCNA von hRad18 und eine erhöhte genomische Instabilität von *hrad18^{-/-}* embryonischen Stammzellen (Tateishi *et al.* 2000, 2003, Watanabe *et al.* 2004).

Eine Kontrolle zur Verifizierung der vielen negativen Ergebnisse im DNA-Reparatur- und Mutationsverhalten nach *knockdown* von *hUBC13* und *TRAF6* wäre sehr wichtig gewesen. Da hRad18 offensichtlich nicht geeignet war, wurden Überlegungen angestellt, andere homologe Proteine der Rad6-Gruppe dafür auszuwählen. Für Rad6 oder Mms2 der Hefe gibt es aber jeweils zwei Homologe im Menschen, so dass sich eine Untersuchung über einen *knockdown* mittels RNAi relativ schwierig gestaltet, da beide Gene gleichzeitig und spezifisch abgeschaltet werden müssten.

4.2 Funktionelle Untersuchungen in hTERT-RPE-Zellen in Abhängigkeit von hUbc13 und TRAF6

Zur Analyse der Funktion verschiedener Gene sollte eine Zelllinie verwendet werden, die nur über Telomerase-Immortalisierung verändert worden ist (hTERT-RPE). Wir sahen gegenüber anderen Zelllinien, wie Tumorzellen oder viral immortalisierten humanen Linien, den Vorteil höherer genomischer Stabilität und eines diploiden Chromosomensatzes (Pirzio *et al.* 2004). Außerdem sind diese Zellen gut geeignet, Strahlungseffekte zu untersuchen, da sie trotz Immortalisierung ihre ursprünglichen Eigenschaften, wie z.B. ihre Strahlenempfindlichkeiten v.a. im niedrigen Dosisbereich beibehalten haben (Nakamura 2008).

4.2.1 Zellüberleben nach Induktion von DNA-Schäden

Nach Deletion der Gene *UBC13* bzw. *RAD5* im Organismus *S. cerevisiae* tritt in den Nullmutanten eine erhöhte Sensibilität gegenüber Strahlung und alkylierenden Substanzen auf (Friedberg 1988, Xiao *et al.* 2000, Broomfield *et al.* 2001, Lyakhovich und Shekhar 2004). Auch *ubc13*-defiziente DT40-Zellen zeigen erhöhte Empfindlichkeiten, v.a. gegenüber UV-Strahlung (Zhao *et al.* 2007). Es stellte sich die Frage, ob ähnliche Empfindlichkeiten resultieren, wenn die Expression der homologen humanen Gene herunterreguliert wird.

Im MTT-Test, über den die metabolische Aktivität der Zellen bestimmt wurde, zeigten sowohl die Kontrollzellen, die mit einer *scrambled* siRNA transfiziert wurden, als auch die *huc13*- und *traf6*-herunterregulierten Zellen kaum Strahlenempfindlichkeit, die metabolische Aktivität blieb nahezu bei 100 %. Selbst hohe Dosen von 10 oder 20 Gy bzw. 30 - 40 J/m² beeinflussten die Zellen kaum (3.2.1, Abbildung 23). Dies deutet darauf hin, dass die induzierten Schäden bis zu 48 h nach Bestrahlung keine Bedeutung für die metabolische Aktivität von hTERT-RPE-Zellen haben. Möglicherweise wurde die Zeitspanne zwischen Behandlung und Messung der metabolischen Aktivität zu kurz gewählt und eine Beeinträchtigung wäre erst später messbar.

Um Strahlungseffekte nach einem längeren Zeitraum zu detektieren, wurden Experimente zur Koloniebildung durchgeführt, durch die die Teilungs- und Überlebensfähigkeit untersucht werden konnte. Dabei zeigte sich eine klare Abhängigkeit zwischen Strahlendosis und Teilungsfähigkeit. Allerdings ergab sich auch hier kein Unterschied

zwischen den Kontrollen und den *hubc13*- und *traf6*-herunterregulierten Zellen (3.2.1, Abbildung 24).

Nach der Behandlung mit verschiedenen chemischen Agenzien konnten mit beiden Experimenten ebenfalls keine oder nur sehr geringe Unterschiede zwischen *knockdown*-Zellen und ihren transfizierten Kontrollen nachgewiesen werden (3.2.2, Abbildung 25).

Somit führt die Herunterregulierung von *hUBC13* bzw. *TRAF6* in hTERT-RPE-Zellen zu keinen erhöhten Empfindlichkeiten gegenüber DNA-schädigenden Agenzien bei den verwendeten Dosen bzw. Konzentrationen. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen aus der Hefe oder auch in DT40-Mutanten, aber auch zu den Ergebnissen, die in Hela-Zellen erzielt wurden (3.7.3). Möglicherweise sind hTERT-RPE-Zellen besonders resistent.

4.2.2 Reparatur- und Mutationsverhalten

Hefemutanten der *RAD6*-Epistasisgruppe zeigen Defekte in der DNA-Reparatur, sowohl in der homologen Rekombination als auch bei der postreplikativen Reparatur (Gangavarapu *et al.* 2006, 2007). Defekte der Reparaturmechanismen gehen oft einher mit einer erhöhten Mutationsrate. Dies ist besonders auffällig in *ubc13*-Mutanten der Hefe (Brusky *et al.* 2000, Broomfield *et al.* 2001, Cejka *et al.* 2001). In *ubc13*-DT40-*knockout*-Zellen kann nach UV-Behandlung keine DNA-Synthese mehr stattfinden, weshalb hier ebenfalls eine Beteiligung von Ubc13 am postreplikativen Reparaturweg postuliert wird (Zhao *et al.* 2007). Des Weiteren konnten nach γ -Bestrahlung mehr γ H2AX-Foci und weniger BRCA1- oder Rad51-Foci, wichtige Faktoren der HR, an DNA-Schäden nachgewiesen werden (Kolas *et al.* 2007, Wang und Elledge 2007, Zhao *et al.* 2007). Über ein Vektorsystem wurde wesentlich weniger HR in *ubc13*^{-/-}-DT40-Zellen detektiert (Zhao *et al.* 2007). Einige dieser Versuche wurden auch in siRNA-regulierten Hela-Zellen untersucht, wobei die gleichen Ergebnisse erzielt wurden (Kolas *et al.* 2007, Wang und Elledge 2007, Zhao *et al.* 2007).

Aufgrund dieser Kenntnisse wurden auch hTERT-RPE-Zellen nach *knockdown* auf Reparaturreffizienz, Rekombinations- und Mutationsverhalten untersucht.

Effekte in der DNA-Reparatur wurden sowohl im alkalischen *Comet assay*, bei dem in erster Linie die Reparatur von SSB untersucht wird, als auch durch die Detektion von γ H2AX-Foci zur Analyse der DSB-Reparatur, untersucht. Weder nach UV-C-, noch nach γ -Bestrahlung konnten Unterschiede zwischen *hubc13*- und *traf6*-herunterregulierten Zellen

und ihren Kontrollen festgestellt werden (3.3). Auch die Untersuchung der spontanen Rekombination oder der Mutationsrate, spontan oder nach γ - bzw. UV-C-Bestrahlung, ergab keine Unterschiede zwischen *hubc13*- und *traf6-knockdown*-Zellen und ihren Kontrollen (3.3, Abbildung 27, 3.4, Tabelle 2). Allerdings waren in hTERT-RPE-Zellen auch keine Auffälligkeiten im Überleben nach Behandlung mit chemischen Agenzien oder Bestrahlung erzielt worden, weshalb diese Ergebnisse übereinstimmen. Hier konnte also keine Bestätigung der bisherigen Erkenntnisse in anderen Systemen erzielt werden.

4.2.3 Gründe für die geringen Unterschiede im phänotypischen Verhalten nach *knockdown* von *hUBC13* und *TRAF6*

Nach *knockdown* von *hUBC13* und *TRAF6* in hTERT-RPE-Zellen konnten keine Unterschiede in verschiedenen Testsystemen festgestellt werden. Daher stellte sich die Frage, ob überhaupt eine Funktion von hUbc13 oder TRAF6 in der DNA-Reparatur von hTERT-RPE-Zellen gegeben ist. Offenbar spielen beide Proteine eine untergeordnete Rolle oder haben überhaupt keine Funktion in der DNA-Reparatur und den assoziierten genetischen Prozessen in hTERT-RPE-Zellen.

Eine weitere Erklärung wäre, dass die ausgewählten Gene von humanen Zellen keine funktionellen Homologe der Hefegene darstellen. TRAF6 weist z.B. nur strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit bezüglich der Ubiquitinierung von Proteinen (E3) mit Rad5 auf, die Sequenzhomologie ist allerdings weniger ausgeprägt (Deng *et al.* 2000, Wang *et al.* 2001). Bisher konnte, im Gegensatz zu allen anderen Proteinen der *RAD6*-Epistasisgruppe, kein eindeutiges Homolog zu Rad5 aus dem Organismus *S. cerevisiae* identifiziert werden. Es konnte bisher kein Gen in Säugerzellen gefunden werden, das den Phänotyp einer Deletion im *RAD5* Gen der Hefe komplementieren kann (Simpson und Sale 2005, Chiu *et al.* 2006).

Auch SHPRH zeigt, wie TRAF6, strukturelle Homologien zu *RAD5*, und es wurde von zwei Gruppen als funktionelles Homolog diskutiert (Motegi *et al.* 2006, Unk *et al.* 2006). Es gehört ebenso wie *RAD5* zu den ATPasen der SWI / SNF-Familie und besitzt eine RING-Finger-Domäne. Wie bei TRAF6 ist allerdings die Sequenzhomologie zu Rad5 mit etwa 30 % auf Proteinebene wenig ausgeprägt. Es kann, wie Rad5, mit PCNA, Rad6- Rad18- und Mms2-Ubc13-Komplexen interagieren, und es ist für die Vermittlung der Polyubiquitinierung von PCNA zuständig, wobei es Ubiquitinligase-Aktivität (E3) aufweist. Außerdem zeigen Zellen mit reduzierter SHPRH-Expression eine erhöhte

Empfindlichkeit gegenüber MMS, welche einhergeht mit vermehrten chromosomalen Veränderungen, also einer erniedrigten genomischen Instabilität (Motegi *et al.* 2006, Unk *et al.* 2006). Bisher gibt es jedoch keine Daten, die eine Rolle von SHRPH für Strahlenempfindlichkeit oder zum Mutations- oder Rekombinationsverhalten belegen. Mit SHRPH-herunterregulierten Zellen wurden in dieser Arbeit keine Analysen durchgeführt, da dieses Protein zu Beginn der Arbeit nicht als Homolog von Rad5 zur Diskussion stand.

Eine weitere Erklärung wäre, dass andere Homologe oder Orthologe im Menschen die Funktion der ausgefallenen Proteine übernehmen können, so dass letztendlich keine Effekte zu detektieren sind. So könnten z.B. andere ubiquitin-konjugierende Proteine die Funktion von hUbc13 ausüben. Diese Erklärung ist jedoch eher unwahrscheinlich, da einige Effekte nach Reduktion von hUbc13 bereits publiziert wurden. So wurde z.B. unterschiedliche Focusbildung von Proteinen, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind, wie γ H2AX, Rad51 und BRCA1, nach Reduktion von hUbc13 nachgewiesen (Kolas *et al.* 2007, Wang und Elledge 2007, Zhao *et al.* 2007).

Möglicherweise sind die Funktionen von hUbc13 und TRAF6 auch zelltypabhängig, so wie dies auch bei der Polyubiquitinierung von PCNA in Säugerzellen der Fall ist. Bisher konnte die Polyubiquitinierung von PCNA nur in einigen Zelllinien nachgewiesen werden, wogegen in den meisten Linien nur Monoubiquitinierung detektierbar ist (Kannouche und Lehmann 2004, Chiu *et al.* 2006). Womöglich hat die Telomerase-Immortalisierung mehr Einfluss auf die genomische Stabilität als man vermutet, so dass dieser Zelltyp weniger geeignet wäre für funktionelle Experimente, als es bisher angenommen wird.

Das Überleben von hTERT-immortalisierten Zellen könnte auch durch die Hemmung der Apoptose beeinflusst werden. Die Expression von hTERT reduziert den Caspase-vermittelten Apoptoseweg, indem die Aktivierung von Caspasen (3, 8, 9) verringert und gleichzeitig die Expression von proapoptischen Genen vermindert bzw. die der antiapoptischen Gene erhöht wird (Bermudez *et al.* 2006).

4.3 Funktioneller Vergleich humane Gene mit Hefegenen

Ziel dieser Arbeit war es, auffällige phänotypische Eigenschaften, die in der Hefe nach Deletion der Gene *UBC13* und *RAD5* auftreten, mit den entsprechenden Eigenschaften nach *knockdown* der postulierten humanen Homologe *hUBC13* und *TRAF6* zu vergleichen. Zunächst wurden Auffälligkeiten aus der Hefe wie erhöhte Sensitivitäten gegenüber genotoxischen Agenzien, das Reparatur- und Rekombinationsverhalten und eine erhöhte Mutationsrate untersucht. Dabei konnten aber keine merklichen Unterschiede zwischen Kontrollen und *hubc13*- oder *traf6-knockdown*-Zellen festgestellt werden (3.2 - 3.4). Es konnten bezüglich der Funktion bei DNA-Reparatur und den assoziierten genetischen Prozessen wie Rekombination oder Mutationsverhalten keine übereinstimmenden Resultate mit der Hefe gefunden werden.

Die bekannten Funktionen von hUbc13 und TRAF6 im NFκB-Weg (Deng *et al.* 2000, Woof *et al.* 2004, Yang *et al.* 2004, Chen *et al.* 2006, Li *et al.* 2006, Fukushima *et al.* 2007, O'Donnell *et al.* 2007) und bei der Regulation von Apoptose wurden deshalb genauer analysiert. Dabei kann allerdings kein Vergleich mit der Hefe unternommen werden. Es gibt zwar Indizien dafür, dass Apoptose auch in dem Einzeller *S. cerevisiae* ablaufen kann (Eisenberg *et al.* 2007, Fröhlich *et al.* 2007, Vachova und Palkova 2007), aber eine Beteiligung von DNA-Reparaturproteinen konnte bisher nicht nachgewiesen werden (mündliche Mitteilung C. Ruckenstuhl, Graz). So ist auch eine Rolle von Ubc13 oder Rad5 für Apoptose in der Hefe, bisher nicht bekannt.

4.4 Überleben von *hubc13-knockdown*-Hela-Zellen nach Bestrahlung

Nach *knockdown* der untersuchten Gene in hTERT-RPE-Zellen haben sich keine Auffälligkeiten gezeigt, deshalb sollte über die Herunterregulierung der Genexpression in Hela-Zellen eventuell vorhandene Parallelen zur Hefe oder zu Ergebnissen aus DT40 oder anderen Säugerzellen gezogen werden. Damit sollte auch eine eventuelle Zelltypabhängigkeit geklärt werden.

Eine Behandlung mit chemischen Agenzien erzeugte keine Empfindlichkeiten in *hubc13*-herunterregulierten Hela-Zellen (Daten nicht gezeigt). Nach γ -Bestrahlung konnte eine leicht erhöhte Sensitivität von *hubc13-knockdown*-Zellen festgestellt werden, wohingegen der Unterschied nach UV-C-Bestrahlung erheblich größer war (3.6.2, Abbildung 34, 3.7.3, Abbildung 39). Dies stimmt auch mit den Daten der *ubc13*-Hefenullmutanten überein (Mörtl nicht veröffentlicht, Xiao *et al.* 2000), bei denen ebenfalls die Empfindlichkeit auf UV-Bestrahlung höher ist als die gegenüber γ -Bestrahlung. Hiermit konnte eine eindeutige Zelltypabhängigkeit gezeigt werden, da nach *hubc13-knockdown* in Hela-Zellen Strahlenempfindlichkeit nachgewiesen werden konnte, unter den gleichen Bedingungen in hTERT-RPE-Zellen aber nicht.

In Hela-Zellen wurden von Wang und Elledge (2007) Untersuchungen der DNA-Reparatur nach *hubc13-knockdown* durchgeführt. Dabei wurde eine Beteiligung von hUbc13 an der Focusbildung verschiedener Reparaturproteine, wie γ H2AX, BRCA1 und Rad51, an DNA-DSB nachgewiesen, aber es wurden keine zellbiologischen Analysen, wie Überlebensdaten, erstellt (Wang und Elledge 2007). Aufgrund dieser bereits publizierten Daten wurde die DNA-Reparatur als Ursache der Strahlenempfindlichkeit in Hela-Zellen zunächst nicht untersucht. Außerdem konnten auch kaum Differenzen im Mutationsverhalten nach *hubc13-knockdown* in Hela-Zellen nachgewiesen werden (3.4).

Da bereits bekannt war, dass hUbc13 eine antiapoptotische Rolle im NF κ B-Weg spielt (O'Donnell *et al.* 2007), wurde vorrangig die Funktion von hUbc13 in der apoptotischen Regulation näher analysiert. *hubc13-knockdown*-Hela-Zellen wiesen deutlich erniedrigte Überlebensraten nach UV-C-Bestrahlung auf, so dass zunächst nur Analysen nach UV-Behandlung durchgeführt wurden. Auch für TRAF6 sind Funktionen im NF κ B-Weg nachgewiesen (Wooff *et al.* 2004, Yang *et al.* 2004, Petroski *et al.* 2007). Da nach Herunterregulierung von *TRAF6* auch in Hela-Zellen keine Unterschiede im Zellüberleben nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt), wurden Untersuchungen zur molekularen Funktion im NF κ B-Weg nur in *hubc13-knockdown*-Zellen untersucht.

4.5 NFκB-Aktivierung in Abhängigkeit von hUbc13

4.5.1 Stimulation des NFκB-Weges durch TNFα

TNFα stimuliert den TNFR1-Rezeptor, womit die Polyubiquitinierung von RIP1 durch hUbc13/Uev1a vermittelt wird. Dadurch wird die Aktivierung von NFκB eingeleitet (Chen *et al.* 2006, Li *et al.* 2006). Über den NFκB-Weg werden sowohl pro- als auch antiapoptotische Prozesse gesteuert (Gupta 2002, Micheau und Tschopp 2003). So könnte eine Verschiebung des Gleichgewichts im NFκB-Weg in Richtung Apoptose das schlechtere Überleben nach UV-Bestrahlung in *huc13-knockdown*-Zellen erklären.

Die Degradierung von IκB als Folge der Rezeptorstimulation wurde nach Herunterregulierung von *hUBC13* untersucht (3.5.1). Nach Stimulation mit TNFα oder auch IL-1β konnte diese Degradierung nur in Hela-Zellen detektiert werden (3.5.1, Abbildung 28), so dass diese weiterhin als Modell dienen. Auch in anderen Gruppen wurde diese Linie bereits erfolgreich zur Untersuchung des NFκB-Weges eingesetzt (D. Krappmann, mündliche Mitteilung, Kulms *et al.* 2000, Magné *et al.* 2006, Syed *et al.* 2006). So fanden z.B. Kulms *et al.* eine stark erhöhte IL-6-Expression nach TNFα-Stimulation (Kulms *et al.* 2000).

Der Einfluss von hUbc13 nach TNFα-Stimulation auf die NFκB-Aktivierung wurde durch die Analyse der Translokation der aktiven Untereinheit p65 in den Kern und über die Expression von Genen, die durch die Transkriptionsfaktoraktivität von NFκB exprimiert werden, untersucht. Nach *huc13-knockdown* konnte kaum noch Translokation von p65 in den Kern detektiert werden, obwohl diese in den kontrolltransfizierten Zellen deutlich sichtbar war (3.5.2.1, Abbildung 29). Viele Faktoren, die über NFκB aktiviert werden, können nur in lymphoiden Zellen nachgewiesen werden, jedoch konnte die Expression von IL-6 und IL-8 auch in Hela-Zellen untersucht werden (Kulms *et al.* 2000). Hier konnte nach TNFα-Stimulation eine deutliche Expressionserhöhung in den Kontrollen nachgewiesen werden (Faktor 20 bzw. 60), nach *huc13-knockdown* fällt diese wesentlich niedriger aus (Faktor 7 bzw. 20) (3.5.2.2, Abbildung 30).

Diese Ergebnisse weisen auf eine eindeutige Rolle von hUbc13 bei der Aktivierung des NFκB-Weges nach TNFα-Stimulation in Hela-Zellen hin. In der Literatur gibt es dazu widersprüchliche Aussagen. So finden Yamamoto *et al.* eine normale TNF-induzierte NFκB-Aktivierung in konditionalen *ubc13-knockout*-Mäusen und ziehen daraus den Schluss, dass hUbc13 in diesem Weg eine untergeordnete Rolle spielt. Wichtigere

Funktionen zeigen sich in anderen Wegen, wie bei der TLR- (*toll like receptor*) oder der CD40-vermittelten Immunantwort. Die Autoren vermuten, dass in der Maus andere E2-Enzyme die Funktion von Ubc13 im NF κ B-Weg übernehmen. Allerdings wird auch eine Zelltypabhängigkeit nicht ausgeschlossen (Yamamoto *et al.* 2006). In anderen Zellsystemen wurden dazu gegensätzliche Ergebnisse gefunden. Andersen *et al.* 2005 und Syed *et al.* 2006 untersuchten z.B. die Funktion von Uev1a, dem Interaktionspartner von hUbc13 in der NF κ B-Aktivierung. Nicht nur nach TNF α -, sondern auch nach LPS- (Lipopolysaccharid) Stimulation wird Uev1a für die Aktivierung benötigt. So wird beispielsweise die Translokation von p65 in den Kern nach Inhibition der Uev1a Expression reduziert und die Expression von Bcl-2, einem Zielgen von NF κ B, wird in Uev1a-überexprimierenden Zellen erhöht. Uev1a ist der Interaktionspartner von hUbc13 im NF κ B-Weg. Daher stimmen diese Daten sehr gut mit den in dieser Arbeit gefundenen Effekten für hUbc13 überein.

Nach TNFR1-Stimulation durch TNF α wird der NF κ B-Weg aktiviert, wodurch das Überleben der Zellen stimuliert, aber ebenso der Apoptoseweg über Caspase-8 aktiviert werden kann (Michaels und Tschopp 2003, Sheikh und Huang 2003). Nun stellt sich die Frage, ob nach Herunterregulierung von *hUBC13* weniger Überleben durch die verminderte Expression antiapoptotischer Gene im NF κ B-Weg bewirkt und / oder vermehrt rezeptorvermittelte Aktivierung der Apoptose stattfindet.

Tatsächlich konnte in verschiedenen Experimenten nach TNF α -Behandlung und *hubc13-knockdown* eine erhöhte Apoptoserate gezeigt werden. Durch die aktivierte Caspase-8 wird die Effektorcaspase-3 aktiviert, welche spezifische Substrate in der Zelle spaltet. Eines davon ist PARP, dessen Spaltung neben der Bestimmung der Caspase-3-Aktivität als Parameter zur Bestimmung der Apoptose diente (Lazebnik *et al.* 1994, Aragane *et al.* 1998). Über beide experimentellen Ansätze konnte eine erhöhte Apoptose nach TNF α -Stimulierung in *hubc13*-herunterregulierten Zellen detektiert werden (3.5.2.3.1, Abbildung 31, 3.5.2.3.2, Abbildung 32). Auch hiermit konnte eine Beteiligung von hUbc13 am NF κ B-Weg nach TNF α -Stimulation nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse könnten sogar auf eine regulatorische Rolle des hUbc13-Proteins hinweisen, da sich das Gleichgewicht nach *hubc13-knockdown* in Richtung Apoptose verschiebt. Syed *et al.* haben ebenfalls eine erhöhte Apoptoserate nach Inhibition von Uev1a entdeckt, und zwar nach Camptothecin-Behandlung, einem Apoptose-induzierenden Agens (Syed *et al.* 2006).

4.5.2 Induktion der Apoptose durch UV-Bestrahlung

Durch die Bestrahlung mit UV-C- oder UV-B-Licht kommt es in der Zelle zu einer direkten Schädigung der DNA. UV-A-Bestrahlung kann durch die Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) eine indirekte Schädigung der DNA hervorrufen (Nakajima *et al.* 2004, Strozyk *et al.* 2006, Gangavarapu 2007). Eine nicht ausreichende Entfernung dieser DNA-Schäden kann zum replikativen Zelltod führen. Außerdem kann UV-Bestrahlung durch die Aktivierung von Todesrezeptoren ebenfalls zur Apoptose führen (Aragane *et al.* 1998, Schwarz 1998, Chow und Tron 2005, Strozyk *et al.* 2006). Da HeLa-Zellen nach Reduktion des hUbc13-Gehalts deutlich erniedrigte Überlebensraten nach UV-C-Bestrahlung aufwiesen (3.7.3, Abbildung 39), war die Untersuchung UV-C-induzierter Apoptose in Abhängigkeit des hUbc13-Status naheliegend.

Zunächst konnte eine Beteiligung von hUbc13 am NF κ B-Weg nach UV-C-Bestrahlung durch die Analyse der Expression der Interleukine IL-6 und IL-8 nachgewiesen werden (3.7.1, Abbildung 35). Wurden die Kontrollen bestrahlt, kam es zu einer Induktion der Expression dieser Gene. Dabei lag der Faktor der Steigerung bei einer Dosis von 20 J/m² im Bereich des 2 - 4 fachen. Dies bestätigt die Ergebnisse von Kulms *et al.* 2000, die allerdings wesentlich höhere Dosen von 400 J/m² verwendet haben und deshalb eine bedeutend größere Expressionsteigerung (Faktor 600) erzielten. Im Vergleich zur Stimulation mit TNF α liegt der Faktor von 2 - 4 wesentlich niedriger. Da die Stimulation über die Bestrahlung sehr viel unspezifischer auf TNFR1 wirkt als der zugehörige Ligand TNF α , ist dies aber nicht weiter verwunderlich. Wurden *hubc13-knockdown*-Zellen mit UV-C-Licht bestrahlt, konnte kaum eine Erhöhung der Expression von IL-6 bzw. IL-8 verzeichnet werden. Dies beweist eine eindeutige Beteiligung von hUbc13 am NF κ B-Weg nach UV-Bestrahlung. Durch die reduzierte IL-Induktion wurde gezeigt, dass in *hubc13-knockdown*-Zellen die NF κ B-Aktivierung nach UV-Behandlung verringert ist und somit vermutlich auch der antiapoptotische Prozess reduziert wird.

Des Weiteren sollte geklärt werden, ob eine Reduktion der Genexpression von *hUBC13* tatsächlich Auswirkungen auf das Ausmass der Apoptose zeigt. Die Quantifizierung der Apoptose wurde mit drei unabhängigen Methoden durchgeführt. Sowohl in den funktionellen Untersuchungen der PARP-Spaltung und der Caspase-3-Aktivität, als auch durch den sog. *TUNEL Assay* konnte nach *hubc13-knockdown* und UV-C-Bestrahlung eine erhöhte Apoptose nachgewiesen werden (3.7.2.1, Abbildung 36, 3.7.2.2, Abbildung 37, 3.7.2.3, Abbildung 38).

huc13-herunterregulierte Zellen zeigten eine erhöhte Apoptoserate, d.h. nach Stimulation von TNFR1 wurde das Gleichgewicht in Richtung des programmierten Zelltodes verschoben (Abbildung 45).

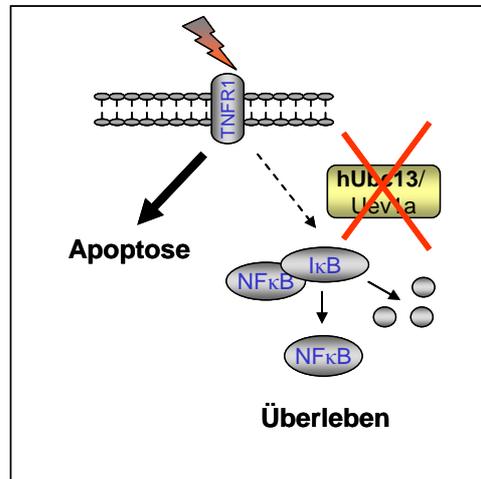


Abbildung 45: TNFR1-Signaltransduktion; Normalerweise wird nach der Stimulation des TNFR1-Rezeptors das Überleben der Zellen über den NFκB-Weg unterstützt und die Apoptose wird gehemmt. Nach *huc13-knockdown* verschiebt sich die Gewichtung der Signale in Richtung Apoptose.

So konnte nicht nur die Beteiligung von hUbc13 am NFκB-Weg bestätigt, sondern auch eine wichtige Funktion von hUbc13 bei der Hemmung der Apoptose nachgewiesen werden. Dies stimmt überein mit Untersuchungen aus der Literatur, dass eine Reduktion anderer Signaltransduktionsproteine, wie TRAF2 oder TRAF6, die für die Vermittlung des Überlebensweges verantwortlich sind, nach UV-Bestrahlung ebenfalls zur Induktion des propapoptotischen Weges führen (Pöppelmann *et al.* 2005, Strozyk *et al.* 2006).

4.6 Einfluss von hUbc13 auf den TNFR1-Todesrezeptor

Nach UV-Behandlung und *knockdown* von *hUBC13* konnte weniger Zellüberleben und vermehrt Apoptose nachgewiesen werden. Deshalb stellte sich die Frage, ob es in *hubc13*-defizienten Zellen zu einer verringerten Expression antiapoptotischer Gene und dadurch zu einer gestörten Aktivierung des NFκB-Weges kommt oder ob Apoptose durch die Aktivierung von Todesrezeptoren induziert werden kann. Ein Argument für die rezeptorvermittelte Apoptoseinduktion ist die bereits nachgewiesene Beteiligung am NFκB-Weg im Zusammenhang mit der Stimulation durch TNFα (3.5, Syed *et al.* 2006). Da auch eine Beziehung zwischen TNFR1 und UV-Strahlung besteht (Sheikh *et al.* 1998), liegt die Vermutung nahe, dass hUbc13 vermehrt Einfluss über den Todesrezeptorweg nimmt.

Als Indikator für die rezeptorinduzierte Apoptose ist die Aktivität der Caspase-8 maßgebend. So konnte die erhöhte Apoptose in *hubc13*-herunterregulierten Zellen nach UV-C-Bestrahlung, nachgewiesen durch PARP-Spaltung, durch einen spezifischen Caspase-8-Inhibitor nahezu vollständig reduziert werden (3.8.1, Abbildung 40). Somit ist wahrscheinlich, dass eine erhöhte Apoptose in *hubc13*-herunterregulierten Zellen nicht nur durch eine geringere Aktivierung des NFκB-Weges verursacht wird, sondern auch aktiv durch die Rezeptoraktivierung erhöht wird.

Dies kann durch bereits bekannte Erkenntnisse erklärt werden. Nach der Stimulation des TNFR1 wird RIP1 durch TRAF2 und den Enzymkomplex hUbc13/Uev1a polyubiquitiniert. Diese Polyubiquitinierung von RIP1 dient als antiapoptotisches Signal. Findet sie nicht statt, kann RIP1 einen Komplex mit Caspase-8 bilden, wodurch Apoptose initiiert wird (Li *et al.* 2005, Ea *et al.* 2006, O'Donnell *et al.* 2007). Außerdem führt dies zu einer verringerten Aktivierung des NFκB-Weges und möglicherweise auch zu einer erniedrigten Expression antiapoptotischer Gene.

Die Polyubiquitinierung von RIP1 ist aber anscheinend nicht die einzige Funktion von hUbc13. Eine aktive Beteiligung an der Rezeptoraktivierung konnte in weiteren Experimenten ebenfalls nachgewiesen werden. Hierbei wurde zum einen die Expression von TNFR1 untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich nach *hubc13*-*knockdown* weniger TNFR1-Protein in der löslichen Zellfraktion detektieren ließ. Nach UV-C-Bestrahlung und *knockdown* konnte TNFR1 gar nicht mehr in dieser Fraktion nachgewiesen werden (3.8.2, Abbildung 41). Da mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

erhöhtes Rezeptor-*Clustering* an der Oberfläche nachgewiesen werden konnte (3.8.3, Abbildung 42), ist das TNFR1-Protein nach *hubc13-knockdown* noch eindeutig vorhanden. Somit ist nicht die Expression des Proteins verändert, sondern eher die Oligomerisierung oder die Internalisierung des Rezeptors. Ein Hinweis darauf, dass die Aggregation des TNFR1 beeinflusst wird, konnte ebenfalls mit dem Nachweis des *Clustering* gezeigt werden. Da nicht nur nach Bestrahlung und *hubc13-knockdown-Clustering* nachgewiesen werden konnte, sondern auch, dass *Cluster*-Bildung bereits in unbehandelten *hubc13-knockdown*-Zellen stattfindet, zeigt einen eindeutigen Einfluss von hUbc13 auf die Lokalisation des Rezeptors in der Membran (3.8.3, Abbildung 42).

Bei der Internalisierung von Rezeptoren gibt es die unterschiedlichsten Wege, die entweder zusammen spielen oder auch allein dafür verantwortlich sind. Es gibt dabei nicht nur liganden-abhängige, sondern auch ubiquitin-abhängige Varianten der frühen Rezeptorinternalisierung (Haglund *et al.* 2003, Höller und Dikic 2004, Haglund und Dikic 2005). Durch die Ubiquitinierung werden Rezeptoren leichter von intrazellulären Proteinen erkannt und deren Aufnahme ins Endosom zur lysosomalen Degradierung in der Zelle wird gewährleistet. Auch kann das *Clustering* von ubiquitinierten Adaptorproteinen beeinflusst werden (Haglund *et al.* 2003). Ubiquitinierung spielt durch die Regulation vieler Schritte also eine kritische Rolle bei der Rezeptorinternalisierung (Höller und Dikic 2004). Offenbar ist hUbc13 hier als ubiquitin-konjugierendes Enzym für die Vermittlung von Ubiquitinierung verantwortlich und übt so Einfluss auf die Internalisierung aus (Abbildung 46).

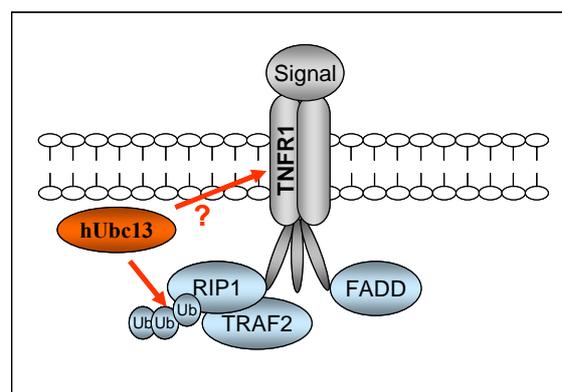


Abbildung 46: Der Einfluss von hUbc13 auf den TNFR1-Weg; hUbc13 übt möglicherweise unterschiedliche Funktionen nach der Stimulation des TNFR1-Weges aus. Neben der Polyubiquitinierung von RIP1 kann auch die Aggregation oder die Internalisierung des Rezeptors beeinflusst werden.

5 Ausblick

Der *knockdown* von *hUBC13* in HeLa Zellen führte zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber UV-Bestrahlung. Eine Ursache dafür liegt in der ebenfalls nachgewiesenen erhöhten Apoptose. Diese beruht sowohl auf einer verminderten Aktivierung des NFκB-Weges, was vermutlich eine reduzierte Expression von antiapoptotischen Genen und Genen, die wichtig für das Überleben der Zelle sind, zur Folge hat, als auch auf einer erhöhten rezeptorvermittelten Apoptose.

In weiteren Untersuchungen sollte nun die Rolle von hUbc13 für diese Vorgänge weiter spezifiziert werden. Zunächst könnte es von Interesse sein den Beitrag des NFκB-Weges an der erhöhten Apoptose zu quantifizieren. Dabei könnte die Expression von antiapoptotischen Genen, wie z.B. FLIP analysiert werden. Durch Untersuchungen der Rolle des *hubc13-knockdown* in *nfkb*^{-/-}-Zellen könnte dies geklärt werden.

Das veränderte TNFR1-*Clustering* in *hubc13-knockdown*-Zellen weist auf eine weitere Rolle von hUbc13 neben der Aktivierung des NFκB-Weges hin. Zur genaueren Analyse dieser Funktion könnte der Zusammenhang zwischen hUbc13 und einer Assoziation von TRAF2, TRADD oder FADD am TNFR1 durch Interaktionsstudien untersucht werden. Auch die Verwendung einer *lysin-63 ubiquitin*^{-/-}-Zelllinie könnte hilfreich sein, um eine potentielle Rolle von Lysin-63 verknüpften Ubiquitinketten für das Rezeptor-*Clustering* zu analysieren.

6 Zusammenfassung

Die humanen Proteine hUbc13 und TRAF6 werden als Homologe von Ubc13 und Rad5 angesehen, die in *S. cerevisiae* wichtige Funktionen in der postreplikativen Reparatur (PRR) ausüben. In dieser Arbeit wurde die Funktion von hUbc13 und TRAF6 bezüglich Zellüberleben, DNA-Reparatur und assoziierten genetischen Prozessen, wie das Rekombinations- und Mutationsverhalten, die in Zusammenhang mit PRR stehen, analysiert. Außerdem wurde eine Beteiligung am NFκB-Weg und der Regulation von Überleben und Apoptose untersucht, Funktionen die in der Hefe bisher nicht bekannt sind.

Für die Analysen wurde die Expression beider Gene mittels RNA-Interferenz-Technik herunterreguliert. Sowohl für hUbc13 als auch für TRAF6 konnte mit jeweils zwei spezifischen siRNA-Sequenzen ein effizienter *knockdown* generiert werden, womit anschließend funktionelle Experimente durchgeführt werden konnten. Zur Kontrolle wurden dabei Zellen mit einer sog. *scrambled* siRNA transfiziert, die keine Homologie zu humanen Sequenzen aufwies.

Nach der Behandlung von hTERT-RPE-Zellen mit Strahlung oder alkylierenden Substanzen konnten keine Auffälligkeiten im Zellüberleben der herunterregulierten Zellen, weder über die metabolische Aktivität im MTT-Test noch durch den Koloniebildungstest, detektiert werden. Auch wurden Untersuchungen von Reparatur-, analysiert im *Comet Assay*, durch γH2AX-Foci und durch Analyse der spontanen Rekombination durch ein spezifisches Plasmiddetektionssystem, und Mutationsverhalten, ebenfalls analysiert mit einem spezifischen Plasmidsystem, in hTERT-RPE-Zellen nach UV- oder γ-Bestrahlung durchgeführt. Dabei ergaben sich allerdings ebenfalls keine Unterschiede zwischen *huc13*- und *traf6*-*knockdown*-Zellen und ihren Kontrollen.

In Hela-Zellen wurde ebenfalls das Zellüberleben nach *knockdown* von *hUBC13* und *TRAF6* nach UV-, γ- Bestrahlung und chemischen Agenzien untersucht. Dabei zeigten *huc13*-herunterregulierte Zellen eine auffällig reduzierte Überlebensfähigkeit und somit eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit gegenüber UV-Bestrahlung.

hUbc13 spielt eine Rolle bei der Aktivierung des NFκB-Weges. Um die Ursache der Strahlenempfindlichkeit von *huc13*-*knockdown*-Hela-Zellen zu untersuchen, wurde dieser Weg näher untersucht. Dabei konnte die Beteiligung von hUbc13 am NFκB-Weg nach TNFα-Stimulation bestätigt werden. Einerseits war die Expression der NFκB-induzierten

Interleukine nach *hubc13-knockdown* geringer als in den entsprechenden Kontrollen. Andererseits zeigte sich auch nach TNF α -Behandlung in den herunterregulierten Zellen erhöhte Apoptose, nachgewiesen durch PARP-Spaltung und Caspase-3-Aktivität.

Die Stimulation des NF κ B-Weges kann durch eine Aktivierung des Todesrezeptors TNFR1 nach UV-Bestrahlung hervorgerufen werden. Auch hier konnte eine Rolle von hUbc13 nachgewiesen werden. Wiederum konnte durch die Messung der Interleukin-Expression eine geringere NF κ B-Aktivierung nach UV-Bestrahlung in *hubc13-knockdown*-Zellen festgestellt werden. Gleichzeitig konnte nach UV-Behandlung eine erhöhte Apoptoserate in den *hubc13-knockdown*-Zellen detektiert werden, die durch einen spezifischen Caspase-8-Inhibitor reduziert werden konnte. Die Beteiligung von Caspase-8 weist auf einen todesrezeptorabhängigen Apoptoseprozess hin.

Genauere Analysen des Todesrezeptors TNFR1 ergaben ein verstärktes Rezeptor-*Clustering* und ein verändertes Löslichkeitsverhalten des TNFR1-Proteins in Lysaten aus *hubc13*-herunterregulierten Zellen.

Die hergestellten Daten begründen die Schlussfolgerung, dass die humanen Proteine hUbc13 und TRAF6 keine Rolle für die PRR spielen, obwohl dieser Prozess in Säugerzellen existiert. Somit unterscheiden sich die Funktionen der Gene sehr deutlich von ihren potentiellen Homologen Ubc13 und Rad5.

hUbc13 spielt eindeutig eine Rolle in der Aktivierung des NF κ B-Weges, speziell nach der Aktivierung des TNFR1, und zwar in doppelter Weise. Zum einen ist hUbc13 für die Polyubiquitinierung von RIP1 verantwortlich, zum anderen wird das Rezeptor-*Clustering*, sowie die Internalisierung des TNFR1, beeinflusst. Es ist bisher ungeklärt, welches der molekulare Mechanismus ist, den hUbc13 übernimmt und ob dieser mit der Funktion als E2-Enzym von hUbc13 verbunden ist. Bezüglich der Aktivierung des NF κ B-Weges und in der rezeptorvermittelten Apoptose gibt es für Hefe keine vergleichbaren Daten.

7 Literaturverzeichnis

Adhikari A., Xu M., Chen Z.J., Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK, *Oncogene* 26 (2007), 3214-3226

Agrawal J., Walsh A., Lee R.C., Multimodal strategies for resuscitating injured cells, *Annals of the New York Academy of Sciences* 1066 (2005), 295-309

Ahne F., Jha B., Eckardt-Schupp F. The RAD5 gene product is involved in the avoidance of non-homologous end-joining of DNA double strand breaks in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acids Research* 25 (4) (1997), 743-749

Angermeier M., RNA-Interferenz zur Ausschaltung von DNA-Reparaturgenen in Telomerase-immortalisierten menschlichen Zelllinien, Diplomarbeit (2004)

Andersen P.L., Zhou H., Pastushok L., Moraes T., McKenna S., Ziola B., Ellison M.J., Dixit V.M., Xiao W., Distinct regulation of Ubc13 functions by the two ubiquitin-conjugating enzyme variants Mms2 and Uev1A, *Journal of Cell Biology* 170 (2005), 745-755

Aragane Y., Kulms D., Metze D., Wilkes G., Pöppelmann B., Luger T.A., Schwarz T., Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L, *Journal of Cell Biology* 140 (1) (1998), 171-182

Ashley C., Pastushok L., McKenna S., Ellison M.J., Xiao W., Roles of mouse *UBC13* in postreplication repair and Lys63-linked ubiquitination, *Gene* 285 (2002), 183-191

Aylon Y., Kupiec M., DSB repair: the yeast paradigm, *DNA Repair* 3 (2004), 797-815

Aylon Y., Kupiec M., New insights into the mechanism of homologous recombination in yeast, *Mutation Research* 566 (2004), 231-248

Bailly V., Lamb P., Sung S., Prakash S., Prakash L., Specific complex formation between yeast RAD6 and RAD18 proteins: a potential mechanism for targeting RAD6 ubiquitin-conjugating activity to DNA damage sites, *Genes Diversity* 8 (1994), 811-820

Bailly V., Lauder S., Sung S., Prakash S., Prakash L., Yeast DNA repair proteins Rad6 and Rad18 form a heterodimer that has ubiquitin conjugating, DNA binding and ATP hydrolytic activities, *Journal of Biological Chemistry* 272 (1997), 23360-23365

Ben-Neriah Y., Regulatory functions of ubiquitination in the immune system, *Nature Immunology* 3 (2002), 20-26

Bermudez Y., Erasso D., Johnson N.C., Alfonso M.Y., Lowell N.E., Kruk P.A., Telomerase confers resistance to caspase-mediated apoptosis, *Clinical Interventions in Aging* 1 (2006), 155-167

Burma S., Chen B.P.C., Chen D.J., Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity, *DNA Repair* 5 (2006), 1042-1048

Broomfield S., Hryciw T., Xiao W., DNA postreplication repair and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mutation Research* 486 (2001), 167-184

Brusky J., Zhu Y., Xiao W., UBC13, a DNA-damage-inducible gene, is a member of the error-free postreplication repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, *Current Genetics* 37 (3) (2000), 168-174

Cejka P., Vondrejs V., Storchová Z., Dissection of the functions of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD6 postreplicative repair group in mutagenesis and UV sensitivity, *Genetics* 159 (2001), 953-963

Chen G., Goeddel D.V., TNF-R1 signaling: A beautiful pathway, *Science* 296 (2002), 1634-1636

Chen Z.J., Ubiquitin signalling in the NF- κ B pathway, *Nature Cell Biology* 7 (8) (2005), 758-765

Chen Z.J., Bhoj V., Seth R.B., Ubiquitin, TAK1 and IKK: is there a connection?, *Cell Death and Differentiation* 13 (2006), 687-692

Chiu R.K., Brun J., Ramaekers C., Weng L., Lambin P., Gray D.A., Wouters B.G., Lysine 63-polyubiquitination guards against translesion synthesis-induced mutations, *PLoS Genetics* 2 (7) (2006), 1070-1083

-
- Chow J., Tron V.A.**, Molecular aspects of ultraviolet radiation-induced apoptosis in the skin, *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery* 9 (6) (2005), 289-295
- Chung J.Y., Lu M., Yin Q., Lin S.C., Wu H.**, Molecular basis for the unique specificity of TRAF6, *Advances in Experimental Medical Biology* 597 (2007), 122-130
- Costa R.M.A., Chingancas V., da Silva Galhardo R., Carvalho H., Menck C.F.M.**, The eukaryotic nucleotide excision repair pathway, *Biochimie* 85 (2003), 1083-1099
- Debatin K-M., Krammer P.H.**, Death receptors in chemotherapy and cancer, *Oncogene* 23 (2004), 2950-2966
- Deng L., Wang C., Spencer E., Yang L., Braun A., You J., Slaughter C., Pickart C., Chen Z.J.**, Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain, *Cell* 103 (2000), 351-361
- Dudas A., Chovanec M.**, DNA double-strand break repair by homologous recombination, *Mutation Research* 566 (2004), 131-167
- Ea C-K., Deng L., Xia Z-P., Pineda G., Chen Z.J.**, Activation of IKK by TNF α requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO, *Molecular Cell* 22 (2006), 245-257
- Ea C-K., Sun L., Inoue J-I., Chen Z.J.**, TIFA activates I κ B kinase (IKK) by promoting oligomerization and ubiquitination of TRAF6, *PNAS* 101 (43) (2004), 15318-15323
- Eddins M.J., Carlile C.M., Gomez K.M., Pickart C.M., Wolberger C.**, Mms2-Ubc13 covalently bound to ubiquitin reveals the structural basis of linkage-specific polyubiquitin chain formation, *Nature Structural & Molecular Biology* 13 (10) (2006), 915-920
- Eisenberg T., Büttner S., Kromer G., Madeo F.**, The mitochondrial pathway in yeast apoptosis, *Apoptosis* 12 (5) (2007), 1011-1023
- Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T.**, Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature* 411 (2001), 494-498
- Elbashir S.M., Harborth J., Weber K., Tuschl T.**, Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs, *Methods* 26 (2002), 199-213

-
- Elbashir S.M., Lendeckel W., Tuschl T.,** RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs, *Genes and Development* 15(2) (2001), 188-200
- Ferraro E., Cecconi F.,** Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 462 (2007), 210-219
- Fortini P., Dogliotti E.,** Base damage and single-strand break repair: Mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways, *DNA Repair* 6 (2007), 398-409
- Fortini P., Pascucci B., Parlanti E., D'Errico M., Simonelli V., Dogliotti E.,** The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility, *Biochimie* 85 (2003), 1053-1071
- Friedberg E.C.,** Deoxyribonucleic acid repair in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiological Reviews* 52 (1) (1988), 70-102
- Friedberg E.C.,** Out of the shadows and into the light: the emergence of DNA repair, *Trends in Biochemical Science* 20 (10) (1995), 381
- Friedberg E.C.,** Suffering in silence: the tolerance of DNA damage, *Nature Reviews Molecular Cellular Biology* 6 (2005), 946-953
- Friedberg, E. C., Walker, G.C., Siede, W., Wood R.D., Schultz R.A., Ellenberger T.,** DNA Repair and Mutagenesis, ASM press, 2. Auflage, Washington DC (2006)
- Friedl A.A., Liefshitz B., Steinlauf R., Kupiec M.,** Deletion of the SRS2 gene suppresses elevated recombination and DNA damage sensitivity in rad5 and rad18 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, *Mutation Research* 486 (2) (2001), 137-146
- Fröhlich K.U., Fussi H., Ruckstuhl C.,** Yeast apoptosis--from genes to pathways, *Seminars in Cancer Biology* 17 (2) (2007), 112-121
- Fukushima T., Matsuzawa S-I., Kress C.L., Bruey J.M., Krajewska M., Levebvre S., Zapata J.M., Ronai Z., Reed J.C.,** Ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 is a critical component of TNF receptor -associated factor (TRAF)-mediated inflammatory responses, *PNAS* 104 (15) (2007), 6371-6376

Fulda S., Debatin K.-M., Apoptosis signaling in tumor therapy, *Annals New York Academy of Science* 1028 (2004), 150-156

Gangavarapu V., Haracska L., Unk I., Johnson R.E., Prakash S., Prakash L., Mms2-Ubc13-dependent and -independent roles of Rad5 ubiquitin ligase in postreplication repair and translesion DNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular and Cellular Biology* 26 (20) (2006), 7783-7790

Gangavarapu V., Prakash S., Prakash L., Requirement of *RAD52* group genes for postreplication repair of UV-damaged DNA in *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular and Cellular Biology* 27 (21) (2007), 7758-7764

Garinis G.A., Mitchell J.R., Moorhouse M.J., Hanada K., de Waard H., Vandeputte D., Jans J., Brand K., Smid M., van der Spek P.J., Hoeijmakers J.H.J., Kanaar R., van der Horst G.T.J., Transcriptome analysis reveals cyclobutane pyrimidine dimers as a major source of UV-induced DNA breaks, *EMBO* 24 (2005), 3952-3962

Gilmore T.D., Multiple mutations contribute to the oncogenicity of the retroviral oncoprotein v-Rel, *Oncogene* 18 (49) (1999), 6925-6937

Graham B., Gibson S.B., The two faces of NF κ B in cell survival responses, *Cell Cycle* 4 (10) (2005), 1342-1345

Grassmé H., Jekle A., Riehle A., Schwarz H., Berger J., Sandhoff K., Kolesnick R., Gulbins E., CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts, *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001), 20589-20596

Grassmé H., Jendrossek V., Bock J., Riehle A., Gulbins E., Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering, *Journal of Immunology* 168 (2002), 298-307

Grzesiuk E., The role of mutation frequency decline and SOS repair systems in methyl methanesulfonate mutagenesis, *Acta Biochimica Polonica* 45 (2) (1998), 523-533

Gulbins E., Grassmé H., Ceramide and cell death receptor clustering, *Biochimica et Biophysica Acta* 1585 (2002), 139-145

Gupta S., A decision between life and death during TNF- α -induced signaling, *Journal of Clinical Immunology* 22 (4) (2002), 185-194

-
- Haglund K., Di Fiore P.P., Dikic I.**, Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis, *Trends in Biochemical Science* 28 (11) (2003), 598-603
- Haglund K., Dikic I.**, Ubiquitylation and cell signalling, *The EMBO Journal* 24 (2005), 3353-3359
- Hannon G. J.**, RNA interference, *Nature* 418 (2002), 244-251
- Haracska L., Unk I., Prakash L., Prakash S.**, Ubiquitylation of yeast proliferation cell nuclear antigen and its implications for translesion DNA synthesis, *PNAS* 103 (17) (2006), 6477-6482
- Hazra T.K., Das A., Das S., Choudhury S., Kow Y.W., Roy R.**, Oxidative DNA damage repair in mammalian cells: A new perspective, *DNA Repair* 6 (2007), 470-480
- Hefferin L.H., Tomkinson A.E.**, Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining, *DNA Repair* 4 (2005), 639-648
- Helleday T.**, Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells, *Mutation Research* 532 (2003), 103-115
- Helleday T., Lo J., van Gent D.C., Engelward B.P.**, DNA double-strand break repair: From mechanistic understanding to cancer treatment, *DNA Repair* 6 (2007), 923-935
- Hoegge C., Pfander B., Moldovan G-L., Pyrowolakis G., Jentsch S.**, *RAD6*-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO, *Nature* 419 (2002), 135-141
- Höller D., Dikic I.**, Receptor endocytosis *via* ubiquitin-dependent and -independent pathways, *Biochemical Pharmacology* 67 (2004), 1013-1017
- Hofmann R.M., Pickart C.M.**, Noncanonical *MMS2*-encoded ubiquitin-conjugation enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair, *Cell* 96 (1999), 645-653
- Hsieh P.**, Molecular mechanisms of DNA mismatch repair, *Mutation Research* 486 (2001), 71-87

-
- Huang T.T., D'Andrea A.D.**, Regulation of DNA repair by ubiquitylation, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 (2006), 323-334
- Inoue J-I., Ghoda J., Akiyama T., Semba K.**, NF- κ B activation in development and progression of cancer, *Cancer Science* 98 (3) (2007), 268-274
- Ishida T., Mizushima S., Azuma S., Kobayashi N. Tojo T., Suzuki K., Aizawa S., Wtanabe T., Mosialos G., Kieff E., Yamamoto T., Inoue J.**, Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region, *Journal of Biological Chemistry* 271 (46) (1996), 28745-28748
- Ichikawa D., Funakoshi-Tago M., Aizu-Yokota E., Sonoda Y., Inoue J-I., Kasahara T.**, TNF-receptor associated factor 6-deficient fibroblast is sensitive to the TNF- α -induced cell death: Involvement of reactive oxygen species, *Biochemical and Biophysical Communications* 351 (2006), 93-98
- Jeggo P., Löbrich M.**, Radiation-induced DNA damage responses, *Radiation Protection Dosimetry* 122 (1-4) (2007), 124-127
- Johnson R.E., Henderson S.T., Petes T.D., Prakash S., Bankmann M., Prakash L.**, *Saccharomyces cerevisiae* RAD5-encoded DNA repair protein contains DNA helicase and zinc-binding sequence motifs and affects the stability of simple repetitive sequences in the genome, *Molecular and Cellular Biology* 12 (9) (1992), 3807-3818
- Johnson R.E., Prakash S., Prakash L.**, Yeast DNA repair protein RAD5 that promotes instability of simple repetitive sequences is a DNA dependent ATPase, *Journal of Biological Chemistry* 269 (1994), 28259-28262
- Kannouche P.L., Lehmann A.R.**, Ubiquitination of PCNA and polymerase switch in human cells, *Cell Cycle* 3 (2004), 1011-1013
- Khvorova A., Reynolds A., Jayasena S.D.**, Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias, *Cell* 115 (2) (2003), 209-216
- Kobayashi T., Walsh M.C., Choi Y.**, The role of TRAF6 in signal transduction and the immune response, *Microbes and Infection* 6 (2004), 1333-1338

-
- Koken M.H., Reynolds P., Jaspers-Dekker I., Prakash L., Prakash S., Bootsma D., Hoeijmakers J.H.,** Structural and functional conservation of the two human homologs of the yeast DNA repair gene RAD6, *PNAS* 88 (20) (1991), 8865-8869
- Kolas N.K., Chapman J.R., Nakada S., Ylanko J., Chahawan R., Sweeney F.D., Panier S., Mendez M., Wildenhain J., Thomson T.M., Pelletier L., Jackson S.P., Durocher D.,** Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase, *Science* 318 (2007), 1637-1640
- Krogh B.O., Symington L.S.,** Recombination proteins in yeast, *Annual Reviews Genetics* 38 (2004), 233-271
- Kulms D., Pöppelmann B., Schwarz T.,** Ultraviolet radiation-induced Interleukin 6 release in Hela cells is mediated via membrane events in a DNA damage-independent way, *Journal of Biological Chemistry* 275 (20) (2000), 15060-15066
- Kulms D., Schwarz T.,** Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis, *Photodermatological Photoimmunological Photomedicine* 16 (2000), 195-201
- Kunkel T.A., Erie D.A.,** DNA mismatch repair, *Annual Reviews in Biochemistry* 74 (2005), 681-710
- Kunz B.A., Gabriel M., Kang X., Kohalmi S.E., Terrick K.A.,** DNA repair modifies the site and strand specificity of methyl methanesulfonate mutagenesis in yeast, *Mutagenesis* 7 (6) (1992), 461-469
- Kunz B.A., Straffon A.F., Vonarx E.J.,** DNA damage-induced mutation: tolerance via translesion synthesis, *Mutation Research* 451 (2000), 169-185
- Lamothe B., Besse A., Campos A.D., Webster W.K., Wu H., Darnay B.G.,** Site-specific Lys-63-linked Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor 6 auto-ubiquitination is a critical determinant of I κ B kinase activation, *Journal of Biological Chemistry* 282 (6) (2007), 4102-4112
- Lawrence C.,** The RAD6 DNA repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*: what does it do, and how does it do it?, *Bioessays* 16 (1994), 253-258
- Lawrence C.W., Christensen R.,** UV mutagenesis in radiation-sensitive strains of yeast, *Genetics* 82 (2) (1976), 207-232

Lazebnik Y.A., Kaufmann S.H., Desnoyer S., Poirier G.G., Earnshaw W.C., Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase by a protease with properties like ICE, *Nature* 371 (1994), 346-347

Lederberg E., Cohen S., Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid, *Journal of Bacteriology* 119 (1974), 1072-1074

Lehoczyk P., McHugh P.J., Chovanec M., DNA interstrand cross-link repair in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiological Reviews* 31 (2007), 109-133

Li H., Kobayashi M., Blonska M., You Y., Lin X., Ubiquitination of RIP is required for tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappaB activation, *Journal of Biological Chemistry* 281 (2006), 13636-13643

Liefshitz B., Steinlauf R., Friedl A., Eckardt-Schupp F., Kupiec M., Genetic interactions between mutants of the 'error-prone' repair group of *Saccharomyces cerevisiae* and their effect on recombination and mutagenesis, *Mutation Research* 407(2) (1998), 135-145

Limole C.L., Giedzinski E., Bonner W.M., Cleaver J.E., UV-induced replication arrest in the xeroderma pigmentosum variant leads to DNA double-strand breaks, gamma-H2AX formation, and Mre11 relocalization, *PNAS* 99 (2002), 233-238

Lin X., Yang J., Chen J., Gunasekera A., Fesik S.W., Shen Y., Development of a tightly regulated U6 promotor for shRNA expression, *FEBS Letters* 577 (3) (2004), 376-380

Lin Y., Devine A., Rodriguez Y., Liu Z.G., Cleavage of death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis, *Genes Development* 13 (1999), 2514-2526

Liu L.F., Duann P., Lin C.T., D'Arpa P., Wu J., Mechanism of action of camptothecin, *Annals of the New York Academy of Science*, 922 (2000), 1-10

Liu J., Lin A., Role of JNK activation in apoptosis: A double-edged sword, *Cell Research* 15 (1) (2005), 36-42

Lyakhovich A., Shekhar M.P., RAD6B overexpression confers chemoresistance: RAD6 expression during cell cycle and its redistribution to chromatin during DNA damage-induced response, *Oncogene* 23 (17) (2003), 3091-3106

- Magné N., Toillon R-A., Bottero V., Didelot C., Van Houtte P., Gérard J-P., Peyron J-F.,** NF κ B modulation and ionizing radiation: mechanisms and future directions for cancer treatment, *Cancer Letters* 231 (2006), 158-168
- Maiuri M.C., Zalckvar E., Kimchi A., Kroemer G.,** Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis, *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (2007), 741-752
- Marquardt H., Schäfer S.,** Lehrbuch der Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2. Auflage 2004
- Marti T.M., Hefner E., Feeney L., Natale V., Cleaver J.E.,** H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks, *PNAS* 103 (26) (2006), 9891-9896
- Masuyama S., Tateishi S., Yomogida K., Nishimune Y., Suzuki K., Sakuraba Y., Inoue H., Ogawa M., Yamaizumi M.,** Regulated expression and dynamic changes in subnuclear localization of mammalian Rad18 under normal and genotoxic conditions, *Genes to Cells* 10 (2005), 753-762
- McKenna S., Moraes T., Pastushok L., Ptak C., Xiao W., Spyrycopoulos L., Ellison M.J.,** An NMR-based Model of the Ubiquitin-bound Human Ubiquitin Conjugating Complex Mms2-Ubc13, *Journal of Biological Chemistry* 278 (48) (2003), 13151-13158
- Micheau O., Tschopp J.,** Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes, *Cell* 114 (2003), 181-190
- Minesinger B.K., Jinks-Robertson S.,** Roles of *RAD6* epistasis group members in spontaneous pol ζ -dependent translesion synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* 169 (2005), 1939-1955
- Miyase S., Tateishi S., Watanabe K., Tomita K., Suzuki K., Inoue H., Yamaizumi M.,** Differential regulation of Rad18 through Rad6-dependent mono- and polyubiquitination, *Journal of Biological Chemistry* 280 (1) (2005), 515-524
- Moertl S., Karras G.I., Wismueller, Ahne F., Eckardt-Schupp F.,** Regulation of double-stranded DNA gap repair by the *RAD6* pathway, *DNA Repair, under revision*, (2008)

- Moraes T.F., Edwards R.A., McKenna S., Pastushok L., Xiao W., Glover J.N., Ellison M.J.**, Crystal structure of the human ubiquitin conjugating enzyme complex, hMms2-hUbc13, *Nature Structural Biology* 8 (8) (2001), 669-673
- Moll U.M., Wolff S., Speidel D., Deppert W.**, Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53, *Current Opinion in Cell Biology* 17 (2005), 631-636
- Motegi A., Sood R., Moinova H., Markowitu S.D., Liu P.P., Myung K.**, Human SHPRH suppresses genomic instability through proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination, *Journal of Cell Biology* 175 (5) (2006), 703-708
- Nakajima S., Lan L., Kanno S-I., Takao M., Yamamoto K., Eker A.P., Yasui A.**, UV light-induced DNA damage and tolerance for the survival of nucleotide excision repair-deficient human cells, *Journal of Biological Chemistry* 279 (2004), 46674-46677
- Nakajima S., Lan L., Kanno S-I., Usami N., Kobayashi K., Mori M., Shiomi T., Yasui A.**, Replication-dependent and -independent responses of RAD18 to DNA damage in human cells, *Journal of Biological Chemistry* 28 (45) (2006), 34687-34695
- Nakamura H.**, hTERT-immortalized cells useful for analysing effects of low-dose-rate radiation on human cells, *Journal of Radiation Research* 49 (1) (2008), 9-15
- O'Donnell M.A., Legarda-Addison D., Skountzos P., Yeh W.C., Ting A.T.**, Ubiquitination of Rip1 regulates an NF- κ B-independent cell-death switch in TNF signaling, *Current Biology* 17 (2007), 418-424
- Pastushok L., Moraes T. F., Ellison M.J., Xiao W.**, A single Mms "key" residue insertion into a Ubc13 pocket determines the interface specificity of a human Lys⁶³ ubiquitin conjugation complex, *Journal of Biological Chemistry* 280 (6) (2005), 17891-17900
- Petroski M.D., Zhou X., Dong GQ., Daniel-Issakani S., Payan D.G., Huang J.**, Substrate modification with lysin 63-linked ubiquitin chains through the UBC13-UEV1A ubiquitin-conjugating enzyme, *Journal of Biological Chemistry* 282 (41) (2007), 29936-29945
- Pickart C.M., Eddins M.J.**, Ubiquitin: structures, functions, mechanisms, *Biochimica et Biophysica Acta* 1695 (2004), 55-72

-
- Pirzio L.M., Freule-Marriere M.A., Fouladi B., Murnane J.P., Sabatier L., Desmaze C.,** Human fibroblasts expressing hTERT show remarkable stability even after exposure to ionizing radiation, *Cytogenetic Genome Research* 104 (2004), 87-94
- Pöppelmann B., Klimmek K., Strozyk E., Voss R., Schwarz T., Kulms D., NfkappaB-**dependent down-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated proteins contributes to interleukin-1-mediated enhancement of ultraviolet B-induced apoptosis, *Journal of Biological Chemistry* 280 (2005), 15635-15643
- Prakash L.,** Characterization of postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae* and effects of rad6, rad18, rev3 and rad52 mutations, *Molecular and General Genetics* 184 (3) (1981), 471-478
- Prakash S., Sung P., Prakash L.,** DNA repair genes and proteins in *Saccharomyces cerevisiae*, *Annual Review of Genetics* 27 (1993), 33-70
- Prakash S., Johnson R.E., Prakash L.,** Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function, *Annual Reviews Biochemistry* 74 (2005), 317-353
- Rai R., Peng G., Li K., Lin S.Y.,** DNA damage response: the players, the network and the role in tumor suppression, *Cancer Genomics Proteomics* 4 (2) (2007), 99-106
- Rickinger A.,** Etablierung des Vektors pDSon-Neo zur simultanen Detektion von homologen Rekombinations- und nicht-homologen Endenverknüpfungseignissen in Säugerzellen, Diplomarbeit (2006)
- Rosette C., Karin M.,** Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors, *Science* 274 (1996), 1194-7119
- Saberi A., Hochegger H., Szuts D., Lan L., Yasui A., Sale J.E., Taniguchi Y., Murakawa Y., Zeng W., Yokomori K., Helleday T., Teraoka H., Arakawa H., Buerstedde J-M., Takeda S.,** RAD18 and Poly(ADP-Ribose) polymerase independently suppress the access of nonhomologous end joining to double-strand breaks and facilitate homologous recombination-mediated repair, *Molecular and Cellular Biology* 27 (7) (2007), 2562-2571

-
- Saleh-Gohari N., Helleday T.;** Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells, *Nucleic Acids Research* 32 (12) (2004), 3683-3688
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.;** *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)
- Scheller J., Schürer A., Rudolph C., Hettwer S., Kramer W.;** MPH1, a yeast gene encoding a DEAH protein, plays a role in protection of the genome from spontaneous and chemically induced damage, *Genetics* 155 (3) (2000), 1069-1081
- Schwarz D.S., Hutvágner G., Du T., Xu Z., Aronin N., Zamore P.D.;** Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex, *Cell* 115 (2003), 199-208
- Schwarz T.;** UV light affects cell membrane and cytoplasmatic targets, *Journal of Photochemistry and Photobiology Biology* 44 (1998), 91-96
- Sheikh M.S., Antinore M.J., Huang Y., Fornace A.J. Jr.;** Ultraviolet-irradiation-induced apoptosis is mediated via ligand independent activation of tumor necrosis factor receptor 1, *Oncogene* 17 (20) (1998), 2555-2563
- Sheik M.S. Huang Y.;** Death receptor activation complexes, It takes two to activate TNF Receptor I, *Cell Cycle* 2 (6) (2003), 550-552
- Shen Y., White E.;** p53-dependent apoptosis pathways, *Advances in Cancer Research* 82 (2001), 55-84
- Simpson L.J., Sale J.E.;** UBE2V2 (MMS2) is not required for effective immunoglobulin gene conversion or DNA damage tolerance in DT40, *DNA Repair* 4 (2005), 503-510
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L.;** A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research* 175 (1988), 184-191
- Soldani C., Scovassi A.I.;** Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: An update, *Apoptosis* 7 (2002), 321-328
- Steininger S.;** *Neue Plasmidsysteme zur Analyse der Reparatur von Mikrodeletionen in Saccharomyces cerevisiae*, Diplomarbeit (2005)

Stelter P., Ulrich H.D., Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation, *Nature* 425 (2003), 188-191

Strozyk E., Pöppelmann B., Schwarz T., Kulms D., Differential effects of NF- κ B on apoptosis induced by DNA-damaging agents; the type of DNA damage determines the final outcome, *Oncogene* (2006), 1-13

Szweykowska-Kulinska Z., Jarmolowski A., Figlerowicz M., RNA interference and its role in the regulation of eucaryotic gene expression, *Acta Biochimica Polonica* 50 (1) (2003), 217-229

Syed N.A., Anderson P.L., Warrington R.C., Xiao W., Uev1A, a ubiquitin conjugating enzyme variant, inhibits stress-induced apoptosis through NF- κ B activation, *Apoptosis* 11 (2006), 2147-2157

Tateishi S., Sakuraba Y., Masuyama S., Inoue H., Yamaizumi M., Dysfunction of human Rad18 results in defective postreplication repair and hypersensitivity to multiple mutagens, *PNAS* 97 (14) (2000), 7927-7932

Tateishi S., Niwa H., Miyazaki J-I., Fujimoto S., Inoue H., Yamaizumi M., Enhanced genomic instability and defective postreplication repair in *RAD18* knockout mouse embryonic stem cells, *Molecular and Cellular Biology* 23 (2) (2003), 474-481

Thornburn A., Death receptor-induced cell killing, *Cellular Signalling* 16 (2004), 139-144

Towbin H., Staehelin T., Gordon J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979, *Biotechnology* 24 (1992), 145-149

Tsui C., Raguraj A., Pickart C.M., Ubiquitin binding site of the ubiquitin E2 variant (UEV) protein Mms2 is required for DNA damage tolerance in the yeast *RAD6* pathway, *Journal of Biological Chemistry* 20 (2005), 19829-19835

Tuschl Lab, siRNA guide (2003)

Tuschl T., Zamore P.D., Lehmann R., Bartel D.P., Sharp P.A., Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro, *Genes and Development* 13 (1999), 3191-3197

-
- Ulrich H.D.**, Conservation of DNA damage tolerance pathways from yeast to humans, *Biochemical Society Transactions* 35 (2007), 1334-1337
- Unk I., Hajdu I., Fatyol K., Szakal B., Blastyak A., Bermudez V., Hurwitz J., Prakash L., Prakash S., Haracska L.**, Human SHRPB is a ubiquitin ligase for Mms-Ubc13-dependent polyubiquitylation of proliferating cell nuclear antigen, *PNAS* 103 (48) (2006), 18107-18112
- Váchová L., Palková Z.**, Caspases in yeast apoptosis-like death: facts and artefacts, *FEMS Yeast Research* 7 (1) (2007), 12-21
- VanDenmark A.P., Hofmann R.M., Tsui C., Pickart C.M., Wolberger C.**, Molecular insights into polyubiquitin chain assembly: crystal structure of the Mms/Ubc13 heterodimer, *Cell* 105 (6) (2001), 711-720
- Van der Laan R., Roest H.P., Hoogerbrugge J.W., Smit E.M., Slater R., Baarends W.M., Hoeijmakers J.H.**, Characterization of mRAD18Sc, a mouse homolog of the yeast postreplication repair gene RAD18, *Genomics* 69 (1) (2000), 86-94
- Vermeulen K., Van Bockstaele D.R., Berneman Z.N.**, Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer, *Annual Hematology* 84 (2005), 627-639
- Vousden K.H., Lu X.**, Live or let die: The cell's response to p53, *Nature Reviews. Cancer* 2 (2002), 594-604
- Wang B., Elledge S.J.**, Ubc13/Rnf8 ubiquitin ligases control foci formation of the Rap80/Abraxas/Brcal/Brcc36 complex in response to DNA damage, *PNAS* 104 (52) (2007), 20759-20763
- Wang C., Deng L., Hong M., Akkaraju G.R., Inoue J., Chen Z.J.**, TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK, *Nature* 412 (2001), 346-351
- Wang J., Theunissen T.W., Orkin S.H.**, Site-directed, virus.free, and inducible RNAi in embryonic stem cells, *PNAS* 104 (52) (2007), 20850-20855
- Wang Z-B., Liu Y-Q., Cui Y-F.**, Pathways to caspase activation, *Cell Biology International* 29 (2005), 489-496

Watanabe K., Tateishi S., Kawasuji M., Tsurimoto T., Inoue H., Yamaizumi M., Rad18 guides pol η to replication stalling sites through physical interaction and PCNA monoubiquitination, *EMBO* 23 (2004), 3886-3896

Wilson III D.M., Bohr V.A., The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease, *DNA Repair* 6 (2007), 544-559

Wooff J., Pastushok L., Hanna M., Fu Y., Xiao W., The TRAF6 RING finger domain mediates physical interaction with Ubc13, *FEBS Letters* 566 (2004), 229-233

Wu H., Arron J.R., TRAF6, a molecular bridge spanning adaptive immunity, innate immunity and osteoimmunology, *Bioessays* 25 (2003), 1096-1105

Wyatt M.D., Pittman D.L., Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks, *Chemical Research in Toxicology* 19 (12) (2006), 1580-1594

Xiao W., Lin S.L., Broomfield S., Chow B.L., Wei Y.F., The products of the yeast *MMS2* and two human homologs (*hMMS2* and *CROC-1*) define a structurally and functionally conserved Ubc-like protein family, *Nucleic Acids Research* 26 (1998), 3908-3914

Xiao W., Chow B.L. Broomfield S., Hanna M., The *Saccharomyces cerevisiae* RAD6 group is composed of an error-prone and two error-free postreplication repair pathways, *Genetics* 155 (4) (2000), 1633-1641

Xin H., Lin W., Sumanasekera W., Zhang Y., Wu X., Wang Z., The human RAD18 gene product interacts with HHR6A and HHR6B, *Nucleic Acids Research* 28 (14) (2000), 2847-2854

Yamamoto M., Okamoto T., Takeda K., Sato S., Sanjo H., Uematsu S., Saitoh T., Yamamoto N., Sakurai H., Ishi K.J., Yamaoka S., Kawai T., Matsuura Y., Takeuchi O., Akira S., Key function for the Ubc13 E2 ubiquitin-conjugating enzyme in immune receptor signaling, *Nature Immunology* 7 (9) (2006), 962-970

Yang K., Zhu J., Sun S., Tang Y., Zhang B., Diao L., Wang C., The coiled-coil domain of TRAF6 is essential for its auto-ubiquitination, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 324 (2004), 432-439

Yuan B., Latek R., Hossbach M., Tuschl T., Lewitter F., siRNA selection server: an automated siRNA oligonucleotide prediction server, *Nucleic Acids Research* 32 (2004), 130-134

Zhao G.Y., Sonoda E., Barber L.J., Oka H., Murakawa Y., Yamada K., Ikura T., Wang X., Kobayashi M., Yamamoto K., Boulton S.J., Takeda S., A critical role for the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 in initiation homologous recombination, *Molecular Cell* 25 (2007), 663-675

Zwelling L.A., Kohn K.W., Mechanism of action of cis-dichlorodiammineplatinum(II), *Cancer Treatment Reports* 63 (1979), 1439-1444

Danksagung

Mein erster Dank geht an Frau Prof. Dr. Friederike Eckardt-Schupp, die es mir ermöglicht hat, diese Arbeit in ihrer Gruppe anfertigen zu können. Ihr großes Interesse am Fortgang der Arbeit fand ich sehr motivierend.

Für die hervorragende Betreuung während der ganzen Zeit möchte ich mich bei Frau Dr. Simone Mörtl bedanken. Stets war sie zu anregenden Diskussion bereit und hatte konstruktive Vorschläge für das Fortsetzen der Arbeit zur Hand.

Mein herzlicher Dank gilt allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die mir nicht nur fachlich beiseite standen, auch meine persönlichen und privaten Dinge wurden geteilt. Daniel, der jederzeit für Diskussionen bereit stand und sogar zwei Wochen Indien mit mir durchmachen musste, Büromitbewohner Irene, Astrid, die alles an der Laborbench mit mir teilte, das Kinderzimmer mit dem Kalorienkasterl-Treffpunkt (Sylvia, Dani, Romy). Hervorheben möchte ich dabei auch Klaudia Winkler und Nancy Kunz, die mir bei Problemen im Labor stets zur Seite standen.

Schließlich möchte ich mich noch bei Frau Dr. Angelika Böttger bedanken, die sich sofort für das Übernehmen des Zweitgutachtens bereit erklärt hat.

Meiner Mutter, meinem Freund Robert und meinen Freunden danke ich für die Geduld, die sie mit mir in stressigen Zeiten haben mussten.

Lebenslauf

Name Marita Angermeier
Geburtsdatum 11.01.1977
Geburtsort Landshut

Beruflicher Werdegang

11/2004 – 02/2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin
am Institut für Strahlenbiologie, Helmholtzzentrum München

Schulische und Hochschulausbildung

1987 – 1996 Gymnasium Dorfen
Abschluss mit allgemeiner Hochschulreife

1996 – 1999 Staatliche Berufsfachschule für Medizinisch Technische
Laboratoriumsassistenten an der Universität München

11/1999 – 10/2004 Studium Biologie Diplom an der LMU München
Abschluss Oktober 2004

03/2005 – 02/2008 Promotion bei Frau Prof. Dr. Eckardt-Schupp
am Institut für Strahlenbiologie, Helmholtzzentrum München

Erklärung

Diese Doktorarbeit wurde am Helmholtzzentrum München im Institut für Strahlenbiologie unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Friederike Eckardt-Schupp angefertigt.

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

München, den 17.03.2008

Marita Angermeier