

Zelluläre Mikroskopie der Poly(ADP-Ribos)ylierung von Proteinen in Echtzeit

Annette Buntz[†], Sarah Wallrodt[†], Eva Gwosch, Michael Schmalz, Sascha Beneke, Elisa Ferrando-May, Andreas Marx* und Andreas Zumbusch*

Abstract: Poly(ADP-Ribos)ylierung (PARylierung) ist eine wichtige posttranskriptionale Proteinmodifikation, die in grundlegende zelluläre Prozesse wie Genregulation und DNA-Reparatur involviert ist. Ihre Fehlregulierung wurde mit verschiedenen Krankheiten wie Krebs in Verbindung gebracht. Trotz größter Wichtigkeit gibt es nur wenige Methoden, um PARylierung und ihre Dynamik in Zellen zu beobachten. Mittels einer chemisch-biologischen Herangehensweise entwickelten wir ein fluoreszierendes NAD⁺-Analogon, das sich als kompetitiver Baustein für die PARylierung von Proteinen *in vitro* und in Zellen erwies. Dies ermöglichte uns, den Umsatz von PAR direkt und in lebenden Zellen nach DNA-Schädigung durch NIR-Mikrobestrahlung zu verfolgen. Zusätzlich wurden mithilfe von FLIM-FRET-Mikroskopie kovalente und nichtkovalente Interaktionen von PAR mit ausgewählten Proteinen sichtbar gemacht. Unsere Ergebnisse eröffnen neue Chancen für die schnelle zelluläre Untersuchung der Protein-PARylierung in Echtzeit und werden somit zu einem besseren Verständnis und höherer Aussagekraft im zellulären Kontext beitragen.

In den letzten Jahrzehnten haben verschiedene biochemische Untersuchungen und In-vivo-Studien die Bedeutsamkeit der Poly(ADP-Ribos)ylierung (PAR, Abbildung 1A) als eine komplexe, funktionell vielfältige, posttranskriptionale Proteinmodifikation aufgedeckt.^[1] Modifizierung von Proteinen durch kovalentes Hinzufügen von ADP-Ribose wird durch die Enzymfamilie der Diphtherietoxin-ähnlichen ADP-Ribosyl-Transferasen (ARTDs) vermittelt, welche 17 Mitglieder im Menschen aufweist. Mittels Nicotinamidadenin-

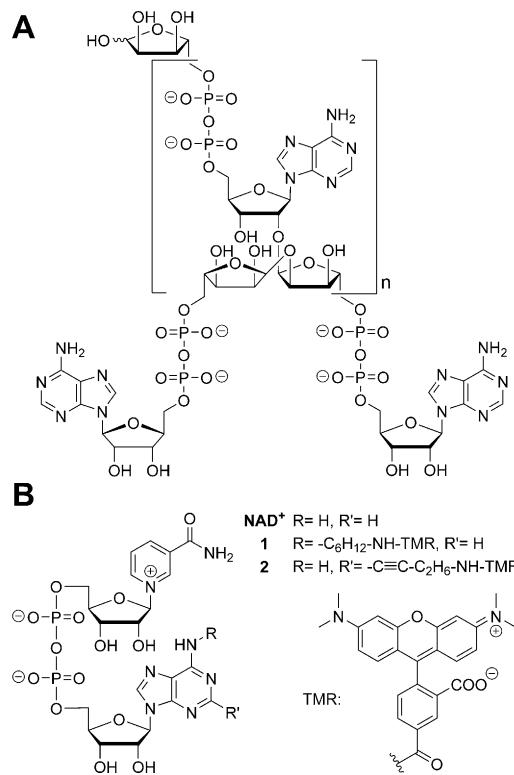


Abbildung 1. Struktur von A) Poly(ADP-ribose) und B) NAD⁺ und NAD⁺⁻-Analoga 1 und 2, die in dieser Studie verwendet wurden.

dinukleotid (NAD⁺) als Substrat übertragen ARTDs ADP-Ribose kovalent auf Glutamat-, Aspartat- oder Lysin-Seitenketten von Akzeptorproteinen. Durch Abspaltung von Nicotinamid entstehen so mono(ADP-ribos)yierte Proteine. Von den verschiedenen ARTDs, die diese erste ADP-Ribose zu PAR-Polymeren verlängern können,^[2] gilt die Diphtherietoxin-ähnliche ADP-Ribosyl-Transferase 1 (ARTD1) als Hauptquelle für PAR.^[3] ARTD1 ist in die Detektion von DNA-Schäden und deren Reparatur, die Regulation von Transkription sowie die Modulation der RNA-Prozessierung involviert.^[4] Fehlregulierung der Funktion von ARTD1 wurde mit Krebs, Entzündungsprozessen, Nervendegeneration und Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Verbindung gebracht, weshalb es ein attraktives Target in klinischen Studien darstellt.^[5]

Protein-PARylierung ist ein streng regulierter Prozess, welcher außer PAR-herstellenden Enzymen auch Abbauenzyme wie Poly(ADP-Ribose)-Glykohydrolasen (PARGs) umfasst.^[6] Die Auswirkungen von PARylierung auf die Proteinfunktion werden entweder durch 1) die Modulation der

[*] A. Buntz,^[†] Prof. Dr. A. Zumbusch
Fachbereich Chemie und Center for Applied Photonics
Universität Konstanz
Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland)
E-Mail: andreas.zumbusch@uni-konstanz.de

S. Wallrodt,^[†] Prof. Dr. A. Marx
Fachbereich Chemie, Universität Konstanz
Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland)
E-Mail: andreas.marx@uni-konstanz.de

E. Gwosch, Dr. S. Beneke, Prof. Dr. E. Ferrando-May
Fachbereich Biologie, Universität Konstanz
Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland)

M. Schmalz
Fachbereich Physik und Center for Applied Photonics
Universität Konstanz
Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind unter:
<http://dx.doi.org/10.1002/ange.201605282> zu finden.

Bindungsaffinität von Proteininteraktionen infolge kovalent hinzugefügter PAR oder 2) durch das Zerstören von Proteinkomplexen oder 3) durch Rekrutierung anderer Proteine vermittelt. Die beiden letzten Prozesse beruhen auf der nichtkovalenten Bindung der Proteine an das räumlich erweiterte und flexible Polymer. Die schnelle Fluktuation zellulärer PAR-Level macht die molekulare Untersuchung der Protein-PARYlierung zu einer anspruchsvollen Aufgabe. Zum heutigen Zeitpunkt existieren nur wenige Methoden, um PARYlierung in Zellen sichtbar zu machen, und keine dieser Methoden ermöglicht es, PAR und seine Dynamik direkt und nach Stimuli wie DNA-Schädigung verfolgen zu können. Einerseits kann man PAR indirekt mittels Antikörpern (z. B. 10-H),^[7] ADP-Ribose bindenden Makrodomänen (z. B. macro-H2A),^[8] sowie durch Markierung PAR-synthetisierender Enzyme (z. B. EGFP-ARTD1)^[9] in Zellen nachweisen. Andererseits kann PAR direkt mithilfe funktionalisierter NAD⁺-Analoga visualisiert werden. Dazu wurden bioorthogonal markierte Reporter-NADs entwickelt, die die Untersuchung der ADP-Ribosylierung *in vitro*^[10] und in Zellen^[11] ermöglichen. In diesem Fall erfolgt die Markierung mit einem entsprechend funktionalisierten Farbstoff durch bioorthogonale Reaktionen mit dem in das Polymer eingebauten NAD⁺-Molekül. Auch wenn diese Reaktionen relativ schnell verlaufen, müssen sie in fixierten Zellen durchgeführt werden, nachdem die PAR-Bildung abgeschlossen ist. Trotz des möglichen Einflusses auf die Untersuchung und das Verständnis von PAR-vermittelter Proteinregulierung^[12] gibt es bisher keine Methode, die es ermöglicht, die Entstehung von PAR in lebenden Zellen und auf Ebene des Polymers zu beobachten. Hier berichten wir über die Entwicklung eines fluoreszenzmarkierten NAD⁺-Analogons für die zeitaufgelöste Visualisierung der PARYlierung in lebenden Zellen (Abbildung 1B). Weiterhin zeigen wir, dass dieses NAD⁺-Analogon in Kombination mit Fluoreszenzlebensdauermikroskopie (FLIM) die Detektion und Untersuchung von proteinpezifischen PAR-Modifikationen nach genotoxischer Schädigung ermöglicht.

Bereits erfolgreich in ADP-Ribosylierungsreaktionen eingesetzte NAD⁺-Analoga wurden an der Purinbase in Position 2 und 6 modifiziert.^[10,11] Deswegen synthetisierten wir NAD⁺-Analoga, die an denselben Positionen über geeignete Linker mit einem fluoreszierenden Farbstoff modifiziert wurden. Zunächst stellten wir die mit den jeweiligen Amino-Linkern modifizierten Adenosinmonophosphate her und setzten diese mit Tetramethylrhodamin(TMR)-N-Hydroxysuccinimidester um (Abbildung 1B sowie Abbildungen S1 und S2 in den Hintergrundinformationen). Anschließende Kupplung der erhaltenen Farbstoff-modifizierten Monophosphate mit präaktiviertem β-Nicotinamidmonophosphat ergab die gewünschten Fluorophor-markierten NADs **1** und **2**.^[10b,11a]

Nachdem diese Verbindungen nun zur Verfügung standen, untersuchten wir ihre Subrateigenschaften mit den üblichen ADP-Ribosylierungssassays und Histon H1.2 oder ARTD1 als Akzeptorproteinen.^[10b] Dazu wurden die jeweiligen Analoga mit den Proteinen sowie kurzer dsDNA als Aktivator für ARTD1 inkubiert. Der Einbau der modifizierten NADs wurde mittels SDS-PAGE-Analyse bewertet

und die Fluoreszenzsignale mit der Coomassie-Blue-Färbung verglichen. In Abwesenheit von natürlichem NAD⁺ wurde nur für Verbindung **2** das H1.2-Protein mit fluoreszierenden PAR-Ketten modifiziert (Abbildung 2, Bahn 4 vs. 7). In einer 1:1-Mischung mit natürlichem NAD⁺ konnten wir diese PAR-Ketten auch für Verbindung **1** beobachten (Abbildung 2,

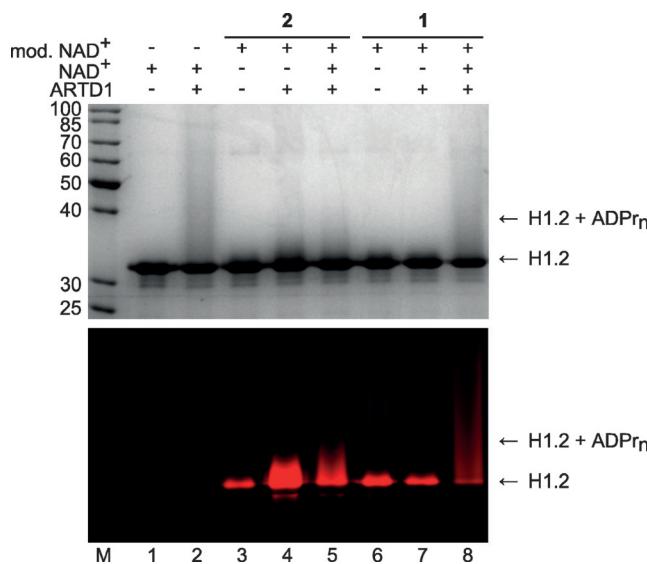


Abbildung 2. Vergleich der NAD⁺-Analoga **1** und **2** mittels SDS-PAGE-Analyse der PARYlierung von Histon H1.2. Oben: Coomassie-Blue-Färbung, Unten: TMR-Fluoreszenz; Die NAD⁺-Konzentration betrug 1 mM. Kontrollreaktionen wurden mit natürlichem Substrat (Bahn 1 und 2) sowie ohne Zugabe von Enzym (Bahn 1, 3 und 6) durchgeführt. Jedes Analogon wurde auch in einem 1:1-Gemisch mit natürlichem NAD⁺ untersucht (Bahn 5 und 8).

Bahn 8). Nennenswert hierbei ist, dass das 2-modifizierte Analogon kürzere PAR-Ketten bildet (Abbildung 2, Bahn 5). Dies lässt die Vermutung zu, dass die Art der Modifikation die Polymerverlängerung beeinflusst. Interessanterweise ist nach Inkubation ohne Enzymzugabe ein geringfügiges Anfärben des Histons zu sehen (Abbildung 2, Bahn 3 und 6). Dies kann von der elektrostatischen Anziehung zwischen dem negativ geladenen NAD⁺-Analogon und dem positiv geladenen Protein herühren und/oder durch die nicht-enzymatische Addition der ADP-Ribose an Lysinseitenketten durch Schiff-Base-Bildung erklärt werden.^[13] Zusätzlich untersuchten wir die NAD⁺-Analoga in einem Auto(ADP-Ribosylierungssassay, in dem ARTD1 als sein eigenes Akzeptorprotein fungiert (Abbildung S3).^[14] Auch hier beobachteten wir fluoreszenzmarkiertes, automodifiziertes ARTD1 nur, wenn Verbindung **2** verwendet wurde (Abbildung S3, Bahn 3 vs. 4). Unsere Ergebnisse lassen auf Folgendes schließen: 1) das Hinzufügen und die Polymerisation der ersten ADP-Riboseeinheiten und die Verlängerung bereits vorhandener Ketten werden in unterschiedlicher Weise von der eingeführten Modifikation beeinflusst und 2) Verbindung **2** ist kompetitiver gegenüber dem natürlichen Substrat als Verbindung **1** während der Initiierung. In Anbetracht dessen, dass in Zellen gebildete Ketten signifikant kürzer sind als *in vitro*,^[15] muss ein zellulär anwendbares NAD⁺-Derivat

seine Effizienz sowohl in Initiierungs- als auch in Verlängerungsreaktionen unter Beweis stellen. Da diese Kriterien besser von Verbindung **2** erfüllt werden, wurden alle weiteren Experimente nur mit diesem Analogon durchgeführt.

Im nächsten Schritt wurde die Verbindung als Mischung in verschiedenen Verhältnissen von modifiziertem zu unmodifiziertem NAD⁺ in einem PARylierungsassay mit Histon H1.2 untersucht (Abbildung 3). Unsere Ergebnisse zeigen, dass PAR-Bildung in einem großen Verhältnismittelbereich detektiert werden kann. Ab einem Verhältnis von modifiziertem zu unmodifiziertem NAD⁺ unter 1:5 können fast keine Un-

terschiede in der Polymerbildung in vitro beobachtet werden. (Abbildung 3, Bahn 6 bis 10 vs. 11). Dies zeigt, dass Verbindung **2** ein kompetitives Substrat für die Protein-PARYlierung darstellt.

Basierend auf diesen Ergebnissen spekulierten wir darauf, dass Verbindung **2** tatsächlich für Lebendzelluntersuchungen der Protein-PARYlierung geeignet ist. Der Transfer des negativ geladenen NAD⁺ über die Zellmembran wurde mithilfe des Carrier-Peptids Pep-1 erreicht.^[16] Zunächst wurden unterschiedliche Carrier-Cargo-Verhältnisse getestet und die Markierungseffizienz mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Zusätzlich wurde die Zellviabilität mithilfe der Sytox-Blue-Färbung bewertet. Mehr als 90% der Zellen waren nach einstündiger Inkubation mit 25 μM Verbindung **2** und 100 μM Pep-1 effizient markiert. Die Zellviabilität wurde bei allen getesteten Konzentrationen nicht beeinflusst (Abbildung S4). Lebendzellmikroskopie von PAR und seiner Dynamik am Ort eines DNA-Schadens wurde mithilfe eines konfokalen Mikroskops realisiert, das mit einer Femtosekunden-Faserlaserquelle ausgestattet wurde. Nachdem die Zellen mit Verbindung **2** beladen wurden, wurden die Zellkerne mit Femtosekunden-Laserpulsen der Wellenlänge 775 nm entlang einer Linie mikrobestrahl (Abbildung 4A). Dies führt zu einer Aktivierung der ARTD1 wie früher beschrieben.^[17] Die DNA-Schädigung ist das Ergebnis einer Dreiphotonenanregung und ist in allen drei Dimensionen räumlich auf das Volumen des Brennpunktes begrenzt.^[18] Wir zeichneten die Bildung von PAR mithilfe eines Konfokalmikroskops bei der Wellenlänge 555 nm in 10-Sekunden-Intervallen entlang der laserbestrahlten Linie auf, um den Einbau der Verbindung **2** innerhalb des Zellkerns detektieren zu können (Abbildung 4B). Bilddaten wurden quantitativ ausgewertet, indem die relative Verstärkung des Fluoreszenzsignals der bestrahlten Regionen im Vergleich zur Umgebung bestimmt wurde (Abbildung 4C). Innerhalb weniger Sekunden nach erfolgtem DNA-Schaden wurde eine starke Zunahme der Fluoreszenzintensität beobachtet, gefolgt von einer langsameren Abnahme der Fluoreszenzintensität, die nach etwa 50 Sekunden einsetzt (Video S1). Zur Kontrolle wurde das gleiche Experiment in Anwesenheit des ARTD-Inhibitors ABT888^[19] wiederholt. Unter diesen Bedingungen wurde der Einbau der Verbindung **2** an der mikrobestrahlten Linie

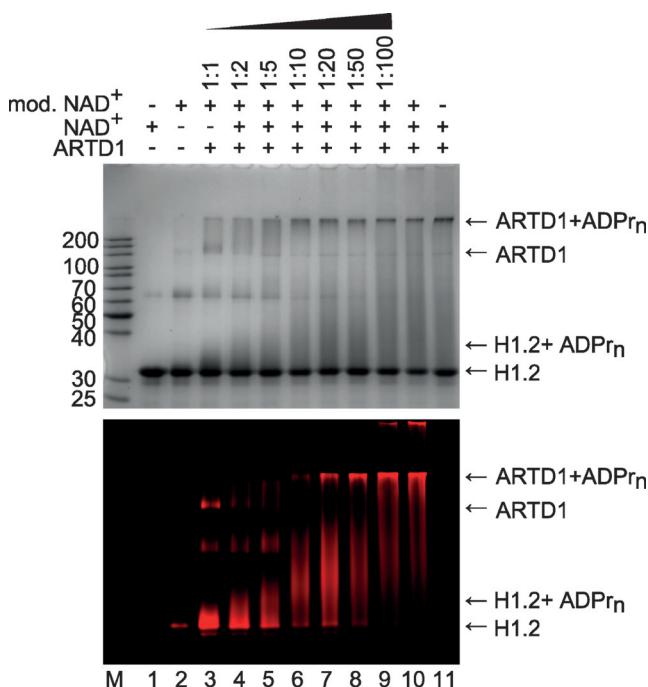


Abbildung 3. SDS-PAGE-Analyse der PARylierung von Histon H1.2 mit NAD⁺-Analogen **2** und natürlichem NAD⁺. Oben: Coomassie-Blue-Färbung; unten: TMR-Fluoreszenz. Die NAD⁺-Konzentration betrug 1 mM mit angegebenen Verhältnissen von modifiziertem zu unmodifiziertem NAD⁺. Kontrollreaktionen wurden mit natürlichem Substrat (Bahn 1 und 11) sowie ohne Zugabe von Enzym (Bahn 1 und 2) durchgeführt.

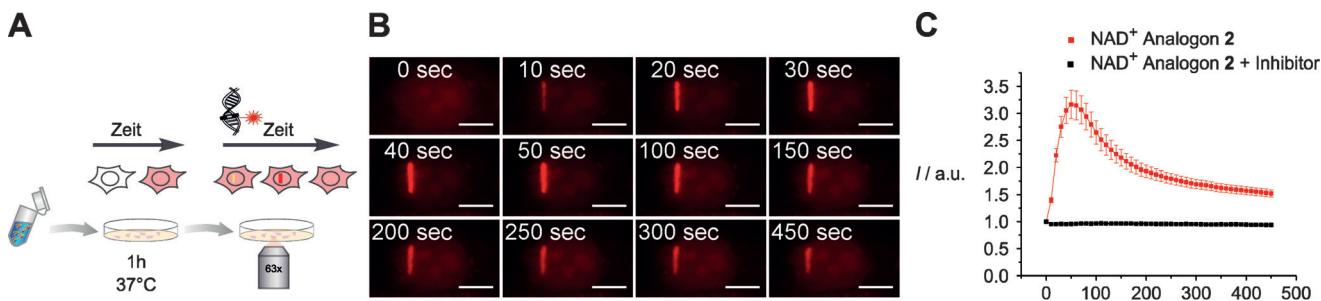


Abbildung 4. Beobachtung von PARylierung nach DNA-Schädigung in lebenden Zellen mithilfe des NAD⁺-Analogs **2**. A) Experimenteller Aufbau. HeLa-Zellen werden mit **2** beladen und zur DNA-Schädigung mikrobestrahlt. B) Exemplarische Sequenz der konfokalen Mikroskopiebilder. Maßstab: 7 μm. C) Quantitative Analyse der relativen Fluoreszenzverstärkung am Ort des DNA-Schadens im Vergleich zur Umgebung ($n=32$ Zellen). Kontrollexperimente wurden mit 10 μM ARTD-Inhibitor ABT888 ($n=28$ Zellen) durchgeführt. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler (SEM).

komplett verhindert. Dies weist darauf hin, dass die Anreicherung und der Einbau von **2** am DNA-Schaden auf die Aktivität von ARTD1 zurückzuführen ist.

Um die Modifizierung von ARTD1 mit fluoreszenzmärkierter PAR direkt visualisieren zu können, haben wir weitere Experimente unter Verwendung der FLIM-FRET-Mikroskopie durchgeführt. Dieser Ansatz wurde bereits erfolgreich für die proteinspezifische Detektion anderer posttranskriptionaler Modifikationen eingesetzt.^[20] Er basiert auf dem Beobachten des Förster-Resonanzenergetransfers zwischen zwei benachbarten Fluorophoren. Deshalb führten wir den FRET-Donor EGFP am Proteinrückgrat der ARTD1 ein. Der TMR-Marker am NAD⁺ diente dabei als FRET-Akzeptor (Abbildung 5 A). Wenn EGFP-ARTD1 mit TMR-markierter PAR modifiziert wird, kann FRET über die Reduktion der Fluoreszenzlebensdauer des EGFP detektiert werden. Dies ist eine der direktesten und robustesten Methoden, um FRET auslesen zu können (FLIM-FRET-Mikroskopie, für Details siehe die Hintergrundinformationen).

Zunächst führten wir Fluoreszenzlebensdauermessungen der EGFP-ARTD1 in vitro durch, indem wir entweder das aufgereinigte Protein (Abbildung S5) oder Lysate von HEK293T-Zellen verwendeten, die EGFP-ARTD1 exprimierten (Abbildung 5B). Die Reaktionsmischung mit

NAD⁺-Analogon **2**, natürlichem NAD⁺ und dsDNA wurde bei 37°C inkubiert und die PARylierung wurde in Echtzeit beobachtet. Fortlaufende Modifizierung des EGFP-ARTD1 mit mehreren TMR-markierten ADP-Riboseeinheiten führt zu einer markanten Abnahme der EGFP-Fluoreszenzlebensdauer, welche auf einen zunehmenden FRET hinweist. Der Effekt wurde nicht beobachtet, wenn die Reaktion in Abwesenheit von dsDNA oder nach Zugabe des ARTD-Inhibitors Olaparib^[21] durchgeführt wurde. Mithilfe von ADP-Ribosylierungsassays überprüften wir, dass der EGFP-Marker die Aktivität des EGFP-ARTD1 im Vergleich zum ARTD1-Wildtyp nicht beeinflusst (Abbildungen S6 und S7).

Nach erfolgreicher Messung der Lebenszeit in vitro arbeiteten wir darauf hin, PAR-Protein-Interaktionen in Zellen nachzuweisen. Dazu wurden HeLa-Zellen, die EGFP-ARTD1 exprimierten, mit Verbindung **2** beladen und wie oben beschrieben mit dem Laser mikrobestrahlt. Dies führte zu der Anreicherung der EGFP- und TMR-Fluoreszenzsignale an den bestrahlten Stellen (Abbildung S8A). Die Zellen wurden zwei bis drei Minuten nach der Bestrahlung fixiert und am FLIM-Mikroskop analysiert (Abbildung 5C). Die Fluoreszenzlebensdauer des EGFP-ARTD1 wurde für jeden Bildpunkt berechnet und in nach Intensität gewichteten Pseudofarben dargestellt (d.h. Pixel mit höherer Intensität erscheinen heller). Der Ort des DNA-Schadens kann durch das helle EGFP-Fluoreszenzsignal, das aus der Rekrutierung von EGFP-ARTD1 resultiert, identifiziert werden. In Kontrollproben ohne fluoreszenzmärktes NAD⁺ war die Fluoreszenzlebensdauer im ganzen Zellkern unverändert. Im Gegensatz dazu wiesen Regionen hoher EGFP-Intensität in Anwesenheit der Verbindung **2** eine signifikant reduzierte Lebensdauer des Donors auf, infolge von FRET zwischen EGFP-ARTD1 und der TMR-markierten PAR. Diese Beobachtung wird durch eine quantitative Analyse von 15 Zellen bestätigt (Abbildung 5D).

Ein wichtiger Wirkmechanismus der PARylierung ist die Rekrutierung von Proteinen an PAR-Ketten durch nichtkovalente Interaktion. Leider können derzeitige Methoden, die zur Identifizierung und Charakterisierung von spezifischen nichtkovalenten PAR-Bindedomänen^[22] verwendet werden, nicht im Kontext intakter Zellen durchgeführt werden. Da FRET auf der Nähe zweier Fluorophore zueinander

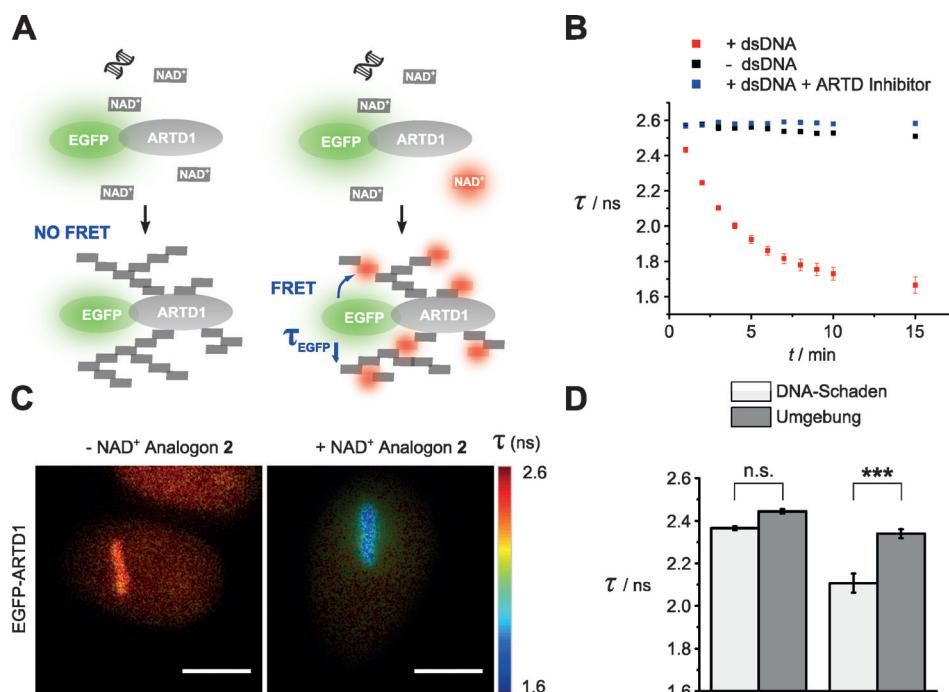


Abbildung 5. Fluoreszenzlebensdauer-basiertes Auslesen von PARylierung. A) Aktivierung von ARTD1 führt zu FRET zwischen EGFP und der TMR-Markierung am PAR-Polymer und wird durch die Abnahme der EGFP-Fluoreszenzlebensdauer detektiert. B) HEK293T-Zellen, die EGFP-ARTD1 exprimierten, wurden lysiert und die Extrakte wurden mit dsDNA, NAD⁺-Analogon **2** und natürlichem NAD⁺ inkubiert. Kontrollen wurden ohne dsDNA und mit ARTD-Inhibitor Olaparib durchgeführt. Die Fluoreszenzlebensdauern wurden bei 37°C gemessen. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler (SEM), $n=3$. C) HeLa-Zellen, die EGFP-ARTD1 exprimierten, wurden mit **2** beladen oder nicht behandelt, mikrobestrahlt und fixiert. Fluoreszenzlebensdauerbilder von EGFP-ARTD1 sind intensitätsgewichtet und in Pseudofarben dargestellt. Maßstab: 7 µm. D) Quantitative Analyse der Fluoreszenzlebensdauern von 15 Zellen. Mittelwerte \pm SEM sind dargestellt. Statistische Signifikanz wurde mittels Two-Way-ANOVA und Bonferroni Posttest bewertet. Das Signifikanzlevel ist mit n.s. = nicht signifikant, *** $p < 0.001$ angegeben.

beruht, schlussfolgerten wir, dass dieser Ansatz nicht nur geeignet ist, kovalente Modifizierung mit PAR sichtbar zu machen, sondern auch die Detektion nichtkovalenter Interaktion der PAR mit Proteinen ermöglicht. Wir überprüften diese Hypothese mithilfe des macroH2A-EGFP-Fusionsproteins als FRET-Donor.^[8b] Diese hochkonservierte Protein-domäne ist dafür bekannt, ADP-Ribose in nichtkovalenter Weise zu binden.^[8] HeLa-Zellen, die macroH2A exprimierten, wurden dazu mit Verbindung **2** behandelt, bestrahlt und anschließend mit FLIM-FRET wie beschrieben analysiert (Abbildungen S8B und S9A). In der Umgebung um die Bestrahlung unterscheidet sich die Fluoreszenzlebensdauer zwischen TMR-behandelten und unbehandelten Zellen nicht. Wesentlich ist, dass auch hier die EGFP-Fluoreszenzlebensdauer am DNA-Schaden nur in mit Verbindung **2** behandelten Zellen signifikant reduziert war (Abbildungen S9B und S9C). Demnach kann auch die nichtkovalente Interaktion von macroH2A-EGFP mithilfe fluoreszenzmarkierter PAR durch FLIM-FRET-Mikroskopie visualisiert werden.

Zusammenfassend haben wir das Potential eines neuen, fluoreszenzmarkierten NAD⁺-Analogons als Werkzeug für die optische Visualisierung der Protein-PARYlierung beschrieben. Dazu wurde das Molekül kovalent mit dem Fluorophor TMR modifiziert. Trotz des sterischen Anspruchs erwies sich das NAD⁺-Analogon als kompetitives und effektives Substrat von ARTD1 in vitro und in Zellen. Es war uns daher möglich, sowohl die Bildung als auch den Abbau von PAR nach erfolgter DNA-Schädigung in Echtzeit zu verfolgen. Nach bestem Wissen ist dies das erste Mal, dass der Umsatz von PAR direkt auf der Ebene des Polymers in Zellen beobachtet wurde. In Kombination mit FLIM-FRET-Mikroskopie ist das neue Analogon **2** ein leistungsfähiges Werkzeug, um proteinspezifische PARYlierung in Zellen untersuchen zu können. Unsere Ergebnisse bereiten daher die Basis für zukünftige Experimente, in denen sowohl kovalente als auch nichtkovalente Interaktionen mit PAR für ausgewählte Proteine untersucht werden. In-vitro-Studien wie beispielsweise enzymspezifische Screenings für neue und klinisch relevante ARTD1-Inhibitoren werden sehr von dieser Methode profitieren, da die Fluoreszenzlebensdauer ein schnelles Auslesen der ARTD1-Aktivität in Echtzeit ermöglicht. Wir sind davon überzeugt, dass unser Ansatz sehr hilfreich bei Lebendzelluntersuchungen von PARYlierungen sein wird – sowohl für die Identifizierung und Charakterisierung verschiedener PAR synthetisierender und abbauender Enzyme als auch für bisher unbekannte Proteintargets. Dies war bisher im Kontext von intakten Zellen nicht möglich.

Danksagung

Diese Arbeiten wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB969, TP B08) und der Konstanz Research School Chemical Biology unterstützt. Wir bedanken uns bei der Deutschen Telekom Stiftung (A.B.) und beim Beilstein-Institut zur Förderung der Chemischen Wissenschaften (S.W.) für Stipendien und bei der FlowKon Facility der Universität Konstanz für Hilfestellung bei der Durchflusszytometrie. Das Plasmid pcDNA3.1-macroH2A1.1-GFP wurde freundlicher-

weise von A. Ladurner zur Verfügung gestellt. Wir danken A. Leitenstorfer für wissenschaftlichen Rat bei der Mikrobestrahlung mit Femtosekunden-Laserpulsen.

Stichwörter: DNA-Reparatur · FRET · NAD⁺ · Poly(ADP-Ribose) · Posttranskriptionale Modifikationen

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 11256–11260
Angew. Chem. **2016**, *128*, 11423–11428

- [1] a) L. Virág, *Mol. Aspects Med.* **2013**, *34*, 1043–1045; b) W. L. Kraus, *Mol. Cell* **2015**, *58*, 902–910.
- [2] B. A. Gibson, W. L. Kraus, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 411–424.
- [3] J. C. Ame, V. Rolli, V. Schreiber, C. Niedergang, F. Apiou, P. Decker, S. Müller, T. Hoger, J. Menissier-de Murcia, G. de Murcia, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 17860–17868.
- [4] K. W. Ryu, D.-S. Kim, W. L. Kraus, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 2453–2481.
- [5] a) P. Bai, C. Cantó, *Cell Metab.* **2012**, *16*, 290–295; b) F. Y. Feng, J. S. de Bono, M. A. Rubin, K. E. Knudsen, *Mol. Cell* **2015**, *58*, 925–934.
- [6] K. Hatakeyama, Y. Nemoto, K. Ueda, O. Hayaishi, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 14902–14911.
- [7] J. H. Küpper, L. van Gool, M. Müller, A. Bürkle, *Histochem. J.* **1996**, *28*, 391–395.
- [8] a) G. I. Karras, G. Kustatscher, H. R. Buhecha, M. D. Allen, C. Pugieux, F. Sait, M. Bycroft, A. G. Ladurner, *EMBO J.* **2005**, *24*, 1911–1920; b) G. Timinszky, S. Till, P. O. Hassa, M. Hothorn, G. Kustatscher, B. Nijmeijer, J. Colombelli, M. Altmeyer, E. H. K. Stelzer, K. Scheffzek, M. O. Hottiger, A. G. Ladurner, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 923–929.
- [9] O. Mortusewicz, J.-C. Amé, V. Schreiber, H. Leonhardt, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 7665–7675.
- [10] a) H. Jiang, J. H. Kim, K. M. Frizzell, W. L. Kraus, H. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9363–9372; b) Y. Wang, D. Rösner, M. Grzywa, A. Marx, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 8159–8162; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 8298–8301; c) I. Carter-O'Connell, H. Jin, R. K. Morgan, L. L. David, M. S. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 5201–5204.
- [11] a) S. Wallrodt, A. Buntz, Y. Wang, A. Zumbusch, A. Marx, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 7660–7664; *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 7790–7794; b) E. Bakondi, P. Bai, É. Szabó, J. Hunyadi, P. Gergely, C. Szabó, L. Virág, *J. Histochem. Cytochem.* **2002**, *50*, 91–98.
- [12] N. P. Westcott, H. C. Hang, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *23*, 56–62.
- [13] E. Kun, A. C. Chang, M. L. Sharma, A. M. Ferro, D. Nitecki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 3131–3135.
- [14] J. P. Gagné, C. Ethier, D. Defoy, S. Bourassa, M. F. Langlier, A. A. Riccio, J. M. Pascal, K. M. Moon, L. J. Foster, Z. Ning, D. Figgeys, A. Droit, G. G. Poirier, *DNA Repair* **2015**, *30*, 68–79.
- [15] a) O. Popp, S. Veith, J. Fahrer, V. A. Bohr, A. Bürkle, A. Mangerich, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 179–188; b) M. Malanga, S. Bachmann, P. L. Panzeter, B. Zweifel, F. R. Althaus, *Anal. Biochem.* **1995**, *228*, 245–251.
- [16] M. C. Morris, J. Depollier, J. Mery, F. Heitz, G. Divita, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 1173–1176.
- [17] J. M. F. Fischer, O. Popp, D. Gebhard, S. Veith, A. Fischbach, S. Beneke, A. Leitenstorfer, J. Bergemann, M. Scheffner, E. Ferrando-May, A. Mangerich, A. Bürkle, *FEBS J.* **2014**, *281*, 3625–3641.
- [18] D. Trautlein, M. Deibler, A. Leitenstorfer, E. Ferrando-May, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, e14.
- [19] C. K. Donawho et al., *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 2728–2737.

- [20] a) W. Lin, L. Gao, X. Chen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *28*, 156–163; b) F. Doll, A. Buntz, A.-K. Späte, V. F. Schart, A. Timper, W. Schrimpf, C. R. Hauck, A. Zumbusch, V. Wittmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 2262–2266; *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 2303–2308.
- [21] K. A. Menear, C. Adcock, R. Boulter, X.-l. Cockcroft, L. Copsey, A. Cranston, K. J. Dillon, J. Drzewiecki, S. Garman, S. Gomez, H. Javaid, F. Kerrigan, C. Knights, A. Lau, V. M. Loh, I. T. W. Matthews, S. Moore, M. J. O'Connor, G. C. M. Smith, N. M. B. Martin, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 6581–6591.
- [22] J. Krietsch, M. Rouleau, E. Pic, C. Ethier, T. M. Dawson, V. L. Dawson, J. Y. Masson, G. G. Poirier, J. P. Gagne, *Mol. Aspects Med.* **2013**, *34*, 1066–1087.

Eingegangen am 30. Mai 2016
Online veröffentlicht am 28. Juli 2016