

**NEJ2: Identifizierung und Charakterisierung eines neuen
Proteins in Säugern und *Saccharomyces cerevisiae*,
assoziiert mit Telomerstrukturen und der Nicht-
Homologen Rekombination von DNA-
Doppelstrangbrüchen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Kijwasch Shah-Hosseini
aus Oldenburg in Oldenburg

2005

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Roswitha Nischt
Prof. Dr. Jens Brüning

Tag der mündlichen Prüfung: 05. Juli 2005

„Ernst zu nehmende Forschung erkennt man daran, daß plötzlich zwei Probleme existieren, wo es vorher nur eines gegeben hat.“

(Thorstein Bunde Veblen (1857-1929),
Soziologe u. Ökonom)

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Modifikationen an der DNA durch endogene und exogene Substanzen	1
1.2. Zelluläre Mechanismen der DNA-Reparatur	2
1.3. Vergleich von Homologer Rekombination und Nicht-Homologer Rekombination	4
1.4. Mechanismen der Homologen Rekombination	5
1.5. Nicht-Homologe Rekombination in Säuger- und Hefezellen.....	8
1.5.1. Der Mechanismus der Nicht-Homologen Rekombination	8
1.6. Beziehung zwischen Nicht-Homologer Rekombination, DNA-Endprotektion, Telomerprotektion und genomischer Stabilität	14
1.7. Phänotypen rekombinationsdefizienter Zellen und Organismen	17
2. ZIELSETZUNG	21
3. MATERIAL UND METHODEN	22
3.1. Material.....	22
3.1.1. Zellkultur	22
3.1.1.1. Zellen	22
3.1.1.2. Reagenzien, Lösungen und Puffer	22
3.1.2. Molekularbiologische Reagenzien	23
3.1.3. Gele zur Auftrennung von DNA	23
3.1.4. Lösungen für den Southern- und Northernblot	24
3.1.5. Two-Hybrid-Puffer	24
3.1.6. Lösungen für die Säulenchromatographie	24
3.1.6.1. Lösungen zur Aufreinigung von Poly-Histidin- fusionierten Proteinen	24
3.1.6.2. Lösungen zur Aufreinigung von Gluthationen-S-Transferase (GST)- fusionierten Proteinen.....	25
3.1.7. Lösungen zur Proteinanalyse	25
3.1.8. Medien zur Kulturvierung verschiedener Bakterienstämme	26
3.1.9. Medien zur Kulturvierung verschiedener Hefestämme	26
3.1.10. Verwendete <i>Escherichia coli</i> -Stämme	27
3.1.11. Verwendete <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme	28
3.1.12. Immunhistochemie	28
3.1.13. Plasmide, Vektoren und Primer	29
3.1.14. Antikörper	32
3.2. Methoden	33
3.2.1 Techniken der DNA-Manipulation	33
3.2.1.1. Polymerasekettenreaktion	33
3.2.1.2. Aufreinigung von DNA-Fragmenten	34
3.2.1.3 Verdau von DNA	34
3.2.1.4. Dephosphorylierung der 5'-Phosphat Termini von DNA-Fragmenten	34
3.2.1.5. Elektrophoretische Auftrennung von DNA	34
3.2.1.6. DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen	35
3.2.1.7. DNA-Ligation	35
3.2.1.8. <i>Escherichia coli</i> -Transformation mit rekombinanter DNA	35
3.2.1.9. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	35
3.2.1.10. Subklonierung von DNA-Fragmenten	36

3.2.1.11. Nukleinsäuresequenzierung	36
3.2.1.12. Southernblot-Analyse genomischer DNA.....	36
3.2.1.12.1. Präparation von genomischer <i>S. cerevisiae</i> -DNA	36
3.2.1.12.2. Transfer von DNA-Molekülen auf eine Nylonmembran.....	37
3.2.1.12.3. Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten	37
3.2.1.13. Northernblot-Analyse.....	37
3.2.2. Homologiesuche mit dem Basic Local Alignment Search Tool.....	38
3.2.3. Das Yeast Two-Hybrid System	39
3.2.4. Sporulation von Hefen	41
3.2.4.1. Kreuzung von Hefestämmen.....	41
3.2.4.2. Sporulation und Tetradenanalyse.....	41
3.2.5. Überexpression von rekombinanten Proteinen	42
3.2.5.1. Überexpression rekombinanter Proteine in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und Gewinnung von Proteinextrakten.....	42
3.2.5.2. Überexpression von rekombinanten Proteinen in <i>E.coli</i> und Gewinnung von Proteinextrakten.....	42
3.2.6. Säulenchromatographie.....	43
3.2.6.1. Nickel-NTA-Agarose-Affinitätschromatographie	43
3.2.6.2. Glutathion-Affinitätschromatographie.....	44
3.2.6.3 Interaktionsnachweis zweier Proteine durch Coexpression und Coaffinitätsreinigung mit Hilfe eines GST-Anhanges	44
3.2.7. Proteinanalyse	45
3.2.7.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	45
3.2.7.2. Coomassie Färbung	45
3.2.7.3. Westernblot.....	45
3.2.7.4. Immunoblotanalyse	45
3.2.8. Überexpression von rekombinanten Proteinen in humanen Zellen.....	46
3.2.8.1. Transfektion humaner Zellen	47
3.2.8.2. Fixierung von Zellen.....	47
3.2.9. Immunhistologische Techniken	47
3.2.10. Komplementation des <i>E.coli recG</i> Phänotyps durch Nej2-Proteine.....	48
4. ERGEBNISSE	49
4.1. Identifikation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Nej2p. Ein neuer Faktor mit Assoziation zur Nicht-Homologen Rekombination.....	49
4.2. Identifizierung orthologer Protein- und Gensequenzen von NEJ2.....	50
4.2.1. Analyse der möglichen kompletten cDNA-Sequenzen.....	55
4.2.2. Kreuzreaktion des anti-scNej2p Antikörpers mit humanem Nej2.....	58
4.3. Analyse der Expression von <i>hNEJ2</i> -mRNA in verschiedenen humanen Geweben.....	59
4.4. Analyse der Interaktion zwischen hNej2 und XRCC4	61
4.4.1 Interaktion von hNej2 und XRCC4 im Two-Hybrid System.....	61
4.4.2. Coaufreinigung von rekombinantem XRCC4 und hNej2.....	62
4.4.3. Untersuchungen zur Eingrenzung der Interaktionsdomäne von hNej2 mit XRCC4	63
4.5. Versuche zur funktionellen Komplementierung der Letalität eines <i>scnej2</i> -Hefestammes durch episodale Überexpression von <i>hNEJ2</i> und <i>scNEJ2</i>	65
4.6. Versuch der Komplementierung eines <i>recG</i> -Phänotyps durch NEJ2	67
4.7. Lokalisation von Nej2 in humanen Zellen und in <i>S. cerevisiae</i>	69
4.7.1. Lokalisation von scNej2p in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	69
4.7.2. Versuch der Etablierung einer <i>hNEJ2</i> überexprimierenden Zelllinie.....	70
4.7.3. Colokalisation von hNej2 mit nukleären Proteinen in humanen Fibroblasten.....	75
4.8. Expression und Aufreinigung eines Antigens zur Herstellung eines Antikörpers gegen hNej2-Protein.....	79

4.8.1. Analyse der Löslichkeit verschiedener rekombinanter hNej2 Fragmente	80
4.9. Herstellung und Testung eines anti-hNej2-Antikörpers.....	82
4.10. Inhibierende Wirkung von Nej2-Protein auf die Nicht-Homologe Rekombination.....	83
4.10.1. Konkurrenz von Dnl4p und scNej2p um die Lif1p-Bindungsdomäne, analysiert im Three- Hybrid.....	83
4.10.2. Einfluss von scNej2p auf die Effizienz der Nicht-Homologen Rekombination in <i>S. cerevisiae</i>	85
4.10.3. Aufreinigung von DNA-Ligase IV/XRCC4 Komplexen	86
4.10.4. Aufreinigung von rekombinatem hNej2	87
4.10.5. Einfluss von hNej2 auf die Ligationseffizienz der DNA-Ligase IV/XRCC4-Komplexe und der T4-DNA-Ligase <i>in vitro</i>	88
4.11. Untersuchung der DNA-Bindungseigenschaften von hNej2	90
5. DISKUSSION	91
5.1. Strukturelle und funktionelle Aspekte der Interaktion zwischen scNej2p und Lif1p.....	91
5.2. NEJ2: Homologien, konservierte Domänen, Expressionsmuster und Interaktionen	93
5.3. Interaktion zwischen hNej2 und XRCC4: Funktionelle Aspekte und mögliche <i>in vivo</i> Relevanz	97
5.4. Zelluläre Lokalisation von hNej2 und scNej2p	100
5.5. Colokalisation von hNej2 mit nukleären Proteinen	101
5.6. <i>In vitro</i> Bindungs- und Ligations-Assays mit rekombinantem hNej2.....	104
6. AUSBLICK	105
Kurzzusammenfassung.....	107
Abstract.....	108
7. LITERATUR	109
Danksagung.....	126
Erklärung	127
Lebenslauf	128

Abkürzungsverzeichnis

::	Genfusion
'	Minute
6xHis	6x Histidin
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
AT	Ataxia-Telangiectasia
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
bp	Basenpaar(e)
cDNA	Copy DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PKcs	DNA- abhängige Protein-Kinase katalytische Untereinheit
Dnl4p	<i>S. cerevisiae</i> DNA-Ligase 4 (Protein)
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
DSBR	DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur
eCFP	verstärktes (enhanced) Cyan fluoreszierendes Protein
<i>et al.</i>	et altera
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
Gal-AD	β -Galaktosidase Aktivierungsdomäne
Gal-BD	β -Galaktosidase DNA-Bindungsdomäne
GST	Glutathionen S-Transferase
h	Stunde
hNej2	humanes Nej2 Protein
<i>hNEJ2</i>	humanes Nej2 Gen
HR	Homologe Rekombination
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kDa	Kilodalton
Lif1p	Ligase 4 interagierender Faktor 1 (Protein)
M	Molar
Mre11	Meiotic recombination11
MRN	Mre11/Rad50/NBS1
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRX	Mre11p/Rad50p/Xrs2p
NBS1	Nijmegen breakage syndrome 1
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEJ2	<u>n</u> on-homologous <u>e</u> nd-joining assoziiert 2
NHEJ	Nicht-Homologe Rekombination (non-homologous end-joining)
OD	Optische Dichte
ORF	open reading frame, offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PML	promyelocytische Leukemie
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

<i>scNEJ2</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Nej2 Gen
scNej2p	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Nej2 Protein
SDS	Natrium-n-Dodecylsulfat
sek.	Sekunden
SMC	Structural Maintenance of Chromosomes Proteins
snRNP	kleine nukleäre Ribonukleoproteine
SV40 LTA	Simian Virus 40 large tumor antigen
TFR	Telomere Repeat Factor
ü/N	über Nacht
XRCC4	X-Ray Cross- Complementing 4
yeGFP	verstärktes Hefe grün fluoreszierenden Protein

1. Einleitung

1.1. Modifikationen an der DNA durch endogene und exogene Substanzen

Die Struktur der DNA als Träger der genetischen Information ist konstant. Noxen, die diese verändern, sind der Erhalt dieser Struktur und die Konstanz seiner Information essentiell für das Überleben einer Zelle oder eines Organismus. Die DNA ist innerhalb der Zelle das einzige Molekül, das spezifisch repariert wird. Selbst einfache Zellen haben Mechanismen zur Protektion dieser Struktur entwickelt.

Sowohl endogene Faktoren, wie beispielsweise Produkte des zellulären Metabolismus oder chemische Instabilität, als auch exogene Faktoren, wie Umwelttoxine, ionisierende Strahlung oder Chemotherapeutika können die DNA modifizieren. Zu den Modifikationen an der DNA zählt z.B. der Verlust von bestimmten chemischen Gruppen an einzelnen Basen, was zu einer Fehlpaarung führen kann. Chemikalien wie z.B. freie Sauerstoff-, Peroxyd- und Hydroxyl-Radikale oder H_2O_2 , die durch Oxidationen oder ionisierende Strahlung freigesetzt werden, können zu oxidativen Schädigungen von DNA-Basen und somit ebenso zu Fehlpaarungen führen.

Auch exogene Umweltgifte und zelleigene Metaboliten können innerhalb von DNA-Basen bestimmte chemische Gruppen modifizieren. Ein Beispiel hierfür ist die Deaminierung, welche durch die Instabilität der primären Aminogruppe der Basen ermöglicht wird. Hierbei wird die Base in die Ketoform überführt. Eine durch UV ausgelöste Form der DNA-Modifikation ist die Bildung von Thymidindimeren, die die häufigste Form von Photoprodukten darstellt. Fehler in der DNA-Replikation, vermittelt durch DNA-Polymerasen, resultieren in Deletionen oder Insertionen.

Der Verlust gesamter Basen an der relativ labilen Glykosyl-Bindung am 1'-Ende der Pentose zur Base, führt zu apurinen oder apyrimidinen Resten.

Schwerere Schäden stellen Querverbindungen von DNA-Einzelsträngen miteinander oder DNA-Einzelsträngen mit Proteinen, induziert durch alkylierende Agenzien, wie Psoralenen und UVA oder ionisierender Strahlung dar.

Ein DNA-Doppelstrangbruch (DSB) ist einer der schwerwiegendsten DNA-Schäden in der Zelle und kann zur Auslösung einer Reparaturantwort oder zum Zelltod führen. DSB werden durch eine Reihe von verschiedenen Mechanismen induziert, wie z.B.

durch ionisierende Strahlung, durch UVA, durch den Zusammenbruch der Replikationsgabeln, wenn die Replikations-Maschinerie auf einen Einzelstrangbruch im DNA-Template trifft oder durch das Schneiden von Endonukleasen, während der meiotischen Rekombination bzw. bei genetischen Rearrangements der Immunglobuline [Karran *et al.*, 2000; Norbury *et al.*, 2001; Bassing *et al.*, 2002; Rapp und Greulich, 2004].

1.2. Zelluläre Mechanismen der DNA-Reparatur

Die Vielzahl der möglichen oben beschriebenen DNA-Veränderungen haben unterschiedliche Konsequenzen hinsichtlich der strukturellen Auswirkungen auf das DNA-Molekül. Innerhalb der Evolution haben sich für kleinere Modifikationen an einzelnen Basen, für größere Addukte an einzelnen Basen oder für unterschiedliche Formen von Strangbrüchen verschiedene Reparaturwege entwickelt. Diese sind teilweise von niedrigen zu höheren Eukaryonten konserviert.

Vereinfacht dargestellt haben sich in Eukaryonten mindestens sechs verschiedene DNA-Reparaturwege entwickelt.

Die Basen-Exzisions-Reparatur ist ein Mechanismus, der in den meisten bekannten Organismen vorkommt [Gros *et al.*, 2002; Izumi *et al.*, 2003; Seeberg *et al.*, 1995] und ist ein Reparaturweg, bei dem chemisch veränderte Basen entfernt werden [Breen und Murphy, 1995]. Im Unterschied zu anderen humanen DNA-Reparaturmechanismen sind keine genetisch bedingten humanen Syndrome bekannt, die auf Störungen der Basen-Exzisions-Reparatur beruhen.

Nukleotidfehlpaarungen können durch inkorrekten Einbau durch DNA-Polymerasen oder durch Schäden in den Nukleotid-Vorstufen im zellulären Nukleotid-Pool verursacht werden. Die DNA-Mismatch-Reparatur ist ein Reparatursystem, das für die Reparatur von Nukleotidfehlpaarungen verantwortlich ist und beinhaltet die Erkennung und Korrektur inkorrekt gepaarter Nukleotide in der DNA [Eshleman und Markowitz, 1996]. Durch Schäden in der DNA-Mismatch-Reparatur wird das „hereditäre nicht polypöse Kolorektalakarzinom“ [Liu *et al.*, 1996; Fedier und Fink, 2004] und das Muir-Torre-Syndrom, welches zu Tumoren in verschiedenen Organen führt [Hartig *et al.*, 1995], verursacht.

Die Nukleotid-Exzisionsreparatur ist ein DNA-Reparatursystem, das für die Exzision von komplexeren Addukten verantwortlich ist. Enge Verbindungen der Nukleotid-

Exzisionsreparatur bestehen zur Transkriptions- gekoppelten Reparatur und der DNA-Interstrang-Crosslinkreparatur [Svejstrup, 2002]. Mutationen in Proteinen mit Funktionen in der Nukleotid-Exzisionsreparatur führen beim Menschen zu unterschiedlichen Manifestationen der Erkrankungen Trichothiodystrophie oder Xeroderma Pigmentosum [Chu *et al.*, 1996]. Die Trichothiodystrophie ruft äußerst heterogene Krankheitsbilder hervor. Xeroderma Pigmentosum ist durch eine übermäßige Lichtempfindlichkeit und durch eine 2000fach gesteigerte Häufigkeit von Hauttumoren gekennzeichnet [Thielmann *et al.*, 1991]. Mutationen in Proteinen mit Funktionen in der Transkriptions- gekoppelten Reparatur führen zum Cockayne Syndrom [Chu *et al.*, 1996]. Das Cockayne Syndrom ist eine autosomal rezessive Krankheit, die u. a. durch Wachstumsstörungen, fortschreitender neuronaler Retardierung und ausgeprägter Photosensitivität gekennzeichnet ist [Venema *et al.*, 1990].

Karzinogene und Chemotherapeutika wie Psoralene, Cisplatin oder Mitomycin C können kovalente Querverbindungen zwischen den Einzelsträngen eines DNA-Doppelstranges bilden. Die DNA-Interstrang-Crosslinkreparatur ist in der Lage diese zu entfernen und den DNA-Strang fehlerfrei zu resynthetisieren. Dazu wird ein Einzelstrang des betroffenen Abschnittes an zwei Stellen eingeschnitten und dieser mit der intakten entsprechenden doppelsträngigen Stelle des Schwesterchromatids homolog gepaart. Von diesem wird der entsprechende Einzelstrangabschnitt in die entstandene Lücke übertragen. Zur Entfernung des Crosslinks wird der zweite Einzelstrang des betroffenen DNA-Doppelstranges ebenfalls zweifach geschnitten und entfernt. Letztlich wird ein neuer komplementärer Einzelstrang synthetisiert [McHugh *et al.*, 2001]. Fanconi-Anämie-Patienten weisen einen Defekt in diesem Reparatursystem auf. Die Hauptsymptome dieser Krankheit sind Knochenmarkhypoplasie, Pigmentierungsanomalien, sowie akute Leukämien [Levitus *et al.*, 2004].

DNA-Doppelstrangbrüche stellen für die Zelle Schäden dar, die mit einem hohen Risiko des Verlustes an genetischer Information oder der Translokation von chromosomalen Abschnitten gekoppelt sind. Diese Läsionen sind mit einer hohen Letalität behaftet. Eukaryontische Zellen haben für diese Läsionen mindestens zwei konservierte DNA-Doppelstrangbruchreparaturwege entwickelt. Dies sind die „Homologe Rekombination“ (HR), sowie die „Nicht-Homologe Rekombination“ („non-homologous end-joining“ [NHEJ]). Außer den beiden Hauptwegen der DNA-

Doppelstrangbruchreparatur (DSBR) ist noch das homologieabhängige „singelstrand annealing“ zu erwähnen, dessen Bedeutung noch unklar ist, jedoch Komponenten aus der HR und des NHEJ beinhaltet [van den Bosch *et al.*, 2002]. Die heutige mechanistische Vorstellung der beiden Hauptwege der DSBR (insbesondere des NHEJ), ihre physiologischen Funktionen, sowie Konsequenzen von Fehlfunktionen einzelner Faktoren sollen im folgenden Kapitel ausführlicher besprochen werden.

1.3. Vergleich von Homologer Rekombination und Nicht-Homologer Rekombination

Der DSB ist einer der schwersten DNA-Schäden und unrepariert belassen, kann er für die Zelle letal sein. Ein DSB ist unter bestimmten Bedingungen potentieller Auslöser eines Zellzyklusarrests oder von Apoptose [Jackson *et al.*, 2001]. Einige Proteine überwachen die Balance zwischen Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur und Apoptose in der Zelle [Dasika *et al.*, 1999; Bernstein *et al.*, 2002].

DSB-Reparaturwege sind zwischen niederen und höheren Eukaryonten konserviert. NHEJ ist in höheren Eukaryonten im Gegensatz zu niederen Eukaryonten der dominante Weg gegenüber der HR, was wahrscheinlich in den prinzipiell andersartig organisierten Genomen begründet liegt. Hefen z.B. besitzen ein relativ dicht gepacktes Genom mit wenigen repetitiven Sequenzen. Im Gegensatz dazu hat das Säugergenom ein repetitiv geprägtes Genom (etwa 40 % des menschlichen Genoms) [Charlesworth *et al.*, 1994], was die Gefahr von pop-out Deletionen oder Translokationen bei HR in sich bergen würde, da repetitive Sequenzen vom HR-Mechanismus als homologe Sequenzen betrachtet werden könnten.

Der grundlegende Unterschied zwischen NHEJ und HR ist die Abhängigkeit der HR von DNA-Homologien, wohingegen NHEJ keine oder nur kleinere Homologien nutzt. Allgemein werden die Unterschiede der beiden Hauptmechanismen der DSBR von Säugern kontrovers diskutiert [Kanaar *et al.*, 1998; Karran *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2001], allgemeiner Konsens ist jedoch, dass das NHEJ eine wichtigere Rolle als die HR in sich mitotisch teilenden Zellen spielt [Jackson *et al.*, 1995]. Es wird angenommen, dass die HR in Säugern eine grundlegendere Rolle während der Mitose, in der späten S- und in der G2-Phase des Zellzyklus, wenn die Schwesterchromatiden als Template dienen können, übernimmt [Karran *et al.*, 2000; Morrison *et al.*, 2000], wohingegen NHEJ in der G1 und in der frühen S-Phase

dominiert [Lee *et al.*, 1997; Takata *et al.*, 1998]. Die DSBR wird während der Replikation von der HR übernommen [Karran *et al.*, 2000; Haber, 1999b], wobei ein DSB während der Replikation kein seltenes Ereignis ist [Thomson *et al.*, 2002]. Möglicherweise wird NHEJ in der späten S-, in der G2-Phase und während der Replikation durch unbekannte Proteine inhibiert. Bisherige Studien, die das relative Verhältnis von HR und NHEJ in humanen Zellen untersucht haben, sind teilweise widersprüchlich. In humanen Gliomzellen beträgt der Anteil der HR durchschnittlich 10 %, wohingegen 90 % der DSB durch NHEJ repariert werden [Valerie *et al.*, 2003]. In CHO-Zellen (chinesischen Hamster Ovarien) wurde der relative Anteil der HR an der gesamten DSBR auf 10 bis 50 % geschätzt [Sargent *et al.*, 1997; Liang *et al.*, 1998].

Die Bevorzugung von NHEJ in Säugern könnte einer der Gründe sein, warum „Gene Targeting“-Strategien, welche durch HR vermittelt werden, in höheren Organismen sehr ineffizient im Vergleich zur Hefe sind. In diesem Fall würde eine Inhibierung des NHEJ in Säuger-, Pflanzen und Insektenzellen möglicherweise zu einer effektiveren Integration von DNA-Sequenzen in homologe DNA-Loci führen. Beobachtungen in CHO-Zellen haben eine bilaterale Regulation zwischen HR und NHEJ aufgezeigt, wobei die Repression einer der beiden DSB-Reparaturwege zu einer Steigerung der Aktivität des jeweiligen anderen Reparaturweges führte [Richardson *et al.*, 2000a; Allan *et al.*, 2002].

1.4. Mechanismen der Homologen Rekombination

Viele Daten über den Mechanismus der Homologen Rekombination wurden im Hefemodell gewonnen. Daher sollen im Folgenden kurz das Modell der HR aus *Saccharomyces cerevisiae* und dann Gemeinsamkeiten und Unterschiede zum humanen Modell diskutiert werden. Initial wird in Hefen ein DSB durch Rad52p erkannt und die Läsion durch den Rad50p-Mre11p-Xrs2p-(MRX)-Komplex von 5' in 3'-Richtung nukleolytisch prozessiert. Es entsteht ein einzelsträngiger 3'-Überhang an den das Rad51-Protein bindet. Rad51p, welches als das zentrale Protein der HR angesehen werden kann, findet an dem nicht geschädigten homologen DNA-Strang den homologen Bereich für das defekte Fragment und katalysiert die Stranginvasion des geschädigten Stranges in die homologe Region. Das 3'-Ende des geschädigten DNA-Moleküls wird durch eine DNA-Polymerase verlängert und durch DNA-Ligase I ligiert, wobei der intakte Strang als Vorlage dient. Nach der DNA-Synthese wird die

so genannte Holliday-Struktur durch Einschneiden und Religation gelöst. Es resultieren zwei intakte Stränge [Modesti und Kanaar, 2001].

In höheren Eukaryonten ist die HR möglicherweise komplizierter (Abb. 1). Darauf deutet u. a. hin, dass es außer den gefundenen HR-Faktoren aus der Hefe, die alle entsprechende Homologe im Menschen haben, es z.B. Rad51-Paraloga (Rad51B, Rad51C und Rad51D) im Menschen gibt, die in der Hefe keine Entsprechungen finden. Zudem scheint es einen Zusammenhang zwischen den humanen Proteinen BRCA1 bzw. BRCA2 und der HR zu geben, da der Funktionsverlust dieser Proteine zu einer verminderten HR-Effizienz führt. Die BRCA-(breast cancer susceptibility) Proteine haben keine Homologen in der Hefe und sind daher für den Hauptmechanismus der HR möglicherweise nicht notwendig [Modesti und Kanaar, 2001]. Sie könnten eine logistische Rolle innerhalb der DNA-Reparatur in einem komplexeren Genom haben. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen Rad51 und BRCA2 die DNA-Bindungsfähigkeit von Rad51 reguliert [Davies *et al.*, 2001]. Der MRX-Komplex der Hefe und der homologe Rad50-Mre11-NBS1-(MRN)-Komplex des Menschen sind sowohl in der HR als auch im NHEJ involviert. Stämme mit deletiertem *rad50*, *mre11* oder *xrs2* sind sensitiv auf DNA-schädigende Agenzien [Bresan *et al.*, 1999; Game und Mortimer, 1974; Johzuka und Ogawa, 1995; Tsubouchi und Ogawa, 1998]. Daher geht man von einer gemeinsamen Rolle des Komplexes in der DNA-Reparatur aus. Rad50p und Xrs2p beeinflussen die Substratbindungsfähigkeit des MRX-Komplexes und die Nukleaseaktivität von Mre11p (Meiotic recombination 11 protein) [Trujillo *et al.*, 2003; Trujillo und Sung, 2001]. Sowohl der MRX- als auch der humane MRN-Komplex spielen eine Rolle bei der Initiation des Intra-S-Phasen-Kontrollpunktes im Bezug auf eine DNA-Schadensantwort. NBS1 und Xrs2p werden jeweils durch die Kinasen der ATM-Familie (Ataxia telangiectasia mutated) als Antwort auf DNA-Schäden phosphoryliert [D'Amours und Jackson, 2001; Lim *et al.*, 2000; Usui *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2000b; Zhao *et al.*, 2001]. Diese Kontrollpunktfunktion in Kombination mit der DNA-Bindungsfähigkeit und Nukleaseaktivität verursacht wahrscheinlich die Komplexität des Phänotyps eines Stammes mit *mrx*-Deletion. Der Verlust einer der Komponenten des MRN-Komplexes im Menschen führt zu schwerwiegenden Krankheiten, wie z.B. die „Ataxia-Telangiectasia-Like Disorder“, welche durch eine Mutation von *mre11* hervorgerufen wird oder das „Nijmegen Breakage Syndrom“, welches im Kapitel 1.7. näher beschrieben wird.

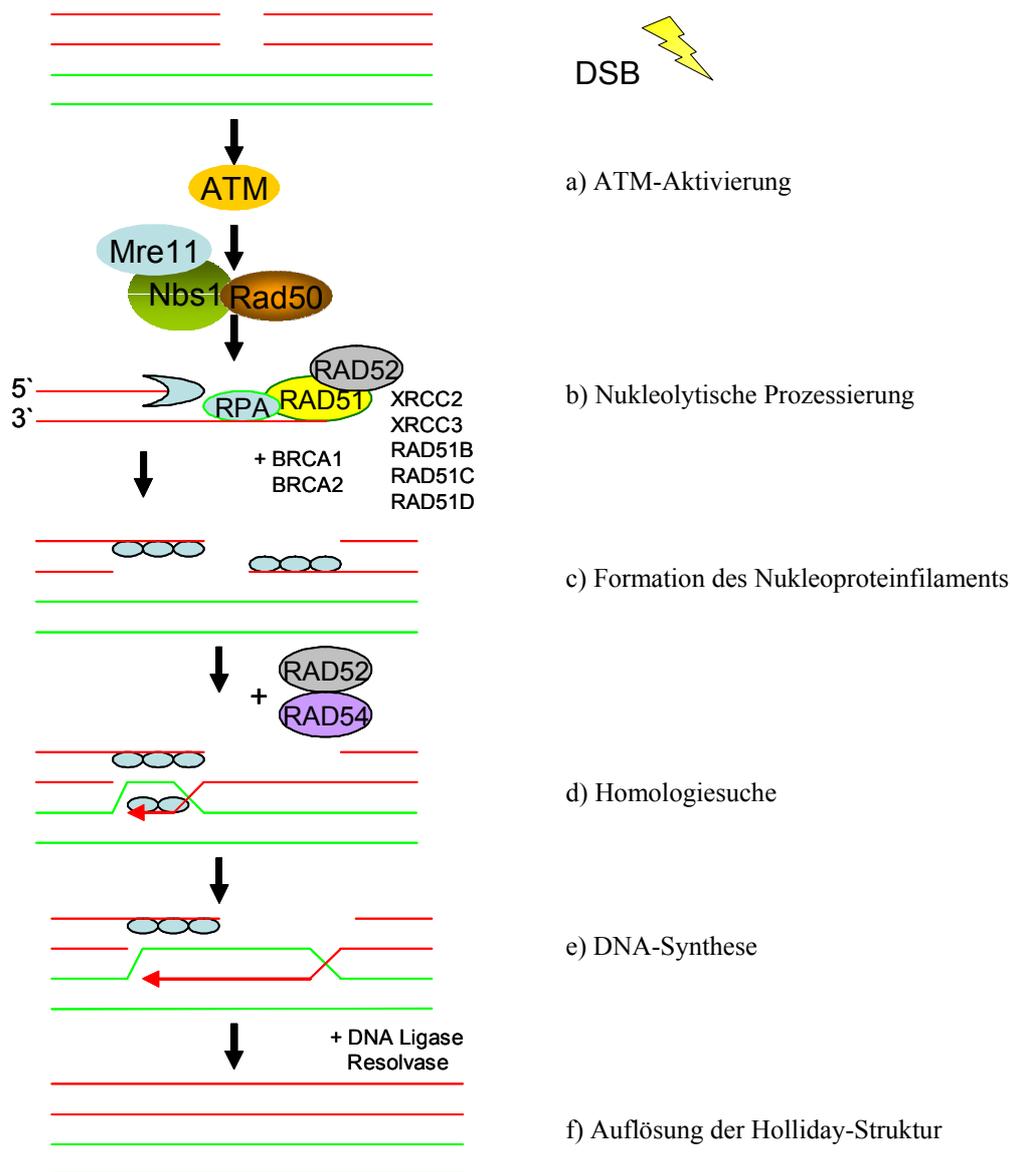


Abb. 1: DSB-Reparatur durch homologe Rekombination in Säugern [nach van Gent et al., 2001].

a) Aktivierung der ATM-Kinase durch einen DSB. NBS1 (Nijmegen Breakage Syndrome 1) ist Substrat für ATM **b)** Erkennung des DSB durch Rad52 und nukleolytische Prozessierung durch den MRN-Komplex. **c)** Rad51 polymerisiert am Einzelstrang und formt mit der DNA und mit Hilfe des Einzelstrang-bindenden Replikationsproteins A (RPA) und Rad52 ein Nukleoproteinfilament. Andere Proteine, wie BRCA1, BRCA2, die Rad51-Paraloga, XRCC2 (X-Ray cross-complementing) und XRCC3 sind an der Rad51-Antwort beteiligt. **d)** Suche des homologen Bereichs auf dem Schwesterchromatid. Folgend bildet sich mit Hilfe von Rad52 und Rad54 ein Komplex aus der homologen, beschädigten und unbeschädigten Duplex-DNA. **e-f)** DNA-Synthese durch DNA-Polymerase, Ligation des Bruches und Auflösung der Rekombinations-Struktur (Holliday-Struktur).

1.5. Nicht-Homologe Rekombination in Säuger- und Hefezellen

NHEJ ist zwischen Hefe- und Säugierzellen stark konserviert. Bis heute sind eine Reihe von Proteinen identifiziert worden, die eine Rolle beim NHEJ spielen. In der Hefe *S. cerevisiae* sind dies yKu70p, yKu80p, Dnl4p, Lif1p, der MRX-Komplex und Nej1p [Feldmann und Winnacker, 1993; Boulton und Jackson, 1996; Feldmann *et al.*, 1996; Milne *et al.*, 1996; Schär *et al.*, 1997; Teo und Jackson, 1997; Wilson *et al.*, 1997; Herrmann *et al.*, 1998; Trujillo *et al.*, 2003; Trujillo und Sung, 2001; Valencia *et al.*, 2001]. Mit Ausnahme des Hefeproteins Nej1p und dem humanen Protein „DNA-abhängige Protein-Kinase katalytische Untereinheit“ (DNA-PKcs) [Anderson *et al.*, 1992] wurden strukturelle Orthologe aller dieser Proteine zwischen Hefe und Säugern identifiziert. Ku70, Ku80, DNA-PKcs, DNA-Ligase IV, XRCC4, Artemis [Chu *et al.*, 1997; Calsou *et al.*, 1999; Norbury *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001a; Dudasova und Chovanec, 2003] und vermutlich DNA-Polymerase μ [Mahajan *et al.*, 2002] sind am humanen NHEJ beteiligt. Die Beteiligung des MRN-Komplex bzw. des MRX-Komplexes am NHEJ in *Schizosaccharomyces pombe* und in Säugern wird kontrovers diskutiert [Huang *et al.*, 2002; Dudasova *et al.*, 2004].

Wie oben bereits erwähnt scheint in Säugern, NHEJ zumindest in der G1- und G0-Phase, wenn die Chromosomen nicht gepaart aneinander liegen, der dominante DSB-Reparaturweg zu sein [Lee *et al.*, 1997; Takata *et al.*, 1998].

Neben der Reparatur von DSB ist NHEJ auch an der für die Entwicklung des Immunsystems essentiellen V(D)J-Rekombination beteiligt. Die V(D)J-Rekombination ist für die Diversität der Immunglobuline und der T-Zellrezeptoren maßgeblich. Die „variable“(V)-, „diversity“(D)- und „joining“(J)-Segmente stellen Sequenzen dar, die zunächst in den Keimbahnzellen räumlich getrennt vorliegen und durch V(D)J-Rekombination verschieden rearrangiert werden [De Villartay *et al.*, 2002; van Gent *et al.*, 1997; Sawchuk *et al.*, 1997; Mansilla-Soto und Cortes, 2003].

1.5.1. Der Mechanismus der Nicht-Homologen Rekombination

Die meisten Komponenten des NHEJ sind zwischen Hefen und Säugern konserviert [Critchlow und Jackson, 1998; Lewis und Resnick, 2000]. Die Proteine wurden strukturell, aber auch biochemisch untersucht. Dieses Kapitel gibt eine Zusammenfassung der Ergebnisse wieder.

Das heutige Konzept des NHEJ geht davon aus, dass der initiale Schritt in der Bindung der freien DNA-Enden durch die Ku-Proteine, die eine Protektion vor Exonukleasen bewirken, besteht. Das Ku-Heterodimer, bestehend aus einem Komplex von Ku70 (70 kDa) und Ku80 (86 kDa), lagert sich asymmetrisch ringförmig, aber eng anliegend an die freien DNA-Enden an [Walker *et al.*, 2001]. Ku weist eine starke Affinität zu freien DNA-Enden auf und kann sich zudem ins Innere der DNA verlagern und es so ermöglichen, dass sich multiple Ku Heterodimere an längere DNA-Moleküle anlagern [Mimori *et al.*, 1986; Paillard *et al.*, 1991; Cary *et al.*, 1997; Yaneva *et al.*, 1997]. Aus Röntgen-Strahlung-Kristallographie geht hervor, dass Ku ungefähr 16-18 Basenpaare (bp) besetzt [Walker *et al.*, 2001]. Dies bestätigen Ergebnisse aus DNA-footprinting Studien an Ku [Yoo *et al.*, 1999].

Die Ku-Proteine rekrutieren folgend DNA-PKcs an die freien DNA-Enden, welches ebenso den Schutz der Enden bewirkt, aber auch das Signaling des DNA-Schadens vermittelt. Strukturelle Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie und Elektronenkristallographie zeigen DNA-PKcs, ungefähr 12 bp in einer Rinnenstruktur fassen kann [Chiu *et al.*, 1998]. DNA-PKcs besetzt das DNA-Ende komplett und drängt Ku ca. 10 bp ins Innere der DNA [Yoo *et al.*, 1999]. Der DNA-PK Holoenzym-Komplex (Ku und DNA-PKcs) nimmt eine festgelegte Position im Bereich von 30 bp der DNA-Enden ein [Valerie *et al.*, 2003]. Die Formation des Holoenzym an den DNA-Enden bewirkt die Aktivierung seiner Kinaseaktivität [Smith *et al.*, 1999]. Aktiviertes DNA-PKcs phosphoryliert einige DNA- bindende Proteine [Anderson *et al.*, 1992], wie z.B. Ku [Lees-Miller *et al.*, 1990; Chan *et al.*, 1999; Labhart *et al.*, 1999] und XRCC4 [Leber *et al.*, 1998; Calsou *et al.*, 2003]. Ebenso ist DNA-PKcs in der Lage sich selbst zu phosphorylieren, was seine Dissoziation von der DNA zur Folge hat [Chan *et al.*, 1996].

DNA-PKcs hat zwei Aufgaben im NHEJ. Die Erste ist das Zusammenführen der beiden DNA-Enden, welches durch DNA-PK effizienter ist als durch Ku allein [De Fazio *et al.*, 2002]. Die zweite Funktion von DNA-PKcs ist seine Autophosphorylierung [Chan *et al.*, 2002; Douglas *et al.*, 2002]. Eine Mutation der Autophosphorylierungsstelle führt in CHO-Zellen zu Radiosensitivität, die zwischen normalen und DNA-PKcs- defizienten Zellen liegt [Chan *et al.*, 2002]. Dies legt eine Funktionalität der Autophosphorylierung im NHEJ nahe. Es konnte zudem gezeigt werden, dass ein Extrakt aus DNA-PKcs- defizienten humanen Gliomzellen nicht in der Lage ist, lineare DNA zu ligieren. Erst nach Zugabe von DNA-PKcs konnte

Ligation beobachtet werden [Hanakahi *et al.*, 2000]. Dies könnte durch die Anwesenheit eines Inhibitors des NHEJ erklärt werden, der erst nach einer Phosphorylierung durch DNA-PKcs seine inhibierende Wirkung verliert und somit NHEJ *in vivo* möglich macht. Es konnte auch beobachtet werden, dass phosphoryliertes DNA-PKcs ausschließlich nach Bestrahlung nukleäre Foci bildet [Chan *et al.*, 2002]. DNA-PKcs ist somit ein potentieller Regulator des NHEJ. Die funktionelle Relevanz der DNA-PKcs- katalysierten Phosphorylierung muss jedoch noch weiter untersucht werden.

Die Rolle des MRN-Komplexes im NHEJ ist nicht genau definiert, jedoch ist Mre11 eine 3'→5' Exonuclease [Paull *et al.*, 2000; Trujillo *et al.*, 1998] und es wird postuliert, dass der Komplex zur Prozessierung der DNA-Enden vor der Zusammenführung der DNA-Enden benötigt wird. Darauf deutet zumindest eine direkte Interaktion zwischen Mre11 und Ku70 in Säugern hin [Goedecke *et al.*, 1999]. In der Hefe konnte gezeigt werden, dass der MRX-Komplex die Bindung der Dnl4p/Lif1p (DNA-Ligase IV/XRCC4-Orthologe) fördert, bzw. die Ligationsrate steigern kann. Die DNA-Bindung und die Förderung der Ligationsrate durch den MRX-Komplex wird zusätzlich durch die Ku70/Ku80-Hefeorthologe stimuliert [Chen *et al.*, 2001a]. Dies legt eine Kooperation der Dnl4p/Lif1p-, MRX- und yKu70p/yKu80p-Komplexe nahe.

Neuere Ergebnisse zeigen, dass Artemis ähnliche Funktionen hat [Dudasova und Chovanec, 2003]. Artemis bindet an DNA-PKcs und wird folgend phosphoryliert. Hierbei kann Artemis sowohl 3'- als auch 5'-Enden endonukleär prozessieren [Ma *et al.*, 2002]. Somit könnte es eine ähnliche Rolle wie der exonucleolytisch aktive MRN-Komplex übernehmen.

Der Bindung von Ku an freie DNA-Enden, der Rekrutierung von DNA-PKcs und der Prozessierung der DNA folgt die Bindung des DNA-Ligase IV/XRCC4-Komplex an DNA-PK [Mahajan *et al.*, 2002]. Möglicherweise erfolgt erst durch die Phosphorylierung von XRCC4 durch DNA-PKcs, die Formation des DNA-Ligase IV/XRCC4-Komplexes. Das phosphorylierte XRCC4 könnte unphosphoryliert einen anderen Interaktionspartner haben, was eine Inhibierung des NHEJ zur Folge haben könnte.

Das *XRCC4* (X-Ray Cross- Complementing 4)-Gen wurde ursprünglich durch die Komplementation der Radiosensitivität, V(D)J Rekombinations- und DSB-Defizienz im CHO-Derivat XR-1 entdeckt [Li *et al.*, 1995]. Das XRCC4 Protein wurde mittels

Röntgen-Strahlung-Kristallographie analysiert und besteht aus einem globulären Kopf und einer langen α -helikalen Kette. Vier XRCC4 Monomere bilden ein hantelförmiges Homotetramer, wobei sich je zwei globuläre Köpfe an den Enden formieren, während sie durch die vier Ketten verbunden werden. In Säugerzellen liegt DNA-Ligase IV in der Interphase in einem festen Komplex mit XRCC4 vor [Lee *et al.*, 2000b]. Außerdem ist Ligase IV nicht detektierbar in Zellen ohne XRCC4 [Bryans *et al.*, 1999]. Die Stoichiometrie des XRCC4/Ligase IV-Komplexes wird kontrovers diskutiert. Postuliert wird jedoch ein 2:2 Tetramer, das DNA-Enden, die durch Ku und DNA-PKcs angenähert sind, ligiert [Jones und Gellert, 2002; Lee *et al.*, 2000b]. Der für die Interaktion mit der DNA-Ligase IV bzw. Dnl4p verantwortliche Bereich in XRCC4 bzw. Lif1p ist konserviert [Hermann *et al.*, 1998; Sibanda *et al.*, 2001].

Der abschließende Schritt des NHEJ ist die Ligation durch den DNA-Ligase IV /XRCC4-Komplex, wobei zunächst die im globulären Kopf sitzende DNA-Bindungsdomäne von XRCC4 distal von Ku an der DNA bindet, um daraufhin die DNA-Ligase IV, die nahe des Zentrum der C-Terminalen Kette von XRCC4 bindet, zu positionieren [Jonop *et al.*, 2000; Sibanda *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2002]. Die starke zusätzliche Interaktion zwischen XRCC4 und DNA-PKcs [Hsu *et al.*, 2001] deutet darauf hin, dass der XRCC4/Ligase IV- Komplex bindet, bevor DNA-PKcs dissoziiert. Ku, DNA-PKcs und XRCC4 unterstützen zusammen die Verbindung der DNA-Enden [Cary *et al.*, 1997; Pang *et al.*, 1997; Yaneva *et al.*, 1997; de Fazio *et al.*, 2002]. Der Effekt von Ku und DNA-PK auf die Ligation durch DNA-Ligase IV/XRCC4 ist komplex und unter bestimmten Bedingungen wird die Ligationseffizienz 20-fach verstärkt [Nick *et al.*, 2000]. Die Bindung von DNA-Ligase IV/XRCC4 und DNA-PK ist in erster Linie durch den Kontakt zwischen Ku und DNA-Ligase IV bzw. durch DNA-PKcs und XRCC4 vermittelt. Die Summe dieser Interaktionen wird anscheinend für die stabile Verbindung an den DNA-Enden benötigt [Hsu *et al.*, 2001].

Eventuelle Basendeletionen werden durch die DNA-Polymerase μ , die mit XRCC4 interagiert, aufgefüllt. Ku und der DNA-Ligase IV/XRCC4-Komplex sind in den Prozess des Auffüllens von bedingt cohesiven DNA-Enden durch die DNA-Polymerase μ (Pol μ) involviert [Cary *et al.*, 1997; Pang *et al.*, 1997; Yaneva *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2000; Feldmann *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001b; Lee *et al.*, 2003]. Ku, Pol μ und der DNA-Ligase IV/XRCC4-Komplex sind in aufgereinigter Form *in vitro* in der Lage, 3'-Überhänge mit vier komplementären Basenpaaren aufzufüllen

[Mahajan *et al.*, 2002]. Allerdings sind Pol μ - defiziente Zellen nicht radiosensitiv. Daher gibt es möglicherweise einen alternativen Weg bzw. eine alternative Polymerase, die diese Aufgabe übernimmt. Ein Kandidat hierfür ist die Polymerase λ , da diese ein BRCT- (BRCA1 carboxyl terminus) Motiv besitzt, welches potentiell mit XRCC4 interagieren könnte [Tseng *et al.*, 2002].

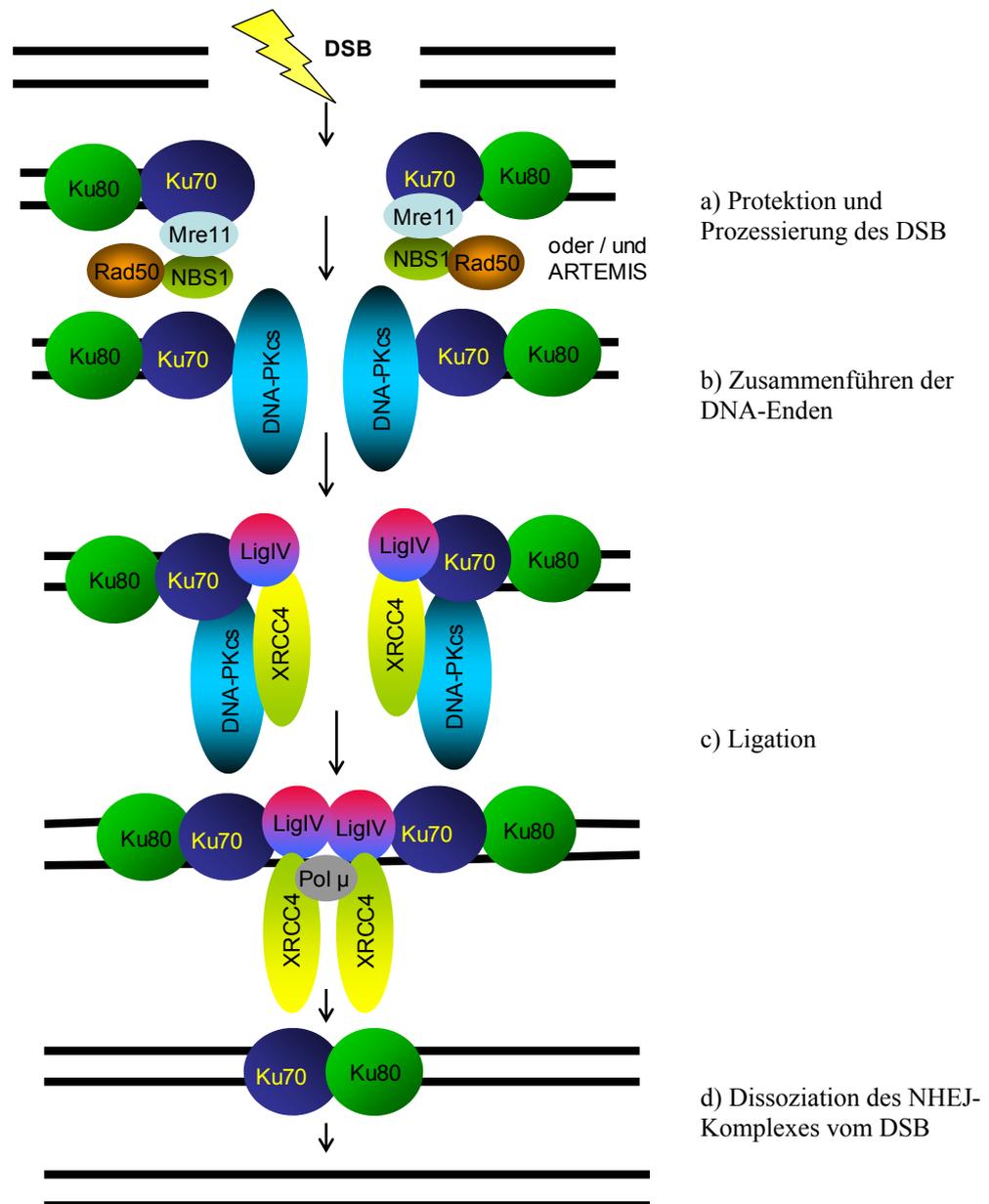


Abb. 2: DNA-Doppelstrangbruchreparatur durch Nicht-Homologe Rekombination in Säugern.

a) Nach der Bindung und Protektion des DSB durch Ku, wird dieser durch den MRN-Komplex (oder/und Artemis) prozessiert. **b)** Das Zusammenführen der DNA-Enden durch DNA-PKcs folgt. **c)** Das Auffüllen von Basendeletionen wird durch Pol μ und die abschließende Ligation durch den DNA-Ligase IV/XRCC4-Komplex vollzogen. **d)** Der NHEJ-Komplex dissoziiert von der DNA.

Das in Abb. 2 dargestellte Model hat in großen Teilen auch Geltung in der Hefe, wobei es in diesem Model (Abb. 3) kein DNA-PKcs gibt. Zudem ist noch kein Ortholog für das Hefeprotein Nej1p im Säuger gefunden worden. Nej1p ist ein haploid-spezifischer NHEJ-Regulator, welcher mit Lif1p interagiert. Das Fehlen von Nej1p verursacht eine reduzierte NHEJ-Effizienz und ist für die nukleäre Lokalisation von Lif1p verantwortlich [Valencia *et al.*, 2001; Kegel *et al.*, 2001; Frank-Vaillant und Marcand, 2001].

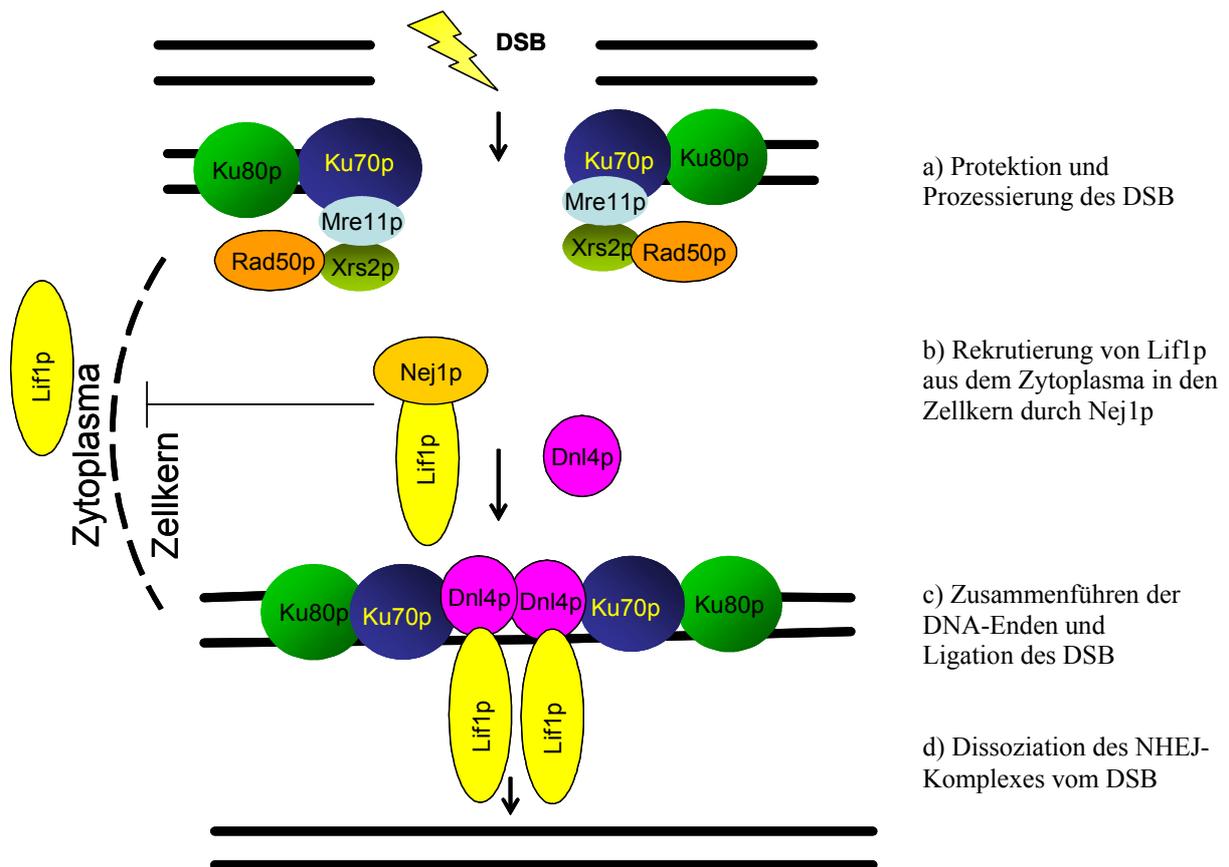


Abb. 3: DNA-Doppelstrangbruchreparatur durch Nicht-Homologe Rekombination in *S. cerevisiae* [nach Krogh und Symington, 2004].

a) Nach der Bindung und der Protektion des DSB durch Ku, wird dieser durch den MRX-Komplexprozessiert. b) Nej1p rekrutiert Lif1p aus dem Zytoplasma in den Nukleus. c) Nach dem Zusammenführen des DSB folgt die abschließende Ligation durch den Lif1p/Dnl4p-Komplex und d) die Dissoziation des NHEJ-Komplexes vom DSB.

Im Nukleus mit vielen nahe beisammen liegenden DSB gibt es statistisch gesehen viele Fehlpaarungen, die z.B. zu Chromosomentranslokationen führen. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass es einen Mechanismus gibt, der dies verhindert. In NHEJ-defizienten Zellen kommt es zu deutlich mehr Misspaarungen als in Zellen mit funktionierendem NHEJ [Wang *et al.*, 1997; Richardson *et al.*, 2000b; Wang *et al.*,

2002; Evans *et al.*, 1996; Rothkamm *et al.*, 2001]. Daher können möglicherweise im NHEJ DNA-Enden verglichen werden. Dies könnte über die Überhänge an den Enden der DSB vollzogen werden, jedoch gibt es bisher noch keinen bekannten Prozess, der diese Hypothese bestätigen würde.

1.6. Beziehung zwischen Nicht-Homologer Rekombination, DNA-Endprotektion, Telomerprotektion und genomischer Stabilität

Die Beziehung zwischen NHEJ und Telomerprotektion bzw. DNA-Endprotektion ist ein wichtiger Aspekt bei der Bewertung des NHEJ [Williams *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2002]. Telomere und DSB repräsentieren Enden eines DNA-Moleküls, werden aber in eukaryontischen Zellen unterschiedlich behandelt. DSB sind eine Gefahr für die genomische Integrität und verursachen Zellzyklusarreste, Apoptose oder DNA-Reparatur. Im Gegensatz dazu sind Telomere stabile Strukturen, die nicht wie DSB prozessiert werden [Lundblad *et al.*, 2000]. Offensichtlich haben chromosomale Enden, Eigenschaften, die sie funktionell und strukturell von DSB unterscheiden. Telomerspezifische-Proteine und -Strukturen sind in der Lage, Telomere davor zu bewahren von der DSBR als DSB wahrgenommen zu werden. Proteine mit Funktionen, sowohl an den Telomeren als auch in der DSBR zeigen einen Zusammenhang der Protektions- und der DSB-Reparatursysteme an [Featherstone *et al.*, 1999; Haber, 1998, 1999a; Shore *et al.*, 1998]. Die Ku-Proteine, die wie oben beschrieben, im NHEJ-Mechanismus beteiligt und bei der Rekrutierung der NHEJ-Proteine am DNA-Schaden mitverantwortlich sind, werden zu diesen Proteinen gezählt. An Telomeren hat Ku eine protektive Rolle und verhindert NHEJ-vermittelte Telomerfusionen [Ferreira und Cooper, 2001]. Das Nej1p-Protein ist für die Rekrutierung von Lif1p aus dem Zytoplasma in den Nukleus verantwortlich und somit für das NHEJ wichtig. An den Telomeren verhindert es wie Ku, NHEJ-vermittelte Telomerfusionen [Liti und Louis, 2003]. Der DNA-Ligase IV/XRCC4-Komplex hat die Fähigkeit *in vitro* DNA-Enden vor dem Abbau durch die T7-Exonuklease zu schützen. Dies ist ein weiterer Hinweis auf den protektiven Charakter der Proteine des NHEJ. Diese Protektion ist ligationsunabhängig, d.h. auch nicht ligierbare Enden werden durch den DNA-Ligase IV/XRCC4-Komplex geschützt [Smith *et al.*, 2003]. XRCC4 allein ist nicht in der Lage DNA-Enden zu

schützen, obwohl es in der Lage ist DNA zu binden. Telomere sind jedoch nicht völlig resistent gegen DSB bzw. gegen die Behandlung als DSB. In humanen Zellen, die TRF2 (Telomere Repeat Faktor 2) dominant negativ überexprimieren, werden Telomere durch DNA-Ligase IV ligiert [Smogorzewska *et al.*, 2002]. Dies geschieht nach Abbau des 3'-Überhangs an den Telomeren. Der Zeitpunkt für dieses Ereignis wird im Zellzyklus mit G1 und G2 determiniert, d.h., vor, aber auch nach der Replikation. Diese Ergebnisse zeigen die teilweise paradoxe Beziehung von NHEJ und Telomerprotektion auf, wie z.B. auch bei Ku-Heterodimer- und DNA-PKcs-defizienten Mauseellen. Diese Defizienzen resultieren in Telomerfusionen [D'Adda *et al.*, 2001; Samper *et al.*, 2000; Gilley *et al.*, 2001; Goytisolo *et al.*, 2001; Hsu *et al.*, 2000; Bailley *et al.*, 1999, 2001]. Das Ku-Heterodimer ist eines der zentralen Proteine, das bei der Untersuchung der Relation zwischen Telomerprotektion und NHEJ eine Rolle spielt. Der Beweis, dass Ku in der Erhaltung von Telomeren involviert ist, erfolgte in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. In Abwesenheit des Ku-Heterodimers konnte eine drastische Verkürzung der Telomerlänge beobachtet werden [Boulton *et al.*, 1996; Porter *et al.*, 1996]. Des Weiteren ist der Verlust von Ku und der Telomerase für die Zelle letal [Nugent *et al.*, 1998; Gravel *et al.*, 1998]. Da Ku nicht nur eine starke Bindung an DSB zeigt, sondern auch an Telomere [Gravel *et al.*, 1998], muss Ku eine direkte Rolle in der Funktion der Telomere spielen. Die primäre Aufgabe von Ku ist, nukleolytische und rekombinatorische Aktivitäten zu inhibieren [Baumann *et al.*, 2000; Godhino *et al.*, 2001; Polotnianka *et al.*, 1998]. In humanen Zellen ist Ku mit telomerischen DNA-Sequenzen assoziiert [Bianchi *et al.*, 1999; Hsu *et al.*, 1999; D'Adda *et al.*, 2001].

Der Mre11/Rad50/NBS1-Komplex ist ebenso Telomer- assoziiert [Haber; 1998] und für die Telomerstabilität wichtig. Allerdings wird diese Funktion in der Telomerreplikation eingeordnet [Nugent *et al.*, 1998]. Hierbei bindet der Komplex über TRF2 an den Telomeren und stabilisiert die DNA bei der T-Loop Bildung, wobei der T-Loop eine sich selbst bindende, schleifenförmige, protektive Nukleoproteinstruktur an den Chromosomenenden darstellt [de Lange, 2002; Cervantes *et al.*, 2002].

Eine andere Arbeit, befasst sich mit der Rolle von DNA-Ligase IV innerhalb der Erhaltung der genomischen Stabilität [Przewloka *et al.*, 2003]. Es konnte die Interaktion von DNA-Ligase IV mit hCap-E in humanen Zellen gezeigt werden. HCap-E ist Mitglied der „Structural Maintenance of Chromosomes (SMC) super-family of

proteins“. Das hCAP-E/C Heterodimer bildet einen Core-Komplex, der dazu dient die Proteine, die bei der Kondensation der mitotischen Chromosomen eine Rolle spielen, zusammenzuführen [Kimura *et al.*, 2001]. In der Interphase ist der Komplex von hCapE im Nucleus lokalisiert, wohingegen er, in sich in Metaphase befindlichen Zellen an den Chromosomen lokalisiert ist. Dies gilt auch für die DNA-Ligase IV. Auch der Interaktionspartner von DNA-Ligase IV, XRCC4, wurde in den verschiedenen Zellzyklusphasen lokalisiert. Erstaunlich an dieser Arbeit ist die Entdeckung, dass DNA-Ligase IV und XRCC4, wie in früheren Arbeiten dokumentiert, in der Interphase einen Komplex im Nucleus bilden, jedoch in der Metaphase nicht (Abb. 4).

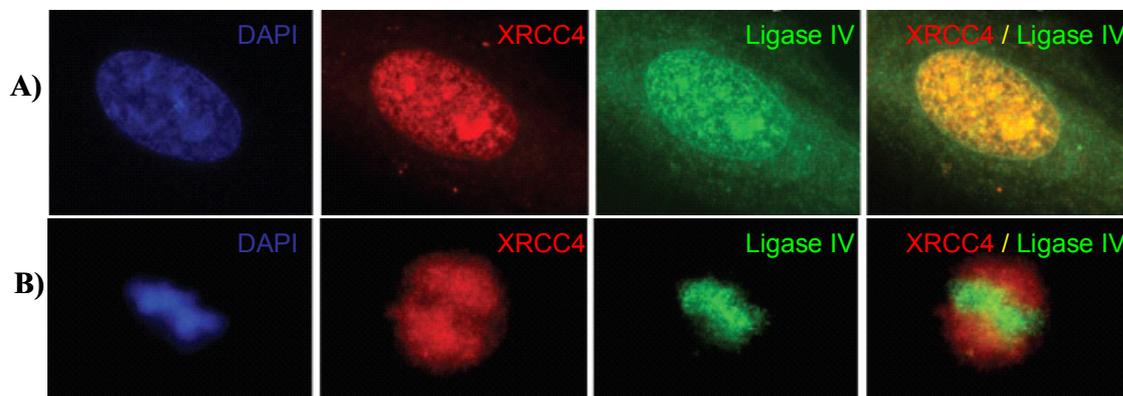


Abb. 4: Vergleich der XRCC4- und DNA-Ligase IV-Lokalisation während der Inter- und Metaphase in humanen Fibroblasten [Przewloka *et al.*, 2003].

Immunfärbung mit Antikörpern gegen XRCC4 und DNA-Ligase IV. DNA wurde mit DAPI angefärbt. Die obere Reihe (A) zeigt einen Interphase-, die untere Reihe (B) einen Metaphase-Zellkern in humanen Fibroblasten.

A) In der Interphase sind XRCC4 und DNA-Ligase IV im Zellkern colokalisiert, wohingegen B) in der Metaphase nur DNA-Ligase IV mit der DNA assoziiert ist. DAPI (blau), XRCC4 (rot), DNA-Ligase IV (grün), Colokalisation (gelb).

DNA-Ligase IV colokalisiert in der Metaphase mit Chromatin, wobei XRCC4 um diesen Bereich lokalisiert liegt, jedoch von ihm ausgeschlossen ist. Ein Erklärungsansatz hierfür wäre eine zellzyklusabhängige Regulation der Interaktion von XRCC4 und DNA-Ligase IV. *In vitro* Versuche haben gezeigt, dass Ligation ohne XRCC4 ineffektiv ist [Critchlow *et al.*, 1997; Grawunder *et al.*, 1997, 1998a, 1998b]. *In vivo* wäre somit, bei Übertragbarkeit der Ergebnisse, eine Inhibition der Ligation in der Metaphase, in der XRCC4 und DNA-Ligase IV getrennt vorliegen, anzunehmen.

1.7. Phänotypen rekombinationsdefizienter Zellen und Organismen

Für eine Reihe von Faktoren, die Funktionen in der Signaltransduktion oder DNA-Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen haben, sind defiziente Zellen oder Organismen als Modell verfügbar. Die Phänotypen dieser defizienten Zellen oder Organismen haben viel zum Verständnis der Funktion der entsprechenden Proteine beigetragen. Häufig haben auch Phänotypen niederer Organismen, wie beispielsweise in Hefen zu Hypothesen über Funktionen der entsprechenden Säugerproteine geführt, die sich später experimentell in Säugern bestätigen ließen. Es sollen hier exemplarisch einige dieser Phänotypen in verschiedenen Organismen diskutiert werden, um die Konsequenzen pathologischer DNA-Rekombination besser zu verstehen.

Neben der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs) gibt es in höheren Eukaryonten zwei weitere große Proteinkinasen aus der Familie der Phosphatidylinositol-3-OH-Kinaseähnlichen-Kinasen, „Ataxia telangiectasia mutated Protein“ (ATM) und „ATM-Rad3-related Protein“ (ATR). Diese haben eine Vielzahl von Funktionen in der Regulation der DNA-Reparatur, der Zellzyklen und der Apoptose nach einer DNA-Schädigung.

ATM, ein zentrales Protein der DNA-DSB-Schadenantwort weist eine Serin/Threonin-Kinaseaktivität auf und reagiert auf die Bildung von DSB mit einer Steigerung seiner Kinaseaktivität. In ungeschädigten Zellen liegen die ATM-Moleküle inaktiv als Dimere vor. Nach Auftreten von DSB phosphorylieren sich die ATM-Moleküle gegenseitig an einem Serin-Rest, woraufhin das Dimer in zwei aktive Monomere zerfällt [Shiloh, 2001]. Viele Substrate des ATM, wie z.B. p53, BRCA1(„breast-cancer-associated 1 Protein“), 53BP1 („p53-binding Protein 1“) und die Kinase CHK2 werden von den ATM-Monomeren phosphoryliert. Zudem ist die Aktivierung des MRN-Komplexes durch ATM für die DSBR wichtig. Hierbei wird NBS1 phosphoryliert und folgend die Nukleaseaktivität des MRN-Komplexes über Mre11 möglich. Diese Bedeutung des Zusammenspiels von ATM und dem MRN-Komplex wird durch das Auftreten des „Nijmegen breakage syndrome“ (*nbs1*) und der „Ataxia-Telangiectasia-Related Disorder“ (*mre11*), die Ähnlichkeiten zur ATM-Defizienz aufweisen, unterstrichen [Uziel *et al.*, 2003]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass Seneszenz in humanen

Zellen, die durch Telomerverkürzungen ausgelöst wurde, durch ATM vermittelt wird [Wong *et al.*, 2003; Herbig *et al.*, 2004].

ATM-Defizienz führt zu Ataxia telangiectasia. Ataxia telangiectasia zeichnet sich durch eine fortschreitende Neurodegeneration, Immundefizienz, erhöhte Strahlensensitivität, Sterilität durch defekte Meiotische Rekombination und einer Prädisposition für Tumorbildung aus. ATM ist von der Hefe (Tel1p) bis zum Säuger konserviert.

ATR ist für die Schadensantwort durch UVC, blockierte Replikationsgabeln oder DNA-Läsionen, wie z.B. DNA Interstrang-Crosslinks verantwortlich. ATR und ATM phosphorylieren teilweise die gleichen Proteine, wie z.B. p53 und BRCA1, jedoch resultiert eine Splicedefekt des ATR im Seckel-Syndrom. Das Seckel-Syndrom ist eine autosomal rezessive Erkrankung, die sich u. a. durch Mikrozephalie und Verzögerungen beim Wachstum und der Entwicklung auszeichnet [O'Driscoll *et al.*, 2004]. ATR ist ebenso wie ATM in der Hefe (Mec1/Rad3) und in Säugern konserviert.

Die erste beschriebene DSBR- defiziente Maus, war die SCID- (severe combined immunodeficiency) Maus, die einen Defekt des *DNA-PKcs* aufweist. Dies resultiert in einem Unvermögen die DSB-Intermediate in der V(D)J-Rekombination zusammenzuführen und somit in einem Defekt des Immunsystem [Gao *et al.*, 1998a; Tacciolo *et al.*, 1998; Jhappan *et al.*, 1997]. Humanes SCID zeichnet sich ebenso durch eine Immundefizienz aus.

Auch Patienten mit einem defekten *ARTEMIS*-Gen leiden unter einem Defekt des Immunsystems. Sie gehören zu der Gruppe von SCID-Patienten, die unter RS-SCID (RS: Radiation-sensitive) leiden, also neben dem Immundefekt strahlenempfindlich sind. Fibroblasten von RS-SCID Patienten zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung und einen Defekt der V(D)J-Rekombination [Dudasova *et al.*, 2003]. Obwohl *ARTEMIS*- defekte Zelllinien strahlenempfindlich sind, zeigen sie nur einen sehr schwachen DSB-Reparaturdefekt und unterscheiden sich damit von Zelllinien mit einem Defekt in der DNA-PKcs oder anderen am NHEJ beteiligten Proteinen. Trotzdem könnten die gefundenen Nukleaseaktivitäten von Artemis auf eine Beteiligung des Proteins an der DSBR hindeuten. DSB, die durch ionisierende Strahlung induziert werden, können wegen evtl. in der Nähe (ca. 10-20 bp) liegender Basenschäden und Einzelstrangbrüchen sehr komplex sein. Diese

DNA-Schäden lassen sich viel schwerer als einfache DSB reparieren. Artemis ist möglicherweise an der Reparatur dieser spezifischen Untergruppe von DSB beteiligt. Zusätzlich zu dem bei *dna-pkcs* beschriebenen Phänotyp zeigen *ku70* und *ku80*-defiziente Mäuse nach der Geburt ein vermindertes Körpergewicht, langsames Wachstum und eine reduzierte Lebensdauer. Fibroblasten dieser Mäuse weisen eine frühe Seneszenz auf, was einen generellen Proliferationsdefekt anzeigt. Dieser im Vergleich mit *dna-pkcs*-defizienten Zellen ausgeprägtere Phänotyp, ist möglicherweise auf eine DNA-PKcs- bzw. NHEJ-unabhängige Funktion z.B. an den Telomeren [Hsu *et al.*, 2000] zurückzuführen.

Das Nijmegen breakage syndrom (NBS) beruht auf einem Defekt im *NBS*-Gen [Van der Burgt *et al.*, 1996]. Es ist eine seltene autosomal rezessive Krankheit, die durch Mikrozephalie, Immundefizienz, eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit und eine Prädisposition für Tumorbildung ausgezeichnet ist. NBS-Zellen wachsen sehr schlecht und weisen eine vorzeitige Seneszenz auf. Einige NBS-Zellen sind nach ionisierender Strahlung defekt im G1-Checkpoint und haben einen Defekt im S-Phase-Checkpoint, der sich in einer strahlenresistenten DNA-Synthese zeigt, die für NBS-Zellen charakteristisch ist. Untersuchungen mit einer primären NBS-Fibroblasten-Zelllinie, die eine im Wesentlichen normale Zellzykluskontrolle aufweist, zeigte, dass die Empfindlichkeit nach ionisierender Strahlung auf DSB-Defekte und nicht auf fehlende Zellzyklus-Checkpunkte zurückzuführen ist. NBS1 ist eine Komponente des MRN-Komplexes und für die Phosphorylierung von Rad50 und Mre11 verantwortlich. Nach ionisierender Bestrahlung ist NBS1 für die Bildung von Rad50/ Mre11-Foci erforderlich, die sich an DSB zeigen.

Die „Ataxia-Telangiectasia-Related Disorder“ ist eine weitere seltene Erkrankung, die durch eine Mutation in *mre11* verursacht wird [Steward *et al.*, 1999] und resultiert in einer Neurodegeneration. *Mre11*-defiziente Zellen zeigen eine erhöhte Strahlensensibilität. Für alle Mutationen der Faktoren des MRN-Komplexes lässt sich allgemein sagen, dass eine DNA-Schaden-Sensitivität, genomische Instabilität, beeinträchtigte Meiose und Telomerverkürzungen zu beobachten sind. Ein *rad50*-Knockout in der Maus ist letal [Luo *et al.*, 1999].

Die Letalität von Mäuseembryonen, bei denen die Gene DNA-Ligase IV oder XRCC4 deletiert wurden, scheint durch eine Anhäufung von nicht erkannten Doppelstrangbrüchen, während der frühen postmitotischen Stadien von Neuronen zustande zu kommen [Frank *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 1998b; Barnes *et al.*, 1998]. Die

Funktion und der Mechanismus von induzierten DSB bei der Ausbildung des Nervensystems und bei der Zelldifferenzierung sind unklar. Es konnten jedoch Verbindungen der Rekombinationsreparatur mit der Determinierung artspezifischen Verhaltens bzw. der neuronalen Differenzierung hergestellt werden [Gilmore *et al.*, 2000]. Die gezielte Induktion und Reparatur von DSB ist auch an der Differenzierung anderer Zelltypen und an der Zellalterung beteiligt [Lieber, 1998]. Die *xrcc4*-Zelllinie, XR-1 [Li *et al.*, 1995], ist radiosensitiv und hat einen Defekt in der V(D)J-Rekombination. Die Radiosensitivität erhöht sich dramatisch in der G1-Phase [Giaccia *et al.*, 1989].

Das Lig4-Syndrom ist eine seltene Krankheit, die durch Mikrozephalie, Entwicklungsverzögerungen, sowie Panzytopenie (starke Verminderung der Blutzellen aller Systeme) charakterisiert ist. 1999 wurde zum ersten Mal von einem Defekt in der DNA-Ligase IV bei einem 14 Jahre alten Leukämiepatienten berichtet [Riballo *et al.*, 1999]. Obwohl der Patient sich bis zum Ausbruch der Leukämie völlig normal entwickelte und es keinen Hinweis für einen Immundefekt gab, zeigte er eine starke Überreaktion auf die strahlentherapeutische Behandlung. Da Mäuse mit inaktivierenden Mutationen in DNA-Ligase IV schon im embryonalen Stadium sterben [Lee *et al.*, 2000b], müssten die Mutationen im menschlichen Lig4-Syndrom hypomorph sein. Bei den identifizierten Mutationen handelt es sich entweder um „Missense“-Mutationen oder kleine Verkürzungen, wodurch möglicherweise eine Restfunktion der DNA-Ligase IV erhalten bleibt. Zellen, die von verschiedenen Patienten in Kultur genommen wurden, sind strahlenempfindlich und zeigen eine stark eingeschränkte DSB-Reparatur. Im Gegensatz zu NBS-Zelllinien weisen sie jedoch keinen Defekt in der Zellzykluskontrolle auf. In Abwesenheit von DNA-Ligase IV sind die Effektivität und die Genauigkeit des NHEJ eingeschränkt. Untersuchungen an DNA-Ligase IV-defizienten Zellen lassen vermuten, dass der DNA-Ligase IV/XRCC4-Komplex, unabhängig von seiner Ligasefunktion, an DNA-Enden bindet, und diese vor der Degradation schützt.

Kürzlich wurden Zellen eines Patienten isoliert, die Radiosensitivität, verminderte DSBR und defekte V(D)J-Rekombination aufwiesen [Dai *et al.*, 2003]. Es konnten keine Defekte in bisher bekannten NHEJ-Faktoren wie Ku70, Ku80, DNA-PKcs, XRCC4, DNA-Ligase IV oder Artemis, aber auch nicht in Mre11, Rad50 oder NBS1 gefunden werden. Dies spricht für eine Beteiligung eines weiteren Proteins am NHEJ und der V(D)J-Rekombination.

2. Zielsetzung

DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) stellen potentiell gefährliche Schäden dar, die zum Tod oder zur malignen Entartung einer Zelle führen können. Daneben ist die koordinierte Induktion und Reparatur von Doppelstrangbrüchen maßgeblich an hochspezialisierten Prozessen, wie der Generierung der Antikörpervielfalt, sowie zellulären Differenzierungs- und Alterungsprozessen beteiligt. NHEJ stellt den dominanten Reparaturweg von DSB in höheren eukaryontischen Zellen dar. Daneben vermittelt NHEJ Telomerendfusionen an geschädigten Telomeren, Veränderungen, die gehäuft in gealterten Zellen gefunden werden. Die Regulation des NHEJ ist in vielen Details noch unverstanden.

Die Fragestellung für diese Arbeit ergab sich aus der Entdeckung eines neuen Hefeproteins, scNej2p, das über eine Interaktion mit Lif1p inhibitorische Funktionen auf NHEJ in Hefe ausübt.

Die Ziele dieser Arbeit waren, die Suche nach orthologen Nej2 Proteinen beim Menschen und in anderen Organismen, deren strukturelle und funktionelle Charakterisierung, sowie eine Positionierung innerhalb der DNA-DSB Reparatur.

Im Speziellen sollte dabei untersucht werden, ob die Interaktion zwischen menschlichem Nej2 und XRCC4, dem Lif1p Ortholog, konserviert ist und welche Konsequenzen sich daraus für die DNA-Ligase IV/XRCC4- vermittelte Ligation von DNA DSB *in vivo* und *in vitro* ergeben.

Darüber hinaus sollte durch Analyse der Nej2 Expression, deren Modulation oder mittels Lokalisationsstudien untersucht werden, ob, wann und an welchen zellulären Strukturen Nej2 Einfluss auf die Regulation des NHEJ hat.

Das Verständnis dieser Prozesse ist wichtig um Mechanismen zu verstehen, die die genomische Integrität gewährleisten und deren Fehlregulation zu Verlust oder Umstrukturierung genetischer Informationen und damit letztendlich zu zellulären Alterungsprozessen oder Tumorgenese führt.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Zellkultur

3.1.1.1. Zellen

Für die Untersuchungen wurden primäre humane Fibroblasten aus Vorhautbiopsien etabliert (FF1/96). Bei der humanen Zelllinie WI26-SV40 (American Type Culture Collection; CCL 95.1; ECACC 89101301) handelt es sich um SV40- transfierte embryonale Lungenfibroblasten. Die WI26-SV40 Fibroblasten enthielten den stabil integrierten Vektor pcDNAHisTR (Tet on System Invitrogen). HeLa-Zellen (American Type Culture Collection, Nr.: CCL 2) wurden für Transfektionen und Immunfluoreszenzen verwendet.

3.1.1.2. Reagenzien, Lösungen und Puffer

Alle Chemikalien hatten die Qualität p.a. und wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Fluka (Taufkirchen, FRG), Merck (Schwalbach/Ts., FRG), Serva (Heidelberg, FRG) oder Sigma (Deisenhofen, FRG) bezogen. Zellkulturmedien, Trypsin, fötales Kälberserum (FKS), Pyruvat und L-Glutamin stammten von der Firma GibcoBRL (Karlsruhe, FRG). Lösungen und Reaktionen wurden in hochreinem, deionisiertem Wasser angesetzt.

PBS (pH 7,4) enthielt 140 mM NaCl, 10 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ und 2 mM KH₂PO₄.

TBS enthielt 150 mM NaCl und 50 mM Tris-HCl (pH 7,4).

Die humanen Zellen wurden in DMEM (Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium) mit 10 % FKS kultiviert.

500 ml Medium wurden 5 ml Glutamin, (200 mM), 5 ml Pyruvat (100 mM) und 10 ml Penicillin/Streptomycin (100 Units/ml) zugegeben.

Serumfreies Medium wurde für Transfektionen benötigt. Dazu wurde DMEM ohne FKS-Zugabe verwendet.

3.1.2. Molekularbiologische Reagenzien

Für molekularbiologische Arbeiten wurden das QIAGEN Plasmidisolierungs-Kit (Qiagen, Hilden, FRG), das QIAquick Gelextraktions-Kit (Qiagen) und das QIAquick PCR-Aufreinigungs-Kit (Qiagen) verwendet.

Folgende Enzyme wurden verwendet:

Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Frankfurt am Main, FRG), Shrimps Alkalische Phosphatase (Amersham Pharmacia, Freiburg, FRG), T4-DNA-Ligase (New England Biolabs), T4-DNA-Polymerase (New England Biolabs), Taq-DNA-Polymerase (Promega, Mannheim, FRG), Pfu-DNA-Polymerase (Promega) und Lysozym.

3.1.3. Gele zur Auftrennung von DNA

Für die Herstellung von Agarose-Gele wurde verwendet:

TAE-Puffer, pH 8,0 (50x): 2 M Tris/HCl; 1 M Essigsäure; 0,5 M EDTA- Dinatriumsalz.

Agarose-Lösung:

Agarose 0,7-2 % (PEQLAB, Erlangen, FRG); Ethidiumbromid-Lösung (0,4 µg/ml) (Roth, Karlsruhe, FRG).

Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst und das Ethidiumbromid nach Abkühlen auf etwa 50° C zugesetzt.

Probenpuffer (6x):

Bromphenolblau 0,2 %; Xylencyanol FF 0,2 % (Roth); Glycerol 60 %; EDTA, Dinatriumsalz 60 mM.

DNA-Längenstandard:

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, FRG).

3.1.4. Lösungen für den Southern- und Northernblot

Für Northernblots wurden ein 1 % Agarosegele verwendet: 83 ml 1xMOPS; 17 ml Formaldehyd 37 %. Als Laufpuffer wurde 1x MOPS eingesetzt.

Southernblots wurden mit 1 % Agarosegelen in TAE-Puffer durchgeführt.

Waschpuffer 1: 2 x SSC; 0,1 % SDS (Natrium-n-Dodecylsulfat).

Waschpuffer 2: 0,1 x SSC; 0,1 % SDS.

TE-Puffer: 10 mM Tris-Cl, pH 8.0; 1 mM EDTA.

RNA-Mastermix: 8 µl Formamid; 3,2 µl Formaldehyd (37 %); 3 µl 1x MOPS; 2 µl 1:10 verdünnte Ethidiumbromidlösung; 1,5 µl Bromphenolblau.

3.1.5. Two-Hybrid-Puffer

Two-Hybrid-Versuche wurden mit dem MATCHMAKER Two-Hybridsystem (Clontech, Palo Alto, USA) durchgeführt.

X-β-Gal-Stammlösung: 2 mg/ml X-β-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid) (Clontech) wurde in DMF (N, N-Dimethylformamid) gelöst und im Dunkeln bei -20 °C gelagert.

Z-Puffer, pH 7,0:

Na₂HPO₄ x 7 H₂O 16,1 g/l; NaH₂PO₄ x H₂O 5,5 g/l; KCl 750 mg/l (Roth); MgSO₄ x 7 H₂O 246 mg/l.

Die Lösung wurde steril filtriert und frisch angesetzt. Es wurden 270 µl β-Mercaptoethanol und 2 ml X-β-Gal-Stammlösung (Endkonzentration: 2,5 µM) auf 100 ml Z-Puffer gegeben.

3.1.6. Lösungen für die Säulenchromatographie

Bakterienlysispuffer: 50 % PBS; 0,5 % TritonX 100; 2 mM EDTA; 5 mM β-Mercaptoethanol; 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF).

3.1.6.1. Lösungen zur Aufreinigung von Poly-Histidin- fusionierten Proteinen

Waschpuffer 1: 20 % Glycerin; 100 mM TrisHCl pH 8,0; 250 mM NaCl; 0,25 % Tween; 4 mM β-Mercaptoethanol; 15 mM Imidazol.

Waschpuffer 2: 20 % Glycerin; 100 mM TrisHCl pH 8,0; 250 mM NaCl; 0,25 % Tween; 4 mM β-Mercaptoethanol; 40 mM Imidazol.

Elutionspuffer: 20 % Glycerin; 100 mM TrisHCl pH 8,0; 250 mM NaCl; 0,25 % Tween; 500 mM Dithiothreitol (DTT); 500 mM Imidazol.

3.1.6.2. Lösungen zur Aufreinigung von Gluthationen-S-Transferase (GST)-fusionierten Proteinen

Waschpuffer 1: 50 % PBS; 0,2 % Nonidet P-40 (NP-40); 400 NaCl; 2 mM EDTA; 5 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM PMSF.

Elutionspuffer: 20 % Glycerin; 50 % PBS; 0,2 % NP-40; 400 mM NaCl; 2 mM EDTA; 5 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM PMSF; 10 mM reduzierte Gluthationen.

3.1.7. Lösungen zur Proteinanalyse

1 x SDS Probenpuffer nach Lämmli [1970]:

60 mM Tris/HCl, pH 6,8; 2 % (w/v) SDS; 10 % Glycerin; 0,02 % (w/v) Bromphenolblau (Boehringer); 5 % β -Mercaptoethanol.

Lösungen für die Tris/Glycin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE):

Reduzierender Probenpuffer (5x):

250 mM Tris/HCl (Boehringer); 10 % (w/v) SDS; 10 % (w/v) DTT; 25 % (v/v) Glycerin; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau; pH-Wert 6,8.

Längenstandards zur Bestimmung von Proteingrößen:

Precision Plus Protein Standards All Blue (BioRad, München, FRG).

Laufpuffer (1x):

25 mM Tris (Boehringer); 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS.

Es wurden SDS-Gele folgender Zusammensetzung verwendet:

Sammelgel 5 % (5 ml):

30 %/0,8 % (w/v) Acryl/Bis-Acrylamid	0,83 ml (5 %)
1 M Tris/HCl, pH 6,8	0,63 ml (126 mM)
10 % (v/v) SDS	50 μ l (0,1 %)
Aqua dest.	3,46 ml
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	5 μ l (0,1 %)
20 % Amoniumpersulfat (APS)	25 μ l (0,1 %)

Trenngel 10 % (10 ml):

30 %/0,8 % (w/v) Acryl/Bis-Acrylamid	3,33 ml (10 %)
1 M Tris/HCl, pH 8,8	3,5 ml (350 mM)
10 % (v/v) SDS	100 µl (0,1 %)
Aqua dest.	3,02 ml
TEMED	5 µl (0,05 %)
20 % APS	50 µl (0,1 %)

Transferpuffer für Westernblots: 20 mM Tris; 150 mM Glyzin; 20 % (v/v) Methanol; 0,01 % (w/v) SDS; pH 8,3.

TBS (Tris-gepufferte Saline): 10 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; pH 7,3.

TBS-Tween-Puffer: 0,05 % (w/v) Tween 20 in TBS.

3.1.8. Medien zur Kulturvierung verschiedener Bakterienstämme

LB-Medium (Luria-Bertoni)

1 % (w/v) Bacto-Trypton (Gibco); 0,5 % (w/v) Hefeextrakt (Gibco); 0,5 % (w/v) NaCl.

2 x YT (2X yeast tryptone)

1,6 % (w/v) Bacto-Trypton; 1 % (w/v) Hefeextrakt; 0,5 % (w/v) NaCl.

Ggf. wurde dem Medium Ampicillin (50 µg/ml in H₂O) oder/und Kanamyzin (40 µg/ml in H₂O) zugesetzt.

Glyzerinstocks zur Lagerung von Bakterienstämmen:

Zu 1 ml einer frisch saturierten Bakterienkultur wurde 1 Volumen Glyzerinlösung (65 % (v/v) Glyzerin) gegeben. Die Kultur wurde bei -80° C gelagert.

3.1.9. Medien zur Kulturvierung verschiedener Hefestämme

YPD (Peptone Yeast Dextrose):

1 % Hefeextrakt; 2 % Bacto-Peptide (Gibco); 2 % Glukose.

Für die Herstellung selektiver Medien wurden Synthetisches Dropout (SD)-Medien (Clontech) mit den jeweiligen Aminosäuren hergestellt. YPD-Galaktose- bzw. -Raffinose- haltige Medien enthielten, statt Glukose, 2 % D(+)-Galaktose (Fluka) bzw. 2 % D(+)-Raffinose (Fluka).

Synthetisches Dropout (SD) -Medium:

6,7 g Synthetisches Dropout Medium ohne Aminosäuren ad 850 ml H₂O (pH 5,8) wurde autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 55°C wurden 100 ml einer

10x Dropout-Lösung und 50 ml einer 40 % Glukoselösung zugegeben.

10x Dropout-Lösung:

L-Adenin Hemisulfat 200 mg/l; L-Arginin HCl 200 mg/l; L-Histidin HCl Monohydrat 200 mg/l; L-Isoleucin 300 mg/l; L-Leucin 1000 mg/l; L-Lysin HCl 300 mg/l; L-Phenylalanin 500 mg/l; L-Threonin 2000 mg/l; L-Tryptophan 200 mg/l; L-Valin 1500 mg/l.

Die Aminosäuren wurden in H₂O gelöst und anschließend steril filtriert.

Die Dropout-Lösung enthielt die für die Hefe essentiellen Aminosäuren. Je nach Zusammensetzung der Dropout-Lösung konnte auf Hefestämme, die zur Synthese bestimmter Aminosäuren befähigt waren, selektiert werden.

Präsporulationsmedium-Medium:

0,8 % Bacto-Yeast-Extract; 0,3 % Bacto-Peptide; 10 % Glukose.

Sporulationsmedium-Medium:

1 % Kaliumacetat; 0,1 % Bacto-Yeast-Extract; 0,05 % Glukose.

Beide Medien wurden steril filtriert.

Puffer zu Hefelyse:

Protoblasting Puffer (PRO):

1 M Sorbitol; 25 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl, pH 7.5; 10 mM DTT; 1 mg/mL Zymolyase.

Lysis Puffer (LYS):

100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA; 0,5 % SDS; 50 µg/mL Proteinase K (Roche).

3.1.10. Verwendete *Escherichia coli*-Stämme

DH5α: *endA1 hsdR17 (rK-mK+) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^r) relA1*

Δ(lacIZYA-argF)U16_9 deoR [Woodcock *et al.*, 1989]

BL21: F⁻, *ompT*, *hsdSB*, (*rB*⁻, *mB*⁻), *gal*, *dcm*, (DE3) (Invitrogen)

3.1.11. Verwendete *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Saccharomyces cerevisiae Y187 (Clontech, Heidelberg, FRG), [Harper *et al.*, 1993]:
MAT α , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3*, 112, *gal4* Δ , *met-*, *gal80 Δ* ,
URA3::GAL1UAS-GAL1TATA-lacZ

Reportergene: *lacZ*

Auxotrophe Marker: *trp1*, *leu2*, *ura*

Saccharomyces cerevisiae Y190 (Clontech):

MAT α , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3*, 112, *gal4* Δ , *met-*, *gal80* Δ ,
LYS2::GAL(UAS) \rightarrow HIS3 *cyh^r*.

Reportergene: *lacZ*

Auxotrophe Marker: *trp1*, *leu2*

Saccharomyces cerevisiae AH109 [James *et al.*, 1996] :

MAT α , *trp1-901*, *leu2-3*, 112, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* , *LYS2::GAL1UAS-*
GAL1TATA-HIS3, *GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2*,
ura3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ

Reportergene: *HIS3*, *ADE2*, *lacZ*

Auxotrophe Marker: *trp1*, *ura3*, *leu2*

Saccharomyces cerevisiae PRSY003,1A [Schär *et al.*, 1997]:

MAT α *leu2-3* *trp1-289* *ura3-52* *his7* *lys1-1* *ligIV::kanMX4*

3.1.12. Immunhistochemie

Gelvatol: 2,4 g Airvol203 (Airproducts) wurde mit 6 g Glycerin und 6 ml H₂O gemischt, gevortext und ü/N bei RT inkubiert, 12 ml 0,2 M Tris (pH 8,5) dazugeben und 1-2 h bei 50°C erhitzt. Bei 5000 g wurde für 15 Minuten zentrifugiert und 2,5 % DABCO (1,4-Diazobicyclo-2.2.2.-Octane) auf den Überstand gegeben.

3.1.13. Plasmide, Vektoren und Primer

<u>Plasmid</u>	<u>Vektor</u>	<u>Klonierungsstelle</u>	<u>Proteine AS</u>	<u>Quelle</u>
pACT2				Clontech
pAS2-1				Clontech
pcDNA4TOMycHisA				Invitrogen
pcDNA6/TR				Invitrogen
pcDNAeCFPhuNej2	pcDNA4/TO/myc-His A	(EcoRI/XhoI)	hNej2 ₁₋₈₃₇	EcoRI/XhoI pKö20
pCDNAmychuNej2	pcDNA4/TO/myc-His A	(EcoRI/XhoI)	hNej2 ₁₋₈₃₇	EcoRI/XhoI pKö20
pCMXGFP				[Umesono <i>et al.</i> , 1991]
pET28c				Novagen
pET _h Nej2	pET28c	(EcoRI/XhoI)	hNej2 ₁₋₈₃₇	EcoRI/XhoI pKö20
pFaKanMX6				[Wach <i>et al.</i> , 1994]
pGEH006	pRS425	(NcoI/BamHI)	XRCC4 ₁₋₃₃₆	G. Herrmann
pGEH007	pYes-2	(EcoRI)	hDNA-Ligase IV ₁₋₉₁₁	P. Schär
pGEH063	pGEX-KG	(NcoI/SalI)	scNej2 ₁₋₇₀₈	G. Herrmann
pGEH079	pAS2-1	(NcoI/BamHI)	XRCC4 ₁₋₂₃₀	G. Herrmann
pGEH080	pAS2-1	(NcoI/BamHI)	XRCC4 ₁₋₃₃₆	G. Herrmann
pGEM;3Zf				Promega
pGEX-KG				Novagen
pGS10A	pGEX-KG	(EcoRI/XhoI)	hNej2 ₁₉₂₋₅₈₀	EcoRI/XhoI pKö10
pGS20A	pGEX-KG	(EcoRI/XhoI)	hNej2 ₁₋₈₃₇	EcoRI/XhoI pKö20
pGS30A	pGEX-KG	(EcoRI/XhoI)	hNej2 ₂₅₂₋₃₈₄	Primer5+6 pKö20
pGS31A	pGEX-KG	(EcoRI/XhoI)	hNej2 ₂₈₉₋₃₄₃	Primer7+8 pKö20
pGS32E	pGEX-KG	(EcoRI/XhoI)	hNej2 ₃₃₇₋₈₃₇	Primer20+4 pKö20
pGS33A	pGEX-KG	(EcoRI/XhoI)	hNej2 ₃₇₈₋₈₃₇	Primer19+4 pKö20
pGS34I	pGEX-KG	(EcoRI/XhoI)	hNej2 ₂₈₉₋₈₃₇	Primer7+4 pKö20
pGS35H	pGEX-KG	(EcoRI/XhoI)	hNej2 ₁₋₃₄₃	Primer3+8 pKö20
pHS80c	pET28c	(NcoI/BamHI)	XRCC4 ₁₋₃₃₆	NcoI/BamHI pGEH080
pKö10	pACT2	(EcoRI/XhoI)	hNej2 ₁₉₂₋₅₈₀	Primer 1+2 pKö20
pKö11	pACT2	(EcoRI/XhoI)	hNej2 ₁₉₂₋₈₃₇	Primer 1+4 pKö20

<u>Plasmid</u>	<u>Vektor</u>	<u>Klonierungsstelle</u>	<u>Proteine AS</u>	<u>Quelle</u>
pKö13	pACT2	(EcoRI/XhoI)	hNej2 ₁₋₅₈₀	Primer 3+2 pKö20
pKö20	pACT2	(EcoRI/XhoI)	hNej2 ₁₋₈₃₇	Primer 3+4 EST
pLack10	pCMXGFP	Klonierung unter 3.2.10.	eGFP::hNej2	Primer 9+10 pKö20
pPRS120	pAS2-1	(EcoRI)	hDNA-Ligase IV ₁₋₉₁₁	P. Schär
pRS425				[Christianson <i>et al.</i> , 1992]
pUG36				P.Schär
pUG36				P.Schär
px79 (2)	pACT2	(NcoI/BamHI)	XRCC4 ₁₋₂₃₀	NcoI/BamHI pGEH079
px80 (A)	pACT2	(NcoI/BamHI)	XRCC4 ₁₋₃₃₆	NcoI/BamHI pGEH080
pYES2				Clontech

Tabelle 1: Plasmidliste.

Nr.	<u>Restriktions-</u> <u>schnittstelle</u>	<u>Vorlage</u>	<u>Fragment/Orientierung</u>	<u>Oligonukleotid-</u> <u>Sequenz 5'--> 3'</u>
1	EcoRI	pKö20	hNej2 AS 192 5'	GGAATTCATGCTTATGGATCCGAGCGCACC
2	XhoI	pKö20	hNej2 AS 580 3'	CCGCTCGAGTCACTTCTGCAGGGCGCTGGACAG
3	EcoRI	hNej2 EST	hNej2 5'	GGAATTCACATGTCATTGTCCCCTTATAC
4	XhoI	hNej2 EST	hNej2 3'	CCGCTCGAGTCACTTGGCCATGTCGATCAG
5	EcoRI	pKö20	hNej2 AS 252 5'	GGAATTCACATTAGCAAGAAGCTCACTGCT
6	XhoI	pKö20	hNej2 AS 384 3'	CCGCTCGAGTCACTCGCACTCCTCCACCATCTC
7	EcoRI	pKö20	hNej2 AS 289 5'	GGAATTCACCACAACGTTCCCGATGATGGG
8	XhoI	pKö20	hNej2 AS 343 3'	CCGCTCGAGTCACTGTAGCTGCCGGTCATTCTG
9	XbaI	pKö20	hNej2 für eCFP-Fusion 5'	CTAGTCTAGATTGTCATTGTCCCCTTATAC
10	sphI	pKö20	hNej2 für eCFP-Fusion 3'	AAAAGCATGCGGTACCTCACTTGGCCATGTCGATCAG
11		pACT2	GAL4 AD- 5' Sequenzierprimer	TACCACTACAATGGAT
12		pACT2	GAL4 AD- 3' Sequenzierprimer	GAGATGGTGCACGATGCA
13		Hefe Genom	scNej2 vor dem 5' Ende	TGAGGCCTTAGAGCGCGCAT
14		Hefe Genom	scNej2 vor dem 3' Ende	GGGAATTAATAGACTCCAC
15		pFa-KanMX6	KanMX mit Nej2 Flanken 5'	GAAGAACTTAAGCCTTCAGTACGCCAAAACATGGAGGAT TCGGACTCCAACACAGATAAACAGCTGAAGCTTCGTACGC
16		pFa-KanMX6	KanMX mit Nej2 Flanken 3'	ATATAAATCGTGCCTATCTCACCTCTTTTATAGGTACTTTC TAGAGGTCAAGGGCCCGCATAGGCCACTAGTGGATCTG GACGCGAATTCTCACTTGGCCATGTCGATCAGG GACGCGAATTCATGTCATTGTCCCCTTATACCGGG
17	EcoRI	pKö20	hNej2 3'	GGAATTCACGAGATGGTGGAGGAGTGCGAG
18	EcoRI	pKö20	hNej2 5'	GGAATTCACCAGAATGACCGGCAGCTACAG
19	EcoRI	pKö20	hNej2 AS 378 5'	
20	EcoRI	pKö20	hNej2 AS 337 5'	

Tabelle 2: Oligonukleotidliste.

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG (Ebersberg, FRG) bezogen.

3.1.14. Antikörper

Antikörper	Verdünnung im Immunoblot	Verdünnung in der Immunfluoreszenz	Herkunft
Rabbit Anit-GST-scNej2p	1:400		G. Hermann
Rabbit Anti-GST-hNej2	1:400		K. Shah-Hosseini
NIH 13 Rabbit Anti-XRCC4	1:400		[Modesti <i>et al.</i> , 1999]
Rabbit Anti 6xHis-Anhang	1:1000		Cell Signaling, Frankfurt a. M. FRG
Rabbit Anti humane DNA-Ligase IV	1:1000		Abcam, Hiddenhausen, FRG
Rabbit Anti-XRCC4	1:400	1:100	Santa Cruz, Heidelberg, FRG
Rabbit Anti PML-Tritc PG-M3		1:100	Santa Cruz
Goat Anti TRF2 N-20		1:400	Santa Cruz
Rabbit Anti-NBS1		1:150	Santa Cruz
Rabbit Anti-MRE11		1:150	Santa Cruz
Rabbit Anti-Rad50		1:150	Santa Cruz
Rabbit Anti-DNA-PK		1:200	Santa Cruz
Humanes Anti-Cetromer Serum		1:200	Serologie der Uniklinik Köln
Humanes Anti-RNP (Ribonukleoprotein) Serum		1:200	Serologie der Uniklinik Köln
Horseradish Peroxidase Conjugate Rabbit Anti Goat IgG	1:5000		Santa Cruz
Goat Anti Rabbit IgG-FITC		1:150	Santa Cruz
Goat Anti Rabbit IgG-Cy3		1:600	Santa Cruz
Donkey Anti Goat IgG-Texas-Red		1:200	Santa Cruz
Goat Anti Human IgG-Texas-Red		1:200	Santa Cruz

Tabelle 3: Antikörperliste.

3.2. Methoden

3.2.1 Techniken der DNA-Manipulation

3.2.1.1. Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction) wird zur Amplifikation spezifischer Fragmente aus geringen Mengen DNA angewandt. Ein bestimmter Bereich eines DNA-Doppelstranges, der als Vorlage dient, wird mit Hilfe zweier Oligonukleotide, die zu den Enden des zu amplifizierenden Fragmentes komplementär sind, durch eine thermostabile DNA-Polymerase exponentiell vervielfältigt [Mullis und Faloona, 1987].

Für die PCR Amplifikationen in dieser Arbeit wurden, in Abhängigkeit vom Template, 5 ng spezifischer Plasmid-DNA oder alternativ 500 ng genomischer Gesamt-DNA pro PCR-Reaktion eingesetzt. Die Oligonukleotide (Primer) wurden so gewählt, dass die Schmelztemperatur im Bereich von 50-65° C lag und keine Komplementarität zu anderen Bereichen des Templates vorlag. Die Primer wurden in einer Konzentration von 100 pmol/µl in 20 mM Tris, pH 8,0 gelöst.

Die Reaktionstemperaturen und -zeiten wurden auf den jeweiligen Primersequenzen und der Länge der erwarteten Produkte basierend kalkuliert. Eine typische PCR wurde wie folgt angesetzt:

5 ng Template-DNA (Plasmid) oder 500 ng Template-DNA (genomisch); 0,5 µl Pfu- oder Taq-Polymerase I; 5 µl 10x PCR-Puffer (Promega); 0,2 mM je dNTP (Promega); Primer 1 und 2 je 50 pM; Aqua dest. ad 50 µl.

Die Zyklusparameter der Amplifikationsreaktionen waren abhängig von Template, den Primerschmelzpunkten und Fragmentlängen. Nach einer initialen Denaturierung von 60 sek. bei 94° C folgte eine Denaturierung von 45 sek. bei 94° C, eine Hybridisierung der Primer an die DNA von 60 sek. bei 50-65° C und eine Amplifikation von 60 sek. pro zu amplifizierende 1000 Basenpaare bei Verwendung von Taq-DNA Polymerase und 2 Minuten (') bei Verwendung von Pfu-DNA Polymerase bei 72° C. Dieser Zyklus wurde bis 35x wiederholt, wobei nach dem letzten Zyklus eine abschließende zehninütige Elongation bei 72° C folgte.

3.2.1.2. Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung der mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte nach dem Protokoll der Firma Qiagen mittels des „QIAquick PCR-Purification“(Aufreinigungs)-Kit. Hierfür wurde ein 50 µl PCR Ansatz mit 5 Volumen PB-Puffer gemischt, auf eine Silica Membran-Säule gegeben und 1' zentrifugiert. Danach wurde die Säule mit der gebundenen DNA nach den Angaben des Herstellers mit PE-Puffer gewaschen, getrocknet und mit TE-Puffer eluiert.

3.2.1.3 Verdau von DNA

Rekombinierte DNA aus PCR-Reaktionen oder Plasmid-DNA wurde mittels verschiedener DNA-Restriktionsendonukleasen verdaut. Dafür wurde 1 µg DNA mit 10 Einheiten des entsprechenden Enzyms (New England Biolabs NEB) in einem Gesamtvolumen von 20 µl unter Einhaltung der vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Temperaturbedingungen inkubiert. In Anlehnung an die Herstellerempfehlungen (New England Biolabs) betragen die Inkubationszeiten zwischen 1 h (analytische Verdau) und 24 h für bestimmte PCR-Fragmente. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme sind in der Beschreibung des jeweiligen Experimentes aufgeführt.

3.2.1.4. Dephosphorylierung der 5'-Phosphat Termini von DNA-Fragmenten

Um nach einem Restriktionsverdau der entsprechenden Vektoren eine Religation zu verhindern, wurden die entsprechend verdauten Vektoren an den freien 5'-Enden dephosphoryliert. Der Verdau wurde dafür nach Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme für 20' bei 65° C (sofern eine Hitzeinaktivierbarkeit des Enzyms vorlag) mit 10 Einheiten (Units) der alkalischen CIP (Calf Intestinal Phosphatase) (NEB) für 60' bei 37° C inkubiert und danach entweder über ein Agarose-Gel oder mittels eines „QIAquick PCR-Aufreinigungs“-Kit (Qiagen) aufgereinigt.

3.2.1.5. Elektrophoretische Auftrennung von DNA

DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und isoliert. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1xTAE verwendet, dem zur Visualisierung der DNA unter der UV Lampe Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 10 ng/ml zugesetzt wurde. In Abhängigkeit von der relevanten Fragmentlänge wurden Agarosegele mit Konzentrationen zwischen 0,7-2 % verwendet.

3.2.1.6. DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen

Nach der Gelelektrophorese wurden die DNA-Fragmente mittels einer UV-Lampe (312 nm) (Bachhofer, Reutlingen, FRG) sichtbar gemacht, mit einem Skalpell ausgeschnitten, gewogen und mittels des „QIAquick Gel Extraction“-Kits (Qiagen) aufgereinigt. Nach der Aufreinigung wurde ein Aliquot der DNA erneut in einem geeigneten Agarose-Gel aufgetrennt, um Integrität und Konzentration des eluierten Fragments zu bestimmen.

3.2.1.7. DNA-Ligation

Für DNA-Ligationen mit überstehenden freien 3'- oder 5'-Überhängen wurden Vektor und das einzubringende DNA-Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:3, für Ligationen mit glatten (Blunt) Enden in einem Verhältnis 1:10 gemischt. Es wurden insgesamt nicht mehr als 100 ng DNA für eine Ligation in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt. Für die Ligation wurden 2000 Einheiten T4-DNA-Ligase (New England Biolabs (NEB), (2000 Einheiten/µl) eingesetzt. Die Reaktion im Ligationpuffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1mM ATP, 25 µg/ml BSA) erfolgte über Nacht bei 16°C.

3.2.1.8. *Escherichia coli*-Transformation mit rekombinanter DNA

Ein 10 µl Aliquot des Ligationsansatzes, entsprechend maximal 50 ng DNA, wurde in kompetente *E.coli* DH5α Zellen (Subklonierungseffizienz, chemisch Kompetent; Invitrogen) oder in kompetente *E.coli* BL21 DE3 transformiert. Die Transformation der Zellen wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Danach folgte eine einstündige Inkubation bei 37° C ohne Selektion und ein Ausplattieren der Ansätze auf entsprechende Kulturplatten unter Selektion.

3.2.1.9. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Ausgehend von einer Kolonie wurden eine Übernachtskultur in 5 ml LB mit dem entsprechenden Antibiotikum angesetzt und am nächsten Tag pelletiert. Die Lyse der Zellen und die Plasmidisolierung wurden mit Hilfe der Plasmidisolierungs-Kits (Qiagen), nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. 2 µl der Plasmid-DNA wurden dann mittels geeigneter Restriktionsenzyme verdaut und somit die adäquate Ligation und Orientierung der Fragmente geprüft. Die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA wurde durch Vergleichsmengen im DNA-Längenstandard abgeschätzt.

3.2.1.10. Subklonierung von DNA-Fragmenten

Die Vorgehensweise entspricht weitgehend der bis hierhin beschriebenen Subklonierung von PCR-Produkten. Bei Subklonierungen von DNA-Fragmenten wurde das DNA-Fragment enzymatisch aus einem Plasmid herausgeschnitten und gereinigt.

3.2.1.11. Nukleinsäuresequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Konstrukte erfolgte mit einem ABI 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems) durch das ZMMK (Zentrum für Molekulare Medizin Köln) Service Labor. Für das „cycle sequencing“ wurden ca. 0,5 µg Plasmid-DNA und 3,2 pmol Primer des entsprechenden Primers verwendet.

Die Daten wurden mit dem Programm EditView (Perkin Elmer) ausgewertet. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide können der Tabelle 2 entnommen werden.

3.2.1.12. Southernblot-Analyse genomischer DNA (nach Southern, 1975)

3.2.1.12.1. Präparation von genomischer *S. cerevisiae*-DNA (Protoplast-Methode)

Zwanzig ml SD-Minimalmedium wurden mit je einer Hefekolonie angeimpft und bei 30° C ü/N inkubiert. Die Zellen wurden bei 1500 g für 5' bei Raumtemperatur abzentrifugiert und zweimal in 10 ml TE-Puffer gewaschen. Die resuspendierten Pellets wurden in 2 ml PRO-Puffer für 45' bei 37° C inkubiert und dann für 20 sek. bei 14000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1,5 ml LYS-Puffer resuspendiert und 30' bei 65° C inkubiert. Nach einer Protein-Präzipitation mit 1/5 Volumen 4 M K-Acetat, pH 5,4 (10', 4° C) und Zentrifugation (5', 6000 g, 4° C) wurden die Überstände in ein steriles 15 ml Corexröhrchen überführt und die DNA durch Zugabe von zwei Volumen Ethanol (96 %), 20' bei RT gefällt. Die DNA wurde mit 10 ml 70 % Ethanol gewaschen und bei RT getrocknet. Das Pellet wurde in 0,5 ml TE, pH 7,5 mit 50 µg RNase A resuspendiert und bei 37° C für 20' inkubiert. Nach einem Extraktionsschritt mit 2 Volumen PCIA (1 Volumen Phenol/ 1 Volumen CIA (CIA = 24:1 Chloroform:Isoamyl Alkohol) und zehnmütiger Zentrifugation bei 14000 rpm (RT), wurde die DNA im Überstand durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaOAc, pH 5,2 und zwei Volumen kaltem Ethanol präzipitiert. Die DNA wurde mit 70 % Ethanol und dann mit 96 % Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Das trockene

Pellet wurde in 50 μ l TE, pH 8,0 resuspendiert und die DNA anschließend quantifiziert.

3.2.1.12.2. Transfer von DNA-Molekülen auf eine Nylonmembran

Zehn μ g genomische DNA wurden ü/N bei 37° C mit einem Restriktionsenzym verdaut und in einem 0,7 % Agarose-Gel aufgetrennt. Zur Fragmentierung der Nukleinsäuren wurde das Agarose-Gel für 30' in 0,25 M HCl und dann zur Neutralisation für 20' in 0,4 M NaOH geschwenkt. Der Blotaufbau erfolgte im Sandwichverfahren, wobei eine Nylonmembran (Hybond N; Amersham) direkt auf das Gel platziert wurde. Darauf wurden zwei Lagen Whatman Filterpapier und mehrere Lagen saugfähiges Papier gelegt. Für den Kapillartransfer von 18 h wurde 0,4 M frisch angesetzte NaOH verwendet. Danach wurde die Membran kurz in 2xSSC gewaschen. Anschließend wurde die Membran zur UV-Quervernetzung der DNA-Moleküle mit der Membran 1' mit $\lambda=320$ nm auf dem Transilluminator 4000 (Stratagene, West Cedar Creek, USA) bestrahlt.

3.2.1.12.3. Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Fragmenten

Zur Detektion spezifischer Fragmente auf den Southernblots wurden radioaktiv markierte Sonden hergestellt. In der Regel wurden 25 ng DNA eingesetzt und durch die Zugabe von 1,85 MBq [α -³²P]dCTP (spezifische Aktivität > 111 TBq/mmol) mittels des Ladderman Labeling Kits (TaKaRa, Apen, FRG) nach Angaben des Herstellers radioaktiv markiert und über eine „Probe Quant G-50 Micro-Säule“ (Amersham) gereinigt. Die Nylonmembran wurde mit 20 ml Hybridisierungslösung (Ultrahyb; Ambion Cambridgeshire, UK) 1 h bei 65° C inkubiert. Anschließend wurden 10⁶ Counts der DNA-Sonde, die 3' bei 95° C denaturiert wurde, hinzugegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 65° C ü/N. Danach wurde die Membran bei RT zunächst zweimal je 15' mit vorgewärmten Waschpuffer 1, dann jeweils zweimal 15' mit Waschpuffer 2 gewaschen, in Folie eingeschweißt und entsprechende Röntgenfilme (Amersham) exponiert.

3.2.1.13. Northernblot-Analyse

Zelluläre Gesamt-RNA wurde aus humanen Zellen mittels saurer Phenolextraktion (TriZol™, Gibco) isoliert. Dafür wurden ca. 1 Mio. Zellen mit einem Zellschaber in 1,5 ml TriZol™-Lösung lysiert, RNA entsprechend den Herstellerangaben isoliert und

gewaschen. Die RNA wurde quantifiziert und 3-5 µg zellulärer Gesamt-RNA wurden auf einem 1 % Agarose-Gel (83 ml 1x MOPS, 17 ml Formaldehyd 37 %) für ca. 5 h bei 30 mA in 1x MOPS-Puffer aufgetrennt.

Für den Probenauftrag wurde die RNA 10' bei 65° C inkubiert, dann für 5' auf Eis gegeben und der RNA-Mastermix hinzugegeben.

Der Nukleinsäuretransfer wurde analog zum Southernblot durchgeführt. Als Blotpuffer wurde 20xSSC verwendet. Bei der für die nachfolgenden Hybridisierungen verwendeten Sonde handelte es sich in dieser Arbeit immer um den kompletten ORF des humanen *NEJ2*.

3.2.2. Homologiesuche mit dem “Basic Local Alignment Search Tool”

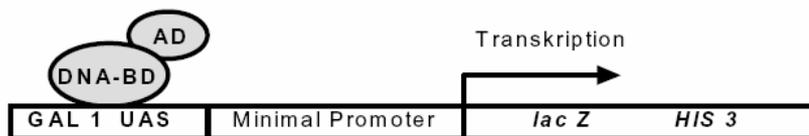
Vergleichende Sequenzanalysen wurden mit Hilfe der Programme BLAST (Basic local alignment search tool) [Altschul *et al.*, 1990] und PSI-BLAST (Position specific iterative BLAST) [Altschul *et al.* 1997; Altschul *et al.* 1998] durchgeführt, die über die Homepage des „National Center for Biotechnology Information“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) zu erreichen sind. Proteinsequenzen wurden im Format FASTA eingegeben. Grundlage der Homologiesuchen bilden Algorithmen, deren Grundlage „Highscoring Segment Pairs“ bilden. Hierbei handelt es sich um Fragmente willkürlicher, aber gleicher Länge aus Such- und Datenbanksequenz, die im Sequenzvergleich ein lokales Maximum bilden und einen Schwellenwert überschreiten. Bei der Homologiesuche mit PSI-BLAST wird aus den Treffern mit hoher Score aus einer ersten BLAST-Homologiesuche ein Profil in Form einer Positionsspezifischen Scoring-Matrix erstellt. Dieses Profil wird im Folgenden für eine weitere Homologiesuche verwendet. Durch die Wiederholung dieses Vorgangs kommt es zu einer iterativen Veränderung des Profils und der erhaltenen Suchergebnisse. Ziel dieses Vorgehens ist es, die Sensitivität der Homologiesuche zu erhöhen, so dass auch noch sehr schwache Homologien und entfernte Verwandtschaften erkannt werden.

Innerhalb der Suchprogramme können unterschiedliche Aminosäure-Austausch-Matrizen gewählt werden, die die evolutive Signifikanz einer Mutation bewerten. Sie unterscheiden sich in der Art ihrer Berechnung und in dem Datensatz, der ihre Grundlage darstellt. Als Matrix wurde in dieser Arbeit BLOSUM62 verwendet.

3.2.3. Das Yeast Two-Hybrid System

Das Yeast Two-Hybrid System wurde zur Detektion von Protein-Protein Interaktionen *in vivo* entwickelt [Fields und Song, 1989; Fields und Sternglanz, 1994]. Ein Vorteil dieser Methode gegenüber *in vitro* Techniken besteht darin, dass die Proteine in einem eukaryontischen System exprimiert und somit unter „*in vivo*“ Bedingungen getestet werden. Die Grundlage für die Entwicklung dieses Systems bildet die Beobachtung, dass viele eukaryontische Transkriptionsfaktoren aus funktionell unabhängigen, physikalisch trennbaren Domänen bestehen [Brent und Ptashne, 1985]. Dabei bindet eine Domäne, die DNA-Bindedomäne (DNA-BD), spezifisch an die zugehörige *upstream activating site*. Durch eine oder mehrere Aktivierungsdomänen (AD) wird daraufhin die Transkription der unter dem Einfluss dieser *upstream activating site* stehenden Gene initiiert [Keegan *et al.*, 1986].

a) natives GAL 4



b) nicht interagierende Hybride



c) interagierende Hybride



Abb. 5: Modell der Transkriptions-Aktivierung durch Wiederherstellung der GAL4 Aktivität.

a) Natives GAL4 Protein enthält DNA-BD und AD, Transkription der Reportergene b) Hybrid enthält entweder DNA-BD oder AD, keine Transkription c) Protein-Protein Interaktion zwischen den beiden Hybriden bringt DNA-BD und AD in räumliche Nähe, Transkription (Verändert nach Fields and Song, 1989)

Werden DNA-BD und -AD physikalisch getrennt in derselben Zelle coexprimiert, bindet die DNA-BD zwar an ihre Zielsequenz, kann aber ohne die AD keine Genexpression auslösen. Die AD kann ihre Funktion nicht ausüben, weil AD und DNA-BD nicht miteinander interagieren und die AD daher nicht in räumliche Nähe zur

upstream activating site gelangt. Werden die beiden Domänen jedoch mit interagierenden Proteinen wie z.B. dem Simian Virus 40 (SV-40) *large tumor (T) antigen* und p53 [Lane und Crawford, 1979] fusioniert, und die beiden Hybridproteine coexprimiert, so wird die AD in räumlicher Nähe zur DNA-BD und damit zur *upstream activating site* lokalisiert und kann ihre Funktion ausüben. Das am häufigsten eingesetzte System verwendet die DNA-BD von GAL 4 (Abb. 5) in Kombination mit der AD von GAL 4.

Als Reportergeräten dienen, in Abhängigkeit vom verwendeten Hefestamm, verschiedene Selektionsmarker, wie beispielsweise das *E.coli lacZ*-Gen, welches für β -Galaktosidase kodiert und bei Aktivierung eine Blaufärbung der Kolonien auf X-Gal-haltigen Filtern hervorruft. Zusätzliche weitere auxotrophe Selektionsmarker, wie beispielsweise Histidin oder Adenin können die Stringenz der Selektion innerhalb des Systems erhöhen.

Zur Untersuchung der Interaktion von XRCC4 und hNej2 wurden verschiedene Primer konstruiert, mit deren Hilfe verschiedenen Fragmente von hNej2-, DNA-Ligase IV und XRCC4 amplifiziert wurden und im offenen Leseraster mit AD und DNA-BD fusioniert wurden (Tabellen 1 und 2).

Als DNA-Vorlagen für die Amplifikationen verschiedener hNej2-Fragmente wurde der von uns identifizierte und sequenzierte EST-Klon DKFZp434B194 verwendet. XRCC4- bzw. DNA-Ligase IV-Fragmente wurden aus der kompletten humanen cDNA der jeweiligen Gene [Critchlow *et al.*, 1997; Robins *et al.*, 1996] amplifiziert. Die Klonierung erfolgte in den DNA-Bindungsdomänenvektor (pAS2-1) oder in den Aktivationsdomänenvektor (pACT2). Mit dem Yeastmaker Yeast Transformations System (Clontech) wurden die so generierten Plasmide nach Sequenzierung der Übergangssequenzen in unterschiedlichen Kombinationen in die *Saccharomyces cerevisiae* Stämme Y187, Y190 oder in AH109 transformiert und über Leu/Trp selektiert. Im Falle des AH109 wurde zusätzlich auf die Interaktion über Ade/His selektiert. Nach 3-5 Tagen wurden die Kolonien (2-3 mm \varnothing) auf β -Galaktosidase-Aktivität (Reportergeräten: *lacZ*) hin überprüft. Der qualitative Nachweis erfolgt mittels Bildung des blauen Spaltprodukts (5-Brom-4-chlor-3-indol) beim enzymatischen Abbau von X- β -Gal durch β -Galaktosidase. Hierfür wurden die Kolonien auf Whatman-Papier aufgenommen und mit Hilfe von flüssigem Stickstoff für den X-Gal-haltigen Z-Puffer permeabel gemacht (Filterliftassay) [Breedon und Nasmyth, 1985]. Danach folgt bis zur evtl. Blaufärbung eine Inkubation bei 30° C, die bis zu 24

Stunden dauern kann. Die Positivkontrolle, p53 (pGBK T7-p53) coexprimiert mit *SV40 large T antigen* (pGAD T7-T), weist nach 2-4 h Inkubation bei 30° C eine deutliche Blaufärbung auf. Außerdem fungierte die Interaktion zwischen humaner DNA-Ligase IV-BD und XRCC4-AD als Positivkontrolle.

3.2.4. Sporulation von Hefen

Allgemeine Methoden der Hefemikrobiologie, wie die Erzeugung diploider Stämme aus haploiden Stämmen durch Kreuzung, Sporulation diploider Zellen, Zerlegung von sporulierten Asci und Tetradenanalyse wurden nach Adams *et al.* [1997] durchgeführt.

3.2.4.1. Kreuzung von Hefestämmen

Die Kreuzung eines haploiden Stammes des Paarungstyps α mit einem des Paarungstyps a geschah durch Mischen eines Aliquots jedes Stammes (z.B. jeweils 5 μ l einer Flüssigkultur) auf einer Vollmedium-Agarplatte und Inkubation bei 30° C für 6-8 h. Durch unterschiedliche Selektionsmarker konnte auf entsprechenden Platten auf die diploiden Zellen, welche die Selektionsmarker der beiden jeweiligen haploiden Ausgangsstämme aufzeigten, selektiert werden.

3.2.4.2. Sporulation und Tetradenanalyse

Die diploiden Hefen wurden für 6-8 h bei 30° C in Präsporulationsmedium (PSPO) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 5000 rpm für 2' zentrifugiert und einmal in Sporulationsmedium (SPO) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 1 ml SPO-Medium, das 1/4 der entsprechenden normalen Supplementkonzentration (7,5 μ l) enthielt, resuspendiert. Die Sporulation erfolgte bei 30° C für 48 h und wurde unter dem Mikroskop überprüft. Die sporulierten Zellen wurden abzentrifugiert und in 1 ml SED (1 M Sorbit, 25 mM EDTA) aufgenommen. Für die Tetradenanalyse wurden die sporulierten Zellen protoplastiert. 200 μ l sporulierte Hefezellen wurden mit 10 μ l 1 M DTT und 20 μ l Novozym (10 mg/ml) (Novo Industri, Bagsvaerd, Dänemark) vermischt und für etwa 15' bei RT inkubiert. Ein Aliquot wurde auf einer YPD-Platte zur Tetradenanalyse ausgestrichen und die vier Sporen einzelner Tetraden mit Hilfe eines Mikromanipulators (MSM, Singer) getrennt. Die Analyse der Tetraden erfolgte anhand der entsprechenden Selektionsmarker.

3.2.5. Überexpression von rekombinanten Proteinen

3.2.5.1. Überexpression rekombinanter Proteine in *Saccharomyces cerevisiae* und Gewinnung von Proteinextrakten

Zur Überexpression rekombinanter Proteine in *S. cerevisiae* wurden unterschiedliche Vektoren mit hoher intrazellulärer Kopienzahl verwendet. Die verwendeten Vektoren erlauben die Induktion der rekombinanten Proteine unter der Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren Promotors. In dieser Arbeit wurde der Stamm PRSY003,1A, der mit den Vektoren pGEH007,2/pGEH006 transformiert wurde, verwendet, um XRCC4 und humane DNA-Ligase IV aufzureinigen. Ebenso wurde der Kontrollstamm mit den Leervektoren als entsprechende Negativkontrolle transformiert.

Nach der Transformation der Konstrukte wurden die Hefen zunächst auf nicht induzierenden (ohne Galaktose) SD-Leu/Ura-Agarplatten ausplattiert. Eine einzelne Kolonie des neu konstruierten Stammes wurde in einer 50 ml-Kultur (SD-Leu/Ura) angeimpft und ü/N bei 30° C inkubiert. Die Hefen der 50 ml-Übernachtskultur wurden in YP-Raffinose-Medium so verdünnt, dass die Kultur eine O.D.₆₀₀ von 0,2-0,3 hatte. Die Kultur wurde für drei Stunden bei 30° C und 200 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. In dieser Zeit erreichten die Hefen die logarithmische Wachstumsphase. Zur Induktion der Expression wurde der Kultur Galaktose mit einer Endkonzentration von 2 % zugesetzt. Nach 16 h Induktion bei 28° C wurden die Zellen bei für 10' bei 3000 g pelletiert und bei -80°C eingefroren.

Zur Proteinextraktion aus Hefezellen wurde der Yeastbuster™ (Novagen) Extraktionskit verwendet. Das Kit basiert auf einer durch reduzierende Detergenzien induzierten Lyse der Hefezellen. Es wurde den Herstellerangaben entsprechend vorgegangen. Hierbei wurde jeweils ein Gramm Pellet in 5 ml YeastBuster Reagenz, 50 µl 100x THP (Tris-Hydroxypropylphosphin) Lösung und 1 µl (25 Einheiten) Benzoase-Nuklease resuspendiert, bei RT 15' inkubiert, und für 20' bei 4° C mit 16000 g zentrifugiert. Der Überstand enthielt die löslichen Proteine.

3.2.5.2. Überexpression von rekombinanten Proteinen in *E.coli* und Gewinnung von Proteinextrakten

Für die Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine in Bakterien wurde der *E.coli* Stamm BL21(DE3) (Stratagene) verwendet. Initial wurden kompetente Zellen (Invitrogen) mit oben beschriebenen entsprechenden Plasmiden transformiert und entsprechende Kolonien selektiert.

Um sechs Histidinreste mit dem gewünschten Protein zu fusionieren, wurde für die Klonierungen der Vektor pET28c (Novagen) verwendet. Die Expression des Fusionsproteins konnte über Isopropyl- β -D-Thio-Galaktopyranosid (IPTG) gesteuert werden.

Für Fusionen mit einem GST-Protein wurde der Vektor pGEX-KG (tac-Promotor, Ampicillinresistenz) verwendet.

Die Konstruktion der Plasmide wurde mittels der unter 3.2.1. beschriebenen Methoden durchgeführt. Tabelle 1 stellt alle in den *E.coli* BL21 Expressions-Stamm gebrachten Plasmide dar. Dabei wurden für die Coexpression alle pGSxx (GST-hNej2) Plasmide mit pHS80c (XRCC4) cotransformiert.

Zur Überexpression wurde eine \bar{u}/N Kultur des das entsprechende Plasmid enthaltenden Bakterienstammes auf eine optische Dichte₅₉₅ von 0,2 in 2YT Medium ohne Antibiotikazugabe verdünnt. Nach Wachstum bei 37° C in die Log-Phase wurde die Kultur für 30' auf Eis abgekühlt und dann 1 mM IPTG dazugegeben, um die Induktion bzw. Überexpression des rekombinanten Proteins zu starten. Induziert wurde für fünf Stunden bei 30° C. Die Bakterien wurden dann bei 5000 g für 10' bei 4° C abzentrifugiert und das Pellet bei -80°C eingefroren.

Das Bakterienpellet wurde für 15' in Bakterienlysispuffer (supplementiert mit 100 μ g/ml Lysozym und 120 μ g/ml PMSF) inkubiert. Danach wurde das Lysat dreimal 20 sek. mit Ultraschall behandelt. Nach Zentrifugation bei 10000 g (4° C) wurde der Überstand des Lysats säulenchromatographisch aufgereinigt.

3.2.6. Säulenchromatographie

3.2.6.1. Nickel-NTA-Agarose-Affinitätschromatographie

Proteine oder Proteinkomplexe mit einem 6xHistidin-Anhang lassen sich mit Nickel-NTA (Nitrilotriaceticacid)-Agarose (Qiagen) aufreinigen. Durch die Affinität der Bindung zwischen dem 6xHistidin-Anhang und dem Ni-NTA-Rest der Agarose können Proteine ohne den 6xHistidin-Anhang ausgewaschen werden. Ein ml einer aufgeschwemmten Ni-NTA-Matrix wurde in ein Eppendorf Reagenzgefäß überführt. Nach Absetzen der Matrix durch Schwerkraft wurde der Überstand entfernt und die Matrix für eine Stunde mit jeweils einem 5-fachen Volumen Äquilibriumspuffer inkubiert. Die zellulären Überstände wurden bei 4° C mit der äquilibrierten Matrix für 60' unter konstanter Rotation inkubiert und dann auf eine 15 ml Gravitationssäule (Biorad) überführt. Die Waschschrte erfolgten mit jeweils 20 Volumen Waschpuffer 1 und 2, danach folgte eine Elution mit dem 5-fachen Säulenvolumen Elutionspuffer.

Die Waschpuffer beinhalteten steigende Imidazolkonzentrationen. Imidazol ist dem Poly-Histidin strukturell ähnlich und konkurriert mit diesem um die Bindung an die Ni-NTA-Agarose. Für unsere Experimente wurden Konzentrationen von 15, 40 bzw. 500 mM Imidazol verwendet. Die gesammelten Proteinfractionen wurden bei -20° C gelagert. Die Fractionen mit dem höchsten Proteingehalt wurden gegen PBS Puffer mit 20 % Glyzerin dialysiert.

3.2.6.2. Glutathion-Affinitätschromatographie

Mit Hilfe der Glutathion-Affinitätschromatographie wurden in *E.coli* überexprimierte, mit Glutathion-S-Transferase (GST)- fusionierte Proteine aufgereinigt. Der Überstand des Lysats wurde mit der vorher in Lysispuffer äquilibrierten Glutathion-Sepharose 4B (1 ml pro Liter Bakterienkultur) gemischt und für zwei Stunden bei 4° C auf dem Taumelrollenmischer inkubiert. Eine Gravitationssäule wurde mit der Protein-assoziierten Glutathion-Sepharose befüllt und mit 10-20 Säulenvolumina Lysispuffer gewaschen. Dann erfolgte die Elution der GST- fusionierten Proteine durch Zugabe des Elutionpuffers, der 10 mM reduzierte Glutathionen enthielt. Es wurden fünf Säulenvolumina Elutionspuffer auf die Säule gegeben, in Eppendorfgefäßen aufgefangen und analysiert. Die Fractionen wurden bei -20° C gelagert. Die Fractionen mit dem höchsten Proteingehalt wurden gegen PBS Puffer mit 20 % Glyzerin dialysiert.

3.2.6.3 Interaktionsnachweis zweier Proteine durch Coexpression und Coaffinitätsreinigung mit Hilfe eines GST-Anhanges

Verschiedene Fragmente des menschlichen Nej2, die mit einem N-terminalen GST-Anhang fusioniert waren, wurden zusammen mit XRCC4 oder den entsprechenden Kontrollvektoren in *E.coli* coexprimiert. Nach Aufschluss der Zellen erfolgte eine Bindung an Glutathion-Sepharose (siehe 3.2.6.2.). Zwei ml des Zelllysates (ca. 500 ng/µl) wurden für zwei Stunden mit 50 µl einer vorher äquilibrierten Glutathion-Sepharose bei 4° C inkubiert. Die Proben wurden mit 500 g 1' zentrifugiert, die Überstände entfernt und die sedimentierte, beladene Glutathion-Sepharose dreimal mit Lysispuffer, dann zweimal mit Waschpuffer 1 gewaschen. Vor der Auftrennung mittels einer SDS-PAGE und dem folgenden Westernblot wurden je 30 µl Lämmli-Puffer [Lämmli, 1970] zur gewaschenen Glutathion-Sepharose gegeben und für 5' bei 95° C aufgeköcht. Im Immunoblot wurden dann mögliche Copurifikationen der Proteine überprüft.

3.2.7. Proteinanalyse

3.2.7.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE wurde wie von Lämmli [1970] beschrieben durchgeführt. In dieser Arbeit wurden verschiedene Konzentrationen an Acrylamid/Bisacrylamid (7,5-15 %) verwendet. Die Elektrophorese wurde zunächst bei 100 Volt und nach Einlauf ins Trenngel bei 200 Volt in einer Elektrophoreseapparatur (Biorad) durchgeführt (Gelgröße 0,75mmx7cmx10 cm). Abhängig von der Größe der Proteine, die dargestellt werden sollten, wurde die Elektrophorese nach 1 bis 3 Stunden beendet und die Gele geblottet oder gefärbt.

3.2.7.2. Coomassie Färbung

Gele wurden in Färbelösung (0,1 % Coomassie Brilliant Blue R250 in 50% Methanol, 5 % Essigsäure) geschwenkt, und anschließend für 30' in Fixierlösung (40 % Methanol, 10 % Essigsäure) inkubiert. Danach wurden die Gele für dreimal eine Stunde in eine Entfärbelösung (10 % Methanol, 10 % Essigsäure) gegeben, mit Wasser gewaschen und anschließend getrocknet.

3.2.7.3. Westernblot

Für Westernblot Analysen erfolgte der Transfer der im Gel aufgetrennten Proteine in einer Biorad Blotting-Apparatur. Dafür wurde das Gel im Sandwichverfahren auf eine Hybond-N (Amersham) Nitrozellulosemembran bei 200 mA für eine Stunde in Transferpuffer geblottet. Nach dem Blot wurde die Membran, um den Transfer zu überprüfen, für 10 sek. in Ponceau-S-Lösung (Amersham) geschwenkt und anschließend für einige Sekunden in H₂O entfärbt.

3.2.7.4. Immunoblotanalyse

Unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper an transferierten Proteinen auf der Nitrozellulosemembran wurden durch einstündige Inkubation mit 5 % Milchpulver in TBS abgesättigt. Der primäre Antikörper wurde im Blockierungspuffer entsprechend verdünnt und für eine Stunde bei RT oder ü/N bei 4° C an der Membran inkubiert. Die Membran wurde dreimal je 15' mit TBST-Puffer gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit Peroxidase- gekoppeltem Sekundäantikörper für eine Stunde bei RT. Die entsprechenden Verdünnungen der unterschiedlichen Primäantikörper und Sekundäantikörper sind in Tabelle 3 aufgeführt. Daraufhin wurde die Membran dreimal für jeweils 5' in TBST, dann einmal in H₂O gewaschen und eine ECL

(enhanced chemiluminescence)-Reaktion mit einem ECL-Detektionskit (Amersham, 1991) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Membran wurde dafür für eine Minute mit ECL-Reagenz bedeckt und anschließend in Frischhaltefolie eingeschweißt. In einer Dunkelkammer wurde ein „Hyperfilm ECL“ (Amersham) auf die Membran aufgelegt und 30 sek. bis zu einer Stunde exponiert.

3.2.8. Überexpression von rekombinanten Proteinen in humanen Zellen

Für die transiente oder stabile Expression von hNej2 wurden verschiedene Plasmide generiert (Tabelle 1), die eine induzierbare Expression von hNej2 in humanen Zellen erlaubte. Als Expressionssystem diente das T-REX System (Invitrogen), ein Tetrazyklin-reguliertes Expressionssystem für Säugerzellen. Es beinhaltet ein Tetrazyklinresistenz-Operon aus *E.coli* als regulatorisches Element (*Tn10*). Die mögliche Tetrazyklin-Regulation basiert auf der Bindung von Tetrazyklin am Tetrazyklin-Repressor und der damit verbundenen Induktion der Expression des gewünschten Gens durch Inaktivierung des Repressors. Zwei Plasmide kommen bei diesem System zum Einsatz. PcDNA6/TR, auf dem ein Blastizidin-Resistenzgen und ein Tetrazyklin (Tet)-Repressor unter Kontrolle des Cytomegaloviruses (CMV)-Promotors kodiert ist.

Der zweite Vektor (pcDNA4/TO/myc-HisA) wurde zur Expression des gewünschten Gens verwendet. Er enthält ein Zeocinresistenzgen, zwei hintereinander liegende Tet-Operons und einen CMV-Promotor. Auf Grundlage dieses Vektors wurde ein Plasmid zur Expression von hNej2 mit einem C-terminalen Myc-Anhang konstruiert.

NEJ2 wurde mit den Primern 3 und 4 und dem Template pKö20 amplifiziert. Die Enden der Amplifikate wurden mit EcoRI und XhoI geschnitten. Der Vektor pcDNA4/TO/myc-HisA wurde ebenso mit diesen Enzymen geschnitten und *hNEJ2* in den Vektor kloniert.

Des Weiteren wurde ein Plasmid mit einem N-terminal *eCFP* (verstärktes Cyan fluoreszierendes Protein)- fusionierten *hNEJ2* konstruiert.

NEJ2 wurde hierzu mit den Primern 9 und 10 amplifiziert und terminal mit XbaI/SphI geschnitten. Das Plasmid pGEM2Zf(x)eCFP wurde mit XbaI/SphI geschnitten und mit dem geschnittenen humanen *NEJ2* ligiert. Das so im Leseraster fusionierte *eCFP-hNEJ2* wurde mit KpnI aus dem neu entstandenen Plasmid wieder herausgeschnitten und in die KpnI-Schnittstelle des Expressionsvektor

pcDNA4/TO/myc-HisA kloniert. Somit entstand ein Plasmid mit dem eine Expression von eCFP-hNej2 möglich war (pcDNATOeCFPhuNej2).

3.2.8.1. Transfektion humaner Zellen

Sowohl die stabile als auch die transiente Transfektion in WI26 SV-40 bzw. Hela-Zellen wurde mit „Superfect Transfektions Reagent“ (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurden 2 µg des jeweiligen Plasmids mit 96 µl DMEM und 10 µl „Superfect Transfektions Reagent“ gemischt. Nach zehnmütiger Inkubation bei RT, wurden 6 Volumen DMEM (mit Zusätzen und FCS) zugegeben und der Ansatz auf die zu transfizierenden Zellen pipettiert. Nach acht Stunden wurde das Transfektionsgemisch durch DMEM ersetzt. Bei stabilen Transfektionen erfolgte nach 24 h die Selektion über Zeocinzugabe (100ng/ml) für zehn Tage.

Bei transienten Transfektionen wurden dem Medium acht Stunden nach der Transfektion, DMEM mit 1 µg/ml Tetracyclin hinzugesetzt und eine fünfständige Induktion der Expression des gewünschten Proteins gestartet. Die Zeit zwischen Transfektion und Mediumwechsel betrug bei den konstitutiv hNej2- exprimierenden Zellen (WI26 pLACK10) zwei Stunden.

3.2.8.2. Fixierung von Zellen

Die Fixierung der auf Glasdeckgläschen gewachsenen humanen Zellen erfolgte bei RT mit 4 % Paraformaldehyd in TBS (10'). Danach wurde für weitere 10' mit TBS und 0,5 % TritonX 100 permeabilisiert, dreimal mit PBS gewaschen und die DNA mit DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) gefärbt. Dazu wurde ein Tropfen mit PBS und 50 ng/ml DAPI auf einen Objektträger pipettiert, das Deckgläschen invertiert aufgelegt und 15' bei RT inkubiert. Danach wurde es mit Aqua dest. gewaschen und mit Gelvatol auf einen sauberen Objektträger gegeben.

3.2.9. Immunhistologische Techniken

Um Colokalisationen von hNej2 mit anderen zellulären Proteinen zu untersuchen wurden parallel zur Expression von eCFP- fusioniertem hNej2 Immunfluoreszenzuntersuchungen durchgeführt. Dafür wurden acht Stunden nach Transformation und fünf Stunden nach Induktion, die Zellen, wie oben beschrieben mit Paraformaldehyd fixiert und permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 0,5 % BSA und 0,2 % Gelatine eine Stunde bei RT inkubiert, um unspezifische Antikörper-Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurden die

Deckgläschen mit den Zellen auf, mit Parafilm überzogenen Objektträgern mit 50 µl des verdünnten Primärantikörpers gegeben und bei 4° C ü/N in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach weiteren Waschschritten mit PBS erfolgte die Inkubation mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper und DAPI für 1 h bei RT. Nach den folgenden Waschschritten wurden die Deckgläschen in Gelvatol auf einem Objektträger eingebettet. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Um zu testen, ob die Überexpression von hNej2 Apoptose auslöst, wurde ein TUNEL-(TdT-mediated dUTP nick end labeling) Assay durchgeführt. Hierbei wurde die durch den programmierten Zelltod ausgelöste DNA-Fragmentierung sichtbar gemacht. Terminale Deoxynukleotidyl Transferase labelt die DNA-Brüche mit fluoreszierendem Nukleotid.

Dieses erlaubt eine Dokumentation von Apoptose unter dem Fluoreszenzmikroskop. Der Assay wurde mit dem „*In Situ* Cell Death Detection Kit, TMR red“ nach dem Protokoll des Herstellers (Roche), ausgehend von den oben beschriebenen fixierten und permeabilisierten Zellen durchgeführt.

3.2.10. Komplementation des *E.coli recG* Phänotyps durch Nej2-Proteine

Zur Komplementation des *E.coli recG* Phänotyps durch Nej2-Proteine wurden der *E.coli* Wildtyp AB1157 [Bachmann, 1996] und der *recG* Stamm N3793 [Al-Deib *et al.*, 1996] mit verschiedenen Nej2-Expressionsvektoren transformiert. Zunächst wurden 15 ml LB mit dem jeweiligen Stamm aus einer LB ü/N Kultur angeimpft und ca. drei Stunden bei 37° C im Schüttler bis zu einer O.D.₅₉₅ von 0,5 inkubiert und 30' auf Eis gestellt. Mittels 1 mM IPTG wurde die Expression von Nej2, drei Stunden bei 30° C induziert. Die Kulturen wurden schließlich für die Bestrahlung auf eine O.D.₅₉₅ von 0,125 verdünnt. Die Zellen wurden nach einer UVB Bestrahlung so verdünnt, dass 2×10^2 Zellen pro Kulturplatte ausplattiert wurden. Nach Inkubation bei 37° C ü/N wurden die überlebenden Kolonien auf den Platten gezählt und prozentual zur unbestrahlten Kontrolle in Relation gesetzt.

4. Ergebnisse

4.1. Identifikation von *Saccharomyces cerevisiae* Nej2p.

Ein neuer Faktor mit Assoziation zur Nicht-Homologen Rekombination

Vor Beginn meiner Dissertation wurde von Dr. G. Herrmann [Dermatologische Klinik der Universität zu Köln] in Two-Hybrid Analysen der neue Faktor scNej2p in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert, der mit dem am NHEJ beteiligten Faktor Lif1p (Hefehomolog von XRCC4) interagiert. Ausgangspunkt meiner Dissertation, die mit Homologiesuchen begann, war die Frage: Gibt es ein menschliches Nej2 Ortholog und welche Funktionen hat es?

Einleitend sollen in diesem Kapitel die Ergebnisse der Vorarbeiten kurz zusammengefasst werden.

Initial konnten mit DNA-Ligase4 (Dnl4p) [Schär *et al.*, 1997] und dem DNA-Ligase4-interagierender Faktor 1 (Lif1p) [Herrmann *et al.*, 1998] zwei Faktoren in der Hefe identifiziert und deren Funktionen im NHEJ gezeigt werden. Beobachtungen in Hefe, wie die Dnl4p- stabilisierende Funktion von Lif1p [Herrmann *et al.*, 1998], konnten später im humanen System bestätigt werden [Bryans *et al.*, 1999].

Mit dem Ziel weitere an NHEJ beteiligte Faktoren zu identifizieren, wurden nach der Entdeckung von Lif1p, Two-Hybrid Analysen durchgeführt, bei denen Lif1p als Köder eingesetzt wurde. Versuche interagierende Proteine von XRCC4, dem menschlichen Lif1p Homolog, mittels Two-Hybrid Analysen zu identifizieren, führten zu keinem Ergebnis [Mizuta *et al.*, 1997].

Es konnten zwei Proteine isoliert werden, die mit Lif1p interagieren. Eines davon war Nej1p. Darüber hinaus konnten drei Klone mit demselben Teil von kodierenden Aminosäuresequenzen von 89-509 eines 83 kDa großen Proteins mit 708 Aminosäuren gefunden werden. Diese wurde durch ein offenes Leseraster (ORF) auf dem Chromosom XII (YLR424W) kodiert. Das Protein wurde mit scNej2p (für *Saccharomyces cerevisiae* non-homologous end-joining assoziiert) benannt. Zuvor konnte die Interaktionsdomäne von Lif1p mit Dnl4p im Bereich der Aminosäuren 190 und 260 von Lif1p determiniert werden [Herrmann *et al.*, 1998]. Diese Region stellt die am höchsten konservierte Region zwischen Lif1p und seinem humanen Homolog XRCC4 dar.

Es wurden weitere Two-Hybrids durchgeführt, um die Interaktionsdomäne von scNej2p innerhalb Lif1p zu determinieren. Hierbei konnte der Bereich zwischen Aminosäure 220 und 240 in Lif1p, also unmittelbar C-terminal der Interaktionsdomäne mit Dnl4p, bestimmt werden.

Die Nähe der beiden Interaktionsdomänen innerhalb von Lif1p mit scNej2p und Dnl4p ist Indiz für eine mögliche Konkurrenz der beiden Proteine um die Interaktionsdomäne. Weitere Two-Hybridanalysen mit verschiedenen scNej2p-Fragmenten ergaben, dass die Interaktionsdomäne von scNej2p mit Lif1p zwischen Aminosäure 180 und 270 von scNej2p liegt. Die Two-Hybrid-Interaktionen wurden in einem unabhängigen System durch Coaufreinigung von in *E. coli* coexprimierten GST-fusioniertem scNej2p und Lif1p bestätigt.

4.2. Identifizierung orthologer Protein- und Gensequenzen von NEJ2

Nach der Identifizierung von scNej2p wurden strukturelle Homologe und Orthologe von scNej2p gesucht. Die Proteinsequenz von scNej2p wurde für Homologievergleiche mit den Programmen BLAST und PSI-BLAST verwendet. Damit konnten in verschiedenen Spezies Proteine mit unterschiedlichen Graden von Orthologien identifiziert werden, die sich teilweise über die gesamte Länge des Proteins erstreckten, teilweise aber nur bestimmte Domänen betrafen. Einige dieser identifizierten Sequenzen, sind exemplarisch mit relativer Übereinstimmungswahrscheinlichkeit (Evalue) für die jeweiligen Bereiche in Tabelle 4 aufgeführt.

Bei den Analysen konnte unter anderem ein humanes Protein (gi:8393259; NP_036275.1) identifiziert werden, das über die gesamte Länge, 22 % identische und 40 % ähnliche Aminosäuren bei 17 % Lücken aufweist. Dieser Grad der Konservierung zwischen humanen Proteinen und solchen aus *S. cerevisiae* liegt im Bereich, der auch bei anderen Proteinen des NHEJ festgestellt wurde [Hermann *et al.*, 1998; Sibanda *et al.*, 2001]. Da sich die Orthologien über die gesamte Länge des Proteins erstrecken, scheint es sich um das strukturelle menschliche Ortholog von scNej2p zu handeln. In Abbildung 6 sind Gegenüberstellungen von Orthologien (Alignments) des menschlichen hNej2, sowie von scNej2p und einem putativen

Ortholog aus der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* (spNej2p, NP_594091.1) aufgeführt.

Protein	Zugangs Nr.	Grad der Orthologie im Bereich von bis (AS)	Evalue
hNej2 [<i>Homo sapiens</i>]	NP_036275.1	22 % AS 61-398	1e-05
Tuftelin Interaktions Protein 11 [<i>Mus musculus</i>] mmNej2	NP_061253.2	22 % AS 61-398	6e-04
Ähnlich dem Tuftelin Interaktions Protein 39 [<i>Rattus norvegicus</i>]	XP_213801.2	22 % AS 61-398	1e-04
Hypothetisches Protein [<i>Schizosaccharomyces pombe</i>]	NP_594091.1	22 % AS 61-333	6e-04
Unbekanntes hypothetisches Protein [<i>Candida albicans</i>]	CAA21978.1	26 % AS 62-298	6e-08
BcDNA.GH11690 [<i>Drosophila melanogaster</i>]	AAD38645.1	36 % AS 61-133	0.001
“DNA-damage-repair/toleration” Protein (DRT111) [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	NP_174336.1	30 % AS 59-145	9.5
Putative Tumor Suppressor LUCA15 RNA-Bindungs Protein 5 [<i>Homo sapiens</i>]	P52756	53 % AS 64-104	0.10
Pin2-Interaktions Protein X1 (TRF1-interacting protein 1) Leber- verwandter putativer Tumor-Suppressor [<i>Homo sapiens</i>]	NP_082504.1	36 % AS 65-121	1.5
Ähnlich zum Pin2-Interaktions Protein X1 (PinX1) [<i>Rattus norvegicus</i>]	XP_224282.2	36 % AS 65-121	1.5

Tabelle 4: Proteine mit Orthologien zu bzw. konservierten Domänen mit scNej2p.

Aufgeführt sind die Proteinnamen aus der Datenbank, Zugangsnummern, relative Übereinstimmungswahrscheinlichkeiten (EValue) und Grad bzw. Bereich der Orthologien im scNej2p zum jeweiligen Protein.

Es konnte im N-terminalen Bereich der orthologen Proteine, die Orthologien über die gesamte Länge zeigen, eine konservierte Glyzin- reiche Domäne identifiziert werden (AS 63-103 in scNej2p), die als G-Patch bezeichnet wird (Koonin *et al.*, 1999). G-Patches sind kurze konservierte Regionen von ca. 40 Aminosäuren mit sieben hochkonservierten Glyzinen, die man in Proteinen findet, die Funktionen im Nukleinsäuremetabolismus haben. Man findet den G-Patch beispielsweise bei PinX1, einem Protein, das mit TRF1- (Telomere Repeat Factor 1) interagiert und eine Rolle in der Regulation der Telomerlänge durch Repression der Telomerase in humanen Zellen einnimmt [Zhou und Lu, 2001]. Daneben hat PinX1 auch Funktionen im RNA-Metabolismus [Guglielmi und Werner, 2002]. G-Patche werden auch beim putativen Tumorsuppressor LUCA 15, welcher RNA-Bindungsqualitäten besitzt und ein

negativer Regulator der Zellproliferation ist [Edamatsu *et al.*, 2000] und DRT111, ein mögliches eukaryotes *RecG* Homolog [Pang *et al.*, 1993], gefunden.

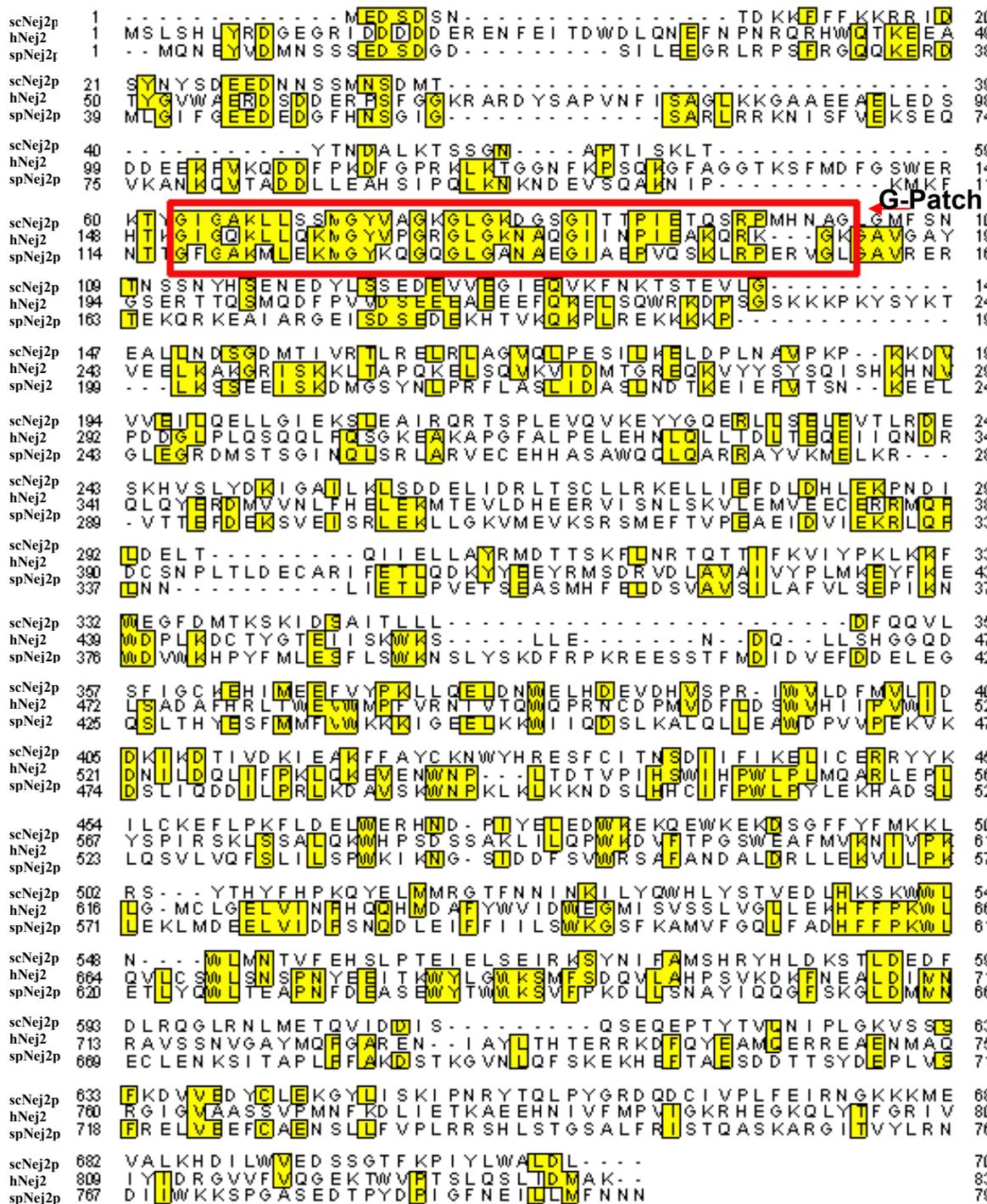


Abb. 6: Alignment der *Saccharomyces cerevisiae*, *Homo sapiens* und *Schizosaccharomyces pombe* Nej2-Orthologe.

Dargestellt sind die unterschiedlichen Aminosäuresequenzen der *Saccharomyces cerevisiae*- (sc), *Homo sapiens*- (h) und *Schizosaccharomyces pombe* (sp) Nej2-Orthologe. Identische Aminosäuren wurden mit gelben Kästchen markiert. Rot umrandet ist die hochkonservierte G-Patch Domäne. Parameter des Alignments war die BLOSUM62-Matrix des Programms „BLAST“ auf dem NCBI-Server.

Nach den Orthologiesuchen mit scNej2p wurde über den NCBI-Server mit dem UniGene-Feature, welches u. a. Informationen über Expressionsmuster eines Gens gibt, aber auch orthologe Gene anzeigt, nach Orthologen von *hNEJ2* (UniGene Cluster Hs.20225 *Homo sapiens*) gesucht. Hierbei konnten Gene, die mit hoher Wahrscheinlichkeit die orthologen Gene zu *hNEJ2* darstellen, gefunden werden (Tabelle 5). Daher wurde im Gegensatz zu Tabelle 4, die Orthologie im gesamten Bereich der Proteine verglichen.

Proteine	Zugangs Nr.	Grad der Orthologie	Proteinlänge
hNej2 [<i>Homo sapiens</i>]	NP_036275.1	100 %	837 As
Tuftelin Interaktions Protein 11 [<i>Mus musculus</i>] mmNej2	NP_061253.2	92 %	838 As
Ähnlich dem Tuftelin Interaktions Protein 39 [<i>Rattus norvegicus</i>]	XP_213801.2	92 %	837 As
Septin interacting protein 1 [<i>Drosophila melanogaster</i>]	NP_524725.2	34 %	839 As
At1g17070 Tuftelin- Interaktions-Protein-ähnliches Protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	NP_173150.1	32 %	849 As
2K638 putative nuclear protein (2K638) [<i>C.elegans</i>]	NP_496226.1	31 %	816 As
SPAC1486.03c [<i>Schizosaccharomyces pombe</i>]	NP_594091.1	27 %	797 As
YLR424W [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>] scNej2	NP_013528.1	22 %	708 As

Tabelle 5: Proteine mit Orthologien zu hNej2, die sich über die gesamte Länge erstrecken.

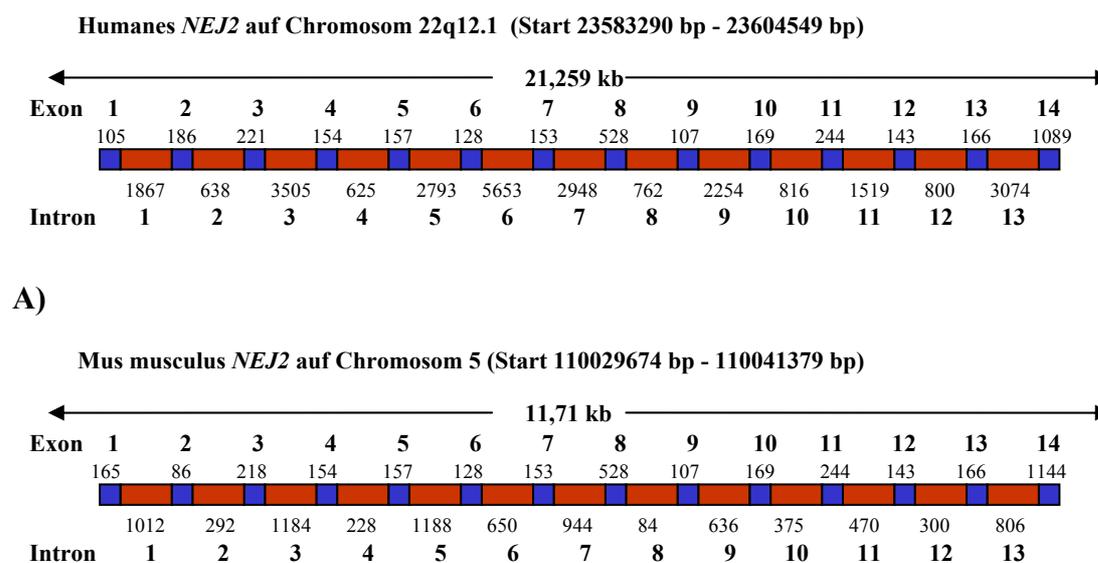
Dargestellt sind die Namen der zu hNej2 putativ orthologen Proteine, die Organismen, Zugangsnummern der Grad der Orthologie, sowie die jeweilige Länge der Proteine.

Es konnten zudem Homologien zum DNA-Reparatur-Protein TgDRE aus *Toxoplasma* [Dendouga *et al.*, 2002] und zum humanen Rad50 gefunden werden. Diese Homologien liegen außerhalb der G-Patch-Domäne. Mit TgDRE (gi: 21666569) wurde eine Homologie von 38 % zwischen Aminosäure 150 und 196 von hNej2 und mit humanen Rad50 von 25 % zwischen Aminosäure 244 und 362 von hNej2 gefunden. Weitere Homologien außerhalb der G-Patch-Domäne zeigten sich mit Proteinen der „structural maintenance of chromosomes“ (SMC) und mit dem Xeroderma Pigmentosum Protein XP-G.

Bei der Homologiesuche konnten in EST-Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene>) 379 exprimierte Sequenzfragmente (EST`s) des humanen *NEJ2* identifiziert werden, wobei zwei EST-Klone mit den

Zugangsnummern DKFZp434B194 und IMAGE3051032, neben flankierenden Sequenzen auch einen übereinstimmenden offenen Leserahmen (ORF) für ein 837 Aminosäuren großes Protein enthielten. Die Gesamtlänge des entsprechenden cDNA Klons betrug, bei einem Aminosäure- kodierenden Bereich von 2511 Basen, bei DKFZp434B194 2876 Basen, bei IMAGE3051032 2841 Basen. Das exprimierte Protein war 837 AS lang und 96,819 kDa schwer. Andere Klone, die auf mögliche Splicevarianten hindeuten könnten, wurden in den Suchen nicht gefunden, so dass es sich bei DKFZp434B194 und IMAGE3051032 um Vollängenklone handeln könnte.

Zusätzlich zu den identifizierten cDNA-Homologien fanden sich bei den Datenbankrecherchen auch Homologien bzw. Orthologien zu chromosomalen DNA-Sequenzen, beispielsweise im Mausgenom und im Menschen. Diese Homologien erlaubten Vorhersagen über die Intron-Exon-Struktur der Proteine (Abbildung 7 A und B).



A)

B)

Abb. 7: Intron-Exon-Struktur der *Homo sapiens* (A) und *Mus musculus* (B) *NEJ2*-Orthologe.

Gegenüberstellung der *NEJ2*-Orthologe von *Mus musculus* und *Homo sapiens*. Introns sind als rote Kästchen, Exons als blaue Kästchen dargestellt. Die Zahlen repräsentieren die entsprechenden Längen in Basenpaaren (bp). Es zeigt sich eine ähnliche Intron-Exonstruktur des *hNEJ2* und des *Mus musculus NEJ2*.

Das menschliche *NEJ2* (gi:7512535) findet sich auf Chromosom 22q12.1 zwischen den Basenpaaren 23583290 und 236045549. Das Mausortholog (gi:13236502) findet sich auf dem Mausechromosom 5 zwischen den Basenpaaren 110029674 und

110041379. Die entsprechende cDNA-Länge ist 3550 Basen, wobei die proteinkodierende Länge 2517 Basen beträgt. Das exprimierte Protein ist 838 AS lang und 96,3 kDa schwer. Beide chromosomalen Loci sind strukturell prinzipiell ähnlich aufgebaut. Die Gene bestehen jeweils aus 13 Introns und 14 Exons. Die hohe Orthologie von 92 % auf Aminosäureebene wird durch eine 85 % Orthologie auf DNA-Ebene widergespiegelt.

Zusammenfassend konnten in verschiedenen Organismen, so auch im Menschen, strukturelle Orthologe von *scNEJ2* identifiziert werden. Verschiedene Homologien deuten auf Funktionen dieser Orthologe im Nukleinsäuremetabolismus hin.

4.2.1. Analyse der möglichen kompletten cDNA-Sequenzen

Zur weiteren Untersuchung der *hNEJ2* cDNA-Vollängenklone, wurde der ORF von *hNEJ2* auf den DKFZp434B194- und IMAGE3051032-Plasmiden mit den Primern 3 und 4 mittels PCR amplifiziert und in dem Vektor pACT2 kloniert. Zur Bestätigung der *hNEJ2*-Sequenzen wurde mit den Primern 11 und 12 eine Sequenzierung durchgeführt. Die *hNEJ2*-Sequenz stimmte in beiden Fällen (mit Ausnahme einer Base) mit der aus der NCBI-Datenbank überein. Durch ein Alignment der DKFZp434B194- und IMAGE3051032-Sequenzen wurden darüber hinaus der ORF und der 5' bzw. 3' untranslatierte Bereich verglichen und die Übereinstimmungen bestätigt (Abb. 8). Es konnte jeweils eine Abweichung von der *hNEJ2* Sequenz aus der Datenbank in jeder cDNA der EST's festgestellt werden. DKFZp434B194 weist eine Tripletteränderung von CAC zu CAT (beide His) und IMAGE3051032 von ATC zu ATT (beide Ile) auf, was jedoch zu keiner Änderung auf Aminosäureebene führt. Somit handelt es sich hierbei um eine „Dritte-Base-Degeneration“.

4 cgctcttctcgcgcggatggtgaagctgaatttggtagctggaccctcggacagacagc 63
 1 cgctcttctcgcgcggatggtgaagctgaatttggtagctggaccctcggacagacagc 60

64 aagagagagacaagcccaggcctgacttctagcactcctgagtttgagccctatgagca 123
 61 aagagagagacaagcccaggcctgacttctagcactcctgagtttgagccctatgagca 120

124 gtggaacctagggaccaccaagatccagatataaattcttctcagtaatagaaaaaag 183
 121 gtggaacctagggaccaccaagatccagatataaattcttctcagtaatagaaaaaag 180

184 aatctgggatctaagaagatacctactcatttttctaagtgactggccatgtcattgtccc 243
 181 aatctgggatctaagaagatacctactcatttttctaagtgactggccatgtcattgtccc 240

ORF →

244 acttataccgggatggggaagggccgcatatgatgatgatgatgacgagcgggagaactttg 303
 241 acttataccgggatggggaagggccgcatatgatgatgatgatgacgagcgggagaactttg 300

304 agatcactgactgggatctccagaatgagttcaacccaaccgacagcggcactggcaga 363
 301 agatcactgactgggatctccagaatgagttcaacccaaccgacagcggcactggcaga 360

364 ccaaggaagaagccacctacggggtgtgggcagagcggagactcggatgatgagaggcca 423
 361 ccaaggaagaagccacctacggggtgtgggcagagcggagactcggatgatgagaggcca 420

424 gctttggaggcaaacgggcccgtgactactctcgccagtcaacttcatcagcgcagggc 483
 421 gctttggaggcaaacgggcccgtgactactctcgccagtcaacttcatcagcgcagggc 480

484 tcaagaaaggggagcggaggagcagagttggaagattctgatgacgaagagaaacctg 543
 481 tcaagaaaggggagcggaggagcagagttggaagattctgatgacgaagagaaacctg 540

544 ttaagcaggacgactttcctaaggattttggaccaaggaagctaaaaacgggtggcaatt 603
 541 ttaagcaggacgactttcctaaggattttggaccaaggaagctaaaaacgggtggcaatt 600

604 ttaagcccagccagaaaggttttgcaggaggaaccaaattcttcatggacttcggcagct 663
 601 ttaagcccagccagaaaggttttgcaggaggaaccaaattcttcatggacttcggcagct 660

664 gggaaagacacacaaaaggaattggacagaagcttcttcagaagatgggctacgtccctg 723
 661 gggaaagacacacaaaaggaattggacagaagcttcttcagaagatgggctacgtccctg 720

724 gacggggcctcgggaagaatgcacaaggtatcattaacccaattgaagccaagcagagaa 783
 721 gacggggcctcgggaagaatgcacaaggtatcattaacccaattgaagccaagcagagaa 780

784 agggaaaaggtgctgtggtggggcttatggatccgagcgcaccactcagtcocatgcaagact 843
 781 agggaaaaggtgctgtggtggggcttatggatccgagcgcaccactcagtcocatgcaagact 840

844 tcctgtggttgactcagaggaagaagctgaagaggagtttcagaaggagctgagccagt 903
 841 tcctgtggttgactcagaggaagaagctgaagaggagtttcagaaggagctgagccagt 900

904 ggaggaaagaccacaagtggaagcaagaagaagccaaaatactcttacaagaccgtggaag 963
 901 ggaggaaagaccacaagtggaagcaagaagaagccaaaatactcttacaagaccgtggaag 960

964 agttgaaggccaagggcaggattagcaagaagctcactgctcccagaaggaactttctc 1023
 961 agttgaaggccaagggcaggattagcaagaagctcactgctcccagaaggaactttctc 1020

1024 aagtcaaggtcatagacatgacagggccgggagcagaaggtctactacagctacagtcaga 1083
 1021 aagtcaaggtcatagacatgacagggccgggagcagaaggtctactacagctacagtcaga 1080

1084 tcagccacaagcacaacgttcccgatgatgggctgccgctacagtcccacagctgccac 1143
 1081 tcagccacaagcacaacgttcccgatgatgggctgccgctacagtcccacagctgccac 1140

1144 agtctggcaaaagaggccaagggccccggcttcgctgcccagctggagcacaacctgc 1203
 1141 agtctggcaaaagaggccaagggccccggcttcgctgcccagctggagcacaacctgc 1200

1204 agctgctcatcgacctcagggagcaggagatcatccagaatgaccggcagctacagtatg 1263
 1201 agctgctcatcgacctcagggagcaggagatcatccagaatgaccggcagctacagtatg 1260

1264 agcgggacatggtgggtcaacctcttccaagagctggagaagatgaccgaggtcctggacc 1323
 1261 agcgggacatggtgggtcaacctcttccaagagctggagaagatgaccgaggtcctggacc 1320

1324 acgaggagcgggtcatctcgaacctcagcaaggtcctggagatggtggaggagtgcgagc 1383
 1321 acgaggagcgggtcatctcgaacctcagcaaggtcctggagatggtggaggagtgcgagc 1380

1384 ggcggatgcagcccagctgcagcaacccccctcacctggacgagtggtcccgcacatcttcg 1443
 1381 ggcggatgcagcccagctgcagcaacccccctcacctggacgagtggtcccgcacatcttcg 1440

1444 aaacctcgcaggacaagtactatgaggagtacaggatgtccgaccgtgtggaccttgctg 1503
 1441 aaacctcgcaggacaagtactatgaggagtacaggatgtccgaccgtgtggaccttgctg 1500

1504 tggccatcgtctatccactcatgaaggagtacttcaaggagtgggatccccctcaaagact 1563
 1501 tggccatcgtctatccactcatgaaggagtacttcaaggagtgggatccccctcaaagact 1560

1564	gcacttatggcaccgagatcatctctaagtggaaaagcctcctagagaatgaccagctct	1623
1561	gcacttatggcaccgagatcatctctaagtggaaaagcctcctagagaatgaccagctct	1620
1624	tgtcccatggcggacaggacctctcagcagatgcctttcacaggttgatatgggaagtct	1683
1621	tgtcccatggcggacaggacctctcagcagatgcctttcacaggttgatatgggaagtct	1680
1684	ggatgccttttgttcgaaatattgtcaccagtgccagccaaggaactgtgaccgatgg	1743
1681	ggatgccttttgttcgaaatattgtcaccagtgccagccaaggaactgtgaccgatgg	1740
1744	tggactttttggatagttgggtgcacattattcctgtgtggatcttagataacatactgg	1803
1741	tggactttttggatagttgggtgcacattattcctgtgtggatcttagataacatactgg	1800
1804	accaactcatcttccccaaagctgcaaaaaggagtggaactggaaccgctcacagaca	1863
1801	accaactcatcttccccaaagctgcaaaaaggagtggaactggaaccgctcacagaca	1860
1864	ctgttccccatccactcttggatccaccatggctgcccttatgcaggcacggctggagc	1923
1861	ctgttccccatccactcttggatccaccatggctgcccttatgcaggcacggctggagc	1920
1924	caacttatcccccatccgtagtaagctgtccagcgcctgcagaagtgccacccagcg	1983
1921	caacttatcccccatccgtagtaagctgtccagcgcctgcagaagtgccacccagcg	1980
1984	actcctctgccaagctcatcctccagcctggaaggatgtcttactcctggctcctggg	2043
1981	actcctctgccaagctcatcctccagcctggaaggatgtcttactcctggctcctggg	2040
2044	aagcattcatggtcaaaaacatagtgccaagctggggatgtgtcttggtgagctagtca	2103
2041	aagcattcatggtcaaaaacatagtgccaagctggggatgtgtcttggtgagctagtca	2100
2104	ttaacccccaccagcagcacatggatgcattctattgggtgattgactgggaaggatga	2163
2101	ttaacccccaccagcagcacatggatgcattctattgggtgattgactgggaaggatga	2160
2164	tctctgtctctagcctggtgggacttcttgaagcacttcttccccaaagtggttcagg	2223
2161	tctctgtctctagcctggtgggacttcttgaagcacttcttccccaaagtggttcagg	2220
2224	tgctgtgctcttggctcagtaacagcccaattatgaggagatcaccaagtggctacctgg	2283
2221	tgctgtgctcttggctcagtaacagcccaattatgaggagatcaccaagtggctacctgg	2280
2284	gttggaaagtcgatgttctcagaccaagtgtggtgacatccatctgtcaaggacaaattta	2343
2281	gttggaaagtcgatgttctcagaccaagtgtggtgacatccatctgtcaaggacaaattta	2340
2344	atgaggcacttgatatacatgaaccggggcgtgtcctccaacgttgggtgctacatgcagc	2403
2341	atgaggcacttgatatacatgaaccggggcgtgtcctccaacgttgggtgctacatgcagc	2400
2404	caggagcacggggagaacattgcctatctcaccacacggagcggaggaaggacttccagt	2463
2401	caggagcacggggagaacattgcctatctcaccacacggagcggaggaaggacttccagt	2460
2464	acgaggccatgcaggagagggcggaggctgagaacatggctcagaggggcattggcgtgg	2523
2461	acgaggccatgcaggagagggcggaggctgagaacatggctcagaggggcattggcgtgg	2520
2524	ccgctagctctgtgccatgaactttaaggacctcattgagaccaaggctgaggagcaca	2583
2521	ccgctagctctgtgccatgaactttaaggacctcattgagaccaaggctgaggagcaca	2580
2584	acattgtcttcatgcccgtcattgggaagcgacacgaagggaagcagctctacacctttg	2643
2581	acattgtcttcatgcccgtcattgggaagcgacacgaagggaagcagctctacacctttg	2640
2644	gccgcattgtgatctacatgaccggggagtggcttttgtccagggcgagaagacgtggg	2703
2641	gccgcattgtgatctacatgaccggggagtggcttttgtccagggcgagaagacgtggg	2700
2704	tgccacctcactgcagagcctgatcgacatggccaagtgaactgtggcaggtccagAAC	2763
2701	tgccacctcactgcagagcctgatcgacatggccaagtgaactgtggcaggtccagAAC	2760
2764	cagtccagagacttgcccctaagagggtgactgtaaataaacagtatttttagatcacc	2823
2761	cagtccagagacttgcccctaagagggtgactgtaaataaacagtatttttagatcacc	2820
2824	ttc	2826
2821	ttc	2823

Abb. 8: Alignment der *hNEJ2* cDNA-Sequenzen von DKFZp434B194- und IMAGE3051032.

Die DKFZp434B194-Sequenz ist jeweils in der oberen Reihe und IMAGE3051032 jeweils in der unteren Reihe dargestellt. Der gelb unterlegte Bereich stellt den 2511 Basen großen ORF dar. Grün hinterlegt sind Basenabweichungen in diesem Alignment, die jedoch mit der *hNEJ2*-Sequenz in der Datenbank übereinstimmen. Rot hinterlegte Abweichungen stimmen nicht mit der Sequenz der Datenbank überein. Die Sequenzen des ORF und der flankierenden Bereiche von *hNEJ2* wurden in ihrer Richtigkeit bestätigt.

Um die Länge der korrespondierenden mRNA zu überprüfen, wurde der ORF von DKFZp434B194 mit den Primern 17 und 18 amplifiziert und eine entsprechend markierte Sonde in eine Northernblot Analyse gegen zelluläre Gesamt-RNA aus humanen dermalen Fibroblasten eingesetzt. In der Northernblot Analyse mit 5 µg zellulärer Gesamt-RNA konnte eine einzelne Bande in der erwarteten Höhe von ca. 2900 bp detektiert werden (Abb. 9).

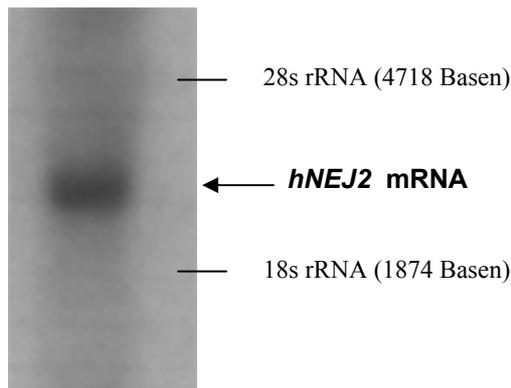


Abb. 9: Detektion der *hNEJ2*-mRNA in zellulärer Gesamt-RNA aus primären humanen dermalen Fibroblasten mittels Northernblot Hybridisierung.

Die Hybridisierung der *hNEJ2*-Volllängensonde mit der aufgetragenen zellulärer Gesamt-RNA aus primären humanen dermalen Fibroblasten, ergibt eine Bande in der Höhe von ca. 2900 Basen. Als Längenstandart diente die 28S und 18S rRNA. *hNEJ2*-mRNA konnte im mRNA-Gesamtext durch die Sonde nachgewiesen werden.

4.2.2. Kreuzreaktion des anti-scNej2p Antikörpers mit humanem Nej2

Um eine weitere Evidenz für die Orthologie von Hefe und humanen NEJ2 zu erhalten, wurde getestet, ob ein gegen GST-scNej2p generierter Antikörper mit dem humanen Ortholog kreuzreagiert. Dazu wurde rekombinantes mit sechs Histidinen fusioniertes humanes *NEJ2* (pET_hNej2) in *E.coli* überexprimiert und die entsprechenden Proteine aus zellulären Extrakten über eine Nickel-NTA-Agarosesäule aufgereinigt. Parallel wurden Extrakte aus *E.coli* Stämmen gewonnen, die den Leervektor trugen (Bahnen 2 und 4, Abb. 10). Die relevanten Elutionsfraktionen wurden nach einem Westernblot mit einem Antikörper gegen 6xHistidin inkubiert. Es konnte ein Protein von ca. 100 kDa in der Elutionsfraktion detektiert werden. In einem parallel durchgeführten Immunoblot zeigte sich eine Kreuzreaktivität des gegen GST- fusionierten scNej2p generierten Antikörpers mit

hNej2p (Abb. 10, Bahn 1). Dies stellte eine weitere Evidenz für eine strukturelle Orthologie der Nej2-Proteine dar.

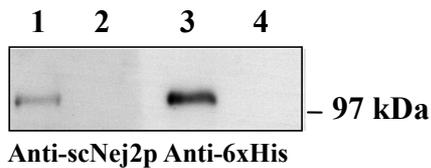


Abb. 10 Kreuzreaktion des gegen GST- fusionierten scNej2p gerichteten Antikörpers mit humanem Nej2.

Immunoblotanalyse mit einem gegen GST- fusioniertes scNej2p gerichteten Antikörpers (Bahn 1 und 2) und mit einem gegen 6xHistidin gerichteten Antikörper (Bahn 3 und 4). Bahn 1 und 3 zeigen 2 µg des über Nickelagarose aufgereinigtes 6xHis-hNej2-Proteins. Die Bahnen 2 und 4 repräsentieren die Negativkontrollen (Aufreinigungselution ohne hNej2). Es zeigt sich eine Detektion von hNej2, sowohl durch den Anti-scNej2p Antikörper, als auch durch den Anti-6xHis Antikörper. Somit konnte eine Kreuzreaktion des Anti-scNej2p Antikörper mit hNej2 gezeigt werden.

4.3. Analyse der Expression von *hNEJ2*-mRNA in verschiedenen humanen Geweben

Nach der Determination der *hNEJ2*-mRNA Expression in primären, humanen, dermalen Fibroblasten stellten wir uns die Frage, in welchen Geweben *hNEJ2* außerdem exprimiert wird und analysierten dafür die Expression der entsprechenden mRNA in verschiedenen menschlichen Geweben.

Mit Hilfe verschiedener EST-Datenbanken (UniGene) konnte eine Expression von *hNEJ2* in Fibroblasten (seneszent), in der Epidermis, im Thymus, in embryonalen Stammzellen, im Nervensystem (Gehirn gesamt, Cerebellum, frontaler Cortex, peripheres Nervensystem), im Uterus, im Skelettmuskel, in Blut (Makrophagen, in Lymphozyten, NK-Killerzellen), in den großen Gefäßen (Aorta), in der Brustdrüse, in der Leber (adult und fetal), in den Nieren, im Magen, im Herz (fetal), in den Augen (Retina, fetale Augenanlage) sowie in der Plazenta gefunden werden.

Mittels der OMIMTM (Online Mendelian Inheritance in ManTM)-Datenbank auf dem NCBI-Server konnten keine bekannten Erkrankungen oder Tumore gefunden werden, bei denen chromosomale Veränderungen im Bereich des *hNEJ2*-Lokus auftreten. Es konnten jedoch *hNEJ2*-EST-Fragmente in, aus verschiedenen Tumoren generierten, cDNA-Banken identifiziert werden, wie z.B. Prostatakarzinom, Melanom, Neuroblastom, Chondrosarkom, invasives Adenocarcinom (Lunge), Glioblastom oder Medullatumor.

Für unsere Untersuchungen wurde eine Sonde eingesetzt, die im Northernblot spezifisch eine Bande erkennt, welche mit der EST's Länge der mRNA von *hNEJ2* übereinstimmt (vgl. Kapitel 4.2.1. Abb. 9).

Für die Analysen wurde ein kommerziell erhältlicher „Human Adult and Fetal Normal Tissue mRNA-Array“ (Cat. No. H3234709 / Lot No: A607075; Biocat, Heidelberg) verwendet, auf dem gleiche Mengen, aus Gesamt-RNA gewonnener PolyA-mRNA, aufgetragen waren (Abb. 11).

A)

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Positiv Kontrolle (Plazenta)	Negativ Kontrolle	Adulte Harnblase	Fetale Harnblase	Adultes Hirn	Fetales Hirn	Adultes Kleinhirn	Fetales Kleinhirn
B	Adultes Colon	Fetaler Colon	Adultes Herz	Fetales Herz	Adulte Niere	Fetale Niere	Adulte Leber	Fetale Leber
C	Adulte Lunge	Fetale Lunge	Adulte Haut	Fetale Haut	Adultes Skelett-Muskel	Fetaler Skelett-Muskel	Adultes Dünndarm	Fetaler Dünndarm
D	Adulte Milz	Fetale Milz	Adultes Magen	Fetaler Magen	Adultes Thymus	Fetaler Thymus	Adulte Zunge	Fetale Zunge

B)

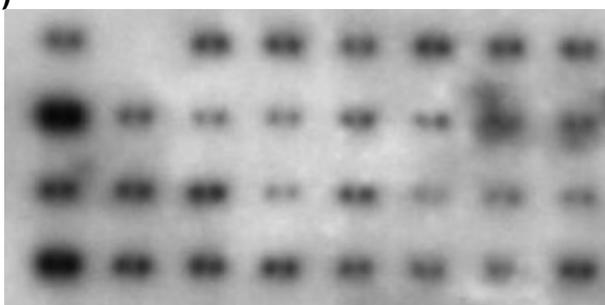


Abb. 11: Northernblot mit einer Sonde gegen *hNEJ2* und Gesamt-mRNA aus verschiedenen humanen adulten und fetalen Geweben.

A) Anordnung von mRNA aus 32 verschiedenen humanen Geweben auf einem Northernblot. **B)** mRNA-Array, auf dem 6 ng Gesamt-mRNA der verschiedenen Gewebe, jeweils punktiert aufgetragen wurden und mit der kompletten, humanen *NEJ2* cDNA hybridisiert wurden. Es zeigte sich eine Expression von *hNEJ2* in allen analysierten Geweben.

Mittels des „Multiple-Tissue RNA Dotblot“ konnte die Expression in verschiedenen Geweben verglichen werden. Zudem war es möglich die Expression im fetalen und adulten Stadium des Gewebes zu vergleichen.

hNEJ2 wird ubiquitär exprimiert. Eine erhöhte Expression fand sich im adulten Colon- und in der adulten Milz. Zudem konnte in der adulten Haut, im Herz, in den Nieren

und im Dünndarm eine erhöhte Expression im Vergleich zur entsprechenden fetalen Probe festgestellt werden.

4.4. Analyse der Interaktion zwischen hNej2 und XRCC4

Ziel der folgenden Untersuchungen war die Klärung der Frage, ob es, analog zur Interaktion von scNej2p und Lif1p, eine entsprechende konservierte Interaktion von hNej2 und XRCC4 gibt. Methodisch wurde dies mittels Two-Hybrid Analysen und Coaufreinigungen analysiert.

4.4.1 Interaktion von hNej2 und XRCC4 im Two-Hybrid System

ScNej2p wurde in Two-Hybrid Screens mit Lif1p als Köder identifiziert (Kapitel 4.1.). Später konnte die Interaktionsdomäne mit Lif1p in weiteren spezifischen Two-Hybrid Experimenten zwischen den Aminosäuren 180-270 eingegrenzt werden (Kapitel 4.1.). Ziel der folgenden Experimente war es, eine mögliche konservierte Interaktion des humanen Nej2 und XRCC4 im Two-Hybrid System zu untersuchen. Es wurden verschiedene Fragmente des humanen *NEJ2* ORF, Fragmente des humanen *XRCC4*, sowie der humanen *DNA-Ligase IV* in entsprechende GAL4 DNA-Bindungs- und Aktivierungsdomänen-Vektoren kloniert und in spezifischen Two-Hybrid Experimenten in verschiedenen Kombinationen eingesetzt.

Die Sequenzen der klonierten Fragmente, sowie die korrekte Klonierung in die entsprechenden ORF an den Übergängen zu den Vektorenssequenzen wurden durch Sequenzierungen überprüft.

Initiale Experimente wurden im Hefestamm Y190 (Clontech) unter Bedingungen durchgeführt, bei denen durch eine Selektion auf Leucin- und Tryptophan-Auxotrophie, nicht auf eine Interaktion der Fusionsproteine, sondern auf die Cotransformation mit den entsprechenden GAL4-AD bzw. DNA-BD Vektoren selektiert wurde. Die Kolonien wurden folgend in einem X-Gal-Assay auf Blaufärbung und damit auf Interaktion der Fusionsproteine untersucht. Es wurden verschiedene Fragmente von hNej2 (AS 192-580, 192-837, 1-580, 1-837) als Fusionsproteine mit der GAL4-AD exprimiert und gegen verschiedenen XRCC4- (AS 1-230, 1-336) DNA-BD-Fusionen eingesetzt. Als Kontrolle diente XRCC4 (Volllänge) fusioniert mit GAL4-AD und DNA-Ligase IV (Volllänge) fusioniert mit DNA-BD. Die Expression der Volllänge des hNej2₍₁₋₈₃₇₎ führte zu keinen überlebensfähigen Klonen. Die hNej2 Versionen Aminosäure 1-580 und 192-837 zeigten keine Interaktion mit den XRCC4-

Varianten. Eine Transaktivierung, d.h. Blaufärbung im X-Gal-Assay, auch bei der Negativkontrolle, die eine Expression eines jeweiligen Fusionsproteins zusammen mit dem entsprechenden Leervektor darstellte, wurde bei hNej2 Aminosäure 192-580 gefunden. Im Two-Hybrid der DNA-Ligase IV als BD-Fusionsprotein und XRCC4 als AD-Fusionsprotein, der als Positivkontrolle verwendet wurde, konnte eine spezifische Interaktion unter diesen Bedingungen gezeigt werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass hNej2 als Fusionsprotein mit der DNA-AD unter diesen Assaybedingungen transaktiviert bzw. letal ist.

Andere Hefestämme, wie beispielsweise AH109 (Clontech) haben zusätzlich weitere Selektionsmarker (*HIS3*, *ADE2*), die eine stringenter Selektion auf spezifische Interaktionen erlauben und es somit ermöglichen eine Transaktivierung zu umgehen. Entsprechende Hefestämme und die zugehörigen Selektionssysteme sind am Institut für Molekulare Krebsforschung der Universität Zürich, CH [AG Dr. Primo Schär] etabliert. Aufgrund der bestehenden engen Kooperation, wurden daher die von mir etablierten Konstrukte dort transformiert und die Stämme auf Interaktion der Proteine untersucht. Dort zeigte sich, dass in diesem Selektionssystem keine Transaktivierung stattfand und sich eine positive Interaktion von XRCC4-BD (AS 1-230) mit hNej2-AD (AS 190-650) ermitteln ließ. Es zeigte sich somit im Two-Hybrid eine Interaktion von hNej2 und XRCC4, wobei initial die Untersuchungen durch eine Transaktivierungstendenz bestimmter hNej2 Konstrukte erschwert waren.

4.4.2. Coaufreinigung von rekombinantem XRCC4 und hNej2

Ziel der folgenden Experimente war die Bestätigung der im Two-Hybrid Assay beobachteten Interaktion von humanem Nej2 und XRCC4 in einem unabhängigen Testsystem. Dafür wurden GST- fusioniertes hNej2 und XRCC4 in unterschiedlich selektierbare Vektoren kloniert und die rekombinanten Proteine in *E.coli* überexprimiert. Als Kontrolle wurden nur eines der Proteine und der korrespondierende Leervektor exprimiert. Fünf Stunden nach Induktionsstart durch IPTG wurden zelluläre Gesamtextrakte hergestellt und die Expression der rekombinanten Proteine im Westernblot getestet. Abbildung 12 A zeigt die Expression von rekombinantem XRCC4 in verschiedenen zellulären Gesamtextrakten. In der ersten Spur wurde ein Extrakt mit XRCC4 und dem entsprechenden GST-Leervektor, in der zweiten Spur GST- fusioniertes hNej2 und dem entsprechenden Leervektor aufgetrennt. Spur 3 zeigt ein Extrakt mit

coexprimiertem GST-hNej2 und XRCC4. In den folgenden Schritten wurden GST-fusionierte Proteine an eine Glutathionesepharosesäule absorbiert und Waschschriffe unter hoher Stringenz (bis 600 mM NaCl) durchgeführt, um die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Proteinbindungen an die Sepharosematrix oder an GST-hNej2 zu verringern. Die nach den Waschschriffen an die Sepharosematrix gebundenen Proteine wurden dann in Westernblot Analysen mit Antikörpern gegen XRCC4 untersucht. Abbildung 12 B zeigt, dass XRCC4 ausschließlich mit GST-fusioniertem hNej2 (Spur 3), nicht aber mit dem GST-Protein copurifiziert werden konnte (Spur 1).

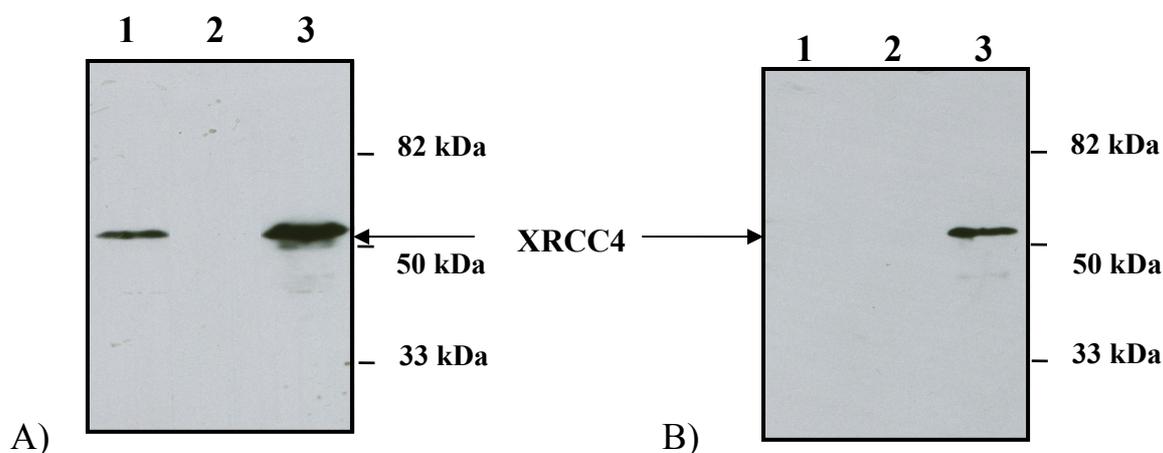


Abb. 12: Coexpression von rekombinatem XRCC4 und GST-hNej2 in *E.coli* (A) und Coaufreinigung von XRCC4 mit GST- hNej2 (B).

A) Westernblot Analyse von Gesamtproteinextrakten mit einem Antikörper gegen XRCC4 B) Westernblot Analyse mit Anti-XRCC4, der an die Glutathion-Sepharose gebundenen Proteine nach mehreren stringenten Waschschriffen. Die Bahnen entsprechen: 1) GST-Leervektor und rekombinantes XRCC4, 2) GST- fusioniertes hNej2 und Leervektor und 3) GST- fusioniertes hNej2 und rekombinantes XRCC4. XRCC4 wurde im Gesamtextrakt (A) in 1 und 3 nachgewiesen. Nach einer stringenten Aufreinigung über eine Glutathion-Sepharosesäule war nur im Eluat (B) mit beiden rekombinaten Proteinen (XRCC4 und GST-hNej2) (3) eine Coaufreinigung mittels Westernblot zu beobachten.

Es konnte somit in einem unabhängigen Testsystem eine weitere Evidenz für eine Interaktion von hNej2 und XRCC4 aufgezeigt werden.

4.4.3. Untersuchungen zur Eingrenzung der Interaktionsdomäne von hNej2 mit XRCC4

In Two-Hybrid Analysen konnte die mit Lif1p- interagierende Region auf einen Bereich zwischen den Aminosäuren 180-270 von scNej2p eingegrenzt werden (Kapitel 4.1.). Die folgenden Untersuchungen hatten das Ziel innerhalb von hNej2 die mit XRCC4 interagierende Region genauer einzugrenzen. Dafür wurden, analog zu

den Experimenten in Abschnitt 4.4.2., statt des gesamten hNej2 Proteins verschiedene Versionen von hNej2 als GST-Fusionsproteine zusammen mit XRCC4 oder den entsprechenden Leervektoren in *E.coli* exprimiert. Abbildung 13 zeigt die Westernblot Analyse die Eluate der an Glutathion-Sepharose gebundenen Proteine nach mehreren stringenten Waschschrritten.

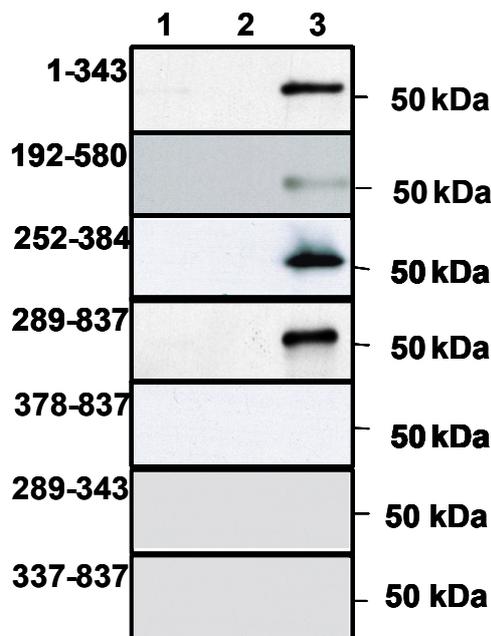


Abb. 13: Coaufreinigung von XRCC4 und verschiedenen GST-hNej2-Versionen.

Die Auftrennung der Eluate der GST-Aufreinigungen mit verschiedenen GST-hNej2-Versionen und XRCC4 (3) bzw. den entsprechenden Kontrollen 1) Leervektor und XRCC4 und 2) GST- hNej2 und Leervektor. Nachweis mit Anti-XRCC4-Antikörper. Eine Coaufreinigung von XRCC4 konnte mittels der GST-hNej2-Fragmente von Aminosäure 1-343, 192-580, 253-384 und 289-837, nicht jedoch mittels der GST-hNej2-Fragmente von Aminosäure 378-837, 289-343 und 337-837 erreicht werden.

Die Aufreinigungen wurden mit einem gegen XRCC4 gerichteten Antikörper untersucht. Es zeigte sich, dass XRCC4 mit GST-Fusionsproteinen von hNej2 coaufgereinigt werden konnte, die die Aminosäuren 1-343, 192-580, 252-384, sowie 289-837 enthielten, so dass die kleinste überlappende Interaktionsdomäne zwischen den Aminosäuren 289 und 343 lokalisiert werden konnte (Abb. 14). Das GST-Fusionsprotein aus diesen Aminosäuren (289-343) reicht jedoch nicht für eine Coaufreinigung von XRCC4 aus, was aber durch eine mögliche veränderte Faltung der Domäne in dem sehr kleinen Fusionsprotein verursacht sein könnte. Das kleinste direkt interagierende Fragment in diesem Versuchsansatz konnte zwischen den Aminosäuren 252 und 384 lokalisiert werden.

```

scNej2p 147 EALLNDSGDMTIVRTLRELRLAGVQLPESILKELDPLNAVPKP--KKDV 193
hNej2 243 VEEELKAKGRISKKLTAPOKELSQVKVIDMTGREQKVYYSSYSQISHKHNV 291

scNej2p 194 VVEILQELLGIEKSLEAIRQRTSPLEVQVKEYYGQERLLSELEVTLRDE 242
hNej2 292 PDDGLPLQSQQLPQSGKEAKAPGFALPELEHNLQLLIDLTEQEIIQNDR 340

scNej2p 243 SKHVSLYDKIGAILKLSDDDELIDRLTSCLLRKELLIEFDLDHLEKPNDI 291
hNej2 341 QLQYERDMVVNLFHELEKMTFVLDHEERVISNLSKVLEMVEECERRMQP 389

```

Abb. 14: Aminosäuresequenz des Homologen Bereiches von scNej2p und hNej2 im Bereich der putativen Interaktionsdomäne.

Im den homologen Bereichen zwischen 180 und 270 von scNej2p bzw. 289 und 384 von hNej2 konnten jeweils die putativen Interaktionsdomänen mit Lif1p bzw. XRCC4 lokalisiert werden.

Rote Aminosäurereste zeigen Übereinstimmungen der beiden Proteine an. Dunkelgrau unterlegt sind die putativen Interaktionsbereiche mit Lif1p bzw. XRCC4. In hellgrau unterlegt wurde darüber hinaus das in den Coaufreinigungen kleinste direkt interagierende Fragment des hNej2 zwischen den Aminosäuren 252 und 384. Es zeigt sich, dass die Interaktionsdomänen von hNej2 und scNej2p an homologen Positionen liegen.

Es findet sich in hNej2 im Vergleich mit der in scNej2p eingegrenzten Interaktionsregion eine funktionell konservierte Interaktionsregion mit XRCC4/Lif1p an ähnlicher Stelle in beiden Proteinen.

4.5. Versuche zur funktionellen Komplementierung der Letalität eines *scnej2*-Hefestammes durch episodale Überexpression von *hNEJ2* und *scNEJ2*

Die Sporulation des heterozygot, *scnej2*-deletierten, diploiden *S. cerevisiae* Stamm FF18734/FF18984 [Schär *et al.*, 1997] zeigte, dass eine *scnej2*-Deletion haploid letal ist [Dr. Primo Schär, Institut für Molekulare Krebsforschung der Universität Zürich, unveröffentlicht]. Alle anderen bekannten NHEJ-Faktoren, wie beispielsweise Dnl4p, Lif1p oder yKu70/80p zeigen diese Eigenschaft nicht. Dies deutet auf zusätzliche essentielle Funktionen von scNej2p außerhalb des NHEJ hin. Auch wenn gezeigt werden konnte, dass die humanen Orthologe von Lif1p (XRCC4) bzw. Dnl4p die Defekte in der DSBR der entsprechend deletierten Hefestämme nicht komplementieren konnten, sollte im Folgenden untersucht werden, ob eine Komplementierung des letalen Phänotyps eines *scnej2* Stammes durch episodale Überexpression von *hNEJ2* möglich ist. Zudem sollte eine Komplementierung des *scnej2*-Knockout durch episodale Überexpression von *scNEJ2* erreicht werden.

Initial war es für diese Experimente notwendig eine heterozygote Deletion von *scnej2* in einem diploiden Hefestamm zu etablieren. Eine Kopie von *scNEJ2* wurde dafür mittels einer PCR- basierten Strategie durch ein Kanamycinresistenzgen ersetzt. Die Oligonukleotide (13 und 14) zur PCR-Amplifikation der Kanamycinresistenz enthielten an den 5'-Enden 60 bp lange Sequenzen aus den flankierenden Sequenzen des genomischen *scNEJ2*-Gens, um eine komplette Deletion des ORF zu ermöglichen. Nach Transformation der PCR-Produkte wurden kanamycinresistente Kolonien auf die heterozygote *scnej2* Deletion mittels PCR-Analysen mit Oligonukleotiden, die das *scNEJ2*-Gen außerhalb des durch die Gendisruption ersetztten Bereichs flankierten, untersucht (Abb. 15 B). Zwei Klone zeigten eine Heterozygotie am *scNEJ2*-Lokus, die sich durch Amplifikation zweier unterschiedlich großer Banden (2389 bp, *scNej2*; 1900 bp Kanamycinresistenzgen) zeigte.

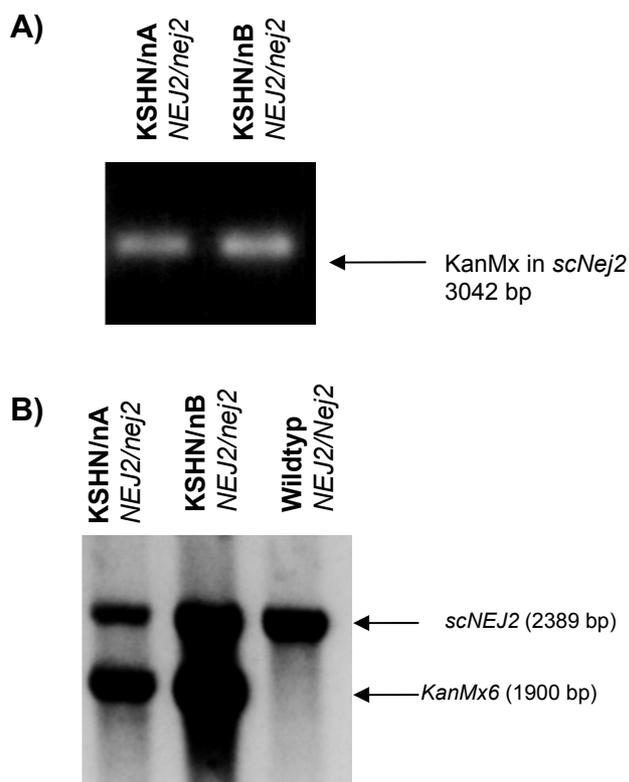


Abb. 15: Nachweis der *KanMx*-Insertion in *NEJ2* des *Saccharomyces cerevisiae* Genoms.

A) Southernblot Analyse mit XhoI- verdauter genomischer Hefe-DNA der diploiden heterozygoten *scnej2/scNEJ2*-Stämme KSHN/nA und B , mittels einer gegen das Kanamycinresistenzgen (*KanMx6*) gerichteten Sonde. Es konnte jeweils eine Bande in Höhe von 3042 bp detektiert und somit eine *KanMx6*-Insertion in *scNEJ2* bestätigt werden.

B) PCR-Analyse genomischer DNA aus kanamycinresistenten diploiden Klonen (KSHN/n A und B) mit Primern, die das *scNEJ2*-Gen außerhalb des durch die Gendisruption ersetztten Bereichs flankierten. Bei den Klonen A und B konnte natives *scNEJ2* (2389 bp) und *scNEJ2* mit einer *KanMx*-Insertion (1900 bp) amplifiziert werden. Als Kontrolle diente genomische *S. cerevisiae* Wildtyp-DNA.

In Southernblot Analysen an XhoI- verdauter genomischer DNA konnte mittels einer gegen das Kanamycinresistenzgen gerichteten Sonde eine 3042 bp große Bande detektiert werden. Dies spricht für eine Integration des Resistenzgens nur an einem genomischen Locus und entspricht der erwarteten Größe bei Integration in *scNEJ2* (Abb. 15 A).

Parallel wurden URA- exprimierende Plasmide (pUG36scNej2 und pUG36hNej2) auf Basis des Vektors pUG36 konstruiert, die es erlaubten yeGFP („yeast enhanced“ Grün fluoreszierendes Protein)- fusioniertes-*scNEJ2* bzw. unfusioniertes *hNEJ2* unter der Kontrolle eines Methionin- reprimierbaren Promotors zu exprimieren und in den kanamycinselektierten heterozygoten *scNEJ2/scnej2*-Hefestamm KSHN/nA zu transformieren.

Nach Sporulationen (Kapitel 3.2.4.2.) und Charakterisierung des diploiden heterozygot deletierten Stammes KSHN/nA mit pUG36scNej2 bzw. pUG36hNej2 zeigte sich in entsprechenden Cosegregationen, dass episomal exprimiertes *scNEJ2*, nicht aber episomal exprimiertes *hNEJ2* die Letalität einer genomischen *scnej2*-Deletion komplementieren konnte. Entsprechende Sporulationen, der von mir konstruierten Stämme wurden von Dr. Primo Schär am Institut für Molekulare Krebsforschung der Universität Zürich durchgeführt.

An der Universität Zürich wurde zudem im diploiden, heterozygoten, episomal yeGFP-scNej2p exprimierenden *scNEJ2/scnej2*-Stamm, die Lokalisation von eGFP-scNej2p untersucht (Kapitel 4.7.) Daneben wurden, der von uns etablierte KSHN/nA pUG36scNej2 Stamm im Labor von Dr. Primo Schär für weitergehende Untersuchungen zur Inhibition von NHEJ durch Überexpression von scNej2p genutzt (Kapitel 4.10.2.).

4.6. Versuch der Komplementierung eines *recG*-Phänotyps durch NEJ2

Wie in Abschnitt 4.2. beschrieben, konnten wir in Datenbanksuchen eine Reihe zu Nej2 orthologer Proteine identifizieren, die Orthologien über die gesamte Länge des Proteins aufweisen (Tabelle 5). Von keinem dieser Orthologe sind biologische Funktionen bekannt. Neben diesen Proteinen konnten wir eine Reihe von Proteinen mit G-Patches identifizieren, die Funktionen im DNA- oder RNA-Metabolismus haben. Zusätzlich waren zu Beginn unserer Untersuchungen eine Reihe dieser

Proteine (unter Ihnen das putative Nej2 Ortholog At1g17070 aus *A. thaliana*) noch nicht in den Datenbanken aufgeführt. Einzig unter den Proteinen mit G-Patches fand sich mit DRT111 (DNA-damage-repair/toleration) aus *Arabidopsis thaliana* ein Protein, dem biologische Funktionen zugeordnet werden konnten [Pang *et al.*; 1993]. Es wurde als mögliches eukaryontisches RecG Ortholog beschrieben. Seine Überexpression konnte in einem für *recG* deletierten *E.coli*-Stamm eine erhöhte UVB-Sensitivität komplementieren. RecG und DRT111 haben keine signifikanten Orthologien, mit Ausnahme eines kleinen Nukleotidbindungsmotifs [Pang *et al.*; 1993]. Somit bestand die Möglichkeit, dass DRT111 nicht das orthologe Protein zu RecG war. Daher stellten wir die Frage, ob *NEJ2* in der Lage ist den *recG* Phänotyp zu komplementieren.

RecG ist eine ATP-abhängige strukturspezifische DNA-Helikase. Ihr Ziel ist die Holliday-Struktur, die am Ende der HR entsteht, wobei sie die Migration der DNA-Verzweigung vorantreibt [Whitby *et al.*, 1993].

Wir überexprimierten *scNej2p*, *hNej2* und *hNej2*_(AS 289-837) in *E.coli recG*-Stämmen.

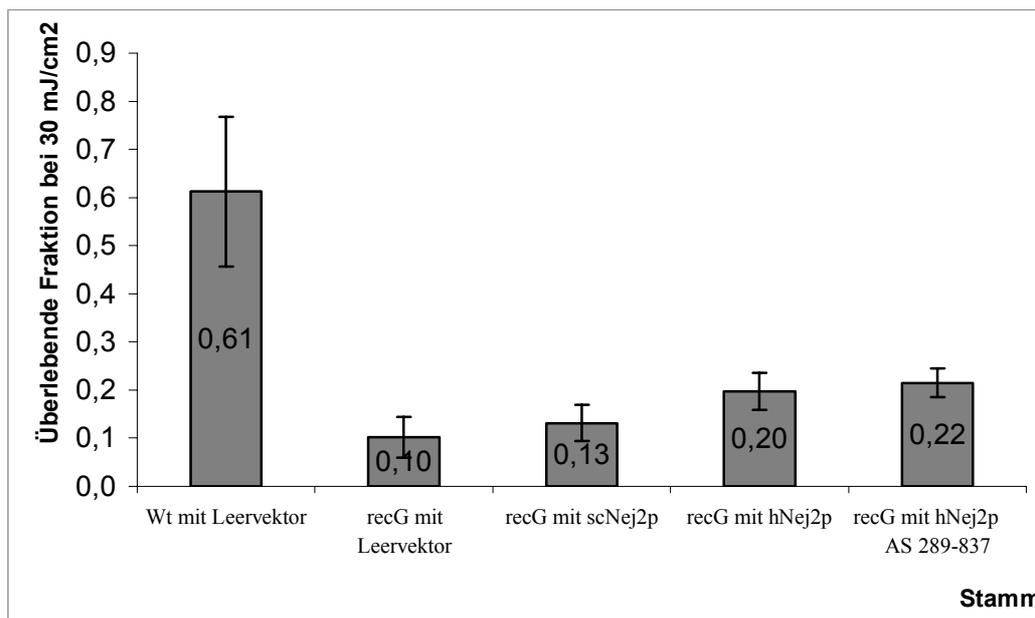


Abb. 16: Nej2-Proteine komplementieren nicht die erhöhte UVB-Sensitivität eines *E. coli recG* UVB-Phänotyps.

Komplementationsversuch des *E. coli recG* UVB-Phänotyps durch Nej2.

In Relation gesetzt wurde, die nach Bestrahlung überlebende Bakterienfraktion zur unbestrahlten eines jeden Stammes, dargestellt für die Stämme: *E.coli* Wildtyp *AB1157* [Bachmann, 1996] mit Leervektor (pGEX-KG), *E.coli recG N3793* [Al-Deib *et al.*, 1996] mit Leervektor, *E.coli recG N3793* mit *scNej2p* exprimierendem Plasmid, *E.coli recG N3793* mit *hNej2* exprimierendem Plasmid und *E.coli recG N3793* mit *hNej2* (AS 289-837) exprimierendem Plasmid. Es konnte keine signifikante Komplementation des *E. coli recG* UVB-Phänotyps durch episomal exprimierte Nej2-Proteine erreicht werden.

Nach Induktion der rekombinanten Proteine für drei Stunden führten wir, analog zu den Arbeiten von Pang *et al.* [1993], eine UVB Bestrahlung mit 30 mJ/cm² durch und konnten weder durch Überexpression von scNej2p (pGEH063), hNej2 (pGS20) oder des N-terminalen hNej2_(AS 289-837) Fragments (pGS34I) die erhöhte UVB-Sensitivität des *recG*- Stammes signifikant komplementieren (Abb. 16).

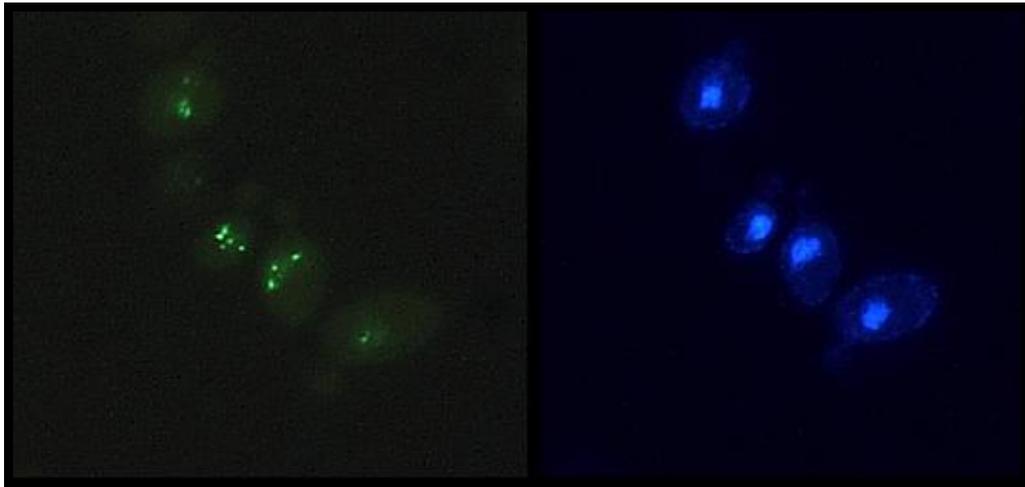
Zusammenfassend erscheint es als unwahrscheinlich, dass Nej2, ein funktionelles eukaryontisches RecG-Ortholog darstellt.

4.7. Lokalisation von Nej2 in humanen Zellen und in *S. cerevisiae*

Das Ziel der folgenden Experimente war zum einen die Untersuchung der zellulären Lokalisation von hNej2 und scNej2p zum anderen die Charakterisierung der zellulären Effekte einer transienten oder stabilen Überexpression von hNej2.

4.7.1. Lokalisation von scNej2p in *Saccharomyces cerevisiae*

Der von uns generierte diploide heterozygote *scNEJ2* deletierte mit pUG36scNej2 komplementierte Stamm KSHN/nA (Kapitel 4.5.) wurde in Zusammenarbeit mit der AG Schär [Institut für Molekulare Krebsforschung der Universität Zürich, CH] zur Lokalisation des scNej2p in *S. cerevisiae* verwendet. Das episomales exprimierte, Methionin- reprimierbare, yeGFP3- (yeast enhanced green fluorescence Protein 3) fusionierte scNej2p konnte in der Hefe in einem nukleären punktförmigen Muster lokalisiert werden, das morphologisch an eine Telomerlokalisierung erinnert (Abb. 17). Hierbei zeigten sich drei bis sechs Foci pro Zellkern. Entsprechende Muster in Hefe sind bei Lokalisationen an Telomer- assoziierten Hefeproteinen beschrieben worden [Gotta *et al.*, 1996].



1000x Vergrößert

Abb. 17: Lokalisation von yeGFP3-scNej2p in haploiden Hefezellen.

Episomale Expression von yeGFP3-scNej2 in einem haploiden chromosomal *scNEJ2*-Deletierten Hefestamm. Es sind jeweils drei bis sechs yeGFP3-scNej2p-Foci im Nukleus zu erkennen, die an eine der Lokalisation von Telomer- assoziierten Proteinen in der Hefe erinnern. Rechts DAPI Färbung des Nukleus, links GFP-Filter zur Betrachtung von yeGFP3-scNej2p.

4.7.2. Versuch der Etablierung einer *hNEJ2* überexprimierenden Zelllinie

Zur der Etablierung einer *hNEJ2* überexprimierenden Zelllinie wurde *hNEJ2* alleine oder als Fusion (*myc*-, *eGFP*- oder *eCFP*- fusioniert) in verschiedene Vektoren kloniert und in unterschiedlichen Zelllinien überexprimiert.

Initial wurden Experimente zur Etablierung einer Zelllinie durchgeführt, in der *hNEJ2* stabil und regulierbar überexprimiert wird.

Als Expressionssystem wurde das T-REX System (Invitrogen) verwendet. Ausgangspunkt stellten humane WI26-SV40-Fibroblasten dar, die stabil mit einem Tetrazyklin-Repressor exprimierenden Plasmid, transfiziert waren (Wi26- SV40 pcDNA6/TR). Auf einem weiteren Plasmid wurde unter Kontrolle des Tet-Operons *hNEJ2* exprimiert.

Plasmide mit *hNEJ2* und verschiedenen fusionierten Anhängen wurden generiert (siehe 3.2.8.). Die Sequenzen der klonierten Gene und die Übergänge vom Vektor zum Insert wurden jeweils durch Sequenzierungen bestätigt. Für die Untersuchungen wurde der komplette ORF von *hNEJ2*, als C-terminale Fusion mit *myc* und als N-terminale Fusion mit einem Gen für das verstärkte Cyan- fluoreszierende Protein (*eCFP*) in den Expressionsvektor pcDNA4/TO/*myc*-HisA (Invitrogen) kloniert, so dass eine Tetrazyklin- induzierbare Expression von *hNEJ2* unter der Kontrolle eines CMV

Promotors und eine Selektion des Plasmids über Zeozin möglich war. WI26-SV40 pcDNA6/TR wurde für die stabile, sowie für eine transiente Transfektion mit den konstruierten Plasmiden mittels eines Transfektionsreagens (Superfect Transfektions Reagent) transfiziert. Nach zehntägiger Selektion mit Zeozin, die 24 h nach der Transfektion begann, konnten keine oder nur vereinzelte überlebenden Zellen im Gegensatz zur Kontrolle (WI26-SV40 pcDNA4/TO/myc-HisA) gefunden werden. Der Versuch wurde mehrfach wiederholt und es wurden 50 Kolonien auf vermehrte hNej2-Expression untersucht, wobei sich in keinem Fall eine induzierbare oder verstärkte Expression von hNej2 nachweisen ließ. Zeocinresistente Zellen, die vermehrt hNej2 exprimierten, konnten auch in anderen Zellen, wie Cos- und Hela (hier konstitutive Expression) nicht etabliert werden, so dass es als wahrscheinlich erscheint, dass eine Überexpression von hNej2 letal ist. Im Fall der durch Tetrazyklin regulierbaren Expression könnte eine „leaky“ Expression von *hNEJ2*, trotz Anwesenheit des Tetrazyklinrepressors dafür verantwortlich sein.

Um den Zeitpunkt der Letalität einzugrenzen, wurden WI26 pcDNA6/TR mit dem *eCFP-hNej2*-Konstrukt (pcDNATOeCFPhuNej2) transfiziert. Acht Stunden nach der Transfektion wurde das Protein für drei bis zwölf Stunden durch Zugabe von Tetrazyklin induziert. Die eCFP-Fluoreszenz wurde unter einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon) analysiert. Es zeigte sich, dass nach Induktionszeiten von mehr als sieben Stunden keine Fluoreszenz zu beobachten war. Nach ca. sechs bis sieben Stunden Induktionsdauer konnten Zellen mit starker eCFP-Fluoreszenz, verteilt über die ganze Zelle und teilweise außerhalb der Zelle gesehen werden. Eine Induktion von ca. drei bis vier Stunden führte zu keiner ausreichenden Induktion des eCFP- fusionierten hNej2. Es konnte keine Fluoreszenz gesehen werden. Nach vier bis sechs Stunden Induktion konnte ein nukleäres Muster des eCFP- fusionierten hNej2, von ca. 20-40 Punkten verschiedener Größe erkannt werden (Abb. 18 a). Zu einem späteren Zeitpunkt (ab ca. sechs Stunden Induktion) traten tendenziell wenige (2-10), große Spots im Zellkern auf (Abb. 18 b). Später war auch außerhalb der Zelle zusätzlich diffuse Fluoreszenz zu sehen (Abb. 18 c). Die Induktionszeit von ca. fünf Stunden stellte sich als optimal für die weiteren Versuche heraus.

Die Versuche wurden parallel mit einem Plasmidkonstrukt durchgeführt, das eine konstitutive Expression von hNej2, fusioniert mit einem verstärkten grün fluoreszierenden Protein (eGFP-hNej2) (pLack10) erlaubte, was zu identischen Ergebnissen führte (Daten nicht gezeigt).

Es konnte in beiden Fällen beobachtet werden, dass im Durchschnitt ca. 1 % der Zellen Fluoreszenz aufwiesen. Hierbei war bedeutend, dass überwiegend, sich in Teilung befindliche Zellen, Fluoreszenz zeigten. Die WI26 pcDNA6/TR Negativkontrolle mit Leervektor zeigte keine Fluoreszenz. In allen Darstellungen wurde eCFP nach Bearbeitung mit dem Programm Lucia G/F grün dargestellt, da die Färbung des Zellkerns blau dargestellt wurde.

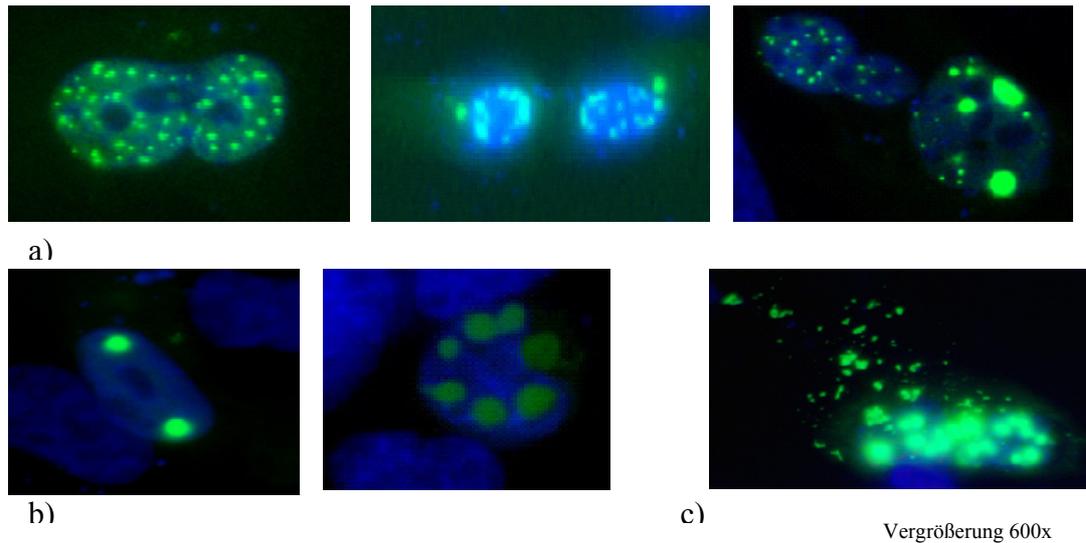
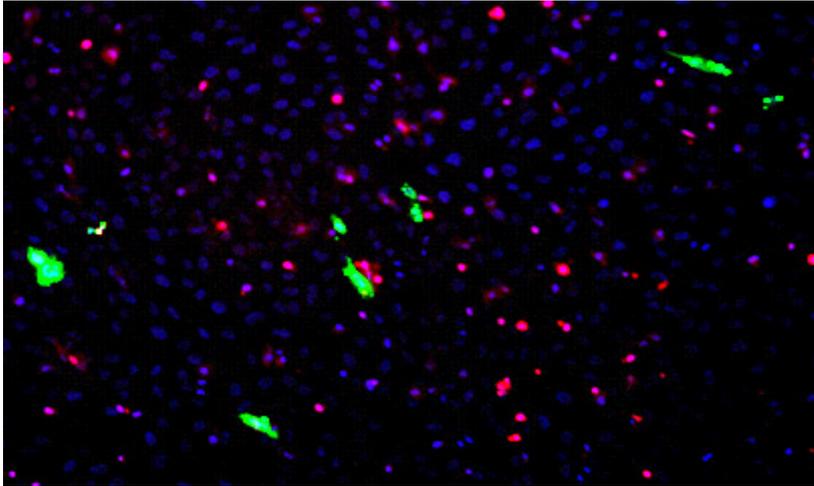


Abb. 18: Lokalisation von eCFP-hNej2 in humanen Fibroblasten nach verschiedenen Induktionszeiten.

Transiente Expression von eCFP-hNej2 in humanen Fibroblasten. **a)** ECFP-hNej2 lokalisierte nach fünfstündiger Induktion nukleär in ca. 20 bis 40 kleinen Spots verschiedener Größe. Überwiegend zeigten, sich in Teilung befindliche Zellen eine eCFP-hNej2-Fluoreszenz. **b)** Nach sechsständiger Induktion lokalisierte das Protein nukleär in zwei bis zehn Spots. **c)** Nach mehr als sechsständiger Induktion der eCFP-hNej2-Expression war eine diffuse nukleäre, aber auch zytoplasmatische Lokalisation von Spots diverser Größe zu beobachten. Zudem konnte außerhalb der Zellen eCFP-Fluoreszenz gesehen werden. DAPI (Blau)/ eCFP-hNej2 (Grün).

Da in verschiedenen Ansätzen sieben Stunden nach Induktionsbeginn von eCFP-hNej2 scheinbar eine Auflösung fluoreszierender Zellen mit Freisetzung aus der Zelle der fluoreszierenden Proteine zu beobachten war (18 c), stellte sich die Frage, welcher Mechanismus in den eCFP-hNej2 überexprimierenden Zellen für den Zelltod verantwortlich sein könnte.

Um Mechanismen der Apoptose zu analysieren wurden in den transient, mit eCFP-hNej2 transfizierten Zellen, apoptotische Zellen mittels eines TUNEL-Assays markiert (Abb. 19).



Vergrößerung 100x

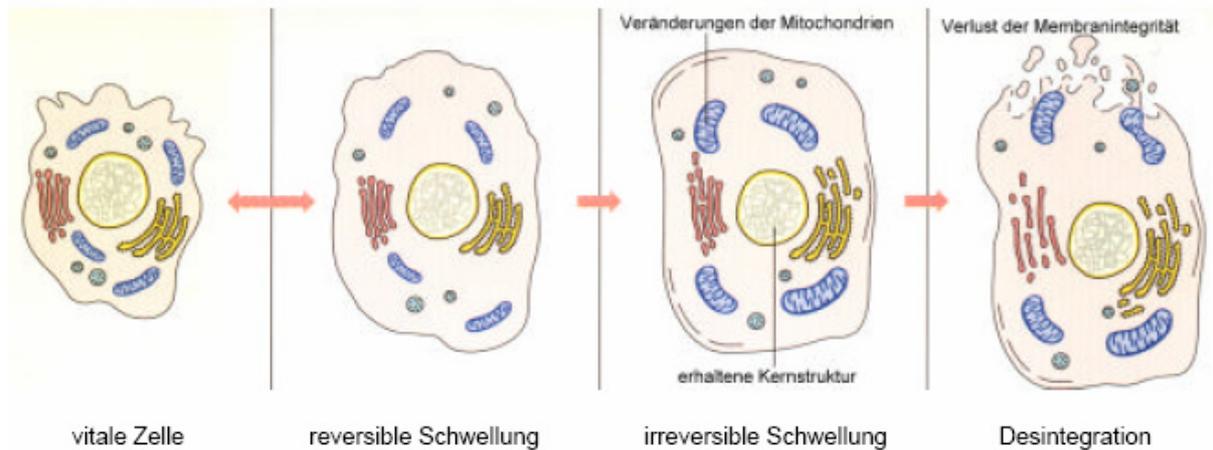
Abb. 19: eCFP-hNej2-Expression führt nicht zur Auslösung von Apoptose.

Apoptose bzw. Defragmentierung der DNA wurde durch Rotfärbung angezeigt. Sechsstündige eCFP-hNej2-Expression führte zu Lokalisationsmustern, wie sie schon in Abb. 18 c beobachtet werden konnten. Es konnte keine Korrelation zwischen eCFP-hNej2 Expression und Apoptose hergestellt werden, da eCFP-hNej2 exprimierende Zellen keine Apoptose zeigten. DAPI (Blau)/ eCFP-hNej2 (Grün.) / Apoptose (Rot).

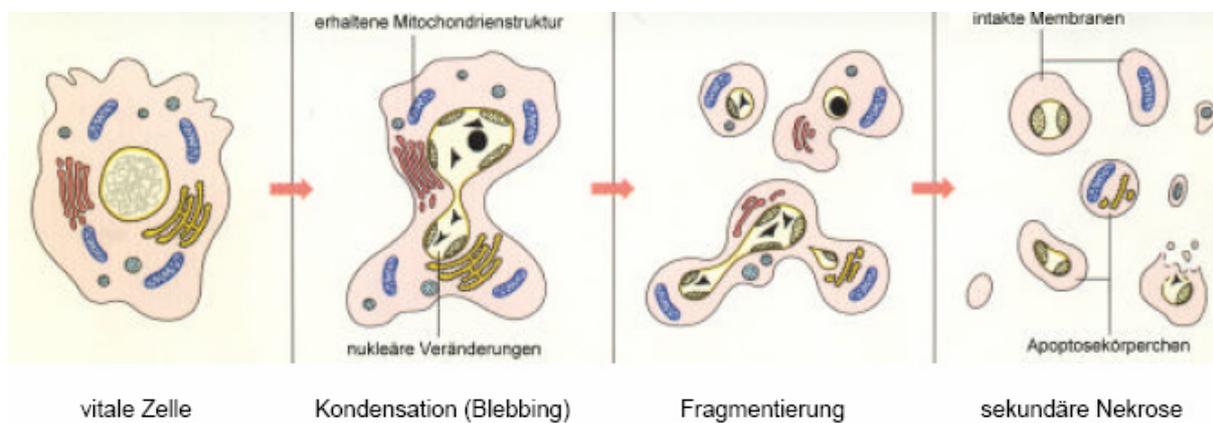
Es zeigte sich keine Colokalisation rotfluoreszierender (apoptotischer) Zellen und den sechs Stunden eCFP-hNej2 exprimierenden Zellen. Dies spricht gegen eine proapoptotische Wirkung, d.h. gegen die spezifische Auslösung eines Apoptoseprogramms durch Überexpression von eCFP-hNej2.

Morphologisch erinnern die „lysierenden“ eCFP-hNej2 überexprimierenden Zellen aufgrund der scheinbar austretenden Proteine, evtl. durch Verlust der Membranintegrität, an nekrotische Zellen (Abb. 20 A).

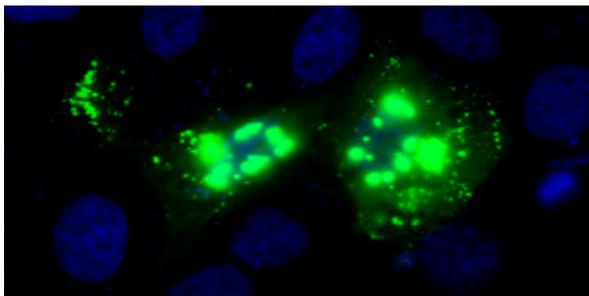
A)



B)



C)



Vergrößerung 600x

Abb. 20: Morphologischer Vergleich zwischen Nekrose (A) und Apoptose (B) mit eCFP-hNej2 überexprimierenden humanen Fibroblasten (C).

A) Nekrotische Zellen zeichnen sich durch eine Schwellung der Zellen und dem Austreten von Proteinen aus der Zelle durch Verlust der Membranintegrität aus. B) Apoptotische Zellen zeigen sekundäre Nekrose, wobei erst nach einer Fragmentierung der Zelle ein Proteinaustritt auftritt. C) Aufgrund der Stabilität des Zellkerns und des aus den nicht fragmentierten Zellen austretenden eCFP-hNej2 handelt es sich wahrscheinlich um Nekrose.

Abb. A und B modifiziert nach „Guide to Cell Proliferation and Apoptosis Methods“, S. 34, Fig. 12 (Roche).

C) DAPI (Blau)/ eCFP-hNej2 (Grün).

4.7.3. Colokalisation von hNej2 mit nukleären Proteinen in humanen Fibroblasten

Nachdem sich die Letalität der Überexpression von hNej2 gezeigt hatte, versuchten wir die nukleäre Lokalisation von hNej2 unter den Bedingungen der transienten Transfektion in humanen WI26 Fibroblasten genauer zu untersuchen. Das Ziel war es, eine mögliche Colokalisation von hNej2 mit anderen bekannten nukleären Strukturen oder DNA Reparaturproteinen zu zeigen, um so eventuell Rückschlüsse auf mögliche Funktionen des Proteins zu ziehen.

Methodisch wurde eine Kombination aus Immunfluoreszenzen und Darstellung der Fluoreszenz des eCFP- fusionierten hNej2 gewählt.

Nukleäre granuläre Muster, die von der Verteilung und Struktur an die von uns in hNej2 transfezierten Zellen beobachtet wurden, findet man immunfluoreszenz-mikroskopisch beispielsweise an Telomerstrukturen [Baumann *et al.*, 2002], Zentromeren [Susuki *et al.*, 2004] oder an „promyelocytic leukemia (PML)-nuclear - bodies“ [Grobelny *et al.* 2000].

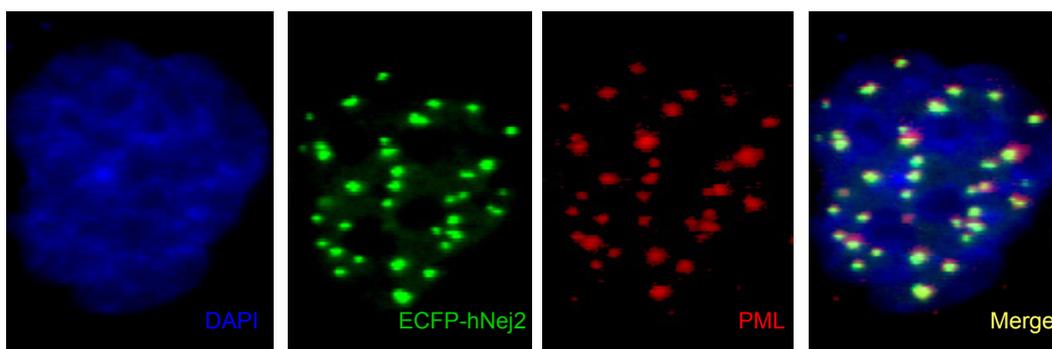
PML-Körperchen sind Strukturen, die mit der Regulation von Apoptose, Transkriptionskontrolle und Tumorsuppression [Hofmann *et al.*, 2003] in Verbindung gebracht werden. In PML-Körperchen sind u.a. p53 [de Stanchina *et al.*, 2004], TRF1 und TRF2 [Grobelny *et al.*, 2000], NBS1 [Wu *et al.*, 2000a] und Mre11 [Lombard *et al.*, 2000] lokalisiert. Sie spielen zudem bei promyelozytischen Leukämie eine Rolle [Gianni *et al.*, 1999].

In Immunfluoreszenzuntersuchungen konnten wir eine Colokalisation von eCFP-hNej2 mit PML-Körperchen zeigen (Abb. 21). Alle eCFP-hNej2 Spots konnten mit PML im Nukleus colokalisiert werden. Zentromere und eCFP-hNej2 colokalisierten nicht (Abb. 22). Zudem wurde das an den Telomeren lokalisierte TRF2 versucht mit eCFP-hNej2 zu colokalisieren (Abb. 23). Es konnten einige TRF2-Spots mit eCFP-hNej2 colokalisiert werden. Eine mögliche Colokalisation mit XRCC4 wurde aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Interaktion mit hNej2 untersucht (Abb. 24). Aufgrund der bekannten diffusen Verteilung von XRCC4, kann hier nicht eindeutig von einer Colokalisierung mit eCFP-hNej2 gesprochen werden. Die Interaktion von hNej2 und XRCC4 kann dadurch jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die diffuse Verteilung von NBS1 zeigt keine Colokalisation mit eCFP-hNej2 (Abb. 25). Verursacht durch die diffuse Verteilung von Rad50 kann auch hier nicht von einer Colokalisierung mit eCFP-hNej2 gesprochen werden (Abb. 26). Eine Ursache hierfür könnte die

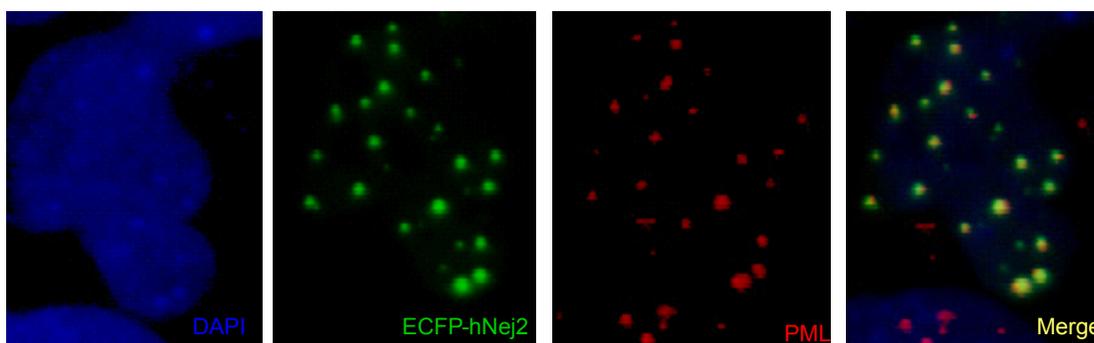
mangelhafte Qualität der Antikörper sein. Das Protein Mre11 konnte mit eCFP-hNej2 in allen Spots im Zellkern colokalisiert werden (Abb. 27). Wie in der Einleitung beschrieben, gibt es Hinweise auf ein Zusammenspiel von DNA-PK und XRCC4 im NHEJ. Somit stellte auch DNA-PK ein potentielles Protein zur Colokalisation mit hNej2 dar (Abb. 28). Die diffuse Verteilung von DNA-PK in der gesamten Zelle erlaubt keine Aussage über die Colokalisierung mit eCFP-hNej2.

Ein Marker für Orte der RNA-Synthese sind Antikörper gegen „kleine nukleäre Ribonukleoproteine“ (snRNP) [Zieve und Sauterer, 1990]. Humanes Nej2 könnte durch das Vorhandensein seiner G-Patch-Domäne in den RNA-Metabolismus involviert sein. Daher wurde versucht snRNP und eCFP-hNej2 zu colokalisieren. Es zeigte sich jedoch, dass die Anzahl und die Größe der größeren Spots von eCFP-hNej2 und snRNP ähnlich sind, sie jedoch nicht colokalisieren (Abb. 29). Die Negativkontrolle (Sekundärantikörper in untransfizierten und transfizierten Zellen) zeigte in allen Immunfluoreszenzversuchen keine Fluoreszenz.

A)



B)



Vergrößerung 600x

Abb. 21: Colokalisation von hNej2 mit PML-Körperchen in HeLa-Zellen und in humanen Fibroblasten.

A) zeigt eCFP-hNej2 transient überexprimierende humane Fibroblasten und B) eCFP-hNej2 überexprimierende HeLa-Zellen. PML wurde durch einen Anti-PML Antikörper sichtbar gemacht. In beiden Fällen konnte PML mit eCFP-hNej2 colokalisiert werden. DAPI (Blau)/ eCFP-hNej2 (Grün)/ PML (Rot).

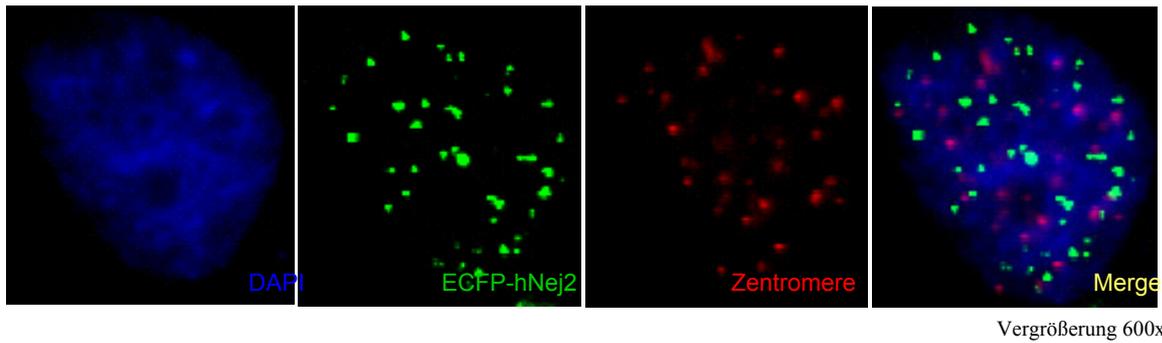


Abb. 22: Vergleich der Lokalisation von hNej2 und Zentromeren.

ECFP-hNej2 Spots konnten in humanen Fibroblasten mit den Spots der Zentromere, die durch einen Anti-Zentromer Antikörper gefärbt wurden, nicht colokalisiert werden. Die Anzahl und die Größe der Spots von eCFP-hNej2 und den Zentromeren sind jedoch ähnlich. DAPI (Blau)/ eCFP-hNej2 (Grün)/ Zentromere (Rot).

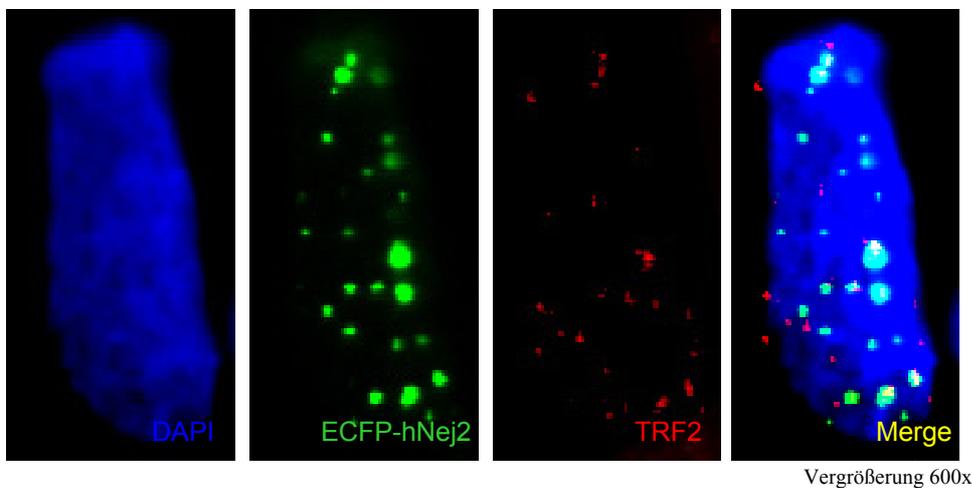


Abb. 23: Vergleich der Lokalisation von eCFP-hNej2 und TRF2.

ECFP-hNej2 konnte zum Teil in einigen Spots mit TRF2, das mit einem Anti- TRF2 Antikörper angefärbt wurde in humanen Fibroblasten colokalisiert werden. Es sind zudem Korrelationen der Anzahl der Spots und der Größe der colokalisierenden Spots von TRF2 und eCFP-hNej2 zu erkennen. DAPI (Blau)/ eCFP-hNej2 (Grün)/ TRF2 (Rot).

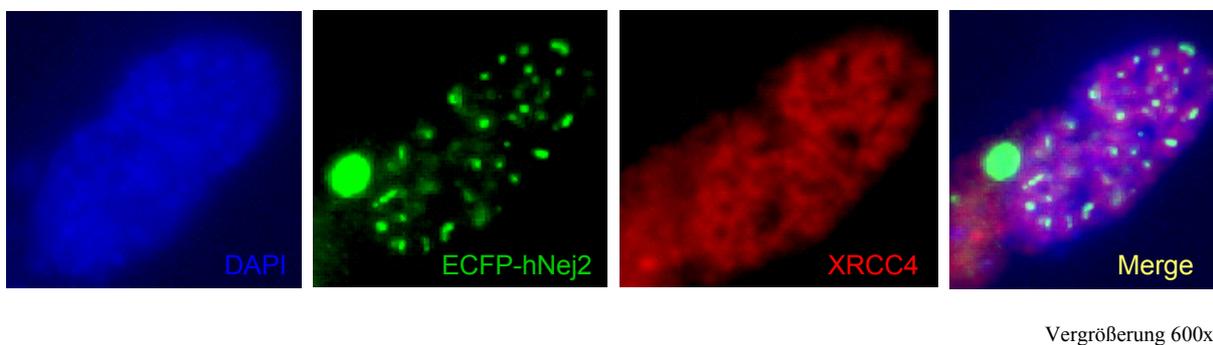


Abb. 24: Vergleich der Lokalisation von hNej2 und XRCC4.

ECFP-hNej2 Spots konnten, bei transienter Expression in humanen Fibroblasten nicht mit XRCC4, angefärbt durch einen Anti-XRCC4 Antikörper, colokalisiert werden. XRCC4 zeigt eine starke nukleäre und eine schwächere zytoplasmatische Verteilung. DAPI (Blau)/ eCFP-hNej2 (Grün) / XRCC4 (Rot).

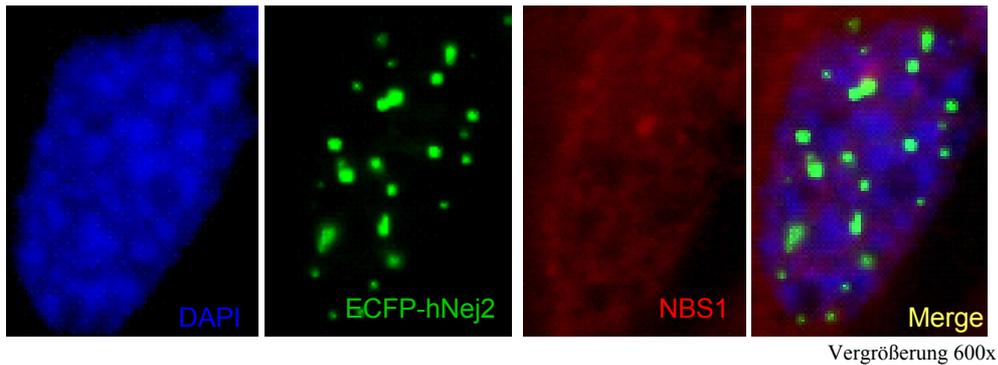


Abb. 25: Vergleich der Lokalisation von hNej2 und NBS1.

ECFP-hNej2 Spots konnten, bei transienter Expression in humanen Fibroblasten nicht mit NBS1, angefärbt durch einen Anti-NBS1 Antikörper, colokalisiert werden. NBS1 ist hier in der Zelle ubiquitär verteilt. DAPI (Blau)/ eCFP-hNej2 (Grün.) / NBS1 (Rot).

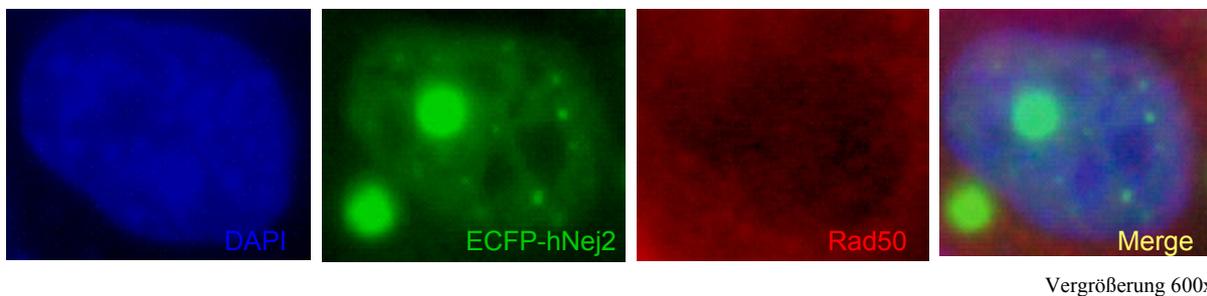


Abb. 26: Vergleich der Lokalisation von hNej2 und Rad50.

ECFP-hNej2 Spots konnten bei transienter Expression in humanen Fibroblasten nicht mit Rad50, angefärbt durch einen Anti-Rad50 Antikörper, colokalisiert werden. Rad50 ist hier in der Zelle zytoplasmatisch verteilt. DAPI (Blau)/ eCFP-hNej2 (Grün.) / Rad50 (Rot).

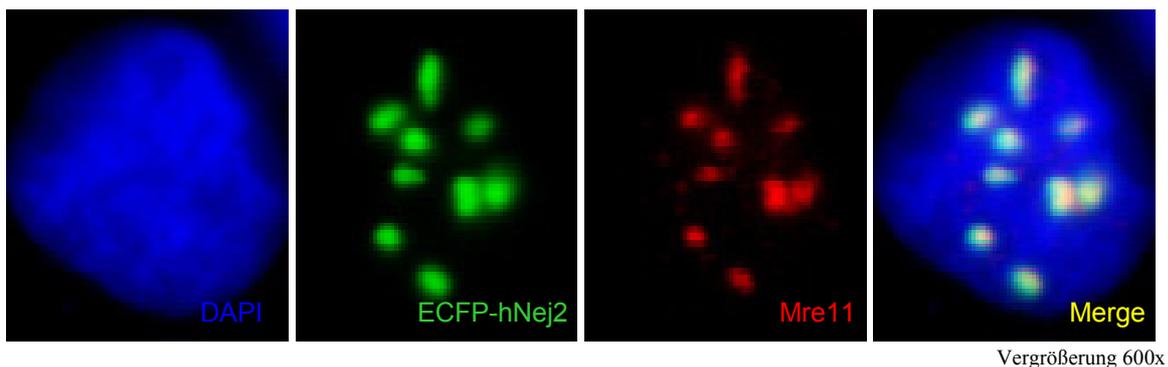


Abb. 27: Colokalisation von hNej2 mit Mre11 in humanen Fibroblasten.

Alle nukleären eCFP-hNej2 Spots konnten bei transienter Expression in humanen Fibroblasten mit Mre11, angefärbt durch einen Anti-Mre11 Antikörper in ca. zehn Spots im Zellkern colokalisiert werden. DAPI (Blau)/ eCFP-hNej2 (Grün.) / Mre11 (Rot).

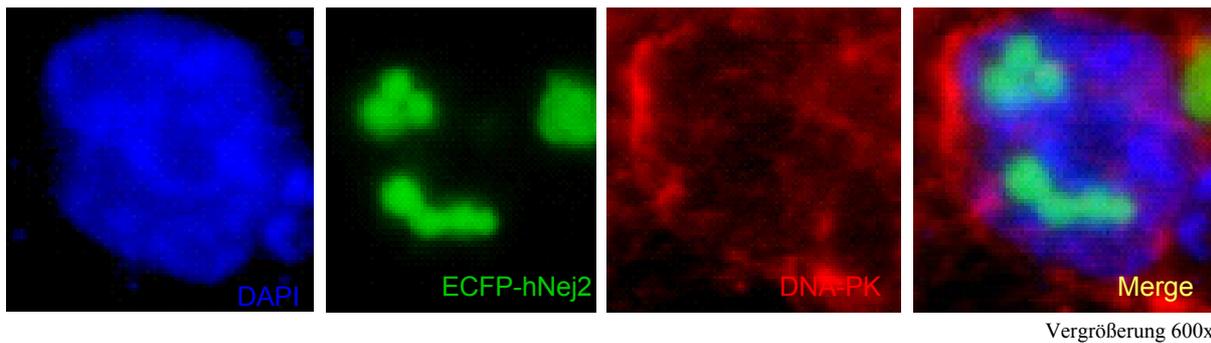


Abb. 28: Vergleich der Lokalisation von hNej2 und DNA-PK.

ECFP-hNej2 Spots konnten bei transienter Expression in humanen Fibroblasten nicht mit DNA-PK, angefärbt durch einen Anti-DNA-PK Antikörper colokalisiert werden. DNA-PK ist zytoplasmatisch und nukleär in der Zelle verteilt. DAPI (Blau)/ eCFP-hNej2 (Grün) / DNA-PK (Rot).

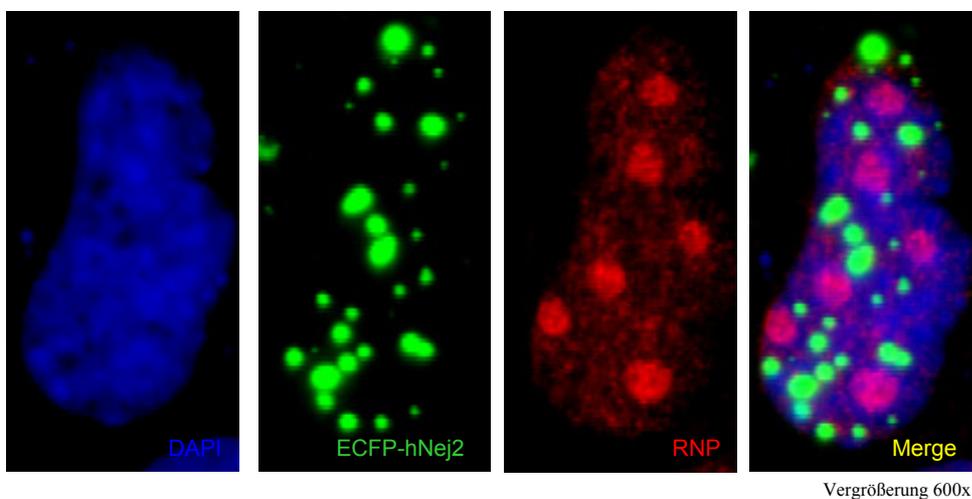


Abb. 29: Versuch der Colokalisation von hNej2 und „kleinen nukleären Ribonukleoproteinen“.

Es sind bei sechsständiger transientser eCFP-hNej2 Expression größere Spots von eCFP-hNej2 und snRNP, angefärbt mit einem Anti-snRNP Antikörper in humanen Fibroblasten zu erkennen, die jedoch nicht die gleiche Lokalisation im Zellkern aufweisen. DAPI (Blau)/ eCFP-hNej2 (Grün) / snRNP (Rot).

4.8. Expression und Aufreinigung eines Antigens zur Herstellung eines Antikörpers gegen hNej2-Protein

Um Expression und Funktionen von hNej2 auf Proteinebene besser untersuchen zu können, sollte ein gegen das hNej2 gerichteter Antikörper generiert werden. Um entsprechende Mengen (1-3 mg) eines rekombinanten Proteinfragments zur Immunisierung eines Kaninchens zu gewinnen, mussten Vorversuche zur Löslichkeit unterschiedlicher, in Bakterien überexprimierter Fusionsproteine durchgeführt werden.

4.8.1. Analyse der Löslichkeit verschiedener rekombinanter hNej2 Fragmente

GST-Fusionen der Fragmente *hNEJ2*_{289-837As}, *hNEJ2*_{252-384As}, *hNEJ2*_{192-580As} und *hNEJ2*_{1-837As} wurden in pGEX-KG kloniert (pGS34I, pGS30A, pGS10A und pGS20A), analysiert und *E.coli* BI21 mit diesen Konstrukten transformiert. Die Überexpression der Proteine und die Herstellung der Proteinextrakte wurden wie in Kapitel 3.2.5.1. beschrieben durchgeführt. Die Induktion und die Löslichkeit wurden im Vergleich mit den unlöslichen Proteinfractionen durch PAGE im Coomassie- gefärbten Gel kontrolliert. Das Verhältnis vom löslichen zum unlöslichen Teil des entsprechenden rekombinanten Fusionsproteins wurde prozentual abgeschätzt (Abb. 30).

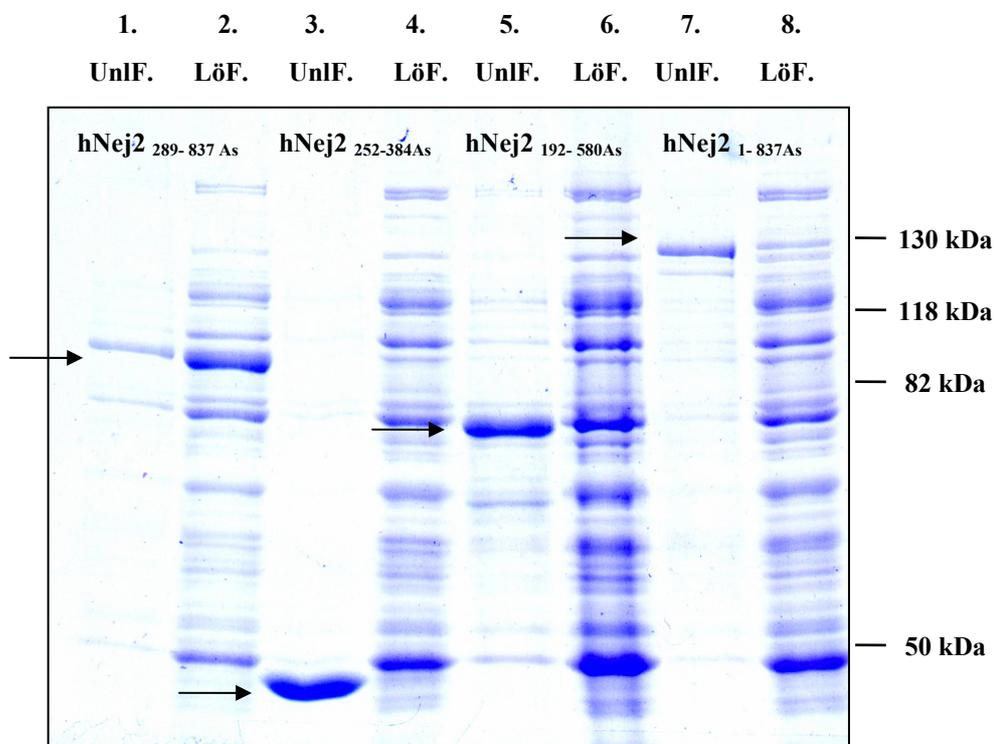


Abb. 30: Löslichkeiten verschiedener rekombinanter GST-hNej2 Fragmente in *E.coli*-Lysaten.

Vergleich von unlöslicher (UnlF.) und löslicher Fraktion (LöF.) der Proteinextrakte mit verschiedenen rekombinanten hNej2-Versionen (Pfeile) auf einem 10 % Coomassie-Gel.

Es wurden auf einer Coomassie- gefärbten SDS-PAGE jeweils die unlösliche und lösliche Fraktion der GST-hNej2_{289-837As} (1, 2), GST-hNej2_{252-384As} (3, 4), GST-hNej2_{192-580As} (5, 6) und GST-hNej2_{1-837As} (7, 8) exprimierenden Stämme gezeigt. Die Negativkontrollen stellten jeweils die anderen drei Stämme dar, die auf der zur untersuchenden Höhe, jeweils nur die *E.coli* Proteine zeigten. Ausschließlich das GST-hNej2_{289-837As} Fragment war zum größten Teil in der löslichen Fraktion zu finden. Die drei anderen Fragmente waren größtenteils in der unlöslichen Fraktion zu finden.

GST-hNej2_{289-837As} (94 kDa) war zu ca. 80 % in der löslichen (Bahn 2) und zu 20% in der unlöslichen (Bahn 1) Fraktion, GST-hNej2_{252-384As} (45 kDa) zu ca. 90% in der unlöslichen Fraktion (Bahn 3), GST-hNej2_{192-580As} (76 kDa) zu ca. 80% in der unlöslichen Fraktion (Bahn 5) und die Volllänge GST-hNej2_{1-837As} (127 kDa) zu 20% in der löslichen Fraktion enthalten. Somit zeigte sich, dass das GST-hNej2_{289-837As} am löslichsten ist.

Der Stamm BL21 pGS34I wurde daher für die Herstellung von 1 mg GST-hNej2_{289-837As} Antigens verwendet. Wie in Kapitel 3.2.5.1. beschrieben wurde das rekombinante Protein überexprimiert (3 Liter *E.coli* Kultur) und ein Proteinextrakt hergestellt. Die daraus gewonnene lösliche Fraktion der Proteinextrakte (40 ml) wurde, wie in 3.2.6.2. beschrieben affinitäts-chromatographisch über eine Glutathionensepharosesäule aufgereinigt. Der Proteingehalt der zehn Elutionsfraktionen zu jeweils 0,4 ml wurde quantifiziert. Die relevanten Fraktionen (E1-E4) mit den höchsten Proteinkonzentrationen wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (Abb. 31).

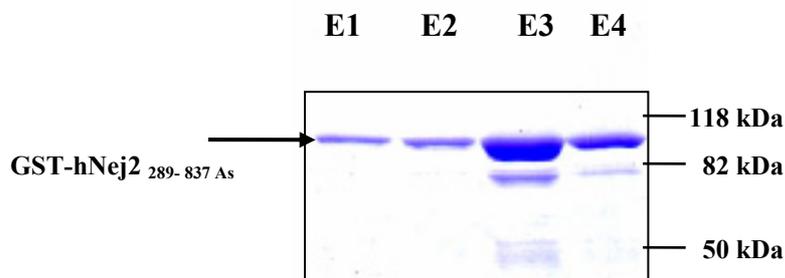


Abb. 31: Aufreinigung von rekombinantem GST- fusioniertem hNej2_{289-873As} über eine Glutathiosepharosesäule.

Dargestellt sind die relevanten Elutionsfraktionen E1 bis E4 (jeweils 0,4 ml), in einem Coomassie gefärbten Gel (10 %). Bei Auftrag von gleicher Volumina (10 µl) aus den Elutionsfraktionen zeigt sich die höchste Konzentration eines ca. 94 kDa schweren Proteins, was dem GST- fusionierten hNej2_(289-873As) entspricht, in E3 und E4.

Die Elutionsfraktionen 3 und 4 wurden nach einer Dialyse gegen PBS mit 20% Glycerin zur Antikörpergeneration verwendet. Die Gesamtproteinmenge in diesen beiden Fraktionen betrug 1 mg.

4.9. Herstellung und Testung eines anti-hNej2-Antikörpers

Die Herstellung polyklonaler Antikörper erfolgte in einem Kaninchen. Zuvor wurde zur Gewinnung eines Präimmunserums Blut des Kaninchens gesichert. Für die primäre Immunisierung wurde 250 µg GST-hNej2_(289-873As) im Verhältnis 1:1 mit Freund'schem Adjuvants emulgiert (0,5 mg/ml des Antigens) und dem Versuchstier subkutan verabreicht. Eine zweite und dritte Immunisierung erfolgten nach 36 bzw. 46 Tagen, mit der jeweils gleichen Antigenmenge. Zehn Tage nach der dritten Immunisierung wurde Blut entnommen und zur Bestimmung von Spezifität und Titer des Antiserums verwendet. In Abhängigkeit von der Serumqualität wurde die Immunisierung fortgesetzt oder das Versuchstier zur Serumgewinnung ausgeblutet.

Die hier kurz beschriebene Immunisierung des Kaninchens und die Serumgewinnung wurde von der Firma Davids Biotechnologie in Regensburg übernommen.

Die Bestimmung der Spezifität des Antikörpers wurde mittels Westernblot analysiert. Das für die Immunisierung verwendete Protein und ein rekombinantes 6xHis-fusioniertes hNej2 wurden als Antigen eingesetzt. Es wurde sowohl das Präimmunserum als auch der anti-hNej2-Antikörper getestet, um den Effekt der Immunisierung zu dokumentieren (Abb. 32).

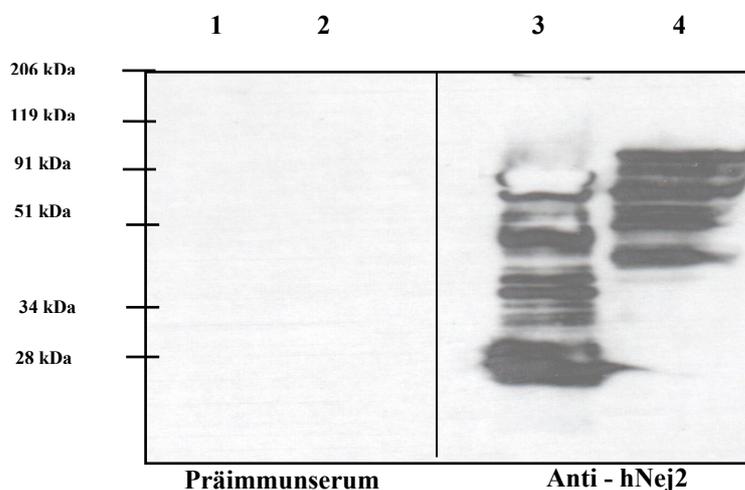


Abb. 32: Test des hNej2- Antikörpers im Westernblot.

Es wurden jeweils 3 µg des GST-hNej2_{289-837As} (Bahn 1 und 3) und 6xHis-hNej2 (Bahn 2 und 4) mittels PAGE (10 % Gel) aufgetrennt und gegen das Präimmunserum bzw. anti-hNej2 getestet. Das Präimmunserum erkennt hNej2 nicht. Das Anti-hNej2 Serum kann sowohl das Antigen (3) als auch 6xHis-hNej2 (4) erkennen.

Das Präimmunserum konnte kein Protein detektieren (1 und 2). Anti-GST-hNej2 konnte das Antigen der Größe 94 kDa und kleinere Fragmente detektieren (3). Anti-GST-hNej2 konnte zudem das 6xHis-fusionierte hNej2 der Größe von ca. 100 kDa

erkennen. Auch hier sind kleinere zusätzliche Fragmente zu sehen. Als Negativkontrolle diente das GST-hNej2_{289-837As}, was kein Signal auf der Höhe von 100 kDa anzeigt. Dies schloss aus, dass es sich um ein Protein aus *E.coli* handelte, welches in der ursprünglichen Antigen-Elutionsfraktion hätte vorhanden sein können. Dies zeigt an, dass eine Immunisierung des Kaninchens durch das Antigen stattfand. Kleinere Fragmente könnten Translations-Abbruchfragmente oder Degradationfragmente des hNej2 darstellen. Des Weiteren konnte eine Kreuzreaktion des GST-hNej2-Antikörpers mit einem 6xHis-fusionierten scNej2p beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

4.10. Inhibierende Wirkung von Nej2-Protein auf die Nicht-Homologe Rekombination

Aufgrund der in Kapitel 4.1. beschriebenen Nähe der Interaktionsdomänen von Dnl4p und scNej2p innerhalb von Lif1p wurden eine mögliche Konkurrenz von Dnl4p und scNej2p um die Interaktion mit Lif1p und die Folgen für das NHEJ in der Hefe untersucht. Zudem stellte sich die Frage, ob die Ergebnisse aus der Hefe auf die humanen Proteine übertragbar sind.

Die Arbeiten in Kapitel 4.10.1 wurden gänzlich und in Kapitel 4.10.2. mit dem von uns generierten, diploiden, heterozygoten, *scNEJ2* deletierten, mit pUG36scNej2 komplementierten Stamm KSHN/nA von der AG Schär [Institut für Molekulare Krebsforschung der Universität Zürich, CH] in enger Kooperation durchgeführt.

4.10.1. Konkurrenz von Dnl4p und scNej2p um die Lif1p-Bindungsdomäne, analysiert im Three- Hybrid

Aufgrund der in Kapitel 4.1. ermittelten Nähe der Interaktionsdomänen von Dnl4p und scNej2p innerhalb von Lif1p, wurde ein Three-Hybrid mit diesen Proteinen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von scNej2p mit der Interaktion von Lif1p und Dnl4p interferiert (Abb. 33 a). Andere Interaktionen, wie die von p53 und SV40-LTA (Abb. 33 a) oder Nej1p und Lif1p (Abb. 33 b) wurden nicht durch eine Überexpression von scNej2p beeinflusst. Dies deutet auf eine Spezifität der Interferenz der Lif1p/Dnl4p-Komplexbildung durch scNej2p hin. Nej1p interagiert im Two-Hybrid-Assay mit der N-terminalen Region von Lif1p [Ooi et al. 2001]. Nej1p und scNej2p interagieren im Two-Hybrid nicht. Jedoch konnte Lif1p

eine Interaktion von Nej1p und scNej2p überbrücken (Abb. 33 b). DB-Lif1p_N und AD-Dnl4p_C, DB-Nej2p und AD-Nej1p entsprachen den Fragmenten von Lif1p (1-260) und Dnl4p (632-945) oder der Volllänge des Proteins fusioniert mit der GAL4 DNA-Bindungsdomäne (Gal-DB) oder der Aktivierungsdomäne (Gal-AD). P53 und SV40-LTA stellen die Positivkontrollen für Proteininteraktionen dar. Nur wenn es zu einer Interaktion der beiden Fusionsproteine kommt, findet eine Expression von HIS und ADE und somit Wachstum auf entsprechenden Selektionsmedium statt.

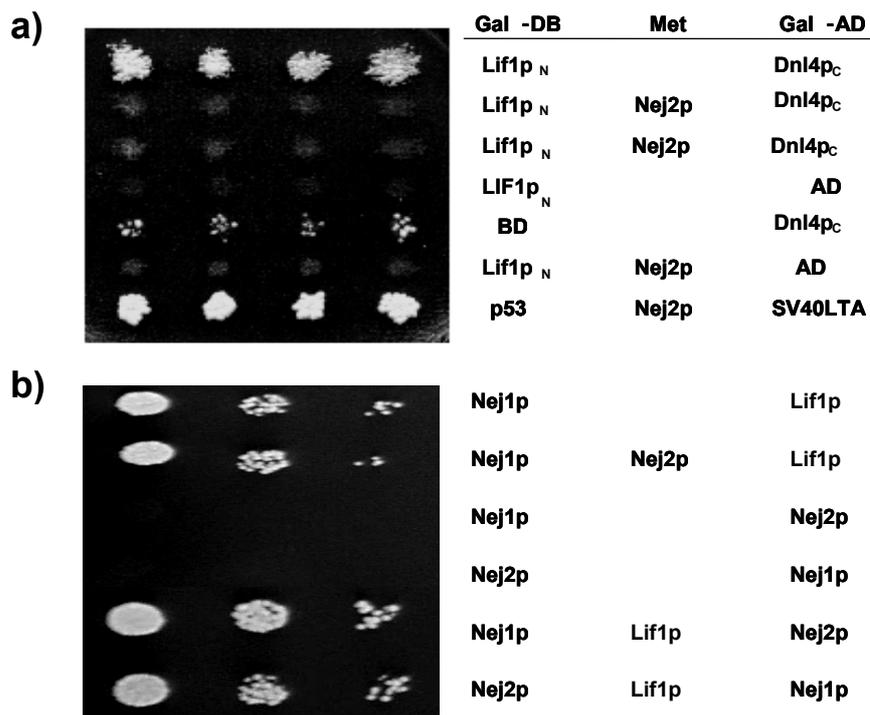


Abb. 33: Die Rolle von scNej2p und Lif1p bei der Formation von Komplexen verschiedener NHEJ- involvierter Proteine.

Darstellt sind Hefen, die mit den für die entsprechende Proteine kodierenden Three-Hybrid-Plasmiden transformiert wurden. Sie wurden in aufsteigenden Verdünnungen auf selektive SD-Agarplatten von links nach rechts aufgetropft. **a)** Three und Two-Hybrid Interaktions-Untersuchungen von scNej2p, Lif1p und Dnl4p. Durch scNej2-Überexpression konnte die Interaktion zwischen Dnl4p und Lif1p aufgehoben werden. „Met“ weist auf eine, über den Methionin- reprimierbaren Promotor kontrollierte, Expression von scNej2 oder Lif1p hin. Die Selektion erfolgte über die Plasmidmarker Leu und Trp. Die Interaktion wurde durch zusätzliche Selektion auf HIS und ADE determiniert, was durch die Verwendung des Stamms AH109 möglich war. **b)** Three- und Two-Hybrid Interaktions-Untersuchungen von Nej1p, scNej2p und Lif1p. Nej1p und Lif1p zeigten eine Interaktion, welche nicht durch Nej2p aufgehoben werden konnte. Nej1p und scNej2p interagierten nicht unmittelbar miteinander, jedoch konnte die Interaktion durch Lif1p vermittelt werden.

4.10.2. Einfluss von scNej2p auf die Effizienz der Nicht-Homologen Rekombination in *S. cerevisiae*

Da die Überexpression von scNej2p die Formation des funktionellen Dnl4p/Lif1p-Komplexes verhindert (Abb. 33 a), wurden Untersuchungen des Einflusses einer scNej2p Überexpression auf die NHEJ-Effizienz angestellt. Dies wurde anhand der Religationsfrequenz eines linearisierten, in Hefe transformierten Plasmides, ohne Homologien zum Hefegenom, berechnet. Die Religation eines Plasmides ohne Homologien zum Hefegenom in der Hefe findet durch NHEJ statt. Es konnte durch die Überexpression von scNej2p in haploiden Hefen eine Reduktion der Religationsfrequenz, um den Faktor 2,2 bei einem Substrat mit 5'-Überhängen an der Linearisierungsstelle und um den Faktor 5 bei einem Substrat mit 3'-Überhängen an der Linearisierungsstelle (Abb. 34) ermittelt werden.

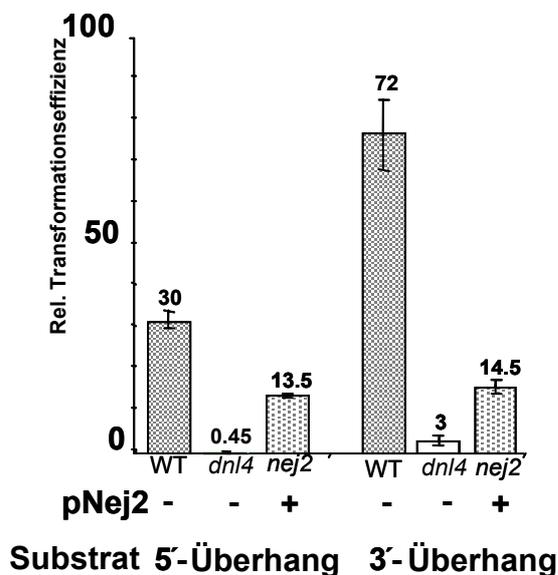


Abb. 34: Inhibierung der Nicht-Homologen Rekombination durch scNej2p-Überexpression in Hefe.

Die Ergebnisse repräsentieren die relative Transformationseffizienz (Transformationseffizienz mit geschnittenem in Relation zu ungeschnittenem Plasmid eines jeweiligen Stammes) entstanden durch parallele Transformation von verschiedenen Hefestämmen mit *EcoRI*- (5'-Überhänge), *PstI*- geschnittenen (3'- Überhänge) und ungeschnittenen Plasmiden (100 ng). Zur Selektion der transformierten Hefen wurde ein Leucinmarker auf dem Plasmid verwendet. Ein *dnl4*-Stamm wurde als Kontrolle für Stämme mit einem NHEJ-Defekt verwendet. Der *dnl4*- bzw. NHEJ- defiziente Stamm zeigt eine Reduktion der relativen. Transformationseffizienz auf 0,45 bei 5'- bzw. 3 bei 3'Überhängen. Die episodale Überexpression von scNej2p (pNej2 +) führte zu einer Reduktion der relativen Transformationseffizienz auf 13,5 bzw. 14,5.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Überexpression von scNej2p eine Reduktion der (NHEJ-) Ligations-Frequenz bewirkt und dass dieser Effekt bei Substraten mit einem 3'-Überhang ausgeprägter ist.

4.10.3. Aufreinigung von DNA-Ligase IV/XRCC4 Komplexen

Um die gezeigten Wirkungen von Nej2 auf das NHEJ weiter zu untersuchen, wurde versucht *in vitro*, Effekte von gereinigtem humanem Nej2 auf DNA und den DNA-Ligase IV/XRCC4-Komplex bzw. seine Ligationsfähigkeit zu analysieren. Hierzu waren ein gereinigtes 6xHis- fusioniertes hNej2 und der DNA-Ligase IV/XRCC4-Komplex notwendig.

Es wurde zunächst der DNA-Ligase IV/XRCC4-Komplex in *S. cerevisiae* überexprimiert und über eine Ni-NTA- Säule gereinigt. Der *Saccharomyces cerevisiae* *dnl4*-Stamm PRSY003,1A wurde mit den Plasmiden pGEH007,2 und pGEH006, die eine Galaktose- induzierbare Expression von 6xHis- fusionierter DNA-Ligase IV und XRCC4 ermöglichen, transformiert. Die Induktion der Komplexe und die Proteinextraktgewinnung wurden, wie in Kapitel 3.2.5.1., die Aufreinigung der Komplexe wie in Kapitel 3.2.6.1. beschrieben, durchgeführt. Die Elutionsfraktionen wurden durch eine Coomassie- gefärbte PAGE analysiert (35 A). Die Ligase IV/XRCC4-Komplexe wurden in der Fraktion mit der höchsten Proteinkonzentration mittels der anti-DNA-Ligase IV und anti-XRCC4-Antikörper im Westernblot nachgewiesen (35 B).

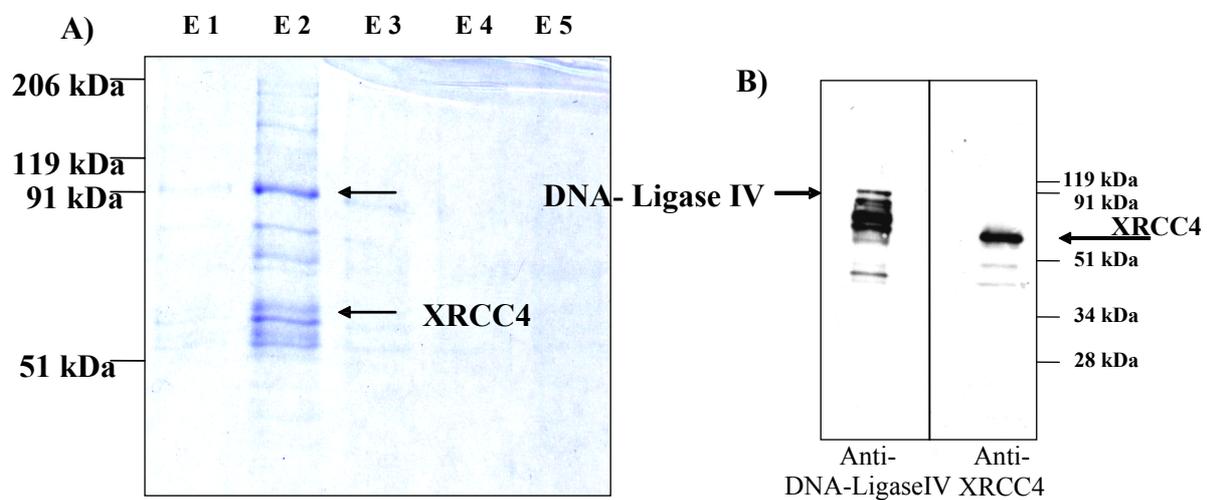


Abb. 35: Analyse der aufgereinigten, rekombinanten DNA-Ligase IV/XRCC4-Komplexe.

Auf einem 10 % Gel sind jeweils 10 μ l (A) bzw. 3 μ l (B) von 0,4 ml der Elutionsfraktion der DNA-Ligase IV/XRCC4-Komplex-Aufreinigung aus *S. cerevisiae* aufgetragen. **A)** In der Coomassie- gefärbten PAGE ist in Fraktion E2 die größte Menge Protein zu sehen. Es handelt sich um mehrere Fragmente verschiedener Größe. Bei ca. 100 kDa und ca. 55 kDa sind die stärksten Signale zu erkennen. **B)** Die Detektion mit den Antikörpern gegen DNA-Ligase IV bzw. XRCC4 ergab ein Signal in Höhe von ca. 100 bzw. 55 kDa, was dem Gewicht der DNA-Ligase IV bzw. XRCC4 entspricht. Zusätzlich konnten unter diesen Banden weitere kleinere Banden detektiert werden.

Es konnte in der Elutionsfraktion 2 DNA-Ligase IV und XRCC4 in der erwarteten Höhe von ca. 100 bzw. 55 kDa detektiert werden. Es konnten jeweils zusätzlich kleinere Banden gesehen werden, bei denen es sich wahrscheinlich um Abbruchfragmente der überexprimierten Proteine handelt. E2 wurde vor der Verwendung in biochemischen Assays gegen PBS und 20 % Glycerin dialysiert.

4.10.4. Aufreinigung von rekombinatem hNej2

Zur Aufreinigung von hNej2 wurde der *E.coli* Stamm BI21 mit pETHnej2 transformiert. Mit diesem Stamm wurde eine IPTG- induzierbare Expression von 6xHis fusioniertem hNej2 ermöglicht. Für die biochemischen Assays wurde ein relativ kleiner 6xHis-Anhang im Gegensatz zum größeren GST-Anhang gewählt, um mögliche Beeinflussungen der hNej2-Eigenschaften durch den Anhang zu vermeiden. Die Überexpression von rekombinantem Protein in *E.coli* und Gewinnung von Proteinextrakten wurde wie in Kapitel 3.2.5.1 beschrieben durchgeführt. Die Aufreinigung des rekombinanten 6xHis-hNej2 ist in Kapitel 3.2.6.1. beschrieben.

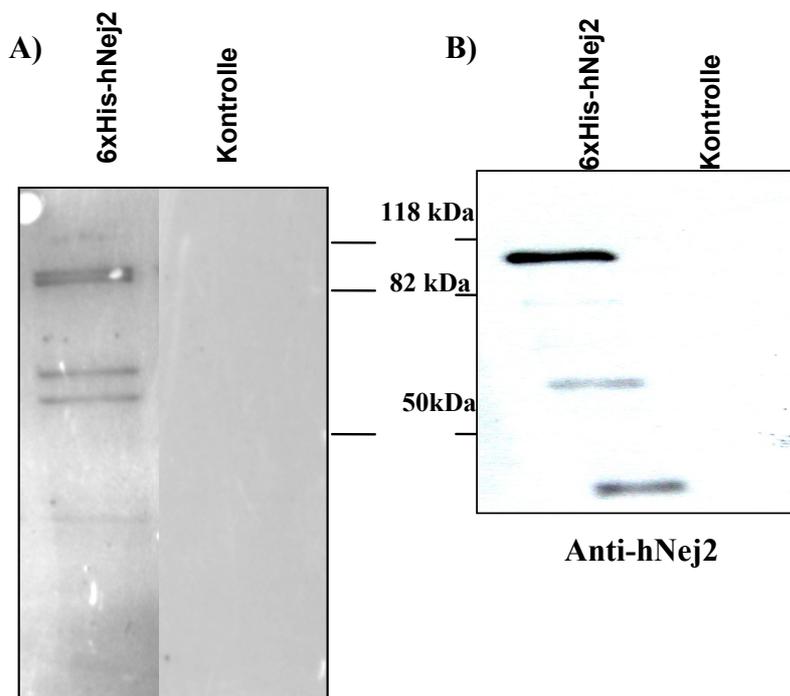


Abb. 36: Analyse der Aufreinigung von rekombinantem 6xHis-hNej2.

Auf einem 10 % Gel sind jeweils 10 μ l (A) bzw. 3 μ l (B) von 0,4 ml der Elutionsfraktion 2 der hNej2-Aufreinigung aus *E.coli* aufgetragen. **A)** Die Auftrennung der Elutionsfraktion 2 des 6xHis-hNej2 durch PAGE. Die aufgetrennte Aufreinigung E2 zeigte nach Färbung mit Coomassie eine Bande im Bereich von ca. 100 kDa, was dem Gewicht von 6xHis-hNej2 entspricht. Darunter sind zudem kleine Banden zu erkennen. Die Elutionsfraktion 2 der Kontrolle zeigt keine Bande. **B)** Der anti-hNej2-Antikörper kann eine Bande von ca. 100 kDa im Westernblot detektieren. Zudem konnten 2 weitere kleinere Banden detektiert werden.

Da die Proteinkonzentration der Elutionsfraktion 2 am höchsten war, wurde diese mittels einer PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt (36 A) bzw. im Westernblot eingesetzt und gegen Anti-hNej2 getestet (36 B). Es wurde parallel eine Kontrollaufreinigung eines *E.coli*-Stammes mit Leervektor also ohne hNej2-Expression, aufgetrennt.

In der Elutionsfraktion 2 konnte hNej2 in der zu erwartenden Höhe von ca. 100 kDa detektiert werden. Des Weiteren konnten zwei Abbruchfragmente detektiert werden. Die Elutionsfraktion 2 wurde gegen PBS mit 20 % Glycerin dialysiert.

4.10.5. Einfluss von hNej2 auf die Ligationseffizienz der DNA-Ligase IV/XRCC4-Komplexe und der T4-DNA-Ligase *in vitro*

Aufgrund der bisherigen Hinweise auf die inhibierende Wirkung von scNej2p auf das NHEJ (Kapitel 4.10.2.), wurde versucht *in vitro* den Einfluss von hNej2 auf eine DNA-Ligase IV/XRCC4 vermittelte Ligation zu untersuchen. Es wurde jedoch zunächst der Effekt einer hNej2 Zugabe auf durch T4-DNA-Ligase- vermittelte Ligation restriktionsverdauter Plasmid-DNA untersucht. Dafür wurde 90' bei 30° C EcoRI-linearisierter pBluescript(KS+) mit T4-DNA-Ligase ligiert. Verglichen wurde die Ligationseffizienz nach Zugabe der 6xHis-hNej2 E2-Fraktion bzw. der entsprechenden Kontrollfraktion (Kapitel 4.10.4.).

Ligation konnte mittels, zum einen mit 2000 Einheiten T4-DNA-Ligase, zum anderen mit 4 µg DNA- Ligase IV/XRCC4 erzielt werden (Abb. 37 B Bahn 3 und 4).

Durch Zugabe von 1 µg hNej2 war eine verminderte Bildung der supercoiled Form durch Ligation mit 2000 Einheiten T4-DNA-Ligase zu beobachten (Abb. 37 A Bahn 1, 2 und 3).

Die Ligation durch 4 µg DNA-Ligase IV/XRCC4 konnte durch die Zugabe von 1 µg 6xHis-hNej2 und nicht durch Zugabe der Kontrollfraktion inhibiert werden (Abb. 37 B Bahn 1 und 2).

Die Inhibierung konnte durch Zugabe von 2 bzw. 4 µg 6xHis-hNej2 nicht erhöht werden.

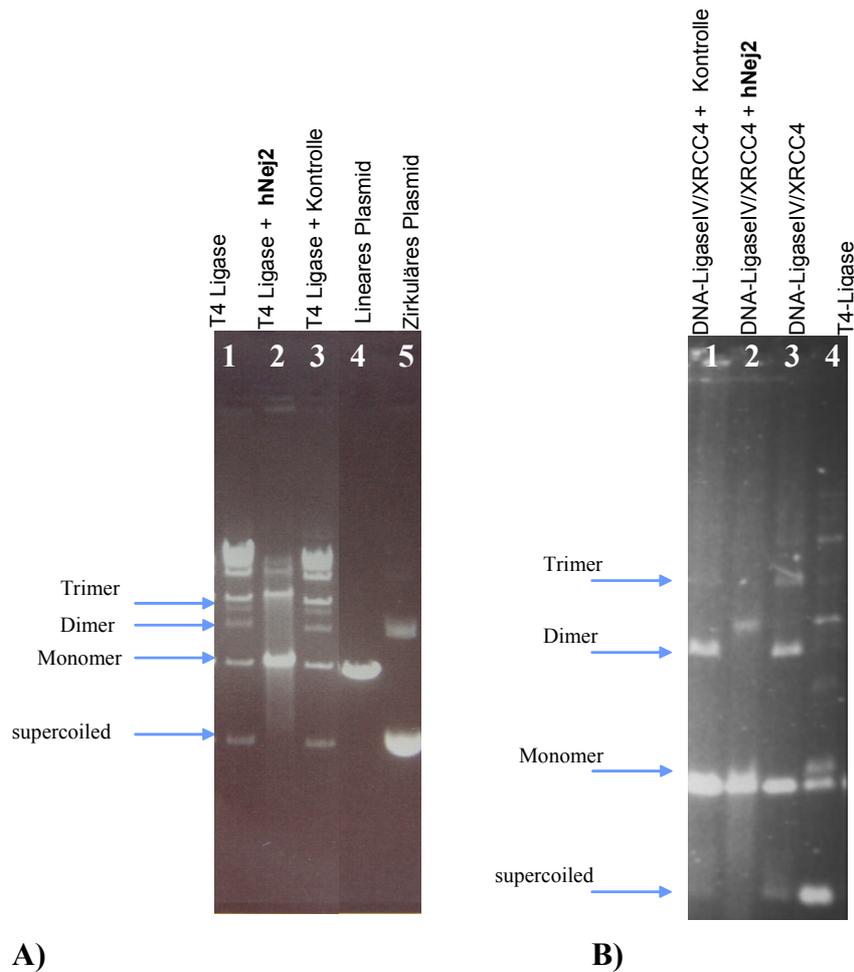


Abb. 37: Einfluss von hNej2 auf die Ligation der T4-DNA-Ligase und der DNA-Ligase IV/XRCC4-Komplexe *in vitro*.

A) Gezeigt ist der Auftrag von 1 μg , mit EcoRI- linearisierter pBluescript-DNA (Bahn 4), sowie einer entsprechenden Menge unverdauter Plasmid-DNA (Bahn 5), die in supercoiled Form und coiled-coiled Form vorlag. Ligation des liniarisierten Plasmides durch 2000 Einheiten T4-DNA-Ligase bewirkte die Bildung der supercoiled Form und Multimeren des Plasmides (Bahn 1). Die Kontrollfraktion E2 hatte keinen Effekt auf die Ligation (Bahn 3). Zugabe von 1 μg hNej2 ergaben eine Verringerung der Multimerbildung und das Ausbleiben einer Erkennbaren supercoiled- Form-Bildung (Bahn 2). **B)** Dargestellt sind vier Ligationsansätze mit 1 μg mit EcoRI- linearisierter pBluescript-DNA. Als Positivkontrolle wurde Ligation durch T4-DNA-Ligase gezeigt (Bahn 4). 4 μg von DNA-Ligase IV/XRCC4 Komplexen konnten im T4-Ligase-Puffer (NEB) die Bildung von Dimeren, Trimeren und einer supercoiled Form des Plasmides katalysieren (Bahn 3). Die Zugabe der Kontrollfraktion hatte keinen Effekt auf die Ligation (Bahn 1). Zugabe von 1 μg hNej2 ergaben das Ausbleiben der Trimer- und supercoiled-Form Bildung (Bahn2).

4.11. Untersuchung der DNA-Bindungseigenschaften von hNej2

Einige Proteine des NHEJ besitzen die Fähigkeit DNA zu binden. Es stellte sich somit die Frage, ob hNej2 selbst, wie z.B. auch XRCC4 oder Ku, die Fähigkeit besitzt DNA zu binden. Um dies festzustellen wurde ein Bandshift Assay mit 6xHis-hNej2 bzw. der entsprechenden Kontrollfraktion (Kapitel 4.10.4.) durchgeführt. Hierzu wurde 1 µg pBluescript(KS+) mit EcoRI linearisiert und 30' mit 2 µg hNej2 bzw. der Kontrollfraktion bei 25° C inkubiert, um eine Bindung zu ermöglichen und auf ein 0,8 % Agarosegel aufgetragen (Abb. 38).

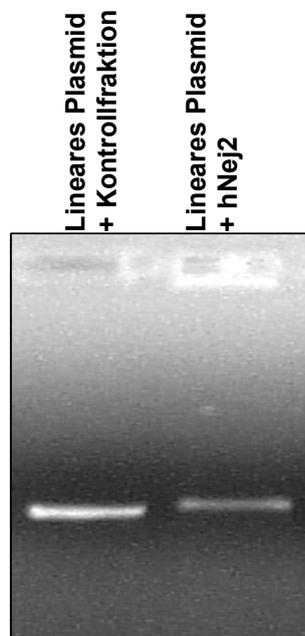


Abb. 38: DNA- Bandshift Assay zur Untersuchung der DNA-Bindungseigenschaften von hNej2.

1 µg linearisierter pBluescript(KS+) zeigt nach 30' Inkubation bei 25°C mit 2 µg 6xHis-hNej2 ein langsames Laufverhalten auf einem 1 % Agarosegel als nach entsprechender Inkubation mit der Kontrollfraktion (E2 Kontrollfraktion, Kapitel 4.10.4.). Somit ist von Bindung des Proteins an die DNA und einem daraus resultierenden veränderten Laufverhalten der DNA, auszugehen.

Das Laufverhalten der DNA wurde durch Inkubation der DNA mit hNej2 verändert. Dies deutet auf eine Bindung von hNej2 an die DNA hin. Durch eine Zugabe von 4 bzw. 6 µg hNej2 konnte der Effekt nicht verstärkt werden.

5. Diskussion

5.1. Strukturelle und funktionelle Aspekte der Interaktion zwischen scNej2p und Lif1p

XRCC4/Lif1p und DNA-Ligase IV spielen eine wichtige Rolle bei den abschließenden Schritten des NHEJ von Säugern bis zur Hefe [Critchlow *et al.*, 1997]. Als Voraussetzung für diese Arbeit konnte in der Hefe *S. cerevisiae* ein neues, scNej2p genanntes Protein identifiziert werden, das mit Lif1p, dem Hefehomolog von XRCC4 interagiert. Mittels Two-Hybrid-Analysen und Coaufreinigungen konnte gezeigt werden, dass die Interaktionsdomäne von Lif1p mit scNej2p zwischen den Aminosäuren 220 und 240 und damit unmittelbar C-terminal der Interaktionsdomäne von Lif1p und Dnl4p liegt (Kapitel 4.1.) [Herrmann *et al.*, 1998]. Daten aus Three-Hybrid-Experimenten (Kapitel 4.10.1.) lassen auf eine mögliche kompetitive Interaktion von Dnl4p und scNej2p mit scLif1p schließen. *In vitro* hält die Bindung zwischen scNej2p und Lif1p auch stringenten Waschschritten von 600 mM NaCl stand. Dieses konnte auch bei der Interaktion von Dnl4p und Lif1p beobachtet werden [Sibanda *et al.*, 2001] und deutet auf eine starke Interaktion hin.

Zusätzlich konnte in Three-Hybrid-Analysen eine gleichzeitige, nicht kompetitive Bindung von Nej1p und scNej2p an Lif1p gezeigt werden. Dies könnte mit unterschiedlichen Bindungsdomänen für Nej1p und scNej2p erklärt werden. Nej1p interagiert mit den N-terminalen 69 Aminosäuren von Lif1p [Ooi *et al.*, 2001]. Nej1p ist jedoch bisher nur in *S. cerevisiae* gefunden worden [Valencia *et al.*, 2001; Kegel *et al.*, 2001; Franl-Vaillant und Marcand, 2001].

Untersuchungen zu möglichen Funktionen von scNej2p wurden durch die Letalität der Deletion von *scnej2* erschwert. Diese Tatsache unterscheidet scNej2p von allen anderen Faktoren mit Funktionen im NHEJ und weist auf zusätzliche essentielle Funktionen des Proteins hin.

Um dennoch den Einfluss von scNej2p auf die Interaktion von Dnl4p und Lif1p zu untersuchen, wurde die NHEJ-Frequenz bei einer Überexpression von scNej2p in einem Assay ermittelt (Kapitel 4.10.2.), in dem die Religationsfrequenz eines linearisierten, in *S. cerevisiae* transformierten, nicht zum Hefegenom homologen Plasmids bestimmt und jeweils in Relation zur Transformationsrate eines zirkulären Plasmids gesetzt wurde [Boulton und Jackson, 1996; Schär *et al.*, 1997]. Hierbei

zeigte sich, dass die Kapazität eines haploiden Hefestammes zur Religation des Plasmids bei einer Überexpression von scNej2p um den Faktor 2,2 bei 5'-Überhängen des Plasmids und um den Faktor 5 mit einem Substrat mit 3'-Überhängen verringert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass zum einen die Überexpression von scNej2p einen negativen Einfluss auf die NHEJ-Frequenz hat und dieser Einfluss stärker an 3'- als an 5'-Überhängen stattfindet. Innerhalb der Zelle finden sich 3'-Überhänge unter anderem an Telomeren, den Enden von Chromosomen [D'Adda et al., 2004]. Rein strukturell stellen Telomere DNA-Doppelstrangbrüche dar, deren Ligation allerdings zu, für die Zelle unerwünschten chromosomalen Fusionen führen würde. Telomere werden also trotz ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu DSB nicht als solche von der NHEJ-Maschinerie erkannt und „repariert“. In humanen Zellen konnte gezeigt werden, dass beispielsweise bei Überexpression eines dominant negativen „Telomeric repeat factor 2“ (TRF2) [van Steensel et al., 1998], auftretende Telomerligationen durch DNA-Ligase IV vermittelt werden [Smogorzewska et al., 2002]. Andere Faktoren mit Funktionen im NHEJ, wie Nej1p und die Ku-Proteine, die freie DNA-Enden schützen und wesentlich an der korrekten Reparatur von DNA-DSB in Hefe beteiligt sind [Boulton und Jackson, 1996; Feldmann et al., 1996, Milne et al., 1996], haben ebenso Funktionen im Telomermetabolismus. Dort können sie paradoxerweise, NHEJ-vermittelte, unerwünschte Telomerfusionen unterdrücken [Liti and Louis, 2003; Ferreira et al., 2001].

Studien zur Lokalisation von scNej2p mittels eines eGFP-fusionierten scNej2p zeigten in der Hefe *S. cerevisiae* eine nukleäre punktartige Struktur (Kapitel 4.7.1.), die auf eine Telomerlokalisierung des Proteins hindeutete.

Immunfluoreszenzuntersuchungen anderer, an Telomerstrukturen lokalisierter Proteine ergeben entsprechende Muster in der Hefe *S. cerevisiae* [Gotta et al., 1996].

Nej2 könnte ein neues Protein repräsentieren, das zur Unterdrückung von NHEJ an den Telomeren trägt. Dies lässt sich aus der kompetitiven Interaktion mit Dnl4p um Lif1p, den Funktionen dieser Proteine im Telomermetabolismus, der Inhibition der Ligation von freien 3'-Überhängen an der DNA und der korrespondierenden Lokalisation, die an eine Telomerlokalisierung erinnert, ableiten.

5.2. NEJ2: Orthologien, konservierte Domänen, Expressionsmuster und Interaktionen

Die Suche nach Homologen von scNej2p hatte verschiedene Ziele. Zum einen sollte versucht werden bestimmte Domänen innerhalb des Proteins zu identifizieren und ihnen gegebenenfalls Funktionen zuzuordnen, zum anderen sollte versucht werden Orthologe in anderen Spezies mit möglicherweise bekannten Funktionen zu finden. In verschiedenen Spezies, wie der Hefe *Schizosaccharomyces pombe*, dem Nematoden *C. elegans*, der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, der Pflanze *Arabidopsis thaliana*, sowie Nagetieren, wie *Rattus norvegicus* und *Mus musculus* und dem Menschen *Homo sapiens*, konnten Proteine mit Orthologien identifiziert werden (Tabelle 4). Zwischen humanem Nej2 und dem *S. cerevisiae* Orthologen zeigten sich 22 % identische und 40 % ähnliche Aminosäuren. Dies ist Vergleichbar mit anderen Graden von Orthologien von Proteinen zwischen Hefe und Mensch, insbesondere aber auch entsprechend dem Grad an Übereinstimmungen, den man bei anderen Proteinen mit Funktionen im NHEJ, wie z.B. DNA-Ligase IV/Dnl4p und XRCC4/Lif1p, finden konnte [Tugendreich *et al.* 1994, Schär *et al.*, 1997; Herrmann *et al.*, 1998].

Keines der in den verschiedenen Spezies identifizierten Nej2-Orthologen wies eine bekannte biologische Funktion auf. Die Ausdehnung der Sequenzanalysen auf konservierte Proteinmotive führte zur Identifikation einer hoch konservierten G-Patch-Domäne, die zwischen den Aminosäuren 64 und 104 in scNej2p und Aminosäuren 151 und 187 in hNej2 lokalisiert ist. G-Patch-Domänen bestehen aus ca. 40 Aminosäuren und beinhalten sechs vollständig konservierte Glyzinreste. Viele Proteine, die einen G-Patch enthalten, haben Funktionen im DNA- oder RNA-Metabolismus [Koonin und Aravind, 1999].

Beispiele für bekannte Funktionen bei Proteinen, die einen G-Patch enthalten finden sich bei DRT111 aus *Arabidopsis thaliana* und TgDRE aus *Toxoplasma gondii*. Es konnte gezeigt werden, dass diese Proteine in der Lage sind erhöhte UV- und Mitomycin C-Sensitivitäten eines *E.coli* *ruvC* und *recG* Stammes zu komplementieren [Pang *et al.*, 1993; Dendouga *et al.*, 2002]. Überexpression von Nej2-Proteinen in den entsprechenden Bakterienstämmen konnte die entsprechenden Phänotypen nicht komplementieren (Abb. 16), wobei sich allerdings die Orthologien von Nej2 mit DRT111 und TgDRE auf den G-Patch beschränken und erst im weiteren Verlauf der

Arbeit, mit Fortschreiten der genomischen Sequenzierungsprojekte, At1g17070 als das eigentliche Nej2 Ortholog in *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden konnte. Für At1g17070 gibt es keine funktionellen Daten in der Literatur.

Anders ist dies bei PinX1, einem weiteren Protein, das einen G-Patch enthält. Menschliches PinX1 interagiert mit dem Telomer-Repeat Faktor 1 (TRF1) und inhibiert Telomerase [Zhou und Lu, 2001]. Dies hat zur Folge, dass beispielsweise durch Unterdrückung der Expression von PinX1 das Wachstum von Tumorzellen in Nacktmäusen gefördert werden kann und es bei Überexpression von PinX1 zu einer verstärkten Telomeraseinhibition und in deren Folge zu einer Seneszenz, auch von Tumorzellen kommt. Die meisten normalen humanen Zellen haben eine definierte Lebensspanne [Hayflick und Moorhead, 1961] und keine Telomeraseaktivität [Broccoli *et al.*, 1995; Taylor *et al.*, 1996]. Tumorzellen gleichen ihre verstärkte Teilung und damit verbundene Telomerverkürzung, die letztlich zum Zelltod führen würde, mit einer Telomeraseaktivität oder mit alternativer Telomerverlängerung über Homologe Rekombination aus und immortalisieren somit die Zelle [Kim *et al.*, 1994]. Interessanterweise hat PinX1 zusätzliche Funktionen in der RNA-Reifung [Guglielmi und Werner, 2002], die auch für Nej2 diskutiert werden. Pxr1p stellt das Hefehomolog von PinX1 dar. PinX1 kann Defekte einer *pxr1* Deletion im RNA-Metabolismus in *S. cerevisiae* komplementieren. Eine direkte Verbindung von Pxr1 und scNej2p ergibt sich aus genomweiten Two-Hybrid-Screens in Hefe, in denen eine Interaktion von Pxr1 mit scNej2p nachgewiesen werden konnte [Hazbun *et al.*, 2003, SGDTM (Saccharomyces Genome Database) <http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/SDG/locus.pl?locus=y1r424w>]. Außerdem wurden 36 weitere Interaktionspartner des scNej2p (YLR424W) gefunden, wobei auch die Interaktion zwischen scNej2p und Lif1p bestätigt wurde. Die schon beschriebenen interagierenden Proteine zeigen eine auffällige Häufigkeit von Assoziation mit RNA-Reifung, DNA-Schadensantwort und Telomeren. Überwiegende Lokalisation der Interagierenden Proteine ist der Nukleus.

Proteine, die mit der RNA-Reifung in *S. cerevisiae* assoziiert sind und mit scNej2p interagieren sind das nukleäres RNA-Porenprotein NUP49, das Splicing-Protein PRP6, PRP3, PRP40, CEF1, EXO84, SPT5 und AIR1, das in die RNA-Reifung der 18S-RNA involvierte Protein LCP5, das in die RNA-Reifung der ribosomale 25S-RNA involvierte Protein SPB4, das mRNA 3'-UTRs-Protektionprotein PAT1, die RNA-Helikase PRP43, das RNA-Erkennungsmotiv enthaltendes Protein EBS1, die

Komponente des RNA-Polymerase II-Holoenzym ASK10, das mitochondriale ribosomale Protein der kleinen Untereinheit PET123, SIK1, RPS4B, das RNA-Transkriptionsregulatorprotein CDC39, der RNA Polymerase I-upstream-Aktivierungsfaktor-Komplex RRN9, das Chromatin Silencing-Protein der ribosomalen DNA NET1 und die RNA-Polymerase II-Untereinheit IKI3. Diese Anhäufung von RNA- assoziierten Interaktionsproteinen, setzt das Ergebnis, der nicht vorhandenen snRNP-Colokalisation (Abb. 29) in Relation. Zumindest ist scNej2p über zahlreiche Interaktionen mit dem Mechanismus der RNA-Prozessierung assoziiert. Hierfür spricht auch die RNA-Metabolismus- assoziierte G-Patch-Domäne von Nej2.

ScNej2p Interaktionsproteine in der Hefe, die mit der DNA-Schadenantwort assoziiert sind, sind HEX3 und REV1, die jedoch unzureichend beschrieben sind.

Telomer- assoziierte mit scNej2p- interagierende Proteine sind das an den Telomeren Chromatinsilencing bewirkende Protein SUM1 und das Telomer- protektierende Protein EBS1. Zudem interagiert scNej2p mit MLP22, welches durch den Einfluss auf den Rif1-Tel1 (ATM-Homolog)-Mechanismus der Telomeraseregulation, die Telomerlänge verkürzt. Hierzu kommt die Interaktion mit Pxr1p, welche Hinweise auf eine Rolle von Nej2 in der Tumorsuppression gibt. Erste Vorversuche aus unserem Labor bestätigen eine Interaktion von hNej2 und PinX1 im Two-Hybrid Assay (Abb. 39) und in Coaufreinigungen [Dr. G. Herrmann, Dermatologische Klinik der Universität zu Köln; unpubliziert].

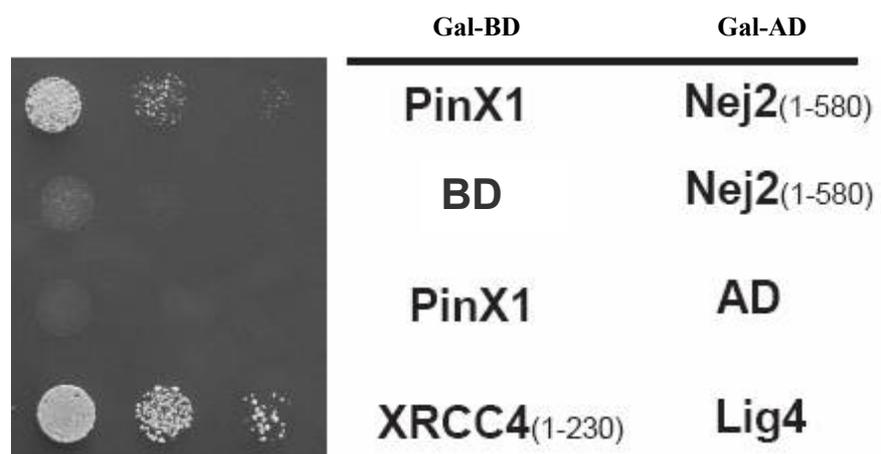


Abb. 39: Interaktion von hNej2 und PinX1 im Two-Hybrid Assay.

Darstellt sind Hefen, die mit den für die entsprechende Proteine kodierenden Two-Hybrid-Plasmiden transformiert wurden. Sie wurden in aufsteigenden Verdünnungen auf selektive SD-Agarplatten von links nach rechts aufgetropft. Die Selektion erfolgte über die Plasmidmarker Leu und Trp. Die Interaktion wurde durch zusätzliche Selektion auf HIS und ADE determiniert. Die Volllänge des Proteins PinX1 zeigt unter selektivem Wachstum eine Interaktion mit hNej2_(AS1-580). PinX1 zeigt keine Transaktivierung mit der Gal-Aktivationsdomäne (AD). Es konnte zudem gezeigt werden, dass hNej2_(AS1-580) nicht mit der Gal-Bindungsdomäne (BD) transaktiviert. Die Positivkontrolle mit XRCC4_(AS1-230) und DNA-Ligase IV zeigt Interaktion.

Homologievergleiche haben keine Übereinstimmungen von hNej2 und hTert [Lin and Blackburn, 2004], der mit PinX1 interagierenden RNA- beinhaltenden Telomeraseuntereinheit ergeben, jedoch wäre eine Beeinflussung von hNej2 auf die Interaktion von hTert und PinX1 denkbar.

Somit wäre auch eine Beeinflussung der Telomeraseaktivität durch eine Interaktion von PinX1/hNej2 möglich. Ob hNej2 durch seine Interaktion mit PinX1 eine Rolle in der Regulation der Telomerase- inhibierten Wirkung von PinX1 hat, wird noch zu klären sein.

Homologien von hNej2 außerhalb des G-Patches konnten in Proteinen mit Funktionen im DNA-Metabolismus und in der DNA-Reparatur, wie z.B. Rad50 und SMC-Proteinen (structural maintenance of chromosomes) gefunden werden. Ein Verlust von *S. cerevisiae* Rad50, welches im Komplex mit Mre11 und Xrs2 (NBS1) vorliegt und sowohl im NHEJ, als auch in der HR eine Rolle spielt, führt zu verkürzten Telomeren und stellt erneut eine Verbindung von Nej2- ähnlichen Proteinen zum Telomer-Capping her [Tsukamoto *et al.*, 2001].

Die Homologiesuchen ergaben, dass obwohl keine bekannten Funktionen von direkten Nej2-Homologen gefunden werden konnten, zumindest mehrere konservierte Domänen auf Funktionen im Telomer-, RNA- und DNA-Metabolismus hindeuten. Mit PinX1 und Pxr1p in *S. cerevisiae*, für die eine Interaktion mit Nej2 gezeigt wurde, konnten homologe Proteine identifiziert werden, die duale Funktionen im Telomermetabolismus (Telomeraseinhibition durch PinX1) und mRNA-Splicing aufweisen. Somit würden mögliche Funktionen von Nej2 Proteinen im RNA-Metabolismus nicht gegen eine Beteiligung beispielsweise im Telomermetabolismus sprechen.

OMIMTM (Online Mendelian Inheritance in ManTM) Datenbankanalysen zeigten die Region des humanen *NEJ2* auf Chromosom 22q12.1 zwischen 23583290 und 236045549 bp nicht als einen „Hotspot“ für humane Tumore oder erbliche Erkrankungen an. Einer der Gründe hierfür könnten noch nicht bekannte essentielle, lebensnotwendige Funktionen von hNej2, beispielsweise im RNA-Metabolismus sein. Es wäre eine Überexpression von hNej2 notwendig, um das NHEJ zu inhibieren und damit möglicherweise Tumorbildung zu fördern.

In Northernblot-Analysen von, aus humanen Fibroblasten isolierter zellulärer Gesamt-mRNA, zeigte sich eine Bande in der erwarteten Höhe (Abb. 9), was gegen ein Pseudogen und für eine native Expression von *NEJ2* spricht. Bei der

Untersuchung der Expression von *hNEJ2*-mRNA in verschiedenen adulten und fetalen Geweben zeigten sich im „Multiple Tissue“-Northernblot eine ubiquitäre Expression von *hNEJ2*-mRNA sowohl in fetalen, als auch adulten menschlichen Geweben (Abb. 11). Eine erhöhte Expression fand sich in adulter Milz und in adulten Colon. Es haben sich für Ursachen keine Evidenzen ergeben. Bisher können auch keine Aussagen über eine mögliche zellzyklusabhängige Expression von *hNEJ2* oder eine mögliche posttranskriptionale Modifikation von hNej2 gemacht werden. Die kürzlich erfolgte Generation eines sowohl im Westernblot, als auch in der Immunfluoreszenz gut funktionierenden Antikörpers, wird voraussichtlich helfen diese Fragestellungen zu bearbeiten.

5.3. Interaktion zwischen hNej2 und XRCC4: Funktionelle Aspekte und mögliche *in vivo* Relevanz

Nach der Identifikation struktureller Homologe von scNej2p stellte sich die Frage, ob humanes Nej2 ebenfalls mit dem humanen Lif1p-Homolog XRCC4 interagiert. Ähnlich wie bei scNej2p, zeigten verschiedene Fragmente transaktivierende oder toxische Eigenschaften im Two-Hybrid Assay. Ebenfalls ähnlich zum Hefeprotein konnte dann in Two-Hybrid Analysen eine Interaktion mit XRCC4 gezeigt werden, wenn die C-terminale Sequenz von Nej2 deletiert wurde. In einem zweiten unabhängigen Testsystem konnte die Interaktion der beiden Proteine bestätigt werden. Bei Coexpression eines GST- fusionierten hNej2 und unfusionierten XRCC4 in *E.coli* und anschließender Aufreinigung der GST- fusionierten Proteine unter stringenten Bedingungen, konnte XRCC4 mit hNej2, aber nicht mit den entsprechenden Kontrollen, im Komplex aufgereinigt werden (Abb. 12). Mittels verschiedener GST- fusionierter Fragmente von hNej2 konnte im gleichen Assay die Interaktionsdomäne mit XRCC4 innerhalb von hNej2 zwischen Aminosäure 289 und 343 lokalisiert werden (Abb. 13) Diese überlappt mit der korrespondierenden Interaktionsregion in scNej2p.

Bisher ist es in verschiedenen Ansätzen nicht gelungen endogenes Lif1p oder scNej2p, sowie hNej2 oder XRCC4 mittels Coimmunpräzipitationen nativ aufzureinigen. In Hefe konnte rekombinantes, mit 6xHis- fusioniertes Lif1p, zumindest bei gemeinsamer Überexpression mit scNej2p, im Komplex aufgereinigt werden, nicht jedoch endogenes Lif1 [Herrmann *et al.*; submitted to Mol. Cell]. Im

Gegensatz dazu konnten in humanen Fibroblasten XRCC4 und DNA-Ligase IV coimmunpräzipitiert werden. Die Gründe hierfür sind bisher nicht aufgeklärt. Eine Möglichkeit könnte sein, dass die Bindung von Nej2 an XRCC4 oder Lif1p nur unter bestimmten Umständen, z.B. nach bestimmten Schädigungen oder räumlich (beispielsweise an Telomeren) und zeitlich (beispielsweise in bestimmten Zellzyklusphasen) begrenzt stattfindet, so dass in einer konventionellen Immunpräzipitation keine entsprechenden Komplexe gereinigt werden können.

Unter pathologischen Bedingungen, wie z.B. in *TRF2*-, *Ku*- oder *DNA-PKcs*-defizienten Zellen [van Steensel *et al.*, 1998; Bailey *et al.*, 1999, Goytisolo *et al.*, 2001; Gilley *et al.*, 2001], werden Telomere in humanen Zellen von DNA-Ligase IV ligiert [Smogorzewska *et al.*; 2002]. Hierbei kommt es nicht nur zu Telomer-Telomer-Fusionen, sondern auch zu Telomer-DSB-Fusionen [Bailey *et al.*; 2004]. Diese Fusionen könnten für die Zelle als „Notlösung“ verwendet werden, um ungeschützte Chromosomen-Enden vor dem Abbau zu schützen. DNA-Ligase IV ist jedoch, zumindest *in vitro*, nur im Komplex mit XRCC4 in der Lage DSB zu ligieren [Grawunder *et al.*, 1998b]. Innerhalb des Zellzyklus konnten Przewloka *et al.* [2003] zeigen, dass in Interphasezellen sich XRCC4 hauptsächlich im Zellkern befindet und dort mit DNA-Ligase IV colokalisiert, jedoch in Metaphasezellen außerhalb des kondensierten Chromatins lokalisiert (Abb. 4). Es konnte zudem durch Coaufreinigungen von Metaphase-Zellkernen eine deutliche Abnahme der DNA-Ligase IV/XRCC4 Komplexbildung gezeigt werden. In der Metaphase findet man somit keine oder deutlich weniger Colokalisation mit DNA-Ligase IV, da DNA-Ligase IV mit dem kondensierten Chromatin colokalisiert. In der späten S- bzw. am Anfang der G2-Zellzyklusphase findet die Replikation der Chromosomen statt, in der die Telomere nicht mehr in Ihrer T-Loop-Konfiguration vorliegen [Griffith *et al.*, 1999] und somit gerade in dieser Phase von der NHEJ-Maschinerie als DNA-DSB erkannt und ligiert werden könnten. Somit wäre eine funktionelle Trennung von DNA-Ligase IV und XRCC4 in dieser Zellzyklusphase zumindest an Telomerstrukturen sinnvoll, wobei es bisher keine Evidenzen für eine lokale Komplextrennung an den Telomeren gibt. Zusätzlich fehlen bisher Anhaltspunkte für eine Colokalisation von hNej2 und XRCC4 in der Metaphase [Herrmann *et al.*; submitted to Mol. Cell].

Erste Versuche ergaben, dass hNej2 zumindest in der Telophase nicht mit XRCC4 colokalisiert und an den neu gebildeten Zellkernen zu finden ist (Abb. 40). Dies

könnte auf eine Zellzyklus- abhängige Funktion von hNej2 evtl. an den Telomeren, während dieser Phase hindeuten.

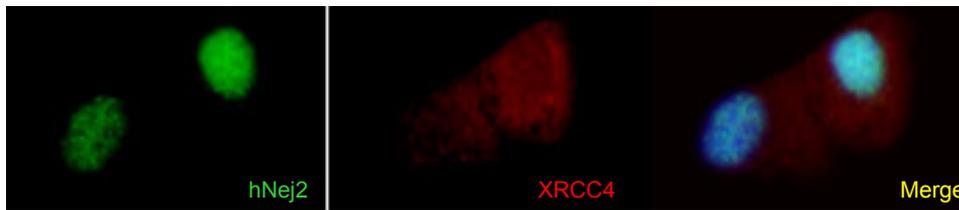


Abb. 40: Vergleich der XRCC4- und hNej2-Lokalisation während der Telophase.

Mittels Fluoreszenz- gekoppelter Antikörper gegen XRCC4 und hNej2, wurden die beiden Proteine in humanen Fibroblasten, welche sich in der Telophase befanden, sichtbar gemacht. DNA wurde mit DAPI angefärbt. In der Telophase ist hNej2 mit der DNA assoziiert, wohingegen XRCC4 aus diesem Bereich ausgeschlossen ist. DAPI (blau), XRCC4 (rot), hNej2 (grün).

Es ist unklar warum DNA-Ligase IV, während der Metaphase mit dem kondensierten Chromatin colokalisiert. Jedoch konnten kürzlich Wang *et al.* [2004] zeigen, dass eine Phosphorylierung der DNA-Ligase IV, auch im Komplex mit XRCC4, durch DNA-PK möglich ist. Die Ligationsfähigkeit der DNA-Ligase IV bleibt durch die Phosphorylierung unbeeinflusst. Gezeigt werden konnte jedoch, dass die Stabilität von DNA-Ligase IV nicht nur abhängig von der Komplexbildung mit XRCC4 ist [Bryans *et al.*, 1999], sondern auch vom Phosphorylierungsstatus der DNA-Ligase IV. Das Fehlen der DNA-Ligase IV-Phosphorylierungsstellen beeinflusst zudem die Fähigkeit der Komplexbildung mit XRCC4. Eine Regulation der DNA-Ligase IV/XRCC4-Komplexbildung mittels DNA-PK- vermittelter Phosphorylierung der DNA-Ligase IV, die Zellzyklusabhängig sein könnte, wäre denkbar. DNA-Ligase IV ohne XRCC4 ligiert *in vitro* DNA nicht effektiv [Grawunder *et al.*, 1998b], zum anderen gibt es Hinweise auf eine protektive Funktion der DNA-Ligase IV an DNA-Enden, die unabhängig von der Ligationfunktion zu sein scheint [Smith *et al.*, 2003]. Somit könnten sich in der Metaphase für die DNA-Ligase IV andere eher protektive Funktionen als in der Interphase ergeben. Hierfür sprechen auch die Interaktionen der DNA-Ligase IV mit Ku, welches auch protektive Funktionen am Telomer übernimmt und als Telomerlängenregulator gilt [Gravel und Wellinger, 2002].

5.4. Zelluläre Lokalisation von hNej2 und scNej2p

Ein von uns konstruiertes Fusionsprotein aus eGFP und scNej2p, welches über ein Plasmid überexprimiert wurde, konnte die Letalität des *scnej2*-deletierten Stammes komplementieren. Das eGFP-fusionierte scNej2p zeigte ein Muster mit drei bis sechs Punkten im Zellkern (Abb. 17). Dieses Muster findet sich bei Proteinen mit einer Telomerlokalisierung [Maillet *et al.*, 2001]. Weitere Untersuchungen mittels high-end konfokaler Mikroskopie konnten kürzlich eine Colokalisation von scNej2p und dem Telomerprotein Rap1 [Gotta *et al.*, 1996] in *S. cerevisiae* zeigen [AG Dr. P. Schär, Institut für Molekulare Krebsforschung der Universität Zürich, CH].

Wir untersuchten die Lokalisation von hNej2 in humanen Zellen mittels eCFP-fusioniertem hNej2. Ursprünglich war geplant stabil transfizierte Zelllinien zu etablieren. Allerdings konnten wir in verschiedenen humanen Zelllinien, wie z.B. WI26 SV-40 Fibroblasten und HeLa Zellen in mehreren Versuchen keine Zellen generieren, die stabil hNej2-überexprimierten (Kapitel 4.7.2.). Die transiente Expression von eCFP-hNej2 in WI26 SV-40 zeigte nach fünfständiger Induktion mit Tetrazyclin ebenfalls ein punkartiges Muster im Zellkern (Abb. 18 A), das an Muster von Telomerassoziierten Proteinen erinnert [Baumann *et al.*; 2002, Salonen *et al.*; 2004, Ye *et al.*; 2004]. Bei längeren Induktionen als sechs Stunden konnten vermehrt Zellen beobachtet werden, die im Zellkern eine fluoreszierende Aggregatbildung aufwiesen und lysierten (Abb. 18 B und C). In neueren Untersuchungen konnten diese Aggregatbildungen mittels eines gegen Nej2p gerichteten Antikörpers auch in WI-26 SV-40 Fibroblasten beobachtet werden, die hNej2 ohne fusioniertes fluoreszierendes Protein exprimierten, wodurch eine mögliche Toxizität durch das fusionierte eCFP ausgeschlossen werden konnte [Herrmann *et al.*, unpubliziert]. TUNEL-Assays an WI-26 SV-40 Fibroblasten die hNej2 länger als sechs Stunden überexprimierten, zeigten keine Colokalisation von DNA-Fragmentierung mit den Aggregat-bildenden Zellen (Abb. 19). Dies schließt Apoptose als Mechanismus der Zellyse aus. Nekrose der Zellen käme als möglicher Mechanismus in Frage.

5.5. Colokalisation von hNej2 mit nukleären Proteinen

Um die punktförmigen Muster des eCFP-hNej2 im Zellkern näher zu untersuchen, wurde versucht dieses mit schon bekannten zellulären Proteinen zu colokalisieren. Punktförmige Fluoreszenzmuster assoziierter Proteine finden sich in Immunfluoreszenzuntersuchungen bei einer Reihe von nukleären Strukturen wie Telomeren, Orten der RNA-Synthese oder Centromeren. Als Marker für Orte der RNA-Synthese wurden Antikörper gegen die „kleinen nukleären Ribonukleoproteine“ (snRNP) verwendet [Zieve und Sauterer, 1990] und versucht diese mit eCFP-hNej2 zu colokalisieren. Für scNej2p werden Funktionen im RNA Metabolismus postuliert [(6.2), Hazbun *et al.*, 2003]. In unseren Untersuchungen mit drei verschiedenen Antikörpern gegen snRNP konnten wir in keinem Fall eine entsprechende Colokalisation mit eCFP-hNej2 zeigen (Abb. 29).

Ein Centromer ist ein eingeschnürter Bereich eines Chromosoms, der die Anheftungsstelle der Mitose- oder Meiosespindel enthält. Proteine, die an Centromeren lokalisieren, zeigen punktförmige nukleäre Fluoreszenzmuster [Susiki *et al.*, 2004]. Unsere Untersuchungen mit gegen Centromerstrukturen gerichteten Antikörpern zeigten eindeutig keine Colokalisation von hNej2 mit Centromeren (Abb. 22).

Im Gegensatz dazu gelang es uns, eCFP-hNej2 mit PML (Promyelocytic Leukemia) - Körperchen zu colokalisieren (Abb. 21).

PML-Körperchen sind nukleäre Strukturen, die im Zusammenhang mit einer Bandbreite von zellulären Funktionen, wie z.B. der DNA-Schadensantwort, der alternativen Verlängerung der Telomere über Homologe Rekombination [Bechter *et al.*, 2004], viraler Pathogenität [Everett, 2001], Seneszenz und p53-vermittelter Apoptose in Zusammenhang gebracht werden [Conlan *et al.*, 2004]. Sie kommen generell in allen Säugerzellen vor und sind in einer Häufigkeit von 5-30, abhängig vom Zellzyklus und Zelltyp, pro Nukleus zu finden [Zhong *et al.*, 2000]. Promyelozytische Leukämie beim Menschen resultiert im Fehlen von PML-Körperchen [Mu *et al.*, 1994]. In der Maus führt promyelozytische Leukämie zur Beeinträchtigung des Immunsystems, chromosomaler Instabilität und Tumorentstehung [Wang *et al.*, 1998; Zhong *et al.*, 1999; Rego *et al.*, 2001]. Nach heutiger Datenlage scheint es keine Verbindungen zwischen PML-Körperchen und RNA-Synthese oder dem RNA-Splicing zu geben [Grande *et al.*, 1996; Tian, 2001]. Im Zentrum der PML-Körperchen konnten weder Chromatin noch RNA gefunden

werden, jedoch konnte festgestellt werden, dass zumindest die Peripherie der PML-Körperchen mit neu synthetisierter RNA assoziiert ist [Boisvert *et al.*, 2000]. Die Funktion von PML-Körperchen ist momentan noch unklar. Sie könnten als Depot für nukleäre Proteine [Negorev und Maul, 2001] oder als Ort für posttranslationale Modifikation von nukleären Proteinen dienen [Hofmann *et al.*, 2002; D’Orazi *et al.*, 2002]. Es zeigte sich, dass PML-Körperchen eine dynamische Struktur, abhängig von z.B. Hitzeschock und DNA-Schäden, haben [Maul *et al.*, 1995; Eskiw *et al.*, 2003]. PML-Körperchen sind mit durch ionisierender Strahlung ausgelösten DNA-Schäden assoziiert [Hofmann *et al.*, 2002; Carbone *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2003]. Auch die Translokationen von DNA-Reparaturfaktoren, wie z.B. ATR [Barr *et al.*, 2003], Mre11 [Mirzoeva und Petrini, 2001], NBS1 [Lombard und Guarente, 2000] und BLM (RecQ DNA Helicase mutiert im Bloom Syndrom) [Bischof *et al.*, 2001], zwischen PML-Körperchen und Umgebung scheinen als Antwort auf DNA-Schäden hin zu erfolgen. Dies stellt eine weitere Assoziation von PML-Körperchen mit DNA-Reparaturmechanismen dar. Ca. 40 weitere Proteine konnten mit PML-Körperchen colokalisiert werden [Dellaire *et al.*, 2003], darunter viele Proteine der DNA-Reparatur, wie z.B. ATM, BRCA1, Chk2, H2AX, Rad50, Rad51, Rad52, RPA, p53, und WRN (RecQ DNA Helicase mutiert im Werner Syndrom). Zudem wurden TRF1 und TRF2 (Telomer-Repeat-Faktor) mit PML colokalisiert [Übersicht in Dellaire und Bazett-Jones, 2004, Henson *et al.*; 2002]. Kürzlich zeigte sich, dass PML-Körperchen in Telomerase- negativen Zellen dynamisch assoziiert mit den Telomeren vorliegen und hierbei Funktionen in der alternativen Verlängerung von Telomeren haben [Molenaar *et al.*, 2003].

In Übereinstimmung mit der Colokalisation mit PML-Körperchen konnte in dieser Arbeit eine Colokalisation mit dem teils Telomer- assoziiertem DNA-Reparaturprotein Mre11 und hNej2 gezeigt werden (Abb. 27).

Es wurde gezeigt, dass der MRN-Komplex während der Abwesenheit von DNA-Schäden in den PML-Körperchen über eine Interaktion von NBS1 mit SP100, welches ebenso in PML- assoziiert ist, liegt [Wu *et al.*, 2000a; Naka *et al.*, 2002]. Nach einem, durch ionisierende Strahlung vermitteltem DNA-Schaden, wird der MRN-Komplex freigesetzt und translokalisiert dann zum DNA-Schaden. Ist dieser behoben, kommt es zur Wiederherstellung der Colokalisation von MRN und den PML-Körperchen [Mirzoeva und Petrini, 2001]. Die Translokation des MRN-Komplexes ist auf die ersten ca. 30’ nach der Bestrahlung begrenzt.

Aufgrund der Toxizität der *hNEJ2*-Überexpression waren wir bisher nicht in der Lage entsprechende „dynamische“ Untersuchungen zur nukleären Translokation der Faktoren nach verschiedenen DNA-Schäden durchzuführen. Es konnte bisher nur eine teilweise Colokalisation von TRF2 und eCFP-hNej2 gezeigt werden.

TRF1 und TRF2 binden an die Telomersequenz TTAGGGn [Blackburn, 1991]. Der Verlust von TRF2, der ein wichtiger protektiver Faktor ist, um Telomerfusionen zu verhindern, führt zu Zellzyklusarresten oder Apoptose [van Steensel *et al.*, 1998]. Dies liegt wahrscheinlich in der Notwendigkeit der TRF2-Anwesenheit für die T-Loop-Bildung an den Telomeren [Griffith *et al.*, 1999]. TRF1 vermittelt, durch Interaktion mit Ku, die Bindung des Ku- Heterodimers an Telomere [Hsu *et al.*, 2000]. Auch wenn in Zusammenfassung aller gezeigten Daten zur Colokalisation von hNej2 vieles für eine, entweder permanente oder zumindest zeitweise dynamische Telomerlokalisierung spricht, muss man dennoch zur Diskussion stellen, dass ein einzelnes Telomer als Einheit der DNA-Repeats und aller Proteine, die mit diesen Repeats assoziiert sind, definiert ist. Somit kann selbst durch die Colokalisation mit TRF1/2 dieses noch nicht endgültig als nachgewiesen gelten. Es ist noch unklar, ob eine mögliche hNej2 Bindung direkt an der Telomer-DNA oder an einem der Telomer- assoziierten Proteine erfolgt. Notwendig wären Versuche einer Colokalisation mit einer Telomer- spezifischen fluoreszenzgekoppelten Peptide-Nucleinsäure(PNA), die gegen die Telomersequenz „TTAGGG“ gerichtet ist [Molenaar *et al.*, 2003]. Entsprechende Versuche werden momentan in der AG Dr. Herrmann in der dermatologischen Klinik der Universität zu Köln durchgeführt.

XRCC4 konnte nicht direkt mit hNej2 colokalisiert werden (Abb. 24). Es zeigt in der Interphase eine eher diffuse Verteilung im Zellkern und auch teilweise zytoplasmatisch. Somit ist zumindest eine zeitweise, gegebenenfalls lokalisierte Interaktion mit hNej2 nicht ausgeschlossen. Weitere Untersuchungen sind jedoch nötig, um diese möglichen Verbindungen weiter zu untersuchen.

5.6. *In vitro* Bindungs- und Ligations-Assays mit rekombinantem hNer2

Um den direkten Einfluss von hNer2 auf XRCC4, Ligation und die DNA zu untersuchen, wurde hNer2, XRCC4 und Ligase IV aufgereinigt und für biochemische *in vitro* Assays verwendet. Hierbei zeigte sich bei Zugabe von hNer2, zu linearisierter Plasmid-DNA im Vergleich zur Kontrolle ein Bandshift (Abb. 38), der eine mögliche DNA-Bindung widerspiegeln könnte.

Des Weiteren wurde der Einfluss von hNer2 auf die Ligation, vermittelt zum einen durch die T4-DNA-Ligase, als auch durch den DNA-Ligase IV/XRCC4-Komplex, untersucht. Es konnte in beiden Fällen eine Inhibierung der Ligationseffizienz durch hNer2 im Vergleich zur Kontrolle *in vitro* gezeigt werden (Abb. 37). Das Interferieren von hNer2 mit der Ligation, könnte trotz der gleichzeitigen Zugabe aller Proteine in den Assay, durch die Bindung an die DNA- Enden von hNer2 oder durch Interaktion mit XRCC4 entstanden sein. Zumindest kann im Falle der T4-DNA-Ligase von keiner Proteininteraktion ausgegangen werden, da es keine Anzeichen für eine solche Interaktion gibt. Im Falle der Inhibierung der Ligationseffizienz des DNA-Ligase IV/XRCC4-Komplex ist die Möglichkeit eher gegeben, dass es hier zusätzlich zu einer Verdrängung von XRCC4 aus der Interaktion mit DNA-Ligase IV zugunsten der Bindung mit hNer2 gekommen ist. XRCC4 hat ebenfalls DNA- Bindungsqualitäten und die Interaktion mit der DNA-Ligase IV ist stark [Sibanda *et al.*, 2001]. *In vivo* ist aufgrund dieser starken Bindungen möglicherweise ein Regulationsmechanismus nötig, um die Interaktionspartner von XRCC4 zu ändern. DNA-PKcs, das XRCC4 phosphorylieren kann [Lee *et al.*, 2002, 2004; Yu *et al.*, 2003] wäre ein möglicher Kandidat für einen Regulator. Dafür spricht die Tatsache, dass die Inhibition der katalytischen Aktivität von DNA-PKcs in humanen Zellen zu Telomerfusionen führt [Bailey *et al.*, 2004]. In Hefen ist jedoch bisher kein DNA- PKcs-Homolog gefunden worden. Es gibt aber Hinweise dafür, dass andere Mitglieder der PIKK-Familie (Phosphoinositide 3-kinase related kinases), wie die Hefehomologe von ATR und ATM, Mec1p bzw. Tel1p die Rolle des DNA-PKcs übernehmen [Abraham, 2004].

6. Ausblick

Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse sollte zukünftig das Hauptinteresse auf die Frage gerichtet sein, ob die Hauptaufgabe des NHEJ nicht das Zusammenführen von DNA-DSB, sondern der Schutz der Telomere ist. Das Potential der Inhibierung von NHEJ an Telomeren und so zur Verhinderung von Telomerfusionen, ist in Bezug auf Seneszenz und Tumorentstehung ein wichtiger Aspekt. In humanen Zellen wurden pro Zelle ca. 0,05 DSB/Zelle gefunden [Rothkamm und Lobrich, 2003; Karanjawala und Lieber, 2004]. Dagegen muss im Laufe eines jeden Zellzyklusses die protektive Telomer-Endstruktur entfernt und wieder rekonstituiert werden, um Replikation zu erlauben [d'Adda di Fagagna *et al.*, 2004]. Dabei sind NHEJ-Proteine an 92 neu entstehenden Telomeren pro Zelle, was 46 DSB entspricht, assoziiert [Bailey und Goodwin, 2004].

Mit NEJ2 konnte ein Faktor identifiziert werden, der möglicherweise an der Schnittstelle von DNA-DSBR und Telomerprotektion steht. Bisher ist unklar wie die Regulation der jeweiligen Inhibierung abläuft, in welchen Situationen oder Zellzyklusphasen sie stattfindet und welche weiteren Proteine hierbei eine Rolle spielen. Möglicherweise wird, wenn die beiden postulierten Funktionen von Nej2, NHEJ-Inhibition zu Gunsten der Homologen Rekombination und Schutz vor Telomerfusionen, sich bestätigen, Nej2 in der späten S- und in der G2-Phase benötigt, in der eher Homologe Rekombination stattfindet und die Telomere während der Replikation ungeschützt vorliegen.

Die Interaktion von hNej2 mit dem potentiellen Tumorsuppressor und Telomeraseinhibitor PinX1, birgt die Möglichkeit einer Regulation der Aktivität der Telomerase, die in humanen Tumorzellen nachweisbar exprimiert gefunden wurde [Kim *et al.*, 1994], jedoch generell nicht von adulten humanen Zellen exprimiert wird.

Es ergibt sich für zukünftige Untersuchungen eine Reihe von Perspektiven. Es sollte zunächst der Einfluss von hNej2 auf die Telomere, evtl. über PinX1, untersucht werden. Da der Telomerkomplex mit seinem assoziierten Proteinen nicht nur zum Schutz vor Exonukleasen, Degradation und NHEJ, sondern auch zur Positionierung der Chromosomen im Nukleus und zum korrekten Alignment von Chromosomen zur Rekombination während der Meiose benötigt wird [Blackburn, 1991; Zakian, 1995; Greider, 1996], sollten in der zukünftigen Betrachtung der NHEJ-Proteine, diese

Punkte auch im Zusammenhang mit NHEJ-Proteinen untersucht und in Verbindung gebracht werden.

Ziel weiterer Untersuchungen sollte es sein, eine humane *nej2* Knockout-Zelllinie zu etablieren und diese, falls viabel, dann auf mögliche Telomerfusionen zu untersuchen, da möglicherweise der DNA-Ligase IV/XRCC4-Komplex an den Telomeren nicht mehr durch hNej2 inhibiert werden könnte. Allerdings muss hierbei auf den Einfluss anderer Telomer- protektiver Proteine, wie z.B. das Ku-Heterodimer Rücksicht genommen werden.

Zudem sollte versucht werden verschiedene unfusionierte hNej2-Fragmente induzierbar in humanen Zellen über zu exprimieren, um deren Effekt zu untersuchen. Möglicherweise lässt sich so die Letalität, der hNej2-Vollängenexpression umgehen. In hNej2 überexprimierenden Zellen, nativ hNej2 exprimierenden Zellen und *hnej2*-defizienten Zellen könnten DSB induziert werden und die Homologe Rekombinations-Frequenz und die NHEJ-Frequenz verglichen werden. Eine Inhibition des NHEJ in humanen Zellen durch Überexpression von hNej2, bei gleichzeitiger Steigerung der Effektivität der Homologen Rekombination, würde Anwendungsmöglichkeiten, unter anderem für das „Gene Targeting“ bei Mäusen bieten.

Einer der wichtigsten Punkte in näherer Zukunft wird die Einordnung der Interaktion zwischen hNej2 und PinX1 in den Telomermetabolismus sein. Geeignet könnte z.B. ein Three-Hybrid von PinX1/hTert (RNA- enthaltene Telomeraseuntereinheit) und hNej2 Überexpression sein, welcher anzeigen könnte, ob hNej2 negativen Einfluss auf die Bindung zwischen PinX1 und hTert hat.

Kurzzusammenfassung

DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) sind die schwerwiegendsten Formen von DNA-Schäden. Unrepariert können sie zum Zelltod führen. Die Nicht-Homologe Rekombination (NHEJ) ist einer der beiden Hauptmechanismen zur Reparatur von DSB. Der DNA-Ligase IV/XRCC4-Komplex in Säugern bzw. der Dnl4/Lif1p-Komplex in Hefe ist für den zusammenführenden Schritt des NHEJ, aber auch für pathologisch bedingte Telomerfusionen verantwortlich.

Diese Arbeit beschreibt die Identifikation und Charakterisierung des neuen humanen Proteins hNej2 und seines Hefeorthologs scNej2p, welches ursprünglich von unserer AG als Interaktionspartner von Lif1p identifiziert wurde. Im Kontrast zu anderen NHEJ-Faktoren, ist eine *scnej2*-Deletion letal, was auf weitere essentielle Funktionen des scNej2p in Hefen hindeutet. ScNej2p interferiert mit der Formation des Dnl4/Lif1p-Komplexes und Überexpression von scNej2p reduziert die NHEJ-Effizienz in Hefen. Wir konnten zeigen, dass NEJ2 in Eukaryonten konserviert vorliegt, es in humanen Zellen ubiquitär exprimiert wird und dass die Interaktion zwischen Nej2 mit dem humanen XRCC4 konserviert ist.

Die Überexpression von hNej2 in humanen Zellen ist letal. Durch eine transiente Expression konnte ein punktförmiges Muster im Nukleus von humanen und Hefe-Zellen gezeigt werden, welches in beiden Organismen an das Muster von Telomer-assoziierten Proteinen erinnert. Wir konnten hNej2 durch Colokalisierungen mit Telomer-assoziierten Proteinen, wie TRF2 (Telomer Repeat Faktor) und Mre11 in humanen Fibroblasten und der Interaktion mit PinX1, einem Telomeraseinhibitor, mit Telomerstrukturen assoziieren. Durch die Colokalisierung von hNej2 und PML-Körperchen, welche eine Reihe von DNA-Reparaturfaktoren beherbergen und mit der DNA-Schadensantwort, der alternativen Verlängerung der Telomere und der zellulären Alterung in Zusammenhang gebracht werden, konnte Nej2 in die DSB-Reparatur eingeordnet werden.

Zusammengefasst gibt es Evidenzen dafür, dass NEJ2 ein neuer NHEJ- und Telomer-assoziiertes Faktor ist, welcher möglicherweise als Verbindungsstelle zwischen DSB-Reparatur und dem Telomermetabolismus agiert. Weitere Studien sind nötig, um zu prüfen, ob NEJ2 der Faktor ist, der unter normalen Bedingungen NHEJ-vermittelte Telomerfusionen von freien Telomeren verhindert.

Abstract

DNA double-strand breaks are dangerous lesions that can lead to genomic instability and to cell death. Non-homologous end joining (NHEJ) is one of two pathways responsible for the repair of double-strand breaks in eukaryotic cells. XRCC4 (Lif1p in yeast) protein forms a complex with DNA ligase IV (Dnl4p) that rejoins two DNA ends in the last step of NHEJ to repair double strand breaks. Telomere fusions resulting from inhibition of telomere-protective factors are also generated by DNA ligase IV /XRCC4-dependent NHEJ.

This report describes the identification and characterization of NEJ2, novel human and yeast proteins, originally identified by our group as an interaction partner of yeast Lif1p. In contrast to other factors with functions in NHEJ, scNej2p is essential in yeast pointing to other functions. ScNej2p interferes with Dnl4p and Lif1p complex formation and overexpression of scNej2p reduces efficiency of NHEJ in yeast.

We could demonstrate that NEJ2 is conserved throughout the eukaryotic kingdom, that it is ubiquitously expressed in human cells and that the interaction of NEJ2 with human XRCC4 is conserved.

Overexpression of *hNEJ2* in human cells is lethal, but transient expression reveals a dot-like pattern in the nucleus of human and yeast cells which is reminiscent of the pattern of telomere-associated proteins in both organisms. We could associate human Nej2 with telomere-associated proteins through colocalization with TRF2 (telomeric repeat factor 2) and Mre11 in human fibroblasts, and the interaction with the telomerase inhibitor PinX1. We could also demonstrate a transient colocalization of hNej2 and PML-bodies, which harbour several DNA-repair factors and are related to DNA-damage-response, the alternative elongation of telomeres and cellular senescence.

In summary, several lines of evidence indicate that NEJ2 is a novel NHEJ- and telomere-associated factor, which may act at the crucial interface of DNA double-strand break repair and telomere metabolism. Further studies will be necessary to prove if Nej2 is the factor that under normal conditions prevents free telomeric ends to be ligated by the DNA double-strand break repair pathway of NHEJ.

7. Literatur

- Abraham,R.T. (2001) **Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases.** *Genes Dev.*, **15**, 2177-2196.
- Abraham,R.T. (2004) **PI 3-kinase related kinases: 'big' players in stress-induced signaling pathways.** *DNA Repair*, **3**, 883-887.
- Adams,A., Gottschling,D.E., Kaiser,C.A. und Stearns,T. (1997) **Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual.** *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.*
- Al-Deib,A.A., Mahdi,A.A. und Lloyd,R.G. (1996) **Modulation of Recombination and DNA Repair by the RecG and PriA Helicases of *Escherichia coli* K-12.** *J. Bact.*, **23**, 6782–6789.
- Allen,C., Kurimasa,A., Brenneman,M.A., Chen,D.J. und Nickoloff,J.A. (2002) **DNA-dependent protein kinase suppresses double-strand break-induced and spontaneous homologous recombination.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 3758-3763.
- Altschul,S.F. und Koonin,E.V. (1998) **Iterated profile searches with PSI-BLAST--a tool for discovery in protein databases.** *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 444-447.
- Altschul,S.F., Gish,W., Miller,W., Myers,E.W. und Lipman,D.J. (1990) **Basic local alignment search tool.** *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Altschul,S.F., Madden,T.L., Schaffer,A.A., Zhang,J., Zhang,Z., Miller,W. und Lipman,D.J. (1997) **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389-3402.
- Anderson,C.W. und Lees-Miller,S.P. (1992) **The nuclear serine/threonine protein kinase DNA-PK.** *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, **2**, 283–314.
- Aravind,L., Koonin,E.V. (1999) **G-patch: a new conserved domain in eukaryotic RNA-processing proteins and type D retroviral polyproteins.** *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 342-344.
- Bachmann,B.J. (1996) **Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12.** In *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C. 2460-2488.
- Bailey,S.M. und Goodwin,E.H. (2004) **DNA and telomeres: beginnings and endings.** *Cytogenet. Genome Res.*, **104**, 109-115.
- Bailey,S.M., Brenneman,M.A., Halbrook,J., Nickoloff,J.A., Ullrich,R.L. und Goodwin,E.H. (2004) **The kinase activity of DNA-PK is required to protect mammalian telomeres.** *DNA Repair*, **3**, 225-33.
- Bailey,S.M., Cornforth,M.N., Kurimasa,A., Chen,D.J. und Goodwin,E.H. (2001) **Strand-specific postreplicative processing of mammalian telomeres.** *Science*, **293**, 2462-2465.
- Bailey,S.M., Cornforth,M.N., Ullrich,R.L. und Goodwin,E.H. (2004) **Dysfunctional mammalian telomeres join with DNA double-strand breaks.** *DNA Repair*, **4**, 349-357.
- Bailey,S.M., Meyne,J., Chen,D.J., Kurimasa,A., Li,G.C., Lehnert,B.E. und Goodwin,E.H. (1999) **DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **96**,14899-14904.

- Barnes,D.E., Stamp,G., Roswell,I., Denzel,A. und Lindahl,T. (1998) **Targeted disruption of the gene encoding DNA ligase IV leads to lethality in embryonic mice.** *Curr. Biol.*, **8**, 1395-1398.
- Barr,S.M., Leung,C.G., Chang,E.E. und Cimprich,K.A. (2003) **ATR kinase activity regulates the intranuclear translocation of ATR and RPA following ionizing radiation.** *Curr. Biol.*, **13**, 1047-1051.
- Bassing,C.H., Swat,W. und Alt,F.W. (2002) **The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination.** *Cell*, **109**, 45-55.
- Baumann,P. und Cech,T.R. (2000) **Protection of telomeres by the Ku protein in fission yeast.** *Mol. Biol. Cell*, **11**, 3265-3275.
- Baumann,P., Podell,E. und Cech,T.R. (2002) **Human Pot1 (protection of telomeres) protein: cytolocalization, gene structure, and alternative splicing.** *Mol. Cell Biol.*, **22**, 8079-8087.
- Bechter,O.E., Shay,J.W. und Wright,W.E. (2004) **The frequency of homologous recombination in human ALT cells.** *Cell Cycle*, **3**, 547-549.
- Bernstein,C., Bernstein,H., Payne,C.M. und Garewal,H. (2002) **DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis.** *Mutat. Res.*, **511**, 145-178.
- Bianchi,A. und de Lange,T. (1999) **Ku binds telomeric DNA *in vitro*.** *J. Biol. Chem.*, **274**, 21223-21227.
- Bischof,O., Kim,S.H., Irving,J., Beresten,S., Ellis,N.A. und Campisi,J. (2001) **Regulation and localization of the Bloom syndrome protein in response to DNA damage.** *J. Cell Biol.*, **153**, 367-380.
- Blackburn,E.H. (1991) **Structure and function of telomeres.** *Nature*, **350**, 569-573.
- Boisvert,F.M., Hendzel,M.J. und Bazett-Jones,D.P. (2000) **Promyelocytic leukemia (PML) NBs are protein structures that do not accumulate RNA.** *J. Cell Biol.*, **148**, 283-292.
- Boulton,S.J. und Jackson,S.P. (1996) **Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance.** *Nucleic Acids Res.*, **24**, 4639-4648.
- Breeden,L. und Nasmyth,K. (1985) **Regulation of the yeast HO gene.** *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **50**, 643-650.
- Breen,A.P. und Murphy,J.A. (1995) **Reactions of oxyl radicals with DNA.** *Free Radic. Biol. Med.*, **18**, 1033-1077.
- Brent,R. und Ptashne,M. (1985) **A bacterial repressor protein or a yeast transcriptional terminator can block upstream activation of a yeast gene.** *Nature*, **20**, 198.
- Bressan,D.A., Baxter,B.K. und Petrini,J.H. (1999) **The Mre11-Rad50-Xrs2 protein complex facilitates homologous recombination- based double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol. Cell Biol.*, **19**, 7681-7687.
- Broccoli,D., Young,J.W., und de Lange,T. (1995) **Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 9082-9086.
- Bryans,M., Valenzano,M.C. und Stamato,T.D. (1999) **Absence of DNA ligase IV protein in XR-1 cells: evidence for stabilization by XRCC4.** *Mutat. Res.*, **433**, 53-58.

- Calsou,P., Delteil,C., Frit,P., Drouet,J. und Salles,B. (2003) **Coordinated assembly of Ku and p460 subunits of the DNA-dependent protein kinase on DNA ends is necessary for XRCC4-ligase IV recruitment.** *J. Mol. Biol.*, **326**, 93-103.
- Calsou,P., Frit,P., Humbert,O., Muller,C., Chen,D.J. und Salles,B. (1999) **The DNA-dependent protein kinase catalytic activity regulates DNA end processing by means of Ku entry into DNA.** *J. Biol. Chem.*, **274**, 7848-7856.
- Carbone,R., Pearson,M., Minucci,S. und Pelicci,P.G. (2002) **PML NBs associate with the hMre11 complex and p53 at sites of irradiation induced DNA damage.** *Oncogene* **18**, 935-941.
- Cary,R.B., Peterson,S.R., Wang,J., Bear,D.G., Bradbury,E.M. und Chen,D.J. (1997) **DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4267-4272.
- Cervantes,R.B. und Lundblad,V. (2002) **Mechanisms of chromosome-end protection.** *Curr. Opin. Cell Biol.*, **14**, 351-356.
- Chan,D.W. und Lees-Miller,S.P. (1996) **The DNA-dependent protein kinase is inactivated by autophosphorylation of the catalytic subunit.** *J. Biol. Chem.*, **271**, 8936-8941.
- Chan,D.W., Chen,B.P., Prithivirajasingh,S., Kurimasa,A., Story,M.D., Qin,J. und Chen,D.J. (2002) **Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks.** *Genes Dev.*, **16**, 2333-2338.
- Chan,D.W., Ye,R., Veillette,C.J. und Lees-Miller,S.P. (1999) **DNA-dependent protein kinase phosphorylation sites in Ku 70/80 heterodimer.** *Biochemistry*, **38**, 1819-1828.
- Charlesworth,B., Sniegowski,P. und Stephan,W. (1994) **The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes.** *Nature*, **371**, 215-220.
- Chen,L., Trujillo,K., Ramos,W., Sung,P., und Tomkinson,A.E. (2001a) **Promotion of Dnl4-catalyzed DNA end-joining by the Rad50/Mre11/Xrs2 and Hdf1/Hdf2 complexes.** *Mol. Cell*, **8**, 1105-1115.
- Chen,L., Trujillo,K., Sung,P. und Tomkinson,A.E. (2000) **Interactions of the DNA ligase IV-XRCC4 complex with DNA ends and the DNA-dependent protein kinase.** *J. Biol. Chem.*, **275**, 26196-26205.
- Chen,S., Inamdar,K.V., Pfeiffer,P., Feldmann,E., Hannah,M.F., Yu,Y., Lee,J.W., Zhou,T., Lees-Miller,S.P. und Povirk,L.F. (2001b) **Accurate in vitro end joining of a DNA double strand break with partially cohesive 3' - overhangs and 3'-phosphoglycolate termini: effect of Ku on repair fidelity.** *J. Biol. Chem.*, **276**, 24323-24330.
- Chiu,C.Y., Cary,R.B., Chen,D.J., Peterson,S.R. und Stewart,P.L. (1998) **Cryo-EM imaging of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase.** (1998). *J. Mol. Biol.*, **284**, 1075-1081.
- Christianson,T.W., Sikorski,R.S., Dante,M., Shero,J.H. und Hieter,P. **Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors.** *Gene*, **110**, 119-122.
- Chu,G. (1997) **Double strand break repair.** *J. Biol. Chem.*, **272**, 24097-24100.
- Chu,G. und Mayne,L. (1996) **Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy: do the genes explain the diseases?** *Trends Genet.* **12**, 187-192.

- Conlan,L.A., McNees,C.J. und Heierhorst,J. (2004) **Proteasome-dependent dispersal of PML nuclear bodies in response to alkylating DNA damage.** *Oncogene*, **23**, 307-310.
- Cormack,B.P., Bertram,G., Egerton,M., Gow,N.A., Falkow,S. und Brown,A.J. (1997) **Yeast- enhanced green fluorescent protein (yEGFP) a reporter of gene expression in Candida albicans.** *Microbiology*, **143**, 303-11.
- Cormack,B.P., Valdivia,R.H. und Falkow,S. (1996) **FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP).** *Gene*, **173**, 33-38.
- Critchlow,S.E. und Jackson,S.P. (1998) **DNA end-joining: from yeast to man.** *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 394-398.
- Critchlow,S.E., Bowater,R.P. und Jackson,S.P. (1997) **Mammalian DNA double-strand break repair XRCC4 interacts with DNA ligase IV.** *Curr. Biol.*, **7**, 588-598.
- D'Adda di Fagagna,F., Hande,M.P., Tong,W., Roth,D., Lansdorp,P.M., Wang,Z. Und Jackson,S.P. (2001) **Effects of DNA nonhomologous end-joining factors on telomere length and chromosomal stability in mammalian cells.** *Curr. Biol.*, **11**, 1192-1196.
- D'Amours,D. und Jackson,S.P. (2001) **The yeast Xrs2 complex functions in S-phase checkpoint regulation.** *Genes Dev.*, **15**, 2238-2249.
- D'Orazi,G., Cecchinelli,B., Bruno,T., Manni,I. und Higashimoto,Y. (2002) **Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis.** *Nat. Cell Biol.*, **4**, 11-19.
- D'Adda di Fagagna,F., Teo,S.H. und Jackson,S.P. (2004) **Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response.** *Genes Dev.*, **18**, 1781-1799.
- Dai,Y., Kysela,B., Hanakahi,L.A., Manolis,K., Riballo,E., Stumm,M., Harville,T.O., West,S.C., Oettinger,M.A. und Jeggo,P.A. (2003) **Nonhomologous end joining and V(D)J recombination require an additional factor** *PNAS*, **100**, 52462-52467.
- Dasika,G.K., Lin,S.C., Zhao,S., Sung,P., Tomkinson,A. und Lee,E.Y. (1999) **DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis.** *Oncogene*, **18**, 7883–7899.
- Davies,A.A., Masson,J.Y., McIlwraith,M.J., Stasiak,A.Z., Stasiak,A., Venkitaraman,A.R. und West,S.C. (2001) **Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein.** *Mol. Cell*, **7**, 273-282.
- De Fazio,L.G., Stansel,R.M., Griffith,J.D. und Chu,G. (2002) **Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase.** *EMBO J.*, **21**, 3192-3200.
- De Lange,T. (2002) **Protection of mammalian telomeres.** *Oncogene*, **21**, 532-540.
- De Lange,T., Shiue,L., Myers,R.M., Cox,D.R., Naylor,S.L., Killery,A.M. und Varmus,H.E. (1990) **Structure and variability of human chromosome ends.** *Mol. Cell Biol.*, **10**, 518-527.
- De Stanchina,E., Querido,E., Narita,M., Davuluri,R.V. und Pandolfi,P.P. (2004) **PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions.** *Mol. Cell*, **13**, 523-535.
- De Villartay,J.P. (2002) **V(D)J recombination and DNA repair: lessons from human immune deficiencies and other animal models.** *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, **2**, 473-479.
- Dellaire,G. und Bazett-Jones,D.P. (2004) **PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress.** *BioEssays*, **26**, 963-977.

- Dellaire,G., Farrall,R. und Bickmore,W.A. (2003) **The Nuclear Protein Database (NPD): sub-nuclear localisation and functional annotation of the nuclear proteome.** *Nucl. Acids Res.*, **31**, 328-330.
- Dendouga,N., Callebaut,I. und Tomavo,S. (2002) **A novel DNA repair enzyme containing RNA recognition, G-patch and specific splicing factor 45-like motifs in the protozoan parasite Toxoplasma gondii.** *Eur. J. Biochem.*, **269**, 3393-3401.
- Douglas,P., Sapkota,G.P., Morrice,N., Yu,Y., Goodarzi,A.A., Merkle,D., Meek,K., Alessi,D.R. und Lees-Miller,S.P. (2002) **Identification of in vitro and in vivo phosphorylation sites in the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase.** *Biochem. J.*, **368**, 243-251.
- Dudasova,Z. und Chovanec,M. (2003) **Artemis, a novel guardian of the genome.** *Neoplasma*, **50**, 311-318.
- Dudasova,Z., Dudas,A. und Chovanec,M. (2004) **Non-homologous end-joining factors of Saccharomyces cerevisiae.** *FEMS Microbiol. Rev.*, **28**, 581-601.
- Durocher,D. und Jackson,S.P. (2001) **DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme?** *Curr. Opin. Cell Biol.*, **13**, 225-231.
- Edamatzu,E., Kaziro,Y. und Itoh,H. (2000) **LUCA15, a putative tumour suppressor gene encoding an RNA-binding nuclear protein, is down-regulated in ras-transformed RAT-1 cells.** *Genes to Cells*, **5**, 849-858.
- Eshleman,J.R. und Markowitz,S.D. (1996) **Mismatch repair defects in human carcinogenesis.** *Hum. Mol. Genet.*, **5**, 1489-1494.
- Eskiw,C.H., Dellaire,G., Mymryk,J.S. und Bazett-Jones,D.P. (2003) **Size, position and dynamic behaviour of PML NBs following cell stress as a paradigm for supramolecular trafficking and assembly.** *J. Cell Sci.*, **116**, 4455-4466.
- Evans,J.W., Liu,X.F., Kirchgessner,C.U. und Brown,J.M. (1996) **Induction and repair of chromosome aberrations in scid cells measured by premature chromosome condensation.** *Radiat Res.*, **145**, 39-46.
- Everett,R.D. (2001) **DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies.** *Oncogene*, **20**, 7266-7273.
- Featherstone,C. und Jackson,S.P. (1999) **Ku, a DNA repair protein with multiple cellular functions?** *Mutat Res.*, **434**, 3-15.
- Fedier,A. und Fink,D. (2004) **Mutations in DNA mismatch repair genes: implications for DNA damage signaling and drug sensitivity.** *Int. J. Oncol.*, **24**, 1039-1047.
- Feldmann,E., Schmiemann,V., Goedecke,W., Reichenberger,S. und Pfeiffer,P. (2000) **DNA double-strand break repair in cell-free extracts from Ku80-deficient cells: implications for Ku serving as an alignment factor in non-homologous DNA end joining.** *Nucleic Acids Res.*, **28**, 2585-2596.
- Feldmann,H. und Winnacker,E.L. (1993) **A putativehomologue of the human autoantigen Ku from Saccharomyces cerevisiae.** *J. Biol. Chem.*, **268**, 12895-12900.
- Feldmann,H., Driller,L., Meier,B., Mages,G.,Kellermann,J. und Winnacker,E.L. (1996) **HDF2, the second subunit of the Ku homologuefrom Saccharomyces cerevisiae.** *J. Biol. Chem.*, **271**, 27765-27769.
- Ferreira,M.G. und Cooper,J.P. (2001) **The fission yeast Taz1 protein protects chromosomes from Ku-dependent end-to end fusions.** *Mol. Cell*, **7**, 55-63.

- Fields,S. und Song,O. (1989) **A novel genetic system to detect protein-protein interactions.** *Nature*, **340**, 245-246.
- Fields,S. und Sternglanz,R. (1994) **The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions.** *Trends Genet.*, **10**, 286-292.
- Frank,K.M., Sekiguchi,J.M., Seidl,K.J., Swat,W., Rathbun,G.A., Cheng,H.L., Davidson,L., Kangaloo,L. und Alt,F.W. (1998) **Late embryonic lethality and impaired V(D)J recombination in mice lacking DNA-Ligase IV.** *Nature*, **396**, 173-177.
- Frank-Vaillant,M. und Marcand,S. (2001) **NHEJ regulation by mating type is exercised through a novel protein, Lif2p, essential to the ligase IV pathway.** *Genes Dev.*, **15**, 3005-3012.
- Game,J.C. und Mortimer,R.K. (1974) **A genetic study of X-ray sensitive mutants in yeast.** *Mutat. Res.* **24**, 281-292.
- Gao,Y., Chaudhuri,J., Zhu,C., Davidson,L., Weaver,D.T. und Alt,F.W. (1998a) **A targeted DNA-PKcs-null mutation reveals DNA-PK-independent functions for KU in V(D)J recombination.** *Immunity*, **9**, 367-376.
- Gao,Y., Sun,Y., Frank,K.M., Dikkes,P., Fujiwara,Y., Seidl,K.J., Sekiguchi,J.M., Rathbun,G.A., Swat,W., Wang,J., Bronson,R.T., Malynn,B.A., Bryans,M., Zhu,C., Chaudhuri,J., Davidson,L., Ferrini,R., Stamato,T., Orkin,S.H., Greenberg,M.E. und Alt,F.W. (1998b) **A critical role for DNA end-joining proteins in both lymphogenesis and neurogenesis.** *Cell*, **95**, 891-902.
- Giaccia,A.J., Richardson,E., Denko,N. und Stamato,T.D. (1989) **Genetic analysis of the XR-1 mutation in hamster and human hybrids.** *Somatic Cell Mol. Genet.*, **15**, 71-79.
- Gianni,M. und de The,H. (1999) **In acute promyelocytic leukemia NB4 cells, the synthetic retinoid CD437 induces contemporaneously apoptosis, a caspase-3-mediated degradation of PML/RARalpha protein and the PML retargeting on PML-nuclear bodies.** *Leukemia*, **13**, 739-749.
- Gilley,D., Tanaka,H., Hande,M.P., Kurimasa,A., Li,G.C. und Oshimura,M., Chen,D.J. (2001) **DNA-PKcs is critical for telomere capping.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 15084-15088.
- Gilmore,E.C., Nowakowski,R.S., Caviness,V.S.Jr. und Herrup,K. (2000) **Cell birth, cell death, cell diversity and DNA breaks: how do they all fit together?** *Trends Neurosci.*, **23**, 100-115
- Goedecke,W., Eijpe,M., Offenbergh,H.H., van Aalderen,M. und Heyting,C. (1999) **Mre11 and Ku70 interact in somatic cells, but are differentially expressed in early meiosis.** *Nat. Genet.*, **23**,194-198.
- Gotta,M., Laroche,T., Formenton,A., Maillet,L., Scherthan,H. und Gasser,S.M. (1996) **The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type Saccharomyces cerevisiae.** *J. Cell Biol.*,**134**, 1349-63.
- Goytisolo,F.A., Samper,E., Edmonson,S., Taccioli,G.E. und Blasco,M.A. (2001) **The absence of the Dna-dependent protein kinase catalytic subunit in mice results in anaphase bridges and in increased telomeric fusions with normal telomere length and G-strand overhang.** *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 3642-3651.
- Grande,M.A., van der Kraan,I., van Steensel,B., Schul,W. und de The,H. (1996) **PML-containing nuclear bodies: their spatial distribution in relation to other nuclear components.** *J. Cell Biochem.*, **63**, 280-291.
- Gravel,S, Larrivee,M., Labrecque,P. und Wellinger,R.J. (1998) **Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure.** *Science*, **280**, 741-744.

- Gravel,S. und Wellinger,R.J. (2002) **Maintenance of doublestranded telomeric repeats as the critical determinant for cell viability in yeast cells lacking Ku.** *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2182-2193.
- Grawunder,U., Wilm,M., Wu,X., Kulesza,P., Wilson,T.E., Mann,M. und Lieber,M.R. (1997) **Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells.** *Nature*, **388**, 492-425.
- Grawunder,U., Zimmer,D. und Lieber,M.R. (1998a) **DNA ligase IV binds to XRCC4 via a motif located between rather than within its BRCT domains.** *Curr. Biol.*, **8**, 873-876.
- Grawunder,U., Zimmer,D., Kulesza,P. und Lieber,M.R. (1998b) **Requirement for an interaction of XRCC4 with DNA ligase IV for wild-type V(D)J recombination and DNA double-strand break repair *in vivo*.** *J. Biol. Chem.*, **273**, 24708–24714.
- Greider,C.W. (1996) **Telomere length regulation.** *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 337-365.
- Griffith,J.D., Comeau,L., Rosenfield,S., Stansel,R.M., Bianchi,A., Moss,H. und de Lange,T. (1999) **Mammalian telomeres end in a large duplex loop.** *Cell*, **97**, 503-514.
- Grobelny,J.V., Godwin,A.K. und Broccoli,D. (2000) **ALT-associated PML bodies are present in viable cells and are enriched in cells in the G(2)/ M phase of the cell cycle.** *J. Cell Sci.*, **113**, 4577-4585.
- Gros,L., Saparbaev,M.K. und Laval,J. (2002) **Enzymology of the repair of free radicalsinduced DNA damage.** *Oncogene*, **21**, 8905-8925.
- Guglielmi,B. und Werner,M. (2002) **The yeast homolog of human PinX1 is involved in rRNA and small nucleolar RNA Maturation, not in telomere elongation inhibition.** *J. Biol. Chem* **277**, 35712–35719.
- Haber,J.E. (1998) **The many interfaces of Mre11.** *Cell*, **95**, 583-586.
- Haber,J.E. (1999a) **Sir-Ku-itous routes to make ends meet.** *Cell*, **97**, 829-832.
- Haber,J.E. (1999b) **DNA recombination: the replication connection.** *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 271-275.
- Haber,J.E. (2000) **Partners and pathways repairing a double-strand break.** *Trends Genet.*, **16**, 259-264.
- Hanakahi,L.A., Bartlet-Jones,M., Chappell,C., Pappin,D. und West,S.C. (2000) **Binding of inositol phosphate to DNA-PK and stimulation of double-strand break repair.** *Cell*, **102**, 721-729.
- Harley,C.B. (1991) **Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb?** *Mutat. Res.*, **256**, 271-282.
- Hartig,C., Stieler,W. und Stadler,R. (1995) **Muir-Torre-Syndrom: Diagnosekriterien und Literaturübersicht.** *Hautarzt*, **46**, 107-113
- Hastie,N.D. und Allshire,R.C. (1989) **Human telomeres: fusion and interstitial sites.** *Trends Genet.*, **5**, 326-331.
- Hayflick,L., und Moorhead,P. (1961) **The serial cultivation of human diploid cell strains.** *Exp. Cell Res.* **25**, 585-621.
- Hazbun,T.R., Malmstrom,L., Anderson,S., Graczyk,B.J., Fox,B., Riffle,M., Sundin,B.A., Aranda,J.D., McDonald,W.H., Chiu,C.H., Snydsman,B.E., Bradley,P., Muller,E.G., Fields,S., Baker,D., Yates,J.R.^{3rd} und Davis,T.N. (2003) **Assigning function to yeast proteins by integration of technologies.** *Mol. Cell*, **12**, 1353-1365.
- Henson,J.D., Neumann,A.A., Yeager,T.R., Reddel,R.R. (2002) **Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells.** *Oncogene*, **21**, 598-610.

- Herbig,U., Jobling,W.A., Chen,B.P., Chen,D.J. und Sedivy,J.M. (2004) **Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21 (CIP1), but not p16 (INK4a).** *Mol Cell.*, **14**(4), 501-513.
- Herrmann,G., Lindahl,T. und Schär,P. (1998) **Saccharomyces cerevisiae LIF1: a function involved in DNA double-strand break repair related to mammalian XRCC4.** *EMBO J.*, **17**, 4188-4198.
- Herrmann,G., Shah-Hosseini,K., Kais,S., Lindahl,T. und Schär,P. (2005) **Nej2: novel human and yeast proteins associated with the non-homologous end-joining pathway of DNA double-strand break repair.** Submitted to *Mol. Cell.*
- Hofmann,T.G. und Will,H. (2003) **Body language: the function of PML nuclear bodies in apoptosis regulation.** *Cell Death Differ.*, **10**, 1290-1299.
- Hofmann,T.G., Moller,A., Sirma,H., Zentgraf,H. und Taya,Y. (2002) **Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomaininteracting protein kinase-2.** *Nat. Cell Biol.*, **4**, 1-10.
- Hsu,H.L., Gilley,D., Blackburn,E.H. und Chen,D.J. (1999) **Ku is associated with the telomere in mammals.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999, **96**, 12454-12458.
- Hsu,H.L., Gilley,D., Galande,S.A., Hande,M.P., Allen,B., Kim,S.H., Li,G.C., Campisi,J., Kohwi-Shigematsu,T. und Chen,D.J. (2000) **Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining.** *Genes Dev.*, **14**, 2807-2812.
- Hsu,H.L., Yannone,S.M. und Chen,D.J. (2001) **Defining interactions between DNA-PK and Ligase IV/XRCC4.** *DNA Repair*, **1**, 225-235.
- Huang,J. und Dynan,W.S. (2002) **Reconstitution of the mammalian DNA double-strand break end-joining reaction reveals a requirement for an Mre11/Rad50/NBS1-containing fraction.** *Nucleic Acids Res.*, **30**, 667-674.
- Izumi,T., Wiederhold,L.R., Roy,G., Roy,R., Jaiswal,A., Bhakat,K.K., Mitra,S. und Hazra,T.K. (2003) **Mammalian DNA base excision repair proteins: their interactions and role in repair of oxidative DNA damage.** *Toxicology*, **193**, 43-65.
- Jackson,S.P. (2001) **Detecting, signalling and repairing DNA double-strand breaks.** *Biochem. Soc. Trans.*, **29**, 655-661.
- Jackson,S.P. und Jeggo,P.A. (1995) **DNA double-strand break repair and V(D)J recombination: involvement of DNA-PK.** *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 412-415.
- Jhappan,C., Morse,H.C., Fleischmann,R.D., Gottesman,M.M. und Merlino,G. (1997) **DNA-PKcs: a T-cell tumour suppressor encoded at the mouse scid locus.** *Nature Genet.*, **17**, 483-486.
- Johnson,R.D. und Jasin,M. (2001) **Double-strand-break-induced homologous recombination in mammalian cells.** *Biochem. Soc. Trans.*, **29**, 196-201.
- Johzuka,K. und Ogawa,H. (1995) **Interaction of Mre11 and Rad50: two proteins required for DNA repair and meiosis-specific double-strand break formation in Saccharomyces cerevisiae.** *Genetics*, **139**, 1521-1532.
- Jones,J.M. und Gellert,M. (2002) **Ordered assembly of the V(D)J synaptic complex ensures accurate recombination.** *EMBO J.*, **21**, 4162-4171.
- Junop,M.S., Modesti,M., Guarne,A., Ghirlando,R., Gellert,M. und Yang,W. (2000) **Crystal structure of the Xrcc4 DNA repair protein and implications for end joining.** *EMBO J.*, **19**, 5962-5970.

- Kanaar,R., Hoeijmakers,J.H. und van Gent,D.C. (1998) **Molecular mechanisms of DNA double strand break repair.** *Trends Cell Biol.*, **8**, 483-489.
- Karanjawala,Z.E. und Lieber,M.R. (2004) **DNA damage and aging.** *Mech. Ageing Dev.*, **125**(6), 405-416.
- Karran,P. (2000) **DNA double strand break repair in mammalian cells.** *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **10**, 144-150.
- Keegan,L., Gill,G. und Ptashne,M. (1986) **Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein.** *Science*, **231**, 699-704.
- Kegel,A. Sjostrand,J.O., Astrom,S.U. (2001) **Nej1p, a cell type-specific regulator of nonhomologous end joining in yeast.** *Curr. Biol.* **11**, 1611-1617.
- Kim,N.W., Piatyszek,M.A., Prowse,K.R., Harley,C.B., West,M.D., Ho,P.L., Coviello,G.M., Wright,W.E., Weinrich,S.L. und Shay,J.W. (1994) **Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer.** *Science*, **266**, 2011-2015.
- Kimura,K., Cuvier,O. und Hirano,T. (2001) **Chromosome condensation by a human condensin complex in *Xenopus* egg extracts.** *J. Biol. Chem.*, **276**, 5417-5420.
- Koonin,E.V. und Aravind,L. (1999) **G-patch: a new conserved domain in eukaryotic RNA-processing proteins and type D retroviral polyproteins.** *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 342-344.
- Krogh,O.B. und Symington,L.S. (2004) **Recombination Proteins in Yeast.** *Annu. Rev. Genet.*, **38**, 233-271.
- Labhart,P. (1999) **Ku-dependent nonhomologous DNA end joining in *Xenopus* egg extracts.** *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 2585-2593.
- Laemmli,U.K. (1970) **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature*, **227**, 680-685.
- Lane,D.P. und Crawford,L.V. (1979) **T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells.** *Nature*, **278**, 261-263.
- Leber,R., Wise,T.W., Mizuta,R. und Meek,K. (1998) **The XRCC4 gene product is a target for and interacts with the DNA-dependent protein kinase.** *J. Biol. Chem.*, **273**, 1794-1801.
- Lee,J.W., Yannone,S.M., Chen,D.J. und Povirk,L.P. (2003) **Requirement for XRCC4 and DNA ligase IV in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in vitro.** *Cancer Res.*, **63**, 22-24.
- Lee,K.J., Dong,X., Wang,J., Takeda,Y., Dynan,W.S. (2002) **Identification of human autoantibodies to the DNA ligase IV/XRCC4 complex and mapping of an autoimmune epitope to a potential regulatory region.** *J. Immunol.*, **169**, 3413-3421.
- Lee,K.J., Jovanovic,M., Udayakumar,D., Bladen,C.L. und Dynan,W.S. (2004) **Identification of DNA-PKcs phosphorylation sites in XRCC4 and effects of mutations at these sites on DNA end joining in a cell-free system.** *DNA Repair*, **3**, 267-276.
- Lee,S.E., Mitchell,R.A., Cheng,A. und Hendrickson,E.A. (1997) **Evidence for DNA-PK-dependent and -independent DNA double-strand break repair pathways in mammalian cells as a function of the cell cycle.** *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 1425-1433.
- Lee,Y. und McKinnon,P.J. (2000a) **ATM dependent apoptosis in the nervous system.** *Apoptosis*, **5**, 523-529.

- Lee,Y., Barnes,D.E., Lindahl,T. und McKinnon,P.J. (2000b) **Defective neurogenesis resulting from DNA ligase IV deficiency requires Atm.** *Genes Dev.*, **14**, 2576-2580.
- Lees-Miller,S.P., Chen,Y.R. und Anderson,C.W. (1990) **Human cells contain a DNA-activated protein kinase that phosphorylates simian virus 40 T antigen, mouse p53, and the human Ku autoantigen.** *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 6472-6481.
- Levitus,M., Rooimans,M.A., Steltenpool,J., Cool,N.F., Oostra,A.B., Mathew,C.G., Hoatlin,M.E., Waisfisz,Q., Arwert,F., De Winter,J.P. und Joenje,H. (2004) **Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for two new genetic subtypes.** *Blood*, **103**, 2498-2503.
- Lewis,L.K. und Resnick,M.A. (2000) **Tying up loose ends: nonhomologous end-joining in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mutat Res.*, **451**, 71-89.
- Li,Z., Otevrel,T., Gao,Y., Cheng,H.L., Seed,B., Stamato,T.D., Taccioli,G.E. und Alt,F.W. (1995) **The XRCC4 gene encodes a novel protein involved in DNA double-strand break repair and V(D)J recombination.** *Cell*, **83**, 1079-1089.
- Liang,F., Han,M., Romanienko,P.J. und Jasin,M. (1998) **Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5172-5177.
- Lieber,M.R. (1998) **Pathological and physiological double-strand breaks. Roles in cancer, aging, and the immune system.** *Am. J. Pathol.*, **153**, 1323-1332.
- Lim,D.S., Kim,S.T., Xu,B., Maser,R.S. und Lin,J. (2000) **ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway.** *Nature*, **404**, 613-617.
- Lin,J. und Blackburn,E.H. (2004) **Nucleolar protein PinX1p regulates telomerase by sequestering its protein catalytic subunit in an inactive complex lacking telomerase RNA.** *Genes Dev.*, **18**, 387-396.
- Liti,G. und Louis,E.J. (2003) **NEJ1 prevents NHEJ-dependent telomere fusions in yeast without telomerase.** *Mol. Cell*, **11**,1373-1378.
- Liu,B., Parsons,R., Papadopoulos,N., Nicolaidis,N.C., Lynch,H.T., Watson,P., Jass,J.R., Dunlop,M., Wyllie,A., Peltomäki,P., de la Chapelle,A., Hamilton,S.R., Vogelstein,B., Kinzler,K.W. (1996) **Analysis of mismatch repair genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients.** *Nature Med.*, **2**, 169-174.
- Lombard,D.B. und Guarente,L. (2000) **Nijmegen breakage syndrome disease protein and MRE11 at PML NBs and meiotic telomeres.** *Cancer Res.*, **60**, 2331-2334.
- Lou,G., Yao,M.S., Bender,C.F., Mills,M., Bladl,A.R., Bradly,A. und Petrini,J.H. (1999) **Disruption of mRad50 cause embryonic stem cell lethality, abnormal embryonic development, and sentivity to ionizing radiation.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 7376-7381.
- Lundblad,V. (2000) **DNA ends: maintenance of chromosome termini versus repair of double strand breaks.** *Mutat. Res.*, **451**, 227-240.
- Ma,Y., Pannicke,U., Schwarz,K. und Lieber,M.R. (2002) **Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination.** *Cell*, **108**, 781-794.

- Mahajan,K.N., Nick McElhinny,S.A., Mitchell,B.S. und Ramsden,D.A. (2002) **Association of DNA polymerase mu (pol mu) with Ku and ligase IV: role for pol mu in end-joining double-strand break repair.** *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 5194-5202.
- Mahdi,A.A., Al-Deib,A.A. und Lloyd,R.G. (1996) **Modulation of Recombination and DNA Repair by the RecG and PriA Helicases of *Escherichia coli* K-12.** *J. Bact.*, **23**, 6782-6789.
- Maillet,L., Gaden,F., Brevet,V., Fourel,G., Martin,S.G., Dubrana,K., Gasser,S.M. und Gilson,E. (2001) **Ku-deficient yeast strains exhibit alternative states of silencing competence.** *Embo reports*, **21**, 203-210.
- Mansilla-Soto,J. und Cortes,P. (2003) **VDJ Recombination Artemis and Its *In Vivo* Role in Hairpin Opening.** *J. Exp. Med.* **197**, 543-547.
- Maul,G.G., Yu,E., Ishov,A.M. und Epstein,A.L. (1995) **Nuclear domain 10 (ND10) associated proteins are also present in NBs and redistribute to hundreds of nuclear sites after stress.** *J. Cell Biochem.*, **59**, 498-513.
- McHugh,P.J., Spanswick,V.J. und Hartley,J.A. (2001) **Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance.** *Lancet. Oncol.*, **2**, 483-490.
- Milne,G.T., Jin,S., Shannon,K.B. und Weaver,D.T. (1996) **Mutations in two Ku homologs define a DNA end-joining repair pathway in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Mol Cell Biol.*, **16**, 4189-4198.
- Mimori,T. und Hardin,J.A. (1986) **Mechanism of interaction between Ku protein and DNA.** *J. Biol. Chem.*, **261**, 10375-10379.
- Mirzoeva,O.K. und Petrini,J.H. (2001) **DNA damage-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex.** *Mol. Cell Biol.* **21**, 281-288.
- Mizuta,R., Cheng,H.L., Gao,Y. und Alt,F.W. (1997) **Molecular genetic characterization of XRCC4 function.** *Int. Immunol.*, **9**, 1607-1613.
- Modesti,M. und Kanaar,R. (2001) **Homologous recombination: from model organisms to human Disease.** *Genome Biology*, **2**, 1014.1-1014.5.
- Modesti,M., Hesse,J.E., Gellert,M. (1999) **DNA binding of Xrcc4 protein is associated with V(D)J recombination but not with stimulation of DNA ligase IV activity.** *EMBO J.*, **18**, 2008-2018.
- Molenaar,C., Wiesmeijer,K., Verwoerd,N.P., Khazen,S., Eils,R., Tanke,H.J. und Dirks,R.W. (2003) **Visualizing telomere dynamics in living mammalian cells using PNA probes.** *EMBO J.*, **22**, 6631-6641.
- Morrison,C., Sonoda,E., Takao,N., Shinohara,A., Yamamoto,K. und Takeda,S. (2000) **The controlling role of ATM in homologous recombinational repair of DNA damage.** *EMBO J.*, **19**, 463-471.
- Mu,Z.M., Chin,K.V., Liu,J.H., Lozano,G. und Chang,K.S. (1994) **PML, a growth suppressor disrupted in acute promyelocytic leukemia.** *Mol. Cell Biol.*, **14**, 6858-6867.
- Mullis,K.B. und Faloona,F.A. (1987) **Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.** *Methods Enzymol.* **155**, 335-50.
- Mumberg,D., Muller,R. und Funk,M. (1994) **Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression.** *Nucleic Acids Res.*, **22**, 5767-5768.
- Naka,K., Ikeda,K. und Motoyama,N. (2002) **Recruitment of NBS1 into PML oncogenic domains via interaction with SP100 protein.** *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **299**, 863-871.

- Nance, M.A. und Berry, S.A. (1992) **Cockayne syndrome: review of 140 cases.** *Am. J. Med. Genet.*, **42**, 68-84.
- Negorev, D. und Maul, G.G. (2001) **Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML NBs/PODs suggest functions of a nuclear depot.** *Oncogene*, **20**, 7234-7242.
- Nick McElhinny, S.A., Snowden, C.M., McCarville, J. und Ramsden, D.A. (2000) **Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends.** *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 2996-3003.
- Niedenthal, R.K., Riles, L., Johnston, M. und Hegemann, J.H. (1996) **Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression and Subcellular Localization in Budding Yeast.** *Yeast*, **12**, 773-786.
- Norbury, C.J. und Hickson, I.D. (2001) **Cellular responses to DNA damage.** *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **41**, 367-401.
- Nugent, C.I., Bosco, G., Ross, L.O., Evans, S.K., Salinger, A.P., Moore, J.K., Haber, J. und Lundblad, V. (1998) **Telomere maintenance is dependent on activities required for end repair of double-strand breaks.** *Curr. Biol.*, **8**, 657-660.
- O'Driscoll, M., Gennery, A.R., Seidel, J., Concannon, P. und Jeggo, P.A. (2004) **An overview of three new disorders associated with genetic instability: LIG4 syndrome, RS-SCID and ATR-Seckel syndrome.** *DNA Repair*, **3**, 1227-1235.
- Ooi, S.L., Shoemaker, D.D. und Boeke, J.D. (2001) **A DNA microarray-based genetic screen for nonhomologous end-joining mutants in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Science*, **294**, 2552-2556.
- Paillard, S. und Strauss, F. (1991) **Analysis of the mechanism of interaction of simian Ku protein with DNA.** *Nucleic Acids Res.*, **19**, 5619-5624.
- Pang, D., Yoo, S., Dynan, W.S., Jung, M. und Dritschilo, A. (1997) **Ku proteins join DNA fragments as shown by atomic force microscopy.** *Cancer Res.*, **57**, 1412-1415.
- Pang, Q., Hays, J.B. und Rajagopal, I. (1993) **Two cDNAs from the plant *Arabidopsis thaliana* that partially restore recombination proficiency and DNA-damage resistance to *E. coli* mutants lacking recombination-intermediate-resolution activities.** *Nucleic Acids Res.*, **21**, 1647-1653.
- Paull, T.T. und Gellert, M. (2000) **A mechanistic basis for Mre11-directed DNA joining at microhomologies.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 6409-6414.
- Polotnianska, R.M., Li, J. und Lustig, A.J. (1998) **The yeast Ku heterodimer is essential for protection of the telomere against nucleolytic and recombinational activities.** *Curr. Biol.*, **8**, 831-834.
- Porter, S.E., Greenwell, P.W., Ritchie, K.B. und Petes, T.D. (1996) **The DNA-binding protein Hdf1p (a putative Ku homologue) is required for maintaining normal telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Nucleic Acids Res.*, **24**, 582-585.
- Przewloka, M.R., Pardington, P.E., Yannone, S.M., Chen, D.J. und Cary, R.B. **In vitro and in vivo interactions of DNA ligase IV with a subunit of the condensin complex.** *Mol. Biol. Cell*, **14**, 685-697.
- Rapp, A. und Greulich, K.O. (2004) **After double-strand break induction by UV-A, homologous recombination and nonhomologous end joining cooperate at the same DSB if both systems are available.** *J. Cell Sci.*, **117**(Pt21), 4935-4945.

- Rego,E., Wang,Z.G., Peruzzi,D., He,L.Z. und Cordon-Cardo,C. (2001) **Role of promyelocytic leukemia (PML) protein in tumor suppression.** *J. Exp. Med.*, **193**, 521-529.
- Riballo,E., Critchlow,S.E., Teo,S.H., Doherty,A.J., Priestley,A., Broughton,B., Kysela,B., Beamish,H., Plowman,N., Arlett,C.F., Lehmann,A.R., Jackson,S.P. und Jeggo,P.A. (1999) **Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukaemia patient.** *Curr. Biol.*, **9**, 699-702.
- Richardson,C. und Jasin,M. (2000a) **Coupled homologous and nonhomologous repair of a double-strand break preserves genomic integrity in mammalian cells.** *Mol. Cell Biol.*, **20**, 9068-9075.
- Richardson,C. und Jasin,M. (2000b). **Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks.** *Nature*, **405**, 697-700.
- Robins,P. und Lindahl,T. (1996) **DNA ligase IV from HeLa cell nuclei.** *J. Biol. Chem.*, **271**, 24257-24261.
- Rothkamm,K. und Lobrich,M. (2003) **Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5057-5062.
- Rothkamm,K., Kuhne,M., Jeggo,P.A. und Lobrich,M. (2001) **Radiation-induced genomic rearrangements formed by nonhomologous end-joining of DNA double-strand breaks.** *Cancer Res.*, **61**, 3886-3893.
- Salonen,E.M., Miettinen,A., Walle,T.K., Koskenmies,S., Kere,J. und Julkunen,H. (2004) **Anti-telomere antibodies in systemic lupus erythematosus (SLE): a comparison with five antinuclear antibody assays in 430 patients with SLE and other rheumatic diseases.** *Ann. Rheum. Dis.*, **63**,1250-1254.
- Samper,E., Goytisolo,F.A., Slijepcevic,P., van Buul,P.P. und Blasco,M.A. (2000) **Mammalian Ku86 prevents telomeric fusions independently of the length of TTAGGG repeats and the G-strand overhang.** *EMBO Rep.*, **1**, 244-252.
- Sargent,R.G., Brenneman,M.A. und Wilson,J.H. (1997) **Repair of site-specific double-strand breaks in a mammalian chromosome by homologous and illegitimate recombination.** *Mol. Cell Biol.*, **17**, 267-277.
- Sawchuk,D.J., Weis-Garcia,F., Malik,S., Besmer,E., Bustin,M., Nussenzweig,M.C. und Cortes,P. (1997) **V(D)J recombination: modulation of RAG1 and RAG2 cleavage activity on 12/23 substrates by whole cell extract and DNA-bending proteins.** *J. Exp. Med.*, **185**, 2025-2032.
- Schär,P., Fasi,M. und Jessberger,R. (2004) **SMC1 coordinates DNA double-strand break repair pathways.** *Nucleic Acids Res.*, **32**, 3921-3929.
- Schär,P., Herrmann,G., Daly,G. und Lindahl,T. (1997) **A newly identified DNA ligase of *Saccharomyces cerevisiae* involved in RAD52-independent repair of DNA double-strand breaks.** *Genes Dev.*, **11**, 1912-1924.
- Seeberg,E., Eide,L. und Bjoras,M. (1995) **The base excision repair pathway.** *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 391-397.
- Shiloh,Y. (2001) **ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage.** *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **11**, 71-77.
- Shore,D. (1998) **Telomeres-unsticky ends.** *Science*, **281**, 1818-1819.
- Sibanda,B.L., Critchlow,S.E., Begun,J., Pei,X.Y., Jackson,S.P., Blundell,T.L. und Pellegrini,L. (2001) **Crystal structure of an Xrcc4-DNA ligase IV complex.** *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 1015-1019.

- Smith,G.C. und Jackson,S.P. (1999) **The DNA-dependent protein kinase.** *Genes Dev.*, **13**, 916-934.
- Smith,J., Riballo,E., Kysela,B., Baldeyron,C., Manolis,K., Masson,C., Lieber,M.R., Papadopoulo,D. und Jeggo,P. (2003) **Impact of DNA ligase IV on the fidelity of end joining in human cells.** *Nucleic Acids Res.*, **31**, 2157-2167.
- Smogorzewska,A., Karlseder,J., Holtgreve-Grez,H., Jauch,A. und de Lange T. (2002) **DNA ligase IV-dependent NHEJ of deprotected mammalian telomeres in G1 and G2.** *Curr. Biol.*, **12**, 1635-1644.
- Southern,E.M. (1975) **Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.** *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517.
- Southern,E.M. (1979) **Measurement of DNA length by gel electrophoresis.** *Anal. Biochem.*, **100**, 319-323.
- Stewart,G.S., Maser,R.S., Stankovic,T., Bressan,D.A. und Kaplan,M.I. (1999) **The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxiatelangiectasia-like disorder.** *Cell*, **99**, 577-587.
- Suzuki,N., Nakano,M., Nozaki,N., Egashira,S., Okazaki,T. und Masumoto,H. (2004) **CENP-B interacts with CENP-C domains containing Mif2 regions responsible for centromere localization.** *J. Biol. Chem.*, **279**, 5934-5946.
- Svejstrup,J.Q. (2002) **Mechanims of Transcriptioncoupled DNA Repair.** *Mol. Cell Biol.*, **3**, 21-29
- Taccioli,G.E., Amatucci,A.G., Beamish,H.J., Gell,D., Xiang,X.H., Arzayus,M.I., Priestley,A., Jackson,S.P., Rothstein,A.M., Jeggo,P.A. und Herrera,V.L.M. (1998) **Targeted disruption of the catalytic subunit of the DNA-PK gene in mice confers severe combined immunodeficiency and radiosensitivity.** *Immunity*, **9**, 355-366.
- Takata,M., Sasaki,M.S., Sonoda,E., Morrison,C., Hashimoto,M., Utsumi,H., Yamaguchi-Iwai,Y., Shinohara,A. und Takeda,S. (1998) **Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells.** *EMBO J.*, **17**, 5497-5508.
- Taylor,R.S., Ramirez,R.D., Ogoshi,M., Chaffins,M., Piatyszek,M.A. und Shay,J.W. (1996) **Detection of telomerase activity in malignantand nonmalignant skin conditions.** *J. Invest. Dermatol.*, **106**, 759-765.
- Teo,S.H. und Jackson,S.P. (1997) **Identification ofSaccharomyces cerevisiae DNA ligase IV: involvementin DNA double-strand break repair.** *EMBO J.*, **16**, 4788-4795.
- Teo,S.H. und Jackson,S.P. (2000) **Lif1p targets theDNA ligase Lig4p to sites of DNA double-strand breaks.** *Curr. Biol.*, **10**, 165-168.
- Thielmann,H.W., Popanda,O., Edler,L. und Jung,E.G. (1991) **Clinical symptoms and DNA repair characteristics of xeroderma pigmentosum patients from Germany.** *Cancer Res.*, **51**, 3456-3470.
- Thompson,L.H. und Schild,D. (2002) **Recombinational DNA repair and human disease.** *Mutat. Res.*, **509**, 49-78.
- Tian,H. (2001) **RNA ligands generated against complex nuclear targets indicate a role for U1 snRNP in coordinating transcription and RNA splicing.** *FEBS Lett.*, **509**, 282-286.
- Trujillo,K.M. und Sung,P. (2001) **DNA structure-specific nuclease activities in the Saccharomyces cerevisiae Rad50 Mre11 complex.** *J. Biol. Chem.*, **276**, 35458-35464.

- Trujillo,K.M., Roh,D.H., Chen,L., Van Komen,S., Tomkinson,A., Sung,P. (2003) **Yeast Xrs2 binds DNA and helps target Rad50 and Mre11 to DNA ends.** *J. Biol. Chem.*, **278**, 48957-48964.
- Trujillo,K.M., Yuan,S.S., Lee,E.Y. und Sung,P. (1998) **Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95.** *J. Biol. Chem.*, **273**, 21447-21450.
- Tseng,H.M. und Tomkinson,A.E. (2002) **A physical and functional interaction between yeast Pol4 and Dnl4-Lif1 links DNA synthesis and ligation in nonhomologous end joining.** *J. Biol. Chem.*, **277**, 45630-45637.
- Tsubouchi,H. und Ogawa,H. (1998) **A novel *mre11* mutation impairs processing of double-strand breaks of DNA during both mitosis and meiosis.** *Mol. Cell Biol.*, **18**, 260-268.
- Tsukamoto,Y., Taggart,A.K. und Zakian,V.A. (2001) **The role of the Mre11-Rad50-Xrs2 complex in telomerase-mediated lengthening of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres.** *Curr. Biol.*, **11**, 1328-1335.
- Tugendreich,S., Bassett,D.E.Jr., McKusick,V.A., Boguski,M.S. und Hieter,P. (1994) **Genes conserved in yeast and humans.** *Hum. Mol. Genet.*, **3**,1509-1517.
- Umesono,K., Murakami,K.K., Thompson,C.C. und Evans,R.M. (1991) **Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors.** *Cell*, **65**,1255-1266.
- Usui,T., Ogawa,H., und Petrini,J.H. (2001) **A DNA damage response pathway controlled by Tel1 and the Mre11 complex.** *Mol. Cell*, **7**,1255-1266.
- Uziel,T., Lerenthal,Y., Moyal,L., Andegeko,Y., Mittelman,L. und Shiloh,Y. (2003) **Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage.** *EMBO J.*, **22**, 5612-5621.
- Valencia,M., Bentele,M., Vaze,M.B., Herrmann,G., Kraus,E., Lee,S.E., Schär,P. und Haber,J.E. (2001) ***NEJ1* controls non-homologous end joining in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Nature*, **414**, 666-669.
- Valerie,K. und Povirk,L.F. (2003) **Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair.** *Oncogene*, **22**, 5792-5812.
- van den Bosch,M., Lohman,P.H. und Pastink,A. (2002) **DNA double-strand break repair by homologous recombination.** *Biol. Chem.*, **383**(6), 873-892.
- Van der Burgt,I., Chrzanowska,K.H., Smeets,D. und Weemaes,C. (1996) **Nijmegen breakage syndrome.** *J. Med. Genet.*, **33**, 153-156.
- Van Gent,D.C., Hiom,K., Paull,T.T. und Gellert M. (1997) **Stimulation of V(D)J cleavage by high mobility group proteins.** *EMBO J.*, **16**, 2665-2670.
- Van Gent,D.C., Hoeijmakers,J.H.J. und Kanaar,R. (2001) **Chromosomal Stability and the DNA Double-stranded Break Connection.** *Genetics*, **2**, 196-206.
- Van Steensel,B., Smogorzewska,A. und de Lange,T. (1998) **TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions.** *Cell*, **92**, 401-413.
- Venema,J., Mullenders,L.H., Natarajan,A.T., van Zeeland,A.A. und Mayne,L.V. (1990) **The genetic defect in Cockayne syndrome is associated with a defect in repair of UV-induced DNA damage in transcriptionally active DNA.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **87**, 4707-4711.
- Wach,A., Brachat,A., Pohlmann,R. und Philippsen,P. (1994) **New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast*, **10**, 1793-1808.

- Walker, J.R., Corpina, R.A. und Goldberg, J. (2001) **Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair.** *Nature*, **412**, 607-614.
- Wang, P., Lee, J.W., Yu, Y., Turner, K., Zou, Y., Jackson-Cook, C.K. und Povirk, L.F. (2002) **Gene rearrangements induced by the DNA double-strand cleaving agent neocarzinostatin: conservative non-homologous reciprocal exchanges in an otherwise stable genome.** *Nucleic Acids Res.*, **30**, 2639-2646.
- Wang, P., Zhou, R.H., Zou, Y., Jackson-Cook, C.K. und Povirk, L.F. (1997) **Highly conservative reciprocal translocations formed by apparent joining of exchanged DNA double-strand break ends.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12018-12023.
- Wang, Y.G., Nnakwe, C., Lane, W.S., Modesti, M. und Karen, M. (2004) **Phosphorylation and Regulation of DNA Ligase IV Stability by DNA-dependent Protein Kinase.** *J. Biol. Chem.*, **36**, 37282–37290.
- Wang, Z.G., Delva, L., Gaboli, M., Rivi, R. und Giorgio, M. (1998) **Role of PML in cell growth and the retinoic acid pathway.** *Science*, **279**, 1547-1551.
- Wei, C., Skopp, R., Takata, M., Takeda, S. und Price, C.M. (2002) **Effects of double-strand break repair proteins on vertebrate telomere structure.** *Nucleic Acids Res.*, **30**, 2862-2870.
- Whitby, M.C., Ryder, L. und Lloyd, R.G. (1993) **Reverse branch migration of Holliday junctions by RecG protein: a new mechanism for resolution of intermediates in recombination and DNA repair.** *Cell*, **75**, 341-50.
- Williams, B. und Lustig, A.J. (2003) **The paradoxical relationship between NHEJ and telomeric fusion.** *Mol. Cell.*, **11**, 1125-1126.
- Wilson, T.E., Grawunder, U. und Lieber, M.R. (1997) **Yeast DNA ligase IV mediates non-homologous DNA end joining.** *Nature*, **388**, 495-498.
- Wong, K.K., Maser, R.S., Bachoo, R.M., Menon, J. und Carrasco, D.R. (2003) **Telomere dysfunction and Atm deficiency compromises organ homeostasis and accelerates ageing.** *Nature*, **421**, 643-648.
- Wu, G., Lee, W.H. und Chen, P.L. (2000a) **NBS1 and TRF1 colocalize at promyelocytic leukemia bodies during late S/G2 phases in immortalized telomerase-negative cells. Implication of NBS1 in alternative lengthening of telomeres.** *J. Biol. Chem.*, **275**, 30618-30622.
- Wu, X., Ranganathan, V., Weisman, D.S., Heine, W.F. und Ciccone, D.N. (2000b) **ATM phosphorylation of Nijmegen breakage syndrome protein is required in a DNA damage response.** *Nature*, **405**, 477-482.
- Xu, Z.X., Timanova-Atsanova, A., Zhao, R.X. und Chang, K.S. (2003) **PML colocalizes with and stabilizes the DNA damage response protein TopBP1.** *Mol. Cell. Biol.* **23**, 4247–4256.
- Yaneva, M., Kowalewski, T. und Lieber, M.R. (1997) **Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies.** *EMBO J.*, **16**, 5098–5112.
- Ye, J.Z., Hockemeyer, D., Krutchinsky, A.N., Loayza, D., Hooper, S.M., Chait, B.T. und de Lange, T. (2004) **POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex.** *Genes Dev.*, **18**, 1649-1654.
- Yoo, S. und Dynan, W.S. (1999) **Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein.** *Nucleic Acids Res.*, **27**, 4679-4686.

-
- Yu,Y., Wang,W., Ding,Q., Ye,R., Chen,D., Merkle,D., Schriemer,D., Meek,K.und Lees-Miller,S.P. (2003) **DNA-PK phosphorylation sites in XRCC4 are not required for survival after radiation or for V(D)J recombination.** *DNA Repair*, **2**, 1239-1252.
 - Zakian,V.A. (1995) **Telomeres: beginning to understand the end.** *Science*, **270**, 1601-1607.
 - Zhao,S., Renthal,W. und Lee,E.Y. (2002) **Functional analysis of FHA and BRCT domains of NBS1 in chromatin association and DNA damage responses.** *Nucleic Acids Res.* **30**, 4815-4822.
 - Zhong,S., Hu,P., Ye,T.Z., Stan,R. und Ellis,N.A. (1999) **A role for PML and the nuclear body in genomic stability.** *Oncogene*, **18**, 7941-7947.
 - Zhong,S., Salomoni,P. und Pandolfi,P.P. (2000) **The transcriptional role of PML and the nuclear body.** *Nat. Cell. Biol.*, **2**, 85-90.
 - Zhou,X.Z. und Lu,K.P. (2001) **The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor.** *Cell*, **107**, 347-359.
 - Zieve,G.W. und Sauterer,R.A. (1990) **Cell biology of the snRNP particles.** *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **25**,1-46.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Gernot Herrmann für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, die hilfreichen Diskussionen, seine Unterstützung und sein Interesse am Fortgang der Arbeit, sowie für die zahlreichen wertvollen Ratschläge.

Frau Nicole Brüggelolte möchte ich für ihre stetige Diskussionsbereitschaft, die Unterstützung bei einem Teil der Versuche und das angenehme, freundschaftliche Laborklima danken.

Bei Frau Priv.-Doz. Dr. Roswitha Nischt möchte ich mich dafür bedanken, dass sie sich als Betreuerin meiner Dissertation zur Verfügung gestellt hat.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Primo Schär, der mir ermöglicht hat, einige Experimente am Institut für Molekulare Krebsforschung der Universität zu Zürich im Zuge eines EMBO „Short Term Fellowships“ durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Jens Brüning danke ich sehr für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Herrn Markus Scharf, Frau Yvonne Meyer und Herrn Athanasios Stratis möchte ich mich für die moralische Unterstützung und die zahlreichen interdisziplinären Diskussionen danken.

Herrn Prof. Dr. Thomas Krieg danke ich dafür, dass er mir ermöglicht hat, in der Hautklinik der Universität zu Köln zu arbeiten.

Universitätsklinik Köln

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der geltenden Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Priv.-Doz. Dr. Roswitha Nischt betreut worden.

K. Shah-Hosseini

Teile der vorliegenden Dissertation wurden unter folgendem Titel zur Veröffentlichung eingereicht:

Herrmann,G., **Shah-Hosseini,K.**, Kais,S. und Schär,P. (2005) **Nej2: novel human and yeast proteins associated with the non-homologous end-joining pathway of DNA double-strand break repair.** Submitted to *Mol. Cell.*

Lebenslauf

Kijwasch Shah-Hosseini

Franzstraße 20
50931 Köln

Geburtsdatum/ -ort	20. September 1974 in Oldenburg in Oldenburg
Familienstand	ledig
Staatsbürgerschaft	deutsch
Schulbildung	
1981 - 1985	Grundschule Kreyenbrück (Oldenburg)
1985 - 1987	Orientierungsstufe Kreyenbrück (Oldenburg)
1987 - 1992	Realschule Osternburg (Oldenburg)
1992 - 1995	Gymnasium Cäcilienchule Oldenburg
06/ 1995	Allgemeine Hochschulreife
Studium	
10/ 1995 - 03/ 2000	Studium der Biologie an der Universität zu Oldenburg.
03/ 2000	Diplomarbeit im Fachbereich Genetik bei Prof. Dr. Wackernagel mit dem Thema: „ Konstruktion und Anwendung eines Promotor-Probe-Vektors für <i>Pseudomonas stutzeri</i> und andere Gram-negative Bakterien “.
Berufstätigkeit	
seit 03/ 2000	Doktorarbeit mit dem Thema: „ NEJ2: Identifizierung und Charakterisierung eines neuen Proteins in Säugern und <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, assoziiert mit Telomerstrukturen und der Nicht-Homologen Rekombination von DNA-Doppelstrangbrüchen “ bearbeitet in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Universität zu Köln.
Auslandsaufenthalt	
01/ 2003 - 04/ 2003	Forschungsaufenthalt bei Prof. Dr. Primo Schär am Institut für Molekulare Krebsforschung der Universität Zürich/Schweiz im Zuge eines EMBO „Short Term Fellowships“.
Weitere Qualifikationen	
	Fortbildung zum Projektleiter und Beauftragten für Biologische Sicherheit nach §15 (2) und GenTSV.