



Forschungszentrum Karlsruhe
in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 7177

Die Dissoziation des Transkriptionsfaktors IIH nach Einwirkung von UV-Strahlung

S. Groh

Institut für Toxikologie und Genetik

September 2005

Forschungszentrum Karlsruhe

in der Helmholtz Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 7177

**Die Dissoziation des Transkriptionsfaktors
IIH nach Einwirkung von UV-Strahlung**

Stefanie Groh

Institut für Toxikologie und Genetik

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2005

Impressum der Print-Ausgabe:

**Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor**

**Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe**

**Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren (HGF)**

ISSN 0947-8620

urn:nbn:de:0005-071776

Die Dissoziation des Transkriptionsfaktors IH nach Einwirkung von UV-Strahlung

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)

genehmigte

DISSERTATION

von

Stefanie Groh

aus Ludwigshafen am Rhein

Dekan: Prof. Dr. Manfred Kappes

Referent: Priv.-Doz. Dr. Christine Blattner

Korreferent: Prof. Dr. Holger Puchta

Tag der mündlichen Prüfung: 14.07.2005

Zusammenfassung

Der basale Transkriptionsfaktor IIH (TFIIH) besteht aus zehn Proteinen, die auf zwei Untereinheiten verteilt sind, den TFIIH-Kern und den Cdk-aktivierenden Kinasekomplex (CAK). Der TFIIH-Komplex ist in einige der wichtigsten Prozesse der Zelle involviert, zum Beispiel in die RNA Polymerase I und Polymerase II vermittelte Transkription oder die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER). Daneben reguliert die CAK-Untereinheit von TFIIH den Zellzyklus.

Mit der Entdeckung der Multifunktionalität von TFIIH stellte sich die Frage, wie der Komplex von Orten aktiver Transkription durch das dicht gepackte Nukleoplasma zu einer Schadensstelle in der DNA gelangt. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit konnte ich zeigen, dass der TFIIH-Komplex nach UV-Bestrahlung der Zelle zerfällt. Die CAK-Untereinheit löst sich in Abhängigkeit von der eingesetzten Strahlendosis innerhalb weniger Minuten nach UV-Bestrahlung als trimerer Komplex vom TFIIH-Kern. Diese Dissoziation erfolgt nur in metabolisch aktiven Zellen, aktive Transkription ist allerdings nicht erforderlich. Der Komplex zerfällt sowohl nach Bestrahlung mit UVC-, UVB- und UVA-Licht als auch bei oxidativem Stress, dissoziiert allerdings selbst nach Einwirkung einer hohen Dosis ionisierender Strahlung nur in geringem Maße. Keine Dissoziation des TFIIH-Komplexes war hingegen nach Behandlung von Zellen mit Cisplatin festzustellen. Die UV-induzierte Dissoziation von TFIIH wurde in einer Vielzahl verschiedener Zelllinien wahrgenommen und ist somit ein genereller Mechanismus. Interessanterweise findet in NER-defizienten Zellen ohne funktionelles XPC-Protein die UV-induzierte Teilung des TFIIH-Komplexes nicht statt, wogegen sie in NER-defizienten Zellen, die mutierte XPA-, XPD- oder CS-Proteine exprimieren, durchaus zu beobachten ist. Die Dissoziation des TFIIH-Komplexes konnte jedoch durch Transfektion einer für das XPC-Protein kodierenden cDNA in XPC-defiziente Zellen rekonstituiert werden, was die Wichtigkeit des XPC-Proteins für diesen Prozess aufzeigt. Die Dissoziation des TFIIH-Komplexes könnte, da das XPC-Protein ausschließlich an der GGR beteiligt ist, für die GGR von entscheidender Bedeutung sein, möglicherweise indem sie unter Umgehung der sterischen Behinderung durch die Größe des Gesamtkomplexes die Translokation der für die Reparatur wichtigen Komponenten an den Ort des Schadens ermöglicht.

Abstract

The dissociation of the transcription factor IIH after application of UV-radiation

The transcription factor IIH (TFIIH) consists of 10 proteins which can be divided in two subunits, the TFIIH-Core- and the cdk-activating kinase-subunit (CAK). The TFIIH-complex is involved in some of the most important cellular pathways, such as the RNA Polymerase I and Polymerase II mediated transcription and the nucleotide excision repair (NER). The CAK-subunit plays an additional role in cell cycle regulation.

Since the observation that the TFIIH-complex has various functions in the cell it was an open question how the TFIIH-complex is translocated from the site of active transcription to a DNA lesion through the densely packed nucleoplasm. During my PhD I found that the TFIIH-complex dissociates in response to UV-Irradiation. The CAK-subunit splits off from the TFIIH-Core as a trimeric complex within minutes after UV-irradiation in a dose dependent manner. The dissociation takes place merely in metabolic active cells, but active transcription is not necessary. The TFIIH-complex divides in response to UVC-, UVB- and also UVA-Radiation and after oxidative stress. In contrast only a minor dissociation of TFIIH was detectable after application of a high dose of γ -Radiation. After incubation of cells with cisplatin no dissociation of TFIIH takes place. The UV-induced dissociation of the TFIIH-complex was observed in different cell lines thus representing a general mechanism. Interestingly, there was no dissociation of the TFIIH-subunits after UV-irradiation in NER-deficient cells expressing a non-functional XPC-protein, while it takes place in NER-deficient cells with mutated XPA-, XPD- or CS-proteins. The ability to dissociate could be restored by transfection of a cDNA coding for the XPC-gene in the XPC-deficient cell line what exhibits the importance of the XPC-protein during that process. Because the XPC-protein only takes part in the GGR this observation leads to the suspicion that the dissociation of the TFIIH-complex could be of special importance for the GGR. Maybe the dissociation of the complex avoids sterical barriers and allows the translocation of the essential NER-components to the DNA-damage.

Abkürzungen

(6-4)PPs	(6-4) Photoprodukte
AR	Androgen Rezeptor
AS	Aminosäure
BER	Basenexzisionsreparatur
CAK	Cdk-aktivierender Kinasekomplex
Cdk	Zyclin-abhängige Kinase (Cyclin-dependent kinase)
CPD	Zyklobutan-Pyrimidin-Dimer
CS	Cockayne Syndrom
CTD	C-terminale Domäne der größten Untereinheit der RNA Pol II
Cyc H	Zyclin H (Cyclin H)
DDB	„damaged DNA“ Bindeprotein
DSBR	Doppelstrangbruchreparatur
ECL	„enhanced chemiluminescence“
ER	Östrogen Rezeptor (Estrogen receptor)
fc	Endkonzentration (final concentration)
GGR	Globale Genomreparatur
IP	Immunpräzipitation
MAT1	"menage a trois" 1
MMR	"mismatch" Reparatur
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur
NHEJ	nicht-homologe Endverknüpfung (Non-homologous end joining)
HR	Homologe Rekombination
PIC	Prä-Initiationskomplex
Pol	Polymerase
RAR	Retinsäurerezeptor (Retinoic Acid Rezeptor)
RPA	Replikationsprotein A
RT	Raumtemperatur
TBP	TATA-Box-Bindeprotein
TCR	Transkriptionsgekoppelte Reparatur (Transcription coupled repair)
TF	Transkriptionsfaktor
TTD	Trichothiodystrophie
ÜK	Übernachtskultur
wt	Wildtyp
XP	Xeroderma Pigmentosum

1.3.3 Trichothiodystrophie (TTD).....	27
1.4 Zielsetzung	28
2. Material und Methoden	29
2.1 Material	29
2.1.1 Chemikalien.....	29
2.1.2 Kits.....	30
2.1.3 Matrices.....	30
2.1.4 Oligonukleotide.....	30
2.1.5 Plasmide.....	31
2.1.6 Antikörper.....	31
2.1.7 Enzyme.....	31
2.1.8 Bakterien.....	32
2.1.9 Zelllinien und Kulturmedien.....	32
2.1.10 Membranen, Filme und Plastikwaren.....	33
2.1.11 Glaswaren.....	33
2.2 Methoden	34
2.2.1 Zellkultur- und Transfektionsmethoden.....	34
2.2.1.1 Zellkultur.....	34
2.2.1.2 Langzeit-Aufbewahrung und Anzucht von eukaryontischen Zellen....	34
2.2.1.3 Transfektion von Lymphozyten mittels Elektroporation.....	35
2.2.1.4 Behandlung der Zellen mit UV-Licht, ionisierender Strahlung und Inhibitoren.....	35
2.2.2 Methoden zur Arbeit mit Nukleinsäuren.....	36
2.2.2.1 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	36
2.2.2.2 Isolierung von Nukleinsäuren.....	37
2.2.2.2.1 Maxipräparation von Plasmiden.....	37
2.2.2.2.2 Minipräparation von Plasmiden durch alkalische Lyse.....	37
2.2.2.3 Präzipitation von DNA.....	37
2.2.2.4 Agarosegelelektrophorese.....	37
2.2.2.5 Isolation und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	38
2.2.2.6 Isolation von PolyA RNA.....	38
2.2.2.7 Northern Blot.....	39
2.2.3 Enzymreaktionen und Klonierungstechniken.....	40
2.2.3.1 Restriktionsverdau von DNA.....	40

2.2.3.2 Ligation linearer DNA-Fragmente.....	40
2.2.3.3 Herstellung und Transformation elektrokompetenter <i>E. coli</i>	40
2.2.3.4 Herstellung von cDNA.....	41
2.2.3.5 Polymerase-Kettenreaktion.....	41
2.2.3.6 Sequenzierung von DNA nach Sanger.....	42
2.2.4 Methoden zur Arbeit mit Proteinen.....	43
2.2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	43
2.2.3.2 Präparation des Gesamtzelllysats.....	43
2.2.3.3 Immunpräzipitation.....	44
2.2.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	45
2.2.3.5 Western Blot.....	45
2.2.3.6 <i>In Vivo</i> Markierung von Zellen mit ³² P-Orthophosphat.....	46
2.2.3.7 Immunfluoreszenz-Färbung.....	46
3. Ergebnisse.....	48
3.1 Der Transkriptionsfaktor IIH dissoziiert nach Bestrahlung mit UVC-Licht.....	48
3.2 Charakterisierung der UV-abhängigen Dissoziation des TFIIH-Komplexes... 53	
3.2.1 Der CAK-Komplex wird nach der Dissoziation vom TFIIH-Kern nicht vom Proteasom degradiert.....	53
3.2.2 Dosisabhängigkeit der Dissoziation von TFIIH nach UVC-Bestrahlung.....	54
3.2.3 Kinetik der Dissoziation des TFIIH-Komplexes.....	55
3.2.4 Der Einfluss von UVA- und UVB-Strahlung auf die Zusammensetzung des TFIIH-Komplexes.....	57
3.2.5 Die Wirkung von Cisplatin auf den TFIIH-Komplex.....	59
3.2.6 γ -Strahlung induziert selbst in hohen Dosen nur die Dissoziation eines geringen Teils des zellulären TFIIH-Komplexes.....	61
3.2.7 Auch oxidativer Stress führt zur Dissoziation des TFIIH-Komplexes.....	62
3.2.8 Die UV-induzierte Dissoziation von TFIIH erfordert aktiven Zellmetabolismus.....	66
3.2.9 Die UV-induzierte Dissoziation des TFIIH-Komplexes ist unabhängig von der Transkription.....	67
3.3 Die Dissoziation des TFIIH-Komplexes nach UV-Strahlung ist ein generelles Prinzip.....	70
3.4 Die Dissoziation des TFIIH-Komplexes erfolgt nur in Gegenwart eines funktionellen XPC-Proteins.....	72

3.5 Rekonstitution von XPC-defizienten Zellen mit dem Wildtyp-XPC-Gen.....	76
3.6 Untersuchungen zum Mechanismus der UV-induzierten Dissoziation des TFIID-Komplexes.....	77
3.3.1 Der Phosphataseinhibitor Okadainsäure hat keine Auswirkung auf die UV-induzierte Dissoziation des TFIID-Komplexes.....	77
3.3.2 Analyse des Phosphorylierungsmodus von TFIID vor und nach UV-Bestrahlung durch Inkubation von Zellen mit [³² P] Orthophosphat.....	79
4. Diskussion.....	82
4.1. Veränderungen des Transkriptionsfaktors IID (TFIID) nach Bestrahlung mit UVC-Licht.....	82
4.2 Alternative Funktionen des vom TFIID-Kern dissoziierten CAK-Komplexes..	86
4.3 TFIID dissoziiert als Antwort auf UV-Strahlung und oxidativen Stress.....	87
4.4 Molekulare und biochemische Grundlagen der UV-induzierten Dissoziation des TFIID-Komplexes.....	89
4.5 Die UV-induzierte Teilung des TFIID-Komplexes ist abhängig von dem Reparaturprotein XPC.....	91
4.6 Modell zur UV-abhängigen Dissoziation des TFIID-Komplexes.....	93
4.7 Ausblick.....	94
5. Literaturverzeichnis.....	101

1. Einleitung

1.1. Der Transkriptionsfaktor IIH (TFIIH) - ein Multiproteinkomplex

Der Transkriptionsfaktor IIH (TFIIH) ist ein von der Hefe bis zum Menschen hochkonservierter Proteinkomplex (Übersicht in: Sveijstrup *et al.*, 1996). Er wurde bisher aus verschiedenen Organismen aufgereinigt wie zum Beispiel aus Hefen als Faktor b (Feaver *et al.*, 1991a; Feaver *et al.*, 1991b), aus *Drosophila melanogaster* (Austin und Biggin, 1996) und aus menschlichen Zellen als BTF2 (Gerard *et al.*, 1991). TFIIH ist in einige der wichtigsten metabolischen Prozesse der Zelle involviert wie zum Beispiel in die RNA Polymerase I- und RNA Polymerase II-vermittelte Transkription, die Kontrolle des Zellzyklus und die DNA-Reparatur (Drapkin *et al.*, 1994; Übersicht in: Zurita und Merino, 2003; Egly, 2001).

1.1.1. Die molekulare Zusammensetzung des TFIIH-Komplexes

Der TFIIH-Komplex besteht aus zehn Proteinen mit einem Molekulargewicht zwischen 8 und 89 kDa, die in zwei Untereinheiten aufgeteilt sind, den TFIIH-Kern und den Cdk-aktivierenden Kinasekomplex (CAK; Übersicht in: Egly, 2001).

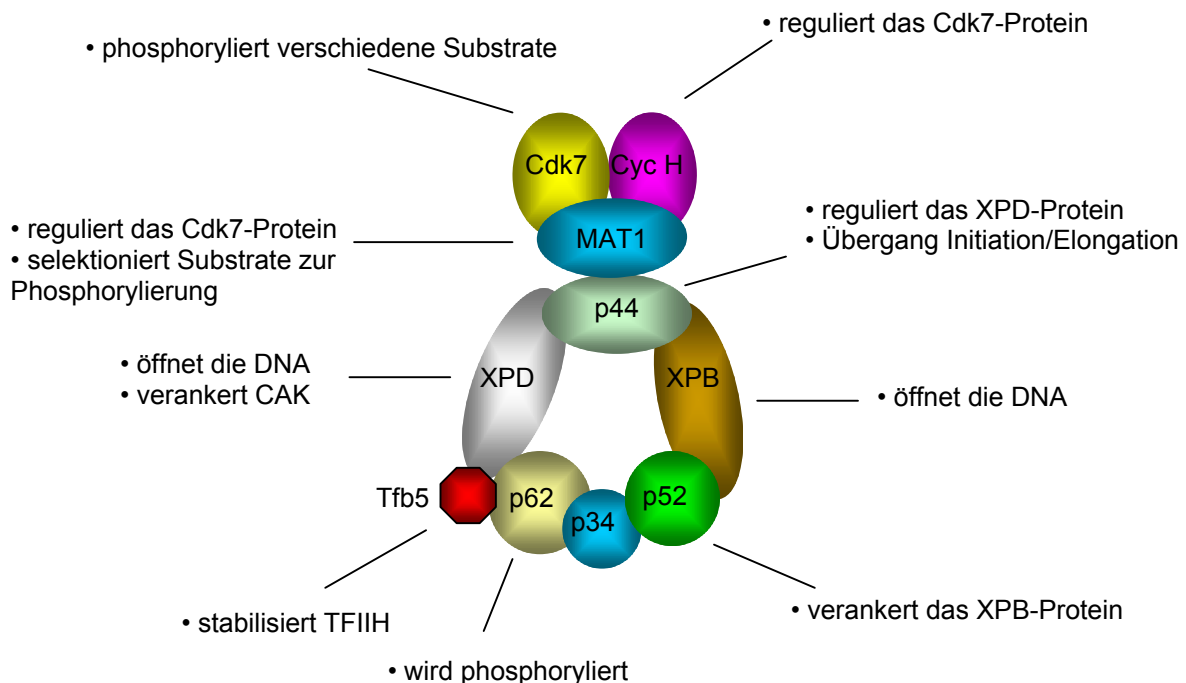


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des TFIIH-Komplexes

Der TFIIH-Komplex besteht aus zehn Proteinen, die in zwei Untereinheiten aufgeteilt sind. Diese Untereinheiten sind der TFIIH-Kern, bestehend aus den Proteinen XPB, p62, p54, p44, p34 und Tfb5/TTD-A, und die CAK-Untereinheit, aufgebaut aus den Proteinen MAT1, Cdk7 und Zyklin H (CycH). Das XPD-Protein verbindet die beiden Untereinheiten. In der Abbildung sind zusätzlich die Funktionen der einzelnen Proteine angegeben.

Der TFIIH-Kern besteht aus den sechs Proteinen XPB, p62, p54, p44, p34 und Tfb5/TTD-A, die CAK-Untereinheit aus den drei Proteinen MAT1, Cdk7 und Zyklin H. Das zehnte Protein, XPD, scheint die Brücke zwischen beiden Untereinheiten zu bilden, da es sowohl mit dem Kern als auch mit der CAK-Untereinheit assoziiert gefunden wurde (Sandrock und Egly, 2001; Drapkin *et al.*, 1996; Reardon *et al.*, 1996). Abhängig von den Aufreinigungsbedingungen liegt TFIIH als vollständiger Komplex aus allen zehn Proteinen oder aber aufgeteilt in verschiedene Unterkomplexe vor (Drapkin *et al.*, 1996; Reardon *et al.*, 1996; Shiekathar *et al.*, 1995).

1.1.2. Die Struktur von TFIIH

Der TFIIH-Komplex hat eine Größe von 16 x 12,5 x 7,5 nm. Die Kern-Proteine bilden eine ringähnliche Struktur, aus der eine große Proteindomäne herausragt (Schultz *et al.*, 2000). Die zentrale Öffnung des Rings hat einen Durchmesser von 2,5 – 3,5 nm und ist damit groß genug um den DNA-Doppelstrang zum Beispiel während der Transkription zu umschließen. Elektronenmikroskopische Analysen des TFIIH-Kerns von Hefezellen zeigten einen analogen Aufbau, was auf eine Konservierung der Struktur zwischen den Spezies hinweist (Chang und Kornberg, 2000).

Durch die Verbindung von elektronenmikroskopischen Studien mit der Immunfärbung einiger TFIIH-Proteine konnten diese TFIIH-Proteine an bestimmten Orten des TFIIH-Komplexes lokalisiert werden (Schultz *et al.*, 2000). Die Kombination dieser Resultate mit den Ergebnissen früherer Proteininteraktionsstudien erlauben heute eine relativ gesicherte Aussage über den Aufbau des TFIIH-Komplexes. Danach liegt das p44-Protein auf der Ringstruktur und zwar an der Basis der herausragenden Proteindomäne. Es wird von den Helikasen XPB und XPD flankiert, die gleichfalls Bestandteil der Ringstruktur sind (Abbildung 1.2; Schultz *et al.*, 2000). Die direkte Interaktion der Proteine p44 und XPD wurde darüber hinaus unter anderem durch Ko-Immunpräzipitationsstudien bestätigt (Coin *et al.*, 1998a; Coin *et al.*, 1998b). Das Cdk7-Protein wurde hingegen als Bestandteil der herausragenden Proteindomäne identifiziert, bei der es sich höchstwahrscheinlich um die CAK-Untereinheit handelt (Schultz *et al.*, 2000). Das Cdk7-Protein interagiert sowohl mit dem Protein Zyklin H als auch mit dem Protein MAT1 (Tirode *et al.*, 1997) welches wiederum mit dem XPD-Protein assoziiert (Sandrock und Egly, 2001; Busso *et al.*, 2000). Entsprechend sollten die Proteine MAT1 und Zyklin H ebenfalls auf der herausragenden Proteindomäne lokalisiert sein, zumindest wenn es sich dabei tatsächlich um den CAK-Komplex handelt.

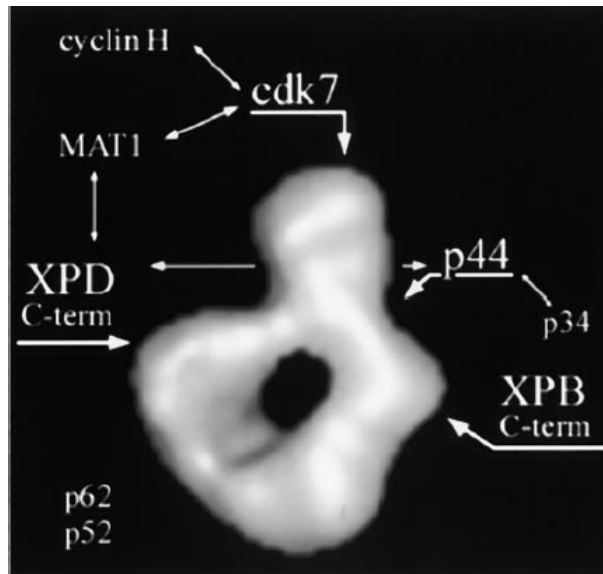


Abbildung 1.2: Modell zur Quartärstruktur des TFIIH-Komplexes

Die Positionen der Proteine Cdk7, XPD, XPB und p44 wurden durch Immunfärbung ermittelt. Pfeile weisen auf die Lage der Proteine im dreidimensionalen Modell des Komplexes hin. Die Ermittlung der Lage der Proteine Zyklin H, p34 und MAT1 beruht hingegen auf Protein-Interaktionsstudien. (Aus: Schultz *et al.*, 2000)

Während relativ sichere Daten über die Lage der Proteine Cdk7, Zyklin H, MAT1, XPD, XPB und p44 existieren, kann über die Lage der übrigen Proteine nur spekuliert werden. Eine Interaktion zwischen den Proteinen p52 und XPB wurde allerdings nachgewiesen, was auf eine räumliche Nähe der beiden Proteine schließen lässt (Jawhari *et al.*, 2002; Feaver *et al.*, 2000).

1.1.3. Die Proteine des TFIIH-Komplexes

Die zehn TFIIH-Proteine erfüllen unterschiedliche Aufgaben innerhalb des Komplexes (Tabelle 1.1). So agieren die Proteine XPB und XPD als ATPasen und Helikasen, das p52-Protein dient der Verankerung des XPB-Proteins im Komplex, das p44-Protein vermittelt die DNA-Bindung, das Tfb5/TTD-A-Protein stabilisiert den Komplex, das Cdk7-Protein besitzt Serin/Threonin Kinaseaktivität, die durch das Zyklin H-Protein reguliert wird, und das MAT1-Protein dient dem Zusammenhalt des CAK-Trimers. Darüber hinaus ist die CAK-Untereinheit als freier Komplex über die Phosphorylierung anderer Cdks an der Regulation des Zellzyklus beteiligt. Diese Spezifität ändert sich allerdings im Komplex mit dem TFIIH-Kern und die C-terminale Domäne der RNA Polymerase II wird zum bevorzugten Substrat (Rossignol *et al.*, 1997; Yankulov und Bentley, 1997). Während bis heute *in vivo* der TFIIH-Kern nicht ohne die CAK-Untereinheit nachgewiesen werden konnte, kann die CAK-Untereinheit in der Zelle

1. Einleitung

auch als freier trimerer Komplex vorliegen (Sandrock und Egly, 2001; Busso *et al.*, 2000; Rossignol *et al.*, 1997; Drapkin *et al.*, 1996; Reardon *et al.*, 1996).

Protein	MW (kDa)	Motiv	Funktion	Homolog in Hefe
XPB (ERCC3)	89	Helikase ATP Bindestelle NLS	3'-5' Helikase ATPase	Ssl2, Rad 25
p62	62			Tfb1
p52	52	NLS	Verankerung des XPB Proteins im Komplex	Tfb2
p44	44	Zink-Finger	DNA-Bindung	Ssl1
p32	32	Zink-Finger		Tfb4
Tfb5 oder TTD-A	8		Stabilisierung des TFIIH Komplexes	Tfb5
XPD (ERCC2)	80	Helikase ATP Bindestelle	5'-3' Helikase ATPase	Rad3
Cdk7 (MO15)	40	Cdk-Motiv NLS ATP-Bindestelle	Serin/Threonin-Proteinkinase	Kin28
Zyklin H	38	Zyklin-Box	Zyklin Partner für Cdk7	Ccl1
MAT1	32	RING-Finger	Zusammenhalt des CAK-Trimers, Substratspezifität	Tfb3, Rig2

Tabelle 1.1: Die Proteine des TFIIH-Komplexes und ihre Funktionen

Die Proteine des TFIIH-Kerns sind weiß unterlegt, die Proteine der CAK-Untereinheit hingegen orange. Die Sonderstellung des XPD-Proteins ist durch die grüne Unterlegung verdeutlicht. NLS = Nukleares Lokalisationssignal.

1.1.3.1. Das XPB-Protein

Die ATP-abhängige Helikase XPB wurde ursprünglich durch Komplementationsstudien in reparatur-defizienten Nagetier-Zellen als ERCC3 identifiziert (Weeda *et al.*, 1991; Thompson *et al.*, 1987). Später wurde sie der Klasse B der Erbkrankheit Xeroderma pigmentosum (XP) zugeordnet (Ma *et al.*, 1994a; Weeda *et al.*, 1991; Weeda *et al.*, 1990; Übersicht in: Weeda *et al.*, 1993). Das XPB-Protein hat eine molekulare Masse von 89 kDa und enthält sieben DNA/DNA Helikasedomänen, ein nukleares Lokalisationssignal sowie eine ATP- und eine

DNA-Bindedomäne (Ma *et al.*, 1994b; Weeda *et al.*, 1990). Die Aufgabe des XPB-Proteins ist die Entwindung des DNA-Doppelstranges in 3'-5'-Richtung (Hwang *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 1994a), was seine Bedeutung bei der Öffnung des Promotors während der Initiierung der Transkription und bei der NER erklärt (Kim *et al.*, 2000, Douziech *et al.*, 2000). Mutationen in der ATP-Bindestelle zerstören neben der ATPase- auch die Helikaseaktivität und vernichten damit die Funktionalität des XPB-Proteins in Transkription und Reparatur (Tirode *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 1997b; Ma *et al.*, 1994b). Das XPB-Protein ist konstitutiv an Serin 751 phosphoryliert, wobei sowohl die phosphorylierte als auch die unphosphorylierte Form das Öffnen des DNA-Doppelstranges im Bereich des Promotors erlaubt. Die Phosphorylierung interferiert jedoch mit der NER, indem sie den von dem Dimer XPF/ERCC1 durchgeführten Einschnitt 5' von der Schadensstelle blockiert (Coin *et al.*, 2004). Mutationen im XPB-Protein sind meist lethal, es sind weltweit nur drei Familien mit erblichen Mutationen im XPB-Protein bekannt (Übersicht in: Lehmann, 2003). Mäuse, die kein XPB-Protein besitzen, sterben bereits im Embryonalstadium (Kraemer, 2004).

1.1.3.2. Das XPD-Protein

Das XPD-Protein (ERCC2) ist die zweite ATP-abhängige Helikase des TFIIH-Komplexes. Sie hat eine molekulare Masse von 80 kDa und entwindet den DNA-Doppelstrang in 5'-3'-Richtung (Armellini *et al.*, 2005; Sung *et al.*, 1993). Wie das XPB-Protein besitzt das XPD-Protein sieben DNA/DNA Helikasemotive. Daneben verfügt das XPD-Protein über sieben RNA Helikasedomänen, die an verschiedenen Orten in der Aminosäuresequenz des *XPD*-Gens zu finden sind (Harosh und Deschavanne, 1991; Übersicht in: Deschavanne und Harosh, 1993). Bis heute konnte allerdings keine RNA Helikaseaktivität nachgewiesen werden.

Während die 3'-5'-Helikaseaktivität des XPB-Proteins für die Transkription obligatorisch ist, ist die 5'-3'-Helikaseaktivität des XPD-Proteins entbehrlich (Winkler *et al.*, 2000). Allerdings ist die physische Anwesenheit eines gegebenenfalls auch inaktiven XPD-Proteins für die Transkription erforderlich, da sich die Ringstruktur des TFIIH-Kerns nur in Anwesenheit des XPD-Proteins ausbildet (Winkler *et al.*, 2000; Seroz *et al.*, 2000). Entsprechend wird dem XPD-Protein bei der RNA Pol II Transkription eine eher strukturelle oder stimulatorische Funktion zugewiesen. Diese strukturelle Funktion ist jedoch essentiell, denn Mäuse ohne XPD-Protein sterben bereits im frühen Embryonalstadium (Kraemer, 2004; de Boer *et al.*, 1998). Für die NER ist die Helikaseaktivität von XPD allerdings eine wesentliche Voraussetzung (Winkler *et al.*, 2000).

Mutationen im *XPD*-Gen lösen die Erbkrankheiten XP, Trichothiodystrophie (TTD) sowie eine Kombination aus XP und dem Cockayne Syndrom (CS) aus (Coin *et al.*, 1999; Coin *et al.*,

1998a; Übersicht in: Lehmann, 2001). Jede individuelle Mutation im *XPD*-Gen beeinflusst die Transkriptions- und Reparaturfunktion in unterschiedlicher Weise, was zu einem der entsprechenden Mutation spezifisch zugeordneten pathologischen Phänotyp und damit zu einer großen Variationsbreite der klinischen Symptome führt (Bienstock *et al.*, 2003; Übersicht in: Sary und Sarasin, 1996; Lehmann, 1995). Die meisten bekannten Mutationen wurden im C-terminalen Drittel des XPD-Proteins lokalisiert. Dieser Bereich interagiert mit dem p44-Protein, welches die Helikaseaktivität des XPD-Proteins stimuliert. C-terminale Mutationen verhindern entsprechend die p44-vermittelte Stimulation der Helikaseaktivität, nicht aber die Helikaseaktivität an sich (Dubaele *et al.*, 2003). Mutationen im N-terminalen Bereich zerstören hingegen die Helikaseaktivität unabhängig von der Interaktion mit dem p44-Protein (Dubaele *et al.*, 2003), beeinträchtigen die Lebensfähigkeit der betroffenen Zellen oder Lebewesen aber nicht (Übersicht in: Lehmann, 2003).

Neben der Helikaseaktivität reguliert das XPD-Protein die Kinaseaktivität des CAK und verbindet die CAK-Untereinheit mit dem Kern (Chen *et al.*, 2003; Rossignol *et al.*, 1997).

1.1.3.3. Das p62-Protein

Das p62-Protein hat eine molekulare Masse von 62 kDa und interagiert mit einer Reihe von zellulären Faktoren wie VP16, p53, ER- α , E2F-1, dem Thyroidhormon Rezeptor sowie mit Proteinen welche die Aktivität des TFIID-Komplexes regulieren (Jawhari *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004). Außerdem interagiert das p62-Protein mit dem NER-Protein XPG (Jawhari *et al.*, 2004). Das p62-Protein kann durch die Kinase CDC2/Zyklus B phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierung reduziert die CTD-Kinase- und Transkriptionsaktivität des TFIID-Komplexes (Long *et al.*, 1998). Das Hefeprotein Tfb1, das für das Zellwachstum essentiell ist, ist homolog zu dem p62-Protein (Gileadi *et al.*, 1992).

1.1.3.4. Das p52-Protein

Das p52-Protein hat eine molekulare Masse von 55 kDa (Marinoni *et al.*, 1997). Es interagiert mit dem XPB-Protein und verankert dieses im TFIID-Kern (Jawhari *et al.*, 2002). Eine Deletion des C-terminalen Bereichs verhindert die Interaktion mit dem XPB-Protein, und beeinträchtigt damit das Öffnen der DNA-Doppelhelix in der Transkription und der NER (Jawhari *et al.*, 2002).

1.1.3.5. Das p44-Protein

Auf das p44-Protein wurde man durch „Two-Hybrid“-Studien in Hefe aufmerksam, in denen nach Faktoren gesucht wurde, die an der Initiation der Transkription beteiligt sind (Yoon *et al.*, 1992).

Das p44-Protein hat eine molekulare Masse von 44 kDa und besitzt im C-terminalen Bereich eine Zystein-reiche Domäne, die einen RING-Finger- und ein C4-Zink-Finger-Motiv ausbildet (Tremeau-Bravard *et al.*, 2001; Fribourg *et al.*, 2000; Humbert *et al.*, 1994). Beide Motive sind zur Aufrechterhaltung der TFIIH-Architektur erforderlich (Tremeau-Bravard *et al.*, 2001). Doppelmutationen im RING-Finger-Motiv erlauben zwar die Bildung der ersten Phosphodiesterbrücke, verhindern aber die Ablösung vom Promotor, während Mutationen in der Zink-Finger-Region die Verbindung des p44-Proteins mit dem TFIIH-Kern verhindern (Tremeau-Bravard *et al.*, 2001). Der N-terminale Bereich des p44-Proteins interagiert außerdem mit dem XPD-Protein und stimuliert seine Helikaseaktivität (Seroz *et al.*, 2000; Coin *et al.*, 1998a; Coin *et al.*, 1998b). In eukaryontischen Genomen liegt das p44-Proteins in zwei Kopien vor, zwischen denen bis heute aber keine funktionellen Unterschiede festgestellt wurden (Burglen *et al.*, 1997).

1.1.3.6. Das p34-Protein

Das p34-Protein hat eine molekulare Masse von 34 kDa und besitzt wie das p44-Protein eine Zink-Finger-Domäne (Humbert *et al.*, 1994). Auch das p34-Protein kann durch die Kinase CDC2/Zyklus B phosphoryliert werden, wodurch die CTD-Kinase- und Transkriptionsaktivität des TFIIH-Komplexes inhibiert werden (Long *et al.*, 1998).

1.1.3.7. Das Tfb5/TTD-A-Protein

Das Tfb5/TTD-A Protein wurde im Jahr 2004 unabhängig von zwei Gruppen als Bestandteil des TFIIH-Komplexes identifiziert (Ranish *et al.*, 2004; Giglia-Mari *et al.*, 2004). Es hat eine molekulare Masse von 8 kDa und ist in Hefezellen für die Translokation des TFIIH-Komplexes zum Promoter und *in vitro* für eine effiziente Transkription erforderlich (Ranish *et al.*, 2004). Hefezellen mit genetischer Deletion des *Tfb5/TTD-A*-Gens haben eine reduzierte Wachstumsrate und sind, wie viele andere Stämme mit Mutationen in Genen des TFIIH-Komplexes, UV-sensitiv (Ranish *et al.*, 2004). Detaillierten Analysen zufolge ist das Tfb5-Protein auch in menschlichen Zellen an der DNA-Reparatur nach UV-Schädigung beteiligt und wurde an Schäden lokalisiert (Übersichtsartikel: Cleaver, 2005). Mutationen im *Tfb5*-Gen lösen die A-Form von TTD aus (Giglia-Mari *et al.*, 2004). In menschlichen Zellen beeinflusst Tfb5/TTD-A außerdem die Gesamtmenge an TFIIH. Eine Überexpression von Tfb5/TTD-A

führt zu einer Zunahme an intrazellulärem TFIIH (Giglia-Mari *et al.*, 2004), wohingegen Zellen aus Patienten mit TTD-A im Vergleich zu Zellen ohne Mutationen im *Tfb5/TTD-A*-Gen einen geringeren Gehalt an TFIIH aufweisen (Botta *et al.*, 2002; Vermeulen *et al.*, 2000).

1.1.3.8. Das Cdk7-Protein (MO15)

Das Cdk7-Protein ist eine Zyklin-abhängige Kinase mit einer molekularen Masse von 40 kDa. Es wurde ursprünglich in Extrakten aus *Xenopus leavis* - Zellen als negativer Regulator der Oozyten-Reifung identifiziert (Shuttleworth *et al.*, 1990) und später in mehreren Organismen als Untereinheit des CAK-Komplexes beschrieben (Keogh *et al.*, 2002; Larochelle *et al.*, 1998; Buck *et al.*, 1995; Damagnez *et al.*, 1995; Tassan *et al.*, 1994; Darbon *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1994; Fisher und Morgan, 1994; Matsuoka *et al.*, 1994; Fesquet *et al.*, 1993; Poon *et al.*, 1993; Solomon *et al.*, 1993).

Das Cdk7-Protein besitzt die typischen Charakteristika einer Zyklin-abhängigen Kinase. Es bindet seinen Zyklin-Partner Zyklin H mittels der NRTALRE-Konsensus-Sequenz (Übersicht in: Nigg, 1996) und besitzt in der T-Schleife ein aktivierendes Threonin. Das Cdk7-Protein besitzt allerdings, im Gegensatz zu anderen Cdk-Proteinen, nicht eine sondern zwei phosphorylierbare Aminosäuren in der T-Schleife (Serin 170 und Threonin 176; Larochelle *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 1997). Außerdem enthält das Cdk7-Protein zwölf Cdk-spezifische Kinasedomänen und eine ATP-Bindestelle des Typs GXGKT (Übersicht in: Shuttleworth, 1995).

Im Unterschied zu anderen Cdk-Proteinen kann das Cdk7-Protein nicht nur über Autophosphorylierung der T-Schleife sondern auch durch die Bindung an das MAT1-Protein oder über das XPD-Protein aktiviert werden (Chen *et al.*, 2003; Tassan *et al.*, 1995; Übersicht in: Nigg, 1996). UV-Bestrahlung hingegen reduziert die Cdk-7-Kinaseaktivität des mit dem TFIIH-Kern verbundenen CAK, wogegen freier CAK die Kinaseaktivität behält (Adamczewski *et al.*, 1996). Als Bestandteil des TFIIH-Komplexes phosphoryliert das Cdk7-Protein präferenziell das Serin an Position fünf des Heptapeptids YSPTSPS der CTD der RNA Pol II, TFIIIE, TFIIIF, das TBP sowie verschiedene nukleare Rezeptoren (RAR α , ER α) und Transkriptionsfaktoren (p53, Oct1; Lu *et al.*, 1997; Ko *et al.*, 1997; Makela *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1992, Übersicht in: Kaldis, 1999).

In vitro ist die Kinaseaktivität des Cdk7-Proteins für die Transkription einiger Promotoren entbehrlich (zum Beispiel für Ad-MLP; Tirode *et al.*, 1999; Akoulitchev *et al.*, 1995; Makela *et al.*, 1995), für andere aber essentiell (zum Beispiel für DHFR; Schwartz *et al.*, 2003; Akoulitchev *et al.*, 1995). Für die NER ist die Kinaseaktivität *in vitro* vernachlässigbar und mitunter sogar hinderlich (Araujo *et al.*, 2000).

Der nicht an den TFIIH-Kern gebundene freie CAK-Komplex ist überwiegend im Zellzyklus

aktiv, wo das Cdk7-Protein andere Cdk-Proteine wie Cdk1/Zyklin B, Cdk4/Zyklin D, Cdk6/Zyklin D und Cdk2/Zyklin A phosphoryliert (Chen *et al.*, 2003; Kaldis und Solomon, 2000; Diehl und Sherr, 1997; Rossignol *et al.*, 1997; Yankulov und Bentley, 1997; Übersicht in: Egly, 2001; Kaldis, 1999; Nigg, 1996). Während der Mitose wird das Cdk7-Protein durch Cdc2/Zyklin B phosphoryliert und so die transkriptionelle Aktivität von TFIIH ausgeschaltet (Akoulitchev und Reinberg, 1998; Long *et al.*, 1998). Der freie CAK-Komplex ist hingegen während des gesamten Zellzyklus aktiv (Bartkova *et al.*, 1996; Tassan *et al.*, 1994; Darbon *et al.*, 1994).

1.1.3.9. Das Zyklin H-Protein

Das Zyklin H-Protein ist der Zyklin-Partner des Cdk7-Proteins. Es hat eine molekulare Masse von 38 kDa und besitzt eine zentrale Zyklin-Box, die aus der Wiederholung eines Bereichs von fünf α -Helizes besteht. Diese Zyklin-Box interagiert mit dem Cdk7-Protein und ist für die Funktionalität des CAK-Komplexes erforderlich (Andersen *et al.*, 1997; Andersen *et al.*, 1996). Anders als mitotische Zyklin-Proteine wird das Zyklin H-Protein konstitutiv exprimiert (Tassan *et al.*, 1994). Die Funktionalität eines Zyklin-Proteins wird überwiegend über Phosphorylierung reguliert. So kann das Zyklin H-Protein zum Beispiel durch die Kinasen CK2 oder Cdk8/Zyklin C phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierungen haben direkte Auswirkungen auf die Kinaseaktivität des CAK (Schneider *et al.*, 2002; Akoulitchev *et al.*, 2000).

1.1.3.10. Das MAT1-Protein

Das 32 kDa-Protein MAT1 bindet die Proteine Cdk7 und Zyklin H mit seinem C-terminalen Bereich. Diese Wechselwirkung stabilisiert den Komplex, aktiviert die Kinaseaktivität und reguliert die Substratspezifität des Cdk7-Proteins (Busso *et al.*, 2000, Rossignol *et al.*, 1997; Yankulov und Bentley, 1997; Devault *et al.*, 1995; Fisher *et al.*, 1995; Tassan *et al.*, 1995). Im mittleren Teil des MAT1-Proteins befindet sich ein coiled-coil Motiv, welches mit den Helikasen XPB und XPD interagiert und so möglicherweise zur Verankerung des CAK-Komplexes am TFIIH-Kern beiträgt (Busso *et al.*, 2000). Im N-terminalen Bereich besitzt das MAT1-Protein einen Zink-Finger oder RING-Finger. Dieser Bereich ist für die Transkriptionsaktivität bedeutend, für die Bildung des ternären CAK-Komplexes aber vernachlässigbar (Busso *et al.*, 2000; Gervais *et al.*, 2001; Tassan *et al.*, 1995).

Das MAT1-Protein bleibt in allen Stadien des Zellzyklus mit dem Cdk7- und dem Zyklin H-Protein assoziiert (Tassan *et al.*, 1995).

1.1.4. Funktionen von TFIIH

Der TFIIH-Komplex ist ein Paradebeispiel für eine multifunktionelle Zellkomponente. Man weiß heute, dass er in mindestens vier wichtige zelluläre Prozesse involviert ist (Abbildung 1.3), nämlich in

- die RNA Polymerase I vermittelte Transkription
- die RNA Polymerase II vermittelte Transkription
- die Regulation des Zellzyklus
- und die DNA-Reparatur.

1.1.4.1. Die RNA Polymerase I (RNA Pol I) vermittelte Transkription

Eine eukaryontische Zelle enthält 100 oder mehr tandemartige Wiederholungen der Gene, für ribosomale RNA (rRNA) die überwiegend im Bereich des Nukleolus organisiert sind. Diese rRNA-Gene werden im Nukleolus von der RNA Pol I mit hoher Effizienz transkribiert, prozessiert und zu ribosomalen Einheiten zusammengesetzt (Übersicht in: Bohmann *et al.*, 1995; Scheer und Weisenberger, 1994). Eine standardisierte rDNA-Transkriptionseinheit beinhaltet die Vorstufen der 18S, 28S und 5,8S rRNAs sowie alle wichtigen Regulatorelemente wie den rDNA-Promotor, Enhancer, Spacer-Promotoren, einen Replikationsursprung, Transkriptionsterminatoren und eine Replikationsgabel-Barriere, welche die Replikationsgabel vor einer Kollision mit der transkribierenden RNA Pol I während der S-Phase schützt (Übersicht in: Grummt, 2003). Das RNA Pol I Holoenzym besteht aus der Polymerase und dem TIF-IB-SL1-Komplex, der wiederum aus dem TBP und drei RNA Pol I-spezifischen TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) aufgebaut ist (Übersicht in: Grummt, 1999).

In den Nukleoli wurde eine nicht unbedeutende Menge des TFIIH-Komplexes detektiert und es wurde nachgewiesen, dass der TFIIH-Komplex an Orten aktiver rDNA-Transkription zu finden ist (Hoogstraten *et al.*, 2002). Weiterhin zeigten biochemische Fraktionierung und Ko-Immunpräzipitationen, dass TFIIH mit einer Sub-Population der RNA Pol I und des TIF-IB-SL1-Faktors assoziiert und dass diese Interaktion für die RNA Pol I-abhängige Transkription notwendig ist (Iben *et al.*, 2002; Übersicht in: Zurita und Merino, 2003). Die Funktion, die TFIIH bei der RNA Pol I-abhängigen Transkription innehat, ist noch nicht näher charakterisiert. Allerdings gibt es Hinweise, dass die Initiation der RNA Pol I-vermittelten Transkription TFIIH-unabhängig erfolgt. Jedoch scheint TFIIH für einen späteren Schritt der Transkription (Ablösung vom Promotor, Elongation oder Re-Initiation) gebraucht zu werden (Iben *et al.*, 2002).

1.1.4.2. Die RNA Polymerase II (RNA Pol II) vermittelte Transkription

In Bakterien ist der σ -Faktor allein ausreichend, um die Polymerase durch die verschiedenen Stadien der Transkription zu führen. In Eukaryonten hingegen wird dazu eine Vielzahl von Proteinen benötigt. Allein zur Initiation der eukaryontischen Transkription werden neben RNA Pol II sechs generelle Transkriptionsfaktoren (TFII-A, -B, -D, -E, -F und -H) gebraucht. Diese Faktoren bilden am Promotor zusammen mit RNA Pol II den Prä-Initiationskomplex (PIC; Übersicht in: Reese, 2003; Warren, 2002; Hampsey und Reinberg, 1999; Roeder, 1996; Orphanides *et al.*, 1996; Conaway und Conaway, 1993).

Die Initiation der Transkription beginnt mit der Erkennung des Promotors durch TFIID, einem Multiproteinkomplex aus dem TBP-Protein und mindestens 14 assoziierten Faktoren (Abbildung 1.3, Chalkley und Verrijzer, 1999; Übersicht in: Albright und Tijan, 2000; Green, 2000). Die Bindung von TFIID verursacht eine Krümmung der DNA-Doppelhelix und bildet eine Plattform, wodurch die Assoziation weiterer Faktoren ermöglicht wird (Nikolov und Burley, 1997; Übersicht in: Burley und Roeder, 1996). Der erste Transkriptionsfaktor, der an den TFIID/DNA-Komplex bindet, ist TFIIA. Obwohl *in vitro* nicht zwingend notwendig, stabilisiert er *in vivo* den TFIID/DNA-Komplex durch Interaktion mit DNA-Sequenzen 5' von der TATA-Box (Übersicht in: Orphanides *et al.*, 1996). Als nächster Faktor wird TFIIB rekrutiert, der mit dem C-Terminus von TBP sowie mit DNA-Sequenzen 3' und 5' vom Promoter interagiert (Lagrange *et al.*, 1998; Nikolov *et al.*, 1995). TFIIB ist essentiell für die Erkennung der +1 Position und bestimmt die Richtung der Transkription (Zhang *et al.*, 2002; Tsai und Sigler, 2000). An den Komplex aus Promoter, TFIID, TFIIA und TFIIB binden RNA Pol II und TFIIF. Die RNA Pol II besteht aus 12 Polypeptiden. Die größte Untereinheit, Rpb1, enthält die katalytische RNA-Syntheseaktivität und eine C-terminale Domäne (CTD) mit einer Spezies-spezifischen Anzahl an Wiederholungen des Heptapeptids YSPTSPS, welches im Verlauf der Transkriptionsinitiation phosphoryliert wird (Allison *et al.*, 1985). Die menschliche RNA Pol II weist zum Beispiel 52 Wiederholungen auf, während die CTD von *Drosophila* 42 und die CTD von Hefen 25 Wiederholungen enthält (Übersicht in: Kobor und Greenblatt, 2002). In den PIC kann grundsätzlich nur die unphosphorylierte Form der RNA Pol II aufgenommen werden (Laybourn und Dahmus, 1989; Cadena und Dahmus, 1987; Übersicht in: Dahmus, 1996). Der nächste Faktor der sich an den PIC anlagert ist TFIIF. TFIIF besteht aus zwei 30 und zwei 74 kDa großen Untereinheiten. Der TFIIF-Komplex interagiert mit dem DNA-Doppelstrang zwischen der TATA-Box und der Startsequenz (Robert *et al.*, 1998; Coulombe *et al.*, 1994). Darüber hinaus fördert die Interaktion von TFIIF und dem TBP-Protein die Rekrutierung von TFIIIE (Orphanides *et al.*, 1996), einem Komplex aus zwei 56 kDa- und zwei 34 kDa-großen Untereinheiten, welcher mit der DNA 5' von der Startsequenz interagiert (Yokomori *et al.*, 1998; Maxon und Tijan, 1994) und die Anlagerung von TFIIH ermöglicht (Maxon *et al.*, 1994), dem einzigen basalen Transkriptionsfaktor mit ATP-

hydrolysierender Aktivität (Übersicht in: Coin und Egly, 1998; Svejstrup *et al.*, 1996). Die Helikase XPB des TFIIH-Komplexes öffnet die DNA-Doppelhelix in einem ATP-abhängigen Schritt von Position -9 bis $+2$, wonach die RNA Pol II die erste Phosphodiesterbindung bilden kann (Douziech *et al.*, 2000; Yan und Gralla, 1997; Hwang *et al.*, 1996; Hawley und Roeder, 1987). Stimuliert durch TFIIIE phosphoryliert das Cdk7-Protein das Serin an Position Fünf der Heptapeptidsequenz in der CTD der RNA Pol II (Ramanathan *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2000; Übersicht in: Riedl und Egly, 2000) und begünstigt damit die Transition von der Initiations- zur Elongationsphase der Transkription, möglicherweise durch Lösen von Protein-Protein Interaktionen innerhalb des PIC (Pinhero *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2000). Zusätzlich phosphoryliert das Cdk7-Protein die basalen Transkriptionsfaktoren TFIIIE und TFIIIF (Rossignol *et al.*, 1997; Yankulov und Bentley, 1997, Übersicht in Kaldis, 1999).

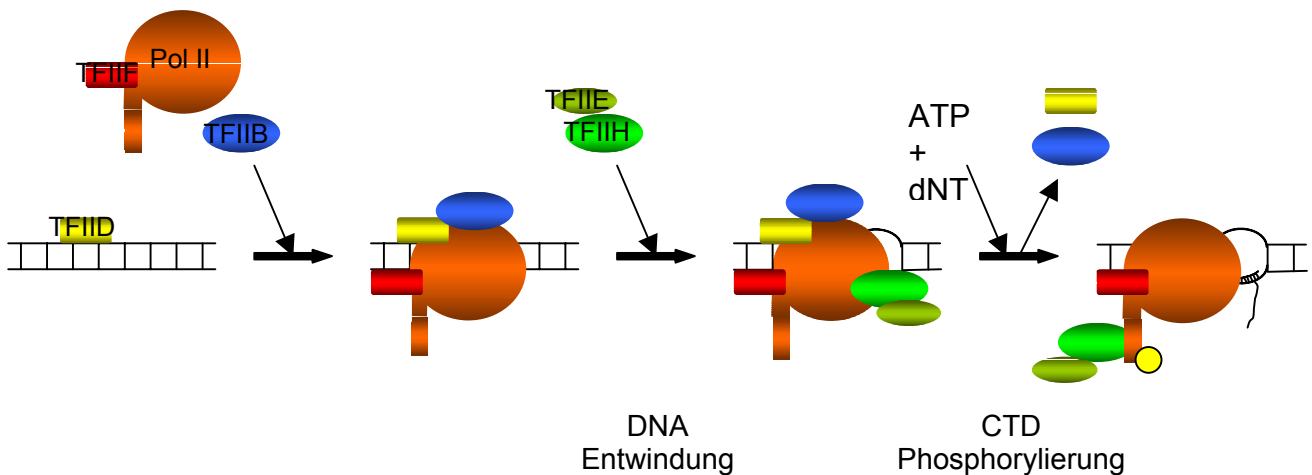


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der PIC-Bildung bei der eukaryontischen RNA Pol II Transkription

Die basalen Transkriptionsfaktoren TFIIID, TFIIIF, TFIIIB, TFIIIE und TFIIH assoziieren zusammen mit der RNA Pol II mit dem Promoter in einer streng hierarchischen Reihenfolge zur Bildung des PIC. Der Eintritt von TFIIH ermöglicht die Bildung des offenen Komplexes und mit der Phosphorylierung der CTD von RNA Pol II den Übergang von der Initiations- in die Elongationsphase

Erreicht die RNA Pol II die Position $+4$, wird die geöffnete DNA-Struktur stabilisiert und es wird kein ATP mehr für ihre Aufrechterhaltung benötigt. Damit wird die Helikase XPB, was die Aufrechterhaltung der offenen Struktur angeht, entbehrlich (Holstege *et al.*, 1997). Vermutlich stimulieren die Proteine XPB und XPD (in Verbindung mit p44) danach die Freisetzung des Promoters (Tremeau-Bravard *et al.*, 2001; Bradsher *et al.*, 2000; Moreland *et al.*, 1999), was mit einem Wandel von früher und häufig abortiver zu produktiver RNA-Synthese einhergeht und den Übergang von der Initiations- zur Elongationsphase kennzeichnet. Beim Freisetzen des Promoters lösen sich zuerst TFIIIB und TFIIIE aus dem Komplex und anschließend TFIIH. Von den generellen Transkriptionsfaktoren bleibt allein TFIIID während der Elongation mit RNA Pol II verbunden (Zawel *et al.*, 1995).

1.1.4.3. Die Regulation des Zellzyklus durch TFIID

Die Zellteilung erfordert eine strenge Koordination von Duplikation und Segregation aller zellulären Komponenten. Diese Prozesse verlaufen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus (G1, S, G2, M), der Übergang von einer Phase in die nächste wird dabei durch Aktivierung und Inaktivierung Zyklin-abhängiger Kinasen (Cdks) und ihrer assoziierten Zyklin-Proteine reguliert (Arellano und Moreno, 1997; Übersicht in McGowan, 2003). Zykline sind instabile Proteine, die während des Zellzyklus periodisch synthetisiert und degradiert werden (Evans *et al.*, 1983; Übersicht in: Pines, 1995; Sherr, 1994). Zwei Mechanismen sichern dabei den korrekten Ablauf der Zyklin-Expression: die transkriptionelle Kontrolle der Zyklin-Synthese (Koch und Nasmyth, 1994) und die Ubiquitin-abhängige Degradation der Zyklin-Proteine (King *et al.*, 1996; Übersicht in: Patton *et al.*, 1998; Townsley und Ruderman, 1998). Die Bindung der Zyklin-Proteine an die Cdk-Kinasen ist essentiell für deren Kinaseaktivität (Übersicht in: Pines, 1995; Pines, 1994; Marcote *et al.*, 1992) und beeinflusst vermutlich auch deren Substratspezifität (Schulman *et al.*, 1998; Peeper *et al.*, 1993). Wesentlich für die Aktivierung der Cdk-Proteine ist außerdem die Phosphorylierung eines konservierten Threonins in der T-Schleife, welche durch das Cdk7-Protein, der Kinase des CAK-Komplexes, vorgenommen wird (Nigg, 1995; Valay *et al.*, 1995). Diese Phosphorylierung wird durch die Bindung der Cdk-Kinase an das Zyklin-Protein begünstigt. Im Fall des Cdk2-Proteins induziert die Bindung des assoziierten Zyklin-Proteins eine Konformationsänderung, wobei die T-Schleife von der „geschlossenen“ in die „offene“ Konformation wechselt und das aktivierende Threonin 160 für den CAK-Komplex zugänglich wird (Jeffery *et al.*, 1995). Entsprechend der Funktion des CAK-Komplexes bei der Regulation des Zellzyklus führt die Ausschaltung des MAT1-Proteins, einer Untereinheit des CAK-Komplexes, zu einem G1-Arrest und Apoptose (Wu *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 1999). Trotz dieser bedeutenden Aktivitäten der freien CAK-Untereinheit hinsichtlich der Regulation des Zellzyklus ist allerdings unklar, ob CAK in Verbindung mit dem TFIID-Kern hier aktiv ist.

1.1.4.4. TFIID und die DNA-Reparatur

Die 3×10^9 Basen des menschlichen Genoms sind täglich intra- und extrazellulären Schadstoffen ausgesetzt, die pro Tag circa 25 000 Basen pro Zelle verändern (Übersicht in: Friedberg, 2001). Schädliche Umwelteinflüsse wie UV-Licht, Gamma-Strahlung und diverse genotoxische Chemikalien führen zu kovalenten Veränderungen der DNA. Auch während des normalen zellulären Stoffwechsels werden genotoxische (Neben-)Produkte generiert. So entstehen bei der oxidativen Atmung oder der Fettsäureoxidation reaktive Sauerstoffderivate wie Superoxidanionen, Hydroxylradikale und Wasserstoffperoxid (Übersicht in: Dizdaroglu, 2003; Cadet *et al.*, 1997a). Manche chemischen Bindungen in der DNA tendieren auch zu

spontaner Dissoziation unter physiologischen Bedingungen. Zum Beispiel hinterlässt die Hydrolyse von Nukleotiden abasische Lücken und die spontane oder induzierte Deaminierung von Zytosin, Adenin, Guanin oder 5-Methylzytosin führt zur Bildung ungewöhnlicher Basen in der DNA wie Urazil, Hypoxanthin oder Xanthin (Lindahl und Wood, 1999). In Gegenwart dieser und ähnlicher DNA-Schäden werden Reparatursysteme aktiviert und DNA-betreffende metabolische Prozesse, wie Transkription und Replikation, gestoppt. Sind die Schäden irreversibel oder die Reparatur fehlerhaft, kann dies zu einer Etablierung genetischer Krankheiten, zu frühzeitiger Zellalterung, zu Apoptose oder zu Krebsentwicklung führen (Übersicht in: Hoeijmakers, 2001). Abhängig von der Art des DNA-Schadens werden in eukaryontischen Zellen vier verschiedene Reparatursysteme aktiviert:

- die Mismatchreparatur
- die Doppelstrangbruchreparatur
- die Basen-Exzisionsreparatur
- und die Nukleotid-Exzisionsreparatur.

1.1.4.4.1. Die Mismatchreparatur (MMR)

Die MMR erkennt und repariert Basen-Fehlpaarungen und kleinere Insertionen und Deletionen, wie sie zum Beispiel während der Replikation entstehen (Übersicht in: Aquilina und Bignami, 2001; Kolodner und Marsischky, 1999). Die Enzyme der MMR können dabei zwischen dem korrekten Nukleotid des Matrizenstranges und dem falschen Nukleotid im neusynthetisierten Strang unterscheiden. Defekte in der MMR erhöhen die Mutationsrate erheblich und fördern damit die Krebsentstehung. Erblisch-bedingter kolorektaler Krebs sowie eine Vielzahl vereinzelt auftretender Krebsarten wie zum Beispiel der Eierstöcke oder des Gastrointestinaltraktes entstehen häufig durch instabile Mikrosatelliten-Sequenzen die durch die Wiederholung von Dinukleotiden aufgrund von Defekten in der MMR zustande kommen (Übersicht in: Aquilina und Bignami, 2001; Jiricny und Nystrom-Lahti, 2000).

1.1.4.4.2. Die Doppelstrangbruchreparatur (DSBR)

Doppelstrangbrüche entstehen durch Einwirkung ionisierender Strahlung, durch freie Radikale und während der Replikation aus einem Einzelstrangbruch. Zur DSBR werden zwei Hauptreparaturwege herangezogen, die homologe Rekombination (HR) und die nicht-homologe Verknüpfung der Enden (NHEJ; Übersicht in: Pfeiffer *et al.*, 2004; Khanna und Jackson, 2001). HR ist dabei in der späten S- und G2-Phase der vorherrschende Reparaturweg, wenn die DNA bereits repliziert ist und eine Kopie als Vorlage zur Verfügung

steht, während das fehlerbehaftete NHEJ vor allem in der G1- und frühen S-Phase des Zellzyklus aktiviert wird (Takata *et al.*, 1998).

Ataxia telangiectasia (AT) und das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS) sind die am besten charakterisierten Krankheiten, die auf Defekte in der DSBR zurück gehen (Übersicht in: Chun und Gatti, 2004; van Gent *et al.*, 2001). AT wird durch Mutation des an der DSBR beteiligten Enzyms ATM (ataxia telangiectasia mutated) hervorgerufen, während NBS auf Mutationen in den Proteinen Nibrin1 (NBS1) oder MRE11, die beide ebenfalls an der DSBR partizipieren, zurück geht (Übersicht in: Chun und Gatti, 2004; van Gent *et al.*, 2001).

1.1.4.4.3. Die Basen-Exzisionsreparatur (BER)

Die BER entfernt hauptsächlich Basen mit leichten chemischen Veränderungen wie Oxidationen, Reduktionen, Deaminierungen und Alkylierungen, aber auch falsch gepaarte Basen (Übersicht in: Sancar *et al.*, 2004; Dizdaroglu, 2003). Die veränderte Base wird dabei durch eine von vielen verschiedenen DNA-Glykosylasen erkannt. Abhängig vom initialisierenden Schritt erfolgt die Reparatur über die Entfernung einer einzelnen Base (Kurzer Weg) oder über die Entfernung von 2 – 10 Nukleotiden (Langer Weg; Frosina *et al.*, 1996).

Wird die veränderte Base von einer Glykosylase/AP Lyase aus dem Deoxyribose-Phosphat-Rückgrat herausgelöst, welche die Phosphodiesterbrücke 3' von der veränderten Base aufbricht, so wird die Aktivität der Endonuklease APE1 erforderlich, die 5' des Schadens schneidet (Übersicht in: Sancar *et al.*, 2004). Andere Glykosylasen besitzen selbst Lyaseaktivität und können somit das ganze Nukleotid aus dem DNA-Doppelstrang herauslösen (Übersicht in: McCullough *et al.*, 1999). In beiden Fällen ersetzt RNA Pol β das herausgeschnittene Nukleotid und die DNA Ligase III verbindet die beiden DNA Stränge (Matsumoto und Kim, 1995; Übersicht in: Sancar *et al.*, 2004; Beard und Wilson, 2000).

Wurde die abasische Stelle von einer hydrolytischen Glykosylase oder durch spontane Hydrolyse generiert, so erfolgt die Reparatur üblicherweise über den Langer Weg der BER. Dabei schneidet die Endonuklease APE1 die Phosphodiesterbrücke 5' des DNA-Schadens und ein Komplex aus RFC/PCNA-RNA Pol δ/ϵ übernimmt die Reparatursynthese, wobei mehrere Nukleotide polymerisiert werden. Der dadurch entstandene Überhang wird von der Endonuklease FEN1 entfernt und die beiden DNA-Stränge durch die DNA Ligase I verbunden (Klungland und Lindahl, 1997; Übersicht in Sancar *et al.*, 2004).

1.1.4.4.4. Die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER)

Der vielseitigste Reparaturweg der Zelle ist die NER. Sie entfernt in einem streng regulierten Multienzymprozess DNA-Schäden wie durch UV-Strahlung hervorgerufene Photoprodukte, durch Chemikalien wie polyzyklische aromatische Hydrogenkarbone entstehende unförmige Basenaddukte oder durch Chemotherapeutika wie Cisplatin induzierte Inter- und Intrastrangverbindungen (Wang *et al.*, 2004a; Wang *et al.*, 2004b, Wang *et al.*, 2003b; Malina *et al.*, 2002; Monjardet-Bas *et al.*, 2002; Braithwaite *et al.*, 1998; Eastman, 1985; Übersicht in: Costa *et al.*, 2003; Geacintov *et al.*, 2002). Darüber hinaus ist das NER-System auch an der Entfernung kleinerer Basenschäden, die zum Beispiel durch Alkylierung und Oxidation entstehen beteiligt (Drablos *et al.*, 2004; Brooks *et al.*, 2000; Satoh *et al.*, 1993 Übersicht in: Sancar *et al.*, 2004; Rybanska und Pirscl, 2003). Diese Basenschäden werden zwar überwiegend über BER repariert, die NER scheint aber bei Ausfall der BER die Reparatur der Schäden übernehmen zu können (Kuipers *et al.*, 2000; Satoh *et al.*, 1993; Übersicht in: Satoh und Lindahl, 1994). Defekte in der NER führen zu den seltenen rezessiven Erbkrankheiten XP, TTD und CS (siehe Abschnitt 1.3 der Einleitung).

Das NER-System wird in zwei Zweige unterteilt, die sich in der Art der Schadenserkenkung unterscheiden (Übersicht in: van Hoffen *et al.*, 2003), nämlich in die globale Genomreparatur (GGR), welche Schäden in nicht-transkribierten Regionen des Genoms repariert und in die transkriptionsgekoppelte Reparatur (TCR), die Schäden aus aktiv transkribierten Teilen des Genoms entfernt (Übersicht in: Mullenders und Berneburg, 2001; Costa *et al.*, 2003).

Die NER ist ein dynamischer Prozess aus verschiedenen aufeinanderfolgenden Schritten. Bei der GGR erkennt ein Dimer aus den Proteinen XPC und HR23B die geschädigte Struktur und initiiert die Öffnung der Doppelhelix von der Position -3 bis +6 (Abbildung 1.4, Tapias *et al.*, 2004; Volker *et al.*, 2001; Sugasawa *et al.*, 2001, Sugasawa *et al.*, 1998). Danach wird der TFIIH-Komplex an den geschädigten DNA-Bereich rekrutiert. Die TFIIH-Proteine ersetzen das Dimer XPC/HR23B und bilden die topologische Struktur, die den Eintritt der Proteine XPA und RPA erlaubt (Tapias *et al.*, 2004). Darüber hinaus öffnen die beiden Helikasen XPB und XPD unter ATP-Verbrauch die DNA-Helix von Position -6 bis +6 (Tapias *et al.*, 2004; Winkler *et al.*, 2001). Die Gegenwart der Proteine XPA und RPA sowie die Ankunft der Endonuklease XPG vergrößern den entwundenen DNA-Abschnitt auf die Position -19 bis +8 (Tapias *et al.*, 2004; Evans *et al.*, 1997a). XPG und XPF/ERCC1, zwei Endonukleasen mit gegenläufiger Orientierung, schneiden die geschädigte DNA am 3'- und 5'- Ende des geöffneten DNA-Abschnitts (Sijbers *et al.*, 1996; O'Donovan *et al.*, 1994), wodurch das 24 - 32 Nukleotide-lange DNA-Fragment entfernt werden kann. Die entstandene Lücke wird durch die DNA Polymerasen δ und ϵ in einem PCNA (proliferating cell nuclear antigen)-abhängigen Schritt aufgefüllt (Shivji *et al.*, 1995) und von einer DNA

1. Einleitung

Ligase geschlossen (Shivji *et al.*, 1995). *In vitro* kann diese Funktion von DNA Ligase I übernommen werden (Araujo *et al.*, 2001).

Wie die Rekrutierung der NER-Faktoren im Einzelnen erfolgt ist weitgehend unbekannt. Bisher konnte nur für TFIIH eine direkte Interaktion mit den Proteinen XPC, XPA und XPG gezeigt werden (Dunand-Sauthier *et al.*, 2004; Araujo *et al.*, 2001; Yokoi *et al.*, 2000; Li *et al.*, 1998; Iyer *et al.*, 1996; Drapkin *et al.*, 1994).

NER Faktor	Funktion in NER	NER Syndrom
XPA	bindet DNA, Schadenserkennung (?), GGR und TCR	XP
RPA	bindet DNA, Schadenserkennung (?), GGR und TCR	-
XPC/hHR23B	bindet DNA, Schadenserkennung, nur GGR	XP
TFIIH: XPB, XPD, p62, p34, p52, p44	entwindet DNA-Doppelhelix, GGR und TCR	XP, TTD, XP + CS
XPG	3' DNA-spezifische Endonuklease, GGR und TCR	XP
XPF/ERCC1	5' DNA-spezifische Endonuklease, GGR und TCR	XP
CSA/CSB	essentiell für TCR, Schadenserkennung, nicht nötig für GGR	CS
XPE (UV-DDB)	CPD-Erkennung (nur in GGR?)	XP

Tabelle 1.2: Die Faktoren des NER-Systems

In der TCR ist das Entfernen von DNA-Schäden in aktiv transkribierten Genen mit Ihrer Detektion durch die Transkriptionsmaschinerie verknüpft (Mei Kwei *et al.*, 2004; Übersicht in: Mullenders und Berneburg, 2001), dadurch erfolgt die Reparatur aktiv transkribierter Gene schneller als die Reparatur inaktiver Gene (Mellon *et al.*, 1987; Mellon *et al.*, 1986; Bohr *et al.*, 1986; Bohr *et al.*, 1985). Die TCR benötigt zusätzlich zu den Proteinen, die auch für die globale Genomreparatur (GGR) benötigt werden, die Proteine CSA und CSB, wogegen das Dimer XPC/hHR23B für die TCR nicht benötigt wird (Tabelle 1.2; Übersicht in: Costa *et al.*, 2003; Sancar *et al.*, 2004).

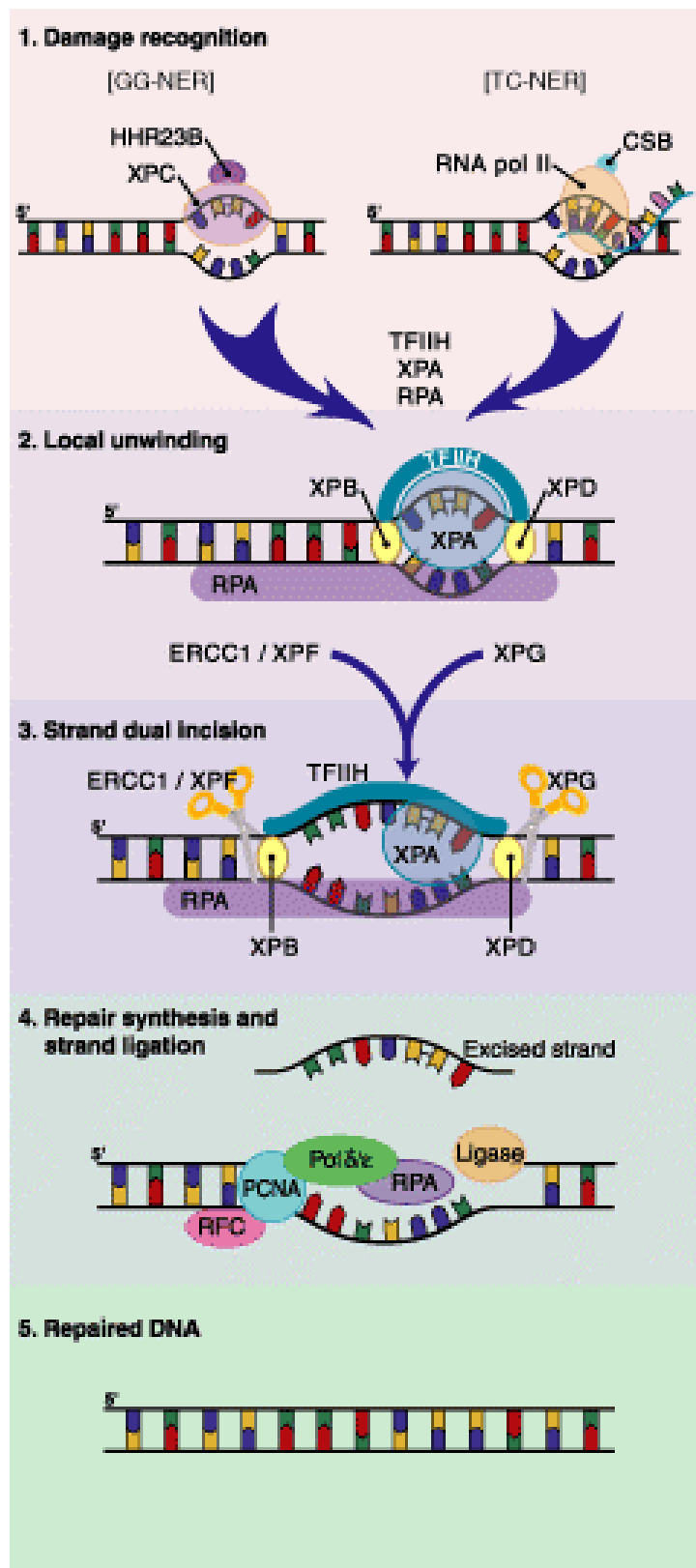


Abbildung 1.4: Die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER)

Die NER ist in zwei Pfade unterteilt, die TCR und die GGR. Der Mechanismus der NER ist im Text erläutert (aus: http://www.rndsystems.com/asp/g_sitebuilder.asp?bodyID=466)

1.1.4.4.1. Die Erkennung von DNA-Schäden in der GGR und das XPC-Protein

Die aktuell wahrscheinlichste Theorie zur Schadenserkenkung ist die kooperative Anlagerung und das kinetische Korrekturlesen (Übersicht in: Sancar *et al.*, 2004; Sugasawa *et al.*, 2001). An der Schadenserkenkung sind mehrere Faktoren beteiligt, unter anderem die Proteine XPA und RPA, die ein Dimer bilden (He *et al.*, 1995; Matsuda *et al.*, 1995), welches an geschädigte DNA binden kann (Janicijevic *et al.*, 2003; Burn *et al.*, 1996; Asahina *et al.*, 1994). Zwar ist die genaue Funktion des 273 Aminosäuren langen XPA-Proteins nicht eindeutig geklärt, nichtsdestoweniger ist es essentiell für GGR und TCR (Übersicht in: Lehmann, 2003) und soll die Rekrutierung von TFIIH unterstützen (Nocentini *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1995). Neben dem Dimer aus den Proteinen XPA und RPA ist auch das Dimer aus den Proteinen XPC und HR23B an der Schadenserkenkung beteiligt. Das XPC-Protein ist ausschließlich für die GGR notwendig, ohne das XPC-Protein kann die DNA-Helix im Bereich des Schadens nicht geöffnet werden (Evans *et al.*, 1997a; Evans *et al.*, 1997b). Das XPC-Protein kann bereits wenige Minuten nach UV-Einwirkung an Schadensstellen lokalisiert werden (Fitch *et al.*, 2003a; Volker *et al.*, 2001). Dabei bindet es besonders gut an bestimmte Arten von Schäden wie UV-induzierte (6-4)PPs, N-acetyl-2-Aminofluoren Addukte sowie künstliche Cholesteryl-Hälften (Sugasawa *et al.*, 2001; Kusumoto *et al.*, 2001; Batty *et al.*, 2000b; Wakasugi und Sancar, 1999; Sugasawa *et al.*, 1998; Übersicht in Batty und Wood, 2000a). CPDs hingegen werden vom XPC-Protein nur schlecht erkannt (Sugasawa *et al.*, 2001), obwohl es auch zur Entfernung dieser Schäden gebraucht wird (Emmert *et al.*, 2000). Das HR23B-Protein bindet zwar nicht direkt an DNA (Shivji *et al.*, 1994), es stimuliert jedoch die Aktivität des XPC-Proteins, möglicherweise indem es seine Stabilität und/oder seine Bindung an geschädigte DNA moduliert. Im zellfreien NER-System ist das HR23B-Protein neben dem XPC-Protein für die Bildung des Inzisionskomplexes erforderlich (You *et al.*, 2003; Sweder *et al.*, 2002; Lommel *et al.*, 2002; Volker *et al.*, 2001; Sugasawa *et al.*, 1998; Sugasawa *et al.*, 1996; Masutani *et al.*, 1997; Masutani *et al.*, 1994; Shivji *et al.*, 1994). Neben dem HR23B-Protein beeinflusst das Protein Zentrin2/Caltrazin1, das die Formierung der Zentromere reguliert, die Stabilität des XPC/HR23B-Komplexes (Popescu *et al.*, 2003) und koppelt möglicherweise die Reparatur an die Zellteilung (Araki *et al.*, 2001). Aufgrund der großen Bandbreite an DNA-Schäden, die durch die NER repariert werden, ist es unwahrscheinlich, dass die Proteine des NER-Systems die spezifischen chemischen Gruppen der DNA-Schäden erkennen. Darüber hinaus reicht die Fähigkeit der Dimere aus den Proteinen XPA und RPA beziehungsweise XPC und HR23B, zwischen geschädigter und intakter DNA zu unterscheiden, nicht für die beobachtete Spezifität *in vivo* aus (Übersicht in: Thoma und Vasquez, 2003). Deshalb ist es wahrscheinlicher, dass Veränderungen der Helixstruktur rezipiert werden (Übersicht in: Sancar *et al.*, 2004). Die Spezifität in der Schadenserkenkung wird dabei vermutlich durch das Zusammenspiel der Proteine XPA,

weiterer zellulärer Faktoren beeinflusst werden. Eine Rolle als Hilfsfaktor zur Erkennung von CPDs wurde bereits für das DDB-Protein (Damaged DNA-binding protein, XPE) postuliert (Fitch *et al.*, 2003b). DDB ist ein Heterodimer aus den Proteinen p127 und p48 (Keeney *et al.*, 1993). Mutationen im p48-Protein führen zu XP der Gruppe E (Nichols *et al.*, 1996; Übersicht in Lehmann, 2003). DDB hat eine sehr hohe Affinität zu geschädigter DNA (Fujiwara *et al.*, 1999; Kazantsev *et al.*, 1996; Übersicht in: Tang und Chu, 2002), akkumuliert *in vivo* unabhängig vom XPC-Protein an CPDs und stimuliert deren Reparatur, obwohl es *in vitro* nicht für die NER benötigt wird (Fitch *et al.*, 2003a; Wakasugi *et al.*, 2002; Wakasugi *et al.*, 2001; Volker *et al.*, 2001; Araujo *et al.*, 2000; Aboussekhra *et al.*, 1995).

Die Transkription des *p48*-Gens wird durch das p53-Protein reguliert (Hwang *et al.*, 1999). Diese Tatsache erklärt auch, warum der Phänotyp von XP Gruppe E-Zellen dem Phänotyp von p53-defizienten Zellen ähnelt, die gleichfalls eine selektive Reduktion der Reparatur von CPDs aber nicht von (6-4)PPs zeigen (Hwang *et al.*, 1999).

1.1.5. Proteininteraktionen von TFIIH

Bis heute wurde eine Vielzahl von Wechselwirkungen des TFIIH-Komplexes mit verschiedenen anderen Zellkomponenten wie Proteinen, DNA und sogar RNA beschrieben. So interagiert TFIIH mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren, einschließlich EBNA2 (Epstein Barr nukleares Antigen 2; Tong *et al.*, 1995), HBX (Hepatitis B Virus X Protein; Qadri *et al.*, 1995), VP16 (Virion Protein 16 von Herpes Simplex; Xiao *et al.*, 1994), FIR (Far upstream element Bindeprotein Interaktionsrepressor; Liu *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2000), E2F1, Thyroid-Hormon-Rezeptor (Liu *et al.*, 2004), Tat (Blau *et al.*, 1996; Qadri *et al.*, 1996; Xiao *et al.*, 1994) und p53. Die Wechselwirkung mit dem p53-Protein ist dabei besonders interessant, da sie wechselseitig verläuft und nicht auf die Regulation der Transkription beschränkt ist. Das p53-Protein ist eine zentrale Komponente des Stress-induzierten Weges, der über Leben oder Tod der Zelle zum Beispiel nach UV-Schädigung entscheidet. Interessanterweise hängt die Entscheidung der Zelle von der Gegenwart des XPD-Proteins ab. Die p53-induzierte Apoptose ist in XPD-defizienten Zellen verzögert und reduziert (Robles *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1996), was zur Vermutung führt, dass der TFIIH-Komplex an der p53-vermittelten Apoptose beteiligt ist. Neben der Regulation seiner Aktivität durch das XPD-Protein moduliert das p53-Protein seinerseits die Aktivität von TFIIH, indem es die Aktivität der beiden Helikasen XPB und XPD hemmt (Leveillard *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1995b; Übersicht in: Frit *et al.*, 1999). Interessanterweise inhibieren mutierte Varianten des p53-Proteins, wie sie aus Tumoren isoliert wurden, die Helikaseaktivität dabei oft weniger effizient (Leveillard *et al.*, 1996). Darüber hinaus stimuliert das p53-Protein die Transkription

der NER-Proteine DDB2 und XPC (Adimoolam und Ford, 2002; Übersicht in: Adimoolam und Ford, 2003) und reguliert sowohl die Rekrutierung des XPC-Proteins und des TFIIH-Komplexes an den Schadensort als auch die Kinaseaktivität des CAK (Wang *et al.*, 2003a; Schneider *et al.*, 1998).

Untereinheiten des TFIIH-Komplexes assoziieren außerdem mit den NER-Proteinen XPC, XPA und XPG sowie mit dem SUG1-Protein, einer Untereinheit des 26S Proteasoms (Weeda *et al.*, 1997). Ob eine Verbindung zwischen dem TFIIH-Komplex und der zellulären Proteindegradationsmaschinerie besteht, bleibt allerdings unklar.

TFIIH assoziiert außerdem mit der „U1 small nuclear“ RNA-Komponente des Spleißosoms, welche die Bildung der ersten Phosphodiesterbindung durch die RNA Pol II *in vitro* stimuliert (Kwek *et al.*, 2002; Übersicht in: Zurita und Merino, 2003).

1.2. UV-Strahlung und die Bildung von Photoprodukten

Die energiereichste Komponente der Sonnenstrahlung, welche die Erdoberfläche in größerem Umfang erreicht, ist die UVB-Strahlung (280–315 nm). Sie führt zu Veränderungen in der DNA, die ein hohes biologisches Gefahrenpotenzial mitbringen, wie das Mutationsspektrum von NER-defizienten UV-bestrahlten Nagetierzellen und von Hauttumoren zeigt (Sage *et al.*, 1996; Nakazawa *et al.*, 1994; Dumaz *et al.*, 1993).

Ist eine Epidermiszelle starker UV-Strahlung ausgesetzt, sind bis zu 40 000 DNA-Schäden pro Stunde nachweisbar (Übersicht in: Ura und Hayes, 2002). Während in der Forschung die UV-Strahlung in J/m^2 gemessen wird, wird für die Information der Bevölkerung eine besser verständliche Größe verwendet, der UV-Index. Dieser Index ist ein Maß für den Tageshöchstwert an sonnenbrandwirksamer UV-Strahlung. Der Index reicht von 0 – 12. In Deutschland liegen die höchsten gemessenen Werte etwa bei 8, weltweit werden Werte bis 12 erreicht (http://www.m-ww.de/enzyklopaedie/strahlen-medizin/uv_strahlung.html). 50 J/m^2 entsprechen etwa einem UV-Index von 1. Für experimentelle Arbeiten wird häufig UVC-Strahlung (200 – 280 nm) verwendet, obwohl diese im biologischen Sinn weniger relevant ist, da sie normalerweise von der Ozonschicht absorbiert wird. Photochemische Reaktionen verlaufen bei dieser Wellenlänge jedoch wesentlich effizienter (2 bis 10 mal mehr Schäden in 10^6 Basen pro J/m^2), weil sie besser mit dem Absorptionsmaximum der DNA, das bei 260 nm liegt, übereinstimmen (Ravanat *et al.*, 2001; Perdiz *et al.*, 2000, Jen *et al.*, 1997; Mitchell *et al.*, 1991).

Die schädlichen Auswirkungen der UVB- und UVC-Strahlung gehen hauptsächlich auf die Bildung von dimeren Pyrimidin-Photoprodukten zurück. Die häufigsten Photoprodukte sind dabei CPDs, die aus einer (2+2) Zykladdition der C5-C6-Doppelbindungen benachbarter

Pyrimidinbasen entstehen (Abbildung 1.6). Entsprechend sind zwei benachbarte Pyrimidinreste nach Einwirkung von UVB- oder UVC-Strahlung als bevorzugte Orte der Bildung von Photoprodukten anzusehen und die Präsenz von CC- oder TT- Mutationen kann deshalb als Anzeichen für die Einwirkung von UVB/C Strahlung gewertet werden (Hussein, 2005; Ikehata *et al.*, 2003; Nakazawa *et al.*, 1994; Dumaz *et al.*, 1993; Übersicht in: Ravanat *et al.*, 2001). Insgesamt sind TT- und TC-Dimere eine Größenordnung photoreaktiver als CT- und CC-Dimere. Die durchschnittliche Bildungsrate dieses Schadens liegt bei 10^7 Basen pro J/m^2 UVB-Strahlung (Perdiz *et al.*, 2000; Kielbassa *et al.*, 1997; Mitchell *et al.*, 1991), wobei die relative Bildungsrate für (6-4)PPs und CPDs jeder Dipyrimidinstelle verschieden ist (Übersicht in: Ravanat *et al.*, 2001).

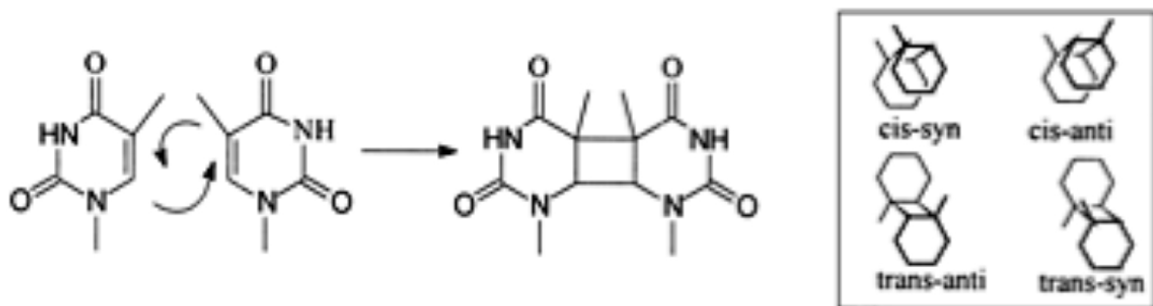


Abbildung 1.6: Bildung von Thymin CPDs.

Im Kasten rechts sind die verschiedenen Stereoisomere abgebildet (aus: Ravanat *et al.*, 2001)

Zwei bis acht mal seltener als CPDs werden (6-4)PPs gebildet (Perdiz *et al.*, 2000; Mitchell *et al.*, 1990). Sie gehen aus einer (2+2) Zyклоaddition der C5-C6-Doppelbindung eines 5'-Pyrimidins und der C4 Carbonyl-Gruppe eines 3'-Pyrimidins hervor. Dabei entsteht als instabiles Zwischenprodukt Oxetan (wenn die 3'-Base ein Thymin ist) oder Azetidin (wenn die 3'-Base ein Zytosin ist) (Abbildung 1.7), welches spontan in ein (6-4)PP umgewandelt wird (Übersicht in: Ravanat *et al.*, 2001). (6-4)PPs induzieren eine stärkere Verdrehung der Helixstruktur als CPDs und werden deshalb leichter erkannt und bis zu fünfmal schneller repariert (Reardon und Sancar, 2003; Übersicht in: Dip *et al.*, 2004; Mitchell und Nairn, 1989).

Schließlich kann die DNA-Base Zytosin nach UV-Einwirkung durch eine Photohydrationsreaktion zu 6-hydroxy-5,6-dihydrozytosin (Zytosin-Photohydrat) umgewandelt werden (Wierzchowski und Shugar, 1961). Durch Deaminierung entsteht aus dem Zytosin-Photohydrat Urazil, eine atypische DNA-Base (Boorstein *et al.*, 1990).

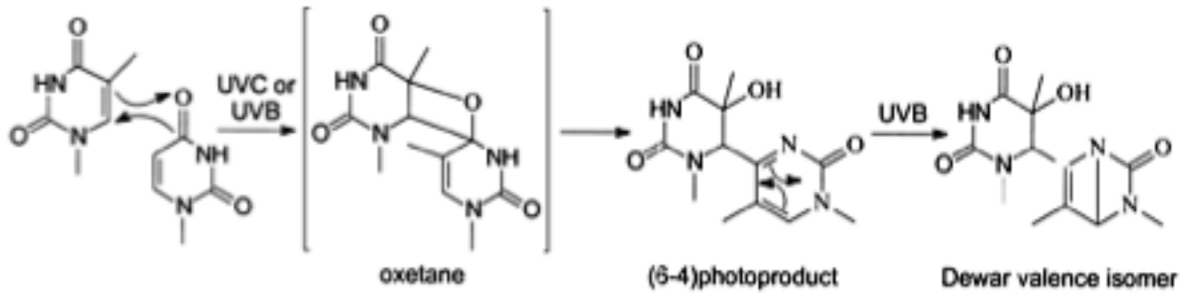


Abbildung 1.7: Bildung und Photoisomerisierung von Thymin (6-4) Photoprodukten
(aus: Ravanat *et al.*, 2001)

Neben den Pyrimidinbasen sind auch Purinbasen photoreaktiv. So können nach UVB-Bestrahlung zwei Adenine oder aber ein Adenin mit einem benachbarten Thymin dimerisieren (Zhao und Taylor, 1996a; Koning *et al.*, 1990; Kumar *et al.*, 1987). Allerdings ist die Anzahl dieser Photoprodukte im Vergleich zu CPDs und 6-4PPs vernachlässigbar gering (Bowden und Davies, 1997; Sharma und Davies, 1989). Nichtsdestoweniger sind zumindest die A-T-Addukte mutagen (Zhao und Taylor, 1996b).

Zusätzlich zur Bildung von Dimeren können Basen der DNA durch UV-Strahlung oxidiert werden (Cadet und Treoule, 1978). Der Oxidation besonders zugänglich ist Guanin, das dabei zu 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosin (8-oxodGuo) umgewandelt wird (Wei *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997; Übersicht in: Ravanat *et al.*, 2001) Die Bildungsrate liegt dabei bei einem Schaden pro 10^9 Basen pro J/m^2 UVB-Strahlung (Douki *et al.*, 1999; Kielbassa *et al.*, 1997).

Im Gegensatz zu UVB/UVC-Strahlung induziert UVA-Strahlung (315 – 400 nm) vorwiegend Photosensibilisierungsreaktionen in der DNA (Cadet *et al.*, 1997b). Dabei werden die Photonen des UVA-Lichtes von bisher nicht identifizierten endogenen Photosensoren absorbiert.

Man unterscheidet zwei Arten photooxidativer Reaktionen (Foote, 1991):

- Typ I (ein-Elektron Oxidation oder Hydrogen-Abstraktion)
- Typ II (Einzel-Sauerstoff Oxidation)

Bei der Typ I-Reaktion sind die DNA-Basen selbst das bevorzugte Ziel, wobei Guanin, die Base mit dem niedrigsten ionischen Potential, vor Adenin, Thymin, Zytosin und 5-Methylzytosin oxidiert wird (Melvin *et al.*, 1998). Der Elektronentransfer radikalischer Kationen in der doppelsträngigen DNA erfolgt dabei von einer Pyrimidin-Base oder von Adenin zu Guanin (Giese, 2000; Hall *et al.*, 1996).

In der photooxidativen Reaktion des Typs II entsteht durch Energietransfer vom angeregten

Photosensor auf molekularen Sauerstoff ein einzelnes Sauerstoffatom ($^1\text{O}_2$). Da $^1\text{O}_2$ nur mit elektronenreichen Molekülen reagiert, ist Guanin der einzig mögliche Reaktionspartner unter den vier Basen. Das hauptsächliche Oxidationsprodukt ist 8-oxodGuo, ein bekannter biochemischer Marker für oxidativen Stress (Cadet und Treoule, 1978; Übersicht in: Ravanat *et al.*, 2001).

1.3. NER-assozierte Erkrankungen

Die Konsequenz eines Defekts in einem der NER-Proteine wird offensichtlich in den drei seltenen, rezessiv vererbten Krankheiten Xeroderma Pigmentosum (XP), Cockayne Syndrom (CS) und der photosensitiven Form der Trichothiodystrophie (TTD). (Tabelle 1.3; Übersicht in: Lehmann, 2003). Die Zuordnung von Patienten zu den verschiedenen Krankheiten ist jedoch mitunter schwierig, da die Symptome häufig überlappen (Übersicht in: Lehmann, 2003; Rapin *et al.*, 2000).

Krankheit	Prädisposition bezüglich Krebs	Involvierte Gene	Betroffene zelluläre Prozesse
XP	Ja	8	NER, Transkription
CS	Nein	2 – 5	NER (TCR), Transkription
TTD	Nein	3	NER

Tabelle 1.3: Erbliche Krankheiten, die auf die Inaktivierung von NER Proteinen zurück gehen.

1.3.1. Xeroderma Pigmentosum

XP-Patienten sind extrem sensitiv gegenüber Sonnenlicht, zeigen zum Teil schwerwiegende Hautveränderungen und eine Prädisposition für Hautkrebs (Übersicht in: Lehmann, 2003). Sie haben häufig eine trockene, pergamentähnliche Haut, die durch Sonnenlicht induzierte Pigmentveränderungen aufweist. Erster Indikator für XP ist die Bildung von Sommersprossen, gefolgt von anderen Pigmentationsstörungen, Elastizitätsverlust und der Entwicklung von Hautkrebs einschließlich Basalzellenkarzinom, Plattenepithelkarzinom und bösartigem Melanom (Kraemer *et al.*, 1994; Übersicht in: Bootsma *et al.*, 2002; van Steeg und Kraemer, 1999; Bootsma *et al.*, 1998; Kraemer *et al.*, 1987). Werden die Patienten von Geburt an vor Sonnenlicht geschützt, treten hingegen keine Veränderungen der Haut auf

(Übersicht in: Lehmann, 2003). Bisher wurden sieben Komplementationsgruppen von XP beschrieben, Xeroderma pigmentosum Gruppe A bis G (XP-A bis XP-G) und XP-variant (XP-V).

Patienten der XP Gruppen A bis G tragen Mutationen in den Genen *XPA* bis *XPG*. Die XP-Proteine partizipieren alle an der NER (Übersicht in: Lehmann, 2003; siehe auch Kapitel 1.1.4.4.4 der Einleitung). Schwer betroffene Patienten entwickeln häufig zusätzlich neurologische Abnormalitäten, welche auf das fortschreitende Absterben von Neuronen zurückzuführen ist, wobei das Alter, mit welchem das Neuronensterben beginnt, variieren kann (Übersicht in: Rapin *et al.*, 2000). Interessanterweise sind Patienten mit verändertem XPC-Protein sowie Mäuse mit genetischer Deletion des XPC-Gens trotz zum Teil schwerer Hautveränderungen stets frei von neurologischen Störungen (Chavanne *et al.*, 2000; Sands *et al.*, 1995). Es ist deshalb davon auszugehen, dass die TCR ausreicht um das Neuronensterben zu verhindern. Patienten mit Veränderungen im XPA-Protein zeigen hingegen zusätzlich zu häufig starken Veränderungen der Haut einen fortschreitenden Zerfall des Zentralnervensystems, der allerdings im Mausmodell nicht reproduziert werden konnte (van Steeg *et al.*, 2000; Nakane *et al.*, 1995; de Vries *et al.*, 1995; Übersicht in: Lehmann, 2003).

Besonders bei Patienten mit mutiertem *XPB*- oder *XPD*-Gen sind die Phänotypen häufig komplex, mit mutationsspezifischem Auftreten aller beschriebenen Phänomene. Diese Komplexität ist vermutlich auf die Beteiligung der beiden Helikasen an mehreren Stoffwechselaktivitäten zurück zu führen. Ebenso scheinen die Proteine XPF und XPG in weitere Prozesse involviert zu sein, denn Veränderungen in diesen Proteinen führen ebenfalls zu vielschichtigen Phänotypen mit unterschiedlicher Ausprägung der Merkmale (Matsumura *et al.*, 1998; Übersicht in: Lehmann, 2003). Mutationen in den *XPE*- und *XPF*-Genen induzieren hingegen einen meist milden Phänotyp. Möglicherweise sind diese Proteine für die NER nicht absolut notwendig sondern haben möglicherweise einen eher stimulierenden Charakter (Übersicht in: Lehmann, 2003). Bei XP-Patienten der Gruppe E, deren Zellen Veränderungen in der DDB-Untereinheit p48 tragen, ist die NER-Aktivität nur um etwa 50% reduziert. (Rapic-Otrin *et al.*, 2003). Entsprechend zeigen XP-Patienten der Gruppe E nur leichte Hautveränderungen, keine neurologischen Veränderungen sowie eine späte Tumorentwicklung. Trotz dieser eher milden Beeinträchtigungen sind Mutationen im *XPE*-Gen erstaunlich selten (Übersicht in: Lehmann, 2003).

Im Gegensatz zu Zellen von Patienten der Gruppen XP-A bis XP-G ist bei Zellen von Patienten der Gruppe XP-V die NER nicht beeinträchtigt. In den Zellen dieser Patienten liegen jedoch Mutationen in DNA Pol η vor (Masutani *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 1999; Übersicht in: Gratchev *et al.*, 2003). DNA Pol η repliziert UV-geschädigte DNA über die induzierten Schäden hinweg (Transläsionssynthese; Übersicht in: Kannouche und Stary,

2003). Zellen mit mutierter Pol η sind deshalb nicht in der Lage, durch UV-Licht geschädigte DNA zu replizieren (Masutani *et al.*, 1999; Übersicht in: Gratchev *et al.*, 2003).

Alle bisher identifizierten XP-auslösenden Mutationen wurden in einer Datenbank zusammengefasst (<http://xpmutations.org>).

1.3.2. Cockayne Syndrom (CS)

Die klinischen Merkmale von CS haben wenig mit XP-Merkmalen gemeinsam. Die Patienten haben viele entwicklungsspezifische Störungen einschließlich schwerer physischer Schäden wie Mikrozephalie, verlängerter Gliedmaßen, vogelähnliches Gesicht, pigmentierte Retinopathie und motorische Störungen (Nance und Berry, 1992). Die neurologischen Störungen gehen meist auf Demyelinisierung und Verkalkung der basalen Ganglien zurück und äußern sich in Ataxie, Haarverlust und einer deutlichen vorzeitigen Alterung (Lindenbaum *et al.*, 2001; Rapin *et al.*, 2000). Mit Patienten mit XP haben Patienten mit CS jedoch die Empfindlichkeit gegenüber Sonnenlicht gemein (Nance und Berry, 1992), die sich häufig als schwerer Ausschlag manifestiert. Im Gegensatz zu Patienten mit XP kommt es bei Patienten mit CS jedoch zu keiner Veränderungen der Pigmentierung und es besteht keine Prädisposition für Hautkrebs (Übersicht in: Lehmann, 2003).

CS-Patienten werden zwei Komplementationsgruppen zugeordnet, CS-A und CS-B obwohl weder in den klinischen noch in den zellulären Merkmalen offensichtliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bestehen. Analog wurde bisher keine Verbindung zwischen der Art oder dem Ort der Mutation und dem klinischen Phänotyp nachgewiesen (Übersicht in: Lehmann, 2003). Die Proteine CSA und CSB sind beide in die TCR involviert. Möglicherweise werden sie zur Aufhebung der Transkriptionsblockade nach UV-Strahlung benötigt (Rockx *et al.*, 2000), denn sowohl in CS-A- als auch CS-B-Zellen wird die Fähigkeit zur RNA-Synthese nach UV-Bestrahlung nicht wieder hergestellt (Übersicht in: Lehmann, 2003).

Mäuse mit genetischer Deletion der CS-Gene zeigen leichte neurologische Defekte und sind überraschenderweise, wenn auch in geringem Maße, empfänglich für UV-induzierte Krebsentstehung (van der Horst *et al.*, 2002; van der Horst *et al.*, 1997).

1.3.3. Trichothiodystrophie (TTD)

Das charakteristische Merkmal von TTD ist brüchiges Haar, das durch einen Mangel an Schwefel und damit Zystein-reicher Matrixproteine hervorgerufen wird. Darüber hinaus sind Patienten mit TTD meist klein, geistig zurückgeblieben, haben schuppige Haut und

Gesichtsmisbildungen, entwickeln β -Thalassämie und sind in vielen Fällen photosensitiv (Itin *et al.*, 2001; Bergmann und Egly, 2001). Wie Patienten mit CS sind sie jedoch nicht prädisponiert für Hautkrebs (Stary und Sarasin, 1996). Bei TTD-Patienten wurden meist Mutationen im *XPD*-Gen (TTD-D) gefunden, obwohl auch Mutationen im *XPB*-Gen (TTD-B) oder dem erst kürzlich entdeckten *Tfb5/TTD-A*-Gen (TTD-A) (Giglia-Mari *et al.*, 2004) zu TTD führen können.

Die unterschiedlichen klinischen Symptome von Patienten mit XP, CS und TTD sowie die Beteiligung des TFIIH-Komplexes sowohl an der Transkription als auch der NER begründeten die Hypothese, dass Mutationen, welche die NER einschränken, zu XP führen, und Mutationen, welche die Transkription beeinträchtigen, zu TTD (Bootsma und Hoeijmakers, 1993). Daneben ist in TTD-Zellen die Menge an TFIIH reduziert, unabhängig davon, ob die verursachende Mutation im *XPB*-Gen, im *XPD*-Gen oder im *Tfb5/TTD-A*-Gen vorliegt (Botta *et al.*, 2002; Vermeulen *et al.*, 2000). Es ist deshalb denkbar, dass der TTD-Phänotyp auch durch die verminderte Menge an TFIIH in der Zelle hervorgerufen werden könnte. Wenn die reduzierte Menge an TFIIH limitierend für die transkriptionelle Aktivität der Zelle wäre, so könnte dies den Mangel an Zystein-reichen Matrixproteinen in den Haarwurzeln und das Fehlen von β -Globin in Erythrozyten von Patienten, die an TTD erkrankt sind, erklären (Übersicht in: Lehmann, 2003). Bei der Interpretation der phänotypischen Merkmale von TTD-Patienten sollte allerdings auch die Beteiligung von TFIIH an weiteren Prozessen wie zum Beispiel der RNA Pol I-vermittelten Transkription und der Aktivierung der Transkription durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren berücksichtigt werden.

1.4. Zielsetzung

Der TFIIH-Komplex ist sowohl in die basale Transkription als auch in die NER involviert (Übersicht in: Egly, 2001; Zurita und Merino, 2003). Mit der Entdeckung dieser Multifunktionalität stellte sich die Frage, wie der Komplex vom „Transkriptionsmodus“ in den „Reparaturmodus“ wechselt. Dieses Problem sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollte. Eventuelle Unterschiede bezüglich der Zusammensetzung zwischen der in der Transkription aktiven und der in der NER aktiven Form des Komplexes sollten charakterisiert werden. Ferner sollte untersucht werden, welche Veränderungen es dem Komplex ermöglichen, von Orten aktiver Transkription durch das dicht gepackte Nukleoplasma an den Ort der geschädigten DNA zu gelangen. Weiterführend sollten molekulare und biochemische Vorgänge untersucht werden, die den TFIIH-Komplex nach Bestrahlung verändern.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von höchster Qualität und wurden von folgenden Firmen erworben:

Aktinomyzin D	Calbiochem, Bad Soden, BRD
Agarose	Peqlab, Erlangen, BRD
Ampizillin (100U/ml)	Calbiochem, Bad Soden, BRD oder Carl Roth GmbH , Karlsruhe, BRD
Aprotinin	Fluka, Buchs, BRD
Bacto-Agar	Otto-Nordwald KG, Hamburg, BRD
BSA, Fraktion V	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AU
DMSO	Fluka, Buchs, BRD
dNTPs	Promega, Mannheim, BRD
DRB	Calbiochem, Bad Soden, BRD
G418 (Neomycin)	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
Hydromount	National Diagnostics, Hesse, GB
Leupeptin	Amersham, Freiburg, BRD oder USB, Cleveland, USA
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg, BRD
MG132	Calbiochem, Bad Soden, BRD
Milchpulver, fettarm	Saliter, Obergünzburg, BRD
Okadainsäure	Calbiochem, Bad Soden, BRD
PBS	Gibco-BRL, Karlsruhe, BRD
Pepstatin	USB, Cleveland, USA
TEMED	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, BRD oder Fluka, Buchs, BRD
Trypsin	Difco, Detroit, USA
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt, BRD

Alle anderen Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, bei folgenden Firmen gekauft:

- Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, BRD
- Merck, Darmstadt, BRD
- Sigma, Deisenhofen, BRD

Radioaktive Chemikalien:

[α - ³² P]-dCTP	1 Pipettenspitze, 50 μ Ci, 3000 Ci/mmol	Amersham, Freiburg, BRD
[α - ³² P]-ddNTPs	1500 Ci/mmol, 450 mCi/ml	Amersham, Freiburg, BRD
[³² P]-Orthophosphat	10 mCi/ml,	Perkin-Elmer, Rodgau- Rüdesheim, BRD

Größenstandards:

DNA:

1 kb DNA Leiter	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main, BRD
2-Log DNA Leiter	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main, BRD

Proteine:

Vorgefärbter SDS	
Molekulargewichtsstandard	Sigma, Deisenhofen, BRD

2.1.2 Kits

"Easy Pure DNA Purification"-Kit	Biozym Diagnostics GmbH, Oldendorf, BRD
„Prime-a-gene DNA labeling“-Kit	Promega, Mannheim, BRD
Qiagen Plasmid Maxi-Kit	Qiagen, Hilden, BRD
Thermo Sequenase	USB, Cleveland, USA
PCR-Sequenzierungs-Kit	

2.1.3 Matrices

Protein A Sepharose	Amersham, Freiburg, BRD oder Pierce, Bonn, BRD
Sephadex G-50	Amersham, Freiburg, BRD
Oligo(dT)Zellulose	Amersham, Freiburg, BRD

2.1.4 Oligonukleotide

Oligo(dT) ₁₂₋₁₆	Invitrogen, Karlsruhe, BRD
XPC_for_KpnI	gac agg tac cat ggc tcg gaa acg cgc ggc cgg ag
XPC_rev_NotI	ggg gcg gcc gct cac agc ttc tca aat ggg aac ag
XPC_mid_for	ccc agc ccg ctt tac cag agt gc
XPC_mid_rev	gct ttc ttc agc cac gtg tct ctg g

2.1.5 Plasmide

pcDNA3.1: Vektor mit CMV-Promoter zur Expression von Genen in eukaryontischen Zellen (Invitrogen, Karlsruhe, BRD).

2.1.6 Antikörper

Primäre Antikörper:

C-4 (sc-7344); gegen das Cdk7-Protein gerichtet	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
2D4; gegen das Zyklin H-Protein gerichtet	J.-M. Egly, IGBMC, Illkirch, F
anti-GSK3 β	BD Biosciences, Heidelberg, BRD
anti-phospho-GSK3 β (Serin9)	Cell Signaling, Beverly, USA
1G6; gegen das MAT1-Protein gerichtet	J.-M. Egly, IGBMC, Illkirch, F
DO-1; gegen das p53-Protein gerichtet	David Lane, Dundee, GB
3C9; gegen das p62-Protein gerichtet	J.-M. Egly, IGBMC, Illkirch, F
PC10; gegen das PCNA-Protein gerichtet	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
TDM2; gegen CPDs gerichtet	J.-M. Egly, IGBMC, Illkirch, F
S-19 (sc-293); gegen das XPB-Protein gerichtet	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
1B3; gegen das XPB-Protein gerichtet	J.-M. Egly, IGBMC, Illkirch, F
2F6; gegen das XPD-Protein gerichtet	J.-M. Egly, IGBMC, Illkirch, F
2H1; gegen das XPC-Protein gerichtet	J.-M. Egly, IGBMC, Illkirch, F
ab6264; gegen das XPC-Protein gerichtet	Abcam, Cambridge, GB

Sekundäre Antikörper:

anti-Maus:	p0161, HRP-konjugiert	DakoCytomation GmbH, Hamburg, BRD
	HRP-konjugiert	Dianova, Hamburg, BRD
	Cy TM 2-konjugiert	Dianova, Hamburg, BRD
anti-Kaninchen:	p0448, HRP-konjugiert	DakoCytomation GmbH, Hamburg, BRD
	Cy TM 3-konjugiert	Dianova, Hamburg, BRD

2.1.7 Enzyme

M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim, BRD
<i>Pfu</i> Polymerase	Promega, Mannheim, BRD
Proteinase K	Sigma, Deisenhofen, BRD
RNasin® Ribonuklease Inhibitor	Promega, Mannheim, BRD
T4 DNA Ligase	Promega, Mannheim, BRD

Thermo Sequenase

USB, Cleveland, USA

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma Promega (Mannheim, BRD) gekauft.

2.1.8 Bakterien

***Escherichia coli* DH5 α :** *supE44 Δ lacU169(ϕ 80lacZ Δ M15)hsdR17recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1* (von Susanne Weg-Rehmers)

2.1.9 Zelllinien und Kulturmedien

EBV-immortalisierte menschliche Prä-B Lymphozyten:

(Alle EBV-immortalisierten lymphoiden Zelllinien wurden vom Coriell Institute for Medical Research, Camden, USA bezogen):

- | | |
|---------|---|
| GM02184 | Zelllinie etabliert von einem gesunden Probanden. |
| GM02246 | Zelllinie etabliert von einem Patienten, mit Xeroderma Pigmentosum der Komplementierungsgruppe C. Das XPC-Protein (AS 1 – 131) ist C-terminal deletiert. |
| GM02248 | Zelllinie etabliert von einem Patienten, mit Xeroderma Pigmentosum der Komplementierungsgruppe C. Das XPC-Protein (AS 1 – 90) ist C-terminal deletiert. |
| GM03249 | Zelllinie etabliert von einem Patienten, mit Xeroderma Pigmentosum der Komplementierungsgruppe D. Eine Punktmutation an der Position 1805 (G1805A) im <i>XPD-Gen</i> führt im XPD-Protein zum Austausch der Aminosäure Glyzin an der Position 602 durch die Aminosäure Asparagin. |
| GM02252 | Zelllinie etabliert von einem Patienten, mit Xeroderma Pigmentosum der Komplementierungsgruppe B. Eine C>A Transversion in der Splice-Akzeptorsequenz des letzten Introns des <i>XPB-Gens</i> führt zu einer Leserasterverschiebung und zum Verlust des C-terminalen Bereichs. |
| GM14589 | Zelllinie etabliert von einem Patienten mit Cockayne Syndrom. |
| GM02250 | Zelllinie etabliert von einem Patienten, mit Xeroderma Pigmentosum der Komplementierungsgruppe A. Punktmutationen in Exon 3 (G→A) und Exon 4 (G555C) des XPA-Proteins verändern das Spleißverhalten. |

Alle lymphoiden Zelllinien wurden in Roswell Park Memorial Institut-Medium (RPMI, Gibco-BRL, Karlsruhe, BRD), das mit 15% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (Gibco-BRL, Karlsruhe, BRD) und 100 U/ml Penizillin und Streptomycin (Gibco-BRL, Karlsruhe, BRD) angereichert war, in feuchter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Adhärente Zellen:

U2OS, menschliche Zelllinie, etabliert aus einem Osteosarkom, ATCC-Nummer HTB 96 (erhalten von Prof. Christoph Englert).

SAOS-2, menschliche Zelllinie, etabliert aus einem Osteosarkom, p53-defizient, ATCC-Nummer HTB 85 (erhalten von Prof. Christoph Englert).

H1299, menschliche Zelllinie, etabliert aus den Epithelzellen eines Lungenkarzinoms, p53-defizient, ATCC Nummer CRL 5803 (erhalten von Sir David Lane).

NIH/3T3, Zelllinie aus immortalisierten embryonalen Mausfibroblasten, ATCC Nummer CCL 92 (erhalten von Margarethe Litfin).

GM01604, primäre menschliche Fibroblasten (Coriell Institute for Medical Research, Camden, USA).

GM03176, primäre menschliche Fibroblasten eines Patienten, mit Xeroderma Pigmentosum der Komplementationsgruppe C (Coriell Institute for Medical Research, Camden, USA).

U2OS, SAOS-2 und H1299 Zellen wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM; Gibco-BRL, Karlsruhe, BRD), das mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und 100 U/ml Penizillin und Streptomycin angereichert war, in feuchter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. 3T3-Zellen wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium, das mit 10% „Donor“-Kälberserum und 100 U/ml Penizillin und Streptomycin angereichert war, in feuchter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Primäre Fibroblasten wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium, das mit 15% fötalem Kälberserum und 100 U/ml Penizillin und Streptomycin angereichert war, in feuchter Umgebung bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

2.1.10 Membranen, Filme und Plastikwaren

ECL und MP Hyperfilme	Amersham, Freiburg, BRD
Hybond N+ Membran	Amersham, Freiburg, BRD
Immobilon P (PVDF) Membran	Amersham, Freiburg, BRD
Plastikwaren für die Zellkultur	Greiner Labortechnik, Nürtingen, BRD

2.1.11 Glaswaren

Alle verwendeten Glaswaren wurden von den Firmen VWR (Darmstadt, BRD), Neolab (Heidelberg, BRD) und Omnilab (Bremen, BRD) bezogen. Die Sterilisation erfolgte 5 Stunden in einem Wärmeschrank (Modell 800, Memmert GmbH & CoKG, Schwabach, BRD). Medien wurden zur Sterilisierung 20 Minuten bei 120°C in einem Autoklaven (Varioklav, H + P Labortechnik AG, Oberschleißheim, BRD) autoklaviert.

2.2 Methoden

Routinemethoden und die Zusammensetzung gebräuchlicher Puffer wurden, soweit nicht anders vermerkt, dem Protokollbuch „Molecular Cloning“ (Sambrook *et al.*, 1989) entnommen.

2.2.1 Zellkultur- und Transfektionsmethoden

2.2.1.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden in einem Steri-Cult 200 Inkubator (Forma Scientific, Marietta, USA) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Suspensionszellen wurden in Zellkulturmedium inkubiert bis sie eine Konfluenz von 80%-90% erreicht hatten. Dann wurden sie 1:5 in frischem Kulturmedium verdünnt.

Adhärenente Zellen wurden bis zum Erreichen einer Zelldichte von 80–90% Konfluenz in Zellkulturmedium inkubiert. Dann wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,5 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM K₂HPO₄) gewaschen. Pro 50 cm² wurde 1 ml einer 0,25%igen Trypsinlösung auf die Zellen gegeben und diese circa 2 Minuten bei 37°, bis zur Ablösung von der Kulturschale, inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden 1:5 in frischem Kulturmedium verdünnt, in ein Falcon-Röhrchen überführt, 2 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert (Megafuge 1.0 Heraeus, Hanau, BRD) und in der gewünschten Dichte ausplattiert.

2.2.1.2 Langzeit-Aufbewahrung und Anzucht von eukaryontischen Zellen

Um Suspensionszellen über einen längeren Zeitraum aufzubewahren, wurde eine logarithmisch wachsende Kultur 3 Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert, in Einfriermedium (RPMI, 20% FCS, 10% DMSO) resuspendiert, in Kryoröhrchen (Greiner Labortechnik, Nürtingen, BRD) aliquotiert und langsam auf –80°C gekühlt. Anschließend wurden die Zellen zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Adhärenente Zellen wurden zur Langzeitaufbewahrung wie unter 2.2.1.1 beschrieben mit Trypsin behandelt und zentrifugiert. Die Zellen wurden in Einfriermedium (DMEM, 20% FCS, 10% DMSO) resuspendiert, in Kryoröhrchen aliquotiert und langsam auf –80°C gekühlt. Anschließend wurden die Zellen zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Anzucht wurden Suspensionszellen schnell bei 37°C aufgetaut, mit 5 ml frischem Kulturmedium versetzt, 5 Minuten bei 800 rpm abzentrifugiert und in 500 µl frischem Kulturmedium resuspendiert. Danach wurden die Zellen wie unter 2.2.1.1 beschrieben weiter kultiviert.

Adhärente Zellen wurden schnell bei 37°C aufgetaut und in frisches Kulturmedium überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen anschließend wie unter 2.2.1.1 beschrieben kultiviert.

2.2.1.3 Transfektion von Lymphozyten mittels Elektroporation

Am Tag vor der Transfektion wurden pro Transfektionsansatz 7 – 8 x 10⁶ Zellen in 10 ml Kulturmedium angesetzt. Unmittelbar vor der Transfektion wurden die Zellen 3 Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert und in circa 400 µl frisches Kulturmedium aufgenommen. Dabei wurde darauf geachtet, dass in 400 µl Zellsuspension mindestens 1 x 10⁷ Zellen enthalten waren. 20 - 40 µg DNA wurden mit 400 µl Zellsuspension gemischt, 10 Minuten auf Eis inkubiert und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (4 mm Elektrodenabstand, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, BRD) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 960 µF und 220 V. Sofort nach der Elektroporation wurden 400 µl eiskaltes FCS zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden 5 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen, in einer Petrischale mit 60mm Durchmesser ausplattiert und 24 Stunden bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen 3 Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert und in 30 – 40 ml Kulturmedium versetzt mit 500 µg/ml G418 aufgenommen. Ein Teil der Zellsuspension wurde mit einer Mehrkanalpipette (Dunn Labortechnik GmbH, Asbach, BRD) auf 96-Well-Platten verteilt. Nach 10 bis 14 Tagen waren die ersten Kolonien sichtbar. Sie wurden wie unter 2.2.1.1 beschrieben kultiviert.

2.2.1.4 Behandlung der Zellen mit UV-Licht, ionisierender Strahlung und Inhibitoren

Zur Bestrahlung mit UV-Licht wurden Suspensionszellen 3 Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert, mit PBS gewaschen und in 150 µl PBS in einer Petrischale mit 60mm Durchmesser ausplattiert. Die Zellen wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit 200 J/m² UVC-Licht (UVK-15, Vetter GmbH Laborgeräte, Wiesloch, BRD) bestrahlt, im ursprünglichen Kulturmedium resuspendiert und 10 – 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die Bestrahlung mit UVA- (Sellas Sunlight med. Geräte GmbH, Gevelsberg, BRD) und UVB-Licht (UVM-15, Vetter GmbH Laborgeräte, Wiesloch, BRD) erfolgte analog mit den jeweils angegebenen Dosen.

Zur Bestrahlung von adhärennten Zellen wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach der Bestrahlung wurde das ursprüngliche Kulturmedium wieder auf die Zellen gegeben und die Zellen 10 – 30 Min bei 37°C inkubiert.

Für die partielle UV-Bestrahlung wurden U2OS-Zellen in 60 mm Petrischalen auf Glasplättchen kultiviert. Vor der Bestrahlung wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen

einmal mit PBS gewaschen, wobei eine dünne Schicht PBS auf den Zellen belassen wurde. Auf diese PBS-Schicht wurde ein Membranfilter (Isopore® Membrane Filters, Millipore GmbH, Schwalbach, BRD) mit 5 µm Porendurchmesser platziert und die Zellen mit einer Dosis von 100 J/m² UVC-Licht bestrahlt. Danach wurde der Filter vorsichtig entfernt, das ursprüngliche Kulturmedium auf die Zellen pipettiert und der Ansatz 10 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die Bestrahlung mit ionisierender Strahlung erfolgte im Kulturmedium in einer ⁶⁰Cobalt γ-Quelle (Gammacell 220, A.E.C.L. Atomic energy of Canada limited, Ottawa, Kanada) bei einer Dosisrate von 2 Gray/Min.

Cisplatin wurde als 10 mM Lösung in DMSO angesetzt und in einer Endkonzentration von 10 µM benutzt.

MG132 wurde als 5 mM Lösung in DMSO angesetzt und in einer Endkonzentration von 10 µM verwendet.

Aktinomyzin D wurde in einer Konzentration von 5 mg/ml in Ethanol angesetzt und in einer Endkonzentration von 5 µg/ml eingesetzt.

5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB) wurde als 250 mM Lösung in DMSO angesetzt und in einer Endkonzentration von 250 µM angewandt.

Okadainsäure wurde in DMSO gelöst und in einer Endkonzentration von 100 mM verwendet.

Wasserstoffperoxid (H₂O₂) wurde in einer Endkonzentration von 3 mM eingesetzt.

Glutathion wurde in einer Konzentration von 0,5 M in Wasser angesetzt und in einer Endkonzentration von 40 mM verwendet.

G418 (Neomycin) zur Selektion transfizierter Zellen wurde in einer Endkonzentration von 500 µg/ml benutzt.

2.2.2 Methoden zur Arbeit mit Nukleinsäuren

2.2.2.1 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 und 280 nm bestimmt. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht 50 µg/ml einer doppelsträngigen DNA bzw. 40 µg/ml RNA. Liegt der Quotient aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ zwischen 1,8 und 2,0, so hat die Nukleinsäure eine akzeptable Reinheit.

2.2.2.2 Isolierung von Nukleinsäuren

2.2.2.2.1 Maxipräparation von Plasmiden

200 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* wurden bei 7000 rpm 10 Minuten zentrifugiert. Aus dem Pellet wurde mit Hilfe des Qiagen Plasmid Maxi Kits nach dem vom Hersteller (Qiagen, Hilden, BRD) empfohlenen Protokoll die Plasmid-DNA gewonnen. Die Plasmid-DNA wurde in 250 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) aufgenommen und bei –20°C aufbewahrt.

2.2.2.2.2 Minipräparation von Plasmiden durch alkalische Lyse (nach Birnboim & Doly, 1979)

1,5 ml einer ÜN-Kultur von *E. coli* wurden 30 Sekunden bei 14 krpm in der Tischzentrifuge bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl GTE-Puffer (50 mM Glukose; 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl NaOH/Triton (0,2 N NaOH; 1% Triton X-100) wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und zur Zelllyse 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl eiskaltem NaAc (3 M, pH 5,2) und vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz 20 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zelltrümmer, chromosomale DNA und Proteine bei 4°C und 14 krpm 10 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde mit 1 Volumen Isopropanol p. A. versetzt und die Plasmid DNA 5–10 Minuten bei RT gefällt. Die DNA wurde anschließend bei 14 krpm für 10 Minuten in einer Tischzentrifuge pelletiert, das Sediment mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen und 10 Minuten bei RT getrocknet. Abschließend wurde die DNA in 30–50 µl Wasser resuspendiert und bei –20°C aufbewahrt.

2.2.2.3 Präzipitation von DNA

Die DNA-haltige Lösung wurde mit 0,1 Volumen NaAc (3 M, pH 5,2) und 2 Volumina eiskaltem EtOH gemischt und für mindestens 30 Minuten bei –20°C gefällt. Anschließend wurde die DNA für 40 Minuten bei 4°C und 14 krpm pelletiert und zur Entfernung von Salzresten mit 500 µl 70% EtOH gewaschen. Der Überstand wurde vollständig abgenommen, das Sediment getrocknet und anschließend in TE-Puffer (10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) oder Wasser resuspendiert.

2.2.2.4 Agarosegelelektrophorese

Je nach Größe des aufzutrennenden DNA-Fragmentes wurde die benötigte Menge Agarose in 1x TAE-Puffer (242 g Tris; 57,1 ml Eisessig; 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0; ad 1 l Wasser)

bis zum vollständigen Lösen aufgeköcht, auf 60°C abgekühlt und mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 3 µg/ml versetzt. Die auf Handwärme abgekühlte Flüssigkeit wurde in eine mit einem Kamm versehene horizontale Gelkammer eingefüllt. Nach der Polymerisation wurde der Kamm entfernt und die mit Ladepuffer (0,5 M EDTA; 50% Glycerol; 0,01% Bromphenolblau) versetzten Proben (Endkonzentration: 1 x) in die Taschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V in 1 x TAE-Puffer. Die DNA wurde auf einem Tisch mit eingebauter UV-Lampe (Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, BRD) sichtbar gemacht und mit einem Eagle Eye Photokamerasystem (Stratagene, Cedar Creek, USA) und einem „Video Copy Processor“ (Mitsubishi, Singapur) dokumentiert.

Agarose-Konzentration (% w/v)	DNA-Größe (kb)
0,6	1 – 20
0,7	0,8 – 10
0,9	0,5 – 7
1,2	0,4 – 6
1,5	0,2 – 3

Tabelle 2.1: Auftrennungsbereich und zugehörige Agarose-Konzentration (Aus: Sambrook *et al.*, 1989)

2.2.2.5 Isolation und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolation und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen wurde der „Easy Pure DNA Purification“-Kit (Biozym Diagnostics GmbH, Oldendorf, BRD) nach den Angaben des Herstellers benutzt.

2.2.2.6 Isolation von PolyA RNA

Alle Lösungen außer den Tris-enthaltenden Puffern wurden zur Entfernung von RNAsen für mindestens eine Stunde bei 37°C mit Diethylpyrokarbonat (DEPC) behandelt und anschließend autoklaviert.

Mindestens 10 ml einer 80 – 90% konfluenten Suspensionszellkultur wurden 3 Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert, mit PBS gewaschen und in 10 ml STE-Puffer (100 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,5 % SDS) aufgenommen. Genomische DNA wurde mittels eines 10 Sekunden Pulses mit einem „Ultra-Turrax T25“ (Janke & Kunkel IKA Labortechnik, Staufen, BRD) zerkleinert und die Proteine durch Zugabe von 300 µg/ml Proteinase K 45 Minuten bei 37°C verdaut. Anschließend wurde das Zellysate mit 0,1 g Oligo(dT)-Zellulose

und 1 ml einer 5 M NaCl-Lösung versetzt und über Nacht bei RT auf einem rotierenden Rad (Rottberg Laborgeräte, Göttingen, BRD) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Zellulose durch Zentrifugation pelletiert und 3 mal mit HSB-Puffer (300 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM EDTA; 0,1 % SDS) gewaschen und die an die Zellulose gebundene RNA 3 mal mit je 1 ml destilliertem, sterilem Wasser eluiert. Um die RNA zu konzentrieren wurde sie mit 300 µl NaAc (3 M, pH 4.8) und einem Volumen (3,3 ml) Isopropanol versetzt und mindestens zwei Tage bei -20°C gefällt. Anschließend wurde sie 25 Minuten bei 10 000 rpm und 4°C pelletiert (Avanti J-20, Beckmann, München, BRD). Der Überstand wurde sofort nach dem Abstoppen der Zentrifuge abgenommen und das Sediment zur Entfernung von verbliebenen Salzen mit 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Sediment getrocknet, die RNA in 50 µl sterilem, destilliertem Wasser gelöst und zur Durchführung eines Northern Blots oder zur Herstellung von cDNA verwendet.

2.2.2.7 Northern Blot

1,4 % Agarose wurde in 1x MOPS-Puffer (20 mM MOPS; 5 mM NaAc pH 7,0; 1 mM EDTA pH 8,0; pH 7,0) durch Aufkochen gelöst. Nach dem Abkühlen auf Handwärme wurde Formaldehyd in einer Endkonzentration von 6% zugegeben und die Lösung in eine mit einem Kamm versehene horizontale Gelkammer gegossen.

5 µg RNA wurden mit einem Volumen RNA-Ladepuffer (17,5% Formaldehyd; 50% deionisiertes Formamid; 1x MOPS-Puffer; 0,5% Ethidiumbromid; 0,01% Bromphenolblau) versetzt, 10 Minuten bei 65°C denaturiert und in die Taschen des vollständig polymerisierten Gels geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 130 Volt bis die Bromphenolblau-Bande etwa 6 cm gewandert war.

Anschließend wurde die RNA für 48 Stunden in 10 x SSC-Puffer (1,5 M NaCl; 150 mM Na-Citrat, pH 7,0) auf eine Hybond N+-Membran geblottet und mittels UV-Bestrahlung und Inkubation bei 80°C für 2 Stunden auf der Membran fixiert.

Vor der Hybridisierung wurde die Membran für 2 Stunden bei 65°C in 4 x SSC-Puffer (600 mM NaCl; 60 mM Na-Citrat; pH 7,0), 1x Denhardt's Lösung (0,02% Fikoll 400; 0,02% Polyvinylpyrolidin 360; 0,02% BSA), 0,1% SDS; 16 mM Na-Phosphat pH 7,3 und 0,05% Natriumpyrophosphat in einem Hybridisierungssofen (Amersham, Freiburg, BRD) vorhybridisiert. Währenddessen wurde die Sonde mit dem „Prime-a-gene labeling“ Kit (Promega, Mannheim, BRD) nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll markiert. Die Vorhybridisierungslösung wurde durch die Hybridisierungslösung (4 x SSC-Puffer, 10 mM EDTA; 0,1% SDS) ersetzt und die frisch denaturierte, radioaktiv markierte Sonde zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C im Hybridisierungssofen.

Am nächsten Tag wurde die Membran je 30 Minuten in Puffer A (300 mM NaCl; 30 mM Na-

Zitrat; 16 mM Na-Phosphat pH 7,3; 0,01% Natriumpyrophosphat), in Puffer B (150 mM NaCl; 15 mM Na-Citrat; 16 mM Na-Phosphat; 0,01% Natriumpyrophosphat), in Puffer C (150 mM NaCl; 15 mM Na-Citrat; 16 mM Na-Phosphat; 0,01% Natriumpyrophosphat) und in Puffer D (75 mM NaCl; 7,5 mM Na-Citrat; 0,1% SDS; 16 mM Na-Phosphat pH 7,3; 0,01% Natriumpyrophosphat) gewaschen und bei -80°C gegen einen MP-Film exponiert. Der Film wurde anschließend in einem M35 X-OMAT Prozessor (Kodak, Stuttgart, BRD) entwickelt.

Zur Entfernung der radioaktiv markierten cDNA-Sonden von der Membran wurden 400 ml destilliertes, steriles Wasser aufgekocht. Anschließend wurden 2 ml 20% SDS und 2 ml 20x SSC zugegeben und die Membran für 5 – 10 Minuten in der kochend-heißen Lösung inkubiert.

2.2.3 Enzymreaktionen und Klonierungstechniken

2.2.3.1 Restriktionsverdau von DNA

Die zu verdauende DNA wurde im vom Hersteller empfohlenen Puffer bis zu einer Konzentration von $1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ verdünnt. Pro μg DNA wurden 2 Einheiten des entsprechenden Restriktionsenzym zugegeben und der Ansatz 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Der Verdau wurde mittels Agarosegelelektrophorese (Material und Methoden, 2.2.2.5) überprüft.

2.2.3.2 Ligation linearer DNA-Fragmenten

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden in 1x T4-Puffer mit 3 Einheiten T4-Ligase für 1–6 Stunden bei RT inkubiert. Das Verhältnis Insert:Vektor betrug 8:1.

2.2.3.3 Herstellung und Transformation elektrokompetenter *E. coli* (nach Dower *et al.* 1988)

100 ml LB-Medium wurden mit 2 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* beimpft und bis zu einer Zelldichte von $\text{OD}_{600} = 0,6-0,8$ bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Kultur sofort in Eiswasser abgekühlt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt!

Die Bakterien wurden 3 Minuten bei 10 krpm in einer vorgekühlten Zentrifuge (Centrikon H-401, Berthold Hermle KG, Gosheim, BRD) pelletiert und dreimal mit je 30 ml eiskaltem 10%-igem Glyzerin gewaschen, wobei die Zellen bei jedem Waschschrift gründlich resuspendiert wurden. Anschließend wurden die Bakterien in $250\ \mu\text{l}$ 10%-igem Glyzerin resuspendiert, in $40\ \mu\text{l}$ Portionen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die Bakterien wurden bei -80°C gelagert.

40 μl der auf Eis aufgetauten elektrokompententen *E. coli*-Zellen wurden mit maximal 5 μl DNA gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,2 mm Elektrodenabstand, Peqlab, Erlangen, BRD) überführt. Die Elektroporation der Bakterien erfolgte bei 1800 V in einem *E. coli*-Pulser (Biorad, München, BRD). Die Pulsdauer lag dabei zwischen 4,5 und 4,7 Millisekunden. Sofort nach der Elektroporation wurden 200 μl LB-Medium zugegeben, der gesamte Ansatz aus der Küvette in 800 μl LB-Medium überführt und 1 Stunde bei 37°C im Bakterieneschüttler (HA Infors AG, Bottmingen, CH) inkubiert.

Anschließend wurden die Bakterien kurz zentrifugiert (5415 R, Eppendorf, Hamburg, BRD), 800 μl des Überstandes abgenommen, das Sediment im verbliebenen Medium resuspendiert und 100 μl auf Selektivplatten ausplattiert.

2.2.3.4 Herstellung von cDNA

1 μg PolyA RNA und 1 μg Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen, Karlsruhe, BRD) wurden mit DEPC-behandeltem, sterilem, destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 14 μl verdünnt. Der Ansatz wurde 5 Minuten bei 70°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Zu dem Ansatz wurden 5 μl 5x M-MLV RT Puffer (Promega, Mannheim, BRD), 1,25 μl dNTP Mix (10mM pro Nukleotid), 25 Units RNasin® Ribonuklease Inhibitor (Promega, Mannheim, BRD) und 200 Units M-MLV Reverse Transkriptase (Promega, Mannheim, BRD) zugegeben und mit DEPC-behandeltem, sterilem, destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25 μl aufgefüllt. Danach wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 40°C und für 50 Minuten bei 55°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung des Enzyms (15 Minuten, 70°C) gestoppt und die cDNA zur Amplifizierung des *XPC*-Gens verwendet.

2.2.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase-Chain-Reaction, PCR)

Alle PCR-Reaktionen wurden in dem Thermocycler GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Rodgau-Rügesheim, BRD) durchgeführt.

Die Amplifikation von zur Klonierung verwendeten DNA-Fragmenten wurde mit der *pfu*-Polymerase durchgeführt. Diese Polymerase besitzt, im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität.

Ein typischer Ansatz für eine PCR-Reaktion mit der *pfu*-Polymerase ist in Tabelle 2.2 und ein typisches PCR-Programm in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Die Qualität der PCR wurde mittels Agarosegelelektrophorese (Material und Methoden, 2.2.2.5) überprüft.

Komponente	eingesetzte Menge	Endkonzentration
template	X μ l	circa 50 ng
Oligonukleotid (50 ng/ μ l)	je 3 μ l	150 ng
dNTPs (10 mM)	1 μ l	250 μ M
10x Puffer	5 μ l	1x
<i>pfu</i> -Polymerase	2 μ l	6 Units
H ₂ O	ad 50 μ l	

Tabelle 2.2: Zusammensetzung einer typischen *pfu*-PCR-Reaktion

Schritt	Temperatur	Dauer
1. Aufschmelzen der DNA-Matrize	96°C	2 Min
2. Denaturierung	96°C	30 sec
3. Annealing	Annealingtemperatur	30 sec
4. Elongation	72°C	2 Min/1 kb
5. Vollständige Synthese	72°C	5 – 10 Min
6. Pause	4°C	∞

Tabelle 2.3 : Beispiel eines typischen *pfu*-PCR-Programms, die Schritte 2 – 4 wurden 30mal wiederholt.

2.2.3.6 Sequenzierung von DNA nach Sanger (Sanger *et al.*, 1975)

Die Sequenzierreaktion wurde mit dem „Thermo Sequenase Radiolabeled Terminator Cycle Sequencing“-Kit nach den Angaben des Hersteller (USB, Cleveland, USA) in dem Thermocycler GeneAmp PCR Systems 9600 (Perkin Elmer, Rodgau-Rügesheim, BRD) durchgeführt.

Die Sequenzierreaktion wurde anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden Glasplatten, Spacer und Kamm mit Ethanol und Wasser gründlich gereinigt, zusammengesetzt und mit Klebeband abgedichtet.

Die Gellösung (40 ml 8% Acrylamid/Urea-Stocklösung (133 ml 30% Acrylamid; 50 ml 10x TBE-Puffer (108 g Tris; 55 g Borsäure; 8,3 g EDTA in 1 l Wasser), 240 g Urea in 500 ml Wasser), 300 μ l 10% APS-Lösung, 30 μ l TEMED) wurde langsam zwischen die Platten

gegossen und der Kamm mit den Zähnen nach außen eingesetzt. Nach der Polymerisation (ca. 30 Minuten), wurde der Kamm entfernt, die Geltasche vorsichtig gereinigt und der Kamm vorsichtig mit den Zähnen nach innen eingesetzt. Das Gel wurde zusammen mit einer Aluminiumplatte in der Gelkammer befestigt, die Vorratsbehälter mit 1x TBE befüllt und die Geltaschen gründlich mit 1x TBE gespült. Danach wurde das Gel für 30 Minuten bei 30 Watt äquilibriert. Währenddessen wurde die Sequenzierreaktion 5-10 Minuten bei 70°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Nach dem Vorlauf wurden die Geltaschen erneut gereinigt und mit 3 µl der Sequenzierreaktion befüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei 30 Watt für 1,5 bis 3 Stunden.

Nach der Elektrophorese wurde die Apparatur auseinandergelassen und die Platten vorsichtig getrennt. 2 Lagen Whatman-Papier wurden auf das Gel gepresst und zusammen mit dem Gel von der Glasplatte gezogen. Das Gel wurde mit Frischhaltefolie bedeckt und bei 90°C ungefähr 1 Stunde im Vakuum auf einem Geltdrockner (GO 40/50, Gibco BRL, Karlsruhe, BRD) getrocknet, bevor es gegen einen MP-Film exponiert wurde

2.2.4 Methoden zur Arbeit mit Proteinen

2.2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt. Für die Bradford-Stocklösung wurden 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 in 50 ml Ethanol gelöst. Zu dieser Mischung wurden 100 ml 85% Phosphorsäure gegeben und der Ansatz auf 1 Liter aufgefüllt. Die Bradford-Stocklösung wurde filtriert und bei 4°C aufbewahrt.

Um die Proteinkonzentration einer Probe zu bestimmen, wurden 2 µl der Probe mit 1 ml Bradford-Stocklösung vermischt und nach 10minütiger Inkubation die Extinktion bei 595 nm in einem Lesegerät (ELX808IU Ultra Microplate Reader, Bio-Tek Instruments Inc., Bad Friedrichshall, BRD) bestimmt.

Um die Proteinkonzentration der Proben zu ermitteln wurde bei jeder Proteinbestimmung eine Kalibrierungskurve erstellt. Dazu wurden je 2 µl des für die Zellyse eingesetzten Puffers zusammen mit 0, 2, 4 und 6 µl einer BSA-Stocklösung (1 mg/ml) und 1 ml der Bradford-Stocklösung vermischt und die Extinktion bestimmt. Die Konzentration der Proben wurde mit der Formel $OD/2\alpha$ errechnet, wobei α die OD von 1 µl BSA (1 mg/ml) in 1 ml Bradford-Stocklösung ist.

2.2.3.2 Präparation des Gesamtzellysats

Suspensionszellen wurden 3 Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und in eiskaltem Lysispuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,9%

NP40; 1 mM DDT; 1 mM PMSF; 10 mM Natriumpyrophosphat; 50 mM Natriumfluorid; 1 µg/ml Benzamidin; 1 µg/ml Aprotinin; 1 µg/ml Leupeptin; 1 µg/ml Pepstatin; 1 µg/ml Chymostatin) 10 Minuten auf Eis lysiert. Von adhären Zellen wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen, in 1 ml PBS von der Platte abgeschabt und 20 Minuten auf Eis in eiskaltem Lysispuffer lysiert. Das Zelllysats wurde 10 Minuten bei 14 krpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration nach Bradford (siehe Kapitel 2.2.3.1) bestimmt.

15 µg des Gesamtzelllysats wurden mit dem gleichen Volumen 2x SDS-Ladepuffer (4% SDS; 0,16 M Tris-HCl pH 6,8; 20% Glycerol; 4% β-Mercaptoethanol; 0,002% Bromphenolblau) versetzt, 5 Minuten bei 95°C denaturiert und auf ein SDS-PAGE Gel (siehe Kapitel 2.2.3.4) geladen.

2.2.3.3 Immunpräzipitation

Koppeln des Antikörpers an die Sepharose: Pro Ansatz wurden 20 µl einer Protein A Sepharose Mischung 12 Sekunden bei 14 krpm zentrifugiert. Beim Pipettieren der Sepharose wurden nur Pipettenspitzen mit gekappter Spitze verwendet, um die Sepharose nicht zu beschädigen. Die Protein A Sepharose wurde einmal mit PBS gewaschen und mit PBS auf 500 µl aufgefüllt. Pro Ansatz wurden, je nach Qualität der Antikörper, 2-3 µl einer Antikörperlösung zugegeben und mindestens 1 Stunde bei RT auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 12 Sekunden bei 14 krpm zentrifugiert und die Sepharose/Antikörper-Komplexe einmal mit PBS gewaschen. Danach wurde die Sepharose gründlich in Lysispuffer resuspendiert und auf die entsprechende Anzahl an Reaktionsgefäßen verteilt.

Immunpräzipitationsreaktion: 150–500 µg Gesamtzelllysats wurden zu den Sepharose/Antikörper-Komplexen gegeben und auf einem Drehrad bei 4°C 1–1,5 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Sepharose/Antikörper/Antigen-Komplexe 12 Sekunden bei 14 krpm pelletiert und 2 mal mit je 400 µl Lysispuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand mit einer feinen Kanüle (100 Sterican® 26G, B. Braun Medical AG, Emmenbrücke, CH) vollständig entfernt. Die Proben wurden mit 65 µl 1x SDS-Probenpuffer (2% SDS; 0,08 M Tris-HCl pH 6,8; 10% Glycerol; 2% β-Mercaptoethanol; 0,001% Bromphenolblau) versetzt und 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Nach der Denaturierung wurde der Ansatz 12 Sekunden bei 14 krpm zentrifugiert und 20 µl des Überstandes auf ein SDS-PAGE Gel (siehe Kapitel 2.2.3.4) aufgeladen.

2.2.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-PAGE wurde das „Mini-PROTEAN®3 System“ (Bio-Rad, München, BRD) benutzt. Eine Front- und eine Rückplatte wurden in den Plattenhalter gespannt und in den Gießstand eingesetzt. Für das Trenngel wurde eine Lösung aus 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 50 µl 20% (w/v) SDS; 100 µl 10% (w/v) Ammoniumpersulfat; 4 µl TEMED und Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8) in der benötigten Konzentration hergestellt und mit Wasser auf ein Endvolumen von 10 ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde zwischen die beiden Platten eingefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel (6,8 ml Wasser; 1,7 ml Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8); 1,25 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8; 50 µl 20% (w/v) SDS; 100 µl 10% (w/v) Ammoniumpersulfat; 10 µl TEMED) auf das Trenngel gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt, das Gel aus der Gießapparatur gelöst und in eine Laufkammer eingesetzt. In die Laufkammer wurde 1 x Laufpuffer (25 mM Tris-HCl; 200 mM Glyzin; 0,1% (w/v) SDS) eingefüllt und die vorbereiteten Proteinproben in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 130 – 150 Volt für 1,5-2 Stunden bis die Bromphenolblau-Front das Ende des Gels erreicht hatte.

2.2.3.5 Western Blot

Nach der Elektrophorese wurde das Gel zusammen mit 2 Filterpapieren und einer mit Methanol gespülten und in Transferpuffer (25 mM Tris-HCl; 200 mM Glyzin; 10% Methanol) äquilibrierten Immobilon P-Membran in die Transferapparatur des „Mini-Protein®3 Systems“ (Bio-Rad, München, BRD) eingespannt. Die Transferkammer wurde mit Transferpuffer aufgefüllt und die Proteine über Nacht bei 30 V auf eine Immobilon P-Membran übertragen. Nach dem Transfer wurden die unspezifischen Bindungen der Membran bei RT 30 Minuten in 5% (w/v) fettarmer Milch in PBST (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,5 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM K₂HPO₄; 0,2% Tween 20) abgesättigt. Anschließend wurde die Membran in einer Lösung aus 5% (w/v) fettarmer Milch in PBST und dem ersten Antikörper 1,5 Stunden bei RT auf einem sich drehenden Brett (REAX2, Heidolph Elektro GmbH, Kelheim, BRD) inkubiert (Phosphorylierungsspezifische Antikörper wurden in 5% BSA in PBST über Nacht bei 4°C inkubiert). Anschließend wurde die Membran 3 mal für je 5–10 Minuten in PBST auf einem Schüttelinkubator gewaschen und mit einem zweiten, HRP-konjugierten Antikörper, der in 5% (w/v) fettarmer Milch in PBST 1:1000 verdünnt worden war, 1 Stunde bei 37°C auf dem sich drehenden Brett inkubiert. Danach wurde die Membran 5 mal für mindestens 10 Minuten in PBST auf einem Schüttelinkubator gewaschen. Zur Entwicklung des Western Blots wurden gleiche Volumina der ECL-Lösung 1 (100 mM Tris-HCl pH 8,5; 2,5 mM Luminol; 400 µM Kumarinsäure) und ECL-Lösung 2 (100 mM Tris-HCl pH 8,5; 0,02% H₂O₂) gemischt und

auf die Membran appliziert, wobei die ECL-Lösung die Membran vollständig bedeckte. Nach 2 Minuten Inkubation bei RT wurde die überschüssige ECL-Lösung entfernt und die Membran gegen einen ECL Hyperfilm exponiert. Der Film wurde in einem Kodak M35 X-OMAT Prozessor entwickelt.

Zur Entfernung der Antikörper von der Membran wurde die Membran 40 Minuten bei 55°C in 62,5 M Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS und 50 mM DDT in einem Wasserbad inkubiert.

2.2.3.6 *In Vivo* Markierung von Zellen mit ³²P-Orthophosphat

10 ml einer exponentiell wachsenden Lymphozyten-Kultur wurden 3 Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert, einmal in TBS (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl) gewaschen und in 10 ml Phosphat- und Glutaminfreiem RPMI-Medium resuspendiert, das mit 1 mM L-Glutamin und 7,5% dialysiertem FCS angereichert war. Zu dieser Zellsuspension wurden 2,5 mCi ³²P-Orthophosphat gegeben und 1,5 Stunden bei 37°C in feuchter Atmosphäre und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2 Minuten bei 1000 rpm pelletiert und in TBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 300 µl TBS aufgenommen und auf 2 Petrischalen mit 60 mm Durchmesser verteilt. Eine dieser Schalen wurde mit 200 J/m² UVC-Licht bestrahlt (siehe auch Kapitel 2.2.1.4). Anschließend wurde das ursprüngliche Kulturmedium auf die Zellen gegeben und die Ansätze 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

2.2.3.7 Immunfluoreszenz-Färbung (nach Mone *et al.*, 2001)

Auf Glasplättchen kultivierte Zellen wurden wie in Kapitel 2.2.1.4 beschrieben bestrahlt und bis zur Ernte weiter kultiviert. Dazu wurden die Glasplättchen mit den Zellen in 24-Loch-Platten überführt und mit 4% Formaldehyd in PBS 15 Minuten bei 4°C fixiert. Danach wurden die Zellen in 0,5% Triton X-100 in PBS 5 Minuten bei RT permeabilisiert und 10 Minuten in 100 mM Glyzin in PBS inkubiert. Die fixierten Zellen wurden einmal in PB-Puffer (130 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2,5 mM MgCl₂, pH 7,4) gewaschen und anschließend in WB-Puffer (PB-Puffer + 0,5% BSA; 0,2% Gelatine; 0,05% Tween 20) äquilibriert. In jedes Glasplättchen-enthaltende Loch wurden 200 µl des primären Antikörpers, verdünnt in WB-Puffer, gegeben und 1,5 Stunden bei RT auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3 mal mit WB-Puffer gewaschen und mit 200 µl eines Cy2- oder Cy3-gekoppelten sekundären Antikörpers, der gleichfalls in WB-Puffer verdünnt worden war, 1 Stunde bei RT im Dunkeln auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Danach wurden die Zellen 5 mal in WB-Puffer gewaschen und mit Hydromount auf Objektträgern eingebettet. Um CPDs nachzuweisen, wurden die Zellen vor der Antikörperinkubation bei 37°C 20

Minuten in 2M HCl bei 37°C denaturiert und anschließend für 15 Minuten bei RT in 10% BSA in PB inkubiert.

Zur Durchführung einer Doppelfärbung von Proteinen und CPDs wurde zunächst das Protein mit primärem und sekundärem Antikörper markiert. Anschließend wurde die DNA denaturiert und die Markierung der CPDs durchgeführt. Nach dem Blocken wurden die Zellen sowohl mit dem primären Antikörper gegen das zu färbende Protein wie auch gegen die CPDs inkubiert. Die Detektion der fluoreszenzmarkierten Proteine erfolgte mit einem Laser-Konfokal-Mikroskop (Axiovert 200M, Carl Zeiss AG, Oberkochen, BRD) und der zugehörigen Software (Zeiss LSM Image Examiner 510, Carl Zeiss AG, Oberkochen, BRD).

Ansetzen der Paraformaldehyd-Lösung:

1,85 g Paraformaldehyd (3,7%) wurden in 2,5 ml Wasser und 5 Tropfen 1 M NaOH bei 80°C für 2–5 Minuten im Wasserbad gelöst. Anschließend wurde die Lösung mit PBS auf 50 ml aufgefüllt.

3. Ergebnisse

3.1 Der Transkriptionsfaktor IIH (TFIIH) dissoziiert nach Bestrahlung mit UVC-Licht

Der Transkriptionsfaktor IIH ist ein Multiproteinkomplex aus zehn Proteinen, die in zwei Untereinheiten aufgeteilt sind, nämlich in den TFIIH-Kern-Komplex und in den Cdk-aktivierenden Kinasekomplex (CAK; Giglia-Mari *et al.*, 2004; Ranish *et al.*, 2004).

Um Hinweise zu erhalten, aufgrund welcher Veränderungen der TFIIH-Komplex von der Transkription in die Reparatur wechselt, wurde die Zusammensetzung des TFIIH-Komplexes vor und nach UV-Bestrahlung untersucht. Dazu wurden Prä-B Lymphozyten (GM02184) eines gesunden Donors mit 200 J/m^2 UVC-Licht bestrahlt beziehungsweise unbestrahlt als Kontrolle verwendet. 15 Minuten nach der Bestrahlung wurden die Zellen geerntet und lysiert. Das XPB-Protein, eine Komponente des TFIIH-Kern-Komplexes, wurde mit zwei verschiedenen Antikörpern, die gegen unterschiedliche Domänen des XPB-Proteins gerichtet sind, aus dem Zelllysats präzipitiert. Dazu wurden die Antikörper an Protein A Sepharose gekoppelt und mit dem Zelllysats inkubiert. Um die Spezifität der Antikörper zu überprüfen wurde einerseits Protein A Sepharose, an die kein Antikörper gekoppelt war, mit Zelllysats inkubiert und andererseits Protein A Sepharose, an die Antikörper gekoppelt worden waren, nur mit Lysispuffer inkubiert. Die Immunpräzipitationen (IPs) wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Immobilon P-Membran übertragen. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen die Proteine XPB und Cdk7, ein Protein des CAK-Komplexes, inkubiert. Nach der Inkubation mit dem entsprechenden zweiten, HRP-konjugierten Antikörper, wurde der Western Blot mittels ECL entwickelt.

Zur Bestimmung der relativen Menge des XPB- und des Cdk7-Proteins im Gesamtzelllysats wurden $15 \mu\text{g}$ Protein des Zelllysats über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran übertragen. Die Membran wurde analog mit Antikörpern gegen die Proteine XPB und Cdk7 hybridisiert. Zusätzlich wurde die Membran mit einem gegen das PCNA-Protein („proliferating cell nuclear antigen“) gerichteten Antikörper inkubiert. Die Menge des PCNA-Proteins änderte sich unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht, so dass die relative Menge des PCNA-Proteins als interner Standard benutzt werden konnte (Moore *et al.*, 1987).

In Übereinstimmung mit veröffentlichten Daten (Coin *et al.*, 2004) konnte in unbestrahlten Zellen eine signifikante Menge des Cdk7-Proteins mit dem gegen das XPB-Protein gerichteten Antikörper präzipitiert werden. Wurden die Zellen jedoch vor der Ernte für 15 Minuten mit UVC-Licht bestrahlt, war die Menge an ko-präzipitierendem Cdk7-Protein signifikant reduziert. Dabei war es unerheblich, welcher Antikörper verwendet wurde

3. Ergebnisse

(Abbildung 3.1, IP). Wie die Analyse des Gesamtzelllysats zeigt, veränderte sich die Menge der Proteine XPB oder Cdk7 nicht durch die Bestrahlung (Abbildung 3.1, Gesamtzelllysats).

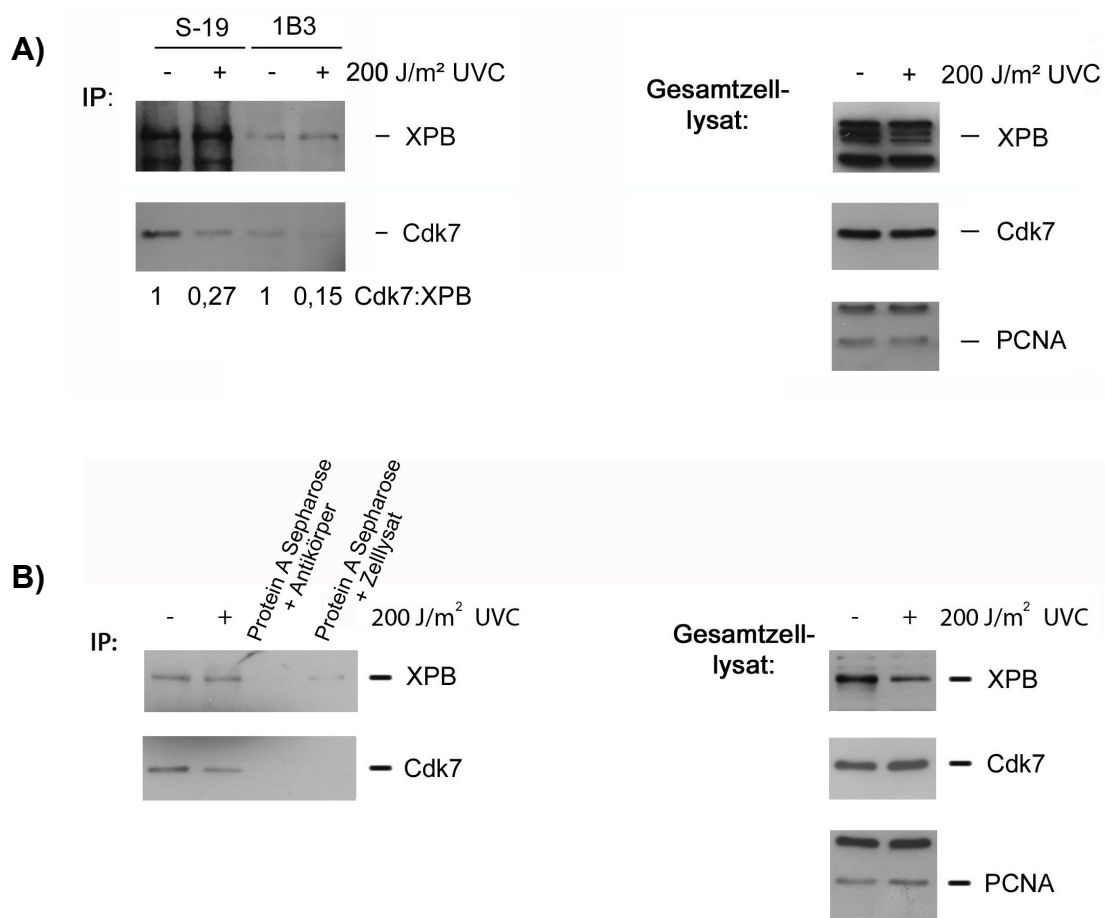


Abbildung 3.1: Die Zusammensetzung des TFIIH-Komplexes verändert sich nach UV-Bestrahlung

Prä-B Lymphozyten der Linie GM02184 wurden mit 200 J/m² UVC-Licht bestrahlt und 15 Minuten nach der Bestrahlung lysiert.

IP: Der TFIIH-Komplex wurde mit den Antikörpern S-19 und 1B3, gekoppelt an Protein A Sepharose, aus 150 µg Protein des Gesamtzelllysats präzipitiert (**A**). Das Zelllysats wurde mit dem Antikörper S-19, gekoppelt an Protein A Sepharose oder mit Protein A Sepharose, an die kein Antikörper gekoppelt worden war, inkubiert (**B**). Außerdem wurde der Antikörper S-19, gekoppelt an Protein A Sepharose, mit Lysispuffer inkubiert (**B**). Die IPs wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran transferiert. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen die Proteine Cdk7 oder XPB hybridisiert. Nach der Inkubation mit dem entsprechenden zweiten Antikörper wurde die Membran mit ECL-Lösung überschichtet und anschließend gegen einen ECL-Hyperfilm exponiert. Die Zahlen geben das Verhältnis des präzipitierten Cdk7-Proteins zum präzipitierten XPB-Protein wieder.

Gesamtzelllysats: 15 µg Protein des Gesamtzelllysats wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran übertragen. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen die Proteine Cdk7, XPB oder PCNA hybridisiert und nach der ECL-Methode entwickelt.

Wurden die an Protein A Sepharose gekoppelten Antikörper nur mit Lysispuffer inkubiert, so waren nach der Hybridisierung der Membran keine Signale in Höhe des XPB- oder Cdk7-

3. Ergebnisse

Proteins zu sehen (Abbildung 3.1B, IP). Wurde die Protein A Sepharose, an die keine Antikörper gekoppelt worden waren, mit Zelllysate inkubiert, so erhielt man zwar ein sehr schwaches Signal für das XPB-Protein, das Cdk7-Protein aber konnte nicht detektiert werden (Abbildung 3.1B).

Wie in Abbildung 3.1 dargestellt, führt die Bestrahlung von Zellen zu einer signifikanten Abnahme der Menge des Cdk7-Proteins, das mit einem gegen das XPB-Protein gerichteten Antikörper präzipitiert werden kann. Im Hinblick auf dieses Ergebnis stellte sich die Frage, ob nur das Cdk7-Protein aus dem TFIIH-Komplex gelöst wird, ob die gesamte CAK-Untereinheit mit den Proteinen Cdk7, Zyklin H und MAT1 abgespalten wird oder ob der TFIIH-Komplex nach UV-Bestrahlung möglicherweise vollständig zerfällt.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden prä-B Lymphozyten der Linie GM02184 mit 200 J/m^2 UVC-Licht bestrahlt und 15 Minuten nach der Bestrahlung geerntet und lysiert. Für die Präzipitation des TFIIH-Komplexes aus dem Zelllysate wurden Antikörper gegen die Proteine XPB, Cdk7 und MAT1, ein weiteres Protein des CAK-Komplexes, eingesetzt. Wie im vorausgegangenen Versuch wurden die IPs über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran transferiert. Die Membran wurde außer mit Antikörpern gegen die Proteine XPB und Cdk7 mit einem Antikörper gegen das Protein Zyklin H, dem dritten Protein des CAK-Komplexes, hybridisiert. Zur Bestimmung der relativen Menge der Proteine XPB, Cdk7 und Zyklin H wurden $15 \mu\text{g}$ Protein des Gesamtzelllysates über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran transferiert, die danach mit Antikörpern gegen die Proteine XPB, Cdk7, Zyklin H und PCNA inkubiert wurde.

Wurde der TFIIH-Komplex mit einem Antikörper gegen die Helikase XPB, einer Komponente des TFIIH-Kerns, gefällt, so wurde aus dem Zelllysate UV-bestrahlter Zellen nicht nur weniger Cdk7-Protein zusammen mit dem XPB-Protein präzipitiert als aus dem Lysate unbehandelter Zellen, sondern auch weniger Zyklin H-Protein (Abbildung 3.2, IP). Präzipitierte man hingegen den TFIIH-Komplex mit einem Antikörper gegen das MAT1-Protein, eine Komponente der CAK-Untereinheit, änderte sich die Menge der ko-präzipitierenden Proteine Cdk7 und Zyklin H hingegen nicht durch eine UV-Bestrahlung (Abbildung 3.2, IP). Führt man die Präzipitation des TFIIH-Komplex mit einem Antikörper gegen das Cdk7-Protein durch, so änderte sich die Menge an ko-präzipitierendem Zyklin H-Protein nicht durch die Bestrahlung. Die Menge an ko-präzipitierendem XPB-Protein war jedoch im Vergleich zu unbestrahlten Zellen signifikant reduziert (Abbildung 3.2, IP).

Die Analyse des Gesamtzelllysates zeigte, dass alle Versuchsansätze eine vergleichbare Menge der TFIIH-Komponenten XPB, Zyklin H und Cdk7 enthielten (Abbildung 3.2, Gesamtzelllysate).

3. Ergebnisse

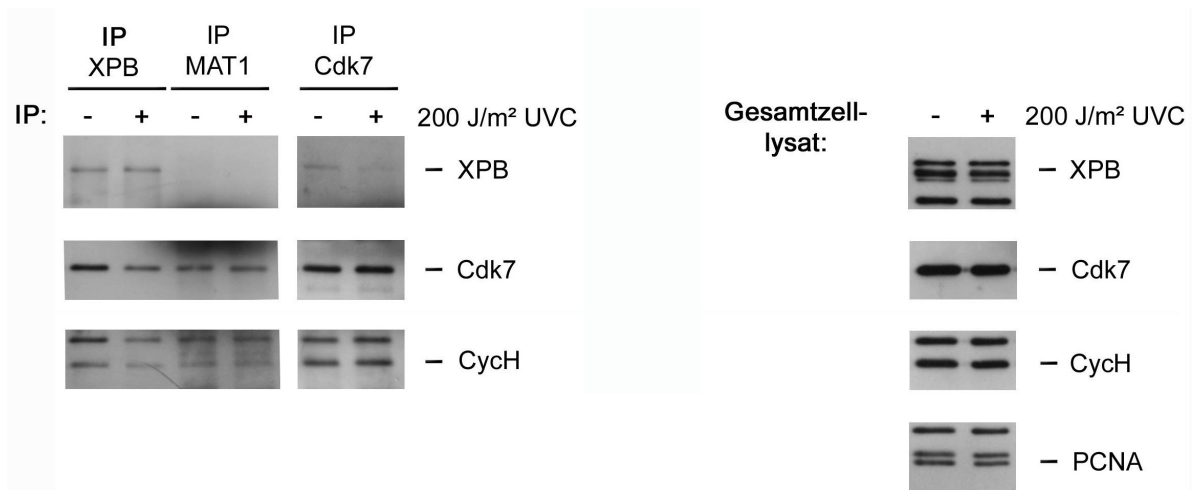


Abbildung 3.2: Die CAK-Untereinheit löst sich nach UV-Bestrahlung als Einheit vom TFIIH-Kern Prä-B Lymphozyten (GM02185) wurden mit 200 J/m² UVC-Licht bestrahlt und 15 Minuten nach der Bestrahlung lysiert.

IP: Der TFIIH-Komplex wurde aus 175 µg Protein des Gesamtzelllysats mit Antikörpern gegen die Proteine XPB, MAT1 und Cdk7 präzipitiert. Die IP wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran übertragen. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen die Proteine XPB, Cdk7 oder Zyklin H hybridisiert und nach der ECL-Methode entwickelt.

Gesamtzelllysat: 15 µg Protein des Gesamtzelllysats wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran transferiert. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen das XPB-, Cdk7-, Zyklin H- oder PCNA-Protein hybridisiert und nach der ECL-Methode entwickelt.

Um sicherzustellen, dass die beobachtete Dissoziation des TFIIH-Komplexes nicht auf eine Besonderheit des Versuchsaufbaus, zum Beispiel der in den Puffern vorhandenen Salzkonzentration, zurück zu führen ist, wurde eine weitere Methode angewandt, um die UV-induzierten Veränderungen im TFIIH-Komplex zu verdeutlichen. Zellen der Linie U2OS, die aus einem Osteosarkom isoliert worden waren, wurden auf Glasplättchen kultiviert und bestrahlt. Diese Zelllinie haftet fest am Untergrund und somit ist der Zellverlust bei den bei dieser Methode anzuwendenden diversen Waschschrinen geringer als bei anderen adhärennten Zelllinien. Zur Bestrahlung wurde das Kulturmedium von den Zellen entfernt und ein Membranfilter mit einem Porendurchmesser von 5 µm wurde vorsichtig auf den Zellen platziert. Durch diesen Filter wurden die Zellen mit 100 J/m² UVC-Licht bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen im ursprünglichen Kulturmedium weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen gewaschen, in Paraformaldehyd fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen auf den Glasplättchen zuerst mit einem Antikörper gegen die Proteine XPB oder Cdk7 inkubiert und danach mit einem zweiten Antikörper, der mit einem fluoreszierenden Farbstoff konjugiert war. Zur Markierung der UV-induzierten CPDs wurden die Zellen in 2M HCl 20 Minuten bei 37°C denaturiert und anschließend 30 Minuten in 10% BSA inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut mit Antikörpern gegen die Proteine XPB oder Cdk7 und gleichzeitig mit einem Antikörper gegen die CPDs inkubiert sowie anschließend mit einem zweiten, an

3. Ergebnisse

einen fluoreszierenden Farbstoff gekoppelten, Antikörper. Die so fluoreszenzmarkierten Proteine wurden unter einem Laser-Konfokal-Mikroskop detektiert und mit der zugehörigen Software dokumentiert.

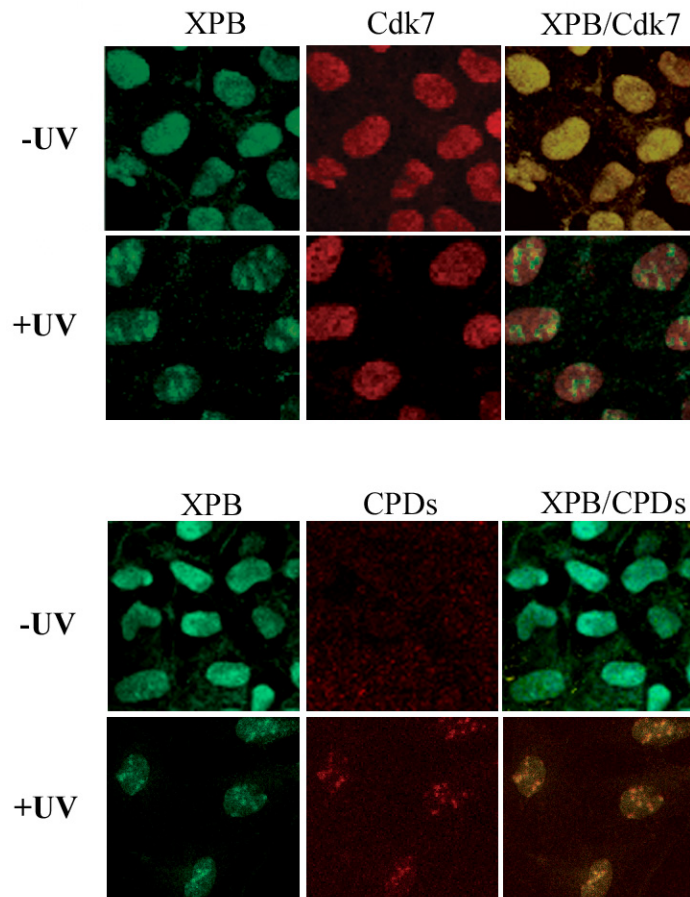


Abbildung 3.3: Das XPB-Protein akkumuliert im Gegensatz zum Cdk7-Protein an UV-induzierten CPDs

Zellen der Linie U2OS wurden auf Glasplättchen kultiviert, mit 100 J/m^2 UVC-Licht durch einen Membranfilter mit $5 \mu\text{m}$ Porengröße bestrahlt und 30 Minuten nach der Bestrahlung in Paraformaldehyd fixiert. Nach der Permeabilisierung in Triton X-100 wurden die Zellen 1,5 Stunden mit Antikörpern gegen die Proteine XPB oder Cdk7 inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und mit dem entsprechenden zweiten, fluoreszenzmarkierten Antikörper eine Stunde im Dunkeln hybridisiert. Zur Detektion der UV-induzierten CPDs wurden die Zellen 20 Minuten bei 37°C in 2 M HCl denaturiert und anschließend 30 Minuten in 10% BSA inkubiert. Die Zellen wurden dann 1,5 Stunden mit Antikörpern gegen das XPB-, das Cdk7-Protein oder gegen CPDs inkubiert. Anschließend wurden sie mit dem zweiten, fluoreszenzmarkierten Antikörper eine Stunde im Dunkeln hybridisiert. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte unter einem Laser-Konfokal-Mikroskop und wurde mit der zugehörigen Software dokumentiert.

Wurden die Zellen mit Antikörpern gegen das XPB-Protein und gegen CPDs inkubiert, konnte man eine Akkumulation des XPB-Proteins an den CPDs feststellen. Die Fluoreszenz

des XPB-Proteins ist hier grün, die Fluoreszenz der CPDs rot wieder gegeben. Überlagerten sich die beiden Fluoreszenzen, nimmt man ein gelbes Signal wahr. Färbte man dagegen das CDK7-Protein (grün) zusammen mit den CPDs (rot) oder dem XPB-Protein (rot), konnte nach UV-Bestrahlung weder eine Akkumulation des CDK7-Proteins an den DNA-Schäden festgestellt werden, noch überlagerten sich die Fluoreszenzsignale des Cdk7- und des XPB-Proteins (Abbildung 3.3).

3.2 Charakterisierung der UV-abhängigen Dissoziation des TFIIH-Komplexes

3.2.1 Der CAK-Komplex wird nach der Dissoziation vom TFIIH-Kern nicht vom Proteasom degradiert

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass nach UV-Bestrahlung weniger Cdk7- und Zyklin H-Protein zusammen mit dem XPB-Protein aus dem Gesamtzelllysat bestrahlter Zellen der Linie GM02184 präzipitiert werden konnte als aus dem Lysat unbestrahlter Zellen. Um sicherzugehen, dass die Proteine der CAK-Untereinheit nach der Dissoziation von TFIIH nicht vom Proteasom abgebaut werden, wurden GM02184-Zellen vier Stunden mit dem Proteasomeninhibitor MG132 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Dosis von 200 J/m^2 UVC-Licht bestrahlt und 30 Minuten nach der UV-Bestrahlung lysiert. Der TFIIH-Komplex wurde mit einem Antikörper gegen die Helikase XPB aus dem Zelllysat präzipitiert, die IP über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran übertragen. Zur Überprüfung der Menge an XPB- und Cdk7-Protein wurde ein Aliquot des Gesamtzelllysats ebenfalls über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran übertragen. Diese Membran wurde mit Antikörpern gegen die Proteine XPB, Cdk7 und PCNA und zur Überprüfung der Wirkung des Proteasomeninhibitors zusätzlich mit einem Antikörper gegen das p53-Protein hybridisiert.

Abbildung 3.4 (IP) zeigt, dass die mit dem XPB-Protein präzipitierte Menge an Cdk7-Protein nach Bestrahlung abnahm, unabhängig davon ob die Zellen mit dem Proteasomeninhibitor behandelt worden waren. Die Gesamtmenge an XPB- und Cdk7-Protein blieb hingegen unter den Versuchsbedingungen konstant, während die Menge des p53-Proteins in Gegenwart des Proteasomeninhibitors zunahm. Unter den gewählten Versuchsbedingungen war keine Mengenzunahme des p53-Proteins nach Bestrahlung zu beobachten obwohl UV-Strahlung normalerweise eine Akkumulation des p53-Proteins induziert (Abbildung 3.4, Gesamtzelllysat; Übersicht in: Blattner *et al.*, 1994; Herrlich *et al.*, 1994).



Abbildung 3.4: Die Dissoziation des TFIIH-Komplexes nach UV-Bestrahlung ist unabhängig von proteasomaler Degradation.

Prä-B Lymphozyten der Linie GM02184 wurden bei 37°C vier Stunden mit 10 µM des Proteasomeninhibitors MG132 inkubiert, anschließend mit 200 J/m² UVC-Licht bestrahlt und 30 Minuten nach der Bestrahlung lysiert.

IP: Der TFIIH-Komplex wurde aus 150 µg Protein des Gesamtzelllysats mit einem Antikörper gegen das XPB-Protein präzipitiert und wie in der Abbildung 3.3 beschrieben prozessiert.

Gesamtzelllysat: 15 µg Protein des Lysats wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran transferiert. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen die Proteine XPB, Cdk7, p53 oder PCNA hybridisiert.

3.2.2 Dosisabhängigkeit der Dissoziation von TFIIH nach UVC-Bestrahlung

Zur Durchführung der Experimente wurde bisher eine relativ hohe Dosis an UVC-Strahlung von 100 - 200 J/m² verwendet. Um festzustellen, ob die Dissoziation des TFIIH-Komplexes auch in einem niedrigeren Dosisbereich zu beobachten ist, wurden Prä-B Lymphozyten der Linie GM02184 mit 10, 60, 100 und 200 J/m² UVC-Licht bestrahlt und 30 Minuten nach der Bestrahlung lysiert. Der TFIIH-Komplex wurde mittels eines Antikörpers gegen das XPB-Protein aus dem Gesamtzelllysat bestrahlter und unbestrahlter Zellen gefällt, die IPs über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Immobilon P-Membran übertragen und mit Antikörpern gegen die Proteine XPB und Cdk7 hybridisiert. Für die Bestimmung der relativen Gesamtmenge der Proteine XPB und Cdk7 wurde das Gesamtzelllysat gleichfalls über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Immobilon P-Membran transferiert und die Membran mit Antikörpern gegen die Proteine XPB, Cdk7 oder PCNA hybridisiert.

Wie in Abbildung 3.5 (IP) zu sehen ist, führte bereits eine Dosis von 10 J/m² UVC-Licht zu einer Abnahme der Menge des Cdk7-Proteins, welches zusammen mit dem XPB-Protein aus dem Zelllysat präzipitiert werden konnte. Eine Erhöhung der Strahlendosis führte reziprok zu einer Abnahme der Menge an Cdk7-Protein, welches mit dem XPB-Protein ko-präzipitierte. Die Gesamtmenge an den Proteinen Cdk7 und XPB blieb in der Zelle jedoch konstant

(Abbildung 3.5, Gesamtzelllysate). Die gleichbleibende Intensität der PCNA-Proteinbanden in allen Proben macht deutlich, dass für jeden Ansatz die gleiche Proteinmenge auf das Gel aufgetragen wurde (Abbildung 3.5, Gesamtzelllysate).

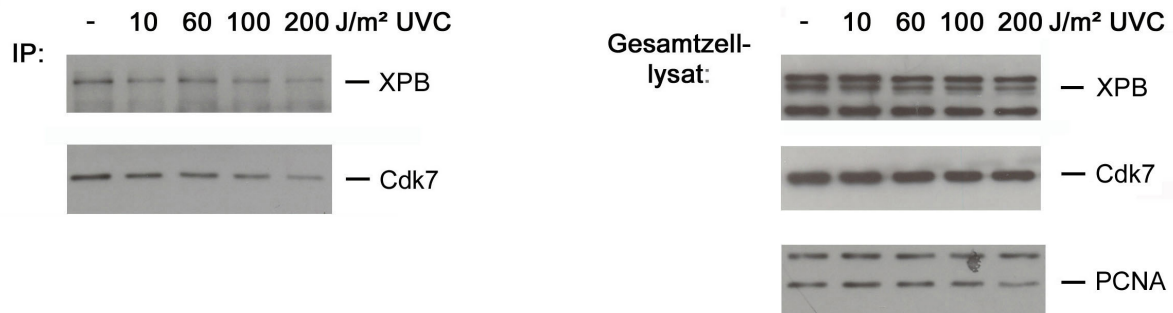


Abbildung 3.5: Abhängigkeit der Dissoziation des TFIIH-Komplexes von der Strahlendosis.

Prä-B Lymphozyten (GM02184) wurden mit den angegebenen Dosen UVC-Licht bestrahlt und 30 Minuten nach der Bestrahlung lysiert.

IP: Der TFIIH-Komplex wurde aus 150 µg Protein des Gesamtzelllysats mit einem Antikörper gegen das XPB-Protein präzipitiert und wie im Text zu Abbildung 3.3 beschrieben prozessiert.

Gesamtzelllysate: 15 µg des Gesamtzelllysats wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran transferiert. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen die Proteine XPB, Cdk7 oder PCNA hybridisiert.

Die Untersuchung zur Dosisabhängigkeit der UV-induzierten Dissoziation von TFIIH zeigte, dass bereits eine Dosis UV-Strahlung von 10 J/m² UVC zur Veränderung eines Teils des TFIIH-Komplexes in der Zelle führt. Allerdings ist der Unterschied in der Menge des mit dem XPB-Protein ko-präzipitierenden Cdk7-Proteins zwischen unbestrahlten und mit 10 oder auch 60 J/m² UVC-Licht bestrahlten Zellen sehr gering. Aus diesem Grund wurde für die folgenden Experimente weiterhin eine Dosis von mehr als 100 J/m² UVC-Licht angewandt.

3.2.3 Kinetik der Dissoziation des TFIIH-Komplexes

Mit Hilfe einer kinetischen Analyse wurde der genaue Zeitpunkt der Dissoziation des TFIIH-Komplexes bestimmt. Die Zellen wurden dazu mit 300 J/m² UVC-Licht bestrahlt und 3, 6, 8, 9 oder 10 Minuten nach der Bestrahlung geerntet. Der TFIIH-Komplex wurde mit einem Antikörper gegen die Helikase XPB aus dem Gesamtzelllysate präzipitiert, die IP über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran übertragen. Die Membran wurde anschließend mit Antikörpern gegen die Proteine XPB oder Cdk7 inkubiert. Zur Bestimmung der relativen Menge des XPB- und des Cdk7-Proteins wurden gleichfalls Aliquots der Gesamtzelllysate über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Immobilon P-Membran übertragen

3. Ergebnisse

und die Membran mit Antikörpern gegen die Proteine XPB, Cdk7 oder PCNA inkubiert. Bereits drei Minuten nach Bestrahlung mit UVC-Licht wurde deutlich weniger Cdk7-Protein zusammen mit dem XPB-Protein aus dem Zelllysate präzipitiert als aus dem Lysat unbestrahlter Zellen. 10 Minuten nach UV-Bestrahlung wurde nahezu kein Cdk7-Protein mehr mit dem XPB-Protein kopräzipitiert (Abbildung 3.6, IP). Die Gesamtmenge an XPB- und Cdk7-Protein blieb hingegen unter den gewählten Versuchsbedingungen konstant (Abbildung 3.6, Gesamtzelllysate).

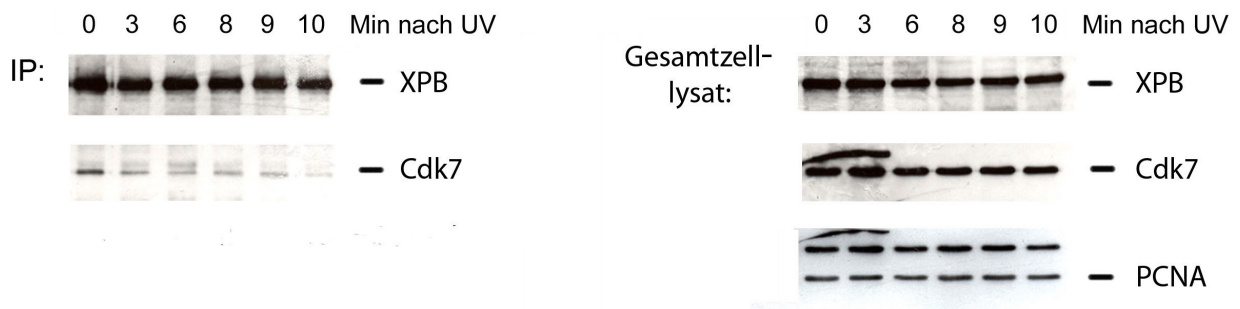


Abbildung 3.6: Kinetik der TFIIH-Dissoziation

Prä-B Lymphozyten der Linie GM02184 wurden mit 300 J/m^2 UVC-Licht bestrahlt und 3, 6, 8, 9 oder 10 Minuten nach der Bestrahlung geerntet und lysiert.

IP: Der TFIIH-Komplex wurde mit einem Antikörper gegen die Helikase XPB aus $150 \mu\text{g}$ Protein des Zelllysats präzipitiert und wie im Text zur Abbildung 3.3 beschrieben prozessiert.

Gesamtzelllysate: $15 \mu\text{g}$ Protein des Gesamtzelllysats wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran transferiert. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen die Proteine XPB, Cdk7 oder PCNA.

Nach einer DNA-Schädigung durch UV-Strahlung finden in der Zelle weitläufige Veränderungen statt. So werden DNA-anhängige Prozesse wie Replikation und Transkription gestoppt und die UV-induzierten Schäden repariert. Nach der Reparatur der Schäden stellt sich in der Regel in der Zelle wieder der Ausgangszustand ein und alle unterbrochenen Vorgänge werden reaktiviert. Es stellte sich deshalb die Frage, ob sich die beiden Untereinheiten des TFIIH-Komplexes zu einem späteren Zeitpunkt nach der UV-Bestrahlung, zum Beispiel nach der Rückkehr in den Ausgangszustand, wieder reassoziieren. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden Zellen der Linie GM02184 mit 200 J/m^2 UVC-Licht bestrahlt und 6 Stunden, 24 Stunden oder 30 Stunden nach Bestrahlung geerntet. Der TFIIH-Komplex wurde mit einem Antikörper gegen das XPB-Protein aus dem Gesamtzelllysate präzipitiert, die IPs über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran übertragen. Die Proteine XPB oder Cdk7 wurden anschließend durch Hybridisierung der Membran mit entsprechenden Antikörpern detektiert. Zur Bestimmung der relativen Menge der Proteine XPB und Cdk7 im Gesamtzelllysate wurden $15 \mu\text{g}$ über SDS-

3. Ergebnisse

PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran übertragen. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen die Proteine XPB, Cdk7 oder PCNA hybridisiert.

Wie Abbildung 3.7 (IP) zeigt war selbst 30 Stunden nach Bestrahlung die Menge an Cdk7-Protein, welche zusammen mit dem XPB-Protein aus dem Lysat der bestrahlten Zellen präzipitiert werden konnte, geringer als aus dem Lysat unbestrahlter Zellen. Die beiden Untereinheiten von TFIIH waren folglich auch 30 Stunden nach UV-Bestrahlung nicht reassoziert. Aus Abbildung 3.7 (Gesamtzelllysate) ist ersichtlich, dass alle Versuchsansätze eine vergleichbare Gesamtmenge der TFIIH-Proteine XPB und Cdk7 enthielten.

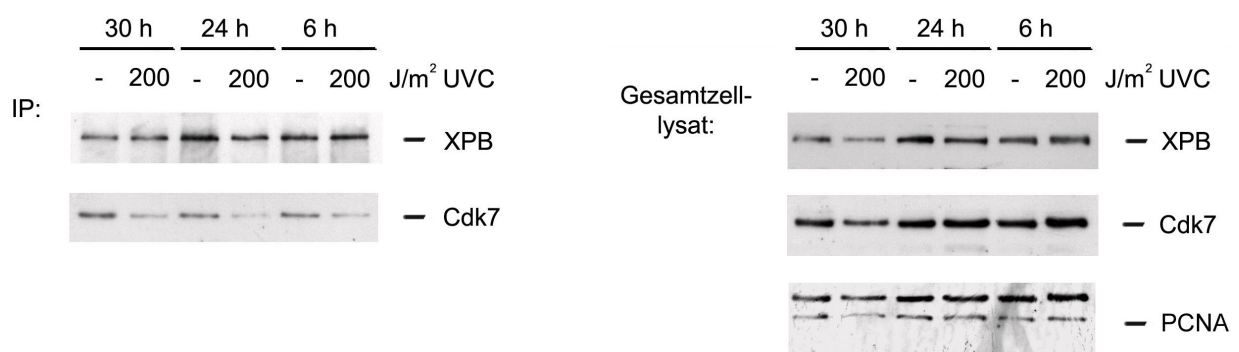


Abbildung 3.7: Langzeitkinetik der Dissoziation des TFIIH-Komplexes nach UVC-Bestrahlung

Zellen der Linie GM02184 wurden mit 200 J/m² UVC-Licht bestrahlt und 6, 24 oder 30 Stunden nach der Bestrahlung geerntet und lysiert.

IP: Der TFIIH-Komplex wurde mit einem Antikörper gegen das XPB-Protein aus 200 µg Protein des Gesamtzelllysats präzipitiert, und wie im Text zu Abbildung 3.3 beschrieben prozessiert.

Gesamtzelllysate: 15 µg Protein des Gesamtzelllysats wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran transferiert. Die Detektion erfolgte durch Hybridisierung der Membran mit Antikörpern gegen die Proteine XPB, Cdk7 oder PCNA.

3.2.4 Der Einfluss von UVA- und UVB-Strahlung auf die Zusammensetzung des TFIIH-Komplexes

Die Dissoziation des TFIIH-Komplexes wurde zuerst nach Bestrahlung mit UVC-Licht nachgewiesen. UVC-Strahlung wird in unserer Atmosphäre jedoch zum größten Teil von der Ozonschicht absorbiert und ist infolgedessen kein Teil der normalen Strahlenbelastung des Menschen. Die auf der Erdoberfläche auftreffende Strahlung besteht vorwiegend aus UVA- und UVB-Licht. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob die Einwirkung physiologischer UVA- und UVB-Strahlung analog zur UVC-Strahlung auch zur Dissoziation des TFIIH-Komplexes führen kann.

Zur Klärung dieser Frage wurden Zellen der Linie GM02184 mit 500, 2500 und 5000 J/m² UVA-Licht und mit 250, 1000 und 2000 J/m² UVB-Licht bestrahlt. Zur Kontrolle wurden

3. Ergebnisse

unbestrahlte und mit 200 J/m^2 UVC-Licht bestrahlte Zellen mitgeführt. 30 Minuten nach der Bestrahlung wurden die Zellen gesammelt und lysiert. Mittels eines Antikörpers gegen das XPB-Protein wurde der TFIIH-Komplex aus dem Gesamtzelllysate gefällt, die IP über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Immobilon P-Membran transferiert und die Membran mit Antikörpern gegen die Proteine XPB und Cdk7 hybridisiert. Zur Bestimmung der relativen Menge an XPB- und Cdk7-Protein wurden $15 \mu\text{g}$ Protein der Gesamtzelllysate über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Immobilon P-Membran übertragen und die Membran mit Antikörpern gegen die Proteine XPB, Cdk7 und PCNA inkubiert.

Aus Abbildung 3.8 (IP) geht hervor, dass eine Dosis von 500 J/m^2 UVA-Licht die Dissoziation des TFIIH-Komplexes nicht induzieren konnte. Wurden die Zellen jedoch mit 2500 oder 5000 J/m^2 UVA-Licht bestrahlt, so wurde im Vergleich zu unbestrahlten Zellen weniger Cdk7-Protein zusammen mit dem XPB-Protein aus dem Gesamtzelllysate präzipitiert. Bei Bestrahlung mit UVB-Licht war hingegen schon eine Dosis von 50 J/m^2 ausreichend, um eine Dissoziation des TFIIH-Komplexes zu bewirken.

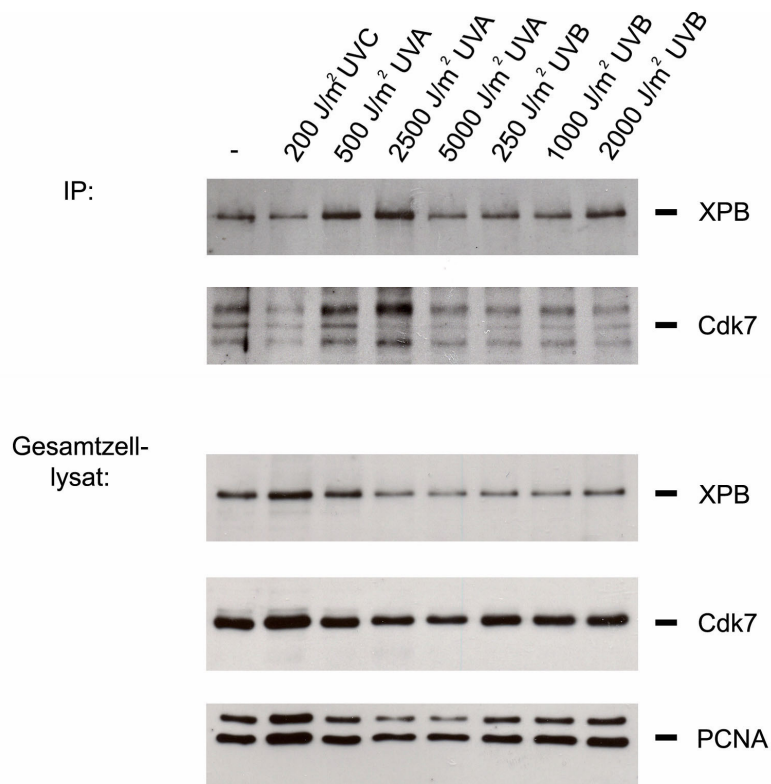


Abbildung 3.8: Der TFIIH-Komplex dissoziiert nach Bestrahlung mit UVA-, UVB- und UVC-Licht Prä-B Lymphozyten der Linie GM02184 wurden mit den angegebenen Dosen und Arten UV-Licht bestrahlt und 30 Minuten nach Bestrahlung lysiert.

IP: Der TFIIH-Komplex wurde mit einem Antikörper gegen die Helikase XPB aus $175 \mu\text{g}$ Protein des Gesamtzelllysats präzipitiert. Die IP wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran übertragen. Die Membran wurde anschließend mit Antikörpern gegen die Proteine XPB oder Cdk7 hybridisiert.

Gesamtzelllysate: $15 \mu\text{g}$ des Lysats wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran übertragen. Die Membran wurde anschließend mit Antikörpern gegen die Proteine XPB, Cdk7 oder PCNA hybridisiert.

Wie bereits gezeigt führte auch eine Bestrahlung mit 200 J/m² UVC-Licht zur Reduktion der Menge an Cdk7-Protein welches mit dem XPB-Protein kopräzipitiert (Abbildung 3.8, IP). Die relative Menge der TFIIH-Proteine XPB und Cdk7 blieb auch in dieser Serie an Experimenten in allen Ansätzen konstant (Abbildung 3.8, Gesamtzelllysate).

Dieses Experiment zeigt, dass nicht nur UVC-Licht, sondern auch UVA- und UVB-Strahlung bereits bei physiologischen Strahlendosen zur Dissoziation des TFIIH-Komplexes führen. Für die folgenden Versuche wurde trotzdem weiterhin UVC-Strahlung verwendet, weil die Anwendung dieser Strahlungsart im Laboralltag leichter durchzuführen war.

3.2.5 Die Wirkung von Cisplatin auf den TFIIH-Komplex

Cisplatin ist eine Chemikalie, welche an DNA bindet und Strangvernetzungen innerhalb eines Stranges und auch zwischen benachbarten Strängen in der DNA-Doppelhelix induziert (Berners-Price *et al.*, 2003; Monjardet-Bas *et al.* 2002; Eastman, 1985). Aufgrund dieser Vernetzung kommt es im Zuge der DNA-Replikation oder -Transkription zum Bruch der DNA, was die Einleitung von Apoptose in der betreffenden Zelle bewirken kann. Diese Eigenschaft wirkt dem Zellwachstum und der Neubildung von Gewebe entgegen, weshalb es zum Beispiel in der Tumortherapie eingesetzt wird. Durch Cisplatin induzierte Strangvernetzungen sind, wie auch Photoprodukte, Substrate der NER (Wang *et al.*, 2004a; Wang *et al.*, 2004b).

Um die Versatilität der Dissoziation des TFIIH-Komplexes in Gegenwart von weiteren Substraten der NER zu untersuchen, wurden Zellen der Linie GM02184 16 Stunden mit 10 µM Cisplatin oder dem Lösungsmittel (DMSO) behandelt. Danach wurden die Zellen mit 200 J/m² UVC-Licht bestrahlt oder, zur Kontrolle der Dissoziation, unbestrahlt weitergeführt. 15 Minuten nach der Bestrahlung wurden alle Zellen lysiert und der TFIIH-Komplex mittels eines Antikörpers gegen das XPB-Protein aus dem Zelllysate präzipitiert. Die IPs wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Immobilon P-Membran übertragen und die Membran mit Antikörpern gegen die Proteine XPB und Cdk7 hybridisiert. Zur Überprüfung der relativen Menge der Proteine XPB und Cdk7 wurden Aliquots der Zelllysate ebenfalls über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Immobilon P-Membran übertragen und die Membran mit Antikörpern gegen die Proteine XPB, Cdk7 und PCNA inkubiert. Um die Funktionalität von Cisplatin zu überprüfen, wurden die Membranen zusätzlich mit einem Antikörper gegen das p53-Protein inkubiert.

Erstaunlicherweise konnte aus dem Lysat mit Cisplatin oder mit DMSO behandelter Zellen sowie un behandelter Zellen eine vergleichbare Menge an Cdk7-Protein zusammen mit dem XPB-Protein aus dem Gesamtzelllysate präzipitiert werden. Bestrahlte man allerdings mit

3. Ergebnisse

Cisplatin behandelte Zellen mit UVC-Licht, nahm die mit dem XPB-Protein aus dem Zelllysate gefällte Menge an Cdk7-Protein im Vergleich zu unbestrahlten Zellen ab. Aus dem Lysat bestrahlter mit DMSO behandelter Zellen sowie nicht mit Cisplatin oder DMSO behandelte Kontrollzellen präzipitierte ebenfalls eine signifikant geringere Menge an Cdk7-Protein mit dem XPB-Protein als aus dem Lysat unbestrahlter Zellen (Abbildung 3.9, IP).

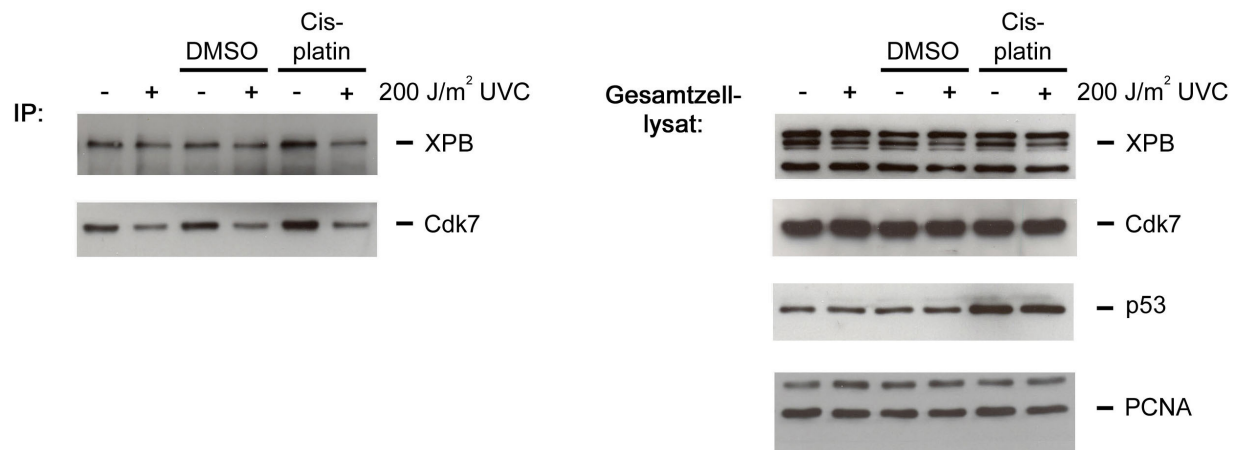


Abbildung 3.9: Cisplatin induziert keine Dissoziation des TFIIH-Komplexes.

Prä-B Lymphozyten der Linie GM02184 wurden mit 10 μ M Cisplatin behandelt. Als Kontrolle wurden unbehandelte und mit DMSO behandelte Zellen mitgeführt. 16 Stunden nach der Zugabe von Cisplatin wurden die Zellen mit 200 J/m² UVC-Licht bestrahlt und nach weiteren 15 Minuten lysiert.

IP: Der TFIIH-Komplex wurde mit einem Antikörper gegen das XPB-Protein aus 150 μ g Protein des Zelllysats gefällt. Die IP wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran transferiert. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen die Proteine Cdk7 oder XPB hybridisiert.

Gesamtzelllysate: 15 μ g Protein des Gesamtzelllysats wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran übertragen. Die Membran wurde anschließend mit Antikörpern gegen die Proteine XPB, Cdk7, p53 oder PCNA inkubiert.

Die Zunahme der Menge des p53-Proteins in Cisplatin-behandelten Zellen zeigt deutlich, dass die Behandlung mit Cisplatin zur Schädigung der DNA geführt hat. (Abbildung 3.9, Gesamtzelllysate). Die Analyse der Gesamtzelllysate zeigt außerdem, dass in den Ansätzen eine vergleichbare Gesamtmenge der TFIIH-Komponenten Cdk7 und XPB enthalten war (Abbildung 3.9, Gesamtzelllysate).

3.2.6 γ -Strahlung induziert selbst in hohen Dosen nur die Dissoziation eines geringen Teils des zellulären TFIIH-Komplexes

Eine Behandlung von Zellen mit γ -Strahlung führt zu einer Reihe von Schäden, unter denen die Bildung von Doppelstrangbrüchen in der DNA physiologisch am relevantesten ist. Zwar ist eine Beteiligung von TFIIH oder anderen Enzymen der NER-Maschinerie an der Doppelstrangbruchreparatur eher unwahrscheinlich, die Ergebnisse nach Bestrahlung von Zellen mit UVA- Licht bzw. nach Behandlung mit Cisplatin zeigten aber, dass die Dissoziation des TFIIH-Komplexes zumindest nicht ausschließlich mit der Initiierung der NER durch bekannte Substrate gleichzusetzen ist. Außerdem gibt es Untersuchungen, nach denen ionisierende Strahlung häufig ähnliche Signalwege aktiviert wie ultraviolette Strahlung. Die Aktivierung dieser Signalwege erfolgt meist nicht durch den eigentlichen DNA-Schaden, sondern über Wechselwirkungen der Strahlung mit anderen zellulären Makromolekülen (Übersicht in: Shackelford *et al.*, 1999).

Um einen besseren Überblick zu gewinnen, welche Stimuli die Dissoziation des TFIIH-Komplexes bewirken und ob möglicherweise andere Faktoren als die Schädigung der DNA dabei eine Rolle spielen könnten, wurde untersucht, ob die Dissoziation des TFIIH-Komplexes auch durch ionisierende Strahlung induziert werden kann.

Dazu wurden Zellen der Linie GM02184 einer Strahlendosis von 5 oder 50 Gray γ -Strahlung ausgesetzt. Mit 200 J/m² UVC-Licht bestrahlte Zellen wurden als Positivkontrolle mitgeführt. Alle Zellen wurden 30 Minuten nach Bestrahlung geerntet und lysiert. Der TFIIH-Komplex wurde mit einem Antikörper gegen das XPB-Protein präzipitiert, die IP über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Immobilon P-Membran übertragen und die Membran mit Antikörpern gegen die Proteine XPB oder Cdk7 hybridisiert. Zur Überprüfung der relativen Menge der TFIIH-Faktoren XPB und Cdk7 wurden Aliquots des Gesamtzelllysats der verschiedenen Versuchsansätze ebenfalls über SDS-PAGE aufgetrennt und analog prozessiert.

Wie in Abbildung 3.10 (IP) dargestellt ist, führte eine Dosis von 5 Gray dabei nicht zu einer Mengenabnahme des zusammen mit dem XPB-Protein ko-präzipitierten Cdk7-Proteins im Vergleich zu der ko-präzipitierten Menge an Cdk7-Protein aus dem Lysat unbestrahlter Zellen. Auch eine Dosis von 50 Gray induzierte nur eine leichte Abnahme der Menge an ko-präzipitiertem Cdk7-Protein, während die Bestrahlung mit 200 J/m² UVC-Licht zu einer nahezu kompletten Dissoziation führte. Die Analyse der Zellysate zeigte, dass in allen vier Ansätzen eine vergleichbare Menge an XPB- und Cdk7-Protein enthalten war (Abbildung 3.10, Gesamtzelllysate).

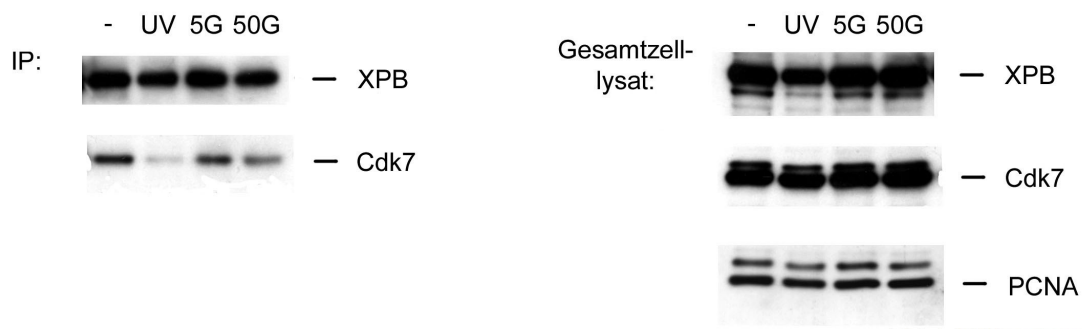


Abbildung 3.10: Selbst nach hohen Dosen ionisierender Strahlung dissoziiert nur ein geringer Anteil des TFIIH-Komplexes in der Zelle

Zellen der Linie GM02184 wurden mit 200 J/m^2 UVC-Licht (UV), 5 oder 50 Gray γ -Strahlung (G) bestrahlt und 30 Minuten nach Bestrahlung geerntet und lysiert.

IP: Der TFIIH-Komplex wurde aus $150 \mu\text{g}$ Protein des Gesamtzelllysats mit einem an Protein A Sepharose gekoppelten Antikörper gegen das XPB-Protein präzipitiert. Die IP wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran übertragen. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen das XPB- und das Cdk7-Protein inkubiert.

Gesamtzelllysat: $15 \mu\text{g}$ Protein der Gesamtzelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran übertragen. Die Membran wurde anschließend mit Antikörpern gegen die Proteine XPB, Cdk7 und PCNA hybridisiert.

3.2.7 Auch oxidativer Stress führt zur Dissoziation des TFIIH-62Komplexes

Wie im Rahmen dieser Doktorarbeit bereits festgestellt wurde, führt auch eine Bestrahlung mit UVA-Licht zur Dissoziation des TFIIH-Komplexes. Im Gegensatz zu UVB- und UVC-Strahlung entstehen durch UVA-Strahlung vorrangig Radikale, die zu oxidativen Basenveränderungen in der DNA, wie 2'-Deoxyguanosin, führen (Ravanat *et al.*, 2001). Vor diesem Hintergrund sollte untersucht werden, ob die Dissoziation von TFIIH neben den Photoprodukten auch durch freie Radikale induziert werden kann. Um diese Frage zu beantworten wurden die Zellen mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) behandelt. H_2O_2 dissoziiert in wässriger Lösung und bildet reaktive Sauerstoffradikale, welche die DNA oxidieren. Um sicherzustellen, dass eine eventuelle Dissoziation des TFIIH-Komplexes nach Behandlung von Zellen mit H_2O_2 auch wirklich auf die Bildung von Radikalen zurück zu führen ist und nicht auf andere adverse Reaktionen, wurde ein Teil der Ansätze zusätzlich mit Glutathion behandelt. Glutathion wirkt als „Radikalfänger“, das heißt, es bindet die Radikale und reduziert dadurch die Konzentration an freien Radikalen in der Zelle.

Um die Wirkung freier Radikale auf die Zusammensetzung des TFIIH-Komplexes zu untersuchen, wurden Zellen der Linie GM02184 für 1 Stunde mit $3 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ kultiviert. Zum Nachweis, dass die Wirkung von H_2O_2 auch tatsächlich auf die Bildung von Radikalen zurück geht, wurde ein Teil der Ansätze zuerst 1 Stunde mit 40 mM Glutathion und anschließend 1 Stunde mit $3 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ inkubiert. Der TFIIH-Komplex wurde aus allen Ansätzen mit einem

3. Ergebnisse

Antikörper gegen die Helikase XPB präzipitiert, die IPs mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Immobilon P-Membran übertragen und die Membran mit Antikörpern gegen die Proteine Cdk7 oder XPB hybridisiert. Zur Überprüfung der relativen Menge der TFIIH-Komponenten XPB und Cdk7 unter diesen Versuchsbedingungen wurden Aliquots der Gesamtzelllysate ebenfalls über SDS-PAGE aufgetrennt und analog prozessiert. Eine weitere Membran mit Proben der Gesamtzelllysate wurde mit Antikörpern gegen eine phosphorylierte Form des GSK3 β -Proteins (phospho-GSK3 β) und gegen PCNA hybridisiert. Nach der Entwicklung des Western Blots wurden die an die Membran gebundenen Antikörper entfernt und die Membran mit einem gegen das GSK3 β -Protein gerichteten Antikörper hybridisiert. Dies ermöglichte die anschließende Bestimmung der Gesamtmenge an GSK3 β -Protein.

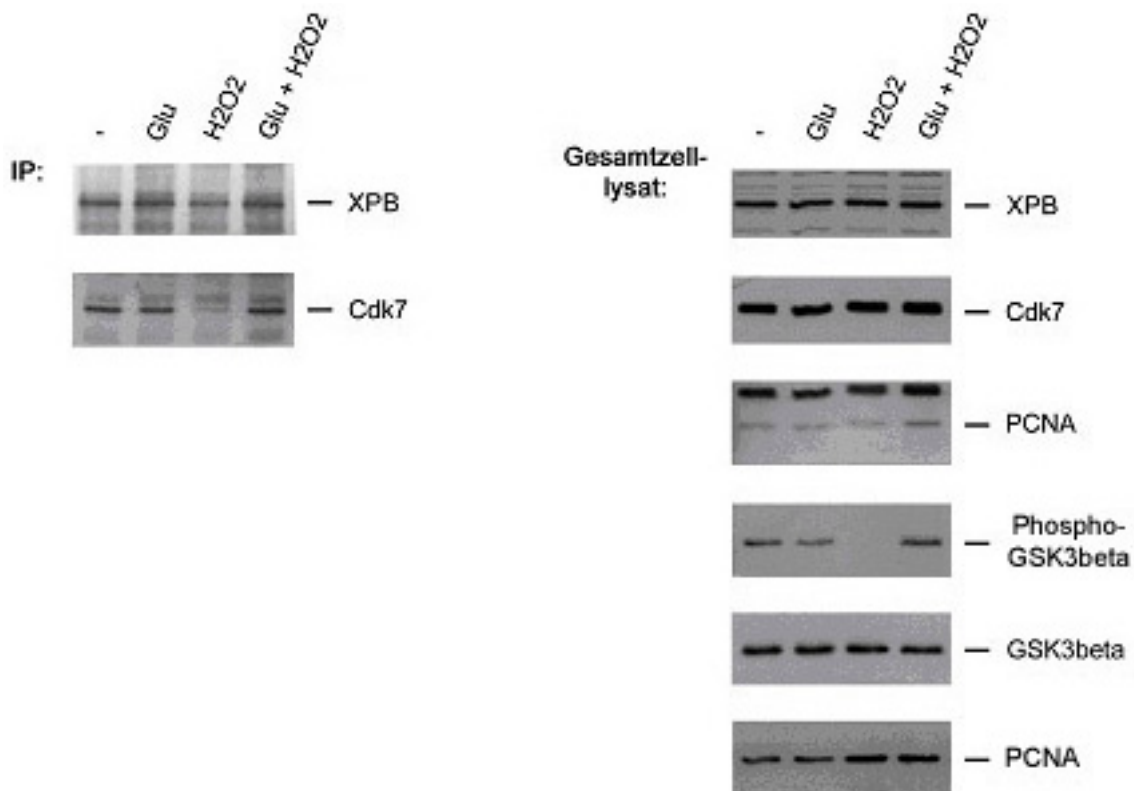


Abbildung 3.11: Die Dissoziation von TFIIH kann durch freie Radikale induziert werden

Prä-B Lymphozyten der Linie GM02184 wurden eine Stunde mit 3 mM H₂O₂ behandelt. Wo es in der Abbildung angegeben ist, wurden die Zellen für 1 Stunde mit 40 mM Glutathion (Glu) vorbehandelt.

IP: Der TFIIH-Komplex wurde mittels eines an Protein A Sepharose gekoppelten Antikörpers gegen das XPB-Protein aus 150 μ g Protein des Gesamtzelllysats präzipitiert. Die IP wurde über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Immobilon P-Membran übertragen und die Membran mit Antikörpern gegen die Proteine XPB oder Cdk7 hybridisiert.

Gesamtzelllysat: 15 μ g Protein des Gesamtzelllysats wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Immobilon P-Membran übertragen und mit Antikörpern gegen die Proteine XPB, Cdk7 oder PCNA hybridisiert. Eine weitere Membran wurde mit Antikörpern gegen die Proteine phospho-GSK3 β oder PCNA inkubiert. Nach der Detektion von phospho-GSK3 β wurde die Membran durch eine 50minütige Inkubation in DDT-haltiger Lösung bei 55°C von den Antikörpern gereinigt und mit einem Antikörper gegen GSK3 β inkubiert.

3. Ergebnisse

Analog zu UV-bestrahlten Zellen wurde aus den mit H_2O_2 behandelten Zellen wesentlich weniger Cdk7-Protein zusammen mit dem XPB-Protein aus dem Gesamtzelllysate gefällt als aus dem Lysat unbehandelter Kontrollen. Inkubierte man die Zellen allerdings vor der Behandlung mit H_2O_2 mit dem Radikalfänger Glutathion, dann wurde aus dem Lysat der mit Glutathion und H_2O_2 behandelten Zellen eine vergleichbare Menge des Cdk7-Proteins zusammen mit dem XPB-Protein präzipitiert wie aus dem Lysat unbehandelter Zellen (Abbildung 3.11, IP). Eine Behandlung der Zellen mit Glutathion alleine veränderte die Menge an mit dem XPB-Protein ko-präzipitierten Cdk7-Protein hingegen nicht. Die Unterschiede in den Mengen an kopräzipitiertem Cdk7-Protein sind nicht auf eine Abnahme der Gesamtmenge des Cdk7-Proteins in der Zelle zurück zu führen, denn in allen Proben konnte eine vergleichbare Gesamtmenge der TFIIH-Komponenten XPB und Cdk7 detektiert werden (Abbildung 3.11, Gesamtzelllysate). In den mit H_2O_2 behandelten Proben war im Vergleich zu den unbehandelten Proben allerdings wesentlich weniger phosphoryliertes GSK3 β -Protein enthalten. Eine Vorinkubation der Zellen mit Glutathion verhinderte jedoch die Abnahme der Phosphorylierung des GSK3 β -Proteins durch H_2O_2 (Abbildung 3.11, Gesamtzelllysate).

Neben Photoprodukten induziert UV-Strahlung auch die Bildung von Radikalen, die bei UVA-Strahlung sogar deutlich überwiegen, bei UVB-Strahlung signifikant zur schädigenden Wirkung beitragen und bei UVC-Strahlung noch immer vorhanden sind. Die Beobachtung, dass Radikale die Dissoziation des TFIIH-Komplexes bewirken, führte deshalb zur Vermutung, dass möglicherweise nicht die Photoprodukte, sondern oxidative Schäden für die Dissoziation von TFIIH nach UV-Bestrahlung verantwortlich sein könnten. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden Zellen vor der Bestrahlung für 1 Stunde mit 40 mM Glutathion inkubiert. Zur Kontrolle der Wirkung von Glutathion wurden Zellen zusätzlich für 1 Stunde mit 3 mM H_2O_2 behandelt. Anschließend wurde der TFIIH-Komplex mit einem Antikörper gegen das XPB-Protein aus 150 μg Protein des Lysates präzipitiert, die IPs mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Immobilon P-Membran übertragen und die Membran mit Antikörpern gegen die Proteine Cdk7 oder XPB hybridisiert. Zur Überprüfung der relativen Menge der TFIIH-Komponenten XPB und Cdk7 unter diesen Versuchsbedingungen wurden Aliquots der Gesamtzelllysate ebenfalls über SDS-PAGE aufgetrennt und analog prozessiert. Eine weitere Membran wurde mit Antikörpern gegen die phosphorylierte Form des GSK3 β -Proteins (phospho-GSK3 β) und gegen PCNA hybridisiert, sowie, nach dem Entfernen des ersten Antikörpers, mit einem gegen das GSK3 β -Protein gerichteten Antikörper.

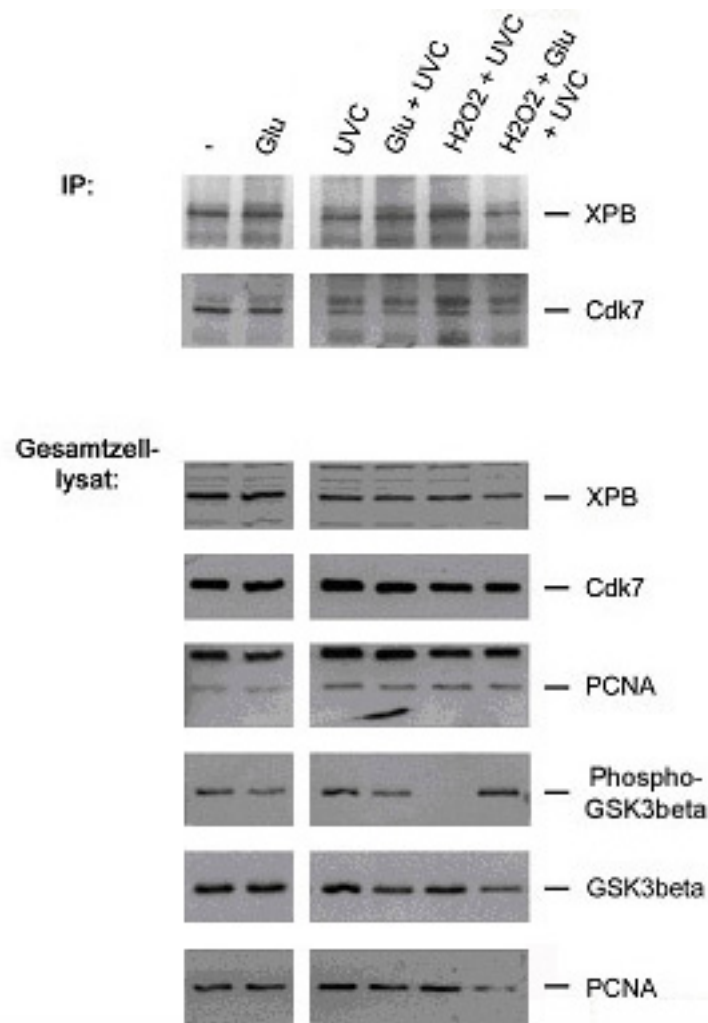


Abbildung 3.12: Glutathion hat keinen Einfluss auf die UVC-induzierte Dissoziation des TFIIH-Komplexes

Prä-B Lymphozyten der Linie GM02184 wurden mit 200 J/m^2 UVC-Licht bestrahlt und 30 Minuten nach Bestrahlung lysiert. Ein Teil der Ansätze wurde zusätzlich mit $3 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ behandelt und ein weiterer Teil 1 Stunde mit 40 mM Glutathion (Glu) inkubiert.

IP: Der TFIIH-Komplex wurde mittels eines an Protein A Sepharose gekoppelten Antikörpers gegen das XPB-Protein aus $150 \mu\text{g}$ Protein des Gesamtzelllysats präzipitiert und analog wie im Text zu Abbildung 3.11 aufgeführt, prozessiert.

Gesamtzelllysat: $15 \mu\text{g}$ Protein des Gesamtzelllysats wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und wie im Text zu Abbildung 3.11 beschrieben weiterbehandelt.

Im Gegensatz zu den mit H_2O_2 behandelten Zellen der vorhergehenden Abbildung veränderte die Vorbehandlung mit Glutathion die Menge des Cdk7-Proteins, welches mit XPB ko-präzipitierte, nicht, weder in anschließend bestrahlten noch in unbestrahlten Zellen. Die zusätzliche Behandlung mit H_2O_2 hatte gleichfalls keinen Einfluss auf die Menge des Cdk7-Proteins, welches nach Bestrahlung mit dem XPB-Protein präzipitierte. Darüber hinaus konnte auch hier eine Behandlung mit Glutathion die Abnahme der Menge des ko-

präzipitierten Cdk7-Proteins nicht verhindern (Abbildung 3.12, IP). Eine Behandlung der Zellen mit Glutathion alleine veränderte die Menge an mit dem XPB-Protein ko-präzipitierten Cdk7-Protein hingegen nicht. Auch unter diesen Bedingungen wurden die absoluten Proteinmengen im Gesamtzelllysate durch die Behandlungen nicht verändert, wie anhand Abbildung 12 (Gesamtzelllysate) zu erkennen ist. In den mit H₂O₂ vorbehandelten Proben war indes, im Vergleich zu den unbehandelten Proben, wieder wesentlich weniger phosphoryliertes GSK3 β Protein enthalten. Wurden die Proben jedoch mit Glutathion inkubiert, so wurde die Menge an phosphoryliertem GSK3 β -Protein durch H₂O₂ nicht verändert, was aufzeigt, dass das Glutathion auch funktionell war (Abbildung 3.12, Gesamtzelllysate).

3.2.8 Die UV-induzierte Dissoziation von TFIIH erfordert aktiven Zellmetabolismus

UV-Licht und auch Radikale interagieren nicht nur mit der DNA, sondern auch mit anderen zellulären Makromolekülen wie RNA oder Proteinen. Entsprechend rückte die Frage in den Vordergrund, ob die Zelle aktiven Stoffwechsel betreiben muss, damit der TFIIH-Komplex nach UV-Bestrahlung dissoziiert oder ob die Dissoziation von TFIIH möglicherweise auch eine Reaktion auf direkte UV-induzierte Veränderungen in den Proteinen des Komplexes sein könnte. Zur Klärung dieser Frage wurden die Zellen unter Bedingungen bestrahlt und inkubiert, welche den zellulären Metabolismus auf einen Bruchteil der üblichen Rate reduzieren. Sollte die Dissoziation des TFIIH-Komplexes auf eine direkte Schädigung der TFIIH-Proteine zurück zu führen sein, so sollte eine Bestrahlung auf Eis keinen Einfluss auf die UV-induzierten Veränderungen haben. Ist jedoch von einer Signaltransduktionskaskade auszugehen, welche die Schädigung der DNA auf den TFIIH-Komplex überträgt, so sollte die Dissoziation bei einer Bestrahlung bei 0°C unterbleiben.

Um diese Überlegungen experimentell zu belegen, wurden Prä-B Lymphozyten der Linie GM02184 bei 0°C mit 200 J/m² UVC-Licht bestrahlt und im vorgekühlten Medium für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert, bevor sie anschließend lysiert wurden. Als Kontrollen wurde eine unbestrahlte auf Eis inkubierte Probe und jeweils eine bestrahlte und unbestrahlte bei 37°C inkubierte Probe mitgeführt. Der TFIIH-Komplex wurde aus 150 μ g Protein des Gesamtzelllysates mittels eines an Protein A Sepharose gekoppelten Antikörpers gegen das XPB-Protein gefällt, die IP über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Immobilon P-Membran übertragen und die Membran mit Antikörpern gegen die Proteine XPB oder Cdk7 inkubiert. Zur Bestimmung der relativen Mengen der TFIIH-Komponenten im Gesamtzelllysate wurden Aliquots der Ansätze ebenfalls über SDS-PAGE aufgetrennt und analog prozessiert.

Wurden Zellen bei 0°C bestrahlt und nach der Bestrahlung bei 0°C inkubiert, so konnte aus dem Zelllysate der UV-bestrahlten Proben dieselbe Menge an Cdk7-Protein zusammen mit

3. Ergebnisse

dem XPB-Protein präzipitiert werden wie aus dem Lysat unbestrahlter Zellen. Wurden die gleichen Zellen hingegen bei 37°C inkubiert, verringerte sich die Menge des mit dem XPB-Protein gefällten Cdk7-Proteins in bestrahlten Zellen im Vergleich zu unbestrahlten (Abbildung 3.13, IP).

Die Analyse der Gesamtzelllysate zeigte, dass alle Ansätze eine äquivalente Gesamtmenge der TFIIH-Komponenten XPB und Cdk7 enthalten (Abbildung 3.13, Gesamtzelllysate).

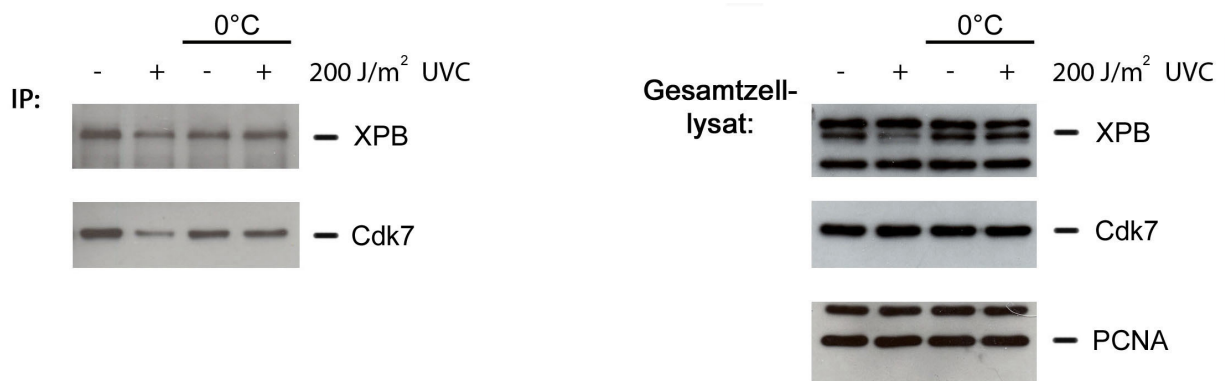


Abbildung 3.13: Die UV-induzierte Dissoziation des TFIIH-Komplexes erfordert aktiven Zellmetabolismus.

Prä-B Lymphozyten der Linie GM02184 wurden bei 0°C mit 200 J/m² UVC-Licht bestrahlt und 30 Minuten inkubiert. Zur Kontrolle wurden Prä-B Lymphozyten bei RT bestrahlt und 30 min bei 37°C inkubiert.

IP: Der TFIIH-Komplex wurde mittels eines an Protein A Sepharose gekoppelten Antikörpers gegen das XPB-Protein aus 150 µg Protein des Gesamtzelllysats präzipitiert. Die IP wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran transferiert und die Membran mit Antikörpern gegen die Proteine Cdk7 oder XPB hybridisiert.

Gesamtzelllysate: 15 µg Protein des Gesamtzelllysats wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran übertragen. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen die Proteine XPB, Cdk7 oder PCNA inkubiert.

3.2.9 Die UV-induzierte Dissoziation des TFIIH-Komplexes ist unabhängig von der RNA Pol II vermittelten Transkription

Ein UV-induziertes Photoprodukt in der DNA stellt für die metabolische Enzyme wie die transkribierende RNA Pol II eine Barriere dar, die sie nicht überwinden können. Entsprechend reduziert die Zelle nach einer Schädigung der DNA durch UV-Licht die Transkription auf ein Minimum und die Replikation der DNA wird vollständig gestoppt (Scaife, 1970). In der wissenschaftlichen Gemeinde gibt es Überlegungen, dass die an einem DNA-Schaden feststehende RNA Pol II in der TCR das Signal zur Initiation der Reparatur gibt (Übersicht in: Mullenders und Berneburg, 2001). Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob die Dissoziation des TFIIH-Komplexes auch unter Bedingungen erfolgt, die keine Transkription erlauben, wie zum Beispiel in Gegenwart von Transkriptioninhibitoren.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde in Prä-B Lymphozyten der Linie GM02184 die basale

3. Ergebnisse

Transkription durch Inkubation mit den Transkriptioninhibitoren Aktinomyzin D und 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazol (DRB) ausgeschaltet. Während Aktinomyzin D die Transkription inhibiert indem es spezifisch an dG(3'-5')dC-Stellen des DNA-Doppelstranges bindet und die Enzyme der DNA-abhängigen RNA-Synthese behindert, führt DRB zum frühzeitigen Abbruch der Transkription in Promotornähe, eventuell durch Inhibition der Kinase Cdk7 (Yankulov *et al.*, 1995; Rossignol *et al.*, 1997). Es ist außerdem ein effizienter Inhibitor der Casein-Kinase II, deren Beteiligung an der Transkription vermutet wird (Zandomeni *et al.*, 1986).

Um die Abhängigkeit der Dissoziation des TFIIH-Komplexes von der Transkription zu untersuchen, wurden Zellen der Linie GM02184 für eine Stunde mit 5 µg/ml Aktinomyzin D oder 250 µM DRB behandelt. Anschließend wurden die Zellen aufgeteilt. Ein Teil der Zellen wurde mit 200 J/m² UVC-Licht bestrahlt und für die Präzipitation des TFIIH-Komplexes verwendet. Diese Zellen wurden nach der Bestrahlung 30 Minuten in dem Inhibitor-enthaltenden Medium inkubiert und anschließend lysiert. Der TFIIH-Komplex wurde mit einem Antikörper gegen die Helikase XPB aus 200 µg Protein des Zelllysats präzipitiert und nach Auftrennung über SDS-PAGE auf eine Immobilon P-Membran übertragen, welche mit Antikörpern gegen die Proteine XPB oder Cdk7 inkubiert wurde.

Zur Überprüfung, ob die Transkription durch die Inhibitoren vollständig gehemmt wurde, wurde der andere Teil der Zellen mit einer Dosis von 30 J/m² UVC-Licht bestrahlt und für 45 Minuten in dem Inhibitor-enthaltenden Medium inkubiert. Aus diesen Zellen wurde PolyA RNA präpariert und mittels Northern Blotting auf die Expression des *c-jun*-Gens untersucht. Bei einer Dosis von 30 J/m² UVC-Licht wird die Transkription des *c-jun*-Gens aktiviert und die RNA-Menge nimmt zu (Herr *et al.*, 1994; Angel und Karin, 1991; Devary *et al.*, 1991). Diese Mengenzunahme kann durch Inhibitoren der Transkription vermieden werden.

5 µg der extrahierten RNA wurden über ein Formaldehydgel aufgetrennt und auf eine Hybond N-Membran übertragen. Die Membran wurde mit einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde für die *c-jun*-RNA und für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH)-RNA hybridisiert. GAPDH ist ein konstitutiv exprimiertes Gen, welches sich gut als interne Kontrolle für die Bestimmung der relativen RNA-Menge pro Ansatz eignet (Perfetti *et al.*, 1991).

3. Ergebnisse

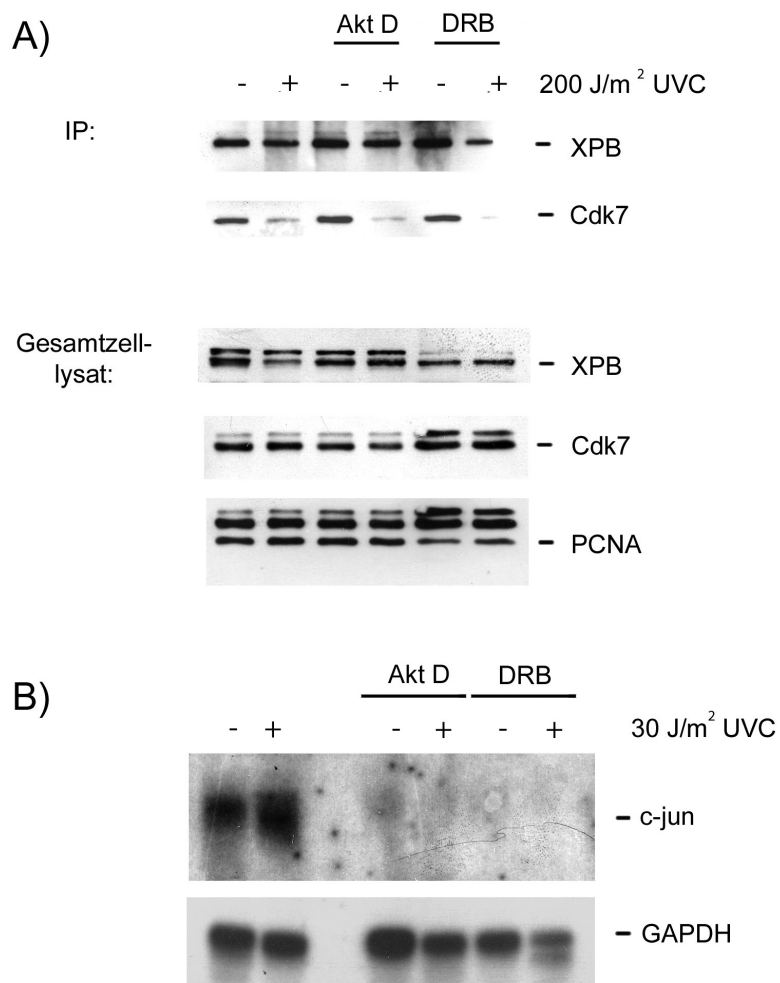


Abbildung 3.14: Die Dissoziation des TFIIH-Komplexes ist unabhängig von RNA Pol II vermittelter Transkription

Zellen der Linie GM02184 wurden eine Stunde mit 5 µg/ml Aktinomyzin D (Akt D) oder 250 µM DRB behandelt. Anschließend wurden die Zellen aufgeteilt, ein Teil davon wurde mit 200 J/m² UVC-Licht bestrahlt und nach weiteren 30 Minuten Inkubation in dem Inhibitor-enthaltenden Kulturmedium lysiert

A)

IP: Der TFIIH-Komplex wurde mit einem Antikörper gegen die Helikase XPB aus 200 µg Protein des Zelllysats präzipitiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran übertragen. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen die Proteine XPB oder Cdk7 inkubiert.

Gesamtzelllysat: 15 µg Protein des Gesamtzelllysats wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran übertragen. Die Membran wurde anschließend mit Antikörpern gegen die Proteine XPB, Cdk7 oder PCNA hybridisiert.

B) Die übrigen Zellen wurden mit 30 J/m² UVC-Licht bestrahlt, 40 Minuten nach der Bestrahlung geerntet und PolyA RNA präpariert. 5 µg RNA wurden über ein Formaldehydgel aufgetrennt, auf eine Hybond N-Membran übertragen und anschließend mit einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde gegen die c-jun-RNA hybridisiert. Nach der ersten Hybridisierung wurde die Membran von der radioaktiven Sonde befreit, und mit einer radioaktiv markierten Sonde gegen die GAPDH-RNA hybridisiert.

Unabhängig davon, ob die Zellen vor der Bestrahlung mit den Transkriptioninhibitoren Aktinomyzin D oder DRB behandelt worden waren, wurde in allen IPs bestrahlter Zellen weniger Cdk7-Protein zusammen mit dem XPB-Protein gefällt als aus dem Lysat unbestrahlter Zellen (Abbildung 3.14A, IP). Durch einen Western Blot der Gesamtzelllysate konnte veranschaulicht werden, dass alle Proben eine vergleichbare Gesamtmenge an XPB- und Cdk7-Protein enthielten (Abbildung 3.14A, Gesamtzelllysate).

Die Analyse der PolyA RNA zeigte, dass die UV-Bestrahlung zur zuvor beschriebenen Mengenzunahme der c-jun-RNA führt (Herr *et al.*, 1994; Angel und Karin, 1991; Devary *et al.*, 1991). In den Zellen, die mit Aktinomyzin D oder DRB behandelt worden waren, war die Menge an c-jun-RNA signifikant reduziert und konnte auch durch Bestrahlung mit UVC-Licht nicht erhöht werden (Abbildung 3.14B). Die Blockierung der Transkription durch die Inhibitoren war folglich vollständig.

3.3 Die Dissoziation des TFIID-Komplexes nach UV-Strahlung ist ein generelles Prinzip

EBV-transformierte Lymphozyten, wie sie für die meisten der vorausgegangen Experimente benutzt wurden, bringen eine Reihe experimenteller Vorteile mit, wie zum Beispiel schnelles Wachstum und einfache Kultivierbarkeit. Allerdings geht die Etablierung von Zelllinien in der Regel mit dem Verlust einiger „normaler“ zellulärer Eigenschaften einher und, was im Zusammenhang mit dieser Studie von besonderer Bedeutung ist, sie sind normalerweise nicht dem Sonnenlicht ausgesetzt. Dies warf einerseits die Frage nach der Allgemeingültigkeit der beobachteten Dissoziation des TFIID-Komplexes auf und andererseits die Frage, ob der TFIID-Komplex auch in Zellen dissoziiert, die unter physiologischen Bedingungen der UV-Strahlung ausgesetzt sind, wie zum Beispiel Hautfibroblasten.

Um diese Frage zu klären, wurden primäre menschliche Hautfibroblasten (GM01604), Mausfibroblasten, die nach dem 3T3-Protokoll etabliert worden waren, sowie Zelllinien, die aus menschlichen Lungen- (H1299 - p53^{-/-}) oder Knochentumoren (U2OS; SAOS-2 - p53^{-/-}) etabliert worden sind mit 200 J/m² UVC-Licht bestrahlt und nach anschließender 30 minütiger Inkubation bei 37°C lysiert. Der TFIID-Komplex wurde mittels eines an Protein A Sepharose gekoppelten Antikörpers gegen die Helikase XPB aus 150 µg Protein des Gesamtzelllysats präzipitiert, die IP über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Immobilon P-Membran transferiert und mit Antikörpern gegen die Proteine XPB und Cdk7 hybridisiert. Zur Bestimmung der relativen Proteinmenge im Gesamtzelllysat wurden Aliquots der Lysate ebenfalls über SDS-PAGE aufgetrennt und analog prozessiert.

3. Ergebnisse

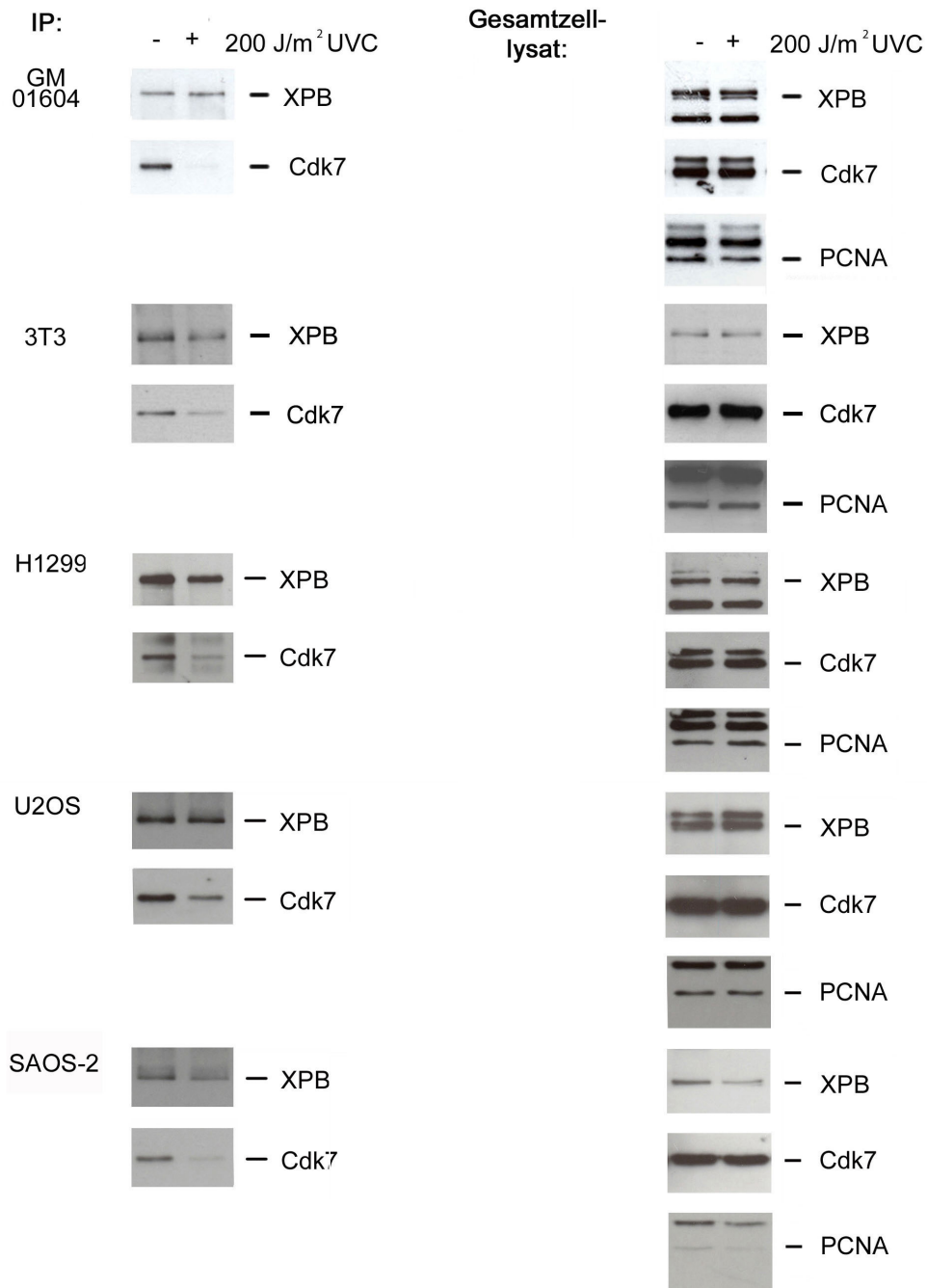


Abbildung 3.15: Dissoziation von TFIIH in den Zelllinien GM01604, 3T3, H1299, U2OS und SAOS-2

Primäre humane Fibroblasten der Linie GM01604, embryonale Mausfibroblasten der Linie 3T3, Lungenkarzinomzellen der Linie H1299 (p53^{-/-}) und Osteosarkomzellen der Linien U2OS und SAOS-2 (p53^{-/-}) wurden mit 200 J/m² UVC-Licht bestrahlt und nach 30 Minuten Inkubation bei 37°C lysiert. Unbestrahlte Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt.

IP: Der TFIIH-Komplex wurde mit einem an Protein A Sepharose gekoppelten Antikörper gegen das XPB-Protein aus 150 µg Protein des Gesamtzelllysats präzipitiert und wie im Text zur Abbildung 3.12 (IP) beschrieben prozessiert.

Gesamtzelllysate: 15 µg Protein des Gesamtzelllysats wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und wie im Text zu Abbildung 3.12 (Gesamtzelllysate) beschrieben prozessiert.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass aus dem Zelllysate aller UV-bestrahlten Zellen der verschiedenen Linien wesentlich weniger Cdk7-Protein zusammen mit dem XPB-Protein präzipitiert werden konnte als aus dem Lysat der entsprechenden unbestrahlten Zellen (Abbildung 3.15, IP). Die Analyse der Gesamtzelllysate zeigte, dass sowohl in den bestrahlten als auch in den unbestrahlten Zellen die gleichen Mengen der TFIIH-Komponenten XPB und Cdk7 vorlagen (Abbildung 3.15, Gesamtzelllysate).

3.4 Die Dissoziation des TFIIH-Komplexes erfolgt nur in Gegenwart eines funktionellen XPC-Proteins

Der TFIIH-Komplex ist neben der Transkription auch in die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) involviert (Übersicht in: Zurita und Merino, 2003). Photoprodukte, die in der DNA-Doppelhelix nach UV-Schädigung der Zelle entstehen, werden durch dieses Reparatursystem entfernt. Um festzustellen, ob ein direkter Zusammenhang zwischen der NER und der UV-induzierten Dissoziation des TFIIH-Komplexes besteht, wurden mehrere reparaturdefiziente Zelllinien untersucht. Dabei handelte es sich um Zelllinien, die aus Patienten isoliert wurden, deren Krankheitssymptome mit Schäden in der NER assoziiert sind. Die Zellen tragen Mutationen in den Proteinen XPA, XPB, XPC, XPD oder in einem der CS-Proteine.

Die reparaturdefizienten Zelllinien wurden mit 200 J/m^2 UVC-Licht bestrahlt, 30 Minuten nach Bestrahlung lysiert und der TFIIH-Komplex wurde mittels eines Antikörpers gegen die Helikase XPB präzipitiert. Die IP wurde über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Immobilon P-Membran übertragen und die Membran mit Antikörpern gegen die Proteine XPB oder Cdk7 hybridisiert. Zur Überprüfung der Proteinmenge der TFIIH Komponenten wurden je $15 \mu\text{g}$ Protein des Gesamtzelllysats über SDS-PAGE aufgetrennt und analog prozessiert.

Präzipitierte man den TFIIH-Komplex mittels eines Antikörpers gegen das XPB-Protein aus dem Gesamtzelllysate, konnte man aus dem Lysate bestrahlter Zellen, die ein mutiertes XPA-, XPD- oder CS-Protein exprimieren, weniger Cdk7-Protein zusammen mit dem XPB-Protein präzipitieren als aus dem Lysate unbestrahlter Zellen (Abbildung 3.16, IP). Für die Zelllinie, die ein verändertes XPB-Protein enthält, ist keine definitive Aussage möglich, da die Gesamtmenge an XPB-Protein in dieser Zelllinie nach UV-Bestrahlung aus unbekanntem Gründen stark reduziert war.

Überraschenderweise konnte aus dem Lysate bestrahlter Zellen, die ein mutiertes XPC-Protein exprimieren, wiederholt eine vergleichbare Menge an Cdk7-Protein zusammen mit dem XPB-Protein präzipitiert werden wie aus dem Lysate unbestrahlter Zellen (Abbildung 3.16, IP). Der Gehalt an den TFIIH-Komponenten XPB und Cdk7 und auch an PCNA-Protein im Zelllysate war in allen Ansätzen, mit Ausnahme von Zellen mit mutiertem XPB-Protein,

3. Ergebnisse

sowohl in unbestrahlten wie auch bestrahlten Proben vergleichbar. Zellen mit mutiertem XPB-Protein zeigten erstaunlicherweise eine starke Verringerung der Menge des XPB-Proteins nach UV-Bestrahlung (Abbildungen 3.16, Gesamtzelllysate).

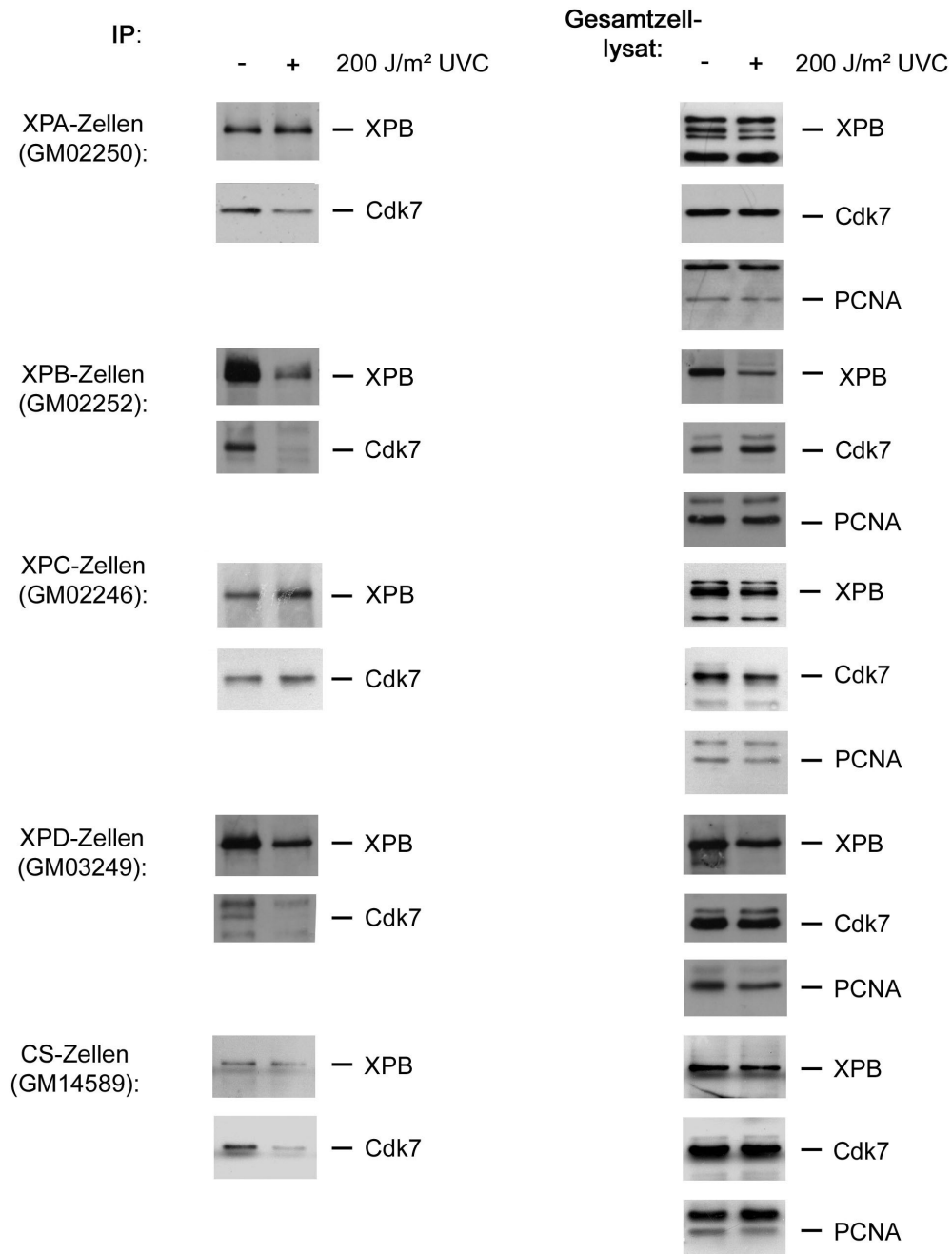


Abbildung 3.16: Die Dissoziation des TFIIH-Komplexes ist unabhängig von der NER.

Prä-B Lymphozyten mit Mutationen im XPA- (GM02250), XPB- (GM02252), XPC- (GM02246), XPD- (GM03249) oder in einem der CS-Proteine (GM14589) wurden mit 200 J/m² UVC-Licht bestrahlt und 30 Minuten nach der Bestrahlung lysiert.

IP: Der TFIIH-Komplex wurde aus 150 µg Protein des Gesamtzelllysats mittels eines Antikörpers gegen das XPB-Protein gefällt und wie im Text zu Abbildung 3.12 (IP) beschrieben prozessiert.

Gesamtzelllysate: 15 µg Protein des Gesamtzelllysats wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und wie im Text zu Abbildung 3.12 (Gesamtzelllysate) beschrieben prozessiert.

3. Ergebnisse

Nachdem festgestellt worden war, dass der TFIIH-Komplex in der Zelllinie GM02246 nicht dissoziiert, stellte sich die Frage, ob diese Veränderung eine Spezifität dieser Zelllinie ist oder ob die Mutation im XPC-Protein mit der Dissoziation des TFIIH-Komplexes nach Bestrahlung interferiert. Um dieser Frage nachzugehen wurde eine weitere Prä-B Lymphozytenzelllinie mit einer Mutation im XPC-Gen sowie zusätzlich eine Fibroblasten-Zelllinie, welche ebenfalls eine Mutation im XPC-Gen trägt, untersucht.

Zellen der beiden Prä-B Lymphozytenlinien (GM02248, GM02246), welche beide ein verkürztes XPC-Protein exprimieren, sowie primäre Fibroblasten mit verändertem XPC-Protein (GM03176) wurden zusammen mit Wildtyp-Lymphozyten (GM02184) und primären Wildtyp-Fibroblasten (GM01604) mit 200 J/m^2 UVC-Licht bestrahlt und 30 Minuten nach Bestrahlung lysiert. Aus dem Gesamtzelllysat wurde der TFIIH-Komplex mittels eines Antikörpers gegen das XPB-Protein präzipitiert, die IP über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Immobilon P-Membran transferiert und die Membran mit Antikörpern gegen die Proteine XPB oder Cdk7 inkubiert. Je $15 \mu\text{g}$ Protein des Lysats wurden ebenfalls über SDS-PAGE aufgetrennt und analog prozessiert.

Interessanterweise konnte aus den Zelllysaten aller untersuchten XPC-defizienten Zelllinien nach UV-Bestrahlung die selbe Menge an Cdk7-Protein zusammen mit dem XPB-Protein aus dem Gesamtzelllysat präzipitiert werden wie aus dem Lysat unbestrahlter Zellen (Abbildung 3.17, IP). Aus Lysaten der Wildtyp-Zellen GM02184 oder GM01604 hingegen war nach UV-Bestrahlung der Zellen die Menge an Cdk7-Protein, die zusammen mit dem XPB-Protein präzipitiert wurde, im Vergleich zu unbestrahlten Zellen wesentlich geringer (Abbildung 3.17, IP).

Die Analyse der Gesamtzelllysate zeigte, dass alle Versuchsansätze eine vergleichbare Menge der TFIIH-Komponenten XPB und Cdk7 besaßen (Abbildung 3.17, Gesamtzelllysat).

3. Ergebnisse

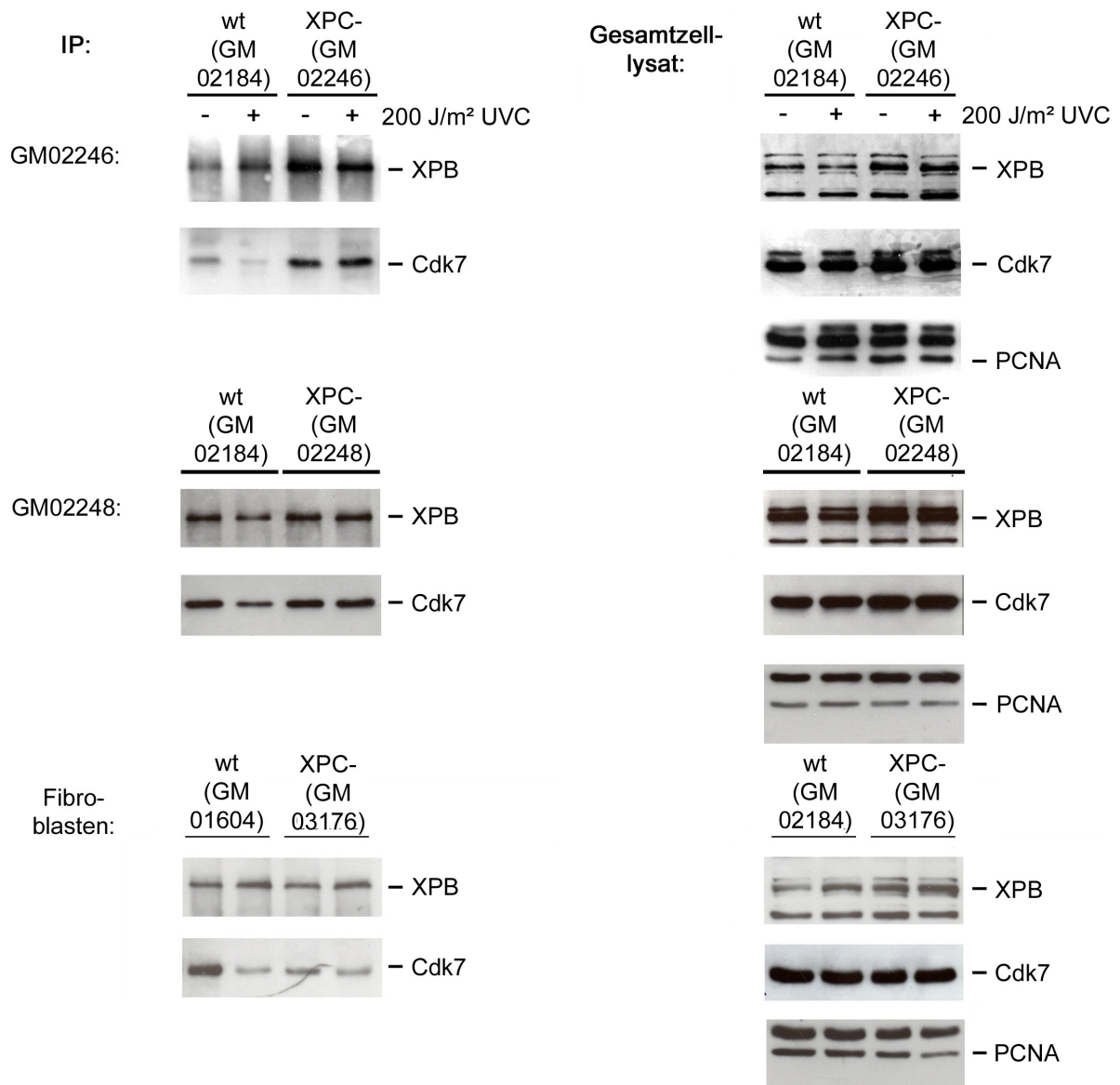


Abbildung 3.17: Inaktivierende Mutationen im XPC-Protein interferieren mit der Dissoziation des TFIIH-Komplexes nach UV-Bestrahlung.

Prä-B Lymphozyten der Linien GM02184 (wt), GM02246 (XPC) und GM02248 (XPC) sowie primäre Fibroblasten der Linien GM01604 (wt) und GM03176 (XPC) wurden mit 200 J/m^2 UVC-Licht bestrahlt und 30 Minuten nach Bestrahlung lysiert.

IP: Der TFIIH-Komplex wurde mit Hilfe eines an Protein A Sepharose gekoppelten Antikörpers gegen die Helikase XPB aus $150 \mu\text{g}$ Protein des Gesamtzelllysats präzipitiert. Die IP wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran übertragen. Anschließend wurde die Membran mit Antikörpern gegen die Proteine Cdk7 oder XPB inkubiert.

Gesamtzelllysat: $15 \mu\text{g}$ Protein des Gesamtzelllysats wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Immobilon P-Membranen transferiert. Die Hybridisierung der Membran erfolgte mit Antikörpern gegen die Proteine XPB, Cdk7 oder PCNA.

3.5 Rekonstitution von XPC-defizienten Zellen mit dem Wildtyp-XPC-Gen

Wie bereits in Kapitel 3.4 gezeigt, dissoziiert der TFIIH-Komplex in allen untersuchten Zelllinien, die ein deletiertes XPC-Protein exprimieren, nach UV-Bestrahlung nicht. Um zu zeigen, dass dieser Umstand ausschließlich auf ein nichtfunktionelles XPC-Protein zurückzuführen ist und nicht auf eine Besonderheit der verwendeten Zelllinien, wurde eine cDNA des XPC-Gens in den Expressionsvektor pcDNA3 kloniert und anschließend in XPC-defiziente Lymphozyten der Linie GM02246 transfiziert. Zur Kontrolle wurden zusätzlich Klone angezogen, in welche der Originalvektor (pcDNA3.1) ohne XPC-cDNA transfiziert worden war. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in Selektionsmedium aufgenommen, das zur Selektion positiver Klone mit 500 µg/ml Neomycin angereichert worden war. Die transfizierten Zellen wurden dann auf 96-Well-Platten verteilt und bis zum Hochwachsen von Einzelklonen kultiviert. Diese Einzelklone wurden mittels Western Blotting auf die Expression des XPC-Proteins untersucht. Zur Detektion des Vektors in den Zellen, welche zur Kontrolle mit dem Originalvektor transfiziert worden waren, wurde PolyA RNA präpariert und die Expression des *Neomycin*-Gens mittels einer gegen die Neomycin-RNA gerichteten radioaktiv markierten cDNA-Sonde im Northern Blotting-Verfahren nachgewiesen.

In Zellklonen, welche das Wildtyp-XPC-Protein exprimieren, bzw. den pcDNA3.1-Vektor integriert hatten, wurde die Dissoziation des TFIIH-Komplexes nach UV-Bestrahlung erneut untersucht. Dazu wurden die Klone jeweils mit 200 J/m² UVC-Licht bestrahlt, 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend lysiert. Der TFIIH-Komplex wurde mit einem Antikörper gegen das XPB-Protein gefällt, die IP über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran übertragen. Die anschließende Hybridisierung der Membran erfolgte mit Antikörpern gegen die Proteine XPB oder Cdk7. 15 µg Protein des Lysats wurden gleichfalls über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran transferiert. Die Membran wurde neben Antikörpern gegen die Proteine XPB, Cdk7 oder PCNA auch mit einem Antikörper gegen das XPC-Protein hybridisiert.

Interessanterweise wurde aus dem Lysat des mit dem Wildtyp-XPC-Gen rekonstituierten Klons GM02246/XPCwt nach UV-Bestrahlung in der Tat weniger Cdk7-Protein zusammen mit dem XPB-Protein gefällt als aus dem Lysat unbestrahlter Zellen. Im Gegensatz dazu konnte weder aus der parentalen Linie, welche nur das deletierte XPC-Protein exprimierte, noch aus dem Klon, der allein mit dem Vektor transfiziert worden war (GM02246/Vektor), dieselbe Menge an Cdk7-Protein mit dem XPB-Protein aus dem Lysat gefällt werden (Abbildung 3.18, IP).

Die Expression des XPC-Proteins konnte ausschließlich in den Zelllysaten der rekonstituierten Zelllinie GM02246/XPCwt nachgewiesen werden. Interessanterweise nahm

3. Ergebnisse

die Gesamtmenge an XPC-Protein nach UV-Bestrahlung ab (Abbildung 3.18, Gesamtzelllysate). Alle Versuchsansätze enthielten jedoch eine vergleichbare Menge an den TFIIH-Proteinen XPB und Cdk7 (Abbildung 3.18, Gesamtzelllysate).

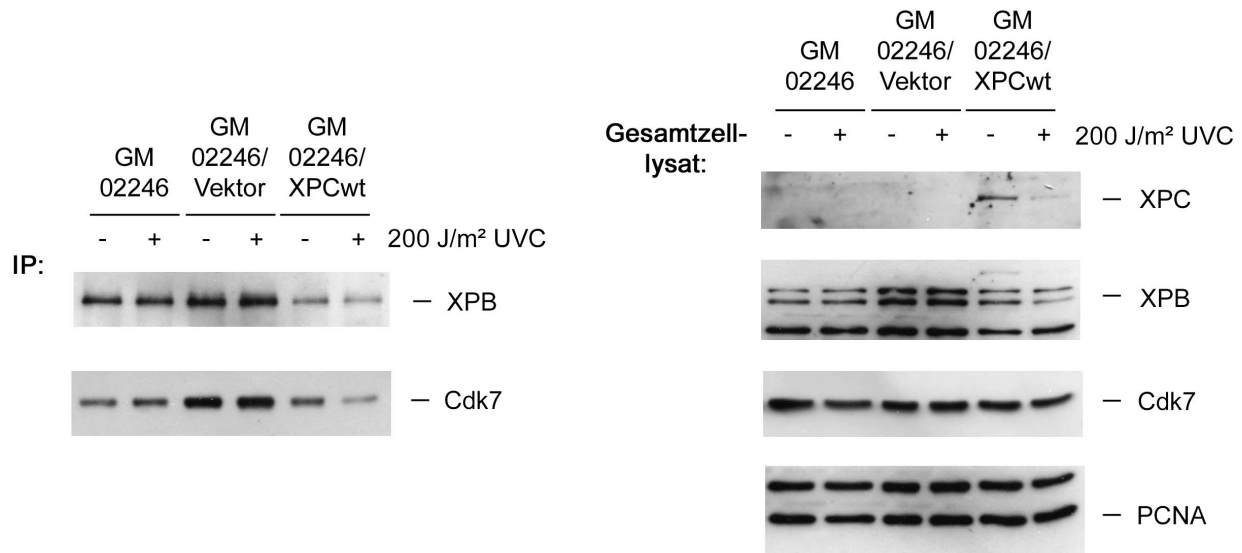


Abbildung 3.18: Die Dissoziation des TFIIH-Komplexes lässt sich in XPC-defizienten Prä-B Lymphozyten durch Transfektion eines wt-XPC-Gens rekonstituieren.

Zellen der Linien GM02246, GM02246/Vektor und GM02246/XPCwt wurden mit 200 J/m² UVC-Licht bestrahlt und nach 30minütiger Inkubation bei 37°C lysiert.

IP: Der TFIIH-Komplex wurde mit einem Antikörper gegen das XPB-Protein aus 150 µg Protein des Gesamtzelllysats präzipitiert. Die IP wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran übertragen, welche mit Antikörpern gegen die Proteine XPB oder Cdk7 hybridisiert wurde.

Gesamtzelllysate: 15 µg Protein des Gesamtzelllysats wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran übertragen. Die Hybridisierung der Membran erfolgte mit Antikörpern gegen die Proteine Cdk7, XPB, XPC oder PCNA.

3.6 Untersuchungen zum Mechanismus der UV-induzierten Dissoziation des TFIIH-Komplexes

3.3.1 Der Phosphataseinhibitor Okadainsäure hat keine Auswirkung auf die UV-induzierte Dissoziation des TFIIH-Komplexes

Mehrere Komponenten des TFIIH-Komplexes wurden in phosphorylierter und dephosphorylierter Form in der Zelle gefunden, unter anderem die Proteine Cdk7, Zyklin H und XPB (Coin *et al.*, 2004; Akoulitchev *et al.*, 2000; Adamczewski *et al.*, 1996). Daraus ergab sich die Frage, ob eine Veränderung des Phosphorylierungsmodus eines Proteins in Verbindung mit dem UV-induzierten Zerfall des TFIIH-Komplexes stehen könnte. Um die eventuelle Beteiligung einer Dephosphorylierung zu prüfen, wurde der Phosphataseinhibitor Okadainsäure eingesetzt, der spezifisch die Aktivität der Proteinphosphatasen PP1 und

3. Ergebnisse

PP2A hemmt (Clarke *et al.*, 1993).

Prä-B Lymphozyten der Linie GM02184 wurden dazu eine Stunde in 100 mM Okadainsäure enthaltendem Zellmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 200 J/m² UVC-Licht bestrahlt und 30 Minuten nach der Bestrahlung lysiert. Der TFIIH-Komplex wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen das XPB-Protein gefällt, die IP per SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Immobilon P-Membran übertragen und die Membran mit Antikörpern gegen die Proteine XPB und Cdk7 inkubiert. Um die Menge der Proteine XPB und Cdk7 im Gesamtzelllysate zu überprüfen, wurden Aliquots der Ansätze über SDS-PAGE aufgetrennt und analog prozessiert.

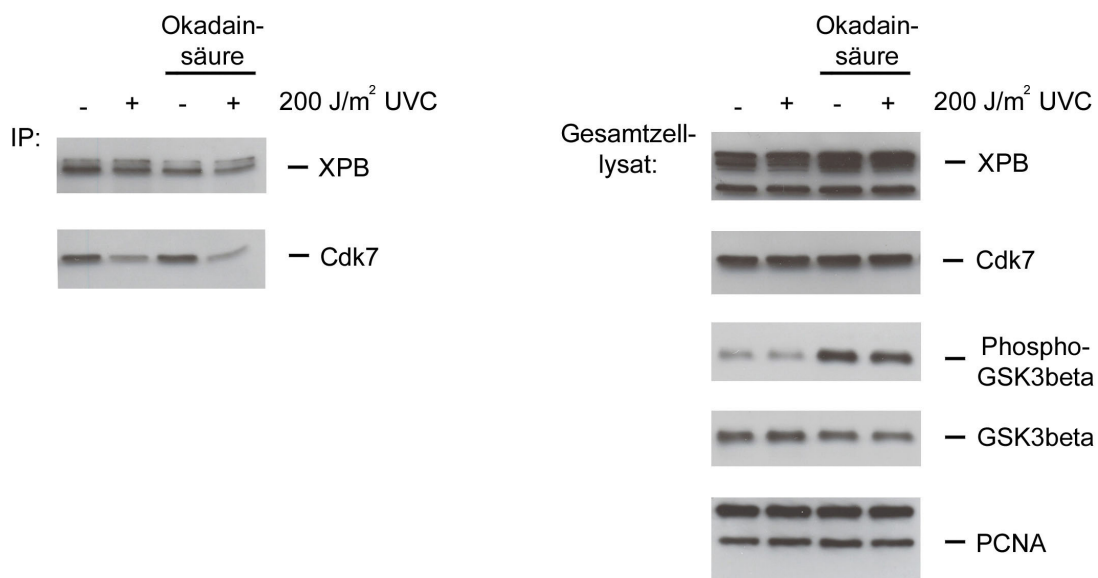


Abbildung 3.19: Die Dissoziation von TFIIH ist unabhängig von der Aktivität der Phosphatasen PP1 und PP2A.

Nach 30 minütiger Inkubation mit 100 mM des Phosphataseinhibitors Okadainsäure wurden Zellen der Linie GM02184 mit 200 J/m² UVC-Licht bestrahlt und 30 Minuten später lysiert.

IP: Der TFIIH-Komplex wurde mit einem an Protein A Sepharose gekoppelten und gegen das XPB-Protein gerichteten Antikörper aus 175 µg Protein des Zelllysats gefällt. Die IP wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran übertragen. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen die Proteine XPB und Cdk7 hybridisiert.

Gesamtzelllysate: 15 µg Protein des Gesamtzelllysats wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran übertragen. Die Hybridisierung der Membran erfolgte mit Antikörpern gegen die Proteine XPB oder Cdk7.

Eine zweite Western Blot-Membran mit je 15 µg Protein der Gesamtzelllysate wurde mit Antikörpern gegen die phosphorylierte Form des GSK3β-Proteins sowie gegen das PCNA-Protein hybridisiert. Nach der Entwicklung des Western Blots wurde die Membran von den Antikörpern befreit, indem sie 50 Minuten in einer DDT-haltigen Lösung inkubiert wurde und anschließend mit einem Antikörper gegen das GSK3β-Protein hybridisiert.

Eine weitere Membran mit Proben der Gesamtzelllysate wurde mit Antikörpern gegen die an Serin 9 phosphorylierte Form des GSK3β-Proteins (phospho-GSK3β) und das PCNA-Protein

hybridisiert. Nach der Hybridisierung mit dem Antikörper gegen phospho-GSK3 β wurde die Membran von den Antikörpern befreit und anschließend die Gesamtmenge an GSK3 β -Protein bestimmt.

Wie in Abbildung 3.19 zu sehen ist, wurde sowohl aus dem Lysat der mit Okadainsäure behandelten als auch der nicht mit dem Inhibitor behandelten Kontrollzellen nach UV-Bestrahlung weniger Cdk7-Protein zusammen mit dem XPB-Protein präzipitiert als aus dem äquivalenten Lysat unbestrahlter Zellen (Abbildung 3.19, IP). Die Behandlung mit Okadainsäure hatte dabei keinen Einfluss auf die Menge der Proteine XPB und Cdk7 in der Zelle, führte jedoch zu einer Zunahme der Menge an phosphoryliertem GSK3 β -Protein, was gleichzeitig die Wirksamkeit des Inhibitors bestätigt. Die relative Menge an GSK3 β -Protein in der Zelle blieb allerdings von einer Behandlung mit Okadainsäure unbeeinflusst (Abbildung 3.19; Gesamtzelllysat).

3.3.2 Analyse des Phosphorylierungsmodus von TFIIH vor und nach UV-Bestrahlung durch Inkubation von Zellen mit [³²P]-Orthophosphat

Um Unterschiede in der Phosphorylierung der TFIIH Komponenten aufzuspüren, wurden Prä-B Lymphozyten der Linie GM02184 für eine Stunde in Gegenwart von 2,5 mCu [³²P]-Orthophosphat kultiviert. Bei dieser Inkubation gelangt das radioaktive Orthophosphat in den Zellkörper und kann anschließend von Kinasen für Proteinphosphorylierungen genutzt werden. Nach der Inkubation mit [³²P]-Orthophosphat wurden die Zellen mit 200 J/m² UVC-Licht bestrahlt, wieder in das [³²P]-Orthophosphat enthaltende Medium aufgenommen und weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Lyse der Zellen wurde der TFIIH-Komplex mit Antikörpern gegen die TFIIH-Komponenten MAT1, XPD und XPB aus dem Gesamtzelllysat präzipitiert und die IPs wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Gele wurden getrocknet und gegen einen MP-Autoradiographie-Film bei -80°C exponiert.

Zur Kontrolle der Zellreaktivität wurden Zellen der Linie GM02184 aus der gleichen Kultur mit 200 J/m² UVC-Licht bestrahlt. Der TFIIH-Komplex wurde mit einem Antikörper gegen die Helikase XPB aus 200 μ g Protein des Gesamtzelllysats präzipitiert, die IPs über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Immobilon P-Membran übertragen und die Membran mit Antikörpern gegen die Proteine XPB und Cdk7 inkubiert. Auch je 15 μ g Protein des Gesamtzelllysats wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und analog prozessiert.

3. Ergebnisse

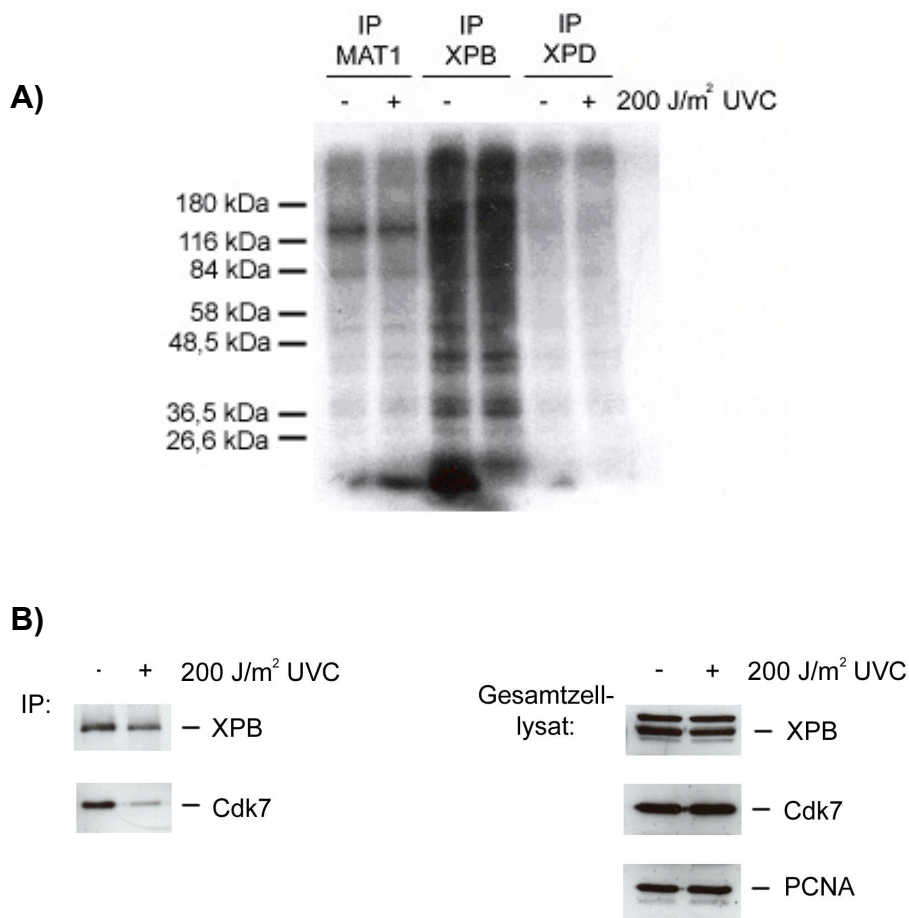


Abbildung 3.20: Die Anzahl an phosphorylierten Phosphatresten innerhalb des TFIID-Komplexes ändert sich nicht.

A) Zellen der Linie GM02184 wurden aufgeteilt. Ein Teil der Zellen wurde 1 Stunde mit jeweils 2,5 mCu Orthophosphat inkubiert. Nach Bestrahlung mit einer Dosis von 200 J/m² UVC-Licht wurden die Zellen 30 Minuten bei 37°C in dem P³² enthaltenden Zellmedium inkubiert und anschließend lysiert. Der TFIID-Komplex wurde mit Antikörpern gegen die Proteine MAT1, XPB oder XPD aus dem Zelllysate gefällt und über SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und gegen einen MP-Autoradiographie-Film bei -80°C exponiert.

B) Der andere Teil der Zellen der Linie GM02184 wurde mit 200 J/m² UVC-Licht bestrahlt und 30 Minuten nach der Bestrahlung lysiert.

IP: Der TFIID-Komplex wurde mit einem an Protein A Sepharose gekoppelten Antikörper gegen das XPB-Protein aus 200 µg Protein des Gesamtzelllysats präzipitiert, die IP wurde über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Immobilon P-Membran transferiert. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen die Proteine XPB oder Cdk7 inkubiert.

Gesamtzelllysate: 15 µg Protein des Gesamtzelllysats wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Immobilon P-Membran übertragen und die Membran wurde mit Antikörpern gegen die Proteine XPB, Cdk7 oder PCNA hybridisiert.

Zwar konnten nach der Markierung mit [³²P]-Orthophosphat einzelne Proteinbanden detektiert werden, es waren aber keine Unterschiede festzustellen, die auf eine unterschiedliche Phosphorylierung der präzipitierten Proteine nach DNA-Schädigung durch UVC-Licht hinwiesen. Weiterhin konnten die Proteinbanden keinem der TFIID-Proteine

3. Ergebnisse

zugeordnet werden, so dass es sich bei diesen phosphorylierten Proteinen möglicherweise um unspezifisch kopräzipitierte Proteine handelt (Abbildung 3.20A).

Wie auch bei den vorhergehenden Abbildungen gezeigt, konnte aus dem Lysat bestrahlter Zellen deutlich weniger Cdk7-Protein zusammen mit dem XPB-Protein präzipitiert werden als aus dem Lysat unbestrahlter Zellen, (Abbildung 3.20B, IP). Alle Ansätze enthielten darüber hinaus eine vergleichbare Menge der TFIIH-Komponenten Cdk7 und XPB sowie eine äquivalente Gesamtproteinmenge (Abbildung 3.20B, Gesamtzelllysat). Die Untereinheiten von TFIIH dissoziierten folglich in diesem Experiment, obwohl mit dieser Vorgehensweise keine Veränderung des Phosphorylierungsmusters der TFIIH Komponenten nachgewiesen werden konnte.

4. Diskussion

Unser Erbmateriale, die DNA, ist kontinuierlich den zerstörerischen Einflüssen intra- und extrazellulärer Schadstoffe ausgesetzt. Umwelteinflüsse wie UV- oder ionisierende Strahlung aber auch toxische Stoffwechselintermediate modifizieren die DNA kovalent, was eine sofortige Reaktion der Zelle erfordert, um dauerhaften Schaden zu vermeiden. Die Reparatur der entstandenen Schäden wird umgehend eingeleitet und alle DNA-abhängigen Vorgänge wie Transkription und Replikation werden sofort gestoppt (Rieger und Chu, 2004). Die Zelle hat mehrere hochkonservierte und schadensspezifische Reparaturwege etabliert, welche die Integrität des Genoms aufrecht erhalten, und diese mit anderen zellulären Prozessen wie Transkription und Replikation vernetzt (Übersicht in: Sancar *et al.*, 2004). Die Vernetzung essentieller Funktionen gewährleistet eine ideale Abstimmung aller zellulären Prozesse. Auch der Transkriptionsfaktor TFIIH ist an verschiedenen überlebenswichtigen Prozessen der Zelle beteiligt. Seine Partizipation sowohl an der RNA Pol II vermittelten Transkription als auch an der DNA-Reparatur warf vor allem zwei Fragen auf:

- Wird der vollständige Multiproteinkomplex TFIIH von Orten aktiver Transkription durch das dicht gepackte Nukleoplasma zur Schadensstelle rekrutiert oder gelangen nur einige Proteine wie zum Beispiel die beiden Helikasen XPB und XPD zum Schadensort?
- Wird der TFIIH-Komplex nach UV-Bestrahlung der Zelle modifiziert und ist er dadurch imstande, von der Transkription in die Reparatur zu wechseln? Existieren sozusagen eine Transkriptions- und eine Reparaturform von TFIIH?

Zur Beantwortung dieser Fragen begann ich, Studien über die Zusammensetzung des TFIIH-Komplexes vor und nach Bestrahlung mit UV-Licht durchzuführen.

4.1. Veränderungen des Transkriptionsfaktors IIH (TFIIH) nach Bestrahlung mit UVC-Licht

Zur Präzipitation des TFIIH-Komplexes aus dem Lysat bestrahlter und unbestrahlter Zellen wurden zwei unterschiedliche Antikörper gegen die Helikase XPB eingesetzt (Sc-19, 1B3). Diese Antikörper sind gegen Epitope gerichtet, die in verschiedenen Regionen des XPB-Proteins lokalisiert sind. Unabhängig davon, welcher Antikörper zur Präzipitation des TFIIH-Komplexes benutzt wurde, wurde aus dem Gesamtzelllysat UV-bestrahlter Zellen im Vergleich zu unbestrahlten Zellen weniger Cdk7-Protein zusammen mit dem XPB-Protein präzipitiert. Mit der Verwendung unterschiedlicher Antikörper gegen dasselbe Protein wurde sichergestellt, dass die UV-induzierte Veränderung von TFIIH nicht nur auf die Verwendung eines speziellen Antikörpers gegen die Helikase XPB, dessen Epitop nach UV-Bestrahlung möglicherweise verändert wird, zurückzuführen ist. Des Weiteren bewies die Durchführung

adäquater Kontrollen die Spezifität der verwendeten Antikörper. Auch ist es unwahrscheinlich, dass die Dissoziation des TFIIH-Komplexes nach UV-Bestrahlung durch den Salzgehalt des Puffers hervorgerufen wird. Zwar deuten frühere Ergebnisse auf einen Zusammenhang zwischen der Salzkonzentration der verwendeten Lösungen und der Zusammensetzung des TFIIH-Komplexes hin (Adamczewski *et al.*, 1996; Schaeffer *et al.*, 1994). Dabei wurde eine spontane Dissoziation des Komplexes bei Salzkonzentrationen im 1 molaren Bereich beobachtet (Adamczewski *et al.*, 1996), die Salzkonzentration des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Lysispuffers betrug jedoch nur 100 mM NaCl und war außerdem für bestrahlte und unbestrahlte Zellen identisch. Die Unabhängigkeit der UV-induzierten Dissoziation des TFIIH-Komplexes von der Salzkonzentration des Lysispuffers konnte ferner durch die Immunfluoreszenzfärbung der TFIIH-Proteine bestätigt werden. Diese Nachweisteknik bedingt die Fixierung von Proteinen in ihrer natürlichen Umgebung. Die Resultate, die durch die Verwendung dieser Technik erzielt wurden, zeigten, dass die TFIIH-Kern-Komponente XPB aber nicht die Kinase Cdk7 an CPDs akkumulierte. Außerdem wurde unter den angewandten Versuchsbedingungen kein unkoordiniertes Auseinanderbrechen des Komplexes in Einzelkomponenten beobachtet, sondern eine gezielte Abspaltung des CAK-Komplexes, der nach der Dissoziation als trimerer Proteinkomplex erhalten blieb. Verwendete man nämlich einen Antikörper gegen die TFIIH-Kern-Komponente XPB zur Präzipitation des TFIIH-Komplexes, so konnte aus dem Lysat bestrahlter Zellen weniger Cdk7- und Zyklin H-Protein mit dem XPB-Protein ko-präzipitiert werden als aus dem Lysat unbestrahlter Zellen. Nutzte man dagegen Antikörper gegen die zur CAK-Untereinheit gehörenden Proteine MAT1 und Cdk7, blieb die Menge des (ko)präzipitierten Zyklin H- oder Cdk7-Proteins in unbestrahlten und bestrahlten Zellen konstant, während die Menge an kopräzipitiertem XPB-Protein zumindest in der IP mit dem Cdk7 Antikörper abnahm. Fällte man den TFIIH-Komplex mit einem Antikörper gegen das MAT1-Protein aus dem Lysat, war es leider aufgrund der schlechten Qualität des MAT1-Antikörpers nicht möglich, das XPB-Protein zu detektieren. Außerdem erkannte dieser Antikörper nur das native MAT1-Protein und konnte damit nicht für die Kontroll-Hybridisierung eingesetzt werden.

Neben der Dissoziation des TFIIH-Komplexes könnte die Abnahme der Menge des Cdk7-Proteins, welches in bestrahlten Zellen mit dem XPB-Protein präzipitiert, auch durch eine UV-induzierte Degradation des TFIIH-assoziierten Cdk7-Proteins erklärt werden. Diese Möglichkeit ist jedoch eher unwahrscheinlich. Zwar wäre die Abnahme der Menge an kopräzipitiertem Cdk7-Protein konsistent mit einer UV-induzierten Degradation des Cdk7-Proteins, allerdings widerspricht die Tatsache, dass die Menge an Cdk7-Protein, die zusammen mit dem MAT1-Protein in bestrahlten und unbestrahlten Zellen präzipitiert wurde,

konstant blieb, dieser Möglichkeit. Darüber hinaus interferierte auch die Behandlung der Zellen mit einem Inhibitor des Protein-abbauenden Proteasoms nicht mit der Verringerung der Menge an mit dem XPB-Protein kopräzipitiertem Cdk7-Protein nach UV-Bestrahlung.

Zwar ist die physiologische Bedeutung der Abspaltung des trimeren CAK-Komplexes vom TFIID-Kern nach UV-Bestrahlung noch unklar, da aber der TFIID-Kern die CTD der RNA Pol II im Zuge der Transkriptionsinitiation ohne die CAK-Untereinheit und die dort lokalisierte Kinaseaktivität nicht phosphorylieren kann, wäre es denkbar, dass durch die sofortige Ablösung der CAK-Untereinheit nach UV-Bestrahlung die RNA Pol II vermittelte basale Transkription blockiert wird. Dies könnte gleichermaßen auch für die RNA Pol I vermittelte Transkription gelten, an der der TFIID-Komplex ebenfalls beteiligt ist (Übersicht in: Zurita und Merino, 2003). Interessanterweise ist die Kinaseaktivität des Cdk7-Proteins zumindest *in vitro* für die RNA Pol II vermittelte Transkription einiger Gene entbehrlich (Tirode *et al.*, 1999; Akoulitchev *et al.*, 1995; Makela *et al.*, 1995). Dieser Umstand würde erklären, warum nach UV-Bestrahlung die Transkription einiger Gene, zum Beispiel des *c-fos*- und *c-jun*-Gens stimuliert wird, während die Transkription zahlloser Gene reprimiert wird (Devary *et al.*, 1991). Ungeklärt ist jedoch, ob die Transkription jener Gene, die nach UV-Bestrahlung aktiviert werden, unabhängig von einer CTD-Phosphorylierung erfolgt, oder ob die Anwesenheit von CAK beziehungsweise die Kinaseaktivität des Cdk7-Proteins die Transkription dieser Gene eventuell sogar negativ beeinflusst.

Für die NER hingegen ist nachgewiesen, dass die Assoziation des CAK-Komplexes mit dem TFIID-Kern *in vitro* nicht essentiell (Mu *et al.*, 1996), sondern sogar hinderlich ist (Araujo *et al.*, 2000). Für die Funktionalität eines *in vitro* NER-Systems reichen die sechs Proteine des TFIID-Kerns (ohne TTD-ATfb5) aus. Gibt man den CAK-Komplex und ein ATP-regenerierendes System zu, wird die NER-Reaktion inhibiert. Die Inhibition wird durch Zugabe des Kinaseinhibitors H-8 aufgehoben (Araujo *et al.*, 2000). Auch in Hefezellen reicht ein TFIID-Kern-Komplex ohne Kinaseaktivität für eine funktionelle NER aus (Sveijstrup *et al.*, 1995). In diesem Kontext waren die Ergebnisse von Jörg Adamczewski, der zeigen konnte, dass die Kinaseaktivität des mit dem TFIID-Kern assoziierten CAK-Komplexes *in vivo* nach UV-Bestrahlung signifikant abnimmt, nicht verwunderlich (Adamczewski *et al.*, 1996). Auch die von mir gezeigte UV-abhängige Dissoziation von TFIID ist ein Weg zur Vermeidung unerwünschter CAK-abhängiger Phosphorylierungen nach UV-Bestrahlung und somit ein weiterer Schritt hin zur Erklärung des NER-Mechanismus.

Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang die Regulation der TFIID-Aktivität durch Phosphorylierung des XPB-Proteins. Das XPB-Protein liegt in proliferierenden Zellen konstitutiv phosphoryliert vor (Coin *et al.*, 2004). Während in der Transkription sowohl die phosphorylierte als auch die dephosphorylierte Form aktiv sind, inhibiert die phosphorylierte

Form die NER, indem sie die Inzision auf der 5'-Seite UV-induzierter DNA-Schäden unterbindet (Coin *et al.*, 2004). Die Dephosphorylierung des XPB-Proteins könnte den TFIIH-Komplex also vom „Transkriptionsmodus“ in den „Reparaturmodus“ überführen und möglicherweise zur UV-induzierten Dissoziation von TFIIH beitragen. Welche Kinasen und Phosphatasen die Phosphorylierung des XPB-Proteins regulieren ist noch unbekannt. Ein naheliegender Kandidat wäre jedoch die zum Komplex gehörende Kinase Cdk7. Durch die Dissoziation eines überwiegenden Teils des TFIIH-Komplexes und gleichzeitige Inaktivierung der Kinaseaktivität des an den TFIIH-Kern gebundenen CAKs nach UV-Bestrahlung (Adamczewski *et al.*, 1996), könnte eine erneute Phosphorylierung des zum Einsatz in der NER dephosphorylierten XPB-Proteins verhindert und so der intrazelluläre Anteil der in der Reparatur aktiven Form des XPB-Proteins erhöht werden. Da sich durch Ablösung vom TFIIH-Kern auch die Substratspezifität der Kinase Cdk7 ändert (Rossignol *et al.*, 1997), widerspricht die Tatsache, dass freier CAK nach UV-Bestrahlung aktiv bleibt (Adamczewski *et al.*, 1996), nicht dieser Theorie.

Auch eine Behandlung mit den Inhibitoren Mikrozystin-LR, Tautomycin und Okadainsäure, die die Protein-Phosphatasen PP1 und PP2A hemmen, bewirkt einen dramatischen Rückgang der NER-Aktivität in Zellextrakten, der wahrscheinlich durch den Verlust der PP2A-Aktivität zustande kommt (Ariza *et al.*, 1996). PP2A könnte folglich die Phosphatase sein, die das XPB-Protein zum Einsatz in der NER dephosphoryliert. Allerdings hätte diese Phosphorylierung dann keine Auswirkung auf die TFIIH-Dissoziation, da sich der Komplex auch in mit Okadainsäure behandelten Zellen nach UV-Bestrahlung teilt.

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die Zellen einer hohen Strahlendosis von 200 - 300 J/m² ausgesetzt. Die Durchführung einer Dosisabhängigkeit zeigte, dass schon geringe Dosen UVC-Strahlung von 10 bis 60 J/m² die Dissoziation eines Teils des zellulären TFIIH-Komplexes induzieren. Der TFIIH-Komplex dissoziierte dabei innerhalb weniger Minuten nach UV-Bestrahlung. Dass der TFIIH-Kern und die CAK-Untereinheit im Rahmen der Langzeitkinetik selbst nach 24 Stunden nicht reassoziieren, ist wahrscheinlich auf Applikation einer sehr hohen Dosis von 200 J/m² UVC-Licht zurückzuführen. Zwar konnten in früheren Untersuchungen UV-induzierte Schäden 24 Stunden nach einer Bestrahlung mit einer Dosis von 150 J/m² UVC-Licht nicht mehr mit Antikörpern detektiert werden (Dunand-Sauthier *et al.*, 2005), eine Erhöhung um weitere 50 J/m² UVC-Strahlung könnte aber zu irreparablen Schäden geführt haben, so dass die Zellen nicht mehr in den „Ausgangszustand“ zurück kehren konnten. Nach diesem Ergebnis wurde die Langzeitkinetik mit einer niedrigeren Dosis UVC-Licht von 50 J/m² wiederholt, allerdings war hier das Ergebnis nicht eindeutig, da die Intensitätsunterschiede zwischen den einzelnen Banden zu gering waren.

Wie inzwischen bereits mehrfach erwähnt, ist der TFIIH-Komplex sowohl an der Transkription als auch an der DNA-Reparatur beteiligt. Wie eine Behandlung der zu untersuchenden Zellen mit den Transkriptioninhibitoren Aktinomycin D beziehungsweise DRB zeigte, ist keine aktive Transkription nötig, damit sich der TFIIH-Komplex nach UV-Bestrahlung teilt. Notwendig ist jedoch ein aktiver Zellmetabolismus, denn wenn die Zellen während der Bestrahlung und in der Zeit zwischen Bestrahlung und Lyse auf Eis inkubiert wurden, zerfiel der TFIIH-Komplex nach UV-Bestrahlung nicht. Zusätzlich kann man aus diesem Ergebnis ableiten, dass der TFIIH-Komplex nicht aufgrund direkt durch UV-Licht induzierter Modifikationen seiner Proteinkomponenten dissoziiert. Vermutlich erkennen Reparaturproteine die Schäden in der DNA und lösen eine Signaltransduktionskaskade aus, die zur Dissoziation des TFIIH-Komplexes führt.

Bis zu diesem Punkt waren Prä-B Lymphozyten der Linie GM02184 zur Durchführung der Experimente verwendet worden. Mit der Untersuchung weiterer Zelllinien sollte ausgeschlossen werden, dass die UV-induzierte Dissoziation des TFIIH-Komplexes eine Spezialität der untersuchten Lymphozytenzelllinie ist. Fibroblasten der Linie GM01604 wurden als Versuchsobjekte ausgewählt, weil sie aufgrund ihrer Lokalisation in der Haut der UV-Strahlung unter natürlichen Bedingungen ausgesetzt sind. Die bisher verwendeten Lymphozyten der Linie GM02184 wurden außerdem mit dem Epstein-Barr-Virus immortalisiert, wogegen Zellen der Linie GM01604 primäre, das heißt genetisch unveränderte, Hautfibroblasten sind. Diese Zellen kommen also den physiologischen Bedingungen im Körper sehr nahe. Nachdem die UV-induzierte Teilung des TFIIH-Komplexes auch in menschlichen Hautfibroblasten beobachtet worden war, wurden Zelllinien, die aus Lungen- und Knochentumoren sowie aus der Maus etabliert worden waren, untersucht. Die UV-induzierte Teilung des TFIIH-Komplexes konnte in allen ausgewählten Zelllinien unabhängig von der physiologischen Lokalisation im Körper und von genetischen Veränderungen beobachtet werden. Die Dissoziation des TFIIH-Komplexes nach UV-Bestrahlung ist folglich keine Spezifität der Prä-B Lymphozyten und auch kein Artefakt, der durch die Immortalisierung der Zelllinie GM02184 hervorgerufen wird.

4.2 Alternative Funktionen des vom TFIIH-Kern dissoziierten CAK-Komplexes

Die CAK-Untereinheit dissoziierte wenige Minuten nach UV-Schädigung der Zelle als trimere Komplex vom TFIIH-Kern und wurde nicht vom Proteasom degradiert. Der dissoziierte CAK könnte also eine Funktion in der UV-geschädigten Zelle erfüllen. Da sich die Substratspezifität des CAK in Abhängigkeit von der Assoziation mit dem TFIIH-Kern verändert (Rossignol *et al.*, 1997), spricht auch die Feststellung, dass der trimere, freie CAK die Kinaseaktivität behält, während mit dem TFIIH-Kern assoziierter CAK nach UV-

Bestrahlung inaktiv wird (Adamczewski *et al.*, 1996), nicht gegen diese Möglichkeit. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, ist die CAK-Untereinheit zum Beispiel an der Regulation des Zellzyklus beteiligt. Der Zellzyklus wird direkt nach UV-Schädigung der Zelle sofort gestoppt. Möglicherweise sind daran das Cdk7-Protein bzw. der freie CAK-Komplex beteiligt.

Die Kinase Cdk7-Protein des freien CAK-Komplexes könnte nach der UV-Bestrahlung bestimmte Zielproteine phosphorylieren. Hierbei könnte es sich um Transkriptionsfaktoren handeln, die spezifisch nach UV-Schädigung induzierte Gene aktivieren. Das Cdk7-Protein phosphoryliert beispielsweise den Transkriptionsfaktor p53 *in vitro* (Übersicht in: Kaldis, 1999). Das Protein p53, das die Bildung von Tumoren hemmt, ist latent in der Zelle vorhanden und wird durch eine Reihe von Umwelteinflüssen wie Strahlung oder chemotherapeutische Medikamente als transkriptioneller Mediator der Zellantwort auf DNA-Schädigung aktiviert (Übersicht in: Levine, 1997; Blattner *et al.*, 1994; Herrlich *et al.*, 1994).

Die freie CAK-Untereinheit könnte aber auch zum Beispiel durch Phosphorylierung von Enzymen der NER-Maschinerie direkten Einfluss auf die Reparatur nehmen. Eine aktive Rolle der freien CAK-Untereinheit in der NER bietet auch eine Erklärung für das Phänomen, dass eine Injektion von Antikörpern gegen das Cdk7-Protein in die Zelle die NER-Reaktion *in vivo* verhindert (Roy *et al.*, 1994). Es ist allerdings nicht bekannt, welcher Mechanismus der NER dadurch vereitelt werden könnte.

4.3 TFIIH dissoziiert als Antwort auf UV-Strahlung und oxidativen Stress

Jeder DNA-Schaden wird im Allgemeinen von einem für diesen Schaden spezifischen Faktor erkannt, der mit einem individuellen Reparatursystem assoziiert ist. Beispielsweise werden Photoprodukte von der NER repariert, oxidierte Basen von der BER und Doppelstrangbrüche von der DSB (Übersicht in: Sancar *et al.*, 2004). Die Dissoziation von TFIIH wurde sowohl durch UVA- und UVB- als auch durch UVC-Strahlung hervorgerufen. Eine Bestrahlung mit UVA-Licht führt im Gegensatz zu UVB- und UVC-Strahlung aber vorwiegend zu oxidativen Schäden in der DNA-Doppelhelix (Ravanat *et al.*, 2001). Folglich kann die Dissoziation des TFIIH-Komplexes anscheinend durch mehr als eine Schadensform induziert werden. Um dies zu testen, wurden Zellen Faktoren ausgesetzt, die verschiedene Arten von DNA-Schäden induzieren. H₂O₂ induziert wie auch UVA-Strahlung vorwiegend oxidative Schäden in der DNA (Ravanat *et al.* 2001), erwartungsgemäß dissoziierte der TFIIH-Komplex auch in mit H₂O₂ behandelten Zellen. Inkubierte man die Zellen aber vor der Behandlung mit H₂O₂ mit dem „Radikalfänger“ Glutathion, wurde die H₂O₂-induzierte Teilung des TFIIH-Komplexes verhindert. Folglich waren es die durch H₂O₂ induzierten freien Radikale, die in diesem Fall zur Dissoziation von TFIIH führten. Wurden die Zellen aber vor der Behandlung mit UVC-

Strahlung ausschließlich mit Glutathion behandelt, konnte die Dissoziation des TFIIH-Komplexes nicht verhindert werden. Aus diesem Ergebnis kann man ableiten, dass eine Radikalbildung im Fall von UVC-Bestrahlung, wenn überhaupt, eine untergeordnete Rolle bei der Dissoziation des TFIIH-Komplexes spielt. Demzufolge kann neben den Photoprodukten auch oxidativer Stress die Dissoziation des TFIIH-Komplexes bewirken. Warum diese zwei Schadenstypen gleichermaßen die Dissoziation von TFIIH bewirken ist unbekannt. Zwar entfernt die NER neben Photoprodukten auch oxidierte Basen aus der DNA (Drablos *et al.*, 2004; Brooks *et al.*, 2000; Satoh *et al.*, 1993; Übersicht in: Sancar *et al.*, 2004; Rybanska und Pirsal, 2003; Satoh und Lindahl, 1994), man geht allerdings davon aus, dass die NER einen oxidativen Schaden nur dann entfernt, wenn die BER, das eigentliche Reparatursystem zur Entfernung oxidativer Schäden, den Schaden nicht reparieren kann (Drablos *et al.*, 2004; Übersicht in: Sancar *et al.*, 2004; Rybanska und Pirsal, 2003).

Eine Applikation von Gamma-Strahlung führt zu Doppelstrangbrüchen, Einzelstrangbrüchen und Basenveränderungen unter denen auch oxidative Schäden zu finden sind (Übersicht in: Cadet *et al.*, 2003; Albanese und Dainiak, 2003). Doppelstrangbrüche werden im Allgemeinen durch die beiden Reparaturwege der Doppelstrangbruchreparatur (DSBR), homologe Rekombination (HR) und nicht-homologe Endverknüpfung (non-homologous end-joining, NHEJ) entfernt. Bisher wurde keine Beteiligung eines TFIIH-Proteins an einem dieser Reparaturprozesse postuliert. Selbst eine hohe Dosis Gamma-Strahlung von 50 Gray führte nur zur Dissoziation eines minimalen Anteils an zellulärem TFIIH im Vergleich zu UV-bestrahlten Proben. Ob diese Abnahme nun auf die Dissoziation eines geringen Teils der Gesamtmenge an TFIIH in der Zelle durch oxidative Schäden in der DNA zurückzuführen ist oder ob die hohe Dosis Gamma-Strahlung einen direkten Effekt auf das Cdk7-Protein oder ein anderes Protein des TFIIH-Komplexes hat, ist unklar.

Da sich der TFIIH-Komplex sowohl nach Behandlung der Zellen mit H₂O₂ wie auch nach Bestrahlung mit UVA- und möglicherweise sogar nach Bestrahlung mit hohen Dosen Gamma-Strahlung teilt, ist es wahrscheinlich, dass auch Modifikationen einzelner Basen, vorwiegend wahrscheinlich oxidative Veränderungen, neben Photoprodukten die Dissoziation des Komplexes induzieren.

Überraschenderweise führte eine Vorbehandlung der Zellen mit Cisplatin nicht zur Dissoziation von TFIIH, obwohl durch Cisplatin induzierte Strangquervernetzungen Substrate der NER-Enzyme sind (Übersicht in: Zamble und Lippard, 1995). Eines der wichtigsten Schadensbindepoteine in der NER ist das XPC-Protein. Die UV-induzierte Dissoziation von TFIIH fand in XPC-defizienten Zellen nicht statt, was auf eine Verbindung zwischen dem XPC-Protein, welches den Schaden in der DNA bindet, dem NER-System und der Teilung von TFIIH hindeutet. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob das XPC-Protein möglicherweise nicht an der Erkennung oder Reparatur von Cisplatin-induzierten DNA-

Schäden beteiligt ist. Diese Möglichkeit ist jedoch eher unwahrscheinlich. Ein Vergleich von Microarray-Daten nativer und XPC-defizienter Zellen zeigte die Regulation mehrerer hundert XPC-abhängiger Gene durch Cisplatin (Wang *et al.*, 2004a; Wang *et al.*, 2004b). Des Weiteren wurde in XPC-defizienten Zellen eine erhöhte Mutationsrate nach Cisplatin-Behandlung festgestellt (Chen *et al.*, 2003). Diese Beobachtungen führen zu der Annahme, dass das XPC-Protein auch an der Reparatur von Cisplatin-induzierten Schäden beteiligt ist. Das Ausbleiben der Dissoziation des TFIIH-Komplexes nach einer Behandlung mit Cisplatin könnte darauf hinweisen, dass die durch Cisplatin induzierten Veränderungen in der DNA nicht direkt vom XPC-Protein erkannt werden und deshalb in diesem Fall die Teilung des TFIIH-Komplexes nicht induziert wird. Alternativ könnte der TFIIH-Komplex nicht zur Reparatur Cisplatin-induzierter Schäden benötigt werden, beziehungsweise die assoziierte CAK-Untereinheit stört bei der Reparatur dieser Schäden nicht. In diesem Zusammenhang ist eine interessante Frage, ob die Kinaseaktivität des mit dem TFIIH-Kern assoziierten CAK nach Behandlung von Zellen mit Cisplatin erhalten bleibt. Eine weitere Option wäre, dass der freie CAK-Komplex bei der Reparatur von Cisplatin-induzierten Schäden keine eigene Funktion erfüllen muss und aus diesem Grund eine Trennung vom TFIIH-Kern nicht notwendig ist und deshalb nicht ausgelöst wird.

4.4 Molekulare und biochemische Grundlagen der UV-induzierten Dissoziation des TFIIH-Komplexes

Mehrere Proteine des TFIIH-Komplexes werden *in vivo* über Phosphorylierung reguliert. Das Cdk7-Protein, die Kinaseeinheit des TFIIH-Komplexes, ist innerhalb der T-Schleife an Serin 164 und Threonin 170 phosphoryliert (Martinez *et al.*, 1997) und wird zum Beispiel während der Mitose durch Dephosphorylierung inaktiviert (Akoulitchev und Reinberg, 1998). Auch die Phosphorylierung des Zyklin H-Proteins durch Cdk8/Zyklin C führt zum Verlust der Kinaseaktivität des Cdk7-Proteins und damit der Transkriptionsaktivität des TFIIH-Komplexes (Akoulitchev *et al.*, 2000). Neben dem Cdk7-Protein ist in proliferierenden Zellen auch die Helikase XPB konstitutiv phosphoryliert und diese Phosphorylierung inhibiert die NER (Coin *et al.*, 2004). Dies sind nur einige Beispiele für die Regulation der TFIIH-Funktionen durch Phosphorylierung einzelner komplexeigener Proteinkomponenten. Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Aminosäuren führt häufig zu Konformationsänderungen von Proteinen und somit gegebenenfalls auch des zugehörigen Komplexes. Da mehrere Proteine des TFIIH-Komplexes durch Phosphorylierung reguliert werden, ist es durchaus denkbar, dass auch die UV-induzierte Dissoziation des TFIIH-Komplexes durch einen solchen Mechanismus geregelt wird. Vor diesem Hintergrund wurden Zellen *in vivo* mit [³²P]-Orthophosphat markiert, bevor der TFIIH-Komplex mit

Antikörpern gegen verschiedene Komponenten präzipitiert wurde. Die erhaltenen Phosphorylierungsmuster zeigten jedoch keine Veränderung hinsichtlich der Phosphorylierung zwischen bestrahlten und unbestrahlten Zellen. Die angewandte Methode gibt jedoch ausschließlich Auskunft über Veränderungen in der relativen Anzahl der Phosphatreste eines Proteins, weshalb durchaus möglich ist, dass lediglich die Position einer Phosphatgruppe im untersuchten Protein verändert wurde. Eine Regulierung der Dissoziation des TFIID-Komplexes durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung von Proteinkomponenten kann also anhand dieser Ergebnisse nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Ausgeschlossen werden kann allerdings eine Beteiligung der Phosphatasen PP1 und PP2A. Diese beiden Phosphatasen werden durch Okadainsäure effizient gehemmt (Clarke *et al.*, 1993), die Behandlung der Zellen mit Okadainsäure beeinträchtigte die Dissoziation des TFIID-Komplexes nach Bestrahlung jedoch nicht. Die Akkumulation von p53-Protein in den mit Okadainsäure behandelten Zellen zeigte die Wirksamkeit des Inhibitors. Auch eine Beteiligung der komplexeigenen Kinaseaktivität kann ausgeschlossen werden. Zwar ist die Möglichkeit naheliegend, dass eine durch das Cdk7-Protein vorgenommene Phosphorylierung an der UV-induzierten Dissoziation beteiligt ist, die Dissoziation des TFIID-Komplexes in Gegenwart des Transkriptioninhibitors DRB, der zugleich ein potenter Inhibitor der Cdk7-Kinase ist (Rossignol *et al.*, 1997; Yankulov *et al.*, 1995), schließt diese Möglichkeit jedoch aus. Gleichzeitig kann auch eine Beteiligung der Kasein Kinase II ausgeschlossen werden, da DRB auch diese Kinase effizient hemmt (Xagorari *et al.*, 2002; Blaydes und Hupp, 1998). Ein interessanter Kandidat wäre hingegen zum Beispiel die atypische Proteinkinase C zeta, von der bereits gezeigt wurde dass sie die NER stimuliert, allerdings durch Regulierung der Expression des XPC/hHR23B-Heterodimers (Louat *et al.*, 2004).

Auch eine Regulation der Dissoziation des TFIID-Komplexes durch UV-induzierte proteasomale Degradation einer Komponente, die für den Zusammenhalt der TFIID-Untereinheiten benötigt wird, kann ausgeschlossen werden, da der TFIID-Komplex auch in mit dem Proteasomeninhibitor MG132 behandelten Zellen dissoziiert.

Obwohl mittlerweile die Beteiligung der einen oder anderen Komponente an der Dissoziation des TFIID-Komplexes nach UV-Strahlung ausgeschlossen werden konnte, erbrachten die durchgeführten Versuche keine Hinweise auf den Mechanismus, der der Dissoziation zugrunde liegt.

4.5 Die UV-induzierte Teilung des TFIIH-Komplexes ist abhängig von dem Reparaturprotein XPC

Da TFIIH neben der Transkription auch an der NER beteiligt ist und die Dissoziation des Komplexes nach UV-Bestrahlung stattfindet, war die Frage naheliegend, ob die Teilung des Komplexes in Zusammenhang mit der NER steht, sei es als essentieller Bestandteil des Reparatursystems oder als Nebenprodukt der Reparatur.

Um diese Frage zu beantworten, wurde die UV-induzierte Teilung des TFIIH-Komplexes in Zelllinien mit Mutationen in verschiedenen Komponenten des NER-Systems untersucht. Dabei zeigte sich, dass der TFIIH-Komplex in allen untersuchten und auswertbaren reparaturdefizienten Zelllinien mit Ausnahme von Zelllinien oder primären Zellen mit mutiertem XPC-Protein dissoziierte. Der Verlust der UV-induzierten TFIIH-Dissoziation wurde dabei in mehreren Zelllinien mit unterschiedlichen Mutationen im XPC-Protein beobachtet, was darauf hinweist, dass ein funktionelles XPC-Protein benötigt, um die Dissoziation des TFIIH-Komplexes zu induzieren. Darüber hinaus wurde die Dissoziationsfähigkeit durch Einführen eines funktionellen XPC-Proteins in die XPC-defiziente lymphoide Zelllinie GM02246 wieder hergestellt. Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, dass eine kausale Verbindung zwischen dem XPC-Protein, welches den Schaden in der DNA erkennt und bindet, und der Dissoziation des TFIIH-Komplexes besteht. Ein funktionelles XPC-Protein, welches ausschließlich für die Schadenserkennung in der GGR benötigt wird, ist also obligatorisch für die Teilung des Komplexes, wogegen die CS-Proteine, welche spezifisch für die Schadenserkennung in der TCR sind, nicht benötigt werden (Übersicht in: Sancar *et al.*, 2004). Ist also die Dissoziation von TFIIH eine Spezifität der GGR?

Ein bezüglich der Reparatur weiterer zu bedenkender Aspekt ist die Größe des TFIIH-Komplexes. Bei der Rekrutierung von TFIIH zu einem Schaden in einem nicht aktiv transkribierten Teil der DNA müsste der Multiproteinkomplex von den Orten aktiver Transkription durch den gesamten, dicht gepackten Nukleus zu der Schadensstelle in der DNA transportiert werden. Außerdem würde sich in der GGR der TFIIH-Komplex aus zehn Proteinen zusammen mit mindestens fünf weiteren Komponenten der NER (XPA, RPA, XPG und das Dimer XPF-ERCC1) um die Schadensstelle drängen, der vollständige TFIIH-Komplex könnte folglich möglicherweise für die Formierung des Präinziptionskomplexes schlicht zu groß sein. Durch die Abspaltung der CAK-Untereinheit und eventuell weiterer Proteine des TFIIH-Kerns könnte die Größe des TFIIH-Kerns so weit reduziert werden, dass alle Enzyme, die für die GGR benötigt werden, am Schaden platziert werden können.

Für die TCR scheint die Dissoziation des TFIIH-Komplexes indes nicht erforderlich zu sein. Weder ist in Zellen, bei denen aufgrund von Veränderungen in einem CS-Protein die TCR nicht erfolgt, die Dissoziation des TFIIH-Komplexes gestört, noch wird die Dissoziation durch eine Behandlung mit den Transkriptioninhibitoren Aktinomyzin D oder DRB beeinflusst.

Zumindest eine Behandlung mit Aktinomyzin D führt zu einer Blockierung der RNA Pol II, wie sie auch durch UV-induzierte Photoprodukte in der DNA hervorgerufen wird. Eine an einem DNA-Schaden feststehende Polymerase kann folglich nicht das Signal zur Teilung von TFIIH geben, da sie durch den Einsatz von Aktinomyzin D schon blockiert worden war, bevor sie ein Photoprodukt erreichen konnte.

Hinsichtlich dieser Ergebnisse scheint es, dass der Wechsel zwischen Transkriptions- und Reparaturform des TFIIH-Komplexes in Abhängigkeit davon, ob die TCR oder die GGR den betreffenden Schaden entfernt, auf zwei verschiedene Arten erfolgen kann.

Eine offene Frage bleibt dabei, wie das XPC-Protein, wenn es an einen DNA-Schaden gebunden ist, die Teilung des TFIIH-Komplexes induzieren kann. Die wahrscheinlichste Möglichkeit ist, dass das XPC-Protein, nachdem es ein Photoprodukt gebunden hat, eine Signalkaskade auslöst, die zu einer Modifikation des TFIIH-Komplexes oder einer anderen zellulären Komponente, die dann den Komplex beeinflusst, führt. Als Konsequenz davon könnte die Konformation von Proteinen des Komplexes verändert werden und der Kontakt zwischen CAK und dem TFIIH-Kern verloren gehen. Ein denkbarer Kandidat für die Vermittlung der Signaltransduktion zwischen dem XPC-Protein und dem TFIIH-Komplex war das p53 Tumorsuppressorprotein. Mehrere veröffentlichte Aufsätze hatten einen Zusammenhang zwischen dem p53-Protein und der GGR postuliert (Nahari *et al.*, 2004; Ford und Hanawalt, 1997; Ford und Hanawalt, 1995). So spielt das p53-Protein zum Beispiel eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung der NER-Faktoren und der Zusammensetzung des Inzisionskomplexes (Wang *et al.*, 2003a). Die untersuchten Zelllinien H1299 und SAOS-2 exprimieren jedoch kein p53-Protein, die UV-induzierte Teilung des TFIIH-Komplexes konnte aber auch in diesen Zelllinien beobachtet werden. Folglich kann eine p53-vermittelte Signaltransduktion zwischen TFIIH und dem XPC-Protein ausgeschlossen werden.

Alternativ könnte das XPC-Protein durch eine direkte Interaktion mit dem TFIIH-Komplex eine Konformationsänderung induzieren, die zur Teilung des Komplexes führt. Interaktionen des XPC-Proteins mit dem XPB- und dem p62-Protein wurden in der Vergangenheit bereits gezeigt (Riedl *et al.*, 2003; Yokoi *et al.*, 2000). Allerdings ist unklar, wie ein XPC-Protein, welches einen Schaden irgendwo im Genom lokalisiert und gebunden hat, mit dem TFIIH-Komplex interagieren kann, der in die Transkriptionsmaschinerie eingebunden ist. Wahrscheinlicher ist deshalb die Überlegung, dass eine direkte Interaktion zwischen dem an den Schaden gebundenen XPC-Protein und den Proteinen des TFIIH-Komplexes erst nach der Rekrutierung von TFIIH zu der Schadensstelle erfolgt. Alternativ wäre es denkbar, dass der TFIIH-Komplex erst nachdem er zum Ort der Läsion rekrutiert wurde, dissoziiert. In diesem Fall könnte eine direkte Interaktion des XPC-Proteins mit Komponenten des TFIIH-Komplexes sehrwohl zu dessen Dissoziation führen, möglicherweise indem sich das XPC-

Protein nach UV-Bestrahlung der Zellen zwischen die beiden Untereinheiten des TFIIH-Komplexes schiebt. Aufgrund der vergrößerten räumlichen Entfernung und Veränderungen der Bindungsstärken könnte dies eine Ko-Präzipitation von CAK und Kern-Untereinheit unterbinden.

Bei den vorgenommenen Analysen fiel außerdem auf, dass die Menge des XPC-Proteins sowohl in den Wildtyp- (GM02184) als auch in den mit der XPC-cDNA rekonstituierten Zellen nach UV-Bestrahlung abnahm. Diese Abnahme war um so erstaunlicher, da die Funktion des XPC-Proteins gerade nach UV-Bestrahlung gebraucht wird. Eine Möglichkeit für die beobachtete Mengenabnahme wäre eine UV-abhängige Degradation des XPC-Proteins. In Hefezellen wurde eine UV-abhängige proteasomale Degradation des RAD 4-Proteins, dem XPC-Homolog, bereits gezeigt (Lommel *et al.*, 2002). Das RAD 4-Protein wird in Hefezellen nach UV-Bestrahlung ubiquitinyliert und degradiert. Seine Bindung an das RAD23-Protein protektiert es hingegen vor proteasomalem Abbau (Lommel *et al.*, 2002). Hefezellen mit mutierter 26S-Untereinheit des Proteasoms oder mit einer Überexpression des RAD 4-Proteins zeigen eine erhöhte NER-Rate (Lommel *et al.*, 2002). Alle diese Ergebnisse weisen auf eine negative Regulation der NER in Hefe durch proteasomale Degradation hin (Lommel *et al.*, 2002). Eine Analyse von Mauszellen, die weder das hHR23A- noch hHR23B-Protein exprimieren, zeigte, dass das HR23-Protein das XPC-Protein stabilisiert, indem es das Protein vor proteasomaler Degradation schützt (Ng *et al.*, 2003). In eukaryontischen Zellen wird auch das NER-Protein p48, eine Untereinheit des DDB, kurze Zeit nach UV-Bestrahlung degradiert (Rapic-Otrin *et al.*, 2002). Erleidet das XPC-Protein ein ähnliches Schicksal? Und wird die NER auch in menschlichen Zellen durch proteasomale Degradation reguliert? Diese Fragen bleiben vorerst unbeantwortet.

4.6 Modell zur UV-abhängigen Dissoziation des TFIIH-Komplexes

Im Rahmen meiner Doktorarbeit konnte ich zeigen, dass die beiden Untereinheiten des TFIIH-Komplexes, CAK und der TFIIH-Kern, nach UV-Bestrahlung der Zelle in Abhängigkeit von dem Reparaturprotein XPC voneinander dissoziieren. Die Dissoziation ist vermutlich auf folgenden Mechanismus zurückzuführen: Das XPC-Protein erkennt und bindet ein UV-induziertes Photoprodukt in der DNA-Doppelhelix. Durch diese Bindung wird eine Signalkaskade ausgelöst, die zu einer Veränderung im TFIIH-Komplex führt. Möglicherweise werden ein oder mehrere Proteine des Komplexes zum Beispiel durch Phosphorylierung oder Azetylierung verändert. Diese Modifikationen könnten zu einer Konformationsänderung des Komplexes führen, welche die Dissoziation der TFIIH-Untereinheiten mit sich bringt. Der TFIIH-Kern-Komplex oder Teile davon werden zum Schaden rekrutiert, um die Reparatur durchzuführen, während die CAK-Untereinheit als trimerer Komplex der Zelle zur Erfüllung weiterer Aufgaben zur Verfügung steht.

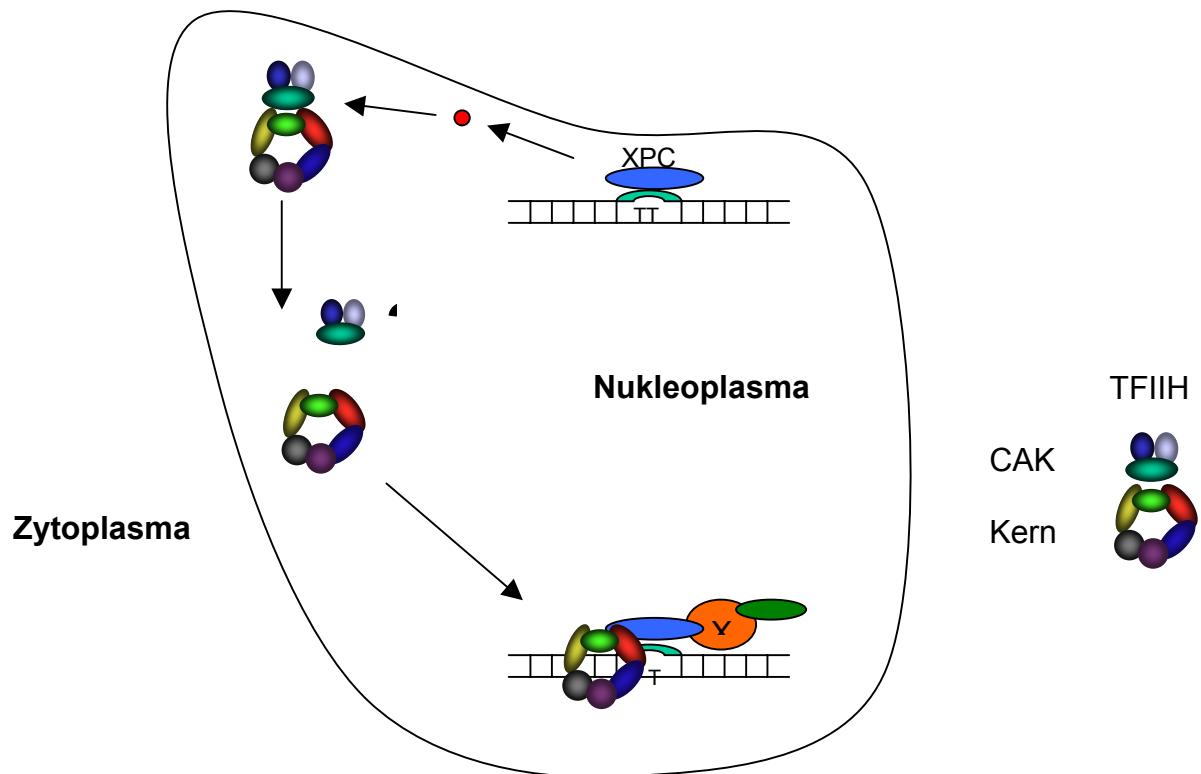


Abbildung 4.1: Modell zur UV-induzierten Dissoziation von TFIIH
Nähere Erläuterung im Text

4.7 Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass sich die trimere CAK-Untereinheit nach UV-Bestrahlung vom TFIIH-Kern löst. Es bleibt jedoch unklar, wie sich die Komponenten des TFIIH-Kerns nach UV-Bestrahlung verhalten. Löst sich der Kern in seine Bestandteile auf oder bleibt er als Ganzes oder in Teilen intakt? Welche Konsequenzen hat die Dissoziation? Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Tatsache, dass nach UV-Bestrahlung die Transkription der meisten Gene reprimiert wird, während die Transkription anderer Gene stimuliert wird (Boerma *et al.*, 2005). Daraus leitet sich die Frage ab, ob die Transkription der nach UV-Bestrahlung aktivierten Gene auch ohne die CAK-Untereinheit stattfindet. Ferner konnte im Rahmen dieser Arbeit nur ungenügend darauf eingegangen werden, welche molekularen biochemischen Prozesse zur Dissoziation führen und wie das XPC-Protein in diese Vorgänge eingreift. Ein weiterer interessanter Aspekt ist der Verbleib und die Funktion des vom TFIIH-Kern dissoziierten CAK-Komplexes.

Was die mögliche Dissoziation des TFIIH-Kerns betrifft, so ist bisher bekannt, dass die TFIIH-Kern-Komponenten XPC und XPD essentiell für die NER sind und an einem DNA-

Schaden akkumulieren (Winkler *et al.*, 2000; Übersicht in: Egly, 2001). Mittels immunhistochemischer Färbung wurde außerdem die Translokation des p62-Proteins an den Ort des DNA-Schadens gezeigt (Mone *et al.*, 2001). Ob weitere Bestandteile des TFIIH-Kerns gleichfalls an einem DNA-Schaden akkumulieren, konnte bisher aufgrund Fehlens entsprechender Antikörper nicht nachgewiesen werden. Gleichmaßen offen ist die Frage, ob die übrigen Untereinheiten des TFIIH-Kerns überhaupt für die Reparatur von Photoprodukten benötigt werden. Dieser Fragenkomplex könnte durch eine abgewandelte Form einer Ko-IP beantwortet werden: Zellen müssten dazu mit Oligonukleotiden transfiziert werden, welche neben einem synthetisch hergestelltem Photoprodukt eine Sequenz zur Aufreinigung der Oligonukleotide enthalten, zum Beispiel Brom-desoxy-Uridin oder einen Dinitrophenyl-Rest. In Abhängigkeit von der Transfektionseffizienz müssten die transfizierten Zellen möglicherweise angereichert werden, zum Beispiel mit Hilfe eines FACS-Gerätes oder magnetischer Teilchen. Anschließend würden die Zellen lysiert und das Oligonukleotid mit Hilfe eines gegen diese Sequenz gerichteten Antikörpers präzipitiert werden. Sowohl Antikörper gegen Brom-desoxy-Uridin als auch gegen einen Dinitrophenyl-Rest sind kommerziell erhältlich. Die IPs würden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran übertragen werden. Durch Inkubation der Membran mit Antikörpern gegen die Proteine des TFIIH-Komplexes könnte dann bestimmt werden, welche Komponenten des Komplexes am Photoprodukt akkumulieren. Die Antikörper dazu müssten allerdings teilweise noch hergestellt werden, da bisher gegen die Proteine MAT1, p34, p44, p54 und Tfb5/TTD-A nur Antikörper von schlechter Qualität erhältlich sind. Diese neu angefertigten Antikörper könnten dann parallel für eine Immunfluoreszenzfärbung in partiell UV-bestrahlten Zellen verwendet werden, wie sie bereits im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde. Alternativ könnten die TFIIH-Proteine selbst für die IP und die Immunfluoreszenzfärbung mit einer bestimmten Sequenz aus einem anderen Protein versehen werden, zum Beispiel des c-Myc- oder V5-Proteins. Diese Sequenz würde die Detektion der TFIIH-Proteine mit einem gegen die betreffende Sequenz des c-Myc- oder des V5-Proteins gerichteten Antikörpers ermöglichen. Solche Antikörper sind kommerziell erhältlich. Für die mikroskopische Analyse könnten auch chimäre Proteine aus der jeweiligen Sequenz und einem fluoreszierenden Protein hergestellt werden, zum Beispiel mit GFP oder YFP. Plasmide mit den chimären cDNAs müssten dann in Zellen transfiziert werden. Daraufhin könnten die Zellen partiell UV-bestrahlt werden. Mit Hilfe des Laser-Konfokal-Mikroskops könnte dann detektiert werden, welche TFIIH-Komponenten an einem DNA-Schaden akkumulieren. Bei dieser Vorgehensweise ist jedoch zu bedenken, dass die Konformation eines Proteins durch zusätzliche Sequenzen, vor allem wenn sie wie im Falle des GFP-Proteins sehr groß sind, verändert werden. Deshalb sind sorgfältige Kontrollen durchzuführen, um sicher zu stellen, dass die Reaktion des chimären Proteins auf UV-Schädigung der Zelle nicht von der

natürlichen Reaktion abweicht. Eine Möglichkeit dies zu überprüfen wäre zum Beispiel der Einsatz des chimären Proteins in einem *in vitro* Reparatursystem.

Der Einsatz eines Cdk7-Inhibitors wie zum Beispiel DRB könnte Aufschluss darüber geben, ob die Kinaseaktivität des Cdk7-Proteins generell für die NER benötigt wird. In mit DRB behandelten Zellen könnte ein „Host Cell Reactivation“-Assay zur Bestimmung der Funktionsfähigkeit der NER durchgeführt werden (Khan *et al.*, 2002; Qiao *et al.*, 2002; Slor *et al.*, 2000). Dazu müsste ein Reporterplasmid, zum Beispiel mit dem *Luziferase*-Gen, mit UV-Licht bestrahlt und in die zu untersuchenden Zellen transfiziert werden. Nach 24 bis 48 Stunden könnte dann die Reporteraktivität im Luminometer bestimmt werden (Khan *et al.*, 2002). Anhand des Vergleich der Messwerte der Luziferaseaktivität von unbehandelten Zellen mit den Werten mit DRB behandelter Zellen könnte eine Aussage getroffen werden, ob die Kinaseaktivität des Cdk7-Proteins für die NER-Aktivität *in vivo* notwendig ist. Eine Hemmung der NER durch die Kinaseaktivität des Cdk7-Proteins wurde bisher nur in *in vitro*-Assays gezeigt (Araujo *et al.*, 2000). Direkte Hinweise auf eine alternative Funktion der freien CAK-Untereinheit nach UV-Bestrahlung könnten zum Beispiel durch eine „Two-Hybrid“-Studie in bestrahlten beziehungsweise unbestrahlten Hefezellen gewonnen werden. Mit dieser Vorgehensweise könnten weitere Bindungspartner der Proteine der CAK-Untereinheit identifiziert werden, durch die möglicherweise Rückschlüsse auf eine Funktion des CAK nach Dissoziation vom TFIIH-Kern gezogen werden könnten. Die Ergebnisse dieser Studie könnten zum Beispiel Hinweise auf Substrate des Cdk7-Proteins in UV-bestrahlten und unbestrahlten Zellen und somit auf eventuell induzierte Signaltransduktionswege geben.

Die physiologische Bedeutung, welche die Ablösung der CAK-Untereinheit vom TFIIH-Kern hat, ist noch immer unklar. Sie könnte aber zum Beispiel für die Inaktivierung der RNA Pol II vermittelten Transkription verantwortlich sein. In der Vergangenheit wurde bereits gezeigt, dass CAK für die Transkription einiger Promotoren *in vitro* nicht erforderlich ist (Araujo *et al.*, 2000; Akoulitchev *et al.*, 1995). Die Möglichkeit, dass die Dissoziation der CAK-Untereinheit vom TFIIH-Kern das differenzierte An- und Abschalten einzelner Gene nach UV-Strahlung reguliert, könnte untersucht werden, indem die Promotoren UV-induzierter Gene mit Promotoren UV-reprimierter Gene in *in vitro* Transkriptionsstudien verglichen werden und die Notwendigkeit der Anwesenheit einer funktionellen CAK-Untereinheit zur Transkription untersucht wird.

Auch hinsichtlich des molekularen und biochemischen Ablaufs der Dissoziation des TFIIH-Komplexes bleiben nach dieser Studie noch viele Fragen offen. Zwar konnte ich eine Beteiligung der Phosphatasen PP1 oder PP2A sowie der Kinasen Cdk7 oder CK2 an der Dissoziation des TFIIH-Komplexes ausschließen, für die konkrete Beteiligung der einen oder anderen Zellkomponente am molekularen Mechanismus der Dissoziation konnte ich, mit Ausnahme des XPC-Proteins, bis jetzt keine Anhaltspunkte finden. Die Behandlung von

Zellen mit Inhibitoren anderer modifizierender Enzyme, wie zum Beispiel weiterer Phosphatasen und Kinasen, Azetylasen und Deazetylasen, und die anschließende Untersuchung des TFIIH-Komplexes in bestrahlten und unbestrahlten Zellen könnte weitere Hinweise auf den Dissoziationsmechanismus von TFIIH bringen. Als weitere Phosphataseinhibitoren wären zum Beispiel RK-682 und Dephostatin zu erwähnen, die Protein-Tyrosin-Phosphatasen inhibieren. Die Substanz DMHV ist ein potenter Inhibitor der Tyrosin-Phosphatase 1B und LY294002, Wortmannin und Koffein sind potente Inhibitoren von PI3-Kinasen. Als Inhibitor für Deazetylasen könnte zum Beispiel TSA verwendet werden. Wie bereits erwähnt stimuliert die atypische Proteinkinase C (PKC) zeta die NER-Aktivität (Louat *et al.*, 2004). Der Einsatz spezifischer Inhibitoren oder von siRNA gegen diese PKC-Isoform könnte zeigen, ob die Kinaseaktivität von PKC die UV-induzierte Dissoziation von TFIIH beeinflusst.

Um einen genaueren Einblick in veränderte Phosphorylierungsmuster von TFIIH-Komponenten und Reparaturproteinen zu erhalten, könnten zweidimensionale Peptidkarten der betreffenden Proteine vor und nach UV-Bestrahlung angefertigt werden. Hierzu müssten die Zellen vor der Bestrahlung mit [³²P]-Orthophosphat radioaktiv markiert werden. Das zu untersuchende Protein würde aus dem Lysat präzipitiert und mit Hilfe einer bestimmten Peptidase, zum Beispiel Trypsin, gespalten werden. Die entstehenden Fragmente würden dann in zwei Dimensionen elektrophoretisch und chromatographisch aufgetrennt und gegen einen Röntgenfilm exponiert. Gegenüber der bisher angewendeten Methode hätte der Verdau des Proteins und die zweidimensionale Auftrennung den Vorteil, dass nicht nur die Gesamtphosphatmenge des Proteins bestimmt werden könnte, sondern auch die Phosphatmenge der einzelnen Fragmente. Dadurch können in der Regel auch intramolekulare Phosphatumlagerungen detektiert werden, die bei der alleinigen Präzipitation und Autoradiographie untergehen. Ein Problem bei der Anwendung dieser Methode könnte allerdings die geringe Phosphatinkorporation der TFIIH-Komponenten sein. Die zu untersuchenden Komponenten müssen nach einer SDS-PAGE aus dem Gel eluiert werden. Für die Identifizierung des zu untersuchenden Proteins im Gel könnte die Phosphatmarkierung möglicherweise nicht ausreichen. Dieser Umstand müsste dann durch vorherige Transfektion und Überexpression der TFIIH-Komponenten verbessert werden, so dass die Komponenten zumindest auf Proteinebene leicht nachweisbar werden. Alternativ könnten die Proteine des TFIIH-Komplexes mittels Massenspektroskopie untersucht werden. Dazu würde der TFIIH-Komplex aus dem Lysat bestrahlter und unbestrahlter Zellen präzipitiert und über Säulenchromatographie und Gelelektrophorese aufgereinigt werden. Auch hier müssten die Faktoren durch eine Peptidase verdaut und anschließend das Gemisch in einem Massenspektrometer analysiert werden. Eine Veränderung der Laufmodalitäten eines Peptids der einzelnen Proteine gäbe Hinweise auf eine

Größenänderung des Proteins und damit verbundene Modifikationen. Als Erweiterung würde sich eine Untersuchung des Komplexes in XPC-defizienten Zellen empfehlen, da hier keine UV-induzierte Dissoziation stattfindet. Ein Vergleich der massenspektrometrischen Analyseergebnisse reparaturkompetenter Zellen und XPC-defizienter Zellen könnte einen Einblick gewähren, welche TFIIH-Komponente in Abhängigkeit von dem XPC-Protein modifiziert wird und eventuell die Dissoziation von TFIIH herbeiführt. Dieser Vergleich wäre besonders hilfreich, falls mehrere Proteine modifiziert werden.

Interessant wäre zudem zu untersuchen, ob die kürzlich beschriebene Phosphorylierung von Serin 751 im XPB-Protein Einfluss auf die UV-induzierten Veränderungen des TFIIH-Komplexes hat, da eine Dephosphorylierung die in der Transkription aktive Form des Komplexes in die in der Reparatur aktive Form überführt (Coin *et al.*, 2004). Durch die Herstellung zweier Mutanten könnte festgestellt werden, ob die Dephosphorylierung von Serin 751 Einfluss auf die Teilungsfähigkeit von TFIIH hat. Dabei sollte eine der Mutanten statt eines Serins an Position 751 ein Alanin enthalten und die unphosphorylierte Form des Proteins nachahmen. Im XPB-Protein der zweiten Mutante würde Serin 751 durch Asparaginsäure ersetzt, was eine konstitutiv phosphorylierte Form imitieren würde. Beide Mutanten wären bezüglich der Aminosäureposition 751 nicht mehr veränderbar und würden je eine Zustandsform des Proteins simulieren. Die Mutanten müssten außerdem mit einer bestimmten Sequenz aus einem anderen Protein versehen werden, zum Beispiel des c-Myc- oder V5-Proteins, damit sie von der nativen Form zu unterscheiden wären. Nach einer Transfektion der Mutanten in Zellen würde ein Teil der Zellen bestrahlt und der TFIIH-Komplex würde anschließend mit einem kommerziell erhältlichen Antikörper gegen die c-Myc- oder V5-Sequenz aus dem Lysat gefällt und über SDS-PAGE aufgetrennt werden. Nach Übertragung der Proteine auf eine Membran und der Detektion der TFIIH-Komponenten könnte anhand der Ergebnisse eine Aussage getroffen werden, ob eine der beiden Zustandsformen der Aminosäure 751 des XPB-Proteins die UV-induzierte Dissoziation des TFIIH-Komplexes unterbindet. Sollte eine der Formen die Teilung des TFIIH-Komplexes nach UV-Bestrahlung verhindern, so wäre der nächste Schritt die Untersuchung, ob in XPC-defizienten Zellen, in denen die UV-induzierte Dissoziation von TFIIH nicht stattfindet, nur die betreffende Form des XPB-Proteins zu finden ist. Sollte also zum Beispiel die Nachahmung des „konstitutiv phosphorylierten“ XPB-Proteins (Ser751Asp) die Teilung unterbinden, so wäre es möglich, dass in XPC-defizienten Zellen eine Dephosphorylierung des Serins 751 im XPB-Protein nach UV-Bestrahlung unterbleibt und umgekehrt. Die einfachste Möglichkeit, dies zu untersuchen, wäre die Verwendung eines phosphorylierungsspezifischen Antikörpers gegen Serin 751. Leider ist ein solcher Antikörper nicht erhältlich und müsste selbst hergestellt oder in Auftrag gegeben werden. Man könnte die aufgereinigten XPB-Proteine aus unbestrahlten und bestrahlten Wildtyp- und XPC-

defizienten Zellen auch, wie bereits zuvor beschrieben, in einem Massenspektrometer untersuchen und so Hinweise auf das Phosphorylierungsmuster erhalten.

Um der Aufklärung der Signaltransduktionskaskade näher zu kommen, wäre es sicherlich auch hilfreich zu untersuchen, welche Domäne(n) innerhalb des XPC-Proteins für die UV-induzierte Dissoziation des TFIIH-Komplexes verantwortlich ist (sind). Die Arbeitsgruppe von Fumio Hanaoka ermittelte in der Vergangenheit mit Hilfe von Deletionsmutanten des XPC-Proteins die Lokalisation verschiedener Domänen (Uchida *et al.*, 2002). So ordneten sie die Interaktion mit dem hHR23B-Protein dem Bereich von AS 496 bis AS 734, die DNA-Interaktionsdomäne dem Bereich von AS 607 bis AS 742 und die Interaktionsdomäne mit TFIIH dem C-terminalen Ende des XPC-Proteins von AS 816 bis AS 940 zu (siehe auch Abbildung 1.6; Uchida *et al.*, 2002).

Die Arbeitsgruppe von Ron Legerski beschrieb ebenfalls die Interaktion des XPC-Proteins mit dem hHR23B-Protein, allerdings lokalisierte diese Gruppe die Interaktionsdomäne im XPC-Protein in dem Bereich zwischen AS 776 und AS 801 (Li *et al.*, 1997). Unverständlicherweise benutzte diese Arbeitsgruppe ein XPC-Protein mit N-terminaler Deletion ($\Delta 1-108$). Es ist deshalb nicht völlig auszuschließen, dass der Verlust des N-terminalen Endes die Konformation und auch die Interaktionsmodalitäten des Proteins verändert. Durch die Diskrepanz in den Ergebnissen der beiden Arbeitsgruppen und der möglichen Bedeutung der Interaktionsdomänen für die Dissoziation des TFIIH-Komplexes, sollten die früheren Ergebnisse überprüft werden. Dazu sind Deletionsmutanten des XPC-Proteins herzustellen oder von Professor Hanaoka zu erfragen und zu sequenzieren. Bei den Deletionsmutanten sollte jede Interaktionsdomäne des XPC-Proteins einzeln ausgeschaltet werden. Die Deletionsmutanten würden dann in XPC-defiziente Zellen transfiziert und positive Klone selektioniert werden. Anschließend könnte die Dissoziation des TFIIH-Komplexes in Gegenwart der XPC-Mutanten mit charakterisierter Deletion einzelner Domänen untersucht werden. Zusätzlich sollten die Deletionsmutanten auf ihre Fähigkeit mit dem hHR23B-Protein und der DNA zu interagieren getestet werden. Die Bindung an das hHR23B-Protein könnte zum Beispiel durch Expression der Proteine in einem *in vitro* Transkriptionssystem und anschließender Ko-IP überprüft werden. Die Fähigkeit, an DNA zu binden, könnte hingegen durch DNA-Bindungsstudien („DNA Footprint“) analysiert werden. Diese Technik beruht auf der Annahme, dass die Bindung eines Proteins an eine bestimmte DNA-Sequenz den Verdau dieser Region durch die Endonuklease DNaseI verhindert. Zur Durchführung sollte ein DNA-Fragment, welches ein Photoprodukt enthält, in unabhängigen Versuchsansätzen mit den verschiedenen XPC-Deletionsmutanten inkubiert werden. Idealerweise sollte das Oligonukleotid ein (6-4)PP besitzen, da das XPC-Protein (6-4)PPs besser bindet als CPDs (Sugasawa *et al.*, 2001). Die DNA wird dann mit DNaseI verdaut und der Verdau mittels Gelelektrophorese analysiert. Ein Vergleich des Bandenmusters der

verschiedenen Ansätze sollte den „Fußabdrucks“ der durch das XPC-Protein protektierten Region zeigen.

Das XPC-Protein sollte außerdem daraufhin untersucht werden, ob es direkt mit Komponenten des TFIIH-Komplexes interagiert. Die Interaktion mit den Proteinen XPB und p62 des TFIIH-Komplexes wurde bereits beschrieben (Uchida et al., 2002; Yokoi et al., 2000). Diese Ergebnisse sollten überprüft und auf weitere Komponenten des TFIIH-Komplexes ausgedehnt werden. Die Deletionsmutanten können auch hier wieder herangezogen werden, um zu bestimmen, welcher Bereich des XPC-Proteins dafür erforderlich ist. Durch Vergleich mit den Resultaten des beschriebenen Experimentes, bei dem die Deletionsmutanten in Zellen transfiziert werden und anschließend die Dissoziation des TFIIH-Komplexes untersucht wird, wird sich zeigen, ob in beiden Fällen die gleichen Domänen erforderlich sind.

Durch die Untersuchung von Deletionsmutanten des XPC-Proteins zusammen mit den Ergebnissen aus den „Two-Hybrid“-Studien in Hefezellen und der Verwendung von verschiedenen Inhibitoren von Signalwegen könnte es möglich sein, konkrete Hinweise auf den nach UV-Bestrahlung induzierten Signaltransduktionsweg zwischen dem XPC-Protein und TFIIH zu erhalten. Die Entschlüsselung dieses Signaltransduktionsweges wäre ein weiterer Schritt hin zum Verständnis der Mechanismen der NER.

5. Literaturverzeichnis

- **Aboussekhra A., Biggerstaff M., Shivji M. K. K., Vilpo J. A., Moncollin V., Podust V. N., Protic M., Hübscher U., Egly J.-M., Wood R. D.**
Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components
1995 *Cell* **80**, pp. 859 - 868
- **Adamczewski J. P., Rossignol M., Tassan J.-P., Nigg E. A., Moncollin V., Egly J.-M.**
MAT1, cdk7 and cyclin H form a kinase complex which is UV light-sensitive upon association with TFIIH
1996 *EMBO J.* **15**, pp. 1877 - 1884
- **Adimoolam S. und Ford J. M.**
p53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair (Review)
2003 *DNA repair* **2**, pp. 947 - 954
- **Adimoolam S. und Ford J. M.**
p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene
2002 *PNAS* **99** (20), pp. 12985 - 12990
- **Akoulitchev S., Chuikov S., Reinberg D.**
TFIIH is negatively regulated by cdk8-containing mediator complexes
2000 *Nature* **407**, pp. 102 - 106
- **Akoulitchev S. und Reinberg D.**
The molecular mechanism of mitotic inhibition of TFIIH is mediated by phosphorylation of CDK7
1998 *Gen. Dev.* **12**, pp. 3541 - 5294
- **Akoulitchev S., Makela T.P., Weinberg R.A., Reinberg D.**
Requirement for TFIIH kinase activity in transcription by RNA polymerase II
1995 *Nature* **377**, pp. 557 - 560
- **Albanese J. und Dainiak N.**
Modulation of intercellular communication mediated at the cell surface and on extracellular membrane-derived vesicles by ionizing radiation (Review)
2003 *Exp. Hematol.* **31** (6), pp. 455 - 464
- **Albright S. R. und Tijan R.**
TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm new ideas
2000 *Gene* **242**, pp. 1 - 13
- **Allison L.A., Moyle M., Shales M., Ingles C.J.**
Extensive homology among the largest subunits of eukaryotic and prokaryotic RNA polymerases
1985 *Cell* **42**, pp. 599 - 610
- **Andersen G., Busso D., Poterszman A., Hwang J.R., Wurtz J.M., Ripp R., Thierry J.C., Egly J.-M., Moras D.**
The structure of cyclin H: common mode of kinase activation and specific features
1997 *EMBO J.* **16** (5), pp. 958-67
1997 *EMBO J.* **16** (5), pp. 958-67
- **Andersen G., Poterszman A., Egly J.-M., Moras D., Thierry J.C.**
The crystal structure of human cyclin H
1996 *FEBS Lett.* **397** (1), pp. 65-9
- **Angel P. und Karin M.**
The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation
1991 *Biochem. Biophys. Acta* **1072**, pp. 129 - 157
- **Aquilina G. und Bignami M.**
Mismatch repair in correction of replication errors and processing of DNA damage (Review)
2001 *J. Cell Physiol.* **187**, pp. 145 - 154
- **Araki M., Masutani C., Takemura M., Uchida A., Sugasawa K., Kondoh J., Ohkuma Y., Hanaoka F.**
Centrosome protein centrin2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair
2001 *J. Biol. Chem.* **276**, pp. 18665 - 18672
- **Araujo S. J., Nigg E. A., Wood R. D.**
Strong functional interactions of TFIIH with XPC and XPG in human DNA nucleotide excision repair, without a preassembled repairosome
2001 *Mol. Cell. Biol.* **21** (7), pp. 2281 - 2291

- **Araujo S. J., Tirode F., Coin F., Pospiech H., Syvaioja J. E., Stucki M., Hübscher U., Egly J.-M., Wood R. D.**
Nucleotide excision repair of DNA with recombinant human proteins: definition of the minimal set of factors, active forms of TFIIH, and modulation by CAK
2000 *Gen. Dev.* **14**, pp. 349 - 359
- **Arellano M. und Moreno S.**
Regulation of cdk/cyclin-complexes during the cell cycle
1997 *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**, pp. 559 - 573
- **Armellini M. G., Muotri A. R., Marchetto M. C., de Lima-Bessa K. M., Sarasin A., Menck C. F.**
Restoring DNA repair capacity of cells from three distinct diseases by XPD gene-recombinant adenovirus.
2005 *Cancer Gene Ther.* **12** (4), pp. 389 - 396
- **Asahina H., Kuraoka I., Shirakawa M., Morita EH., Miura N., Miyamoto I., Ohtsuka E., Okada Y., Tanaka K.**
The XPA protein is a zinc metalloprotein with an ability to recognize various kinds of DNA-damage
1994 *Mut. Res.* **315**, pp. 229 - 237
- **Austin R. J. and Biggin M. D.**
Purification of *Drosophila* RNA polymerase II general transcription factors
1996 *PNAS* **93** (129), pp. 5788 - 5792
- **Bartkova J., Zemanova M., Bartek J.**
Expression of cdk7/CAK in normal and tumor cells of diverse histogenesis, cell-cycle position and differentiation
1996 *Int. J. Cancer* **66**, pp. 732 - 737
- **Bastien J., Adam-Stitah S., Riedl T., Egly J.-M., Chambon P., Rochette-Egly C.**
TFIIH interacts with the retinoic acid receptor gamma and phosphorylates its AF-1-activating domain through cdk7
2000 *J. Biol. Chem.* **275** (29), pp. 21896-904
- **Batty D. P. und Wood R. D.**
Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA (Review)
2000a *Gene* **241**, pp. 193 - 204
- **Batty D., Ropic-Otrin V., Levine A. S., Wood R. D.**
Stable Binding of Human XPC Complex to Irradiated DNA Confers Strong Discrimination for Damaged Sites
2000b *J. Mol. Biol.* **300**, pp. 275 - 290
- **Beard WA. und Wilson SH.**
Structural design of a eukaryotic DNA repair polymerase: DNA polymerase beta (Review)
2000 *Mutat. Res.* **460**, pp. 231 - 244
- **Bergmann E. und Egly J.-M.**
Trichithiodystrophy, a transcription syndrome
2001 *Trends Genet.* **17**, pp. 279 - 286
- **Berners-Price S. J., Davies M. S., Cox J. W., Thomas D. S., Farrell N.**
Competitive reactions of interstrand and intrastrand DNA-Pt adducts: a dinuclear-platinum complex preferentially forms a 1,4-interstrand cross-link rather than a 1,2 intrastrand cross-link on binding to a GG 14-mer duplex
2003 *Chemistry* **9**, pp. 713 - 725
- **Bienstock R. J., Skovvaga M., Mandavilli B. S., van Houten B.**
Structural and functional characterization of the human DNA repair helicase XPD by comparative molecular modeling and site-directed mutagenesis of the bacterial repair protein UvrB
2003 *J. Biol. Chem.* **278**, pp. 5309 - 5316
- **Birnboim H. C. und Doly J.**
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA
1979 *Nucl. Acid Res.* **7**, pp. 1513 - 1523
- **Blattner C., Knebel A., Radler-Pohl A., Sachsenmaier C., Herrlich P., Rahmsdorf H.-J.**
DNA damaging agents and growth factors induce changes in the program of expressed gene products through common routes (Review)
1994 *Environ. Mol. Mutagen.* **24** (1), pp. 3 - 10

- **Blau J., Xiao H., McCracken S., O'Hare P., Greenblatt J., Bentley D.**
Three functional classes of transcriptional activation domain
1996 *Mol. Cell. Biol.* **16**, pp. 2044 – 2055
- **Blaydes J. P. und Hupp T. R.**
DNA damage triggers DRB-resistant phosphorylation of human p53 at the CK2 site
1998 *Oncogene* **17** (8), pp. 1045 - 1052
- **de Boer J., Donker I., de Wit J., Hoeijmakers J. H., Weeda G.**
Disruption of the mouse xeroderma pigmentosum group D DNA repair/basal transcription gene results in preimplantation lethality
1998 *Cancer Res.* **58** (1), pp. 89-94
- **Boerma M., van der Wees C. G., Vrieling H., Svensson J. P., Wondergem J., van der Laarse A., Mullenders L. H., van Zeeland A. A.**
Microarray analysis of gene expression profiles of cardiac myocytes and fibroblasts after mechanical stress, ionising or ultraviolet radiation
2005 *BMC Genomics* **6** (1), pp. 6 - 16
- **Bohmann K., Ferreira J., Santama N., Weis K., Lamond A. I.**
Molecular analysis of the coiled body (Review)
1995 *J. Cell Sci. Suppl.* **19**, pp. 107 - 113
- **Bohr VA., Okumoto D. S., Hanawalt P. C.**
Survival of UV-irradiated mammalian cells correlates with efficient DNA repair in an essential gene
1986 *PNAS* **83** (11), pp. 3830 - 3833
- **Bohr VA., Smith CA., Okumoto DS., Hanawalt PC.**
DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall
1985 *Cell* **40** (2), pp. 359 - 69.
- **Boorstein R.J., Hilbert T.P., Cunningham R.P., Teebor G.W.**
Formation and stability of repairable pyrimidine photohydrates in DNA
1990 *Biochemistry* **29**, pp. 10455 - 10460
- **Bootsma D., Kraemer KH., Cleaver JE., Hoeijmakers J. H. J.**
Nucleotide excision repair syndromes: Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome, and Trichothiodystrophy
1998 In: B. Vogelstein und K. W. Kinzler (Eds.), *The genetic basis of human cancer*, McGraw-Hill, New York, pp. 245 - 274
2002 Second ed. In: B. Vogelstein und K. W. Kinzler (Eds.), *The genetic basis of human cancer*, McGraw-Hill, New York, pp. 211 - 237
- **Bootsma D. und Hoeijmakers J. H. J.**
DNA Repair. Engagement with Transkription.
1993 *Nature* **363**, pp. 1114 - 1115
- **Botta E., Nardo T., Lehmann A. R., Egly J.-M., Pedrini A. M., Stefanini M.**
Reduced level of the repair/transcription factor TFIIH in trichothiodystrophy
2002 *Hum. Mol. Genet.* **11** (23), pp. 2919-28
- **Bowden G.M. und Davies R.J.H.**
A sequence-specific alkali-labile photolesion mapping to adenine in single-stranded DNA
1997 *Photchem. Photobiol.* **66**, pp. 413 - 417
- **Bradsher J., Coin F., Egly J.-M.**
Distinct roles for the helicases of TFIIH in transcript initiation and promotor escape
2000 *J. Biol. Chem.* **275**, pp. 2532 - 2538
- **Braithwaite E., Wu X., Wang Z.**
Repair of DNA lesions induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell-free extracts: involvement of two excision repair mechanisms in vitro
1998 *Carcinogenesis*. **19** (7), pp. 1239-46.
- **Brooks P.J., Wise D.S., Berry D.A., Kosmoski J.V., Smerdon M.J., Somers R.L., Mackie H., Spoonde A.Y., Ackerman E.J., Coleman K., Tarone R.E., Robbins J.H.**
The oxidative DNA lesion 8,5'-(S)-cyclo-2'-deoxyadenosine is repaired by the nucleotide excision repair pathway and blocks gene expression in mammalian cells
2000 *J. Biol. Chem.* **275** (29), pp. 22355 - 22362.
- **Buck V., Russell P., Millar J. B. A.**
Identification of a cdk-activating kinase in fission yeast
1995 *EMBO J.* **14**, pp. 6173 – 6183

- **Burglen L, Seroz T, Miniou P, Lefebvre S, Burlet P, Munnich A, Pequignot EV, Egly JM, Melki J.**
The gene encoding p44, a subunit of the transcription factor TFIIH, is involved in large-scale deletions associated with Werding-Hoffmann disease
1997 Am J Hum Genet. **60** (1), pp. 72-9
- **Burley S.K. und Roeder R.G.**
Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID) (Review)
1996 Annu. Rev. Biochem. **65**, pp. 769 - 799
- **Burn JL., Guzder SN., Sung P., Prakash S., Prakash L.**
An affinity of human replication protein A for ultraviolet-damaged DNA
1996 J. Biol. Chem. 1996, pp. 11607 - 11610
- **Busso D., Keriel A., Sandrock B., Peterzman A., Gileadi O., Egly J.-M**
Distinct regions of MAT1 regulate cdk7 kinase and TFIIH transcription activities
2000 J. Biol. Chem. **275** (30), pp. 22815 - 22823
- **Cadena D.L. und Dahmus M.E.**
Messenger RNA synthesis in mammalian cells is catalyzed by the phosphorylated form of RNA polymerase II
1987 J.Biol. Chem. **262**, pp. 12468 - 12474
- **Cadet J., Douki T., Gasparutto D., Ravanat J. L.**
Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features (Review)
2003 Mutat. Res. **531** (1-2), pp. 5-23
- **Cadet J., Berger M., Douki T., Ravanat J. L.**
Oxidative damage to DNA : formation, measurement, and biological significance (Review)
1997a Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. **131**, pp. 1 - 87
- **Cadet J., Berger M., Douki T., Morin B., Raoul S., Ravanat J.-L., Spinelli S.**
Effects of UV and visible radiations an DNA-final base damage
1997b Biol. Chem. **378**, pp. 1275 - 1286
- **Cadet J. und Treoule R.**
Comparative study of oxidation of nucleic acid components by hydroxyl radicals, singlet oxygen and superoxide anion radicals
1978 Photochem.Photobiol. **28**, pp. 661 - 667
- **Chalkley GE. und Verrijzer CP.**
DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF(II)250-TAF(II)150 complex recognizes the initiator
1999 EMBO J. **18**, pp. 4835 - 4845
- **Chang W.-H. und Kornberg R. D.**
Electron crystal structure of the transcription factor and DNA repair complex, core TFIIH
2000 Cell **102**, pp. 609 - 613
- **Chavanne F., Broughton B. C., Pietra D., Nardo T., Browitt A., Lehmann A. R., Stefanini M.**
Mutations in the *XPC* gene in families with xeroderma pigmentosum and consequences at the cell, protein and transcript levels
2000 Cancer Res. **60**, pp. 1974 - 1982
- **Chen J., Laroche S., Li X., Suter B.**
Xpd/Erc2 regulates CAK activity and mitotic progression
2003 Nature **424**, pp. 228 – 232
- **Chen D., Riedl T., Washbrook E., Pace P.E., Coombes R.Cc, Egly J.-M., Ali S.**
Activation of estrogen receptor alpha by S118 phosphorylation involves a ligand-dependent interaction with TFIIH and participation of CDK7
2000 Mol. Cell **6** (1), pp. 127-37
- **Chun H. H. und Gatti R. A.**
Ataxia-telangiectasia, an evolving phenotype (review)
2004 DNA repair **3** (8 – 9): pp. 1187 - 1196
- **Clarke P.R., Siddhanti S.R., Cohen P., Blackshear P.J.**
Okadaic acid-sensitive protein phosphatases dephosphorylate MARCKs, a major protein kinase C substrate
1993 FEBS Lett. **336** (1), pp. 37 - 42
- **Cleaver J. E.**
Splitting hairs – discovery of a new DNA repair and transcription factor for the human disease trichothiodystrophy
2005 DNA Repair **4**, pp. 285 - 287

- **Coin F., Auriol J., Tapias A., Clivio P., Vermeulen W., Egly J. M.**
Phosphorylation of XPB Helicase regulates TFIIH nucleotide excision repair activity
2004 EMBO J. **23** (24), pp. 4835 - 4846
- **Coin F., Bergmann E., Tremeau-Bravard A., Egly J.-M.**
Mutations in XPB and XPD helicases found in xeroderma pigmentosum patients impair the transcription function of TFIIH
1999 EMBO J. **18** (5), pp. 1357 - 1366
- **Coin F., Marinoni J.-C., Rodolfo C., Fribourg S., Pedrini A. M., Egly J.-M.**
Mutations in the XPD helicase gene result in XP and TTD phenotypes, preventing interaction between XPD and the p44 subunit of TFIIH
1998a Nat. Gen. **20**, pp. 184 - 188
- **Coin F., Marinoni J.-C., Egly J.-M.**
Mutations in XPD helicase prevent its interaction and regulation by p44, another subunit of TFIIH, resulting in Xeroderma pigmentosum (XP) and trichothiodystrophy (TTD) phenotypes
1998b Pathol Biol (Paris) **46** (9), pp. 679-80
- **Coin F. und Egly J.-M.**
Ten years of TFIIH (Review)
1998 Col Spring Harb. Symp. Quant Biol. **63**, pp. 105 - 110
- **Conaway R.C. und Conaway J.W.**
General initiation factors for RNA polymerase II (Review)
1993 Annu. Rev. Biochem. **62**, pp. 161 - 190
- **Costa R. M. A., Chigancas V., da Silva Galhardo R., Carvalho H., Menck C. F. M.**
The eukaryotic nucleotide excision repair pathway (Review)
2003 Biochimie **85**, pp. 1083 - 1099
- **Coulombe B., Li J., Greenblatt J.**
Topological localization of the human transcription factor IIA, IIB, TATA box-binding protein, and RNA polymerase II-associated protein 30 on a class II promoter
1994 J. Biol. Chem. **269**, pp. 19962 – 19967
- **Dahmus M. E.**
Reversible Phosphorylation of the C-terminal Domain of RNA Polymerase II (Minireview)
1996 J. Biol. Chem. **271** (32), pp. 19009 – 19012
- **Damagnez V., Mäkelä T.P., Cottarel G.**
Schizosaccharomyces pombe Mop1-Mcs2 is related to mammalian CAK
1995 EMBO J. **14**, pp. 6164 - 6172
- **Darbon J.-M., Devault A., Taviaux S., Fesquet D., Martinez A.-M., Galas S., Cavadore J. C., Doree M., Blanchard J. M.**
Cloning, expression and subcellular localization of the human homolog of p40^{MO15} catalytic subunit of cdk-activating kinase
1994 Oncogene **9**, pp. 3127 - 3138
- **Deschavanne P. J. und Harosh I.**
The Rad3 protein from *Saccharomyces cerevisiae*: a DNA and DNA:RNA helicase with putative RNA helicase activity (Review)
1993 Mol. Microbiol. **7** (6), pp. 831 - 8355
- **Devary Y., Gottlieb R. A., Lau L. F., Karin M.**
Rapid and preferential activation of the c-jun gene during the mammalian UV response
1991 Mol. Cell. Biol. **11**, pp. 2804 - 2811
- **Devault A., Martinez A.M., Fesquet D., Labbe J.C., Morin N., Tassan J.P., Nigg E.A., Cavadore J.C., Doree M.**
MAT1 ('menage a trois') a new RING finger protein subunit stabilizing cyclin H-cdk7 complexes in starfish and *Xenopus* CAK
1995 EMBO J. **14** (20), pp. 5027-36.
- **Diehl JA. und Sherr CJ.**
A dominant-negative cyclin D1 mutant prevents nuclear import of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and its phosphorylation by CDK-activating kinase
1997 Mol Cell Biol. **17** (12), pp. 7362 - 7374
- **Dip R., Camenisch U., Naegeli HP.**
Mechanisms of DNA damage recognition and strand discrimination in human nucleotide excision repair (Review)
2004 DNA Repair **3**, pp. 1409 – 1524

- **Dizdaroglu M.**
Substrate specificities and excision kinetics of DNA glycosylases involved in base-excision repair of oxidative DNA damage (Review)
2003 Mutat Res. **531** (1 – 2), pp. 109 - 126
- **Douki T., Perdiz D., Grpf P., Kulucics Z., Moustacchi E., Cadet J., Sage E.**
Oxidation of guanine in cellular DNA by solar UV radiation: biological role
1999 Photochem. Photobiol. **70**, pp. 184 - 190
- **Douziech M., Coin F., Chipoulet J. M., Ohkuma Y., Egly J. M., Coulombe B.**
Mechanism of promoter melting by the xeroderma pigmentosum complementation group B helicase of transcription factor IIH revealed by protein-DNA photo-cross-linking.
2000 Mol. Cell. Biol. **20** (21), pp. 8168-8177
- **Dower W. J., Miller J. F., Ragsdale C. W.**
High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation
1988 Nucl. Acid Res. **16**, pp. 6127 - 6145
- **Drablos F., Feyzi E., Aas PA., Vaagbo CB., Kavli B., Bratlie MS., Pena-Diaz J., Otterlei M., Slupphaug G., Krokan HE.**
Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance
2004 DNA Repair (Amst) **3** (11), pp. 1389-407
- **Drapkin R., Le Roy G., Cho H., Akoulitchev S., Reinberg D.**
Human cyclin-dependent kinase-activating kinase exists in three distinct complexes
1996 PNAS **93**, pp. 6488 - 6493
- **Drapkin R., Reardon J. T., Ansari A., Huang J.-C., Zawel L., Ahn KJ, Sancar A., Reinberg D.**
Dual role of TFIIH in DNA excision repair and in transcription by RNA Pol II
1994 Nature **368**, pp. 769 - 772
- **Dubaele S., de Santis L. P., Bienstock R. J., Keriell A., Stefanini M., van Houten B., Egly J.-M.**
Basal transcription defect discriminates between Xeroderma pigmentosum and Trichithiodystrophy in XPD patients
2003 Mol. Cell **11**, pp. 1635 – 1646
- **Dumaz N., Drougard C., Sarasin A., Daya-Grosjean AL.**
Specific UV-induced mutation spectrum in the p53 gene of skin tumors from DNA-repair-deficient xeroderma pigmentosum patients
1993 PNAS **90**, pp. 10529 - 10533
- **Dunand-Sauthier I., Hohl M., Thorel F., Jaquier-Gubler P., Clarkson S. G., Schärer O. D.**
The spacer region of XPG mediates recruitment to nucleotide excision repair complexes and determines substrate specificity
2005 J. Biol. Chem. **280** (8), pp. 7030 - 7037
- **Dvir A., Conaway RC., Conaway JW.**
Mechanism of transcription initiation and promoter escape by RNA polymerase II (Review)
2001 Curr. Opin. Genet. Dev. **11**, pp. 209 - 214
- **Eastman A.**
Interstrand cross-links and sequence specificity in the reaction of cis-dichloro(ethylenediamine) platinum (II) with DNA
1985 Biochemistry **24**, pp. 5027 - 5032
- **Egly J.-M.**
TFIIH: from transcription to clinic (Review)
2001 FEBS letters **498** (2-3), pp. 124 - 128
- **Emmert S., Kobayashi N., Khan S. G., Kraemer K. H.**
The xeroderma pigmentosum group C gene leads to selective repair of cyclobutane pyrimidine dimers rather than 6-4 photoproducts
2000 PNAS **97** (5), pp. 2151 - 2156
- **Evans E., Fellows J., Coffey A., Wood RD:**
Open complex formation around lesion during nucleotide excision repair provides a structure for cleavage by human XPG protein
1997a EMBO J. **16**, pp. 625 - 638
- **Evans E., Moggs J. G., Hwang J. R., Egly J.-M., Wood R. D.**
Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors
1997b EMBO J. **16** (21), pp. 6559 - 6573

- **Evans T., Rosenthal E. T., Youngbloom J., Distel D., Hunt T.**
Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division
1983 *Cell* **33**, pp. 389 – 396
- **Feaver W.J., Huang W., Gileadi O., Myers L., Gustafsson C.M., Kornberg R.D., Friedberg E.C.**
Subunit interactions in yeast transcription/repair factor TFIIH. Requirement for Tfb3 subunit in nucleotide excision repair
2000 *J. Biol. Chem.* **275** (8), pp. 5941-6
- **Feaver W. J., Gileadi O., Li Y., Kornberg R.**
CTD kinase associated with yeast RNA polymerase II initiation factor b
1991a *Cell* **67**, pp. 1223 - 1230
- **Feaver W. J., Gileadi O., Kornberg R.**
Purification and characterisation of yeast RNA polymerase II transcription factor b
1991b *J. Biol. Chem.* **266**, pp. 19000 - 19005
- **Fesquet D., Labbe J.-C., Derancourt J., Capony J.-P., Galas S., Girard F.**
The *MO15* gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin-dependent kinase (CDKs) through phosphorylation of Thr161 and its homologues
1993 *EMBO J.* **12**, pp. 3111 - 3121
- **Fisher R. P., Jin P., Chamberlin H. M., Morgan D. O.**
Alternative mechanisms of CAK assembly require an assembly factor or an activating kinase
1995 *Cell* **83**, pp. 47 - 57
- **Fisher R. P. und Morgan D. O.**
A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase
1994 *Cell* **78**, pp. 713 - 724
- **Fitch M. E., Cross I. V., Ford J. M.**
p53 responsive nucleotide excision repair gene products p48 and XPC, but not p53, localize to sites of UV-irradiation-induced DNA damage, *in vivo*
2003a *Carcinogenesis* **24** (5), pp. 843 - 850
- **Fitch M. E., Nakajima S., Yasui A., Ford J. M.**
In vivo recruitment of XPC to UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers by the *DDB2* gene product
2003b *J. Biol. Chem.* **278** (47), pp. 46906 - 46910
- **Foote C.S.**
Definition of type I and type II photosensitized oxidation
1991 *Photochem. Photobiol.* **54**, pp. 659
- **Ford J. M. und Hanawalt P. C.**
Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance
1995 *PNAS* **92**, pp. 8876 - 8880
- **Ford J. M. und Hanawalt P. C.**
Expression of wild-type p53 is required for efficient global genomic nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts
1997 *J. Biol. Chem.* **272** (44), pp. 28073 - 28080
- **Fribourg S., Kellenberger E., Rogniaux H., Poterszman A, Van Dorsseleer A, Thierry JC, Egly JM, Moras D, Kieffer B.**
Structural characterization of the cysteine-rich domain of TFIIH p44 subunit
2000 *J Biol Chem.* **275** (41), pp. 31963-71
- **Friedberg E. C.**
How nucleotide excision repair protects against cancer (Review)
2001 *Nat. Rev. Cancer* **1**, 22 - 23
- **Frit P., Bergmann E., Egly J.-M.**
Transcription factor IIH: a key player in the cellular response to DNA damage (Review)
1999 *Biochimie* **81** (1-2), pp. 27-38
- **Frosina G., Fortini P., Rossi O., Carozzino F., Raspaglio G.**
Two pathways for base excision repair in mammalian cells
1996 *J. Biol. Chem.* **271**, pp. 9573 – 9578

- **Fujiwara Y., Masutani C., Mizukoshi T., Kondo J., Hanaoka F., Iwai S.**
Characterisation of DNA recognition by the human UV-damaged DNA-binding protein
1999 *J. Biol. Chem.* **274**, pp. 20027 – 2003
- **Geacintov NE., Brojde S., Buterin T., Naegeli H., Wu M., Yan S., Patel DJ.**
Thermodynamic and structural factors in the removal of bulky DNA adducts by the
nucleotide excision repair machinery (Review)
2002 *Biopolymers*. **65** (3), pp. 202-10
- **Van Gent DC., Hoeijmakers JHJ., Kanaar R.**
Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection (Review)
2001 *Nat. Rev. Genet.* **2**, pp. 196 - 206
- **Gerard M., Fischer L., Moncollin V., Chipoulet M., Chambon P, Egly J. M.**
Purification and interaction properties of the human RNA polymerase B(II) general
transcription factor BTF2
1991 *J. Biol. Chem.* **266**, pp. 20940 - 20945
- **Gervais V., Busso D., Wasielewski E., Poterszman A., Egly J.-M., Thierry J.C., Kieffer B.**
Solution structure of the N-terminal domain of the human TFIIH MAT1 subunit: new insights
into the RING finger family.
2001 *J. Biol. Chem.* **276** (10), pp. 7457-64
- **Giese B.**
Long-distance charge transport in DNA: the hopping mechanism
2000 *Acc. Chem. Res.* **33**, 631 - 636
- **Giglia-Mari G., Coin F., Ranish J. A., Hoogstraten D., Theil A., Wijgers, Jaspers N. G. J., Raams A., Argentinini M., van der Spek P. J., Botta E., Stefanini M., Egly J.-M., Aebersold R., Hoeijmakers J. H. J., Vermeulen W.**
A new, tenth subunit of TFIIH is responsible for the DNA repair syndrome
trichothiodystrophy group A
2004 *Nat. Gen.* **36** (7), pp. 714 - 719
- **Gileadi O., Feaver W.J., Kornberg R.D.**
Cloning of a subunit of yeast RNA polymerase II transcription factor b and CTD kinase
1992 *Science* **257** (5075), pp. 1389-92
- **Gratchev A., Strein P., Utikal J., Sergij G.**
Molecular genetics of Xeroderma pigmentosum variant (Review)
2003 *Exp Dermatol.* **12** (5), pp. 529 - 536.
- **Green MR.**
TBP-associated factors (TAFIIIs): multiple, selective transcriptional mediators in common
complexes
2000 *Trends Biochem. Sci.* **25**, pp. 59 - 63
- **Grummt I.**
Life on a planet of its own: regulation of RNA polymerase I transcription in the nucleolus
(Review)
2003 *Gen. Dev.* **17**, pp. 1691 - 1702
- **Grummt I.**
Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by RNA polymerase I (Review)
1999 *Prog. Nucleic. Acid Res. Mol. Biol.* **62**, pp. 109 - 154
- **Guzder S. N., Sung P., Prakash L., Prakash S.**
Nucleotide excision repair in yeast is mediated by sequential assembly of repair factors and
not by a pre-assembled repairosome
1996 *J. Biol. Chem.* **271**, pp. 8903 - 8910
- **Hall D.B., Holmlin R.E., Baron J.K.**
Oxidative DNA damage through long-range electron transfer
1996 *Nature* **382**, pp. 731 - 735
- **Hampsey M. und Reinberg D.**
RNA polymerase II as a control panel for multiple coactivator complexes (Review)
1999 *Curr. Opin. Genet. Dev.* **9** (2), pp. 132-9
- **Harosh I. und Deschavanne P.**
The RAD3 gene is a member of the DEAH family RNA helicase-like protein.
1991 *Nucl. Acid Res.* **19** (22), pp. 6331 ff.

- **Hawley D.K. und Rodere R. G.**
Functional steps in transcription initiation and reinitiation from the major late promoter in a HeLa nuclear extract.
1987 J Biol Chem. **262** (8), pp. 3452-61.
- **He Z., Henrickson LA., Wold MS., Ingles CJ.**
RPA involvement in the damage-recognition and incision steps of nucleotide excision repair
1995 Nature **374**, pp. 566 - 569
- **Herr I., van Dam H., Angel P.**
Binding of promotor-associated AP-1 is not altered during induction and subsequent repression of the *c-jun* promotor by TPA and UV irradiation
1994 Carcinogenesis **15** (6), pp. 1105 - 1113
- **Herrlich P., Sachsenmaier C., Radler-Pohl A., Gebel S., Blattner C., Rahmsdorf H. J.**
The mammalian UV response: mechanism of DNA damage induced gene expression (Review)
1994 Adv. Enzyme Regul. **34**, pp. 381 - 395
- **Hoeijmakers J. H. J.**
Genome maintenance: mechanisms for preventing cancer (Review)
2001 Nature **411**, pp. 366 - 374
- **van Hoffen A., Balajee A. S., van Zeeland A. A., Mullenders L. H. F.**
Nucleotide excision repair and its interplay with transcription (Review)
2003 Toxikology **193**, pp. 79 - 90
- **Holstege FCP., Fiedler U., Timmers MAT.**
Three transitions in the RNA polymerase II transcription complex during initiation
1997 EMBO J. **16**, pp. 7468 - 7480
- **Hoogstraten D., Nigg A.L., Heath H., Mullenders L.H., van Driel R., Hoeijmakers J.H., Vermeulen W., Houtsmuller A.B.**
Rapid switching of TFIIH between RNA polymerase I and II transcription and DNA repair *in vivo*
2002 Mol Cell. **10** (5), pp. 1163-74
- **Hopfield JJ.**
Kinetic proofreading: a new mechanism for reducing errors in biosynthetic processes requiring high specificity
1974 PNAS **71**, pp. 4135 - 4139
- **Van der Horst G. T., Meira L., Gorgels T. G., de Wit J., Velasco-Miguel S., Richardson J. A., Kamp Y., Vreeswijk M. P., Smit B., Bootsma D., Hoeijmakers J. H. J., Friedberg E. C:**
UVB radiation-induced cancer predisposition in Cockayne syndrome group A (CSA) mutant mice
2002 DNA Repair (Amst.) **1**, pp. 143 - 157
- **Van der Horst G. T., van Steeg H., Berg R. J. W., van Gool A. J., de Wit J., Weeda G., Morreau H., Beems R. B., van Kreijl C. F., de Gruijl F. R., Bootsma D., Hoeijmakers J. H. J.**
Defective transcription-coupled repair in Cockayne syndrome B mice is associated with skin cancer predisposition
1997 Cell **89**, pp. 425 - 435
- **Humbert S., van Vuuren H., Lutz Y., Hoeijmakers J. H., Egly J.-M., Moncollin V.**
p44 and p34 subunits of the BTF2/TFIIH transcription factor have homologies with SSL1, a yeast protein involved in DNA repair
1994 EMBO J. **13** (10), pp. 2393 - 2398
- **Hussein M. R.**
Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanism
2005 J. Cutan. Pethol. **32** (3); pp. 191 - 205
- **Hwang BJ., Ford JM., Hanawalt PC., Chu G.**
Expression of the *p48* xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair
1999 PNAS **96**, pp. 424 - 428
- **Hwang J.R., Moncollin V., Vermeulen W., Seroz T., van Vuuren H., Hoeijmakers J.H.J., Egly J.-M.**
A 3' → 5' XPB helicase defect in repair/transcription factor TFIIH of xeroderma pigmentosum group B affects both DNA repair and transcription.
1996 J. Biol. Chem. **271** (27), pp. 15898-904.

- **Iben S., Tschochner H., Bier M., Hoogstarten D., Hozak P., Egly J.-M., Grummt I.**
TFIIH plays an essential role in RNA polymerase I transcription
2002 *Cell* **109**, pp. 297 - 306
- **Ikehata H., Kudo H., Masuda T., Ono T.**
UVA induces C→T transitions at methyl-CpG-associated dipyrimidine sites in mouse skin epidermis more frequently than UVB
2003 *Mutagenesis* **18** (6), pp. 511 - 519
- **Itin P. H., Sarasin A., Pittelkow M. R.**
Trichothiodystrophy: update on the sulfur-deficient brittle hair syndromes
2001 *J. Am. Acad. Dermatol.* **44**, pp. 891 - 920
- **Ito S., Takeyama K., Yamamoto A., Sawatsubashi S., Shiode Y., Kouzmenko A., Tabata T., Kato S.**
In vivo potentiation of human estrogen receptor alpha by Cdk7-mediated phosphorylation
2004 *Genes Cells*. **9** (10), pp. 983 - 992
- **Iyer N., Reagan M. S., Wu K.-J., Canagarajah B., Friedberg E. C.**
Interactions involving the human RNA polymerase II transcription/nucleotide excision repair complex TFIIH, the NER protein XPG, and Cockayne syndrome group B (CSB) protein
1996 *Biochemistry* **35**, pp. 2157 - 2167
- **Janicijevic A., Sugasawa K., Shimizu Y., Hanaoka F., Wijgers N., Djurica M., Hoeijmakers J., Wyman C.**
DNA bending by the human damage recognition complex XPC-HR23B
2003 *DNA Repair* **2**, pp. 325 - 336
- **Jawhari A., Boussett S., Lamour V., Atkinson R. A., Kieffer B., Poch O., Potier N., van Dorsellaer A., Moras D., Poterszman A.**
Domain architecture of the p62 subunit from the human transcription factor TFIIH deduced by limited proteolysis and mass spectrometry analysis
2004 *Biochemistry* **43** (45), pp. 14420 - 14430
- **Jawhari A., Laine J.-P., Dubaele S., Lamour V., Peterzman A., Coin F., Moras D., Egly J.-M.**
p52 mediates XPB function within the transcription/repair factor TFIIH
2002 *J. Biol. Chem.* **277** (35), pp. 31761 - 31767
- **Jeffrey P. D., Russo A. A., Polyak K., Gibbs E., Hurwitz J., Massague J., Pavletich N. P.**
Mechanism of cdk activation revealed by the structure of a cyclin A-CDK2 complex
1995 *Nature* **376**, pp. 313 - 320
- **Jen J., Mitchell D.L., Cunningham R.P., Smith C.A., Taylor J.S., Cleaver J.E.**
Ultraviolet irradiation produces novel endonuclease III-sensitive cytosine photoproducts at dipyrimidine sites
1997 *Photochem. Photobiol.* **65**, pp. 323 - 329
- **Jiricny J. und Nystrom-Lahti M.**
Mismatch repair defects in cancer (Review)
2000 *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, pp. 157 - 161
- **Johnson RE., Kondratick CM., Prakash S., Prakash L.**
hRAD30 mutations in the variant form of xeroderma pigmentosum
1999 *Science* **285**, pp. 212 - 213
- **Kaldis P. und Solomon MJ.**
Analysis of CAK activities from human cells
2000 *Eur. J. Biochem.* **267** (13), pp. 4213 - 4221
- **Kaldis P.**
The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals (Review)
1999 *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, pp. 284 - 296
- **Kannouche P. und Strydom A.**
Xeroderma pigmentosum variant and error-prone DNA polymerases (Review)
2003 *Biochimie* **85**, pp. 1123 - 1132
- **Kartalou M. und Essigmann J. M.**
Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins
2001 *Mutat. Res.* **478** (1-2), pp. 1 - 21
- **Kazantsev A., Mu D., Nichols A. F., Zhao X., Linn S., Sancar A.**
Functional complementation of xeroderma pigmentosum complementation group E by replication protein A in an in vitro system
1996 *PNAS* **93** (10), pp. 5014 - 5018

- **Keeney S., Chang GJ., Linn S.**
Characterization of a human DNA damage binding protein implicated in xeroderma pigmentosum E.
1993 J Biol Chem. **268** (28), pp. 21293 – 21300
- **Keogh M.-C., Cho E.-J., Podolny V., Buratowski S.**
Kin28 is found within TFIIH and a Kin28-Ccl1-Tfb3 trimer complex with differential sensitivities to T-loop phosphorylation
2002 Mol. Cell. Biol. **22** (5), pp. 1288 - 1297
- **Keriel A., Stary A., Sarasin A., Rochette-Egly C., Egly J.-M.**
XPD mutations prevent TFIIH-dependent transactivation by nuclear receptors and phosphorylation of RAR α
2002 Cell **109**, pp. 125 - 135
- **Khan S. G., Muniz-Medina V., Shahlavi T., Baker C. C., Inui H., Ueda T., Emmert S., Schneider T. D., Kraemer K. H.**
The human XPC DNA repair gene: arrangement, splice site information content and influence of a single nucleotide polymorphism in a splice acceptor site on alternative splicing and function
2002 Nucl. Acid Res. **30** (16), pp. 3624 - 3631
- **Khanna KK. und Jackson SP.**
DNA double-strand breaks: signaling, repair and cancer connection (Review)
2001 Nat. Genet. **27**, pp. 247 – 254
- **Kielbassa C., Roza L., Epe B.**
Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light
1997 Carcinogenesis **18**, pp. 811 - 816
- **Kim T.K., Ebright R.H., Reinberg D.**
Mechanism of ATP-dependent promoter melting by transcription factor IIIH
2000 Science. **288** (5470), pp. 1418 - 1422
- **King R. W., Deshaies R. J., Peters J.-M., Kirschner M. W.**
How proteolysis drives the cell cycle
1996 Science **274**, pp. 1652 - 1659
- **Klungland A. und Lindahl T.**
Second pathway for completion of human DNA base-excision repair: reconstitution with purified proteins and requirement for Dnase IV (FEN1)
1997 EMBO J. **16**, pp. 3341 - 3348
- **Ko L. J., Shieh S.-Y., Chen X., Jayaraman L., Tamai K., Taya Y., Prives C., Pan Z.-Q.**
p53 is phosphorylated by CDK7-Cyclin H in a p36^{MAT1}-dependent manner
1997 Mol. Cell. Biol. **17** (12), pp. 7220 - 7229
- **Kobor M. S. und Greenblatt J.**
Regulation of transcription elongation by phosphorylation
2002 Biochimica et Biophysica acta **1577**, pp. 261 - 275
- **Koch C. und Nasmyth K.**
Cell cycle regulated transcription in yeast
1994 Curr. Opin. Cell Biol. **6**, pp. 451 - 459
- **Kolodner RD. and Marsischky GT.**
Eukaryotic DNA mismatch repair (Review)
1999 Curr. Opin. Genet. Dev. **9**, pp. 89 - 96
- **Koning T.M.G., Davies R.J.H., Kaptein R.**
The solution structure of the intramolecular ohotoprodukt of d(TpA) derived with the use of NMR and a combination of distance geometry and molecular dynamics
1990 Nucl. Acids Res. **18**, pp. 277 - 284
- **Kraemer K.H.**
From proteomics to disease
2004 Nature Gen. **36** (7), pp. 677 - 678
- **Kraemer K.H., Lee M. M., Andrews A. D., Lambert W. C.**
The role of sunlight and DNA repair in melanoma and non-melanoma skin cancer: the xeroderma pigmentosum paradigm
1994 Arch. Dermatol. **130**, pp. 1018 - 1021
- **Kraemer K.H., Lee M. M., Scotto J.**
Xeroderma pigmentosum. Cutaneous, ocular and neurologic abnormalities in 830 published cases (Historical Article)
1987 Arch Dermatol. **123**, pp. 241 - 150

- **Kuipers GK., Slotman BJ., Poldervaart HA., van Vilsteren IM., Reitsma-Wijker CA., Lafleur MV.**
The role of nucleotide excision repair of Escherichia coli in repair of spontaneous and gamma-radiation-induced DNA damage in the lacZalpha gene
2000 Mutat. Res. **460** (2), pp. 117-25
- **Kumar S., Shamar N.D., Davies R.J.H., Phillipson D.W., Mc Closkey J.A.**
The isolation and characterisation of a new type of dimeric adneine photoproduct in UV-irradiated deoxyadenylates
1987 Nucl. Acids Res. **15**, pp. 1199 - 1216
- **Kusumoto R., Masutani C., Sugasawa K., Iwai S., Araki M., Uchida A., Mizukoshi T., Hanaoka F.**
Diversity of the damage recognition step in the global genomic nucleotide excision repair in vitro
2001 Mut. Res. **485**, pp. 219 - 227
- **Kwek KY, Murphy S, Furger A, Thomas B, O'Gorman W, Kimura H, Proudfoot NJ, Akoulitchev A.**
U1 snRNA associates with TFIIH and regulates transcriptional initiation
2002 Nat. Struct. Biol. **9** (11), pp. 800 - 805
- **Lagrange T., Kapanidis AN., Tang H., Reinberg D., Ebright R.**
New core promotor element in RNA polymerase II dependent transcription: sequence-specific binding by transcription factor IIB
1998 Genes Dev. **12**, pp. 34 - 44
- **Larochelle S., Chen J., Knights R., Pandur J., Morcillo P., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Suter B., Fisher R. P.**
T-loop phosphorylation stabilizes the cdk7-cyclin H-MAT1 complex *in vivo* and regulates its CTD kinase activity
2001 EMBO **20** (14), pp. 3749 - 3759
- **Larochelle S., Pandur J., Fisher R. P., Salz H. K., Suter B.**
Cdk7 is essential for mitosis and for *in vivo* Cdk-activating kinase activity
1998 Gen. Dev. **12**, pp. 370 - 381
- **Laybourn P. J. und Dahmus M. E.**
Transcription-dependent structural changes in the C-terminal domain of mammalian RNA polymerase subunit Ila/o
1989 J. Biol. Chem. **264**, pp. 6693 - 6698
- **Lee D. K., Duan H. O., Chang C.**
From Androgen Receptor to the General Transcription Factor TFIIH. Identification of cdk activating kinase (CAK) as an androgen receptor NH(2)-terminal associated coactivator
2000 J. Biol. Chem. **275** (13), pp. 9308 - 9313
- **Legerski R. und Peterson C.**
Expression cloning of a human repair gene involved in xeroderma pigmentosum group C
1992 Nature **359**, pp. 70 - 73
- **Lehmann A. R.**
DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy (Review)
2003 Biochimie **85**, pp. 1101 – 1111
- **Lehmann A. R.**
The xeroderma pigmentosum group D (XPB) gene: one gene, two functions, three diseases (Review)
2001, Genes Dev. **15**, pp. 15 - 23
- **Lehmann A. R.**
Nucleotide excision repair and the link with transcription (Review)
1995 TIBS **20**, pp. 402 – 405
- **Leveillard T., Andera L., Bisonette N., Schaeffer L., Bracco L., Egly J.-M., Wasyluk B.**
Functional interactions between p53 and the TFIIH complex are affected by tumor-associated mutations
1996 EMBO J. **15** (7), pp. 1615 - 1624
- **Levine AJ.**
p53, the cellular gatekeeper for growth and division (Review)
1997 Cell **88**, pp. 323 – 331

- **Li R.-Y., Calsou P., Jones C. J., Salles B.**
Interactions of the transcription/DNA repair factor TFIIH and XP repair proteins with DNA lesions in a cell-free repair assay
1998 J. Biol. Chem. **281**, pp. 211 - 218
- **Li L., Lu X., Peterson C., Legerski R.**
XPC interacts with both HHR23B and HHR23A *in vivo*
1997 Mutat Res. **383** (3), pp. 197 - 203
- **Lindahl T. und Wood RD.**
Quality control by DNA repair
1999 Science **286**, pp. 1897 - 1905
- **Lindenbaum Y., Dickson D., Rosenbaum P., Kraemer K., Robbins I., Rapin I.**
Xeroderma pigmentosum/Cockayne syndrome complex: first neuropathological study and review of eight other cases
2001 Eur. J. Paediatr. Neurol. **5**, pp. 225 - 242
- **Liu Y., Ando S., Xia X., Yao R., Kim M., Fondell J., Yen P. M.**
p62, a TFIIH subunit directly interacts with thyroid hormone receptor and enhances T3-mediated transcription
2004 Mol. Endocrinol. **19** (4), pp. 879 - 884
- **Liu J., Akoulitchev S., Weber A., Ge H., Chuikov S., Libutti D., Wang X. W., Conaway J. W., Harris C. C., Conaway R. C., Reinberg D., Levens D.**
Defective interplay of activators and repressors with TFIIH in Xeroderma pigmentosum
2001 Cell **104**, pp. 353 - 363
- **Liu J., He L., Collins I., Ge H., Libutti D., Li J., Egly J.-M., Levens D.**
The FBP interacting repressor targets TFIIH to inhibit activated transcription
2000 Mol. Cell **5** (2), pp. 331 - 341
- **Lommel L., Ortolan T., Chen L., Madura K., Sweder K. S.**
Proteolysis of a nucleotide excision repair protein by the 26S proteasome
2002 Curr. Genet. **42**, pp. 9 - 20
- **Long J. J., Leresche A., Kriwacki R. W., Gottesfeld J. M.**
Repression of TFIIH transcriptional activity and TFIIH-associated cdk7 kinase activity at mitosis
1998 Mol. Cel. Biol. **18** (3), pp. 1467 - 1476
- **Louat T., Canitrot Y., Jousseume S., Baudouin C., Canal P., Laurent G., Lautier D.**
Atypical protein kinase C stimulates nucleotide excision repair activity
2004 FEBS Letters **574**, pp. 121 - 125
- **Lu H., Zawel L., Fisher L., Egly J.-M., Reinberg D.**
Human general transcription factor IIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II
1992 Nature **358**, pp. 641 - 645
- **Lu H., Fisher R. P., Bailey P., Levine A. J.**
The CDK7-cycH-p36 Complex of Transcription Factor IIH Phosphorylates p53, Enhancing Ist Sequence-Specific DNA Binding Activity In Vitro
1997 Mol. Cel. Biol. **17** (10), pp. 5923 - 5934
- **Ma L., Siemssen E. D., Noteborn H. M., van der Eb A. J.**
The xeroderma pigmentosum group B protein ERCC3 produced in baculovirus system exhibits helicase activity
1994a Nucl. Acid Res. **22** (20), pp. 4095 - 5102
- **Ma L., Westbroek A., Jochemsen A. G., Weeda G., Bosch A., Bootsma D., Hoeijmakers J.H., van der Eb A. J.**
Mutational analysis of ERCC3, which is involved in DNA repair and transcription initiation: Identification of domains essential for the DNA repair function
1994b Mol. Cell. Biol. **14** (6), pp. 4126-34
- **Makela T. P., Parvin J. D., Kim J., Huber L. J., Sharp P. A., Weinberg R. A.**
A kinase-deficient transcription factor TFIIH is functional in basal and activated transcription
1995 PNAS **92**, pp. 5174 - 5178
- **Maldonado E., Shiekhattar R., Sheldon M., Cho H., Drapkin R., Rickert P., Lees E., Anderson CW., Linn S., Reinberg D.**
A human RNA polymerase II complex associated with SRB and DNA-repair proteins
1996 Nature **382**, pp. 86 - 89

- **Malina J., Kasparkova J., Natile G., Brabec V.**
Recognition of major DNA adducts of enantiomeric cisplatin analogs by HMG box proteins and nucleotide excision repair of these adducts
2002 Chem. Biol. **9** (5), pp. 629-38
- **Marcote M. J., Pagano M., Draetta G.**
Cdc2 protein kinase: structure-function relationships (Review)
1992 Ciba Found Symp. **170**, pp. 30 - 41
- **Marinoni J.-C., Roy R., Vermeulen W., Miniou P., Lutz Y., Weeda G., Seroz T., Gomez D. M., Hoeijmakers J. H. J., Egly J.-M.**
Cloning and characterization of p52, the fifth subunit of the core of the transcription/DNA repair factor TFIIH
1997 EMBO J. **16** (5), pp. 1093 - 1102
- **Martinez A. M., Afshar M., Martin F., Cavadore J. C., Labbe J. C., Doree M.**
Dual phosphorylation of the T-loop in cdk7: its role in controlling cyclin H binding and CAK activity
1997 EMBO J. **16** (2), pp. 343 - 354
- **Masutani C., Kusumoto R., Yamada A., Dohmae N., Yokoi M., Yuasa M., Araki M., Iwai S., Takio K., Hanaoka F.**
The *XPV* (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA Polymerase η
1999 Nature **399**, pp. 700 - 704
- **Masutani C., Araki M., Sugasawa K., van der Spek P. J., Yamada A., Uchida A., Maekawa T., Bootsma D., Hoeijmakers J. H. J., Hanaoka F.**
Identification and Characterization of XPC-Binding Domain of hHR23B
1997 Mol. Cell. Biol. **17** (12), pp. 6915 - 692
- **Masutani C., Sugasawa K., Yanagisawa J., Sonoyama T., Ui M., Enomoto T., Takio K., Tanaka K., van der Spek P.J., Bootsma D., Hoeijmakers J.H.J., Hanaoka F.**
Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23
1994 EMBO J. **13**, pp. 1831 - 1843
- **Matsuda T., Saijo M., Kuraoka I., Kobayashi T., Nakatsu Y., Nagai A., Enjoji T., Masutani K., Sugasawa K., Hanaoka F., Yasui A., Tanaka K.**
DNA repair protein XPA binds replication protein A
1995 J. Biol. Chem. **270**, pp. 4152 - 4157
- **Matsumoto Y. und Kim K.**
Excision of dooxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair
1995 Science **269**, pp. 699 - 702
- **Matsumura Y., Nishigori C., Yagi T., Imamura S., Takebe H.**
Characterization of molecular defects in xeroderma pigmentosum group F in relation to its clinically mild symptoms
1998 Hum. Mol. Genet. **7**, pp. 969 - 974
- **Matsuoka M., Kato J.-Y., Fisher R. P., Morgan D. O., Sherr C. J.**
Activation of cyclin-dependent kinase 4 (cdk4) by mouse MO15-associated kinase
1994 Mol. Cell. Biol. **14**, pp. 7265 - 7275
- **Maxon M.E. und Tjian R.**
Transcriptional activity of transcription factor IIE is dependent on zinc binding
1994 PNAS **91**, pp. 9529 - 9533
- **Maxon M.E., Goodrich J.A., Tjian R.**
Transcription factor IIE binds preferentially to RNA polymerase IIa and recruits TFIIH: a model for promoter clearance
1994 Genes Dev. **5**, pp. 515 - 524
- **McCullough A.K., Dodson M.L., Lloyd R.S.**
Initiation of base excision repair: glycosylase mechanisms and structure
1999 Annu. Rev. Biochem. **68**, pp. 255 - 285
- **McGowan C. H.**
Regulation of the eukaryotic cell cycle (Review)
2003 Prog. Cell Cycle Res. **5**, pp. 1 - 4
- **Meek D. W.**
The p53 response to DNA damage (Review)
2004 DNA Repair (Amst.) **3** (8-9), pp. 1049 - 1056

- **Mei Kwei J. S., Kuraoka I., Horibata K., Ubukata M., Kobatake E., Iwai S., Handa H., Tanaka K.**
Blockage of RNA polymerase II at a cyclobutane pyrimidine dimer and 6-4 photoproducts
2004 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320** (4), pp. 1133 - 1138
- **Mellon I., Spivak G., Hanawalt P.C.**
Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene
1987 *Cell* **51**, pp. 241 - 249
- **Mellon I., Bohr V. A., Smith C. A., Hanawalt P. C.**
Preferential DNA repair of an active gene in human cells
1986 *PNAS* **83** (23), pp. 8878 - 8882
- **Melvin T., Cunniffe S.M.T., O'Neill P., Parker A.W., Roldan-Arjona R.**
Guanine is the target for direct ionisation damage in DNA, as detected using excision enzymes
1998 *Nucl. Acids Res.* **26**, pp. 4935 - 4942
- **Mitchell DL., Jen J., Cleaver J.E.**
Relative induction of cyclobutane dimers and cytosine photohydrates in DNA irradiated in vitro and in vivo with ultraviolet-C and ultraviolet-B light
1991 *Photochem. Photobiol.* **54**, pp. 741 - 746
- **Mitchell DL., Allison JP., Nairn RS.**
Immunoprecipitation of pyrimidine (6-4) pyrimidone Photoproducts and cyclobutane pyrimidine dimers in UV-irradiated DNA
1990 *Radiat. Res.* **123**, pp. 299 - 303
- **Mitchell DL. und Nairn RS.**
The biology of the (6-4) photoproduct (Review)
1989 *Photochem. Photobiol.* **49**, pp. 805 - 819
- **Mone M.J., Volker M., Nikaido O., Mullenders L.H., van Zeeland A.A., Verschure P.J., Manders E.M., van Driel R.**
Local UV-induced DNA damage in cell nuclei results in local transcription inhibition
2001 *EMBO Rep.* **2** (11), pp. 1013 - 1017
- **Monjardet-Bas V., Chottard J. C., Kozelka J.**
Fast interstrand crosslinking of cisplatin-DNA monoadducts compared with intrastrand chelation: a kinetic study using hairpin-stabilized duplex oligonucleotides
2002 *Chemistry* **8**, pp. 1144 - 1150
- **Moore K.S., Sullivan K., Tan E.M., Prystowsky M.B.**
Proliferating cell nuclear antigen/cyclin is an interleukin 2-responsive gene
1987 *J. Biol. Chem.* **262** (18), pp. 8447 - 8450
- **Moreland R.J., Tirode F., Yan Q., Conaway J.W., Egly J.-M., Conaway R.C.**
A role for the TFIIH XPB DNA helicase in promoter escape by RNA polymerase II
1999 *J. Biol. Chem.* **274**, pp. 22127-22130
- **Mullenders L. und Berneburg M.**
Photoimmunology and nucleotide excision repair: impact of transcription coupled and global genome excision repair (Review)
2001 *J. of Photochemistry and Photobiology* **56**, pp. 97 - 100
- **Mu D., Hsu D., Sancar A.**
Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease
1996 *J. Biol. Chem.* **271** (14), pp. 8285 - 8294
- **Mu D., Park C.-H., Matsunaga T., Hsu D.S., Reardon J.T., Sancar A.**
Reconstitution of human DNA repair excision nuclease in a highly defined system
1995 *J. Biol. Chem.* **270**, pp. 2415 - 2418
- **Nahari D., McDaniel L. D., Task L. B., Daniel R. L., Velasco-Miguel S., Friedberg E. C.**
Mutations in the Trp53 gene of UV-irradiated XPC mutant mice suggest a novel XPC-dependent DNA repair process
2004 *DNA Repair* **3**, pp. 379 - 386
- **Nakane H., Takeuchi S., Yuba S., Sijo M., Nakatsu Y., Murai H., Nakatsuru Y., Ishikawa T., Hirota S., Kitamura Y., Kato Y., Tsunoda Y., Miyauchi H., Horio T., Tokunaga T., Matsunaga T., Nikaido O., Nishimune Y., Okada Y., Tanaka K.**
High incidence of ultraviolet-B- or chemical-carcinogen-induced skin tumors in mice lacking the xeroderma pigmentosum group A gene
1995 *Nature* **377**, pp. 165 - 168

- **Nakazawa H., Englisch D., Randell P. L., Nakazawa K., Martel N., Armstrong B.K., Yamasaki H.**
UV and skin cancer: specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement
1994 PNAS **91**, pp. 360 - 364
- **Nance M. A. und Berry S. A.**
Cockayne syndrome: review of 140 cases
1992 Am. J. Med. Genet. **42**, pp. 68 - 84
- **Nichols AF., Ong P., Linn S.**
Mutations specific to the xeroderma pigmentosum group E Ddb- phenotype.
1996 J Biol Chem. **271** (40), pp. 24317 - 24320
- **Nikolov DB. und Burley SK.**
RNA polymerase II transcription initiation: a structural view
1997 PNAS **94**, pp. 15 - 22
- **Nikolov DB., Chen H., Halay HD., Usheva AA., Hisatake K., Kun Lee D., Roeder RG., Burley SK.**
Crystal structure of a TFIIB-TBP-TATA-element ternary complex
1995 Nature **377**, pp. 119 - 128
- **Nigg E. A.**
Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA-repair and cell cycle control? (Review)
1996 Current Opinion in Cell Biology **8**, pp. 312 - 317
- **Nigg E. A.**
Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell
1995 Bioessays **17**, pp. 471 - 480
- **Ng J., Vermeulen W., van der Horst G., Bergink S., Sugawara K., Vrieling H., Hoeijmakers J.**
A novel regulation mechanism of DNA repair by damage-induced and RAD23-dependent stabilization of xeroderma pigmentosum group C protein
2003 Gen. Dev. **17**, pp. 1630 - 1645
- **Nocentini S., Coin F., Saijo M., Tanaka K., Egly J.-M.**
DNA damage recognition by XPA protein promotes efficient recruitment of transcription factor IIH
1997 J. Biol. Chem. **272** (37), pp. 22991 - 22994
- **O'Donovan A., Davies AA., Moggs JG., West SC., Wood RD.**
XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair
1994 Nature **371**, pp. 432 - 435
- **Orphanides G, Lagrange T, Reinberg D.**
The general transcription factors of RNA polymerase II (Review)
1996 Genes Dev. **10** (21), pp. 2657-83
- **Patton E. E., Willems A. R., Tyers M.**
Combinatorial control in the ubiquitin-dependent proteolysis: don't skip the F-box hypothesis (Review)
1998 Trends Genet. **14** (6), pp. 236 - 243
- **Park C.-H., Mu D., Reardon J. T., Sancar A.**
The general transcription-repair factor TFIIH is recruited to the excision repair complex by the XPA protein independent of the TFIIIE transcription factor
1995 J. Biol. Chem. **270** (9), pp. 4896 - 4902
- **Peeper D. S., Parker L. L., Ewen M. E., Toebes M., Hall F. L., Xu M.**
A- and B-type cyclins differentially modulate substrate specificity of cyclin-cdk complexes
1993 EMBO J. **12**, pp. 1947 - 1954
- **Perdiz D., Grof P., Mezzina M., Nikaido O., Moustacchi E., Sage E.**
Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis
2000, J. Biol. Chem. **275**, pp. 26732 - 26742
- **Perfetti V., Manenti G., Dragani T. A.**
Expression of housekeeping genes in Hodgkin's disease in lymph nodes
1991 Leukemia **5** (12), pp. 1110 - 1112

- **Pfeiffer P., Goedecke W., Kuhfittig-Kulle. Obe G.**
Pathways of DNA double-strand break repair and their impact on the prevention and formation of chromosomal aberration (Review)
2004 Cytogenet. Genome Res. **104** (1 – 4); pp. 7 - 13
- **Pines J.**
Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view (Review)
1995 Biochem. J. **308**, pp. 697 - 711
- **Pines J.**
The cell cycle kinases (Review)
1994 Semin Cancer Biol. **5** (4), pp. 305 - 313
- **Pinhero R., Liaw P., Bertens K., Yankulov K.**
Three cyclin-dependent kinases preferentially phosphorylate different parts of the C-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II
2004 Eur. J. Biochem. **275** (5), pp. 1004 - 1014
- **Poon R. Y. C., Yamashita K., Adamczewski J. P., Hunt T., Shuttleworth J.**
The cdc2-related protein p40^{MO15} is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33^{cdk2} and p34^{cdc2}
1993 EMBO J. **12**, pp. 3123 - 3132
- **Popescu A., Miron S., Blouquit Y., Duchambon P., Christova P., Craescu CT.**
Xeroderma pigmentosum group C protein possesses a high affinity binding site to human centrin 2 and calmodulin.
J Biol Chem. 2003 **278** (41), pp. 40252 - 40261
- **Qadri I., Conaway W., Conaway R. C., Shaak J., Siddiqui A.**
Hepatitis B virus transactivator protein, HBx, associates with the components of TFIIH and stimulates the DNA helicase activity of TFIIH
1996 PNAS **93**, pp. 10578 - 10583
- **Qiao Y., Spitz M. R., Shen H., Guo Z., Shete S., Hedayati M., Grossmann L., Mohrenweiser H., Wei Q.**
Modulation of repair of ultraviolet damage in the host-cell reactivation assay by polymorphic XPC and XPD/ERCC2 genotypes
2002 Carcinogenesis **23** (2), pp. 295 - 329
- **Ramanathan Y., Rajpara S. M., Reza S. M., Lees E., Shuman S., Mathews M. B., Peéry T.**
Three RNA polymerase II carboxyl-terminal domain kinases display distinct substrate preferences
2001 J. Biol. Chem. **276** (14), pp. 10913 - 10920
- **Ranish J. A., Hahn S., Lu Y., Yi E. C., Li X-J, Eng J., Aebersold**
Identification of TFB5, a new component of general transcription factor IIH
2004 Nat. Gen. **36** (7), pp. 707 - 713
- **Rapic-Otrin V., Navazza V., Nardo T., Botta E., McLenigan MP., Bisi DC., Levine AS., Stefanini M.**
True XP group E patients have a defective UV-damaged DNA binding protein complex and mutations in DDB2 which reveal the functional domains of its p48 product
2003 Hum. Mol. Genet. **12**, pp. 1507 - 1522
- **Rapic-Otrin V., McLenigan MP., Bisi DC., Gonzalez M., Levine AS.**
Sequential binding of UV DNA damage binding factor and degradation of the p48 subunit as early events after UV irradiation
2002 Nucl. Acids Res. **30**, pp. 2588 - 2598
- **Rapin I., Lindenbaum Y., Dickson D. W., Kraemer K. H., Robbins J. H.**
Cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum: DNA repair disorders with overlaps and paradoxes
2000 Neurology **55**, pp. 1442 - 1449
- **Ravanat J.-L., Douki T., Cadet J.**
Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components
2001 J. Photochem Photobiol **63** (1-3), pp. 88 - 103
- **Reardon J. T. und Sancar A.**
Recognition and repair of the cyclobutane thymine dimer, a major cause of skin cancers, by the human excision nuclease
2003 Genes Dev. **17**, pp. 2539 – 2551

- **Reardon J. T., Ge H., Gibbs E., Sancar A., Hurwitz J., Pan Z.-Q.**
Isolation and characterization of two human transcription factor IIIH (TFIIH)-related complexes: ERCC2/CAK and TFIIH
1996 PNAS **93**, pp. 6482 - 6487
- **Reese J. C.**
Basal transcription factors (Review)
2003 Gen. Dev. **13**, pp. 1 - 5
- **Riedl T., Hanaoka F., Egly J.-M.**
The comings and goings of nucleotide excision repair factors on damaged DNA
2003 EMBO **22** (19), pp. 5293 - 5303
- **Riedl T. und Egly J.-M.**
Phosphorylation in Transcription: The CTD and More (Review)
2000 Gene Expression **9**, pp. 3 - 13
- **Rieger K. E. und Chu G.**
Portrait of transcriptional response to ultraviolet and ionizing radiation in human cells
2004 Nucl. Acid. Res. **32** (16), pp. 4786 - 4803
- **Robles A. I., Wang X. W., Harris C. C.**
Drug-induced apoptosis is delayed and reduced in XPD lymphoblastoid cell lines: possible role of TFIIH in p53-mediated apoptotic cell death
1999 Oncogene **18**, 4681 - 4688
- **Robert F., Douziech M., Forget D., Egly JM., Greenblatt J., Burton ZF., Coulombe B.**
Wrapping of promotor DNA around the RNA polymerase II initiation complex induced by TFIIH
1998 Mol. Cell **2**, pp. 341 - 351
- **Rochette-Egly C., Adam S., Rossignol M., Egly J.-M., Chambon P.**
Stimulation of RAR α activation function AF-1 through binding to general transcription factor TFIIH and phosphorylation by Cdk7
1997 Cell **90**, pp. 1 - 20
- **Rockx D. A., Mason R., van Hoffen A., Barton M. C., Citterio E., Bregman D. B., van Zeeland A. A., Vrieling H., Mullenders L. H.**
UV-induced inhibition of transcription involves repression of transcription initiation and phosphorylation of RNA Pol II
2000 PNAS **97**, pp. 10503 - 10508
- **Roeder RG.**
The role of general transcription factors in transcription by RNA polymerase II (Review)
1996 Trends Biochem. Sci. **21**, pp. 327 - 335
- **Rossi D. J., Londesborough A., Korsisaari N., Pihlak A., Lehtonen E., Henkemeyer M., Mäkelä T. P.**
Inability to enter S phase and defective RNA polymerase II CTD phosphorylation in mice lacking MAT1
2001 EMBO J. **20** (11), pp. 2844 - 2856
- **Rossignol M., Kolb-Cheyne I., Egly J.-M.**
Substrate specificity of the cdk-activating kinase (CAK) is altered upon association with TFIIH
1997 EMBO J. **16** (7), pp. 1628 - 1637
- **Roy R., Adamczewski J. P., Seroz T., Vermeulen W., Tassan J.-P., Schaeffer L., Nigg E. A., Hoeijmakers J., Egly J.-M.**
The MO15 cell cycle kinase is associated with the TFIIH transcription-DNA repair factor
1994 Cell **79**, pp. 1093 - 1101
- **Rybanska I. und Pirsell M.**
Involvement of the nucleotide excision repair proteins in the removal of oxidative DNA base damage in mammalian cells (Review)
2003 Neoplasma **50** (6), pp. 389 - 395
- **Sage E., Lamolet B., Brulay E., Moustacchi E., Chateauneuf A., Drobetsky EA.**
Mutagenic specificity of solar UV light in nucleotide excision repair-deficient rodent cells
1996 PNAS **93**, pp. 176 - 180
- **Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.**
Molecular Cloning, a laboratory manual
1989 2nd edition, CSH press, New York, USA

- **Sancar A., Lindsey-Boltz L. A., Ünsal-Kacmaz K., Linn S.**
Molecular mechanism of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints (Review)
2004 *Annu. Rev. Biochem.* **73**, pp. 39 - 85
- **Sancar A.**
DNA Excision repair (Review)
1996 *Annu. Rev. Biochem.* **65**, pp. 15 - 25
- **Sandrock B. und Egly J.-M.**
A Yeast Four-hybrid System Identifies Cdk-activating Kinase as a Regulator of the XPD Helicase, a Subunit of Transcription Factor IIH
2001 *J. Biol. Chem.* **276** (38), pp. 35328 - 35333
- **Sands A. T., Abuin A., Sanchez A., Conti C. J., Bradley A.**
High susceptibility to ultraviolet induced carcinogenesis in mice lacking XPC
1995 *Nature* **377** (3545), pp. 162 - 165
- **Sanger F. and Coulson A. R.**
A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerases
1975 *J. Mol. Biol.* **94** (3), pp. 441 - 448
- **Satoh MS. und Lindahl T.**
Enzymatic repair of oxidative DNA damage (Review)
1994 *Cancer Res.* **90**, pp. 1899s – 1901s
- **Satoh MS., Jones CJ., Wood RD., Lindahl T.**
DNA-excision repair defect of xeroderma pigmentosum prevents removal of a class of oxygen free radical-induced base lesions
1993 *PNAS* **90**, pp. 6335 - 6339
- **Scaife JF.**
Mitotic G 2 delay induced in synchronized human kidney cells by UV and x-irradiation and its relation to DNA strand breakage, repair and transcription
1970 *Cell Tissue Kinet.* **3** (3), pp. 229-42
- **Schaeffer L., Moncollin V., Roy R., Staub A., Mezzina M., Sarasin A. Weeda G., Hoeijmakers J. H. J., Egly J.-M.**
The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor
1994 *EMBO J.* **13**, pp. 2388 – 2392
- **Scheer U. und Weisenberger D.**
The nucleolus (Review)
1994 *Curr. Opin. Cell Biol.* **6** (3), pp. 354 - 359
- **Schneider E., Montenarh M., Wagner P.**
Regulation of CAK kinase activity by p53
1998 *Oncogene* **17**, pp. 2733 - 2741
- **Schneider E., Kartarius S., Schuster N., Montenarh M.**
The cyclin H/cdk7/MAT1 kinase activity is regulated by CK2 phosphorylation of cyclin H
2002 *Oncogene* **21**, pp. 5031 - 5037
- **Schulman B. A., Lindstrom D. L., Harlow E.**
Substrate recruitment to cyclin-dependent kinase 2 by a multipurpose docking site on cyclin A
1998 *PNAS* **95**, pp. 10453 - 10458
- **Schulte-Frohlinde D.**
Biological consequences of strand breaks in plasmid and viral DNA (review)
1987 *Br. J. Cancer Suppl.* **8**, pp. 129 - 134
- **Schultz P., Fribourg S., Peterzman A., Mallouh V., Moras D., Egly J.-M.**
Molecular structure of human TFIIH
2000 *Cell* **102**, pp. 599 - 607
- **Schwartz B. E., Larochele S., Suter B., Lis J. T.**
Cdk7 is required for full activation of Drosophila heat shock genes and RNA polymerase II phosphorylation in vivo
2003 *Mol. Cell. Biol.* **23** (19), pp. 6876 - 6886
- **Seroz T., Perez C., Bergmann E., Bradsher J., Egly J.-M.**
p44/SSL1, the regulatory subunit of the XPD/RAD3 helicase, plays a crucial role in the transcriptional activity of TFIIH
2000 *J Biol. Chem.* **275**, pp. 33260 - 33266

- **Shackelford R. E., Kaufmann W. K., Paules R. S.**
Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress (Review)
1999 Environ. Health Perspect. **107** Suppl. 1, pp. 5 - 24
- **Sharma N.D. und Davies R.J.H.**
Extent of formation of a dimeric adenine photoproduct in polynucleotides and DNA
1989 J. Photochem. Photobiol. B: Biol. **3**, pp. 247 - 258
- **Sherr C. J.**
G1 phase progression: cycling on cue (Review)
1994 Cell **79**, pp. 551 - 555
- **Shiekhattar R., Mermelsten F., Fisher R. P., Drapkin R., Dynlacht B., Wessling H. C., Morgan D. O., Reinberg D.**
Cdk-activating kinase complex is a component of human transcription factor TFIIH
1995 Nature **374**, pp. 283 - 287
- **Shivji MKK., Podust VN., Hubsher U., Wood RD.**
Nucleotide excision repair DNA synthesis by DNA polymerase epsilon in the presence of PCNA, RFC, and RPA
1995 Biochemistry **34**, pp. 5011 - 5017
- **Shivji MK, Eker AP, Wood RD.**
DNA repair defect in xeroderma pigmentosum group C and complementing factor from HeLa cells
1994 J. Biol. Chem. **269**, pp. 22749 - 22757
- **Shuttleworth J.**
The regulation and functions of cdk7 (Review)
1995 Prog. Cell Cycle Res. **1**, pp. 229-40
- **Shuttleworth J, Godfrey R, Colman A.**
p40^{MO15}, a cdc2-related protein kinase involved in negative regulation of meiotic maturation of *Xenopus* oocytes
1990 EMBO J. **9** (10), pp. 3233-40
- **Sijbers AM., de Laat WL., Ariza RR., Biggerstaff M., Wei YF., Moggs JG., Certer KC., Shell BK., Evans E., de Jong MC., Rademakers S., de Rooij J., Jaspers NG., Hoeijmakers JHJ, Wood RD.**
Xeroderma pigmentosum group F caused by a defect in a structure-specific DNA repair endonuclease
1996 Cell **86**, pp. 811 - 822
- **Solomon M. J., Harper J. W., Shuttleworth J.**
CAK, the p34^{cdc2} activating kinase, contains a protein identical or closely related to p40^{MO15}
1993 EMBO J. **12**, pp. 3133 - 3142
- **Stary A. und Sarasin A.**
The genetic basis of xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy syndromes (Review)
1996 Cancer Surveys **26**, pp. 155 - 171
- **Van Steeg H., Mullenders L.-H., Vijg M.**
Mutagenesis and carcinogenesis in nucleotide excision repair-deficient XPA knock out mice (Review)
2000 Mutat. Res. **450**, pp. 167 - 180
- **Van Steeg H. und Kraemer K. H.**
Xeroderma pigmentosum and the role of UV-induced DNA damage in skin cancer (Review)
1999 Mol. Med. Today **5** (2), pp. 86 - 94
- **Sugasawa K., Okamoto T., Shimizu Y., Masutani C., Iwai S., Hanaoka F.**
A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair
2001 Gen. Dev. **15**, pp. 507 - 521
- **Sugasawa K., Ng J., Masutani C., Iwai S., van der Spek P., Eker A., Hanaoka F., Bootsma D., Hoeijmakers J.**
Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair
1998 Mol. Cell. **2**, pp. 223 - 232
- **Sugasawa K., Masutani C., Uchida A., Maekawa T., van der Spek P. J., Bootsma D., Hoeijmakers J. H. J., Hanaoka F.**
hHr23b, a human RAD23 homolog, stimulates XPC protein in nucleotide excision repair *in vitro*
1996 Mol. Cell. Biol. **16**, pp. 4852 - 4861

- **Sung P., Bailly V., Weber C., Thompson LH., Prakash L., Prakash S.**
Human xeroderma pigmentosum group D gene encodes a DNA helicase.
1993 Nature **365** (6449), pp. 852-5
- **Svejstrup J. Q., Vichi P., Egly J.-M.**
The multiple roles of transcription/repair factor TFIIH
1996 TIBS **21**, pp. 346 - 350
- **Svejstrup J. Q., Wang Z., Feaver W. J., Wu X., Bushnell D. A., Donahue T. F., Friedberg E. C., Kornberg R. D.**
Different forms of TFIIH for transcription and DNA repair: Holo-TFIIH and a nucleotide excision repairosome
1995 Cell **80**, pp. 21 - 28
- **Sweder K. und Madura K.**
Regulation of Repair by the 26S Proteasome
2002 J. Biomed. Biotechnol. **2**, pp. 94 - 105
- **Tang J. und Chu G.**
Xeroderma pigmentosum complementation group E and UV-damaged DNA-binding protein (Review)
2002 DNA Repair (Amst). **1** (8), pp. 601 - 616
- **Tapias A, Auriol J, Forget D, Enzlin JH, Scharer OD, Coin F, Coulombe B, Egly JM.**
Ordered conformational changes in damaged DNA induced by nucleotide excision repair factors
2004 J Biol Chem. **279** (18), pp. 19074-83
- **Takata M. Sasaki MS., Sonoda E., Morrison C., Hashimoto M., Utsumi Y., Yamaguchi-Iwai Y., Shinohara A., Takeda S.**
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
1998 EMBO J. **17**, pp. 5497 - 5508
- **Tassan J.P., Jaquenoud M., Fry A. M., Frutiger S. Hughes G. J., Niggs E. A.**
In vitro assembly of a functional human CDK7-cyclin H complex requires MAT1, a novel 36 kDa RING finger protein
1995 EMBO J. **14**, pp. 5608 - 5617
- **Tassan JP., Shultz J., Bartek J. Nigg EA.**
Cell cycle analysis of the activity, subcellular localisation, and subunit composition of human CAK (Cdk-activating kinase)
1994 J.Cell. Biol. **127**, pp. 467- 478
- **Thoma B. S. und Vasquez K. M.**
Critical DNA damage recognition functions of XPC-hHR23B and XPA-RPA in nucleotide excision repair (Review)
2003 Mol. Carcinogenesis **38**, pp. 1 - 13
- **Thompson LH, Carrano AV, Sato K, Salazar EP, White BF, Stewart SA, Minkler JL, Siciliano MJ**
Identification of nucleotide-excision-repair genes on human chromosomes 2 and 13 by functional complementation in hamster-human hybrids
1987 Somat. Cell. Mol. Genet. **13** (5), pp. 539-51.
- **Tirode F., Busso D., Coin F., Egly J.-M.**
Reconstitution of the transcription factor TFIIH: assignment of function for the three enzymatic subunits, XPB, XPD, and cdk7
1999 Mol Cell **3**, pp. 87 – 95
- **Tirode F., Malaguti C., Romero F., Attar R., Camonis J., Egly J.-M.**
A conditionally expressed partner stabilizes or prevents the formation of a transcriptional activator in a three-hybrid system
1997 J. Biol. Chem. **272** (37), pp. 22995 - 22999
- **Tong X., Drapkin R., Reinberg D., Kieff E.**
The 62- und 80-kDa subunits of transcription factor IIH mediate the interaction with Epstein-Barr virus nuclear protein 2
1995 PNAS **92** (8), pp. 3259 - 3263
- **Townsley F. M. und Ruderman J. V.**
Proteolytic ratchets that control progression through mitosis
1998 Trends Cell Biol. **8**, pp. 238 – 244

- **Tremeau-Bravard A., Perez C., Egly J.-M.**
A role of the C-terminal part of p44 in the promoter escape activity of transcription factor IIH
2001 J. Biol. Chem. **276** (29), pp. 27693-7
- **Tsai FT. und Sigler PB.**
Structural basis of preinitiation complex assembly on human pol II promoters
2000 EMBO J. **19**, pp. 25 – 36
- **Uchida A., Sugasawa K., Masutani C., Dohmae N., Araki M., Yokoi M., Ohkuma Y., Hanaoka F.**
The carboxy-terminal domain of the XPC protein plays a crucial role in nucleotide excision repair through interactions with transcription factor IIH
2002 DNA Repair **1**, pp. 449 - 461
- **Ura K. und Hayes J. J.**
Nucleotide excision repair and chromatin remodeling (Review)
2002 Eur. J. Biochem. **269**, pp. 2288 - 2293
- **Valay JG., Simon M., Dubois MF., Bensaude O., Facca C., Faye G.**
The Kin28 gene is required both for RNA polymerase II mediated transcription and phosphorylation of the Rpb1pCTD
1995 J. Mol. Biol. **249**, pp. 535 - 544
- **Vermeulen W, Bergmann E, Auriol J, Rademakers S, Frit P, Appeldoorn E, Hoeijmakers JH, Egly JM.**
Sublimiting concentration of TFIIH transcription/DNA repair factor causes TTD-A trichothiodystrophy disorder
2000 Nat. Genet. **26** (3), pp. 307-13
- **Volker M., Mone M. J., Karmakar P., van Hoffen A., Schul W., Vermeulen W., Hoeijmakers J., van Driel R., van Zeeland A. A., Mullenders L. H. F.**
Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors *in vivo*
2001 Mol. Cell **8**, pp. 213 - 224
- **de Vries A., van Oostrom C. Th. M., Hofhuis F. M. A., Dortant P. M., Berg R. J. W., de Gruijl F. R., Wester P. W., van Kreijl C. F., Capel P. J. A., van Steeg H., Verbeek S. J.**
Increased susceptibility to ultraviolet-B and carcinogens of mice lacking the DNA excision repair gene XPA
1995 Nature **377**, pp. 169 - 173
- **Wakasugi M., Kawashima A., Morioka H., Linn S., Sancar A., Mori T., Nikaido O., Matsunaga T.**
DDB accumulates at DNA damage sites immediately after UV irradiation and directly stimulates nucleotide excision repair
2002 J. Biol. Chem. **277** (3), pp. 1637 - 1640
- **Wakasugi M., Shimitzu M., Morioka H., Linn S., Nikaido O., Matsunaga T.**
Damaged DNA-binding protein DDB stimulates the excision of cyclobutane pyrimidine dimers *in vitro* in concert with XPA and replication protein A
2001 J. Biol. Chem. **276**, pp. 15434 - 15440
- **Wakasugi M. und Sancar A.**
Order of assembly of human DNA repair excision nuclease
1999 J. Biol. Chem. **274** (26), pp. 18759 - 18768
- **Wang G., Dombkowski A., Chuang L., Xu X. X.**
The involvement of XPC protein in the cisplatin DNA damaging treatment-mediated cellular response
2004a Cell Res. **14** (4), pp. 303 - 314
- **Wang G., Chuang L., Zhang X., Colton S., Dombkowski A., Reiners J., Diakiw A., Xu X. S.**
The initiative role of XPC protein in cisplatin DNA damaging treatment-mediated cell cycle regulation
2004b Nucl. Acid Res. **32** (7), pp. 2231 - 2240
- **Wang Q., Zhu Q., Wani M. A., Wani G., Chen J., Wani A. A.**
Tumor suppressor p53 dependent recruitment of nucleotide excision repair factors XPC and TFIIH to DNA damage
2003a DNA Repair **2**, pp. 483 - 499
- **Wang D., Hara R., Singh G., Sancar A., Lippard SJ.**
Nucleotide excision repair from site-specifically platinum-modified nucleosomes
2003b Biochemistr **42** (22), pp. 6747-53

- **Wang X. W., Vermeulen W., Coursen J. D., Gibson M., Lupold S. E., Forrester K., Xu G., Elmore L., Yeh H., Hoeijmakers J. H. J., Harris C. C.**
The XPB and XPD DNA helicase are components of the p53-mediated apoptosis pathway
1996 *Gen. Dev.* **10**, pp. 1219 - 1232
- **Wang Z, Buratowski S, Svejstrup JQ, Feaver WJ, Wu X, Kornberg RD, Donahue TF, Friedberg EC**
The yeast TFB1 and SSL1 genes, which encode subunits of transcription factor IIH, are required for nucleotide excision repair and RNA polymerase II transcription
1995a *Mol Cell Biol.* **15** (4), pp. 2288-93
- **Wang XW., Yeh H., Schaeffer L., Roy R., Moncollin V., Egly J.-M., Wang Z., Friedberg EC., Evans MK., Taffe BG., Bohr VA., Weeda G., Hoeijmakers JHJ., Forrester K., Harris CC.**
p53-modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity
1995b *Nat. Genet.* **10**, pp. 188 - 195
- **Warren A. J.**
Eukaryotic transcription factors (Review)
2002 *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, pp.107 - 114
- **Watanabe T., Hayashi K., Tanaka A., Furumoto T., Hanaoka F., Ohkuma Y.**
The carboxy terminus of the small subunit of TFIIH regulates the transition from transcription initiation to elongation by RNA polymerase II
2003 *Mol. Cel. Biol.* **23** (8), pp. 2914 - 2926
- **Watanabe Y., Fujimoto H., Watanabe T., Maekawa T., Masutani C., Hanaoka F., Ohkuma Y.**
Modulations of TFIIH-associated kinase activity by complex formation and its relationship with CTD phosphorylation of RNA polymerase II
2000 *Genes Cells* **5** (5), pp. 407 - 423
- **Weeda G., Rossignol S., Fraser R. A., Winkler G. S., Vermeulen W., van't Veer L. J., Ma L., Hoeijmakers J. H. J., Egly J. M.**
The XPB subunit of repair/transcription factor TFIIH directly interacts with SUG1, a subunit of the 26S proteasome and putative transcription factor
1997a *Nucl. Acid Res.* **25** (12), pp. 2274 - 2283
- **Weeda G., Hoeijmakers JHJ., Bootsma D.**
Genes controlling nucleotide excision repair in eukaryotic cells (Review)
1993 *Bioessays.* **15** (4), pp. 249-58.
- **Weeda G., Wiegant J., van der Ploeg M., Geurts van Kessel AH., van der Eb AJ., Hoeijmakers JHJ.**
Localization of the xeroderma pigmentosum group B-correcting gene ERCC3 to human chromosome 2q21.
1991 *Genomics* **10** (4), pp. 1035-40.
- **Weeda G., van Ham RC., Vermeulen W., Bootsma D., van der Eb AJ., Hoeijmakers JHJ.**
A presumed DNA helicase encoded by ERCC-3 is involved in the human repair disorders xeroderma pigmentosum and Cockayne's syndrome
1990 *Cell* **62** (4), pp. 777-91.
- **Wei H.C., Cai Q.Y., Rahn R., Zhang X.S.**
Singlet oxygen involvement in ultraviolet (254 nm) radiation-induced formation of 8-hydroxy-deoxyguanosin in DNA
1997 *Free Radic. Biol. Med.* **23**, pp. 148 - 154
- **Wierzchowski K.L. und Sugar D.**
Photochemistry of cytosine nucleosides, II
1961 *Acta Biochim. Pol.* **8**, pp. 219 - 234
- **Williams R. T., Wu L., Carbonaro-Hall D. A., Hall F.-L.**
Identification, assay and purification of a cdc2-activating threonine-161 protein kinase from human cells
1994, *Arch. Biochem. Biophys.* **314**, pp. 99 - 106
- **Winkler G. S., Sugasawa K., Eker AP., de Laat WL., Hoeijmakers JHJ.**
Novel functional interactions between nucleotide excision DNA repair proteins influencing the enzymatic activities of TFIIH, XPG, and ERCC1-XPF
2001 *Biochemistry* **40**, pp. 160 – 165

- **Winkler G. S., Araujo S. J., Fiedler U., Vermeulen W., Coin F., Egly J.- M., Hoeijmakers JHJ., Wood R. D., Timmers M., Weeda G.**
TFIIH with inactive XPD helicase functions in transcription initiation but is defective in DNA repair
2000 J. Biol. Chem. **275** (6), pp. 4258 - 4266
- **Wu L., Chen P., Shum C. H., Chen C., Barsky L. W., Weinberg K. I., Jong A., Triche T. J.**
MAT1-modulated CAK activity regulates cell cycle G1 exit
2001 Mol. Cell. Biol. **21** (1), pp. 260 - 270
- **Wu L., Chen P., Hwang J. J., Barsky L. W., Weinberg K. I., Jong A., Starnes V. A.**
RNA antisense abrogation of MAT1 induces G1 phase arrest and triggers apoptosis in aortic smooth muscle cells
1999 J. Biol. Chem. **274**, pp. 5564 - 5572
- **Wu L., Yee A., Liu L. Carbonaro-Hall D., Venkatesan N., Tolo V. T., Hall F. L.**
Molecular cloning of the human CAK1 gene encoding a cyclin-dependent kinase-activating kinase
1994 Oncogene **9** (7), pp. 2089 - 2096
- **Xagorari A, Roussos C, Papapetropoulos A.**
Inhibition of LPS-stimulated pathways in macrophages by the flavonoid luteolin.
2002 Br. J. Pharmacol. **136** (7), pp. 1058-64.
- **Xiao H., Pearson H., Coulombe R., Truant R., Zhang S., Regier J. L., Triezenberg S. J., Reinberg D., Flores O., Ingles C. J., Greenblatt J.**
Binding of basal transcriptionfactor TFIIH to the acidic activation domain of VP16 and p53
1994 Mol. Cell. Biol. **14**, pp. 7013 – 7024
- **Yan M. und Gralle J. D.**
Multiple ATP-dependent steps in RNA polymerase II promotor melting and initiation
1997 EMBO J. **26**, pp. 7457 - 7467
- **Yankulov K. Y. und Bentley D. L.**
Regulation of cdk7 substrate specificity by MAT1 and TFIIH
1997 EMBO J. **17** (7), pp. 1638 – 46
- **Yankulov K., Yamashita K., Roy R., Egly J.-M., Bentley D. L.**
The transcriptional elongation inhibitor 5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole inhibits transcription factor IIH-associated protein kinase
1995 J. Biol. Chem. **270** (41), pp. 23922 - 23925
- **Yokoi M., Masutani C., Maekawa T., Sugawara K., Ohkuma Y., Hanaoka F.**
The xeroderma pigmentosum group C protein complex XPC-HR23B plays an important role in the recruitment of transcription factor IIH to damaged DNA
2000 J. Biol. Chem. **275** (13), pp. 9870 - 9875
- **Yokomori K., Verrijzer CP., Tjian R.**
An interplay between TATA box-binding protein and transcription factors IIE and IIA modulates DNA binding and transcription
1998 PNAS **95**, pp. 6722 - 6727
- **Yoon H., Miller S.P., Pabich E.K., Donahue T.F..**
SSL1, a suppressor of a HIS4 5'-UTR stem-loop mutation, is essential for translation initiation and affects UV resistance in yeast
1992 Genes Dev. **6** (12B), pp. 2463-77
- **You J.-S., Wang M., Lee S.-H.**
Biochemical analysis of the damage recognition process in nucleotide excision repair
2003 J. Biol. Chem. **278** (9), pp. 7476 - 7485
- **Zamble D. B. und Lippard S. J.**
Cisplatin und DNA repair in cancer chemotherapy (Review)
1995 Trends Biochem. Sci. **20**, pp. 435 - 439
- **Zandomeni R., Zandomeni M. C., Shugar D., Weinmann R.**
Casein kinase type II is involved in the inhibition by 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole of specific RNA polymerase II transcription
1986 J. Biol. Chem. **261** (7), pp. 3414 - 3419
- **Zawel L., Kumar P., Reinberg D.**
Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase II transcription
1995 Genes Dev. **9**, pp. 1479 – 1490

- **Zhang DY., Carson DJ., Ma J.**
The role of TFIIIB-RNA polymerase II interaction in start site selection in yeast cells
2002 Nucl. Acids Res. **30**, pp. 3078 - 3085
- **Zhang X.S., Rosenstein B.S., Wang Y., Lebwohl M., Wei H.C.**
Identification of possible reactive oxygen species involved in ultraviolet radiation-induced oxidative DNA damage
1997 Free Radic. Biol. Med. **23**, pp. 980 -985
- **Zhao X. und Taylor J.-S.**
The structure of d(TpA), the major photoproduct of thymidydy-(3'5')-deoxyadenosine
1996a Nucl. Acids Res. **24**, pp. 1554 - 1560
- **Zhao X. und Taylor J.-S.**
Mutation spectra of TA*, the major photoproduct of thymidydy-(3'5')-deoxyadenosine, in *Escherichia coli* under SOS conditions
1996 Nucl.Acids Res. **24**, pp. 1561 - 1565
- **Zurita M. und Merino C.**
The transcriptional complexity of the TFIIH complex (Review)
2003 Trends Gen. **19** (10), pp. 578 - 584

