

Charakterisierung der Ubiquitinierung des Ku80-Proteins

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl.-Biol. Florian Naeve

aus

Karlsruhe

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: PD Dr. Christine Blattner

Korreferent: Prof. Dr. Holger Puchta

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.2012

I. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Karlsruhe, September 2011

Florian Naeve

II. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mir das Anfertigen dieser Arbeit ermöglicht haben.

An erster Stelle steht dabei Christine Blattner, die mir das Anfertigen dieser Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe ermöglicht hat und ihre sehr gute Betreuung.

Besonders möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Holger Puchta bedanken, der ohne zu zögern die Stelle des Korreferenten übernommen hat.

Dank auch an meine freundlichen Kollegen aus Labor 203 (Yulia Elch, Irene Kiess, Carolin Oberle, Valeriya Solozobova, Verena Hemberger, Laura Köhler, Volker Middel, Justine Letienne, Christina Bauer und Ping Zhang) und Labor 224 (Roman Häuser und Thorsten Stellberger), die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und für ein gutes Arbeitsklima gesorgt haben.

Ebenso ein großes Dankeschön an das gesamte ITG und dessen Infrastruktur.

Vielen Dank an meine Eltern, die mich stets unterstützt haben.

Zu guter Letzt, ein ganz großes Dankeschön an meine Freundin Alexandra Baumann, die es geschafft hat, mir am Ende nochmal die nötige Motivation zu verschaffen!

III. Zusammenfassung

Ku80 ist ein Protein, welches an der DNA-Reparatur beteiligt ist. Ku80 bildet zusammen mit Ku70 und der katalytischen Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK_{CS}) das DNA-PK Holoenzym. Dieses spielt vor allem bei der Nicht-homologen Endverknüpfung (NHEJ) eine Rolle. Über die Regulation von Ku80 und BRCA1 ist bisher nur wenig bekannt.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Ku80 mittels Polyubiquitinierung posttranslational modifiziert wird. Diese Ubiquitinierung wird durch ionisierende Strahlung verstärkt. Die Ubiquitinierung von Ku80 dient jedoch nicht als Signal zum proteasomalen Abbau. Während die Verknüpfung über Lysin 48 des Ubiquitins, ubiquitinierte Proteine für den Abbau im Proteasom markieren, war im Falle von Ku80 eine Verknüpfung der Ubiquitinkette über die Lysine an den Positionen 33 oder 63 des Ubiquitin-Proteins zu beobachten.

Um die Ubiquitinierungsstelle im Ku80-Protein zu kartieren, wurde das Ku80 Protein vom C-Terminus her deletiert und die Fragmente auf eine Ubiquitinierung untersucht. Dabei ergab sich, dass ein Fragment von Aminosäure 1 bis 168 noch ubiquitiniert wurde. Daraufhin wurden die Lysine in diesem Fragment kumulativ durch Arginin ersetzt. Dabei zeigte sich eine deutlich schwächere Ubiquitinierung des Fragments wenn alle Lysine von Aminosäure 1 bis 129 durch Arginin ersetzt worden waren. Damit war es wahrscheinlich, dass die Lysine, die in dieser Mutante zusätzlich zur vorausgehenden Mutante durch Arginin ersetzt worden waren (Lysin 125, Lysin 126, Lysin 129) im Ku80 Protein ubiquitiniert werden. Wurden die Lysine 125, 126 und 129 jedoch im Gesamtprotein durch Arginin ersetzt, führte dies zu keiner schwächeren Ubiquitinierung.

Um herauszufinden, welche Ubiquitinligase Ku80 ubiquitiniert, wurden H1299-Zellen mit den Ubiquitinligasen BRCA1 und RNF8 transfiziert. In Gegenwart dieser Ubiquitinligasen war die Ubiquitinierung von Ku80 erhöht. Daneben war eine Assoziation von Ku80 mit BRCA1 zu beobachten. Vorläufige Ergebnisse zeigten darüber hinaus, dass Ku80 schwächer an geschädigte DNA bindet, wenn die Proteinmenge von BRCA1 experimentell reduziert wurde.

Zusammengenommen, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass BRCA1 für die Aktivität von Ku80 physiologisch relevant ist.

IV. Inhaltsverzeichnis

I. Eidesstattliche Erklärung	i
II. Danksagung	ii
III. Zusammenfassung	iii
IV. Inhaltsverzeichnis.....	iv
1. Einleitung	1
1.1. DNA-Schäden und Mutationen.....	1
1.2. Detektion von Doppelstrangbrüchen	2
1.3. Doppelstrangbruchreparatur	4
1.3.1. Homologe Rekombination	4
1.3.2. Nicht-homologe Endverknüpfung	5
1.4. Ku80.....	8
1.5. BRCA1	10
1.6. RNF8.....	12
1.7. Posttranslationelle Modifikationen.....	13
1.7.1. Ubiquitinierung.....	14
1.8. Zielsetzung.....	16
2. Material und Methoden.....	17
2.1. Material	17
2.1.1. Chemikalien	17
2.1.2. Enzyme.....	19
2.1.3. Größenstandards	19
2.1.4. Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	19
2.1.5. Primäre Antikörper	21
2.1.6. Sekundäre Antikörper (HRP-gekoppelt)	22
2.1.7. Sekundäre Antikörper (Fluorophor-gekoppelt) und Kernfarbstoffe.....	22
2.1.8. Kits und Transfektions-Reagenzien.....	22
2.1.9. Software und Programme	23
2.1.10. Plasmide	23

2.1.11. Oligonukleotide	24
2.1.11.1. Primer.....	25
2.1.11.2. siRNA	26
2.1.12. Bakterien.....	26
2.1.13. Zelllinien.....	26
2.2. Methoden	26
2.2.1. Methoden und Medien für Bakterien	26
2.2.1.1. Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	26
2.2.1.2. Transformation chemisch kompetenter Bakterien.....	27
2.2.2. Kultur und Manipulation eukaryotischer Zellen	27
2.2.2.1. Kultur eukaryotischer Zellen	27
2.2.2.2. Kryokonservierung und Anzucht von Zellen.....	28
2.2.2.3. Transfektion mittels Kalzium-Phosphat-Kopräzipitation	28
2.2.2.4. Transfektion mit Lipofectamine™ 2000.....	29
2.2.2.5. Behandlung von Zellen.....	29
2.2.3. Proteinbiochemische Methoden	29
2.2.3.1. Herstellen von Zelllysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration.....	29
2.2.3.2. Ko-Immunpräzipitation.....	30
2.2.3.3. Ubiquitinierungs-Assay.....	31
2.2.3.4. Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP).....	31
2.2.3.5. SDS-PAGE.....	33
2.2.3.6. Western Blot.....	34
2.2.3.7. Immunodetektion	34
2.2.3.8. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung.....	35
2.2.3.9. Quantifizierung	35
2.2.4. Molekularbiologische Methoden	35
2.2.4.1. Plasmid-DNA Präparation.....	35
2.2.4.2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	36
2.2.4.3. Analyse von DNA	38
2.2.4.4. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	38
2.2.4.5. Restriktionsverdau	39
2.2.4.6. Ligation.....	39
2.2.4.7. Isolierung von RNA.....	39
2.2.4.8. Reverse Transkription	39

3. Ergebnisse	41
3.1. Klonierung von Ku80 aus revers transkribierter RNA.....	41
3.2. Ku80 wird durch Ubiquitinierung posttranslational modifiziert	42
3.3. Charakterisierung der an das Ku80-Protein gebundenen Ubiquitinketten...	45
3.4. Kartierung der Ubiquitinierungsstelle von Ku80	50
3.5. Die Gegenwart von BRCA1 und RNF8 verstärkt die Ubiquitinierung des Ku80-Proteins	56
3.6. BRCA1 interagiert mit Ku80	61
3.7. Das BRCA1 Protein ist an Doppelstrangbrüchen nachweisbar.....	62
3.8. BRCA1 fördert die Doppelstrangbruch-Reparatur.....	64
3.9. BRCA1 reguliert die Bindung von Ku80 an Doppelstrangbrüche	66
4. Diskussion.....	71
4.1. Das Ku80 Protein ist ubiquitiniert.....	71
4.2. Die Ubiquitinreste am Ku80 Protein sind über verschiedene Lysine miteinander verknüpft.....	72
4.3. BRCA1 und RNF8 verstärken die Ubiquitinierung des Ku80 Proteins	74
4.4. BRCA1 wird zur vollständigen DNA-Reparatur benötigt	75
4.5. BRCA1 reguliert die Bindung von Ku80 an den DNA-Schaden	76
5. Ausblick.....	77
6. Literatur	79
7. Anhang.....	104
7.1. Abkürzungsverzeichnis	104
7.2. Lebenslauf	107

1. Einleitung

Nach Angaben des Robert-Koch-Instituts gab es im Jahr 2006 in Deutschland 426.800 Neuerkrankungen und 210.930 Sterbefälle durch Krebs (Krebs in Deutschland – Häufigkeiten und Trends 2005/2006, 2010). Laut WHO ist Krebs einer der Hauptverantwortlichen bei den Todesursachen (WHO Fact sheet N°297, 2011).

Krebs dient als Oberbegriff für eine Vielzahl bösartiger Erkrankungen. Im Allgemeinen versteht man darunter die unkontrollierte Vermehrung von Zellen. Durch diese unkontrollierte Vermehrung von Zellen können Organe beeinflusst oder sogar zerstört werden. Das gefährlichste an Tumorzellen ist dabei ihre Fähigkeit, sich mit Hilfe der Blutbahn oder des Lymphsystems im Organismus zu verbreiten und Metastasen zu bilden. Die Hauptursache für Krebs sind DNA Schäden, die nicht, oder nur fehlerhaft repariert wurden.

1.1. DNA-Schäden und Mutationen

Eines der obersten Ziele jedes Organismus ist die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität. Diese wird jedoch jeden Tag durch eine Vielzahl von Faktoren gestört, die zu Schäden in der DNA führen. Dabei unterscheidet man verschiedene Arten von DNA Schäden. Bei der Veränderung einer Base spricht man von Basenschäden. Daneben kommt es aber auch zu Basenfehlpaarungen oder zum Verlust einer kompletten Base. Es kann aber auch zu Veränderungen im Zucker-Phosphatgerüst der DNA oder zu Strangvernetzungen kommen. Dabei sind DNA-DNA-Vernetzungen oder Protein-DNA-Vernetzungen möglich. Zusätzlich können aber auch Brüche vorkommen, wobei entweder nur ein DNA-Strang (Einzelstrangbruch) oder beide DNA-Stränge (Doppelstrangbruch) unterbrochen werden können. Welcher Schaden entsteht, hängt vom Auslöser ab. Polyzyklische Kohlenwasserstoffe führen zu Basenaddukten während UV-Strahlung neben Basenschäden zu Thymin-Dimeren und ionisierende Strahlung neben Basenveränderungen, Einzel- und Doppelstrangbrüche bewirkt.

Doppelstrangbrüche stellen eine besonders schwere Schädigung der DNA dar. Sollte der Organismus nicht in der Lage sein, die entstandenen Schäden reparieren zu können, so kann dies zu Chromosomen-Translokationen oder sogar zum Zelltod führen (Deckbar *et al.*, 2007; Richardson and Jasin, 2000; Vamvakas *et al.*, 1997). Neben exogenen Faktoren können DNA Schäden und Mutationen auch durch endogene Faktoren entstehen. Fehler während der Replikation verursachen Basenfalschpaarungen, Insertionen und Deletionen. Diese müssen dann durch die Mismatch-Reparatur behoben werden. Je nachdem um welchen DNA-Schaden es sich handelt, werden verschiedene Reparaturwege aktiviert.

Dabei werden Basenschäden über die Basenexzisionsreparatur, Thymindimere und 6-4-Photoprodukte über die Nukleotidexzisionsreparatur repariert. Doppelstrangbrüche und Strangvernetzungen werden durch die Nicht-homologe Endverknüpfung oder die Homologe Rekombination behoben.

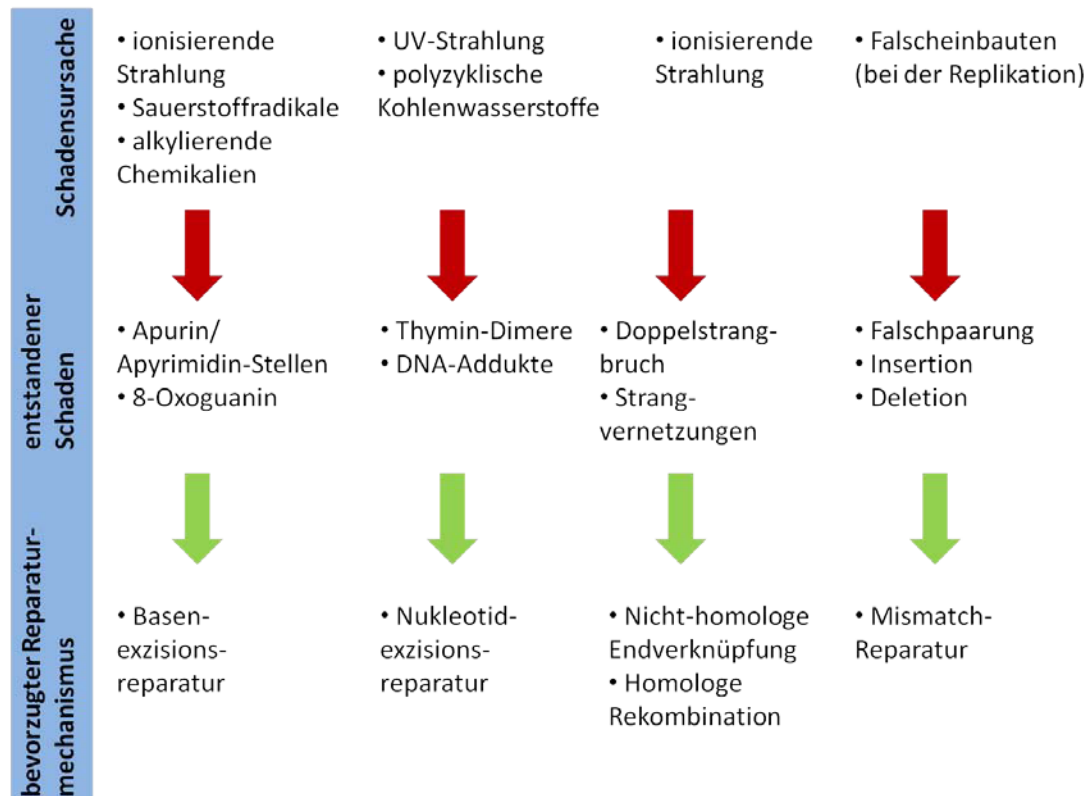


Abbildung 1: DNA-Schäden und ihre Reparaturmechanismen.

Ionisierende Strahlung, Sauerstoffradikale und alkylierende Chemikalien führen zu AP-Stellen (Apurin oder Apyrimidin-freie Stellen) oder auch zu 8-Oxoguanin. Diese Basenschäden werden über die Basenexzisionsreparatur repariert. UV-Strahlung und polyzyklische Kohlenwasserstoffe verursachen Thymin-Dimere bzw. DNA-Addukte und werden mittels Nukleotidexzisionsreparatur repariert. Durch ionisierende Strahlung verursachte Doppelstrangbrüche und Strangvernetzungen werden durch die Nicht-homologe Endverknüpfung oder durch die Homologe Rekombination repariert. Falscheinbauten während der Replikation führen zu Insertionen und Deletionen und werden durch die Mismatch-Reparatur behoben.

1.2. Detektion von Doppelstrangbrüchen

Ist ein Doppelstrangbruch aufgetreten, so muss dieser von der Zelle auch als solcher erkannt werden. Als erster Schritt nach dem Eintritt eines Schadens wird das Histon H2AX Protein an Serin 139 phosphoryliert (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004; Rogakou *et al.*, 1998). Zwar können Doppelstrangbrüche prinzipiell durch alle drei zur Familie der Phosphatidylinositol 3-Kinase-ähnlichen Protein Kinasen gehörenden Kinasen wie *Ataxia-telangiectasia-mutated*

(ATM), *Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein* (ATR) und *DNA-abhängige Protein Kinase* (DNA-PK) erkannt werden, doch scheint *in vivo* nur ATM das H2AX Protein zu phosphorylieren (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004; Stiff *et al.*, 2004). ATM scheint dabei in der Lage zu sein, Veränderungen der Chromatinstruktur, die bei einem Doppelstrangbruch auftreten, zu erkennen. Das als inaktives Homodimer vorliegende ATM-Protein teilt sich danach in zwei aktive Monomere, die sich gegenseitig phosphorylieren (Bakkenist and Kastan, 2003). Dabei scheint der Mre11-Rad50-Nbs1-Komplex (MRN) eine wichtige Rolle zu spielen. Der MRN-Komplex besitzt gleichfalls eine hohe Affinität für geschädigte DNA und ist ebenfalls sehr früh an einem DNA-Schaden zu finden (Difilippantonio *et al.*, 2005; Lee and Paull, 2004; Lee and Paull, 2005). Ein weiteres Protein, das an der Schadenserkenkung beteiligt sein könnte, ist die Acetyltransferase Tip60, welche Chromatin im Bereich eines DNA-Schadens modifiziert (Murr *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2009).

Die Phosphorylierung von H2AX ermöglicht es dann dem MDC1- (*mediator of DNA damage checkpoint 1*) Protein an den Ort des Schadens zu binden. MDC1 bindet über die zwei C-terminalen BRCT-Domänen an γ H2AX und sorgt für die Aufrechterhaltung der Phosphorylierung, indem es die Phosphatasen PP2A und PP4 behindert. Zusätzlich dient MDC1 als Plattform zur Anlagerung und Rekrutierung weiterer Faktoren wie zum Beispiel von RNF8 (Chowdhury *et al.*, 2005; Chowdhury *et al.*, 2008; Nakada *et al.*, 2008; Stucki *et al.*, 2005). Interessanterweise wurde bei Hefe bis jetzt kein Ortholog von MDC1 gefunden. Dafür sind aber bei höheren Eukaryoten später im Signalweg vorkommenden Proteine wie 53BP1 (Ortholog in Hefe: Rad9) in der Lage, direkt an phosphoryliertes H2A zu binden (Du *et al.*, 2006; Hammet *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2010). Gleichzeitig sorgt das MDC1-Protein für eine weitere Anreicherung des MRN-Komplexes, was zu einer weiteren Aktivierung von ATM führt, wodurch ein positiver *feedback loop* aufgebaut wird (Chapman and Jackson, 2008; Lloyd *et al.*, 2009; Melander *et al.*, 2008; Spycher *et al.*, 2008; Stucki *et al.*, 2005). Dabei assoziiert das MDC1 Protein über die FHA-Domäne des Nbs1-Proteins, welches an eine konservierte Phosphorylierungsstelle im N-terminalen Bereich des MDC1-Proteins bindet, mit dem MRN-Komplex (Chapman and Jackson, 2008; Melander *et al.*, 2008; Spycher *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2008).

Innerhalb von zwei Minuten nach einem Doppelstrangbruch hat sich somit eine erste Welle an Faktoren der Doppelstrangbruch-Reparatur an den Schaden angelagert und das Signal verstärkt (Bekker-Jensen *et al.*, 2005; Lukas *et al.*, 2004; Mailand *et al.*, 2007). Dabei bilden diese Proteine Aggregate an der geschädigten DNA welche als sog. Foci unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden können.

In einem zweiten Schritt lagern sich weitere Proteine wie RNF8, RNF168, 53BP1 und BRCA1 an den Doppelstrangbruch an. Als Ausgangspunkt dient hierbei die E3-Ubiquitin-Ligase RNF8, die über ihre FHA-Domäne mit dem phosphorylierten MDC1 Protein assoziiert.

RNF8 ubiquitiniert dann die Histonproteine H2A und H2AX und ermöglicht dadurch die Rekrutierung weiterer Reparaturfaktoren (Huen *et al.*, 2007; Mailand *et al.*, 2007).

1.3. Doppelstrangbruchreparatur

1.3.1. Homologe Rekombination

Die Homologe Rekombination (HR) ist ein fehlerfrei arbeitender Reparaturmechanismus für Doppelstrangbrüche. Dabei wird der Bereich des Doppelstrangbruchs anhand des Schwesterchromatids neu synthetisiert. In somatischen Zellen kann dies aber nur in der späten S- oder G2-Phase des Zellzyklus stattfinden, da nur hier das Schwesterchromatid in unmittelbarer Nähe vorliegt (Franco *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2005). Damit die Homologe Rekombination stattfinden kann, müssen die DNA-Enden des Doppelstrangbruchs zunächst prozessiert werden. Dabei werden die 5'-Enden durch den Rad50/Mre11/Nbs1-Komplex abgebaut und es entsteht ein langer 3'-Einzelstrang (Helmink *et al.*, 2009). Hier scheint Mre11 die verantwortliche Nuklease zu sein. Diverse Studien haben gezeigt, dass die Nukleaseaktivität von Mre11 bei der Doppelstrangbruchreparatur benötigt wird (Bressan *et al.*, 1999; Johzuka and Ogawa, 1995; Moreau *et al.*, 1999; Moreau *et al.*, 2001). Mre11 scheint hierbei speziell für die Prozessierung geschädigter DNA-Enden zuständig zu sein (Llorente and Symington, 2004; Tsubouchi and Ogawa, 2000). An den entstandenen 3'-DNA-Einzelstrang bindet das RPA-Protein (*replication protein A*), um ihn vor Abbau zu schützen und um eventuelle Sekundärstrukturen zu entfernen (Sugiyama *et al.*, 1997). An den Nukleoproteinfilamentkomplex lagert sich dann Rad51 an und fördert die ATP-abhängige Invasion des DNA-Einzelstrangs in den komplementären Bereich des Schwesterchromatids (Ristic *et al.*, 2005; Song and Sung, 2000; Sugiyama *et al.*, 1997; Sung, 1994). Dabei muss das Nukleofilament mit Rad51 mindestens 100bp lang sein, damit ein effizienter Strangaustausch stattfinden kann (Ira and Haber, 2002). Weiterhin lagern sich Rad52 und Rad54 an und es entsteht ein DNA-Heteroduplex (*displacement-loop; D-loop*). Bei Wirbeltieren scheint auch BRCA2, möglicherweise anstatt Rad52, beim Strangaustausch und der Stranginvasion eine Rolle zu spielen (Davies and Pellegrini, 2007; Esashi *et al.*, 2007). Rad54 ist u.a. für die Suche nach der homologen Sequenz auf dem Schwesterchromatid und der Paarung der homologen Sequenzen zuständig (Bugreev *et al.*, 2007; Heyer *et al.*, 2006; Sugawara *et al.*, 2003). Nachdem die passende Stelle gefunden wurde, synthetisieren die beiden Polymerasen μ und λ anhand des entsprechenden komplementären Stranges auf dem Schwesterchromatid einen neuen Strang (Maloisel *et al.*, 2008). Dabei kommen die einzelnen DNA-Stränge überkreuz zu liegen (*holiday junction*). Um

die Reparatur abzuschließen, muss diese Überkreuzstruktur aufgelöst werden. Dies geschieht durch die beiden Proteine Rad51C und XRCC3 (Liu *et al.*, 2007).

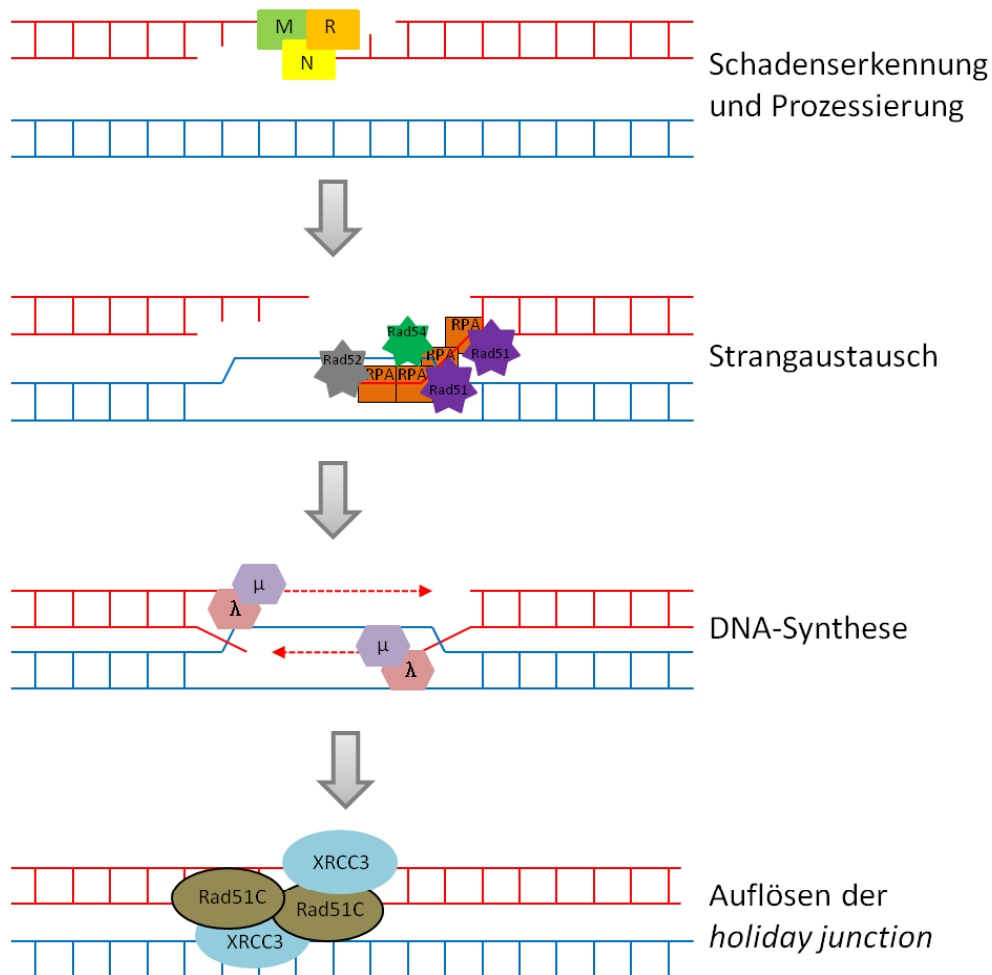


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Homologen Rekombination.

Die DNA-Enden am Doppelstrangbruch werden durch den MRN-Komplex prozessiert. Der freiliegende DNA-Einzelstrang wird durch die Proteine RPA (braunes Viereck), Rad51 (lila Stern), Rad52 (grauer Stern) und Rad54 (grüner Stern) bedeckt so dass sich ein Nukleoproteinfilament bildet. Mit Hilfe von Rad51 findet der ATP-getriebene Strangaustausch und die Anlagerung an eine homologe Sequenz statt. Anschließend wird unter Zuhilfenahme des Schwesterchromatids (blauer Strang) ein neuer DNA-Strang durch die Polymerasen μ (fliefarbenes Sechseck) und λ (rosa Sechseck) synthetisiert. Die entstandene *holiday junction* wird durch die Proteine XRCC3 und Rad51C aufgelöst.

1.3.2. Nicht-homologe Endverknüpfung

Die meisten Doppelstrangbrüche werden bei höheren Eukaryoten über die Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ von *Non-homologous end joining*) repariert. Da hier die beiden DNA-Enden nur ligiert werden, kann sie in jeder Phase des Zellzyklusses erfolgen.

Ursprünglich nahm man an, dass es sich bei der NHEJ um eine simple Ligation von zwei DNA-Enden handelt. Wegen des gehäuften Auftretens von Deletionen und Insertionen nahm man weiterhin an, dass es sich bei der NHEJ *per se* um einen sehr fehlerhaften Reparaturmechanismus handelt. (Moore and Haber, 1996; Wilson *et al.*, 1997). Neuere Untersuchungen in Hefe zeigten jedoch, dass beim Vorliegen eines Doppelstrangbruches bei dem keine weitere Bearbeitung der DNA-Enden notwendig ist und bei dem nur das Zucker-Phosphat-Gerüst der DNA durchtrennt ist, die NHEJ den Schaden ohne Informationsverlust beheben würde (Wilson *et al.*, 1997; Wilson and Li eber, 1999). Bei den meisten Doppelstrangbrüchen sind die DNA-Enden jedoch nicht kompatibel und es bedarf einer Prozessierung der Enden vor der Ligation. Diese Prozessierung führt zum Sequenzverlust am Doppelstrangbruch und damit zu Mutationen.

Die NHEJ kann grob in vier Stufen eingeteilt werden. Der erste Schritt ist das Erkennen des Doppelstrangbruchs und die Einleitung der NHEJ. Hierbei spielt das Ku70/Ku80 Heterodimer eine wichtige Rolle. Es bindet an die DNA am Doppelstrangbruch, schützt die DNA-Enden vor ungewolltem Abbau und dient als Plattform für die Rekrutierung weiterer Reparaturfaktoren, inklusive der regulatorischen Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK). Nach dem Ku70/Ku80 Heterodimer kommt die katalytische Untereinheit der DNA-PK zum DNA-Schaden. In Anwesenheit von DNA-gebundenem Ku70/Ku80 Protein, bindet die DNA-PK_{CS} 100 Mal stärker, als ohne Ku70/Ku80 (West *et al.*, 1998). DNA-PK phosphoryliert daraufhin ihre Zielproteine H2AX, XRCC4, Ku70 und Ku80 (Ma *et al.*, 2004; Soubeyrand *et al.*, 2003; Yavuzer *et al.*, 1998) und sorgt für ein räumliches Zusammenhalten der DNA-Enden (Spagnolo *et al.*, 2006).

Beim zweiten Schritt der NHEJ werden weitere Reparaturfaktoren an den DNA Schaden rekrutiert, wie zum Beispiel die DNA-Ligase IV, das XRCC4 (*X-ray repair complementing group 4 protein*) Protein, die Proteine XLF (*XRCC4-like factor*) und Artemis sowie die Polymerasen μ und λ und eine terminale deoxynukleotidyl Transferase (TdT) (Daley *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2002). Allerdings kommt die TdT nur in lymphoiden Zellen vor (Bogue *et al.*, 1997; Mahajan *et al.*, 1999; Mickelsen *et al.*, 1999).

In einem dritten Schritt, werden ligierbare DNA-Enden hergestellt. Dabei werden zu lange DNA-Einzelstränge durch den MRN-Komplex (Lee and Paull, 2004) oder durch Artemis verkürzt bzw. zu kurze Einzelstränge mit den passenden Nukleotiden durch die Polymerasen μ und λ verlängert (Daley *et al.*, 2005; Nick McElhinny *et al.*, 2005). Über die TdT können ferner weitere Nukleotide an die DNA-Enden angeknüpft werden (Mahajan *et al.*, 1999; Mickelsen *et al.*, 1999).

Anschließend werden in einem vierten und letzten Schritt die DNA-Enden durch den Ligase IV/XRCC4/XLF-Komplex ligiert. Dabei ist die Ligase IV für die eigentliche Ligation verantwortlich. Sie assoziiert über ihren C-Terminus mit dem XRCC4 Protein und wird

dadurch stabilisiert. Dadurch wird gewährleistet, dass in der Zelle immer eine ausreichende Menge an Ligase IV zur Verfügung steht (Bryans *et al.*, 1999; Grawunder *et al.*, 1997; Grawunder *et al.*, 1998). XRCC4 ist wie Ligase IV ein nukleäres Protein. Nach Bestrahlung ist es vermehrt phosphoryliert (Matsumoto *et al.*, 2000). Daneben wird das XRCC4 Protein auch ubiquitiniert und sumoyliert (Foster *et al.*, 2006; Yurchenko *et al.*, 2006). Die Bedeutung dieser posttranslationalen Modifikationen von XRCC4 wurde bisher jedoch noch nicht weiter untersucht.

Vor etwa fünf Jahren wurde XLF als weiterer essentieller Faktor der NHEJ identifiziert (Ahnesorg *et al.*, 2006; Buck *et al.*, 2006). XLF interagiert mit dem XRCC4/LigaseIV-Komplex und reguliert so die Aktivität der Ligase IV (Andres *et al.*, 2007; Hentges *et al.*, 2006). XLF wird innerhalb von wenigen Sekunden an den Doppelstrangbruch rekrutiert (Yano *et al.*, 2008). Wie XRCC4, wird auch XLF phosphoryliert. Die genaue Funktion dieser Phosphorylierung ist jedoch noch unbekannt (Yu *et al.*, 2008).

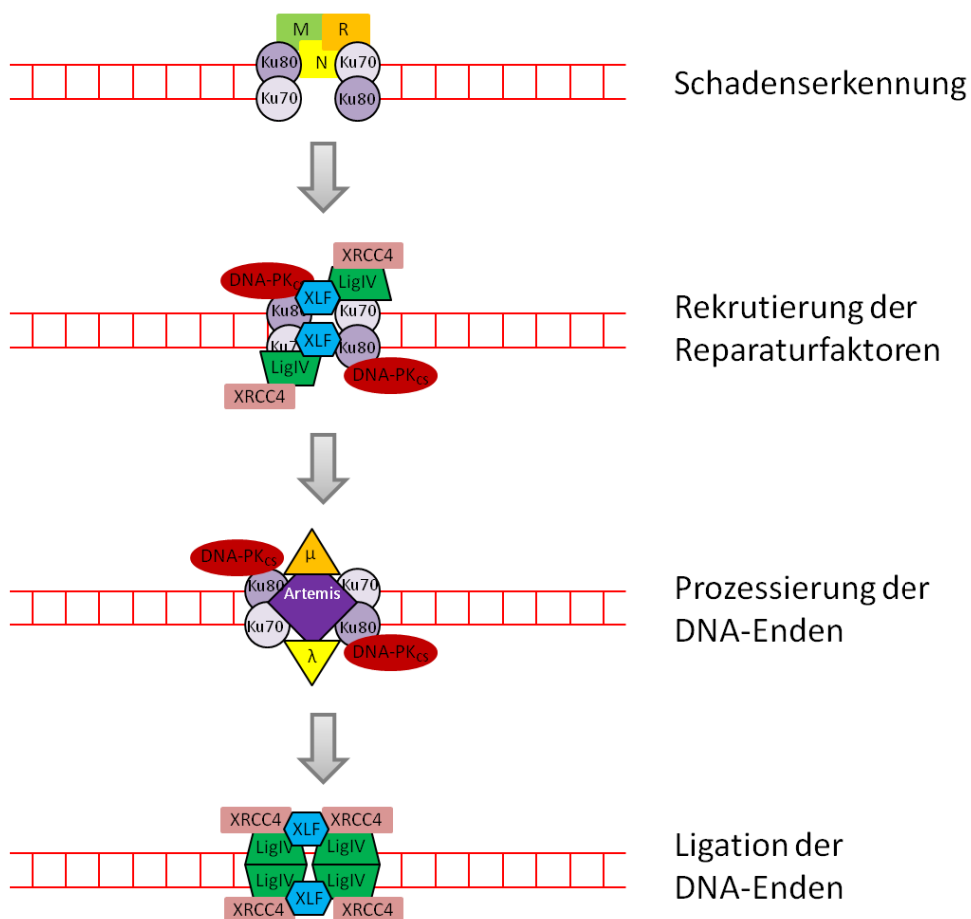


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Nicht-homologen Endverknüpfung.

Nach einem Doppelstrangbruch wird der Schaden durch das Ku70/Ku80 Heterodimer erkannt. Anschließend werden weitere Faktoren wie DNA-PK_{CS}, XRCC4, LigaseIV, XLF, Artemis, und die Polymerasen μ und λ an den DNA Schaden rekrutiert. Die DNA-Enden werden durch Artemis und den MRN-Komplex prozessiert. Lücken im DNA-Strang werden durch die beiden Polymerasen μ und λ geschlossen. Anschließend werden die Enden durch den LigaseIV/XRCC4/XLF-Komplex ligiert.

Sollte einer der Hauptfaktoren der NHEJ (Ku70, Ku80, DNA-PK, DNA-Ligase IV, XRCC4, XLF oder Artemis) ausfallen, so ist die Zelle nicht mehr in der Lage DNA-Doppelstrangbrüche mittels NHEJ zu reparieren, was eine erhöhte Empfindlichkeit der Zelle gegenüber ionisierender Strahlung zur Folge hat. Da die Proteine Ligase IV, XRCC4, XLF und Artemis zusätzlich bei der V(D)J-Rekombination involviert sind, ergibt sich bei deren Ausfall oder Mutation automatisch auch eine Einschränkung der Funktion des Immunsystems (Chang *et al.*, 1993; Rooney *et al.*, 2002; Weterings and van Gent, 2004).

Nachdem der DNA Schaden repariert ist, müssen die Reparaturfaktoren wieder von der DNA entfernt werden. Wie diese Dissoziation des Reparaturkomplexes abläuft, ist noch unklar.

1.4. Ku80

Das Ku80-Protein und seine Funktion bei der Nicht-homologen Endverknüpfung ist seit langem bekannt. Zusammen mit Ku70 bildet es ein Heterodimer, welches das Hauptziel von Autoimmunantikörpern aus Patienten mit Sklerodermie-Polymyositis ist (Mimori *et al.*, 1981).

Das Heterodimer Ku80/Ku70 ist an einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie der V(D)J-Rekombination, der DNA-Reparatur oder dem Erhalt der Telomer-Struktur beteiligt (Tuteja and Tuteja, 2000). Ku80 fungiert dabei als DNA- und ATP-abhängige Helikase (Tuteja *et al.*, 1994).

Das Ku80 Protein besteht aus 732 Aminosäuren, die auf vier Domänen aufgeteilt sind (Abbildung 4). Die erste und die vierte Domäne interagieren mit der DNA-Ligase IV und XRCC4 (Nick McElhinny *et al.*, 2000; Wu and Lieber, 1996). Die zweite Domäne assoziiert mit der DNA, wobei die Aminosäuren 396 bis 404 für die Interaktion mit der kleinen Furche der DNA zuständig sind. Der C-Terminus besteht aus der dritten und vierten Domäne des Ku80 Proteins und dient der Dimerisierung mit Ku70. Daneben assoziiert dieser Bereich auch mit der katalytischen Untereinheit der DNA-abhängigen Protein Kinase (DNA-PK_{CS}) (Koike *et al.*, 1999; Myung *et al.*, 1997). Ku80 wird ferner, in Verbindung mit PARP1, zum Erhalt der genomischen Stabilität und zur Tumorsuppression benötigt (Tong *et al.*, 2002).

Im aktiven Zustand bildet das Ku70/Ku80 Heterodimer einen hohlen Zylinder, durch dessen Mitte die DNA nach einem Doppelstrangbruch hindurchgeführt werden kann (Walker *et al.*, 2001). Dadurch werden die beiden losen DNA-Enden vor dem Abbau geschützt. Da sich jeweils an beiden Seiten des Doppelstrangbruchs ein Ku70/Ku80 Heterodimer anlagert und diese beiden Heterodimere mit einem Molekül DNA-PK_{CS} interagieren, wird außerdem eine Überbrückung des Doppelstrangbruchs erreicht und beide DNA-Enden in räumlicher Nähe zu einander gehalten (Walker *et al.*, 2001).

Ku80 bildet zusammen mit Ku70 die regulatorische Untereinheit der DNA-abhängigen Protein Kinase (DNA-PK). Alle drei Komponenten zusammen bilden das DNA-PK Holoenzyme (Cary *et al.*, 1997).

Die Bedeutung von Ku80 für die Doppelstrangbruch-Reparatur, zeigte sich in Mäusen, bei denen das Ku80-Protein genetisch entfernt worden war. Diese Mäuse zeigten neben einem reduzierten Wachstum auch Chromosomen-Anomalien (Gu *et al.*, 1997). Auch für menschliche Zellen wurden Chromosomen-Anomalien beschrieben, wenn Ku80 genetisch ausgeschaltet wurde (Li *et al.*, 2002). Ferner werden die Proteine Ku70 und Ku80 für die Entwicklung der T-Zellen des Immunsystems benötigt (Gu *et al.*, 1997; Kurimasa *et al.*, 1999; Nussenzweig *et al.*, 1996; Ouyang *et al.*, 1997). Auch Mäuse mit einer Deletion im *DNA-PK_{CS}* Gen sind hypersensitiv gegenüber ionisierender Strahlung und weisen Chromosomen-Anomalien sowie Immundefekte durch Fehler in der V(D)J-Rekombination auf. Allerdings zeigen sich nach genetischer Entfernung der *DNA-PK_{CS}* in Mäusen keine Wachstumsprobleme.

Eine erhöhte Menge an Ku80, kann jedoch auch negative Auswirkungen haben. Bei verschiedenen Krebstherapien werden ionisierende Strahlung oder andere DNA-schädigenden Substanzen verwendet um Tumorzellen abzutöten. Die DNA-Reparaturleistung der Zelle kann die Wirkung dieser Behandlungen erheblich reduzieren. So wurde gezeigt, dass eine erhöhte Expression von Ku80 bei Menschen mit chronischer lymphatischer Leukämie oder einem multiplen Myelom, sowie in Mäusen mit Leukämie, zur Resistenz der Krebszellen gegenüber Bestrahlung oder Behandlung mit cis-Dichlorodiamminplatin(II) führt (Frit *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 1998; Tai *et al.*, 2000).

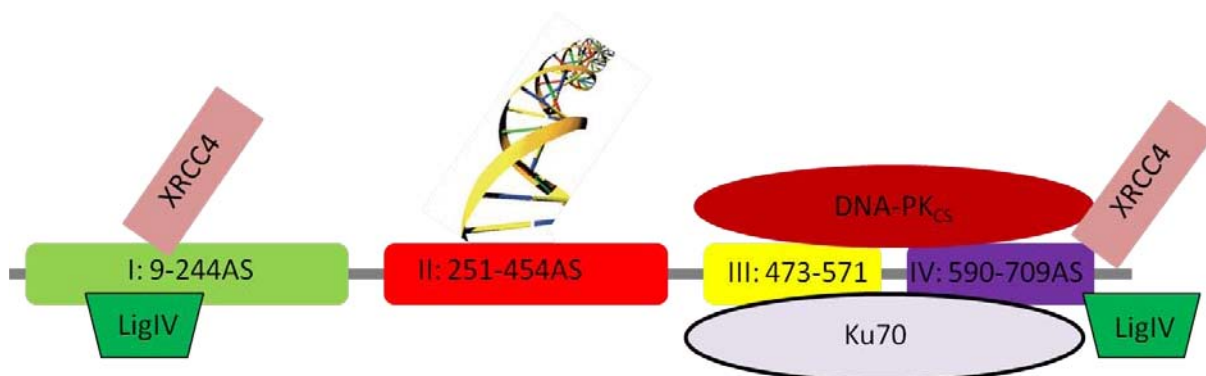


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ku80-Proteins.

Die erste (grün) und vierte (lila) Domäne assoziieren mit Ligase IV und XRCC4. Die Assoziation mit *DNA-PK_{CS}* und Ku70 findet über den gesamten C-Terminus des Ku80-Proteins statt. Über die zweite Domäne (rot) bindet Ku80 an die DNA. Die Domänenaufteilung entspricht der Pfam Datenbank V23 (Finn *et al.*, 2010).

1.5. BRCA1

Mutationen im BRCA1-Gen (*breast cancer type 1 susceptibility Gen*) gehen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit einher, an Brust- oder Eierstockkrebs zu erkranken (Easton *et al.*, 1993). Mutationen des BRCA1 Gens sind für mehr als 80% des ererbten Brust- oder Eierstockkrebs verantwortlich (Barker *et al.*, 1996; Durocher *et al.*, 1996; Friedman *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 2003; Valarmathi *et al.*, 2004).

Da BRCA1 mit Rad51 ko-lokalisiert, wurde schon früh vermutet, dass BRCA1 an der DNA-Reparatur beteiligt sein könnte (Scully *et al.*, 1997; Scully *et al.*, 1996). Diese Vermutung bestätigte sich nach der genetischen Entfernung der beiden BRCA1 Allele in der Maus. Mäuse ohne BRCA1-Gen verstarben innerhalb von 13,5 Tagen im Embryonalstadium und Zellen aus diesen Embryonen zeigten eine Überempfindlichkeit gegenüber ionisierender-Strahlung. Daneben führte der Verlust der BRCA1 Funktion nach Exposition gegenüber ionisierender Strahlung zu einer veränderten Chromosomenanzahl und -struktur (Shen *et al.*, 1998; Zhou and Elledge, 2000). Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass das BRCA1 Protein an der Homologen Rekombination, an der Nicht-homologen Endverknüpfung, an der transkriptions-gekoppelten Reparatur und an der durch Mikrohomologie-vermittelten Endverknüpfung beteiligt ist (Abbott *et al.*, 1999; Baldeyron *et al.*, 2002; Moynahan *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001; Zhong *et al.*, 2002a; Zhong *et al.*, 2002b). Daneben ist BRCA1 an der Regulation der Transkription (Chapman and Verma, 1996; Monteiro *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998), an der Polyadenylierung von mRNA (Kleiman and Manley, 1999) und an der Elongation von mRNA beteiligt (Krum *et al.*, 2003).

Funktionell ist BRCA1 eine Ubiquitin Ligase. Das BRCA1 Protein besitzt eine N-terminale RING-Domäne (Abbildung 4) und zeigt *in vitro* Ubiquitinierungsaktivität (Lorick *et al.*, 1999), die durch Interaktion mit dem BARD1 Protein verstärkt wird (Baer and Ludwig, 2002). Dabei scheint BARD1 das BRCA1-Protein vor allem vor dem Abbau im 26S Proteasom zu schützen (Choudhury *et al.*, 2004). Als Substrate für das BRCA1/BARD1 Heterodimer wurden H2A und H2AX, p53, das FANCD2-Protein, γ -Tubulin, Nukleophosmin und BRCA1 selbst beschrieben (Chen *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2003; Mallery *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2004; Starita *et al.*, 2004; Vandenberg *et al.*, 2003). Neben der RING-Domäne besitzt BRCA1 auch zwei C-terminale BRCT-Domänen, die für die Interaktion mit anderen Proteinen wie zum Beispiel mit CtIP oder BACH verantwortlich sind (Bork *et al.*, 1997; Callebaut and Mornon, 1997; Koonin *et al.*, 1996).

BRCA1 kommt in drei größeren Komplexen vor. Zusammen mit Abraxas, Rap80 und Brcc36 formt es den BRCA1-A-Komplex (Wang *et al.*, 2007), mit Bach1 und dem *topoisomerase II-binding protein 1* (TOPBP1) den BRCA1-B- und mit CtIP und dem MRN-Komplex, den BRCA1-C-Komplex. Komplex A spielt bei der DNA-Reparatur eine Rolle, wohingegen die

Komplexe B und C an der Zellzykluskontrolle beteiligt sind (Cantor *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2007; Yu and Chen, 2004).

Nach einem Doppelstrangbruch werden die Histonproteine H2A und H2AX durch RNF8 und RNF168 ubiquitiniert (Mailand *et al.*, 2007), was zur Rekrutierung von BRCA1 an den Doppelstrangbruch führt (Paull *et al.*, 2000; Rogakou *et al.*, 2000). Eine Beteiligung von BRCA1 an der NHEJ wird gegenwärtig kontrovers diskutiert. Bau und Mitarbeiter fanden bei *in vitro* und *in vivo* Experimenten, dass bei Abwesenheit oder reduzierter Proteinmenge von BRCA1 eine verminderte NHEJ Aktivität vorliegt und die Effektivität der Ligation von DNA-Enden verringert ist (Baldeyron *et al.*, 2002; Bau *et al.*, 2004; Coupier *et al.*, 2004). Hingegen beobachteten Wang und Mitarbeiter keinen Einfluss von BRCA1 auf die Effektivität der NHEJ (Moynahan *et al.*, 1999; Snouwaert *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001). Die genaue Funktion von BRCA1 bei der NHEJ ist noch ungeklärt. Möglicherweise interagiert es mit dem MRN-Komplex und unterdrückt dort die Nukleaseaktivität von Mre11. Daneben scheint BRCA1 die ATM-abhängige Phosphorylierung von Nbs1 zu regulieren. (Foray *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2003; Paull *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 1999). Die genauen Mechanismen sind jedoch noch unklar.

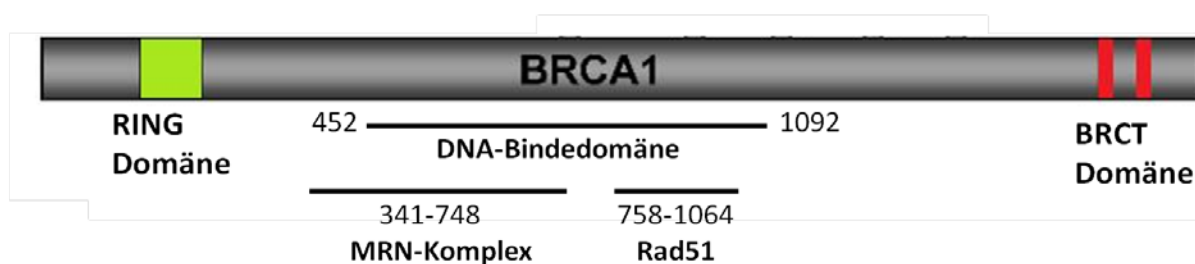


Abbildung 5: Schematische Darstellung des BRCA1-Proteins.

Im N-terminalen Bereich befindet sich eine RING-Domäne (Aminosäure 24-65). In der Mitte des BRCA1 Proteins liegen die Bindestellen für den MR N-Komplex (Aminosäure 341-748), Rad51 (Aminosäure 758-1064) und für DNA (Aminosäure 452-1092). Am C-Terminus (Aminosäure 1642-1736 und Aminosäure 1756-1855) liegen die beiden BRCT-Domänen.

Bei der Homologen Rekombination ist BRCA1 an der MRN-abhängigen Prozessierung der DNA Enden beteiligt (Greenberg *et al.*, 2006). Erst kürzlich wurde entdeckt, dass BRCA1 an DNA-Schäden mit PALB2 und BRCA2 interagiert (Sy *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009a; Zhang *et al.*, 2009b). PALP2 und BRCA2 assoziieren darüber hinaus mit Rad51 und unterstützen die Rad51-abhängige Bildung von DNA-Einzelsträngen (Xia *et al.*, 2006). Der Verlust von BRCA1 verringert die Stabilität von PALB2 und BRCA2 und verhindert die Lokalisierung von Rad51 an DNA-Schäden, was wiederum die Homologe Rekombination verhindert (Zhang *et al.*, 2009a; Zhang *et al.*, 2009b).

1.6. RNF8

RNF8 (*RING finger protein 8*) ist eine E3-Ubiquitin-Ligase, die ebenfalls bei der Doppelstrangbruch-Reparatur eine Rolle spielt. Das erste Mal wurde sie 1998 von Seki *et al.* als ein neues Protein mit RING-Finger-Domäne beschrieben (Seki *et al.*, 1998). RNF8 besteht aus einer N-terminalen FHA- (*forkhead-associated*) Domäne und einer RING-Finger-Domäne am C-Terminus (Kolas *et al.*, 2007; Mailand *et al.*, 2007). Zusammen mit dem E2-Enzym Ubc13 ubiquitiniert RNF8 die Histone H2A und H2AX an einem DSB (Huen *et al.*, 2007; Mailand *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009). RNF8 lagert sich an den DSB an, indem es eine Phosphorylierungs-abhängige Interaktion zwischen der N-terminalen FHA-Domäne und des durch ATM phosphoryliertem TQXF Motivs von MDC (*mediator of DNA damage checkpoint*) eingeht (Huen *et al.*, 2007; Kolas *et al.*, 2007; Mailand *et al.*, 2007). Ohne Phosphorylierung von MDC1 ist keine Akkumulierung von RNF8 an Doppelstrangbrüchen möglich (Mailand *et al.*, 2007). Ebenso kann eine Anlagerung von RNF8 an den Doppelstrangbruch und Ubiquitinierung von H2A und H2AX nur stattfinden, wenn die FHA-Domäne von RNF8 nicht mutiert ist (Mailand *et al.*, 2007). Da Ubc13 ein E2-Enzym ist, welches die Verknüpfung der Ubiquitinketten über Lysin 63 fördert, ist auszuschließen, dass die Ubiquitinierung von H2A und H2AX als Abbausignal dient (Hofmann and Pickart, 1999). Viel wahrscheinlicher ist, dass die Ubiquitinierung der Histone H2A und H2AX durch RNF8/Ubc13, als Plattform für die Anlagerung weiterer Proteine an einem DSB dient. Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, dass sowohl Ubc13, als auch RNF8 benötigt werden, um eine Anlagerung von BRCA1 und 53BP1 an den DSB zu ermöglichen (Huen *et al.*, 2007; Huen *et al.*, 2008; Kolas *et al.*, 2007; Mailand *et al.*, 2007; Wang and Elledge, 2007). Neben RNF8 und Ubc13 wird für die Anlagerung von BRCA1 und 53BP1 an den Doppelstrangbruch noch eine weitere E3-Ubiquitin-Ligase, RNF168, benötigt. RNF168 bindet über sein MIU (*motif interacting with ubiquitin*)-Motiv an ubiquitinierte Histonproteine (Doil *et al.*, 2009; Penengo *et al.*, 2006; Stewart *et al.*, 2009). Wie RNF8 ist auch RNF168 in der Lage, zusammen mit Ubc13 die Histonproteine H2A und H2AX mit über Lysin 63-verknüpften Polyubiquitinketten zu ubiquitinieren. Die Gegenwart von RNF168 verstärkt die von RNF8 begonnene Ubiquitinierung (Doil *et al.*, 2009; Stewart *et al.*, 2009). Dadurch wird ein Schwellenwert überschritten, der die Anlagerung weiterer Faktoren wie BRCA1 und 53BP1 ermöglicht (Doil *et al.*, 2009; Stewart *et al.*, 2009). Ob allerdings RNF8 und RNF168 die gleichen Substrate besitzen und das Signal durch RNF168 nur verstärkt wird oder ob beide Proteine gleichzeitig arbeiten und jedes Enzym für sich noch ein separates Substrat ubiquitiniert, ist noch unklar. Die Bedeutung des RNF168 Proteins für die DNA-Reparatur zeigt sich in der Tatsache, dass eine Mutation der beiden RNF168 Allele, zum RIDDLE- (*radiosensitivity, immunodeficiency, dysmorphic features and learning difficulties*) Syndrom führt (Stewart *et*

al., 2009). Demgegenüber zeigen Zellen mit verringerter Menge an RNF8/RNF168 nur leichte Defekte bei der Zellzykluskontrolle nach einem DNA-Schaden (Noon *et al.*, 2010). Auch Zellen, bei denen RNF-8 genetisch entfernt wurde, zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung (Noon *et al.*, 2010). Daneben sind männliche Mäuse ohne RNF8 unfruchtbar. Bei ihnen kann es zu keiner korrekt ablaufenden Meiose kommen, da bei ihnen die DNA mangels Ubiquitinierung nicht von den Nukleosomen getrennt werden kann. (Li *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2010; Ramachandran *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010). Die Ursache für die erhöhte Strahlensensitivität nach genetischer Entfernung von RNF8 ist noch weitgehend ungeklärt. Mailand *et al.* vermuten, dass RNF8 defiziente Zellen nicht in der Lage sind BRCA1 und 53BP1 an den DNA-Schaden zu rekrutieren bzw. sie dort zu halten (Mailand *et al.*, 2007). Tatsächlich zeigen Mäuse ohne RNF8, Defekte in der *class switch recombination* (CSR) und es bilden sich Anhäufungen von DNA-Brüchen in der Region der DNA, wo die schwere Kette der Immunglobuline kodiert ist (Li *et al.*, 2010; Ramachandran *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010). Ein ähnliche Anhäufung von DNA-Brüchen ist auch in der Mäusezelllinie CH12F3-2 nach Reduktion der RNF168 Proteinmenge durch siRNA zu beobachten (Ramachandran *et al.*, 2010). Erstaunlicherweise ist der CSR Phänotyp in RNF8-negativen Mäusen leichter als in Mäuse ohne 53BP1 (Manis *et al.*, 2004; Ward *et al.*, 2004).

1.7. Posttranslationelle Modifikationen

Durch posttranslationelle Modifikationen ist die Zelle in der Lage, die Funktion und Aktivität eines Proteins innerhalb kürzester Zeit zu ändern. Posttranslationelle Modifikationen haben deshalb eine herausragende Bedeutung bei der Reaktion der Zelle auf äußere Einflüsse. Entsprechend spielen sie auch eine wichtige Rolle bei der DNA-Reparatur. Die Regulation der Aktivität von Reparaturfaktoren durch posttranslationelle Modifikationen ist jedoch nicht nur durch die Geschwindigkeit, mit der die Proteine auf veränderte Bedingungen reagieren können, interessant. Nach dem Auftreten von DNA-Schäden hat die posttranslationelle Regulation der Enzymaktivität außerdem den Vorteil, dass die Möglichkeit umgangen wird dass das Gen für das benötigte Protein im Bereich des DNA Schadens liegt und bei einer Regulation der Proteinmenge über eine Neusynthese ein defektes Protein entstehen könnte. Posttranslationellen Modifikationen können in Form von Phosphorylierungen, Azetylierungen, Methylierungen oder durch kovalente Verknüpfung mit weiteren Proteinen wie Ubiquitin, SUMO oder NEDD8 vorgenommen werden (Oberle and Blattner, 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch nur die Möglichkeit der Regulation von Ku80 durch Ubiquitinierung untersucht.

1.7.1. Ubiquitinierung

Ursprünglich wurde der Vorgang der Proteinubiquitinierung in den siebziger Jahren entdeckt, als man bei der Untersuchung von zellfreien Lysaten aus Kaninchen Retikulozyten feststellte, dass bestimmte ubiquitinierte Proteine unter ATP-Verbrauch abgebaut werden. Dies führte zu dem Schluss, dass die Ubiquitinierung ein Signal zum Abbau des Zielproteins durch das 26S Proteasom darstellen muss (Hershko and Ciechanover, 1992; Hochstrasser, 1996). Mittlerweile hat sich aber gezeigt, dass die Ubiquitinierung bei der Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Transkription, DNA-Reparatur, Apoptose und Zellzyklus eine wichtige Rolle spielt (Haglund and Dikic, 2005; Mukhopadhyay and Riezman, 2007).

Bei einer Ubiquitinierung wird das aus 76 Aminosäuren bestehende Protein Ubiquitin kovalent mit einem Zielprotein verknüpft. Dabei wird das Ubiquitin zuerst am C-terminalen Glyzin unter ATP-Verbrauch aktiviert und anschließend auf das Ubiquitin-aktivierende Enzym (E1) übertragen. Anschließend wird das Ubiquitin-Molekül auf ein Cystein im C-terminalen Bereich des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2) und zum Schluss auf eine epsilon-Aminogruppe des Zielproteins durch eine Ubiquitin-Ligase (E3) übertragen (Hershko and Ciechanover, 1998). Die Substratspezifität wird dabei durch eine der mehr als 500 verschiedenen E3-Ligasen und deren Interaktion mit einer der ca. 40 verschiedenen E2 Enzymen erreicht (Ramaekers and Wouters, 2011).

E3-Ligasen lassen sich in 3 Klassen eingliedern. Man unterscheidet zwischen E3-Ligasen mit einer HECT-Domäne oder einer RING-finger-Domäne und Ligasen mit einem U-box-Motiv (Passmore and Barford, 2004). Dabei unterscheiden sich die E3-Ligasen in der Art der Übertragung des Ubiquitin-Moleküls auf das Substrat. Bei RING- und U-Box-Ligasen muss ein Komplex aus E3, E2 und dem Substrat gebildet werden, damit das Ubiquitin auf das Substrat übertragen werden kann. Warum diese Ligasen die Interaktion mit dem E2 Enzym zur Übertragung des Ubiquitins benötigen ist noch unklar. Da die RING-Domäne bei den RING-Ligasen vom aktiven Zentrum zu weit entfernt ist, wird eine Beteiligung an der Bildung der Isopeptid-Bindung angezweifelt (Passmore and Barford, 2004). Eine Möglichkeit wäre deshalb, dass die E3-Ligase nur den Kontakt zwischen dem E2-Enzym und dem Substrat herstellt. Eine andere Möglichkeit wäre, dass sich durch die Interaktion des E2-Enzyms mit der E3-Ligase eine Konformationsänderung ergibt, die zu einer Lageänderung der aktiven Seite führt. Jedoch konnte bisher noch keine Änderung der dreidimensionalen Struktur der E3 Ligase durch ein E2-Enzym beobachtet werden (Huang *et al.*, 2009; Kentsis *et al.*, 2002; Mace *et al.*, 2008; Poyurovsky *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2000).

Bei den HECT-Ligasen wird das Ubiquitin-Molekül über eine Thioesterbindung kovalent an ein Cysteinrest im aktiven Zentrum gebunden. Das Ubiquitin kann dadurch ohne das Beisein des E2-Enzyms direkt auf ein Lysin des Zielproteins übertragen werden.

Die große Anzahl an zellulären Prozessen, die durch Ubiquitinierung reguliert werden, kommt daher, dass Ubiquitin selbst sieben Lysine besitzt und daher auch ubiquitiniert werden kann. So können Ketten mit unterschiedlicher Verkettung der Ubiquitin Proteine entstehen, die in der Zelle unterschiedliche Funktionen haben. Dabei ist es möglich, dass nur ein Ubiquitin Protein (Monoubiquitinierung) oder aber mehrere Ubiquitinmonomere in Form einer Ubiquitinkette kovalent an ein Lysin des Zielproteins (Polyubiquitinierung) gebunden werden. Daneben können auch mehrere Ubiquitinmonomere an verschiedene Lysine des Zielproteins (multi-Monoubiquitinierung) angeknüpft werden (Ikeda and Dikic, 2008; Kim *et al.*, 2007). Weiterhin kann eine Verknüpfung innerhalb der Kette über den jeweils gleichen Lysinrest (zum Beispiel nur über Lysin 48) geschehen, was zu einer homogenen Kette führt, oder die Verknüpfungen können über verschiedene Lysine des Ubiquitinproteins erfolgen (Kim *et al.*, 2007; Komander, 2009). Sowohl die Anzahl, als auch die Art der Verknüpfung der Ubiquitinmonomere beeinflussen die Funktion des Substrats. Die Monoubiquitinierung eines Substrats kommt zum Beispiel bei der DNA-Reparatur und bei der Endozytose vor (Haglund *et al.*, 2003; Hoege *et al.*, 2002; Nicassio *et al.*, 2007). Am weitesten verbreitet sind Polyubiquitinketten, welche über Lysin 48 oder über Lysin 63 der Ubiquitin Proteine verknüpft sind. Eine Ubiquitinkette, welche über Lysin 48 verknüpft ist, markiert das Zielprotein normalerweise für den Abbau durch das 26S Proteasom (Pickart and Fushman, 2004; Thrower *et al.*, 2000). Verknüpfungen über Lysin 63 oder Lysin 6 kommen hingegen vor allem an Protein vor, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind (Huang and D'Andrea, 2006; Kolas *et al.*, 2007; Nishikawa *et al.*, 2004). Ubiquitinketten welche über Lysin 11 verknüpft werden, werden durch die E3-Ligase APC/C (*anaphase-promoting complex*) an das Substrat geknüpft und sorgen so für dessen proteasomalen Abbau (Jin *et al.*, 2008), während Ubiquitinketten, die über Lysin 29 des Ubiquitin Proteins verknüpft sind, das Zielprotein für den Abbau in Lysosomen oder Proteasomen markieren (Chastagner *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 1995).

Welche Art von Polyubiquitinkette gebildet wird, ist wahrscheinlich von der Kombination der E2-Enzyme mit den E3-Ligasen abhängig (David *et al.*, 2010).

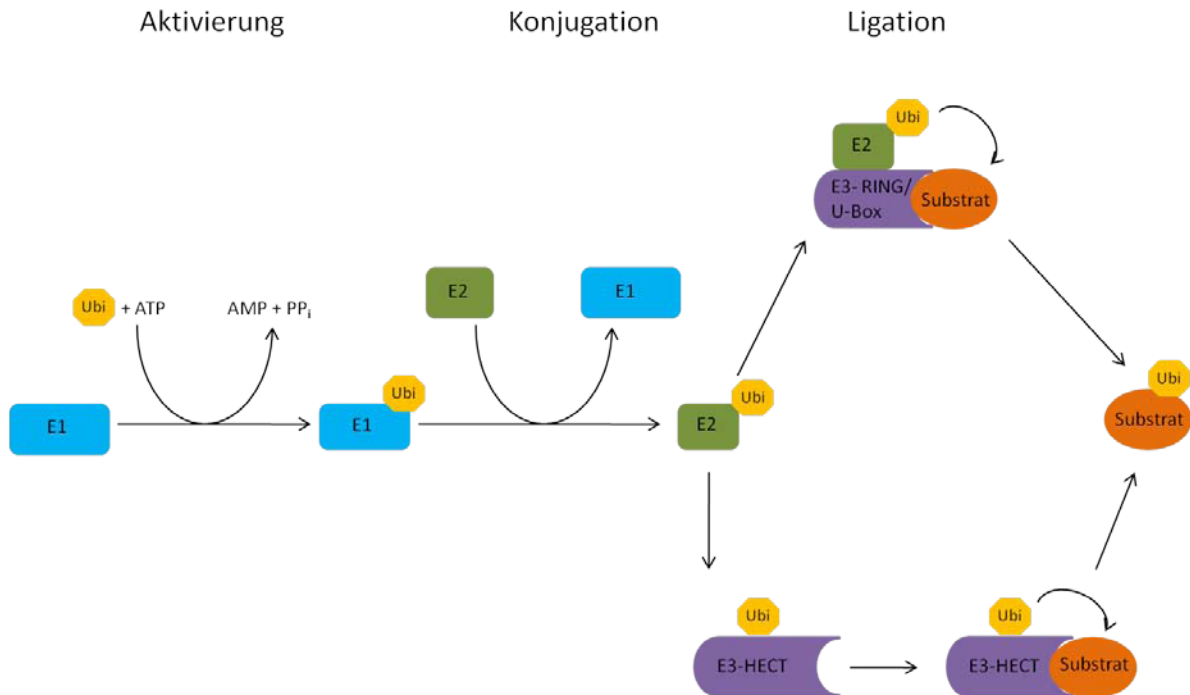


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Ubiquitinierungsreaktion.

Zuerst wird Ubiquitin (Ubi) durch das E1-Enzym (E1) am C-terminalen Glycin unter ATP-Verbrauch aktiviert. Anschließend wird das Ubiquitin auf das Cystein im C-Terminus des E2-Enzyms (E2) übertragen. Im letzten Schritt wird durch die E3-Ligase (E3), das Ubiquitin kovalent an ein Substrat gebunden. Hierbei unterscheidet man drei Arten von E3-Ligasen. RING- oder U-Box-Ligasen gehen keine kovalente Verbindung mit Ubiquitin ein, sondern vermitteln die Übertragung des Ubiquitin Proteins vom E2-Enzym auf die epsilon-Aminogruppe eines Lysins des Substrats nur. HECT-Ligasen sind hingegen katalytisch aktiv. Sie binden das Ubiquitin an einem Cystein-Rest im aktiven Zentrum und übertragen es in einem weiteren Schritt kovalent an ihr Substrat.

1.8. Zielsetzung

Ku80 übernimmt eine wichtige Rolle bei der Nicht-homologen Endverknüpfung. Da posttranslationelle Modifikationen eine herausragende Rolle bei der Regulation von Proteinen haben war das Ziel dieser Doktorarbeit herauszufinden, ob und wie Ku80 posttranslationell modifiziert wird und inwiefern diese Modifikation seine Funktion beeinflusst.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Lösungen.

Chemikalien	Firma, Ort
Agar	Otto Nordwald, Hamburg
Agarose	Peqlab, Erlangen
Ampizillin	Roth, Karlsruhe
Azeton	Roth, Karlsruhe
30% Acryl- Bisacrylamid-Mischung	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Bradford-Reagenz	BioRad, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chlorophorm	Merck, Darmstadt
deoxy-Nukleotidtriphosphat (dNTP)	Peqlab, Erlangen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Di-Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Dithiotreithol (DTT)	Roche, Mannheim
Dulbeccos modified eagle medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol (100% vergällt)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (100% unvergällt)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Glyzin	Roth, Karlsruhe
Guanidinium-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Hydromount	National Diagnostics, USA

MATERIAL UND METHODEN

Imidazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kalziumchlorid	Roth, Karlsruhe
Lithiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Luminol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Manganchlorid (MnCl ₂)	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
MG132	Calbiochem, Darmstadt
MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Natriumazetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Roth, Karlsruhe
Natrium-Dihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
NP-40 (Nonident-P40, Igepal)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe
Penizillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Pepton/Trypton	Roth, Karlsruhe
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Pink-DNA [®]	Roth, Karlsruhe
Rinderserum-Albumin (BSA)	PAA, Cölbe
Rubidiumchlorid (RbCl ₂)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Triamzinolonazonid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween [®] 20	Roth, Karlsruhe

Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Xylencyanol FF	Biorad, München

2.1.2. Enzyme

Tabelle 2: Verwendete Enzyme.

Enzym	Firma, Ort
<i>Bam</i> HI	Fermentas, St. Leon-Rot
Dream <i>Taq</i> -Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
FastDigest [®] <i>Bam</i> HI	Fermentas, St. Leon-Rot
FastDigest [®] <i>Dpn</i> I	Fermentas, St. Leon-Rot
FastDigest [®] <i>Not</i> I	Fermentas, St. Leon-Rot
Go <i>Taq</i> [®] -Polymerase	Promega, Mannheim
<i>Not</i> I	Fermentas, St. Leon-Rot
Proteinase K	Roth, Karlsruhe
PrimeStar-Polymerase	Takara, Japan
Reverse Transkriptase	Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
T4-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
Trypsin	Difco, USA

2.1.3. Größenstandards

Tabelle 3: Größenstandards.

Name	Firma, Ort
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.4. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Geräte und Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Firma, Ort
96- /24-Loch-Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Bakterienschüttler	Heraeus, Fellbach

MATERIAL UND METHODEN

Deckgläschen (rund)	Roth, Karlsruhe
Drehrad	Kisker, Steinfurt
ECL-Filme	GE-Healthcare Europe, Freiburg
Einfrierbox	Nalgene, USA
Einfrierröhrchen	Corning, Niederlande
Elektrophorese-Zubehör für Proteingele	BioRad, München
Entwickler Kodak X-omat 2000	Kodak, Stuttgart
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5ml und 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Falcon-Röhrchen (15ml und 50ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Feinwaage	Mettler, Gießen
Filterpapier	Whatman, Schweiz
Folienschweißgerät	Audion Electro, Kleve
Gefrierschrank -80°C	New Brunswick Scientific, USA
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Ochsenhausen
Glaspipetten (diverse Größen)	Brand, Wertheim
Glaswaren (Flaschen, Bechergläser, Kolben)	Schott, Mainz
Hamilton-Spritze	Hamilton, Martinsried
Heizblock mit Schüttler	Haep Labour Consult, Bovenden
Kanülen und Spritzen	Braun, Melsungen
Klebeband (verschiedene Sorten)	tesa, Hamburg
Kühlraum 4°C	Foster, Schutterwald
Kühlschrank 4°C	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlzentrifuge (Eppendorf 5415R)	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge (Eppendorf 5810R)	Eppendorf, Hamburg
Konfokalmikroskop LSM 510	Zeiss, Jena
Lichtmikroskop Leica DMIL	Leica, Wetzlar
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Stauffen
Messzylinder (diverse Größen)	Brand, Wertheim
Nanodrop Spektrophotometer	Peqlab, Erlangen
Netzgerät für Gelelektrophorese (EV243)	Peqlab, Erlangen
Ni ²⁺ -NTA-Agarose-Beads	Qiagen, Hilden
Ni ²⁺ -NTA-Agarose-Beads	amocol, Teltow
Objekträger Superfrost Plus	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
pH-Meter	Knick, Berlin
Pipette (0,1-1µl)	Brand, Wertheim

Pipetten Labmate (2-20µl, 20-200µl, 100-1000µl)	Abimed, Langenfeld
Pipettenspitzen (1µl)	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen (200µl, 1000µl)	Corning, Niederlande
Pipettierhilfe inklusive Ladegerät	Brand, Wertheim
PVDF-Membran (0,45µm)	Millipore, USA
Röntgenfilmkassette	Rego, Augsburg
Röntgenquelle (Gulmay Medical RS225)	XStrahl Ltd, UK
Schwenkplatte	Heidolph, Schwabach
Skalpell	Braun, Melsungen
Spektrometer (ELISA-Lesegerät)	Biotek Instruments, Bad Friedrichshall
Spritzflasche (Plastik)	Roth, Karlsruhe
Sterilbank	Clean Air Technik, Niederlande
Sterilfilteraufsatz (0,22µm) für Spritze	Renner, Dannstadt
Sterilfilter (0,22µm), Steritop	Millipore, USA
Tischzentrifuge	Heraeus, Fellbach
Tusche (schwarz)	Pelikan, Hannover
Ultraschallgerät (Sonifizierer) BIORUPTOR	diagenode
Vortex-Gerät	Julabo, Seelbach
Waage	Sartorius, Göttingen
Zellkulturartikel (Flaschen und Petrischalen)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturinkubator	Heraeus, Fellbach
Zentrifuge Beckmann Avanti J-20 (Corex)	Beckmann Coulter, Krefeld
Zentrifuge Beckmann J2-HS (Bakterien)	Beckmann Coulter, Krefeld
Zentrifuge für Zellkultur	Heraeus, Fellbach

2.1.5. Primäre Antikörper

Tabelle 5: Primäre Antikörper.

Ziel (Verdünnung)	Herkunftsorganismus	Firma, Ort
Anti-AuroraA (WB 1:1000)	Kaninchen, polyklonal	Abcam, UK
Anti-BRCA1 (D9, WB 1:500)	Maus, monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-BRCA1 (C20, IF 1:200)	Kaninchen, monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-FLAG (WB 1:1000)	Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Anti-Ku80 (WB 1:5000)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-PCNA (WB 1:5000)	Maus, monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-phospho-Histon H2AX (IF 1:500)	Maus, monoklonal	Millipore, USA
Anti-V5 (WB 1:3000)	Maus, monoklonal	AbDSerotec, Düsseldorf

2.1.6. Sekundäre Antikörper (HRP-gekoppelt)

Tabelle 6: Sekundäre Antikörper.

Ziel (Verdünnung)	Herkunftsorganismus	Firma, Ort
Anti-Kaninchen (1:1000)	Ziege	Dako, Dänemark
Anti-Maus (1:1000)	Ziege	Dako, Dänemark

2.1.7. Sekundäre Antikörper (Fluorophor-gekoppelt) und Kernfarbstoffe

Tabelle 7: Sekundäre Antikörper und Kernfarbstoffe.

Ziel (Verdünnung 1:1000)	Herkunftsorganismus	Fluorophor	Firma, Ort
Anti-Maus	Ziege	Alexa488	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Kaninchen	Ziege	Alexa546	Invitrogen, Karlsruhe
Draq5™			Biostatus Ltd, UK

2.1.8. Kits und Transfektions-Reagenzien

Tabelle 8: Kits und Transfektionsreagenzien.

Bezeichnung	Firma, Ort
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Qiagen® Plasmid Maxi Purification Kit	Qiagen, Hilden
peqGOLD Gel Extraction Kit	Peqlab

2.1.9. Software und Programme

Tabelle 9: Software und Programme.

Name	Verwendung
BioEdit 7.0.9	DNA-/Protein-Sequenz-Analyse
Endnote X4.0.2	Literaturverwaltung
ImageJ 1.42	densitometrische Auswertung
Zeiss LSM Image Browser 4.2.0.121	Betrachtung und Auswertung der Fluoreszenzbilder vom Konfokalmikroskop

2.1.10. Plasmide

Nachfolgende Plasmide wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet. Die mit einem * gekennzeichneten Konstrukte wurden von mir hergestellt und in den pcDNA3.1-Vektor kloniert.

pcDNA3.1: Eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV Promotor (Invitrogen, Karlsruhe).

pEJ: Plasmid, zwei IScel-Schnittstellen zur Doppelstrangbruch-Induktion (zur Verfügung gestellt von Prof. Jochen Dahm-Daphi, Marburg) (Mansour *et al.*, 2008).

pRFP-GR-IScel: Das Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein aus *Red-Fluorescent-Protein*, dem Restriktionsenzym IScel und der ligandenbindenden Domäne des Glukokortikoidrezeptors. Nach der Behandlung der Zellen mit dem Glukokortikoid-Analogon Triamzinolonazetonid (TA) transloziert das Fusionsprotein in den Zellkern. Somit entsteht nach Induktion mit TA in dem pEJ-Plasmid ein Doppelstrangbruch (zur Verfügung gestellt von Prof. Jochen Dahm-Daphi, Marburg) (Soutoglou *et al.*, 2007).

V5-AuroraA: (1-403)

Flag-BRCA1: (1-1863)

***V5-Ku80:** (1-732)

***V5-Ku80_KuC:** (1-588)

***V5-Ku80_Ku:** (1-460)

***V5-Ku80_KuN:** (1-244)

***V5-Ku80_KuN2:** (1-168)

***V5-Ku80_KuN1:** (1-109)

*V5-Ku80_KuN2_K7R:	(1-168), K7R
*V5-Ku80_KuN2_K36R:	(1-168), K7R, K35R, K36R
*V5-Ku80_KuN2_K51R:	(1-168), K7R, K35R, K36R, K51R
*V5-Ku80_KuN2_K97R:	(1-168), K7R, K35R, K36R, K51R, K97R
*V5-Ku80_KuN2_K129R:	(1-168), K7R, K35R, K36R, K51R, K97R, K125R, K126R, K129R
*V5-Ku80_KuN2_K144R:	(1-168), K7R, K35R, K36R, K51R, K97R, K125R, K126R, K129R, K144R
*V5-Ku80_KuN2_K156R:	(1-168), K7R, K35R, K36R, K51R, K97R, K125R, K126R, K129R, K144R, K155R, K156R
*V5-Ku80_K129R:	(1-732), K125R, K126R, K129R
*V5-Ku80_K144R:	(1-732), K144R
FLAG-RNF8:	(1-485)
His-Ubi:	(1-76)
His-Ubi_K0:	(1-76), K6R, K11R, K27R, K29R, K33R, K48R, K63R
His-Ubi_K6R:	(1-76), K6R
His-Ubi_K6only:	(1-76), K11R, K27R, K29R, K33R, K48, K63
His-Ubi_K11R:	(1-76), K11R
His-Ubi_K11only:	(1-76), K6R, K27R, K29R, K33R, K48, K63
His-Ubi_K27R:	(1-76), K27R
His-Ubi_K27only:	(1-76), K6R, K11R, K29R, K33R, K48, K63
His-Ubi_K29R:	(1-76), K29R
His-Ubi_K29only:	(1-76), K6R, K11R, K27R, K33R, K48, K63
His-Ubi_K33R:	(1-76), K33R
His-Ubi_K33only:	(1-76), K6R, K11R, K27R, K29R, K48, K63
His-Ubi_K48R:	(1-76), K48R
His-Ubi_K48only:	(1-76), K6R, K11R, K27R, K29R, K33R, K63
His-Ubi_K63R:	(1-76), K63R
His-Ubi_K63only:	(1-76), K6R, K11R, K27R, K29R, K33R, K48

2.1.11. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden entweder von der Firma Metabion, Martinsried (Primer) oder von der Firma MWG Eurofins, Ebersberg (siRNA) lyophilisiert geliefert.

2.1.11.1. Primer

Tabelle 10: Primer zur Herstellung von Plasmiden und Punktmutanten.

Primer	Sequenz [5'-3']
Ku80_for	cgtaggatccgccaccatgggtaagcctatccctaaccctctcctcgggtctcgattctacg gtgcggtcggggaataaggcagct
Ku80_rev	tgccggccgcctatatcatgtccaataaatcgccacatc
Ku80_KuC_rev	tgccggccgcctatccaacagagggtgacactgccttcagccag
Ku80_Ku_rev	tgccggccgcctatgtcttctcatctttctttgccaagctcat
Ku80_KuN_rev	tgccggccgcctagccaatggtcagtcggcagggccagtgaaat
Ku80_KuN2_rev	tgccggccgcctatgagaaaggcaagaagaattgcagggga
Ku80_KuN1_rev	tgccggccgcctaataccaggaagtcagcctgttgagaacc
Ku80_KuN2_K7R_for	gtgcggtcggggaatagggcagctgtgtgtctg
Ku80_KuN2_K7R_rev	cagcacaacagctgccctattccccgaccgcac
Ku80_KuN2_K36R_for	gaatccccatttgaacaagcaaggagggtgataaccatgtttgtacagcg
Ku80_KuN2_K36R_rev	cgctgtacaacatggttatcacctccttgctgttcaaatggggattc
Ku80_KuN2_K51R_for	cgacaggtgtttgctgagaacagggatgagattgcttttagtcc
Ku80_KuN2_K51R_rev	ggactaaagcaatctcatccctgttctcagcaaacacctgtcg
Ku80_KuN2_K97R_for	gctggaggacattgaaagcagaatccaaccaggttctcaacaggc
Ku80_KuN2_K97R_rev	gcctgtgagaacctggttgattctgcttcaatgtcctccagc
Ku80_KuN2_K129R_for	ggatgtgattcaacatgaaacaataggaaggaggtttgagaggaggcatattgaaat attcactg
Ku80_KuN2_K129R_rev	cagtgaatattcaatatgcctcctctcaaacctcctcctattgtttcatgttgaatcacatc c
Ku80_KuN2_K144R_for	gacctcagcagccgattcagcagaagtcagctgg
Ku80_KuN2_K144R_rev	ccagctgacttctgctgaatcggctgctgaggtc
Ku80_KuN2_K156R_for	gtcagctggatattataattcatagcttgaggagatgtgacatctccctgcaattc
Ku80_KuN2_K156R_rev	gaattgcaggagatgtcacatctcctcaagctatgaattataatatccagctgac
Ku80_KuN2_K129R_for	ggatgtgattcaacatgaaacaataggaaggaggtttgagaggaggcatattgaaat attcactg
Ku80_KuN2_K129R_rev	cagtgaatattcaatatgcctcctctcaaacctcctcctattgtttcatgttgaatcacatc c
Ku80_KuN2_K144R_for	gacctcagcagccgattcagcagaagtcagctgg
Ku80_K144R_rev	ccagctgacttctgctgaatcggctgctgaggtc

erreicht worden war. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C und 2500rpm 10min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 16ml kaltem RF1-Puffer (100mM RbCl₂, 50mM MnCl₂, 30mM Kalium-Azetat, 10mM CaCl₂, 15% Glycerin) resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien 3-4h auf Eis inkubiert und danach erneut bei 4° und 2500rpm für 10min zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen, und das Pellet in 4ml RF2-Puffer (10mM MOPS, 10mM RbCl₂, 75mM CaCl₂, 15% Glycerin, pH6,8) resuspendiert. Nach 15minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien in 100µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.1.2. Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Die Bakterien wurden vorsichtig auf Eis aufgetaut und mit 0,1µg Plasmid-DNA, einem kompletten Ligationsansatz oder dem Ansatz einer Mutagenese-PCR versetzt. Der Ansatz wurde 20min auf Eis inkubiert und anschließend für 45s auf 42°C erhitzt. Danach wurden 800µl LB-Medium hinzugegeben und für 1h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Bakterien für 20s bei 13000rpm zentrifugiert. 700µl des Überstands wurden abgenommen, das Pellet im restlichen Medium resuspendiert und auf einer Agar-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Agar-Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag auf Kolonien überprüft.

2.2.2. Kultur und Manipulation eukaryotischer Zellen

2.2.2.1. Kultur eukaryotischer Zellen

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Gleichfalls wurden stets sterile Medien und Materialien verwendet.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich immortalisierte, adhärente Zelllinien verwendet. H1299-Zellen wurden in Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM), das mit 1% Penizillin/Streptomycin und 10% FCS versetzt worden war, kultiviert. Für die Kultivierung von SKOV3-Zellen wurde DMEM verwendet, das mit 1% Penizillin/Streptomycin und 15% FCS versetzt worden war. Beide Zelllinien wurden bei 37°C, 7% CO₂ und einer Luftfeuchte von ca. 95% kultiviert.

Nachdem die Zellen eine Dichte von 80-90% erreicht hatten, wurden sie passagiert. Hierzu wurde zuerst das alte Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde eine 0,25% Trypsin-Lösung hinzugegeben und bei 37°C inkubiert bis

sich die Zellen von der Kulturschale abgelöst hatten. Die Zellen werden nun in frischem Medium aufgenommen und für 2min bei 1000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in frischem Medium resuspendiert und in eine neue Zellkulturflasche überführt.

2.2.2.2. Kryokonservierung und Anzucht von Zellen

Für eine längere Lagerung wurden die Zellen, in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren. Hierzu wurden die Zellen zunächst von der Kulturschale abgelöst und pelletiert. Das Zellpellet wurde dann in Einfriermedium (DMEM, 10% DMSO, 20% FCS) aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Diese werden in einer Einfrierbox zwei Tage lang auf -80°C herunter gekühlt. Anschließend werden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur erneuten Anzucht, werden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff genommen und in einem 37°C warmen Wasserbad schnellstmöglich aufgetaut. Danach wurden die Zellen in Medium aufgenommen und für 2min bei 1000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt.

2.2.2.3. Transfektion mittels Kalzium-Phosphat-Kopräzipitation (Chen and Okayama, 1987)

In eine 10cm Gewebekulturschale wurden 4,4ml Medium und 1ml Zellsuspension vorgelegt. Pro Transfektionsansatz (600µl) werden bis zu 15µg DNA in 30µl 2,5M CaCl₂ und der entsprechenden Menge an Wasser auf 300µl verdünnt. Unter ständigem Mischen wurden 300µl 2xHBS-Puffer (280mM NaCl, 50mM HEPES, 1,5mM Na₂HPO₄, pH7,05) hinzugegeben. Die Kalzium-Phosphat-DNA-Präzipitatlösung wurde auf die Zellen getropft und die Gewebekulturschale vorsichtig geschwenkt. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und 4ml 15% Glycerin in PBS für 3min bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde die Glycerinlösung mit der gleichen Menge an PBS verdünnt und das Gemisch abgenommen. Die Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen und erhielten dann 5ml frisches Medium. Nach weiteren 24h Inkubation wurden die Zellen geerntet.

2.2.2.4. Transfektion mit Lipofectamine™ 2000

Am Tag der Transfektion werden in eine 10cm Gewebekulturschale 7,1ml DMEM und 1ml Zellsuspension vorgelegt.

Als Transfektionsmix werden einmal 450µl DMEM mit 15µl Lipofectamine™ 2000 gemischt. Gleichfalls wurden 450µl DMEM mit 800pMol siRNA zusammen mit bis zu 10µg DNA gemischt. Alternativ wurden 450 µl DMEM mit bis zu 10 µg DNA (in Abwesenheit von siRNA) gemischt. Die Ansätze wurden 5min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die beiden Lösungen vereinigt, gemischt und 20min bei RT inkubiert. Danach wurde der Transfektionsmix auf die Zellen gegeben und 10min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden über Nacht im Inkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und durch Medium, welches FCS und Antibiotika enthielt, ersetzt. Nach weiteren 72h werden die Zellen geerntet.

2.2.2.5. Behandlung von Zellen

Ionisierende Strahlung (IR): Zur Erzeugung von Doppelstrangbrüchen werden die Zellen mit 5Gray (CoIP und Ubiquitinierungs-Versuch) oder 0,5Gray (Immunfluoreszenz) mit einer Röntgenquelle bei 200kV und 15mA bestrahlt.

MG132: Zur Inhibierung des Proteasoms, wurden 4h vor der Ernte 10µM MG132 zu den den Zellen gegeben.

Triamzinolonazetonid (TA): Um für die Chromatin-Immunpräzipitation Doppelstrangbrüche zu induzieren, wurde TA in einer Endkonzentration von 200nM auf die Zellen gegeben.

2.2.3. Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1. Herstellen von Zelllysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Herstellung von Zelllysaten wurde zunächst das Medium von den Zellen abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann von der Gewebekulturschale abgeschabt und in ein Reaktionsröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C und 13200rpm für 20s pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 100µl NP-40-Lysis-Puffer (150mM NaCl, 50mM Tris pH8,0, 5mM EDTA

pH8,0, 1% NP-40, 1mM PMSF) resuspendiert und für 15min auf Eis lysiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 4°C und 13500 rpm für 15min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsröhrchen überführt.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford, 1976) wurde pro Probe 1ml Bradford-Reagenz in ein Reaktionsröhrchen vorgelegt und 2µl der Proteinlösung hinzupipettiert.

Für die Erstellung einer Eichkurve wurde 1ml Bradford-Reagenz in ein Reaktionsröhrchen vorgelegt und mit 2µl Lysis-Puffer versetzt. Danach wurden die entsprechenden Konzentrationen an BSA (0, 2, 4, 6µg) hinzugefügt und alles gut gemischt. Von allen Ansätzen werden 150µl in eine 96 Loch-Platte überführt und bei 595nm photometrisch gemessen. Mit Hilfe der Eichkurve kann so die Proteinkonzentration der einzelnen Proben bestimmt werden. Dabei liegen der Berechnung folgende Formeln zu Grunde:

Zuerst wird ein Koeffizient F errechnet

$$F = \text{Extinktion [BSA-Eichkurve]} / \text{Konzentration [BSA-Eichkurve]}$$

Nun kann der Extinktionswert der einzelnen Proben mit dem Koeffizienten F multipliziert werden und man erhält die Proteinkonzentration in µg/µl

$$\text{Konzentration [Probe]} = F \times \text{Extinktion [Probe]}$$

2.2.3.2. Ko-Immunpräzipitation

Zuerst wurden pro Probe 25µl A+G-Agarose mit PBS gewaschen und mindestens 2h bei RT mit dem entsprechenden Antikörper (gegen Ku80 oder gegen BRCA1) auf dem Drehrad inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und von der Kulturschale abgeschabt. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation pelletiert, in 400µl Lysis-Puffer (10mM Tris pH7,5, 5mM EDTA, 50mM NaCl, 1% Triton-X-100; 1mM PMSF) resuspendiert und für 15min auf Eis inkubiert. Danach werden die Ansätze bei 4°C und 13200rpm für 15min zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsröhrchen überführt und die Proteinkonzentration bestimmt. Pro Ansatz wurden 750µg Protein eingesetzt und mit Lysis-Puffer auf ein gleiches Volumen aufgefüllt. Nun wurde zu jedem Ansatz 25µl der an Antikörper-gekoppelten-A+G-Agarose gegeben und über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde die Agarose dreimal mit Wasch-Puffer (50mM Tris pH7,5, 1mM EDTA, 100mM NaCl, 0,1% Triton-X-100, 5% Glycerin) gewaschen. Die Präzipitate wurden mit 20µl 2x SDS-Probenpuffer (160mM Tris pH6,8, 4% SDS, 20% Glycerin, 4% β-

Mercaptoethanol, 0,002% Bromphenolblau) versetzt, für 10min auf 95°C erhitzt und auf ein 10% SDS-Polyacrylamidgel geladen.

2.2.3.3. Ubiquitinierungs-Assay

Zunächst wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 6ml PBS auf die Zellen pipettiert und diese mit einem Gummischaber von der Gewebekulturplatte gelöst. 1ml (17%) der Zellsuspension wurde als Kontrolle abgenommen. Mit diesem Aliquot wurde, wie unter Punkt 2.2.3.5. und 2.2.3.6. beschrieben, weiterverfahren. Die restlichen 5ml (83%) werden bei 4°C und 2000rpm für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 7ml Guanidinium-Puffer (6M Guanidiniumhydrochlorid, 0,01M Tris pH8,0, 0,1M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH8,0), dem 10mM β-Mercaptoethanol und 5 mM Imidazol frisch zugesetzt worden war, aufgenommen. Jedem Ansatz wurden 60µl Ni²⁺-NTA-Agarose beigefügt und über Nacht bei Raumtemperatur (RT) auf einem Drehrad inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Ni²⁺-NTA-Agarose nacheinander einmal mit 1ml Guanidinium-Puffer, dann mit 1ml Puffer A (8M Harnstoff, 0,1M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH6,3, 0,01M Tris, pH6,3), anschließend mit 1ml Puffer A mit 0,2% Triton-X-100 und dann mit 1ml Puffer A mit 0,1% Triton-X-100 gewaschen. Allen drei Puffern wurde kurz vor der Verwendung 10mM β-Mercaptoethanol frisch zugesetzt. Die ubiquitinierten Proteine wurden mit 60µl Elutionspuffer (200mM Imidazol, 5% SDS, 0,15M Tris pH6,7, 30% Glycerin, 0,72M β-Mercaptoethanol) für mindestens 30min bei RT auf einem Schüttler eluiert. Das Eluat wurde 1min bei 13200rpm zentrifugiert. 60µl des Überstands wurden mit 15µl 5x SDS-Probenpuffer versetzt. Anschließend wurden die Proben entweder bei -20°C eingefroren oder gleich anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blotting analysiert.

2.2.3.4. Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Für die Chromatin-Immunpräzipitation wurde zunächst Formaldehyd in einer Endkonzentration von 1% auf die Zellen gegeben, gut gemischt und 10min bei RT inkubiert. Danach wurde Glyzin zu einer Endkonzentration von 137,5mM zugegeben um die Proteinfixierung zu stoppen. Anschließend werden die Zellen dreimal mit eiskaltem PBS/0,5mM PMSF gewaschen, von der Gewebekulturschale abgeschabt und für 20s bei 13200rpm pelletiert. Anschließend wurden die Proben bis zum nächsten Tag bei -80°C eingefroren. Am darauffolgenden Tag werden die Zellen in 1ml Lysis-Puffer (25mM Hepes

pH7,8, 1,5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0,1% NP-40, 1mM DTT, 0,5mM PMSF) resuspendiert und 10min auf Eis inkubiert. Danach werden die Zellen durch zwanzigmaliges *Douncen* aufgebrochen und die Ansätze bei 4°C und 3000rpm für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1ml Sonifizierungs-Puffer (50mM Hepes pH7,9, 140mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton-X-100, 0,1% Natriumdeoxycholat, 0,1% SDS, 0,5mM PMSF) resuspendiert. Die Ansätze wurden in Intervallen von 10s bei höchster Stufe für 7,5min sonifiziert, um das Chromatin in kleinere Fragmente aufzuspalten. Danach werden die Proben bei 4°C und 13200rpm für 15min zentrifugiert. Der chromatinhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsröhrchen überführt und mit BSA in einer Endkonzentration von 1mg/ml und Lac hssperma-DNA in einer Endkonzentration von 1µg/ml, versetzt. Zur Vorreinigung der Lysate, wurde jedem Ansatz 40µl einer Protein A+G-Agarose-Suspension beigefügt und für 2h bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend werden die Proben für 5min bei 6000rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsröhrchen überführt. Hiervon wurden 50µl als Kontrolle abgenommen und bei -20°C gelagert. Zum Rest werden 2µg eines gegen Ku80 gerichteten Antikörpers gegeben und für 2h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Danach werden 40µl einer Protein A+G-Agarose-Suspension beigefügt und über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben bei 3300rpm zentrifugiert und die Präzipitate zweimal mit Sonifizierungs-Puffer, zweimal mit Wasch-Puffer A (50mM Hepes pH7,9, 500mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton-X-100, 0,1% Natriumdeoxycholat, 0,1% SDS, 0,5mM PMSF), zweimal mit Wasch-Puffer B (20mM Tris pH8, 1mM EDTA, 250mM LiCl, 0,5% NP-40, 0,5% Natriumdeoxycholat, 0,5mM PMSF) und zweimal mit TE-Puffer (10mM Tris pH8, 1 mM EDTA) gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden mit 200µl Elutions-Puffer (50mM Tris pH8,0, 1mM EDTA, 1% SDS, 50mM NaHCO₃) 10min bei 65°C eluiert und durch eine 1minütige Zentrifugation bei 13000rpm von der A+G-Agarose abgetrennt. Die Protein-Elution wurde einmal wiederholt und die beiden Eluate vereint. Zu den Eluaten wurde NaCl in einer Endkonzentration von 210mM hinzugegeben und die Ansätze für 5h bei 65°C inkubiert. Zu den Kontrollen (50µl) wurden gleichfalls 350µl Elutions-Puffer und NaCl zu einer Endkonzentration von 210mM hinzugegeben und diese wurden ebenfalls für 5h bei 65°C inkubiert. Danach wurde zu allen Proben RNase A in einer Endkonzentration von 25µg/ml pipettiert und für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde Proteinase K zu einer Endkonzentration von 50µg/ml und EDTA zu einer Endkonzentration von 5mM beigegeben und für 1h bei 42°C inkubiert. Danach wurden die Proben bis zum nächsten Tag bei -20°C eingefroren.

Nach dem Auftauen wurden die Proben mit 150µl eines Chloroform/Phenol/Isoamylalkohol-Gemischs (1:1:1) und mit 150µl eines Chloroform/Isoamylalkohol-Gemischs (1:1) aufgereinigt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1ml EtOH (100%), 40µl 3M Na-Azetat und 1µl Pink-DNA[®] bei -20°C für 2h gefällt. Danach wurde die DNA bei 4°C und 13200rpm für

30min pelletiert und mit 80% EtOH gewaschen. Nach Abdampfen des Alkohols wurde das Pellet in 30µl Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.3.5. SDS-PAGE

Für die SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) wurde das System von BioRad verwendet. Es wurden Trenngele mit einer Acrylamidkonzentration von 10%, 12% und 15% und ein Sammelgel mit einer Acrylamidkonzentration von 5% verwendet. Zur Anfertigung des Gels wurden die Glasplatten mittels eines Fixierrahmens zusammengebaut und in den Gießstand eingespannt. Dann wurde das Trenngel zusammenpipettiert, zwischen die Glasplatten eingefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Isopropanol ausgegossen und die Geloberfläche mit Wasser abgespült. Danach wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Kamm mit 10 Taschen eingesteckt. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels wurde das Gel in die Laufkammer gestellt, die Kammer mit Laufpuffer (25mM Tris, 193 mM Glyzin, 0,1% SDS) befüllt und der Kamm entfernt.

Die Proben werden mit dem gleichen Volumen an 2x Probenpuffer (160mM Tris pH6,8, 4% SDS, 20% Glycerin, 4% β-Mercaptoethanol, 0,002% Bromphenolblau versetzt), für 10min auf 95°C erhitzt und in die Taschen pipettiert. In eine weitere Tasche wurden 4µl eines Protein-Markers pipettiert.

Die Elektrophorese wurde bei 120V für ca. 2-3h durchgeführt bis die blaue Bromphenol-Front am unteren Ende der Glasplatten angelangt war.

Tabelle 13: Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele.

Reagenzien	Trenngel [10ml]			Sammelgel [3ml]
	10%	12%	15%	5%
Wasser	4,0ml	3,3ml	2,3ml	2,1ml
Acrylamid 30%	3,3ml	4,0ml	5ml	0,5ml
1,5M Tris, pH8,8	2,5ml	2,5ml	2,5	-
1M Tris, pH6,8	-	-	-	0,38ml
10% SDS	100µl	100µl	100µl	30µl
10% APS	100µl	100µl	100µl	30µl
TEMED	4µl	4µl	4µl	3µl

2.2.3.6. Western Blot

Zunächst wurde eine PVDF-Membran mit 100% Methanol gespült und in Blot-Puffer (25mM Tris, 193 mM Glyzin, 10% Methanol) äquilibriert. In eine Wanne, die mit Blot-Puffer gefüllt war, wurde die Blot-Halterung gelegt. Anschließend wurde der Blot von unten nach oben unter Blot-Puffer in folgender Reihenfolge aufgebaut. Zuerst kam ein Schwamm, danach ein Stück Filterpapier, anschließend die Blot-Membran, dann das Polyacrylamid-Gel, danach wieder ein Stück Filterpapier und zuletzt nochmals ein Schwamm. Der Blot-Halter wurde geschlossen und in die Blot-Kammer eingelegt. Dabei war zu beachten, dass die Proteine von der Anode zur Kathode wandern. Der Transfer erfolgte in Blot-Puffer bei 30V über Nacht.

2.2.3.7. Immunodetektion

Nach dem Blotten wurde die Membran aus der Blot-Kammer genommen und die Proteine mit 0,1% Tinte in PBS angefärbt. Anschließend wurde die Membran für 30min in 5% Magermilchpulver in PBS/T (PBS + 0,2% Tween[®] 20) blockiert. Danach wurde die Membran für 1,5h mit dem entsprechenden primären Antikörper in der 5% Magermilch-Lösung auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5min mit PBS/T gewaschen. Nun wurde die Membran mit einem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper, der ebenfalls in der 5% Magermilch-Lösung verdünnt worden war, für 1,5h auf einem Drehrad inkubiert. Danach wurde für jeweils 10min zweimal mit PBS/T und einmal mit PBS gewaschen. Im Anschluss werden die ECL Lösungen I (100mM Tris pH8,4, 2,5mM Luminol, 400µM Kumarinsäure) und II (100mM Tris pH8,5, 0,02% H₂O₂) im Verhältnis 1:1 gemischt, auf die Membran gegeben und für ca. 2 Minuten inkubiert. Die Membran wurde in Folie eingepackt und in eine lichtdichte Röntgenfilmkassette gelegt. In einer Dunkelkammer wurde die Membran gegen einen ECL-Film exponiert. Anschließend wurde der Film maschinell in einem Kodak X-omat 2000-Entwickler entwickelt.

In den Fällen, in denen der primäre Antikörper über Nacht inkubiert wurde, wurde Zellkulturmedium (DMEM, 10% Serum, 1% P/S) anstelle der Magermilchlösung verwendet und der Antikörper bei 4°C inkubiert.

2.2.3.8. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Um eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung durchführen zu können, wurden bei der Aussaat der Zellen bereits Glasplättchen vorgelegt. Auf diese Glasplättchen wurde dann die Zellsuspension pipettiert und die Zellen so auf den Glasplättchen gezogen. Für die Immundetektion wurden die Glasplättchen dann in eine 24-Lochplatte überführt und die Zellen auf Eis mit eiskaltem Azeton/Methanol (1:1) für 8min fixiert. Danach werden die Zellen dreimal für 5min mit PBS gewaschen und mit 1%BSA in PBS für 30min blockiert. Anschließend werden die Zellen 1,5h mit dem entsprechenden primären Antikörper, der in 1% BSA in PBS verdünnt (γ H2AX: 1:500; BRCA1: 1:200) worden war, bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit einem Fluorophor-gekoppelten Antikörper, der 1:1000 in 1% BSA/PBS verdünnt worden war, und Draq5[®], das gleichfalls 1:1000 verdünnt wurde, für weitere 1,5h bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Damit der Farbstoff nicht bereits während der Inkubation ausbleicht, wurde der Inkubationsansatz in Aluminiumfolie eingewickelt. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal für 5min mit PBS gewaschen, mit einem Tropfen Hydromount auf einem Objektträger eingebettet und über Nacht im Dunkeln getrocknet. Die Auswertung erfolgt an einem Konfokalmikroskop.

2.2.3.9. Quantifizierung

Zur Quantifizierung der Signale aus den Agarosegelen, wurden diese digitalisiert und die Signalstärke anschließend mit der *ImageJ* Software ermittelt.

2.2.4. Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1. Plasmid-DNA Präparation

Maxipräparation

Zur Isolierung von Plasmiden wurde das Maxipräparations-Kit von Qiagen verwendet. 200ml LB-Medium wurden mit dem entsprechenden Antibiotikum (Ampizillin oder Kanamycin; Endkonzentration 100 μ g/ml) versetzt, mit einer Einzelkolonie inokuliert und im Bakterienschüttler über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen werden die Bakterien bei 4°C und 6000rpm für 15min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 10ml Puffer P1 (50mM Tris HCl pH8,0, 10mM EDTA, 100 μ g/ml RNase A, 0,1% Lyse-Blue) resuspendiert und die Bakterien durch Zugabe von 10ml Puffer P2 (200mM NaOH, 1% SDS)

5min lysiert. Anschließend wurden 10ml Puffer P3 (3M Kalium-Azetat, pH5,5) hinzugefügt und der Ansatz 20min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 4°C und 4000rpm für 10min wurde der Überstand auf eine zuvor mit 10ml QBT-Puffer (750mM NaCl, 50mM MOPS pH7,0, 15% Isopropanol, 0,15% Triton-X-100) äquilibrierte Qiagen-Säule gegeben. Die Säule wurde danach zweimal mit 30ml QC-Puffer (1M NaCl, 50mM MOPS pH7,0, 15% Isopropanol) gewaschen und die DNA anschließend mit 15ml QF-Puffer (1,25M NaCl, 50mM Tris HCl pH8,5, 15% Isopropanol) eluiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 10,5ml Isopropanol gefällt und durch 30minütiges Zentrifugieren bei 4°C und 9000rpm pelletiert. Die DNA wurde mit 5ml 70% Ethanol gewaschen, an der Luft angetrocknet, in 500µl TE-Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Minipräparation

2ml LB-Medium wurden mit 100µg/ml Ampizillin versetzt, mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 37°C im Bakterienschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1,5ml der Bakteriensuspension in ein Reaktionsröhrchen überführt und die Bakterien 1min bei 13000rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 250ml Puffer P1 resuspendiert. Danach wurden 250µl Puffer P2 hinzugegeben, alles gut gemischt und für 5min bei RT inkubiert. Danach kamen 350µl Puffer P3 dazu und der Ansatz wird vorsichtig gemischt. Anschließend wurde der Ansatz bei 4°C und 13200rpm für 10min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsröhrchen überführt. Zur Fällung der DNA wurden 600µl Isopropanol und 60µl 3M Na-Azetat hinzugegeben. Danach wurde die DNA bei 4°C und 13200rpm für 20min pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und die DNA mit 500µl eiskaltem 80%EtOH gewaschen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet, in 30µl Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.4.2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Klonierung von Ku80 und dessen Fragmenten in den pcDNA3.1-Vektor

Für die Amplifizierung von Ku80 wurden 5µl einer aus mRNA gewonnenen cDNA verwendet. Bei der Klonierung der Fragmente wurden 500ng des Ku80-Plasmids als Template verwendet. Zu diesem Template wurden je 0,2µM des Vorwärts- und Rückwärts-Primers, 0,2mM dNTPs, 10µl 5x PrimeSTAR®-Puffer und 0,5µl PrimeSTAR®-Polymerase pipettiert. Anschließend wurde der PCR-Ansatz mit H₂O auf 50µl aufgefüllt.

Die PCR-Reaktion wurde mit den folgenden Einstellungen durchgeführt:

98°C – 10s
 98°C – 10s }
 55°C – 15s } 35x
 72°C – 3min }
 72°C – 5min
 4°C – ∞

Einführung von Punktmutationen

Für die Einführung von Punktmutationen wurden 50ng der Template-DNA mit je 125ng eines Vorwärts- und Rückwärts-Primers, welche die Mutation enthielten, 0,2mM dNTPs, 10µl 5x PrimeSTAR®-Puffer und 1µl PrimeSTAR®-Polymerase gemischt. Anschließend wurde der PCR-Ansatz mit H₂O auf 50µl aufgefüllt.

Die PCR-Reaktion wurde mit den folgenden Einstellungen durchgeführt:

98°C – 10s
 98°C – 10s }
 55°C – 5s } 35x
 72°C – 10min }
 72°C – 10min
 4°C – ∞

Nach der PCR wurde das Template mit 1µl *DpnI* 1,5h bei 37°C verdaut. *DpnI* erkennt nur methylierte DNA und baut somit nur die Parental-DNA und nicht das PCR-Produkt ab.

PCR für die Chromatinimmunpräzipitation

Für die PCR der Chromatinimmunpräzipitation wurden pro Ansatz (20µl) 1µl pEJ-DNA mit 0,2mM dNTPs, je 0,5µM des Vorwärts- und Rückwärtsprimers (pEJ_for und pEJ_rev), 4µl 5x GoTaq®-Puffer und 0,5µl GoTaq®-Polymerase gemischt und mit H₂O auf 20µl aufgefüllt.

Die PCR-Reaktion wurde mit den folgenden Einstellungen durchgeführt:

95°C – 3min
 95°C – 30s }
 65°C – 30s } 28x
 72°C – 30s }
 72°C – 10min
 4°C – ∞

2.2.4.3. Analyse von DNA

Bestimmung der DNA Konzentration

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde ein Tropfen der DNA-Lösung auf den Nanodrop1000 (Peqlab) gegeben und spektrophotometrisch bei 260nm gemessen. Zur Bestimmung der Reinheit der DNA wurde der Quotient von OD_{260}/OD_{280} bestimmt. Dieser sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA wurde in Gelen mit einer Agarosekonzentration zwischen 0,8 und 2% aufgetrennt. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose abgewogen und mit der entsprechenden Menge an TAE-Puffer (40mM Tris pH7,2, 20mM Na-Azetat, 1mM EDTA) so lange aufgeköcht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nach kurzem Abkühlen wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5µg/ml hinzugegeben und gemischt. Das Gel wurde in die entsprechende Apparatur gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nachdem das Gel fest geworden war, wurde es mit TAE-Puffer überschichtet und der Kamm wurde entfernt. Die zu analysierenden Proben wurden mit 6x Ladepuffer (1% Bromphenolblau, 1% Xylencyanol FF in 30% Glycerin) versetzt und in die Taschen pipettiert. Neben den Proben wurde auf jedes Gel ein DNA-Größenstandard geladen. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 1h bei 80-100V. Die DNA wurde unter UV-Licht bei 320nm visualisiert und photographisch dokumentiert oder ausgeschnitten und aufgereinigt.

2.2.4.4. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Nachdem die DNA-enhaltende Agarose aus dem Gel ausgeschnitten worden war, wurde sie in ein Reaktionsröhrchen überführt und gewogen. Pro 100mg DNA/Agarose wurden 100µl Binde-Puffer zugegeben und bei 60°C unter leichtem Schütteln inkubiert, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Danach wurden 5µl 5M Na-Azetat hinzupipettiert und der Ansatz wurde gut gemischt. Danach wurde er auf die *PerfectBind-DNA-Säule* (Peqlab) gegeben und bei RT 1min bei 13000rpm zentrifugiert. Die Säule wurde zweimal mit 600µl Wasch-Puffer gewaschen und anschließend bei RT 1min bei 13000rpm trocken zentrifugiert. Die DNA wurde mit 30µl H₂O eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.4.5. Restriktionsverdau

Für den Restriktionsverdau wurden 1/10 Volumen eines 10x Restriktions-Puffers und 10U *Bam*HI, 10U *Not*I, sowie 20µl eines PCR-Ansatzes, 16 µl einer DNA-Lösung aus einer Mini-Präparation oder 2µg Plasmid-DNA gegeben und mit H₂O auf 30µl aufgefüllt. Anschließend wurde die DNA bei 37°C 3h verdaut.

2.2.4.6. Ligation

Für die Ligation zweier DNA-Fragmente wurden 1/10 Volumen eines 10x T4-Puffers und 10U der T4-Ligase zu Insert und Vektor in einem Verhältnis von 1:10 gegeben. Üblicherweise wurde die Ligation in einem 20 µl Ansatz angesetzt und über Nacht bei RT inkubiert.

2.2.4.7. Isolierung von RNA

H1299-Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, abgeschabt, in ein Reaktionsröhrchen überführt und pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 600µl RLT-Puffer resuspendiert. Zum Aufbrechen der Zellen und Homogenisieren des Zelllysats, wurde die Zellsuspension fünfmal mit einer 20-Gauge-Nadel aufgezogen. Danach wurden 600µl 70% EtOH zum Lysat gegeben und das Ganze gut gemischt. Der Ansatz wurde dann auf eine RNeasy-Säule gegeben und 1min bei 13000rpm zentrifugiert. Die Säule wurde einmal mit 700µl RW1-Puffer und zweimal mit 500µl RPE-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Säule mittels Zentrifugation getrocknet und die RNA mit 30µl RNase-freiem Wasser eluiert.

2.2.4.8. Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurden 3µl RNA, 4µl DEPC-H₂O, 1µl RiboBlock[®]-Puffer, 1µl RiboBlock[®]-RNase Inhibitor und 1µl DNase gemischt und bei 37°C für 40min inkubiert. Danach wurden 1µl einer 25mM EDTA-Lösung hinzupipettiert und der Ansatz wurde 10min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden 1µl eines Oligo-dT-Primers (200ng/µl) zugefügt und bei 70°C für 5min inkubiert. Danach wurden 4µl eines 5fach konzentrierten ReverseTranskriptase-Puffers, 2µl einer 10mM dNTP-Lösung und 3µl Wasser hinzugegeben und 5min bei 37°C inkubiert. Zum Schluss wurden 1µl Reverse-Transkriptase dazu gegeben

und das Ganze für 10min bei 25°C, für 60min bei 42°C und für 10min bei 70°C inkubiert. Die so erhaltene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3. Ergebnisse

3.1. Klonierung von Ku80 aus revers transkribierter RNA

Das Ku80-Protein ist eines der Hauptkomponenten der Nicht-homologen Endverknüpfung. Es formt zusammen mit Ku70 ein Heterodimer und bildet die regulatorische Untereinheit der DNA-abhängigen Protein Kinase (DNA-PK). Obwohl die Doppelstrangbruchreparatur seit mehreren Jahrzehnten intensiv erforscht wird, ist über die Regulation der Doppelstrangbruchreparatur und über die Interaktion mit anderen an der Doppelstrangbruch-Reparatur beteiligten Proteinen wenig bekannt. Es ist wahrscheinlich, dass an dieser Regulation posttranslationelle Modifikationen unterschiedlicher Reparaturfaktoren eine Rolle spielen. Um das Ku80-Protein auf posttranslationelle Modifikationen zu untersuchen, musste zunächst eine cDNA des Gens hergestellt werden.

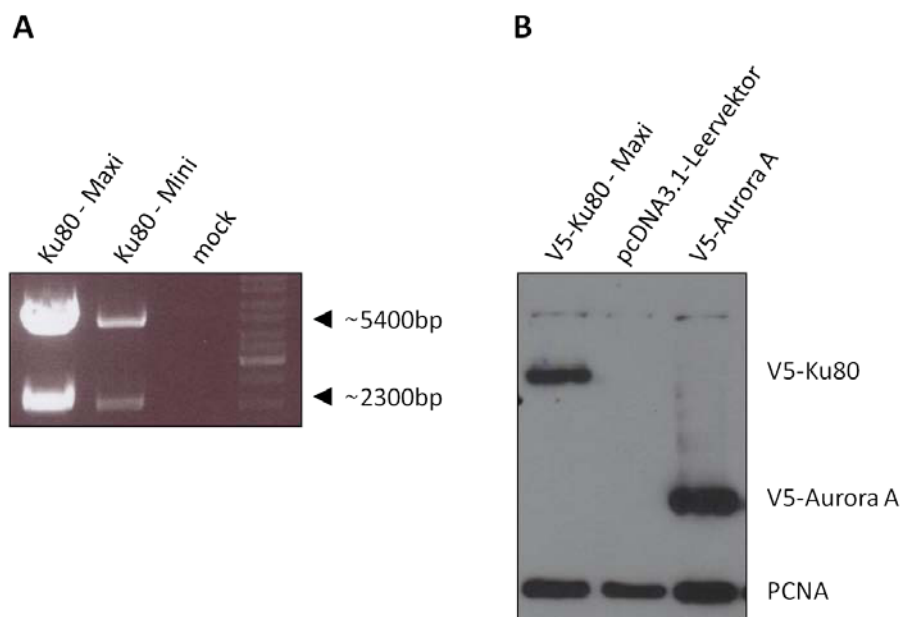


Abbildung 7: Klonierung des Ku80-Proteins.

(A) 2µg der V5-Ku80-Plasmide aus der Mini- bzw. Maxipräparation wurden durch die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Not*I für 3h bei 37°C verdaut. Der komplette Ansatz wurde mit Ladepuffer versetzt und auf ein 0,8%-TAE-Agarosegel geladen. Zur Kontrolle der Größe wurde ein DNA-Marker mit auf das Gel geladen. Dieses wurde bei 80V für ca. 1h laufen gelassen und unter UV-Licht analysiert und dokumentiert. (B) H1299-Zellen wurden mit dem V5-Ku80-Konstrukt, dem pcDNA3.1-Leervektor oder dem V5-AuroraA-Konstrukt (positiv Kontrolle) transfiziert. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 5 Gray bestrahlt. 50µg des zellulären Gesamtproteins wurden über ein 12% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit 5% Magermilchlösung für 30min blockiert, mit PBS/0,2% Tween gewaschen anschließend mit den Antikörpern gegen das V5-Epitop und gegen PCNA (Ladekontrolle) 1,5h bei RT inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in 5% Magermilchlösung (V5: 1:3000; PCNA: 1:50000; AuroraA: 1:1000). Die PVDF-Membran wurde gegen einen ECL-Film exponiert und entwickelt.

Für die Klonierung der Ku80 cDNA wurde zunächst mRNA aus H1299-Zellen isoliert und anschließend mit reverser Transkriptase in cDNA transkribiert. Anschließend wurde die Ku80 cDNA mittels PCR und den entsprechenden Vorwärts- und Rückwärtsprimern, welche zusätzlich Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Not*I enthielten, amplifiziert. Zur Unterscheidung des klonierten Ku80-Proteins vom endogenen Protein wurde in den Vorwärtsprimer das V5-Epitop eingebaut. Nach der PCR wurden das PCR-Produkt sowie der pcDNA3.1-Vektor mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Not*I geschnitten, aufgereinigt und ligiert. Das gewonnene V5-Ku80-Plasmid wurde in *E.coli* Bakterien transformiert und ausplattiert. Bei zehn der gewachsenen Kolonien wurde zunächst eine DNA Minipräparation durchgeführt und auf das Vorhandensein der V5-Ku80 cDNA überprüft (Abbildung 7A). Von einem positiven Klon wurde anschließend eine DNA-Präparation für die weitere Verwendung des Plasmids durchgeführt. Zur Überprüfung des Konstrukts wurde ein Kontrollverdau durchgeführt (Abbildung 7A) und die Ku80 cDNA anschließend sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm *BioEdit* ausgewertet.

Zur Überprüfung der Expression wurde die V5-Ku80 cDNA in H1299-Zellen transfiziert und ein Zelllysate hergestellt. Als Kontrolle wurde parallel ein Plasmid, das für ein V5-markiertes AuroraA-Protein kodiert sowie der pcDNA3.1-Vektor transfiziert. Die zellulären Proteine wurden über ein 12% SDS-PAGE Gel aufgetrennt und mittels Western Blotting analysiert. In Abbildung 7B ist in der ersten Spalte das Ku80 Protein (ca. 86kDa) und in der dritten Spalte das Aurora A Protein (45kDa) zu sehen (Abbildung 7B).

3.2. Ku80 wird durch Ubiquitinierung posttranslational modifiziert

Im Falle eines Doppelstrangbruchs ist ein schnelles Handeln der Zellen notwendig. Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, dass die Doppelstrangbruchreparatur über posttranslationelle Modifikationen reguliert wird. Für diese Annahme spricht die Autophosphorylierung der ATM, die Phosphorylierung von H2AX durch ATM oder die Phosphorylierung von Ku70 und XRCC4 durch die DNA-PK (Bakkenist and Kastan, 2003; Chan *et al.*, 1999; Kozlov *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2004; Paull *et al.*, 2000; Rogakou *et al.*, 1998).

In den letzten Jahren gab es neben der posttranslationalen Modifikation durch Phosphorylierung immer mehr Hinweise, dass auch die Ubiquitinierung von Proteinen bei der Doppelstrangbruchreparatur eine Rolle spielt. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob auch das Ku80-Protein ubiquitiniert wird. Dazu wurden H1299-Zellen mit einer cDNA transfiziert, die für Ku80 kodiert. Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen mit einer cDNA transfiziert, die für ein mit Histidin-markiertes Ubiquitin kodiert. Nach 48h wurden die Zellen

geerntet und lysiert. Die ubiquitinierten Proteine im Zelllysate wurden über Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt und über ein 10% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Mittels Western Blotting wurde anschließend die Menge des vorhandenen Ku80-Proteins bestimmt.

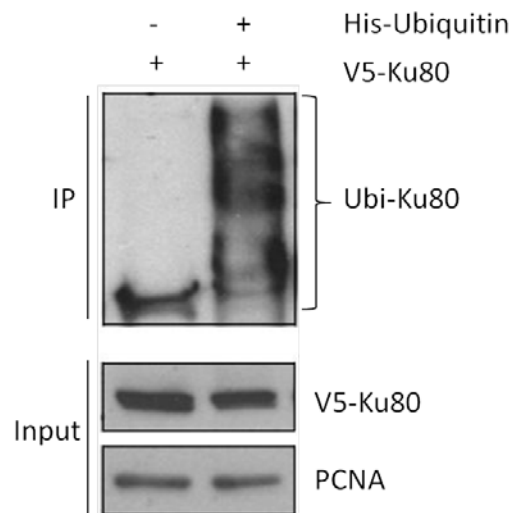


Abbildung 8: Das Ku80 wird ubiquitiniert.

H1299-Zellen wurden entweder mit dem V5-Ku80-Konstrukt und His-Ubiquitin oder nur mit dem V5-Ku80-Konstrukt transfiziert. 48h Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert. *IP*: 83% der Zellen werden mit 7ml Guanidinium-Lysisbuffer lysiert und die ubiquitinierten Proteine über Ni²⁺-Agarose aufgereinigt. Die Proteine wurden von der Ni²⁺-Agarose eluiert, über ein 10% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit 5% Magermilchlösung für 30min blockiert, mit PBS/0,2% Tween gewaschen anschließend mit dem Antikörper gegen das V5-Epitop 1,5h bei RT inkubiert. Der Antikörper wurde in 5% Magermilchlösung 1:3000 verdünnt. Die PVDF-Membran wurde gegen einen ECL-Film exponiert und in einer Dunkelkammer entwickelt. *Input*: 17% der Zellen wurden lysiert und 50µg des zellulären Gesamtproteins wurden über ein 10% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit 5% Magermilchlösung für 30min blockiert, mit PBS/0,2% Tween gewaschen anschließend mit den Antikörpern gegen das V5-Epitop und PCNA (Ladekontrolle) 1,5h bei RT inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in 5% Magermilchlösung (V5: 1:3000; PCNA: 1:50000). Die PVDF-Membran wurde gegen einen ECL-Film exponiert und in einer Dunkelkammer entwickelt.

In Abbildung 8 ist zu sehen, dass in Anwesenheit von His-markiertem Ubiquitin höhermolekulares Ku80 in der Zelle mit Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt werden kann. Diese höhermolekularen Banden weisen auf ein Ku80-Protein mit verschiedenen langen Ubiquitinketten hin. Diese verschiedenen langen Ubiquitinketten verändern das Molekulargewicht von Ku80, was hier als „Schmier“ zu erkennen ist. Die erste Spalte dient als negative Kontrolle. Hier wurde kein His-markiertes Ubiquitin transfiziert was zur Folge hatte, dass keine ubiquitinierten Proteine durch die Ni²⁺-NTA-Agarose präzipitiert werden konnten. Dementsprechend sind bei dieser Probe auch keine höhermolekularen Banden zu erkennen.

Da Ku80 an der Nicht-homologen Endverknüpfung beteiligt ist, stellte sich die Frage, ob sich die Menge an ubiquitiniertem Ku80 in Gegenwart von Doppelstrangbrüchen ändert. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden die Zellen wiederum mit cDNAs transfiziert, die für

V5-markiertes Ku80 und für His-markiertes Ubiquitin kodieren. Nach 48h wurden die Zellen mit 5Gy bestrahlt. Null, fünfzehn und fünfundvierzig Minuten nach der Bestrahlung wurden die Zellen geerntet und die Menge an ubiquitiniertem Ku80-Protein wie oben beschrieben bestimmt.

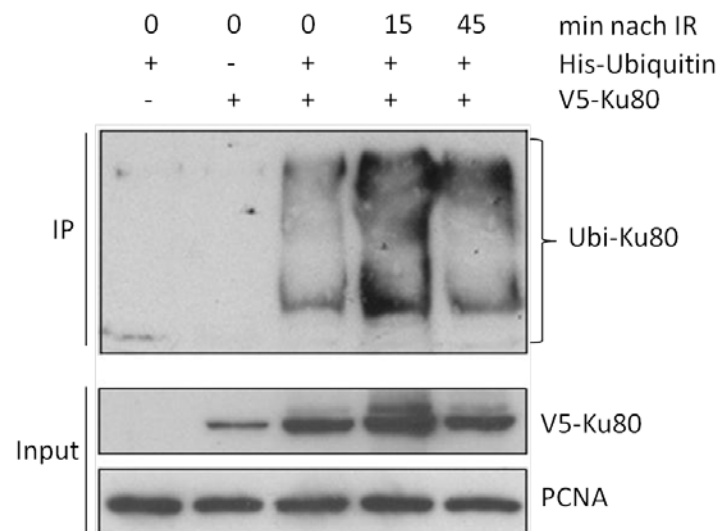


Abbildung 9: Die Ubiquitinierung von Ku80 wird durch ionisierende Strahlung verstärkt.

H1299-Zellen wurden entweder sowohl mit einer cDNA, welche für V5-Ku80 kodiert und einer cDNA, welche für His-Ubiquitin kodiert, oder nur mit einer cDNA, welche für V5-Ku80 kodiert, bzw. nur mit einer cDNA, die für His-Ubiquitin kodiert, transfiziert. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 5Gray bestrahlt und nach 0, 15min bzw. nach 45min geerntet. *IP*: 83% der Zellen werden mit 7ml Guanidinium-Lysispuffer lysiert und die ubiquitinierten Proteine über Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt. Die ubiquitinierten Proteine wurden von der Ni²⁺-NTA-Agarose eluiert, mittels eines 10% SDS-PAGE-Gels aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit 5% Magermilchlösung für 30min blockiert und anschließend mit einem Antikörper gegen das V5-Epitop 1,5h bei RT inkubiert. Der Antikörper wurde dafür in 5% Magermilchlösung 1:3000 verdünnt. Die PVDF-Membran wurde gegen einen ECL-Film exponiert und in einer Dunkelkammer entwickelt. *Input*: 17% der Zellen wurden lysiert und 50µg des zellulären Gesamtproteins wurden über ein 10% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit 5% Magermilchlösung für 30min blockiert und anschließend mit den Antikörpern gegen das V5-Epitop und gegen PCNA (Ladekontrolle) 1,5h bei RT inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in 5% Magermilchlösung (V5: 1:3000; PCNA: 1:50000). Die PVDF-Membran wurde gegen einen ECL-Film exponiert und in einer Dunkelkammer entwickelt.

Wie in Abbildung 9 zu sehen ist, zeigte sich bei diesem Experiment eine wesentlich stärkere Ubiquitinierung in bestrahlten, als in unbestrahlten Zellen.

In der ersten Spalte, in der nur His-markiertes Ubiquitin, aber kein V5-markiertes Ku80 transfiziert worden war, waren bei der IP keine höhermolekularen Banden zu sehen. In der zweiten Spalte, die ebenfalls als negative Kontrolle diente und bei der nur eine cDNA, die für V5-markiertes Ku80 kodiert, transfiziert worden war, aber keine, die für His-Ubiquitin kodiert, waren bei der IP gleichfalls keine Banden zu erkennen. In der dritten Spalte wurde das Zelllysate von Zellen aufgetrennt, die sowohl mit cDNAs, die für His-Ubiquitin kodieren als auch mit cDNAs, welche für V5-Ku80 kodieren, transfiziert worden waren. Hier sind

höhermolekulare Banden zu sehen, was eine Ubiquitinierung von Ku80 signalisiert. In der vierten Spalte wurde das Zelllysate von Zellen aufgetrennt, die sowohl mit cDNAs, die für His-Ubiquitin kodieren als auch mit cDNAs, welche für V5-Ku80 kodieren, transfiziert worden waren und die zusätzlich mit 5Gy bestrahlt und nach 15min geerntet worden waren. Hier zeigt sich eine stärkere Ubiquitinierung als in den Zellen, die zum Zeitpunkt „0“ geerntet worden sind. In der letzten Spalte ist das Lysat von Zellen aufgetrennt, die 45min nach Bestrahlung geerntet worden sind. Hier ist eine Abnahme des Signals für die höhermolekularen Banden von Ku80 zu sehen, was auf einen Rückgang der Ubiquitinierung von Ku80 hindeutet.

Bei der Input-Kontrolle ist zu sehen, dass das Gel gleichmäßig beladen worden war (PCNA als Ladekontrolle) und dass zumindest bei den letzten 3 Spalten auch annähernd gleiche Mengen der für Ku80-kodierenden cDNA transfiziert worden war.

3.3. Charakterisierung der Ubiquitinketten des Ku80-Proteins

Ein wesentlicher Teil der zellulären Proteine wird über das 26S Proteasom abgebaut. Um ein Protein zum Abbau zu markieren, wird es meist mit einer Ubiquitinkette markiert. Da auch das Ku80-Protein ubiquitiniert wird, wäre es somit denkbar, dass die Ubiquitinierung von Ku80 ein Signal zur Degradation des Proteins durch das Proteasom darstellt (Pickart and Fushman, 2004; Thrower *et al.*, 2000). Sollte dies der Fall sein, dann sollte eine Hemmung des Proteasoms zur Anreicherung des Ku80-Proteins führen.

Um die Möglichkeit, dass die Ubiquitinierung von Ku80 zu seiner Degradation führt, zu überprüfen, wurden H1299-Zellen mit dem Proteasomen-Inhibitor MG132 behandelt und die Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten geerntet.

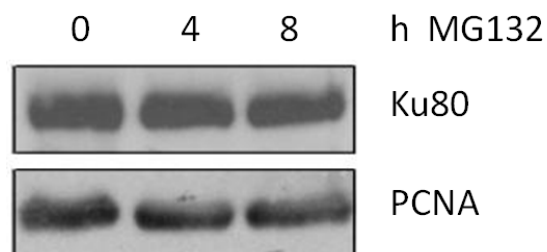


Abbildung 10: Ku80 ist kein Substrat für das 26S Proteasom.

H1299-Zellen wurden 24h nach dem Aussähen für die angegebene Zeit mit 10µM MG132 inkubiert und anschließend geerntet. Die Zellen wurden lysiert und 50µg des zellulären Gesamtproteins wurden über ein 12% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit 5% Magermilchlösung für 30min blockiert und anschließend mit Antikörpern gegen das Ku80-Protein und gegen PCNA (Ladekontrolle) 1,5h bei RT inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in 5% Magermilchlösung (Ku80 1:5000; PCNA 1:50000). Die PVDF-Membran wurde gegen einen ECL-Film exponiert und in einer Dunkelkammer entwickelt.

Wie in Abbildung 10 gezeigt ist, war jedoch selbst 8h nach Zugabe des Proteasomen-Inhibitors keine Zunahme des Signals für das Ku80 Protein und somit keine Anreicherung von Ku80 zu beobachten (Abbildung 10). PCNA diente als Ladekontrolle und zeigt, dass das Gel annähernd gleichmäßig beladen worden war. Entsprechend diesem Ergebnis ist es eher unwahrscheinlich, dass Ku80 durch das 26S Proteasom abgebaut wird.

Proteine, die über das Proteasom abgebaut werden, werden üblicherweise über Ubiquitinketten, welche über Lysin 48 des Ubiquitin-Proteins verknüpft werden, markiert (Pickart and Fus hman, 2004; Thrower *et al.*, 2000). Das Ubiquitin-Protein besitzt jedoch neben Lysin 48 noch sechs weitere Lysine (Lysin 6, Lysin 11, Lysin 27, Lysin 29, Lysin 33 und Lysin 63), an die Ubiquitin-Proteine kovalent angebunden werden können. So können Ubiquitinketten entstehen, die über ganz unterschiedliche Lysine verknüpft sind. Besonders bekannt sind neben der Verknüpfung über Lysin 48, auch Verknüpfungen über Lysin 63, welche häufiger an Proteinen, welche an der DNA Reparatur beteiligt sind, nachgewiesen wurden (Huang and D'Andrea, 2006; Kolas *et al.*, 2007).

Da Ku80 ubiquitiniert wird, an der DNA Reparatur beteiligt ist und nicht über das 26S Proteasom abgebaut wird, stellte sich die Frage, ob die Lysine 48 bzw. 63 des Ubiquitin-Proteins an der Ubiquitinierung von Ku80 beteiligt sind.

Um diese Frage zu beantworten wurden SKOV3-Zellen mit cDNAs, die für V5-Ku80 und Wildtyp His-Ubiquitin bzw. für Ubiquitin-Mutanten kodieren, transfiziert. Beim Wildtyp Ubiquitin sind alle Lysine vorhanden und eine Verknüpfung der Ubiquitinketten ist über jedes der Lysine möglich. Bei den Mutanten handelt es sich um Konstrukte, bei denen entweder nur das Lysin an der Position 48 durch ein Arginin (K48R-Mutante) ersetzt worden war (Abbildung 11A) oder alle Lysine, außer das an Position 48 (K48only-Mutante), durch Arginin ersetzt worden waren (Abbildung 11B). Durch das Ersetzen des Lysins an Position 48 durch Arginin, kann dieses keine weiteren Verknüpfungen mit anderen Lysinen eingehen und eine Kettenbildung über dieses Lysin ist ausgeschlossen. Bei der K48only-Mutante ist eine Kettenbildung nur noch über das Lysin 48 möglich, da alle anderen Lysine ersetzt wurden. Das gleiche Prinzip gilt für die K63-Mutante. Eine Ausnahme bildet die K0-Mutante (K0). Hier wurden alle Lysine durch Arginin ersetzt. An diese K0-Mutante können keine weiteren Ubiquitinmoleküle mehr angeknüpft werden und eine Kettenbildung ist ausgeschlossen. Mit dieser Mutante lässt sich klären, ob die Ubiquitinierung durch eine multi-Monoubiquitinierung verursacht wird, d.h. ob mehrere einzelne Ubiquitinmoleküle auf verschiedene Lysine des Substrats übertragen werden.

48h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 5Gray bestrahlt. 2h nach der Bestrahlung wurden 10µM MG132 zugegeben. Nach weiteren 4 Stunden wurden die Zellen geerntet und

lysiert. Die ubiquitinierten Proteine im Zelllysat werden über Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt und über SDS-PAGE aufgetrennt. Mittels Western Blotting wurde die Menge des ubiquitinierten Ku80-Proteins bestimmt.

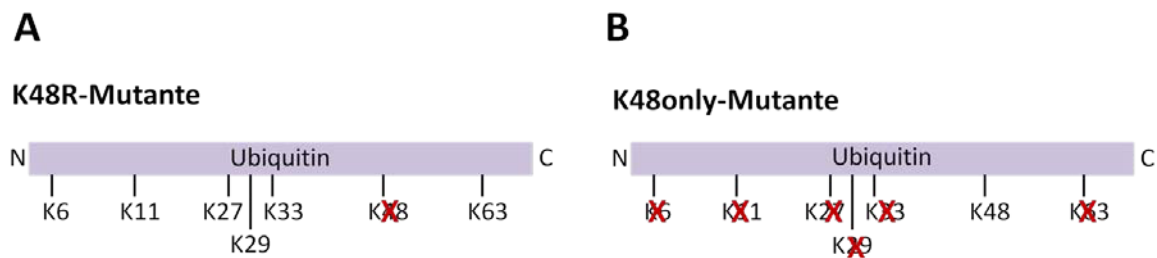


Abbildung 11: Schematische Darstellung der K48R und K48only Ubiquitin-Mutanten.

(A) Bei der K48R-Mutante wurde nur das Lysin an der Position 48 durch ein Arginin ersetzt. Damit können keine Ubiquitinketten mehr gebildet werden, welche über Lysin48 verknüpft sind. (B) Bei der K48only-Mutante wurden alle Lysine, außer das an Position 48, durch ein Arginin ersetzt. Eine Verknüpfung der Ubiquitin-Moleküle ist damit nur noch über das Lysin an der Position 48 möglich.

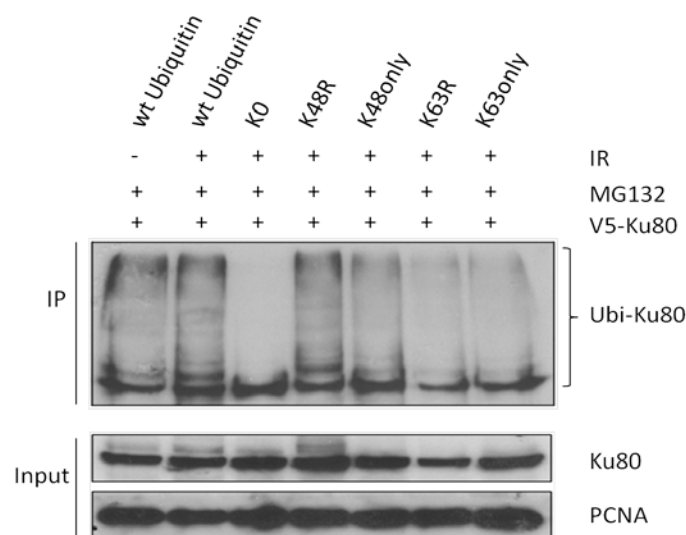


Abbildung 12: Untersuchung des Ku80-Proteins auf K48- und K63-Ubiquitinketten.

SKOV3-Zellen wurden mit cDNAs, die für V5-markiertes Ku80 und His-markiertes Wildtyp Ubiquitin oder für die entsprechenden Mutanten kodieren, transfiziert. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 5Gy bestrahlt. 2h später wurden 10µM MG132 zugegeben. Nach weiteren 4 Stunden wurden die Zellen geerntet. *IP*: 83% der Zellen werden mit 7ml Guanidinium-Lysispuffer lysiert und die ubiquitinierten Proteine über Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt. Die ubiquitinierten Proteine wurden eluiert, mittels einer 10% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit 5% Magermilchlösung für 30min blockiert und anschließend mit dem Antikörper gegen das V5-Epitop 1,5h bei RT inkubiert. Der Antikörper wurde in 5% Magermilchlösung 1:3000 verdünnt. Nach Inkubation mit einem zweiten, HRP-gekoppelten anti-Maus Antikörper wurde die Membran gegen einen ECL-Film exponiert und in einer Dunkelkammer entwickelt. *Input*: 17% der Zellen wurden lysiert und 50µg des zellulären Gesamtproteins wurden über ein 10% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit 5% Magermilchlösung für 30min blockiert und anschließend mit den Antikörpern gegen das V5-Epitop und PCNA (Ladekontrolle) 1,5h bei RT inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in 5% Magermilchlösung (V5 1:3000; PCNA 1:50000). Nach Inkubation mit einem zweiten, HRP-gekoppelten anti-Maus Antikörper wurde die Membran gegen einen ECL-Film exponiert und in einer Dunkelkammer entwickelt.

In Abbildung 12 sieht man in Gegenwart des Wildtyp Ubiquitins deutlich höhermolekulare Banden des Ku80-Proteins, die darauf hinweisen, dass zumindest ein Teil des Ku80-Proteins in diesen Ansätzen ubiquitiniert vorlag. Da ein Ansatz unbestrahlt blieb, und in beiden Spuren die höhermolekulare Banden eine gleiche Intensität aufweisen, war 6h Stunden nach Bestrahlung kein Unterschied zwischen der bestrahlten und der unbestrahlten Probe festzustellen. Bei den Zellen, deren Lysat in der dritten Spur analysiert wurde, wurden cDNAs, welche für die K0-Ubiquitinmutante und für V5-Ku80 kodieren, ko-transfiziert. Hier zeigen sich keine höhermolekularen Banden. Damit ist eine multi-Monoubiquitinierung des Ku80-Proteins auszuschließen. In der vierten Spur ist wiederum eine starke Ubiquitinierung des Ku80 Proteins zu erkennen. Da hier die cDNA, welche für die K48R-Mutante transfiziert zusammen mit der cDNA, welche für V5-Ku80 kodiert, transfiziert worden war, bedeutet dies, dass trotz der Mutation des Lysins an Position 48, immer noch Ubiquitinketten am Ku80 Protein gebildet werden. Passend dazu ist in der fünften Spur, wo Zelllysat von Zellen analysiert wurde, die mit einer cDNA transfiziert worden war, die für die K48only-Mutante kodiert, nur eine schwache Ubiquitinierung des Ku80-Proteins zu erkennen. In den letzten beiden Spuren wurde Zelllysat von Zellen aufgetrennt, die mit cDNAs transfiziert worden waren, welche für die K63R bzw. mit der K63only Mutante, zusammen mit einer cDNA, welche für das Ku80-Protein kodiert, transfiziert worden waren. In beiden Fällen war nur eine sehr schwache Ubiquitinierung zu beobachten.

Der Input zeigt eine gleichmäßige Expression des ko-transfizierten V5-Ku80-Plasmids an.

Um genau zu untersuchen, über welches Lysin die Ubiquitin-Moleküle bei der Ubiquitinierung des Ku80-Proteins miteinander verbunden werden, wurde dieser Versuch erweitert und Mutanten aller Lysine analysiert. Dabei wurden Zellen neben einer cDNA, welche für Ku80 kodiert, einmal mit cDNAs transfiziert, bei denen Lysin 7, 11, 27, 29, 33, 48 oder 63 durch Arginin ersetzt wurde (K7R, K11R, K27R, K29R, K33R, K48R, K63R), (Abbildung 11A) und zum anderen mit cDNAs, welche für Ubiquitin-Mutanten kodieren, bei denen alle Lysine, außer die an Position 7, 11, 27, 29, 33, 48 oder 63, durch ein Arginin ersetzt wurden (K7only, K11only, K27only, K29only, K33only, K48only, K63only) (Abbildung 11B). Zusätzlich wurde nochmals die cDNA, die für die K0-Ubiquitinmutante kodiert, zusammen mit der cDNA, welche für Ku80 kodiert, transfiziert. Zum Vergleich wurde außerdem eine cDNA, die für Wildtyp Ubiquitin (wt) kodiert, zusammen mit einer cDNA, die für Ku80 kodiert, transfiziert. 48h Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 4h mit 10µM MG132 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die ubiquitinierten Proteine im Zelllysat wurden über Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt und über SDS-PAGE aufgetrennt. Mittels Western Blotting wurde die Menge des ubiquitinierten Ku80-Proteins bestimmt. (Abbildung 13).

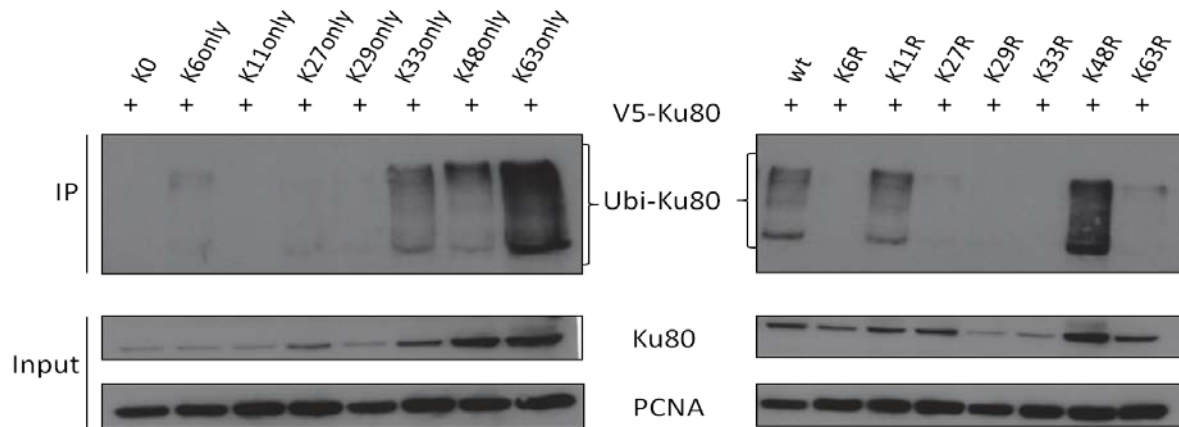


Abbildung 13: Charakterisierung der Ubiquitinketten des Ku80-Proteins.

H1299-Zellen wurden mit cDNAs, welche für das V5-Ku80 Protein und für His-Ubiquitin oder die entsprechenden Mutanten kodieren, ko-transfiziert und 48h später geerntet 4h vor der Ernte wurden die Zellen mit 10µM MG132 inkubiert. *IP*: 83% der Zellen wurden mit 7ml Guanidinium-Lysispuffer lysiert und die ubiquitinierten Proteine über Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt. Die ubiquitinierten Proteine wurden eluiert, mittels einer 10% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit 5% Magermilchlösung für 30min blockiert und anschließend mit einem Antikörper gegen das V5-Epitop 1,5h bei RT inkubiert. Der Antikörper wurde in 5% Magermilchlösung 1:3000 verdünnt. Nach Inkubation mit einem zweiten, HRP-gekoppelten anti-Maus Antikörper wurde die Membran gegen einen ECL-Film exponiert und in einer Dunkelkammer entwickelt. *Input*: 17% der Zellen wurden lysiert, 50µg des zellulären Gesamtproteins über ein 10% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit 5% Magermilchlösung für 30min blockiert und anschließend mit Antikörpern gegen das V5-Epitop und PCNA (Ladekontrolle) 1,5h bei RT inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in 5% Magermilchlösung (V5 1:3000; PCNA 1:50000). Nach Inkubation mit einem zweiten, HRP-gekoppelten anti-Maus Antikörper wurde die Membran gegen einen ECL-Film exponiert und in einer Dunkelkammer entwickelt.

Wie bereits in Abbildung 12 zu sehen war, waren nach Transfektion von Zellen mit cDNAs welche für V5-Ku80 und His-Ubiquitin (wt) kodieren, höhermolekulare Banden des Ku80 Proteins zu erkennen, die auf eine Ubiquitinierung des Ku80-Proteins hindeuten. Im Gegensatz dazu war bei Zellen, welche mit einer cDNA transfiziert worden waren, die für die K0-Ubiquitinmutante kodierte, wie auch in Abbildung 12 gezeigt, keine Ubiquitinierung mehr zu erkennen. Bei Zellen, welche mit einer cDNA transfiziert worden waren, welche für die K6only-Ubiquitinmutante kodiert, ist eine sehr schwache Ubiquitinierung zu beobachten, während bei Zellen, welche mit einer cDNA transfiziert worden waren, die für die K6R-Ubiquitinmutante kodiert, keine höhermolekularen Banden für das Ku80 Protein sichtbar sind. Zellen, welche mit einer cDNA transfiziert worden waren, die für die K33only-Ubiquitinmutante kodiert, zeigten hingegen eine deutliche Ubiquitinierung des Ku80-Proteins während dies bei Zellen, welche mit einer cDNA transfiziert worden waren, die für die K33R-Ubiquitinmutante kodiert, nicht zu erkennen ist. In Gegenwart der Ubiquitinmutante, bei der nur das Lysin an Position 63 vorhanden ist (K63only), fand eine sehr starke und deutliche Ubiquitinierung des Ku80-Proteins statt. Im Gegensatz dazu war in Gegenwart der K63R-Ubiquitinmutante das Ku80 Protein kaum ubiquitiniert. In Gegenwart der K48R-Ubiquitinmutante sowie in Gegenwart der K48only Ubiquitinmutante war die Ubiquitinierung

von Ku80 deutlich zu sehen wobei die Ubiquitinierung des Ku80 Proteins in Gegenwart der K48only-Ubiquitinmutante jedoch deutlich schwächer war als in Gegenwart der K48R-Mutante.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die Ubiquitinierung des Ku80-Proteins die Lysine an der Position 33 und 63 des Ubiquitins am wichtigsten sind.

3.4. Kartierung der Ubiquitinierungsstelle von Ku80

Um die physiologische Bedeutung der Ubiquitinierung von Ku80 zu untersuchen, ist es notwendig, das Lysin, welches ubiquitiniert wird, zu identifizieren. Nach der Identifizierung ist es dann möglich, die Ubiquitinierungsstelle durch ein Arginin zu ersetzen, sodass die E3-Ubiquitin-Ligase dann nicht mehr in der Lage ist, Ubiquitin-Moleküle kovalent an diese Stelle des Substrats zu binden.

Um auf die Domäne schließen zu können, in welcher das Ku80-Protein ubiquitiniert wird, wurden zunächst verschiedene Fragmente kloniert. Dafür wurde das Gesamtprotein vom Ende her immer weiter verkürzt. Damit die Funktion der Domänen weitestgehend erhalten blieb, wurde die native Domänenstrukturierung und -aufteilung des Ku80-Proteins entsprechend der Pfam-Datenbank V23 (Finn *et al.*, 2010) berücksichtigt (Abbildung 14).



Abbildung 14: Schematische Darstellung der angefertigten Fragmente des Ku80-Proteins.

Ku80 zeigt das Gesamtprotein mit den vier Domänen (Aminosäure 1-732); Bei dem Ku80_KuC Fragment (Aminosäure 1-588) wurde die vierte Domäne entfernt: Bei dem Ku80_Ku Fragment (Aminosäure 1-460) wurde neben der vierten Domäne auch die Ku_C-Domäne entfernt. Bei dem Ku80_KuN Fragment (Aminosäure 1-244) ist nur noch die N-terminale Domäne vorhanden.

Die so erhaltenen Fragmente wurden anschließend auf eine mögliche Ubiquitinierung untersucht. Dazu wurden H1299-Zellen mit einer cDNA transfiziert, die für His-markiertes Ubiquitin und für V5-Ku80 (wt) bzw. für die klonierten Fragmente kodiert. Nach 48h wurden die Zellen für 4h mit 10µM des Proteasomen-Inhibitors MG132 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die ubiquitinierten Proteine im Zelllysat wurden über Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt und durch eine 12% SDS-PAGE aufgetrennt. Durch Western

Blotting wurde dann die Menge des vorhandenen Ku80-Proteins, bzw. der resultierenden Ku80 Proteinfragmente bestimmt.

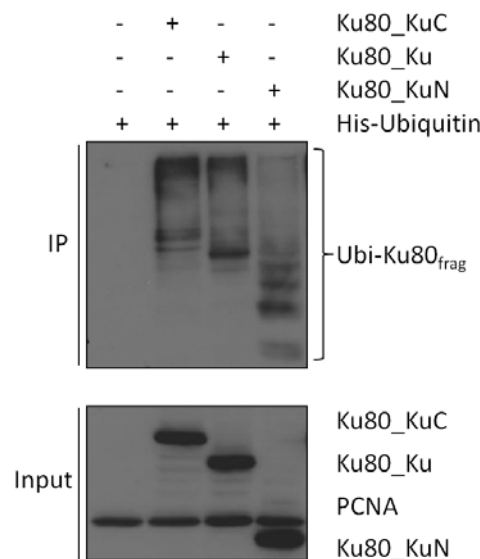


Abbildung 15: Der N-Terminus des Ku80 Proteins wird ubiquitiniert.

H1299-Zellen wurden mit cDNAs ko-transfiziert, welche für His-markiertes Ubiquitin sowie für Ku80_kuC, Ku80_Ku oder für Ku80_KuN kodieren. Nach 48h wurden die Zellen für 4h mit 10µM MG132 inkubiert und anschließend geerntet. *IP*: 83% der Zellen wurden mit 7ml Guanidinium-Lyspuffer lysiert und die ubiquitinierten Proteine über Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt. Die ubiquitinierten Proteine wurden eluiert und mittels einer 12% SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine werden auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit 5% Magermilchlösung für 30min blockiert und anschließend mit dem Antikörper gegen das V5-Epitop 1,5h bei RT inkubiert. Der Antikörper wurde in 5% Magermilchlösung 1:3000 verdünnt. Nach Inkubation mit einem zweiten, HRP-gekoppelten anti-Maus Antikörper wurde die Membran gegen einen ECL-Film exponiert und in einer Dunkelkammer entwickelt. *Input*: 17% der Zellen wurden lysiert und 50µg des zellulären Gesamtproteins wurden über ein 10% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit 5% Magermilchlösung für 30min blockiert und anschließend mit Antikörpern gegen das V5-Epitop und PCNA (Ladekontrolle) 1,5h bei RT inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in 5% Magermilchlösung (V5: 1:3000; PCNA: 1:50000). Nach Inkubation mit einem zweiten, HRP-gekoppelten anti-Maus Antikörper wurde die Membran gegen einen ECL-Film exponiert und in einer Dunkelkammer entwickelt.

Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, wurden alle drei Fragmente des Ku80-Proteins ubiquitiniert. Da die Fragmente vom C-Terminus her verkürzt worden waren, ist aus diesem Ergebnis zu schlussfolgern, dass die Ubiquitinierungsstelle in den N-terminalen 244 Aminosäuren liegen muss.

Nachdem bei allen drei Fragmenten noch eine Ubiquitinierung zu erkennen war, wurde das kürzeste Fragment (Ku80_KuN) für eine genauere Kartierung der Ubiquitinierungsstelle noch weiter verkürzt (Abbildung 16) und das daraus resultierende Protein auf seine Ubiquitinierung getestet. Dazu wurden H1299-Zellen mit cDNAs transfiziert, die für His-markiertes Ubiquitin und für V5-Ku80 (wt) bzw. für die Fragmente Ku80_KuN1 und Ku80_KuN2 kodieren. Nach 48h wurden die Zellen für 4h mit 10µM des Proteasomen-Inhibitors MG132 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die

ubiquitinierten Proteine wurden über Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt und durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Durch Western Blotting wurde anschließend die Menge des ubiquitinierten Ku80-Proteins, bzw. der entsprechenden Ku80-Proteinfragmente, bestimmt.



Abbildung 16: Schematische Darstellung der klonierten N-terminalen Fragmente des Ku80-Proteins.

Das Ku80_KuN-Fragment umfasst den N-terminalen Bereich von AS 1 bis AS 244. Das Fragment Ku80_KuN2 besteht aus AS 1-168 und das Fragment Ku80_KuN1 aus AS 1-109 des Ku80 Proteins.

Wurde sowohl eine cDNA, die für V5-Ku80 kodiert zusammen mit einer cDNA, welche für His-markiertes Ubiquitin kodiert ko-transfiziert, waren wiederum deutlich höhermolekulare Banden zu erkennen, was eine Ubiquitinierung des Ku80-Proteins anzeigt. Nach Ko-Transfektion einer cDNA, die für His-Ubiquitin und das Ku80_KuN2-Fragment kodiert (zweite Spur) war ebenso eine deutliche Ubiquitinierung zu beobachten. Wurde hingegen kein His-markiertes Ubiquitin ko-transfiziert, konnten keine ubiquitinierten Proteine nachgewiesen werden. Während die Expression der V5-Ku80 und der V5-Ku80_KuN2 cDNAs deutlich nachweisbar waren, wurde das Ku80_KuN1-Fragment nicht exprimiert (Input). Damit ist auch keine Aussage über die Ubiquitinierung des kleinsten klonierten Fragments möglich.

Da in dem N2-Fragment (AS 1-168) des Ku80-Proteins, welches noch ubiquitiniert wurde, noch 11 Lysine vorhanden waren (Abbildung 18), reichte die Klonierung von kleineren Fragmenten von Ku80 nicht aus, um die Ubiquitinierungsstelle zu identifizieren. Deshalb wurden in das N2 Fragment Punktmutationen eingeführt. Die Mutagenese erfolgte kumulativ, was bedeutet, dass, beginnend bei Lysin 7, bei jeder Mutationsrunde ein weiteres Lysin durch Arginin ersetzt wurde. Da die Lysine an den Positionen 35/36, 125/126/129 und 155/156, sehr nahe beieinander liegen, wurden diese innerhalb jeweils einer Mutationsrunde mutiert.

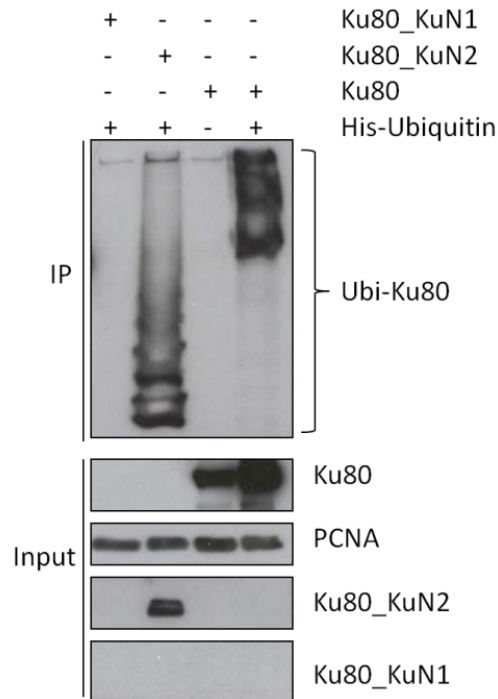


Abbildung 17: Das Ku80_KuN2-Fragment wird ubiquitiniert.

H1299-Zellen wurden mit cDNAs ko-transfiziert, welche für His-markiertes Ubiquitin, sowie für Ku80_KuN1, Ku80_KuN2 oder für Ku80 kodieren. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen für 4h mit 10µM MG132 inkubiert und anschließend geerntet. *IP*: 83% der Zellen wurden mit 7ml Guanidinium-Lysispuffer lysiert und die ubiquitinierten Proteine über Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt. Die ubiquitinierten Proteine wurden eluiert, mittels einer 12% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit 5% Magermilchlösung für 30min blockiert und anschließend mit dem Antikörper gegen das V5-Epitop 1,5h bei RT inkubiert. Der Antikörper wurde in 5% Magermilchlösung 1:3000 verdünnt. Nach Inkubation mit einem zweiten, HRP-gekoppelten anti-Maus Antikörper wurde die Membran gegen einen ECL-Film exponiert und in einer Dunkelkammer entwickelt. *Input*: 17% der Zellen wurden lysiert und 50µg des zellulären Gesamtproteins wurden über ein 15% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit 5% Magermilchlösung für 30min blockiert und anschließend mit Antikörpern gegen das V5-Epitop und PCNA (Ladekontrolle) 1,5h bei RT inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in 5% Magermilchlösung (V5: 1:3000; PCNA: 1:50000). Nach Inkubation mit einem zweiten, HRP-gekoppelten Antikörper wurde die Membran gegen einen ECL-Film exponiert und in einer Dunkelkammer entwickelt.

Um zu untersuchen, welche der Ku80_KuN2-Fragmente, bei denen eine zunehmende Anzahl von Lysinen durch Arginin ersetzt worden waren, noch ubiquitiniert werden, wurden H1299-Zellen mit cDNAs, welche für Histidin-markiertes Ubiquitin und die entsprechende Punktmutante des Ku80_KuN2-Fragments kodieren, ko-transfiziert. Als positive Kontrolle wurde eine cDNA, welche für das wt Ku80_KuN2-Fragment kodiert, mit einer cDNA, welche für Histidin-markiertes Ubiquitin kodiert, ko-transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen 4h mit 10µM MG132 inkubiert um das Proteasom zu inhibieren und anschließend lysiert. Die ubiquitinierten Proteine wurden über Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt, durch eine 12% SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde die Menge an ubiquitiniertem Ku80_KuN2 Protein bestimmt.

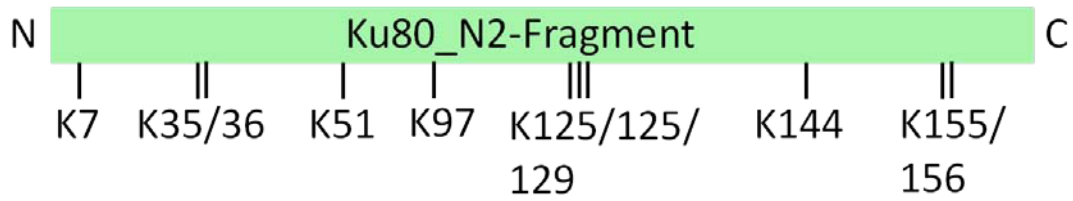


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Verteilung der Lysine im Ku80_KuN2-Fragment. Das Ku80_KuN2-Fragment (AS 1-168) enthält 11 Lysine. Die Zahlen bei den eingezeichneten Lysinen (K) bezeichnen die Position im Fragment.

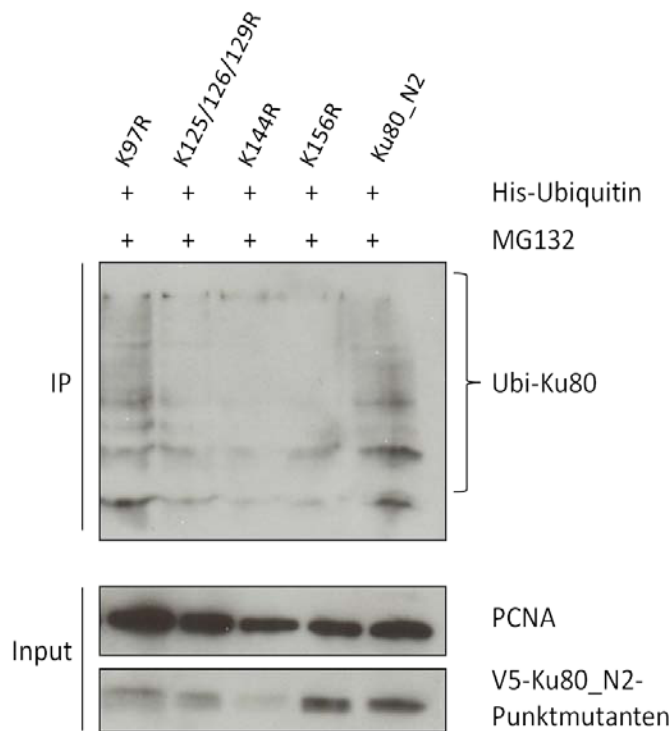


Abbildung 19: Die Ubiquitinierung der Ku80_K125/126/129R-Punktmutante ist deutlich reduziert.

H1299-Zellen wurden mit cDNAs ko-transfiziert, welche für His-markiertes Ubiquitin, sowie für das Wildtyp Ku80_KuN2-Fragmente oder für die angegebenen Mutanten kodieren. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen für 4h mit 10µM MG132 inkubiert und anschließend geerntet. *IP*: 83% der Zellen wurden mit 7ml Guanidinium-Lysis-puffer lysiert und die ubiquitinierten Proteine über Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt. Die ubiquitinierten Proteine wurden eluiert, mittels einer 12% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit 5% Magermilchlösung für 30min blockiert und anschließend mit einem Antikörper gegen das V5-Epitop 1,5h bei RT inkubiert. Der Antikörper wurde in 5% Magermilchlösung 1:3000 verdünnt. Nach Inkubation mit einem zweiten, HRP-gekoppelten Antikörper wurde die Membran gegen einen ECL-Film exponiert und in einer Dunkelkammer entwickelt. *Input*: 17% der Zellen wurden lysiert und 50µg des zellulären Gesamtproteins wurden über ein 12% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit 5% Magermilchlösung für 30min blockiert und anschließend mit Antikörpern gegen das V5-Epitop und PCNA (Ladekontrolle) 1,5h bei RT inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in 5% Magermilchlösung (V5: 1:3000; PCNA: 1:50000). Nach Inkubation mit einem zweiten, HRP-gekoppelten Antikörper wurde die Membran gegen einen ECL-Film exponiert und in einer Dunkelkammer entwickelt.

Wie bereits in Abbildung 15 und 17 gezeigt, wird das Ku80_KuN2-Fragment in Gegenwart von Ubiquitin deutlich ubiquitiniert. Diese Ubiquitinierung ist selbst dann noch nachweisbar, wenn die Lysine 7, 35/36, 51 s owie 97 dur ch Arginin ersetzt sind. Werden hingegen zusätzlich die Lysine 125/126 und 129 m utiert, so ist die Ubiquitinierung wesentlich schwächer. Auch wenn zusätzlich noch Lysin 144 bzw. Lysin 144 und Lysin 156 mutiert wurden war die Ubiquitinierung des Ku80_KuN2 Fragments deutlich reduziert (Abbildung 19).

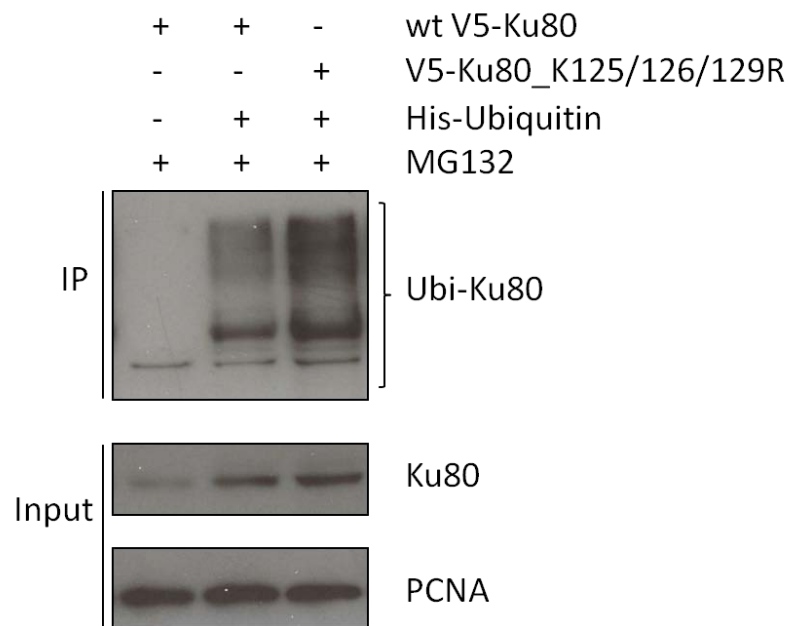


Abbildung 20: Die Lysine 125/126/129 sind nicht alleine für die Ubiquitinierung des Ku80-Proteins verantwortlich.

H1299-Zellen wurden mit cDNAs ko-transfiziert, welche für His-markiertes Ubiquitin und Wildtyp V5-Ku80 oder für V5-Ku80, bei dem die Lysine K125, 126 und 129 durch Arginin ersetzt wurden, kodieren. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen für 4h mit 10µM MG132 inkubiert und anschließend geerntet. *IP*: 83% der Zellen wurden mit 7ml Guanidinium-Lysispuffer lysiert und die ubiquitinierten Proteine über Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt. Die ubiquitinierten Proteine wurden eluiert, mittels einer 10% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit 5% Magermilchlösung für 30min blockiert und anschließend mit einem Antikörper gegen das V5-Epitop 1,5h bei RT inkubiert. Der Antikörper wurde in 5% Magermilchlösung 1:3000 verdünnt. Nach Inkubation mit einem zweiten, HRP-gekoppelten Antikörper wurde die Membran gegen einen ECL-Film exponiert und in einer Dunkelkammer entwickelt. *Input*: 17% der Zellen wurden lysiert und 50µg des zellulären Gesamtproteins wurden über ein 12% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit 5% Magermilchlösung für 30min blockiert und anschließend mit Antikörpern gegen das V5-Epitop und PCNA (Ladekontrolle) 1,5h bei RT inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in 5% Magermilchlösung (V5: 1:3000; PCNA: 1:50000). Nach Inkubation mit einem zweiten, HRP-gekoppelten Antikörper wurde die Membran gegen einen ECL-Film exponiert und in einer Dunkelkammer entwickelt.

Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass eines der drei Lysine (K125/K126/K129) oder möglicherweise auch alle drei, im Ku80-N2 Fragment ubiquitiniert wird. Zur Überprüfung, ob dies auch im Gesamtprotein der Fall ist oder ob es dort noch weitere Lysine gibt, die für die Ubiquitinierung verantwortlich sind, wurden im Ku80-Gesamtprotein die Lysine an den Positionen 125, 126 und 129 durch Arginin ersetzt. Die cDNA der Mutante wurde zusammen

mit einer cDNA, die für His-markiertes Ubiquitin kodiert, in H1299-Zellen ko-transfiziert und auf eine mögliche Ubiquitinierung getestet. Als positive Kontrolle wurde eine cDNA, die für das Wildtyp Ku80-Gesamtprotein kodiert, zusammen mit einer cDNA, die für His-markiertes Ubiquitin kodiert, ko-transfiziert. Als negative Kontrolle wurde eine cDNA, welche für Ku80 kodiert, zusammen mit dem pcDNA3.1-Vektor k-transfiziert. Die cDNA, welche für His-Ubiquitin kodiert, wurde dabei weggelassen.

Aus Abbildung 20 geht hervor, dass nach dem Austausch der Lysine 125, 126 und 129 durch Arginin (dritte Spur), das Ku80 Protein noch immer in gleichem Umfang ubiquitiniert wird wie das Wildtyp Ku80 Protein (zweite Spur).

Die Expressions-Kontrolle (Input) zeigt, dass das annähernd gleiche Mengen der für Ku80-kodierenden cDNA transfiziert worden waren.

Dies Ergebnis führt zu dem Schluss, dass die Lysine an den Positionen 125, 126 und 129 nicht alleine für die Ubiquitinierung des Ku80-Gesamtproteins verantwortlich sind.

3.5. Die Gegenwart von BRCA1 und RNF8 verstärkt die Ubiquitinierung des Ku80-Proteins

Ku80 ist mit Ubiquitinketten, die über Lysin 63 miteinander verbunden sind, modifiziert. Ein bekanntes Protein mit einer N-terminalen RING-Domäne, ist das *Breast cancer type 1 susceptibility protein* (BRCA1). BRCA1 ist eine E3-Ligase, die sowohl über Lysin 63 verbundene Ubiquitinketten herstellt, als auch an der Homologen Rekombination, der Nicht-homologen Endverknüpfung, der Transkriptions-gekoppelten Reparatur und der durch Mikrohomologie-vermittelten Endverknüpfung beteiligt ist (Abbott *et al.*, 1999; Baldeyron *et al.*, 2002; Lorick *et al.*, 1999; Moynahan *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001; Zhong *et al.*, 2002a; Zhong *et al.*, 2002b). Mutationen im BRCA1-Gen gehen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit einher, an Brust- oder Eierstockkrebs zu erkranken (Easton *et al.*, 1993). Es stellte sich deshalb die Frage, ob BRCA1 möglicherweise eine E3-Ubiquitin-Ligase für das Ku80-Protein sein könnte. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden H1299-Zellen mit cDNAs, welche für V5-Ku80, His-Ubiquitin und BRCA1 kodieren, bzw. mit dem pcDNA3.1-Vektor, ko-transfiziert. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen für 4h mit 10µM MG132 inkubiert und anschließend lysiert. Die ubiquitinierten Proteine wurden über Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt, durch eine 10% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Anschließend wurde die Menge an ubiquitiniertem Ku80 mittels Western Blotting bestimmt.

In Abbildung 21 wurden in der ersten Spur Zelllysate analysiert, bei denen nur eine cDNA für His-markiertes Ubiquitin und der pcDNA3.1-Vektor transfiziert worden waren. Hier sind entsprechend keine höhermolekularen Banden von Ku80 zu erkennen. In der zweiten Spur wurden cDNAs, welche für His-markiertes Ubiquitin und für V5-Ku80 kodieren, sowie der pcDNA3.1-Vektor, ko-transfiziert. Wie bereits in Abbildung 8 gezeigt, ist das Ku80-Protein in diesen Zellen konstitutiv ubiquitiniert. In der dritten Spur wurde das Zelllysate von Zellen aufgetrennt, in die neben der cDNA für His-Ubiquitin und V5-Ku80 noch zusätzlich die cDNA, welche für BRCA1 kodiert, ko-transfiziert wurde. Dabei führte die Expression von BRCA1 zu einer deutlichen Verstärkung der Ubiquitinierung von Ku80 (Abbildung 21).

Die Expressionskontrolle (Input) zeigt an, dass die mit einer für Ku80 kodierenden cDNA transfizierten Zellen vergleichbare Mengen der transfizierten cDNA exprimieren.

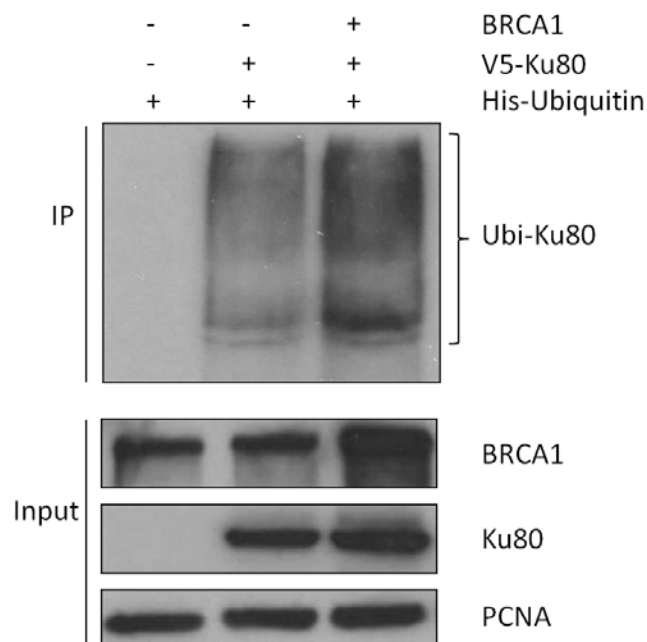


Abbildung 21: Die Gegenwart von BRCA1 verstärkt die Ubiquitinierung des Ku80-Proteins.

H1299-Zellen wurden mit cDNAs, welche für V5-Ku80, His-Ubiquitin oder BRCA1 kodieren, bzw. mit dem pcDNA3.1-Vektor transfiziert. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen 4h mit 10µM MG132 inkubiert und anschließend geerntet. *IP*: 83% der Zellen wurden mit 7ml Guanidinium-Lysispuffer lysiert und die ubiquitinierten Proteine über Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt. Die ubiquitinierten Proteine wurden eluiert, mittels einer 10% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit 5% Magermilchlösung für 30min blockiert und mit PBS/0,2% Tween gewaschen. Die Inkubation der Membran mit dem Antikörper gegen das V5-Epitop (1:3000), erfolgte in DMEM mit 10% FCS und 1% Penizillin/Streptomycin über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad. Nach Inkubation mit einem zweiten, HRP-gekoppelten Antikörper wurde die Membran gegen einen ECL-Film exponiert und in einer Dunkelkammer entwickelt. *Input*: 17% der Zellen wurden lysiert und 50µg des zellulären Gesamtproteins wurden über ein 10% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit 5% Magermilchlösung für 30min blockiert und mit PBS/0,2% Tween gewaschen. Die Inkubation der Membran mit den Antikörpern gegen das V5-Epitop (1:3000), BRCA1 (1:500) und PCNA (Ladekontrolle; 1:50000) erfolgte in DMEM mit 10% FCS und 1% Penizillin/Streptomycin über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad. Nach Inkubation mit einem zweiten, HRP-gekoppelten Antikörper wurde die Membran gegen einen ECL-Film exponiert und in einer Dunkelkammer entwickelt.

Um zu untersuchen, ob BRCA1 eine physiologische Relevanz bei der Ubiquitinierung von Ku80 hat, wurden Zellen entweder mit einer Kontroll siRNA oder mit siRNA, die gegen BRCA1 gerichtet ist, transfiziert. Zusätzlich wurden noch cDNAs, die für His-markiertes Ubiquitin und für mit einem V5-Epitop-markiertem Ku80 kodieren, transfiziert. 96h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und anschließend lysiert. Die ubiquitinierten Proteine wurden über Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt und durch eine 10% SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde die Menge an ubiquitiniertem Ku80 durch Western Blotting bestimmt.

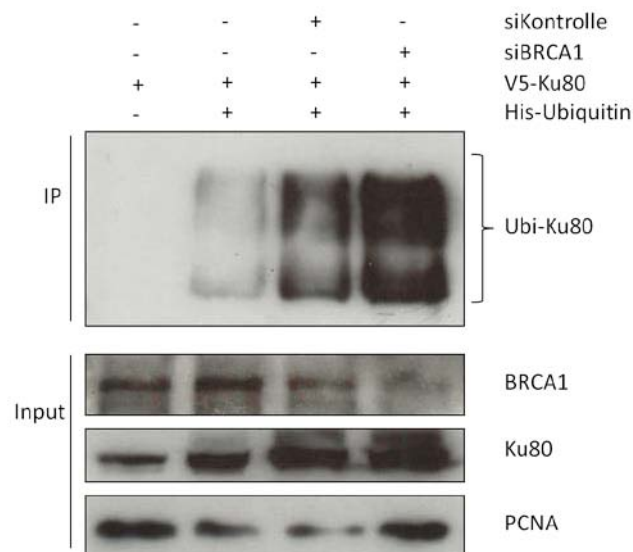


Abbildung 22: Die Verminderung der BRCA1 Menge führt nicht zu einer verminderten Ku80 Ubiquitinierung.

H1299-Zellen wurden mit einer cDNA, die für His-Ubiquitin und, wo angegeben, mit einer cDNA, die für V5-Ku80 kodiert, transfiziert. Zusätzlich wurden, wo angegeben, 800pmol einer gegen BRCA1 gerichteten siRNA bzw. einer Kontroll siRNA ko-transfiziert. 96h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet. *IP*: 83% der Zellen wurden mit 7ml Guanidinium-Lysisbuffer lysiert und die ubiquitinierten Proteine über Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt. Die ubiquitinierten Proteine wurden eluiert, mittels einer 10% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit 5% Magermilchlösung für 30min blockiert und mit PBS/0,2% Tween gewaschen. Die Inkubation der Membran mit einem Antikörper gegen das V5-Epitop (1:3000), erfolgte in DMEM mit 10% FCS und 1% Penizillin/Streptomycin über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad. Nach Inkubation mit einem zweiten, HRP-gekoppelten Antikörper, wurde die Membran gegen einen ECL-Film exponiert und in einer Dunkelkammer entwickelt. *Input*: 17% der Zellen wurden lysiert und 50µg des zellulären Gesamtproteins wurden über ein 10% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit 5% Magermilchlösung für 30min blockiert und mit PBS/0,2% Tween gewaschen. Die Inkubation der Membran mit den Antikörpern gegen das V5-Epitop (1:3000), BRCA1 (1:500) und PCNA (Ladekontrolle; 1:50000) erfolgte in DMEM mit 10% FCS und 1% Penizillin/Streptomycin über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad. Nach Inkubation mit einem zweiten, HRP-gekoppelten Antikörper wurde die Membran gegen einen ECL-Film exponiert und in einer Dunkelkammer entwickelt.

Bei Abbildung 22 wurde in der ersten Spur nur eine cDNA, welche für His-markiertes Ubiquitin kodiert, transfiziert. Entsprechend der Abwesenheit von V5-markiertem Ku80 sind hier auch keine höhermolekularen Banden für dieses Protein zu erkennen. In der zweiten Spur wurde das Zelllysate von Zellen aufgetrennt, die mit cDNAs, welche V5-markiertes Ku80 und His-markiertes Ubiquitin kodieren, ko-transfiziert worden waren. Hier sind

höhermolekulare Banden zu sehen, die auf eine Ubiquitinierung des Ku80-Proteins hindeuten. In der dritten und vierten Spur wurden die Zellen, zusätzlich zu den cDNAs für His-markiertes Ubiquitin und V5-markiertes Ku80, noch mit einer gegen BRCA1 gerichteten siRNA bzw. mit einer Kontroll siRNA transfiziert. In beiden Fällen zeigt sich eine starke Ubiquitinierung des Ku80-Proteins, die nach Ko-Transfektion der gegen BRCA1-gerichteten siRNA sogar stärker ist, als nach Transfektion einer Kontroll-siRNA (Abbildung 22). Bei der Expressionskontrolle (Input) ist in den ersten drei Spuren eine Bande in Höhe von 220kDa zu erkennen, was der Größe von BRCA1 entspricht. In der letzten Spur ist das Signal für BRCA1 deutlich reduziert. Die auf den ersten Blick stärkere Ubiquitinierung in der vierten Spur im Vergleich zur dritten, lässt sich durch die unterschiedliche Menge an geladenem Gesamtprotein erklären, wie sich anhand des Signals für PCNA, welches als Ladekontrolle eingesetzt wurde, entnehmen lässt.

Eine weitere E3-Ubiquitin-Ligase, welche neben BRCA1 ebenfalls K63-Ubiquitinketten herstellt, ist RNF8 (*RING finger protein 8*). RNF8 spielt besonders am Anfang der Doppelstrangbruch-Reparatur eine Rolle. RNF8 besteht aus einer N-terminalen FHA- (*forkhead-associated*) Domäne und einer RING-Finger-Domäne am C-Terminus und lagert sich an den DSB an, indem es eine Phosphorylierungs-abhängige Interaktion zwischen der N-terminalen FHA-Domäne und des durch ATM phosphoryliertem TQXF Motivs von MDC (*mediator of DNA damage checkpoint*) eingeht (Huen *et al.*, 2007; Kolas *et al.*, 2007; Mailand *et al.*, 2007). Bekannte Substrate von RNF8 sind die Histon-Proteine H2A und H2AX, welche durch RNF8/Ubc13 ubiquitiniert werden. Diese Ubiquitinierung dient als Plattform für die Anlagerung weiterer Proteine. RNF8 bleibt so lange am Doppelstrangbruch, bis der Schaden repariert ist (Mailand *et al.*, 2007), was bedeutet, dass später rekrutierte Proteine ebenfalls noch durch RNF8 ubiquitiniert werden können.

Um einen möglichen Einfluss von RNF8 auf die Ubiquitinierung von Ku80 zu untersuchen, wurden H1299-Zellen mit cDNAs, die für V5-Ku80, His-Ubiquitin und FLAG-RNF8 kodieren, ko-transfiziert. Bei den Proben, wo keine cDNA für FLAG-RNF8 eingesetzt wurde, wurde die gleiche Menge des pcDNA3.1 Vektors ko-transfiziert. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet. Die ubiquitinierten Proteine wurden über Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt und durch eine 10% SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde die Menge an ubiquitiniertem Ku80 durch Western Blotting bestimmt.

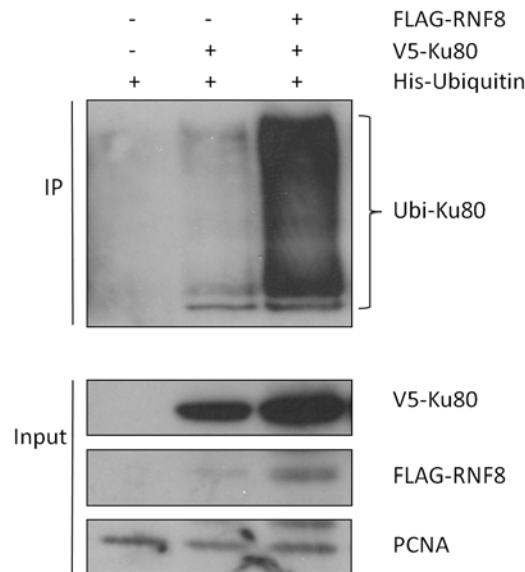


Abbildung 23: Die Gegenwart von RNF8 verstärkt die Ubiquitinierung des Ku80-Proteins.

H1299-Zellen wurden mit cDNAs, welche für V5-Ku80, His-Ubiquitin und FLAG-RNF8 kodieren bzw. mit dem pcDNA3.1 Vektor ko-transfiziert. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet. *IP*: 83% der Zellen wurden mit 7ml Guanidinium-Lysispuffer lysiert und die ubiquitinierten Proteine über Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt. Die Proteine wurden eluiert, mittels einer 10% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit 5% Magermilchlösung für 30min blockiert und mit PBS/0,2% Tween gewaschen. Die Inkubation der Membran mit einem Antikörper gegen das V5-Epitop (1:3000), erfolgte in DMEM mit 10% FCS und 1% Penizillin/Streptomycin über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad. Nach Inkubation mit einem zweiten, HRP-gekoppelten Antikörper, wurde die Membran gegen einen ECL-Film exponiert und in einer Dunkelkammer entwickelt. *Input*: 17% der Zellen wurden lysiert und 50µg des zellulären Gesamtproteins wurden über ein 10% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit 5% Magermilchlösung für 30min blockiert und mit PBS/0,2% Tween gewaschen. Die Inkubation der Membran mit Antikörpern gegen das V5-Epitop (1:3000), den FLAG-tag (1:1000) und PCNA (Ladekontrolle; 1:50000) erfolgte in DMEM mit 10% FCS und 1% Penizillin/Streptomycin über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad. Nach Inkubation mit einem zweiten, HRP-gekoppelten Antikörper wurde die Membran gegen einen ECL-Film exponiert und in einer Dunkelkammer entwickelt.

In Abbildung 23 wurden in der linken Spur Zelllysate aus Zellen aufgetragen, die nur mit einer cDNA, die für His-Ubiquitin kodiert, und dem pcDNA3.1 Vektor ko-transfiziert worden waren. Entsprechend der Abwesenheit von V5-markiertem Ku80 waren hier auch keine höhermolekularen Banden für das V5-Ku80-Protein zu beobachten. In der mittleren Spur wurden Zelllysate von Zellen analysiert, die mit cDNAs, die für His-Ubiquitin und V5-Ku80 kodieren, sowie mit dem pcDNA3-1 Vektor ko-transfiziert worden waren. In der rechten Spur wurden Zelllysate von Zellen analysiert, die zusätzlich noch mit einer cDNA, welche für RNF8 kodiert, transfiziert worden waren. Während in der mittleren Spur, ohne ektopische Expression von RNF8, eine schwache Ubiquitinierung zu erkennen war, war in der rechten Spur, in Gegenwart von ektopisch exprimiertem RNF8, eine deutlich stärkere Ubiquitinierung von Ku80 zu sehen (Abbildung 23).

Mit Ausnahme der ersten Spur, war in allen Spuren V5-markiertes Ku80 vorhanden, wie aus der Expressionskontrolle (Input) zu erkennen ist (Abbildung 23).

3.6. BRCA1 interagiert mit Ku80

Da eine Überexpression von BRCA1 zu einer verstärkten Ubiquitinierung des Ku80-Proteins führt, stellte sich die Frage, ob es möglicherweise zu einer direkten Interaktion zwischen den beiden Proteinen kommt. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde eine Ko-Immunpräzipitation durchgeführt.

Um die Interaktion von BRCA1 und Ku80 nachzuweisen, wurden H1299 Zellen mit cDNAs, die für Ku80 und BRCA1 kodieren, transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 4h mit 10µM MG132 inkubiert und anschließend lysiert. 750µg des zellulären Gesamtproteins wurden über Nacht bei 4°C mit A+G-Agarose, die mit Antikörpern gegen BRCA1 bzw. Ku80 gekoppelt waren, inkubiert. Anschließend wurde die A+G-Agarose gewaschen und zur Elution der gebundenen Proteine mit Probenpuffer versetzt. Das Ganze wurde auf ein 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels Western Blotting analysiert.

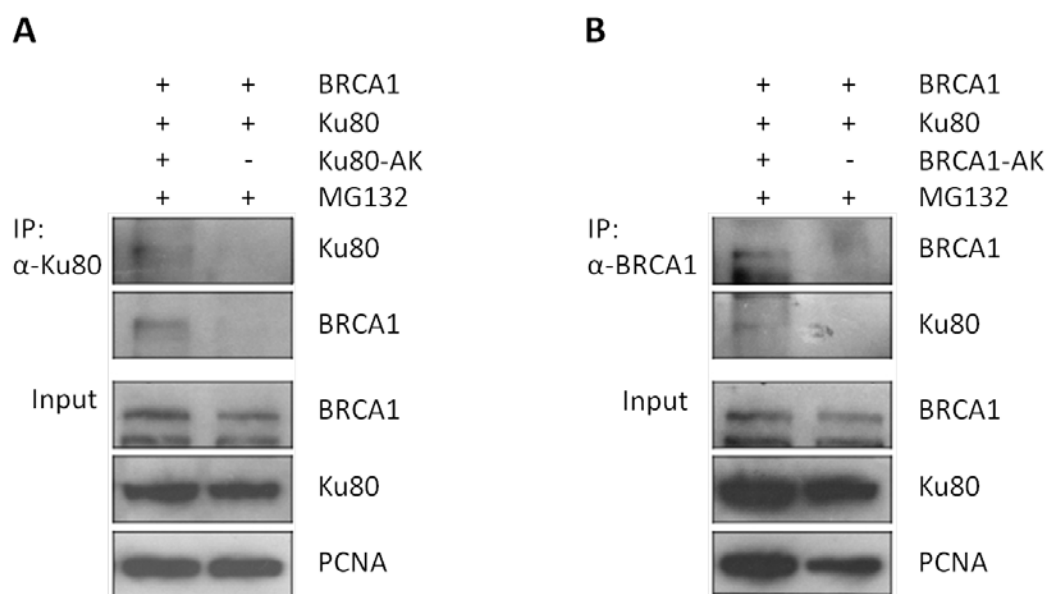


Abbildung 24: Das Ku80-Protein interagiert mit dem BRCA1-Protein.

H1299-Zellen wurden mit cDNAs transfiziert, die für V5-Ku80 und BRCA1 kodieren. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen für 4h mit 10µM MG132 inkubiert und anschließend lysiert. *IP:* Ku80 bzw. BRCA1 wurden mit dem entsprechenden Antikörper, gekoppelt an A+G-Agarose, aus 750µg des zellulären Gesamtproteins über Nacht bei 4°C präzipitiert. Die Präzipitate wurden durch eine 10% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde 30min mit 5% Magermilchlösung blockiert. Anschließend wurde die Membran mit PBS/0,2% Tween gewaschen. Die Inkubation der Membran mit Antikörpern gegen Ku80 (1:5000) und BRCA1 (1:500) erfolgte in DMEM mit 10% FCS und 1% Penizillin/Streptomycin über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad. Nach Inkubation mit einem zweiten, HRP-gekoppelten Antikörper wurde die Membran gegen einen ECL-Film exponiert und entwickelt. *Input:* 50µg an zellulärem Gesamtprotein wurde mittels einer 10% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde 30min mit 5% Magermilchlösung blockiert. Anschließend wurde die Membran mit PBS/0,2% Tween gewaschen. Die Inkubation der Membran mit Antikörpern gegen Ku80 (1:5000), BRCA1 (1:500) und PCNA (1:50000) erfolgte in DMEM mit 10% FCS und 1% Penizillin/Streptomycin über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad. Nach Inkubation mit einem zweiten, HRP-gekoppelten Antikörper wurde die Membran gegen einen ECL-Film exponiert und entwickelt.

Nach der Präzipitation von Ku80 mit einem an Protein A+G-gekoppelten anti-Ku80-Antikörper aus dem Gesamtzelllysat und der anschließenden Hybridisierung der Membran mit einem gegen BRCA1 gerichteten Antikörper, zeigt sich ein Signal in der Höhe von 220kDa (Abbildung 24A). Diese Größe entspricht dem Molekulargewicht von BRCA1. Wurde hingegen nur mit Protein A+G-Agarose (ohne Antikörper) präzipitiert, dann war dieses Signal nicht vorhanden (Abbildung 24A). Analog war bei der Präzipitation von BRCA1 nach der Hybridisierung mit einem gegen Ku80 gerichteten Antikörper ein Signal bei 86kDa zu detektieren, bei dem es sich sehr wahrscheinlich um den Nachweis von Ku80 handelt (Abbildung 24B). Auch hier war bei einer Präzipitation nur mit Protein A+G-Agarose (ohne Antikörper) kein Signal zu sehen (Abbildung 24B).

3.7. Das BRCA1 Protein ist an Doppelstrangbrüchen nachweisbar

Sollte BRCA1 in die Anfangsphase der Doppelstrangbruchreparatur involviert sein, so sollte man unter dem Fluoreszenzmikroskop eine Ko-Lokalisation mit γ H2AX nachweisen können. Bei einem Doppelstrangbruch, wird schon nach kurzer Zeit das Histon-Protein H2AX durch ATM phosphoryliert. Das phosphorylierte H2AX-Protein, das auch als γ H2AX bezeichnet wird, ist nach einer Immunfluoreszenzfärbung im Mikroskop als „Fokus“ nachweisbar. Ein Fokus des γ H2AX-Proteins entspricht einem Doppelstrangbruch (Blocher and Pohlitz, 1982; Lobrich *et al.*, 1994a; Lobrich *et al.*, 1994b; Paull *et al.*, 2000; Rogakou *et al.*, 1998). Die Anwesenheit von BRCA1 an Doppelstrangbrüchen wurde mittels Fluoreszenzfärbung in SKOV3-Zellen dokumentiert. SKOV3-Zellen besitzen eine relativ große Menge an endogenem BRCA1, sodass das Protein auch im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden kann.

Für den Nachweis von BRCA1 an Doppelstrangbrüchen wurden SKOV3-Zellen auf Glasplättchen ausgesät und am nächsten Tag mit 0,5 Gray bestrahlt. 45min nach der Bestrahlung wurden die Zellen auf den Glasplättchen fixiert und anschließend mit Antikörpern gegen γ H2AX und BRCA1 inkubiert. Beide primären Antikörper kommen aus unterschiedlichen Organismen und müssen daher mit verschiedenen sekundären Antikörpern detektiert werden. Als sekundäre Antikörper wurden IgG-Antikörper verwendet, die mit unterschiedlichen Fluorophoren gekoppelt sind. Dabei wurde für den Nachweis von γ H2AX ein Alexa488-gekoppelter-anti-Maus-IgG-Antikörper verwendet und für den Nachweis von BRCA1 ein Alexa546-gekoppelter-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper. Nach der Antikörperinkubation wurden die Glasplättchen auf einem Objektträger eingebettet und an einem Konfokalmikroskop ausgewertet. Wenn die beiden sekundären Antikörper in

räumlicher Nähe zueinander sind, dann findet eine Überlagerung der Emissionen der beiden Fluorophore statt und aus der roten (Alexa546) und grünen Farbe (Alexa488) entsteht gelb.

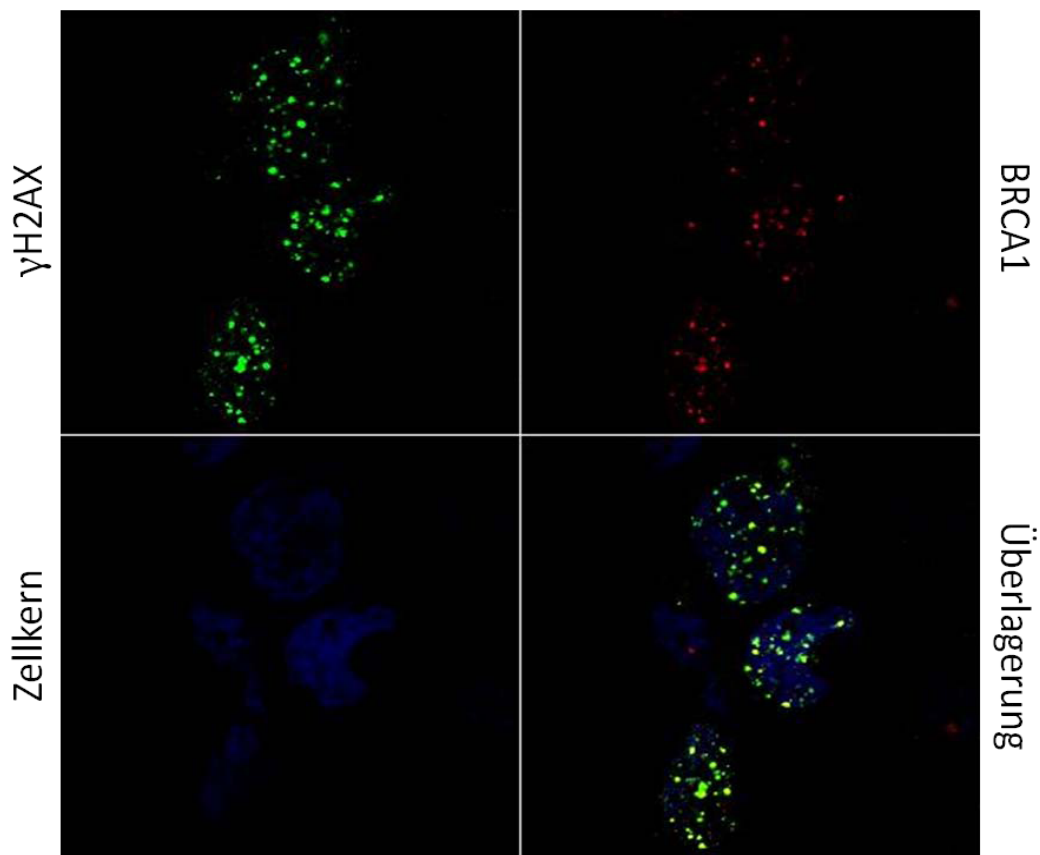


Abbildung 25: BRCA1 ko-lokalisiert mit γ H2AX.

SKOV3-Zellen wurden auf Glasplättchen ausgesät und am nächsten Tag mit 0,5Gy bestrahlt. 45min nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit Azeton/Methanol (1:1) fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem primären Antikörper gegen γ H2AX und BRCA1 für 1,5h bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen 1,5h bei RT mit einem Alexa488-gekoppelten sekundären gegen Maus-IgG gerichteten Antikörper (grün) und einem Alexa546-gekoppelten sekundären gegen Kaninchen-IgG gerichteten Antikörper (rot) inkubiert. Zur Färbung des Zellkerns wurde Draq5[®] verwendet. Die Zellen wurden auf einem Objektträger eingebettet und mit einem Konfokalmikroskop ausgewertet.

In Abbildung 25 sind links oben in grün, einzelne γ H2AX-Fozi zu erkennen. Rechts oben stellen die roten Punkte das BRCA1-Protein dar. Der durch Draq5[®] angefärbte Zellkern ist links unten in blau zu erkennen. Bei der Überlagerung der drei Bilder sind gelbe Punkte zu erkennen die anzeigen, dass γ H2AX und BRCA1 am Doppelstrangbruch ko-lokalisieren (Abbildung 25).

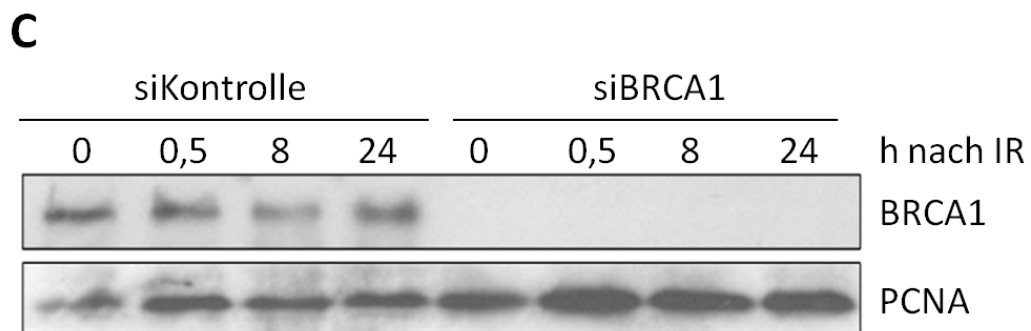
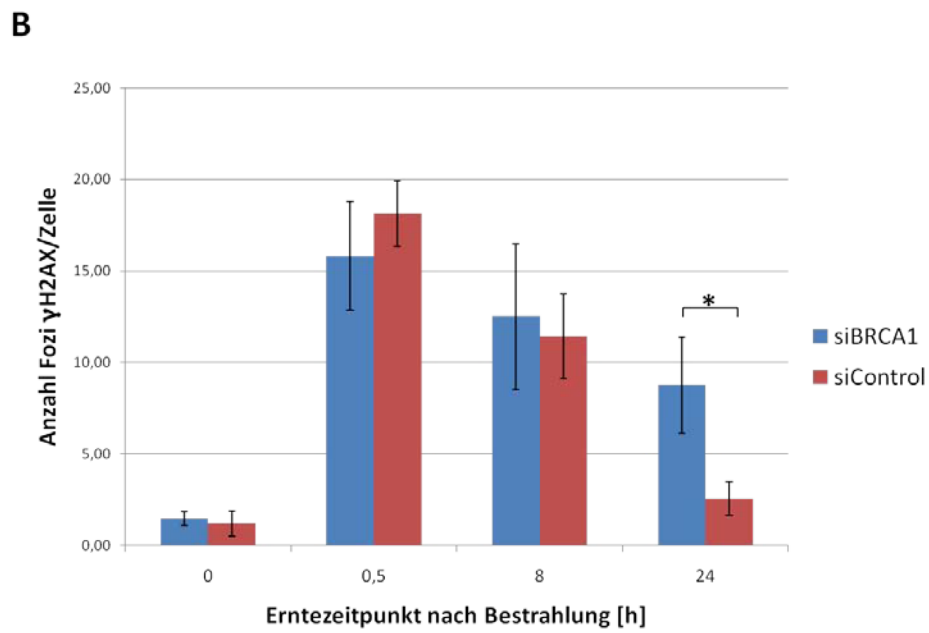
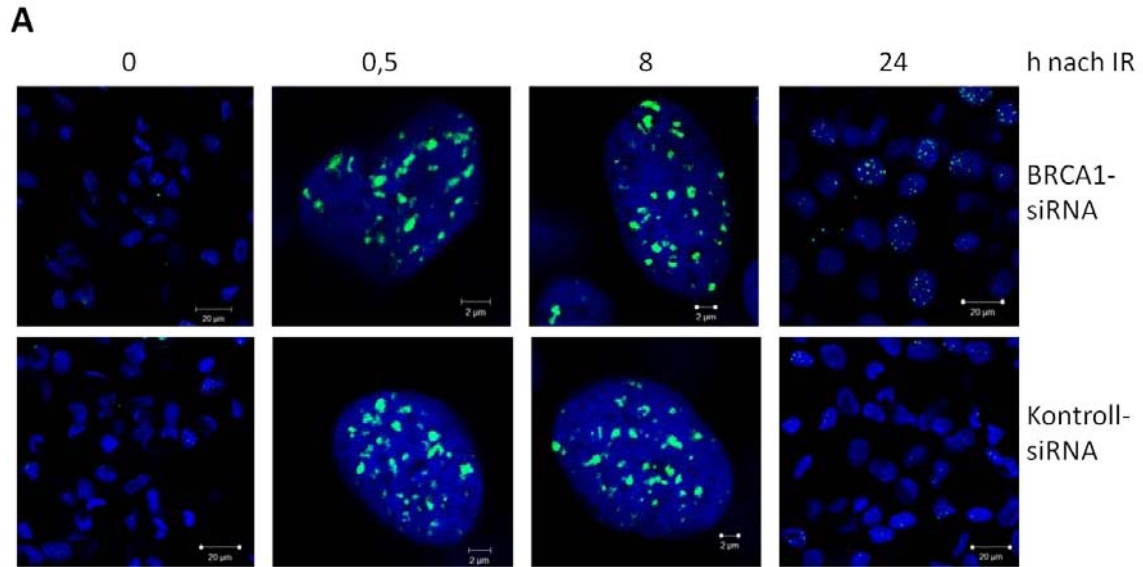
3.8. BRCA1 fördert die Doppelstrangbruch-Reparatur

Da BRCA1 direkt mit dem Ku80 Protein interagiert und außer dem relativ früh an Doppelstrangbrüchen akkumuliert, stellte sich die Frage, ob BRCA1 für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen benötigt wird. Eine Möglichkeit Doppelstrangbrüche sichtbar und zählbar zu machen, ist die Bestimmung von γ H2AX-Foci (Blocher and Pohlitz, 1982; Lobrich *et al.*, 1994a; Lobrich *et al.*, 1994b). Da die Anzahl der Doppelstrangbrüche im Laufe der Doppelstrangbruchreparatur abnimmt, kann die Anzahl der γ H2AX-Foci auch zur Bestimmung der DNA-Reparatur herangezogen werden (Blocher and Pohlitz, 1982; Lobrich *et al.*, 1994a; Lobrich *et al.*, 1994b).

Um den Einfluss von BRCA1 auf die Doppelstrangbruch-Reparatur zu bestimmen, wurde in SKOV3-Zellen die Menge des BRCA1-Proteins durch Transfektion einer gegen BRCA1-gerichteten siRNA reduziert. 96h nach Transfektion der Zellen mit der siRNA wurden die Zellen mit 0,5Gray bestrahlt und nach 0,5, 8h und 24h fixiert. Danach wurden die Zellen mit einem gegen phosphoryliertes H2AX gerichteten ersten und Fluorophor-gekoppelten zweiten Antikörper inkubiert, auf einem Objektträger eingebettet und unter einem Konfokalmikroskop ausgewertet. Bei der Auswertung wurden pro Zeitpunkt γ H2AX-Foci von 50 Zellen manuell ausgezählt. Die bestrahlten Zellen wurden mit unbestrahlten Zellen, die jedoch gleichfalls mit einer gegen BRCA1-gerichteten siRNA transfiziert worden waren, sowie mit Zellen, die anstelle von einer gegen BRCA1-gerichteten siRNA mit einer Kontroll siRNA transfiziert worden waren, verglichen.

Abbildung 26: BRCA1 beeinflusst die Doppelstrangbruch-Reparatur.

(A) SKOV3-Zellen wurden auf Glasplättchen herangezogen und mit 800pMol einer gegen BRCA1-gerichteten siRNA oder einer Kontroll-siRNA transfiziert. 96h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 0,5Gy bestrahlt und zu den angegebenen Zeitpunkten mit Azeton/Methanol (1:1) fixiert. Danach wurden die Zellen 30min mit 1% BSA in PBS blockiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem primären Antikörper gegen γ H2AX und danach mit einem Alexa488-gekoppelten, sekundären gegen Maus-IgG gerichteten Antikörper (grün) und mit Draq5 (blau) inkubiert. Die Zellen wurden auf einem Objektträger eingebettet und mit einem Konfokalmikroskop ausgewertet. **(B)** Pro Ansatz und Zeitpunkt wurden die γ H2AX-Foci von 50 Zellen gezählt. Aus drei unabhängigen Experimenten wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet und graphisch dargestellt. Durch einen *Zwei-Stichproben-t-Test* mit ungleicher Varianz wurde der *p-Wert* ermittelt (*: $p < 0,05$). **(C)** Ein Aliquot der Zellen wurde lysiert. 50 μ g Protein wurden über ein 10% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde 30min mit 5% Magermilchlösung blockiert. Anschließend wurde die Membran mit PBS/0,2%Tween gewaschen. Die Inkubation der Membran mit Antikörpern gegen BRCA1 (1:500) und PCNA (Ladekontrolle; 1:50000) erfolgte in DMEM mit 10% FCS und 1% Penizillin/Streptomycin über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad. Nach Inkubation mit einem zweiten, HRP-gekoppelten Antikörper wurde die Membran gegen einen ECL-Film exponiert und entwickelt.



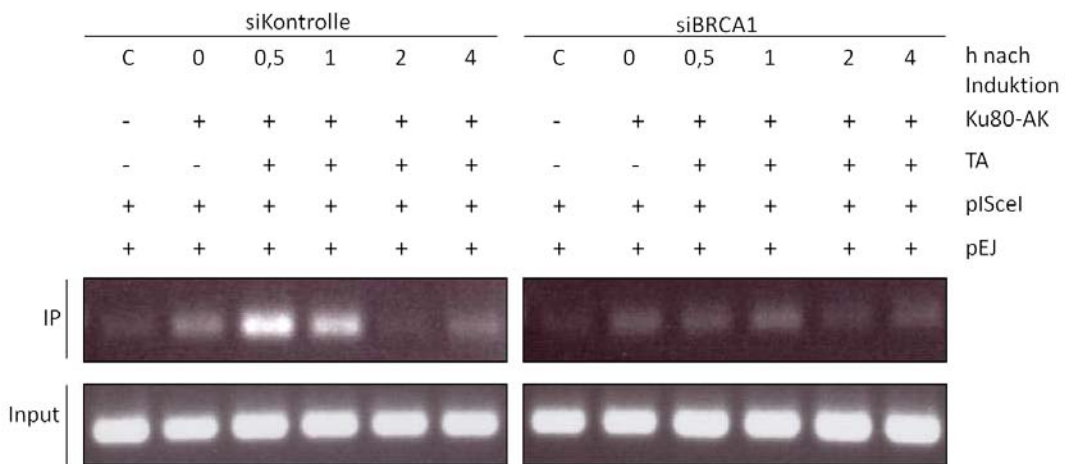
Wie aus Abbildung 26 hervorgeht, waren in Zellen, in denen die BRCA1 Menge mittels siRNA reduziert worden war und die nicht bestrahlt worden sind, nahezu keine Fozi zu erkennen. Die durchschnittliche Anzahl an γ H2AX-Fozi betrug hier 1,46. 0,5h nach Bestrahlung waren durchschnittlich 15,82 γ H2AX-Fozi zu erkennen. Nach 8h war ein Rückgang auf 12,51 Fozi pro Zelle zu beobachten und 24h nach Bestrahlung waren es noch 8,75 γ H2AX-Fozi. Demgegenüber war in Zellen, die mit einer Kontroll siRNA transfiziert und nicht bestrahlt worden waren, eine durchschnittliche Anzahl von 1,18 γ H2AX-Fozi pro Zelle vorhanden. In Zellen, die 0,5h nach Bestrahlung fixiert worden waren, wurden 18,14 Fozi gezählt. Dies entspricht in etwa dem erwarteten Wert von ca. 20 Doppelstrangbrüchen pro 0,5 Gray (Blocher and Pohlitz, 1982; Lobrich *et al.*, 1994a; Lobrich *et al.*, 1994b). 8h Stunden nach der Bestrahlung war die Anzahl an γ H2AX-Fozi auf 11,42 Fozi reduziert. Diese Abnahme der Anzahl der γ H2AX-Fozi liegt vermutlich daran, dass in der dazwischenliegenden Zeit, einige Doppelstrangbrüche repariert worden sind. 24h nach Bestrahlung waren in den Zellen, welche mit einer Kontroll siRNA transfiziert worden waren, nur noch 2,54 γ H2AX-Fozi zu zählen, was in etwa dem Anfangswert ohne Bestrahlung entspricht. Insgesamt war in Zellen, die mit einer gegen BRCA1 gerichteten siRNA transfiziert worden waren, ein deutlich schwächerer Rückgang an γ H2AX-Fozi zu beobachten, als in Zellen, welche mit einer Kontroll siRNA transfiziert worden waren.

3.9. BRCA1 reguliert die Bindung von Ku80 an Doppelstrangbrüche

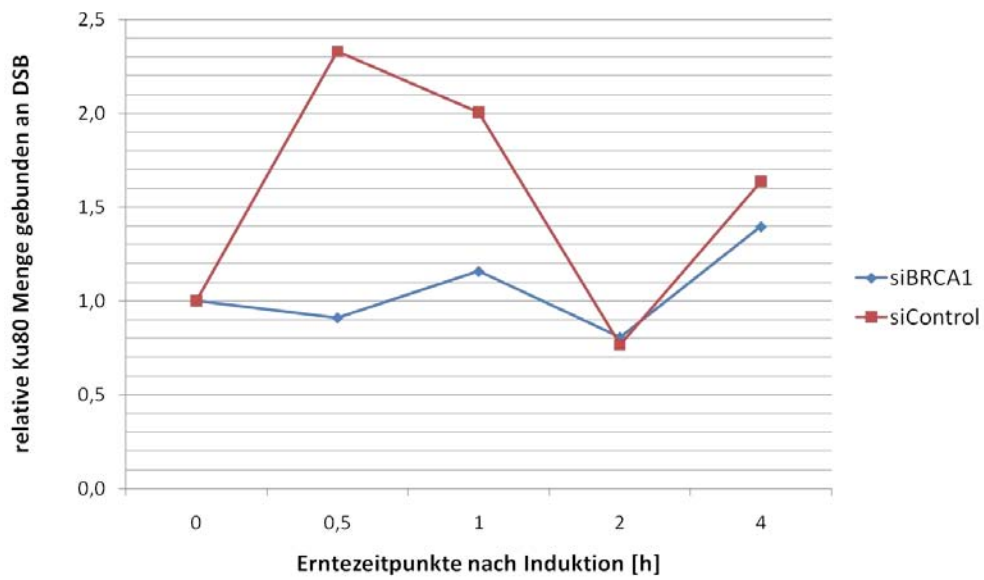
Ku80 spielt eine wichtige Rolle bei der Doppelstrangbruch-Reparatur. Zusammen mit Ku70 formt es ein Heterodimer und bildet so die regulierende Untereinheit der DNA-abhängigen Protein-Kinase (DNA-PK) (Cary *et al.*, 1997). Diese dient als Ausgangspunkt und Plattform zur Anlagerung und Rekrutierung weiterer Reparaturfaktoren wie zum Beispiel der Nuklease Artemis oder der Ligase IV. Zusätzlich bewirkt es durch seine Ringstruktur einen Schutz der freien DNA-Enden und schützt diese vor ungewolltem Abbau. Ku80 besitzt eine wichtige Funktion in der ersten Phase der Nicht-homologen Endverknüpfung und ohne Ku80 zeigen sich Chromosomen-Anomalien in somatischen Zellen (Li *et al.*, 2002).

Durch die Beobachtung, dass BRCA1 die Reparatur von Doppelstrangbrüchen verbesserte, stellte sich die Frage, ob BRCA1 die Bindung von Ku80 an Doppelstrangbrüche beeinflussen kann. Um diese Frage zu beantworten, wurde eine Chromatin-Immunpräzipitation mit einem gegen Ku80 gerichteten Antikörper durchgeführt. Dazu wurden zunächst H1299-Zellen mit dem pEJ-Plasmid transfiziert. Dieses Plasmid besitzt zwei Schnittstellen für die Meganuklease IScel. In Gegenwart von IScel wird so ein Doppelstrangbruch erzeugt.

A



B



C

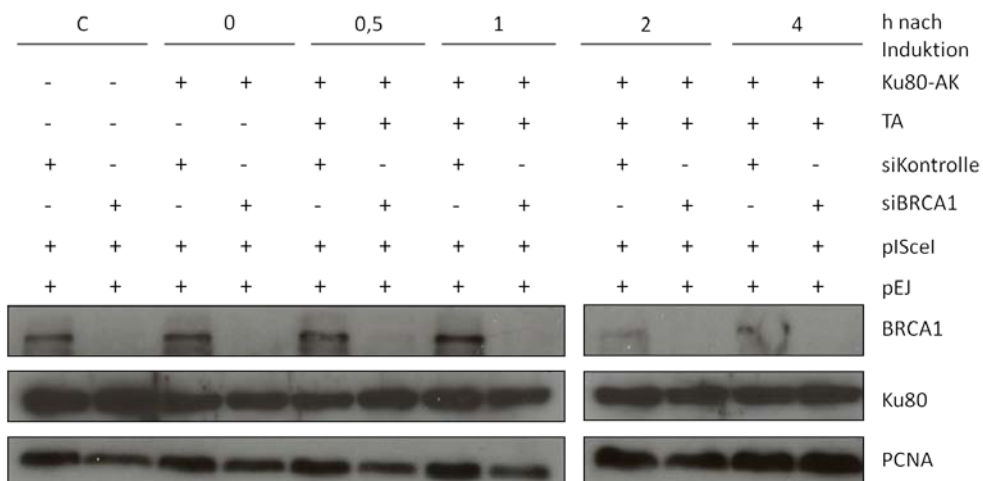


Abbildung 27: BRCA1 beeinflusst die Bindung von Ku80 an Doppelstrangbrüche.

H1299-Zellen wurden mit einer Kontroll siRNA (siKontrolle) oder mit einer gegen BRCA1-gerichteten siRNA (siBRCA1), zusammen mit einem Plasmid, welches für die Meganuklease IScel kodiert (pIScel), die mit der Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors fusioniert ist, und dem pEJ-Plasmid (pEJ), welches eine Schnittstelle für IScel besitzt, transfiziert. 96h nach der Transfektion wurde durch Zugabe von Triamzinolonazetonid (TA) die Translokation der Meganuklease in den Zellkern induziert. Bei der Kontrolle (C) und dem 0h-Wert wurde anstelle von TA nur mit Ethanol inkubiert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit Formaldehyd fixiert und eingefroren. **(A)** 25% der Zellsuspension wurden für die ChIP lysiert. Anschließend wurde die DNA mit Ultraschall fragmentiert. Dann erfolgte durch BSA, sonifizierte Lachssperma-DNA und 40µl Protein-A+G-gekoppelter Agarose die Vorreinigung. Anschließend wurde für den Input ein Aliquot entnommen und die verbleibende Probe für die ChIP mit 40µl Protein-A+G-gekoppelter Agarose und 2µg Ku80-Antikörper (Ku80-AK) über Nacht auf einem Drehrad bei 4 °C, inkubiert. Nach der Präzipitation des Ku80-Proteins wurde die Agarose vier Mal gewaschen. Anschließend wurden die Protein-DNA-Komplexe 10 min bei 65°C eluiert. Die Proben der ChIP und die der DNA-Kontrollen wurden anschließend bei 65 °C für 5 h inkubiert um die DNA-Protein Verbindung zu lösen. Dann wurden durch Zugabe von RNase A und Proteinase K RNA und Proteine verdaut. Die DNA der Proben wurde daraufhin durch Chloroform/Phenol/Isoamylalkohol extrahiert und bei -20 °C für 2 h gefällt. Nach dem Pelletieren der DNA wurde diese einmal mit 80 %igem Ethanol gewaschen und das DNA Pellet bei RT getrocknet. Anschließend wurde dieses in 30µl H₂O gelöst, wobei 1µl dieser DNA-Lösung als Template für die PCR diente. Dieses PCR Produkt wurde über ein 2% Agarosegel aufgetrennt. **(B)** Die Signale aus Teil B wurden mit *ImageJ* quantifiziert und ausgewertet. Die erhaltenen Werte der IP wurden durch die Werte des Inputs normalisiert und die Werte der Kontrolle (C) davon abgezogen. Der „0-Wert“ wurde „1“ gesetzt. **(C)** Zur Expressionskontrolle wurden 75% der geernteten H1299-Zellen lysiert, über ein 10% SDS-PAGE Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde 30min mit 5% Magermilchlösung blockiert. Anschließend wurde die Membran mit PBS/0,2% Tween gewaschen. Die Inkubation der Membran mit Antikörpern gegen Ku80 (1:5000), BRCA1 (1:500) und PCNA (Ladekontrolle; 1:50000) erfolgte in DMEM mit 10% FCS und 1% Penizillin/Streptomycin über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad. Nach Inkubation mit einem zweiten, HRP-gekoppelten Antikörper wurde die Membran gegen einen ECL-Film exponiert und entwickelt.

Entsprechend wurden die H1299-Zellen zusätzlich mit dem pRFP-GR-IScel-Plasmid transfiziert, das für die Meganuklease IScel kodiert. Die Meganuklease IScel auf diesem Plasmid, ist mit der Hormon-Bindedomäne des Östrogenrezeptors fusioniert. Diese Fusion führt dazu, dass das Fusionsprotein in Abwesenheit von Östrogen im Zytoplasma lokalisiert ist. Bindet jedoch Östrogen, oder ein Östrogenanalogon (z.B. Triamzinolonazetonid) an die Hormon-Bindestelle, dann transloziert das Fusionsprotein in den Zellkern. Dies bedeutet, dass in den transfizierten H1299-Zellen, IScel im Zytoplasma lokalisiert ist. Durch Zugabe von Triamzinolonazetonid (TA), gelangt das Enzym in den Zellkern, wo es im pEJ-Plasmid einen Doppelstrangbruch hervorruft.

96h nach der Ko-Transfektion der Zellen, entweder mit einer gegen BRCA1-gerichteten siRNA oder mit einer Kontroll siRNA und den Plasmiden pEJ und pRFP-GR-IScel, wurden die Zellen 30min mit Triamzinolonazetonid inkubiert und anschließend zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und mit 1% Formaldehyd fixiert. Die Kontrolle (C) und der 0h-Wert wurden nicht induziert und stattdessen nur mit der entsprechenden Menge Ethanol, indem TA solubilisiert worden war, inkubiert. Nachdem die Zellen fixiert waren, wurden die Zellen eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zellen lysiert und die DNA durch Sonifizieren in kleine Fragmente zerteilt. Mit einem an A+G-Agarose-gekoppelten anti-Ku80-Antikörper wurde das an DNA-gebundene Ku80-Protein präzipitiert. Der Protein-DNA-Komplex wurde

gewaschen und von der A+G-Agarose eluiert. Nach Beseitigung von RNA und Proteinen durch Inkubation mit RNase A und Proteinase K wurde die verbleibende DNA mittels Chloroform/Phenol/Isoamylalkohol aufgereinigt und g efällt. Das entstandene DNA-Pellet wurde mit 80% Ethanol gewaschen, getrocknet und in Wasser gelöst. 1µl von jeder Probe wurde zur PCR verwendet um die Menge an DNA-gebundenem Ku80 zu bestimmen. Zur genauen Quantifizierung der erhaltenen Werte wurden die Banden mit dem Programm *ImageJ* ausgelesen. Die erhaltenen Werte wurden durch die entsprechenden Werte der Input-Kontrolle dividiert und der Wert der Kontrolle (C) von diesen abgezogen. Der Wert der uninduzierten Probe (0h-Wert) wurde „1“ gesetzt.

Wie aus Abbildung 27 hervorgeht, war in Zellen, welche mit einer Kontroll siRNA transfiziert worden waren, bereits 30 Minuten nach der TA-Zugabe eine, gegenüber unbehandelten Zellen mehr als doppelt so starke Bindung (2,3fache) von Ku80 an das pEJ Plasmid (mit dem durch IScel induzierten Doppelstrangbruch) zu beobachten. Beim 1h-Wert war immer noch eine verstärkte Bindung zu beobachten, wenngleich auch nicht mehr so stark. Der 2h-Wert war wieder auf den Ausgangswert zurückgegangen und erst beim 4h-Wert erfolgte ein erneuter Anstieg auf das 1,7fache. Das Gegenteil war bei Proben der Fall, in welchen die BRCA1 Menge durch eine Transfektion mit einer gegen BRCA1-gerichteten siRNA verringert worden war. Hier war 30min nach der Induktion eines Doppelstrangbruches keine verstärkte Bindung von Ku80 an den Schaden zu erkennen. Die Menge an gebundenem Ku80 blieb mehr oder minder bis zum 2h-Wert gleich. Beim 1h-Wert war eine Erhöhung auf das 1,3fache zu beobachten, während es beim 2h-Wert zu einem Absinken auf das 0,8fache der uninduzierten Probe kam. Erst vier Stunden nach der Bestrahlung zeigte sich eine Zunahme der Bindung des Ku80 Proteins an das pEJ-Plasmid auf das 1,4fache. Sie blieb aber immer noch hinter den Werten der Proben ohne Reduzierung der BRCA1 Menge zurück (Abbildung 27A, B).

Um die Reduktion der BRCA1 Menge zu überprüfen, wurde ein Teil der Zellen nach der Fixierung lysiert, das darin enthaltene Gesamtprotein über eine 12% SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Anschließend wurde die Proteinmenge an BRCA1, Ku80 und PCNA bestimmt. In jeder Spur, bei der eine Kontroll siRNA transfiziert worden war, waren Banden auf der Höhe von 220kDa zu erkennen, was auf das Vorhandensein von BRCA1 deutet. Bei den Proben, bei denen eine gegen BRCA1 gerichtete siRNA transfiziert worden war, war keine Bande zu erkennen (Abbildung 27C). In jeder Probe war außerdem ein etwa gleich starkes Signal bei ca. 86kDa zu erkennen, was der Höhe von Ku80 entspricht (Abbildung 27C).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es in Anwesenheit von BRCA1, vermutlich zu einer stärkeren Bindung von Ku80 an den Doppelstrangbruch kommt, als wenn die BRCA1

Menge mittels siRNA verringert wurde. Dieses Ergebnis legt dar, dass BRCA1 die Bindung von Ku80 an geschädigte DNA beeinflussen könnte. Allerdings wurde dieses Experiment bisher nur einmal durchgeführt.

4. Diskussion

4.1. Das Ku80 Protein ist ubiquitiniert

Nach einem DNA-Schaden müssen innerhalb kürzester Zeit diverse zelluläre Reaktionen aktiviert werden, angefangen beim Zellzyklusarrest, über die eigentliche Reparatur des DNA-Schadens, bis hin zum Auslösen der Apoptose. Um hier schnellstmöglich reagieren zu können werden in der Zelle häufig Proteine posttranslational modifiziert. Durch diese posttranslationalen Modifikationen kann die Aktivität von Proteinen erhöht werden, oder sie können Interaktionen eingehen, die zuvor nicht möglich waren, ohne dass das Gen neu transkribiert oder die mRNA translatiert werden muss. So wird darüber hinaus auch vermieden, dass ein Gen, welches möglicherweise auf einem geschädigten Bereich der DNA liegt, transkribiert werden muss, was dann zu einem fehlerhaften und nicht funktionsfähigen Protein führen könnte.

Das Ku80-Protein ist eines der Kernproteine der Nicht-homologen Endverknüpfung. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ku80 durch Ubiquitin posttranslational modifiziert wird. Nach Bestrahlung nahm diese Ubiquitinierung zunächst zu, um bald darauf wieder auf das Ausgangsniveau zurückzukehren. Dieses Ergebnis lässt auf eine wichtige Rolle der Ubiquitinierung des Ku80 Proteins in der Anfangsphase der DSB-Reparatur schließen.

Dass die Ubiquitinierung eines Reparaturfaktors ein bewährtes Mittel zu seiner Regulation darstellt, wurde auch in anderen Arbeiten gezeigt (Foster *et al.*, 2006; Garcia-Higuera *et al.*, 2001; Sugasawa *et al.*, 2005; Trickey *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2005).

Um die Funktion und physiologische Relevanz dieser Ubiquitinierung zu untersuchen, wurde versucht, die Ubiquitinierungsstelle zu kartieren. Dazu wurden zunächst zunehmend kleinere Fragmente des Ku80-Proteins hergestellt und auf ihre Ubiquitinierung getestet. Anschließend wurden in das kleinste der ubiquitinierten Fragmente kumulativ Punktmutationen eingefügt und die mutierten Fragmente auf Ubiquitinierung getestet. Dabei zeigte sich eine verringerte Ubiquitinierung wenn alle Lysine bis zur Position 129 durch ein Arginin ersetzt worden waren. Da bei der letzten Mutation aufgrund der räumlichen Nähe drei Lysine gleichzeitig mutiert worden waren, war zwar anzunehmen, dass eines dieser drei Lysine ubiquitiniert wird, es war aber keine Aussage darüber zu treffen, welches der Lysine (oder ob eventuelle alle drei) Lysine ubiquitiniert werden. Beim Arbeiten mit Proteinfragmenten ist jedoch immer Vorsicht geboten, da meist nicht nur die eigentliche Funktion des Proteins aufgehoben ist, sondern oft auch seine Regulation zumindest beeinträchtigt ist. Obwohl im Falle von Ku80 die Domänenstruktur berücksichtigt wurde, war nicht auszuschließen, dass eventuell doch Nebeneffekte entstanden sind. Immerhin fehlten beim Ku80 N2-Fragment über 77% des

restlichen Proteins und damit möglicherweise auch regulatorische Bereiche. Das dadurch im Ku80 N2-Fragment entstandene Ubiquitinierungsmuster entspricht damit möglicherweise gar nicht der physiologischen Realität. Es war deshalb notwendig, die im Ku80 N2-Fragment als Ubiquitinierungsstelle identifizierten Lysine, auch im Gesamtprotein zu mutieren. Als diese Ku80 Mutante des Gesamtproteins dann auf ihre Ubiquitinierung getestet wurde, zeigte sich aber eine ebenso starke Ubiquitinierung der Mutante wie die des Wildtyps. Die einfachste Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass die drei Lysine (125, 126, 129) tatsächlich auch im Gesamtprotein ubiquitiniert werden und es zusätzlich weitere Lysine im Gesamtprotein gibt, die zur Ubiquitinierung von Ku80 beitragen. Desweiteren besteht die Möglichkeit, dass durch die Bildung kleinerer Fragmente von Ku80, Lysine auf der Oberfläche des Proteinfragments zu liegen kommen, die im nativen Protein für eine E3-Ligase nicht zugänglich sind.

Daneben sollte nicht vergessen werden, dass das V5-Epitop, mit welchem das Ku80-Protein fusioniert war, ebenfalls ein Lysin enthält. Deshalb gäbe es selbst beim vollständigen Ersetzen aller Lysine des Ku80 Proteins durch Arginin eine – wenn auch unwahrscheinliche – Möglichkeit zur Ubiquitinierung.

Ein weiteres Problem war die ungleichmäßige Expression der verschiedenen Ku80-Punktmutanten, die einen Vergleich der Ubiquitinierung unterschiedlicher Mutanten schwierig machte. Die Ursache für diese unterschiedlichen Expressionsstärken ist unklar. Eine mögliche Erklärung wäre, dass, obwohl das Gesamtprotein vermutlich kein Substrat des 26S Proteasoms ist, das Ku80 N2-Fragment möglicherweise doch im 26S Proteasom abgebaut werden könnte und dass dieser Abbau durch eines oder mehrere Lysine reguliert werden könnte. Alternativ könnten Lysine auch einen Proteasom-unabhängigen Abbau des Ku80 N2-Fragments kontrollieren, was bisher aber noch nicht gezeigt wurde.

4.2. Die Ubiquitinreste am Ku80 Protein sind über verschiedene Lysine miteinander verknüpft.

Neben vielen anderen zellulären Proteinen kann auch das Ubiquitin Protein selbst an einem seiner sieben Lysine ubiquitiniert werden (Dubiel and Gordon, 1999; Pickart and Fushman, 2004). Dies ermöglicht die Bildung von Ubiquitinketten. Je nachdem welches Lysin des Ubiquitin-Proteins ubiquitiniert wurde, können unterschiedliche Ketten entstehen, die dann auch verschiedene Konsequenzen für das ubiquitinierte Protein haben. Am besten untersucht sind Ubiquitinketten, welche über das Lysin an Position 48 des Ubiquitin-Proteins verbunden sind (Hochstrasser, 2006; Pickart, 2004). Diese Modifikation markiert das veränderte Protein für den Abbau durch das 26S Proteasom. Lange Zeit wurde dieses

Markieren des Substrats für den Abbau in 26S Proteasomen als einziger Zweck einer Ubiquitinierung angesehen. Zwischenzeitlich konnten jedoch weitere Arten von Ubiquitinketten nachgewiesen werden, die nicht mit der Proteindegradation in Zusammenhang stehen (Chastagner *et al.*, 2006; Huang and D'Andrea, 2006; Johnson *et al.*, 1995; Nishikawa *et al.*, 2004; Varadan *et al.*, 2004). Das bekannteste Beispiel hierfür sind Ubiquitinketten, die über das Lysin an Position 63 des Ubiquitin Proteins verknüpft sind (Chan and Hill, 2001; Doil *et al.*, 2009; Haglund *et al.*, 2003; Huang and D'Andrea, 2006; Kolas *et al.*, 2007; Shilatifard, 2006; Spence *et al.*, 2000; Stewart *et al.*, 2009). Aufgrund dieser unterschiedlichen Bedeutungen von Ubiquitinketten, wurde untersucht, welche Art von Ubiquitinkette beim Ku80-Protein vorliegt und ob diese Ubiquitinierung das Ku80-Protein möglicherweise für die Degradation in 26S Proteasomen markiert. Um die Art der Ubiquitinkette des Ku80-Proteins zu bestimmen, wurden einerseits Mutanten des Ubiquitin-Proteins eingesetzt, bei denen entweder jeweils eines der sieben Lysine durch ein Arginin ersetzt worden war, und andererseits Mutanten des Ubiquitin-Proteins, bei dem jeweils sechs von sieben Lysinen durch ein Arginin ausgetauscht worden war, so dass in der entsprechenden Mutante nur noch ein Lysin vorhanden war, über das Ubiquitinketten gebildet werden konnten. Der Vorteil an diesem System ist, dass im Vergleich zu einem vollständigen Entfernen des Ubiquitin-Moleküls, immer noch Ubiquitinketten gebildet werden können. Somit gibt es kaum Auswirkungen auf die meisten physiologischen Prozesse im Organismus und Nebenwirkungen werden gering gehalten.

Die Verwendung verschiedener Ubiquitinmutanten ergab, dass an der Ubiquitinierung des Ku80-Proteins verschiedene Lysine des Ubiquitin-Proteins beteiligt sind. Ein erster Blick auf die Ergebnisse legt die Vermutung nahe, dass bei der Ubiquitinierung von Ku80 drei verschiedene Ketten verwendet werden. Nämlich Ketten über Lysin 6, 33 und 63. Die Stärke der Ubiquitinierung von K6 und K33 ist allerdings wesentlich schwächer als die von K63. Ubiquitinketten, die über Lysin 6 oder über Lysin 63 verknüpft sind, wurden schon häufiger im Zusammenhang mit der DNA Reparatur beobachtet (Doil *et al.*, 2009; Huang and D'Andrea, 2006; Kolas *et al.*, 2007; Nishikawa *et al.*, 2004; Stewart *et al.*, 2009; Varadan *et al.*, 2004). Ubiquitinketten, welche über Lysin 33 verknüpft sind, wurden seltener beobachtet. Al-Hakim und Mitarbeiter konnte jedoch zeigen, dass eine Ubiquitinierung der NUAK1 und MARK4 (*microtubule-affinity-regulating kinase*) Kinase, aus der Familie der AMPK (AMP-aktivierten Protein Kinasen)-verwandten Kinasen, mit K33-Ubiquitinketten, deren Kinasefunktion inhibiert. Zusätzlich wurde eine verstärkte Phosphorylierung von TCR- ζ bei gleichzeitiger Ubiquitinierung durch K33-Ubiquitinketten beobachtet. Dies hatte eine verminderte Interaktion mit Zap-70 zur Folge, was TCR- ζ vor einer Dephosphorylierung schützt (Al-Hakim *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2010). Die Beobachtung, dass Lysin 48 des Ubiquitin-Proteins nicht zur Ubiquitinierung des Ku80-Proteins beiträgt, stimmt auch mit der

Beobachtung überein, dass die Menge des Ku80-Proteins in Gegenwart des Proteasomen-Inhibitors MG132 nicht zunahm. Damit kann eine Degradation des Ku80 Proteins durch 26S Proteasomen ausgeschlossen werden.

In diesem Versuch fand nur eine Überexpression der entsprechenden Ubiquitin-Mutanten statt, aber keine Verringerung der Menge vom Wildtyp Ubiquitin. Darin könnte die Ursache liegen, dass es manchmal trotzdem zu einem schwachen Signal kommt, wie zum Beispiel bei der K48only-Mutante. Es bestände somit die Möglichkeit, dass immer wieder ein normales Ubiquitin-Molekül als Zwischenglied eingesetzt werden kann und eine Kette entsteht, obwohl bei der verwendeten Mutante eigentlich nichts zu sehen sein sollte. Außerdem halte ich es trotz fehlendem Beweis in der Literatur für Möglich, dass es einen sog. „Notfallmechanismus“ gibt, was bedeutet, selbst wenn das „richtige“ Ubiquitin nicht vorhanden ist, wird im Notfall ein anderes verwendet. Hauptsache eine Ubiquitinierung findet statt und der physiologische Ablauf wird nicht unterbrochen – in unserem Fall die DNA-Reparatur.

4.3. BRCA1 und RNF8 verstärken die Ubiquitinierung des Ku80 Proteins

Da bekannt war, dass BRCA1 an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt ist und es sich bei BRCA1 um eine E3-Ubiquitin-Ligase handelt (Hashizume *et al.*, 2001; Ruffner *et al.*, 2001; Xia *et al.*, 2003), war es naheliegend zu untersuchen, ob BRCA1 eine E3-Ligase für Ku80 sein könnte.

In der Tat war die Ubiquitinierung von Ku80 verstärkt, wenn BRCA1 überexprimiert wurde. Wenn BRCA1 jedoch eine physiologische E3-Kinase für Ku80 wäre, dann sollte sich eine Reduktion der BRCA1 Menge gleichfalls auf die Ubiquitinierung von Ku80 auswirken. Dies war jedoch nicht der Fall. Es zeigte sich sowohl bei der Verwendung von Kontroll siRNA, als auch bei der Verwendung von siRNA gegen BRCA1, eine deutliche Ubiquitinierung.

Von der physiologischen Seite her, gibt es für diese Tatsache keine vernünftige Erklärung. Denn wenn die Überexpression von BRCA1 zu einer stärkeren Ubiquitinierung führt, so sollte die Reduktion der BRCA1 Menge, zu einer Verringerung führen. Möglicherweise liegt eine Redundanz vor und eine weitere E3-Ubiquitin-Ligase, die unter normalen physiologischen Umständen von BRCA1 verdrängt wird und nicht zum Einsatz kommt, übernimmt die Ubiquitinierung. Vielleicht hängt dies aber auch mit dem Einsatz von siRNA zusammen. Diese löst möglicherweise unbekannte Nebeneffekte aus, was auch bei Abwesenheit von BRCA1 zu einer Ubiquitinierung von Ku80 führt.

Ich habe jedoch nicht nur die Ubiquitinierungsstärke von Ku80 bei einer Überexpression von BRCA1 untersucht, sondern auch bei der Überexpression von RNF8. Hier zeigte sich ebenfalls eine verstärkte Ubiquitinierung von Ku80. Möglich wäre, dass RNF8 ebenfalls eine Ubiquitin-Ligase für Ku80 darstellt. In der vorliegenden Arbeit bin ich allerdings nicht weiter auf RNF8 eingegangen und habe keine weiteren Experimente dazu durchgeführt.

Selbst wenn RNF8 keine (zusätzliche) E3-Ubiquitin-Ligase für Ku80 ist, so lässt sich die stärkere Ubiquitinierung von Ku80 dadurch erklären, dass RNF8 relativ am Anfang des Reparaturwegs steht. RNF8 ubiquitiniert in großem Umfang γ H2AX. Dadurch wird das Signal für einen Doppelstrangbruch verstärkt und weitere an der Doppelstrangbruch-Reparatur beteiligten Faktoren (z.B. RNF168 und BRCA1), werden rekrutiert (Huen *et al.*, 2007). Darin liegt auch eine passende Erklärung für die verstärkte Ubiquitinierung von Ku80 bei einer Überexpression von RNF8. Ein schon am Anfang durch vermehrte Ubiquitinierung der Histone H2A und H2AX verstärktes Signal wird weiter amplifiziert und letztendlich führt dies zu einer vermehrten Anlagerung und Rekrutierung von weiteren Faktoren, wie zum Beispiel BRCA1. Da BRCA1 die Ubiquitinierung von Ku80 positiv beeinflusst, beinhaltet dies die Möglichkeit, dass mehr BRCA1 an den Doppelstrangbruch rekrutiert wird als normalerweise und es dadurch zu einer stärkeren Ubiquitinierung von Ku80 kommt.

4.4. BRCA1 wird zur vollständigen DNA-Reparatur benötigt

Um die Rolle von BRCA1 für die Doppelstrangbruchreparatur zu dokumentieren wurde die Menge an BRCA1 durch Transfektion einer siRNA reduziert. Anschließend wurden die Zellen bestrahlt und die Reparatur anhand der Menge an γ H2AX-Fozi verfolgt (Sedelnikova *et al.*, 2002). Bei Zellen, die mit einer Kontroll siRNA transfiziert worden waren, waren kurz nach der Bestrahlung etwa 18 γ H2AX-Fozi pro Zelle vorhanden, was der durchschnittlichen Anzahl von etwa 20 Doppelstrangbrüchen pro 0,5 Gray entspricht (Blocher and Pohlitz, 1982; Lobrich *et al.*, 1994a; Lobrich *et al.*, 1994b). Nach 24h war in diesen Zellen fast wieder das Ausgangsniveau erreicht. Dies bedeutet, dass in den Zellen, in denen die normale Menge an BRCA1-Protein vorhanden war, die 18 Doppelstrangbrüche innerhalb von 24 h repariert werden konnten. Bei Zellen, bei denen die Menge an BRCA1 Protein reduziert worden war, waren jedoch nach 24h deutlich mehr γ H2AX-Fozi zu erkennen, was auf das Vorhandensein der entsprechenden Anzahl an Doppelstrangbrüchen hinweist. Dieses Ergebnis ist als ein deutlicher Hinweis darauf zu werten, dass bei einer deutlichen Verminderung der Menge an BRCA1-Protein, die DNA-Reparatur nicht mehr einwandfrei funktioniert. Da die Anzahl der Fozi 30min nach Bestrahlung bei beiden Ansätzen annähernd gleich war ist davon auszugehen, dass das H2AX-Protein auch in Abwesenheit von BRCA1 durch die ATM-

Kinase phosphoryliert wird. Die Funktion von BRCA1 scheint also nicht für die Schadenserkennung, sondern eher für einen der nachfolgenden Schritte erforderlich zu sein.

4.5. BRCA1 reguliert die Bindung von Ku80 an den DNA-Schaden

Zwar konnte BRCA1 nicht als Ubiquitinligase für Ku80 festgemacht werden, nichtsdestoweniger konnte gezeigt werden, dass BRCA1 mit dem Ku80-Protein interagiert und auch, dass BRCA1 für eine effiziente Doppelstrangbruchreparatur erforderlich ist. Daraus ergab sich die Frage, wie BRCA1 nun zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beitragen könnte. Eine mögliche Bedeutung für BRCA1 bei der Doppelstrangbruchreparatur wäre gegeben, wenn BRCA1 die Bindung von Ku80 an den DNA-Schaden regulieren würde. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde eine Chromatin-Immunpräzipitation durchgeführt.

Nach Induktion eines Doppelstrangbruches war in den Zellen, welche mit einer Kontroll-siRNA transfiziert worden waren, ein Anstieg der Bindung von Ku80 an den Doppelstrangbruch bis auf über das Doppelte des Ausgangswerts zu beobachten. Anschließend fiel der Wert wieder auf das Ausgangsniveau ab. Hingegen war in Zellen, welche mit einer gegen BRCA1 gerichteten siRNA transfiziert worden waren, auch nach Induktion eines Doppelstrangbruchs keine Zunahme der Bindung des Ku80 Proteins an die geschädigte DNA zu beobachten.

Bei einer ersten Betrachtung führt dieses Ergebnis zu dem Schluss, dass BRCA1 die Bindung an den DNA-Schaden reguliert. Ohne BRCA1 scheint Ku80 nicht an den DNA-Schaden binden zu können und somit ist keine effektive Reparatur mehr möglich (siehe Kapitel 4.4.). Ob BRCA1 eine Rolle bei der Anlagerung von Ku80 an den Doppelstrangbruch spielt oder ob Ku80 möglicherweise von BRCA1 ubiquitiniert wird, lässt sich nicht klären und es wären weitere Versuche nötig.

Jedoch sollte man die Daten dieses Versuchs mit Vorsicht betrachten, da dieses Experiment bisher nur einmal durchgeführt worden ist. Ein weiteres Problem, das ich aber erst am Ende meiner Arbeit bemerkte, war die Tatsache, dass ich die geernteten Zellen bei -80°C weggefroren habe, obwohl das Protokoll eine Präparation der Zellkerne vorsah. Durch das Einfrieren waren die Kerne jedoch vermutlich zum größten Teil zerstört worden, sodass ein Großteil der nukleären Proteine inkl. der daran gebundenen DNA wahrscheinlich verloren ging. Nichtsdestoweniger war noch ein Unterschied zwischen den Proben, bei denen die Menge des BRCA1 Proteins durch Transfektion einer siRNA reduziert worden war, und jenen Zellen, die mit einer Kontroll siRNA behandelt worden waren, zu erkennen.

5. Ausblick

Weitere Experimente zur Bestätigung und genaueren Charakterisierung der Ubiquitinierung des Ku80-Proteins wären z.B. ein *in vitro* Ubiquitinierungs-Versuch. Auch könnte man die, für die Ubiquitinierung verantwortlichen Lysine herausfinden, um gezielt Punktmutanten herstellen zu können. Dies könnte entweder durch eine vollständige Mutagenese aller im Ku80-Protein vorkommenden Lysine erreicht werden, oder man beschränkt sich in einem ersten Versuch auf die Lysine, welche nach einer bioinformatischen Analyse am ehesten für eine Ubiquitinierung in Frage kommen. Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung des Lysinrests, welcher posttranslational modifiziert wird, wäre über Massenspektrometrie. Bei dieser Gelegenheit könnte man auch genauer auf die Verknüpfungsart der Ubiquitinketten eingehen.

Durch eine genaue Kartierung, der für die Ubiquitinierung von Ku80 verantwortlichen Lysine, könnte man auch *in vivo* herausfinden, welche Rolle BRCA1 bei der Bindung von Ku80 an geschädigte DNA spielt und welche weitere physiologische Relevanz sich für die Doppelstrangbruch-Reparatur ergibt. Es ließe sich klären, ob das alleinige Vorhandensein von BRCA1 die Bindung von Ku80 an den DNA-Schaden reguliert oder ob es tatsächlich auf die Ubiquitinierung ankommt. In diesem Zusammenhang müsste man auch die Chromatin-Immunpräzipitation mit der entsprechenden Punktmutant wiederholen und die Proben gar nicht oder erst nach der Präparation der Kernproteine wegfrieren.

Ob die Ubiquitinierung von Ku80 auch Auswirkungen auf dessen Interaktion mit weiteren Komponenten der NHEJ besitzt, ließe sich durch weitere Ko-Immunpräzipitationen herausfinden. Dabei könnte man entweder die Punktmutante verwenden, welche nicht mehr Ubiquitiniert werden kann oder man erreicht durch siRNA eine verminderte BRCA1 Expression und testet, ob es zu einer verminderten Interaktion mit anderen NHEJ Komponenten kommt. Eine weitere Möglichkeit wäre die Verwendung der Ubiquitinmutante ohne Lysin. Damit wäre es der Zelle nicht möglich Ubiquitinketten an Ku80 anzuknüpfen und man könnte ebenfalls auf ein verändertes Interaktionsmuster testen. Allerdings hätte der Versuch mit der Ubiquitinmutante den Nachteil, dass alle Proteine der Zelle nur noch (multi-) Monoubiquitiniert werden könnten, was ebenfalls Einfluss auf deren Verhalten und Funktion haben könnte und eine definitive Aussage schwierig werden lässt.

Da sich auch bei der Überexpression von RNF8 eine verstärkte Ubiquitinierung des Ku80-Proteins gezeigt hat, sollten auch in diese Richtung weitere Versuche geplant werden. Möglich wäre wieder eine Untersuchung der Ubiquitinierungsstärke bei einer verminderten RNF8 Expression mittels siRNA. Auch sollte man das Interaktionsmuster von Ku80 in Ab- oder Anwesenheit von RNF8 untersuchen. Wichtig wäre, ob mittels Ko-Immunpräzipitation eine direkte Interaktion von RNF8 mit Ku80 nachzuweisen wäre.

Zum Schluss könnte man noch auf andere posttranslationelle Modifikationen wie SUMOylierung und NEDDylierung testen und anhand des gleichen Versuchsaufbaus wie für die Ubiquitinierung, die Rolle dieser Arten von Modifikationen versuchen zu bestimmen.

6. Literatur

Abbott, D. W., Thompson, M. E., Robinson-Benion, C., Tomlinson, G., Jensen, R. A., and Holt, J. T. (1999). BRCA1 expression restores radiation resistance in BRCA1-defective cancer cells through enhancement of transcription-coupled DNA repair. *The Journal of biological chemistry* 274, 18808-18812.

Ahnesorg, P., Smith, P., and Jackson, S. P. (2006). XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* 124, 301-313.

Al-Hakim, A. K., Zagorska, A., Chapman, L., Deak, M., Peggie, M., and Alessi, D. R. (2008). Control of AMPK-related kinases by USP9X and at typical Lys(29)/Lys(33)-linked polyubiquitin chains. *The Biochemical journal* 411, 249-260.

Andres, S. N., Modesti, M., Tsai, C. J., Chu, G., and Junop, M. S. (2007). Crystal structure of human XLF: a twist in nonhomologous DNA end-joining. *Molecular cell* 28, 1093-1101.

Baer, R., and Ludwig, T. (2002). The BRCA1/BARD1 heterodimer, a tumor suppressor complex with ubiquitin E3 ligase activity. *Current opinion in genetics & development* 12, 86-91.

Bakkenist, C. J., and Kastan, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499-506.

Baldeyron, C., Jacquemin, E., Smith, J., Jacquemont, C., De Oliveira, I., Gad, S., Feunteun, J., Stoppa-Lyonnet, D., and Papadopoulos, D. (2002). A single mutated BRCA1 allele leads to impaired fidelity of double strand break end-joining. *Oncogene* 21, 1401-1410.

Barker, D. F., Almeida, E. R., Casey, G., Fain, P. R., Liao, S. Y., Masunaka, I., Noble, B., Kurosaki, T., and Anton-Culver, H. (1996). BRCA1 R841W: a strong candidate for a common mutation with moderate phenotype. *Genet Epidemiol* 13, 595-604.

Bau, D. T., Fu, Y. P., Chen, S. T., Cheng, T. C., Yu, J. C., Wu, P. E., and Shen, C. Y. (2004). Breast cancer risk and the DNA double-strand break end-joining capacity of nonhomologous end-joining genes are affected by BRCA1. *Cancer research* 64, 5013-5019.

Bekker-Jensen, S., Lukas, C., Melander, F., Bartek, J., and Lukas, J. (2005). Dynamic assembly and sustained retention of 53BP1 at the sites of DNA damage are controlled by Mdc1/NFBD1. *The Journal of cell biology* 170, 201-211.

Blocher, D., and Pohlit, W. (1982). DNA double strand breaks in Ehrlich ascites tumour cells at low doses of x-rays. II. Can cell death be attributed to double strand breaks? *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 42, 329-338.

Bogue, M. A., Wang, C., Zhu, C., and Roth, D. B. (1997). V(D)J recombination in Ku86-deficient mice: distinct effects on coding, signal, and hybrid joint formation. *Immunity* 7, 37-47.

Bork, P., Hofmann, K., Bucher, P., Neuwald, A. F., Altschul, S. F., and Koonin, E. V. (1997). A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *Faseb J* 11, 68-76.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Bressan, D. A., Baxter, B. K., and Petrini, J. H. (1999). The Mre11-Rad50-Xrs2 protein complex facilitates homologous recombination-based double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 19, 7681-7687.

Bryans, M., Valenzano, M. C., and Stamato, T. D. (1999). Absence of DNA ligase IV protein in XR-1 cells: evidence for stabilization by XRCC4. *Mutation research* 433, 53-58.

Buck, D., Malivert, L., de Chasseval, R., Barraud, A., Fondaneche, M. C., Sanal, O., Plebani, A., Stephan, J. L., Hufnagel, M., le Deist, F., Fischer, A., Durandy, A., de Villartay, J. P., and Revy, P. (2006). Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell* 124, 287-299.

Bugreev, D. V., Hanaoka, F., and Mazin, A. V. (2007). Rad54 dissociates homologous recombination intermediates by branch migration. *Nature structural & molecular biology* 14, 746-753.

Callebaut, I., and Mornon, J. P. (1997). From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS letters* 400, 25-30.

Cantor, S. B., Bell, D. W., Ganesan, S., Kass, E. M., Drapkin, R., Grossman, S., Wahrer, D. C., Sgroi, D. C., Lane, W. S., Haber, D. A., and Livingston, D. M. (2001). BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell* 105, 149-160.

Cary, R. B., Peterson, S. R., Wang, J., Bear, D. G., Bradbury, E. M., and Chen, D. J. (1997). DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 4267-4272.

Chan, D. W., Ye, R., Veillette, C. J., and Lees-Miller, S. P. (1999). DNA-dependent protein kinase phosphorylation sites in Ku 70/80 heterodimer. *Biochemistry* 38, 1819-1828.

Chan, N. L., and Hill, C. P. (2001). Defining polyubiquitin chain topology. *Nature structural biology* 8, 650-652.

Chang, C., Biedermann, K. A., Mezzina, M., and Brown, J. M. (1993). Characterization of the DNA double strand break repair defect in scid mice. *Cancer research* 53, 1244-1248.

Chapman, J. R., and Jackson, S. P. (2008). Phospho-dependent interactions between NBS1 and MDC1 mediate chromatin retention of the MRN complex at sites of DNA damage. *EMBO reports* 9, 795-801.

Chapman, M. S., and Verma, I. M. (1996). Transcriptional activation by BRCA1. *Nature* 382, 678-679.

Chastagner, P., Israel, A., and Brou, C. (2006). Itch/AIP4 mediates Deltex degradation through the formation of K29-linked polyubiquitin chains. *EMBO reports* 7, 1147-1153.

Chen, A., Kleiman, F. E., Manley, J. L., Ouchi, T., and Pan, Z. Q. (2002). Autoubiquitination of the BRCA1*BARD1 RING ubiquitin ligase. *The Journal of biological chemistry* 277, 22085-22092.

Chen, C., and Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Molecular and Cellular Biology* 7, 2745-2752.

Choudhury, A. D., Xu, H., and Baer, R. (2004). Ubiquitination and proteasomal degradation of the BRCA1 tumor suppressor is regulated during cell cycle progression. *The Journal of biological chemistry* 279, 33909-33918.

Chowdhury, D., Keogh, M. C., Ishii, H., Peterson, C. L., Buratowski, S., and Lieberman, J. (2005). gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Molecular cell* 20, 801-809.

Chowdhury, D., Xu, X., Zhong, X., Ahmed, F., Zhong, J., Liao, J., Dykxhoorn, D. M., Weinstock, D. M., Pfeifer, G. P., and Lieberman, J. (2008). A PP4-phosphatase complex dephosphorylates gamma-H2AX generated during DNA replication. *Molecular cell* 31, 33-46.

Coupier, I., Baldeyron, C., Rousseau, A., Mosseri, V., Pages-Berhouet, S., Caux-Moncoutier, V., Papadopoulo, D., and Stoppa-Lyonnet, D. (2004). Fidelity of DNA double-strand break repair in heterozygous cell lines harbouring BRCA1 missense mutations. *Oncogene* 23, 914-919.

Daley, J. M., Laan, R. L., Suresh, A., and Wilson, T. E. (2005). DNA joint dependence of pol X family polymerase action in nonhomologous end joining. *The Journal of biological chemistry* 280, 29030-29037.

David, Y., Ziv, T., Admon, A., and Navon, A. (2010). The E2 ubiquitin-conjugating enzymes direct polyubiquitination to preferred lysines. *The Journal of biological chemistry* 285, 8595-8604.

Davies, O. R., and Pellegrini, L. (2007). Interaction with the BRCA2 C terminus protects RAD51-DNA filaments from disassembly by BRC repeats. *Nature structural & molecular biology* 14, 475-483.

Deckbar, D., Birraux, J., Krempler, A., Tchouandong, L., Beucher, A., Walker, S., Stiff, T., Jeggo, P., and Lobrich, M. (2007). Chromosome breakage after G2 checkpoint release. *The Journal of cell biology* 176, 749-755.

Difilippantonio, S., Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H. T., Reina San Martin, B., Van Laethem, F., Yang, Y. P., Petukhova, G. V., Eckhaus, M., Feigenbaum, L., Manova, K., Kruhlak, M., Camerini-Otero, R. D., Sharan, S., Nussenzweig, M., and Nussenzweig, A. (2005). Role of Nbs1 in the activation of the Atm kinase revealed in humanized mouse models. *Nature cell biology* 7, 675-685.

Doil, C., Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Menard, P., Larsen, D. H., Pepperkok, R., Ellenberg, J., Panier, S., Durocher, D., Bartek, J., Lukas, J., and Lukas, C. (2009). RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell* 136, 435-446.

Dong, Y., Hakimi, M. A., Chen, X., Kumaraswamy, E., Cooch, N. S., Godwin, A. K., and Shiekhata, R. (2003). Regulation of BRCC, a holoenzyme complex containing BRCA1 and BRCA2, by a signalosome-like subunit and its role in DNA repair. *Molecular cell* 12, 1087-1099.

Du, L. L., Nakamura, T. M., and Russell, P. (2006). Histone modification-dependent and -independent pathways for recruitment of checkpoint protein Crb2 to double-strand breaks. *Genes & development* 20, 1583-1596.

Dubiel, W., and Gordon, C. (1999). Ubiquitin pathway: another link in the polyubiquitin chain? *Current biology* : CB 9, R554-557.

Durocher, F., Shattuck-Eidens, D., McClure, M., Labrie, F., Skolnick, M. H., Goldgar, D. E., and Simard, J. (1996). Comparison of BRCA1 polymorphisms, rare sequence variants and/or missense mutations in unaffected and breast/ovarian cancer populations. *Human Molecular Genetics* 5, 835-842.

Easton, D. F., Bishop, D. T., Ford, D., and Rockford, G. P. (1993). Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 52, 678-701.

Esashi, F., Galkin, V. E., Yu, X., Egelman, E. H., and West, S. C. (2007). Stabilization of RAD51 nucleoprotein filaments by the C-terminal region of BRCA2. *Nature structural & molecular biology* 14, 468-474.

Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M., and Nussenzweig, A. (2004). H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA repair* 3, 959-967.

Finn, R. D., Mistry, J., Tate, J., Coggill, P., Heger, A., Pollington, J. E., Gavin, O. L., Gunasekaran, P., Ceric, G., Forslund, K., Holm, L., Sonnhammer, E. L., Eddy, S. R., and Bateman, A. (2010). The Pfam protein families database. *Nucleic acids research* 38, D211-222.

Foray, N., Marot, D., Gabriel, A., Randrianarison, V., Carr, A. M., Perricaudet, M., Ashworth, A., and Jeggo, P. (2003). A subset of ATM- and ATR-dependent phosphorylation events requires the BRCA1 protein. *The EMBO journal* 22, 2860-2871.

Foster, R. E., Nnakwe, C., Woo, L., and Frank, K. M. (2006). Monoubiquitination of the nonhomologous end joining protein XRCC4. *Biochemical and biophysical research communications* 341, 175-183.

Franco, S., Alt, F. W., and Manis, J. P. (2006). Pathways that suppress programmed DNA breaks from progressing to chromosomal breaks and translocations. *DNA repair* 5, 1030-1041.

Friedman, L. S., Ostermeyer, E. A., Szabo, C. I., Dowd, P., Lynch, E. D., Rowell, S. E., and King, M. C. (1994). Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nature genetics* 8, 399-404.

Frit, P., Canitrot, Y., Muller, C., Foray, N., Calsou, P., Marangoni, E., Bourhis, J., and Salles, B. (1999). Cross-resistance to ionizing radiation in a murine leukemic cell line resistant to cis-dichlorodiammineplatinum(II): role of Ku autoantigen. *Mol Pharmacol* 56, 141-146.

Fu, Y. P., Yu, J. C., Cheng, T. C., Lou, M. A., Hsu, G. C., Wu, C. Y., Chen, S. T., Wu, H. S., Wu, P. E., and Shen, C. Y. (2003). Breast cancer risk associated with genotypic polymorphism of the nonhomologous end-joining genes: a multigenic study on cancer susceptibility. *Cancer research* 63, 2440-2446.

Garcia-Higuera, I., Taniguchi, T., Ganesan, S., Meyn, M. S., Timmers, C., Hejna, J., Grompe, M., and D'Andrea, A. D. (2001). Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Molecular cell* 7, 249-262.

Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T. E., Mann, M., and Lieber, M. R. (1997). Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* 388, 492-495.

Grawunder, U., Zimmer, D., Kulesza, P., and Lieber, M. R. (1998). Requirement for an interaction of XRCC4 with DNA ligase IV for wild-type V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in vivo. *The Journal of biological chemistry* 273, 24708-24714.

Greenberg, R. A., Sobhian, B., Pathania, S., Cantor, S. B., Nakatani, Y., and Livingston, D. M. (2006). Multifactorial contributions to an acute DNA damage response by BRCA1/BARD1-containing complexes. *Genes & development* 20, 34-46.

Gu, Y., Seidl, K. J., Rathbun, G. A., Zhu, C., Manis, J. P., van der Stoep, N., Davidson, L., Cheng, H. L., Sekiguchi, J. M., Frank, K., Stanhope-Baker, P., Schlissel, M. S., Roth, D. B., and Alt, F. W. (1997). Growth retardation and leaky SCID phenotype of Ku70-deficient mice. *Immunity* 7, 653-665.

Haglund, K., Di Fiore, P. P., and Dikic, I. (2003). Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem Sci* 28, 598-603.

Haglund, K., and Dikic, I. (2005). Ubiquitylation and cell signaling. *The EMBO journal* 24, 3353-3359.

Hammet, A., Magill, C., Heierhorst, J., and Jackson, S. P. (2007). Rad9 BRCT domain interaction with phosphorylated H2AX regulates the G1 checkpoint in budding yeast. *EMBO reports* 8, 851-857.

Hashizume, R., Fukuda, M., Maeda, I., Nishikawa, H., Oyake, D., Yabuki, Y., Ogata, H., and Ohta, T. (2001). The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *The Journal of biological chemistry* 276, 14537-14540.

Helmink, B. A., Bredemeyer, A. L., Lee, B. S., Huang, C. Y., Sharma, G. G., Walker, L. M., Bednarski, J. J., Lee, W. L., Pandita, T. K., Bassing, C. H., and Sleckman, B. P. (2009). MRN complex function in the repair of chromosomal Rag-mediated DNA double-strand breaks. *J Exp Med* 206, 669-679.

Hentges, P., Ahnesorg, P., Pitcher, R. S., Bruce, C. K., Kysela, B., Green, A. J., Bianchi, J., Wilson, T. E., Jackson, S. P., and Doherty, A. J. (2006). Evolutionary and functional conservation of the DNA non-homologous end-joining protein, XLF/Cernunnos. *The Journal of biological chemistry* 281, 37517-37526.

Hershko, A., and Ciechanover, A. (1992). The ubiquitin system for protein degradation. *Annual review of biochemistry* 61, 761-807.

Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry* 67, 425-479.

Heyer, W. D., Li, X., Rolfsmeier, M., and Zhang, X. P. (2006). Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination? *Nucleic acids research* 34, 4115-4125.

Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annual review of genetics* 30, 405-439.

Hochstrasser, M. (2006). Lingering mysteries of ubiquitin-chain assembly. *Cell* 124, 27-34.

Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419, 135-141.

Hofmann, R. M., and Pickart, C. M. (1999). Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* 96, 645-653.

Huang, A., de Jong, R. N., Wienk, H., Winkler, G. S., Timmers, H. T., and Boelens, R. (2009). E2-c-Cbl recognition is necessary but not sufficient for ubiquitination activity. *Journal of molecular biology* 385, 507-519.

Huang, H., Jeon, M. S., Liao, L., Yang, C., Elly, C., Yates, J. R., 3rd, and Liu, Y. C. (2010). K33-linked polyubiquitination of T cell receptor-zeta regulates proteolysis-independent T cell signaling. *Immunity* 33, 60-70.

Huang, T. T., and D'Andrea, A. D. (2006). Regulation of DNA repair by ubiquitylation. *Nature reviews Molecular cell biology* 7, 323-334.

Huen, M. S., Grant, R., Manke, I., Minn, K., Yu, X., Yaffe, M. B., and Chen, J. (2007). RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. *Cell* 131, 901-914.

Huen, M. S., Huang, J., Yuan, J., Yamamoto, M., Akira, S., Ashley, C., Xiao, W., and Chen, J. (2008). Noncanonical E2 variant-independent function of UBC13 in promoting checkpoint protein assembly. *Molecular and Cellular Biology* 28, 6104-6112.

Ikeda, F., and Dikic, I. (2008). Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series. *EMBO reports* 9, 536-542.

Ira, G., and Haber, J. E. (2002). Characterization of RAD51-independent break-induced replication that acts preferentially with short homologous sequences. *Molecular and Cellular Biology* 22, 6384-6392.

Jin, L., Williamson, A., Banerjee, S., Philipp, I., and Rape, M. (2008). Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex. *Cell* 133, 653-665.

Johnson, E. S., Ma, P. C., Ota, I. M., and Varshavsky, A. (1995). A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *The Journal of biological chemistry* 270, 17442-17456.

Johzuka, K., and Ogawa, H. (1995). Interaction of Mre11 and Rad50: two proteins required for DNA repair and meiosis-specific double-strand break formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 139, 1521-1532.

Kentsis, A., Gordon, R. E., and Borden, K. L. (2002). Control of biochemical reactions through supramolecular RING domain self-assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 15404-15409.

Kim, H. T., Kim, K. P., Lledias, F., Kisselev, A. F., Scaglione, K. M., Skowyra, D., Gygi, S. P., and Goldberg, A. L. (2007). Certain pairs of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) and ubiquitin-protein ligases (E3s) synthesize nondegradable forked ubiquitin chains containing all possible isopeptide linkages. *The Journal of biological chemistry* 282, 17375-17386.

Kleiman, F. E., and Manley, J. L. (1999). Functional interaction of BRCA1-associated BARD1 with polyadenylation factor CstF-50. *Science* 285, 1576-1579.

Koike, M., Awaji, T., Kataoka, M., Tsujimoto, G., Kartasova, T., Koike, A., and Shiomi, T. (1999). Differential subcellular localization of DNA-dependent protein kinase components Ku and DNA-PKcs during mitosis. *Journal of cell science* 112 (Pt 22), 4031-4039.

Kolas, N. K., Chapman, J. R., Nakada, S., Ylanko, J., Chahwan, R., Sweeney, F. D., Panier, S., Mendez, M., Wildenhain, J., Thomson, T. M., Pelletier, L., Jackson, S. P., and Durocher, D. (2007). Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science* 318, 1637-1640.

Komander, D. (2009). The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochemical Society transactions* 37, 937-953.

Koonin, E. V., Altschul, S. F., and Bork, P. (1996). BRCA1 protein products ... Functional motifs. *Nature genetics* 13, 266-268.

Kozlov, S. V., Graham, M. E., Peng, C., Chen, P., Robinson, P. J., and Lavin, M. F. (2006). Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. *The EMBO journal* 25, 3504-3514.

Krum, S. A., Miranda, G. A., Lin, C., and Lane, T. F. (2003). BRCA1 associates with processive RNA polymerase II. *The Journal of biological chemistry* 278, 52012-52020.

Kurimasa, A., Ouyang, H., Dong, L. J., Wang, S., Li, X., Cordon-Cardo, C., Chen, D. J., and Li, G. C. (1999). Catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase: impact on lymphocyte development and tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 1403-1408.

Lee, J. H., and Paull, T. T. (2004). Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science* 304, 93-96.

Lee, J. H., and Paull, T. T. (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* 308, 551-554.

Lee, K. J., Jovanovic, M., Udayakumar, D., Bladen, C. L., and Dynan, W. S. (2004). Identification of DNA-PKcs phosphorylation sites in XRCC4 and effects of mutations at these sites on DNA end joining in a cell-free system. *DNA repair* 3, 267-276.

Li, G., Nelsen, C., and Hendrickson, E. A. (2002). Ku86 is essential in human somatic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 832-837.

Li, L., Halaby, M. J., Hakem, A., Cardoso, R., El Ghamrasni, S., Harding, S., Chan, N., Bristow, R., Sanchez, O., Durocher, D., and Hakem, R. (2010). Rnf8 deficiency impairs class switch recombination, spermatogenesis, and genomic integrity and predisposes for cancer. *J Exp Med* 207, 983-997.

Liu, Y., Tarsounas, M., O'Regan, P., and West, S. C. (2007). Role of RAD51C and XRCC3 in genetic recombination and DNA repair. *The Journal of biological chemistry* 282, 1973-1979.

Llorente, B., and Symington, L. S. (2004). The Mre11 nuclease is not required for 5' to 3' resection at multiple HO-induced double-strand breaks. *Molecular and Cellular Biology* 24, 9682-9694.

Lloyd, J., Chapman, J. R., Clapperton, J. A., Haire, L. F., Hartsuiker, E., Li, J., Carr, A. M., Jackson, S. P., and Smerdon, S. J. (2009). A supramodular FHA/BRCT-repeat architecture mediates Nbs1 adaptor function in response to DNA damage. *Cell* 139, 100-111.

Lobrich, M., Ikpeme, S., and Kiefer, J. (1994a). DNA double-strand break measurement in mammalian cells by pulsed-field gel electrophoresis: an approach using restriction enzymes and gene probing. *International journal of radiation biology* 65, 623-630.

Lobrich, M., Ikpeme, S., and Kiefer, J. (1994b). Measurement of DNA double-strand breaks in mammalian cells by pulsed-field gel electrophoresis: a new approach using rarely cutting restriction enzymes. *Radiation research* 138, 186-192.

Lorick, K. L., Jensen, J. P., Fang, S., Ong, A. M., Hatakeyama, S., and Weissman, A. M. (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 11364-11369.

Lu, L. Y., Wu, J., Ye, L., Gavrulina, G. B., Saunders, T. L., and Yu, X. (2010). RNF8-dependent histone modifications regulate nucleosome removal during spermatogenesis. *Developmental cell* 18, 371-384.

Lukas, C., Melander, F., Stucki, M., Falck, J., Bekker-Jensen, S., Goldberg, M., Lerenthal, Y., Jackson, S. P., Bartek, J., and Lukas, J. (2004). Mdc1 couples DNA double-strand break recognition by Nbs1 with its H2AX-dependent chromatin retention. *The EMBO journal* 23, 2674-2683.

Ma, Y., Lu, H., Schwarz, K., and Lieber, M. R. (2005). Repair of double-strand DNA breaks by the human nonhomologous DNA end joining pathway: the iterative processing model. *Cell Cycle* 4, 1193-1200.

Ma, Y., Lu, H., Tippin, B., Goodman, M. F., Shimazaki, N., Koiwai, O., Hsieh, C. L., Schwarz, K., and Lieber, M. R. (2004). A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining. *Molecular cell* 16, 701-713.

Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., and Lieber, M. R. (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108, 781-794.

Mace, P. D., Linke, K., Feltham, R., Schumacher, F. R., Smith, C. A., Vaux, D. L., Silke, J., and Day, C. L. (2008). Structures of the cIAP2 RING domain reveal conformational changes associated with ubiquitin-conjugating enzyme (E2) recruitment. *The Journal of biological chemistry* 283, 31633-31640.

Mahajan, K. N., Gangi-Peterson, L., Sorscher, D. H., Wang, J., Gathy, K. N., Mahajan, N. P., Reeves, W. H., and Mitchell, B. S. (1999). Association of terminal deoxynucleotidyl transferase with Ku. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 13926-13931.

Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Fastrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C., and Lukas, J. (2007). RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell* 131, 887-900.

Mallery, D. L., Vandenberg, C. J., and Hiom, K. (2002). Activation of the E3 ligase function of the BRCA1/BARD1 complex by polyubiquitin chains. *The EMBO journal* 21, 6755-6762.

Maloisel, L., Fabre, F., and Gangloff, S. (2008). DNA polymerase delta is preferentially recruited during homologous recombination to promote heteroduplex DNA extension. *Molecular and Cellular Biology* 28, 1373-1382.

Manis, J. P., Morales, J. C., Xia, Z., Kutok, J. L., Alt, F. W., and Carpenter, P. B. (2004). 53BP1 links DNA damage-response pathways to immunoglobulin heavy chain class-switch recombination. *Nat Immunol* 5, 481-487.

Mansour, W. Y., Schumacher, S., Roskopf, R., Rhein, T., Schmidt-Petersen, F., Gatzemeier, F., Haag, F., Borgmann, K., Willers, H., and Dahm-Daphi, J. (2008). Hierarchy of nonhomologous end-joining, single-strand annealing and gene conversion at site-directed DNA double-strand breaks. *Nucleic acids research* 36, 4088-4098.

Matsumoto, Y., Suzuki, N., Namba, N., Umeda, N., Ma, X. J., Morita, A., Tomita, M., Enomoto, A., Serizawa, S., Hirano, K., Sakaia, K., Yasuda, H., and Hosoi, Y. (2000). Cleavage and phosphorylation of XRCC4 protein induced by X-irradiation. *FEBS letters* 478, 67-71.

Melander, F., Bekker-Jensen, S., Falck, J., Bartek, J., Mailand, N., and Lukas, J. (2008). Phosphorylation of SDT repeats in the MDC1 N terminus triggers retention of NBS1 at the DNA damage-modified chromatin. *The Journal of cell biology* 181, 213-226.

Meyer, P., Voigtlaender, T., Bartram, C. R., and Klaes, R. (2003). Twenty-three novel BRCA1 and BRCA2 sequence alterations in breast and/or ovarian cancer families in Southern Germany. *Hum Mutat* 22, 259.

Mickelsen, S., Snyder, C., Trujillo, K., Bogue, M., Roth, D. B., and Meek, K. (1999). Modulation of terminal deoxynucleotidyltransferase activity by the DNA-dependent protein kinase. *J Immunol* 163, 834-843.

Mimori, T., Akizuki, M., Yamagata, H., Inada, S., Yoshida, S., and Homma, M. (1981). Characterization of a high molecular weight acidic nuclear protein recognized by autoantibodies in sera from patients with polymyositis-scleroderma overlap. *The Journal of clinical investigation* 68, 611-620.

Monteiro, A. N., August, A., and Hanafusa, H. (1996). Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 C-terminal region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 13595-13599.

Moore, J. K., and Haber, J. E. (1996). Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 16, 2164-2173.

Moreau, S., Ferguson, J. R., and Symington, L. S. (1999). The nuclease activity of Mre11 is required for meiosis but not for mating type switching, end joining, or telomere maintenance. *Molecular and Cellular Biology* 19, 556-566.

Moreau, S., Morgan, E. A., and Symington, L. S. (2001). Overlapping functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Mre11, Exo1 and Rad27 nucleases in DNA metabolism. *Genetics* 159, 1423-1433.

Moynahan, M. E., Chiu, J. W., Koller, B. H., and Jasin, M. (1999). Brca1 controls homology-directed DNA repair. *Molecular cell* 4, 511-518.

Mukhopadhyay, D., and Riezman, H. (2007). Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* 315, 201-205.

Muller, C., Dusseau, C., Calsou, P., and Salles, B. (1998). Human normal peripheral blood B-lymphocytes are deficient in DNA-dependent protein kinase activity due to the expression of a variant form of the Ku86 protein. *Oncogene* 16, 1553-1560.

Murr, R., Loizou, J. I., Yang, Y. G., Cuenin, C., Li, H., Wang, Z. Q., and Herceg, Z. (2006). Histone acetylation by Trrap-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks. *Nature cell biology* 8, 91-99.

Myung, K., He, D. M., Lee, S. E., and Hendrickson, E. A. (1997). KARP-1: a novel leucine zipper protein expressed from the Ku86 autoantigen locus is implicated in the control of DNA-dependent protein kinase activity. *The EMBO journal* 16, 3172-3184.

Nakada, S., Chen, G. I., Gingras, A. C., and Durocher, D. (2008). PP4 is a gamma H2AX phosphatase required for recovery from the DNA damage checkpoint. *EMBO reports* 9, 1019-1026.

Nicassio, F., Corrado, N., Vissers, J. H., Areces, L. B., Bergink, S., Marteijn, J. A., Geverts, B., Houtsmuller, A. B., Vermeulen, W., Di Fiore, P. P., and Citterio, E. (2007). Human USP3 is a chromatin modifier required for S phase progression and genome stability. *Current biology : CB* 17, 1972-1977.

Nick McElhinny, S. A., Havener, J. M., Garcia-Diaz, M., Juarez, R., Bebenek, K., Kee, B. L., Blanco, L., Kunkel, T. A., and Ramsden, D. A. (2005). A gradient of template dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining. *Molecular cell* 19, 357-366.

Nick McElhinny, S. A., Snowden, C. M., McCarville, J., and Ramsden, D. A. (2000). Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Molecular and Cellular Biology* 20, 2996-3003.

Nishikawa, H., Ooka, S., Sato, K., Arima, K., Okamoto, J., Klevit, R. E., Fukuda, M., and Ohta, T. (2004). Mass spectrometric and mutational analyses reveal Lys-6-linked polyubiquitin chains catalyzed by BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase. *The Journal of biological chemistry* 279, 3916-3924.

Noon, A. T., Shibata, A., Rief, N., Lobrich, M., Stewart, G. S., Jeggo, P. A., and Goodarzi, A. A. (2010). 53BP1-dependent robust localized KAP-1 phosphorylation is essential for heterochromatic DNA double-strand break repair. *Nature cell biology* 12, 177-184.

Nussenzweig, A., Chen, C., da Costa Soares, V., Sanchez, M., Sokol, K., Nussenzweig, M. C., and Li, G. C. (1996). Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. *Nature* 382, 551-555.

Oberle, C., and Blattner, C. (2010). Regulation of the DNA Damage Response to DSBs by Post-Translational Modifications. *Current genomics* 11, 184-198.

Ouyang, H., Nussenzweig, A., Kurimasa, A., Soares, V. C., Li, X., Cordon-Cardo, C., Li, W., Cheong, N., Nussenzweig, M., Iliakis, G., Chen, D. J., and Li, G. C. (1997). Ku70 is required for DNA repair but not for T cell antigen receptor gene recombination *In vivo*. *J Exp Med* 186, 921-929.

Passmore, L. A., and Barford, D. (2004). Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *The Biochemical journal* 379, 513-525.

Paull, T. T., Cortez, D., Bowers, B., Elledge, S. J., and Gellert, M. (2001). Direct DNA binding by Brca1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 6086-6091.

Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M., and Bonner, W. M. (2000). A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current biology : CB* 10, 886-895.

Penengo, L., Mapelli, M., Murachelli, A. G., Confalonieri, S., Magri, L., Musacchio, A., Di Fiore, P. P., Polo, S., and Schneider, T. R. (2006). Crystal structure of the ubiquitin binding domains of rabex-5 reveals two modes of interaction with ubiquitin. *Cell* 124, 1183-1195.

Pickart, C. M. (2004). Back to the future with ubiquitin. *Cell* 116, 181-190.

Pickart, C. M., and Fushman, D. (2004). Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol* 8, 610-616.

Poyurovsky, M. V., Priest, C., Kentsis, A., Borden, K. L., Pan, Z. Q., Pavletich, N., and Prives, C. (2007). The Mdm2 RING domain C-terminus is required for supramolecular assembly and ubiquitin ligase activity. *The EMBO journal* 26, 90-101.

Ramachandran, S., Chahwan, R., Nepal, R. M., Frieder, D., Panier, S., Roa, S., Zaheen, A., Durocher, D., Scharff, M. D., and Martin, A. (2010). The RNF8/RNF168 ubiquitin ligase cascade facilitates class switch recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 809-814.

Ramaekers, C. H., and Wouters, B. G. (2011). Regulatory functions of ubiquitin in diverse DNA damage responses. *Curr Mol Med* 11, 152-169.

Richardson, C., and Jasin, M. (2000). Coupled homologous and nonhomologous repair of a double-strand break preserves genomic integrity in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology* 20, 9068-9075.

Ristic, D., Modesti, M., van der Heijden, T., van Noort, J., Dekker, C., Kanaar, R., and Wyman, C. (2005). Human Rad51 filaments on double- and single-stranded DNA: correlating regular and irregular forms with recombination function. *Nucleic acids research* 33, 3292-3302.

Robert Koch-Institut, GEKID e.V. (Hrsg.): Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends., 7. Ausgabe, 2010, ISBN 978-3-89606-207-9

Rogakou, E. P., Nieves-Neira, W., Boon, C., Pommier, Y., and Bonner, W. M. (2000). Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *The Journal of biological chemistry* 275, 9390-9395.

Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., and Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of biological chemistry* 273, 5858-5868.

Rooney, S., Sekiguchi, J., Zhu, C., Cheng, H. L., Manis, J., Whitlow, S., DeVido, J., Foy, D., Chaudhuri, J., Lombard, D., and Alt, F. W. (2002). Leaky Scid phenotype associated with defective V(D)J coding end processing in Artemis-deficient mice. *Molecular cell* 10, 1379-1390.

Ruffner, H., Joazeiro, C. A., Hemmati, D., Hunter, T., and Verma, I. M. (2001). Cancer-predisposing mutations within the RING domain of BRCA1: loss of ubiquitin protein ligase activity and protection from radiation hypersensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 5134-5139.

Santos, M. A., Huen, M. S., Jankovic, M., Chen, H. T., Lopez-Contreras, A. J., Klein, I. A., Wong, N., Barbancho, J. L., Fernandez-Capetillo, O., Nussenzweig, M. C., Chen, J., and Nussenzweig, A. (2010). Class switching and meiotic defects in mice lacking the E3 ubiquitin ligase RNF8. *J Exp Med* 207, 973-981.

Sato, K., Hayami, R., Wu, W., Nishikawa, T., Nishikawa, H., Okuda, Y., Ogata, H., Fukuda, M., and Ohta, T. (2004). Nucleophosmin/B23 is a candidate substrate for the BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase. *The Journal of biological chemistry* 279, 30919-30922.

Scully, R., Chen, J., Ochs, R. L., Keegan, K., Hoekstra, M., Feunteun, J., and Livingston, D. M. (1997). Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell* 90, 425-435.

Scully, R., Ganesan, S., Brown, M., De Caprio, J. A., Cannistra, S. A., Feunteun, J., Schnitt, S., and Livingston, D. M. (1996). Location of BRCA1 in human breast and ovarian cancer cells. *Science* 272, 123-126.

Sedelnikova, O. A., Rogakou, E. P., Panyutin, I. G., and Bonner, W. M. (2002). Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiation research* 158, 486-492.

Seki, N., Hattori, A., Sugano, S., Suzuki, Y., Nakagawara, A., Ohhira, M., Muramatsu, M., Hori, T., and Saito, T. (1998). Isolation, tissue expression, and chromosomal assignment of a novel human gene which encodes a protein with RING finger motif. *J Hum Genet* 43, 272-274.

Shen, S. X., Weaver, Z., Xu, X., Li, C., Weinstein, M., Chen, L., Guan, X. Y., Ried, T., and Deng, C. X. (1998). A targeted disruption of the murine Brca1 gene causes gamma-irradiation hypersensitivity and genetic instability. *Oncogene* 17, 3115-3124.

Shilatifard, A. (2006). Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annual review of biochemistry* 75, 243-269.

Snouwaert, J. N., Gowen, L. C., Latour, A. M., Mohn, A. R., Xiao, A., DiBiase, L., and Koller, B. H. (1999). BRCA1 deficient embryonic stem cells display a decreased homologous recombination frequency and an increased frequency of non-homologous recombination that is corrected by expression of a brca1 transgene. *Oncogene* 18, 7900-7907.

Song, B., and Sung, P. (2000). Functional interactions among yeast Rad51 recombinase, Rad52 mediator, and replication protein A in DNA strand exchange. *The Journal of biological chemistry* 275, 15895-15904.

Soubeyrand, S., Pope, L., Pakuts, B., and Hache, R. J. (2003). Threonines 2638/2647 in DNA-PK are essential for cellular resistance to ionizing radiation. *Cancer research* 63, 1198-1201.

Soutoglou, E., Dorn, J. F., Sengupta, K., Jasin, M., Nussenzweig, A., Ried, T., Danuser, G., and Misteli, T. (2007). Positional stability of single double-strand breaks in mammalian cells. *Nature cell biology* 9, 675-682.

Spagnolo, L., Rivera-Calzada, A., Pearl, L. H., and Llorca, O. (2006). Three-dimensional structure of the human DNA-PKcs/Ku70/Ku80 complex assembled on DNA and its implications for DNA DSB repair. *Molecular cell* 22, 511-519.

Spence, J., Gali, R. R., Dittmar, G., Sherman, F., Karin, M., and Finley, D. (2000). Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell* 102, 67-76.

Spycher, C., Miller, E. S., Townsend, K., Pavic, L., Morrice, N. A., Janscak, P., Stewart, G. S., and Stucki, M. (2008). Constitutive phosphorylation of MDC1 physically links the MRE11-RAD50-NBS1 complex to damaged chromatin. *The Journal of cell biology* 181, 227-240.

Starita, L. M., Machida, Y., Sankaran, S., Elias, J. E., Griffin, K., Schlegel, B. P., Gygi, S. P., and Parvin, J. D. (2004). BRCA1-dependent ubiquitination of gamma-tubulin regulates centrosome number. *Molecular and Cellular Biology* 24, 8457-8466.

Stewart, G. S., Panier, S., Townsend, K., Al-Hakim, A. K., Kolas, N. K., Miller, E. S., Nakada, S., Ylanko, J., Olivarius, S., Mendez, M., Oldreive, C., Wildenhain, J., Tagliaferro, A., Pelletier, L., Taubenheim, N., Durandy, A., Byrd, P. J., Stankovic, T., Taylor, A. M., and Durocher, D. (2009). The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage. *Cell* 136, 420-434.

Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Lobrich, M., and Jeggo, P. A. (2004). ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer research* 64, 2390-2396.

Stucki, M., Clapperton, J. A., Mohammad, D., Yaffe, M. B., Smerdon, S. J., and Jackson, S. P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* 123, 1213-1226.

Sugasawa, K., Okuda, Y., Saijo, M., Nishi, R., Matsuda, N., Chu, G., Mori, T., Iwai, S., Tanaka, K., and Hanaoka, F. (2005). UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell* 121, 387-400.

Sugawara, N., Wang, X., and Haber, J. E. (2003). In vivo roles of Rad52, Rad54, and Rad55 proteins in Rad51-mediated recombination. *Molecular cell* 12, 209-219.

Sugiyama, T., Zaitseva, E. M., and Kowalczykowski, S. C. (1997). A single-stranded DNA-binding protein is needed for efficient presynaptic complex formation by the *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 protein. *The Journal of biological chemistry* 272, 7940-7945.

Sun, Y., Jiang, X., Xu, Y., Ayrapetov, M. K., Moreau, L. A., Whetstine, J. R., and Price, B. D. (2009). Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60. *Nature cell biology* 11, 1376-1382.

Sung, P. (1994). Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein. *Science* 265, 1241-1243.

Sy, S. M., Huen, M. S., and Chen, J. (2009). PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 7155-7160.

Tai, Y. T., Teoh, G., Lin, B., Davies, F. E., Chauhan, D., Treon, S. P., Raje, N., Hideshima, T., Shima, Y., Podar, K., and Anderson, K. C. (2000). Ku86 variant expression and function in multiple myeloma cells is associated with increased sensitivity to DNA damage. *J Immunol* 165, 6347-6355.

Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C. M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The EMBO journal* 19, 94-102.

Tong, W. M., Cortes, U., Hande, M. P., Ohgaki, H., Cavalli, L. R., Lansdorp, P. M., Haddad, B. R., and Wang, Z. Q. (2002). Synergistic role of Ku80 and poly(ADP-ribose) polymerase in suppressing chromosomal aberrations and liver cancer formation. *Cancer research* 62, 6990-6996.

Trickey, M., Grimaldi, M., and Yamano, H. (2008). The anaphase-promoting complex/cyclosome controls repair and recombination by ubiquitylating Rhp54 in fission yeast. *Molecular and Cellular Biology* 28, 3905-3916.

Tsubouchi, H., and Ogawa, H. (2000). Exo1 roles for repair of DNA double-strand breaks and meiotic crossing over in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell* 11, 2221-2233.

Tuteja, N., Tuteja, R., Ochem, A., Taneja, P., Huang, N. W., Simoncsits, A., Susic, S., Rahman, K., Marusic, L., Chen, J., and et al. (1994). Human DNA helicase II: a novel DNA unwinding enzyme identified as the Ku autoantigen. *The EMBO journal* 13, 4991-5001.

Tuteja, R., and Tuteja, N. (2000). Ku autoantigen: a multifunctional DNA-binding protein. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 35, 1-33.

Valarmathi, M. T., Sawhney, M., Deo, S. S., Shukla, N. K., and Das, S. N. (2004). Novel germline mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes in Indian breast and breast-ovarian cancer families. *Hum Mutat* 23, 205.

Vamvakas, S., Vock, E. H., and Lutz, W. K. (1997). On the role of DNA double-strand breaks in toxicity and carcinogenesis. *Crit Rev Toxicol* 27, 155-174.

Vandenberg, C. J., Gergely, F., Ong, C. Y., Pace, P., Mallery, D. L., Hiom, K., and Patel, K. J. (2003). BRCA1-independent ubiquitination of FANCD2. *Molecular cell* 12, 247-254.

Varadan, R., Assfalg, M., Haririnia, A., Raasi, S., Pickart, C., and Fushman, D. (2004). Solution conformation of Lys63-linked di-ubiquitin chain provides clues to functional diversity of polyubiquitin signaling. *The Journal of biological chemistry* 279, 7055-7063.

Walker, J. R., Corpina, R. A., and Goldberg, J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 412, 607-614.

Wang, B., and Elledge, S. J. (2007). Ubc13/Rnf8 ubiquitin ligases control foci formation of the Rap80/Abraxas/Brca1/Brcc36 complex in response to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 20759-20763.

Wang, B., Matsuoka, S., Ballif, B. A., Zhang, D., Smogorzewska, A., Gygi, S. P., and Elledge, S. J. (2007). Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. *Science* 316, 1194-1198.

Wang, H., Zeng, Z. C., Bui, T. A., DiBiase, S. J., Qin, W., Xia, F., Powell, S. N., and Iliakis, G. (2001). Nonhomologous end-joining of ionizing radiation-induced DNA double-stranded breaks in human tumor cells deficient in BRCA1 or BRCA2. *Cancer research* 61, 270-277.

Wang, Q., Zhang, H., Kajino, K., and Greene, M. I. (1998). BRCA1 binds c-Myc and inhibits its transcriptional and transforming activity in cells. *Oncogene* 17, 1939-1948.

Wang, Q. E., Zhu, Q., Wani, G., El-Mahdy, M. A., Li, J., and Wani, A. A. (2005). DNA repair factor XPC is modified by SUMO-1 and ubiquitin following UV irradiation. *Nucleic acids research* 33, 4023-4034.

Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S. J., and Qin, J. (2000). BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes & development* 14, 927-939.

Ward, I. M., Reina-San-Martin, B., Olaru, A., Minn, K., Tamada, K., Lau, J. S., Cascalho, M., Chen, L., Nussenzweig, A., Livak, F., Nussenzweig, M. C., and Chen, J. (2004). 53BP1 is required for class switch recombination. *The Journal of cell biology* 165, 459-464.

West, R. B., Yaneva, M., and Lieber, M. R. (1998). Productive and nonproductive complexes of Ku and DNA-dependent protein kinase at DNA termini. *Molecular and Cellular Biology* 18, 5908-5920.

Weterings, E., and van Gent, D. C. (2004). The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synapsis. *DNA repair* 3, 1425-1435.

WHO Fact sheet N°297, 2011

Williams, J. S., Williams, R. S., Dovey, C. L., Guenther, G., Tainer, J. A., and Russell, P. (2010). gammaH2A binds Brc1 to maintain genome integrity during S-phase. *The EMBO journal* 29, 1136-1148.

Wilson, T. E., Grawunder, U., and Lieber, M. R. (1997). Yeast DNA ligase IV mediates non-homologous DNA end joining. *Nature* 388, 495-498.

Wilson, T. E., and Lieber, M. R. (1999). Efficient processing of DNA ends during yeast nonhomologous end joining. Evidence for a DNA polymerase beta (Pol4)-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* 274, 23599-23609.

Wu, J., Huen, M. S., Lu, L. Y., Ye, L., Dou, Y., Ljungman, M., Chen, J., and Yu, X. (2009). Histone ubiquitination associates with BRCA1-dependent DNA damage response. *Molecular and Cellular Biology* 29, 849-860.

Wu, L., Luo, K., Lou, Z., and Chen, J. (2008). MDC1 regulates intra-S-phase checkpoint by targeting NBS1 to DNA double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 11200-11205.

Wu, X., and Lieber, M. R. (1996). Protein-protein and protein-DNA interaction regions within the DNA end-binding protein Ku70-Ku86. *Molecular and Cellular Biology* 16, 5186-5193.

Wu, X., Rathbun, G., Lane, W. S., Weaver, D. T., and Livingston, D. M. (2000). Interactions of the Nijmegen breakage syndrome protein with ATM and BRCA1. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 65, 535-545.

Xia, B., Sheng, Q., Nakanishi, K., Ohashi, A., Wu, J., Christ, N., Liu, X., Jasin, M., Couch, F. J., and Livingston, D. M. (2006). Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Molecular cell* 22, 719-729.

Xia, Y., Pao, G. M., Chen, H. W., Verma, I. M., and Hunter, T. (2003). Enhancement of BRCA1 E3 ubiquitin ligase activity through direct interaction with the BARD1 protein. *The Journal of biological chemistry* 278, 5255-5263.

Xu, Z., Kohli, E., Devlin, K. I., Bold, M., Nix, J. C., and Misra, S. (2008). Interactions between the quality control ubiquitin ligase CHIP and ubiquitin conjugating enzymes. *BMC Struct Biol* 8, 26.

Yano, K., Morotomi-Yano, K., Wang, S. Y., Uematsu, N., Lee, K. J., Asaithamby, A., Weterings, E., and Chen, D. J. (2008). Ku recruits XLF to DNA double-strand breaks. *EMBO reports* 9, 91-96.

Yavuzer, U., Smith, G. C., Bliss, T., Werner, D., and Jackson, S. P. (1998). DNA end-independent activation of DNA-PK mediated via association with the DNA-binding protein C1D. *Genes & development* 12, 2188-2199.

Yu, X., and Chen, J. (2004). DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains. *Molecular and Cellular Biology* 24, 9478-9486.

Yu, Y., Mahaney, B. L., Yano, K., Ye, R., Fang, S., Douglas, P., Chen, D. J., and Lees-Miller, S. P. (2008). DNA-PK and A TM phosphorylation sites in XLF/Cernunnos are not required for repair of DNA double strand breaks. *DNA repair* 7, 1680-1692.

Yurchenko, V., Xue, Z., and Sadofsky, M. J. (2006). SUMO modification of human XRCC4 regulates its localization and function in DNA double-strand break repair. *Molecular and Cellular Biology* 26, 1786-1794.

Zhang, F., Fan, Q., Ren, K., and Andreassen, P. R. (2009a). PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2. *Molecular cancer research : MCR* 7, 1110-1118.

Zhang, F., Ma, J., Wu, J., Ye, L., Cai, H., Xia, B., and Yu, X. (2009b). PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. *Current biology : CB* 19, 524-529.

Zhang, M., Windheim, M., Roe, S. M., Peggie, M., Cohen, P., Prodromou, C., and Pearl, L. H. (2005). Chaperoned ubiquitylation--crystal structures of the CHIP U box E3 ubiquitin ligase and a CHIP-Ubc13-Uev1a complex. *Molecular cell* 20, 525-538.

Zheng, N., Wang, P., Jeffrey, P. D., and Pavletich, N. P. (2000). Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell* 102, 533-539.

Zhong, Q., Boyer, T. G., Chen, P. L., and Lee, W. H. (2002a). Deficient nonhomologous end-joining activity in cell-free extracts from Brca1-null fibroblasts. *Cancer research* 62, 3966-3970.

Zhong, Q., Chen, C. F., Chen, P. L., and Lee, W. H. (2002b). BRCA1 facilitates microhomology-mediated end joining of DNA double strand breaks. *The Journal of biological chemistry* 277, 28641-28647.

Zhong, Q., Chen, C. F., Li, S., Chen, Y., Wang, C. C., Xiao, J., Chen, P. L., Sharp, Z. D., and Lee, W. H. (1999). Association of BRCA1 with the hRad50-hMre11-p95 complex and the DNA damage response. *Science* 285, 747-750.

Zhou, B. B., and Elledge, S. J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433-439.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 14: Verwendete Abkürzungen.

A	Adenin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATM	Ataxia-telangiectasia, mutiert
BARD1	<i>Brca1 associated ring domain 1</i>
BER	Basen Exzisionsreparatur
bp	Basenpaare
BRCA1	<i>Breast cancer type 1 susceptibility protein</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (rinderserum albumin)
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cDNA	komplementäre DNA
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbeccos modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (deoxyribonukleinsäure, dns)
DNA-PK	DNA-Proteinkinase
dNTP	deoxy-Nukleotidtriphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
DSBR	Doppelstrangbruch-Reparatur
DTT	Dithiotreithol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ER	Estrogen Rezeptor
etc.	<i>Et cetera</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (fötales rinderserum)
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (fötales kälberserum)

for	<i>forward</i>
g	<i>Gravitational acceleration</i>
G	Guanin
Gy	Gray
h	Hour (Stunde/Stunden)
HBS	<i>Hepes buffered saline</i>
HEPES	<i>Hydroxyethylpiperazineethanesulfonic acid</i>
His	Histidin
HR	Homologe Rekombination
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IgG	Immunglobulin G
IF	Immunfluoreszenz
IR	<i>Ionizing radiation</i>
k	Kilo
K	Lysin
Ko-IP	Ko-Immunpräzipitation
Ku70	<i>Lupus Ku autoantigen protein p70</i>
Ku80	<i>Lupus Ku autoantigen protein p80</i>
l	Liter
M	Molar
min	Minute/Minuten
ml	Mililiter
MMEJ	<i>microhomology-mediated end joining</i> (Mikrohomologie-vermittelte Endstrangverknüpfung)
mRNA	Messenger RNA
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaH ₂ HPO ₄	Natrium-dihydrogenphosphat
NER	Nukleotid Exzisionsreparatur
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i> (Nicht-homologe Endstrangverknüpfung)
Ni ²⁺	Nickel
NP-40	Nonylphenoethoxylat
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-gelelektrophorese

PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>Proliferatin cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	pH-Wert
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Arginin
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
SDS	<i>Sodium-dodecylsulfat</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
sog.	Sogenannte
T	Thymin
TA	Trimamzinolonazetonid
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N,N', N'-tetramethylenethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
Vgl.	Vergleich(e)
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
XLF	<i>XRCC4-like factor</i>
XRCC4	X-ray repair cross-complementing protein 4
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
°C	Grad Celcius
%	Prozent

7.2. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Florian Naeve
Geburtsdatum: 9. April 1981 in Karlsruhe
Anschrift: Albert-Schweitzer-Straße 60, 76297 Stutensee
Tel.: +49 7249 6719
e-Mail: FlorianNaeve@web.de
Familienstand: ledig

Schulbildung

08/1988 – 07/1992 Besuch der Grund- und Hauptschule Stutensee-Spöck
08/1992 – 06/2001 Besuch des Justus-Knecht-Gymnasiums Bruchsal
Abschluss: Abitur

Hochschulausbildung

10/2002 – 06/2008 Studium der Biologie an der Universität Karlsruhe (TH)
Abschluss: Diplom Biologe
Thema der Diplomarbeit:
„Proteindomänen und ihre Interaktionen in *Treponema pallidum*“

07/2008 - Wissenschaftlicher Angestellter am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), im Institut für Toxikologie und Genetik (ITG)
zum Zwecke der Promotion
Thema der Dissertation:
„Charakterisierung der Ubiquitinierung des Ku80-Proteins“

Sonstiges

07/2001 – 07/2002 Wehrdienst beim 1./Stabs- und Fernmelderegiment 210, Ulm
06/2010 – 07/2010 Fortbildung „Radioaktive Reststoffe und Abfälle“

7.3. Corrigenda

7.3.1. Nachtrag zu 1.4. Ku80

Bei *in vitro* Experimenten mit Extrakten aus Eiern des Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) und mit ³⁵S-Methionin radioaktiv markiertem *Xenopus* Ku80 (xKu80), konnte die Gruppe um Lisa Postow *et al.* zeigen, dass xKu80 in zellfreien Ei-Extrakten nach Bindung an den Doppelstrangbruch ubiquitiniert wird. Diese Ubiquitinierung findet in der zentralen Domäne des Proteins statt. Die dabei verwendeten Ubiquitinmoleküle sind hauptsächlich über das Lysin an Position 48 miteinander verbunden. Da eine Interaktion von xKu80 und Cul1, einem Protein des E3-Ubiquitin-Ligase Komplexes SCF (Skp1-Cul1-F-Box) nachzuweisen ist, wurde der SCF-Komplex als mögliche E3-Ubiquitin-Ligase für xKu80 vorgeschlagen. Postow *et al.* konnten ebenfalls zeigen, dass die Ubiquitinierung von xKu80 als Signal zum Lösen von der DNA dient und xKu80 durch das Proteasom abgebaut wird. Das Entfernen von xKu80 von der DNA mittels Ubiquitinierung wird allerdings nicht zur NHEJ benötigt (Postow, 2011; Postow *et al.*, 2008).

Da sowohl Ku80 als auch BRCA1 bei der DNA-Reparatur eine wichtige Rolle spielen, haben Wei und Mitarbeiter Ku80 und v verschiedene BRCA1-Fragmente auf ihre Interaktion untersucht (Wei *et al.*, 2008). Dabei konnte mittels Ko-Immunpräzipitation gezeigt werden, dass Ku80 und BRCA1 miteinander assoziieren. Der Nachweis einer direkten Interaktion zwischen Ku80 und BRCA1 durch die Verwendung aufgereinigter Proteine, konnte jedoch nicht erbracht werden. Als weiterer Punkt wurde von Wei *et al.* untersucht, ob die Anlagerung von BRCA1 an Doppelstrangbrüche von bestimmten Reparaturfaktoren abhängig ist. Dabei wurde mit Zelllinien gearbeitet, die jeweils negativ für ein bestimmtes Reparatur-Protein sind. In XRV15B-Zellen, welche negativ für Ku80 sind, konnte gezeigt werden, dass das N-terminale Fragment von BRCA1 nicht mehr am DNA-Schaden akkumulieren kann, wenn kein Ku80 vorhanden ist. Das C-terminale Fragment war hierzu jedoch noch in der Lage (Wei *et al.*, 2008).

7.3.2. Nachtrag zu 4.1. Das Ku80 Protein ist ubiquitiniert und 4.2. Die Ubiquitinreste am Ku80 Protein sind über verschiedene Lysine miteinander verknüpft

Im Vergleich zu meinen Ergebnissen, findet bei Postow *et al.* (Postow, 2011; Postow *et al.*, 2008) eine Ubiquitinierung von gebundenem *Xenopus* Ku80 (xKu80) statt. Die einzelnen Ubiquitin-Moleküle sind dabei hauptsächlich über das Lysin an der Position 48 miteinander verknüpft. Eine mögliche Ursache könnte die Verwendung unterschiedlicher Methoden und Systeme sein. Während Postow und Mitarbeiter (Postow, 2011; Postow *et al.*, 2008) *in vitro* mit Extrakten aus *Xenopus* Eiern und dem *Xenopus* Ku80-Protein gearbeitet haben, wurde bei meinen Versuchen in humanen H1299-Zellen gearbeitet. Zwar liegt die Homologie zwischen humanem und *Xenopus* Ku80 bei ca. 62% (Yagura and Sumi, 1999), doch könnte dieser Unterschied dazu beitragen, dass das Ubiquitinierungsmuster verschieden ist. Ebenfalls wäre es möglich, dass das *in vitro* System mit dem Ei-Extrakt nicht die physiologische Realität im Organismus widerspiegelt. Ein deutlicher Unterschied ist auch bei der Art der Ubiquitinkette zu beobachten. Während bei mir im humanen System eine Verknüpfung der Ubiquitin-Moleküle über das Lysin an der Position 48 eher unwahrscheinlich ist und auch kein Abbau des humanen Ku80 durch das 26S Proteasom zu beobachten ist, so zeigt sich bei den Studien von Postow *et al.* (Postow *et al.*, 2008) eine Verknüpfung der Ubiquitin-Moleküle über das Lysin an der Position 48. Damit einher geht auch deren Erkenntnis, dass xKu80 über das Proteasom abgebaut wird. Möglicherweise ist das System zur Regulation der Doppelstrangbruch-Reparatur im Menschen doch weit komplexer aufgebaut als das des Krallenfroschs. Dadurch hat die Ubiquitinierung des Ku80-Proteins im Menschen eine andere Aufgabe (z.B. möglicherweise Bindung an den DNA-Schaden und Rekrutierung weiterer Reparaturfaktoren) als in *Xenopus*, wo die Ubiquitinierung nur zur Entfernung des Ku70/Ku80-Heterodimers und dessen Abbau im Proteasom dient. Die von mir und Postow *et al.* erhaltenen Ergebnisse müssen sich aber nicht notwendigerweise widersprechen. Ebenfalls besteht die Möglichkeit, dass es sich um zwei unterschiedliche Modifikationen handelt, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten vorkommen. Die bei mir beobachtete Ubiquitinierung und deren Verknüpfung über das Lysin an Position 63 stellt möglicherweise den Anfang der Doppelstrangbruch-Reparatur dar und dienen der Bindung von Ku80 an den DNA-Schaden und evtl. der Rekrutierung weiterer Reparaturfaktoren. Postow und Mitarbeiter zeigen hingegen die Ereignisse am Schluss der Doppelstrangbruch-Reparatur, wo das Entfernen von Ku80 von der DNA und dessen Abbau im Proteasom im Vordergrund steht.

7.3.3. Nachtrag zu 4.5. BRCA1 reguliert die Bindung von Ku80 an den DNA-Schaden

Bei der Arbeit von Wei *et al.* wurde gezeigt, dass zumindest das N-terminale Fragment des BRCA1-Proteins auf Ku80 angewiesen ist, um an den DNA-Schaden zu binden (Wei *et al.*, 2008). Dies steht im Gegensatz zu meinem erhaltenen Ergebnis, bei dem das Vorhandensein von BRCA1 eine Voraussetzung ist, damit sich Ku80 in vollem Umfang an den DNA-Schaden anlagern kann. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass bei Wei und Mitarbeitern eine andere Zelllinie verwendet wurde. In diesen Ku80-negative XR15B-Zellen haben sich die physiologischen Begebenheiten möglicherweise geändert und die Zelle hat einen „neuen“ Reparaturweg eingerichtet um den Verlust von Ku80 zu kompensieren. Ein weiterer Grund könnte auch darin liegen, dass zwei unterschiedliche Methoden verwendet wurden. Bei meinen Versuchen wurde eine Chromatin-Immunpräzipitation durchgeführt, wohingegen bei Wei *et al.* die Ergebnisse mittels Immunfluoreszenz erzielt wurden. Ebenfalls ein Unterschied besteht bei der Verwendung von BRCA1. Während ich das Vollängen Protein BRCA1 verwendete, wurde in der Gruppe von Wei und Mitarbeitern mit einem N- und einem C-terminalen Fragment von BRCA1 gearbeitet. Dabei zeigte nur das N-terminale Fragment von BRCA1 eine Abhängigkeit von Ku80. Das C-terminale Fragment akkumulierte auch ohne Ku80 in gewohnter Weise an den Laser-induzierten DNA-Schaden. Möglicherweise würde dies auch für das Vollängen Protein gelten und somit eher in Richtung meiner erhaltenen Ergebnisse gehen. Doch könnte es auch sein, dass beide Ergebnisse „richtig“ sind und durch die unterschiedlichen Methoden nur zwei verschiedene Momentaufnahmen des gleichen Prozesses gezeigt werden. Möglicherweise baut sich zwischen Ku80 und BRCA1 ein positiver *feedback-loop* auf, um das Signal zur DNA-Reparatur weiter zu verstärken.

Da ein Protein selten alleine seine Funktion ausübt, sondern meist als Komplex mit anderen Proteinen – was auch für Proteine der DNA-Reparatur gilt – besteht auch die Möglichkeit, dass Ku80 und BRCA1 gleichzeitig am DNA-Schaden zu finden sind und zusammen ihre Funktion ausüben. Die vermeintliche Abhängigkeit des einen Proteins vom anderen, in Bezug auf die Anlagerung an den DNA-Schaden, könnte in diesem Fall nur ein Artefakt der jeweiligen Methode sein.

7.4. Literatur

Postow, L. (2011). Destroying the ring: Freeing DNA from Ku with ubiquitin. *FEBS letters*.

Postow, L., Ghenoiu, C., Woo, E. M., Krutchinsky, A. N., Chait, B. T., and Funabiki, H. (2008). Ku80 removal from DNA through double strand break-induced ubiquitylation. *The Journal of cell biology* 182, 467-479.

Wei, L., Lan, L., Hong, Z., Yasui, A., Ishioka, C., and Chiba, N. (2008). Rapid recruitment of BRCA1 to DNA double-strand breaks is dependent on its association with Ku80. *Molecular and Cellular Biology* 28, 7380-7393.

Yagura, T., and Sumi, K. (1999). Molecular cloning and sequencing of cDNAs encoding homologues of human Ku70 and Ku80 autoantigen from *Xenopus* and their expression in various *Xenopus* tissues. *Biochimica et biophysica acta* 1445, 160-164.