

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie

Direktorin Prof. Dr. med. Cordula Petersen

**DNA-Reparatur in Mauszellen
mit einem Defekt im XRCC4-Reparaturgen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Leonie Schulte-Uentrop
aus Würzburg

Hamburg 2011

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 20.04.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. J. Dahm-Daphi

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. K. Kutsche

Publikation

„Distinct roles of XRCC4 and Ku80 in non-homologous
end-joining of endonuclease- and ionizing radiation-induced
DNA double-strand breaks“

Leonie Schulte-Uentrop, Raafat A. El-Awady, Lena Schliecker,
Henning Willers und Jochen Dahm-Daphi
(Nucleic Acids Research, 2008, Vol. 36, No. 8 2561–2569)

Distinct roles of XRCC4 and Ku80 in non-homologous end-joining of endonuclease- and ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks

Leonie Schulte-Uentrop¹, Raafat A. El-Awady^{1,2}, Lena Schliecker¹, Henning Willers³ and Jochen Dahm-Daphi^{1,*}

¹Laboratory of Radiobiology & Experimental Radiation Oncology, Department of Radiotherapy and Radiation Oncology, University Medical School Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, D-20246 Hamburg, Germany,

²Department of Tumor Biology, National Cancer Institute, University of Cairo, Egypt and ³Laboratory of Cellular & Molecular Radiation Oncology, Department of Radiation Oncology, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Charlestown, MA 02129, USA

Received January 31, 2008; Revised and accepted February 15, 2008

ABSTRACT

Non-homologous end-joining (NHEJ) of DNA double-strand breaks (DSBs) is mediated by two protein complexes comprising Ku80/Ku70/DNA-PKcs/Artemis and XRCC4/LigaseIV/XLF. Loss of Ku or XRCC4/LigaseIV function compromises the rejoining of radiation-induced DSBs and leads to defective V(D)J recombination. In this study, we sought to define how XRCC4 and Ku80 affect NHEJ of site-directed chromosomal DSBs in murine fibroblasts. We employed a recently developed reporter system based on the rejoining of I-SceI endonuclease-induced DSBs. We found that the frequency of NHEJ was reduced by more than 20-fold in XRCC4^{−/−} compared to XRCC4^{+/+} cells, while a Ku80 knock-out reduced the rejoining efficiency by only 1.4-fold. In contrast, lack of either XRCC4 or Ku80 increased end degradation and shifted repair towards a mode that used longer terminal micro-homologies for rejoining. However, both proteins proved to be essential for the repair of radiation-induced DSBs. The remarkably different phenotype of XRCC4- and Ku80-deficient cells with regard to the repair of enzyme-induced DSBs mirrors the embryonic lethality of XRCC4 knock-out mice as opposed to the viability of the Ku80 knock-out.

Thus, I-SceI-induced breaks may resemble DSBs arising during normal DNA metabolism and mouse development. The removal of these breaks likely has different genetic requirements than the repair of radiation-induced DSBs.

INTRODUCTION

DNA double-strand breaks (DSBs) represent the most serious DNA lesion, which, if not adequately repaired, can lead to cell death through the generation of lethal chromosomal aberrations. Alternatively, inadequately repaired DSBs may give rise to potentially carcinogenic mutations or chromosomal rearrangements. In mammalian cells, non-homologous end-joining (NHEJ) is the principal pathway for the removal of DSBs throughout the entire cell cycle. NHEJ relies on a limited number of core proteins that are sufficient to execute DSB repair *in vitro* (1,2). The heterodimer of Ku70 and Ku80 recognizes and binds DNA ends and recruits the catalytic subunit of the DNA-dependent kinase (DNA-PKcs), together forming the DNA-PK holoenzyme. Ku proteins and DNA-PKcs are both capable of tethering DNA ends (3–5), with Ku translocating internally upon binding of DNA-PKcs to the DNA end (6). Prior to ligation, the DNA ends need to be trimmed for proper annealing. At least a fraction of DSB ends is tailored by the Artemis

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +49 40 42803 3930; Fax: +49 40 42803 5139; Email: dahm@uke.uni-hamburg.de

The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as joint First Authors

© 2008 The Author(s)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/uk/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

nuclease in concert with DNA-PKcs (7). Other exo- and endonucleases are not yet defined. The polymerases Pol μ and Pol λ likely replenish small sequence gaps (8,9). The fill-in synthesis appears to be tightly coupled to the ligation of DNA ends (2,8). The latter step is performed by DNA ligase IV (LigIV) together with its obligatory cofactor XRCC4 (10,11). Another partner involved in the ligation step *in vivo* has been recently identified as the XRCC4-like factor (= XLF, Cernunnos) (12,13). The ligation complex is recruited by and interacts with Ku and DNA-PKcs (14–16).

Cells deficient in any of the NHEJ core proteins display pronounced hypersensitivity to ionizing radiation (IR) and a reduced ability to rejoin IR-induced DSBs (17). The NHEJ core proteins are also required for V(D)J recombination and class-switch recombination (18–20). Deficiency of either of these proteins leads to severe clinical immunodeficiency in mice and humans (21–25). Further, NHEJ deficiencies in mice are associated with impaired neurogenesis and growth delay (25–27). Defective NHEJ also causes gross chromosomal aberrations, genomic instability and lymphomagenesis (28,23). In humans, however, defective NHEJ has not yet been extensively linked to malignancy (29–32).

Genetic knock-out of XRCC4 but not of Ku80 in mice leads to embryonic death, suggesting that XRCC4 function is critical for the removal of DSBs that arise during development (22,23). Interestingly, this differential importance of XRCC4 and Ku80 for the DSB repair efficiency is generally not well reflected in biochemical and extrachromosomal end-joining assays (33–36). Furthermore, loss of XRCC4 or Ku80 causes IR hypersensitivity that is of similar severity.

Chromosomal plasmid assays that employ the rare-cutting I-SceI endonuclease have been employed successfully to elucidate the genetic determinants and molecular mechanisms of homologous recombination (37,38). Recently, others and we have applied these assays to NHEJ as well (39–41). In a report by Lopez and colleagues (39), mutation of Ku80 had surprisingly little if any effect on the rejoining of non-complementary ends generated by cleavage of two inverted I-SceI recognition sites spaced some kb apart. However, it cannot be excluded that residual Ku80 activity in the xrs6 CHO cells was sufficient for DSB rejoining in that assay. The importance of XRCC4/LigIV for the rejoining of site-directed chromosomal breaks was not studied and has remained unknown.

In the present study, we therefore investigated the roles of XRCC4 and Ku80, as the respective representatives of the XRCC4/XLF/LigIV and Ku/DNA-PKcs/Artemis complex, in the rejoining of I-SceI endonuclease-induced DSBs. We report the chromosomal repair phenotype of XRCC4 null mouse cells, which is characterized by a more than 20-fold reduction of NHEJ proficiency, increased end-degradation, and an increase in microhomology length used for joining of ends. Strikingly, knock-out of Ku80 resulted only in a mild I-SceI end-joining defect (1.4-fold), while having an impact on repair fidelity that was similar to the loss of XRCC4.

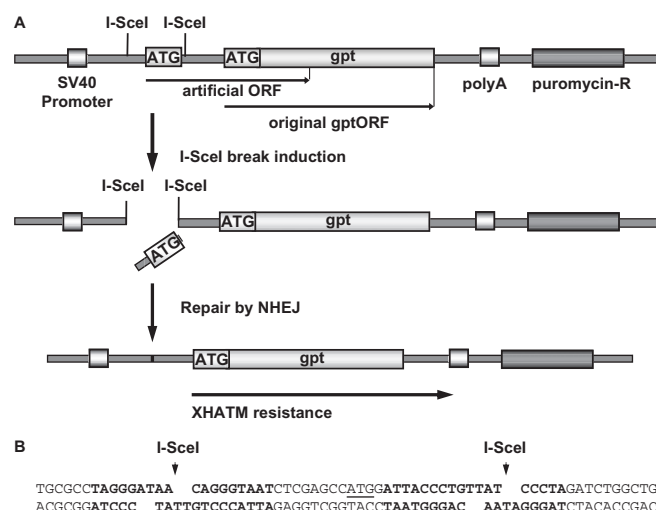


Figure 1. NHEJ reporter construct. **(A)** Illustration of the reporter assay. See text for details. **(B)** Double-stranded sequence flanking both I-SceI recognition sites (bold), which are placed in inverse orientation: Simultaneous cleavage of both sites with pop-out of the intervening sequence creates two non-compatible cohesive ends. A single I-SceI cleavage creates compatible cohesive ends that can be directly religated. The artificial start codon is underscored. Figure is adopted from (41).

MATERIALS AND METHODS

Cells

Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) lacking either Ku80 or the XRCC4 (28, 23, kindly gifted by A. Nussenzweig and F. Alt) and the respective parental strains (all strains were p53^{-/-}) were cultured in DMEM medium supplemented with 15% FCS, 1% penicillin/streptomycin at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. The presence or absence of XRCC4 and Ku80 was verified by Western blotting (Supplementary Figure S1). To harvest clones grown in selection medium (either Puromycin or XHATM, see below) in T-175 plastic culture flasks (Greiner, Germany), a 75 W soldering iron (ERSA Multisprint, ERSÄ, Germany) was used to melt a 1 cm hole directly above each individual colony through which careful micro-trypsinization (10 μ l Trypsin-EDTA, GIBCO-Invitrogen) was possible. Only those clones were chosen that grew in sufficient distance (>1 cm) to its proximate neighbor colony to avoid cross contamination. The individual clones were transferred to microwell plates and further expanded.

NHEJ reporter substrate

The generation of the pPHW2 plasmid was described previously (40). Induction of DSBs by the I-SceI endonuclease and rejoining by NHEJ lead to gpt translation and resistance to XHATM-containing selection medium (Figure 1). Here, 0.5 μ g of the pPHW2 was linearized with PvuI and electroporated into 10⁶ cells. Cells were grown for 2–3 weeks in selection medium (0.5 μ g/ml puromycin, Sigma) to obtain clones with stable integration of pPHW2. This was verified by PCR using the primer pair ATGTTGCAGATCCATGCACG and

AATACGACGCCATATCCC, yielding a 400-bp fragment only in clones with an integrated repair substrate. Single copy integration was verified by sequencing of repair products (see below).

NHEJ assay

DSBs were induced by transfecting 3×10^6 cells carrying the pPHW2 plasmid with 50 μ g of pCMV-3xNLS-I-SceI (kindly provided by M. Jasin) or a control plasmid (40). To allow for I-SceI expression and end-joining to proceed, cells were grown for 48 h in non-selective medium. Cells were then replated at appropriate densities between 10^5 and 10^6 per 175 cm² tissue culture flasks and grown for 2–3 weeks in selection medium containing XHATM (xanthine, hypoxanthine, aminopterin, thymidine and mycophenolic acid at 10, 13.6, 0.17, 3.87 and 10 μ g/ml respectively; all Sigma). The relative NHEJ frequency was derived from the number of XHATM-resistant colonies per number of seeded cells. This frequency was corrected for the plating efficiency of control cells grown in non-selective medium and normalized to the transfection efficiency, ranging between 0.53 and 0.56 for Ku80 cells and 0.43 and 0.48 for XRCC4 cells.

Repair product analysis

Individual XHATM-resistant colonies were harvested, expanded and genomic DNA was subjected to sequencing across the repair junction using the primers agctattcagaagtagtgaggag (forward) and gtgatcgtagctggaatacaaac (reverse), an automated sequencer (ABI 3100, Applied Biosystems-Hitachi) and Big-Dye technology.

Clonogenic cell survival and overall DSB rejoining after irradiation

Cells were irradiated with X-ray doses of up to 8 Gy and seeded for colony formation as described (42). For measuring of DSB repair, cells were irradiated with 50 Gy and rejoining of DSBs was measured at different time intervals after irradiation by neutral constant-field gel electrophoresis as described (42).

Statistics

Experiments were repeated at least three times, and data are presented as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis, data fitting and graphics were performed by means of the Prism 4.0 computer program (GraphPad Software, San Diego, USA).

RESULTS

To elucidate the roles of XRCC4 and Ku80 in chromosomal NHEJ, we made use of a recently developed I-SceI reporter assay that has been described elsewhere (40,41). Briefly, the plasmid substrate, pPHW2, contains an artificial translational start sequence inserted between an early SV40 promoter and the bacterial gpt gene (Figure 1A). The associated artificial open reading frame is shifted by 1 bp against the downstream gpt ORF and is dominant over the gpt start site, hence, preventing

gpt translation. Two I-SceI recognition sites flank the artificial ATG site. Simultaneous cleavage at both I-SceI sites results in frequent loss, i.e. pop-out, of the 34-bp-sequence containing the artificial ATG. NHEJ of the resulting DNA ends reconstitutes translation of the original gpt ORF, thereby allowing the detection of recombinants as colonies growing in XHATM selection medium. The tandem I-SceI sites are inverted, so that I-SceI cleavage results in two of non-complementary 3' single-stranded overhangs of 4 bases. These ends require modification prior to ligation (Figure 1B), which is a typical feature of repair via NHEJ (2, 34, 35, 41).

A hallmark of this plasmid design is that it does not select for specific NHEJ products, i.e. the pop-out mechanism allows for the detection of a broad variety of sequence alterations that range from single nucleotide alterations to deletions of up to 100 bp at the I-SceI sites. Since the 34-bp pop-out leaves the DNA ends in close proximity (within one nucleosome), the rejoining mechanism is likely representative of the repair of a single DSB. In addition, the assay can monitor a variety of repair events associated with sequence alterations after a single I-SceI cleavage (for details see below and Ref. (40,41)). In contrast, a direct ligation of an individually cleaved I-SceI site, which likely occurs in the majority of cells, cannot be detected as it does not alter the plasmid sequence. Finally, DSBs induced in the S/G2-phases of the cell cycle may also be repaired via error-free homologous recombination with the sister chromatid as a donor, which likewise does not alter the wild-type sequence and thus remains undetectable.

Lack of XRCC4 reduces the efficiency and fidelity of NHEJ of I-SceI-induced chromosomal DSBs

The pPHW2 reporter was stably integrated as a single copy into the genome of MEFs derived from XRCC4^{+/+} or XRCC4^{-/-} mice (23). Subsequently, cells were transiently transfected with the I-SceI expression plasmid and incubated for 3 weeks in selective medium for colony formation. Four independent XRCC4^{+/+} clones carrying pPHW2 showed a mean NHEJ frequency of 0.034 (SEM, $\pm$ 0.01) (Figure 2A, Supplementary Table S1). Knock-out of XRCC4 in another four clones drastically reduced the NHEJ efficiency on average to 0.0015 ($\pm$ 0.00045), corresponding to a 23-fold suppression compared to the parental cells ($P < 0.0001$). Of note, the data indicate that a small fraction of DSBs was still rejoined in the absence of a functional XRCC4/LigIV complex.

The persistence of non-ligated DNA ends in XRCC4^{-/-} cells may lead to increased end degradation and deletion formation. To address this possibility, we raised individual XHATM-resistant clones after induction of I-SceI breaks and performed DNA sequencing across the repair junctions (see Supplementary Figure S2). XRCC4^{+/+} cells showed minimal end resections of 0–4 nt, which were restricted to the 3' overhangs (Figure 2B). Rejoining was mediated exclusively by 1–2 nt of A/T microhomologies present in the overhangs. In contrast, this high-fidelity repair phenotype was absent in

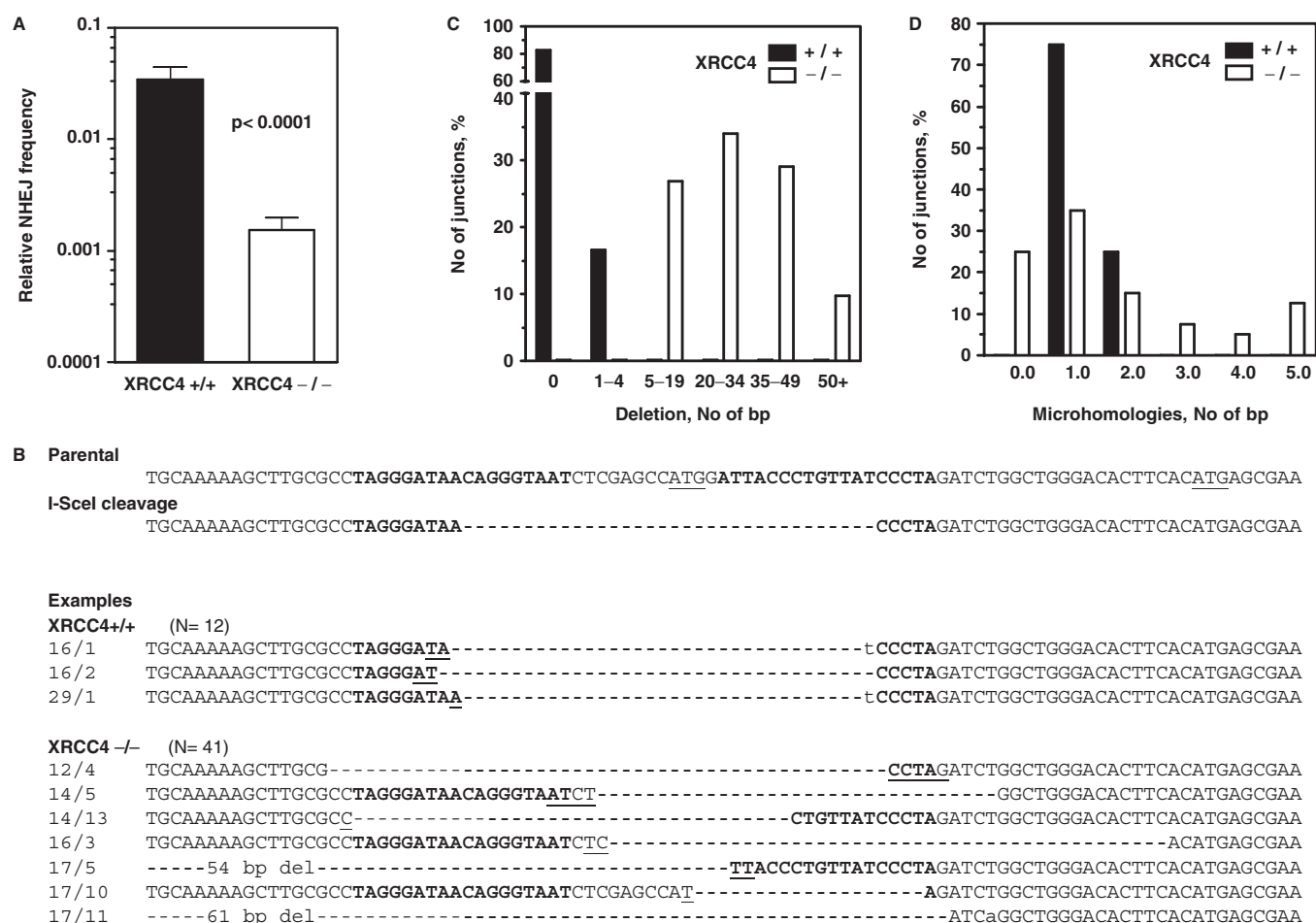


Figure 2. Efficiency and fidelity of NHEJ depending on XRCC4. **(A)** Endjoining frequency after induction of DSBs by I-SceI endonuclease as measured by the frequency of XHATM-resistant colonies normalized to colony formation in non-selective medium. **(B)** Examples of repaired DNA sequences obtained from genomic DNA of individual XHATM-resistant clones. Only the sense strand is shown. I-SceI recognition sites are depicted in bold. In the parental sequence, both start codons are underscored. Microhomologies are underscored within the example sequences. Fill-in synthesis is drawn as lower case letters. *N* indicates the total number of analyzed sequences. **(C)** Distribution of length of deletions at individual junctions. Deletions are defined as the sum of base pairs lost at both sites of the DSB. According to this definition, the 34-bp pop-out event in case of double I-SceI cleavage is not considered a deletion. **(D)** Distribution of the number of homologous bases (microhomologies) used for junction formation. Only terminal microhomologies are considered.

XRCC4^{-/-} cells. In these cells, all individual repair products revealed large deletions ranging from 10 to 76 bp (Figure 2B and C). The mean deletion length was 0.25 bp (± 0.2) and 31 bp (± 2.2) in XRCC4^{+/+} and XRCC4^{-/-} cells, respectively (Mann-Whitney test, $P < 0.0001$). In addition to reduced repair efficiency and fidelity, XRCC4^{-/-} cells frequently changed to a repair mode that employed longer microhomologies for the annealing of ends, i.e. 3–5 nt, which never occurred in XRCC4^{+/+} cells (Fisher's exact test, $P = 0.049$) (Figure 2D). Endjoining along 1–2 nt of microhomology was observed in only 35% of repair events in XRCC4^{-/-} cells.

Lack of Ku80 reduces the fidelity but not the efficiency of NHEJ

To compare the repair phenotype of XRCC4^{-/-} MEFs with the consequences of losing Ku80, we integrated pPHW2 into an isogenic pair of Ku80^{+/+} and Ku80^{-/-} MEFs (28). We found that lack of Ku80 only led to a

statistically non-significant reduction of NHEJ, i.e. by a factor of 1.4 ($P = 0.6$) (Figure 3A, Supplementary Table S1), which markedly contrasts with the more than 20-fold reduced rejoining ability of XRCC4^{-/-} cells. We considered the possibility that extensive deletions (> 100 bp) arising from the cleaved I-SceI sites could have affected the adjacent promoter or gpt reporter gene in the XRCC4^{-/-} cells, thereby leading to XHATM sensitivity and low rejoining frequencies. We, therefore, plated cells following I-SceI break induction into non-selective medium for colony formation. We observed that colony survival was significantly reduced only in XRCC4^{-/-} but not in Ku80-deficient cells when compared to the transfection of a pNeo control plasmid (Supplementary Figure S3). These data indicate that XRCC4^{-/-} cells suffer from a high frequency of lethal unrejoined breaks while Ku80^{-/-} are widely capable of resealing I-SceI breaks.

The absence of an effect on rejoining efficiency in Ku80^{-/-} cells does not preclude the possibility of an alteration in the fidelity of repair. We thus proceeded to

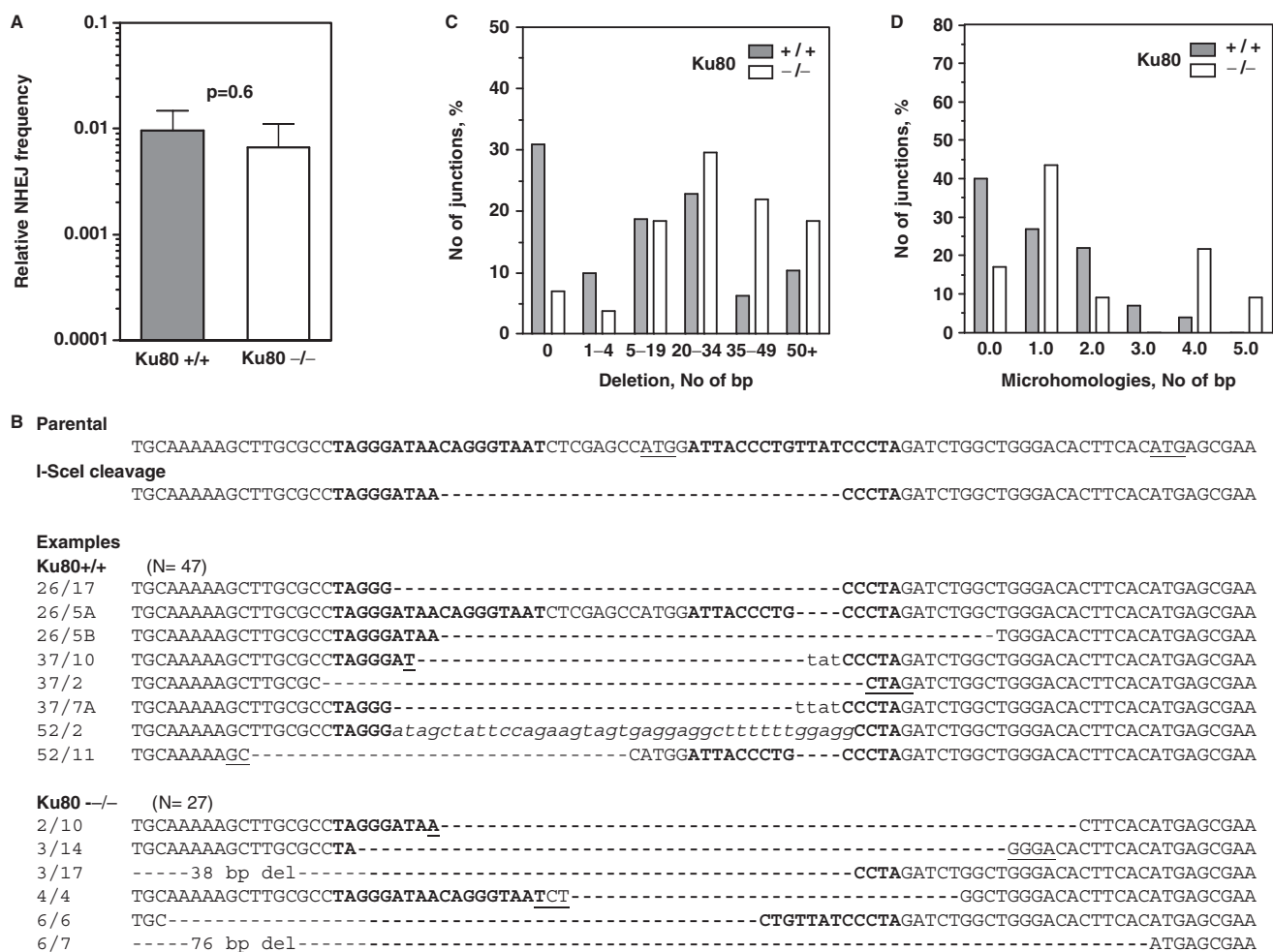


Figure 3. Efficiency and fidelity of NHEJ depending on Ku80. **(A)** End-joining frequency after induction of DSBs by I-SceI endonuclease analogous to Figure 2A. **(B)** Examples of repaired DNA sequences obtained from genomic DNA of individual XHATM resistant clones. Display as in Figure 2, italic font indicates inserted nucleotides. **(C)** and **(D)** Distribution of deletion length and microhomology usage as in Figure 2.

perform DNA sequencing on individual MEF clones following I-SceI break induction. In Ku80^{+/+} MEFs, we observed a spectrum of repair products similar although not identical to the repair phenotype of XRCC4^{+/+} cells (Figure 3B), which is likely attributable to the different mouse strains used. As in the XRCC4^{-/-} cells, we detected an increase in deletion size in Ku80^{-/-} MEFs compared to wild-type cells (Figure 3C). In Ku80^{+/+} cells, 42% of junctions showed small deletions of 4 bp or less, but only 10% of these high-fidelity events were detected in knock-out cells. Accordingly, deletions in Ku80-deficient cells were significantly longer than in the wild-type cells, i.e., a mean of 30 bp (± 4) versus 18 bp (± 3), respectively (Mann-Whitney test, $P = 0.005$). In addition, Ku80^{-/-} cells used significantly more often microhomologies of 4–5 nt than the wild-type cells (Figure 3D, $P = 0.005$), suggesting that loss of Ku80, similar to XRCC4, changes the mechanism of rejoining. Interestingly, the percentage of junctions mediated by 1–2 nt microhomology, which appeared to be a feature of XRCC4-mediated NHEJ, was virtually identical in Ku80^{+/+} and Ku80^{-/-} cells ($\sim 50\%$ of all events).

We noticed that the repair spectrum of XRCC4^{+/+} and Ku80^{+/+} MEFs was not identical, which is likely due to the different origin of the respective mouse strains (Figures 2 and 3) (23,28). To exclude that the less precise baseline NHEJ activities seen in the Ku80^{+/+} cells have masked the impact of losing Ku80, we repeated the experiments in K1 wild-type and Ku80-mutant CHO cells. Loss of Ku80 function only led to a slightly reduced NHEJ capacity, i.e. from 0.042 to 0.031 (Supplementary Table S2), which confirmed the observed mild defect in Ku80^{-/-} MEFs compared to Ku80 cells (see Figure 3A).

Taken together, our data reveal a reduced fidelity of NHEJ and preferred usage of longer microhomologies in both repair-deficient strains; however, only loss of XRCC4 significantly reduced the efficiency of rejoining.

Lack of XRCC4 or Ku80 enhances error-prone rejoining of complementary DNA ends

Previous studies with extrachromosomal substrates suggested that Ku80 and LigIV are involved in the precise ligation of complementary DNA ends (43–45).

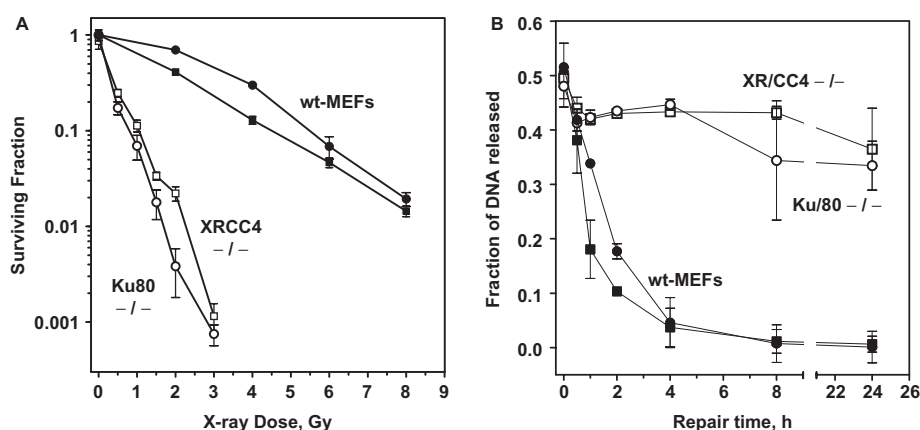


Figure 4. Radiosensitivity and double-strand break repair. (A) Colony formation after irradiation. Closed symbols represent parental cells for the respective knock-out cells (open symbols). (B) Repair of DSB after 40 Gy as assessed by constant field gel electrophoresis. Fraction of DNA released (FDR) was determined after different repair times. The decline of FDR reflect the repair of DSB as described (42). Each curve represents the mean of four values of two independent experiments.

As outlined above, complementary ends are created when only one I-SceI site is cleaved. Error-free religation does not alter the DNA sequence and cannot be detected directly. However, if precise end-ligation fails, sequence alterations that abolish the dominant function of the artificial start codon may occur (41). Examples of single-cleavage events are included in Figures 2B and 3B where the artificial ATG was either deleted (Sequences 4/4, 14/5, 14/13, 17/10) or shifted in frame with the original start codon (Sequences 52/11, 52/13), either of which restored gpt translation and resistance to XHATM.

We next analyzed the subpopulation of repair products arising from cleavage at individual I-SceI sites in more detail to determine whether loss of either XRCC4 or Ku80 had compromised the rate of precise endligation, thereby leading to sequence alteration upon repair of the ends (i.e. error-prone repair). Specifically, we estimated the fraction of error-prone repair events at individual I-SceI sites among all detectable repair events, i.e. individual I-SceI repair plus repair following pop-out events. In XRCC4^{+/+} cells, the portion of repair events at individual I-SceI sites was small (11%) (Supplementary Figure S2B), suggesting that the vast majority of these breaks was closed by precise religation. In contrast, in XRCC4^{-/-} cells the fraction of error-prone repair events increased to 41% ($P = 0.028$), consistent with impaired precise ligation. The increase in error-prone rejoining of complementary ends in Ku80^{-/-} cells was less pronounced, i.e. by 11% (Supplementary Figure S2B), and did not reach statistical significance.

Together, our data illustrate distinct roles of XRCC4 and Ku80 in NHEJ of I-SceI-induced DSBs with complementary and non-complementary ends. Loss of XRCC4 uniformly leads to a more severe repair defect than loss of Ku80.

Both XRCC4 and Ku80 are equally required for radioresistance and repair of IR-induced DSBs

After exposure to IR, DSB repair primarily relies on NHEJ. Accordingly, using constant-field gel electrophoresis, XRCC4 and Ku80 knock-out MEFs demonstrated

a substantial DSB repair defect when compared to the respective wild-type strain (Figure 4B). Notably, loss of either gene resulted in a similar amount of unrepaired IR-induced DSBs, which is in contrast to the different I-SceI rejoining efficiencies seen in XRCC4^{-/-} and Ku80^{-/-} cells (Figures 2A and 3A). The observed impairment in the repair of radiation damage translated into a similar degree of cellular radiation hypersensitivity in both knock-out lines (Figure 4A).

DISCUSSION

XRCC4 promotes efficiency and fidelity of NHEJ

We characterize here the impact of murine XRCC4 deficiency on NHEJ of chromosomal DSBs on a molecular level. Upon loss of XRCC4, cells demonstrated a more than 20-fold decreased ability to rejoin I-SceI endonuclease-induced DSBs (Figure 2A) which is a much more pronounced difference than the effects reported for *in vitro* end-joining extrachromosomal NHEJ, or class switch recombination but similar to the effects upon V(D)J recombination (19,20,33–35). The importance of XRCC4 for the rejoining of enzymatic breaks extended to both, cohesive complementary DNA ends that are substrates for precise religation as well as non-complementary ends that are typically rejoined along 1–2 nt of terminal A/T microhomology.

Others and we have found extended deletions and frequent usage of longer microhomologies in the absence of XRCC4 (this study, 19,24,35,36). Deletions are likely due to exonuclease activity in the absence of the XRCC4/LigIV complex. XRCC4 is further required for the recruitment and activation of the polymerase X family members Pol λ and Pol μ , which have emerged as the important polymerases in NHEJ (2,8,9,46). Reduced polymerase activity should result in unopposed exonuclease activity, which may lead to the long deletions observed in XRCC4^{-/-} cells. Progressive end resection eventually exposes longer sequence homologies at the DNA ends, which may provide sufficient stability to

complete end-joining even without XRCC4/LigIV. It is tempting to speculate that DNA ligase III (LigIII) rejoins these ends. Longer microhomologies not only increase the stability of the junction but also better separate the free DNA ends. The gaps on each strand may be then recognized as individual SSBs, which are better substrates for LigIII than genuine DSBs (47). However, in our study only about 25% of junctions formed independently of any microhomologies (Figure 2D), thus additional mechanisms must exist for stabilization and synapsis of ends.

Ku80 is dispensable for efficient NHEJ of site-directed DSBs

Similar to the XRCC4^{-/-} repair spectrum, Ku80^{-/-} cells exhibited an increase in deletion size and a shift towards a mode of end-joining that relies on the use of longer microhomologies (3–5 bp) (Figure 3C). This is in line with several previous reports (34,35,39,43,45,48,49). Interestingly, we could not detect a significantly reduced efficiency of end-joining in Ku80^{-/-} compared to Ku80^{+/+} cells (Figure 3A, Supplementary Figure S3). Similar results were reported by Ma *et al.* for yeast (50) and Guirouilh-Barbat *et al.* (39) for hamster cell mutants despite notable differences in the chromosomal repair assays. The mild repair phenotype of Ku80^{-/-} MEFs contrasts the severe rejoining deficiency in XRCC4^{-/-} cells, which mirrors the observed differences in embryonic viability seen with Ku80 versus XRCC4 knock-out mice (22,23). This raises the possibility that the chromosomal breaks created by the I-SceI endonuclease represent a better model of DSBs occurring during normal DNA metabolism and mouse development than biochemical or extrachromosomal end-joining systems.

Why is Ku80 not required for proficient end-joining? We cannot exclude the possibility that binding of the I-SceI enzyme and DNA cleavage may alter the chromatin structure sufficiently to attract other repair proteins, thereby alleviating the need for Ku to act as a signal amplifier and attractor of repair components. On the other hand, Ku is needed for the recruitment of XRCC4/LigIV (14, 16), yet we did not observe the same rejoining defect in Ku80 cells as in XRCC4^{-/-} cells. A more attractive explanation involves the repair pathway relying on LigIII, PARP-1, and XRCC1, which operates alternatively and independently of the DNA-PK-dependent pathway, as shown by the Salles and Iliakis laboratories (51–53). This alternative rejoining activity was guided by the initial binding of PARP-1 to free DNA ends, which required the absence of Ku. Interestingly, the efficiency of this pathway could be significantly increased in LigIV-deficient cells by knock-down of Ku70 (50). This observation supports previous results showing that LigIV-deficient DT40 cells and even the embryonic lethality of LigIV^{-/-} mice could be rescued by a simultaneous abrogation of Ku70 (54,55). Thus, repair in Ku80^{-/-} MEFs may be channeled towards a LigIII-dependent pathway, which maintains rejoining levels although at the expense of sequence loss at the break sites. In contrast, XRCC4-deficient cells express normal Ku80, which impairs access of PARP-1 to DNA. Hence, LigIII-mediated end-joining remains inefficient.

Distinct roles for Ku80 and XRCC4 in the rejoining of I-SceI endonuclease versus IR-induced DSBs

Why are the requirements for XRCC4 and Ku80 distinct for endonuclease- and IR-induced breaks? Enzymatic cleavage leaves clean termini while radiation-induced DNA ends are blocked by 5' dephosphorylated residues or 3' phosphoglycolates, which need to be removed prior to further processing. The resection of this type of ends requires the kinase activity of DNA-PK, and/or Artemis, and XRCC4/LigIV (11,48,56). Recruitment and proper activity of these proteins depend on Ku (7,14,16), thus explaining the high sensitivity of Ku80-deficient cells towards radiation but not enzymatic damage. In contrast, XRCC4 is needed for both types of breaks. An alternative but perhaps less likely possibility is that Ku80-independent end-joining mediates efficient repair of 1–2 DSBs but cannot cope with the large number of DSBs typically generated by IR.

In conclusion, our findings significantly advance our understanding of the roles of XRCC4 and Ku80 in chromosomal DSB repair. Both proteins are essential for the removal of IR-induced DSBs but only XRCC4 is required for efficient rejoining of enzymatic breaks, which may resemble spontaneous DSBs arising during normal DNA metabolism. Our results can thus help us appreciate why the XRCC4^{-/-} but not the Ku80^{-/-} phenotype is lethal in mice.

While this manuscript was under revision Lopez and colleagues published a complementary work (57) that lead to similar conclusions, i.e. that only loss of XRCC4 but not of Ku80 reduced the efficiency of the repair of I-SceI induced breaks

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Ekkehard Dikomey for critically reading the manuscript. JDD was supported by the German Cancer Aid (Deutsche Krebshilfe Grant No. Da-10-1510). HW was partly supported by a grant from Susan G. Komen for the Cure.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

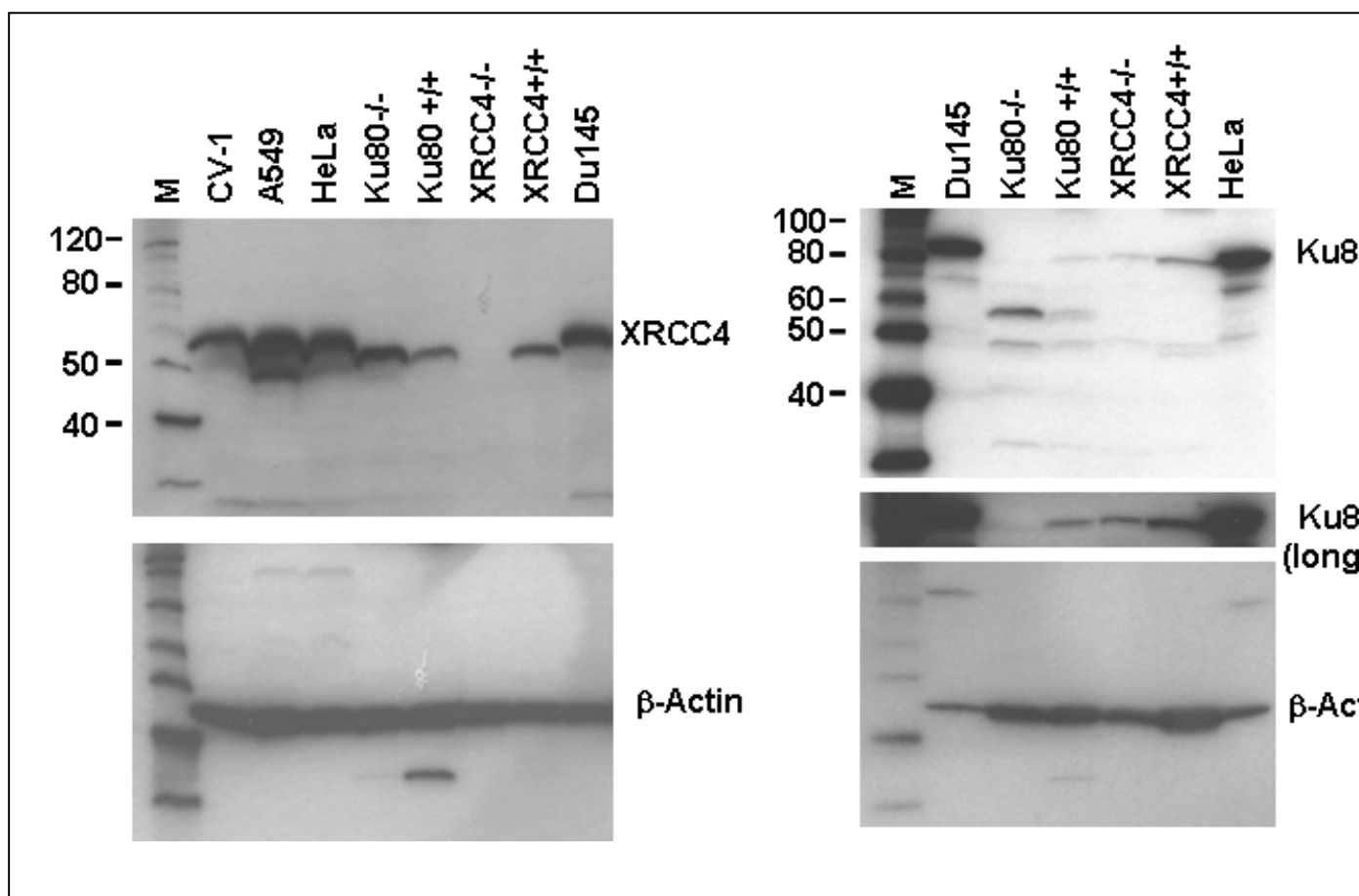
- Baumann,P. and West,S.C. (1998) DNA end-joining catalyzed by human cell-free extracts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **95**, 14066–14070.
- Ma,Y., Ku,H., Tiffin,B., Goodman,M.F., Shimazaki,N., Koiwai,O., Hsieh,C.L., Schwarz,K. and Lieber,M.R. (2004) A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA joining. *Mol. Cell*, **16**, 701–713.
- Pang,D., Yoo,S., Dynan,W.S., Jung,M. and Dritschilo,A. (1997) Ku proteins join DNA fragments as shown by atomic force microscopy. *Cancer Res.*, **57**, 1412–1415.
- 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.

5. Weterings, E., Verkaik, N.S., Brüggewirth, H.T., Hoeijmakers, J.H.J. and van Gent, D.C. (2003) The role of DNA dependent protein kinase in synopsis of DNA ends. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 7238–7246.
6. Yoo, S. and Dynan, W.S. (1999) Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of KU protein. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 4679–4686.
7. 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.
8. Lee, J.W., Blanco, L., Zhou, T., Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Kunkel, T.A., Wang, Z. and Povirk, L.F. (2004) Implication of DNA polymerase λ in alignment-based gap filling for non-homologous DNA end-joining in human nuclear extracts. *J. Biol. Chem.*, **279**, 805–811.
9. Nick McElhinny, S.A., Hevener, J.M., Garcia-Diaz, M., Juarez, R., Bebenek, K., Kee, B.L., Blanco, L., Kunkel, T.A. and Ramsden, D. A. (2005) A gradient template dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining. *Mol. Cell*, **19**, 357–366.
10. Lee, K.J., Huang, J., Takeda, Y. and Dynan, W.C. (2000) DNA ligase IV and XRCC4 form a stable mixed tetramer that functions synergistically with other repair factors in a cell-free end-joining system. *J. Biol. Chem.*, **275**, 34787–34796.
11. Lee, J.W., Yannone, S.M., Chen, D.J. and Povirk, L.F. (2003) Requirement for XRCC4 and DNA ligase IV in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in vitro. *Cancer Res.*, **63**, 22–24.
12. Ahnesorg, P., Smith, P. and Jackson, S.P. (2006) XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA non-homologous end-joining. *Cell*, **124**, 301–313.
13. Buck, D., Malivert, L., de Chasseval, R., Barraud, A., Fondaneche, M.C., Sanal, O., Plebani, A., Stephan, J.L., Hufnagel, M., le Deist, F. et al. (2006) Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell*, **124**, 287–299.
14. Nick McElhinny, S.A., Snowden, C.A., McCarville, J. and Ramsden, D. A. (2000) Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 2996–3003.
15. Chen, L., Trujillo, K., Sung, P. and Tomkinson, A.E. (2000) Interaction of the ligase IV-XRCC4 complex with DNA ends and the DNA dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **275**, 26196–26205.
16. Mari, P.O., Florea, B.I., Persengiev, S.P., Verkaik, N.S., Brüggewirth, H.T., Modesti, M., Giglia-Mari, G., Bezstarosti, K., Demmers, J.A.A., Luidert, T.M. et al. (2006) Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **103**, 18597–18602.
17. Kasten-Pisula, U., Tastan, H. and Dikomey, E. (2005) Huge differences in cellular radiosensitivity due to only small variations in double-strand break repair. *Int. J. Radiat. Biol.*, **81**, 409–419.
18. Taccioli, G.E., Gottlieb, T.M., Blunt, T., Priestley, A., Demengeot, J., Mizuta, R., Lehmann, A.R., Alt, F.W., Jackson, S.P. and Jeggo, P.A. (1994) Ku80: product of the XRCC5 gene and its role in DNA repair and V(D)J recombination. *Science*, **265**, 1442–1445.
19. Li, Z., Otevrel, T., Gao, Y., Cheng, H.L., Seed, B., Stamato, T.D., Taccioli, G.E. and Alt, F.W. (1995) The XRCC4 gene encodes a novel protein involved in DNA double-strand break repair and V(D)J recombination. *Cell*, **83**, 1079–1089.
20. Yan, C.T., Boboila, C., Souza, E.K., Franco, S., Hickernell, T.R., Murphy, M., Gumaste, S., Geyer, M., Zarrin, A.A., Marris, J.P. et al. (2007) IgH class switch and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature*, **449**, 478–482.
21. Blunt, T., Finnie, N.J., Taccioli, G.E., Gottlieb, G.C.M., Mizuta, R., Varghese, A.J., Alt, F.W., Jeggo, P.A. and Jackson, S.P. (1995) Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. *Cell*, **80**, 813–823.
22. 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.
23. Gao, Y., Ferguson, D.O., Xie, W., Manis, J.P., Sekiguchi, J., Frank, K.M., Chaudhuri, J., Horner, J., DePinho, D.A. and Alt, F.W. (2000) Interplay of p53 and DNA-repair protein XRCC4 in tumorigenesis genomic stability and development. *Nature*, **404**, 897–900.
24. O'Driscoll, M., Cersaletti, K.M., Girard, P.M., Gai, Y., Stumm, M., Kysela, B., Hirsch, B., Gennery, A., Palmer, S.E., Seidel, J. et al. (2001) DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Mol. Cell*, **8**, 1175–1185.
25. Gao, Y., Sun, Y., Frank, K.M., Dikkes, P., Fujiwara, Y., Seidl, K.J., Sekiguchi, J.M., Rathbun, G.A., Swat, W., Wang, J. et al. (1998) A critical role for DNA end-joining proteins in both lymphogenesis and neurogenesis. *Cell*, **95**, 891–902.
26. Gu, Y., Sekiguchi, J., Gao, Y., Dikkes, P., Frank, K., Ferguson, D., Hasty, P., Chun, J. and Alt, F.W. (2000) Defective embryonic neurogenesis in ku-deficient but not DNA-dependent protein kinase catalytic subunit-deficient mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **97**, 2668–2673.
27. Frank, K.M., Sharpless, N.E., Gao, Y., Sekiguchi, J.M., Ferguson, D.O., Zhu, C., Manis, J.P., Horner, J., DePinho, R.A. and Alt, F.W. (2000) DNA ligase IV deficiency in mice leads to defective neurogenesis and embryonic lethality via the p53 pathway. *Mol. Cell*, **5**, 993–1002.
28. Difilippantonio, M.J., Zhu, J., Chen, H.T., Meffre, E., Nussenzweig, M.C., Max, E.E., Roed, T. and Nussenzweig, A. (2000) DNA repair protein Ku80 suppress chromosomal aberrations and malignant transformation. *Nature*, **404**, 510–514.
29. Lees-Miller, S.P., Godbout, R., Chan, D.W., Weinfeld, M., Day, R.S., Barron, G.M. and Allalunis-Turner, J. (1995) Absence of p350 subunit of DNA-activated protein kinase from a radiosensitive human cell line. *Science*, **267**, 1183–1185.
30. Riballo, E., Critchlow, S.E., Teo, S.H., Priestley, A.H., Doherty, A., Broughton, B., Kysela, B., Plowman, H., Beamish, N., Arlett, C.F. et al. (1999) Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukaemia patient. *Current Biol.*, **9**, 699–702.
31. Ralhan, R., Kaur, J., Kreienberg, R. and Wiesmüller, L. (2007) Links between DNA double-strand break repair and breast cancer: Accumulating evidence from both familial and nonfamilial cases. *Cancer Lett.*, **248**, 1–17.
32. Moshous, R., Pannetier, D., de Chasseval, C., le Deist, F., Cavazzana-Calvo, M., Romana, S., Macintyre, E., Canioni, D., Brousse, N., Fischer, A. et al. (2003) Partial T and B lymphocyte immunodeficiency and predisposition to lymphoma in patients with hypomorphic mutations in Artemis. *J. Clin. Invest.*, **111**, 381–387.
33. Verkaik, N.S., Esveldt-van-Lange, R.E. E., van Heemst, D., Brüggewirth, H.T., Hoeijmakers, J.H.J., Zdzienicka, M.Z. and van Gent, D.C. (2002) Different types of V(D)J recombination and end-joining defects in DNA double-strand break repair mutant mammalian cells. *Europ. J. Immun.*, **32**, 701–709.
34. van Heemst, D., Brugmans, L., Verkaik, N.S. and van Gent, D.C. (2004) End-joining of blunt DNA double-strand breaks in mammalian fibroblasts is precise and requires DNA-PK and XRCC4. *DNA Repair*, **3**, 43–50.
35. Kuhfittig-Kulle, S., Feldmann, E., Odersky, A., Kuliczowska, A., Goedecke, W., Eggert, A. and Pfeiffer, P. (2007) The mutagenic potential of non-homologous endjoining in the absence of the NHEJ core factors Ku70/80, DNA-PKcs and XRCC4-LigIV. *Mutagenesis*, **22**, 217–233.
36. Kabotyski, E.B., Gomelsky, L., Han, J.O., Stamato, T.D. and Roth, D.B. (1998) Double-strand break repair in Ku86- and XRCC4-deficient cells. *Nucleic. Acids Res.*, **26**, 5333–5342.
37. Willers, H., Xia, F. and Powell, S.N. (2002) Recombinational DNA repair in cancer and normal cells: The challenge of functional analysis. *J. Biomed. Biotech.*, **2**, 86–93.
38. Nickoloff, J.A. and Brennemann, M.A. (2004) Analysis of recombinational repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells with I-SceI nuclease. *Meth. Mol. Biol.*, **262**, 35–52.
39. Guirouilh-Barbat, J., Huck, S., Bertrand, P., Pirzio, L., Desmaze, C., Sabatier, L. and Lopez, B.S. (2004) Impact of the Ku80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells. *Mol. Cell*, **14**, 611–623.
40. Dahm-Daphi, J., Hubbe, P., Horvath, F., El-Awady, R.A., Bouffard, K.E., Powell, S.N. and Willers, H. (2005) Non-homologous end-joining of site-specific but not of radiation-induced DNA

- double-strand breaks is reduced in the presence of wild-type p53. *Oncogene*, **24**, 1663–1672.
41. Willers, H., Husson, J., Lee, L.W., Hubbe, P., Horvath, F., Powell, S. N. and Dahm-Daphi, J. (2006) Distinct mechanisms of non-homologous end-joining in the repair of site-directed chromosomal breaks with non-complementary and complementary ends. *Radiat. Res.*, **166**, 567–574.
 42. El-Awady, R.A., Dikomey, E. and Dahm-Daphi, J. (2003) Radiosensitivity of human tumour cells is associated with the induction but not with the repair of DNA double-strand breaks. *British J. Cancer*, **89**, 593–601.
 43. Feldmann, E., Schmiemann, V., Goedecke, W., Reichenberger, S. and Pfeiffer, P. (2000) DNA double-strand break repair in cell-free extracts from Ku80-deficient cells: implications for Ku serving as an alignment factor in non-homologous DNA end joining. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 2585–2596.
 44. Smith, J., Riballo, E., Kysela, B., Baldeyron, C., Manolis, C., Masson, C., Lieber, M.R., Papadopulo, D. and Jeggo, P.A. (2003) Impact of DNA ligase IV on the fidelity of end joining in human cells. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 2157–2167.
 45. Katsura, Y., Sasaki, S., Sato, M., Yamaoka, K., Suzukawa, K., Nagasawa, T., Yokota, J. and Kohno, T. (2007) Involvement of Ku80 in microhomology-mediated end joining for DNA double-strand breaks in vivo. *DNA Repair*, **6**, 639–648.
 46. Capp, J.P., Boudsocq, F., Bertrand, P., Laroche-Calry, A., Pourquier, P., Lopez, B.S., Cazaux, C., Hoffmann, J.S. and Canitrot, Y. (2006) The polymerase I is required for the repair of non-compatible DNA double-strand breaks by NHEJ in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 2998–3007.
 47. Taylor, R.W., Whitehouse, C.J. and Caldecott, K.W. (2000) The DNA ligase III zinc finger stimulates binding of DNA secondary structure and promotes end joining. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 3558–3563.
 48. Chen, S., Inamdar, K.V., Pfeiffer, P., Feldmann, E., Hannah, M.F., Yu, Y., Lee, J.W., Zhou, T., Lees-Miller, S.P. and Povirk, L.F. (2001) Accurate in vitro end joining of a double-strand break with partially cohesive 3'-overhangs and 3'-phosphoglycolate termini. *J. Biol. Chem.*, **276**, 24323–24330.
 49. Liang, F. and Jasin, M. (1996) Ku80-deficient cells exhibit excess degradation of extrachromosomal DNA. *J. Biol. Chem.*, **271**, 14405–14111.
 50. Ma, J.L., Kim, E.M., Haber, J.E. and Lee, S.E. (2003) Yeast Mre11 and Rad1 proteins define a Ku-independent mechanism to repair double-strand breaks lacking overlapping sequences. *Mol. Cell Biol.*, **23**, 8820–8828.
 51. Wang, M., Wu, W., Rosidi, B., Zhang, L., Wang, H. and Iliakis, G. (2007) PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res.*, **34**, 6170–6182.
 52. Wang, H., Rosidi, B., Perrault, R., Wang, M., Zhang, L., Windhofer, F. and Iliakis, G. (2005) DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. *Cancer Res.*, **65**, 4020–4030.
 53. Audebert, M., Salles, B. and Calsou, P. (2004) Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III is an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J. Biol. Chem.*, **279**, 55117–55126.
 54. Adachi, N., Ishino, T., Ishii, Y., Takeda, S. and Koyama, H. (2001) DNA ligase IV-deficient cells are more resistant to ionizing radiation in the absence of Ku70: Implications for DNA double-strand break repair. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **98**, 12109–12113.
 55. Karanjawala, Z.E., Adachi, N., Irvine, R. A., Oh, E. K., Shibata, D., Schwarz, K., Hsieh, C. and Lieber, M.R. (2002) The embryonic lethality in DNA ligase IV-deficient mice is rescued by deletion of Ku: implications for unifying the heterogeneous phenotypes of NHEJ mutants. *DNA Repair*, **1**, 1017–1026.
 56. Povirk, L.F., Zhou, T., Zhou, R., Cowan, M.J. and Yannoni, S.M. (2007) Processing of 3'-phosphoglycolate-terminated DNA double strand breaks by Artemis nuclease. *J. Biol. Chem.*, **282**, 3547–3558.
 57. Guirouilh-Barbat, J., Rass, E., Plo, I., Bertrand, P. and Lopez, B.S. (2007) Defects in XRCC4 and Ku80 differentially affect the joining of distal non-homologous ends. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **104**, 20902–20907.

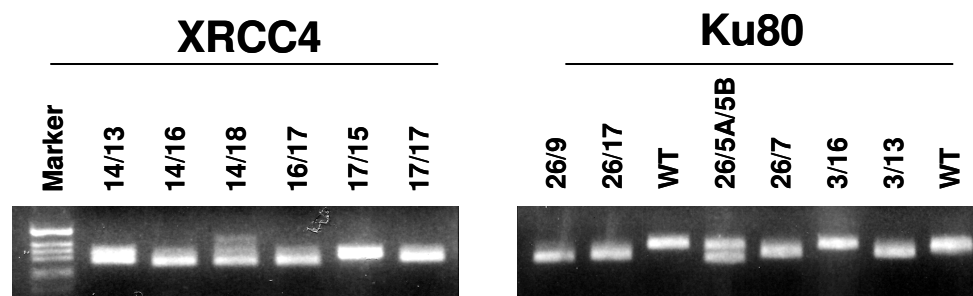
Supplement zur Publikation

Supplement Fig. S1



Supplement Fig. S2

A PCR amplificates of the repair region



B Sequences of the repair products

I-SceI
↓

Parental TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAACAGGGTAAT**CTCGAGCCATGG**ATTACCCTGTTATCCCTA**GATCTGGCTGGGACA

I-SceI
↓

XRCC4^{+/+}

16/1 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATA**-----t**CCCTA**GATCTGGCTGGGACA

16/2 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGAT**-----**CCCTA**GATCTGGCTGGGACA

16/3 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAA**aaaa**TAAT**CTCGAGCCATGG**ATTACCCTGT**-at**CCCTA**GATCTGGCTGGGACA

16/4 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAA**-----t**CCCTA**GATCTGGCTGGGACA

16/5 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGAT**-----tat**CCCTA**GATCTGGCTGGGACA

16/6 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATA**-----t**CCCTA**GATCTGGCTGGGACA

16/9 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAA**-----t**CCCTA**GATCTGGCTGGGACA

16/10 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAA**-----t**CCCTA**GATCTGGCTGGGACA

16/14 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGAT**-----tat**CCCTA**GATCTGGCTGGGACA

29/1	TGCAAAAAGCTTGCGCC TAGGGATAA -----t CCCTA GATCTGGCTGGGACA
29/2	TGCAAAAAGCTTGCGCC TAGGGAT -----tat CCCTA GATCTGGCTGGGACA
29/3	TGCAAAAAGCTTGCGCC TAGGGAT -----tat CCCTA GATCTGGCTGGGACA

XRCC4-/-

12/1	TGCAAAAAGCTTGCGCC-----CATGG ATTACCCTGTTATCCCTA GATCTGGCTGGGACA
12/2	TGCAAAAAG-----CTA GATCTGGCTGGGACA
12/4	TGCAAAAAGCTTGCG-----CCTA GATCTGGCTGGGACA
12/5	TGCAAAAAGCTTGCG-----CCTA GATCTGGCTGGGACA
14/2	34 bp del-----tCCATGG ATTACCCTGTTATCCCTA GATCTGGCTGGGACA
14/3	TGCAAAAAGCTTGCGCC TAGGGATAA -----
14/4	TGCAAAAAGCTTGCGCC TAGGGATAACAGGGTAAT CTCGAGCCATGGA-----TGGGACA
14/5	TGCAAAAAGCTTGCGCC TAGGGATAACAGGGTAATCT -----GGCTGGGACA
14/8	TGCAAAAAGCTTGCGCC TAGGGATAACAGGGTAATCT cGAGCCATG-----GATCTGGCTGGGACA
14/9	TGCAAAAAGCTTGCGCC TAGGGAT -----CTGGCTGGGACA
14/10	TGCAAAAAGCTTGCGCC TAGGGATAA -----atctcgagc-----
14/11	TGCAAAAAGCTTGCGCC TAGGGA -----
14/13	TGCAAAAAGCTTGCGCC-----CTGTTATCCCTA GATCTGGCTGGGACA
14/15	TGCAAAAAGCTTGCG-----CCTA GATCTGGCTGGGACA
14/16	41 bp del-----at CCCTA GATCTGGCTGGGACA
14/18	41 bp del-----tat CCCTA GATCTGGCTGGGACA
14/20	TGCAAAAAGCTTGCGCC TAGGGATAA -----
14/23	TGCAAAAAGCTTGCGCC TAGGGATAA -----
16/1	56 bp del-----GGCTGGGACA
16/2	TGCAAAAAGCTTGCGCC TAGGGATAA -----
16/3	TGCAAAAAGCTTGCGCC TAGGGATAACAGGGTAATCTC -----
16/4	TGCAAAAAGCTTGCGCC TAGGGATAA -----
16/5	TGCAAAAAGCTTGCGCC TAGGGATAA -----
16/7	TGCAAAAAGCTTGCGCC TAGGGATAACAGGGTAATCTC -----
16/8	TGCAAAAAGCTTGCGCC TAGGGATAACAGGGTAATCTC -----
16/9	66 bp del-----GTTATCCCTA GATCTGGCTGGGACA
16/10	TGCAAAAAGCTTGCGCC TAGGGATAA -----
16/11	TGCAAAAAGCTTGCGCCT-----GTTATCCCTA GATCTGGCTGGGACA

16/12 44 bp del-----ttat**CCCTA**GATCTGGCTGGGACA

17/1 TGCAAAAAGCgTGCGCC-----**CTGTTATCCCTA**GATCTGGCTGGGACA

17/2 38 bp del-----**CCTA**GATCTGGCTGGGACA

17/4 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAA**CAGGGTAATCTCGAGCCATGG**AT**-----CTGGCTGGGACA

17/5 54 bp del-----**TTACCCTGTTATCCCTA**GATCTGGCTGGGACA

17/7 40 bp del-----**AGATCTGGCTGGGACA**

17/8 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAA**-----

17/10 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAACAGGGTAAT**CTCGAGCCAT-----**AGATCTGGCTGGGACA**

17/11 61 bp del-----ATCaGGCTGGGACA

17/12 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAACAGGGTAAT**CTCGAGCCAT-----**AGATCTGGCTGGGACA**

17/14 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAACAGGGTAAT**CTCGAGCCAT-----**AGATCTGGCTGGGACA**

17/15 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAACAGGGTAAT**CTCGAGCCAT-----**TAGATCTGGCTGGGACA**

17/17 38 bp del-----ATCTGGCTGGGACA

Ku80+/+

26/17 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGG**-----**CCCTA**GATCTGGCTGGGACA

26/3 29 bp del -----ttat**CCCTA**GATCTGGCTGGGACA

26/7 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAACAGGGTAAT**CTC-----CA

26/9 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAA**-----

26/6 TGCAAAAAGCTTGCGC---**tttttt**-----TGG**ATTACCCTGTTATCCCTA**GATCTGGCTGGGACA

26/5A TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAACAGGGTAAT**CTCGAGCCATGG**ATTACCCTG**---**CCCTA**GATCTGGCTGGGACA

26/5B TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAA**-----TGGGACA

26/12A 54 bp del-----

26/12B 52 bp del-----**GGATTACCCTGTTATCCCTA**GATCTGGCTGGGACA

37/1 48bp del-(together)-----TGGCTGGGACA

37/8 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAA**-----t**CCCTA**GATCTGGCTGGGACA

37/9A TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAA**-----t**CCCTA**GATCTGGCTGGGACA

37/9B TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATA**-----**TAGATCTGGCTGGGACA**

37/2A TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGAT**-----tat**CCCTA**GATCTGGCTGGGACA

37/2B TGCAAAAAGCTTGCGC-----**CTA**GATCTGGCTGGGACA

37/10 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGAT**-----tat**CCCTA**GATCTGGCTGGGACA

37/3 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAACAGGGTAAT**CTCGAGC-----

37/4 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGAT**-----tat**CCCTA**GATCTGGCTGGGACA

37/5 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAA**-----

37/6 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAA**-----

37/7A TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGG**-----ttat**CCCTA**GATCTGGCTGGGACA

37/7B TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGAT**-----**CCCTA**GATCTGGCTGGGACA

52/6 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAACAGGGTAAT**CTCGAGCCATG-----GATCTGGCTGGGACA

52/3 T-----GCTGGGACA

52/5 T-----GCTGGGACA

52/8 TGCAAAAAGCTcctcgcggaactgaaaaaccagaaagttaattccctatagtgagtcgtattaaat-TCTGGCTGGGACA

52/1 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAA**-----GATTACCC**TGTTATCCCTA**GATCTGGCTGGGACA

52/2 51 bp del-----**GGATTACCC**TGTTATCCCTA

52/7A 51 bp del-----**CTA**GATCTGGCTGGGACA

52/7B TGCAAAAAGCTTGCGCC**T**-----GCTGGGACA

52/4 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAA**-----

52.3/2 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGG**atagctattccagaagtagtgaggaggcttttttggagg**CCTA**GATCTGGCTGGGACA

52.3/5 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATA**gctattccagaagtagtgaggaggcttttttggagg**CCCTA**GATCTGGCTGGGACA

52.3/6 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAACAGGGTAAT**CTCGAGCCATG-----GCTGGGACA

52.3/7 TGCAAAAatagctattccagaagtagtgaggaggcttttttggaggcctaggcttttgcctat**CCCTA**GATCTGGCTGGGACA

52.3/8 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAACAGGGTAAT**CTCGAGCCATG-----GATCTGGCTGGGACA

52.3/9 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAACAGGGTAAT**CTCGAGCCtagctattccagaagtagttgaggaggcttttttgcctat**CCCTA**GATCTGGCTGGGACA

52.3/10 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAACAGGGTAAT**CTCGAGCCATG-----GATCTGGCTGGGACA

52.3/11 TGCAAAAAGC-----CATGG**ATTACCC**TG----**CCCTA**GATCTGGCTGGGACA

52.3/13 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAACAGGGTAAT**CTCGAGCCATGG**ATTACCC**-----GGCTGGGACA

52.3/15 TGCAAAAAGCTTGtagctattccagaagtagtgaggaggcttttttggaggcctaggcttt**CCTA**GATCTGGCTGGGACA

52.3/16 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGG**tagctattccagaagtagtgaggaggcttttttgcctat**CCCTA**GATCTGGCTGGGACA

52.3/17 TGCAAtagctattccatagctattccagaagtagtgaggaggcttttttggaggcctgctat**CCCTA**GATCTGGCTGGGACA

52.3/19 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAA**tgctattccagaagtagtgaggaggcttttttgcctat**CCCTA**GATCTGGCTGGGACA

52.3/20 TGCAAAAAGCTTGCGCC-----**CTA**GATCTGGCTGGGACA

52.3/22 TGCAAAAAGCTTGCGCC-----**CTA**GATCTGGCTGGGACA

52.3/24 > 70 bp deletion-----**CCCTA**GATCTGGCTGGGACA

Ku80 -/-

2/10 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAA**-----

2/9A TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAA**-----

2/9B TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAA**cagggtaaatgtctctgatCCATGG**ATTACCC**TGTTATCCCTA**GATCTGGCTGGGACA**

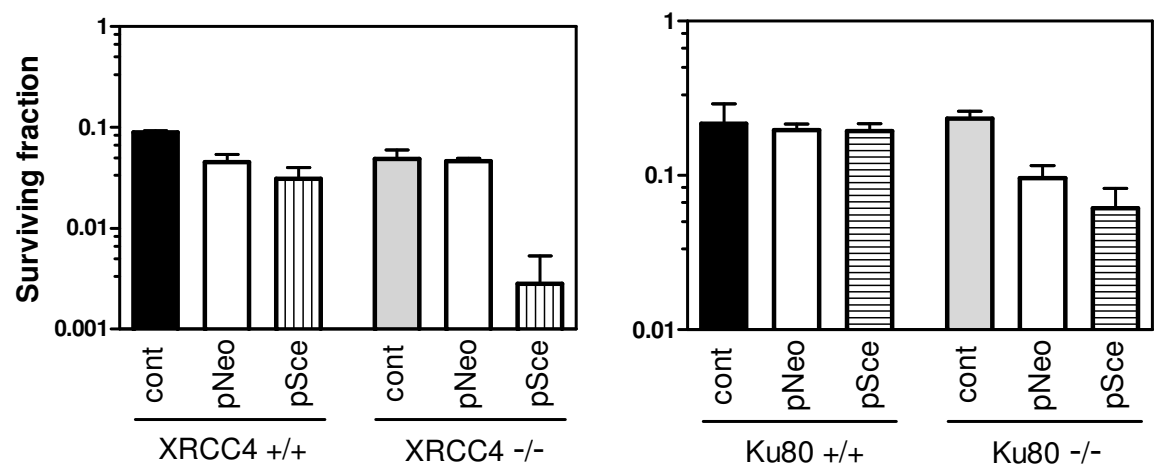
2/4 51 bp del-----**CCCTGTTATCCCTA**GATCTGGCTGGGACA

2/3 56 bp del-----**GGATTACCC**TGTTATCCCTA**GATCTGGCTGGGACA**

3/16 TGCAAAAAGCTTGCGCC**TAGGGATAACAGGGTAAT**CTCGAGCCATGG**ATT**-----**CCCTA**GATCTGGCTGGGACA

3/19	TGCAAAAAGCTTGCGCC TAGGGATAACAGGGTAAT CTCGAGCCATGG ATT ----- TAG ATCTGGCTGGGACA
3/14	TGCAAAAAGCTTGCGCC TA ----- GGG ACA
3/18	TGCAAAAAGCTTGCGCC TAGGGATAACAGGGTAAT CTCGAGCCATGG ATTACCCT -----CTGGCTGGGACA
3/13	TGCAAAAAGCTTGCGCC TAGGGAT ----- CCCTA GATCTGGCTGGGACA
3/12	43 bp del-----GGCTGGGACA
3/17	38 bp del----- CCTA GATCTGGCTGGGACA
4/1A	60 bp del-----ttat CCCTA GATCTGGCTGGGACA
4/1B	T-----ttat CCCTA GATCTGGCTGGGACA
4/2	TGCAAAAAGCTTGC-----GCTGGGACA
4/3	TGCAAAAAGCTTGCGCC TAGGGATAA -----
4/4	TGCAAAAAGCTTGCGCC TAGGGATAACAGGGTAAT <u>CT</u> -----GGCTGGGACA
4/5	TGCAAAAAGCTTGCGCC TAGGGATAACAGGGTAAT C-----cctaggc-----
4/6	TGCAAAAAGCTTGCGCC TAGGGATAACAGGGTAAT CTCGAGC-----
4/7	TGCAAAAAGCTTGCGC----- CTA GATCTGGCTGGGACA
6/1A	46 bp del-----GGGACA
6/1B	16 bp del-----agctatttccagaagtagtgaggaggccttttttgaggcctag-----GGGACA
6/2A	38 bp del ----- CCTA GATCTGGCTGGGACA
6/2B	TGCAAAAAGCTT-----agctatttccagaagtagtgaggcctttttaagagg----- CCTA GATCTGGCTGGGACA
6/3	TGCAAAAAGCTTGCGCC TAGGGATAA -----
6/6	TGC----- CTGTTATCCCTA GATCTGGCTGGGACA
6/7	76 bp del-----

Supplement Fig. S3



Supplement Tab. S1

NHEJ frequency of individual MEF clones

XRCC4 +/+		XRCC4 -/-	
clone		clone	
#3	$5.9 (\pm 3.0) \times 10^{-2}$	#12	$2.1 (\pm 1.4) \times 10^{-3}$
#29	$1.1 (\pm 0.1) \times 10^{-2}$	#14	$2.3 (\pm 0.9) \times 10^{-3}$
#16	$2.9 (\pm 0.7) \times 10^{-2}$	#16	$0.3 (\pm 0.1) \times 10^{-3}$
#7	$3.8 (\pm 0.9) \times 10^{-2}$	#17	$1.3 (\pm 0.6) \times 10^{-3}$
Ku80 +/+		Ku80 -/-	
clone		clone	
#26	$1.1 (\pm 0.2) \times 10^{-2}$	#2	$0.7 (\pm 0.2) \times 10^{-3}$
#37	$0.2 (\pm .03) \times 10^{-3}$	#3	$1.9 (\pm 0.2) \times 10^{-2}$
#52	$1.8 (\pm 0.5) \times 10^{-2}$	#4	$6.5 (\pm 0.6) \times 10^{-3}$
		#6	$0.2 (\pm .01) \times 10^{-3}$

Supplement Tab. S2

NHEJ frequency of individual CHO clones

CHO K1		xrs5 (Ku80-def)	
clone		clone	
#3	6.65×10^{-2}	#22	1.64×10^{-2}
#40	3.62×10^{-2}	#26	5.44×10^{-2}
#9	2.3×10^{-2}	#59	2.23×10^{-2}
mean	$4.19 \times 10^{-2} (\pm 1.3)$		$3.1 \times 10^{-2} (\pm 1.2)$

Legends

Suppl. Fig. 1. Expression of Ku80 and XRCC4 proteins

Lack of XRCC4-expression in XRCC4^{-/-} MEFs was verified by immunoblotting probing with an anti-XRCC4 antibody (sc-8285) (left). Actin was used for loading control. Of note, neither human (A549, HeLa, Du145) nor mouse (Xrs5) XRCC4 has a molecular weight of 38 or 36 kDa, respectively (Modesti, M.; Hesse, J.E.; Gellert, M. (1999) DNA binding of XRCC4 to DNA double-strand breaks: role in recombination but not with stimulation of DNA ligase IV activity, *EMBO J* **18**, 2008-2018). Lack of Ku80 in XRCC4^{-/-} MEFs was verified by immunoblotting with anti-Ku80 rabbit polyclonal antibody (Cell Signaling, #2753) (right). Actin was used for loading control. On the right, 100 µg of human (HeLa) but 100 µg of mouse protein was loaded to compensate for the lower Ku80 expression levels in rodent cells.

Suppl. Fig. 2 Repair sequence analysis.

(A) Examples of genomic DNA of individual repair clones amplified by PCR (B) complete list of all clones. * indicates a sequence duplication copied from a region between -67 and -16 upstream of 1st I-SceI cleavage site.

Suppl. Fig. 3. Sensitivity towards I-SceI induced DSB.

Colony forming ability of MEFs: Cells were either untreated (cont), transfected with 50 µg of a control vector (pSce). Note the different scale used for XRCC4 and Ku80 strains

Suppl. Tab. 1

Experimental details and mean values are given in Figures 2A and 3A

Suppl. Tab. 2

GFP-based endjoining substrate pEJ (Mansour et al, submitted) was used instead of pPHW2. pEJ carries the GFP gene. The structure of the repair cassette and the principle of the assay is identical. NHEJ frequency correlated with GFP⁺ cells 48h after I-SceI-induction as measured by flow cytometry (FACSscan, BD). Xrs5-frequencies were normalized to transfection efficiency compared to CHO-K1 cells.

**DNA-Reparatur in Mauszellen
mit einem Defekt im XRCC4-Reparaturgen**

Zusammenfassende Darstellung der Publikation

1. Einleitung

Die hier vorliegende Zusammenfassung basiert auf der Veröffentlichung „*Distinct roles of XRCC4 and Ku80 in non-homologous end-joining of endonuclease- and ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks*“, publiziert im Mai 2008 in der Zeitschrift *Nucleic Acids Research*. Die zugrundeliegende Studie befasst sich mit dem Nicht-homologen Endjoining (NHEJ) in Mauszellen mit einem Defekt im XRCC4- bzw. Ku80-Reparaturgen. Die Arbeit wurde mit geteilter Erstautorenschaft veröffentlicht. Meiner Dissertation liegen die Versuche bezüglich XRCC4 zugrunde, die Experimente betreffend Ku80 hat Herr Raafat El-Awady durchgeführt.

Doppelstrangbrüche

Einer der schwersten Schäden, die der Desoxyribonukleinsäure (DNA) zugefügt werden können, ist ein DNA-Doppelstrangbruch (DSB). Dies bedeutet eine vollständige Unterbrechung beider Einzelstränge der DNA-Doppelhelix in unmittelbarer Nachbarschaft. Die Anzahl an täglich auftretenden DNA-Doppelstrangbrüchen wird auf 10 pro Zelle geschätzt (*Lieber 2010*). In mitotischen Zellen von Eukaryoten sind die meisten DSBs pathologischer oder akzidenteller Herkunft, ausgenommen spezielle Funktionen von frühen Lymphozyten des Immunsystems. Dieses physiologische Auftreten von DSBs kommt zum einen bei der V(D)J-Rekombination, bei welcher Antigen-Rezeptor-Gene generiert werden, zum anderen bei der Class-Switch-Rekombination (CSR) vor, die nötig ist, um das Immunglobulin-Schwerketten-Gen zu verändern (*Dudley et al. 2005*). Zusätzlich haben meiotische Zellen ein DSB-verursachendes Topoisomerase II-ähnliches Enzym genannt Spo II, welches Crossovers zwischen den homologen parentalen Chromosomen während der Prophase I verursacht (*Hamer et al. 2003*). Pathologisches Auftreten von DSBs kann unterschiedliche Gründe haben. Häufig ist die Bildung einer Schlaufe während der Replikation, die zu einem Chromatid-Bruch während der S-Phase führen kann (*Lieber 2010*). Des Weiteren treten DSBs spontan auf (*Lindahl 1993*), z. B. durch nichtenzymatische Hydrolyse oder Oxidation durch reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) wie Sauerstoffanionen, Wasserstoffperoxid oder Hypochlorid, welche in der mitochondrialen Atmungskette (*Wei et al. 1998*) und bei inflammatorischen Prozessen (*Pernofsky et al. 1991, Pero et al. 1996*) entstehen. Natürlich vorkommender radioaktiver Zerfall resultiert pro Stunde in 300 Millionen Ionisationen im menschlichen Körper, die vor allem im Wasser auftreten und dabei zu freien Radikalen führen. Wenn diese Radikale die Nähe der DNA erreichen, können sie diese beschädigen. Dabei kommen auf einen DSB circa 25 Einzelstrangbrüche (*Lieber 2010*). Außerdem können inadäquate Enzymreaktionen DSBs erzeugen, meist durch Typ II-Topoisomerasen, die normalerweise nur vorübergehend die DNA-Stränge brechen (*Adachi et al. 2003*). Physikalischer oder mechanischer Stress an der DNA kann ebenfalls DSBs hervorrufen, in Prokaryoten

zum Beispiel Dehydratation (Pitcher et al. 2007).

Nicht-homologes Endjoining (NHEJ)

Auf die entstandenen DSBs kann die Zelle nun unterschiedlich reagieren: mit Apoptose, Zellzyklus-Arrest oder auch mit der Aktivierung von DNA-Reparatur-Mechanismen. Bei letzteren gibt es zwei Hauptwege – die Homologe Rekombination (HR) und das Nicht-homologe Endjoining (NHEJ). Welcher Reparaturweg gewählt wird ist abhängig vom Zellzyklus und den verfügbaren Enzymen. Nicht-teilende haploide Zellen oder diploide Zellen, die sich nicht in S- oder G2-Phase befinden, haben kein homologes Schwesterchromatid, welches als Matrix dienen könnte, und wählen NHEJ als Reparaturweg. In Säugetierzellen werden 80-90% der DSBs über NHEJ repariert. Durch *in vitro*-Experimente konnten Proteine identifiziert werden, die notwendig sind, um NHEJ auszuführen (Baumann et al. 1998, Ma et al. 2004). Das Heterodimer Ku70 und Ku80 erkennt und bindet an die DNA-Enden und rekrutiert die DNA-PKcs, die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Kinase. Zusammen bilden sie das DNA-PK-Holoenzym, welches DNA-Enden zusammen halten kann (Pang et al. 1997, Walker et al. 2001, Weterings et al. 2003). Vor Ligation müssen die DNA-Enden noch modifiziert werden. Ein Teil der Enden wird von der Artemis-Nuklease zusammen mit DNA-PKcs beschnitten (Ma et al. 2002). Die Polymerasen Pol μ und Pol λ füllen kleine Sequenzlücken auf (Lee et al. 2004, Nick McElhinny et al. 2005). Der letzte Schritt wird durch DNA-Ligase IV (LigIV) zusammen mit ihrem Cofaktor XRCC4 und dem XRCC4-ähnlichen Faktor Cernunnos (XLF) ausgeführt (Buck et al. 2006, Lee et al. 2000 und 2003)

(Abb.1). Dieser Ligationskomplex wird induziert von und interagiert mit Ku und DNA-PKcs (Chen et al. 2000, Nick McElhinny et al. 2000, Mari et al. 2006). Nuklease, Polymerase und Ligase des NHEJ besitzen eine große mechanistische Flexibilität, was zu einer größeren Vielfalt an Verbindungsergebnissen führt als der sequenz-determinierte Weg der HR.

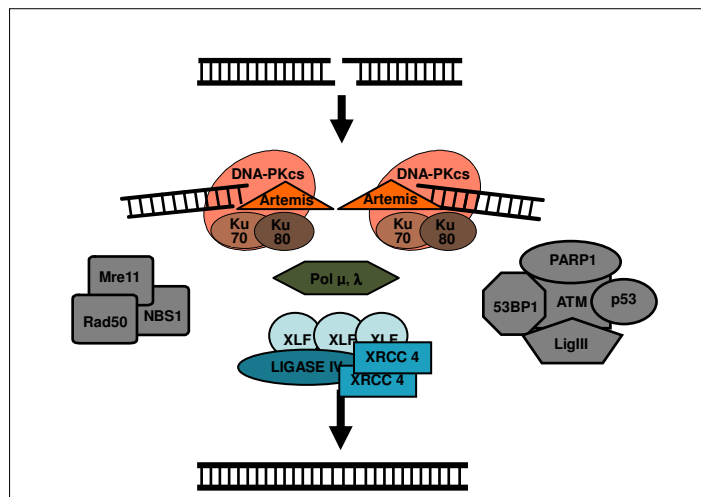


Abb. 1: Proteine des Nicht-Homologen Endjoinings (modifiziert nach Lieber 2010)

NHEJ-Defekt

Wenn Zellen einen Defekt in einem der zentralen Proteine des NHEJ besitzen, führt dies zu einer stark reduzierten Fähigkeit durch ionisierende Strahlung (IR) induzierte DSBs zu repa-

rieren und zu einer Hypersensitivität gegen IR (*Kasten-Pisula et al. 2005*). Des Weiteren tritt ein klinischer Immundefekt in Mäusen und Menschen auf (*Blunt et al. 1995, Gao et al. 1998 und 2000, Nussenzweig et al. 1996, O'Driscoll et al. 2001*). In Mäusen ist dies assoziiert mit fehlerhafter Neurogenese und Wachstumsverzögerung (*Frank et al. 2000, Gao et al. 1998, Gu et al. 2000*). Der Reparaturdefekt verursacht weiterhin Chromosomenaberrationen, genomische Instabilität und Lymphomentstehung (*Difilippantonio et al. 2000, Gao et al. 2000*). In Menschen wurde dies bisher nicht mit Malignität assoziiert (*Lees-Miller et al. 1995, Moshous et al. 2003, Ralhan et al. 2007, Riballo et al. 1999*).

NHEJ-Proteine

Ku wurde benannt nach der scheinbaren Molekülgröße in der Protein-Gelelektrophorese (70 und 80kDa) eines autoantigenen Proteins eines Sklerodermie-Patienten mit den Initialen K.U. Es existiert im Überfluss mit 4000000 Molekülen pro Zelle (*Blier et al. 1993, Falzon et al. 1993, Mimori et al. 1986*). Es hat eine körbchenförmige Kristallstruktur und bildet ein Heterodimer aus Ku70 und Ku80. Die minimale Andockstelle an einem DNA-Ende beträgt 14 Basenpaare (bp) (*Walker et al. 2000*). Es ist das früheste Protein, das am DSB bindet und dann Nuklease, Polymerase und Ligase rekrutiert. Gebunden an die DNA ändert es seine Konformität, in freier Lösung bildet es keinen Komplex mit DNA-PKcs (*Yaneva et al. 1997*). Entdeckt wurde das humane Ku80-Gen im Rahmen von Versuchen, strahlensensible Xrs-6-Hamstermutanten über Transfektion von Fragmenten des humanen Chromosoms 2 wieder strahlenresistent zu machen. Letztlich gelang das mit der cDNA des XRCC5-Gens (was für *X-Ray-Cross-Complementation* steht). Dieses befindet sich auf Chromosom 2q33-35 (*Taccioli et al. 1994*). Ku80-/- Mäuse sind lebens- und fortpflanzungsfähig, aber sie erreichen nur 40-60% der Größe von Wildtypmäusen. Ihre T- und B-Lymphozytenentwicklung stagniert in frühen Vorläuferstadien und die V(D)J-Rekombination ist stark eingeschränkt. Nussenzweig *et al.* isolierten im Jahre 1996 Fibroblasten aus Ku80-/- Mäusen. Diese zeigten eine verlangsamte Verdopplungszeit und einen frühzeitigen Proliferationsstop. Ku80 wurde hier inaktiviert durch die Deletion von 3,4 Kilobasenpaaren (kb) des Maus-Ku80-Lokus. Diese Deletion schließt 100bp des Promotors und der ersten beiden Exons mit ein. Western Blot-Analysen ergaben eine Null-Mutation. Ku70 ist noch vorhanden, wenn auch in geringer Konzentration. Dies liegt daran, dass Ku70 ohne Ku80 an Stabilität verliert.

Der Komplex XLF:XRCC4:LigIV ist die flexibelste bekannte Ligase. Sie kann über Sequenzlücken hinweg inkompatible Enden und komplexe Konfigurationen ligieren (*Gu et al. 2007a, Gu et al. 2007b*). Gelfiltrationen zeigen eine Stöchiometrie von 3xXLF, 2xXRCC4 und 1xLigIV-Molekülen (*Modesti et al. 2003, Sibanda et al. 2001*). Ku verbessert die Bindung von XRCC4:LigIV an den DNA-Enden (*Costantini et al. 2007*) und die Präsenz von DNA-PKcs beschleunigt diese Komplexformation (*Hsu et al. 2002, Leber et al. 1998*). XRCC4 kann sich selbst

tetramerisieren (*Modesti et al. 2003*) und hat eine Kristallstruktur mit einer zentralen Kopffdomäne und einem gedrehten C-Terminus, wenn es ein Dimer formt. XRCC4 interagiert mit der Polynukleotidkinase, Aprataxin und dem PNK-APTX-ähnlichen Faktor (*Koch et al. 2004*). Das humane XRCC4-Protein hat 334 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 38kDa. Li *et al.* isolierten 1995 eine humane cDNA-Sequenz, welche der XRCC4-defizienten Xr-1-Hamster-Ovarzelllinie die Fähigkeit zu normaler V(D)J-Rekombination und DNA-Reparatur wiederverleiht. Dieses XRCC4-Gen passt zu einem Locus auf Chromosom 5q11.2-13.3. Junop *et al.* beschrieben im Jahre 2000 die Kristallstruktur des XRCC4-Proteins. Es formt ein elongiertes hantelförmiges Tetramer. Jede der N-terminalen kugelförmigen Kopffdomänen besteht aus einem β -Sandwich und einem DNA-bindenden Helix-Turn-Helix-Motiv. Der C-terminale Stiel umfasst eine einzelne α -Helix, welche über 120Å lang ist. Das Maus-XRCC4-Gen überspannt 60kb, die meisten Exons sind dabei mindestens 10kb voneinander entfernt. Gao *et al.* inaktivierten dieses XRCC4-Gen in embryonalen Maus-Fibroblasten (MEF), indem das Exon 3 gegen ein *Antisense*-Neomycin-Resistenzgen ausgetauscht wurde. Dies führte zu einer Verschiebung des Leserahmens. Northern Blot-Analysen ergaben eine Null-Mutation (*Gao et al. 2000*). Das Maus-XRCC4-Gen ist zu 75% identisch und zu 84% ähnlich dem humanen XRCC4-Gen. XRCC4^{-/-} p53^{-/-} MEFs sind strahlensensibel und haben einen Defekt in der V(D)J-Rekombination. Sie zeigen Wachstumsverzögerung und frühes Altern, ihre Verdopplungszeit ist zweifach verlängert. Ihre Reparaturfrequenz ist erniedrigt und führt zur Wachstumsstagnation nach Bestrahlung. Die XRCC4^{-/-} Mäuse sterben in der späten Embryonalphase, wobei die Embryonen eine defekte Lymphozytenentwicklung haben und auch neuronale Zellen beschädigt sind. LigIV^{-/-} Embryonen zeigen ähnliche Defekte (*Gao et al. 1998*).

2. Studie „Distinct roles of XRCC4 and Ku80 in non-homologous end-joining of endonuclease- and ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks“

In unserer Veröffentlichung wurde der Effekt von XRCC4 als Vertreter des XLF:XRCC4:LigIV-Komplexes und von Ku80 als Repräsentant des Ku:DNA-PKcs:Artemis-Komplexes auf das NHEJ von gezielten chromosomalen DSBs in MEFs untersucht. Dies wurde mittels eines Reporter-Systems ausgeführt, welches auf der Wiederverbindung (*Rejoining*) von I-SceI-Endonuclease-induzierten DSBs beruht. Chromosomale Plasmid-Assays wurden bereits erfolgreich benutzt um genetische Determinanten und molekulare Mechanismen sowohl der homologen Rekombination (*Nickoloff et al. 2004, Willers et al. 2002*) als auch des NHEJ zu untersuchen (*Dahm-Daphi et al. 2005, Guirouilh-Barbat et al. 2004, Willers et al. 2006*). In einer Arbeit von Lopez *et al.* zeigte eine Ku80-Mutation wenig Effekt auf das Rejoining nichtkomplementärer DNA-Enden, welche durch einen Schnitt an I-SceI-Erkennungs-Sequenzen entstanden waren (*Guirouilh-Barbat et al. 2004*). Die Bedeutung von XRCC4 oder auch LigIV beim Rejoining

gezielter chromosomaler Brüche wurde bis zu dieser Arbeit nicht untersucht.

Wir verwendeten MEFs, die einen Knockout des Ku80- bzw. XRCC4-Gens haben und p53^{-/-} sind. Sie wurden uns von A. Nussenzweig und F. Alt zur Verfügung gestellt. Die MEFs wurden nach standardisierten Zellkulturbedingungen kultiviert. Der Knockout konnte von uns auf Proteinebene durch Western Blot bestätigt werden (siehe Supplement Fig.S1). Wir untersuchten die Wachstums-Kinetik der Wildtyp-Zellen im Vergleich zu den Knockouts und bestimmten die Verdopplungszeit. Diese war für XRCC4^{-/-} etwas niedriger als für XRCC4^{+/+}, möglicherweise bedingt durch eine verminderte Kontaktinhibition in den Knockoutzellen. Wir ermittelten die IR-Sensitivität nach Bestrahlung der Zellen mit bis zu 8Gy und maßen die Gesamt-Reparaturkapazität für DSBs nach Bestrahlung mit 40Gy per Gel-Elektrophorese.

Als NHEJ-Reporter-Substrat wurde das pPHW2-Plasmid verwendet, welches von Dahm-Daphi *et al.* generiert worden war (Abb.2) (Dahm-Daphi *et al.* 2005). pPHW2 wurde durch die Nuklease PvuI linearisiert und per Elektroporation in die Zellen transfiziert. Nachfolgend wurden die Zellklone, die das Plasmid stabil integriert

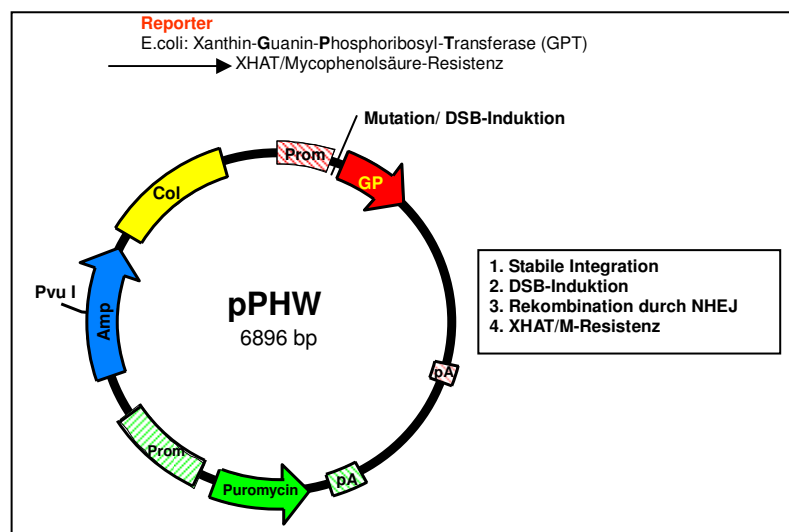


Abb. 2: Das Plasmid pPHW2, 2003 von Dahm-Daphi *et al.* kreiert. Nach stabiler Integration und DSB-Induktion durch I-SceI-Endonuklease sowie Rekombination durch NHEJ wird die Zelle resistent gegen XHAT/M-haltiges Medium (Dahm-Daphi *et al.* 2005).

hatten, per Selektionsmedium isoliert und auf einfachen Plasmideinbau per DNA-Sequenzanalyse untersucht. Durch Transfektion der Klone mit pCMV-3xNLS-I-SceI wurden DSBs an zwei spezifischen Schnittstellen des pPHW2 induziert (Abb.3). Die Zellklone wurden für 48h in Normalmedium kultiviert, damit I-SceI arbeiten und NHEJ durchgeführt werden konnte. Erfolgreiche Reparaturprodukte wurden dann durch XHAT/M-haltiges Selektionsmedium isoliert. Anschließend wurde die relative NHEJ-Frequenz bestimmt und mit der Transfektionseffizienz normalisiert. Letztere betrug für Ku80-Zellen zwischen 0,53 und 0,56, für XRCC4-Zellen zwischen 0,43 und 0,48. XHAT/M-resistente Kolonien wurden geerntet, die DNA sequenziert und die Reparaturstellen mit passenden Primern analysiert. Alle Experimente wurden mindestens dreifach durchgeführt, alle Daten zeigen Mittelwerte $\pm$ SEM.

3. Ergebnisse

Mit dem I-SceI-Reporter-Assay mittels pPHW2 konnte nun die Rolle von XRCC4 und Ku80

bei der Reparatur von gezielt induzierten chromosomalen Doppelstrangbrüchen



Abb.3: Erkennungssequenz der I-SceI-Endonuklease und ihre Schnittstellen auf dem Plasmid pPHW2.

untersucht werden. In pPHW2 ist eine künstliche translationale Startsequenz (ATG) zwischen SV40-Promoter und bakteriellem Xanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (GPT)-Gen inseriert. Der zugehörige artifizielle Leserahmen wird um ein Basenpaar gegen den originalen GPT-Leserahmen verschoben. Da der artifizielle Leserahmen so dominant gegenüber der GPT-Startstelle ist, wird kein GPT translatiert. Das artifizielle ATG ist flankiert von zwei I-SceI-Erkennungs-Schnittstellen. Wird die DNA an diesen beiden Stellen geschnitten, wird eine 34bp lange Sequenz herausgelöst, die das artifizielle ATG enthält. Da die beiden I-SceI-Schnittstellen gegeneinander invertiert sind, entstehen zwei nichtkomplementäre 4bp lange 3' Einzelstrang-Überhänge (Abb.3). Diese Enden müssen vor Ligation erst modifiziert werden. Wird der entstandene DSB nun per NHEJ repariert, kann der originale GPT-Leserahmen translatiert werden. Hierdurch erhalten die entstehenden Klone Resistenz gegen XHAT/M und können per Selektionsmedium isoliert werden. Zur Isolierung der gewachsenen Zellklone entwickelten wir eine neuartige Technik, mit der einzelne Klone gezielt mithilfe eines Lötkolbens aus Kulturflaschen heraustrypsiniert werden können (*Schulte-Uentrop und Dahm-Daphi 2006*). Die durch I-SceI entstehenden DNA-Enden liegen relativ nah beieinander innerhalb eines Nukleosoms, somit ist der Rejoining-Mechanismus repräsentativ für die Reparatur eines einzelnen DSB. Hierbei können eine Vielfalt von Sequenzveränderungen detektiert werden, von kleinen Läsionen bis hin zu großen Deletionen. Eine direkte Ligation der Schnittstellen, welche die Sequenz nicht verändert, kann dagegen nicht erfasst werden. Dies geschieht wahrscheinlich in der Mehrheit der Zellen. Wenn DSBs in der S- oder G2-Phase des Zellzyklus induziert werden, könnten diese auch durch fehlerfreie Homologe Rekombination repariert werden, da hier ein Schwesterchromatid als Matrize dienen kann. Auch dies würde die Sequenz nicht verändern und damit von uns nicht detektiert werden.

Effekt des XRCC4-Knockouts auf das NHEJ von I-SceI-induzierten chromosomalen DSBs

pPHW2 wurde stabil als einzelne Kopie in das Genom von XRCC4^{+/+} und XRCC4^{-/-} MEFs integriert. Nach Transfektion mit I-SceI wurden die Zellen 3 Wochen in Selektionsmedium inkubiert und die Koloniebildung abgewartet. Vier voneinander unabhängige XRCC4^{+/+} Klone mit pPHW2 zeigten eine NHEJ-Frequenz von 0,034 (SEM $\pm$ 0,01). Der XRCC4-Knockout in 4 anderen Klonen reduzierte die NHEJ-Effizienz auf 0,0015 (SEM $\pm$ 0,00045), was einer 23-fachen Reduktion verglichen mit dem Wildtyp entspricht. Bemerkenswert ist, dass eine kleine Fraktion von DSBs auch trotz XRCC4-Knockout noch repariert werden konnte.

Wir züchteten nun individuelle XHAT/M-resistente Kolonien heran und sequenzierten die DNA der Reparaturstelle. Hier zeigten die XRCC4^{+/+} Klone minimale Endresektionen von 0-4 Nukleotiden (nt), welche auf die 3' Überhänge beschränkt waren (siehe Studie Fig.2B). Rejoining wurde durch 1-2 Nukleotide der A/T-Mikrohomologien vermittelt, welche in den Überhängen vorhanden waren. In den XRCC4^{-/-} Zellen dagegen fehlte dieser nahezu exakte Reparaturphänotyp. Hier zeigten sich große Deletionen von 10 bis 76bp (siehe Studie Fig.2B). Die mittlere Deletionslänge betrug in XRCC4^{+/+} 0,25bp ($\pm 0,2$) und 31bp ($\pm 2,2$) in den XRCC4-Knockouts. Statistisch war dieser Unterschied hochsignifikant. Die XRCC4^{-/-} Zellen veränderten ihren Reparaturmodus hin zum Gebrauch längerer Mikrohomologien für die Ligation, meist 3-5bp, was in den XRCC4^{+/+} Zellen nie auftrat. Endjoining über kurze (1-2bp) Mikrohomologien wurde in XRCC4^{-/-} Zellen nur in 35% der Reparaturereignisse benutzt (siehe Supplement Fig.2B).

Effekt des Ku80-Knockout auf NHEJ

Um die Bedeutung von Ku80 bei chromosomalen DSBs zu untersuchen, wurde pHW2 in Ku80^{+/+} und Ku80^{-/-} MEFs integriert. In den Ku80-Knockouts konnten wir keine signifikante Reduktion des NHEJ finden, im Gegensatz zur drastischen Reduktion bei XRCC4^{-/-}.

Um die Genauigkeit des Rejoinings der Ku80^{-/-} Zellen zu prüfen, wurde die DNA der Ku80-Klone nach I-SceI-DSB-Induktion und Reparatur sequenziert. In Ku80^{+/+} Zellen zeigten 42% der Junktionen kleine Deletionen von bis zu 4bp, in den Knockouts waren es dagegen nur 10%. Bei letzteren waren die Deletionen signifikant länger als im Wildtyp, im Mittel 30bp (± 4) verglichen zu 18bp (± 3) (siehe Studie Fig.3 und Supplement Fig.S2B). Weiterhin benutzten die Ku80^{-/-} Zellen häufiger als der Wildtyp Mikrohomologien von 4-5bp, was vermuten lässt, dass der Verlust von Ku80 ähnlich wie von XRCC4 den Mechanismus des Rejoinings verändert. Interessanterweise war der Prozentsatz der durch 1-2bp lange Mikrohomologien gesteuerten Verbindungen in Ku80^{+/+} und Ku80^{-/-} Zellen mit ca. 50% aller Reparaturereignisse gleich.

Das Reparaturspektrum der Ku80- und XRCC4-Wildtyp-Zellen war allerdings nicht identisch, was auf die unterschiedliche Herkunft der Mauszellstämme zurückzuführen sein könnte.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Genauigkeit des chromosomalen NHEJ in Ku80- und XRCC4-Knockout-Zellen reduziert ist – allerdings nur der XRCC4-Verlust zu einer deutlichen Effizienzeinbusse führt.

Knockout von XRCC4 oder Ku80 beim Rejoining von komplementären DNA-Enden

Vorherige Studien mit extrachromosomalen Substraten legten nahe, dass sowohl Ku80 als auch LigIV in die präzise Ligation von komplementären DNA-Enden involviert sind (*Feldmann et al. 2000, Katsura et al. 2007, Smith et al. 2003*). Komplementäre DNA-Enden entstehen in unserem Modell, wenn an nur einer I-SceI-Erkennungssequenz geschnitten wird. Wird dieser Bruch fehlerfrei repariert, so ändert sich die DNA-Sequenz nicht – somit wird dieses Reparatur-

produkt auch nicht detektiert. Wenn allerdings bei der Ligation Fehler passieren, kann eine Sequenzveränderung dazu führen, dass das artifizielle Startkodon nicht mehr dominant ist – damit wird die Zelle resistent gegen XHAT/M und für uns detektierbar. Es wurde die Untergruppe der Reparaturprodukte untersucht, die aus einem einzelnen I-SceI-Schnitt entstanden. Unter allen untersuchten Reparaturereignissen traten diese fehlerhaften Produkte nach einfachem DSB bei XRCC4+/+ in 11% der Fälle auf. Bei XRCC4-/- waren es dagegen 41% ($p < 0.028$). Bei den Ku80-Knockouts war die Fraktion der fehlerhaften Reparaturprodukte von komplementären Enden nicht signifikant gegenüber dem Wildtyp verändert.

Zusammengefasst zeigt dies, dass XRCC4 und Ku80 unterschiedliche Rollen im NHEJ von I-SceI-induzierten DSBs mit komplementären und nichtkomplementären Enden besetzen. Der Verlust von XRCC4 führt zu einem deutlich schwereren Reparaturdefekt als das Fehlen von Ku80.

Einfluss von XRCC4 und Ku80 auf IR-induzierte DSBs

Nach Strahlenexposition werden die entstandenen DSBs primär durch NHEJ repariert. In Gel-Elektrophoresen zeigen XRCC4- und Ku80-Knockout-MEFs einen deutlichen DSB-Reparatur-Defekt verglichen mit dem jeweiligen Wildtyp. Bemerkenswerterweise war hier der Defekt bei beiden Knockout-Linien gleichstark ausgeprägt im Gegensatz zur Effizienz des Rejoinings I-SceI-induzierter DSBs. Genauso wie die DNA-Reparatur war auch die zelluläre Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung deutlich erhöht, wie im Koloniebildungstest nach Bestrahlung gezeigt werden konnte (siehe Studie Fig.4A und B).

4. Diskussion

XRCC4 stärkt Effizienz und Genauigkeit des NHEJ

Mit dieser Arbeit konnte der Einfluss des XRCC4-Defekts in Mäusen anhand des NHEJ von chromosomalen Doppelstrangbrüchen auf molekularer Ebene aufgezeigt werden. XRCC4-Knockouts zeigten eine über 20-fach reduzierte Fähigkeit, I-SceI-Endonuklease-induzierte Brüche zu reparieren. Dies ist ein stärkerer Effekt auf das NHEJ als er bisher in extrachromosomalen *in-vitro*-Assays oder bei der CSR gezeigt werden konnte, allerdings ähnlich dem Einfluss auf die V(D)J-Rekombination (*Koch et al. 2004*, *Kuhfittig-Kulle et al. 2007*, *Van Heemst et al. 2004*, *Verkaik et al. 2002*, *Yan et al. 2007*). Die Bedeutung von XRCC4 beim Rejoining von enzymatischen DSBs bezieht sich sowohl auf kohäsive komplementäre Enden, die präzise ligiert werden können, als auch auf nichtkomplementäre Enden, die typischerweise mit 1-2nt einer terminalen A/T-Mikrohomologie ligiert werden.

Analog zu früheren Ergebnissen fanden wir lange Deletionen und häufigen Gebrauch von längeren Mikrohomologien in den XRCC4 Knockouts (*Kabotyanski et al. 1998*, *Koch et al. 2004*, *Kuhfittig-Kulle et al. 2007*, *O'Driscoll et al. 2001*,). Deletionen sind wahrscheinlich der

Exonuklease-Aktivität durch Fehlen des XRCC4:LigIV-Komplexes geschuldet. XRCC4 wird außerdem benötigt, um Pol λ und Pol μ der Polymerase X-Familie zu rekrutieren und zu aktivieren. Dies sind wichtige Polymerasen des NHEJ (*Capp et al. 2006, Lee et al. 2004, Ma et al. 2004, Nick McElhinny et al. 2005*). Reduzierte Polymerase-Aktivität könnte bedeuten, dass die Exonuklease Überhand gewinnt, was möglicherweise zu den langen Deletionen führt, wie sie in den XRCC4^{-/-} Zellen auftreten. Schrittweise End-Resektion exponiert möglicherweise längere Sequenz-Homologien an den DNA-Enden, was dann zu einer ausreichenden Stabilität führen könnte, um das NHEJ ohne XRCC4:LigIV zu beenden. Eventuell ligiert DNA-Ligase III (LigIII) diese Enden. Längere Mikrohomologien erhöhen nicht nur die Stabilität der Junktionen, sondern separieren auch die DNA-Enden besser. Die Lücken eines jeden Stranges könnten dann als individuelle Einzelstrangbrüche erkannt werden, welche bessere Substrate für LigIII darstellen als echte DSBs (*Taylor et al. 2000*). In unserer Studie wurden aber nur 25% der Reparaturprodukte auch unabhängig von Mikrohomologien gebildet (siehe Studie Fig.2D), somit könnte neben der Mikrohomologie-Junktion ein zusätzlicher Mechanismus zur Stabilisation der Enden existieren.

Ku80 ist verzichtbar für effizientes NHEJ gezielter I-SceI-induzierter DSBs

Ähnlich dem XRCC4^{-/-} Reparaturspektrum zeigt Ku80^{-/-} einen Anstieg der Deletionsgröße und eine Verschiebung zu einem Endjoining-Modus, welcher auf dem Gebrauch längerer Mikrohomologien (3-5bp) beruht (siehe Studie Fig.3). Dies passt zu mehreren früheren Arbeiten (*Chen et al. 2001, Feldmann et al. 2000, Guirouilh-Barbat et al. 2004, Katsura et al. 2007, Kufittig-Kulle et al. 2007, Liang et al. 1996, Van Heemst et al. 2004*). Interessanterweise konnten wir verglichen mit dem Wildtyp keine signifikant reduzierte Effizienz des NHEJ in Ku80^{-/-} Zellen beobachten (siehe Studie Fig.3A und Supplement Fig.S3). Ähnliche Ergebnisse wurden von Ma *et al.* für Hefen (*Ma et al. 2003*) und Guirouilh-Barbat *et al.* (*Guirouilh-Barbat et al. 2004*) für Hamsterzell-Mutanten berichtet, trotz bemerkenswerter Unterschiede in den chromosomalen Reparatur-Assays. Der milde Reparatur-Phänotyp von Ku80^{-/-} MEFs zeigt einen deutlichen Unterschied zu XRCC4^{-/-} Zellen, was die beobachteten Differenzen bei der embryonalen Lebensfähigkeit von Ku80- versus XRCC4-Knockout-Mäusen widerspiegelt (*Gao et al. 2000, Nussenzweig et al. 1996*). Wieso ist Ku80 nun nicht für das NHEJ erforderlich? Wir können nicht ausschließen, dass die I-SceI-Bindung und der DNA-Schnitt die Chromatinstruktur verändern, damit andere Reparaturproteine anziehen und so die Notwendigkeit für Ku als Signalverstärker für andere Reparaturproteine verringern. Andererseits ist Ku nötig für die Rekrutierung von XRCC4:LigIV (*Mari et al. 2006, Nick McElhinny et al. 2000*), allerdings konnten wir nicht den gleichen Rejoining-Defekt in Ku80^{-/-} Zellen beobachten wie in XRCC4^{-/-} Zellen. Eine mögliche Erklärung hierfür involviert den LigIII-, PARP-1- und XRCC1-abhängigen Reparaturweg, welcher alternativ arbeitet und unabhängig vom DNA-PK-abhängigen Weg ist

(Audebert *et al.* 2004, Wang *et al.* 2005, Wang *et al.* 2007). Dieser beginnt mit der Bindung von PARP-1 an freie DNA-Enden, was die Abwesenheit von Ku voraussetzt. Die Effizienz dieses Reparaturwegs konnte in LigIV-defizienten Zellen durch Ku70-Knockdown deutlich erhöht werden (Ma *et al.* 2003). Diese Beobachtung unterstützt frühere Ergebnisse, die zeigten, dass LigIV-defiziente DT40 Zellen und auch die embryonale Letalität von LigIV^{-/-} Mäusen durch gleichzeitigen Knockout von Ku70 aufgehoben werden konnten (Adachi *et al.* 2001, Karanjawala *et al.* 2002). Also könnte die Reparatur in Ku80^{-/-} Mäusen zu einem LigIII-abhängigen Reparaturweg umgeleitet werden, der für Rejoining-Aktivität trotz des Sequenzverlusts an den Bruchstellen sorgt. Im Gegensatz dazu exprimieren XRCC4^{-/-} Zellen normales Ku80, was den Zugang von PARP-1 an die DNA versperrt. Also bleibt hier das LigIII-vermittelte Endjoining ineffizient.

Spezifische Rollen von XRCC4 und Ku80 beim Rejoining von I-SceI-Endonuclease versus IR-induzierten DSBs

Warum ist die Bedeutung von XRCC4 und Ku80 bei Endonuclease- und IR-induzierten Brüchen unterschiedlich? Enzymatische Schnitte hinterlassen saubere Enden, während strahlungsinduzierte DNA-Enden von 5`phosphorylierten Resten oder 3`Phosphoglycolaten blockiert sind. Diese müssen erst entfernt werden, bevor die Enden weiter bearbeitet werden können. Dies erfordert die Kinase-Aktivität der DNA-PK und/ oder von Artemis sowie von XRCC4:LigIV (Chen *et al.* 2001, Lee *et al.* 2003, Povirk *et al.* 2007). Rekrutierung und korrekte Aktivität dieser Proteine hängt von Ku ab (Ma *et al.* 2002, Mari *et al.* 2006, Nick McElhinny *et al.* 2000), was die hohe Sensitivität von Ku80-defizitären Zellen gegenüber Strahlung, aber nicht gegenüber enzymatischem Schaden erklärt. Eine andere, jedoch weniger wahrscheinliche Alternative ist, dass Ku80-unabhängiges Endjoining 1-2 DSBs effizient reparieren kann, aber mit der hohen Anzahl an Brüchen durch IR überfordert ist.

Zusammengefasst konnten unsere Untersuchungen das Verständnis für die Rolle von XRCC4 und Ku80 in chromosomaler DSB-Reparatur weit voranbringen. Beide Proteine sind wichtig für die Reparatur IR-induzierter Brüche, aber nur XRCC4 ist essentiell für effizientes Endjoining von enzymatischen Brüchen. Letztere ähneln am meisten den spontanen DSBs, die während des normalen DNA-Metabolismus auftreten. Unsere Ergebnisse können erklären, wieso der XRCC4^{-/-}, aber nicht der Ku80-Knockout-Phänotyp für Mäuse tödlich ist. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen zeitgleich Lopez *et al.*, die ebenso zeigen konnten, dass nur der Verlust von XRCC4, aber nicht von Ku80 die Effizienz der Reparatur der I-SceI-induzierten Brüche reduziert. Im humanen Bereich gibt es bisher keine Berichte von Individuen mit einem Ku80- oder XRCC4-Defekt, was den essentiellen Charakter beider Proteine unterstreicht. Die Bedeutung für die Karzinogenese lässt sich noch nicht abschätzen, da lediglich einige wenige Fälle von XRCC4-defizienten Neuroblastomen beschrieben wurden (Guirouilh-Barbat *et al.* 2007).

Literaturverzeichnis

- Adachi N, Ishino T, Ishii Y, Takeda S and Koyama H (2001) DNA ligase IV-deficient cells are more resistant to ionizing radiation in the absence of Ku70: Implications for DNA double-strand break repair. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 98, 12109–12113.
- Adachi N, Suzuki H, Iizumi S, Koyama H (2003) Hypersensitivity of nonhomologous DNA end-joining mutants to VP-16 and ICRF-193: implications for the repair of topoisomerase II-mediated DNA damage. *J Biol Chem.* 278(38):35897-902.
- Audebert M, Salles B and Calsou P (2004) Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III is an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J. Biol. Chem.* 279, 55117–55126.
- Baumann P and West SC (1998) DNA end-joining catalyzed by human cell-free extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95; 14066-14070.
- Blier PR, Griffith AJ, Craft J, Hardin JA (1993) Binding of Ku protein to DNA. Measurement of affinity for ends and demonstration of binding to nicks. *J Biol Chem.* 5;268(10):7594-601.
- Bernofsky C (1991) Nucleotide chloramines and neutrophil-mediated cytotoxicity. *FASEB J.* 5(3):295-300.
- Blunt T, Finnie NJ, Taccioli GE, Smith GC, Demengeot J, Gottlieb TM, Mizuta R, Varghese AJ, Alt FW, Jeggo PA (1995) Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. *Cell.* 10;80(5):813-23.
- Buck D, Malivert L, de Chasseval R, Barraud A, Fondanèche MC, Sanal O, Plebani A, Stéphan JL, Hufnagel M, le Deist F, Fischer A, Durandy A, de Villartay JP, Revy P (2006) Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell.* 27;124(2):287-99 and 27;124(2):260-2.
- Capp JP, Boudsocq F, Bertrand P, Laroche-Calry A, Pourquier P, Lopez BS, Cazaux C, Hoffmann JS and Canitrot Y (2006) The polymerase I is required for the repair of non-compatible DNA double-strand breaks by NHEJ in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 34, 2998–3007.
- Chen L, Trujillo K, Sung P, Tomkinson AE (2000) Interactions of the DNA ligase IV-XRCC4 complex with DNA ends and the DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* 25;275(34):26196-205.
- Chen S, Inamdar KV, Pfeiffer P, Feldmann E, Hannah MF, Yu Y, Lee JW, Zhou T, Lees-Miller SP and Povirk LF (2001) Accurate in vitro end joining of a double-strand break with partially cohesive 3' - overhangs and 3' -phosphoglycolate termini. *J. Biol. Chem.* 276, 24323–24330.
- Costantini S, Woodbine L, Andreoli L, Jeggo PA, Vindigni A (2007) Interaction of the Ku heterodimer with the DNA ligase IV/Xrcc4 complex and its regulation by DNA-PK. *DNA Repair* 6:712–22
- Dahm-Daphi J, Hubbe P, Horvath F, El-Awady RA., Bouffard KE, Powell SN and Willers H (2005) Non-homologous end-joining of site-specific but not of radiation-induced DNA double-strand breaks is reduced in the presence of wild-type p53. *Oncogene*, 24, 1663–1672.
- Difilippantonio MJ, Zhu J, Chen HT, Meffre E, Nussenzweig MC, Max EE, Ried T, Nussenzweig A (2000) DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation. *Nature.* 30;404(6777):510-4.
- Dudley DD, Chaudhuri J, Bassing CH, Alt FW (2005) Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Adv Immunol.* 86:43-112.
- Falzon M, Fewell JW, Kuff EL (1993) EBP-80, a transcription factor closely resembling the human auto-antigen Ku, recognizes single- to double-strand transitions in DNA. *J Biol Chem.* 15;268(14):10546-52.

Frank KM, Sharpless NE, Gao Y, Sekiguchi JM, Ferguson DO, Zhu C, Manis JP, Horner J, DePinho RA, Alt FW (2000) DNA ligase IV deficiency in mice leads to defective neurogenesis and embryonic lethality via the p53 pathway. *Mol Cell.* 5(6):993-1002.

Feldmann E, Schmiemann V, Goedecke W, Reichenberger S. and Pfeiffer P (2000) DNA double-strand break repair in cell-free extracts from Ku80-deficient cells: implications for Ku serving as an alignment factor in non-homologous DNA end joining. *Nucleic Acids Res.* 28, 2585–2596.

Gao Y, Sun Y, Frank KM, Dikkes P, Fujiwara Y, Seidl KJ, Sekiguchi JM, Rathbun GA, Swat W, Wang J, Bronson RT, Malynn BA, Bryans M, Zhu C, Chaudhuri J, Davidson L, Ferrini R, Stamato T, Orkin SH, Greenberg ME, Alt FW (1998) A critical role for DNA end-joining proteins in both lymphogenesis and neurogenesis. *Cell.* 23;95(7):891-902.

Gao Y, Ferguson DO, Xie W, Manis JP, Sekiguchi J, Frank KM, Chaudhuri J, Horner J, DePinho RA, Alt FW (2000) Interplay of p53 and DNA-repair protein XRCC4 in tumorigenesis, genomic stability and development. *20;404(6780):897-900.*

Gu J, Lu H, Tippin B, Shimazaki N, Goodman MF, Lieber MR (2007a) XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *EMBO J.* 26:1010–23.

Gu J, Lu H, Tsai AG, Schwarz K, Lieber MR (2007b) Single-stranded DNA ligation and XLF-stimulated incompatible DNA end ligation by the XRCC4-DNA ligase IV complex: influence of terminal DNA sequence. *Nucleic Acids Res.* 35:5755–62.

Gu Y, Sekiguchi J, Gao Y, Dikkes P, Frank K, Ferguson D, Hasty P, Chun J, Alt FW (2000) Defective embryonic neurogenesis in Ku-deficient but not DNA-dependent protein kinase catalytic subunit-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14;97(6):2668-73.

Guirouilh-Barbat J, Huck S, Bertrand P, Pirzio L, Desmaze C, Sabatier L and Lopez BS (2004) Impact of the Ku80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells. *Mol. Cell.* 14, 611–623.

Guirouilh-Barbat J, Rass E, Plo I, Bertrand P and Lopez BS (2007) Defects in XRCC4 and Ku80 differentially affect the joining of distal non-homologous ends. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 104, 20902–20907.

Hamer G, Roepers-Gajadien HL, van Duyn-Goedhart A, Gademan IS, Kal HB, van Buul PP, Ashley T, de Rooij DG. (2003) Function of DNA-protein kinase catalytic subunit during the early meiotic prophase without Ku70 and Ku86. *Biol Reprod.* 68(3):717-21.

Hsu HL, Yannone SM, Chen DJ (2002) Defining interactions between DNA-PK and ligaseIV/XRCC4. *DNA Repair* 1:225–35.

Junop MS, Modesti M, Guarné A, Ghirlando R, Gellert M, Yang W (2000) Crystal structure of the Xrcc4 DNA repair protein and implications for end joining. *EMBO J.* 2000 15;19(22):5962-70.

Kabotyanski EB, Gomelsky L, Han JO, Stamato TD and Roth DB (1998) Double-strand break repair in Ku86- and XRCC4-deficient cells. *Nucleic Acids Res.* 26, 5333–5342.

Karanjawala ZE, Adachi N, Irvine RA, Oh EK, Shibata D, Schwarz K, Hsieh C and Lieber MR (2002) The embryonic lethality in DNA ligase IV-deficient mice is rescued by deletion of Ku: implications for unifying the heterogeneous phenotypes of NHEJ mutants. *DNA Repair.* 1, 1017–1026.

Kasten-Pisula U, Tastan H, Dikomey E (2005) Huge differences in cellular radiosensitivity due to only very small variations in double-strand break repair capacity. *Int J Radiat Biol.* 81(6):409-19.

Katsura Y, Sasaki S, Sato M, Yamaoka K, Suzukawa K, Nagasawa T, Yokota J and Kohno T (2007) Involvement of Ku80 in microhomology-mediated end joining for DNA double-strand breaks in vivo. *DNA Repair.* 6, 639–648.

- Koch CA, Agyei R, Galicia S, Metalnikov P, O'Donnell P (2004) Xrcc4 physically links DNA end processing by polynucleotide kinase to DNA ligation by DNA ligase IV. *EMBO J.* 23:3874–85.
- Kuhfittig-Kulle S, Feldmann E, Odersky A, Kuliczowska A, Goedecke W, Eggert A and Pfeiffer P (2007) The mutagenic potential of non-homologous endjoining in the absence of the NHEJ core factors Ku70/80, DNA-PKcs and XRCC4-LigIV. *Mutagenesis.* 22, 217–233.
- Leber R, Wise TW, Mizuta R, Meek K (1998) The XRCC4 gene product is a target for and interacts with the DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 273:1794–801.
- Lee JW, Blanco L, Zhou T, Garcia-Diaz M, Bebenek K, Kunkel TA, Wang Z, Povirk LF (2004) Implication of DNA polymerase lambda in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in human nuclear extracts. *J Biol Chem.* 279(1):805-11.
- Lee JW, Yannone SM, Chen DJ, Povirk LF (2003) Requirement for XRCC4 and DNA ligase IV in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in vitro. *Cancer Res.* 63(1):22-4.
- Lee KJ, Huang J, Takeda Y, Dynan WS (2000) DNA ligase IV and XRCC4 form a stable mixed tetramer that functions synergistically with other repair factors in a cell-free end-joining system. *J Biol Chem.* 275(44):34787-96.
- Lees-Miller SP, Godbout R, Chan DW, Weinfeld M, Day RS 3rd, Barron GM, Allalunis-Turner J (1995) Absence of p350 subunit of DNA-activated protein kinase from a radiosensitive human cell line. *Science.* 267(5201):1183-5.
- Liang F and Jasin M (1996) Ku80-deficient cells exhibit excess degradation of extrachromosomal DNA. *J. Biol. Chem.* 271, 14405–14111.
- Li Z, Otevrel T, Gao Y, Cheng HL, Seed B, Stamato TD, Taccioli GE, Alt FW (1995) The XRCC4 gene encodes a novel protein involved in DNA double-strand break repair and V(D)J recombination. *Cell.* 79:83(7):1079-89.
- Lieber MR (2010) The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem.* 79:181-211.
- Lindahl T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature.* 362(6422):709-15.
- Ma JL, Kim EM, Haber JE and Lee SE (2003) Yeast Mre11 and Rad1 proteins define a Ku-independent mechanism to repair double-strand breaks lacking overlapping sequences. *Mol. Cell Biol.* 23, 8820–8828.
- Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR (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(6):781-94.
- Ma Y, Lu H, Tiffin B, Goodman MF, Shimazaki N, Koiwai O, Hsieh CL, Schwarz K, Lieber MR (2004) A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining. *Mol Cell.* 16(5):701-13.
- Mari PO, Florea BI, Persengiev SP, Verkaik NS, Brüggewirth HT, Modesti M, Giglia-Mari G, Bezstarosti K, Demmers JA, Luider TM, Houtsmuller AB, van Gent DC (2006) Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(49):18597-602.
- Mimori T and Hardin JA (1986) Mechanism of interaction between Ku protein and DNA. *J Biol Chem.* 261(22):10375-9.
- Modesti M, Junop MS, Ghirlando R, van de Rakt M, Gellert M (2003) Tetramerization and DNA ligase IV interaction of the DNA double-strand break protein XRCC4 are mutually exclusive. *J. Mol. Biol.* 334:215–28.

Moshous D, Pannetier C, Chasseval Rd R, Deist FI F, Cavazzana-Calvo M, Romana S, Macintyre E, Canioni D, Brousse N, Fischer A, Casanova JL, Villartay JP (2003) Partial T and B lymphocyte immunodeficiency and predisposition to lymphoma in patients with hypomorphic mutations in Artemis. *J Clin Invest.* 111(3):381-7.

Nick McElhinny SA, Snowden CM, McCarville J, Ramsden DA (2000) Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Mol Cell Biol.* 20(9):2996-3003.

Nick McElhinny SA, Havener JM, Garcia-Diaz M, Juárez R, Bebenek K, Kee BL, Blanco L, Kunkel TA, Ramsden DA (2005) A gradient of template dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining. *Mol Cell.* 5;19(3):357-66.

Nickoloff JA and Brennemann MA (2004) Analysis of recombinational repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells with I-SceI nuclease. *Meth. Mol. Biol.*, 262, 35–52.

Nussenzweig A, Chen C, da Costa Soares V, Sanchez M, Sokol K, Nussenzweig MC, Li GC (1996) Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. *Nature.* 8;382(6591):551-5.

O'Driscoll M, Cerosaletti KM, Girard PM, Dai Y, Stumm M, Kysela B, Hirsch B, Gennery A, Palmer SE, Seidel J, Gatti RA, Varon R, Oettinger MA, Neitzel H, Jeggo PA, Concannon P (2001) DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. *Mol Cell.* 8(6):1175-85.

Pang D, Yoo S, Dynan WS, Jung M, Dritschilo A (1997) Ku proteins join DNA fragments as shown by atomic force microscopy. *Cancer Res.* 15;57(8):1412-5.

Pero RW, Sheng Y, Olsson A, Bryngelsson C, Lund-Pero M (1996) Hypochlorous acid/N-chloramines are naturally produced DNA repair inhibitors. *Carcinogenesis.* 17(1):13-8.

Pitcher RS, Green AJ, Brzostek A, Korycka-Machala M, Dziadek J, Doherty AJ (2007) NHEJ protects mycobacteria in stationary phase against the harmful effects of desiccation. *DNA Repair (Amst).* 1;6(9):1271-6.

Povirk LF, Zhou T, Zhou R, Cowan MJ and Yannone SM (2007) Processing of 3'-phosphoglycolate-terminated DNA double strand breaks by Artemis nuclease. *J. Biol Chem.* 282, 3547–3558.

Ralhan R, Kaur J, Kreienberg R, Wiesmüller L (2007) Links between DNA double strand break repair and breast cancer: accumulating evidence from both familial and nonfamilial cases. *Cancer Lett.* 8;248(1):1-17.

Riballo E, Critchlow SE, Teo SH, Doherty AJ, Priestley A, Broughton B, Kysela B, Beamish H, Plowman N, Arlett CF, Lehmann AR, Jackson SP, Jeggo PA (1999) Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukaemia patient. *Curr Biol.* 1;9(13):699-702.

Schulte JH, Kuhfittig-Kulle S, Klein-Hitpass L, Schramm A, Biard DS, Pfeiffer P, Eggert A (2008) Expression of the TrkA or TrkB receptor tyrosine kinase alters the double-strand break (DSB) repair capacity of SY5Y neuroblastoma cells. *DNA Repair (Amst).* 1;7(10):1757-64.

Schulte-Uentrop L and Dahm-Daphi J (2006) Ein LötKolben als Klonierungshilfe. *Laborjournal* 2: 65.

Sibanda BL, Critchlow SE, Begun J, Pei XY, Jackson SP (2001) Crystal structure of an Xrcc4-DNA ligase IV complex. *Nat. Struct. Biol.* 8:1015–19.

Smith J, Riballo E, Kysela B, Baldeyron C, Manolis C, Masson C, Lieber MR, Papadopoulos D and Jeggo PA (2003) Impact of DNA ligase IV on the fidelity of end joining in human cells. *Nucleic Acids Res.* 31, 2157–2167.

Taccioli GE, Gottlieb TM, Blunt T, Priestley A, Demengeot J, Mizuta R, Lehmann AR, Alt FW, Jackson SP, Jeggo PA (1994) Ku80: product of the XRCC5 gene and its role in DNA repair and V(D)J

recombination. *Science*. 2;265(5177):1442-5.

Taylor RW, Whitehouse CJ and Caldecott KW (2000) The DNA ligase III zinc finger stimulates binding of DNA secondary structure and promotes end joining. *Nucleic Acids Res.* 28, 3558–3563.

Van Heemst D, Brugmans L, Verkaik NS and van Gent DC (2004) End-joining of blunt DNA double-strand breaks in mammalian fibroblasts is precise and requires DNA-PK and XRCC4. *DNA Repair*. 3, 43–50.

Verkaik NS, Esveltd-van-Lange REE, van Heemst D, Brueggenwirth HT, Hoeijmakers JHJ, Zdzienicka MZ and van Gent DC (2002) Different types of V(D)J recombination and end-joining defects in DNA double-strand break repair mutant mammalian cells. *Europ J.Immun.* 32, 701–709.

Wang H, Rosidi B, Perrault R, Wang M, Zhang L, Windhofer F and Iliakis G. (2005) DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. *Cancer Res.* 65, 4020–4030.

Wang M, Wu W, Rosidi B, Zhang L, Wang H, Iliakis G. (2007) PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res.* 34, 6170–6182.

Wang YG, Nnakwe C, Lane WS, Modesti M, Frank KM (2004) Phosphorylation and regulation of DNA ligase IV stability by DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 279:37282–90.

Walker EH, Pacold ME, Perisic O, Stephens L, Hawkins PT, Wymann MP, Williams RL (2000) Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Mol Cell.* 6(4):909-19.

Walker EH, Pacold ME, Perisic O, Stephens L, Hawkins PT, Wymann MP, Williams RL (2000) Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Mol Cell.* 6(4):909-19.

Walker JR, Corpina RA, Goldberg J (2001) Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*. 9;412(6847):607-14.

Wei YH, Lu CY, Lee HC, Pang CY, Ma YS (1998) Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function. *Ann N Y Acad Sci.* 20;854:155-70.

Weterings E, Verkaik NS, Brüggewirth HT, Hoeijmakers JH, van Gent DC (2003) The role of DNA dependent protein kinase in synopsis of DNA ends. *Nucleic Acids Res.* 15;31(24):7238-46.

Willers H, Xia F, Powell SN (2002) Recombinational DNA repair in cancer and normal cells: The challenge of functional analysis. *J.Biomed. Biotech.* 2, 86–93.

Willers H, Husson J, Lee LW, Hubbe P, Horvath F, Powell SN and Dahm-Daphi J (2006) Distinct mechanisms of non-homologous end-joining in the repair of site-directed chromosomal breaks with non-complementary and complementary ends. *Radiat. Res.* 166, 567–574.

Yan CT, Boboila C, Souza EK, Franco S, Hickernell TR, Murphy M, Gumaste S, Geyer M, Zarrin AA, Marris JP (2007) IgH class switch and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature*. 449, 478–482.

Yaneva M, Kowalewski T, Lieber MR (1997) Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. *EMBO J.* 15;16(16):5098-112.

Danksagung

Mein aufrichtiger Dank geht an meinen Doktorvater Jochen Dahm-Daphi für die hervorragende Betreuung und für seine Geduld, an Raafat El-Awady für die gute Zusammenarbeit, an Fruszina Horvath, Petra Hubbe und Lena Schliecker für die Unterstützung beim Erlernen der Methodik sowie an meine Familie für ihren unermüdlichen Zuspruch.

Lebenslauf

(entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen)

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: