

Abstract

Der Mre-Rad50-Nbs1 (MRN) Proteinkomplex ist ein bekannte Sensor für DNA-Schäden, welcher in solchen Signaltransduktionswegen eine große Rolle spielt, die Zellzyklus-Checkpoints aktivieren. Die Funktion von Mre11 ist ebenfalls bekannt für ihre Rolle in der homologen Rekombinations-Reparatur (HRR), wobei auch neuere Studien gezeigt haben, dass dieses Protein neben HRR auch in der klassischen Nicht-homologen End-Verknüpfung (NHEJ), die mit DNA-PK auch Ku und den Ligase IV/XRCC4-Komplex einschließt, involviert ist. In Hefezellen sind neben Ku und Ligase IV-Homologen auch entsprechende MRN-Homologe an der Reparatur über NHEJ beteiligt. Das Ku70/Ku80 Heterodimer stellt eines der ersten Proteine dar, welche DNA-Enden erkennen und binden. Die Kristallstruktur von Ku zeigt eine asymmetrische Ringkonformation, welche das Einfädeln in die DNA und möglicherweise die Endverknüpfung erleichtert. Nach Komplettierung der Endverknüpfung bleibt das Protein aber weiterhin an der DNA festgeklemmt. Dieser Umstand wirft die Frage auf, wie das immernoch festgebundene Ku von der DNA abgelöst wird und wie das festgeklemmte Protein zu einer voll aktivierten DNA-Schadensantwort beiträgt. Bisher wurde nur in einer Publikation vermutet, dass eine Ubiquitin-abhängige Beseitigung und Degradation von Ku80 von der DNA erfolgt, welche unabhängig von der Vollendung von NHEJ ist. Bis heute gibt es keine publizierten Studien, die untersuchen, ob gebundenes Ku-Protein eine funktionelle Rolle bei der Sicherstellung der Signaltransduktion für die DNA-Schadensantwort spielt.

Die vorliegende Arbeit überprüft die Hypothese, ob gebundenes Ku an der Signaltransduktion der DNA-Schadensantwort beteiligt ist, möglicherweise durch die Unterstützung der Rekrutierung des MRN-Komplex an Doppelstrangbrüche (DSB). Diese Hypothese untermauernd zeigen wir hier, dass die konstitutive Interaktion zwischen Mre11 und Ku nach der Exposition von ionisierender Strahlung verstärkt wurde und dass diese Verstärkung dosisabhängig ist. Die Interaktion zwischen Mre11 und Ku wurde über Immunpräzipitation (IP) von nukleären Extrakten untersucht, wobei ein Anti-Ku70 Antikörper während der Detektion von Mre11 über Western Blot zum Einsatz kam. Zu diesem Zweck wurden IP-Experimente mit einer Zell-Linie aus einem humanen alveolären Basalepithelkarzinom (A549), CHO-Zellen und Ku80 defiziente Mutanten (*xrs6*) durchgeführt. Wie erwartet zeigten Ku defiziente Zellen keine detektierbare Interaktion zwischen Mre11 und Ku70 und bestätigt daher die Spezifität dieses Assays. Eine Interaktion zwischen Mre11 und Ku war in A549 Zellen deutlich sichtbar und wurde nach einer Exposition von 2 und 4 Gy ionisierender

Strahlung merklich verstärkt. Diese Interaktion zeigte sich unempfindlich gegenüber Ethidiumbromid (EtBr) und Rnase, wobei vermutet werden kann, dass sie nicht durch DNA oder RNA vermittelt wird. Rad50 und Nbs1 wurden ebenfalls mit Mre11 koprizipitiert. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass der gesamte MRN-Komplex in dieser Interaktion involviert ist. Bemerkenswert ist, dass außer MRN auch andere DNA-Schadenssensoren wie PARP-1 und ATM Teile dieses Komplexes sind und ebenfalls koprizipitiert wurden. Die Resultate zeigen bemerkenswerte Interaktionen zwischen Ku und Signal-/Reparaturproteinen wie dem MRN-Komplex, was weiterhin auch künftige Untersuchungen rechtfertigt. Die Kinetik der Mre11-Interaktion mit Ku nach einer Exposition von 4 und 8 Gy ionisierender Strahlung zeigte ein nur schwaches Mre11-Signal 10 Minuten, jedoch ein starkes Signal 1-2 Stunden nach Bestrahlung. Als diese Interaktion in DNA-PKcs und ATM defekten Zellen untersucht wurden, konnte in DNA-PKcs defekten Zellen keine Ku-MRN Interaktion nach Exposition mit ionisierender Strahlung beobachtet werden. Eine Behandlung der Extrakte mit bakterieller alkalischer Phosphatase führte zu einer Abnahme in der dosisabhängigen Interaktion zwischen Mre11 und Ku, während die Behandlung mit Natrium-Orthovanadat und Natriumazid (Inhibitoren von Protein-Thyrosinphosphatasen) zu einer Abnahme der Gesamtinteraktion führte; die strahlungsabhängigen Aspekte blieben jedoch unverändert.

Der zweite Teil meiner Arbeit konzentriert sich auf die Aktivität von PARP-1, welches eine mutmaßliche Komponente des Backup-Signalwegs der nicht homologen Endverknüpfung darstellt, wo es zusammen mit DNA-Ligase III und Histon H1 eine Rolle spielen könnte. Ziel dieses Teils der Arbeit war, mögliche Interaktionen zwischen Mre11 und PARP-1 und damit auch mögliche Wechselwirkungen zwischen D-NHEJ und B-NHEJ zu untersuchen. Die Resultate zeigen einen merklichen Anstieg in der PARP-Aktivität mit zunehmender Konzentration von Histon H1.