

MAŁGORZATA Z. ZDZIENICKA

Department of Radiation Genetics and Chemical Mutagenesis,
Leiden University – LUMC,
Wassenaarseweg 72, 2333 AL Leiden, Holandia
e-mail: zdzienicka@rulf2.medfac.leidenuniv.nl

MECHANIZMY NAPRAWY PODWÓJNYCH PĘKNIĘC DNA (DSB) W KOMÓRKACH SSAKÓW: PODSTAWY MOLEKULARNE I KONSEKWENCJE BIOLOGICZNE

WPROWADZENIE

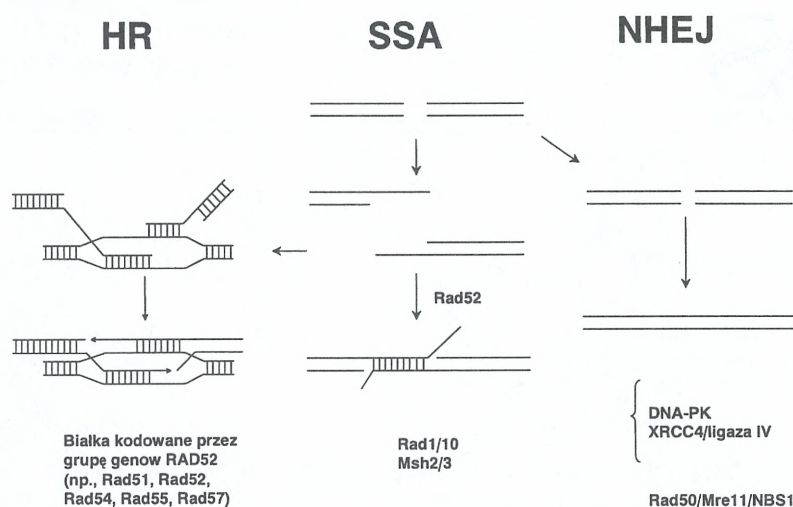
Człowiek narażony jest często na niskie dawki promieniowania jonizującego pochodzące ze środowiska (promieniowanie kosmiczne, radon) lub aparatury diagnostycznej (na przykład prześwietlenie płuc). Promieniowanie jonizujące jest także stosowane w radioterapii nowotworów i wtedy dawki promieniowania są stosunkowo duże. Pod wpływem promieniowania jonizującego powstaje wiele różnych uszkodzeń DNA, takich jak pojedyncze i podwójne pęknięcia nici DNA, uszkodzenia zasad oraz wiązania krzyżowe pomiędzy DNA a białkami. Podobne uszkodzenia powstają również pod wpływem wolnych rodników, które są generowane w czasie normalnego metabolizmu komórkowego, a także przez różne związki chemiczne. Nic więc dziwnego, że wszystkie organizmy posiadają sprawne mechanizmy naprawy uszkodzeń DNA. Enzymy naprawiające uszkodzenia DNA muszą je najpierw rozpoznać i usunąć, a następnie odtworzyć poprzednio istniejącą sekwencję DNA. W procesie naprawy biorą udział enzymy, uczestniczące także w innych procesach metabolicznych DNA, takich jak: replikacja DNA czy transkrypcja. Oprócz naprawy uszkodzeń DNA ważną rolę w zachowaniu integralności genomu odgrywa kontrola cyklu komórkowego, która pozwala dzielącym się komórkom zatrzymać się w różnych fazach cyklu tak, aby umożliwić naprawę uszkodzenia przed podziałem komórki.

Sprawne i dokładne naprawianie podwójnych pęknięć nici DNA (ang. DNA double strand break, DSB) powstałych pod wpływem promieniowania jest szczególnie ważne dla organizmu, gdyż nienaprawione DSB są letalne, a niedo-

kładna naprawa prowadzi do powstania mutacji (aberracji chromosomowych). Trzeba jednak także wziąć pod uwagę, że DSB są również indukowane enzymatycznie w normalnych procesach komórkowych, na przykład w inicjacji procesu rekombinacji, w procesie mejozy, mitozy czy rekombinacji V(D)J. W konsekwencji uszkodzony proces naprawy DSB prowadzi więc nie tylko do zwiększonej wrażliwości na promieniowanie jonizujące, ale także zaburza wiele procesów komórkowych takich jak: procesy mejozy czy mitozy, czy odpowiedzi immunologicznej (syntezy przeciwciał). Oczywiście jest zatem, że dla organizmu ważne jest istnienie sprawnych mechanizmów odpowiedzialnych za naprawę sprawnych DSB.

Analiza mutantów drożdży *Saccharomyces cerevisiae* nadwrażliwych na promieniowanie jonizujące dostarczyła podstaw dla badania genów homologicznych oraz ich funkcji w komórkach ssaków (IVANOV i HARBER 1997, KANAAR i HOEIJMAKERS 1997, PETRINI i współaut. 1997, KANAAR i współaut. 1998, BAUMANN i WEST 1998). W komórkach *S. cerevisiae* DSB są naprawiane przez trzy mechanizmy: rekombinację homologiczną (HR), naprawę niehomologiczną (NHEJ) oraz tak zwane „single-strand annealing” (SSA), które są przedstawione schematycznie na Ryc. 1.

Rekombinacja HR polega na wymianie homologicznej pomiędzy uszkodzonym chromosomem oraz nieuszkodzonym chromosomem homologicznym lub chromatydą siostrzaną. W wyniku tego procesu następuje wierne odtworzenie informacji genetycznej, natomiast naprawa NHEJ prowadzi do utraty krótkich



Ryc. 1. Schematyczne mechanizmy naprawy DSB: naprawa homologiczna (ang. homologous repair, HR), single-strand annealing (SSA), naprawa niehomologiczna (ang. non-homologous end joining, NHEJ).

sekwencji DNA w pobliżu DSB. Tak więc pierwszy proces jest naprawą bezbłędną, zaś drugi prowadzi do powstania mutacji.

W komórkach ssaków za naprawę DSB odpowiedzialne są zarówno mechanizmy naprawy NHEJ, jak i rekombinacji HR, a udział naprawy DSB typu SSA prawdopodobnie nie odgrywa większej roli. W przeciwieństwie do

drożdży, u ssaków naprawa NHEJ (ang. non-homologous end joining) wydaje się być głównym mechanizmem naprawy DSB indukowanych przez promieniowanie jonizujące. Prawdopodobnie jednak obydwa mechanizmy odgrywają ważną rolę w tym procesie, włączając się w zależności od typu komórek, etapu rozwoju komórkowego organizmu czy różnych faz cyklu komórkowego.

NAPRAWA DSB A PROCES REKOMBINACJI V(D)J

Kilka lat temu zrobiono zaskakujące odkrycie, że niektóre enzymy biorące udział w naprawie uszkodzeń DSB indukowanych przez promieniowanie jonizujące biorą także udział w procesie rekombinacji V(D)J (JACKSON i JEGGO 1995, ZDZIENICKA 1996). Proces ten odpowiedzialny za syntezę wielu różnorodnych przeciwciał jest specyficzną miejscowo rekombinacją zachodzącą tylko w limfocytach. Geny kodujące przeciwciała składają się z wielu podobnych segmentów zmiennych (ang. variable i diversity), segmentów łącznikowych (ang. joining) oraz fragmentu stałego. W procesie tym następuje połączenie fragmentów DNA (V, D i J), a w wyniku takiego przegrupowania powstaje wiele różnych genów kodujących przeciwciała lub receptory powierzchniowe limfocytów T. W procesie tym pod wpływem enzymów: Rag1 i Rag2, nacinane są podwójne nici DNA (MCBLANE i współaut. 1995), a powstałe w ten sposób DSB są następnie łączone przez enzymy, które również naprawiają DSB indukowane przez promieniowanie jonizujące.

Sygnałem, że mechanizm naprawy DSB może mieć powiązanie z procesem rekombinacji

V(D)J było scharakteryzowanie fenotypu komórek myszy *scid* (ang. severe combined immunodeficiency). Stwierdzono, że myszy te, poza uszkodzonym procesem rekombinacji V(D)J mają zwiększoną wrażliwość na promieniowanie jonizujące (promieniowanie X) oraz uszkodzony proces naprawy DSB. To naprowadziło badaczy na pomysł zbadania procesu rekombinacji V(D)J w różnych mutantach komórkowych chomika chińskiego nadwrażliwych na promieniowanie X. Jak wiadomo proces ten zachodzi tylko w komórkach limfatycznych. Takie doświadczenia można było jednak przeprowadzić dzięki wprowadzeniu do komórek mutantów gryzoni genów *RAG1* i *RAG2* (białka kodowane przez te geny nacinają podwójne nici DNA) oraz plazmidów z odpowiednimi sekwencjami DNA biorącymi udział w procesie rekombinacji V(D)J.

Do tej pory zidentyfikowano co najmniej 11 grup komplementacyjnych mutantów gryzoni nadwrażliwych na promieniowanie jonizujące (ZDZIENICKA 1995). Wśród nich znaleziono trzy grupy, które miały uszkodzony zarówno proces naprawy DSB, jak i rekombinację V(D)J (PERGO-

Generalnie przyjęto następujące nazewnictwo: grupa genów *RAD52*, gen *RAD52*, zaś produkt tego genu odpowiednio Rad52. Ta zasada dotyczy także innych genów.

LA i współaut. 1993, TACCIOLI i współaut. 1993). Przy zastosowaniu tych mutantów sklonowano trzy geny, *XRCC4*, *XRCC5* i *XRCC7*, z których *XRCC5* i *XRCC7* kodują podjednostki kompleksu enzymatycznego kinazy DNA-PK (ang. DNA-dependent protein kinase). Produktem genu *XRCC5* jest białko Ku80, a genu *XRCC7* podjednostka katalityczna DNA-PK (DNA-PKcs). Później metodami biochemicznymi zidentyfikowano trzecią podjednostkę tego kompleksu, Ku70. Wyniki tych badań doprowadziły do poznania głównego mechanizmu naprawy

DSB, NHEJ, w którym główną rolę odgrywa kompleks DNA-PK (JACKSON i JEGGO 1995, ZDZIENICKA 1996, JEGGO 1997, JIN i współaut. 1997, KANAAR i współaut. 1998). Jak wspomniano powyżej, w NHEJ następuje często utrata małych fragmentów DNA, w związku z czym proces ten prowadzi do powstawania mutacji. Prawdopodobnie mutacje te odgrywają pozytywną rolę w procesie rekombinacji V(D)J, gdyż są źródłem jeszcze większej różnorodności genów kodujących przeciwciała.

KOMPLEKS KINAZY ZALEŻNEJ OD DNA (DNA-PK)

W skład DNA-PK wchodzi heterodimer białkowy Ku składający się z dwóch podjednostek Ku70 i Ku80 (Ku86), białek o masie cząsteczkowej odpowiednio około 70 kDa oraz 86 kDa. Trzecim, największym białkiem, o masie 465 kDa, wchodzącym w skład kompleksu DNA-PK, jest podjednostka katalityczna (DNA-PKcs). Jest ona produktem genu *Prkdc/XRCC7/DNA-PKcs*, poprzednio znanego także jako *SCID*. Dodatkowym białkiem biorącym udział w procesie naprawy niehomologicznej jest produkt genu *XRCC4*, nuklearna fosfoproteina, zwana także białkiem *Xrcc4*. Współdziała ona z ligazą IV sugerując, że właśnie ta ligaza bierze udział w łączeniu podwójnych pęknięć nici DNA w NHEJ (CRITCHLOW i współaut. 1997, GRAWUNDER i współaut. 1997).

Białko Ku po raz pierwszy zidentyfikowano jako autoantygen rozpoznawany przez przeciwciała chorych na różne choroby autoimmunologiczne (MIMORI i współaut. 1986). Ku jest białkiem jądrowym (5×10^5 cząstek/komórkę) występującym u wszystkich eukariotów. Do tej pory zidentyfikowano szereg mutantów uszkodzonych zarówno w Ku80, jak i DNA-PKcs (ZDZIENICKA 1999) i niektóre z nich są przedstawione w Tabeli I. Stwierdzono, że u mutantów *XRCC5* zarówno białko Ku80, jak i Ku70 jest zdegradowane, wskazując, że forma heterodimeru Ku (Ku80/Ku70) służy stabilizacji tych podjednostek (ERRAMI i współaut. 1998a). Pomi-

mo, że poziom białka DNA-PKcs jest u tych mutantów niezmieniony, nie wykazują one aktywności kinazy. U wszystkich mutantów gryzoni uszkodzonych w *XRCC7/DNA-PKcs* stwierdzono obecność normalnego heterodimeru Ku70/Ku80 oraz oczekiwany brak aktywności kinazy DNA-PK (ERRAMI i współaut. 1998b). Do tej pory nie udało się zidentyfikować u człowieka mutacji w genach kompleksu DNA-PK.

Na Ryc. 2 przedstawiono schematycznie poszczególne etapy naprawy niehomologicznej DSB, NHEJ. Najpierw do DSB przyłącza się heterodimer Ku, co sugeruje, że może on być odpowiedzialny za rozpoznanie uszkodzenia, jak również za ochronę DSB przed atakiem nukleaz. Następnie przyłącza się podjednostka DNA-PKcs, co prowadzi do jej aktywacji. Wykazano, że *in vitro* DNA-PK fosforyluje wiele różnych białek, jednak do tej pory nie wiadomo dokładnie jakie białka są fosforylowane *in vivo* (JACKSON 1992). Przypuszcza się, że fosforylacja daje sygnał dla pozostałych enzymów biorących udział w naprawie DSB. Być może w ten sposób rekrutowana jest na przykład nukleaza i polimeraza DNA, które teoretycznie powinny brać udział w procesie naprawy DSB, jednak do tej pory nie zostało to potwierdzone. W ostatnim etapie procesu naprawy podwójne pęknięcia DNA zostają połączone przez ligazę IV przy udziale białka *XRCC4*.

KOMPLEKS HRAD50/HMRE11/NBS1

Drugim mechanizmem odpowiedzialnym za niehomologiczną naprawę DSB u ssaków jest proces, w którym bierze udział kompleks białkowy hRad50/hMre11, homologiczny do kompleksu Rad50/Mre11/Xrs2 opisanego u drożdży (PETRINI i współaut. 1997). Ostatnio wykazano, że białko zidentyfikowane jako p95, kodowane przez gen uszkodzony u pacjentów z ze-

społem Nijmegen (ang. nijmegen breakage syndrome, NBS), jest analogiem funkcjonalnym Xrs2 (CARNEY i współaut. 1998). Białko to kodowane przez gen *NBS1*, zwane nibriną lub białkiem NBS1, jest uszkodzone u tych pacjentów (VARON i współaut. 1998, MATSUURA i współaut. 1998). Fakt, że wchodzi ono w skład kompleksu hRad50/hMre11, który u drożdży jest odpowie-

Tabela 1. Mutanty komórek gryzoni nadwrażliwe na promieniowanie jonizujące, z defektem naprawy DSB oraz procesu rekombinacji V(D)J

Mutant	Grupa komplement	Lokalizacja chromosomowa	Gen
XR-1 M10	IR-4	5q11.2-13.3	<i>XRCC4</i>
xrs5, 6 XR-V9B 16B	IR-5	2q35	<i>XRCC5/ Ku80</i>
XR-V10- sxi-2, 3	IR-6	22q13	<i>XRCC6/ Ku70</i>
ES/Ku70 ^a			
scid	IR-7	8q11	<i>XRCC7/ SCID1</i>
V-3			<i>DNA-PKcs/ Prkdc</i>
irs-20			
S-X9			
XR-C1			
XR-C2			

^aES, (ang. embryonic stem cells) zarodkowe komórki pnia, pozbawione genu *Ku70*.
Dodatkowe informacje w artykułach przeglądowych:
ZDZIENICKIEJ 1995, 1999.

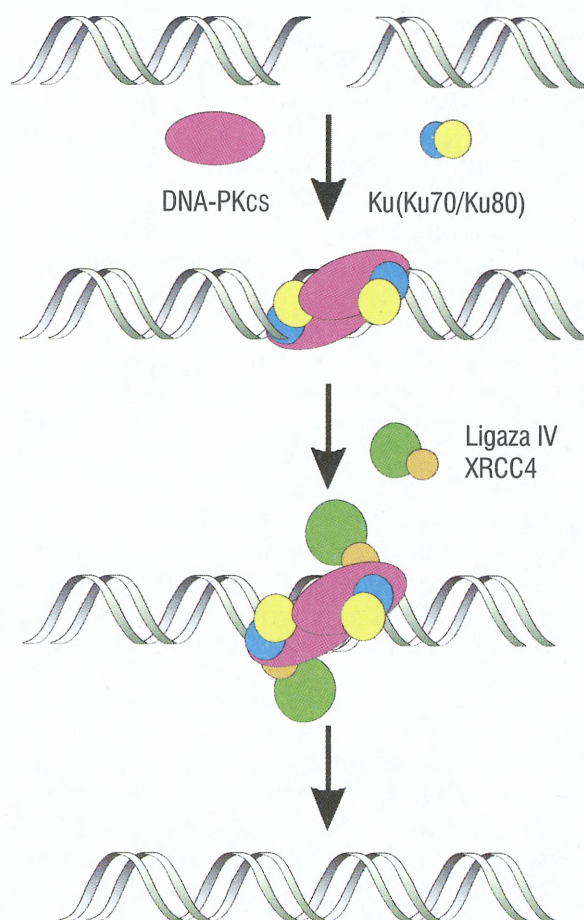
działny za naprawę DSB, sugeruje, że proces ten jest uszkodzony u pacjentów NBS.

NBS jest bardzo rzadką recesywną chorobą genetyczną człowieka występującą głównie wśród populacji Słowian (VAN DER BURGT i współaut. 1996). Choroba ta charakteryzuje się małogłowieiem (ang. microcephaly), niesprawnością układu immunologicznego, niestabilnością chromosomalną (zwiększona liczba zarówno spontanicznych, jak i indukowanych przez promieniowanie jonizujące aberracji chromosomowych), a także bardzo wysokim ryzykiem zapałności na choroby nowotworowe, w szczególności chłoniaki. Komórki NBS w hodowli mają zwiększoną wrażliwość na promieniowanie jonizujące, a także tak zwaną radioodporną syntezę DNA, która przejawia się brakiem zahamowania syntezy DNA po napromienieniu. Właściwości komórek NBS są bardzo podobne do właściwości komórek pochodzących od pacjentów z inną chorobą genetyczną związaną także z nadwrażliwością na promieniowanie jonizujące, a mianowicie ataxia-telangiectasia (AT) (SHILOH 1995). Natomiast kliniczny przebieg choroby jest różny u tych pacjentów; pacjenci NBS nie mają ataksji mózdkowej ani telangiektazji (rozszerzenie naczyń włosowatych). Ostatnie badania wskazują na współdziałanie białka ATM z kompleksem hRad50/hMre11/NBS1, co nasuwa przypuszczenie, że ATM i NBS1 biorą

udział w tym samym procesie (CARNEY i współaut. 1998, Featherstone i JACKSON 1998).

Analiza molekularna genu *NBS1* wykazała, że większość pacjentów NBS posiada delecje 5 nukleotydów, a mutacja ta prowadzi do wcześniejszego zakończenia transkrypcji genu *NBS1* i w rezultacie — do braku tego białka. W przeciwieństwie do genów *hRad50* i *hMre11*, gen *NBS1* nie jest genem niezbędnym dla rozwoju zarodkowego organizmu. Wcześniej zaobserwowano, że brak genu *RAD50* lub *MRE11* prowadzi do śmierci zarodka myszy, co wskazuje, że są to geny niezbędne. Tak więc niemożność otrzymania myszy z tak zwane zerowym lub knockout *Rad50* czy *Mre11* bardzo utrudniła badania funkcji tych genów u ssaków.

Jak wiadomo, oprócz genów biorących udział w procesie naprawy uszkodzeń DNA, komórka posiada także system nadzoru ostrzegawczego; mechanizm ten współdziała z innymi procesami, takimi jak kontrola cyklu komórkowego. Znajomość tych mechanizmów jest jeszcze niepełna. Wyniki badań prowadzonych w wielu pracowniach wskazują, że produkt genu *ATM* działa jako czujnik uszkodzeń DNA i jest odpowiedzialny za regulację cyklu komórkowego w fazie G1/S po napromienianiu; podobnie



Ryc. 2. Schemat procesu NHEJ w którym pośredniczy DNA-PK

jak białko p53 (ENOCH i NORBURY 1995, ROTMAN i SHILOH 1997). Prawdopodobnie więc, również i kompleks hRad50/hMre11/NBS1 bierze udział w rozpoznaniu i sygnalizowaniu uszkodzeń DNA, najprawdopodobniej DSB; nato-

miast samo łączenie podwójnych pęknięć DNA w komórkach NBS wydaje się przebiegać normalnie (KRAAKMAN-VAN DER ZWET i współaut. 1999).

UDZIAŁ REKOMBINACJI HOMOLOGICZNEJ W NAPRAWIE DSB

Alternatywnym w stosunku do NHEJ mechanizmem naprawy DSB jest rekombinacja homologiczna (HR), która jest zachowana ewolucyjnie od bakterii do człowieka (SHINOHARA i OGAWA 1995, BAUMANN i WEST 1998). Wiadomo, że u *Escherichia coli* produkt genu *recA* odgrywa centralną rolę w procesie rekombinacji homologicznej (WEST 1992). Niedawno odkryto, że bakteryjne białko RecA i drożdżowe białko Rad51 są homologami. W procesie rekombinacji homologicznej u *S. cerevisiae*, obok białka Rad51, biorą udział produkty grupy genów RAD52, a mianowicie Rad50, Rad52, Rad54, Rad55, Rad57, Rad59, Mre11 i Xrs2. Jak wspomniano już powyżej, Rad50, Mre11 i Xrs2 biorą udział także w naprawie niehomologicznej. Zarówno u organizmów niższych, jak i u ssaków Rad51 odgrywa centralną rolę w sparowaniu chromosomów homologicznych oraz w wymianie nici DNA w rekombinacji homologicznej. Ostatnio wyizolowano szereg genów człowieka (oraz myszy) homologicznych do genów RAD51, RAD52 i RAD54, grupa genów RAD52 uczestniczy w naprawie rekombinacyjnej DSB także u ssaków (KANAAR i współaut. 1998, PASTINK i LOCHMAN 1999). Wykazano, że komórki myszy pozbawione genu RAD54 (ang. knockout) są nadwrażliwe na promieniowanie jonizujące i

jest u nich uszkodzony proces rekombinacji homologicznej (ESSERS i współaut. 1997). Natomiast mysz pozbawiona genu RAD52 nie wykazuje zwiększonej wrażliwości, przy jednoczesnym zmniejszonym poziomie rekombinacji homologicznej (RIJKERS i współaut. 1998). W przeciwieństwie do mutantów grupy RAD52, bardzo znacznie zwiększona wrażliwość mutantów DNA-PK na promieniowanie jonizujące sugeruje, że NHEJ, nie zaś rekombinacja homologiczna, jest głównym mechanizmem naprawy DSB u ssaków.

W przeciwieństwie do Rad52 i Rad54 stwierdzono, że brak funkcji Rad51 prowadzi do śmierci zarodka myszy, co świadczy o niezbędności tego genu dla rozwoju organizmu (TSUZUKI i współaut. 1996, LIM i HASTY 1996). Ostatnie badania ujawniły istnienie szeregu homologów RAD51 u ssaków (BAUMANN i WEST 1998), brak jednak szczegółowych danych o ich roli. Odkrycie, że geny supresorowe guza (BRCA1 i BRCA2) tworzą kompleks z hRAD51 (SCULLY i współaut. 1997, MIZUTA i współaut. 1997, SHARAN i współaut. 1997) wskazuje, że prawidłowo działający proces naprawy DSB jest ważnym elementem zapobiegającym rozwojowi choroby nowotworowej.

UWAGI DODATKOWE

NHEJ wydaje się być najważniejszym mechanizmem odpowiedzialnym za naprawę DSB u ssaków. Jakie mogą być przyczyny tego, że naprawa niehomologiczna a nie rekombinacja homologiczna jest głównym mechanizmem naprawy DSB u ssaków? Wydaje się, że są one następujące: 1) naprawa niehomologiczna jest procesem szybszym od rekombinacji homologicznej, gdyż nie wymaga skomplikowanej maszynierii rekombinacji homologicznej; 2) naprawianie uszkodzonego DNA u ssaków przez rekombinację homologiczną może być utrudnione z powodu istnienia dużej ilości sekwencji homologicznych, które mogłyby prowadzić do niepotrzebnych, dodatkowych zmian w chromosomach.

Wiadomo, że zaburzenia w kontroli cyklu komórkowego na przykład w komórkach AT i NBS prowadzą do nadwrażliwości tych komórek

na promieniowanie X. Obecnie wydaje się także, że w zależności od fazy cyklu komórkowego włączają się różne mechanizmy naprawy DNA. Ostatnio stwierdzono, że ekspresja genów RAD51 i RAD52 jest najwyższa w S/G2, co sugeruje, że naprawa homologiczna zachodzi w późniejszym okresie cyklu komórkowego. Natomiast komórki uszkodzone w DNA-PK są bardziej wrażliwe na promieniowanie w fazie G1, w porównaniu z fazą S. Tak więc, wyniki te sugerują, że udział NHEJ oraz HR w naprawie DSB może być zależny od fazy cyklu komórkowego (HENDRICKSON 1997).

Wyniki badań nad mechanizmami naprawy DSB wskazują, że procesy te mają ogromne znaczenie dla stabilności genomu, normalnej odpowiedzi immunologicznej oraz przeciwdziałania rozwojowi choroby nowotworowej. Tak

więc, dokładne poznanie mechanizmów naprawy DSB pozwoli także na lepsze zrozumienie współzależności pomiędzy promieniowrażliwością a odpowiedzią immunologiczną, co może w

istotny sposób pomóc w ocenie indywidualnego narażenia na promieniowanie, a także w opracowaniu ulepszonych metod terapii przeciwnowotworowej.

MECHANISMS OF DNA DOUBLE-STRAND BREAK (DSB) REPAIR AND THE SENSITIVITY TO IONIZING RADIATION

Summary

In all organisms multiple pathways to repair DNA double-strand breaks (DSB) have been identified. In mammalian cells, repair of DSB by homologous recombination

(HR) and non-homologous end joining (NHEJ) have been described. These mechanisms and their biological significance are briefly reviewed.

LITERATURA

- BAUMANN P., WEST S. C., 1998. *Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-strand-break repair*. Trends Biochem. Sci. 23, 247-251.
- CARNEY J. P., MASER R. S., OLIVERAS H., DAVIS E. M., LE BEAU M., YATES II J. R., HAYES L., MORGAN W. F., PETRINI J. H. J., 1998. *The hMre11/Hrad50 protein complex and Nijmegen Breakage Syndrome: Linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response*. Cell 93, 477-486.
- CRITCHLOW S. W., BOWATER R. P., JACKSON S. P., 1997. *Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligase IV*. Current Biol. 7, 588-598.
- ENOCH T., NORBURY, C., 1995. *Cellular responses to DNA damage: cell-cycle checkpoints, apoptosis and the role of p53 and ATM*. Trends Biochem. Sci. 20, 426-430.
- ERRAMI A., FINIE N. J., MOROLLI B., JACKSON S. P., LOCHMAN P. H. M., ZDZIENICKA M. Z., 1998a. *Molecular and biochemical characterization of new X-ray-sensitive hamster cell mutations of complementation group 5*. Nucleic Acid Res. 26, 4332-4338.
- ERRAMI A., HE D. M., FRIEDL A. A., OVERKAMP W. J. I., MOROLLI B., HENDRICKSON E. A., ECKARDT-SCHUPP F., OSHIMURA M., LOCHMAN P. H. M., JACKSON S. P., ZDZIENICKA M. Z., 1998b. *XR-C1, a new CHO mutant which is defective in DNA-PKcs, is impaired in both V(D)J coding and signal joint formation*. Nucleic Acid Res. 26, 3146-3153.
- ESSERS J., HENDRILS R. W., SWAGEMAKERS, S. M. A., TROELSTRA, C., DE WIT, J., BOOTSMA D., HOEIJMAKERS, J. H. J., KANAAR R., 1997. *Disruption of mouse RAD54 reduces ionizing radiation resistance and homologous recombination*. Cell 89, 195-204.
- FEATHERSTONE C., JACKSON S. P., 1998. *The Nijmegen breakage syndrome protein*. Curr. Biol. 8, R622-R625.
- GRAUNDER U., WILM M., WU X., KULESZA P., WILSON T. E., MANN M., LIEBER M. R., 1997. *Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells*. Nature 388, 492-495.
- HENDRICKSON E. A., 1997. *Cell cycle regulation of mammalian DNA double-strand break repair*. Am. J. Human Genet. 61, 795-800.
- IVANOV E. L., HARBER J. E., 1997. *DNA repair: RAD alert*. Curr. Biol., 7, 492-495.
- JACKSON S. P., 1992. *Regulating transcription factor activity by phosphorylation*. Trends Cell Biol. 2, 104-118.
- JACKSON S. P., JEGGO P. A., 1995. *DNA double-strand break repair and V(D)J recombination: involvement of DNA-PK*. Trends in Biochem. Sci. 20, 412-415.
- JEGGO P. A., 1997. *DNA-PK: at the cross-roads of biochemistry and genetics*. Mutation Res. 384, 1-14.
- JIN S., INOUE S., WEAVER D. T., 1997. *Functions of the DNA dependent protein kinase*, in: Cancer Surveys, Checkpoint Control and Cancer 29, 221-261.
- KANAAR R., HOEIJMAKERS, J. H. J., 1997. *Recombination and joining; different means to the same ends*. Genes and Functions 1, 165-174.
- KANAAR R., HOEIJMAKERS J. H. J., VAN GENT D. C., 1998. *Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair*. Trends Cell Biol., 8, 483-489.
- KRAAKMAN-VAN DER ZWET, M., OVERKAMP W. J. I., FRIEDL A. A., KLEIN B., MIDRO A. T., VERHAEGH G. W. C. T., JASPERS N. G. J., ECKARDT-SCHUPP F., LOCHMAN P. H. M., ZDZIENICKA M. Z., 1999. *Characterization of primary and immortal Nijmegen breakage syndrome (NBS) fibroblasts*. Mutation Res. in press.
- LIM D.-S., HASTY P., 1996. *A mutation in mouse rad51 results in early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53*. Mol. Cell. Biol. 16, 7133-7143.
- MATSUURA S., TAUCHI H., NAKAMURE A. et al., 1998. *Positional cloning of the gene for Nijmegen breakage syndrome*. Nature Genetics 19, 179-181.
- MCBLANE J. F., VAN GENT D. C., RAMSDEN, D. A., ROMEO C., CUOMO C. A., GELLERT, M., OETTINGER, M. A., 1995. *Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps*. Cell 3, 387-395.
- MIMORI T., HARDIN J. A., STEITZ J. A., 1986. *Characterization of the DNA-binding protein antigen Ku recognized by autoantibodies from patients with rheumatic disorders*. J. Biol. Chem. 262, 2264-2278.
- MIZUTA R., LASALLE J. M., CHENG H. L., SHINOHARA A., OGAWA H., COPELAND N., JENKINS N. A., LALANDE M., ALT F. W., 1997. *RAB22 and RAB163/mouse BRC2: proteins that specifically interact with RAD51 protein*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 6927-6932.
- PASTINK A., P. H. M. LOCHMAN P. H. M. 1999. *Repair and consequences of double-strand breaks in DNA*. Mutation Res. (in press).
- PERGOLA F., ZDZIENICKA M. Z., LIEBER M. R., 1993. *V(D)J recombination in mammalian cell mutants defective in DNA double-strand break repair*. Mol. Cell. Biol. 13, 3464-3471.
- PETRINI J. H. J., BRESSAN D. A., YAO M. S., 1997. *The RAD52 epistasis group in mammalian double strand break repair*. Seminars Immunol. 9, 181-188.
- RIJKERS T., VAN DEN OUWELAND J., MOROLLI, B., ROLINK, A. G., BAAREND, W. M., VAN SLUON, P. P., LOCHMAN, P. H. M., PASTINK, A., 1998. *Targeted inactivation of mouse RAD52 reduces homologous recombination but not resistance to ionizing radiation*. Mol. Cell. Biol. 18, 6423-6429.
- ROTMAN G., SHILOH Y., 1997. *Ataxia-telangiectasia: is ATM a sensor of oxidative damage and stress?* Bioessays 19, 911-917.
- SCULLY R., CHEN J., PLUG A., XIAO Y., WEAVER D., FEUTEUN J., ASHLEY T., LIVINGSTON D., 1997. *Association of BRCA1*

- with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 88, 265–275.
- SHARAN S. K., MORIMATSU M., ALBRECHT U., LIM D-S., REGEL E., DINH C., SANDS A., EICHELE G., HASTY P., BRADLEY A., 1997. Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature* 386, 804–810.
- SHILOH Y., 1995. Ataxia-telangiectasia: closer to unraveling the mystery. *Eur. J. Hum. Genet.* 3, 116–138.
- SHINOHARA A., OGAWA T., 1995. Homologous recombination and the roles of double-strand breaks. *Trends Biochem. Sci.* 20, 387–391.
- TACCIOLI G. E., RATHBUN G., OLTZ E., STAMATO T., JEGGO P. A., ALT F. W., 1993. Impairment of V(D)J recombination in double-strand break repair mutants. *Science* 260, 207–210.
- TSUZUKI T., FUJII Y., SAKUMI K., TOMINGA Y., NAKAO K., SEKIGUCHI, M., MATSUSHIRO A., YOSHIMURA Y., MORITA T., 1996. Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 93, 6236–6340.
- VARON R., VISSINGA C., PLATZER M. et al., 1998. Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein is mutated in Nijmegen Breakage Syndrome. *Cell* 93, 467–476.
- VAN DER BURGT I., CHRZANOWSKA K. H., SMEETS D., WEEMAES C., 1996. Nijmegen breakage syndrome. *J. Med. Genet.* 33, 153–156.
- WEST S. C., 1992. Enzymes and molecular mechanisms of genetic recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 603–640.
- ZDZIENICKA M. Z., 1995. Mammalian mutants defective in response to ionizing radiation-induced DNA damage. *Mutation Res.* 336, 203–213.
- ZDZIENICKA M. Z., 1996. Mammalian X-ray sensitive mutants: A tool for the elucidation of the cellular response to ionizing radiation, [W:] *Cancer Surveys, Genetic Instability*, Cancer 28, 281–293.
- ZDZIENICKA M. Z., 1999. Mammalian X-ray-sensitive mutants which are defective in non-homologous (illegitimate) DNA double-strand break repair. *Biochemie* 81, 107–116.