

# **Untersuchungen zur Reparatur von DNA- Doppelstrangbrüchen in der G2-Phase des Zellzyklus**

**Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt**

**zur**

**Erlangung des akademischen Grades  
eines Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)**

**genehmigte Dissertation von**

**Dipl.-Biol. Andrea Beucher  
aus Saarbrücken**

**Darmstadt 2009**

**D17**

Referent: Prof. Dr. Markus Löbrich

Koreferent: Prof. Dr. Harald Kolmar

Tag der Einreichung: 08. Juli 2009

Tag der mündlichen Prüfung: 15. September 2009

**Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 2005 bis Juni 2009 am Institut für Biophysik der Universität des Saarlandes sowie in der Abteilung Strahlenbiologie und DNA-Reparatur der Technischen Universität Darmstadt unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Markus Löbrich angefertigt.**

**Das Glück besteht nicht darin,  
dass du tun kannst, was du willst,  
sondern darin,  
dass du immer willst, was du tust.**

Leo N. Tolstoi (1828-1910),  
russ. Schriftsteller

**Der Zweifel ist der Beginn der Wissenschaft.  
Wer nichts anzweifelt, prüft nichts.  
Wer nichts prüft, entdeckt nichts.  
Wer nichts entdeckt, ist blind und bleibt blind.**

Teilhard de Chardin (1881-1955),  
frz. Theologe, Paläontologe u. Philosoph

<b>1. Abkürzungen und Symbole</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Zusammenfassung/Summary</b> .....	<b>3</b>
<b>3. Einleitung</b> .....	<b>7</b>
<b>3.1. Strahlenphysikalische und -biologische Grundlagen</b> .....	<b>8</b>
3.1.1. Elektromagnetische Wellen und ihre Wechselwirkung mit Materie.....	8
3.1.2. Linearer Energie Transfer und Relative Biologische Wirksamkeit .....	9
3.1.3. Direkte und indirekte Strahleneffekte im biologischen System .....	9
3.1.4. Strahleninduzierte Schäden der DNA.....	11
<b>3.2. Radiomimetika</b> .....	<b>12</b>
<b>3.3. Zelluläre Schadensantwort auf DNA-Doppelstrangbrüche</b> .....	<b>15</b>
3.3.1. Die Schadenserkennung .....	16
3.3.2. Regulation des Zellzyklus .....	18
3.3.3. Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen .....	20
<b>3.4. Chromosomeninstabilitätssyndrome in Zusammenhang mit der DNA-Schadensantwort</b> .....	<b>24</b>
3.4.1. <i>Ataxia telangiectasia</i> (AT) und ATM .....	24
3.4.2. AT-ähnliche Syndrome .....	25
3.4.3. <i>Radiation-sensitive severe combined immunodeficiency</i> (RS-SCID) und Artemis .....	26
<b>3.5. Karzinogenese in Zusammenhang mit der DNA-Reparatur</b> .....	<b>27</b>
3.5.1. BRCA1 .....	28
3.5.2. BRCA2 .....	29
<b>3.6. Nachweisverfahren für DNA-Doppelstrangbrüche</b> .....	<b>30</b>
3.6.1. Analyse von strahlungsinduzierten Foci ( <i>ionising radiation induced foci</i> , IRIFs).....	30
3.6.2. Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) .....	32
3.6.3. Vorzeitige Chromosomenkondensation ( <i>premature chromosome condensation</i> , PCC) .....	33
<b>3.7. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit</b> .....	<b>34</b>
<b>4. Material und Methoden</b> .....	<b>36</b>
<b>4.1. Material</b> .....	<b>36</b>
4.1.1. Biologische Materialien.....	36
4.1.2. Kulturmedien und Lösungen.....	38
4.1.3. Material für molekular- und zellbiologische Methoden.....	40
4.1.4. Antikörper .....	45
4.1.5. Standardlösungen .....	45

4.1.6. Verbrauchsmaterialien.....	46
4.1.7. Geräteliste .....	46
4.1.8. Computerprogramme .....	47
<b>4.2. Methoden .....</b>	<b>48</b>
4.2.1. Manipulation von DNA.....	48
4.2.2. Analyse von Proteinen.....	49
4.2.3. Kultivierung und Manipulation von Bakterien.....	51
4.2.4. Kultivierung und Manipulation eukaryotischer Zellen.....	51
4.2.5. Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen .....	52
4.2.6. Immunologische Methoden .....	54
4.2.7. Chromosomale Analysen .....	56
4.2.8. Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) .....	57
4.2.9. Durchflusszytometrische Methoden.....	58
<b>5. Ergebnisse .....</b>	<b>60</b>
<b>5.1. Anwendung der <math>\gamma</math>H2AX-Analyse zur Charakterisierung der DNA-Reparatur von exponentiell wachsenden primären humanen Fibroblasten.....</b>	<b>60</b>
5.1.1. Identifizierung der Zellzyklusphasen.....	60
5.1.2. Analyse von DSBs anhand von $\gamma$ H2AX-Foci in der G2-Phase .....	62
5.1.3. Untersuchung der Entstehung von $\gamma$ H2AX-Foci nach Behandlung mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	65
5.1.4. Untersuchung des Einflusses von Aphidicolin auf exponentiell wachsende Zellen.....	66
<b>5.2. Das Reparaturverhalten von BRCA1- und BRCA2-heterozygoten Zellen .</b>	<b>70</b>
5.2.1. Analyse von konfluenten BRCA1- und BRCA2 heterozygoten Zellen nach Mammographie-ähnlicher Röntgenstrahlung.....	71
5.2.2. Untersuchung des zellzyklusabhängigen Reparaturverhaltens von primären humanen Fibroblasten mit Defekten in BRCA1 und BRCA2 .....	72
<b>5.3. DSB-Reparatur in primären humanen Fibroblasten mit homozygoter Mutation in BRCA2 im Vergleich zu ATM- bzw. Artemis-defizienten Zellen ....</b>	<b>75</b>
5.3.1. Analyse des Reparaturverhaltens mit Hilfe der $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenz	75
5.3.2. Epistasisanalyse mit Hilfe der $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenz.....	77
5.3.3. Untersuchung der Reparaturkapazität durch Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) .....	80
5.3.4. Untersuchung der DSB-Reparatur mit Hilfe der PCC-Analyse .....	84
<b>5.4. Charakterisierung der Funktion von Artemis bei der Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden.....</b>	<b>88</b>
5.4.1. Untersuchungen zur DNA-PK-Abhängigkeit der Artemis-abhängigen Reparatur .....	88

5.4.2. Untersuchungen zur Bedeutung der Endonukleasefunktion von Artemis für die Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden .....	95
<b>5.5. Untersuchungen zur Reparatur von etoposidinduzierten DNA-Schäden</b>	<b>104</b>
5.5.1. Induktion und Reparatur von DNA-Schäden durch Etoposidbehandlung in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus.....	104
5.5.2. Untersuchung des Anteils der Artemis-abhängigen Reparatur an etoposidinduzierten DNA-Schäden .....	108
5.5.3. Quantifizierung des Anteils der HR an der Reparatur etoposidinduzierter DSBs .....	111
<b>5.6. Untersuchungen zur Beteiligung des MRN-Komplexes an der DSB-Reparatur</b> .....	<b>114</b>
5.6.1. Vergleichende Betrachtung der DNA-Reparatur nach Behandlung mit Etoposid und IR.....	114
5.6.2. Kontrollexperiment zur Beteiligung des MRN-Komplexes an der Reparatur etoposidinduzierter DNA-Schäden .....	116
<b>6. Diskussion</b> .....	<b>118</b>
<b>6.1. Einfluss von heterozygoten Mutationen in BRCA1 bzw. BRCA2 auf die Reparatur von strahleninduzierten DSBs</b> .....	<b>118</b>
<b>6.2. Charakterisierung der Reparatur von strahleninduzierten DNA-Schäden in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus</b> .....	<b>123</b>
6.2.1. Der Verlauf der Reparaturkinetiken .....	123
6.2.2. Der Beitrag der HR zur Reparatur strahleninduzierter DSBs.....	124
6.2.3. ATM und Artemis – NHEJ versus HR .....	125
6.2.4. Der funktionelle Beitrag von Artemis zur Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden .....	126
6.2.5. Zur Funktion von ATM bei der Reparatur strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche .....	129
6.2.6. Modell zur Reparatur strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche.....	131
6.2.7. Charakterisierung der Reparatur von etoposidinduzierten DNA-Schäden in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus.....	132
6.2.8. Überlegungen zur Charakterisierung ATM- bzw. Artemis-abhängiger DNA-Schäden .....	135
6.2.9. Ausblick .....	137
<b>6.3. Untersuchungen zur Reparatur kovalent verknüpfter Protein-DNA-Komplexe</b> .....	<b>140</b>
6.3.1. Zur Funktion des MRN-Komplexes bei der Reparatur von etoposidinduzierten DNA-Schäden .....	140
6.3.2. Überprüfung der Spezifität der reduzierten Reparaturkapazität von MRN-Mutanten durch Vorbehandlung mit dem katalytischen Topoll-Inhibitor Aclarubicin .....	142
6.3.3. Ausblick .....	142

<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>144</b>
<b>8. Anhang .....</b>	<b>162</b>
8.1. Veröffentlichungen .....	162
8.2. Danksagung .....	163
8.3. Lebenslauf .....	164
8.4. Eidesstattliche Erklärung .....	165

## 1. Abkürzungen und Symbole

A	Absorption
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
AT	<i>Ataxia telangiectasia</i>
ATLD	<i>Ataxia telangiectasia like disease</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATMi	spezifischer ATM-Inhibitor
ATR	<i>ATM and Rad3 related</i>
bp	Basenpaar
Bq	Becquerel (Einheit der Radioaktivität)
BRCA	<i>breast cancer associated</i>
BrdU	5-Bromo-2'-desoxy-uridin
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
CENP-F	Centromer protein F
Chk	Checkpoint Kinase
DAPI	4'-6'-Diamino-2-Phenyl-indoldihydrochlorid
DMEM	<i>Dulbecco's minimal essential medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DNA-PK <sub>cs</sub>	katalytische Untereinheit der DNA-PK ( <i>catalytic subunit of DNA-PK</i> )
DNA-PKi	spezifischer Inhibitor der DNA-PK <sub>cs</sub>
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
dsDNA	doppelsträngige DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamidtetraacetat
ESB	Einzelstrangbruch
eV	Elektronenvolt
FACS	<i>fluorescence activated cell scanner</i>
FAR	<i>fraction of radioactivity released</i>
FCS	Fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Gy	Gray (Einheit der Strahlendosis)
HR	Homologe Rekombination
IF	Indirekte Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IR	ionisierende Bestrahlung ( <i>ionising radiation</i> )
IRIF	<i>ionising radiation induced foci</i>
KAP-1	<i>KRAB associated protein 1</i>
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth
LET	Linearer Energie Transfer

LMDS	<i>locally multiply damaged site</i>
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
MEM	<i>Minimal essential medium</i>
MPF	<i>mitosis promoting factor</i>
MRN	Mre11/Rad50/NBS1-Komplex
NBS	<i>Nijmegen breakage syndrome</i>
NEAA	nicht essentielle Aminosäuren ( <i>non essential amino acids</i> )
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung ( <i>non homologous end-joining</i> )
NLS	<i>nuclear localisation site</i>
o/N	über Nacht ( <i>over night</i> )
OD	optische Dichte
p.A.	zur Analyse ( <i>per analysi</i> )
P/S	Penicillin-Streptomycin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCC	<i>premature chromosome condensation</i>
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PI	Propidiumiodid
PIKK	Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase ähnliche Kinase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RBW	Relative Biologische Wirksamkeit
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RS SCID	<i>radiation-sensitive severe combined immunodeficiency</i>
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Bäckerhefe)
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (Spaltheife)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	<i>small interference RNA</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA ( <i>single-stranded DNA</i> )
TE	Tris-EDTA-Puffer
Topo	Topoisomerase
U	internationale Enzymaktivitätseinheit ( <i>unit</i> )
UV	Ultraviolett
V(D)J	variable (diversity) joining
v/v	Volumenprozent
VE-Wasser	voll entmineralisiertes Wasser
w/v	Masse-Volumen-Verhältnis
WB	Western Blot
WT	Wildtyp

## 2. Zusammenfassung/Summary

Diese Arbeit widmet sich der Untersuchung des Beitrags der verfügbaren Wege zur Reparatur von strahlen- und etoposidinduzierten DNA-Schäden in der G2-Phase des Zellzyklus. Hier stehen zwei Hauptreparaturwege zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSBs) zur Verfügung. Die Homologe Rekombination (HR) ermöglicht durch Sequenzabgleich mit homologen DNA-Regionen die fehlerfreie Reparatur des DNA-Schadens. Das NHEJ beruht auf der einfachen Verknüpfung von freien DNA-Enden. Die Reparatur erfolgt sehr schnell, allerdings birgt dieser Reparaturweg das Risiko von Mikrodeletionen und verläuft somit nicht zwangsweise fehlerfrei. Die Nuklease Artemis und die Proteinkinase ATM sind für die Reparatur einer Subpopulation strahleninduzierter DNA-Schäden von Bedeutung.

Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit dem Einfluss von heterozygoten Mutationen der DNA-Reparaturfaktoren BRCA1 und BRCA2, die mit einer erblichen Prädisposition für Brustkrebs in Verbindung gebracht werden. Die Untersuchung des Reparaturvermögens stationärer BRCA1- bzw. BRCA2-Mutanten konnte keine Einschränkung der DNA-Reparatur nach ionisierender Bestrahlung (IR) nachweisen. Dieses Ergebnis wurde durch die Analyse von G1-Phase-Zellen einer exponentiell wachsenden Kultur bestätigt. Auch in der G2-Phase hat eine heterozygote Mutation in BRCA1 keinen Einfluss auf die Reparaturkapazität der betroffenen Zellen. Die Aktivität des vorhandenen Restproteins scheint für eine vollständige Reparatur auszureichen. Dagegen führt eine heterozygote Mutation in BRCA2 zu einer Verminderung der DSB-Reparatur in der G2-Phase und resultiert in einem Defekt der langsamen Reparaturkomponente. Allerdings zeigen die untersuchten Mutanten trotz identischer Mutationen ein sehr heterogenes Reparaturverhalten, was einen Einfluss des genetischen Hintergrunds nahe legt. Aufgrund der geringen Kohortengröße der untersuchten Zelllinien und der in der Literatur kontrovers diskutierten Situation ist eine Beurteilung des Einflusses heterozygoter Mutationen in BRCA1 bzw. BRCA2 auf Basis der durchgeführten Experimente nicht abschließend möglich.

Die Charakterisierung der homozygot defekten BRCA2-Mutante konnte eine Beteiligung der HR an der Reparatur strahleninduzierter DSBs in der G2-Phase nachweisen. Defekte in der HR betreffen ebenso wie Defizienzen in ATM und Artemis die langsame Komponente der Reparatur. Die Ähnlichkeiten in Verlauf der Reparaturkinetik und im Ausmaß des Reparaturdefekts von BRCA2-, ATM- und Artemis-defizienten Zellen eröffnet die Möglichkeit der Beteiligung dieser Reparaturfaktoren an einem gemeinsamen Reparaturweg. Epistasisanalysen mit einem spezifischen ATM-Inhibitor bestätigen diese Vermutung. BRCA2 ist ein etablierter HR-Faktor, wodurch ATM und Artemis in der G2-Phase mit der HR in Zusammenhang gebracht werden. Dieses Ergebnis ist sehr überraschend, da die ATM/Artemis-abhängige Reparatur in G1 als Unterweg des DNA-PK-abhängigen NHEJ

betrachtet wird. Dagegen verläuft die Reparatur dieser Schäden in der G2-Phase unabhängig von funktionaler DNA-PK über den Reparaturweg der HR, wie durch Epistasianalysen mit einem Inhibitor der DNA-PK<sub>cs</sub> gezeigt werden konnte. Somit wird der Großteil der IR-induzierten DSBs sowohl in G1 wie auch in G2 durch die schnelle Komponente des NHEJ repariert. Die Reparaturfaktoren ATM und Artemis werden für die langsame Reparatur einer Subfraktion der strahleninduzierten DSBs benötigt. Diese werden in der G1-Phase unter Beteiligung funktionaler DNA-PK über NHEJ repariert, während die Reparatur in G2 DNA-PK-unabhängig durch HR fortgeführt wird. Der Heterochromatinanteil in humanen Zellen korreliert sehr gut mit dem Ausmaß der ATM/Artemis-abhängigen Reparatur. Dies könnte darauf hindeuten, dass heterochromatinassoziierte DSBs aufgrund ihrer Lokalisation zur erfolgreichen Reparatur ATM und Artemis benötigen. Die Funktion von ATM könnte in der Auflösung der dichtgepackten Heterochromatinstruktur liegen, wurde jedoch in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Die Rolle von Artemis wurde in Komplementationsexperimenten mit verschiedenen Artemis-Konstrukten charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Endonukleasefunktion von Artemis für eine vollständige Reparatur unabdingbar ist. Die Tatsache, dass etoposidinduzierte DNA-Schäden eine deutlich geringere Beteiligung von ATM und Artemis zeigen, deutet darauf hin, dass auch die Komplexität eines DNA-Schadens Einfluss auf die Reparatur hat. Chemisch induzierte DSBs weisen eine einheitliche, unkomplizierte Struktur auf und können aus diesem Grund ohne Beteiligung von ATM und Artemis auch im Heterochromatin durch NHEJ repariert werden. Dagegen könnte bei IR-induzierten DNA-Schäden die Struktur der DSBs in Kombination mit der Lokalisation des Bruchs die Abhängigkeit von ATM und Artemis bedingen. Sowohl die Lokalisation des DSBs im Heterochromatin wie auch die Komplexität eines DSBs führen zu einer Verzögerung der Reparatur. Möglicherweise entstehen während dieser Zeit, die der DSB in unrepariertem Zustand verbleibt, sekundäre Strukturen, die durch Artemis bearbeitet werden müssen. Nach der Bearbeitung durch ATM und Artemis werden die entsprechenden DNA-Schäden in G2 der HR zugeführt. Dies deutet darauf hin, dass diese Strukturen in frühen Bearbeitungsschritten der HR entstehen, unbearbeitet die Reparatur verhindern und den Bruch für die HR markieren. In der G1-Phase, in der keine HR zur Verfügung steht, müssen diese DNA-Schäden unter Beteiligung der DNA-PK über NHEJ repariert werden, während DNA-PK die Reparatur der anderen durch NHEJ reparierten DNA-Schäden lediglich erleichtert.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde die Reparatur von etoposidinduzierten, kovalent verknüpften DNA-Protein-Komplexen untersucht. Die Ergebnisse zeigen eine direkte Beteiligung des MRN-Komplexes an der Reparatur dieser DNA-Schäden in der G1-Phase. Dabei ist vermutlich die Endonukleaseaktivität des Proteinkomplexes für die Entfernung des verknüpften Proteins mitsamt eines kurzen DNA-Fragments verantwortlich. Die entstehenden freien Enden können anschließend durch NHEJ verknüpft werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte Einblick in das komplexe Zusammenspiel der unterschiedlichen Reparaturwege in der G2-Phase des Zellzyklus gewonnen werden. Der Beitrag der HR zur Reparatur von DNA-Schäden konnte quantifiziert und der langsamen Komponente der Reparatur zugeordnet werden. Diese ist für die ATM/Artemis-abhängige Reparatur von DNA-Schäden zuständig, die in G1 durch DNA-PK-abhängiges NHEJ repariert werden, während in G2 die HR angeschlossen wird. Über die Faktoren, die den Bedarf an ATM und Artemis bedingen, konnten nur Vermutungen angestellt werden. Diese Aspekte sind allerdings noch nicht vollständig verstanden und sollten in zukünftigen Arbeiten weiter untersucht werden.

This work addresses the contribution of different repair pathways available in G2 to the repair of DNA double strand breaks (DSBs). Repair in G2 involves two major pathways. Homologous recombination allows error-free repair by resynthesizing the damaged sequence information using a homologous template. The non-homologous end joining (NHEJ) pathway acts in a template independent fashion by rejoining the broken ends of a DSB. Repair is very fast but error-prone and at risk of microdeletions. The nuclease Artemis and the kinase ATM are involved in the repair of a subfraction of IR-induced DSBs.

The first part of this work deals with the effect of heterozygous mutations in the repair factors BRCA1 and BRCA2 which account for an inherited predisposition for breast cancer. Confluent BRCA mutants do not show an impaired repair capacity after IR. This result is confirmed by analysis of DSB repair in the G1 phase of exponentially growing cells. Heterozygous mutations in BRCA1 do not have any effect on G2 phase cells as well. The amount of wildtype (WT) protein seems to suffice for accurate DNA repair. However, a heterozygous BRCA2-status reduces the repair capacity and leads to a repair defect of the slow component. Even though all analysed cell lines exhibit the same mutation there are enormous differences among them. These results suggest the influence of the genetic background on DSB repair. The influence of heterozygous mutations of BRCA1 and BRCA2 on DSB repair is discussed controversially in the literature. But the number of mutant cell lines analysed in this work is too small to draw a final conclusion.

Repair kinetics of cells with a homozygous mutation in BRCA2 revealed the contribution of HR to DSB repair during G2 phase. Defects in HR components as well as defects in ATM and Artemis diminish the repair capacity of the slow component. The striking similarity in the repair kinetics of BRCA2-, ATM- and Artemis-deficient cells raised the possibility that the three repair factors participate in one joint repair pathway. Epistasis analysis with a specific ATM inhibitor confirmed this notion. BRCA2's role in HR is well documented and these results link ATM and Artemis to the HR pathway. This conclusion is very surprising because ATM/Artemis dependent repair is regarded as a subpathway of NHEJ in G1 phase. In G2 the repair of these

breaks is completely different and involves the HR pathway without reliance on functional DNA-PK as was shown by epistasis analysis using a specific inhibitor of DNA-PK<sub>cs</sub>. The fast component removes the majority of IR-induced DSBs by NHEJ in G1 and G2. The slow component involves ATM and Artemis and is responsible for the repair of a subfraction of IR-induced DSBs. In G1 the repair of these breaks is channeled into NHEJ involving DNA-PK whereas in G2 the HR pathway removes the DSBs without reliance on functional DNA-PK. The fraction of DSBs that requires ATM and Artemis for successful repair shows a nice correlation with the amount of heterochromatin in human cells. This suggests that the ATM/Artemis dependency of a DSB results from its localisation in heterochromatin. ATM may be involved in chromatin relaxation but the role of ATM was not further investigated in this work. Complementation experiments with different variants of Artemis revealed the importance of Artemis' endonuclease activity for proper DNA repair and gave insight into the function of Artemis in HR-mediated repair. The fact that etoposide-induced DSBs show a diminished ATM/Artemis defect suggests that factors like complexity may also have influence on the repair pathway choice. DSBs induced by chemicals like etoposide show the same structure without complicated modifications and are repaired with fast kinetics using NHEJ even in heterochromatin. In contrast, IR induces a spectrum of DSBs with various modifications that could account for the dependency on ATM and Artemis in addition to heterochromatin association. The localisation of a DSB as well as its complexity prevents the fast rejoining of DSB ends. This retardation possibly contributes to the formation of secondary structures or lesions that may need the processing of Artemis before religation can occur. The repair of ATM/Artemis dependent DSBs is accomplished using HR in G2. This may suggest that structures requiring the activity of ATM and Artemis arise during early steps of the HR process. The repair of this DSB is impaired and marked for HR mediated repair. In G1, where HR is not available, modified DSBs are repaired using DNA-PK dependent NHEJ whereas DNA-PK plays merely a facilitating role in the repair of the majority of IR induced DSBs.

The last part of this work investigates the repair of etoposide-induced DSBs with covalently linked protein-DNA-complexes. The results indicate a direct role for the MRN-complex in the G1 phase of the cell cycle. The endonuclease activity of MRN could possibly be involved in resolving the covalently bound protein by endonucleolytic cleavage of the DNA. The resulting free ends are rapidly rejoined by NHEJ.

This work allowed insight into the complex network of DSB repair. The contribution of HR to G2 repair was substantiated and identified as the slow component which is responsible for ATM/Artemis dependent repair of a subfraction of DSBs. Repair of these breaks continues using DNA-PK dependent NHEJ in G1 and is channeled into HR in G2. The nature of factors that implicate the dependency on ATM and Artemis merely can be speculated on and require further examination.

### 3. Einleitung

Die DNA trägt die gesamte genetische Erbinformation eines Organismus, daher ist die Erhaltung der genomischen Integrität von größter Wichtigkeit für die Zelle. Unterschiedlichste Einflüsse rufen Schädigungen in der DNA hervor: Fehler bei endogen ablaufenden Prozessen wie der Replikation oder Meiose können ebenso wie die bei Stoffwechselprozessen entstehenden reaktiven Sauerstoffradikale zu DNA-Schäden führen. Außerdem besitzen zahlreiche Agenzien wie Röntgen- oder UV-Strahlung und verschiedene mutagen wirkende Chemikalien und Chemotherapeutika potentiell DNA-schädigende Eigenschaften. Das Spektrum der entstehenden Schäden ist groß und reicht von einfachen Basenschädigungen über kovalente Verknüpfung zwischen einzelnen DNA-Strängen oder zwischen DNA und Protein bis hin zu DNA-Einzelstrangbrüchen (ESBs) und DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs).

In der Zelle existieren unterschiedliche Reparatursysteme, die Schäden in der DNA erkennen und für deren Behebung verantwortlich sind. Eng mit der Reparatur verknüpft sind weitere Antworten der Zelle. So wird der Zellzyklus angehalten, um der Zelle Zeit zur Beseitigung der aufgetretenen Schäden zu geben und somit zu verhindern, dass die Zelle mit Schäden die Replikation aufnimmt oder in die Zellteilung eintritt. Ist der zugefügte Schaden zu groß, als dass dieser noch repariert werden könnte, so wird der programmierte Zelltod eingeleitet, um die Vermehrung zu stark geschädigter Zellen zu vermeiden. Defekte in diesem komplexen Netzwerk aus Zellzyklusregulation, DNA-Reparatur und Apoptoseinduktion stehen in Zusammenhang mit dem Auftreten von Mutationen und können zur Entstehung von Krebs führen.

Ionisierende Strahlung und verschiedene Chemotherapeutika induzieren multiple Schäden in einem räumlich engen Bereich und erzeugen auf diese Weise DSBs in der DNA. Diese gehören zu den schwerwiegendsten DNA-Schädigungen und können zum permanenten Zellzyklusarrest oder zur Induktion der Apoptose führen (Olive 1998). Die Reparatur von DSBs stellt die Zelle vor eine spezielle Herausforderung, da in diesem Fall beide DNA-Stränge geschädigt sind und nicht ein DNA-Strang als Matrize zur Reparatur des anderen Stranges dienen kann. Bereits ein einziger unreparierter DSB kann in Hefezellen die Apoptose auslösen (Paques & Haber 1999). Im Falle einer Fehlreparatur kann es zu Translokationen, Inversionen oder Deletionen kommen und somit massive chromosomalen Aberrationen verursachen (Hoeijmakers 2001).

Die Strahlenbiologie beschäftigt sich nicht nur mit der Wirkung ionisierender Strahlung (*ionising radiation*, IR) auf physikalischer Ebene, sondern versucht auch die biologischen Mechanismen, die im Anschluss an die Entstehung eines DNA-Schadens in Gang gesetzt werden, zu verstehen und zu erklären.

### **3.1. Strahlenphysikalische und -biologische Grundlagen**

Ionisierende Strahlung kann in elektromagnetische Wellen und Teilchenstrahlung unterteilt werden und hat die Eigenschaft, ein oder mehrere Orbitalelektronen aus getroffenen Atomen oder Molekülen herauszuschlagen und damit das Atom oder Molekül zu ionisieren. Neben Ionisationen können auch Anregungen ausgelöst werden, wobei ein Elektron eines Atoms lediglich auf ein höheres Energieniveau gehoben wird und unter Abgabe von Strahlung wieder auf das ursprüngliche Energieniveau zurückfällt. Zu den elektromagnetischen Wellen gehören Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung, während Elektronen, Neutronen, Protonen,  $\alpha$ -Teilchen und Schwerionen der Teilchenstrahlung zugeordnet werden.

#### **3.1.1. Elektromagnetische Wellen und ihre Wechselwirkung mit Materie**

Elektromagnetische Strahlung lässt sich als ein Strom von Photonen darstellen, wobei jedes Photon genügend Energie besitzt, um Ionisationen durchführen zu können. Bei der Absorption der Röntgenstrahlung durch biologisches Material wird die Energie ungleichmäßig in diskreten Energiepaketen deponiert. Dabei kommt es zur Wechselwirkung der Strahlung mit dem absorbierenden Material, wobei die Energie der Photonen ausschlaggebend für die Art der Wechselwirkung ist. Bei hochenergetischer Röntgenstrahlung dominiert der Comptoneffekt. Das Photon interagiert mit einem freien Elektron aus der äußeren Hülle eines Atoms, wobei ein Teil der Energie des Photons als kinetische Energie auf das Elektron übertragen wird. Das Photon wird von seiner Bahn abgelenkt, bewegt sich mit nun geringerer Energie und kann auf seinem Weg weitere Ionisationen verursachen. Das freigesetzte Elektron kann seinerseits mit der Materie wechselwirken und Ionisationen auslösen. Bei niederenergetischer Röntgenstrahlung (< 50 keV) dominiert der Photoeffekt, der durch die vollständige Absorption des Photons durch ein Elektron in der äußeren Schale eines Atoms gekennzeichnet ist. Das freigesetzte Elektron bewegt sich mit geringerer Energie weiter als das Photon, da sich der Energiebetrag um die zum Aufbrechen der Bindung benötigte Energie reduziert, und kann nun seinerseits ebenfalls mit der Materie wechselwirken und weitere Ionisationen auslösen. Energien unter 124 eV können keine Ionisationen bewirken (Hall et al. 2006). Bei sehr hohen Energien über 1,02 MeV tritt der Paarbildungseffekt auf. Hier kommt es unter dem Einfluss des Kernfeldes zu einer Materialisierung des Quants in ein Elektron und ein Positron. Diese können über sehr hohe Energien verfügen.

Durch die primären Prozesse wird nur ein einziges Atom ionisiert. Die Wirkung der sekundär entstandenen Elektronen ist um ein Vielfaches höher und ist im Wesentlichen für die strahleninduzierten Veränderungen im absorbierenden biologischen Material verantwortlich. Für eine Beurteilung der Strahlenwirkung ionisierender Strahlung sind die Eigenschaften der sekundär entstandenen Elektronen ausschlaggebend.

Standardmäßig eingesetzte 90 kV-Röntgenstrahlung und 25 kV-Mammographiestrahlung können der Photonenstrahlung zugeordnet werden, jedoch sind die Effekte auf biologisches Material unterschiedlich. 90 kV-Röntgenstrahlung löst in durchdrungener Materie vor allem den Comptoneffekt aus, während die Wechselwirkung von niederenergetischer 25 kV-Strahlung vom Photoeffekt dominiert wird. Die Elektronen, die durch niederenergetische Röntgenstrahlung freigesetzt werden, verfügen zudem über geringere Energien als bei höherenergetischer Strahlung. Somit sind die Elektronenspuren kürzer und es kommt zum Auftreten von vielen Ionisationsereignissen auf relativ kurzer Strecke. Dies führt zu einer erhöhten Effektivität (Hill et al. 2001). Die Dimensionen der Elektronenspuren mit sehr hoher Ionisationsdichte liegen im Größenbereich der DNA-Helix. Es ist daher leicht vorstellbar, dass durch niederenergetische Röntgenstrahlung mit großer Effizienz DSBs induziert werden. (Kiefer et al. 2003, Hall et al. 2006)

### **3.1.2. Linearer Energie Transfer und Relative Biologische Wirksamkeit**

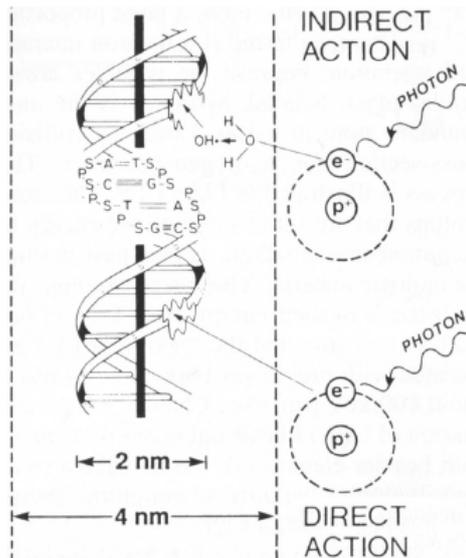
Die Energie der ionisierenden Strahlung wird entlang der Bahnspur weitgehend in diskreten Energiepaketen abgegeben, die entlang ihres Weges Ionisationen hervorrufen. Je nach Dichte der auftretenden Ionisationen kann IR in dünn und dicht ionisierende Strahlung unterteilt werden. Dabei wird die pro Wegstrecke deponierte Energie als LET (*linear energy transfer*) definiert. Photonenstrahlung wie Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlung wird als dünn ionisierende Strahlung eingestuft und erzeugt entlang der Photonenspur relativ wenige Ionisationen, die räumlich weit voneinander getrennt liegen. Dagegen kann es bei dicht ionisierender Teilchenstrahlung mit hohem LET zu tausenden Ionisationen kommen, die relativ geringen Abstand zueinander aufweisen.

Zur Beurteilung der Strahlenwirkung auf biologisches Material ist die im Körper deponierte Energie entscheidend. Diese wird durch die Dosis angegeben, die definiert ist als absorbierte Energie pro Masse und in der Einheit „Gray“ (Gy) angegeben wird. Zum Vergleich verschiedener Strahlenarten, die in biologischen Systemen bei gleicher Dosis unterschiedliche Wirkung ausüben können, dient die relative biologische Wirksamkeit (RBW). Diese gibt das Verhältnis einer Referenzstrahlung (z.B. 250 kV Röntgenstrahlung) zu der zu charakterisierenden Teststrahlung an, die zur Auslösung desselben Effekts führt. So weist beispielsweise 1 Gy  $\alpha$ -Teilchen einen höheren LET auf und erzeugt einen etwa 20fach größeren Effekt als 1 Gy Röntgenstrahlung. (Kiefer et al. 2003, Hall et al. 2006)

### **3.1.3. Direkte und indirekte Strahleneffekte im biologischen System**

Der Zellkern mit der darin enthaltenen DNA konnte schon früh als strahlenempfindliches Kompartiment der Zelle identifiziert werden (Munro et al. 1970). Die direkte Strahlenwirkung ist durch Wechselwirkung der Strahlung oder entstehender Sekundärelektronen mit der DNA

gekennzeichnet und tritt vor allem bei Strahlungsarten mit hohem LET wie beispielsweise  $\alpha$ -Teilchen auf. Dabei werden Atome und Moleküle der DNA direkt ionisiert oder angeregt, was zum Aufbrechen von kovalenten Bindungen und somit zur Schädigung der DNA führen kann (Abb. 3.1). Dünn ionisierende Strahlung mit niedrigem LET wie Röntgenstrahlung dagegen verursacht meist indirekte Ionisationen. Dabei interagiert das Photon mit dem absorbierenden Material unter Erzeugung von freien Radikalen, die eine genügend große Reichweite besitzen um die DNA zu erreichen und diese zu schädigen (Abb. 3.1).



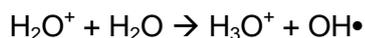
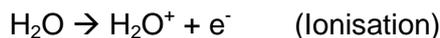
**Abbildung 3.1:** Direkte und indirekte Wirkung ionisierender Strahlung.

Die DNA ist schematisch dargestellt. Bei der direkten Wirkung reagiert ein Elektron, das durch Absorption eines Röntgenphotons entstanden ist, direkt mit der DNA und verursacht einen DNA-Schaden. Bei der indirekten Wirkung reagiert das vom Röntgenphoton gebildete Sekundärelektron unter Bildung von Hydroxylradikalen ( $\text{OH}\cdot$ ) mit  $\text{H}_2\text{O}$ . Diese wechselwirken mit der DNA und verursachen den DNA-Schaden. Bei dicht ionisierender Strahlung überwiegt der direkte Effekt, bei dünn ionisierender Strahlung der indirekte Effekt.

(S = Zucker, P = Phosphat, A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin)

(aus: Hall et al. 2006)

Da Zellen zu 80 % aus Wasser bestehen, wird der größte Teil der Energie von Wasser absorbiert. Bei der Wechselwirkung eines Photons mit einem Wassermolekül kann dieses unter Entstehung eines Radikals ionisiert werden.



Das ionische  $\text{H}_2\text{O}^+$ -Radikal besitzt ein ungepaartes Elektron in der äußeren Schale und trägt außerdem aufgrund des Elektronenverlusts eine positive Ladung. Es zeigt hohe Reaktivität und führt durch den Angriff auf andere Wassermoleküle zur Entstehung einer weiteren reaktiven Sauerstoff-Spezies, dem Hydroxylradikal  $\text{OH}\cdot$ .

Neben der Ionisation kann es durch IR zur Anregung und anschließenden Homolyse des Wassers kommen. Auch bei diesem Prozess treten Hydroxylradikale auf.



Das Hydroxylradikal zeigt die größte Reaktivität der entstehenden Radikale und hat daher eine geringe Reichweite. Es diffundiert nicht weiter als zwei Moleküldurchmesser (Marnett et al. 2000). Entsteht es jedoch im Bereich von wenigen Nanometern um die DNA, so kann es diese erreichen und zu DNA-Schäden führen (Goodhead et al. 1994). Die Bedeutung dieser Radikale für die Wirkung von IR auf biologisches Material ist enorm und verantwortlich für den

Großteil des durch Röntgen- oder  $\gamma$ -Strahlung induzierten Schadens. (Kiefer et al. 2003, Hall et al. 2006, Friedberg et al. 2006)

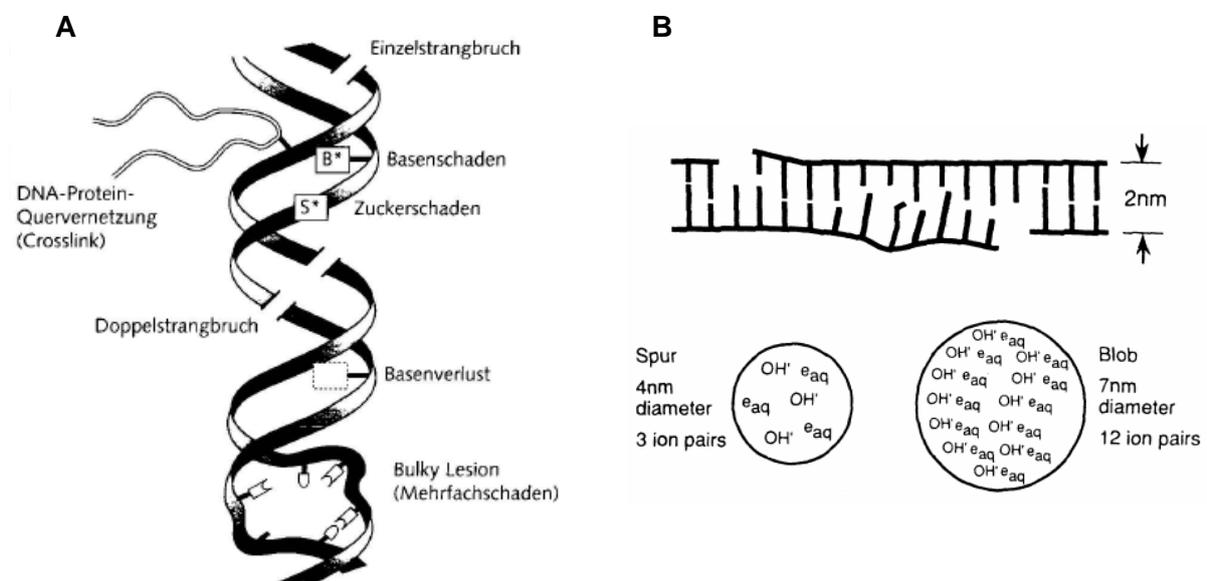
### 3.1.4. Strahleninduzierte Schäden der DNA

Durch IR wird eine Bandbreite an DNA-Schäden induziert, die unterschiedliche Auswirkungen auf die Zelle haben. Einfache Schädigungen wie Basenverluste oder -veränderungen kommen in großer Zahl vor und können relativ leicht repariert werden. Dagegen stellt vor allem die Reparatur von DSBs die Zelle vor eine Herausforderung, da hier beide Stränge der DNA geschädigt sind. Somit gehören diese zu den folgenschwersten Schädigungen der DNA. Eine Bestrahlung mit 1 Gy Röntgenstrahlung produziert 1000 bis 2000 Basenschäden, 600 bis 1000 ESBs und 16 bis 40 DSBs (Ward 1988). Die Bedeutung von Basenschäden und DNA-ESBs ist bei Verwendung biologisch relevanter Strahlendosen gering. Sie können sehr schnell repariert werden und haben keinen Einfluss auf das zelluläre Überleben (Ward 1995). In Abb. 3.2A sind mögliche Schäden der DNA, die durch Einwirkung von IR ausgelöst werden, schematisch dargestellt.

OH• Radikale sind für dünn ionisierende Strahlung mit geringem LET der Hauptauslöser von strahleninduzierten Schäden und zeigen typische Reaktionsmuster. Es konnte gezeigt werden, dass der Angriff von OH• bevorzugt an der C5=C6-Doppelbindung von Pyrimidinen erfolgt (Cadet et al. 1998). Durch die Reaktion des entstehenden Pyrimidinradikals mit Sauerstoff kann es anschließend zur Entstehung von gesättigten Ringstrukturen wie beispielsweise Thyminglycol (5,6-Dihydroxy-5,6-dihydrothymine) kommen (Dempfle & Linn 1982, Ward 1988, Cadet et al. 1998). Der Angriff von Hydroxylradikalen auf das Purin Guanin führt zur Entstehung von 8-Oxoguanin (7,8-Dihydro-8-oxoguanin) und seiner isomeren Form 8-Hydroxyguanin (Cadet et al. 1999). Diese erlauben die Paarung mit Adenin, was zur Entstehung von Transversionsmutationen beitragen kann (Cheng et al. 1992). Außerdem können Purin-Reste unter Bildung von z.B. 8-5'-Cyclodeoxy-guanosin bzw. -adenin zyklisieren und somit eine Verzerrung der DNA-Helix herbeiführen (von Sonntag 1987, Teoule 1987, Dizdaroglu et al. 1987). 20 % der entstehenden Hydroxylradikale greifen die Zucker des DNA-Rückgrats an und entziehen diesen unter Bildung eines Desoxyribose-Radikals ein Proton. Der bevorzugte Angriffspunkt von OH• ist dabei vermutlich an der C4'-Position der Desoxyribose (Breen & Murphy 1995).

IR deponiert die abgegebene Energie entlang der Bahnspur in diskreten Energiepaketen, die aber nicht homogen verteilt sind. Wird eine große Menge Energie auf relativ kleinem Raum abgegeben, so kommt es zum gehäuften Auftreten von OH• Radikalen, die aufgrund der geringen Reichweite zahlreiche Schäden auf lokal begrenztem Raum auslösen (Abb. 3.2B). Diese *locally multiply damaged site* (LMDS) kann durch die Kombination von direkter und indirekter Strahlenwirkung entstehen, wird aber durch eine einzelne Ionenspur induziert und

umfasst schätzungsweise einen Bereich von 20 bp (Hall et al. 2006). DNA-Doppelstrangbrüche werden den LMDS zugeordnet und sind durch Schädigung des Zuckerphosphat-Rückgrats auf beiden Strängen der DNA in einem Bereich von etwa 10 bp gekennzeichnet. Die Mehrzahl der durch IR induzierten DSBs weist veränderte oder zerstörte Enden auf, was die einfache Religation des Bruchs ausschließt (von Sonntag 1987). So fehlen häufig die OH-Gruppen am 3'-Ende und Phosphate oder Phosphoglycolate können angefügt sein (Henner et al. 1983). Ebenso kann es zum Verlust des Phosphats am 5'-Ende kommen, der verbliebene Zucker weist dann oftmals ebenfalls Schädigungen auf. An den Bruchenden können Basen verloren gehen und es kann zum Auftreten von überhängenden einzelsträngigen Enden kommen (von Sonntag 1987). Diese vielfältigen Veränderungen der Bruchstellen erfordern eine umfassende Prozessierung bevor die Reparatur der DNA erfolgen kann. (Kauffmann et al. 2001, Hall et al. 2006, Friedberg et al. 2006)



**Abbildung 3.2:** Schematische Darstellung von DNA-Schäden durch ionisierende Strahlung.

**(A)** Basenschäden oder Basenverluste und Zuckerschäden treten nach ionisierender Strahlung (IR) in großer Zahl auf. Außerdem kommt es zur Entstehung von Strangbrüchen. Einzelstrangbrüche (ESBs) weisen einen geschädigten DNA-Strang auf, bei Doppelstrangbrüchen (DSBs) sind beide Stränge betroffen. Treten zahlreiche einfache Schäden gehäuft auf lokal begrenztem Raum auf, spricht man von Mehrfachschaden (*bulky lesion* oder *locally multiply damage site*, LMDS). Bei sehr hohen Strahlendosen kann es zur kovalenten DNA-Vernetzung (*crosslink*) kommen (aus: Kaufmann et al. 2001)

**(B)** Schematische Darstellung einer LMDS. Die Energie von Röntgenstrahlen wird nicht homogen abgegeben, sondern in diskreten Paketen entlang der Bahnspur eines Röntgenphotons bzw. des durch Ionisation entstandenen Sekundärelektrons deponiert. Die Ausmaße der ionisierten Bereiche (*spurs* und *blobs*) sind vergleichbar mit dem Durchmesser der DNA (2 nm). Tritt ein Ionisationsbereich in der Nähe der DNA auf, so kommt es zu zahlreichen Ionisationen und damit vielen Schäden in einem begrenzten DNA-Abschnitt. (aus: Hall et al. 2006)

### 3.2. Radiomimetika

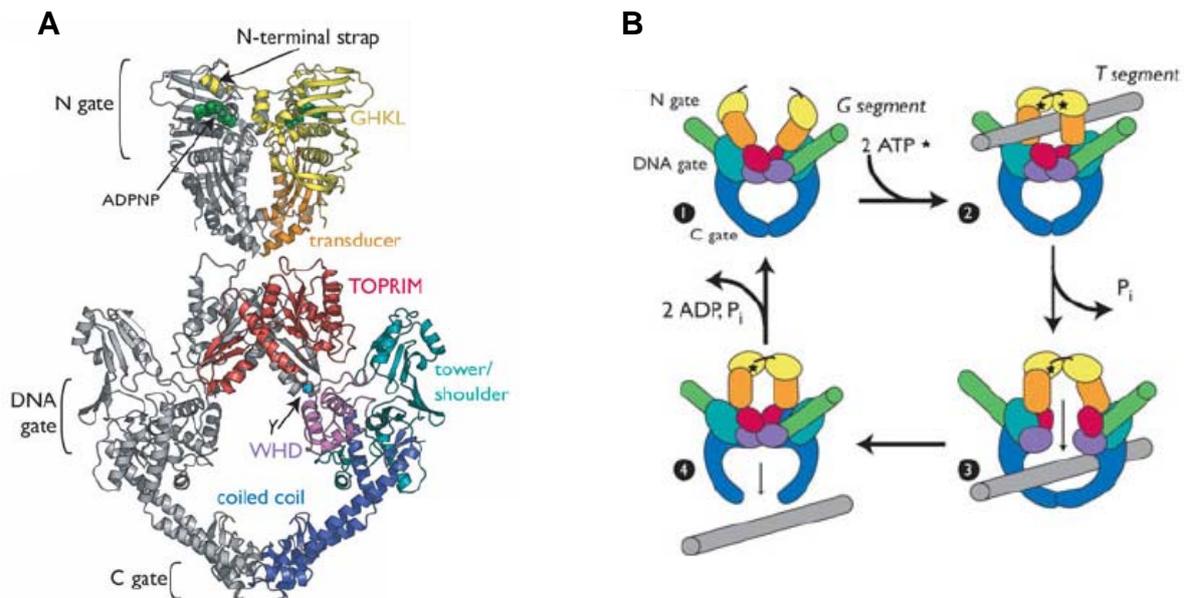
DNA-Schäden können auch durch zahlreiche Chemikalien und Chemotherapeutika induziert werden. Ein möglicher Angriffspunkt für diese Moleküle sind Topoisomerasen. Diese Enzyme sind in der Lage, die DNA durch das Setzen von Strangbrüchen zu entwinden, somit sterische

Spannung zu reduzieren und das Risiko von DNA-Schäden zu verringern. Topoisomerase I (TopoI) setzt einen ESB und entdrillt die DNA, indem der gebrochene Strang um den intakten Strang herumgewunden wird, während die Topoisomerase II (TopoII) durch das Setzen von DSBs ganze Windungen aus der DNA entfernen kann. TopoII führt Reaktionen durch, die für die Zelle potentiell gefährlich werden können. So kommt es zum einen zur Einführung von DSBs, zum anderen werden kovalente Bindungen zwischen Protein und DNA geknüpft (Schoeffler & Berger 2008).

Um die Entstehung von persistierenden DSBs zu vermeiden durchläuft die TopoII eine streng reglementierte Abfolge von Ereignissen, die die Religation der gesetzte DSBs vor dem Verlassen der DNA sicherstellt. Dies spiegelt sich in der komplexen zweigeteilten Struktur des Enzyms wider, die in Abb. 3.3A gezeigt ist. Die eukaryotische TopoII ist ein Homodimer aus zwei Untereinheiten, die aus jeweils drei Domänen bestehen. Die N-terminale Domäne (*N-gate*) ist zuständig für die Bindung und Hydrolyse von ATP und kann zudem über eine *transducer*-Region mit der zentralen Tasche (*DNA-gate*) kommunizieren (Bjergbaek et al. 2000, Classen et al. 2003). Diese führt die Bindung und Spaltung der DNA aus, indem an beiden DNA-Strängen versetzt ein ESB induziert wird, sodass ein 5'-Überhang von 4 bp entsteht (Muller et al. 1988). Die WHD-Region des *DNA-gates* enthält das katalytisch aktive Tyrosin, das die Spaltung der DNA durchführt (Sander & Hsieh 1983) und die Enden des DSBs durch eine kovalente Bindung in einem *cleavable complex* fixiert (Zechiedrich et al. 1989). Außerdem verfügt das *DNA-gate* über eine *shoulder*-Region, die an der Fixierung der DNA beteiligt ist (Dong & Berger 2007). Die C-terminale Domäne (*C-gate*) schließlich sorgt für die koordinierte Entlassung der DNA nach erfolgter Religation des eingeführten DSBs (Berger et al. 1996, Fass et al. 1999) und ist außerdem durch die enthaltene NLS (*nuclear localisation sequence*) für die Kernlokalisierung des Proteins verantwortlich (Crenshaw & Hsieh 1993). Die Bindung von TopoII an die DNA und die anschließende katalytische Aktivität werden u. a. durch die Topologie der DNA reguliert, die von dem Enzym erkannt werden kann. Die Interaktion erfolgt dabei vorzugsweise an DNA-Strängen mit negativen oder positiven *supercoils* und weniger an relaxierter DNA (Zechiedrich & Osheroff 1990).

Die Passage des DNA-Segmentes durch den gesetzten DSB verläuft durch einen Reaktionszyklus, der schon früh beschrieben wurde und durch jüngere Forschungen bestätigt werden konnte (Mizuuchi et al. 1980). Die Reaktionssequenz beginnt mit der Bindung eines DNA-Segments (*gate/G*-Segment) am *DNA-gate* (Roca & Wang 1992). Anschließend wird am *N-gate* ebenfalls ein DNA-Segment gebunden (*transport/T*-Segment) (Roca et al. 1993, Kampranis et al. 1999). Nach der Assoziation von 2 ATPs an der ATP-Bindungsdomäne (GHKL-Motiv) schließt sich das *N-gate* um die zu transportierende T-DNA (Roca & Wang 1992, Olland & Wang 1999). Hydrolyse eines ATPs löst eine Konformationsänderung aus und induziert das Öffnen des *DNA-gates* unter Spaltung des dort gebundenen DNA-Stranges

(G-Segment) durch das katalytisch aktive Tyrosin (Harkins et al. 1998, Baird et al. 1999). Die T-DNA wandert durch die Lücke und wird nach erfolgter Religation des DSBs in der am DNA-*gate* gebundenen DNA durch das geöffnete C-*gate* entlassen (Roca et al. 1996, Dong & Berger 2007). Hydrolyse des zweiten gebundenen ATP führt zum erneuten Öffnen des N-*gates* (Wigley et al. 1991) und das Enzym ist bereit für einen neuen Reaktionszyklus (Übersicht: Schoeffler & Berger 2008). Der Reaktionszyklus der Topoll ist in Abb. 3.3B schematisch dargestellt.



**Abbildung 3.3:** Struktur und Reaktionsmechanismus der Topoisomerase II (Topoll)

**(A)** Struktur der ATPase, DNA-Bindungs- und -Spaltungsregion der Topoll aus *S. cerevisiae*. Ein Protomer des Homodimers ist in grau dargestellt. Die Bezeichnung der *gate*-Regionen ist links angezeigt. Die GHKL-Domäne zur Bindung und Hydrolyse von ATP (gelb) kommuniziert über eine *transducer*-Region (orange) mit dem zentralen DNA-*gate*, das aus TOPRIM-Domäne (rot), WHD (*winged helix domain*, violett) und *shoulder*-Region (blaugrün) besteht. Das katalytisch aktive Tyrosin ist als türkisfarbener Kreis dargestellt. Das C-*gate* wird von einer *coiled-coil* Region mit distaler globulärer Domäne (blau) gebildet.

**(B)** Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der Topoll aus *S. cerevisiae*. Die Färbung der Domänen entspricht Abbildung A. (1) Bindung des G-Segments am DNA-*gate*. (2) Bindung von 2ATP (\*) am N-*gate*, dadurch schließt dieses um das assoziierte T-Segment. (3) Hydrolyse von 1 ATP, Konformationsänderung und Spaltung des G-Segments, Passage des T-Segments durch das DNA-*gate*. (4) Religation des G-Segments, Öffnen des C-*gates* und Entlassung des T-Segments. Durch Hydrolyse des verbliebenen ATPs wird das N-*gate* wieder geöffnet, die Spaltprodukte werden entlassen und das Enzym ist bereit für einen neuen Reaktionszyklus. (aus: Schoeffler & Berger 2008)

Chemotherapeutika greifen häufig in den Reaktionszyklus der Topoll ein. Topoll-Gifte wie die Epipodophylotoxine verhindern die Beseitigung der kritischen Strukturen und sorgen für die Stabilisierung von Intermediatzuständen, die als DNA-Schaden erkannt werden. Somit wird das essentielle Enzym in ein Zellgift umgewandelt (Liu et al. 1989, Nitiss 1994, Nitiss & Beck 1996). Andere Chemotherapeutika wirken als katalytische Inhibitoren und verhindern die enzymatische Aktivität von Topoll. Dies kann beispielsweise durch direkten Kontakt mit dem Enzym geschehen, etwa durch kompetitive Bindung der ATPase-Domäne wie bei Novobiocin (Corbett et al. 1993). Bisdioxopiperazine interagieren ebenfalls direkt mit dem Enzym und

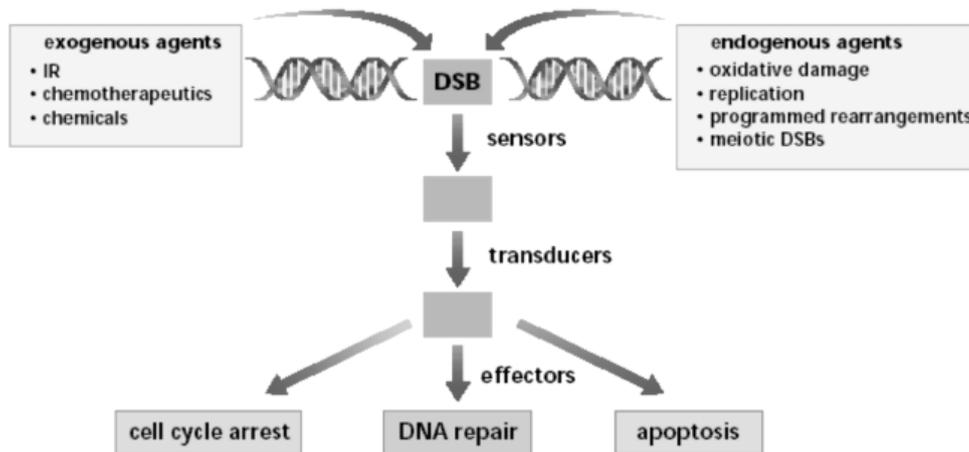
arretieren es in Form einer geschlossenen Klammer (Roca et al. 1994). Alternativ kann das Inhibitormolekül auch direkt an die DNA binden, diese blockieren und somit den Kontakt zwischen Topoll und DNA verhindern, wie es bei Anthracyclinen der Fall ist (Jensen et al. 1990).

Das häufig verwendete Chemotherapeutikum Etoposid (VP16) ist ein Topoll-Gift der Gruppe der Epipodophyllotoxine und wird aus der Wurzel von *Podophyllum peltatum* gewonnen. Es blockiert die Topoll nach Induktion des DSBs und Ausbildung kovalenter Bindungen zu den 5'-Enden des entstandenen Bruchs in Form eines *cleavage complex* und sorgt so für die Entstehung von DSBs mit kovalenter DNA-Protein-Bindung (Liu et al. 1989). Etoposid verhindert die Religation des induzierten DSBs (Sorensen et al. 1992, Burden et al. 1996). Der genaue Wirkmechanismus von Etoposid ist noch nicht bekannt, jedoch gibt es Hinweise einer Interaktion mit dem Enzym-DNA-Komplex (Burden et al. 1996), möglicherweise unter Beteiligung des katalytisch aktiven Tyrosins am DNA-*gate* der Topoll (Burden & Osheroff 1998, Wang et al. 2002).

### 3.3. Zelluläre Schadensantwort auf DNA-Doppelstrangbrüche

Die zelluläre DNA-Schadensantwort als Signal-Transduktionskaskade beginnt mit der Erkennung des Schadens durch ein Signal, welches von biologischen Sensormolekülen wahrgenommen wird. Dieses Signal besteht entweder im DSB selbst oder in Chromatinveränderungen, die durch den DNA-Schaden ausgelöst werden. Die Sensoren geben die Information weiter an Transducer, die für die Verstärkung und Weitergabe des Signals an Effektoren zuständig sind. Diese sorgen dann für die unterschiedlichen Antworten der betroffenen Zelle. Der Zellzyklus muss kontrolliert und bei Bedarf angehalten werden, um der Zelle Zeit für eine adäquate Beseitigung des Schadens zu geben, wobei die zuständigen Reparaturvorgänge ebenfalls durch Effektormoleküle initiiert werden. Gleichzeitig findet eine Kommunikation mit Schlüsselproteinen der Apoptoseregulation statt, damit die Zelle bei nicht reparablen DNA-Schäden dem programmierten Zelltod zugeführt werden kann. Eine Übersicht über den Ablauf der DNA-Schadensantwort ist in Abb. 3.4 gezeigt.

In jüngster Zeit wurde die Signalkaskade um ein weiteres Mitglied, die Mediatoren, erweitert. Diese besitzen keine eigene katalytische Aktivität, sie können aber die Interaktion zwischen anderen Proteinen unterstützen und somit zur Signalweitergabe beitragen.



**Abbildung 3.4:** Schematische Darstellung der DNA-Schadensantwort

Durch endogene und exogene Einflüsse kommt es zum Auftreten von DSBs in der DNA. Sensor-Proteine erkennen den DNA-Schaden und übermitteln ein Signal an Transducer. Diese verstärken das empfangene Signal und geben es an Effektoren weiter, die die verschiedenen Antworten der Zelle auf den aufgetretenen Schaden in Gang setzen und Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur oder Apoptoseinduktion aktivieren. (aus: Khanna & Jackson 2001)

### 3.3.1. Die Schadenserkenkung

Das Auftreten eines DSBs hat gravierende Auswirkungen auf die Struktur des Chromatins und es besteht die Möglichkeit, dass Veränderungen des Chromatins wenigstens teilweise an der Signalgebung beteiligt sind. Es erfolgt eine Dekondensation des Chromatins, die normalerweise versteckt liegenden Histone werden exponiert und sind damit für verschiedene Interaktionspartner besser zugänglich.

In der Tat kommt es nach dem Auftreten eines DSBs zur Modifikation der Histone, beispielsweise kann Histon H3 an der Position Lys79 methyliert werden (Sanders et al. 2004), was die Affinität des Mediatorproteins 53BP1 gegenüber H3 *in vitro* erhöht (Huyen et al. 2004).

Außerdem erfährt die Histonisoform H2AX, die durchschnittlich etwa 10% der H2A-Population im Genom ausmacht, in lokal begrenzter Umgebung eines DSBs eine Phosphorylierung an Ser139 (Rogakou et al. 1998). Das entstehende  $\gamma$ H2AX ist von größter Wichtigkeit bei Erkennung und Weitergabe des Schadenssignals. Es bleibt nicht auf die unmittelbare Umgebung des DSBs begrenzt, sondern wird durch positive Rückkopplung weiter verstärkt, sodass schließlich schätzungsweise etwa 2000 H2AX-Moleküle über 2 Mbp DNA um den DSB phosphoryliert vorliegen (Rogakou et al. 1998). Auf diese Weise kann die Information über einen lokal aufgetretenen gefährlichen DNA-Schaden, der als DSB das Potential zu weitreichenden Chromatinveränderungen besitzt, auf die gesamte umgebende Chromatinregion übertragen werden.

Das Phosphorylierungsmotiv von H2AX, das SQ-Motiv, liegt am C-Terminus des Proteins und ist ein Erkennungssignal für die Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase ähnlichen Kinasen (PIKK), zu denen die Proteine ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*), ATR (*ATM and Rad3 related*)

und die katalytische Untereinheit der DNA-PK (*DNA dependent protein kinase catalytic subunit*, DNA-PK<sub>cs</sub>) gehören. Alle drei können H2AX phosphorylieren, wobei ATM für die Detektion und Weitergabe des Signals nach dem Auftreten von DSBs zuständig ist, während ATR bei Replikationsprozessen aktiv wird (Abraham 2001). Ob die Phosphorylierung von H2AX durch DNA-PK von Bedeutung ist und inwieweit eine Kooperation mit ATM stattfindet, ist bisher noch nicht geklärt. Neben der Verstärkung des Initialsignals kommen ATM und ATR noch weitreichendere Funktionen bei der Weiterleitung des Schadenssignals zu. Als Serin-Threonin-Kinasen phosphorylieren und aktivieren sie über 700 Proteine des DNA-Reparatur-Netzwerkes (Matsuoka et al. 2007), darunter Faktoren der Zellzyklusregulation und DNA-Reparatur, es wird aber auch Einfluss auf Nukleinsäure- und Proteinmetabolismus, Zellstruktur und -proliferation und Signaltransduktion genommen (Abraham 2004).

Der mechanistische Beitrag der umfangreichen H2AX-Phosphorylierung besteht in der Bereitstellung einer Plattform für zahlreiche andere Reparaturfaktoren (Kim et al. 2006). So konnte die Erkennung und Bindung von  $\gamma$ H2AX durch 53BP1 (Ward et al. 2003), NBS1 (Kobayashi et al. 2002) und MDC1 (Stewart et al. 2003) gezeigt werden.

Die Induktion der initialen Phosphorylierung von H2AX wird kontrovers diskutiert. Verschiedene Quellen gehen davon aus, dass ATM selbst in der Lage ist, die veränderte Chromatinstruktur im Umfeld eines DSBs zu erkennen, sich daraufhin autophosphoryliert und aktiviert und somit die Verstärkungskaskade in Gang setzt (Bakkenist & Kastan 2003). Andererseits könnte die hohe Affinität des Ku70/Ku80-Komplexes zu freien DNA-Enden zur Rekrutierung der DNA-PK<sub>cs</sub> führen, die dann wiederum die Phosphorylierung der ersten H2AX-Moleküle ausführen könnte (Kinner et al. 2008).

Auch wird eine Beteiligung des Mre11-Rad50-NBS1 (MRN)-Komplexes bei der DSB-Erkennung angenommen, zusätzlich zu den bekannten Funktionen in der DNA-Replikation und DNA-Reparatur sowie bei der Signalweitergabe zur Zellzyklusregulation (Assenmacher & Hopfner 2004). Der MRN-Komplex bindet demnach in Form eines Heterotetramers (M2R2) über das DNA-Bindemotiv von Mre11 an das Bruchende (deJager et al. 2001). Nach der Bindung an die DNA kommt es zu einer Konformationsänderung des Komplexes, sodass die beiden Rad50-Moleküle parallel angeordnet sind und die intermolekulare Vernetzung mit einem am komplementären Bruchende lokalisierten MRN-Komplex möglich ist (Moreno-Herrero et al. 2005). Auf diese Weise können die beiden Bruchenden des DSB in räumlicher Nähe gehalten werden. Über NBS1 ist auch die Bindung an ATM möglich (Kobayashi et al. 2002) und beide Komponenten sind bei der Erkennung und Signalweitergabe nach dem Auftreten eines DSBs eng miteinander verknüpft (Lavin 2007). Ob nun der MRN-Komplex zuerst am Bruchende für die Aktivierung von ATM zuständig ist oder ATM nach eigenständiger Erkennung des DNA-Schadens nach Autophosphorylierung für die Weitergabe des Signals sorgt, bleibt im Fokus der Forschung.

### 3.3.2. Regulation des Zellzyklus

Der Zellzyklus umfasst die streng reglementierte Abfolge von Ereignissen zwischen zwei Zellteilungen und kann in vier Phasen unterteilt werden. Die Präsynthesephase (*gap1*, G1-Phase) ist die erste Phase, die gerade gebildete Tochterzellen durchlaufen. Die Zelle beginnt zu wachsen, Zytoplasma und Zellorganellen werden ergänzt. Außerdem wird durch Produktion von mRNAs für Replikationsenzyme und Histone die anschließende Synthesephase (S-Phase) vorbereitet. Diese beginnt mit der Aufnahme der DNA-Synthese, gleichzeitig wird die RNA-Produktion und Proteinsynthese mit Ausnahme der Histonproduktion gedrosselt. Am Ende der S-Phase wurde die DNA verdoppelt und jedes Chromosom liegt als 2-Chromatid-Chromosom vor. In der anschließenden Postsynthesephase (G2-Phase) wird wiederum verstärkt Proteinsynthese betrieben. Die Zelle gewinnt an Größe, außerdem werden Proteine für die anschließende Zellteilung wie etwa Mikrotubuli synthetisiert. Schließlich erfolgt in der Metaphase (M-Phase) die gleichmäßige Verteilung der DNA auf die Tochterzellen und die Kernteilung (Karyogenese), bevor die zytoplasmatische Trennung der Tochterzellen (Zytokinese) erfolgen kann. Die entstehenden Tochterzellen können nun mit dem erneuten Eintritt in die G1-Phase einen weiteren Zellzyklus beginnen oder verlassen den Zellzyklus in die Ruhephase (G0-Phase) und stellen die Teilungsaktivität ein.

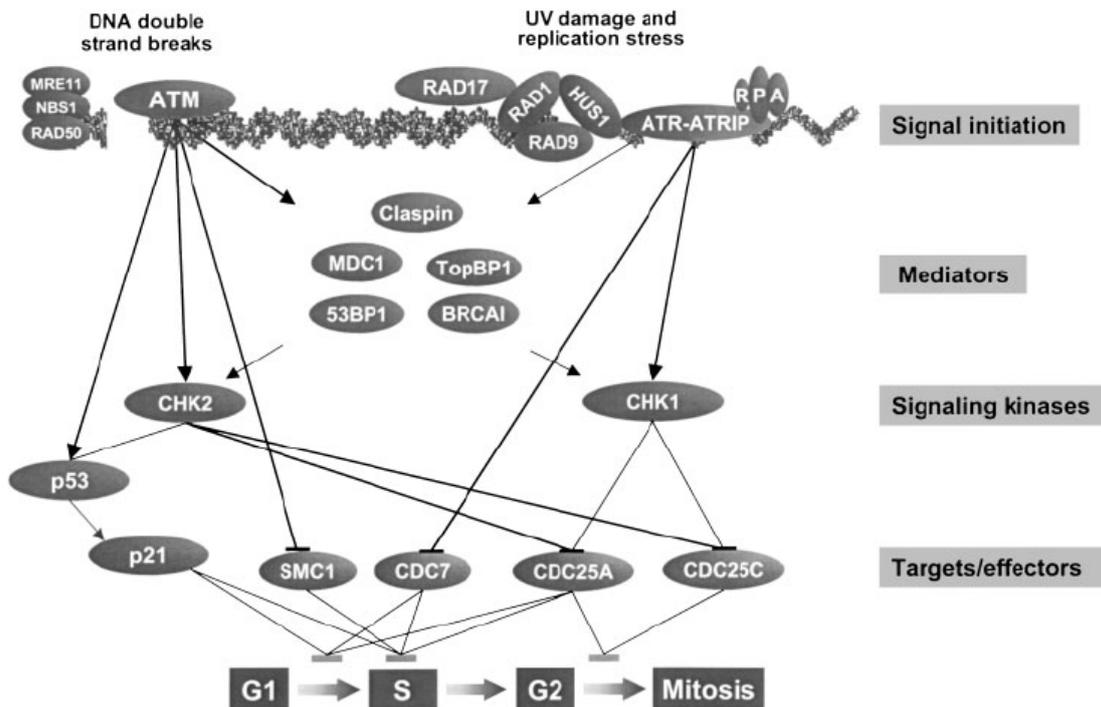
Die Regulation des Zellzyklus ist sehr komplex. Der Übertritt von einer Phase in die nächste wird durch das Zusammenspiel verschiedener Cycline und Cyclin-abhängiger Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, CDK) reguliert, die im Komplex Kinaseaktivität besitzen. Die Cycline werden zu bestimmten Zeitpunkten des Zellzyklus verstärkt exprimiert, erreichen ein Maximum und werden anschließend rasch abgebaut. Die jeweilige Konzentration an Cyclinen bestimmt den Übertritt von einer Zellzyklusphase in die nächste.

Äußere Faktoren wie Zellgröße, Nährstoffangebot, Anzahl an vorhandenen Nachbarzellen oder Kontakt zu Wachstumsfaktoren nehmen Einfluss auf den Zellzyklus. Ebenso wird die korrekte Abfolge des Zellzyklus an verschiedenen Kontrollpunkten (Checkpoints) überwacht um zu gewährleisten, dass eine Zelle erst dann in die nächste Phase eintritt, wenn die vorherige Phase abgeschlossen ist. (Alberts et al. 2002)

Das gehäufte Auftreten von DNA-Schäden kann zum Innehalten im Zellzyklus führen. Nach der Erkennung des Schadensignals erfolgt die Weiterleitung vor allem über die PIKKs ATM und ATR in Abhängigkeit von der Art des aufgetretenen Schadens. ATR ist verantwortlich für die Weitergabe des Signals nach dem Auftreten von einzelsträngigen DNA-Bereichen durch replikativen Stress oder UV-Bestrahlung (Abraham 2001, Sogo et al. 2002) an die Checkpointkinase1 (Chk1), die dann entsprechende Zielproteine wie Cdc25a und Cdc25c phosphoryliert und damit inaktiviert. Diese gehören neben Cdc25b zu einer Gruppe von Threonin-Phosphatasen, die inhibierende Phosphorylierungen von CDK1 und CDK2 entfernt, diese somit aktiviert und das Fortschreiten des Zellzyklus erlaubt. Die Inaktivierung der CDK-

Proteine verhindert dies und sorgt somit für die Einleitung des Checkpoints (Peng et al. 1997, Sanchez et al. 1997).

Nach dem Auftreten von DSBs kommt es wie beschrieben zur Aktivierung von ATM, das seine zellzyklusregulierende Funktion über Phosphorylierung der Checkpointkinase Chk2 ausübt. Diese bewirkt durch Inhibierung von Cdc25a und Cdc25c die oben beschriebene Einleitung des Checkpoints (Matsuoka et al. 2000). Außerdem wird über die Phosphorylierung und damit Aktivierung von p53 durch ATM die Transkription des CDK-Inhibitors p21 verstärkt, der dann direkt an den G1-Cyclin-CDK-Komplex bindet und somit den G1/S-Übergang unterbindet. Ein Modell der schadensinduzierten Aktivierung der Zellzykluscheckpoints ist in Abb. 3.5 gezeigt.

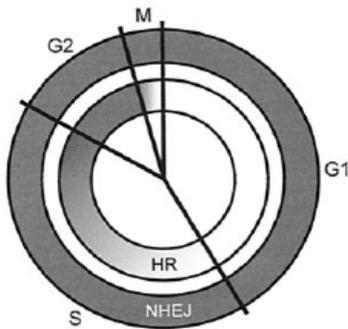


**Abbildung 3.5:** Modell der schadensinduzierten Aktivierung von Zellzyklus-Checkpoints

Das Auftreten von DSBs führt zur Aktivierung von ATM, das verschiedenste Substrate phosphoryliert und somit direkt oder über Mediatoren die Checkpointkinasen Chk1 und Chk2 aktiviert. Diese bewirken die Inhibition von Cdc25a und Cdc25c und sorgen so für die Einleitung des Checkpoints. Außerdem kommt es durch Aktivierung von p53 zur Produktion von p21, das als CDK-Inhibitor wirkt. ESBs bewirken die Aktivierung von ATR-ATRIP, die ebenfalls direkt oder über Mediatorproteine Einfluss auf Chk1 und Chk2 nehmen und die Induktion der Zellzykluscheckpoints auslösen können. (aus: Li & Zou 2005)

### 3.3.3. Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Die Reparatur von DSBs verläuft in eukaryotischen Zellen vor allem über zwei Hauptreparaturmechanismen. Die Homologe Rekombination (HR) ist auf die späte S- und G2-Phase beschränkt, während die Nicht-homologe Endverknüpfung (*non-homologous end-joining*, NHEJ) während des gesamten Zellzyklus zur Verfügung steht (Abb. 3.6, Rothkamm et al. 2003).



**Abbildung 3.6:** Schematische Darstellung der Beteiligung von HR und NHEJ an der Reparatur IR-induzierter DSBs.

In der G1- und frühen S-Phase werden strahleninduzierte DSBs vorwiegend über NHEJ repariert. In der späten S- und G2-Phase tragen NHEJ und HR zur Reparatur dieser Brüche bei. (aus: Rothkamm et al. 2003)

#### 3.3.3.1. Die Homologe Rekombination (HR)

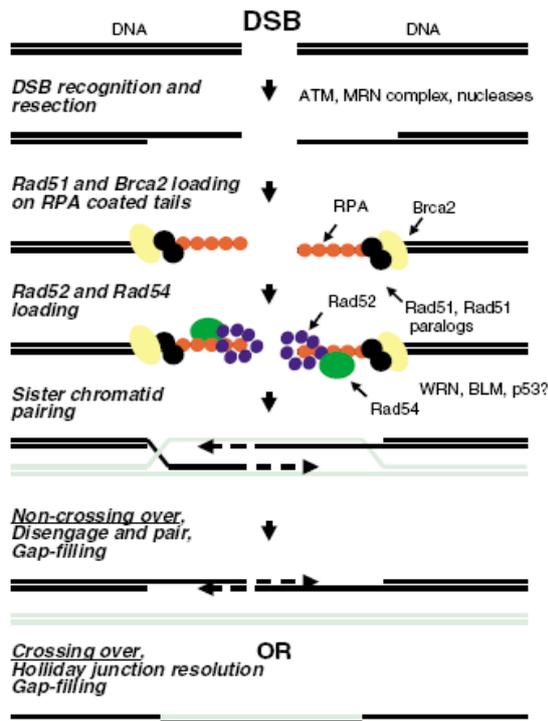
Die HR ist ein sehr präziser Prozess, bei dem die fehlerfreie Reparatur eines DSBs durch den Abgleich mit sequenzhomologen Bereichen gewährleistet ist. Die homologe DNA stammt in der Regel vom Schwesterchromatid, also der identischen Kopie einer Chromatide, die während der Replikation in der S-Phase entsteht. Dies erklärt auch, weshalb die HR nur in der späten S- und G2-Phase zum Einsatz kommt, wo homologe Sequenzen auf der während der Replikation synthetisierten Schwesterchromatide zur Verfügung stehen. Dagegen werden Rekombinationereignisse zwischen homologen Chromosomen in Säugern unterdrückt (Johnson & Jasin 2001). Dies könnte durch das Vorhandensein von ausgedehnten Sequenzen mit repetitiven Elementen erklärt werden, die etwa 40 % des Genoms ausmachen und somit das Risiko von Fehlpaarungen erhöhen.

Nach der Erkennung des DSBs durch den MRN-Komplex, der aus Mre11, Rad50 und NBS1 besteht, erfolgt zunächst die Prozessierung der Enden eines DSBs unter Entstehung von einzelsträngigen 3'-Überhängen. Eine Beteiligung des MRN-Komplexes an diesem Schritt wird vermutet, jedoch besteht die Notwendigkeit der Beteiligung weiterer Faktoren an der Resektion, da Mre11 zwar 3'-5'-Exonuklease- und Endonukleaseaktivität besitzt, jedoch keine 5'-3'-Exonukleaseaktivität, die für diesen Bearbeitungsschritt notwendig wäre (Paull & Gellert 1998, Trujillo et al. 1998). Aufgrund seiner ATPase-Aktivität wird Rad50 zusätzlich eine Funktion bei der Entwindung der DNA zugeordnet (Paull & Gellert 1999), während NBS1 durch Kommunikation mit ATM vermutlich als Bindeglied zur DNA-Schadens-Signalkaskade fungiert. Kürzlich konnte CtIP (*CtBP interacting protein*) als weiterer Interaktionspartner des MRN-Komplexes identifiziert werden (Sartori et al. 2007).

Die einzelsträngigen Bereiche werden unmittelbar nach deren Entstehung von Replikationsprotein A (RPA) erkannt, gebunden und somit vor möglichen Schädigungen geschützt. Anschließend wird Rad51 mit Hilfe von BRCA1, BRCA2 und Rad52 auf den einzelsträngigen DNA-Bereich aufgeladen, verdrängt somit RPA und bildet ein Nukleoproteinfilament (Song & Sung 2000, Ting & Lee 2004, Yang et al. 2002). Rad51 und seine Paraloge sind zusammen mit Rad52 und Rad54 zuständig für die ATP-abhängige Suche nach der homologen Sequenz und für die Stranginvasion (Baumann et al. 1996, Gupta et al. 1997). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Rad52 Ringstrukturen aus sieben Rad52-Monomeren bildet, die sowohl mit einzelsträngiger wie auch mit doppelsträngiger DNA interagieren können (Van Dyck et al. 1998, 1999). Rad54 besitzt ATPase-Aktivität und weist Ähnlichkeiten zu Helikasen auf. Es könnte somit helfen, durch das Entwinden der DNA die Zugänglichkeit zur Bruchstelle zu verbessern (Solinger et al. 2001).

Durch Invasion des DNA-Einzelstranges in die homologe Sequenz kommt es zur Ausbildung einer D-Schleife, die theoretisch mit der anderen Seite des DSB zusammenpasst. Es könnte somit nicht nur DNA-Synthese am eingedrungenen Strang betrieben werden, sondern auch am 3'-Ende des nicht-invasiven Stranges unter Bildung von X-förmigen Strukturen, den sogenannten Holliday-Intermediaten (*Holliday junction*). Im weiteren Verlauf des Reparaturprozesses kommt es zur Wanderung der Verzweigungsstelle (*branch migration*) und schließlich zur Trennung der überkreuzten Strukturen. Diese Prozesse sind bisher noch wenig verstanden und sind Gegenstand der momentanen Forschung. So sind die Bloom-Helikase und das Produkt des WRN-Gens in der Lage, *Holliday junctions* als Substrat zu erkennen und zu binden (Mohaghedegh et al. 2001, Constantinou et al. 2000) und werden in Zusammenhang mit den Ereignissen in der späten HR gebracht.

Nach erfolgter DNA-Synthese wird der Reparaturprozess abgeschlossen. Durch Loslösen der synthetisierten DNA vom Templat wird die *Holliday junction* ohne Austausch von DNA (*crossing over*) zwischen den beteiligten DNA-Strängen gelöst und das 5'-Ende des geschädigten DNA-Stranges wird mit dem neu synthetisierten Einzelstrang verbunden. Dies scheint die in Säugern bevorzugte Art des Abschlusses der HR zu sein (Johnson & Jasin 2000). Alternativ kann die *Holliday junction* auch endonukleolytisch gespalten werden. Dabei kann es zum Austausch von DNA zwischen den beteiligten DNA-Strängen kommen. Abschließend werden eventuell vorhandene Lücken mit Hilfe von Polymerasen aufgefüllt, bevor Ligasen die Stränge miteinander verschmelzen. Die beteiligten Proteine sind allerdings noch nicht bekannt. Der Ablauf der HR ist in Abb. 3.7 schematisch dargestellt.



**Abbildung 3.7:** Schematische Darstellung der Homologen Rekombination (HR)  
 Nach der Erkennung des DSBs durch den MRN-Komplex und Signalamplifikation durch ATM werden die Bruchenden resektiert, sodass überhängende 3'-Enden entstehen. Diese werden vom einzelstrangbindenden Protein RPA erkannt und geschützt. BRCA2 wird zum Bruch rekrutiert und trägt durch Aufladung von Rad51 auf den Einzelstrang zur Entstehung eines Nukleoproteinfilaments bei. Rad52 und Rad54 helfen bei der Invasion des Einzelstranges in die homologe Sequenz unter Entstehung einer *Holliday junction*. Nach erfolgter DNA-Synthese werden die DNA-Stränge entweder voneinander gelöst und dem ursprünglichen Ende zugeordnet oder die *Holliday junction* wird endonukleolytisch gespalten, wobei es durch *crossing over* zum DNA-Austausch kommen kann. Nach dem Auffüllen eventuell vorhandener Lücken werden die Enden ligiert. (aus: Valerie & Povirk 2003)

**3.3.3.2. Die Nicht-homologe Endverknüpfung (*non homologous end-joining*, NHEJ)**

Das NHEJ ist ein sehr schnell ablaufender Prozess, der auch bei der Reparatur der im Verlauf der V(D)J-Rekombination bei Antikörper- und T-Zell-Rezeptorproduktion regulär gesetzten DSBs von essentieller Bedeutung ist. Der Reparaturmechanismus ist einfach, die gebrochenen Enden werden miteinander verknüpft, ohne dass ein Templat mit ausgedehnten homologen Sequenzen benötigt wird. Diese Art der Reparatur ist nicht zwangsläufig exakt und fehlerfrei, bei beschädigten Bruchenden kann es durchaus zum Verlust einiger Nukleotide kommen.

Die Kernkomponenten des NHEJ bestehen aus zwei Proteinkomplexen, der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK), die wiederum aus den drei Komponenten Ku70, Ku80 und der katalytische Untereinheit der DNA-PK (DNA-PK<sub>cs</sub>) zusammengesetzt ist, und dem XRCC4/DNA-Ligase IV-Komplex (Jeggo 1998, Jackson 2002).

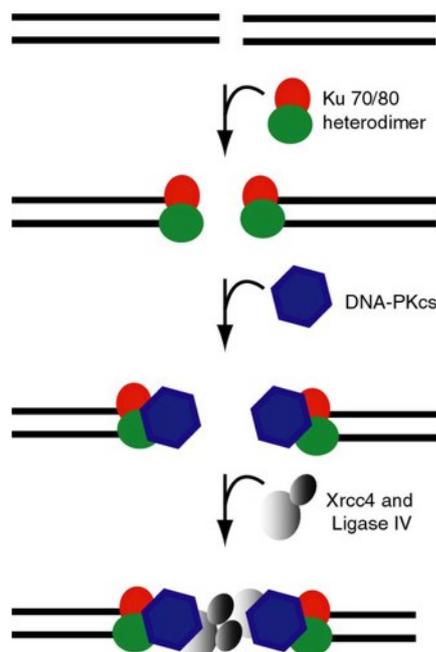
Die Reaktionssequenz des NHEJ beginnt mit der Erkennung des Schadens und der Bindung der freien DNA-Enden durch das Ku70/Ku80-Heterodimer. Beide Proteine besitzen zwar wenig Sequenzhomologie, zeichnen sich aber durch eine ähnliche Topologie aus und bilden eine ringförmige Struktur, in die die DNA eingefädelt wird (Walker et al. 2001). Die Bindung des Komplexes erfolgt in Richtung des intakten DNA-Stranges, sodass die Enden für Wechselwirkungen mit anderen Proteinen zugänglich sind (Yoo et al. 1999). Neben der Erkennung und Bindung der DNA-Enden kommt dem Ku70/Ku80-Dimer ebenfalls die Aufgabe der Rekrutierung der DNA-PK<sub>cs</sub> zu.

Dieses Protein besitzt Serin-Threonin-Kinaseaktivität (Gottlieb & Jackson 1993), überbrückt vermutlich ebenfalls die Lücke zwischen den Bruchenden und hält somit die freien Enden in

räumlicher Nähe (DeFazio et al. 2002). Außerdem werden die freien Enden des DSB verdeckt, so vor dem Angriff von Nukleasen und Ligasen geschützt und Degradation bzw. falsche Verknüpfung verhindert (Weterings et al. 2003). Vor der Religation müssen die Enden des DSBs wieder freigegeben werden. Dies geschieht vermutlich durch in-trans-Autophosphorylierung von zwei an den komplementären Enden eines DSBs lokalisierten DNA-PK-Komplexen (Meek et al. 2007). Außerdem weist die DNA-PK Phosphorylierungsstellen für ATM auf, die vor der Freigabe der Enden phosphoryliert werden müssen (Chen et al. 2007). Auf diese Weise kann sichergestellt werden, dass die Bruchenden des DSBs erst dann freigegeben werden, wenn die DNA-Schadensantwort in Gang gesetzt und die Kinaseaktivität von ATM aktiviert wurde, und zudem beide DNA-Enden so ausgerichtet vorliegen, dass die trans-Autophosphorylierung von DNA-PK<sub>cs</sub> durchgeführt werden kann. Anschließend kommt es zur Konformationsänderung der DNA-PK relativ zum Bruchende, sodass dieses freigegeben wird und für weitere Prozessierungsschritte und die abschließende Religation zugänglich ist.

Die Ligation wird von einem Komplex aus XRCC4 und DNA-Ligase IV nach Aktivierung durch DNA-PK durchgeführt (Teo & Jackson 2000). Kürzlich konnte Cernunnos/XLF (*XRCC4 like factor*) als weiterer NHEJ-Faktor identifiziert werden, der die Ligation durch XRCC4/DNA-LigaseIV unterstützt. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch ungeklärt (Buck et al. 2006, Ahnesorg et al. 2006).

Neben diesen Kernkomponenten werden mittlerweile auch verschiedene andere Proteine mit NHEJ in Verbindung gebracht. So gibt es Hinweise darauf, dass der Mre11-Rad50-NBS1-Komplex an der Schadenserkenkung und Initiation der DNA-Schadensantwort auch bei anschließender Reparatur durch NHEJ beteiligt sein könnte (Assenmacher & Hopfner 2004). Der Verlauf des NHEJ ist in Abb. 3.8 schematisch dargestellt.



**Abbildung 3.8:** Schematische Darstellung der Nicht homologen Endverknüpfung (*non homologous end-joining*, NHEJ)

Nach der Erkennung und Bindung des DSBs durch das Ku70/Ku80-Heterodimer erfolgt die Rekrutierung der katalytischen Untereinheit der DNA-PK (DNA-PK<sub>cs</sub>) unter Bildung des DNA-PK-Holoenzym. Dieses schützt die Enden des DSBs, hält sie in räumlicher Nähe und sorgt zudem für die Rekrutierung des Ligationkomplexes, der aus XRCC4, LigaseIV und XLF (Cernunnos) zusammengesetzt ist. Abschließend werden die Bruchenden miteinander verknüpft, wobei es jedoch zu Mikrodeletionen kommen kann. ([www.atlasgeneticsoncology.org](http://www.atlasgeneticsoncology.org))

Das NHEJ ermöglicht die Verknüpfung von glatten wie auch von überhängenden Enden. Vor allem durch exogene Einflüsse wie ionisierende Strahlung kommt es jedoch zur Entstehung von Brüchen mit komplizierten Strukturen, wie beispielsweise 3'-Phosphate, 3'-Phosphoglycolate, Zucker- und Basenschäden (Friedberg et al. 2006). Diese können nicht direkt religiert werden und benötigen zusätzliche Prozessierung bevor eine abschließende Verknüpfung der Enden erfolgen kann. Eine Rolle bei der Prozessierung von komplexeren Brüchen in stationären Zellen kommt der Nuklease Artemis zu, die während der V(D)J-Rekombination für das Aufschneiden von Haarnadelstrukturen zuständig ist (Moshous et al. 2001). Etwa 10-15 % der IR-induzierten DSBs zeigen in G0/G1 eine Abhängigkeit von Artemis und bleiben auch nach langen Reparaturzeiten in Artemis-defizienten Zellen unrepariert (Riballo et al. 2004, Kuhne et al. 2004). Epistasisstudien belegen, dass auch ATM an diesem Reparaturweg teilhat (Riballo et al. 2004). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Schadensqualität das Ausmaß des Reparaturdefektes beeinflusst. So ist bei etoposidinduzierten Schäden mit geringer Komplexität in konfluenten Zellen keine Abhängigkeit von ATM und Artemis nachweisbar (Riballo et al. 2004). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass der ATM/Artemis-abhängige Reparaturweg auch in G2 existiert und ebenfalls für 10-15 % der IR-induzierten Brüche essentiell ist (Deckbar et al. 2007). Zudem gibt es Hinweise, dass auch die Lokalisation der DSBs für die Reparatur von Bedeutung ist und ATM in G0/G1 vor allem für Brüche benötigt wird, die mit Heterochromatin assoziiert sind (Goodarzi et al. 2008).

### **3.4. Chromosomeninstabilitätssyndrome in Zusammenhang mit der DNA-Schadensantwort**

#### **3.4.1. Ataxia telangiectasia (AT) und ATM**

*Ataxia telangiectasia* (AT) ist eine mit einer Häufigkeit von 1:40.000 Lebendgeburten (Swift et al. 1986) selten auftretende autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die durch Mutation im AT-Gen auf Chromosom 11 (11q23) ausgelöst wird (Taylor et al. 1975). Dieses codiert für das 370 kDa große Protein ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) (Savitsky et al. 1995), dem eine Schlüsselrolle in der DNA-Schadensantwort zukommt.

ATM gehört zu den Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase-ähnlichen Kinasen (PIKK), phosphoryliert jedoch Proteine und nicht Lipide wie andere PIKKs (Savitsky et al. 1995). Die katalytische Domäne der PIKKs ist etwa 300 Aminosäuren (aa) lang und liegt von zwei FAT-Domänen flankiert nahe dem C-Terminus des Proteins. Beide FAT-Regionen (FAT und FATC) sind an der Regulation der Konformation der dazwischen gelagerten Kinasedomäne beteiligt (Bosotti et al. 2000). *In vivo* liegt ATM als inaktives Dimer vor, wobei die FAT-Domäne des einen die Kinasedomäne des anderen Bindungspartners blockiert und umgekehrt. Nach dem Auftreten von DSBs phosphorylieren sich die Partner gegenseitig an in der FAT-Domäne

lokalisierten Serin1981 um anschließend in zwei aktive Monomere zu zerfallen und Substrate mit einem Erkennungsmotiv aus Serin oder Threonin gefolgt von Glutamin (S/T-Q-Motiv) zu phosphorylieren (Bakkenist & Kastan 2003, Shiloh 2006).

Die Krankheit *Ataxia telangiectasia* ist gekennzeichnet durch fortschreitende Ataxie aufgrund zunehmender Degeneration der Kleinhirnrinde, primäre Immundefizienz, erhöhte Strahlenempfindlichkeit und erhöhtes Krebsrisiko. Zudem treten charakteristische Erweiterungen der Kapillargefäße (Telangiektasien) in der Bindehaut des Auges, im Gesicht und an den Ohren auf (Savitsky et al. 1995). Das Krebsrisiko ist gegenüber der Normalbevölkerung etwa 60-80fach erhöht (Meyn 1997). Auf zellulärer Ebene zeichnet sich das AT-Syndrom durch defekte Zellzyklus-Checkpoints, fehlerhafte Apoptose, defekte p53-Schadensantwort sowie auftretende Chromosomenbrüche und instabile Telomere aus (Lavin & Khanna 1999, Shiloh & Kastan 2001). AT-Zellen weisen eine 3-4fach erhöhte Strahlenempfindlichkeit auf (Taylor et al. 1975). Auch längere Zeit nach IR liegen etwa 10-15 % der induzierten Brüche unrepariert vor (Lobrich et al. 2000). Sie zeigen ebenfalls eine erhöhte Anzahl an Chromosomenaberrationen nach IR (Cornforth & Bedford 1985, Deckbar et al. 2007).

### 3.4.2. AT-ähnliche Syndrome

#### 3.4.2.1. *Nijmegen breakage syndrome* (NBS) und NBS1

NBS ist eine selten auftretende autosomal-rezessive Krankheit verursacht durch die hypomorphe Mutation des NBS1-Gens auf Chromosom 8 (8q21). Etwa 90 % der NBS-Patienten sind homozygot für die Mutation 657del5, die zu einem trunkierten Restprotein führt (Varon et al. 1998), das aber noch Restaktivität aufweist (Kruger et al. 2007). Der Totalverlust von NBS1 ist embryonal lethal (Zhu et al. 2001).

Das NBS1-Gen kodiert für NBS1, p95 oder Nibrin, ein 95 kDa großes Protein, das als Bestandteil des MRN-Komplexes wichtige Funktion in der DNA-Schadensantwort wahrnimmt. Die N-terminale Region weist sowohl eine FHA (*fork-head associated*) als auch eine BRCT (*BRCA1 carboxy-terminal*) Domäne auf, die beide häufig mit Zellzykluskontrolle und DNA-Schadensantwort in Verbindung gebracht werden (Becker et al. 2006). Vermutlich sind diese Regionen verantwortlich für die Interaktion mit  $\gamma$ H2AX (Kobayashi et al. 2002). NBS1 ist ein Substrat von ATM und wird von diesem an mindestens vier Aminosäuren phosphoryliert (Cerosaletti & Concannon 2003). Die C-terminale Region ist verantwortlich für die Interaktion mit Mre11 (Digweed & Sperling 2004).

Das klinische Erscheinungsbild von NBS ist geprägt von Mikrozephalie verbunden mit charakteristisch veränderten Gesichtszügen durch zurückweichende Stirn und Unterkiefer. Außerdem kommt es zu fortschreitender geistiger Retardierung und Wachstumsverzögerung

sowie Immundefizienz, erhöhtem Krebsrisiko und Strahlenempfindlichkeit (Digweed & Sperling 2004).

### **3.4.2.2. *Ataxia telangiectasia like disorder (ATLD) und Mre11***

ATLD ist eine sehr seltene Erkrankung, die auf eine hypomorphe Mutation im Mre11-Gen zurückzuführen ist. Der Totalverlust von Mre11 ist embryonal lethal (Xiao & Weaver 1997). Das Mre11-Gen kodiert für ein 81 kDa Protein mit einer N-terminalen Nuklease-Domäne und zwei DNA-Bindemotiven (deJager et al. 2001), das ebenfalls an der Bildung des MRN-Komplexes teilhat.

Das klinische Erscheinungsbild ähnelt dem von AT-Patienten sehr. Es kommt zum Auftreten von fortschreitender Ataxie, jedoch setzt diese später ein und zeigt einen langsameren und mildereren Verlauf. Einige Patienten zeigen Mikrozephalie bei normaler Intelligenz (Taylor et al. 2004). Im Gegensatz zu AT treten keine Telangiektasien auf, auch Immundefizienz und erhöhtes Krebsrisiko wurden bisher nicht beschrieben (Stewart et al. 1999, Taylor et al. 2004). Auf zellulärer Ebene zeigen sich Strahlenempfindlichkeit und chromosomale Rearrangements vor allem zwischen Chromosom 7 und 14, jedoch in deutlich geringem Maße als bei AT-Zellen (Stewart et al. 1999).

### **3.4.3. *Radiation-sensitive severe combined immunodeficiency (RS-SCID) und Artemis***

Patienten, die einen Defekt im Artemis-Gen aufweisen, leiden unter einer starken Immunschwäche und können daher der Patientengruppe mit schwerwiegender kombinierter Immunschwäche (*severe combined immunodeficiency*, SCID) zugeordnet werden. Daneben liegt aber auch eine massive Strahlenempfindlichkeit vor, weshalb das Krankheitsbild erweitert wurde (*radiation-sensitive severe combined immunodeficiency*, RS-SCID). Eine Reihe verschiedener Mutationen des Artemis-Gens konnten bisher identifiziert werden, darunter auch umfangreiche Trunkationen. Dies deutet darauf hin, dass der Totalverlust von Artemis toleriert werden kann, was auch durch die Generierung von *knockout*-Mäusen bestätigt wurde (Rooney et al. 2002).

Das Artemis-Gen liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 10 und kodiert für ein 78 kDa großes Protein, das zur Familie der Metallo- $\beta$ -Lactamasen gehört (Moshous et al. 2000, 2001). Artemis wurde zunächst eine Rolle in der V(D)J-Rekombination zugeordnet. Dieser Prozess ermöglicht die Bereitstellung einer großen Variabilität von Immunglobulin G (IgG)- und T-Zell-Rezeptoren, indem verschiedene V-(*variability*), D-(*diversity*) und J-(*joining*) Segmente miteinander kombiniert werden. Die Rekombination wird durch RAG1 und RAG2 eingeleitet, dabei kommt es zur Entstehung von Haarnadelstrukturen an den codierenden Sequenzen (van Gent et al. 1996). Diese müssen vor dem korrekten Verknüpfen der

einzelnen Segmente durch die *core*-NHEJ Komponenten XRCC4/DNA-LigaseIV entfernt werden. Artemis besitzt neben einer ssDNA-spezifischen 5'-3'-Exonukleaseaktivität auch Endonukleaseaktivität, die nach Phosphorylierung durch DNA-PK aktiviert wird (Ma et al. 2002, 2005, LeDeist et al. 2004) und für die Auflösung der Haarnadelstrukturen verantwortlich ist.

Mittlerweile konnte Artemis auch eine Beteiligung an der Reparatur von 10-15 % der durch IR induzierten DSBs in der G1-Phase zugeordnet werden (Riballo et al. 2004). Die Bruchenden eines durch IR verursachten DSBs weisen häufig weitere Modifikationen wie beispielsweise Basenschäden auf, die zunächst der Bearbeitung durch die Nukleaseaktivität von Artemis bedürfen, bevor die Kernkomponenten des NHEJ die Bruchenden wieder miteinander verknüpfen können (Riballo et al. 2004, Jeggo & Lobrich 2005). So lässt sich der Bedarf für Artemis durch Induktion von DSBs durch chemische Agenzien wie Etoposid, die vornehmlich DSBs mit einfacher Struktur induzieren, aufheben (Riballo et al. 2004). Außerdem konnte die Beteiligung der Proteinkinase ATM an der Reparatur dieser komplexen Brüche in G1 aufgezeigt werden. Epistasisstudien belegen zudem, dass ATM und Artemis sogar im selben Reparaturweg arbeiten (Riballo et al. 2004). Die genaue Funktion von ATM bei der Reparatur der komplexen Schäden ist allerdings noch nicht abschließend geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass Artemis von ATM und DNA-PK phosphoryliert werden kann (Zhang et al. 2004, Poinson et al. 2004).

Außerdem ist bekannt, dass die Autophosphorylierung von DNA-PK in G1 für die Rekrutierung von Artemis ans Bruchende und für die Ausführung der Endonukleaseaktivität essentiell ist (Goodarzi et al. 2006). Jedoch ist die Phosphorylierung von Artemis durch DNA-PK für die Endonukleaseaktivität nicht unbedingt notwendig (Goodarzi et al. 2006). Mittlerweile gibt es erste Hinweise, dass die Lokalisation der Brüche Einfluss auf den zuständigen Reparaturweg hat. So konnte gezeigt werden, dass ATM in stationären Zellen vor allem bei der Reparatur von Brüchen von Bedeutung ist, die im Heterochromatin lokalisiert sind (Goodarzi et al. 2008).

### **3.5. Karzinogenese in Zusammenhang mit der DNA-Reparatur**

Die DNA-Reparatur ist von immenser Bedeutung bei der Erhaltung der genomischen Integrität. Defekte in DNA-Reparaturwegen stehen in Zusammenhang mit einigen erblich bedingten Erkrankungen, die eine Prädisposition für Krebs aufweisen. Dies lässt sich anhand der großen Komplexität der DNA-Schadensantwort erklären. Sie beinhaltet nicht nur die Reparatur der geschädigten DNA, sondern sorgt auch dafür, dass durch die Regulation des Zellzyklus zusätzlicher Schaden verhindert wird. Außerdem gewährleistet die zusätzliche Verknüpfung mit der Apoptoseregulation, dass Zellen bei zu starkem Schadensausmaß dem programmierten Zelltod zugeführt werden. Gerät dieses komplexe Netzwerk außer Kontrolle, kann es zur Entartung der Zelle und damit zur Entstehung von Krebs kommen.

In den letzten Jahren konnten mehr und mehr Gene identifiziert werden, die in Tumorzellen häufig Veränderungen zeigen. Diese können prinzipiell in zwei große Gruppen unterteilt werden, sind auch in gesunden Zellen vorhanden und vor allem an Regulation von Proliferation und anschließender Differenzierung der Zellen beteiligt. Onkogene wirken fördernd auf das Zellwachstum, während Tumorsuppressorgene dieses hemmen. Tritt eine Mutation von Tumorsuppressor- bzw. Onkogenen in der Keimbahn auf, so führt dies in der Regel zu einer erbliche Prädisposition für eine Krebserkrankung.

So lässt sich beispielsweise bei Brustkrebs, der häufigsten Krebserkrankung bei Frauen (Parkin et al. 1999, Schon et al. 2004), bei etwa 5 % der Erkrankungen und 15-20 % der Fälle von familiär bedingtem Brustkrebs eine Mutation in BRCA1 oder BRCA2 (*breast cancer susceptibility gene*) nachweisen (Brody & Biesecker 1998, Nathanson et al. 2001, Venkitaraman 2002). Bereits die Mutation eines Allels von BRCA1/2 ist ausreichend für eine erbliche Prädisposition, der Verlust des zweiten Allels (*loss of heterozygosity*, LOH) lässt sich konsistent im Tumorgewebe von erblich prädisponierten Personen nachweisen (Venkitaraman 2002). Dies deutet auf eine Funktion von BRCA1/2 als Tumorsuppressorgen hin. Darüberhinaus wird ein heterozygoter BRCA1-Status auch mit einer Prädisposition vor allem für Ovarial-, aber auch Prostata- und Colon-Karzinome (Ford et al. 1999) assoziiert, während ein heterozygoter BRCA2-Status mit einem erhöhten Risiko für Ovarial- aber auch Prostata-, Pankreas-, Gallenblasen-, Magenkarzinomen sowie malignen Melanomen (Nathanson et al. 2001) einhergeht.

### 3.5.1. BRCA1

Frauen mit Mutationen in BRCA1 tragen ein Risiko von 60-80 %, innerhalb ihres Lebens Brustkrebs zu entwickeln (Struewing et al. 1996). Das verantwortliche Gen konnte 1994 identifiziert und auf Chromosom 17 (17q21) lokalisiert werden (Miki et al. 1994). Das BRCA1-Gen besteht aus 22 kodierenden Exons verteilt über mehr als 100 kb DNA und kodiert für ein 220 kDa großes Protein mit einer N-terminalen RING-Domäne und einer konservierten C-terminalen Region mit zwei aufeinanderfolgenden BRCT-Domänen (*BRCA1 carboxy terminus*) (Miki et al. 1994), die mit der Aktivierung der Transkription in Zusammenhang gebracht wird (Chapman & Verma 1996). Mögliche Zielgene von BRCA1 sind beispielsweise Gene der p53-Antwort, darunter p21 und BclX (Zhang et al. 1998). Außerdem konnte die Interaktion des BRCA1-Proteins mit BRCA2 und Rad51, p53, den Komponenten des MRN-Komplexes und anderen Proteinen der DNA-Schadensantwort gezeigt werden (Scully et al. 1997, Scully & Livingston 2000). BRCA1 wird nach dem Auftreten von DNA-Schäden von verschiedenen Kinasen darunter ATM, ATR und Chk2 phosphoryliert (Cortez et al. 1999, Tibbetts et al. 2000, Lee et al. 2000), die Bedeutung dieser Phosphorylierungen ist allerdings noch nicht geklärt. Die N-terminale RING-Domäne erlaubt die Interaktion von BRCA1 mit

BARD1 (BRCA1 associated RING domain) (Wu et al. 1996). Durch Heterodimerisierung mit BARD1 erlangt BRCA1 die enzymatische Aktivität einer E3-Ubiquitin-Ligase (Hashizume et al. 2001, Brzovic et al. 2001). Jedoch ist über die intrazellulären Substrate bisher noch wenig bekannt.

BRCA1 spielt eine bedeutende Rolle in der DNA-Schadensantwort und ist schon sehr früh am Schadensort vorhanden (Paull et al. 2000). Zur Rekrutierung von BRCA1 wird Rad80 gebraucht, das vermittelt durch Abraxas an BRCA1 bindet (Wang et al. 2007) und anschließend Ubiquitinreste an der Schadensstelle erkennt (Sobhian et al. 2007, Kim et al. 2007). Die Bindung von Abraxas an BRCA1 wird durch die BRCT-Domänen am C-Terminus von BRCA1 vermittelt, die spezifisch an Phosphopeptide mit der Sequenz S(P)XXF bindet (Manke et al. 2003). Durch die Interaktion mit dem MRN-Komplex wäre eine Rolle von BRCA1 bei der Resektion denkbar. Darüberhinaus interagiert BRCA1 auch mit Chromatinmodellierungsfaktoren und Regulatoren der Histonacetylierung und -deacetylierung (Cantor et al. 2001). BRCA1 besitzt zudem Phosphorylierungsstellen für Proteinkinasen, die in der DNA-Schadensantwort von Bedeutung sind (Cortez et al. 1999, Lee et al. 2000), was eine Beteiligung von BRCA1 an der Zellzyklusregulation nahe legt.

### 3.5.2. BRCA2

Mutationen in BRCA2 bedeuten für die Trägerinnen ein Risiko von 60-85 % im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs zu erkranken (Nathanson et al. 2001). Das BRCA2-Gen konnte 1995 auf Chromosom 13 (13q12) lokalisiert werden und kodiert für ein 384 kDa großes Protein, das wenig Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen aufweist. In Exon 11 befinden sich acht BRC-Motive von etwa 40 aa Länge, die in Sequenz und Abstand zueinander hochkonserviert sind (Bork et al. 1996) und *in vitro* mit Rad51 interagieren können (Wong et al. 1997). Außerdem gibt es C-terminal eine weitere Rad51-Bindesequenz, die keine Ähnlichkeit zu den BRC-Motiven aufweist (Mizuta et al. 1997). Somit kann Rad51 sehr effizient an BRCA2 gebunden werden, was bei einem beachtlichen Anteil der in der Zelle vorhandenen Proteine der Fall ist. So liegen etwa 80 % der BRCA2-Moleküle gebunden an etwa 25 % des vorhandenen Rad51 vor (Marmorstein et al. 1998). Es konnte gezeigt werden, dass das BRC-Motiv die Interaktionssequenz, die für die Bindung zwischen zwei Rad51 Monomeren im Nukleoproteinfilament zuständig ist, imitiert und diese blockiert, sodass der Polymerisation von Rad51 entgegengewirkt werden kann (Pellegrini et al. 2002). Somit kommt BRCA2 eine Kontrollfunktion zu, die ungewollte Rekombinationsereignisse bei physiologischen Prozessen wie beispielsweise der Replikation, wo ebenfalls ssDNA Bereiche entstehen, verhindern kann. Beim Auftreten von DNA-Schäden kommt BRCA2 nach Empfang des entsprechenden Signals die Aufgabe zu, die gebundenen und damit immobilisierten Rad51-Monomere zum Ort des Schadens zu bringen und bei der Bildung des Nukleoproteinfilaments zu unterstützen (Yuan et

al. 1999). In diesem Kontext ist die C-terminale Region von BRCA2 von besonderer Bedeutung. Sie interagiert mit dem konservierten Protein DSS1 und vermittelt somit die direkte Bindung am Übergang von einzelsträngiger zu doppelsträngiger DNA. Außerdem wird RPA von der ssDNA entfernt, damit Rad51 aufgeladen werden kann (Yang et al. 2002, 2005). Dabei ist eine Interaktion von Rad51 mit dem C-Terminus von BRCA2 wichtig, um das aufgeladene Rad51 vor dem erneuten Angriff durch die BRC-Motive zu schützen (Esashi et al. 2007, Davies & Pellegrini 2007). Die Aktivität von BRCA2 muss durch Signale, möglicherweise posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen, an die jeweilige Situation angepasst werden. Denkbar wäre dann auch eine Beteiligung von BRCA2 bei der Entfernung von Rad51 nach erfolgter Reparatur, über die bisher jedoch relativ wenig bekannt ist (Venkitaraman 2008).

### **3.6. Nachweisverfahren für DNA-Doppelstrangbrüche**

Die Messung von DSBs erlaubt die Beurteilung der Reparaturkapazität von Zellen. In dieser Arbeit wurden verschiedene Verfahren zur Bestimmung des Anteils an unreparierten DSBs eingesetzt. Die Pulsfeldgelelektrophorese ist eine Methode, die auf dem physikalischen Nachweis von durch DNA-Schädigung entstandenen Fragmenten beruht. Allerdings müssen in diesem Verfahren sehr hohe Schadenszahlen induziert werden. Dagegen zeichnet sich der Nachweis von strahlungsinduzierten Foci durch erhöhte Sensitivität aus und kann nach geringen und somit physiologischen Dosen durchgeführt werden. Allerdings beruht die Ausbildung der immunfluoreszenztechnisch nachweisbaren Proteinagglomerate auf der Modifikation bzw. Ansammlung von Proteinen am Schadensort. Es erfolgt somit nicht der direkte Nachweis der geschädigten Struktur. Eine weitere Möglichkeit der Messung von DSBs besteht in der vorzeitigen Kondensation der Chromosomen und der anschließenden Auswertung von Chromosomenschäden. Hier erfolgt der physikalische Nachweis der gebrochenen DNA, auch ist die Applikation von niedrigen Dosen möglich. Allerdings führt nicht jeder DSB zu einem Chromosomenbruch, sodass die Gefahr besteht, die tatsächlich vorhandene Anzahl an DSBs zu unterschätzen. Alle drei Methoden bieten jedoch die Möglichkeit, die Auswirkungen von Defizienzen in reparaturrelevanten Proteinen im Vergleich zu Wildtypzellen abzuschätzen und können aufgrund der unterschiedlichen Ausrichtung zur unabhängigen Bestätigung der gewonnenen Ergebnisse herangezogen werden.

#### **3.6.1. Analyse von strahlungsinduzierten Foci (*ionising radiation induced foci*, IRIFs)**

Eine verbreitete Methode zur Untersuchung von DNA-DSBs beruht auf dem Nachweis von Proteinagglomeraten, die in unmittelbarer Umgebung des DSBs auftreten und die immunfluoreszenztechnisch in Form von diskreten Foci sichtbar gemacht werden können. Da

DSBs vor allem durch IR und radiomimetische Chemikalien induziert werden, bezeichnet man diese Proteinhäufungen als *ionising radiation induced foci* (IRIFs).

Ein häufig verwendetes, focibildendes Protein zur Darstellung von DSBs ist die Histonvariante H2AX, die nach dem Auftreten eines DSB sehr schnell am Ser139 zu  $\gamma$ H2AX phosphoryliert wird. Durch Rückkopplungsereignisse wird das Signal verstärkt, sodass  $\gamma$ H2AX schließlich in einem Bereich von mehreren Mbp um den DSB vorliegt und mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper als Focus mikroskopisch dargestellt werden kann. H2AX macht durchschnittlich etwa 10 % der H2A-Population aus, mit einer relativ großen Varianz zwischen verschiedenen Zelltypen von 2 % bei Lymphozyten bis hin zu 20 % bei SF268, einer humanen Glioma-Zelllinie (Rogakou et al. 1998). H2AX kommt somit im Schnitt in jedem fünften Nucleosom vor. Nach der Phosphorylierungskaskade, die sich im Anschluss an das Auftreten eines DSBs anschließt, liegt etwa 0,03 % des H2AX-Pools in phosphorylierter Form als  $\gamma$ H2AX vor (Shroff et al. 2004). Die Anzahl an  $\gamma$ H2AX-Foci korreliert mit der applizierten Dosis und nimmt mit zunehmender Reparaturzeit ab. In vergleichenden Experimenten mit PFGE (Sedelnikova et al. 2002, Rothkamm & Lobrich 2003) und neutralem Cometassay (Mirzayans et al. 2006) konnte gezeigt werden, dass die Abnahme der  $\gamma$ H2AX-Foci mit der fortschreitenden DSB-Reparatur übereinstimmt. Jeder Focus enthält mehrere hundert  $\gamma$ H2AX-Moleküle und die Foci-Anzahl korreliert eng mit der Anzahl vorhandener DSBs, sodass man annehmen kann, dass jeder DSB durch einen  $\gamma$ H2AX-Focus dargestellt werden kann (Sedelnikova et al. 2002, 2003, Rothkamm & Lobrich 2003).

Die Analyse von  $\gamma$ H2AX-Foci ist eine sehr empfindliche Methode, die die Untersuchung der DSB-Reparatur auf Einzelzellebene und nach sehr niedrigen, physiologischen Dosen ermöglicht. Die Sensitivität der Methode wird außerdem durch die Tatsache erhöht, dass  $\gamma$ H2AX nach DSB-Induktion *de novo* gebildet wird und nicht durchgehend im Zellkern vorhanden ist, was den Hintergrund der Immunfluoreszenzfärbung positiv beeinflusst.

Die  $\gamma$ H2AX-Agglomeration am DSB dient als Plattform für andere Reparaturfaktoren oder Checkpointproteine wie beispielsweise 53BP1, BRCA1, ATM oder die Komponenten des MRN-Komplexes. Diese werden in großer Zahl an den Doppelstrangbruch rekrutiert und können als Foci dargestellt werden, die mit  $\gamma$ H2AX kolokalisieren (Bekker-Jensen et al. 2006, Schlegel et al. 2006). Dagegen bilden Reparaturfaktoren wie beispielsweise Ku70 und Ku80 keine IRIFs aus, da sie nur in geringer Anzahl am DSB auftreten.

Auch HR-Faktoren wie Rad51 oder RPA bilden Foci aus, die allerdings deutlich kleiner sind als  $\gamma$ H2AX (Mikrofoci) und auf die S- und G2-Phase beschränkt sind (Bekker-Jensen et al. 2006, Schlegel et al. 2006). Sie sind in  $\gamma$ H2AX-markierten Bereichen lokalisiert, werden deutlich langsamer gebildet und zeigen Regionen an, in denen HR-Ereignisse stattfinden. Sie ermöglichen so die Unterscheidung zwischen Brüchen, die über HR oder NHEJ repariert werden. Um die Reparatur von DSBs mit Hilfe der  $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenz

zellzyklusphasenspezifisch untersuchen zu können, erfolgt die zusätzliche Detektion von Proteinen, deren Auftreten auf bestimmte Zellzyklusphasen beschränkt ist. So können etwa G2-Zellen durch ein pan-nukleäres Signal des Centromerproteins F (CENP-F) identifiziert werden, das nur in der späten S- und G2-Phase im Zellkern vorhanden ist (Liao et al. 1995, Kao et al. 2001).

Die Analyse von IRIFs ist eine sehr vielseitige Methode, die die Charakterisierung der DSB-Reparatur ermöglicht. Jedoch muss man im Hinterkopf behalten, dass die Methode nicht auf dem direkten Nachweis des DSBs basiert, sondern auf der Detektion von modifizierten oder rekrutierten Proteinen am Schadensort. Nichtsdestotrotz erlaubt der zeitliche Verlauf des Auftretens verschiedener Faktoren der DNA-Schadenskaskade wertvolle Einblicke in die genauen Abläufe der Reparatur, von der Schadenserkennung über die Signalweiterleitung bis hin zur Reparatur der induzierten DSBs.

### **3.6.2. Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)**

Die PFGE wurde erstmals als Methode zur Auftrennung von sehr großen DNA-Fragmenten beschrieben (Schwartz & Cantor 1984). Während die herkömmliche Agarosegelelektrophorese bei Fragmenten von etwa 20 kbp an ihre Grenzen stößt, erlaubt die Pulsfeldgelelektrophorese die Auftrennung von DNA bis zu einer Größe von 10 Mbp. Dabei beruhen beide Verfahren auf dem Prinzip der Wanderung der DNA im elektrischen Feld mit einer Geschwindigkeit, die der Größe des entsprechenden Fragments entspricht. Die zu durchschreitende Agarosematrix erlaubt dabei kleineren Fragmenten eine schnellere Passage als größeren Fragmenten. Während die herkömmliche Agarosegelelektrophorese in einem gleichmäßigen Spannungsfeld durchgeführt wird, ändert sich bei der PFGE in regelmäßigen zeitlichen Abständen die Orientierung des elektrischen Feldes, sodass die aufzutrennenden DNA-Fragmente ihre Richtung anpassen müssen. Dies gelingt kleineren Fragmenten schneller als größeren, sodass diese eine längere Restzeit zur Wanderung im Gel nutzen können. Auf diese Weise können auch sehr große DNA-Fragmente separiert werden. Ein weiterer Unterschied zwischen beiden Methoden besteht in der Vorbereitung der Proben. Zur Vermeidung der weiteren Fragmentierung der aufzutrennenden DNA-Moleküle durch Scherkräfte werden die Zellen in Agaroseblöckchen eingegossen, anschließend komplett lysiert und einem Proteinverdau unterzogen, sodass nur noch die DNA in den Blöckchen erhalten bleibt. Diese werden dann ins Agarosegel eingesetzt und durch PFGE aufgetrennt.

Mittlerweile ist die PFGE als Standardmethode zur Quantifizierung von DSBs etabliert (Lobrich et al. 1993). Dabei variiert die Fragmentgröße der zu analysierenden DNA mit der Dosis, die zur DSB-Induktion eingesetzt wurde, und der Reparaturzeit, die den Zellen im Anschluss an die Bestrahlung gewährt wurde. Je höher die Bestrahlung einer Zelle, desto mehr DSBs werden induziert und desto kleiner wird die Fragmentgröße. Stattfindende Reparatur

vermindert die Anzahl an DSBs wieder, sodass die Fragmentgröße mit zunehmender Reparaturzeit wieder zunimmt. Auf diese Weise kann beispielsweise die Reparaturkapazität von Zelllinien mit unterschiedlichen Defekten in DSB-Reparaturwegen untersucht werden. Die Quantifizierung erfolgt entweder durch Analyse des DNA-spezifischen Fluoreszenzsignals nach Ethidiumbromidfärbung des Gels oder bei  $^3\text{H}$ - oder  $^{14}\text{C}$ -vormarkierten Zellen durch Messung der Radioaktivität in einzelnen Regionen des Gels. Dabei wird das Verhältnis von ins Gel gelaufener DNA zu Gesamt-DNA in beiden Fällen als FAR-Wert (*fraction of radioactivity released*) angegeben. Dieser Wert erlaubt durch Abgleich mit einer durch unterschiedliche Induktionsdosen erstellten Eichkurve eine Beurteilung der verbliebenen Restschädigung. Außerdem kann jeder Probe ein Dosis-Äquivalent zugeordnet werden.

Die klassische PFGE ist auf die Analyse von stationären Zellen in G0/G1 beschränkt, um die Durchmischung von verschiedenen Zellzyklusphasen zu vermeiden.

Durch Anpassung der Versuchsdurchführung ist die Untersuchung der Reparaturkapazität mittels PFGE auch in anderen Zellzyklusphase wie der G2-Phase möglich (Deckbar et al. 2007). Dazu werden die Zellen mit radioaktivem  $^3\text{H}$ -Thymidin pulsmarkiert und erst nach Eintritt in die gewünschte Zellzyklusphase bestrahlt. Nach Durchführung der PFGE erfolgt die Quantifizierung durch Analyse der ins Gel gewanderten Radioaktivität, die eine Aussage über die Reparaturkapazität der markierten Zellen erlaubt.

Die PFGE ist eine vielseitige Methode zur Analyse der DSB-Reparatur. Jedoch müssen zur Analyse der Reparatur von DNA-DSBs sehr hohe, nicht physiologische Bestrahlungsdosen eingesetzt werden.

### **3.6.3. Vorzeitige Chromosomenkondensation (premature chromosome condensation, PCC)**

Nach IR kann es zum Auftreten von Chromosomenbrüchen kommen, wobei diese in der Regel in deutlich geringerer Anzahl vorliegen als DSBs, was zu einem Verhältnis von Chromosomenbruch zu DSB von schätzungsweise 1:3 bis 1:6 führt. Somit kann man davon ausgehen, dass nicht jeder DSB zum Chromosomenbruch wird, aber jeder Chromosomenbruch auf einen DSB zurückzuführen ist. Die Chromosomen liegen in der Interphase des Zellzyklus in dekondensierter Form vor, sodass Chromosomenbrüche hier nicht direkt mikroskopisch sichtbar gemacht werden können. Nur in der kondensierten Form während der M-Phase wird offensichtlich, wenn ein DSB gleichzeitig ein Chromosomenbruch ist. Zur Untersuchung der Chromosomen außerhalb der M-Phase kann die vorzeitige Kondensation der Chromosomen (premature chromosome condensation, PCC) chemisch beispielsweise durch Calyculin A-Behandlung induziert werden (Gotoh & Durante 2006).

Der reguläre Mechanismus, der die Chromosomenkondensation in der späten G2/M-Phase herbeiführt, ist zurzeit noch nicht vollständig geklärt. Ein Schlüsselprotein der Chromosomenkondensation in meiotischen und mitotischen Zellen ist der MPF

(*maturation/**mitosis promoting factor*) (Miake-Lye & Kirschner 1985), ein Komplex aus p34cdc2 und CyclinB (Maller et al. 1989). Die Aktivität von MPF wird durch die Tyrosin-Phosphatase Cdc25 reguliert, die MPF an Tyrosinresten dephosphoryliert (Strausfeld et al. 1991), so aktiviert und die Kondensation des Chromatins initiiert (Moreno et al. 1989). Cdc25 wird ebenfalls durch den Phosphorylierungsstatus reguliert. Autophosphorylierung aktiviert die Phosphataseaktivität von Cdc25, die dann zum Anschalten von MPF und zur Kondensation der Chromosomen führt. Zum Abschalten wird Cdc25 durch die Phosphatasen PP1 und PP2A (*phosphatase type 1/phosphatase type 2A*) dephosphoryliert (Kumagai & Dunphy 1992, Kinoshita et al. 1993).

Calyculin A wirkt als spezifischer Inhibitor von PP1 und PP2A, nimmt so Einfluss auf die Aktivität von Cdc25 und MPF und induziert die frühzeitige Kondensation der Chromosomen (Kumagai & Dunphy 1992, Kinoshita et al. 1993).

Die Beteiligung von CyclinB am MPF ermöglicht aufgrund der oszillierenden Verteilung während des Zellzyklus außerdem die Beschränkung der Chromosomenkondensation auf bestimmte Zellzyklusphasen. In der G1-Phase ist die CyclinB-Konzentration sehr gering, nimmt über S- und G2-Phase zu bis sie in der späten G2-Phase ihr Maximum erreicht, was dem Maximum der MPF-Aktivität entspricht. Daher wird durch Calyculin A-Behandlung PCC auch vor allem in G2-Zellen ausgelöst, während dies in G0-Zellen nicht möglich ist (Durante et al. 1998).

Die Analyse von vorzeitig kondensierten Chromosomen stellt somit eine wertvolle Methode dar, die die Untersuchung der Entstehung und Reparatur von DNA-Schäden nach IR oder Chemikalienbehandlung auf chromosomaler Ebene ermöglicht.

### **3.7. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

DSBs gehören zu den schwerwiegendsten DNA-Schäden und stellen eine ernsthafte Bedrohung der genomischen Integrität einer Zelle dar. Im Wesentlichen erfolgt die Reparatur von DSBs über zwei Reparaturwege. Die HR ist ein sehr genauer Reparaturmechanismus, der die schadhafte Sequenz mit homologen DNA-Bereichen abgleicht und so eine fehlerfreie Reparatur des DSBs ermöglicht. Allerdings birgt dieser Reparaturmechanismus bei der Paarung homologer Chromosomen aufgrund der umfangreichen repetitiven Sequenzen im Säuger genom das Risiko von Fehlpaarungen. Aus diesem Grund wird die HR auf die S- und G2-Phase begrenzt, wo die Chromosomen als Zwei-Chromatid-Chromosom vorliegen und die homologe Paarung somit zwischen Schwesterchromatiden erfolgt. Das NHEJ beruht auf der Religation freier DNA-Enden ohne auf Sequenzhomologien angewiesen zu sein und ermöglicht so die schnelle Reparatur von DSBs in allen Phasen des Zellzyklus. Allerdings ist dieser Prozess nicht fehlerfrei und es kann zum Verlust von kurzen DNA-Sequenzen kommen. Vor einiger Zeit konnte in konfluenten Zellen ein zusätzlicher Unterweg der Reparatur

identifiziert werden, der unter Beteiligung von ATM und Artemis für die Reparatur einer Subpopulation strahleninduzierter DSBs benötigt wird.

Defizienzen in DSB-Reparaturwegen führen zur Ausprägung von klinischen Syndromen, die häufig durch erhöhte Radiosensitivität und erhöhtes Krebsrisiko gekennzeichnet sind. Heterozygote Keimbahnmutationen von reparaturrelevanten Proteinen bedingen oft eine erblichen Krebsprädisposition. So werden beispielsweise BRCA1 bzw. BRCA2 mit einer Prädisposition für Brustkrebs in Verbindung gebracht. Da beide Proteine an der DNA-Reparatur beteiligt sind, könnte der heterozygote BRCA-Status das DSB-Reparaturvermögen beeinflussen. Dadurch könnte für betroffene Frauen ein erhöhtes Risiko der Induktion eines Tumors durch regelmäßige mammographische Bestrahlung vorliegen. Der erste Teil dieser Arbeit widmet sich der Beantwortung dieser Frage. So soll die Reparaturkapazität von primären humanen Fibroblasten mit heterozygoten Mutationen in BRCA1 bzw. BRCA2 sowohl in stationären Zellen als auch in der G1- und G2-Phase von exponentiell wachsenden Zellen untersucht werden.

Darüber hinaus beschäftigt sich diese Arbeit mit der Charakterisierung der DNA-Reparatur in der G2-Phase des Zellzyklus. Die Tatsache, dass in der G2-Phase verschiedene Reparaturwege zur Verfügung stehen, wirft die Frage nach deren Beteiligung an der DSB-Reparatur in dieser Phase des Zellzyklus auf. Zur Untersuchung des Anteils dieser Reparaturwege an der DSB-Reparatur werden primäre humane Zellen mit Defizienzen in unterschiedlichen Reparaturwegen analysiert. Auf diese Weise soll vor allem der Beitrag der HR zur DSB-Reparatur quantifiziert werden. Außerdem soll eine Einordnung von ATM und Artemis in das Zusammenspiel der Reparaturwege in G2 vorgenommen werden. Desweiteren soll untersucht werden, ob die Eigenschaften eines DNA-Schadens Einfluss auf die Wahl des zuständigen Reparaturwegs haben. Dazu soll die Reparatur von unterschiedlichen Schadensarten charakterisiert werden. Durch IR entstehen sehr heterogene DSBs mit unterschiedlichen und teilweise komplizierten Modifikationen der Bruchenden. Dagegen zeigen chemisch induzierte DNA-Schäden aufgrund des immer gleichen Entstehungsmechanismus die gleiche Struktur. In dieser Arbeit wird Etoposid zur chemischen Induktion von DNA-Schäden eingesetzt. Dieses bildet kovalent verknüpfte Protein-DNA-Komplexe, die eine weitere Herausforderung für die DNA-Reparatur-Systeme darstellen.

So kann ein Einblick in das komplexe Zusammenspiel der verfügbaren Reparaturwege gewonnen werden, das die Reparatur von DNA-Schäden ermöglicht und so die Erhaltung der genomischen Integrität gewährleistet.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Biologische Materialien

##### 4.1.1.1. Verwendete Bakterienklone (*E. coli*)

XL1 blue Stratagene  
Genotyp *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15Tn10(Tet<sup>r</sup>)*]

##### 4.1.1.2. eukaryotische Zelllinien

- HSF1 primäre humane Hautfibroblasten eines gesunden Spenders, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. K. Dittmann (Eberhard-Karls-Universität Tübingen), Kultivierung in *Minimal Essential Medium* (MEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS), 1 % *Non essential amino acids* (NEAA), 0,1 mg/ml Streptomycin, 100 Units/ml Penicillin
- C2856 primäre humane Hautfibroblasten eines gesunden Spenders, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Margit Frankenberg-Schwager (Georg-August-Universität, Göttingen), Kultivierung in *Minimal Essential Medium* (MEM) mit 20 % fötalem Kälberserum (FCS), 1 % *Non essential amino acids* (NEAA), 0,1 mg/ml Streptomycin, 100 Units/ml Penicillin
- C2886 primäre humane Hautfibroblasten eines gesunden Spenders, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Margit Frankenberg-Schwager (Georg-August-Universität, Göttingen), Kultivierung in *Minimal Essential Medium* (MEM) mit 20 % fötalem Kälberserum (FCS), 1 % *Non essential amino acids* (NEAA), 0,1 mg/ml Streptomycin, 100 Units/ml Penicillin
- C2906 primäre humane Hautfibroblasten eines gesunden Spenders, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Margit Frankenberg-Schwager (Georg-August-Universität, Göttingen), Kultivierung in *Minimal Essential Medium* (MEM) mit 20 % fötalem Kälberserum (FCS), 1 % *Non essential amino acids* (NEAA), 0,1 mg/ml Streptomycin, 100 Units/ml Penicillin
- 82-6 htert primäre humane Hautfibroblasten eines gesunden Spenders, immortalisiert mit einem htert-exprimierenden (*human telomerase reverse transcriptase*) Retrovirus (Kim et al. 1999), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. R. Schiestl (UCLA Schools of Medicine and Public Health, Los Angeles, USA), Kultivierung in *Minimal Essential Medium* (MEM) mit 20 % fötalem Kälberserum (FCS), 1 % *Non essential amino acids* (NEAA), 0,1 mg/ml Streptomycin, 100 Units/ml Penicillin. Die Expression der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase verhindert die Verkürzung der Telomere und unterbindet somit die Seneszenz der Zellen.
- 180BR primäre humane Hautfibroblasten mit einer hypomorphen homozygoten Mutation (R278H) im Lig4-Gen (Riballo et al. 1999), isoliert aus einem Leukämie-Patienten mit übermäßig starker Bestrahlungsreaktion, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. P. A. Jeggo (University of Sussex, Brighton, UK), Kultivierung in *Minimal Essential Medium* (MEM) mit 20 % fötalem Kälberserum (FCS), 1 % *Non essential amino acids* (NEAA), 0,1 mg/ml Streptomycin, 100 Units/ml Penicillin

- AT1Br primäre humane Hautfibroblasten mit homozygoter Mutation im ATM-Gen (751insSQX + D1853N; Sasaki et al. 1998), isoliert aus einem Patienten mit der Krankheit *Ataxia telangiectasia* (AT), bezogen von der European Collection of animal Cell Cultures (ECACC-Nr. BM0020), Kultivierung in Ham's F10-Medium mit 15 % fötalem Kälberserum (FCS), 0,1 mg/ml Streptomycin, 100 Units/ml Penicillin
- ATLD2 primäre humane Hautfibroblasten mit einer hypomorphen homozygoten Mutation im Mre11-Gen, die zur Trunkation des exprimierten Proteins führt (Stewart et al. 1999), isoliert aus einem Patienten mit der Krankheit *Ataxia telangiectasia like disorder* (ATLD), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. P. A. Jeggo (University of Sussex, Brighton, UK), Kultivierung in Dulbecco's *Minimal Essential Medium* (DMEM) mit 20 % fötalem Kälberserum (FCS), 1 % *Non essential amino acids* (NEAA), 0,1 mg/ml Streptomycin, 100 Units/ml Penicillin
- CJ179 primäre humane Hautfibroblasten mit einem Defekt im Artemis-Gen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. P. A. Jeggo (University of Sussex, Brighton, UK), Kultivierung in *Minimal Essential Medium* (MEM) mit 20 % fötalem Kälberserum (FCS), 1 % *Non essential amino acids* (NEAA), 0,1 mg/ml Streptomycin, 100 Units/ml Penicillin
- CJ htert primäre humane Hautfibroblasten mit einem Defekt im Artemis-Gen, immortalisiert mit einem htert-exprimierenden (*human telomerase reverse transcriptase*) Retrovirus, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. P. A. Jeggo (University of Sussex, Brighton, UK), Kultivierung in *Minimal Essential Medium* (MEM) mit 20 % fötalem Kälberserum (FCS), 1 % *Non essential amino acids* (NEAA), 0,1 mg/ml Streptomycin, 100 Units/ml Penicillin
- F01-240 primäre humane Hautfibroblasten mit einem Defekt im Artemis-Gen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. P. A. Jeggo (University of Sussex, Brighton, UK), Kultivierung in *Minimal Essential Medium* (MEM) mit 20 % fötalem Kälberserum (FCS), 1 % *Non essential amino acids* (NEAA), 0,1 mg/ml Streptomycin, 100 Units/ml Penicillin
- HSC62 primäre humane Fibroblasten mit einer hypomorphen Mutation (IVS19-1, G to A) im BRCA2-Gen (Howlett et al. 2002), isoliert aus einem Brustkrebs-Patienten, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Martin Digweed (Humboldt-Universität, Berlin), Kultivierung in *Minimal Essential Medium* (MEM) mit 20 % fötalem Kälberserum (FCS), 1 % *Non essential amino acids* (NEAA), 0,1 mg/ml Streptomycin, 100 Units/ml Penicillin
- CZD82CH primäre humane Hautfibroblasten mit einer Mutation (657del5) im NBS1-Gen (Stiff et al. 2005), isoliert aus einem Patienten mit *Nijmegen breakage syndrome* (NBS), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. P. A. Jeggo (University of Sussex, Brighton, UK), Kultivierung in *Minimal Essential Medium* (MEM) mit 20 % fötalem Kälberserum (FCS), 1 % *Non essential amino acids* (NEAA), 0,1 mg/ml Streptomycin, 100 Units/ml Penicillin
- GM07166A primäre humane Hautfibroblasten mit homozygoter Mutation im NBS1-Gen (657del5), isoliert aus einem Patienten mit *Nijmegen breakage syndrome* (NBS), bezogen von Coriell Cell Repositories (Katalog ID GM07166), Kultivierung in *Minimal Essential Medium* (MEM) mit 20 % fötalem Kälberserum (FCS), 1 % *Non essential amino acids* (NEAA), 0,1 mg/ml Streptomycin, 100 Units/ml Penicillin



DMEM 20 %	20 %	FCS (v/v), hitzeinaktiviert
	1 %	NEAA
	100 U/ml	P/S
HAM's F10 15 %	15 %	FCS (v/v)
	100 U/ml	P/S

Trypsin-EDTA-Lösung

0,1 %	Trypsin
0,5 mM	Na <sub>2</sub> EDTA pH 8.0
in 1x PBS	

Kryokonservierungslösung für eukaryotische Zellen

60 %	FCS (v/v)
20 %	DMSO (v/v)
20 %	komplettes Kulturmedium (v/v)

MEM, HAM's F10, DMEM	Biochrom
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
NEAA	Biochrom
Trypsin	Biochrom
FCS	Biochrom

bei Bedarf Inaktivierung des Komplements durch Inkubation bei 56 °C für 45 min

Transfektion eukaryotischer Zellen

Nucleofector solution V	Amaxa
-------------------------	-------

Chemikalienbehandlung

DMSO Rotipuran®	Roth
Aphidicolin 1 mg/ml in DMSO	Sigma
Etoposid 100 mM in DMSO	Sigma
Aclarubicin 35 mM in Methanol, eingedampft, zum Versuch aufgenommen in DMSO	Sigma

Inhibitorbehandlung

KU55933: hochspezifischer Inhibitor von ATM  
10 mM in DMSO

freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Graeme Smith, Kudos Pharmaceuticals, Cambridge

NU7026: hochspezifischer Inhibitor der katalytischen Untereinheit der DNA-PK  
10 mM in DMSO

freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Graeme Smith, Kudos Pharmaceuticals, Cambridge

Pulsfeldgelelektrophorese[methyl <sup>3</sup>H] Thymidin

Amersham

Pulsmarkierung von exponentiellen Zellen

BrdU

1 mM in 1x PBS

BD Bioscience

**4.1.3. Material für molekular- und zellbiologische Methoden****4.1.3.1. Aufreinigung und Analyse von DNA**Plasmide

pCIneo-cmyc-WT-Artemis

WT-Artemis *in-frame* kloniert in pCIneo-cmyc-Vektor

freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. P. A. Jeggo (University of Sussex, Brighton, UK)

pCIneo-cmyc-D37N-Artemis

Artemis mit Mutation (D37N), die die Endonukleaseaktivität des Proteins ausschaltet (Pannicke et al. 2004), *in-frame* kloniert in pCIneo-cmyc-Vektor

freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. P. A. Jeggo (University of Sussex, Brighton, UK)

PlasmidaufarbeitungpeqGOLD Plasmid Miniprep Kit II  
NucleoBond®Xtra Maxipeqlab  
Machery-NagelRestriktionsverdau

HindIII

Puffer rot

MBI Fermentas  
MBI FermentasDNA-Agarosegele

Laufpuffer

1x TBE

siehe Standardlösungen

Agarose (*Certified Molecular Biology*)1 % Agarose  
in 1x TBE

Biorad

DNA-Größenstandard

GeneRuler™ DNA Ladder Mix

MBI Fermentas

Ladepuffer, 6x loading dye

MBI Fermentas

Ethidiumbromid

Endkonzentration 1 µg/ml in Laufpuffer

Roth



Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

USB Europe  
Roth

#### 4.1.3.2. Aufreinigung und Analyse von Proteinen

##### Gewinnung von Gesamtprotein

Lysepuffer 50 mM Tris/HCl pH 8.0  
150 mM NaCl  
0,5 % Natriumdesoxycholat  
1 % Triton X-100  
0,1 % SDS  
vor Verwendung Zugabe von 1/25 Volumen Proteaseinhibitor

NaCl Roth  
Natriumdesoxycholat Merck  
Proteaseinhibitor Roche  
SDS Roth  
Tris Roth  
Triton X100 Roth

##### Proteinmengenbestimmung nach Bradford

Bradford-Reagenz Biorad

##### Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Trenngel 12,5 % zum Nachweis von Artemis und GAPDH  
Ansatz für 4 Gele

Substanz	Menge
Lösung A	15 ml
Lösung B	9 ml
H <sub>2</sub> O	12 ml
APS	200 µl
TEMED	20 µl

Sammelgel Ansatz für 4 Gele

Substanz	Menge
Lösung A	2,2 ml
Lösung C	3,8 ml
H <sub>2</sub> O	9 ml
APS	100 µl
TEMED	40 µl

Gellösung A Rotiphorese® Gel 30

Gellösung B 1,5 M Tris/HCl pH 8.8  
14 mM SDS

Gellösung C 495 mM Tris/HCl pH 6.8  
14 mM SDS

Elektrophoresepuffer (1x)  
25 mM Tris/HCl pH 8.8  
0,2 M Glycin  
0,5 % SDS (w/v)

## SDS-Probenpuffer (6x)

120	mM	Tris/HCl	pH 6.8
200	mM	DTT	
10	mM	$\beta$ -Mercaptoethanol	
4	%	SDS (w/v)	
20	%	Glycerin (v/v)	
0,02	%	Bromphenolblau	

## Proteingrößenstandard

PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder

MBI Fermentas

APS

Roth

Bromphenolblau

USB Europe

DTT

Sigma

Glycin

Sigma

Glycerin

USB Europe

Rotiphorese® Gel 30

Roth

SDS

Merck

TEMED

Roth

Tris

Roth

 $\beta$ -Mercaptoethanol

Sigma

Westernblot-Analyse

## Transferpuffer (1x)

20	mM	Tris/HCl	pH 8.3
150	mM	Glycin	

PonceauS 0,5 % PonceauS (w/v)  
in 1 % Essigsäure

## Milchblockpuffer

5	%	Magermilchpulver
0,1	%	Tween®20
in 1x PBS		

## Antikörperverdünnungslösung

1	%	Magermilchpulver
0,1	%	Tween®20
in 1x PBS		

## Waschpuffer

0,1	%	Tween®20
in 1x PBS		

Lumilight-Kit

Roche

Glycin

Sigma

Magermilchpulver

Roth

Ponceau S

Sigma

Tris

Roth

Tween®20

Sigma

Immunologische Methoden

## Formaldehydlösung

2 % Formaldehyd (v/v)  
in 1x PBS

## Tritonlösung

0,25 % TritonX100 (v/v)  
1 % FCS (v/v)  
in 1x PBS

## Wasch- und Antikörperverdünnungslösung

1 % FCS (v/v)  
in 1x PBS

## Blockierungs- und Antikörperverdünnungslösung

5 % BSA (w/v)  
1 % FCS (v/v)  
0,1 % Tween®20 (v/v)  
in 1x PBS

## Inkubationspuffer

60 mM Tris  
0,6 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM β-Mercaptoethanol  
1 µg/ml DNase

## Crosslinklösung

0,2 % Formaldehyd (v/v)  
in 1x PBS

## DAPI

0,2 µg/ml in 1x PBS

Sigma

## DNase

1 mg/ml in 50 % Glycerin + 0,15 M NaCl

Roche

## Glycerin

USB Europe

## NaCl

Roth

## BSA, Albumin Fraktion V

Roth

## Formaldehyd, 37 %

Roth

MgCl<sub>2</sub>

Roth

## Mounting medium Vectashield®

Axxora Alexis

## Tris

Roth

## Triton X100

Roth

## Tween®20

Sigma

## β-Mercaptoethanol

Sigma

Durchflusszytometrische Methoden

## Denaturierungslösung

2 M HCl (v/v)  
in H<sub>2</sub>O

## Renaturierungslösung

0,1 M Natrium-Tetraborat pH 8.5  
in H<sub>2</sub>O

## Propidiumiodidlösung

50 µg/ml Propidiumiodid  
 0,5 mg/ml RNaseA  
 in 1x PBS

## RNaseA

10 mg/ml PBS, 20 min bei 75 °C hitzeinaktiviert

Sigma

## EtOH (vergällt)

Chemikalienlager TU  
 Darmstadt

## HCl

Natrium-Tetraborat-Decahydrat

Propidiumiodid

Roth  
 Roth  
 Roth

**4.1.4. Antikörper**Immunfluoreszenz

mouse  $\alpha$  c-myc

mouse  $\alpha$   $\gamma$ H2AX (Ser139)

rabbit  $\alpha$  CENP-F

rabbit  $\alpha$   $\gamma$ H2AX (Ser139)

rabbit  $\alpha$  Rad51

sheep  $\alpha$  BrdU

Santa Cruz  
 Upstate  
 Santa Cruz  
 Cell signaling  
 technologies  
 Calbiochem  
 US Biological

goat  $\alpha$  mouse Alexa Fluor 488®

goat  $\alpha$  mouse Alexa Fluor 594®

goat  $\alpha$  rabbit Alexa Fluor 488®

goat  $\alpha$  rabbit Alexa Fluor 594®

donkey  $\alpha$  sheep 594

MolecularProbes  
 MolecularProbes  
 MolecularProbes  
 MolecularProbes  
 MolecularProbes

FACS

mouse  $\alpha$  BrdU, fertige Gebrauchslösung

*FITC conjugated mouse monoclonal antibodyset*

BD Bioscience

Westernblot

rabbit  $\alpha$  Artemis

rabbit  $\alpha$  GAPDH

Novus biologicals  
 Santa Cruz

goat  $\alpha$  rabbit, HRP-gekoppelt

MolecularProbes

**4.1.5. Standardlösungen**

PBS

PBS Dulbecco Instamed Pulver

Biochrom

TE

10 mM Tris-HCl pH 7.4  
 1 mM EDTA pH 8.0

TBE

44,5 mM Tris  
 44,5 mM Borsäure  
 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA pH 8.0

Borsäure	Roth
Na <sub>2</sub> EDTA	Roth
Tris	Roth

#### 4.1.6. Verbrauchsmaterialien

6-Loch-Platten	Greiner
Deckgläser für Neubauer-Kammer, rechteckig	Roth
Deckgläser, Ø 15mm	Roth
Einfrierröhrchen CryoPure, 2 ml	Sarstedt
Filterpapier, Whatman	Schleicher&Schüll
Gelladespitzen	Nikon
Küvetten (Kunststoff)	Roth
Latexhandschuhe Ansell Derma Clean	VWR
Nitrilhandschuhe Neoprotect	Neolab
Objekträger superfrost	Roth
Parafilm	Roth
Pasteurpipetten, Glas	Roth
Pasteurpipetten, Kunststoff	Roth
Pipettenspitzen	Sarstedt
Pipettenspitzen, gestopft	Roth
PVDF-Membran	GE Healthcare
Reaktionsgefäße SafeSeal 1,5 ml, 2 ml	Roth
Rundbodenröhrchen für FACS	BD Bioscience
Spritzen	BD
Sterilfilter (Rotilabo 0,22 µm)	Roth
Szintillationsgefäße Polyethylenvials™, 20 ml	Perkin Elmer®
Transfektionsküvetten	Amaxa
Wischtücher KimWipes	Neolab
Zellkulturflaschen 25 cm <sup>2</sup>	Biochrom
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Biochrom
Zellkulturschalen 100x20 mm	Biochrom
Zellkulturschalen Nunclon 35x10 mm	VWR
Zellkulturschalen Nunclon 60x15 mm	VWR
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Neolab

#### 4.1.7. Geräteliste

Agarosegel-Elektrophoresekammer	Gibco
Chemilumineszenz-Detektionsgerät	Vilber Lourmat
Durchflusszytometer FACScan™	Becton Dickinson
Einfrierbox MrFreeze	Nalgene
Elektrophorese Blotapparatur	Biorad
Fluoreszenzmikroskope AxioPlan2, Axioskop, Axioobserver	Zeiss
Folienschweißgerät	HitCompany
Heizplatte	Präzitherm
Inversmikroskop (Zellkultur) Eclipse TS100	Nikon
Kamerasystem AxioCam MRm	Zeiss
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr
Kühltruhe -70 °C Herafreeze	Thermo
scientific	
Kühlzentrifuge 5804R, 5810R, 5415R	Eppendorf
Laborwaage	Sartorius

Magnetrührer	Variomag
Mikroliterpipetten	Gilson
Mikrowellengerät	Exquisit
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld
pH-Meter pMX2000	WTW
Pipettierhilfe Pipetboy	Integra
Polyacrylamidgel-Elektrophoresekammer	Biorad
Power Supply	Pharmacia biotech
Pulsfeld-Gelelektrophorese-System Chef-DR® III	Biorad
Röntgenröhre MCN 165/796704	Philips
Spektralphotometer Ultrospec 3000pro	Amersham
Sterilwerkbänke Herasafe	Thermo scientific
Stickstofftank Locator 8+	Thermolyne
Szintillationszähler Tri-Carb 2700 TR	Packard
Thermomixer	Eppendorf
Tischschwenkplatte	Fröbel
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Transfektionssystem	Amaxa
Ultraschallgerät Sonorex	Bandelin
UV-Tisch	Biometra
Vortex genie2	Scientific industries
Wasserbad	Memmert
Zellkulturinkubator Heracell	Thermo scientific

#### 4.1.8. Computerprogramme

Adobe Acrobat Reader	Adobe Inc.
Adobe Photoshop	Adobe Inc.
CellQuest	Becton Dickinson
Chemi-Capt	Vilber Lourmat
CorelDRAW®	Corel corp.
CorelPHOTO-PAINT®	Corel corp.
ImageJ	NIH Software
ISIS	Metasystems
Metafer	Metasystems
Microsoft Office	Microsoft corp.
Pubmed/Medline	NIH Software

## 4.2. Methoden

### 4.2.1. Manipulation von DNA

#### 4.2.1.1. Aufreinigung von bakterieller DNA (kleiner Maßstab)

Zur Gewinnung kleinerer DNA-Mengen wurde das peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II (peqlab) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

#### 4.2.1.2. Aufreinigung von bakterieller DNA (großer Maßstab)

Zur Gewinnung größerer DNA-Mengen wurde das *Plasmid DNA Purification Kit* NucleoBond® Xtra Maxi (Machery Nagel) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

#### 4.2.1.3. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Mit Hilfe einer photometrischen Messung der Absorption (A) bei 260 bzw. 280 nm kann Reinheit und Konzentration einer Nukleinsäurelösung ermittelt werden. Dazu wurde eine Verdünnung der entsprechenden Nukleinsäure hergestellt und in einer Quarzküvette im Photometer vermessen. Zu Referenzzwecken wurde die Extinktion des Lösungsmittels gemessen und zum Nullausgleich genutzt. Folgende Formel erlaubte eine Konzentrationsberechnung:

$$\text{dsDNA: } c = A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \mu\text{g/ml}$$

Zur Beurteilung der Reinheit einer Nukleinsäure wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm gemessen. Der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  sollte etwa 2 betragen. Ein niedrigerer Wert ( $<1,8$ ) deutet auf einen erhöhten Proteingehalt hin, ein höherer Wert ( $>2,2$ ) auf phenolische Verunreinigung.

#### 4.2.1.4. Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Dabei wandert die DNA aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatgruppen im elektrischen Feld in Richtung Anode. Die engmaschige Agarosematrix erlaubt dabei kleineren DNA-Molekülen eine schnellere Passage als größeren, sodass kleine Fragmente in der gleichen Zeit eine längere Laufstrecke bewältigen und daher im unteren Bereich des Gels zu finden sind. Die Detektion erfolgt nach Zugabe der interkalierenden Substanz Ethidiumbromid unter UV-Bestrahlung.

Für ein 1 %iges Agarosegel wurde 1 g Agarose in 100 ml 1x TBE eingewogen, aufgeköcht und nach Ausgleich der dabei verdampften Flüssigkeitsmenge bei einer Temperatur von ca. 50 °C zum Gießen des Agarosegels verwendet. Nach dem Erkalten wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer überführt und mit 1x TBE-Puffer bedeckt.

Die aufzutragenden Proben wurden mit 1/6 Volumen 6x BPB-Ladepuffer versetzt und in die Taschen gefüllt. Um Größenbestimmung und Quantifizierung zu ermöglichen, wurde zusätzlich ein DNA-Größenstandard aufgetragen.

Nach erfolgter Gelelektrophorese für 60-80 min bei 80-120 V wurde das Gel für 3-4 h im Ethidiumbromidbad gefärbt, anschließend in Laufpuffer entfärbt. Die analytische Auswertung erfolgte unter kurzweiliger UV-Bestrahlung (254 nm).

#### 4.2.1.5. Restriktionsverdau

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Restriktionsverdau zur Kontrolle der vermehrten Plasmid-DNA verwendet. Der Verdau wurde in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt, eingesetzt wurde 1 µl Plasmid-DNA, 1 µl des verwendeten Restriktionsenzym HindIII sowie 1 µl des empfohlenen Puffers, die Differenz zum gewünschten Volumen von 10 µl wurde mit sterilem H<sub>2</sub>O ausgeglichen. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert, anschließend mit

6x DNA-Probenpuffer versetzt und mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese (4.2.1.4) analysiert.

## 4.2.2. Analyse von Proteinen

### 4.2.2.1. Gewinnung von Gesamtprotein

Zur Gewinnung von Gesamtprotein wurde der Zellrasen vor der Ernte zweimal mit 1x PBS gewaschen, anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Petrischale gelöst und in 1x PBS aufgenommen. Nach Zentrifugation bei 300 g und 4 °C für 7 min wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 1x PBS gelöst und erneut zentrifugiert (300 g, 4 °C, 7 min). Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet je nach Größe in 100-200 µl Lysepuffer, der zuvor im Verhältnis 1:25 mit Proteaseinhibitor versetzt wurde, resuspendiert. Zum Aufschluss der Zellen wurde die Zellsuspension dreimal für je 1 min im eisgekühlten Ultraschallbad sonifiziert. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis wurde die Probe für 30 min bei 13.000 g und 4 °C zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Probe konnte über kurze Zeit bei -20 °C gelagert werden, längerfristige Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### 4.2.2.2. Proteinmengenbestimmung nach Bradford

Bradford-Reagenz enthält den Farbstoff *Coomassie Brilliant blue*, der nach einer Reaktion mit den sauren Aminosäureseitenketten von Proteinen sein Absorptionsverhalten ändert.

Die Proteinmengenbestimmung wurde in einem Volumen von 1 ml durchgeführt. Zu 800 µl H<sub>2</sub>O wurde 1 µl der zu bestimmenden Probe gegeben. Nach Zugabe von 200 µl Bradfordreagenz wurde gevortext, nach 5minütiger Inkubation erfolgte die Bestimmung der OD im Photometer bei 595 nm.

Zur absoluten Konzentrationsbestimmung wurde eine BSA-Eichgerade angefertigt, an der man entsprechend der gemessenen Absorption abzüglich eines Nullwertes die Proteinmenge ablesen konnte. Der Nullwert entsprach dabei der Absorption bei einer Reaktion von H<sub>2</sub>O ohne vorhandenes Protein mit Bradfordreagenz.

### 4.2.2.3. Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese können Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Native Proteine unterscheiden sich in ihrer Aminosäurezusammensetzung und weisen damit charakteristische Ladungen auf. Somit zeigen sich deutliche Unterschiede in Sekundär- und Tertiärstruktur verschiedener Proteine, die sich im Laufverhalten der Proteine äußern. Das Laufverhalten eines nativen Proteins leitet sich daher nicht direkt von Größe und Ladung ab.

Bei der denaturierenden Gelelektrophorese werden die Proteine mit β-Mercaptoethanol und Natriumdodecylsulfat (SDS) behandelt: β-Mercaptoethanol zerstört Disulfidbrücken, während sich SDS an die Aminosäureseitenketten anlagert, so Wechselwirkungen verhindert und zu einer gestreckten Konformation des Proteins beiträgt. Außerdem erhält das Protein durch die negative Sulfatgruppe des angelagerten SDS eine der Größe entsprechenden Ladung, sodass jetzt eine proportionale Auftrennung entsprechend der Größe des jeweiligen Proteins möglich ist. Die verwendete diskontinuierliche denaturierende PAA-Gelelektrophorese nutzt unterschiedliche Acrylamidkonzentrationen und pH-Werte im zweiphasigen Gel zur Verbesserung der Auftrennungsleistung. Das obere Viertel des PAA-Gels (= Sammelgel) zeichnet sich durch einen niedrigen Acrylamidgehalt und leicht sauren pH-Wert (pH 6.8) aus, während im unteren Bereich (= Trenngel) eine Acrylamidkonzentration von 10-15 % und ein leicht basischer pH-Wert vorliegt. Die pH-Unterschiede sorgen durch den so genannten „steading effect“ an der Grenzlinie zwischen Sammel- und Trenngel für eine schärfere Auftrennung der Proteine. Im Sammelgel liegt das im Laufpuffer vorhandene Glycin bei pH 6.8

als Zwitter-Ion vor, es kann somit nur relativ langsam durch die engmaschige Acrylamid-Matrix laufen. Dadurch werden die schneller laufenden Proteine an der Grenzlinie zusammengestaucht (= steading effect). Im Trenngel verliert Glycin seine Ladung bei pH 8.8 und kann viel schneller durch die Gelmatrix laufen und die Proteine überholen, die nun entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden können.

Das Trenngel mit 12,5 % Acrylamid wurde zunächst in die Gießkammer gefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Sammelgel gegossen, in das dann der Kamm eingebettet wurde. Das auspolymerisierte Gel wurde in eine Gelkammer eingespannt. Nach Einfüllen von 1x Elektrophorese-Puffer wurde der Kamm entfernt und die Taschen gespült. Die aufzutragenden Proben wurden mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt, gut gemischt und für eine vollständige Denaturierung der Proteine 5 min bei 95 °C inkubiert. Nach kurzem Anzentrifugieren wurden die Proben mit Gelladespitzen in die Taschen des Gels eingefüllt. Zusätzlich wurden 5 µl eines Standardgrößenmarkers aufgetragen. Nach der Beladung der Taschen konnte die Elektrophorese bei 25 mA für 1,5-2 h durchgeführt werden. Nach abgeschlossenem Gellauf wurde das Gel aus der Kammer entfernt und konnte nach dem Abtrennen des Sammelgels mittels Westernblot (4.2.2.4) analysiert werden.

#### 4.2.2.4. Westernblot-Analyse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Immunoblot dazu verwendet, die (Über-) Expression bestimmter Proteine nach Transfektion eukaryotischer Zellen zu analysieren.

Um Proteine durch den Einsatz spezifischer Antikörper im Westernblot nachzuweisen, wurden diese zunächst über SDS-PAGE (4.2.2.3) elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran übertragen. Dazu wird ein senkrecht zum Gel gelagertes elektrisches Feld angelegt, sodass die Proteine aus dem Gel auf die Membran wandern und dort aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften bleiben. Für den Transfer der Proteine vom Polyacrylamidgel auf die PVDF-Membran wurde das Tank-Blot-Verfahren mit folgendem Aufbau angewandt: Auf ein in Transferpuffer getränktes Pad folgten drei zugeschnittene und ebenfalls puffergetränkte Whatman-Filterpapiere. Anschließend folgte die in Methanol aktivierte PVDF-Membran, auf die das PAA-Gel luftblasenfrei aufgebracht wurde. Den Abschluss bildeten wiederum drei puffergetränkte Whatman-Papiere sowie ein puffergetränktes Pad. Nach dem Entfernen möglicher Luftblasen konnte der Blotaufbau verschlossen und in den Tank eingebracht werden. Die im Gel befindlichen Proteine wandern aufgrund ihrer negativen Ladung zur Kathode, die Membran musste daher zwischen PAA-Gel und Kathode lokalisiert sein. Nach dem Befüllen des Tanks mit 1x Transferpuffer erfolgte der Proteintransfer bei 100-120 mA über Nacht. Die Übertragung der Proteine konnte über eine unspezifische Färbung der Membran mit Ponceau S überprüft werden. Nach Entfärbung des Blots unter fließendem Wasser wurden die restlichen freien Bindestellen der Membran durch eine Inkubation von mindestens 1 h bei RT in 5 % Blockmilch blockiert. Die Membran wurde kurz in 1x PBS/0,1 % Tween®20 gewaschen und über Nacht bei 4 °C mit dem in 1 % Blockmilch verdünnten Erstantikörper unter Schwenken inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch gründliches Waschen in 1x PBS/0,1 % Tween®20 entfernt (2 x kurz spülen, 2 x 10min). Zur Detektion der spezifisch gebundenen Erstantikörper wurde ein gegen diesen gerichteter Zweitkörper, gekoppelt an Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP), eingesetzt. Dieser wurde ebenfalls in 1 % Blockmilch verdünnt und für 1 h bei RT unter Schwenken inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift in 1x PBS/0,1 % Tween®20 (2 x kurz schwenken, 2 x 10 min) konnte der Blot entwickelt werden. Der spezifische Nachweis der Proteine erfolgte mit Hilfe der Chemilumineszenz, die durch die immobilisierte Meerrettich-Peroxidase vermittelt wird. Luminol und Enhancer-Lösung des verwendeten Lumilight kit wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und 1 min auf der Membran inkubiert. Nach dem Abtrocknen der Membran konnte die Detektion im Chemilumineszenz-Gerät vollzogen werden.

### 4.2.3. Kultivierung und Manipulation von Bakterien

#### 4.2.3.1. Anlegen von Glycerinkulturen

Um Bakterien über einen längeren Zeitraum konservieren zu können wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurde 0,5 ml Bakterienkultur mit 0,5 ml Glycerin (100 %) versetzt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Glycerolstocks erfolgte bei -80 °C. Bei Bedarf wurden aus diesen Kulturen neue Übernachtskulturen angelegt.

#### 4.2.3.2. Kultur von Bakterien

Der verwendete *E. coli*-Bakterienstamm wurde unter Schütteln (200 rpm) bei 37 °C i. d. R. über Nacht inkubiert. Als Kulturmedium diente LB-Medium, dem das Antibiotikum Ampicillin zur Selektion in einer Konzentration von 100 µg/ml zugegeben wurde.

#### 4.2.3.3. Transformation von Bakterien mittels Hitzeschock

Ein Aliquot mit 200 µl kompetenten *E. coli* XL1-blue wurde auf Eis aufgetaut, mit 5 µl der zu transformierenden Plasmid-DNA versetzt und vorsichtig gemischt. Um zu gewährleisten, dass das Plasmid gleichmäßig um die Bakterienzellen verteilt vorlag, erfolgte eine 30minütige Inkubation auf Eis. Zur Aufnahme der Plasmid-DNA in die Zelle wurde der Ansatz einem Hitzeschock von 90 sec bei 42 °C ausgesetzt und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde der Ansatz in sterile Reagenzgläser übertragen und für 1 h bei 37 °C geschüttelt. 50 bzw. 200 µl des Transformationsansatzes wurden auf LB-Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelne Kolonien konnten zum Animpfen einer Vorkultur verwendet werden.

### 4.2.4. Kultivierung und Manipulation eukaryotischer Zellen

#### 4.2.4.1. Kultur von Säugerzellen

Die verwendeten eukaryotischen Zellen wurden im jeweils geeigneten Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Zur Subkultivierung wurden die adhärennten Zellen nach Abnehmen des Mediums mit 1x PBS überspült, um Mediumreste zu entfernen. Zum Ablösen der Zellen aus dem Zellverband schloss sich eine 5-10minütige Inkubation in Trypsin-EDTA-Lösung an. Nach Aufnahme der Zellen in frischem Medium wurde eine der Splitrate (1:2 bis 1:3 für primäre Zellen) entsprechende Menge der Zellsuspension in neue Zellkulturgefäße überführt und mit einer ausreichenden Menge an Medium aufgefüllt.

#### 4.2.4.2. Kryokonservierung von Säugerzellen

Eukaryotische Zellen können zur langfristigen Lagerung bei -80 °C bzw. in flüssigem Stickstoff (-197 °C) aufbewahrt werden. Dazu wurden die Zellen zunächst durch Trypsin-EDTA-Behandlung von der Oberfläche der Zellkulturflasche abgelöst und in frischem Medium aufgenommen. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension zentrifugiert (8 min, 300 g, 4 °C) und in 0,8 ml gekühltem Vollmedium pro einzufrierendem Aliquot aufgenommen. Die Suspension wurde mit der gleichen Menge an gekühltem Einfriermedium versetzt und nach der Überführung von 1,6 ml pro Aliquot in gekühlte Kryoröhrchen erfolgte das schonende Herunterkühlen (1 °C/min) der Probe auf -80 °C in speziellen Einfrierboxen. Zur langfristigen Lagerung wurden die Kryoröhrchen nach 1-2 Tagen bei -80 °C in flüssigen Stickstoff transferiert.

Das Auftauen von konservierten Zellen erfolgte schnellstmöglich bei 37 °C im Wasserbad, um Schädigungen der Zellen durch das dem Einfriermedium zugesetzte DMSO zu minimieren. Nach Überführung in 5 ml angewärmtes Kulturmedium wurde für 8 min bei 300 g zentrifugiert,

das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert, in eine Zellkulturflasche gegeben und bei den beschriebenen Zellkulturbedingungen kultiviert.

#### 4.2.4.3. Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität mit der Neubauer-Zählkammer

Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer konnte die Zellzahl in einer Zellsuspension bestimmt werden. Zunächst wurden die Zellen durch Trypsin-EDTA-Behandlung von der Oberfläche gelöst und in frischem Kulturmedium aufgenommen. Ein Aliquot dieser Suspension wurde in einem Volumen von 10  $\mu\text{l}$  in die Neubauer-Zählkammer eingebracht. Die auszuzählende Fläche von 16 Zählquadraten fasst ein Volumen von 0,1  $\mu\text{l}$ , sodass die auf 16 Quadraten ermittelte Zahl multipliziert mit  $1 \times 10^4$  der Zellzahl pro ml Zellsuspension entspricht. Die Genauigkeit der Zellzahlbestimmung ließ sich durch Auszählen mehrerer 16er-Quadrate und Bilden des entsprechenden Mittelwertes erhöhen.

Zur Bestimmung der Zellvitalität konnte der Zellsuspension Trypanblau zugegeben werden. Dieser Farbstoff dringt selektiv in tote Zellen ein und färbt diese dunkelblau. Beim Auszählen wurden nur lebende, ungefärbte Zellen berücksichtigt.

Zur besseren Vergleichbarkeit von Experimenten mit exponentiellen Zellen wurden diese zwei Tage vor dem Versuch in einer bestimmten Zellzahl ausgesät (10.000 Zellen pro  $\text{cm}^2$ ). Für durchflusszytometrische Ansätze wurden kleine Zellkulturflaschen ( $25 \text{ cm}^2$ ) gewählt, chromosomale Studien und Pulsfeld-Experimente wurden in großen Zellkulturflaschen ( $75 \text{ cm}^2$ ) durchgeführt und für immunologische Ansätze wurden die Zellen auf Deckgläsern ( $\text{Ø } 15 \text{ mm}$ ) ausgesät.

#### 4.2.4.4. Transfektion eukaryotischer Zellen

Bei einer Transfektion wird DNA in eukaryotische Zellen eingebracht. Bei der in dieser Arbeit durchgeführten transienten Transfektion bleibt die DNA als Episom in der Zelle erhalten, während eine stabile Transfektion durch die Integration der transfizierten DNA ins Genom der Zelle gekennzeichnet ist.

In dieser Arbeit wurde eine Transfektion von primären humanen Fibroblasten mittels Elektroporation durchgeführt. Dabei werden durch einen elektrischen Puls kleine Löcher in der Zellmembran erzeugt, durch die die zugegebene DNA eindringen kann und die sich innerhalb von Millisekunden wieder verschließen. Die verwendeten primären humanen Fibroblasten wurden zwei Tage vor der Transfektion im Verhältnis 1:2 passagiert, um zu gewährleisten, dass die Zellen im logarithmischen Wachstum begriffen waren. Zunächst wurden die Zellen durch Trypsin-EDTA-Behandlung von der Oberfläche gelöst, in frischem Medium aufgenommen und nach Bestimmung der Zellzahl für 10 min bei 90 g und RT pelletiert. Nach sorgfältigen Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in 100  $\mu\text{l}$  vorgewärmter Nucleofector solution V pro Ansatz mit  $1-1,5 \times 10^6$  Zellen resuspendiert. Zu jedem Ansatz wurde 2,5  $\mu\text{g}$  der gewünschten Plasmid-DNA bzw. 1,5  $\mu\text{g}$  des GFP-Kontrollplasmids gegeben. Anschließend wurde die Suspension luftblasenfrei in die Elektroporationsküvette überführt, verschlossen und ins Gerät überführt. Nach der Elektroporation (Programm V020) erfolgte die Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  vorgewärmtem Zellkulturmedium. Die behandelte Zellsuspension wurde sofort aus der Küvette entnommen und in vorbereitete 6Loch-Platten mit 2 ml vorgewärmtem Medium gegeben, die zusätzlich mit Deckgläsern bestückt waren. Nach 24stündiger Inkubation bei Standardzellkulturbedingungen konnten die Zellen für das jeweilige Experiment verwendet werden.

#### 4.2.5. Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen

Bei der Durchführung von Experimenten mit exponentiellen Zellen wurde direkt nach erfolgter Doppelstrangbruchinduktion der Polymeraseinhibitor Aphidicolin in einer Konzentration von 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  zugegeben und bis zur Ernte auf den Zellen belassen. Durch die erfolgte Replikationsblockade wurde ein Fortschreiten der Zellen von der S- in die G2-Phase und somit eine Verfälschung der Ergebnisse durch nicht in G2 behandelten Zellen verhindert.

#### 4.2.5.1. Röntgenbestrahlung

Die Bestrahlung der Zellen wurde in einer Röntgenröhre mit Wolfram-Anode bei einer Spannung von 90 kV und einer Stromstärke von 19 mA durchgeführt. In der verwendeten Bestrahlungshöhe von 30 cm über dem Austrittsfenster konnte somit nach Filterung durch 2 mm Aluminium eine Dosisleistung von 1,96 Gy/min erreicht werden. Diese wurde durch Fricke-Dosimetrie sowie durch Messung mit einem PTW-Weichstrahlkammer-Dosimeter bestimmt und in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Bei lang andauernden Bestrahlungen für PFGE-Experimente wurde das Aluminiumblech heruntergekühlt, um DNA-Reparatur während der Bestrahlungszeit zu unterdrücken und eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden. Bei der Bestrahlung von auf Glasdeckgläsern wachsenden Zellen musste ein zusätzlicher Gewichtungsfaktor berücksichtigt werden, der sich durch Wechselwirkung der Röntgenbestrahlung mit Glas erklärt. Durch Photoeffekt entstehen zusätzliche Sekundärelektronen, die die adhären Zellen erreichen und schädigen können, die jedoch nicht durch Fricke-Dosimetrie oder ein Dosimeter detektiert werden können. Die effektiv verabreichte Dosis ist somit bei Bestrahlung auf Glasdeckgläsern um etwa Faktor 2 höher als bei Bestrahlung auf Kunststoffoberflächen wie z. B. Zellkulturflaschen (Kegel et al. 2007). Dieser Umstand wurde bei allen Dosisangaben in der vorliegenden Arbeit berücksichtigt.

#### 4.2.5.2. Chemikalienbehandlung

##### 4.2.5.2.1. Etoposid

Etoposid ist ein Topoisomerase II-Gift, das das Enzym nach der Einführung des zur Entwindung des DNA-Stranges notwendigen DNA-Doppelstrangbruchs blockiert und somit das Wiederverbinden der Strangenden verhindert. Es kommt zur Ausbildung von Doppelstrangbrüchen, wobei das Enzym am Strangende gebunden bleibt (Liu et al. 1989).

Zur Untersuchung der Reparatur etoposidinduzierter DSBs in G0/G1 wurden die Zellen auf Deckgläsern ausgesät und bis zur vollständigen Konfluenz etwa 2-3 Wochen bei regelmäßigem Mediumwechsel kultiviert. Die Schadensinduktion erfolgte während einstündiger Behandlung mit 20  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 300  $\mu\text{M}$  Etoposid bei 37 °C, anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen, mit frischem Medium versetzt und bis zum Ablauf der jeweiligen Reparaturzeit bei 37 °C inkubiert.

G2-Zellen reagieren sensitiver auf Etoposid, daher wurden bei Reparaturstudien in G2 Etoposidkonzentrationen von 2  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$  Etoposid auf exponentiell wachsenden Kulturen eingesetzt. Die Schadensinduktion erfolgte analog zu konfluenten Kulturen für 1 h bei 37 °C, nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS wurde frisches Medium zugegeben und bis Ablauf der Reparaturzeit bei 37 °C inkubiert.

##### 4.2.5.2.2. Aclarubicin

Aclarubicin ist ein Topoisomerase II-Inhibitor, der in die DNA interkaliert und somit die Kontaktaufnahme des Enzyms mit und die Bindung an die DNA verhindert. Es kommt nicht zur Entstehung von DSBs (Jensen et al. 1990).

Die Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesetzt und bis zur vollständigen Konfluenz etwa 2-3 Wochen kultiviert. Die Aclarubicinbehandlung erfolgte in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  für 30 min bei 37 °C. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde frisches Medium zugegeben oder die Zellen wurden einer anschließenden Etoposidbehandlung wie unter 4.2.5.2.1 beschrieben unterzogen.

#### 4.2.5.3. Behandlung mit spezifischen Proteininhibitoren

Spezifische Inhibitormoleküle gegen verschiedene Reparaturproteine eröffnen die Möglichkeit, den Beitrag des gehemmten Proteins zur Reparatur von DSBs genauer zu untersuchen und zu spezifizieren.

In dieser Arbeit wurden Inhibitoren von Artemis (KU55933, ATMi) und der katalytische Untereinheit der DNA-PK (NU7026, DNA-PKi) eingesetzt. Die Zellen wurden 2 Tage vor dem

Experiment ausgesetzt. Die Inhibitorbehandlung setzte 1 h vor Schadensinduktion in einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  (ATMi) bzw. 10  $\mu\text{M}$  (DNA-PKi) ein und dauerte bis zur Ernte nach Ablauf der entsprechenden Reparaturzeit an. Der übrige Versuchsablauf wurde analog zu unbehandelten Proben durchgeführt.

#### 4.2.5.4. Behandlung mit $\text{H}_2\text{O}_2$

$\text{H}_2\text{O}_2$  gehört zu den reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) und verursacht nach der Entstehung von Hydroxylradikalen ( $\text{OH}\bullet$ ) v. a. ESBs in der DNA (Bradley & Kohn 1979).

Exponentiell wachsende Zellen wurden nach zweimaligem Waschen in 1x PBS für 20 min bei 4 °C mit 150  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  in 1x PBS behandelt. Anschließend wurde erneut gründlich gewaschen (2 x mit 1x PBS) bevor die Zellen mit frischem Zellkulturmedium versetzt wurden. Nach einer Reparaturzeit von 30 min bei 37 °C wurden die Zellen fixiert.

### 4.2.6. Immunologische Methoden

#### 4.2.6.1. Fixierung von Zellen mittels Methanol-Aceton-Behandlung

Nach Entfernen des Mediums wurden die auf den Deckgläsern befindlichen Zellen für 30 min bei -20 °C in eiskaltem Methanol fixiert und durch eine anschließende Acetonbehandlung (1 min bei -20 °C) permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen in 1x PBS/1 % FCS wurden die Zellen für 30 min in Blocklösung inkubiert, um unspezifische Bindestellen zu blockieren und konnten bis zur jeweiligen Antikörperfärbung bei 4 °C gelagert werden.

#### 4.2.6.2. Fixierung von Zellen mittels Formaldehyd-Behandlung

Zum Fixieren wurden die Zellen für 15 min mit Formaldehydlösung behandelt und nach dreimaligem Waschen in PBS für 5 min in gekühlter Tritonlösung bei 4 °C permeabilisiert. Nach erneutem Waschen in 1x PBS/1 % FCS (3 x) erfolgte ein 30minütiger Blockierungsschritt in Blocklösung, anschließend konnten die Deckgläser bis zur Antikörperfärbung bei 4 °C gelagert werden.

#### 4.2.6.3. CENP-F/ $\gamma$ H2AX-Doppelfärbung

Die fixierten Deckgläser wurden in einer Feuchtekammer ausgelegt, mit 35  $\mu\text{l}$  Primärantikörperlösung (rabbit  $\alpha$  CENP-F 1:500, mouse  $\alpha$   $\gamma$ H2AX 1:500 in Blocklösung) überschichtet und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde dreimal für 10 min in 1x PBS/1 % FCS gewaschen um überschüssige Primärantikörper zu entfernen. Nach Inkubation mit 40  $\mu\text{l}$  Sekundärantikörperlösung (goat  $\alpha$  rabbit Alexa Fluor 595® 1:500, goat  $\alpha$  mouse Alexa Fluor 488® 1:500 in Blocklösung) für 1 h im Dunkeln wurde wiederum dreimal für je 15 min in 1x PBS/0,1 % Tween®20 gewaschen, bevor die unspezifische DNA-Färbung mittels DAPI erfolgte. Dazu wurden die Deckgläser 3 min in 1x PBS/0,2  $\mu\text{g/ml}$  DAPI gefärbt und danach etwa 5 min in 1x PBS gewaschen. Abschließend konnten die Deckgläser mit je 3  $\mu\text{l}$  Mounting Medium eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt werden. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

#### 4.2.6.4. BrdU/ $\gamma$ H2AX-Doppelfärbung

Die Pulsmarkierung wachsender Zellen mit 5-Bromo-2'-deoxy-Uridin (BrdU) eröffnet die Möglichkeit, eine Zellpopulation in der S-Phase zu markieren und das weitere Schicksal dieser Population zu analysieren.

Dazu wurde den Zellen für 1 h 10 nM BrdU ins Kulturmedium zugegeben, anschließend zweimal mit 1x PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt. Zellen, die in dieser Zeit die DNA-Synthese in der S-Phase durchlaufen, bauen das Basenalogon BrdU in die DNA

ein und können somit identifiziert werden. Zur Analyse von exponentiell wachsenden G2-Zellen wurde der Bestrahlungszeitpunkt so gewählt, dass die markierte Population bereits nach G2 progressiert war. Dieser Zeitpunkt wurde in im Vorfeld durchgeführten FACS-Analysen (4.2.9) bestimmt und auf 4 h festgelegt. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgte die Induktion der Doppelstrangbrüche durch Röntgenstrahlung oder Chemikalienbehandlung. Auf den Zusatz von Aphidicolin konnte bei diesem Ansatz verzichtet werden, da die bestrahlten Zellen anhand der BrdU-Markierung identifiziert wurden. Nach Ablauf der Reparaturzeit erfolgte die Fixierung der Probe in Methanol wie unter 4.2.6.1 beschrieben.

Die fixierten Deckgläser wurden in eine Feuchtekammer eingebracht, mit 35 µl der ersten Primärantikörperlösung (mouse  $\alpha$   $\gamma$ H2AX 1:800 in 1x PBS/1 % FCS) überschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Deckgläser wurden zweimal für 10 min in 1x PBS/1 % FCS und einmal für 30 min in 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden spezifisch gebundenen Antikörper durch Formaldehydbehandlung (20 min Crosslinklösung) kovalent mit dem Zielprotein verknüpft. Nach drei weiteren Waschschritten in 1x PBS/1 % FCS konnte die Inkubation der Deckgläser mit je 35 µl der zweiten Primärantikörperlösung (sheep  $\alpha$  BrdU 1:150 in Inkubationspuffer) in der Feuchtekammer für 1 h bei 37 °C durchgeführt werden. Überschüssiger Antikörper wurde wiederum durch dreimaliges Waschen in 1x PBS/1 % FCS entfernt. Die Detektion der spezifisch gebundenen Primärantikörper erfolgte durch Behandlung mit 40 µl Sekundärantikörperlösung (goat  $\alpha$  mouse Alexa Fluor 488®, goat  $\alpha$  rabbit Alexa Fluor 594®, je 1:500 in 1x PBS/1 % FCS) für 1 h abgedunkelt und bei RT. Nach vier 15minütigen Waschschritten in 1x PBS konnte die DAPI-Gegenfärbung durchgeführt werden. Dazu wurden die Deckgläser für 3 min in 0,2 µg/ml DAPI in 1x PBS gefärbt und anschließend für 5 min in 1x PBS gewaschen. Nach dem Eindeckeln der Deckgläser mit je 3 µl Mounting Medium konnten diese mit Nagellack versiegelt und bei 4 °C gelagert werden.

#### 4.2.6.5. c-myc/ $\gamma$ H2AX bzw. Rad51-Doppelfärbung

Dieser Färbeansatz wurde in der vorliegenden Arbeit zur Identifizierung von Zellen eingesetzt, die nach Transfektion wie unter 4.2.4.4 beschrieben das gewünschte Konstrukt aufgenommen, in den Kern transportiert und exprimiert haben. Das entstandene Protein besteht aus der gewünschten Artemis-Sequenz (WT oder D37N) gekoppelt mit einer c-myc-Sequenz, die sich durch entsprechende Antikörper nachweisen lässt.

Die transfizierten Zellen wurden nach der entsprechenden Versuchsdurchführung durch Formaldehydbehandlung (4.2.6.2) fixiert und geblockt. Zur Antikörperfärbung wurden die Deckgläser in eine Feuchtekammer eingebracht, mit 35 µl Primärantikörperlösung (mouse  $\alpha$  c-myc 1:500, rabbit  $\alpha$   $\gamma$ H2AX 1:1000 bzw. rabbit  $\alpha$  Rad51 1:4000 in 1x PBS/1 % FCS) überschichtet und 1 h bei RT inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen in 1x PBS/1 % FCS entfernt. Anschließend erfolgte die Behandlung mit 40 µl Sekundärantikörperlösung (goat  $\alpha$  mouse Alexa Fluor 594®, goat  $\alpha$  rabbit Alexa Fluor 488®, je 1:500 in 1x PBS/1 % FCS) lichtgeschützt für 1 h bei RT. Nach vier Waschschritten in 1x PBS konnte die DAPI-Gegenfärbung durchgeführt werden, indem die Deckgläser für 3 min in 0,2 µg/ml DAPI in 1x PBS eingebracht und danach 5 min in 1x PBS gewaschen wurden. Danach konnten die Proben mit je 3 µl Mounting Medium eingedeckelt, mit Nagellack versiegelt und bei 4 °C gelagert werden.

Die Auswertung der  $\gamma$ H2AX-Foci erfolgte in Zellen, die ein deutliches c-myc-Signal zeigten. Die Unterscheidung der Zellzyklusphase erfolgte anhand des DAPI-Signals wie unter 4.2.6.7.2 beschrieben.

#### 4.2.6.6. $\gamma$ H2AX/Rad51-Doppelfärbung

Dieser Färbeansatz wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um Ausbildung und Reparatur von  $\gamma$ H2AX- und Rad51-Foci in derselben Zelle beurteilen zu können. Dazu wurden die nach 4.2.6.2 in Formaldehydlösung fixierten Deckgläser mit 35 µl Erstantikörperlösung (mouse  $\alpha$   $\gamma$ H2AX 1:1000, rabbit  $\alpha$  Rad51 1:4000) überschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dem Entfernen ungebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen in

1x PBS/1 % FCS schloss sich die Zweitantikörperbehandlung (goat  $\alpha$  mouse Alexa Fluor 594® 1:1000, goat  $\alpha$  rabbit Alexa Fluor 488® 1:500 in 1x PBS/1 % FCS) für 1 h lichtgeschützt bei RT an. Erneut wurde gründlich (4 x) in 1x PBS gewaschen bevor die unspezifische DNA-Färbung für 3 min in 0,2  $\mu$ g/ml DAPI in PBS erfolgte. Nach Waschen in PBS konnten die Proben mit je 3  $\mu$ l Mounting Medium eingedeckelt, mit Nagellack versiegelt und bei 4 °C gelagert werden.

Die Auswertung erfolgte wiederum zellzyklusphasenspezifisch unter Zuhilfenahme der Metafer-Software (Metasystems) wie unter 4.2.6.7.2 beschrieben.

#### 4.2.6.7. Auswertung der Immunfluoreszenz-Ansätze

##### 4.2.6.7.1. Auswertung der $\gamma$ H2AX-Färbung

Die Anzahl der  $\gamma$ H2AX-Foci korreliert direkt mit der Anzahl unreparierter DNA-Doppelstrangbrüche. Zur Beurteilung der Reparaturkapazität einer untersuchten Zelllinie wurde daher die Abnahme der  $\gamma$ H2AX-Foci nach Ablauf von bestimmten Reparaturzeiten ausgewertet.

Die Auswertung erfolgte bei 1000facher Vergrößerung direkt am Mikroskop, bei jedem Datenpunkt wurden mindestens 40 Zellen ausgewertet, dabei mussten mindestens 40 Foci insgesamt erreicht werden. Bei größeren Focianzahlen (>80-90 Foci pro Zelle) erfolgte die Aufnahme der Zelle bei 630facher Vergrößerung mit Hilfe der ISIS-Software (Metasystems), das anschließende Auszählen erfolgte am Bildschirm.

Jedes Experiment wurde in der Regel dreimal durchgeführt. Die dargestellten Ergebnisse stellen den Mittelwert der unabhängigen Experimente dar, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte. Zur statistischen Absicherung wurde bei Bedarf der *Student's t-test (one-tailed Welch's test)* angewendet.

##### 4.2.6.7.2. Identifizierung von Zellzyklusphasen

Bei Experimenten mit exponentiell wachsenden Zellen wurden in der Regel G1- und G2-Phase ausgewertet. Die Färbung von primären humanen Fibroblasten mit Antikörpern gegen das Centromerprotein F (CENP-F) ermöglicht die Identifizierung von Zellen in der späten S- und G2-Phase. Diese zeigen eine globale Kernfärbung, in G2 deutlich intensiver als in S. S-Phase Zellen konnten zudem leicht durch die aufgrund der Aphidicolinbehandlung auftretende globale  $\gamma$ H2AX-Färbung erkannt werden.

Alternativ konnte die Identifizierung der Zellzyklusphase auch mit Hilfe der Intensität des DAPI-Signals ermittelt werden. G2-Zellen weisen einen höheren DNA-Gehalt auf und zeigen daher ein deutlich intensiveres DAPI-Signal. Zellen in der S-Phase, die einen DNA-Gehalt und damit eine DAPI-Intensität zwischen G1 und G2 aufweisen, konnten durch die aufgrund der Aphidicolinbehandlung auftretende globale  $\gamma$ H2AX-Färbung ausgeschlossen werden. Die Auswertung der DAPI-Intensität erfolgte automatisch mit Hilfe der Software Metafer (Metasystems) und wurde gegen die Intensität des  $\gamma$ H2AX-Signals in einem Diagramm aufgetragen. Hier konnten die Zellen der G1- bzw. G2-Population ausgewählt, mit Hilfe der Relokierungsfunktion der Software auf dem Deckglas wieder gefunden und ausgewertet werden.

#### 4.2.7. Chromosomale Analysen

##### 4.2.7.1. Vorzeitige Chromosomen-Kondensation (PCC) in G2

Zur Untersuchung der Doppelstrangbruchreparatur in der G2-Phase auf Chromosomenebene wurde der Phosphataseinhibitor Calyculin A 30 min vor Ablauf der jeweiligen Reparaturzeit in einer Konzentration von 50 nM ins Kulturmedium gegeben. Somit wird der MPF-Level (Mitose fördernden Faktor, *Mitosis promoting factor*), der im Normalfall durch die nun inhibierten Phosphatasen in der Interphase auf niedrigem Niveau gehalten wird, erhöht und eine

vorzeitige Kondensation der Chromosomen (*premature chromosome condensation*, PCC) in G2 ausgelöst.

Die Ernte der Zellen erfolgte durch Trypsin-EDTA-Behandlung. Um die Zellausbeute zu optimieren wurden sämtliche Überstände gesammelt und vereint, da Zellen nach Behandlung mit Calyculin A dazu neigen, sich abzukugeln und somit leicht beim Waschen von der Oberfläche gelöst werden und verloren gehen. Die Zellsuspension wurde bei 300 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Im Anschluss erfolgte eine hypotone Behandlung zum Aufquellen der Zellen in 5 ml vorgewärmter KCl-Lösung (75 mM) für 20 min bei 37 °C. Die Zellen wurden pelletiert (10 min, 200 g, 4 °C), der Überstand vorsichtig abgesaugt und die Zellen durch langsames Zutropfen von 10 ml Fixativ unter ständigem Vortexen fixiert. Nach 10minütiger Inkubation bei RT und anschließendem Zentrifugieren (10 min, 200 g, 4 °C) wurden die Zellen erneut in 10 ml Fixativ aufgenommen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde zentrifugiert (200 g, 10 min, 4 °C) und wie beschrieben mit 10 ml Fixativ ein drittes Mal fixiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Abschließend wurden die Zellen pelletiert (200 g, 10 min, 4 °C), nach vorsichtigem Absaugen des Überstands bis auf etwa 500 µl und anschließendem Resuspendieren in der Restflüssigkeit auf angefeuchtete Objektträger aufgetropft. Diese wurden mindestens über Nacht bei RT getrocknet und schließlich mit Giemsa gefärbt.

#### 4.2.7.2. Giemsa-Färbung

Zur Anfärbung der Chromosomen wurden die Objektträger für 3 min in 3 % Giemsa-Lösung bei RT inkubiert und anschließend zweimal für je etwa 1 min in H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach dem Trocknen bei RT oder bei 50 °C auf der Heizplatte konnten die Präparate bei RT aufbewahrt werden.

#### 4.2.7.3. Auswertung von Chromosomenpräparationen

Die Giemsa-gefärbten Objektträger wurden mit Hilfe des Moduls MSearch der Software Metafer (Metasystems) bei 100facher Vergrößerung im Durchlicht nach Chromosomenspreitungen abgesucht und deren Koordinaten gespeichert. Die Relokierungsfunktion der Software ermöglichte das Wiederauffinden vielversprechender Chromosomenspreitungen, sodass diese bei 630facher Vergrößerung mit ISIS (Metasystems) aufgenommen werden konnten. Diese Bilder wurden anschließend auf Chromosomenbrüche analysiert, bei bestrahlten Proben wurden 60-70, bei unbestrahlten Kontrollen etwa 80-100 Metaphasen ausgewertet.

Die gezeigten Werte entsprechen den Mittelwerten aller ausgewerteten Chromosomenspreitungen eines Datenpunktes, die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler der Mittelwerte.

#### 4.2.8. Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

##### 4.2.8.1. Markierung mit [Methyl <sup>3</sup>H] Thymidin

Zur Untersuchung der Doppelstrangbruchreparatur spezifisch in G2-Zellen wurde eine exponentiell wachsende Zellpopulation radioaktiv markiert. Dazu wurde [Methyl <sup>3</sup>H] Thymidin mit einer spezifischen Aktivität von 2,81 TBq/mmol in einer Konzentration von 37 kBq/ml für 1 h ins Kulturmedium gegeben. Zellen, die innerhalb dieser Zeit die S-Phase durchlaufen, bauen das radioaktive Molekül in die DNA ein und können somit später identifiziert werden. Nach der Markierung wurde das Medium entfernt, die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt. Zur Analyse der DSB-Reparatur in G2 wurde der markierten Zellpopulation anschließend Zeit gegeben in G2 zu progressieren. Dieser Zeitrahmen wurde in Vorversuchen mit Hilfe von durchflusszytometrischen Ansätzen untersucht und auf 4 h festgelegt. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen bestrahlt, die Induktionsproben wurden direkt im Anschluss, die Reparaturproben nach Ablauf der

entsprechenden Reparaturzeit geerntet. Kontrollen wurden einer identischen Behandlung ohne Röntgenbestrahlung unterzogen und zusammen mit den Induktionsproben geerntet.

#### **4.2.8.2. Isolierung genomischer DNA für die Pulsfeldgelelektrophorese**

Zur Ernte der behandelten Proben wurde das Medium entfernt, die Zellen zweimal mit 10 ml eiskaltem 1x PBS gespült und durch Trypsin-EDTA-Behandlung zur Unterbindung weiterer Reparaturprozesse bei 4 °C für 30-60 min von der Oberfläche gelöst. Anschließend wurden die Zellen in 8 ml eiskaltem Medium aufgenommen und für 10 min bei 300 g und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in gekühltem 1x PBS gewaschen, erneut zentrifugiert (10 min, 300 g, 4 °C) und nach Entfernen des Überstands in 50 µl 1x PBS (RT) gelöst. Die Suspension wurde mit 50 µl Blöckchenagarose versetzt, gemischt und in vorgekühlte Blöckchenformer gefüllt. Das Aushärten der Agarose erfolgte bei 4 °C, bevor die Blöckchen für mindestens 30 min bei 4 °C in Lysispuffer äquilibriert wurden. Zur abschließenden Lyse der Zellen wurde bei 50 °C über Nacht inkubiert und danach zweimal in 0,5 M EDTA gewaschen. Schließlich konnten die Blöckchen bei 4 °C in 0,5 M EDTA gelagert werden.

#### **4.2.8.3. Durchführung der Pulsfeldgelelektrophorese**

Zunächst wurden die Blöckchen zweimal für 30 min bei 4 °C in TE gewaschen und in die Taschen eines FAR-Gels eingesetzt, die dann mit Taschenagarose verschlossen wurden. Nach dem vollständigen Erstarren wurde das Gel zum Äquilibrieren mindestens 30 min vor Start der Gelelektrophorese in die mit 0,5x TBE gefüllte und bereits auf 14 °C heruntergekühlte Elektrophoresekammer eingesetzt. Im anschließenden Lauf wurde die DNA für 92 h bei einem Feldwinkel von 120°, einer elektrischen Feldstärke von 1,5 V/cm und Pulszeiten von 5-5000 s bei 14 °C aufgetrennt. Diese Laufbedingungen erlauben eine Auftrennung von Fragmenten bis zu einer Größe von 8 Mbp. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel über Nacht in 1 µg/ml Ethidiumbromid in 0,5x TBE gefärbt und anschließend für etwa 4h in 0,5x TBE entfärbt. Die Geldokumentation erfolgte unter UV-Belichtung bei 302 nm mit Hilfe einer digitalen Kamera und der Aufnahmesoftware ISIS (Metasystems).

#### **4.2.8.4. Szintillationsmessung und Auswertung der G2-spezifische Reparatur**

Tritium ist ein  $\beta$ -Strahler und weist somit eine sehr geringe Reichweite auf. Aus diesem Grund muss zur Analyse der radioaktiv markierten Zellpopulation die genomische DNA aus dem Agarosegel eluiert werden. Um die Information über Laufverhalten und damit Reparatur der aufgetrennten Proben zu erhalten wurden daher die jeweilige Probestasche sowie die dazugehörigen Spuren bis etwa 4 cm unterhalb der Kompressionszone in gleichgroße Blöckchen geschnitten. Diese wurden nach Zugabe von 1 ml Hypochlorid für 45-60 min bei 50 °C unter mehrmaligem Vortexen gelöst. Danach wurde die Suspension in 10 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben und gemischt. Nach 24 h abgedunkelt bei RT wurden die Proben im Szintillationszähler vermessen.

Zur Ermittlung des FAR-Wertes der radioaktiv markierten DNA wurde zunächst die Gesamtaktivität pro Spur errechnet. Die Aktivität der aus der Tasche herausgelaufenen Radioaktivität wurde durch die Gesamtaktivität dividiert. Dieser Wert entsprach dann dem Anteil der radioaktiv markierten DNA, die bei der entsprechenden Probe ins Gel gelaufen war und erlaubte eine Aussage über die DSB-Reparatur der analysierten G2-Population.

#### **4.2.9. Durchflusszytometrische Methoden**

In der vorliegenden Arbeit wurden durchflusszytometrische Methoden vor allem benutzt, um die Zellzyklusphase einer BrdU-markierten Zellpopulation parallel zur Immunfluoreszenz-Auswertung (4.2.6.4) bzw. zur G2-spezifischen PFGE (4.2.8) zu überprüfen. Dazu wurde eine exponentiell wachsende Kultur für 1 h mit 10 nM BrdU markiert. Anschließend wurde das

Medium entfernt, der Zellrasen zweimal mit PBS gespült und frisches Medium zugegeben. Die Behandlung der Proben erfolgte nun analog zu den entsprechenden Experimenten.

#### **4.2.9.1. Probenfixierung für die Durchflusszytometrie**

Nach Abschluss der jeweiligen Behandlung wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, durch Trypsin-EDTA-Behandlung von der Oberfläche gelöst und in 3 ml Medium aufgenommen. Nach der Überführung in FACS-Röhrchen wurden diese zentrifugiert (400 g, 10 min, 4 °C), der Überstand verworfen und die Zellen in 1x PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernen des Überstandes wurde das gelöste Pellet durch tropfenweise Zugabe von 2 ml 70 % Ethanol (-20 °C) unter ständigem Vortexen fixiert und konnte bei -20 °C aufbewahrt werden.

#### **4.2.9.2. BrdU/PI-Färbung**

Die bei -20 °C aufbewahrten Proben wurden zunächst zentrifugiert (10 min, 400 g, 4 °C), das Pellet in kaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, 400 g, 4 °C). Anschließend wurden die Zellen in 1 ml 2 M HCl aufgenommen und 20 min bei RT inkubiert, um die DNA zu denaturieren und das eingebaute BrdU so für die spätere Antikörperbehandlung zugänglich zu machen. Nach Zugabe von 1 ml 1x PBS/1 % FCS schloss sich ein Zentrifugationsschritt (10 min, 400 g, 4 °C) an. Zur partiellen Renaturierung der DNA wurde das Pellet in 500 µl 0,1 M Natrium-Tetraborat (pH 8.5) resuspendiert, für 2 min bei RT inkubiert und mit 1 ml 1x PBS/1 % FCS versetzt. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 400 g, 4 °C) und vorsichtigem Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in 20 µl FITC-gekoppeltem  $\alpha$  BrdU-Antikörper aufgenommen und 30 min abgedunkelt bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml 1x PBS/1 % FCS bevor die Zellen pelletiert (10 min, 400 g, 4 °C) und in 500 µl Propidiumiodidlösung resuspendiert wurden. Nach 30minütiger Inkubation abgedunkelt bei RT konnten die Proben im Durchflusszytometer vermessen werden, wobei jeweils der DNA-Gehalt und die Intensität des BrdU-Signals quantitativ ausgewertet wurden.

#### **4.2.9.3. Messung am Durchflusszytometer**

Messung und Auswertung der Proben erfolgte mit Hilfe der Software CellQuest (Becton Dickinson). Das verwendete Durchflusszytometer verfügt über einen Argonlaser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Das Propidiumiodid-Signal wurde im Fluoreszenzkanal 2 (FL2) im Bereich von 564-606 nm, das BrdU-Signal im Fluoreszenzkanal 1 (FL1) bei 505-545 nm aufgenommen. Zur Auswertung der durchgeführten BrdU-Experimente wurden 20.000 Zellen erfasst.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Anwendung der $\gamma$ H2AX-Analyse zur Charakterisierung der DNA-Reparatur von exponentiell wachsenden primären humanen Fibroblasten

#### 5.1.1. Identifizierung der Zellzyklusphasen

Diese Arbeit widmet sich der Untersuchung der DNA-Reparatur in der G2-Phase des Zellzyklus im Vergleich zur G1-Phase. Dies setzt voraus, dass bekannt ist, in welcher Zellzyklusphase sich die analysierten Zellen befinden. Durch Synchronisation können Zellen in der gewünschten Phase angereichert werden. So können primäre Zellen durch Kontaktinhibition in der G0/G1-Phase des Zellzyklus analysiert werden (Kuhne et al. 2004, Harper 2005). Zur Charakterisierung der Zellen in der G2-Phase werden in der Regel Replikationsinhibitoren wie Hydroxyharnstoff oder hohe Konzentrationen an Thymidin eingesetzt, die die Passage der Zellen durch die S-Phase verhindern (Harper 2005). Nach Entfernung der Chemikalie treten die Zellen synchron in die G2-Phase ein. Allerdings konnte gezeigt werden, dass diese Behandlung die Induktion von DNA-Schäden bedingt und zur Phosphorylierung von H2AX führt (Kurose et al. 2006). Daher sind diese Ansätze zur Charakterisierung der DNA-Reparatur nicht geeignet. Auch eine Synchronisation am G2/M-Übergang bspw. durch Nocodazol ist nicht sinnvoll, da die Zellen zwar synchron in die G1-Phase eintreten, die Synchronität aber während der weiteren Progression durch G1- und S-Phase verlieren (Kurose et al. 2006). Aus diesem Grund ist auch die Ansammlung von mitotischen Zellen durch *mitotic shake-off*, wo abgekugelte und damit schlecht haftende mitotische Zellen mechanisch von der Oberfläche gelöst und abgeerntet werden, nicht zielführend (Harper 2005). Somit wurden in dieser Arbeit unsynchronisierte Zellen verwendet, was außerdem den direkten Vergleich von G1- und G2-Phase-Zellen in einem Experiment ermöglicht.

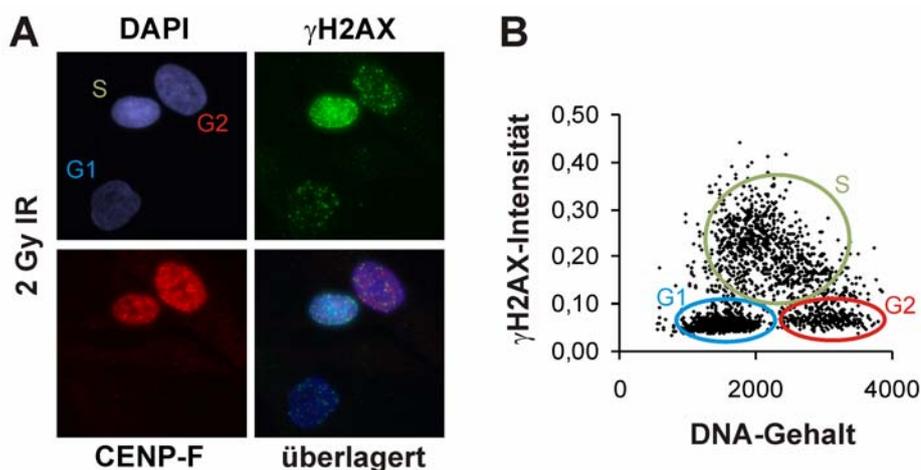
Die Untersuchung der DSB-Reparatur auf Einzelzellebene in einer exponentiell wachsenden Kultur erfordert die sichere Unterscheidung der Zellzyklusphasen. Außerdem muss der Übertritt zwischen den Zellzyklusphasen während der Reparaturzeit unterbunden werden, um eine Verfälschung des Ergebnisses zu verhindern. Daher erfolgte in den folgenden Untersuchungen die Identifikation von G2-Zellen über den Nachweis von CENP-F (Centromer-Protein F). CENP-F wird nur in der späten S- und G2-Phase exprimiert und sorgt im Immunfluoreszenzansatz für eine pan-nukleäre Färbung von Zellen in diesen Zellzyklusphasen (Liao et al. 1995, Kao et al. 2001). Die Intensität der Färbung ist dabei in G2 größer als in S.

Zusätzlich verhindert der Einsatz des Polymerase-Inhibitors Aphidicolin den Übertritt der Zellen von der S- in die G2-Phase. Er ermöglicht zudem die Unterscheidung zwischen CENP-F-positiven S- und G2-Zellen. In der S-Phase kommt es durch Behandlung mit

Aphidicolin zum Replikationsarrest, der vermutlich zur Aktivierung von ATR und damit zum Einsetzen der DNA-Schadensantwort führt. H2AX wird in so starkem Ausmaß phosphoryliert, dass Zellen in der S-Phase eine pan-nukleäre  $\gamma$ H2AX-Färbung aufweisen, was zusammen mit einem schwachen CENP-F Signal eine eindeutige Identifizierung der S-Phase ermöglicht. CENP-F-positive Zellen mit punktförmigem  $\gamma$ H2AX-Signal befinden sich in der G2-Phase, G1-Zellen besitzen ein punktförmiges  $\gamma$ H2AX-Muster und sind CENP-F-negativ (Abb. 5.1A).

Eine an  $\gamma$ H2AX- und CENP-F-gefärbten Zellen am Fluoreszenzmikroskop durchgeführte Analyse des DNA-Gehaltes, bei der die Intensität des DAPI-Signals in Relation zur Intensität des  $\gamma$ H2AX-Signals gesetzt wird, ergibt bei etwa 1000-3000 ausgewerteten Zellen eine hufeisenförmige Verteilung. Diese Verteilung spiegelt die einzelnen Zellzyklusphasen wider (Abb. 5.1B). Zellen mit einfachem DNA-Gehalt befinden sich in G1 und zeigen relativ geringe  $\gamma$ H2AX-Intensität in Form eines punktförmigen Musters. In diesen Zellen fehlt das CENP-F-Signal. Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt haben das Genom bereits vollständig repliziert und zeigen als G2-Zellen ebenfalls ein punktförmiges  $\gamma$ H2AX-Signal bei intensiver flächiger CENP-F-Färbung. Eine DAPI-Intensität zwischen derjenigen in G1 und G2 repräsentiert Zellen in der S-Phase. Diese Population bildet den Bogen des Hufeisens im *Dotplot*. Sie zeichnet sich durch ein im Vergleich zu G1 bzw. G2 deutlich intensiveres  $\gamma$ H2AX-Signal aufgrund der Aphidicolin-Behandlung aus. Diese Zellen zeigen zudem ein flächiges CENP-F-Signal, das jedoch schwächer ausgeprägt ist als in G2 (Abb. 5.1).

Diese Kriterien erlauben die Identifizierung der Zellzyklusphase und ermöglichen so die gezielte Auswertung einer Zellpopulation in der G1- bzw. der G2-Phase.



**Abbildung 5.1:** Identifizierung der Zellzyklusphasen in exponentiell wachsenden primären humanen Fibroblasten.

**(A)** Immunfluoreszenzfärbung von bestrahlten WT-Fibroblasten (HSF1, 2 Gy Röntgenstrahlung, +Aphidicolin, 2 h Reparatur) mit Antikörpern gegen  $\gamma$ H2AX und CENP-F, aufgenommen bei 630facher Vergrößerung. CENP-F ist in rot,  $\gamma$ H2AX in grün gefärbt. Die DNA wurde unspezifisch mit DAPI (blau) gegengefärbt. G2-Zellen zeigen ein intensives pan-nukleäres CENP-F-Signal bei punktförmigem  $\gamma$ H2AX-Muster. S-Zellen zeigen ebenfalls ein flächiges, aber weniger intensives CENP-F Signal und ein aufgrund der Behandlung mit Aphidicolin pan-nukleäres  $\gamma$ H2AX-Signal. G1-Zellen sind CENP-F negativ und zeigen ein punktförmiges  $\gamma$ H2AX-Signal.

**(B)** Parallel wurde mit Hilfe der Relokierungsfunktion der verwendeten Software ein *Dotplot* zur

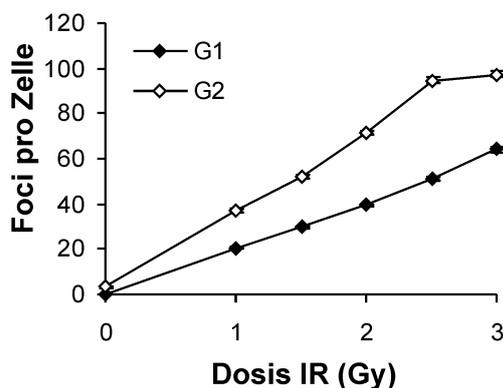
Überprüfung der beschriebenen Identifikationskriterien zur Bestimmung der Zellzyklusphasen erzeugt. Dazu wurde die  $\gamma$ H2AX-Intensität der auf einem Deckglas vorhandenen 1000-3000 Zellen gegen den anhand der DAPI-Intensität ermittelten DNA-Gehalt aufgetragen und in einem *Dotplot* dargestellt. An der X-Achse ist der DNA-Gehalt dimensionslos in linearer Darstellung aufgetragen, die Y-Achse zeigt die Intensität des  $\gamma$ H2AX-Signals ebenfalls dimensionslos und in linearer Darstellung.

### 5.1.2. Analyse von DSBs anhand von $\gamma$ H2AX-Foci in der G2-Phase

Die Quantifizierung von  $\gamma$ H2AX-Foci zur Charakterisierung der DSB-Reparatur ist eine in konfluenten Zellen etablierte und anerkannte Methode. Hier konnte eine 1:1-Korrelation zwischen der Anzahl vorhandener DSBs und der Anzahl ausgebildeter  $\gamma$ H2AX-Foci gezeigt werden (vergleiche Kapitel 3.6.1).

In dieser Arbeit wurde zunächst die Anwendbarkeit dieser Methode auf G2-Phase-Zellen überprüft. In G0/G1 ist das Verschwinden von  $\gamma$ H2AX-Foci abhängig von funktionaler DNA-Ligase IV (Lig4) (Riballo et al. 2004). Die Tatsache, dass die Dephosphorylierung von  $\gamma$ H2AX in Abwesenheit eines essentiellen DNA-Reparaturfaktors nicht erfolgt, ist ein weiterer Beweis für die Korrelation zwischen  $\gamma$ H2AX-Focus und DSB. Auch in der G2-Phase konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der strahleninduzierten  $\gamma$ H2AX-Foci in Lig4-defizienten Zellen erhalten bleibt (Tchouandoung, mündliche Mitteilung). Dies ist ein erster Hinweis, dass  $\gamma$ H2AX-Foci auch in der G2-Phase DNA-DSBs markieren.

Zunächst wurde die Induktion von  $\gamma$ H2AX-Foci in G2-Phase-Zellen im Vergleich zu G1-Zellen untersucht. Darüberhinaus wurde die Linearität zwischen applizierter Dosis und den auftretenden DSBs in der G2-Phase überprüft. Dazu wurde die Anzahl an Foci in Relation zur applizierten Dosis quantifiziert. Es wurde ein für die nachfolgenden Untersuchungen relevanter Dosisbereich von 0 Gy bis 3 Gy Röntgenstrahlung gewählt.

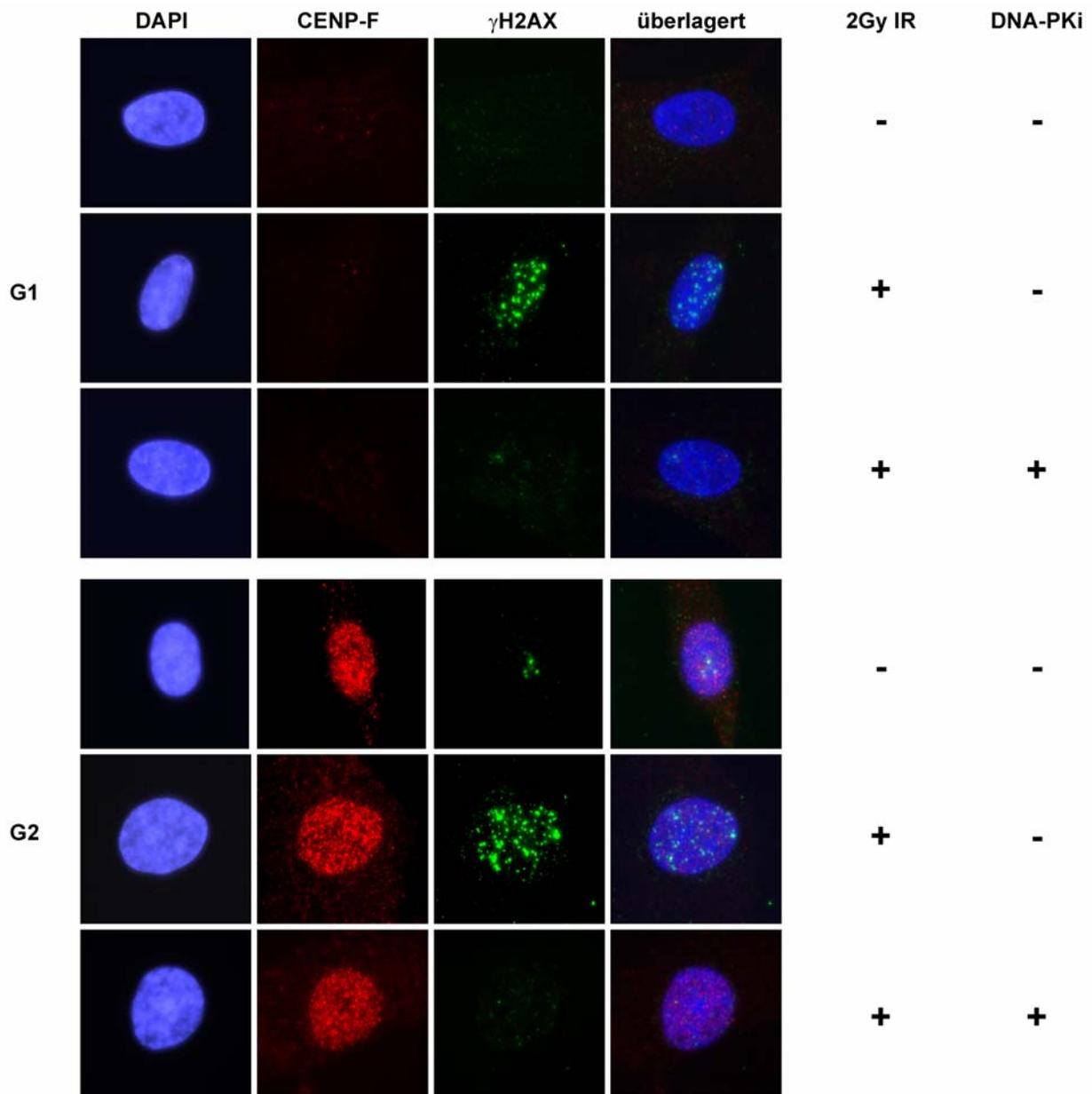


**Abbildung 5.2:** Induktionskurve exponentiell wachsender primärer Fibroblasten. WT-Zellen (HSF1) wurden mit unterschiedlichen Dosen (1; 1,5; 2; 2,5; 3 Gy Röntgenstrahlung) bestrahlt und 15 min kultiviert. Nach der Fixierung der Zellen wurde die Immunfluoreszenzfärbung von  $\gamma$ H2AX und CENP-F durchgeführt. Die Quantifizierung der vorhandenen  $\gamma$ H2AX-Foci erfolgte in G1 und G2. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Kontrolle beträgt 0,2 Foci in G1 und 2,3 Foci in G2 und wurde von den Reparaturwerten abgezogen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler zwischen den Mittelwerten der Experimente und liegen teilweise innerhalb der Symbole.

In G1 und G2 steigt im Dosisbereich zwischen 0 Gy und 2,5 Gy IR die Anzahl an induzierten  $\gamma$ H2AX-Foci linear mit der Dosis an, wobei in G2 aufgrund des doppelten DNA-Gehaltes etwa doppelt so viele Foci auftreten. Während in G1 die Linearität auch bei 3 Gy IR gewahrt bleibt, wird in G2 ab etwa 80 Foci pro Zelle eine Sättigung erreicht (Abb. 5.2). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Unterscheidung distinkter Foci und damit die quantitative

Analyse der  $\gamma$ H2AX-Foci aufgrund der großen Schadensmenge nicht mehr möglich ist. Außerdem kann gezeigt werden, dass die im Versuchsansatz applizierte Dosis von 2 Gy sowohl in G1 wie auch in G2 im linearen Bereich induziert und somit die quantitative Analyse der DSB-Reparatur durch Auszählung von  $\gamma$ H2AX-Foci möglich ist. Die Tatsache, dass in G2-Zellen etwa doppelt so viele  $\gamma$ H2AX-Foci wie in der G1-Phase auftreten, ist ein weiterer Hinweis darauf, dass  $\gamma$ H2AX-Foci auch in der G2-Phase als Maß für vorhandenen DSBs gewertet werden können.

Desweiteren wurde die Ausbildung von  $\gamma$ H2AX-Foci in Abwesenheit von ATM und DNA-PK untersucht. Nach dem Auftreten eines DSBs wird H2AX sehr schnell durch ATM bzw. in dessen Abwesenheit durch DNA-PK phosphoryliert (Stiff et al. 2004). Dagegen wird ATR nach dem Auftreten von einzelsträngigen Bereichen beispielsweise nach replikativem Stress aktiv (Abraham 2001). Um sicherzustellen, dass die Agglomeration von  $\gamma$ H2AX in der G2-Phase die Anwesenheit eines DSBs anzeigt, wurde das Auftreten von  $\gamma$ H2AX-Foci in Abwesenheit von ATM und DNA-PK untersucht. Dazu wurde in exponentiell wachsenden ATM-defizienten Fibroblasten (AT1BR) durch Behandlung mit dem hochspezifischen Inhibitormolekül NU7026 (DNA-PKi) die katalytische Untereinheit der DNA-PK (DNA-PK<sub>cs</sub>) ausgeschaltet und damit die Enzymaktivität des gesamten Enzymkomplexes unterbunden. Nach der Induktion von DNA-Schäden durch Behandlung der Zellen mit ionisierender Strahlung (IR) wurde die Fähigkeit der Zellen zur Ausbildung von  $\gamma$ H2AX-Foci in G1 und G2 analysiert. Die Identifizierung der Zellzyklusphase erfolgte wie oben beschrieben durch parallele Immunfluoreszenzfärbung von  $\gamma$ HAX und CENP-F.



**Abbildung 5.3:** Ausbildung von  $\gamma$ H2AX-Foci in ATM-defizienten primären humanen Fibroblasten nach Behandlung mit DNA-PKi.

Exponentiell wachsende ATM-defiziente Fibroblasten (AT1BR) wurden 1 h vor Bestrahlung mit 10  $\mu$ M DNA-PKi bzw. mit DMSO in identischer Konzentration versetzt, mit 2 Gy IR bestrahlt und anschließend mit Aphidicolin behandelt. Die unbestrahlte Kontrolle wurde ebenfalls mit DMSO versetzt und einer identischen Behandlung unterzogen. Nach einer Reparaturzeit von 2 h wurden die Zellen fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen  $\gamma$ H2AX (grün) und CENP-F (rot) gefärbt. Außerdem wurde die unspezifische Gegenfärbung der DNA mit DAPI (blau) vorgenommen. Die Aufnahme erfolgte bei 630facher Vergrößerung.

DMSO-behandelte ATM-defiziente AT1BR zeigen nach Bestrahlung in G1 und einer Reparaturzeit von 2 h etwa 15-20  $\gamma$ H2AX-Foci. Dagegen ist deren Ausbildung in Abwesenheit funktionaler DNA-PK vergleichbar mit unbestrahlten Kontrollen (Abb. 5.3). In der G2-Phase sind in unbehandelten ATM-defizienten Zellen 2 h nach Bestrahlung etwa 35-40  $\gamma$ H2AX-Foci nachweisbar. Auch in dieser Zellzyklusphase wird die Anzahl vorhandener  $\gamma$ H2AX-Foci durch Behandlung mit dem spezifischen Inhibitor der DNA-PK<sub>cs</sub> auf Kontrollniveau reduziert

(Abb. 5.3). Demnach kann durch Inhibierung der DNA-PK in ATM-defizienten AT1BR die Ausbildung von  $\gamma$ H2AX-Foci nach Bestrahlung sowohl in G1 als auch in G2 nahezu vollständig unterdrückt werden. Dies zeigt, dass die Phosphorylierung von  $\gamma$ H2AX in der G2-Phase ebenso wie in G1 von ATM bzw. DNA-PK und nicht von ATR durchgeführt wird. Die entstehenden  $\gamma$ H2AX-Foci können somit auch in G2 als Maß für die Anzahl vorhandener DSBs angesehen werden.

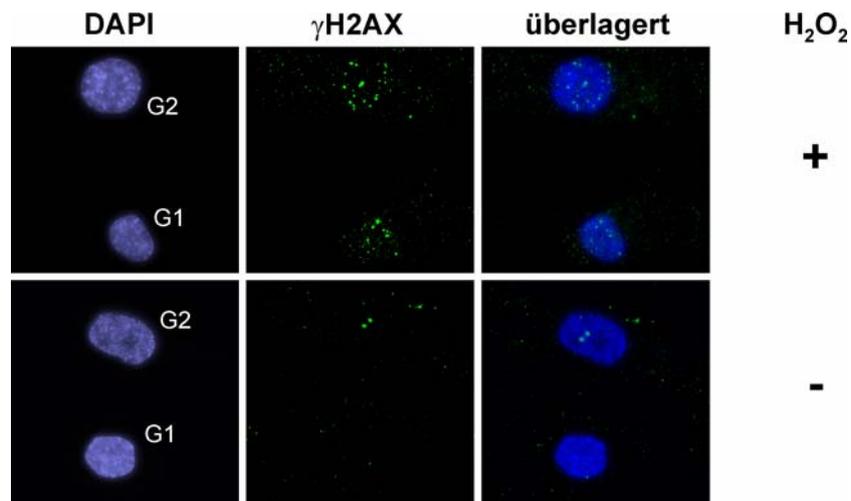
### 5.1.3. Untersuchung der Entstehung von $\gamma$ H2AX-Foci nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses von DNA-Einzelstrangbrüchen (ESBs) auf die Ausbildung von  $\gamma$ H2AX-Foci wurden Agenzien verwendet, die einen hohen Anteil an ESBs gegenüber DSBs induzieren.

Dünn ionisierende Strahlung, zu der auch Röntgenstrahlung gehört, interagiert unter Bildung freier Radikale mit dem absorbierenden Material. Da Zellen zu 80 % aus Wasser bestehen, wird der größte Teil der Energie von Wasser absorbiert. Dabei kommt es zur Entstehung von OH• (vergleiche Kapitel 3.1.3). Diese Hydroxylradikale werden bei dünn ionisierender Strahlung mit geringem LET als Hauptauslöser der strahleninduzierten Schäden betrachtet (vergleiche Kapitel 3.1.4). So werden durch 1 Gy IR etwa 16-40 DSBs sowie 600-1000 ESBs induziert (Ward 1988). Sollten ESBs, wenn auch in geringem Ausmaß, zur Phosphorylierung von  $\gamma$ H2AX in der G1- und G2-Phase beitragen, würde dies die Untersuchung von kleinen Effekten bereits erschweren. Die Ausbildung von  $\gamma$ H2AX-Foci bei nur 1 % der ESBs würde die Focianzahl bereits um 6-10 Foci erhöhen.

Nach der Behandlung mit reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treten ebenfalls Hydroxylradikale auf. Diese führen zu Schäden, die überwiegend nur einen DNA-Strang betreffen, wie ESBs oder Basenschäden. Es konnte gezeigt werden, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu > 99 % ESBs induziert (Bradley & Kohn 1979). Dies wird durch die Tatsache, dass nach der Einwirkung von ROS nahezu ausschließlich Chromatidtyp-Aberrationen detektiert werden, bestätigt (Duell et al. 1995). DSBs werden dagegen erst bei sehr hohen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen erzeugt (Dahm-Daphi et al. 2000).

Exponentiell wachsende primäre Fibroblasten wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt. Anschließend wurde die Ausbildung von  $\gamma$ H2AX-Foci nach erfolgter Immunfluoreszenzfärbung sowohl in der G1- wie auch in der G2-Phase untersucht. Die Identifizierung der Zellzyklusphasen wurde anhand des DNA-Gehaltes wie unter 5.1.1. beschrieben durchgeführt.



**Abbildung 5.4:** Repräsentative Immunfluoreszenz-Aufnahme von primären humanen Fibroblasten nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Exponentiell wachsende primäre humane Fibroblasten (HSF1) wurden mit 150  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 1x PBS behandelt (20 min, 4 °C), anschließend mit frischem Medium versetzt und weitere 15 min kultiviert. Zudem wurden Zellen mit 1x PBS (20 min, 4 °C) inkubiert. Nach der Fixierung erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung von  $\gamma$ H2AX (grün). Zudem wurde eine unspezifische Kernfärbung mit DAPI (blau) vorgenommen. Die Aufnahme erfolgte bei 630facher Vergrößerung.

Die Behandlung mit 150  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziert mindestens 30.000 ESBs (Fisher et al. 2007). Die Ausbildung von  $\gamma$ H2AX-Foci bei angenommenen 1 % der ESBs würde somit bereits zu etwa 300 Foci führen. Allerdings treten lediglich etwa 6  $\gamma$ H2AX-Foci in G1-Zellen auf (Abb. 5.4), was mit der Arbeit von Fisher et al. (2007) konsistent ist. Dieser Wert korreliert gut mit dem in der Literatur beschriebenen DSB:ESB-Verhältnis von 1:2.000 (Bradley & Kohn 1979). In der G2-Phase sind etwa 12  $\gamma$ H2AX-Foci nachweisbar (Abb. 5.4), was den doppelten DNA-Gehalt in der G2-Phase widerspiegelt.

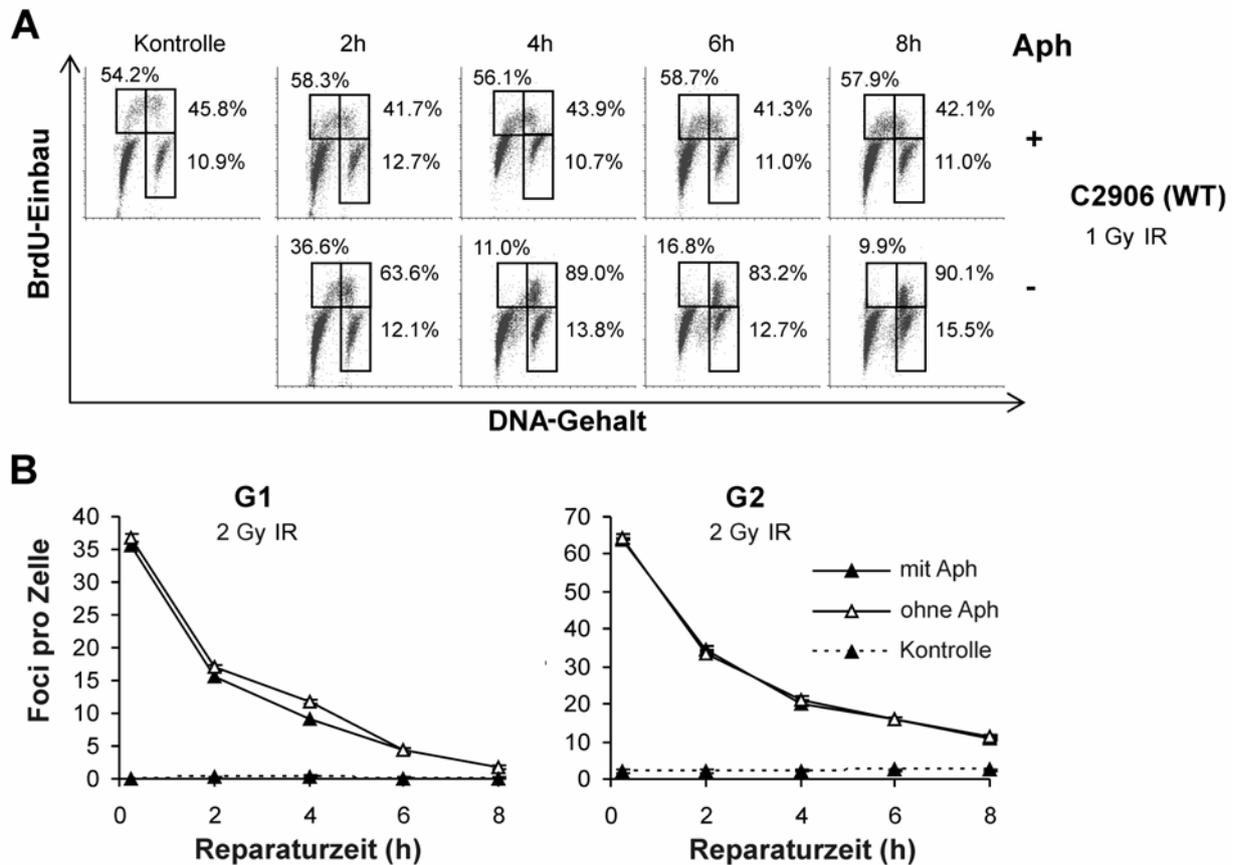
Dieses Ergebnis ist ein weiterer Beweis, dass  $\gamma$ H2AX-Foci sowohl in der G1- wie auch in der G2-Phase auf die Anwesenheit von DSBs zurückzuführen sind und die Methode somit zur Charakterisierung der DSB-Reparatur verwendet werden kann.

#### 5.1.4. Untersuchung des Einflusses von Aphidicolin auf exponentiell wachsende Zellen

Nach erfolgter Reparatur von DNA-Schäden werden Zellen aus ihrem Zellzyklusarrest entlassen und treten in die nächste Phase ein. Dies bedeutet, dass im Normalfall bei der Untersuchung exponentiell wachsender Zellen ab einem gewissen Zeitpunkt Zellen aus einer vorangehenden Zellzyklusphase in die analysierte Population gelangen und gleichzeitig Zellen der analysierten Zellzyklusphase diese nach erfolgter Reparatur verlassen. Um den Übergang von Zellen aus der S- in die G2-Phase zu verhindern, werden die Zellen mit Aphidicolin behandelt. Das hohe Schadensmass, welches durch Aphidicolin hervorgerufen wird, sollte einen Übertritt von der S-Phase in die G2-Phase verhindern. Gleichzeitig muss sichergestellt werden, dass die durch die applizierte Dosis induzierte Zahl an DNA-Schäden ausreichend

hoch ist, um die Zellen im analysierten Zeitraum von 8 h in der G2-Phase zu halten. Nur so kann gewährleistet werden, dass bei der Analyse der Reparatur in G2 nur Zellen berücksichtigt werden, die sich zum Zeitpunkt der DSB-Induktion durch Bestrahlung oder Chemikalienbehandlung in der G2-Phase befinden.

Zur eingehenden Untersuchung der Dynamik in der Zellzyklusverteilung nach IR-Behandlung sowie unter Aphidicolineinfluss wurden durchflusszytometrische Ansätze (*fluorescence activated cell scanning*, FACS) benutzt (Abb. 5.5A). Exponentiell wachsende Zellen wurden mit dem Basenanalogen 5-Bromo-2'-deoxy-Uridin (BrdU) pulsmarkiert. Dieses wird während der Replikation ins Genom integriert und markiert somit Zellen in der S-Phase. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit Aphidicolin bzw. mit DMSO behandelt und nach Ablauf der jeweiligen Reparaturzeit für die FACS-Analyse geerntet. Der interkalierende DNA-Farbstoff Propidiumiodid (PI) erlaubte die Analyse der Zellzyklusverteilung der Gesamtpopulation. Nach Vermessung einer Probe im Durchflusszytometer wurde der DNA-Gehalt der vermessenen Zellen in einem *Dotplot* gegen das BrdU-Signal aufgetragen (Abb. 5.5A). Zellen mit einfachem DNA-Gehalt bilden die G1-, diejenigen mit doppeltem DNA-Gehalt die G2-Population. Zellen in der S-Phase besitzen einen DNA-Gehalt, der zwischen G1 und G2 liegt. Die BrdU-markierte Population setzt sich deutlich von den unmarkierten Zellen ab und befindet sich in der S-Phase. Um den Zellzyklusarrest durch Aphidicolin in der S-Phase und jenen durch die Bestrahlung in der G2-Phase zu verfolgen, wurde eine Einteilung in frühe und späte S-Phase vorgenommen und die Veränderung dieser Fraktionen über die Zeit beobachtet. Zudem wurde der Anteil nicht-markierter G2-Zellen an der Gesamtpopulation bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb. 5.5A dargestellt.



**Abbildung 5.5:** Einfluss von Aphidicolin auf exponentiell wachsende primäre humane Fibroblasten

**(A)** Durchflusszytometrische Analyse von BrdU-markierten Zellen nach Bestrahlung und mit bzw. ohne Aphidicolin-Behandlung. Wildtyp-Zellen (C2906) wurden für 1 h mit BrdU pulsmarkiert, bestrahlt (1 Gy IR) und mit Aphidicolin bzw. DMSO versetzt. Nach Ablauf der Reparaturzeit (15 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h) wurden die Zellen fixiert. Die Kontrolle wurde zum Zeitpunkt der Bestrahlung fixiert. Zur Identifizierung der BrdU-markierten Population wurde mit einem spezifischen BrdU-Antikörper gefärbt, zudem erfolgte die unspezifische Färbung der DNA mit PI. Nach Vermessung im FACS wurde der anhand des PI-Signals ermittelte DNA-Gehalt (X-Achse, dimensionslos, linear) in einem *Dotplot* gegen das spezifische BrdU-Signal (Y-Achse, dimensionslos, logarithmisch) aufgetragen. Jeder Punkt entspricht einer Zelle. Die G1-Population besitzt einfachen, die G2-Population doppelten DNA-Gehalt. Zellen in der S-Phase weisen einen DNA-Gehalt zwischen G1 und G2 auf. Deutlich zu erkennen ist die Gruppe der BrdU-positiven Zellen, die auf der Y-Achse nach oben verschoben ist und vor allem S-Zellen enthält. Die BrdU-Population wurde in frühe und späte S-Phase unterteilt und quantifiziert (Prozentangaben neben den oberen Rechtecken). Zudem wurde der Anteil von G2-Zellen zur Gesamtpopulation ermittelt (Prozentangaben neben den unteren Rechtecken). Somit konnten Änderungen der Zellzyklusverteilung im Lauf der Reparaturzeit quantifiziert werden. Die Prozentangaben entsprechen den im gezeigten Experiment ermittelten Werten.

**(B)**  $\gamma$ H2AX-Analyse von Aphidicolin-behandelten Fibroblasten. Wildtyp-Zellen (HSF1) wurden bestrahlt (2 Gy IR) und anschließend mit Aphidicolin bzw. DMSO versetzt. Nach Ablauf der Reparaturzeit (15 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h) erfolgte die Fixierung. Zudem wurden Kontrollzellen ohne Bestrahlung mit Aphidicolin versetzt und einer identischen Behandlung unterzogen. Nach Immunfluoreszenzfärbung gegen  $\gamma$ H2AX und CENP-F wurden die verbliebenen DSBs in G1- und G2-Zellen quantifiziert. Die dargestellten Datenpunkte zeigen den Mittelwert aus mindestens 40 ausgewerteten Zellen. Bei sehr niedrigen Focizahlen wurden so viele Zellen analysiert bis mindestens 40 Foci gezählt wurden. In Kontrollen betrug der Foci-Wert etwa 0,2 Foci in G1 und 2 Foci in G2 und wurde von den Werten der bestrahlten Proben abgezogen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Messwerte und liegen teilweise innerhalb der Symbole.

Zum Zeitpunkt der Bestrahlung befinden sich etwa 54 % der BrdU-markierten Population in der frühen und etwa 46 % in der späten S-Phase. Ohne Aphidicolinbehandlung progressieren die Zellen weiter durch die S-Phase. Die BrdU-Population verlagert sich kontinuierlich nach

spät S/G2, 8 h nach Bestrahlung finden sich 90 % der markierten Zellen in dieser Phase. Auch der Anteil der G2-Phase gegenüber der Gesamtpopulation vergrößert sich auf 15,5 % (Abb. 5.5A). Dagegen ändert sich die Zellzyklusverteilung der BrdU-markierten Population nach Aphidicolin-Behandlung im Zeitverlauf nicht maßgeblich. 8 h nach Bestrahlung enthält die BrdU-Population zu 57,9 % Zellen in der frühen und zu 42,1 % Zellen in der späten S-Phase. Auch der Anteil der G2-Zellen an der Gesamtpopulation bleibt nach Aphidicolinzugabe mit etwa 11 % bis 8 h nach Bestrahlung konstant (Abb. 5.5A). Das Ergebnis der FACS-Studien zeigt, dass eine Durchmischung der gewünschten G2-Population mit Zellen aus anderen Zellzyklusphasen durch Behandlung mit Aphidicolin unterbunden wird. Außerdem verbleiben Zellen nach Bestrahlung ausreichend lange in der G2-Phase, um eine Analyse der DSB-Reparatur auch 6-8 h nach Bestrahlung gewährleisten zu können.

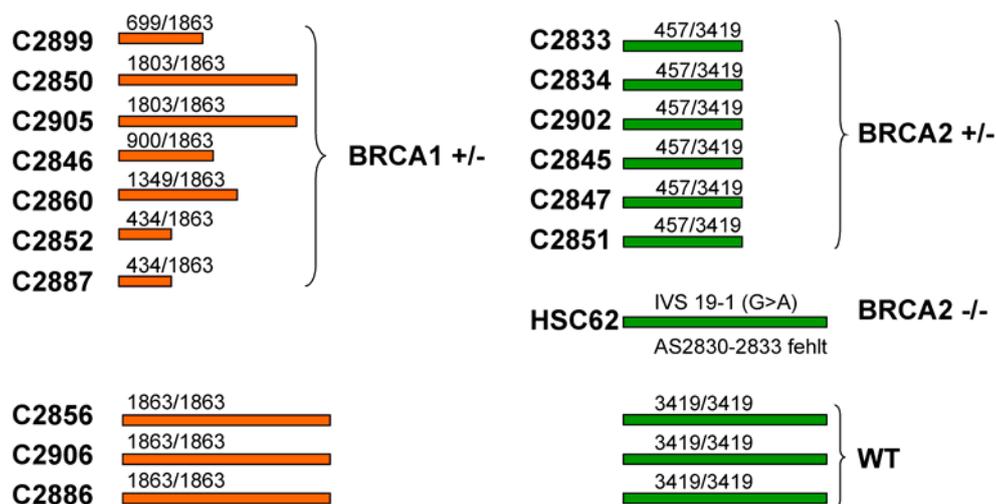
Aphidicolin wird mit der Entstehung von replikationsassoziierten DSBs während der S-Phase in Verbindung gebracht (Rothkamm & Lobrich 2003). Um sicherzustellen, dass durch die Behandlung mit Aphidicolin keine zusätzlichen DSBs in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus entstehen, wurden exponentiell wachsende primäre humane Fibroblasten nach Bestrahlung mit Aphidicolin versetzt. Um die Induktion von DSBs nach unterschiedlich langen Einwirkzeiten zu untersuchen, wurden parallel Kontrollzellen ohne Bestrahlung mit Aphidicolin versetzt und identisch behandelt. Nach Fixierung und spezifischer Färbung gegen  $\gamma$ H2AX und CENP-F wurde die Anzahl an DSBs in G1 und G2 quantifiziert. Das Ergebnis ist in Abb. 5.5B dargestellt. Die Auswertung der  $\gamma$ H2AX-Foci in bestrahlten Zellen ohne Aphidicolinbehandlung erlaubt die Generierung von Reparaturkinetiken, die in G1 und G2 einen sehr ähnlichen Verlauf zeigen. Dabei weisen G2-Zellen etwa doppelt so viele  $\gamma$ H2AX-Foci auf wie G1-Zellen. Die Reparaturkinetik der mit Aphidicolin behandelten Zellen unterscheidet sich nicht von unbehandelten Zellen. Die Behandlung mit IR induziert in den unterschiedlich behandelten Proben jeweils etwa 35 Foci in G1 und 63-65 Foci in G2, die innerhalb der untersuchten Reparaturzeit von maximal 8 h auf etwa 1,3 Foci in G1 und etwa 10 Foci in G2 reduziert werden (Abb. 5.5B). Auch unbestrahlte Kontrollen weisen nach Aphidicolin-Einwirkzeiten von bis zu 8 h keine zusätzlichen DSBs gegenüber unbehandelten Proben auf und zeigen über den gesamten beobachteten Zeitraum 0,1-0,3 Foci in G1 und etwa 2 Foci in G2 (Abb. 5.5B). Dies zeigt, dass durch die beschriebene Anwendung von Aphidicolin keine zusätzlichen DSBs in G1 und G2 induziert werden.

Die durchgeführten Kontrollexperimente belegen, dass die  $\gamma$ H2AX-Foci-Analyse eine geeignete Methode zur Charakterisierung der DSB-Reparatur nicht nur in G1, sondern auch in der G2-Phase des Zellzyklus darstellt.

## 5.2. Das Reparaturverhalten von BRCA1- und BRCA2-heterozygoten Zellen

Frauen mit einer erblichen Prädisposition für Brustkrebs tragen oftmals Mutationen in BRCA1 oder BRCA2 und werden in der Regel routinemäßig ab etwa fünf Jahre vor dem frühesten Brustkrebsfall in der Familie zweimal jährlich einer mammographischen Untersuchung unterzogen, um entstandene Tumore möglichst frühzeitig zu erkennen. Ionisierende Strahlung, wie sie auch bei mammographischen Untersuchungen eingesetzt wird, induziert DSBs, eine der schwerwiegendsten Läsionen der DNA. Die Tatsache, dass sowohl BRCA1 wie auch BRCA2 an der DNA-Schadensantwort nach dem Auftreten von DSBs beteiligt sind, wirft die Frage auf, inwieweit die Trägerinnen dieser heterozygoten BRCA-Mutationen Einschränkungen in der Reparaturkapazität und damit ein erhöhtes Risiko für Fehlreparatur und daraus entstehende Mutationen aufweisen.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden primäre humane Fibroblasten mit Mutationen in BRCA1 bzw. BRCA2 untersucht. Die Mutationen bedingen Trunkationen unterschiedlichen Ausmaßes im entstehenden Restprotein. Daneben wurde eine Zelllinie mit homozygoter Mutation in BRCA2, die zum Verlust von lediglich 4 AS (2830-2833) ohne C-terminale Trunkation führt, sowie verschiedene Wildtypzelllinien (WT) in die Analyse einbezogen (Abb. 5.6).



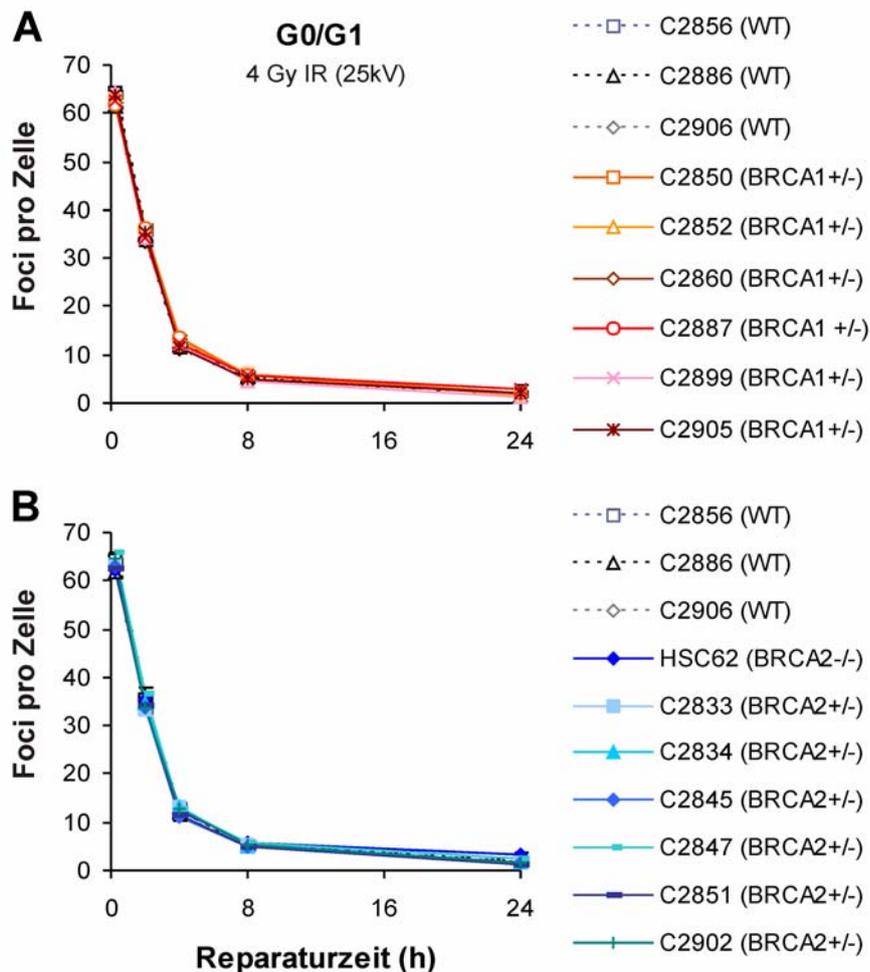
**Abbildung 5.6:** Mutationsvarianten von BRCA1 und BRCA2 in untersuchten primären humanen Fibroblasten.

Zur Charakterisierung der Reparaturkapazität von Zellen mit Mutationen in BRCA1 und BRCA2 wurden 7 Zelllinien mit unterschiedlicher heterozygoter Mutation in BRCA1 (C2899, 2850, 2905, 2846, 2860, 2852, 2887) und 6 Zelllinien mit heterozygoter Mutation in BRCA2 (C2833, 2834, 2902, 2845, 2847, 2851) untersucht. Daneben standen eine Zelllinie mit homozygoter BRCA2-Mutation (HSC62) sowie drei verschiedene Wildtyp (WT) Zelllinien (C2856, C2906, C2886) zur Verfügung.

### 5.2.1. Analyse von konfluenten BRCA1- und BRCA2 heterozygoten Zellen nach Mammographie-ähnlicher Röntgenstrahlung

In einem Organismus befinden sich die meisten Zellen nach der Spezialisierung auf die jeweilige Aufgabe in einem teilungsinaktiven Zustand. Unter Zellkulturbedingungen kann dieser Zustand durch Konfluenz nachempfunden werden. Nach dem Erreichen eines gewissen Dichtegrades stellen die verwendeten primären Fibroblasten nach Kontaktinhibition ihre Teilungsaktivität ein und befinden sich zu mindestens 95 % in der G1- bzw. G0-Phase (Kuhne et al. 2004).

Zur Untersuchung der Reparaturkapazität wurden die primären humanen Fibroblasten bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert und mit Mammographie-ähnlicher Röntgenstrahlung (25 kV) behandelt. Nach Ablauf der Reparaturzeit von maximal 24 h erfolgte die Fixierung der Zellen. Vorhandene Doppelstrangbrüche wurden durch den immunfluoreszenztechnischen Nachweis von  $\gamma$ H2AX sichtbar gemacht.



**Abbildung 5.7:**  $\gamma$ H2AX-Foci-Analyse von primären humanen Fibroblasten in G0/G1.

**(A)** Reparaturkinetik von Wildtypzellen (WT) sowie Zellen mit heterozygoter Mutation in BRCA1 15 min, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h nach 4 Gy 25 kV-Röntgenstrahlung.

**(B)** Reparaturkinetik von Wildtypzellen (WT), Zellen mit heterozygoter Mutation in BRCA2 und der homozygot defekten BRCA2-Mutante HSC62 15 min, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h nach 4 Gy 25 kV-Röntgenstrahlung. Der Hintergrundwert der unbestrahlten Kontrollen (0,1-0,5 Foci) wurde jeweils von den Reparaturwerten abgezogen. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Ansätzen, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler der Mittelwerte dar und liegen teilweise innerhalb der verwendeten Symbole.

Die Analyse der  $\gamma$ H2AX-Reparaturkinetiken von Zellen mit heterozygoten Defekten in BRCA1 (Abb. 5.7A) und BRCA2 sowie einer homozygoten BRCA2-Mutante (Abb. 5.7B) lässt keine Unterschiede des DSB-Reparaturvermögens im Vergleich zu verschiedenen Wildtypzellen erkennen. Alle untersuchten Zelllinien zeigen einen identischen zeitlichen Verlauf der

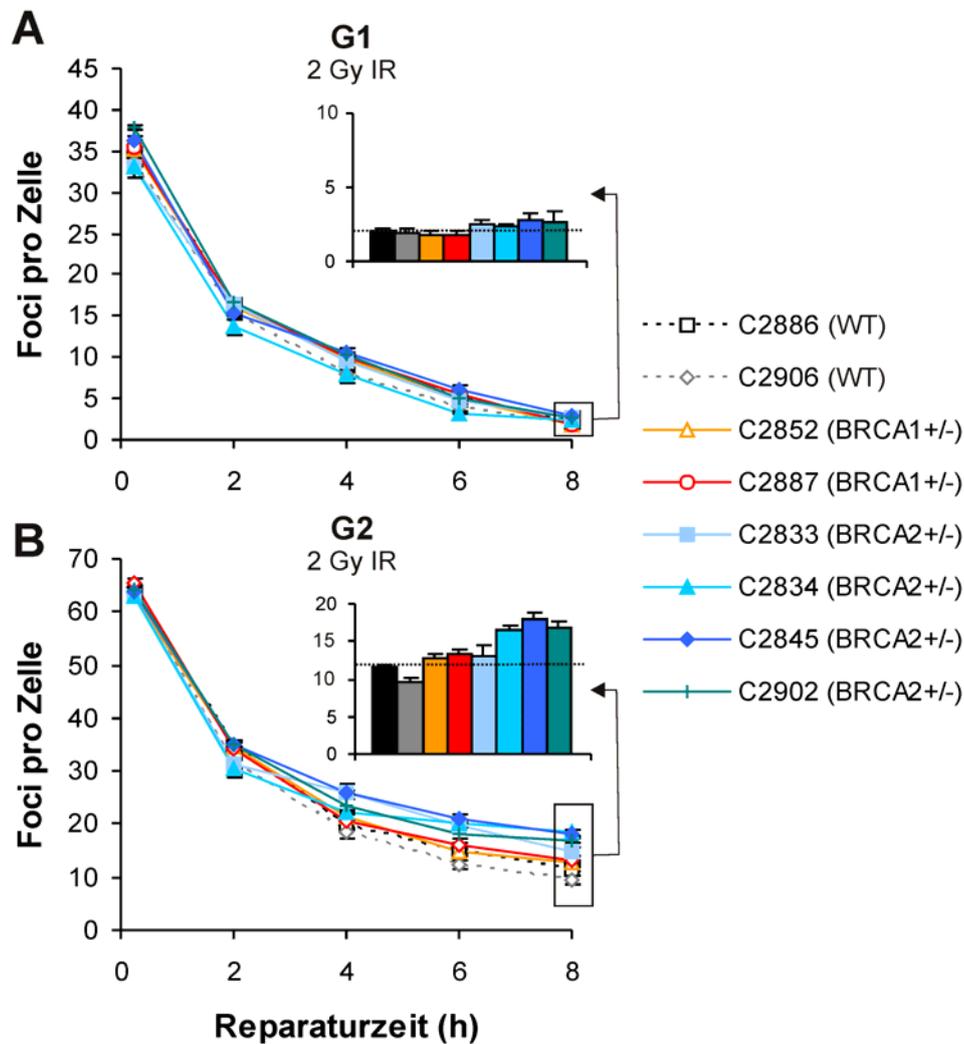
Reparatur. Durch 4 Gy (25 kV) Röntgenbestrahlung werden 62-64 DSBs induziert, von denen 55-80 % innerhalb einer schnellen Reparaturphase von 2-4 h repariert werden. Während der anschließenden langsamen Reparaturphase werden die verbliebenen Brüche beseitigt. Nach 24 h ist mit 1-3 verbliebenen  $\gamma$ H2AX-Foci das Hintergrundniveau einer unbestrahlten Kontrollzelle nahezu erreicht (Abb. 5.7).

Somit wurde gezeigt, dass das Reparaturvermögen von stationären Zellen durch heterozygote Mutationen in BRCA1 und BRCA2 nicht beeinträchtigt wird. Auch die homozygote BRCA2-Mutante HSC62 zeigt keinen signifikant anderen Reparaturverlauf als Wildtypzellen. Da für die Reparatur von DSBs in der G0/G1 Phase ausschließlich der Reparaturweg des NHEJ zur Verfügung steht (Riballo et al. 2004), ist dieses Ergebnis auch konsistent mit der Annahme, dass BRCA2 keine Funktion im NHEJ hat.

### **5.2.2. Untersuchung des zellzyklusabhängigen Reparaturverhaltens von primären humanen Fibroblasten mit Defekten in BRCA1 und BRCA2**

Es konnte gezeigt werden, dass durch Mammographie-ähnliche Röntgenstrahlung (25 kV) induzierte DSBs mit ähnlicher Kinetik repariert werden wie DNA-Schäden, die durch höherenergetische Standard-Röntgenstrahlung (120 kV) verursacht wurden (Kegel et al. 2007). Zur besseren Vergleichbarkeit mit Daten aus früheren und laufenden Studien wurden darum die folgenden Untersuchungen zur Charakterisierung der zellzyklusabhängigen Reparatur mit 90 kV-Röntgenstrahlung durchgeführt.

Zur Untersuchung der Reparaturkapazität von primären humanen Fibroblasten mit Mutationen in BRCA1 und BRCA2 in verschiedenen Phasen des Zellzyklus wurden ausgewählte Zelllinien in einer definierten Zellzahl auf Deckgläsern ausgesät und nach 48 h mit Röntgenstrahlung behandelt. Nach der Zugabe von Aphidicolin wurden die Zellen zur Reparatur weiter kultiviert und anschließend fixiert. Nach Immunfluoreszenzfärbung von  $\gamma$ H2AX und CENP-F wurde die Anzahl an  $\gamma$ H2AX-Foci in G1 und G2 analysiert.



**Abbildung 5.8:**  $\gamma$ H2AX-Analyse von primären humanen Fibroblasten mit heterozygoter Mutation in BRCA1 bzw. BRCA2 in der G1- und G2-Phase.

Exponentiell wachsende BRCA1- und BRCA2-Mutanten wurden mit 2 Gy IR bestrahlt, anschließend mit Aphidicolin versetzt und zur Reparatur für 15 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h kultiviert. Nach erfolgter Fixierung wurden  $\gamma$ H2AX und CENP-F immunfluoreszenztechnisch gefärbt. Die Quantifizierung der  $\gamma$ H2AX-Foci erfolgte in G1 (**A**) und G2 (**B**). Der 8 h-Reparaturpunkt ist zusätzlich als Balkendiagramm dargestellt. Die gezeigten Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten aus mindestens drei unabhängigen Ansätzen. Die unbestrahlten Kontrollen betragen 0,1-0,3 Foci in G1 und 1,5-3,0 Foci in G2 und wurden von den gezeigten Werten abgezogen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte und liegen teilweise innerhalb der Symbole.

In Übereinstimmung mit der Analyse der BRCA1- und BRCA2-Mutanten in konfluenten Zellen (G0/G1) ist auch in der G1-Phase von exponentiell wachsenden Zellen kein Unterschied im Reparaturverhalten der verschiedenen Zelllinien im Vergleich zum WT erkennbar (Abb 5.8A). Der Verlauf der Kinetik ist in allen untersuchten Zelllinien sehr ähnlich. Durch Bestrahlung mit 2 Gy IR werden in der G1-Phase 33-37 DSBs induziert, von denen über 50 % innerhalb einer schnellen Reparaturphase von 2 h beseitigt werden. Die restlichen DNA-Schäden werden in einer anschließenden langsamen Phase innerhalb der beobachteten Reparaturzeit von 8 h bis auf 1-3 Foci repariert (Abb 5.8A). Dieses Ergebnis zeigt, dass das Reparaturvermögen der Zellen in G1 durch eine heterozygote Mutation in BRCA1 und BRCA2 nicht beeinträchtigt wird.

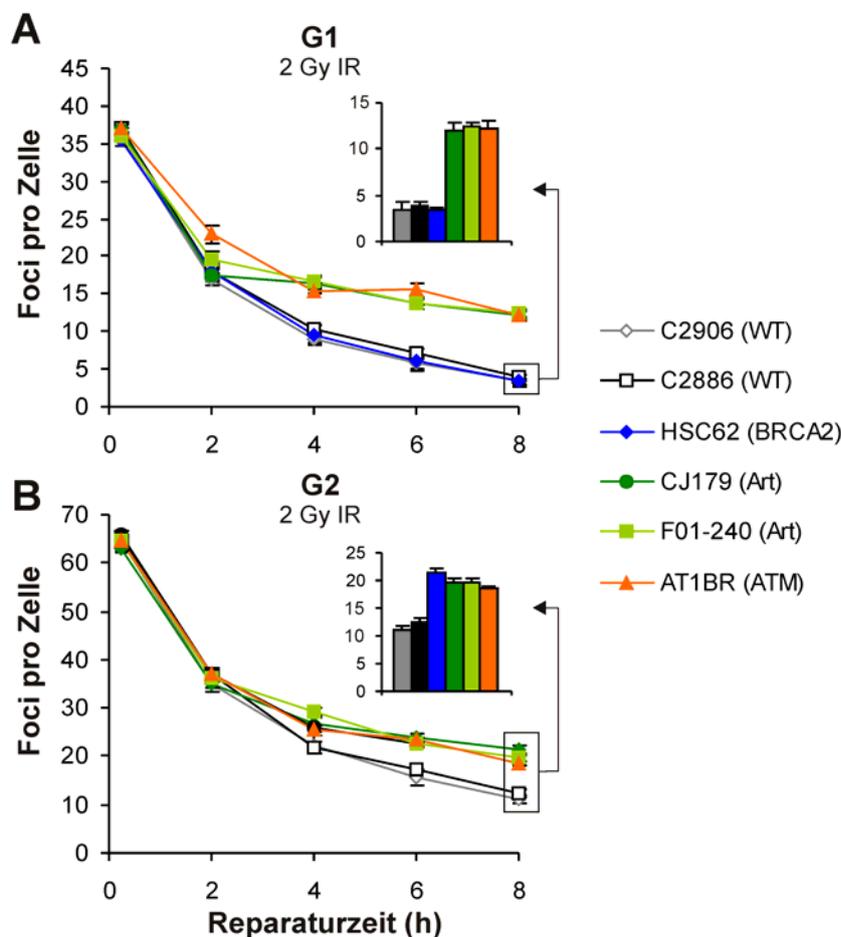
In G2-Zellen treten nach 2 Gy Röntgenstrahlung 62-65  $\gamma$ H2AX-Foci auf. Die Reparatur von IR-induzierten DSBs zeigt auch in G2 einen biphasischen Verlauf. Innerhalb von 2 h werden etwa 50 % der initialen DNA-Schäden durch die schnelle Komponente repariert. Die langsame Komponente beseitigt den Rest der DSBs. Nach Ablauf der maximalen Reparaturzeit von 8 h ist in WT-Zellen ein Restschaden von 9-12 Foci nachweisbar. Die Analyse der heterozygoten BRCA1-Mutanten C2852 und C2887 zeigt in G2 keine signifikanten Unterschiede zum WT. Dagegen zeigt sich das Bild in BRCA2-Mutanten sehr heterogen. Obwohl die untersuchten heterozygoten BRCA2-Mutanten die gleiche Mutation tragen (Abb. 5.6) zeigen sie 8 h nach Bestrahlung ein unterschiedliches Ausmaß an unreparierten Brüchen. Während die Mutante C2833 nahezu auf WT-Niveau repariert, zeigen C2845 und C2902 ein gegenüber dem WT um 6-9 Foci erhöhtes Maß an verbliebenen  $\gamma$ H2AX-Foci (Abb. 5.8B).

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass bereits der Verlust eines Allels von BRCA2 zu einer Beeinträchtigung des Reparaturvermögens in der G2-Phase führen kann, während der Verlust eines Allels von BRCA1 ohne negative Auswirkungen bleibt. Jedoch besteht kein direkter Zusammenhang zwischen einer spezifischen BRCA2-Mutation und der Einschränkung des Reparaturvermögens, da die gleiche BRCA2-Mutation in verschiedenen Zellen zu unterschiedlich ausgeprägten reparaturdefizienten Phänotypen führt. In der G1-Phase des Zellzyklus und in ruhenden Zellen bleiben heterozygote Mutationen in BRCA1 und BRCA2 ohne Auswirkung.

### **5.3. DSB-Reparatur in primären humanen Fibroblasten mit homozygoter Mutation in BRCA2 im Vergleich zu ATM- bzw. Artemis-defizienten Zellen**

#### **5.3.1. Analyse des Reparaturverhaltens mit Hilfe der $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenz**

BRCA2 ist als wichtiger Faktor der Homologen Rekombination beschrieben (Valerie & Povirk 2003). Wie in Kapitel 5.2 gezeigt werden konnte, kann bereits der Ausfall eines Allels Auswirkungen auf die Reparatur von strahleninduzierten DSBs haben. Um das Ausmaß des Reparaturdefekts in den heterozygoten Mutanten einordnen zu können, wurde im Folgenden der Einfluss einer homozygoten Mutation von BRCA2 auf das Reparaturvermögen von primären Fibroblasten nach Applikation von IR untersucht. Da die homozygote BRCA2-Mutante keine reparaturspezifische Funktion mehr erfüllt (Arnold et al. 2006), kann anhand der Reparaturstudien in diesen Zellen der Anteil der HR an der Gesamt-DSB-Reparatur analysiert werden. Fibroblasten mit Funktionsverlust von ATM und Artemis wurden zusätzlich mitgeführt, um den Reparaturdefekt dieser Zellen in Relation zum Defekt einer HR-Mutante setzen zu können. Exponentiell wachsende primäre humane Fibroblasten mit Defekten in BRCA2 (HSC62), Artemis (CJ179, F01-240), ATM (AT1BR) sowie verschiedene WT-Fibroblasten (C2906, C2886) wurden nach der Bestrahlung mittels  $\gamma$ H2AX-Foci-Analyse in G1 und G2 analysiert. Die Erkennung der Zellzyklusphasen wurde durch parallele Immunfluoreszenzfärbung von CENP-F ermöglicht.



**Abbildung 5.9:**  $\gamma$ H2AX-Foci-Analyse von Fibroblasten mit Defekten in BRCA2, ATM und Artemis nach IR.

Primäre humane Fibroblasten mit Defekten in BRCA2 (HSC62), ATM (AT1BR) und Artemis (CJ179, F01-240) sowie WT-Zellen (C2906, C2886) wurden im exponentiellen Wachstum mit 2 Gy IR bestrahlt und für 15 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h kultiviert. Nach Ablauf der jeweiligen Reparaturzeit wurden die Zellen fixiert und mit Antikörpern gegen  $\gamma$ H2AX und CENP-F gefärbt. Die Auswertung erfolgte in G1 (**A**) und G2 (**B**). Der 8 h-Punkt wurde zudem als Balkendiagramm dargestellt. Die gezeigten Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Ansätzen. Der in Kontrollen ermittelte Hintergrund (0,2-0,7 Foci in G1; 2,5-4,0 Foci in G2) wurde von den Reparaturwerten abgezogen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

In der G1-Phase induziert die Behandlung mit 2 Gy IR in allen untersuchten Zelllinien 34-36 DSBs, die mit fortschreitender Reparaturzeit wieder verschwinden. Die Reparaturkinetik der BRCA2-Mutante HSC62 unterscheidet sich in G1 nicht vom WT. Beide zeigen den charakteristischen biphasischen Verlauf. Die schnelle Komponente beseitigt innerhalb der ersten 2 h bereits über 50 % der induzierten DNA-Schäden, die langsame Komponente setzt die Reparatur bis zu einem Schadenslevel von etwa 3 Foci bei 8 h fort (Abb. 5.9A). Dagegen zeigen ATM- und Artemis-defiziente Zellen den bereits beschriebenen Defekt in der langsamen Komponente der Reparatur (Riballo et al. 2004, Deckbar et al. 2006). Bis etwa 2 h unterscheiden sich ATM- und Artemis-defiziente Zellen nicht wesentlich vom WT, die schnelle Komponente der Reparatur wird nicht beeinflusst. Ab etwa 2 h manifestiert sich ein zunehmender Reparaturdefekt, der bei 8 h etwa 20 % der Brüche unrepariert belässt (Abb. 5.9A).

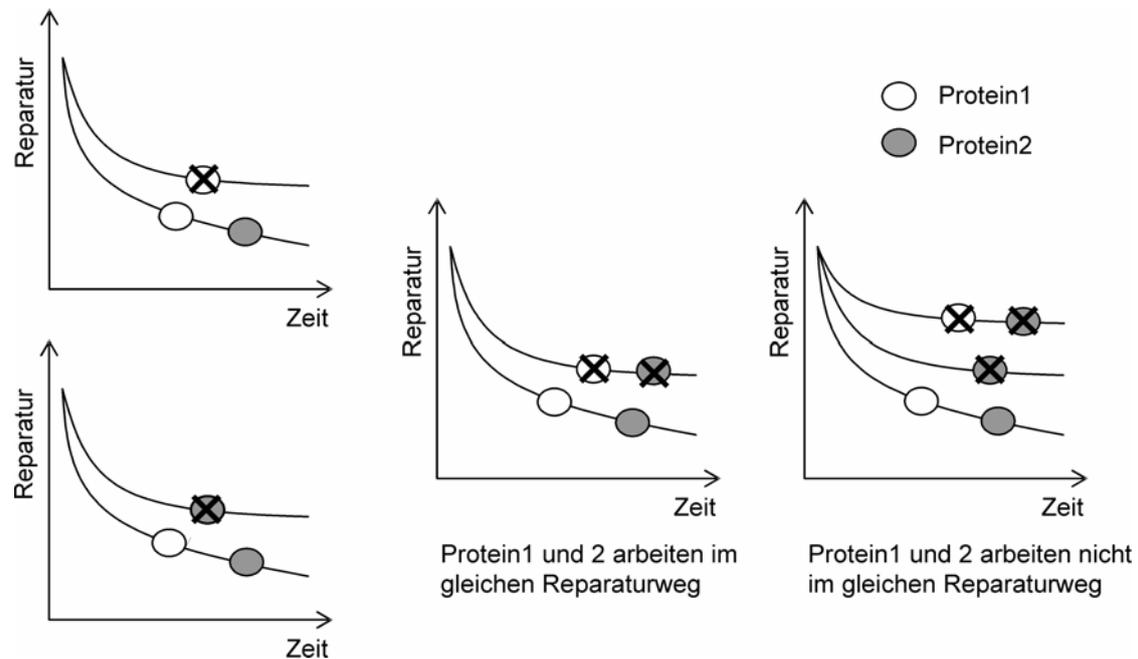
In G2 treten nach Bestrahlung mit 2 Gy IR 63-66  $\gamma$ H2AX-Foci auf. Bis 2 h nach Bestrahlung reparieren WT-Zellen über 50 % des induzierten Schadens über die schnelle Komponente, die restlichen DSBs werden innerhalb der folgenden 6 h bis auf einen verbleibenden Restschaden von 9-11 Foci langsam beseitigt (Abb. 5.9B). Im Vergleich dazu zeigt die Reparaturkinetik von

BRCA2-defizienten Zellen in G2 einen anderen Verlauf. Bis 2 h ist kein Unterschied zur WT-Reparaturkinetik erkennbar, jedoch verbleibt ab etwa 2 h eine zunehmende Anzahl an DSBs unrepariert, die bei 8 h etwa 15-20 % der initial vorhandenen Brüche ausmachen. Überraschenderweise zeigen sowohl der Verlauf der Reparaturkinetik wie auch das Ausmaß des Reparaturdefektes sehr große Ähnlichkeit mit ATM- und Artemis-defizienten Zellen (Abb. 5.9B).

In G2 unterscheiden sich die Kinetiken von BRCA2-defizienten HSC62 und WT-Zellen. Somit konnte eine Beteiligung der HR an der Reparatur von strahleninduzierten Brüchen nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass die Kinetiken von BRCA2-, ATM- und Artemis-defizienten Zellen einen sehr ähnlichen Verlauf zeigen und zu einem Reparaturdefekt von identischem Ausmaß führen, ist sehr überraschend. Dieses Ergebnis deutet möglicherweise darauf hin, dass ATM und Artemis zusammen mit BRCA2 in einem gemeinsamen Reparaturweg arbeiten. Die gezeigten Ergebnisse bringen beide Proteine in der G2-Phase mit dem Reparaturweg der HR in Verbindung. Zur Verifizierung dieses sehr überraschenden Ergebnisses wurden im Folgenden Epistasisanalysen durchgeführt.

### **5.3.2. Epistasisanalyse mit Hilfe der $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenz**

Eine Möglichkeit zur mechanistischen Charakterisierung eines Reparaturweges sind Epistasisanalysen. Diese helfen bei der Zuordnung von Reparaturfaktoren zu einem gemeinsamen oder zu getrennten Reparaturwegen. Dazu wird der Einfluss der zuzuordnenden Proteine auf das Reparaturvermögen einer Zelle alleine und in Kombination untersucht. Arbeiten zwei Enzyme an einem gemeinsamen Weg und führt das Fehlen jedes Einzelnen zur Entstehung eines Reparaturdefektes, so sollte sich dieser Defekt beim Ausschalten beider Faktoren nicht vergrößern, da der gemeinsame Weg bereits durch das Fehlen eines Proteins nicht mehr funktionsfähig ist. In diesem Fall sind beide Proteine epistatisch. Arbeiten die zu charakterisierenden Proteine jedoch in getrennten Reparaturwegen, so wird durch das kombinierte Ausschalten beider Proteine der Reparaturdefekt vergrößert, da sich die Defekte aus zwei ausgeschalteten Reparaturwegen aufaddieren (Abb. 5.10). Zum gezielten Ausschalten von Proteinen bietet sich die Verwendung von hochspezifischen chemischen Inhibitoren an, außerdem können Proteine mit Hilfe von spezifischer siRNA sehr effizient herunterreguliert werden.

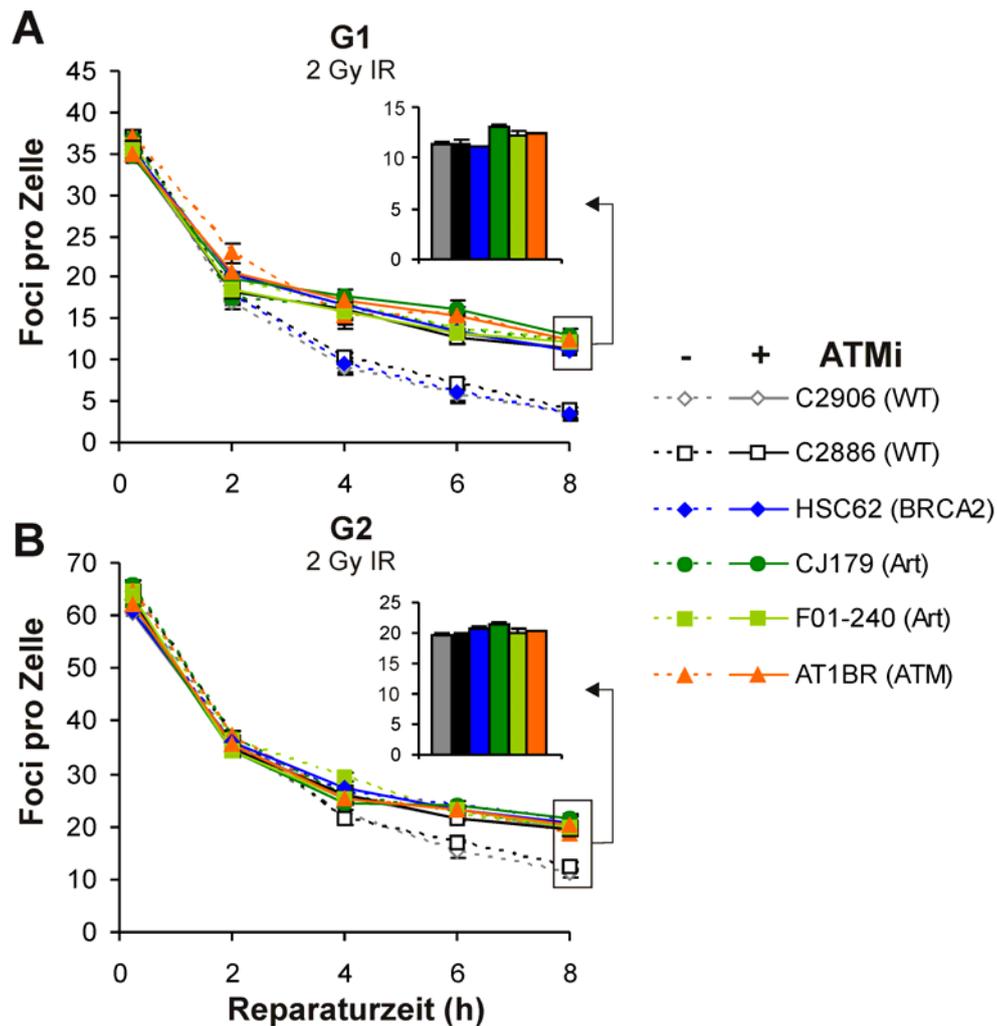


**Abbildung 5.10:** Schematische Darstellung des Prinzips der Epistasisanalyse.

Untersucht werden soll, ob Protein 1 und Protein 2 an einem gemeinsamen Reparaturweg beteiligt sind. Defekte in Protein 1 führen ebenso wie Defekte in Protein 2 zum Auftreten eines Reparaturdefektes mit ähnlicher Kinetik und identischem Ausmaß. Durch das kombinierte Ausschalten von Protein 1 und Protein 2 lässt sich eine Aussage über das Zusammenspiel beider Proteine treffen. Wirken beide in einem gemeinsamen Reparaturweg, so ändert sich die Kinetik im Vergleich zum Defekt in nur einem der beiden Proteine nicht. Protein A und Protein B sind epistatisch. Wirken sie dagegen in getrennten Wegen, so addiert sich der Defekt, der durch das Ausschalten von Protein 1 verursacht wird, auf den Defekt, der durch das fehlende Protein 2 entsteht.

Zur Überprüfung der Hypothese, dass BRCA2, ATM und Artemis an einem gemeinsamen Reparaturweg beteiligt sind, wurde eine Epistasisanalyse durchgeführt, bei der vor BRCA2- bzw. Artemis-defizientem Hintergrund zusätzlich mit Hilfe eines hochspezifischen Inhibitormoleküls ATM ausgeschaltet wurde.

Exponentiell wachsende primäre Fibroblasten mit Defekten in BRCA2, ATM und Artemis sowie verschiedene WT-Zellen wurden vor der Bestrahlung mit dem hochspezifischen ATM-Inhibitor KU55933 (ATMi) bzw. mit DMSO versetzt und nach Ablauf der jeweiligen Reparaturzeit fixiert. Die  $\gamma$ H2AX-Analyse erfolgte in G1 und G2.



**Abbildung 5.11:** Epistasisanalyse von ATM-, Artemis- und BRCA2-Mutanten.

Exponentiell wachsende primäre humane Fibroblasten mit Defekten in BRCA2 (HSC62), ATM (AT1BR), Artemis (CJ179, F01-240) sowie WT-Zellen (C2906, C2886) wurden 1 h vor Bestrahlung mit dem hochspezifischen ATM-Inhibitor Ku55933 (ATMi) bzw. mit DMSO behandelt und mit 2 Gy IR bestrahlt. Nach Ablauf der jeweiligen Reparaturzeit (15 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h) wurden die Zellen fixiert. Unbestrahlte Kontrollen wurden ebenfalls mit ATMi bzw. DMSO behandelt und gemeinsam mit dem 2 h-Reparaturpunkt fixiert. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit Antikörpern gegen  $\gamma$ H2AX und CENP-F durchgeführt. Die Auswertung erfolgte in G1 (**A**) und G2 (**B**). Das Balkendiagramm zeigt den 8 h Reparaturpunkt der mit ATMi-behandelten Zellen. Die Datenpunkte zeigen den Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Hintergrundwerte aus unbestrahlten Kontrollen (0,2-0,5 Foci in G1, 1,5-4,0 Foci in G2) wurden jeweils abgezogen. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler der Mittelwerte und werden teilweise von den Symbolen verdeckt. Die gestrichelt dargestellten Kinetiken ohne Inhibitorbehandlung wurden bereits in Abb. 5.9 gezeigt.

Durch Applikation von 2 Gy IR in G1 wird in allen untersuchten Zelllinien ein DNA-Schaden von 34-36 DSBs induziert, der auch durch Behandlung mit ATMi nicht vergrößert wird. Die Behandlung von ATM-defizienten Zellen mit ATMi hat keinen Einfluss auf den Verlauf der Reparaturkinetik, was die Spezifität des Inhibitormoleküls demonstriert. Erwartungsgemäß zeigen ATMi-behandelte Zellen mit Defekt in Artemis ebenfalls keine Veränderung im Verlauf der Kinetik oder im Ausmaß des Reparaturdefekts. Während unbehandelte WT-Zellen nach 8 h einen Restschaden von 3-4  $\gamma$ H2AX-Foci aufweisen, führt die Inhibierung von ATM durch Behandlung mit ATMi in WT-Fibroblasten zur Imitation des ATM-Defekts. Die resultierende

Reparaturkinetik verläuft wie in ATM-defizienten AT1BR und führt durch einen Defekt in der langsamen Reparaturkomponente zum Verbleiben von zusätzlich 8-9 DSBs, was einem Reparaturdefekt von etwa 15 % entspricht. Gleiches gilt für die BRCA2-Mutante HSC62, die nach 8 h ebenfalls einen Reparaturdefekt von etwa 15 % aufweist (Abb. 5.11A). Dieses Ergebnis bedeutet, dass ATM und Artemis nicht nur in G0/G1 epistatisch sind (Riballo et al. 2004), sondern dass dies auch in der G1-Phase proliferierender Zellen der Fall ist.

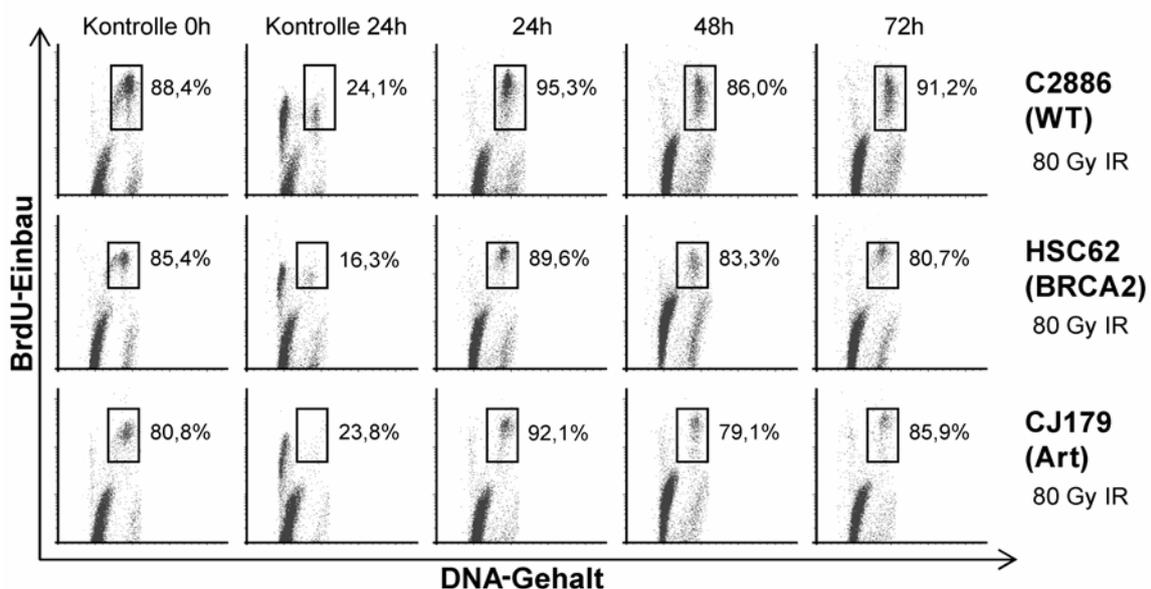
In G2 werden die nach 2 Gy IR auftretenden 62-65  $\gamma$ H2AX-Foci in unbehandelten WT-Fibroblasten durch die schnelle und langsame Reparaturkomponente bis auf etwa 10 DSBs nach 8 h repariert. Die ATMi-Behandlung von ATM-defizienten AT1BR hat in G2 keinen Einfluss auf den Verlauf der Reparaturkinetik und ist somit ein Beleg für die Spezifität des Inhibitors auch in G2. In ATMi-behandelten WT-Zellen tritt ein Reparaturdefekt von 15 % auf, was dem ATM-Defekt in G2-Zellen entspricht. Das Ausschalten von ATM in Artemis-defizienten Zellen führt auch in G2 zu keiner Veränderung der Kinetik gegenüber der unbehandelten Mutante. Der Reparaturdefekt von etwa 15 % bleibt konstant, sodass für ATM und Artemis auch in G2 Epistasie nachgewiesen werden konnte (Abb. 5.11B). Beide Proteine sind sowohl in der G1- als auch in der G2-Phase an einem gemeinsamen Reparaturweg beteiligt. Interessanterweise wird durch die Behandlung von BRCA2-defizienten HSC62 mit ATMi der vorhandene Reparaturdefekt von 15 % ebenfalls nicht vergrößert (Abb. 5.11B). Es liegt somit keine Additivität vor. Aus diesen Ergebnissen kann der überraschende Schluss gezogen werden, dass BRCA2 tatsächlich zusammen mit ATM und Artemis an einem gemeinsamen Reparaturweg arbeitet. Die Analysen bringen die bisher dem NHEJ zugeordneten Reparaturfaktoren ATM und Artemis in Zusammenhang mit dem Reparaturweg der HR.

### **5.3.3. Untersuchung der Reparaturkapazität durch Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)**

Da die  $\gamma$ H2AX-Analyse auf den Nachweis von modifizierten Proteinen an der Bruchstelle beschränkt ist, war es wünschenswert, unabhängige Methoden einzusetzen, die die direkte Messung von DSBs erlauben. Eine klassische Methode zur Untersuchung der DSB-Reparatur ist die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE). Diese beruht auf dem direkten physikalischen Nachweis von durch DSBs entstandenen DNA-Fragmenten (vergleiche Kapitel 3.6.2). Allerdings ist keine Unterscheidung von Zellzyklusphasen möglich, sodass diese Methode v. a. bei kontaktinhibierten Zellen in G0/G1 eingesetzt wird. Die Modifikation des klassischen Protokolls ermöglicht die Untersuchung der G2-spezifischen DSB-Reparatur. Mit Hilfe dieser Methode konnte der Reparaturdefekt von ATM- bzw. Artemis-defizienten Zellen in der G2-Phase gezeigt werden (Deckbar et al. 2007). Dieser Ansatz wurde zur Untersuchung der

Reparaturkapazität von BRCA2-defizienten Zellen im Vergleich zu Artemis-Mutanten in der G2-Phase eingesetzt.

Um sicherzustellen, dass mit dieser Methode spezifisch G2-Zellen untersucht werden, wurde die Progression der BrdU-markierten Zellpopulation in den unterschiedlichen Zelllinien überprüft. Exponentiell wachsende WT-Zellen (C2886) sowie BRCA2- (HSC62) und Artemis- (CJ179) defiziente Zellen wurden nach BrdU-Markierung in der G2-Phase bestrahlt und nach Ablauf der jeweiligen Reparaturzeit geerntet. Die durchflusszytometrische Analyse der geernteten Proben erlaubte eine Aussage darüber, inwieweit die markierte Population nach Ablauf der jeweiligen Reparaturzeit in G2 arretiert war. Dazu wurden die Proben mit BrdU-spezifischem Antikörper sowie dem DNA-interkalierenden Farbstoff Propidiumiodid (PI) gefärbt und im FACS vermessen. Anschließend wurde der mittels unspezifischer PI-Färbung ermittelte DNA-Gehalt in einem *Dotplot* gegen die Intensität des spezifischen BrdU-Signals aufgetragen. Der Anteil BrdU-positiver G2-Zellen zur gesamten BrdU-Population wurde jeweils errechnet und im Diagramm angegeben (Abb. 5.12).



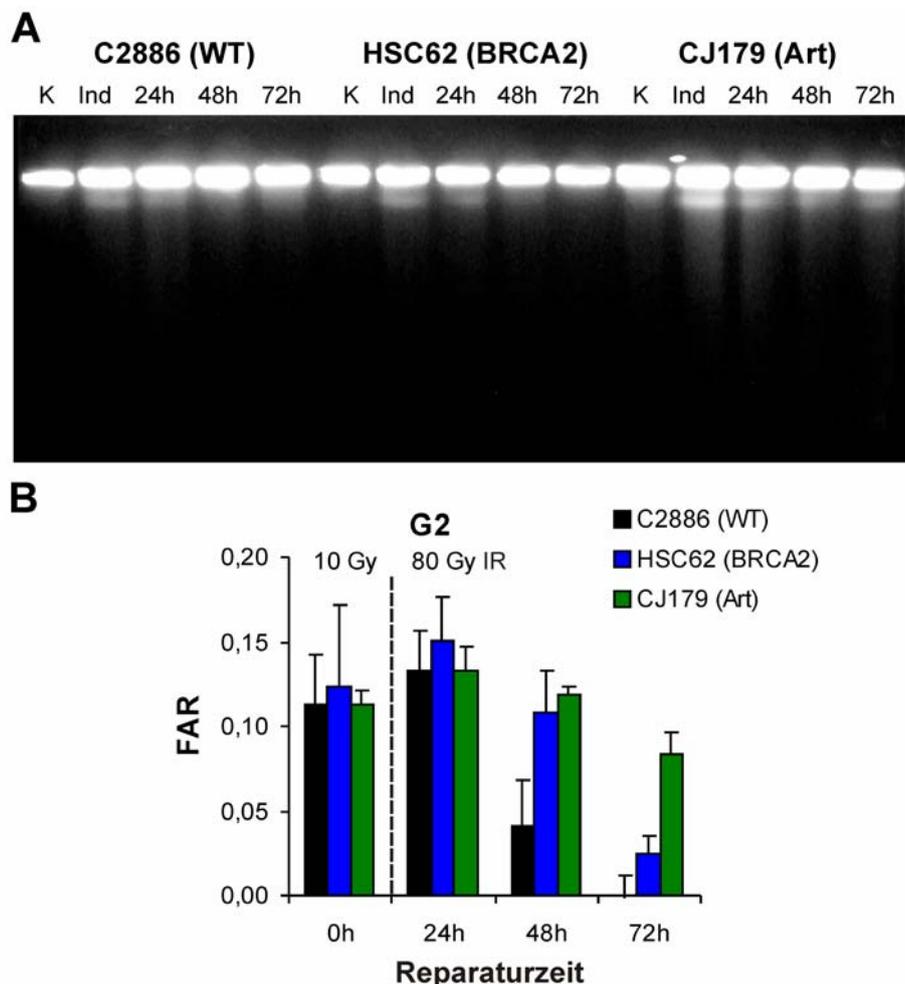
**Abbildung 5.12:** Repräsentative durchflusszytometrische Analyse von primären humanen Fibroblasten.

Exponentiell wachsende Fibroblasten mit Defekten in BRCA2 (HSC62) und Artemis (CJ179) sowie WT (C2886) wurden 1 h mit BrdU pulsmarkiert und 4 h kultiviert. Nach Bestrahlung mit 80 Gy IR wurde eine Reparaturzeit von 24 h, 48 h, 72 h gewährt und anschließend fixiert. Kontrollen wurden zum Zeitpunkt der Bestrahlung sowie 24 h nach einer simulierten Bestrahlung geerntet. Nach BrdU- und PI-Färbung wurden die Proben im FACS vermessen. Der mit Hilfe der unspezifischen PI-Färbung quantifizierte DNA-Gehalt (X-Achse, linear, dimensionslos) wurde in einem *Dotplot* gegen das spezifische BrdU-Signal (Y-Achse, logarithmisch, dimensionslos) aufgetragen. Die BrdU-markierte Population ist durch das erhöhte BrdU-Signal deutlich zu erkennen. Zur Beurteilung der Arretierung der Zellen in G2 wurde jeweils der Anteil BrdU-positiver G2-Zellen (Rechtecke) an der BrdU-Gesamtpopulation bestimmt und im Diagramm als Prozentangabe dargestellt.

Die durchflusszytometrische Analyse der BrdU-markierten Population zeigt, dass 4 h nach der BrdU-Pulsmarkierung ca. 81 % (CJ179) bis 88,4 % (C2886) der markierten Zellen nach G2 progressiert sind. Damit kann der überwiegende Teil der markierten Zellen zu diesem

Zeitpunkt in G2 bestrahlt werden. In unbestrahlten Kontrollzellen befinden sich zum 24 h-Punkt nur noch 16,3 % (HSC62) bis 24,1 % (C2886) dieser Population in G2. Dagegen ist nach der Bestrahlung mit 80 Gy IR bis 72 h nach Bestrahlung keine wesentliche Veränderung in der Verteilung der markierten Population festzustellen (Abb. 5.12). Durch das hohe Schadensniveau werden Checkpoints aktiviert und die Zellen werden in der G2-Phase festgehalten. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Methode geeignet und dass die applizierte Bestrahlungsdosis von 80 Gy IR ausreichend ist, um eine G2-spezifische Analyse des Reparaturverhaltens durchzuführen.

Zur Analyse der DSB-Reparatur mittels PFGE wurden die Zellen anstelle von BrdU mit radioaktivem [methyl  $^3\text{H}$ ] Thymidin pulsmarkiert. Die Zellen wurden in G2 bestrahlt und zur Reparatur inkubiert. Die Induktionsproben wurden direkt im Anschluß an die Bestrahlung auf Eis geerntet, um sämtliche Reparaturvorgänge zu unterbinden. Nach der Ernte der Zellen wurden diese in Gelblöckchen eingegossen und der elektrophoretischen Auftrennung über PFGE unterzogen. Das Pulsfeldgel wurde fotografiert (Abb. 5.13A), anschließend wurde die jeweilige Laufspur in etwa gleichgroße Blöckchen geschnitten. Diese wurden gelöst und der Anteil enthaltener Radioaktivität wurde im Scintillationszähler ermittelt. Das Verhältnis der ins Gel gelaufenen DNA im Vergleich zur Gesamt-DNA diente zur Ermittlung des FAR-Wertes.



**Abbildung 5.13:** G2-spezifische PFGE von WT, BRCA2- und Artemis-defizienten Fibroblasten.

**(A)** Repräsentatives Gelbild der PFGE von primären humanen Fibroblasten. Exponentiell wachsende BRCA2-defiziente HSC62, Artemis-defiziente CJ179 sowie WT-Zellen wurden 1 h mit [methyl  $^3\text{H}$ ] Thymidin pulsmarkiert, 4 h kultiviert und anschließend mit 80 Gy IR bestrahlt. Nach Ablauf der Reparaturzeit (24 h, 48 h, 72 h) wurden die Proben geerntet. Zusätzlich wurden Induktionsproben mit 10 Gy IR bestrahlt und unmittelbar im Anschluss geerntet. Unbestrahlte Kontrollen wurden zum Zeitpunkt der Bestrahlung der Parallelproben fixiert. Nach Auftrennung der DNA wurde diese durch Ethiumbromid-Behandlung gefärbt und unter UV-Licht fotografiert.

**(B)** FAR-Analyse der G2-spezifischen Reparatur. Das Agarosegel wurde im Bereich der jeweiligen Laufspur in etwa gleichgroße Stücke geschnitten, lysiert und der Anteil inkorporierten [methyl  $^3\text{H}$ ] Thymidins durch Vermessung im Scintillationszähler quantifiziert. Zur Bildung des jeweiligen FAR (*Fraction of activity released*)-Wertes wurde der Anteil der ins Gel gewanderten Radioaktivität in Relation zur in den Taschen vorhandenen Radioaktivität gesetzt. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dar. Die Kontrollwerte (0,07-0,1) wurden jeweils abgezogen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte. Die statistische Analyse der Ergebnisse nach 48 h Reparatur bestätigt, dass HSC62 bzw. CJ179 signifikant mehr DSBs aufweisen als WT-Zellen (*Student's t-test*,  $p \leq 0,5$ ).

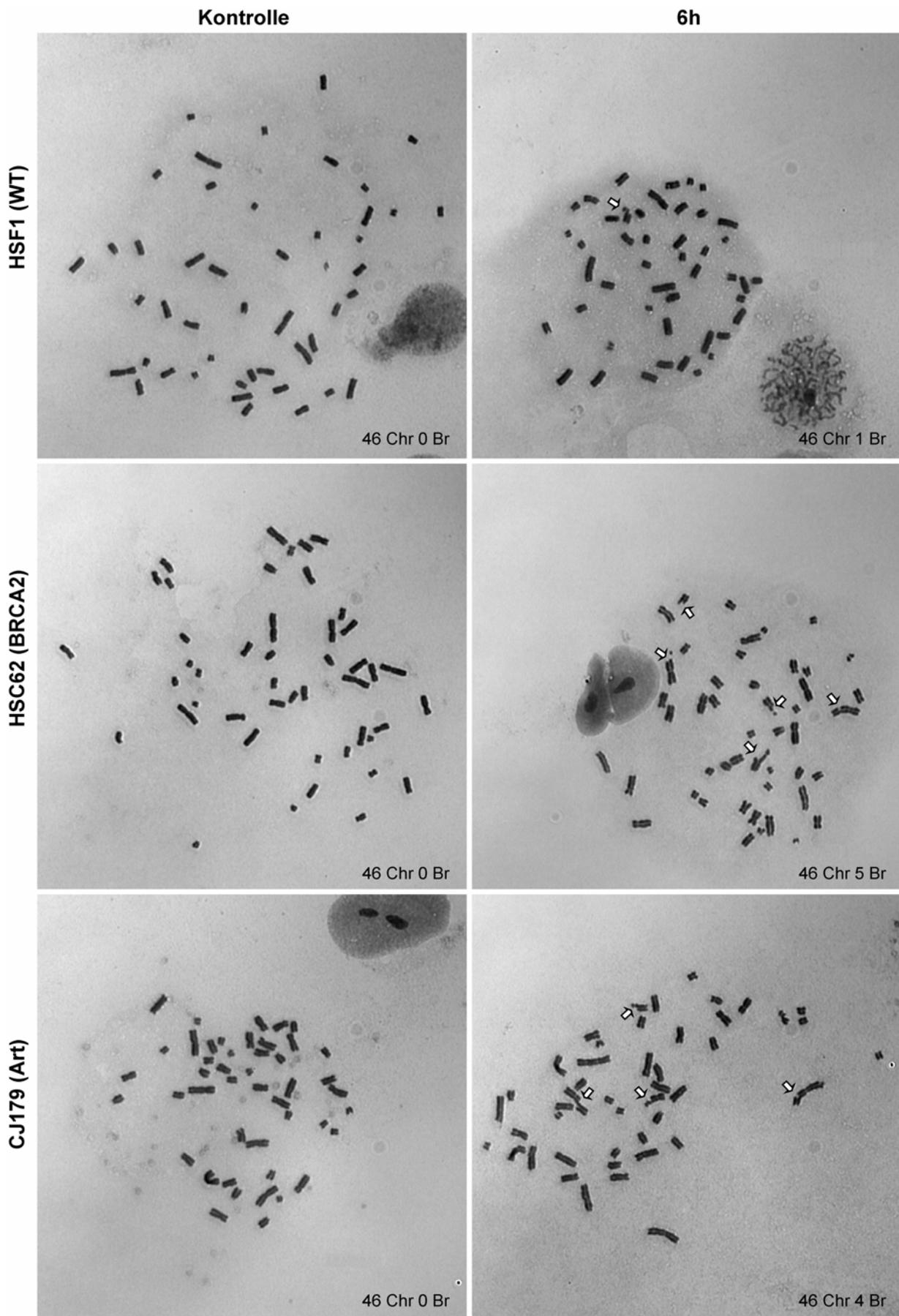
Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Reparatur-, Induktions- und Kontrollproben der zu untersuchenden Zelllinien C2886, HSC62 und CJ179 spiegelt das Gelbild in etwa die Verhältnissen einer G1-Population wider, da primäre humane Fibroblasten einen G2-Anteil von nur 20-30 % der Zellen aufweisen (vergleiche Abb. 5.12). Die unbestrahlten Kontrollen weisen einen geringen Anteil ins Gel gelaufener DNA auf. Dies schließt eine starke Schädigung der DNA während der Probenaufbereitung aus. Bestrahlung mit 10 Gy IR führt bei allen untersuchten Zelllinien zur Ausbildung eines deutlichen DNA-Schmiers durch ins Gel gewanderte DNA-Fragmente, was das Vorhandensein von DSBs widerspiegelt. Während bei WT-Zellen durch die fortschreitende Reparatur die DNA-Fragmente deutlich reduziert werden, zeigen die Artemis-defizienten CJ179 aufgrund des Reparaturdefektes auch 72 h nach Bestrahlung noch einen deutlichen DNA-Schmier. In BRCA2-defizienten HSC62 sind nach 72 h ebenfalls kaum DNA-Fragmente ins Gel gewandert. Die DSBs konnten repariert werden, was mit der in G1 vorhandenen Reparaturprofizienz erklärt werden kann (Abb. 5.13A).

Um die G2-spezifische Reparatur zu analysieren, musste der Anteil ins Gel gewanderte Radioaktivität untersucht werden. Zur Ermittlung des FAR-Wertes wurde die ins Gel gewanderte Radioaktivität in Relation zu der in der Tasche gemessenen Radioaktivität gesetzt, die nahezu die Gesamt-Aktivität der Probe widerspiegelt. Das Ergebnis ist in Abb. 5.13B dargestellt. Die mit 10 Gy IR bestrahlten Induktionsproben zeigen, dass durch die Bestrahlung in allen untersuchten Zelllinien eine ähnliche Schadensanzahl induziert wird. 24 h nach einer applizierten Dosis von 80 Gy IR liegt in allen Zelllinien ein sehr ähnliches Schadensniveau vor (Abb. 5.13B). Erst ab 48 h nach der Bestrahlung werden Unterschiede zwischen den Zelllinien erkennbar. Während der WT durch fortwährende Reparatur ein deutlich reduziertes Schadensniveau erreicht, weisen sowohl die Artemis defizienten CJ179 als auch die BRCA2-Mutante HSC62 ein signifikant höheres Maß an unreparierten Schäden auf (Abb. 5.13B). Dieser Effekt verdeutlicht sich bei CJ179 weiter, auch 72 h nach der Bestrahlung erfolgt kaum Reparatur, während der WT bereits Kontrollniveau erreicht hat. Das vorhandene Schadensniveau bei 48 h und 72 h kann in etwa mit dem Induktionswert

verglichen werden. In der Annahme, dass die achtfache Dosis (80 Gy) den achtfachen Schaden einer 10 Gy-Induktion verursacht, ergibt sich aus der Reparatur der Artemis-defizienten Zelllinie auf 1/8 des induzierten Schadens somit ein Reparaturdefekt von etwa 12,5 %. Bei 48 h gilt dies auch für die BRCA2-defizienten HSC62, jedoch wird die Reparatur fortgesetzt und erreicht 72 h nach Bestrahlung nahezu Hintergrundniveau (Abb. 5.13B). Diese gute Reparatur nach langen Zeiten kann durch die Restfunktion von BRCA2 erklärt werden, die durch die hypomorphe Mutation von BRCA2 in dieser Zelllinie noch vorhanden ist (Howlett et al. 2002). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die G2-spezifische PFGE den bereits durch  $\gamma$ H2AX-Analyse gezeigten Reparaturdefekt von BRCA2- und Artemis-defizienten Zellen bestätigt. Allerdings sind die gewonnenen Daten nicht sehr stabil und der Reparaturdefekt der HR-Mutante ist auch nur in einem schmalen Zeitfenster nachweisbar. Aus diesem Grund wurden Chromosomenanalysen als weitere Methode zur Untersuchung der DSB-Reparatur eingesetzt.

#### **5.3.4. Untersuchung der DSB-Reparatur mit Hilfe der PCC-Analyse**

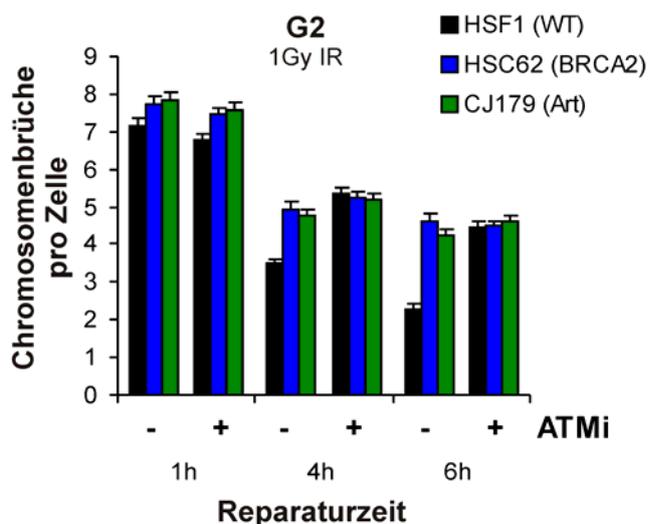
Eine weitere Methode, die das direkte Sichtbarmachen von strahlungsinduzierten DSBs ermöglicht, ist die vorzeitigen Chromosomenkondensation (PCC). Die Kondensation des Chromatins wird durch Chemikalienbehandlung bereits in G2 ausgelöst. Chromosomenschäden, die als Folge von unreparierten DSBs auftreten, können direkt quantifiziert werden. Exponentiell wachsende primäre humane Fibroblasten mit Defekten in BRCA2 und Artemis sowie die WT-Zelllinie HSF1 wurden vor der Bestrahlung mit ATMi bzw. DMSO behandelt. 30 min vor Ablauf der Reparaturzeit wurde die vorzeitige Kondensation der Chromosomen durch Zugabe des Phosphataseinhibitors Calyculin A eingeleitet. Nach dem Auftropfen der Proben auf Objektträger und der anschließenden Giemsa-Färbung wurden diese mit Hilfe der Software Metafer (Metasystems) abgesucht. Unter Zuhilfenahme der Relokierungsfunktion konnten aussagekräftige Chromosomenspreitungen wieder angefahren, fotografiert und ausgewertet werden. Bei der Auswertung erfolgte zunächst die Quantifizierung der vorhandenen Chromosomen um sicherzustellen, dass nur vollständige Metaphasen in die Auswertung einfließen. Anschließend wurden alle Chromosomen auf mögliche Schäden wie Chromatidbrüche und Chromosomenbrüche untersucht. Bei Chromatidbrüchen liegt ein Bruch in einer Chromatide des 2-Chromatid-Chromosoms vor, während bei Chromosomenbrüchen beide Chromatiden beschädigt sind, sodass es zur Entstehung von Chromosomenfragmenten kommt. Abb. 5.14 zeigt repräsentative Aufnahmen von Chromosomenspreitungen der untersuchten Zelllinien in unbestrahlten Kontrollen sowie 6 h nach Bestrahlung mit 1 Gy IR. Die Anzahl der gezählten Chromosomen sowie die identifizierten Chromosomenschäden sind jeweils angegeben bzw. durch Pfeile markiert.



**Abbildung 5.14:** Repäsentative Aufnahmen von Chromosomenspreitungen nach PCC. Exponentiell wachsende WT (HSF1), BRCA2- (HSC62) und Artemis- (CJ179) defiziente primäre humane Fibroblasten wurden mit 1 Gy IR bestrahlt und zur Reparatur 1 h, 4 h, 6 h kultiviert. 30 min vor

Ablauf der Reparaturzeit wurde die vorzeitige Chromosomenkondensation mit Calyculin A eingeleitet. Unbehandelte Kontrollen wurden mit der 1 h-Probe geerntet. Die Proben wurden auf Objektträger aufgetropft, mit Giemsa gefärbt und bei 630facher Vergrößerung fotografiert. Nach Quantifizierung der vorhandenen Chromosomen wurden diese auf das Vorhandensein von Chromatid- und Chromosomenbrüchen untersucht. Das Ergebnis ist jeweils rechts unten angegeben. (Chr = Chromosomen, Br = Brüche)

Zur statistischen Analyse des Reparaturverhaltens der untersuchten Zelllinien nach IR wurden pro Experiment bei unbestrahlten Kontrollen etwa 80-100, bei bestrahlten Proben mindestens 60 Spreitungen ausgewertet.



**Abbildung 5.15:** PCC-Analyse von primären humanen Fibroblasten nach IR.

WT-Fibroblasten sowie BRCA2- (HSC62) und Artemis- (CJ179) defiziente Zellen wurden mit 1 Gy IR bestrahlt und zur Reparatur für 1 h, 4 h und 6 h kultiviert. Zudem wurden Zellen 1 h vor der Bestrahlung mit ATMi versetzt und identisch behandelt. Unbestrahlte Kontrollen wurden mit dem 1 h-Punkt geerntet. Pro Experiment wurden 60-70 Chromosomenspreitungen je Probe ausgewertet, bei unbestrahlten Kontrollen 80-100. Die Datenpunkte zeigen den Mittelwert aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Die Kontrollwerte (0,2 - 0,4 Brüchen) wurden von den Werten der bestrahlten Proben abgezogen. Fehlerbalken stellen den Standardfehler der Einzelergebnisse dar.

Durch Bestrahlung mit 1 Gy IR werden in allen Zelllinien unabhängig von der ATMi-Behandlung etwa 7-8 Chromosomenbrüche induziert. Diese werden in unbehandelten WT-Zellen innerhalb der Reparaturzeit bis auf etwa 2 Brüchen pro Metaphase reduziert. Bei BRCA2-defizienten HSC62 und Artemis-defizienten CJ179 lassen sich nach kurzen Zeiten keine großen Unterschiede zu WT-Zellen erkennen, jedoch zeigen HSC62 und CJ179 nach 4 h und 6 h im Vergleich zum WT einen deutlichen Reparaturdefekt, der in beiden Zelllinien zum Verbleiben von etwa 25 % der induzierten Chromosomenbrüche führt (Abb. 5.15).

Durch die Behandlung von WT-Zellen mit ATMi wird deren Reparaturkapazität vermindert. Nach 6 h sind gegenüber dem unbehandelten WT 2 zusätzliche Chromosomenbrüche vorhanden. Der Reparaturdefekt von etwa 25 % gleicht jenem von HSC62 und CJ179. Dagegen hat die ATMi-Behandlung von Artemis- und BRCA2-defizienten Zellen keinen Einfluss auf den Reparaturdefekt, was die bereits in der  $\gamma$ H2AX-Analyse gezeigte Epistasis zwischen den Faktoren BRCA2, ATM und Artemis bestätigt (Abb. 5.15).

Die PFGE- und PCC-Analyse bestätigen das Ergebnis der  $\gamma$ H2AX-Analyse und belegen einen Reparaturdefekt von BRCA2-defizienten primären humanen Fibroblasten in der G2-Phase des Zellzyklus, der sowohl im Verlauf der Kinetik wie auch im Ausmaß des resultierenden Reparaturdefekts große Ähnlichkeit zu ATM- und Artemis-defizienten Zellen aufweist. Die

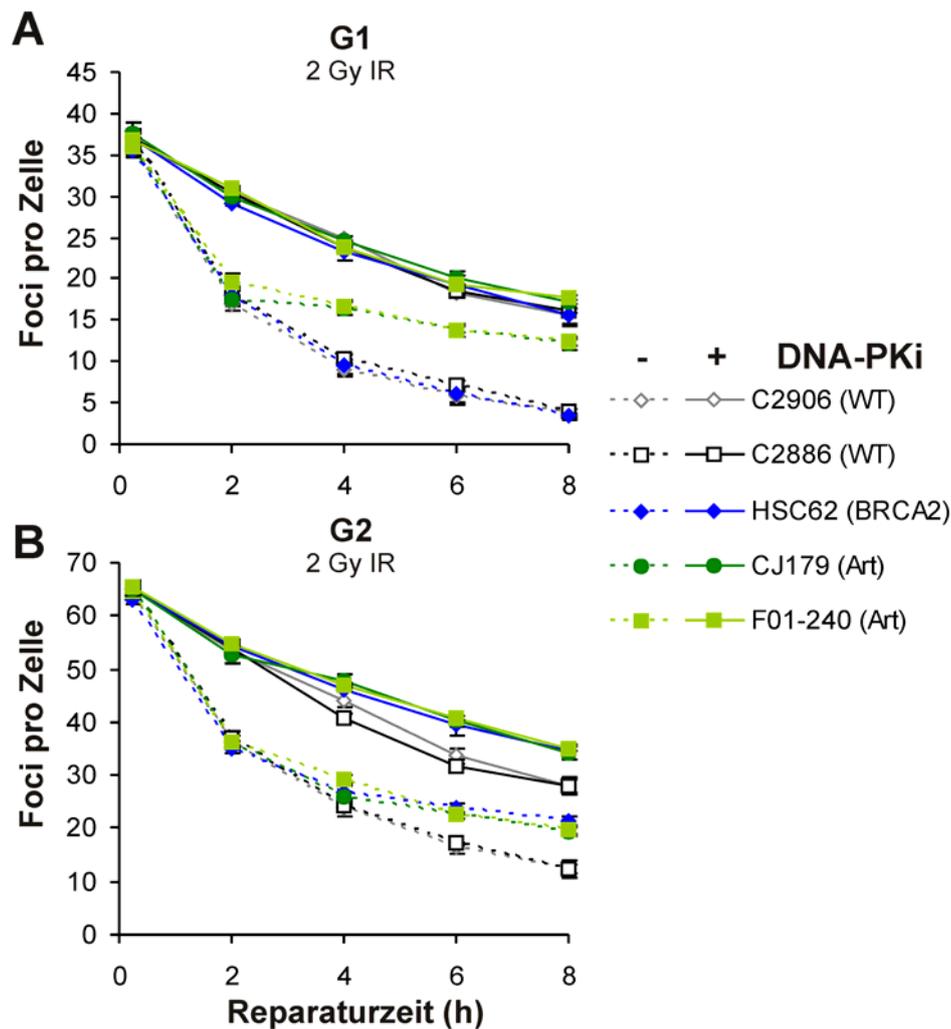
Chromosomenanalyse konnte zudem die Epistasie zwischen BRCA2, ATM und Artemis in G2 bekräftigen. Somit konnte gezeigt werden, dass BRCA2, ATM und Artemis bei der Reparatur strahleninduzierter DSBs in G2 an einem gemeinsamen Reparaturweg beteiligt sind. Dies ist ein sehr überraschender Befund, der die Faktoren ATM und Artemis in G1 und G0/G1 einem Unterweg des NHEJ zuordnet, in der G2-Phase aber in Zusammenhang mit dem Reparaturweg der HR bringt.

## **5.4. Charakterisierung der Funktion von Artemis bei der Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden**

### **5.4.1. Untersuchungen zur DNA-PK-Abhängigkeit der Artemis-abhängigen Reparatur**

Die bisher gezeigten Ergebnisse konnten für die Reparatur von strahleninduzierten DSBs in der G2-Phase einen Zusammenhang zwischen dem klassischen HR-Faktor BRCA2 und der ATM/Artemis-abhängigen Reparatur aufdecken. In G0/G1 lässt sich eine Abhängigkeit der ATM/Artemis-abhängigen Reparatur von der *core*-NHEJ-Komponente DNA-PK nachweisen (Riballo et al. 2004, Goodarzi et al. 2006). Demnach gilt der ATM/Artemis-abhängige Weg in G0/G1 als Unterweg des NHEJ. Um eine Beteiligung von ATM und Artemis an den beiden Reparaturwegen NHEJ und HR in G2 zu definieren, wurde die Abhängigkeit von funktionaler DNA-PK mit Hilfe eines spezifischen Inhibitormoleküls der katalytischen Untereinheit der DNA-PK (DNA-PK<sub>cs</sub>), das die Enzymaktivität des gesamten Komplexes unterbindet, untersucht.

Exponentiell wachsende primäre humane Fibroblasten mit Mutationen in BRCA2 und Artemis sowie WT-Zellen wurden vor der Bestrahlung mit dem hochspezifischen Inhibitor NU7026 (DNA-PKi) bzw. mit DMSO behandelt. Die Untersuchung von ATM-defizienten Zellen war nicht möglich, da nach dem Ausschalten von DNA-PK keine Phosphorylierung von H2AX mehr erfolgt (vergleiche Abb. 5.3). Die  $\gamma$ H2AX-Analyse erfolgte in G1 und G2.



**Abbildung 5.16:**  $\gamma$ H2AX-Analyse der Abhängigkeit von funktionaler DNA-PK bei der Reparatur strahleninduzierter Schäden.

Primäre humane Fibroblasten mit Mutationen in BRCA2, Artemis sowie verschiedene WT-Zellen wurden 1 h vor Bestrahlung mit dem spezifischen DNA-PK<sub>cs</sub>-Inhibitor NU7026 (DNA-PKi) versetzt. Nach der Bestrahlung mit 2 Gy IR wurden die Zellen zur Reparatur für 15 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h kultiviert und anschließend fixiert. Es folgte der Immunfluoreszenz-Nachweis von  $\gamma$ H2AX und CENP-F. Die Quantifizierung der  $\gamma$ H2AX-Foci erfolgte in G1 (**A**) und G2 (**B**). Die dargestellten Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Hintergrundwerte wurden in unbestrahlten Kontrollen ermittelt (0,4-0,7 Foci in G1, 2,5-4,0 Foci in G2) und abgezogen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte und werden teilweise von den Symbolen überdeckt.

Durch Behandlung mit DNA-PKi lässt sich in G1 und G2 in allen untersuchten Zelllinien ein deutlicher Reparaturdefekt induzieren, der den Defekt von ATM- und Artemis-defizienten Zellen übertrifft (Abb. 5.16). Ein Vergleich der Induktionswerte zeigt, dass durch Behandlung mit DNA-PKi vor der Bestrahlung keine zusätzlichen DSBs entstehen. Alle untersuchten Zelllinien mit bzw. ohne DNA-PKi-Behandlung zeigen in G1 35-37 und in G2 64-65  $\gamma$ H2AX-Foci. Bereits 2 h nach Bestrahlung offenbart sich in beiden Zellzyklus-Phasen ein deutlicher Unterschied zwischen DNA-PKi-behandelten und unbehandelten Zellen. Dabei führt die DNA-PKi-Behandlung zu einer Verzögerung in der schnellen Reparaturkomponente. Dieser Defekt der schnellen Komponente nach DNA-PKi-Behandlung lässt vermuten, dass insbesondere

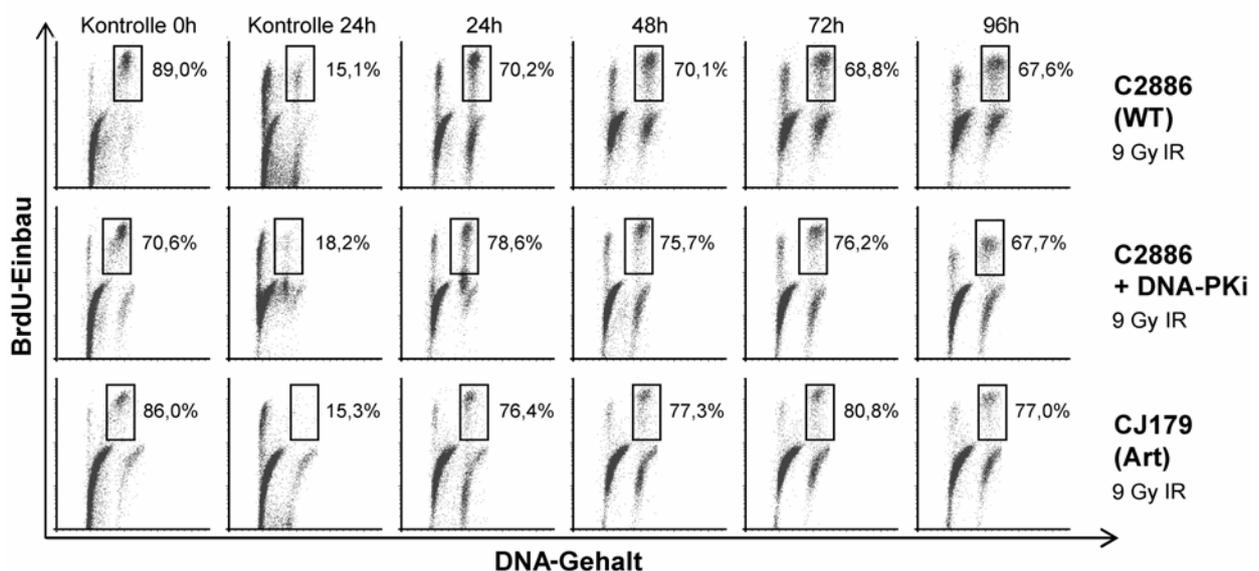
das DNA-PK-abhängige NHEJ für die schnelle Phase der Reparatur strahleninduzierter DSBs zuständig ist. Auch 8 h nach Bestrahlung verbleiben nahezu 50 % der Brüche unrepariert (Abb. 5.16). Dies deutet darauf hin, dass DNA-PK-abhängiges NHEJ nicht nur in G1 maßgeblich zur Reparatur strahleninduzierter DSBs beiträgt, sondern auch in G2 den Hauptteil der auftretenden DSBs repariert.

Während in der G1-Phase in unbehandelten Zellen ein Unterschied in der Reparaturfähigkeit zwischen WT bzw. BRCA2-Zellen und Artemis-defizienten Zellen erkennbar ist, verlaufen die Kinetiken nach DNA-PKi-Behandlung für alle Zelllinien identisch (Abb. 5.16A). Damit ist die Artemis-abhängige Reparatur in exponentiell wachsenden G1-Zellen ebenfalls abhängig von funktionaler DNA-PK und als Unterweg des NHEJ einzuordnen (Riballo et al. 2004, Goodarzi et al. 2006).

Dagegen lassen sich in G2 nach DNA-PKi-Behandlung Unterschiede im Reparaturdefekt zwischen den Zelllinien erkennen. BRCA2- und Artemis-defiziente Zellen weisen nach DNA-PKi-Behandlung eine im Vergleich zum identisch behandelten WT um etwa 12 % erhöhte Anzahl an DSBs auf (Abb. 5.16B). Dieser Unterschied entspricht nahezu dem Reparaturdefekt von 15 % von unbehandelten BRCA2- und Artemis-defizienten Zellen gegenüber unbehandelten WT-Zellen. Dieser additive Effekt zeigt, dass der Reparaturweg, an dem BRCA2 und Artemis in G2 teilhaben, unabhängig von funktionaler DNA-PK agiert. Dies unterstützt den Zusammenhang zwischen ATM und Artemis und der HR in G2. Dies führt zu der Hypothese, dass Brüche, die der Prozessierung durch ATM und Artemis bedürfen, in der G2-Phase der HR zugeführt werden, während in G1 das NHEJ für die Weiterbearbeitung der DSBs zuständig ist.

In der G0/G1-Phase konnte gezeigt werden, dass DSBs auch ohne DNA-PK<sub>cs</sub> mit reduzierter Geschwindigkeit repariert werden können. Dies gilt nicht für ATM/Artemis-abhängige Brüche, deren Reparatur nur in Anwesenheit von funktionaler DNA-PK<sub>cs</sub> durchgeführt werden kann (Riballo et al. 2004). Zur Untersuchung der DNA-PK-Abhängigkeit der DSB-Reparatur in der G2-Phase wurden Reparaturstudien nach hoher Bestrahlungsdosis in Kombination mit langen Reparaturzeiten durchgeführt. Durch die Anwendung hoher Bestrahlungsdosen sollte der in Abb. 5.16B gezeigte Unterschied von 6-9 Foci zwischen Artemis- bzw. BRCA2-defizienten Zellen gegenüber WT-Zellen vergrößert werden. Da dieser Reparaturdefekt allerdings die langsame Komponente der Reparatur betrifft, muss zugleich der Beobachtungszeitraum vergrößert werden. Die Identifizierung der Zellen erfolgte mit Hilfe einer BrdU-Markierung. Auf diese Weise wurde eine Einwirkung von Aphidicolin über Tage hinweg umgangen. Eine Zellpopulation wurde mit BrdU pulsmarkiert und weiter kultiviert, bis der Großteil dieser Zellen nach G2 progressiert war. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen aufgrund der induzierten DNA-Schäden in G2 arretiert und konnten in dieser Phase mit Hilfe der  $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenz analysiert werden.

Um sicherzustellen, dass die markierte Population über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg vor allem G2-Zellen widerspiegelt, wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Dazu wurden exponentiell wachsende WT-Zellen mit und ohne DNA-PKI-Behandlung sowie Artemis-defiziente CJ179 mit BrdU pulsmarkiert, in der G2-Phase bestrahlt und nach Ablauf der Reparaturzeit für die FACS-Analyse geerntet. Neben der BrdU-spezifischen Färbung erfolgte die unspezifische PI-Färbung der Gesamt-DNA. Der mittels PI-Färbung ermittelte DNA-Gehalt wurde in einem *Dotplot* gegen das spezifische BrdU-Signal aufgetragen. Die BrdU-markierte Population findet sich auf der Y-Achse deutlich nach oben verschoben. Die Identifizierung der Zellzyklusphase erfolgt anhand des PI-Signals. Zur Auswertung wurde der Anteil der BrdU-positiven G2-Zellen an der gesamten BrdU-markierten Population ermittelt und im Diagramm dargestellt. Die Veränderung der BrdU-positiven G2-Population wurde über die gesamte Reparaturzeit beobachtet.



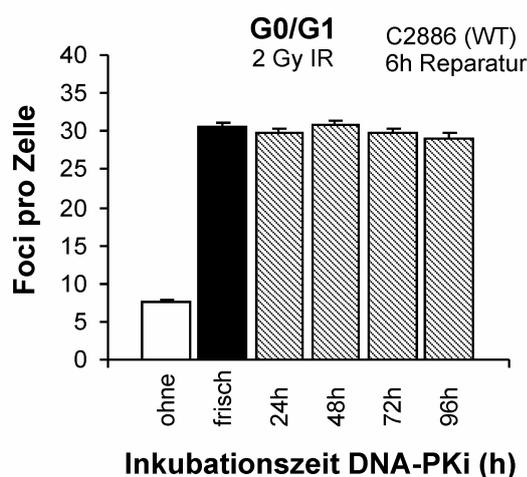
**Abbildung 5.17:** Durchflusszytometrische Analyse primärer humaner Fibroblasten nach BrdU-Pulsmarkierung.

WT-Zellen sowie Artemis-defiziente CJ179 wurden für 1 h mit BrdU pulsmarkiert und anschließend 4 h kultiviert, um der markierten Population den Eintritt in die G2-Phase zu erlauben. Dieser Zeitpunkt entspricht dem Zeitpunkt 0 h des Experiments. Anschließend wurden die Zellen mit 9 Gy IR bestrahlt und für 24 h, 48 h, 72 h und 96 h zur Reparatur kultiviert. Zudem wurden WT-Zellen 1 h vor Bestrahlung mit DNA-PKi versetzt und identisch behandelt. Nach Ablauf der Reparaturzeit wurden die Zellen für die FACS-Analyse geerntet. Unbestrahlte Kontrollzellen wurden zum Zeitpunkt 0 h, also 4 h nach BrdU-Pulsmarkierung fixiert. Des Weiteren wurde eine unbestrahlte Kontrolle zusammen mit dem 24 h-Reparaturpunkt geerntet. Anschließend erfolgte die spezifische BrdU-Färbung sowie die unspezifische Färbung der Gesamt-DNA mit PI. Nach der Vermessung der Proben im FACS wurde der DNA-Gehalt (X-Achse, linear, dimensionslos) gegen die Intensität des eingebauten BrdU (Y-Achse, logarithmisch, dimensionslos) aufgetragen und erlaubte die Identifizierung der BrdU-markierten Population. Anhand des DNA-Gehaltes konnte außerdem die Zellzyklusphase bestimmt werden. Zur Auswertung wurde der Anteil der BrdU-positiven G2-Zellen zur BrdU-positiven Gesamtpopulation in jeder Probe ermittelt und im Diagramm dargestellt. Somit konnte die Veränderung der BrdU-positiven G2-Population im Verlauf der Reparaturzeit beobachtet werden.

Das Ergebnis der FACS-Analyse zeigt, dass 70,6 % (C2886 + DNA-PKi) bis 89,0 % (C2886) der BrdU-positiven Zellen innerhalb von 4 h in die G2-Phase progressieren. Ohne Bestrahlung wird der Zellzyklus fortgesetzt und nach 24 h befinden sich noch 15,1 % bis 18,2 % der BrdU-

Population in der G<sub>2</sub>-Phase (Abb. 5.17). Durch Bestrahlung mit 9 Gy IR wird die BrdU-markierte Population in der G<sub>2</sub>-Phase arretiert. 24 h bis 96 h nach Bestrahlung sind kaum Veränderungen zu beobachten. Die Population bleibt nahezu konstant (Abb. 5.17). Damit ist die applizierte Dosis von 9 Gy IR ausreichend hoch, um die Zellen über 96 h hinweg in G<sub>2</sub> zu halten. Somit enthält die BrdU-Population auch 96 h nach der Bestrahlung zum Großteil G<sub>2</sub>-Zellen und der gewählte BrdU-Ansatz ist für die Untersuchung der DNA-Reparatur in der G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus nach langen Reparaturzeiten geeignet.

Des Weiteren musste die Aktivität des DNA-PK-Inhibitors überprüft werden, um die effektive Inhibition der DNA-PK<sub>cs</sub> über den gesamten Beobachtungszeitraum zu gewährleisten. Dazu wurden stationäre WT-Zellen vor der Bestrahlung mit DNA-PKi versetzt, der bereits unterschiedlich lange auf einer Parallelkultur eingesetzt worden war. Außerdem wurde Medium einer Parallelkultur ohne zugesetzten DNA-PKi mit frischem DNA-PKi versetzt und vor der Bestrahlung zu konfluenten WT-Zellen gegeben. Nach der spezifischen  $\gamma$ H2AX-Färbung erfolgte die Quantifizierung der Anzahl vorhandener DSBs.



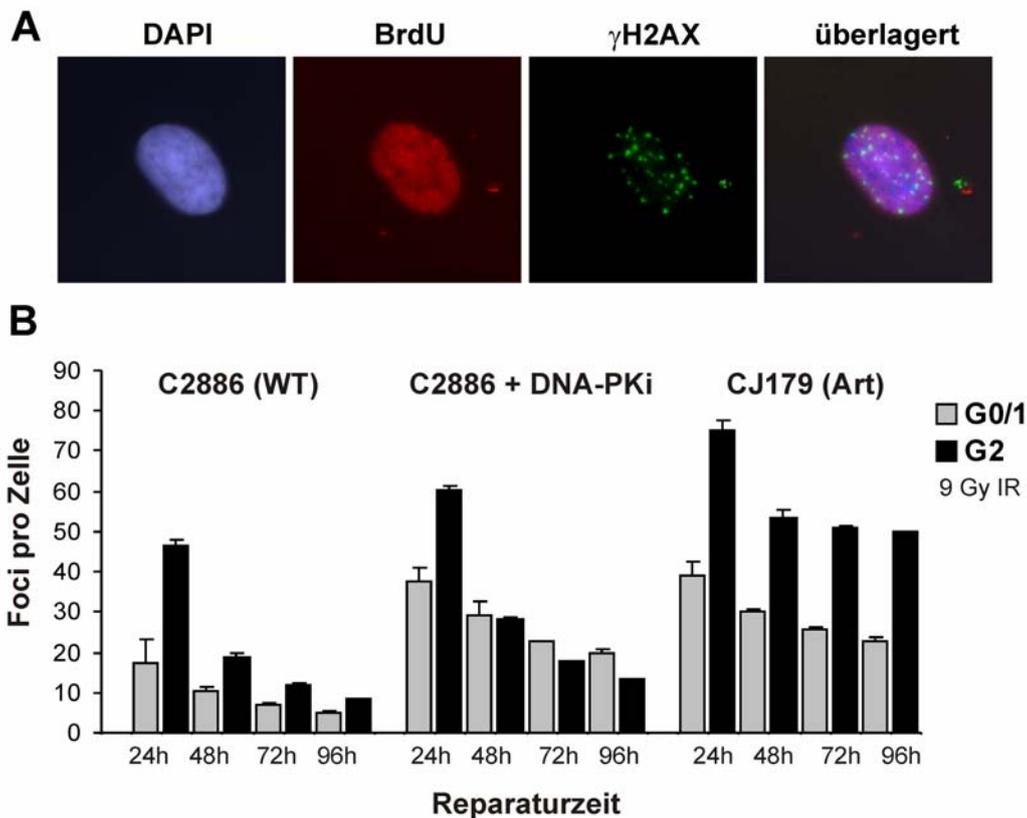
**Abbildung 5.18:** Kontrolle der Aktivität des DNA-PK-Inhibitors NU7026 (DNA-PKi) nach langen Inkubationszeiten.

Konfluente WT-Fibroblasten wurden mit DNA-PKi versetzt, der zuvor bereits für 24 h, 48 h, 72 h, 96 h auf einer Kultur verwendet worden war. Zusätzlich wurde DNA-PKi-freies Medium dieser Parallelkulturen mit frischem DNA-PKi versetzt und zu konfluenten WT-Fibroblasten gegeben. Zudem erfolgte eine Behandlung mit DMSO. 1 h nach Zugabe des DNA-PKi wurden die Proben mit 2 Gy IR bestrahlt und nach einer Reparaturzeit von 6 h fixiert. Die unbestrahlte Kontrolle wurde identisch behandelt. Nach spezifischer  $\gamma$ H2AX-Färbung erfolgte die Auswertung der vorhandenen DSBs. Die Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten aus mindestens 40 ausgewerteten Zellen. Kontrollwerte von etwa 0,2 Foci wurden abgezogen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Einzelergebnisse.

Das durchgeführte Kontrollexperiment zeigt, dass auch nach Inkubation über 96 h kein Aktivitätsverlust des DNA-PKi auftritt. Die Inhibition der DNA-PK<sub>cs</sub> durch vorinkubierten DNA-PKi ist vergleichbar mit frischem DNA-PKi und führt zum Auftreten eines deutlichen Reparaturdefektes im Vergleich zur mit DMSO behandelten Kontrolle (Abb. 5.18). Die Daten beweisen, dass die Inhibition der DNA-PK<sub>cs</sub> bis 96 h nach Bestrahlung durch Behandlung mit dem spezifischen DNA-PK<sub>cs</sub>-Inhibitor möglich ist.

Diese Kontrollexperimente belegen, dass der gewünschte Versuchsansatz zur Untersuchung der DNA-PK-Abhängigkeit der Reparatur IR-induzierter DSBs geeignet ist. Zur Untersuchung der DNA-PK-Abhängigkeit in G<sub>2</sub> wurden exponentiell wachsende primäre humane Fibroblasten wie beschrieben eingesetzt und mit Hilfe des BrdU-Signals identifiziert. Die

Quantifizierung der  $\gamma$ H2AX-Foci erfolgte in Zellen mit pan-nukleärer BrdU-Färbung (Abb. 5.19A). Dieser BrdU-Ansatz erlaubt allerdings nur die sichere Identifikation von G2-Zellen. BrdU-negative Zellen können nicht der G1- oder S-Phase zugeordnet werden. Aus diesem Grund wurden zusätzlich stationäre Zellen zur Untersuchung der DNA-PK-Abhängigkeit in G1 verwendet und mit Hilfe der  $\gamma$ H2AX-Analyse untersucht.



**Abbildung 5.19:** Untersuchung der DNA-PK-Abhängigkeit nach langen Reparaturzeiten.

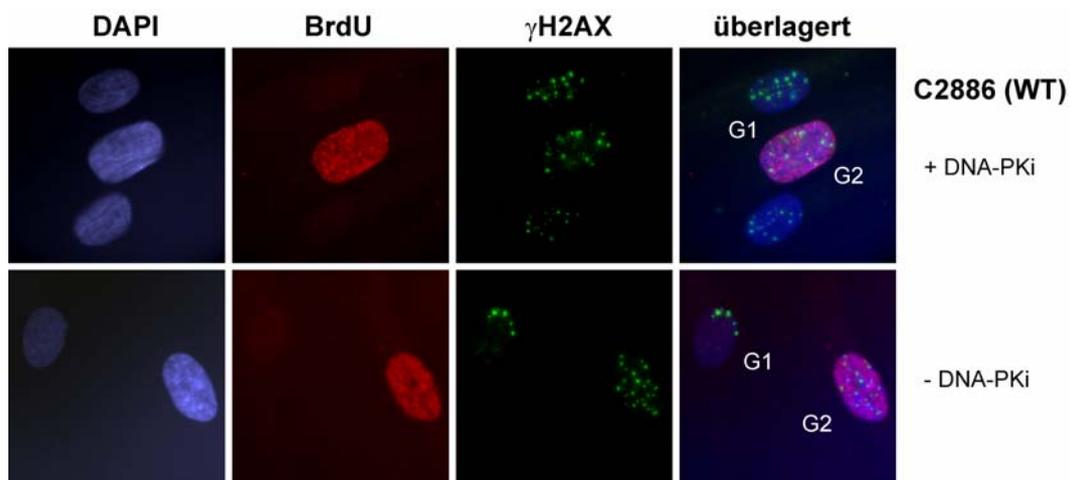
(A) Repräsentative Aufnahme einer BrdU-markierten und mit  $\gamma$ H2AX-gefärbten Zelle. WT-Fibroblasten wurden 1 h mit BrdU pulsmarkiert, nach 4 h mit 9 Gy IR bestrahlt und nach Ablauf der jeweiligen Reparaturzeit fixiert. Anschließend erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung gegen  $\gamma$ H2AX (grün) und BrdU (rot). Zusätzlich wurde eine DAPI-Färbung (blau) durchgeführt. Gezeigt wird der 48 h-Reparaturpunkt. Die Aufnahme erfolgte unter 630facher Vergrößerung.

(B)  $\gamma$ H2AX-Analyse primärer humaner WT-Fibroblasten mit und ohne DNA-PKi-Behandlung sowie Artemis-defizienter CJ179. Die gezeigten G2-Daten wurden mit Hilfe eines BrdU-Ansatzes generiert. Exponentiell wachsende Zellen wurden 1 h mit BrdU pulsmarkiert und 4 h später nach der Wanderung in G2 mit 9 Gy IR bestrahlt. Zusätzlich wurden WT-Zellen 1 h vor Bestrahlung mit DNA-PKi behandelt und ebenso wie unbestrahlte Kontrollen einer identischen Behandlung unterzogen. Nach Ablauf der Reparaturzeit von 24 h, 48 h, 72 h, 96 h wurden die Zellen durch Methanol-Aceton-Behandlung fixiert und gegen  $\gamma$ H2AX und BrdU gefärbt. Die Auswertung der  $\gamma$ H2AX-Foci erfolgte in BrdU-positiven Zellen. Dagegen wurden die gezeigten G0/G1-Daten in einem getrennten Ansatz mit konfluenten Zellen gewonnen. Diese wurden mit 9 Gy IR bestrahlt und nach Ablauf der Reparaturzeit fixiert. Zusätzlich wurden WT-Zellen 1 h vor Bestrahlung mit DNA-PKi behandelt und ebenso wie die unbestrahlten Kontrollen identisch behandelt. Nach der  $\gamma$ H2AX-Färbung erfolgte die Auswertung der vorhandenen Foci. Die dargestellten Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Kontrollen (0,2-0,4 Foci in G1, 2-3 Foci in G2) wurden jeweils abgezogen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

Nach 9 Gy IR weist der WT sehr effiziente Reparatur bis auf etwa 5  $\gamma$ H2AX-Foci in G1 und 8 Foci in G2 auf (Abb. 5.19B). Artemis-defiziente CJ179 zeigen auch nach langen Reparaturzeiten sowohl in G1 (23  $\gamma$ H2AX-Foci) wie auch in G2 (50  $\gamma$ H2AX-Foci) einen

Reparaturdefekt gegenüber WT-Zellen (Abb. 5.19B). Nach Inhibition der DNA-PK<sub>cs</sub> in der G1-Phase zeigt sich, dass die Reparatur von Brüchen auch ohne funktionsfähige DNA-PK durchgeführt werden kann. So liegt nach 96 h Reparatur in DNA-PKi-behandelten WT-Zellen mit 20  $\gamma$ H2AX-Foci eine mit Artemis-defizienten Zellen vergleichbare Anzahl an unreparierten DSBs vor. Allerdings kann die G1-Phase-Reparatur von DNA-PKi-behandelten WT-Zellen das Niveau an verbleibenden DSBs in Artemis-defizienten CJ179 nicht unterschreiten (Abb. 5.19B). Dies spiegelt die in der Literatur beschriebene Bedeutung der DNA-PK wider, wonach diese nur für die Reparatur von Artemis-abhängigen DSBs essentiell ist. Für alle anderen Brüche wird die Reparatur durch funktionelle DNA-PK vereinfacht, sie ist aber auch in Abwesenheit von DNA-PK möglich (Riballo et al. 2004). Demnach ist funktionale DNA-PK auch nach hohen Dosen und langen Reparaturzeiten in der G1-Phase für die Reparatur Artemis-abhängiger Brüche essentiell.

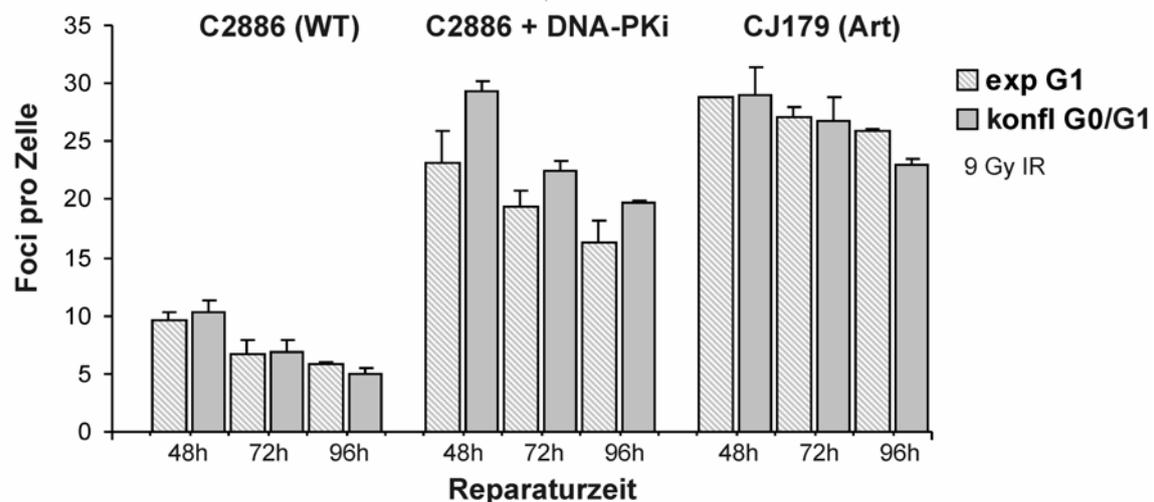
In der G2-Phase zeigen Artemis-defiziente CJ179 nach 96 h etwa 50 unreparierte DSBs, während WT-Zellen nach Behandlung mit DNA-PKi etwa 13  $\gamma$ H2AX-Foci aufweisen (Abb. 5.19B). Das Niveau unreparierter DSBs in DNA-PKi-behandelten WT-Zellen unterschreitet den Artemis-Defekt deutlich. Dies führt zu der paradoxen Situation, dass DNA-PKi-behandelte WT-Zellen 72h und 96h nach Bestrahlung in G1 mehr  $\gamma$ H2AX-Foci aufweisen als in G2 (Abb. 5.19B, Abb. 5.20). Dieses Ergebnis belegt, dass die Reparatur Artemis-abhängiger DSBs in der G2-Phase auch nach langen Zeiten unabhängig von funktionaler DNA-PK ist.



**Abbildung 5.20:**  $\gamma$ H2AX Foci in BrdU-positiven und -negativen Fibroblasten mit und ohne DNA-PKi-Behandlung.

WT-Fibroblasten wurden wie beschrieben mit BrdU pulsmarkiert und nach Zugabe von DNA-PKi bzw. DMSO mit 9 Gy IR bestrahlt. Nach Ablauf der Reparaturzeit wurden die Zellen fixiert und gegen  $\gamma$ H2AX (grün) und BrdU (rot) gefärbt. Gezeigt wird der 96 h-Reparaturpunkt bei 630facher Vergrößerung. Nach Behandlung mit DNA-PKi sind 96 h nach Bestrahlung in der BrdU-positiven G2-Zelle weniger Foci erkennbar als in der darübergelegenen BrdU-negativen Zelle. Dagegen zeigt sich in unbehandelten Zellen das gewohnte Bild der deutlich höheren Anzahl an  $\gamma$ H2AX-Foci in der BrdU-positiven G2-Zelle gegenüber der BrdU-negativen Zelle.

Die Ermittlung der in Abb. 5.19 gezeigten G1/G0-Daten erfolgte in einem getrennten Ansatz mit stationären Zellen. Um eine Verfälschung des Ergebnisses durch phasenspezifische Einflüsse wie beispielsweise durch veränderte DNA-Organisation, Stoffwechselfvorgänge o.ä. in stationären Zellen auszuschließen, wurden im Folgenden die BrdU-negativen Zellen der exponentiellen Kulturen ausgewertet. Dabei lässt die in Abb. 5.17 dargestellte FACS-Analyse vermuten, dass die BrdU-negativen Zellen des exponentiellen Versuchsansatzes zum Großteil in G1 sind. Der Vergleich der durch unterschiedliche Versuchsansätze gewonnenen G1-Daten ist in Abb. 5.21 gezeigt.



**Abbildung 5.21:** Vergleich der G0/G1-Daten aus stationären Zellen mit BrdU-negativen Zellen des BrdU-Ansatzes.

Die G0/G1-Daten wurden durch Versuche mit stationären primären humanen Fibroblasten generiert. Diese wurden mit 9 Gy IR bestrahlt und anschließend zur Reparatur kultiviert. Zudem wurden WT-Zellen 1 h vor Bestrahlung mit DNA-PKi behandelt und bestrahlt. Unbestrahlte Kontrollen wurden einer simulierten Bestrahlung unterzogen und identisch behandelt. Nach der  $\gamma$ H2AX-Färbung erfolgte die Quantifizierung der Foci. Dagegen wurden die G1-Daten exponentieller Zellen aus dem beschriebenen BrdU-Ansatz gewonnen. Exponentiell wachsende Fibroblasten wurden 1 h mit BrdU pulsmarkiert und nach 4 h mit 9 Gy IR bestrahlt. Zusätzlich wurden WT-Zellen 1 h vor Bestrahlung mit DNA-PKi behandelt und ebenso wie die unbestrahlten Kontrollen identisch behandelt. Nach der spezifischen BrdU- und  $\gamma$ H2AX-Färbung erfolgte die Auswertung der  $\gamma$ H2AX-Foci in der BrdU-negativen Population. Die abgebildeten Datenpunkte wurden als Mittelwert in drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Kontrollen von 0,1-0,2 Foci in stationären sowie 0,2-0,6 Foci in exponentiellen Zellen wurden abgezogen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte. Die Daten in G0/G1 wurden bereits in Abb. 5.19 dargestellt.

Die ermittelten Werte zum jeweiligen Reparaturpunkt ähneln sich in konfluenten und exponentiellen G1-Zellen sehr (Abb. 5.21). Da konfluente Zellen eine eindeutige Identifizierung der Zellen erlaubt, wurden zur Untersuchung der DNA-PK-Abhängigkeit in G1 konfluente Zellen benutzt.

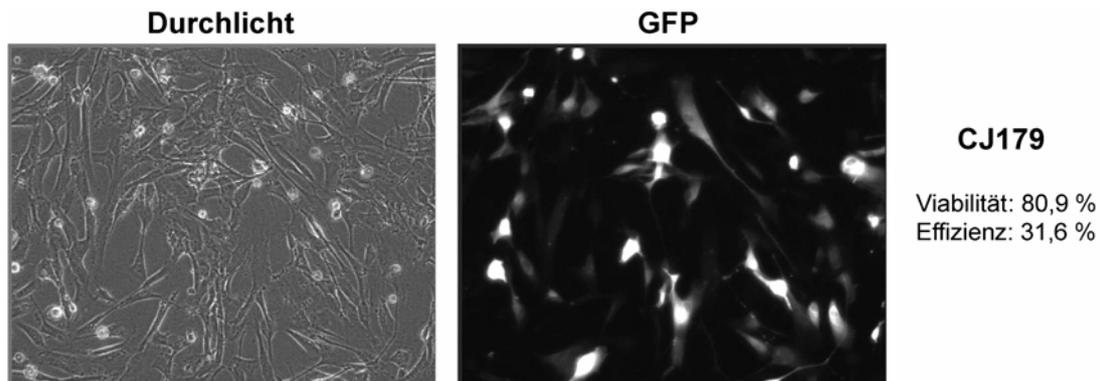
#### 5.4.2. Untersuchungen zur Bedeutung der Endonukleasefunktion von Artemis für die Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden

Die genaue Funktion von Artemis und ATM bei der Reparatur von DSBs ist noch nicht abschließend geklärt. Ausgehend von der Funktion von Artemis bei der V(D)J-Rekombination

als *Hairpin*-öffnendes Enzym wird angenommen, dass Artemis bei der DSB-Reparatur eine ähnliche Funktion besitzt. Neben einer Exonukleasefunktion konnte bei Artemis auch eine Endonukleaseaktivität festgestellt werden (Ma et al. 2002, 2005). Diese könnte bei der Prozessierung von komplizierten Bruchstrukturen wie etwa umgeklappten Enden von Bedeutung sein. Zur Untersuchung des mechanistischen Beitrags der Endonukleaseaktivität von Artemis zur DSB-Reparatur wurden Komplementationsexperimente mit verschiedenen Artemis-Varianten in Artemis-defizienten primären humanen Fibroblasten durchgeführt. Zur Verwendung kam neben einem WT-Artemis-Konstrukt auch die Artemis-Variante D37N mit einer Mutation, die spezifisch die Endonukleaseaktivität von Artemis ausschaltet. Diese Mutation ist gekennzeichnet durch den Austausch eines hochkonservierten Asparaginsäure-Bausteins an Position 37 der Metallo- $\beta$ -lactamase/ $\beta$ -CASP-Domäne im aktiven Zentrum von Artemis gegen Asparagin. Pannicke et al. konnten Expressionsvektoren mit der cDNA von WT-Artemis sowie von D37N-Artemis mit verknüpftem c-myc-Tag herstellen (Pannicke et al. 2004). Nach transienter Transfektion eukaryotischer Zellen mit den beschriebenen Konstrukten konnte gezeigt werden, dass das gewünschte Protein exprimiert wird, im Kern lokalisiert ist, korrekt gefaltet wird und von DNA-PK phosphoryliert werden kann (Pannicke et al. 2004). Jedoch konnte keine Endonuklease-Aktivität von D37N-Artemis nachgewiesen werden, während die Exonukleasefunktion durch die Mutation nicht beeinträchtigt wurde (Pannicke et al. 2004).

Diese Expressionsplasmide wurden zur transienten Transfektion von primären humanen Fibroblasten benutzt. So sollte untersucht werden, ob und inwieweit die Endonukleaseaktivität von Artemis für die Wiederherstellung der Reparaturkapazität von Artemis-defizienten Zellen essentiell ist. Dazu wurden exponentiell wachsende Artemis-defiziente CJ179 sowie WT-Zellen durch Elektroporation mit WT-Artemis bzw. mit D37N-Artemis transfiziert. Anschließend wurde die Reparaturkapazität mit Hilfe der  $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenz untersucht.

Zur Etablierung des Transfektionsprotokolls wurde ein GFP-Kontrollplasmid verwendet und in die Zellen eingebracht. Die Transfektion erfolgte in Suspension in speziellen Küvetten. Nach der Elektroporation wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät und 24 h kultiviert. Anschließend konnte die Effizienz der Transfektion mit Hilfe des GFP-Signals im Fluoreszenzmikroskop untersucht werden (Abb. 5.22).

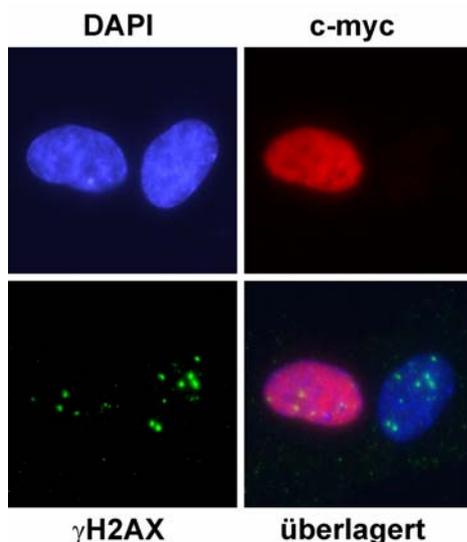


**Abbildung 5.22:** Überprüfung der Transfektionseffizienz mit GFP-Kontrollplasmid.

Primäre humane Fibroblasten mit Mutation in Artemis wurden mit 1,5 µg GFP-Kontrollplasmid transfiziert und anschließend 24 h kultiviert. Der Anteil überlebender Zellen und deren Zustand wurden im Durchlicht beurteilt. Zur Beurteilung der Transfektionseffizienz wurde der Anteil GFP-exprimierender Zellen in Relation zur Gesamtzahl lebender Zellen ermittelt. Die Aufnahme erfolgte bei 100facher Vergrößerung.

Das angewendete Protokoll erlaubte die Transfektion von etwa 32 % der behandelten Zellen. Die Kultur zeigt eine Viabilität von etwa 81 %. Die Zellen haben sich an die Oberfläche angeheftet und unterscheiden sich im Durchlicht nicht offensichtlich von untransfizierten Zellen (Abb. 5.22).

Nach der Etablierung des Transfektionsprotokolls wurden Artemis-defiziente sowie WT-Fibroblasten mit den beschriebenen Artemis-Konstrukten transfiziert. Zur Identifizierung der Zellen, die erfolgreich transfiziert wurden und das aufgenommene Artemis-Konstrukt exprimiert haben, wurden spezifische Antikörper gegen den anhängenden c-myc-Tag eingesetzt. Die transfizierten Zellen zeigten in der Immunfluoreszenz ein intensives, pan-nukleäres c-myc-Signal (Abb. 5.23).

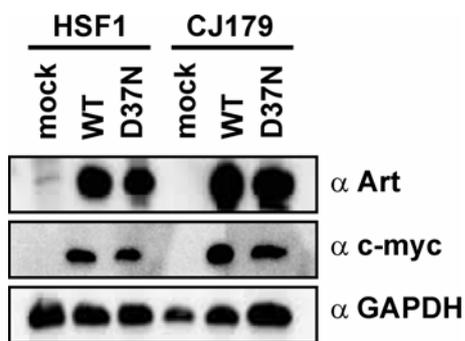


**Abbildung 5.23:** Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahme von transfizierten primären humanen Fibroblasten.

Exponentiell wachsende Artemis-defiziente CJ179 wurden mit 2,5 µg c-myc-WT-Artemis-Konstrukt transfiziert und 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 2 Gy IR bestrahlt, mit Aphidicolin versetzt und nach Ablauf der Reparaturzeit von 8 h fixiert. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen c-myc (rot) und  $\gamma$ H2AX (grün). Zusätzlich wurde die unspezifische Kernfärbung mit DAPI (blau) durchgeführt. Die Aufnahme erfolgte bei 630facher Vergrößerung. Deutlich zu erkennen ist die in der c-myc-positiven, transfizierten Zelle reduzierte Anzahl an  $\gamma$ H2AX-Foci gegenüber der c-myc-negativen Artemis-defizienten Zelle.

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz mit WT- bzw. D37N-Artemis wurde der Anteil an c-myc-positiven Zellen in Relation zur Gesamtzellzahl gesetzt. Die Auswertung ergab mit 35-40 % in G1 und etwa 35 % in G2 ähnliche Transfektionseffizienzen wie mit dem GFP-Kontrollplasmid.

Die Immunfluoreszenz der transfizierten Zellen zeigt, dass die Expression der c-myc-Konstrukte ausreichend groß ist, um eine flächige, intensive Färbung des gesamten Kerns hervorzurufen (Abb. 5.23). Jedoch ist keine quantitative Aussage über die tatsächliche Menge an ektopisch exprimiertem Artemis in den transfizierten Zellen möglich. Um dieser Frage nachzugehen, wurde eine Westernblot-Analyse von transfizierten Zellen im Vergleich zu WT-Fibroblasten bzw. Artemis-defizienten Zellen durchgeführt.



**Abbildung 5.24:** Westernblot-Analyse von transfizierten primären humanen Fibroblasten. Exponentiell wachsende Artemis-defiziente CJ179 sowie WT-Zellen wurden mit c-myc/WT-Artemis bzw. c-myc/D37N-Artemis transfiziert. Zudem wurden Kontrollzellen ohne zugesetzte DNA der Elektroporation unterzogen. 24 h nach Transfektion wurde eine Gesamtprotein-extraktion durchgeführt. 40 µg Gesamtprotein wurden über SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit spezifischen Antikörpern gegen Artemis, c-myc, und GAPDH inkubiert. Die Detektion erfolgte über Lumilight-Kit.

Scheinbehandelte WT-Fibroblasten zeigen im Westernblot eine schwache Bande an endogen vorhandenem Artemis, während bei Artemis-defizienten CJ179 keine Bande zu erkennen ist. Nach der Transfektion mit WT-Artemis bzw. D37N-Artemis treten sehr prominente Artemis-spezifische Banden auf (Abb. 5.24). Die Proteine liegen in deutlich größerer Menge vor als in unbehandelten WT-Zellen. Dadurch ist anzunehmen, dass endogenes Artemis in den WT-Zellen in seiner Funktion stark zurückgedrängt wird. Die c-myc-spezifische Bande tritt nur in transfizierten Zellen auf (Abb. 5.24). Sie ist ebenfalls sehr deutlich ausgeprägt und bestätigt, dass die enorme Überexpression von Artemis auf die c-myc-markierte Form des Proteins zurückzuführen ist. Wichtig für die Auswertung der Daten ist, dass einerseits keine Unterschiede in der Expression der beiden unterschiedlichen Konstrukte innerhalb einer Zelllinie erkennbar sind und andererseits das Ausmaß der Expression in beiden Zelllinien vergleichbar ist.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Transfektion von primären humanen Fibroblasten mit den beschriebenen c-myc/Artemis-Konstrukten in zufriedenstellender Effizienz möglich ist. Zudem können Zellen, die das jeweilige Konstrukt aufgenommen haben und erfolgreich exprimieren, eindeutig identifiziert werden. Darüber hinaus konnte sichergestellt werden, dass bei der Transfektion von WT-Fibroblasten endogen exprimiertes Artemis wenig bis keinen Einfluss auf das Ergebnis hat, da es im Vergleich zur Vektor-exprimierten Artemis-Variante in äußerst geringer Menge vorhanden ist.

Zur Untersuchung des Einflusses der Endonukleasefunktion von Artemis auf die Reparaturkapazität wurden exponentiell wachsende Zellen durch Elektroporation mit c-myc/WT-Artemis bzw. c-myc/D37N-Artemis sowie mit dem GFP-Kontrollplasmid transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Viabilität und der Zustand der Zellen mikroskopisch

kontrolliert. Das GFP-Signal der mit Kontrollplasmid transfizierten Zellen erlaubte eine Aussage über die Effizienz der Transfektion. Die Zellen wurden bestrahlt, nach Ablauf der Reparaturzeit fixiert und mit  $\gamma$ H2AX- und c-myc-spezifischen Antikörpern sowie DAPI gefärbt. Zur Auswertung erfolgte die Identifizierung der Zellzyklusphase wie beschrieben mit Hilfe der Intensität des DAPI-Signals (vergleiche Kapitel 5.1.1). Die Auswertung der  $\gamma$ H2AX-Foci erfolgte manuell bei 1000facher Vergrößerung in c-myc-positiven G1- und G2-Zellen.

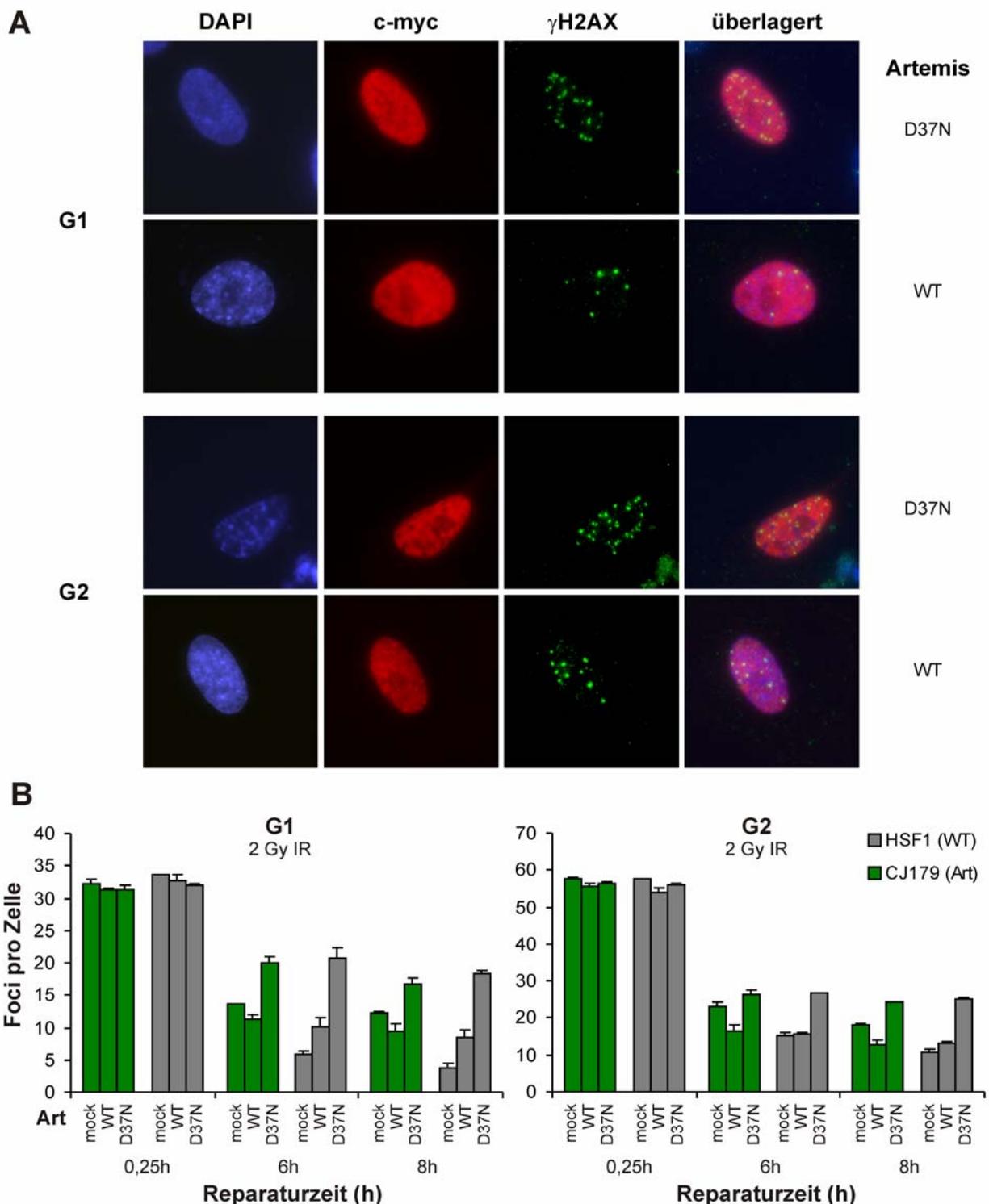


Abbildung 5.25:  $\gamma$ H2AX-Foci-Analyse von transfizierten primären humanen Fibroblasten

**(A)** Repräsentative Immunfluoreszenz-Aufnahmen von c-myc-positiven G1- und G2-Zellen nach Transfektion mit WT-Artemis und D37N-Artemis. Exponentiell wachsende Artemis-defiziente CJ179 wurden wie beschrieben mit c-myc/WT-Artemis bzw. c-myc/D37N-Artemis transfiziert und mit 2 Gy IR bestrahlt. Nach einer Reparaturzeit von 8 h wurden die Zellen fixiert und gegen  $\gamma$ H2AX (grün) und c-myc (rot) gefärbt. Zudem wurde eine unspezifische DAPI-Färbung (blau) durchgeführt, die in Kombination mit dem  $\gamma$ H2AX-Signal zur Identifizierung der Zellzyklusphasen genutzt wurde. Die Aufnahme erfolgte bei 630facher Vergrößerung.

**(B)** Quantitative Auswertung der  $\gamma$ H2AX-Analyse von WT-Fibroblasten und Artemis-defizienter CJ179 nach Transfektion mit WT-Artemis bzw. D37N-Artemis. Exponentiell wachsende primäre Fibroblasten wurden wie beschrieben mit c-myc/WT-Artemis sowie c-myc/D37N-Artemis transfiziert, anschließend mit 2 Gy IR bestrahlt, mit Aphidicolin versetzt und zur Reparatur (15 min, 6 h, 8 h) kultiviert. Nach der Fixierung erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung von  $\gamma$ H2AX und c-myc. Zellzyklusphasen wurden mit Hilfe der DAPI-Intensität identifiziert. Die Quantifizierung der  $\gamma$ H2AX-Foci erfolgte in G1 und G2. Die abgebildeten Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Experimenten. Die Kontrollen, die in transfizierten Zellen (2,5-3,0 Foci in G1, 5-6 Foci in G2) höher lagen als bei scheinbehandelten Zellen (0,2-0,5 Foci in G1, 2,0-2,5 Foci in G2), wurden abgezogen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

Die mikroskopische Betrachtung der transfizierten Artemis-defizienten primären humanen Fibroblasten lässt vermuten, dass durch die Überexpression von WT-Artemis die Reparaturkapazität in G1 und in G2 deutlich verbessert wird. In Abb. 5.23 ist zu beobachten, dass die c-myc-positive, mit WT-Artemis transfizierte CJ179-Zelle eine im Vergleich mit der untransfizierten und damit Artemis-defizienten Zelle deutlich reduzierte Anzahl an  $\gamma$ H2AX-Foci aufweist. In Abb. 5.25A ist der direkte Vergleich von Artemis-defizienten CJ179 nach Transfektion mit WT-Artemis bzw. mit D37N-Artemis gezeigt. Während die Anzahl an  $\gamma$ H2AX-Foci nach Transfektion mit WT-Artemis reduziert ist, kann die Endonukleasemutante D37N nicht zur Verminderung des Artemis-Reparaturdefektes beitragen.

Die quantitative Auswertung der  $\gamma$ H2AX-Foci in c-myc-positiven G1- und G2-Zellen bestätigt diesen Eindruck. In der G1-Phase hat die Überexpression der Artemis-Konstrukte keinen Einfluß auf die Anzahl induzierter DSBs, die bei allen untersuchten Zelllinien bei etwa 31-33 DSBs liegt (Abb. 5.25B). Die Transfektion Artemis-defizienter CJ179 mit dem WT-Artemis-Konstrukt führt zu einer Verringerung der Focianzahl um 9 % gegenüber scheinbehandelter CJ179 (9,4 Foci). Im Vergleich zu scheinbehandelten WT-Zellen (3,7 Foci) verbleibt 8 h nach Bestrahlung eine erhöhte Anzahl an DSBs unrepariert (9,4 Foci). Dieses Niveau entspricht jedoch dem von WT-Zellen nach der Expression von WT-Artemis (8,6 Foci). Die Transfektion von WT-Zellen mit WT-Artemis zeigt, dass das Niveau an  $\gamma$ H2AX-Foci im Vergleich zu scheinbehandelten Zellen leicht erhöht ist (8,6 Foci gegenüber 3,7 Foci 8 h nach Bestrahlung). Vermutlich ist diese leicht erhöhte Focianzahl auf die Überexpression der Artemis-Konstrukte zurückzuführen. Die Expression von funktionellem Artemis hebt den Artemis-Reparaturdefekt in G1 auf und verbessert die Reparaturkapazität. Dagegen ist in Artemis-defizienten CJ179 nach der Transfektion mit D37N-Artemis keine Verbesserung des Reparaturvermögens festzustellen (16,8 Foci). In WT-Zellen induziert die Überexpression der endonukleasetoten Artemisvariante einen Reparaturdefekt (18,4 Foci). Es kommt zu einem dominant-negativen Effekt des ektopisch exprimierten Proteins gegenüber dem endogenen

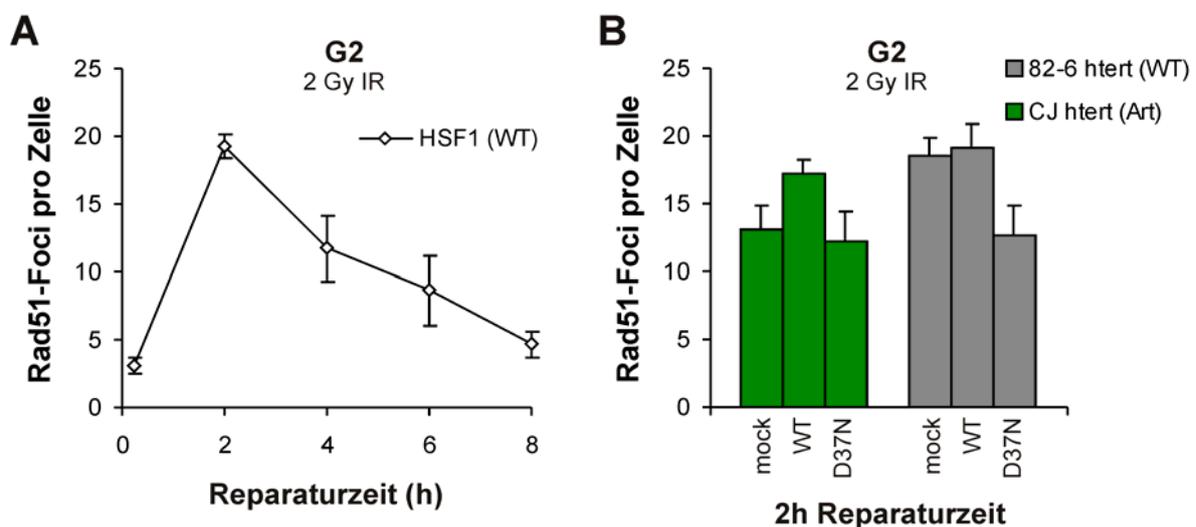
Protein. Die Zellen weisen einen Reparaturdefekt auf, der dem von D37N-transfizierten CJ179 ähnelt. Der Unterschied zwischen WT-Artemis und D37N-Artemis entspricht mit 22-30 % dem Reparaturdefekt scheinbehandelter Artemis-defizienter Zellen gegenüber scheinbehandelter WT-Zellen (Abb. 5.25B).

In der G2-Phase ist die Situation ähnlich, auch hier wird die Anzahl induzierter DSBs durch die Transfektion nicht verändert und liegt bei 55-57 DSBs (Abb. 5.25B). WT-Artemis kann in Artemis-defizienten CJ179 das Reparaturvermögen nahezu vollständig wiederherstellen. Die Anzahl verbleibender  $\gamma$ H2AX-Foci (12,5 Foci) ist gegenüber der von scheinbehandelten WT-Zellen (10,7 Foci) nur leicht erhöht und korreliert gut mit WT-Zellen nach Transfektion mit WT-Artemis (Abb. 5.25B). In WT-Zellen führt die Expression von WT-Artemis auch in G2 zu einer leichten Erhöhung der Foci-Anzahl gegenüber scheinbehandelten WT-Zellen (13,0 Foci gegenüber 10,7 Foci 8 h nach Bestrahlung). In Artemis-defizienten CJ179 kann die Überexpression von D37N-Artemis die Reparaturkapazität nicht verbessern. Es kommt zu einer leichten Erhöhung der Anzahl unreparierter DSBs (24,1 Foci) gegenüber scheinbehandelten CJ179 (18,3 Foci). Durch die Transfektion mit D37N-Artemis wird die Reparaturkapazität von WT-Zellen in G2 eingeschränkt und es kommt zur Ausbildung eines Reparaturdefekts (25,2 Foci). Wiederum korreliert dieses Schadensniveau gut mit dem von D37N-Artemis-transfizierten CJ179. Die Differenz zwischen WT-Artemis- und D37N-Artemis-exprimierenden Zellen entspricht mit 21-30 % wie in G1 in etwa dem Reparaturdefekt von scheinbehandelten Artemis-defizienten CJ179 gegenüber WT-Zellen (Abb. 5.25B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die Expression eines WT-Artemis-Konstruktes die Reparaturkapazität von Artemis-defizienten Fibroblasten in G1 und in G2 wieder hergestellt werden kann. Dagegen trägt die endonukleasetote Artemisvariante D37N nicht zur Verbesserung der Reparatur bei. Somit ist die Endonukleasefunktion von Artemis für die vollständige Reparatur strahleninduzierter DSBs in der G1- und G2-Phase unabdingbar und kritischer Angriffspunkt für Mutationen, die zur Ausprägung von Reparaturdefekten führen können.

Die bisher gezeigten Ergebnisse weisen die Beteiligung von Artemis an der HR-Reparatur in G2 v. a. mit Hilfe der  $\gamma$ H2AX-Analyse nach. Allerdings liefert diese Methode eher indirekte Beweise. Eine Möglichkeit der direkten Untersuchung der HR besteht in der Analyse von HR-assoziierten Reparaturfaktoren wie Rad51, die am Schadensort agglomerieren und so Mikrofoci bilden. Diese kolokalisieren mit  $\gamma$ H2AX und markieren DSBs, die durch HR repariert werden (Bekker-Jensen et al. 2006). Die Quantifizierung von Rad51-Foci erlaubt eine Aussage über das Ausmaß der HR-Reparatur. So konnte gezeigt werden, dass Artemis-defizienten Zellen eine im Vergleich zum WT verminderte Ausbildung von Rad51-Foci zeigen (Barton, mündliche Mitteilung), was die Beteiligung von Artemis an der HR bestätigt. Komplementationstudien konnten die Bedeutung der Endonukleasefunktion von Artemis für

die Reparatur auch in G2 aufdecken. Der Artemis-Reparaturdefekt wurde durch Überexpression von WT-Artemis, aber nicht von endonukleasetotem D37N-Artemis, aufgehoben (Abb. 5.25). Somit sollte durch WT-Artemis auch die in Artemis-defizienten Zellen verminderte HR-Rate wieder gesteigert werden, während D37N-Artemis keine Auswirkung auf die Anzahl an Rad51-Foci haben sollte. Dies wurde im Folgenden überprüft. Zunächst wurde der Verlauf der Rad51-Kinetik untersucht, um einen Zeitpunkt mit maximaler Rad51-Foci-Anzahl zu bestimmen. Dazu wurden exponentiell wachsende WT-Zellen bestrahlt und nach der jeweiligen Reparaturzeit fixiert. Nach der Immunfluoreszenzfärbung von Rad51 erfolgte die Quantifizierung der Rad51-Foci in G2-Phase-Zellen. Die Identifizierung der Zellzyklusphase wurde anhand der Intensität des DAPI-Signals durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 5.26A dargestellt.



**Abbildung 5.26:** Rad51-Foci-Analyse von humanen Fibroblasten

**(A)** Rad51-Foci-Analyse von WT-Fibroblasten. Exponentiell wachsende HSF1 wurden mit 2 Gy IR bestrahlt, mit Aphidicolin versetzt und nach Ablauf der jeweiligen Reparaturzeit (15 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h) fixiert. Anschließend erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung von Rad51. Zudem wurde eine unspezifische Kernfärbung mit DAPI durchgeführt. Die Quantifizierung der Rad51-Foci erfolgte in G2-Phase-Zellen, die anhand der DAPI-Intensität identifiziert wurden. Die dargestellten Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten. In unbestrahlten Zellen ermittelte Kontrollwerte (1,7-2,2 Foci) wurden abgezogen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

**(B)** Rad51-Foci-Analyse von transfizierten humanen Fibroblasten. Artemis-defiziente CJ htert sowie WT-Zellen (82-6 htert) wurden wie beschrieben mit c-myc/WT-Artemis bzw. c-myc/D37N-Artemis transfiziert und 24 h bei 37 °C kultiviert. Zudem wurden Zellen ohne zugegebene DNA einer identischen Behandlung unterzogen. Nach der Bestrahlung mit 2 Gy IR wurde Aphidicolin zugegeben und für weitere 2 h inkubiert. Nach Ablauf der Reparaturzeit erfolgte die Fixierung der Zellen und die anschließende Immunfluoreszenzfärbung von Rad51 und c-myc. Zudem wurde eine unspezifische DAPI-Gegenfärbung durchgeführt. Rad51-Foci wurden in über die DAPI-Intensität identifizierten G2-Zellen mit pan-nukleärer c-myc-Färbung durchgeführt. Die dargestellten Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte. Die in unbestrahlten Zellen ermittelten Kontrollwerte (2,1-2,5 Foci) wurden abgezogen.

Durch Bestrahlung mit 2 Gy IR werden maximal 19,3 Rad51-Foci ausgebildet. Diese Anzahl nimmt im beobachteten Zeitraum wieder ab und erreicht nach 8 h mit 4,7 Foci nahezu Hintergrundniveau. Die Kinetik der Ausbildung von Rad51-Foci ist im Vergleich zu  $\gamma$ H2AX-Foci

verzögert, ein Maximum wird 2 h nach Bestrahlung erreicht (Abb. 5.26A). Auf Basis dieses Ergebnisses wurde der 2 h-Reparaturzeitpunkt zur Charakterisierung der HR mit Hilfe der Rad51-Foci-Analyse nach Komplementation mit verschiedenen Artemiskonstrukten gewählt. Dazu wurden Artemis-defiziente CJ hert sowie WT-Zellen wie beschrieben mit WT- bzw. D37N-Artemis transfiziert und 24 h später bestrahlt. Nach Ablauf der Reparaturzeit erfolgte die Fixierung und anschließende Rad51- und c-myc-Immunfluoreszenzfärbung der Zellen. Die Quantifizierung der Rad51-Foci wurde in c-myc-positiven G2-Phase-Zellen durchgeführt, die anhand der DAPI-Intensität identifiziert wurden. Das Ergebnis ist in Abb. 5.26B gezeigt. In Artemis-defizienten Zellen erhöht sich die Anzahl an Rad51-Foci von 13,0 Foci in scheinbehandelten CJ hert nach der Überexpression von WT-Artemis auf 17,3 Foci (Abb. 5.26B). Dies entspricht nahezu der Anzahl an Rad51-Foci in scheinbehandelten WT-Zellen (18,6 Foci). Dagegen ändert D37N-Artemis nichts am Ausmaß der HR-Reparatur, es treten 12,2 Rad51-Foci auf. Somit erhöht die Überexpression von WT-Artemis den Anteil der HR-Reparatur, während endonukleasetotes Artemis diesen verringert. Scheinbehandelte WT-Zellen weisen 18,6 Foci auf, diese Anzahl wird durch Transfektion mit WT-Artemis nicht maßgeblich verändert (19,2 Foci). Dagegen führt die Überexpression des endonukleasetoten Artemis zur Reduktion der Rad51-Foci-Anzahl auf 12,6 Foci (Abb. 5.26B). Durch den dominant-negativen Effekt des exprimierten Artemis-Konstrukts wird der Anteil der HR an der Gesamt-Reparatur verringert. Dieses Ergebnis beweist, dass die Endonukleasefunktion von Artemis für die HR in der G2-Phase benötigt wird.

Die zusammenfassende Betrachtung der gezeigten Ergebnisse erlaubt neue Einblicke in die Reparatur von strahleninduzierten DSBs. ATM und Artemis werden für die Reparatur einer Subpopulation von etwa 15 % der IR-induzierter Brüche in G1 und G2 benötigt. In der G1-Phase verläuft die Reparatur der Artemis-abhängigen Brüche unter Beteiligung funktionaler DNA-PK über NHEJ. In G2 dagegen konnte die Beteiligung von ATM und Artemis an einem gemeinsamen Reparaturweg mit BRCA2 gezeigt werden. Die Reparatur der Artemis-abhängigen Brüche verläuft unabhängig von funktionaler DNA-PK über die HR. Komplementationsexperimente mit verschiedenen Artemisvarianten konnten die Bedeutung der Endonukleaseaktivität von Artemis für die Reparatur strahleninduzierter Brüche in G1 und in G2 aufzeigen.

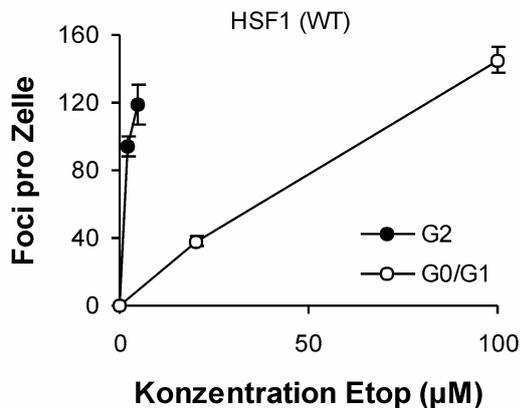
## 5.5. Untersuchungen zur Reparatur von etoposidinduzierten DNA-Schäden

### 5.5.1. Induktion und Reparatur von DNA-Schäden durch Etoposidbehandlung in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus

Durch die Behandlung mit ionisierender Strahlung entsteht eine große Bandbreite an unterschiedlichsten DNA-Schäden (vergleiche Kapitel 3.1.4). Viele dieser Schäden bedingen alleine oder in Kombination DSBs oder treten in unmittelbarer Nähe davon auf. Um mehr über die Zusammenhänge zwischen chemischer Struktur und Reparatur eines DSBs zu lernen, wurden durch die Chemikalie Etoposid chemisch gleichartige DSBs induziert. Dabei sollte der Verlauf der Reparaturkinetik in den beiden Zellzyklusphasen G1 und G2 im Vergleich zur Reparatur von IR-induzierten DSBs Aufschluss über die Bedeutung der schnellen und der langsamen Komponente geben. Außerdem wurde die Beteiligung von ATM und Artemis an der Reparatur dieser Art von Brüchen in wachsenden Zellen untersucht. So konnte bereits gezeigt werden, dass der ATM/Artemis-Reparaturdefekt nach Etoposidbehandlung in stationären Zellen nicht auftritt (Riballo et al. 2004).

Etoposid ist ein häufig angewendetes Chemotherapeutikum der Gruppe der Epipodophyllotoxine und greift in den Reaktionsmechanismus der Topoisomerase II (TopoII) ein. Dieser beinhaltet die Induktion eines DSBs, der im Verlauf des Reaktionszyklus wieder verbunden wird, bevor das Enzym die DNA verlässt. Durch Etoposid wird das Enzym nach der Induktion des DSBs in Form eines Intermediatzustandes (*cleavage complex*) arretiert, welcher als DNA-Schaden erkannt wird. Dabei sind beide Enden des DSBs durch kovalente Protein-DNA-Bindungen fixiert. Alle durch Etoposidbehandlung induzierten DSBs sind durch eine einheitliche Struktur gekennzeichnet (vergleiche Kapitel 3.2).

Die Empfindlichkeit von Zellen gegenüber Etoposid ist abhängig von der Aktivität des Zielenzym TopoII und variiert somit in den Phasen des Zellzyklus (Wang et al. 2007). Um zu gewährleisten, dass in den beiden Zellzyklusphasen G1 und G2 der Verlauf der Reparatur nach Induktion eines vergleichbaren Schadensausmaßes untersucht wird, wurde zunächst die Wirksamkeit unterschiedlicher Etoposidkonzentrationen in der G1- und G2-Phase quantifiziert. Primäre humane WT-Fibroblasten wurden bis zur Konfluenz kultiviert bzw. im exponentiellen Wachstum mit Etoposid behandelt. Anschließend wurde die induzierte Anzahl an DSBs nach Immunfluoreszenzfärbung von  $\gamma$ H2AX, bei exponentiell wachsenden Zellen in Kombination mit CENP-F, bestimmt. Die Quantifizierung wurde bis zu einer Anzahl von etwa 90-100 Foci manuell bei 1000facher Vergrößerung durchgeführt. Bei höherer Focianzahl wurden bei 630facher Vergrößerung Aufnahmen angefertigt und am Bildschirm ausgewertet.

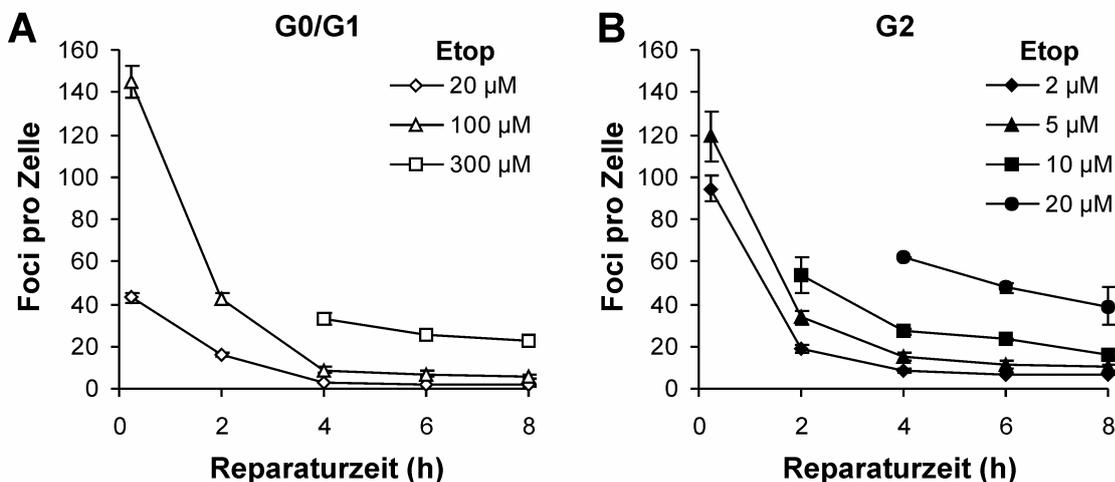


**Abbildung 5.27:** Induktion von  $\gamma$ H2AX-Foci nach Behandlung mit unterschiedlichen Etoposidkonzentrationen (Etop).

Primäre humane WT-Fibroblasten wurden bis zur Konfluenz kultiviert und für 1 h mit unterschiedlichen Etoposidkonzentrationen (20  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  Etop) behandelt. Im Anschluß erfolgte die Kultivierung für weitere 15 min. Nach Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung gegen  $\gamma$ H2AX erfolgte die Auswertung. Parallel wurden exponentiell wachsende WT-Fibroblasten einer einstündigen Etoposidbehandlung (2  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ ) unterzogen, für 15 min kultiviert und nach der Fixierung zusätzlich gegen CENP-F gefärbt. Die Auswertung der  $\gamma$ H2AX-Foci erfolgte in der G2-Phase. Die Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, Kontrollwerte (0,1-0,2 Foci in G0/G1, 2,0-3,1 Foci in G2) wurden abgezogen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

Stationäre Zellen in der G0/G1-Phase zeigen eine deutlich geringere Anzahl an etoposidinduzierten DSBs als exponentiell wachsende G2-Zellen (Abb. 5.27). Der große Unterschied in der Anzahl induzierter DSBs in G1 bzw. G2 spiegelt nicht wie nach Röntgenstrahlung (vergleiche Abb. 5.2) den unterschiedlichen DNA-Gehalt wider, sondern scheint auf unterschiedliche Empfindlichkeit der Zellen in der G0/G1- bzw. G2-Phase zurückzuführen zu sein. Zur Induktion einer vergleichbaren DSB-Anzahl in G0/G1 und G2 müssen stationäre Zellen mit etwa der 20fachen Etoposidkonzentration behandelt werden (Abb. 5.27). Dieses Ergebnis geht mit der höheren Enzymaktivität des Zielenzym TopoII in der G2-Phase einher (Wang et al. 2007).

Zur Untersuchung der Reparatur etoposidinduzierter DSBs in G0/G1 wurden konfluente primäre humane Fibroblasten mit Etoposid behandelt. Die Analyse der DSB-Reparatur in G2 erfolgte in exponentiell wachsenden Zellen nach Etoposidbehandlung. Dazu wurden jeweils unterschiedliche Konzentrationen an Etoposid eingesetzt. Vorhandene DSBs wurden durch  $\gamma$ H2AX-Färbung sichtbar gemacht und ausgewertet.



**Abbildung 5.28:**  $\gamma$ H2AX-Analyse der Reparatur etoposidinduzierter DSBs in primären humanen

## Fibroblasten

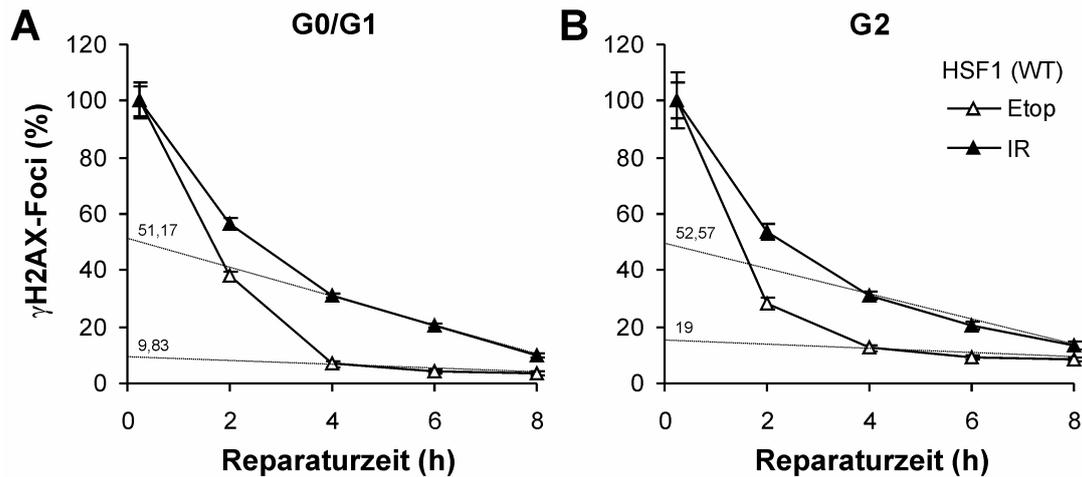
**(A)** Reparatur etoposidinduzierter DNA-Schäden in G0/G1. Konfluente WT-Fibroblasten (HSF1) wurden 1 h mit Etoposid (20  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 300  $\mu$ M) behandelt. Anschließend wurden die Zellen zur Reparatur kultiviert (15 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h). Nach der Fixierung erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung von  $\gamma$ H2AX. Die dargestellten Datenpunkte zeigen den Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die in unbestrahlten Zellen ermittelten Kontrollwerte (0,2-0,4 Foci) wurden abgezogen. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler der Mittelwerte und liegen teilweise innerhalb der Symbole.

**(B)** Reparatur etoposidinduzierter DNA-Schäden in G2. Exponentiell wachsende WT-Fibroblasten wurden 1 h mit Etoposid (2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M) behandelt und zur Reparatur inkubiert (15 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h). Nach der Fixierung erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung von  $\gamma$ H2AX und CENP-F. Die Quantifizierung der  $\gamma$ H2AX-Foci erfolgte in CENP-F-positiven G2-Zellen. Die Datenpunkte zeigen den Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, Hintergrundwerte (2,2-2,9 Foci) wurden abgezogen. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler der Mittelwerte dar und liegen teilweise innerhalb der Symbole.

In stationären Fibroblasten werden durch Behandlung mit 20  $\mu$ M Etoposid 42,9 DSBs induziert, 100  $\mu$ M Etoposid führen zu etwa 140 DSBs (Abb. 5.28A). Diese Schäden sind 4 h nach Schadensinduktion bereits zu über 90 % repariert (2,9 Foci bei 20  $\mu$ M bzw. 8,6 Foci bei 100  $\mu$ M Etoposid). Die Behandlung mit 300  $\mu$ M Etoposid resultiert in einer großen Anzahl an DSBs und sorgt für das Auftreten einer pan-nukleären  $\gamma$ H2AX-Färbung. Mit dem Fortschreiten der Reparatur ist die Quantifizierung der Signale durch die Auflösung in punktförmige  $\gamma$ H2AX-Signale ab etwa 4 h nach Schadensinduktion möglich. Eine Auswertung der Anzahl vorhandener  $\gamma$ H2AX-Foci erfolgte daher für die 4 h-, 6 h- und 8 h-Reparaturpunkte. Hier können 33,1 Foci quantifiziert werden, was bei der enormen Anzahl an induzierten DSBs auf eine ebenfalls sehr rasche Reparatur hindeutet (Abb. 5.28A).

Exponentiell wachsende Zellen reagieren empfindlicher auf Etoposid und werden daher mit niedrigeren Konzentrationen behandelt. Die entstehenden DSBs (94,6 Foci bei 2  $\mu$ M, 120,0 Foci nach 5  $\mu$ M Etoposid) werden ebenfalls innerhalb von 4 h zu etwa 90 % repariert (8,6 Foci bei 2  $\mu$ M, 14,9 Foci bei 5  $\mu$ M Etoposid) (Abb. 5.28B). Die Behandlung mit 10  $\mu$ M bzw. 20  $\mu$ M Etoposid führt aufgrund der hohen Anzahl an induzierten DNA-Schäden zu einem flächigen  $\gamma$ H2AX-Signal. Die Quantifizierung ist ab 2 h (10  $\mu$ M Etoposid) bzw. ab 4 h (20  $\mu$ M Etoposid) möglich (Abb. 5.28B). Hier deutet die Anzahl detektierter  $\gamma$ H2AX-Foci ebenfalls auf einen sehr raschen Reparaturverlauf hin.

Die Reparaturkinetiken nach unterschiedlichen Etoposidkonzentrationen zeigen, dass der Großteil der induzierten DNA-Schäden in relativ kurzer Zeit repariert wird. Zur besseren Beurteilung des zeitlichen Verlaufs der Reparatur nach Etoposidbehandlung wurde diese exemplarisch für eine Etoposidkonzentration in G0/G1 sowie in G2 mit der Reparatur strahleninduzierter DSBs verglichen. Die jeweilige Anzahl verbliebener Foci wurde in Relation zum Induktionswert (15 min) angegeben.



**Abbildung 5.29:**  $\gamma$ H2AX-Analyse der Reparatur etoposid- und strahleninduzierter DSBs in primären humanen WT-Fibroblasten.

**(A)** WT-Fibroblasten (HSF1) wurden bis zur Konfluenz kultiviert und für 1 h mit 20  $\mu$ M Etoposid behandelt. Nach vollständiger Entfernung des Etoposids erfolgte die Zugabe von frischem Medium, anschließend wurden die Zellen zur Reparatur für 15 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h kultiviert. Nach der Fixierung erfolgte die spezifische  $\gamma$ H2AX-Färbung.

**(B)** Exponentiell wachsende WT-Zellen wurden 1 h mit 5  $\mu$ M Etoposid behandelt, anschließend mit PBS gewaschen und mit frischem Medium und Aphidicolin versetzt. Nach Ablauf der Reparaturzeit (15 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h) wurden die Zellen fixiert und es erfolgte der Immunfluoreszenznachweis von  $\gamma$ H2AX und CENP-F. Die Quantifizierung der  $\gamma$ H2AX-Foci erfolgte in CENP-F-positiven G2-Zellen.

Zudem wurden exponentiell wachsende WT-Fibroblasten mit 2 Gy IR bestrahlt und nach der Zugabe von Aphidicolin zur Reparatur inkubiert. Nach Ablauf der Reparaturzeit (15 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h) wurden die Zellen fixiert und anschließend mit spezifischen Antikörpern gegen  $\gamma$ H2AX und CENP-F gefärbt. Die Auswertung der  $\gamma$ H2AX-Foci erfolgte in G2. Zur besseren Vergleichbarkeit der Reparaturkinetiken wurde die Anzahl der jeweils ermittelten  $\gamma$ H2AX-Foci in Relation zum 15 min-Induktionswert dargestellt (%). Der im Diagramm angegebene Anteil der langsamen Komponente an der Reparatur wurde durch exponentielle Extrapolation der 4 h-, 6 h-, und 8 h-Reparaturpunkte berechnet. Die abgebildeten Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte in Relation zum 15 min-Induktionswert und liegen teilweise innerhalb der Symbole.

Die Reparatur von etoposidinduzierten Brüchen zeigt sowohl in G1 (Abb. 5.29A) wie auch in G2 (Abb. 5.29B) einen deutlich rascheren Verlauf als nach ionisierender Strahlung. Bereits 2 h nach Etoposidbehandlung sind etwa 20-30 % mehr Brüche repariert als nach Bestrahlung. Die langsame Reparaturkomponente ist zudem für einen deutlich geringeren Anteil der induzierten DSBs verantwortlich, wie die in Abb. 5.29 gezeigte Extrapolation verdeutlicht. Werden nach IR noch 51,17 % der Brüche in G1 bzw. 52,57 % in G2 der langsamen Komponente zugeführt, so beträgt dieser Anteil nach Etoposidbehandlung lediglich 9,83 % in G1 bzw. 19,0 % in G2 (Abb. 5.29).

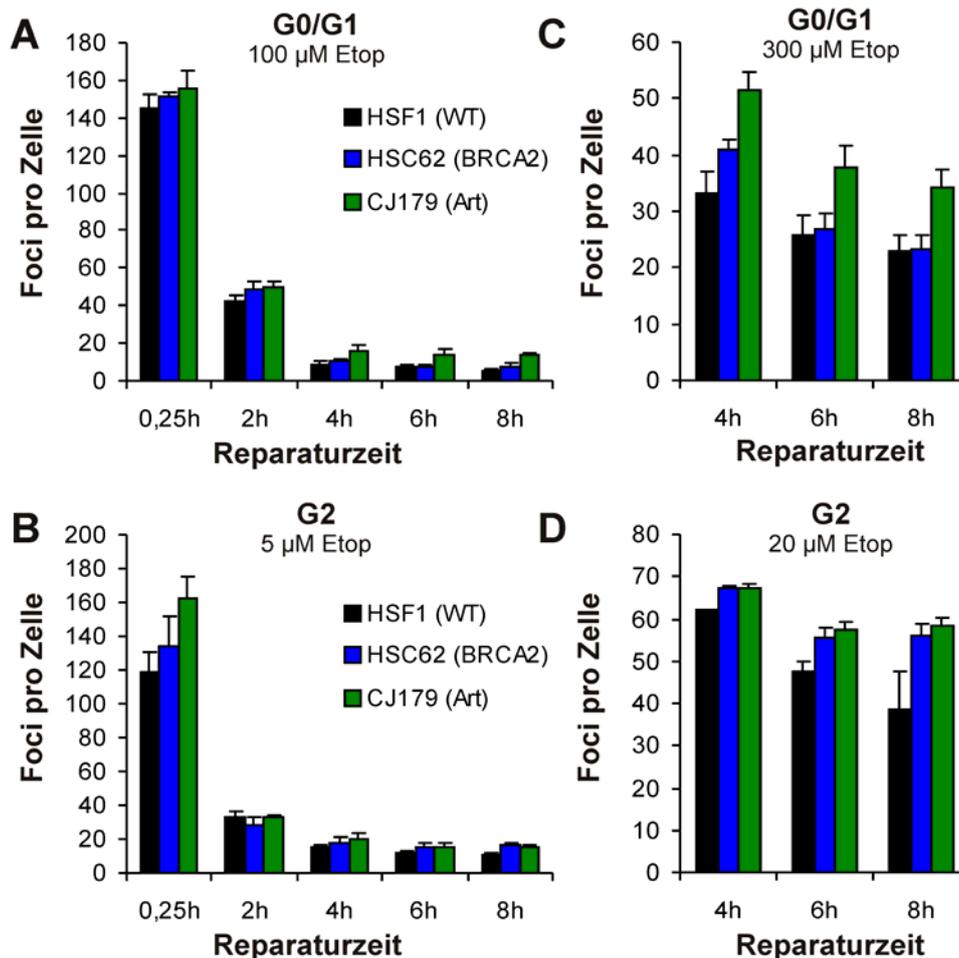
Diese Ergebnisse zeigen, dass die Beschaffenheit eines DNA-Schadens Einfluss auf den Verlauf und die Geschwindigkeit der DSB-Reparatur sowohl in der G1- wie auch in G2-Phase hat.

### **5.5.2. Untersuchung des Anteils der Artemis-abhängigen Reparatur an etoposidinduzierten DNA-Schäden**

Bei der Reparatur strahleninduzierter DSBs wird die langsame Komponente in der G1- und G2-Phase durch die ATM/Artemis-abhängige Reparatur repräsentiert. Schäden, die ATM und Artemis benötigen, werden in G1 durch NHEJ repariert, während in G2 die HR eingesetzt wird.

Um die genetische Abhängigkeit der etoposidinduzierten DNA-Schäden von Artemis und den Zusammenhang zur HR in G2 zu überprüfen, wurde untersucht, ob Defizienzen in der langsamen Komponente zur Ausprägung von Reparaturdefekten nach Etoposidbehandlung führen. Dazu wurden stationäre sowie exponentiell wachsende primäre humane Fibroblasten mit Defekten in Artemis und BRCA2 sowie WT-Zellen mit Etoposid behandelt, nach Ablauf der jeweiligen Reparaturzeit fixiert und gegen  $\gamma$ H2AX und CENP-F gefärbt. Der 15 min-Induktionspunkt wurde am Bildschirm ausgewertet, die Reparaturpunkte wurden manuell am Mikroskop gezählt. Das Ergebnis ist in Abb. 5.30A und 5.30B dargestellt.

Da die Reparatur von etoposidinduzierten DNA-Schäden hauptsächlich über die schnelle Reparaturkomponente verläuft und der Anteil der langsamen Komponente im Vergleich zu strahleninduzierten Schäden deutlich reduziert ist (Abb. 5.29), kann die Bedeutung von Artemis für die Reparatur dieser Brüche nur schwer analysiert werden. Es stellt sich daher die Frage, ob der Anteil der langsamen Komponente an der Reparatur von Etoposidschäden durch Erhöhung der initial vorhandenen Schadenszahl gesteigert werden kann. Um eine große Schadenszahl zu induzieren wurden sehr hohe Etoposidkonzentrationen eingesetzt. Der Verlauf der Reparatur wurde mit Hilfe der  $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenz verfolgt und quantifiziert. Das Ergebnis ist in Abb. 5.30C und 5.30D gezeigt.



**Abbildung 5.30:**  $\gamma$ H2AX-Analyse der Reparatur von etoposidinduzierten DSBs in primären humanen Fibroblasten.

**(A)** Zur Untersuchung der Reparatur etoposidinduzierter DSBs in G0/G1 wurden Artemis-defiziente CJ179, BRCA2-defiziente HSC62 sowie WT-Zellen (HSF1) bis zur Konfluenz auf Deckgläsern kultiviert. Die Etoposidbehandlung erfolgte mit einer Konzentration von 20  $\mu$ M Etoposid in vorgewärmtem Zellkulturmedium für 1 h bei 37 °C. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit frischem Medium versetzt und zur Reparatur (15 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h) kultiviert. Die Zellen wurden nach Ablauf der Reparaturzeit fixiert und gegen  $\gamma$ H2AX gefärbt.

**(B)** Zur Analyse der Reparatur etoposidinduzierter Brüche in G2 wurden exponentiell wachsende Artemis-defiziente CJ179, BRCA2-defiziente HSC62 sowie WT-Zellen (HSF1) verwendet. Diese wurden 1 h mit 5  $\mu$ M Etoposid in Zellkulturmedium behandelt, anschließend zweimal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt. Der Zugabe von Aphidicolin schloss sich eine Reparaturzeit von 15 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h an. Die Zellen wurden fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen  $\gamma$ H2AX und CENP-F gefärbt. Die Auswertung erfolgte in G2.

**(C)** Konfluente Artemis-defiziente CJ179, BRCA2-defiziente HSC62 sowie WT-Zellen wurden für 1 h mit 300  $\mu$ M Etoposid behandelt, gewaschen, mit frischem Medium versetzt und im Anschluss zur Reparatur für 4 h, 6 h, 8 h kultiviert. Nach der Fixierung erfolgte die spezifische  $\gamma$ H2AX-Färbung.

**(D)** Exponentiell wachsende Artemis-defiziente CJ179, BRCA2-defiziente HSC62 sowie WT-Zellen wurden 1 h mit 20  $\mu$ M Etoposid behandelt, gewaschen, mit frischem Medium versetzt und nach Aphidicolin-Zugabe für 4 h, 6 h, 8 h kultiviert. Neben  $\gamma$ H2AX wurde parallel CENP-F gefärbt. Die Quantifizierung erfolgte in G2. Die gezeigten Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Ansätzen, die Kontrollwerte (etwa 0,2 Foci in G1 und 2-3 Foci in G2) wurden abgezogen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

Auch nach Etoposidbehandlung zeigen BRCA2-defiziente HSC62 in G0/G1 im Vergleich zu WT-Zellen keine Unterschiede im Verlauf der Reparaturkinetik (Abb. 5.30A). Dies ist konsistent mit der fehlenden Beteiligung der HR an der DSB-Reparatur in G0/G1. Während in Artemis-defizienten CJ179 nach Bestrahlung 15-20 % der induzierten Brüche unrepariert

verbleiben (vergleiche Abb. 5.9), ist bei etoposidinduzierten DNA-Schäden in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> die Anzahl an  $\gamma$ H2AX-Foci im Vergleich zu WT-Zellen nur leicht erhöht (13,4 gegenüber 5,7 Foci, Abb. 5.30A). Es verbleiben somit nach 8 h lediglich etwa 7 DSBs im Vergleich zu WT-Zellen unrepariert, was bei einem initialen Schadensausmaß von etwa 145 DSBs 5 % entspricht. In der G<sub>2</sub>-Phase zeigen Artemis- und BRCA2-defiziente Zellen nach IR im Vergleich zum WT einen Defekt der langsamen Reparaturkomponente, der etwa 15-20 % der DNA-Schäden betrifft (vergleiche Abb. 5.9). Etoposidinduzierte Brüche dagegen können in Artemis-defizienten Zellen (15,5 Foci) ebenso wie in BRCA2-Mutanten (16,0 Foci) mit einer nur leicht reduzierten Effizienz wie in WT-Zellen repariert werden (10,0 Foci). Die Differenz von etwa 6 Foci entspricht bei einer Induktion von 120-160 Foci etwa 3-4 % (Abb. 5.30B).

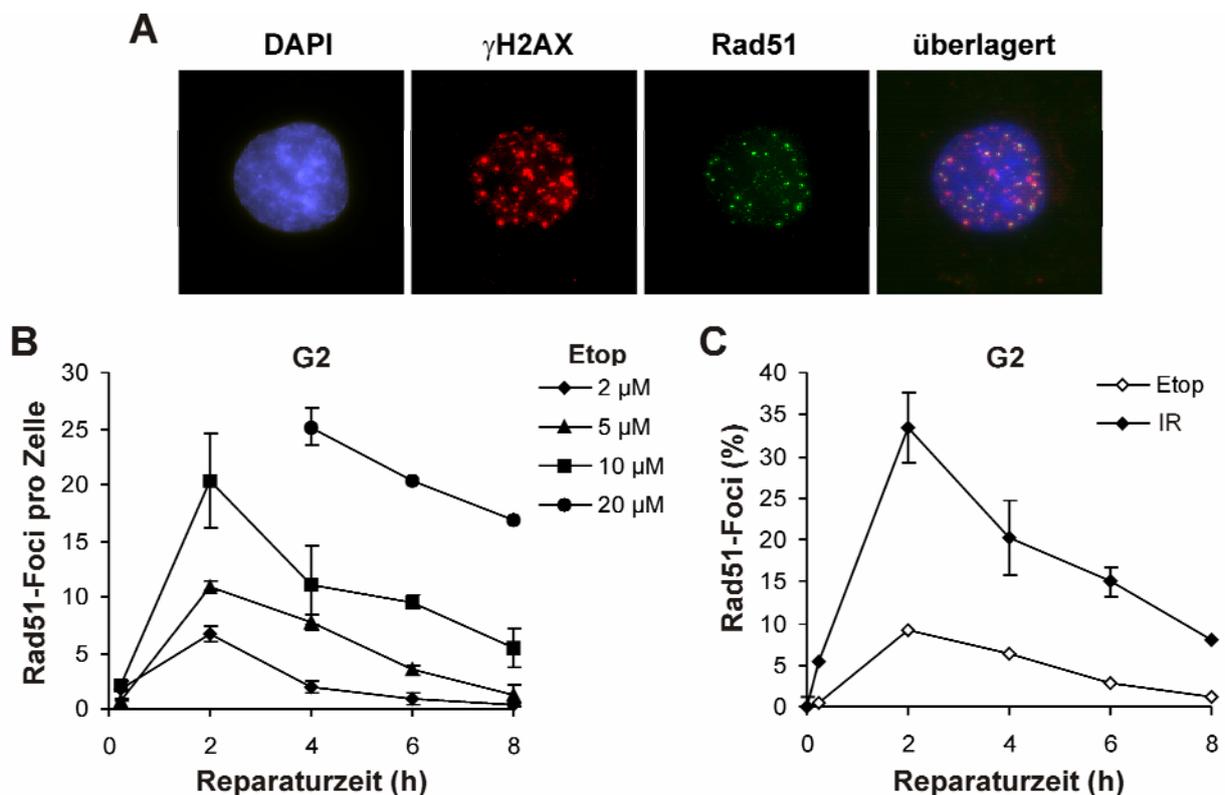
Um den Anteil der langsamen Komponente an der Reparatur von Etoposidschäden durch Erhöhung der initial vorhandenen Schadenszahl zu steigern, wurden hohe Etoposidkonzentrationen zur Schadensinduktion eingesetzt. Durch Behandlung von stationären Fibroblasten mit 300  $\mu$ M Etoposid sollten bei angenommener Linearität der Induktion schätzungsweise 450-500 DSBs entstehen. Diese werden in WT-Zellen und BRCA2-defizienten Zellen innerhalb von 8 h bis auf einen Restschaden 23,0 bzw. 23,5 DSBs repariert (Abb. 5.30C). Dagegen weisen Artemis-defiziente CJ179 nach 8 h 34,2 DSBs auf. Somit verbleiben hier 11,2 DSBs unrepariert, was etwa 2,5 % der initial vorhandenen Schäden entspricht (Abb. 5.30C). In G<sub>2</sub>-Zellen sollte nach Behandlung mit 20  $\mu$ M Etoposid ein ähnliches initiales Schadensausmaß von 450-500 DSBs auftreten. WT-Zellen weisen nach 8 h etwa 38,8 Foci auf, dagegen liegen in BRCA2- und Artemis-defizienten Zellen noch 56,0 bzw. 58,7  $\gamma$ H2AX-Foci vor (Abb. 5.30D). Diese Differenz von etwa 17 bzw. 20 Foci entspricht somit einem Anteil von 3-4 %.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sowohl in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> als auch in G<sub>2</sub> ein kleiner Teil von 2,5-5,0 % der chemisch einfach strukturierten etoposidinduzierten Brüche der Bearbeitung durch Artemis bedürfen und mit Hilfe der langsamen Komponente repariert werden (Abb. 5.30A-D). BRCA2-defiziente HSC62 zeigen in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> keine Einschränkung der Reparaturkapazität (Abb. 5.30A und 5.30C), der Reparaturprozess dieser Brüche wird in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> durch NHEJ abgeschlossen. Dagegen kann in G<sub>2</sub> ein ähnliches Schadensausmaß wie in Artemis-defizienten Zellen beobachtet werden (Abb. 5.30B und 5.30D). Dies deutet darauf hin, dass auch bei etoposidinduzierten DNA-Schäden die ATM/Artemis-abhängigen Brüche mittels HR repariert werden.

### 5.5.3. Quantifizierung des Anteils der HR an der Reparatur etoposidinduzierter DSBs

In der G2-Phase haben ATM und Artemis geringen Anteil an der Reparatur von etoposidinduzierten DSBs. Um zu verifizieren, dass es sich tatsächlich um Brüche handelt, die mittels HR repariert werden, wurde die Beteiligung der HR an der Reparatur etoposidinduzierter Brüche direkt untersucht. HR-assoziierte Proteine wie Rad51 bilden am Schadensort Proteinagglomerate. Diese können mit Hilfe spezifischer Antikörper als Mikrofoci sichtbar gemacht und quantifiziert werden (Abb. 5.31A, vergleiche Abb. 5.26A). Rad51-Foci treten mit deutlich langsamerer Kinetik als  $\gamma$ H2AX-Foci in der S- und G2-Phase des Zellzyklus auf, kolokalisieren mit  $\gamma$ H2AX und dienen als direkter Nachweis von HR-assoziierten DSBs (Bekker-Jensen et al. 2006).

Zur Untersuchung der HR-vermittelten Reparatur wurden exponentiell wachsende primäre humane WT-Fibroblasten mit unterschiedlichen Etoposidkonzentrationen behandelt, nach der Reparatur fixiert und anschließend mit spezifischen Antikörpern gegen  $\gamma$ H2AX und Rad51 gefärbt. Die Identifizierung der Zellzyklusphase wurde wie in Kapitel 5.1.1 beschrieben anhand der Intensität des DAPI-Signals und des  $\gamma$ H2AX-Musters durchgeführt. Die Quantifizierung der Rad51-Foci erfolgte in der G2-Phase und ist in Abb. 5.31B gezeigt. Zum Vergleich des Anteils der HR an der Gesamtreaktion wurden zudem IR-behandelte Zellen analysiert. Die Anzahl der Rad51-Foci wurde prozentual auf den Induktionswert der  $\gamma$ H2AX-Foci, der die Gesamtzahl entstandener DSBs widerspiegelt, bezogen. Das Ergebnis ist in Abb. 5.31C dargestellt.



**Abbildung 5.31:** Analyse von  $\gamma$ H2AX- und Rad51-Foci nach Etoposidbehandlung und Bestrahlung in primären humanen Fibroblasten.

**(A)** Immunfluoreszenzaufnahme von  $\gamma$ H2AX- und Rad51-Foci in WT-Fibroblasten (HSF1). Exponentiell wachsende WT-Zellen wurden 1 h mit 10  $\mu$ M Etoposid behandelt und nach Ablauf einer Reparaturzeit von 2 h durch Methanol-Aceton-Behandlung fixiert. Anschließend erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung von  $\gamma$ H2AX und Rad51. Die Identifizierung der Zellzyklusphase wurde anhand der Intensität des DAPI-Signals durchgeführt. Die gezeigte G2-Zelle wurde bei 630facher Vergrößerung aufgenommen. DAPI ist blau gefärbt, während  $\gamma$ H2AX rot dargestellt ist. Rad51 bildet Mikrofoci, die grün gefärbt wurden und mit  $\gamma$ H2AX kolokalisieren.

**(B)** Quantifizierung der Rad51-Foci nach Etoposidbehandlung von WT-Fibroblasten. HSF1 wurden für 1 h mit 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M bzw. 20  $\mu$ M Etoposid behandelt und nach Ablauf der Reparaturzeit (15 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h) fixiert. Nach Immunfluoreszenzfärbung von Rad51 erfolgte die Quantifizierung der Foci in G2-Zellen, die anhand der DAPI-Intensität identifiziert wurden. Dargestellt ist die Absolutzahl der zum jeweiligen Reparaturpunkt gezählten Foci.

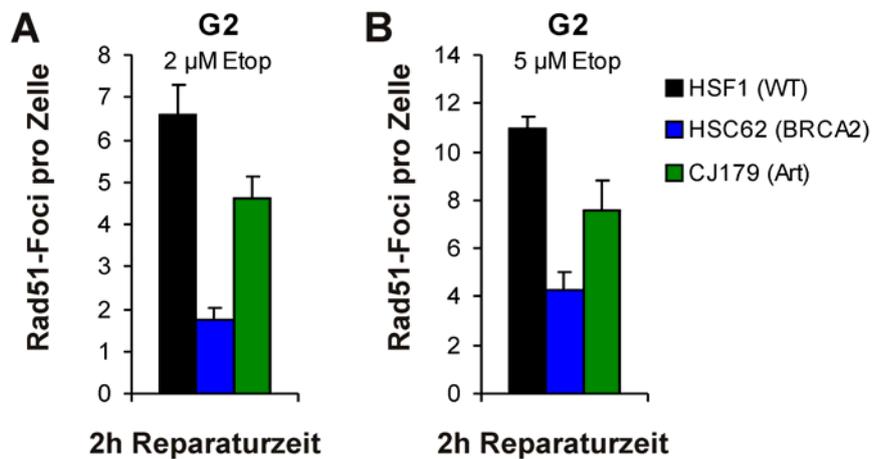
**(C)** Vergleich des Anteils von Rad51-Foci an der Reparatur etoposid- und strahleninduzierter DSBs. Exponentiell wachsende WT-Fibroblasten (HSF1) wurden mit 5  $\mu$ M Etoposid behandelt, fixiert und die Immunfluoreszenzfärbung von  $\gamma$ H2AX und Rad51 durchgeführt. Zudem wurden Zellen mit 2 Gy IR bestrahlt, nach der Bestrahlung mit Aphidicolin versetzt und nach Ablauf einer Reparaturzeit (15 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h) fixiert. Die Immunfluoreszenzfärbung von  $\gamma$ H2AX und Rad51 wurde durchgeführt und in G2 ausgewertet. Zur Ermittlung des Anteils der HR an der Gesamt-Reparatur wurde die Anzahl an Rad51-Foci zu jedem Zeitpunkt in Relation zur Gesamtzahl induzierter DSBs gesetzt, die bei der Quantifizierung der  $\gamma$ H2AX-Foci des 15 min-Reparaturpunktes ermittelt wurde (%).

Die dargestellten Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten aus mindestens drei unabhängig durchgeführten Ansätzen. Die in unbehandelten Kontrollen ermittelten Hintergrundwerte (2,5-4,1  $\gamma$ H2AX-Foci, 0,8-2,6 Rad51-Foci) wurden abgezogen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte und liegen teilweise innerhalb der Symbole.

Die Behandlung von WT-Fibroblasten mit Etoposid führt zur Induktion von Rad51-Foci. Diese erreichen 2 h nach Schadensinduktion ein Maximum und verschwinden anschließend mit fortschreitender Reparatur wieder, ein Verhalten das auch bei der Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden beobachtet werden kann (Abb. 5.31B, vergleiche Abb. 5.26A). Interessanterweise entspricht die Anzahl an Rad51-Foci 2 h nach Schadensinduktion nahezu der Anzahl an  $\gamma$ H2AX-Foci und damit DSBs, die ab 4 h durch die langsame Komponente repariert werden (Abb. 5.31B, vergleiche Abb. 5.28B). Nach 2  $\mu$ M Etoposid sind 6,6 Rad51-Foci vorhanden, was mit 8,6  $\gamma$ H2AX-Foci bei 4 h korreliert. Dieser Zusammenhang zeigt sich auch nach der Behandlung mit 5  $\mu$ M (11,0 Rad51-Foci gegenüber 14,9  $\gamma$ H2AX-Foci) bzw. 10  $\mu$ M Etoposid (20,3 Rad51-Foci gegenüber 23,2  $\gamma$ H2AX-Foci). Dies verdeutlicht, dass die langsame Reparaturkomponente in G2 nahezu vollständig durch den Reparaturweg der HR dargestellt wird. Der Vergleich der aufgetretenen Rad51-Foci in Relation zur Gesamtzahl der durch Etoposid bzw. IR induzierten DSBs zeigt, dass der Anteil der HR nach Etoposidbehandlung deutlich reduziert ist (Abb. 5.31C). Lediglich ca. 10 % der chemisch einheitlichen Etoposidbrüche weisen zusätzlich eine Agglomeration von Rad51 auf, während nach der Applikation von Röntgenstrahlung etwa 35 % der DSBs über HR repariert werden (Abb. 5.31C).

Aufgrund der Beteiligung von Artemis an der HR zeigen Artemis-defiziente Zellen nach Bestrahlung eine eingeschränkte Ausbildung von Rad51-Foci (Barton, mündliche Mitteilung, Abb. 5.26B). Zur Verifizierung der oben gezeigten Rolle von Artemis bei der Reparatur etoposidinduzierter DSBs wurde eine Rad51-Foci-Analyse durchgeführt. Dazu wurden Artemis-defiziente CJ179, BRCA2-defiziente HSC62 sowie WT-Zellen (HSF1) mit Etoposid

behandelt und nach einer Reparaturzeit von 2 h geerntet. Nach der Fixierung erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung von Rad51, die Quantifizierung der Rad51-Foci erfolgte in G2-Zellen, die anhand des DNA-Gehaltes identifiziert wurden.



**Abbildung 5.32:** Rad51-Foci-Analyse von primären humanen Fibroblasten nach Etoposidbehandlung. Exponentiell wachsende Artemis-defiziente CJ179, BRCA2-defiziente HSC62 sowie WT-Zellen (HSF1) wurden 1 h mit 2 µM (A) bzw. 5 µM (B) Etoposid behandelt. Nach einer Reparaturzeit von 2 h erfolgte die Fixierung und anschließende Immunfluoreszenzfärbung der Zellen. Die Quantifizierung der Rad51-Foci wurde in G2-Zellen durchgeführt, die anhand der Intensität des DAPI-Signals identifiziert wurden. Die dargestellten Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. In unbehandelten Kontrollen ermittelte Hintergrundwerte (1,9-2,3 Rad51-Foci) wurden abgezogen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

Artemis-defiziente Zellen zeigen nach Behandlung mit 2 µM Etoposid mit 4,6 Foci eine gegenüber dem WT (6,6 Foci) reduzierte Zahl an Rad51-Foci. Dieser Effekt vergrößert sich bei einer durch 5 µM Etoposid erhöhten Schadenszahl (7,6 gegenüber 11,0 Foci, Abb. 5.32B). Somit konnte die Beteiligung von Artemis an der Reparatur von etoposidinduzierten DSBs bestätigt werden.

Zusammengefasst verdeutlichen die gezeigten Ergebnisse, dass die Reparatur einer Subpopulation von DNA-Schäden für die Reparatur durch die langsame Komponente der Reparatur vorgesehen ist. Dieser Anteil ist nach Röntgenbestrahlung, welche DNA-Schäden mit sehr unterschiedlicher Struktur und chemischer Beschaffenheit verursacht, erheblich größer als bei vergleichsweise einfachen DSBs, wie sie durch Behandlung mit dem TopoII-Gift Etoposid entstehen. Die Reparatur dieser Subpopulation erfordert funktionelles ATM und Artemis, bevor die Bruchenden durch NHEJ in G1 bzw. durch HR in G2 wieder verbunden werden.

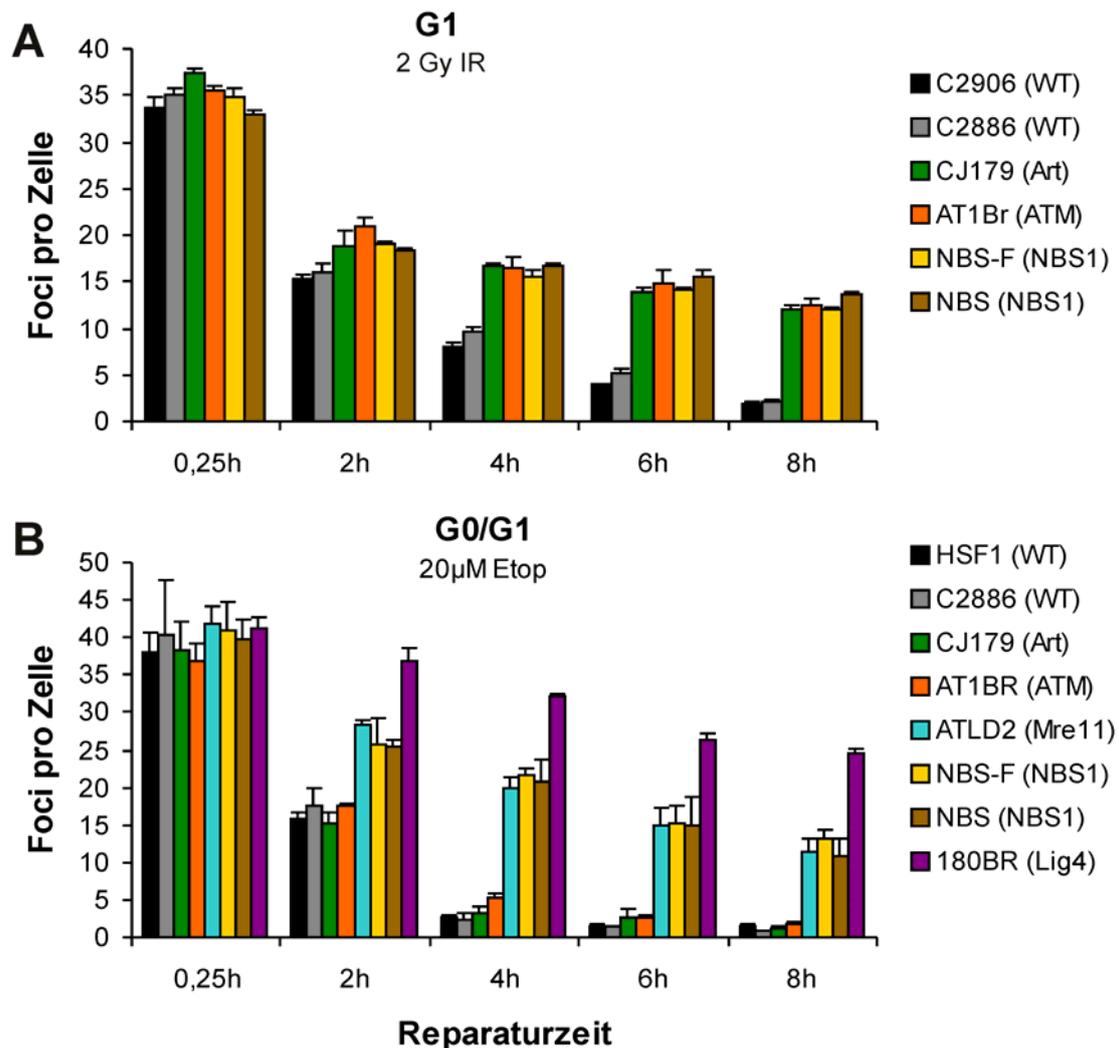
## 5.6. Untersuchungen zur Beteiligung des MRN-Komplexes an der DSB-Reparatur

### 5.6.1. Vergleichende Betrachtung der DNA-Reparatur nach Behandlung mit Etoposid und IR

Der MRN-Komplex ist aufgrund seiner Beteiligung an der Erkennung von DNA-Schäden für die Initiation der Schadensantwort von großer Bedeutung (Assenmacher & Hopfner 2004). Zudem nimmt der MRN-Komplex eine direkte Rolle in der DSB-Reparatur in G2 wahr, er wird bei der Resektion der Bruchenden in den Anfangsschritten der HR benötigt (Valerie & Povirk 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die Endonukleaseaktivität von MRN auch für die Reparatur einer speziellen Art von DNA-Schäden, nämlich solchen, die kovalente DNA-Protein-Verknüpfungen aufweisen, benötigt wird (Hartsuiker et al. 2009). Etoposid arretiert die Topoll als *cleavable complex*. In diesem Zustand liegt eine kovalente Verknüpfung des Enzyms mit dem 5'-Ende des DSBs vor (Wang 1996). Um zu analysieren, inwieweit der MRN-Komplex eine Bedeutung für die Reparatur von etoposidinduzierten Schäden hat, wurden primäre humane Fibroblasten mit Defizienzen in Komponenten des MRN-Komplexes in der G1-Phase analysiert. Somit konnte spezifisch die Funktion von MRN bei der Reparatur von Protein-DNA-Komplexen untersucht werden, ohne dass zusätzliche Effekte durch die Beteiligung von MRN an der HR auftreten.

Zudem wurden die Auswirkungen von Defekten im MRN-Komplex auf die Reparatur von strahleninduzierten DNA-Schäden untersucht, die nur selten Protein-DNA-*crosslinks* aufweisen (Friedberg et al. 2006). Zur Abschätzung der Einschränkung der Reparatur wurden zudem Zellen mit Defizienzen in der langsamen und der schnellen Komponente der Reparatur hinzugezogen.

Primäre humane Fibroblasten mit Defizienzen in Komponenten des MRN-Komplexes, ATM, Artemis und Ligase IV (Lig4) sowie WT-Zellen wurden mit Etoposid bzw. mit Röntgenstrahlung behandelt. Die Reparatur der induzierten DNA-Schäden wurde mit Hilfe der  $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenz in der G1-Phase bzw. in G0/G1 quantifiziert.



**Abbildung 5.33:**  $\gamma$ H2AX-Analyse von primären humanen Fibroblasten nach Behandlung mit IR bzw. Etoposid.

**(A)** Artemis-defiziente CJ179, ATM-defiziente AT1BR und NBS1-defiziente NBS bzw. NBS-F sowie WT-Zellen wurden im exponentiellen Wachstum mit 2 Gy IR bestrahlt, mit Aphidicolin versetzt und zur Reparatur für 15 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h kultiviert. Die Zellen wurden fixiert,  $\gamma$ H2AX und CENP-F wurden immunfluoreszenztechnisch gefärbt. Die Auswertung erfolgte in G1.

**(B)** Zellen mit Defekten in ATM (AT1BR), Artemis (CJ179), Mre11 (ATLD2), NBS1 (NBS, NBS-F), Lig4 (180BR) sowie WT-Zellen wurden stationär für 1 h mit 20  $\mu$ M Etoposid behandelt, gewaschen und mit frischem Medium versetzt. Nach Ablauf der Reparaturzeit (15 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h) wurden die Zellen fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen  $\gamma$ H2AX gefärbt. Die dargestellten Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Ansätzen. Die Hintergrundwerte (etwa 0,2 Foci) wurden abgezogen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler der Mittelwerte.

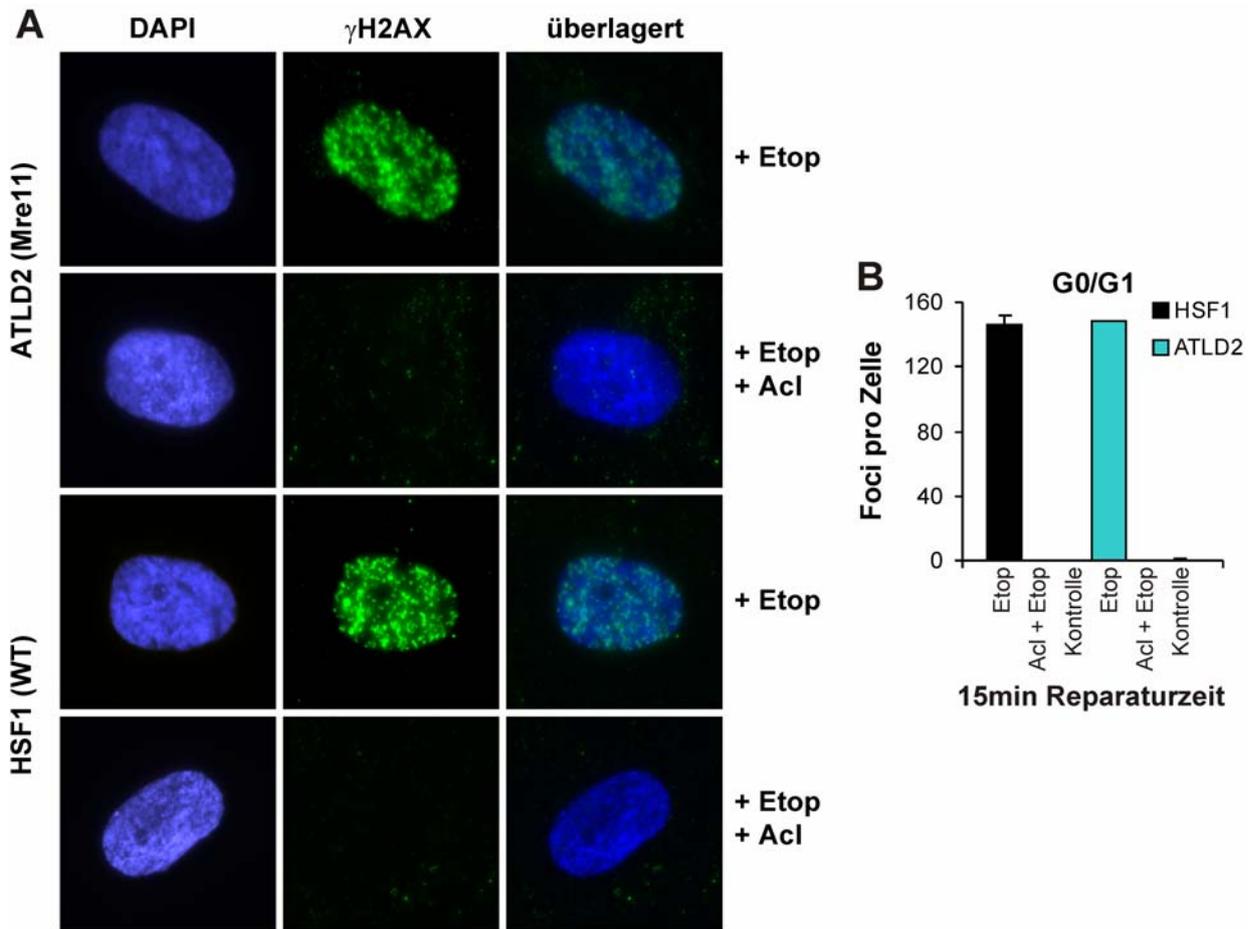
Die Bestrahlung der untersuchten Zelllinien führt zum Auftreten von 33-37  $\gamma$ H2AX-Foci. Diese verschwinden in WT-Zellen mit fortschreitender Reparaturzeit bis auf einen Restschaden von 2-4 Foci (Abb. 5.33A). Die resultierende Reparaturkinetik zeigt den bereits beschriebenen biphasischen Verlauf. ATM- und Artemis-defiziente Zellen weisen den erwarteten Reparaturdefekt auf. Auch in NBS1-defiziente Fibroblasten tritt nach IR ein Reparaturdefekt auf (Abb. 5.33A). Der Verlauf der Kinetik und das Ausmaß des Defektes zeigen dabei große Ähnlichkeit zu ATM- und Artemis-defizienten Zellen. Damit scheint der MRN-Komplex nach IR für die Reparatur ATM- und Artemis-abhängiger Brüche notwendig zu sein.

Durch Behandlung mit 20  $\mu$ M Etoposid entstehen in konfluenten Zellen 35-41 DSBs, die innerhalb von 8 h nahezu bis auf Hintergrundniveau (etwa 1 Focus) repariert werden (Abb. 5.33B). Die Reparaturkinetiken von ATM- und Artemis-defizienten Zellen unterscheiden sich nach Etoposidbehandlung nicht vom WT. Dagegen verbleibt in Zellen, die aufgrund von Defekten in Mre11 bzw. NBS1 keinen MRN-Komplex ausbilden können, ein Anteil von etwa 25-30 % der initialen Brüche unrepariert (Abb. 5.33B). In Lig4-defizienten Zellen bleiben etwa 75 % der Brüche erhalten (Abb. 5.33B).

Der deutlich Unterschied in der Reparatureffizienz von ATM- und Artemis-defiziente Zellen im Vergleich zu Zellen mit Defekten in Komponenten des MRN-Komplex deutet darauf hin, dass der MRN-Komplex bei der Reparatur etoposidinduzierter Brüche eine zusätzliche Rolle unabhängig von der Funktion von ATM und Artemis ausübt.

### **5.6.2. Kontrollexperiment zur Beteiligung des MRN-Komplexes an der Reparatur etoposidinduzierter DNA-Schäden**

Um zu beweisen, dass der Reparaturdefekt von Zellen mit Defekten in Komponenten des MRN-Komplexes auf die Anwesenheit etoposidinduzierter Topoll-DNA-Komplexe zurückzuführen und damit spezifisch ist, wurde eine Vorbehandlung mit einem Topoll-Inhibitor durchgeführt. Aclarubicin (Aclacinomycin A) gehört zur Gruppe der Anthracycline und wirkt als antineoplastisches Antibiotikum. Durch Interkalation des Proteins in die DNA wird die Kontaktaufnahme der Topoll mit der DNA verhindert und es kommt nicht zur enzyminduzierten Einführung von DSBs in die DNA (Jensen et al. 1990). Somit wird dem Eingreifen von Etoposid in den Wirkmechanismus von Topoll und der Induktion von persistierenden DSBs vorgebeugt. Zur Überprüfung der Spezifität der Reparaturstudien etoposidinduzierter DSBs wurden Mre11-defiziente sowie WT-Zellen vor der Etoposidbehandlung mit Aclarubicin vorbehandelt. Nach der Fixierung der Zellen erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung von  $\gamma$ H2AX (Abb. 5.34A) und die anschließende Quantifizierung vorhandener DSBs (Abb. 5.34B).



**Abbildung 5.34:**  $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenzfärbung nach Behandlung von primären humanen Fibroblasten mit Etoposid bzw. mit Aclarubicin und Etoposid

**(A)** Repräsentative Immunfluoreszenz-Aufnahmen von primären humanen Fibroblasten. Stationäre Mre11-defiziente ATLD2 sowie WT-Zellen wurden 30 min mit 5  $\mu$ M Aclarubicin behandelt, gewaschen und anschließend für 1 h mit 100  $\mu$ M Etoposid inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde frisches Medium zugegeben, für weitere 15 min kultiviert und fixiert. Zudem wurden Zellen 30 min mit 5  $\mu$ M DMSO versetzt, anschließend 1 h mit 100  $\mu$ M Etoposid behandelt und nach 15 min Reparatur fixiert. Kontrollzellen wurde bei identischem Ablauf DMSO in den entsprechenden Konzentrationen zugegeben. Nach der spezifischen Färbung von  $\gamma$ H2AX (grün) und unspezifischer Gegenfärbung mit DAPI (blau) erfolgte die Aufnahme bei 630facher Vergrößerung.

**(B)** Quantitative Auswertung der  $\gamma$ H2AX-Foci-Analyse. Stationäre Fibroblasten wurden wie beschrieben behandelt, gefärbt und ausgewertet. Dazu wurden Aufnahmen bei 630facher Vergrößerung angefertigt und am Bildschirm ausgewertet. Die gezeigten Datenpunkte entsprechen dem Mittelwert aus zwei unabhängigen Ansätzen. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler der Mittelwerte dar.

Durch Behandlung mit Etoposid erfolgt die massive Induktion von DSBs in beiden behandelten Zelllinien. Dagegen liegt die erzielte Anzahl an DSBs nach kombinierter Aclarubicin-Etoposid-Behandlung ebenso wie nach alleiniger Aclarubicin-Behandlung auf Kontrollniveau (Abb. 5.34). Somit kann der etoposidinduzierten Entstehung von DSBs durch Aclarubicinbehandlung sowohl in WT-Zellen wie auch in Mre11-defizienten Fibroblasten vollständig entgegengewirkt werden. Dieses Kontrollexperiment zeigt, dass die beobachteten Reparaturdefekte auf die durch Etoposidbehandlung induzierten DNA-Schäden zurückzuführen sind.

Zusammengefasst beweisen diese Ergebnisse eine Beteiligung des MRN-Komplexes an der Auflösung von kovalent verknüpften Protein-DNA-Komplexen.

## 6. Diskussion

### 6.1. Einfluss von heterozygoten Mutationen in BRCA1 bzw. BRCA2 auf die Reparatur von strahleninduzierten DSBs

In den durchgeführten Studien wurde der Einfluss von heterozygoten BRCA-Mutationen auf das Reparaturvermögen von primären humanen Fibroblasten nach der Einwirkung ionisierender Strahlung untersucht. Hintergrund für diese Untersuchungen ist, dass Menschen mit einer erblichen Prädisposition für Brustkrebs häufig eine heterozygote Keimbahnmutation von BRCA1 oder BRCA2 aufweisen. Um eine möglichst frühzeitige Entdeckung eines entstandenen Tumors zu gewährleisten, wird betroffenen Personen eine frühzeitige und regelmäßige Mammographie empfohlen. Diese setzt in der Regel fünf Jahre vor dem frühesten in der Familie aufgetretenen Brustkrebsfall ein und wird ein- bis zweimal pro Jahr durchgeführt. Jedoch wird sowohl BRCA1 wie auch BRCA2 eine Rolle in der DNA-Schadensantwort zugeordnet. Dies führt zu der Frage, inwieweit der Verlust eines Allels zur Einschränkung des Reparaturvermögens einer Zelle führt. Zudem ist bekannt, dass das Risiko einer strahleninduzierten Entstehung von Krebs in jungen Jahren groß ist und mit zunehmendem Lebensalter abnimmt.

Im Körper befindet sich die Mehrzahl der Zellen nach der Spezialisierung auf die jeweilige Aufgabe in einem teilungsinaktiven Zustand, der in der Kultur von primären Zellen durch Erreichen eines bestimmten Dichtegrades simuliert werden kann. Die Zellen treten nach Kontaktinhibition aus dem Zellzyklus aus und können in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase untersucht werden. Die  $\gamma$ H2AX-Analyse stationärer Zellen nach Mammographie-ähnlicher 25 kV-Röntgenstrahlung konnte keine Einschränkung der Reparatur in den untersuchten Zelllinien feststellen (Abb. 5.7). Auch der zeitliche Verlauf der Reparaturkinetik offenbart keine Unterschiede zwischen den BRCA1- bzw. BRCA2-Mutanten und den mitgeführten WT-Zellen. Die Ergebnisse der  $\gamma$ H2AX-Analyse zeigen, dass die Reparatur strahleninduzierter DSBs vom heterozygoten BRCA-Status nicht negativ beeinflusst wird.

Der Einfluss einer heterozygoten Mutation in BRCA1 ebenso wie in BRCA2 auf das Reparaturvermögen einer Zelle wird in der Literatur sehr kontrovers diskutiert. Verschiedene Arbeiten zeigen eine erhöhte Radiosensitivität von BRCA-Mutanten gegenüber Kontrollzellen (Foray et al. 1999, Rothfuss et al. 2000, Trenz et al. 2002, Buchholz et al. 2002), während dieser Zusammenhang in anderen Studien nicht offensichtlich wird (Baria et al. 2001, Nieuwenhuis et al. 2002, Trenz et al. 2003). Jedoch variieren in den Untersuchungen die Zellart, die analysierte Zellzyklusphase, die angewandten Methode sowie die Art der Schadensinduktion. So konnte durch Mikrokern-Analyse (*micronucleus test*, MNT) von peripheren Blutlymphozyten in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> ein Zusammenhang zwischen heterozygotem BRCA1-Status in peripheren Blutlymphozyten und erhöhter Mutagensensitivität festgestellt werden

(Rothfuss et al. 2000, Trenz et al. 2002). Die Untersuchung von Blutlymphozyten mittels Chromosomenanalyse in G2 bzw. Comet-Assay konnte diesen Effekt jedoch nicht bestätigen (Baria et al. 2001, Trenz et al. 2003). Die Immortalisierung von charakterisierten Lymphozyten (Trenz et al. 2002) durch EBV zur Herstellung lymphoblastoider Zelllinien scheint die Mutagensensitivität zu reduzieren, sodass Unterschiede zwischen BRCA-Mutanten und Kontrollzellen durch MNT in G0 nicht mehr nachgewiesen werden konnten (Trenz et al. 2003). Die Analyse primärer Fibroblasten mittels Überlebensexperiment und PFGE zeigte eine erhöhte Radiosensitivität von BRCA-Mutanten auf, jedoch wurde in dieser Analyse nur eine kleine Versuchskohorte charakterisiert (Buchholz et al. 2002). Nieuwenhuis et al. (2002) konnte diese Ergebnisse mittels PFGE von Fibroblasten (vorwiegend G1) bzw. Cometassay von Lymphozyten (G0/G1) derselben Individuen nicht bestätigen. Unsere Ergebnisse wurden unter Verwendung der gleichen Zelllinien mit Hilfe der  $\gamma$ H2AX-Analyse generiert und zeigen in Übereinstimmung mit Nieuwenhuis et al. (2002) keine Unterschiede in der Reparaturkapazität von BRCA-Mutanten gegenüber Kontrollzellen in G0/G1 und G1.

Keine der heterozygoten Mutationen in BRCA1, welche in unterschiedlich stark trunkierten Restproteinen resultieren, konnte Unterschiede im Reparaturvermögen aufzeigen (Abb. 5.7A). Daher ist die Aktivität des vorhandenen Proteins ausreichend, um die durch die applizierte Dosis induzierten DNA-Schäden zu reparieren. Allerdings könnte die phänotypische Auswirkung einer Mutation von ihrer Art abhängen. Mutationen, die eine Trunkation des resultierenden Proteins bedingen, führen vermutlich zu einer reduzierten Gesamtmenge an funktionsfähigem Protein. Das entstehende fehlerhafte Protein ist je nach Ausmaß der Trunkation nur bedingt zur Komplexbildung fähig. Nur Wildtyp-Protein kann in Kooperation mit den jeweiligen Interaktionspartnern die spezifische Funktion ausführen, sodass alle entstehenden Proteinkomplexe zwar volle Funktionsfähigkeit aufweisen, aber in reduzierter Anzahl vorliegen. Dagegen kann es bei nahezu vollständiger Proteinelänge bzw. nach *Missense*-Mutationen zu einer Konkurrenzsituation zwischen mutiertem und Wildtyp-Protein kommen. Das mutierte Protein kann zwar mit Bindungspartnern interagieren, der entstehende Komplex ist aber nicht oder nur eingeschränkt funktionsfähig. In diesem Fall ist die Beteiligung von mutiertem Protein in etwa der Hälfte der Proteinkomplexe zu erwarten, was zum entsprechenden Funktionsverlust beitragen kann. Somit wird durch das fehlerhafte Genprodukt die Funktionsausübung der WT-Kopie beeinträchtigt, was als negative Interferenz bezeichnet wird.

Die Tatsache, dass Fibroblasten mit einer homozygoten Mutation in BRCA2 keine verminderte Reparaturkapazität zeigen, ist nicht überraschend. BRCA2 ist als typischer Faktor der HR beschrieben (Valerie & Povirk 2003), dieser Reparaturweg ist auf die späte S- und G2-Phase des Zellzyklus beschränkt und steht somit in stationären G0/G1-Zellen nicht zur Verfügung (Rothkamm et al. 2003). Eine Einschränkung des Reparaturvermögens durch einen

heterozygoten BRCA2-Status ist nicht zu erwarten, was durch die  $\gamma$ H2AX-Analyse bestätigt wird. Diese Ergebnisse zeigen, dass BRCA2 keine Rolle im NHEJ spielt. Somit scheint die Bestrahlung von ausdifferenziertem Gewebe in der G0/G1-Phase bei Patienten mit heterozygotem BRCA-Status im Zuge mammographischer Screening-Verfahren keine negativen Auswirkungen zu haben.

Im Brustgewebe gibt es auch teilungsaktive Zellen, die während der Schwangerschaft die starke Proliferation des Drüsengewebes bedingen. In ausgewählten BRCA1- und BRCA2-Mutanten sowie in WT-Zellen wurden Reparaturstudien in der G1- und G2-Phase exponentiell wachsender Zellen durchgeführt. Unterschiedliche heterozygote Mutationen in BRCA1 führen weder in der G1- noch in der G2-Phase zur Veränderung der Reparaturkapazität nach IR. Selbst Mutationen, die zur Trunkation von 77 % des Proteins führen, beeinträchtigen das Reparaturvermögen der betroffenen Zelle nicht (Abb. 5.8). BRCA1 nimmt eine multifunktionale Rolle in der DNA-Schadensantwort wahr. Nach Schadensinduktion wird BRCA1 in großer Zahl zum Schadensort rekrutiert und interagiert mit zahlreichen Faktoren der DNA-Reparatur und der Zellzykluskontrolle. Dennoch führt die heterozygote trunkierende Mutation von BRCA1, die zur Reduzierung der Gesamtmenge an funktionsfähigem Protein führt, nicht zur Einschränkung der Reparatur von strahleninduzierten DNA-Schäden. Das Ergebnis muss jedoch aufgrund der geringen Kohortengröße eingeschränkt werden.

Die Untersuchung der Reparaturkapazität von Zellen mit heterozygoter Mutation in BRCA2 bestätigt in der G1-Phase das Ergebnis der stationär behandelten Zellen. Unterschiede der Reparaturkapazität im Vergleich zum WT können nicht festgestellt werden. Dagegen ist die Reparaturkapazität der heterozygoten BRCA2-Mutanten in der G2-Phase im Vergleich zum WT reduziert, wobei die untersuchten Zelllinien stark in der Anzahl unreparierter DNA-DSBs variieren. Während die Mutante C2833 auf WT-Niveau repariert, verbleiben in C2834, C2845, C2902 maximal 14 % der induzierten Brüche unrepariert, was nahezu dem Reparaturdefekt BRCA2-homozygot defekter HSC62 (etwa 15 %) entspricht (Abb. 5.8). BRCA2 ist ein Interaktionspartner von Rad51 und wird als Reparaturfaktor der HR betrachtet und ist daher besonders in der G2-Phase von Bedeutung (Venkitaraman 2002). Die Mehrzahl der Keimbahnmutationen mit heterozygotem BRCA2-Status führen zur Trunkation und damit zum Verlust der Funktionalität des Proteins (Spain et al. 1999). Dies lässt sich auf den Verlust von zwei NLS-Sequenzen (*nuclear localisation site*) am äußersten C-Terminus zurückführen, die in den letzten 156 AS des Proteins lokalisiert sind (Spain et al. 1999). Somit kommt es zum Auftreten einer cytoplasmatischen Fraktion von BRCA2 und die Menge an kernlokalisiertem, funktionsfähigem BRCA2 ist reduziert (Arnold et al. 2006). Alle untersuchten Zelllinien weisen die gleiche Mutation auf. Somit deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass der genetische Hintergrund der unterschiedlichen primären Fibroblasten die Reparaturkapazität der BRCA2-

heterozygoten Mutanten beeinflusst. So ist auch der Zusammenhang zwischen BRCA2-mutiertem Genotyp und der phänotypischen Ausprägung sehr komplex. Die gleiche BRCA2-Mutation kann zur Ausprägung unterschiedlicher Krebserkrankungen beitragen (BCLC 1999). Mutationen, die homozygote C-terminale Trunkationen bedingen, führen im Allgemeinen zu embryonaler Lethalität, wie im Mausmodell gezeigt werden konnte (Suzuki et al. 1997). Eine biallelische Inaktivierung von BRCA2 wird allerdings mit dem Auftreten einer Form von Fanconi-Anämie (FA), einer seltenen autosomal rezessiv vererbten Krankheit mit ausgeprägter Hypersensitivität gegenüber Mutagenen (Wang & D'Andrea 2004), in Verbindung gebracht. Genotypisch ist eine Mutation in der 3'-Region des BRCA2-Gens nachzuweisen (Howlett et al. 2002). Die gebildeten fehlerhaften Proteine besitzen in der Regel Teilaktivität. Die in dieser Arbeit charakterisierte Zelllinie HSC62 wurde ebenfalls aus einem Patienten mit FA isoliert und weist eine *in-frame* Mutation in Exon 20 auf, die zum Verlust von 4 AS (2830-2833) unter Erhaltung der C-terminalen Region führt. Das entstehende Protein ist im Kern lokalisiert, kann an der Komplexbildung teilnehmen und besitzt Restaktivität (Howlett et al. 2002).

Während BRCA1-Mutanten auch in der G2-Phase keinen Unterschied zu Kontrollzellen zeigen, tritt in Fibroblasten mit heterozygoter BRCA2-Mutation ein Reparaturdefekt von maximal 14 % auf (Abb. 5.8). Die  $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenz erlaubt die Analyse der Reparatur von DNA-Schäden anhand des Auftretens bzw. Verschwindens von Proteinagglomeraten am Schadensort und stellt eine sehr sensitive Methode zur Untersuchung der Reparatur von DSBs dar. Die Untersuchung der Entstehung bzw. des Verschwindens von  $\gamma$ H2AX nach Bestrahlung mittels Westernblot-Analyse konnte ebenfalls eine Beeinträchtigung der DSB-Reparatur von BRCA2-heterozygoten Zelllinien nachweisen, die jedoch im neutralen Comet-Assay nicht bestätigt werden konnte (Arnold et al. 2006). Die Tatsache, dass bereits im Westernblot mit Hilfe der  $\gamma$ H2AX-Detektion Reparaturunterschiede nachgewiesen werden können, unterstreicht die Sensitivität dieses Ansatzes. Diese kann durch die zellzyklusphasenspezifische Quantifizierung von  $\gamma$ H2AX-Foci auf Einzelzellebene noch erhöht werden. Dennoch erlauben die vorgestellten Daten die endgültige Beantwortung der Frage nicht, ob und inwieweit eine heterozygote Mutation in BRCA1 bzw. BRCA2 zu einer erhöhten Radiosensitivität beiträgt und somit ein vergrößertes Risiko der Tumorentstehung bedingt. Zur Klärung eines möglichen kausalen Zusammenhangs zwischen heterozygotem BRCA-Status und erhöhter Mutagen-Sensitivität sind umfangreiche Studien mit weiteren BRCA-heterozygoten Zelllinien und verschiedenen, unabhängigen Methoden in definierten Zellzyklusphasen notwendig.

Das Risiko für die Entstehung eines spontanen Tumors bei heterozygotem BRCA-Status ist ohne Zweifel erhöht, da bereits ein Allel eines Tumorsuppressorgens inaktiviert ist (Ford et al. 1999, Nathanson et al. 2001). So ist im Tumorgewebe von erblich prädisponierten Personen

konsistent ein Funktionsverlust des zweiten BRCA-Allels (*loss of heterozygosity*, LOH) nachzuweisen (Venkitaraman 2002). Durch Bestrahlung entstehen DSBs, die durch die Reparatursysteme der Zelle beseitigt werden. Sollte durch einen heterozygoten BRCA-Status eine Einschränkung der Reparaturkapazität ausgelöst werden, so erhöht dies das Risiko der Entstehung von Mutationen. Diese treten zufällig auf, sodass das Risiko des Funktionsverlusts für alle Tumorsuppressorgene in gleichem Maße und nicht speziell für das korrekte BRCA-Allel erhöht sein sollte. Somit rechtfertigt eine leichte Einschränkung der Reparaturkapazität von BRCA2-heterozygoten Zellen nicht den Verzicht auf regelmäßige mammographische Untersuchungen, die die frühzeitige Diagnose eines entstandenen Tumors ermöglichen.

## **6.2. Charakterisierung der Reparatur von strahleninduzierten DNA-Schäden in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus**

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der HR und der Beteiligung dieses Reparaturweges an der Reparatur IR-induzierter DSBs. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde das Reparaturvermögen von primären humanen Fibroblasten mit Defizienzen in verschiedenen reparaturrelevanten Proteinen analysiert, um mechanistische Einblicke in den Ablauf der verschiedenen Reparaturwege zu gewinnen.

### **6.2.1. Der Verlauf der Reparaturkinetiken**

WT-Zellen zeigen in G1 wie auch in G2 einen charakteristischen Verlauf der Reparatur strahleninduzierter DSBs. Die Mehrzahl der DNA-Schäden wird innerhalb einer schnellen Reparaturphase von etwa 2 h beseitigt. Die verbleibenden DSBs werden anschließend durch eine langsame Komponente bis auf einen geringen Restschaden repariert (Abb. 5.9). Die Beteiligung einer schnellen und einer langsamen Komponente an der Reparatur wurde bereits in der Literatur beschrieben (Lobrich et al. 1995, Wu et al. 2008).

Die schnelle Komponente zeigt in NHEJ-defizienten Zelllinien in G1 und G2 massive Defekte (Rothkamm et al. 2003, Riballo et al. 2004, Tchouandong, mündliche Mitteilung). Dies deutet darauf hin, dass der Reparaturweg des NHEJ in beiden Phasen für die schnelle Reparatur zuständig ist. Dies wird durch die Analyse der Reparatur nach Behandlung mit einem spezifischen Inhibitormolekül der DNA-PK<sub>cs</sub>, das zum Verlust der Funktionalität des Gesamtkomplexes führt und somit das DNA-PK-abhängige NHEJ inhibiert, bestätigt. Auch hier ist ein Reparaturdefekt der schnellen Komponente sowohl in der G1- wie auch in der G2-Phase nachweisbar (Abb. 5.16).

Aufschluss über die langsame Reparaturkomponente brachten zunächst Reparaturstudien an ATM- und Artemis-defekten Zellen in G0/G1. Es konnte gezeigt werden, dass ATM und Artemis in stationären Zellen für die Reparatur einer Subfraktion von strahleninduzierten DSBs benötigt wird. Hierbei tritt der Reparaturdefekt, der etwa 15 % der induzierten Brüche betrifft, erst nach langen Reparaturzeiten auf. Dagegen entspricht die anfängliche Phase der Reparatur jener von WT-Zellen (Riballo et al. 2004). Reparaturstudien nach Induktion unterschiedlicher Schadenstypen lassen vermuten, dass ATM und Artemis zur Prozessierung von DNA-Schäden benötigt werden, die ansonsten nicht ligiert werden können (Lobrich & Jeggo 2005). Schliesslich zeigen Untersuchungen an wachsenden Zellen mit Defizienzen in ATM und Artemis einen Reparaturdefekt der langsamen Komponente von identischem Verlauf und Ausmaß sowohl in der G1- als auch in der G2-Phase des Zellzyklus (Deckbar et al. 2007).

### 6.2.2. Der Beitrag der HR zur Reparatur strahleninduzierter DSBs

Die ATM/Artemis-abhängige Reparatur in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> benötigt die Beteiligung funktionaler DNA-PK. Daher scheint hier ein Unterweg des NHEJ aktiv zu sein (Riballo et al. 2004). In Bezug auf die G<sub>2</sub>-Phase stellt sich die Frage, inwieweit die HR einen Beitrag zur langsamen Reparaturkomponente leistet. Die Charakterisierung der Reparaturkapazität von Fibroblasten mit homozygoter Mutation im HR-Faktor BRCA2 erlaubt die Quantifizierung des Anteils der über HR reparierten Brüche. Erwartungsgemäß zeigt sich in G<sub>1</sub> ebenso wie in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> keine Beeinträchtigung der Reparatur. Dagegen tritt in G<sub>2</sub> ein Reparaturdefekt auf, der die langsame Komponente der Reparatur betrifft und erst ab etwa 4 h nach Bestrahlung erkennbar wird (Abb. 5.9). Die schnelle Reparatur wird durch Defizienzen in diesem Faktor der HR nicht beeinflusst. Die Beteiligung der HR an der Reparatur strahleninduzierter DSBs konnte durch PFGE und PCC bestätigt werden. BRCA2-defiziente HSC62 zeigen ebenso wie Artemis-defiziente CJ179 48 h nach Bestrahlung eine signifikant erhöhte Anzahl an unreparierten DSBs im Vergleich zu WT-Zellen (Abb. 5.13, Abb. 5.15). In primären humanen Fibroblasten ist die HR mit etwa 15-20 % für einen relativ geringen Anteil der strahleninduzierten DNA-Schäden zuständig. Dies bestätigt Arbeiten von Rothkamm et al. (2003), die den Hauptanteil der Reparatur auch in der G<sub>2</sub>-Phase dem NHEJ zuordnen, während die HR in den verwendeten Säugerzellen von untergeordneter Bedeutung ist. Auch in embryonalen Stammzellen von Mäusen werden etwa 60 % der exogen induzierten DSBs durch NHEJ repariert (Liang et al. 1998). Dagegen zeigen DT40-Hühnerzellen eine größere Beteiligung der HR an der Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden (Sonoda et al. 2006). Dies könnte auf den mit 20 % geringen Anteil an G<sub>1</sub>-Zellen und die kurze Dauer dieser Zellzyklusphase, in der NHEJ als alleiniger Reparaturweg zur Verfügung steht, zurückgeführt werden (Sonoda et al. 2006). In Hefen ist die HR sowohl in der G<sub>1</sub>- als auch in der G<sub>2</sub>-Phase der dominierende Reparaturweg (Paques & Haber 1999, Aylon & Kupiec 2004). Dies gewährleistet die fehlerfreie Reparatur des sehr kompakten Genoms mit wenigen und sehr kurzen Introns, kurzen nicht codierenden Bereichen zwischen den Genen und wenigen repetitiven Sequenzen.

Interessanterweise zeigen der Verlauf der Kinetik und das Ausmaß des Reparaturdefektes der BRCA2-defizienten HSC62 große Ähnlichkeit mit ATM- und Artemis-defizienten Zellen. BRCA2 ist ein etablierter HR-Faktor (Venkitaraman 2002, Valerie & Porkin 2003). Somit deckt dieses Ergebnis den überraschenden Zusammenhang zwischen ATM, Artemis und dem Reparaturweg der HR in der G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus auf. Zur Verifizierung dieser Beziehung wurden Epistasianalysen durchgeführt.

### 6.2.3. ATM und Artemis – NHEJ versus HR

Epistasisanalysen ermöglichen die Untersuchung der Beziehung zwischen verschiedenen Proteinen. Um den möglichen Zusammenhang zwischen ATM und Artemis und der HR zu überprüfen, wurde eine Epistasisanalyse mit einem spezifischen Molekülinhibitor für ATM (ATMi) durchgeführt. Diese bestätigt zunächst die Epistasis zwischen ATM und Artemis und damit deren Beteiligung an einem gemeinsamen Reparaturweg in G1 (Abb. 5.11A). Dagegen wird durch ATMi-Behandlung von BRCA2-defizienten Zellen in G1 der ATM-Defekt simuliert, es tritt jedoch kein zusätzlicher Reparaturdefekt auf (Abb. 5.11A). Dies bestätigt, dass die HR in dieser Zellzyklusphase keine Rolle spielt. Die Epistasis von ATM und Artemis konnte auch in der G2-Phase gezeigt werden. Interessanter jedoch ist, dass beide Faktoren in G2 zudem epistatisch zum HR-Faktor BRCA2 sind, was den Zusammenhang zwischen der ATM/Artemis-abhängigen Reparatur und der HR verdeutlicht (Abb.5.11B). Die mit Hilfe der  $\gamma$ H2AX-Methode gewonnenen Ergebnisse wurden zudem durch die Untersuchung von Chromosomenbrüchen in G2 überprüft. Auch hier zeigt sich keine Additivität beim zusätzlichen Ausschalten von ATM vor BRCA2- und Artemis-defizientem Hintergrund (Abb. 5.15).

Diese Ergebnisse bestätigen die sehr überraschende Beziehung zwischen ATM, Artemis und der HR in der G2-Phase. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass beide Reparaturproteine in G2 unabhängig von klassischen NHEJ-Faktoren wie der DNA-PK agieren sollten. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde eine Epistasisanalyse mit einem spezifischen Inhibitor der DNA-PK<sub>cs</sub> (DNA-PKi) durchgeführt. Behandlung mit DNA-PKi führt zu einem Defekt in der schnellen Komponente der Reparatur. In der G1-Phase ist keine Vergrößerung dieses Reparaturdefektes in Artemis-defizienten Zellen gegenüber WT-Zellen zu beobachten. Die Kinetiken unterscheiden sich kaum (Abb. 5.16A). Dies bedeutet, dass die Artemis-abhängige Reparatur in G1 abhängig von funktionaler DNA-PK ist. Artemis-Defizienz löst keine zusätzliche Beeinträchtigung der Reparatur aus. Auch BRCA2-defiziente Zellen zeigen keine zusätzlichen Reparaturdefekte, was auf die fehlende Funktion von BRCA2 im NHEJ zurückzuführen ist. Dagegen zeigt sich in G2 ein Unterschied zwischen Artemis-defizienten Zellen und WT nach Inhibierung von DNA-PK<sub>cs</sub>, der dem Reparaturdefekt von ATM/Artemis-defizienten Zellen ohne DNA-PKi-Behandlung entspricht. BRCA2-defiziente Zellen zeigen nach DNA-PKi-Behandlung ein identisches Verhalten (Abb. 5.16B). Somit tritt nach der Inhibierung des NHEJ durch DNA-PKi bei vorhandener Defizienz in Artemis eine zusätzliche Beeinträchtigung der Reparatur auf. Dieser additive Effekt beweist, dass die Reparatur von ATM/Artemis-abhängigen Brüchen in G2 unabhängig von funktionaler DNA-PK ist. BRCA2-defiziente Zellen zeigen ein identisches Verhalten, was auf die gleichzeitige Inaktivierung von NHEJ und HR zurückgeführt werden kann. Die Reparaturkinetiken von BRCA2- und Artemis-defizienten Zellen verlaufen sehr ähnlich und die Vergrößerung des DNA-PKi-induzierten Reparaturdefektes ist von identischem Ausmaß. Dies bestätigt den Zusammenhang zwischen

ATM, Artemis und der HR für die Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden in der G2-Phase.

Die grundsätzlich unterschiedlichen Reparaturabläufe in den verschiedenen Zellzyklusphasen werden vor allem bei der Untersuchung längerer Reparaturzeiten deutlich. In G1 weisen Artemis-defiziente Zellen 96 h nach Schadensinduktion im Vergleich zu WT-Zellen eine deutlich erhöhte Anzahl unreparierter DSBs auf. Nach der Inhibition von DNA-PK<sub>cs</sub> ist die Reparatur bis auf das Schadensniveau von Artemis-defizienten Zellen möglich. Dieses Niveau kann allerdings nicht unterschritten werden (Abb. 5.19B). Somit verbleiben nach Einsatz von DNA-PKi nur Brüche unrepariert, die der Prozessierung durch ATM und Artemis bedürfen. Alle anderen Brüche können, wenn auch mit verlangsamter Kinetik, ohne Beteiligung der DNA-PK repariert werden. Somit ist die DNA-PK in G0/G1 für die Reparatur von strahleninduzierten DSBs nicht unbedingt notwendig, die Reparatur wird lediglich erleichtert (Riballo et al. 2004). Dieser alternative Weg des NHEJ könnte nach Ausfall von DNA-PK<sub>cs</sub> durch die direkte Interaktion von Ku70 mit XRCC4 eingeleitet werden (Mari et al. 2006). Auch in G2 tritt in Artemis-defizienten Zellen ein deutlicher Reparaturdefekt auf. Jedoch kann dieses Schadensniveau in Abwesenheit funktionaler DNA-PK deutlich unterschritten werden und erreicht nahezu WT-Niveau (Abb. 5.19B). Artemis-abhängige Brüche werden somit in G2 unabhängig von DNA-PK mittels HR repariert. So kommt es zu der paradoxen Situation, dass G1-Zellen in Abwesenheit funktionaler DNA-PK mehr DSBs aufweisen als G2-Zellen (Abb. 5.20). Dies verdeutlicht den grundsätzlich anderen Verlauf der Reparatur in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die langsame Reparatur von strahleninduzierten DSBs die Prozessierung der Brüche durch ATM und Artemis erfordert und in G1 durch die Kernkomponenten des NHEJ abgeschlossen wird. Dagegen werden in G2 die Kernkomponenten der HR aktiv. Die Reparatur der schnellen Komponente verläuft in G1 und in G2 über NHEJ. Somit kann den Reparaturfaktoren ATM und Artemis überraschenderweise eine duale Rolle im NHEJ und der HR zugeordnet werden.

#### **6.2.4. Der funktionelle Beitrag von Artemis zur Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden**

Die Beteiligung von Artemis an der HR wurde bisher noch nicht beschrieben, diese Arbeit zeigt erstmalig diesen Zusammenhang. Der Nuklease Artemis wurde zunächst eine Rolle in der V(D)J-Rekombination zugeordnet, wo die Endonukleaseaktivität des Proteins für die Auflösung von Haarnadelstrukturen benötigt wird (Ma et al. 2002, 2005). Ausgehend von dieser Funktion könnte Artemis an der Prozessierung von komplizierten Bruchstrukturen wie umgeklappten Enden beteiligt sein. Zur Aufklärung der Bedeutung der Endonukleaseaktivität von Artemis für die DSB-Reparatur wurden Komplementationsexperimente mit WT-Artemis bzw. einer endonukleasetoten Artemis-Variante (D37N) vor Artemis-defizientem Hintergrund

durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass WT-Artemis die Reparaturkapazität von Artemis-defizienten CJ179 wiederherstellen kann. Dagegen ist nach Transfektion des endonukleasetoten D37N-Artemis keine Verbesserung des Reparaturvermögens festzustellen (Abb. 5.25B). Außerdem wird durch Überexpression von WT-Artemis die in Artemis-defizienten Zellen eingeschränkte Ausbildung von Rad51-Foci ermöglicht, während D37N-Artemis keine Veränderung des Rad51-Foci-Niveaus hat (Abb. 5.26B). Die vollständige Wiederherstellung eines reparaturprofizienten Phänotyps durch Komplementation mit WT-Artemis ist ein direkter Hinweis auf die Beteiligung der Endonukleaseaktivität von Artemis an der HR-vermittelten Reparatur. Dies wird zudem dadurch unterstützt, dass die Überexpression von D37N-Artemis in WT-Zellen zur Einschränkung der Reparaturkapazität (Abb. 5.25B) sowie zu einem verminderten Ausmaß an Rad51-Foci führt (Abb. 5.26B).

Die Reduktion von RPA- und Rad51-Foci in Artemis-defizienten Zellen deutet auf eine Funktion in der frühen Phase des Reparaturprozesses hin (Barton, mündliche Mitteilung). Dies könnte möglicherweise auf eine Beteiligung von Artemis an der Resektion zu Beginn des HR-Prozesses hindeuten. Mittlerweile gibt es Hinweise auf den genauen Ablauf der Resektion, die im Hefemodell gewonnen und auf das Säugersystem übertragen werden konnten (Mimitou et al. 2008, Gravel et al. 2008). In einem ersten Schritt erfolgt die Anresection des DSBs durch Mre11 und CtIP (bzw. Sae2 in *S. cerevisiae*), vermutlich durch die Endonukleaseaktivität von CtIP, die durch Mre11 verstärkt wird (Lengsfeld et al. 2007, Sartori et al. 2007). Durch dieses initiale Ereignis der DNA-Resektion könnte die Bindung des Ku-Komplexes an die Enden des DSBs und damit die Reparatur über NHEJ verhindert werden (Mimitou et al. 2008). Im anschließenden zweiten Schritt erfolgt die Erstellung von ausgedehnten einzelsträngigen 3'-Überhängen über die 5'-3'-Exonuklease EXO1 (Exo1 in *S. cerevisiae*). Jüngst konnte die überraschende Beteiligung der Helikase BLM (Sgs1 in *S. cerevisiae*) an der Resektion gezeigt werden (Mimitou et al. 2008, Gravel et al. 2008), die in einem alternativen Weg zu EXO1 die Resektion der Bruchenden durchführen kann. Bisher wurde BLM mit der Auflösung von D-Schleifen bzw. *Holliday junctions* in der späten HR in Verbindung gebracht (Constantinou et al. 2000, Mohaghede et al. 2001). Jedoch deutet die frühe Akkumulation von BLM am DSB auf die Beteiligung des Faktors an frühen Reparaturereignissen hin (Karmakar et al. 2006). Die an der BLM-vermittelten Resektion beteiligte Nuklease ist bisher noch nicht bekannt. Möglicherweise könnte Artemis diese Funktion wahrnehmen.

Eine Möglichkeit der direkten Untersuchung der Beteiligung von Reparaturfaktoren an der HR besteht in der Analyse von endonukleolytisch induzierten DSBs durch die I-SCE I-Methode. Dabei werden Rekombinationskonstrukte mit einer Erkennungsstelle für das selten schneidende Restriktionsenzym I-SCE I in die Zelle eingebracht. Durch die Expression des Enzyms kommt es zur Entstehung von DSBs, die durch HR repariert werden müssen. Die Reparatur resultiert in der Wiederherstellung einer vollständigen GFP-Sequenz aus zwei zuvor

räumlich getrennten, funktionsunfähigen GFP-Fragmenten. Dies ermöglicht die einfache Identifizierung von HR-Ereignissen (Pierce et al. 1999). Jedoch konnten mit Hilfe dieser Methode keine Beeinträchtigung der HR in Artemis-defizienten Zellen nachgewiesen werden (Jeggo, mündliche Mitteilung), sodass eine Funktion von Artemis als Kernkomponente der HR nicht in Frage kommt. Dies wird durch Eigenschaften von Artemis-defizienten Zellen bestätigt. Sie zeigen keine erhöhte genomische Instabilität, jedoch starke Sensitivität gegenüber Agenzien, die *crosslinks* in der DNA verursachen, wie es bei Defekten in Kernkomponenten der HR der Fall ist (Moynahan et al. 2001).

Die genaue Funktion von Artemis als Endonuklease in der frühen HR bleibt unklar. Für die Bindung von Artemis als strukturspezifischer Endonuklease ist ein Übergang von einzelsträngiger zu doppelsträngiger DNA bedeutend (Ma et al. 2005). Es konnte gezeigt werden, dass Artemis neben Haarnadelstrukturen und 5'- bzw. 3'-Überhängen ein großes Spektrum an DNA-Schäden darunter Stamm-Schleife-Strukturen, symmetrische DNA-Blasen und unsymmetrische Schleifen, Y- und pseudo-Y-Strukturen sowie einzelsträngige Lücken der DNA prozessieren kann (Ma et al. 2005). Diese große Vielfalt an Substratstrukturen deutet auf die Beteiligung von Artemis an der Entfernung von DNA-Schäden oder sekundären Strukturen hin, die nach Einwirkung ionisierender Strahlung entstehen und die die Resektion des Bruches andernfalls behindern oder sogar verhindern können.

Allerdings ist die Endonukleaseaktivität von Artemis nicht ubiquitär vorhanden, sondern muss aktiviert werden. Wie diese Aktivierung abläuft, ist noch nicht abschließend geklärt. Zunächst wurde vermutet, dass die Endonukleaseaktivität von Artemis nach der Phosphorylierung durch DNA-PK aktiviert wird (Ma et al. 2002, 2005). Jedoch konnte gezeigt werden, dass ein Artemis-Konstrukt mit Mutationen in sieben der zehn S-T/Q-Phosphorylierungsmotive den Reparaturdefekt Artemis-defizienter Zellen komplementieren kann (Poinsignon et al. 2004). Experimente mit Mutationsvarianten in den elf identifizierten spezifischen Phosphorylierungsstellen, darunter die zehn S-T/Q-Motive, konnten keine Einschränkung der Endonukleaseaktivität von Artemis nachweisen (Goodarzi et al. 2006). Artemis weist zudem ATM-spezifische Phosphorylierungsstellen auf, die jedoch für die Aktivierung der Endonukleaseaktivität ebenfalls unbedeutend sind (Goodarzi et al. 2006). Dies deutet darauf hin, dass die Phosphorylierung von Artemis durch DNA-PK bzw. ATM zur Aktivierung der Endonukleasefunktion nicht unbedingt benötigt wird. Mittlerweile wird die Autophosphorylierung von DNA-PK<sub>cs</sub> am ABCDE-Cluster mit der Aktivierung der Endonukleaseaktivität von Artemis in Verbindung gebracht (Goodarzi et al. 2006). Durch diese Phosphorylierung kommt es zur Konformationsänderung des Proteins an der gebundenen DNA. Der Übergang von einzelsträngiger zu doppelsträngiger DNA wird zugänglich und kann prozessiert werden (Goodarzi et al. 2006). Allerdings ist der genaue Zusammenhang zwischen der Autophosphorylierung der DNA-PK und der endonukleolytischen Aktivierung von

Artemis noch nicht abschließend geklärt. Tatsache ist, dass keine direkte Abhängigkeit der Endonukleaseaktivität von Artemis von der DNA-PK-vermittelten Phosphorylierung besteht. Dies wurde bisher angenommen und beschränkt die Aktivität von Artemis auf den Reparaturweg des NHEJ. Jedoch erfolgt die Aktivierung der Endonukleaseaktivität von Artemis in G0/G1 in Kooperation mit einem Reparaturfaktor des zuständigen Reparaturweges, hier der DNA-PK. Dies eröffnet die Möglichkeit einer alternativen Aktivierung der Endonukleasefunktion von Artemis auch im Reparaturweg der HR.

### **6.2.5. Zur Funktion von ATM bei der Reparatur strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche**

Der Nachweis der Beteiligung von ATM am Reparaturweg der HR ist nicht überraschend. Biochemische Daten deuten auf einen Zusammenhang zwischen ATM und der HR hin (Yuan et al. 1998, Chen et al. 1999), der durch Epistasisanalysen bestätigt wird (Morrison et al. 2000). Kirshner et al. (2009) vermuten eine Interaktion von ATM mit Rad54 und Rad54B, Vertretern der Rad52-Epistasis-Gruppe. Jedoch zeigen Studien aus unserer Gruppe bereits eine Beeinträchtigung der Rad51-Foci-Ausbildung in ATM-defizienten primären humanen Fibroblasten (Barton, persönliche Mitteilung). Dies deutet auf eine frühere Beteiligung von ATM hin und bestätigt die Arbeiten von Chen et al. (1999) sowie Yuan et al. (2003), die eine Beteiligung von ATM an der Ausbildung von Rad51-Foci beschreiben.

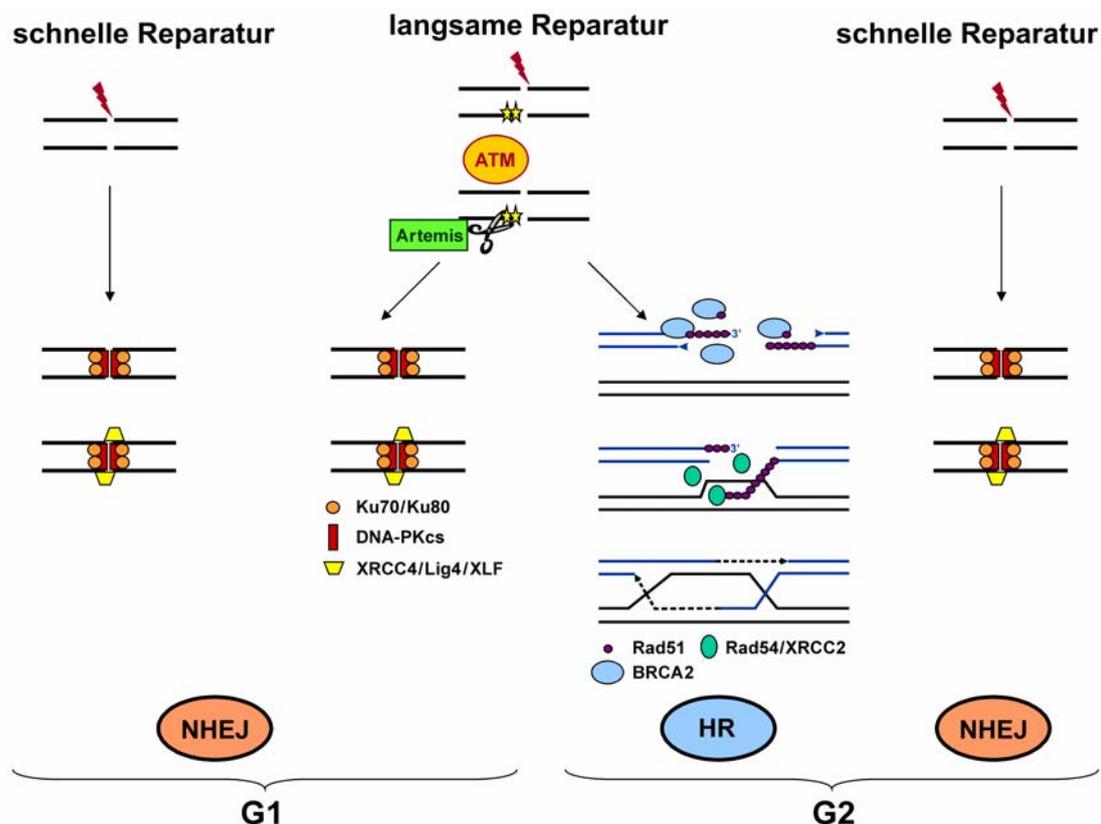
ATM nimmt eine Schlüsselrolle in der Initiation der DNA-Schadensantwort ein (vergleiche Kapitel 3.3.1). Die genaue Funktion des Proteins in der HR ist noch unklar. ATM könnte durch Veränderung der Chromatinorganisation die Zugänglichkeit der Schadensstelle für verschiedene Reparaturfaktoren regulieren.

Indirekte Hinweise auf den Einfluss der Chromatinstruktur auf die DNA-Reparatur finden sich in der Literatur. So konnte gezeigt werden, dass es in der Umgebung von laserinduzierten DNA-Schäden zur Relaxierung des Chromatins kommt (Kruhlak et al. 2006). In *S. cerevisiae* ist die Entfernung von Histonen durch den MRX-Komplex (Mre11/Rad50/Xrs2 = NBS1) für die erfolgreiche Rekrutierung von Reparaturfaktoren notwendig (Tsukuda et al. 2005). Außerdem kann durch Entfernen von Histon H1, das die DNA-Windungen um das Histonoktamer fixiert, die Packungsdichte des Chromatins reduziert werden, was das ATM-Signaling verbessert und zur Sensibilisierung der Checkpoints sowie verstärkter Radioresistenz beiträgt (Murga et al. 2007). Erste direkte Hinweise auf die Beteiligung von ATM an der Regulation der Chromatinorganisationen ergeben sich aus der Identifizierung von ATM-spezifischen Phosphorylierungsstellen in KAP-1 (KRAB-associated protein 1), einem Schlüsselprotein der Chromatinorganisation (Ziv et al. 2006). KAP-1 ist ein transkriptionaler Korepressor, der durch Interaktion mit anderen Proteinen die Ausbildung von Heterochromatin reguliert. Er bindet an die KRAB-Domäne (Krüppel associated box) von Bindungspartnern, die mit Hilfe von Zink-Finger-Motiven spezifische DNA-Sequenzen erkennen. Gleichzeitig erfolgt N-terminal die

Interaktion mit weiteren heterochromatinassoziierten Proteinen wie HP1 (*Heterochromatin protein 1*), Histondeacetylasen (HDAC), Histonmethyltransferasen und Chromatinmodellierern (Craig 2005). Durch die koordinierte Aktion dieses komplexen Netzwerkes wird die Stilllegung von einzelnen Genen, ganzen DNA-Bereichen bis hin zu kompletten Chromosomen initiiert und reguliert. Durch das Auftreten von DNA-Schäden wird ATM aktiviert und greift durch Phosphorylierung von KAP-1 in dieses komplexe Netzwerk ein (Ziv et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass diese Interaktion für die Reparatur ATM-abhängiger DSBs in stationären Zellen essentiell ist. Wird die dichte Packung des Heterochromatins durch Herunterregulation von KAP-1 aufgelockert, so schwindet auch die Abhängigkeit von ATM und eine vollständige Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden ist möglich (Goodarzi et al. 2008). Besonders deutlich wird die kritische Rolle von ATM für die notwendige Relaxierung des Heterochromatins bei der Expression einer phosphomimetischen Variante von KAP-1. Dieses Konstrukt weist eine dauerhafte Phosphorylierung der ATM-spezifischen Phosphorylierungsstellen von KAP-1 auf. Nun ist auch in Abwesenheit von ATM keine Beeinträchtigung des Reparaturvermögens zu beobachten (Goodarzi et al. 2008). Jüngste Ergebnisse zeigen, dass ATM auch in der G2-Phase die Relaxierung des Heterochromatins bewirkt (Barton, Jeggo, mündliche Mitteilung). Somit ist die Abhängigkeit von ATM bei der Reparatur vermutlich auf die Lokalisation eines DSBs im Heterochromatin zurückzuführen. Bisher wurde die ATM-Abhängigkeit einer bestimmten Subpopulation von DSBs auf die Komplexität der betreffenden DNA-Schäden zurückgeführt. Die Aktivität von ATM wurde mit der Aktivierung von Artemis in Verbindung gebracht. Dieses entfernt als Endonuklease komplizierte Strukturen vom Bruchende, die die Ligation des Bruches behindern (Riballo et al. 2004, Lohrich et al. 2005). Jedoch konnte gezeigt werden, dass ATM für die Aktivierung der Endonukleaseaktivität von Artemis nicht notwendig ist (Goodarzi et al. 2006). Dennoch besteht die Möglichkeit, dass ATM durch Aktivierung seiner *downstream*-Effektorproteine indirekt Einfluss auf die Artemis-abhängige Reparatur nimmt. Die ATM-spezifische Phosphorylierung könnte die Proteinstabilität von Artemis verändern, ohne dass die enzymatische Aktivität des Proteins direkt beeinflusst wird (Goodarzi et al. 2006). Allerdings konnte auch nach Behandlung mit Strahlenarten, die aufgrund einer höheren RBW mehr Brüche mit komplizierter Struktur erzeugen sollten wie beispielsweise  $\alpha$ -Teilchen oder Kohlenstoff K-Photonen ( $C_K$ -X-rays) bzw. durch Behandlung mit entsprechenden Chemikalien der ATM-Reparaturdefekt nur auf maximal 25 % der initial entstandenen Schäden vergrößert werden (Riballo et al. 2004, Goodarzi et al. 2008). Dieser Anteil von 10-25 % ATM-abhängiger Brüche korreliert sehr gut mit dem Anteil an Heterochromatin in humanen Zellen (Dimitri et al. 2005, Goodarzi et al. 2008). Die Bedeutung von ATM für die Reparatur von strahleninduzierten DSBs resultiert somit vermutlich aus der Struktur des umgebenden Chromatins und hängt weniger mit der Natur des eigentlichen Schadens zusammen.

### 6.2.6. Modell zur Reparatur strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche

Basierend auf den gezeigten Ergebnissen kann folgendes Modell der Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden entwickelt werden (Abb. 6.1). Die Reparatur lässt sich in G1 und G2 in eine Phase der langsamen und eine Phase der schnellen Reparatur unterteilen. Die schnelle Komponente beseitigt innerhalb der ersten Stunden (< 2 h) die Mehrzahl der aufgetretenen DNA-Schäden und wird sowohl in G1 wie auch in G2 durch den Reparaturweg des NHEJ bestritten. Die langsame Komponente setzt etwa 2-4 h nach Schadensinduktion ein und führt die DSB-Reparatur unter Beteiligung von ATM und Artemis fort. Sie ist für die Reparatur von etwa 15-20 % der strahleninduzierten DNA-Schäden zuständig. Der Abschluss der Reparatur der ATM/Artemis-abhängigen Brüche unterscheidet sich in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus. In G1 setzen Komponenten des *core*-NHEJ, darunter DNA-PK, die Reparatur der ATM/Artemis-abhängigen Brüche fort. Dagegen erfolgt in G2 nach der Prozessierung die Resektion und die DSBs werden in den Reparaturweg der HR eingespeist. Die Konsequenz dieses Modells ist die Existenz von Reparaturfaktoren, die weder dem NHEJ noch der HR eindeutig zugeordnet werden können, da sie Funktionen in beiden Reparaturwegen ausführen. Zu diesen gehören ATM und Artemis, allerdings deutet sich auch bei verschiedenen Mediatorproteinen wie 53BP1 oder MDC1 eine Funktion in beiden Reparaturwegen an (Barton, mündliche Mitteilung). Somit wäre die strikte Unterteilung in die getrennten Reparaturwege nicht mehr gegeben.



**Abbildung 6.1:** Modell der Reparatur von strahleninduzierten DSBs in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus

### **6.2.7. Charakterisierung der Reparatur von etoposidinduzierten DNA-Schäden in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus**

Die Untersuchung der Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden erlaubte die Etablierung einer Modellvorstellung über die Zuständigkeit der unterschiedlichen DSB-Reparaturwege in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus (Abb. 6.1). Diese sollte durch die Untersuchung der Reparatur einer anderen Schadensart verifiziert und ausgeweitet werden.

Die Empfindlichkeit der behandelten Zellen gegenüber Etoposid ist abhängig von der Aktivität von Topoll und unterscheidet sich deutlich in G1 und G2. Proliferierende Zellen in der G2-Phase reagieren deutlich sensibler auf Etoposid als stationäre G0/G1-Zellen, sodass zur Induktion einer ähnlichen Schadensanzahl G0/G1-Zellen mit der bis zu 20fachen Menge an Etoposid behandelt werden müssen als G2-Zellen (Abb. 5.27). Dies bestätigt die Arbeiten von Wang et al. (2007), der die Entstehung von DNA-Schäden durch Etoposid nicht nur in der S-Phase sondern auch in G1 und G2 zeigen konnte.

Die Reparaturkinetik von WT-Zellen zeigt nach Etoposidbehandlung ebenso wie nach Bestrahlung einen biphasischen Verlauf in G1 und G2. Die Mehrzahl der Brüche wird innerhalb einer schnellen Reparaturphase beseitigt, während die langsame Komponente für die verbleibenden Schäden zuständig ist. Diese werden innerhalb des beobachteten Zeitraums von 8 h nahezu auf Hintergrundniveau repariert (Abb. 5.28). Jedoch verläuft die Reparatur von etoposidinduzierten DSBs deutlich schneller als die von strahleninduzierten DNA-Schäden (Abb. 5.29). IR-induzierte DNA-Schäden zeigen eine große Variabilität der jeweiligen Struktur und können unterschiedlichste Modifikationen der Bruchenden aufweisen (vergleiche Kapitel 3.1.4). Dagegen weisen chemisch induzierte DSB aufgrund des immer gleichen Entstehungsmechanismus eine einheitliche Struktur auf und können durch die Kernkomponenten des NHEJ sehr effektiv repariert werden. Dies bestätigt Arbeiten von Adachi et al. (2003), die NHEJ als Hauptreparaturweg zur Beseitigung von etoposidinduzierten DNA-Schäden identifizieren konnten.

Der Anteil der langsamen Komponente ist sowohl in der G0/G1- wie auch in der G2-Phase reduziert. Dies wird durch die Analyse von ATM- und Artemis-defizienten Zellen bestätigt. Durch Etoposidbehandlung entstehen weniger Brüche, die durch ATM und Artemis prozessiert werden müssen. Der resultierende Reparaturdefekt zeigt ein sehr geringes Ausmaß und betrifft etwa 3-4% der initial vorhandenen Brüche (Abb. 5.30). In der G2-Phase korrelieren die Reparaturkinetiken von ATM- bzw. Artemis-defizienten Zellen gut mit jener der BRCA2-Mutante (Abb. 5.30B und Abb. 5.30D). Dies ist auch bei der Reparatur von strahleninduzierten DSBs der Fall (Abb. 5.9) und deutet darauf hin, dass ATM und Artemis auch bei der Reparatur etoposidinduzierter DNA-Schäden in einem gemeinsamen Reparaturweg mit BRCA2 arbeiten. Somit unterstützt die Untersuchung von etoposidinduzierten DNA-Schäden die in Abb. 6.1 dargestellte Modellvorstellung der Reparatur IR-induzierter DSBs. ATM/Artemis-abhängige

Brüche werden demnach in der G2-Phase durch HR repariert. Die langsame Komponente spiegelt somit in dieser Phase des Zellzyklus die HR-vermittelte Reparatur wider.

Eine weitere Möglichkeit, die Beteiligung der HR an der DSB-Reparatur zu charakterisieren, besteht in der Untersuchung von Rad51-Foci. Diese bilden sich mit langsamer Kinetik an durch HR reparierten Schadensorten und geben Aufschluss über den Anteil der HR an der gesamten DSB-Reparatur (Bekker-Jensen et al. 2006, Schlegel et al. 2006). Die Entstehung von Rad51-Foci nach der Behandlung mit Etoposid konnte gezeigt werden (Abb. 5.31A). Dies bestätigt die Beteiligung der HR an der Reparatur etoposidinduzierter DSBs. Die Korrelation zwischen HR-Reparatur und der langsamen Reparaturkomponente wird beim Vergleich von Abb. 5.28B und Abb. 5.31B deutlich. Der Anteil an Rad51-Foci 2 h nach Etoposidbehandlung entspricht nahezu vollständig dem Anteil an DSBs, der durch die langsame Komponente ab etwa 4 h repariert wird. Dabei ist der Anteil der HR an der Gesamtreaktion nach Etoposidbehandlung deutlich geringer als nach Röntgenstrahlung (Abb. 5.31C). Dies korreliert mit dem Reparaturdefekt in BRCA2-defizienten Zellen nach Etoposidbehandlung (Abb. 5.30) bzw. Röntgenstrahlung (Abb. 5.9). Diese Ergebnisse bestätigen Arbeiten von Adachi et al. (2003), der bereits eine geringe Beteiligung der HR an der Reparatur etoposidinduzierter DNA-Schäden zeigen konnte.

Die Reparatur von ATM/Artemis-abhängigen Brüchen wird somit in G2 durch den Reparaturweg der HR abgeschlossen. Wie die Reparatur dieser DNA-Schäden in der G1-Phase fortgeführt wird, wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass DNA-PK für die Reparatur von etoposidinduzierten DSBs nicht unbedingt notwendig ist (Adachi et al. 2004). Somit besteht die Möglichkeit, dass in G1 nur ATM/Artemis-abhängige Brüche die Anwesenheit funktionaler DNA-PK zur erfolgreichen Reparatur zwingend erfordern, während alle anderen Brüche über einen DNA-PK-unabhängigen Weg des NHEJ repariert werden können, wie es nach IR der Fall ist (Abb. 5.16, Abb. 5.19, Riballo et al. 2004).

Das vorgestellte Modell zur Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden assoziiert die ATM-Abhängigkeit von DSBs mit deren Lokalisation im Heterochromatin. Strahlungsinduzierte DNA-Schäden treten aufgrund der zufälligen Verteilung über den Zellkern auch im Heterochromatin auf. Dagegen hängt die Induktion von Etoposidschäden direkt von der Aktivität des beeinflussten Enzyms Topoll ab. Dies führt zu der Frage, ob etoposidinduzierte DNA-Schäden auch im Heterochromatin entstehen. Da die transkriptionelle Aktivität im Heterochromatin reduziert ist (Richards & Elgin 2002), könnte dies auch auf den Anteil der im Heterochromatin lokalisierten Etoposidbrüche zutreffen. Somit würde Behandlung mit Etoposid deutlich weniger heterochromatinassoziierte DNA-Schäden induzieren. In diesem Fall bestätigt das Ergebnis das in Abb. 6.1 gezeigte Modell der DSB-Reparatur. Demnach

erstreckt sich die Aktivität von ATM nur auf DNA-Schäden, die im Heterochromatin lokalisiert sind. Somit ist der Reparaturdefekt, der durch Defizienz in ATM entsteht, nach Etoposidbehandlung im Vergleich zu IR ebenfalls reduziert.

Allerdings gibt es Hinweise auf Aktivitäten im konstitutiven Heterochromatin, das in humanen Zellen etwa 20 % des Genoms ausmacht (Dimitri et al. 2005). Diese erfordern eine Beteiligung der Topoll zur Vermeidung von sterischen Spannungen. Die Transkription von repetitiven Elementen v. a. in der Centromer-Region der Chromosomen wird mit der Bildung von kleinen RNA-Elementen (*small* RNA, sRNA) in Verbindung gebracht. Diese sind wiederum an der Stilllegung von Gensequenzen beteiligt (Buhler & Moazed 2007). In *Drosophila melanogaster* existieren über 200 aktiv transkribierte Gene in ausgedehnten Heterochromatinbereichen des Genoms (Smith et al. 2007). In humanen Zellen erfolgt die Initiation der Transkription an den meisten Genen, auch an den inaktivierten (Guenther et al. 2007). Jedoch konnte an inaktiven Genen keine Elongation nachgewiesen werden, was auf eine Postinitiationsregulation hindeutet (Guenther et al. 2007). Diese Studien belegen, dass Heterochromatin nicht wie bisher angenommen aus stillgelegter, unbrauchbarer DNA besteht, sondern durchaus für den Metabolismus der Zelle von Bedeutung ist. Somit ist die Aktivität von Topoll auch in diesen Bereichen des Genoms notwendig. Zudem gibt es Hinweise auf eine direkte Beteiligung der Topoll an der Regulation der Chromatinkondensation vor der Mitose, was die Aktivität des Enzyms in kondensierten DNA-Bereichen andeutet (Adachi et al. 1991, Germe & Hyrien 2005). Somit sollte Etoposid auch im Heterochromatin DNA-Schäden induzieren. Untersuchungen der Lokalisation von etoposidinduzierten DSBs konnten bestätigen, dass die Verteilung der Brüche in Eu- bzw. Heterochromatin keine signifikanten Unterschiede zu strahleninduzierten Brüchen zeigen (Jeggo, mündliche Mitteilung).

Jedoch ist der Anteil an ATM/Artemis-abhängigen DNA-Schäden nach Etoposidbehandlung wesentlich geringer als nach Behandlung mit Röntgenstrahlung. Dies mag zum einen daran liegen, dass Topoll vor allem in Heterochromatinbereichen aktiv wird, die gewisse Aktivität aufweisen. Diese könnten dadurch eine ohnehin aufgelockertere Struktur zeigen, was auch die Zugänglichkeit für Reparaturfaktoren verbessert. Alternativ könnte man sich vorstellen, dass ATM nicht für alle heterochromatinassoziierten DSBs benötigt wird. Nach Etoposidbehandlung ist ein Großteil der DNA-Schäden im Euchromatin lokalisiert und kann sehr schnell über NHEJ repariert werden. Im Heterochromatin werden Etoposidschäden nicht ausschließlich unter Beteiligung von ATM und Artemis repariert, wie dies bei strahleninduzierten DSBs der Fall ist. Ein Teil dieser Brüche kann vermutlich ohne Auflockerung des Chromatins ATM-unabhängig über NHEJ repariert werden.

Somit könnte der für die Reparatur von etoposidinduzierten DNA-Schäden zuständige Reparaturweg nicht nur durch die Lokalisation des DNA-Schadens bestimmt sein. Auch die

Eigenschaften eines DNA-Schadens scheinen den Bedarf der Prozessierung durch ATM und Artemis zu beeinflussen.

### **6.2.8. Überlegungen zur Charakterisierung ATM- bzw. Artemis-abhängiger DNA-Schäden**

Die Beteiligung der Reparaturfaktoren ATM und Artemis an der Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden zeigt eine direkte Korrelation mit dem Anteil an heterochromatinassoziierten DSBs. Dies ist bei Brüchen, die durch Etoposid verursacht werden, nicht der Fall. Der Anteil ATM/Artemis-abhängiger Brüche an der Gesamtschadenszahl ist hier deutlich geringer als der Anteil heterochromatinassoziiierter DNA-Schäden. Dies ist ein Hinweis auf die Beteiligung weiterer Faktoren an der Entscheidung, welcher Reparaturweg für die Beseitigung eines aufgetretenen Schadens zuständig ist.

Die Lokalisation eines Bruches im Heterochromatin schränkt die Zugänglichkeit der Schadensstelle für verschiedene Reparaturfaktoren ein (Downs et al. 2007). So ist die PIKK-spezifische Phosphorylierungsstelle von H2AX in der Solenoidfaser nicht frei zugänglich. Durch Chromatinrelaxierung wird die Phosphorylierung zumindest vereinfacht und erlaubt darüber hinaus die Translokation der PIKKs zur Amplifizierung des Schadenssignals im Umfeld der Schadensstelle (Downs et al. 2007). In Abwesenheit der zuständigen Chromatinremodellierungsfaktoren wird die Phosphorylierung von H2AX verzögert (Downs et al. 2007). Dadurch verlängert sich der Zeitraum, in dem ein DNA-Schaden unrepariert vorliegt. In dieser Zeit konkurrieren die initialen Reparaturfaktoren der HR und des NHEJ um die Bindung an die Schadensstelle. Ku70/Ku80 binden mit hoher Affinität an den DSB und verlassen diesen auch sehr rasch wieder, sodass die Frequenz von Assoziation und Dissoziation mit den Enden des DSBs sehr hoch ist (Mari et al. 2006). Trifft DNA-PK<sub>cs</sub> auf am DSB gebundenes Ku70/Ku80, erfolgt die Autophosphorylierung und der Komplex dissoziiert sehr schnell vom Schadensort, um für die Ligation durch Lig4/XRCC4 Platz zu schaffen (Uematsu et al. 2007). Ist in diesem Moment kein Lig4/XRCC4-Komplex zugegen, kommt es zur erneuten Dissoziation der Reparaturfaktoren und das Spiel beginnt von vorn. HR-Faktoren dagegen binden deutlich seltener, jedoch wird der DSB zur Vorbereitung der HR-Reparatur vermutlich durch den MRN-Komplex in Kooperation mit CtIP anresektiert (Huertas et al. 2008). Daraufhin verlassen die initialen HR-Faktoren den Bruch wieder, bevor die endgültige Resektion stattfindet. Die Bindung der Initialisierungsfaktoren des NHEJ ist nun aber nicht mehr möglich (Mimitou et al. 2008, Gravel et al. 2008). Diese DSBs sind für eine Reparatur über HR markiert.

Ein ähnliches Szenario bietet sich bei DNA-Schäden, die aufgrund komplizierter Modifikationen der Bruchenden nicht direkt von den Kernkomponenten des NHEJ ligiert werden können. Sie bedürfen der zeitaufwendigen Prozessierung, was wiederum die

Verweildauer in unrepariertem Zustand verlängert und die Wahrscheinlichkeit der Bindung von HR-Faktoren erhöht.

Die Berücksichtigung der Zeit, die ein DSB unrepariert verbleibt, bietet die Möglichkeit, die Reparatur strahlen- sowie etoposidinduzierter DNA-Schäden durch ein gemeinsames Modell zu erklären. Die Verweildauer in unrepariertem Zustand wird sowohl durch die Lokalisation wie auch durch die Komplexität eines DNA-Schadens beeinflusst. IR-induzierte DSBs zeigen eine große Varianz an möglichen Modifikationen der Bruchenden. Die Beschaffenheit der DSBs scheint die Reparatur der im Heterochromatin lokalisierten DNA-Schäden zusätzlich zu verlangsamen, sodass vermutlich der Großteil dieser DSBs nur in Anwesenheit von ATM und Artemis repariert werden kann. Somit korreliert der Anteil ATM/Artemis-abhängiger DSBs sehr gut mit dem Anteil an heterochromatinassoziierten DNA-Schäden. Im Fall von etoposidinduzierten DSBs scheint die geringe Komplexität der im Heterochromatin lokalisierten DNA-Schäden die geringe ATM- bzw. Artemis-Abhängigkeit zu bedingen. Jedoch ist die zeitliche Verzögerung nicht groß genug, um alle im Heterochromatin befindlichen DNA-Schäden der Reparatur über die langsame Komponente zuzuführen. Vielmehr kann die Reparatur auch im Heterochromatin sehr schnell durch NHEJ durchgeführt werden.

Diese Interpretation ermöglicht die Vereinbarung von früheren Modellvorstellungen mit den gewonnenen Erkenntnissen. So ist eine durch Modifikation der Bruchenden erhöhte Komplexität der DNA-Schäden für die Abhängigkeit von ATM und Artemis von Bedeutung (Riballo et al. 2004, Lohrich & Jeggo 2005). Darüber hinaus kann auch die Lokalisation von DSBs im Heterochromatin zur Abhängigkeit von ATM und Artemis beitragen.

Möglicherweise entsteht der Bedarf für ATM und Artemis erst durch die lange Verweildauer der DSBs in unrepariertem Zustand. Initiale HR-Faktoren können binden, bereiten die DSB-Enden für die Reparatur vor und markieren die Brüche so für eine HR-abhängige Reparatur. Die im Zuge der HR ablaufenden Prozesse wie Resektion und Stranginvasion erfordern u. a. die Entfernung von Nukleosomen und sind auf eine gewisse Flexibilität des DNA-Fadens angewiesen (Downs et al. 2007). Das dichtgepackte Chromatin muss daher weit geöffnet werden und die Aktivität von ATM wird zur Auflösung der dichtgepackten Heterochromatinstruktur benötigt. ATM und Artemis arbeiten in einem gemeinsamen Reparaturweg und sind für die gleiche Subpopulation an DNA-Schäden zuständig. Möglicherweise entstehen durch die frühen Schritte zur Vorbereitung des HR-Prozesses Strukturen, die durch die Endonukleasefunktion von Artemis vor der Reparatur entfernt werden müssen.

In G1, wo die HR nicht zur Verfügung steht, werden ATM/Artemis-abhängige Brüche durch NHEJ repariert. Allerdings ist zur erfolgreichen Reparatur funktionale DNA-PK notwendig und die DNA muss ebenfalls durch ATM entwunden werden. Die gleichzeitige Abhängigkeit von

Artemis deutet darauf hin, dass auch hier Strukturen vorliegen, die vor der Reparatur durch Artemis entfernt werden müssen. Möglicherweise treten Veränderungen der Bruchstelle durch den gleichen Prozess auf, der die Brüche für die ATM-abhängige Reparatur über HR in G2 markiert.

Es konnte gezeigt werden, dass ATM und Artemis nicht unmittelbar durch aktivierende Prozesse aneinander gekoppelt sind (Goodarzi et al. 2006). Dies wirft die Frage auf, ob es Situationen gibt, in denen beide Proteine unabhängig voneinander aktiv werden. Von S. Conrad durchgeführte Reparaturstudien nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen geben weiteren Einblick in die Funktion und Zuständigkeit der beiden Reparaturfaktoren. Kohlenstoffionen weisen einen hohen LET auf und verursachen DNA-Schäden mit komplizierter Struktur, die mit verlangsamter Kinetik repariert werden (Conrad, mündliche Mitteilung). Die Reparaturfunktion von ATM scheint auf das Öffnen der Heterochromatinstruktur beschränkt zu sein und spiegelt sich in einem Reparaturdefekt von etwa 20 % in ATM-defizienten Zellen wider (Conrad, mündliche Mitteilung). Dagegen verbleiben in Artemis-defizienten Zellen mit etwa 40-45 % ein deutlich größerer Anteil an DSBs unrepariert (Conrad, mündliche Mitteilung), der auch den Anteil an heterochromatinassoziierten DNA-Schäden übersteigt. Vermutlich werden die schwerioneninduzierten DNA-Schäden auch im Euchromatin so langsam repariert, dass es zur Entstehung von Strukturen kommt, die vor der Reparatur durch Artemis prozessiert werden müssen. Außerdem könnten durch die Bestrahlung zusätzlich Strukturen auftreten, die *per se* der Bearbeitung durch Artemis bedürfen. Es konnte eine Fraktion von DNA-Schäden identifiziert werden, die ausschließlich Artemis und kein ATM zur Reparatur benötigen und die nicht aufs Heterochromatin beschränkt zu sein scheinen. Diese vorläufigen Erkenntnisse bestätigen die oben diskutierte Modellvorstellung. Die Zeit, die ein DNA-Schaden unrepariert verbleibt, scheint bei der Entscheidung über den zuständigen Reparaturweg eine bedeutende Rolle zu spielen.

### 6.2.9. Ausblick

Die diskutierten Schlussfolgerungen basieren v. a. auf der indirekten Analyse der Beziehung zwischen Proteinen durch Epistasistudien. Der direkte Nachweis der Beteiligung von Artemis an der HR ist für die Bestätigung des diskutierten Modells von immenser Bedeutung. Zur zweifelsfreien Verifizierung müssen weitere Verfahren zur Überprüfung der Beteiligung von Reparaturfaktoren an der HR angewendet werden.

Eine Möglichkeit, die Beteiligung von Artemis an der HR direkt zu zeigen besteht in der Analyse von Schwesterchromatidaustauschen (*sister chromatid exchanges*, SCE). Diese Methode beruht auf dem Nachweis des reziproken Austauschs von DNA-Sequenzen

zwischen homologen Sequenzen der Schwesterchromatiden (Wilson & Thompson 2007). Der genaue Mechanismus des SCE bleibt unklar. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Säugerzellen mit Defekten in Kernkomponenten der HR wie Rad54 bzw. Rad51 eine reduzierte Rate spontan auftretender SCEs aufweisen. Dies ist bei NHEJ-defekten Ku70-Mutanten nicht der Fall (Sonoda et al. 1999), was auf eine Beteiligung der HR an der Entstehung von SCEs hinweist. Exogen induzierte DNA-Schäden, die durch HR beseitigt werden, führen zu einer Erhöhung der SCE-Rate. Diese Methode könnte zur Untersuchung der Beteiligung von ATM und Artemis an der HR-vermittelten Reparatur von strahleninduzierten DSBs verwendet werden. Bei direkter Funktion der beiden Reparaturfaktoren in der HR sollte die durch Schadensinduktion erhöhte SCE-Rate in ATM- und Artemis-defizienten Zellen aufgrund der Beeinträchtigung des HR-Prozesses nicht auftreten.

Der Einbau des Thymidinanalogons BrdU an durch HR reparierten DSBs ist aufgrund der ausgeprägten neusynthetisierten Bereiche ein möglicher Ansatzpunkt der direkten Untersuchung von HR-assoziierten Reparaturfaktoren. Nach der Denaturierung der DNA kann der immunfluoreszenztechnische Nachweis der BrdU-markierten DNA-Bereiche mit Hilfe von spezifischen BrdU-Antikörpern erfolgen. Diese Bereiche sollten bei Defizienzen in der HR nicht auftreten und belegen direkt die Beteiligung eines Reparaturfaktors an der HR. Diese Methode konnte in unserem Labor etabliert werden und wird augenblicklich zur Überprüfung der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse herangezogen.

Die genaue Beschaffenheit von DNA-Schäden, die der Endonukleasefunktion von Artemis bedürfen, bleibt unklar. Es konnte gezeigt werden, dass Artemis bereits sehr früh im HR-Prozess aktiv wird (vergleiche Kapitel 6.2.4). Ein entscheidender Schritt in der Vorbereitung der HR ist die Resektion der DNA an der Bruchstelle zur Herstellung von ausgedehnten 3'-Überhängen, die mit dem einzelstrangspezifischen Bindeprotein RPA besetzt und so vor Degradation und Abbau geschützt werden. In diesem Zusammenhang erlangt CtIP zunehmend Beachtung. Dieses interagiert mit dem MRN-Komplex, erlangt dadurch selbst Nukleaseaktivität und wird mit der Anrektion der Bruchenden vor der eigentlichen Resektion in Verbindung gebracht (Sartori et al. 2007, Mimitou et al. 2008). Artemis-defiziente Zellen sind bereits in der Ausbildung von RPA-Foci beeinträchtigt (Barton, mündliche Mitteilung). Somit besteht die Möglichkeit, dass bei der Vorbereitung der Resektion durch CtIP Strukturen entstehen, die vor der Fortsetzung der Reparatur durch die Endonukleaseaktivität von Artemis entfernt werden müssen. So könnten die einzelsträngigen Überhänge unter Entstehung von *hairpins* oder *foldbacks* mit sich selbst paaren, so das Bruchende blockieren und das Binden weiterer Reparaturfaktoren verhindern. Eine Überprüfung dieser Annahme könnte ebenfalls

unter Zuhilfenahme der siRNA-Technologie durchgeführt werden. So könnte der Einfluss der siRNA-vermittelten Herunterregulation von CtIP auf die Reparaturkapazität von Artemis-defizienten Zellen untersucht werden. Hängt die Entstehung von Artemis-abhängigen Strukturen mit der Aktivität von CtIP zusammen, so sollte der Artemis-Reparaturdefekt durch Entfernen von CtIP aufgehoben werden.

Die Frage, inwieweit die Lokalisation eines DSBs im Heterochromatin bzw. die Komplexität des DSBs für die ATM/Artemis-abhängige Reparatur verantwortlich ist, kann ebenfalls durch gezielte Herunterregulation von Proteinen weiter untersucht werden. Durch siRNA-vermittelte Herunterregulation des Chromatinorganitors KAP-1 kann die Chromatinstruktur aufgelockert werden. Ist die ATM-Abhängigkeit durch den dicht gepackten Chromatinstatus bedingt, sollte bei ATM-defizientem Hintergrund der ATM-Reparaturdefekt nicht mehr auftreten. Dieser Versuchsansatz erlaubt bei Untersuchung Artemis-defizienter Zellen auch eine Aussage über die gekoppelte Funktion von ATM und Artemis. Die Untersuchung der Auswirkung der Chromatinrelaxierung auf Artemis-defiziente Zellen erlaubt erste Einblicke in das Zusammenspiel der beiden Reparaturfaktoren. Verschwindet der Artemis-Reparaturdefekt, so scheint die Aktivität von Artemis ebenso wie bei ATM auf heterochromatinassoziierte Brüche beschränkt zu sein. Wird der Reparaturdefekt nur teilweise reduziert, so deutet dies darauf hin, dass Strukturen, die vor der Reparatur durch Artemis bearbeitet werden müssen, auch im Euchromatin auftreten. In jüngsten Reparaturstudien nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen, die zur Induktion von hochkomplexen DNA-Schäden führen, konnte eine Fraktion von DNA-Schäden identifiziert werden, die einer Artemis-abhängigen Prozessierung bedarf, aber keine Abhängigkeit von ATM aufweist (Conrad, mündliche Mitteilung). Dies deutet auf eine entkoppelte Funktion von ATM und Artemis bei besonderer Komplexität der Schäden hin. Weiterführende Untersuchungen v. a. von HR-Mutanten können Aufschluss über das Zusammenspiel der Reparatur von ATM- bzw. Artemis-abhängigen Brüchen und dem Reparaturweg der HR geben.

Es konnte gezeigt werden, dass ATM/Artemis-abhängige Brüche in der G1-Phase in das NHEJ eingespeist werden, während in der G2-Phase die Reparatur über HR fortgeführt wird. Sollten Artemis-abhängige Strukturen in Vorbereitung der HR und in G1 durch NHEJ repariert werden, so deutet dies darauf hin, dass ein Wechsel zwischen HR und NHEJ auch nach der Initiation der Reparatur möglich ist. Somit wären beide Reparaturwege nicht strikt voneinander getrennt. Dies führt zu der Frage, ab welchem Schritt ein DNA-Schaden unumkehrlich auf einen bestimmten Weg festgelegt ist. Die weitere Untersuchung dieser Fragen erlaubt wertvolle Einblicke in das Wechselspiel der verschiedenen Reparaturwege, die dazu beitragen, die komplexe Regulation der DNA-Reparatur zu verstehen.

### 6.3. Untersuchungen zur Reparatur kovalent verknüpfter Protein-DNA-Komplexe

#### 6.3.1. Zur Funktion des MRN-Komplexes bei der Reparatur von etoposidinduzierten DNA-Schäden

Der letzte Teil dieser Arbeit widmet sich der Reparatur von etoposidinduzierten Protein-DNA-Komplexen. Die Tatsache, dass Zellen mit Defizienzen in Komponenten des MRN-Komplexes sensitiv auf Etoposid reagieren (Malik & Nitiss 2004) deutet darauf hin, dass diesen eine Rolle in der Reparatur der durch diese Chemikalien hervorgerufenen Läsionen zukommt. Allerdings ist noch nicht bekannt, ob die entstehenden Reparaturdefekte auf Fehler in der Entfernung der Protein-DNA-Komplexe oder auf die Einschränkung der anschließenden DNA-Reparaturwege zurückzuführen sind. Etoposidinduzierte DSBs weisen eine kovalente Verknüpfung der TopoII am 5'-Ende der Bruchenden auf (Wang 1996). Der erste Schritt der Reparatur solcher DNA-Schäden besteht in der Entfernung dieser Strukturen vom Bruchende des DSBs. Dies geschieht durch nukleolytische Spaltung der DNA, was in der Freisetzung der TopoII sowie eines kurzen DNA-Fragments resultiert (Connelly & Leach 2004). Der Reparaturdefekt von MRN-defizienten Zellen nach Etoposidbehandlung zeigt, dass der MRN-Komplex neben seiner Reparaturfunktion für die Auflösung von kovalent verknüpften DNA-Protein-Komplexen von Bedeutung ist. Dies wird durch Studien in verschiedenen Spezies bestätigt. In *S. pombe* konnte die Beteiligung der Nukleaseaktivität des Mre11-Homologs Rad32 an der Auflösung der TopoII-DNA-Derivate gezeigt werden (Hartsuiker et al. 2009). Bei der Replikation des Bakteriophagen T4 auftretende kovalent verknüpfte DNA-TopoII-Komplexe werden durch Homologe von Rad50 und Mre11 (gp46/gp47-Komplex) entfernt (Stohr & Kreuzer 2001). Zudem gibt es Hinweise, dass der MRN-Komplex an der Auflösung anderer kovalent verknüpfter Protein-DNA-Komplexe beteiligt ist. In *E. coli* entfernt das MRN-Homolog SbcCD kovalent gebundene Proteine durch Einführung eines DSBs vom Ende eines DNA-Duplex (Connelly et al. 2003). In *S. cerevisiae* konnte die Beteiligung des MRN- bzw. MRX-Komplexes an der Reparatur von DSBs mit kovalent verknüpftem Spo11, das mit der Initiation der meiotischen Rekombination in Verbindung gebracht wird, gezeigt werden (Neale et al. 2005). In Säugern konnte eine weitere wichtige Funktion des MRN-Komplexes, die mit der Entfernung von kovalenten Protein-DNA-Komplexen zusammenhängt, identifiziert werden. Adenoviren nutzen die Transkriptionsmaschinerie der Wirtszelle zur Replikation des Virusgenoms. Dabei sind die Enden der einzelnen Genomeinheiten durch kovalent verknüpfte terminale Proteineinheiten (*precursor polypeptide*, pTP) geschützt (de Vries et al. 1989). Durch Abwehrmechanismen der Wirtszelle wird die E4-Region des Virus entfernt. Es kommt zur Ausbildung langer DNA-Stränge aus vielen, hintereinanderliegenden Virusgenomeinheiten (*concatemere*), die nicht mehr verpackt werden können (Weiden & Ginsberg 1994). Es konnte gezeigt werden, dass die Bildung von *concatemeres* durch Entfernung des schützenden pTPs vom Ende des Virusgenoms ausgelöst wird. An diesem Prozess ist die durch Mre11

vermittelte Nukleaseaktivität des MRN-Komplexes maßgeblich beteiligt (Stracker et al. 2002). Die nun freien Enden der Virusgenomeinheiten werden als DNA-Schaden erkannt und durch NHEJ verknüpft.

Zur weiteren Untersuchung der Bedeutung des MRN-Komplexes für die Reparatur dieser speziellen Läsionen wurde das Reparaturvermögen von humanen Fibroblasten mit Defizienzen in Komponenten des MRN-Komplexes sowie von ATM- und Artemis-defiziente Zellen nach der Behandlung mit IR bzw. Etoposid charakterisiert. Defekte in der MRN-Komponente NBS1 führen zu einer Beeinträchtigung der Reparaturkapazität von IR-induzierten DNA-Schäden (Abb. 5.33A). Der resultierende Reparaturdefekt gleicht in Ausmaß und Verlauf der Kinetik dem von ATM- bzw. Artemis-defizienten Zellen. Dieser Effekt kann dadurch erklärt werden, dass NBS1 und damit der MRN-Komplex an der Aktivierung von ATM beteiligt sein könnte (Dupre et al. 2006). Allerdings ist der genaue Ablauf der Aktivierung von ATM unklar. Es gibt zumindest Hinweise, dass ATM nach der Erkennung der Chromatinveränderung an der Bruchstelle durch Autophosphorylierung aktiv wird und die DNA-Schadensantwort in Gang setzt (Bakkenist & Kastan 2003). Somit deutet die Ausbildung eines identischen Reparaturdefekts auf eine mechanistische Beziehung zwischen ATM und dem MRN-Komplex hin. Es konnte gezeigt werden, dass der MRN-Komplex zusammen mit anderen Mediatorproteinen wie MDC1 oder 53bp1 an der Ausbildung einer Reparaturplattform an der Schadensstelle teilnimmt (van Attikum & Gasser 2009). ATM wird gebunden, bleibt an der Schadensstelle lokalisiert und phosphoryliert weitere Interaktionspartner. So kann das Schadenssignal amplifiziert und weitergeleitet werden.

Die in Kapitel 6.2.6 beschriebene Modellvorstellung bringt ATM mit der Reparatur von heterochromatinassoziierten DSBs in Verbindung. Dabei wird die ATM-vermittelte Relaxierung des Chromatins durch Phosphorylierung des Chromatin-Organisators KAP-1 initiiert (Ziv et al. 2006, Goodarzi et al. 2008). Die MRN-vermittelte Ausbildung von Reparaturplattformen ist insbesondere bei der Reparatur dieser DNA-Schäden wichtig. Vermutlich wird nur bei am Schadensort immobilisiertem ATM ein ausreichend starkes Signal in Form von phosphoryliertem KAP-1 gebildet. Ohne funktionalen MRN-Komplex kann keine Plattform gebildet werden, ATM wird nicht an der Schadensstelle gebunden und entfernt sich durch Diffusion vom Schadensort. Möglicherweise genügt die durch frei bewegliches ATM phosphorylierte Menge an KAP-1 nicht, um eine ausreichende Relaxierung der Chromatinstruktur durchzuführen. Heterochromatinassoziierte DSBs können somit nicht repariert werden.

Die Bedeutung von ATM für die Reparatur etoposidinduzierter DNA-Schäden ist deutlich geringer (vergleiche Kapitel 6.2.7). Allerdings zeigen Zellen mit Defizienzen in Mre11 sowie NBS1 einen deutlichen Reparaturdefekt (Abb. 5.33B). Defekte in Kernkomponenten des NHEJ führen zu einem massiven Reparaturdefekt, der den Defekt von MRN-Mutanten übertrifft

(Abb. 5.33B). Dieses Ergebnis bestätigt die Beteiligung des MRN-Komplexes an der Reparatur von kovalent verknüpften Protein-DNA-Komplexen. Allerdings wird der MRN-Komplex nur für die Reparatur einer Subpopulation der etoposidinduzierten DSBs benötigt. Die Auflösung von DNA-Topoll-Komplexen könnte auch von anderen Nukleasen durchgeführt werden. DNA-Schäden, die eine kovalente Verknüpfung mit Topol aufweisen, werden durch Hydrolyse der Tyrosin-Phosphodiesterbindung repariert (Pouliot et al. 1999). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass vergleichbare Mechanismen für kovalent verknüpfte Topoll-DNA-Komplexe existieren, die an der Reparatur etoposidinduzierter DNA-Schäden beteiligt sind.

### **6.3.2. Überprüfung der Spezifität der reduzierten Reparaturkapazität von MRN-Mutanten durch Vorbehandlung mit dem katalytischen Topoll-Inhibitor Aclarubicin**

Um zu überprüfen, ob die unterschiedliche Reparaturkapazität der untersuchten Zelllinien auf die durch Etoposidbehandlung entstehenden Schäden zurückzuführen ist, wurde eine Vorbehandlung mit einem Topoll-Inhibitor durchgeführt. Während Topoisomerasegifte wie Etoposid das Enzym durch Stabilisierung eines Intermediatzustandes in ein cytotoxisches Agens verwandeln und die Ausbildung von DNA-Schäden induzieren, unterbinden Topoisomeraseinhibitoren die Interaktion zwischen Enzym und DNA (Nitiss et al. 1997). Durch diese Vorbehandlung wird die Ausbildung von etoposidinduzierten DNA-Schäden bei WT-Zellen und Mre11-defizienten Zellen verhindert (Abb. 5.34). Dies beweist die Spezifität der in Abb. 5.33 gezeigten Ergebnisse.

Das Anthracyclin Aclarubicin (Aclacinomycin A) wirkt als katalytischer Inhibitor und bindet an die DNA (Jensen et al. 1990). Aclarubicin wirkt somit *upstream* von Etoposid, die Kontaktaufnahme des Enzyms mit der DNA wird verhindert und es kommt nicht zur Ausbildung eines *cleavage complex*, der von Etoposid unter Ausbildung von DNA-Schäden stabilisiert werden kann. Diese antagonistische Wirkung von Topoll-Inhibitoren wie Aclarubicin und Topoll-Giften wie Etoposid konnte bereits gezeigt werden (Jensen et al. 1990, Tanabe et al. 1991). Dieses Kontrollexperiment bestätigt die Beteiligung des MRN-Komplexes an der Reparatur von etoposidinduzierten DNA-Protein-Komplexen.

### **6.3.3. Ausblick**

CtIP ist ein Interaktionspartner des MRN-Komplexes, der die Endonukleaseaktivität von Mre11 steigert (Sartori et al. 2007). Beide sind an der Resektion von freien DSB-Enden in der Homologen Rekombination beteiligt (Limbo et al. 2007, Sartori et al. 2007). Ctp1, das *S. pombe*-Homolog zu CtIP, ist ebenfalls an der Entfernung von Topoll-DNA-Komplexen beteiligt (Hartsuiker et al. 2009a). Außerdem werden auch kovalente Protein-DNA-Komplexe mit dem Spo11-Homolog Rec12, die im Zusammenhang mit der Initiation der meiotischen

Rekombination in *S. cerevisiae* auftreten (Keeney et al. 1997), nur in Anwesenheit von Ctp1 aufgelöst (Hartsuiker et al. 2009b). Dies legt nahe, dass CtIP auch in Säugern an der Reparatur von Protein-DNA-Komplexen insbesondere nach Etoposidbehandlung beteiligt ist. Eine Möglichkeit, diese Frage zu klären, besteht in der Untersuchung der Reparaturkapazität von etoposidinduzierten DNA-Schäden nach siRNA-vermittelter Herunterregulation von CtIP. Die siRNA-Technik bietet hier auch die Möglichkeit, die gezeigten Ergebnisse, die in primären humanen Fibroblasten mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund sowie bei teilweise vorhandener Restaktivität des betreffenden Proteins gewonnen wurden, durch gezielte Herunterregulation des gewünschten Proteins vor genetisch einheitlichem Hintergrund zu bestätigen.

Die Beseitigung von kovalent verknüpften Protein-DNA-Strukturen ist für die Erhaltung der genomischen Integrität von großer Wichtigkeit. So können DNA-Schäden, die beispielsweise durch Kollision mit Replikationsgabeln entstehen, vermieden werden. Vorhandene DSBs werden allerdings von der gebundenen Proteinkomponente verdeckt, was die Reparatur behindert. Die weitere Charakterisierung der Rolle des MRN-Komplexes bei der Auflösung dieser DNA-Läsionen bietet Einblick in einen Vorgang, der die Reparatur eines nicht frei zugänglichen DSBs durch die bekannten Reparaturmechanismen ermöglicht.

## 7. Literaturverzeichnis

Abraham,R.T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* 15, 2177-2196.

Abraham,R.T. (2004). PI 3-kinase related kinases: 'big' players in stress-induced signaling pathways. *DNA Repair (Amst)* 3, 883-887.

Adachi,N., Iizumi,S., So,S., and Koyama,H. (2004). Genetic evidence for involvement of two distinct nonhomologous end-joining pathways in repair of topoisomerase II-mediated DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318, 856-861.

Adachi,N., Suzuki,H., Iizumi,S., and 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, 35897-35902.

Adachi,Y., Luke,M., and Laemmli,U.K. (1991). Chromosome assembly in vitro: topoisomerase II is required for condensation. *Cell* 64, 137-148.

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

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) *Molecular biology of the cell.* Taylor & Francis, New York

Arnold,K., Kim,M.K., Frerk,K., Edler,L., Savelyeva,L., Schmezer,P., and Wiedemeyer,R. (2006). Lower level of BRCA2 protein in heterozygous mutation carriers is correlated with an increase in DNA double strand breaks and an impaired DSB repair. *Cancer Lett.* 243, 90-100.

Assenmacher,N. and Hopfner,K.P. (2004). MRE11/RAD50/NBS1: complex activities. *Chromosoma* 113, 157-166.

Aylon,Y. and Kupiec,M. (2004). New insights into the mechanism of homologous recombination in yeast. *Mutat. Res.* 566, 231-248.

Baird,C.L., Harkins,T.T., Morris,S.K., and Lindsley,J.E. (1999). Topoisomerase II drives DNA transport by hydrolyzing one ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 13685-13690.

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

Baria,K., Warren,C., Roberts,S.A., West,C.M., Evans,D.G., Varley,J.M., and Scott,D. (2001). Correspondence re: A. Rothfuss et al., Induced micronucleus frequencies in peripheral blood lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 mutation in breast cancer families. *Cancer Res.*, 60: 390-394, 2000. *Cancer Res.* 61, 5948-5949.

Baumann,P., Benson,F.E., and West,S.C. (1996). Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell* 87, 757-766.

Becker,E., Meyer,V., Madaoui,H., and Guerois,R. (2006). Detection of a tandem BRCT in NBS1 and Xrs2 with functional implications in the DNA damage response. *Bioinformatics.* 22, 1289-1292.

Bekker-Jensen,S., Lukas,C., Kitagawa,R., Melander,F., Kastan,M.B., Bartek,J., and Lukas,J. (2006). Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J. Cell Biol.* 173, 195-206.

Berger, J.M., Gamblin, S.J., Harrison, S.C., and Wang, J.C. (1996). Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature* 379, 225-232.

Bjergbaek, L., Kingma, P., Nielsen, I.S., Wang, Y., Westergaard, O., Osheroff, N., and Andersen, A.H. (2000). Communication between the ATPase and cleavage/religation domains of human topoisomerase IIalpha. *J. Biol. Chem.* 275, 13041-13048.

Bork, P., Blomberg, N., and Nilges, M. (1996). Internal repeats in the BRCA2 protein sequence. *Nat. Genet.* 13, 22-23.

Bosotti, R., Isacchi, A., and Sonnhammer, E.L. (2000). FAT: a novel domain in PIK-related kinases. *Trends Biochem. Sci.* 25, 225-227.

Bradley, M.O. and Kohn, K.W. (1979). X-ray induced DNA double strand break production and repair in mammalian cells as measured by neutral filter elution. *Nucleic Acids Res.* 7, 793-804.

Breen, A.P. and Murphy, J.A. (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 1033-1077.

Brody, L.C. and Biesecker, B.B. (1998). Breast cancer susceptibility genes. BRCA1 and BRCA2. *Medicine (Baltimore)* 77, 208-226.

Brzovic, P.S., Rajagopal, P., Hoyt, D.W., King, M.C., and Klevit, R.E. (2001). Structure of a BRCA1-BARD1 heterodimeric RING-RING complex. *Nat. Struct. Biol.* 8, 833-837.

Buchholz, T.A., Wu, X., Hussain, A., Tucker, S.L., Mills, G.B., Haffty, B., Bergh, S., Story, M., Geara, F.B., and Brock, W.A. (2002). Evidence of haplotype insufficiency in human cells containing a germline mutation in BRCA1 or BRCA2. *Int. J. Cancer* 97, 557-561.

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

Buhler, M. and Moazed, D. (2007). Transcription and RNAi in heterochromatic gene silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 1041-1048.

Burden, D.A. and Osheroff, N. (1998). Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 1400, 139-154.

Burden, D.A., Kingma, P.S., Froelich-Ammon, S.J., Bjornsti, M.A., Patchan, M.W., Thompson, R.B., and Osheroff, N. (1996). Topoisomerase II. etoposide interactions direct the formation of drug-induced enzyme-DNA cleavage complexes. *J. Biol. Chem.* 271, 29238-29244.

Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J.P., Ravanat, J.L., and Sauvaigo, S. (1999). Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat. Res.* 424, 9-21.

Cadet, J., D'Ham, C., Douki, T., Pouget, J.P., Ravanat, J.L., and Sauvaigo, S. (1998). Facts and artifacts in the measurement of oxidative base damage to DNA. *Free Radic. Res.* 29, 541-550.

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

- Cerosaletti, K.M. and Concannon, P. (2003). Nibrin forkhead-associated domain and breast cancer C-terminal domain are both required for nuclear focus formation and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 278, 21944-21951.
- Chapman, M.S. and Verma, I.M. (1996). Transcriptional activation by BRCA1. *Nature* 382, 678-679.
- Chen, B.P., Uematsu, N., Kobayashi, J., Lerenthal, Y., Krempler, A., Yajima, H., Lobrich, M., Shiloh, Y., and Chen, D.J. (2007). Ataxia telangiectasia mutated (ATM) is essential for DNA-PKcs phosphorylations at the Thr-2609 cluster upon DNA double strand break. *J. Biol. Chem.* 282, 6582-6587.
- Chen, G., Yuan, S.S., Liu, W., Xu, Y., Trujillo, K., Song, B., Cong, F., Goff, S.P., Wu, Y., Arlinghaus, R., Baltimore, D., Gasser, P.J., Park, M.S., Sung, P., and Lee, E.Y. (1999). Radiation-induced assembly of Rad51 and Rad52 recombination complex requires ATM and c-Abl. *J. Biol. Chem.* 274, 12748-12752.
- Cheng, K.C., Cahill, D.S., Kasai, H., Nishimura, S., and Loeb, L.A. (1992). 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. *J. Biol. Chem.* 267, 166-172.
- Classen, S., Olland, S., and Berger, J.M. (2003). Structure of the topoisomerase II ATPase region and its mechanism of inhibition by the chemotherapeutic agent ICRF-187. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 10629-10634.
- Connelly, J.C. and Leach, D.R. (2004). Repair of DNA covalently linked to protein. *Mol. Cell* 13, 307-316.
- Connelly, J.C., de Leau, E.S., and Leach, D.R. (2003). Nucleolytic processing of a protein-bound DNA end by the E. coli SbcCD (MR) complex. *DNA Repair (Amst)* 2, 795-807.
- Constantinou, A., Tarsounas, M., Karow, J.K., Brosh, R.M., Bohr, V.A., Hickson, I.D., and West, S.C. (2000). Werner's syndrome protein (WRN) migrates Holliday junctions and co-localizes with RPA upon replication arrest. *EMBO Rep.* 1, 80-84.
- Corbett, A.H., Hong, D., and Osheroff, N. (1993). Exploiting mechanistic differences between drug classes to define functional drug interaction domains on topoisomerase II. Evidence that several diverse DNA cleavage-enhancing agents share a common site of action on the enzyme. *J. Biol. Chem.* 268, 14394-14398.
- Cornforth, M.N. and Bedford, J.S. (1985). On the nature of a defect in cells from individuals with ataxia-telangiectasia. *Science* 227, 1589-1591.
- Cortez, D., Wang, Y., Qin, J., and Elledge, S.J. (1999). Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* 286, 1162-1166.
- Craig, J.M. (2005). Heterochromatin--many flavours, common themes. *Bioessays* 27, 17-28.
- Crenshaw, D.G. and Hsieh, T. (1993). Function of the hydrophilic carboxyl terminus of type II DNA topoisomerase from *Drosophila melanogaster*. II. In vivo studies. *J. Biol. Chem.* 268, 21335-21343.
- Dahm-Daphi, J., Sass, C., and Alberti, W. (2000). Comparison of biological effects of DNA damage induced by ionizing radiation and hydrogen peroxide in CHO cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 76, 67-75.

- Davies, O.R. and Pellegrini, L. (2007). Interaction with the BRCA2 C terminus protects RAD51-DNA filaments from disassembly by BRC repeats. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 475-483.
- de Jager, M., Dronkert, M.L., Modesti, M., Beerens, C.E., Kanaar, R., and van Gent, D.C. (2001). DNA-binding and strand-annealing activities of human Mre11: implications for its roles in DNA double-strand break repair pathways. *Nucleic Acids Res.* **29**, 1317-1325.
- de Jager, M., van Noort, J., van Gent, D.C., Dekker, C., Kanaar, R., and Wyman, C. (2001). Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol. Cell* **8**, 1129-1135.
- de Vries, E., van Driel, W., Bergsma, W.G., Arnberg, A.C., and van der Vliet, P.C. (1989). HeLa nuclear protein recognizing DNA termini and translocating on DNA forming a regular DNA-multimeric protein complex. *J. Mol. Biol.* **208**, 65-78.
- Deckbar, D., Birraux, J., Krempler, A., Tchouandong, L., Beucher, A., Walker, S., Stiff, T., Jeggo, P., and Lobrich, M. (2007). Chromosome breakage after G2 checkpoint release. *J. Cell Biol.* **176**, 749-755.
- DeFazio, L.G., Stansel, R.M., Griffith, J.D., and Chu, G. (2002). Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO J.* **21**, 3192-3200.
- Demple, B. and Linn, S. (1982). 5,6-Saturated thymine lesions in DNA: production by ultraviolet light or hydrogen peroxide. *Nucleic Acids Res.* **10**, 3781-3789.
- Digweed, M. and Sperling, K. (2004). Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* **3**, 1207-1217.
- Dimitri, P., Corradini, N., Rossi, F., and Verni, F. (2005). The paradox of functional heterochromatin. *Bioessays* **27**, 29-41.
- Dizdaroglu, M., Dirksen, M.L., Jiang, H.X., and Robbins, J.H. (1987). Ionizing-radiation-induced damage in the DNA of cultured human cells. Identification of 8,5-cyclo-2-deoxyguanosine. *Biochem. J.* **241**, 929-932.
- Dong, K.C. and Berger, J.M. (2007). Structural basis for gate-DNA recognition and bending by type IIA topoisomerases. *Nature* **450**, 1201-1205.
- Downs, J.A. (2007). Chromatin structure and DNA double-strand break responses in cancer progression and therapy. *Oncogene* **26**, 7765-7772.
- Downs, J.A., Nussenzweig, M.C., and Nussenzweig, A. (2007). Chromatin dynamics and the preservation of genetic information. *Nature* **447**, 951-958.
- Duell, T., Lengfelder, E., Fink, R., Giesen, R., and Bauchinger, M. (1995). Effect of activated oxygen species in human lymphocytes. *Mutat. Res.* **336**, 29-38.
- Dupre, A., Boyer-Chatenet, L., and Gautier, J. (2006). Two-step activation of ATM by DNA and the Mre11-Rad50-NBS1 complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 451-457.
- Durante, M., Furusawa, Y., and Gotoh, E. (1998). A simple method for simultaneous interphase-metaphase chromosome analysis in biodosimetry. *Int. J. Radiat. Biol.* **74**, 457-462.
- Esashi, F., Galkin, V.E., Yu, X., Egelman, E.H., and West, S.C. (2007). Stabilization of RAD51 nucleoprotein filaments by the C-terminal region of BRCA2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 468-474.
- Fass, D., Bogden, C.E., and Berger, J.M. (1999). Quaternary changes in topoisomerase II may direct orthogonal movement of two DNA strands. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 322-326.

- Fisher, A.E., Hochegger, H., Takeda, S., and Caldecott, K.W. (2007). Poly(ADP-ribose) polymerase 1 accelerates single-strand break repair in concert with poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Mol. Cell Biol.* 27, 5597-5605.
- Foray, N., Randrianarison, V., Marot, D., Perricaudet, M., Lenoir, G., and Feunteun, J. (1999). Gamma-rays-induced death of human cells carrying mutations of BRCA1 or BRCA2. *Oncogene* 18, 7334-7342.
- Ford, K., Marcus, E., and Lum, B. (1999). Breast cancer screening, diagnosis, and treatment. *Dis. Mon.* 45, 333-405.
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RD, Schultz RA, Ellenberger T (2006). DNA repair and mutagenesis. ASM Press, Washington, D.C.
- Friedberg, E.C., Aguilera, A., Gellert, M., Hanawalt, P.C., Hays, J.B., Lehmann, A.R., Lindahl, T., Lowndes, N., Sarasin, A., and Wood, R.D. (2006). DNA repair: from molecular mechanism to human disease. *DNA Repair (Amst)* 5, 986-996.
- Germe, T. and Hyrien, O. (2005). Topoisomerase II-DNA complexes trapped by ICRF-193 perturb chromatin structure. *EMBO Rep.* 6, 729-735.
- Goodarzi, A.A., Noon, A.T., Deckbar, D., Ziv, Y., Shiloh, Y., Lohr, M., and Jeggo, P.A. (2008). ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol. Cell* 31, 167-177.
- Goodarzi, A.A., Yu, Y., Riballo, E., Douglas, P., Walker, S.A., Ye, R., Harer, C., Marchetti, C., Morrice, N., Jeggo, P.A., and Lees-Miller, S.P. (2006). DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *EMBO J.* 25, 3880-3889.
- Goodhead, D.T. (1994). Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA. *Int. J. Radiat. Biol.* 65, 7-17.
- Gotoh, E. and Durante, M. (2006). Chromosome condensation outside of mitosis: mechanisms and new tools. *J. Cell Physiol* 209, 297-304.
- Gottlieb, T.M. and Jackson, S.P. (1993). The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* 72, 131-142.
- Gravel, S., Chapman, J.R., Magill, C., and Jackson, S.P. (2008). DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. *Genes Dev.* 22, 2767-2772.
- Guenther, M.G., Levine, S.S., Boyer, L.A., Jaenisch, R., and Young, R.A. (2007). A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* 130, 77-88.
- Gupta, R.C., Bazemore, L.R., Golub, E.I., and Radding, C.M. (1997). Activities of human recombination protein Rad51. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 463-468.
- Hall EJ, Giaccia AJ (2006) Radiobiology for the Radiologist. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
- Harkins, T.T., Lewis, T.J., and Lindsley, J.E. (1998). Pre-steady-state analysis of ATP hydrolysis by *Saccharomyces cerevisiae* DNA topoisomerase II. 2. Kinetic mechanism for the sequential hydrolysis of two ATP. *Biochemistry* 37, 7299-7312.
- Harper, J.V. (2005). Synchronization of cell populations in G1/S and G2/M phases of the cell cycle. *Methods Mol. Biol.* 296, 157-166.

- Hartsuiker,E., Mizuno,K., Molnar,M., Kohli,J., Ohta,K., and Carr,A.M. (2009). Ctp1CtIP and Rad32Mre11 nuclease activity are required for Rec12Spo11 removal, but Rec12Spo11 removal is dispensable for other MRN-dependent meiotic functions. *Mol. Cell Biol.* **29**, 1671-1681.
- Hartsuiker,E., Neale,M.J., and Carr,A.M. (2009). Distinct requirements for the Rad32(Mre11) nuclease and Ctp1(CtIP) in the removal of covalently bound topoisomerase I and II from DNA. *Mol. Cell* **33**, 117-123.
- Hashizume,R., Fukuda,M., Maeda,I., Nishikawa,H., Oyake,D., Yabuki,Y., Ogata,H., and Ohta,T. (2001). The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *J. Biol. Chem.* **276**, 14537-14540.
- Henner,W.D., Grunberg,S.M., and Haseltine,W.A. (1983). Enzyme action at 3' termini of ionizing radiation-induced DNA strand breaks. *J. Biol. Chem.* **258**, 15198-15205.
- Hill,M.A., Stevens,D.L., Stuart Townsend,K.M., and Goodhead,D.T. (2001). Comments on the recently reported low biological effectiveness of ultrasoft X rays. *Radiat. Res.* **155**, 503-510.
- Hoeijmakers,J.H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* **411**, 366-374.
- Howlett,N.G., Taniguchi,T., Olson,S., Cox,B., Waisfisz,Q., Die-Smulders,C., Persky,N., Grompe,M., Joenje,H., Pals,G., Ikeda,H., Fox,E.A., and D'Andrea,A.D. (2002). Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* **297**, 606-609.
- Huertas,P., Cortes-Ledesma,F., Sartori,A.A., Aguilera,A., and Jackson,S.P. (2008). CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination. *Nature* **455**, 689-692.
- Huyen,Y., Zgheib,O., Ditullio,R.A., Jr., Gorgoulis,V.G., Zacharatos,P., Petty,T.J., Sheston,E.A., Mellert,H.S., Stavridi,E.S., and Halazonetis,T.D. (2004). Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. *Nature* **432**, 406-411.
- Jackson,S.P. (2002). Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* **23**, 687-696.
- Jeggo,P.A. (1998). Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiat. Res.* **150**, S80-S91.
- Jeggo,P.A. and Lobrich,M. (2005). Artemis links ATM to double strand break rejoining. *Cell Cycle* **4**, 359-362.
- Jensen,P.B., Sorensen,B.S., Demant,E.J., Sehested,M., Jensen,P.S., Vindelov,L., and Hansen,H.H. (1990). Antagonistic effect of aclarubicin on the cytotoxicity of etoposide and 4'-(9-acridinylamino)methanesulfon-m-anisidide in human small cell lung cancer cell lines and on topoisomerase II-mediated DNA cleavage. *Cancer Res.* **50**, 3311-3316.
- Johnson,R.D. and Jasin,M. (2000). Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *EMBO J.* **19**, 3398-3407.
- Johnson,R.D. and Jasin,M. (2001). Double-strand-break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 196-201.
- Kampranis,S.C., Bates,A.D., and Maxwell,A. (1999). A model for the mechanism of strand passage by DNA gyrase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 8414-8419.

Kao,G.D., McKenna,W.G., and Yen,T.J. (2001). Detection of repair activity during the DNA damage-induced G2 delay in human cancer cells. *Oncogene* 20, 3486-3496.

Karmakar,P., Seki,M., Kanamori,M., Hashiguchi,K., Ohtsuki,M., Murata,E., Inoue,E., Tada,S., Lan,L., Yasui,A., and Enomoto,T. (2006). BLM is an early responder to DNA double-strand breaks. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348, 62-69.

Kaufmann GW, Moser E, Sauer R (2001) Radiologie. Urban & Fischer Verlag, München

Keeney,S., Giroux,C.N., and Kleckner,N. (1997). Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* 88, 375-384.

Kegel,P., Riballo,E., Kuhne,M., Jeggo,P.A., and Lobrich,M. (2007). X-irradiation of cells on glass slides has a dose doubling impact. *DNA Repair (Amst)* 6, 1692-1697.

Khanna,K.K. and Jackson,S.P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat. Genet.* 27, 247-254.

Kiefer J, Kiefer I (2003) Allgemeine Radiologie, Strahlenanwendung – Strahlenwirkung - Strahlenschutz. Blackwell Verlag, Berlin

Kim,H., Chen,J., and Yu,X. (2007). Ubiquitin-binding protein RAP80 mediates BRCA1-dependent DNA damage response. *Science* 316, 1202-1205.

Kim,J.E., Minter-Dykhouse,K., and Chen,J. (2006). Signaling networks controlled by the MRN complex and MDC1 during early DNA damage responses. *Mol. Carcinog.* 45, 403-408.

Kinner,A., Wu,W., Staudt,C., and Iliakis,G. (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res.* 36, 5678-5694.

Kinoshita,N., Yamano,H., Niwa,H., Yoshida,T., and Yanagida,M. (1993). Negative regulation of mitosis by the fission yeast protein phosphatase ppa2. *Genes Dev.* 7, 1059-1071.

Kirshner,M., Rathavs,M., Nizan,A., Essers,J., Kanaar,R., Shiloh,Y., and Barzilai,A. (2009). Analysis of the relationships between ATM and the Rad54 paralogs involved in homologous recombination repair. *DNA Repair (Amst)* 8, 253-261.

Kobayashi,J., Tauchi,H., Sakamoto,S., Nakamura,A., Morishima,K., Matsuura,S., Kobayashi,T., Tamai,K., Tanimoto,K., and Komatsu,K. (2002). NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain. *Curr. Biol.* 12, 1846-1851.

Kruger,I., Rothkamm,K., and Lobrich,M. (2004). Enhanced fidelity for rejoining radiation-induced DNA double-strand breaks in the G2 phase of Chinese hamster ovary cells. *Nucleic Acids Res.* 32, 2677-2684.

Kruger,L., Demuth,I., Neitzel,H., Varon,R., Sperling,K., Chrzanowska,K.H., Seemanova,E., and Digweed,M. (2007). Cancer incidence in Nijmegen breakage syndrome is modulated by the amount of a variant NBS protein. *Carcinogenesis* 28, 107-111.

Kruhlak,M.J., Celeste,A., Dellaire,G., Fernandez-Capetillo,O., Muller,W.G., McNally,J.G., Bazett-Jones,D.P., and Nussenzweig,A. (2006). Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J. Cell Biol.* 172, 823-834.

Kuhne,M., Riballo,E., Rief,N., Rothkamm,K., Jeggo,P.A., and Lobrich,M. (2004). A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity. *Cancer Res.* 64, 500-508.

Kumagai,A. and Dunphy,W.G. (1992). Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts. *Cell* 70, 139-151.

Kurose,A., Tanaka,T., Huang,X., Traganos,F., and Darzynkiewicz,Z. (2006). Synchronization in the cell cycle by inhibitors of DNA replication induces histone H2AX phosphorylation: an indication of DNA damage. *Cell Prolif.* 39, 231-240.

Lavin,M.F. (2007). ATM and the Mre11 complex combine to recognize and signal DNA double-strand breaks. *Oncogene* 26, 7749-7758.

Lavin,M.F. and Khanna,K.K. (1999). ATM: the protein encoded by the gene mutated in the radiosensitive syndrome ataxia-telangiectasia. *Int. J. Radiat. Biol.* 75, 1201-1214.

le Deist,F., Poinsignon,C., Moshous,D., Fischer,A., and de Villartay,J.P. (2004). Artemis sheds new light on V(D)J recombination. *Immunol. Rev.* 200, 142-155.

Lee,J.S., Collins,K.M., Brown,A.L., Lee,C.H., and Chung,J.H. (2000). hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature* 404, 201-204.

Lengsfeld,B.M., Rattray,A.J., Bhaskara,V., Ghirlando,R., and Paull,T.T. (2007). Sae2 is an endonuclease that processes hairpin DNA cooperatively with the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. *Mol. Cell* 28, 638-651.

Li,L. and Zou,L. (2005). Sensing, signaling, and responding to DNA damage: organization of the checkpoint pathways in mammalian cells. *J. Cell Biochem.* 94, 298-306.

Liang,F., Han,M., Romanienko,P.J., and Jasin,M. (1998). Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 5172-5177.

Liao,H., Winkfein,R.J., Mack,G., Rattner,J.B., and Yen,T.J. (1995). CENP-F is a protein of the nuclear matrix that assembles onto kinetochores at late G2 and is rapidly degraded after mitosis. *J. Cell Biol.* 130, 507-518.

Limbo,O., Chahwan,C., Yamada,Y., de Bruin,R.A., Wittenberg,C., and Russell,P. (2007). Ctp1 is a cell-cycle-regulated protein that functions with Mre11 complex to control double-strand break repair by homologous recombination. *Mol. Cell* 28, 134-146.

Liu,L.F., Rowe,T.C., Yang,L., Tewey,K.M., and Chen,G.L. (1983). Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II. *J. Biol. Chem.* 258, 15365-15370.

Liu,S.Y., Hwang,B.D., Liu,Z.C., and Cheng,Y.C. (1989). Interaction of several nucleoside triphosphate analogues and 10-hydroxycamptothecin with human DNA topoisomerases. *Cancer Res.* 49, 1366-1370.

Lobrich,M. and Jeggo,P.A. (2005). Harmonising the response to DSBs: a new string in the ATM bow. *DNA Repair (Amst)* 4, 749-759.

Lobrich,M., Ikpeme,S., Haub,P., Weber,K.J., and Kiefer,J. (1993). DNA double-strand break induction in yeast by X-rays and alpha-particles measured by pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Radiat. Biol.* 64, 539-546.

Lobrich,M., Kuhne,M., Wetzel,J., and Rothkamm,K. (2000). Joining of correct and incorrect DNA double-strand break ends in normal human and ataxia telangiectasia fibroblasts. *Genes Chromosomes. Cancer* 27, 59-68.

- Lobrich, M., Rydberg, B., and Cooper, P.K. (1995). Repair of x-ray-induced DNA double-strand breaks in specific Not I restriction fragments in human fibroblasts: joining of correct and incorrect ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 12050-12054.
- Ma, Y., Lu, H., Schwarz, K., and Lieber, M.R. (2005). Repair of double-strand DNA breaks by the human nonhomologous DNA end joining pathway: the iterative processing model. *Cell Cycle* 4, 1193-1200.
- Ma, Y., Pannicke, U., Lu, H., Niewolik, D., Schwarz, K., and Lieber, M.R. (2005). The DNA-dependent protein kinase catalytic subunit phosphorylation sites in human Artemis. *J. Biol. Chem.* 280, 33839-33846.
- 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.
- Ma, Y., Schwarz, K., and Lieber, M.R. (2005). The Artemis:DNA-PKcs endonuclease cleaves DNA loops, flaps, and gaps. *DNA Repair (Amst)* 4, 845-851.
- Malik, M. and Nitiss, J.L. (2004). DNA repair functions that control sensitivity to topoisomerase-targeting drugs. *Eukaryot. Cell* 3, 82-90.
- Maller, J., Gautier, J., Langan, T.A., Lohka, M.J., Shenoy, S., Shalloway, D., and Nurse, P. (1989). Maturation-promoting factor and the regulation of the cell cycle. *J. Cell Sci. Suppl* 12, 53-63.
- Manke, I.A., Lowery, D.M., Nguyen, A., and Yaffe, M.B. (2003). BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting. *Science* 302, 636-639.
- Mari, P.O., Florea, B.I., Persengiev, S.P., Verkaik, N.S., Bruggenwirth, H.T., Modesti, M., Giglia-Mari, G., Bezstarosti, K., Demmers, J.A., Luider, T.M., Houtsmuller, A.B., and van Gent, D.C. (2006). Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 18597-18602.
- Marmorstein, L.Y., Ouchi, T., and Aaronson, S.A. (1998). The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 13869-13874.
- Marnett, L.J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21, 361-370.
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., III, Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., Shiloh, Y., Gygi, S.P., and Elledge, S.J. (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316, 1160-1166.
- Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K., and Elledge, S.J. (2000). Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 10389-10394.
- Meek, K., Douglas, P., Cui, X., Ding, Q., and Lees-Miller, S.P. (2007). trans Autophosphorylation at DNA-dependent protein kinase's two major autophosphorylation site clusters facilitates end processing but not end joining. *Mol. Cell Biol.* 27, 3881-3890.
- Meyn, M.S. (1997). Chromosome instability syndromes: lessons for carcinogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 221, 71-148.
- Miake-Lye, R. and Kirschner, M.W. (1985). Induction of early mitotic events in a cell-free system. *Cell* 41, 165-175.

Miki,Y., Swensen,J., Shattuck-Eidens,D., Futreal,P.A., Harshman,K., Tavtigian,S., Liu,Q., Cochran,C., Bennett,L.M., Ding,W., and . (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266, 66-71.

Mimitou,E.P. and Symington,L.S. (2008). Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* 455, 770-774.

Mirzayans,R., Severin,D., and Murray,D. (2006). Relationship between DNA double-strand break rejoining and cell survival after exposure to ionizing radiation in human fibroblast strains with differing ATM/p53 status: implications for evaluation of clinical radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 66, 1498-1505.

Mizuta,R., LaSalle,J.M., Cheng,H.L., Shinohara,A., Ogawa,H., Copeland,N., Jenkins,N.A., Lalande,M., and Alt,F.W. (1997). RAB22 and RAB163/mouse BRCA2: proteins that specifically interact with the RAD51 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 6927-6932.

Mizuuchi,K., Fisher,L.M., O'Dea,M.H., and Gellert,M. (1980). DNA gyrase action involves the introduction of transient double-strand breaks into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 77, 1847-1851.

Mohaghegh,P., Karow,J.K., Brosh,J.R., Jr., Bohr,V.A., and Hickson,I.D. (2001). The Bloom's and Werner's syndrome proteins are DNA structure-specific helicases. *Nucleic Acids Res.* 29, 2843-2849.

Moreno,S., Hayles,J., and Nurse,P. (1989). Regulation of p34cdc2 protein kinase during mitosis. *Cell* 58, 361-372.

Moreno-Herrero,F., de Jager,M., Dekker,N.H., Kanaar,R., Wyman,C., and Dekker,C. (2005). Mesoscale conformational changes in the DNA-repair complex Rad50/Mre11/NBS1 upon binding DNA. *Nature* 437, 440-443.

Morrison,C., Sonoda,E., Takao,N., Shinohara,A., Yamamoto,K., and Takeda,S. (2000). The controlling role of ATM in homologous recombinational repair of DNA damage. *EMBO J.* 19, 463-471.

Moshous,D., Callebaut,I., de Chasseval,R., Corneo,B., Cavazzana-Calvo,M., le Deist,F., Tezcan,I., Sanal,O., Bertrand,Y., Philippe,N., Fischer,A., and de Villartay,J.P. (2001). Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell* 105, 177-186.

Moshous,D., Li,L., Chasseval,R., Philippe,N., Jabado,N., Cowan,M.J., Fischer,A., and de Villartay,J.P. (2000). A new gene involved in DNA double-strand break repair and V(D)J recombination is located on human chromosome 10p. *Hum. Mol. Genet.* 9, 583-588.

Moynahan,M.E., Cui,T.Y., and Jasin,M. (2001). Homology-directed dna repair, mitomycin-c resistance, and chromosome stability is restored with correction of a Brca1 mutation. *Cancer Res.* 61, 4842-4850.

Muller,M.T., Spitzner,J.R., DiDonato,J.A., Mehta,V.B., Tsutsui,K., and Tsutsui,K. (1988). Single-strand DNA cleavages by eukaryotic topoisomerase II. *Biochemistry* 27, 8369-8379.

Munro,T.R. (1970). The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of Chinese hamster fibroblasts. *Radiat. Res.* 42, 451-470.

Murga,M., Jaco,I., Fan,Y., Soria,R., Martinez-Pastor,B., Cuadrado,M., Yang,S.M., Blasco,M.A., Skoultchi,A.I., and Fernandez-Capetillo,O. (2007). Global chromatin compaction limits the strength of the DNA damage response. *J. Cell Biol.* 178, 1101-1108.

Nathanson, K.L., Wooster, R., and Weber, B.L. (2001). Breast cancer genetics: what we know and what we need. *Nat. Med.* 7, 552-556.

Neale, M.J., Pan, J., and Keeney, S. (2005). Endonucleolytic processing of covalent protein-linked DNA double-strand breaks. *Nature* 436, 1053-1057.

Nieuwenhuis, B., Assen-Bolt, A.J., Waarde-Verhagen, M.A., Sijmons, R.H., Van der Hout, A.H., Bauch, T., Streffer, C., and Kampinga, H.H. (2002). BRCA1 and BRCA2 heterozygosity and repair of X-ray-induced DNA damage. *Int. J. Radiat. Biol.* 78, 285-295.

Nitiss, J.L. (1994). Using yeast to study resistance to topoisomerase II-targeting drugs. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 34 Suppl, S6-13.

Nitiss, J.L. and Beck, W.T. (1996). Antitopoisomerase drug action and resistance. *Eur. J. Cancer* 32A, 958-966.

Nitiss, J.L., Pourquier, P., and Pommier, Y. (1997). Aclacinomycin A stabilizes topoisomerase I covalent complexes. *Cancer Res.* 57, 4564-4569.

Olive, P.L. (1998). The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiat. Res.* 150, S42-S51.

Olland, S. and Wang, J.C. (1999). Catalysis of ATP hydrolysis by two NH(2)-terminal fragments of yeast DNA topoisomerase II. *J. Biol. Chem.* 274, 21688-21694.

Pannicke, U., Ma, Y., Hopfner, K.P., Niewolik, D., Lieber, M.R., and Schwarz, K. (2004). Functional and biochemical dissection of the structure-specific nuclease ARTEMIS. *EMBO J.* 23, 1987-1997.

Paques, F. and Haber, J.E. (1999). Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 349-404.

Parkin, D.M., Pisani, P., and Ferlay, J. (1999). Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int. J. Cancer* 80, 827-841.

Paull, T.T. and Gellert, M. (1998). The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol. Cell* 1, 969-979.

Paull, T.T. and Gellert, M. (1999). NBS1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev.* 13, 1276-1288.

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

Pellegrini, L., Yu, D.S., Lo, T., Anand, S., Lee, M., Blundell, T.L., and Venkitaraman, A.R. (2002). Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature* 420, 287-293.

Peng, C.Y., Graves, P.R., Thoma, R.S., Wu, Z., Shaw, A.S., and Piwnicka-Worms, H. (1997). Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* 277, 1501-1505.

Pierce, A.J., Johnson, R.D., Thompson, L.H., and Jasin, M. (1999). XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes Dev.* 13, 2633-2638.

Poinsignon,C., de Chasseval,R., Soubeyrand,S., Moshous,D., Fischer,A., Hache,R.J., and de Villartay,J.P. (2004). Phosphorylation of Artemis following irradiation-induced DNA damage. *Eur. J. Immunol.* **34**, 3146-3155.

Poinsignon,C., Moshous,D., Callebaut,I., de Chasseval,R., Villey,I., and de Villartay,J.P. (2004). The metallo-beta-lactamase/beta-CASP domain of Artemis constitutes the catalytic core for V(D)J recombination. *J. Exp. Med.* **199**, 315-321.

Pouliot,J.J., Yao,K.C., Robertson,C.A., and Nash,H.A. (1999). Yeast gene for a Tyr-DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase I complexes. *Science* **286**, 552-555.

Riballo,E., Critchlow,S.E., Teo,S.H., Doherty,A.J., Priestley,A., Broughton,B., Kysela,B., Beamish,H., Plowman,N., Arlett,C.F., Lehmann,A.R., Jackson,S.P., and Jeggo,P.A. (1999). Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukaemia patient. *Curr. Biol.* **9**, 699-702.

Riballo,E., Kuhne,M., Rief,N., Doherty,A., Smith,G.C., Recio,M.J., Reis,C., Dahm,K., Fricke,A., Krempler,A., Parker,A.R., Jackson,S.P., Gennery,A., Jeggo,P.A., and Lobrich,M. (2004). A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol. Cell* **16**, 715-724.

Richards,E.J. and Elgin,S.C. (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell* **108**, 489-500.

Roca,J. and Wang,J.C. (1992). The capture of a DNA double helix by an ATP-dependent protein clamp: a key step in DNA transport by type II DNA topoisomerases. *Cell* **71**, 833-840.

Roca,J., Berger,J.M., and Wang,J.C. (1993). On the simultaneous binding of eukaryotic DNA topoisomerase II to a pair of double-stranded DNA helices. *J. Biol. Chem.* **268**, 14250-14255.

Roca,J., Berger,J.M., Harrison,S.C., and Wang,J.C. (1996). DNA transport by a type II topoisomerase: direct evidence for a two-gate mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 4057-4062.

Roca,J., Ishida,R., Berger,J.M., Andoh,T., and Wang,J.C. (1994). Antitumor bisdioxopiperazines inhibit yeast DNA topoisomerase II by trapping the enzyme in the form of a closed protein clamp. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 1781-1785.

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

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

Rothfuss,A., Schutz,P., Bochum,S., Volm,T., Eberhardt,E., Kreienberg,R., Vogel,W., and Speit,G. (2000). Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 mutation in breast cancer families. *Cancer Res.* **60**, 390-394.

Rothkamm,K. and Lobrich,M. (2003). Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 5057-5062.

Rothkamm,K., Kruger,I., Thompson,L.H., and Lobrich,M. (2003). Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol. Cell Biol.* **23**, 5706-5715.

- Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R.S., Richman, R., Wu, Z., Piwnica-Worms, H., and Elledge, S.J. (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* 277, 1497-1501.
- Sander, M. and Hsieh, T. (1983). Double strand DNA cleavage by type II DNA topoisomerase from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 258, 8421-8428.
- Sanders, S.L., Portoso, M., Mata, J., Bahler, J., Allshire, R.C., and Kouzarides, T. (2004). Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. *Cell* 119, 603-614.
- Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* 450, 509-514.
- Sasaki, T., Tian, H., Kukita, Y., Inazuka, M., Tahira, T., Imai, T., Yamauchi, M., Saito, T., Hori, T., Hashimoto-Tamaoki, T., Komatsu, K., Nikaido, O., and Hayashi, K. (1998). ATM mutations in patients with ataxia telangiectasia screened by a hierarchical strategy. *Hum. Mutat.* 12, 186-195.
- Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., Tagle, D.A., Smith, S., Uziel, T., Sfez, S., Ashkenazi, M., Pecker, I., Frydman, M., Harnik, R., Patanjali, S.R., Simmons, A., Clines, G.A., Sartiel, A., Gatti, R.A., Chessa, L., Sanal, O., Lavin, M.F., Jaspers, N.G., Taylor, A.M., Arlett, C.F., Miki, T., Weissman, S.M., Lovett, M., Collins, F.S., and Shiloh, Y. (1995). A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 268, 1749-1753.
- Schlegel, B.P., Jodelka, F.M., and Nunez, R. (2006). BRCA1 promotes induction of ssDNA by ionizing radiation. *Cancer Res.* 66, 5181-5189.
- Schoeffler, A.J. and Berger, J.M. (2008). DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. *Q. Rev. Biophys.* 41, 41-101.
- Schon, D., Bertz, J., Gorsch, B., Haberland, J., and Kurth, B.M. (2004). [Federal Cancer Reporting Unit. Surveillance program for cancer registration in Germany]. *Bundesgesundheitsblatt. Gesundheitsforschung. Gesundheitsschutz.* 47, 429-436.
- Schwartz, D.C. and Cantor, C.R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37, 67-75.
- Scully, R. and Livingston, D.M. (2000). In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature* 408, 429-432.
- Scully, R., Chen, J., Ochs, R.L., Keegan, K., Hoekstra, M., Feunteun, J., and Livingston, D.M. (1997). Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell* 90, 425-435.
- Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T., and Livingston, D.M. (1997). Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 88, 265-275.
- Sedelnikova, O.A., Pilch, D.R., Redon, C., and Bonner, W.M. (2003). Histone H2AX in DNA damage and repair. *Cancer Biol. Ther.* 2, 233-235.
- Sedelnikova, O.A., Rogakou, E.P., Panyutin, I.G., and Bonner, W.M. (2002). Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat. Res.* 158, 486-492.
- Shiloh, Y. (2006). The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem. Sci.* 31, 402-410.

Shiloh, Y. and Kastan, M.B. (2001). ATM: genome stability, neuronal development, and cancer cross paths. *Adv. Cancer Res.* 83, 209-254.

Shroff, R., Arbel-Eden, A., Pilch, D., Ira, G., Bonner, W.M., Petrini, J.H., Haber, J.E., and Lichten, M. (2004). Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break. *Curr. Biol.* 14, 1703-1711.

Smith, C.D., Shu, S., Mungall, C.J., and Karpen, G.H. (2007). The Release 5.1 annotation of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Science* 316, 1586-1591.

Sobhian, B., Shao, G., Lilli, D.R., Culhane, A.C., Moreau, L.A., Xia, B., Livingston, D.M., and Greenberg, R.A. (2007). RAP80 targets BRCA1 to specific ubiquitin structures at DNA damage sites. *Science* 316, 1198-1202.

Sogo, J.M., Lopes, M., and Foiani, M. (2002). Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science* 297, 599-602.

Solinger, J.A., Lutz, G., Sugiyama, T., Kowalczykowski, S.C., and Heyer, W.D. (2001). Rad54 protein stimulates heteroduplex DNA formation in the synaptic phase of DNA strand exchange via specific interactions with the presynaptic Rad51 nucleoprotein filament. *J. Mol. Biol.* 307, 1207-1221.

Song, B. and Sung, P. (2000). Functional interactions among yeast Rad51 recombinase, Rad52 mediator, and replication protein A in DNA strand exchange. *J. Biol. Chem.* 275, 15895-15904.

Sonoda, E., Hohegger, H., Saberi, A., Taniguchi, Y., and Takeda, S. (2006). Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair (Amst)* 5, 1021-1029.

Sonoda, E., Sasaki, M.S., Morrison, C., Yamaguchi-Iwai, Y., Takata, M., and Takeda, S. (1999). Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells. *Mol. Cell Biol.* 19, 5166-5169.

Sorensen, B.S., Sinding, J., Andersen, A.H., Alsner, J., Jensen, P.B., and Westergaard, O. (1992). Mode of action of topoisomerase II-targeting agents at a specific DNA sequence. Uncoupling the DNA binding, cleavage and religation events. *J. Mol. Biol.* 228, 778-786.

Spain, B.H., Larson, C.J., Shihabuddin, L.S., Gage, F.H., and Verma, I.M. (1999). Truncated BRCA2 is cytoplasmic: implications for cancer-linked mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 13920-13925.

Stewart, G.S., Maser, R.S., Stankovic, T., Bressan, D.A., Kaplan, M.I., Jaspers, N.G., Raams, A., Byrd, P.J., Petrini, J.H., and Taylor, A.M. (1999). The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder. *Cell* 99, 577-587.

Stewart, G.S., Wang, B., Bignell, C.R., Taylor, A.M., and Elledge, S.J. (2003). MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature* 421, 961-966.

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

Stiff, T., Reis, C., Alderton, G.K., Woodbine, L., O'Driscoll, M., and Jeggo, P.A. (2005). NBS1 is required for ATR-dependent phosphorylation events. *EMBO J.* 24, 199-208.

Stohr, B.A. and Kreuzer, K.N. (2001). Repair of topoisomerase-mediated DNA damage in bacteriophage T4. *Genetics* 158, 19-28.

- Stracker,T.H., Carson,C.T., and Weitzman,M.D. (2002). Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11-Rad50-NBS1 DNA repair complex. *Nature* 418, 348-352.
- Strausfeld,U., Labbe,J.C., Fesquet,D., Cavadore,J.C., Picard,A., Sadhu,K., Russell,P., and Doree,M. (1991). Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. *Nature* 351, 242-245.
- Struewing,J.P., Tarone,R.E., Brody,L.C., Li,F.P., and Boice,J.D., Jr. (1996). BRCA1 mutations in young women with breast cancer. *Lancet* 347, 1493.
- Suzuki,A., de la Pompa,J.L., Hakem,R., Elia,A., Yoshida,R., Mo,R., Nishina,H., Chuang,T., Wakeham,A., Itie,A., Koo,W., Billia,P., Ho,A., Fukumoto,M., Hui,C.C., and Mak,T.W. (1997). Brca2 is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Genes Dev.* 11, 1242-1252.
- Swift,M., Morrell,D., Cromartie,E., Chamberlin,A.R., Skolnick,M.H., and Bishop,D.T. (1986). The incidence and gene frequency of ataxia-telangiectasia in the United States. *Am. J. Hum. Genet.* 39, 573-583.
- Tanabe,K., Ikegami,Y., Ishida,R., and Andoh,T. (1991). Inhibition of topoisomerase II by antitumor agents bis(2,6-dioxopiperazine) derivatives. *Cancer Res.* 51, 4903-4908.
- Taylor,A.M., Groom,A., and Byrd,P.J. (2004). Ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD)-its clinical presentation and molecular basis. *DNA Repair (Amst)* 3, 1219-1225.
- Taylor,A.M., Harnden,D.G., Arlett,C.F., Harcourt,S.A., Lehmann,A.R., Stevens,S., and Bridges,B.A. (1975). Ataxia telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity. *Nature* 258, 427-429.
- Teo,S.H. and Jackson,S.P. (2000). Lif1p targets the DNA ligase Lig4p to sites of DNA double-strand breaks. *Curr. Biol.* 10, 165-168.
- Teoule,R. (1987). Radiation-induced DNA damage and its repair. *Int. J. Radiat. Biol. Relat Stud. Phys. Chem. Med.* 51, 573-589.
- The Breast Cancer Linkage Consortium BCLC (1999). Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol 91, 1310-1316
- Tibbetts,R.S., Cortez,D., Brumbaugh,K.M., Scully,R., Livingston,D., Elledge,S.J., and Abraham,R.T. (2000). Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev.* 14, 2989-3002.
- Ting,N.S. and Lee,W.H. (2004). The DNA double-strand break response pathway: becoming more BRCAish than ever. *DNA Repair (Amst)* 3, 935-944.
- Trenz,K., Landgraf,J., and Speit,G. (2003). Mutagen sensitivity of human lymphoblastoid cells with a BRCA1 mutation. *Breast Cancer Res. Treat.* 78, 69-79.
- Trenz,K., Rothfuss,A., Schutz,P., and Speit,G. (2002). Mutagen sensitivity of peripheral blood from women carrying a BRCA1 or BRCA2 mutation. *Mutat. Res.* 500, 89-96.
- Trujillo,K.M., Yuan,S.S., Lee,E.Y., and Sung,P. (1998). Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95. *J. Biol. Chem.* 273, 21447-21450.
- Tsukuda,T., Fleming,A.B., Nickoloff,J.A., and Osley,M.A. (2005). Chromatin remodelling at a DNA double-strand break site in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 438, 379-383.

- Uematsu,N., Weterings,E., Yano,K., Morotomi-Yano,K., Jakob,B., Taucher-Scholz,G., Mari,P.O., van Gent,D.C., Chen,B.P., and Chen,D.J. (2007). Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *J. Cell Biol.* 177, 219-229.
- Valerie,K. and Povirk,L.F. (2003). Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* 22, 5792-5812.
- van Attikum,H. and Gasser,S.M. (2009). Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends Cell Biol.*
- Van Dyck,E., Hajibagheri,N.M., Stasiak,A., and West,S.C. (1998). Visualisation of human rad52 protein and its complexes with hRad51 and DNA. *J. Mol. Biol.* 284, 1027-1038.
- Van Dyck,E., Stasiak,A.Z., Stasiak,A., and West,S.C. (1999). Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein. *Nature* 398, 728-731.
- van Gent,D.C., McBlane,J.F., Ramsden,D.A., Sadofsky,M.J., Hesse,J.E., and Gellert,M. (1996). Initiation of V(D)J recombinations in a cell-free system by RAG1 and RAG2 proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 217, 1-10.
- Varon,R., Vissinga,C., Platzer,M., Cerosaletti,K.M., Chrzanowska,K.H., Saar,K., Beckmann,G., Seemanova,E., Cooper,P.R., Nowak,N.J., Stumm,M., Weemaes,C.M., Gatti,R.A., Wilson,R.K., Digweed,M., Rosenthal,A., Sperling,K., Concannon,P., and Reis,A. (1998). Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell* 93, 467-476.
- Venkitaraman,A.R. (2002). Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 108, 171-182.
- Venkitaraman,A.R. (2008). Linking the Cellular Functions of BRCA Genes to Cancer Pathogenesis and Treatment. *Annu. Rev. Pathol.*
- Von Sonntag, C. (1987) *The Chemical Basis of Radiation Biology*. Taylor and Francis, London.
- Walker,J.R., Corpina,R.A., and Goldberg,J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 412, 607-614.
- Wang S, Sun X, Zhang C, Wang M, Li W, Liu S, Ni Y, and Yao S (2002). Antitumor mechanism of VP-16: A pulse radiolysis study. *Science in China (Series B)*, Vol 45, 394-397
- Wang,B., Matsuoka,S., Ballif,B.A., Zhang,D., Smogorzewska,A., Gygi,S.P., and Elledge,S.J. (2007). Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. *Science* 316, 1194-1198.
- Wang,J.C. (1996). DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 635-692.
- Wang,L., Roy,S.K., and Eastmond,D.A. (2007). Differential cell cycle-specificity for chromosomal damage induced by merbarone and etoposide in V79 cells. *Mutat. Res.* 616, 70-82.
- Wang,X. and D'Andrea,A.D. (2004). The interplay of Fanconi anemia proteins in the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)* 3, 1063-1069.
- Ward,I.M., Minn,K., Jorda,K.G., and Chen,J. (2003). Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX. *J. Biol. Chem.* 278, 19579-19582.

- Ward, J.F. (1988). DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **35**, 95-125.
- Ward, J.F. (1995). Radiation mutagenesis: the initial DNA lesions responsible. *Radiat. Res.* **142**, 362-368.
- Weiden, M.D. and Ginsberg, H.S. (1994). Deletion of the E4 region of the genome produces adenovirus DNA concatemers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 153-157.
- Weterings, E., Verkaik, N.S., Bruggenwirth, H.T., Hoeijmakers, J.H., and van Gent, D.C. (2003). The role of DNA dependent protein kinase in synapsis of DNA ends. *Nucleic Acids Res.* **31**, 7238-7246.
- Wigley, D.B., Davies, G.J., Dodson, E.J., Maxwell, A., and Dodson, G. (1991). Crystal structure of an N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein. *Nature* **351**, 624-629.
- Wilson, D.M., III and Thompson, L.H. (2007). Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutat. Res.* **616**, 11-23.
- Wong, A.K., Pero, R., Ormonde, P.A., Tavtigian, S.V., and Bartel, P.L. (1997). RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene *brca2*. *J. Biol. Chem.* **272**, 31941-31944.
- Wu, L.C., Wang, Z.W., Tsan, J.T., Spillman, M.A., Phung, A., Xu, X.L., Yang, M.C., Hwang, L.Y., Bowcock, A.M., and Baer, R. (1996). Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nat. Genet.* **14**, 430-440.
- Wu, W., Wang, M., Mussfeldt, T., and Iliakis, G. (2008). Enhanced use of backup pathways of NHEJ in G2 in Chinese hamster mutant cells with defects in the classical pathway of NHEJ. *Radiat. Res.* **170**, 512-520.
- Xiao, Y. and Weaver, D.T. (1997). Conditional gene targeted deletion by Cre recombinase demonstrates the requirement for the double-strand break repair Mre11 protein in murine embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* **25**, 2985-2991.
- Yang, H., Jeffrey, P.D., Miller, J., Kinnucan, E., Sun, Y., Thoma, N.H., Zheng, N., Chen, P.L., Lee, W.H., and Pavletich, N.P. (2002). BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science* **297**, 1837-1848.
- Yang, H., Li, Q., Fan, J., Holloman, W.K., and Pavletich, N.P. (2005). The BRCA2 homologue Brh2 nucleates RAD51 filament formation at a dsDNA-ssDNA junction. *Nature* **433**, 653-657.
- Yoo, S., Kimzey, A., and Dynan, W.S. (1999). Photocross-linking of an oriented DNA repair complex. Ku bound at a single DNA end. *J. Biol. Chem.* **274**, 20034-20039.
- Yuan, S.S., Chang, H.L., and Lee, E.Y. (2003). Ionizing radiation-induced Rad51 nuclear focus formation is cell cycle-regulated and defective in both ATM(-/-) and c-Abl(-/-) cells. *Mutat. Res.* **525**, 85-92.
- Yuan, S.S., Lee, S.Y., Chen, G., Song, M., Tomlinson, G.E., and Lee, E.Y. (1999). BRCA2 is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo. *Cancer Res.* **59**, 3547-3551.
- Yuan, Z.M., Huang, Y., Ishiko, T., Nakada, S., Utsugisawa, T., Kharbanda, S., Wang, R., Sung, P., Shinohara, A., Weichselbaum, R., and Kufe, D. (1998). Regulation of Rad51 function by c-Abl in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* **273**, 3799-3802.

Zechiedrich,E.L. and Osheroff,N. (1990). Eukaryotic topoisomerases recognize nucleic acid topology by preferentially interacting with DNA crossovers. *EMBO J.* **9**, 4555-4562.

Zechiedrich,E.L., Christiansen,K., Andersen,A.H., Westergaard,O., and Osheroff,N. (1989). Double-stranded DNA cleavage/religation reaction of eukaryotic topoisomerase II: evidence for a nicked DNA intermediate. *Biochemistry* **28**, 6229-6236.

Zhang,H., Somasundaram,K., Peng,Y., Tian,H., Zhang,H., Bi,D., Weber,B.L., and El Deiry,W.S. (1998). BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. *Oncogene* **16**, 1713-1721.

Zhang,X., Succi,J., Feng,Z., Prithivirajsingh,S., Story,M.D., and Legerski,R.J. (2004). Artemis is a phosphorylation target of ATM and ATR and is involved in the G2/M DNA damage checkpoint response. *Mol. Cell Biol.* **24**, 9207-9220.

Zhu,J., Petersen,S., Tessarollo,L., and Nussenzweig,A. (2001). Targeted disruption of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to early embryonic lethality in mice. *Curr. Biol.* **11**, 105-109.

Ziv,Y., Bielopolski,D., Galanty,Y., Lukas,C., Taya,Y., Schultz,D.C., Lukas,J., Bekker-Jensen,S., Bartek,J., and Shiloh,Y. (2006). Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nat. Cell Biol.* **8**, 870-876.

## 8. Anhang

### 8.1. Veröffentlichungen

#### Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Deckbar D, Birraux J, Krempler A, Tchouandong L, Beucher A, Walker S, Stiff T, Jeggo P and Löbrich M "Chromosome breakage after G2 checkpoint release"  
J Cell Biol. 2007 Mar 12;176(6):749-55.

Beucher A, Birraux J, Tchouandong L, Barton O, Shibata A, Conrad S, Goodarzi AA, Krempler A, Jeggo PA and Löbrich M „ATM and Artemis promote homologous recombination repair of radiation-induced DNA double strand breaks in G2“  
EMBO J, *in press*

#### Teile der vorliegenden Arbeit wurden als Tagungsbeiträge präsentiert:

Beucher A, Birraux J, Tchouandong L, Barton O, Shibata A, Rief N, Goodarzi A, Krempler A, Jeggo PA, and Löbrich M (2008)  
„A dual role for ATM and Artemis in HR and NHEJ repair of radiation induced DNA double strand breaks“  
Posterpräsentation, 10<sup>th</sup> Biennial Meeting of the DGDR, Berlin

Beucher A, Tchouandong L, Krempler A, Rief N, Längler K, and Löbrich M (2007)  
„ATM and Artemis and their role in homologous recombination in G2“  
Posterpräsentation, 10<sup>th</sup> International Wolfsberg Meeting on Molecular Radiation Biology/Oncology, Wolfsberg

Beucher A, Tchouandong L, Krempler A, and Löbrich M (2006)  
„ATM and Artemis and their role in homologous recombination in G2“  
Vortrag, 9<sup>th</sup> Biennial Meeting of the DGDR, Hamburg

Beucher A, Tchouandong L, Krempler A, and Löbrich M (2006)  
„Komponenten der DNA-Doppelstrangbruchreparatur und ihre Bedeutung im ATM-abhängigen DNA-Reparaturweg“  
Vortrag, 9. Jahrestagung der GBS, Braunschweig

## 8.2. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Markus Löbrich für die Bereitstellung des interessanten Themas, die umfassende Betreuung und unermüdliche Diskussionsbereitschaft, die vielen Ideen sowie die Unterstützung und Förderung, die er mir hat zuteil werden lassen.

Herrn Prof. Dr. Harald Kolmar danke ich herzlich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Frau Dr. Andrea Krempler möchte ich für die gute Betreuung, die vielen Ideen und praktischen Tipps sowie für unermüdliches Korrekturlesen dieser Arbeit unter erschwerten Bedingungen danken.

Ein herzliches Dankeschön geht an alle aktuellen und ehemaligen Mitglieder der AG Löbrich, für das gute Betriebsklima, den Zusammenhalt, das jederzeit offene Ohr und den Spass bei der Arbeit und vor allem darüber hinaus. Ihr habt es leichter gemacht, jeden Sonntag wieder zurück nach Darmstadt zu fahren.

Dank gebührt auch unserem TA-Team in Darmstadt, die durch die gute Organisation den reibungslosen Ablauf des Laboralltags möglich machen.

Unserer ehemaligen guten Seele des Labors, Frau Roswitha Schepp, möchte ich Dank aussprechen für die Unterstützung bei den zeitaufwendigen PFGE-Experimenten, ihren aufopfernden Einsatz fürs Labor aber auch für die vielen praktischen Tipps und die Zeit, die sie immer für mich und meine Fragen hatte.

Zudem möchte ich Herrn Dr. Joachim Berlich und Frau Cornelia Andres-Marx für die Bereitstellung des Scintillationszählers und die Unterstützung bei der Vermessung der Proben danken.

Frau Dipl.-Biol. Helge Hussong danke ich herzlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Darüberhinaus danke ich allen, die, in welcher Form auch immer, zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Ein aus tiefstem Herzen kommendes Dankeschön soll an meine Familie und vor allem meine Eltern gehen, die mir nicht nur mein Studium ermöglicht, sondern durch ihren unerschütterlichen Glauben an mich und an alles was ich tue jederzeit den Rücken gestärkt haben.

Nicht zuletzt möchte ich meinem Freund, Partner und Lebensgefährten Boris danken, der in den letzten Monaten und Jahren sehr viel Geduld mit mir bewiesen und der mir die Kraft gegeben hat, immer wieder aufzustehen, wenn ich am Boden lag.

### 8.3. Lebenslauf

**Name** Andrea Elisabeth Beucher

**Geburtsdatum** 01.02.1980  
**Geburtsort** Saarbrücken

#### **Berufstätigkeit im Rahmen der Promotion**

07/2007 – 06/2009 Technische Universität Darmstadt  
Abteilung Strahlenbiologie und DNA-Reparatur – Arbeitsgruppe  
Prof. Löbrich

03/2005 – 06/2007 Universität des Saarlandes  
Abteilung Biophysik – Arbeitsgruppe Prof. Löbrich

#### **Studium**

09/1999 – 12/2004 Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg  
Studienfach Biologie – Hauptfach Molekularbiologie  
Abschluss: Diplom

#### **Schulbildung**

08/1996 – 06/1999 Willi-Graf-Gymnasium Saarbrücken  
Abschluss: Abitur

08/1990 – 07/1996 Realschule Heusweiler  
Abschluss: Realschulabschluss (Mittlere Reife)

08/1986 – 07/1990 Grundschule Heusweiler

#### **8.4. Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmitteln verwendet habe.

Darmstadt, 08.07.2009

-----  
(Andrea Beucher)