

Untersuchungen zur Entstehung chromosomaler Translokationen nach ionisierender Bestrahlung

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biol. Julia Künzel

aus Darmstadt

1. Referent: Prof. Dr. Markus Löbrich

2. Referentin: Prof. Dr. Beatrix Süß

Tag der Einreichung: 27.06.2017

Tag der mündlichen Prüfung: 18.08.2017

Darmstadt 2017

D17





Life is what happens to you while you're busy making other plans. (John Lennon)

Für die Besten – meine Eltern.



Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den 27. Juni 2017

Julia Künzel

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Zusammenfassung – Summary	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Strahlenphysikalische Grundlagen	2
1.2 Wechselwirkung von ionisierender Strahlung mit Biomaterie.....	2
1.3 Erkennung von DNA-Doppelstrangbrüchen und Schadensantwort.....	4
1.4 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	6
1.4.1 Das kanonische NHEJ (c-NHEJ)	7
1.4.2 Varianten des NHEJ	9
1.5 Chromatinmodifizierungen im Kontext der Schadensantwort.....	11
1.6 Chromosomale Aberrationen.....	13
1.6.1 Numerische Aberrationen.....	14
1.6.2 Strukturelle Aberrationen.....	14
1.7 Dosiseffekt-Beziehung.....	19
1.8 Analyse von DNA-Doppelstrangbrüchen.....	20
1.8.1 Chromosomenstudien	20
1.9 Zielsetzung	24
2 Materialien und Methoden	25
2.1 Materialien	25
2.1.1 Chemikalien.....	25
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	26
2.1.3 Software und Geräte	26
2.1.4 Medien, Lösungen, Puffer.....	27
2.1.5 siRNA und Inhibitoren.....	28
2.1.6 Chromosomensonden und Antikörper	28
2.1.7 Zellen.....	29
2.2 Methoden	30
2.2.1 Zellkultur.....	30
2.2.2 RNA-Interferenz.....	30
2.2.3 Behandlung der Zellen vor Schadensinduktion.....	31
2.2.4 Schädigung der Zellen mittels Röntgenstrahlung.....	31
2.2.5 Zellfusion.....	32
2.2.6 Chromosomenpräparation.....	33
2.2.7 Chromosomenfärbung.....	34
2.2.8 Auswertung der Chromosomenpräparate	35
2.2.9 Immunfluoreszenz	36
2.2.10 Auswertung der IFM-Präparate.....	37
3 Ergebnisse	39
3.1 Etablierung der vorzeitigen Chromosomenkondensation in G1-Phase-Zellen.....	40
3.2 Chromosomale Reparaturkinetik in G1-Wildtyp-Zellen.....	45

3.3	Reparaturkinetik in Abhängigkeit von CtIP.....	47
3.3.1	Chromosomale Reparaturkinetik nach CtIP-Depletion in der G1-Phase.....	47
3.3.2	γ H2AX- und RAD51-Reparaturkinetik nach CtIP-Depletion (7 Gy).....	49
3.4	Chromosomale Aberrationen in Abhängigkeit von Plk3 in der G1-Phase.....	53
3.5	Einfluss der NHEJ-Reparatur auf die Entstehung von Translokationen in G1	54
3.5.1	Einfluss des alt-NHEJ auf die Translokationsentstehung	55
3.5.2	Ausbildung von Translokationen in c-NHEJ-defekten Zellen.....	57
3.5.3	Einfluss des alt-NHEJ auf die chromosomale Reparatur in c-NHEJ-Mutanten	58
3.5.4	Entstehung von Translokationen nach partieller Inhibition von DNA-PK.....	59
3.5.5	Ausbildung von Translokationen in Artemis-defekten Zellen	61
3.6	DSB-Reparatur in G1-Phase-Zellen in Abhängigkeit der DNA-Transkription	62
4	Diskussion	65
4.1	Chromosomale Analyse der DSB-Reparatur in G1-WT-Zellen	65
4.2	Chromosomale Aberrationen in G1-Phase-Zellen in Abhängigkeit von CtIP	68
4.3	Einfluss von Plk3 auf CtIP und die chromosomale DSB-Reparatur in G1.....	71
4.4	Entstehung von Translokationen in Abhängigkeit der DSB-Mobilität	73
4.5	Funktion der NHEJ-Reparatur innerhalb der Translokationsentstehung in G1	75
4.6	Evolutionäre Bedeutung einer geduldeten DNA-Fehlreparatur in G1	80
4.7	Entstehung von Translokationen in Abhängigkeit der DNA-Transkription	81
5	Ausblick.....	84
	Literaturverzeichnis.....	LXXXVI
	Anhang.....	XCV
	Publikationen.....	XCV
	Persönliche Tagungsbeiträge.....	XCV
	Lebenslauf	XCVII
	Danksagung	XCVIII

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Indirekte und direkte Wirkung ionisierender Strahlung	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der DNA-Schadensantwort.....	5
Abbildung 3: Doppelstrangbruchreparatur in der G2-Phase und der G1-Phase	7
Abbildung 4: Das kanonische-NHEJ (c-NHEJ).....	9
Abbildung 5: Das alternative-NHEJ (alt-NHEJ)	10
Abbildung 6: Aufbau eines Nukleosoms	11
Abbildung 7: Exemplarische Darstellung struktureller Chromosomenaberrationen.....	15
Abbildung 8: PEG-induzierte Zellfusion und PCC Induktion	22
Abbildung 9: Exemplarische Darstellung einer Zellfusion und FISH-Färbung.....	23
Abbildung 10: Vorzeitig kondensierte G1-Phase Chromosomen nach Giemsa-Färbung .	41
Abbildung 11: Vorzeitig kondensierte G2-Phase Chromosomen nach Giemsa-Färbung .	42
Abbildung 12: Zellfusion und Giemsa-Färbung nach Röntgenbestrahlung.....	42
Abbildung 13: Differenzierung von G1-, G2- und S-Phase nach FISH-Färbung.....	43
Abbildung 14: Vorzeitig kondensierte G1-Chromosomen nach FISH-Färbung	44
Abbildung 15: Chromosomale Brüche in G1-Wildtyp-Zellen	46
Abbildung 16: Chromosomale Translokationen in G1-Wildtyp-Zellen	47
Abbildung 17: Chromosomale Analyse in Abhängigkeit von CtIP in G1	48
Abbildung 18: Exemplarische Darstellung einer γ H2AX- und RAD51-Färbung.....	50
Abbildung 19: γ H2AX-Reparaturkinetik nach CtIP-Depletion in G1	51
Abbildung 20: γ H2AX- und RAD51-Reparaturkinetik nach CtIP-Depletion in G2	52
Abbildung 21: Chromosomale Analyse in Abhängigkeit von Plk3 in G1	54
Abbildung 22: Einfluss von alt-NHEJ-Faktoren auf chromosomale Aberrationen in G1 .	56
Abbildung 23: Chromosomale Analyse in XLF-defekten G1-Phase-Zellen.....	57
Abbildung 24: Chromosomale Analyse in c-NHEJ-Mutanten nach PARP1-Inhibition.....	59
Abbildung 25: Untersuchung chromosomaler Aberrationen nach DNA-PK-Inhibition....	60
Abbildung 26: Chromosomale Analyse in Artemis-defekten G1-Phase-Zellen.....	61
Abbildung 27: Einfluss der DNA-Transkription auf chromosomale Aberrationen in G1 .	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Eingesetzte siRNA	28
Tabelle 2: Eingesetzte Inhibitoren	28

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
alt-NHEJ	Alternative non-homologous end-joining
AT	Ataxia Telangiectasia
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	ATM- and Rad3-related
BAF	BRG1- or hBRM-associated factors
b-NHEJ	Backup non-homologous end-joining
bp	Basenpaar
BS	Bloom-Syndrom
BRCA	Breast cancer early onset
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
BRG1	Brahma-related gene 1
BSA	Bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
c-NHEJ	Canonical non-homologous end-joining
CDK	Cycline-dependent protein kinases
CtIP	C-terminal binding protein-interacting protein
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's minimal essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
DNA-PKcs	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit
DRB	5, 6-Dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole
DSB	Doppelstrangbruch
DSBR	Doppelstrangbruchreparatur
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESB	Einzelstrangbruch
EXD2	Exonuclease 3'-5' domain-containing protein 2
Exo1	Exonuclease 1
FA	Fanconi-Anämie
FCS	Fetal calf serum
FISH	Fluorescence in situ hybridization
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

G1-Phase	Erste <i>gap</i> -Phase im Zellzyklus
G2-Phase	Zweite <i>gap</i> -Phase im Zellzyklus
Gy	Gray
h	hour
hBRM	Human brahma
HCl	Hydrogenchlorid
HDAC	Histondeacetylase
HMT	Histonmethyltransferase
HP1	Heterochromatin Protein 1
HR	Homologe Rekombination
hTert	Human Telomerase reverse transcriptase
IFM	Immunfluoreszenz-Mikroskopie
IR	Ionizing radiation
kg	Kilogramm
keV	Kilo-Elektronenvolt
kV	Kilovolt
LET	Linearer Energietransfer
Lig	Ligase
LMDS	Locally multiply damage side
Mbp	Mega-Basenpaar
MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
MEM	Minimal essential medium
MilliQ-Wasser	Reinstwasser
min	Minute
MMEJ	Microhomology mediated end-joining
MRN-Komplex	Mre11-RAD50-NBS1-Komplex
Mre11	Meiotic recombination 11
NaOH	Natriumhydroxid
NBS1	Nijmegen breakage syndrome protein 1
NEA	Non-essential amino acids
NHEJ	Non-homologous end-joining
PARP1	Poly (ADP-ribose) polymerase 1
PBAF	Polybromo-associated BAF
PBRM1	Polybromo 1
PCC	Premature chromosome condensation
PEG	Polyethylenglycol

PBS	Phosphate buffered saline
PIKKs	Phosphatidylinositol 3-kinase-like serine/threonine protein kinases
Plk	Polo-like kinase
PNKP	Polynucleotide kinase 3'phosphatase
RAD	Radiation repair protein
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonucleic acid
RNAi	RNA-Interferenz
RPA	Replication protein A
RT	Raumtemperatur
SSC	Saline-sodium citrat buffer
SWI/SNF	SWItch/Sucrose Non Fermentable
siRNA	small interfering RNA
S-Phase	Synthese Phase im Zellzyklus
ssDNA	Single stranded DNA
TR	Texas red
u. a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V(D)J	Variable (diversity) joining
WT	Wildtyp
XLF	XRCC4-like factor
XRCC	X-ray repair cross-complementing protein
z. B.	zum Beispiel

Zusammenfassung – Summary

Für den Erhalt der genomischen Stabilität ist die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) von besonderer Relevanz. Werden DSBs inkorrekt repariert, können daraus chromosomale Aberrationen resultieren, wie z. B. Translokationen. Translokationen entstehen durch die Verbindung falscher DNA-Enden während der DSB-Reparatur. Verschiedene Studien beschreiben das Auftreten von Translokationen in malignen Tumoren und postulieren folglich eine Korrelation zwischen Translokationen und einer Karzinogenese. Daher ist das Verständnis der DSB-Reparaturmechanismen, die eine Translokationsentstehung begünstigen, von großer Bedeutung im Bereich der Onkologie. Die wichtigsten Mechanismen für die Reparatur von DSBs sind die kanonische nicht-homologe Endverknüpfung (*canonical non-homologous end-joining*, c-NHEJ) und die homologe Rekombination (HR). DSBs können in allen Zellzyklusphasen über das NHEJ repariert werden, wobei neben dem c-NHEJ die Funktion eines alternativen (alt-) NHEJ innerhalb der DSB-Reparatur diskutiert wird. Die HR-vermittelte DSB-Reparatur ist dagegen auf die S- und G2-Phase beschränkt, da für die Reparatur die homologe Schwesterchromatide als Matrize benötigt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Reparatur strahleninduzierter DSBs und die Entstehung von Translokationen in humanen G1-Phase-Zellen mittels Chromosomenstudien untersucht. Neben der Analyse von chromosomalen Brüchen, die einen Aufschluss über die Quantität der DSB-Reparatur erlaubt, sollte die Auswertung von chromosomalen Translokationen einen Einblick in die Qualität der DSB-Reparatur ermöglichen und das Verständnis für die Entstehung von Translokationen erweitern. Im ersten Teil der Arbeit wurde daher die vorzeitige Chromosomenkondensation (*premature chromosome condensation*, PCC) über die Methode der Polyethylen-vermittelten Zellfusion in G1-Phase-Zellen etabliert. Anschließend wurde die PCC-Methode mit der 3-Farben-FISH-Technik kombiniert, wodurch eine Analyse chromosomaler Brüche und chromosomaler Translokationen in der G1-Phase möglich wurde. Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Reparatur chromosomaler Brüche und die Entstehung chromosomaler Translokationen in Wildtyp (WT)-Zellen im Vergleich zu reparaturdefizienten Zellen analysiert. In G1-WT-Zellen zeigten die Reparatur chromosomaler Brüche und die Ausbildung von Translokationen eine schnelle und eine langsame Komponente. Obwohl die Mehrheit der Chromosomenbrüche (ca. 80 %) mit schneller Kinetik repariert wird, entstehen über die langsame Reparatur der verbleibenden 20 % der Chromosomenbrüche etwa 50 % aller detektierten Translokationen. Folglich konnte in der vorliegenden Arbeit eine vermehrte Fehlerhaftigkeit der langsamen Reparaturkomponente in G1-WT-Zellen nachgewiesen werden. In weiteren Chromosomenanalysen wurde gezeigt, dass die Qualität der langsamen

DSB-Reparatur in Abhängigkeit des DNA-Resektion vermittelnden Proteins CtIP steht. Darüber hinaus wurde ein Einfluss der Proteinkinase Plk3 auf die Translokationsentstehung innerhalb der langsamen Reparaturkomponente detektiert. Andere Studien konnten eine Abhängigkeit zwischen einer Plk3-induzierten Phosphorylierung von CtIP und einer DSB-Resektion in der G1-Phase nachweisen. In folgenden Chromosomenanalysen wurde der CtIP- und Plk3-abhängige Reparaturweg weiter klassifiziert und der Einfluss der alt-NHEJ Proteine PARP1 sowie Lig1/3 auf die DSB-Reparatur untersucht. Hierbei konnte keine Beteiligung des alt-NHEJ innerhalb der DSB-Reparatur bzw. der Translokationsentstehung in G1-WT-Zellen detektiert werden. Die Analyse von XLF- und Lig4-defekten c-NHEJ-Mutanten zeigte zwar eine quantitativ und qualitativ verschlechterte Reparatur, aber ebenfalls keinen Einfluss des alt-NHEJ. Darüber hinaus konnte eine Abhängigkeit der langsamen DSB-Reparatur von der c-NHEJ-Kernkomponente DNA-PK und der Nuklease Artemis gezeigt werden. Folglich postulieren die Studien der vorliegenden Arbeit, dass die Reparatur von DSBs in G1-WT-Zellen ausschließlich über das c-NHEJ erfolgt, wobei die Entstehung von Translokationen innerhalb der langsamen Reparaturkomponente anscheinend in Abhängigkeit einer DSB-Resektion verläuft.

Im dritten Teil der Arbeit wurde die Grundlage der Translokationsentstehung innerhalb der schnellen DSB-Reparaturkomponente untersucht. Frühere Studien beschreiben das Auftreten von Translokationen in transkriptionell aktiven Bereichen. Daher wurde die chromosomale Reparatur in Abhängigkeit der DNA-Transkription betrachtet. Nach BAF180-Depletion konnte gezeigt werden, dass ein fehlerhaftes *Chromatinremodelling* die Quantität der schnellen DSB-Reparaturkomponente verlangsamt, allerdings im weiteren Verlauf quantitativ und qualitativ nicht beeinflusst. Nach Inhibition der RNA-Polymerase II konnte keine Veränderung der Reparatur-Quantität sowie der Qualität der schnellen Reparaturkomponente beobachtet werden. Überraschenderweise wurde innerhalb der langsamen Reparaturkomponente eine Abhängigkeit der Reparatur-Qualität von der Transkription detektiert.

Zusammenfassend postulieren die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass neben der DNA-Resektion auch die DNA-Transkription entscheidend ist für die Ausbildung von Translokationen während der langsamen DSB-Reparatur in der G1-Phase. Hierbei könnte der Einfluss der Transkription auf die langsame DSB-Reparatur durch eine schadensabhängige Synthese von reparaturrelevanten Proteinen oder durch andere transkriptionsinduzierte Prozesse, wie z. B. eine veränderte Chromatindynamik, begründet sein. In weiterführenden Untersuchungen könnten diese Aspekte verifiziert werden.

The repair of DNA double-strand breaks (DSBs) is of utmost importance for the preservation of genomic stability. If DSBs are repaired incorrectly, chromosomal aberrations (e. g. translocations) can arise. Translocations result from misrejoining of wrong DNA ends during DSB repair. Several studies describe that translocations are found in malignant tumors and therefore postulated a correlation between translocations and carcinogenesis. Hence, it is of particular interest in the field of cancer research to understand the DSB repair mechanisms that facilitate translocation formation. The two major repair pathways for the repair of DSBs are canonical non-homologous end joining (c-NHEJ) and homologous recombination (HR). DSBs can be repaired by c-NHEJ in all cell cycle phases although the contribution of an alternative (alt-) NHEJ pathway is discussed in the literature. HR, on the other hand, is only available in S and G2 phase as this repair pathway requires the presence of the sister chromatid which serves as a template for repair synthesis.

In this thesis, the repair of radiation-induced DSBs and the formation of translocations were analyzed by chromosomal studies in human G1 phase cells. Chromosomal breaks were studied to assess repair quantity, while chromosomal translocations were analyzed to assess repair quality and to gain further insight into the underlying mechanisms of translocation formation. Therefore, in the first part of this thesis a method for premature chromosome condensation (PCC) in G1 phase using polyethylene-mediated cell fusion was established. Subsequently, the PCC method was combined with 3-color-FISH technology, which made the analysis of chromosomal breaks and chromosomal translocations in G1 phase cells possible.

In the second part of this thesis, the repair of chromosomal breaks and the generation of chromosomal translocations were compared between wild type (wt) cells and cells deficient in specific repair factors. In G1 wt cells, chromosome break repair and translocation formation showed a fast and a slow component. Although the majority of chromosome breaks (approximately 80 %) are repaired with fast kinetics, the slow repair of the remaining 20 % formed approximately 50 % of all detected translocations. Consequently, the data presented in this thesis demonstrate that the slow repair component in G1 wt cells is more error prone. Additional chromosomal studies showed that the repair quality of the slow component is dependent on CtIP, a protein involved in DSB end resection. Moreover, the data indicate that protein kinase Plk3 is involved in the generation of translocations in the slow repair component. Previous studies were able to show that Plk3-mediated phosphorylation of CtIP promotes end resection in G1. This CtIP- and Plk3-dependent repair pathway was further characterized using chromosomal analyses and the influence of the alt-NHEJ factors PARP1 and Lig1/3 on DSB repair was investigated. The results indicated that DSB repair and translocation formation in G1 wt cells is not completed by alt-NHEJ. Analysis of XLF- and

Lig4-deficient c-NHEJ mutant cells showed that repair quality and quantity decreased in these cells but alt-NHEJ still does not play a role. Furthermore, the results show that the slow DSB repair component depends on the c-NHEJ core protein DNA-PK and the nuclease Artemis. Consequently, the results in this study argue that the repair of DSBs in G1 wt cells is completed exclusively by c-NHEJ and that the formation of translocations during the slow repair component seems to be dependent on DSB end resection.

In the third part of this thesis, the formation of translocations during the fast repair component was analyzed. Previous studies have reported that translocations arise in transcriptionally active regions. Thus, the interplay between chromosomal repair and transcription was analyzed. After depletion of BAF180, the quantity of repair was delayed only during the fast repair component due to erroneous chromatin remodeling. After inhibition of RNA-Polymerase II, the repair quantity and quality in the fast repair component was not affected. Surprisingly, however, the data revealed that the repair quality in the slow repair component depends on transcription.

In summary, the results in this thesis show that DSB end resection as well as transcription play essential roles during translocation formation in the slow component in G1 phase. The influence of transcription during slow DSB repair might indicate that a synthesis of repair proteins is triggered after damage induction. Alternatively, transcription-induced changes in the chromatin dynamic could play a role. Future studies should be conducted to gain further insight.

1 Einleitung

Molekularer Träger der genetischen Information ist die Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleid acid*, DNA). Sie bildet den Bauplan aller Proteine und gewährleistet darüber die Aufrechterhaltung des zellulären Stoffwechsels. Die Bewahrung der genetischen Integrität ist daher von größter Relevanz, um die Stabilität aller zellulären Prozesse und die fehlerfreie Weitergabe der genetischen Information an die nachfolgenden Zellgenerationen zu garantieren. Die Integrität der DNA ist sowohl durch endogene Prozesse als auch über exogene Einflüsse permanent gefährdet. Unter anderem können endogene Prozesse, wie z. B. die meiotische Rekombination (Keeney & Neale, 2006) oder die V(D)J-Rekombination (Shih, Melek, Jayaratne, & Gellert, 2002), die DNA-Struktur verändern. Darüber hinaus können Sauerstoffradikale als Produkt von Stoffwechselprozessen (Marnett, 2000) oder auch Fehler während der Replikation zu DNA-Schäden führen (Umar & Kunkel, 1996). DNA-schädigende exogene Faktoren sind u. a. mutagene Chemikalien, UV-Strahlung oder ionisierende Strahlung, wie z. B. Röntgenstrahlung (Ciccia & Elledge, 2010). Das Ausmaß der endogen und exogen induzierten DNA-Schäden ist vielfältig und umfasst u. a. Basenschäden sowie Einzelstrangbrüche (ESBs) und Doppelstrangbrüche (DSBs) des DNA-Zucker-Phosphat-Rückgrats. In Abhängigkeit von der Art des DNA-Schadens und der Zellzyklusphase, in welcher der Schaden induziert wurde, existieren verschiedene Signaltransduktions- und Reparaturmechanismen. Um ausreichend Zeit für die Reparatur zu gewährleisten, kann die Zelle darüber hinaus einen Zellzyklusarrest initiieren. Wenn der DNA-Schaden nicht reparabel ist, kann die geschädigte Zelle über die Induktion der Apoptose aus dem Zellverband entfernt werden, um eine Entartung zu vermeiden. Für den Erhalt der genomischen Stabilität ist vor allen Dingen die Reparatur von DSBs entscheidend. Eukaryotische Zellen besitzen für die Reparatur von DSBs zwei Hauptwege, die kanonische nicht-homologe Endverknüpfung (*canonical non-homologous end-joining*, c-NHEJ) und die homologe Rekombination (HR) (Chapman, Taylor, & Boulton, 2012; Davis & Chen, 2013; Jackson & Bartek, 2009). Nicht- oder falsch reparierte DSBs sind die Grundlage von chromosomalen Aberrationen, die zur Karzinogenese führen können (Bunting & Nussenzweig, 2013; Hoeijmakers, 2001).

Das Forschungsgebiet der Strahlenbiologie beschäftigt sich mit der Wirkung von ionisierender Strahlung auf biologische Systeme. Unter anderem wird die DNA-schädigende Wirkung von ionisierender Strahlung genutzt, um die verschiedenen zellulären Mechanismen der DSB-Reparatur aufzuklären, mit dem Ziel eine Karzinogenese nach Möglichkeit zu verhindern bzw. über die Entwicklung neuer Behandlungsansätze die Tumorthherapie zu optimieren.

1.1 Strahlenphysikalische Grundlagen

Wird Strahlung von biologischer Materie absorbiert, führt das zu einer Anregung oder Ionisation von Molekülen. Einen ionisierenden Effekt hat Strahlung immer dann, wenn die Energie der deponierten Strahlung größer ist als die Bindungsenergie von Elektronen innerhalb der absorbierenden Materie und Elektronen aus dem Atom oder Molekülverband gelöst werden. Ionisierende Strahlung (*ionising radiation*, IR) wird in Photonen- und Teilchenstrahlung unterteilt. Röntgen- und Gamma-Strahlen zählen zur Photonenstrahlung, dagegen werden u. a. Alpha-Teilchen, Protonen und Schwerionen der Teilchenstrahlung zugeordnet. Die ionisierende Wirkung geladener Teilchen steigt mit dem Quadrat ihrer Ladung und sinkt mit der Teilchengeschwindigkeit. Während Teilchenstrahlung beim Durchdringen von Materie über ihr elektrisches Feld zu einer direkten Ionisation von Atomen und Molekülen führt, bewirkt Photonenstrahlung durch verschiedene Wechselwirkungsprozesse überwiegend eine indirekte Ionisation der durchdringenden Materie. Die Art der Wechselwirkung ist abhängig von der Energie der Photonenstrahlung. Der für niederenergetische Röntgenstrahlung bis zu 50 keV relevante Wechselwirkungsprozess ist der Photoeffekt. Hierbei überträgt ein Photon der Strahlung seine gesamte Energie auf ein Elektron in einer inneren Atomschale. Die Photonenenergie wird abzüglich der Ionisierungsenergie in Bewegungsenergie umgewandelt, das Elektron löst sich aus der Atomhülle und kann als sogenanntes Sekundärelektron weitere Ionisationen bewirken. Bei hochenergetischer Röntgenstrahlung bis zu 100 keV dominiert der Compton-Effekt, bei welchem nur ein Teil der Photonenenergie auf das Elektron in einer äußeren Atomschale übertragen wird. Das Photon verliert zwar einen Teil seiner Energie und ändert die Richtung kann aber, genau wie das freigesetzte Sekundärelektron, weitere Ionisationen verursachen.

1.2 Wechselwirkung von ionisierender Strahlung mit Biomaterie

Die Wechselwirkung von IR bzw. von IR-erzeugten Sekundärelektronen mit Biomolekülen wie DNA, RNA, Proteinen oder Lipiden ist entscheidend für einen biologischen Effekt. Da das DNA-Molekül Träger der gesamten genetischen Information ist, sind strahleninduzierte DNA-Schäden und deren Auswirkungen von größter Relevanz und stehen deshalb im Mittelpunkt strahlenbiologischer Untersuchungen. Die biologische Wirkung ist hierbei abhängig vom LET (*linear energy transfer*) der jeweiligen Strahlung. Der LET beschreibt die pro Wegstrecke deponierte Energie und erlaubt in Abhängigkeit der Ionisationsdichte eine Klassifizierung in

dünn und dicht ionisierende Strahlung. Demnach ist der LET bei dünn ionisierender Strahlung wie Röntgen- oder Gamma-Strahlung niedrig, wohingegen Teilchenstrahlung einen hohen LET besitzt und folglich dicht ionisierend ist. Neben dem LET ist die biologische Wirkung von IR auch abhängig von der Energiedosis. Hierbei wird die in der Materie deponierte Energiedosis einer ionisierenden Strahlung als absorbierte Energie pro Masse (Joule/kg) definiert und besitzt die Einheit Gray (Gy). Eine Schädigung der DNA kann über eine direkte oder indirekte Strahlenwirkung erfolgen. Bei der indirekten Strahlenwirkung wird die Strahlungsenergie beim Durchdringen der Materie primär von Wassermolekülen absorbiert und induziert die Radiolyse der Wassermoleküle. Die bei der Radiolyse erzeugten Hydroxylradikale können durch die Oxidation des DNA-Moleküls zu sekundären DNA-Schäden führen, wenn sie im Bereich weniger Nanometer um die DNA entstehen (Hall et al., 2006). Erfolgt die Absorption der Strahlungsenergie im DNA-Molekül selbst, wird das als direkte Strahlenwirkung beschrieben. Dicht ionisierende Teilchenstrahlung erzeugt überwiegend direkte Strahleneffekte, wohingegen dünn ionisierende Photonenstrahlung vorwiegend über indirekte Strahleneffekte mit biologischer Materie wechselwirkt (Abb. 1).

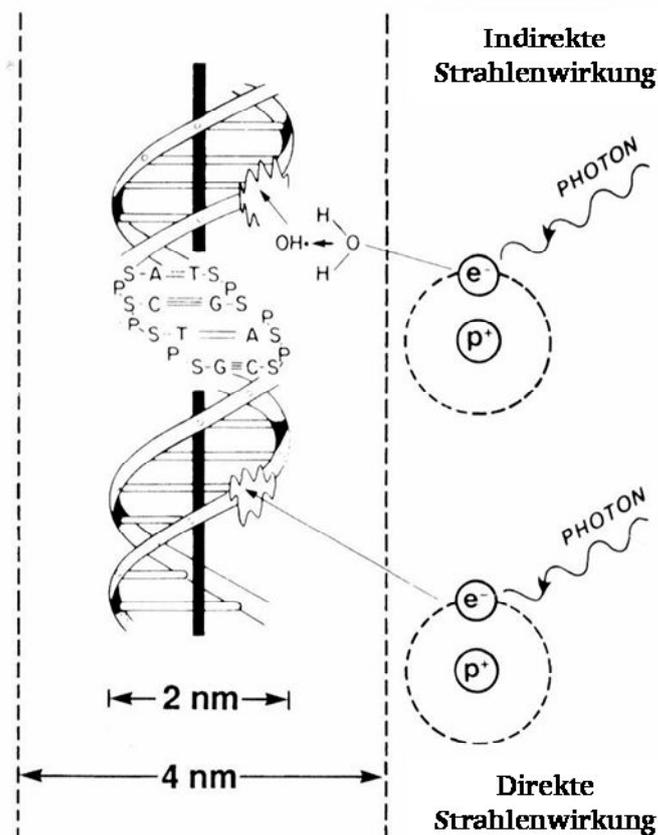


Abbildung 1: Indirekte und direkte Wirkung ionisierender Strahlung

Bei einer indirekten Strahlenwirkung werden Schäden am DNA-Molekül durch Hydroxylradikale ($\text{OH}\cdot$) induziert, welche durch die Wechselwirkung von IR bzw. von IR-erzeugten Sekundärelektronen mit Wasser entstehen. Bei einer direkten Strahlenwirkung reagieren IR bzw. von IR-erzeugte Sekundärelektronen direkt mit dem DNA-Molekül und bewirken hierüber Strukturschäden (S=Zucker, P=Phosphat, A=Adenin, C=Cytosin, G=Guanin, T=Thymin) (modifiziert nach Hall et al., 2006).

Unabhängig davon, ob die Strahlenwirkung indirekt oder direkt ist, können durch die strahleninduzierte Zerstörung chemischer Bindungen u. a. Basenschäden, ESBs und DSBs des Zucker-Phosphat-Rückgrats entstehen. Mit steigender Dosis und LET der Strahlung erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass komplexe DNA-Schäden entstehen. Sie werden als *locally multiply damage sites* (LMDS) bezeichnet und umfassen im Bereich weniger Basenpaare (bp) verschiedene Schäden. DSBs entstehen, wenn zwei ESBs in einem Abstand von ≤ 10 bp gegenüber liegen (Mladenov & Iliakis, 2011; Schipler & Iliakis, 2013).

1.3 Erkennung von DNA-Doppelstrangbrüchen und Schadensantwort

Für den Erhalt der genomischen Stabilität ist die Erkennung und darauf folgende korrekte Reparatur von DNA-DSBs von besonderer Relevanz. Werden DSBs nicht oder falsch repariert, können daraus Genmutationen oder chromosomale Aberrationen resultieren, die Ursache verschiedenster Krankheitsbilder sein können und eine Karzinogenese begünstigen (Downs, 2007; Hoeijmakers, 2001). Nach der Entstehung eines DSBs wird ein komplexes Netzwerk der Schadensantwort aktiviert, um eine möglichst effiziente Reparatur zu gewährleisten. Der DSB wird zunächst von Sensor-Proteinen erkannt. Neben dem Ku/DNA-PKcs (*DNA dependent protein kinase catalytic subunit*)-Komplex, der mit hoher Affinität an DSBs bindet und eine zentrale Funktion für die NHEJ-Reparatur besitzt, wird der MRN-Komplex bestehend aus Mre11 (*meiotic recombination 11*), RAD50 (*radiation repair protein 50*) und NBS1 (*Nijmegen Breakage Syndrom 1*) als einer der ersten Schadenssensoren angenommen (Kinner, Wu, Staudt, & Iliakis, 2008; Petrini & Stracker, 2003). Der MRN-Komplex unterstützt durch eine Interaktion von NBS1 mit der Proteinkinase ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) dessen Rekrutierung und Aktivierung (Lee & Paull, 2005; You, Chahwan, Bailis, Hunter, & Russell, 2005).

Allerdings wird auch eine MRN-unabhängige Aktivierung von ATM beschrieben, die aus der DSB-induzierten Veränderung der Chromatinstruktur resultiert (Bakkenist & Kastan, 2003). ATM wird als zentrale Kinase innerhalb der Schadensantwort gesehen und gehört neben ATR (*ATM and Rad3 related*) und der DNA-PKcs zur Familie der PIKKs (*phosphatidylinositol 3-kinase-like serine/threonine protein kinases*) (Burma, Chen, Murphy, Kurimasa, & Chen, 2001). Durch eine Autophosphorylierung am Serin 1981 wird das inaktive ATM Dimer schadensabhängig aktiviert und monomerisiert. ATM phosphoryliert das Histon H2AX am Serin 139 zu γ H2AX, wobei H2AX redundant zu ATM auch von DNA-PK (*DNA dependent protein kinase*) phosphoryliert werden kann (Stiff et al., 2004).

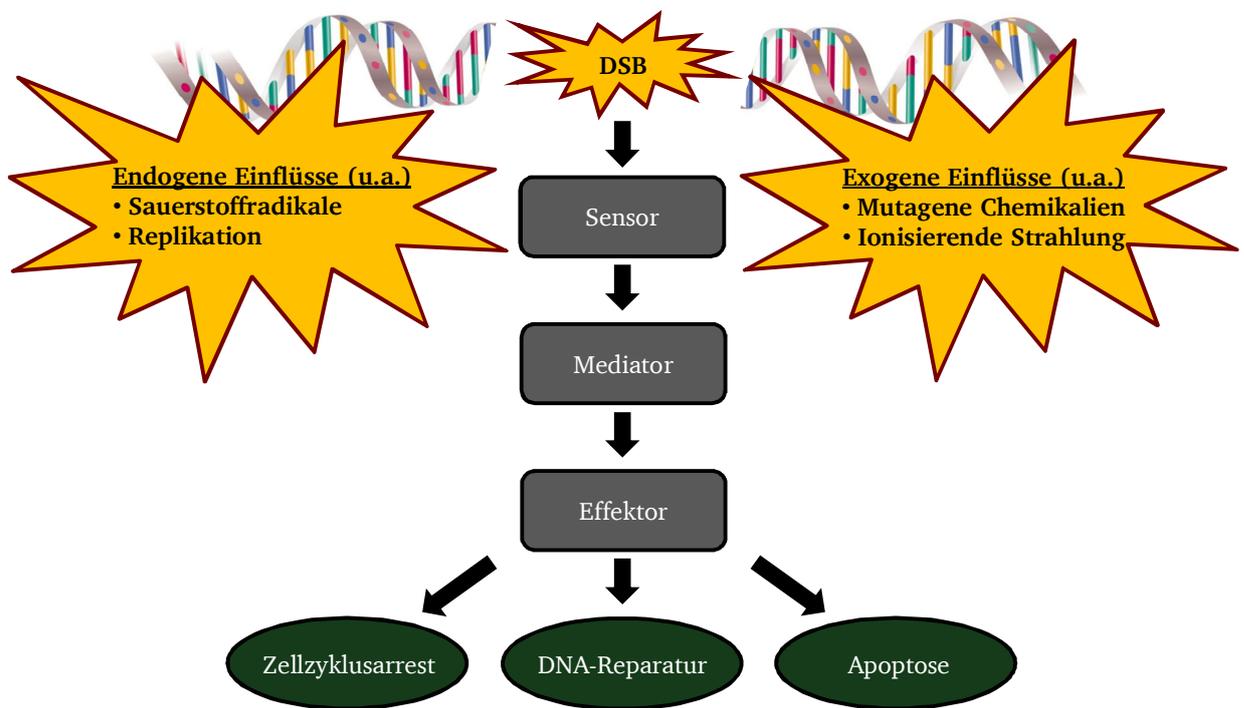


Abbildung 2: Schematische Darstellung der DNA-Schadensantwort

Verschiedene endogene Prozesse oder exogene Einflüsse können DSBs innerhalb des DNA-Zucker-Phosphat-Rückgrats induzieren. DSBs werden durch Sensor-Proteine erkannt, welche die Schadensinformation an Mediator-Proteine weiterleiten. Diese übermitteln das Schadensignal an Effektor-Proteine, welche die endgültige Schadensantwort initiieren. Je nach Ausmaß des DNA-Schadens können Effektor-Proteine die DNA-Reparatur, einen Zellzyklusarrest oder auch die Apoptose sowie die Seneszenz der geschädigten Zelle induzieren (modifiziert nach Khanna & Jackson, 2001).

Einzelsträngige DNA-Bereiche aktivieren die Proteinkinase ATR, die daher u. a. eine wichtige Funktion für die Phosphorylierung von H2AX und die Weitergabe des Schadenssignals bei Replikationsprozessen besitzt (Abraham, 2001; Hanasoge & Ljungman, 2007; Ward & Chen, 2001). In Abhängigkeit des initialen γ H2AX Signals, bindet MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) im Bereich phosphorylierter H2AX Histone (Stucki et al., 2005). MDC1 interagiert mit NBS1, wodurch der MRN-Komplex die Rekrutierung von ATM unterstützt. In der Folge phosphoryliert ATM weitere H2AX-Histone. Diese Reaktionsschleife bewirkt, dass sich die Phosphorylierung innerhalb weniger Minuten in einer Region von etwa 2 Mbp um den DSB herum ausdehnt, was ein Signal für weitere an der Schadensantwort beteiligte Faktoren darstellt (Rogakou, Pilch, Orr, Ivanova, & Bonner, 1998; Stewart, Wang, Bignell, Taylor, & Elledge, 2003).

Im weiteren Verlauf der Schadensantwort werden sogenannte Mediator-Proteine aktiviert, die das Schadenssignal verstärken und an Effektor-Proteine übermitteln (Abb. 2). In Abhängigkeit von der Art und dem Ausmaß des DNA-Schadens können Effektor-Proteine neben der DNA-Reparatur auch einen Zellzyklusarrest initiieren. Durch den Zellzyklusarrest gewinnt die Zelle Zeit für die Reparatur und vermeidet dadurch eine Replikation bzw. mitotische Teilung eines geschädigten Genoms. Darüber hinaus ist neben der initialen Phosphorylierung von H2AX eine Vielzahl unterschiedlicher Chromatinmodifikationen im Bereich von DSBs Bestandteil einer effizienten DNA-Schadensantwort (siehe Kapitel 1.5). Falls der DNA-Schaden irreparabel ist, können Effektor-Proteine zur Erhaltung der genomischen Stabilität außerdem die Apoptose oder die Seneszenz der Zelle initiieren (Jackson & Bartek, 2009; Khanna & Jackson, 2001).

1.4 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Die wichtigsten Mechanismen für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen sind das kanonische NHEJ (*canonical non-homologous end-joining*, c-NHEJ) und die HR. DSBs können in allen Zellzyklusphasen über das c-NHEJ repariert werden, wobei die Ligation der Bruchenden mit Basendeletionen bzw. -insertionen oder Fehlverknüpfungen verbunden sein kann. Im Gegensatz zum c-NHEJ verläuft die HR fehlerfrei, da für die Reparatur homologe DNA-Sequenzen genutzt werden. Daher ist die HR auf die späte S-Phase und G2-Phase des Zellzyklus beschränkt, in welchen die homologe Schwesterchromatide als genetisch identische Matrize für die Reparatur zur Verfügung steht (Lieber, 2010a; Neal & Meek, 2011).

Die Doppelstrangbruch-Reparatur (DSBR) zeigt in Säuger-Zellen in der G2-Phase und der G1-Phase des Zellzyklus einen biphasischen Verlauf (Abb. 3). Nach dünnionisierender Strahlung wie Röntgenstrahlung werden etwa 80 % der induzierten DSBs mit schneller Kinetik innerhalb der ersten Stunden repariert. Die verbleibenden 20 % der Brüche werden dagegen mit langsamer Kinetik im Verlauf von etwa 24 h nach Schadensinduktion repariert. Die schnelle Komponente der DSBR verläuft in der G2-Phase und der G1-Phase über das c-NHEJ. In der G2-Phase erfolgt die langsame DSBR über die HR, wohingegen der langsame Mechanismus DSBR in der G1-Phase bislang unklar ist. In der vorliegenden Arbeit wurde die DSBR in Zusammenhang mit der Entstehung von chromosomalen Translokationen in G1-Phase-Zellen analysiert. Da wie oben beschrieben die DSBR über die HR in G1-Phase-Zellen nicht von Relevanz ist, wird im Folgenden ausschließlich das NHEJ detaillierter dargestellt.

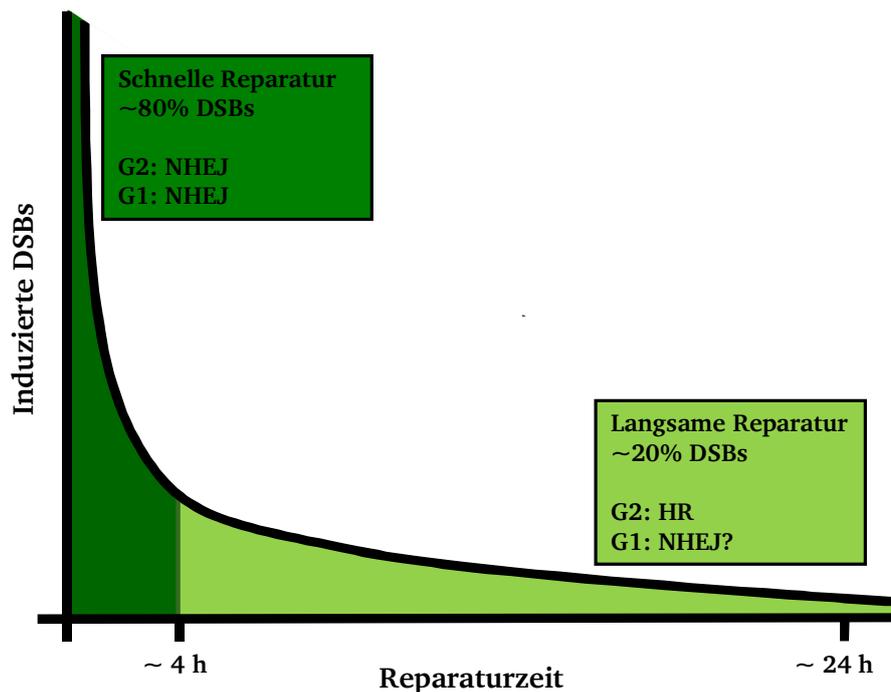


Abbildung 3: Doppelstrangbruchreparatur in der G2-Phase und der G1-Phase

In Säuger-Zellen wird die Reparatur von IR-induzierten DSBs sowohl in der G2- als auch in der G1-Phase in eine schnelle und eine langsame Komponente unterteilt. In beiden Zellzyklusphasen wird die schnelle Komponente durch das NHEJ repräsentiert. Die langsame Reparatur von DSBs verläuft in der G2-Phase über die HR, in der G1-Phase über einen langsamen, bislang unklaren, NHEJ-Mechanismus.

1.4.1 Das kanonische NHEJ (c-NHEJ)

Die Reparatur über das c-NHEJ gewährleistet der Zelle durch den gesamten Zellzyklus eine Reparatur von DSBs. Der Mechanismus beruht auf einer schnellen Verknüpfung der Bruchenden, kann allerdings mit Basendeletionen oder -insertionen und Fehlverknüpfungen verbunden sein. Die Kernkomponenten des Reparaturmechanismus sind zum einen die DNA-PK, die sich aus den Proteinen Ku70, Ku80 und der DNA-PKcs zusammensetzt, zum anderen der DNA-LigaseIV-Komplex, der aus der LigaseIV, XRCC4 (*X-ray repair cross-complementing*) und XLF (*XRCC 4 like factor*) gebildet wird (Ahnesorg, Smith, & Jackson, 2006; Jeggo, 1998). Nach Auftreten eines DSBs bindet zunächst ein Heterodimer aus Ku70/Ku80 an die freien DSB-Enden, die dadurch stabilisiert und vor einem nukleolytischen Abbau geschützt werden (Liang & Jasin, 1996; Walker, Corpina, & Goldberg, 2001) (Abb. 4). Im weiteren Verlauf der Reparatur wird in Abhängigkeit von Ku70/Ku80 die DNA-PKcs an den DSB rekrutiert, die zusammen mit Ku70/Ku80 das Holoenzym DNA-PK formt (Gell & Jackson, 1999; Meek, Gupta, Ramsden, & Lees-Miller, 2004; Singleton, Torres-Arzayus, Rottinghaus, Taccioli, & Jeggo, 1999). Die DNA-PK bildet einen sogenannten *Synaptic-complex*, der die DSB-Enden in

räumlicher Nähe hält (DeFazio, Stansel, Griffith, & Chu, 2002; Soutoglou et al., 2007). Darüber hinaus reguliert die DNA-PK als Serin/Threonin-Kinase durch Phosphorylierungen die Funktion verschiedener anderer NHEJ relevanter Proteine, wobei die Autophosphorylierung der DNA-PK entscheidend für den weiteren Verlauf des NHEJ ist (Chan & Lees-Miller, 1996; Douglas et al., 2007; Jiang et al., 2015; Uematsu et al., 2007). In Abhängigkeit der Autophosphorylierung steht sowohl die Inaktivierung der DNA-PK und die dadurch initiierte Freigabe der DSB-Enden sowie eine mögliche Prozessierung der Bruchenden (Cui et al., 2005; Hammel et al., 2010; Neal & Meek, 2011). Des Weiteren wird eine DNA-PK abhängige Rekrutierung des DNA-LigaseIV-Komplexes beschrieben (Drouet et al., 2005). Die meisten DSBs zeigen keine 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Enden, die für eine Ligation notwendig sind. Wenn terminale Nukleotide modifiziert oder zerstört sind, müssen daher die Bruchenden vor der Ligation zunächst prozessiert werden. Hierbei wird die Polynukleotid-Kinase/-Phosphatase (PNKP) sowohl über eine DNA-PK- und ATM-abhängige Phosphorylierung (Zolner et al., 2011) als auch über eine Interaktion mit XRCC4 aktiviert (Koch et al., 2004). Die PNKP ist ein bifunktionaler Prozessierungsfaktor, da sie eine 5'-Kinase- und eine 3'-Phosphatase-Aktivität besitzt, um DSBs in ligierbare 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Enden zu modifizieren. Des Weiteren sind die Polymerasen μ und λ für ihre Aktivität innerhalb der Bruchenden-Prozessierung während der NHEJ-Reparatur beschrieben (Chayot, Montagne, & Ricchetti, 2012). Im weiteren Verlauf werden die 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Enden über den DNA-LigaseIV-Komplex miteinander ligiert und damit die DSBR abgeschlossen (Ahnesorg et al., 2006; Smith et al., 2003).

Darüber hinaus kann eine Prozessierung der Bruchenden auch über die Nuklease Artemis erfolgen, die in Abhängigkeit von DNA-PK aktiviert wird (Ma, Pannicke, et al., 2005). Hierbei ist eine Funktion von Artemis für die Prozessierung von DSB-Enden während der V(D)J-Rekombination beschrieben, in welcher Artemis sogenannte *hairpin*-Strukturen im Bereich der Bruchenden öffnet um eine Ligation zu ermöglichen (Ma, Pannicke, Schwarz, & Lieber, 2002; Ma, Schwarz, & Lieber, 2005). Des Weiteren wird eine Funktion von Artemis innerhalb der NHEJ-Reparatur in der G1-Phase postuliert. Es ist bekannt, dass die Reparatur von etwa 20 % der strahleninduzierten DSBs eine Abhängigkeit von Artemis zeigt und dass diese Brüche vermutlich in heterochromatischen Bereichen lokalisiert sind. Der genaue Reparaturmechanismus und die Funktion von Artemis in diesem Prozess, sind allerdings bislang noch nicht geklärt (Riballo et al., 2004).

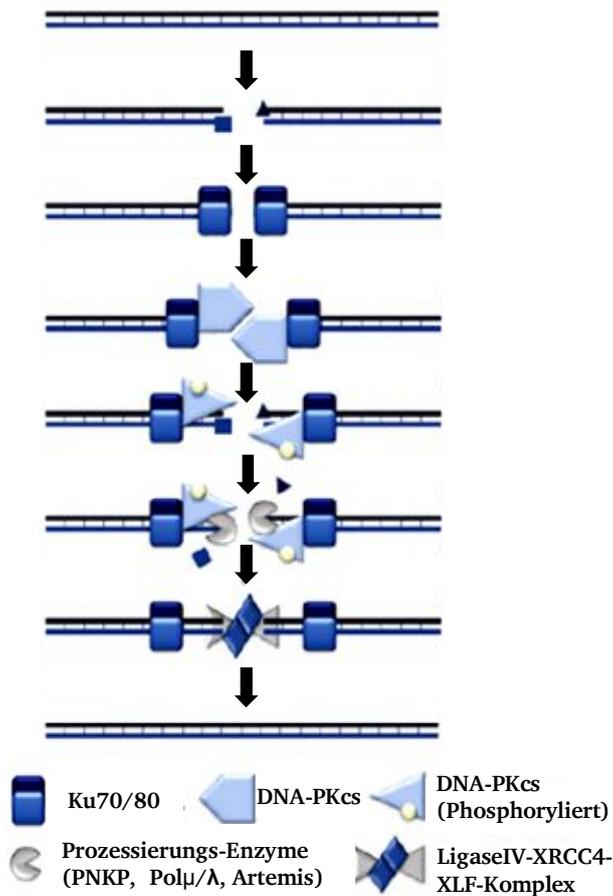


Abbildung 4: Das kanonische NHEJ (c-NHEJ)

Nach der Entstehung eines DSBs wird das c-NHEJ durch Binden eines Ku70/Ku80 Heterodimers an die offenen Bruchenden initiiert. Dadurch werden die Bruchenden stabilisiert und vor einem nukleolytischen Abbau geschützt. In der Folge wird durch Ku70/Ku80 die DNA-PKcs rekrutiert. Zusammen bilden sie das DNA-PK-Holoenzym, welches u. a. die Bruchenden in räumlicher Nähe hält. Nach einer Autophosphorylierung der DNA-PK werden die Bruchenden frei und mögliche Modifikationen, wie z. B. beschädigte Nucleotide, prozessiert. Im weiteren Verlauf des c-NHEJ werden 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Enden über den DNA-LigaseIV-XRCC4-XLF-Komplex ligiert (modifiziert nach Goodarzi & Jeggo, 2013).

1.4.2 Varianten des NHEJ

Neben dem c-NHEJ wird derzeit die Existenz weiterer NHEJ Varianten diskutiert, die im Gegensatz zum c-NHEJ Mikrohomologien zwischen 2 bis 25 Nucleotiden im Bereich der ursprünglichen DNA-Bruchstellen zeigen und deshalb allgemein als MMEJ (*microhomology mediated end-joining*) bezeichnet werden (Decottignies, 2013; Goodarzi & Jeggo, 2013; McVey & Lee, 2008). Die genaue Funktion und der Ablauf der Mechanismen sowie eine detaillierte Klassifizierung der verschiedenen Varianten sind gegenwärtig im Interesse mehrerer DNA-Reparaturstudien. Eine Variante innerhalb der MMEJ-Mechanismen ist das alternative (alt-) NHEJ oder auch *backup-NHEJ* genannt, welches hauptsächlich in c-NHEJ-defekten Zellen für die DSB-Reparatur verantwortlich ist (Abb. 5). Anders als beim c-NHEJ steht die Ligation der DSB-Enden beim alt-NHEJ in Abhängigkeit des DNA-LigaseI- bzw. DNA-LigaseIII-XRCC1-Komplex (Paul et al., 2013). Ein weiteres zentrales Protein im alt-NHEJ ist PARP1 (*Poly (ADP-ribose) polymerase 1*). PARP1 bindet an DSB-Enden, wobei Ku70/80 DSBs mit

einer höheren Affinität bindet, sodass PARP1 erst in Ku70/80-defizienten bzw. c-NHEJ-defekten Zellen für die DSBR von Relevanz ist. PARP1 modifiziert in der Folge verschiedene Proteine, die an der DNA-Schadensantwort beteiligt sind (M. L. Wang et al., 2006). Neben PARP1 werden außerdem der MRN-Komplex sowie das Protein CtIP (*C-terminal binding protein-interacting protein*) innerhalb der DSBR über das alt-NHEJ beschrieben. Hierbei scheinen Mre11 und CtIP, die während der HR eine DNA-Endresektion initiieren, auch im alt-NHEJ eine Resektion der DSB-Enden zu vermitteln, woraus die Mikrohomologien im Bereich der ursprünglichen DNA-Bruchstellen resultieren (Schipler & Iliakis, 2013). Eine DSBR in c-NHEJ-defekten Zellen über das alt-NHEJ ist zwar möglich, verläuft aber langsamer als in c-NHEJ-profizienten Zellen. Darüber hinaus postulieren verschiedene Studien, dass das alt-NHEJ die Entstehung von chromosomalen Aberrationen wie Translokationen begünstigt und daher eine mögliche Grundlage einer Karzinogenese ist (Lieber, 2010b; Nussenzweig & Nussenzweig, 2007; Simsek et al., 2011; Soni et al., 2014; Zhang & Jasin, 2011).

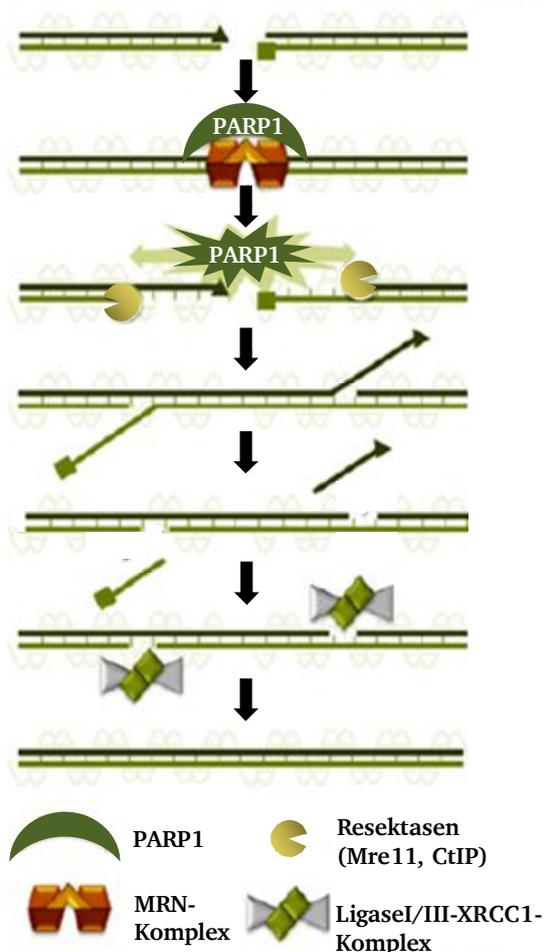


Abbildung 5: Das alternative NHEJ (alt-NHEJ)

Die Reparatur von DSBs über das alt-NHEJ scheint besonders in Ku70/80-defizienten bzw. c-NHEJ-defekten Zellen von Relevanz zu sein. Hierbei binden vermutlich nach der Entstehung eines DSBs zunächst der MRN-Komplex und PARP1 an die Bruchenden. Es wird angenommen, dass im weiteren Verlauf die Bruchenden unter Beteiligung von Mre11 und CtIP resektiert werden, woraus Mikrohomologien im Bereich der Bruchstellen resultieren. Die Ligation der Bruchenden verläuft in Abhängigkeit des DNA-LigaseI- bzw. DNA-LigaseIII-XRCC1-Komplex (modifiziert nach Goodarzi & Jeggo, 2013).

1.5 Chromatinmodifizierungen im Kontext der Schadensantwort

Der als Chromatin bezeichnete DNA-Protein-Komplex ist innerhalb des eukaryotischen Zellkerns in verschiedene Strukturen organisiert, durch welche eine Komprimierung der DNA ermöglicht wird. Hierbei ist die kleinste funktionelle Untereinheit des Chromatins ein Nukleosom (Abb. 6). Ein Nukleosom besteht aus 147 bp DNA, die um ein Histonoktamer gewunden sind. Das Histonoktamer wird aus je zwei Kopien der Histone H3, H4, H2A und H2B gebildet (Luger, Mader, Richmond, Sargent, & Richmond, 1997). Das Histon H2AX ist eine Variante des Histon H2A, wobei die H2A Population zwischen 2 bis 25 % H2AX Histone umfasst. Der DNA-Bereich der zwischen den einzelnen Nukleosomen liegt umfasst 20 bis 80 bp und wird als „Linker“-DNA bezeichnet, wobei das Histon H1 den Bereich markiert, ab dem sich die DNA beginnt um das Histonoktamer zu winden. Eine weitere Komprimierung wird durch DNA-assoziierte Proteine vermittelt.

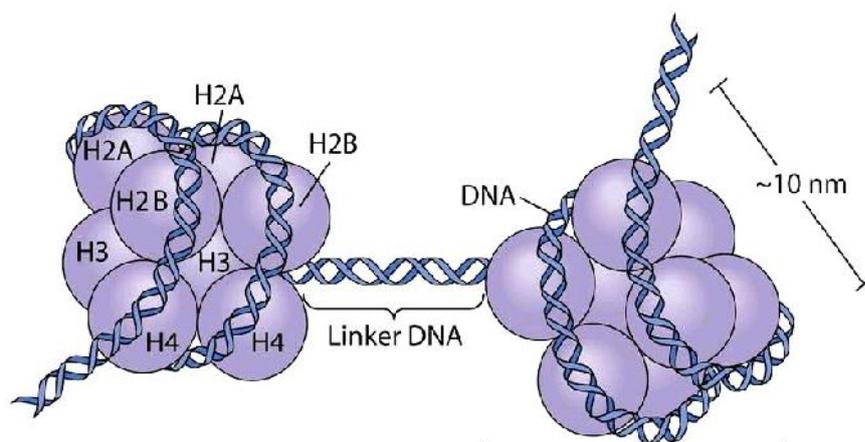


Abbildung 6: Aufbau eines Nukleosoms

Ein Nukleosom besteht aus einem Histonoktamer (je zwei Kopien der Histone H3, H4, H2A und H2B) und 147 bp DNA. Die DNA ist um das Histonoktamer gewunden, wobei der Bereich zwischen den einzelnen Nukleosomen als „Linker“-DNA bezeichnet wird (aus Dissertation Gasparoni, 2009).

Es existieren verschiedene zelluläre Mechanismen, die eine Konformationsänderung der hochkomplexen Chromatinstruktur ermöglichen. Die partielle Modifikation der Chromatinstruktur ist z. B. für die Regulation der Transkription und der Replikation erforderlich, aber auch für eine korrekte DNA-Schadensantwort von entscheidender Bedeutung (Kinner et al., 2008). Unter anderem kann die DNA-Histon-Interaktion über verschiedene chemische Modifikationen wie Phosphorylierungen, Acetylierungen, Methylierungen oder Ubiquitinierungen an der DNA selbst, den Histonen oder an den DNA-

assoziierten Proteinen verändert werden. Beispielsweise führen Acetylierungen von positiv geladenen Lysin- oder Arginin-Resten im N-Terminus von Histonen zu einer schwächeren Interaktion der acetylierten Histone mit dem negativ geladenen DNA-Rückgrat (Gospodinov & Herceg, 2013). So ist z. B. eine Acetylierung des HistonH3 am Lysin 9 (H3K9Ac) mit einer euchromatischen, dekondensierten Chromatinstruktur und transkriptioneller Aktivität verbunden. Dagegen kann das gleiche Histon durch Histondeacetylasen (HDACs) und Histonmethyltransferasen (HMTs) am Lysin 9 auch trimethyliert werden (H3K9Me), woraus eine heterochromatische, hochkondensierte Chromatinstruktur und transkriptionelle Repression resultiert (Martin & Zhang, 2005). Neben der Relevanz bei transkriptionellen Prozessen ist eine Modifizierung der hochkomplexen Chromatinstruktur auch für eine effiziente DNA-Schadensantwort unerlässlich. Hierbei besitzt die durch DSBs aktivierte Proteinkinase ATM eine zentrale Funktion. Eine der bekanntesten schadensabhängigen Histon-Modifikationen ist z. B. die ATM-vermittelte Phosphorylierung des Histons H2AX zu γ H2AX im Bereich eines DSB (siehe Kapitel 1.3). Einerseits können chemische Modifikationen selbst zu einer Veränderung der Chromatinstruktur führen, andererseits können sie auch die Rekrutierung bzw. Bindung von Proteinen induzieren, welche ihrerseits die Fähigkeit haben die Chromatinstruktur zu modifizieren. Beispielsweise werden acetylierte Lysinreste von sogenannten Bromodomänen erkannt, die Bestandteil von *Chromatinremodelling*-Enzymen sind.

Chromatinremodelling-Enzyme sind große Protein-Komplexe, die unter Verbrauch von ATP Nukleosomen verschieben oder einzelne Histone bzw. vollständige Histon-Oktamere entfernen können (Jeggo & Downs, 2014; Seeber, Hauer, & Gasser, 2013). Sie werden in Abhängigkeit ihres katalytischen Zentrums in 4 Unterfamilien eingeteilt. Im Folgenden werden nur die Proteinkomplexe der SWI/SNF (*SWItch/Sucrose Non Fermentable*)-Familie näher beschrieben, da in der vorliegenden Arbeit das zu dieser Familie zugehörige Protein BAF180 (*BRG1-associated factor 180*) untersucht wurde. Die SWI/SNF-Proteinkomplexe bestehen aus mindestens acht Untereinheiten, wobei das katalytische Zentrum in humanen Zellen entweder von BRG1 (*brahma-related gene 1*) oder hBRM (*human brahma*) gebildet wird. Hierbei kann der BAF (*BRG1- or hBRM-associated factors*)-Komplex entweder BRG1 oder hBRM enthalten. Das katalytische Zentrum des PBAF (*polybromo-associated BAF*)-Komplexes wird ausschließlich von BRG1 gebildet. Die übrigen Untereinheiten der Komplexe enthalten verschiedene Domänen, die eine spezifische Chromatininteraktion zeigen. Hierzu zählen u. a. Bromodomänen.

In Säuger-Zellen konnte eine Lokalisation der SWI/SNF-Proteinkomplexe im Bereich von DSBs unmittelbar nach Schadensinduktion und ein Einfluss auf die Ausbildung der schadensabhängigen H2AX-Phosphorylierung gezeigt werden (Park et al., 2006). Zudem wird beschrieben, dass die Reparatur von enzymatisch- und strahleninduzierte DSBs in Abhängigkeit der SWI/SNF-Proteinkomplexe verläuft. Hierbei wird eine Funktion der unterschiedlichen Komplexe sowohl innerhalb der HR, als auch für das NHEJ postuliert (Jeggo & Downs, 2014). Darüber hinaus sind SWI/SNF-Proteinkomplexe bzw. die von ihnen induzierten Chromatinmodifikationen an der Regulation der Transkription beteiligt. Hierbei scheinen sie u. a. einen Einfluss auf die Expression von Genen zu haben, die mit der Zellzykluskontrolle und der Proliferation assoziiert sind (Roberts & Orkin, 2004). Im Zusammenhang mit ihrer regulatorischen Funktion bezüglich der Transkription und ihrer direkten Rolle während der DNA-Schadensantwort werden Defekte innerhalb der SWI/SNF-Proteinkomplexe mit einer Karzinogenese in Verbindung gebracht (Shain & Pollack, 2013).

1.6 Chromosomale Aberrationen

Chromosomale Aberrationen sind numerische oder strukturelle Veränderungen der Chromosomen. Mutationen innerhalb einzelner Gene gehören dagegen nicht zur Gruppe der chromosomalen Aberrationen, sie werden als Genmutation bezeichnet. Durch numerische oder strukturelle Veränderungen der Chromosomen entstehen abnorme genetische Regionen, die je nach Ausprägung der Aberration für die Zelle letal oder Ursache verschiedenster Krankheitsbilder sein können (Tariverdian & Buselmaier, 2004). Chromosomenanomalien können pränatal und postnatal, durch endogene Prozesse oder exogene Einflüsse entstehen. Bei etwa 0,5 % aller Lebendgeburten sind chromosomale Veränderungen zu finden, die verschiedene strukturelle und numerische Aberrationen umfassen. Etwa 50-60 % aller spontanen Aborte zeigen Chromosomenanomalien, wobei überwiegend numerische Aberrationen detektiert werden. Für die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität ist die Reparatur von DNA-DSBs von besonderer Relevanz. Eine ausbleibende oder fehlerhafte DSBR ist die Grundlage verschiedenster chromosomaler Aberrationen. Die hieraus resultierende veränderte Genomstruktur kann u. a. zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen bzw. Aktivierung von Protoonkogenen führen und eine Karzinogenese begünstigen. Verschiedene epidemiologische Studien haben gezeigt, dass eine gesteigerte Frequenz chromosomaler Aberrationen innerhalb der peripheren Lymphozyten das Risiko einer Karzinogenese deutlich erhöht (Boffetta et al., 2007; Norppa et al., 2006).

1.6.1 Numerische Aberrationen

Numerische Aberrationen werden auch als Genommutation oder Aneuploidie bezeichnet. Im Gegensatz zur Euploidie, die einen ganzzahlig-mehrfachen Chromosomensatz beschreibt, ist die Aneuploidie gekennzeichnet durch das Fehlen (Monosomie) oder das zusätzliche Vorhandensein (Polysomie) einzelner Chromosomen innerhalb des regulären Chromosomensatzes. Eine Aneuploidie entsteht überwiegend präzygot. Ursächlich sind meistens Fehler bei der Meiose und eine daraus resultierenden Fehlverteilung der homologen Chromosomen während der Gametogenese. Die Gameten enthalten dann nicht den regulären haploiden Chromosomensatz mit 23, sondern 22 bzw. 24 Chromosomen, woraus eine Zygote mit einer Monosomie bzw. einer Trisomie resultiert. Aber auch postzygot können während der Embryonalentwicklung fehlerhafte mitotische Teilungen zu Aberrationen führen. Hierbei wird zwischen gonosomalen und autosomalen Aneuploidien unterschieden. Während gonosomale Aneuploidien die Geschlechtschromosomen betreffen, bezieht sich eine autosomale Aneuploidie auf numerische Aberrationen der sogenannten Körperchromosomen. Im Gegensatz zu verschiedenen gonosomalen Aneuploidien, einer autosomalen Polysomie und einer partiellen autosomalen Monosomie ist eine vollständige autosomale Monosomie immer letal. Die Fehlverteilung gonosomaler Chromosomen führt zu verschiedenen Krankheitsbildern wie dem Ullrich-Turner-Syndrom (45, X), dem Triple-X-Syndrom (47, XXX) oder dem Klinefelter-Syndrom (47, XXY). Gonosomale Aneuploidien sind selten mit schwerwiegenden Erkrankungen, Fehlbildungen und massiven geistigen Entwicklungsverzögerungen assoziiert. Dagegen führen autosomale Aneuploidien wie das Down-Syndrom (Trisomie 21), das Edwards-Syndrom (Trisomie 18) oder das Patau-Syndrom (Trisomie 13) zu multiplen morphologischen und organischen Fehlbildungen sowie gravierenden geistigen und motorischen Entwicklungsstörungen (Tariverdian & Buselmaier, 2004).

1.6.2 Strukturelle Aberrationen

Strukturelle Aberrationen werden auch als Chromosomenmutation beschrieben und entstehen aufgrund eines nicht oder falsch reparierten DNA-Schadens. Die gezielte Schädigung der DNA mittels ionisierender Strahlung ermöglichte erste Studien über strukturelle Aberrationen. Die Chromosomen wurden hierbei in der ersten Metaphase nach DNA-Schädigung untersucht. Die Analyse dieser sogenannten primären Aberrationen in Metaphase-Chromosomen gewährleistet einen Überblick aller induzierten Chromosomenanomalien, da einige zur

Apoptose der geschädigten Zelle führen und daher in späteren Studien nicht mehr erfasst werden können. Chromosomenanomalien, die nicht zur Apoptose der Zelle führen und an folgende Zellgenerationen weitergegeben werden, bezeichnet man als sekundäre Aberrationen. Allerdings ist nach einfacher oder sogar mehrfacher Teilung der Zelle ein Rückschluss auf die primäre Aberration nur noch schwer möglich. Diese ersten chromosomalen Analysen führten zu einer Klassifizierung der detektierten primären Aberrationen in Chromosomentyp- und Chromatidtyp-Aberrationen. Chromosomentyp-Aberrationen betreffen hierbei immer beide Schwesterchromatiden eines Metaphase-Chromosoms und resultieren aus DNA-Schäden, die in der G1- oder der G0-Phase, d. h. vor der DNA-Replikation, entstanden sind. Bei Chromatidtypaberrationen ist dagegen nur eine der beiden Schwesterchromatiden strukturell verändert, was auf einen postreplikativen Schaden während der S- oder G2-Phase zurückzuführen ist (Abb. 7). Zu den Aberrationen zählen chromosomale Brüche und symmetrische bzw. asymmetrische chromosomale Austausche.

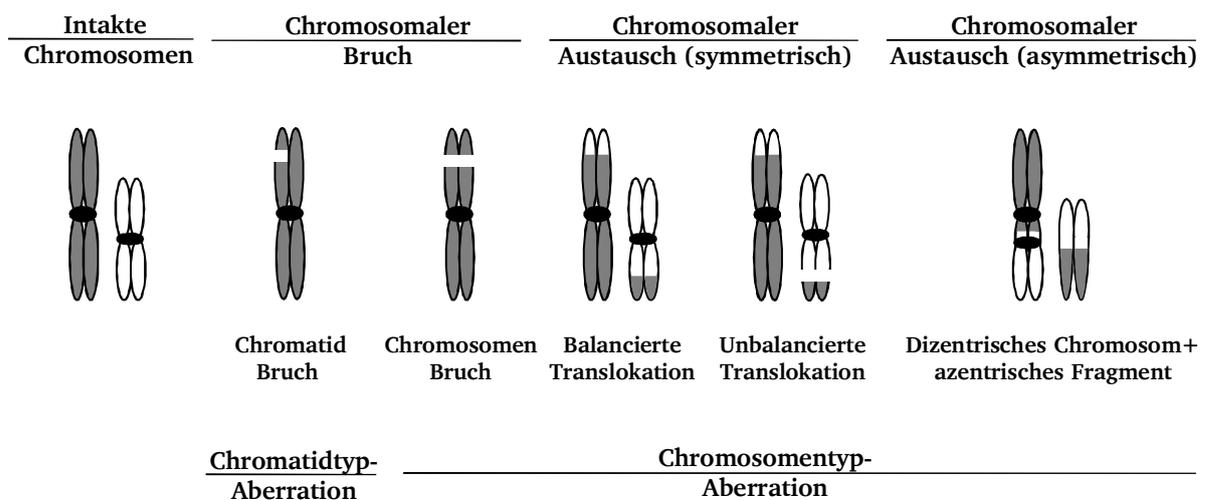


Abbildung 7: Exemplarische Darstellung struktureller Chromosomenaberrationen

Strukturelle Aberrationen entstehen durch Fehler während der DNA-Reparatur. Hierbei resultieren Chromatidtyp-Aberrationen aus postreplikativen DNA-Schäden und betreffen nur eine Schwesterchromatide. Dagegen basieren Chromosomentyp-Aberrationen auf Schäden vor der DNA-Replikation, wodurch beide Schwesterchromatiden des Metaphase-Chromosoms strukturell verändert sind. Ein chromosomaler Bruch repräsentiert einen nicht reparierten DNA-Schaden. Chromosomale Austausche entstehen durch eine fehlerhafte DNA-Reparatur. Unterschieden wird zwischen symmetrischen und asymmetrischen Austauschen. Balancierte bzw. unbalancierte Translokationen sind beispielhaft für einen symmetrischen chromosomalen Austausch. Ein dizentrisches Chromosom und das daraus resultierende azentrische Fragment repräsentieren einen charakteristischen asymmetrischen chromosomalen Austausch.

Chromosomale Brüche entstehen durch einen nicht reparierten DNA-Schaden, wohingegen symmetrische und asymmetrische Austausche eine fehlerhafte Reparatur beschreiben und sowohl intra- als auch interchromosomal vorliegen können. Bei symmetrischen Austauschen entstehen keine azentrischen Chromosomenfragmente. Intrachromosomal können z. B. Inversionen von Chromatid- oder Chromosomenfragmenten auftreten, während interchromosomal balancierte oder unbalancierte Translokationen detektiert werden können. Dagegen sind asymmetrische Austausche durch die Ausbildung von azentrischen Fragmenten gekennzeichnet. Aufgrund des fehlenden Zentromers kann das azentrische Fragment während der Mitose nicht korrekt auf die Tochterzellen aufgeteilt werden, was die Induktion der Apoptose zur Folge haben kann. Ein asymmetrischer intrachromosomaler Austausch ist z. B. die Ausbildung eines Ringchromosoms, wohingegen ein dizentrisches Chromosom und das daraus resultierende azentrische Fragment beispielhaft für einen asymmetrischen interchromosomalen Austausch zu nennen sind (Cornforth, 2006).

Ausgehend von der Frage, wie chromosomale Austausche entstehen und welche initialen DNA-Schäden Grundlage für die Ausbildung von strukturellen Aberrationen sind, wurden verschiedene Modelle entwickelt. Im Folgenden werden die bekanntesten Modelle beschrieben. Die *contact-first*-Hypothese nimmt an, dass die Möglichkeit chromosomaler Austausche auf DNA-Bereiche begrenzt ist, die auch schon vor der Schadensinduktion in unmittelbarer räumlicher Nähe liegen. Dagegen postuliert die *breakage-first*-Hypothese, dass erst die Schädigung der DNA einen Kontakt verschiedener DNA-Bereiche ermöglicht und darüber die Ausbildung chromosomaler Austausche begünstigt wird. Die *breakage-first*-Hypothese wird durch Studien unterstützt, in welchen gezeigt werden konnte, dass nach Bestrahlung von Zellen mit Röntgenstrahlung die Anzahl chromosomaler Austausche quadratisch mit der Dosis steigt und nicht linear, wie es im Fall der *contact-first*-Hypothese anzunehmen wäre. Basierend auf der *breakage-first*-Hypothese entwickelte sich die *breakage-and-reunion*-Theorie die Chromosomenbrüche, entstanden durch DNA-schädigende Agenzien, als Grundlage struktureller Chromosomenanomalien annimmt. Eine ausbleibende oder fehlerhafte Reparatur von Chromosomenbrüchen soll hiernach ursächlich für die Ausbildung von chromosomalen Fragmenten bzw. chromosomalen Austauschen sein (Sax, 1939, 1940, 1942). Ein alternatives Modell, die *exchange*-Theorie, beschreibt dass der Ursprung einer strukturellen Chromosomenaberration nicht ein Bruch der DNA sei, sondern eine andersartige Läsion, die zu einer vorübergehenden Instabilität der DNA führt. Chromosomale Austausche können erst durch die Interaktion zweier in räumlicher Nähe liegender Läsionen entstehen. Wenn Zellen mit fehlerhaften oder nicht abgeschlossenen chromosomalen Austauschen die

Mitose initiieren, begünstigen mitotische Prozesse wie die Kondensation der DNA eine Trennung der Austausch-Intermediate und damit die Ausbildung chromosomaler Brüche (Revell, 1959). Im Gegensatz zur *breakage-and-reunion*-Theorie, die Chromosomenbrüche als initiales Ereignis aller weiteren entstehenden Aberrationen sieht, sind Chromosomenbrüche nach der *exchange*-Theorie erst Resultat fehlerhafter chromosomaler Austausche. Allerdings basieren beide Theorien auf dem *two-hit*-Modell bzw. auf der Tatsache, dass für die Ausbildung chromosomaler Austausche mindestens zwei Schäden respektive Läsionen gleichzeitig vorhanden sein müssen, damit sie miteinander interagieren können. Im Gegensatz dazu beschreibt die *molecular-* oder *one-hit*-Theorie, dass auch ein einzelner strahleninduzierter Chromosomenbruch über rekombinatorische Prozesse zur Entstehung von strukturellen Chromosomenanomalien führen kann. Das Modell geht davon aus, dass während der DNA-Reparatur weitere Chromosomenbrüche strahlungsunabhängig durch enzymatische Prozesse entstehen, wobei eine Interaktion dieser Brüche mit den strahleninduzierten Brüchen die Ausbildung von strukturellen Aberrationen begünstigen kann.

Bis heute sind die exakten Mechanismen, die zur Ausbildung chromosomaler Austausche führen nicht gänzlich verstanden. Allerdings beschreiben verschiedene neuere Arbeiten, dass DSBs als initiale Schäden grundlegend für ihre Entstehung sind (Cornforth, 2006; Natarajan, 2002; Obe & Durante, 2010; Pfeiffer, Goedecke, & Obe, 2000). Unter anderem konnte gezeigt werden, dass bestrahlte Zellen vermehrt strukturelle Aberrationen ausbilden, wenn sie zusätzlich zur Bestrahlung mit einer Einzelstrang spezifischen Endonuklease behandelt wurden. Dieses Ergebnis führte zu der Schlussfolgerung, dass die strahleninduzierten ESBs nach einer zusätzlichen Behandlung der Zellen mit der Endonuklease in DSBs resultieren und daher eine erhöhte Frequenz an Aberrationen nachzuweisen ist. Mehrere darauf folgende Studien konnten außerdem eine erhöhte chromosomale Instabilität bei Zellen mit Defekten innerhalb von DSB-Reparaturwegen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen zeigen. Hierüber konnten DSBs als Ursprung und Grundlage von strukturellen Chromosomenaberrationen weiter verifiziert werden. Chromosomeninstabilitäts-Syndrome, die auf Defekte innerhalb der DSB-Reparatur zurückzuführen sind, umfassen Krankheitsbilder wie z. B. Ataxia Telangiectasia (AT), die Fanconi-Anämie (FA) oder das Bloom-Syndrom (BS). Neben einer erhöhten chromosomalen Instabilität sind alle Erkrankungen mit unterschiedlichsten physiologischen Defekten und einer Prädisposition der Karzinogenese assoziiert.

1.6.2.1 Translokationen

Translokationen sind strukturelle Aberrationen und entstehen durch die Verbindung falscher DNA-Enden während der DSB-Reparatur (Agarwal, Tafel, & Kanaar, 2006). Die Folge hieraus sind abnorme genetische Regionen, die je nach Art und Lokalisierung der Translokation die genomische Stabilität gefährden können. Bereits innerhalb von embryonalen Zellen sind Translokationen mit einer Frequenz von 0,7 auf 1000 Geburten zu detektieren und können zu embryonalen Entwicklungsstörungen oder zu einer Prädisposition der Tumorentstehung führen (Bunting & Nussenzweig, 2013). Neben einfachen und balancierten Translokationen treten komplexere und unbalancierte Translokationen auf, die verschiedenste intra- sowie interchromosomale Translokationen zwischen mehreren Chromosomen umfassen. In einigen Fällen kommt es durch Translokationen zu einer Fusion von Genen (Mitelman, Johansson, & Mertens, 2007; Nussenzweig & Nussenzweig, 2010). Die bei einer Expression dieser Fusionsgene gebildeten Fusionsproteine können z. B. zu einer Deregulation der Zellzyklus-Kontrolle führen und eine Karzinogenese begünstigen. Viele maligne Tumore zeigen spezifische chromosomale Translokationen, weshalb eine Korrelation zwischen der Entstehung von Translokationen und einer Karzinogenese naheliegt.

Eine zentrale Frage innerhalb der DNA-Reparaturforschung betrifft daher die Entstehung und zelluläre Konsequenz von chromosomalen Translokationen. Durch verbesserte Methoden der Genomsequenzierung werden stetig neue Fusionsgene in Tumorzellen detektiert, welche möglicherweise ursächlich für eine Karzinogenese sind. Bislang wurden Fusionsgene vor allem bei Leukämien und Krebserkrankungen des lymphatischen Systems gefunden. Die malignen Zellen des Knochenmarks bei chronischer myeloischer Leukämie (CML) zeigen z. B. eine charakteristische, als Philadelphia-Chromosom beschriebene, balancierte Translokation zwischen Chromosom 9 und 22. Diese Translokation führt zu einer Fusion zwischen dem *ABL*- (oder *ABL1*; *Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1*) Gen auf Chromosom 9 und der *BCR* (Breakpoint-Cluster-Region) auf Chromosom 22. Das *ABL*-Gen codiert für eine Tyrosinkinase, die u. a. eine Funktion innerhalb der Zellzyklusregulation und der Apoptose besitzt. Das aus der Translokation resultierende *BCR-ABL*-Fusionsgen auf Chromosom 22 führt zur Synthese einer transformierten Tyrosinkinase, die eine unkontrollierte Proliferation und damit maligne Veränderung der betroffenen Zelle induziert. Ein weiteres Beispiel für eine translokationsbedingte Fusion von Genen ist in den malignen Zellen des Burkitt-Lymphoms zu detektieren. Hierbei fusioniert das *MYC*-Gen von Chromosom 8 mit Immunglobulin (*IG*)-Genen von Chromosom 8, 14 oder 22. Das *MYC*-Protein kontrolliert als Transkriptionsfaktor u. a. die Expression von Genen, die für zellzykluskontrollierende Proteine codieren. Aufgrund

der Genfusion wird die Expression des *MYC*-Gens durch Promotoren der *IG*-Gene reguliert, was eine Überexpression des *MYC*-Gens bewirkt. Die verstärkte Synthese des *MYC*-Proteins führt wiederum zu einer Überexpression der durch *MYC* kontrollierten Gene, woraus eine Deregulation der Proliferation und maligne Transformation resultiert. Neben den beschriebenen charakteristischen Translokationen bei Leukämien und Krebserkrankungen des lymphatischen Systems, zeigen auch einige solide Tumore charakteristische Mutationen bzw. Fusionsgene.

Die Ergebnisse von Genom-Sequenzierungen belegen, dass einfache Genmutationen innerhalb von Tumorzellen deutlich häufiger auftreten als Translokationen bzw. Fusionsgene. Darüber hinaus korrelieren die Frequenz und die Ausprägung der Translokationen nicht zwangsläufig mit der Tumor-Art. Beispielsweise zeigt die Sequenzanalyse verschiedener Brustkrebstumore sowohl Zellen, in denen keine Translokation zu detektieren ist, als auch Tumore, deren Zellen bis zu 29 Translokationen aufweisen. Weiterhin konnte eine Studie zeigen, dass die Translokationsfrequenz bei Lungentumoren nicht im Zusammenhang mit dem weiteren klinischen Verlauf der Patienten steht. Trotzdem scheint, zumindest für bestimmte Tumor-Arten, eine Korrelation zwischen dem Auftreten von Translokationen und einer Karzinogenese evident. Daher ist das Verständnis der Mechanismen, die zur Ausbildung von Translokationen führen, von großer Bedeutung, um eine Karzinogenese nach Möglichkeit zu verhindern bzw. über die Entwicklung neuer Therapieansätze die Tumorbehandlung zu optimieren. Bisher postulieren mehrere Arbeiten eine fehlerhafte DSB-Reparatur über einen NHEJ-basierten Mechanismus als Grundlage chromosomaler Translokationen. Gegenwärtig steht die Aufklärung über die Beteiligung der unterschiedlichen NHEJ-Varianten an der Entstehung von Translokationen im Fokus verschiedener Studien (Simsek et al., 2011; Simsek & Jasin, 2010; Zhang & Jasin, 2011).

1.7 Dosiseffekt-Beziehung

Dosiseffekt-Beziehungen beschreiben das Auftreten struktureller Chromosomenaberrationen in Abhängigkeit der Strahlendosis. Strukturelle Chromosomenaberrationen entstehen aufgrund eines nicht oder falsch reparierten DNA-DSBs und bilden die Grundlage einer genomischen Instabilität und daraus potentiell resultierenden Karzinogenese. Daher ist die Kenntnis über die Entstehung von chromosomalen Aberrationen in Abhängigkeit der Strahlendosis und Strahlenart eine zentrale Frage innerhalb der DNA-Reparaturforschung und im Strahlenschutz. Je nach Strahlendosis und Art der ionisierenden Strahlung existieren

unterschiedliche Dosiseffekt-Beziehungen. Während die Häufigkeit von chromosomalen Brüchen nach dünnionisierender Strahlung linear mit der Dosis ansteigt, entstehen chromosomale Austausche überwiegend mit einer quadratischen Abhängigkeit zur Dosis. Im Gegensatz zu dünnionisierender Strahlung, ist bei dictionisierender Teilchenstrahlung ausschließlich eine lineare Dosiseffekt-Beziehung zu beobachten. Die Betrachtung der verschiedenen Dosiseffekt-Beziehungen ermöglicht einen Rückschluss auf die Lokalisation der induzierten DNA-DSBs bzw. die Grundlage chromosomaler Aberrationen. Die linear-quadratische Dosisabhängigkeit von dünnionisierender Strahlung lässt sich darüber erklären, dass bei Strahlung mit niedrigem LET DSBs gleichmäßig verteilt über den gesamten Zellkern induziert werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass DSBs zeitgleich in enger räumlicher Nähe entstehen erhöht sich daher mit zunehmender Dosis und Dosisrate. Da ein DSB aus zwei offenen Enden besteht, die potentiell unabhängig voneinander repariert werden können, steigt die Möglichkeit einer Fehlverknüpfung von falschen DNA-Enden durch sogenannte *Inter-Track* Ereignisse, demzufolge mehr als linear. Hieraus resultiert die quadratische Komponente der Dosiseffekt-Kurve bei dünnionisierender Strahlung. Dictionisierende Teilchenstrahlung erzeugt DSBs dagegen nicht gleichmäßig im Zellkern verteilt, sondern aufgrund des hohen LET entlang der Bahnspur durch den Zellkern. Die Wahrscheinlichkeit, dass gleichzeitig zwei DSBs in enger räumlicher Nähe liegen und chromosomale Austausche über sogenannte *Inter-Track* Ereignisse entstehen, ist daher deutlich größer als bei dünnionisierender Strahlung. Demnach sind Dosiseffekt-Kurven bei Teilchenstrahlung unabhängig von der Dosis bzw. der Dosisrate und zeigen ausschließlich einen linearen Verlauf (Cornforth, 2006; Hlatky, Sachs, Vazquez, & Cornforth, 2002).

1.8 Analyse von DNA-Doppelstrangbrüchen

1.8.1 Chromosomenstudien

Chromosomenstudien ermöglichen den direkten Nachweis geschädigter DNA-Strukturen durch die Analyse verschiedenster struktureller oder auch numerischer Aberrationen. U. a. kann über die Auswertung von chromosomalen Brüchen bzw. Fragmenten, welche nicht reparierte DSBs repräsentieren, die Quantität der DNA-Reparatur untersucht werden. Darüber hinaus erlauben Chromosomenstudien, z. B. über die Quantifizierung von Translokationen, eine Beurteilung bezüglich der Reparatur-Qualität. Klassische chromosomale Studien basieren auf der Analyse von mitotischen Zellen in der Metaphase. Während der Mitose kondensiert das Chromatin innerhalb der Zelle und erlaubt eine Untersuchung der kondensierten

Metaphase-Chromosomen (Lett & Sinclair, 1993). Die Studie chromosomaler Aberrationen in anderen Zellzyklusphasen erfordert daher eine vorzeitig induzierte Kondensation des Interphase-Chromatins, die als *premature chromosome condensation* (PCC) bezeichnet wird. Hierbei ermöglicht u. a. die Fusion von mitotischen Zellen und Interphase-Zellen eine PCC-Induktion. Die Zellfusion kann sowohl virusvermittelt als auch über die Chemikalie Polyethylenglycol (PEG) induziert werden (Johnson & Rao, 1970; Pantelias & Maillie, 1983). PEG wirkt hygroskopisch, wodurch in Gegenwart von PEG eine Wechselwirkung und die Fusion der Zellmembranen von Mitosen und Interphase-Zellen begünstigt werden. Ursächlich für die vorzeitige Kondensation des Interphase-Chromatins scheint der *mitosis promoting factor* (MPF) der mitotischen Zellen zu sein. Der MPF ist ein Proteinkomplex aus der Cyclin-abhängigen Kinase, CDK1 (*cyclin dependent kinase 1*) und dem Protein CyclinB. In der aktiven Form ist CDK1 dephosphoryliert und CyclinB phosphoryliert, wodurch über verschiedene Mechanismen die Kondensation des Chromatins während der Mitose induziert wird. Werden mitotische Zellen mit Interphase-Zellen fusioniert, bewirkt der MPF der Mitosen eine vorzeitige Kondensation des Chromatins innerhalb der Interphase-Zellen (Dunphy, Brizuela, Beach, & Newport, 1988; Moreno, Hayles, & Nurse, 1989) (Abb. 8).

Die Morphologie der vorzeitig kondensierten Chromosomen ermöglicht eine Klassifizierung nach der Zellzyklusphase, in welcher die PCC induziert wurde. G1-Phase Chromosomen sind über ihre Einchromatid-Struktur zu detektieren. Dagegen zeigen G2-Phase Chromosomen eine Zweichromatid-Struktur, ähnlich der Morphologie von Metaphase-Chromosomen. Zellen die sich zum Zeitpunkt der PCC Induktion in der S-Phase des Zellzyklus befanden, sind über eine pulverisierte Chromatinstruktur zu erkennen. Eine weitere Methode zur Induktion einer PCC ist die Verwendung von Phosphatase-Hemmstoffen wie Okadasäure oder Calyculin A. Okadasäure und Calyculin A inhibieren spezifisch die Aktivität der Serin/Threonin-Phosphatasen 1 und 2A (PP1, PP2A). PP1 und PP2A regulieren die MPF-Aktivität in Interphase-Zellen, sodass der Einsatz von spezifischen Phosphatase-Hemmstoffen eine vorzeitige Aktivität des MPF und damit die Chromosomenkondensation bewirkt. Durch Phosphatase-Hemmstoffe wird überwiegend das Chromatin in G2-Phase-Zellen vorzeitig kondensiert, da der Mechanismus u. a. auf der Anwesenheit von CyclinB basiert, welches hauptsächlich in G2-Phase-Zellen vorhanden ist. Für eine direkte Analyse von Chromosomen in der G1-Phase ist daher die PCC Induktion über die Fusion von Mitosen und Interphase-Zellen erforderlich (Durante, Furusawa, & Gotoh, 1998; Gotoh & Durante, 2006).

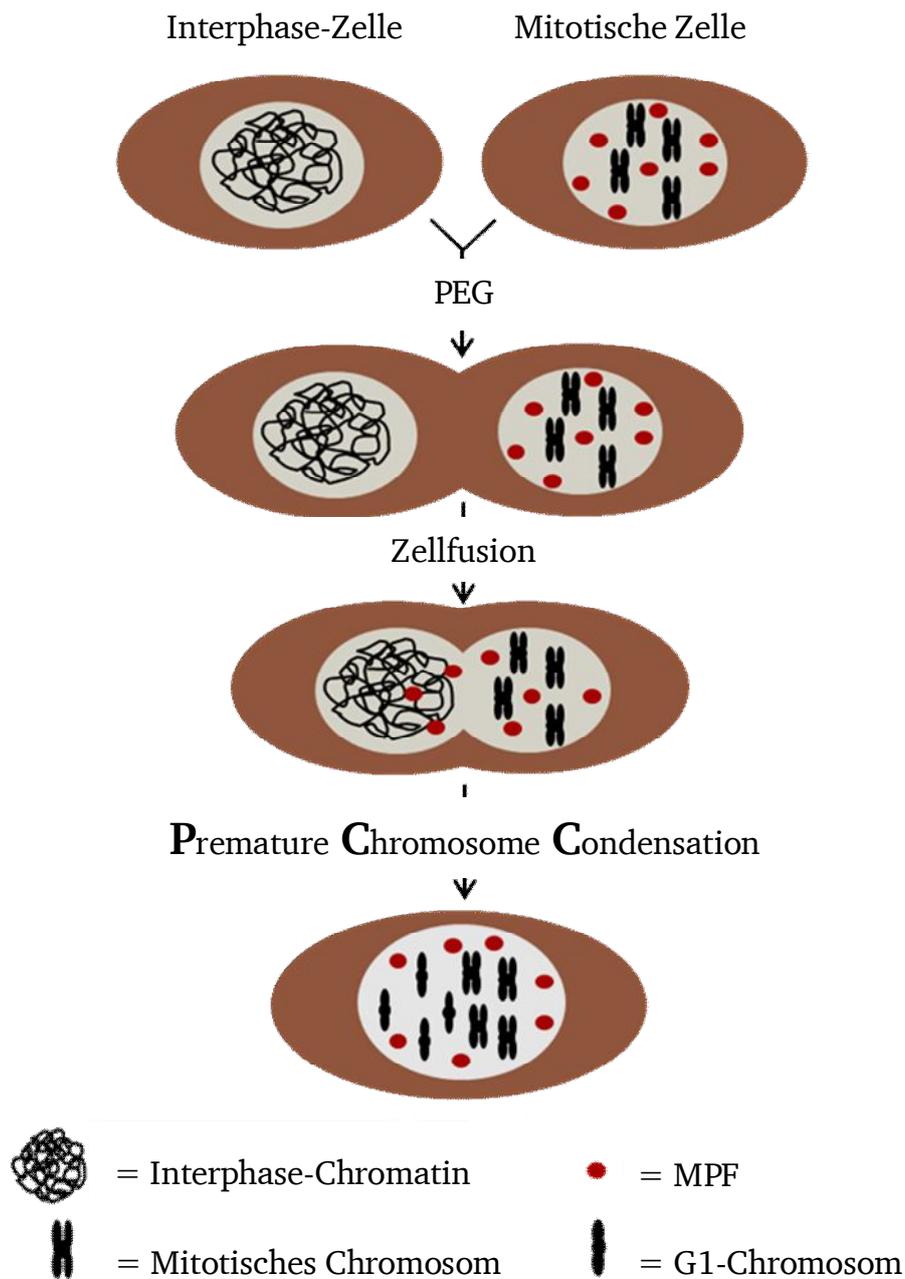


Abbildung 8: PEG-induzierte Zellfusion und PCC Induktion

Die Technik basiert auf der Fusion einer Interphase-Zelle mit einer mitotischen Zelle, vermittelt über die Chemikalie PEG. PEG wirkt hygroskopisch, woraus eine Wechselwirkung der Zellmembranen und die Fusion der Zellen resultieren. Durch den MPF der mitotischen Zelle wird eine vorzeitige Kondensierung des Chromatins innerhalb der Interphase-Zelle induziert (modifiziert nach Gotoh & Durante, 2006).

1.8.1.1 Chromosomenfärbung

Chromosomale Fragmente oder asymmetrische Austausche wie Ringchromosomen können über die Anfärbung der gesamten Chromosomen-Spreitung mit z. B. dem DNA-Farbstoff Giemsa detektiert und quantifiziert werden. Die Analyse von symmetrischen Austauschen, wie beispielsweise Translokationen, ist dagegen schwieriger und erfordert speziellere Chromosomen-Färbetechniken. Die Entwicklung der *fluorescence in situ hybridization* (FISH)-Technik ermöglichte zum ersten Mal eine differenzielle Anfärbung einzelner Chromosomen (Pinkel et al., 1986). Hierbei hybridisieren sequenzspezifische und fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden mit der homologen DNA-Sequenz im zytologischen Präparat. In Abhängigkeit der eingesetzten DNA-Sonde können entweder ganze Chromosomen oder auch nur einzelne chromosomale Bereiche, wie das Zentromer oder die Telomere, markiert werden. Die fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden bzw. die von ihnen gebundenen DNA-Bereiche können über eine Fluoreszenzfärbung detektiert werden und erlauben z. B. eine Quantifizierung von chromosomalen Fragmenten und Translokationen (Abb. 9).

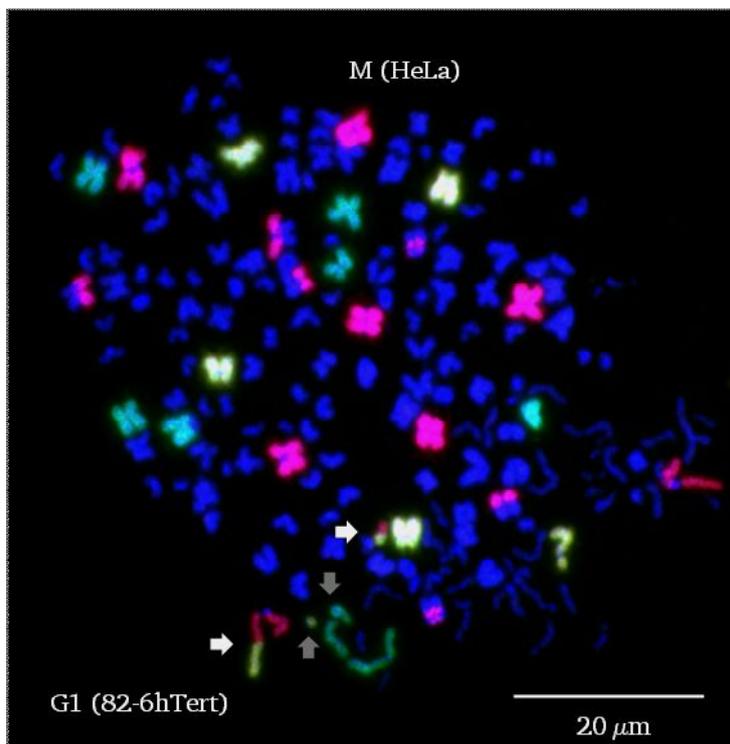


Abbildung 9:
Exemplarische Darstellung
einer Zellfusion und FISH-
Färbung

Die Abbildung zeigt die Fusion zwischen einer mitotischen HeLa-Zelle (M) und einer humanen G1-Phase Fibroblasten-Zelle (82-6hTert). Nach der Fusion wurden die Chromosomen 1 (rot), 2 (grün) und 4 (gelb) über die 3-Farben-FISH-Technik angefärbt. Die Methode der FISH-Färbung ermöglicht eine Analyse von chromosomalen Brüchen (graue Pfeile) und Translokationen (weiße Pfeile).

1.9 Zielsetzung

Translokationen sind strukturelle Chromosomenaberrationen und entstehen durch die Ligation falscher DNA-Enden während der DSB-Reparatur (Agarwal et al., 2006). Frühere Studien beschreiben einen Zusammenhang zwischen chromosomalen Translokationen und einer Karzinogenese (Bunting & Nussenzweig, 2013; Panier & Durocher, 2013; van Gent, Hoeijmakers, & Kanaar, 2001). Unter Berücksichtigung von u. a. der Schadensart oder dem Zelltyp, wird hierbei die Beteiligung der verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen an der Translokationsentstehung diskutiert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die DSB-Reparatur respektive die Entstehung von Translokationen nach ionisierender Bestrahlung in humanen G1-Phase Zellen mittels Chromosomenstudien zu analysieren. Da die meisten Zellen im menschlichen Körper postmitotisch sind und sich im Stadium der G1-/G0-Phase befinden, ist die Aufklärung der DNA-Reparaturmechanismen in der G1-Phase von besonderer Relevanz. Neben der Analyse von chromosomalen Brüchen, die einen Rückschluss auf die Reparatur-Quantität ermöglichte, sollte insbesondere die Quantifizierung chromosomaler Translokationen die Reparatur-Qualität beurteilen und das Verständnis der Translokationsentstehung erweitern. Um die Beteiligung der unterschiedlichen DNA-Reparaturmechanismen innerhalb der Translokationsausbildung in der G1-Phase zu überprüfen, wurde die Reparatur-Quantität und die Reparatur-Qualität von IR-induzierten DSBs sowohl in WT-Zellen als auch in verschiedenen reparaturdefizienten Zellen untersucht.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Aphidicolin (1 mg/ml in DMSO)	Sigma
BSA	AppliChem
Colcemid (100 µg/ml in DMSO)	Sigma
DAPI (1 mg/ml in PBS)	Sigma
DMEM	Biochrom
DMSO	Roth
EDTA	Roth
Essigsäure (100 %)	Roth
Ethanol	Roth
FCS	Biochrom
Formaldehyd (37 %)	Roth
Giemsa	Roth
HiPerFect	Qiagen
Kaliumchlorid	Roth
Magnesiumchlorid	Roth
Methanol (99,99 %)	Roth
Mounting Medium (mit DAPI)	Vector Laboratories, Vectashield
Natriumhydroxid	Roth
Natriumchlorid	Roth
Nocodazol (500 µg/ml in DMSO)	Sigma
Non-essential amino acid	Biochrom
PBS	Biochrom
Polyethylenglycol (1500)	Roche
Pepsin	Roth
RNAse free	AppliChem
Salzsäure	Roth
Triton X-100	Roth
Trypsin	Biochrom
Tween 20	Roth
Zitronensäure	Sigma

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Roth, Ø 12 mm und 24x60 mm
Fixogum	Marabu
Latexhandschuhe	VWR, Micro Touch
Neubauer-Zählkammer	Roth
Objektträger	Roth SuperFrost, 76x26 mm
Parafilm	Roth
Pasteurpipetten, Glas	Roth
Pasteurpipetten, Kunststoff	Roth
Pipettenspitzen	Sarstedt
Pipettenspitzen, gestopft	Roth
Pipettierhilfe	Pipetboy Integra
Reaktionsgefäße	Roth
Wischtücher	Neolab, KimWipes
Zellkulturflaschen	Biochrom, 75 cm ²
Zellkulturschalen	VWR, 55 cm ²
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt

2.1.3 Software und Geräte

2.1.3.1 Software

Metafer4	MetaSystems
ImageJ	Wayne Rasband

2.1.3.2 Geräte

Brutschränke	Thermo Scientific Hera cell 240
Fluoreszenz-Mikroskop	Zeiss Axioimager Z2, Zeiss Axioplan2
Kühlzentrifugen	Eppendorf 5804R, Eppendorf 5810R
Laborwaage	Sartorius
Magnetrührer	Variomag
Mikroliterpipetten	Gilson
Mikroskop-Kamerasystem	Zeiss AxioCam MRm
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld

pH-Meter	pMX2000 WTW
Röntgenröhre	GE München, Isovolt Titan E
Sterilwerkbanken	Thermo Scientific HERA safe
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifugen	Heraeus Biofuge pico, Eppendorf 5415C
Vortexer	Scientific Industries, Vortex Genie 2
Wasserbad	Memmert

2.1.4 Medien, Lösungen, Puffer

Zellkulturmedium (MEM)	Minimal Essential Medium (4,5 g/l D-Glucose) + 20 % FCS + 1 % NEA
Zellkulturmedium (DMEM)	Dulbecco's Minimal Essential Medium (4,5 g/l D-Glucose) + 10 % FCS + 1 % NEA
Chromosomen-Fixativ	Methanol:Essigsäure = 3:1
DAPI-Lösung	0,4 µg/ml DAPI in PBS
Giemsa-Färbelösung	6 % Giemsa-Lösung in MilliQ
PBS (pH 7,4)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄
20x SSC (pH 7,2)	3 M NaCl 0,3 M Zitronensäure
Trypsin/EDTA (pH 8)	2,5 % (v/v) Trypsin 0,5 M EDTA in PBS

Der pH-Wert wurde über NaOH und HCl eingestellt.

2.1.5 siRNA und Inhibitoren

Tabelle 1: Eingesetzte siRNA

siRNA	Sequenz	Einsatz	Inkubation	Hersteller
BAF180	5'-GAGAAAUCUUGAGACAGCCAAGAAA-3'	20 nM	72 h	Invitrogen
CtIP	5'-TCCACAACATAATCCTAATAA-3'	50 nM	48 h	Qiagen
Kontroll	5'-AATTCTCCGAACGTGTCACGT-3'	10 nM	48 h	Qiagen
Ligase1	5'-AAGGCATGATCCTGAAGCAGA-3'	20 nM	48 h	Qiagen
Ligase3	5'-AACCACAAAAAAAATCGAGGA-3'	20 nM	48 h	Qiagen
Plk3	5'-CTGCATCAAGCAGGTTCACTA-3'	25 nM	48 h	Qiagen

Tabelle 2: Eingesetzte Inhibitoren

Inhibitor	Einsatz	Inkubation vor IR	Hersteller
DNA-PK (NU7441)	7,5 μ M	1 h	Tocris Bioscience
PARP (PJ34)	15 μ M	1 h	Calbiochem (Merck)
Plk1/3 (GW843682X)	0,5 μ M	1 h	Tocris Bioscience
DRB (RNA-Polymerase II)	100 μ M	3 h	Sigma

2.1.6 Chromosomensonden und Antikörper

Chromosomensonden:

XCP (XCyting Chromosome Paint) Mix

Chromosom 1, TexasRed-gekoppelt

Chromosom 2, FITC-gekoppelt

Chromosom 4, TexasRed-/FITC-gekoppelt

MetaSystems

Primär-Antikörper:

Anti- γ H2AX monoklonaler Antikörper (Maus)

Upstate (Millipore)

Anti-RAD51 polyklonaler Antikörper (Hase)

Calbiochem (Merck)

Sekundär-Antikörper:

Anti-Maus Alexa Fluor 594 (aus der Ziege)

Molecular Probes

Anti-Hase Alexa Fluor 488 (aus der Ziege)

Molecular Probes

2.1.7 Zellen

HeLa:

Humane Zellen eines Zervixkarzinoms. Sie wurden 1951 aus dem Tumor der Patientin Henrietta Lacks isoliert und als erste humane Zelllinie kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in DMEM-Medium mit 10 % FCS und 1 % NEA.

82-6hTert:

Humane Fibroblasten-Zellen, die über die Transformation mit einem hTert (*human Telomerase reverse transcriptase*)-exprimierenden Retrovirus immortalisiert wurden. Die Expression der humanen Telomerase verhindert die Verkürzung der Telomere und damit die Seneszenz. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in MEM-Medium mit 20 % FCS und 1 % NEA.

CJ179hTert:

Humane Fibroblasten-Zellen, die über einen hTert-exprimierenden Retrovirus immortalisiert wurden. Die Zellen tragen einen Defekt im Artemis-Gen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in MEM-Medium mit 20 % FCS und 1 % NEA.

2BNhTert:

Humane Fibroblasten-Zellen, die über einen hTert-exprimierenden Retrovirus immortalisiert wurden. Die Zellen tragen einen Defekt im XLF-Gen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in MEM-Medium mit 20 % FCS und 1 % NEA.

411BrhTert:

Humane Fibroblasten-Zellen, die über einen hTert-exprimierenden Retrovirus immortalisiert wurden. Die Zellen tragen einen Defekt im Ligase4-Gen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in MEM-Medium mit 20 % FCS und 1 % NEA.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂-Anteil in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre. Für die Subkultivierung wurde das alte Medium abgenommen, einmal mit PBS gewaschen und die Zellen zur Ablösung für 5 min bei 37 °C mit Trypsin-EDTA-Lösung behandelt. Durch die Zugabe von frischem Zellkulturmedium wurde die Trypsinierung gestoppt, die Zellen entsprechend der Wachstumsrate 1:5 bis 1:10 gesplittet und auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Für die Experimente wurde eine definierte Zellzahl durch Auszählen der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurden unter dem Durchlichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung 10 µl der Zellsuspension innerhalb der vier Großquadrate ausgezählt und das arithmetische Mittel gebildet. Das Volumen in jedem Quadrat entspricht 0,1 µl, weshalb sich die Zellzahl pro ml aus dem arithmetischen Mittel multipliziert mit 10⁴ errechnet. Für alle Chromosomenexperimente, die eine Inhibitor-Behandlung bzw. siRNA-Inkubationszeit von 48 h umfassten, wurden 5x10⁵ Zellen in 55 cm² Zellkulturschalen und 11 ml Zellkulturmedium ausgesät. Betrug die siRNA-Inkubationszeit 72 h, wurden 3x10⁵ Zellen ausgesät. Für die Immunfluoreszenzexperimente wurden vor Aussaat der Zellen 2 sterile Deckgläser in die entsprechenden Zellkulturschalen der Chromosomenexperimente gelegt. Die für die Fusionsexperimente benötigten HeLa-Zellen wurden 48 h vor Beginn der Experimente mit einer Zellzahl von 1x10⁶ in 75 cm² Zellkulturflaschen und 10 ml Zellkulturmedium ausgesät.

2.2.2 RNA-Interferenz

Die Methode der RNA-Interferenz (RNAi) erlaubt eine posttranskriptionelle Genregulation auf Ebene der mRNA (messenger RNA). Grundlage dieser Methode ist eine sogenannte siRNA (*small interfering RNA*), deren Sequenz homolog zu einer spezifischen endogenen mRNA-Sequenz ist. Im Zytoplasma der Zelle bildet die doppelsträngige siRNA mit verschiedenen Enzymen den RISC (*RNA-induced silencing complex*)-Komplex. Die doppelsträngige siRNA wird durch eine Endonuklease in einzelsträngige RNA gespalten. In der Folge bindet die endogene mRNA an den komplementären siRNA-Einzelstrang innerhalb des RISC-Komplexes. Die mRNA wird daraufhin durch die Nukleaseaktivität des RISC-Komplexes degradiert und folglich die Proteinsynthese unterbunden.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die siRNA-Transfektion unmittelbar nach der Aussaat der Zellen bzw. 48 h vor Schadensinduktion. Für den Transfektionsansatz wurde zunächst ein definiertes Volumen an Zellkulturmedium ohne Zusätze vorgelegt, sodass abhängig vom eingesetzten siRNA-Volumen (Tab. 1) der Ansatz ein Gesamtvolumen von 480 μl hatte, bevor 57,6 μl Transfektionsreagenz (*HiPerFect*) zugegeben wurde. Der Ansatz wurde auf dem Vortexer durchmischt (1 min) und nach 10 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur (RT) tropfenweise zu den zuvor ausgesäten Zellen gegeben. Die transfizierten Zellen wurden bis zur weiteren Behandlung bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. BAF180-siRNA behandelte Zellen wurden 24 h nach der ersten Transfektion ein zweites Mal transfiziert und bis zur Schadensinduktion für weitere 48 h inkubiert.

2.2.3 Behandlung der Zellen vor Schadensinduktion

Sowohl die Zellen für die Chromosomenstudien als auch die Zellen für die Immunfluoreszenz (IFM)-Analyse wurden vor Schadensinduktion mit Nocodazol (100 ng/ml) behandelt. Nocodazol inhibiert die Polymerisierung der Mikrotubuli und folglich die Ausbildung des Spindelapparats. Dadurch werden die mitotische Teilung bzw. die Progression der Zellen, von der G₂- in die G₁-Phase, während der Reparaturzeit verhindert. Hierüber ist eine Analyse von ausschließlich in der G₁-Phase geschädigten und reparierten Zellen gewährleistet. Für die IFM-Analyse wurden die Zellen zusätzlich mit Aphidicolin (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) behandelt. Aphidicolin hemmt die replikationsrelevanten α - und δ -DNA-Polymerasen und verhindert darüber die DNA-Replikation, wodurch die Zellen im Stadium der S-Phase arretieren. Die Behandlung mit Aphidicolin ermöglicht daher einen Ausschluss von S-Phase-Zellen und die selektive Auswertung von Zellen, die in der G₂-Phase geschädigt und repariert wurden.

2.2.4 Schädigung der Zellen mittels Röntgenstrahlung

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte in einer Röntgenröhre mit Wolframanode bei einer Spannung von 90 kV und einer Stromstärke von 19 mA. Hierbei wurden die Proben mit einem Abstand von 16 cm zum Austrittsfenster der Röntgenstrahlung auf einer 1 mm Aluminiumplatte platziert. Unter den genannten Bedingungen wurde mit einer Dosisleistung von 3,0348 Gy/min bestrahlt. Wurden Zellen für die IFM-Experimente auf Deckgläsern bestrahlt, musste die Wechselwirkung der Röntgenstrahlung mit dem Material Glas berücksichtigt werden (Kegel, Riballo, Kuhne, Jeggo, & Lobrich, 2007). Über den Photoeffekt entstehen bei der Bestrahlung von Materialien, die aus Atomen mit hoher Ordnungszahl

bestehen Sekundärelektronen, welche die Zellen zusätzlich schädigen. Werden Zellen auf Deckgläsern bestrahlt, führen die Sekundärelektronen in etwa zu einer Verdopplung der Schäden, im Vergleich zu einer Bestrahlung von Zellen in einer aus Kunststoff bestehenden Zellkulturflasche. Daher wurden die auf Deckgläsern wachsenden Zellen vor Versuchsbeginn zusammen mit 1 ml Zellkulturmedium in eine separate Zellkulturschale überführt und mit der halben Dosis gesondert bestrahlt. Hierüber konnte eine vergleichbare effektive Dosis für die Chromosomen- und die IFM-Analysen gewährleistet werden. Die im Folgenden angegebene Strahlendosis bezieht sich immer auf eine effektive Dosis von 2 Gy bzw. 7 Gy Röntgenstrahlung. Nach der Schadensinduktion wurden die Zellen bis zur Ernte im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

2.2.5 Zellfusion

Grundlage der Methode ist eine Polyethylen-vermittelte Fusion zwischen mitotischen Zellen und Interphase-Zellen. Hierüber wird eine vorzeitige Kondensation des Interphase-Chromatins durch die mitotische Zelle induziert und die Chromosomenanalyse in Interphase-Zellen ermöglicht (siehe Kapitel 1.8.1).

Zur Gewinnung der Mitosen wurden HeLa-Zellen 20 h vor Versuchsbeginn mit Colcemid (200 ng/ml) behandelt. Colcemid verhindert die Ausbildung des Spindelapparats, wodurch eine Anreicherung von Zellen in der Mitose erzielt wird. Nach 20 h Colcemid-Behandlung erfolgte die Ernte der angereicherten mitotischen Zellen durch einen *mitotic shake-off*. Hierbei wurden die Zellen durch leichtes Aufklopfen vom Flaschenboden gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Rundboden-Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (200 g, 4 °C, 5 min). Darauf folgend wurde der Überstand verworfen, die Zellen in 5 ml FCS-freies Kulturmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Das Medium der Interphase-Zellen wurde nach Ende der Reparaturzeit in einem 15 ml Rundboden-Zentrifugenröhrchen gesammelt, die Zellen mit PBS gewaschen und zur Ablösung 5 min bei 37 °C mit Trypsin-EDTA-Lösung behandelt. Die Trypsinierung wurde durch Aufnahme der Zellen in das zuvor gesammelte Medium abgestoppt und die Zellen zentrifugiert (200 g, 4 °C, 5 min). Anschließend wurde der Überstand verworfen, die Zellen in 5 ml FCS-freies Kulturmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Mitosen und Interphase-Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:1 in ein 15 ml Rundboden-Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (200 g, 4 °C, 5 min). Darauf folgend wurde der Überstand zügig entfernt und das Rundboden-Zentrifugenröhrchen für 1 min invertiert auf ein Papiertuch gestellt. Verbliebenes Medium am Rand des Röhrchens wurde durch leichtes Klopfen entfernt und das Zellpellet in 250 µl PEG

gelöst. PEG wirkt hygroskopisch, wodurch eine Wechselwirkung der Zellmembranen und die Fusion von mitotischen Zellen und Interphase-Zellen begünstigt werden. Durch tropfenweise Zugabe von 2 ml FCS-freiem Kulturmedium wurde das PEG nach 1 min verdünnt und die Zellsuspension zentrifugiert (200 g, 4 °C, 5 min). Anschließend wurde der Überstand durch Abgießen entfernt und das Zellpellet durch tropfenweise Zugabe von 0,5 ml Kulturmedium gelöst. Außerdem wurden Colcemid (200 ng/ml) und Magnesium-Chlorid (2 mM) zu der Zellsuspension gegeben. Colcemid verhindert die Proliferation der mitotischen HeLa-Zellen während der folgenden Fusionszeit, Magnesium-Chlorid erhöht die Fusions-Rate (Rao & Johnson, 1971; Rao, Wilson, & Puck, 1977). Für die Zellfusion bzw. PCC-Induktion wurde das Zellgemisch mit leicht geschlossenem Deckel für 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.6 Chromosomenpräparation

Die Chromosomenpräparation erfolgte unmittelbar nach Ende der Fusions- bzw. Inkubationszeit. Hierfür wurde die Zellsuspension tropfenweise mit 10 ml KCl-Lösung (75 mM) versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Die hypotone KCl-Lösung bewirkt ein Aufbrechen der Zellmembran, wodurch die Chromosomen für die weitere Präparation zugänglich werden. Darauf folgend wurden die Zellen zentrifugiert (200 g, 4 °C, 10 min), der Überstand verworfen und das Zellpellet unter vorsichtigem Mischen in 10 ml Chromosomenfixativ (Eisessig:Methanol, 1:3) resuspendiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert (200 g, 4 °C, 10 min), in 10 ml Chromosomenfixativ resuspendiert und anschließend für mindestens 1 h oder über Nacht bei -20 °C inkubiert. Vor der dritten Fixierung wurden die Zellen zentrifugiert (200 g, 4 °C, 10 min), der Überstand verworfen und in 10 ml frischem Fixativ aufgenommen. Nach einer weiteren Zentrifugation (200 g, 4 °C, 10 min) wurde der Überstand bis auf etwa 1 ml verworfen und das Zellpellet in der Restflüssigkeit resuspendiert. Für die Chromosomenpräparation wurden die Objektträger mit MilliQ-Wasser befeuchtet und 20 µl der Zellsuspension senkrecht auf den Objektträger getropft. Zur besseren Chromosomenspreitung wurde das verdrängte Wasser am Rand des Objektträgers vorsichtig mit einem Papiertuch entfernt. Die Präparate wurden luftgetrocknet und am Durchlichtmikroskop auf ihre Qualität, d. h. Zelldichte und Anzahl der Fusionen, überprüft. Bis zur vollständigen Trocknung wurden die Präparate bei RT gelagert. Die Lagerung überschüssiger Zellsuspension erfolgte bei -20 °C.

2.2.7 Chromosomenfärbung

2.2.7.1 Giemsa-Färbung

Die Methode der Giemsa-Färbung ermöglicht eine schnelle und homogene Anfärbung von Chromosomenpräparaten. Hierüber können u. a. numerische Aberrationen oder auch einige strukturelle Aberrationen, wie chromosomale Brüche, detektiert werden.

Die in dieser Arbeit eingesetzte Giemsa-Färbung erfolgte durch Inkubation der Chromosomenpräparate in einer 6 % Giemsa-Lösung (RT, 10 min). Anschließend wurden die Präparate in MilliQ-Wasser gewaschen und luftgetrocknet. Die Lagerung der Chromosomenpräparate erfolgte bei RT.

2.2.7.2 FISH-Färbung

Die Technik der FISH-Färbung basiert auf sequenzspezifischen und fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden, die eine differenzielle Anfärbung einzelner oder aller Chromosomen innerhalb des Genoms ermöglichen. Darüber hinaus können auch verschiedene chromosomale Bereiche, wie das Zentromer oder die Telomere, über spezifische DNA-Sonden markiert werden (siehe Kapitel 1.8.1.1). Die in dieser Arbeit eingesetzte 3-Farben-FISH-Färbung umfasste die spezifische Anfärbung der Chromosomen 1, 2 und 4 und erfolgte nach dem Protokoll *XCyte lab manual* der Firma MetaSystems.

Für die einzelnen Inkubations- und Waschschrte wurden die Chromosomenpräparate in einem Färbegestell platziert. Die verschiedenen Inkubations- und Waschlösungen der Färbung wurden in Glasküvetten angesetzt, sodass das Färbegestell jeweils in die nächste Glasküvette überführt werden konnte. Um eine optimale Denaturierung der DNA bzw. Hybridisierung der FISH-Sonden zu gewährleisten und unspezifische Hintergrundsignale zu minimieren, erfolgte zunächst eine Vorbehandlung der Chromosomenpräparate zur Entfernung cytoplasmatischer Proteine. Der Proteinverdau wurde durch Inkubation der Präparate in einer HCl (10 mM)/Pepsin (100 ng/ml)-Lösung (37 °C, 2 min) durchgeführt. Im Anschluss wurden die Präparate in PBS gewaschen (RT, 2 min) und darauf folgend im Wasserbad in 2x SSC (70 °C, 30 min) inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die gesamte Glasküvette aus dem Wasserbad genommen, sodass die Präparate in der 2x SSC Lösung bei RT auf 37 °C abkühlen konnten. Anschließend wurden die Chromosomenpräparate in 0,1x SSC (RT, 1 min) inkubiert, bevor die DNA-Denaturierung durch Inkubation in NaOH (0,07 M) (RT, 1 min) folgte. Um die Denaturierung zu stoppen, wurden die Präparate in 0,1x SSC (4 °C, 1 min) und im Anschluss in 2x SSC (4 °C, 1 min) inkubiert. Durch die Inkubation in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe

70 %, 95 % und 100 % (RT, je 1 min) wurden die Chromosomenpräparate dehydriert und anschließend bei RT getrocknet. Die Denaturierung der DNA-Sonden erfolgte während der Trocknungszeit der Chromosomenpräparate. Hierfür wurden pro zu hybridisierendem Präparat jeweils 10 μ l DNA-Sonden-Mix denaturiert (75 °C, 5 min), auf Eis abgekühlt (1 min) und darauf folgend inkubiert (37 °C, 30 min). Anschließend wurden jeweils 10 μ l der denaturierten DNA-Sonden auf die denaturierten Chromosomenpräparate gegeben. Die Präparate wurden mit einem Deckglas abgedeckt und diese mit Fixogum abgedichtet. Um eine Hybridisierung zwischen DNA und DNA-Sonden zu ermöglichen, wurden die Präparate im Anschluss inkubiert (37 °C, 24 h).

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Deckgläser vorsichtig von den Objektträgern entfernt und die Chromosomenpräparate in 0,4x SSC (75 °C, 2 min) inkubiert. Darauf folgend wurden die Präparate zunächst in 2x SSC/ 0,05 % Tween 20 (RT, 2 min) inkubiert, anschließend in MilliQ-Wasser gewaschen (RT, 2 min) und luftgetrocknet. Im Anschluss wurden die Chromosomenpräparate mit jeweils 15 μ l Mounting-Medium (mit DAPI) überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt. Das Deckglas wurde an den Rändern mit Nagellack fixiert. Die Lagerung der Präparate erfolgte bei 4 °C und Dunkelheit.

2.2.8 Auswertung der Chromosomenpräparate

Die Giemsa-gefärbten Präparate wurden am Durchlichtmikroskop mit Hilfe der Software „Metafer 4“ (MetaSystems) ausgewertet. Über das Modul „MSearch“ wurden die Präparate bei 100-facher Vergrößerung zunächst gescannt und erkannte Chromosomenspreitungen in einer Galerie gespeichert. Nach einer manuellen Selektion wurden die ausgewählten Chromosomenspreitungen über das Modul „AutoCapt“ bei Durchlicht und 630-facher Vergrößerung aufgenommen und ausgewertet. Hierbei wurde die Morphologie der vorzeitig kondensierten Chromosomen bzw. Zellfusionen analysiert und die Eignung der Giemsa-Färbung für chromosomale Analysen in G1-Phase-Zellen überprüft.

Die Auswertung der FISH-Chromosomenpräparate erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop mittels der Software „Metafer4“ (MetaSystems). Die Präparate wurden über das Modul „MSearch“ bei 100-facher Vergrößerung im DAPI-Filter gescannt und detektierte Chromosomenspreitungen in einer Galerie gespeichert. Die anschließende manuelle Auswertung der gespeicherten Galerie ermöglichte eine Klassifizierung zwischen G2-, S- und G1-Chromosomenspreitungen. Die Aufnahme der selektierten Chromosomenspreitungen wurde über das Modul „AutoCapt“ bei 630-facher Vergrößerung und Verwendung der Filter DAPI, FITC und TexasRed durchgeführt. Die aufgenommenen Fluoreszenz-Bilder wurden mit

Hilfe der Software „ImageJ“ ausgewertet. Basierend auf der eingesetzten 3-Farben-FISH-Technik, wurden die Bilder in Bezug auf chromosomale Aberrationen der Chromosomen 1 (rot), 2 (grün) und 4 (gelb) analysiert. Gewertet wurden sowohl zusätzliche chromosomale Fragmente als auch chromosomale Translokationen.

Wenn nicht anders beschrieben, wurden pro Experiment und Datenpunkt mindestens 40 G1-Phase Chromosomenspreitungen ausgewertet. Die dargestellten Ergebnisse zeigen den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler der Mittelwerte zwischen den einzelnen Experimenten. Bei Bedarf wurde zur statistischen Absicherung der Datenpunkte der t-Test angewendet.

2.2.9 Immunfluoreszenz

Die Methode der Immunfluoreszenzmikroskopie basiert auf dem Nachweis von Proteinen mit Hilfe von spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Grundlage der Methode ist, dass zunächst ein Primärantikörper in einer Antikörper-Antigen-Reaktion an sein Epitop bindet. Die indirekte Methode der IFM verwendet darauf folgend einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper, der spezifisch an den Primärantikörper bindet. Der Sekundärantikörper kann in einer anschließenden IFM-Analyse detektiert werden und ermöglicht darüber eine Quantifizierung der zuvor über den Primärantikörper gebundenen Proteine. Die in dieser Arbeit eingesetzte Immunfluoreszenz-Färbung des Proteins γ H2AX basiert darauf, dass das Histon H2AX nach Auftreten eines DSBs im Bereich von etwa 2 Mbp um den DSB zu γ H2AX phosphoryliert wird. Über eine spezifische Antikörperfärbung, kann γ H2AX bereits wenige Minuten nach Schadensinduktion in Form von diskreten Foci mittels IFM nachgewiesen werden. Hierbei entspricht ein γ H2AX-Fokus einem DSB (Rogakou et al., 1998; Rothkamm & Lobrich, 2003). Die Analyse von γ H2AX-Foci erlaubt daher eine Quantifizierung von DSBs und darüber eine Beurteilung der zellulären DSB-Reparatur-Kinetik. Neben γ H2AX sind u. a. Checkpoint-Signalproteine und die Komponenten des MRN-Komplexes im Bereich um den DSB lokalisiert und lassen sich über die IFM als Foci darstellen. Zusätzlich zu den allgemeinen Schadensmarkern ermöglicht der Nachweis von reparaturspezifischen Proteinen eine Klassifizierung des DSB-Reparaturweges. Aufgrund seiner spezifischen Funktion in der HR ist z. B. das Protein RAD51 nur in der S- und G2-Phase zu detektieren (Bekker-Jensen et al., 2006; Schlegel, Jodelka, & Nunez, 2006).

2.2.9.1 γ H2AX- und RAD51-Antikörperfärbung

Nach Entfernung des Mediums wurden die Deckgläser kurz in PBS gewaschen und die Zellen fixiert (2 % Formaldehyd/ PBS, RT, 15 min). Im Anschluss wurden die Zellen dreimal gewaschen (PBS, RT, 10 min) und die Zellmembranen mit Triton permeabilisiert (0,2 % Triton-X-100/ PBS/ 1 % FCS, 4 °C, 10 min). Nach drei weiteren Waschschritten (PBS/ 1 % FCS, RT, 10 min) wurden zur Blockierung der unspezifischen Antikörper-Bindestellen die Zellen mit 5 % BSA/ PBS/ 1 % FCS inkubiert (30 min bei RT oder ü. N. bei 4 °C). Um das Austrocknen der Zellen zu verhindern, wurden die Deckgläser für die Antikörperinkubation in eine Petrischale überführt, die zuvor mit einem feuchten Tuch und Parafilm ausgelegt wurde. Die Zellen wurden pro Deckglas mit jeweils 40 μ l Primärantikörper-Lösung (Anti- γ H2AX monoklonaler Antikörper 1:1000 und Anti-RAD51 polyklonaler Antikörper 1:10000 in PBS/ 1 % FCS) überschichtet und inkubiert (4 °C, ü. N.). Darauf folgend wurden die Zellen dreimal gewaschen (PBS/ 1 % FCS, RT, 10 min) und pro Deckglas mit jeweils 40 μ l Sekundärantikörper-Lösung (Anti-Maus Alexa Fluor 594 1:1000 und Anti-Hase Alexa Fluor 488 1:500 in PBS/ 1 % FCS) überschichtet und inkubiert (RT, 1 h, im Dunkeln). Im Folgenden wurden die Zellen dreimal gewaschen (PBS/ 1 % FCS, RT, 10 min) und im Anschluss die DNA unspezifisch mit DAPI (0,2 μ g/ml PBS) angefärbt (RT, 4 min). Nach einem weiteren Waschschriff (PBS, RT, 5 min) wurden die Deckgläser mit einem Wischtuch vorsichtig abgetrocknet. Abschließend wurden die Deckgläser mit der Zellseite nach unten mit 3 μ l Mounting Medium auf einem Objektträger fixiert und mit Nagellack versiegelt. Die Lagerung der IFM-Präparate erfolgte bei 4 °C und Dunkelheit.

2.2.10 Auswertung der IFM-Präparate

Die Auswertung der IFM-Präparate erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop mittels der Software „Metafer4“ (MetaSystems). Bei 100-facher Vergrößerung wurden die Präparate zunächst gescannt und die detektierten Zellen in einem Punkt-Diagramm abgebildet und gespeichert. Hierbei wurde die DAPI-Intensität, die den DNA-Gehalt der Zellen repräsentiert, gegen die γ H2AX-Intensität im Zellkern im Diagramm dargestellt. Aufgrund des doppelten DNA-Gehalts zeigen G2-Phase-Zellen ein deutlich intensiveres DAPI-Signal als G1-Phase-Zellen. S-Phase-Zellen besitzen einen DNA-Gehalt, der zwischen G2- und G1-Phase-Zellen liegt. Die Aphidicolin-Behandlung der Zellen vor Schadensinduktion erzeugt ein globales γ H2AX-Signal in S-Phase-Zellen (siehe Kapitel 2.2.3), welches S-Phase-Zellen innerhalb des Punkt-Diagramms deutlich von G1- und G2-Phase-Zellen abgrenzt. Hieraus resultiert eine

hufeisenförmige Verteilung der verschiedenen Zellpopulationen innerhalb des Punktdiagramms. Durch Markieren der gewünschten Zellpopulation konnten die zuvor gespeicherten Zellen relokiert werden, worüber eine selektive Analyse von G1- bzw. G2-Phase-Zellen gewährleistet war. Die Auswertung erfolgte bei 1000-facher Vergrößerung direkt am Mikroskop und umfasste eine quantitative Analyse von γ H2AX-Foci in G1-Phase-Zellen bzw. γ H2AX- und RAD51-Foci in G2-Phase-Zellen. Die Aufnahme der Zellen erfolgte bei 630-facher Vergrößerung über das Modul „Isis“ (MetaSystems).

Pro Datenpunkt und Experiment wurden 40 Zellen ausgewertet. Die dargestellten Ergebnisse zeigen den Mittelwert aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler der Mittelwerte zwischen den einzelnen Experimenten. Bei Bedarf wurde zur statistischen Absicherung der Datenpunkte der t-Test angewendet.

3 Ergebnisse

In früheren Studien (Beucher et al., 2009; Goodarzi et al., 2008; Riballo et al., 2004) konnte gezeigt werden, dass IR-induzierte DSBs mit einer biphasischen Kinetik repariert werden. Innerhalb der ersten Stunden nach Schadensinduktion werden sowohl in der G2- als auch in der G1-Phase etwa 80 % der DSBs über das NHEJ repariert. Die Reparatur der verbleibenden DSBs verläuft mit langsamer Kinetik, da sie vermutlich aufgrund ihrer Schadensstruktur oder genomischen Lage schwieriger zu reparieren sind. Untersuchungen haben belegt, dass die langsame Reparatur von DSBs in der G2-Phase in Abhängigkeit einer CtIP-vermittelten DNA-Endresektion über die HR erfolgt (Huertas & Jackson, 2009; Sartori et al., 2007). Dagegen ist der Mechanismus der langsamen DSB-Reparatur in der G1-Phase bislang unklar, wobei unterschiedliche Studien neben dem kanonischen NHEJ (c-NHEJ) die Funktion von alternativen (alt-) NHEJ Mechanismen innerhalb der DSB-Reparatur diskutieren (Nussenzweig & Nussenzweig, 2007; H. Wang et al., 2005; M. L. Wang et al., 2006).

Die Analyse der Reparaturmechanismen in der G1-Phase ist von besonderer Relevanz, da die meisten Zellen im menschlichen Körper postmitotisch sind und sich in der G0-/G1-Phase befinden. Grundlage der vorliegenden Arbeit waren Daten aus der Arbeitsgruppe, die auch für die langsame Reparatur von IR-induzierten DSBs in der G1-Phase eine Funktion von CtIP postulieren (Barton et al., 2014). Darüber hinaus wurde in anderen Arbeitsgruppen eine Beteiligung von CtIP an der Entstehung von Translokationen nach enzymatisch induzierten DSBs gezeigt. Hierbei wird die Entstehung von Translokationen während der DSB-Reparatur in Abhängigkeit einer CtIP-vermittelten DNA-Endresektion über das alt-NHEJ postuliert (Simsek et al., 2011; Zhang & Jasin, 2011). Verschiedene Studien beschreiben das Auftreten von charakteristischen Translokationen in malignen Tumoren, wodurch eine Korrelation zwischen der Entstehung von Translokationen und einer Karzinogenese naheliegt (Bunting & Nussenzweig, 2013; Jackson & Bartek, 2009). Eine zentrale Frage innerhalb der DNA-Reparaturforschung betrifft daher die Aufklärung der grundlegenden Mechanismen, die eine Translokationsentwicklung begünstigen. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sollten die bekannten Daten mit Hilfe von Chromosomenstudien verifizieren und den Mechanismus der Translokationsentstehung nach IR in der G1-Phase weiter klassifizieren. Hierfür wurden chromosomale Studien an Wildtyp-Zellen im Vergleich zu reparaturdefizienten Zellen durchgeführt. Neben der Analyse von chromosomalen Brüchen, die einen Aufschluss über die Quantität der Reparatur erlaubt, sollte insbesondere die Auswertung von chromosomalen Translokationen einen Einblick in die Qualität der Reparatur ermöglichen und das Verständnis für die Entstehung chromosomaler Translokationen erweitern.

3.1 Etablierung der vorzeitigen Chromosomenkondensation in G1-Phase-Zellen

In der vorliegenden Arbeit sollte die DSB-Reparatur in der G1-Phase basierend auf Chromosomenstudien aufgeklärt und die Funktion beteiligter Proteine charakterisiert werden. Die Analyse von chromosomalen Aberrationen erlaubt grundsätzlich einen direkten Nachweis geschädigter DNA-Strukturen, wobei in Abhängigkeit der verwendeten Methode verschiedene chromosomale Aberrationen untersucht werden können. Die in dieser Arbeit verwendete Methode der Chromosomenanalyse sollte sowohl eine Aussage über die Quantität als auch über die Qualität der DNA-Reparatur in G1-Phase-Zellen ermöglichen. Chromosomale Studien in G1-Phase-Zellen erfordern allerdings eine vorzeitig induzierte Kondensation des Interphase-Chromatins, welches unter nativen Bedingungen ausschließlich während der Mitose kondensiert.

Im ersten Teil der Arbeit wurde daher auf Grundlage der Polyethylen-vermittelten Zellfusion (siehe Kapitel 1.8.1) die Methode der vorzeitigen Chromosomenkondensation, auch als *premature chromosome condensation* (PCC) bezeichnet, in G1-Phase-Zellen etabliert. Die PCC-Methode wurde zunächst in humanen Fibroblasten-Zellen etabliert und mit verschiedenen Chromosomenfärbungen kombiniert, um eine Qualifizierung der Methode für weiterführende Untersuchungen und Fragestellungen zu überprüfen. Um eine vorzeitige Kondensation des Interphase-Chromatins zu induzieren, wurden in ersten Experimenten unbehandelte humane Fibroblasten-Zellen (82-6hTert) mit mitotischen HeLa-Zellen mittels der Chemikalie PEG fusioniert und die Chromosomen präpariert (siehe Kapitel 2.2.5 und 2.2.6). Darauf folgend wurden die Chromosomenpräparate zunächst über den DNA-Farbstoff Giemsa angefärbt um die Struktur des vorzeitig kondensierten Chromatins zu bewerten. Die Morphologie der Giemsa-gefärbten Interphase-Chromosomen ermöglichte eine Klassifizierung der Zellzyklusphase, in welcher die vorzeitige Kondensation des Interphase-Chromatins induziert wurde. G1-Chromosomen zeigen eine Einchromatid-Struktur (Abb. 10), G2-Chromosomen dagegen eine Zweichromatid-Struktur (Abb. 11) vergleichbar mit der Morphologie der mitotischen Chromosomen der HeLa-Zellen. Die in dieser Arbeit detektierte Morphologie der vorzeitig kondensierten Chromosomen ist konsistent mit den Ergebnissen in früheren Chromosomenstudien (Gotoh & Durante, 2006; Johnson & Rao, 1970). Hierüber wurde die Qualifizierung der PEG-vermittelten Zellfusion für eine vorzeitige Kondensation des Interphase-Chromatins in humanen Fibroblasten-Zellen bestätigt.

In weiteren Experimenten wurde die Eignung der Methode in Bezug auf DNA-Reparaturanalysen untersucht. Hierfür wurden humane Fibroblasten-Zellen (82-6hTert) mit

7 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt und die Zellfusion mit mitotischen HeLa-Zellen 5 h nach Schadensinduktion eingeleitet. Basierend auf dem zeitintensiven Protokoll der Zellfusion (siehe Kapitel 2.2.5) erfolgte die Fixierung der Zellen respektive die Chromosomenpräparation etwa 2 h später, d. h. nach 7 h Reparaturzeit. Die Chromosomenpräparate wurden im Anschluss mit Giemsa angefärbt und auf erkennbare chromosomale Aberrationen analysiert (Abb. 12). Die Morphologie der Giemsa-gefärbten Chromosomen ermöglichte auch nach Bestrahlung eine Klassifizierung zwischen G1- und G2-Phase bzw. mitotischen Chromosomen. In G2-Chromosomen konnten nicht oder falsch reparierte Brüche über eine irreguläre chromosomale Struktur eindeutig detektiert werden. Im Vergleich zu G2-Chromosomen ist die Struktur von G1-Chromosomen filigran und verworren. Vermutlich ist deshalb eine eindeutige Unterscheidung zwischen Chromosomen und chromosomalen Brüchen in Giemsa-gefärbten G1-Chromosomen nicht möglich. Der Versuch, chromosomale Brüche oder zusätzliche Chromosomenfragmente in Giemsa-gefärbten G1-Chromosomen zu quantifizieren, zeigte keine validen Ergebnisse. Die Analyse von chromosomalen Aberrationen in G1-Chromosomen erfordert demzufolge neben einer vorzeitigen Chromatinkondensatin eine differenziertere Chromosomenfärbung. In weiteren Experimenten wurde daher die PEG-vermittelte Zellfusion mit der FISH-Färbetechnik kombiniert (siehe Kapitel 1.8.1.1), um eine Qualifizierung der Färbung für Chromosomenanalysen in G1-Phase-Zellen zu überprüfen.

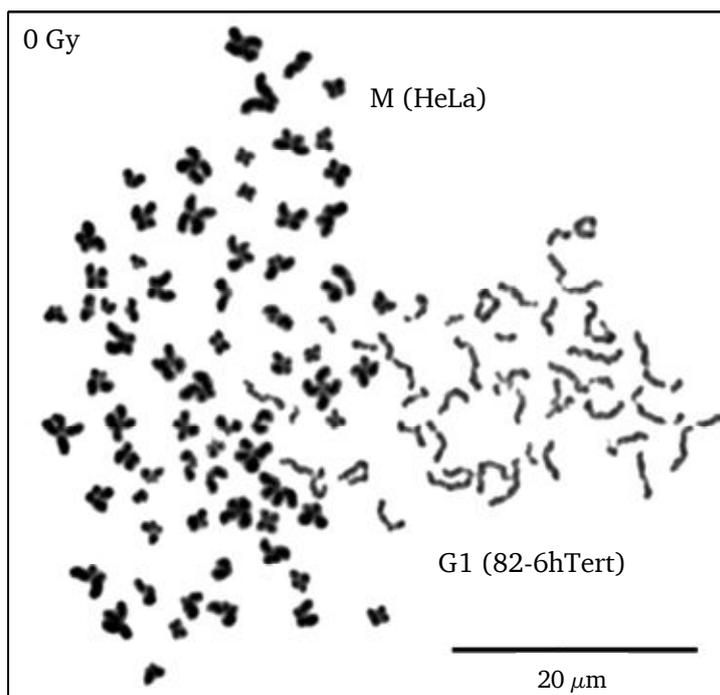


Abbildung 10: Vorzeitig kondensierte G1-Phase Chromosomen nach Giemsa-Färbung

Die Abbildung zeigt die Fusion zwischen einer mitotischen HeLa-Zelle (M) und einer unbehandelten G1-Phase Fibroblasten-Zelle (82-6hTert). Die Chromosomen wurden mittels Giemsa angefärbt.

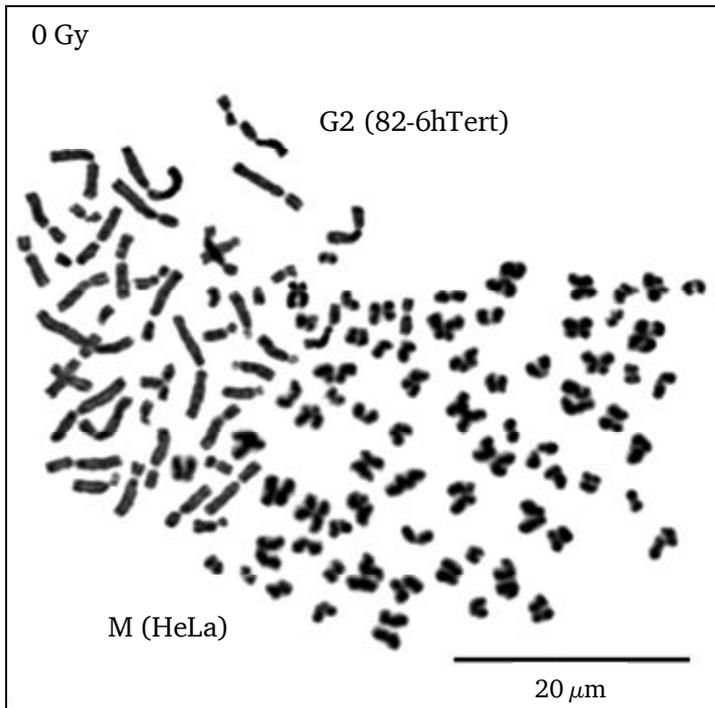


Abbildung 11: Vorzeitig kondensierte G2-Phase Chromosomen nach Giemsa-Färbung

Die Abbildung zeigt die Fusion zwischen einer mitotischen HeLa-Zelle (M) und einer unbehandelten G2-Phase Fibroblasten-Zelle (82-6hTert). Die Chromosomen wurden mittels Giemsa angefärbt.

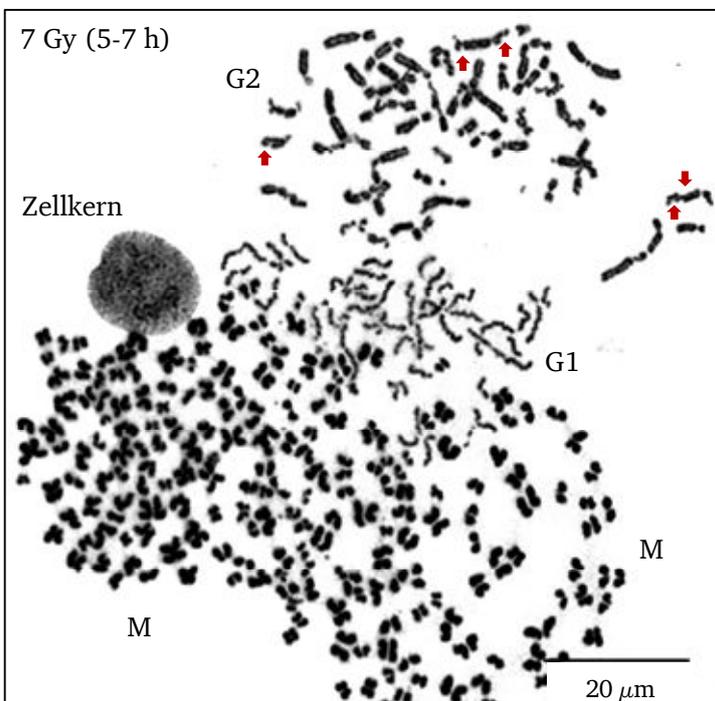


Abbildung 12: Zellfusion und Giemsa-Färbung nach Röntgenbestrahlung

Die Abbildung zeigt die Fusion zwischen zwei mitotischen HeLa-Zellen (M) und einer G1- bzw. G2-Phase Fibroblasten-Zelle (82-6hTert). Die Fibroblasten-Zellen wurden mit 7 Gy bestrahlt und die Fusion 5 h nach Schädigung eingeleitet. Die Präparation der Chromosomen erfolgte 2 h später. Die Chromosomen wurden mittels Giemsa angefärbt. Rote Pfeile: chromosomale Brüche.

Hierfür wurden zunächst unbestrahlte humane Fibroblasten-Zellen (82-6hTert) mit mitotischen HeLa-Zellen fusioniert und darüber eine vorzeitige Kondensation des Chromatins der Fibroblasten-Zellen induziert. Im Anschluss wurden die Chromosomenpräparate über die 3-Farben-FISH-Technik angefärbt. Hierbei wurden die Chromosomen 1, 2 und 4 durch sequenzspezifische DNA-Sonden markiert. Die übrigen Chromosomen wurden über den DNA-Farbstoff DAPI markiert. Ebenso wie die im vorherigen Abschnitt beschriebene Giemsa-Färbung ermöglichte auch die FISH-Färbung eine Klassifizierung der verschiedenen Zellzyklusphasen, in welcher die vorzeitige Chromosomenkondensation induziert wurde. G2-Chromosomen zeigen eine Zweichromatid-Struktur, G1-Chromosomen dagegen eine Einchromatid-Struktur (Abb. 13, A). S-Phase-Zellen sind durch eine pulverisierte Chromatinstruktur erkennbar (Abb. 13, B).

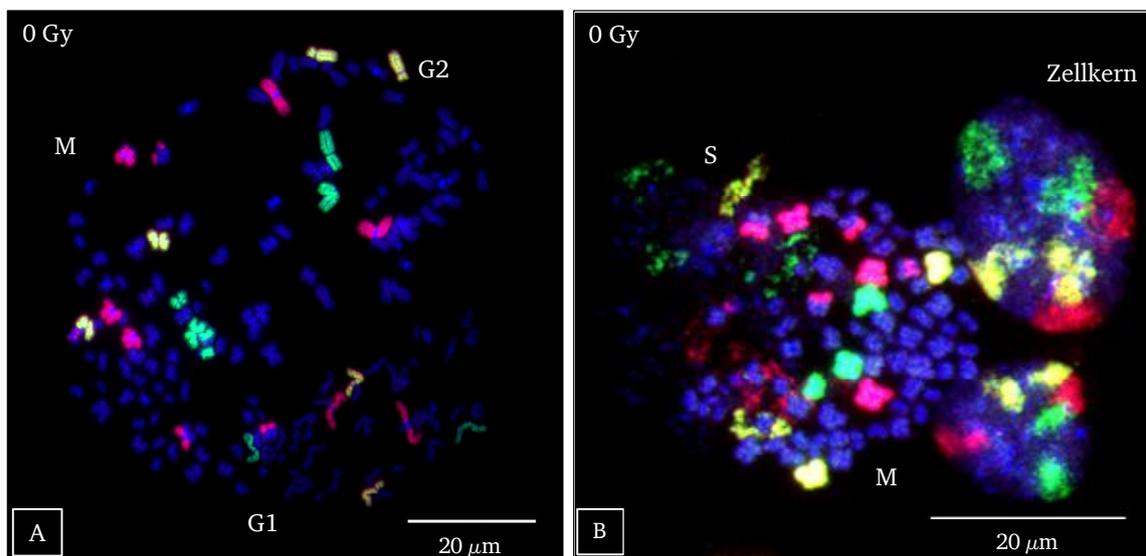


Abbildung 13: Differenzierung von G1-, G2- und S-Phase nach FISH-Färbung

Die Abbildung zeigt die Zellfusion zwischen mitotischen HeLa-Zellen (M) und unbehandelten humanen Fibroblasten-Zellen (82-6hTert). Nach der Fusion wurden die Chromosomen 1 (rot), 2 (grün) und 4 (gelb) über sequenzspezifische DNA-Sonden mit der 3-Farben-FISH-Technik markiert. Die übrigen Chromosomen wurden über den DNA-Farbstoff DAPI (blau) angefärbt. **A:** G1-Chromosomen (G1) zeigen eine Einchromatid-Struktur. G2-Chromosomen (G2) sind über eine Zweichromatid-Struktur zu erkennen, ähnlich der Struktur mitotischer Chromosomen (M). **B:** Das Chromatin von S-Phase-Zellen (S) zeigt nach vorzeitiger Kondensation eine pulverisierte Struktur.

Nachdem eine gezielte Anfärbung und Detektion von G1-Chromosomen über die 3-Farben-FISH-Technik bestätigt werden konnte, wurde in folgenden Experimenten die Qualifizierung der Methode in Bezug auf DNA-Reparaturanalysen in G1-Phase-Zellen untersucht. Hierfür wurden humane Fibroblasten-Zellen (82-6hTert) mit 7 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt und die

Zellfusion 5 h nach Schädigung induziert. Aufgrund des zeitintensiven Protokolls der Zellfusion erfolgte die Chromosomenpräparation bzw. Fixierung der Zellen 7 h nach Schadensinduktion. Die Chromosomenpräparate wurden anschließend über die 3-Farben-FISH-Technik angefärbt und auf erkennbare chromosomale Aberrationen analysiert.

In den markierten Chromosomen 1 (rot), 2 (grün) und 4 (gelb) konnten sowohl chromosomale Brüche als auch chromosomale Translokationen detektiert werden (Abb. 14, A). Chromosomale Brüche werden durch zusätzliche farbige Fragmente erkennbar. Irreguläre Farbwechsel der FISH-markierten Chromosomen untereinander oder auch zwischen FISH-markierten und den übrigen DAPI-gefärbten Chromosomen repräsentieren dagegen eine Translokation. Zusätzlich wurden die Bilder der Chromosomenspreitungen im DAPI-Kanal betrachtet (Abb. 14, B). Hierüber konnten Bruchstellen und Translokationen innerhalb der verworrenen G1-Chromosomen zusätzlich verifiziert werden. Im Gegensatz zur Giemsa-Färbung ermöglicht die FISH-Färbung daher eine Visualisierung struktureller Aberrationen in G1-Chromosomen und ist in Kombination mit der PEG-vermittelten Zellfusion qualifiziert für chromosomale Reparaturanalysen in G1-Phase-Zellen.

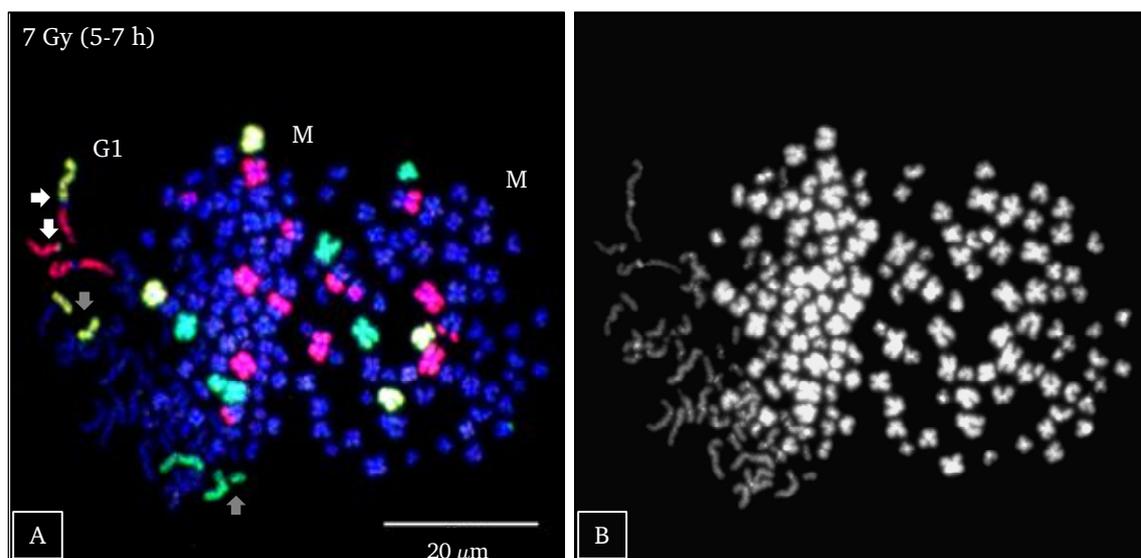


Abbildung 14: Vorzeitig kondensierte G1-Chromosomen nach FISH-Färbung

Die Abbildung zeigt die Fusion zwischen mitotischen HeLa-Zellen (M) und einer G1-Phase Fibroblasten-Zelle (G1). Die Fibroblasten-Zellen (82-6hTert) wurden mit 7 Gy bestrahlt. Die Fusion wurde 5 h nach Schädigung eingeleitet, die Chromosomenpräparation erfolgte 2 h später. A: Die Chromosomen 1 (rot), 2 (grün) und 4 (gelb) wurden nach der Fusion mit der 3-Farben-FISH-Technik angefärbt. Die übrigen Chromosomen wurden über den DNA-Farbstoff DAPI (blau) markiert. Die Methode der FISH-Färbung ermöglicht in G1-Chromosomen sowohl die Quantifizierung chromosomaler Brüche (graue Pfeile) als auch die Analyse chromosomaler Translokationen (weiße Pfeile) B: Chromosomenspreitung (aus Abb. 14, A) im DAPI-Kanal

3.2 Chromosomale Reparaturkinetik in G1-Wildtyp-Zellen

Mit Hilfe von Chromosomenstudien kann sowohl die Quantität als auch die Qualität der DNA-Reparatur analysiert werden. Nach Etablierung der vorzeitigen Chromosomenkondensation und der 3-Farben-FISH-Färbung in G1-Phase-Zellen (siehe Kapitel 3.1), wurde im folgenden Experiment zunächst die Kinetik der Chromosomenreparatur in G1-Wildtyp-Zellen (WT) untersucht. Um während der Reparaturzeit eine Progression von G2-Phase-Zellen in die G1-Phase zu vermeiden, wurden die Zellen vor der Bestrahlung mit Nocodazol behandelt (siehe Kapitel 2.2.3). Für weitere Versuchsplanungen und Fragestellungen wurde eine mögliche Dosisabhängigkeit der chromosomalen Reparatur überprüft. Daher wurden humane Fibroblasten-Zellen (82-6hTert) sowohl mit 7 Gy als auch mit 2 Gy Röntgenstrahlung geschädigt (Abb. 15 und 16). Die Zellfusion erfolgte zwischen 0 bis 13 h (7 Gy) bzw. 0 bis 9 h (2 Gy) nach Schadensinduktion und die Chromosomenpräparation jeweils 2 h später. Die Präparate wurden darauf folgend gefärbt und G1-Chromosomenspreitungen in Bezug auf chromosomale Aberrationen analysiert (siehe Kapitel 2.2.7 und 2.2.8). Es wurden sowohl chromosomale Brüche als auch chromosomale Translokationen quantifiziert. Hierbei ermöglicht die Auswertung chromosomaler Brüche eine Analyse der Reparatur-Quantität über die Reparaturzeit und die Auswertung chromosomaler Translokationen Rückschlüsse auf die Reparatur-Qualität der IR-induzierten DSBs.

Die Analyse chromosomaler Brüche zeigte nach Bestrahlung mit 7 Gy unmittelbar nach Schädigung (0-2 h nach IR) 6,49 Brüche pro Zelle (Abb. 15, A). Innerhalb der ersten Stunden (5-7 h nach IR) konnte eine schnelle Reparatur auf 1,53 Brüche detektiert werden. In den folgenden Stunden wurden die verbleibenden Brüche mit langsamer Kinetik repariert, sodass 13-15 h nach Schadensinduktion noch 0,54 Brüche quantifiziert werden konnten. Nach Bestrahlung mit 2 Gy zeigten die Zellen 0-2 h nach Schadensinduktion 1,56 Brüche (Abb. 15, B). Im weiteren Verlauf der Reparatur waren 7-9 h nach Schädigung 0,32 und zwischen 9-11 h noch 0,29 Brüche pro Zelle zu detektieren. Demzufolge zeigte die Reparatur chromosomaler Brüche in G1-Wildtyp-Zellen sowohl nach 7 Gy als auch nach 2 Gy eine biphasische Kinetik.

Die Auswertung chromosomaler Translokationen zeigte nach Bestrahlung mit 7 Gy unmittelbar nach Schädigung (0-2 h nach IR) mit 0,15 Translokationen pro Zelle eine frühe Komponente der Translokationsentstehung (Abb. 16, A). Innerhalb der ersten Stunden der Reparatur (5-7 h nach IR) wurde ein minimaler Anstieg der Translokationen auf 0,18 pro Zelle quantifiziert. Im weiteren Verlauf wurde eine Zunahme der Translokationsereignisse

sichtbar, sodass 13-15 h nach Schadensinduktion mit 0,37 Translokationen pro Zelle eine späte Komponente der Translokationsentstehung detektiert werden konnte. Wurden die Zellen mit 2 Gy geschädigt war 0-2 h nach Schadensinduktion mit 0,017 Translokationen pro Zelle ebenfalls eine frühe Komponente der Translokationsentstehung zu beobachten (Abb. 16, B). Mit 0,019 und 0,016 Translokationen pro Zelle nach 7-9 h bzw. 9-11 h Reparaturzeit konnte allerdings im Gegensatz zu 7 Gy keine späte Translokationskomponente detektiert werden. Möglicherweise besteht eine Dosisabhängigkeit oder die Methode ist bei niedrigen Dosen nicht geeignet, die wenigen Translokationsereignisse valide zu quantifizieren. Alle folgenden Experimente wurden daher mit 7 Gy durchgeführt.

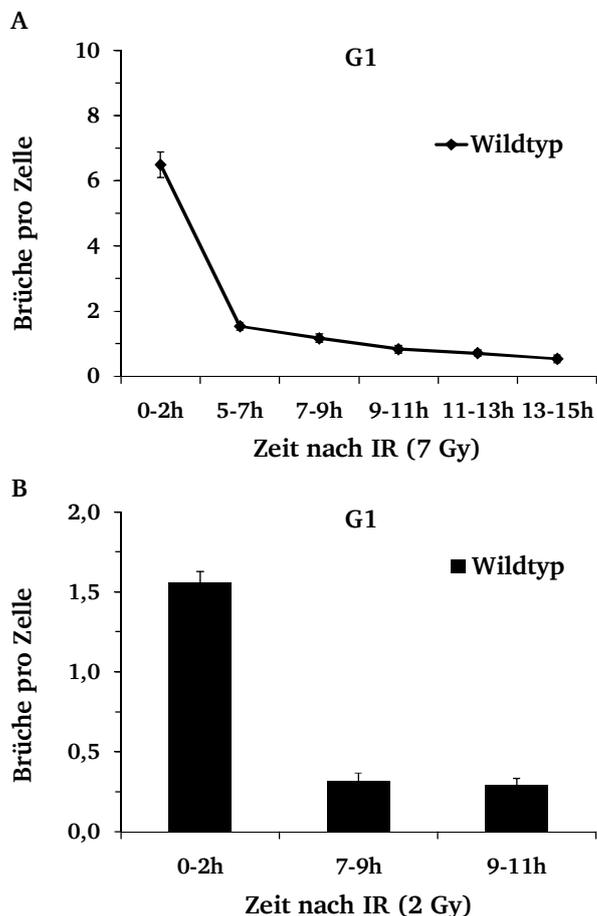


Abbildung 15: Chromosomale Brüche in G1-Wildtyp-Zellen

Humane Fibroblasten-Zellen, 82-6hTert (WT) wurden mit Nocodazol (100 ng/ml) behandelt und mit 7 Gy (A) bzw. 2 Gy (B) bestrahlt. Die Zellfusion wurde 0, 5, 7, 9, 11 und 13 h nach Schädigung induziert, die Chromosomenpräparation erfolgte jeweils 2 h später. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten (abzüglich unbehandelter Kontrollen, MW (Brüche): 0,08 (7 Gy), 0,22 (2 Gy) pro Zelle). Pro Experiment und Datenpunkt wurden 50 (7 Gy) bzw. mindestens 500 (2 Gy) G1-Chromosomenspreitungen auf chromosomale Brüche analysiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler zwischen den Experimenten.

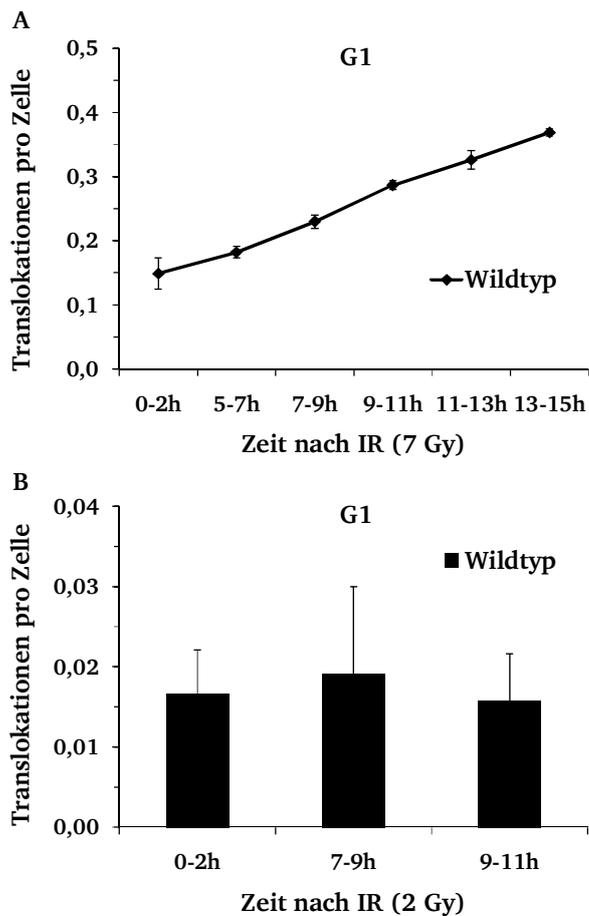


Abbildung 16: Chromosomale Translokationen in G1-Wildtyp-Zellen

Die Auswertung der Zellen auf chromosomale Translokationen erfolgte anhand der Chromosomenpräparate aus Abb. 15. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten (in unbehandelten Zellen wurden keine Translokationen detektiert). Pro Experiment und Datenpunkt wurden 50 (7 Gy) bzw. mindestens 500 (2 Gy) G1-Chromosomenspreitungen auf chromosomale Translokationen analysiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler zwischen den Experimenten.

3.3 Reparaturkinetik in Abhängigkeit von CtIP

3.3.1 Chromosomale Reparaturkinetik nach CtIP-Depletion in der G1-Phase

Grundlage der folgenden Untersuchung waren Studien, die eine Abhängigkeit der Translokationsentstehung vom Protein CtIP bei der Reparatur enzymatisch-induzierter DSBs postulieren (Zhang & Jasin, 2011). Die Untersuchung der vorliegenden Arbeit sollte den Einfluss von CtIP auf die DSB-Reparatur insbesondere die Entstehung von Translokationen nach IR-induzierten DSBs in der G1-Phase überprüfen. Hierfür wurde CtIP in humanen Fibroblasten-Zellen (82-6hTert) mittels RNA-Interferenz depletiert. Um einen Einfluss der Transfektionsmethode auf die Zellen und die Reparaturkinetik auszuschließen, wurden

zudem humane Fibroblasten-Zellen (82-6hTert) mit Kontroll-siRNA transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach siRNA-Transfektion mit Nocodazol behandelt und mit 7 Gy Röntgenstrahlung geschädigt. Die Zellfusion erfolgte zwischen 0 bis 13 h nach Bestrahlung, die Chromosomenpräparation jeweils 2 h später. Anschließend wurden die Chromosomenpräparate wie in Kapitel 3.2 beschrieben gefärbt und analysiert (Abb. 17).

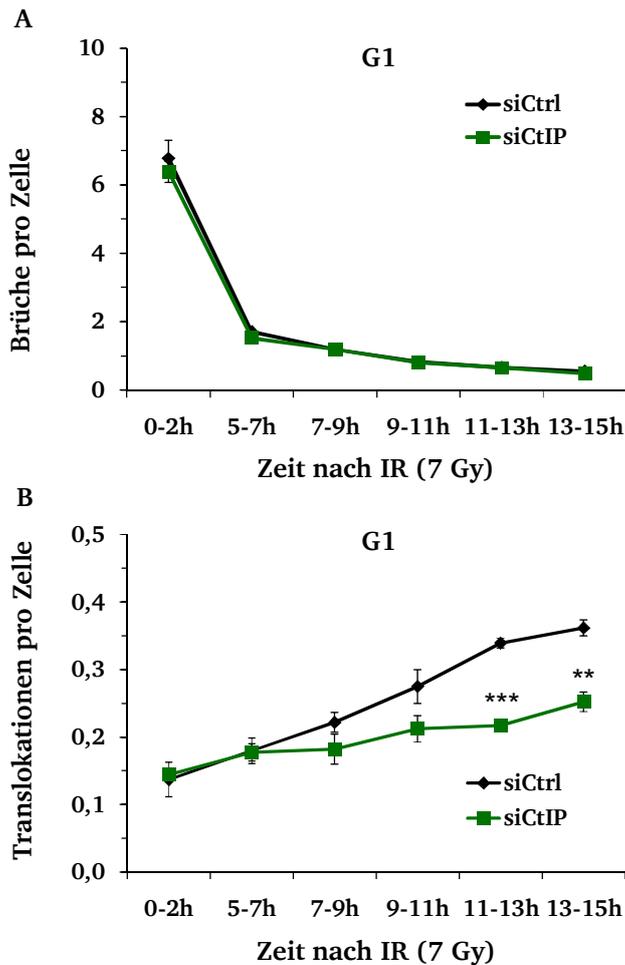


Abbildung 17: Chromosomale Analyse in Abhängigkeit von CtIP in G1

82-6hTert-Zellen wurden 48 h nach siRNA-Transfektion (siCtrl: 10 nM, siCtIP: 50 nM) mit Nocodazol (100 ng/ml) behandelt und mit 7 Gy bestrahlt. Die Zellfusion wurde 0, 5, 7, 9, 11 und 13 h nach Schädigung induziert, die Chromosomenpräparation erfolgte jeweils 2 h später. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten (abzüglich unbehandelter Kontrollen, MW (Brüche): 0,11 pro Zelle. In unbehandelten Zellen wurden keine Translokationen detektiert). Pro Experiment und Datenpunkt wurden 50 G1-Chromosomenspreitungen analysiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler zwischen den Experimenten (**= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$). A: Chromosomale Brüche pro Zelle B: Chromosomale Translokationen pro Zelle (Daten veröffentlicht in Barton et al., 2014)

Der Vergleich von G1-Wildtyp-Zellen (siehe Kapitel 3.2) und Kontroll-siRNA behandelten Zellen (Abb. 17) zeigte nach Bestrahlung mit 7 Gy einen ähnlichen Verlauf der Reparaturkinetik. Daher konnte ein Einfluss der Transfektionsmethode auf die Zellen respektive die chromosomale Reparaturkinetik ausgeschlossen werden.

Die Quantifizierung chromosomaler Brüche in Kontroll-siRNA behandelten und CtIP depletierten Zellen resultierte nach Bestrahlung mit 7 Gy ebenfalls in einer vergleichbaren Kinetik (Abb. 17, A). Unmittelbar nach Schädigung (0-2 h nach IR) waren in Kontroll-siRNA behandelten Zellen 6,78 und in CtIP-depletierten Zellen 6,38 Chromosomenbrüche zu detektieren. Zwischen 5-7 h wurden nach Kontroll-siRNA Behandlung 1,70 und nach CtIP-Depletion 1,52 chromosomale Brüche quantifiziert. Die Reparatur der verbliebenen Chromosomenbrüche erfolgte mit langsamer Kinetik. In Kontroll-siRNA behandelten Zellen konnte 13-15 h nach Bestrahlung eine Abnahme der Chromosomenbrüche auf 0,55 pro Zelle detektiert werden. CtIP-depletierte Zellen zeigten mit 0,48 Chromosomenbrüchen 13-15 h nach Bestrahlung ähnliche Werte wie die Kontroll-siRNA behandelten Zellen.

Die Analyse chromosomaler Translokationen zeigte nach Bestrahlung mit 7 Gy zu frühen Zeitpunkten der DSB-Reparatur (0-2 h und 5-7 h nach IR) mit durchschnittlich 0,14 und 0,18 Translokationen nach Kontroll-siRNA Behandlung bzw. nach CtIP-Depletion keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben. Sowohl in Kontroll-siRNA behandelten Zellen als auch in CtIP-depletierten Zellen war demnach eine frühe Komponente der Translokationsentstehung zu detektieren (Abb. 17, B). Im weiteren Verlauf der Reparatur konnte in Kontroll-siRNA behandelten Zellen eine zweite Komponente der Translokationsentstehung beobachtet werden. Hierbei wurden 13-15 h nach Schadensinduktion 0,36 Translokationen pro Zelle quantifiziert. Dagegen zeigten CtIP-depletierte Zellen mit 0,25 Translokationen nach 13-15 h im Vergleich zu Kontroll-siRNA behandelten Zellen eine signifikante Reduktion der Translokationen innerhalb der langsamen Reparaturkomponente. Dieses Ergebnis lässt einen Einfluss von CtIP an der Entstehung chromosomaler Translokationen zu späten Zeitpunkten der DSB-Reparatur in humanen G1-Phase-Zellen vermuten.

3.3.2 γ H2AX- und RAD51-Reparaturkinetik nach CtIP-Depletion (7 Gy)

Im folgenden Experiment wurde die Quantität der DSB-Reparatur nach Bestrahlung mit 7 Gy über eine γ H2AX-Foci-Analyse überprüft, um einen Vergleich mit der chromosomalen DSB-Reparaturkinetik in G1-Phase-Zellen aus Kapitel 3.3.1 zu ermöglichen. Die Quantifizierung

von γ H2AX-Foci respektive der Nachweis von Proteinagglomeraten in unmittelbarer Nähe eines DSB ist eine etablierte Methode innerhalb der DSB-Reparatur-Analyse. Hierbei können Schadensmarker und reparaturrelevante Proteine über fluoreszenzmarkierte Antikörper in Form von einzelnen Foci detektiert werden (siehe Kapitel 2.2.9 und Abb. 18). Das Protein γ H2AX ist ein allgemeiner Schadensmarker, wodurch die Analyse von γ H2AX-Foci eine Quantifizierung von DSBs und darüber eine Beurteilung der zellulären DSB-Reparaturkinetik in allen Zellzyklusphasen ermöglicht. Neben der Reparatur-Quantität sollte zudem die siRNA-*knock-down*-Effizienz des Proteins CtIP überprüft werden. Da die DNA-Bindung des Proteins RAD51 während der HR in Abhängigkeit einer CtIP-vermittelten Resektion der DSB-Enden steht, ermöglicht die Analyse von RAD51-Foci in G2-Phase-Zellen u. a. einen indirekten Nachweis der CtIP-Aktivität und folglich der siRNA-*knock-down*-Effizienz.

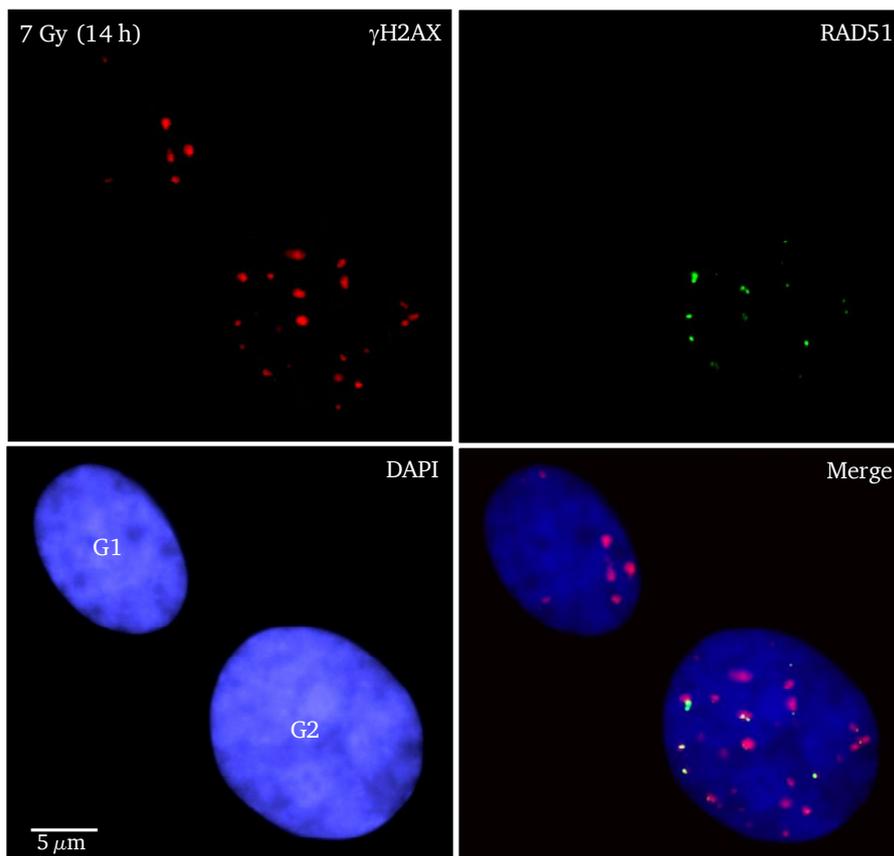


Abbildung 18: Exemplarische Darstellung einer γ H2AX- und RAD51-Färbung

Die Abbildung zeigt eine G1- und eine G2-Phase Fibroblasten-Zelle, 82-6hTert (WT). Die Zellen wurden mit 7 Gy bestrahlt, 14 h nach Schadensinduktion fixiert und mit spezifischen Antikörpern (AKs) gefärbt. DAPI: Kernfärbung (blau), γ H2AX: Färbung mit TexasRed-gekoppelten AKs (rot), RAD51: Färbung mit FITC-gekoppelten AKs (grün). Merge: Überlagerung aus allen Kanälen

Humane Fibroblasten-Zellen (82-6hTert) wurden mit Kontroll- und CtIP-siRNA transfiziert. Zusätzlich wurden unbehandelte Wildtyp-Zellen (WT) mitgeführt. Die Zellen wurden 48 h nach siRNA-Transfektion mit Nocodazol und Aphidicolin behandelt und mit 7 Gy Röntgenstrahlung geschädigt. Nocodazol arretiert G2-Phase-Zellen respektive Mitosen und gewährleistet darüber eine spezifische Auswertung von Zellen, die in der G1-Phase geschädigt und repariert wurden. Mittels Aphidicolin können S-Phase-Zellen markiert und von der IFM-Analyse ausgeschlossen werden (siehe Kapitel 2.2.3). Eine differenzierte Foci-Analyse direkt nach Bestrahlung mit 7 Gy war aufgrund der hohen Foci-Anzahl nicht möglich. Die Fixierung der Zellen erfolgte daher 6 bis 14 h nach Bestrahlung. Die Präparate wurden darauf folgend mit spezifischen Primärantikörpern gegen γ H2AX und RAD51 sowie fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern gefärbt und analysiert (siehe Kapitel 2.2.9 und 2.2.10). Konsistent mit der chromosomalen Reparaturkinetik aus Kapitel 3.3.1 zeigten G1-Phase-Zellen nach Bestrahlung mit 7 Gy eine vergleichbare γ H2AX-Reparaturkinetik zwischen WT-Zellen, Kontroll-siRNA behandelten Zellen und CtIP-depletierten Zellen (Abb. 19). Im Mittel wurden 6 h nach Schadensinduktion 18,97 γ H2AX-Foci pro Zelle quantifiziert. In den folgenden 8 h wurde in allen Proben eine ähnliche DSB-Reparaturkinetik beobachtet. Die γ H2AX-Foci-Analyse zeigte 14 h nach Schadensinduktion durchschnittlich 6,15 Foci pro Zelle.

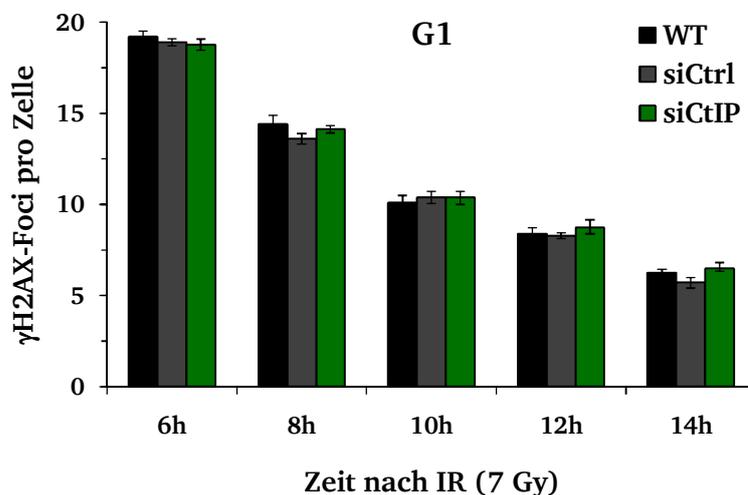


Abbildung 19: γ H2AX-Reparaturkinetik nach CtIP-Depletion in G1

82-6hTert-Zellen (WT) wurden 48 h nach siRNA-Transfektion (siCtrl: 10 nM, siCtIP: 50 nM) mit Nocodazol (100 ng/ml) und Aphidicolin (3 μ g/ml) behandelt und mit 7 Gy bestrahlt. Die Fixierung der Zellen erfolgte nach 6, 8, 10, 12 und 14 h Reparaturzeit. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten (abzüglich unbehandelter Kontrollen, MW (γ H2AX-Foci): 0,50 pro Zelle). Pro Experiment und Datenpunkt wurden 40 G1-Phase-Zellen ausgewertet. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler zwischen den Experimenten.

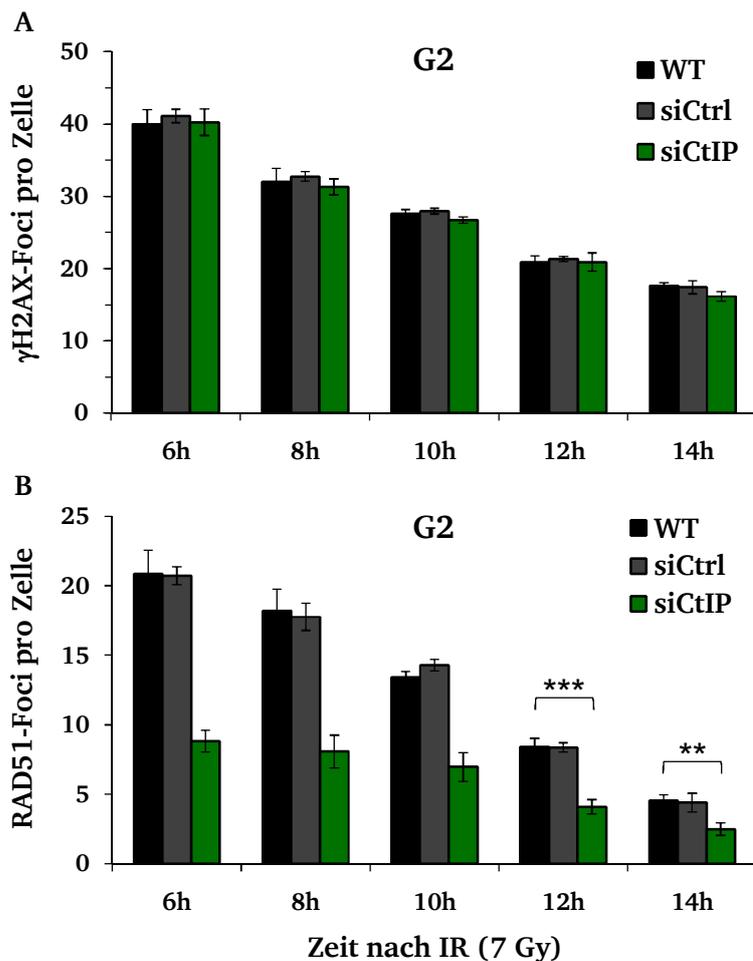


Abbildung 20: γH2AX- und RAD51-Reparaturkinetik nach CtIP-Depletion in G2

82-6hTert-Zellen (WT) wurden 48 h nach siRNA-Transfektion (siCtrl: 10 nM, siCtIP: 50 nM) mit Nocodazol (100 ng/ml) und Aphidicolin (3 μg/ml) behandelt und mit 7 Gy bestrahlt. Die Fixierung der Zellen erfolgte nach 6, 8, 10, 12 und 14 h Reparaturzeit. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten (abzüglich unbehandelter Kontrollen, MW (γH2AX-Foci): 1,51 pro Zelle/ MW (RAD51-Foci): 0,40 pro Zelle). Pro Experiment und Datenpunkt wurden 40 G2-Phase-Zellen ausgewertet. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler zwischen den Experimenten (**=p<0,01, ***=p<0,001). **A:** γH2AX-Foci pro Zelle **B:** RAD51-Foci pro Zelle

Konsistent mit G1-Phase-Zellen war auch in G2-Phase-Zellen nach Bestrahlung mit 7 Gy eine vergleichbare γH2AX-Reparaturkinetik zwischen WT-Zellen, Kontroll-siRNA behandelten Zellen und CtIP-depletierten Zellen zu detektieren (Abb. 20, A). Im Mittel wurden 6 h nach Bestrahlung 40,41 γH2AX-Foci pro Zelle quantifiziert. Im weiteren Verlauf der DSB-Reparatur wurde in allen Proben eine ähnliche Kinetik beobachtet. Die γH2AX-Foci-Analyse zeigte 14 h nach Schädigung durchschnittlich 17,02 Foci pro Zelle. Bei der Analyse von RAD51-Foci wurden Unterschiede zwischen WT-Zellen, Kontroll-siRNA behandelten Zellen und CtIP-depletierten Zellen erkennbar (Abb. 20, B). In WT- und Kontroll-siRNA behandelten Zellen

wurden 6 h nach Schädigung im Mittel 20,81 RAD51-Foci pro Zelle und damit vergleichbare Werte detektiert. Dagegen zeigten CtIP-depletierte Zellen mit 8,83 Foci pro Zelle eine deutliche Reduktion der RAD51-Foci. In den folgenden 8 h wurde in allen Proben eine Abnahme der RAD51-Foci beobachtet. Während die Werte zwischen WT-Zellen und Kontroll-siRNA behandelte Zellen mit durchschnittlich 4,47 Foci pro Zelle 14 h nach Schädigung ähnlich waren, zeigten CtIP-depletierte Zellen mit 2,48 Foci pro Zelle eine bleibende Reduktion der RAD51-Foci im Vergleich zu WT- und Kontroll-siRNA behandelten Zellen.

3.4 Chromosomale Aberrationen in Abhängigkeit von Plk3 in der G1-Phase

Basierend auf den Ergebnissen aus Kapitel 3.3.1, die eine CtIP-Abhängigkeit der langsamen Reparaturkomponente in der G1-Phase postulieren, wurde in der folgenden Untersuchung die Funktion von CtIP innerhalb der DSB-Reparatur weiter klassifiziert. Nachdem verschiedene Studien unserer Arbeitsgruppe in der G1-Phase eine Plk3-vermittelte Phosphorylierung von CtIP und somit eine Aktivierung der CtIP-abhängigen DNA-Resektion beschreiben, wurde die Beteiligung von Plk3 in der DSB-Reparatur über Chromosomenstudien verifiziert. Hierfür wurde in humanen Fibroblasten-Zellen (82-6hTert) das Protein Plk3 mittels RNA-Interferenz depletiert und in einer weiteren Probe über einen Plk-Inhibitor inhibiert. Zum Vergleich wurden WT-Zellen mitgeführt. Die Zellen wurden 48 h nach siRNA-Transfektion bzw. 1 h nach Plk-Inhibitor (Plk1/3i) Inkubation mit Nocodazol behandelt und mit 7 Gy Röntgenstrahlung geschädigt. Die Zellfusion erfolgte 0, 5 und 13 h nach Bestrahlung, die Chromosomenpräparation jeweils 2 h später. Die Chromosomenpräparate wurden anschließend wie in Kapitel 3.2 beschrieben gefärbt und analysiert (Abb. 21).

Nach Bestrahlung mit 7 Gy verlief die Reparatur chromosomaler Brüche sowohl in WT-Zellen als auch nach Plk3-Depletion und -Inhibition über eine ähnliche Kinetik (Abb. 21, A). Unmittelbar nach Schädigung (0-2 h nach IR) wurden im Mittel 6,72 Brüche pro Zelle detektiert. Im weiteren Verlauf wurde in allen Proben eine Reparatur beobachtet. Hierbei wurden 5-7 h nach Schadensinduktion durchschnittlich 1,38 chromosomale Brüche quantifiziert. Die verbleibenden Brüche wurden mit langsamer Kinetik repariert. Hierbei zeigte die Chromosomenanalyse 13-15 h nach Schädigung im Mittel 0,71 Brüche pro Zelle.

Bei der Untersuchung chromosomaler Translokationen wurden zu frühen Zeiten der DSB-Reparatur mit durchschnittlich 0,17 Translokationen (0-2 h nach IR) und 0,18 Translokationen (5-7 h nach IR) keine Unterschiede zwischen WT-Zellen, Plk3-depletierten und Plk-inhibierten Zellen beobachtet (Abb. 21, B). Demnach zeigten alle Proben eine frühe

Komponente der Translokationsentstehung. Zu späten Zeiten der DSB-Reparatur (13-15 h nach IR) wurden dagegen Unterschiede zwischen den Proben erkennbar. Im Vergleich zu WT-Zellen mit 0,36 Translokationen zeigten Plk3-depletierte Zellen mit 0,25 Translokationen und Plk-inhibierte Zellen mit 0,22 Translokationen eine deutliche Reduktion innerhalb der Translokationsentstehung. Demnach zeigte die Ausbildung von Translokationen während der langsamen DSB-Reparatur in G1-Phase-Zellen eine Plk3-Abhängigkeit und vergleichbare Effekte wie eine CtIP-Depletion (siehe Kapitel 3.3.1).

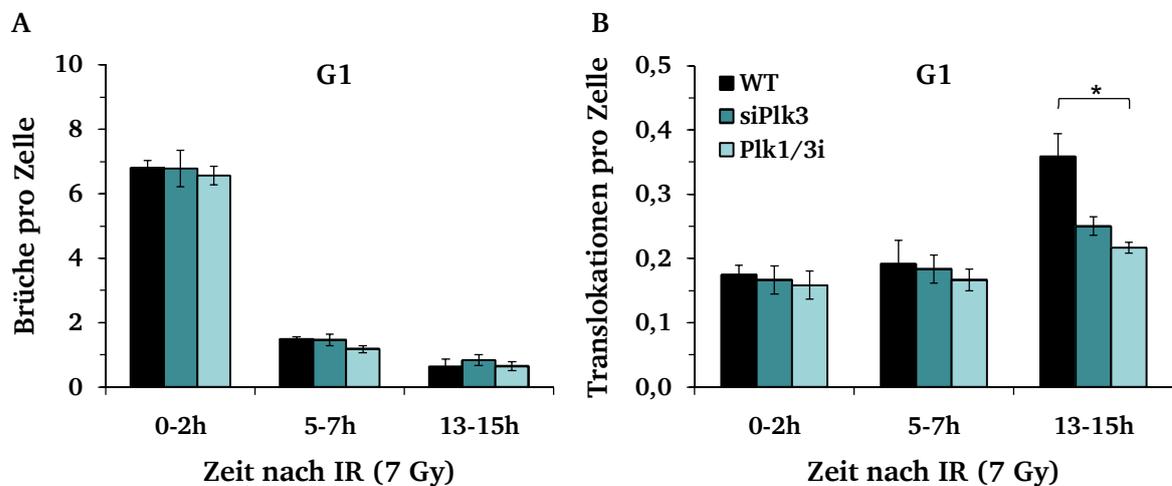


Abbildung 21: Chromosomale Analyse in Abhängigkeit von Plk3 in G1

82-6hTert-Zellen (WT) wurden 48 h nach siRNA-Transfektion (siPlk3: 25 nM) bzw. 1 h nach Plk1/3i-Inhibition (0,5 μ M) mit Nocodazol (100 ng/ml) behandelt und mit 7 Gy bestrahlt. Die Zellfusion wurde 0, 5 und 13 h nach Schädigung induziert, die Chromosomenpräparation erfolgte jeweils 2 h später. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten (abzüglich unbehandelter Kontrollen, MW (Brüche): 0,27 pro Zelle. In unbehandelten Zellen wurden keine Translokationen detektiert). Pro Experiment und Datenpunkt wurden mindestens 40 G1-Chromosomenspreitungen analysiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler zwischen den Experimenten (*=p<0,05). **A:** Chromosomale Brüche pro Zelle **B:** Chromosomale Translokationen pro Zelle (Daten veröffentlicht in Barton et al., 2014)

3.5 Einfluss der NHEJ-Reparatur auf die Entstehung von Translokationen in G1

Die chromosomalen Analysen aus Kapitel 3.2, 3.3.1 und 3.4 postulieren eine erhöhte Fehlreparatur in humanen G1-Phase-Zellen für IR-induzierte DSBs, die mit langsamer Kinetik repariert werden. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse aus Kapitel 3.3.1 eine Abhängigkeit der späten Translokationskomponente von CtIP. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde in den folgenden Untersuchungen der CtIP-abhängige Reparaturweg weiter klassifiziert.

Verschiedene Studien beschreiben in Mauszellen eine CtIP-vermittelte Entstehung von Translokationen über das alt-NHEJ während der Reparatur von enzymatisch-induzierten DSBs (Simsek et al., 2011; Zhang & Jasin, 2011). Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sollten den Einfluss der NHEJ-Reparatur auf die Entstehung von Translokationen nach IR-induzierten DSBs in der G1-Phase in humanen Zellen verifizieren.

3.5.1 Einfluss des alt-NHEJ auf die Translokationsentstehung

Wie oben beschrieben zeigen verschiedene Studien die Beteiligung eines CtIP-vermittelten alt-NHEJ an der Entstehung von Translokationen bei der Reparatur von enzymatisch-induzierten DSBs. Da die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine CtIP-Anhängigkeit innerhalb der Translokationsentstehung postulieren, sollte das folgende Experiment den Einfluss des alt-NHEJ auf die chromosomale Reparaturkinetik nach IR-induzierten DSBs in der G1-Phase überprüfen. Sowohl das Protein PARP1, als auch Lig1/3 sind für ihre Funktion im alt-NHEJ beschrieben (Mansour, Rhein, & Dahm-Daphi, 2010; Paul et al., 2013; M. L. Wang et al., 2006). Um einen Einfluss des alt-NHEJ auf die chromosomale Reparaturkinetik in der G1-Phase zu untersuchen, wurde daher in humanen Fibroblasten-Zellen (82-6hTert) PARP1 über einen Inhibitor inhibiert und in einer weiteren Probe Lig1/3 mittels RNA-Interferenz depletiert. Als Kontrolle wurden WT-Zellen mitgeführt. Die Zellen wurden 1 h nach Inkubation mit PARP1-Inhibitor (PARPi) bzw. 48 h nach siRNA-Transfektion mit Nocodazol behandelt und mit 7 Gy Röntgenstrahlung geschädigt. Die Zellfusion wurde 0 bis 13 h nach Bestrahlung eingeleitet, die Chromosomenpräparation erfolgte jeweils 2 h später. Darauf folgend wurden die Chromosomenpräparate wie in Kapitel 3.2 beschrieben gefärbt und analysiert (Abb. 22).

Bei der Untersuchung chromosomaler Brüche wurde nach Bestrahlung mit 7 Gy in WT- und PARP1-inhibierten Zellen sowie in Lig1/3-depletierten Zellen eine vergleichbare Kinetik detektiert (Abb. 22, A). Hierbei wurden direkt nach Schadensinduktion (0-2 h nach IR) im Mittel 7,62 Brüche pro Zelle quantifiziert. Innerhalb der nächsten Stunden zeigten alle Proben eine schnelle Reparatur der Brüche, sodass 5-7 h nach Bestrahlung durchschnittlich 1,63 Brüche pro Zelle gezählt wurden. In den folgenden 8 h verlief die Reparatur der verbliebenen Brüche mit langsamer Kinetik. Die Quantifizierung chromosomaler Brüche zeigte 13-15 h nach Schadensinduktion in allen Proben im Mittel 0,54 Brüche pro Zelle. Konsistent mit der Reparatur chromosomaler Brüche zeigte die Analyse chromosomaler Translokationen nach Bestrahlung mit 7 Gy eine ähnliche Kinetik zwischen WT-, PARP1-inhibierten und Lig1/3-depletierten Zellen (Abb. 22, B). Hierbei konnte zu frühen Zeiten der DSB-Reparatur mit

durchschnittlich 0,18 Translokationen (0-2 h nach IR) und 0,21 Translokationen (5-7 h nach IR) in allen Proben eine frühe Komponente der Translokationsentstehung detektiert werden. Im weiteren Verlauf der Reparatur wurden 13-15 h nach Schadensinduktion im Mittel 0,38 Translokationen pro Zelle quantifiziert. Folglich zeigten alle Proben auch eine vergleichbare späte Komponente der Translokationsentstehung. Ein Einfluss des alt-NHEJ an der DSB-Reparatur respektive der Entstehung von Translokationen konnte demnach in humanen G1-WT-Zellen nicht beobachtet werden.

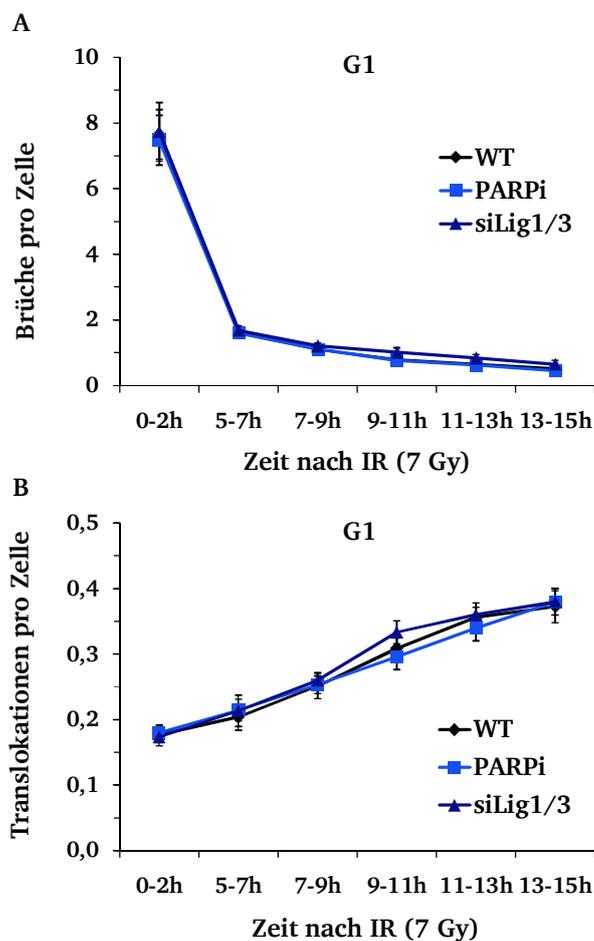


Abbildung 22: Einfluss von alt-NHEJ-Faktoren auf chromosomale Aberrationen in G1

82-6hTert-Zellen (WT) wurden 1 h nach PARPi-Inkubation (15 μ M) bzw. 48 h nach siRNA-Transfektion (siLig1/siLig3: 20 nM) mit Nocodazol (100 ng/ml) behandelt und mit 7 Gy bestrahlt. Die Zellfusion wurde 0, 5, 7, 9, 11 und 13 h nach Schädigung induziert, die Chromosomenpräparation erfolgte jeweils 2 h später. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten (abzüglich unbehandelter Kontrollen, MW (Brüche): 0,18 pro Zelle. In unbehandelten Zellen wurden keine Translokationen detektiert). Pro Experiment und Datenpunkt wurden mindestens 40 G1-Chromosomenspreitungen analysiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler zwischen den Experimenten. **A:** Chromosomale Brüche pro Zelle **B:** Chromosomale Translokationen pro Zelle (Daten veröffentlicht in Biehs et al., 2017)

3.5.2 Ausbildung von Translokationen in c-NHEJ-defekten Zellen

Die Untersuchungen aus Kapitel 3.5.1 postulieren, dass das alt-NHEJ an der Reparatur von IR-induzierten DSBs in humanen G1-WT-Zellen nicht beteiligt ist. Daher wurde in weiteren Studien der Einfluss des c-NHEJ an der Reparatur von IR-induzierten DSBs in G1-Phase-Zellen verifiziert werden. Hierfür wurde im folgenden Experiment die Reparatur von chromosomalen Brüchen sowie die Ausbildung von Translokationen in c-NHEJ-defekten Fibroblasten-Zellen überprüft. 82-6hTert-Zellen (WT) und 2BNhTert-Zellen (XLF-defekt/c-NHEJ-Mutante) wurden mit Nocodazol behandelt und mit 7 Gy Röntgenstrahlung geschädigt. Die Zellfusion erfolgte 0 bis 13 h nach Schadensinduktion, die Chromosomenpräparation jeweils 2 h später. Anschließend wurden die Chromosomenpräparate wie in Kapitel 3.2 beschrieben gefärbt und analysiert (Abb. 23).

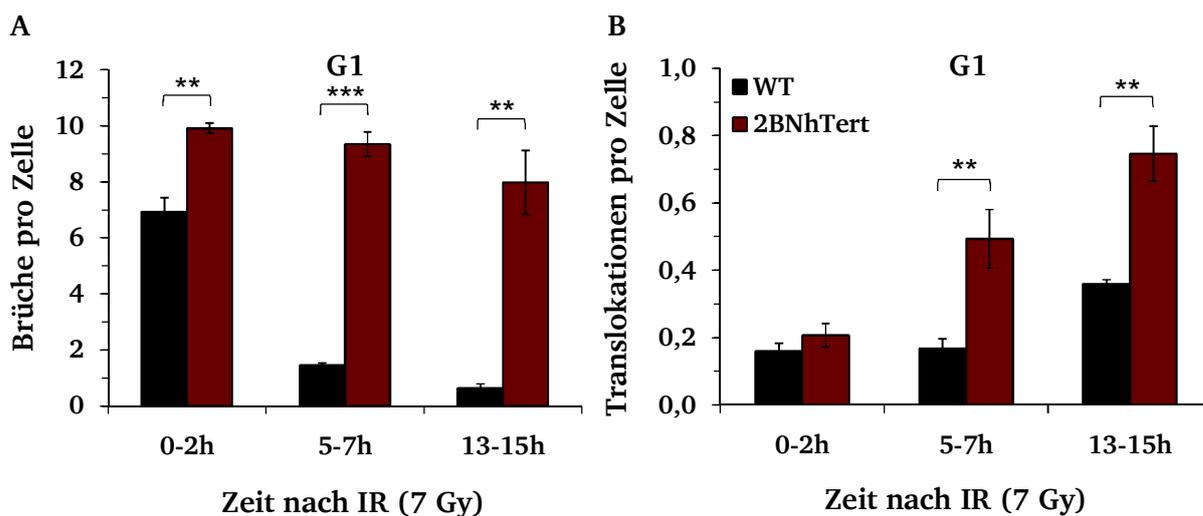


Abbildung 23: Chromosomale Analyse in XLF-defekten G1-Phase-Zellen

82-6hTert-Zellen (WT) und 2BNhTert-Zellen (XLF-defekt/c-NHEJ-Mutante) wurden mit Nocodazol (100 ng/ml) behandelt und mit 7 Gy bestrahlt. Die Zellfusion wurde 0, 5 und 13 h nach Schädigung induziert, die Chromosomenpräparation erfolgte jeweils 2 h später. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten (abzüglich unbehandelter Kontrollen, MW (Brüche): 0,16 (WT), 0,19 (2BNhTert) pro Zelle. In unbehandelten Zellen wurden keine Translokationen detektiert). Pro Experiment und Datenpunkt wurden mindestens 40 G1-Chromosomenspreitungen analysiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler zwischen den Experimenten (**= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$). **A:** Chromosomale Brüche pro Zelle **B:** Chromosomale Translokationen pro Zelle

Bei der Analyse chromosomaler Brüche zeigten WT-Zellen im Verlauf der Analyse (0 bis 15 h nach IR) eine Reparatur von 6,93 auf 0,63 Chromosomenbrüche pro Zelle (Abb. 23, A). Die Analyse von XLF-defekten Zellen zeigte dagegen bereits zu frühen Zeiten der Reparatur (0-2 h

nach IR) mit 9,91 Brüchen einen Reparaturdefekt im Vergleich zu WT-Zellen, der im weiteren Verlauf persistierte. Zwischen 5-7 h nach Schädigung wurden 9,35 und 13-15 h nach Schadensinduktion 7,98 Chromosomenbrüche in XLF-defekten Zellen detektiert.

Die Quantifizierung chromosomaler Translokationen zeigte in WT- und XLF-defekten Zellen unmittelbar nach Schädigung (0-2 h) mit 0,16 und 0,21 Translokationen eine vergleichbare frühe Komponente der Translokationsentstehung (Abb. 23, B). Im weiteren Verlauf wurde bei beiden Proben ein Anstieg der Translokationen erkennbar. Allerdings zeigten XLF-defekte Zellen zu späteren Analysezeitpunkten (5-7 h und 13-15 h nach IR) mit 0,49 und 0,75 Translokationen etwa doppelt so viele Translokationen wie WT-Zellen und demzufolge eine deutlich erhöhte Fehlreparatur.

3.5.3 Einfluss des alt-NHEJ auf die chromosomale Reparatur in c-NHEJ-Mutanten

Die Chromosomenanalysen aus Kapitel 3.5.1 zeigen keine Beteiligung des alt-NHEJ an der Reparatur von IR-induzierten DSBs in humanen G1-WT-Zellen. Allerdings postulieren verschiedene Studien eine Funktion des alt-NHEJ in c-NHEJ-Mutanten. Hierbei werden eine vermehrte Fehlreparatur respektive eine erhöhte Translokationsfrequenz in c-NHEJ-Mutanten beschrieben (Boboila et al., 2010; Nussenzweig & Nussenzweig, 2010; Weinstock, Brunet, & Jasin, 2007). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen ebenfalls einen Reparaturdefekt und eine vermehrte Ausbildung von Translokationen in einer c-NHEJ-Mutanten (siehe Kapitel 3.5.2). Daher sollte im folgenden Experiment der Einfluss des alt-NHEJ auf die chromosomale Reparatur in c-NHEJ-defekten G1-Phase-Zellen überprüft werden. Hierfür wurden c-NHEJ-defekte Zellen mit PARP1-Inhibitor behandelt und darüber das alt-NHEJ inhibiert. Als Kontrolle wurden WT-Zellen mitgeführt. 82-6hTert-Zellen (WT), 2BNhTert-Zellen (XLF-defekt/c-NHEJ-Mutante) und 411BrhTert-Zellen (Lig4-defekt/c-NHEJ-Mutante) wurden 1 h nach PARPi-Inkubation mit Nocodazol behandelt und mit 7 Gy geschädigt. Die Zellfusion wurde 13 h nach Schädigung induziert, die Chromosomenpräparation erfolgte 2 h später. Die Chromosomenpräparate wurden darauf folgend wie in Kapitel 3.2 beschrieben gefärbt und analysiert (Abb. 24).

Bei der Untersuchung chromosomaler Brüche wurde sowohl in XLF-defekten Zellen mit 6,70 Brüchen als auch in Lig4-defekten Zellen mit 2,73 Brüchen ein Reparaturdefekt im Vergleich zu WT-Zellen detektiert (Abb. 24, A). In PARP1-inhibierten Zellen zeigte die Analyse chromosomaler Brüche vergleichbare Werte. Bei der Quantifizierung chromosomaler Translokationen wurde in XLF-defekten Zellen mit 0,68 und in Lig4-defekten Zellen mit 0,50

Translokationen eine deutlich erhöhte Fehlreparatur im Vergleich zu WT-Zellen erkennbar (Abb. 24, B). Konsistent mit der Reparatur chromosomaler Brüche zeigten PARP1-inhibierte Zellen ähnliche Werte bezüglich der Translokationsentstehung. Demzufolge scheint das alt-NHEJ, in den untersuchten c-NHEJ-Mutanten, keinen Einfluss auf die DSB-Reparatur in G1-Phase-Zellen zu haben.

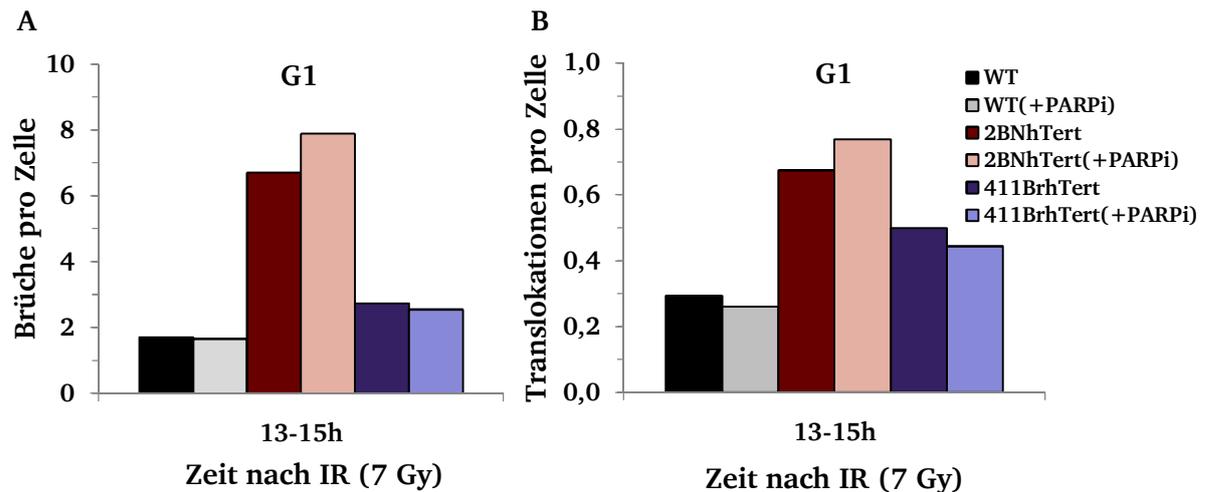


Abbildung 24: Chromosomale Analyse in c-NHEJ-Mutanten nach PARP1-Inhibition

82-6hTert-Zellen (WT), 2BNhTert-Zellen (XLF-defekt/c-NHEJ-Mutante) und 411BrhTert Zellen (Lig4-defekt/c-NHEJ-Mutante) wurden 1 h nach PARPi-Inkubation (15 μ M) mit Nocodazol (100 ng/ml) behandelt und mit 7 Gy bestrahlt. Die Zellfusion wurde 13 h nach Schädigung induziert, die Chromosomenpräparation erfolgte 2 h später. Im Mittel wurden 46 G1-Chromosomenspreitungen pro Datenpunkt (c-NHEJ-Mutanten) ausgewertet. **A:** Chromosomale Brüche pro Zelle **B:** Chromosomale Translokationen pro Zelle

3.5.4 Entstehung von Translokationen nach partieller Inhibition von DNA-PK

Die Untersuchungen der chromosomalen DSB-Reparatur aus Kapitel 3.5.2 und 3.5.3 haben in c-NHEJ-Mutanten einen Reparaturdefekt im Vergleich zu WT-Zellen gezeigt. Darüber hinaus wurde eine vermehrte Ausbildung chromosomaler Translokationen in c-NHEJ-defekten Zellen erkennbar. Da wie in Kapitel 3.5.3 beschrieben eine PARP1-Inhibition keinen Einfluss auf die detektierten Reparaturdefekte in c-NHEJ-Mutanten hat, scheint eine Funktion des alt-NHEJ innerhalb der DSB-Reparatur in G1-WT-Zellen unwahrscheinlich. In weiteren Untersuchungen wurde die Bedeutung des c-NHEJ in G1-WT-Zellen verifiziert. Im folgenden Experiment wurde das c-NHEJ in WT-Zellen zu späten Zeiten inhibiert, nachdem die Mehrheit aller Brüche bereits repariert und die schnelle Reparaturkomponente abgeschlossen ist. Hierfür

wurden WT-Zellen mit Nocodazol behandelt und mit 7 Gy bestrahlt. In einer Probe wurde 5 h nach Schadensinduktion für die verbleibende Reparaturzeit die c-NHEJ-Kernkomponente DNA-PK mittels DNA-PK-Inhibitor (DNA-PKi) inhibiert. Die Zellfusion wurde 5 bis 13 h nach Schadensinduktion eingeleitet, die Chromosomenpräparation erfolgte jeweils 2 h später. Anschließend wurden die Chromosomenpräparate wie in Kapitel 3.2 beschrieben gefärbt und analysiert (Abb. 25).

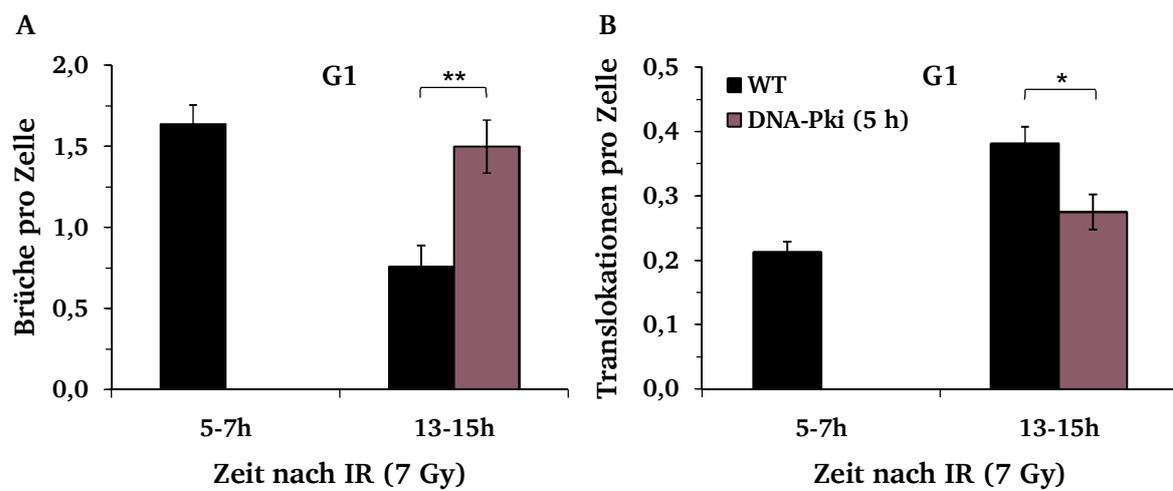


Abbildung 25: Untersuchung chromosomaler Aberrationen nach DNA-PK-Inhibition

82-6hTert-Zellen (WT) wurden mit Nocodazol (100 ng/ml) behandelt und mit 7 Gy bestrahlt. 5 h nach Schädigung wurde eine Probe mit DNA-PKi (7,5 μ M) behandelt. Die Zellfusion wurde 5 und 13 h nach Schädigung induziert, die Chromosomenpräparation erfolgte jeweils 2 h später. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten (abzüglich unbehandelter Kontrollen, MW (Brüche): 0,19 pro Zelle. In unbehandelten Zellen wurden keine Translokationen detektiert). Pro Experiment und Datenpunkt wurden mindestens 40 G1-Chromosomenspreitungen analysiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler zwischen den Experimenten (*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$). **A:** Chromosomale Brüche pro Zelle **B:** Chromosomale Translokationen pro Zelle (Daten veröffentlicht in Biehs et al., 2017)

Die DNA-PK-Inhibition (5 h nach IR) resultierte 13-15 h nach Schadensinduktion mit 1,50 Brüchen pro Zelle in einem Defekt der späten DSB-Reparatur (Abb. 25, A). Darüber hinaus wurde mit 0,28 Translokationen pro Zelle eine deutliche Reduktion der Translokationen in DNA-PK-inhibierten Zellen im Vergleich zu WT-Zellen detektiert (Abb. 25, B). Hierbei entsprach die Anzahl der quantifizierten Brüchen und Translokationen nach DNA-PK-Inhibition etwa den Werten von WT-Zellen zum Zeitpunkt der DNA-PKi Behandlung. Dieses Ergebnis zeigt eine Beteiligung von DNA-PK innerhalb der langsamen Reparaturkomponente und unterstützt folglich die in Kapitel 3.5.3 postulierte Funktion des c-NHEJ in G1-WT-Zellen.

3.5.5 Ausbildung von Translokationen in Artemis-defekten Zellen

Die Ergebnisse der vorherigen Kapitel postulieren, dass Translokationen während der langsamen DSB-Reparatur in G1-WT-Zellen über einen DNA-PK bzw. c-NHEJ abhängigen Weg entstehen. Frühere Studien beschreiben eine Funktion von Artemis innerhalb der langsamen c-NHEJ-Reparatur in der G1-Phase (Riballo et al., 2004). Artemis ist zudem als Nuklease innerhalb der V(D)J-Rekombination beschrieben und wird in Abhängigkeit von DNA-PKcs aktiviert (Ma, Pannicke, et al., 2005; Ma et al., 2002). Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde im folgenden Experiment mit Hilfe von Artemis-defekten Zellen (CJhTert) die Beteiligung von Artemis an der langsamen Reparatur in G1-Phase-Zellen verifiziert und ein möglicher Einfluss auf die Entstehung von Translokationen überprüft. Als Kontrolle wurden WT-Zellen mitgeführt. 82-6hTert-Zellen (WT) und CJhTert-Zellen (Artemis-defekt) wurden mit Nocodazol behandelt und mit 7 Gy Röntgenstrahlung geschädigt. Die Zellfusion erfolgte 5 und 13 h nach Schädigung, die Chromosomenpräparation jeweils 2 h später. Darauf folgend wurden die Chromosomenpräparate wie in Kapitel 3.2 beschrieben gefärbt und analysiert (Abb. 26).

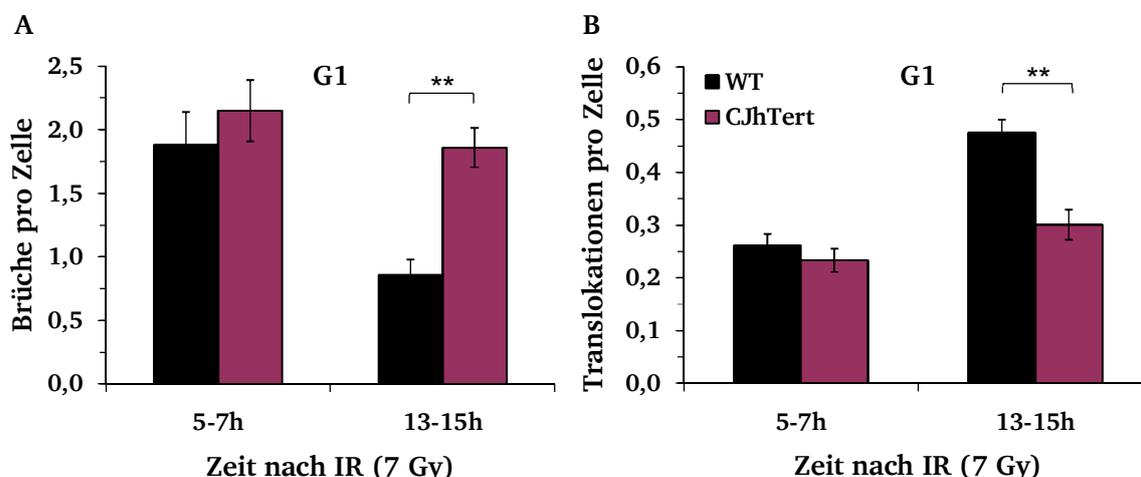


Abbildung 26: Chromosomale Analyse in Artemis-defekten G1-Phase-Zellen

82-6hTert-Zellen (WT) und CJhTert-Zellen (Artemis-defekt) wurden mit Nocodazol (100 ng/ml) behandelt und mit 7 Gy bestrahlt. Die Zellfusion wurde 5 und 13 h nach Schädigung induziert, die Chromosomenpräparation erfolgte jeweils 2 h später. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten (abzüglich unbehandelter Kontrollen, MW (Brüche): 0,60 (WT), 0,55 (CJhTert) pro Zelle. In unbehandelten Zellen wurden keine Translokationen detektiert). Es wurden mindestens 100 G1-Chromosomenspreitungen analysiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler zwischen den Experimenten (**= $p < 0,01$). A: Chromosomale Brüche pro Zelle B: Chromosomale Translokationen pro Zelle (Daten veröffentlicht in Biehs et al., 2017)

Die Quantifizierung chromosomaler Brüche zeigte zu frühen Zeiten der DSB-Reparatur (5-7 h nach IR) mit etwa 2 Brüchen pro Zelle vergleichbare Werte zwischen WT- und Artemis-defekten Zellen (Abb. 26, A). Im weiteren Verlauf der Analyse (13-15 h nach IR) konnte in WT-Zellen eine Reparatur auf 0,86 Brüche pro Zelle detektiert werden, wohingegen in Artemis-defekten Zellen mit 1,86 Brüchen ein Reparaturdefekt erkennbar wurde. Auch die Ausbildung chromosomaler Translokation zeigte mit durchschnittlich 0,24 Translokationen pro Zelle 5-7 h nach Schädigung ähnliche Werte zwischen WT- und Artemis-defekten Zellen (Abb. 26, B). Dagegen wurde zu späten Zeiten der DSB-Reparatur (13-15 h nach IR) mit 0,48 Translokationen nur in WT-Zellen eine zweite Komponente der Translokationsentstehung detektiert. Konsistent mit den Chromosomenstudien nach DNA-PK-Inhibition (siehe Kapitel 3.5.4) zeigten Artemis-defekte Zellen mit 0,30 Translokationen eine deutliche Reduktion innerhalb der Translokationsentstehung. Demzufolge scheint während der langsamen DSB-Reparatur in G1-WT-Zellen eine Funktion von Artemis sowohl für die Reparatur von DSBs als auch für die Ausbildung von chromosomalen Translokationen relevant zu sein.

3.6 DSB-Reparatur in G1-Phase-Zellen in Abhängigkeit der DNA-Transkription

Die vorangegangenen Experimente postulieren u. a., dass eine CtIP-abhängige DNA-Resektion Grundlage für eine erhöhte Fehlerhaftigkeit während der langsamen DSB-Reparatur in G1-WT-Zellen ist. In weiteren Untersuchungen wurde überprüft, welche zellulären Prozesse darüber hinaus eine erhöhte Fehlerhaftigkeit der DSB-Reparatur respektive eine Translokationsentstehung begünstigen könnten. Frühere Studien beschreiben ein verstärktes Auftreten von Translokationen in transkriptionell aktiven Bereichen (Bunting & Nussenzweig, 2013). Daher wurde im folgenden Experiment die Reparatur chromosomaler Brüche und die Entstehung chromosomaler Translokationen in Abhängigkeit der DNA-Transkription in G1-Phase-Zellen untersucht werden. Hierfür wurde in humanen Fibroblasten-Zellen die RNA-Polymerase II über die Chemikalie DRB inhibiert. Um den Einfluss der Chromatinstruktur auf die Transkription bzw. die DNA-Reparatur zu überprüfen, wurde in einer weiteren Probe das Protein BAF180 mittels siRNA depletiert, welches Teil des PBAF *Chromatinremodelling*-Komplexes ist. Außerdem wurde die Ausbildung chromosomaler Aberrationen nach Inhibition der RNA-Polymerase II und gleichzeitiger BAF180-Depletion analysiert. Als Kontrolle wurden WT-Zellen mitgeführt. Die Zellen wurden 72 h nach siRNA-Transfektion bzw. 3 h nach DRB-Inkubation mit Nocodazol behandelt und mit 7 Gy geschädigt. Die Zellfusion erfolgte 0 bis 13 h nach Schadensinduktion, die Chromosomenpräparation jeweils 2 h später. Anschließend wurden die Chromosomenpräparate wie in Kapitel 3.2 beschrieben gefärbt und analysiert

(Abb. 27). Die Reparatur chromosomaler Brüche zeigte unmittelbar nach Schädigung (0-2 h nach IR) mit durchschnittlich 7,22 Brüchen pro Zelle vergleichbare Werte zwischen WT-, DRB-behandelten und DRB-behandelten plus BAF180-depletierten Zellen. Bei alleiniger BAF180-Depletion, konnte zu frühen Zeiten der Reparatur (0-2 h nach IR) mit 9,38 Brüchen pro Zelle ein Defekt im Vergleich zu den anderen Proben detektiert werden (Abb. 27, A).

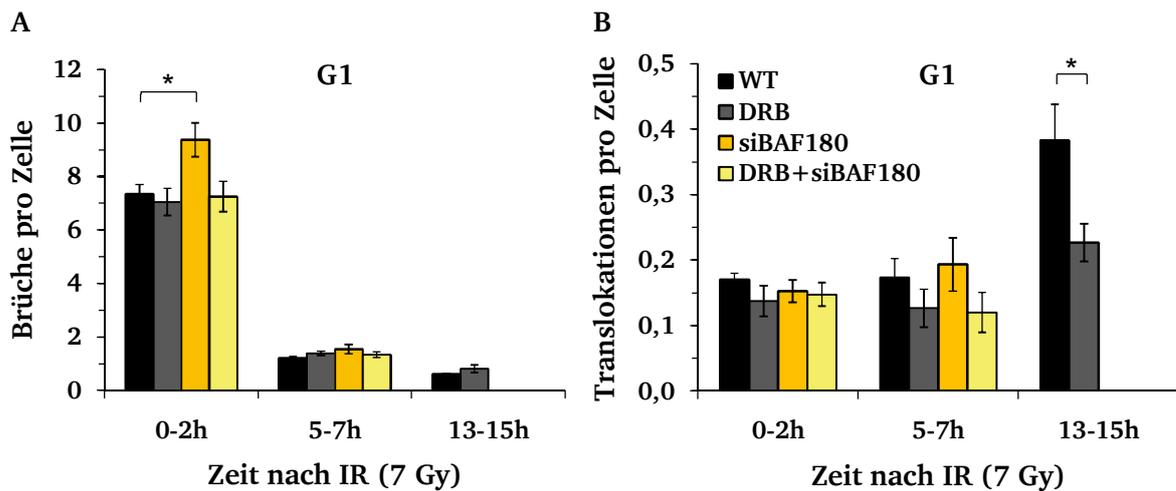


Abbildung 27: Einfluss der DNA-Transkription auf chromosomale Aberrationen in G1

82-6hTert-Zellen (WT) wurden 72 h nach siRNA-Transfektion (siBAF180: 20 nM) bzw. 3 h nach DRB-Inkubation (100 μ M) mit Nocodazol (100 ng/ml) behandelt und mit 7 Gy Röntgenstrahlung geschädigt. Die Zellfusion wurde 0, 5 und 13 h nach Schädigung induziert, die Chromosomenpräparation erfolgte jeweils 2 h später. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten (abzüglich unbehandelter Kontrollen, MW (Brüche): 0,15 pro Zelle. In unbehandelten Zellen wurden keine Translokationen detektiert). Pro Experiment und Datenpunkt wurden mindestens 40 G1-Chromosomenspreitungen analysiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler zwischen den Experimenten (*= $p < 0,05$). **A:** Chromosomale Brüche pro Zelle **B:** Chromosomale Translokationen pro Zelle (Daten in Teilen veröffentlicht in Kakarougkas et al., 2014)

Im weiteren Verlauf (5-7 h nach IR) zeigten alle Proben eine ähnliche Reparaturkinetik und im Mittel 1,37 Brüchen pro Zelle. Zu späten Zeiten der DSB-Reparatur (13-15 h nach IR) konnten keine G1-Chromosomenspreitungen in BAF180-behandelten Proben detektiert werden. Es wird ein Einfluss von BAF180 auf den G1-Checkpoint vermutet, wodurch eine vorzeitige Progression von G1-Phase-Zellen in die S-Phase induziert werden könnte (Xia et al., 2008). Daher wurden ausschließlich WT- und DRB-behandelte G1-Chromosomenspreitungen ausgewertet. Hierbei wurden in WT- und DRB-behandelte Zellen durchschnittlich 0,71 Brüchen pro Zelle quantifiziert.

Bei der Analyse chromosomaler Translokationen zeigten alle Proben zu frühen Zeiten der DSB-Reparatur (0-2 h nach IR) im Mittel 0,15 Translokationen und demzufolge eine vergleichbare frühe Komponente der Translokationsentstehung (Abb. 27, B). Zwischen 5 und 7 h nach IR wurden Unterschiede innerhalb der Translokationsentstehung erkennbar. WT-Zellen zeigten mit 0,17 Translokationen und BAF180-depletierte Zellen mit 0,19 Translokationen pro Zelle ähnliche Werte. Dagegen wurde in DRB-behandelten Zellen mit 0,13 Translokationen und in DRB-behandelten plus BAF180-depletierten Zellen mit 0,12 Translokationen pro Zelle eine leicht verminderte Translokationsentwicklung im Vergleich zu WT-Zellen detektiert. Zu späteren Zeiten (13-15 h nach IR) der DSB-Reparatur wurde dieser Effekt stärker, hierbei zeigten DRB-behandelte Zellen mit 0,23 Translokationen im Vergleich zu WT-Zellen mit 0,38 Translokationen eine deutliche Reduktion innerhalb der Translokationsentstehung. Die Ergebnisse postulieren, dass eine veränderte Chromatinstruktur nach BAF180-Depletion die DSB-Reparatur anfänglich verlangsamt, im weiteren Verlauf aber nicht beeinflusst. Darüber hinaus lässt der Vergleich von WT- und DRB-behandelten Zellen vermuten, dass eine aktive DNA-Transkription für die Quantität der Reparatur nicht relevant zu sein scheint, wohingegen die Qualität während der langsamen DSB-Reparatur eine Abhängigkeit von der DNA-Transkription zeigt.

4 Diskussion

4.1 Chromosomale Analyse der DSB-Reparatur in G1-WT-Zellen

Für den Erhalt der genomischen Stabilität ist die Reparatur von DNA-DSBs entscheidend. Eine fehlende oder falsche Reparatur von DSBs ist die Grundlage chromosomaler Aberrationen, wie z. B. Translokationen. Translokationen entstehen durch die Verbindung falscher DNA-Bruchenden während der DSB-Reparatur (Agarwal et al., 2006). Hieraus resultieren abnorme genetische Regionen, die je nach Art und Lokalisierung die genomische Stabilität gefährden und Grundlage unterschiedlichster Krankheitsbilder sein können. Verschiedene Studien beschreiben das Auftreten von charakteristischen Translokationen in malignen Tumoren, weshalb eine Korrelation zwischen dem Auftreten von Translokationen und einer Karzinogenese postuliert wird (Bunting & Nussenzweig, 2013; Jackson & Bartek, 2009; Panier & Durocher, 2013; van Gent et al., 2001). Die zellulären Prozesse bzw. Reparaturmechanismen, die eine Translokationsentstehung begünstigen, sind daher eine zentrale Frage in der DNA-Reparaturforschung. Da die meisten Zellen im menschlichen Körper postmitotisch sind und sich im Stadium der G₀-/G₁-Phase befinden, sind die DNA-Reparaturmechanismen der G₀-/G₁-Phase von besonderer Relevanz für die Erhaltung der genomischen Integrität.

Es existieren zwei Hauptreparaturwege für DNA-DSBs, das NHEJ und die HR (Chapman et al., 2012; Davis & Chen, 2013; Jackson & Bartek, 2009). Die Reparatur von IR-induzierten DSBs verläuft in der G₁- und der G₂-Phase des Zellzyklus nach Schädigung mit Röntgenstrahlung über eine biphasische Kinetik. Sowohl in der G₁- als auch in der G₂-Phase werden etwa 80 % der DSBs innerhalb der ersten Stunden nach Schadensinduktion über das NHEJ repariert. Die Reparatur der verbleibenden DSBs erfolgt über einen langsamen Prozess, da diese Subklasse von DSBs vermutlich aufgrund ihrer genomischen Lage oder der Schadensstruktur schwieriger zu reparieren sind (Beucher et al., 2009; Goodarzi et al., 2008; Riballo et al., 2004). In der G₂-Phase verläuft die langsame Reparatur von DSBs in Abhängigkeit einer CtIP-vermittelten DNA-Resektion über die HR (Huertas & Jackson, 2009; Sartori et al., 2007). Dagegen ist der langsame DSB-Reparaturmechanismus in der G₁-Phase bislang nicht eindeutig klassifiziert. Allerdings diskutieren verschiedene Studien neben dem kanonischen NHEJ (c-NHEJ) die Beteiligung von alternativen (alt-) NHEJ Mechanismen innerhalb der DSB-Reparatur (Nussenzweig & Nussenzweig, 2007; Simsek et al., 2011; Simsek & Jasin, 2010; H. Wang et al., 2005; M. L. Wang et al., 2006).

Die Studien der vorliegenden Arbeit sollten die Reparatur von IR-induzierten DSBs und im Speziellen die Entstehung von Translokationen in der G1-Phase nach Schädigung mit Röntgenstrahlung mittels Chromosomenanalysen untersuchen und klassifizieren. Chromosomenstudien ermöglichen einen direkten Nachweis geschädigter DNA-Strukturen, erfordern allerdings in G1-Phase-Zellen eine vorzeitige und artifizielle Kondensation des Interphase-Chromatins, welches unter nativen Bedingungen ausschließlich in mitotischen Zellen kondensiert und eine Chromosomenanalyse ermöglicht (Gotoh & Durante, 2006).

In ersten Experimenten wurde daher zunächst die Methode der Polyethylen (PEG)-vermittelten Zellfusion etabliert (siehe Kapitel 3.1). Die Methode der PEG-vermittelten Zellfusion induziert eine vorzeitige Kondensation des Interphase-Chromatins und ist demzufolge grundlegend für chromosomale Reparaturanalysen in der G1-Phase. Anschließend wurden die G1-Chromosomenpräparate mit der 3-Farben-FISH-Technik kombiniert, wodurch die Detektion chromosomaler Brüche und chromosomaler Translokationen in G1-Phase-Zellen möglich wurde. Hierbei erlaubt die Quantifizierung chromosomaler Brüche eine Beurteilung der Reparatur-Quantität über die Reparaturzeit und die Analyse chromosomaler Translokationen Rückschlüsse auf die Reparatur-Qualität der IR-induzierten DSBs. Nach Etablierung der vorzeitigen Chromosomenkondensation und der 3-Farben-FISH-Färbung in G1-Phase-Zellen wurden die Reparatur chromosomaler Brüche und die Ausbildung chromosomaler Translokationen nach IR zunächst in G1-WT-Zellen untersucht. Die Zellen wurden mit 2 Gy und 7 Gy Röntgenstrahlung geschädigt und zu verschiedenen Zeiten nach Schadensinduktion analysiert, um eine Dosisabhängigkeit der chromosomalen Reparaturkinetik in G1-WT-Zellen zu überprüfen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass sowohl nach Schädigung mit 2 Gy als auch nach 7 Gy chromosomale Brüche in G1-WT-Zellen über eine biphasische Kinetik repariert werden (Abb. 16, A). Hierbei verläuft die Reparatur der Mehrheit aller Brüche über einen schnellen Prozess. Innerhalb der ersten Stunden nach Schadensinduktion werden etwa 80 % der unmittelbar nach Schädigung detektierten Brüche repariert. Die Reparatur der verbleibenden Chromosomenbrüche erfolgt über einen langsamen Prozess. Dieses Ergebnis ist konsistent mit früheren Studien, die eine biphasische Reparaturkinetik für IR-induzierte DSBs u. a. in γ H2AX-Analysen und über die Methode der Pulsfeld-Gelelektrophorese gezeigt haben (Kuhne et al., 2004; Riballo et al., 2004).

Bei der Untersuchung chromosomaler Translokationen wurde in G1-WT-Zellen unmittelbar nach Schadensinduktion sowohl nach 2 Gy als auch nach 7 Gy eine frühe Komponente der Translokationsentstehung detektiert (Abb. 16, B).

Da chromosomale Translokationen durch die Verbindung falscher DNA-Enden während der DSB-Reparatur entstehen, ist die Anwesenheit von zwei DSBs respektive vier offenen DNA-Enden in räumlicher Nähe Grundlage für die Ausbildung von Translokationen (Cornforth, 2006; Hlatky et al., 2002). Dünnionisierende Strahlung, wie beispielsweise Röntgenstrahlung, induziert DSBs gleichmäßig über den gesamten Zellkern. Allerdings ist die Mobilität von DSBs in Säugerzellen limitiert, daher können DSBs interchromosomal nicht beliebig miteinander wechselwirken (Lemaitre & Soutoglou, 2015). Unmittelbar nach Bestrahlung bzw. zu frühen Zeiten der DSB-Reparatur befinden sich im Verhältnis die meisten DSBs in räumlicher Nähe und können potentiell miteinander wechselwirken respektive eine Fehlreparatur begünstigen. Hierüber wäre die detektierte frühe Translokationskomponente in G1-WT-Zellen zu erklären. Im weiteren Verlauf der Reparatur sinkt die Anzahl an DSBs in WT-Zellen, sodass die Wahrscheinlichkeit einer Wechselwirkung und einer Fehlreparatur theoretisch abnimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings im weiteren Verlauf der Reparaturanalyse nach Schädigung mit 7 Gy eine zweite, späte Komponente der Translokationsentstehung beobachtet. Frühere Untersuchungen in Lymphozyten bestätigen dieses Ergebnis (Darroudi, Fomina, Meijers, & Natarajan, 1998). Hierbei konnte mittels Chromosomenanalyse nach Schädigung mit 2 Gy und 6 Gy eine frühe, aber ebenfalls nur nach Schädigung mit 6 Gy eine späte Komponente der Translokationsentstehung detektiert werden. Es wird vermutet, dass die späte Komponente der Translokationsentstehung dosisabhängig ist bzw. dass die wenigen Translokationsereignisse bei einer niedrigen Dosis über die angewendete Methode nicht valide quantifiziert werden können.

Die chromosomalen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass etwa 50 % der gesamt detektierten Translokationen während der langsamen DSB-Reparatur entstehen, obwohl diese nur noch ungefähr 20 % der induzierten DSBs repariert. Folglich konnte eine deutlich gesteigerte Fehlerhaftigkeit der langsamen im Vergleich zur schnellen DSB-Reparaturkomponente in G1-WT-Zellen nachgewiesen werden. In früheren Studien wird beschrieben, dass DSBs, die mit schneller Kinetik repariert werden, in euchromatischen Bereichen liegen. Dagegen scheinen DSBs, die mit langsamer Kinetik repariert werden, im Heterochromatin lokalisiert zu sein (Beucher et al., 2009; Goodarzi et al., 2008). Möglicherweise begünstigt die langsame Reparaturkinetik bzw. die genomische Lage eine vermehrte Fehlreparatur respektive Translokationsentstehung in G1-WT-Zellen. In folgenden Untersuchungen wurde die Grundlage der Translokationsentstehung in G1-WT-Zellen verifiziert und beteiligte Proteine respektive Reparaturwege charakterisiert.

4.2 Chromosomale Aberrationen in G1-Phase-Zellen in Abhängigkeit von CtIP

Das Protein CtIP (*C-terminal binding protein interacting protein*) wurde ursprünglich als Bindungspartner des transkriptionellen Suppressors CtBP (*C-terminal binding protein of Adenovirus E1A*) beschrieben (Schaeper, Subramanian, Lim, Boyd, & Chinnadurai, 1998). Neben der Rolle bei transkriptionellen Prozessen konnte für CtIP außerdem eine Beteiligung innerhalb der Zellzyklusregulation gezeigt werden. Nach der Induktion von DNA-Schäden ist CtIP, zusammen mit dem Protein BRCA1 (*Breast cancer related gene 1*), entscheidend für die Initiation des G2-/M-Checkpoints (Yu & Chen, 2004).

Darüber hinaus wurde für CtIP eine Funktion innerhalb der DSB-Reparatur beschrieben. Hierbei interagiert CtIP mit dem MRN-Komplex bei HR-vermittelten Reparaturprozessen (Sartori et al., 2007). Es wird postuliert, dass die Nukleaseaktivität von Mre11 im MRN-Komplex von CtIP abhängig ist. Demnach ist CtIP essentiell für die initiale DSB-Resektion bzw. die HR-vermittelte DSB-Reparatur. Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass CtIP durch spezifische Phosphorylierungen reguliert wird, vermittelt über CDKs (*Cycline-dependent protein kinases*), sowie die Kinasen ATM und ATR (Huertas, Cortes-Ledesma, Sartori, Aguilera, & Jackson, 2008; Peterson et al., 2013). In der S- und G2-Phase steht eine effiziente Resektionsfunktion von CtIP beispielsweise in Abhängigkeit einer CDK-vermittelten Phosphorylierung der Aminosäuren Serin 327 und Threonin 847 (Huertas & Jackson, 2009; Yun & Hiom, 2009). Die Bedeutung und Regulation von CtIP innerhalb weiterer DNA-Reparaturwege wird in verschiedenen Studien diskutiert (Lee-Theilen, Matthews, Kelly, Zheng, & Chaudhuri, 2011; Quennet, Beucher, Barton, Takeda, & Lobrich, 2011; Yun & Hiom, 2009; Zhang & Jasin, 2011).

Die Studien von Zhang und Jasin (2011) konnten zeigen, dass bei der Reparatur von enzymatisch-induzierten DSBs Translokationen über einen CtIP-abhängigen Prozess entstehen. Hierbei wurde die Entstehung von Translokationen über ein Reporter-System in Mauszellen untersucht. Basierend auf den Studien von Zhang und Jasin (2011) wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von CtIP auf die Reparatur von IR-induzierten DSBs und die Entstehung von Translokationen, nach Schädigung der DNA mittels Röntgenstrahlung, über Chromosomenstudien analysiert. Zudem wurden die Untersuchungen zellzyklusphasenspezifisch in humanen G1-Phase-Zellen durchgeführt, um eine Klassifizierung der CtIP-Funktion respektive der Entstehung chromosomaler Translokationen innerhalb der humanen DNA-Reparatur in der G1-Phase zu ermöglichen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Reparatur chromosomaler Brüche in der G1-Phase nach Schädigung mit 7 Gy in CtIP-depletierten Zellen über eine mit WT-Zellen vergleichbare biphasische Kinetik verläuft (Abb. 17, A). Unterstützt wird dieses Ergebnis durch Immunfluoreszenz-Analysen (Abb. 19 und Abb. 20), in welchen eine CtIP-Depletion nach Bestrahlung der Zellen mit 7 Gy sowohl in der G1- als auch in der G2-Phase ebenfalls keinen Einfluss auf die γ H2AX-Kinetik bzw. DSB-Reparatur zeigte. Zudem wurde über die Reduktion der RAD51-Foci in CtIP-depletierten G2-Phase-Zellen eine effiziente siRNA-Transfektion bestätigt (Abb. 20). Darüber hinaus konnten weitere γ H2AX-Studien innerhalb unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass nach Schädigung mit Röntgenstrahlung eine CtIP-Depletion die Quantität der DSB-Reparatur in G1-WT-Zellen nicht beeinflusst (Barton et al., 2014).

Bei der Quantifizierung chromosomaler Translokationen wurde in CtIP-depletierten Zellen eine zum WT vergleichbare frühe Translokationskomponente detektiert. Dagegen konnte während der langsamen DSB-Reparatur nach CtIP-Depletion eine signifikante Reduktion innerhalb der Translokationsentstehung nachgewiesen werden (Abb. 17, B). Dieses Ergebnis unterstützt die Studien von Zhang und Jasin (2011) und postuliert eine Funktion von CtIP bei der langsamen Reparatur von IR-induzierten DSBs in der G1-Phase. Darüber hinaus konnte durch die Analysen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass CtIP zwar die Qualität, nicht aber nicht die Quantität der langsamen DSB-Reparatur in humanen G1-Phase-Zellen beeinflusst. Der Einfluss von CtIP auf die Qualität der DSB-Reparatur wurde zudem durch weitere Analysen innerhalb unserer Arbeitsgruppe bestätigt. Hierbei wurde die Reparatur respektive Fehlreparatur von enzymatisch-induzierten DSBs mit Hilfe eines Reporter-Systems untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Fehlreparaturereignisse in CtIP-depletierten Zellen um etwa 50 % abnehmen (Barton et al., 2014).

Folglich scheint CtIP in G1-WT-Zellen für die Reparatur-Quantität nicht zwangsläufig relevant zu sein, wohingegen die Reparatur-Qualität innerhalb der langsamen Reparaturkomponente eine CtIP-Abhängigkeit zeigt. Dieses Ergebnis widerlegt die Vermutung aus Kapitel 4.1, dass die Kinetik der Reparatur bzw. die genomische Lage der DSBs ursächlich für eine erhöhte Fehlerhaftigkeit respektive vermehrte Translokationsentstehung während der langsamen Reparaturkomponente in G1-WT-Zellen sein könnten. Denn obwohl die Kinetik der Reparatur unverändert bleibt, wird die Qualität der DSB-Reparatur in CtIP-depletierten Zellen verbessert. In weiteren Untersuchungen wurde die Grundlage der Reparatur-Qualität in der G1-Phase verifiziert und die Funktion von CtIP innerhalb der Translokationsentstehung näher klassifiziert.

Neben der bekannten Resektionsfunktion von CtIP während HR-vermittelter DSB-Reparaturprozesse in der S- und G2-Phase postulieren verschiedene Studien eine CtIP-abhängige Prozessierung von DSB-Enden während weiterer DNA-Reparaturwege. Unter anderem konnte in Hühnerzellen eine Funktion von CtIP innerhalb der Mikrohomologie-vermittelten NHEJ-Reparatur (*microhomology mediated end-joining*, MMEJ) gezeigt werden (Yun & Hiom, 2009). Darüber hinaus wurde in Säugerzellen eine CtIP-abhängige Prozessierung von DSB-Enden und eine Beteiligung der MMEJ-Reparatur während der Antikörpersynthese beschrieben (Lee-Theilen et al., 2011). Zudem konnten die Studien von Zhang und Jasin (2011) im Zusammenhang mit der CtIP-abhängigen Entstehung von Translokationen auch das Auftreten von Mikrohomologien im Bereich der enzymatisch-induzierten DSB-Enden zeigen. Folglich scheint eine Funktion von CtIP bzw. eine CtIP-vermittelte Prozessierung von DSB-Enden in weiteren zellulären Prozessen und DNA-Reparaturmechanismen evident.

Allerdings sind die Funktion und die Regulierung von CtIP bei der Reparatur von IR-induzierten DSBs in der G1-Phase unklar. Um eine Resektion von DSB-Enden in der G1-Phase zu überprüfen und die Funktion von CtIP zu verifizieren, wurde innerhalb unserer Arbeitsgruppe u. a. die Anwesenheit des Proteins RPA und CtIP in G0-/G1-Phase-Zellen mittels Westernblot-Analysen untersucht (Barton et al., 2014). RPA bindet an einzelsträngige DNA-Bereiche und ist demzufolge ein Indikator für eine DNA-Resektion bzw. der daraus resultierenden einzelsträngigen DNA-Bereiche. Nach Schädigung der Zellen konnte sowohl die Anwesenheit von CtIP als auch eine Zunahme von RPA in der G0-/G1-Phase gezeigt werden. Zudem wurde über Westernblot-Studien eine schadensabhängige Phosphorylierung von RPA in der G1-Phase detektiert, welche bereits in früheren Arbeiten nach Schadensinduktion in der G2-Phase beschrieben wurde (Stephan, Concannon, Kremmer, Carty, & Nasheuer, 2009).

Darüber hinaus wurde nach Schadensinduktion über Hoch-LET Strahlung die Ausbildung von phosphoryliertem RPA (pRPA) im Bereich von DSBs mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Konsistent mit den Westernblot-Studien konnte über die Quantifizierung von pRPA-Foci die Anwesenheit von pRPA in G1-WT-Zellen bestätigt werden. CtIP-depletierte Zellen zeigten dagegen eine deutliche Reduktion der pRPA-Foci. Außerdem konnte die Ausbildung einzelsträngiger DNA-Bereiche in Abhängigkeit von CtIP über die Analyse von BrdU-Foci gezeigt werden (Barton et al., 2014). Demzufolge lassen sowohl die oben beschriebenen Westernblot-Analysen als auch die Immunfluoreszenz-Studien eine CtIP-abhängige Resektion von IR-induzierten DSBs in der G1-Phase vermuten. Möglicherweise

könnte eine CtIP-abhängige Resektion der DSBs in G1-WT-Zellen ursächlich für die in der vorliegenden Arbeit detektierte erhöhte Fehlerhaftigkeit respektive eine Translokationsentstehung während der langsamen DSB-Reparatur sein.

Die Resektionsfunktion von CtIP ist während der DSB-Reparatur in der S- und G2-Phase des Zellzyklus abhängig von einer CDK-vermittelten Phosphorylierung der Aminosäuren Serin 327 und Threonin 847 (Huertas & Jackson, 2009; Yun & Hiom, 2009). Daher wurde in verschiedenen Studien innerhalb unserer Arbeitsgruppe die Notwendigkeit einer CtIP-Phosphorylierung im Zusammenhang mit einer DSB-Resektion in G1-Phase-Zellen überprüft (Barton et al., 2014). Die Untersuchungen haben bestätigt, dass eine Phosphorylierung der Aminosäuren Serin 327 und Threonin 847 auch in der G1-Phase für die Resektionsfunktion von CtIP essentiell ist, allerdings ist diese im Gegensatz zur S- und G2-Phase schadensabhängig. Zudem konnte eine Abhängigkeit der Reparatur-Qualität in Zusammenhang mit einer CtIP-Phosphorylierung über ein Reporter-System gezeigt werden, was einen Einfluss der Resektionsfunktion von CtIP auch auf die Entstehung chromosomaler Translokationen vermuten lässt.

4.3 Einfluss von Plk3 auf CtIP und die chromosomale DSB-Reparatur in G1

Die Studien von Barton et al. (2014) konnten zeigen, dass CtIP in der G1-Phase schadensabhängig phosphoryliert wird. Konsistent zur S- und G2-Phase steht die CtIP-vermittelte DNA-Resektion in der G1-Phase in Abhängigkeit einer Phosphorylierung der Aminosäuren Serin 327 und Threonin 847. Allerdings wurde belegt, dass die Phosphorylierung von CtIP im Gegensatz zu S- und G2-Phase-Zellen nicht durch CDKs, sondern über eine andere Kinase vermittelt wird. Basierend auf Immunfluoreszenz-Analysen und Westernblot-Studien konnte eine Abhängigkeit der CtIP-vermittelten Resektionsfunktion von der Kinase Plk3 (*Polo-like kinase 3*) in G1-Phase-Zellen nachgewiesen werden.

Plk3 gehört wie die CDKs zur Gruppe der Serin/Threonin-Kinasen und phosphoryliert folglich Substrate mit einem (S/T)-P-Motiv. Daher wurde eine Funktion von Plk3 bei der Phosphorylierung von CtIP in der G1-Phase vermutet. In weiteren Untersuchungen wurde eine Plk3-abhängige Phosphorylierung von CtIP im Bereich der Aminosäuren Serin 327 und Threonin 847 sowie eine daraus resultierende Aktivierung der CtIP-vermittelten DSB-Resektion in der G1-Phase bestätigt (Barton et al., 2014). Wie im vorherigen Kapitel (4.2) beschrieben, konnte über ein Reporter-System gezeigt werden, dass die Qualität der DSB-Reparatur in Abhängigkeit einer CtIP-Phosphorylierung respektive DSB-Resektion steht. Zudem wurde durch die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit eine CtIP-abhängige

Entstehung chromosomaler Translokationen nachgewiesen. Daher sollte in folgenden Chromosomenstudien die Funktion von CtIP bei der Ausbildung von Translokationen verifiziert werden. Hierbei sollte ein möglicher Einfluss der Resektionsfunktion von CtIP auf die DSB-Reparatur in der G1-Phase, insbesondere die Entstehung chromosomaler Translokationen, über eine Plk3-Depletion und Plk-Inhibition überprüft werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Reparatur chromosomaler Brüche in Plk3-depletierten Zellen und nach Plk-Inhibition über eine mit G1-WT-Zellen vergleichbare biphasische Kinetik verläuft (Abb. 21, A).

Dagegen wurde bei der Quantifizierung von Translokationen zwar eine ähnliche frühe Komponente detektiert, aber eine deutliche Reduktion der Translokationen nach Plk3-Depletion und Plk-Inhibition innerhalb der späten Translokationskomponente erkennbar (Abb. 21, B). Dieses Ergebnis ist konsistent mit den Chromosomenstudien nach CtIP-Depletion in G1-Phase-Zellen. Darüber hinaus wurde der Einfluss von Plk3 auf die Qualität der DSB-Reparatur durch weitere Studien innerhalb unserer Arbeitsgruppe bestätigt. Mittels eines Reporter-Systems konnte gezeigt werden, dass nach Plk3-Depletion oder Plk-Inhibition die Fehlreparaturereignisse um etwa 50 % vermindert sind (Barton et al., 2014).

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sowohl in Abwesenheit von CtIP als auch bei einer dysfunktionalen Resektionsfunktion von CtIP nach Plk3-Depletion oder Plk-Inhibition eine unveränderte Reparatur-Quantität, wohingegen die Reparatur-Qualität verbessert wird. Folglich scheint die Qualität der langsamen DSB-Reparaturkomponente respektive die Entstehung chromosomaler Translokationen in G1-WT-Zellen in Abhängigkeit einer DSB-Resektion zu stehen. Diese Ergebnisse bestätigen die Vermutung aus Kapitel 4.2, dass nicht die Reparaturkinetik entscheidend ist für die Translokationsentstehung innerhalb der langsamen Reparaturkomponente, sondern eine DSB-Resektion. Trotzdem könnte nach einer DSB-Resektion in G1-WT-Zellen die langsame Reparaturkinetik oder die genomische Lage möglicherweise die in dieser Arbeit detektierte erhöhte Fehlerhaftigkeit der langsamen Reparaturkomponente begünstigen.

Es wird vermutet, dass eine DNA-Resektion der DSBs respektive die daraus resultierenden einzelsträngigen DNA-Bereiche die Mobilität der DNA-Bruchenden erhöht und eine interchromosomale Wechselwirkung erst ermöglicht. Allerdings ist anzunehmen, dass die Wahrscheinlichkeit einer Wechselwirkung zwischen zwei unreparierten DSBs mit der Zeit zunimmt. Obwohl die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Reparaturkinetik und die genomische Lage nicht ursächlich für eine erhöhte Fehlreparatur innerhalb der langsamen DSB-Reparaturkomponente sind, könnten sie folglich dennoch den Prozess der Translokationsentstehung unterstützen.

4.4 Entstehung von Translokationen in Abhängigkeit der DSB-Mobilität

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass das Genom in spezifischen Domänen organisiert ist und die Chromosomen nicht beliebig im Interphase-Zellkern verteilt sind (Meaburn, Misteli, & Soutoglou, 2007). In proliferierenden Zellen z. B. sind die Chromosomen in Abhängigkeit ihrer Gendichte im Zellkern angeordnet. Genreiche Chromosomen sind hierbei im Zentrum und genarme Chromosomen in der Peripherie des Zellkerns lokalisiert. Ähnlich ist die intrachromosomale Lokalisierung der Gene organisiert. Während genreiche Regionen bevorzugt im Zentrum der jeweiligen chromosomalen Domäne liegen, sind die genärmeren Regionen präferenziell in der chromosomalen Peripherie lokalisiert. Allerdings sind die Anordnung der Chromosomen im Zellkern und damit die relative Position der Chromosomen und Gene untereinander variabel und abhängig von verschiedenen Faktoren, wie z. B. dem Zellzyklusstadium oder der transkriptionellen Aktivität. Unter Berücksichtigung der variablen Genom-Organisation haben verschiedene Studien einen Zusammenhang zwischen der räumlichen Nähe von Chromosomen respektive von Genen und der Wahrscheinlichkeit einer Translokationsentstehung nachgewiesen (Bickmore & Teague, 2002; Kozubek et al., 1999; Parada, McQueen, & Misteli, 2004).

Grundsätzlich ist die Entstehung von Translokationen abhängig von unterschiedlichen Faktoren: zum einen der Anwesenheit von zwei DSBs bzw. vier offenen Bruchenden, zum anderen dem physikalischen Kontakt zwischen den DSB-Enden und einer fehlerhaften DSB-Reparatur. Es existieren zwei verschiedene Modelle, welche die Entstehung von chromosomalen Translokationen in Bezug auf die räumliche Nähe der beteiligten Chromosomen beschreiben. Einerseits das *breakage-first*-Modell, das nach einer DSB-Induktion eine Mobilität der DSBs annimmt. Demnach könnten auch räumlich entfernte DSBs miteinander wechselwirken und Translokationen ausbilden. Dagegen postuliert das *contact-first*-Modell, dass DSBs in ihrer Position stabil sind und die Entstehung von Translokationen folglich auf benachbarte DSBs bzw. Chromosomen beschränkt ist. Unterschiedliche Studien konnten Hinweise auf die Existenz beider Modelle belegen (Aten et al., 2004; Lemaitre & Soutoglou, 2015; Roukos et al., 2013; Savage, 2000).

In Säugerzellen ist die DSB-Mobilität und daher die Möglichkeit von interchromosomalen Wechselwirkungen limitiert (Lemaitre & Soutoglou, 2015; Obe & Durante, 2010). Hiernach wäre die Entstehung von Translokationen über das *contact-first*-Modell begünstigt. Allerdings wurde eine Korrelation zwischen einer DSB-Mobilität und der Schadensart respektive DSB-Struktur nachgewiesen. Unter anderem konnte nach Schädigung mit dichtungisierender alpha-Strahlung eine erhöhte DSB-Mobilität detektiert werden, folglich könnten Translokationen

auch über das *breakage-first*-Model entstehen (Aten et al., 2004; Krawczyk et al., 2012). Dagegen zeigten enzymatisch-induzierte DSBs keine oder lediglich eine geringe DSB-Mobilität, hiernach wäre die Entstehung von Translokationen durch das *contact-first*-Model präferiert (Soutoglou et al., 2007). Es wird daher vermutet, dass sowohl das *breakage-first*-Model als auch das *contact-first*-Model an der Ausbildung von Translokationen beteiligt sein kann und der Mechanismus in Abhängigkeit der Schadensart bzw. DSB-Struktur steht.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit haben nach Schädigung mit 2 Gy und 7 Gy Röntgenstrahlung eine frühe Komponente der Translokationsentstehung in humanen G1-WT-Zellen gezeigt (siehe Kapitel 4.1). Dünnionisierende Röntgenstrahlung induziert DSBs gleichmäßig über den Zellkern. Folglich befinden sich zu frühen Zeiten der DSB-Reparatur im Verhältnis die meisten DSBs in räumlicher Nähe, wodurch potentiell eine interchromosomale Wechselwirkung und eine Fehlreparatur begünstigt werden. Daher könnte die frühe Translokationskomponente in G1-Phase-Zellen auf dem *contact-first*-Model basieren.

Im weiteren Verlauf der Reparaturanalyse wurde nach Schädigung mit 7 Gy eine zweite, späte Komponente der Translokationsentstehung in G1-WT-Zellen beobachtet. Innerhalb der langsamen Komponente werden nur noch ca. 20 % der induzierten DSBs repariert, trotzdem entstehen hierüber etwa 50 % der gesamt detektierten Translokationen (Abb. 15 und 16). Demnach konnte eine vermehrte interchromosomale Wechselwirkung respektive Fehlerhaftigkeit während der langsamen DSB-Reparatur in G1-WT-Zellen nachgewiesen werden, obwohl die Anzahl der DSBs in räumlicher Nähe im Verlauf der Reparatur abnimmt. Diese Beobachtung ist nicht über das *contact-first*-Model der Translokationsentstehung zu erklären.

Die chromosomalen Studien der vorliegenden Arbeit und weitere Untersuchungen innerhalb unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die Ausbildung von Translokationen innerhalb der langsamen DSB-Reparaturkomponente abhängig ist von einer DSB-Resektion (siehe Kapitel 4.3). Es wird vermutet, dass resektierte DSB-Enden eine erhöhte Mobilität besitzen, wodurch eine interchromosomale Wechselwirkung auch zwischen räumlich entfernten DSBs möglich und eine Fehlreparatur respektive Translokationsentstehung begünstigt werden. Diese Hypothese würde, innerhalb der langsamen DSB-Reparaturkomponente in der G1-Phase, die Entstehung von Translokationen über das *breakage-first*-Model postulieren.

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass durch Hoch-LET Strahlung induzierte DSBs in der G1-Phase nur in Abhängigkeit einer DSB-Resektion repariert werden können (Averbeck et al., 2014; Barton et al., 2014). Darüber hinaus wurde eine vom MRN-Komplex abhängige gesteigerte DSB-Mobilität sowie eine erhöhte Translokationsfrequenz nach Schädigung mit

Hoch-LET Strahlung beschrieben (Aten et al., 2004). Zudem konnte eine Funktion der Mre11-Exonukleaseaktivität innerhalb der DSB-Resektion bzw. der langsamen Reparaturkomponente in G1-Phase-Zellen nachgewiesen werden (Biehs et al., 2017). Zusammenfassend unterstützen diese Ergebnisse die Hypothese der vorliegenden Arbeit, wonach eine DSB-Resektion die Mobilität von DSB-Enden erhöht und darüber eine interchromosomale Wechselwirkung bzw. die Entstehung von Translokation begünstigt.

In früheren Untersuchungen wurde darüber hinaus eine Zunahme der DSB-Mobilität in Ku80-defekten c-NHEJ Mutanten beobachtet (Soutoglou et al., 2007). In WT-Zellen bindet Ku70/Ku80 an freie DSB-Enden, wodurch diese zunächst stabilisiert und vor einem nukleolytischen Abbau geschützt werden. In Abhängigkeit von Ku70/Ku80 wird im weiteren Verlauf der Reparatur die DNA-PKcs an den DSB rekrutiert. DNA-PKcs bildet zusammen mit Ku70/Ku80 das Holoenzym DNA-PK respektive einen sogenannten *Synaptic-complex*, der die DSB-Enden in räumlicher Nähe hält (DeFazio et al., 2002; Liang & Jasin, 1996; Lieber, 2010a; Meek et al., 2004; Walker et al., 2001). Folglich ist zu vermuten, dass die erhöhte DSB-Mobilität in Ku80-Mutanten aus einer fehlenden Stabilisierung der DSB-Enden resultiert. Zudem wurde beschrieben, dass die DSB-Reparatur in Ku80-Mutanten ausschließlich über ein resektionsabhängiges alt-NHEJ verläuft, welches deutlich fehlerbehafteter ist als das c-NHEJ (Barton et al., 2014; Bunting & Nussenzweig, 2013). Eine vermehrte DSB-Resektion würde neben einer fehlenden Stabilisierung die DSB-Mobilität in Ku80-Mutanten zusätzlich erhöhen und eine Fehlreparatur unterstützen. Zusammenfassend postulieren die Ergebnisse früherer Studien, dass die Anwesenheit von Ku70/80 sowohl die Mobilität als auch die Resektion von DSBs in WT-Zellen limitiert und darüber die Möglichkeiten einer interchromosomalen Wechselwirkung und folglich die Entstehung von Translokationen beschränkt. Trotzdem konnte, über die chromosomalen Analysen der vorliegenden Arbeit, auch in WT-Zellen eine resektionsabhängige Ausbildung von Translokationen während der langsamen DSB-Reparatur nachgewiesen werden. In weiteren Untersuchungen wurden daher der grundlegende DNA-Reparaturmechanismus der Translokationsentwicklung bzw. die daran beteiligten Proteine in G1-WT-Zellen verifiziert.

4.5 Funktion der NHEJ-Reparatur innerhalb der Translokationsentstehung in G1

Die chromosomalen Analysen der vorangegangenen Kapitel haben in der G1-Phase eine vermehrte Fehlreparatur respektive Translokationsentstehung für IR-induzierte DSBs, die mit langsamer Kinetik repariert werden, gezeigt (siehe Kapitel 4.1). Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die Ausbildung von Translokationen während der späten DSB-Reparatur

in Abhängigkeit einer CtIP- und Plk3-vermittelten DSB-Resektion steht (siehe Kapitel 4.2 und 4.3). In der G1-Phase können DSBs ausschließlich über das NHEJ repariert werden. Neben dem c-NHEJ wird die Funktion eines alt-NHEJ innerhalb der DNA-Reparatur beschrieben und die Beteiligung der verschiedenen Reparaturmechanismen an der Entstehung von Translokationen diskutiert (Bunting & Nussenzweig, 2013; Iliakis, Murmann, & Soni, 2015; Lieber, 2010b). Bei der Reparatur von enzymatisch-induzierten DSBs wurde in Mauszellen eine CtIP-vermittelte Translokationsentstehung über das alt-NHEJ belegt (Simsek et al., 2011; Zhang & Jasin, 2011).

Aufbauend auf den bekannten Analysen sollten die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit die Beteiligung der unterschiedlichen NHEJ-Reparaturmechanismen an der chromosomalen Reparatur, insbesondere der Entstehung von Translokationen, nach IR-induzierten DSBs in humanen G1-Phase-Zellen weiter charakterisieren. Hierbei wurde in ersten Experimenten die chromosomale Reparatur IR-induzierter DSBs nach PARP1-Inhibition und Lig1/3-Depletion überprüft. Die Proteine PARP1 und Lig1/3 sind für ihre Funktion im alt-NHEJ beschrieben und ermöglichen daher Rückschlüsse auf den beteiligten DNA-Reparaturweg (Mansour et al., 2010; Paul et al., 2013; H. Wang et al., 2005; M. L. Wang et al., 2006). Die chromosomalen Analysen dieser Arbeit haben gezeigt, dass sowohl nach PARP1-Inhibition als auch Lig1/3-Depletion die Reparatur chromosomaler Brüche und die Ausbildung chromosomaler Translokationen über eine mit G1-WT-Zellen vergleichbare biphasische Kinetik verlaufen (Abb. 22, A und 22, B). Folglich scheint das alt-NHEJ bei der Reparatur von IR-induzierten DSBs respektive an der Entstehung von Translokationen in humanen G1-Phase-Zellen nicht beteiligt zu sein. Dieses Ergebnis wird unterstützt durch Immunfluoreszenz-Analysen unserer Arbeitsgruppe, in welchen nach PARP1-Inhibition ebenfalls keine Veränderung der DSB-Reparatur in G1-WT-Zellen detektiert wurde (Biehs et al., 2017).

Entgegen der in früheren Studien beschriebenen Entstehung von Translokationen über ein CtIP-vermitteltes alt-NHEJ bei der Reparatur von enzymatisch-induzierten DSBs in Mauszellen (Simsek et al., 2011; Zhang & Jasin, 2011) postulieren die chromosomalen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, dass die Reparatur von IR-induzierten DSBs und die Entstehung von Translokationen in humanen G1-Phase-Zellen ausschließlich über das c-NHEJ erfolgen. In weiteren Chromosomenstudien sollte daher der Einfluss des c-NHEJ an der Reparatur von IR-induzierten DSBs und der Entstehung von Translokationen in c-NHEJ-defekten G1-Phase-Zellen verifiziert werden. Hierfür wurden die Reparatur chromosomaler Brüche und die Entstehung chromosomaler Translokationen in XLF-defekten c-NHEJ Mutanten im Vergleich zu WT-Zellen untersucht. In XLF-defekten Zellen wurden ein persistierender Reparaturdefekt

und nur eine minimale Reparatur chromosomaler Brüche im Vergleich zu G1-WT-Zellen detektiert (Abb. 23, A). Obwohl in XLF-defekten Zellen lediglich wenige Brüche über den gesamten Analysezeitraum repariert wurden, zeigten sie eine deutliche Fehlreparatur im Vergleich zu WT-Zellen. Die verschlechterte Reparatur-Qualität wurde insbesondere innerhalb der langsamen Reparaturkomponente deutlich. Hierbei wurden in XLF-defekten Zellen etwa doppelt so viele Translokationen wie in WT-Zellen detektiert (Abb. 23, B).

Wie beschrieben konnte in der vorliegenden Arbeit nach PARP1-Inhibition und Lig1/3-Depletion keine Beteiligung des alt-NHEJ innerhalb der DSB-Reparatur in humanen G1-WT-Zellen nachgewiesen werden. Verschiedene Studien postulieren allerdings eine Funktion des alt-NHEJ in c-NHEJ-defekten Zellen (Boboila et al., 2010; Simsek & Jasin, 2010; Weinstock et al., 2007). Neben einem Reparaturdefekt werden hierbei in Abhängigkeit des alt-NHEJ eine vermehrte Fehlreparatur bzw. eine erhöhte Translokationsfrequenz in c-NHEJ Mutanten gezeigt. Möglicherweise basieren der in dieser Arbeit detektierte Reparaturdefekt und die vermehrte Ausbildung von Translokationen in XLF-defekten G1-Phase-Zellen ebenfalls auf einer Funktion des alt-NHEJ. Daher wurde der Einfluss des alt-NHEJ auf die chromosomale Reparatur in c-NHEJ-defekten G1-Phase-Zellen überprüft. Das alt-NHEJ wurde hierbei mittels PARP1-Inhibitor in WT- und c-NHEJ-defekten Zellen inhibiert und die chromosomale Reparatur von IR-induzierten DSBs untersucht. Sowohl XLF- als auch Lig4-defekte Zellen zeigten eine quantitativ und qualitativ verschlechterte Reparatur im Vergleich zu G1-WT-Zellen. Eine PARP1-Inhibition hatte allerdings keinen Einfluss auf die Reparatur-Quantität respektive Reparatur-Qualität in XLF- und Lig4-defekten Zellen (Abb. 24). Folglich wurde in den untersuchten c-NHEJ-Mutanten keine Funktion des alt-NHEJ erkennbar. Es wird vermutet, dass die fehlerhafte DSB-Reparatur über ein verlangsamtes, residuales c-NHEJ erfolgt. Diese Daten werden durch Immunfluoreszenz-Analysen innerhalb unserer Arbeitsgruppe bestätigt, die ebenfalls keinen Effekt einer PARP1-Inhibition in XLF- und Lig4-defekten Zellen nachweisen konnten (Biehs et al., 2017).

Da in der vorliegenden Arbeit in G1-WT-Zellen eine vermehrte Fehlerhaftigkeit der langsamen Reparaturkomponente detektiert wurde (siehe Kapitel 4.1), sollte zunächst die Funktion des c-NHEJ bei der Translokationsentstehung innerhalb der langsamen DSB-Reparatur verifiziert werden. Hierfür wurde die chromosomale Reparatur nach Inhibition der c-NHEJ-Kernkomponente DNA-PK untersucht. Die Inhibition von DNA-PK erfolgte 5 h nach Bestrahlung, wenn die Mehrheit aller DSBs über die schnelle Komponente repariert wurde. Die Reparatur chromosomaler Brüche bzw. die Ausbildung chromosomaler Translokationen wurde 13-15 h nach IR analysiert. Die Inhibition von DNA-PK resultierte innerhalb der

langsamen Komponente in einem quantitativen Reparaturdefekt und in einer deutlichen Reduktion der Translokationsentwicklung im Vergleich zu WT-Zellen (Abb. 25). Die Anzahl der quantifizierten Brüche und Translokationen entsprach in DNA-PK-inhibierten Zellen etwa den Werten von WT-Zellen zum Zeitpunkt der DNA-PK-Inhibitor-Behandlung. Folglich scheint eine DSB-Reparatur nach der Inhibierung von DNA-PK nicht mehr möglich. Grundlage hierfür könnten u. a. die DNA-PK-abhängige Rekrutierung des DNA-LigaseIV-Komplexes respektive die beschriebene Funktion der DNA-PK-Kinaseaktivität innerhalb der Lig4-/XRCC4-vermittelten DNA-Ligation sein (Drouet et al., 2005; Jiang et al., 2015). Dieses Ergebnis unterstützt die Daten der vorangegangenen Analysen und postuliert, dass die Reparatur strahleninduzierter DSBs und die Ausbildung von Translokationen in der G1-Phase auch innerhalb der langsamen Reparaturkomponente ausschließlich über das c-NHEJ verlaufen. Bestätigt werden die Ergebnisse durch weitere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, die über Immunfluoreszenz-Analysen in G1-Phase-Zellen eine Abhängigkeit der langsamen DSB-Reparaturkomponente von DNA-PK zeigen konnten (Biehs et al., 2017).

In früheren Studien wurde neben DNA-PK eine Funktion der Nuklease Artemis innerhalb der langsamen DSB-Reparatur in der G1-Phase beschrieben (Riballo et al., 2004). Zudem ist bekannt, dass Artemis in Abhängigkeit von DNA-PK rekrutiert und aktiviert wird (Goodarzi et al., 2006; Jiang et al., 2015; Li et al., 2014; Ma, Pannicke, et al., 2005). Basierend auf diesen Studien wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Artemis auf die chromosomale Reparatur innerhalb der langsamen Reparaturkomponente in G1-Phase-Zellen überprüft. Hierfür wurden die Reparatur chromosomaler Brüche und die Ausbildung chromosomaler Translokationen in Artemis-defekten Zellen (CJhTert) untersucht. Konsistent mit den Ergebnissen in DNA-PK-inhibierten Zellen zeigten Artemis-defekte Zellen nach Bestrahlung einen quantitativen Reparaturdefekt innerhalb der langsamen DSB-Reparaturkomponente (Abb. 26). Darüber hinaus wurde eine signifikante Reduktion in der Translokationsentstehung im Vergleich zu WT-Zellen detektiert. Folglich scheint eine Funktion von Artemis innerhalb der langsamen DSB-Reparatur in der G1-Phase evident, sowohl für die Reparatur von DSBs als auch für die Ausbildung von Translokationen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden unterstützt durch Daten unserer Arbeitsgruppe, welche über γ H2AX-Studien und weitere Chromosomenanalysen gezeigt haben, dass Artemis-defekte Zellen einen Reparaturdefekt innerhalb der langsamen DSB-Reparatur in der G1-Phase aufweisen. Dieser Reparaturdefekt ist bei einer Depletion von CtIP oder Plk3 in Artemis-defekten Zellen nicht mehr zu detektieren (Biehs et al., 2017). Wie in der vorliegenden Arbeit in Kapitel 4.3 beschrieben, werden DSBs innerhalb der langsamen Reparaturkomponente in der G1-Phase in

Abhängigkeit von CtIP resektiert, wobei CtIP über eine schadensabhängige Phosphorylierung von Plk3 reguliert wird. Studien unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass CtIP in der G1-Phase nach einer Phosphorylierung am Serin 327 mit dem Protein BRCA1 interagiert, wodurch in der Folge eine DSB-Resektion durch die Nukleasen Mre11, EXD2 und Exo1 initiiert wird (Biehs et al., 2017). Aufgrund der beschriebenen Daten ist daher anzunehmen, dass nach Ausbleiben einer DNA-Resektion die langsame Reparatur von IR-induzierten DSBs in der G1-Phase über ein Artemis unabhängiges c-NHEJ verlaufen kann, was eine Funktion von Artemis nach der DSB-Resektion vermuten lässt. Die Möglichkeit der alternativen DSB-Reparatur nach einer ausbleibenden initialen DSB-Resektion ist für die langsame Reparaturkomponente in der G2-Phase ebenfalls beschrieben. Hierbei wird ein möglicher Wechsel der langsamen DSB-Reparatur von der resektionsabhängigen HR zum resektionsunabhängigen c-NHEJ gezeigt (Shibata et al., 2011).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, im Kontext mit weiteren Studien unserer Arbeitsgruppe, dass die Reparatur von IR-induzierten DSBs respektive die Entstehung von Translokationen in humanen G1-WT-Zellen ausschließlich über das c-NHEJ erfolgen. Hierbei wird die schnelle Reparatur von IR-induzierten DSBs bzw. die Entstehung von Translokationen über ein resektionsunabhängiges c-NHEJ vermittelt. Dagegen verlaufen die Reparatur von DSBs und die Entstehung von Translokationen innerhalb der langsamen Reparaturkomponente über ein resektionsabhängiges c-NHEJ. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von CtIP bzw. nach Plk3-Depletion oder Plk-Inhibition, d. h. nach Ausbleiben einer initialen DNA-Resektion, die langsame DSB-Reparatur über das qualitativ bessere, resektionsunabhängige c-NHEJ erfolgen kann.

Verschiedene Studien beschreiben eine erhöhte Plk3-Konzentration u. a. in Ovarial- und Brustkrebstumoren (Weichert et al., 2004; Weichert et al., 2005). Möglicherweise reparieren die mutierten und malignen Zellen in diesen Tumorarten daher DSBs vermehrt über den Plk3-abhängigen und qualitativ schlechteren DNA-Reparaturweg. Das würde die Entstehung von weiteren chromosomalen Translokationen und eine daraus resultierende fortschreitende genomische Instabilität begünstigen. Dagegen zeigen andere Studien eine Funktion von Plk3 in apoptotischen Prozessen und eine Unterexpression von Plk3 u. a. in Lungen- und Lebertumoren (Conn, Hennigan, Dai, Sanchez, & Stambrook, 2000; Helmke, Becker, & Strebhardt, 2016; Helmke, Raab, et al., 2016). Folglich würde Plk3 in diesen Tumoren als Tumorsuppressor agieren. Unter Berücksichtigung der Tumorart könnte die Inhibierung von Plk3 respektive des resektionsabhängigen c-NHEJ neue Ansätze innerhalb der Tumorthherapie ermöglichen.

4.6 Evolutionäre Bedeutung einer geduldeten DNA-Fehlreparatur in G1

Wie über die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, werden DSBs in G1-WT-Zellen ausschließlich über das c-NHEJ repariert (siehe Kapitel 4.5). Hierbei steht die Qualität der langsamen DSB-Reparatur bzw. die Ausbildung von Translokationen in Abhängigkeit von CtIP und Plk3 respektive einer DSB-Resektion (siehe Kapitel 4.2 und 4.3). Die Quantität der langsamen Reparaturkomponente ist dagegen unbeeinflusst von einer DNA-Resektion. Folglich können DSBs, die über Röntgenstrahlung induziert werden, in der G1-Phase bei ausbleibender DNA-Resektion über einen alternativen und qualitativ besseren Weg repariert werden. Daher stellt sich die Frage, welche evolutionäre Bedeutung eine geduldete DNA-Fehlreparatur innerhalb der langsamen Reparaturkomponente in G1-WT-Zellen haben könnte.

Verschiedene Studien haben in der G1-Phase die Reparatur von DSBs analysiert, die über Hoch-LET-Strahlung induziert wurden (Averbeck et al., 2014; Barton et al., 2014). Im Vergleich zu Niedrig-LET-Röntgenstrahlung, induziert Hoch-LET-Strahlung komplexere DSBs (Schipler & Iliakis, 2013). Es konnte gezeigt werden, dass die gesamte DSB-Reparaturkinetik nach Hoch-LET-Strahlung langsamer verläuft als nach Niedrig-LET-Strahlung. Zudem wurde eine Abhängigkeit der DSB-Reparatur von CtIP und Plk3 detektiert. Folglich scheint eine DNA-Resektion für die DSB-Reparatur nach Hoch-LET-Strahlung unerlässlich, da vermutlich eine Ligation der DSB-Enden erst nach Prozessierung der komplexen Bruchenden stattfinden kann. Möglicherweise ist daher die resektionsabhängige, fehlerbehaftete DNA-Reparatur evolutionär geduldet, damit eine Reparatur komplexer DNA-Schäden in G1-WT-Zellen gewährleistet ist. Es wird angenommen, dass G1-WT-Zellen zuerst versuchen, DSBs über das schnelle, resektionsunabhängige c-NHEJ zu reparieren. Ist das aufgrund der Schadenskomplexität nicht möglich, kommt es zu einer DSB-Resektion und einer Reparatur über das langsame, resektionsabhängige c-NHEJ.

Zudem ist beschrieben, dass die aus einer Resektion resultierenden einzelsträngigen DNA-Bereiche die Proteinkinase ATR und diese wiederum den G1-Checkpoint aktiviert (Gamper et al., 2013). DSBs die mit langsamer Kinetik repariert und folglich resektiert werden, induzieren demnach den G1-Checkpoint. Kann die Zelle DSBs nicht reparieren oder benötigt aufgrund von z. B. komplexer DNA-Schäden mehr Zeit für die Reparatur, verhindert dieser Mechanismus die Progression der Zelle in die S-Phase und die Duplikation von DSBs.

Darüber hinaus wurden bei DSB-Reparaturanalysen und Überlebensexperimenten in Ku80-defekten c-NHEJ-Mutanten eine Abhängigkeit von CtIP und Plk3 respektive die Funktion eines resektionsabhängigen alt-NHEJ in G1-Phase-Zellen detektiert. Demnach scheint ein

resektionsabhängiges alt-NHEJ für die DSB-Reparatur in Ku80-defekten c-NHEJ-Mutanten von Relevanz, was eine evolutionäre Erhaltung der resektionsvermittelten DSB-Reparatur in der G1-Phase ebenfalls begründen würde (Barton et al., 2014). Folglich hat sich die Erhaltung eines fehlerhaften, resektionsabhängigen NHEJ in G1-Phase-Zellen und das daraus resultierende Risiko einer chromosomalen Instabilität offensichtlich gegenüber einer ausbleibenden DSB-Reparatur respektive einer unmittelbaren Apoptose evolutionär bewährt.

4.7 Entstehung von Translokationen in Abhängigkeit der DNA-Transkription

In den vorangegangenen Kapiteln wurde beschrieben, dass die DSB-Reparatur in G1-WT Zellen ausschließlich über das c-NHEJ erfolgt (siehe Kapitel 4.5). Hierbei konnte gezeigt werden, dass chromosomale Translokationen während der langsamen Reparaturkomponente in Abhängigkeit einer DSB-Resektion entstehen (siehe Kapitel 4.2 und 4.3).

Im folgenden Teil der Arbeit wurde die Grundlage der Translokationsentstehung innerhalb der schnellen DSB-Reparaturkomponente in der G1-Phase charakterisiert. Frühere Studien postulieren, dass DSBs, die mit schneller Kinetik repariert werden, im Bereich des Euchromatins lokalisiert sind und die langsame Reparaturkomponente heterochromatische DSBs umfasst. Während das Euchromatin als transkriptionell aktiv beschrieben wird, unterliegen heterochromatische Bereiche des Genoms einer transkriptionellen Repression (Goodarzi, Jeggo, & Lobrich, 2010).

In verschiedenen Tumoren konnte ein verstärktes Auftreten von Translokationen in transkriptionell aktiven Bereichen gezeigt werden (Berger et al., 2011; Stephens et al., 2009). Folglich wurde ein Zusammenhang zwischen einer aktiven Transkription und einer Translokationsentstehung innerhalb der schnellen DSB-Reparaturkomponente vermutet. Daher wurden in weiteren Untersuchungen der vorliegenden Arbeit die chromosomale Reparatur respektive die Entstehung von Translokationen in Abhängigkeit der DNA-Transkription betrachtet. Hierbei wurde die DSB-Reparatur sowohl nach Depletion des Proteins BAF180, das am *Chromatinremodelling* beteiligt ist, als auch nach Inhibition der RNA-Polymerase II bzw. der DNA-Transkription analysiert. Das Protein BAF180 ist eine Untereinheit des PBAF *Chromatinremodelling*-Komplexes. Mehrere Studien haben gezeigt, dass verschiedene Tumorarten eine Mutation in dem für BAF180 codierenden Gen *PBRM1* aufweisen. BAF180 bzw. der PBAF-Komplex scheinen demnach eine entscheidende Funktion bei der Prävention einer Karzinogenese einzunehmen. Es ist bekannt, dass der PBAF-Komplex bzw. die durch ihn induzierte Chromatinmodifikation in der Regulation transkriptioneller Prozesse involviert sind. Hierbei könnte der Einfluss auf die Expression von Genen, die für

zellzyklusregulierende Proteine codieren, eine mögliche Grundlage einer Karzinogenese in BAF180-defekten Zellen sein (Brownlee, Chambers, Oliver, & Downs, 2012; Shain & Pollack, 2013). Desweiteren wird gegenwärtig die Funktion von BAF180 innerhalb der DSB-Reparatur diskutiert. Möglicherweise ist die genetische Instabilität in BAF180-defekten Zellen auch durch eine fehlerhafte DNA-Schadensantwort begünstigt (Chambers & Downs, 2012).

Die Chromosomenstudien der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass nach BAF180-Depletion die Quantität der schnellen DNA-Reparaturkomponente in der G1-Phase verlangsamt wird (Abb. 27). Hierbei konnte eine signifikante Erhöhung chromosomaler Brüche im Vergleich zu WT-Zellen beobachtet werden. Allerdings wurde im weiteren Verlauf der DSB-Reparatur kein persistierender Reparaturdefekt in BAF180-depletierten Zellen detektiert. Die Auswertung chromosomaler Translokationen zeigte in BAF180-depletierten Zellen über den gesamten Analysezeitraum (0-7 h nach IR) vergleichbare Werte mit WT-Zellen. Folglich konnte kein Einfluss von BAF180 bzw. einem veränderten *Chromatinremodelling* auf die Qualität der DSB-Reparatur respektive die Entstehung von Translokationen innerhalb der schnellen Reparaturkomponente in G1-Phase-Zellen nachgewiesen werden.

Bei einer gleichzeitigen Depletion von BAF180 und einer Inhibierung der RNA-Polymerase II mittels der Chemikalie DRB wurde im Vergleich zu einer ausschließlichen Depletion von BAF180 kein Defekt innerhalb der schnellen DNA-Reparaturkomponente beobachtet. Demzufolge scheint eine Inhibierung der RNA-Polymerase II respektive der DNA-Transkription den in BAF180-depletierten Zellen detektierten Reparaturdefekt während der frühen DSB-Reparatur aufzuheben. Unterstützt werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit durch weitere DSB-Reparaturstudien, in welchen nach BAF180-Depletion ebenfalls ein Defekt in der schnellen DSB-Reparaturkomponente erkennbar war, welcher bei einer gleichzeitigen Inhibition der RNA-Polymerase II bzw. der Transkription nicht mehr detektiert wurde (Kakarougkas et al., 2014). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Transkription nach DSB-Induktion in Abhängigkeit des PBAF *Chromatinremodelling*-Komplexes angehalten wird. Daher wird vermutet, dass in BAF180-defekten Zellen eine fortlaufende Transkription die Reparatur von DSBs erschwert und folglich den Defekt innerhalb der schnellen DSB-Reparaturkomponente begründet. Zudem könnte ein fehlerhaftes *Chromatinremodelling* die Zugänglichkeit der DSBs für Reparatur-Prozesse respektive Reparatur-Proteine verschlechtern und daher die Quantität der DSB-Reparatur zusätzlich beeinflussen und die genetische Stabilität gefährden.

Zu späten Zeiten der DSB-Reparatur (13-15 h nach IR) wurden keine BAF180-depletierten Zellen bzw. G1-Chromosomenspreitungen detektiert. Daher kann über die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit keine Aussage über eine mögliche Funktion von BAF180 respektive die Konsequenzen eines fehlerhaften *Chromatinremodellings* innerhalb der langsamen DSB-Reparatur getroffen werden. Verschiedene Studien beschreiben einen Einfluss von BAF180 u. a. auf die Expression von p21 und folglich auf den G1-Checkpoint (Chowdhury et al., 2016; Murakami et al., 2017; Xia et al., 2008). Daher wird vermutet, dass eine BAF180-Depletion die vorzeitige Progression von G1-Phase-Zellen in die S-Phase induziert. Das würde das Fehlen von G1-Phase-Zellen bzw. Chromosomenspreitungen zu späten Analysezeitpunkten erklären und eine Karzinogenese in BAF180-defekten Zellen potentiell begünstigen.

Die chromosomalen Analysen nach alleiniger DRB-Behandlung bzw. Inhibition der RNA-Polymerase II zeigten während der schnellen DSB-Reparatur keine Veränderung bezüglich der Reparatur-Quantität und der Reparatur-Qualität im Vergleich zu G1-WT-Zellen (Abb. 27). Auch innerhalb der langsamen DSB-Reparaturkomponente konnte kein Einfluss der Transkription auf die Reparatur-Quantität detektiert werden. Allerdings wurde eine Abhängigkeit der Reparatur-Qualität bzw. der Translokationsentstehung von der RNA-Polymerase II respektive der Transkription während der langsamen DSB-Reparatur in G1-Phase-Zellen beobachtet. Hierbei wurde in DRB-behandelten Zellen eine signifikante Reduktion der Translokationen im Vergleich zu WT-Zellen erkennbar.

Folglich konnte über die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit kein Einfluss der DNA-Transkription auf die Translokationsentstehung innerhalb der schnellen DSB-Reparatur nachgewiesen werden. Allerdings wurde ein Einfluss der DNA-Transkription auf die Entstehung von Translokationen während der langsamen DSB-Reparatur beobachtet. Dieses Ergebnis ist überraschend, da die langsame Reparaturkomponente in früheren Studien mit der Reparatur von heterochromatischen DSBs und folglich einer transkriptionellen Repression assoziiert wurde. Der Einfluss einer aktiven Transkription auf die langsame DSB-Reparatur in G1-WT-Zellen ist daher unklar. Dieser Aspekt wird im folgenden Kapitel detaillierter beschrieben und könnte in weiterführenden Studien untersucht werden.

5 Ausblick

Die Studien der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass nach Schadensinduktion über Röntgenstrahlung DSBs in G1-WT-Zellen ausschließlich über das c-NHEJ repariert werden (siehe Kapitel 4.5). Hierbei verlaufen die DSB-Reparatur respektive die Entstehung von Translokationen in der schnellen Reparaturkomponente über ein resektionsunabhängiges c-NHEJ. Dagegen erfolgen die langsame Reparatur von DSBs bzw. die Ausbildung von Translokationen über ein resektionsvermitteltes c-NHEJ. Dabei stehen die DSB-Resektion und die Qualität der langsamen DSB-Reparaturkomponente in Abhängigkeit von CtIP und Plk3 (siehe Kapitel 4.2 und 4.3). Die Quantität der langsamen DSB-Reparatur ist unbeeinflusst von CtIP und Plk3 respektive einer DSB-Resektion. Folglich können DSBs in der G1-Phase innerhalb der langsamen Reparaturkomponente bei einer ausbleibenden DNA-Resektion über einen anderen und qualitativ besseren Weg repariert werden. Offensichtlich hat sich die Erhaltung der resektionsabhängigen c-NHEJ Reparatur trotzdem evolutionär bewährt und ist daher in G1-WT-Zellen geduldet (siehe Kapitel 4.6).

Darüber hinaus wurde während der langsamen DSB-Reparatur in der G1-Phase eine Abhängigkeit der Reparatur-Qualität bzw. der Translokationsentstehung von der DNA-Transkription nachgewiesen (siehe Kapitel 4.7). Dieses Ergebnis war unerwartet, da die langsame DSB-Reparatur in früheren Studien mit heterochromatischen Genombereichen und einer transkriptionellen Repression assoziiert wurde (Goodarzi et al., 2010). Der detektierte Effekt nach Inhibition der DNA-Transkription war vergleichbar mit den chromosomalen Reparaturkinetiken nach CtIP- und Plk3-Depletion respektive Plk3-Inhibition.

Die transkriptionsabhängige Reduktion von Translokation innerhalb der langsamen Reparaturkomponente lässt vermuten, dass Proteine, die in der resektionsvermittelten c-NHEJ-Reparatur involviert sind, erst schadensabhängig transkribiert bzw. synthetisiert werden könnten. Unterstützt wird diese Hypothese durch Studien, die nach DNA-Schädigung in Abhängigkeit von u. a. ATM, p53 und RAD9 eine komplexe DNA-Transkription und die Synthese verschiedenster Proteine in humanen Fibroblasten-Zellen belegen (Lieberman, Panigrahi, Hopkins, Wang, & Broustas, 2017; Venkata Narayanan et al., 2017). Hierbei wurde nach Schädigung mit 2 Gy nach 2 bis 3 h ein Maximum der Proteinsynthese detektiert. Zu diesem Zeitpunkt ist die Mehrheit der induzierten DSBs bereits über die schnelle Komponente repariert. Dieser Aspekt gibt weitere Hinweise auf eine schadensabhängige Synthese von Proteinen, die in der langsamen DSB-Reparaturkomponente involviert sind. Dieser Hypothese folgend, würde nach einer Inhibition der Transkription die langsame DSB-Reparatur in G1-Phase-Zellen nicht über das resektionsabhängige c-NHEJ, sondern alternativ über das

qualitativ bessere, resektionsunabhängige c-NHEJ verlaufen. Hierüber wäre die nach Inhibition der Transkription detektierte, mit CtIP- und Plk3-defizienten Zellen vergleichbare chromosomale Reparaturkinetik in der vorliegenden Arbeit zu erklären. Demnach wäre die transkriptionsabhängige Reduktion der Translokationen während der langsamen DSB-Reparatur nicht durch die Transkription selbst, sondern durch ein dysfunktionales resektionsabhängiges c-NHEJ bzw. durch einen Wechsel der DNA-Reparaturwege begründet. In weiteren Untersuchungen könnte diese Hypothese respektive die schadensabhängige DNA-Transkription bzw. Proteinsynthese in G1-Phase-Zellen überprüft und ein möglicher Zusammenhang in Bezug auf die Wahl der DSB-Reparaturwege verifiziert werden.

Neben der DNA-Resektion könnte möglicherweise eine aktive Transkription respektive eine transkriptionsinduzierte Dynamik des Chromatins die Entstehung von Translokationen während der langsamen DSB-Reparatur dennoch begünstigen. In neuesten Studien konnte eine biphasische DSB-Reparaturkinetik detektiert werden, obwohl DSBs ausschließlich in euchromatischen Genombereichen induziert wurden (Aymard et al., 2017; Aymard et al., 2014). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass DSBs, die mit langsamer Kinetik repariert werden, in transkriptionell aktiven Genombereichen lokalisiert sind. Entgegen früherer Studien postulieren diese Ergebnisse, dass die langsame Reparaturkomponente nicht zwangsläufig die exklusive Reparatur von heterochromatischen DSBs bzw. von DSBs in transkriptionell inaktiven Genombereichen umfasst. Dieses Postulat wäre konsistent mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, die neben der DNA-Resektion ebenfalls einen Einfluss der DNA-Transkription auf die Qualität während der langsamen DSB-Reparatur nachweisen konnten.

Zudem wurde in den Untersuchungen von Aymard et al. (2017) in G1-Phase-Zellen eine vom MRN-Komplex und der DNA-Transkription abhängige DSB-Dynamik innerhalb der langsamen Reparaturkomponente beobachtet. Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutungen aus Kapitel 4.4, dass die Mobilität von DSBs und folglich eine interchromosomale Wechselwirkung und potentielle Translokationsausbildung in Abhängigkeit von Mre11 respektive einer DNA-Resektion während der langsamen DSB-Reparatur in der G1-Phase begünstigt wird (Aten et al., 2004; Biehs et al., 2017). Demnach scheint sowohl eine DNA-Resektion als auch die DNA-Transkription grundlegend für die Entstehung von Translokationen innerhalb der langsamen DSB-Reparaturkomponente in der G1-Phase zu sein. Ob die Funktion der DNA-Transkription innerhalb der Translokationsentstehung auf der schadensinduzierten Synthese von resektions- bzw. reparaturrelevanten Proteinen und einer daraus resultierenden Abhängigkeit der DNA-Reparaturwege oder einer transkriptionsinduzierten Chromatindynamik basiert, könnte in weiterführenden Untersuchungen analysiert werden.

Literaturverzeichnis

- Abraham, R. T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev*, 15(17), 2177-2196. doi: 10.1101/gad.914401
- Agarwal, S., Tafel, A. A., & Kanaar, R. (2006). DNA double-strand break repair and chromosome translocations. *DNA Repair (Amst)*, 5(9-10), 1075-1081. doi: 10.1016/j.dnarep.2006.05.029
- Ahnesorg, P., Smith, P., & Jackson, S. P. (2006). XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell*, 124(2), 301-313. doi: 10.1016/j.cell.2005.12.031
- Aten, J. A., Stap, J., Krawczyk, P. M., van Oven, C. H., Hoebe, R. A., Essers, J., & Kanaar, R. (2004). Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains. *Science*, 303(5654), 92-95. doi: 10.1126/science.1088845
- Averbeck, N. B., Ringel, O., Herrlitz, M., Jakob, B., Durante, M., & Taucher-Scholz, G. (2014). DNA end resection is needed for the repair of complex lesions in G1-phase human cells. *Cell Cycle*, 13(16), 2509-2516. doi: 10.4161/15384101.2015.941743
- Aymard, F., Aguirrebengoa, M., Guillou, E., Javierre, B. M., Bugler, B., Arnould, C., . . . Legube, G. (2017). Genome-wide mapping of long-range contacts unveils clustering of DNA double-strand breaks at damaged active genes. *Nat Struct Mol Biol*, 24(4), 353-361. doi: 10.1038/nsmb.3387
- Aymard, F., Bugler, B., Schmidt, C. K., Guillou, E., Caron, P., Briois, S., . . . Legube, G. (2014). Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks. *Nat Struct Mol Biol*, 21(4), 366-374. doi: 10.1038/nsmb.2796
- Bakkenist, C. J., & Kastan, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421(6922), 499-506. doi: 10.1038/nature01368
- Barton, O., Naumann, S. C., Diemer-Biehs, R., Kunzel, J., Steinlage, M., Conrad, S., . . . Lobrich, M. (2014). Polo-like kinase 3 regulates CtIP during DNA double-strand break repair in G1. *J Cell Biol*, 206(7), 877-894. doi: 10.1083/jcb.201401146
- Bekker-Jensen, S., Lukas, C., Kitagawa, R., Melander, F., Kastan, M. B., Bartek, J., & Lukas, J. (2006). Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J Cell Biol*, 173(2), 195-206. doi: 10.1083/jcb.200510130
- Berger, M. F., Lawrence, M. S., Demichelis, F., Drier, Y., Cibulskis, K., Sivachenko, A. Y., . . . Garraway, L. A. (2011). The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature*, 470(7333), 214-220. doi: 10.1038/nature09744
- Beucher, A., Birraux, J., Tchouandong, L., Barton, O., Shibata, A., Conrad, S., . . . Lobrich, M. (2009). ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *EMBO J*, 28(21), 3413-3427. doi: 10.1038/emboj.2009.276
- Bickmore, W. A., & Teague, P. (2002). Influences of chromosome size, gene density and nuclear position on the frequency of constitutional translocations in the human population. *Chromosome Res*, 10(8), 707-715.
- Biehs, R., Steinlage, M., Barton, O., Juhasz, S., Kunzel, J., Spies, J., . . . Lobrich, M. (2017). DNA Double-Strand Break Resection Occurs during Non-homologous End Joining in G1 but Is Distinct from Resection during Homologous Recombination. *Mol Cell*, 65(4), 671-684 e675. doi: 10.1016/j.molcel.2016.12.016
- Boboila, C., Yan, C., Wesemann, D. R., Jankovic, M., Wang, J. H., Manis, J., . . . Alt, F. W. (2010). Alternative end-joining catalyzes class switch recombination in the absence of both Ku70 and DNA ligase 4. *J Exp Med*, 207(2), 417-427. doi: 10.1084/jem.20092449
- Boffetta, P., van der Hel, O., Norppa, H., Fabianova, E., Fucic, A., Gundy, S., . . . Bonassi, S. (2007). Chromosomal aberrations and cancer risk: results of a cohort study from Central Europe. *Am J Epidemiol*, 165(1), 36-43. doi: 10.1093/aje/kwj367
-

-
- Brownlee, P. M., Chambers, A. L., Oliver, A. W., & Downs, J. A. (2012). Cancer and the bromodomains of BAF180. *Biochem Soc Trans*, 40(2), 364-369. doi: 10.1042/BST20110754
- Bunting, S. F., & Nussenzweig, A. (2013). End-joining, translocations and cancer. *Nat Rev Cancer*, 13(7), 443-454. doi: 10.1038/nrc3537
- Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A., & Chen, D. J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem*, 276(45), 42462-42467. doi: 10.1074/jbc.C100466200
- Chambers, A. L., & Downs, J. A. (2012). The RSC and INO80 chromatin-remodeling complexes in DNA double-strand break repair. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 110, 229-261. doi: 10.1016/B978-0-12-387665-2.00009-2
- Chan, D. W., & Lees-Miller, S. P. (1996). The DNA-dependent protein kinase is inactivated by autophosphorylation of the catalytic subunit. *J Biol Chem*, 271(15), 8936-8941.
- Chapman, J. R., Taylor, M. R., & Boulton, S. J. (2012). Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell*, 47(4), 497-510. doi: 10.1016/j.molcel.2012.07.029
- Chayot, R., Montagne, B., & Ricchetti, M. (2012). DNA polymerase mu is a global player in the repair of non-homologous end-joining substrates. *DNA Repair (Amst)*, 11(1), 22-34. doi: DOI 10.1016/j.dnarep.2011.09.016
- Chowdhury, B., Porter, E. G., Stewart, J. C., Ferreira, C. R., Schipma, M. J., & Dykhuizen, E. C. (2016). PBRM1 Regulates the Expression of Genes Involved in Metabolism and Cell Adhesion in Renal Clear Cell Carcinoma. *PLoS One*, 11(4), e0153718. doi: 10.1371/journal.pone.0153718
- Ciccia, A., & Elledge, S. J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*, 40(2), 179-204. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.019
- Conn, C. W., Hennigan, R. F., Dai, W., Sanchez, Y., & Stambrook, P. J. (2000). Incomplete cytokinesis and induction of apoptosis by overexpression of the mammalian polo-like kinase, Plk3. *Cancer Res*, 60(24), 6826-6831.
- Cornforth, M. N. (2006). Perspectives on the formation of radiation-induced exchange aberrations. *DNA Repair (Amst)*, 5(9-10), 1182-1191. doi: 10.1016/j.dnarep.2006.05.008
- Cui, X., Yu, Y., Gupta, S., Cho, Y. M., Lees-Miller, S. P., & Meek, K. (2005). Autophosphorylation of DNA-dependent protein kinase regulates DNA end processing and may also alter double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell Biol*, 25(24), 10842-10852. doi: 10.1128/MCB.25.24.10842-10852.2005
- Darroudi, F., Fomina, J., Meijers, M., & Natarajan, A. T. (1998). Kinetics of the formation of chromosome aberrations in X-irradiated human lymphocytes, using PCC and FISH. *Mutat Res*, 404(1-2), 55-65.
- Davis, A. J., & Chen, D. J. (2013). DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Transl Cancer Res*, 2(3), 130-143. doi: 10.3978/j.issn.2218-676X.2013.04.02
- Decottignies, A. (2013). Alternative end-joining mechanisms: a historical perspective. *Front Genet*, 4, 48. doi: 10.3389/fgene.2013.00048
- DeFazio, L. G., Stansel, R. M., Griffith, J. D., & Chu, G. (2002). Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO J*, 21(12), 3192-3200. doi: 10.1093/emboj/cdf299
- Douglas, P., Cui, X. P., Block, W. D., Yu, Y. P., Gupta, S., Ding, Q., . . . Meek, K. (2007). The DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is phosphorylated in vivo on threonine 3950, a highly conserved amino acid in the protein kinase domain. *Mol Cell Biol*, 27(5), 1581-1591. doi: Doi 10.1128/Mcb.01962-06
- Downs, J. A. (2007). Chromatin structure and DNA double-strand break responses in cancer progression and therapy. *Oncogene*, 26(56), 7765-7772. doi: 10.1038/sj.onc.1210874
- Drouet, J., Delteil, C., Lefrancois, J., Concannon, P., Salles, B., & Calsou, P. (2005). DNA-dependent protein kinase and XRCC4-DNA ligase IV mobilization in the cell in response to DNA double strand breaks. *J Biol Chem*, 280(8), 7060-7069. doi: 10.1074/jbc.M410746200
- Dunphy, W. G., Brizuela, L., Beach, D., & Newport, J. (1988). The Xenopus cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell*, 54(3), 423-431.
-

-
- Durante, M., Furusawa, Y., & Gotoh, E. (1998). A simple method for simultaneous interphase-metaphase chromosome analysis in biodosimetry. *Int J Radiat Biol*, 74(4), 457-462.
- Gamper, A. M., Rofougaran, R., Watkins, S. C., Greenberger, J. S., Beumer, J. H., & Bakkenist, C. J. (2013). ATR kinase activation in G1 phase facilitates the repair of ionizing radiation-induced DNA damage. *Nucleic Acids Res*, 41(22), 10334-10344. doi: 10.1093/nar/gkt833
- Gasparoni, G., Dissertation (2009). Funktionelle Analyse von cis- bzw. trans-regulierenden Elementen der Dlk1/Gtl2 Imprinting-Region
- Gell, D., & Jackson, S. P. (1999). Mapping of protein-protein interactions within the DNA-dependent protein kinase complex. *Nucleic Acids Res*, 27(17), 3494-3502.
- Goodarzi, A. A., Jeggo, P., & Lobrich, M. (2010). The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax. *DNA Repair (Amst)*, 9(12), 1273-1282. doi: 10.1016/j.dnarep.2010.09.013
- Goodarzi, A. A., & Jeggo, P. A. (2013). The repair and signaling responses to DNA double-strand breaks. *Adv Genet*, 82, 1-45. doi: 10.1016/B978-0-12-407676-1.00001-9
- Goodarzi, A. A., Noon, A. T., Deckbar, D., Ziv, Y., Shiloh, Y., Lobrich, M., & Jeggo, P. A. (2008). ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol Cell*, 31(2), 167-177. doi: 10.1016/j.molcel.2008.05.017
- Goodarzi, A. A., Yu, Y., Riballo, E., Douglas, P., Walker, S. A., Ye, R., . . . Lees-Miller, S. P. (2006). DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *EMBO J*, 25(16), 3880-3889. doi: 10.1038/sj.emboj.7601255
- Gospodinov, A., & Herceg, Z. (2013). Chromatin structure in double strand break repair. *DNA Repair (Amst)*, 12(10), 800-810. doi: 10.1016/j.dnarep.2013.07.006
- Gotoh, E., & Durante, M. (2006). Chromosome condensation outside of mitosis: mechanisms and new tools. *J Cell Physiol*, 209(2), 297-304. doi: 10.1002/jcp.20720
- Hall, EJ, Giaccia AJ (2006). Radiobiology for the Radiologist. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
- Hammel, M., Yu, Y., Mahaney, B. L., Cai, B., Ye, R., Phipps, B. M., . . . Tainer, J. A. (2010). Ku and DNA-dependent protein kinase dynamic conformations and assembly regulate DNA binding and the initial non-homologous end joining complex. *J Biol Chem*, 285(2), 1414-1423. doi: 10.1074/jbc.M109.065615
- Hanasoge, S., & Ljungman, M. (2007). H2AX phosphorylation after UV irradiation is triggered by DNA repair intermediates and is mediated by the ATR kinase. *Carcinogenesis*, 28(11), 2298-2304. doi: 10.1093/carcin/bgm157
- Helmke, C., Becker, S., & Strebhardt, K. (2016). The role of Plk3 in oncogenesis. *Oncogene*, 35(2), 135-147. doi: 10.1038/onc.2015.105
- Helmke, C., Raab, M., Rodel, F., Matthes, Y., Oellerich, T., Mandal, R., . . . Strebhardt, K. (2016). Ligand stimulation of CD95 induces activation of Plk3 followed by phosphorylation of caspase-8. *Cell Res*, 26(8), 914-934. doi: 10.1038/cr.2016.78
- Hlatky, L., Sachs, R. K., Vazquez, M., & Cornforth, M. N. (2002). Radiation-induced chromosome aberrations: insights gained from biophysical modeling. *Bioessays*, 24(8), 714-723. doi: 10.1002/bies.10126
- Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411(6835), 366-374. doi: 10.1038/35077232
- Huertas, P., Cortes-Ledesma, F., Sartori, A. A., Aguilera, A., & Jackson, S. P. (2008). CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination. *Nature*, 455(7213), 689-692. doi: 10.1038/nature07215
- Huertas, P., & Jackson, S. P. (2009). Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *J Biol Chem*, 284(14), 9558-9565. doi: 10.1074/jbc.M808906200
- Iliakis, G., Murmann, T., & Soni, A. (2015). Alternative end-joining repair pathways are the ultimate backup for abrogated classical non-homologous end-joining and homologous recombination repair: Implications for the formation of chromosome translocations. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 793, 166-175. doi: 10.1016/j.mrgentox.2015.07.001
- Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461(7267), 1071-1078. doi: 10.1038/nature08467
-

-
- Jeggo, P. A. (1998). Identification of genes involved in repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Radiat Res*, 150(5 Suppl), S80-91.
- Jeggo, P. A., & Downs, J. A. (2014). Roles of chromatin remodellers in DNA double strand break repair. *Exp Cell Res*. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.09.023
- Jiang, W., Crowe, J. L., Liu, X., Nakajima, S., Wang, Y., Li, C., . . . Zha, S. (2015). Differential phosphorylation of DNA-PKcs regulates the interplay between end-processing and end-ligation during nonhomologous end-joining. *Mol Cell*, 58(1), 172-185. doi: 10.1016/j.molcel.2015.02.024
- Johnson, R. T., & Rao, P. N. (1970). Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature*, 226(5247), 717-722.
- Kakarougkas, A., Ismail, A., Chambers, A. L., Riballo, E., Herbert, A. D., Kunzel, J., . . . Downs, J. A. (2014). Requirement for PBAF in transcriptional repression and repair at DNA breaks in actively transcribed regions of chromatin. *Mol Cell*, 55(5), 723-732. doi: 10.1016/j.molcel.2014.06.028
- Keeney, S., & Neale, M. J. (2006). Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double-strand breaks: mechanism and regulation. *Biochem Soc Trans*, 34(Pt 4), 523-525. doi: 10.1042/BST0340523
- Kegel, P., Riballo, E., Kuhne, M., Jeggo, P. A., & Lobrich, M. (2007). X-irradiation of cells on glass slides has a dose doubling impact. *DNA Repair (Amst)*, 6(11), 1692-1697. doi: 10.1016/j.dnarep.2007.05.013
- Khanna, K. K., & Jackson, S. P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet*, 27(3), 247-254. doi: 10.1038/85798
- Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., & Iliakis, G. (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res*, 36(17), 5678-5694. doi: 10.1093/nar/gkn550
- Koch, C. A., Agyei, R., Galicia, S., Metalnikov, P., O'Donnell, P., Starostine, A., . . . Durocher, D. (2004). Xrcc4 physically links DNA end processing by polynucleotide kinase to DNA ligation by DNA ligase IV. *EMBO J*, 23(19), 3874-3885. doi: 10.1038/sj.emboj.7600375
- Kozubek, S., Lukasova, E., Mareckova, A., Skalnikova, M., Kozubek, M., Bartova, E., . . . Slotova, J. (1999). The topological organization of chromosomes 9 and 22 in cell nuclei has a determinative role in the induction of t(9,22) translocations and in the pathogenesis of t(9,22) leukemias. *Chromosoma*, 108(7), 426-435.
- Krawczyk, P. M., Borovski, T., Stap, J., Cijssouw, T., ten Cate, R., Medema, J. P., . . . Aten, J. A. (2012). Chromatin mobility is increased at sites of DNA double-strand breaks. *J Cell Sci*, 125(Pt 9), 2127-2133. doi: 10.1242/jcs.089847
- Kuhne, M., Riballo, E., Rief, N., Rothkamm, K., Jeggo, P. A., & Lobrich, M. (2004). A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity. *Cancer Res*, 64(2), 500-508.
- Lee-Theilen, M., Matthews, A. J., Kelly, D., Zheng, S., & Chaudhuri, J. (2011). CtIP promotes microhomology-mediated alternative end joining during class-switch recombination. *Nat Struct Mol Biol*, 18(1), 75-79. doi: 10.1038/nsmb.1942
- Lee, J. H., & Paull, T. T. (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*, 308(5721), 551-554. doi: 10.1126/science.1108297
- Lemaitre, C., & Soutoglou, E. (2015). DSB (Im)mobility and DNA repair compartmentalization in mammalian cells. *J Mol Biol*, 427(3), 652-658. doi: 10.1016/j.jmb.2014.11.014
- Lett, J. T. & Sinclair, W. K. (1993). Advances in Radiation Biology. Volume 17. DNA and Chromatin Damage Caused by Radiation. Academic Press, Inc.
- Li, S., Chang, H. H., Niewolik, D., Hedrick, M. P., Pinkerton, A. B., Hassig, C. A., . . . Lieber, M. R. (2014). Evidence that the DNA endonuclease ARTEMIS also has intrinsic 5'-exonuclease activity. *J Biol Chem*, 289(11), 7825-7834. doi: 10.1074/jbc.M113.544874
- Liang, F., & Jasin, M. (1996). Ku80-deficient cells exhibit excess degradation of extrachromosomal DNA. *J Biol Chem*, 271(24), 14405-14411.
-

-
- Lieber, M. R. (2010a). The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annual Review of Biochemistry*, Vol 79, 79, 181-211. doi: DOI 10.1146/annurev.biochem.052308.093131
- Lieber, M. R. (2010b). NHEJ and its backup pathways in chromosomal translocations. *Nat Struct Mol Biol*, 17(4), 393-395. doi: 10.1038/nsmb0410-393
- Lieberman, H. B., Panigrahi, S. K., Hopkins, K. M., Wang, L., & Broustas, C. G. (2017). p53 and RAD9, the DNA Damage Response, and Regulation of Transcription Networks. *Radiat Res*, 187(4), 424-432. doi: 10.1667/RR003CC.1
- Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), 251-260. doi: 10.1038/38444
- Ma, Y., Pannicke, U., Lu, H., Niewolik, D., Schwarz, K., & Lieber, M. R. (2005). The DNA-dependent protein kinase catalytic subunit phosphorylation sites in human Artemis. *J Biol Chem*, 280(40), 33839-33846. doi: 10.1074/jbc.M507113200
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., & 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(6), 781-794.
- Ma, Y., Schwarz, K., & Lieber, M. R. (2005). The Artemis:DNA-PKcs endonuclease cleaves DNA loops, flaps, and gaps. *DNA Repair (Amst)*, 4(7), 845-851. doi: 10.1016/j.dnarep.2005.04.013
- Mansour, W. Y., Rhein, T., & Dahm-Daphi, J. (2010). The alternative end-joining pathway for repair of DNA double-strand breaks requires PARP1 but is not dependent upon microhomologies. *Nucleic Acids Res*, 38(18), 6065-6077. doi: 10.1093/nar/gkq387
- Marnett, L. J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21(3), 361-370.
- Martin, C., & Zhang, Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(11), 838-849. doi: 10.1038/nrm1761
- McVey, M., & Lee, S. E. (2008). MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet*, 24(11), 529-538. doi: 10.1016/j.tig.2008.08.007
- Meaburn, K. J., Misteli, T., & Soutoglou, E. (2007). Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations. *Semin Cancer Biol*, 17(1), 80-90. doi: 10.1016/j.semcancer.2006.10.008
- Meek, K., Gupta, S., Ramsden, D. A., & Lees-Miller, S. P. (2004). The DNA-dependent protein kinase: the director at the end. *Immunol Rev*, 200, 132-141. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00162.x
- Mitelman, F., Johansson, B., & Mertens, F. (2007). The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer*, 7(4), 233-245. doi: 10.1038/nrc2091
- Mladenov, E., & Iliakis, G. (2011). Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutat Res*, 711(1-2), 61-72. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.02.005
- Moreno, S., Hayles, J., & Nurse, P. (1989). Regulation of p34cdc2 protein kinase during mitosis. *Cell*, 58(2), 361-372.
- Murakami, A., Wang, L., Kalthorn, S., Schraml, P., Rathmell, W. K., Tan, A. C., . . . Hu, C. J. (2017). Context-dependent role for chromatin remodeling component PBRM1/BAF180 in clear cell renal cell carcinoma. *Oncogenesis*, 6(1), e287. doi: 10.1038/oncsis.2016.89
- Natarajan, A. T. (2002). Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504(1-2), 3-16. doi: Pii S0027-5107(02)00075-1
Doi 10.1016/S0027-5107(02)00075-1
- Neal, J. A., & Meek, K. (2011). Choosing the right path: Does DNA-PK help make the decision? *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 711(1-2), 73-86. doi: DOI 10.1016/j.mrfmmm.2011.02.010
- Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, I. L., Hagmar, L., Stromberg, U., Rossner, P., . . . Fucic, A. (2006). Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res*, 600(1-2), 37-45. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2006.05.030
-

-
- Nussenzweig, A., & Nussenzweig, M. C. (2007). A backup DNA repair pathway moves to the forefront. *Cell*, *131*(2), 223-225. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.005
- Nussenzweig, A., & Nussenzweig, M. C. (2010). Origin of chromosomal translocations in lymphoid cancer. *Cell*, *141*(1), 27-38. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.016
- Obe, G., & Durante, M. (2010). DNA double strand breaks and chromosomal aberrations. *Cytogenet Genome Res*, *128*(1-3), 8-16. doi: 10.1159/000303328
- Panier, S., & Durocher, D. (2013). Push back to respond better: regulatory inhibition of the DNA double-strand break response. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *14*(10), 661-672. doi: 10.1038/nrm3659
- Pantelias, G. E., & Maillie, H. D. (1983). A simple method for premature chromosome condensation induction in primary human and rodent cells using polyethylene glycol. *Somatic Cell Genet*, *9*(5), 533-547.
- Parada, L. A., McQueen, P. G., & Misteli, T. (2004). Tissue-specific spatial organization of genomes. *Genome Biol*, *5*(7), R44. doi: 10.1186/gb-2004-5-7-r44
- Park, J. H., Park, E. J., Lee, H. S., Kim, S. J., Hur, S. K., Imbalzano, A. N., & Kwon, J. (2006). Mammalian SWI/SNF complexes facilitate DNA double-strand break repair by promoting gamma-H2AX induction. *EMBO J*, *25*(17), 3986-3997. doi: 10.1038/sj.emboj.7601291
- Paul, K., Wang, M., Mladenov, E., Bencsik-Theilen, A., Bednar, T., Wu, W., . . . Iliakis, G. (2013). DNA ligases I and III cooperate in alternative non-homologous end-joining in vertebrates. *PLoS One*, *8*(3), e59505. doi: 10.1371/journal.pone.0059505
- Peterson, S. E., Li, Y., Wu-Baer, F., Chait, B. T., Baer, R., Yan, H., . . . Gautier, J. (2013). Activation of DSB processing requires phosphorylation of CtIP by ATR. *Mol Cell*, *49*(4), 657-667. doi: 10.1016/j.molcel.2012.11.020
- Petrini, J. H., & Stracker, T. H. (2003). The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends Cell Biol*, *13*(9), 458-462.
- Pfeiffer, P., Goedecke, W., & Obe, G. (2000). Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis*, *15*(4), 289-302.
- Pinkel, D., Gray, J. W., Trask, B., van den Engh, G., Fuscoe, J., & van Dekken, H. (1986). Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, *51 Pt 1*, 151-157.
- Quennet, V., Beucher, A., Barton, O., Takeda, S., & Lobrich, M. (2011). CtIP and MRN promote non-homologous end-joining of etoposide-induced DNA double-strand breaks in G1. *Nucleic Acids Res*, *39*(6), 2144-2152. doi: 10.1093/nar/gkq1175
- Rao, P. N., & Johnson, R. T. (1971). Mammalian cell fusion. IV. Regulation of chromosome formation from interphase nuclei by various chemical compounds. *J Cell Physiol*, *78*(2), 217-223. doi: 10.1002/jcp.1040780208
- Rao, P. N., Wilson, B., & Puck, T. T. (1977). Premature chromosome condensation and cell cycle analysis. *J Cell Physiol*, *91*(1), 131-141. doi: 10.1002/jcp.1040910113
- Revell, S. H. (1959). The accurate estimation of chromatid breakage, and its relevance to a new interpretation of chromatid aberrations induced by ionizing radiations. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, *150*, 563-589.
- Riballo, E., Kuhne, M., Rief, N., Doherty, A., Smith, G. C., Recio, M. J., . . . Lobrich, M. (2004). A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol Cell*, *16*(5), 715-724. doi: 10.1016/j.molcel.2004.10.029
- Roberts, C. W., & Orkin, S. H. (2004). The SWI/SNF complex--chromatin and cancer. *Nat Rev Cancer*, *4*(2), 133-142. doi: 10.1038/nrc1273
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., & Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, *273*(10), 5858-5868.
- Rothkamm, K., & 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*(9), 5057-5062. doi: 10.1073/pnas.0830918100
- Roukos, V., Voss, T. C., Schmidt, C. K., Lee, S., Wangsa, D., & Misteli, T. (2013). Spatial dynamics of chromosome translocations in living cells. *Science*, *341*(6146), 660-664. doi: 10.1126/science.1237150
-

-
- Sartori, A. A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., . . . Jackson, S. P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*, *450*(7169), 509-514. doi: 10.1038/nature06337
- Savage, J. R. (2000). Cancer. Proximity matters. *Science*, *290*(5489), 62-63.
- Sax, K. (1939). The Time Factor in X-Ray Production of Chromosome Aberrations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *25*(5), 225-233.
- Sax, K. (1940). An Analysis of X-Ray Induced Chromosomal Aberrations in *Tradescantia*. *Genetics*, *25*(1), 41-68.
- Sax, K. (1942). The Distribution of X-Ray Induced Chromosomal Aberrations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *28*(6), 229-233.
- Schaeper, U., Subramanian, T., Lim, L., Boyd, J. M., & Chinnadurai, G. (1998). Interaction between a cellular protein that binds to the C-terminal region of adenovirus E1A (CtBP) and a novel cellular protein is disrupted by E1A through a conserved PLDLS motif. *J Biol Chem*, *273*(15), 8549-8552.
- Schipler, A., & Iliakis, G. (2013). DNA double-strand-break complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice. *Nucleic Acids Res*, *41*(16), 7589-7605. doi: 10.1093/nar/gkt556
- Schlegel, B. P., Jodelka, F. M., & Nunez, R. (2006). BRCA1 promotes induction of ssDNA by ionizing radiation. *Cancer Res*, *66*(10), 5181-5189. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3209
- Seeber, A., Hauer, M., & Gasser, S. M. (2013). Nucleosome remodelers in double-strand break repair. *Curr Opin Genet Dev*, *23*(2), 174-184. doi: 10.1016/j.gde.2012.12.008
- Shain, A. H., & Pollack, J. R. (2013). The spectrum of SWI/SNF mutations, ubiquitous in human cancers. *PLoS One*, *8*(1), e55119. doi: 10.1371/journal.pone.0055119
- Shibata, A., Conrad, S., Birraux, J., Geuting, V., Barton, O., Ismail, A., . . . Jeggo, P. A. (2011). Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *EMBO J*, *30*(6), 1079-1092. doi: 10.1038/emboj.2011.27
- Shih, I. H., Melek, M., Jayaratne, N. D., & Gellert, M. (2002). Inverse transposition by the RAG1 and RAG2 proteins: role reversal of donor and target DNA. *EMBO J*, *21*(23), 6625-6633.
- Simsek, D., Brunet, E., Wong, S. Y., Katyal, S., Gao, Y., McKinnon, P. J., . . . Jasin, M. (2011). DNA ligase III promotes alternative nonhomologous end-joining during chromosomal translocation formation. *PLoS Genet*, *7*(6), e1002080. doi: 10.1371/journal.pgen.1002080
- Simsek, D., & Jasin, M. (2010). Alternative end-joining is suppressed by the canonical NHEJ component Xrcc4-ligase IV during chromosomal translocation formation. *Nat Struct Mol Biol*, *17*(4), 410-416. doi: 10.1038/nsmb.1773
- Singleton, B. K., Torres-Arzayus, M. I., Rottinghaus, S. T., Taccioli, G. E., & Jeggo, P. A. (1999). The C terminus of Ku80 activates the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit. *Mol Cell Biol*, *19*(5), 3267-3277.
- Smith, J., Riballo, E., Kysela, B., Baldeyron, C., Manolis, K., Masson, C., . . . Jeggo, P. (2003). Impact of DNA ligase IV on the fidelity of end joining in human cells. *Nucleic Acids Res*, *31*(8), 2157-2167.
- Soni, A., Siemann, M., Grabos, M., Murmann, T., Pantelias, G. E., & Iliakis, G. (2014). Requirement for Parp-1 and DNA ligases 1 or 3 but not of Xrcc1 in chromosomal translocation formation by backup end joining. *Nucleic Acids Res*, *42*(10), 6380-6392. doi: 10.1093/nar/gku298
- Soutoglou, E., Dorn, J. F., Sengupta, K., Jasin, M., Nussenzweig, A., Ried, T., . . . Misteli, T. (2007). Positional stability of single double-strand breaks in mammalian cells. *Nat Cell Biol*, *9*(6), 675-682. doi: 10.1038/ncb1591
- Stephan, H., Concannon, C., Kremmer, E., Carty, M. P., & Nasheuer, H. P. (2009). Ionizing radiation-dependent and independent phosphorylation of the 32-kDa subunit of replication protein A during mitosis. *Nucleic Acids Res*, *37*(18), 6028-6041. doi: 10.1093/nar/gkp605
- Stephens, P. J., McBride, D. J., Lin, M. L., Varela, I., Pleasance, E. D., Simpson, J. T., . . . Stratton, M. R. (2009). Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature*, *462*(7276), 1005-1010. doi: 10.1038/nature08645
-

-
- Stewart, G. S., Wang, B., Bignell, C. R., Taylor, A. M., & Elledge, S. J. (2003). MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature*, *421*(6926), 961-966. doi: 10.1038/nature01446
- Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Lobrich, M., & Jeggo, P. A. (2004). ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res*, *64*(7), 2390-2396.
- Stucki, M., Clapperton, J. A., Mohammad, D., Yaffe, M. B., Smerdon, S. J., & Jackson, S. P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*, *123*(7), 1213-1226. doi: 10.1016/j.cell.2005.09.038
- Tariverdian, G. & Buselmaier W., (2004). Humangenetik. 3. Auflage. Springer Verlag
- Uematsu, N., Weterings, E., Yano, K., Morotomi-Yano, K., Jakob, B., Taucher-Scholz, G., . . . Chen, D. J. (2007). Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *J Cell Biol*, *177*(2), 219-229. doi: 10.1083/jcb.200608077
- Umar, A., & Kunkel, T. A. (1996). DNA-replication fidelity, mismatch repair and genome instability in cancer cells. *European Journal of Biochemistry*, *238*(2), 297-307. doi: DOI 10.1111/j.1432-1033.1996.0297z.x
- van Gent, D. C., Hoeijmakers, J. H., & Kanaar, R. (2001). Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet*, *2*(3), 196-206. doi: 10.1038/35056049
- Venkata Narayanan, I., Paulsen, M. T., Bedi, K., Berg, N., Ljungman, E. A., Francia, S., . . . Ljungman, M. (2017). Transcriptional and post-transcriptional regulation of the ionizing radiation response by ATM and p53. *Sci Rep*, *7*, 43598. doi: 10.1038/srep43598
- Walker, J. R., Corpina, R. A., & Goldberg, J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, *412*(6847), 607-614. doi: 10.1038/35088000
- Wang, H., Rosidi, B., Perrault, R., Wang, M., Zhang, L., Windhofer, F., & Iliakis, G. (2005). DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. *Cancer Res*, *65*(10), 4020-4030. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3055
- Wang, M. L., Wu, W. Z., Wu, W. Q., Rosidi, B., Zhang, L. H., Wang, H. C., & Iliakis, G. (2006). PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res*, *34*(21), 6170-6182. doi: Doi 10.1093/Nar/Gkl840
- Ward, I. M., & Chen, J. (2001). Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem*, *276*(51), 47759-47762. doi: 10.1074/jbc.C100569200
- Weichert, W., Denkert, C., Schmidt, M., Gekeler, V., Wolf, G., Kobel, M., . . . Hauptmann, S. (2004). Polo-like kinase isoform expression is a prognostic factor in ovarian carcinoma. *Br J Cancer*, *90*(4), 815-821. doi: 10.1038/sj.bjc.6601610
- Weichert, W., Kristiansen, G., Winzer, K. J., Schmidt, M., Gekeler, V., Noske, A., . . . Denkert, C. (2005). Polo-like kinase isoforms in breast cancer: expression patterns and prognostic implications. *Virchows Arch*, *446*(4), 442-450. doi: 10.1007/s00428-005-1212-8
- Weinstock, D. M., Brunet, E., & Jasin, M. (2007). Formation of NHEJ-derived reciprocal chromosomal translocations does not require Ku70. *Nat Cell Biol*, *9*(8), 978-981. doi: 10.1038/ncb1624
- Xia, W., Nagase, S., Montia, A. G., Kalachikov, S. M., Keniry, M., Su, T., . . . Parsons, R. (2008). BAF180 is a critical regulator of p21 induction and a tumor suppressor mutated in breast cancer. *Cancer Res*, *68*(6), 1667-1674. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5276
- You, Z., Chahwan, C., Bailis, J., Hunter, T., & Russell, P. (2005). ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. *Mol Cell Biol*, *25*(13), 5363-5379. doi: 10.1128/MCB.25.13.5363-5379.2005
- Yu, X., & Chen, J. (2004). DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains. *Mol Cell Biol*, *24*(21), 9478-9486. doi: 10.1128/MCB.24.21.9478-9486.2004
-

-
- Yun, M. H., & Hiom, K. (2009). CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature*, 459(7245), 460-463. doi: 10.1038/nature07955
- Zhang, Y., & Jasin, M. (2011). An essential role for CtIP in chromosomal translocation formation through an alternative end-joining pathway. *Nat Struct Mol Biol*, 18(1), 80-84. doi: 10.1038/nsmb.1940
- Zolner, A. E., Abdou, I., Ye, R., Mani, R. S., Fanta, M., Yu, Y., . . . Lees-Miller, S. P. (2011). Phosphorylation of polynucleotide kinase/ phosphatase by DNA-dependent protein kinase and ataxia-telangiectasia mutated regulates its association with sites of DNA damage. *Nucleic Acids Res*, 39(21), 9224-9237. doi: 10.1093/nar/gkr647
-

Anhang

Publikationen

- 2017 Biehs R, Steinlage M, Barton O, Juhász S, **Kunzel J**, et al. "DNA double-strand break resection occurs during non-homologous end-joining in G1 but is distinct from resection during homologous recombination." *Mol. Cell* Vol.65 671-684
- 2014 Barton O, Naumann SC, Diemer-Biehs R, **Kunzel J**, et al. "Polo-like kinase 3 regulates CtIP during DNA double-strand break repair in G1." *J. Cell Biol.* Vol.206 No.7 877-894
- 2014 Kakarougkas A, Ismail A, Chambers A. L, Riballo E, Herbert A. D, **Kunzel J**, et al. "Requirement for PBAF in transcriptional repression and repair at DNA breaks in actively transcribed regions of chromatin." *Mol. Cell* Vol.55 723-732
- 2011 Conrad S, **Kunzel J**, Loblrich M "Sister chromatid exchanges occur in G2-irradiated cells". *Cell Cycle* Vol.10 222-8

Persönliche Tagungsbeiträge

Vorträge:

- 10/2012 **Amalfi, Italien**
The 10th International Symposium on Chromosomal Aberrations (ISCA10)
"A canonical non-homologous end-joining pathway involving CtIP-dependent end-resection promotes chromosome translocation formation".
- 10/2012 **Vietri sul Mare, Italien**
39th Annual Meeting of the European Radiation Research Society
"A canonical non-homologous end-joining pathway involving CtIP-dependent end-resection promotes chromosome translocation formation".
-

10/2011 **Königstein**

HGS-HiRe Graduate Days 2011

“Repair of x-ray induced DNA double-strand breaks in G1 phase cells”.

Posterpräsentation:

09/2010 **Hamburg**

13. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung

“Quantification of homologous recombination repair events in G2- and S-phase measured by sister chromatid exchange analyses”.

Lebenslauf

Name: Julia Künzel

Geburtsdatum: 4 Oktober 1982

Geburtsort: Darmstadt

Dissertation

08/2010 – 06/2017 **Technische Universität Darmstadt**
Strahlenbiologie und DNA-Reparatur
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Markus Löbrich

08/2010 – 12/2013 Stipendiatin HGS-HIRe
(Helmholtz Graduate School for Hadron and Ion Research)

Ausbildung

10/2003 – 05/2010 **Technische Universität Darmstadt**
Diplom Biologie (1,0)

10/2002 – 09/2003 **Justus-Liebig Universität Giessen**
Agrarwissenschaften

08/1993 – 06/2002 **Gymnasium Schuldorf Bergstraße**
Abitur (2,1)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Markus Löbrich für die Möglichkeit meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen sowie die Unterstützung und das Verständnis in dieser Zeit. Bei Frau Prof. Dr. Beatrix Süß bedanke ich mich herzlich für die kurzfristige Übernahme des Koreferats. Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Franz Rödel und Frau Prof. Dr. Gisela Taucher-Scholz für ihre Bereitschaft als Prüfer meine Disputation zu begleiten.

Ein herzliches Dankeschön an Ronja Biehs und Dr. Olivia Barton für ihre Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit. Ganz besonders möchte ich Dr. Monika Steinlage danken, die nicht nur bei wissenschaftlichen Fragen immer an meiner Seite stand und steht. Der gesamten Arbeitsgruppe – im Speziellen der „alten Truppe“ – danke ich für das freundliche Arbeitsklima und viele unvergessliche Anekdoten.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meinen Eltern für ihre bedingungslose Liebe sowie bei meinen Freunden für die Zuversicht und den Rückhalt in jeder Lebenslage.

