

Untersuchung zur Relokalisierung heterochromatischer DNA Läsionen

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte

Dissertation von

Dipl.-Biol. Marcus Beuke

aus Eisenach

1. Referent: Prof. Dr. Marco Durante

2. Referent: Prof. Dr. Markus Löbrich

Tag der Einreichung: 06. Mai 2013

Tag der mündlichen Prüfung: 04. Juli 2013

Darmstadt 2013

D 17

If a cluttered desk is a sign of a
cluttered mind, of what, then,
is an empty desk a sign?

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1..... Zusammenfassung	1
2..... Einleitung	4
2.1. Strahlenphysikalische Grundlagen	5
2.1.1. Ionisierende Strahlung	5
2.1.2. Wechselwirkung ionisierender Strahlung mit Materie	6
2.1.3. Dosis	8
2.2. Strahlenbiologische Grundlagen	12
2.2.1. Schadensarten	12
2.2.2. Zelluläre Reaktion auf DNA Schäden	13
2.2.3. Reparatur	14
2.2.4. Die Rolle des Chromatins	17
2.2.5. Die Rolle der PIK-Kinasen	19
2.2.6. Der Heterochromatin bildende Faktor KAP1	21
2.3. Hochauflösende Mikroskopie - STED	22
2.4. Zielsetzung	24
3..... Material und Methoden	26
3.1. Material	26
3.1.1. Zelllinien	26
3.1.2. siRNA	26
3.1.3. Konstrukte (Transfektion)	26
3.1.4. Antikörper	27
3.1.5. Chemikalien	28
3.1.6. Verwendete Lösungen	29
3.1.7. Verbrauchsmaterial	31
3.1.8. Geräteliste	31
3.1.9. Software	32
3.2. Methoden	33
3.2.1. Zellkultur	33
3.2.2. Inhibitoren	34
3.2.3. Transfektionen	35
3.2.3.1 siRNA Transfektion mit „Hiperfect“	35
3.2.3.2 siRNA Transfektion mit „INTERFERin“	35
3.2.3.3 Transfektion von Plasmid DNA mit „jetPrime“	35
3.2.3.4 Transfektion von Plasmid DNA mit „Attractene“	36
3.2.4. Bestrahlung	36

3.2.4.1	Röntgenbestrahlung	36
3.2.4.2	Schwerionenbestrahlung am UNILAC	37
3.2.4.3	Gezielte Schwerionenbestrahlung mit der Mikrosonde am UNILAC	38
3.2.4.4	Schwerionenbestrahlung am SIS 18	41
3.2.4.5	Verwendete Ionen	41
3.2.5	Immunhistochemische Methoden	42
3.2.5.1	Fixierungsmethoden	42
3.2.5.2	Immunfluoreszenzfärbung	42
3.2.5.3	Modifizierte TUNEL Färbung	43
3.2.6	Immunfluoreszenz-Mikroskopie	43
3.2.7	STED Mikroskopie	44
3.2.8	Bildauswertung	45
3.2.9	Biochemische Methoden	45
3.2.9.1	Präparation von Zelllysaten	45
3.2.9.2	Protein-Konzentrationsbestimmung	45
3.2.9.3	SDS-PAGE und Western Blot	45
3.2.10	Statistische Berechnungen	47
4.....	Ergebnisse	48
4.1	Gezielte Schadensinduktion im Heterochromatin	48
4.2	Charakterisierung der DNA Schadensantwort im Heterochromatin	50
4.3	Relokalisierung der heterochromatischen DNA Schäden in euchromatische Bereiche	53
4.3.1	Zellzyklusverteilung der für die Relokalisierungsmessung analysierten Zellen	59
4.4	Die Relokalisierung der heterochromatischen DNA Schäden in euchromatische Bereiche ist ATM abhängig	61
4.5	Schadensabhängige Dekondensation des Heterochromatins	67
4.5.1	Die Dynamik von HP1 α und KAP1 an heterochromatischen DNA Schäden	71
4.6	Der Einfluss von KAP1 auf die Relokalisierung und die Chromatindekondensation	74
4.7	Einfluss anderer PIK-Kinasen auf die Relokalisierung	79
4.7.1	DNA-PK	80
4.7.2	ATR	82
4.8	Einfluss des NHEJ auf die Relokalisierung	83
4.9	Verlangsamte Reparatur der heterochromatischen DNA Schäden	84
4.10	Resektion im Heterochromatin	88
4.11	DSB Dynamik/Bewegung	96
5.....	Diskussion	101
5.1	DNA Schäden lassen sich auch im Heterochromatin nachweisen	101
5.2	Heterochromatische DNA Läsionen werden kurz nach Schadensinduktion an die Grenzfläche zum Euchromatin relokalisiert	105
5.3	Die Kinetik der Relokalisierung heterochromatischer DNA Schäden ist abhängig von den PIK Kinasen	108
5.4	Geschädigtes (Hetero)Chromatin dekondensiert entlang der Trajektorie.	113
5.5	Die Reparatur ioneninduzierter, heterochromatischer DNA Schäden ist gegenüber euchromatischen DNA Schäden verlangsamt	117
5.6	Die Reparatur ioneninduzierter, heterochromatischer DNA Schäden ist resektionsassoziiert	119

5.7	Ausblick	125
6.....	Literaturverzeichnis	128
7.....	Anhang	148
7.1	Veröffentlichungen	148
7.2	Lebenslauf	149
7.3	Danksagung	150
7.4	Ehrenwörtliche Erklärung	151

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wechselwirkungsprozesse elektromagnetischer Strahlung mit Materie.	7
Abbildung 2: Direkter und indirekter Effekt ionisierender Strahlung auf die DNA.	8
Abbildung 3: Flächendosisprofile für Röntgenstrahlung (X-ray) und Kohlenstoffionen unterschiedlicher Energien.	9
Abbildung 4: Tiefendosisprofil von Photonen und Ionen unterschiedlicher Energien.	11
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Vielfalt von DNA Schäden (durch ionisierende Strahlung).	12
Abbildung 6: Vergleich der RBW von Kohlenstoffionen und Röntgenstrahlung.	13
Abbildung 7: Schematische Darstellung der zellulären Schadensantwort	14
Abbildung 8: Modell des Anteils der HR bzw. des NHEJ in den einzelnen Phasen des Zellzyklus.	15
Abbildung 9: Vereinfachte Darstellung des NHEJ und der HR	16
Abbildung 10: Struktur des Chromatins.	17
Abbildung 11: Unterschiede zwischen Eu- und Heterochromatin.	18
Abbildung 12: Anteile der langsamen und der schnellen Komponente der DSB Reparatur nach Röntgenbestrahlung.	19
Abbildung 13: Grundlagen der STED Mikroskopie.	23
Abbildung 14: Darstellung der Lichtspots bei der STED Mikroskopie.	24
Abbildung 15: WB Analyse der ATM Inhibitorfunktion.	34
Abbildung 16: WB Analyse der ATR Inhibitorfunktion.	34
Abbildung 17: Immunfluoreszenzaufnahme von Röntgen-mikrobestrahlten Zellen.	37
Abbildung 18: Magazin und Probenhalter für die ungerichtete Bestrahlung am UNILAC.	38
Abbildung 19: Aufbau der GSI Mikrosonde.	39
Abbildung 20: Modellzeichnung der Mikrosondenkammern.	39
Abbildung 21: Ablauf der Mikrosondenbestrahlung.	40
Abbildung 22: Heterochromatinmarkierung der intensiv DNA-gefärbten Chromocenter in MEFs.	48
Abbildung 23: Direkte DNA Schadensmarkierung mit einer modifizierten TUNEL-Färbung.	49
Abbildung 24: Rekrutierung der MRN Komponenten MRE11 und NBS1 an heterochromatische, durch Ionen induzierte DNA Schäden.	51
Abbildung 25: Nachweis von aktiviertem ATM innerhalb des Heterochromatins.	52
Abbildung 26: Nachweis der Rekrutierung von XRCC1 an ioneninduzierte Schäden im Heterochromatin.	52
Abbildung 27: Definition der Schadensspureinteilung in „zentral“, „intermediär“ und „peripher“.	54
Abbildung 28: Relokalisierungskinetik heterochromatischer DNA Schäden gemessen in WT Fibroblasten.	56
Abbildung 29: Lebendzellbeobachtung der Relokalisierung eines heterochromatischen DNA-Schadensfocues zur Chromocenter Peripherie.	57
Abbildung 30: Relokalisierung in Röntgen mikrobestrahlten Zellen.	58
Abbildung 31: Zellzyklusanalyse in embryonalen Maus Fibroblasten mit Hilfe einer pH3 Immunfluoreszenzfärbung.	59
Abbildung 32: Vergleich der Fläche einzelner Chromocenter (CC) zwischen Zellzyklusphasen in embryonalen Maus Fibroblasten.	60
Abbildung 33: Relokalisierungskinetiken heterochromatischer DNA Schäden im Vergleich zwischen WT Fibroblasten und ATM defizienten Fibroblasten (MEF ATM -/-).	63
Abbildung 34: Zentrale Schadensspuren 1 h nach Bestrahlung der Chromocenter in ATM defizienten Fibroblasten.	64
Abbildung 35: Vermessung der Fläche einzelner Chromocenter von embryonalen Maus Fibroblasten in Maximalprojektionen.	65
Abbildung 36: Vergleich der Größenverteilung einzelner Chromocenter zwischen der allgemeinen Population und den bestrahlten Chromocentern.	66

Abbildung 37: Relokalisierungskinetik heterochromatischer DNA Schäden gemessen in WT Fibroblasten, die mit ATM Inhibitor behandelt wurden.	66
Abbildung 38: Zentrale Schadensspur in einem Chromocenter nach Bestrahlung mit einzelnen, gezielten Kohlenstoffionen (290 keV/ μ m; 4,8 MeV/u) an der GSI Mikrosonde.	67
Abbildung 39: Lebendzellbeobachtung der lokalen Dekondensation an einem Ionendurchgang in einem Chromocenter.	68
Abbildung 40: Vergleich der Lebendzellbeobachtung der lokalen Dekondensation an einem Ionendurchgang in einem Chromocenter mit konfokalen Aufnahmen der selben Zellen nach der Fixierung.	70
Abbildung 41: Immunfluoreszenzanalyse der HP1 α , KAP1 und H3K9me3 Dynamik an heterochromatischen DNA Schäden.	73
Abbildung 42: Relokalisierungskinetik heterochromatischer DNA Schäden gemessen in ATM defizienten Fibroblasten (MEF ATM -/-) mit einem k.d. gegen KAP1.	74
Abbildung 43: Relokalisierungskinetik heterochromatischer DNA Schäden gemessen in WT Fibroblasten nach einem k.d. gegen KAP1.	75
Abbildung 44: Vermessung der Fläche einzelner Chromocenter von embryonalen Maus Fibroblasten in Maximalprojektionen.	76
Abbildung 45: Lokale Dekondensation an heterochromatischen DNA Schäden in WT Fibroblasten nach einem KAP1 k.d.	77
Abbildung 46: Lokale Dekondensation an heterochromatischen DNA Schäden in ATM defizienten Fibroblasten nach einem KAP1 k.d.	78
Abbildung 47: Vermessung des γ H2AX Focusdurchmessers in unterschiedlichen MEF Stämmen.	79
Abbildung 48: Relokalisierungskinetik heterochromatischer DNA Schäden gemessen in ATM profizienten und ATM defizienten Fibroblasten (MEF ATM -/-), die jeweils mit dem DNA-PK Inhibitor KU7026 behandelt wurden.	81
Abbildung 49: Relokalisierungskinetik heterochromatischer DNA Schäden gemessen in WT Fibroblasten die mit dem ATR Inhibitor NVP BEZ235 behandelt wurden.	82
Abbildung 50: Relokalisierungskinetik heterochromatischer DNA Schäden gemessen in KU80 defizienten Fibroblasten.	83
Abbildung 51: Lebendzellbeobachtung der XRCC1 Rekrutierung in embryonalen Maus Fibroblasten.	86
Abbildung 52: Focusanalyse im Eu- und Heterochromatin von embryonalen Maus Fibroblasten.	87
Abbildung 53: Exemplarische Aufnahmen der Reparaturfoci in horizontal bestrahlten Maus Fibroblasten.	87
Abbildung 54: Rekrutierung von CtIP an heterochromatische, durch Ionen induzierte DNA Schäden.	89
Abbildung 55: Rekrutierung von MRE11 an heterochromatische, durch Ionen induzierte DNA Schäden.	90
Abbildung 56: Rekrutierung von RPA an heterochromatische, durch Ionen induzierte DNA Schäden.	91
Abbildung 57: Rekrutierung von TopBP1 an heterochromatische, durch Ionen induzierte DNA Schäden.	92
Abbildung 58: Vergleich des lokalen γ H2AX Signalabfalls bei Ionen mit unterschiedlichem LET.	93
Abbildung 59: Rekrutierung von 53BP1 an Ionen induzierte DNA Schäden.	94
Abbildung 60: Gekrümmte 53BP1 Spuren nach Schwerionenbestrahlung.	95
Abbildung 61: Rekrutierung von 53BP1 und RPA an ioneninduzierte, heterochromatische DNA Schäden.	96
Abbildung 62: DNA Schadensdetektion mit Hilfe einer modifizierten TUNEL Färbung.	98
Abbildung 63: Vergleich von konfokaler und STED Mikroskopie.	99
Abbildung 64: STED Aufnahme von MRE11 und RPA Foci nach Schrägbestrahlung mit schweren Ionen.	100
Abbildung 65: Modelle für die Rolle des MRN Komplexes während der DNA Reparatur.	104
Abbildung 66: Modell der Verteilung von DNA Reparaturproteinen in einem Focus um einen DSB.	117

Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1: Primärantikörper	27
Tab. 3.2: Sekundärantikörper.....	27
Tab. 3.3: LETs und Energien der verwendeten Ionen.....	41

Abkürzungsverzeichnis

53BP1	<i>p53 binding protein 1</i>
α	alpha
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AT	<i>Ataxia telangiectasia</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATMi	ATM Inhibitor
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ATM and Rad3 related</i>
ATRIP	<i>ATR interacting protein</i>
β	beta
BER	Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaar
BLM	Bloom
BRCA	<i>breast cancer</i>
BrdU	5-Bromo-2'-desoxy-Uridin
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	centi
C	Celsius
ca.	circa
CC	Chromocenter
Cdk	cyclin dependent kinase
CENP-F	Centromer-Protein F
Chk1/2	<i>Checkpoint kinase 1/2</i>
CtIP	<i>CtBP interacting protein</i>
δ	delta
Da	Dalton
DAPI	4'-6'-Diamino-2-Phenyl-indoldihydrochlorid
DMEM	<i>Dulbecco's minimal essential medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DNA-PKcs	katalytische Untereinheit der DNA-PK (<i>catalytic subunit of DNA-PK</i>)
DNA-PKi	DNA-PK-Inhibitor
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
dsDNA	doppelsträngige DNA
EC	Euchromatin
EDTA	Ethylendiamidtetraacetat
ESB	Einzelstrangbruch
eV	Elektronenvolt
Exo1	<i>exonuclease 1</i>
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)

ff	und folgende Seiten
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
γ	gamma
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Gy	Gray (Einheit der Strahlendosis)
h	Stunde
HC	Heterochromatin
HP1	<i>heterochromatin protein 1</i>
HR	Homologe Rekombination
HRP	horse radish peroxidase
HU	Hydroxyharnstoff (<i>hydroxyurea</i>)
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
inkl.	inklusive
IR	ionisierende Strahlung (<i>ionising radiation</i>)
IRIF	<i>ionising radiation induced foci</i>
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
KAP-1	<i>KRAB associated protein 1</i>
λ	lambda (Wellenlänge)
l	Liter
LEM	<i>local-effect-model</i>
LET	Linearer Energie-Transfer
Lig	Ligase
LMDS	<i>locally multiply damaged site</i>
μ	micro
M	Molar, mega
MB	microbeam
m	Meter, milli
MDC1	mediator of DNA-damage checkpoint 1
MEF	<i>mouse embryonic fibroblasts</i>
min	Minute
MNase	<i>micrococcal nuclease</i>
MRE11	<i>meiotic recombination protein 11</i>
MRN-Komplex	MRE11-Rad50-NBS1-Komplex
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
ν	Ny (Frequenz)
n	nano
N	Neutron
NBS1	<i>Nijmegen breakage syndrom 1</i>
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäuren (<i>non essential amino acids</i>)
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NHEJ	Nichthomologe Endverknüpfung (<i>non-homologous end-joining</i>)
oD	optische Dichte

OT	Objektträger
p	phosphoryliert
P	Passage
P/S	Penicillin-Streptomycin
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigene</i>
PFA	Paraformaldehyd
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinasen
PIKK	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-ähnliche Kinase
Pol	Polymarase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rad	<i>Radiation Repair Protein</i>
RBW	relative biologische Wirksamkeit
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies
RPA	Replikationsprotein A (<i>replication protein A</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RPMI	Rosswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Bäckerhefe)
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (Spaltheife)
s	Sekunde
S	Serin
SDS	sodium dodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
SMC1	<i>Structural maintenance of chromosomes 1</i>
SSB	Einzelstrangbruch (<i>single-strand break</i>)
SSA	<i>Single strand annealing</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA (<i>single-stranded DNA</i>)
STED	<i>stimulated emission depletion</i>
Sv	Sievert (Einheit der Äquivalentdosis)
T	Threonin
Tab.	Tabelle
T/cm ²	Teilchen/cm ²
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethyldiamin
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP nick end labeling</i>
u.a.	unter anderem
UNILAC	Universal Linear Accelerator
UV	Ultraviolett

V	Volt
V(D)J	<i>variable (diversity) joining</i>
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumenprozent)
VE-Wasser	voll entionisiertes Wasser
vgl.	vergleiche
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewichtsprozent)
WB	Western Blot
WRN	Werner-Protein
WT	Wildtyp
XLF	<i>XRCC4-like factor</i>
XRCC	<i>X-ray repair cross-complementing</i>
z.B.	Zum Beispiel

1. Zusammenfassung

Die DNA in Säugerzellen ist um Histone gewunden und faltet sich zu höher geordneten Strukturen, welche man als Chromatin bezeichnet. Dieses wird in zwei Klassen aufgeteilt: das locker gepackte, transkriptionell aktive Euchromatin und das dicht gepackte Heterochromatin (HC). Letzteres ist transkriptionell inaktiv, aber von entscheidender Bedeutung für die Regulation der Genexpression und die gesamte nukleäre Architektur. Obwohl das Heterochromatin durch seine dichte Packung eine besondere Herausforderung für die DNA Reparatur darzustellen scheint, ist wenig bekannt über den Ablauf der heterochromatischen Reparatur. In den meisten Studien wird nicht zwischen Eu- und Heterochromatin differenziert und da letzteres nur einen Anteil von etwa 20 % des Säuger-genoms ausmacht, gehen die speziellen Anforderungen dieses besonderen Chromatinbereichs in solchen Studien unter.

Durch die Verwendung gezielter Ionenbestrahlung wurde in dieser Arbeit die Relokalisierung heterochromatischer DNA Schäden aus den Chromocentern muriner Fibroblasten charakterisiert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das getroffene Chromatin nach gezielter Schwerionenbestrahlung innerhalb von Sekunden dekontensiert. Die DNA Schäden wurden neben der Immunofluoreszenzmarkierung von Reparaturproteinen auch durch den direkten Nachweis mit Hilfe einer modifizierten TUNEL Analyse detektiert. Die Schäden relokalisieren innerhalb von etwa 20 Minuten aus dem Heterochromatin (HC) heraus. Dabei verliert das geschädigte Chromatin einen Teil seiner HC Marker wie H3K9me3, während andere HC Marker wie HP1 α erhalten bleiben bzw. zusätzlich zu dem bereits gebundenen Anteil an den DNA Schaden rekrutiert werden. Der Prozess der Relokalisierung erwies sich als unabhängig von der Zellzyklusphase. Auch der LET (Linearer Energie Transfer) des Ions hatte keinen messbaren Einfluss auf die Relokalisierung. Darüber hinaus ließ sich diese auch nach Röntgenbestrahlung beobachten.

Durch Relokalisierungsanalysen in ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) defizienten Fibroblasten konnte jedoch belegt werden, dass die Geschwindigkeit der Relokalisierung von ATM abhängt. Allerdings läuft der generelle Prozess grundsätzlich auch ohne diese Kinase ab. Der Heterochromatin-bildende Faktor KAP1, der mit der schadensinduzierten, ATM abhängigen Chromatindekondensation in Verbindung gebracht wurde, zeigte sich als unbedeutend für die Geschwindigkeit der Relokalisierung. So ließ sich die Relokalisierungsverzögerung in ATM defizienten Zellen nicht durch einen KAP1 *knock down* kompensieren.

Neben ATM zeigten sich auch die anderen PIKK-Familien-Mitglieder ATR und DNA-PK für die Geschwindigkeit der Relokalisierung von Bedeutung. Die Kinasen scheinen dabei nicht vollständig redundant zu agieren. So hatte die DNA-PK Inhibition in ATM defizienten Zellen einen zusätzlich verlangsamenden Effekt auf die Relokalisierung. Dennoch konnte kein Hinweis darauf gefunden werden, dass die drei untersuchten PIK Kinasen einen Einfluss auf die Ausprägung der Dekondensation haben.

Durch Immunofluoreszenzanalysen konnte gezeigt werden, dass die Reparatur heterochromatinassoziierter Schäden langsamer abläuft als die Reparatur euchromatischer Schäden und dass diese langsam reparierenden DNA Läsionen fast ausnahmslos mit Resektion assoziiert sind. Auch nach gezielter Bestrahlung von Chromocentern konnte die Resektion der ioneninduzierten DNA Schäden bereits innerhalb des Heterochromatins nachgewiesen werden. Der Resektionsmarker RPA war dabei oft von dem NHEJ (*non homologous end joining*) Faktor 53BP1 umgeben, ohne aber dass die beiden Proteine kolo-kalisiert. Diese spezielle Focusstruktur konnte auch mit Hilfe von hochauflösender Mikroskopie bestätigt werden und spricht für eine Konkurrenz der Reparaturwege um die DNA Schäden. Bei den hier beschriebenen Reparaturfocusstrukturen könnte es sich um sogenannte Reparaturzentren handeln, in denen mehrere DNA Schäden, wie sie entlang einer Ionentrajektorie entstehen, zusammen gezogen werden.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit liefern neue Einblicke in die DNA Schadensantwort im Heterochromatin und in die Reparatur heterochromatischer DNA Schäden.

In the mammalian cell nucleus DNA is highly compacted being wrapped around histones and folded into higher order structures building chromatin. Chromatin can be subdivided into two classes: the highly transcriptional active, loosely packed euchromatin and the densely packed heterochromatin (HC). Heterochromatin is transcriptionally inert but essential for the regulation of the gene expression and the entire architecture of the nucleus. Because of the dense packing of the DNA heterochromatin seems to represent a major challenge for DNA repair. However, little is known about the specific repair mechanism of heterochromatic DNA lesions. Most of the past repair studies did not differentiate between euchromatin and heterochromatin. Thus, representing only 20 % of the overall chromatin, the special requirements of the heterochromatic repair get lost in these studies.

Making use of the unique submicrometer resolution of the GSI microprobe the distinct mouse heterochromatin chromocenters were precisely irradiated with single ions. This way it was possible to characterize the relocalization of heterochromatic DNA lesions out of the chromocenters of murine fibroblasts after aimed ion irradiation. The chromatin hit by ions was shown to decondensate within seconds after damage induction.

DNA double strand breaks (DSBs) were tracked by visualization of DNA repair factors in a classical immunofluorescence detection approach and also traced directly in a modified TUNEL analysis. The ion induced DSBs relocated out of the heterochromatin within 20 minutes. Along the way the damaged chromatin showed loss of some of its heterochromatic markers including H3K9me3, while at the same time other markers such as HP1 α were shown to be recruited in addition to the initial level.

The process of damage relocalization demonstrated to be independent of the cell cycle phase. The analysis also showed that the LET (*linear energy transfer*) of the irradiation ion has no influence on the

relocation. Furthermore, evidence for relocation after x-ray irradiation was found as well. However, relocation analyses in ATM deficient fibroblasts revealed that the speed of the relocation is dependent on ATM (ataxia telangiectasia mutated). Nevertheless, the general process of relocalization can in fact take place without this specific kinase.

In contrast, the heterochromatin building factor KAP1, which is thought to be involved in the damage induced, ATM dependent chromatin decondensation was found to be dispensable for the relocalization speed of heterochromatic DNA lesions. Consequently, the relocalization delay in ATM deficient cells could not be compensated by an additional, RNAi driven depletion of KAP1. Besides ATM the other PIKK family members ATR and DNA-PK are relevant for the speed of relocalization as well. However, the data within this work suggest that these three kinases are not completely redundant for this process. Accordingly the inhibition of DNA-PK showed an additional delay of the relocalization in ATM deficient cells. However, no evidence was found that any of these three kinases has a major impact on the process of decondensation of damaged heterochromatin.

Immunofluorescence analyses revealed that the repair of heterochromatin associated DNA lesions is slower than the repair of euchromatic lesions. Moreover, the slow DNA repair process was shown to be associated with resection in the majority of cases. DNA resection was detected already within the heterochromatin following its ion induced DNA damage. Interestingly, the applied resection marker RPA was often surrounded by the NHEJ factor 53BP1, but without distinctive colocalization of the two. This observation was validated by high resolution microscopy. The described structure suggests a competition of repair pathways for the DNA lesions. Based on the multiplicity of DSBs induced by charged particles, this structure could possibly display what is called repair centers. In these it is proposed that multiple DNA lesions are collected together.

In Summary, the investigations in this thesis provide new insights into the DNA damage response in the heterochromatin and into the repair of heterochromatic lesions.

2. Einleitung

Eine der wichtigsten Aufgaben der Zelle ist es die Integrität der DNA zu erhalten und diese korrekt an Tochterzellen weiter zu geben. Fehler in der DNA können zu Ausfällen einzelner Funktionen der Zelle, zum Zelltod und im schlimmsten Fall zur Entstehung von Krebs führen. Das Genom ist ständig einer Reihe von endogenen und exogenen Einflüssen ausgesetzt, die in der Lage sind die DNA zu schädigen. Zu den wichtigsten exogenen Ursachen für DNA-Schäden gehört neben chemischen Agenzien die ionisierende Strahlung (*ionizing radiation* – IR). Neben der natürlichen Strahlenexposition wie der terrestrischen Strahlung fallen auch die Röntgenstrahlen und die Ionenstrahlen in diese Kategorie. Ionisierende Strahlung dient in der Medizin sowohl der Diagnose als auch der Therapie. Insbesondere bei der Behandlung von Krebserkrankungen hat ionisierende Strahlung einen hohen Stellenwert. Ionenstrahlen bieten gegenüber Photonenstrahlung den Vorteil, dass sie bei geeigneter Energie tief im Gewebe präzise eine hohe Dosis applizieren können und gleichzeitig das umliegende gesunde Gewebe schonen. Diese Art der Therapie bietet sich daher besonders für tiefliegende, operativ schwer zugängliche, solide Tumore, wie Hirntumore, an. Die hohe biologische Wirksamkeit der Schwerionenbestrahlung macht es außerdem möglich auch strahlenresistente Tumore effizient zu behandeln.

Neben den genannten exogenen Einflüssen gibt es eine ganze Reihe von endogenen Prozessen, die Schäden in der DNA zur Folge haben. Die Bandbreite der DNA-Schäden, die dabei entstehen, ist vielfältig. Während des normalen Zellmetabolismus werden reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS – *reactive oxygen species*) erzeugt, welche zu oxidativen Basenschäden oder weiteren Radikalen führen, die ihrerseits Schäden verursachen.

Zu den schwerwiegendsten Eingriffen in die Integrität des Genoms gehören die DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs), da durch sie Deletionen und Translokationen entstehen können. DSBs entstehen sowohl durch exogene Einflüsse, aber auch ganz gezielt endogen zum Beispiel bei Prozessen des Immunsystems wie der V(D)J-Rekombination oder bei der meiotischen Rekombination. Zusätzlich zu diesen beabsichtigten DSBs werden während der DNA Synthese DSBs endogen erzeugt, z.B. wenn Replikationsgabeln zusammenbrechen.

Der Zelle stehen zahlreiche Mechanismen der DNA Reparatur zur Verfügung, um auf DNA-Schäden zu reagieren. Die Reparatur ioneninduzierter DNA Schäden stellt dabei eine besondere Herausforderung dar, da durch die hohe Energiedeposition auf engem Raum verschiedenste DNA Schäden in räumlicher Nähe zu einander entstehen. Diese sogenannten komplexen DNA-Schäden enthalten neben DSBs beispielweise auch Einzelstrangbrüche (englisch: *single strand break* - SSB) und Basenschäden. Die Dichte der DNA Schäden ist neben der Schadensursache auch vom Ort der Schadensinduktion abhängig (Lorat et al, 2012). Beim Packungsgrad der DNA wird grundsätzlich zwischen aufgelockertem Euchromatin und dicht gepacktem Heterochromatin unterschieden. Die vorliegende Arbeit befasst sich speziell mit der räumlichen Dynamik von heterochromatinassoziierten DNA Schäden. Insbesondere die

Relokalisierung der heterochromatischen DNA Schäden in euchromatische Chromatinbereiche wird charakterisiert. Zunächst werden im Folgenden jedoch die physikalischen Grundlagen der Wirkung ionisierender Strahlung und deren biologische Wirkung erklärt.

2.1. Strahlenphysikalische Grundlagen

2.1.1. Ionisierende Strahlung

Unter dem Begriff Ionisierende Strahlung werden alle Strahlenarten zusammengefasst, die bei der Wechselwirkung mit Materie Elektronen aus der Atomhülle von Molekülen herausschlagen. Bei der ionisierenden Strahlung unterscheidet man zwischen elektromagnetischen Wellen/Photonenstrahlung und Teilchenstrahlung. Elektromagnetische Wellen niedriger Energie wie Radiowellen, sichtbares Licht und Infrarotstrahlung wirken nicht ionisierend, da ihre Energieübertragung nicht ausreicht die Bindungsenergie eines Elektrons zu überwinden. Erst Röntgen- (x-ray) und Gamma-Strahlung (γ -ray) ab einer Energie von einigen Zehn eV (entspricht $\lambda \sim 10^{-8}$ m) wirken ionisierend (Hall 2006). Diese beiden Strahlenarten unterscheiden sich nur im Ort ihrer Entstehung. Gamma-Strahlung wird als intranukleare Strahlung frei, wenn radioaktive Isotope eine energetisch niedrigere, stabilere Form einnehmen. Röntgenstrahlung ist dagegen extranuklear und kann kontrolliert in Röntgenröhren erzeugt werden. In einer Röntgenröhre werden im Vakuum durch die Spannung, die man an die Glühkathode anlegt Elektronen frei. Ein durch Hochspannung induziertes elektrisches Feld beschleunigt diese Elektronen auf eine feste Materie (Anode, z.B. Wolfram). Durch das abrupte Abbremsen geht ein Teil der kinetischen Energie der beschleunigten Elektronen in Röntgen- bzw. Bremsstrahlung über. Der verbleibende Anteil der Energie wird in Wärme umgewandelt.

Die Geschwindigkeit elektromagnetischer Wellen ist konstant und durch Gleichung (1) definiert.

$$c = \lambda \cdot f \quad (1)$$

c :	Lichtgeschwindigkeit	[m/s]
λ :	Wellenlänge	[m]
f :	Frequenz	[s ⁻¹]

Die Energie eines Photons ist durch Gleichung (2) definiert.

$$E = h \cdot f \quad (2)$$

E :	Energie	[J]
h :	Planckkonstante	[Js]
f :	Frequenz	[s ⁻¹]

Teilchenstrahlung umfasst unter anderem die Elektronen-, Protonen-, Neutronen-, Alpha- und Schwerionenstrahlung. Sie ist Teil der kosmischen Hintergrundstrahlung und der Sonnenwinde, entsteht bei

Kernzerfallsprozessen und kann an Einrichtungen wie der GSI künstlich erzeugt und kontrolliert werden. Ionenstrahlen werden ähnlich zu Röntgenphotonen ebenfalls im Vakuum und unter Anlegen eines elektromagnetischen Feldes in Teilchenbeschleunigern erzeugt.

2.1.2. Wechselwirkung ionisierender Strahlung mit Materie

Die Art und Weise wie elektromagnetische Wellen mit Materie interagieren hängt unter anderem von der Photonenenergie (siehe Abbildung 1) ab. Bei niedrigen Photonenenergien (< 1 MeV) kommt es vor allem zum Photoelektrischen Effekt. Dabei trifft ein Photon eines der inneren Elektronen mit höherer Bindungsenergie und wird vollständig absorbiert. Das Elektron wird durch die Energieübertragung aus der Atomhülle geschlagen und kann seinerseits weitere Ionisationen durchführen. Die kinetische Energie des freien Elektrons entspricht dabei der Energie des Photons abzüglich der Bindungsenergie. Die frei gewordene Stelle auf der inneren Schale des Atoms wird durch eines der freien Außenelektronen aus einer höheren Schale ersetzt. Die Energiedifferenz der beiden Schalen wird dabei als elektromagnetische Strahlung frei.

Bei höheren Photonenenergien (ca. 1 bis 10 MeV) dominiert der Compton Effekt. Dabei interagiert ein Photon mit einem Außenelektron und schlägt dieses aus seiner Schale, wobei das Photon einen Teil seiner kinetischen Energie an das Elektron abgibt. Das Photon wird dabei nicht vernichtet, sondern mit verminderter Energie (f') gestreut. Somit können sowohl das ausgeschlagene Sekundärelektron, als auch das Photon nach ihrer Interaktion weitere Ionisationen bewirken.

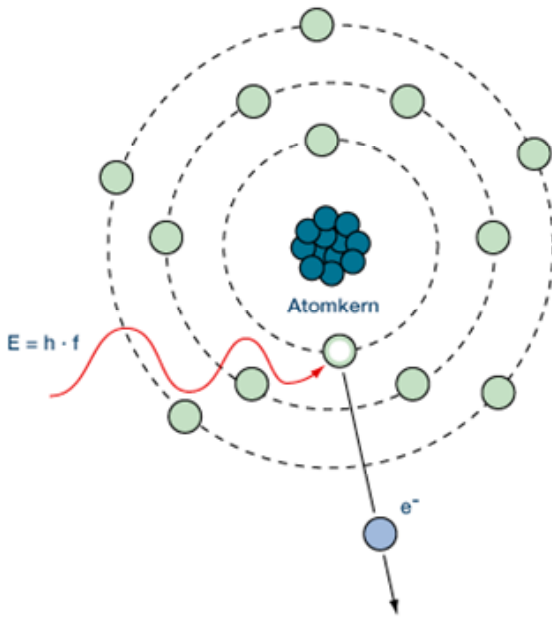
Bei sehr hohen Photonenenergien (ab ca. 10 MeV) kommt es überwiegend zur Paarbildung (Mindestenergie $> 1,02$ MeV). Dabei materialisiert sich das Photon unter Einfluss des Kernfeldes zu einem Elektron und einem Positron. Diese können über sehr hohe kinetische Energien verfügen und somit weitere Ionisationen bewirken.

Neben der Photonenenergie hat die Art des interagierenden Materials einen Einfluss auf die Wechselwirkung. Die Wahrscheinlichkeit der Interaktion steigt mit der Ordnungszahl des bestrahlten Moleküls.

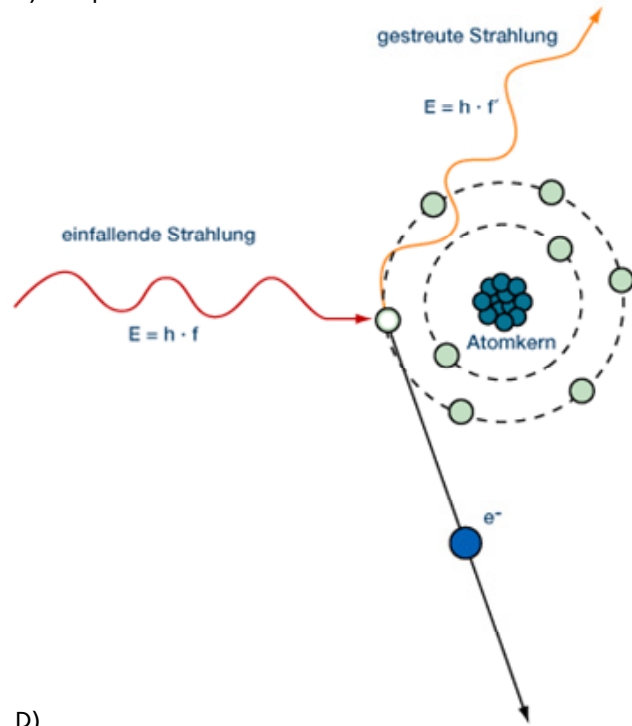
Munro identifizierte schon 1970 die DNA als strahlenempfindliche Komponente der Zelle. Die bei der Ionisation entstehenden Sekundärelektronen können die DNA entweder direkt oder indirekt schädigen (siehe Abbildung 2). Dünn ionisierende Strahlung wirkt überwiegend indirekt, während dicht ionisierende Strahlung hauptsächlich direkt Schäden erzeugt. Bei direkten Strahlungseffekten wird die DNA unmittelbar ionisiert und damit geschädigt. Diese Art der Interaktion ist typisch für Strahlung mit einem hohen linearen Energietransfer (LET) wie der Teilchenstrahlung. Elektromagnetische Strahlung wirkt sich vor allem indirekt auf die DNA aus. Die durch Ionisation entstehenden Sekundärelektronen interagieren mit Nicht-DNA-Molekülen (überwiegend Wasser) und erzeugen so ihrerseits geladene, hoch reaktive Moleküle. Diese Radikale schädigen in der Folge die DNA. Die Erzeugung eines Hydroxylradikals ($\text{OH}\cdot$) läuft in zwei sehr schnellen Schritten ab. Zunächst entsteht ein ionisches Radikal

indem das Wassermolekül durch das Sekundärelektron ionisiert wird: $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}^+ + \text{e}^-$. Dieses extrem kurzlebige Radikal (Lebenserwartung 10^{-10} s) wird zum Hydroxylradikal deprotoniert: $\text{H}_2\text{O}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_3\text{O}^+ + \text{OH}^\cdot$. Auch die Hydroxylradikale haben nur eine kurze Lebenserwartung (10^{-9} s), sind aber in der Lage die DNA gleich mehrfach zu schädigen, wenn sie nur wenige Nanometer von der DNA entfernt erzeugt werden (Goodhead et al, 1994).

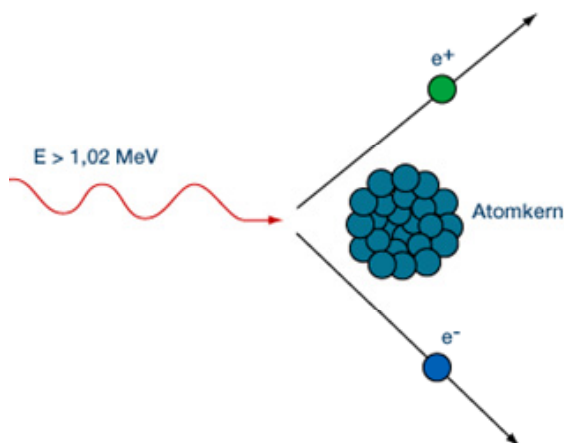
A) Photoelektrischer Effekt



B) Compton Effekt



C) Paarbildungseffekt



D)

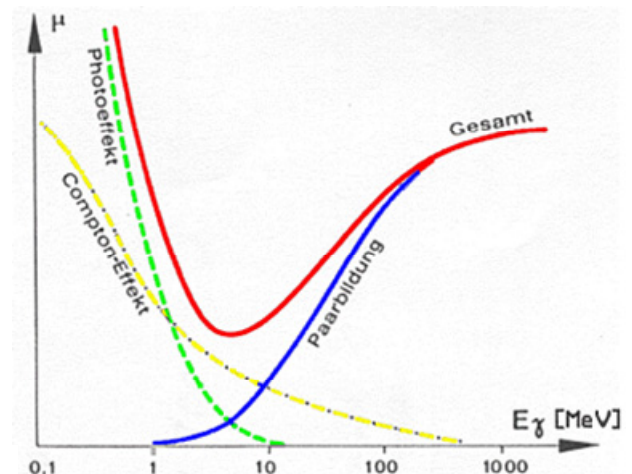


Abbildung 1: Wechselwirkungsprozesse elektromagnetischer Strahlung mit Materie.

E = Energie, h = Planckkonstante, f = Frequenz, e^- = Elektron, e^+ = Positron. A: Photoelektrischer Effekt: Ein Photon wird vollständig absorbiert und gibt dabei seine gesamte Energie an ein Elektron der inneren Schale ab. B: Compton Effekt: Ein Photon interagiert mit einem freien Orbitalelektron, gibt dabei einen Teil seiner Energie an dieses ab und wird selbst gestreut. C: Paarbildungseffekt: Ein Photon interagiert mit dem Atomkern und erzeugt in dessen Feld ein Elektron und ein Positron. D: Verlauf des Schwächungskoeffizienten μ als Summe seiner Anteile aus dem Photo-, Compton- und Paarbildungseffekt. Aufgetragen ist der Schwächungskoeffizient μ über der Energie E_γ des Photons. Der Schwächungskoeffizient μ ist abhängig von dem schwächenden Material und der Energie der Strahlung. Modifiziert nach www.onmeda.de/lexika/strahlenmedizin.

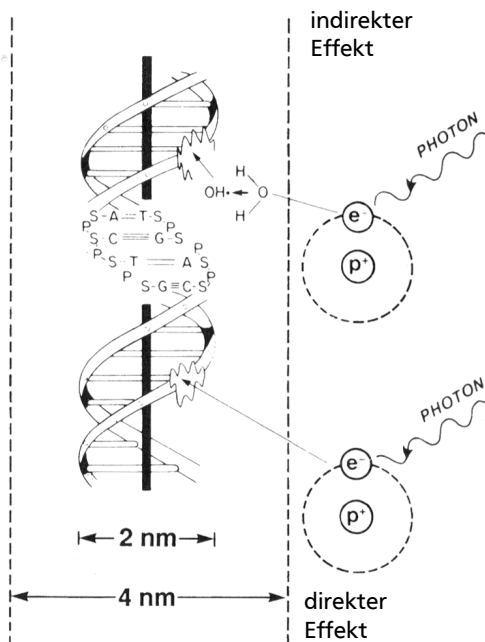


Abbildung 2: Direkter und indirekter Effekt ionisierender Strahlung auf die DNA.

Beim direkten Effekt interagiert das durch eine Ionisation frei gewordene Sekundärelektron direkt mit dem DNA Molekül und schädigt dieses. Beim indirekten Effekt kommt es zunächst zur Wechselwirkung zwischen dem Sekundärelektron und einem Wassermolekül. Dabei wird ein Hydroxylradikal (OH·) erzeugt, welches in der Folge mit der DNA interagiert (S = Zuckermolekül, p = Phosphatgruppe des DNA Rückgrats, A = Adenin, T = Thymin, G = Guanin, C = Cytosin). Modifiziert nach Hall 2006.

2.1.3. Dosis

Die durch primäre und sekundäre Teilchen deponierte Energie in Materie ist die Energiedosis (D). Sie ist definiert als aufgenommene Energie (E) pro Masse (M) (siehe Gleichung 3) und wird in Gray (Gy) angegeben.

$$D = \frac{E}{m} \quad (3)$$

D :	Dosis	[Gy]
E :	Energie	[J]
m :	Masse	[kg]

Photonen und die durch sie entstehenden Sekundärelektronen verteilen sich gleichmäßig über eine zu bestrahlende Fläche. Bei der Teilchenstrahlung hingegen konzentrieren sich die Ionisationsereignisse auf einen relativ engen Radius um deren Flugbahn. Die Teilchen schlagen so lange Elektronen entlang ihrer Trajektorie aus, bis ihre Energie zu niedrig für weitere Ionisationen ist und sie in der Materie stoppen. Die Energiedeposition zwischen locker ionisierender, elektromagnetischer Strahlung und dicht ionisierender Teilchenstrahlung unterscheidet sich räumlich also erheblich. Abbildung 3 zeigt wie sich die Dosisverteilung dieser beiden Strahlenarten unterscheidet.

Im Querschnitt einer Teilchenflugbahn nimmt die Dosis mit $1/r^2$ (r = Radius) zu den Rändern hin ab. Das heißt die Dosis ist im Kern der Ionenspurs um ein vielfaches höher und nimmt zur Peripherie hin ab. Je höher die Energie des Ions, desto größer die Reichweite der Sekundärelektronen (siehe Abbildung 3). Gleichung (4) definiert die maximale Reichweite (R_{\max}) in Mikrometern, abhängig von der Energie (E) des Ions in MeV/u.

$$R_{\max} = 0,05 \cdot E^{1,7} \quad (4)$$

R_{\max} : max. Reichweite e^- [μm]

E : Energie des Ions [MeV/u]

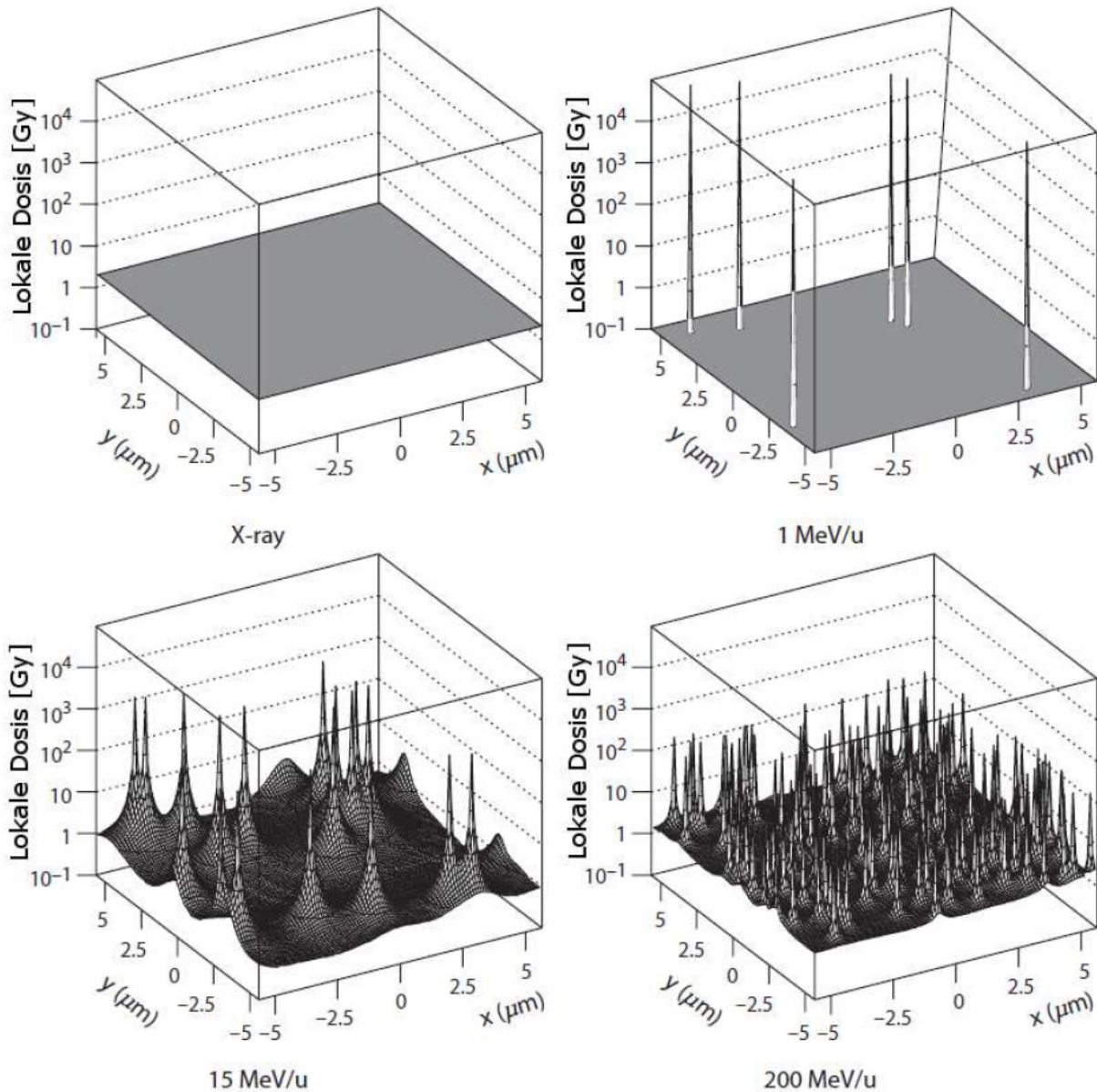


Abbildung 3: Flächendosisprofile für Röntgenstrahlung (X-ray) und Kohlenstoffionen unterschiedlicher Energien. Dargestellt ist jeweils das Flächendosisprofil für 2 Gy der unterschiedlichen Strahlungsarten. Für Röntgenstrahlung ist die Dosis über die gesamte Fläche homogen. Kohlenstoffionen mit einer Energie von 1 MeV/u erzeugen eine sehr hohe Dosis (mehrere kGy) wenige Nanometer um ihre Flugbahn. Ionen mit 15 MeV/u verteilen ihre Dosis in einem größeren Radius, der Hauptanteil wird aber weiterhin im Zentrum der Trajektorie deponiert. Je höher die Energien, umso mehr muss für die gleiche Dosis die Teilchenzahl erhöht werden (hier am Beispiel von 200 MeV/u). Durch die hohe Ionendichte und die Reichweite der Sekundärelektronen beginnen die Ionenspuren zu überlappen. Die Maximaldosen im Kern der Ionenspuren sind geringer als bei niedrigerer Teilchenenergie. Je höher die Teilchenenergie, desto breiter die Dosisverteilung. Aus Scholz et al. 2003.

Bei Ionen mit niedrigen Energien ist die Ionisationsspur also sehr schmal, die Dosis im Zentrum der Spur dafür sehr hoch (siehe Abbildung 3, 1 MeV) während bei hohen Ionenenergien die Ionisations-

spur weiter wird, die Dosis im Zentrum dabei aber sinkt (siehe Abbildung 3, 200 MeV). Treffen mehrere Ionen in räumlicher Nähe zu einander auf Materie, können deren Ionisationsspuren sich gegenseitig überlagern, wobei die Dosis aufsummiert wird.

Die Verteilung der Ionisationen und somit der Energieabgabe entlang der Trajektorie des Ions wird durch den linearen Energietransfer (LET) beschrieben. Dieser gibt die Energieabgabe pro Wegstrecke des Ions an. Gleichung (5) definiert den LET in Abhängigkeit der effektiven Kernladung und der Geschwindigkeit des Teilchens.

$$LET = \frac{dE}{dx} \propto \frac{Z_{eff}^2}{\beta^2} \quad (5)$$

LET : linearer Energietransfer [keV/ μm]

E : Energie des Ions [keV]

x : Wegstrecke des Ions [μm]

Z_{eff} : effektive Ladung

β : $\beta = \frac{v}{c}$; v : Geschwindigkeit; c : Lichtgeschwindigkeit

Je höher die spezifische Energie des Ions, desto geringer die Energieabgabe. Beim Eindringen in Materie haben die Teilchen ihre maximale Geschwindigkeit und interagieren daher seltener mit dieser. Je weiter das Ion in Materie eindringt, desto langsamer wird es und desto mehr Energie gibt es ab. Ab einer bestimmten Eindringtiefe nimmt die Interaktion des Ions mit der Materie rasch zu, weil die Geschwindigkeit und die Energie des Ions stark abnehmen. Dadurch steigen der LET und die lokale Dosis sehr stark an. Den Punkt höchster Dosisdeposition nennt man *Bragg-Peak*. Über diesen Punkt hinaus nimmt das Ion Elektronen auf. Dadurch sinkt die effektive Ladung und in der Folge auch die Dosis rasch ab (siehe Abbildung 4), bis das Ion kurz nach Erreichen des *Bragg-Peak* abstoppt. Je höher die Anfangsenergie des Ions, desto tiefer dringt es in Gewebe ein. Ionen zeigen im Vergleich zu Photonen ein invertiertes Tiefendosisprofil (siehe Abbildung 4). Letztere deponieren die meiste Energie kurz nach dem Eindringen in das Gewebe. Ionen haben daher entscheidende Vorteile für die Bestrahlung von tief im Gewebe liegenden Tumoren. Durch Variation der Energie lassen sich der *Bragg-Peak* und damit die höchste Dosis bis in das Tumorgewebe hinein verschieben, während das Gewebe vor und hinter dem Tumor geschont wird. Dagegen belasten Photonen auf Grund ihres Dosisprofils sehr stark das vor dem Tumor liegende, gesunde Gewebe.

Die räumliche Verteilung der Ionen bei der Bestrahlung mit Teilchenbeschleunigern erfolgt üblicherweise zufällig. Die Dosis wird dann anhand des LETs und der Fluenz (F , Anzahl der Ionen pro cm^2) berechnet (siehe Gleichung (6)).

$$D = 1,602 \cdot 10^{-9} \left(\frac{\mu\text{m} \cdot \text{g} \cdot \text{J}}{\text{keV} \cdot \text{cm} \cdot \text{kg}} \right) \cdot F \cdot LET \cdot \frac{1}{\rho} \quad (6)$$

D :	Dosis	[Gy]
F :	Fluenz	[1/cm ²]
LET :	linearer Energietransfer	[keV/μm]
ρ :	Dichte der Materie	[g/cm ³]

Menschliches Gewebe hat einen sehr hohen Wasseranteil, daher nimmt man für die Zell- und Gewebebestrahlung die Dichte (ρ) von Wasser an. Neben der erwähnten zufälligen Bestrahlung mit Ionen bietet die GSI Mikrosonde die Möglichkeit einzelne Ionen gezielt im Gewebe zu platzieren. Dazu werden die Ionen mit Hilfe von Magneten mit solcher Präzision abgelenkt, dass es möglich ist, Bereiche des Zellkerns gezielt zu bestrahlen (Zielgenauigkeit: 670 ± 400 nm STD, Voss et al. 2011). Die Ionen erzeugen Sekundärelektronen, wenn sie das Austrittsfenster passieren. Diese können detektiert werden und machen es so möglich nach der gewünschten Zahl von Ionen den Strahl automatisch durch einen Deflektor zu unterbrechen (Fischer et al. 2003, Heiss et al. 2006).

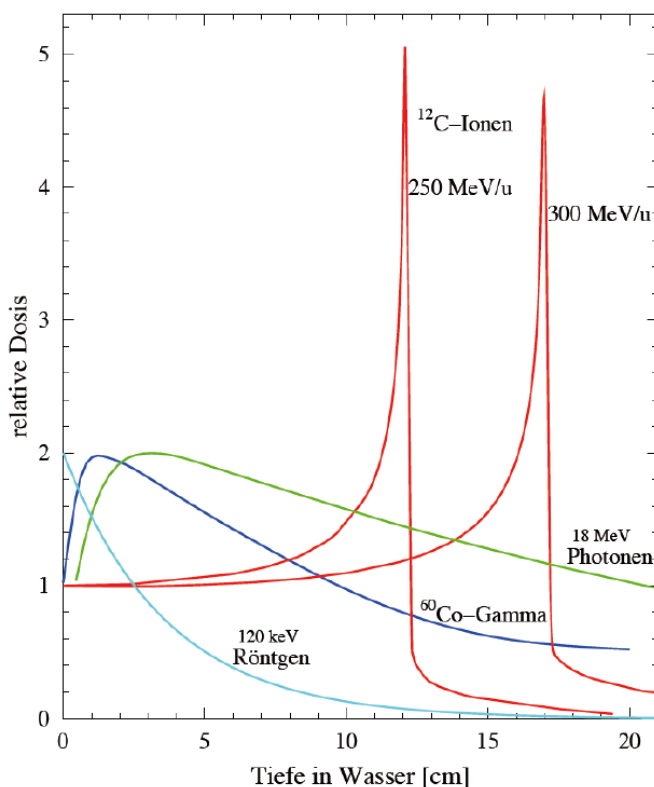


Abbildung 4: Tiefendosisprofil von Photonen und Ionen unterschiedlicher Energien. Ionen haben im Vergleich zu Photonen ein invertiertes Tiefendosisprofil. Während letztere kurz nach dem Eindringen in Materie die meiste Energie deponieren, zeigen Ionen einen so genannten *Bragg Peak*, den Punkt höchster Energieabgabe tief im Gewebe. Je höher dabei die ursprüngliche Energie des Ions ist, desto tiefer dringt es ins Gewebe ein. Aus Kraft 2008.

2.2. Strahlenbiologische Grundlagen

2.2.1. Schadensarten

Ionisierende Strahlung ruft ein breites Spektrum von DNA Schäden hervor (siehe Abbildung 5). Die einzelnen Schadensarten sind unterschiedlich häufig und von unterschiedlichem Risiko für die Integrität der DNA. Schäden wie Basenveränderungen oder -verluste, Zuckerschäden und Einzelstrangbrüche kommen in großer Zahl vor und können relativ leicht repariert werden (Ward et al. 1995). DSBs kommen weitaus seltener vor, stellen aber das deutlich größere Risiko und eine größere Herausforderung für die Reparatur dar, weil beide DNA Stränge gebrochen sind. Somit liegt keine direkte Vorlage für die Reparatur vor. Außerdem können die Bruchenden im Fall eines DSBs auseinander driften. Pro Gy Röntgenstrahlung werden 1000 bis 2000 Basenschäden, 600 bis 1000 SSBs und 16 bis 40 DSBs pro Zellkern induziert (Ward et al. 1988).

Durch dicht ionisierende Strahlung kann es dazu kommen, dass mehrere, unterschiedliche DNA Schäden in räumlicher Nähe zu einander auftreten. Man spricht in diesem Fall von komplexen DNA Schäden (*clustered damage*; Goodhead et al. 1993) oder *locally multiply damaged sites* (LMDS; Ward et al. 1994), wenn sich die Schäden innerhalb von ein bis zwei Helixwindungen der DNA konzentrieren. Durch nahe beieinander auftretende Einzelstrangbrüche kann es außerdem dazu kommen, dass sich die betroffenen DNA Stränge von einander trennen und aus einfach zu reparierenden SSBs ein DSB wird, der weitaus schwerer zu reparieren ist. Komplexe Schäden sind allgemein schwieriger zu reparieren als isoliert auftretende Schäden (Asaithamby et al. 2011).

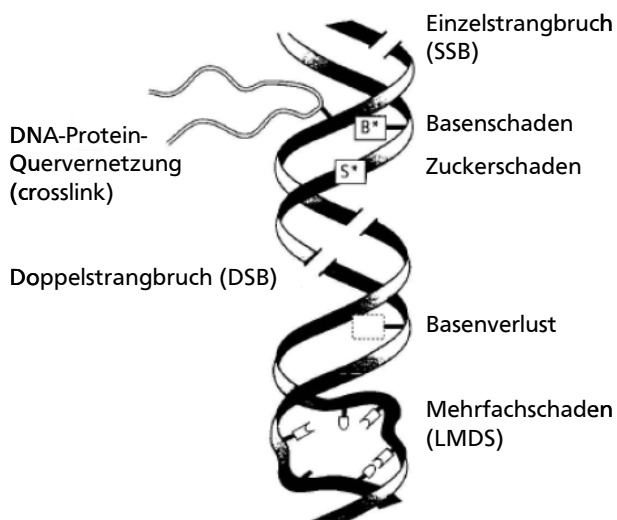


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Vielfalt von DNA Schäden (durch ionisierende Strahlung). Modifiziert nach Kaufmann et al. 2001.

Bei gleicher Dosis kann sich dicht ionisierende Strahlung daher weitaus negativer auf das Zellüberleben auswirken als dünn ionisierende Strahlung. Um diesem Umstand gerecht zu werden definiert man neben der Dosis die relative biologische Wirksamkeit (RBW, Gleichung (7)). Sie gibt das Verhältnis zwischen der Dosis einer Referenzstrahlung (D_r , meist Röntgenstrahlung) und der Dosis der Ionenstrahlung (D_i) an, durch die der gleiche Effekt (Isoeffekt) erzielt wird.

$$RBW = \frac{D_\gamma}{D_I} \quad (7)$$

RBW : relative biologische Wirksamkeit

D_γ : Referenzdosis [Gy]

D_I : Ionendosis [Gy]

Die RBW hängt jedoch davon ab, welchen Vergleichswert man wählt. Abbildung 6 zeigt, dass die RBW mit steigender Dosis fällt. Das liegt daran, dass die Überlebenskurven nach Ionen- bzw. Röntgenbestrahlung nicht parallel verlaufen. Schwerere Ionen als Kohlenstoff mit einem höheren LET haben nicht notwendigerweise eine höhere RBW. Bei gleicher Dosis sinkt durch den hohen LET die Fluenz, wodurch weniger Zellen bestrahlt werden. Die Zellen, die getroffen werden, werden dagegen mit einer höheren Dosis bestrahlt, als für die Inaktivierung der Zelle nötig wäre. Durch diesen „overkill“ Effekt sinkt die Effektivität der Ionenbestrahlung. Zusätzlich ist die RBW von weiteren Faktoren wie der Zell-sorte, der Oxigenierung, der Dosisfraktionierung, dem gemessenen Endpunkt und der Zellzyklusphase bei Bestrahlung abhängig.

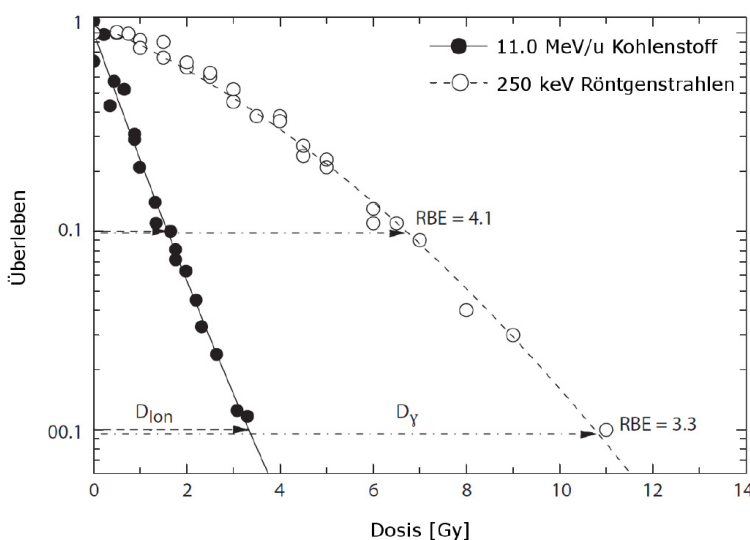


Abbildung 6: Vergleich der RBW von Kohlenstoffionen und Röntgenstrahlung. Aufgetragen sind die Überlebenskurven von Hamsterzellen (CHO-K1) nach unterschiedlichen Röntgen- bzw. Ionendosen. Bei gleicher Dosis wirken sich Kohlenstoffionen stärker auf das Zellüberleben aus als Röntgenstrahlung. Die RBW (englisch: RBE – relative biological effectiveness) hängt davon ab, welcher Vergleichswert gewählt wird. Die Überlebenskurve für Röntgenstrahlung ist nicht linear, sondern folgt einem linearquadratischen Verlauf. Daher fällt die RBW von 4,1 für 10 % Überleben auf 3,3 für 1 % Überleben ab. Bei niedrigeren Dosen ist die RBW von Kohlenstoffionen also höher als bei hohen Dosen. Aus Scholz 2003.

2.2.2. Zelluläre Reaktion auf DNA Schäden

Wie bereits erwähnt stellen DSBs die kritischsten DNA Schäden dar (Ward et al. 1975). Ihr Auftreten löst eine Vielzahl von Reaktionskaskaden in der Zelle aus (siehe Abbildung 7). Sensorproteine erkennen die DSBs und geben die Information an signalverstärkende Proteine weiter, die sie wiederum an Effektorproteine weiterleiten (Khanna et al. 2001, Bakkenist et al. 2003, Shiloh et al. 2003). Diese Effektoren steuern die verschiedenen Reaktionswege der Zelle an. Während Reparaturfaktoren aktiviert werden um den Schaden zu beheben, wird gleichzeitig überprüft, ob der Zellzyklus angehalten werden muss, um der Reparatur mehr Zeit zu verschaffen und zu verhindern, dass die Zelle sich mit zu

vielen DNA Schäden teilt. Schlägt die Reparatur fehl, wird die Apoptose als programmierter Zelltod eingeleitet (Khanna et al. 2001, Jeggo et al. 2006) und die beschädigte Zelle so aus dem Zellverband entfernt.

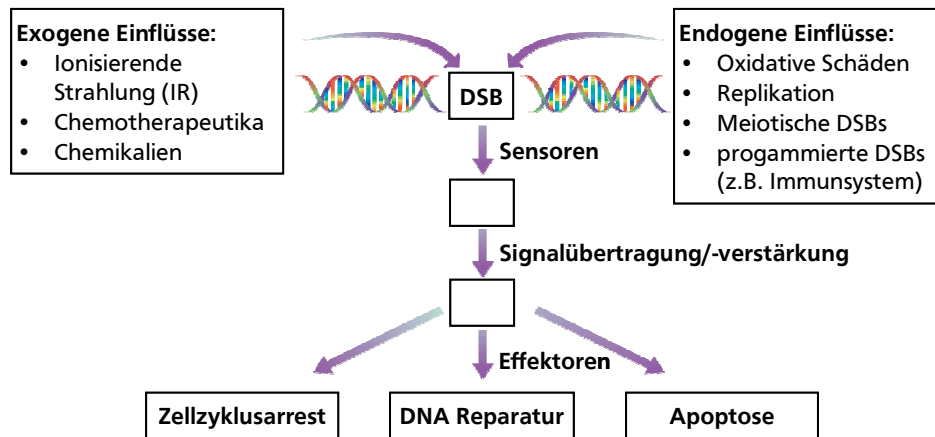


Abbildung 7: Schematische Darstellung der zellulären Schadensantwort

Die durch endogene und exogene Einflüsse induzierten DSBs werden durch Sensorproteine erkannt. Die Information wird an signalübertragende Proteine weitergeben, die die Schadensantwort gleichzeitig verstärken. Effektorproteine leiten schließlich die verschiedenen Reaktionsmöglichkeiten der Zelle, wie Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur oder Apoptose, ein. Frei nach Khanna et al. 2001.

2.2.3. Reparatur

Welcher Reparaturmechanismus Verwendung findet hängt u.A. von der Art des DNA Schadens, der Zellzyklusphase und dem Organismus ab. Für die Reparatur von DSB stehen im Wesentlichen zwei Hauptreparaturwege zur Verfügung: die Homologe Rekombination (HR) und die Nicht-Homologe-End-Verknüpfung (*Non Homologous End Joining*, im Folgenden NHEJ) (siehe Abbildung 9). In niederen Eukaryoten (z.B. Hefe) dient die HR als Hauptreparaturweg und steht diesen Organismen während des gesamten Zellzyklus zur Verfügung. In höheren Eukaryoten ist die HR dagegen auf die S- und die G2-Phase begrenzt, da nur dann ausreichende homologe Sequenzen auf den Schwesterchromatiden vorliegen (siehe Abbildung 8). Durch diese exakte Reparaturvorlage gilt die HR als fehlerfreier Reparaturweg. Das NHEJ steht hingegen auch in höheren Eukaryoten über den ganzen Zellzyklus hinweg zur Verfügung (Rothkamm et al. 2003, Hinz et al. 2005), da dieser Reparaturweg keinerlei Vorlagen benötigt. Das Verbinden der Bruchenden ohne Vorlage macht das NHEJ jedoch zu einem fehlerbehafteten Reparaturweg (Khanna et al. 2001, Iijima et al. 2008, Kinner et al. 2008).

Das NHEJ verbindet DNA Enden entweder direkt (*blunt ends*) oder nach kurzer Resektion von überstehenden Einzelsträngen ohne die Notwendigkeit einer homologen Matrize. Zunächst bindet an jedes Bruchende ein Heterodimer aus KU70 und KU80, welches die DNA Enden vor der Degradierung schützt (Liang et al. 1996, Weterings et al. 2008). Diese Anlagerung bewirkt außerdem die Rekrutierung der katalytischen Untereinheit der DNA abhängigen Proteinkinase (DNA-PK_{CS}) an die Bruchenden, welche zusammen mit dem KU-Heterodimer den vollständigen DNA-PK Enzymkomplex bildet.

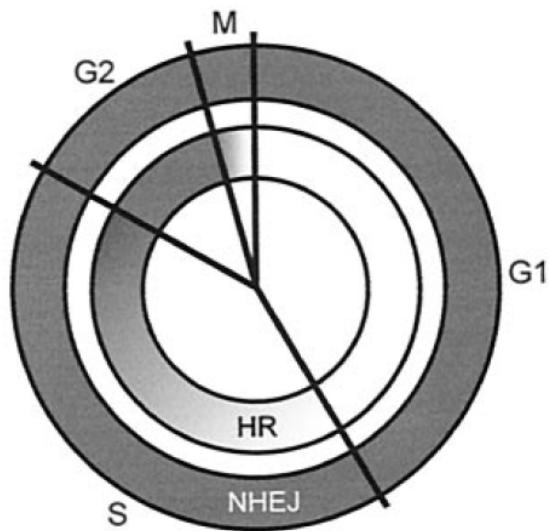


Abbildung 8: Modell des Anteils der HR bzw. des NHEJ in den einzelnen Phasen des Zellzyklus. In der G1 und der frühen S Phase dominiert das NHEJ, während in der späten S und G2 Phase sowohl HR als auch NHEJ zur DSB Reparatur beitragen. Aus Rothkamm et al. 2003.

Die beiden gebundenen DNA-PK Komplexe halten die Bruchenden zusammen (Meek et al. 2008). DNA-PK ist in der Lage sich selbst zu phosphorylieren und damit zu aktivieren (Burma et al. 2004, Uematsu et al. 2007). Sollten Einzelstrangüberhänge oder Haarnadelstrukturen die direkte Ligation der Bruchenden verhindern aktiviert DNA-PK die Endonuklease Artemis, welche die störenden Strukturen abschneidet (Ma et al. 2002). Schließlich werden die Bruchenden durch einen Ligasekomplex aus der DNA-Ligase IV, XRCC4 und XLF verbunden (Grawunder et al 1998, Jackson et al. 2002, Ahnesorg et al. 2006, Uematsu et al. 2007). Durch das potentielle Abschneiden überstehender einzelsträngiger Bereiche können Nukleotide verloren gehen.

Die Homologe Rekombination (HR) ist dagegen durch die Verwendung einer homologen Vorlage ein fehlerfreier Reparaturmechanismus, im Gegenzug aber auf die S und G2 Phase beschränkt. Zunächst bindet der MRN Komplex die Bruchenden (Tsuchi et al. 2002) und hält diese als molekulare Klammer in räumlicher Nähe zu einander (Nakamura et al. 2010). Die Bindung von MRN an die Bruchenden rekrutiert außerdem ATM an den Schaden (Lee et al. 2005). An der 5'-3'-Resektion der Bruchenden sind mehrere Nukleasen wie MRE11, CtIP und EXO1 beteiligt (Mimitou et al. 2009). RPA (*replication protein A*) bindet die entstandenen 3'-Einzelstrangüberhänge, stabilisiert diese und verhindert so, dass es zu störenden Sekundärstrukturen kommt (Binz et al. 2004). Durch die einzelsträngigen Bereiche wird außerdem die Kinase ATR (*ATM and Rad3 related*) aktiviert, die wiederum CHK1 phosphoryliert (Wang et al. 2004), welches BRCA2 reguliert (*breast cancer 2*) (Bahassi et al. 2008). Dieses rekrutiert RAD51 zum Bruch, welches RPA ersetzt und den Rad51-Nukleoproteinkomplex bildet (Pellegrini et al. et al. 2002, Thorslund et al. 2007, San Filippo et al. 2008). Nach erfolgreicher Homologiesuche wandert der Einzelstrang in den homologen Doppelstrang der unbeschädigten Schwesterchromatide ein. Anhand dieser Matrize integriert die DNA-Polymerase I die fehlenden Nukleotide (Li et al. 2008). Schließlich verbindet die DNA Ligase I die Stränge und die *Holliday Junction* wird aufgelöst (Holthausen et al. 2010).

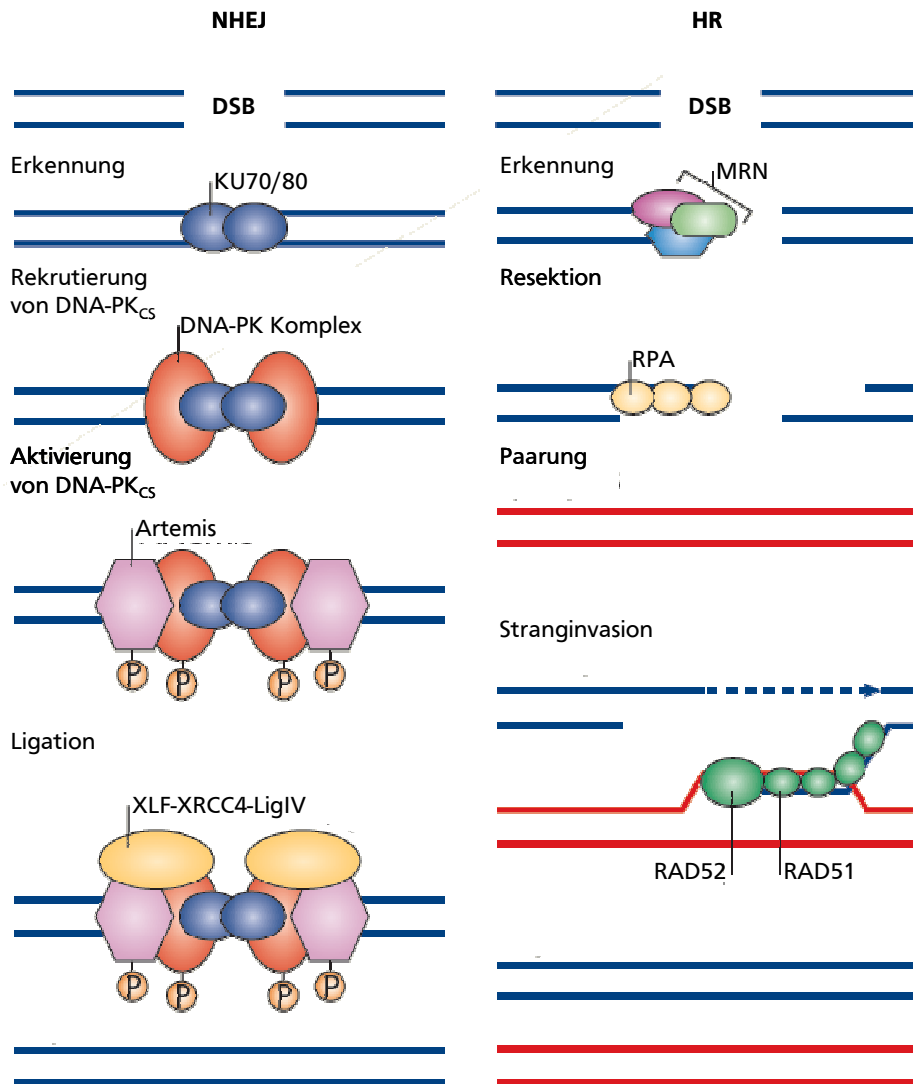


Abbildung 9: Vereinfachte Darstellung des NHEJ und der HR

NHEJ: KU70/80 erkennt und markiert die DSB Enden, DNA-PK_{CS} wird rekrutiert und formt zusammen mit dem KU Heterodimer den DNA-PK Komplex. Phosphoryliertes/aktiviertes DNA-PK rekrutiert XRCC4, DNA Ligase IV, XLF und Artemis, welche die Stränge ligieren.

HR: Der MRN Komplex erkennt die Bruchenden und resektiert diese (an der Resektion sind auch andere Nukleasen wie CtIP beteiligt). RPA bindet die einzelsträngigen Bereiche, Rad51 ersetzt RPA und wandert zusammen mit Rad52 in den homologen Doppelstrang ein. Ein „D-loop“ und eine „Holliday Junction“ entstehen. Die fehlenden DNA Bereiche werden anhand der homologen Vorlage neu synthetisiert bevor die DNA ligiert wird und sich die DNA Stränge wieder trennen. Modifiziert nach Misteli et al. 2009.

Wie bereits beschrieben entstehen durch ionisierende Strahlung jedoch nicht nur Doppelstrangbrüche. Die Basenexzisionsreparatur (BER) repariert Einzelstrangbrüche und beschädigte Basen, z.B. oxidierte Basen sowie Apurin- und Apyrimidinstellen. DNA Glykosylasen erkennen die fehlerhaften Basen und schneiden diese aus (Krokan et al. 2002). Die AP-Endonuklease erzeugt anschließend ein 3'OH-Ende und ein 5'Deoxyribosephosphat-Ende (Doetsch et al. 1990). In die entstandene Lücke setzt die DNA-Polymerase β ein neues Nukleotid ein, wobei sie am 5'-Ende schneidet und ein 5'-Phosphat-Ende entsteht (Matsumoto et al. 1995, Prasad et al. 1998). Schließlich verbindet die Ligase I die DNA Stränge (Hegde et al. 2008).

Strukturverändernde DNA Schäden, wie sie z.B. durch natürliche UV Strahlung erzeugt werden (z.B. Thymidin-Dimere und Inter-Strang-Vernetzungen in der DNA) werden durch die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) repariert. Bei der NER unterscheidet man die globale genomische Reparatur, durch die auch inaktive Gene repariert werden können, und die transkriptionsgekoppelte Reparatur, die zum Einsatz kommt, wenn die RNA-Polymerase II bei der Transkription auf einen DNA-Schaden trifft. Diese beiden NER-Wege unterscheiden sich nur durch die Erkennung des DNA-Schadens und laufen in der Folge gleich ab. Wurde ein solcher Schaden erkannt, entwinden die Helikasen XPB und XPD die DNA etwa 30 bp um den Schaden. Die dabei offen gelegten einzelsträngigen Bereiche werden durch RPA und XPA stabilisiert. Die Nukleotide um den Schaden werden durch die Nukleasen ERCC1/XPF und XPG ausgeschnitten, neue Nukleotide durch Polymerasen eingefügt und der Strang durch Ligase I oder Ligase III verknüpft (Diderich et al. 2011).

2.2.4. Die Rolle des Chromatins

Die DNA liegt in einer hochgeordneten Struktur im Zellkern vor. Der Komplex aus DNA, Histonen und Nicht-Histon-Proteinen wird Chromatin genannt (siehe Abbildung 10). Der DNA Doppelstrang windet sich um jedes Histon-Oktamer mit je 146 bp ca. 1,7-mal (Luger et al. 1997). Der Komplex aus DNA und Histon-Oktamer wird Nukleosom genannt und vom Linker-Histon H1 stabilisiert (Hayes et al. 1993). Die Nukleosomen werden durch Linker-DNA variabler Länge (Wu et al. 2007) zu einer Art Perlenschnur verbunden (Olins et al. 1974, Woodcock et al. 1976). Jedes Histon-Oktamer besteht aus je zwei Histonen H2A, H2B, H3 und H4. Benachbarte Nukleosomen sind in der Lage zu interagieren und sorgen für eine weitere Verdrillung dieser Perlenschnur zu einer kompakten Chromatinfaser (Happel et al. 2009, McBryant et al. 2006).

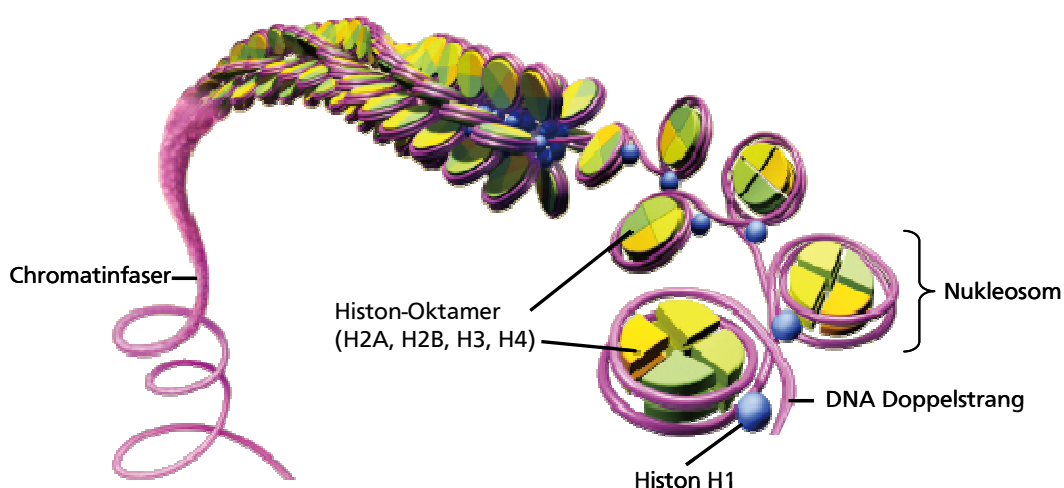


Abbildung 10: Struktur des Chromatins.

Der DNA-Doppelstrang ist spulenartig um die Histonoktamere gewickelt. Der Komplex aus DNA und Histonen wird Nukleosom genannt und durch das Histon H1 zusammen gehalten. Jedes der Nukleosomen besteht aus je zwei Histonen H2A, H2B, H3 und H4. Die einzelnen Nukleosomen werden durch Linker-DNA miteinander verbunden. Die so entstehende „Perlenschnurstruktur“ verdrillt sich weiter und bildet eine kompakte Chromatinfaser.

Modifiziert nach www.rikenresearch.riken.jp/images/figures

Die Kompaktierung des Chromatins ist nicht statisch, sondern lässt sich durch Histonmodifikationen und Chromatinremodeler verändern (Hargreaves et al. 2011). Inaktive Gene liegen kondensiert vor, während das Chromatin um transkribierte Gene geöffnet wird. Auch für die DNA Reparatur wird das Chromatin aufgelockert (review: Xu et al. 2011), man spricht von Dekondensation. Außerdem nimmt die Zellzyklusphase Einfluss auf die Chromatinkompaktierung. So liegt in der Mitose die DNA sehr kompakt vor (Belmont et al. 2006) während sie sich für die Replikation in der S-Phase öffnet.

Grundsätzlich unterscheidet man je nach Grad der Kompaktierung zwei Chromatinarten: das offene Euchromatin (EC) und das dicht gepackte Heterochromatin (HC) (siehe Abbildung 11). Während das Euchromatin durch einen hohen Acetylierungsgrad seiner Histone gekennzeichnet ist, ist das Heterochromatin an der Trimethylierung des Lysins 9 an Histon 3 (Trojer et al. 2007, Kouzarides et al. 2007) und der Markierung mit dem Heterochromatin Protein 1 (HP1) (Honda et al. 2012) erkennbar. Besonders die HP1 Isoform HP1 α ist im HC angereichert (Bolderson et al. 2012).

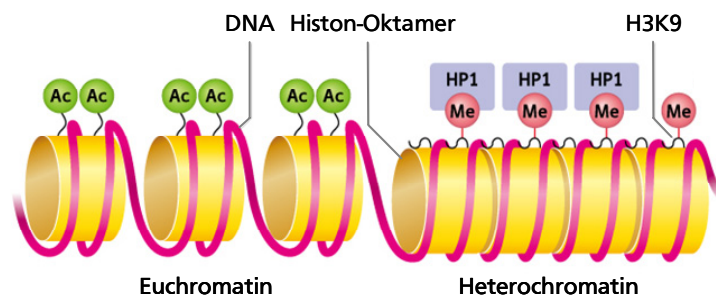


Abbildung 11: Unterschiede zwischen Eu- und Heterochromatin

Das Euchromatin weist eine lockere Packung auf und ist durch einen hohen Acetylierungsgrad der Histone gekennzeichnet. Dagegen liegt die DNA im Heterochromatin stark kondensiert vor. Dieses ist durch einen hohen Methylierungsgrad (speziell H3K9me3) und durch die Bindung des Heterochromatin-Bildungsfaktors HP1 (speziell HP1 α) gekennzeichnet.

Modifiziert nach www.rikenresearch.riken.jp/images/figures

Das HC wurde bereits 1928 als besonderer Bereich des Zellkerns beschrieben, welcher über den gesamten Zellzyklus hinweg durch seine intensive Anfärbung sichtbar bleibt (Heitz et al. 1928). 1966 definiert Brown et al. den Unterschied zwischen konstitutionellem und fakultativem Heterochromatin. Konstitutionelles HC zeichnet sich durch eine sich ständig wiederholende Sequenzen aus und ist vor allem in den Telomeren und den Zentromeren zu finden. Die repetitiven Sequenzen erleichtern die Bildung des Heterochromatins. Durch die starke Kondensierung dieser Bereiche werden die enthaltenen Gene dauerhaft blockiert. Das fakultative Heterochromatin stellt dagegen eine vorübergehende bzw. gewebespezifische Stilllegung von Genen dar. Das bekannteste Beispiel dieser Form des HC ist das inaktivierte X-Chromosom weiblicher Säugetiere (Barr-Körperchen).

Die Art des Chromatins nimmt nicht nur Einfluss auf die Transkription, sondern auch auf die DNA Reparatur. DSB Reparaturanalysen nach Röntgenbestrahlung zeigen ein biphasisches Verhalten (siehe Abbildung 12) mit einer schnellen Phase, in der innerhalb der ersten Stunden nach Bestrahlung die Majorität der DSBs (75 – 90 %) repariert wird und einer langsamen Phase von mehreren Tagen, in der

die verbleibenden DSBs repariert werden. Die schnelle Phase wird den DSBs im locker gepackten EC zugeordnet während die heterochromatischen DSBs mit langsamen Kinetiken repariert werden (Goodarzi et al. 2010).

Wie bereits erwähnt stellt das NHEJ den dominanten Reparaturweg in Säugerzellen dar, während die HR auf die späte S und die G2 Phase beschränkt ist. Der hier beschriebene, schnelle Reparaturweg wird generell durch das NHEJ gestellt. Die langsame Reparaturkomponente ist abhängig von der Zellzyklusphase. In G2 Zellen führt die HR die langsame/heterochromatinassoziierte Reparatur aus (Beucher et al. 2009) während in der G1 Phase die langsame Reparatur vom NHEJ übernommen wird (Ribalbo et al. 2004). Die DSBs, welche mit einer langsamen Kinetik repariert werden, unterliegen jedoch generell einer Prozessierung der DSB-Enden. Dies gilt sowohl für die HR in G2, als auch für das NHEJ der langsam reparierenden DSBs in G1. Diese ist generell abhängig von ATM was den Reparaturdefekt der langsamen Komponente in ATM defizienten Zellen erklärt (siehe Abbildung 12). Die Reparatur im HC scheint allgemein komplexer (Falk et al. 2013, review: Price et al. 2013). Dadurch kommt es im HC zu erhöhten Mutationsraten (Schuster-Böckler et al. 2012).

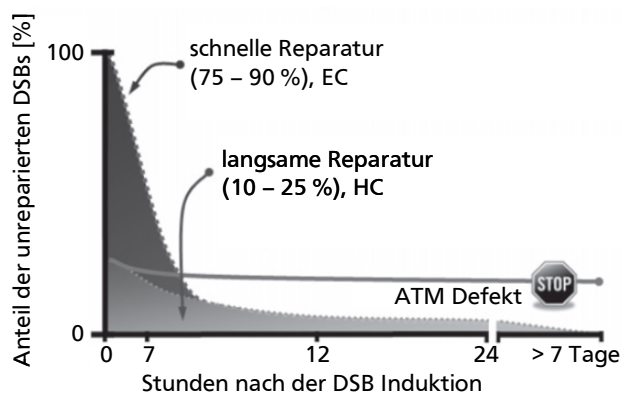


Abbildung 12: Anteile der langsamen und der schnellen Komponente der DSB Reparatur nach Röntgenbestrahlung.

Die meisten DSBs werden schnell innerhalb der ersten 4 bis 6 h nach Induktion repariert. Dabei handelt es sich um euchromatische (EC) DSBs. Heterochromatische DSBs sind die Minderheit, werden jedoch deutlich langsamer repariert. Ohne ATM ist die langsame Reparaturkomponente stark eingeschränkt. Verändert nach Goodarzi et al. 2010.

Bei der Bestrahlung mit schweren Ionen kommt es vermehrt zu komplexen DNA Schäden und der Reparaturanteil der HR steigt gegenüber der Röntgenbestrahlung erheblich an (Woodbine et al. 2011). Nach Schadensinduktion mit Ionenstrahlen kommt es neben der S und G2 Phase auch in der G1 Phase zur Resektion (Averbeck et al. 2011). Bei komplexen bzw. heterochromatischen DNA Schäden scheint die langsame Reparatur und damit in G2 die HR begünstigt (Neal et al. 2011, Shibata et al. 2011).

2.2.5. Die Rolle der PIK-Kinasen

Die Familie der PIK-Kinasen (PIKK, *phosphatidylinositol 3-kinase related protein kinases*) umfasst unter anderem ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), ATR (*ATM- and Rad-3-related*) und DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*). Alle drei Kinasen sind in der Lage als Antwort auf DSBs das Histon H2AX an Ser139 zu phosphorylieren (Kinner et al. 2008) und spielen entscheidende Rollen in der DNA Reparatur und Zellzykluskontrolle. ATM, ATR und DNA-PK sind teilweise redundant und beeinflussen sich

gegenseitig durch wechselseitige Phosphorylierung (Chen et al. 2007, Solier et al. 2009) und die Regulation der jeweiligen Expression (Chan et al. 1998, Peng et al. 2005, Shrivastav et al. 2009).

Mutationen im ATM-Gen führen zu der seltenen, autosomal rezessiv vererbten Krankheit *Ataxia Telangiectasia* (AT). Diese ist durch motorische Bewegungsstörungen (Ataxie), die Vergrößerungen der Kapillargefäße der Gesichtshaut (Telangiectasie) und eine Immundefizienz gekennzeichnet. Zellen von AT Patienten zeigen Defekte in der Zellzykluskontrolle, erhöhte genomische Instabilität und Strahlensensitivität (Morgan et al. 1997, Takagi et al. 1998), sowie ein erhöhtes Krebsrisiko (Vorechovsky et al. 1996, Vo et al. 2004).

ATM liegt vor der Schadensinduktion inaktiv als Di- bzw. Tetramer im Nukleoplasma vor. Kommt es zum DNA Schaden wird dieser vom MRN Komplex erkannt. MRN rekrutiert die Acetyltransferase TIP60 und die ATM Multimere (durch NBS1) an den DSB (review: Bhatti et al. 2011). TIP60 bindet in der Folge rasch an ATM und acetyliert es am Lysin 3016. Dadurch kommt es zur Autophosphorylierung von ATM am Serin 1981 und die Multimere zerfallen in aktive Monomere (review: Bhatti 2011). Das aktivierte ATM phosphoryliert Reparatur- und Zellzykluskomponenten wie CHK2, NBS1 und MDC1. Darüber hinaus sind jedoch hunderte von ATM-Substraten bekannt, bei denen die Funktionen der einzelnen Phosphorylierungen nicht klar sind (Matsuoka et al. 2000). Eine besondere Rolle spielt ATM bei der schadensinduzierten Dekondensation des Heterochromatins (Ziv et al. 2006) und bei der Regulation der Resektion durch Artemis und CtIP (Riballo et al. 2004, You et al. 2009). ATM reagiert jedoch nicht nur auf DSBs, auch kurze, einzelsträngige DNA-Überhänge (Shiotani et al. 2009) und Chromatinstrukturveränderungen scheinen ATM aktivieren zu können (Bakkenist et al. 2003).

Nach Röntgenbestrahlung werden die meisten DSBs unabhängig von ATM repariert. Nur die langsame Reparaturkomponente ist abhängig von ATM (siehe Abbildung 12). Dies gilt sowohl für die HR in G2, als auch für das NHEJ in G1 (Riballo et al. 2004, Deckbar et al. 2007).

Der Kinasedefekt von ATR führt *in vitro* zu erhöhter Strahlenempfindlichkeit und fehlerhafter Zellzykluskontrolle (Wright et al. 1998). Eine ATR Mutation *in vivo* ist dagegen embryonal letal (Brown et al. 2000). Eine verminderte Genexpression von ATR durch eine hypomorphe Mutation führt zum Seckel-Syndrom (Typ 1), einer seltenen autosomal-rezessiven Erbkrankheit. Diese äußert sich durch Kleinwüchsigkeit, Mikrozephalie, mentale Retardierung und eine typischen Gesichtsform (O'Driscoll et al. 2003).

Wie ATM ist auch ATR entscheidend für die Steuerung der Zellzykluskontrolle. Es phosphoryliert u.A. CHK1, CHK2, 53BP1 und P53 (Tomimatsu et al. 2009). Außerdem phosphoryliert ATR Reparaturkomponenten wie BRCA1 (Tibbetts et al. 2000), BLM (Bloom; Davies et al. 2004) und WRN (Werner; Pichierri et al. 2003). ATR scheint eine besondere Rolle bei der DNA Schadensantwort nach replikativem Stress (Chanoux et al. 2009) und UV induzierten Schäden zu spielen. Nach S-Phase assoziierten Schäden phosphoryliert ATR H2AX (Ward et al. 2001). Nach UV Bestrahlung oder blockierten Replikati-

onsgabeln kann ATR die Autophosphorylierung von ATM an Ser1981 ansteuern oder DNA-PK phosphorylieren (review: Bhatti et al. 2011).

ATR wird an einzelsträngige, RPA bedeckte Bereiche rekrutiert (Zou et al. 2003) wie sie bei der Replikation und durch Resektion bei der DNA Reparatur entstehen. ATRIP (*ATR interacting protein*) vermittelt die Bindung von ATR (Cortez et al. 2001), während TopBP1 entscheidend für dessen Aktivierung ist (Kumagai et al. 2006). TopBP1 wird durch einzelsträngige DNA Bereiche, die an einen Doppelstrang angrenzen rekrutiert (Kousholt et al. 2012) und durch ATM und ATR phosphoryliert (review: Bhatti et al. 2011).

Wie schon in Abschnitt 2.2.3 beschrieben, ist DNA-PK ein zentrales Enzym für das NHEJ. Dieses ist wiederum essentiell für die V(D)J-Rekombination, bei der es die programmierten DSBs während der Erzeugung von Antikörpern verbindet. DNA-PK-defiziente Mäuse sind folglich radiosensitiv und immundefizient (Hill et al. 2010). Man ging lange davon aus, dass ein DNA-PK-Defekt im Menschen letal wäre (Meek et al. 2008) bis eine hypomorphe DNA-PK-Mutation eines Patienten erwähnt wurde (van der Burg et al. 2009).

DNA-PK ist wie zuvor beschrieben (siehe Abschnitt 2.2.3) ein Proteinkomplex aus den drei Komponenten KU70, KU80 und DNA-PK_{CS}. Der Komplex findet sich erst am DSB zusammen und wird dort aktiviert. Dabei bildet zunächst KU ein Heterodimer an den Bruchenden bevor DNA-PK_{CS} bindet, was zu einer Konformationsänderung des Komplexes führt und den Kinasekomplex aktiviert. Der vollständige DNA-PK Komplex kann außerdem eine Bindung mit einem weiteren DNA-PK Komplex am gegenüberliegenden DNA Ende aufbauen und so die Bruchenden verknüpfen (Davis et al. 2013, Neal et al. 2011).

DNA-PK phosphoryliert sowohl sich selbst, als auch fast alle anderen Komponenten des NHEJ (Davis et al. 2013). Die Autophosphorylierung von DNA-PK ist essentiell für das NHEJ, verhält sich dabei aber sehr komplex. Es sind über 40 potentielle Phosphorylierungsstellen an DNA-PK bekannt. Je nachdem an welcher es zur Phosphorylierung kommt, kann die Resektion und damit die HR entweder gefördert oder unterdrückt werden (Cui et al. 2005, Meek et al. 2008, Neal et al. 2011). Außerdem scheint die Autophosphorylierung von DNA-PK an dessen Inaktivierung und der Dissoziation von der DNA beteiligt zu sein (Chan et al. 1996, Merkle et al. 2002, Davis et al. 2013).

2.2.6. Der Heterochromatin bildende Faktor KAP1

Wie in Abschnitt 2.2.4 erläutert ist die Expression von Genen innerhalb von heterochromatischen Bereichen unterdrückt. KAP1 (*Krüppel-associated box (KRAB)-associated co-repressor 1*) ist im HC angereichert (Ziv et al. 2006) und wirkt als ein essentieller Corepressor für die KRAB Zinkfinger Protein Superfamilie von Transkriptionsfaktoren (Hu et al. 2012). KAP1 rekrutiert sowohl HP1 (Lechner et al. 2000), als auch die Methyltransferase SETDB1 und den Histondeacetylase Komplex NuRD (Schultz et

al. 2001, 2002). Diese wiederum sorgen für die charakteristische Histonmarkierung des HC mit einem hohen Methylierungs- und einem niedrigen Acetylierungsgrad (siehe Abschnitt 2.2.4). Zusammen mit der Anlagerung von HP1 führen diese Histonmodifikationen zur Unterdrückung der Genexpression durch Ausbildung des Heterochromatins (Sripathy et al. 2006).

Zur Schadensantwort nach DSBs gehört die Dekondensation des Chromatins um den Schaden. Die durch den Bruch aktivierte Kinase ATM (vgl. Abschnitt 2.2.5) phosphoryliert u.A. auch KAP1 am Serin 824. Darüber hinaus kann diese spezifische Phosphorylierung auch durch ATR oder DNA-PK erfolgen (White et al. 2006, Li et al. 2007). Verhindert man diese Phosphorylierung, kommt es nicht zur schadensinduzierten Chromatindekondensation (Ziv et al. 2006). Die ATM-abhängige Phosphorylierung von KAP1 gilt als essentiell für die DSB Reparatur im HC (White et al. 2012, Woodbine et al. 2011). Man geht davon aus, dass die DSBs im HC persistieren, wenn ATM fehlt, da dieses KAP1 nicht mehr phosphoryliert und das Chromatin kondensiert bleibt (Woodbine et al. 2011). Dieser Effekt lässt sich durch den *knock down* (k.d.) von KAP1 aufheben (Woodbine et al. 2011). Ohne KAP1 kommt es zu einer allgemeinen Chromatindekondensation (Ziv et al. 2006). Die Phosphorylierung von KAP1 nach IR führt außerdem zum Loslösen des ATP abhängigen Chromatin Remodeling Enzyms CHD3 (Goodarzi et al. 2012). Dieser Schritt wird ebenfalls mit der schadensabhängigen Chromatindekondensation in Verbindung gebracht.

2.3. Hochauflösende Mikroskopie - STED

STED (*stimulated emission depletion*) Mikroskopie ist eine spezielle Form der Fluoreszenzmikroskopie, welche die beugungsbedingte Auflösungsgrenze der herkömmlichen Lichtmikroskopie überwindet. Ernst Abbe definierte 1873 die Beugungsgrenze (Abbe et al. 1873), die besagt, dass sich zwei Punkte in der Bildebene nur unterscheiden lassen, wenn sie um mindestens Δd voneinander getrennt sind (siehe Gleichung (8)).

$$\Delta d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} \quad (8)$$

- d : Auflösungsgrenze [nm]
 λ : Wellenlänge des Lichts [nm]
 n : Brechungsindex der Probe
 α : halber Öffnungswinkel des Lichtkegels

Da sich bei der Fluoreszenzmikroskopie die Wellenlänge λ in einem Bereich von 400 bis 700 nm bewegt und der Öffnungswinkel α auf $< 70^\circ$ begrenzt ist, liegt die untere Auflösungsgrenze bei ca. 200 nm (Hell et al. 2006).

Sehr intensives Laserlicht kann ein Fluorophor nicht nur schlagartig anregen, sondern auch mit einer hohen Effizienz wieder abregen. Auf dieser Grundlage der reversiblen, sättigbaren, optischen Übergänge zwischen zwei Zuständen eines Fluorophors basiert das RESOLFT (*reversible saturable optical fluorescent transitions*) Konzept, welches bei der STED Mikroskopie Anwendung findet. Bei der stimulierten Emission wird die abgestrahlte Energie als weiteres Photon des stimulierenden Lichtstrahls abgeführt (siehe Abbildung 13 A). Die so abgeregten Moleküle können sofort wieder angeregt werden. Entscheidend für die Unterschreitung der Beugungsgrenze ist die Übersättigung der stimulierten Emission. Dabei wird eine höhere Lichtintensität verwendet, als zur Abregung des Fluorophors nötig wäre. Die Fluoreszenz nimmt etwa exponentiell mit der Intensität des stimulierenden Lichts ab (siehe Abbildung 13 B).

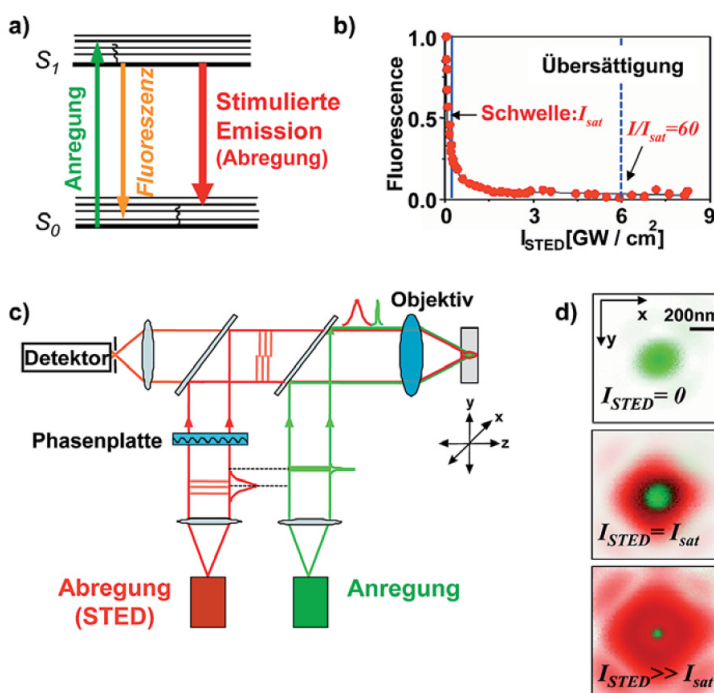


Abbildung 13: Grundlagen der STED Mikroskopie. A: Dargestellt ist ein Energieschema eines Fluoreszenzmoleküls. Durch stimulierte Emission kann Licht geeigneter Wellenlänge den fluoreszierenden, angeregten Zustand S_1 in den Grundzustand S_0 abregen. B: Die Fluoreszenz aus S_1 nimmt mit zunehmender STED-Intensität I_{STED} nahezu exponentiell ab. Über der ersten markierten Schwelle I_{sat} ist die Abregung nahezu gesättigt und die Fluoreszenz weitgehend aufgehoben. Weitere Steigerung der Intensität des stimulierenden Lichts erhöht den Sättigungsgrad I/I_{SAT} . C: Schematische Abbildung eines STED-Mikroskops. D: In der Fokusebene (x, y) des Objektivs bildet der Anregungslichtpuls (grün) einen Spot mit ca. 250 nm Durchmesser (oben). Dieser überlappt mit dem Spot eines zeitlich synchronisierten Abregungslichtpulses (rot, Mitte). Die Phasenplatte bildet den Abregungsstrahl so um, dass er eine zentrale Nullstelle hat. Je höher die Intensität des Abregungslichts, umso kleiner wird der zentrale Bereich, der von der Abregung ausgenommen ist (unten). Aus Hell et al. 2006.

Das (gepulste) Anregungs- und Abregungslicht wird gleichzeitig mittels eines dichromatischen Spiegels in das Objektiv eingekoppelt (siehe Abbildung 13 C). Gemäß dem Beugungsgesetz liefert das Anregungslicht etwa einen Spot von 200 nm Durchmesser (siehe Abbildung 13 D und Abbildung 14). Das Abregungslicht wird mittels Phasenplatte so angepasst, dass es in der Mitte eine Nullstelle besitzt und den Anregungsspot ringförmig überlagert. Auf diese Weise wird die Fluoreszenz im Randbereich unterbunden, während sie an der Nullstelle erhalten bleibt. Je intensiver das Abregungslicht, desto feiner die Nullstelle und desto höher die Auflösung. Mit dem so verkleinerten Spot (siehe Abbildung 13 D) rastert man die Probe ab und erhält so ein deutlich schärferes Bild als mit konventioneller Fluoreszenzmikroskopie.

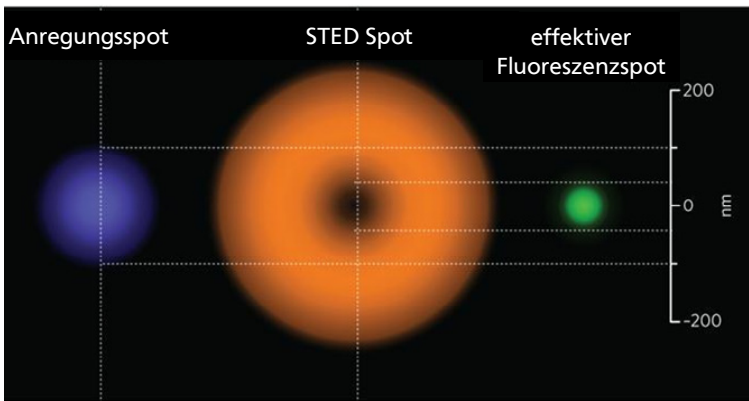


Abbildung 14: Darstellung der Lichtspots bei der STED Mikroskopie.

Die Überlagerung des Anregungsstrahls (blau) mit dem ringförmigen STED Strahl (orange) reduziert den fluoreszierenden Bereich (grün) unter die Beugungsgrenze. Modifiziert nach Abbott et al. 2009.

Beim RESOLFT Konzept ist die Auflösung prinzipiell unbegrenzt, da sie nur noch vom erreichbaren Sättigungsgrad abhängt (Hell et al. 2003, Hell et al. 2004). Die Auflösung folgt in diesem Fall dem erweiterten Abbe'schen Gesetz in Gleichung (9).

$$\Delta d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha I/I_{Sat}} \quad (9)$$

d : Auflösungsgrenze [nm]

λ : Wellenlänge des Lichts [nm]

n : Brechungsindex der Probe

α : halber Öffnungswinkel des Lichtkegels

I : Anregungsintensität [MW/cm²]

I_{Sat} : Sättigungsintensität [MW/cm²]: die Schwelle, bei der die Fluoreszenz eines Fluorophors mit 63%iger Wahrscheinlichkeit verhindert wird (Hell et al. 2003, Westphal et al. 2005). Diese hängt vom verwendeten Farbstoff ab.

Für biologische Anwendungen konnte die Auflösungsgrenze in der Bildebene bisher auf ca. 40 nm reduziert werden.

In der Anwendung liegen die fokalen Intensitäten für das Anregungslicht bei ca. 6 MW pro cm² und ca. 400 MW pro cm² für das Abregungslicht (Westphal et al. 2007).

2.4. Zielsetzung

Die spezifische Reaktion der Zelle auf Schäden im Heterochromatin ist bisher kaum untersucht. In Säugerzellen nimmt das HC etwa einen Anteil von 20 Prozent des gesamten Chromatins im Zellkern (Murray et al. 2012) ein. Die Reparatur von DNA Schäden in diesem besonderen Bereich ist bis dato kaum differenziert charakterisiert, da in den meisten Reparatur-Studien nicht zwischen Eu- und Heterochromatin unterschieden wird. Allgemein gilt die Reparatur von heterochromatinassoziierten DNA Schäden durch die hohe Dichte der DNA als schwierig (Falk et al. 2013). Schon der Nachweis von DNA

Schäden innerhalb des Heterochromatins stellt eine Herausforderung dar, die erst vor Kurzem bewältigt wurde (Jakob et al. 2011).

Nach gezielter Bestrahlung von heterochromatischen Chromocentern muriner Zellen konnten in dieser Arbeitsgruppe etablierte DNA-Schadensmarker wie γ H2AX und XRCC1 innerhalb des HC nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch, dass die heterochromatischen DNA Schäden kurz nach ihrer Induktion aus dem HC heraus transportiert werden. Dies erklärt zumindest zum Teil, warum deren Nachweis bisher so schwer fiel. Verwandte Prozesse dieser Relokalisierung bestimmter DNA Bereiche wurden in Hefezellen und in jüngster Zeit auch in *Drosophila spec.* nachgewiesen. Das Hauptziel dieser Arbeit war es die räumliche Dynamik von Heterochromatin assoziierten DNA Schäden genauer zu untersuchen. Speziell die Relokalisierung heterochromatischer DNA Schäden in euchromatische Chromatinbereiche sollte charakterisiert werden.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war es, die IRIFs (*ionising radiation induced foci*) nach Ionenbestrahlung genauer in ihrer Struktur zu untersuchen. Die unerwartet geringe Zahl der Foci nach Ionenbestrahlung und deren klare Abgrenzung voneinander lassen vermuten, dass einzelne DSB zusammengezogen werden um sie in einer Art Reparaturzentrum zu reparieren. In dieser Arbeit sollte versucht werden die potentielle Substruktur der IRIFs durch hochauflösende Mikroskopie zu ergründen.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Zelllinien

MEF H2AX WT, MEF ATM $-/-$, MEF KU80 $-/-$

Wenn nicht anders angegeben handelt es sich bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellen um embryonale Maus Fibroblasten (MEF H2AX WT) aus dem Labor von P.A. Jeggo, Sussex University. Die ATM defiziente Zelllinie (MEF ATM $-/-$) und die KU80 defiziente Zelllinie (MEF KU80 $-/-$) stammen ebenfalls aus diesem Labor. Embryonale Maus Fibroblasten zeichnen sich für diese Arbeit vor Allem dadurch aus, dass das Heterochromatin in diesen Zellen kompakt in so genannten Chromocentern vorliegt und sich optisch daher klar vom Euchromatin abgrenzen lässt. Die Zellen wurden in DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 10 % FCS kultiviert. Zum Ablösen der Zellen wurde 0,05 % Trypsin/ 0,02 % EDTA verwendet.

NIH3T3

NIH3T3 wurden bereits 1962 in der Pathologie der New York University School of Medicine als Zelllinie etabliert. Bei diesen Zellen handelt es sich um spontan immortalisierte Maus Fibroblasten, die sich ebenfalls durch klar abgegrenzte Chromocenter auszeichnen. Die Zellen wurden in DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 10 % FCS kultiviert. Zum Ablösen der Zellen wurde 0,05 % Trypsin/ 0,02 % EDTA verwendet.

U2OS

Diese humane Osteosarkom-Zelllinie wurde von der ATCC (American Type Culture Collection) bezogen. Die Zellen wurden in DMEM mit 4,5 g/l Glukose und 10 % FCS kultiviert. Zum Ablösen der Zellen wurde 0,05 % Trypsin/ 0,02 % EDTA verwendet.

3.1.2. siRNA

KAP1 siRNA, Sequenz (5'-3'). AAGAUGCAGUGAGGAACCAACGUAA; Stammlösung 20 μ M;

Hersteller: Eurofins MWG Operon.

Bei jeder der hier aufgeführten Analysen wurde der KAP1 k.d. durch eine Immunfluoreszenzfärbung gegen KAP1 bestätigt und nur solche Zellen in die Auswertung aufgenommen, die keine KAP1 Färbung im Zellkern aufwiesen.

3.1.3. Konstrukte (Transfektion)

pGFP-XRCC1, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. M. Levin, Queensland Institute of Medical Research, Australia.

pENmRFP-XRCC1, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. N. Aeverbeck, GSI

3.1.4. Antikörper

Tab. 3.1 und Tab. 3.2 listen die Antikörper, die in dieser Arbeit für Immunofluoreszenzfärbungen (IF) und Westen Blot Analysen (WB) verwendet wurden.

Tab. 3.1: Primärantikörper

Antigen (Klon/Nummer)	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
53BP1 (Ab-1)	Kaninchen	1:500 (IF)	Calbiochem
ATM, phospho-S1981	Schaf	1:100 (IF)	zur Verfügung gestellt von Prof. M. Lavin, Brisbane
ATM, pospho-S1981 (clone 10H11.E12)	Maus	1:2000 (WB)	Rockland
BrdU-FITC	Ratte	1:20 (IF)	Abcam
Chk1, phospho-S345	Kaninchen	1:1000 (WB)	Cell Signaling Technology
CtIP	Kaninchen	1:100 (IF)	Bethyl Laboratories
γ H2AX (07-164)	Kaninchen	1:200 (IF)	Millipore
γ H2AX (JBW301)	Maus	1:500 (IF)	Millipore
γ H2AX, Alexa Fluor 488	Maus	1:50 (IF)	Biozol
Histon H3, phospho-S10	Kaninchen	1:100 (IF)	Millipore
H3K9me3	Kaninchen	1:500 (IF)	Upstate
HP1 α	Kaninchen	1:600 (IF)	Cell Signaling Technology
KAP1	Kaninchen	1:500 (IF)	Abcam
MRE11-PP (S676, S678)	Kaninchen	1:100 (IF)	zur Verfügung gestellt von Prof. M. Lavin, Brisbane
NBS1, phospho-S343 (3001)	Kaninchen	1:100 (IF)	Cell Signaling Technology
NBS1 (ab 23996)	Kaninchen	1:1000 (WB)	Abcam
RPA32, phospho-S4/S8 (A300-254A)	Kaninchen	1:200 (IF)	Bethyl Laboratories
RPA, p34	Maus	1:300 (IF)	Thermo Scientific
TopBP1 (ab2402)	Kaninchen	1:1000 (IF)	Abcam
Tubulin	Maus	1:50000 (WB)	Sigma
XRCC1	Kaninchen	1:1000 (IF)	Alexis Biochemicals

Tab. 3.2: Sekundärantikörper

Konjugat	Antigen	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle	Nummer
Alexa-488	Kaninchen-IgG	Ziege	1:400	Molecular Probes	A11070
Alexa-488	Maus-IgG	Ziege	1:400	Molecular Probes	A11017
Alexa-568	Kaninchen-IgG	Ziege	1:400	Molecular Probes	A21069
Alexa-568	Maus-IgG	Ziege	1:400	Molecular Probes	A11019
Alexa-647	Kaninchen-IgG	Ziege	1:200	Invitrogen	S-20992
Atto-565	Maus-IgG	Esel	1:1000	Bioquant	nicht kommerziell
Atto-565	Kaninchen-IgG	Esel	1:1000	Bioquant	nicht kommerziell
Dyomics-485	Maus-IgG	Esel	1:500	Bioquant	nicht kommerziell
Dyomics-485	Kaninchen-IgG	Esel	1:500	Bioquant	nicht kommerziell
HRP	Kaninchen-IgG	Esel	1:10000	Amersham Biosciences	NA934
HRP	Maus-IgG	Schaf	1:10000	Amersham Biosciences	NXA931

3.1.5. Chemikalien

Chemikalie bzw. Lösung	Bezugsquelle
2-Bromo-1-nitro-1,3-propandiol	Sigma-Aldrich
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	Roth
APS	Sigma
ATM-Inhibitor KU55933	Calbiochem
ATR-Inhibitor NVP-BEZ 235	Cayman Chemical
Attractene	Qiagen
Bis-Tris	AppliChem
BrdU	Sigma
BSA	Roth
Caffeine	Sigma
Cell-Tak	BD Biosciences
DAPI	Serva, AppliChem
DC Protein Assay	Biorad
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
DMSO	Roth
DNA-PK-Inhibitor NU7026	Santa Cruz
ECL Plus	GE Healthcare
EDTA	Sigma
Entwicklerlösung (für Filmentwicklung)	AGFA
Ethanol	AppliChem
Fixierlösung (für Filmentwicklung)	AGFA
Glycerol	Sigma
Glycin	Roth
HiMark Prestained HMW Protein	Invitrogen
HiPerfect	Qiagen
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich
Immersionsöl nach DIN58884	Merck
INTERFERin	Peqlab
Isopropanol	Roth
jetPRIME	Peqlab
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	AppliChem
Koffein	Sigma
Magnesiumchlorid	Roth
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Methanol 99,9 %	Roth
Milchpulver fettfrei	IGA
Mini Complete Protease Inhibitor Cocktail EDTA-frei	Roche
Mowiol	Sigma
Natriumazid	Sigma
Natriumbicarbonat	Biochrom
Natriumchlorid	AppliChem
Natrium-Deoxycholat	Sigma
Natriumfluorid	AppliChem
PageRuler Prestained Plus	Fermentas
Paraformaldehyd	AppliChem
Propidiumiodid	AppliChem
Salzsäure (37 %)	Merck

SDS	Sigma
TEMED	Merck
ToPro-3	Invitrogen
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck
Tris HCl	Merck
Tris-Base	Roth
Triton X-100	Applichem
TUNEL-Assay	Roche
Tween	Sigma-Aldrich
Vectashield	Vector Laboratories
Wortmannin	Sigma

für die Zellkultur

Accutase	PAA Laboratories
Alpha-Medium mit Nukleosiden	Biochrom
DMEM	Biochrom
EMEM mit EBSS	Lonza
FCS	Biochrom
Hepes (1M)	Biochrom
L-Alanyl-L-Glutamin	Biochrom
OptiMEM	GIBCO
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml / 10000 µg/ml)	Biochrom
Trypsin/EDTA	PAN Biotech

3.1.6. Verwendete Lösungen

Cell-TAK-Lösung: Cell Tak in 0,1 M Natriumbicarbonat (pH 8, steril) gelöst (1,38 µg/100 µl), innerhalb von 10 min verarbeitet.

Citratpuffer (TUNEL): 0,01 M Natriumcitrat (mit Zitronensäure auf pH 6,0 eingestellt).

Cytoskeleton Puffer (Streck-Fixierung): 10 mM PIPES (pH 6,8), 100 mM Natriumchlorid, 300 mM Saccharose, 3 mM Magnesiumchlorid, 1 mM EGTA, 0,5 % (v/v) Triton X-100

Cytoskeleton Stripping Puffer (Streck-Fixierung): 10 mM Tris HCl, 10 mM Natriumchlorid, 3 mM Magnesiumchlorid, 1 % Tween, 0,5 % (w/v) Natrium-Deoxycholat, pH 7,4 mit Natriumhydroxid eingestellt.

Laufpuffer für PAA-Gele ohne Gradient: 25 mM Tris Base, 192 mM Glycin, 0.1 % (w/v)

Mowiol Eindeckmedium (für ca. 25 ml): Zu 6 g Glycerol in 50er Falcon langsam (über mehrere Stunden) 2.4 g MOWIOL zugeben, dabei rühren (sehr viskos). 6 ml dH₂O unter Rühren zugeben und über Nacht bei Raumtemperatur stehen lassen. 12 ml 0.2 M Tris-Puffer (0.2 M Tris Base mit 0.2 M Tris HCl auf pH 6.8 einstellen) unter Rühren zugeben und im Wasserbad bei 50 °C die Mowiol-Flakes lösen

(mindestens 10 min). Bei 4 °C und 5000 g 15 min zentrifugieren um die Lösung zu klären. 2.5 % DABCO (1,4-diazobicyclo-[2.2.2]-octane) zu geben, 2.5 % bei 25 ml sind 0.625 g. DABCO löst sich nur langsam, daher Schütteln, erneut kurz anzentrifugieren um zu klären. Aliquotieren, mögliche Luftblasen kurz raus zentrifugieren und bei -20°C aufbewahren. Vor der Verwendung über Nacht im Vakuum aufbewahren.

SDS Laufpuffer für Gradientengele: 50 mM Tricin, 50 mM Tris Base, 0,1 % (w/v) SDS

PBS: 137 mM Natriumchlorid, 7,9 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 2,7 mM Kaliumchlorid, 1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat.

Ribonuklease-freies Wasser: 1 ml DMPC in 99 ml 50 % Ethanol lösen, auf 1 l Wasser auffüllen, Inkubation mindestens für 30 min bei RT, anschließend autoklavieren.

Sammelgelpuffer (Für 2 Gele mit 5 % AA): 3,4 ml Wasser, 830 µl 30 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 630 µl 1 M Tris (pH 6,8), 50 µl 10 % SDS, 50 µl 10 % APS, 5 µl TEMED.

SDS-Lysepuffer: 100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerol.

SDS-Probenpuffer (2fach konzentriert): 100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 50 % (v/v) Glycerol, 4 % (w/v) SDS, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol.

Streck Fixativ: 150 mM 2-Bromo-2-nitro-1,3-propandiol, 108 mM Diazolidinylurea, 10 mM Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 50 mM EDTA.

TBS-T: 20 mM Tris Base, 137 mM Natriumchlorid, 0,1 % Tween.

Transferpuffer: 19,2 mM Glycin, 25 mM Tris Base, 0,037 % (w/v) SDS.

Trenngelpuffer (für 2 Gele mit 8 % AA): 6,9 ml Wasser, 4,0 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 3,8 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 150 µl 10 % SDS, 150 µl 10 % APS, 9 µl TEMED

3.1.7. Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Chemolumineszenzfilm Hyperfilm ECL	GE Healthcare
Deckgläser 18 mm x 18 mm	IDL
Deckgläser 24 mm x 24mm	Roth
Deckgläser rund, Ø 7 mm, Ø 10 mm	Thermo
Deckgläser rund, Ø 30 mm	Glaswarenfabrik Karl Hecht
Deckgläser rund, Ø 40 mm	VWR
Einmalhandschuhe (Latex)	Roth
Einmalhandschuhe (Nitril)	UNIGLOVES
Einwegspritzen 1 ml	Terumo
Einwegspritzen 20 ml	Braun
Gefäßträger	Heraeus
Glaspipetten	Hirschmann
Glaswaren	Schott Duran
Gradientengele (Tris-Acetat, 3-8 %)	Invitrogen
Kanülen 25G, 27G	Terumo; Braun
Kryoröhrchen, 2ml	greiner
Küvetten UVette	eppendorf
Mikrogefäße 0,75 ml	Heraeus
Mikrotiterplatte EL808	BioTek
Multipipette HandyStep	Brand
Mylarfolie	Goodfellow
Objektträger	VWR
Pasteurpipetten	VWR
Petrischalen Ø 3,2 cm	Nunc
Petrischalen Ø 14,5 cm	greiner
Plastikpipetten	TPP
Pipette 2 µl	Gilson
Pipette 10 - 1000 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen	Brand; Eppendorf
PVDF-Membran	Millipore
Reaktionsgefäße 0,5 ml - 1,5 ml	Eppendorf
Spritzen-/Kanülenfilter (0,22 µm)	TPP
Whatmanpapier	Schleicher und Schüll
Zellkulturflaschen	BD Falcon
Zellschaber	TPP
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	TPP, greiner

3.1.8. Geräteliste

Gerät	Name	Hersteller
Blottingapparatur, <i>semi-dry</i>	Hoefer Semiphor	Pharmacia Biotech
Brutschrank	BBD 6220	Heraeus
Cryo Tank	Cryo Freezing Container	Nalgene
Dosimeter	SN4	PTW
Elektroporation	Amaxa	Lonza
ELISA-Reader	EL 808	BioTek
Entwicklermaschine	Curix 60	AGFA
Filmkassette	IEC 60406	rego
Heizblock	1101	peqlab
Magnetrührer	Heat-Stir CB162	Stuart
	MR 3001	Heidolph

Mikroskop, Durchlicht	DM IRBE	Leica
Mikroskop, konfokal	TCS NT	Leica
	Eclipse Ti,	Nikon
	inkl. spinning disc Einheit	Yokogawa
Mikroskop, STED-Aufbau	DMI 4000B mit einem 63x (NA 1.30, Leica) Öl Immersionsobjektiv	Leica (STED-Aufbau: optical nanoscopy division, DKFZ Heidelberg)
PAGE-Kammern	Mini-Protean II	Bio-Rad
	XCell Sure Lock	Invitrogen
pH-Meter	766 Calimatic	Knick
Photometer	BioPhotometer	eppendorf
Plattformschüttler	UNIMAX 1010	Heidolph
	Shaker DRS-12	neolab
Pipettierhilfe	accu-jetR pro	Brand
Power Supply	peqpower 300	peqlab
Reinstwasseranlage	MicroPure	TKA
Röntgenröhre	Isovolt DS1, Typ IV320-13	Seifert/G§
	Isovolt 160M1/10-55?	GE
	inkl. Mikrobestrahlungsanlage	Microleman
Stereomikroskop	D03	Carl Zeiss
Sterilwerkbänke	Herasafe	Heraeus
Ultraschallbad	Bioruptor UCD-200	diagenode
Waage	H110	Sartorius
	GS	KERN
Wasserbad	SW20	Julabo
	1003	GFL
Vortexer	REAX 2000	Heidolph
	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Zellzählgerät	Coulter Counter	Coulter
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus
	3K30 (Kühlzentrifuge)	Sigma
	3-18K (Kühlzentrifuge)	Sigma
	Megafuge 1.0	Heraeus
	Tischzentrifuge	Fisherbrand

3.1.9. Software

Name	Hersteller
Andor iQ 1.10.3	Andor Bioimaging Division
Gen5 1.00.14	Biotek Instruments, Inc.
ImageJ 1.42q	National Institutes of Health
Leica TCS NT 1.6.587	Leica Microsystems Heidelberg GmbH
Leica LAS AF	Leica Microsystems Heidelberg GmbH
Microsoft Excel 2003	Microsoft Corporation
Microsoft PowerPoint 2003	Microsoft Corporation
Microsoft Word 2003	Microsoft Corporation
Inspector v0.1	MPI for biophysical Chemistry, Göttingen
Huygens essential	SVI, Niederlande
Image-Pro-Plus	Media Cybernetics Inc., USA

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

Die Zellen wurden in Kulturflaschen (75 cm²) im Brutschrank kultiviert, der eine konstante Temperatur von 37 °C, einen CO₂-Anteil von 5 % und eine Wasserdampf-gesättigte Atmosphäre sicher stellte. Vor Erreichen einer konfluenten Zelldichte wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit 3 ml PBS gewaschen. Um die Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen zu lösen, wurden diese mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung bzw. 3 ml Accutase (im Falle von Transfektionen) versetzt und 5-10 min bei 37 °C inkubiert. Die so gelösten Zellen wurden durch Auf- und Abpipetieren vereinzelt. Durch Zugabe von Medium wurde anschließend die Trypsinaktivität gestoppt (im Falle von Accutase nicht notwendig) und die Zellsuspension je nach Spltrate in neue Zellkulturgefäße ausgesät.

Für Experimente wurden die Zellen entweder direkt in Petrischalen (Ø 3,2 cm), oder auf Deckgläsern (24 x 24 mm, Ø 18 mm), welche in Petrischalen gelegt wurden, sowie in Mikrosondenkammern (siehe Kapitel 3.2.4.3, Ø 7 mm) auf Polypropylen oder Biofolie kultiviert. Die Zellzahl wurde vor der Einsaat mittels Zählgerät bestimmt.

Langzeitlagerung

Die Zellen wurden dauerhaft in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert. Vor dem Einfrieren wurden die Zellen geerntet und die Zellsuspension in Portionen à 2 Millionen Zellen für 10 min mit 110 g bei RT zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in je 2 ml Kulturmedium mit 30 % FCS und 10 % DMSO resuspendiert. Die Zellen wurden zunächst in Kryoröhrchen innerhalb eines mit Isopropanol gefüllten Cryo Freezing Containers langsam auf -80 °C gekühlt. Dieser Container stellt eine Abkühlungsrate von 1 °C/min sicher. Nach 24 h bei -80 °C wurden die Zellen in den flüssigen Stickstoff überführt.

Um die so gelagerten Zellen wieder aufzutauen, wurde ein Kryoröhrchen aus dem Stickstoff entnommen und die darin befindlichen Zellen in einem Wasserbad bei 37 °C rasch aufgetaut. Anschließend wurde die konzentrierte Zellsuspension in 20 ml 4 °C kalten Mediums aufgenommen und das DMSO-haltige Medium für 10 min mit 110 g bei 4 °C abzentrifugiert. Das resultierende Zellpellet wurde in 15 ml, auf 37 °C vorgewärmtes Medium resuspendiert und die Zellen im Brutschrank kultiviert.

3.2.2. Inhibitoren

ATM Inhibition

Die Inhibition der Kinaseaktivität von ATM erfolgte durch den Inhibitor KU55933 (Hickson et al. 2004). Die Stammlösung betrug 10 mM in DMSO. Eingesetzt wurde der Inhibitor mit einer Endkonzentration von 10 μ M bei einer Vorinkubationszeit von mindestens 1 h. Abbildung 15 belegt die Wirksamkeit des Inhibitors in den in dieser Arbeit verwendeten Maus Fibroblasten anhand der ATM Autophosphorylierung nach 10 Gy Röntgenstrahlung.

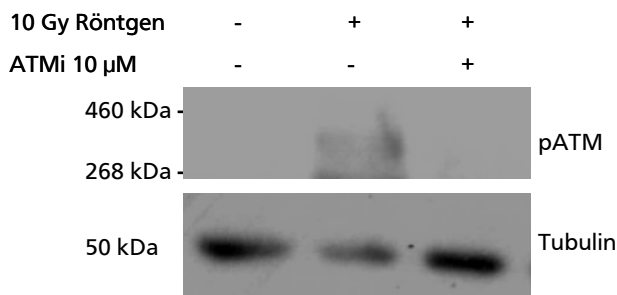


Abbildung 15: WB Analyse der ATM Inhibitorfunktion.

Aufgetragen sind jeweils 10 μ g aus MEFs gewonnenem Protein. Als Endpunkt diente die ATM Autophosphorylierung. Diese wurde mit 10 Gy Röntgenstrahlung induziert (mittlere Spalte). Die rechte Spalte zeigt die ATM Autophosphorylierung nach Bestrahlung und Behandlung mit 10 μ m ATM Inhibitor für eine Stunde. Als Ladekontrolle diente Tubulin.

DNA-PK Inhibition

Die Inhibition der Kinaseaktivität von DNA-PK erfolgte durch Verwendung des Inhibitors NU7026 (Veuger et al. 2003, Riballo et al. 2004, Peddi et al. 2010). Die Stammlösung betrug 5 mM in DMSO. Eingesetzt wurde der Inhibitor mit einer Endkonzentration von 10 μ M bei einer Vorinkubationszeit von mindestens 1 h.

ATR Inhibition

Die Kinaseaktivität von ATR wurde durch Verwendung des Inhibitors NVP-BEZ235 (Maira et al. 2008, Toledo et al. 2011) unterdrückt. Die Stammlösung betrug 2 μ M in DMSO. Eingesetzt wurde der Inhibitor mit einer Endkonzentration von 100 nM bei einer Vorinkubationszeit von mindestens 1 h. Abbildung 16 belegt die Wirksamkeit des Inhibitors in den in dieser Arbeit verwendeten Maus Fibroblasten anhand des ATR Phosphorylierungssubstrats CHK1 nach Schadensinduktion durch Hydroxyurea (1 mM, 3 h).

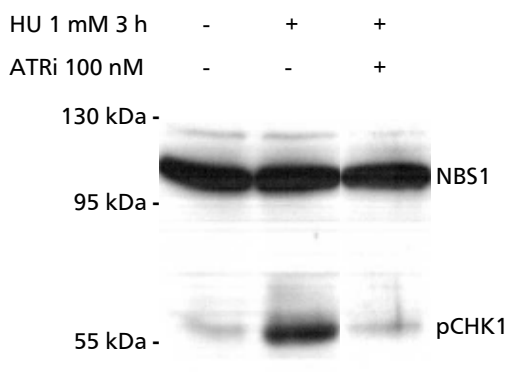


Abbildung 16: WB Analyse der ATR Inhibitorfunktion.

Aufgetragen sind jeweils 10 μ g aus MEFs gewonnenem Protein. Als Endpunkt diente das ATR Kinase Substrat CHK1. Dessen Phosphorylierung durch ATR wurde durch eine Behandlung mit 1 mM Hydroxyurea (HU) für 3 h induziert (mittlere Spur). Die rechte Spalte zeigt die CHK1 Phosphorylierung nach Behandlung mit HU und 100 nM ATR Inhibitor NVP BEZ 235 für eine Stunde. Als Ladekontrolle diente NBS1.

3.2.3. Transfektionen

3.2.3.1 siRNA Transfektion mit „Hiperfect“

Im Falle der Transfektion mit „Hiperfect“ wurden die Zellen unmittelbar nach der Aussaat transfiziert. In der Vorbereitung für die Transfektion wurden die Zellen so kultiviert, dass sie zum Zeitpunkt der Ernte ca. 80 % konfluent waren. Für das Ablösen der Zellen wurde im Falle von Transfektionen Accutase anstatt Trypsin verwendet.

Für einen typischen Transfektionsansatz wurden 4×10^5 Zellen in 2,2 ml Kulturmedium in eine \varnothing 3,2 cm Petrischale ausgesät. Bis zur Zugabe des siRNA-Mix wurden die Zellen im Brutschrank gelagert. Für den siRNA Mix wurden 86 μ l OptiMEM (ohne weitere Zusätze wie Aminosäuren oder Serum) vorgelegt, 2 μ l siRNA und 12 μ l des Transfektionsreagenz „Hiperfect“ hinzugefügt. Dieser Mix wurde für eine Minute durchmischt und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der so vorbereitete siRNA Mix wurde anschließend auf die frisch ausgesäten Zellen getropft.

Für Transfektionen in Mikrosondenkammern wurde die beschriebene Zellsuspension (4×10^5 Zellen in 2,2 ml Medium) direkt nach der Inkubation des siRNA-Mix mit diesem durchmischt und je 380 μ l dieser Mischung pro Mikrosondenkammer ausgesät.

3.2.3.2 siRNA Transfektion mit „INTERFERin“

Im Falle der Transfektion mit „INTERFERin“ wurden die Zellen bereits 24 h vor der Transfektion ausgesät ($2,5 \times 10^5$ Zellen in 2 ml Medium). Für den siRNA-Mix 1 μ l siRNA in 187 μ l OptiMEM aufgenommen und danach 12 μ l „INTERFERin“ zugegeben. Dieser Mix wurde durchmischt und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dessen wurde das Medium der 24 h vorkultivierten Zellen abgesaugt und durch 1,8 ml frisches Kulturmedium ersetzt. Schließlich wurde der vorbereitete siRNA-Mix unter vorsichtigem Schwenken den Zellen zugegeben und diese für weiter 48 h kultiviert.

3.2.3.3 Transfektion von Plasmid DNA mit „jetPrime“

Im Falle der Transfektion mit „jetPrime“ wurden die Zellen bereits 24 h vor der Transfektion ausgesät ($2,5 \times 10^5$ Zellen in 2 ml Medium). Zum Zeitpunkt der Transfektion sollten die Zellen zu ca. 70 % konfluent gewachsen sein. Für den Transfektionsansatz wurden 2 μ g des Plasmids in 200 μ l „jetPrime“ Puffer gelöst, die Lösung durchmischt und kurz anzentrifugiert. Anschließend wurden 4 μ l „jetPrime“ Reagenz zugegeben, erneut durchmischt, abzentrifugiert und der Ansatz für 10 min bei RT inkubiert. Schließlich wurden 200 μ l des Transfektionsmix zu den vorkultivierten Zellen getropft und diese für weitere 24 h kultiviert.

3.2.3.4 Transfektion von Plasmid DNA mit „Attractene“

Im Falle der Transfektion mit „Attractene“ wurden die Zellen mit der Aussaat transfiziert. Für den Transfektionsansatz wurden 1,2 µg des Plasmids in ad. 100 µl OptiMEM gelöst und 4,5 µl „Attractene“ zugegeben. Die Lösung wurde durchmischt, kurz an zentrifugiert und für 10 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen geerntet und je Ansatz 400.000 Zellen in 1,9 ml Medium in eine Ø 3,2 cm Petrischale ausgesät. Schließlich wurden 100 µl des Transfektionsmix zu den Zellen getropft und diese für 48 h im Brutschrank kultiviert.

3.2.4 Bestrahlung

3.2.4.1 Röntgenbestrahlung

Die homogene Röntgenbestrahlung der Proben erfolgte an einer IV320-13 Röntgenröhre in Ø 3,2 cm Petrischalen bzw. auf 24 x 24 mm Glasplättchen in Petrischalen. Bei einer Spannung von 250 kV und einer Stromstärke von 16 mA lag die Dosisrate zwischen 1 und 2 Gy/min je nach gewähltem Abstand zur Röntgenröhre. Die applizierte Dosis wurde mit dem Dosimeter SN4 überwacht.

Röntgen-Mikrobestrahlung

Für eine lokal abgegrenzte Röntgenbestrahlung diente das Mikrobestrahlungssystem der Firma Microlema gekoppelt mit einer 160M1/10-55 Röntgenröhre (GE).

Zwischen Röntgenaustrittsfenster und Probenhalter befand sich ein Kollimator, der die Röntgenstrahlung bis auf einen Bereich von 10 definierten Spalten mit einer Breite von jeweils ca. 2 µm absorbierte. Somit war es möglich lokal begrenzt hohe Dosen innerhalb eines kleinen Bereichs des Zellkerns zu deponieren. Da sich die Strahlung kegelförmig von der Punktquelle ausbreitet, die Spalten in den Kollimatoren aber parallel zu einander stehen, wurde der Kollimator während der Bestrahlung von – 0,5° bis + 0,5° geneigt. Somit konnten mehr Spalten parallel zur einfallenden Bestrahlung gestellt und somit mehr Streifen bestrahlt werden.

Die Zellen wurden auf Ø 18 mm Glasplättchen der Stärke 2 in Petrischalen kultiviert. Für die Bestrahlung wurden die Glasplättchen den Petrischalen entnommen, auf dem Probenhalter platziert und die Zellen mit einer sehr dünnen Schicht Medium benetzt. Die Probe wurde für 4 min bei 20 kV und 80 mA bestrahlt, wobei der Probenhalter von – 0,5° bis + 0,5° mit 0,25°/min geneigt wurde. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen entweder sofort fixiert oder für eine weitere Inkubation wieder in ihre Petrischale überführt. Abbildung 17 zeigt die Rekrutierung der DNA Schadensmarker XRCC1 und γH2AX an einen mikrobestrahlten Streifen in U2OS Zellen.

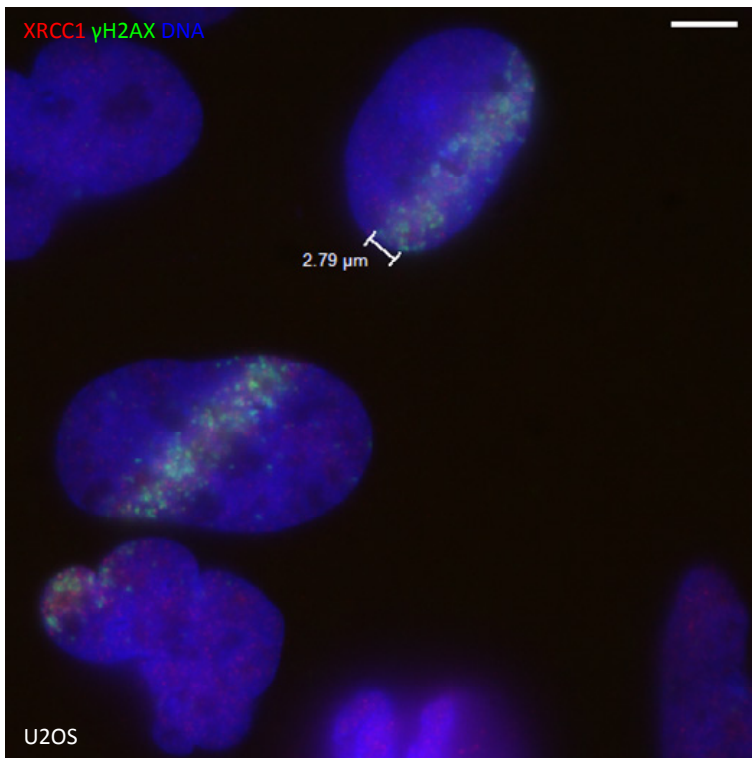


Abbildung 17: Immunfluoreszenzaufnahme von Röntgen-mikrobestrahlten Zellen.

U2OS Zellen wurden für 2 min bei 20 kV und 80 mA in der Röntgen-Mikrobestrahlungsanlage bestrahlt. Die Strahlung wurde durch einen Kollimator auf eine Schlitzbreite von ca. 2 µm begrenzt und die Probe während der Bestrahlungsdauer von $-0,5^\circ$ bis $+0,5^\circ$ relativ zur Strahlrichtung gekippt. Die Zellen wurden 2 min nach Bestrahlung fixiert und gegen XRCC1 (rot), γ H2AX (grün) und die DNA (DAPI, blau) gefärbt. Maßstab: 5 µm

3.2.4.2 Schwerionenbestrahlung am UNILAC

Die ungerichtete Schwerionenbestrahlung von biologischen Proben am UNILAC (*Universal Linear Accelerator*) erfolgte entweder unter einem Winkel von 15° (Schrägbestrahlung) oder senkrecht zur Ebene des Zellrasens. Die so erzeugten DNA Schäden wurden nach der Immunfluoreszenzfärbung im Mikroskop entweder als punktförmige Foci (senkrechte Bestrahlung) oder als Streifen quer durch den Zellkern (Schrägbestrahlung) sichtbar (Jakob et al. 2003).

Für die senkrechte Bestrahlung wurden die Zellen entweder direkt in \varnothing 3,2 cm Petrischalen eingesät, oder auf 24 x 24 mm Glasplättchen, die mittels passender Gummiringe in den gleichen Petrischalen gesichert wurden (siehe Abbildung 18 rechts). Unmittelbar vor der Bestrahlung wurden die Petrischalen unter sterilen Bedingungen ohne Deckel in spezielle Magazine überführt (siehe Abbildung 18 links). Die Magazine boten Platz für 20 solcher Petrischalen und wurden mit sterilem, vorgewärmtem (37°C) Medium ohne Zusätze aufgefüllt und luftdicht verschlossen. Erst innerhalb der biologischen Bestrahlungsanlage direkt am Beschleuniger wurden die Magazine wieder geöffnet. Vom Kontrollraum aus wurde jede Probe einzeln mittels eines ferngesteuerten Greifer entnommen und im Strahlengang platziert. Jede Probe befand sich so nur für die Dauer der eigentlichen Bestrahlung (maximal 30 s) außerhalb des Mediums und wurde danach wieder im Magazin platziert.

Für die Schrägbestrahlung wurden die Zellen ausnahmslos auf 24 x 24 mm Glasplättchen in Petrischalen ausgesät. Unmittelbar vor der Bestrahlung wurden die Glasplättchen den Petrischalen entnommen und in spezielle Schräg-Adapter (siehe Abbildung 18 rechts) eingesetzt, die einen Winkel des Zellrasens von 15° zum Strahlengang sicherstellten. Die so bestückten Schräg-Adapter wurden in den oben

beschriebenen, mit Medium gefüllten Magazinen platziert. Der Greifer der biologischen Bestrahlungsanlage entnahm auch diese Zellproben einzeln für die Dauer der Bestrahlung. Dabei blieb im unteren Teil jedes Glasplättchens stets ein Tropfen Medium zurück, der die auftreffenden Ionen in diesem Bereich abstoppte und so die Bestrahlung der Zellen an dieser Stelle verhinderte. Nach der Bestrahlung wurden die Proben wieder in das Magazin gesenkt.

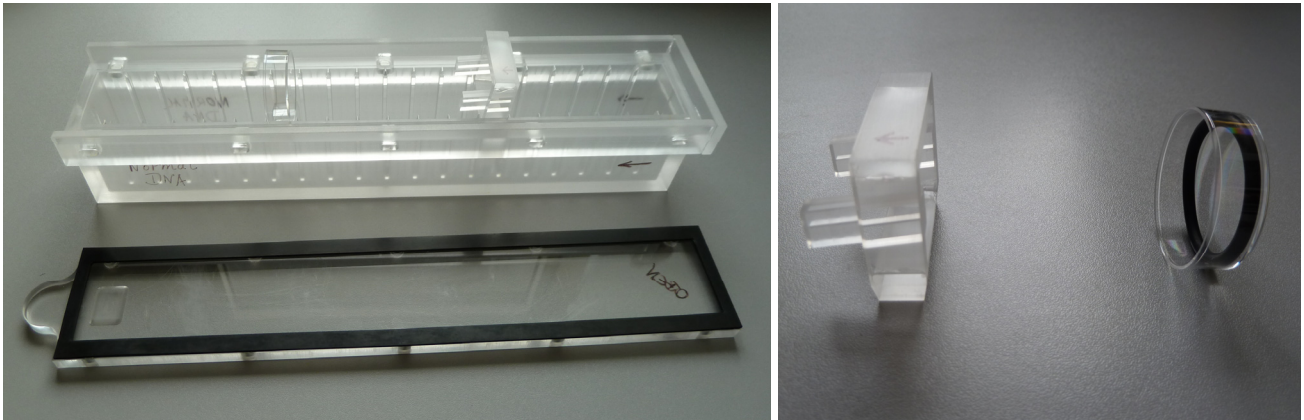


Abbildung 18: Magazin und Probenhalter für die ungerichtete Bestrahlung am UNILAC.

Die Magazine (links) für die ungerichtete UNILAC Bestrahlung können sterilisiert, mit Medium befüllt und dicht verschlossen werden. Sie fassen bis zu 10 Schrägadapter (rechts), in denen mit Zellen besiedelte Deckgläschen mit einer Kantenlänge von 24 mm für die Bestrahlung unter einem spitzen Winkel eingesetzt werden können. Alternativ können bis zu 20 Petrischalen für die senkrechte Bestrahlung eingesetzt werden. Die Petrischalen können entweder direkt besiedelt werden oder man fixiert ein besiedeltes Deckgläschen mit einem Gummiring.

3.2.4.3 Gezielte Schwerionenbestrahlung mit der Mikrosonde am UNILAC

Die Mikrosonde am UNILAC (siehe Abbildung 19) bietet die Möglichkeit punktgenau mit einer definierten Zahl von Ionen zu bestrahlen. Dazu werden die Ionen mit Hilfe von Magneten mit solcher Präzision abgelenkt, dass es möglich ist Bereiche des Zellkerns gezielt zu bestrahlen (Zielgenauigkeit: 670 ± 400 nm STD, Voss et al. 2011). Aus doppelten, fehlenden oder fehlgeleiteten Ionen ergibt sich ein Fehler von 1,3 % (Fischer et al. 2003). Die Ionen erzeugen Sekundärelektronen wenn sie das Austrittsfenster passieren. Diese können detektiert werden und machen es so möglich nach der gewünschten Zahl von Ionen den Strahl automatisch durch einen Deflektor zu unterbrechen (Fischer et al. 2003, Heiss et al. 2006). In der Arbeit von Heiss et al. (2006) befindet sich eine detaillierte Beschreibung des Aufbaus der Mikrosonde, sowie der Zellgefäße.

Für eine gezielte Bestrahlung an der Mikrosonde wurden die Zellen in speziellen Gefäßen, den so genannten Mikrosondenkammern ausgesät (siehe Abbildung 20). Die Kammern sind quadratisch, mit einer Kantenlänge von 20 mm und aus rostfreiem Stahl gefräst. In der Mitte dieses Quadrats befindet sich eine Öffnung von $\varnothing 7$ mm. Die Kammern wurden von unten mit einer 4 μ m dicken Polypropylenfolie bespannt, auf der die Zellen wuchsen. Vor dem Bespannen wurde die Folie für 3 h in einer 2 prozentigen Lipsollösung eingelegt, danach mehrfach mit entionisiertem Wasser gewaschen und über Nacht in Wasser gespült. Nach dem Trocknen der Folie wurde die Unterseite der Kammern mit heißem

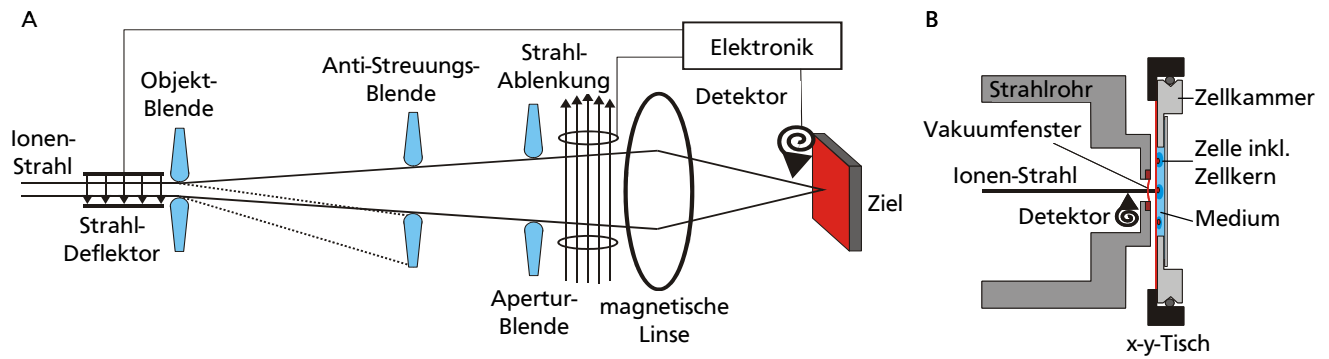


Abbildung 19: Aufbau der GSI Mikrosonde.

A: Schematische Zeichnung der Strahlsteuerung der Mikrosonde. B: Schematische Zeichnung des Strahl-Ziels. Die Ionen des UNILAC Linearbeschleunigers werden an der Mikrosonde mit Hilfe von Magneten auf ein vorher festgelegtes Ziel (im vorliegenden Fall Zellen) abgelenkt. Bei der Passage des Austrittsfensters erzeugen die Ionen Sekundärelektronen, die durch einen Detektor erfasst werden. Nach der gewünschten Zahl von Ionen wird der Strahl automatisch durch einen Deflektor unterbrochen. Modifiziert nach Heiss et al. 2006.

Wachs benetzt und mit der vorbereiteten Folie bespannt. Nach dem Abkühlen wurden die Kammern für 20 min in 70 prozentigem Ethanol sterilisiert und anschließend unter sterilen Bedingungen getrocknet. Um das Anwachsen der Zellen zu verbessern wurden die Kammern mit einer Cell-Tak Lösung ($3,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) beschichtet. Die Folie jeder Kammer wurde dazu für 20 min mit $100 \mu\text{l}$ frisch angesetzter Zell-Tak-Lösung benetzt. Anschließend wurde die Lösung abgenommen, die Kammern dreimal mit sterilem Wasser gewaschen, getrocknet und bis zur Einsaat bei 4°C gelagert. 24 Stunden vor der Besiedlung wurden die Kammern mit Zellmedium befüllt und bis zur Einsaat im Brutschrank vorinkubiert. Direkt vor der Einsaat wurde das Medium der Vorinkubation abgesaugt. Um das Anwachsen der

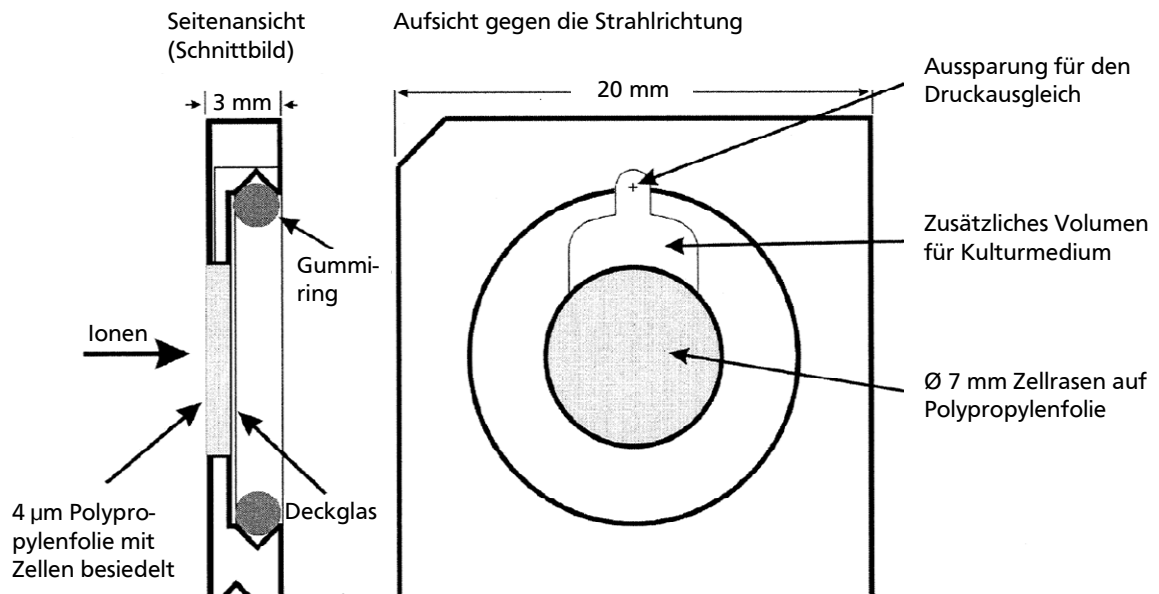


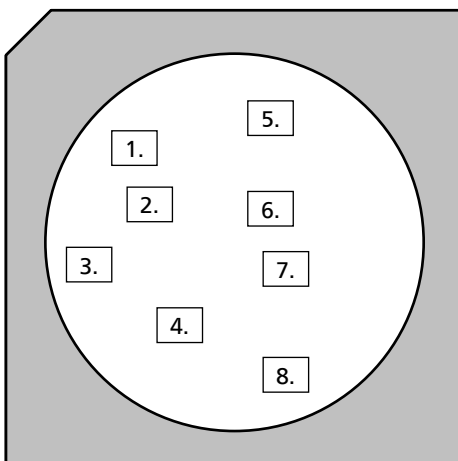
Abbildung 20: Modellzeichnung der Mikrosondenkammern.

Die speziellen Mikrosondengefäße wurden mit $4 \mu\text{m}$ dicker Polypropylenfolie bespannt und diese nach einer Beschichtung mit Cell Tak mit Zellen besiedelt. Direkt vor Bestrahlung wurden die Kammern durch ein Deckglas verschlossen, welches durch einen Gummiring fixiert wurde. Die so präparierte Kammer wurde senkrecht in den Strahlengang eingesetzt. Modifiziert nach Heiss et al., 2006.

Zellen weiter zu verbessern, wurde bei der Einsaat nur der Bereich der Folie mit \varnothing 7 mm bzw. $0,39 \text{ cm}^2$ mit $50 \mu\text{l}$ Zellsuspension besiedelt. Nach mindestens 3 h Inkubation wurden die Kammern mit $350 \mu\text{l}$ vorgewärmtem Medium aufgefüllt und weiter kultiviert.

Eine Stunde vor der Bestrahlung wurde die DNA der Zellen durch Zugabe von $4 \mu\text{l}$ einer $10 \mu\text{M}$ Hoechst 33342 Lösung (Endkonzentration 100 nM) gefärbt. Anschließend wurde das Färbemedium durch steril filtriertes Kulturmedium mit 20 mM HEPES Puffer (pH 7,2) ersetzt und die Zellen bis zur Bestrahlung im Brutschrank aufbewahrt. Unmittelbar vor der Bestrahlung wurden die Kammern mit Deckgläsern (\varnothing 13,7 mm) verschlossen und mit Gummiringen abgedichtet. Um die negativen Einflüsse der fehlenden Temperaturkontrolle zu begrenzen, wurde darauf geachtet, dass die Zellen sich nur für maximal 20 min außerhalb des Brutschranks befanden. Die Kammern wurden senkrecht zwischen Objektiv und Strahlengang platziert.

Durch die DNA-Färbung wurden die Chromocenter der Zellkerne erkennbar. Mit Hilfe der Software Image-Pro-Plus wurden die Zielkoordinaten der Bestrahlung direkt im aufgenommenen DNA-Bild festgelegt und der ausgewählte Bereich bestrahlt. Die Zielauswahl von Hand und das stetige Kalibrieren der Anlage sind zeitaufwendig und begrenzen die Zahl der bestrahlten Felder in einer Probe auf ca. 12 Stück. Die Zielbilder und die entsprechenden Koordinaten wurden abgespeichert um ein späteres Wiederauffinden der bestrahlten Bereiche zu vereinfachen. Nach der Bestrahlung aller Felder wurde die Kammer ausgebaut, zerlegt und die Zellen entweder sofort fixiert oder mit frischem Medium bedeckt und im Brutschrank weiter kultiviert. Abbildung 21 verdeutlicht den zeitlichen Ablauf der Bestrahlung.



Arbeitsschritt	Zeit [min:sek]	Reparaturzeit
Schließen der Mikrosondenkammer	0:00	
Einsetzen der Mikrosondenkammer (Kalibrierung der Mikrosonde)		
Bestrahlung des 1. Feldes	3:30	ca. 16 min
Bestrahlung des 2. Feldes	4:40	ca. 15 min
Bestrahlung des 3. Feldes	5:40	ca. 14 min
Bestrahlung des 4. Feldes	6:50	ca. 13 min
...		
Bestrahlung des letzten Feldes	17:20	ca. 2,5 min
Ausbau der Mikrosondenkammer	18:00	
Öffnen der Mikrosondenkammer (möglicherweise Nachinkubation)	19:30	
Fixierung der Zellen	20:00	

Abbildung 21: Ablauf der Mikrosondenbestrahlung.

Den Zellen im zuerst bestrahlten Feld steht die längste Reparaturzeit zur Verfügung. Durch die Zeit, die der Ausbau und das Öffnen der Mikrosondenkammer in Anspruch nehmen ist der frühest mögliche Fixierungszeitpunkt auf ca. 90 Sekunden nach Bestrahlung limitiert.

3.2.4.4 Schwerionenbestrahlung am SIS 18

Am Schwerionensynchrotron (SIS) war es möglich biologische Proben auch mit höherer Energie zu bestrahlen. In einem homogenen Strahlfenster von 7 x 7 cm konnten gleichzeitig bis zu vier 24 x 24 mm Gläschen in Petrischalen (Anordnung 2 x 2) parallel zum Zellrasen bestrahlt werden.

3.2.4.5 Verwendete Ionen

In Tab. 3.3 ist die weite Spanne der für diese Arbeit verwendeten Ionen mit deren LET und Energie auf Target aufgelistet.

Tab. 3.3: LETs und Energien der verwendeten Ionen

Ion	Isotop	LET [keV/ μm]	Energie [MeV/u]	Art der Bestrahlung
Kohlenstoff	^{12}C	170	9,9	UNILAC
		290	4,8	Mikrosonde
Stickstoff	^{14}N	390	4,8	Mikrosonde
Neon	^{20}Ne	460	9,6	UNILAC
Calcium	^{40}Ca	1800	7,7	UNILAC
		2260	4,8	Mikrosonde
Titan	^{50}Ti	2600	5,1	UNILAC
		110	1000	SIS
Chrom	^{54}Cr	2600	6,5	UNILAC
		3000	4,8	Mikrosonde
Eisen	^{56}Fe	3050	6,1	UNILAC
Nickel	^{64}Ni	3800	4,8	Mikrosonde
Krypton	^{84}Kr	4600	7,2	UNILAC
Samarium	^{150}Sm	9900	4,8	Mikrosonde
Gold	^{197}Au	13000	4,8	UNILAC
		13000	4,8; 3,6	Mikrosonde
Uran	^{238}U	15000	6,2	UNILAC

3.2.5 Immunhistochemische Methoden

3.2.5.1 Fixierungsmethoden

Paraformaldehydfixierung

Die gesamte Paraformaldehyd (PFA) Fixierung findet bei RT statt. Vor der Fixierung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und danach für 15 min mit 2 % PFA in PBS bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 min mit 0,5 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Das Detergens wird zweimal für 3 min mit PBS abgewaschen und die Zellen bis zur Färbung, mindestens aber für 20 min mit 0,4 % BSA in PBS inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen. Bei längerer Lagerung wurden die Proben zusätzlich mit 0,01 % Natriumazid versetzt und bei 4 °C aufbewahrt.

Im Falle der Mikrosondenbestrahlung wurde das Protokoll modifiziert um ein Ablösen der Zellen von der Trägerfolie zu verhindern. Die Lösungen wurden in diesem Fall nicht pipettiert, sondern in kleinen Kunststoffwannen vorgelegt und die Kammern vorsichtig darin eingetaucht. Der Fixierungsschritt verlängerte sich außerdem auf 20 min während die Permeabilisierung auf 7 min verkürzt wurde.

Im speziellen Fall der TUNEL Färbung (siehe Kapitel 3.2.5.3) wurden die Proben nach Protokoll mit PFA fixiert und danach direkt ohne Permeabilisierung bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C in PBS gelagert.

Methanol-Acetonfixierung

Für die Methanol-Aceton Fixierung wurden beide Lösungen bei -20 °C vorgekühlt. Die Proben wurden zunächst mit 4 °C kaltem PBS gewaschen, auf eine vorgekühlte (-20 °C) Metallplatte überführt und mit dem eiskalten Methanol (100 %) bei -20 °C für 30 min fixiert. Anschließend wird das Methanol abgenommen, die Zellen für 1 min mit eiskaltem Aceton permeabilisiert und mindestens dreimal für 3 min mit kaltem PBS gewaschen. Abschließend wurden auch diese Proben für mindestens 20 min mit 0,4 % BSA in PBS inkubiert um die unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen. Die Langzeitlagerung erfolgte falls, notwendig, nach Zugabe von 0,01 % Natriumazid bei 4 °C.

3.2.5.2 Immunfluoreszenzfärbung

Die Primärantikörper wurden entsprechend Kapitel 3.1.4 (Tab. 3.1: Primärantikörper) in 0,4 % BSA in PBS verdünnt. Pro Deckglas wurden 50 µl Antikörperlösung auf Parafilm vorgelegt und das Deckglas mit dem Zellrasen nach unten auf den Tropfen gelegt. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblase mehr unter dem Deckglas befand. Die Zellen in Mikrosondenkammern wurden mit jeweils 100 µl Primärantikörperlösung bedeckt. Die Inkubation erfolgt für 1 h bei RT in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Proben dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Die Sekundärantikörperlösung wurde entsprechend Kapitel 3.1.4 (Tab. 3.2: Sekundärantikörper) in 0,4 % BSA in PBS angesetzt und wie die Primärantikörperlösung verwendet. Die Inkubation erfolgte für 45 min in einer feuchten, lichtdichten Kammer. Generell wurden die Proben ab diesem Schritt im Dunkeln gehalten,

da es sich um lichtempfindliche Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper handelte. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde die DNA je nach Aufnahmesystem entweder mit ToPro 3 (1 μ M) oder mit DAPI (0,2 μ g/ml) für 15 min gefärbt. Schließlich wurden die Proben nach kurzem Spülen in entionisiertem Wasser mit 5 μ l Einbettmedium versetzt und auf einen OT gelegt (im Fall der Besiedlung von Deckgläschen) bzw. mit einem Deckglas abgedeckt (im Fall der Mikrosondenkammern).

3.2.5.3 Modifizierte TUNEL Färbung

Die PFA fixierten Proben wurden erst unmittelbar vor der Färbung permeabilisiert. Dafür wurden die Deckgläschen in den Schrägadaptern (siehe Abbildung 18) in 200 ml 0,01 M Citratpuffer (pH 6,0) in der Mikrowelle bei 335 W für 4 min bis auf ca. 88 °C erwärmt. Im Falle von Mikrosondenkammern wurden diese auf Trägerplatten aus 4 mm Aluminium befestigt und ebenfalls im Citratpuffer erhitzt. Direkt nach dem Erhitzen wurde der Citratpuffer mit 80 ml ddH₂O aufgefüllt und so rasch abgekühlt. Die Deckgläschen wurden den Schrägadaptern entnommen und zweimal bei RT mit PBS für 3 min gewaschen.

Nach der Permeabilisierung wurden unspezifische Bindungsstellen für die spätere Antikörperfärbung durch eine Inkubation mit 0,4 % BSA in PBS für 30 min abgesättigt. Für die TUNEL-Färbung wurde der Reaktionsmix stets frisch auf Eis angesetzt. Je Probe wurden 45 μ l „label solution“ mit 5 μ l „enzyme solution“ (*In Situ Cell Death Detection Kit*, Roche) gemischt und 50 μ l der Lösung auf Parafilm vorgelegt. Die Deckgläschen wurden mit dem Zellrasen nach unten auf dem Tropfen abgelegt, wobei Luftblasen vermieden wurden. Die Proben wurden in einer lichtundurchlässigen, feuchten Kammer für 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und anschließend dreimal mit PBS bei RT gewaschen. Nachfolgend wurden die Proben mittels gewöhnlicher Immunfluoreszenzfärbung angefärbt, wobei für eine Sekundärantikörperfärbung nur Antikörper in Frage kamen, die nicht an einen Fluorophor mit einer Emission bei 488 nm gekoppelt waren, da das TUNEL Kit auf FITC basiert.

3.2.6 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die Immunfluoreszenzaufnahmen wurden je nach Farbstoffen, Verfügbarkeit und Auflösungsanspruch an unterschiedlichen Aufnahmesystemen durchgeführt.

Proben, deren DNA mit ToPro 3 gefärbt war, wurden mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop des Typs DM IRBE/TCS NT der Firma Leica aufgenommen. Das System war u.A. ausgestattet mit einem 63x Objektiv (Plan Apo 63x/1,32; Ölimmersion) und einem Argon-Krypton-Laser, der in den Wellenlängen 488 nm, 568 nm und 647 nm anregen konnte. Bei der Aufnahme wurde darauf geachtet, dass sich das Fluoreszenzsignal nicht in Sättigung befand. Dafür wurden die Laserintensität (Stärke der Anregung), die Signalverstärkung des Photomultipliers und der Offset (untere Detektionsschwelle) entsprechend angepasst. Die gefärbten Zellkerne wurden in der Tiefe in Schritten von 0,243 μ m

Abstand gescannt, wobei für jede Schicht ein Mittelwert aus zwei Aufnahmen gebildet wurde, um das Signalrauschen zu reduzieren.

Proben, deren DNA mit DAPI gefärbt war, wurden mit einem konfokalen Spinning Disk Mikroskop von Nikon (Eclipse Ti mit Spinning Disk Einheit von Yokogawa und EMCCD Kamera von Andor) aufgenommen. Das System war u.A. ausgestattet mit einem 100x Objektiv (100x/1,3; Ölimmersion) und einem Lasersystem, dass in den Wellenlängen 405 nm, 488 nm, 561 nm und 647 nm anregen konnte. Somit war auch die Aufnahme einer vierfach Färbung möglich. Auch hier wurde darauf geachtet, dass sich das Fluoreszenzsignal nicht in Sättigung befand. Dafür wurden hier die Laserintensität (Stärke der Anregung), die Verstärkung der Kamera und die Integrationszeit angepasst. Die gefärbten Zellkerne wurden in der Tiefe in Schritten von 0,1 bzw. 0,2 μm Abstand aufgenommen.

Alternativ zum konfokalen Spinning Disk System wurde außerdem ein konfokales Laser Scanning Mikroskop TCS SPE der Firma Leica verwendet. Dieses System war u.A. ausgestattet mit einem 63x Objektiv (Apo 63x/1,3; Ölimmersion) und einem Lasersystem, dass in den Wellenlängen 405 nm, 488 nm, 561 nm und 647 nm anregen konnte. Somit war auch hier die Aufnahme einer vierfach Färbung möglich. Wie bei den anderen Systemen wurde auch hier darauf geachtet, dass sich das Fluoreszenzsignal nicht in Sättigung befand. Dafür wurden hier die Laserintensität (Stärke der Anregung), die Verstärkung des Photomultipliers und der Offset (untere Detektionsschwelle) angepasst. Die gefärbten Zellkerne wurden in der Tiefe in Schritten von 0,2 μm Abstand aufgenommen.

Dieses System wurde außerdem für nicht konfokale Weitfeldaufnahmen genutzt, da es neben der konfokalen Einheit auch das Kamerasystem DFC360FCX besaß.

3.2.7 STED Mikroskopie

Die STED Aufnahmen wurden bei der Optical Nanoscopy Division am DKFZ in Heidelberg durchgeführt. Die Anregung erfolgte durch eine gepulste Laserdiode (Picoquant) mit einer Wellenlänge von 470 nm, synchronisiert mit einem STED Krypton Laser (Coherent Inc.) mit Wellenlängen von 568 nm und 647 nm durch eine schnelle Photodiode (OCF-401, Becker & Hickl GmbH). Mit Hilfe einer Phasenplatte (RPC Photonics) wurde ein ringförmiger Fokuspunkt für das STED Licht erzeugt. Anregungs- und STED-Licht wurden durch acousto-optisch modulierbare Filter (Crystal Technologies) in einem Mikroskop (DMI 4000B, Leica Microsystems) mit 63x Objektiv (NA 1,30; Ölimmersion; Leica) kombiniert. Das emittierte Fluoreszenzlicht wurde durch einen Bandpassfilter (HQ510/40M, Chroma) geleitet und konfokal mit einer Avalanche-Photodiode (SPCM-AQR-13-FC, PerkinElmer) aufgenommen. Die Datenaufnahme und Systemsteuerung erfolgte mit der Software „Inspector“ (MPI Göttingen). Die Pixelgröße betrug bei dem beschriebenen System ca. 30 nm.

3.2.8 Bildauswertung

Die Dekonvolution der aufgenommenen Bilder erfolgte mit der Software Hyugens Essential. Die Quantitative Auswertung der Fluoreszenzsignale wurde mit Hilfe der Software ImageJ durchgeführt.

3.2.9 Biochemische Methoden

3.2.9.1 Präparation von Zelllysaten

Zelllysate wurden aus besiedelten Ø 3,2 cm Petrischalen gewonnen. Für die Lyse (auf Eis) wurde das Kulturmedium abgezogen, die Zellen kurz mit PBS gespült und nach Zugabe von 70 µl 2fach SDS-Lysepuffer mit einem Zellschaber vom Boden des Kulturgefäßes gekratzt. Die Lösung wurde sorgfältig in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und auf Eis mittels einer 1 ml Spritze zehnmal durch ein 25G Kanüle gezogen. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 100 °C gekocht und danach bei 4 °C mit 13000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde schließlich in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.9.2 Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der Proteinlösungen erfolgte nach der Lowry Methode (Lowry et al. 1951) mit Hilfe des „D_C Protein Assay Kit“ der Firma Bio-Rad nach Herstellerangabe. Die Absorption der entstehenden Kupfer-Protein-Komplexe wurde bei 690 nm mit einem ELISA-Reader gemessen, wobei jede Probe doppelt bestimmt wurde. Für jede Konzentrationsbestimmung wurde eine neue Eichgerade durch Messung der Absorption bekannter BSA-Konzentrationen (0, 0,2, 0,4, 0,8 und 1 mg/ml) erstellt. Die Berechnung der Proteinkonzentrationen anhand der Eichgeraden erfolgte mit Hilfe der Software „Gen5“.

3.2.9.3 SDS-PAGE und Western Blot

Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Da sich aber das Laufverhalten nativer Proteine durch z.B. deren Sekundär- und Tertiärstruktur nicht direkt von ihrer Größe ableitet, werden sie vor der Auftrennung denaturiert. Dies geschieht zum einen durch β-Merkaptoethanol, welcher die Disulfidbrücken zerstört. Zum anderen lagert sich SDS (*sodium dodecyl sulfate*) an die Aminosäuresequenz und verhindert so Wechselwirkungen innerhalb der Sequenz. Darüber hinaus verleiht SDS durch seine negativen Sulfatgruppen dem Protein eine Ladung, welche proportional zur Proteingröße ist. Auf diese Weise wird die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe möglich. Um die Auftrennungsleistung weiter zu verbessern, wurden diskontinuierliche Gele genutzt. Diese biphasigen Gele unterscheiden sich in ihrer Acrylamid-Konzentration und dem pH-Wert. Die obersten 20 % des Gels (Sammelgel) zeichnen sich durch einen leicht sauren pH-

Wert (pH 6,8) und einen niedrigen Acrylamidgehalt (5 %) aus. Der verbleibende untere Teil des Gels (Trenngel) hat dagegen einen basischen pH (pH 8,8) und eine höhere Acrylamid-Konzentration (zwischen 5 und 15 %). Der resultierende pH-Unterschied führt zum so genannten „*steading effect*“: Bei einem pH von 6,8 (Sammelgel) liegt, das im Laufpuffer vorhandene, Glycin als Zwitter-Ion vor, welches nur sehr langsam durch die Acrylamidmatrix wandert. Dadurch werden die schneller laufenden Proteine an der Grenzlinie zum Trenngel zusammengestaucht. Durch den basischen pH im Trenngel verliert das Glycin seine Ladung und läuft damit schneller als die Proteine. Letztere werden nun entsprechend ihrer Größe aufgetrennt.

Zunächst wurde das Trenngel in die Gießkammer gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um eine scharfe Grenzlinie des Gels zu gewährleisten und Luftblasen zu vermeiden. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol abgeschüttet, kurz mit entionisiertem Wasser gewaschen, das Sammelgel gegossen und der Kamm darin eingebettet. Nach erneuter Polymerisation wurde das nun fertige Gel in die PAGE-Apparatur (Bio-Rad) eingespannt und diese mit 1xElektrophoresepuffer gefüllt. Anschließend wurde der Kamm vorsichtig entfernt und die Geltaschen mit Puffer gespült. Die entsprechend ihrer Proteinkonzentration (siehe 3.2.9.2) normierten Proben wurden mit 2xSDS-Probenpuffer vermischt und 5 min bei 95 °C inkubiert, um sie vollständig zu denaturieren. Anschließend wurden die Proben an zentrifugiert und in die Geltaschen pipettiert. Als Größenreferenz wurden 4 µl des Proteinstandards PageRuler PreStained Plus (Fermentas) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für ca. 45 min bei 45 mA/Gel durchgeführt. Die so aufgetrennten Proteine wurden mittels Westernblot (im Folgenden) analysiert.

Westernblot-Analyse

Die mittels SDS-PAGE (siehe oben) aufgetrennten Proteine wurden auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran übertragen und mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Zum Transfer auf die Membran wird ein elektrisches Feld angelegt, das senkrecht zur Gellaufrihtung steht. Die negativ geladenen Proteine wandern in diesem Feld in Richtung der Kathode und somit auf die Membran. Dort haften sie auf Grund hydrophober Wechselwirkungen.

Für biphasische Gele erfolgte das Blotting der Proteine in einer mit Wasser angefeuchteten Semidry-Blottingapparatur (Hoefer). Zunächst wurde die PVDF-Membran durch kurzes Tränken in 100 % Methanol aktiviert (hydrophil gemacht) und anschließend kurz in Transferpuffer geschwenkt. Das Sammelgel wurde vom Trenngel entfernt und dieses auf zwei Transferpuffer-getränkte Whatman-Papiere gelegt. Die Membran wurde luftblasenfrei auf der anderen Seite des Gels platziert und zwei weitere Transferpuffer-getränkte Whatman-Papiere auf die Membran gelegt. Dieser Stapel wurde so in die Semidry-Blottingapparatur gelegt, dass das Gel auf der Seite der Anode und die Membran auf der Seite der Kathode zu liegen kam. Möglicherweise vorhandene Luftblasen wurden sorgfältig entfernt. Der Proteintransfer erfolgte bei 65 mA/Gel für 45 min.

Nach Ausbau der Membran folgte der immunologische Nachweis der Proteine. Dafür wurde die Membran zunächst für 1 h bei RT in 5 % Blockmilch bzw. 5 % BSA in TBS inkubiert und so die freien Bindestellen blockiert. Anschließend folgte die Inkubation in Erstantikörperlösung (in Blocklösung verdünnt) für 1 h unter Rotation bei RT. Durch dreimaliges Waschen (je 5 min) in TBS/Tween wurde danach der ungebundene Erstantikörper entfernt. Der Nachweis der spezifisch gebundenen Erstantikörper erfolgte mit Hilfe eines gegen diesen gerichteten Zweitantikörpers, welcher an die Meerrettichperoxidase (*horse radish peroxidase* - HRP) gekoppelt war. Dieser wurde in Blocklösung verdünnt und für 1 h unter Schwenken bei RT inkubiert. Ungebundener Zweitantikörper wurde durch zweimaliges Waschen für je 5 min in TBS/Tween entfernt. Die immobilisierte Meerrettichperoxidase vermittelt eine Chemolumineszenz, durch die der Zweitantikörper sichtbar gemacht wurde. Für diese Reaktion wurden Luminol- und Enhancer-Lösung (ECL PLUS Kit) im Verhältnis 40 zu 1 gemischt und für fünf Minuten unter Lichtausschluss auf der Membran inkubiert. Die Meerrettichperoxidase verwendet H₂O₂, um ihr Substrat Luminol zu oxidieren. Dieses zerfällt daraufhin, wobei Licht emittiert wird. Diese Emission wird durch einen Fotofilm im Dunkeln detektiert. Die Belichtungszeit des Films wurde je nach Signalstärke variiert und lag zwischen 10 sec und 10 min. Die Entwicklung des Films erfolgte automatisiert in einer Entwicklermaschine (AGFA) mit den zugehörigen Entwickler- und Fixierlösungen.

3.2.10 Statistische Berechnungen

Die Abschätzung der Treffergenauigkeit bei der Schwerionenbestrahlung an der Mikrosonde erfolgte durch Annäherung der Ionenverteilung mit Hilfe einer zweidimensionalen Gaußfunktion. Dies führte zu Gleichung (10), welche den Anteil (f) der Ionen im Ziel (Chromocenter) definiert.

$$f = 1 - e^{\frac{-\pi \cdot r_{CC}^2}{4r_{Ziel}^2}} \quad (10)$$

f : Anteil der Ionen im Ziel

r_{CC} : mittlerer Radius des angezielten Chromocenters

r_{Ziel} : mittlerer Abstand des Ions von der Zielkoordinate (Voss et al. 2011)

Für Signifikantstests wurde der Students t-Test verwendet.

4. Ergebnisse

Nach gezielter Bestrahlung von heterochromatischen Chromocentern wurde neben der Rekrutierung von DNA-Schadensmarkern wie γ H2AX und XRCC1 in das Heterochromatin auch deren Relokalisierung zur Heterochromatin Peripherie in Richtung Euchromatin beobachtet (Jakob et al. 2011). Ziel dieser Arbeit war es, die räumliche Dynamik von heterochromatinassoziierten DNA Schäden genauer zu untersuchen. Speziell die Relokalisierung heterochromatischer DNA Schäden in euchromatische Chromatinbereiche wurde charakterisiert.

4.1 Gezielte Schadensinduktion im Heterochromatin

Um die Relokalisierung heterochromatischer Schäden in Richtung euchromatischer Bereiche zu untersuchen, wurden embryonale Maus Fibroblasten (MEF) an der GSI Mikrosonde mit einzelnen, gezielt applizierten Ionen beschossen. Die MEFs zeichnen sich durch eine scharfe Abgrenzung des Heterochromatins in so genannte Chromocenter aus, die sich durch eine intensive DNA Färbung vom umgebenden Euchromatin abheben.

Zur Verifizierung, dass es sich bei den intensiv DNA gefärbten Bereichen tatsächlich um heterochromatische Chromocenter handelt, wurden die MEFs gegen den Heterochromatinmarker H3K9me3 gefärbt. Wie in Abbildung 22 gezeigt, überlagerte das H3K9me3 Signal mit den intensiv DNA gefärbten Bereichen.

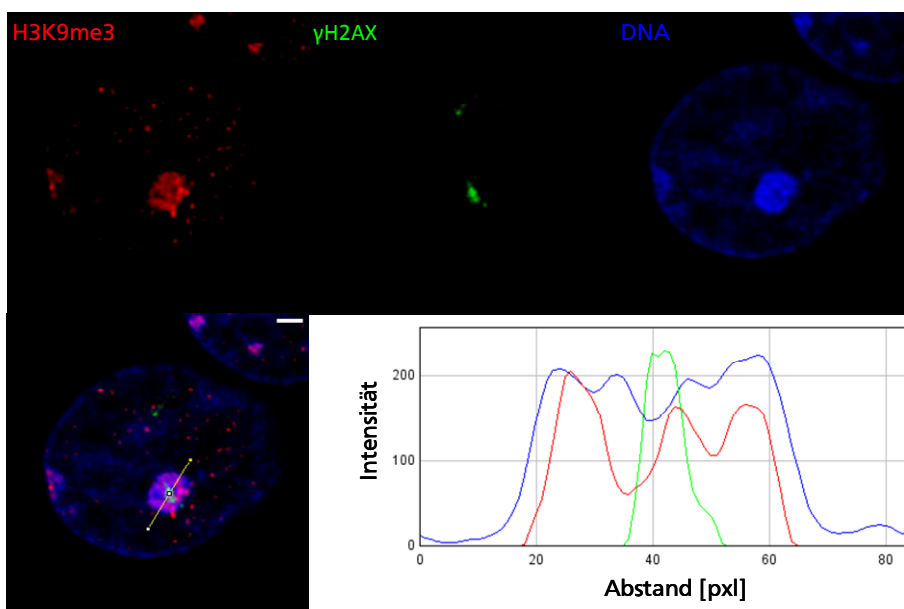


Abbildung 22: Heterochromatinmarkierung der intensiv DNA-gefärbten Chromocenter in MEFs.

Die Chromocenter embryonaler Maus Fibroblasten wurden mit einzelnen Stickstoffionen ($390 \text{ keV}/\mu\text{m}$; $4,8 \text{ MeV/u}$) an der Mikrosonde bestrahlt. Die Zellen wurden ca. 5 min nach der Bestrahlung fixiert und gegen H3K9me3 (rot), γ H2AX (grün) und die DNA (DAPI, blau) gefärbt. Das Linienprofil zeigt den Intensitätsverlauf der drei Färbungen entlang der dargestellten Achse (gelbe Linie in der Überlagerung). Maßstab: $2 \mu\text{m}$; 10 pxl im Intensitätsprofil entsprechen $0,72 \mu\text{m}$.

Für die folgenden Versuche wurden die Zellen so in speziellen Mikrosonden Kammern ausgesät, dass sie sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung weiterhin in der Proliferation befanden, um eine Selektion auf die G0/G1 Phase durch Konfluenz zu vermeiden.

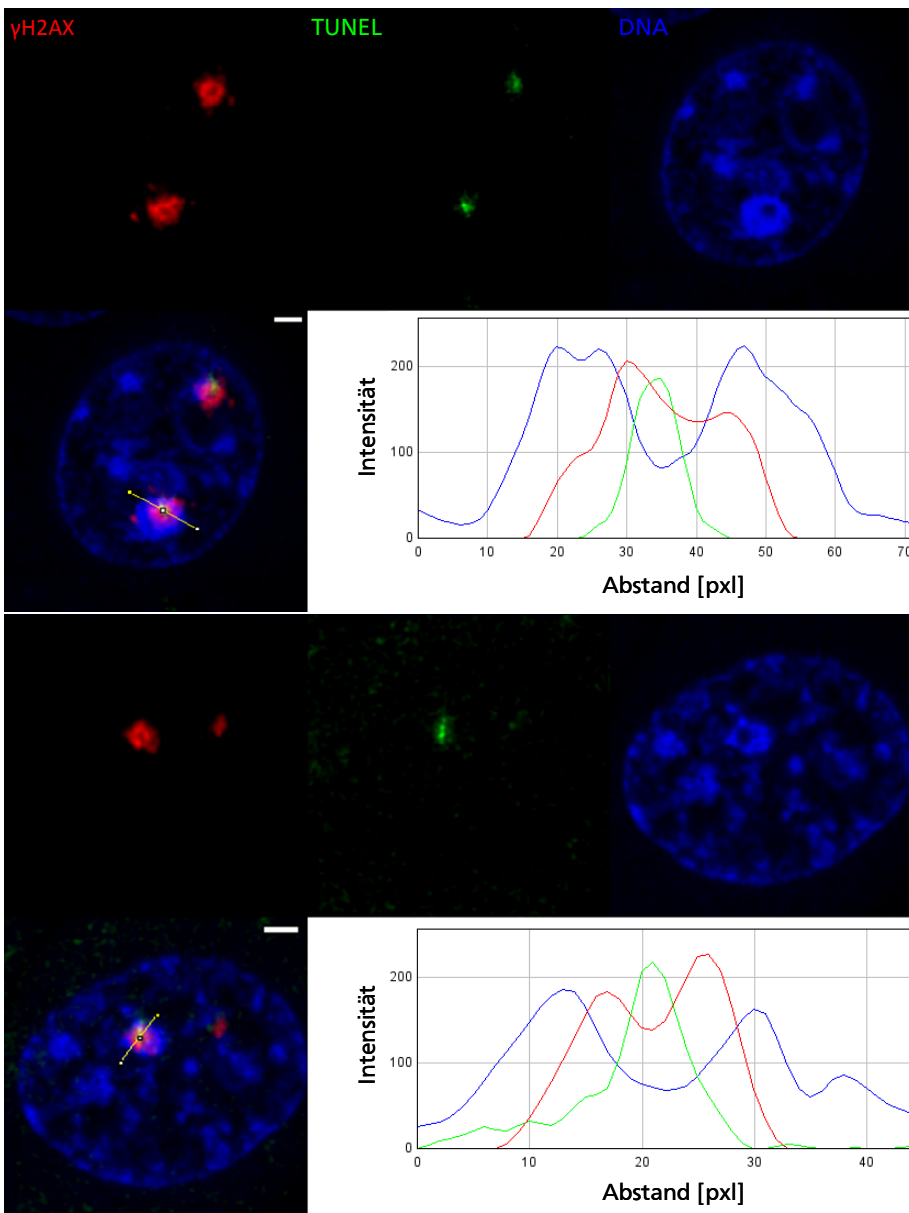


Abbildung 23: Direkte DNA Schadensmarkierung mit einer modifizierten TUNEL-Färbung.

Die Chromocenter embryonaler Maus Fibroblasten wurden mit einzelnen Goldionen ($12800 \text{ keV}/\mu\text{m}$, $4,8 \text{ MeV/u}$) an der Mikrosonde bestrahlt. Die Zellen wurden 5 min nach der Bestrahlung fixiert. Dargestellt sind die Fluoreszenzsignale für TUNEL (grün), γH2AX (rot) und die DNA (DAPI, blau). Die Linienprofile zeigen den Intensitätsverlauf der drei Färbungen entlang der dargestellten Achse (gelbe Linie in der Überlagerung). Maßstab: $2 \mu\text{m}$; 10 pxl in den Intensitätsprofilen entsprechen $0,72 \mu\text{m}$.

Der etablierte DSB Marker γH2AX (Rogakou et al. 1998) kann nach Ionenbestrahlung in heterochromatischen Chromocentern nachgewiesen werden (Jakob et al. 2011) (siehe auch Abbildungen 22 bis 24).

Um sicher zu stellen, dass es sich bei den detektierten IRIFs in den Chromocentern tatsächlich um DSBs handelt, wurde die TUNEL Methode soweit modifiziert, dass sie empfindlich genug war freie

DNA Enden in einzelnen Ionenspuren sichtbar zu machen. Die terminale Transferase hängt Fluorophor gekoppelte Nukleotide an die freien DNA Enden. Der Vorteil dieser Methode ist folglich die direkte Markierung der gebrochenen DNA Stränge anstelle des immunhistochemischen Nachweises von nachträglich, schadensabhängig rekrutierten oder modifizierten Proteinen. Die resultierenden TUNEL Foci sind deutlich begrenzter in ihrer Ausdehnung, während sich Schadensmarker wie γ H2AX mehrere Megabasenpaare um den Bruch ausdehnen (Rogakou et al. 1998 und 1999). Somit ist eine präzisere Lokalisierung der DSBs durch die TUNEL Färbung möglich.

Abbildung 23 zeigt beispielhaft die Detektion von DNA Schäden innerhalb von Chromocentern nach der Bestrahlung mit schweren Ionen durch die modifizierte TUNEL Markierung. Das parallel detektierte γ H2AX Signal überlagerte mit dem TUNEL Signal, wobei letzteres weniger diffus und räumlich begrenzter erschien. Direkt um den DNA Schaden herum sank das Signal der DNA Färbung deutlich ab. Dieser Aspekt wird im Abschnitt 4.5 genauer erläutert. Auch das γ H2AX Signal zeigte oft einen Einbruch bzw. ein lokales Minimum im Zentrum des Schadensfokus (siehe Abbildungen 23 und 24, siehe Abschnitt 4.10).

4.2 Charakterisierung der DNA Schadensantwort im Heterochromatin

Heterochromatin gilt durch seinen dichten Packungsgrad weithin als Barriere für die Rekrutierung von Reparaturproteinen. In den bisherigen Arbeiten konnte nach Röntgenbestrahlung beispielweise γ H2AX nicht innerhalb des Heterochromatins nachgewiesen werden (Goodarzi et al. 2008 und 2010). Die Reparatur heterochromatischer DNA Schäden wird allgemein als komplexer angesehen und läuft sowohl nach Röntgen- als auch nach Ionenbestrahlung langsamer ab, als die Reparatur euchromatischer DNA Schäden (Beucher et al. 2009, Jakob et al. 2011, Falk et al. 2013). Um Rückschlüsse auf den Reparaturweg heterochromatischer DNA Schäden und die Unterschiede zur euchromatischen Reparatur zu ziehen, wurde untersucht, welche Reparaturfaktoren tatsächlich an heterochromatische Schäden nach Schwerionenbestrahlung rekrutiert werden.

Unabhängig vom später gewählten Reparaturweg ist der MRN Komplex einer der frühesten Marker von DNA Schäden (Williams et al. 2010). Abbildung 24 belegt, dass die MRN Komponenten NBS1 und MRE11 auch innerhalb des Heterochromatins kurz nach der Schadensinduktion durch Ionen rekrutiert werden. Die Signale beider Proteine überlagern mit γ H2AX, sind aber in ihrer Ausdehnung schärfer abgegrenzt.

Nach der Schadenserkennung wird H2AX durch aktiviertes ATM phosphoryliert (Rogakou et al. 1998, Williams et al. 2010). Auch das aktivierte, das heißt phosphorylierte ATM konnte innerhalb der Chromocenter nach Ionenbestrahlung nachgewiesen werden (Abbildung 25). Das pATM Signal überlagerte ebenfalls mit γ H2AX und zeigte anders als die MRN Komponenten die gleiche weiträumige Ausdehnung wie γ H2AX.

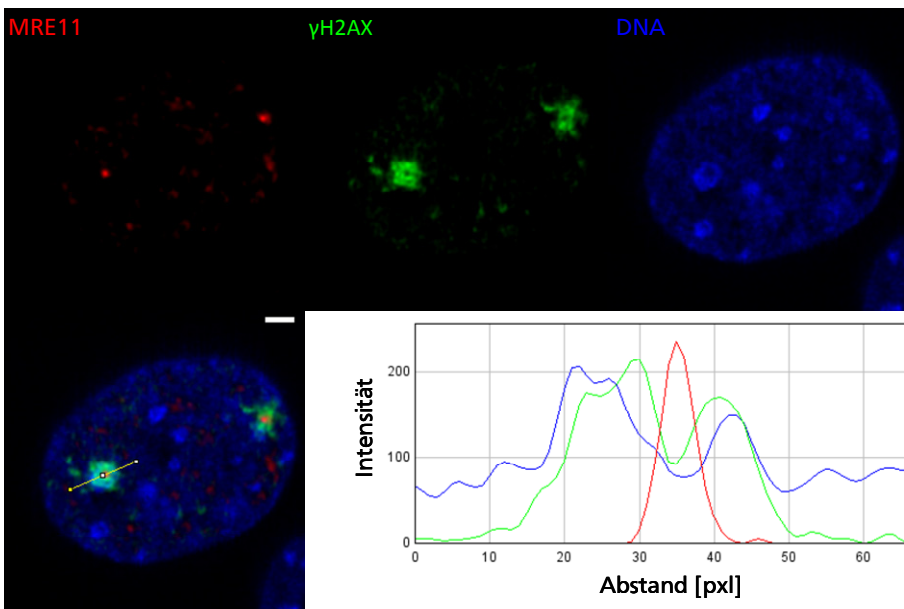
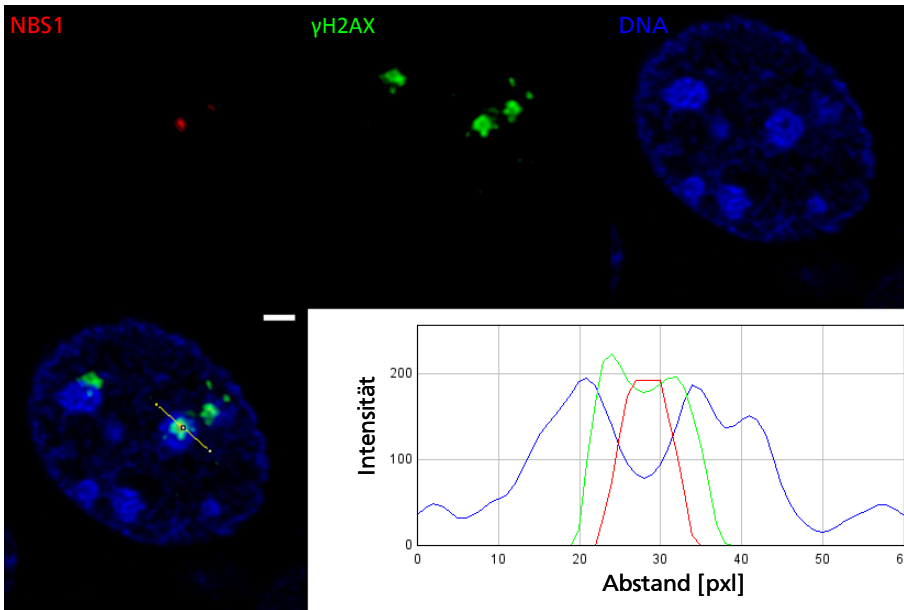


Abbildung 24: Rekrutierung der MRN Komponenten MRE11 und NBS1 an heterochromatische, durch Ionen induzierte DNA Schäden.

Oberes Bildfeld: Die Chromocenter embryonaler Maus Fibroblasten wurden mit einzelnen Nickelionen ($3800 \text{ keV}/\mu\text{m}$; $4,8 \text{ MeV}/\text{u}$) an der Mikrosonde bestrahlt. Die Zellen wurden ca. 7 min nach der Bestrahlung fixiert und gegen NBS1 (rot), γ H2AX (grün) und die DNA (DAPI, blau) gefärbt. Das Linienprofil zeigt den Intensitätsverlauf der drei Färbungen entlang der dargestellten Achse (gelbe Linie in der Überlagerung).

Unteres Bildfeld: Die Chromocenter embryonaler Maus Fibroblasten wurden mit einzelnen Goldionen ($12800 \text{ keV}/\mu\text{m}$; $4,8 \text{ MeV}/\text{u}$) an der Mikrosonde bestrahlt. Die Zellen wurden ca. 9 min nach der Bestrahlung fixiert und gegen MRE11 (rot), γ H2AX (grün) und die DNA (DAPI, blau) gefärbt. Das Linienprofil zeigt den Intensitätsverlauf der drei Färbungen entlang der dargestellten Achse. Maßstab: $2 \mu\text{m}$; 10 pxl in den Intensitätsprofilen entsprechen $0,72 \mu\text{m}$.

Die lokalisierte Energiedeposition bei der Bestrahlung mit schweren Ionen führt zu besonders komplexen DNA Schadensmustern, die neben den bereits nachgewiesenen DSBs auch andere DNA Schäden wie Einzelstrangbrüche und Basenveränderungen enthalten (Ward et al. 1994). XRCC1 ist einer der Schlüsselfaktoren der SSB Reparatur durch BER (Rice et al. 1999, Whitehouse et al. 2001) und

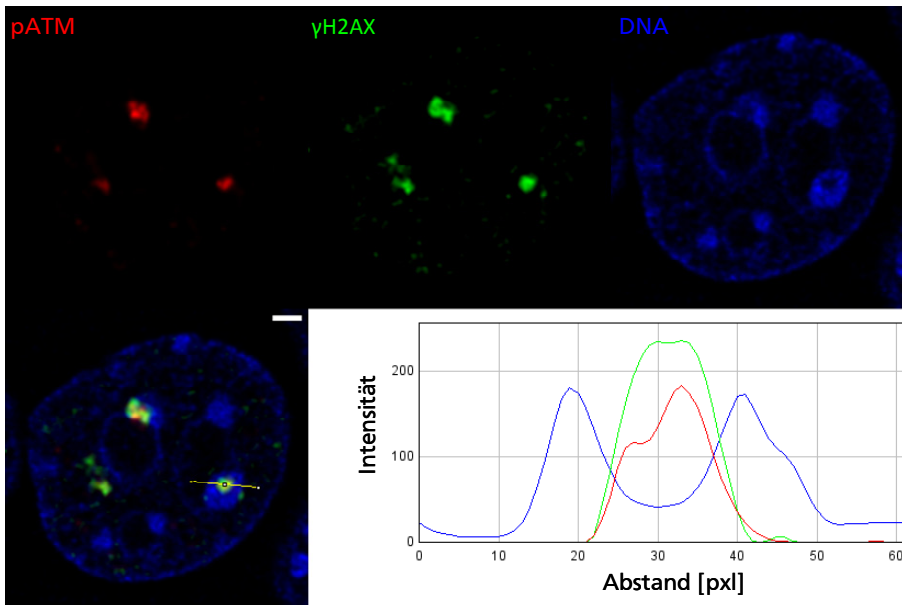


Abbildung 25: Nachweis von aktiviertem ATM innerhalb des Heterochromatins.

Die Chromocenter embryonaler Maus Fibroblasten wurden mit einzelnen Nickelionen ($3800 \text{ keV}/\mu\text{m}$; $4,8 \text{ MeV}/\text{u}$) an der Mikrosonde bestrahlt. Die Zellen wurden ca. 30 min nach der Bestrahlung fixiert und gegen pATM (rot), γH2AX (grün) und die DNA (DAPI, blau) gefärbt. Das Linienprofil zeigt den Intensitätsverlauf der drei Färbungen entlang der dargestellten Achse (gelbe Linie in der Überlagerung). Maßstab: $2 \mu\text{m}$; 10 pxl im Intensitätsprofil entsprechen $0,72 \mu\text{m}$.

außerdem am MMEJ (Wang et al. 2008) und der NER (Solimando et al. 2009) beteiligt. Es wird innerhalb von Sekunden an Ionenschäden rekrutiert und bleibt für die ersten Minuten nach Bestrahlung lokal an den DNA Schäden konzentriert (Jakob et al. 2011). Auch XRCC1 konnte nach gezielter Bestrahlung innerhalb der Chromocenter von MEF H2AX WT, als auch MEF ATM $-/-$ (Abbildung 26) nachgewiesen werden.

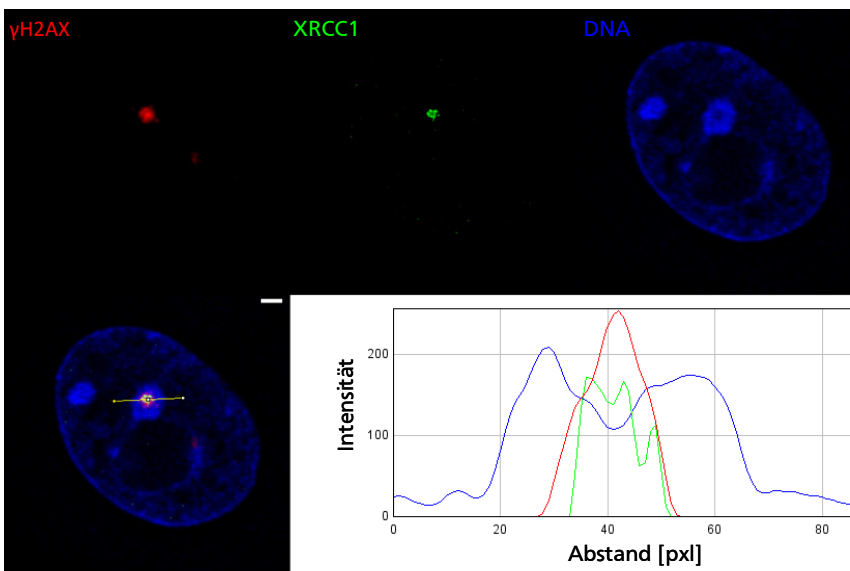


Abbildung 26: Nachweis der Rekrutierung von XRCC1 an ioneninduzierte Schäden im Heterochromatin.

Die Chromocenter embryonaler Maus Fibroblasten (MEF ATM $-/-$) wurden mit einzelnen Samariumionen ($9900 \text{ keV}/\mu\text{m}$; $4,8 \text{ MeV}/\text{u}$) an der Mikrosonde bestrahlt. Die Zellen wurden ca. 2 min nach der Bestrahlung fixiert und gegen γH2AX (rot), XRCC1 (grün) und die DNA (DAPI, blau) gefärbt. Das Linienprofil zeigt den Intensitätsverlauf der drei Färbungen entlang der dargestellten Achse (gelbe Linie in der Überlagerung). Maßstab: $2 \mu\text{m}$; 10 pxl im Intensitätsprofil entsprechen $0,72 \mu\text{m}$.

4.3 Relokalisierung der heterochromatischen DNA Schäden in euchromatische Bereiche

Wie 2011 von Jakob et al. publiziert, relokalisieren heterochromatische Schäden kurz nach der Schadensinduktion zur Peripherie der Chromocenter, sodass sie schließlich außerhalb des eigentlichen Chromocenters auf dessen Grenzfläche zum Euchromatin aufliegen. Diese Relokalisierung wurde in den folgenden Experimenten in genauerer zeitlicher Auflösung und Ausdehnung charakterisiert.

Für die Analyse der Relokalisierung wurde zwischen drei Stadien der Lage der Schadensmarkerspur relativ zum getroffenen Chromocenter unterschieden: zentrale, intermediäre und periphere Spuren. Abbildung 27 zeigt die Definition dieser Stadien anhand von beispielhaften Aufnahmen. Das obere Bildfeld (A) zeigt zentrale Schadensspuren markiert durch γ H2AX, TUNEL und 53BP1. Sie verlaufen in gerader Linie annähernd mittig durch das getroffene Chromocenter (gerenderte Aufnahmen in der Mitte). Eine einzelne Bildebene in Strahlrichtung aufgenommen zeigt die IRIFs der DNA Schadensmarker im Zentrum des Chromocenters (links). Das Linienprofil (rechts) eines solchen, zentralen Schadensfocus zeigt die Spitze des Schadenssignales inmitten eines lokalen Minimums des DNA Signals, welches zu beiden Seiten der Schadensmarkierung etwa gleich hoch ansteigt. Die gerenderten Aufnahmen des DNA Signals zeigen die zentral getroffenen Chromocenter in einer Donut-Form. Das Absinken des DNA Signals direkt um den DNA Schaden wird in Abschnitt 4.5 genauer erläutert.

Das mittlere Bildfeld (B) von Abbildung 27 zeigt Beispiele für intermediäre Schadensspuren anhand von γ H2AX- und TUNEL-Färbung. Diese verlaufen gerade noch innerhalb der Chromocenter, weisen jedoch bereits eine leichte Krümmung auf und passieren das Chromocenter nicht mehr im Zentrum (gerenderte Aufnahmen in der Mitte). Eine einzelne Bildebene in Strahlrichtung aufgenommen zeigt die IRIFs der DNA Schadensmarker gerade noch innerhalb des getroffenen Chromocenters, aber außerhalb dessen Zentrums. Das Linienprofil (rechts) einer solchen intermediären Schadensspur zeigt das Schadenssignal deutlich versetzt zur zentralen Lage. Der Schadensfocus und damit die Schadensspur wurden nur dann als intermediär gewertet, wenn das DNA Signal neben dem Hauptmaximum auf der einen Seite des Schadensmarkers noch ein Nebenmaximum auf der anderen Seite aufweist.

Das untere Bildfeld (C) von Abbildung 27 zeigt Beispiele für periphere Schadensspuren von γ H2AX, 53BP1 und TUNEL. Diese krümmen sich entlang der Grenzfläche zwischen Hetero- und Euchromatin um das getroffene Chromocenter herum. Eine einzelne Bildebene in Strahlrichtung aufgenommen zeigt die IRIFs der DNA Schadensmarker außerhalb des Chromocenters. Das Linienprofil (rechts) einer solchen peripheren Schadensspur zeigt das Schadenssignal neben dem DNA Signal. Die Bildfolge im unteren Teil des Bildfelds (C) zeigt eine Reihe einzelner Bildebenen in Strahlrichtung mit einem Abstand von 0,4 μ m. Die Position, an der das Ion auf das Chromocenter traf (durch Schadensmarker verifiziert) ist durch einen weißen Punkt markiert, der einen fixen Bezugspunkt in jeder darauffolgenden Bildebene bietet. Je weiter man in das Chromocenter hinein fokussiert, umso deutlicher wird der Versatz des Schadensmarkerfocus zur Koordinate des Ioneneintritts. Dieser Versatz beschreibt die

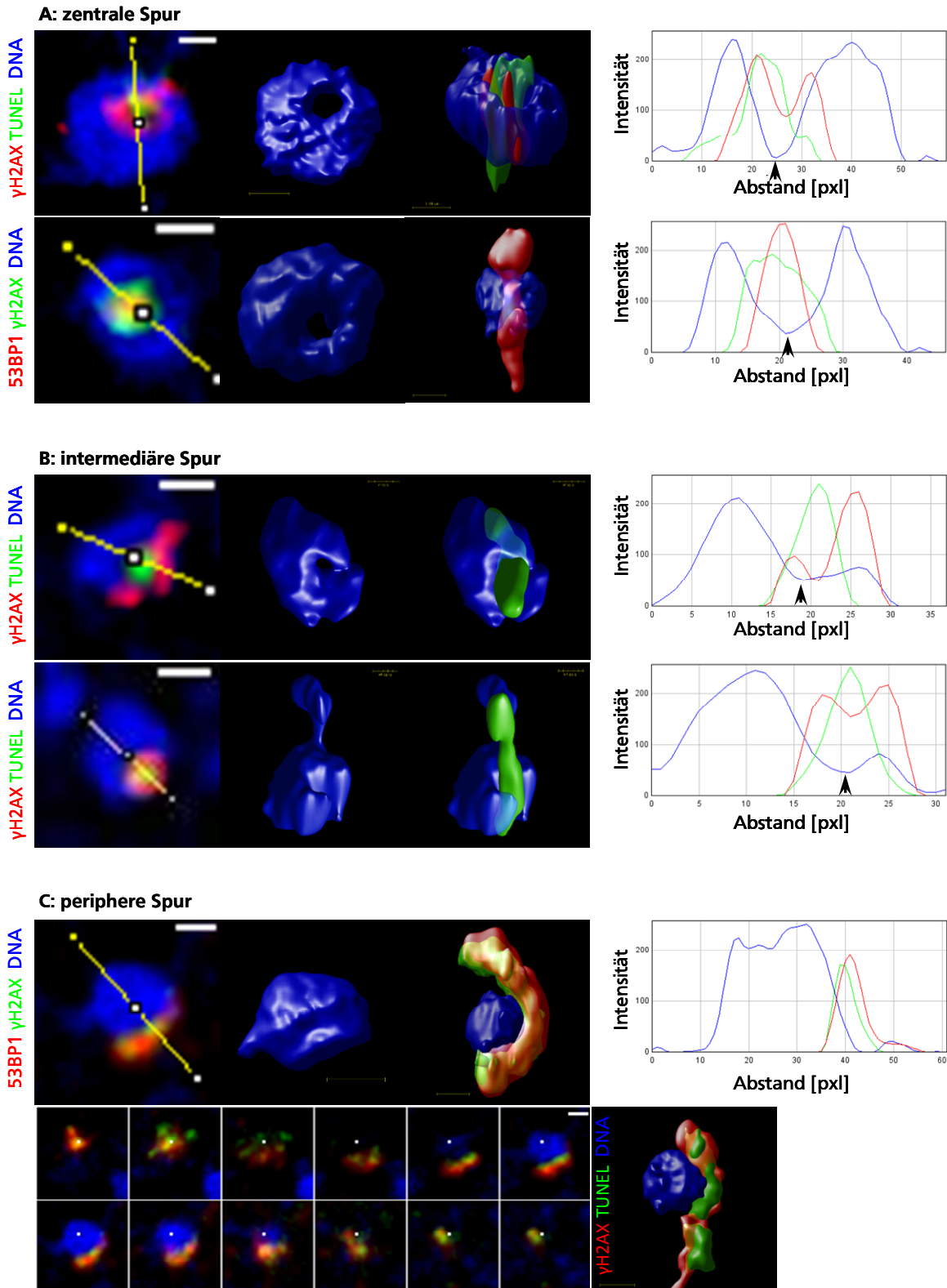


Abbildung 27: Definition der Schadensspureinteilung in „zentral“, „intermediär“ und „peripher“.

Die Chromocenter embryonaler Maus Fibroblasten wurden mit einzelnen, schweren Ionen an der Mikrosonde bestrahlt. Abgebildet sind Beispiele für „zentrale“ (A) „intermediäre“ (B) und „periphere“ (C) Spuren. Links jeweils eine einzelne Bildebene, in der entlang der eingezeichneten Achse (gelbe Linie) das Intensitätsprofil der drei Färbungen gemessen wird, welches rechts abgebildet ist. Der schwarze Pfeil markiert jeweils den tiefsten Punkt der DNA Intensität (A und B). In der Mitte befinden sich gerenderte Aufnahmen des jeweils gemessenen Chromocenters. Die in (C) dargestellte Bildfolge zeigt die einzelnen Tiefenebenen (z-Auflösung; Abstand von 0,4 μm) des darüber abgebildeten, gerenderten Chromocenters. Die Koordinate des Ioneneintritts, nachgewiesen durch die Schadensmarker, ist mit einem weißen Punkt markiert, der sich in jedem darauffolgenden Bild an der gleichen Position befindet. Man sieht den Versatz der Schadensmarker relativ zur Eintrittscoordinate.

dinate (weißer Punkt), welcher die Krümmung der Spur um das Chromocenter beschreibt. Ganz unten rechts (C) sind weitere Beispiele für Schadensspuren abgebildet, die sich um das getroffene Chromocenter winden. Maßstab: 1 μm ; 10 pxl in den Intensitätsprofilen entsprechen 0,72 μm .

Krümmung der Schadensspur um das getroffene Chromocenter, welche in der gerenderten Aufnahme des selben Chromocenters darüber noch deutlicher wird. Auf der gegenüberliegenden Seite des Chromocenters befinden sich die IRIFs der Schadensmarker wieder in der Nähe der Eintrittskordinate. Ganz unten rechts (C) finden sich weiter Beispiele für gekrümmte, periphere Schadensspuren zur Verdeutlichung.

Um zu vermeiden, dass Fehlschüsse, die das angezielte Chromocenter nicht getroffen haben, die Analyse verfälschen, wurden nur solche Spuren als peripher aufgenommen, die die oben beschriebene Krümmung aufweisen. Solch eine charakteristische Krümmung zeigt, dass die Ionen, die in gerader Linie fliegen, das Chromocenter getroffen haben und die Schadensspur durch die Relokalisierung nachträglich gekrümmt wurde. Schadensspuren nach Ionen, die ihr Ziel verfehlt haben, zeigen keine Krümmung.

Damit die Krümmung um solch kleine Strukturen sichtbar gemacht werden konnte, wurden die Proben konfokal mit einem Ebenenabstand von 0,1 bis 0,2 μm aufgenommen und diese Aufnahmen anschließend durch Dekonvolution weiter verarbeitet.

Bei allen drei Stadien der DNA Schadensspuren fällt auf, dass das γH2AX Signal im Zentrum des Schadens abfiel während andere Schadensmarker ihr Maximum in diesem lokalen γH2AX Minimum hatten. Trotz dieser Unterschiede, zeigte jeder der untersuchten DNA-Schadensmarker die im Folgenden beschriebene Relokalisierung mit vergleichbaren Kinetiken.

Um die Relokalisierung der heterochromatischen Schäden zu messen, wurden die Chromocenter von embryonalen Maus Fibroblasten gezielt mit einzelnen Ionen an der GSI Mikrosonde bestrahlt und die Proben in unterschiedlichen Zeitfenstern fixiert. Nach der Fluoreszenzfärbung der DNA Schäden wurden die bestrahlten Zellen konfokal aufgenommen und die Schadensspuren in die oben definierten Kategorien „zentral“, „intermediär“ und „peripher“ eingeteilt. Trägt man schließlich die relativen Anteile dieser drei Gruppen über die Zeit auf, ergibt sich eine Relokisierungskinetik wie sie in Abbildung 28 (A) für WT Fibroblasten dargestellt ist. Aus technischen Gründen liegt der frühest mögliche Fixierungszeitpunkt bei ca. 1,5 min nach Bestrahlung. Das Ausgangszeitfenster zeigte etwa die Hälfte der Schadensspuren zentral und ein Viertel der Schadensspuren intermediär. Das verbleibende Viertel der Spuren zeigte schon eine bis drei Minuten nach Bestrahlung eine Krümmung um die angezielten Chromocenter. Mit fortschreitender Zeit nach Bestrahlung nahm der Anteil der zentralen und intermediären Spuren immer weiter ab, während der Anteil der peripheren Spuren folglich zunahm. Eine halbe Stunde nach Bestrahlung befanden sich bereits mehr als 90 % der DNA Schadensspuren außerhalb der Chromocenter. Zu späten Zeitpunkten (1 und 2 h nach Bestrahlung) fanden sich nur noch sehr vereinzelt Spuren, die noch nicht (vollständig) relokalisiert waren. Abbildung 28 B zeigt den Verlauf

des zentralen bzw. peripheren Anteils der Schadensspuren, aufgetragen mit einer linearen Zeitachse. Die Zeitfensterbreite ist durch gepunktete Balken markiert. Der Anteil der zentralen Schadensspuren fiel in den ersten Minuten nach Bestrahlung stark ab und strebte im weiteren Verlauf gegen Null. Dem entgegen nahm der Anteil der peripheren Schadensspuren rasch zu und strebte gegen 100 Prozent.

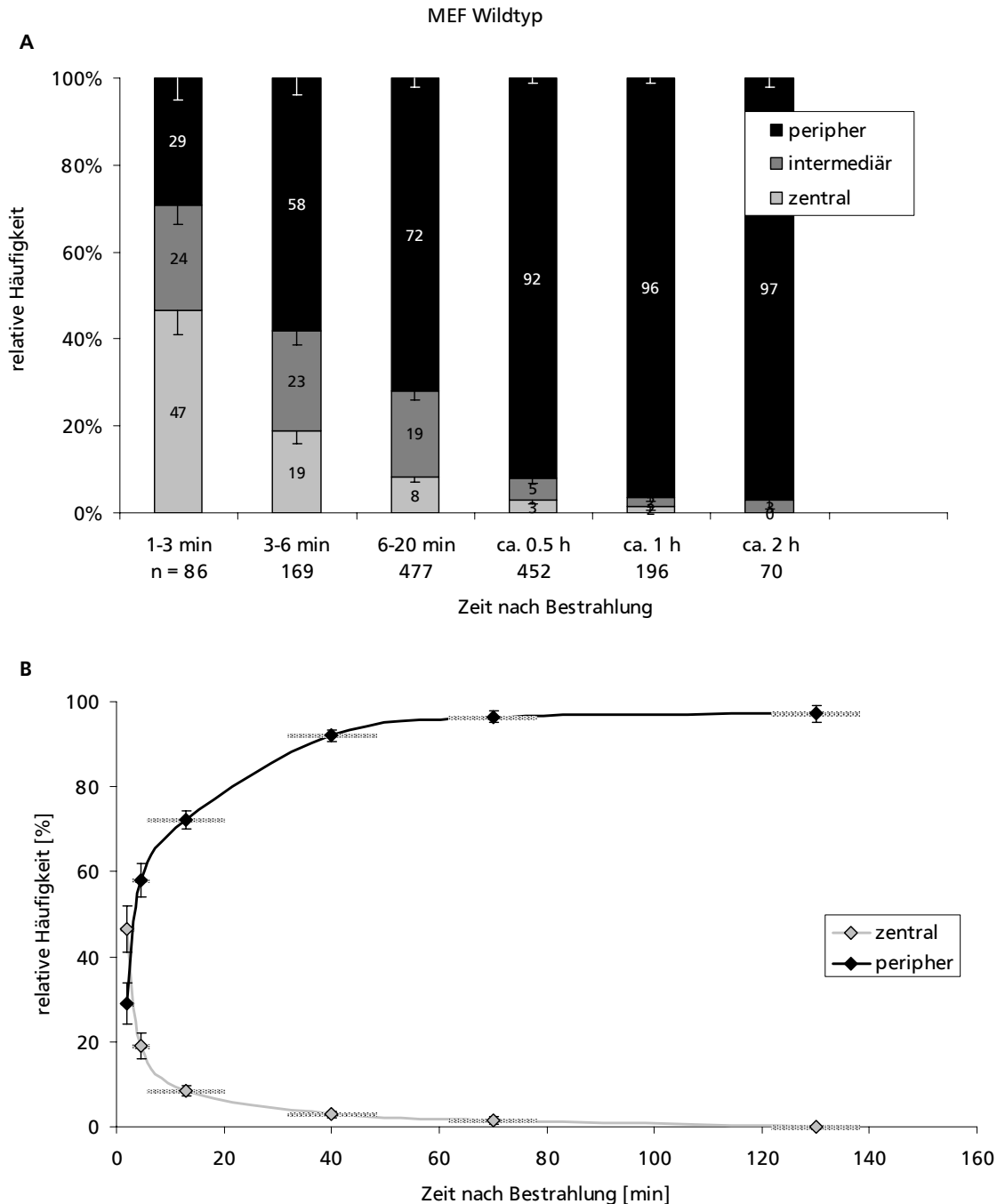


Abbildung 28: Relokalisierungskinetik heterochromatischer DNA Schäden gemessen in WT Fibroblasten.

A: Dargestellt sind die relativen Anteile von zentralen, intermediären und peripheren Schadensmarkerspuren in festen Zeitfenstern. Die prozentualen Werte sind jeweils in den Balken abzulesen. Die Fehlerbalken geben den binomial Fehler der jeweiligen Fraktion an. „n“ gibt die Zahl der für dieses Zeitfenster gemessenen Chromocenter an.

B: Dargestellt ist die Kinetik der zentralen und peripheren Schadensspuren mit einer linearen Zeitachse. Die Fehlerbalken (y-Ausdehnung) geben den binomial Fehler der jeweiligen Fraktion an, während die X-Ausdehnung (gepunkteter Balken) die Breite des jeweiligen zeitlichen Messfensters angibt.

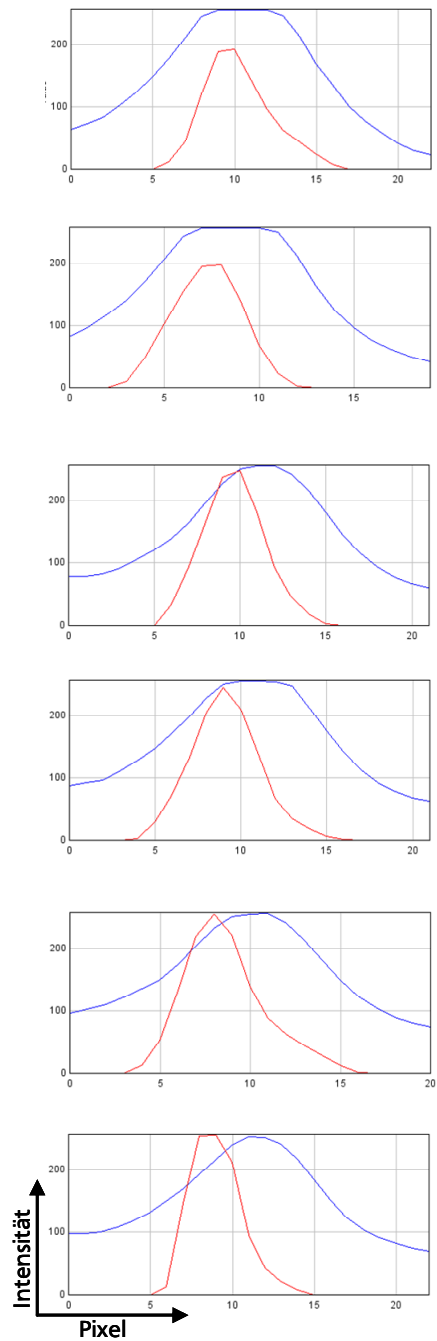
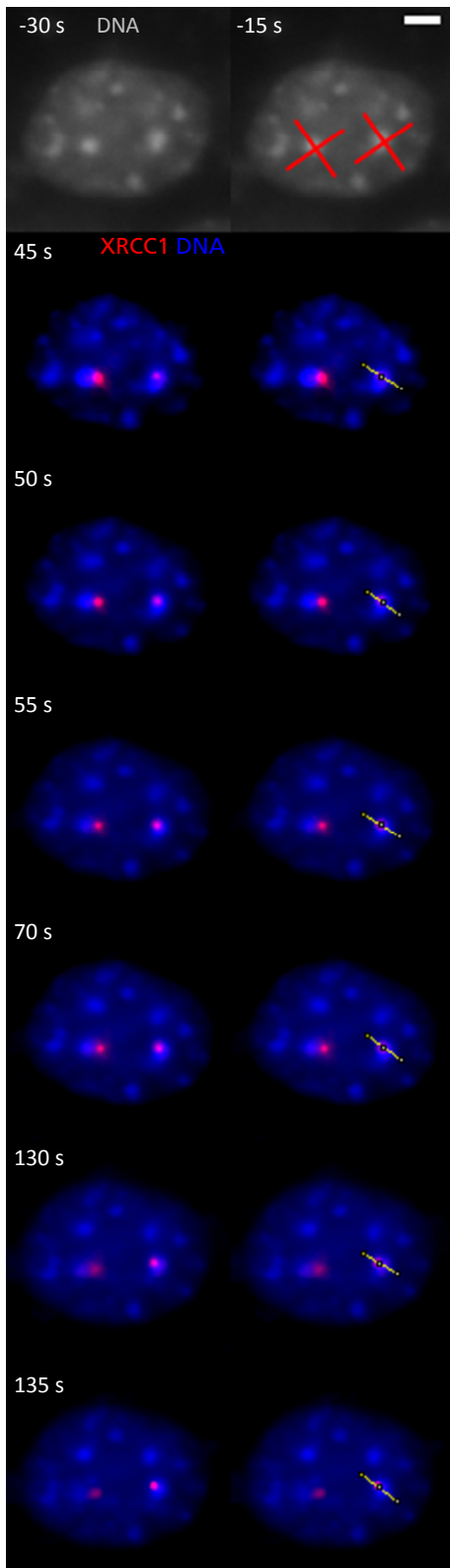


Abbildung 29: Lebendzellbeobachtung der Relokalisierung eines heterochromatischen DNA-Schadensfocues zur Chromocenter Peripherie.

Embryonale Maus Fibroblasten wurden mit Hilfe eines Plasmids mit RFP markiertem XRCC1 transfiziert und kurz vor der Bestrahlung mit dem Lebendzell-DNA-Farbstoff Hoechst 33342 gefärbt. Die so modifizierten Zellen wurden mit einzelnen Goldionen ($13000 \text{ keV}/\mu\text{m}$; $3,6 \text{ MeV}/u$) an der Mikrosonde bestrahlt und die DNA bzw. XRCC1 Intensität in Abständen von 5 s gemessen. Das erste Bild (-30 s) zeigt die DNA Färbung einer lebenden Zelle kurz vor der Bestrahlung. Im zweiten Bild (-15 s) sind die Zielkoordinaten der zwei Ionen eingezeichnet, welche die ausgewählten Chromocenter der Zelle treffen sollten. Die nachfolgenden Überlagerungen aus DNA Färbung und XRCC1 Intensität zeigen die Rekrutierung von XRCC1 an den Ort des Ionendurchgangs und im Falle des rechten Treffers die Relokalisierung innerhalb von ca. 2 min zur Peripherie des getroffenen

Chromocenters. Die Linienprofile zeigen den Intensitätsverlauf der zwei Färbungen entlang der dargestellten Achse (gelbe Linien in der Überlagerung). Maßstab: 3 μm ; 10 pxl in den Intensitätsprofilen entsprechen 0,72 μm .

Die Relokalisierung heterochromatischer DNA Schäden aus den getroffenen Chromocentern wurde hauptsächlich in fixierten Proben untersucht. Abbildung 29 zeigt darüber hinaus die Lebendzellbeobachtung einer solchen, sehr raschen Relokalisierung. Um die Relokalisierung auch im lebenden System zu untersuchen, wurden embryonale Maus Fibroblasten mit Hilfe eines Plasmids mit RFP gekoppeltem XRCC1 transfiziert. Kurz vor der Bestrahlung wurde die DNA der so modifizierten Zellen zusätzlich mit Hoechst 33342 angefärbt. Die Fluoreszenzsignale wurden in Abständen von 5 s gemessen. Die Abbildung 29 zeigt, dass XRCC1 in weniger als 45 s nach Bestrahlung der Zelle zum DNA Schaden rekrutiert wurde. Das rechte Chromocenter wurde zentral getroffen (siehe Bilder zum Zeitpunkt „45 s“). Die darauf folgenden Bilder zeigen, wie der durch XRCC1 markierte Schaden in Richtung der Chromocenter Peripherie relokalisiert wurde und sich bereits 135 s nach Bestrahlung am Rande des getroffenen Chromocenters befand.

Um zu untersuchen, ob der LET der verwendeten Ionen einen Einfluss auf die Geschwindigkeit oder die Ausprägung der Relokalisierung hat, wurde diese nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Ionen verglichen. Über ein Ionenspektrum von Kohlenstoff bis Uran ergaben sich vergleichbare Relokalisierungskinetiken. Die geschilderte Relokalisierung der heterochromatischen Schäden in Richtung Euchromatin scheint daher unabhängig vom LET und erlaubte deshalb das Zusammenführen der Daten aus unterschiedlichen Strahlzeiten.

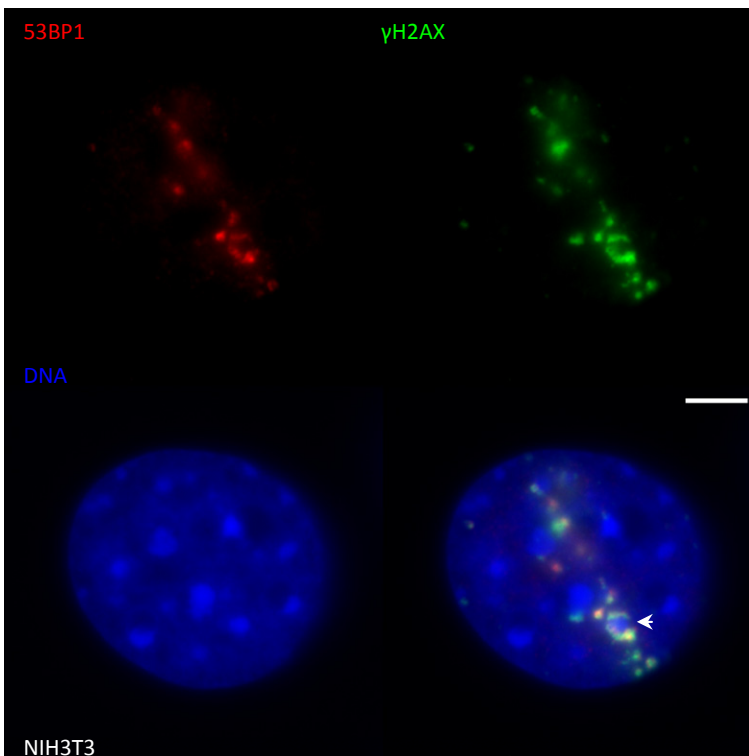


Abbildung 30: Relokalisierung in Röntgen mikrobestrahlten Zellen.

NIH3T3 Zellen wurden für 5 min bei 20 kV und 80 mA in der Röntgen-Mikrobestrahlungsanlage bestrahlt. Die Strahlung wurde durch einen Kollimator auf eine Schlitzbreite von ca. 1-2 μm begrenzt und die Probe während der Bestrahlungsdauer von $-0,5^\circ$ bis $+0,5^\circ$ relativ zur Strahlrichtung gekippt. Die Zellen wurden 1 h nach Bestrahlung fixiert und gegen 53BP1 (rot), γH2AX (grün) und die DNA (DAPI, blau) gefärbt. Der weiße Pfeil markiert ein Chromocenter inmitten der Bestrahlungsspur, welches im Inneren keinerlei Schadensmarker aufweist, von diesem aber umschlossen wird. Maßstab: 5 μm

Um zu untersuchen, ob es sich bei der Relokalisierung um ein generelles Phänomen der Schadensantwort für heterochromatische DNA Schäden handelt, wurden Zellen nicht nur mit schweren Ionen bestrahlt, sondern auch mit Röntgenstrahlung. Diese wurde an einer Mikrobestrahlungsanlage mit Hilfe von Kollimatoren auf Schlitzbreiten von 1 bis 2 μm begrenzt, um eine lokale Dosis von ca. 4 Gy in einem abgegrenzten Bereich des Zellkerns zu deponieren. Färbt man so bestrahlte Zellen mit DNA-Schadensmarkern, werden scharf abgegrenzte Streifen von DNA Schädigung sichtbar (Abbildungen 17 und 30). Abbildung 30 zeigt einen sehr feinen, ca. 2 μm breiten Streifen, in dem 53BP1 und γH2AX rekrutiert werden. Auffällig war, dass dort wo die Röntgenstrahlung auf heterochromatische Chromocenter traf, 5 min nach Bestrahlung keinerlei Schadensmarkersignal detektierbar war. Sowohl γH2AX als auch 53BP1 sparten das Chromocenter aus. Wie bei dem markierten Chromocenter (weißer Pfeil) hervorgehoben, zeigten sich die Schadensmarker intensiv in der Peripherie des Chromocenters, nicht aber darin.

4.3.1 Zellzyklusverteilung der für die Relokalisierungsmessung analysierten Zellen

Für die Relokalisierungsanalysen waren die Zellen so eingesät worden, dass sie sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung weiterhin in der Proliferation befanden, um zu verhindern, dass durch Konfluenz/Kontaktinhibition eine Selektion auf G0 Zellen erfolgte. Um zu untersuchen, ob die Relokalisierung von der Zellzyklusphase beeinflusst wird, wurden die Zellen neben der DNA Schadensmarkierung auch mit dem Zellzyklusmarker (siehe 3.2.5.2) pH3 gefärbt. G2 Zellen lassen sich an einer intensiven pH3 Markierung im Zellkern erkennen, während G1 Zellen nicht durch pH3 angefärbt werden.

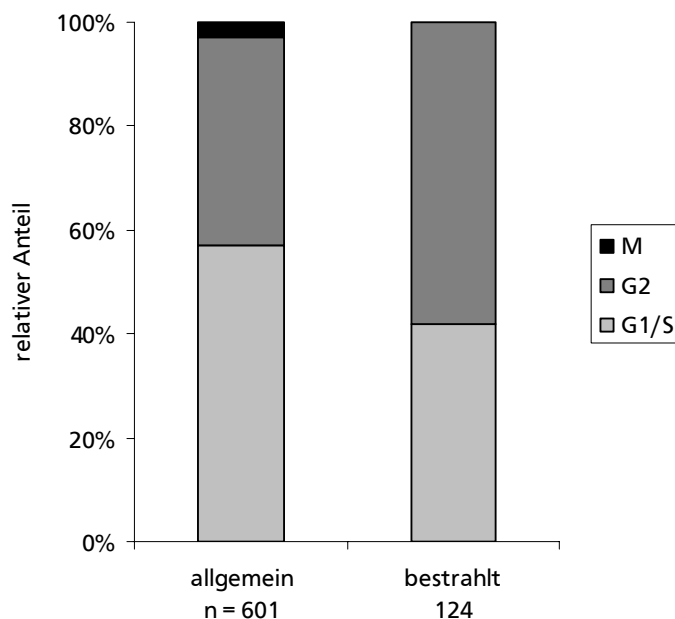


Abbildung 31: Zellzyklusanalyse in embryonalen Maus Fibroblasten mit Hilfe einer pH3 Immunfluoreszenzfärbung.

Dargestellt sind die relativen Anteile von Zellen in der M, G1/S und G2 Phase zum Zeitpunkt der Bestrahlung in Mikrosondengefäßen im Vergleich zur Zellzyklusverteilung in den Zellen, die für die Relokalisierungsanalyse an der Mikrosonde bestrahlt wurden.

Zellen in der Mitose weisen verglichen mit G2 Zellen eine um ein vielfaches intensivere pH3 Markierung auf. Abbildung 31 zeigt einen Vergleich der Zellzyklusphasenverteilung zwischen den Zellen in

Mikrosondenkammern zum Zeitpunkt der Bestrahlung im Allgemeinen (linker Balken) und den Zellen, die für die Relokalisierungsanalyse bestrahlt wurden (rechter Balken). Die allgemeine Zellzyklusverteilung wies etwa 40 % G2 Zellen, 3 % Mitosen und 57 % Zellen in G1/S auf. In den Zellen, die für die Relokalisierungsanalyse bestrahlt wurden, fanden sich keine Mitosen. Das Verhältnis von G1/S zu G2 war mit etwa 40 zu 60 genau umgekehrt zum Verhältnis in der allgemeinen Population. Bei der Bestrahlung kam es offenbar zu einer leichten Selektion auf Zellen in der G2 Phase.

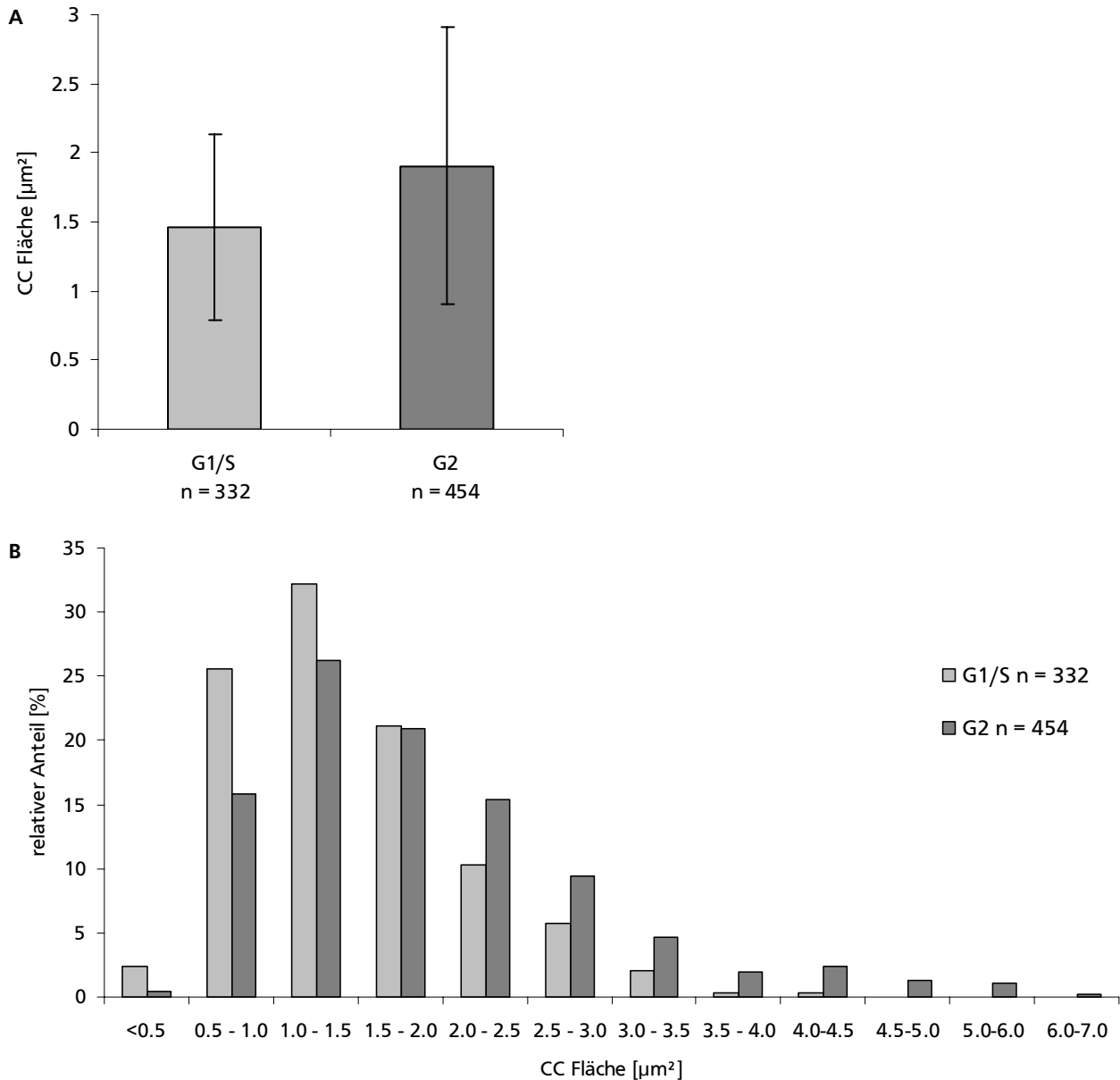


Abbildung 32: Vergleich der Fläche einzelner Chromocenter (CC) zwischen Zellzyklusphasen in embryonalen Maus Fibroblasten.

A: Aufgetragen ist die durchschnittliche Fläche eines einzelnen Chromocenters (gemessen in Maximalprojektionen anhand der DAPI Färbung) als Vergleich zwischen G1/S und G2 Phase (durch pH3 Färbung diskriminiert). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die beiden Verteilungen unterscheiden sich signifikant (Students t-Test; $P = 5.6 \times 10^{-12}$)

B: Histogrammdarstellung der Größenverteilung einzelner Chromocenter als Vergleich zwischen G1/S und G2 Zellen. Aufgetragen ist der relative Anteil der jeweiligen Größenfenster.

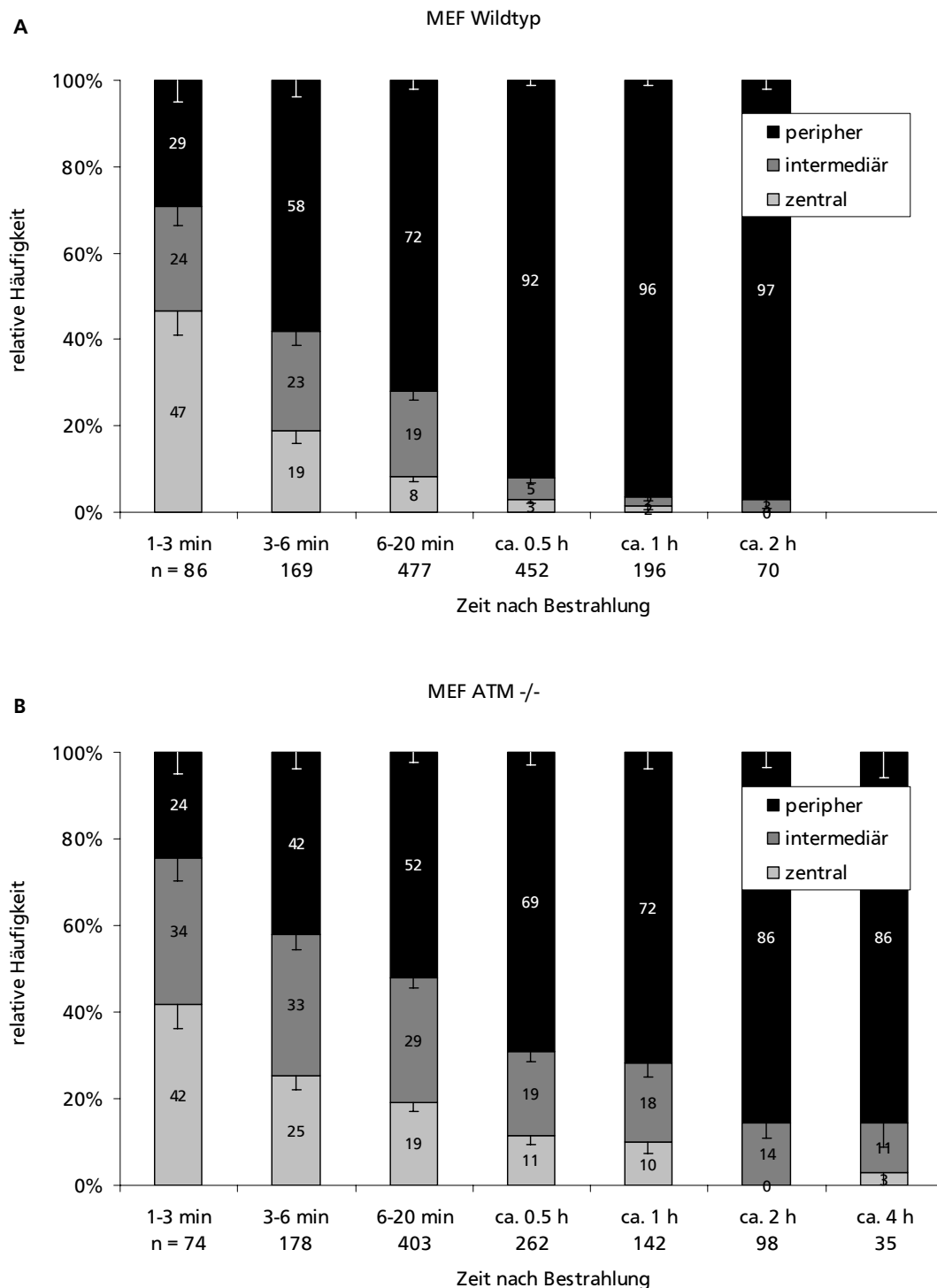
Während der Bestrahlung fiel eine Präferenz für besonders große Chromocenter bei der Bestrahlungsauswahl auf, da diese mit höherer Wahrscheinlichkeit getroffen werden und einfacher zu erkennen bzw. auszuwerten sind. Aus diesem Grund wurde die Größe der Chromocenter in Maximalprojektionen gemessen. Abbildung 32 A zeigt eine Gegenüberstellung der durchschnittlichen Größe der Chromocenter im Vergleich zwischen G1/S und G2 Zellen. Die Chromocenter in G2 Zellen waren mit durchschnittlich $1,90 \mu\text{m}^2$ signifikant (Students t-Test; $p = 5,6 \times 10^{-12}$) größer als die im Durchschnitt $1,46 \mu\text{m}^2$ großen Chromocenter der G1/S Zellen. In der Histogrammdarstellung (Abbildung 32 B) wird die Größenverteilung der Chromocenter abhängig von der Zellzyklusphase noch deutlicher. Der überwiegende Teil der Chromocenter in G1/S Zellen war kleiner als $2 \mu\text{m}^2$. Die Chromocenter der G2 Zellen streuten in ihrer Größe deutlich weiter. Chromocenter über $3 \mu\text{m}^2$ Fläche waren fast ausschließlich in G2 Zellen zu finden.

4.4 Die Relokalisierung der heterochromatischen DNA Schäden in euchromatische Bereiche ist ATM abhängig

Einer der zentralen Faktoren in der DNA Schadensantwort und der Chromatinmodifizierung ist die PIK Kinase ATM (review: Iijima et al. 2008, Bhatti et al. 2011). Die Rekrutierung einer ganzen Fülle von Reparaturfaktoren basiert essentiell auf der Kinaseaktivität von ATM und besonders für die Reparatur von heterochromatischen DSBs wurde ATM als unabdingbar identifiziert (Beucher et al. 2009). Unmittelbar nach der Schadensinduktion kommt es zur Dekondensation des geschädigten Chromatins (Tsukuda et al. 2005, Kruhlak et al. 2006, Ziv et al. 2006, Dellaire et al. 2009, Sanz-Garcia et al. 2012) unabhängig davon, ob es sich um Eu- oder Heterochromatin handelt. Diese schadensinduzierten Veränderungen der Chromatinstruktur sind abhängig von der ATM-Kinaseaktivität (Peng et al. 2009, Lukas et al. 2011, Moyal et al. 2011). Die Chromatindekondensation gilt als abhängig von der schadensinduzierten Phosphorylierung von KAP1 durch ATM (Goodarzi et al. 2008, Noon et al. 2010, Chiolo et al. 2011). Wir gingen davon aus, dass diese ATM vermittelte, lokale Auflockerung des (Hetero-) Chromatins um den DNA Schaden dessen Relokalisierung begünstigen könnte. Deshalb wurde der mögliche Einfluss von ATM auf die Relokalisierung heterochromatischer DNA Schäden untersucht. Als Modellsystem diente ein ATM defizienter Stamm embryonaler Maus Fibroblasten (MEF ATM $-/-$).

Die Relokalisierungsanalyse erfolgte in der gleichen Weise wie für den Wildtyp beschrieben (siehe Abschnitt 4.3). Abbildung 33 stellt die Relokalisierungskinetiken von WT und ATM defizienten Fibroblasten gegenüber. Schon die Ausgangswerte (1-3 min, A und B) der ATM defizienten Zellen zeigten geringfügig mehr zentrale und intermediäre Spuren als die WT Zellen. Ab 3-6 min wird dieser Unterschied noch deutlicher. Während sich beim WT (A) bereits 58 % der Schadensspuren peripher an den getroffenen Chromocentern befanden, waren es im Falle der ATM defizienten Zellen (B) nur 43 %. Dieser Trend setzte sich weiter fort. Während im WT eine halbe Stunde nach Bestrahlung bereits 92 % der Spuren peripher lagen, waren es bei den ATM defizienten Zellen nur 69 % und selbst 4 h nach Be-

strahlung hatten 14 % der heterochromatischen Schäden in ATM defizienten Zellen die Chromocenter noch nicht verlassen. Abbildung 33 C zeigt den Verlauf des zentralen bzw. peripheren Anteils der Schadensspuren als direkten Vergleich zwischen WT und ATM defizienten Fibroblasten aufgetragen mit einer linearen Zeitachse. Die Zeitfensterbreite ist durch gepunktete Balken markiert. Der Anteil der zentralen Schadensspuren fiel in den ATM defizienten Zellen langsamer ab, während der Anteil der peripheren Schadensspuren erheblich langsamer zunahm als in den WT Zellen.



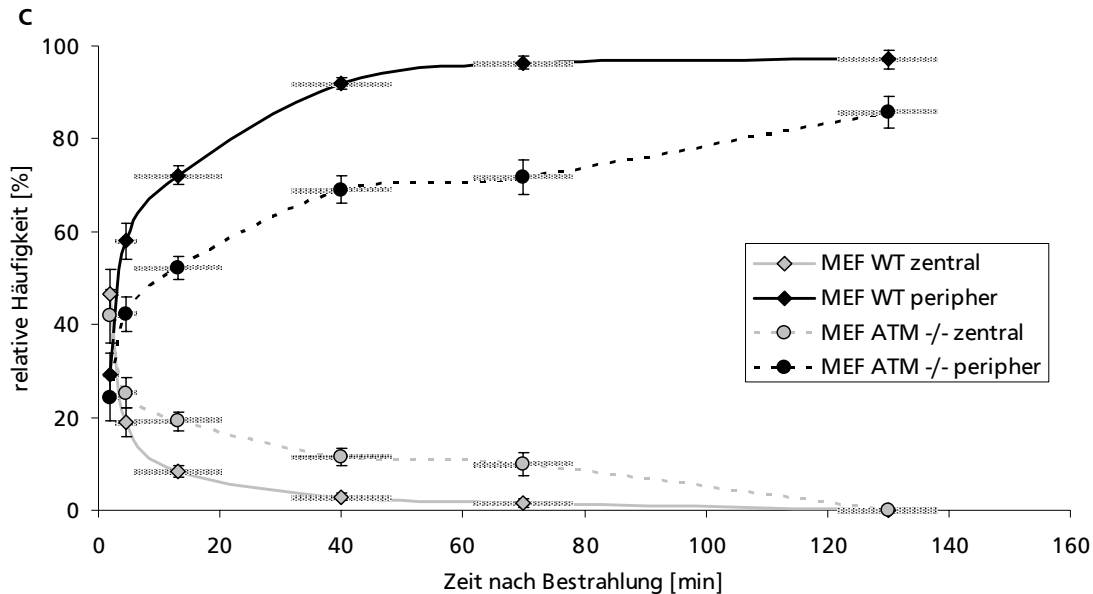


Abbildung 33: Relokalisierungskinetiken heterochromatischer DNA Schäden im Vergleich zwischen WT Fibroblasten und ATM defizienten Fibroblasten (MEF ATM -/-).

A und B: Dargestellt sind die relativen Anteile von zentralen, intermediären und peripheren Schadensmarkerspuren in festen Zeitfenstern in WT (A) und ATM defizienten (B) Fibroblasten. Die prozentualen Werte sind jeweils in den Balken abzulesen. Die Fehlerbalken geben den binomial Fehler der jeweiligen Fraktion an. „n“ gibt die Zahl der für dieses Zeitfenster gemessenen Chromocenter an.

C: Dargestellt sind die Kinetiken der zentralen und peripheren Schadensspuren als Vergleich zwischen WT und ATM defizienten Fibroblasten mit einer linearen Zeitachse. Die Fehlerbalken (y-Ausdehnung) geben den binomial Fehler der jeweiligen Fraktion an, während die X-Ausdehnung (gepunkteter Balken) die Breite des jeweiligen zeitlichen Messfensters angibt

Abbildung 34 zeigt Beispiele für Schadensfoci in einer ATM defizienten Zelle, die auch 1 h nach Bestrahlung die Chromocenter noch nicht verlassen hatten.

Bei der Analyse der Relokalisierung entstand der Eindruck, dass die Chromocenter des ATM defizienten Stamms im Durchschnitt größer waren als die Chromocenter des WT Stamms. Größere Chromocenter würden den Weg der Relokalisierung verlängern und so die Zeit bis zur vollständigen Relokalisierung erhöhen. Um den potentiellen Einfluss von möglicherweise größeren Chromocentern in den ATM defizienten Zellen auf die Relokalisierung zu untersuchen, wurde zunächst die genaue Größe der Chromocenter in den unterschiedlichen Zellentypen bestimmt.

Abbildung 35 zeigt den Größenvergleich eines durchschnittlichen Chromocenters im WT gegenüber dem ATM defizienten Stamm. Die Chromocenter in der Gesamtpopulation waren im Fall des WT im Durchschnitt $1,3 \mu\text{m}^2$ groß, während die Chromocenter des ATM defizienten Stamms in der allgemeinen Population mit durchschnittlich $1,8 \mu\text{m}^2$ deutlich größer waren (dunkelgraue Balken) (Students t-Test; $p = 2,2 \times 10^{-11}$). Die Chromocenter der ATM defizienten Zellen waren also tatsächlich im Mittel etwa 1,4-fach größer als die Chromocenter des WT. Weiterhin wird deutlich, dass bei der Bestrahlungsauswahl große Chromocenter bevorzugt wurden, wie dies schon in Abschnitt 4.3.1 beschrieben wurde. Bestrahlte Chromocenter des WT waren im Durchschnitt $2,1 \mu\text{m}^2$ groß während die bestrahlten

Chromocenter der ATM defizienten Zellen im Durchschnitt sogar $3,0 \mu\text{m}^2$ groß waren. Wiederum zeigten sich die Chromocenter der ATM defizienten Zellen um etwa 1,4-fach größer als die des WT (Students t-Test; $p = 1,14 \times 10^{-5}$). In der Histogrammdarstellung (Abbildung 36) wird die Bevorzugung großer Chromocenter bei der Bestrahlung noch deutlicher. Der überwiegende Teil der Chromocenter in der allgemeinen Population war zwischen $0,5$ und $2 \mu\text{m}^2$ groß, während die Chromocenter, die zur Bestrahlung ausgewählt wurden, gewöhnlich bis zu $4 \mu\text{m}^2$ groß waren.

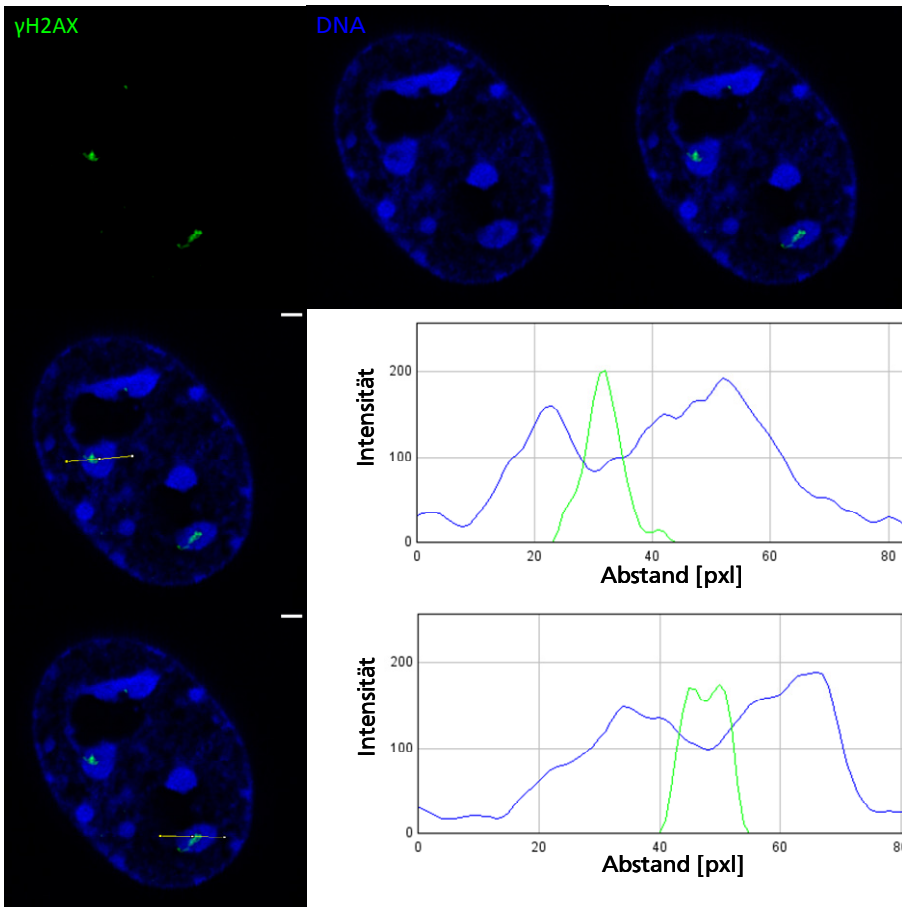


Abbildung 34: Zentrale Schadensspuren 1 h nach Bestrahlung der Chromocenter in ATM defizienten Fibroblasten. Die Chromocenter embryonaler Maus Fibroblasten (MEF ATM $-/-$) wurden mit einzelnen Goldionen ($12800 \text{ keV}/\mu\text{m}$; $4,8 \text{ MeV}/u$) an der Mikrosonde bestrahlt. Die Zellen wurden ca. 1 h nach der Bestrahlung fixiert und gegen γH2AX (grün) und die DNA (DAPI, blau) gefärbt. Die Linienprofile zeigen jeweils den Intensitätsverlauf der zwei Färbungen entlang der dargestellten Achse (gelbe Linie in der Überlagerung). Maßstab: $2 \mu\text{m}$; 10 pxl in den Intensitätsprofilen entsprechen $0,72 \mu\text{m}$.

Der beschriebene Größenunterschied der Chromocenter zwischen WT und ATM defizienten Zellen könnte zumindest teilweise die langsamere Relokalisierung der heterochromatischen Schäden aus den Chromocentern in den ATM defizienten Zellen erklären. Bei einer 1,4-fach größeren Chromocenterfläche ergibt sich bei zentralen Treffern ein etwa 1,2-fach längerer Weg, den die geschädigte DNA im Fall der ATM defizienten Zellen zurückzulegen hat im Vergleich zum WT.

Um zu klären, ob sich die beschriebene Verzögerung der Relokalisierung in den ATM defizienten Fibroblasten nur auf diesen Größenunterschied stützt, wurde eine Relokalisierungsanalyse in WT Zellen durchgeführt, die mit dem ATM Inhibitor KU55933 (Hickson et al. 2004) behandelt wurden. Eine

Stunde vor der Bestrahlung wurden die ausgesäten Zellen dafür mit 10 μm ATM Inhibitor versetzt. Die Inhibitorkonzentration wurde auch bei eventueller Nachinkubation nach der Bestrahlung aufrecht erhalten.

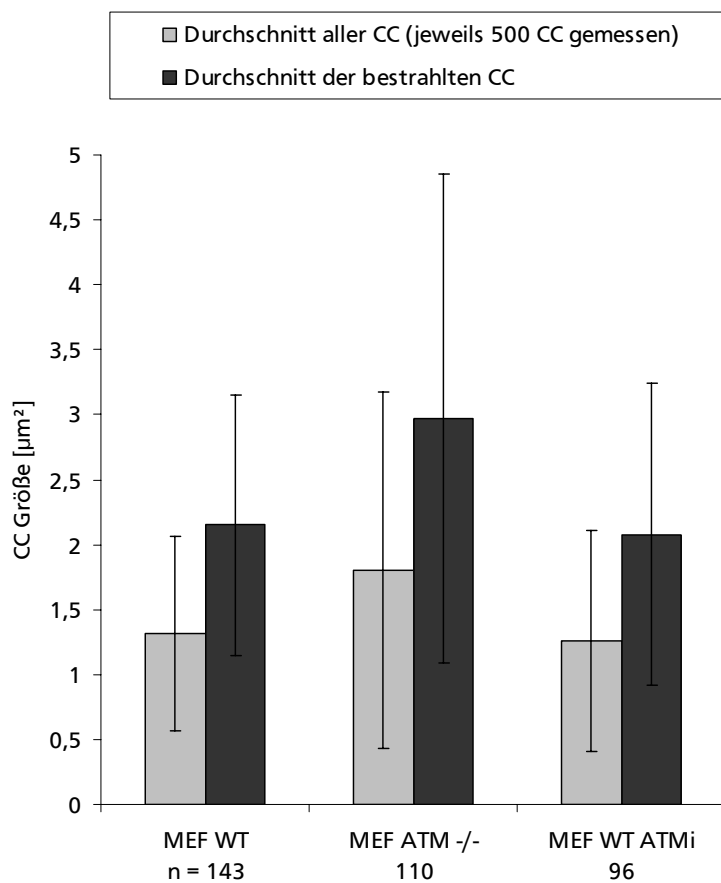


Abbildung 35: Vermessung der Fläche einzelner Chromocenter von embryonalen Maus Fibroblasten in Maximalprojektionen. Aufgetragen ist die durchschnittliche Fläche eines einzelnen Chromocenters als Vergleich zwischen WT Fibroblasten, ATM defizienten Fibroblasten und ATM inhibierten WT Fibroblasten. Unterschieden wird außerdem zwischen der allgemeinen Chromocenter Population (hellgrau) und der Population, die für die Relokalisierungsanalyse bestrahlt wurden (dunkelgrau). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Signifikanzen (Students t-Test)

allgemeine Population	MEF ATM -/-	MEF WT ATMi
MEF WT	** ($2,2 \times 10^{-11}$)	n. s. (0,23)
bestrahlte Population	MEF ATM -/-	MEF WT ATMi
MEF WT	** ($1,14 \times 10^{-5}$)	n. s. (0,70)

Abbildung 37 zeigt die Relokalisierungskinetik für WT Fibroblasten nach ATM Inhibition. Verglichen mit den Relokalisierungskinetiken der WT Fibroblasten (siehe Abbildung 28) zeigten auch die ATM inhibierten Fibroblasten eine deutliche Verzögerung der Relokalisierung. Im Fall der ATM inhibierten Zellen war die Verzögerung jedoch etwas weniger stark ausgeprägt als in den ATM defizienten Zellen (siehe Abbildung 33). Eine Stunde nach Bestrahlung waren beispielweise 76 % der heterochromatischen Schadensspuren peripher, während der periphere Anteil der ATM defizienten Zellen zu diesem Zeitpunkt mit 72 % etwas geringer ausfiel. Im Falle des WT lag der periphere Anteil nach einer Stunde mit 96 % deutlich höher als in ATM defizienten und ATM inhibierten Zellen. Durch die Bestätigung der verzögerten Relokalisierung durch ATM Inhibition konnte auch ein grundlegender Einfluss der

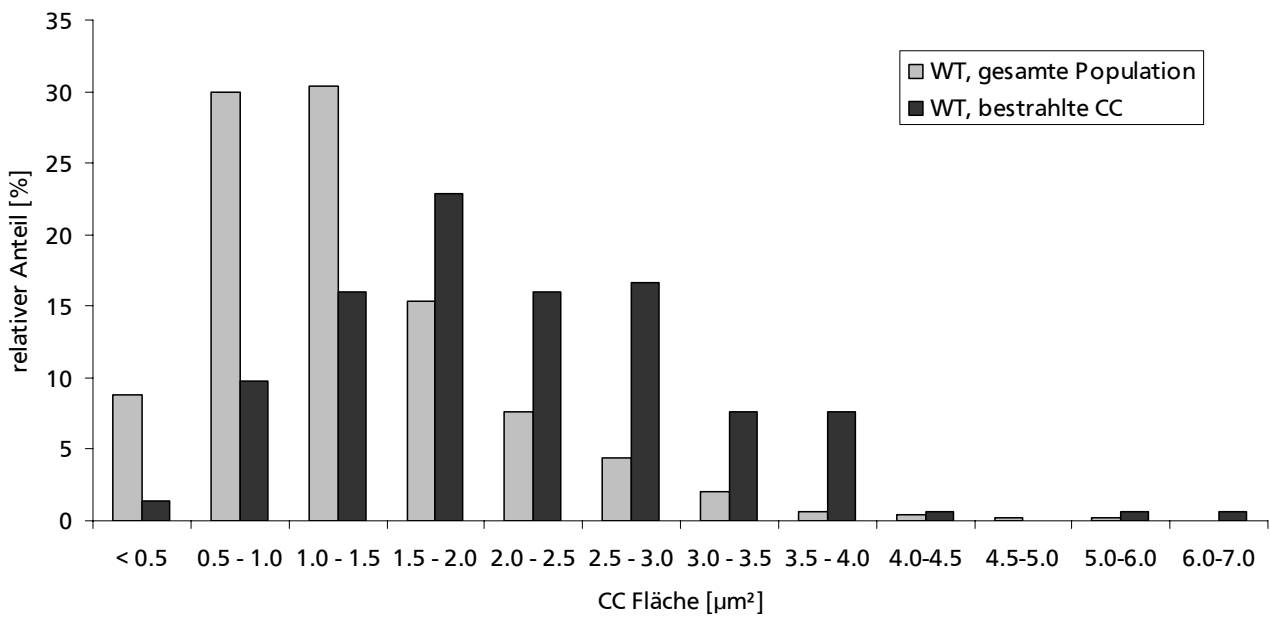


Abbildung 36: Vergleich der Größenverteilung einzelner Chromocenter zwischen der allgemeinen Population und den bestrahlten Chromocentern. Aufgetragen sind die relativen Anteile der jeweiligen Größenfenster.

unterschiedlichen Zellstämme (MEF H2AX WT und MEF ATM -/-) auf die unterschiedlichen Relokalisierungskinetiken ausgeschlossen werden.

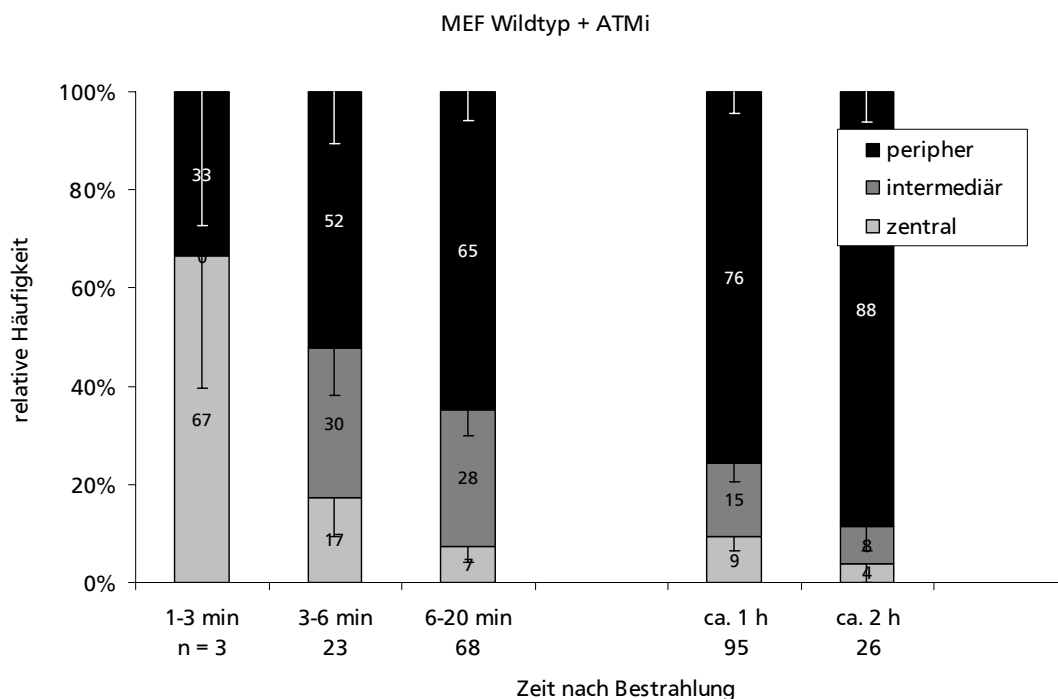


Abbildung 37: Relokalisierungskinetik heterochromatischer DNA Schäden gemessen in WT Fibroblasten, die mit ATM Inhibitor behandelt wurden.

Für die ATM Inhibition wurden die ausgesäten Zellen 1 h vor Bestrahlung mit ATM Inhibitor KU55933 in der Endkonzentration 10 μM versetzt. Die Inhibitorkonzentration wurde auch bei der eventuellen Nachinkubation nach der Bestrahlung aufrecht erhalten. Dargestellt sind die relativen Anteile von zentralen, intermediären und peripheren Schadensmarkerspuren in festen Zeitfenstern. Die prozentualen Werte sind jeweils in den Balken abzulesen. Die Fehlerbalken geben den binomial Fehler der jeweiligen Fraktion an. „n“ gibt die Zahl der für dieses Zeitfenster gemessenen Chromocenter an.

Wie Abbildung 35 belegt, zeigten die Chromocenter in ATM inhibierten Zellen mit $1,3 \mu\text{m}^2$ in der allgemeinen Population und $2,1 \mu\text{m}^2$ in der bestrahlten Population keinen signifikanten Größenunterschied zu den WT Chromocentern (Students t-Test; $p = 0,23$ bzw. $p = 0,70$).

4.5 Schadensabhängige Dekondensation des Heterochromatins

KAP1 (*Krüppel-associated box (KRAB)-associated co-repressor 1*) ist ein essentieller Corepressor für die KRAB Zinkfinger Protein Superfamilie von Transkriptionsfaktoren, der im HC an die HP1 Familie bindet (Hu et al. 2012). Nach DSBs wird KAP1 durch ATM phosphoryliert, woraufhin es zu einer Dekondensation des Chromatins kommt (Ziv et al. 2006, Goodarzi et al. 2008, White et al. 2011, Langerak et al. 2011, Bolderson et al. 2012, Hu et al. 2012). Die bisher gezeigten Aufnahmen von heterochromatischen Schäden (vgl. Abbildungen 22 bis 27 und Abbildung 34) zeigen alle ein lokales Minimum der DNA Färbung innerhalb des getroffenen Chromocenters, welches mit der Spitze des Signals der jeweils gefärbten Schadensmarker überlappt (γH2AX kann hier eine Ausnahme bilden wie in Abschnitt 4.2 beschrieben). Die gerenderten Aufnahmen im oberen Bildfeld von Abbildung 27 zeigen die getroffenen Chromocenter durch den Abfall des DNA Signals in einer Donut Form. Der beschriebene Intensitätsabfall der DNA Färbung am Ort der DNA Schädigung lies sich unabhängig vom Ion (von Kohlenstoff bis Uran) der Bestrahlung beobachten (vgl. Abbildung 38) und könnte auf eine wie oben beschriebene Dekondensation des Chromatins um den Schaden hindeuten.

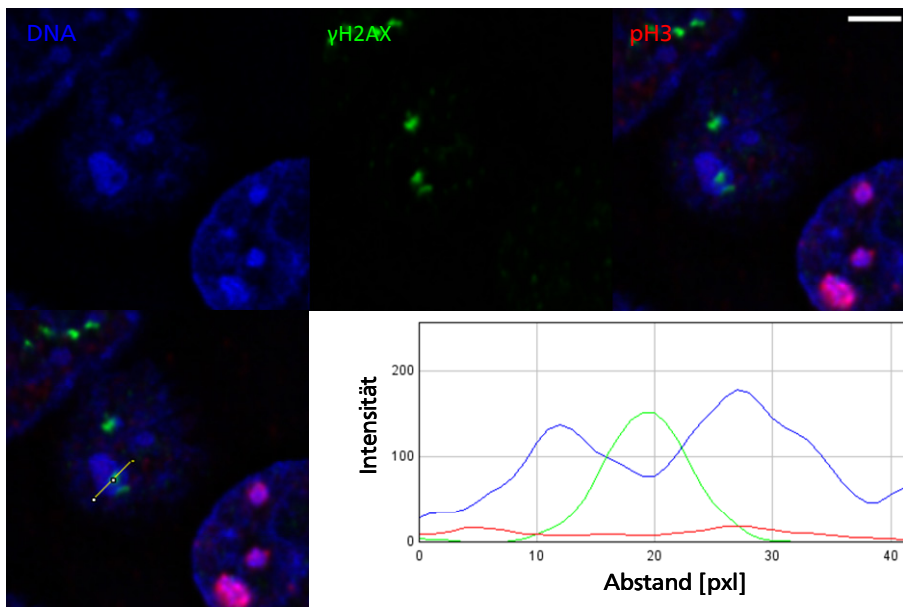


Abbildung 38: Zentrale Schadensspur in einem Chromocenter nach Bestrahlung mit einzelnen, gezielten Kohlenstoffionen ($290 \text{ keV}/\mu\text{m}$; $4,8 \text{ MeV}/\text{u}$) an der GSI Mikrosonde.

Die Zellen wurden ca. 5 min nach der Bestrahlung fixiert und gegen pH3 (rot), γH2AX (grün) und die DNA (DAPI, blau) gefärbt. Das Linienprofil zeigt den Intensitätsverlauf der drei Färbungen entlang der dargestellten Achse (gelbe Linie in der Überlagerung). Maßstab: $3 \mu\text{m}$; 10 pxl im Intensitätsprofil entsprechen $0,72 \mu\text{m}$.

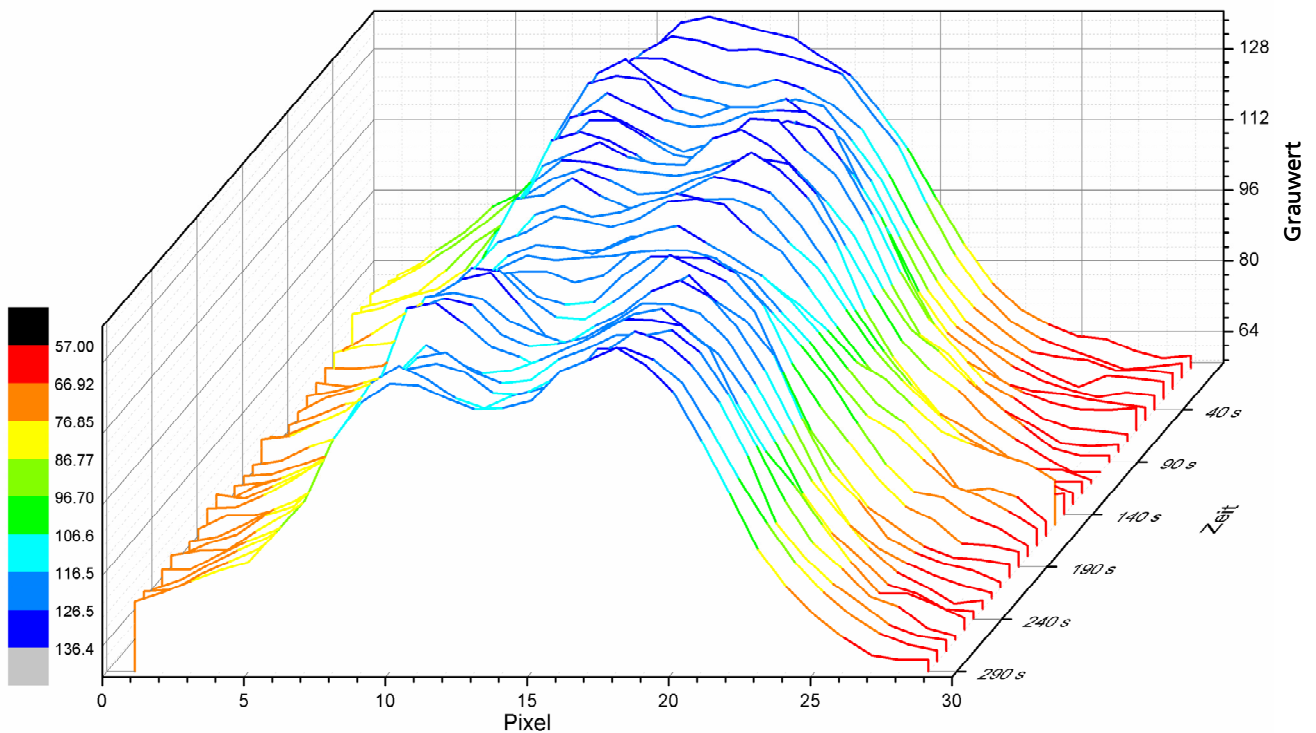
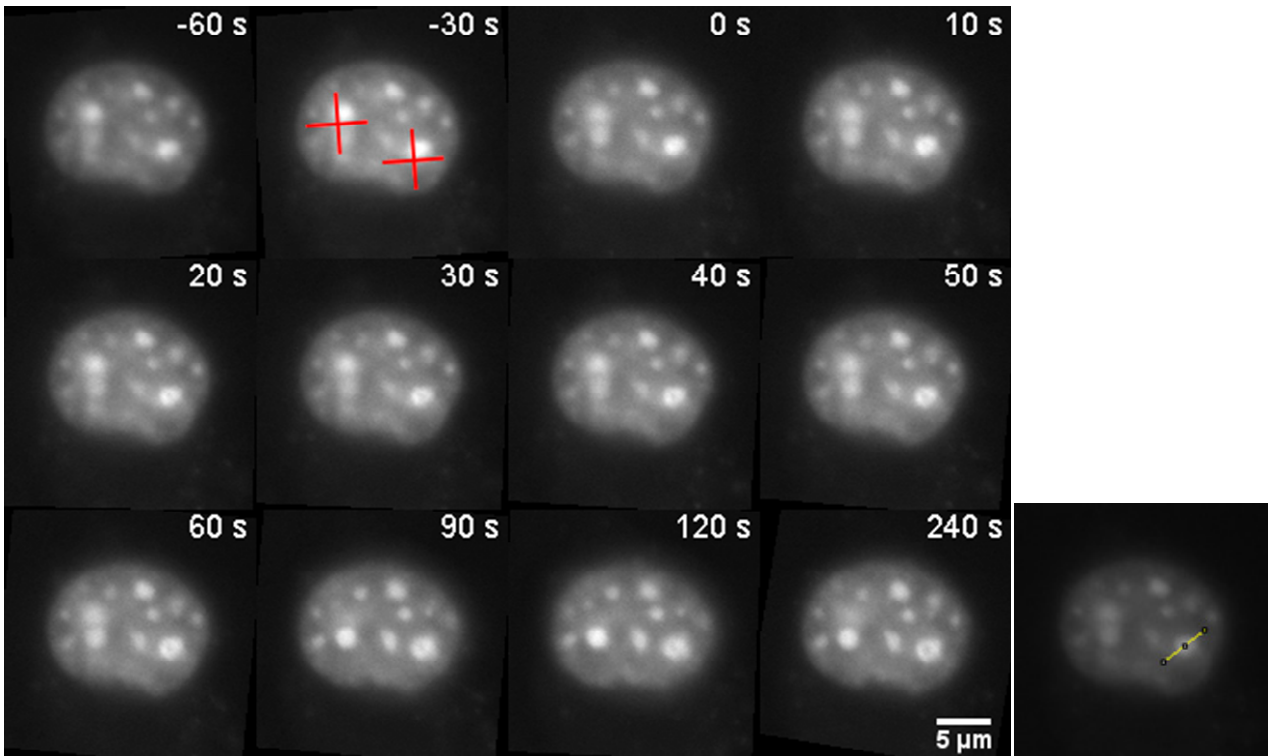


Abbildung 39: Lebendzellbeobachtung der lokalen Dekondensation an einem Ionendurchgang in einem Chromocenter. Embryonale Maus Fibroblasten wurden kurz vor der Bestrahlung mit dem Lebendzell-DNA-Farbstoff Hoechst 33342 gefärbt und ausgewählte Chromocenter mit einzelnen Goldionen ($13000 \text{ keV}/\mu\text{m}$; $3,6 \text{ MeV/u}$) an der Mikrosonde bestrahlt. Die DNA Intensität wurde in Abständen von 10 s gemessen. Das obere Bildfeld zeigt ausgewählte Aufnahmen der Lebendzellbeobachtung. Das erste Bild (-60 s) zeigt die DNA Färbung einer lebenden Zelle kurz vor der Bestrahlung. Im zweiten Bild (-30 s) sind die Zielkoordinaten der zwei Ionen eingezeichnet, welche die ausgewählten Chromocenter der Zelle treffen sollten. Die weitere Bildfolge zeigt die Dekondensation des rechten Chromocenters über die Zeit. Die Aufnahmen wurden hinsichtlich Translations- und Rotationsbewegungen sowie Bleichen der Gesamtfluoreszenzintensität korrigiert. Das untere Bildfeld zeigt die Messung der DNA Intensität dieses Chromocenters mit Hilfe von Linienprofilen. Aufgetragen ist der Grauwert entlang der eingezeichneten Achse (gelbe Linie im Bild rechts oben). 10 Pixel entsprechen $1,6 \mu\text{m}$.

Um zu untersuchen, ob es sich bei der beobachteten Reduktion der DNA Intensität nach Ionenbestrahlung um einen biologischen Prozess bzw. eine mögliche Dekondensation handelt und nicht um die bloße Zerstörung der Chromatinstruktur als Ganzes durch das Ion, wurde der Intensitätsabfall im lebenden System gemessen.

Abbildung 39 zeigt eine Lebendzellbeobachtung der lokalen Abnahme der DNA Färbung am Ionendurchgang innerhalb eines Chromocenters. Embryonale Maus Fibroblasten wurden kurz vor der Bestrahlung mit dem DNA-Lebendzellfarbstoff Hoechst 33342 gefärbt und die DNA Intensität nach Bestrahlung der Chromocenter im Abstand von 10 s gemessen.

Das rechte der beiden bestrahlten Chromocenter zeigte im Laufe der Aufnahmezeit ein sich entwickelndes Loch, in dem die DNA Intensität immer weiter abnimmt. In der Aufnahme im unteren Bildfeld ist die Achse, über die die einzelnen Linienprofile gemessen wurden, markiert (gelbe Linie). Die Profile selbst zeigen einen graduellen Intensitätsabfall der DNA Färbung in der Mitte des getroffenen Chromocenters, welcher im Laufe der Beobachtungsdauer immer ausgeprägter erscheint. Der graduelle Intensitätsabfall der DNA Färbung an der Stelle des Ionendurchgangs deutet auf einen biochemischen Prozess hin, bei dem es sich höchst wahrscheinlich um die lokale DNA Dekondensation an den heterochromatischen DNA Schäden handelt. Durch die zeitliche Entwicklung kann eine Zerstörung der DNA als hauptsächliche Ursache für die reduzierte DNA Färbung weitgehend ausgeschlossen werden, da diese quasi instantan nach dem Ionendurchgang erfolgen sollte.

Das linke der beiden bestrahlten Chromocenter lies keine solche lokale Dekondensation erkennen. Abbildung 40 belegt jedoch beispielhaft, dass die Dekondensation in den Lebendzellaufnahmen aufgrund der systembedingten, geringen Auflösung und der schwankenden Fokusstabilität oft nicht zu erkennen war, in nachgeschalteten konfokalen Aufnahmen der selben, fixierten Zellen aber sichtbar wurde. Die Lebendzellaufnahmen des linken Zellkerns (obere 6 Aufnahmen) zeigen eine rasche XRCC1 Rekrutierung innerhalb von 60 Sekunden nach Bestrahlung. Das obere der beiden angezielten Chromocenter scheint mittig getroffen, eine Dekondensation ist im Linienprofil der Lebendzellaufnahme jedoch am Ort der XRCC1 Rekrutierung nicht wirklich zu erkennen. Erst die konfokale Aufnahme der selben Zelle nach Fixierung (ca. 15 min nach Bestrahlung) zeigt die deutliche Dekondensation am Ort des Ionendurchgangs (unteres Linienprofil). Die untersten beiden Aufnahmen zeigen den zweiten bestrahlten Zellkern. Links ist die Lebendzellaufnahme 2 min nach Bestrahlung zu sehen. Wiederum ist keine Dekondensation in den beiden angezielten Chromocentern zu erkennen. In der konfokalen Aufnahme der selben Zelle (rechts unten) nach Fixierung (ca. 15 min nach Bestrahlung) zeigen beide bestrahlten Chromocenter jedoch eine lokale Dekondensation.

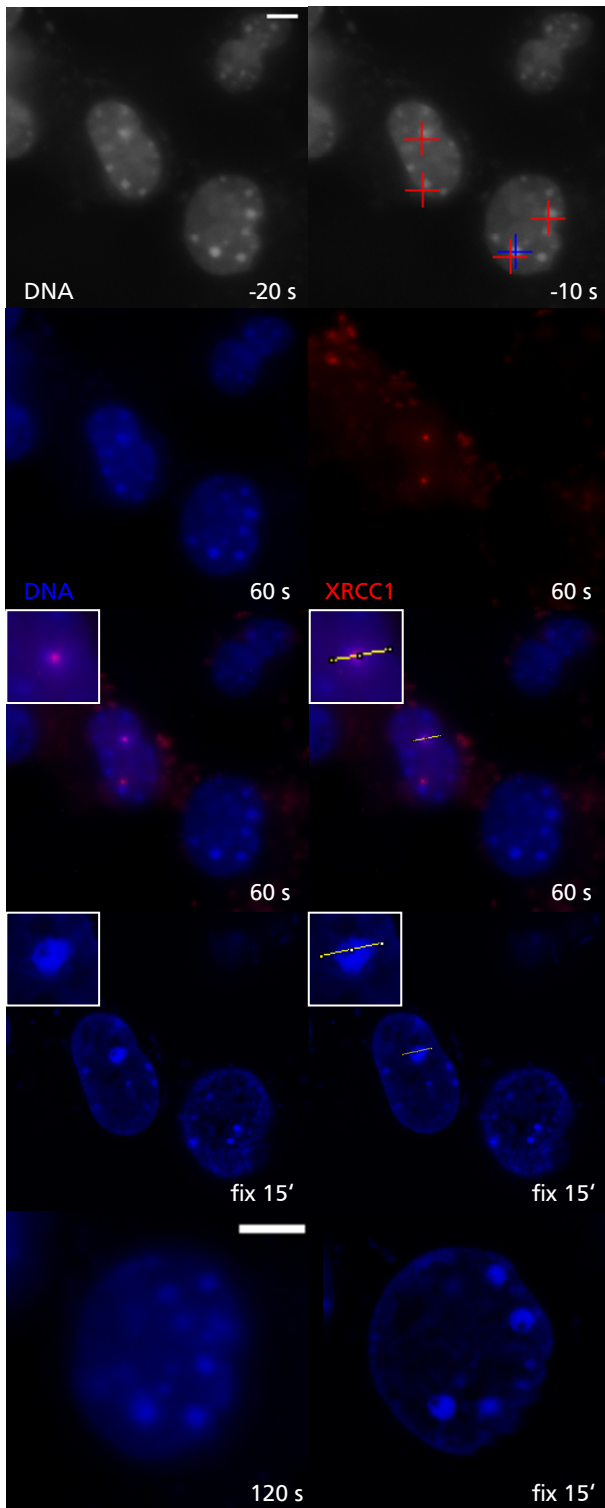


Abbildung 40: Vergleich der Lebendzellbeobachtung der lokalen Dekondensation an einem Ionendurchgang in einem Chromocenter mit konfokalen Aufnahmen der selben Zellen nach der Fixierung.

Embryonale Maus Fibroblasten wurden mit Hilfe eines Plasmids mit RFP markiertem XRCC1 transfiziert und kurz vor der Bestrahlung mit dem Lebendzell-DNA-Farbstoff Hoechst 33342 gefärbt. Die so modifizierten Zellen wurden mit einzelnen Goldionen ($13000 \text{ keV}/\mu\text{m}$; $3,6 \text{ MeV/u}$) an der Mikrosonde bestrahlt und die DNA bzw. XRCC1 Intensität in Abständen von 10 s gemessen. Das erste Bild („-20 s“) zeigt die DNA Färbung zweier lebender Zellen kurz vor der Bestrahlung. Im zweiten Bild („-10 s“) sind die Zielkoordinaten der Ionen eingezeichnet. Die nachfolgenden Überlagerungen aus DNA Färbung und XRCC1 Intensität zeigen die Rekrutierung von XRCC1 an den Ort des Ionendurchgangs innerhalb von 60 s. Der quantifizierte Focus ist heraus vergrößert. Im oberen Linienprofil ist der Intensitätsverlauf der zwei Färbungen entlang der dargestellten Achse (gelbe Linien in der Überlagerung „60 s“) zu sehen. Die weitere Bildfolge zeigt die selbe Zelle in einer konfokalen Aufnahme nach der Fixierung (ca. 15 min nach Bestrahlung). Im entsprechenden Linienprofil rechts unten ist der Intensitätsverlauf der

DNA Färbung entlang der dargestellten Achse (gelbe Linie) zu sehen. Das unterste Bildfeld zeigt die rechte der beiden bestrahlten Zellen. Links eine Lebendzellaufnahme der DNA 120 s nach Bestrahlung und rechts eine konfokale Aufnahme der DNA der fixierten Zelle (ca. 15 min nach Bestrahlung). Maßstab: 5 μm ; 10 pxl in den Intensitätsprofilen entsprechen 0,72 μm .

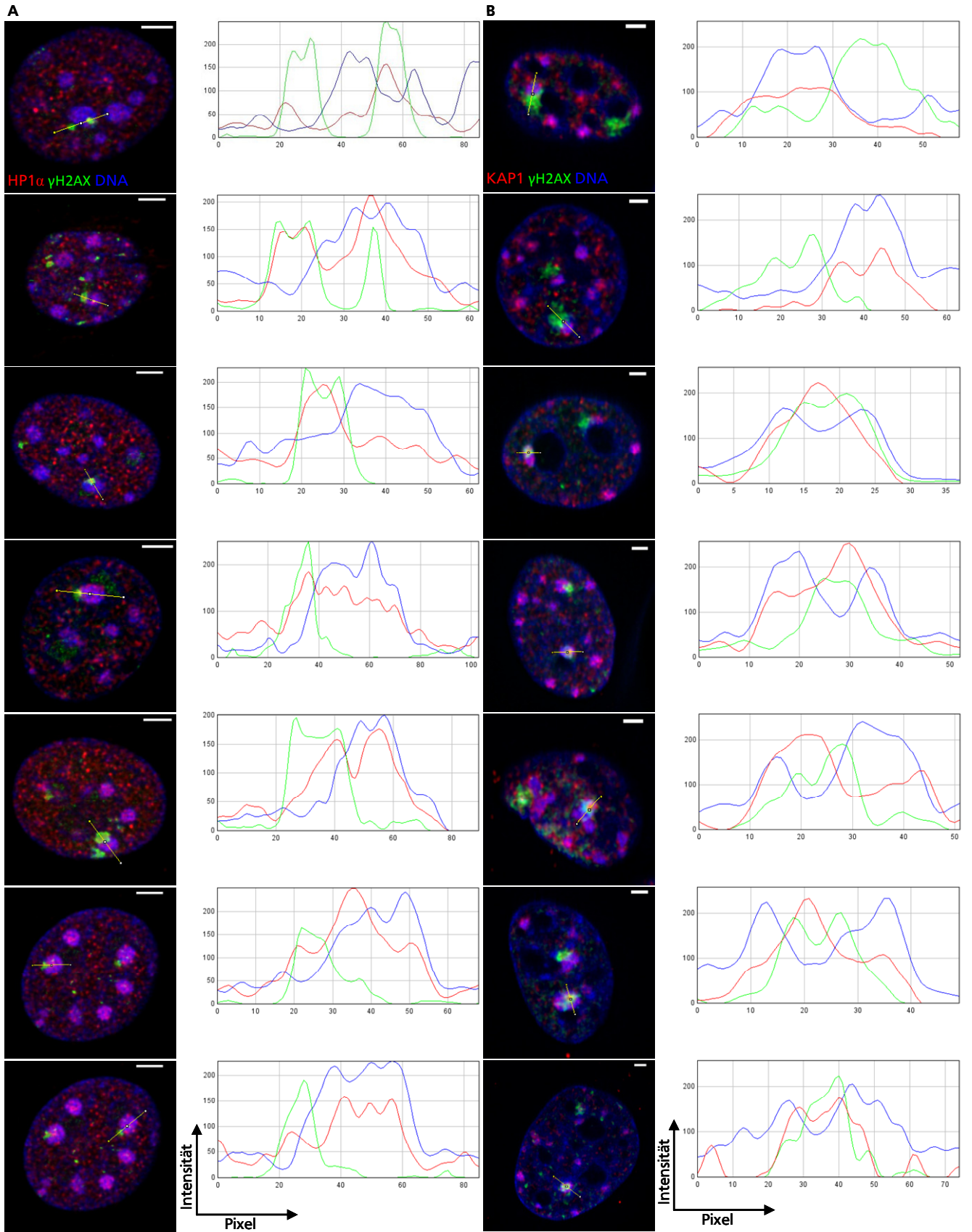
4.5.1 Die Dynamik von HP1 α und KAP1 an heterochromatischen DNA Schäden

HP1 und KAP1 sind Heterochromatinproteine, die unabhängig von DNA Schädigung angereichert im Heterochromatin vorliegen (White et al. 2012). HP1 α wird zusätzlich, unabhängig von H3K9me3 an UV und Laser induzierte DNA Schäden rekrutiert (Luijsterburg et al. 2009, Baldeyron et al. 2011). Im Folgenden wurde untersucht, wie sich HP1 α und KAP1 im vorliegenden Modellsystem der embryonalen Maus Fibroblasten und der Bestrahlung mit schweren Ionen verhalten.

Abbildung 41 A zeigt, dass HP1 α im Allgemeinen mit dem intensiven DNA Signal der heterochromatischen Chromocenter kolokalisierte. Über dieses Grundniveau hinaus stieg nach Bestrahlung das HP1 α Signal an ioneninduzierten Schäden innerhalb der Chromocenter weiter an. Auch Schäden, die sich bereits peripher zum getroffenen Chromocenter befanden, zeigten ein erhöhtes HP1 α Signal.

KAP1 kolokalisierte ebenfalls mit dem DNA Signal der Chromocenter (siehe Abbildung 41 B). Ähnlich wie für HP1 α beobachtet stieg das KAP1 Signal an DNA Schäden innerhalb der CC über dieses heterochromatische Grundniveau hinaus an (Abbildung 41 B Bildfeld 3 und folgende). Schäden, welche die Chromocenter verlassen hatten, zeigten jedoch kein erhöhtes Signalniveau von KAP1 mehr (Abbildung 41 B Bildfeld 1 und 2). Hierin unterschieden sich KAP1 und HP1 α .

H3K9me3 als etablierter Heterochromatinmarker (Almouzni et al. 2011) kolokalisierte zuverlässig mit den Chromocentern (Abbildung 22 und Abbildung 41 C). Das H3K9me3 Signal stieg jedoch im Gegensatz zum Signal von HP1 α und KAP1 nicht am Ort von heterochromatischen Schäden an, sondern folgte auch hier dem DNA Signal, welches um den DNA Schaden herum absank. Periphere DNA Schäden zeigten keinerlei H3K9me3 Markierung mehr.



C

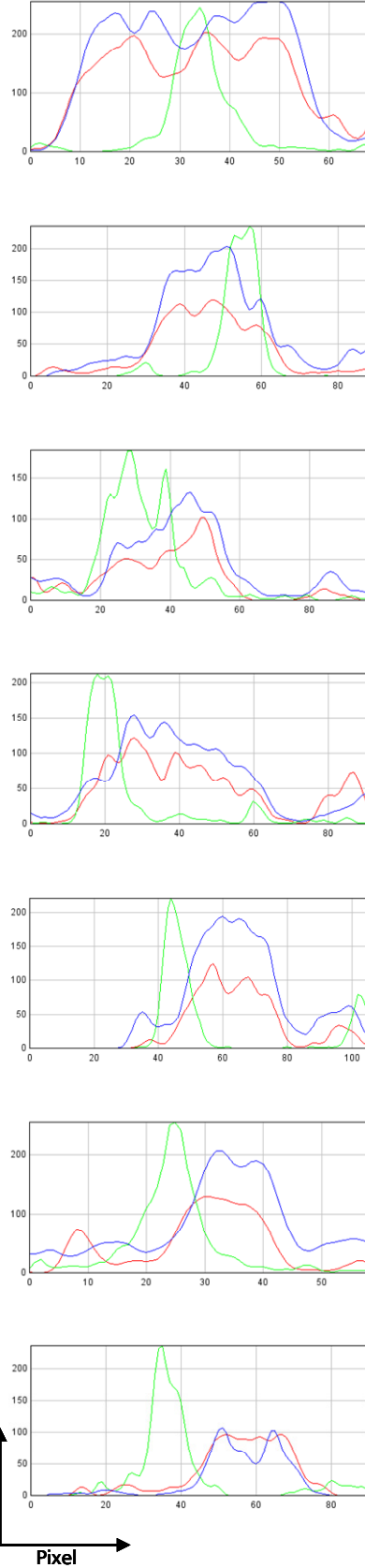
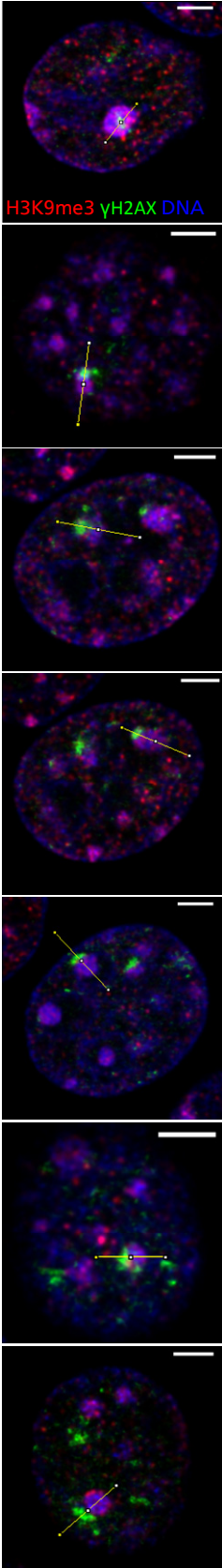


Abbildung 41: Immunfluoreszenzanalyse der HP1 α , KAP1 und H3K9me3 Dynamik an heterochromatischen DNA Schäden.

Dargestellt sind Beispiele für Chromocenter embryonaler Maus Fibroblasten, die mit einzelnen Ionen (A und C: Stickstoffionen, 390 keV/ μ m; 4,8 MeV/u; B: Goldionen 12800 keV/ μ m; 4,8 MeV/u) an der Mikrosonde bestrahlt wurden. Die Zellen wurden kurze Zeit (2 bis 12 min) nach der Bestrahlung fixiert und γ H2AX (grün), die DNA (DAPI, blau) und HP1 α (A), KAP1 (B) oder H3K9me3 (C) (rot) gefärbt. Die Linienprofile zeigen den Intensitätsverlauf der drei Färbungen entlang der dargestellten Achse (gelbe Linie in der Überlagerung). Maßstab: 2 μ m (A, B) bzw. 3 μ m (C); 10 pxl in den Intensitätsprofilen entsprechen 0,72 μ m.

4.6 Der Einfluss von KAP1 auf die Relokalisierung und die Chromatindekondensation

Wie in Abschnitt 4.4 erläutert war die Relokalisierungskinetik der heterochromatischen DSBs aus den Chromocentern zumindest teilweise von ATM abhängig. Wie bereits erwähnt wurde ATM als essentiell für die Reparatur von heterochromatischen DNA Schäden beschrieben (Goodarzi et al. 2008, Beucher et al. 2009). Das vorgeschlagene Modell beschreibt, dass ATM schadensabhängig chromatingebundenes KAP1 phosphoryliert. Daraufhin kommt es zur Dekondensation der Chromatinstruktur um den DNA Schaden. Weiterhin beschreibt Goodarzi, dass sich die ATM Abhängigkeit der DNA Reparatur im HC umgehen lässt, indem man die Expression von KAP1 unterdrückt. Ohne KAP1 läge das Chromatin bereits dekondensiert vor. Die ATM abhängige Phosphorylierung von KAP1 und die darauffolgende Chromatinmodifikation entfielen. Um zu untersuchen, ob sich ein KAP1 *knock down* (k.d.) auf die Relokalisierung auswirkt und ob das Chromatin in solchen Zellen möglicherweise schadensunabhängig dekondensiert vorliegt, wurde im Folgenden die Expression von KAP1 sowohl in ATM defizienten als auch in WT Zellen unterdrückt.

Mit Hilfe von spezifischer siRNA wurde die Expression von KAP1 über einen Zeitraum von 48 h vor der Bestrahlung unterdrückt. Um einen erfolgreichen *knock down* zu verifizieren, wurden die Proben neben den Schadensmarkern zusätzlich gegen KAP1 gefärbt. Für die folgenden Relokalisierungsanalysen wurden nur solche Zellen verwendet, die ein deutlich reduziertes KAP1 Level im Zellkern aufwiesen.

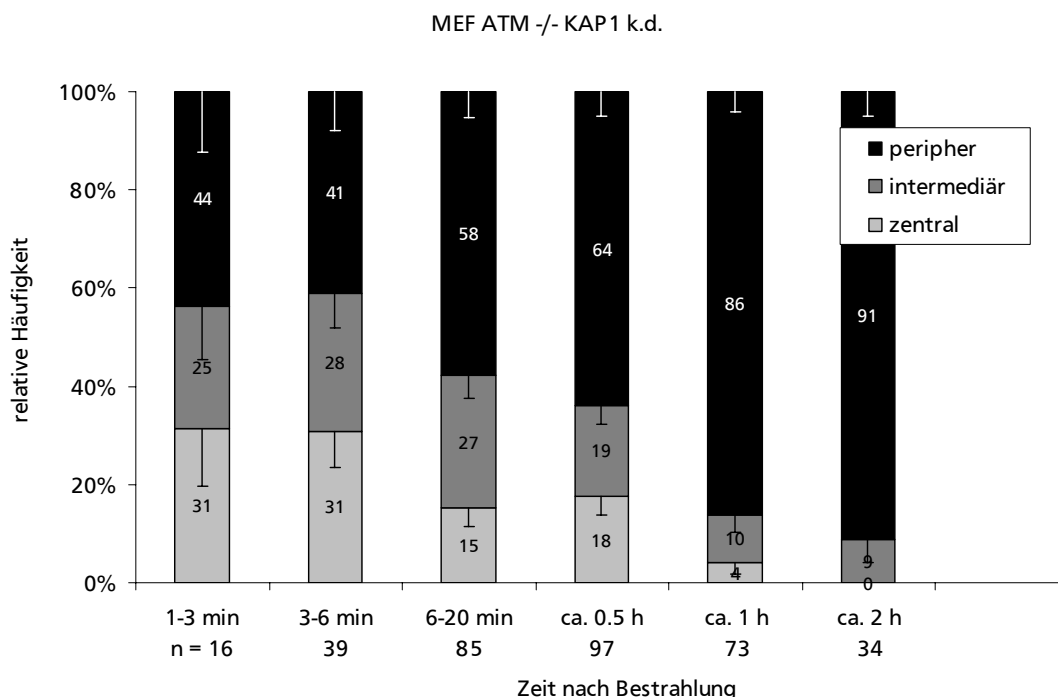


Abbildung 42: Relokalisierungskinetik heterochromatischer DNA Schäden gemessen in ATM defizienten Fibroblasten (MEF ATM^{-/-}) mit einem k.d. gegen KAP1.

Dargestellt sind die relativen Anteile von „zentralen“, „intermediären“ und „peripheren“ Schadensmarkerspuren in festen Zeitfenstern. Die prozentualen Werte sind jeweils in den Balken abzulesen. Die Fehlerbalken geben den binomial Fehler der jeweiligen Fraktion an. „n“ gibt die Zahl der für dieses Zeitfenster gemessenen Chromocentern an.

Abbildung 42 zeigt die Relokalisierungsanalyse von ATM defizienten Zellen mit einem zusätzlichen KAP1 k.d.. Die Kinetik zeigt keine signifikanten Unterschiede zur Kinetik der ATM defizienten Zellen (vgl. Abbildung 33).

Um zu beantworten, ob der *knock down* von KAP1 möglicherweise einen eigenständigen, ATM-unabhängigen Effekt auf die Relokalisierung hat, wurde eine weitere Relokalisierungsanalyse in ATM profizienten (WT) Zellen mit einem KAP1 k.d. durchgeführt (siehe Abbildung 43). Die Kinetik lieferte keinen eindeutigen Trend. Die Zeitfenster 3-6 min und 6-20 min zeigten einen im Vergleich zum WT (siehe Abbildung 33) höheren Anteil an bereits peripheren Schadensspuren. Dies ist möglicherweise auf eine schlechte Zielgenauigkeit der Mikrosonde bei dieser Strahlzeit zurückzuführen. Das Zeitfenster von 0,5 h dagegen zeigte einen deutlich geringeren Anteil an peripheren Schadensspuren als der WT, der eher auf Höhe der ATM defizienten Zellen lag (siehe Abbildung 33). Das 1 h Zeitfenster schließlich war mit dem des WT vergleichbar.

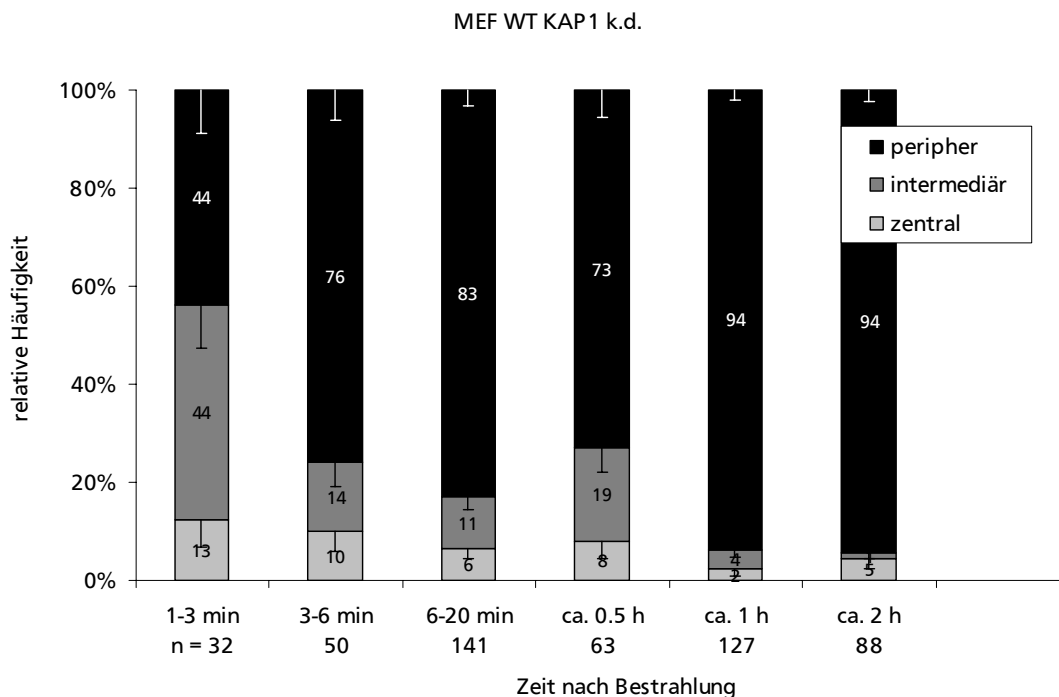


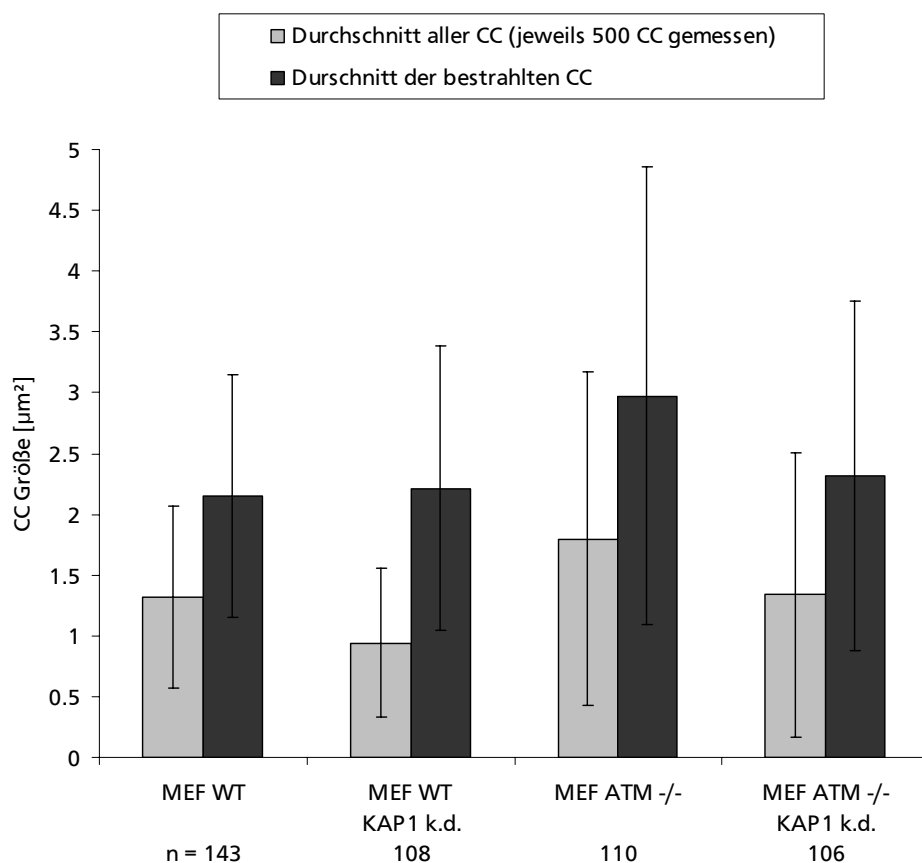
Abbildung 43: Relokalisierungskinetik heterochromatischer DNA Schäden gemessen in WT Fibroblasten nach einem k.d. gegen KAP1.

Dargestellt sind die relativen Anteile von „zentralen“, „intermediären“ und „peripheren“ Schadensmarkerspuren in festen Zeitfenstern. Die prozentualen Werte sind jeweils in den Balken abzulesen. Die Fehlerbalken geben den binomial Fehler der jeweiligen Fraktion an. „n“ gibt die Zahl der für dieses Zeitfenster gemessenen Chromocenter an.

Die kondensierten heterochromatischen Chromocenter waren unabhängig von ATM oder KAP1 in jedem Zellkern klar zu erkennen, was gegen eine generelle, ausgeprägte Dekondensation des Chromatins in KAP1 k.d. Zellen spricht.

Wie in Abschnitt 4.4 erläutert, wurde auch für die Zellen mit KAP1 k.d. ein möglicher Einfluss der unterschiedlichen Chromocentergrößen untersucht. Abbildung 44 zeigt die durchschnittlichen Größen

einzelner Chromocenter der WT und ATM defizienten Zellen, jeweils mit und ohne KAP1 k.d.. Verglichen werden sowohl die allgemeinen Chromocenterpopulation als auch die Chromocenter, die für die Bestrahlung ausgewählt wurden. In der allgemeinen Population sank sowohl für die WT Zellen, als auch für die ATM defizienten Zellen die durchschnittliche Größe der Chromocenter nach erfolgreichem KAP1 k.d. signifikant (Students t-Test; $p = 4,32 \times 10^{-17}$ bzw. $2,18 \times 10^{-11}$) um ca. 30 %. Die Größe der jeweils für die Bestrahlung ausgewählten Chromocenter der WT Zellen mit KAP1 k.d. (Students t-Test; $p = 0,64$) bzw. ATM defizienten Zellen mit KAP1 k.d. (Students t-Test; $p = 0,28$) unterschied sich mit ca. $2,1 \mu\text{m}^2$ nicht signifikant vom unbehandelten WT.



Signifikanzen (Students t-Test)

allgemeine Population	MEF WT KAP1 k.d.	MEF ATM -/-	MEF ATM -/- KAP1 k.d.
MEF WT	** ($4,32 \times 10^{-17}$)	** ($2,18 \times 10^{-11}$)	n. s. (0,72)
MEF ATM -/-			** ($1,20 \times 10^{-8}$)
bestrahlte Population	MEF WT KAP1 k.d.	MEF ATM -/-	MEF ATM -/- KAP1 k.d.
MEF WT	n. s. (0,64)	** ($1,14 \times 10^{-5}$)	n. s. (0,28)
MEF ATM -/-			** (0,0045)

Abbildung 44: Vermessung der Fläche einzelner Chromocenter von embryonalen Maus Fibroblasten in Maximalprojektionen.

Aufgetragen ist die durchschnittliche Fläche eines einzelnen Chromocenters als Vergleich zwischen WT Fibroblasten, ATM defizienten Fibroblasten und dem KAP1 k.d. dieser beiden Zelllinien. Unterschieden wird außerdem zwischen der allgemeinen Chromocenter Population (hellgrau) und der Population, die für die Relokalisierungsanalyse bestrahlt wurden (dunkelgrau). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

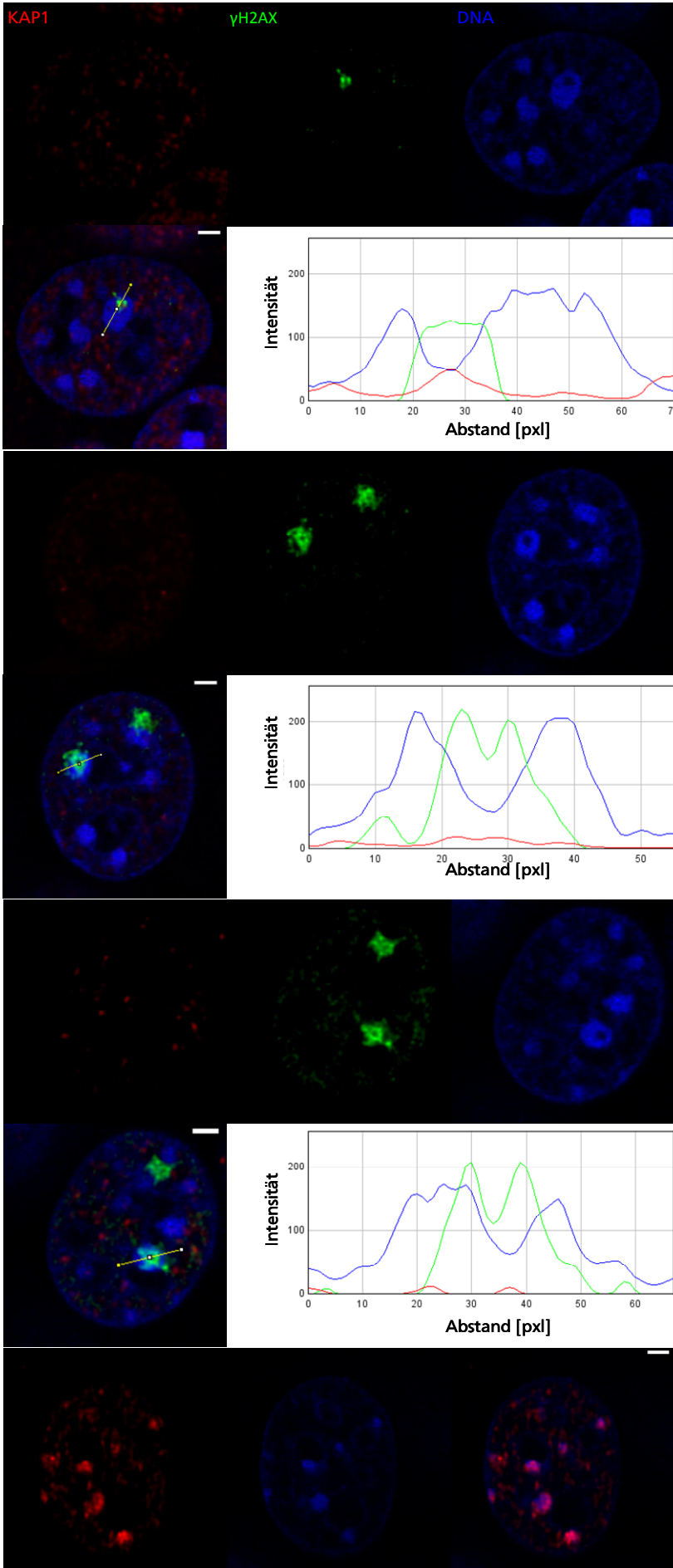


Abbildung 45: Lokale Dekondensation an heterochromatischen DNA Schäden in WT Fibroblasten nach einem KAP1 k.d. In embryonalen Maus Fibroblasten wurde mit Hilfe von siRNA das Expressionsniveau von KAP1 reduziert. Die Chromocenter der so modifizierten Zellen wurden mit einzelnen Goldionen (12800 keV/μm; 4,8 MeV/u) an der Mikrosonde bestrahlt. Die Zellen wurden im Zeitfenster von 2 bis 12 min nach der Bestrahlung fixiert und gegen KAP1 (rot), γH2AX (grün) und die DNA (DAPI, blau) gefärbt. Die Linienprofile zeigen den Intensitätsverlauf der drei Färbungen entlang der dargestellten Achse (gelbe Linie in der Überlagerung). Das unterste Bildfeld zeigt eine Vergleichszelle im gleichen Bildfeld, bei der der k.d. keine Wirkung zeigt. Maßstab: 2 μm; 10 pxl in den Intensitätsprofilen entsprechen 0,72 μm.

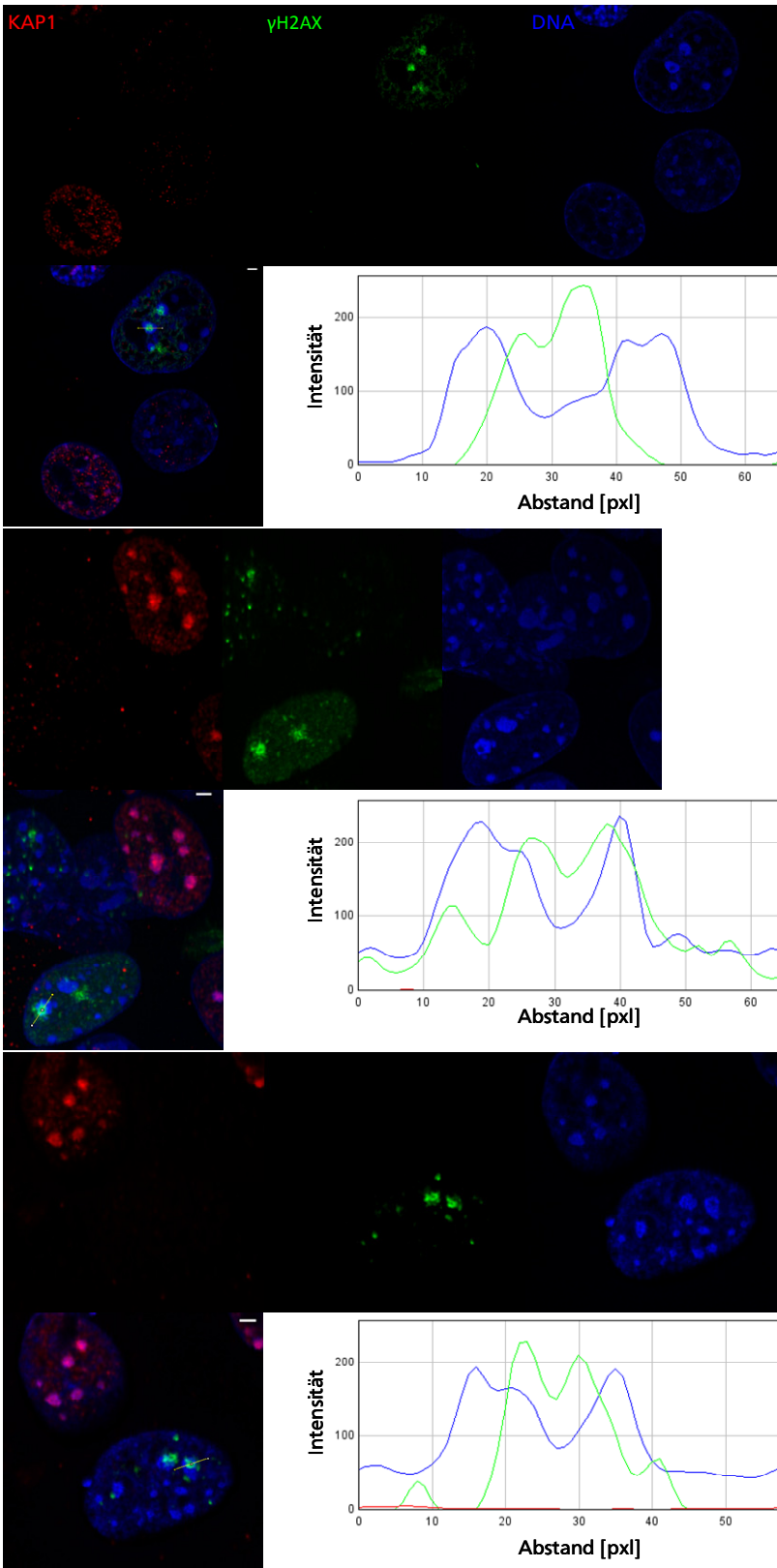


Abbildung 46: Lokale Dekondensation an heterochromatischen DNA Schäden in ATM defizienten Fibroblasten nach einem KAP1 k.d.

In embryonalen Maus Fibroblasten (MEF ATM $-/-$) wurde mit Hilfe von siRNA das Expressionsniveau von KAP1 reduziert. Die Chromocenter der so modifizierten Zellen wurden mit einzelnen Goldionen (12800 keV/ μ m; 4,8 MeV/u) an der Mikrosonde bestrahlt. Die Zellen wurden im Zeitfenster von 5 bis 30 min nach der Bestrahlung fixiert und gegen KAP1 (rot), γ H2AX (grün) und die DNA (DAPI, blau) gefärbt. Die Linienprofile zeigen den Intensitätsverlauf der drei Färbungen entlang der dargestellten Achse (gelbe Linie in der Überlagerung). In jedem Bildfeld finden sich neben den bestrahlten Zellen auch solche, in denen der KAP1 k.d. keine Wirkung zeigte. Maßstab: 2 μ m; 10 pxl in den Intensitätsprofilen entsprechen 0,72 μ m.

Wie weiter oben beschrieben, schildert Goodarzi et al. (2008) die Dekondensation des Chromatins nach DNA Schäden als einen Prozess, der von der ATM abhängigen Phosphorylierung von KAP1 abhängig ist. Die Abbildungen 45 und 46 belegen jedoch einen von ATM oder KAP1 unabhängigen Abfall der DNA Intensität innerhalb der Chromocenter an der Stelle der DNA Schädigung (siehe auch Abbildung 34).

Eine Dekondensation des Heterochromatins sollte sich auch auf die Ausdehnung der Schadensfoci innerhalb der Chromocenter auswirken, da die Rekrutierung und Ausbreitung des Schadenssignals in dekondensiertem Chromatin einfacher ist, als im kondensierten Chromatin (Goodarzi et al. 2008, Falk et al. 2013). Abbildung 47 zeigt die Vermessung der γ H2AX Foci in WT Zellen, ATM defizienten Zellen und dem KAP1 k.d. der beiden Zelllinien. Die aufgetragenen Mittelwerte der γ H2AX Focusdurchmesser unterschieden sich jedoch kaum (siehe Signifikanztabelle) von einander, was ebenfalls einen Hinweis auf eine ähnliche, strahlungsinduzierte Ausdehnung der Dekondensation unabhängig von ATM und KAP1 lieferte.

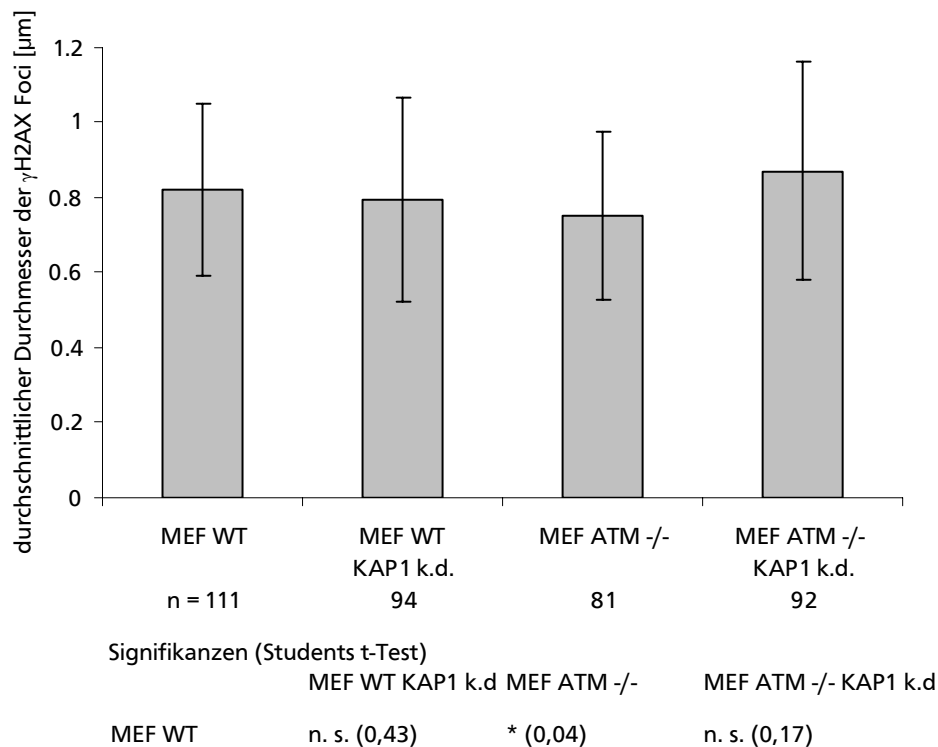


Abbildung 47: Vermessung des γ H2AX Focusdurchmessers in unterschiedlichen MEF Stämmen. Aufgetragen ist der Mittelwert des γ H2AX Focusdurchmessers in μ m für WT Fibroblasten, ATM defiziente Fibroblasten und für den KAP1 k.d. dieser beiden Zelllinien. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

4.7 Einfluss anderer PIK-Kinasen auf die Relokalisierung

Für viele Phosphorylierungssubstrate in der DNA Schadensantwort sind die drei PIK-Kinasen ATM, ATR und DNA-PK in ihrer Funktion zumindest zum Teil untereinander redundant (Matsuoka et al., 2000, Savic et al. 2009, Tomimatsu et al. 2009, review: Bhatti et al. 2011). Die folgenden Experimente

sollen eine mögliche Relevanz der Kinasen DNA-PK und ATR für die Relokalisierung offenlegen, wie sie in Abschnitt 4.4 bereits für ATM beschrieben wurde.

4.7.1 DNA-PK

DNA-PK besteht aus zwei Untereinheiten, der strukturellen Untereinheit aus dem KU70/KU80 Heterodimer und der katalytischen Untereinheit DNA-PK_{CS}. DNA-PK_{CS} ist eine Serin/Threonin Protein Kinase, die durch KU70/80 an den DSB rekrutiert wird und dort aktiviert wird, sobald sie die DSB Enden bindet. DNA-PK dient als synaptischer Komplex, der die beiden Bruchenden zusammen hält (Davis et al., 2013). Sobald es durch die Bindung der DSB Enden aktiviert wurde, kann DNA-PK eine ganze Reihe von Substraten wie XRCC4, H2AX, P53, KU70/80 und sich selbst phosphorylieren (review: Bhatti et al. 2011, Davis et al. 2013).

DNA-PK ist in der Lage ATM in dessen Kinase Funktion zumindest teilweise zu ersetzen (Hickson et al. 2004, Stiff et al. 2004). So kann beispielsweise KAP1 in ATM defizienten Zellen durch DNA-PK phosphoryliert werden (Tomimatsu et al. 2009).

Um einen möglichen Einfluss von DNA-PK auf die Relokalisierung der heterochromatischen DNA Schäden zu untersuchen, wurden embryonale Maus Fibroblasten mit dem DNA-PK Inhibitor NU7026 (Veuger et al. 2003, Riballo et al. 2004, Peddi et al. 2010) behandelt.

Zur Inhibition wurden die Zellen mindestens 1 h vor der Bestrahlung mit dem Inhibitor versetzt und die Konzentration von 10 μ M auch für eine mögliche Nachinkubation aufrecht erhalten.

Abbildung 48 zeigt die Relokalisierungskinetiken für WT Fibroblasten und ATM defiziente Fibroblasten, die jeweils mit dem DNA-PK Inhibitor behandelt wurden. Die Kinetiken wurden u.A. anhand von γ H2AX Markierungen gemessen. ATM und DNA-PK stellen die wichtigsten Kinasen für die Phosphorylierung von H2AX dar. Das Fehlen dieser beiden Kinasen und die Phosphorylierung von H2AX stehen in diesem Fall jedoch nicht im Widerspruch. Barbara Meyer (2011) zeigte, dass nach Bestrahlung mit Schwerionen H2AX auch nach erfolgreicher Inhibition von ATM und DNA-PK noch phosphoryliert werden kann. Die Relokalisierungskinetik nach DNA-PK Inhibition in WT Zellen zeigte keinen klaren Unterschied zu den unbehandelten Kontrollen. Während im Zeitfenster 6-20 min mit 85 % bereits ein höherer Anteil der Schäden im Vergleich zum unbehandelten WT (Abbildung 28, 72 %) peripher zu finden war, lagen nach DNA-PK-Inhibition im Zeitfenster von etwa einer Stunde mit 89 % weniger DNA Schäden peripher als im WT (96 %).

Die zusätzlich verlangsamte Relokalisierungskinetik der DNA-PK inhibierten, ATM defizienten Fibroblasten zeigte dagegen einen additiven Effekt beider Kinasen. In allen drei gemessenen Zeitfenstern lag der Anteil der peripheren Schadensspuren nach zusätzlicher DNA-PK Inhibition unter dem der unbehandelten ATM defizienten Fibroblasten (vgl. Abbildung 33). Im Zeitfenster 6-20 min betrug der Unterschied des Anteils peripherer Schäden 19 %, für 0,5 h waren es 22 % und für das Zeitfenster von

ca. 1 h waren 16 % weniger Spuren in den DNA-PK inhibierten, ATM defizienten Zellen peripher (Prozentangaben in Bezug auf die Gesamtpopulation der Spuren).

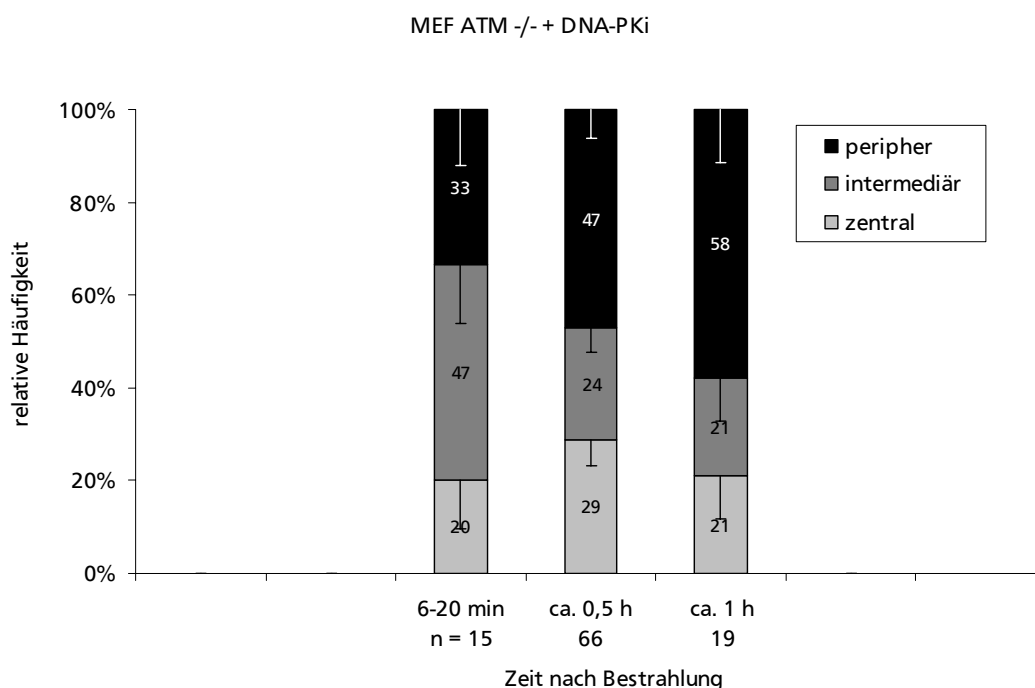
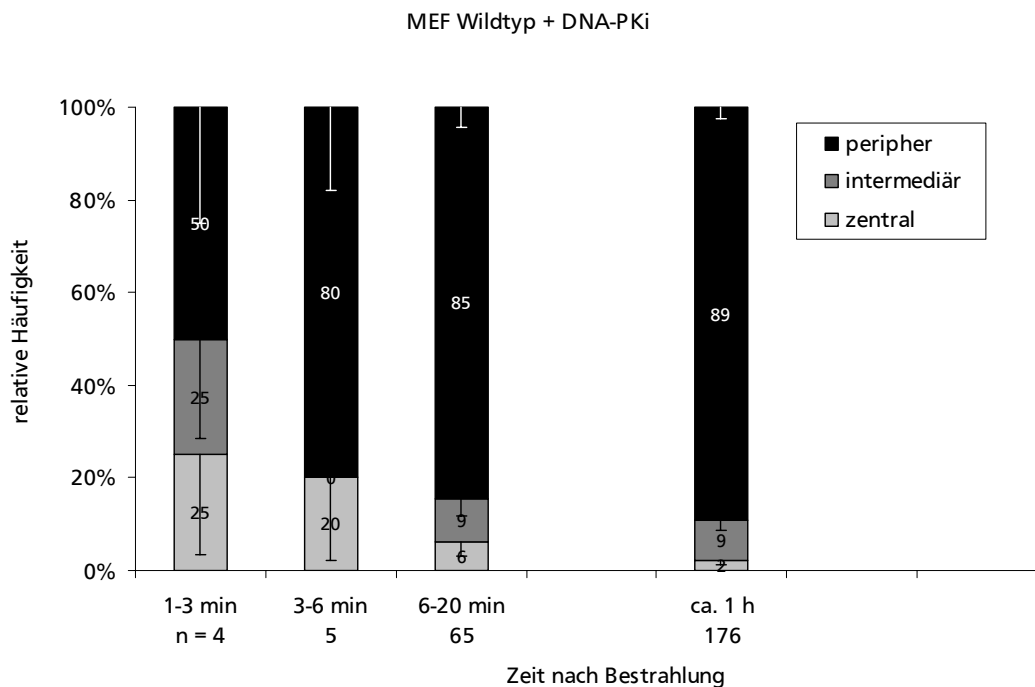


Abbildung 48: Relokalisierungskinetik heterochromatischer DNA Schäden gemessen in ATM profizienten und ATM defizienten Fibroblasten (MEF ATM -/-), die jeweils mit dem DNA-PK Inhibitor KU7026 behandelt wurden. Dargestellt sind die relativen Anteile von „zentralen“, „intermediären“ und „peripheren“ Schadensmarkerspuren in festen Zeitfenstern. Die prozentualen Werte sind jeweils in den Balken abzulesen. Die Fehlerbalken geben den binomial Fehler der jeweiligen Fraktion an. „n“ gibt die Zahl der für dieses Zeitfenster gemessenen Chromocenter an.

4.7.2 ATR

Ein weiteres Mitglied der PIKK-Familie ist ATR. Während ATM vor allem an der DNA Schadensantwort nach DSBs beteiligt ist, wird ATR überwiegend nach UV induzierten und replikationsassoziierten DNA Schäden aktiv (Batchelor et al. 2011, review: Bhatti et al. 2011). Wie DNA-PK ist auch ATR bezüglich seiner Substrate teilweise redundant zu ATM. Wichtige Checkpointproteine wie P53, SMC1, 53BP1, CHK1 und CHK2 werden auch von ATR phosphoryliert, wenn auch in geringerem Ausmaß als durch ATM (Matsuoka et al. 2000, Tomimatsu et al. 2009, review: Bhatti et al., 2011).

Nach DSB Induktion phosphoryliert sowohl ATM, als auch ATR die BAF170 Untereinheit des SWI-SNF Komplexes. Dieser wird daraufhin zu den DSBs rekrutiert und fördert die Dekondensation des Chromatins um den Bruch (Peng et al. 2009).

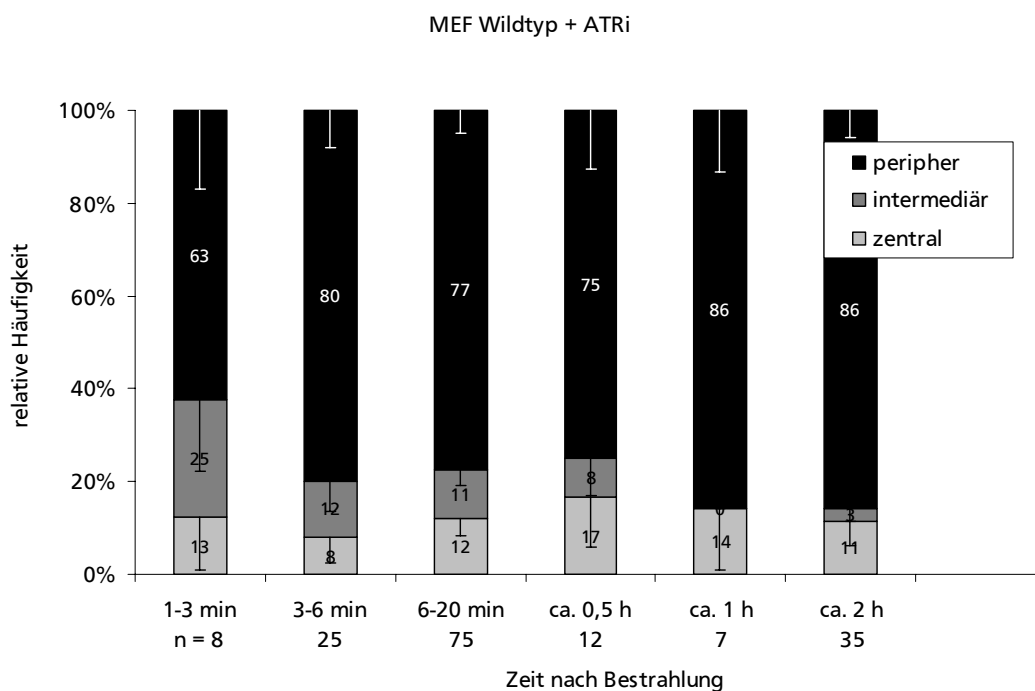


Abbildung 49: Relokalisierungskinetik heterochromatischer DNA Schäden gemessen in WT Fibroblasten die mit dem ATR Inhibitor NVP BEZ235 behandelt wurden.

Dargestellt sind die relativen Anteile von „zentralen“, „intermediären“ und „peripheren“ Schadensmarkerspuren in festen Zeitfenstern. Die prozentualen Werte sind jeweils in den Balken abzulesen. Die Fehlerbalken geben den binomial Fehler der jeweiligen Fraktion an. „n“ gibt die Zahl der für dieses Zeitfenster gemessenen Chromocenter an.

Abbildung 49 zeigt die Relokalisierungskinetik von ATR inhibierten WT Fibroblasten. Die Zellen wurden vor der Bestrahlung für mindestens eine Stunde mit 100 nM ATR Inhibitor (NVP BEZ 235; Maira et al. 2008; Toledo et al. 2011) inkubiert und diese Konzentration auch für die Zeit der Nachinkubationen aufrecht erhalten. Die Relokalisierungskinetik der ATR inhibierten Zellen zeigte keinen klaren Trend. Die ersten drei Zeitfenster zeigten teilweise deutlich mehr periphere DNA Schäden als der unbehandelte WT (siehe Abbildung 28). Dies deutet auf eine schlechte Treffergenauigkeit der Mikrosonde in diesem Experiment hin. Die drei darauf folgenden Zeitfenster zeigten dagegen den umgekehrten

Trend mit niedrigeren peripheren Schadensanteilen, die sich eher mit dem der ATM defizienten Zellen (vgl. Abbildung 33) vergleichen lassen. Die schlechte Trefferquote (frühe Zeiten) in Kombination mit den geringen Anteilen peripherer Spuren zu späten Zeiten weisen allerdings auf einen Einfluss von ATR auf die Relokalisierung hin.

4.8 Einfluss des NHEJ auf die Relokalisierung

In Säugerzellen stellt (abhängig von der Zellzyklusphase) das NHEJ den vorherrschenden Reparaturweg von DSBs (Beucher et al. 2009, Woodbine et al. 2012). Eine Schlüsselrolle beim NHEJ nimmt das KU70/80 Heterodimer ein. Es bindet freie DSBs Enden, rekrutiert DNA-PK_{CS} und initiiert damit die Ligation des DSBs durch LigIV (Weterings et al. 2008, Strande et al. 2012, Sun et al. 2012). Eine Untersuchung der Relokalisierung heterochromatischer DNA-Schäden in *Drosophila spec.* ergab keine Abhängigkeit von KU80 (Chiolo et al. 2011). Die Autoren schlossen daraus, dass das klassische NHEJ keinen Einfluss auf die Relokalisierung hat. Im Gegensatz zu Säugersystemen ist der dominante Reparaturweg für DSB in *Drosophila* jedoch die HR, nicht das NHEJ. Shao et al. (2012) spekulieren, dass KU unabhängig von der Zellzyklusphase zunächst alle DSBs in Säugerzellen bindet, die Bruchenden zusammenhält und vor unangemessener Prozessierung schützt. Da KU die Resektion inhibiert (Lange-rak et al. 2011, Strande et al. 2012, Sun 2012), muss es vor der Prozessierung der DNA Enden vom DSB verdrängt werden (Shao et al. 2012). Ohne KU als DSB-Enden stabilisierenden Faktor könnte sich

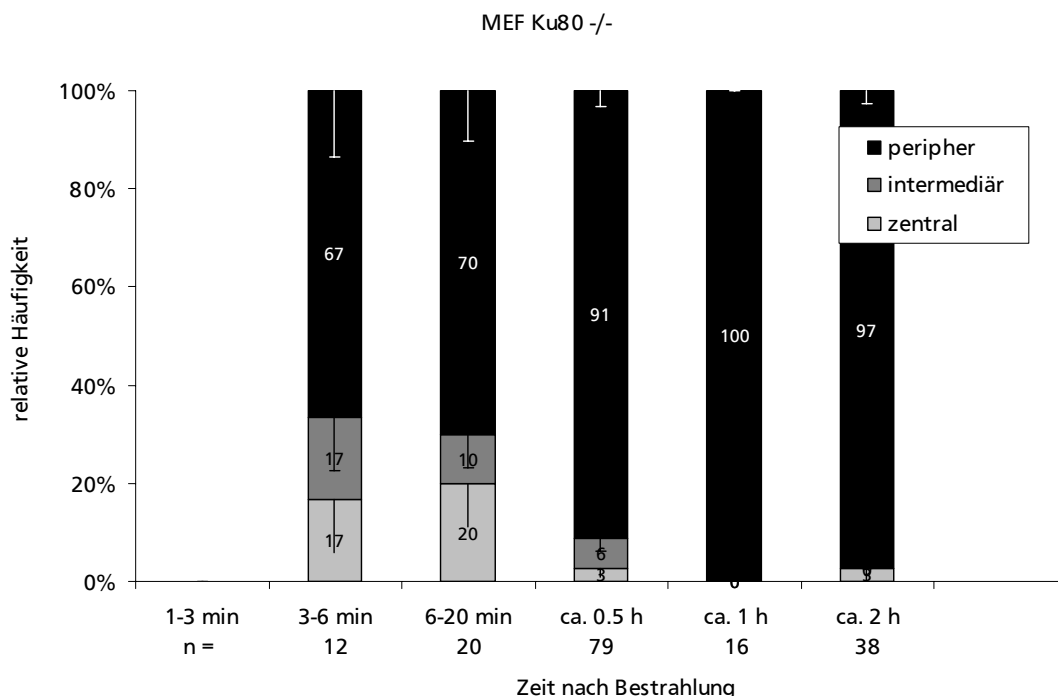


Abbildung 50: Relokalisierungskinetik heterochromatischer DNA Schäden gemessen in KU80 defizienten Fibroblasten. Dargestellt sind die relativen Anteile von „zentralen“, „intermediären“ und „peripheren“ Schadensmarkerspuren in festen Zeitfenstern. Die prozentualen Werte sind jeweils in den Balken abzulesen. Die Fehlerbalken geben den binomial Fehler der jeweiligen Fraktion an. „n“ gibt die Zahl der für dieses Zeitfenster gemessenen Chromocenter an.

möglicherweise etwas an der sonst so konzertierten Resektionsbewegung ändern. Außerdem könnten die Resektion und damit die Relokalisierung ohne das Resektions-inhibitorische KU möglicherweise schneller ablaufen (Lee et al. 1998, Soutoglou et al. 2007). Im folgenden Experiment wurde deshalb eine mögliche NHEJ Abhängigkeit der Relokalisierung heterochromatischer DNA Schäden im Säugersystem (Maus Fibroblasten) untersucht.

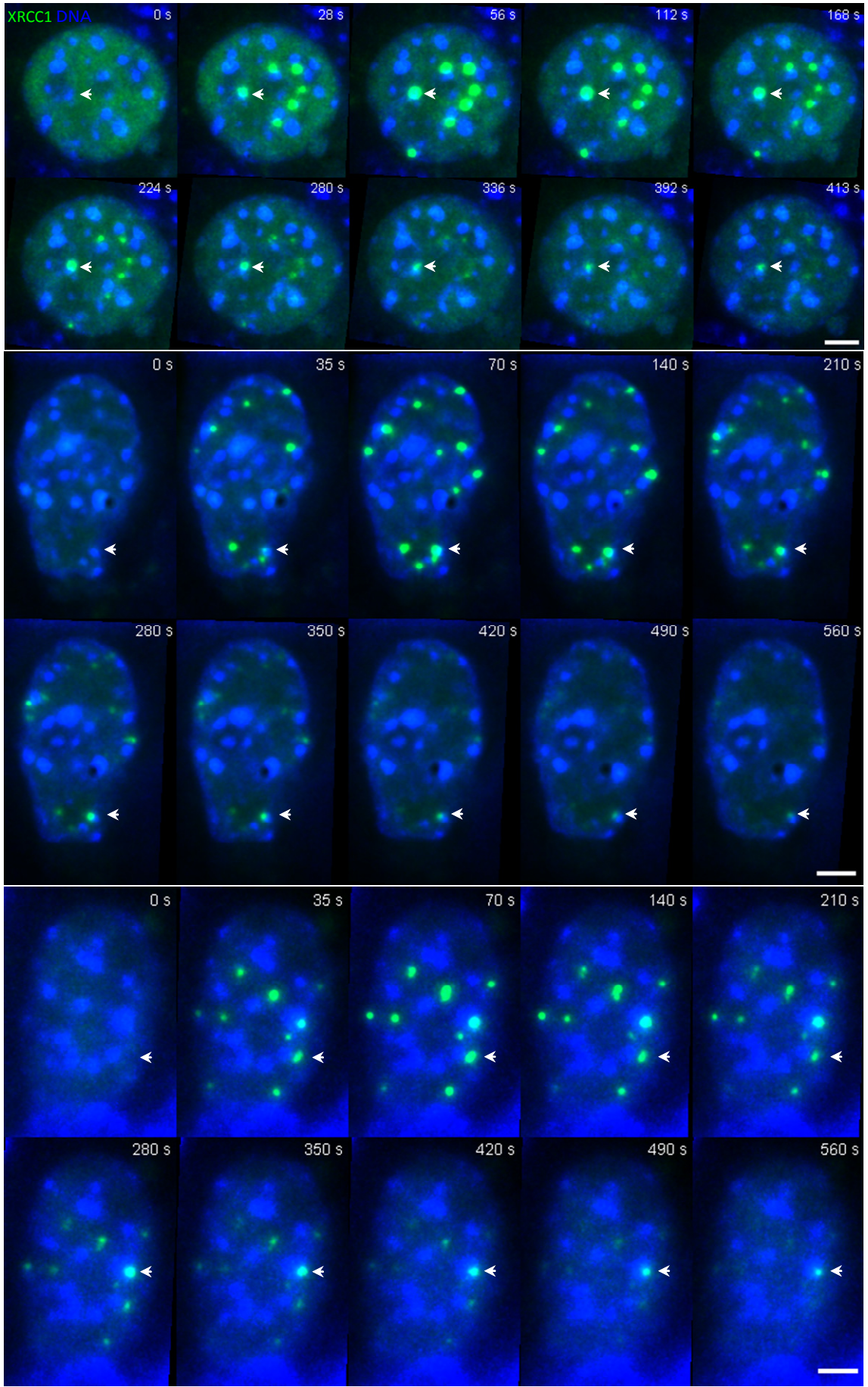
Wie Abbildung 50 zeigt, lag die Relokalisierungskinetik in NHEJ defizienten embryonalen Maus Fibroblasten (MEF KU80 -/-) auf WT Niveau (vgl. Abbildung 28). Bereits eine halbe Stunde nach Bestrahlung lagen 91 % der heterochromatischen Schäden peripher zu den entsprechenden, getroffenen Chromocentern. Somit zeigten sich auch im Säugersystem keine Anzeigen dafür, dass klassisches NHEJ die Relokalisierungsgeschwindigkeit beeinflusst.

4.9 Verlangsamte Reparatur der heterochromatischen DNA Schäden

Heterochromatische DSBs werden nach Induktion durch Röntgenbestrahlung mit langsamerer Kinetik als euchromatische DSBs repariert (Beucher et al. 2009). Auch nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen ist die Reparatur heterochromatinassoziierter DSBs langsamer als die von euchromatischen DSBs (Jakob et al. 2011).

Dass heterochromatinassoziierte DNA Schäden offenbar auch in Bezug auf von DSBs verschiedene Schadensarten länger nachweisbar bleiben, ließ sich hier in einem kleineren zeitlichen Maßstab auch im lebenden System beobachten. Dafür wurden embryonale Maus Fibroblasten mit Hilfe von Elektroporation (AMAXA) mit GFP-gekoppeltem XRCC1, welches hauptsächlich SSBs und Basenschäden anzeigt, markiert. Kurz vor der Bestrahlung wurden die Zellen zusätzlich mit dem Lebendzell-DNA-Marker Hoechst 33342 gefärbt. Die Verwendung des Strahlplatzmikroskops (Jakob et al. 2005) macht es möglich die Rekrutierung des Schadensmarkers im lebenden System zu beobachten. Die Bestrahlung erfolgte senkrecht zur Ebene des Zellrasens. Die traversierenden Ionen hinterlassen wie bei der Bestrahlung mit der Mikrosonde Schadensspuren, die in dieser Geometrie durch die Aufsicht im Mikroskop als einzelne Fluoreszenzpunkte erscheinen. Abbildung 51 A zeigt die Lebendzellbeobachtung der so modifizierten Zellen. Die drei Bildfelder zeigen Beispiele für einzelne bestrahlte Zellen. Die erste Aufnahme jedes Bildfeldes zeigt die jeweilige Zelle vor der Bestrahlung. Die jeweils zweite Aufnahme zeigt die Zellen direkt nach der Bestrahlung. Die markierten Schäden (weißer Pfeil) repräsentieren Chromocenter assoziierte XRCC1 Markierungen, die deutlich länger sichtbar blieben, als die euchromatischen. Abbildung 51 B zeigt die Rekrutierungskinetiken der unter A gemessenen, schadensabhängigen XRCC1 Akkumulation als Vergleich zwischen Heterochromatin und Euchromatin. Beide Rekrutierungskurven stiegen nach Bestrahlung (Zeitpunkt „0“) innerhalb von weniger als einer Minute auf ihren Maximalwert. Die Intensität der Euchromatin assoziierten XRCC1 Markierungen begann bereits nach ca. 1,5 Minuten wieder rasch zu sinken und war nach etwa 3 Minuten bereits auf die Hälfte des

A



B

XRCC1 Rekrutierung

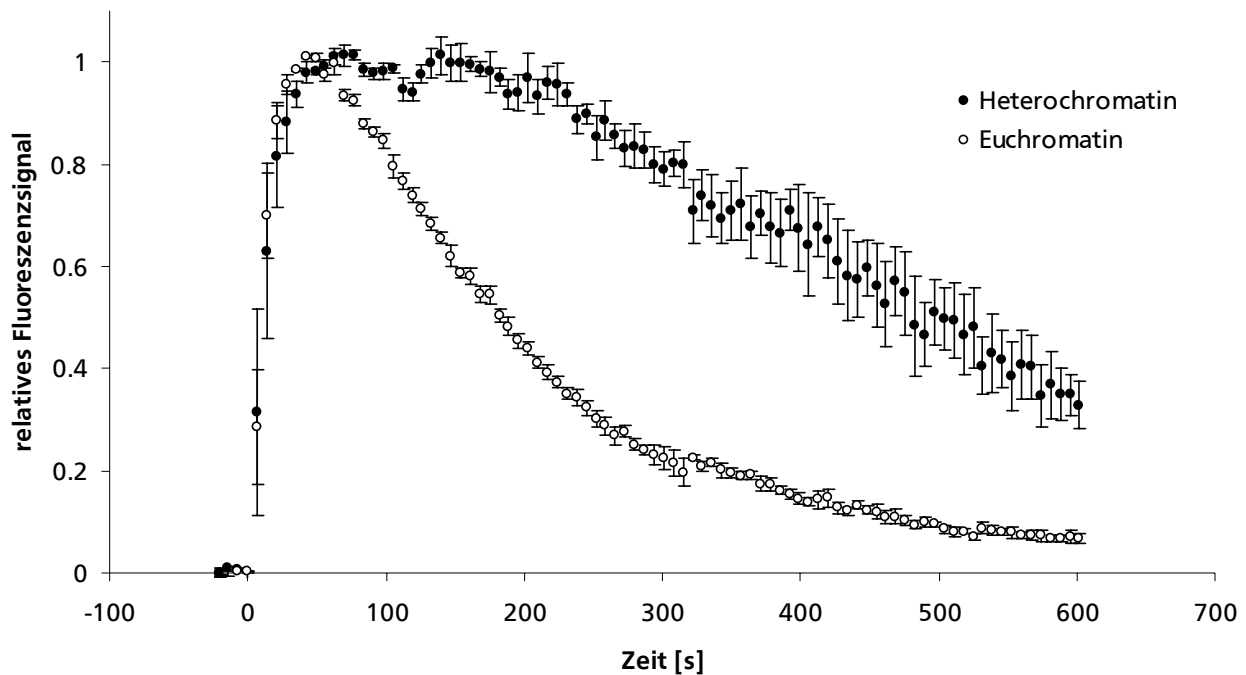


Abbildung 51: Lebendzellbeobachtung der XRCC1 Rekrutierung in embryonalen Maus Fibroblasten.

Die Fibroblasten wurden mit Hilfe eines Plasmids mit GFP gekoppeltem XRCC1 (grün) transfiziert und kurz vor der Bestrahlung mit dem Lebendzell-DNA-Farbstoff Hoechst 33342 (blau) gefärbt. Die Bestrahlung erfolgte senkrecht zum Zellrasen mit Urani-onen (15000 keV/ μm ; 6,2 MeV/u).

A: Die jeweils erste Aufnahme je Bildfeld zeigt die Zelle vor der Bestrahlung. Die markierten XRCC1 Spots (weißer Pfeil) zeigen jeweils Chromocenter assoziierte Schäden an. Maßstab: 3 μm

B: Aufgetragen ist die XRCC1-GFP Rekrutierungskinetik der oben gezeigten Aufnahmen als relative Fluoreszenzintensität gegen die Zeit als Vergleich zwischen HC assoziierten XRCC1 Markierungen (3 Spots) und EC assoziierten XRCC1 Markierungen (18 Spots). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

ursprünglichen Maximalniveaus abgefallen. Die Intensität der heterochromatinassoziierten XRCC1 Markierungen zeigte dagegen eine ausgedehnte Plateauphase bei der das Intensitätsmaximum bis über 3 Minuten hinweg andauerte. Das halbmaximale Intensitätsniveau wurde erst nach ca. 8 Minuten wieder erreicht. Auch für diese Art von DNA Schäden war eine, zwar moderate, relativ gesehen aber deutliche Verzögerung der Prozessierung zu beobachten.

Die weiter oben beschriebene langsame Reparatur heterochromatischer DSBs könnte an der Prozessierung der DNA Enden beispielweise durch Resektion liegen. Solch eine Resektion würde eine schnelle Reparatur über NHEJ verhindern. Chiolo et al. (2011) beschrieben für die heterochromatinassoziierte Reparatur in *Drosophila spec.* einen zweiphasigen Prozess. Der frühen Resektion und RPA-Beladung der Einzelstränge innerhalb des Heterochromatins folgen dabei weitere, spätere Reparatur Schritte nach einer Relokalisierung, welche am Rand zum Euchromatin stattfinden (Rad51 Beladung). Im folgenden Experiment sollte überprüft werden, ob es an den langsam reparierenden, heterochromatischen DNA Schäden in Maus Fibroblasten vermehrt zur Resektion kommt.

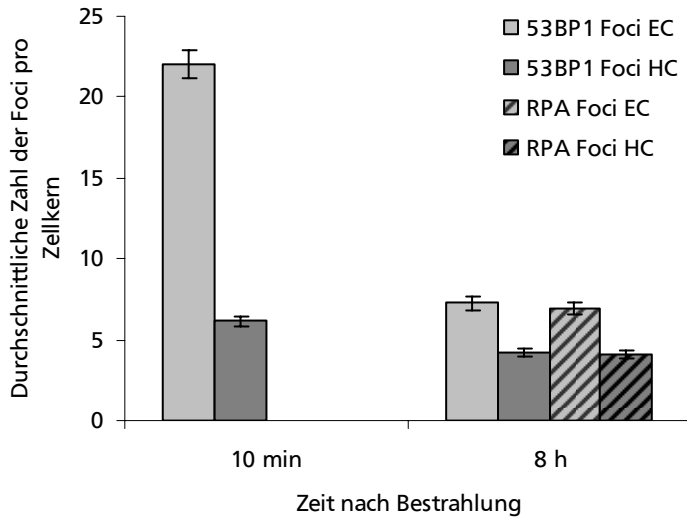


Abbildung 52: Focusanalyse im Eu- und Heterochromatin von embryonalen Maus Fibroblasten. Die Zellen wurden am Synchrotron (SIS) mit Titanionen ($110 \text{ keV}/\mu\text{m}$, $1 \text{ GeV}/\text{u}$, Fluenz: 1×10^7) horizontal zum Zellrasen bestrahlt, 10 min bzw. 8 h nach Bestrahlung fixiert und gegen 53BP1 und RPA gefärbt. Die Foci der Schadensmarker wurden pro Zellkern gezählt wobei zwischen heterochromatinassozierten und euchromatischen Foci unterschieden wurde. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

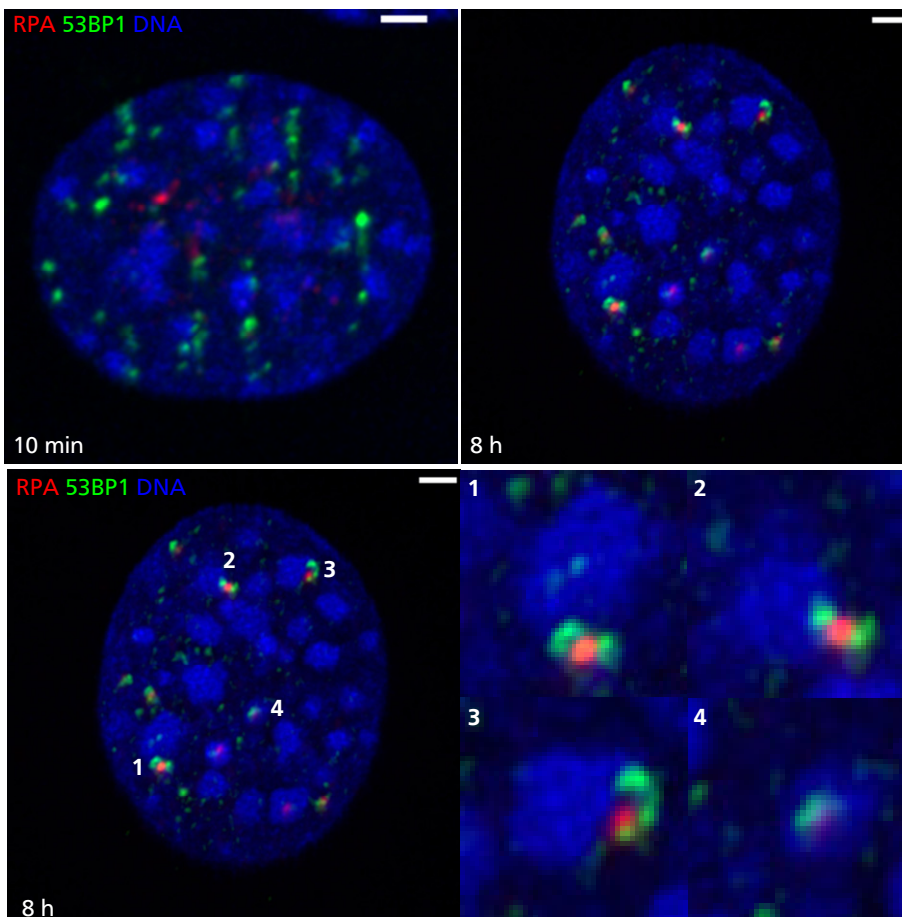


Abbildung 53: Exemplarische Aufnahmen der Reparaturfoci in horizontal bestrahlten Maus Fibroblasten. Die Zellen wurden am Synchrotron (SIS) mit Titanionen ($110 \text{ keV}/\mu\text{m}$, $1 \text{ GeV}/\text{u}$, Fluenz: 1×10^7) horizontal zum Zellrasen bestrahlt, 10 min bzw. 8 h nach Bestrahlung fixiert und gegen RPA (rot), 53BP1 (grün) und die DNA (DAPI, blau) gefärbt. Oberes Bildfeld: Maximalprojektionen einer Zelle die 10 min (links) bzw. 8 h (rechts) nach Bestrahlung fixiert wurde. Unteres Bildfeld: die selbe Aufnahme einer 8 h nach Bestrahlung fixierten Zelle wie oben abgebildet mit Vergrößerungen einzelner Reparaturfoci. Maßstab: $2 \mu\text{m}$

Abbildung 52 zeigt die Auszählung von 53BP1 Foci kurz nach der Bestrahlung (10 min) und nach 8 h Reparatur, aufgetrennt nach heterochromatinassoziierten und euchromatischen Foci. Kurz nach Bestrahlung mit Titanionen (Energie: 1 GeV/u; LET: 110 keV/μm; Fluenz: 1 x 10⁷/cm²) fanden sich im Durchschnitt 6 heterochromatinassoziierte 53BP1 Foci und weitere 22 euchromatische Foci pro Zelle. Nach 8 h Reparatur blieben zwei Drittel (4) der heterochromatinassoziierten Foci zurück während von den euchromatischen Foci nur ein Drittel (7) verblieb. Auffällig ist, dass jeder nach 8 h noch vorhandene 53BP1 Focus unabhängig von der Lage im Eu- oder am Heterochromatin mit RPA assoziiert war (Abbildungen 52 und 53). Die Resektion ist offenbar die Ursache oder aber die Folge der langsamen Reparatur heterochromatischer DSBs. Der Aspekt der Resektion heterochromatischer DNA Schäden wird im folgenden Abschnitt genauer beleuchtet.

4.10 Resektion im Heterochromatin

Die ausnahmslose Assoziation der nach 8 h verbliebenen (heterochromatinassoziierten) Schäden nach Ionenbestrahlung mit RPA (Abschnitt 4.9, Abbildungen 52 und 53) und die langsame Reparatur der HC-assoziierten DNA Schäden lenkte die Aufmerksamkeit auf eine mögliche generelle Resektion heterochromatischer DNA Schäden auch in Säugerzellen. Für ioneninduzierte Schäden wurde gezeigt, dass Resektion nicht nur in der G2- und der S-Phase, sondern auch in der G1 Phase stattfindet (Averbeck et al., 2011).

Der MRN Komplex rekrutiert nach Erkennung des DNA Schadens unter anderem CtIP an die Bruchstelle. CtIP fördert die DNA Endresektion in humanen Zellen (Sartori et al. 2007). Die MRN Komponente MRE11 besitzt selbst sowohl eine Endo- als auch eine Exonukleaseaktivität (3'-5'-Richtung) (Garcia et al. 2011). Die gemeinsame Aktivität von MRE11 und CtIP verdrängt, zumindest in Hefezellen, gebundenes KU 70/80 vom DSB und ermöglicht dadurch die Resektion desselben (Langerak et al. 2011). Die so entstehenden, einzelsträngigen Bereiche werden dann rasch von RPA gebunden (Binz et al. 2004, Langerak et al. 2011). TOPBP1 (*Topoisomerase II beta binding protein 1*) wird an RPA bedeckte ssDNA (Cescutti et al. 2010) und an den Übergang von ssDNA zu dsDNA rekrutiert (Kousholt et al. 2012) und mediiert die Aktivierung von ATR (Kumagai et al. 2006, Kousholt et al. 2012). Die Rekrutierung von TopBP1 an heterochromatische DNA Schäden und die darauf folgende Relokalisierung zur Heterochromatinperipherie wurde 2011 bereits in *Drosophila spec.* nachgewiesen (Chiolo et al. 2011). Um eine mögliche Beteiligung der Resektion an der Reparatur von heterochromatinassoziierten Schäden zu untersuchen, wurden die ionenbestrahlten Maus Fibroblasten gegen die genannten Resektionsmarker (MRE11, CtIP, TopBP1 und RPA) angefärbt.

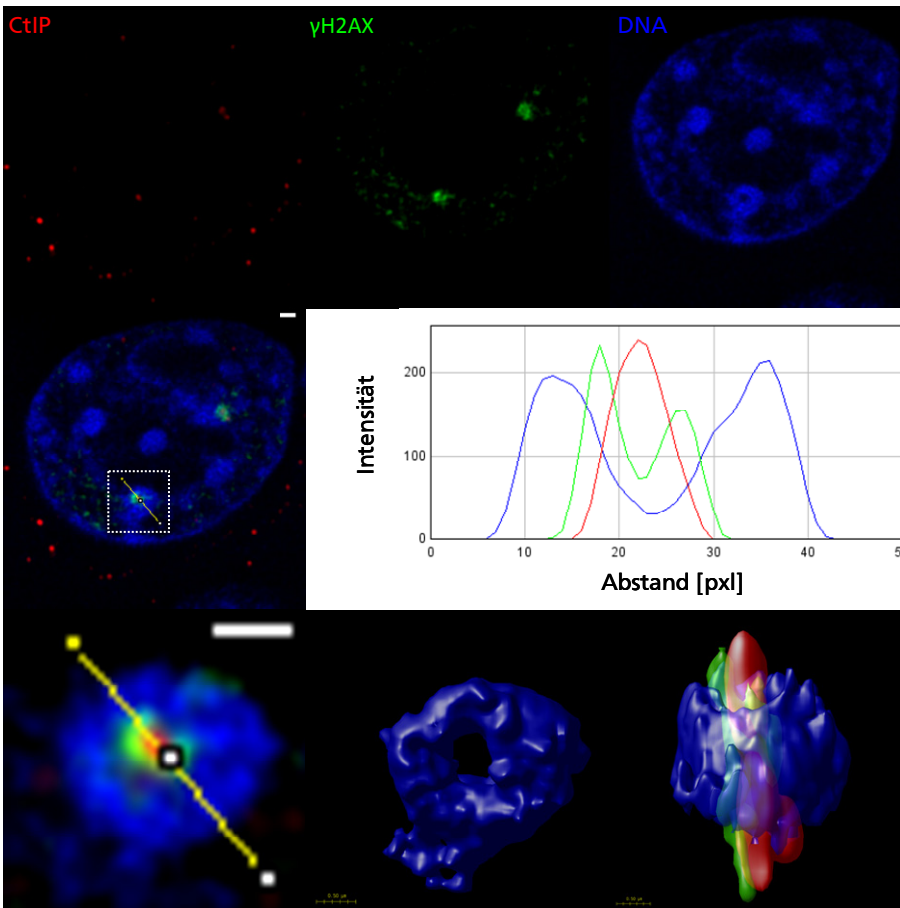


Abbildung 54: Rekrutierung von CtIP an heterochromatische, durch Ionen induzierte DNA Schäden. Oberes Bildfeld: Die Chromocenter embryonaler Maus Fibroblasten wurden mit einzelnen Chromionen ($3000 \text{ keV}/\mu\text{m}$; $4,8 \text{ MeV/u}$) an der Mikrosonde bestrahlt. Die Zellen wurden ca. 30 min nach der Bestrahlung fixiert und gegen CtIP (rot), γH2AX (grün) und die DNA (DAPI, blau) gefärbt. Das Linienprofil zeigt den Intensitätsverlauf der drei Färbungen entlang der dargestellten Achse (gelbe Linie in der Überlagerung). Die untere Bildfolge zeigt das getroffene Chromocenter in vergrößerter und geränderter Ansicht (rechten beiden Abbildungen). Maßstab: $1 \mu\text{m}$; 10 pxl im Intensitätsprofile entsprechen $0,72 \mu\text{m}$.

Nach gezielter Bestrahlung der Chromocenter von embryonalen Maus Fibroblasten an der GSI Mikrosonde konnte sowohl die frühe Rekrutierung von CtIP (30 min; Abbildung 54) als auch von MRE11 (8 min; Abbildung 55) an die heterochromatischen Schäden nachgewiesen werden.

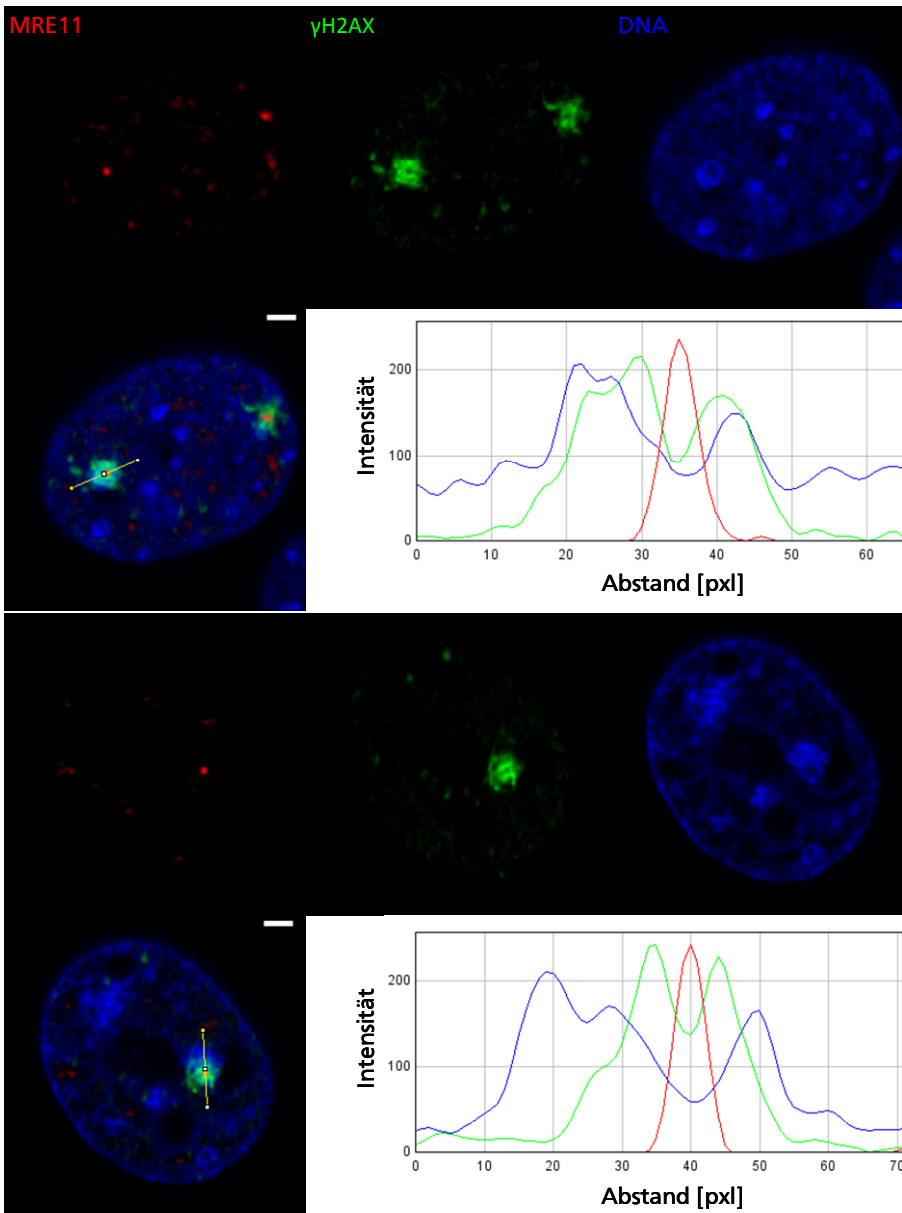


Abbildung 55: Rekrutierung von MRE11 an heterochromatische, durch Ionen induzierte DNA Schäden.

Die Chromocenter embryonaler Maus Fibroblasten wurden mit einzelnen Goldionen ($12800 \text{ keV}/\mu\text{m}$; $4,8 \text{ MeV}/u$) an der Mikrosonde bestrahlt. Die Zellen wurden ca. 8 min nach der Bestrahlung fixiert und gegen MRE11 (rot), γH2AX (grün) und die DNA (DAPI, blau) gefärbt. Das Linienprofil zeigt den Intensitätsverlauf der drei Färbungen entlang der dargestellten Achse (gelbe Linie in der Überlagerung). Maßstab: $2 \mu\text{m}$; 10 pxl in den Intensitätsprofilen entsprechen $0,72 \mu\text{m}$.

RPA, welches nach erfolgreicher Resektion die erzeugten einzelsträngigen DNA Stränge bindet, konnte in den Fällen, in denen nach 30 min noch keine Relokalisierung erfolgt war, ebenfalls an heterochromatischen Schäden innerhalb der gezielt bestrahlten Chromocenter nachgewiesen werden (siehe Abbildung 56). Bereits relokalisierte Schäden zeigen ebenfalls eine Markierung mit RPA.

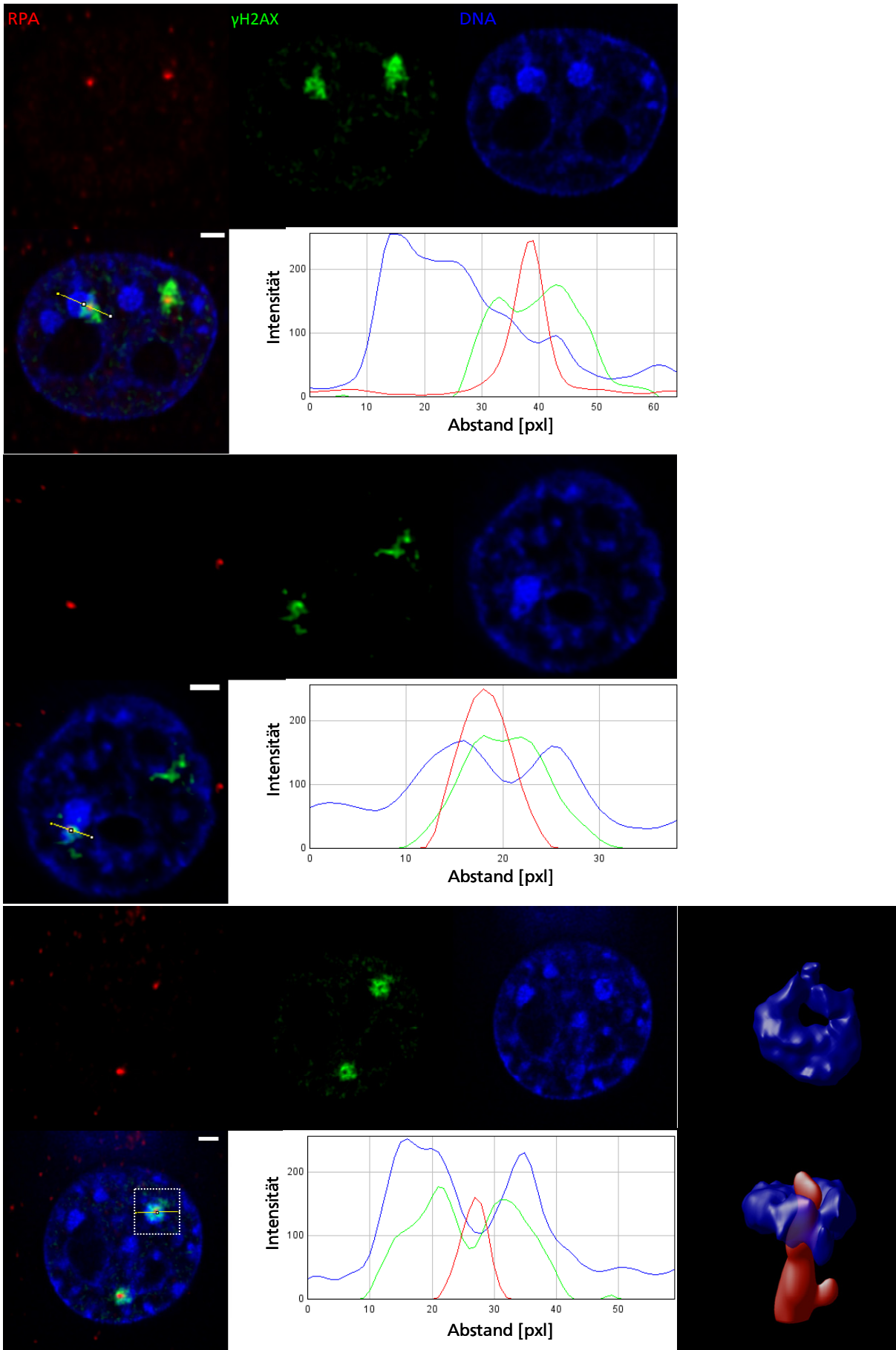


Abbildung 56: Rekrutierung von RPA an heterochromatische, durch Ionen induzierte DNA Schäden.

Oberes Bildfeld: Die Chromocenter embryonaler Maus Fibroblasten wurden mit einzelnen Goldionen (12800 keV/μm; 4,8 MeV/u) an der Mikrosonde bestrahlt. Die Zellen wurden ca. 30 min nach der Bestrahlung fixiert und gegen RPA (rot), γH2AX (grün) und die DNA (DAPI, blau) gefärbt. Das Linienprofil zeigt den Intensitätsverlauf der drei Färbungen entlang der dargestellten Achse (gelbe Linie in der Überlagerung). Im untersten Bildfeld ist das getroffene Chromocenter nochmals heraus vergrößert und gerendert abgebildet (rechte Abbildungen) Maßstab: 2 μm; 10 pxl in den Intensitätsprofilen entsprechen 0,72 μm.

Abbildung 57 zeigt, dass auch TopBP1 an ioneninduzierte DNA Schäden in embryonalen Maus Fibroblasten rekrutiert wurde.

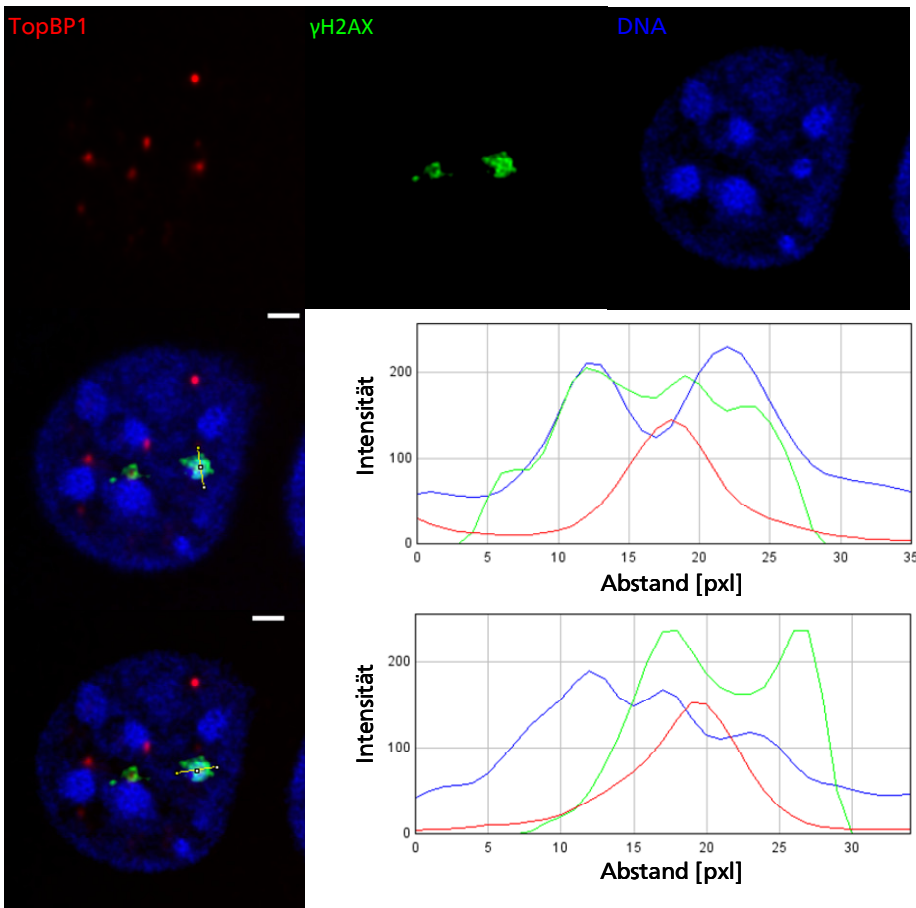


Abbildung 57: Rekrutierung von TopBP1 an heterochromatische, durch Ionen induzierte DNA Schäden.

Die Chromocenter embryonaler Maus Fibroblasten wurden mit einzelnen Goldionen (12800 keV/μm; 4,8 MeV/u) an der Mikrosonde bestrahlt. Die Zellen wurden ca. 10 min nach der Bestrahlung fixiert und gegen TopBP1 (rot), γH2AX (grün) und die DNA (DAPI, blau) gefärbt. Die Linienprofile zeigen den Intensitätsverlauf der drei Färbungen entlang der dargestellten Achsen (gelbe Linien in der Überlagerungen) des getroffenen Chromocenters in zwei Richtungen. Maßstab: 2 μm; 10 pxl in den Intensitätsprofilen entsprechen 0,72 μm.

In Abschnitt 4.1 wurde der lokale Abfall des γH2AX Signals im Zentrum des Schadensfokus bereits erwähnt. Die Abbildungen 54 bis 56 belegen, dass das γH2AX Signal genau dort absinkt, wo Resektionsfaktoren ihr Maximum haben. Kim et al. beschrieben 2007, dass γH2AX direkt an den resektierten DNA Bereichen fehlt. Viele der bisher gezeigten Abbildungen zeigen einen γH2AX Signalabfall im Zentrum des DNA Schadens (Abbildungen 23, 24, 27, 41, 45, 46, 54, 55 und 56). Dieser war teilweise unterschiedlich stark ausgeprägt und nicht immer klar zu erkennen (siehe Abbildungen 34 und 57 bzw. Abbildungen 25, 38, 41 und 45). Der lokale Abfall des γH2AX Signals zeigte häufig auch eine Überlage-

rung mit einem nicht resektionsassoziierten, lokal begrenzten Schadensmarkers, wie beispielsweise XRCC1 (siehe Abbildungen 23, 24 und 27). Die Abbildung 58 zeigt einen Vergleich des γ H2AX Signalabfalls nach Bestrahlung der Chromocenter mit unterschiedlichen Ionen. Über eine LET Spanne von 290 keV/ μ m (Kohlenstoffionen) bis hin zu 13000 keV/ μ m (Goldionen) war der lokale Einbruch des γ H2AX Signals messbar. Die Abbildung zeigt beispielhaft, dass das Ausmaß des Signaleinbruchs variabel sein kann und meist mit einem anderen DNA Schadensmarker überlagert (hier XRCC1, CtIP oder MRE11).

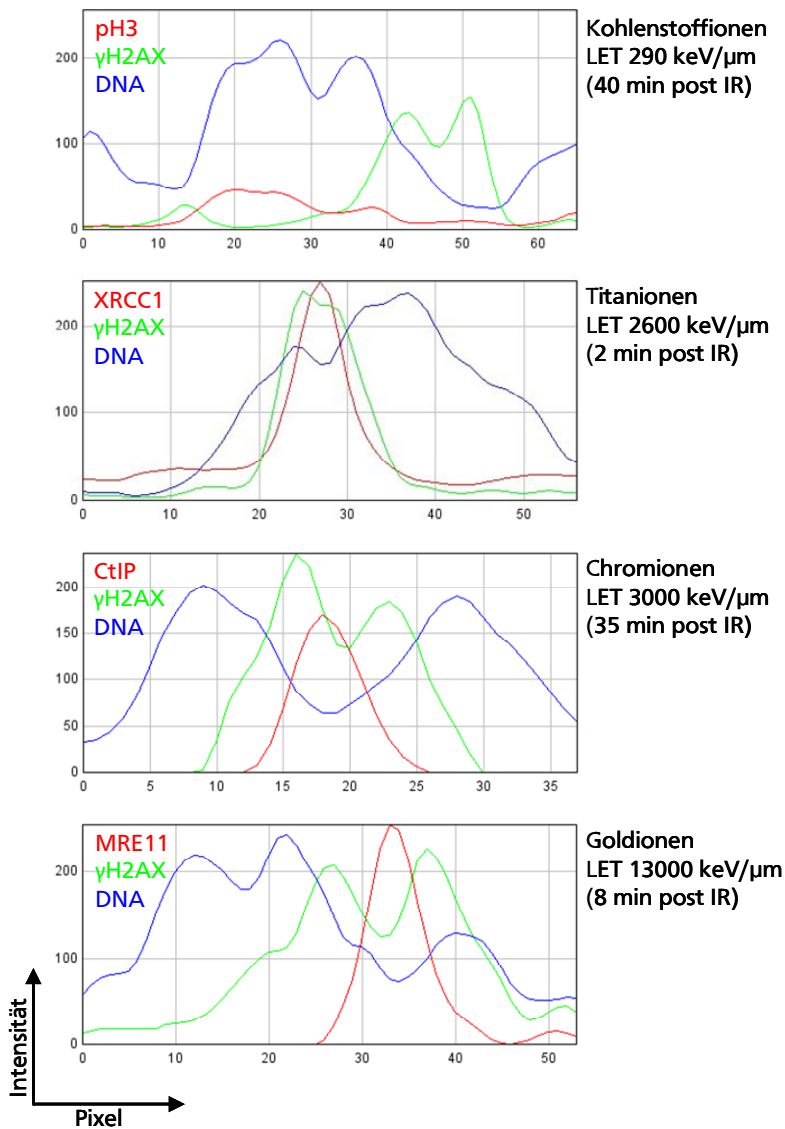


Abbildung 58: Vergleich des lokalen γ H2AX Signalabfalls bei Ionen mit unterschiedlichem LET.

Die Chromocenter embryonaler Maus Fibroblasten wurden mit den aufgeführten einzelnen Ionen an der Mikrosonde bestrahlt. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten nach der Bestrahlung fixiert und die gegen die genannten DNA Schadensmarker und die DNA (DAPI, blau) gefärbt. Die Linienprofile zeigen den Intensitätsverlauf der jeweiligen drei Färbungen entlang einer Achse durch das getroffene Chromocenter Maßstab: 10 pxl im Intensitätsprofil entsprechen 0,72 μ m.

Das Histon H2AX wird nach DNA Schäden nicht nur phosphoryliert, sondern durch die Ubiquitinligasen RNF8 und RNF168 auch ubiquitiniert (Danielsen et al. 2012, Poulsen et al. 2012). Diese Histonu-

biquitinierung wird mit der Öffnung des geschädigten Chromatins in Verbindung gebracht, wodurch vorher verdeckte Histonmodifikationen zugänglich werden. So bindet z.B. 53BP1 spezifisch an das methylierte Histon H4K20me2 (Malette et al. 2012), welches vor Bestrahlung nicht zugänglich ist (Panier et al. 2009, Mallette et al. 2012).

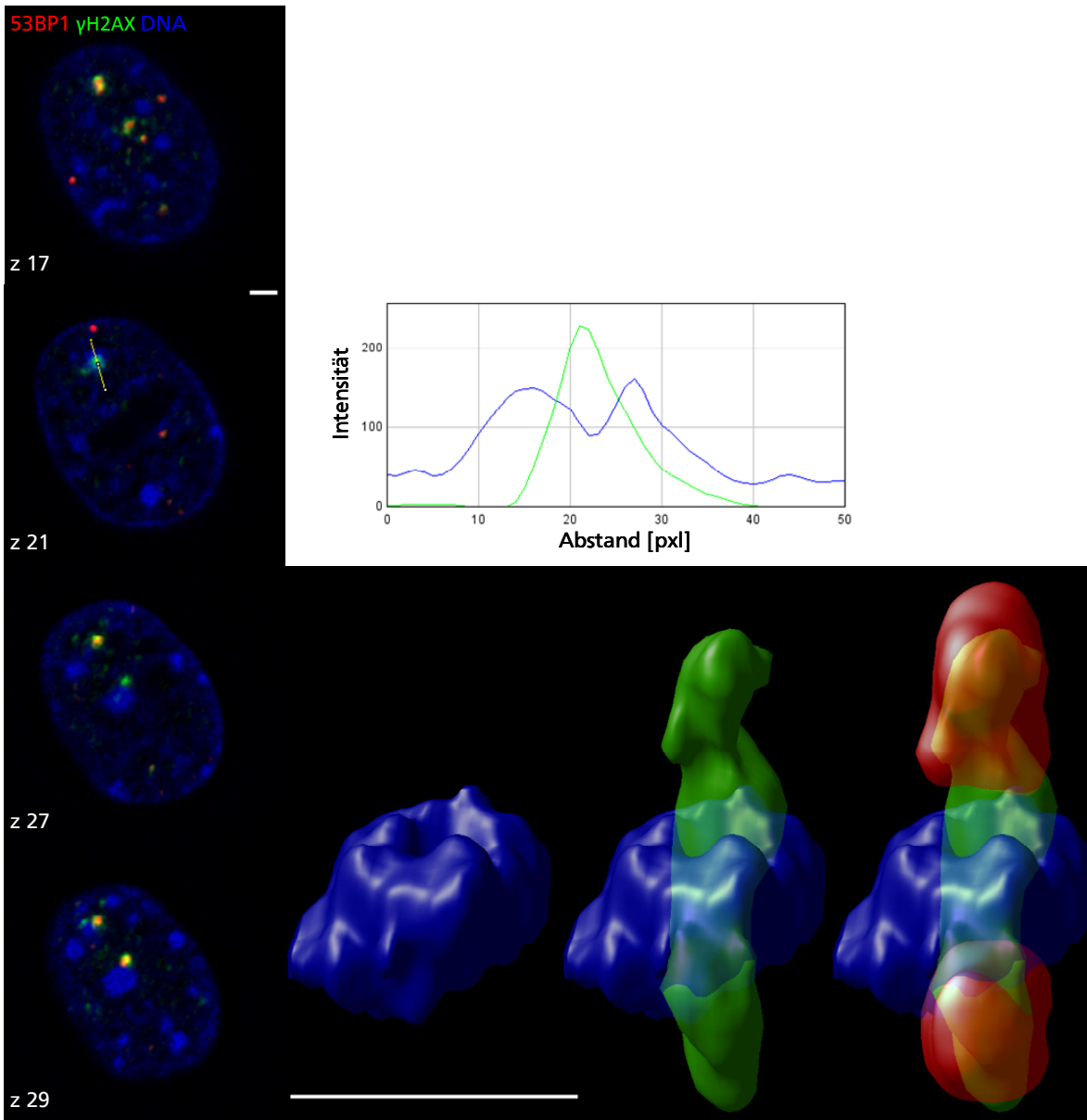


Abbildung 59: Rekrutierung von 53BP1 an Ionen induzierte DNA Schäden.

Die Chromocenter embryonaler Maus Fibroblasten wurden mit einzelnen Titanionen (2600 keV/µm; 5,1 MeV/u) an der Mikrosonde bestrahlt. Die Zellen wurden ca. 3 min nach der Bestrahlung fixiert und gegen 53BP1 (rot), γH2AX (grün) und die DNA (DAPI, blau) gefärbt. Das Linienprofil zeigt den Intensitätsverlauf der drei Färbungen entlang der dargestellten Achse (gelbe Linie in der Überlagerung). Abgebildet sind außerdem mehrere Bildebenen in z-Richtung über und unter dem getroffenen Chromocenter. Dieses ist in den gerenderten Aufnahmen nochmals vergrößert dargestellt (rechts unten). Maßstab: 2 µm; 10 pxl im Intensitätsprofil entsprechen 0,72 µm.

53BP1 wirkt inhibierend auf die Resektion (Bunting et al. 2010, Lottersberger et al. 2013) und muss daher für eine erfolgreiche Resektion aus dem Zentrum des Schadensfocus verdrängt werden (Zimmermann et al. 2013). Im unteren Bildfeld der Abbildung 53 ist zu erkennen, dass langsam reparie-

rende DNA Schäden nach Schwerionenstrahlung sowohl von 53BP1, als auch von RPA markiert wurden. Die Signale der beiden Marker kolokalisierten jedoch kaum. Vielmehr waren die zentralen, kleinen RPA Foci vom 53BP1 Signal eingefasst. Abbildung 59 zeigt, dass 53BP1 3 min nach Bestrahlung mit Titanionen an den euchromatischen Teil der Schadensspur rekrutiert wurde, im Inneren des Chromocenters zu diesem Zeitpunkt aber, trotz der deutlichen Ausprägung der γ H2AX Färbung dort, nicht nachzuweisen war. Wie in Abbildung 60 zu sehen, wurde 53BP1 jedoch zu späteren Zeitpunkten nach Bestrahlung an bereits relocalisierte Schäden entlang der gesamten Spurlänge rekrutiert.

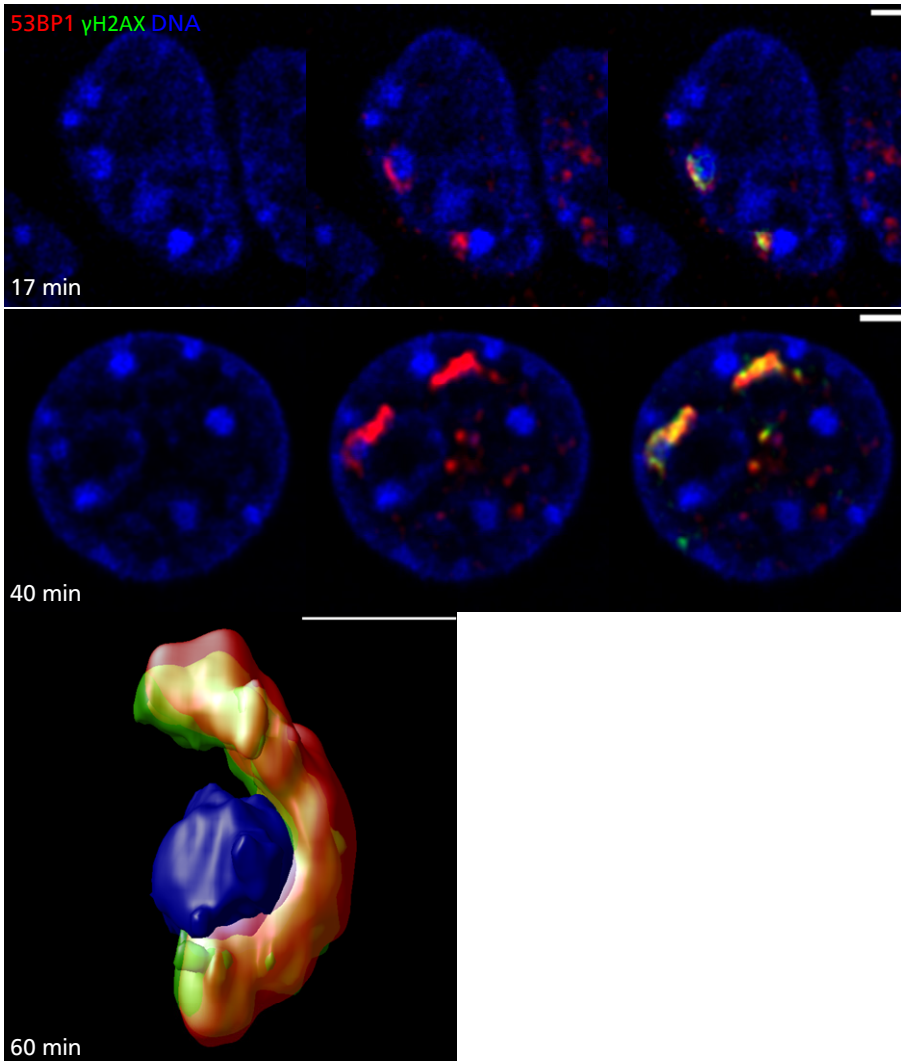


Abbildung 60: Gekrümmte 53BP1 Spuren nach Schwerionenbestrahlung.

Die Chromocenter embryonaler Maus Fibroblasten wurden mit einzelnen Goldionen ($12800 \text{ keV}/\mu\text{m}$; $4,8 \text{ MeV/u}$) an der Mikrosonde bestrahlt. Die Zellen wurden 17, 40 bzw. 60 min nach der Bestrahlung fixiert und gegen 53BP1 (rot), γ H2AX (grün) und die DNA (DAPI, blau) gefärbt. Das untere Bildfeld zeigt eine gerenderte Aufnahme einer peripheren Schadensspur mit 53BP1 (rot), γ H2AX (grün) und der DNA (DAPI, blau). Maßstab: $2 \mu\text{m}$.

Abbildung 61 zeigt ein getroffenes Chromocenter quer zur Ionentrajektorie. Der in Abschnitt 4.5 beschriebene Rückgang der DNA Intensität entlang der Ionenspur lässt eine Art Tunnel durch das Chromocenter erkennen (vergrößerte Darstellung der DNA Färbung). Die vergrößerten Darstellungen zeigen, dass 53BP1 zwar in diesen Tunnel rekrutiert wurde, jedoch mit weitaus geringerer Intensität als

an die Bereiche der Schadensspur, die außerhalb des Chromocenters lagen. Beides deutet darauf hin, dass 53BP1 nach erfolgter Chromatinöffnung auch an heterochromatische DNA Schäden rekrutiert wird.

Abbildung 61 zeigt außerdem ein Beispiel dafür, dass nicht alle relokalierten Schadensspuren in einer gekrümmten Spur resultieren müssen. In seltenen Fällen relokalierten die heterochromatischen Schadensbereiche, wie hier zu sehen, auch zum Ein- bzw. Austrittspunkt des Ions im Chromocenter, wodurch die DNA Schadensspur unterbrochen erscheint.

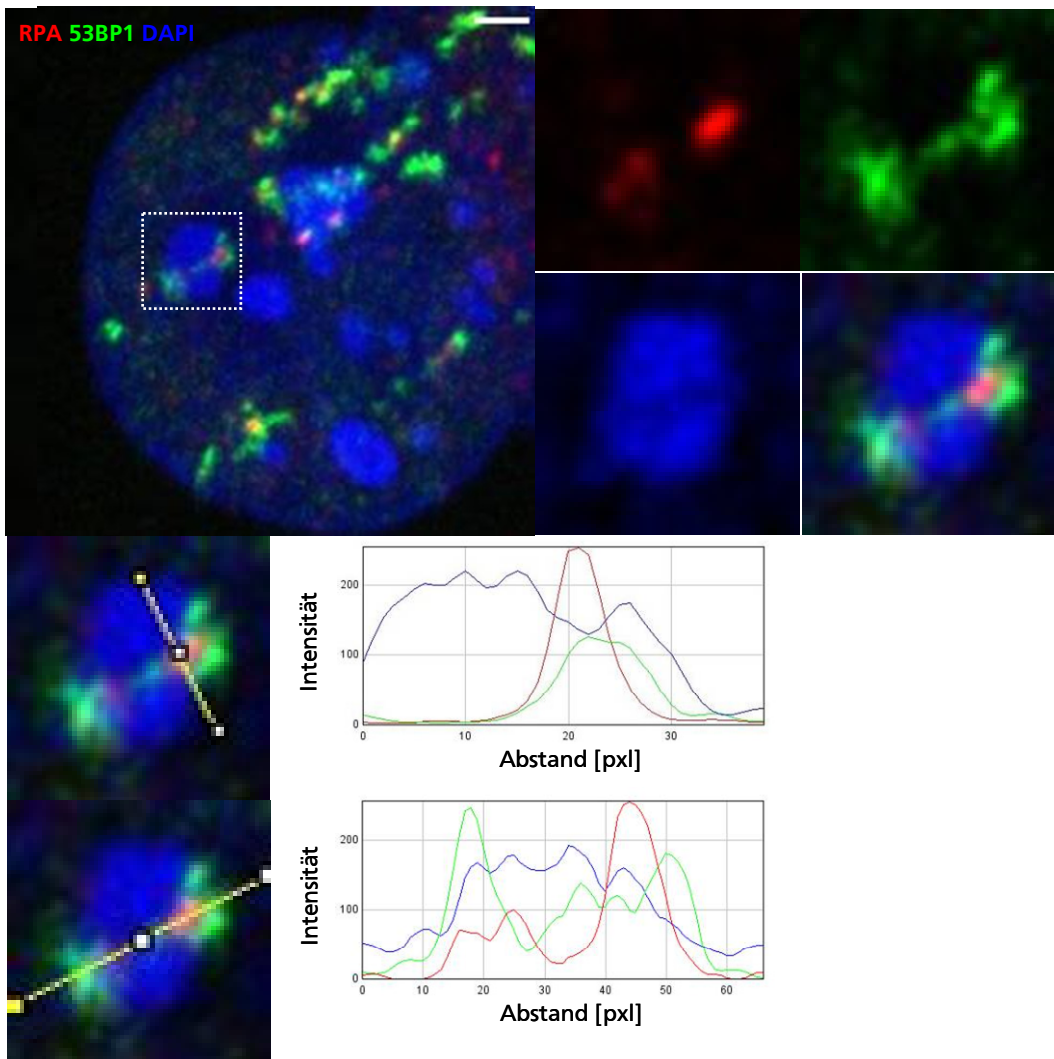


Abbildung 61: Rekrutierung von 53BP1 und RPA an ioneninduzierte, heterochromatische DNA Schäden. Embryonale Maus Fibroblasten (MEF ATM $-/-$) wurden unter einem Winkel von ca. 15° zur Ebene des Zellrasens mit Kohlenstoffionen ($290 \text{ keV}/\mu\text{m}$; $4,8 \text{ MeV/u}$) bestrahlt, 45 min später fixiert und gegen RPA (rot), 53BP1 (grün) und die DNA (DAPI, blau) gefärbt. Das quer getroffene Chromocenter ist herausvergrößert dargestellt. Die Linienprofile zeigen den Intensitätsverlauf der drei Färbungen entlang der dargestellten Achse (gelbe Linie in der Überlagerung) des getroffenen Chromocenters in zwei Richtungen. Maßstab: $2 \mu\text{m}$; 10 pxl in den Intensitätsprofilen entsprechen $0,72 \mu\text{m}$

4.11 DSB Dynamik/Bewegung

Die in dieser Arbeit beschriebene Relokalisierungsbewegung heterochromatischer DNA Schäden an die Peripherie der bestrahlten Chromocenter findet in einer Größenordnung von knapp einem Mikrometer statt. Wie schnell und wie weit sich DSBs nach ihrer Induktion bewegen und ob diese Beweglichkeit

über die des ungeschädigten Chromatins hinausgeht ist ein kontrovers diskutierter Aspekt der DNA Reparatur. Während manche Studien eine relative Unbeweglichkeit von DNA Schäden attestieren (Nelms et al. 1998, Soutoglou et al. 2007), beschreiben andere Forschergruppen eine begrenzte Bewegung von DSBs (Kruhlak et al. 2006, Jakob et al. 2009, Krawczyk et al. 2012) und deren Verschiebung in Bereiche niedriger Chromatindichte (Falk et al. 2007). Aten et al. (2004) diskutierten nach Bestrahlung mit α -Teilchen die Bildung von so genannten *repair clustern*, in denen sich mehrere, DSBs enthaltende Chromatindomänen zusammenfinden. Dies würde eine deutliche Bewegung der geschädigten Chromatinbereiche, in der Größenordnung von einigen Mikrometern, voraussetzen.

Nach der Bestrahlung von Zellen unter einem spitzen Winkel (ca. 15°) werden die entstehenden Schadensspuren als unterbrochene Linien sichtbar (siehe Abbildung 62). Die Dichte der DNA Läsionen nach Bestrahlung mit Ionen hängt von deren Geschwindigkeit und dem LET ab (Nikjoo et al. 1998). Besonders bei der Bestrahlung mit schwereren Ionen wie der hier gezeigten Goldbestrahlung sind durch die hohe Dichte von DNA Schäden (>165 DSBs/ μm) durchgängige Schadensspuren zu erwarten (Jakob et al. 2003). Die Untergliederung der Spuren in einzelne Foci lässt entweder auf eine ungleichmäßige Chromatinverteilung in der Größenordnung der Bahnstruktur oder auf eine lokale Zusammenfassung der DNA Schäden in Reparaturzentren schließen (Jakob et al. 2003). Unabhängig von der schadensabhängigen Rekrutierung von Reparaturproteinen wurde mit Hilfe der direkten DSB-Färbung durch eine modifizierte TUNEL Analyse die Verteilung der Schäden in Zellen untersucht, die quer zur Ebene des Zellrasens bestrahlt wurden. Abbildung 62 zeigt zwischen ein und zwei klar getrennte TUNEL Foci pro μm Spurlänge nach Schrägbestrahlung mit Goldionen. Die Zahl der gefundenen TUNEL Markierungen pro μm Spurlänge lag somit weit unter der Zahl der nach Bestrahlung mit Goldionen erwarteten DSBs pro μm (>165 DSBs/ μm). Die TUNEL Foci kolokalisierten dabei sowohl mit dem Mikrofocusmarker XRCC1 als auch mit den größeren, weniger gut abgegrenzten γ H2AX-IRIFs. Das Übereinstimmen der Reparaturprotein-Foci mit der TUNEL Markierung zeigt, dass nicht nur eine Untermenge der DSBs mit IRIFs dekoriert sind. Die Zusammenfassung mehrerer DSBs zu einem *repair center* auf einer Größenskala unter einem μm scheint daher plausibel. Allerdings kann ohne weiterführende Experimente ein Beitrag der Chromatinverteilung nicht ausgeschlossen werden.

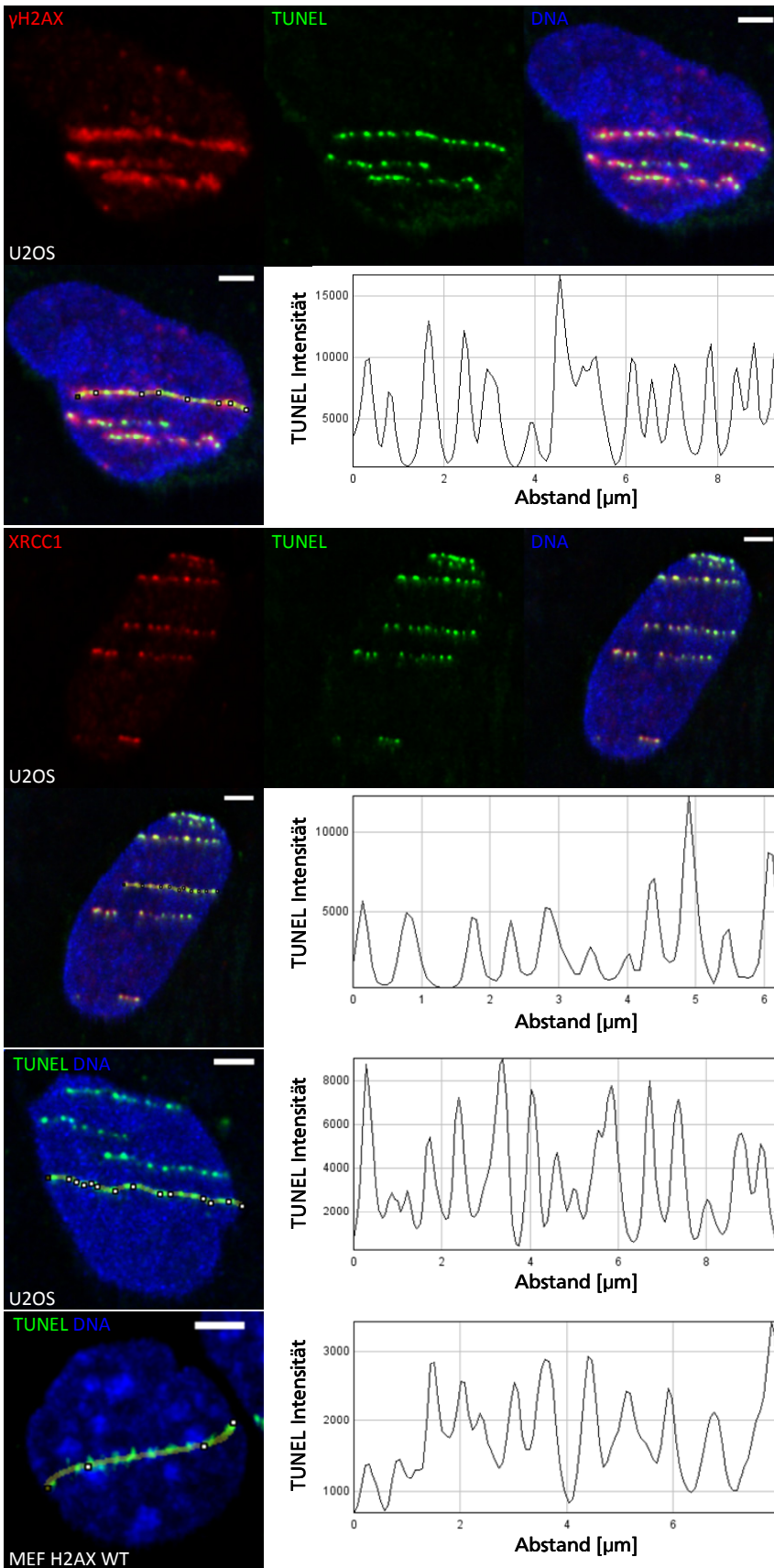


Abbildung 62: DNA Schadensdetektion mit Hilfe einer modifizierten TUNEL Färbung. Säugerzellen (U2OS und MEF H2AX WT) wurden unter einem Winkel von ca. 15° zur Ebene des Zellrasens mit Goldionen (12800 keV/μm; 4,8 MeV/u) bestrahlt, 10 min später fixiert und gegen TUNEL (grün), einen weiteren Schadensmarker (rot) und die DNA (DAPI, blau) gefärbt. Die Linienprofile zeigen den Intensitätsverlauf der TUNEL Färbung entlang der eingezeichneten Linie (gelb) in der Überlagerung. Maßstab: 2 μm.

Konventionelle Lichtmikroskopie ist bedingt durch die Beugungsgrenze auf eine maximale Auflösung von ca. 0,2 μm limitiert. Die Größe der einzelnen TUNEL-Markierungen in Abbildung 62 liegt nahe an dieser Schwelle. Die Größe der γH2AX Foci liegt darüber, weshalb diese aufgrund von überlappenden Signalen als weitgehend unstrukturierte Wolke erscheinen. Eine mögliche Unterteilung der IRIFs in Subfoci ist mit herkömmlicher Mikroskopie nicht zu untersuchen. Aus diesem Grund wurden ausgewählte Proben mit freundlicher Unterstützung der Nanoskopie Gruppe des DKFZ Heidelberg mit einem STED Aufbau untersucht. Durch gezielte Abregung der Fluorophore im Randbereich des optischen Focus (siehe Abschnitt 3.2.7) waren durch STED Aufnahmen mit einer für unsere Proben gemessenen Auflösung von ca. 60 nm möglich. Die verwendeten Fluorophore der TUNEL-Färbung eignen sich jedoch nicht für STED-Aufnahmen. Deshalb wurde RPA, welches eine ähnlich feine Mikrofocusstruktur wie die TUNEL-Signale zeigt, und 53BP1 (vergleichbar mit γH2AX) für die folgenden Aufnahmen verwendet.

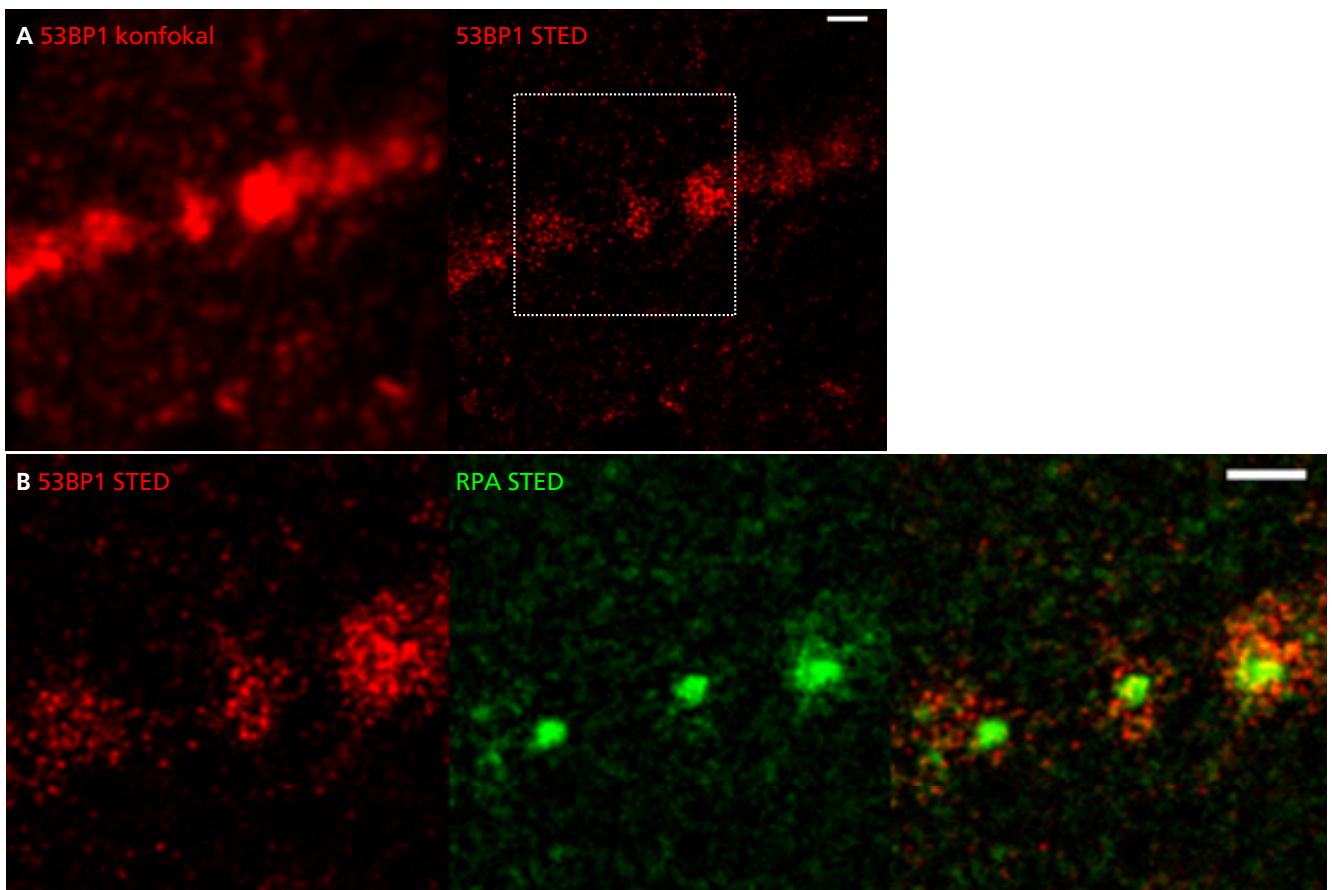


Abbildung 63: Vergleich von konfokaler und STED Mikroskopie.

HeLa Zellen wurden unter einem Winkel von ca. 15° zur Ebene des Zellrasens mit Uranionen ($15000 \text{ keV}/\mu\text{m}$; $6,2 \text{ MeV}/\text{u}$) bestrahlt, 1 h später fixiert und gegen 53BP1 (rot) und RPA (grün) gefärbt.

A: Dargestellt ist der Vergleich zwischen konfokalem Signal (links) und STED Signal (rechts) von 53BP1. B: Dargestellt ist das STED Signal von 53BP1 (rot) und RPA (grün) des unter (A) markierten Bildausschnittes. Maßstab: $1 \mu\text{m}$.

Abbildung 63 A zeigt einen Vergleich zwischen konfokaler Mikroskopie und STED Mikroskopie. Der Makrofocusmarker 53BP1 bildete konfokal gemessen erwartungsgemäß große IRIFs. Die STED Auf-

nahme der selben Probe zeigte jedoch eine feine Substruktur der 53BP1 Färbung, wie sie konfokal so nicht erkennbar war. Der über einen Mikrometer große (konfokale Messung) 53BP1 Makrofocus teilte sich bei höherer Auflösung in ca. 200 nm große Subfoci auf (STED Messung), die bei konfokaler Aufnahme zu einem Focus verschmolzen. Die kompakten, vereinzelt RPA Foci (siehe Abbildung 63 B) lagen jeweils im Zentrum eines solchen 53BP1 Clusters. Wie in Abschnitt 4.10 erläutert, hat 53BP1 eine inhibitorische Wirkung auf die Resektion (Bunting et al. 2010, Lottersberger et al. 2013). Abbildung 63 B unterstützt die Hypothese, dass 53BP1 lokal verdrängt werden muss, damit dort andere Proteine binden können und Resektion stattfinden kann (Bunting et al. 2010, Di Virgilio et al. 2013, Feng et al. 2013).

Abbildung 64 zeigt STED Aufnahmen der RPA und MRE11 Markierung von DNA Schäden nach Schrägbestrahlung mit Uranionen. Wie zuvor (siehe oben) konnten die RPA Foci auch durch STED Mikroskopie nicht weiter in Subfoci aufgelöst werden. Die zentralen RPA Foci wurden von einzelnen, sehr feinen MRE11 Foci umgeben.

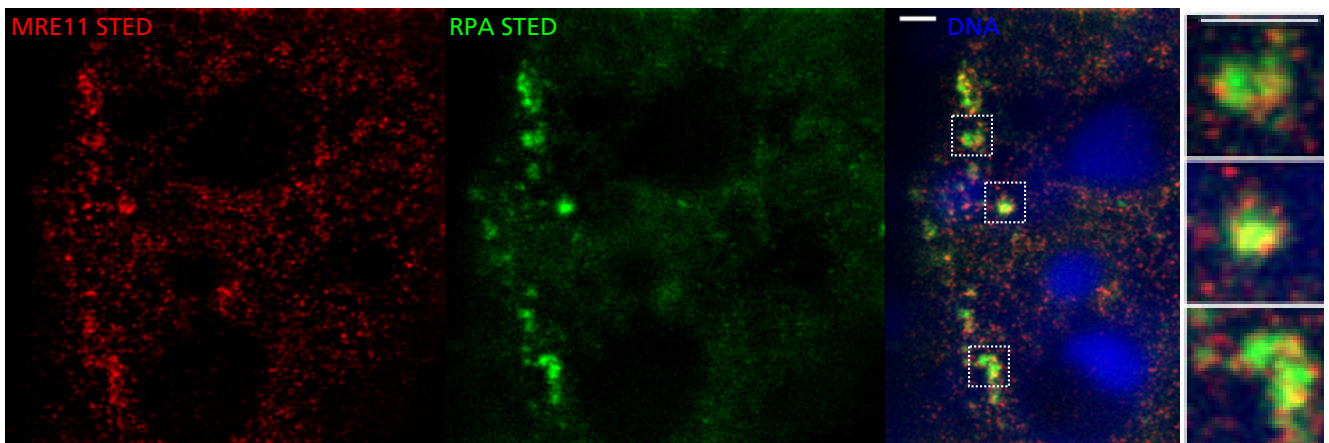


Abbildung 64: STED Aufnahme von MRE11 und RPA Foci nach Schrägbestrahlung mit schweren Ionen. Embryonale Maus Fibroblasten wurden unter einem Winkel von ca. 15° zur Ebene des Zellrasens mit Uranionen ($15000 \text{ keV}/\mu\text{m}$; $6,2 \text{ MeV/u}$) bestrahlt, 1 h später fixiert und gegen MRE11 (rot), RPA (grün) und die DNA (DAPI, blau) gefärbt. Dargestellt sind die STED Aufnahmen der beiden Schadensmarker, die konfokale Aufnahme der DNA sowie Vergrößerungen der markierten Bereiche. Maßstab: $1 \mu\text{m}$.

5.1 DNA Schäden lassen sich auch im Heterochromatin nachweisen

In Untersuchungen der Schadensmarker, die nach Schwerionenbestrahlung entlang der Ionenspur rekrutiert werden, fiel auf, dass die sonst gerade verlaufenden Spuren (Jakob et al. 2003) eine Krümmung aufwiesen, sobald sie auf dichtes Heterochromatin trafen. Es stellte sich heraus, dass DNA Schäden, die innerhalb des Heterochromatins erzeugt wurden, innerhalb weniger Minuten aus dem Heterochromatin hinaus zur Grenzfläche des Euchromatins relokalisiert wurden (Jakob et al. 2011). Um diesem Aspekt genauer nach zu gehen, wurde in der vorliegenden Arbeit diese Relokalisierungsbewegung heterochromatischer DNA Schäden in Säugerzellen detaillierter charakterisiert, indem die Kinetik und deren Abhängigkeit von bestimmten Reparaturfaktoren untersucht wurde.

Heterochromatin stellt in Säugerzellen etwa einen Anteil von 20 Prozent des Chromatins im Zellkern (review: Murray et al. 2012). Die Reparatur von DNA Schäden in dieser Minderheit des Chromatins gilt allgemein als schwierig (Woodbine et al. 2011, Falk et al. 2013), ist bis dato aber kaum differenziert charakterisiert, da in den meisten Reparatur-Studien nicht zwischen Eu- und Heterochromatin unterschieden wird.

In Mäusezellen bildet das Heterochromatin scharf abgegrenzte Chromocenter (Minc et al. 2000, Nielsen et al. 2001, Probst et al. 2009), die sich durch eine intensive DAPI Färbung und eine Anreicherung an klassischen Heterochromatinmarkern wie HP1 und H3K9me3 (review: Almouzni et al. 2011, Honda 2012, review: Soria 2012) erkennen lassen (Probst et al. 2009, review: Almouzni et al. 2011). Diese klar erkennbare Abgrenzung des Heterochromatins eröffnet die Möglichkeit der gezielten Bestrahlung dieser speziellen Chromatinbereiche. Die Chromocenter als Bestrahlungsziel sind in der Projektion jedoch durchschnittlich nur ca. $2 \mu\text{m}^2$ groß (siehe Abbildung 35). Erst die hohe Zielgenauigkeit der GSI Mikrosonde macht daher die Bestrahlung solch kleiner Zielstrukturen möglich. Durch die Mikrosonde können definierte Zahlen von Ionen mit einer Genauigkeit von unter einem Mikrometer in ein Zielvolumen geleitet werden (Heiss et al. 2006, Voss et al. 2010). Durch Lebendzellmikroskopie im Strahlengang ist es möglich in Echtzeit die Rekrutierung von Reparaturproteinen nach ungezielter Schwerionenbestrahlung zu messen (Tobias et al. 2010, Jakob et al. 2012). Neueste Entwicklungen an der GSI Mikrosonde machen es außerdem möglich diese Rekrutierung von Reparaturproteinen auch nach gezielter Schwerionenbestrahlung live zu beobachten (Merk 2011, Merk 2013).

Eine alternative Mikrobestrahlung mit Lasern ist technisch einfacher und in modernen Konfokalsystemen integriert und wird daher oft verwendet. Die Vergleichbarkeit mit ionisierender Strahlung ist jedoch schwierig (Splinter et al. 2010, Jakob et al. 2012). Die bei Lasermikrobestrahlung applizierten lokalen Dosen sind relativ undefiniert und liegen in der Regel über 100 Gy (equivalent zur Röntgenbestrahlung). Teilweise können qualitative Unterschiede zur IR beobachtet werden wie z.B. dass TRF1 und TRF2 (*telomere repeat binding factors*) an Laserschäden rekrutiert werden (Bradshaw et al. 2005),

aber nicht an Alphateilchen- (gezielte Bestrahlung mit 200-400 $\alpha/20\mu\text{m}^2$; Williams et al. 2007) oder Schwerionenschäden (Splinter et al. 2010).

Das Heterochromatin galt lange als Barriere für die DNA Reparatur und die Rekrutierung von Reparaturfaktoren an sich (Goodarzi et al. 2008, Noon et al. 2010). Es wurde postuliert, dass große Proteine nicht in der Lage sind in das dichte Netzwerk des kondensierten Chromatins einzudringen (Bunting 2010). Etablierte Schadensmarker wie γH2AX (Rogakou et al. 1998) waren nach Photonenbestrahlung nicht durch Immunofluoreszenzfärbung innerhalb des HC nachweisbar, sondern nur an der Peripherie des HC oder im EC (Cowell et al. 2007, Goodarzi et al. 2008). Chromatinimmunopräzipitationsanalysen bestätigten, dass das HC die Phosphorylierung von H2AX hemmt (Kim et al. 2007). Einzig nach der Schadensinduktion durch Hydroxyurea ließen sich DNA Schäden sowohl im EC als auch im HC nachweisen (Cowell et al. 2007). Prinzipiell schien eine Phosphorylierung von H2AX zumindest bei replikationsassoziierten Schäden auch im HC möglich.

γH2AX gilt als weitverbreitetster DSB-Marker (Rothkamm et al. 2009). Wie die Abbildungen 22, 23, 24 und 26 belegen, konnte bereits zu frühen Zeitpunkten nach Schadensinduktion (< 2 min) mit schweren Ionen γH2AX innerhalb des Heterochromatins nachgewiesen werden. Möglicherweise erleichtert die hohe Schadensdichte nach Bestrahlung mit Schwerionen die Schadensdetektion im HC. Die H3K9me3 Markierung in Abbildung 22 bestätigt außerdem, dass es sich bei den anvisierten Strukturen tatsächlich um heterochromatische Chromocenter handelt. Zu den entscheidenden Unterschieden dieser Arbeit gegenüber den oben genannten Studien gehört neben der erhöhten Schadensdichte durch Schwerionenbestrahlung auch die Wahl des Beobachtungszeitraums. In den Immunfluoreszenzanalysen von Cowell et al. (2007) und Goodarzi et al. (2008) wurde 30 min nach Bestrahlung als frühester Messzeitpunkt gewählt. Kim et al. (2007) führten die Chromatinimmunopräzipitationen frühestens eine Stunde nach Schadensinduktion durch. Abbildung 28 bestätigt, dass sich zwischen 30 min und einer Stunde nach Bestrahlung auch in den heterochromatischen Chromocentern der hier analysierten Maus Fibroblasten kaum DNA Schäden fanden. Die Schadensmarker ließen sich nur zu sehr frühen Zeiten (wenige Minuten) nach Schadensinduktion nachweisen.

Neuere Studien bestätigen, dass die initialen Schritte des *DDR Signalings* wie die H2AX Phosphorylierung und die Rekrutierung von DDR Proteinen wie MDC1, RPA und XRCC1 auch innerhalb des HC ablaufen (Chiolo et al. 2011, Jakob et al. 2011). Diese beiden Studien unterscheiden sich in der Wahl des Modellsystems (Chiolo et al. 2011: *Drosophila spec.*) oder der Strahlenqualität (Jakob et al. 2011: Schwerionenbestrahlung) von früheren Analysen in Säugerzellen nach Photonenbestrahlung (Goodarzi et al. 2008, Cowell et al. 2007). Außerdem wurden die Messungen in den neueren Studien wenige Minuten nach Schadensinduktion durchgeführt. Übereinstimmend mit der vorliegenden Arbeit belegen diese Studien, dass heterochromatische Bereiche nicht notwendiger Weise die initialen Schritte der DDR unterdrücken. Tatsächlich können auch relativ große Moleküle ungehindert durch das HC diffun-

dieren (Bancaud et al. 2009, Soria et al. 2012). Kondensiertes Chromatin hat zwar eine sehr feine Porengröße, die Dynamik der Nukleosomen macht es dennoch auch großen Proteinen möglich, sich relativ frei durch dieses feine Netzwerk zu bewegen (Hihara et al. 2012). Große Proteinkomplexe finden sich außerdem erst am Ort des DNA Schadens zusammen und diffundieren nicht als vorgeformte Komplexe durch das Chromatin (Misteli et al. 2009).

Über den indirekten Nachweis durch rekrutierte Reparaturproteine oder Histonmodifikationen hinaus, war es möglich, DSBs durch Markierung der freien DNA Enden mit Fluorophor-gekoppelten Nukleotiden (modifizierter TUNEL Assay) direkt nachzuweisen (siehe Abbildung 23). Die TUNEL Markierung bietet außerdem den Vorteil, dass die Schäden lokal sehr begrenzt markiert werden, während sich Schadensmarker wie γ H2AX über weite Bereiche vom Schaden entfernt ausbreiten (Rogakou et al. 1999, Shroff et al. 2004, Bonner et al. 2008, Nakamura et al. 2010). Somit ist mittels TUNEL Färbung eine genauere Lagebestimmung der Schäden relativ zum getroffenen Chromocenter möglich. Außerdem belegt die TUNEL Färbung, dass es tatsächlich die DSBs selbst sind, die relokalisieren und nicht nur das umgebende Chromatin, welches weiträumig um den Schaden durch Histonmodifikationen wie γ H2AX oder durch Reparaturproteine markiert wird.

Einer der frühesten DNA Schadenssensoren ist der MRN Komplex. MRN ist an der Erkennung des Schadens, der Signalübertragung und -verstärkung inklusive der ATM-Aktivierung (Lee et al. 2013) beteiligt und damit von entscheidender Bedeutung für die beiden wichtigsten DSB Reparaturwege HR und NHEJ (review: Williams et al. 2010). Abbildung 24 belegt, dass die MRN Komponenten MRE11 und NBS1 auch an DNA Schäden innerhalb des HCs rekrutiert wurden. Da alle drei Komponenten des MRN Komplexes an DSBs kolokalisieren (Hopfner et al. 2002, Cervelli et al. 2008, Nakamura et al. 2010) kann man davon ausgehen, dass auch Rad50 an heterochromatische DNA Schäden rekrutiert wird.

Der MRN Komplex kann als molekulare Klammer DNA Sequenzen zusammenhalten, indem zwei DNA gebundene MRN Komplexe über die Zn-Haken ihrer Rad50 Komponenten verknüpft werden. Auf diese Weise kann MRN DNA Sequenzen über Distanzen bis zu 120 nm miteinander verbinden (Hopfner et al. 2002, Lobachev et al. 2004, Nakai et al. 2011, review: Williams 2010) und so homologe Chromatiden verknüpfen oder DSB Enden in räumlicher Nähe zu einander halten (siehe Abbildung 65).

In einer Chromatinumgebung wie dem HC, in dem die DNA so dicht gepackt ist, könnte es von besonderer Wichtigkeit sein, die Vielzahl der Doppelstrangbruchendenpaare nach Ionenbestrahlung in räumlicher Nähe zu einander zu halten, damit die passenden DNA Enden verknüpft werden. MRN bildet außerdem die Bindungsplattform für eine Vielzahl von Reparaturfaktoren. Beispielsweise binden CtIP, MDC1, ATM, WRN und 53BP1 direkt an MRN. BRCA1 interagiert indirekt mit MRN über CtIP (Yun et al. 2009, Nakamura et al. 2010). Darüber hinaus besitzt MRE11 eine Einzelstrang Endonuklease und

eine Doppelstrang 3'→5' Exonukleaseaktivität (Paull et al. 1998, Trujillo et al. 1998). Diese Nukleaseaktivität macht es dem MRN Komplex möglich, blockierte DNA Enden (z.B. durch einen *hairpin loop* eines Einzelstrangüberhangs) zu bereinigen (Lammens et al. 2011).

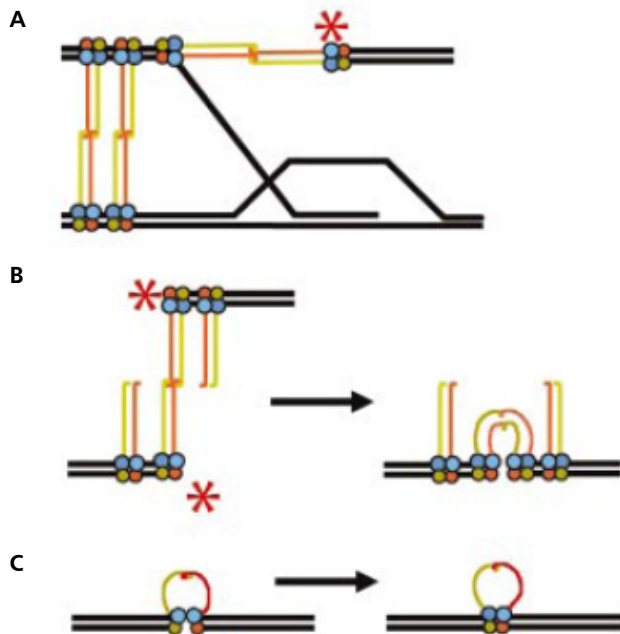


Abbildung 65: Modelle für die Rolle des MRN Komplexes während der DNA Reparatur.

A: Die Verknüpfung von MRN Komplexen hält die Schwesterchromatiden während der HR zusammen

B: Die Verknüpfung und Zusammenführung von zwei DSB Enden durch gebundene MRN Komplexe

C: Die Verknüpfung von DSB Enden durch einen einzelnen MRN Komplex.

Stern: potentielle Nukleaseaktivität von Mre11.

Modifiziert nach Nakamura et al. 2010.

Eines der wichtigsten Proteine der DNA Schadensantwort ist ATM (review: Bhatti et al. 2011). Als PIK Kinase phosphoryliert ATM u.A. NBS1, MDC1, H2AX und sich selbst (review: Iijima et al. 2008, Bhatti et al. 2011). Durch diese Autophosphorylierung zerfallen die ATM-Multimere in Monomere, welche sich in aktiver/phosphorylierter Form am DNA Schaden anreichern (Bakkenist et al. 2003). Auf diese Weise kommt es zu einer Selbstverstärkung des DNA Schadens- und Checkpoint-Signals (review: Bhatti et al. 2011). Der Nachweis von aktiviertem ATM innerhalb der Chromocenter (siehe Abbildung 25) deutet darauf hin, dass ATM auch im HC die Hauptkinase ist, die H2AX phosphoryliert. Zusätzlich dazu könnte ATM im HC die spezielle Aufgabe haben, KAP1 schadensabhängig zu phosphorylieren und so die DNA-Dekondensation zu vermitteln (Goodarzi et al. 2008).

Die extrem lokalisierte Energiedeposition bei Bestrahlung mit Ionen führt zu besonders komplexen DNA Schäden, bei denen neben DSBs auch eine Reihe weiterer DNA Schäden wie SSBs und Nukleotidschäden gebündelt vorkommen (Ward et al. 1994). Ein Schlüsselprotein der BER (Hitomi et al. 2007, Fortini et al. 2007, Dianov et al. 2007), der NER (Solimando et al. 2009) und des MMEJ (Wang et al. 2008) ist XRCC1. Es wurde sehr schnell nach Bestrahlung des HCs mit niederenergetischen Ionen an DNA Schäden rekrutiert (siehe Abbildung 26). Kinetische Messungen mittels Lebendzellmikroskopie nach Bestrahlung mit niederenergetischen Gold- (Abbildungen 29 und 40) bzw. Uranionen (Abbildung 51) zeigen eine deutliche XRCC1 Rekrutierung schon nach wenigen Sekunden an die Orte der Ionen-

durchgänge. Die Rekrutierungskurve (Abbildung 51 B) belegt, dass DNA Schäden in Eu- und Heterochromatin mit etwa der gleichen Geschwindigkeit erkannt werden. In beiden Fällen erfolgte die Rekrutierung von XRCC1 innerhalb von einer Minute bis zur Sättigung. Obgleich die Intensität der Foci sowohl im Eu- als auch im Heterochromatin anschließend generell wieder abnahm, unterschieden sich die Kinetiken deutlich. Das Auflösen des XRCC1 Signals von heterochromatinassoziierten DNA Schäden war erheblich langsamer als dies für euchromatische DNA Schäden der Fall war. Diese Befunde stehen in Einklang mit bereits veröffentlichten Daten unserer Arbeitsgruppe nach Verwendung hochenergetischer Ionen (Jakob et al. 2011). Insgesamt deutet das Auflösen des XRCC1 Signals auch im Heterochromatin jedoch darauf hin, dass auch hier eine DNA Reparatur möglich ist. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass das Ablösen von XRCC1 noch vor dem Abschluss der Reparatur stattfindet. Das generell rasche Verschwinden der XRCC1 Markierung könnte darauf hindeuten, dass die Reparatur von SSBs deutlich schneller abläuft als die von DSBs (Ward et al. 1995).

Eine andere Studie zeigt allerdings, dass XRCC1 an komplexen Schäden, wie sie durch Bestrahlung mit Schwerionen erzeugt werden, in Einzelfällen auch über 24 h am DNA Schaden verbleiben kann (Asaithamby et al. 2011). Eventuell werden einzelne, komplexe SSBs und Basenschäden mit deutlich langsamerer Kinetik repariert.

5.2 Heterochromatische DNA Läsionen werden kurz nach Schadensinduktion an die Grenzfläche zum Euchromatin relokalisiert

Die vorliegende Arbeit gibt einen detaillierten Einblick in die Relokalisierungskinetik heterochromatischer DNA Schäden. Für die kurzen Zeiten der Relokalisierungsmessungen (siehe Abbildung 28) fiel auf, dass sich bereits im Ausgangszeitfenster (1-3 min post IR) nur etwa die Hälfte der Spuren zentral durch die Chromocenter verliefen. Bei einer Zielgenauigkeit der Mikrosonde von ca. $0,67 \mu\text{m}$ (Voss 2010) und einer durchschnittlichen Zielgröße von $2,1 \mu\text{m}^2$ (siehe Abbildung 35) ergibt sich aus der damit verbundenen, unvermeidbaren Streuung, dass ein Teil der Chromocenter verfehlt wird, und dass die restlichen Chromocenter nicht immer zentral getroffen werden. Der berechnete Anteil der Ionen, die ein mittleres WT Chromocenter mit einem Radius von $0,82 \mu\text{m}$ verfehlen, liegt bei ca. 31 % (3.2.10). Um die Relokalisierungskinetik nicht durch diese Fehlschüsse zu verfälschen, wurden, wie in Abschnitt 4.4 erklärt, nur solche Spuren als peripher aufgenommen, welche eine Krümmung um das angezielte Chromocenter aufwiesen. Da die Flugbahn der beschleunigten Ionen eine gerade Linie beschreibt, kann die beobachtete Krümmung nur durch die Verlagerung der geschädigten DNA Bereiche aus den Chromocentern hinaus entstanden sein. Der frühe Anteil dieser gekrümmten, peripheren Schadensspuren (29%, Abbildung 28) deutet daher auf eine sehr schnelle Relokalisierung anfänglich relativ randständiger DNA Schäden hin. Darüber hinaus ist nicht völlig auszuschließen, dass trotz Kontrolle der Spurkrümmung kleine Mengen nicht getroffene Chromocenter in die Auswertung mit eingeflossen sind.

Die Kinetik (Abbildung 28) bestätigt, dass die Relokalisierung zu einem großen Teil innerhalb der ersten Minuten nach Schadensinduktion abläuft. Die Darstellung der Relokalisierungskinetik mit linearer Zeitachse (Abbildung 28 B) macht deutlich, wie schnell der Anteil der zentralen Schadensspuren nach Induktion abfiel. Bereits 30 min nach Bestrahlung befanden sich mehr als 90 % der Schadensspuren peripher zu den jeweiligen Chromocentern. Dies steht in Einklang mit anderen Studien, die ebenfalls nachweisen, dass die Relokalisierung ein sehr schneller Prozess ist (Chiolo et al. 2011, Jakob et al. 2011, Falk et al. 2013).

Die Kurve (Abbildung 28 B, zentrale Schadensspuren) flacht mit zunehmender Zeit ab und geht nach 2 h gegen Null. Einzelne Schadensspuren schienen etwas langsamer zu relokalisieren als die Mehrheit. Bei diesen Spuren könnte es sich um zentrale Treffer in außergewöhnlich großen Chromocentern gehandelt haben. Tatsächlich waren die Chromocenter, die nach einer Stunde noch ein zentrales Schadenssignal zeigten, besonders große Exemplare über $3 \mu\text{m}^2$. Die Größe der Chromocenter schwankte generell sehr stark (Abbildung 36). So waren die größten unter ihnen bis zu $7 \mu\text{m}^2$ groß und damit dreimal größer als der Durchschnitt. Die dreifache Größe bedingt einen 1,7-mal längeren Weg der Relokalisierung und damit eine längere Relokalisierungszeit.

Die Relokalisierung ließ sich im Einzelfall auch im lebenden System beobachten (siehe Abbildung 29). Nach ca. 2 min war der, durch Bestrahlung mit einem einzelnen Goldion induzierte, XRCC1-RFP Focus bereits zum Rand des getroffenen Chromocenters relokalisiert.

Die Aussparung der Chromocenter von DNA Schadensmarkern nach Röntgen-(Mikro-)Bestrahlung in MEF Zellen (siehe Abbildung 30) zeigt, dass die Relokalisierung vermutlich auch nach Röntgenbestrahlung stattfindet.

Die hier beschriebene schnelle Relokalisierung heterochromatischer DNA Schäden könnte erklären, warum es in früheren Studien nicht gelang γH2AX im HC nachzuweisen. 2007 berichtete Cowell et al., dass sich γH2AX Foci nach Röntgenbestrahlung hauptsächlich im EC zeigen, obwohl man eine stochastische Schadensverteilung, also auch Schäden im HC, erwarten würde. Man spekulierte schon damals, dass möglicherweise die heterochromatischen DNA Schäden zur Peripherie des Heterochromatins transportiert würden (Cowell et al. 2007). Auch anderen Studien gelang es nicht γH2AX nach Röntgenbestrahlung innerhalb des HCs nachzuweisen (Goodarzi et al. 2008). Sowohl Cowell et al. (2007) als auch Goodarzi et al. (2008) wählten 30 min nach Bestrahlung als frühesten Messzeitpunkt. Zu diesem Zeitpunkt konnten auch in dieser Arbeit kaum noch DNA Schäden innerhalb des HCs nachgewiesen werden (Abbildung 28). Dies liegt jedoch viel mehr an der Geschwindigkeit der Relokalisierung als an einer Blockade der Schadensantwort im HC.

Goodarzi et al. (2008) und später auch Noon et al. (2010) konnten γH2AX nach Röntgenbestrahlung zwar nicht innerhalb des HCs nachweisen, beschrieben aber eine gewisse Bevorzugung der IRIF Lage an der Heterochromatinperipherie. Dieser Befund unterstützt die These, dass eine schnelle Relokalisierung der heterochromatischen Schäden aus dem HC auch nach Röntgenbestrahlung erfolgt.

Mittlerweile ist die Relokalisierung heterochromatischer DNA Schäden zur Peripherie des HCs sowohl nach Röntgenbestrahlung in *Drosophila spec* (Chiolo et al. 2011) als auch von unserer Gruppe nach Ionenbestrahlung in Maus Fibroblasten (Jakob et al. 2011) gezeigt worden. Chiolo et al. (2011) vermuteten, dass die räumliche und zeitliche Kontrolle der DSB-Reparatur im HC die genomische Stabilität bewahrt, indem es einen Austausch zwischen den repetitiven Sequenzen verhindert.

Die Untersuchung der Zellzyklusphasenverteilung in den bestrahlten Zellen ergab, dass die Relokalisierung in allen Zellzyklusphasen statt fand. Es konnte kein Hinweis für eine mögliche Zellzyklusabhängigkeit festgestellt werden. Bei der Bestrahlung wurde jedoch eine leichte Selektion auf Zellen in der G2 Phase beobachtet (siehe Abbildung 31). Dies lässt sich leicht durch die gesteigerte Größe der Chromocenter in G2 Zellen erklären (siehe Abbildung 32). Durch den verdoppelten DNA Gehalt vergrößern sich nachvollziehbar auch die Chromocenter. Je größer diese sind, umso leichter sind sie in der Lebendzellmikroskopie vor der Bestrahlung zu erkennen, während der Bestrahlung zu treffen und nach der Bestrahlung auszuwerten.

Die Relokalisierung zu prozessierender DNA beschränkt sich jedoch nicht nur auf DNA Schäden. Heterochromatische DNA wird überwiegend an der Peripherie der Chromocenter repliziert. Die Replikation innerhalb von hochrepetitiven Sequenzen kann zu spontanen DNA Schäden führen (Branzei 2010). Direkt nach der Replikation bewegt sich die neu synthetisierte DNA von der Peripherie der heterochromatischen Bereiche wieder ins Innere des Chromocenters (Jaunin et al. 2000, Quivy et al. 2004). Diese bemerkenswerte Parallele legt nahe, dass ähnliche Mechanismen verwendet werden, um geschädigte oder zu replizierende DNA aus dem Inneren des HCs zu dessen Peripherie zu transportieren (review: Soria et al. 2012). In Bezug auf die DNA Reparatur verhindern diese Mechanismen durch die Begrenzung der Prozessierung der DNA Enden auf die Peripherie des HCs die Rekombination zwischen repetitiven Sequenzen innerhalb des HCs (Quivy et al., 2004; Peng and Karpen, 2008; Chiolo et al., 2011). Dies könnte wiederum Deletionen und genomische Instabilität verhindern (Peng et al. 2008, review: Soria et al. 2012), da die Rekombination zwischen repetitiven Sequenzen auf nicht homologen Chromosomen dizentrische und azentrische Chromosomen erzeugen kann (Pearson et al. 2005).

Im Hefesystem wurde eine Relokalisierung von DSBs aus Nukleoli heraus beschrieben (Torres-Rosell et al. 2007). Man nimmt an, dass diese dazu dient, Rekombination innerhalb von repetitiven Sequenzen zu verhindern, um Deletionen zu vermeiden (Torres-Rosell et al. 2007). Zu einem ähnlichen Schluss kommen Chiolo et al. (2011) bei der Relokalisierung in *Drosophila spec.*. In beiden Systemen wird die HR innerhalb der heterochromatischen Bereiche verhindert, indem SMC5/6 abhängig Rad51 bzw. Rad52 aus dem HC fern gehalten wird (Torres-Rosell et al. 2007, Chiolo et al. 2011). Für eine anschließende, erfolgreiche Rekombination werden die geschädigten Bereiche daher aus dem HC transportiert (Torres-Rosell et al. 2007, Chiolo et al. 2011).

5.3 Die Kinetik der Relokalisierung heterochromatischer DNA Schäden ist abhängig von den PIK Kinasen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass aktives ATM konzentriert an heterochromatischen DNA Schäden vorlag (siehe Abbildung 25). Dort ist es unter anderem für die schadensabhängige Phosphorylierung von H2AX zu γ H2AX, welches als DSB Marker (Rogakou et al. 1998) für die Relokalisierungsanalyse diente, verantwortlich.

Abhängig von der Art des DNA Schadens werden unterschiedliche PIK Kinasen aktiv. Während ATM beispielsweise hauptsächlich für die Schadensantwort nach DSBs von Bedeutung ist, wird ATR überwiegend nach UV induzierten und replikationsassoziierten DNA Schäden und SSBs aktiviert (review: Nagaria et al. 2013). Die Bestrahlung mit schweren Ionen führt jedoch nicht zu einer einzigen Schadensart, sondern zu Schadensclustern mit unterschiedlichsten DNA Schäden auf engem Raum (Brenner et al. 1992).

ATM ist einer der zentralen Faktoren der DNA Reparatur, der Zellzykluskontrolle und der Chromatinmodifikation (review: Iijima et al. 2008, Weterings et al. 2008, Bhatti et al. 2011). Insbesondere für die Reparatur von heterochromatischen DNA Schäden ist ATM ein essentieller Faktor (Goodarzi et al. 2008, Beucher et al. 2009, Goodarzi et al. 2010, review: Cann et al. 2011, review: Goodarzi et al. 2012).

Darüber hinaus existieren mehrere Studien, die in ihrer Modellvorstellung beschreiben, dass ATM entscheidend für die Dekondensation des geschädigten Chromatins in Säugerzellen unmittelbar nach Schadensinduktion ist (Peng et al. 2009, Moyal et al. 2011, Goodarzi et al. 2011). Diese Studien unterscheiden sich allerdings in den Erklärungen, wie ATM diese Dekondensation vermittelt. Peng et al. (2009) belegen, dass BRIT1 mit dem SWI-SNF Komplex über die Untereinheiten BAF170 interagiert. Diese Interaktion wird nach DNA Schäden durch ATM (und ATR) abhängige Phosphorylierung von BAF170 verstärkt. Der SWI-SNF Remodelerkomplex relaxiert daraufhin das Chromatin und steigert so die Reparaturreffizienz. Moyal et al. beschrieben 2011, dass es ATM vermittelt zu einer Monoubiquitinierung von H2B durch RNF20-RNF40 kommt, die zu DNA Schäden rekrutiert wird und dort durch ATM phosphoryliert wird. Man nimmt an, dass durch diese Reaktionskaskade möglicherweise die Chromatindekondensation ausgelöst wird. Darüber hinaus beschrieben Goodarzi et al. 2011, dass die ATM vermittelte Phosphorylierung von KAP1 dieses von der Interaktion mit CHD3 (*chromodomain-helicase DNA binding protein 3*) entbindet. CHD3 ist ein Nukleosomenremodeler, dessen Dissoziation zur lokalen Chromatindekondensation führt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Relokalisierung der heterochromatischen DNA Schäden auch in ATM defizienten Zellen stattfand, jedoch mit verlangsamter Kinetik (siehe Abbildung 33). Die Ausgangswerte der beiden Kinetiken (1-3 min) lagen sehr nah zusammen. In den ATM defizienten Zellen fanden sich geringfügig mehr zentrale und intermediäre Spuren verglichen zum WT.

ATM scheint schon in den ersten Minuten nach Schadensinduktion eine verzögernde Wirkung auf die Relokalisierung zu haben. Dass sich der Anteil der peripheren Spuren zu solch einem frühen Zeitpunkt durch ATM beeinflussen ließ, spricht für eine sehr schnelle Relokalisierung in WT Zellen.

Die Verzögerung der Relokalisierung durch ATM Defizienz wird mit fortschreitender Zeit immer deutlicher. Selbst vier Stunden nach Schadensinduktion waren noch 14 % der Schadensspuren in ATM defizienten Zellen nicht vollständig relokalisiert, während die Relokalisierung im WT nach einer Stunde bereits abgeschlossen war.

Zwischen zwei und vier Stunden nach Bestrahlung veränderten sich die Anteile der Schadensspuren in ATM defizienten Zellen kaum. Ob es sich bei diesem verbleibenden, peripheren Anteil um eine residuale Fraktion handelt, die nicht vollständig relokalisiert oder ob die Relokalisierung dieses Anteils so langsam abläuft, dass sie sich in der gemessenen Zeit nicht erfassen lässt, kann hier nicht abschließend beantwortet werden. Der im Vergleich sehr kleine Stichprobenumfang des 4 h Zeitfensters erschwert die Einschätzung, da kleine Unterschiede zum Zeitfenster davor innerhalb der Messtoleranz liegen können. Weitere Analysen sind notwendig um diese Fragestellung zu beantworten. Generell waren längere Inkubationszeiten nach Mikrosondenbestrahlung schwierig. Die Zellen wurden in eigens angefertigten Kulturgefäßen auf speziell beschichteten Folien kultiviert. Trotz dieser Bemühungen waren die Zellen in solchen Experimenten sehr empfindlich. Die Bestrahlung an der Mikrosonde konnte aus technischen Gründen nicht unter sterilen Bedingungen erfolgen. Außerdem waren Temperatur und CO₂ Gehalt der Luft während der Bestrahlung nicht reguliert. Die Dauer der Behandlung außerhalb des Inkubators wurde daher auf maximal 20 min beschränkt. Der pH Wert wurde durch ein HEPES Puffersystem auch unabhängig von der CO₂ Kontrolle stabilisiert. Trotz allem sank die Ausbeute bestrahlter Zellen mit fortschreitender Kultivierungszeit. Darüber hinaus waren die lebenden Zellen z.T. nicht ortsfest und bewegten sich nach der Bestrahlung. Mit fortschreitender Zeit fiel es daher immer schwerer die bestrahlten Zellen an den ursprünglichen Koordinaten wieder zu finden.

Die Auftragung des Verlaufs der zentralen und peripheren Spuren als Vergleich zwischen WT und ATM defizienten Zellen mit linearer Zeitachse (Abbildung 33 C) zeigt eine weitere Auffälligkeit. Der Einfluss der ATM Defizienz auf den zentralen Anteil scheint geringer zu sein, als der auf den peripheren Schadensanteil. Die Fraktion der zentralen Schadensspuren nahm in ATM defizienten Zellen zwar langsamer ab, sank aber wie im WT bis auf Null. Der Anteil der peripheren Spuren in den ATM defizienten Zellen stieg im Vergleich deutlich langsamer und erreichte nie (im Rahmen der hier gezeigten Messungen) das WT Niveau. Der intermediäre Anteil der Schadensspuren in ATM defizienten Zellen schien daher über die Zeit immer weiter zuzunehmen. Ein Grund für dieses Verhalten könnte sein, dass möglicherweise ATM vor Allem für den Abschluss der Relokalisierung von Bedeutung ist.

Entgegen der Einschätzung von Goodarzi et al. (2008) und unserer früheren Beurteilung (Jakob et al. 2011) scheint ATM nicht nur für die Reparatur von heterochromatischen Schäden von Bedeutung, sondern auch für deren Relokalisierung. Dieser Eindruck deckt sich mit der Bedeutung von ATM für

die Relokalisierung in *Drosophila spec.* Nach ATM Inhibition verbleiben mehr γ H2AX Foci in den dicht DNA gefärbten Bereichen (Chiolo et al. 2011). Doch bereits in einer frühen Goodarzi Studie (2008) finden sich Hinweise, dass ATM einen Einfluss auf die Relokalisierung von heterochromatischen DNA Schäden hat. So beschreiben die Autoren, dass γ H2AX-Foci in WT Zellen nicht direkt in Chromocentern liegen, sondern um diese herum angeordnet (30 min nach Photonenbestrahlung). In Zellen mit einem ATM abhängigen DSB-Reparaturdefekt dagegen zeigte sich ein gewisser Überlapp zwischen γ H2AX und DAPI-gefärbten Chromocentern, wie er in WT Zellen nicht zu sehen war. ATM scheint unabhängig von der Ursache der DNA Enden deren Mobilität zu beeinflussen. So wird die Größe des Raums, in dem sich ungeschützte Telomerenden bewegen entscheidend von ATM beeinflusst (Dimitrova et al. 2008). Auch auf die Mobilität der DSB Enden im Hefemodell (Torres-Rosell et al. 2007) hat ATM einen Einfluss. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass sowohl in *Drosophila spec.* als auch im Hefesystem die HR der überwiegende DSB-Reparaturweg ist, während in Säugerzellen das NHEJ überwiegt.

Bei der Auswahl der zu bestrahlenden Chromocenter kam es zu einer Selektion auf besonders große Ziele (siehe auch Abbildung 35). Im Fall der ATM defizienten Zellen waren die Chromocenter der bestrahlten Zellen signifikant größer als die Chromocenter der WT Zellen. Größere Chromocenter verlängern den Weg der Relokalisierung und erklären somit zumindest teilweise die Verzögerung der Relokalisierung in ATM defizienten Zellen. Die 1.4-fache Größe der Chromocenter ATM defizienter Zellen (Abbildung 35) kann aber nicht alleine für die deutliche Verzögerung der Relokalisierung verantwortlich sein. Eine größenbereinigte Analyse der Relokalisierungskinetiken (Daten nicht dargestellt) zeigte keine signifikanten Unterschiede zu den ursprünglichen Kinetiken (siehe Abbildung 33). Die größeren Chromocenter der ATM defizienten Zellen bedingen daher nicht die Verzögerung der Relokalisierung. Die Inhibition von ATM wirkte sich nicht auf die Größe der Chromocenter der WT Fibroblasten aus (siehe Abbildung 35). Die Relokalisierungskinetik in ATM inhibierten WT Zellen bestätigte die Abhängigkeit der Verzögerung der Relokalisierung von ATM (siehe Abbildung 37). Diese war geringfügig weniger ausgeprägt als in den ATM defizienten Zellen, was an einer geringeren Effizienz der Inhibition gegenüber dem stabilen *knock out* liegen könnte. Zusammengefasst ist die Verzögerung der Relokalisierung in ATM defizienten Zellen weder durch eine unterschiedliche Chromocentergröße, noch durch den unterschiedlichen Zelltyp zu begründen, sondern lässt sich reproduzierbar auf den Mangel an aktivem ATM zurückführen.

Die Relokalisierungsanalyse in ATM defizienten Zellen nach KAP1 k.d. (Abbildung 42) zeigte keine signifikanten Unterschiede zur Kinetik der unbehandelten ATM defizienten Zellen (vgl. Abbildung 33). Die Immunofluoreszenzfärbung gegen KAP1 bestätigte den erfolgreichen *knock down* in den ausgewerteten Zellen, sodass dieses Ergebnis nicht durch einen unzureichenden k.d. erklärt werden kann. Die Verzögerung der Relokalisierung heterochromatischer DNA Schäden ließ sich nicht durch die Unter-

drückung der KAP1 Expression aufheben. Das von Goodarzi et al. (2008) postulierte Modell der ATM/KAP1 abhängigen Dekondensation und DNA Reparatur lässt sich daher nicht ohne Weiteres auf die Relokalisierung übertragen. Nach Ionenbestrahlung scheint KAP1 nicht das für die Relokalisierung relevante Phosphorylierungssubstrat von ATM zu sein.

Dieses Ergebnis passt dazu, dass KAP1 als struktureller Bestandteil des HCs auch nach seiner Phosphorylierung chromatingebunden bleibt (Xu et al. 2011). Die Auflockerung der Chromatinstruktur lässt sich daher zumindest nicht direkt durch eine schadensabhängige, ATM vermittelte KAP1 Ablösung vom Chromatin erklären.

Die Untersuchung ob der k.d. von KAP1 einen eigenständigen Effekt auf die Relokalisierungskinetik hat lieferte keinen eindeutigen Trend (siehe Abbildung 43). Der hohe Anteil an peripheren Spuren im Zeitraum zwischen 3 und 20 min deutet auf eine schlechte Treffergenauigkeit der Mikrosonde in diesem Experiment oder auf eine im Vergleich zum unbehandelten WT schnellere Relokalisierung hin. Eine schnellere Relokalisierung nach KAP1 k.d. würde für die postulierte, generelle Chromatindekondensation ohne KAP1 sprechen (siehe oben). Gegen diese spricht jedoch, dass die Chromocenter auch nach einem KAP1 k.d. klar erkennbar waren, unabhängig ob in ATM profizienten oder ATM defizienten Zellen. Gegen eine schnellere Relokalisierung nach KAP1 k.d. spricht außerdem, dass der Anteil der peripheren Schadensspuren im 0,5 h Zeitfenster deutlich geringer war als für den unbehandelten WT.

Der Größenvergleich der Chromocenter zwischen Zellen mit bzw. ohne KAP1 k.d. (Abbildung 44) zeigte, dass die Chromocenter in Zellen nach KAP1 k.d. signifikant kleiner waren als die Chromocenter der unbehandelten Zellen (bezogen auf die Messung in der allgemeinen Population). Dies war sowohl für den WT, als auch für die ATM defizienten Zellen der Fall. Möglicherweise führt die postulierte Dekondensation nach KAP1 k.d. nicht zu einem Auflösen der Chromocenter, aber zu einer Verkleinerung durch Auflockerung der Randbereiche. Die hier beschriebene Verkleinerung der Chromocenter nach KAP1 k.d. wird jedoch in Bezug auf die Population, die bestrahlt wurde, durch die generelle Selektion auf große Chromocenter (s.o.) aufgehoben. So unterschieden sich die Größen der Chromocenter in dieser speziellen Population nicht signifikant zwischen WT, WT nach KAP1 k.d. und ATM defizienten Zellen nach KAP1 k.d..

Die Relevanz von ATM für die Kinetik der Relokalisierung heterochromatischer DNA Schäden konnte somit auch im Säugersystem bestätigt werden. KAP1 scheint jedoch nicht das für die Relokalisierung relevante Phosphorylierungssubstrat von ATM zu sein. Dies steht in Einklang mit Beobachtungen von Noon et al. (2011), die bestätigen, dass sich die Mobilität von strahlungsinduzierten DSBs nicht vor bzw. nach der Phosphorylierung von KAP1 unterscheidet.

Es stellt sich die Frage, welches alternative ATM Substrat die Relokalisierung so entscheidend beeinflussen könnte. Ein für die Dekondensation relevantes Phosphorylierungssubstrat von ATM ist der SWI/SNF Komplex – ein ATP abhängiger Chromatinremodeler (Peng et al. 2009, Xu et al. 2011). Nach

DNA Schäden phosphoryliert ATM die BAF170 Untereinheit des SWI/SNF Komplex, wodurch dessen Interaktion mit BRIT1 zunimmt. BRIT1 wird durch die gemeinsame Wirkung von ATM und MRN zu DNA Schäden rekrutiert. Nach DNA Schäden wird der SWI/SNF Komplex also ATM abhängig phosphoryliert und durch die Interaktion mit BRIT1 an den Schaden rekrutiert, wo er das Chromatin dekondestriert (Peng et al. 2009). Zukünftige Untersuchungen werden zeigen müssen, ob der SWI/SNF-Komplex neben der Dekondensation auch die Relokalisierung beeinflusst.

Neben ATM existieren noch zwei weitere PIK Kinasen. Alle drei sind untereinander bis zu einem gewissen Grad redundant und können sich gegenseitig ersetzen (Matsuoka et al. 2000, Stiff et al. 2004, Savić et al. 2009, Yin et al. 2009, Tomimatsu et al. 2009, review: Bhatti et al. 2011).

Für die Relokalisierungskinetik der WT Zellen mit DNA-PK Inhibitor ergab sich allerdings kein eindeutiges Bild (siehe Abbildung 48). Die ersten drei gemessenen Zeitfenster ließen durch den hohen peripheren Anteil vermuten, dass die Zielgenauigkeit der Mikrosonde in diesem Experiment vergleichsweise schlecht war. Einer der möglichen Gründe für die Ungenauigkeit der Bestrahlung an der Mikrosonde ist ein nicht perfekt orthogonal zum Strahlengang liegendes Glasplättchen zwischen Zellträgerfolie und Bestrahlungskammer. Liegt dieses Plättchen leicht schräg, kommt es zu einem optischen Versatz, der bedingt, dass die Ionen ihr Ziel verfehlen. Genauso kann eine schräg im Probenhalter sitzende Mikrosondenkammer zu Ungenauigkeiten führen. Für die Präzision der Bestrahlung ist darüber hinaus auch die Strahlqualität entscheidend. So kann bei geringer Strahlintensität die Feinjustage nicht so genau erfolgen, was dazu führt, dass sich der Ionenfokus etwas vergrößert.

Eine Stunde nach Bestrahlung waren nach DNA-PK Inhibition etwas weniger Schadensspuren vollständig relokalisiert als im unbehandelten WT (vgl. Abbildung 28). Der möglicherweise relokalisierungsverzögernde Effekt durch DNA-PK Inhibition war jedoch weitaus weniger ausgeprägt, als dies für ATM defiziente bzw. inhibierte Zellen der Fall war (vgl. Abbildungen 33 und 37). Für die Relokalisierungskinetik in ATM defizienten Zellen, die zusätzlich mit DNA-PK Inhibitor behandelt wurden, zeigte sich ein deutlicheres Bild (Abbildung 48). Die in allen Zeitfenstern gemessene, weitaus geringere vollständige Relokalisierung der Schadensspuren nach DNA-PK Inhibition deutet auf einen additiven Effekt beider Kinasen hin.

Die unterschiedliche Ausprägung der DNA-PK Inhibition zwischen WT Zellen und ATM defizienten Zellen ließe sich durch eine teilweise Redundanz der beiden Kinasen erklären. Für die Geschwindigkeit der Relokalisierung scheint ATM wichtiger als DNA-PK. Fehlt nur DNA-PK ist die Relokalisierung kaum beeinträchtigt, da ATM die fehlende Kinase kompensiert. Umgekehrt kann DNA-PK jedoch bis zu einem gewissen Grad fehlendes ATM kompensieren, denn auch in ATM defizienten Zellen findet eine Relokalisierung statt, wenn auch deutlich verzögert. Fehlen jedoch beide Kinasen kommt es zu einer zusätzlichen Verzögerung der Relokalisierungsgeschwindigkeit.

Auch ATR scheint einen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Relokalisierung zu haben (siehe Abbildung 49). Die ersten drei gemessenen Zeitfenster zeigten teilweise deutlich mehr periphere Schadensspuren, als dies für den unbehandelten WT der Fall war (vgl. Abbildung 28). Dies deutet auch hier auf eine schlechte Zielgenauigkeit der Mikrosonde in diesem Experiment hin (siehe oben). Die drei darauffolgenden Zeitfenster zeigten eine Schadensverteilung, wie sie eher mit der der ATM defizienten Zellen zu vergleichen ist (vgl. Abbildung 33). Zwei Stunden nach Schadensinduktion waren noch immer 14 % der Schäden nicht vollständig relokalisiert. Interessanter Weise wurde ATR als die wichtigste Kinase für die Relokalisierung in *Drosophila spec.* beschrieben (Chiolo et al. 2011). Daher ist es vorstellbar, dass ATR auch für die Relokalisierung in Säugerzellen eine Rolle spielt, wie die hier gezeigten Ergebnisse andeuten. Der teilweise sehr geringe Stichprobenumfang in der Relokalisierungsmessung ATR inhibierter Zellen lässt jedoch vorerst keine abschließende Bewertung zu. Die Hypothese, dass ATR an heterochromatische DNA Schäden rekrutiert wird, wird indirekt durch die TopBP1 Rekrutierung an ioneninduzierte DNA Schäden in Chromocentern (Abbildung 57) unterstützt. Bekannt ist, dass nach erfolgter Resektion TopBP1 an die Nahtstelle zwischen ssDNA und dsDNA und an die RPA bedeckten Einzelstränge rekrutiert wird (Kousholt et al. 2012). TopBP1 rekrutiert anschließend seinerseits ATR an die DNA Schäden (Cescutti et al. 2010, Kousholt et al. 2012).

Der Einfluss von ATR auf die Relokalisierung unterstützt die These, dass der SWI/SNF Chromatinremodeler Komplex ein relevantes Phosphorylierungssubstrat für die Relokalisierung sein könnte. Die BAF170 Untereinheit von SWI/SNF wird schadensabhängig nicht nur durch ATM phosphoryliert (siehe oben), sondern auch durch ATR (Peng et al. 2009), wodurch der Komplex an DNA Schäden rekrutiert wird und dort das Chromatin auflockert.

Dass sich die Relokalisierung durch Inhibition von PIK-Kinasen beeinflussen ließ, lässt auf einen aktiven Prozess schließen. Ein aktiver Transport durch das Cytoskelet und seine Motoren scheint jedoch zumindest in *Drosophila spec.* nicht für die Relokalisierung verantwortlich, da die Inhibition der Aktin- bzw. Tubulin-Polymerisierung dort keinen Einfluss auf die Relokalisierung zeigte (Chiolo et al. 2011). Möglicherweise ist die schadensabhängige Dekondensation des Chromatins der aktive Prozess und die Relokalisierung nur die Folge dieser Dekondensation. Dieser Aspekt wird im Folgenden genauer diskutiert.

Mit den hier gezeigten Analysen gelang es erstmals die Relokalisierung in Säugerzellen durch genetische Modifikationen zu beeinflussen und entscheidende Hinweise auf relevante Faktoren zu geben.

5.4 Geschädigtes (Hetero)Chromatin dekondensiert entlang der Trajektorie.

Die Kompaktierung der DNA in Chromatin mindert die Erreichbarkeit der Läsionen durch Reparaturproteine (Goodarzi et al. 2008, Noon et al. 2010, Luijsterburg 2012). Um diese physische Barriere zu überwinden, gibt es verschiedene Chromatinmodifizierer, die Chromatinveränderungen während der DNA Reparatur initiieren damit die Reparaturfaktoren leichter binden können (Luijsterburg et al. 2012, re-

view: Price et al. 2013). Veränderungen der Chromatinstruktur werden von zwei verknüpften Prozessen übernommen: große Motor-ATPasen, welche die Chromatinstruktur direkt verändern und die dynamische Regulation der posttranslationalen Modifikationen der Histone (Xu 2011). Motor-ATPasen stellen die funktionellen Schlüsselkomponenten der Chromatinremodeling-Komplexe dar. Diese sind in der Lage: (I) Nukleosomen vom Chromatin zu entfernen und so freie DNA Sequenzen zu erzeugen, (II) die Nukleosomen zu verschieben und (III) Histone auszutauschen (review: Xu et al. 2011, Clapier et al. 2009). Posttranslationale Modifikationen können Bindestellen für andere chromatinmodifizierende Proteine darstellen und die Stabilität der Interaktion zwischen DNA und Histonen verändern (review: Campos et al. 2009, Cairns et al. 2005, Xu et al. 2011). Ein Schlüsselschritt in der DNA-Reparatur ist die Erzeugung eines Nukleosomen freien Raums um den Bruch. Nach einem DSB kommt es zum schnellen Verlust der Histone im Bereich von einigen 100 bp um den Bruch. Die Entfernung der Histone benötigt den MRN Komplex und den Ino80 Chromatinremodeler (Shroff et al. 2004, review: Tsukuda et al. 2005, Berkovich et al. 2007, review: Xu 2011). Der MRN Komplex besitzt sowohl Nuklease- (MRE11) als auch ATPase- (Rad50) Aktivität (Lavin 2007).

Durch die Acetylierung von Lysinen wird deren ursprünglich negative Ladung neutralisiert und so die Histon-Histon bzw. Histon-DNA Interaktion geschwächt, was zur Relaxierung des Chromatins führt (Seiler et al. 2011). Euchromatin weist generell einen hohen Acetylierungsgrad auf. Acetyliertes H3K14 rekrutiert außerdem den RSC Chromatinremodeler Komplex, der ebenfalls zur Dekondensation beiträgt (Wang et al. 2012). H2A und H4 zeigen nach DSBs einen gesteigerten Acetylierungsgrad. Tip60 ist eine Acetyltransferase, die zu DSBs rekrutiert wird, wo sie H2A und H4 acetyliert (Murr et al. 2006, Jiang et al. 2010 review: Xu 2011). Darüber hinaus acetyliert Tip60 ATM. Dies ist notwendig für eine vollständige Aktivierung der Kinase nach DSBs (Sun et al. 2005, Sun et al. 2007, review: Xu 2011). Die Acetylierung der Histone alleine reicht jedoch nicht aus für eine umfassende Dekondensation. Die Auflockerungen entstehen durch die gemeinsame Wirkung der p400 SWI/SNF ATPase und der Histonacetylierung durch Tip60. Die daraus resultierende Nukleosomendestabilisierung ist nötig für die Ubiquitinierung des Chromatins (u.A. H2A/X) durch RNF8 und die nachfolgende Rekrutierung von BRCA1 an den DSB (Xu et al. 2011).

Nach DNA Schäden in Drosophila (Chiolo et al. 2011) und Maus Zellen (Jakob et al. 2011) konnte speziell die Auflockerung heterochromatischer Bereiche gezeigt werden. Diese Dekondensation könnte es erlauben, dass der Schaden ins umgebende Euchromatin relokalisiert, um die weiteren Schritte der Reparatur in einer offeneren Chromatinumgebung zu vollziehen (Chiolo et al. 2011, Jakob et al. 2011; review: Goodarzi et al. 2012, Soria et al. 2012).

Die lokale Dekondensation des Heterochromatins von Maus Fibroblasten in der direkten Umgebung um den DNA Schaden nach definierter Bestrahlung mit Schwerionen verursachte entlang der Ionentrajektorie einen lokalen Abfall der DNA Intensität (siehe Abbildungen 22 bis 27 und Abbildung 34). Diese Dekondensation ließ sich unabhängig vom LET des Ions der Bestrahlung (von Kohlenstoff bis Uran)

beobachten (siehe auch Abbildung 38). In der dreidimensionalen Rekonstruktion zeigten die getroffenen Chromocenter durch die Dekondensation im Zentrum eine Donut-Form (siehe Abbildung 27 A). Die Dekondensation ist ein sehr schneller Prozess, da sie schon 2 min nach Bestrahlung in fixierten Proben sichtbar war (siehe Abbildung 26). Die Lebendbeobachtung (Abbildung 39) bot die Möglichkeit einen detaillierten Einblick in den Prozess und die Kinetik der lokalen Dekondensation nach gezielter Ionenbestrahlung zu erhalten. Der lokale Abfall des DNA Signals im bestrahlten Chromocenter war hier bereits 30 Sekunden nach der Bestrahlung sichtbar. Die Linienprofile über das getroffene Chromocenter belegen, dass sich das lokale Minimum der DNA Färbung über die Zeit immer weiter ausformte. Es handelt sich somit um einen graduellen Prozess. Dies belegt, dass der Abfall der DNA Intensität im Inneren der Chromocenter nach Bestrahlung ein biologischer Prozess ist und die Chromatinstruktur nicht einfach instantan durch das passierende Ion zerstört wird. In den Lebendaufnahmen der DNA Färbung zeigte sich, dass die Dekondensation entgegen der in fixierten Proben nicht in jedem Fall gemessen werden konnte (siehe Abbildung 40). Das Aufnahmesystem an der Mikrosonde bot aus technischen Gründen eine deutlich geringere Auflösung als das für fixierte Proben verwendete Konfokalmikroskop. Zusätzlich erschwerte der Fokusdrift bei der Lebendaufnahme die ortsgebundene Messung der DNA Intensität über mehrere Minuten. Obwohl manche Chromocenter nach einem Ionentreffer (siehe XRCC1 Rekrutierung) in der Lebendbeobachtung keine Dekondensation zeigten, belegt die spätere konfokale Aufnahme der selben, fixierten Probe, dass es sehr wohl zur Dekondensation gekommen war. Die beobachtete lokale Abnahme der DNA Dichte nach Schadensinduktion ist in Einklang mit bereits veröffentlichten Befunden dieser Arbeitsgruppe (Jakob et al. 2011, Müller et al. 2013), den Beobachtungen in *Drosophila* (Chiolo et al. 2011) und elektronenmikroskopischen Analysen von MEF Zellen nach Laserbestrahlung (Kruhak et al. 2006).

Wie bereits angesprochen, waren die bestrahlten Chromocenter im Durchschnitt deutlich größer als die Chromocenter in der allgemeinen Population (siehe 5.2, 5.3, Abbildungen 35, 36 und 44). Dies ist durch die Selektion bei der Bestrahlung zu erklären. Ein weiterer Grund könnte darüber hinaus in der strahlungsabhängigen Dekondensation liegen. Durch eine Auflockerung des geschädigten Chromatins könnte das gesamte bestrahlte Chromocenter an Größe zunehmen. Somit wäre das durchschnittliche, bestrahlte Chromocenter größer als ein unbestrahltes. Durch die Vermessung von Chromocentern in hoch aufgelösten Aufnahmen vor und nach der Ionenbestrahlung ließe sich eine solche strahleninduzierte Expansion des HCs nachweisen, konnte aber mangels Strahlzeit nicht mehr durchgeführt werden. Die Expansion bestrahlter, heterochromatischer Bereiche wurde allerdings in *Drosophila spec.* nach Röntgenbestrahlung bereits beschrieben (Chiolo et al. 2011).

Eine Möglichkeit die lokale Dekondensation am DSB zu erklären ist, dass der DSB die kontinuierliche Chromatinfiber unterbricht und diese sich durch die aufgebaute Torsion bei der Kompaktierung nun

selbst entwindet. Gegen einen rein „passiven“ Prozess spricht allerdings eine ATP- bzw. Remodeler-Abhängigkeit der strahlungsinduzierten Dekondensation nach Laserbestrahlung (Kruhlak et al. 2006). Wie in Abschnitt 5.3 bereits beschrieben, existiert ein Modell zur Reparatur heterochromatischer DNA Schäden in *Drosophila spec.*, nach welchem ATM schadensabhängig KAP1 phosphoryliert, was zur lokalen Dekondensation des Chromatins um den DNA Schaden führt (Chiolo et al. 2011). Wie in Abbildung 34 dargestellt war die Dekondensation des Heterochromatins in embryonalen Maus Fibroblasten in Form des lokalen DNA Signalabfalls auch in ATM defizienten Zellen zu sehen. In den hier gezeigten Experimenten fanden sich keine Hinweise darauf, dass diese Dekondensation in Zellen ohne ATM langsamer oder weniger ausgeprägt stattfindet. Die ioneninduzierten Auflockerungen in den Chromocentern scheinen außerdem unabhängig von KAP1 zu sein (siehe Abbildungen 45 und 46). In dieser Arbeit konnte kein Hinweis darauf gefunden werden, dass sich die Durchmesser der γ H2AX Foci in WT Zellen, ATM defizienten Zellen und dem KAP1 k.d. der beiden Zelltypen signifikant voneinander unterscheiden (siehe Abbildung 47). Unterschiede in der Dekondensation des Heterochromatins durch ATM bzw. KAP1 könnten sich auch in der Größe der γ H2AX Foci widerspiegeln. Je weiter der aufgelockerte Chromatinbereich um den Schaden reicht, umso weiter könnte sich auch die Phosphorylierung der Histone vom Schaden weg erstrecken. Insgesamt konnten jedoch keine Hinweise darauf gefunden werden, dass sich der Verlust von ATM und/oder KAP1 auf die messbare Dekondensation um den DNA Schaden auswirkt. Brunton et al. (2011) berichten dagegen, dass nach Röntgenbestrahlung die Expansion der γ H2AX IRIFs innerhalb von Chromocentern durch einen KAP1 k.d. ausgeweitet werden kann. Dagegen soll die Inhibition von ATM die γ H2AX Foci verkleinern (Brunton et al. 2011).

Auffällig war, dass das lokale Minimum der DNA Färbung mit dem Maximum des Signals der DNA Schadensmarker überlagerte. Einzig das γ H2AX Signal bildete hier eine Ausnahme. Häufig zeigte sich direkt im Zentrum des breiten γ H2AX Focus ein zentraler Einbruch des Signals (siehe Abschnitt 4.10). Dieser lag genau am Ort des DNA Schadens, wie die Kolo-kalisation mit dem viel feineren TUNEL Focus zeigte (Abbildung 23). Während γ H2AX eine Histonmodifikation darstellt, die nur indirekt auf einen DSB schließen lässt, zeigt das TUNEL Signal die freien DNA Enden nach einem DSB direkt an. Der Abfall der Signaldichte von γ H2AX ist zumindest teilweise durch die lokale Dekondensation bedingt. Jedoch blieb die charakteristische γ H2AX Markierung inklusive des lokalen Signalabfalls im Zentrum des Schadens bestehen, auch nachdem die geschädigten Chromatinbereiche das DNA-dichte Chromocenter verlassen hatten (keine H3M9me3 Markierung an den relokalierten Schäden, siehe Abbildung 41 C). Wie die DAPI Färbung zeigt, korreliert das γ H2AX Profil an solchen peripheren DNA Schäden nicht mit der DNA Intensität (Abbildung 58 oben). Wie weiter oben beschrieben, kommt es nach der Induktion von DNA Schäden zur Entfernung der Histone um den Bruch. Durch diese und die lokale Dekondensation um den DNA Schaden sinkt die Dichte der Histone und somit auch die Dichte der γ H2AX Markie-

rungen, was den Signalabfall direkt um die Läsion erklären kann. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Studien überein (Abbildung 66) (Kim et al. 2007, Berkovich et al. 2007, Savic et al. 2009, Iacovoni 2010, Nakamura et al. 2010, Splinter et al. 2010). Ein Zusammenhang des LETs der Bestrahlung und der Ausprägung des lokalen γ H2AX Signalabfalls war auf Grund der beobachteten Variabilität in dieser Studie nicht erkennbar.

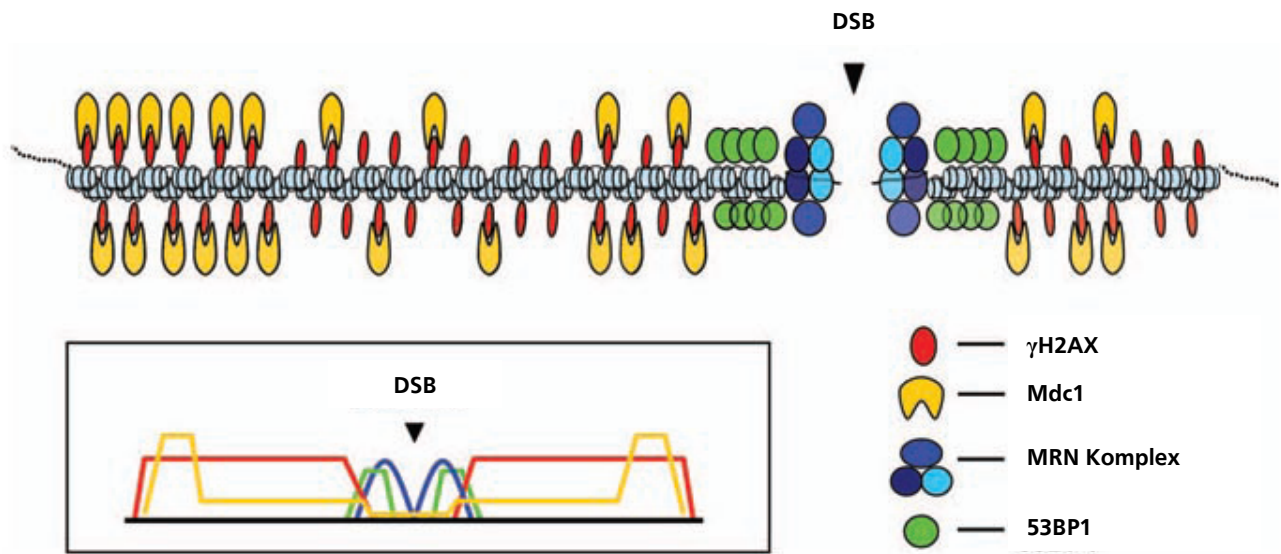


Abbildung 66: Modell der Verteilung von DNA Reparaturproteinen in einem Focus um einen DSB.

γ H2AX formt einen Focus, der sich in einem weiten Bereich um den DSB erstreckt, fehlt aber im Zentrum dieses IRIFs. MDC1 bindet hauptsächlich an den äußeren Enden des durch γ H2AX markierten Bereichs. Dagegen akkumulieren 53BP1, NBS1 und MRE11 in einem kleinen Bereich direkt um den DSB. Genau in diesem Bereich fehlt die γ H2AX Markierung. Abbildung modifiziert nach Nakamura et al. 2010.

5.5 Die Reparatur ioneninduzierter, heterochromatischer DNA Schäden ist gegenüber euchromatischen DNA Schäden verlangsamt

Nach Schwerionenbestrahlung konnte eine Verzögerung der heterochromatischen Reparatur beobachtet werden (siehe Abbildungen 52 und 53). Nach 8 h Reparatur waren zwei Drittel der euchromatischen 53BP1 Foci verschwunden, während die heterochromatinassoziierten Foci nur um ein Drittel zurück gingen. Wie bereits weiter oben angesprochen, wurden heterochromatische DNA Schäden mit ähnlicher Geschwindigkeit erkannt und markiert (XRCC1 Rekrutierung) wie euchromatische Schäden. Dies legt nahe, dass die beobachtete Verzögerung der Reparatur nicht auf eine mangelhafte Detektion der Schäden zurückzuführen ist. Auch die heterochromatinassoziierten XRCC1 Foci blieben deutlich länger erhalten als die euchromatischen Foci (Abbildung 51).

Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit früheren Studien, die bestätigen, dass heterochromatische DNA Schäden langsamer repariert werden als euchromatische Schäden (Goodarzi et al. 2008, Goodarzi et al. 2009, Beucher et al. 2009, Jakob et al. 2011, Noon et al. 2010, Lorat et al. 2012). Die Reparatur heterochromatinassoziiierter Schäden zeigt einen Zusammenhang mit der lokalen Dekondensation und die Notwendigkeit der Rekrutierung weiterer Reparaturfaktoren, die für die euchromatische Repa-

ratur nicht benötigt werden (Falk et al. 2013, Jezkova et al. 2013). Die Verlangsamung der heterochromatischen Reparatur lässt sich jedoch nur teilweise durch die hier geschilderte Chromatindekondensation und die Relokalisierung der Schäden erklären. Wie im Abschnitt zuvor beschrieben, fand die Dekondensation innerhalb weniger Minuten nach Bestrahlung statt. Auch die Relokalisierung der DNA Schäden war innerhalb der ersten Stunde nach Schadensinduktion abgeschlossen (siehe Abschnitt 5.2). Die heterochromatische Reparatur war dagegen um viele Stunden verzögert.

Möglicherweise entfernen sich die zusammengehörigen DSB Enden auf dem Weg aus dem Heterochromatin weiter voneinander und müssen an der HC Peripherie neu gepaart werden. Während der Relokalisierung könnten die Bruchstücke der DNA sich auch ineinander verschlingen, was eine aufwändige Reorganisation nach sich ziehen würde. Durch die dichte Packung der DNA innerhalb des Heterochromatins entstehen insbesondere nach Bestrahlung mit schweren Ionen (Brenner et al. 1992, Ward et al. 1994) sehr viele DNA Schäden in räumlicher Nähe. Die im Vergleich zum Euchromatin höhere Schadensdichte im Heterochromatin könnte die Reparatur zusätzlich erschweren bzw. verlangsamen (Lorat et al. 2012).

Erstaunlich war, dass alle verbleibenden DNA Schäden nach 8 h Reparatur eine Markierung mit RPA aufwiesen (siehe Abbildung 52). Dies spricht dafür, dass es an jedem dieser Foci zu Resektion gekommen ist, bedeutet aber nicht notwendigerweise, dass an jedem DSB in einem Focus resektiert wurde. Eine aufwändige Prozessierung der DNA Enden von heterochromatischen DNA Schäden könnte die Reparatur weiter verzögern. Der Aspekt der Resektion im HC wird im folgenden Abschnitt (5.6) genauer erläutert.

Die geschädigten, relokalierten DNA Bereiche behielten nur einen Teil der Heterochromatinmarkierungen (siehe Abbildung 41). Sobald die Schäden das DNA-dichte Chromocenter verlassen hatten, verloren sie z.B. die H3K9me3 Markierung (Abbildung 41 C). Da es sich bei dieser Markierung um eine Histonmodifikation handelt, ist es nachvollziehbar, dass sich die Dichte der Histontrimethylierung parallel zur Dichte der DNA und damit der Histone verhält. Solange die DNA Schäden sich innerhalb der Chromocenter befanden, waren sie durch eine intensive KAP1 Markierung gekennzeichnet, die jedoch nicht durch die lokale Chromatindekondensation beeinflusst wurde (Abbildung 41 B). Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass sich KAP1 nicht von geschädigtem Chromatin löst (vgl. Abschnitt 5.3), sondern sogar zusätzlich rekrutiert wird. Sobald die geschädigte DNA jedoch das Chromocenter verlassen hatte, ging die Intensität der KAP1 Markierung zurück.

HP1 α findet sich hauptsächlich im Heterochromatin während die Isoformen HP1 β und HP1 γ auch im Euchromatin vorkommen (Bolderson et al. 2012). Hier konnte gezeigt werden, dass HP1 α zusätzlich zur bereits in Chromocentern vorhandenen Markierung an heterochromatische DNA Schäden rekrutiert wurde (siehe Abbildung 41). Diese Markierung wurde im Gegensatz zu KAP1 und H3K9me3 auch nach der Relokalisierung aufrecht erhalten, wenn das geschädigte Chromatin das DNA-dichte Chromocenter bereits verlassen hatte. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Studien, die eine Rek-

rutierung von HP1 α an UV- und Laser-induzierte DNA Schäden (Ayoub et al. 2009, Baldeyron et al. 2011) sowie an Schäden nach Röntgenstrahlung (Soria et al. 2012) nachweisen. Diese Rekrutierung fand sowohl im Eu- als auch im Heterochromatin statt und war 30 min nach Schadensinduktion nicht mehr zu messen (Baldeyron et al. 2011). Baldeyron et al. spekulierten 2011, dass die transiente Bindung von HP1 α an geschädigtes Chromatin (unabhängig von der Interaktion zwischen HP1 α und anderen HC-Markern) die losen DSB Enden stabilisiert und in der S/G2 Phase Schwesterchromatiden zusammen hält. Ein möglicher, unterstützender Einfluss von HP1 α auf die DNA Endresektion wird ebenfalls in Erwägung gezogen (Baldeyron et al. 2011). Die HP1 Paraloge sind in der Lage über ihre *chromoshadow* Domäne zu dimerisieren (Cann et al. 2011, Richart et al. 2012, Soria et al. 2012), was es ermöglichen würde zwei gebundene DNA Enden miteinander zu verknüpfen.

Bolderson et al. schlugen 2012 ein bimodales Verhalten von HP1 α nach DNA Schäden vor. Direkt nach Schadensinduktion kommt es zur Mobilisierung von HP1 α . In einem zweiten, langsameren Schritt wird darauffolgend HP1 α an die Schäden rekrutiert (siehe auch review: Cann et al. 2011). Die schadensabhängige Mobilisierung von HP1 α von dessen Bindung an H3K9me3 könnte dazu beitragen den Pool des frei verfügbaren HP1 α zu vergrößern, der anschließend zu den Schadensstellen rekrutiert werden kann (Soria et al. 2012). Durch das Ablösen von HP1 α vom H3K9me3 wird diese HC Markierung außerdem frei für die Bindung anderer Proteine wie z.B. Tip60, welches durch diese Bindung die volle Acetyltransferase Aktivität erlangt (Sun et al. 2005). Die dadurch ausgelöste, verstärkte Acetylierung der Histone trägt zur Chromatindekondensation um den DNA Schaden bei (siehe oben) während die Dimerisierung von HP1 α gleichzeitig die DSB Enden in räumlicher Nähe halten könnte.

Obschon die relokalierten DNA Bereiche einen Teil der Heterochromatinmarkierungen verlieren, bleiben sie doch stets mit dem getroffenen Chromocenter assoziiert und stellen offenbar eine besondere Herausforderung für die DNA Reparatur Maschinerie der Säugerzelle dar.

5.6 Die Reparatur ioneninduzierter, heterochromatischer DNA Schäden ist resektionsassoziiert

Die vorliegende Arbeit belegt, dass einer der wichtigsten Resektionsfaktoren, CtIP (Sartori et al. 2007), auch an DNA Schäden innerhalb der Chromocenter rekrutiert wurde (siehe Abbildung 54). Darüber hinaus wurde auch MRE11 an die heterochromatischen DNA Schäden rekrutiert (Abbildung 55), welches ebenfalls Nukleaseaktivitäten besitzt (Liao et al. 2012, Westmoreland et al. 2013,). Diese indirekten Hinweise auf Resektion werden durch den Nachweis von RPA (Abbildung 56) und TopBP1 (Abbildung 57) an den DNA Läsionen innerhalb der Chromocenter gestützt. Beide Faktoren weisen spezifisch einzelsträngige DNA nach, die durch erfolgreiche Resektion entsteht (Langerak et al. 2011, Kousholt et al. 2012, Liao et al. 2012, Peterson et al. 2012). Einzelsträngige DNA muss jedoch nicht notwendigerweise für eine Reparatur durch die HR sprechen. Auch das MMEJ nutzt einzelsträngige DNA Abschnitte.

Der Nachweis der Resektion an DNA Schäden innerhalb der Chromocenter steht in Einklang mit früheren Studien. Bereits 2009 beschrieb Beucher et al., dass die Reparatur heterochromatischer DSBs in Säugerzellen in der G2 Phase exklusiv von der HR durchgeführt wird. Diese heterochromatische HR unterscheidet sich aber von der replikationsassoziierten HR, wie sie im Euchromatin abläuft, da sie neben den üblichen HR Faktoren auch ATM und Artemis benötigt. Die HR basiert generell auf der ausgedehnten Prozessierung der DSB Enden um einzelsträngige Bereiche zu erzeugen, die danach auf die Suche nach homologen Sequenzen gehen (Qing et al. 2011). Diese Homologiesuche stellt eine Bewegung der Bruchenden und somit eine gewisse Parallele zu der, in dieser Arbeit charakterisierten, Relokalisierung dar.

Auch die beobachtete Relokalisierung von DSBs in Hefezellen zur Peripherie des Zellkerns sind abhängig von Resektionsfaktoren (Miné-Hattab et al. 2012, Ira et al. 2012). Genauso benötigt die Relokalisierung von heterochromatischen DNA Schäden in *Drosophila spec.* HR- bzw. Resektionsfaktoren (Chiolo et al. 2011). Diese Befunde sprechen dafür, dass die Relokalisierungsbewegung allgemein von der Resektion der DNA Schäden abhängt. Auch in *Drosophila spec.* unterscheidet sich jedoch die HR der heterochromatischen DSBs von der HR, wie sie im Euchromatin abläuft. Während die frühen Schritte der HR, wie die Resektion und Beladung des Einzelstrangs mit RPA, innerhalb des Heterochromatins ablaufen, scheinen die späten Schritte der HR erst dann zu erfolgen, wenn der DNA Schaden die Peripherie des HCs erreicht hat. So wird Rad51 konsequent aus dem HC verbannt und erst nach der Relokalisierung auf die Einzelstränge geladen (Chiolo et al. 2011). Die Autoren spekulieren, dass die rasche Resektion heterochromatischer DNA Schäden das NHEJ an solchen Läsionen verhindert, während die zeitlich Aufteilung der HR solcher Schäden die Stranginvasion verzögert, bis der DSB die repetitiven Sequenzen verlassen hat. NHEJ kann Translokationen durch die falsche Verknüpfung von DSBs in räumlicher Nähe erzeugen (Soutoglou et al. 2008) und wird daher durch die schnelle Resektion innerhalb des HCs blockiert (Chiolo et al. 2011). Die Rekombination zwischen repetitiven Sequenzen auf nicht homologen Chromosomen kann jedoch dizentrische und azentrische Chromosomen erzeugen (Pearson 2005) und somit zu Deletionen führen (Peng et al. 2008). Daher wird die Stranginvasion erst dann durchgeführt, wenn die DSBs das HC verlassen haben (Peng et al. 2008, Chiolo et al. 2011, Soria et al. 2012).

Schwerionenbestrahlung stellt in Bezug auf die Resektion einen Sonderfall dar. Anders als bei anderen DNA Schadensquellen (Beucher et al. 2009, Buis et al. 2012, Sun et al. 2012) ist die Resektion nach Ionenbestrahlung nicht auf die S und G2 Phase beschränkt sondern findet auch in der G1 Phase statt (Averbeck et al. 2011). Dies passt zur Einschätzung, dass unkomplizierte Läsionen über das NHEJ verknüpft werden, während komplexe DNA Läsionen eher durch die HR repariert werden (Shahar et al. 2012). Ähnlich dazu werden im Hefemodell „clean“ DSBs durch NHEJ repariert, während „ragged“ DSBs markiert werden für eine spätere HR in S bzw. G2 (Barlow et al. 2008). Eine noch unveröffentlichte Studie in Säugerzellen (Barton et al., Manuskript in Bearbeitung) beschreibt, dass heterochroma-

tische DSBs auch in der G1 Phase CtIP abhängig resektiert werden, bevor sie durch NHEJ verknüpft werden.

Zusätzlich zu diesen Resektionsmarkern wurde versucht resektierte Bereiche durch einen Immunfluoreszenznachweis von BrdU darzustellen. Dafür wurden die Zellen vor der Bestrahlung für 48 h mit BrdU (10 μ M) inkubiert und 45 min nach Schadensinduktion fixiert. Durch die Resektion an den DNA Schäden sollten einzelne BrdU-Nukleotide offen zugänglich und damit ohne Denaturierung des Doppelstrangs für einen Antikörper erreichbar sein. Keiner der getesteten Antikörper zeigte jedoch ein BrdU Signal in den bestrahlten Bereichen. Der Einbau des BrdUs und die Bindung der Antikörper wurde nach Denaturierung des Doppelstrangs bestätigt. Die fehlenden, strahlungsabhängigen Foci können durch eine geringe Sensibilität der Methode erklärt werden. BrdU als Thymidin-Analogon ersetzt statistisch selbst nach idealer Einbaueffizienz maximal ein Viertel der eingebauten Basen. Man kann jedoch davon ausgehen, dass dieses Optimum im Experiment nicht erreicht wird, da zelleigenes Thymidin weiterhin als Alternative zu BrdU zur Verfügung steht. Die Zahl der Epitope für den Antikörper ist daher auch nach ausgedehnter Resektion eher gering, was eine Detektion der Resektion durch BrdU Immunfluoreszenzfärbung schwierig macht. Die weiter oben angeführten Resektionsmarker belegen jedoch zweifelsfrei, dass zumindest ein Teil der Läsionen, die nach Ionenbestrahlung der Chromocenter entstehen, resektiert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine gewisse Konkurrenz zwischen NHEJ Faktoren und der Resektions- Faktoren um DNA Läsionen hin. Die Vergrößerungen in Abbildung 53 zeigen, dass die verbleibenden DNA Schäden 8 h nach Reparatur durch einen zentralen RPA Focus markiert wurden, der von mehreren 53BP1 Foci in dessen Peripherie umgeben war. Dieser Eindruck deckt sich mit den Ergebnissen aktueller Studien, die ebenfalls ein Konkurrieren von Resektions- bzw. HR-Faktoren mit NHEJ Faktoren um jeden einzelnen DSB beschreiben (review: Decottignies 2013). Die am intensivsten untersuchten Gegenspieler sind dabei BRCA1 auf der Seite der HR und 53BP1 bzw. RIF1 auf der Seite des NHEJ. Chapman et al. beschrieben 2012, dass die Anreicherung von 53BP1 in IRIFs in G1/0 Zellen am größten ist. Dies passt zur Rolle von 53BP1 das NHEJ zu fördern. Die ATM-abhängige Phosphorylierung von 53BP1 rekrutiert RIF1 an DSBs (Sanz-Garcia et al. 2012, Chapman et al. 2013, Di Virgilio et al. 2013, Feng et al. 2013, Lukas et al. 2013). RIF1 und 53BP1 wirken epistatisch (Lukas et al. 2013) und inhibieren die 5'-Resektion durch CtIP, BLM und EXO1, limitieren die Akkumulation von BRCA1 an DSBs und fördern so NHEJ (Bothmer et al. 2010 und 2011) bzw. hemmen die HR (Bunting et al. 2010, Chapman et al. 2012 und 2013, Sanz-Garcia et al. 2012, Di Virgilio et al. 2013, Zimmermann et al. 2013). RIF1 inhibiert also die BRCA1 Rekrutierung an DNA Schäden in der G1 Phase (Feng et al. 2013). Sobald die Zellen in die S Phase eintreten, wird BRCA1 an die 53BP1 IRIFs rekrutiert und 53BP1 zum Rand dieser Foci verdrängt. Die räumliche Trennung zwischen 53BP1 und

BRCA1 zeigt BRCA1 dann im Kern des IRIFs und 53BP1 in der Peripherie. Das BRCA1-assoziierte IRIF Zentrum entspricht Chromatinregionen, die mit HR verknüpft sind. Die Anreicherung von BRCA1 stellt also einen zeitlichen Wechsel des Reparaturprogramms dar (Chapman et al. 2012). BRCA1 wiederum ist ein Antagonist für die 53BP1-abhängige Reparatur (NHEJ) in der S-Phase, indem es dessen Interaktion mit dem Chromatin nahe des DSBs verhindert. CtIP zeigt die gleichen Färbungsmuster wie BRCA1 und findet sich im IRIF Zentrum, umgeben von 53BP1 (Chapman et al. 2012). Wie der molekulare Mechanismus der Resektionsblockade durch 53BP1/RIF1 aussieht ist jedoch noch weitgehend ungeklärt (Feng et al. 2013). Die NHEJ Faktoren KU (Postow et al. 2008) und 53BP1 (Watanabe et al. 2009) werden DSB-abhängig durch Ubiquitinierung verdrängt. Während die aktive Entfernung von *Endjoining* Proteinen durch die Proteinubiquitinierung die Resektion begünstigen könnte (Zhang et al. 2007), könnte im Gegenzug auch die fortschreitende Endresektion selbst die Ablösung der *Endjoining* Proteine begünstigen. Beispielsweise könnte die MRE11/CtIP-abhängige DSB Resektion oder MRE11-abhängige Nukleosomenverschiebung nukleosomenfreie Einzelstrangregionen erzeugen, die nicht mit der Bindung von 53BP1 kompatibel sind, dafür aber zugänglich für die Rekrutierung der HR Faktoren (Bunting et al. 2010). Die in dieser Arbeit geschilderte Focusstruktur (siehe Abbildung 53) ähnelt der von Chapman et al., (2012) beschriebenen und stimmt mit der Annahme überein, dass für eine erfolgreiche Resektion der BRCA1-CtIP Komplex aktiv den Resektionsblock durch 53BP1/RIF1 aufheben muss (Bunting et al. 2010, Chapman et al. 2012).

Die mit Hilfe von hochauflösender STED Mikroskopie aufgenommenen Strukturen der RPA/53BP1 Foci (Abbildung 63) belegen, dass einzelne RPA Foci von mehreren kleinen 53BP1 Ansammlungen umgeben waren. Am Ort der größten RPA Intensität sank dabei die 53BP1 Intensität deutlich ab. Dies deutet auf die Verdrängung von 53BP1 vom Ort der Resektion hin. Diese Beobachtung deckt sich mit 4Pi Aufnahmen vergleichbarer Proben (Splinter et al. 2010) und ähnelt der von Chapman et al (2012, s.o.) beschriebenen Focusstruktur. Während RPA an einzelsträngige DNA bindet (Kim et al. 1992), die sich direkt am Schaden befindet, bindet 53BP1 an Histonmodifikationen (Huyen et al. 2004), die den DNA Schaden umgeben. Eine ähnliche, im Detail jedoch unterschiedliche Focusorganisation zeigt Abbildung 64, in der sich mehrere MRE11 Subfoci dicht am Rande um einzelne, zentrale RPA Foci gruppieren. Es macht den Eindruck als wenn die resektierenden Enzyme (MRE11) sich um die resektierten Bereiche (RPA Markierung) geschart hätten bzw. an deren Ende gebunden sind.

Das hier beschriebene Modell der Konkurrenz zwischen der Resektion und dem NHEJ lässt sich außerdem mit der Abwesenheit von 53BP1 an heterochromatischen DNA Schäden nach Mikrosondenbestrahlung vereinbaren. So war 53BP1 nur in Ausnahmefällen im Inneren der Chromocenter nachweisbar und dann auch nur in geringen Mengen (siehe Abbildung 27 A und Abbildung 61). In der Regel blieb der innere Bereich in einem Chromocenter einer zentralen Schadensspur von 53BP1 ausgespart (siehe Abbildung 59), während die γ H2AX Spur durchgehend war. Spuren, die nicht durch ein Chro-

mocenter verliefen, zeigten eine 53BP1 Markierung, die konsequent mit γ H2AX überlappt. Nach abgeschlossener Relokalisierung wurden die DNA Schadensspuren hingegen in gesamter Länge durch 53BP1 markiert (siehe Abbildung 60).

Dieses Verhalten von 53BP1 passt zu aktuellen Studien (Xu et al. 2011, Falk et al. 2013), die erklären, dass 53BP1 erst in heterochromatische Bereiche einwandert, wenn diese ausreichend dekondensiert sind. Die beiden 53BP1 Tudor Domänen binden spezifisch H4K20me₂, welches in ungeschädigtem Chromatin verdeckt vorliegt. Es existiert ein Modell in dem die Ubiquitinierung von H2A und H2AX die Öffnung des Chromatins verursacht. Dadurch werden die Methylgruppen der Histone offen gelegt und so die Bindung von 53BP1 im Chromatin um den Bruch ermöglicht (Mailand et al. 2007, Huen et al. 2007, Steward et al. 2009, Doil et al. 2009, Bekker-Jensen et al. 2010, review: Noon et al. 2011). JMJD2 bindet ebenfalls an H4K20me₂ und konkurriert mit 53BP1 um diese Bindung. Nach DNA Schädigung wird JMJD2 durch RNF8/RNF168 ubiquitiniert, abgebaut und gibt so die Bindungsstelle für 53BP1 schadensabhängig frei (Panier et al. 2009, Mallette et al. 2012). Die Rekrutierung und Bindung von 53BP1 an DNA Schäden bedarf also einer Chromatinreorganisation, weshalb 53BP1 einer der Schadensmarker ist, die vergleichsweise spät nach Schadensinduktion nachzuweisen sind (Goodarzi et al. 2012).

Die Dichte der induzierten DNA Schäden nach Ionenbestrahlung hängt im Wesentlichen vom LET und von der Geschwindigkeit der Ionen ab (Kraft et al. 1992). Nach Bestrahlung mit Goldionen (Abbildung 62) bzw. Uranionen (Abbildungen 63 und 64) würde man durch die extrem hohe Dichte an DNA Schäden weitgehend durchgängige Schadensspuren erwarten (Jakob et al. 2003). Tatsächlich waren die Schadensspuren nach Schrägbestrahlung mit Ionen aber in einzelne Foci unterbrochen (siehe Abbildungen 62 bis 64). Der Abstand der beobachteten einzelnen Foci lag zwischen 0,5 und 1 μ m (siehe Abbildung 62). Dass die DNA-Schadensmarker sich entlang der Trajektorie in einzelnen, meist klar von einander zu trennenden Foci sammelten, spricht entweder für eine Ungleichverteilung des Chromatins und damit der DNA die geschädigt werden kann oder für die Ausbildung von lokalen Reparaturzentren in denen die DNA Läsionen der unmittelbaren Umgebung zusammengefasst werden. Ein solcher Mechanismus wurde bereits früher postuliert (Jakob et al. 2003, Costes et al. 2007, Jakob et al. 2009, Neumeier et al. 2012). Zusätzlich zur beschriebenen Unterbrechung der Schadensmarkerspuren könnte auch die weiter oben beschriebene Focusstruktur aus einzelnen RPA Foci umgeben von 53BP1/MRE11 einen Hinweis auf die Bildung von Reparaturzentren entlang der Ionentrajektorie geben, in denen sich mehrere DSBs zusammen finden.

Die Ausbildung von Reparaturzentren in Säugerzellen wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Aten et al. 2004, Soutoglou et al. 2007, Misteli et al. 2009,). Für das Hefesystem wurde diese bereits nachgewiesen (Lisby et al. 2003), wobei der Bewegungsradius in diesem System (Misteli et al. 2009) auffälligerweise ebenfalls der hier zu beobachtenden Größenordnung der Focusorganisation von etwa einem

Mikrometer entsprach. Der Kern einer Säugerzelle ist im Vergleich 200 bis 400 Mal größer als der einer Hefezelle (Dion et al. 2013), was zu der Notwendigkeit einer lokalen Organisation von vielen Reparaturzentren führen könnte. Auch die Relokalisierung der heterochromatischen DNA Schäden (siehe Abschnitt 5.2) findet in einer vergleichbaren Größenordnung statt. So hatten die bestrahlten Chromocenter im WT einen mittleren Radius von $0,8 \mu\text{m}$ (Abbildung 44). Die in anderen Studien gemessene Beweglichkeit von euchromatischen DSBs (Jakob et al. 2009, Krawczyk et al. 2012) zeigen, dass Bewegungen von DNA Schäden in der Größenordnung von $<1 \mu\text{m}$ auf einer Zeitskala von wenigen Minuten möglich sind.

Die Relokalisierungskinetik in NHEJ defizienten embryonalen Maus Fibroblasten (MEF KU80 $-/-$) (siehe Abbildung 50) lag in dieser Studie auf WT Niveau (vgl. Abbildung 28). Im Säugersystem fanden sich also keine Anzeichen dafür, dass klassisches NHEJ die Relokalisierungsgeschwindigkeit beeinflusst bzw. dass das Fehlen von KU die Relokalisierung beschleunigt. Dies wäre vorstellbar gewesen, denn solange sich KU am DNA Schaden befindet, ist die Prozessierung der DNA Enden blockiert (Langerak et al. 2011, Shao et al. 2012). Ohne KU hätte die Resektion und damit die Relokalisierung möglicherweise schneller ablaufen können (Lee et al. 1998, Soutoglou et al. 2007). Der Verlust von KU als DSB-Enden stabilisierender Faktor zeigte außerdem keine Auswirkungen auf die konzertierte Relokalisierungsbewegung. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Studien in *Drosophila spec.*, die keinen Einfluss von KU80 auf die Relokalisierung heterochromatischer DNA Schäden feststellen konnten (Chiolo et al. 2011). Das Fehlen eines Einflusses von KU auf die Geschwindigkeit und Art und Weise der Relokalisierung heterochromatischer Schäden in defizienten Maus Fibroblasten muss nicht zwingend bedeuten, dass das NHEJ nicht an der Reparatur heterochromatischer Schäden beteiligt ist. Lediglich die Relokalisierung ist unabhängig vom NHEJ.

Um welche Art der Reparatur es sich in den ionenbestrahlten Chromocentern handelt ist hier nicht abschließend zu beantworten. Deutlich wird, dass die Reparatur im Heterochromatin gegenüber der euchromatischen Reparatur verlangsamt ist (siehe Abschnitt 5.5). Lorat et al. (2012) beschreiben, dass EC DNA Schäden (gekennzeichnet durch zwei pKU70-gold beads, die als KU-Heterodimer interpretiert werden) sofort nach Bestrahlung (6 MV Photonen, Linearbeschleuniger) erkannt und verbunden werden, während die DNA Packung im HC die DNA Prozessierung zu verzögern scheint. Komplexe pKU-cluster innerhalb des HC (4 oder ≥ 6 beads) könnten multiple Brüche in räumlicher Nähe zueinander darstellen, die durch IR in hochkompakter DNA induziert wurden (Lorat et al. 2012).

Nach neuesten Studien muss eine Schadensmarkierung mit dem KU Heterodimer nicht notwendigerweise die Reparatur durch NHEJ bedeuten (Shao et al. 2012, Hihara et al. 2012). Man geht davon aus, dass das klassische NHEJ grundsätzlich zunächst versucht alle DNA Schäden zu reparieren und abhängig von der Komplexität des Schadens und der Chromatenumgebung in der sich der Schaden befindet KU70/80 wieder vom Schaden verdrängt wird, um die Bruchenden einer Prozessierung zu unterziehen

(Riballo et al. 2004). In *Drosophila spec.* (Chiolo et al. 2011) hängt die Relokalisierung heterochromatischer DNA Schäden entscheidend von Resektionsfaktoren ab. In Einklang damit nennen eine Reihe von Studien die HR als exklusiven Reparaturweg heterochromatischer DNA Läsionen (Beucher et al. 2009, Chiolo et al. 2011, Jezkova et al. 2012). Eine kürzlich veröffentlichte Studie beschreibt, dass das Heterochromatin Protein HP1 die Wahl des Reparaturwegs zu Gunsten der HR beeinflusst (Lee et al. 2013). Die Anreicherung von HP1 im HC könnte folglich die HR in diesem Chromatinbereich fördern. Die HR gilt jedoch in Säugern als üblicherweise auf die S und G2 Phase beschränkt, da sich nur dann homologe Schwesterchromatiden finden (Qing et al. 2011). Im Gegensatz dazu kann für die HR in *Drosophila spec.* und in Hefe neben dem homologen Schwesterchromatid jedoch auch ein anderes Chromosom für eine interhomologe oder ektopische Rekombination als Homolog dienen (Ira et al. 2003, Keogh et al. 2006, Agmon et al. 2009, Miné-Hattab et al. 2012).

Es kann als gesichert gelten, dass die heterochromatischen DNA Schäden auch in G1 eine umfangreiche DNA Endprozessierung durchlaufen. Bei der heterochromatischen Reparatur muss es sich dennoch zumindest in G1 nicht notwendigerweise um HR handeln. Möglicherweise handelt es sich auch um einen alternativen *Endjoining* Prozess (review: Grabarz et al. 2012, Decottignies et al. 2013), der aufwendige Resektion braucht, wie z.B. das MMEJ. Wie schon 2011 von Chiolo et al. beschrieben unterscheidet sich die vermeintliche HR im Heterochromatin durch die räumliche Trennung der Prozessierung entscheidend von der HR, wie sie im Euchromatin abläuft. Möglicherweise handelt es sich dabei um einen eigenen *Endjoining* Prozess, der neben den Kernkomponenten des NHEJ (z.B. DNA Ligase IV, DNK-PK_{CS}) in G1 auch Kernkomponenten der HR (z.B. Rad51) in G2 braucht (Riballo et al. 2004, Shibata et al. 2011, review: Goodarzi et al. 2012). Zusammenfassend untermauern die hier vorgestellten Ergebnisse den Zusammenhang der heterochromatischen Reparatur in Säugerzellen mit ATM, ATR, DNA-PK und den Resektionsfaktoren.

5.7 Ausblick

Wie zuvor erläutert, kann diese Arbeit nicht abschließend beantworten, welcher Reparaturweg in den heterochromatischen Bereichen der Säugerzellen bevorzugt wird. Durch die hohe Dichte der DNA im Heterochromatin ist insbesondere nach Ionenbestrahlung von besonders dichten und dadurch auch besonders komplexen DNA Schäden und DSB Clustern auszugehen. Dadurch bedingt und durch die spezielle Chromatinstruktur ist die Reparatur heterochromatinassoziierter Schäden gegenüber der euchromatischen Reparatur verlangsamt (siehe Abschnitt 5.5).

Diese Verlangsamung der heterochromatischen Reparatur lässt sich nur teilweise durch die Chromatinkondensation und die Relokalisierung der Schäden erklären. Welche anderen Faktoren die heterochromatische Reparatur so dramatisch verlangsamen müssen zukünftige Experimente zeigen.

Nach Mikrosondenbestrahlung mit relativ niedrigem LET (beispielsweise C-Ionen) könnte man über die Relokalisierung hinaus auch die Reparaturmechanismen und -kinetiken der induzierten hetero-

chromatischen Schäden weitergehend untersuchen. Die Untersuchung entsprechender HR und NHEJ Mutanten könnte direkte Einblicke in den für das HC relevanten Reparaturweg geben. Eine interessante Fragestellung wäre es, ob es nach erfolgreicher Reparatur zu einem Rücktransport der DNA-Bereiche ins Innere der Chromocenter kommt. Dazu müssten die geschädigten Chromatinbereiche über die Reparatur hinaus beobachtet werden. Den für bestimmte Reparaturwege relevanten DNA Polymerasen könnten zu diesem Zweck fluoreszenzmarkierte Nukleotide angeboten werden. Die bei der Reparatur neu synthetisierten Bereiche ließen sich dann auch nach erfolgreicher Reparatur verfolgen.

Auch der Prozess der Relokalisierung selbst ist noch nicht vollständig verstanden. Die Bewegung ließ sich durch die Inhibition der PIK Kinasen ATM, ATR und DNA-PK zwar verzögern, jedoch nicht aufhalten. Abschnitt 5.6 beschreibt, dass die heterochromatische Reparatur von ioneninduzierten DNA Schäden mit der Resektion der DNA Enden assoziiert ist. Zu überprüfen wäre, ob sich die beteiligten Resektionsfaktoren auch auf die Relokalisierung der DNA Schäden auswirken.

Die in Abschnitt 5.4 beschriebene Dekondensation des Chromatins hängt möglicherweise direkt mit der Relokalisierung zusammen und könnte ihre Triebkraft sein. Laut Goodarzi et al. (2008) ist die strahlungsabhängige Dekondensation von ATM abhängig. In dieser Arbeit konnte kein Unterschied in der Ausdehnung der Dekondensation in Abhängigkeit von ATM oder KAP1 gefunden werden. Da die Dekondensation, wie hier gemessen, ein sehr schneller Prozess ist, konnte eine potentielle Verzögerung dieser in fixierten Proben möglicherweise nicht erfasst werden. Durch die technische Weiterentwicklung an der Mikrosonde gelang es allerdings die Dekondensation auch im lebenden System zu beobachten. Vergleichbare Folgeexperimente könnten mögliche Unterschiede in der Dekondensationskinetik in Abhängigkeit von ATM und anderen Faktoren aufdecken.

Darüber hinaus wäre es von Interesse zu ergründen, ob die Relokalisierungsbewegung essentiell für die Reparatur der heterochromatischen DNA Schäden ist und wenn ja, bis zu welchem Schritt die Reparatur im Inneren der CC abläuft. Um dies heraus zu finden müsste man jedoch zunächst in der Lage sein die Relokalisierung umfassend und zuverlässig zu inhibieren.

Es konnte gezeigt werden, dass die PIK Kinasen für die Relokalisierung von Bedeutung sind. Welches jedoch die für die Relokalisierung relevanten Phosphorylierungssubstrate dieser Kinasen sind, müssen zukünftige Experimente zeigen. KAP1 als ATM Substrat scheint nicht von grundlegender Bedeutung für die Relokalisierung zu sein. In Abschnitt 5.3 wird die BAF170 Untereinheit des SWI/SNF Chromatinremodeler Komplexes als potentiell entscheidendes Substrat vorgeschlagen. Diese These könnte durch zukünftige RNAi Experimente untersucht werden.

Die in dieser Arbeit beschriebene, konzertierte Relokalisierungsbewegung lässt auf eine Vernetzung der DNA Enden im Heterochromatin schließen. Eine Reihe der hier vorgestellten Faktoren wie MRE11, HP1 α und KU70/80 kommen für diese Aufgabe in Frage. Mit Hilfe von Chromatinimmunopräzipitationsexperimenten könnten diese Faktoren an andere Schadensmarker gekoppelt nachgewiesen werden bzw. neue Faktoren aufgedeckt werden, die zur Prozessierung der heterochromatischen DNA Schäden

notwendig sind. Um den Anteil der heterochromatischen Schäden in diesen Präzipitaten zu erhöhen, sollte ein Zeitpunkt nach Schadensinduktion gewählt werden, bei dem die Majorität der euchromatischen DNA Schäden bereits repariert ist. Da heterochromatische DNA Schäden langsamer repariert werden (siehe oben), reichern sich diese mit fortschreitender Reparaturzeit gegenüber den euchromatischen DNA Schäden an.

Die in Abschnitt 5.6 vorgestellte optische Auflösung der Reparaturfoci in Subfoci, wurde bisher nur an wenigen Beispielen erprobt. STED Mikroskopie ist noch eine recht junge Technik, die weiterentwickelt und ständig verbessert wird. Diese und andere hochauflösende Methoden (z.B. die Elektronenmikroskopie, siehe Lorat et al. 2012) könnten es in der Zukunft möglich machen, die innere Struktur der Reparaturfoci zu entschlüsseln und aufzudecken, ob es sich bei den hier gezeigten, ioneninduzierten IRIFs möglicherweise tatsächlich um den Zusammenschluss mehrerer DSBs in Reparaturzentren handelt.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse liefern wichtige neue Einblicke in die Reparatur heterochromatischer DNA Schäden. Der Zusammenhang der Relokalisierung dieser Schäden mit den PIK Kinasen sowie der Resektion wird in dieser Arbeit zum ersten Mal für Säugerzellen belegt. Der Prozess der Relokalisierung scheint ein essentieller und konservierter Mechanismus für die Erhaltung der genomischen Integrität zu sein.

6 Literaturverzeichnis

- Abbe, E. "Beitrage Zur Theorie Des Mikroskops Und Der Mikroskopischen Wahrnehmung." *Arch. Mikr. Anat.* 9, (1873): 413–420.
- Abbott, A. "Microscopic Marvels: The Glorious Resolution." *Nature* 459, no. 7247 (2009): 638-9.
- Agmon, N., S. Pur, B. Liefshitz and M. Kupiec. "Analysis of Repair Mechanism Choice During Homologous Recombination." *Nucleic Acids Res* 37, no. 15 (2009): 5081-92.
- Ahnesorg, P., P. Smith and S. P. Jackson. "Xlf Interacts with the Xrcc4-DNA Ligase Iv Complex to Promote DNA Nonhomologous End-Joining." *Cell* 124, no. 2 (2006): 301-13.
- Almouzni, G. and A. V. Probst. "Heterochromatin Maintenance and Establishment: Lessons from the Mouse Pericentromere." *Nucleus* 2, no. 5 (2011): 332-8.
- Asaithamby, A. and D. J. Chen. "Mechanism of Cluster DNA Damage Repair in Response to High-Atomic Number and Energy Particles Radiation." *Mutat Res* 711, no. 1-2 (2011): 87-99.
- Aten, J. A., J. Stap, P. M. Krawczyk, C. H. van Oven, R. A. Hoebe, J. Essers and R. Kanaar. "Dynamics of DNA Double-Strand Breaks Revealed by Clustering of Damaged Chromosome Domains." *Science* 303, no. 5654 (2004): 92-5.
- Averbeck, N. B.; Ringel, O.; Herrlitz, M.; Jakob, B.; Tobias, F.; Leifke, A.L.; Durante, M.; Taucher-Scholz, G. "DNA Double Strand Break Resection after Heavy Ion Irradiation." *GSI SCIENTIFIC REPORT* 2011, no. CANCER-05 (2011).
- Ayoub, N., A. D. Jeyasekharan and A. R. Venkitaraman. "Mobilization and Recruitment of Hp1: A Bimodal Response to DNA Breakage." *Cell Cycle* 8, no. 18 (2009): 2945-50.
- Bahassi, E. M., J. L. Ovesen, A. L. Riesenberger, W. Z. Bernstein, P. E. Hasty and P. J. Stambrook. "The Checkpoint Kinases Chk1 and Chk2 Regulate the Functional Associations between Hbrca2 and Rad51 in Response to DNA Damage." *Oncogene* 27, no. 28 (2008): 3977-85.
- Bakkenist, C. J. and M. B. Kastan. "DNA Damage Activates Atm through Intermolecular Autophosphorylation and Dimer Dissociation." *Nature* 421, no. 6922 (2003): 499-506.
- Baldeyron, C., G. Soria, D. Roche, A. J. Cook and G. Almouzni. "Hp1alpha Recruitment to DNA Damage by P150caf-1 Promotes Homologous Recombination Repair." *J Cell Biol* 193, no. 1 (2011): 81-95.
- Bancaud, A., S. Huet, N. Daigle, J. Mozziconacci, J. Beaudouin and J. Ellenberg. "Molecular Crowding Affects Diffusion and Binding of Nuclear Proteins in Heterochromatin and Reveals the Fractal Organization of Chromatin." *EMBO J* 28, no. 24 (2009): 3785-98.
- Barlow, J. H., M. Lisby and R. Rothstein. "Differential Regulation of the Cellular Response to DNA Double-Strand Breaks in G1." *Mol Cell* 30, no. 1 (2008): 73-85.
- Barton, O; Künzel, O.; Naumann, S.C.; Conrad, S.; Shibata, A.; Makharashvili, N. ; Biehs, R.; Steinlage, M.; Lopez, B.S.; Taucher-Scholz, G.; Paul, T.T.; Jeggo, P.A.; Löbrich, M. "Plk3 Regulates a Ctip-Dependent Non-Homologous End-Joining Process in G1." 2013.

-
- Batchelor, E., A. Loewer, C. Mock and G. Lahav. "Stimulus-Dependent Dynamics of P53 in Single Cells." *Mol Syst Biol* 7, (2011): 488.
- Bekker-Jensen, S., J. Rendtlew Danielsen, K. Fugger, I. Gromova, A. Nerstedt, C. Lukas, J. Bartek, J. Lukas and N. Mailand. "Herc2 Coordinates Ubiquitin-Dependent Assembly of DNA Repair Factors on Damaged Chromosomes." *Nat Cell Biol* 12, no. 1 (2010): 80-6; sup pp 1-12.
- Belmont, A. S. "Mitotic Chromosome Structure and Condensation." *Curr Opin Cell Biol* 18, no. 6 (2006): 632-8.
- Berkovich, E., R. J. Monnat, Jr. and M. B. Kastan. "Roles of Atm and Nbs1 in Chromatin Structure Modulation and DNA Double-Strand Break Repair." *Nat Cell Biol* 9, no. 6 (2007): 683-90.
- Beucher, A., J. Birraux, L. Tchouandong, O. Barton, A. Shibata, S. Conrad, A. A. Goodarzi, A. Krempler, P. A. Jeggo and M. Lobrich. "Atm and Artemis Promote Homologous Recombination of Radiation-Induced DNA Double-Strand Breaks in G2." *EMBO J* 28, no. 21 (2009): 3413-27.
- Bhatti, S., S. Kozlov, A. A. Farooqi, A. Naqi, M. Lavin and K. K. Khanna. "Atm Protein Kinase: The Linchpin of Cellular Defenses to Stress." *Cell Mol Life Sci* 68, no. 18 (2011): 2977-3006.
- Binz, S. K., A. M. Sheehan and M. S. Wold. "Replication Protein a Phosphorylation and the Cellular Response to DNA Damage." *DNA Repair (Amst)* 3, no. 8-9 (2004): 1015-24.
- Bolderson, E., K. I. Savage, R. Mahen, V. Pisupati, M. E. Graham, D. J. Richard, P. J. Robinson, A. R. Venkitaraman and K. K. Khanna. "Kruppel-Associated Box (Krab)-Associated Co-Repressor (Kap-1) Ser-473 Phosphorylation Regulates Heterochromatin Protein 1beta (Hp1-Beta) Mobilization and DNA Repair in Heterochromatin." *J Biol Chem* 287, no. 33 (2012): 28122-31.
- Bonner, W. M., C. E. Redon, J. S. Dickey, A. J. Nakamura, O. A. Sedelnikova, S. Solier and Y. Pommier. "GammaH2ax and Cancer." *Nat Rev Cancer* 8, no. 12 (2008): 957-67.
- Bothmer, A., D. F. Robbiani, M. Di Virgilio, S. F. Bunting, I. A. Klein, N. Feldhahn, J. Barlow, H. T. Chen, D. Bosque, E. Callen, A. Nussenzweig and M. C. Nussenzweig. "Regulation of DNA End Joining, Resection, and Immunoglobulin Class Switch Recombination by 53bp1." *Mol Cell* 42, no. 3 (2011): 319-29.
- Bothmer, A., D. F. Robbiani, N. Feldhahn, A. Gazumyan, A. Nussenzweig and M. C. Nussenzweig. "53bp1 Regulates DNA Resection and the Choice between Classical and Alternative End Joining During Class Switch Recombination." *J Exp Med* 207, no. 4 (2010): 855-65.
- Bradshaw, P. S., D. J. Stavropoulos and M. S. Meyn. "Human Telomeric Protein Trf2 Associates with Genomic Double-Strand Breaks as an Early Response to DNA Damage." *Nat Genet* 37, no. 2 (2005): 193-7.
- Brenner, D. J. and J. F. Ward. "Constraints on Energy Deposition and Target Size of Multiply Damaged Sites Associated with DNA Double-Strand Breaks." *Int J Radiat Biol* 61, no. 6 (1992): 737-48.
- Brown, E. J. and D. Baltimore. "Atr Disruption Leads to Chromosomal Fragmentation and Early Embryonic Lethality." *Genes Dev* 14, no. 4 (2000): 397-402.
- Brown, S. W. "Heterochromatin." *Science* 151, no. 3709 (1966): 417-25.

-
- Brunton, H., A. A. Goodarzi, A. T. Noon, A. Shrikhande, R. S. Hansen, P. A. Jeggo and A. Shibata. "Analysis of Human Syndromes with Disordered Chromatin Reveals the Impact of Heterochromatin on the Efficacy of Atm-Dependent G2/M Checkpoint Arrest." *Mol Cell Biol* 31, no. 19 (2011): 4022-35.
- Buis, J., T. Stoneham, E. Spehalski and D. O. Ferguson. "Mre11 Regulates Ctip-Dependent Double-Strand Break Repair by Interaction with Cdk2." *Nat Struct Mol Biol* 19, no. 2 (2012): 246-52.
- Bunting, S. F., E. Callen, N. Wong, H. T. Chen, F. Polato, A. Gunn, A. Bothmer, N. Feldhahn, O. Fernandez-Capetillo, L. Cao, X. Xu, C. X. Deng, T. Finkel, M. Nussenzweig, J. M. Stark and A. Nussenzweig. "53bp1 Inhibits Homologous Recombination in Brca1-Deficient Cells by Blocking Resection of DNA Breaks." *Cell* 141, no. 2 (2010): 243-54.
- Burma, S. and D. J. Chen. "Role of DNA-Pk in the Cellular Response to DNA Double-Strand Breaks." *DNA Repair (Amst)* 3, no. 8-9 (2004): 909-18.
- Cairns, B. R. "Chromatin Remodeling Complexes: Strength in Diversity, Precision through Specialization." *Curr Opin Genet Dev* 15, no. 2 (2005): 185-90.
- Campos, E. I. and D. Reinberg. "Histones: Annotating Chromatin." *Annu Rev Genet* 43, (2009): 559-99.
- Cann, K. L. and G. Dellaire. "Heterochromatin and the DNA Damage Response: The Need to Relax." *Biochem Cell Biol* 89, no. 1 (2011): 45-60.
- Cervelli, T., J. A. Palacios, L. Zentilin, M. Mano, R. A. Schwartz, M. D. Weitzman and M. Giacca. "Processing of Recombinant Aav Genomes Occurs in Specific Nuclear Structures That Overlap with Foci of DNA-Damage-Response Proteins." *J Cell Sci* 121, no. Pt 3 (2008): 349-57.
- Cescutti, R., S. Negrini, M. Kohzaki and T. D. Halazonetis. "Topbp1 Functions with 53bp1 in the G1 DNA Damage Checkpoint." *EMBO J* 29, no. 21 (2010): 3723-32.
- Chan, D. W., D. P. Gately, S. Urban, A. M. Galloway, S. P. Lees-Miller, T. Yen and J. Allalunis-Turner. "Lack of Correlation between Atm Protein Expression and Tumour Cell Radiosensitivity." *Int J Radiat Biol* 74, no. 2 (1998): 217-24.
- Chan, D. W. and S. P. Lees-Miller. "The DNA-Dependent Protein Kinase Is Inactivated by Autophosphorylation of the Catalytic Subunit." *J Biol Chem* 271, no. 15 (1996): 8936-41.
- Chanoux, R. A., B. Yin, K. A. Urtishak, A. Asare, C. H. Bassing and E. J. Brown. "Atr and H2ax Cooperate in Maintaining Genome Stability under Replication Stress." *J Biol Chem* 284, no. 9 (2009): 5994-6003.
- Chapman, J. R., A. J. Sossick, S. J. Boulton and S. P. Jackson. "Brca1-Associated Exclusion of 53bp1 from DNA Damage Sites Underlies Temporal Control of DNA Repair." *J Cell Sci* 125, no. Pt 15 (2012): 3529-34.
- Chapman, J. R., P. Barral, J. B. Vannier, V. Borel, M. Steger, A. Tomas-Loba, A. A. Sartori, I. R. Adams, F. D. Batista and S. J. Boulton. "Rif1 Is Essential for 53bp1-Dependent Nonhomologous End Joining and Suppression of DNA Double-Strand Break Resection." *Mol Cell*, (2013).

-
- Chen, B. P., N. Uematsu, J. Kobayashi, Y. Lerenthal, A. Krempler, H. Yajima, M. Lobrich, Y. Shiloh and D. J. Chen. "Ataxia Telangiectasia Mutated (Atm) Is Essential for DNA-Pkcs Phosphorylations at the Thr-2609 Cluster Upon DNA Double Strand Break." *J Biol Chem* 282, no. 9 (2007): 6582-7.
- Chiolo, I., A. Minoda, S. U. Colmenares, A. Polyzos, S. V. Costes and G. H. Karpen. "Double-Strand Breaks in Heterochromatin Move Outside of a Dynamic Hp1a Domain to Complete Recombinational Repair." *Cell* 144, no. 5 (2011): 732-44.
- Clapier, C. R. and B. R. Cairns. "The Biology of Chromatin Remodeling Complexes." *Annu Rev Biochem* 78, (2009): 273-304.
- Cortez, D., S. Guntuku, J. Qin and S. J. Elledge. "Atr and Atrip: Partners in Checkpoint Signaling." *Science* 294, no. 5547 (2001): 1713-6.
- Costes, S. V., A. Ponomarev, J. L. Chen, D. Nguyen, F. A. Cucinotta and M. H. Barcellos-Hoff. "Image-Based Modeling Reveals Dynamic Redistribution of DNA Damage into Nuclear Sub-Domains." *PLoS Comput Biol* 3, no. 8 (2007): e155.
- Cowell, I. G., N. J. Sunter, P. B. Singh, C. A. Austin, B. W. Durkacz and M. J. Tilby. "Gamma2ax Foci Form Preferentially in Euchromatin after Ionising-Radiation." *PLoS One* 2, no. 10 (2007): e1057.
- Cui, X., Y. Yu, S. Gupta, Y. M. Cho, S. P. Lees-Miller and K. Meek. "Autophosphorylation of DNA-Dependent Protein Kinase Regulates DNA End Processing and May Also Alter Double-Strand Break Repair Pathway Choice." *Mol Cell Biol* 25, no. 24 (2005): 10842-52.
- Danielsen, J. R., L. K. Povlsen, B. H. Villumsen, W. Streicher, J. Nilsson, M. Wikstrom, S. Bekker-Jensen and N. Mailand. "DNA Damage-Inducible Sumoylation of Herc2 Promotes Rnf8 Binding Via a Novel Sumo-Binding Zinc Finger." *J Cell Biol* 197, no. 2 (2012): 179-87.
- Davies, S. L., P. S. North, A. Dart, N. D. Lakin and I. D. Hickson. "Phosphorylation of the Bloom's Syndrome Helicase and Its Role in Recovery from S-Phase Arrest." *Mol Cell Biol* 24, no. 3 (2004): 1279-91.
- Davis, A. J., K. J. Lee and D. J. Chen. "The Amino-Terminal Region of the DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit (DNA-Pkcs) Is Required for Its DNA Double-Strand Break-Mediated Activation." *J Biol Chem*, (2013).
- Deckbar, D., J. Birraux, A. Krempler, L. Tchouandong, A. Beucher, S. Walker, T. Stiff, P. Jeggo and M. Lobrich. "Chromosome Breakage after G2 Checkpoint Release." *J Cell Biol* 176, no. 6 (2007): 749-55.
- Decottignies, A. "Alternative End-Joining Mechanisms: A Historical Perspective." *Front Genet* 4, (2013): 48.
- Dellaire, G., R. Kepkey and D. P. Bazett-Jones. "High Resolution Imaging of Changes in the Structure and Spatial Organization of Chromatin, Gamma-H2a.X and the Mrn Complex within Etoposide-Induced DNA Repair Foci." *Cell Cycle* 8, no. 22 (2009): 3750-69.
- Di Virgilio, M., E. Callen, A. Yamane, W. Zhang, M. Jankovic, A. D. Gitlin, N. Feldhahn, W. Resch, T. Y. Oliveira, B. T. Chait, A. Nussenzweig, R. Casellas, D. F. Robbiani and M. C. Nussenzweig. "Rif1 Prevents Resection of DNA Breaks and Promotes Immunoglobulin Class Switching." *Science* 339, no. 6120 (2013): 711-5.

-
- Dianov, G. L. and J. L. Parsons. "Co-Ordination of DNA Single Strand Break Repair." *DNA Repair (Amst)* 6, no. 4 (2007): 454-60.
- Diderich, K., M. Alanazi and J. H. Hoeijmakers. "Premature Aging and Cancer in Nucleotide Excision Repair-Disorders." *DNA Repair (Amst)* 10, no. 7 (2011): 772-80.
- Dimitrova, N., Y. C. Chen, D. L. Spector and T. de Lange. "53bp1 Promotes Non-Homologous End Joining of Telomeres by Increasing Chromatin Mobility." *Nature* 456, no. 7221 (2008): 524-8.
- Dion, V. and S. M. Gasser. "Chromatin Movement in the Maintenance of Genome Stability." *Cell* 152, no. 6 (2013): 1355-64.
- Doetsch, P. W. and R. P. Cunningham. "The Enzymology of Apurinic/Apyrimidinic Endonucleases." *Mutat Res* 236, no. 2-3 (1990): 173-201.
- Doil, C., N. Mailand, S. Bekker-Jensen, P. Menard, D. H. Larsen, R. Pepperkok, J. Ellenberg, S. Panier, D. Durocher, J. Bartek, J. Lukas and C. Lukas. "Rnf168 Binds and Amplifies Ubiquitin Conjugates on Damaged Chromosomes to Allow Accumulation of Repair Proteins." *Cell* 136, no. 3 (2009): 435-46.
- Falk, M., E. Lukasova, B. Gabrielova, V. Ondrej and S. Kozubek. "Chromatin Dynamics During Dsb Repair." *Biochim Biophys Acta* 1773, no. 10 (2007): 1534-45.
- Falk, M., E. Lukasova, L. Stefancikova, E. Baranova, I. Falkova, L. Jezkova, M. Davidkova, A. Bacikova, J. Vachelova, A. Michaelidesova and S. Kozubek. "Heterochromatinization Associated with Cell Differentiation as a Model to Study DNA Double Strand Break Induction and Repair in the Context of Higher-Order Chromatin Structure." *Appl Radiat Isot*, (2013).
- Feng, L., K. W. Fong, J. Wang, W. Wang and J. Chen. "Rif1 Counteracts Brca1-Mediated End Resection During DNA Repair." *J Biol Chem*, (2013).
- Fischer, B. E., M. Heiß and M. Cholewa. "About the Art to Shoot with Single Ions." *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 210, (2003): 285-291.
- Fortini, P. and E. Dogliotti. "Base Damage and Single-Strand Break Repair: Mechanisms and Functional Significance of Short- and Long-Patch Repair Subpathways." *DNA Repair (Amst)* 6, no. 4 (2007): 398-409.
- Garcia, V., S. E. Phelps, S. Gray and M. J. Neale. "Bidirectional Resection of DNA Double-Strand Breaks by Mre11 and Exo1." *Nature* 479, no. 7372 (2011): 241-4.
- Goodarzi, A. A. and P. A. Jeggo. "The Heterochromatic Barrier to DNA Double Strand Break Repair: How to Get the Entry Visa." *Int J Mol Sci* 13, no. 9 (2012): 11844-60.
- Goodarzi, A. A., P. Jeggo and M. Lobrich. "The Influence of Heterochromatin on DNA Double Strand Break Repair: Getting the Strong, Silent Type to Relax." *DNA Repair (Amst)* 9, no. 12 (2010): 1273-82.
- Goodarzi, A. A., T. Kurka and P. A. Jeggo. "Kap-1 Phosphorylation Regulates Chd3 Nucleosome Remodeling During the DNA Double-Strand Break Response." *Nat Struct Mol Biol* 18, no. 7 (2011): 831-9.

-
- Goodarzi, A. A., A. T. Noon, D. Deckbar, Y. Ziv, Y. Shiloh, M. Lobrich and P. A. Jeggo. "Atm Signaling Facilitates Repair of DNA Double-Strand Breaks Associated with Heterochromatin." *Mol Cell* 31, no. 2 (2008): 167-77.
- Goodhead, D. T. "Initial Events in the Cellular Effects of Ionizing Radiations: Clustered Damage in DNA." *Int J Radiat Biol* 65, no. 1 (1994): 7-17.
- Goodhead, D. T., J. Thacker and R. Cox. "Weiss Lecture. Effects of Radiations of Different Qualities on Cells: Molecular Mechanisms of Damage and Repair." *Int J Radiat Biol* 63, no. 5 (1993): 543-56.
- Grabarz, A., A. Barascu, J. Guirouilh-Barbat and B. S. Lopez. "Initiation of DNA Double Strand Break Repair: Signaling and Single-Stranded Resection Dictate the Choice between Homologous Recombination, Non-Homologous End-Joining and Alternative End-Joining." *Am J Cancer Res* 2, no. 3 (2012): 249-68.
- Grawunder, U., D. Zimmer, S. Fugmann, K. Schwarz and M. R. Lieber. "DNA Ligase Iv Is Essential for V(D)J Recombination and DNA Double-Strand Break Repair in Human Precursor Lymphocytes." *Mol Cell* 2, no. 4 (1998): 477-84.
- Hall, E.J.; Giaccia, A.J. *Radiobiology for the Radiologist*: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
- Happel, N. and D. Doenecke. "Histone H1 and Its Isoforms: Contribution to Chromatin Structure and Function." *Gene* 431, no. 1-2 (2009): 1-12.
- Hargreaves, D. C. and G. R. Crabtree. "Atp-Dependent Chromatin Remodeling: Genetics, Genomics and Mechanisms." *Cell Res* 21, no. 3 (2011): 396-420.
- Hayes, J. J. and A. P. Wolffe. "Preferential and Asymmetric Interaction of Linker Histones with 5s DNA in the Nucleosome." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, no. 14 (1993): 6415-9.
- Hegde, M. L., T. K. Hazra and S. Mitra. "Early Steps in the DNA Base Excision/Single-Strand Interruption Repair Pathway in Mammalian Cells." *Cell Res* 18, no. 1 (2008): 27-47.
- Heiss, M., B. E. Fischer, B. Jakob, C. Fournier, G. Becker and G. Taucher-Scholz. "Targeted Irradiation of Mammalian Cells Using a Heavy-Ion Microprobe." *Radiat Res* 165, no. 2 (2006): 231-9.
- Heitz, E. "Das Heterochromatin Der Moose." *Jahrbücher für Wissenschaftliche Botanik* 69, (1928): 762-818.
- Hell, S. W. "Toward Fluorescence Nanoscopy." *Nature Biotechnol.* 21, (2003): 1347-1355.
- Hell, S. W., M. Dyba and S. Jakobs. "Concepts for Nanoscale Resolution in Fluorescence Microscopy." *Curr Opin Neurobiol* 14, no. 5 (2004): 599-609.
- Hell, S. W.; Wichmann, J. "Fluoreszenzmikroskopie Ohne Beugungsgrenze." *BIOspektrum* 12. Jahrgang, (2006).
- Hickson, I., Y. Zhao, C. J. Richardson, S. J. Green, N. M. Martin, A. I. Orr, P. M. Reaper, S. P. Jackson, N. J. Curtin and G. C. Smith. "Identification and Characterization of a Novel and Specific Inhibitor of the Ataxia-Telangiectasia Mutated Kinase Atm." *Cancer Res* 64, no. 24 (2004): 9152-9.

-
- Hihara, S., C. G. Pack, K. Kaizu, T. Tani, T. Hanafusa, T. Nozaki, S. Takemoto, T. Yoshimi, H. Yokota, N. Imamoto, Y. Sako, M. Kinjo, K. Takahashi, T. Nagai and K. Maeshima. "Local Nucleosome Dynamics Facilitate Chromatin Accessibility in Living Mammalian Cells." *Cell Rep* 2, no. 6 (2012): 1645-56.
- Hill, R. and P. W. Lee. "The DNA-Dependent Protein Kinase (DNA-Pk): More Than Just a Case of Making Ends Meet?" *Cell Cycle* 9, no. 17 (2010): 3460-9.
- Hinz, J. M., N. A. Yamada, E. P. Salazar, R. S. Tebbs and L. H. Thompson. "Influence of Double-Strand-Break Repair Pathways on Radiosensitivity Throughout the Cell Cycle in Cho Cells." *DNA Repair (Amst)* 4, no. 7 (2005): 782-92.
- Hitomi, K., S. Iwai and J. A. Tainer. "The Intricate Structural Chemistry of Base Excision Repair Machinery: Implications for DNA Damage Recognition, Removal, and Repair." *DNA Repair (Amst)* 6, no. 4 (2007): 410-28.
- Holthausen, J. T., C. Wyman and R. Kanaar. "Regulation of DNA Strand Exchange in Homologous Recombination." *DNA Repair (Amst)* 9, no. 12 (2010): 1264-72.
- Honda, S., Z. A. Lewis, K. Shimada, W. Fischle, R. Sack and E. U. Selker. "Heterochromatin Protein 1 Forms Distinct Complexes to Direct Histone Deacetylation and DNA Methylation." *Nat Struct Mol Biol* 19, no. 5 (2012): 471-7, S1.
- Hopfner, K. P., L. Craig, G. Moncalian, R. A. Zinkel, T. Usui, B. A. Owen, A. Karcher, B. Henderson, J. L. Bodmer, C. T. McMurray, J. P. Carney, J. H. Petrini and J. A. Tainer. "The Rad50 Zinc-Hook Is a Structure Joining Mre11 Complexes in DNA Recombination and Repair." *Nature* 418, no. 6897 (2002): 562-6.
- Hu, C., S. Zhang, X. Gao, X. Gao, X. Xu, Y. Lv, Y. Zhang, Z. Zhu, C. Zhang, Q. Li, J. Wong, Y. Cui, W. Zhang, L. Ma and C. Wang. "Roles of Kruppel-Associated Box (Krab)-Associated Co-Repressor Kap1 Ser-473 Phosphorylation in DNA Damage Response." *J Biol Chem* 287, no. 23 (2012): 18937-52.
- Huen, M. S., R. Grant, I. Manke, K. Minn, X. Yu, M. B. Yaffe and J. Chen. "Rnf8 Transduces the DNA-Damage Signal Via Histone Ubiquitylation and Checkpoint Protein Assembly." *Cell* 131, no. 5 (2007): 901-14.
- Huyen, Y., O. Zgheib, R. A. Ditullio, Jr., V. G. Gorgoulis, P. Zacharatos, T. J. Petty, E. A. Sheston, H. S. Mellert, E. S. Stavridi and T. D. Halazonetis. "Methylated Lysine 79 of Histone H3 Targets 53bp1 to DNA Double-Strand Breaks." *Nature* 432, no. 7015 (2004): 406-11.
- Iacovoni, J. S., P. Caron, I. Lassadi, E. Nicolas, L. Massip, D. Trouche and G. Legube. "High-Resolution Profiling of Gammah2ax around DNA Double Strand Breaks in the Mammalian Genome." *EMBO J* 29, no. 8 (2010): 1446-57.
- Iijima, K., M. Ohara, R. Seki and H. Tauchi. "Dancing on Damaged Chromatin: Functions of Atm and the Rad50/Mre11/Nbs1 Complex in Cellular Responses to DNA Damage." *J Radiat Res* 49, no. 5 (2008): 451-64.
- Ira, G. and P. J. Hastings. "DNA Breakage Drives Nuclear Search." *Nat Cell Biol* 14, no. 5 (2012): 448-50.

-
- Ira, G., A. Malkova, G. Liberi, M. Foiani and J. E. Haber. "Srs2 and Sgs1-Top3 Suppress Crossovers During Double-Strand Break Repair in Yeast." *Cell* 115, no. 4 (2003): 401-11.
- Jackson, S. P. "Sensing and Repairing DNA Double-Strand Breaks." *Carcinogenesis* 23, no. 5 (2002): 687-96.
- Jakob, B. and M. Durante. "Radiation Dose Detection by Imaging Response in Biological Targets." *Radiat Res* 177, no. 4 (2012): 524-32.
- Jakob, B., J. H. Rudolph, N. Gueven, M. F. Lavin and G. Taucher-Scholz. "Live Cell Imaging of Heavy-Ion-Induced Radiation Responses by Beamline Microscopy." *Radiat Res* 163, no. 6 (2005): 681-90.
- Jakob, B., M. Scholz and G. Taucher-Scholz. "Biological Imaging of Heavy Charged-Particle Tracks." *Radiat Res* 159, no. 5 (2003): 676-84.
- Jakob, B., J. Splinter, S. Conrad, K. O. Voss, D. Zink, M. Durante, M. Loblrich and G. Taucher-Scholz. "DNA Double-Strand Breaks in Heterochromatin Elicit Fast Repair Protein Recruitment, Histone H2ax Phosphorylation and Relocation to Euchromatin." *Nucleic Acids Res* 39, no. 15 (2011): 6489-99.
- Jakob, B., J. Splinter, M. Durante and G. Taucher-Scholz. "Live Cell Microscopy Analysis of Radiation-Induced DNA Double-Strand Break Motion." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, no. 9 (2009): 3172-7.
- Jakob, B., J. Splinter and G. Taucher-Scholz. "Positional Stability of Damaged Chromatin Domains Along Radiation Tracks in Mammalian Cells." *Radiat Res* 171, no. 4 (2009): 405-18.
- Jaunin, F., A. E. Visser, D. Cmarko, J. A. Aten and S. Fakan. "Fine Structural in Situ Analysis of Nascent DNA Movement Following DNA Replication." *Exp Cell Res* 260, no. 2 (2000): 313-23.
- Jeggo, P. A. and M. Loblrich. "Contribution of DNA Repair and Cell Cycle Checkpoint Arrest to the Maintenance of Genomic Stability." *DNA Repair (Amst)* 5, no. 9-10 (2006): 1192-8.
- Jezkova, L., M. Falk, I. Falkova, M. Davidkova, A. Bacikova, L. Stefancikova, J. Vachelova, A. Michalidesova, E. Lukasova, A. Boreyko, E. Krasavin and S. Kozubek. "Function of Chromatin Structure and Dynamics in DNA Damage, Repair and Misrepair: Gamma-Rays and Protons in Action." *Appl Radiat Isot*, (2013).
- Jiang, X., Y. Xu and B. D. Price. "Acetylation of H2ax on Lysine 36 Plays a Key Role in the DNA Double-Strand Break Repair Pathway." *FEBS Lett* 584, no. 13 (2010): 2926-30.
- Kaufmann, G.W.; Moser, E.; Sauer, R. *Radiologie*: Urban & Fischer Verlag, München, 2001.
- Keogh, M. C., J. A. Kim, M. Downey, J. Fillingham, D. Chowdhury, J. C. Harrison, M. Onishi, N. Datta, S. Galicia, A. Emili, J. Lieberman, X. Shen, S. Buratowski, J. E. Haber, D. Durocher, J. F. Greenblatt and N. J. Krogan. "A Phosphatase Complex That Dephosphorylates Gammah2ax Regulates DNA Damage Checkpoint Recovery." *Nature* 439, no. 7075 (2006): 497-501.
- Khanna, K. K. and S. P. Jackson. "DNA Double-Strand Breaks: Signaling, Repair and the Cancer Connection." *Nat Genet* 27, no. 3 (2001): 247-54.
- Kim, C., R. O. Snyder and M. S. Wold. "Binding Properties of Replication Protein a from Human and Yeast Cells." *Mol Cell Biol* 12, no. 7 (1992): 3050-9.

-
- Kim, J. A., M. Kruhlak, F. Dotiwala, A. Nussenzweig and J. E. Haber. "Heterochromatin Is Refractory to Gamma-H2ax Modification in Yeast and Mammals." *J Cell Biol* 178, no. 2 (2007): 209-18.
- Kinner, A., W. Wu, C. Staudt and G. Iliakis. "Gamma-H2ax in Recognition and Signaling of DNA Double-Strand Breaks in the Context of Chromatin." *Nucleic Acids Res* 36, no. 17 (2008): 5678-94.
- Kousholt, A. N., K. Fugger, S. Hoffmann, B. D. Larsen, T. Menzel, A. A. Sartori and C. S. Sorensen. "Ctip-Dependent DNA Resection Is Required for DNA Damage Checkpoint Maintenance but Not Initiation." *J Cell Biol* 197, no. 7 (2012): 869-76.
- Kouzarides, T. "Chromatin Modifications and Their Function." *Cell* 128, no. 4 (2007): 693-705.
- Kraft, G. *Tumorthherapie Mit Schweren Ionen.: Verein zur Förderung der Tumorthherapie mit schweren Ionen e.V*, 2008.
- Krawczyk, P. M., T. Borovski, J. Stap, T. Cijssouw, R. ten Cate, J. P. Medema, R. Kanaar, N. A. Franken and J. A. Aten. "Chromatin Mobility Is Increased at Sites of DNA Double-Strand Breaks." *J Cell Sci* 125, no. Pt 9 (2012): 2127-33.
- Krokan, H. E., F. Drablos and G. Slupphaug. "Uracil in DNA--Occurrence, Consequences and Repair." *Oncogene* 21, no. 58 (2002): 8935-48.
- Kruhlak, M. J., A. Celeste, G. Dellaire, O. Fernandez-Capetillo, W. G. Muller, J. G. McNally, D. P. Bazett-Jones and A. Nussenzweig. "Changes in Chromatin Structure and Mobility in Living Cells at Sites of DNA Double-Strand Breaks." *J Cell Biol* 172, no. 6 (2006): 823-34.
- Kumagai, A., J. Lee, H. Y. Yoo and W. G. Dunphy. "Topbp1 Activates the Atr-Atrip Complex." *Cell* 124, no. 5 (2006): 943-55.
- Lammens, K., D. J. Bemeleit, C. Mockel, E. Clausing, A. Schele, S. Hartung, C. B. Schiller, M. Lucas, C. Angermuller, J. Soding, K. Strasser and K. P. Hopfner. "The Mre11:Rad50 Structure Shows an Atp-Dependent Molecular Clamp in DNA Double-Strand Break Repair." *Cell* 145, no. 1 (2011): 54-66.
- Langerak, P., E. Mejia-Ramirez, O. Limbo and P. Russell. "Release of Ku and Mrn from DNA Ends by Mre11 Nuclease Activity and Ctp1 Is Required for Homologous Recombination Repair of Double-Strand Breaks." *PLoS Genet* 7, no. 9 (2011): e1002271.
- Lavin, M. F. "Atm and the Mre11 Complex Combine to Recognize and Signal DNA Double-Strand Breaks." *Oncogene* 26, no. 56 (2007): 7749-58.
- Lechner, M. S., G. E. Begg, D. W. Speicher and F. J. Rauscher, 3rd. "Molecular Determinants for Targeting Heterochromatin Protein 1-Mediated Gene Silencing: Direct Chromoshadow Domain-Kap-1 Co-repressor Interaction Is Essential." *Mol Cell Biol* 20, no. 17 (2000): 6449-65.
- Lee, J. H., M. R. Mand, R. Deshpande, E. Kinoshita, S. H. Yang, C. Wyman and T. T. Paull. "Atm Kinase Activity Is Regulated by Atp-Driven Conformational Changes in the Mrn Complex." *J Biol Chem*, (2013).
- Lee, J. H. and T. T. Paull. "Atm Activation by DNA Double-Strand Breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex." *Science* 308, no. 5721 (2005): 551-4.

-
- Lee, S. E., J. K. Moore, A. Holmes, K. Umez, R. D. Kolodner and J. E. Haber. "Saccharomyces Ku70, Mre11/Rad50 and Rpa Proteins Regulate Adaptation to G2/M Arrest after DNA Damage." *Cell* 94, no. 3 (1998): 399-409.
- Lee, Y. H., C. Y. Kuo, J. M. Stark, H. M. Shih and D. K. Ann. "Hp1 Promotes Tumor Suppressor Brca1 Functions During the DNA Damage Response." *Nucleic Acids Res*, (2013).
- Li, X. and W. D. Heyer. "Homologous Recombination in DNA Repair and DNA Damage Tolerance." *Cell Res* 18, no. 1 (2008): 99-113.
- Li, X., Y. K. Lee, J. C. Jeng, Y. Yen, D. C. Schultz, H. M. Shih and D. K. Ann. "Role for Kap1 Serine 824 Phosphorylation and Sumoylation/Desumoylation Switch in Regulating Kap1-Mediated Transcriptional Repression." *J Biol Chem* 282, no. 50 (2007): 36177-89.
- Liang, F., P. J. Romanienko, D. T. Weaver, P. A. Jeggo and M. Jasin. "Chromosomal Double-Strand Break Repair in Ku80-Deficient Cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, no. 17 (1996): 8929-33.
- Liao, S., C. Guay, T. Toczylowski and H. Yan. "Analysis of Mre11's Function in the 5'→3' Processing of DNA Double-Strand Breaks." *Nucleic Acids Res* 40, no. 10 (2012): 4496-506.
- Lisby, M., U. H. Mortensen and R. Rothstein. "Colocalization of Multiple DNA Double-Strand Breaks at a Single Rad52 Repair Centre." *Nat Cell Biol* 5, no. 6 (2003): 572-7.
- Lobachev, K., E. Vitriol, J. Stemple, M. A. Resnick and K. Bloom. "Chromosome Fragmentation after Induction of a Double-Strand Break Is an Active Process Prevented by the Rmx Repair Complex." *Curr Biol* 14, no. 23 (2004): 2107-12.
- Lorat, Y., S. Schanz, N. Schuler, G. Wennemuth, C. Rube and C. E. Rube. "Beyond Repair Foci: DNA Double-Strand Break Repair in Euchromatic and Heterochromatic Compartments Analyzed by Transmission Electron Microscopy." *PLoS One* 7, no. 5 (2012): e38165.
- Lotterberger, F., A. Bothmer, D. F. Robbiani, M. C. Nussenzweig and T. de Lange. "Role of 53bp1 Oligomerization in Regulating Double-Strand Break Repair." *Proc Natl Acad Sci U S A*, (2013).
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent." *J Biol Chem* 193, no. 1 (1951): 265-75.
- Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent and T. J. Richmond. "Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 2.8 Å Resolution." *Nature* 389, no. 6648 (1997): 251-60.
- Luijsterburg, M. S., C. Dinant, H. Lans, J. Stap, E. Wiernasz, S. Lagerwerf, D. O. Warmerdam, M. Lindh, M. C. Brink, J. W. Dobrucki, J. A. Aten, M. I. Fouteri, G. Jansen, N. P. Dantuma, W. Vermeulen, L. H. Mullenders, A. B. Houtsmuller, P. J. Verschure and R. van Driel. "Heterochromatin Protein 1 Is Recruited to Various Types of DNA Damage." *J Cell Biol* 185, no. 4 (2009): 577-86.
- Luijsterburg, M. S., K. Acs, L. Ackermann, W. W. Wiegant, S. Bekker-Jensen, D. H. Larsen, K. K. Khanna, H. van Attikum, N. Mailand and N. P. Dantuma. "A New Non-Catalytic Role for Ubiquitin Ligase Rnf8 in Unfolding Higher-Order Chromatin Structure." *EMBO J* 31, no. 11 (2012): 2511-27.

Lukas, C., V. Savic, S. Bekker-Jensen, C. Doil, B. Neumann, R. S. Pedersen, M. Grofte, K. L. Chan, I. D. Hickson, J. Bartek and J. Lukas. "53bp1 Nuclear Bodies Form around DNA Lesions Generated by Mitotic Transmission of Chromosomes under Replication Stress." *Nat Cell Biol* 13, no. 3 (2011): 243-53.

Lukas, J. and C. Lukas. "Molecular Biology. Shielding Broken DNA for a Quick Fix." *Science* 339, no. 6120 (2013): 652-3.

Ma, Y., U. Pannicke, K. Schwarz and M. R. Lieber. "Hairpin Opening and Overhang Processing by an Artemis/DNA-Dependent Protein Kinase Complex in Nonhomologous End Joining and V(D)J Recombination." *Cell* 108, no. 6 (2002): 781-94.

Mailand, N., S. Bekker-Jensen, H. Faustrup, F. Melander, J. Bartek, C. Lukas and J. Lukas. "Rnf8 Ubiquitylates Histones at DNA Double-Strand Breaks and Promotes Assembly of Repair Proteins." *Cell* 131, no. 5 (2007): 887-900.

Maira, S. M., F. Stauffer, J. Brueggen, P. Furet, C. Schnell, C. Fritsch, S. Brachmann, P. Chene, A. De Pover, K. Schoemaker, D. Fabbro, D. Gabriel, M. Simonen, L. Murphy, P. Finan, W. Sellers and C. Garcia-Echeverria. "Identification and Characterization of Nvp-Bez235, a New Orally Available Dual Phosphatidylinositol 3-Kinase/Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor with Potent in Vivo Antitumor Activity." *Mol Cancer Ther* 7, no. 7 (2008): 1851-63.

Mallete, F. A., F. Mattioli, G. Cui, L. C. Young, M. J. Hendzel, G. Mer, T. K. Sixma and S. Richard. "Rnf8- and Rnf168-Dependent Degradation of Kdm4a/Jmjd2a Triggers 53bp1 Recruitment to DNA Damage Sites." *EMBO J* 31, no. 8 (2012): 1865-78.

Matsumoto, Y. and K. Kim. "Excision of Deoxyribose Phosphate Residues by DNA Polymerase Beta During DNA Repair." *Science* 269, no. 5224 (1995): 699-702.

Matsuoka, S., G. Rotman, A. Ogawa, Y. Shiloh, K. Tamai and S. J. Elledge. "Ataxia Telangiectasia-Mutated Phosphorylates Chk2 in Vivo and in Vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, no. 19 (2000): 10389-94.

McBryant, S. J., V. H. Adams and J. C. Hansen. "Chromatin Architectural Proteins." *Chromosome Res* 14, no. 1 (2006): 39-51.

Meek, K., V. Dang and S. P. Lees-Miller. "DNA-Pk: The Means to Justify the Ends?" *Adv Immunol* 99, (2008): 33-58.

Merk, B.; Voss, K.-O.; Müller, I.; Fischer, B.E.; Jakob, B.; Taucher-Scholz, G.; Trautmann, C.; Durante, M. "An Attempt to See Chromatin Structure Change after Heavy Ion Irradiation at the Gsi Microbeam " *GSI SCIENTIFIC REPORT* 2011, no. CANCER-04 (2011).

Merk, B.; Voss, K.-O.; Müller, I.; Fischer, B.E.; Jakob, B.; Taucher-Scholz, G.; Trautmann, C.; Durante, M. "Photobleaching Setup for the Biological End-Station of the Darmstadt Heavy-Ion Microprobe." *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, (2013).

Merkle, D., P. Douglas, G. B. Moorhead, Z. Leonenko, Y. Yu, D. Cramb, D. P. Bazett-Jones and S. P. Lees-Miller. "The DNA-Dependent Protein Kinase Interacts with DNA to Form a Protein-DNA Complex That Is Disrupted by Phosphorylation." *Biochemistry* 41, no. 42 (2002): 12706-14.

-
- Meyer, Barbara. "Kernweite H2ax-Phosphorylierung Nach Schwerionenbestrahlung." TUD Darmstadt, 2011.
- Mimitou, E. P. and L. S. Symington. "Nucleases and Helicases Take Center Stage in Homologous Recombination." *Trends Biochem Sci* 34, no. 5 (2009): 264-72.
- Minc, E., J. C. Courvalin and B. Buendia. "Hp1gamma Associates with Euchromatin and Heterochromatin in Mammalian Nuclei and Chromosomes." *Cytogenet Cell Genet* 90, no. 3-4 (2000): 279-84.
- Mine-Hattab, J. and R. Rothstein. "Increased Chromosome Mobility Facilitates Homology Search During Recombination." *Nat Cell Biol* 14, no. 5 (2012): 510-7.
- Misteli, T. and E. Soutoglou. "The Emerging Role of Nuclear Architecture in DNA Repair and Genome Maintenance." *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, no. 4 (2009): 243-54.
- Morgan, S. E. and M. B. Kastan. "Dissociation of Radiation-Induced Phosphorylation of Replication Protein a from the S-Phase Checkpoint." *Cancer Res* 57, no. 16 (1997): 3386-9.
- Moyal, L., Y. Lerenthal, M. Gana-Weisz, G. Mass, S. So, S. Y. Wang, B. Eppink, Y. M. Chung, G. Shalev, E. Shema, D. Shkedy, N. I. Smorodinsky, N. van Vliet, B. Kuster, M. Mann, A. Ciechanover, J. Dahm-Daphi, R. Kanaar, M. C. Hu, D. J. Chen, M. Oren and Y. Shiloh. "Requirement of Atm-Dependent Monoubiquitylation of Histone H2b for Timely Repair of DNA Double-Strand Breaks." *Mol Cell* 41, no. 5 (2011): 529-42.
- Müller, I.; Merk, B.; Voss, K.-O.; Aeverbeck, N.; Jakob, B.; Durante, M.; Taucher-Scholz, G. "Species Conserved DNA Damage Response at the Inactive Human X Chromosome." *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, (2013).
- Munro, T. R. "The Relative Radiosensitivity of the Nucleus and Cytoplasm of Chinese Hamster Fibroblasts." *Radiat Res* 42, no. 3 (1970): 451-70.
- Murray, J. M., T. Stiff and P. A. Jeggo. "DNA Double-Strand Break Repair within Heterochromatic Regions." *Biochem Soc Trans* 40, no. 1 (2012): 173-8.
- Murr, R., J. I. Loizou, Y. G. Yang, C. Cuenin, H. Li, Z. Q. Wang and Z. Herceg. "Histone Acetylation by Trp-Tip60 Modulates Loading of Repair Proteins and Repair of DNA Double-Strand Breaks." *Nat Cell Biol* 8, no. 1 (2006): 91-9.
- Nagaria, P., C. Robert and F. V. Rassool. "DNA Double-Strand Break Response in Stem Cells: Mechanisms to Maintain Genomic Integrity." *Biochim Biophys Acta* 1830, no. 2 (2013): 2345-53.
- Nakai, W., J. Westmoreland, E. Yeh, K. Bloom and M. A. Resnick. "Chromosome Integrity at a Double-Strand Break Requires Exonuclease 1 and Mrx." *DNA Repair (Amst)* 10, no. 1 (2011): 102-10.
- Nakamura, A. J., V. A. Rao, Y. Pommier and W. M. Bonner. "The Complexity of Phosphorylated H2ax Foci Formation and DNA Repair Assembly at DNA Double-Strand Breaks." *Cell Cycle* 9, no. 2 (2010): 389-97.
- Nakamura, K., T. Kogame, H. Oshiumi, A. Shinohara, Y. Sumitomo, K. Agama, Y. Pommier, K. M. Tsutsui, K. Tsutsui, E. Hartsuiker, T. Ogi, S. Takeda and Y. Taniguchi. "Collaborative Action of Brca1 and

Ctip in Elimination of Covalent Modifications from Double-Strand Breaks to Facilitate Subsequent Break Repair." *PLoS Genet* 6, no. 1 (2010): e1000828.

Neal, J. A. and K. Meek. "Choosing the Right Path: Does DNA-Pk Help Make the Decision?" *Mutat Res* 711, no. 1-2 (2011): 73-86.

Nelms, B. E., R. S. Maser, J. F. MacKay, M. G. Lagally and J. H. Petrini. "In Situ Visualization of DNA Double-Strand Break Repair in Human Fibroblasts." *Science* 280, no. 5363 (1998): 590-2.

Neumaier, T., J. Swenson, C. Pham, A. Polyzos, A. T. Lo, P. Yang, J. Dyball, A. Asaithamby, D. J. Chen, M. J. Bissell, S. Thalhammer and S. V. Costes. "Evidence for Formation of DNA Repair Centers and Dose-Response Nonlinearity in Human Cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, no. 2 (2012): 443-8.

Nielsen, A. L., M. Oulad-Abdelghani, J. A. Ortiz, E. Remboutsika, P. Chambon and R. Losson. "Heterochromatin Formation in Mammalian Cells: Interaction between Histones and Hp1 Proteins." *Mol Cell* 7, no. 4 (2001): 729-39.

Nikjoo, H., S. Uehara, W. E. Wilson, M. Hoshi and D. T. Goodhead. "Track Structure in Radiation Biology: Theory and Applications." *Int J Radiat Biol* 73, no. 4 (1998): 355-64.

Noon, A. T. and A. A. Goodarzi. "53bp1-Mediated DNA Double Strand Break Repair: Insert Bad Pun Here." *DNA Repair (Amst)* 10, no. 10 (2011): 1071-6.

Noon, A. T., A. Shibata, N. Rief, M. Lobrich, G. S. Stewart, P. A. Jeggo and A. A. Goodarzi. "53bp1-Dependent Robust Localized Kap-1 Phosphorylation Is Essential for Heterochromatic DNA Double-Strand Break Repair." *Nat Cell Biol* 12, no. 2 (2010): 177-84.

O'Driscoll, M., V. L. Ruiz-Perez, C. G. Woods, P. A. Jeggo and J. A. Goodship. "A Splicing Mutation Affecting Expression of Ataxia-Telangiectasia and Rad3-Related Protein (Atr) Results in Seckel Syndrome." *Nat Genet* 33, no. 4 (2003): 497-501.

Olins, A. L. and D. E. Olins. "Spheroid Chromatin Units (V Bodies)." *Science* 183, no. 4122 (1974): 330-2.

Panier, S. and D. Durocher. "Regulatory Ubiquitylation in Response to DNA Double-Strand Breaks." *DNA Repair (Amst)* 8, no. 4 (2009): 436-43.

Paull, T. T. and M. Gellert. "The 3' to 5' Exonuclease Activity of Mre 11 Facilitates Repair of DNA Double-Strand Breaks." *Mol Cell* 1, no. 7 (1998): 969-79.

Pearson, C. E., K. Nichol Edamura and J. D. Cleary. "Repeat Instability: Mechanisms of Dynamic Mutations." *Nat Rev Genet* 6, no. 10 (2005): 729-42.

Peddi, P., C. W. Loftin, J. S. Dickey, J. M. Hair, K. J. Burns, K. Aziz, D. C. Francisco, M. I. Panayiotidis, O. A. Sedelnikova, W. M. Bonner, T. A. Winters and A. G. Georgakilas. "DNA-Pkcs Deficiency Leads to Persistence of Oxidatively Induced Clustered DNA Lesions in Human Tumor Cells." *Free Radic Biol Med* 48, no. 10 (2010): 1435-43.

Pellegrini, L., D. S. Yu, T. Lo, S. Anand, M. Lee, T. L. Blundell and A. R. Venkitaraman. "Insights into DNA Recombination from the Structure of a Rad51-Brca2 Complex." *Nature* 420, no. 6913 (2002): 287-93.

-
- Peng, J. C. and G. H. Karpen. "Epigenetic Regulation of Heterochromatic DNA Stability." *Curr Opin Genet Dev* 18, no. 2 (2008): 204-11.
- Peng, J. C. and G. H. Karpen. "Heterochromatic Genome Stability Requires Regulators of Histone H3 K9 Methylation." *PLoS Genet* 5, no. 3 (2009): e1000435.
- Peng, Y., R. G. Woods, H. Beamish, R. Ye, S. P. Lees-Miller, M. F. Lavin and J. S. Bedford. "Deficiency in the Catalytic Subunit of DNA-Dependent Protein Kinase Causes Down-Regulation of Atm." *Cancer Res* 65, no. 5 (2005): 1670-7.
- Peterson, S. E., Y. Li, F. Wu-Baer, B. T. Chait, R. Baer, H. Yan, M. E. Gottesman and J. Gautier. "Activation of Dsb Processing Requires Phosphorylation of CtIP by Atr." *Mol Cell*, (2012).
- Pichierri, P., F. Rosselli and A. Franchitto. "Werner's Syndrome Protein Is Phosphorylated in an Atr/Atm-Dependent Manner Following Replication Arrest and DNA Damage Induced During the S Phase of the Cell Cycle." *Oncogene* 22, no. 10 (2003): 1491-500.
- Postow, L., C. Ghenoiu, E. M. Woo, A. N. Krutchinsky, B. T. Chait and H. Funabiki. "Ku80 Removal from DNA through Double Strand Break-Induced Ubiquitylation." *J Cell Biol* 182, no. 3 (2008): 467-79.
- Poulsen, M., C. Lukas, J. Lukas, S. Bekker-Jensen and N. Mailand. "Human Rnf169 Is a Negative Regulator of the Ubiquitin-Dependent Response to DNA Double-Strand Breaks." *J Cell Biol* 197, no. 2 (2012): 189-99.
- Prasad, R., W. A. Beard, P. R. Strauss and S. H. Wilson. "Human DNA Polymerase Beta Deoxyribose Phosphate Lyase. Substrate Specificity and Catalytic Mechanism." *J Biol Chem* 273, no. 24 (1998): 15263-70.
- Price, B. D. and A. D. D'Andrea. "Chromatin Remodeling at DNA Double-Strand Breaks." *Cell* 152, no. 6 (2013): 1344-54.
- Probst, A. V., E. Dunleavy and G. Almouzni. "Epigenetic Inheritance During the Cell Cycle." *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, no. 3 (2009): 192-206.
- Qing, Y., M. Yamazoe, K. Hirota, D. Dejsuphong, W. Sakai, K. N. Yamamoto, D. K. Bishop, X. Wu and S. Takeda. "The Epistatic Relationship between Brca2 and the Other Rad51 Mediators in Homologous Recombination." *PLoS Genet* 7, no. 7 (2011): e1002148.
- Quivy, J. P., D. Roche, D. Kirschner, H. Tagami, Y. Nakatani and G. Almouzni. "A Caf-1 Dependent Pool of Hp1 During Heterochromatin Duplication." *EMBO J* 23, no. 17 (2004): 3516-26.
- Riballo, E., M. Kuhne, N. Rief, A. Doherty, G. C. Smith, M. J. Recio, C. Reis, K. Dahm, A. Fricke, A. Krempler, A. R. Parker, S. P. Jackson, A. Gennery, P. A. Jeggo and M. Lobrich. "A Pathway of Double-Strand Break Rejoining Dependent Upon Atm, Artemis, and Proteins Locating to Gamma-H2ax Foci." *Mol Cell* 16, no. 5 (2004): 715-24.
- Rice, P. A. "Holding Damaged DNA Together." *Nat Struct Biol* 6, no. 9 (1999): 805-6.

-
- Richart, A. N., C. I. Brunner, K. Stott, N. V. Murzina and J. O. Thomas. "Characterization of Chromoshadow Domain-Mediated Binding of Heterochromatin Protein 1alpha (Hp1alpha) to Histone H3." *J Biol Chem* 287, no. 22 (2012): 18730-7.
- Rogakou, E. P., C. Boon, C. Redon and W. M. Bonner. "Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-Strand Breaks in Vivo." *J Cell Biol* 146, no. 5 (1999): 905-16.
- Rogakou, E. P., D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova and W. M. Bonner. "DNA Double-Stranded Breaks Induce Histone H2ax Phosphorylation on Serine 139." *J Biol Chem* 273, no. 10 (1998): 5858-68.
- Rothkamm, K., I. Kruger, L. H. Thompson and M. Lobrich. "Pathways of DNA Double-Strand Break Repair During the Mammalian Cell Cycle." *Mol Cell Biol* 23, no. 16 (2003): 5706-15.
- Rothkamm, K. and S. Horn. "Gamma-H2ax as Protein Biomarker for Radiation Exposure." *Ann Ist Super Sanita* 45, no. 3 (2009): 265-71.
- San Filippo, J., P. Sung and H. Klein. "Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination." *Annu Rev Biochem* 77, (2008): 229-57.
- Sanz-Garcia, M., D. M. Monsalve, A. Sevilla and P. A. Lazo. "Vaccinia-Related Kinase 1 (Vrk1) Is an Upstream Nucleosomal Kinase Required for the Assembly of 53bp1 Foci in Response to Ionizing Radiation-Induced DNA Damage." *J Biol Chem* 287, no. 28 (2012): 23757-68.
- Sartori, A. A., C. Lukas, J. Coates, M. Mistrik, S. Fu, J. Bartek, R. Baer, J. Lukas and S. P. Jackson. "Human CtIP Promotes DNA End Resection." *Nature* 450, no. 7169 (2007): 509-14.
- Savic, V., B. Yin, N. L. Maas, A. L. Bredemeyer, A. C. Carpenter, B. A. Helmink, K. S. Yang-Iott, B. P. Sleckman and C. H. Bassing. "Formation of Dynamic Gamma-H2ax Domains Along Broken DNA Strands Is Distinctly Regulated by Atm and Mdc1 and Dependent Upon H2ax Densities in Chromatin." *Mol Cell* 34, no. 3 (2009): 298-310.
- Scholz, M. "Effects of Ion Radiation on Cells and Tissues." In *Radiation Effects on Polymers for Biological Use*: Springer, 2003.
- Schultz, D. C., K. Ayyanathan, D. Negorev, G. G. Maul and F. J. Rauscher, 3rd. "Setdb1: A Novel Kap-1-Associated Histone H3, Lysine 9-Specific Methyltransferase That Contributes to Hp1-Mediated Silencing of Euchromatic Genes by Krab Zinc-Finger Proteins." *Genes Dev* 16, no. 8 (2002): 919-32.
- Schultz, D. C., J. R. Friedman and F. J. Rauscher, 3rd. "Targeting Histone Deacetylase Complexes Via Krab-Zinc Finger Proteins: The Phd and Bromodomains of Kap-1 Form a Cooperative Unit That Recruits a Novel Isoform of the Mi-2alpha Subunit of Nurd." *Genes Dev* 15, no. 4 (2001): 428-43.
- Schuster-Bockler, B. and B. Lehner. "Chromatin Organization Is a Major Influence on Regional Mutation Rates in Human Cancer Cells." *Nature* 488, no. 7412 (2012): 504-7.
- Seiler, D. M., J. Rouquette, V. J. Schmid, H. Strickfaden, C. Ottmann, G. A. Drexler, B. Mazurek, C. Greubel, V. Hable, G. Dollinger, T. Cremer and A. A. Friedl. "Double-Strand Break-Induced Transcriptional Silencing Is Associated with Loss of Tri-Methylation at H3k4." *Chromosome Res* 19, no. 7 (2011): 883-99.

-
- Shahar, O. D., E. V. Raghuram, E. Shimshoni, S. Hareli, E. Meshorer and M. Goldberg. "Live Imaging of Induced and Controlled DNA Double-Strand Break Formation Reveals Extremely Low Repair by Homologous Recombination in Human Cells." *Oncogene* 31, no. 30 (2012): 3495-504.
- Shao, Z., A. J. Davis, K. R. Fattah, S. So, J. Sun, K. J. Lee, L. Harrison, J. Yang and D. J. Chen. "Persistently Bound Ku at DNA Ends Attenuates DNA End Resection and Homologous Recombination." *DNA Repair (Amst)* 11, no. 3 (2012): 310-6.
- Shibata, A., S. Conrad, J. Birraux, V. Geuting, O. Barton, A. Ismail, A. Kakarougkas, K. Meek, G. Taucher-Scholz, M. Lobrich and P. A. Jeggo. "Factors Determining DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice in G2 Phase." *EMBO J* 30, no. 6 (2011): 1079-92.
- Shiloh, Y. "Atm and Related Protein Kinases: Safeguarding Genome Integrity." *Nat Rev Cancer* 3, no. 3 (2003): 155-68.
- Shiotani, B. and L. Zou. "Single-Stranded DNA Orchestrates an Atm-to-Atr Switch at DNA Breaks." *Mol Cell* 33, no. 5 (2009): 547-58.
- Shrivastav, M., C. A. Miller, L. P. De Haro, S. T. Durant, B. P. Chen, D. J. Chen and J. A. Nickoloff. "DNA-Pkcs and Atm Co-Regulate DNA Double-Strand Break Repair." *DNA Repair (Amst)* 8, no. 8 (2009): 920-9.
- Shroff, R., A. Arbel-Eden, D. Pilch, G. Ira, W. M. Bonner, J. H. Petrini, J. E. Haber and M. Lichten. "Distribution and Dynamics of Chromatin Modification Induced by a Defined DNA Double-Strand Break." *Curr Biol* 14, no. 19 (2004): 1703-11.
- Solier, S. and Y. Pommier. "The Apoptotic Ring: A Novel Entity with Phosphorylated Histones H2ax and H2b and Activated DNA Damage Response Kinases." *Cell Cycle* 8, no. 12 (2009): 1853-9.
- Solimando, L., M. S. Luijsterburg, L. Vecchio, W. Vermeulen, R. van Driel and S. Fakan. "Spatial Organization of Nucleotide Excision Repair Proteins after Uv-Induced DNA Damage in the Human Cell Nucleus." *J Cell Sci* 122, no. Pt 1 (2009): 83-91.
- Soria, G. and G. Almouzni. "Differential Contribution of Hp1 Proteins to DNA End Resection and Homology-Directed Repair." *Cell Cycle* 12, no. 3 (2012).
- Soria, G., S. E. Polo and G. Almouzni. "Prime, Repair, Restore: The Active Role of Chromatin in the DNA Damage Response." *Mol Cell* 46, no. 6 (2012): 722-34.
- Soutoglou, E., J. F. Dorn, K. Sengupta, M. Jasin, A. Nussenzweig, T. Ried, G. Danuser and T. Misteli. "Positional Stability of Single Double-Strand Breaks in Mammalian Cells." *Nat Cell Biol* 9, no. 6 (2007): 675-82.
- Splinter, J., B. Jakob, M. Lang, K. Yano, J. Engelhardt, S. W. Hell, D. J. Chen, M. Durante and G. Taucher-Scholz. "Biological Dose Estimation of Uva Laser Microirradiation Utilizing Charged Particle-Induced Protein Foci." *Mutagenesis* 25, no. 3 (2010): 289-97.
- Sripathy, S. P., J. Stevens and D. C. Schultz. "The Kap1 Corepressor Functions to Coordinate the Assembly of De Novo Hp1-Demarcated Microenvironments of Heterochromatin Required for Krab Zinc Finger Protein-Mediated Transcriptional Repression." *Mol Cell Biol* 26, no. 22 (2006): 8623-38.

-
- Stewart, G. S., S. Panier, K. Townsend, A. K. Al-Hakim, N. K. Kolas, E. S. Miller, S. Nakada, J. Ylanko, S. Olivarius, M. Mendez, C. Oldreive, J. Wildenhain, A. Tagliaferro, L. Pelletier, N. Taubenheim, A. Durandy, P. J. Byrd, T. Stankovic, A. M. Taylor and D. Durocher. "The Riddle Syndrome Protein Mediates a Ubiquitin-Dependent Signaling Cascade at Sites of DNA Damage." *Cell* 136, no. 3 (2009): 420-34.
- Stiff, T., M. O'Driscoll, N. Rief, K. Iwabuchi, M. Lobrich and P. A. Jeggo. "Atm and DNA-Pk Function Redundantly to Phosphorylate H2ax after Exposure to Ionizing Radiation." *Cancer Res* 64, no. 7 (2004): 2390-6.
- Strande, N., S. A. Roberts, S. Oh, E. A. Hendrickson and D. A. Ramsden. "Specificity of the Drp/Ap Lyase of Ku Promotes Nonhomologous End Joining (Nhej) Fidelity at Damaged Ends." *J Biol Chem* 287, no. 17 (2012): 13686-93.
- Sun, J., K. J. Lee, A. J. Davis and D. J. Chen. "Human Ku70/80 Protein Blocks Exonuclease 1-Mediated DNA Resection in the Presence of Human Mre11 or Mre11/Rad50 Protein Complex." *J Biol Chem* 287, no. 7 (2012): 4936-45.
- Sun, Y., X. Jiang, S. Chen, N. Fernandes and B. D. Price. "A Role for the Tip60 Histone Acetyltransferase in the Acetylation and Activation of Atm." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, no. 37 (2005): 13182-7.
- Sun, Y., Y. Xu, K. Roy and B. D. Price. "DNA Damage-Induced Acetylation of Lysine 3016 of Atm Activates Atm Kinase Activity." *Mol Cell Biol* 27, no. 24 (2007): 8502-9.
- Takagi, M., D. Delia, L. Chessa, S. Iwata, T. Shigeta, Y. Kanke, K. Goi, M. Asada, M. Eguchi, C. Kodama and S. Mizutani. "Defective Control of Apoptosis, Radiosensitivity, and Spindle Checkpoint in Ataxia Telangiectasia." *Cancer Res* 58, no. 21 (1998): 4923-9.
- Tauchi, H., J. Kobayashi, K. Morishima, D. C. van Gent, T. Shiraishi, N. S. Verkaik, D. vanHeems, E. Ito, A. Nakamura, E. Sonoda, M. Takata, S. Takeda, S. Matsuura and K. Komatsu. "Nbs1 Is Essential for DNA Repair by Homologous Recombination in Higher Vertebrate Cells." *Nature* 420, no. 6911 (2002): 93-8.
- Thorslund, T. and S. C. West. "Brca2: A Universal Recombinase Regulator." *Oncogene* 26, no. 56 (2007): 7720-30.
- Tibbetts, R. S., D. Cortez, K. M. Brumbaugh, R. Scully, D. Livingston, S. J. Elledge and R. T. Abraham. "Functional Interactions between Brca1 and the Checkpoint Kinase Atr During Genotoxic Stress." *Genes Dev* 14, no. 23 (2000): 2989-3002.
- Tobias, F., M. Durante, G. Taucher-Scholz and B. Jakob. "Spatiotemporal Analysis of DNA Repair Using Charged Particle Radiation." *Mutat Res* 704, no. 1-3 (2010): 54-60.
- Toledo, L. I., M. Murga, R. Zur, R. Soria, A. Rodriguez, S. Martinez, J. Oyarzabal, J. Pastor, J. R. Bischoff and O. Fernandez-Capetillo. "A Cell-Based Screen Identifies Atr Inhibitors with Synthetic Lethal Properties for Cancer-Associated Mutations." *Nat Struct Mol Biol* 18, no. 6 (2011): 721-7.
- Tomimatsu, N., B. Mukherjee and S. Burma. "Distinct Roles of Atr and DNA-Pkcs in Triggering DNA Damage Responses in Atm-Deficient Cells." *EMBO Rep* 10, no. 6 (2009): 629-35.

-
- Torres-Rosell, J., I. Sunjevaric, G. De Piccoli, M. Sacher, N. Eckert-Boulet, R. Reid, S. Jentsch, R. Rothstein, L. Aragon and M. Lisby. "The Smc5-Smc6 Complex and Sumo Modification of Rad52 Regulates Recombinational Repair at the Ribosomal Gene Locus." *Nat Cell Biol* 9, no. 8 (2007): 923-31.
- Trojer, P. and D. Reinberg. "Facultative Heterochromatin: Is There a Distinctive Molecular Signature?" *Mol Cell* 28, no. 1 (2007): 1-13.
- Trujillo, K. M., S. S. Yuan, E. Y. Lee and P. Sung. "Nuclease Activities in a Complex of Human Recombination and DNA Repair Factors Rad50, Mre11, and P95." *J Biol Chem* 273, no. 34 (1998): 21447-50.
- Tsukuda, T., A. B. Fleming, J. A. Nickoloff and M. A. Osley. "Chromatin Remodelling at a DNA Double-Strand Break Site in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Nature* 438, no. 7066 (2005): 379-83.
- Uematsu, N., E. Weterings, K. Yano, K. Morotomi-Yano, B. Jakob, G. Taucher-Scholz, P. O. Mari, D. C. van Gent, B. P. Chen and D. J. Chen. "Autophosphorylation of DNA-Pkcs Regulates Its Dynamics at DNA Double-Strand Breaks." *J Cell Biol* 177, no. 2 (2007): 219-29.
- van der Burg, M., J. J. van Dongen and D. C. van Gent. "DNA-Pkcs Deficiency in Human: Long Predicted, Finally Found." *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 9, no. 6 (2009): 503-9.
- Veuger, S. J., N. J. Curtin, C. J. Richardson, G. C. Smith and B. W. Durkacz. "Radiosensitization and DNA Repair Inhibition by the Combined Use of Novel Inhibitors of DNA-Dependent Protein Kinase and Poly(Adp-Ribose) Polymerase-1." *Cancer Res* 63, no. 18 (2003): 6008-15.
- Vo, Q. N., W. J. Kim, L. Cvitanovic, D. A. Boudreau, D. G. Ginzinger and K. D. Brown. "The Atm Gene Is a Target for Epigenetic Silencing in Locally Advanced Breast Cancer." *Oncogene* 23, no. 58 (2004): 9432-7.
- Vorechovsky, I., L. Luo, A. Lindblom, M. Negrini, A. D. Webster, C. M. Croce and L. Hammarstrom. "Atm Mutations in Cancer Families." *Cancer Res* 56, no. 18 (1996): 4130-3.
- Voss, K.-O.; Merk, B.; Fischer, B.; Jakob, B.; Tobias, F.; Taucher-Scholz, G. "First Sub-Micron Targeting with Single Ions." *GSI SCIENTIFIC REPORT 2010*, (2010).
- Voss, K.-O.; Merk, B.; Fischer, B.; Jakob, B.; Tobias, F.; Taucher-Scholz, G. "First Sub-Micron Targeting with Single Ions." *GSI SCIENTIFIC REPORT 2010*, no. HEALTH-44 (2011).
- Wang, H., H. Wang, S. N. Powell, G. Iliakis and Y. Wang. "Atr Affecting Cell Radiosensitivity Is Dependent on Homologous Recombination Repair but Independent of Nonhomologous End Joining." *Cancer Res* 64, no. 19 (2004): 7139-43.
- Wang, H., X. Wang, P. Zhang and Y. Wang. "The Ku-Dependent Non-Homologous End-Joining but Not Other Repair Pathway Is Inhibited by High Linear Energy Transfer Ionizing Radiation." *DNA Repair (Amst)* 7, no. 5 (2008): 725-33.
- Wang, H., Z. Shao, L. Z. Shi, P. Y. Hwang, L. N. Truong, M. W. Berns, D. J. Chen and X. Wu. "Ctip Protein Dimerization Is Critical for Its Recruitment to Chromosomal DNA Double-Stranded Breaks." *J Biol Chem* 287, no. 25 (2012): 21471-80.
- Ward, I. M. and J. Chen. "Histone H2ax Is Phosphorylated in an Atr-Dependent Manner in Response to Replicational Stress." *J Biol Chem* 276, no. 51 (2001): 47759-62.

-
- Ward, J. F. "Radiation-Induced Strand Breakage in DNA." *Basic Life Sci* 5B, (1975): 471-2.
- Ward, J. F. "DNA Damage Produced by Ionizing Radiation in Mammalian Cells: Identities, Mechanisms of Formation, and Reparability." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 35, (1988): 95-125.
- Ward, J. F. "The Complexity of DNA Damage: Relevance to Biological Consequences." *Int J Radiat Biol* 66, no. 5 (1994): 427-32.
- Ward, J. F. "Radiation Mutagenesis: The Initial DNA Lesions Responsible." *Radiat Res* 142, no. 3 (1995): 362-8.
- Watanabe, K., K. Iwabuchi, J. Sun, Y. Tsuji, T. Tani, K. Tokunaga, T. Date, M. Hashimoto, M. Yamai-zumi and S. Tateishi. "Rad18 Promotes DNA Double-Strand Break Repair During G1 Phase through Chromatin Retention of 53bp1." *Nucleic Acids Res* 37, no. 7 (2009): 2176-93.
- Westmoreland, J. W. and M. A. Resnick. "Coincident Resection at Both Ends of Random, Gamma-Induced Double-Strand Breaks Requires Mrx (Mrn), Sae2 (Ctp1), and Mre11-Nuclease." *PLoS Genet* 9, no. 3 (2013): e1003420.
- Westphal, V. "Dynamic Far-Field Fluorescence Nanoscopy." *New Journal of Physics* 9, (2007).
- Westphal, V. and S. W. Hell. "Nanoscale Resolution in the Focal Plane of an Optical Microscope." *Phys Rev Lett* 94, no. 14 (2005): 143903.
- Weterings, E. and D. J. Chen. "The Endless Tale of Non-Homologous End-Joining." *Cell Res* 18, no. 1 (2008): 114-24.
- White, D. E., D. Negorev, H. Peng, A. V. Ivanov, G. G. Maul and F. J. Rauscher, 3rd. "Kap1, a Novel Substrate for Pikk Family Members, Colocalizes with Numerous Damage Response Factors at DNA Lesions." *Cancer Res* 66, no. 24 (2006): 11594-9.
- White, D., I. U. Rafalska-Metcalf, A. V. Ivanov, A. Corsinotti, H. Peng, S. C. Lee, D. Trono, S. M. Janicki and F. J. Rauscher, 3rd. "The Atm Substrate Kap1 Controls DNA Repair in Heterochromatin: Regulation by Hp1 Proteins and Serine 473/824 Phosphorylation." *Mol Cancer Res* 10, no. 3 (2012): 401-14.
- Whitehouse, C. J., R. M. Taylor, A. Thistlethwaite, H. Zhang, F. Karimi-Busheri, D. D. Lasko, M. Wein-feld and K. W. Caldecott. "Xrcc1 Stimulates Human Polynucleotide Kinase Activity at Damaged DNA Termini and Accelerates DNA Single-Strand Break Repair." *Cell* 104, no. 1 (2001): 107-17.
- Williams, E. S., J. Stap, J. Essers, B. Ponnaiya, M. S. Luijsterburg, P. M. Krawczyk, R. L. Ullrich, J. A. Aten and S. M. Bailey. "DNA Double-Strand Breaks Are Not Sufficient to Initiate Recruitment of Trf2." *Nat Genet* 39, no. 6 (2007): 696-8; author reply 698-9.
- Williams, G. J., S. P. Lees-Miller and J. A. Tainer. "Mre11-Rad50-Nbs1 Conformations and the Control of Sensing, Signaling, and Effector Responses at DNA Double-Strand Breaks." *DNA Repair (Amst)* 9, no. 12 (2010): 1299-306.
- Woodbine, L., H. Brunton, A. A. Goodarzi, A. Shibata and P. A. Jeggo. "Endogenously Induced DNA Double Strand Breaks Arise in Heterochromatic DNA Regions and Require Ataxia Telangiectasia Mutated and Artemis for Their Repair." *Nucleic Acids Res* 39, no. 16 (2011): 6986-97.

-
- Woodcock, C. L., J. P. Safer and J. E. Stanchfield. "Structural Repeating Units in Chromatin. I. Evidence for Their General Occurrence." *Exp Cell Res* 97, (1976): 101-10.
- Wright, J. A., K. S. Keegan, D. R. Herendeen, N. J. Bentley, A. M. Carr, M. F. Hoekstra and P. Concannon. "Protein Kinase Mutants of Human Atr Increase Sensitivity to Uv and Ionizing Radiation and Abrogate Cell Cycle Checkpoint Control." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, no. 13 (1998): 7445-50.
- Wu, C., A. Bassett and A. Travers. "A Variable Topology for the 30-Nm Chromatin Fibre." *EMBO Rep* 8, no. 12 (2007): 1129-34.
- Xu, Y. and B. D. Price. "Chromatin Dynamics and the Repair of DNA Double Strand Breaks." *Cell Cycle* 10, no. 2 (2011): 261-7.
- Yin, B., V. Savic, M. M. Juntilla, A. L. Bredemeyer, K. S. Yang-Iott, B. A. Helmink, G. A. Koretzky, B. P. Sleckman and C. H. Bassing. "Histone H2ax Stabilizes Broken DNA Strands to Suppress Chromosome Breaks and Translocations During V(D)J Recombination." *J Exp Med* 206, no. 12 (2009): 2625-39.
- You, Z., L. Z. Shi, Q. Zhu, P. Wu, Y. W. Zhang, A. Basilio, N. Tonnu, I. M. Verma, M. W. Berns and T. Hunter. "Ctip Links DNA Double-Strand Break Sensing to Resection." *Mol Cell* 36, no. 6 (2009): 954-69.
- Yun, M. H. and K. Hiom. "Ctip-Brca1 Modulates the Choice of DNA Double-Strand-Break Repair Pathway Throughout the Cell Cycle." *Nature* 459, no. 7245 (2009): 460-3.
- Zhang, Y., M. L. Hefferin, L. Chen, E. Y. Shim, H. M. Tseng, Y. Kwon, P. Sung, S. E. Lee and A. E. Tomkinson. "Role of Dnl4-Lif1 in Nonhomologous End-Joining Repair Complex Assembly and Suppression of Homologous Recombination." *Nat Struct Mol Biol* 14, no. 7 (2007): 639-46.
- Zimmermann, M., F. Lotterberger, S. B. Buonomo, A. Sfeir and T. de Lange. "53bp1 Regulates Dsb Repair Using Rif1 to Control 5' End Resection." *Science* 339, no. 6120 (2013): 700-4.
- Ziv, Y., D. Bielopolski, Y. Galanty, C. Lukas, Y. Taya, D. C. Schultz, J. Lukas, S. Bekker-Jensen, J. Bartek and Y. Shiloh. "Chromatin Relaxation in Response to DNA Double-Strand Breaks Is Modulated by a Novel Atm- and Kap-1 Dependent Pathway." *Nat Cell Biol* 8, no. 8 (2006): 870-6.
- Zou, L. and S. J. Elledge. "Sensing DNA Damage through Atrip Recognition of Rpa-Ssdna Complexes." *Science* 300, no. 5625 (2003): 1542-8.

7 Anhang

7.1 Veröffentlichungen

M. Beuke, Iris Müller, B. Jakob, J. Splinter, K.-O. Voss, B. Merk, G. Becker, M. Durante, G. Taucher-Scholz (2010). DNA lesions within the heterochromatin elicit fast damage response and are relocated to euchromatic regions. GSI Scientific Report 2010.

M. Beuke, Iris Müller, B. Jakob, K.-O. Voss, B. Merk, G. Becker, M. Durante, G. Taucher-Scholz (2011). Relocation of heterochromatic DNA lesions to euchromatin is ATM-dependent. GSI Scientific Report 2011.

M. Beuke, B. Jakob, T. Staudt, J. Engelhardt, G. Becker, M. Durante, G. Taucher-Scholz. STED Microscopy of DNA Damage Markers. GSI Scientific Report 2012.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden als Tagungsbeiträge präsentiert:

M. Beuke, I. Müller, B. Jakob, M. Durante und G. Taucher-Scholz (2010)
„Untersuchung der Chromatinstruktur an Ionen-bestrahlten Chromocentern“
Posterpräsentation, 13. Jahrestagung der GBS, Hamburg

M. Beuke, I. Müller, B. Jakob, M. Durante und G. Taucher-Scholz (2011)
„Umlagerung heterochromatischer DSBs in euchromatische Chromatinbereiche in Säugerzellen“
Vortrag, 14. Jahrestagung der GBS, Köln

M. Beuke, I. Müller, B. Jakob, M. Durante und G. Taucher-Scholz (2012)
„Relocation of heterochromatic DNA lesions to euchromatin is ATM-dependent“
Vortrag, 15. Jahrestagung der GBS bzw. 12. Tagung der DGDR, München

7.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Marcus Beuke
Geburtsdatum	08.09.1984
Geburtsort	Eisenach

Universitäre Ausbildung

Seit 02/2010	Promotion an der Technischen Universität Darmstadt, Fachbereich Biologie, durchgeführt am GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung in der Abteilung Biophysik
04/2009 – 11/2009	Diplomarbeit an der Technischen Universität Darmstadt, Fachbereich Biologie, in der Abteilung der Strahlenbiologie
10/2004 – 11/2009	Studium der Biologie an der Technischen Universität, Abschluss: Diplom

Schulbildung

1995 – 2004	Werratschule Heringen, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1991 – 1995	Grundschule Wölfershausen

7.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Marco Durante für die Möglichkeit, meine Arbeit in der Abteilung der Biophysik der GSI durchführen zu können und für seine Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Markus Löbrich danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für die Begeisterung, die er in mir für dieses Forschungsfeld geweckt hat.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Gisela Taucher-Scholz für die umfassende Betreuung, die unermüdliche Diskussionsbereitschaft, die neuen Ideen und die kritische Auseinandersetzung mit meiner Arbeit bedanken.

Ganz besonders danke ich meinem Mentor Herrn Dr. Burkhard Jakob für die hervorragende Betreuung, die Unterstützung und Förderung meiner Arbeit, die Denkanstöße, sein Vertrauen, die unermüdliche Korrektur dieser Arbeit und nicht zuletzt für die sehr herzliche Zusammenarbeit.

Bei Dr. Kay-Obbe Voss und Bruno Merk bedanke ich mich sehr für die technische Unterstützung und unermüdliche Hilfe bei der Mikrosondenbestrahlung. Ohne sie wäre die hochpräzise Ionenbestrahlung nicht möglich gewesen.

Ebenso danke ich Dr. Thorsten Staudt, Pit Bingen und Dr. Jasmin Zahn vom BioQuant der Universität Heidelberg für die technische Unterstützung bei der hochauflösenden Mikroskopie.

Gudrun Becker, Anna Lena Leifke und allen anderen Mitgliedern dieser Arbeitsgruppe danke ich für die hervorragende Organisation des Labors, ihre technische Hilfe und Unterstützung bei den Bestrahlungsmarathons und die gute Zusammenarbeit.

Auch möchte ich mich bei Rayees Khan, Wolfgang Becher, Günter Lenz und Thomas Friedrich, sowie allen weiteren Mitgliedern der Biophysik Abteilung für die technische Unterstützung bei UNILAC und SIS Strahlzeiten bedanken.

Schließlich gilt mein großer Dank meiner Familie, meinen Freunden und ganz besonders meiner Freundin Lucie. Sie gaben mir die Bestätigung, die Unterstützung und hielten mir den Rücken frei, wenn meine Arbeit mich zu überfordernd drohte. Danke.

7.4 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 02.05.2013

.....

(Marcus Beuke)