

Studien zur Reparatur Camptothecin- und Methylmethansulfonat- induzierter DNA-Schäden

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt zur
Erlangung des akademischen Grades eines

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation von

Christian Ebel (M. Sc.)

aus Dortmund

Darmstadt, 2013

D 17

Referent: Prof. Dr. Markus Löbrich

Koreferent: Prof. Dr. Gerhard Thiel

Tag der Einreichung: 17.06.2013

Tag der mündlichen Dissertation: 06.09.2013

„Zweifel ist der Weisheit Anfang“

René Descartes
französischer Philosoph, Naturforscher und Mathematiker (1596 - 1650)

„So, from the perspective of cancer, DNA damage causes the disease, it is used to treat the disease, and it is responsible for the toxicity of therapies for the disease.“

Michael B.Kastan & Jiri Bartek; Cell-cycle checkpoints and cancer; Nature; 2004

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 17. Juni 2013

Inhaltsverzeichnis

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....	I
INHALTSVERZEICHNIS.....	II
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	V
TABELLENVERZEICHNIS	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 QUELLEN DER DNA-SCHÄDIGUNG	1
1.1.1 Endogene Schädigung der DNA	2
1.1.2 Exogene Schädigung der DNA.....	3
1.1.2.1 Ionisierende Strahlung	3
1.1.2.2 DNA-schädigende Wirkung chemischer Agenzien	4
1.2 ZELLULÄRE SCHADENSANTWORT AUF DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHE	5
1.2.1 Erkennung von DNA-Schäden und Signalweiterleitung	5
1.2.2 Zellzykluskontrolle und Checkpoints.....	7
1.3 MECHANISMEN ZUR REPARATUR VON DNA-SCHÄDEN	13
1.3.1 Nichthomologe Endverknüpfung.....	14
1.3.2 Homologe Rekombination.....	16
1.3.2.1 Break-induced replication	19
1.3.2.2 Synthesis-dependent strand annealing.....	20
1.3.2.3 Ausbildung und Auflösung einer doppelten Holliday-Struktur.....	21
1.4 S-PHASE-SPEZIFISCHE DNA-REPARATURPROZESSE	23
1.4.1 Entstehung replikationsassoziiertes DNA-Schäden.....	25
1.4.2 Reparatur replikationsassoziiertes DNA-Schäden.....	27
1.5 CAMPTOTHECIN.....	30
1.5.1 Topoisomerasen und die inhibierende Wirkung von CPT	31
1.5.2 Reparatur CPT-induzierter DNA-Schäden	35
1.6 METHYLMETHANSULFONAT	38
1.6.1 MMS-induzierte Basenmethylierungen	38
1.6.2 Reparatur MMS-induzierter Basenmethylierungen	39
1.6.2.1 Basenexzisionsreparatur.....	39
1.6.3 Induktion und Reparatur MMS-induzierter DSBs.....	40
1.7 ZIELSETZUNG	41
2 MATERIAL UND METHODEN	42
2.1 MATERIAL.....	42
2.1.1 Chemikalien	42
2.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze.....	43
2.1.3 Lösungen	43
2.1.4 Antikörper	44
2.1.5 Gebrauchsfertige Kits	44
2.1.6 Small interfering RNAs.....	44
2.1.7 Weiteres Verbrauchsmaterial.....	45
2.1.8 Zelllinien	45
2.1.9 Geräte.....	45
2.1.10 Software	46
2.2 METHODEN.....	47
2.2.1 Zellkultur.....	47
2.2.2 Zellzahlbestimmung und Zellaussaat	47
2.2.3 Transfektion von Zellen mittels „small interfering RNAs“ (SiRNA)	48
2.2.4 Behandlung von Zellen mit CPT und MMS	48
2.2.5 Behandlung von Zellen mit Coffein.....	49
2.2.6 Zellzykluspezifische Immunfluoreszenzanalysen	49

2.2.6.1	Markierung von S-Phase-Zellen mittels EdU	50
2.2.6.2	Fixierung von Zellen auf Deckgläsern	50
2.2.6.3	Immunfluoreszenz- und EdU-Markierung	50
2.2.6.4	Mikroskopische Detektion und Auswertung markierter Zellen	54
2.2.6.5	Kombinierte Lebendzellmikroskopie und γ H2AX-Foci-Analyse	55
2.2.7	Nachweis der siRNA-Effizienz mittels SDS-Page und Westernblot	56
2.2.8	Durchflusszytometrie	58
2.2.8.1	Fixierung von Zellen für die Durchflusszytometrie	58
2.2.8.2	Markierung der Zellen mit BrdU und PI	58
2.2.8.3	Durchflusszytometrische Detektion und Auswertung markierter Zellen	59
2.2.9	Zytogenetische Ansätze	59
2.2.9.1	Analyse von SCEs und chromosomalen Aberrationen in mitotischen Zellen	59
2.2.9.1.1	BrdU-Markierung von Zellen	59
2.2.9.1.2	Metaphasepräparation	59
2.2.9.1.3	Fluoreszenz plus Giemsa (FpG) -Färbung	60
2.2.9.2	Analyse von Aberrationen in frühzeitig kondensierten G2-Phase-Chromosomen	61
2.2.9.3	Mikroskopische Analyse und Auswertung der Chromosomen-Präparate	61
3	ERGEBNISSE	62
3.1	DIE ANALYSE VON DSBs ANHAND DER γ H2AX-FOCI-METHODE	62
3.1.1	CPT und MMS induzieren dosisabhängig γ H2AX-Foci in der S-Phase	62
3.1.2	Analyse CPT- und MMS-induzierter DNA-Schäden anhand von Kinetiken	64
3.1.3	Die Zahl an induzierten DNA-Schäden variiert innerhalb der S-Phase	66
3.1.4	Abhängigkeit der γ H2AX-Foci-Anzahl von zellulären Aufenthaltsdauer in der S-Phase	67
3.1.5	Der Großteil CPT-induzierter γ H2AX-Foci verschwindet erst nach weitgehend vollendeter Replikation	71
3.2	WIE WERDEN CPT- UND MMS-INDUZIERTER DSBs REPARIERT?	72
3.2.1	Die Reparatur CPT- und MMS-induzierter DSBs ist unabhängig von KU80 und DNA-PKcs jedoch abhängig von RAD51	73
3.2.2	CPT und MMS führen zur Ausbildung von Schwesterchromatidaustauschen	75
3.2.3	Zusammenhang von CPT- oder MMS-induzierten SCEs und DSBs	78
3.2.4	Zellzyklusverhalten von CPT- und MMS-behandelten Zellen und die Bedeutung von Checkpoints	79
3.3	WANN WERDEN CPT- UND MMS-INDUZIERTER DSBs REPARIERT?	84
3.3.1	CPT- und MMS-induzierte DSBs gelangen ausschließlich unter einem Reparaturdefekt und zusätzlicher Aufhebung von Checkpoints in die Mitose	86
3.3.2	CPT und MMS führen zu Chromatidbrüchen in der Mitose nach Inhibition von Checkpoints und der HR	88
3.3.3	RAD51 verhindert die Progression von CPT- und MMS-behandelten S-Phase-Zellen in die G2-Phase/Mitose	89
4	DISKUSSION	92
4.1	UNTERSUCHUNGEN ZUR INDUKTION VON DSBs DURCH CPT UND MMS	92
4.1.1	Analyse von CPT- und MMS-induzierten DSBs anhand von γ H2AX-Foci	92
4.1.2	Limitierungen der einstündigen Markierung von S-Phase-Zellen mittels EdU	95
4.1.3	Zusammenhang von γ H2AX-Foci-Anzahl und Zellzyklusstatus innerhalb der S-Phase	96
4.2	DIE REPARATUR MMS- UND CPT-INDUZIERTER DSBs ERFOLGT HR-ABHÄNGIG UND NHEJ-UNABHÄNGIG	98
4.2.1	CPT und MMS führen zur massiven Ausbildung von SCEs	101
4.2.2	MMS und CPT erzeugen Strukturen, welche zu SCEs jedoch nicht zu γ H2AX-Foci führen	104
4.3	ZUSAMMENHANG VON ZELLYKLUSPROGRESSION UND REPARATUR CPT- UND MMS-INDUZIERTER DNA-SCHÄDEN	107
4.3.1	Der Großteil CPT-induzierter DSBs wird nach weitgehend abgeschlossener S-Phase repariert ...	107
4.3.2	CPT- und MMS-induzierte DSBs werden pre-mitotisch repariert	109
4.3.3	Aufgaben von RAD51 und Checkpoints nach einer CPT- oder MMS-Behandlung	111
4.3.4	Zellzyklusprogression von CPT- oder MMS-behandelten Zellen in Abhängigkeit von Checkpoints	115
5	ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	123

6	LITERATURVERZEICHNIS	127
	ANHANG	143
	LEBENS LAUF	146
	DANKSAGUNG.....	147

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der DNA-Schadensantwort.....	5
Abbildung 2: Erkennung eines DSBs und Signalweiterleitung	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Zellzyklus.....	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung der zellzyklusspezifischen Cyclinregulation	9
Abbildung 5: Übersicht der Signalkaskaden zur Aktivierung von Zellzykluscheckpoints	10
Abbildung 6: Beteiligung der Reparaturwege an der DSB-Reparatur während des Zellzyklus	14
Abbildung 7: Schematische Darstellung der DSB-Reparatur via NHEJ	15
Abbildung 8: Wege der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	17
Abbildung 9: Bildung des RAD51-Nukleoproteinfilaments und D-loops im Zuge der HR.....	18
Abbildung 10: Schematisches Model für den Mechanismus des SDSA	20
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Ausbildung und Auflösung einer dHJ mittels <i>resolution</i>	22
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Auflösung einer dHJ mittels <i>dissolution</i>	23
Abbildung 13: Vereinfachte, schematische Darstellung einer Replikationsgabel	24
Abbildung 14: MUS81-vermittelte Induktion eines ein-endigen DSBs nach Kollabieren der Replikationsgabel .	25
Abbildung 15: Ausbildung eines ein-endigen DSBs durch den Prozess des <i>replication fork run-offs</i>	26
Abbildung 16: Schematische Darstellung zur Überwindung eines Replikation-arretierenden Schadens auf dem Leitstrang	28
Abbildung 17: Schematische Darstellung zur Überwindung eines Schadens auf dem Folgestrang.....	29
Abbildung 18: Strukturformel von Camptothecin	31
Abbildung 19: Schneidemechanismen unterschiedlicher Klassen von Topoisomerasen.....	32
Abbildung 20: Prozess der Umesterung bei der Spaltung des DNA-Phosphatrückgrats am Beispiel der TOP1 ...	33
Abbildung 21: Darstellung der Interaktion zwischen CPT, Topoisomerase 1 und der DNA.....	34
Abbildung 22: Wege zur Reparatur von kovalent-gebundenen TOP1-CCs.....	37
Abbildung 23: MMS-induzierte Basenmethylierungen.....	38
Abbildung 24: Exemplarische Immunfluoreszenz-Färbung zur Analyse von S-Phase-Zellen	52
Abbildung 25: Exemplarische Immunfluoreszenz-Färbung zur Analyse RAD51-defizienter Zellen.....	53
Abbildung 26: Exemplarische Immunfluoreszenz-Färbung zur Analyse mitotischer Zellen.....	53
Abbildung 27: Zellzyklusspezifische Detektion und Auswertung von Zellen.	54
Abbildung 28: Verwendung von μ Slides für die kombinierte Lebendzellmikroskopie und γ H2AX-Foci-Analyse	55
Abbildung 29: Konzentrationsabhängige Induktion von γ H2AX-Foci nach einer einstündigen CPT-Behandlung	63

Abbildung 30: γ H2AX-Foci-Induktion nach unterschiedlichen Dosen von CPT und MMS	63
Abbildung 31: Reparaturkinetiken nach einer Pulsbehandlung mit CPT oder MMS sowie einer Dauerbehandlung mit CPT	65
Abbildung 32: Varianz der γ H2AX-Foci-Anzahl einer CPT- oder MMS-behandelten Zellpopulation.....	67
Abbildung 33: Verfolgung der S-Phase-Progression mittels LIG1-Muster.....	68
Abbildung 34: Kombinierte <i>Life cell</i> -Mikroskopie und Immunfluoreszenzanalyse	69
Abbildung 35: Induktion von γ H2AX-Foci in Abhängigkeit von der zellulären Aufenthaltsdauer in der S-Phase.....	70
Abbildung 36: Verschwinden von γ H2AX-Foci nach weitgehender Beendigung der Replikation.....	72
Abbildung 37: Reparaturkinetiken von Zellen nach Suppression von NHEJ- und HR-Faktoren	74
Abbildung 38: Nachweis der SiRNA-vermittelten Rad51-Suppression per Immunfluoreszenz	75
Abbildung 39: SCEs nach CPT- und MMS-Behandlung sowie Depletion von RAD51 mittels SiRNA.....	76
Abbildung 40: Nachweis der RAD51-Suppression mittels Westernblot.....	77
Abbildung 41: SCEs in AAG-defizienten MEFs aufgrund MMS-induzierter DNA-Schäden.....	78
Abbildung 42: Durchflusszytometrie von Zellen mit inkorporiertem BrdU	80
Abbildung 43: Zellzyklusprogression von CPT- und MMS-behandelten Zellen in Abhängigkeit von Zellzykluscheckpoints.....	81
Abbildung 44: Zellzyklusprogression von CPT- und MMS-behandelten, RAD51-defizienten Zellen in Abhängigkeit von Zellzykluscheckpoints.....	83
Abbildung 45: γ H2AX-Foci in S-Phase- und mitotischen Zellen 16 Stunden nach CPT- oder MMS-Behandlung.....	86
Abbildung 46: γ H2AX-Foci in S-Phase- und mitotischen Zellen 16 Stunden mit/nach Behandlung	87
Abbildung 47: Chromatidbrüche nach CPT- oder MMS- sowie Koffein-Behandlung und Depletion von RAD51 mittels SiRNA	89
Abbildung 48: Chromatidbrüche in frühzeitig kondensierten Chromosomen nach Behandlung mit CPT und MMS sowie Depletion von RAD51	90
Abbildung 49: Replikationsverhalten von Zellen innerhalb der S-Phase	97
Abbildung 50: Modell zur Entstehung zwei-endiger DSBs in der S-Phase	101
Abbildung 51: Detektion von Schwesterchromatidaustauschen.....	102
Abbildung 52: Schematische Darstellung der Zellzyklusprogression nach einer CPT- oder MMS-Behandlung...	114
Abbildung 53: Modell zur verstärkten Arretierung von Replikationsgabeln nach einer MMS-Behandlung im Vergleich zu einer CPT-Behandlung.....	119
Abbildung 54: Modell zur Induktion und Reparatur CPT- und MMS-induzierter DNA-Schäden	122

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Phasen der Zellteilung	8
Tabelle 2: Sequenzen und Konzentrationen der eingesetzten SiRNAs	48
Tabelle 3: Ansatz zur Transfektion von Zellen mit SiRNA	48
Tabelle 4: <i>Click-it</i> -Reaktionsansatz zur Fluoreszenzfärbung von Zellen mit inkorporiertem EdU.....	51

Abkürzungsverzeichnis

53BP1	p53 binding protein 1
ALKB	Alpha-ketoglutarat-abhängige Dioxygenase B
APE1	apurinisch-apyrimidinische Endonuclease 1
ATM	Ataxia telangiectasia mutiert
ATR	ATM und RAD3-ähnlich (engl. ATM and RAD3 related)
ATRIP	ATR interagierendes Protein
BER	Basenexzisionsreparatur (engl. base excision repair)
BIR	Break-induzierte Replikation
BLM/RECQ2	Bloom-Syndrom-Protein
Bp	Basenpaar
BRCA1/BRCA2	Breast cancer 1/2
BrdU	Bromodeoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumin)
Bzw.	beziehungsweise
CC	Cleavage complex
CCNSC	Cancer Chemotherapy National Service Center
CDC25A	Cell division cycle 25 homolog A
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (engl. cyclin dependent kinase)
CHK1/CHK2	Checkpoint Kinase
CPT	Camptothecin
CtIP	C-terminal-binding protein 1 interagierendes Protein
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DDR	DNA-Schadensantwort (engl. DNA-damage response)
DDR	DNA-Schadensantwort (engl. DNA damage response)
dHJ	doppelte Holliday-Struktur (engl. double-Holliday-junction)
D-loop	Displacement loop
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DNA2	DNA-Replikation ATP-abhängige Helicase/Nuclease DNA2
DNA-PK	DNA-abhängige Protein Kinase
DNA-PKcs	DNA-abhängige Protein Kinase katalytische Untereinheit
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSB	Doppelstrangbruch (engl. double strand break)
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. Ethylenediaminetetraacetic acid)
EdU	5-Ethynyl-2'-deoxyuridin
EME1	Essential meiotic endonuclease homolog 1
engl.	Englisch
eV/MeV	Elektronenvolt/Megaelektronenvolt

EXO1	Exonuclease 1
FANCD2	Fanconi anemia group D2 protein
FANCM	Fanconi anemia group M protein
FCS	Fötales Kälberserum (engl. fetal calv serum)
FEN	Flap endonuclease 1
g	Normfallbeschleunigung von 9,80665m/s ²
GEN1	Gen endonuclease homolog 1/ Flap endonuclease GEN homolog 1
h	Stunde (engl. hour)
HJ	Holliday-Struktur (engl. Holliday-junction)
HR	Homologe recombination (engl. homologous recombination)
HU	Hydroxyharnstoff (engl. hydroxyurea)
kB	Kilobasen
LIG1	Ligase 1
MDC1	Mediator of DNA-damage checkpoint protein 1
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MEF	Mouse embryonic fibroblast
MGMT	O6-Methylguanin-Methyltransferase
Min.	Minute
MMR	Mismatch repair
MMS	Methylmethansulfonat
MRE11	Meiotic recombination 11
MUS81	Methylmethansulfonate and ultraviolet sensitive 81/ Crossover junction endonuclease MUS81
NBS1	Nijmegen breakage syndrome 1
NEAA	Non essential amino acids
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NHEJ	Nichtomologe Endverknüpfung (engl. nonhomologous end joining)
PARP1	Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphat-buffered saline)
PCC	Frühzeitige Chromosomenkondensation (engl. premature chromosome condensation)
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PI	Propidiumiodid
PIKK	Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase-ähnliche Kinasen
PNK1/PNKP	Polynucleotide kinase-3'-phosphatase 1
RF	Replikationsgabel (engl. replication fork)
RMI1/RMI2	RecQ-mediated genome instability protein 1
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species)
RPA	Replication protein A
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCAN1	spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy 1

SCE	Schwesterchromatidaustausch (engl. sister chromatid exchange)
SDSA	synthesis-dependent strand annealing
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sec.	Sekunde (engl. second)
siRNA	small interfering RNA
SLX1/SLX4	Structure-specific endonuclease subunit SLX 1/4
SMC1	Structural maintenance of chromosomes 1
SSA	Einzelstranganlagerung (engl. single strand annealing)
SSB	Einzelstrangbruch (engl. single strand break)
ssDNA	Einzelsträngige DNA (engl. single stranded DNA)
TDP1	Tyrosyl DNA phosphodiesterase 1
TLS	Translesion synthesis
TOP1/TOP2/TOP3	Topoisomerase 1/2/3
TPP1	Tripeptidyl peptidase 1
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
WRN	Werner syndrome ATP-dependent helicase
WT	Wildtyp
XLF	XRCC4-like factor
XPF/ERCC4	Xeroderma pigmentosum group F-complementing protein
XRCC	X-Ray repair cross complementing protein

1 Einleitung

Die humane Desoxyribonukleinsäure (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) beinhaltet die Erbinformation eines Menschen und gehört zu den wichtigsten Strukturen einer jeden Zelle. Während einerseits Mutationen der DNA zur Evolution beitragen, können DNA-Schäden zur Instabilität des Genoms führen, weshalb sich komplizierte Mechanismen entwickelt haben, welche die DNA schützen und bei Schädigung reparieren. Defekte in Genen und Proteinen der DNA-Reparatur führen zu einer Vielzahl von vererbten Krankheiten, sodass die Erforschung der Reparaturmechanismen vor allem zum Verständnis der Entstehung solcher Krankheiten und zur Entwicklung von therapeutischen Ansätzen beiträgt.

Jeden Tag treten in einer Zelle des menschlichen Körpers tausende von endogenen DNA-Schäden in Form von Basenmodifikationen und Basenverlusten bis hin zu DNA-Einzelstrangbrüchen (engl. *single strand breaks*, SSBs) und Doppelstrangbrüchen (engl. *double strand breaks*, DSBs) auf. Dabei stellt der DSB die biologisch gravierendste Läsion für die Integrität der DNA dar, wenn dieser ungeplant induziert wird (Rothkamm and Lobrich 2003, Kinner et al. 2008, Conrad et al. 2011). DSBs stellen keine Gefahr für die genomische Integrität dar, wenn diese für biologisch wichtige Prozesse endogen induziert wurden. So treten programmierte DSBs während der Rekombination in der Meiose, zur Relaxierung der DNA bei Torsionsstress und bei der Generierung und Reifung von Immunglobulinen, der sogenannten V(D)J-Rekombination, auf (Schoeffler and Berger 2005, Neale and Keeney 2006, Bowen et al. 2013). Diese DSBs werden jedoch gezielt erzeugt und kontrolliert wieder ligiert. Sowohl auf exogen-erzeugte als auch spontane DSBs und DNA-Läsionen muss eine Zelle schnell reagieren, um die Integrität der Erbinformation zu erhalten. Exogene Quellen der DNA-Schädigung sind elektromagnetische Strahlungen mit Wellenlängen unterhalb des sichtbaren Bereichs, sprich ultraviolette (UV), Röntgen-, Gamma- und Höhenstrahlung, sowie Teilchenstrahlung und chemische Noxen. Verbleiben DNA-Schäden unrepariert oder ist deren Reparatur fehlerhaft, so können diese Läsionen mutagene Wirkungen hervorrufen und potentiell zur Entstehung von Krebs beitragen. Krebszellen zeichnen sich in erster Linie durch ein stark erhöhtes, unkontrolliertes Wachstum aus, sodass genau hierbei die gezielte Induktion von DNA-Schäden sinnvoll sein kann um die Krebszellen in ihrer Vermehrung zu hindern oder gar zu zerstören. Hierzu bedient sich die Medizin neben der Bestrahlung, welche ein breites Spektrum an DNA-Schäden verursacht, vor allem einer Bandbreite von chemischen Substanzen, welche gezielt DNA-Schäden erzeugen. Um die Erzeugung und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen vergleichend zu analysieren, wurden in der vorliegenden Arbeit Camptothecin (CPT) und Methylmethansulfonat (MMS) als DNA-schädigende Agenzien verwendet. Erstaunlicher Weise ist trotz des langjährigen, medizinischen Einsatzes dieser Agenzien und ihrer Derivate die molekulare Wirkungsweise der Schädigung und Reparatur der CPT- und MMS-induzierten DNA-Schäden noch nicht vollständig aufgeklärt, sodass die vorliegende Arbeit tiefere Einblicke in diese Mechanismen geben soll. Hierzu soll zunächst ein Einblick in das Thema der DNA-Schädigung und Reparatur gegeben werden.

1.1 Quellen der DNA-Schädigung

Die DNA einer menschlichen Zelle unterliegt täglich einer Vielzahl von Noxen, welche sowohl endogen als auch exogen auf die DNA wirken können. Zunächst sollen Prozesse aufgezeigt werden, die kontinuierlich in einer Zelle stattfinden und zu einer endogenen Schädigung der DNA führen.

1.1.1 Endogene Schädigung der DNA

Als endogene Schäden der DNA werden alle Läsionen bezeichnet, die ohne äußeres Einwirken in einer Zelle verursacht werden. Die Replikation stellt dabei eine der größten endogenen Fehlerquellen dar. So tauchen Replikationsfehler bei der komplementären Synthese von Nukleotiden mit einer Häufigkeit von ca. 1:100.000 auf (Pray 2008). Die dafür verantwortlichen DNA-Polymerasekomplexe beinhalten zwar eine Korrekturleseaktivität, welche diese Fehler erkennt und direkt reduziert, jedoch vermindert sich dadurch die Fehlerrate „nur“ auf ca. ein fehlgepaartes Nukleotid in 1×10^9 Basenpaaren (Graw 2006). Das bedeutet, dass in einer Zelle pro Replikation im Durchschnitt mindestens eine Fehlbasenpaarung stattfindet. Dieser Wert erscheint pro Zelle gering, in einem Menschen, bei dem sich jedoch jede Sekunde tausende von Zellen verdoppeln, kann dies zu einer hohen Mutationsrate führen (Graw 2006). Replikationsunabhängige Reparaturmechanismen wie die Nukleotidexzisions-reparatur (NER) und *missmatch-repair* (MMR) können diese Fehler jedoch auch zu späteren Zeitpunkten erkennen und nachträglich reparieren.

Eine weitere Quelle für endogene DNA-Schäden stellen spontane Veränderungen an Nukleotiden dar. Diese spontanen Veränderungen können sehr vielfältig sein, treten jedoch am Häufigsten in Form von Desaminierungen und Hydrolyse der N-glycosidischen Bindung auf. Desaminierungen stellen den Verlust der Aminogruppe einer Base dar und können zu Basen-Fehlpaarung führen, die eine hohe Mutagenität fördern (Graw 2006). So führt beispielsweise eine spontane Hydrolyse der Base Cytosin zum Verlust der Aminogruppe, wobei aus Cytosin die Base Uracil entsteht. Auch hier gibt es Reparaturmechanismen, welche diese Reaktion kurzfristig rückgängig machen können. Tritt die spontane Desaminierung des Cytosins jedoch in einem Bereich auf, welcher kurz vor der Replikation steht und somit keine Zeit zur Reparatur verbleibt, so wird anstelle des komplementären Guanins ein Adenin in den neu-synthetisierten Strang eingebaut, was eine Punktmutation zur Folge hat. Vor allem bei Purinen kommt es jedoch mit einer Häufigkeit von 1:300 Basenpaaren täglich zu einer Auflösung der Verbindung zwischen Base und Zucker, einer sogenannten Depurinierung (Graw 2006). Das Zuckerphosphatrückgrat bleibt bei dieser Hydrolyse bestehen, die apurine Stelle in der DNA kann jedoch zu falscher Basenpaarung oder Entstehung eines SSBs führen, sodass sich Reparaturmechanismen wie die BER entwickelt haben, welche diese Fehler erkennen und beseitigen können.

Neben Fehlern bei der Replikation und spontanen Basenveränderungen wird ein weiterer Teil der endogenen Schäden durch Stoffe hervorgerufen, welche bei metabolischen Prozessen in einer Zelle entstehen, wobei vorrangig reaktive Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species*, ROS) eine Rolle spielen. Diese ROS entstehen vor allem durch oxidative Phosphorylierungen bei der Atmungskette in Mitochondrien oder durch den Abbau von langkettigen Fettsäuren in den Peroxisomen (Imlay and Linn 1988). ROS können auch durch exogene Quellen wie UV- und ionisierende Strahlung, sowie durch chemische Agenzien erzeugt werden und entfalten ihr toxisches Potential durch die Oxidation von Biomolekülen. Für die biologische Auswirkung von Röntgenstrahlen stellen ROS sogar die ausschlaggebende Schadensquelle dar (Tominaga et al. 2004). Die Struktur der DNA bietet hierbei für ROS mehrere Angriffspunkte, da sowohl DNA-Nukleobasen als auch das Zuckerphosphatrückgrat beschädigt werden können und es somit zu einer Vielzahl von Läsionen wie Basenmodifikationen, abasischen Stellen, SSBs, Protein-DNA-Verknüpfungen, sowie zu Intra- und Inter-DNA-Querverknüpfungen (engl. *crosslinks*) kommen kann (Berquist and Wilson 2012). Bis heute konnten ungefähr 100 verschiedene Arten von Basen- und Zuckerschäden identifiziert werden, welche durch oxidativen Stress an der DNA

einer Zelle verursacht werden können (Brierley and Martin 2012). Für die Reparatur dieser Schäden sorgen je nach Art verschiedene Reparaturwege.

Die beschriebenen Quellen für endogene Schäden der DNA stellen nur eine Auswahl der potentiellen Gefahren für die genetische Stabilität einer Zelle dar, geben jedoch einen Einblick in die Vielfältigkeit von endogen erzeugten Defekten und die damit verbundenen Aufgaben zur Erhaltung der Erbinformation. Stellt man sich die hohe Summe aller endogenen DNA-Schäden vor, die täglich in einem Organismus entstehen, so kann dieser dank hochentwickelter Mechanismen die Reparatur der Schäden erstaunlich gut bewerkstelligen. Zusätzlich ist die DNA von Zellen jedoch auch exogenen Noxen ausgesetzt, welche diverse und schwerwiegende DNA-Schäden verursachen können.

1.1.2 Exogene Schädigung der DNA

Exogen erzeugte DNA-Schäden können durch ionisierende Strahlung wie ultraviolette- (UV), Röntgen-, Gamma-, Teilchen- und Höhenstrahlung, sowie chemische Substanzen wie pflanzliche Toxine, alkylierende Agenzien, DNA-interkalierende Stoffe und diverse, menschlich-synthetisierte Mutagene wie Chemotherapeutika, aber auch durch hohe Temperaturen entstehen. Einige dieser DNA-schädigenden Noxen wirken täglich auf uns Menschen ein, andere finden in der Forschung und Medizin häufige Anwendung. Zur Erforschung der DNA-Reparatur bedient sich die Wissenschaft in erster Linie der Strahlung und chemischen Agenzien, um gezielt DNA-Schäden zu induzieren. Strahlung kann als Ausbreitung von Elementarteilchen oder Wellen beschrieben werden. Dabei wird zwischen Teilchenstrahlung, die Masse befördert und elektromagnetischer Strahlung, welche Energie ohne Masse transportiert, unterschieden. Treten die Strahlungen mit Materie in Wechselwirkung, so können sie in Abhängigkeit der transportierten Materie und Energie Elektronen aus Atomen der Materie entfernen und diese ionisieren. Für die Strahlenbiologie ist somit vor allem die sogenannte ionisierende Strahlung interessant, da sie in der Lage ist Bestandteile von Organismen durch Ionisation von Atomen zu schädigen.

1.1.2.1 Ionisierende Strahlung

Ionisierende Strahlung kann sowohl in Form von Teilchenstrahlung als auch in Form von Photonen auftreten. Während zur Teilchenstrahlung α -Teilchen, Protonen, Neutronen, Elektronen und Schwerionen gehören, beschreiben Photonen Lichtteilchen, sogenannte Quanten, welche Energie ohne eigene Masse transportieren und elektromagnetische Wellen darstellen. Aus heutiger Sicht besteht jede elektromagnetische Welle, von Höhenstrahlung bis hin zu niederfrequenten Wechselströmen aus Photonen, deren Wellencharakter mit unterschiedlichen Wellenlängen und Frequenzen beschrieben werden kann. Je höher dabei die Frequenz und kleiner die Wellenlänge ist, desto energiereicher ist die Strahlung. Um nun Elektronen aus Atomhüllen durch elektromagnetische Strahlung zu entfernen bedarf es Ionisationsenergien von mindestens 5 Elektronenvolt (eV), was im elektromagnetischen Spektrum Strahlung mit einer Wellenlänge von etwa 200nm entspricht. Findet eine Wechselwirkung mit Materie statt, so kann es je nach Energie des Photons zu unterschiedlichen Effekten bei der Ionisation eines Atoms kommen. Bei niederenergetischer Röntgenstrahlung mit Energien kleiner als 0,5MeV dominiert der sogenannte Photoelektrische Effekt, wobei die Energie des Photons komplett auf ein Elektron übertragen und dieses somit aus der Atomhülle gelöst wird. Das herausgelöste Elektron wird als Sekundärelektron bezeichnet und besitzt nach der Abspaltung vom Atom eine kinetische Energie, welche der

Quantenenergie des ursprünglichen Photons abzüglich der Bindungsenergie des Elektrons entspricht, und potentiell auch weiterhin eine ionisierende Gefahrenquelle darstellen kann. Hochenergetische Röntgenstrahlung besitzt Energien zwischen 0,1 und 1MeV mit Wellenlängen kleiner 1nm und erzeugt bei Wechselwirkung mit Materie hauptsächlich den Compton-Effekt, bei welchem das Photon nur einen Teil seiner Energie für die Freisetzung eines Hüllenelektrons verbraucht. Das Photon wird dabei abgelenkt und kann mit einer verminderten Restenergie weitere Ionisationen verursachen. Bei Quantenenergien der Photonen größer 1MeV tritt zusätzlich der sogenannte Paarbildungseffekt auf. Hierbei führt die hohe Energie des Photons zur Entstehung eines hochenergetischen Elektron-Positron-Paares, wobei dies entweder durch Wechselwirkung des Photons mit dem Atomkern oder einem Hüllenelektron stattfinden kann (Musiol G. 1995). Treffen Photonen hochenergetischer UV-, Röntgen oder Gammastrahlung auf DNA, so treten sowohl direkte als auch indirekte Strahleneffekte auf. Bei direkten Strahleneffekten ionisiert ein Photon, oder ein dadurch erzeugtes Sekundärelektron, direkt ein Atom der DNA, wodurch Moleküle der DNA verändert oder Verbindungen zerstört werden können. Hinzu kommt ein indirekter Strahleneffekt, welcher auf Wechselwirkungen der Photonen mit Wasser, dem Hauptbestandteil menschlicher Zellen, beruht und bei konventioneller Röntgenstrahlung dominiert. Werden Wassermoleküle ionisiert, so können Hydroxylradikale entstehen, welche zwar sehr kurzlebig, jedoch hoch-reaktiv sind. Hydroxylradikale, welche sich in räumlicher Nähe zur DNA befinden, sind deshalb potentiell in der Lage diese durch Ionisation zu schädigen.

1.1.2.2 DNA-schädigende Wirkung chemischer Agenzien

Die Wirkung chemischer, DNA-schädigender Agenzien besteht vor allem in der Induktion von DNA-Läsionen und einer damit verbundenen Störung oder Verhinderung der Replikation einer Zelle. Pflanzliche Toxine oder synthetisierte Stoffe können dabei durch diverse Modifikationen der DNA vor allem während der Replikationsphase einer Zelle verheerende Schäden erzeugen. So können alkylierende Agenzien, wie das in dieser Arbeit untersuchte MMS, Nukleinbasen methylieren, was die Replikation erschweren und potentiell SSBs und DSBs erzeugen kann, wobei noch nicht genau geklärt ist, ob die durch methylierende Agenzien erzeugten Läsionen selbst, oder die dadurch erzeugten Strukturen an angehaltenen Replikationsgabeln (engl. *stalled replication forks*) für die Toxizität verantwortlich sind (Nikolova et al. 2010). So genannte Crosslinker wie Mitomycin C, Cis-Platin oder Senfgas induzieren kovalente Verbindungen zwischen DNA-Strängen und verhindern so eine Trennung der beiden komplementären Stränge bei der Replikation und Transkription (Deans and West 2011). Desweiteren können chemische Noxen wie zum Beispiel Aphidicolin durch Inhibition von Polymerasen oder Hydroxyharnstoff (engl. *hydroxyurea*, HU) durch Depletion des Nukleotidpools direkt auf den Replikationsapparat wirken. Topoisomerase-Inhibitoren, wie das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Camptothecin, inhibieren aktive Topoisomerasen und erzeugen dadurch hauptsächlich Replikationsblockaden und DSBs (Tomicic and Kaina 2013). Da CPT- und MMS-induzierte DNA-Schäden und deren Reparatur den Hauptbestandteil dieser Arbeit darstellen, werden diese Agenzien in Kapitel 1.5 und 1.6 detaillierter analysiert.

Da sich Tumorzellen häufig unkontrolliert duplizieren, bieten chemische Stoffe, welche schwerwiegende DNA-Schäden wie DSBs in der Replikationsphase des Zellzyklus bewirken, einen sehr guten medizinischen Ansatz diese Zellen im Vergleich zu „gesunden Zellen“ vermehrt zu schädigen, sodass viele der genannten Agenzien als Chemotherapeutika in der Krebstherapie eingesetzt werden. Wie reagiert nun

eine Zelle auf die Vielzahl endogen- und exogen-erzeugter DNA-Schäden mit spezieller Hinsicht auf den schwerwiegendsten Schaden, den DSB?

1.2 Zelluläre Schadensantwort auf DNA-Doppelstrangbrüche

Um die Integrität der DNA durch die effiziente Reparatur eines DSBs gewährleisten zu können, muss dieser zunächst erkannt werden und Mechanismen zur Reparatur initiiert werden. Diese Reaktion einer Zelle auf DNA-Läsionen wird als DNA-Schadensantwort (engl. *DNA damage response*, DDR) bezeichnet (Abbildung 1). Hierbei werden vielfältige und weit verzweigte Signalkaskaden ausgelöst, in welchen eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine beteiligt ist.

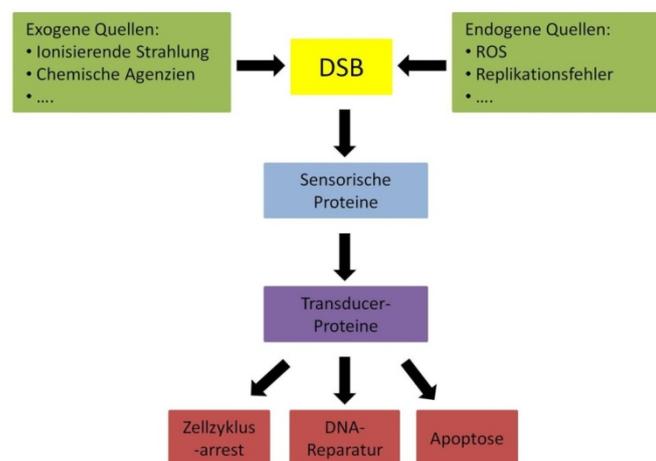


Abbildung 1: Schematische Darstellung der DNA-Schadensantwort

DSBs können von Sensorproteinen erkannt werden, woraufhin das Schadenssignal verstärkt wird und über eine Signalkaskade von Transducer-Proteinen an Effektor-Proteine weitergeleitet wird. Je nach Signal sind diese dann in der Lage einen Zellzyklusarrest, die DNA-Reparatur oder die Apoptose einzuleiten (Khanna and Jackson 2001).

Die durch DNA-Schäden induzierten Signale können je nach Komplexität und Quantität der Schäden drei mögliche Reaktionen der Zelle einleiten. Zum einen sollen Reparaturproteine zum Schadensort rekrutiert werden, um den DNA-Schaden zu reparieren. Zweitens, kann bei schwerwiegenden Schäden der Zellzyklus an sogenannten Zellzyklus-Checkpoints arretiert werden, was der Zelle Zeit verschafft die entstandenen DNA-Schäden zu reparieren. Um einer Entartung einer zu stark geschädigten Zelle vorzubeugen, stellt der programmierte Zelltod (Apoptose) den dritten und letzten Ausweg einer Zelle dar (Jeggo and Lobrich 2006).

1.2.1 Erkennung von DNA-Schäden und Signalweiterleitung

DNA-Schäden werden von sogenannten Sensor-Proteinen erkannt. Je nach Struktur des Schadens werden jedoch unterschiedliche Proteine aktiviert um damit den jeweiligen Reparaturmechanismus in Gang zu setzen. In menschlichen Zellen wird die Erkennung des schwerwiegendsten Schadens, also die eines DSBs dem MRN-Komplex zuteil, welcher aus den Proteinen *Meiotic recombination 11* (MRE11), RAD50 und *Nijmegen breakage syndrome 1* (NBS1) zusammengesetzt ist (Pardo et al. 2009). Der

MRN-Komplex rekrutiert im Folgenden die Kinase *Ataxia-telangiectasia mutated* (ATM) und den Bruch, welche als Transducer- aber auch als Checkpoint-Regulator-Protein mehrere Funktionen übernimmt. ATM gehört zur Gruppe der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-ähnlichen Kinasen (PIKK), zu welcher ebenso die Proteine *ATM and RAD3 related* (ATR), als auch die *DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit* (DNA-PKcs) gehören, und phosphoryliert eine Vielzahl an Substraten (Lobrich and Jeggo 2005). Die wichtige Bedeutung von ATM wird bei der namensgebenden Krankheit *Ataxia Telangiectasia* (AT) deutlich, bei welcher Mutationen des ATM-Gens schwerwiegende Symptome wie Kleinhirn-Degeneration, Gleichgewichtsstörungen (Ataxien), Immundefizienz, genomische Instabilität, Thymus- und Gonaden-Atrophien (Verkümmern) und vor allem eine erhöhte Prädisposition von lymphoretikulären Tumoren und extreme Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung und DSB-erzeugenden Agenzien hervorrufen (Crawford 1998, Shiloh 2003).

In der Signaltransduktionskaskade der DDR liegt ATM zunächst als inaktives Homodimer vor, auto-phosphoryliert sich jedoch nach Induktion eines DSBs an Serin 1981 und bildet hierdurch aktive ATM-Monomere (Bakkenist and Kastan 2003). Aktives ATM phosphoryliert als Schadensantwort auf DSBs eine Bandbreite an Substraten zur Zellzykluskontrolle sowie Transkriptionsfaktoren. Eine weitere Aufgabe von ATM bei der Schadenserkenkung und Signaltransduktion besteht in der Phosphorylierung des Histons H2AX an dessen Serin 139 (Lobrich et al. 2010). Diese Phosphorylierung kann jedoch auch von den beiden anderen Kinasen ATR und DNA-PKcs übernommen werden (Kinner et al. 2008). Phosphoryliertes H2AX wird als γ H2AX bezeichnet und vom Sensor-Protein *mediator of DNA damage checkpoint protein 1* (MDC1) erkannt, welches selbst weiteren Kinasen eine Zielstruktur zur Anlageung bietet (Lukas et al. 2011). Die Bindung von MDC1 an γ H2AX sorgt mit Hilfe des Proteins NBS1 für eine stetige Anwesenheit von aktivem ATM, was zu einer Signalamplifikation führt und die Phosphorylierung von H2AX über mehrere Nachbar-Nukleosomen ermöglicht (Ciccia and Elledge 2010), (Abbildung 2).

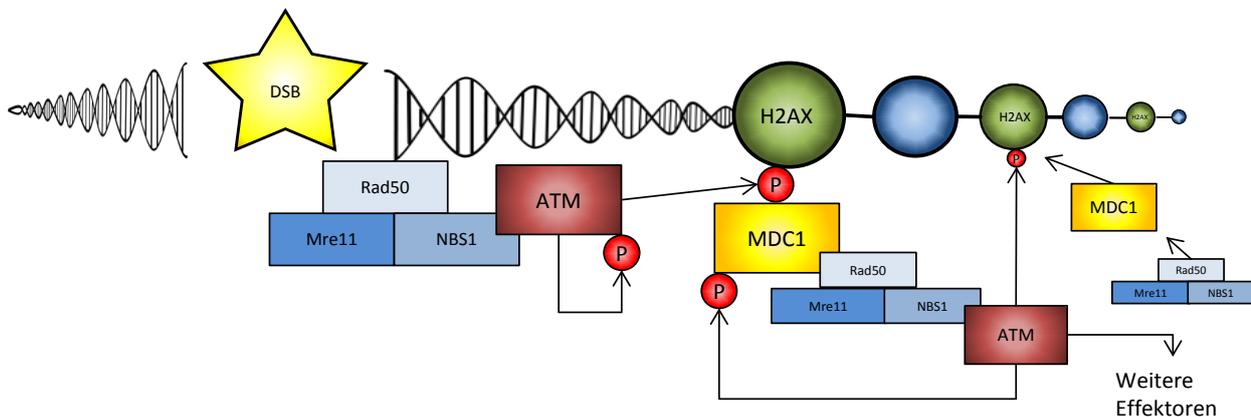


Abbildung 2: Erkennung eines DSBs und Signalweiterleitung

Nach der Induktion eines DSBs erkennt zunächst der MRN-Komplex, bestehend aus den Proteinen MRE11, RAD50 und NBS1 den Schaden, worauf ATM zum Schadensort rekrutiert wird. Dieses wird durch Autophosphorylierung aktiviert und kann im Anschluß das Histon H2AX phosphorylieren, welches als γ H2AX ein Signal für Mediatorproteine wie MDC1 darstellt. MDC1 wird durch ATM phosphoryliert und stellt eine Plattform für die weitere Anlagerung von MRN-Komplexen dar, sodass dies zur Akkumulation der Reparaturproteine und Phosphorylierung von H2AX über mehrere Megabasenpaare um den DSB herum führt.

Bei Störung der Replikation wird ATR in einem Komplex mit dem *ATR interacting protein* (ATRIP) zu Replikationsgabeln rekrutiert und kann dort eine ähnliche Signalamplifikation hervorrufen. ATR wird

hierbei durch einzelsträngige, mit dem replication protein A (RPA) beladene, DNA-Bereiche (engl. *single stranded DNA*, ssDNA) aktiviert, welche vor allem an arretierten Replikationsgabeln aber auch an resektierter DNA auftreten (Shechter et al. 2004). Defekte im Gen, welches für das Protein ATR codiert, äußern sich in Patienten mit dem sogenannten Seckel-Syndrom. Die Krankheit ist durch Punktmutationen des Gens und einer damit verbundenen Veränderung des Splice-Verhaltens gekennzeichnet, was zu einer sehr geringen Produktion von funktionalem ATR führt (O'Driscoll et al. 2003). Die Symptome eines Patienten mit Seckel-Syndrom sind Mikrozephalie, Wachstumsstörungen und für diese Krankheit charakteristische Gesichtsveränderungen (Ogi et al. 2012). Eine Krankheit, bei welcher ATR vollständig depletiert vorliegt ist nicht bekannt und Mäuse mit ATR-Nullmutationen sind embryonal letal (Brown and Baltimore 2000).

Neben den beschriebenen Protein-Modifikationen bei der DNA-Schadensantwort, welche sich auf Phosphorylierungen beschränken, kommt es nach einem DNA-Schaden je nach Struktur und Lage zu einer Vielzahl weiterer Modifikationen von beteiligten Proteinen wie Poly-ADP-Ribosylierungen, Methylierungen, Acetylierungen sowie Ubiquitinierungen. Auf diesem Gebiet der Forschung ist jedoch noch vieles ungeklärt, da über Jahrzehnte hinweg die Phosphorylierung von Proteinen als einzige und wichtigste Modifikation zur Aktivierung oder Inaktivierung galt. Eine wichtige Aufgabe der Kinasen ATM und ATR liegt zusätzlich in der bereits angesprochenen Einleitung von Zellzykluscheckpoints.

1.2.2 Zellzykluskontrolle und Checkpoints

Für das Wachstum von eukaryotischen Organismen und den Erhalt von Gewebe müssen fortlaufend neue Zellen gebildet werden. Hierzu verdoppeln sich eukaryotische Zellen indem sie Ihre DNA replizieren und anschließend auf zwei Tochterzellen verteilen. Dieser Zyklus kann in unterschiedliche Phasen eingeteilt werden, wobei zunächst zwischen der eigentlichen Zellteilung während der Mitose und der sogenannten Interphase unterschieden wird. Die Interphase kann weiter differenziert werden, wobei zwischen der Verdopplung der DNA in der S-Phase (Synthese-Phase) und der Mitose so genannte Lückenphasen bestehen, welche mit G1 und G2 (engl. *Gap1*, *Gap2*) bezeichnet werden (Abbildung 3). Zudem kann eine Zelle aus der G1-Phase in ein G0-Stadium wechseln, mit welchem sie den Zellzyklus verlässt und sich somit nicht mehr teilt.

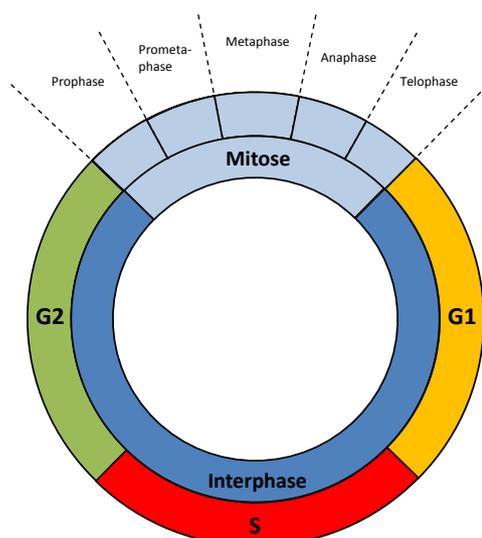


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Zellzyklus

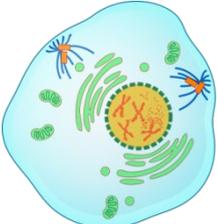
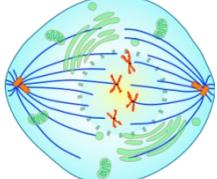
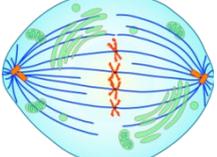
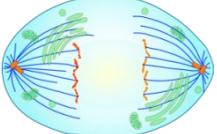
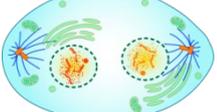
Ein Zellzyklus lässt sich in die Mitose (hellblau), welche die Zellteilung beschreibt und die Interphase (dunkelblau) unterteilen. Die Interphase gliedert sich in die G1-Phase (gelb), in welcher die Zelle einen einfachen Chromosomensatz besitzt, die S-Phase (rot), bei der die DNA dupliziert wird und die G2-Phase (grün), in welcher ein doppelter Chromosomensatz vorliegt. Der komplizierte Mechanismus der Mitose kann aufgrund wichtiger Schlüsselmomente während der Zellteilung in Pro-, Prometa-, Meta-, Ana- und Telophase unterteilt werden.

Jede Zellzyklusphase ist durch bestimmte Merkmale und Aktivitäten einer Zelle gekennzeichnet. Während der G1-Phase nimmt die Zelle die Produktion von mRNA und Proteinen wieder auf, welche während der Mitose überwiegend reduziert wurde und bereitet sich auf die bevorstehende S-Phase vor, in welcher für die Synthese des kompletten Genoms eine Vielzahl von Proteinen

und DNA-Bausteinen benötigt wird. Die Hauptaufgabe der S-Phase liegt in der Replikation der gesamten DNA. Die Zelle nimmt deutlich an Größe zu und besitzt nach Abschluss der S-Phase einen doppelten und identischen DNA-Gehalt. Die darauf folgende G2-Phase ist wiederum durch starke Proteinsynthese gekennzeichnet und dient zur Vorbereitung auf die bevorstehende Teilung der Zelle. Die Mitose kann beginnend mit der Prophase in 5 Phasen eingeteilt werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Phasen der Zellteilung

(Grafiken von <http://commons.wikimedia.org/wiki/File%3AMITOSIS-cells-secuence.svg>)

	<p>Interphase: Während der G1-, S- und G2-Phase liegt das Genom für die Replikation der DNA und Expression von Genen als unkondensiertes Chromatin vor.</p>
	<p>Prophase: Das Chromatin wird kondensiert und es bilden sich lichtmikroskopisch erkennbare Chromosomen. Diese bestehen aus 2 Chromatiden welche die zuvor replizierte, also identische DNA beinhalten. Das Centromer hält beide Chromatiden zusammen, sodass die Chromosomen eine X-förmige Struktur bilden. Zusätzlich bilden so genannte Centriolen zunächst zwei Centrosomen und mit Hilfe von Mikrotubuli den Spindelapparat und ordnen sich auf gegenüberliegenden Seiten des Zellkerns an, sodass sich zwei Pole bilden, weshalb dieser Mechanismus Polfaserbildung genannt wird. Außerdem werden vorhandene Kernkörperchen (Nucleoli) aufgelöst und das Zytoskelett abgebaut.</p>
	<p>Prometaphase: Die Kernmembran beginnt sich durch eine Phosphorylierung der beinhaltenen Lamine aufzulösen, wodurch es den Mikrotubuli des Spindelapparats ermöglicht wird eine Verbindung zu den Chromosomen aufzubauen, welche hierzu an den Centromeren sogenannte Kinetochore ausbilden.</p>
	<p>Metaphase: Die beiden Centromere beginnen mit Hilfe der an die Kinetochore gebunden Mikrotubuli die Chromosomen an sich zu ziehen, worauf sich die Chromosomen entlang der Äquatorialebene anordnen.</p>
	<p>Anaphase: Die aus zwei identischen Chromatiden bestehenden Chromosomen werden geteilt, sodass sogenannte Ein-Chromatid-Chromosomen entstehen, welche in Richtung der Pole wandern.</p>
	<p>Telophase: Nachdem die Chromosomen die Kernpole erreicht haben, beginnt die Ausbildung der Kernmembran und Auflösung des Spindelapparats. Anschließend tritt die Dekondensation der Chromosomen ein.</p>
	<p>Cytokinese: In der darauffolgenden Zellteilung entstehen zwei unabhängige und genetisch identische Tochterzellen. Die Zellteilung gehört nicht mehr zur eigentlichen Mitose, wird hier jedoch zur Vollständigkeit aufgeführt.</p>

Die Dauer eines Zellzyklus und dessen jeweiligen Phasen variiert unter verschiedenen Spezies und sogar unterschiedlichen Zelltypen innerhalb eines Organismus sehr stark. Viele eukaryotische Zellen, wozu auch die in dieser Arbeit verwendeten humanen Tumorzelllinien gehören, besitzen eine Zellzyk-

lusdauer von 18 bis 24 Stunden, woran die G1- und S-Phase mit je 6h – 9h, die G2-Phase mit 2h – 5h und die Mitose mit ca. 1h beteiligt sind. Für die Regulation des Zellzyklus sind zwei Klassen von Proteinen verantwortlich, die sogenannten Cyclin-abhängigen Kinasen (engl. *cyclin-dependent kinases*, CDKs) und deren Bindungspartner, die Cycline (Morgan 1997, Satyanarayana and Kaldis 2009). Während in Hefen hauptsächlich CDK1 den kompletten Zellzyklus durch Interaktion mit verschiedenen Cyclinen reguliert, gibt es in höheren Organismen über 20 funktionale Homologe, welche in einem komplizierten Netzwerk die Zellzyklusprogression steuern (Satyanarayana and Kaldis 2009). In humanen Zellen interagieren hierzu die verschiedenen CDKs mit 4 Hauptgruppen von Cyclinen, die in Cyclin A, B, D, und E eingeteilt werden. Diese werden durch CDKs zellzyklusspezifisch reguliert (Abbildung 4).

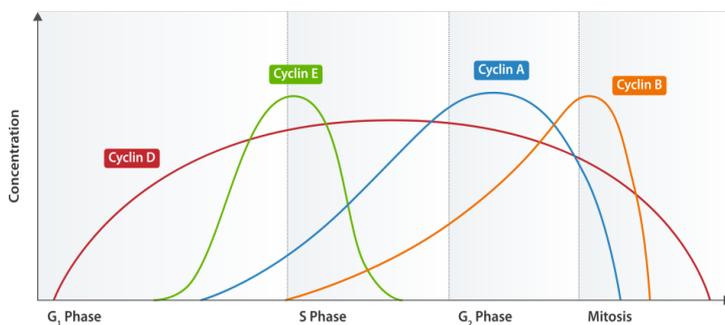


Abbildung 4: Schematische Darstellung der zellzyklusspezifischen Cyclinregulation

Während eines Zellzyklus nimmt die Cyclin D-Konzentration in einer Zelle von der G₁-Phase über die S-Phase zu und fällt anschließend bis zur Mitose wieder ab. Für den Eintritt in die S-Phase ist ein hoher Cyclin E –Spiegel erforderlich, und für die Progression in die G₂-Phase/Mitose sind hohe Cyclin A/B –Spiegel notwendig.

An wichtigen Stellen im Zellzyklus haben sich Kontrollmechanismen entwickelt, welche die Progression der Zelle vor allem bei Stress wie DNA-Schädigung verlangsamen oder gar verhindern können. Diese Punkte treten vor allem am Übergang von der G₁- zur S-Phase und von der G₂-Phase in die Mitose auf und werden als Zellzyklus-Checkpoints bezeichnet. Dieser Ausdruck bezieht sich auf Mechanismen, mit welchen die Zelle aktiv die Zellzyklusprogression anhalten kann, bis sichergestellt ist, dass ein vorausgehender Prozess wie die DNA-Replikation oder die Mitose vollständig beendet ist (Hartwell and Weinert 1989, Kastan and Bartek 2004). Außerdem wurden in den letzten Jahren Checkpoints identifiziert, welche die Progression der Zelle innerhalb der S-Phase und Mitose beeinflussen können. Zunächst soll jedoch die Frage nach der Funktionsweise und Einleitung von Checkpoints beantwortet werden.

Wie bereits beschrieben, ist die Aktivierung der Kinasen ATM oder ATR der erste und wichtigste Schritt zur Schadenserkenkung und zur Signaltransduktion. Während ATM vorrangig bei DNA-Schädigungen wie DSBs aktiviert wird, dient ATR zur zellulären Antwort auf arretierte Replikationsgabeln und einzelsträngige DNA-Bereiche (Abbildung 5). ATM und ATR phosphorylieren nach der Induktion eines DNA-DSBs sowohl Proteine im Kernplasma wie p53 als auch Proteine direkt an der Schadenstelle wie NBS1, *breast cancer 1* (BRCA1), MDC1, *p53 binding protein 1* (53BP1) oder *structural maintenance of chromosomes 1* (SMC1). Die extrem schnelle Autophosphorylierung von ATM nach DNA-Schädigung scheint dabei nicht eine direkte Bindung an einen DSB sondern vielmehr eine Veränderung der Chromatinstruktur in räumlicher Nähe zu benötigen (Bakkenist and Kastan 2003). Eine Aktivierung von ATR ist nicht nötig, um dessen Substrate zu phosphorylieren.

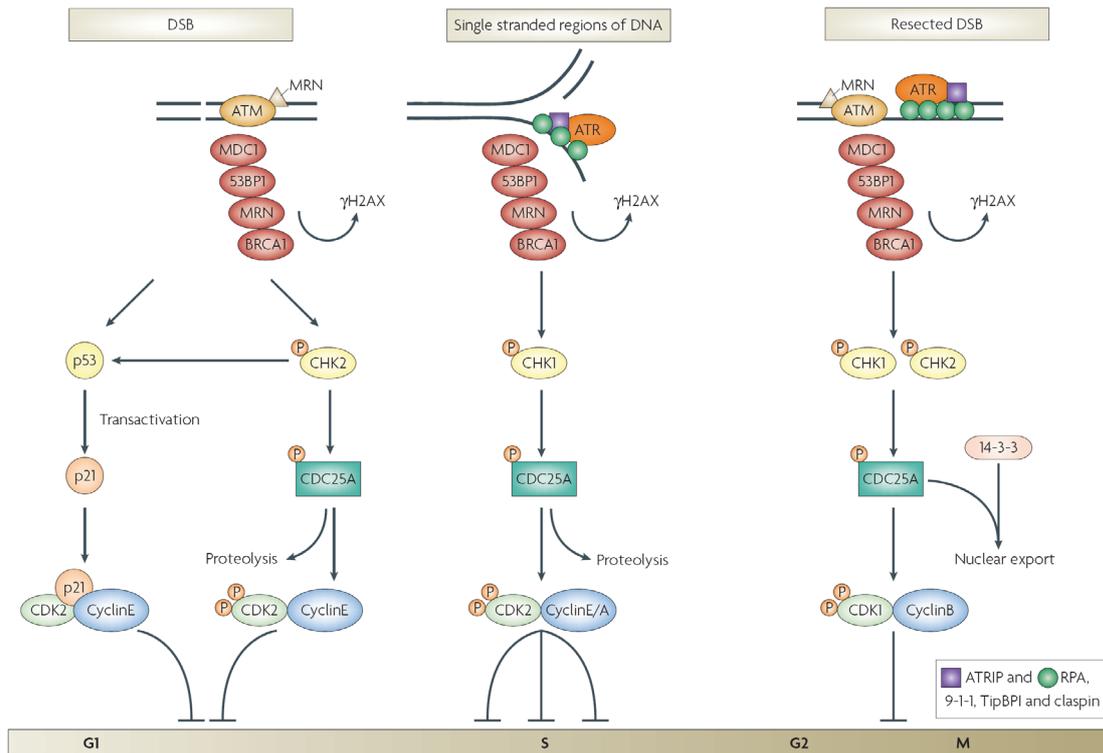


Abbildung 5: Übersicht der Signalkaskaden zur Aktivierung von Zellzykluscheckpoints

Die für Checkpoints erforderlichen Signalwege erfolgen initial über ATM und ATR. ATM dient hierbei der Schadensantwort auf DSBs, wobei dem MRN-Komplex eine aktivierende Funktion zugeschrieben wird (Uziel et al. 2003). ATR dient zur Schadensantwort auf einzelsträngige DNA-Bereiche und benötigt ATRIP, RPA, den RAD17-RFC2-5-Komplex, den RAD9-HUS1-RAD1-Komplex (9-1-1-Komplex), TOPBP1 und Claspin. Die Signalwege, welche das Schadenssignal amplifizieren, beinhalten Zellzyklus- und Checkpoint-unabhängig die Proteine MDC1, 53BP1, den MRN-Komplex und BRCA1. Obwohl ATM und ATR zu einem großen Teil die gleichen Substrate phosphorylieren und ATR einen ATM-Defekt teilweise kompensieren kann, zeigen die Kinasen eine Spezifität in der Phosphorylierung von CHK1 und CHK2. Es konnten zwei ATM-abhängige G1/S-Checkpoints beschrieben werden, wobei in der G1-Phase eine ATM-Aktivierung durch DSBs zu einer Phosphorylierung von CHK2 und einer damit verbundenen Phosphorylierung der Phosphatase CDC25A führt. Daraufhin wird CDC25A ubiquitiniert, was ein typisches Signal zur proteolytischen Degradierung von CDC25A darstellt. Als Folge kann CDC25A nicht mehr die aktivierende Dephosphorylierung von CDK2 an Thr14 und Tyr15 ausführen, was zum Checkpoint führt. Da dieser Signalweg post-translational abläuft, setzt der G1/S-Checkpoint sehr schnell nach Schadensinduktion ein. Der zweite Mechanismus zur G1/S-Checkpoint-Initiation beinhaltet den Tumorsuppressor p53, welcher direkt durch ATM oder indirekt über CHK2 aktiviert und stabilisiert wird. p53 dient hierbei als Transkriptionsfaktor für den CDK-Inhibitor p21. Aufgrund der Transkriptionsabhängigkeit von p21 zeigt dieser Signalweg der Checkpoint-Initiation eine Verzögerung nach Schadensinduktion durch zum Beispiel Röntgenstrahlen, was eine Rolle in der Aufrechterhaltung des G1/S-Checkpoints vermuten lässt. Kollabierte und arretierte Replikationsgabeln aktivierend in der S-Phase ATR, was zu einer Phosphorylierung von CHK1 und dadurch zur Phosphorylierung und Degradierung von CDC25A führt. Ein weiterer Signalweg zur Induktion von Intra-S-Checkpoints beinhaltet die Proteine BRCA1, FANCD2, SMC1 und den MRN-Komplex (in Abbildung nicht dargestellt). In der G2-Phase kann ATM entweder direkt über einen DSB aktiviert, oder ATR nach Resektion des Bruchs. Dies hat abhängig von der Aktivierung von ATM oder ATR eine aktivierende Phosphorylierung von CHK2 bzw. CHK1 zur Folge, was die Initiierung des Checkpoints durch CDC25C auslöst (Lobrich and Jeggo 2007).

Vor und nach der Schädigung von DNA, zum Beispiel durch ultraviolettes Licht, liegt ATR als Komplex mit ATRIP vor (Cortez et al. 2001). Zou und Elledge konnten im Jahr 2003 zeigen, dass ATRIP in *in vitro* Versuchen vermehrt an RPA bindet (Zou and Elledge 2003). Dieses Protein flankiert während der DNA-Replikation und bei Reparaturprozessen einzelsträngige DNA-Bereiche, welche vor allem bei arretierten Replikationsgabeln gehäuft auftreten. Dieses Ergebnis unterstützt ein Modell bei welchem jeglicher Schaden, welcher zu einer Arretierung von Replikationsgabeln und damit zur RPA-Bindung führt,

eine Rekrutierung von ATRIP und damit auch ATR direkt zum Schadensort hervorruft. Von hieraus kann ATR wichtige Substrate wie RAD17 und die *Checkpoint kinase 1* (CHK1) phosphorylieren (Kastan and Bartek 2004). Während Zellen ohne ATM lebensfähig sind, ist eine ATR-Defizienz letal (Brown and Baltimore 2003), was darauf schließen lässt, dass ATR auch für eine normale Zellzyklusprogression ohne exogene DNA Schädigung essentiell ist. Außerdem kann angenommen werden, dass ATR einen ATM-Defekt zumindest teilweise kompensieren kann, da viele Substrate von ATM auch von ATR phosphoryliert werden können. Um nun eine gleichzeitige Rekrutierung von Reparaturproteinen und die Induktion von Checkpoints zu gewährleisten, interagieren ATM und ATR mit sogenannten Checkpoint-Mediatoren und den Checkpoint-Kinasen CHK1 und CHK2 (Bartek and Lukas 2003).

Den wohl dominantesten Checkpoint menschlicher Zellen stellt nach Schädigung der DNA der ATM/CHK2-p53/MDM2-P21 -vermittelte G1-Checkpoint dar, welcher einen nachhaltigen und gegebenenfalls permanenten Arrest auslösen kann (Kastan and Lim 2000). Während die Expression von ATM und CHK2 durch den kompletten Zellzyklus relativ konstant bleibt, sind die Konzentrationen an ATR und CHK1 in der G1-Phase verhältnismäßig niedrig und steigen erst mit der Progression der Zelle in die S-Phase an (Kastan and Bartek 2004). Nach DNA-Schädigung wird p53 einerseits direkt von ATM und ATR und andererseits indirekt über CHK1 und CHK2 phosphoryliert (Shiloh 2003). Zusätzlich wird die Ubiquitin-Ligase *mouse double minute 2 homolog* (MDM2) aktiviert, was eine Anhäufung von p53 zur Folge hat, welches als Transkriptionsfaktor aktiv ist (Maya et al. 2001). In der Zellzykluskontrolle stellt die Transkription des CDK-Inhibitors p21 eine Schlüsselfunktion von p53 dar, welche den zum Übertritt von der G1- zur S-Phase erforderlichen Cyclin E/CDK2-Komplex stilllegt. Außerdem wird als DNA-Schadensantwort das Protein *cell division cycle 25 homolog A* (CDC25A) degradiert, was ebenso zu einer verminderten Aktivität von Cyclin E/CDK2 führt (Donzelli and Draetta 2003). Während dieser transkriptionsunabhängige Weg der Inhibition sehr schnell einsetzt jedoch nur einige Stunden aufrecht erhalten werden kann, sorgt die p53-abhängige Antwort für einen fortwährenden G1-Arrest der Zelle (Kastan and Bartek 2004).

Innerhalb der S-Phase resultieren Intra-S-Phase-Checkpoints hauptsächlich in einer reduzierten Aktivierung von DNA-Replikations-Startpunkten, sogenannten *replication-origins*, woraus eine Verlangsamung der DNA-Synthese resultiert, sowie der Stabilisation von arretierten Replikationsgabeln. Die Checkpoints werden hauptsächlich über ATM und ATR gesteuert, wobei diese einerseits die über die CDC25A-Degradation stattfindende Inhibition von CDK2 und andererseits die Phosphorylierung von NBS1 regulieren. Eine reduzierte CDK2-Aktivität ruft hierbei eine verminderte Beladung von CDC45 auf das Chromatin hervor, was benötigt wird um die DNA Polymerase α zu sogenannten Pre-Replikationskomplexen zu rekrutieren, wodurch die Aktivierung neuer *replication-origins* verhindert wird (Bartek et al. 2004). Eine weitere Möglichkeit zur Induktion von Intra-S-Phase-Checkpoints beruht auf der ATM- und ATR-vermittelten Phosphorylierung von NBS1 und SMC1 an mehreren Stellen, als wichtigste jedoch an Serin 343 von NBS1 (Kastan and Lim 2000) und an Serin 957 und 966 von SMC1 (Kitagawa et al. 2004). Außerdem sind an diesem Weg der Checkpoint-Induktion die Proteine BRCA1 und *Fanconi anaemia complementation group D2* (FANCD2) beteiligt (Nakanishi et al. 2002). Grundsätzlich können drei verschiedenen Schadensarten zur Induktion von Intra-S-Phase-Checkpoints unterschieden werden (Bartek et al. 2004). Der replikationsabhängige Checkpoint wird induziert wenn Replikationsgabeln durch eine Depletion des Nukleotidpools, eine Kollision mit aberranten DNA-Strukturen oder durch chemische Inhibition der DNA-Polymerasen arretiert werden. Schlüsselfaktoren bei dieser Art von Checkpoint sind RPA, der ATR-ATRIP-Komplex, Claspin, RAD17 und der 9-1-1-

Komplex. Die Funktionen dieses Checkpoints liegen zum einen in der Inhibition der Initiation neuer *replication-origins* durch Einflussnahme auf die Cyclin/CDK- und CDC7/DBF4-Kinasen, welche die Initiierung und Ausbildung neuer *replication-origins* steuern (Jares et al. 2000). Zum Anderen dient dieser Checkpoint zum Schutz der Integrität von arretierten Replikationsgabeln und zur Wiederaufnahme der Zellzyklusprogression, nachdem eine DNA-Reparatur stattgefunden hat oder der Nukleotidpool wieder aufgefüllt wurde (Lopes et al. 2001, Bartek et al. 2004). Ein weiterer Intra-S-Phase-Checkpoint verhindert, dass Zellen eine Zellteilung einleiten bevor das gesamte Genom dupliziert wurde. Dieser so genannte S-M-Checkpoint beruht hauptsächlich auf der Aktivität des Cyclin-B/CDK1-Komplex. Der dritte Intra-S-Phase-Checkpoint wird durch die Generierung von DSBs eingeleitet, welche unabhängig und außerhalb aktiver Replikationsbereiche liegen. Allen gemeinsam ist jedoch, dass keiner der drei genannten Intra-S-Phase-Checkpoints auf das Protein p53 angewiesen ist, welches das Schlüsselprotein des bereits beschriebenen G1-Checkpoints darstellt (Bartek and Lukas 2001).

Während der G1-Checkpoint und die Intra-S-Phase-Checkpoints sehr sensibel auf DSBs reagieren, konnte gezeigt werden, dass der G2/M-Checkpoint, welcher DNA-geschädigte Zellen an einem Eintritt in die Mitose hindern soll, verhältnismäßig insensitive mit einer Schwelle von 10-20 DSBs ist (Deckbar et al. 2007, Lobrich and Jeggo 2007). Ähnlich der Aktivierung des G1/S- und der Intra-S-Phase-Checkpoints erfolgt die Initiierung des G2/M-Checkpoints durch die Phosphorylierung der Checkpoint-Kinasen CHK1 und CHK2 als auch spezifisch über CDC25C. Dies verhindert in der G2-Phase eine Dephosphorylierung von Cyclin B/CDK1-Komplexen, was für eine Progression der Zelle in die Mitose erforderlich ist (Lukas et al. 2004, Lobrich and Jeggo 2007). Gründe für die hohe Insensitivität des G2/M-Checkpoints könnte eine verringerte ATM-Konzentration und damit verbunden eine verminderte Signaltransduktion an DSBs darstellen, welche in Folge der Reparatur resektiert wurden. Die Auswirkungen dieser Insensitivität sind weiterhin Bestandteil heutiger Forschungen.

Kann die Reparatur von DNA-Schäden nicht durch die Einleitung von Zellzykluscheckpoints bewerkstelligt werden, so bleibt der Zelle eine weitere und letzte Möglichkeit einer potentiellen Entartung vorzubeugen und so die Entstehung einer Krebszelle zu verhindern, indem sie den programmierten Zelltod, die so genannte Apoptose, einleitet. Die Apoptose ist ein Mechanismus, der nicht nur während der Entwicklung von Geweben und Organen, wie zum Beispiel der Trennung von Fingern in der Embryonalentwicklung dient, sondern auch der Entartung von Zellen nach DNA-Schädigung vorbeugt. Hierbei wird in einem komplexen System von Signalen, die hauptsächlich über so genannte Caspasen weitergeleitet werden, ein programmierter Zelltod herbeigeführt. Bevor eine Zelle diesen Ausweg zur Erhaltung von Gewebe und Vermeidung der Krebsentstehung „wählt“, versucht sie mit höchst effektiven Reparaturmechanismen entstandene DNA-Schäden zu reparieren.

1.3 Mechanismen zur Reparatur von DNA-Schäden

Aufgrund der hohen Diversität an DNA-Schäden haben sich in eukaryotischen Zellen vielfältige Reparaturmechanismen entwickelt, um den unterschiedlichen Anforderungen, die verschiedene DNA-Schäden an die Reparatur stellen, gerecht zu werden. Da in der vorliegenden Arbeit der Focus auf Mechanismen zur Reparatur von DSBs, sowie spezifischen Wegen zur Reparatur von replikationsassoziierten DNA-Schäden liegt, wird auf Reparaturmechanismen wie MMR und NER nicht eingegangen.

Für die Reparatur eines DSBs stehen drei unabhängige Reparaturwege zur Verfügung, welche in die Nichthomologe Endverknüpfung (engl. *non-homologous end-joining*, NHEJ), die Homologe Rekombination (HR) und die sogenannte Einzelstranganlagerung (engl. *single strand annealing*, SSA) unterteilt werden können, wobei das SSA einen Nebenweg der DSB-Reparatur darstellt und deshalb nur kurz erläutert wird. Das SSA ist ein Homologie-spezifischer Reparaturweg, welcher die Rekombination an Tandem-Regionen der DNA (engl. *tandem repeats*) fördert, wobei RPA-beladene ssDNA durch RAD52 an resektierte Bereiche des zweiten DNA-Endes verknüpft wird (Krogh and Symington 2004). Hierbei ist weder eine Stranginvasion, noch RAD51 von Nöten. SSA und HR konkurrieren bei der DNA-Reparatur mit einander, wobei das SSA ausreichend große, resektierte Bereiche benötigt, um benachbarte Tandem-Regionen offen zu legen. Dieser Prozess des SSAs führt jedoch in der Regel zu einer Deletion der interstitiellen DNA und einer der Tandem-Regionen (Heyer et al. 2010).

Die beiden Hauptreparaturwege für DSBs stellen das NHEJ und die HR dar. Wie die Namen dieser Mechanismen bereits vermuten lassen, besteht der größte Unterschied zwischen den Reparaturwegen in der Notwendigkeit von Homologien der zu reparierenden DNA. Während die HR zur Reparatur eines DSBs das Vorhandensein eines homologen DNA-Bereichs benötigt, stellt der NHEJ-Prozess eine direkte Verknüpfung zweier Bruchenden dar, welche nicht auf homologe DNA-Sequenzen angewiesen ist. Als Konsequenz hieraus kann sich eine eukaryotische Zelle zur Reparatur von DSBs während des kompletten Zellzyklus des NHEJs bedienen und zusätzlich der HR wenn die DNA in der S- und G2-Phase repliziert wurde (Rothkamm et al. 2003). Hierbei konnte gezeigt werden, dass der größte Anteil an HR mit dem Zeitpunkt der maximalen Replikationsaktivität einer Zelle in der Mitte der S-Phase korreliert (Karanam et al. 2012) (Abbildung 6). Dies könnte auf eine Präferenz von replikationsassoziierten DNA-Schäden für die Reparatur via HR hindeuten. Wie hoch der Anteil der HR an der Reparatur von DSBs ist, hängt jedoch zusätzlich stark von der Art und Lokalisation des Schadens ab. Nach einer Bestrahlung von eukaryotischen G2-Phase-Zellen mit Röntgenstrahlen konnte gezeigt werden, dass der HR-Anteil an der Reparatur von DSBs ca. 15% beträgt (Beucher et al. 2009). Dieser Anteil variiert jedoch mit der Komplexität des Schadens. So leistet die HR an der Reparatur von weniger komplexen Brüchen, die zum Beispiel durch den Topoisomerase II-Inhibitor Etoposid erzeugt werden (siehe auch 1.X.X), eine Beteiligung, welche deutlich weniger als 15% beträgt. Im Gegensatz hierzu steigt die HR-Beteiligung an sehr komplexen DNA-Schäden, welche beispielsweise durch Schwerionen induziert werden (Shibata et al. 2011). Außerdem konnte gezeigt werden, dass strahleninduzierte DSBs, welche im Heterochromatin lokalisiert sind, hauptsächlich von der HR abhängig sind (Goodarzi et al. 2008, Jeggo et al. 2011).

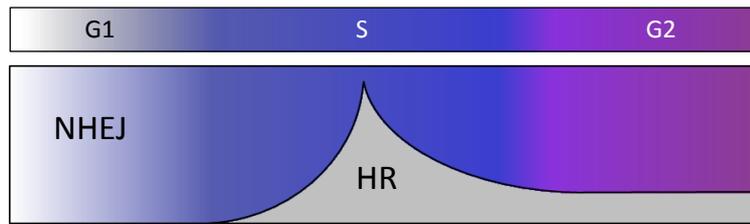


Abbildung 6: Beteiligung der Reparaturwege an der DSB-Reparatur während des Zellzyklus

In der G1-Phase des Zellzyklus kann eine Zelle zur Reparatur von DSBs keine HR benutzen, da hierfür die homologe Sequenz fehlt, sodass sämtliche DSBs über das NHEJ repariert werden. Während der S-Phase nimmt der Anteil an HR deutlich zu und erreicht in Korrelation mit der höchsten Replikationsaktivität sein Maximum (Karanam et al. 2012). In der G2-Phase ist trotz vollständigen homologen DNA-Sequenzen das NHEJ wieder der vorherrschende Weg für die Reparatur von DSBs. Nach einer Bestrahlung mit Röntgenstrahlen wird in der G2-Phase eine Fraktion von ca. 15% der induzierten DSBs HR-abhängig repariert (Beucher et al. 2009).

Sowohl NHEJ als auch HR bergen Vor- und Nachteile bezüglich der DNA-Reparatur. Das NHEJ gilt als Reparaturprozess, welcher eine schnelle Ligation zweier Doppelstrangbruchenden begünstigt, was allerdings nicht immer fehlerfrei abläuft und in Deletionen, Insertionen und Substitutionen direkt an der Bruchstelle, sowie in Translokationen resultieren kann, wenn Bruchenden von verschiedenen DSBs miteinander verknüpft werden (Lieber 2010). Dem gegenüber stellt die HR einen vorwiegend fehlerfreien Reparaturmechanismus dar, welcher neben der limitierenden Notwendigkeit eines Schwesterchromatids eine komplizierte Prozessierung des Bruchs erfordert. Hierbei werden die Bruchenden resektiert, sodass einzelsträngige 3'-DNA-Überhänge entstehen, welche von RPA und anschließend RAD51 beladen werden. Dieses sogenannte RAD51-Nukleoproteinfilament vollzieht eine Homologiesuche und nach erfolgreicher Suche eine Stranginvasion in die doppelsträngige DNA-Sequenz auf der Schwesterchromatide, welche als Vorlage zur Reparatur genutzt werden kann (Chapman et al. 2012). Die Auflösung der so entstandenen Struktur kann auf unterschiedliche Weisen erfolgen und zu *Crossover*- oder *Non-Crossover*-Produkten führen (siehe Kapitel 1.3.2.3). Studien in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konnten zeigen, dass als Matrize für die HR vorwiegend das Schwesterchromatid und nicht das homologe Chromosom dient (Kadyk and Hartwell 1992). Grundsätzlich kann angenommen werden, dass eine Resektion von DSBs die Wahrscheinlichkeit der Reparatur mittels der einzelstrangabhängigen Mechanismen SSA und HR enorm erhöht. Dennoch ist die Resektion von DSBs stark reguliert und speziell in der G1-Phase durch die Bindung des KU70/KU80-Heterodimers supprimiert (Tomita et al. 2003).

Die Frage, welche DSBs nun von welchem Reparaturweg repariert werden und was der Wahl eines Weges zu Grunde liegt, stellt einen Schwerpunkt der heutigen DNA-Reparatur-Forschung dar. Obwohl die Mechanismen des NHEJs und der HR größtenteils bekannt sind, finden sich stets neue Proteine, welchen eine Beteiligung an der Reparatur zugeschrieben wird. Die bekannten, grundsätzlichen Funktionsweisen des NHEJ und der HR sollen im Folgenden beschrieben werden.

1.3.1 Nichthomologe Endverknüpfung

Das NHEJ ist der Hauptreparaturweg für DSBs und beschreibt die Ligation zweier Bruchenden, welche unabhängig von der Sequenz des geschädigten Bereichs erfolgt (Weterings and van Gent 2004). Der Prozess beinhaltet das „Fangen“, sowie die Zusammenführung und Ligation der beiden, getrennten DNA-Enden (Abbildung 7).

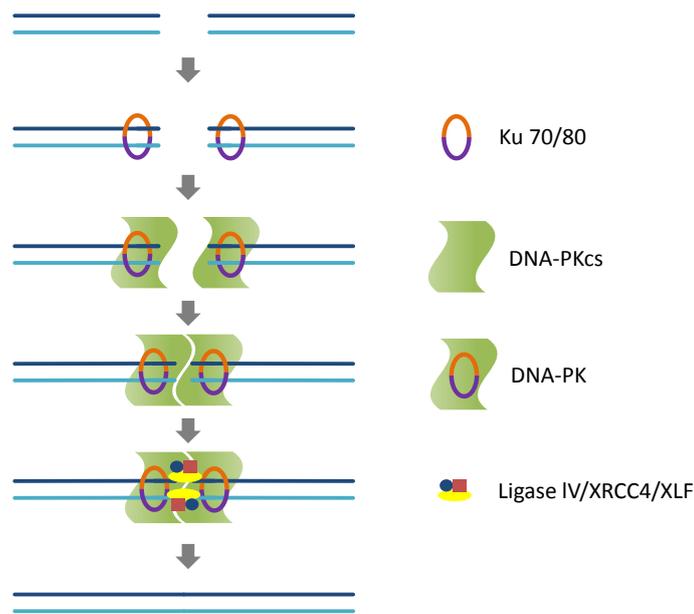


Abbildung 7: Schematische Darstellung der DSB-Reparatur via NHEJ

Ein DSB wird von dem KU70/KU80-Heterodimer erkannt, welches eine Ringstruktur um die DSB-Enden bildet. Zusammen mit der DNA-PKcs bildet KU70/KU80 das DNA-PK-Holoenzym. Dieses führt die beiden DNA-Enden zusammen, sodass ein Komplex aus Ligase IV, XRCC4 und XLF den DSB ligieren kann.

Hierbei wird ein doppelsträngiges DNA-Bruchende zunächst von dem KU70/KU80-Heterodimer erkannt und gebunden. Das KU70/KU80-Heterodimer stellt eine Ringstruktur dar, welche eine hohe Affinität zu offenen DNA-Enden besitzt und nach der Bindung an den Bruch ein Gerüst für weitere NHEJ-Reparaturproteine bildet (Walker et al. 2001). Das erste dieser zum Schadensort rekrutierten Proteine ist die 460kD große Serin-/Threonin-Kinase *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit* (DNA-PKcs). Zusammen mit dem KU70/KU80-Heterodimer bildet sie die *DNA-dependent protein kinase* (DNA-PK), welche die DNA-Enden zusammenhält, und für die folgende Ligation positioniert (Weterings and Chen 2007). Nicht komplementäre DNA-Enden müssen hierfür jedoch zunächst prozessiert werden. Einzelsträngige DNA-Überhänge können dabei entweder aufgefüllt oder resektiert werden, wobei die Polymerasen μ und λ , die terminale Desoxy-nukleotidyltransferase, die Polynukleotidkinase und diverse Nukleasen eine Rolle spielen (Weterings and Chen 2007). Der Endonuklease Artemis wird hierbei eine besondere Bedeutung bei der Prozessierung von komplizierten Bruch- oder sogenannten Haarnadelstrukturen zugeschrieben (Riballo et al. 2004, Jeggo and Lobrich 2005). Anschließend erfolgt die Ligation der Bruchenden durch den Ligase IV-/XRCC4-Komplex in Verbindung mit dem *nonhomologous end-joining factor 1*, auch bekannt als *XRCC4-like factor* (XLF).

Neben dem in Abbildung 7 beschriebenen, sogenannten kanonischen Weg des NHEJs (c-NHEJ oder DNA-PKcs-dependent, D-NHEJ) gibt es weitere, alternative Varianten dieses Reparaturwegs (engl. *backup-NHEJ*, B-NHEJ), welche in bestimmten Situationen in Kraft treten können, auf die in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht weiter eingegangen wird. Wie zuvor beschrieben ist das NHEJ der wichtigste Reparaturweg für einen Großteil der DSBs. Vor allem in der S-Phase stellt die HR jedoch für einen beträchtlichen Teil der DSBs, und in der G2-Phase für eine Fraktion der DSBs, den bevorzugten Mechanismus der DNA-Reparatur dar.

1.3.2 Homologe Rekombination

Bei der Homologen Rekombination ist zunächst zwischen der Reparatur von sogenannten ein-endigen und zwei-endigen DNA-Doppelstrangbrüchen zu unterscheiden. Die Reparaturprozesse, welche hauptsächlich für ein-endige DSBs zuständig sind, die in der S-Phase an Replikationsgabeln entstehen können, werden in Kapitel 1.4 beschrieben. Zunächst soll auf die grundlegenden Mechanismen der HR an zwei-endigen DSBs eingegangen werden. Hierbei kann die HR in drei Phasen eingeteilt werden, welche als *Presynapsis*, *Synapsis* und *Postsynapsis* bezeichnet werden (Heyer et al. 2010).

Während der *Presynapsis* wird ein DSB prozessiert, wobei die DNA-Stränge in 5'-3'-Richtung resektiert werden, um an beiden Enden des DSBs 3'-Überhänge entstehen zu lassen, welche im Anschluss von dem Protein RPA gebunden werden. Dieser Mechanismus benötigt den MRN-Komplex, die Nukleasen *Exonuclease 1* (EXO1), *DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease DNA2* (DNA2) und das *C-terminal-binding protein 1 interacting protein* (CTIP), sowie die Helicase *RECQ helicase-like 2* oder auch *Bloom syndrome Protein* (BLM) genannt (Mimitou and Symington 2009). RPA verhindert dabei die Ausbildung von Sekundärstrukturen der einzelsträngigen DNA und zunächst auch die Bindung von RAD51 an den Einzelstrang, was Mediatorproteinen einen Zeitraum verschafft zum Schadensort rekrutiert zu werden (Heyer et al. 2010). Die Mediatoren können unterteilt werden in die RAD51-Paraloge RAD51 B, C, D, *X-Ray repair cross complementing protein* (XRCC) 2 und 3, das Mediatorprotein RAD52, welches eine Funktion bei der Stranganlagerung besitzt und den Mediator BRCA2. Letzterer besitzt sowohl Einzelstrangbindemotive (*OB-folds*) und Doppelstrangbindemotive (*tower-domain*), als auch mehrere RAD51-Bindestellen, was eine Funktion bei der Beladung von DNA mit RAD51 an DSBs und resektierten Bereichen impliziert (Yang et al. 2005).

Die Synapsis beschreibt die Homologiesuche des geschädigten DNA-Bereichs auf dem Schwesterchromatid und die Stranginvasion des RAD51-Nukleoproteinfilaments durch Ausbildung eines sogenannten *displacement loops* (D-loop), womit die DNA-Synthese eingeleitet wird. RAD54 unterstützt hierbei die D-loop-Ausbildung und entfernt RAD51 vor der DNA-Synthese von der Heteroduplex-DNA (Heyer et al. 2010). Mit Einleitung der Postsynapsis, welche zur Auflösung der während der HR entstandenen Strukturen dient, können drei Wege unterschieden werden (Abbildung 8). Ohne vorliegendes, zweites DNA-Ende bildet der D-loop eine vollwertige Replikationsgabel aus, was als bruchinduzierte Replikation (engl. *break-induced replication*, BIR) bezeichnet wird (Abbildung 8, BIR). Ist an einem DSB ein zweites DNA-Ende in räumlicher Nähe vorhanden, so ist der vorherrschende Reparaturweg die so genannte syntheseabhängige Stranganlagerung (engl. *synthesis-dependent strand annealing*, SDSA), wobei der D-loop aufgelöst wird und der neusynthetisierte Strang an den resektierten Bereich des zweiten DNA-Endes bindet (Sung and Klein 2006, Marini and Krejci 2012). Dieser Weg unterbindet von Natur aus die Ausbildung von Schwesterchromatidaustauschen (engl. *Sister chromatid exchanges*, SCEs), den bereits beschriebenen *Crossover* (Abbildung 8, SDSA). Die dritte Möglichkeit die HR abzuschließen ist die Bildung einer doppelten Holliday-Struktur (engl. *double-Holliday-junction*, dHJ) und deren Auflösung mit Hilfe der Proteine BLM, FANCM, *Gen endonuclease homolog 1* (GEN1), sowie *methylmethansulfonate and ultraviolet sensitive 81* (MUS81) und *essential meiotic endonuclease 1 homolog 1* (EME1) unter der möglichen Ausbildung eines *Crossover*-Produkts (Heyer et al. 2010) (Abbildung 8, dHJ subpathway).

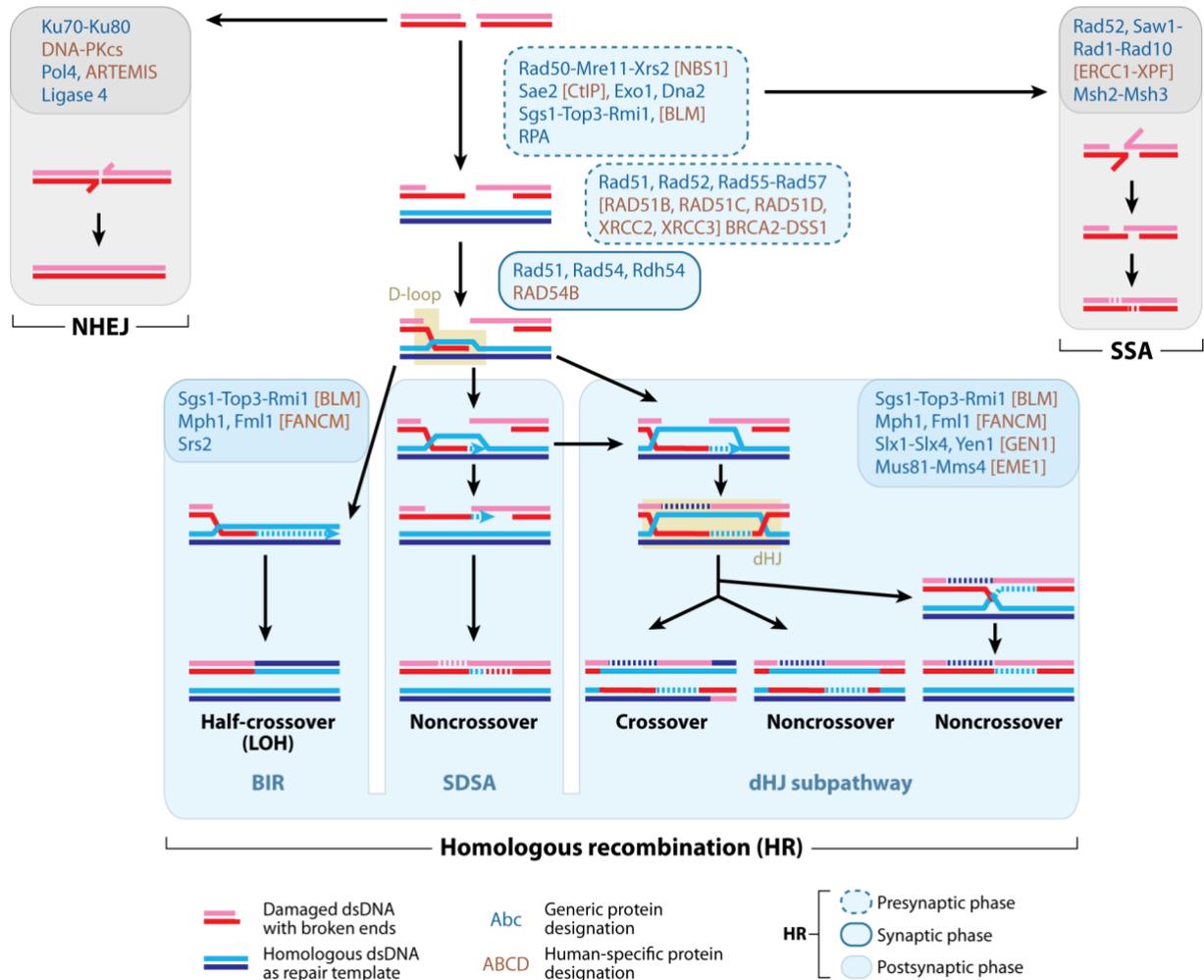


Abbildung 8: Wege der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Ausgehend von einem DSB kann eine Zelle drei verschiedene Wege der DSB-Reparatur zur Behebung des Schadens und damit zur Wiederherstellung der genomischen Integrität einschlagen. Es kann zwischen den Wegen des NHEJ und SSAs, sowie der HR unterschieden werden, wobei diese sich sowohl in Ihren Mechanismen als auch in der Beteiligung verschiedener Proteine voneinander abgrenzen. Bei der HR können ausgehend von der Struktur des D-loops weitere Reparaturunterwege unterschieden werden. Bezeichnungen in blauer Schrift beziehen sich auf Proteine der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Im humanen System abweichende Namen sind in Klammern und braun abgebildet. Bei humanen Proteinen ohne vorhandenes Hefe-Analogon wurde auf Klammern verzichtet. Gestrichelte Linien stellen neu synthetisierte DNA dar (Heyer et al. 2010).

Wie aus Abbildung 8 ersichtlich wird, beginnt die HR immer mit den gleichen oder zumindest ähnlichen Prozessen, welche die Resektion, die Homologiesuche und die Stranginvasion unter Ausbildung des D-Loops beinhalten, was in Abbildung 9 detaillierter dargestellt ist.

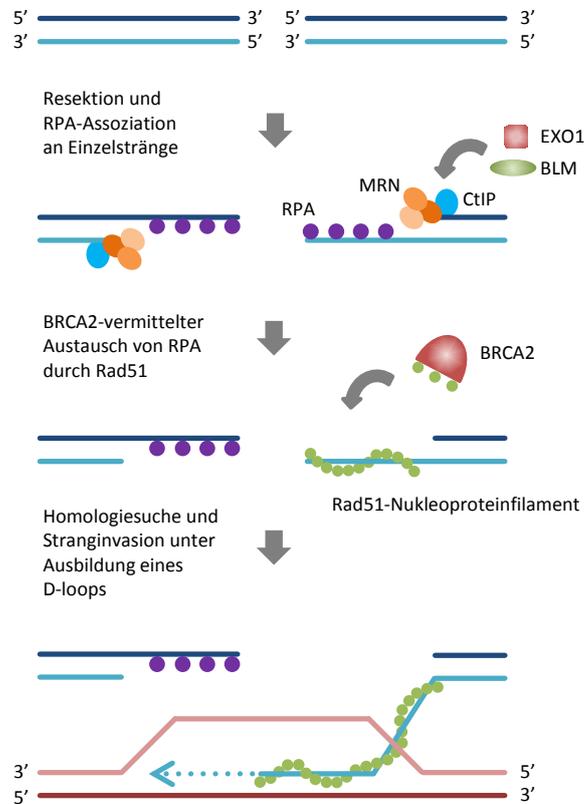


Abbildung 9: Bildung des RAD51-Nukleoproteinfilaments und D-loops im Zuge der HR

Für die Initiation der HR werden zunächst die DSB-Enden in 5'-3'-Richtung resektiert. Hierfür erkennt und bindet der MRN-Komplex die Schadensstelle und vollzieht zusammen mit der Nuklease CtIP die initiale Resektion. An der weiterführenden Resektion wird eine Beteiligung der Helikase BLM und der Exonuklease 1 (EXO1) postuliert. Die resultierenden, einzelsträngigen 3'-Überhänge werden von RPA erkannt und gebunden. Dies stellt eine Zielstruktur für BRCA2 dar, welches das gebundene RPA durch RAD51 austauscht. Das so gebildete RAD51-Nukleoproteinfilament vollzieht anschließend die Homologiesuche und Stranginvasion in den homologen Bereich der Schwesterchromatide unter Ausbildung einer D-loop-Struktur. Es folgt die Synthese der zuvor geschädigten DNA-Sequenz in 5'-3'-Richtung.

Ausgehend von der Struktur des D-loops kann die HR, wie aus Abbildung 8 ersichtlich wurde, in verschiedene Reparatur-Unterwege eingeteilt werden, welche komplizierte Mechanismen und für die vorliegende Arbeit wichtige Aspekte darstellen.

1.3.2.1 Break-induced replication

Die BIR ist ein Prozess, mit dem eine Zelle im Zuge der Reparatur von DSBs große Regionen von DNA duplizieren kann. Diese einige 100 Kilobasen (kb) umfassenden Bereiche sind in ihrer Größe mit DNA vergleichbar, welche während der S-Phase von einer Replikationsgabel an einem Stück repliziert und als Replikon bezeichnet wird (Deem et al. 2011). Bei der Vielfältigkeit an Reparaturprozessen ist die BIR für die Reparatur von kollabierten Replikationsgabeln, und demzufolge ein-endigen DSBs, sowie der Stabilisation von ungeschützten Telomer-Enden spezialisiert. Im Gegensatz zu anderen Reparaturwegen, wie dem NHEJ oder dem SSA, zeichnet sich die BIR durch die Ausbildung einer BIR-Replikationsgabel aus (Lydeard et al. 2007), welche nahezu die gleichen Proteine wie eine „normale“ Replikationsgabel während der S-Phase benötigt (Lydeard et al. 2010, Deem et al. 2011). Hierzu wird das Ende eines DSBs resektiert, sodass wie in Abbildung 8 und 9 beschrieben das freie 3'-Ende in den homologen DNA Strang einwandern und einen D-loop bilden kann. An den frei-gewordenen, gegenüberliegenden Strang können Primasen binden und so eine neue Replikationsgabel initiieren (Llorente et al. 2008). Unterschiede konnten bisher in der Notwendigkeit von spezifischen Polymerasen und deren Untereinheiten sowie in den Aufgaben und Geschwindigkeiten der Polymerasen zu frühen und späten Zeiten der Replikation gezeigt werden (Lydeard et al. 2007, Jain et al. 2009). Im Vergleich zu anderen Reparaturmechanismen wie dem SDSA kann davon ausgegangen werden, dass die BIR wesentlich langsamer abläuft (Heyer et al. 2010). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die räumliche Nähe eines zweiten DNA-Bruch-Endes die BIR supprimiert und dadurch andere, fehlerfreiere Reparaturmechanismen favorisiert werden (Jain et al. 2009). Obwohl die chromosomale Integrität mit dem Prozess der BIR vollständig wieder hergestellt werden kann, stellt die BIR für die Reparatur zweiseitiger DSBs einen sehr inakkuraten Reparaturweg dar, sodass der BIR hierfür eine untergeordnete Rolle zugeschrieben wird. Die BIR kann sogar zum Verlust der Heterozygotie (engl. *loss of heterozygosity*, LOH), chromosomalen Translokationen und alternativer Telomerverlängerung führen, welche potentielle Auslöser von Krebs darstellen (Deem et al. 2011), wenn eine Stranginvasion in einem Bereich der DNA abseits der homologen Sequenz des Schwesterchromatids, beispielsweise auf dem homologen Chromosom, stattfindet. Ein LOH birgt ein großes Risiko für die Zelle, da pathogene Mutationen eines Gens nicht mehr durch eine funktionierende Version des zweiten Gens ausgeglichen werden können (Heyer et al. 2010). In welchen Fällen die Reparatur eines DSBs via BIR sinnvoll ist und wann Zellen diesen Weg zur Reparatur von DSBs wählen ist weiterhin Bestandteil der Forschung und wird unter 1.4.1 und 1.4.2 genauer beschrieben. Einen vergleichsweise „sicheren“ Reparaturweg bietet das SDSA, welches im Folgenden dargestellt wird.

1.3.2.2 Synthesis-dependent strand annealing

Das SDSA wird als der dominierende HR-Weg angesehen, um Homologie-vermittelt zwei-endige DSBs zu reparieren (Heyer et al. 2010). Dieser vergleichsweise einfache Reparaturweg bedient sich zunächst einer 5'-3'-Resektion der Bruchenden, um einzelsträngige 3'-DNA-Überhänge zu generieren (Abbildung 10).

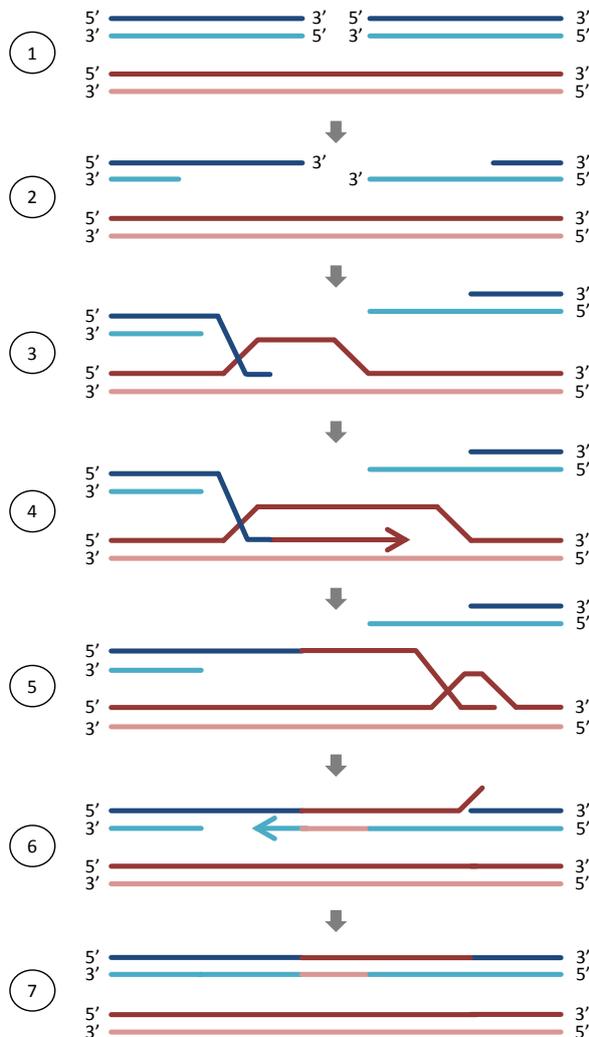


Abbildung 10: Schematisches Modell für den Mechanismus des SDSA

Das SDSA wird durch die 5'-Resektion der DSB-Enden eingeleitet (2). Nachdem die HR-typischen Proteine (RPA, RAD51) die 3'-DNA-Überhänge gebunden haben, erfolgt die Homologiesuche und Stranginvasion eines DNA-Endes des DSBs in das Schwesterchromatid, wodurch so genannte Heteroduplex-DNA und der D-Loop erzeugt werden (3). Der Stranginvasion folgt die DNA-Synthese über die eigentliche Bruchstelle hinaus, um so die fehlende DNA-Sequenz wieder herzustellen (4) (Helleday et al. 2007). Auf der anderen Seite des D-Loops wird zwischen der Hetero- und Homoduplex-DNA eine X-förmige Struktur gebildet, welche als einfache *Holliday Junction* (HJ) bezeichnet wird (Holliday 1966). Diese HJ kann durch Modulation von bestimmten Proteinen in beide Richtungen der DNA verschoben werden, was als *branch migration* bezeichnet wird (Helleday et al. 2007). Die HJ wird in Syntheserichtung der neu-entstandenen DNA soweit verschoben (5), bis sich die neu-synthetisierte Sequenz mit der Sequenz des zweiten DNA-Endes gleich und der neu-synthetisierte Strang von seiner komplementären Matrize abgelöst werden kann. Eine Prozessierung der zu viel synthetisierten Bereiche, das Auffüllen von einzelsträngigen Bereichen (6) und die Ligation der DNA-Enden vervollständigt den Prozess des SDSA (7).

Wie in allen HR-Prozessen besitzt das Protein RAD51 in Assoziation mit weiteren Proteinen (wie BRCA2, RAD52, RAD54, RAD54B und den RAD51-Paralogen RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 und XRCC3) auch bei der Reparatur von DSBs durch SDSA eine Schlüsselfunktion, indem es hauptsächlich an der Homologiesuche und der Stranginvasion beteiligt ist (Baumann et al. 1996, Helleday et al. 2007). Nach der Bildung des D-loops wird das eingewanderte 3'-Ende durch Polymerasen verlängert. Es konnte gezeigt werden, dass die Polymerase η dazu in der Lage ist diese Synthese an D-loop-Strukturen auszuführen, was mit anderen Studien konsistent ist, welche einen HR-Defekt in Polymerase η -defizienten Zellen nachweisen konnten (Kawamoto et al. 2005, McIlwraith et al. 2005). Nachdem ein ausreichend großer Bereich synthetisiert wurde, kann das „neue“ 3'-Ende vom Matrizenstrang der Schwesterchromatide abgelöst werden, indem die Holliday-Struktur (engl. *Holliday junction*, HJ) in Richtung des 3'-Endes wandert. Auch wenn die genaue Funktionsweise der Bewegung und Auflösung

der HJ noch nicht vollständig aufgeklärt ist, konnte die Beteiligung von mehreren Proteinen wie *Werner syndrome ATP-dependent helicase* (WRN), BLM, p53 und RAD54 an diesem Mechanismus nachgewiesen werden (Lee et al. 1997, Constantinou et al. 2000, Mohaghegh et al. 2001, Bugreev et al. 2006). Nachdem das neue, einzelsträngige 3'-Ende durch diese *branch migration* von der Matrize abgelöst wurde, wird dieses wahrscheinlich sehr schnell von RPA gebunden und kann durch einfache Verknüpfung an das zweite DSB-Ende ligiert werden, welches ebenfalls ein einzelsträngiges, überhängendes 3'-Ende besitzt und somit in ähnlicher Form vorliegt (Helleday et al. 2007). Je nach Ausmaß der Synthese des neuen 3'-Endes können spezifische Endonukleasen wie *Xeroderma pigmentosum group F-complementing protein* (XPF/ERCC4) die DNA-Überhänge entfernen (Niedernhofer et al. 2004, Helleday et al. 2007). Für die finale Ligation der DNA-Enden und das Auffüllen von Lücken werden beim SDSA die reparaturüblichen Proteine wie die Polymerasen δ und ϵ , sowie das *Proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) und DNA-Ligase 1 rekrutiert (Helleday et al. 2007). Aufgrund der Homologie-abhängigen Reparatur des SDSAs wird ein Teilstück der DNA von der Schwesterchromatide übernommen. Dieser bei dem SDSA auftretende Transfer von Sequenzinformation konnte durch Studien in Säugerzellen belegt werden und wird als *gene conversion* bezeichnet (Elliott et al. 1998, Johnson and Jasin 2000). Bei dem SDSA kommt es aufgrund der gebildeten Struktur und Beteiligung nur eines DNA-Bruchendes jedoch nicht zu reziproken SCEs. Diese sind charakteristisch für die Reparatur von DNA-Schäden durch die Ausbildung und Auflösung von dHJs.

1.3.2.3 Ausbildung und Auflösung einer doppelten Holliday-Struktur

Wie aus Abbildung 8 erkenntlich wird, bilden der D-loop und alle Schritte, die zu dessen Ausbildung benötigt werden, die Ausgangsstruktur für die HR. Auch bei der Ausbildung einer dHJ dient die Resektion beider Bruchenden sowie die Homologiesuche und Stranginvasion des RAD51-Nukleoproteinfilaments zur Ausbildung eines D-loops. Der große Unterschied zur BIR und zum SDSA besteht jedoch in der zusätzlichen Anlagerung des zweiten, resektierten 3'-Endes an den komplementären Strang des D-loops, was als *second end capture* bezeichnet wird. Hierdurch bilden sich zwei Bereiche mit Heteroduplex-DNA sowie zwei charakteristische Kreuzungspunkte zwischen den involvierten DNA-Strängen. Die Auflösung einer dHJ durch so genannte Resolvasen kann zu SCEs und dem damit verbundenen reziproken Austausch der homologen Bereiche führen. Das grundlegende Modell der Ausbildung einer dHJ wurde bereits 1983 entwickelt, um *Crossover*-Ereignisse während der Meiose, sprich der Reifeteilung von Zellen zu erklären (Szostak et al. 1983, Schwacha and Kleckner 1995). Neueren Studien war es jedoch möglich dieses Modell auch auf die DSB-induzierte Reparatur in mitotischen Zellen zu übertragen (Bzymek et al. 2010). Eine dHJ kann entweder durch eine mehrfache Trennung von DNA-Strängen mittels Resolvasen, was als *resolution* bezeichnet wird, oder durch eine so genannte *dissolution* mittels Spaltung nur eines DNA-Strangs aufgelöst werden.

Die Nukleasen GEN1 und MUS81 stellen bei der *resolution* die wichtigsten Komponenten dar, wobei Letzteres in Säugern in einem heterodimeren Komplex mit der nicht-katalytischen Komponente EME1 vorliegt (Taylor and McGowan 2008, Rass et al. 2010). Wichtig bei dieser Art der Auflösung ist, dass hier beide Holliday-Strukturen entweder am Kreuzungspunkt der DNA-Stränge, oder an den ungekreuzten DNA-Bereichen geschnitten werden. Sobald die beiden HJ unterschiedlich geschnitten werden, führt diese Art der dHJ-Auflösung zu einem SCE (Paques and Haber 1999) (Abbildung 11).

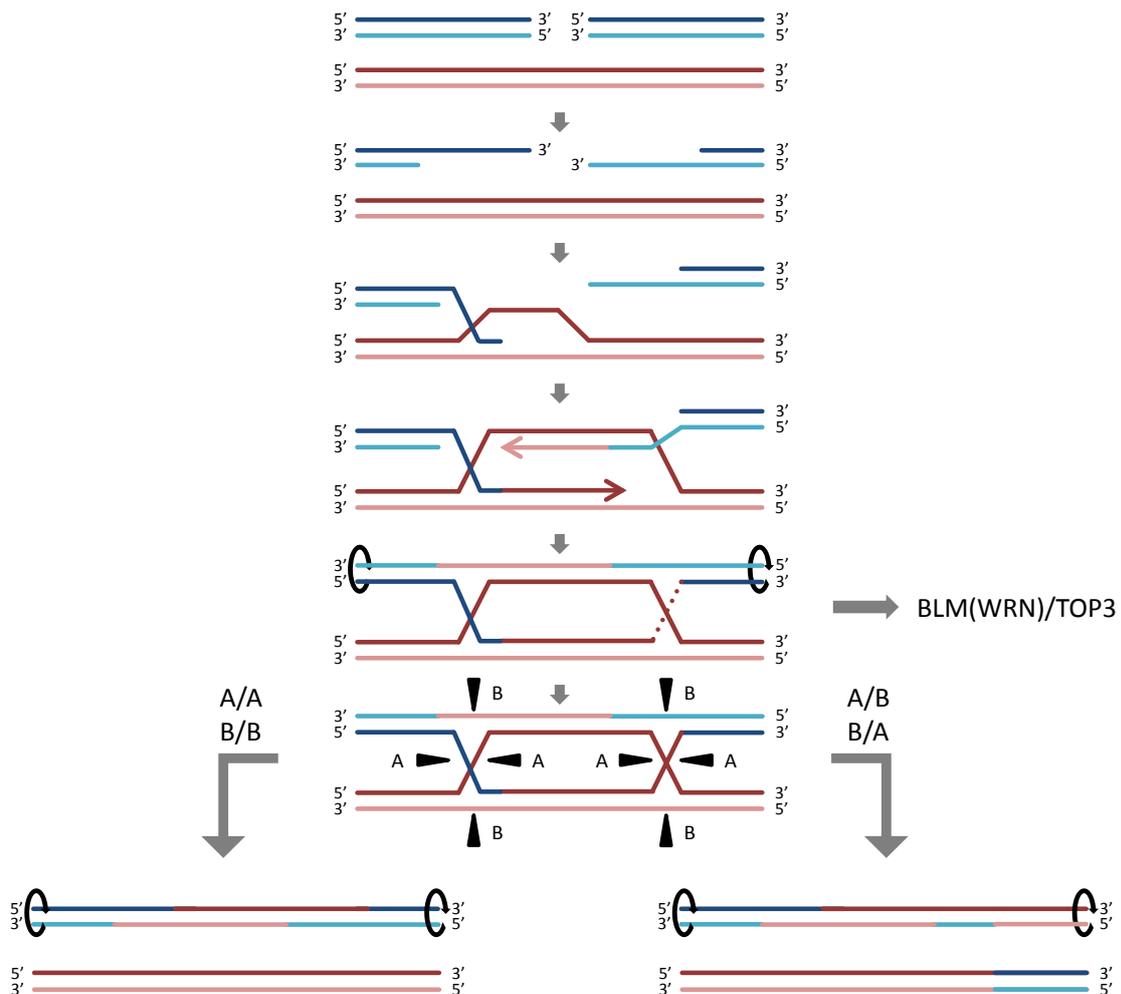


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Ausbildung und Auflösung einer dHJ mittels *resolution*

Nachdem die Bruchenden resektiert wurden und die Stranginvasion des RAD51-Nukleoproteinfilaments stattgefunden hat, lagert sich das zweite, resektierte Bruchende an den freien und komplementären DNA-Strang des D-loops auf der Schwesterchromatide an. Es entsteht eine doppelte Überkreuzung der DNA-Stränge, was die typische dHJ darstellt. Darauf folgt die Synthese beider DNA-Stränge des geschädigten Chromatids in 5'-3'-Richtung bis zum unresektierten Bereich des gegenüberliegenden Bruchendes sowie die Verknüpfung der neusynthetisierten 3'-Enden an die zuvor resektierten 5'-Enden (In der zweidimensionalen, schematischen Abbildung wird dies durch die Drehung der geschädigten Heteroduplex-DNA möglich). Die Auflösung der dHJ kann durch eine Verschiebung der beiden HJs aufeinander zu vollzogen werden, wobei eine hemikatenane Struktur entsteht, die durch den Schnitt eines DNA-Strangs aufgelöst werden kann (in Abbildung 12 veranschaulicht). Dieser Weg unterbindet von Natur aus die Entstehung von *Crossover*-Produkten. Der andere Weg zur Auflösung einer dHJ bedient sich Resolvasen, welche DNA-Stränge entweder an den Kreuzungspunkten oder den nicht-gekreuzten DNA-Strängen schneiden können. Falls die DNA beider HJs gleichartig geschnitten wird, so kommt es nicht zu einem *Crossover*-Ereignis (A/A oder B/B), wohingegen die unterschiedliche Teilung von DNA-Strängen (einmal A und einmal B) zu einem *Crossover*-Produkt führt (A/B oder B/A).

Die Anzahl von SCEs nach Induktion von DSBs ist vergleichsweise gering, sodass angenommen werden kann, dass entweder die Ausbildung einer dHJ ein eher seltenes Ereignis darstellt, oder dass bei Auflösung einer dHJ ein Weg favorisiert wird, welcher nicht zu *Crossover*-Ereignissen führt (Johnson and Jasin 2000, Ira et al. 2003). Der unkomplizierteste und wohl dominierende Weg der Auflösung einer dHJ besteht in der Verschiebung der beiden Kreuzungspunkte zueinander, sodass die zwei DNA-Stränge unterschiedlicher Chromatiden in einer Schleife übereinander liegen, was als hemikatenane

Struktur bezeichnet wird. Für die *branch-migration*, also die Verschiebung der beiden Holliday-Strukturen zueinander und die folgende Auflösung der hemikatenanen Struktur werden die Helicasen BLM oder WRN, die Topoisomerase III α und die Faktoren *RecQ-mediated genome instability protein 1 und 2* (RMI1, RMI2) benötigt, welche zusammen den BTR-Komplex bilden (Hoadley et al. 2010). Der Vorteil dieses Mechanismus besteht darin, dass nur ein DNA-Strang durch die Topoisomerase geschnitten werden muss, um die Auflösung der dHJ zu ermöglichen (Abbildung 12). Als Konsequenz hieraus ist die Ausbildung eines SCEs bei diesem BLM-abhängigen Weg ausgeschlossen (Wu and Hickson 2003).

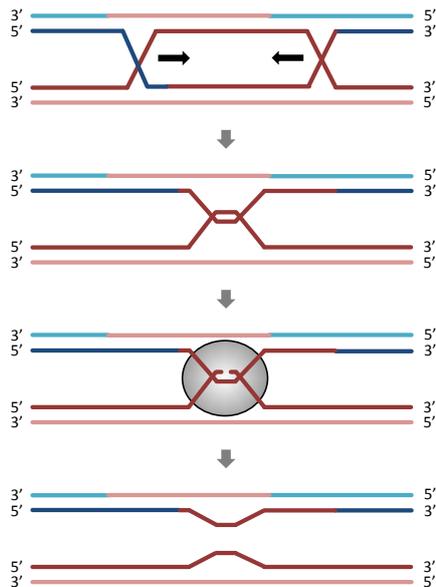


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Auflösung einer dHJ mittels *dissolution*

Durch die Helicasen BLM und WRN werden die aneinandergelagerten DNA-Stränge aufgetrennt und die beiden Kreuzungspunkte soweit aufeinander zu verschoben, bis sie nur noch durch eine Schleife miteinander verbunden sind. Diese hemikatenane Struktur wird durch Induktion eines Einzestrangbruchs, Entwindung der DNA und anschließender Religation mittels der Topoisomerase 3 α (grau) aufgelöst. Dieser Prozess führt nicht zur Ausbildung von SCEs.

Ein Defekt im BLM-Gen führt zu dem namensgebenden Krankheitsbild, dem Bloom-Syndrom, welches 1954 erstmals von dem Dermatologen Dr. David Bloom beschrieben wurde (Bloom 1954). Neben einer hohen Prädisposition für Krebserkrankungen (Bachrati and Hickson 2003) zeigen Zellen von Patienten mit Bloom-Syndrom stark erhöhte Raten an SCEs (German et al. 1977), was darauf schließen lässt, dass die Dissolution einen hohen Beitrag zur Auflösung von dHJs leistet.

Die präsentierten Mechanismen zur Reparatur von zwei-endigen DSBs lassen sich nur bedingt auf die Reparatur von ein-endigen DSBs übertragen, welche hauptsächlich während der Replikation der DNA entstehen, sodass im Folgenden S-Phase-spezifische Reparaturmechanismen beschrieben werden.

1.4 S-Phase-spezifische DNA-Reparaturprozesse

In der S-Phase des Zellzyklus wird die komplette DNA einer Zelle dupliziert. Um eine akkurate und schnelle Duplikation der DNA zu gewährleisten, ist die Replikation in der S-Phase stark reguliert. Die Abläufe und involvierten Proteine der Replikation sind in eukaryotischen Zellen hoch konserviert, was auf die Wichtigkeit dieser Prozesse schließen lässt (Branzei and Foiani 2010). Gäbe es pro Chromosom nur eine Replikationsgabel, welche in Säugetieren mit einer Geschwindigkeit von 2-3 kb pro Minute repliziert, so würde eine Zelle ca. 20 Tage benötigen, um ihr aus 3×10^6 kb bestehendes Genom zu duplizieren (Mechali 2010). Tatsächlich sind in Säuger-Zellen 30.000 – 50.000 Replikationsursprünge

(engl. *replication origins*, Origins) vorhanden (Huberman and Riggs 1966), wobei nicht alle in jedem Zellzyklus und vor allem nicht gleichzeitig aktiviert werden. So werden nur ca. 10% der Replikationsursprünge in der S-Phase aktiviert, während die restlichen inaktiviert (engl. *dormant*) vorliegen (Chaudhuri et al. 2012). Wird die Progression gestört, können diese ruhenden Replikationsursprünge aktiviert werden, um eine vollständige Replikation sicher zu stellen (Ge and Blow 2010). Durch die organisierte Initiierung mehrerer tausend Replikationsgabeln pro Zellzyklus verkürzt sich die S-Phase auf wenige Stunden.

Die Reparatur von geschädigter DNA wird in der S-Phase durch die gleichzeitige Replikation des Genoms stark verkompliziert. Einige Bereiche der DNA liegen bereits dupliziert vor, wohingegen andere Bereiche noch dupliziert werden müssen oder gerade repliziert werden, sodass, je nach Lokalisation und Zeitpunkt des DNA-Schadens, unterschiedliche Reparaturwege zur Verfügung stehen. Schäden welche direkt an der Replikationsgabel (engl. *replication fork*, RF) auftreten, repräsentieren für eine Zelle wesentlich komplexere Strukturen und Probleme als beispielsweise zwei-endige DSBs in einem transkriptiv-inaktiven Bereich der DNA während der G1- oder G2-Phase. In der S-Phase stellen vergleichsweise einfache DNA-Schäden wie Basenmodifikationen oder SSBs ein hohes Risiko für die Zelle dar, wenn Replikationsgabeln, die auf diese Läsionen treffen, arretieren oder kollabieren und dadurch ein-endige DSBs entstehen. Abbildung 13 soll einen Einblick in die Struktur und Prozesse einer Replikationsgabel bieten.

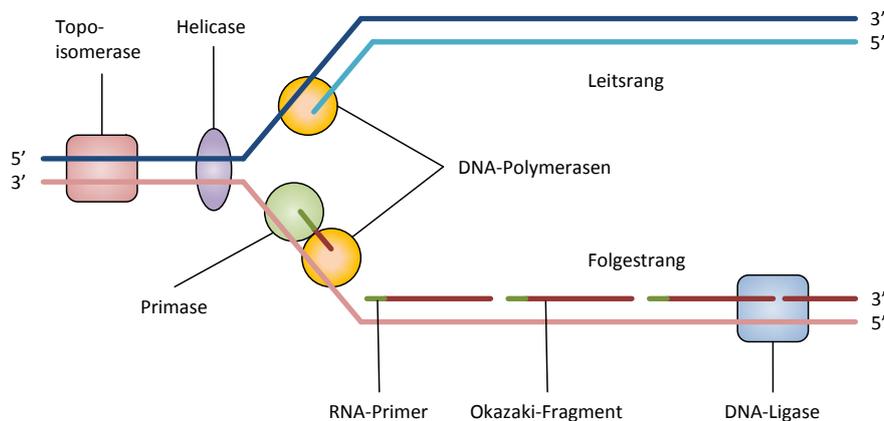


Abbildung 13: Vereinfachte, schematische Darstellung einer Replikationsgabel

Bei der Replikation von DNA wird zunächst die DNA-Helix durch Helicasen entwunden. Der dabei auftretende Torsionsstress wird von Topoisomerasen durch kontrolliertes Entwinden der DNA mittels SSBs aufgelöst (siehe auch 1.5.1). Die DNA-Polymerasen können nur in 5'-3'-Richtung DNA synthetisieren, da im Gegensatz zu RNA-Polymerasen die Synthese des komplementären DNA-Stranges nur dann möglich ist, wenn der Polymerase ein freies 3'-Hydroxylende zur Verfügung steht. Die Synthese des Leitstrangs erfolgt somit kontinuierlich, die des Folgestrangs jedoch diskontinuierlich. Hierzu wird eine RNA-Polymerase benutzt (Primase), um eine kurze Sequenz zu erzeugen, welche sich an den komplementären Folgestrang anlagert und als Primer bezeichnet wird. Der so entstandene doppelsträngige Bereich wird von der DNA-Polymerase erkannt und zur Elongation bis zum nächsten Primer genutzt. Hinter der Replikationsgabel bilden sich auf dem Folgestrang dementsprechend viele doppelsträngige Bereiche, die als Okazaki-Fragmente bezeichnet und durch DNA-Ligasen miteinander verknüpft werden, wobei die RNA-Primer durch DNA-Bausteine ausgetauscht werden.

Aufgrund der hohen Komplexität während der Replikation und der Wichtigkeit der korrekten Koordination der Replikations- und Reparaturprozesse ist es nicht verwunderlich, dass Defekte in der DNA-

Replikation an sich oder deren Regulation für viele humane Krankheiten verantwortlich sind (DePamphilis 2006). Deshalb ist es enorm wichtig ein Verständnis für die Mechanismen der Replikation und die Wege, welche die Instabilität von RFs unterbinden oder die Reparatur kollabierter RFs bewerkstelligen, zu erlangen. An einer RF sind neben den für die Replikation essentiellen Faktoren eine Vielzahl von weiteren Proteinen assoziiert, um beispielsweise kurzzeitig arretierte Replikationsgabeln vor einem Kollaps zu schützen oder den Aufbau der Replikationsmaschinerie und die Umstrukturierung des Chromatins zu gewährleisten (Jones and Petermann 2012). Auf die Beteiligung einzelner Faktoren an der Initiierung, Elongation und Terminierung der Replikation soll in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht weiter eingegangen werden, vielmehr soll im Folgenden die Entstehung und Reparatur replikationsassoziiierter DNA-Schäden erörtert werden.

1.4.1 Entstehung replikationsassoziiierter DNA-Schäden

An jedem gestarteten Origin werden zwei RFs erzeugt, welche sich auf dem parentalen DNA-Strang voneinander wegbewegen. Wird eine RF durch eine DNA-Läsion oder einen Protein-DNA-Komplex an der Progression gehindert, so wird die Replikation in der Regel durch Initiierung von ruhenden RFs oder anderen in der Nähe befindlichen RFs vollendet (Branzei and Foiani 2010). Blockierte Replikationsgabeln sind dabei durchaus in der Lage den Arrest zu überwinden und die Replikation wieder aufzunehmen (engl. *replication fork restart*), nachdem die Inhibierung beseitigt wurde (Petermann and Helleday 2010). SSBs oder langanhaltende Replikationsblockaden können jedoch zum Kollaps der Replikationsgabel und zur Generierung von ein-endigen DSBs führen. Da eine direkte Wiederaufnahme der Replikation nach einem Kollaps und der damit verbundenen Dissoziation der Replikationsmaschinerie nicht mehr möglich ist, werden durch den MUS81-EME1-Komplex ein-endige DSBs generiert (Petermann and Helleday 2010) (Abbildung 14). Diese müssen durch spezifische Reparaturmechanismen wie der BIR repariert werden.

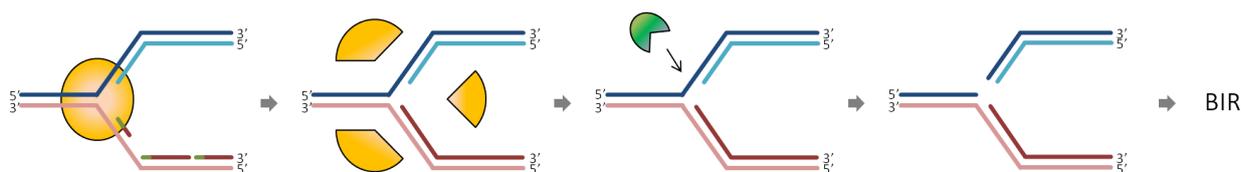


Abbildung 14: MUS81-vermittelte Induktion eines ein-endigen DSBs nach Kollabieren der Replikationsgabel

Kommt es aufgrund langer Replikationsblockaden zu einer Dissoziation des Replisoms (gelb) und damit zum Kollabieren der Replikationsgabel, ist eine direkt Wiederaufnahme der Replikation an diesem Punkt nicht mehr möglich. Für die Wiederaufnahme der Replikation durch den Mechanismus der BIR ist ein ein-endiger DSB notwendig, welcher durch die Endonuclease MUS81 (grün) induziert wird.

Zu den häufigsten DNA-Läsionen, welche zu einem Arrest oder zum Kollaps von RFs führen können, gehören Basenmodifikationen wie Oxidationen, Methylierungen und Desaminierungen. Werden diese Modifikationen nicht rechtzeitig behoben oder befinden sich die Schäden gerade in der Reparatur, so können RFs mit diesen kollidieren und arretieren. Das in dieser Arbeit verwendete MMS bietet hierbei ein bewährtes Agens zur Induktion von Basenmodifikationen durch Methylierungen der DNA, worauf unter 1.6 genauer eingegangen wird. Ein weiteres Hindernis stellen Interstrand-Crosslinks dar, die zum Beispiel durch Mitomycin C oder Cis-Platin erzeugt werden. Interstrand-Crosslinker stellen kova-

lente Bindungen zwischen zwei Basen auf den gegenüberliegenden DNA-Strängen her, sodass die Helikase der Replikations-Maschinerie den DNA-Doppelstrang nicht entwinden kann und somit die Replikation zum Erliegen kommt (Kottemann and Smogorzewska 2013). Außerdem können Sekundärstrukturen der DNA, die durch bestimmte Basenabfolgen entstehen können, oder an die DNA angelagerte Proteine das Fortschreiten einer Replikationsgabel hemmen (Usdin and Woodford 1995). Darüber hinaus können chemische Agenzien direkt oder indirekt die Replikation durch Inhibition der Polymerasen stoppen. So hemmt der Stoff Aphidicolin eine Zelle an der DNA-Replikation durch Inhibition der Polymerasen α und δ (Ikegami et al. 1978, Goscin and Byrnes 1982). Hydroxyharnstoff (HU) hingegen depletiert den Nukleotidpool durch Inhibition der Ribonukleotid-Reduktase, welche Ribonukleosid-Triphosphate zu Desoxyribonukleosid-Triphosphaten reduziert und somit einen essentiellen Bestandteil des Synthesewegs für Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), den Bausteinen der DNA, darstellt (Lundin et al. 2002). Im Gegensatz zu vielen anderen toxischen Agenzien, welche ihre Wirkung konzentrationsabhängig entfalten, bestimmt bei HU hauptsächlich die Dauer der Behandlung die Art und Anzahl der DNA-Schäden. Während kurze HU-Behandlungen von einigen Minuten bis wenigen Stunden lediglich die Arretierung von RFs bedingen, führt eine Behandlungsdauer größer 6h zum Kollaps von RFs und zur Ausbildung von DSBs, welche in ihrer Anzahl mit zunehmender Dauer steigen (Saintigny et al. 2001). Nicht zuletzt bildet der SSB eine gefährliche Läsion für eine voranschreitende RF, da es bei einer Kollision zu einem ein-endigen DSB durch einen so genannten *replication fork run-off* kommen kann. Trifft eine Polymerase während der Replikation dabei auf einen SSB, so kann die Polymerase nach Entwindung des parentalen Doppelstrangs bei der Synthese des Leitstrangs „ins Leere laufen“ und von diesem dissoziieren (Abbildung 15). Ein Aufeinandertreffen der Polymerasen mit SSBs auf dem Folgestrang wird in der Literatur seltener beschrieben, kann jedoch ebenso zu ein-endigen DSBs führen (Caldecott 2008).

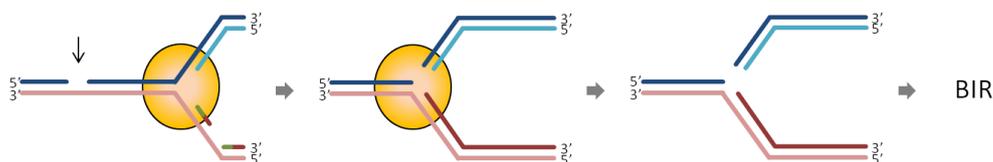


Abbildung 15: Ausbildung eines ein-endigen DSBs durch den Prozess des *replication fork run-offs*

Das Auftreten eines SSBs auf dem parentalen Leitstrang kann im Zuge der Replikation zu einem Verlust des Leitstrangs führen. Die für die Duplikation des Leitstrangs verantwortliche Polymerase (stark vereinfacht als Replisom in Gelb dargestellt) trifft dabei auf das durch den SSB erzeugte 5'-Ende und löst sich von der DNA. Hierbei wird ein ein-endiger DSB generiert, welcher durch die BIR repariert werden kann.

SSBs können durch ionisierende Strahlung, im Zuge der Reparatur von Basenmodifikationen durch die BER (z. Bsp. MMS induziert) oder durch gezielte Induktion von SSBs mittels Topoisomerasen und Verhinderung der Religation durch das in dieser Arbeit verwendete CPT auftreten.

1.4.2 Reparatur replikationsassoziierter DNA-Schäden

Um einem Kollaps von arretierten RFs entgegenzuwirken, haben Zellen Mechanismen entwickelt arretierte RFs und angelagerte Replisomen möglichst lange zu stabilisieren, um eine Wiederaufnahme der Replikation zu ermöglichen (Osman and Whitby 2007). Die Stabilisation wird vor allem durch Zellzyklus-Faktoren wie ATR und CHK1 sowie durch Claspin vermittelt, welches zur Kohäsion der Schwesterchromatiden dient (Scorah and McGowan 2009). Anschließend stehen einer Zelle verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung den Arrest zu überwinden, wobei die Arrest-auslösende Läsion entscheidend für die Wiederaufnahme der Replikation ist. Basenmodifikationen können während der Replikation durch die DNA-Polymerasen δ und ϵ zu einem Arrest führen, da diese keine passenden Nukleotide für die modifizierten Basen finden (Abbildung 16, 2). Die dadurch auftretende Replikationsblockade wird in der Regel durch den Mechanismus der *translesion synthesis* (TLS) überwunden (Abbildung 16, 3) wobei die Polymerasen δ und ϵ durch sogenannte TLS-Polymerasen ersetzt werden, welche weniger spezifisch bei der Nukleotidwahl sind (Izhar et al. 2013). Dabei kann die geschädigte Stelle bei der Replikation überwunden werden, jedoch birgt die Unspezifität der TLS-Polymerasen eine erhöhte Gefahr für Punktmutationen (Heyer et al. 2010). Da die TLS dennoch der dominierende Weg zur Überwindung von Basenmodifikationen ist, scheint die Gefahr einer Punktmutation im Gegensatz zum möglichen RF-Kollaps tolerierbar zu sein.

Eine zweite Möglichkeit zur Überwindung von DNA-Schäden an arretierten RFs bietet der Prozess der *fork regression*, bei welchem sich die Replikationsgabel ein Stück entgegengesetzt der Replikationsrichtung zurück bewegt, um eine so genannte *chicken foot*-Struktur zu bilden (Abbildung 16, 4). Hierbei lösen sich zunächst die neusynthetisierten DNA-Stränge von den parental Strängen, welche sich wieder aneinander anlagern (in einen Ausgangszustand vor der Replikation). Die dabei freiwerdenden, neusynthetisierten Stränge paaren daraufhin, wobei eine HJ entsteht, welche aufgrund ihrer Form als *chicken foot*-Struktur bezeichnet wird (Heyer et al. 2010). Ausgehend von dieser stabilen Struktur hat die Zelle nun entweder die Möglichkeit zu warten, bis die blockierende Läsion im parental Strang behoben wurde (Abbildung 16, 5) oder sie vollzieht einen Reparaturweg, welcher bereits 1976 postuliert wurde und heute als *lesion bypass* durch *template switching* bezeichnet wird (Higgins et al. 1976, Mazloum and Holloman 2009). Dieser Weg wird ermöglicht, wenn die Synthese des Leitstrangs durch eine Basenmodifikation geblockt wird, die des Folgestrangs jedoch weiter voranschreiten kann, sodass der lädierte Bereich des Leitstrangs bereits dupliziert auf dem Folgestrang vorliegt (Osman and Whitby 2007). Dieser kann nun als Matrize für die DNA-Synthese des Leitstrangs dienen (Abbildung 16, 6). Nach einer Re-Initiierung der Replikationsgabel ist der DNA-Schaden überwunden und die Replikation kann fortgesetzt werden, selbst wenn die Läsion noch nicht entfernt wurde (Heyer et al. 2010), (Abbildung 16, 7). Wie die Re-Initiierung einer Replikationsgabel aus einer *chicken foot*-Struktur erfolgt, ist noch nicht genau geklärt, wobei allerdings den Proteinen BLM und WRN eine Funktion in der umgekehrten *fork regression* zugeschrieben wird (Davies et al. 2007). Neuere Studien konnten dabei belegen, dass BLM und WRN in der Lage sind Substrate, welche eine *chicken foot*-Struktur imitieren, in aktive Replikationsgabeln zu konvertieren (Machwe et al. 2011). Ein weiteres Modell beschreibt die Re-Initiierung einer Replikationsgabel durch eine MUS81-abhängige Prozessierung der *chicken foot*-Struktur, was zu einem ein-endigen DSB führt, welcher HR-vermittelt repariert wird (Osman and Whitby 2007). Außerdem konnte ein Modell entwickelt werden, bei dem eine D-Loop-abhängige Reaktivierung der RF postuliert wird, wobei das freie DSB-Ende der *chicken foot*-Struktur nach einer Re-

sektion in den parentalen Doppelstrang einwandert. Womöglich ist eine Resektion nicht nötig, falls das bestehende, einzelsträngige 3'-Ende ausreichend lang ist. Dabei kommt es zur Ausbildung eines typischen D-Loops und womöglich auch einer dHJ (Lundin et al. 2002, Petermann and Helleday 2010).

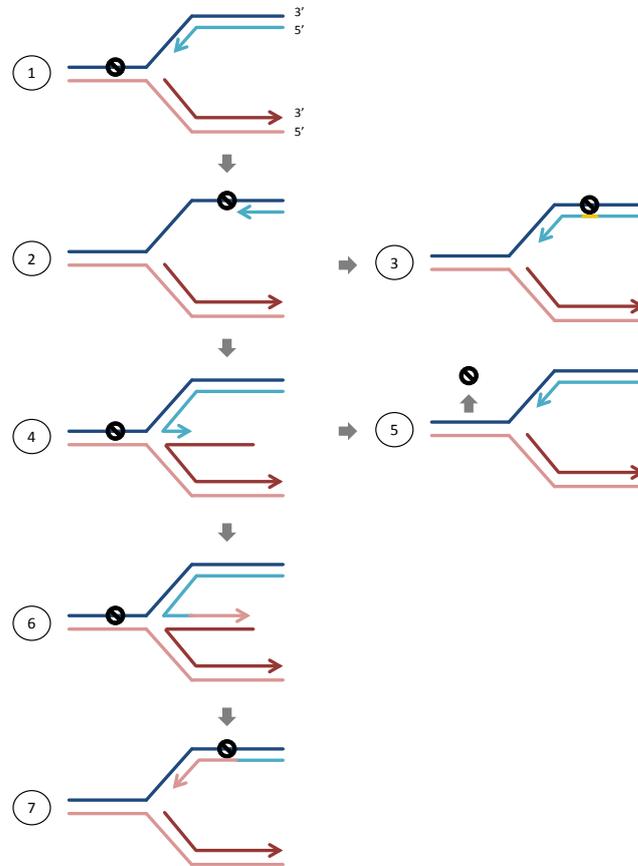


Abbildung 16: Schematische Darstellung zur Überwindung eines Replikation-arretierenden Schadens auf dem Leitstrang

Eine Läsion auf dem Leitstrang behindert das Voranschreiten der Polymerase (Schritt 2). Auf dem Folgestrang konnte jedoch einige Nukleotide über die Läsion auf dem komplementären Leitstrang hinweg synthetisiert werden. Durch eine Umkehrung der Replikation über mehrere Nukleotide entgegengesetzt zur Syntheserichtung wird ein doppelsträngiger Bereich mit einem 3'-Überhang erzeugt (siehe Schritt 4), was der Struktur einer *chicken foot* gleicht. Dieser kann sowohl als Matrize für den Leitstrang dienen (Schritt 6), womit der geschädigte Bereich des parentalen Leitstrangs erfolgreich überwunden ist (Schritt 7), als auch als Substrat für die Bildung einer D-Loop-Struktur durch Invasion in den parentalen DNA-Strang genutzt werden (nicht dargestellt). Eine Alternative bildet die TLS, bei welcher die DNA-Polymerasen durch fehlertolerante Polymerasen ausgetauscht werden, wobei die Gefahr einer Basenfehlpaarung besteht (Schritt 3), oder die Reinitiation der Replikation aus der *chicken foot*-Struktur nach Entfernung der Läsion (Schritt 5).

Betreffen DNA-Läsionen den Folgestrang, so lassen sich die beschriebenen Modelle nur teilweise auf die Reparatur dieser Schäden übertragen. Bei einer Blockade der DNA-Synthese auf dem Folgestrang kommt es gewöhnlich zur Ausbildung von einzelsträngigen Bereichen, wobei durch eine *fork regression* die Bildung einer *chicken foot*-Struktur theoretisch ermöglicht wird. Dabei entsteht jedoch ein doppelsträngiges Ende mit einem überhängenden Ende des am Leitstrangs synthetisierten 3'-Endes (Osman and Whitby 2007). Ein *lesion bypass* ist aus dieser Struktur nicht möglich, da das kürzere 5'-Ende kein geeignetes Substrat für die DNA-Polymerasen darstellt. Im Gegensatz zum Leitstrang wird während der Replikation der Folgestrang durch Ausbildung von bereits beschriebenen Okazaki-Fragmenten diskontinuierlich synthetisiert. Die Okazaki-Fragmente werden anschließend durch Liga-

sen miteinander verknüpft. Dieser Mechanismus ist erforderlich, da DNA-Polymerasen nur von 5' nach 3' DNA synthetisieren können. Je nach Läsion auf dem Folgestrang kann auch hier die TLS einsetzen und so den Replikationsarrest überwinden. Aufgrund des überhängenden 3'-Endes ist jedoch auch eine Einwanderung dieses Endes in den neusynthetisierten Leitstrang denkbar, welcher aufgrund abgeschlossener Synthese als Matrize und zur Ausbildung eines neuen D-Loops benutzt werden kann. So wurde ein SDSA-ähnlicher Weg postuliert, bei welchem der eingewanderte Strang bereits nach kurzer Synthese wieder mit dem parentalen Folgestrang gepaart wird, womit die Läsion überwunden ist und verbleibende einzelsträngige Bereiche durch Polymerasen aufgefüllt werden können (Heyer et al. 2010). Ein zweites Model beschreibt die Bindung des parentalen Leitstrangs, welcher während der Stranginvasion vom Folgestrang verdrängt wird, mit dem einzelsträngigen Bereich des parentalen Folgestrangs, sodass es zur Ausbildung einer HJ kommt (Abbildung 17, 3). Nach der Replikation des eingewanderten Folgestrangs ist somit die Ausbildung einer dHJ möglich. Nach der Auflösung der HJs kann eine aktive Replikationsgabel wieder hergestellt werden, wobei die Auflösung der dHJ wie bereits unter 1.3.2.3 beschrieben zur Ausbildung eines *Crossover*, bzw. SCEs führen kann (Abbildung 17, 4).

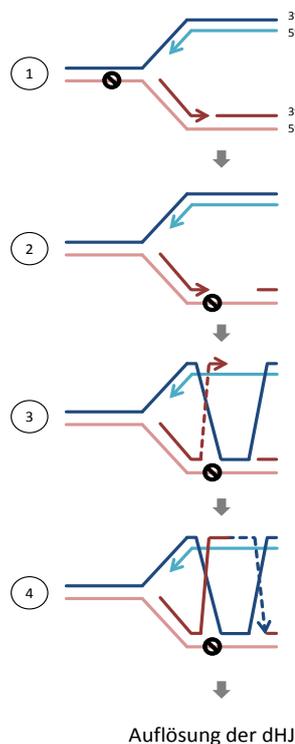


Abbildung 17: Schematische Darstellung zur Überwindung eines Schadens auf dem Folgestrang

Eine Läsion auf dem Folgestrang behindert die korrekte Synthese von Okazakifragmenten (Schritt 2). Daraufhin kann der bereits synthetisierte parentale Leitstrang sich mit dem unreplizierten Bereich auf dem parentalen Folgestrang verbinden, woraufhin der einzelsträngige und freigewordene, neusynthetisierte Leitstrang als Matrize für den neuen Folgestrang dienen kann (Schritt 3). Die Replikation kann reinitiiert und die ausgebildete dHJ wie unter 1.3.2.3 beschrieben aufgelöst werden.

Schwere Läsionen der DNA wie SSBs, Protein-DNA-Komplexe sowie langanhaltende Replikationsblockaden können zu einem Kollaps der RFs führen. Der RF-Kollaps beschreibt einen Prozess, bei welchem die Replikationsmaschinerie, sprich das Replisom, von der RF dissoziiert, was in der Regel mit der Bildung von ein-endigen DSBs assoziiert ist. Läuft eine RF in einen auf dem Leitstrang lokalisierten SSB so kann es zum bereits beschriebenen *replication fork run-off* kommen, wobei direkt ein ein-endiger DSB erzeugt wird (Strumberg et al. 2000). Die Stabilität von arretierten RFs kann nur einige Stunden aufrecht erhalten werden, sodass anschließend die Replikationsproteine dissoziieren und wie bereits beschrieben eine direkte Aufnahme der Replikation am selben Punkt nicht möglich ist (Petermann and Helleday 2010). Tritt dieser Fall ein, so erfolgt eine gezielte Induktion eines ein-

endigen DSBs an der inaktiven RF, um hiermit ein Substrat für die Reparatur mittels HR zu schaffen und so die Re-Initiierung der Replikation zu ermöglichen (Petermann and Helleday 2010). Studien konnten zeigen, dass an diesem Prozess der Endonuklease-Komplex MUS81-EME1 sowie das Protein BLM, jedoch nicht dessen Helicase-Aktivität beteiligt sind (Hanada et al. 2007, Froget et al. 2008). Da nach einem *replication fork run-off* ein zweites Bruchende fehlt, kann die Reparatur dieses Schadens nicht über das NHEJ erfolgen. Stattdessen werden diese ein-endigen DSBs HR-abhängig repariert. Der für die Reparatur von ein-endigen DSBs zuständige Reparaturmechanismus ist die BIR, welche sich der Resektion des freien Bruchendes bedient und nach Stranginvasion und Ausbildung eines D-loops die Wiederaufnahme der Replikationsgabel ermöglicht.

Ebenso ist ein Model entworfen worden, welches einen SDSA-ähnlichen Prozess postuliert, bei welchem der eingewanderte Strang kontinuierlich aus der Heteroduplex-DNA gelöst wird, und selbst als Vorlage für die Synthese des zweiten Strangs dient (Paques and Haber 1999). Nach einer Auflösung der HJ kann eine intakte RF wieder hergestellt werden, welche die Replikation fortsetzen kann, bis sie auf die nächste, aktive Replikationsblase trifft. Diese Ereignisse konnten bereits in *E. coli* und dem Bakteriophagen T4 charakterisiert werden (Mosig 1987, Kogoma 1997). Desweiteren wurde herausgefunden, dass Zellen auf kollabierte Replikationsgabeln mit einer vermehrten Aktivierung von benachbarten Origins in der Nähe reagieren (Petermann et al. 2010). Dabei wird ein zweites DNA-Bruchende am Ort der zuvor kollabierten RF geschaffen, wenn die neu-initiierte RF die Schadensstelle von der anderen Seite erreicht. Somit wird aus einem ein-endigen DSB ein zwei-endiger DSB, welcher die Voraussetzung für die Reparatur mittels SDSA oder Ausbildung einer dHJ schafft.

Wie aus dem vorherigen Abschnitt erkenntlich wurde, stellen SSBs und DSBs während der S-Phase des Zellzyklus aufgrund gleichzeitiger Replikation der DNA eine besondere Gefahr für die genomische Integrität einer Zelle dar. Gerade hier ist andererseits die Induktion von SSBs und DSBs aber auch zwingend erforderlich, um Torsionsstress entgegenzuwirken, welcher durch das Entwinden der DNA-Helix bei der Replikation entsteht. Eine Zelle bedient sich hierbei der gezielten und kontrollierten, kurzzeitigen Induktion mit anschließender Ligation von SSBs und DSBs durch so genannte Topoisomerasen. Aufgrund dieser enorm wichtigen Aufgabe von Topoisomerasen während der S-Phase bieten diese Enzyme primäre Zielstrukturen für therapeutische Ansätze in der Behandlung von Krebserkrankungen. Die Inhibition von Topoisomerasen führt dabei zu massiver Schädigung von hoch proliferativen Krebszellen durch Induktion von replikationsassoziierten DNA-Läsionen. Ein Paradebeispiel für einen Topoisomeraseinhibitor stellt das in dieser Arbeit verwendete Camptothecin dar.

1.5 Camptothecin

Von 1957 bis 1958 wurden von dem *Cancer Chemotherapy National Service Center* (CCNSC) 1000 Pflanzenextrakte auf ihre Antitumor-Aktivität getestet, wobei nur einem einzigen Extrakt aus den Blättern des Baums *Camptotheca acuminata* eine hohe Wirksamkeit zugeschrieben werden konnte (Wall and Wani 1996). Den Wissenschaftlern Wall und Wani gelang es 1966 den für die antitumoröse Wirkung verantwortlichen Stoff aufzureinigen und durch Röntgenstrukturanalyse zu charakterisieren (Wall et al. 1966). Dass gewonnene, pentacyclische Alkaloid benannten sie in Anlehnung an den Gattungsnamen des Baums Camptothecin (Abbildung 18). 1971 gelang die erste Totalsynthese von CPT (Stork and Schultz 1971), welcher viele weitere Derivate gefolgt sind, die heute klinische Anwendung finden.

Obwohl bereits in den frühen 70er Jahren klinische Phase 1-Studien mit CPT durchgeführt wurden, fand das Alkaloid aufgrund schlechter Wasserlöslichkeit und hoher Toxizität zunächst keine Anwendung in der Krebstherapie (Gottlieb et al. 1970, Muggia et al. 1972) und wurde als Arzneimittel zunächst nicht mehr weiterentwickelt. Mit der Entdeckung des Wirkungsmechanismus, welcher auf der Hemmung von Topoisomerase 1 beruht, erlangte CPT 1985 wieder Interesse in der Forschung und Medizin (Hsiang et al. 1985). Durch die Modulation von CPT konnten Derivate entwickelt werden, welche eine bessere Löslichkeit und Pharmakokinetik aufwiesen (Kehrer et al. 2001). Seit vielen Jahren werden Camptothecin-Derivate wie Topotecan und Irinotecan zu medizinischen Zwecken in der Krebstherapie eingesetzt. In Deutschland ist Topotecan für die Behandlung des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms zugelassen, während Irinotecan seit 1998 gegen fortgeschrittene Dickdarmtumore nach erfolgloser Therapie mit 5-Fluoruracil eingesetzt wird (Brogden and Wiseman 1998, Rothenberg 2001).

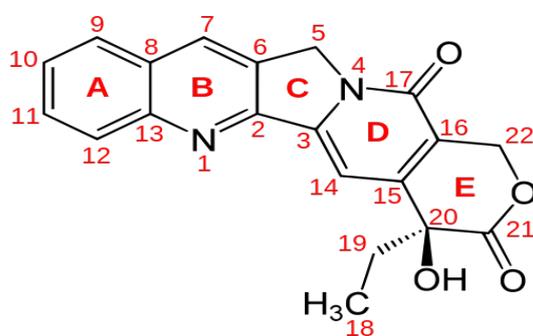


Abbildung 18: Strukturformel von Camptothecin

CPT ist ein pentazyklisches Chinolin-Alkaloid und stellt eines der beliebtesten Agenzien zur Arzneientwicklung in der Krebsforschung dar. Für die zytostatische Wirksamkeit von Camptothecin sind vor allem die chemischen Eigenschaften des C-, D- und E-Rings notwendig, sodass diese auch in den medizinisch-angewandten Derivaten unverändert vorliegen (Verma and Hansch 2009).

Die zytostatische Wirkung von CPT und dessen Analoga beruht hauptsächlich auf der massiven Induktion von DNA-Läsionen in der S-Phase einer Zelle. Dabei verhindert CPT die Auflösung des sogenannten *cleavage complex* (CC) und damit die Re-Ligation des DNA-Strangs, welcher durch die Topoisomerase 1 im Zuge der Replikation geschnitten wurde. RFs können mit CCs sowohl kollidieren und arretieren als auch zu einem *replication fork run-off* führen, wenn sie auf die Topoisomerase-induzierten SSBs treffen. Ein mögliches Resultat stellen ein-endige DSBs dar (Pommier 2004). Hierzu sollen zunächst die Funktionsweisen und Aufgaben von Topoisomerasen erläutert werden.

1.5.1 Topoisomerasen und die inhibierende Wirkung von CPT

Bei der Replikation und Transkription entsteht durch das Öffnen der DNA-Helix und Separation der beiden DNA-Stränge auf beiden Seiten der Öffnung eine Ent- oder Superspiralisierung der DNA. Diese Spiralisierung wird in positiven Torsionsstress, welcher zu Verdichtung der DNA führt und in negativen Torsionsstress, der zu großräumiger Aufwindung der DNA und abnormalen DNA-Strukturen wie so genannten R-loops führt, unterschieden (Pommier 2006). Topoisomerasen sind in eukaryotischen Zellen, Archae- und Eubakterien allgegenwärtig, um die DNA einerseits vor schwerwiegenden Schäden zu schützen, welche aufgrund des Torsionsstress bei der Replikation und Transkription auftreten können, und andererseits einer Verstrickung der helikalen Duplex-DNA (engl. *entanglements*) bei dichter Kondensation im Zellkern vorzubeugen (Forterre et al. 2007, Pommier 2013). Humane Zellen exprimieren 6 verschiedene Topoisomerasen, die aufgrund ihrer „Schneidemechanismen“ in 3 Klassen eingeteilt werden können (Pommier 2009). Typ IA-Topoisomerasen schneiden nur einen Strang der DNA-

Helix, führen diesen an dem intakten Strang vorbei und ligieren den Strang anschließend hinter dem intakten Strang wieder, was als *strand passage* bezeichnet wird (Abbildung 19, 1). Typ IB-Topoisomerasen schneiden ebenfalls nur einen DNA-Strang, worauf sich die DNA aufgrund des torsionalen Stresses jedoch durch Drehung um den intakten Strang entwinden kann (Abbildung 19, 2). Typ IIA-Topoisomerasen induzieren gezielt einen DSB, welcher allerdings nicht „frei“ vorliegt, sondern nach der Entwindung der DNA-Helix durch die Topoisomerase kontrolliert und unter Adenosintriphosphat (ATP) -Verbrauch religiert wird (Abbildung 19, 3).

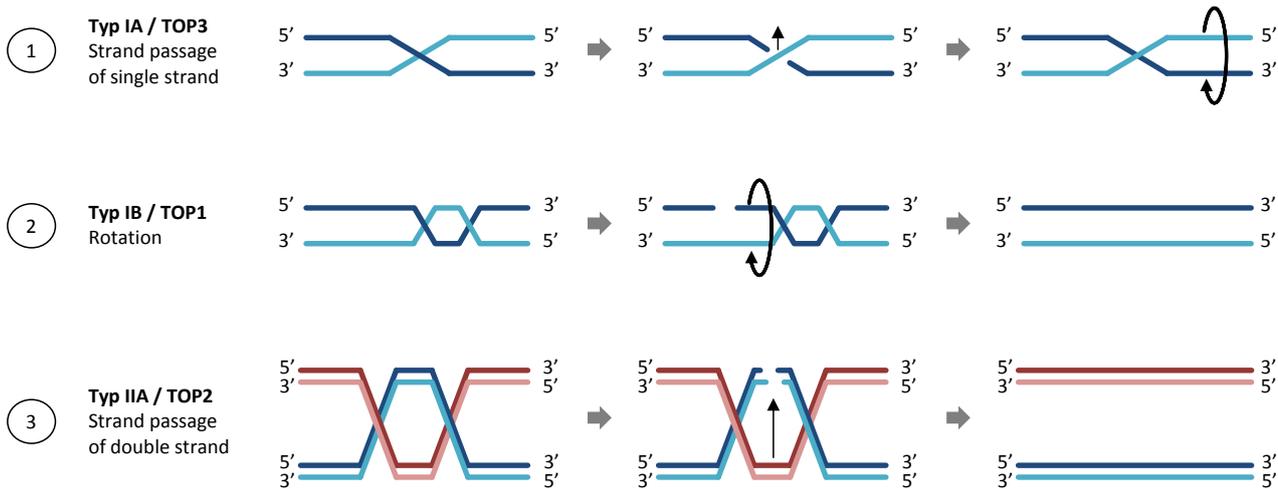


Abbildung 19: Schneidemechanismen unterschiedlicher Klassen von Topoisomerasen

Zu den Typ IA-Topoisomerasen zählen in humanen Zellen TOP3 α und TOP3 β , welche nach Spaltung des DNA-Strangs kovalent das 5'-Ende binden. Anschließend wird die Passage des geschnittenen DNA-Strangs durch Konformationsänderungen der Topoisomerase an dem intakten DNA-Strang vorbei ermöglicht. (siehe (Viard and de la Tour 2007) für detailliertere Informationen). Ähnlich erfolgt die Passage des doppelten DNA-Stranges bei der Topoisomerase Typ IIA-vermittelten Reaktion, hier jedoch mit Hilfe einer ATPase-Funktion und Verbrauch von ATP. Zu den Typ IIA-Topoisomerasen zählen TOP2 α und TOP2 β . Im Gegensatz hierzu bilden Typ IB-Topoisomerasen, welche TOP1 und die mitochondriale TOP1 (TOP1mt) repräsentieren, 3'-Phosphat-Tyrosin-Brücken und reduzieren die Superspiralisierung durch kontrollierte Rotation des gebrochenen 5'-Endes um den intakten DNA-Strang herum (nach (Pommier 2013)).

Topoisomerase 3 α (TOP3 α), eine der beiden TYP IA-Topoisomerasen, bildet mit dem BLM-Protein Heterodimere und dient hauptsächlich zur Auflösung von postreplikativen, hemikatenanen Strukturen und Rekombinationsintermediaten, wie unter 1.3.2.3 bereits beschrieben wurde. Topoisomerase 2 (TOP2), eine TYP IIA-Topoisomerase, ist verwandt zur bakteriellen Gyrase, welche eine Zielstruktur für Antibiotika darstellt (Pommier et al. 2006). Topoisomerase 1 (TOP1) gehört zu den Typ IB-Topoisomerasen, welche nicht in Bakterien vorkommen und in humanen Zellen sowohl positiven als auch negativen Torsionsstress auflösen können (Wang 2002, El Hage et al. 2010).

Alle beschriebenen Topoisomerasen gehören zur Klasse der Tyrosin-Rekombinasen, wobei sie DNA durch den chemischen Prozess der Umesterung (engl. *transesterification*) trennen, bei welchem ein Tyrosinrest der Topoisomerase als Nukleophil wirkt, um hiermit das Phosphatrückgrat der DNA zu spalten (Pommier 2013) (Abbildung 20). Nachdem die Topoisomerasen die 5'-Enden im Fall von Typ IA und IIA, bzw. das 3'-Ende im Fall von Typ IB-Topoisomerasen kovalent gebunden haben (engl. *cleaved state*) und der Torsionsstress aufgehoben wurde, greifen die 3'- bzw. 5'-Hydroxyenden der

freiliegenden DNA-Stränge die gebildete Phosphat-Tyrosin-Verbindung an und führen somit zur Dissoziation der Topoisomerasen und Religation der Bruchenden (Pommier 2013).

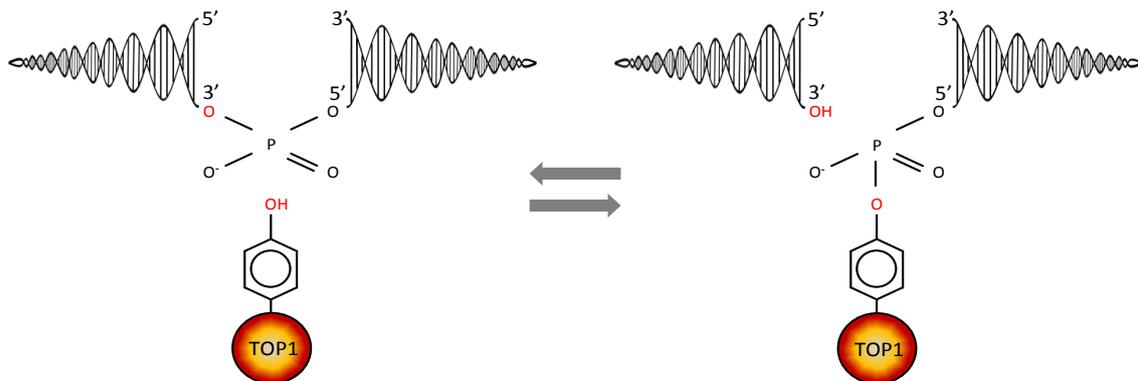


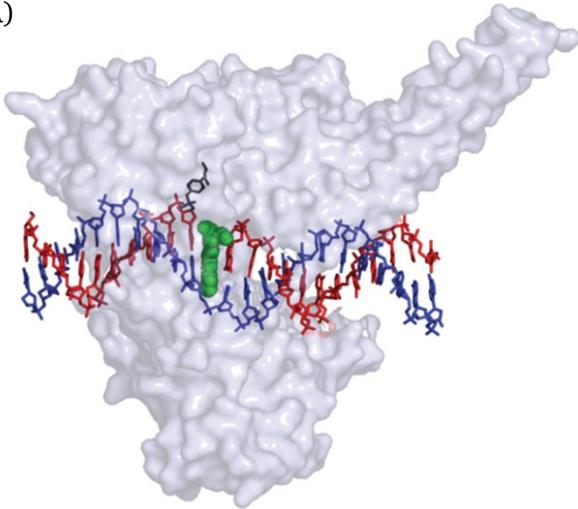
Abbildung 20: Prozess der Umesterung bei der Spaltung des DNA-Phosphatrückgrats am Beispiel der TOP1

Gezeigt ist die Umesterung am Beispiel der Typ IA-Topoisomerase-vermittelten Katalyse. Hierbei greift die Hydroxylgruppe des Tyrosins der Topoisomerase die Phosphatgruppe des Phosphatrückgrats der DNA an, was zu einem Einzelstrangbruch und einer transienten, kovalenten Verbindung des Enzyms mit der DNA führt. Die nun frei vorliegende Hydroxylgruppe des 3'-Endes greift anschließend wieder die Phosphatgruppe an und stellt so wieder die Verbindung zum 5'-Ende her (nach (Viard and de la Tour 2007)).

Das Schneiden und Re-Ligieren dauert dabei nur wenige Millisekunden, sodass TOP1 bis zu 6000 und TOP2 bis zu 250 solcher Reaktion in einer Minute katalysieren können (Pommier and Marchand 2012). Dabei sind Topoisomerasen vor allem während der Bindung des Einzelstrangs bzw. zum Zeitpunkt des temporären SSBs anfällig für inhibierende Agenzien (Seol et al. 2012). So entfalten viele Topoisomeraseinhibitoren, wie auch CPT, ihre DNA-schädigende Wirkung an dem Punkt der katalysierten Reaktion, an welchem die Topoisomerase die kovalente Bindung mit einem DNA-Ende eingegangen ist und somit den reversiblen CC gebildet hat. Durch die Bindung von CPT wird der CC aufrecht erhalten und die Re-Ligation der DNA über einen gewissen Zeitraum inhibiert bzw. die Dissoziation der Topoisomerase von der DNA nach abgeschlossener Katalyse verlangsamt (Pommier 2004). Zur Veranschaulichung dient eine Grafik der Röntgenstruktur eines TOP1-CCs mit CPT (Abbildung 21).

CPT gilt als hoch-spezifischer TOP1-Inhibitor, da TOP1 dessen einziges Zielsubstrat ist, was aus Versuchen mit Hefezellen hervorging, welche nach genetischer Entfernung des TOP1-Gens komplett immun gegen CPT wurden (Bjornsti et al. 1989). Ähnliches konnte auch in vertebraten Zelllinien gezeigt werden, welche keine Sensitivität gegenüber CPT nach induzierten TOP1-Mutationen aufwiesen (Pommier et al. 1999). Ein Knockout der TOP1-Gene führt in Mäusen und Fliegen (*Brachycera*) zu embryonaler Letalität, sodass angenommen wird, dass diese Enzyme für Vertebraten und Fliegen essentielle Proteine darstellen (Morham et al. 1996, Zhang et al. 2000, Pommier et al. 2006). Im Gegensatz hierzu überleben Hefen auch ohne TOP1 (Eng et al. 1988).

A)



B)

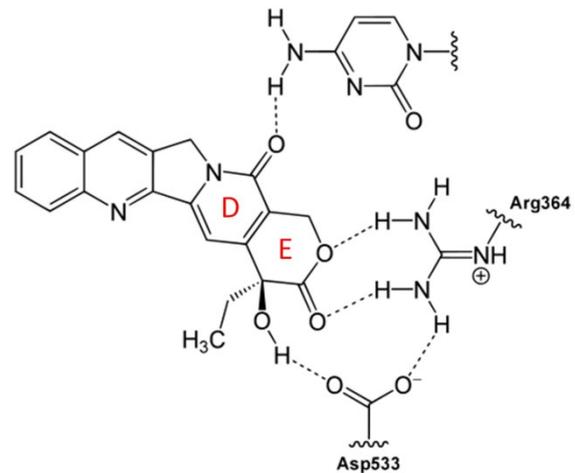


Abbildung 21: Darstellung der Interaktion zwischen CPT, Topoisomerase 1 und der DNA

A) Topoisomerase 1 (grau) bindet das 3'-Ende (schwarz) des gespaltenen DNA Strangs (rot). Der Einzelstrangbruch ermöglicht die Rotation des freien 5'-Endes um den intakten DNA-Strang (blau), um Torsionstress aufzulösen. CPT (grün) verhindert unter Ausbildung eines reversiblen, ternären Komplexes die Religation der beiden DNA-Enden (Pommier 2013).

B) Die Religation der Einzelstrangbrüche wird durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen CPT, der DNA und der Topoisomerase 1 verhindert. Für die Interaktion von CPT mit der Topoisomerase ist der Ring E verantwortlich, welcher Bindungen zu den Aminosäureresten von Asparaginsäure-533 und Arginin-364 oder mit Glycin717 und Asparaginsäure 722 eingeht, welche in räumlicher Nähe des für die Spaltung der DNA verantwortlichen Tyrosins an Stelle 723 der Topoisomerase liegen. Das Sauerstoffatom von Ring D interagiert hingegen hauptsächlich mit Cytosinen der DNA. (Redinbo et al. 1998).

TOP1 wird während des gesamten Zellzyklus konstitutiv exprimiert, wobei es im Nukleus konzentriert vorkommt (Muller et al. 1985, Baker et al. 1995). Die durch CPT induzierten CCs bilden für eine Zelle vor allem während der Replikation der DNA gefährliche Addukte, da bei Kollision einer RF mit einem CC Replikationsblockaden sowie ein-endige DSBs bei Kollaps der RFs entstehen können. CPT entfaltet in vertebarten Zellen innerhalb von Minuten nach Applikation sogar bei sub-mikromolaren Dosen eine hoch-spezifische Wirkung. Dabei müssen jedoch zwei pharmakologische Eigenschaften von CPT hervorgehoben werden. Einerseits bindet CPT reversible den TOP1-DNA-CC, wobei unter pharmakologischen Bedingungen zügig ein Equilibrium, sprich Fließgleichgewicht zwischen ternärem CPT-TOP1-DNA-Komplex und der Dissoziation der Komponenten hergestellt wird (Pommier et al. 2006). Demzufolge kommt es nach einem Entzug von CPT zu einer schnellen Auflösung der CCs (Covey et al. 1989). Andererseits inhibiert CPT nur einen bestimmten Teil der CCs, welche ein Guanin am 5'-Ende des SSBs aufweisen, sodass einige TOP1-CCs unanfällig für CPT sind (Pommier et al. 2006). Neben den inhibitorisch-induzierten TOP1-CCs können auch endogene DNA-Läsionen wie Basenfehlpaarungen und abasische Stellen zu einem CC führen. Diese können sogar zu irreversiblen TOP1-CCs, sogenannten *suicide complexes* führen, wenn die Topoisomerase kurzzeitig zuvor geschädigte DNA bindet (Burgin et al. 1995, Pommier et al. 2006). Für die Reparatur dieser speziellen Addukte haben sich folglich Reparaturmechanismen entwickelt, um schwereren Schäden während der Replikation vorzubeugen. CPT erweist sich hierbei als ideales, pharmakologisches Werkzeug, um replikationsabhängige DNA-Reparatur zu untersuchen (Pommier 2004).

1.5.2 Reparatur CPT-induzierter DNA-Schäden

TOP1-CCs können bei Kollision mit einer RF schwerwiegende DNA-Schäden verursachen (Sordet et al. 2008). Diese Kollisionen bilden in der Regel ein-endige DSBs durch den Mechanismus des *replication fork run-off*, wobei TOP1 kovalent an das 3'-Bruchende gebunden bleibt (Strumberg et al. 2000, Zhang et al. 2011). Für die Reparatur von CPT-induzierten, ein-endigen DSBs ist eine Entfernung des TOP1-CCs von der DNA notwendig. Ebenso wichtig ist die Vermeidung einer Kollision von RFs mit TOP1-CCs durch rechtzeitige Beseitigung der Protein-DNA-Addukte, sodass sich unterschiedliche Wege entwickelt haben TOP1-CCs von der zu replizierenden oder reparierenden DNA zu entfernen.

In Hefen sind zwei Wege bekannt, welche TOP1-Addukte entfernen können und in ähnlicher Form auch in Vetebraten zur Reparatur dieser Läsionen genutzt werden. Während ein Weg sich der Hydrolyse der TOP1-DNA-Verbindung durch die Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase 1 (TDP1) bedient (Dexheimer et al. 2008), vollzieht ein weiterer Weg eine endonucleolytische Exzision des TOP1-CCs samt kovalent-gebundener DNA mit Hilfe von verschiedenen Endonukleasekomplexen wie RAD1/RAD10, MRE11-RAD50-XRS2 (MRX, Ortholog zu humanem MRN), MUS81-MMS4 (Ortholog zu humanem MUS81-EME1) und *structure-specific endonuclease subunit SLX 1* und *4* (SLX1-SLX4) (Deng et al. 2005). Dabei spiegelt RAD1/RAD10 das heterodimere Ortholog der humanen Endonuklease XPF/ERCC1 wieder (Ciccina et al. 2008, Zhang et al. 2011).

Im humanen System gibt es für die Reparatur von TOP1-assoziierten DNA-Schäden vorrangig drei Wege (Pommier et al. 2006). Beim ersten Weg kann der kovalent gebundene TOP1-DNA-Komplex durch die Re-Ligation eines freien 5'-DNA-Endes wieder aufgelöst werden, wozu allerdings ein freies 5'-Ende in räumlicher Nähe des CCs benötigt wird. Kam es im Zuge der Replikation zu einer Kollision der RF mit dem CC, so ist der Leitstrang in der Regel bis zum freien 5'-Ende dupliziert worden, sodass dieser neu-synthetisierte Doppelstrang nicht als Substrat für die Ligation an das 3'-Ende genutzt werden kann. Für die Erzeugung eines freien 5'-Endes kann sich die Zelle der *fork regression* unter Ausbildung einer *Chicken foot*-Struktur bedienen, welche topologisch einer HJ gleicht und BLM-TOP3 α -vermittelt aufgelöst werden kann (Pommier et al. 2006). Durch die Regression wird wieder das ursprüngliche 5'-Ende des Leitstrangs generiert, welches ein Substrat für das durch die TOP1-gebundene 3'-Ende darstellt und die Re-Ligation initiieren kann (Abbildung 22, A).

Der zweite Weg beschreibt die Exzision der TOP1 durch die TDP1. 1999 wurde TDP1 erstmals als das Enzym beschrieben, welches für die Hydrolyse der Verbindung zwischen dem Tyrosin der TOP1 und dem 3'-Ende der DNA verantwortlich ist (Pouliot et al. 1999). Dieses in Eukaryoten hoch-konservierte Protein gehört zur Phospholipase-D-Superfamilie der Phospholipid-hydrolysierenden Enzyme (Interthal et al. 2001). Eine homozygote Mutation des TDP1-Gens führt zum Krankheitsbild der spinocerebellären Ataxie mit axonaler Neuropathie (engl. spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy, SCAN1) (Takashima et al. 2002). SCAN1-Zellen reagieren hypersensitiv auf TOP1-Inhibitoren wie CPT, jedoch nicht auf TOP2-Inhibitoren, was darauf zurückzuführen ist, dass TDP1 spezifisch 3'- aber keine 5'-Tyrosin-DNA-Komplexe prozessieren kann (Pommier et al. 2006). Eine optimale TDP1-Aktivität benötigt ein DNA-Segment, welches zumindest aus einigen Nukleotiden besteht, eine freiliegende Phosphotyrosyl-Verbindung zwischen TOP1 und der DNA und eine verkürzte TOP1-Polypeptidkette (Debethune et al. 2002, Pommier et al. 2006). Um diese Anforderungen zu erfüllen, wird die TOP1 an langandauernden CCs zumindest teilweise proteasomal degradiert. Tatsächlich konnte eine Ubiquitinierung, welche einen zellulären Marker für abzubauen Proteine darstellt, sowie eine Degradation

von TOP1 nach einer CPT-Behandlung festgestellt werden (Desai et al. 1997). Durch die Proteolyse der TOP1 wird die Phosphotyrosylverbindung freigelegt, welche zuvor für die geschützte Katalyse der Reaktion in einer Tasche der TOP1 lag. Nachdem die Verbindung zugänglich für TDP1 gemacht wurde, spaltet dieses die Verbindung zwischen der DNA und dem verbleibendem Rest der TOP1 und erzeugt dabei einen unüblichen Phosphatrest am 3'-Ende des Bruchs. Für die Ligation mit dem einzelsträngigen 5'-Ende oder für das Auffüllen von Nukleotiden durch Polymerasen ist daher eine Hydrolyse des 3'-Endes notwendig, um einen 3'-Hydroxylrest zu erzeugen. Die 3'-Phosphataseaktivität wird in Hefen von der Tripeptidyl-Peptidase 1 (TPP1) und im humanen System von der Polynukleotid-Kinase 3'-Phosphatase (PNKP) sowie von AP-Endonukleasen übernommen (Pommier et al. 2006). Nach dieser Prozessierung des 3'-Endes können die beiden TOP1-induzierten DNA-Enden durch Ligasen ligiert und, falls notwendig, fehlende Nukleotide durch Polymerasen aufgefüllt werden (Abbildung 22, B).

In einem dritten Weg kann die Exzision der TOP1 durch eine Vielzahl an verschiedenen Endonukleasen durchgeführt werden, wobei der durch TOP1-gebundene Teil der DNA ebenfalls entfernt wird (Abbildung 22, C). Für diese Funktion wurden im humanen System die Endonukleasen XPF/ERCC1 beschrieben (RAD1/RAD10 in Hefen), welche während der Nukleotid-Excisionsreparatur großräumige und dichte DNA-Strukturen (engl. *bulky adducts*) schneiden (Hoeijmakers 2001). Wie TDP1 benötigt dieser Komplex einen SSB, bei welchem das 3'-Ende prozessiert werden kann. In Abwesenheit von TDP1 scheint außerdem der dimere Komplex aus SLX1 und SLX4 mit seiner starken Endonukleaseaktivität und breiten Substratspezifität eine TOP1-CC-Exzision durchführen zu können (Fricke and Brill 2003, Deng et al. 2005, Pommier et al. 2006). Da MUS81- und RAD50-defiziente Hefen eine hohe Sensitivität gegenüber CPT aufweisen, kann der Endonuklease MUS81 ebenfalls eine Funktion der TOP1-CC-Entfernung zugeschrieben werden. MUS81 bildet in Säugerzellen Dimere mit dem Protein EME1, welche auch bei der unter 1.3.2.3 beschriebenen Auflösung von dHJs eine Rolle spielen und ebenso an der Prozessierung von DNA an geschädigten Replikationsgabeln beteiligt sind (Ciccio et al. 2003, Pommier et al. 2006). Obwohl in Hefen eine Sensitivität gegenüber CPT gezeigt werden konnte (Deng et al. 2005), wiesen MUS81-Knockout-Mäuse keine Hypersensitivität bezüglich CPT auf (Dendouga et al. 2005). Demzufolge benötigt es weiterer Aufklärung der Beteiligung von MUS81 an der Prozessierung von TOP1-CCs. Zusätzlich bilden TOP1-CCs ein Substrat für den MRN-Komplex, welcher unabhängig vom TDP1-Weg und mit Hilfe des endonukleolytisch-aktiven CtIP DNA-Addukte entfernen kann (Liu et al. 2002). Hefen mit einer SAE2-Deletion (SAE2 bildet das CtIP-Ortholog in Hefen) gehören zu den CPT-sensitivsten Hefestämmen und CtIP-supprimierte, humane Zellen weisen stark erhöhte DSB-Level nach einer CPT-Behandlung auf (Sartori et al. 2007), was einen starken Hinweis auf die Beteiligung von MRN und CtIP an der Prozessierung von TOP1-CCs oder der Reparatur CPT-induzierter DSBs darstellt.

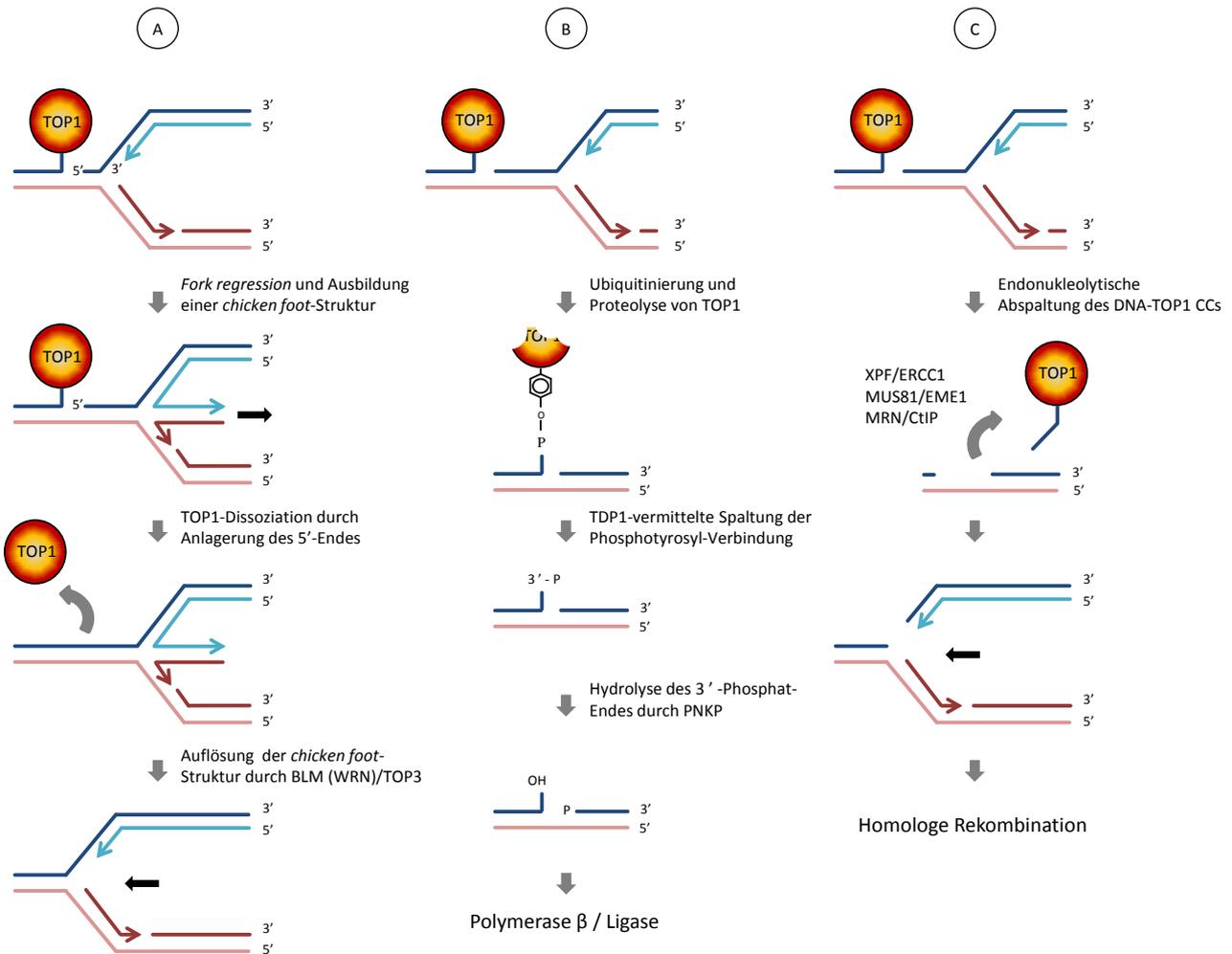


Abbildung 22: Wege zur Reparatur von kovalent-gebundenen TOP1-CCs

A) Für die Religation des TOP1-gebundenen 3'-Endes wird ein freies, einzelsträngiges 5'-Hydroxylende benötigt. Dieses kann jedoch im Zuge der Replikation bereits dupliziert vorliegen, sodass eine Religation nicht mehr möglich ist. Durch eine *fork regression* und Ausbildung einer *chicken foot*-Struktur wird das 5'-Hydroxylende wieder verfügbar und kann durch eine Umesterung zur Dissoziation der TOP1 genutzt werden. B) Die TDP1-vermittelte TOP1-Exzision benötigt den Abbau der Topoisomerase, um die Phosphotyrosyl-Verbindung für das Enzym zugänglich zu machen. TDP1 generiert daraufhin ein 3'-Phosphatende, welches jedoch nicht mit dem 5'-Phosphatende verknüpft werden kann, sodass dieses erst durch PNKP hydrolysiert werden muss. C) Der Top1-CC wird inklusive gebundener DNA durch 3'-Endonukleasen entfernt. Die resultierende DNA-Läsion wird anschließend HR-abhängig repariert. (Grafik modifiziert nach (Pommier et al. 2006))

Abgesehen von der endonukleolytischen Exzision des TOP1-CCs spielt bei Menschen die Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1 (PARP-1) eine Rolle in der Reparatur TOP1-assoziierter DNA-Schäden. Eine genetische Inaktivierung von PARP sensibilisiert Säugerzellen gegenüber CPT, sodass PARP-Inhibitoren sowohl in der Zellkultur als auch in *Xenograft*-Systemen (Fremd-Zell-Transplantationen) CPT-induzierte Effekte verstärken (Bowman et al. 2001, Calabrese et al. 2004, Zhang et al. 2011). Es konnte gezeigt werden, dass eine PARP-Inhibierung einen Anstieg an TOP1-CC-induzierten DNA-Brüchen herbeiführt, ohne dabei die Anzahl an TOP1-CCs zu erhöhen (Smith et al. 2005). Die genauen Mechanismen der PARP-vermittelten Reparatur von TOP1-induzierten DNA-Schäden sind jedoch noch nicht aufgeklärt (Zhang et al. 2011).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass CPT die Dissoziation der Topoisomerase 1 stört und damit während der Replikation die Wahrscheinlichkeit für ein Arretieren der Replikationsgabeln drastisch steigert. Hierdurch werden vorrangig ein-endige DSBs induziert, welche durch Reparaturmechanismen behoben werden. Dieser spezifischen Induktion von nicht-ligierbaren SSBs, welche im Zuge der Replikation zu ein-endigen DSBs konvertiert werden, steht das alkylierende Agens MMS gegenüber, das diverse Basenmodifikationen und Folgeschäden verursacht.

1.6 Methymethansulfonat

Alkylierende Agenzien werden seit Jahrzehnten als klassische DNA-schädigende Stoffe genutzt, um DNA-Reparaturmechanismen aufzuklären und hochproliferative Zellen zu schädigen (Wyatt and Pittman 2006, Nikolova et al. 2010). Die DNA-schädigende Wirkung wird dabei durch die massive Induktion von Methylierungen an diversen Stellen von DNA-Basen erzielt. MMS dient hierbei als geläufiges Modell-Agens, welches Methylgruppen einer Vielzahl von nukleophilen Atomen der DNA hinzufügt (Wyatt and Pittman 2006).

1.6.1 MMS-induzierte Basenmethylierungen

Nukleinbasen bieten MMS eine Bandbreite an Zielstrukturen. Die MMS-induzierten Methylierungen erfolgen durch eine nukleophile Substitutionsreaktion vor allem an den Stickstoff- und Sauerstoffatomen der Basen. MMS besitzt dabei eine hohe Affinität zu Stickstoffatomen von Purinringen, weshalb hauptsächlich Stickstoff-Methylierungen an Adenin und Guanin auftreten (Abbildung 23).

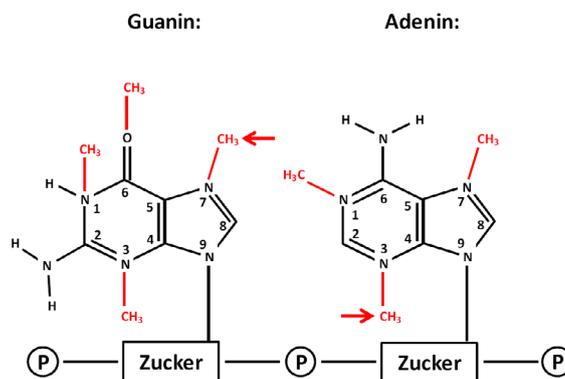


Abbildung 23: MMS-induzierte Basenmethylierungen

Die Purine Adenin und Guanin stellen die primären Zielstrukturen für MMS dar. Das Stickstoffatom an Position 7 von Guanin und an Position 3 von Adenin weisen die höchsten Elektronegativitäten in der DNA auf und sind damit stark nukleophil. Für ein elektrophiles, methylierendes Agens wie MMS bieten diese Atome ideale Bindungspartner, sodass in einer nukleophilen Substitution diese beiden Stickstoffatome der Basen vorrangig methyliert werden (rote Pfeile). Weiter Stickstoffatome der Basen Guanin und Adenin, sowie das exocyclische Sauerstoffatom von Guanin werden zu einem geringen Prozentsatz ebenfalls methyliert (Methylgruppen in rot) (nach (Wyatt and Pittman 2006)).

Das vorherrschende Addukt stellt 7-Methylguanin (N7-MeG) mit 82% aller MMS-induzierten Methylierungen dar, gefolgt von 11% 3-Methyladenin (N3-MeA). Die restlichen Basenmethylierungen wie N1-MeA, N7-MeA, N1-MeG, N3-MeG und Methylierungen an den Phyrmidinen machen weniger als 5%

der an doppelsträngiger DNA verursachten Modifikationen aus (Beranek 1990, Wyatt and Pittman 2006). Ein weiterer und besonders schwerwiegender Basenschaden ist O6-Methylguanin (O6-MeG), der zu 0,3% von MMS erzeugt wird. Während der ersten S-Phase führt O6-Methylguanin bei unzureichender Reparatur zur Ausbildung einer Punktmutation, da während der Replikation fälschlicherweise ein Thymin anstelle eines Cytosins als komplementäre Base eingebaut wird. O6-MeG induziert keinen Zellzyklusarrest, bevor die Zelle eine zweite S-Phase durchlaufen hat, was darauf hindeutet, dass die biologischen Konsequenzen erst nach der Fehlpaarung von O6-MeG mit einem Thymin zum Tragen kommen (Goldmacher et al. 1986, Aquilina et al. 1999, Wyatt and Pittman 2006). Die geringe Auftrittswahrscheinlichkeit von 0,3% aller MMS-induzierten Basenmodifikationen lässt jedoch eine eher unbedeutende Beteiligung von O6-MeG an der DNA-schädigenden Wirkung von MMS vermuten.

1.6.2 Reparatur MMS-induzierter Basenmethylierungen

Studien im Bakterium *Escherichia coli* (E. coli) konnten zeigen, dass methylierte DNA-Basen über hochspezifische Reparaturprozesse repariert werden, was als *adaptive response* bezeichnet wird (Samson and Cairns 1977, Laval 1985). Bei dieser Schadensantwort ist es 5 Proteinen möglich 11 verschiedene, methylierte Basen und Methylphosphat-Modifikationen zu beseitigen (Wyatt and Pittman 2006). Proteine von Säugetieren ähneln sich in der Spezifität der E. Coli-Enzyme, sodass bestimmte Proteine spezifisch eine oder zwei schädliche Strukturen entfernen können. So ist das Enzym O6-Methylguanin-Methyltransferase (MGMT) spezifisch für die Reparatur von O6-Methylguanin verantwortlich. MGMT entfernt dabei die Methylierung in einer sogenannten *suicide reaction*, indem es die Methylgruppe vom Sauerstoff-Atom löst und kovalent auf einen Cystein-Rest überträgt, wodurch das Enzym irreversibel inaktiviert wird (Wyatt and Pittman 2006). Weitere an der Reparatur von methylierten Basen beteiligte Enzyme sind die Mitglieder der *Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase ALKB* (ALKB) -Proteinfamilie, welche eine N-Methyl-Dioxygenase-Aktivität besitzen und dadurch die Methylgruppen von N1-MeA und N1-MeG entfernen können (Falnes 2004). Den N-Methylpurin-DNA-Glycosylasen wird jedoch die wichtigste Aufgabe in der Reparatur MMS-induzierter DNA-Schäden zuteil, da sie die beiden häufigsten Modifikationen N7-MeG und N3-MeA aus der DNA entfernen können und somit die Reparatur mittels BER einleiten können. Die große Bedeutung der BER bei der Reparatur MMS-induzierter DNA-Schäden wird durch Studien verdeutlicht, die eine Hypersensitivität von Zellen mit Defekten in der BER gegenüber MMS beschrieben haben (Thompson et al. 1982, Sobol et al. 2002).

1.6.2.1 Basenexzisionsreparatur

Tausende endogene Basenschäden und Modifikationen werden täglich in einer Zelle über die BER behoben (Baute and Depicker 2008). Vor allem in der S-Phase des Zellzyklus ist eine schnelle Reparatur dieser Basenschäden zwingend erforderlich, um schwerwiegende, replikationsassoziierte DNA-Schäden zu vermeiden. Es ist nicht verwunderlich, dass der Prozess der BER bei solch hoher Frequenz an Basenschäden essentiell für das Überleben einer Zelle ist. Krankheiten mit einem BER-Defekt wurden bisher nicht beschrieben und Mäuse mit Nullmutationen in wichtigen BER-Faktoren wie Pol β oder XRCC1 sind embryonal letal (Gu et al. 1994, Tebbs et al. 1999). Wie beschrieben, stellt die BER auch für MMS-induzierte Basenmethylierungen den wichtigsten Reparaturmechanismus dar. Dabei kann zwischen zwei Wegen der BER unterschieden werden. Die *short patch* BER beschreibt in Säugerzellen

gegenüber der *long patch* BER den vorherrschenden Weg zur Reparatur von Basenmodifikationen, wobei sich die beiden Wege nur in den letzten Schritten voneinander unterscheiden. Zunächst wird die endogen- oder exogen-modifizierte Base durch spezifische Glycosylasen aus der DNA gelöst und von dem Zuckerphosphatrückgrat getrennt, sodass eine sogenannte abasische Stelle in einem Strang der DNA entsteht. Das übriggebliebene Zuckerphosphatrückgrat kann durch die *apurinic-apyrimidinic endonuclease 1* (APE1) geschnitten werden, um einen Einzelstrangbruch mit einem 3-OH- und einem 5-Desoxyribosephosphat-Rest zu generieren. Im Zuge der *short patch* BER wird durch die Pol β die fehlende Base zunächst ersetzt und durch die 5-dRP-Lyase-Aktivität der Pol β der Zucker vom 5'-Ende entfernt, sodass ein freies Phosphatende gebildet wird. Dieser Schritt der *short patch* BER wird als der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reparatur bezeichnet (Wilson et al. 2000) und ermöglicht die Ligation der freien DNA-Enden mittels der DNA-Ligase III. Liegt die Zuckergruppe am 5'-Ende oxidiert oder reduziert vor, so ist die Pol β nicht in der Lage ein 5'-Phosphatende zu erzeugen und der Weg der *long patch* BER wird eingeschlagen, welcher sich weiterer Proteine wie PARP, PCNA und FEN1 bedient (Caldecott 2003). Hierbei synthetisiert Pol β zunächst eine längere Sequenz von 2 bis 15 Nukleotiden und verdrängt dabei einen Teil des gebundenen DNA-Strangs, was auch durch die Pol δ und Pol ϵ vollzogen werden kann (Fortini et al. 1998). Der verdrängte Strang wird anschließend durch *flap endonuclease 1* (FEN1) abgeschnitten und der neusynthetisierte Strang mittels der Ligase 1 (LIG1) mit der DNA verbunden (Levin et al. 2000). XRCC1 konnte als Interaktionspartner mit fast allen BER-Faktoren wie LIG III (Caldecott et al. 1995), Pol β (Caldecott et al. 1996), APE1 (Vidal et al. 2001) und *Polynucleotide kinase 3'-phosphatase 1* (PNK1) (Whitehouse et al. 2001) identifiziert werden, was eine unterstützende Funktion in der BER vermuten lässt. XRCC1-defekte Hamsterzellen zeigen eine Hypersensitivität gegenüber MMS und anderen alkylierenden Substanzen und weisen Beeinträchtigungen in der Einzelstrangbruch-Reparatur auf (Thompson et al. 1982, Veld et al. 1998). Aufgrund der großen Anzahl an Interaktionspartnern von XRCC1 ist es jedoch schwierig spezifische Aufgaben von XRCC1 an den einzelnen Reaktion der BER festzulegen, sodass eine koordinative Funktion von XRCC1 in der BER vermutet wird (Caldecott 2003).

1.6.3 Induktion und Reparatur MMS-induzierter DSBs

Eine MMS-induzierte Ausbildung von DSBs konnte bereits in Studien mittels γ H2AX-Foci-Analyse beobachtet werden (Zhou et al. 2006). Außerdem konnte gezeigt werden, dass γ H2AX-Foci nicht auftreten wenn Zellen nicht proliferieren (Staszewski et al. 2008), was auf eine DSB-Induktion durch MMS in der S-Phase schließen ließ. Weitere Studien konnten diese Annahme durch eine Kollokalisierung von MMS-induzierten γ H2AX-Foci mit Replikationsmarkern belegen (Groth et al. 2010). Die molekularen Mechanismen der Entstehung replikationsabhängiger DSBs durch MMS-induzierte Basenmethylierungen sind jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt, wobei hauptsächlich zwei Prozesse plausibel erscheinen. Zum einen konnte nach eine MMS-Behandlung eine Arretierung von Replikationsgabeln festgestellt werden, welche auf die massive Anzahl an induzierten Methylierungen zurückgeführt wurde (Larson et al. 1985, Engelward et al. 1998). Bei andauerndem Arrest können Replikationsgabeln kollabieren und so zur Ausbildung von ein-endigen DSBs führen. Zum anderen können temporäre, abasische Stellen und SSBs, die während der BER erzeugt werden, zu ein-endigen DSBs führen, wenn Replikationsgabeln mit diesen kollidieren. Bei diesem Prozess ist ein *replication fork run-off* denkbar, was durch Studien mit BER-mutierten Zelllinien unterstützt wird. XRCC1- oder Pol β -defiziente Zellen akkumulieren SSBs und zeigen eine hohe Empfindlichkeit gegenüber MMS (Thompson et al. 1982,

Sobol et al. 2002). In beiden Modellen entstehen jedoch replikationsassoziierte, ein-endige DSBs, welche über einen HR-abhängigen Mechanismus repariert werden. Eine Vielzahl an Studien konnte eine Hypersensitivität unterschiedlicher, HR-defizienter Zellen nachweisen (Smiraldo et al. 2005, Hinz et al. 2006, Nikolova et al. 2010), wohingegen NHEJ-defiziente Zellen kaum sensitiv auf MMS reagierten (Lundin et al. 2005, Nikolova et al. 2010)

1.7 Zielsetzung

Für die Reparatur zwei-endiger DSBs sowohl in der G1- als auch in der G2-Phase existieren gut beschriebene Mechanismen, wobei das NHEJ und die HR die Hauptreparaturwege dieser DNA-Schäden darstellen. Ein großer Anteil der endogen-erzeugten DNA-Schäden sind jedoch ein-endige DSBs, die während der Replikation der DNA in der S-Phase des Zellzyklus entstehen. Es ist anzunehmen, dass die Reparaturmechanismen eukaryotischer Zellen darauf ausgelegt sind, diese Schäden mindestens genauso gut zu bewerkstelligen wie zwei-endige DSBs, wenn nicht sogar hauptsächlich für diese Art von Schäden entstanden sind. Deshalb ist es zwingend notwendig die Reparatur von in der S-Phase induzierten DNA-Schäden genauer zu untersuchen und mehr über die Mechanismen der DNA-Reparatur unter physiologischen Konditionen zu erfahren. Hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Agenzien gewählt, welche gezielt DNA-Schäden in der S-Phase hervorrufen. Dabei sollte untersucht werden, ob sich das Reparaturverhalten von CPT- und MMS-induzierten, replikationsassoziierten DNA-Schäden von einander unterscheidet und wie sich die replikationsassoziierten DNA-Schäden auf den Zellzyklus auswirken. Außerdem sollte mit spezifischen und sensitiven Methoden die Ausbildung und Reparatur einzelner, replikationsassoziiierter DSBs nach therapeutischen Dosen von CPT und MMS genauer charakterisiert werden. Der Focus der vorliegenden Arbeit lag sowohl in der Beantwortung der Fragen, wie und wann CPT- oder MMS-induzierte DSBs entstehen als auch wie und vor allem wann die induzierten DSBs von Zellen repariert werden.

Dabei ist zu beachten, dass sich Studien zur DNA-Reparatur von replikationsabhängigen DNA-Schäden stark von Studien in G₀/G₁-, G₂-Phase oder mitotischen Zellen unterscheiden, da S-Phase-Zellen eine große Variabilität aufweisen und sich ihr DNA-Gehalt ständig verändert. Zusätzlich verkomplizieren aktive Replikationsprozesse die Analyse von DNA-Reparaturprozessen, da ständig neue DNA-Schäden während der S-Phase entstehen können. Umso wichtiger ist es bei zellzyklusspezifischen Experimenten, welche die S-Phase betreffen, innovative Versuchsansätze zu entwickeln, um Rückschlüsse auf die Reparaturmechanismen replikationsassoziiierter DNA-Schäden herstellen zu können. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Kombination aus Immunfluoreszenz-Studien, *Life cell*-Analyse, Zellzyklus-Studien und zytogenetischen Ansätzen sollte hierzu genaueren Aufschluss über die molekularen Mechanismen der Entstehung und Reparatur CPT- und MMS-induzierter DNA-Schäden geben.

2 Material und Methoden

Im Folgenden Abschnitt werden sämtliche Materialien und Methoden aufgelistet und beschrieben, welche für die vorliegende Arbeit verwendet wurden.

2.1 Material

Das benötigte Material gliedert sich in diverse Verbrauchsmittel sowie genutzte Geräte und Software.

2.1.1 Chemikalien

10 x PBS Instamed-Pulver	(Biochrom AG, Berlin)
β -Mercaptoethanol	(Roth, Karlsruhe)
BrdU (1 mM in PBS)	(BD Pharmingen™, Heidelberg)
BSA (Bovines Serumalbumin)	(AppliChem, Darmstadt)
Calyculin	(LC Laboratories, Woburn, USA)
Camptothecin	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Colcemid (100 g/ml in DMSO)	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
DAPI (in MilliQ)	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Dithiothreitol (DTT)	(Roth, Karlsruhe)
DMSO	(Roth, Karlsruhe)
DNA-PK-Inhibitor (NU7026, 10 mM in DMSO)	(Tocris, Ellisville, USA)
DNase (1 mg/ml in 50% Glycerin)	(Roche, Mannheim)
EDTA	(Roth, Karlsruhe)
EdU (10 mM in DMSO, Click-iT™ Kit)	(Invitrogen, Karlsruhe)
Essigsäure	(Roth, Karlsruhe)
Ethanol (reinst > 99,8%)	(AppliChem, Darmstadt)
Ethanol (vergällt)	(Roth, Karlsruhe)
Formaldehyd (37%)	(Roth, Karlsruhe)
Giemsa	(Roth, Karlsruhe)
Glycerol	(Roth, Karlsruhe)
Glycin	(Roth, Karlsruhe)
HCl (37 %)	(Roth, Karlsruhe)
HiPerFect® Transfection Reagent	(Qiagen, Hilden)
Kaliumchlorid	(Roth, Karlsruhe)
Koffein (50 mM in PBS)	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Methanol	(Roth, Karlsruhe)

Methylmethansulfonat (99%)	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Milchpulver	(Roth, Karlsruhe)
Mounting Medium (Vectashield®)	(Vector Laboratories, Burlingame, USA)
Natriumchlorid	(Roth, Karlsruhe)
Natrium-Deoxycholat	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Natrium-Tetraborat-Decahydrat	(Roth, Karlsruhe)
Propidiumiodid (0,1 mg/ml in 1xPBS)	(Fluka Chemika AG, Buchs, CH)
RNaseA (10 mg/ml in PBS, hitzeinaktiviert)	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
TRIS	(Roth, Karlsruhe)
Triton X-100	(Roth, Karlsruhe)
Trypsin	(Biochrom AG, Berlin)
Tween®20	(Sigma-Aldrich, Steinheim)

2.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze

Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Minimal Essential Medium (MEM) Earle	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
RPMI-Medium	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Non-essential amino acids (NEAA)	(Biochrom AG, Berlin)
FCS Superior	(Biochrom AG, Berlin)
Hygromycin B-Lösung 50mg/ml	(Roth, Karlsruhe)

2.1.3 Lösungen

Trypsin-EDTA-Lösung	0,02 % Trypsin-Lösung (2,5 %) 0,05 % 0,5 mM Na ₂ -EDTA, pH 8 in 1xPBS
1xPBS	10xPBS 1:10 in MilliQ
1xPBS/1%FCS	10xPBS 1:10 in MilliQ 1 % FCS
Fixierlösung	2 % Formaldehyd in 1xPBS
Permeabilisierungspuffer	0,2 % Triton X-100 in 1xPBS/1%FCS
Blockpuffer	5 % BSA in 1xPBS/1%FCS
Click-IT™reaction cocktail (500µl)	430 µl 1xClick-IT™ reaction buffer 20 µl CuSO ₄ 1,2 µl Alexa Fluor® azide 50 µl reaction buffer additive
DAPI-Lösung	0,2 µg/ml DAPI in 1xPBS
Durchflusszytometrie-Denaturierungslösung	2 M HCl in 1xPBS

Durchflusszytometrie-Neutralisierungslösung	3,81 g Natrium-Tetraborat-Decahydrat in 100 ml MilliQ, pH 8,5
Propidiumiodid-Lösung	10 % Propidiumiodid-Stammlösung 5 % RNaseA (10 µg/ml) 85 % 1xPBS
RIPA-Puffer	50mM Tris 150mM NaCl 0,1% SDS 0,5% Natrium-Deoxycholat 1% Triton X
5x Lämmli-Puffer	10% SDS 250mM Tris-HCL, pH 6,8 1mg/ml Bromphenolblau 25% β-Mercaptoethanol 50% Glycerol

2.1.4 Antikörper

Primärantikörper

anti-γH2AX (Ser 139), mouse monoclonal IgG	(Millipore GmbH, Schwalbach)
anti-γH2AX (Ser 139), rabbit	
anti-phospho H3	
anti-RAD51	

Sekundärantikörper

goat anti-mouse IgG AlexaFluor488®	(Invitrogen, Karlsruhe)
goat anti-mouse IgG AlexaFluor594®	(Invitrogen, Karlsruhe)
goat anti-rabbit IgG AlexaFluor488®	(Invitrogen, Karlsruhe)
goat anti-rabbit IgG AlexaFluor594®	(Invitrogen, Karlsruhe)

2.1.5 Gebrauchsfertige Kits

ClickiT™ EdU Alexa Fluor®594 Imaging Kit	(Invitrogen, Karlsruhe)
ClickiT™ EdU Alexa Fluor®647 Imaging Kit	(Invitrogen, Karlsruhe)

2.1.6 Small interfering RNAs

siRNA	Sequenz
Control	5 AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT 3
DNA-PKcs	5 CTC GTG TAT TAC AGA AGG AAA 3

KU80	5 AAG ACA GAC ACC CTT GAA GAC 3
RAD51	5 AAG GGA ATT AGT GAA GCC AAA 3

2.1.7 Weiteres Verbrauchsmaterial

Deckgläser (Ø 12 mm)	(Roth, Karlsruhe)
Objektträger Superfrost® (76x26 mm)	(Roth, Karlsruhe)
Pasteurpipetten (Glas)	(Roth, Karlsruhe)
Pasteurpipetten (Kunststoff)	(Roth, Karlsruhe)
Pipettenspitzen	(Sarstedt, Nümbrecht)
Pipettenspitzen (gestopft)	(Roth, Karlsruhe)
Reaktionsgefäße SafeSeal (1,5 ml und 2 ml)	(Roth, Karlsruhe)
Rundbodenröhrchen BD Falcon™ (5 ml)	(BD Biosciences, Heidelberg)
Zellkulturflaschen (25 cm ² und 75 cm ²)	(TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz)
Zellkulturschalen (9,2 cm ² und 221 cm ²)	(TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz)
Zentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml)	(Biochrom AG, Berlin)

2.1.8 Zelllinien

A549	Humane Epithelzellen eines Lungenkarzinoms
HeLa	Humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
AAG-Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs)	Murine embryonale Fibroblasten mit einer Defizienz der Methylpurin Glykosylase. Freundlicherweise von Prof. B. Kaina aus Mainz zur Verfügung gestellt.
U2OS-LIG1dsRED	Humane Osteosarkomzellen mit stabil-transfiziertem LIG1dsRed-Reporter gen, hergestellt von Andreas Taubmann.

2.1.9 Geräte

Durchflusszytometer	FC500 (Beckman Coulter, Krefeld)
Durchlicht-Mikroskope	Eclipse TS100 (Nikon, Düsseldorf)
Fluoreszenzmikroskope	Axioplan 2 (Zeiss, Jena) Axiovert 200M (Zeiss, Jena)
	Observer. D1 (Zeiss, Jena)
Kühl- und Gefrierschränke	(Liebherr, Kirchdorf an der Iller)

Kühlzentrifugen	5804R + Rotor A-4-44 (Eppendorf, Hamburg) 5810R + Rotor A-4-81 (Eppendorf, Hamburg)
Magnetrührer	Varimag (H+P Labortechnik, Oberschleißheim) MRH-Szandard (Heidolph Instruments GmbH & CoKG, Schwabach)
pH-Meter	pMX2000 (WTW, Weilheim)
Pipetten	Pipetman (Gilson, Middleton, USA)
Pipettierhilfe	Pipetboy (Integra, Fernwald)
Reinstwasseranlage	Astacus BIS MT (MembraPure GmbH, Bodenheim)
Sterilwerkbänke	Hera safe (Thermo Scientific, Langenselbold)
Stickstofftank	Locator 8 Plus (Thermolyne, Dubuque, USA)
Tiefkühltruhe (-80°C)	Hera freeze (Thermo Scientific, Langenselbold)
Tischzentrifugen	Mini-Zentrifuge Spectrafuge (Neolab, Heidelberg)
Vortexer	Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, USA)
Waagen	TE1502S und TE153S-DS (Sartorius mechatronics, München)
Wasserbad	WB14 (Mettler, Schwabach)
Zählkammer	Neubauer-improved (Marienfeld GmbH & CoKG, Lauda-Koenigshofen)
Zellkultur-Inkubatoren	Hera cell 240 (Thermo Scientific, Langenselbold)

2.1.10 Software

Adobe Acrobat Reader	(Adobe Inc., San Jose, USA)
CLC Sequence Viewer 6.7.1	CLC Bio A/S
CXP Acquisition/CXP Analysis	Beckman Coulter, Krefeld
ImageJ 1.43	Wayne Rasband, National Institute of Health, USA
Micro-Manager 1.4.13	University of California, San Francisco, USA
Metapher	(Metasystems, Altlußheim)
Microsoft Office	(Microsoft corp., Seattle, USA)

2.2 Methoden

Für die vorliegende Arbeit wurden verschiedene biologische und technische Methoden angewandt, welche im Folgenden dargestellt und beschrieben werden sollen.

2.2.1 Zellkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden in einem wasserdampfgesättigten Umfeld mit einem CO₂-Gehalt von 5% und einer Temperatur von 37° Celsius kultiviert. Die Zellen wurden hierbei in 25cm²- oder 75cm²-Zellkulturflaschen als adhärente Monolayer-Kulturen gehalten und, je nach Wachstumsverhalten, bis zu dreimal wöchentlich passagiert. Hierzu wurde zunächst das Zellkulturmedium entnommen. Die Zellen wurden danach einmal mit sterilem 1xPBS gewaschen und anschließend mit 1ml Trypsin/EDTA überschichtet. Nach zehnminütiger Lagerung bei 37°C konnten die abgelösten Zellen in vorgewärmtes Medium aufgenommen und in gewünschten Verdünnungen für die weitere Zellkultur in neue Zellkulturflaschen ausgesät werden. Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien A549 und HeLa wurden in der Regel zwei Mal wöchentlich in einem Verhältnis von 1:8 passagiert, MEF-Zellen zwei Mal wöchentlich in einem Verhältnis von 1:10. Die variierenden Passagierungs-raten sind auf Unterschiede in der Zellzyklusdauer zurückzuführen, was in unterschiedlichen Wachstumsraten der verschiedenen Zellpopulationen resultiert.

2.2.2 Zellzahlbestimmung und Zellaussaat

Die Aussaat von Zellen erfolgte in Zellkulturschalen mit einer Fläche von 9,2cm² beziehungsweise 22,1cm² und in der Regel 48h vor der Analyse. Für Immunfluoreszenzanalysen wurden zuvor Deckgläser mit einem Durchmesser von 12mm in die Behältnisse gelegt. Für die mikroskopische Analyse war es unabdingbar eine ausreichende, jedoch nicht zu dichte Zellpopulation zu generieren. Zum Einen sollte für alle Versuche eine exponentiell-wachsende Zellpopulation analysiert werden, zum Anderen war es vor allem für die in dieser Arbeit verwendete automatische Zellerkennung (wie unter 2.X.X beschrieben) wichtig zum Zeitpunkt der Analyse genügend, jedoch nicht zu dicht gewachsene Zellen zu mikroskopieren. Zu dicht neben- oder sogar übereinanderliegende Zellen können von der verwendeten Software zur Zellerkennung nicht mehr als einzelne Objekte identifiziert werden. Demzufolge wurde für jeden Versuch eine definierte Anzahl von Zellen ausgesät. Hierfür wurden Zellen wie unter 2.2.1 beschrieben mittels Trypsin/EDTA abgelöst, in einem bestimmten Volumen Medium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt, sodass pro Ansatz die gewünschte Menge an Zellen als Zellsuspension mit gewünschtem Volumen ausgesät werden konnte. Hierzu diente ein Hämocyto-meter mit welchem es möglich ist per Lichtmikroskop Zellen in einem geringen Volumen auszuzählen. Dabei verteilen sich die Zellen in einer Kammer auf einer definierten Fläche, welche in Groß- und Kleinquadrate eingeteilt ist. Zur Bestimmung der Zellzahl einer Ausgangssuspension wurde in dieser Arbeit eine Neubauer-Zählkammer mit 10µl Zellsuspension beschickt und es wurden jeweils 4 Großquadrate ausgezählt. Ein Großquadrat gibt Auskunft über die Zellzahl in einem Volumen von 0,1µl, sodass durch Umrechnung die vorhandene Zellzahl in der Ausgangslösung ermittelt werden kann. Die genaue Höhe der Kammer von 0,1 mm wird durch ein Deckgläschen festgelegt, welches auf zwei eingeschliffenen Glasstegen auf der Zählkammer liegt. Es wird die Zellzahl pro Großquadrat (vier mal

vier kleine Quadrate) mit einer Kantenlänge von 1mm bestimmt, woraus sich ein Probenvolumen von 1mm^3 ($0,1\mu\text{l}$) je Großquadrat ergibt.

2.2.3 Transfektion von Zellen mittels „small interfering RNAs“ (SiRNA)

Um Proteine der DNA-Reparatur effizient zu depletieren, wurden Zellen mit SiRNA transient transfiziert. Hierbei wurden doppelsträngige RNA Moleküle mit einer Länge von 21 Basenpaaren (Bp) mit Hilfe des Transfektionsreagens *HiPerFect Transfection Reagent* in die Zellen transferiert. Um die höchste Effektivität für die Transfektion zu erreichen, wurden die verschiedenen SiRNAs in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Sequenzen und Konzentrationen der eingesetzten SiRNAs

SiRNA	Sequenz	Endkonzentration
Kontrolle	5 AAT TCT CCG AAC GTG TCA CGT 3	10nM - 20nM
DNA-PKcs	5 CTC GTG TAT TAC AGA AGG AAA 3	15nM
Ku80	5 AAG ACA GAC ACC CTT GAA GAC 3	20nM
RAD51	5 AAG GGA ATT AGT GAA GCC AAA 3	10nM

Nach Anleitung wurden hierfür eine definierte Menge SiRNA zusammen mit der entsprechenden Menge Transfektionsreagenz für 10min bei Raumtemperatur in Zellkulturmedium ohne weitere Zusätze inkubiert (Tabelle 3).

Tabelle 3: Ansatz zur Transfektion von Zellen mit SiRNA

Kulturformat	Zellzahl	Zellkulturmedium	SiRNA	Hiperfect	Medium ohne Zusätze
9,2cm ² Schale	1×10^5 bis 2×10^5	2ml	2 - 4 μl	10 μl	100
22,1cm ² Schale	2×10^5 bis 5×10^5	4ml	4 - 8 μl	20 μl	200

Anschließend wurde dieser Ansatz zu der auszusäenden Zellsuspension in ein Falconbehälter gegeben und durch invertieren homogenisiert. Danach wurde die Zellsuspension in gewünschten Verhältnissen ausgesät und vor dem Experiment für 48h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.2.4 Behandlung von Zellen mit CPT und MMS

Um S-Phase-spezifische DNA-Schäden in den verschiedenen Zelllinien zu erzeugen, wurden Zellen mit unterschiedlichen Dosen an CPT oder MMS 48h nach Zellaussaat behandelt. Die Behandlung erfolgte mit Gabe des Zellkulturmediums für eine bestimmte Zeitspanne.

Um eine 10mM CPT-Stammlösung zu erhalten wurden 8,71mg reines CPT in Form eines weißen Pulvers in 2,5ml DMSO gelöst. Diese wurde in einem Verhältnis von 1:100 und 1:1000 mit DMSO verdünnt, sodass für die Versuche pipettierbare CPT-Lösungen von 100 μ M und 10 μ M zur Verfügung standen. Diese Lösungen wurden zur Behandlung der Zellen zum Zellkulturmedium gegeben.

Für eine Pulsbehandlung wurde das Medium aus den Zellkulturschalen abgesaugt, und anschließend neues Medium mit CPT in unterschiedlichen Konzentrationen verabreicht. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C inkubiert. Nach 1h wurde das CPT-haltige Medium abgesaugt, zwei Mal mit 1xPBS gewaschen und neues, auf 37°C temperiertes Medium hinzugegeben. Für eine Dauerbehandlung mit CPT wurde zu dem frischen Medium erneut CPT in gewünschter Konzentration gegeben, und dieses bis zur Zellernte auf den Zellen belassen. Das Abnehmen und Zugeben der CPT-Lösung bei einer Dauerbehandlung war nötig um eine Pulsbehandlung mit EdU (wie unter 2.2.6.1 beschrieben) durchführen zu können.

Für die Pulsbehandlung von Zellen mit MMS wurde analog zur Behandlung mit CPT verfahren. MMS lag als Ausgangssubstanz bereits als reine Flüssigkeit vor. Bei jedem Experiment wurde aus dieser eine 100mM Stammlösung angesetzt, welche zum Zellkulturmedium in gewünschten Verhältnissen gegeben wurde um die Zielkonzentration von 0,5 und 1,5mM zu erreichen.

2.2.5 Behandlung von Zellen mit Coffein

Um mögliche, durch die Agenzien induzierte Checkpoints aufzuheben wurde den untersuchten Zellen in einigen Versuchen dieser Arbeit Koffein appliziert. Hierzu wurde sowohl zusätzlich bei der Behandlung mit CPT und MMS als auch nach der Behandlung Koffein mit einer Endkonzentration von 2mM dem Medium hinzugefügt. Es wurde zunächst eine 100mM Coffein-Lösung in destilliertem Wasser angesetzt und diese dann in entsprechenden Verhältnissen in das Zellkulturmedium gegeben. Um eine 100mM Lösung Koffein zu erhalten, wurden 1,942g Koffein in 100ml destilliertem Wasser gelöst und anschließend aliquotiert.

2.2.6 Zellzykluspezifische Immunfluoreszenzanalysen

Eine besonders aufschlussreiche und anschauliche Methode zur Erforschung des Reparaturverhaltens von Zellen stellt die zellzykluspezifische γ H2AX-Foci-Analyse per Immunfluoreszenz-Mikroskopie dar. Wie unter 1.2.1 beschrieben, wird nach Schadensinduktion das Histon H2AX am Serin 139 phosphoryliert. Diese phosphorylierte Form des Histons wird als γ H2AX bezeichnet und taucht innerhalb weniger Minuten nach DNA-Schädigung in einem Bereich von einem bis zwei Megabasenpaaren um den DNA Schaden herum auf. Mit Hilfe von Antikörpern, welche die phosphorylierte Version des Histons erkennen, können somit diese geschädigten Bereiche der DNA in der Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden. Hierzu bedient man sich eines primären Antikörpers gegen das gewünschte Epitop, in diesem Fall also γ H2AX, und eines Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten sekundären Antikörpers, welcher an den primären Antikörper bindet. Nach Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs können die markierten Bereiche mittels Mikroskopie als sogenannte Foci detektiert werden. Als Marker für Zellkerne wurde das in der Forschung vielfach eingesetzte Agens 4',6-Diamidin-2-phenylindol, kurz DAPI, verwendet, welches sich an die DNA anlagert und in Verbindung mit doppelsträngiger DNA nach Anregung sichtbares, blaues Licht emittiert.

Da nach einer Reparatur von DSBs eine Dephosphorylierung des Histons H2AX stattfindet, verschwinden mit zunehmender Zeit die γ H2AX-Foci wieder. Dies ermöglicht es, die Entstehung und das Schwinden der γ H2AX-Signale über eine gewisse Zeit hinweg zu verfolgen und Reparaturkinetiken zu erstellen. Hierzu wurden in dieser Arbeit Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach einer Behandlung fixiert. Sowohl endogen als auch exogen erzeugte γ H2AX-Foci können in allen Zellzyklusphasen beobachtet werden. Durch die zusätzliche Verwendung eines Zellzyklusmarkers ist es jedoch möglich eine bestimmte Zellpopulation differenziert zu untersuchen.

2.2.6.1 Markierung von S-Phase-Zellen mittels EdU

CPT und MMS sind, wie bereits beschrieben, Agenzien, welche die Replikation von Zellen stören und hierbei DNA-Schäden verursachen. Demzufolge sollten ausschließlich Zellen geschädigt werden, welche sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden. Um bei der Analyse von S-Phase-Zellen von Zellen andere Zellzyklusphasen abgrenzen zu können, wurde eine Markierung mit 5-Ethynyl-2'-Desoxyuridin (EdU) durchgeführt. EdU ist ein Thymidin-Analogon, welches von der Zelle während der DNA-Synthese als Nukleosid eingebaut wird. Die Detektion dieses Einbaus erfolgt ohne Antikörper durch Kopplung eines Fluoreszenzfarbstoffes an das eingebaute EdU mit Hilfe einer „Click-Reaktion“. Solange Zellen EdU aus dem Medium angeboten wird, bauen diese es während der S-Phase in die neu synthetisierte DNA ein. Da in der vorliegenden Arbeit jene Zellen untersucht werden sollten, welche zum Zeitpunkt der Behandlung in der S-Phase des Zellzyklus waren, wurde zeitgleich mit Beginn der einstündigen CPT- und MMS-Behandlung eine EdU-Behandlung mit 10 μ M EdU durchgeführt. Für die Analyse der unbehandelten Kontrollpopulation wurde eine einstündige Markierung mit EdU, jedoch ohne schädigende Agenzien vollzogen.

2.2.6.2 Fixierung von Zellen auf Deckgläsern

Für die Fixierung von Zellen auf Deckgläsern wurde Formaldehyd verwendet. Hierzu wurde das Medium aus den Zellkulturschalen mit den darin befindlichen Deckgläsern entfernt und durch eine 2%ige Formaldehydlösung (in 1xPBS) ersetzt. Nach 15-minütiger Fixierung bei Raumtemperatur wurden die Zellen drei Mal für je 5 Minuten mit 1xPBS gewaschen und anschließend zur Permeabilisierung für 10 Minuten mit 0,5%-iger Triton X-100-Lösung (in 1xPBS) bei Raumtemperatur behandelt. Es folgten je drei 5-minütige Waschschrte mit einer 1%-igen FCS-Lösung (in 1xPBS) bevor die auf Deckgläsern fixierten Zellen in einer 5%-igen BSA-Lösung (in 1xPBS/1% FCS) gelagert wurden.

2.2.6.3 Immunfluoreszenz- und EdU-Markierung

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Deckgläser mit den fixierten Zellen in eine feuchte Kammer gelegt und mit 40 μ l der Primärantikörperlösung beschichtet. Hierzu wurde der γ H2AX-Antikörper (Mouse anti- γ H2AX) im Verhältnis 1:2000 in einer 5%-igen BSA-Lösung (in 1xPBS/1% FCS) angesetzt. Nach Inkubation der Deckgläser mit der Primärantikörperlösung über Nacht bei 4°C wurden diese drei Mal für 10 Minuten mit 1xPBS/1% FCS gewaschen.

Bei Ansätzen, welche die Markierung von S-Phase-Zellen mittels EdU beinhalteten, folgte anschließend die „Färbung“ von EdU durch die Click-Reaktion. Dabei wird ein Azid, was in diesem Fall der Fluores-

zenzfarbstoff ist, in einer durch Kupfer katalysierten Reaktion kovalent an ein Alkin gebunden, was hier das von den Zellen in die DNA eingebaute EdU darstellt. Hierzu wurden die Deckgläser nach der Primärantikörperbehandlung und drei-maligem Waschen in eine feuchte Kammer gelegt und mit je 40µl einer zuvor angesetzten EdU-Lösung (Tabelle 4) beschichtet. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten unter Lichtausschluss.

Tabelle 4: *Click-it*-Reaktionsansatz zur Fluoreszenzfärbung von Zellen mit inkorporiertem EdU

Anzahl an Deckgläsern	Bis zu 12	Bis zu 25	Bis zu 50	Bis zu 100
1xClick-iT Reaktionspuffer	430µl	860µl	1,8ml	3,5ml
CuSO ₄ -Lösung	20µl	40µl	80µl	160µl
Alexa-Fluor Azid	1,2µl	2,5µl	5µl	10µl
Additiver Reaktionspuffer	50µl	10µl	200µl	400µl
Gesamtvolumen (gerundet)	500µl	1ml	2ml	4ml

Um unspezifische Bindungsstellen für die folgende Behandlung mit dem Sekundärantikörper zu blockieren, wurden die Deckgläser nach der EdU-Färbung drei Mal für 10 Minuten mit einer 5%-igen BSA Lösung (in 1xPBS/1% FCS) gewaschen. Es folgte eine einstündige Behandlung mit der Sekundärantikörperlösung bei Raumtemperatur. Hierzu wurden die Deckgläser wieder in eine feuchte Kammer gelegt und mit 40µl der Sekundärantikörperlösung beschichtet. Der Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Anti-Maus-Sekundärantikörper (goat anti-mouse Alexa Fluor 488) wurde im Verhältnis 1:1000 in 5%-iger BSA-Lösung (in 1xPBS/1% FCS) angesetzt.

Um nun Zellkerne in den fixierten Zellen zu färben, wurde die DNA mit DAPI für 5 Minuten mittels einer DAPI-Lösung (0,2µg/ml DAPI in 1xPBS) markiert. Wird dieser Stoff beim Mikroskopieren mit violetter bis ultraviolettem Licht angeregt, emittiert DAPI in Verbindung mit doppelsträngiger DNA blaues Licht mit einem Emissionsmaximum von ~460nm. Anschließend wurden die Deckgläser drei Mal für eine Minute mit destilliertem Wasser gewaschen und mit je 3µl Mounting-Medium mit der „Zellseite“ auf Objektträger gelegt. Die Versiegelung erfolgte mit Nagellack und die Lagerung bei 4°C. Das Resultat dieser Färbung waren fixierte Zellen mit grün-fluoreszierenden γH2AX-Foci, per Click-iT-Reaktion rot-, bzw. Cy5-markiertes EdU und mittels DAPI blau-gefärbte DNA (Abbildung 24).

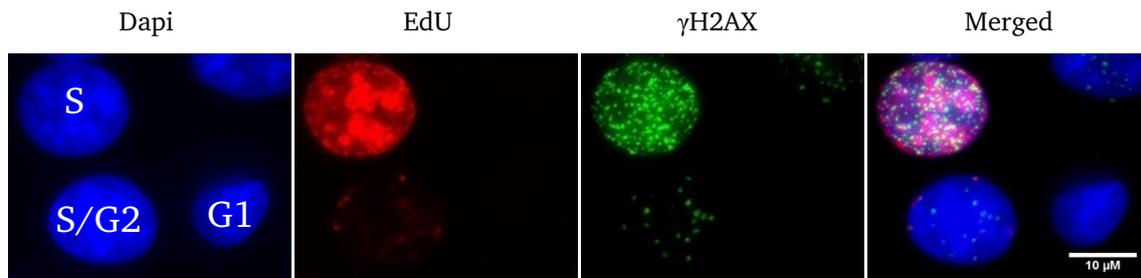


Abbildung 24: Exemplanische Immunfluoreszenz-Färbung zur Analyse von S-Phase-Zellen

A549-Zellen wurden für 1h mit 10nM CPT und EdU behandelt, anschließend fixiert und einer Immunfluoreszenz-Färbung unterzogen. Die Bildergalerie zeigt die mit DAPI gefärbte DNA der Zellkerne (blau), inkorporiertes EdU (rot) sowie γ H2AX-Foci (grün). Zusätzlich ist ein Summenbild der einzelnen Kanäle dargestellt (Merged). Im Bildausschnitt sind drei Zellkerne unterschiedlicher Größe zu erkennen, wobei der Zellkern oben links eine deutliche EdU-Färbung aufweist. Diese Färbung spricht für einen kontinuierlichen Einbau von EdU und somit für eine Replikation von DNA während der einstündigen Behandlung. Der Zellkern im unteren, rechten Teil des Bildes weist kein EdU-Signal auf, und lässt aufgrund seiner Größe auf eine G1-Phase-Zelle schließen. Der dritte Zellkern zeigt ein minimales EdU-Signale, was auf einen kurzzeitigen Einbau zurückzuführen ist, sodass angenommen werden kann, dass sich diese Zelle bei Beginn der Behandlung in einer sehr späten Phase der Replikation befunden hat. Die Größe des Zellkerns lässt außerdem auf eine bereits duplizierte DNA-Menge in der G2-Phase schließen. Die S-Phase-Zelle zeigt eine starke Ausbildung an γ H2AX-Foci, wohingegen die S/G2-Phase-Zelle wenige und die G1-Phase keine Foci aufweist. Die dargestellten Bilder wurden bei 100-facher Vergrößerung aufgenommen.

Für die γ H2AX-Foci-Analyse RAD51-depletierter Zellen wurden diese nach 48 stündiger SiRNA-Transfektion fixiert. Es folgte eine Immunfluoreszenzfärbung mit zwei verschiedenen Primär- und Sekundärantikörpern. Der RAD51-Antikörper (Rabbit anti-RAD51, 1:10000) wurde dabei zusammen mit der γ H2AX-Antikörperlösung angesetzt. Als Sekundärantikörper wurden ein Anti-Maus- (goat anti-mouse Alexa Fluor 488, 1:1000) und Anti-Kaninchen-Antikörper (goat anti-rabbit Alexa Fluor 594, 1:1000) verwendet. Die Verwendung eines rot-fluoreszierenden Sekundärantikörpers für die Detektion von RAD51 erforderte die Markierung von EdU mittels Alexa Fluor 647, eines Cy5-Farbstoffs. Das Resultat dieser Färbung waren grün-fluoreszierende γ H2AX-Foci und rot-fluoreszierendes RAD51, per Click-iT-Reaktion Cy5-markiertes EdU und mittels DAPI blau-gefärbte DNA (Abbildung 25). Bei der Auswertung RAD51-depletierter Zellen wurden ausschließlich Zellen ausgewertet, welche keine RAD51-Foci aufwiesen. Um eine γ H2AX-Foci-Analyse in NHEJ-defizienten Zellen durchführen zu können, wurden zwei essentielle NHEJ-Faktoren simultan depletiert. Da diese Faktoren bei DNA-Schädigung keine Foci bilden, wurde in diesen Ansätzen keine Zellselektion per Immunfluoreszenz getroffen.

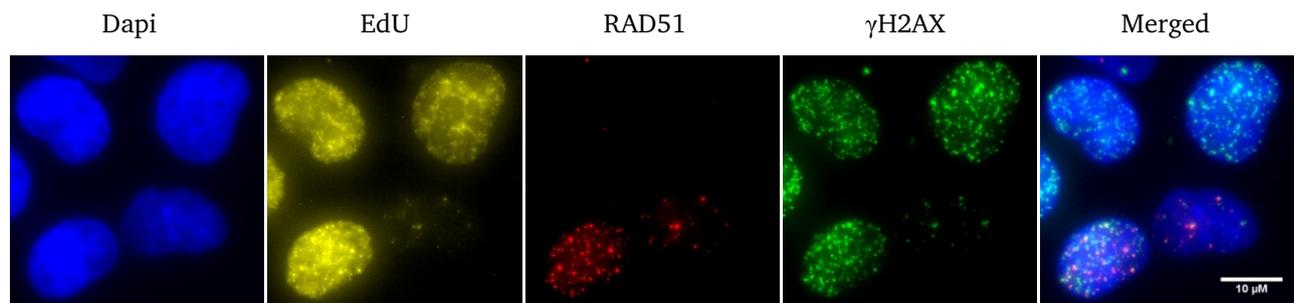


Abbildung 25: Exemplarische Immunfluoreszenz-Färbung zur Analyse RAD51-defizienter Zellen

A549-Zellen wurden für 48h mit RAD51-SiRNA und anschließend für eine Stunde mit 10nM CPT und EdU behandelt. Es folgte eine Fixierung und Immunfluoreszenz-Färbung der Zellen. Die Bildergalerie zeigt die mit DAPI gefärbte DNA der Zellkerne (blau), inkorporiertes EdU (gelb), RAD51-Foci (rot) sowie γ H2AX-Foci (grün). Zusätzlich ist ein Summenbild der einzelnen Kanäle dargestellt (Merged). Im Bildausschnitt sind vier Zellkerne zu erkennen, wobei drei Zellkerne eine deutliche EdU-Färbung aufweisen und somit der S-Phase zugeschrieben werden können. Der Zellkern im unteren, rechten Teil des Bildes weist nur punktuell einige EdU-Signale auf, was unter Berücksichtigung der Kerngröße eine spät-S/G2-Phase-Zelle beschreibt. Von den drei S-Phase-Zellen (EdU positiv) zeigt die untere deutliche RAD51-Foci, wohingegen die oberen beiden keine RAD51-Foci aufweisen. Demzufolge wurde die Expression von RAD51 mittels SiRNA in den oberen Zellen erfolgreich suprimiert, wohingegen die Suppression in den anderen Zellen (unten) fehlgeschlagen ist. Durch die Kombination aus EdU-, RAD51-, und γ H2AX-Färbung wird sowohl eine zellzyklusspezifische Selektion als auch eine Prüfung der SiRNA-Transfektionseffizienz ermöglicht. Die dargestellten Bilder wurden bei 100-facher Vergrößerung aufgenommen.

Für die γ H2AX-Foci-Analyse von mitotischen Zellen, wurde das Experiment analog zu der Analyse von S-Phase Zellen durchgeführt. Zusätzlich wurde ein weiterer Primärantikörper verwendet, welcher die phosphorylierte Version des Histons H3 erkennt und daran bindet. Das Histon H3 wird in der Mitose und Meiose phosphoryliert und ist ein etablierter Marker zur Detektion von mitotischen Zellen (Hans and Dimitrov 2001). Der pH3-Antikörper (rabbit anti-pH3, 1:1000) wurde zusammen mit der γ H2AX-Antikörperlösung auf die Zellen gegeben. Als Sekundärantikörper diente ein Anti-Maus-Sekundärantikörper (goat anti-mouse Alexa Fluor 488, 1:1000) gegen den γ H2AX-Antikörper, sowie ein Anti-Kaninchen-Antikörper gegen den pH3-Antikörper (goat anti-rabbit Alexa Fluor 594, 1:1000). Auch hier erforderte die Verwendung eines rot-fluoreszierenden Sekundärantikörpers zur Detektion von pH3 eine Markierung von EdU mittels des Cy5-Farbstoffs Alexa Fluor 647 (Abbildung 26).

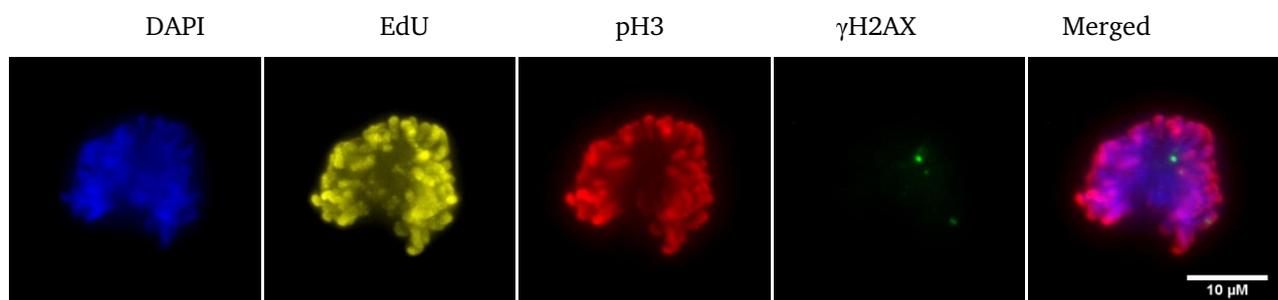


Abbildung 26: Exemplarische Immunfluoreszenz-Färbung zur Analyse mitotischer Zellen

A549-Zellen wurden für eine Stunde mit 10nM CPT und EdU behandelt. Nach 16h erfolgte eine Fixierung und Immunfluoreszenz-Färbung der Zellen. Die Bildergalerie zeigt die mit DAPI gefärbte DNA eines Zellkerns (blau), inkorporiertes EdU (gelb), pH3 (rot) sowie γ H2AX-Foci (grün). Zusätzlich ist ein Summenbild der einzelnen Kanäle dargestellt (Merged). Der Bildausschnitt enthält eine pH3-positive, mitotische Zelle, welche zum Zeitpunkt der Behandlung in der S-Phase war und somit EdU eingebaut hat. In den Kanälen DAPI, EdU und pH3 sind deutlich die für mitotische Zellen charakteristischen Chromosomen in kondensierter Form zu erkennen. Die dargestellten Bilder wurden bei 100-facher Vergrößerung aufgenommen.

2.2.6.4 Mikroskopische Detektion und Auswertung markierter Zellen

Um zellzyklusspezifische Foci-Analysen der auf Deckgläsern fixierten Zellen durchzuführen, wurde zur Mikroskopie die Software *Metafer* verwendet. Das Modul *Metacyte* dieser Software ist eine Scanning-Anwendung, welche es erlaubt Fluoreszenzsignale mittels einer Kamera und definierten Suchparametern automatisch zu erkennen. Als Suchparameter dienen in erster Linie die Fläche und Intensität des DAPI-Signals um Zellkerne zu detektieren sowie das emittierte EdU-Signal für die zellzyklusspezifische Differenzierung. Aufgrund des Zellzyklus, und der damit verbundenen Verdopplung des DNA-Gehalts in der S-Phase, variieren Größe und Intensität des DAPI Signals stark. G2-Phase-Zellen besitzen aufgrund des doppelten DNA Gehalts einen größeren Zellkern, womit die mittlere Signalintensität (Intensität pro Fläche) nahezu gleichbleibt, die absolute Signalintensität gegenüber G1-Phase-Zellen jedoch deutlich zunimmt. Somit können Zellen eindeutig aufgrund Ihrer Größe und Intensität in G1- und G2-Population unterschieden werden. Die Größe und Intensität von S-Phase Zellen befindet sich im Bereich zwischen der von G1- und G2-Zellen und macht eine klare Abgrenzung dieser 3 Populationen voneinander schwierig. Hierzu dient die unter 2.2.6.1 beschriebene Methode der EdU-Markierung. Das EdU-Signal bietet einen zusätzlichen Parameter zur Zellerkennung. Hiermit können alle S-Phase-Zellen, welche EdU während der Replikationsphase eingebaut haben, von den restlichen Zellen unterschieden werden. Bei einem automatisierten Suchlauf können alle erkannten und eingescannten Zellen in einem Diagramm dargestellt und gegeneinander aufgetragen werden. Anschließend ist es für den Benutzer möglich eine bestimmte Fraktion von Zellen auszuwählen und gezielt zu analysieren (Abbildung 27).

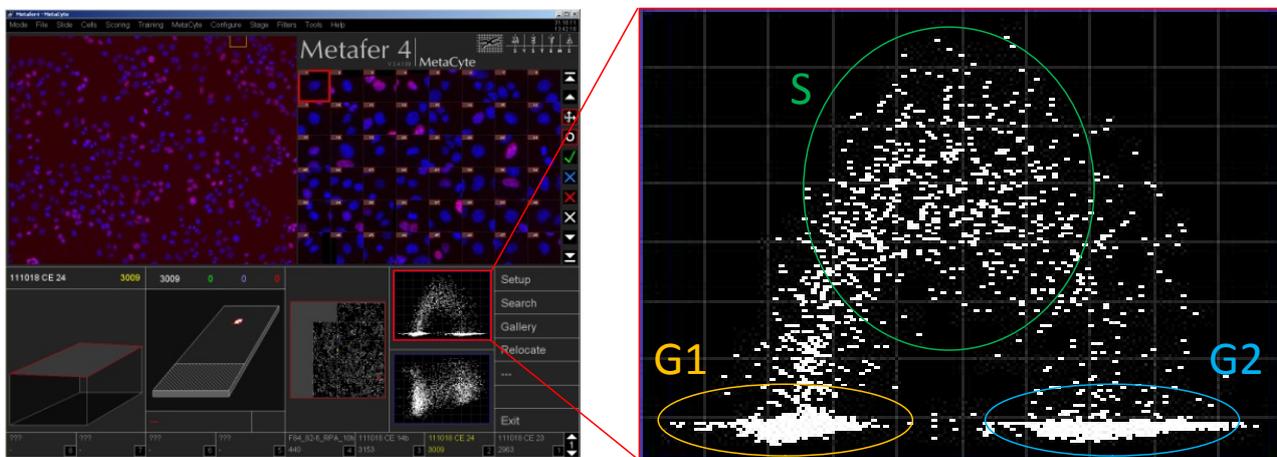


Abbildung 27: Zellzyklusspezifische Detektion und Auswertung von Zellen.

Dargestellt ist ein repräsentativer Ausschnitt des Moduls *Metacyte* aus dem Programm *Metafer* der Firma *Metasystems*. Das linke Bild zeigt dabei die Benutzeroberfläche mit einem Bildausschnitt der gefärbten Zellen auf dem Objektträger und der Galerieansicht der gefundenen Zellen. Exemplarisch ist ein Ansatz dargestellt, bei welchem exponentiell-wachsende Zellen für eine Stunde mit EdU behandelt und anschließend fixiert sowie gefärbt wurden. Das vergrößerte Diagramm auf der rechten Seite spiegelt dabei die Summe aller erfassten Objekte wieder, wobei jeder Punkt ein Objekt darstellt. Horizontal ist dabei die DAPI-Intensität des Objektes, vertikal die EdU-Intensität aufgetragen. Objekte im gelben und blauen Kreis stellen somit zwei EdU-negative Populationen dar, wobei die Population im blauen Kreis eine stark erhöhte DAPI-Intensität aufweist, was auf den doppelten DNA-Gehalt dieser Population zurückzuführen ist. Somit sind G1-Phase Zellen deutlich von G2-Phase Zellen zu unterscheiden. Zellen, welche während der S-Phase EdU in ihre DNA eingebaut haben, heben sich aufgrund Ihres EdU-Signals deutlich von anderen Zellen ab. Diese Zellpopulation ist im grünen Kreis dargestellt und befindet sich aufgrund Ihres EdU Signals oberhalb und aufgrund des intermediären DNA-Gehalts zwischen der G1- und G2- Population.

Nachdem die Zellen mit Hilfe des Mikroskops und der Metafer Software bei 10x Vergrößerung eingeschaut und die gewünschte Zellpopulation ausgesucht wurde, erfolgte die manuelle Auswertung der γ H2AX-Foci bei 1000x Vergrößerung. Hierzu wurde die Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle bestimmt. Für jeden dargestellten Datenpunkt wurden zunächst 40 Zellen ausgewertet und anschließend der Mittelwert der Foci-Anzahlen errechnet. Die Experimente wurden, wenn nicht anders angegeben, unabhängig voneinander drei Mal durchgeführt. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse stellen Mittelwerte aus diesen unabhängigen Experimenten dar, wobei die Fehlerbalken den Standardfehler dieser Mittelwerte anzeigen.

2.2.6.5 Kombinierte Lebendzellmikroskopie und γ H2AX-Foci-Analyse

Für die Bestimmung von γ H2AX-Foci in Zellen in Abhängigkeit ihrer Aufenthaltsdauer in der S-Phase wurden humane, stabil-transfizierte U2OS-LIG1dsRed Zellen analysiert, welche in μ Slides der Firma Ibidi, sogenannten Ibis, kultiviert wurden (Abbildung 28 A). Diese Objektträger ermöglichten es durch einen dünnen Boden sowohl lebende Zellen als auch fixierte Zellen bei einer hohen Auflösung mittels eines inversen Mikroskops zu analysieren (Abbildung 28 B).

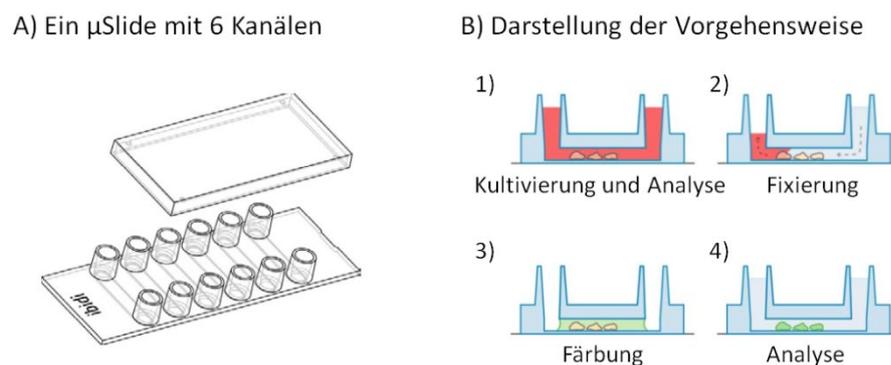


Abbildung 28: Verwendung von μ Slides für die kombinierte Lebendzellmikroskopie und γ H2AX-Foci-Analyse

A) Schematische Darstellung eines μ Slides mit 6 Kanälen. An den Seiten eines jeden Kanals mit einer Höhe von 0,4mM und einem Fassungsvermögen von 30 μ l befinden sich Reservoirs, die jeweils ein Volumen von 60 μ l aufnehmen können. Der Boden der Kanäle besteht aus einer hydrophilen Folie, welche die Analyse mit 63x- oder 100x-Objektiven ermöglicht.

B) Für die Analyse von Zellen werden diese in den Kanälen inkubiert und können anschließend per Lebendzellmikroskopie beobachtet werden (1). Anschließend können Zellen in den Kanälen fixiert (2) sowie per Immunfluoreszenzfärbung markiert werden (3), woraufhin eine weitere Analyse möglich ist (4). (<http://ibidi.com/xtproducts/en/ibidi-Labware/Channel-Slides/m-Slide-VI-0.4>)

Hierzu wurden zunächst 10.000 U2OS-LIG1dsRed-Zellen pro Kanal ausgesät und für 48h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Ibidi in ein *Life cell*-Mikroskop-System transferiert, welches zuvor auf 37°C vorgeheizt wurde und eine physiologische Begasung der Zellen mit 5% CO₂ erlaubt. Mittels der Software *Micro-Manager* war es möglich eine Positionsliste von manuell ausgewählten Zellen zu erstellen. Hierzu wurden einerseits Zellen ausgewählt, welche aufgrund ihrer Größe subjektiv der G1-Phase zuzuordnen waren und deshalb kein S-Phase-typisches LIG1-Muster aufwiesen (siehe 3.X.X), und andererseits Zellen, welche aufgrund des charakteristischen LIG1-Musters bereits in der S-Phase waren. Ziel war es hierbei den Zeitpunkt des S-Phase Eintritts und des S-Phase Austritts festhalten zu können. Nach der Auswahl von je 50 bis 70 Zellen in zwei Kanälen eines Ibis, erfolgte in einem der Kanäle

eine Behandlung der Zellen mit einer 10nM CPT-Lösung. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen des zweiten Kanals. Hierzu wurde zunächst das alte Medium in den Kanälen abgenommen und je zwei Mal mit auf 37°C-temperiertem, frischem Medium gewaschen, bevor entweder Medium mit CPT oder Medium ohne CPT zugeführt wurde. Für die folgende *Life cell*-Analyse wurde Medium ohne Phenolrot verwendet, da dieses die Qualität der angefertigten Bilder des LIG1dsRed-Signals beeinträchtigte. Es folgte eine 6-stündige, automatisierte Analyse der Zellen, indem in einem Intervall von 30 Minuten digitale Aufnahmen sowohl im Durchlicht als auch bei einer Anregung von 560nm anhand der zuvor erstellten Positionsliste angefertigt wurden. Anschließend wurden die Zellen fixiert und einer Immunfluoreszenzfärbung gegen γ H2AX unterzogen. Aufgrund der gespeicherten Positionsliste konnten die nun γ H2AX-gefärbten Zellen relokalisiert werden, sodass abermals Aufnahmen der im *Life cell*-verfolgten Zellen erzeugt werden konnten. Durch einen Vergleich der *Life cell*-Aufnahmen mit den Bildern der fixierten Zellen war es möglich, die Anzahl an γ H2AX-Foci in Abhängigkeit von der Zellzyklusprogression der LIG1-positiven Zellen auf eine halbe Stunde genau zu dokumentieren.

2.2.7 Nachweis der SiRNA-Effizienz mittels SDS-Page und Westernblot

In der vorliegenden Arbeit wurde das Protein RAD51 in zwei Zellsystemen verschiedener Spezies mittels SiRNA supprimiert. Da hierfür stets die gleiche SiRNA verwendet wurde, sollte zunächst gezeigt werden, dass diese in beiden Zellsystemen funktioniert. Hierzu wurde die Effizienz der RAD51-SiRNA per Westernblot kontrolliert. Exemplarisch wurden für das humane System HeLa-Zellen und für das Maussystem MEFs verwendet. Nachdem mit Hilfe der Software *CLC Sequence Viewer 6* ein Sequenzabgleich der vorliegenden RAD51-SiRNA mit den RAD51-Gensequenzen der zwei verschiedenen Spezies stattfand, wurden die ausgesuchten Zellen mit einer Zellzahl von 5×10^5 Zellen je Ansatz in 22,1cm²-Schalen ausgesät und mit Kontroll-, beziehungsweise RAD51-SiRNA (wie unter 2.2.X beschrieben) transfiziert. Nach 48h Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit 1xPBS gewaschen. Es folgte ein Zellaufschluss mittels Lyse der Zellen auf Eis. Hierzu wurden die Zellen für eine Minute mit je 300 μ l RIPA-Puffer überschichtet und auf Eis gekühlt um einer Denaturierung der Proteine vorzubeugen. Anschließend wurde das Zelllysate in ein vorgekühltes 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und 3 x 10 Sekunden per Ultraschall sonifiziert um die DNA durch Scherkräfte zu zerkleinern. Es folgte eine 20 minütige Zentrifugation bei 16000x g um restliche Zellfragmente vom Lysat abzutrennen. Der Überstand wurde in ein neues, vorgekühltes 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung zunächst mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Für die Bestimmung der im Lysat enthaltenen Proteinkonzentration wurde ein Bradford-Assay durchgeführt (Bradford, 1976). Bei der Proteinbestimmung nach Bradford handelt es sich um eine kolorimetrische Methode, die auf der Bindung von Coomassie-Brilliant-Blau G-250 an Proteine im sauren Milieu basiert. Dies hat eine konzentrationsabhängige Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465nm zu 595nm zur Folge. Es wurde je 1 μ l Zelllysate zu 800 μ l destilliertem Wasser und 200 μ l Bradfordreagenz gegeben und durch Vortexen vermischt. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 590nm photometrisch ermittelt. Anhand einer zuvor erstellten Eichgerade mit BSA konnte die Proteinkonzentration der zu untersuchenden Proben ermittelt werden. Anschließend wurden übereinstimmende Proteinmengen der einzelnen Ansätze in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, kurz SDS-PAGE,

aufgetrennt. Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine Variante der Gelelektrophorese, die zur Trennung von Proteinen im elektrischen Feld dient. Wie der Name bereits sagt, wird als Trennmedium ein Gel auf Polyacrylamidbasis eingesetzt. Dabei gilt, je höher das Acrylamid und der Quervernetzer N, N'-Methylenbisacrylamid konzentriert ist, desto geringer ist die Porenweite, durch welche die Proteine sich bewegen. Das anionische Detergenz Natrium Dodecylsulfat, kurz SDS, überdeckt die Eigenladungen von Proteinen. Pro Gramm Protein binden ungefähr 1,4 g SDS, was dazu führt, dass die Proteine eine konstante Ladungsverteilung aufweisen. Für alle Proteine resultiert bei der SDS-PAGE demzufolge ein gleiches Verhältnis aus Ladung und Molekülmasse. Die Wanderungsgeschwindigkeit der negativ geladenen Proteine hängt nur noch von der Molekülgröße der Proteine ab, da diese bei steigender Größe eine geringere Mobilität besitzen.

Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit *Lämmli*-Puffer in geeignetem Verhältnis verdünnt und für 10 min. bei 90 °C im Heizgerät denaturiert. Pro Ansatz wurden 60µg Protein eingesetzt und in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese fand bei konstanter Spannung von 120V statt, bis die Bromphenolblaufront das untere Ende des Gels erreicht hatte. Nachdem die Proteine bei der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, konnten diese mittels Western Blot auf eine Membran übertragen und anschließend mit verschiedenen Antikörpern markiert werden. Ziel dieser Methode ist es die negativ geladenen Proteine anhand einer angelegten Spannung vom Gel Richtung Anode auf die Membran zu transferieren. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 300 mA für ca. 1 Stunde. Nach erfolgreichem Transfer konnte die Membran zur Kontrolle eines positiven Blotvorgangs reversibel mit Ponceau S Lösung gefärbt, dokumentiert, und anschließend mit destilliertem Wasser wieder entfärbt werden.

Vor der Antikörperbehandlung wurden die Membranen für 1h in 5% Magermilch (in 1xTBS/0,1% Tween) geblockt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Die Primärantikörperbehandlung erfolgte im Anschluss mit einem RAD51- (rabbit anti-RAD51, 1:1000) und Tubulinantikörper (mouse anti-Tubulin, 1:1000) als Ladekontrolle bei 4°C über Nacht in 5% Magermilch (in 1xTBS/0,1% Tween) auf einem Rotationsgerät, um eine gleichmäßige Bindung der Antikörper auf der Membran zu gewährleisten. Vor der Inkubation mit den Sekundärantikörpern (donkey anti-rabbit-HRP, 1:20000 und goat anti-mouse-HRP, 1:2000) wurden die Membranen drei Mal für 10 Minuten mit 1xTBS/0,1% Tween gewaschen. Die Sekundärantikörper-Behandlung erfolgte für 1h in 5% Magermilch (in 1xTBS/0,1% Tween) bei Raumtemperatur. Vor der Detektion der Zielproteine mittels einer Chemolumineszenz-Lösung wurden die Membranen wieder drei Mal für 10 Minuten mit 1xTBS/0,1% Tween gewaschen.

Die Detektion der Banden erfolgte mit Hilfe der an den sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase (engl. horseradish peroxidase, HRP). HRP und H₂O₂ katalysieren die Oxidation von Luminol, welches Bestandteil der verwendeten Detektionslösung ist. Anschließend geht unter Lichtemission bei einer Wellenlänge von 428nm Luminol in seinen Grundzustand über, was als Chemolumineszenz bezeichnet wird. Die Oxidationsreaktion findet in Anwesenheit von chemischen Verstärkern wie Phenol statt, welche die Lichtemission um das 100fache erhöhen und die Emissionszeit verlängern. Die Chemolumineszenz erreicht nach 5 bis 20 Minuten ihr Maximum und fällt dann innerhalb von 60 Minuten langsam ab. Zum Zeitpunkt der maximalen Lichtemission wurden die Banden durch eine Luminiszenz-empfindliche Kamera detektiert und dokumentiert.

2.2.8 Durchflusszytometrie

Um das Zellzyklusverhalten von Zellen nach einer DNA-Schädigung zu untersuchen, wurde die Methode der Durchflusszytometrie angewandt. Hierbei werden Zellen in Suspension an einem Laser vorbeigeführt, wobei diese in Abhängigkeit ihrer Größe, Struktur und spezifischen Färbungen charakteristische Signale emittieren. Diese Signale können durch das Durchflusszytometer detektiert werden. Bei der in dieser Arbeit angewendeten zweidimensionalen Analyse ist es möglich in hohem Durchsatz mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markierte Zellen auf Einzelzelebene zu untersuchen.

Für die Durchflusszytometrie wurden 48h vor der Analyse 2×10^5 A549-Zellen in Zellkulturschalen mit einer Fläche von $9,2 \text{ cm}^2$ ausgesät und gegebenenfalls mit SiRNA und/oder Koffein behandelt. Für die Analyse von S-Phase-Zellen erfolgte zeitgleich mit der CPT- oder MMS-Behandlung eine einstündige Markierung mit Bromdesoxyuridin (BrdU), einem Thymidinanalogon, welches während der Replikation in die neusynthetisierte DNA eingebaut wird. Die Färbung der DNA in der gesamten Zellpopulation ermöglichte die Verwendung von Propidiumiodid (PI), einem DNA-interkallierenden Stoff, welcher ein Absorptionsmaximum bei 488nm und Emissionsmaximum bei 590nm besitzt.

2.2.8.1 Fixierung von Zellen für die Durchflusszytometrie

Für die Fixierung der Zellen wurde das Zellkulturmedium entfernt und einmal mit 1xPBS gewaschen. Zur Ablösung der Zellen von der Zellkulturschale wurde 1ml Trypsin/EDTA-Lösung und eine 10-minütige Inkubation bei 37°C angewendet. Die abgelösten Zellen wurden in 4ml Medium resuspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation bei $400 \times g$ für 10 Minuten wurde der Überstand restlos abgenommen und das Zellpellet durch tropfenweise Zugabe von 4ml eiskaltem, 70%-igem Ethanol unter permanentem Vortexen fixiert. Bis zur Färbung der Zellen erfolgte die Lagerung bei -20°C im Gefrierschrank.

2.2.8.2 Markierung der Zellen mit BrdU und PI

Eine Unterscheidung der verschiedenen Zellzyklusphasen konnte durch Färbung der Zellen mit PI und BrdU erzielt werden. Im Anschluss an die Fixierung wurden die Zellen erneut bei $400 \times g$ für 10 Minuten zentrifugiert, und der Überstand verworfen. Da die Detektion von BrdU mittels spezifischer Antikörper funktioniert, wird die DNA in einem weiteren Schritt denaturiert, um BrdU für die Antikörper zugänglich zu machen. Hierzu wurden die Zellpellets in je $500 \mu\text{l}$ 2 M HCl-Lösung (in 1xPBS) resuspendiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 1ml 1xPBS/1% FCS und erneuter Zentrifugation bei $400 \times g$ für 10 Minuten wurde der Überstand verworfen und den Zellpellets $500 \mu\text{l}$ 0,1M Natriumtetraboratlösung (pH 8,5, in destilliertem Wasser) zur Neutralisierung zugefügt. Nach kurzem Vortexen wurden die Zellen hiermit 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine erneute Zugabe von je 1ml 1xPBS/1% FCS, eine Zentrifugation bei $400 \times g$ für 10 Minuten und Abnahme des Überstands, bevor die Zellpellets zur BrdU-Färbung in je $20 \mu\text{l}$ BrdU-Antikörperlösung (*FITC conjugated mouse anti-BrdU monoclonal antibody*) resuspendiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert wurden. Für die Färbung der DNA mittels PI wurde der Antikörper-Zellsuspension 1ml 1xPBS/1% FCS zugegeben, wieder bei $400 \times g$ für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden nun in je $500 \mu\text{l}$ PI-Lösung

(85% 1xPBS, 10% 10xPI, 5% RNase-Lösung) resuspendiert und konnten nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss durchflusszytometrisch analysiert werden.

2.2.8.3 Durchflusszytometrische Detektion und Auswertung markierter Zellen

Die zellzyklusspezifische, zweidimensionale Analyse von Zellen erfolgte im Durchflusszytometer bei einer Anregung durch einen Argon Laser mit einer Wellenlänge von 488nm. Die detektierten Emissionen des FITC-gekoppelten BrdU-Antikörpers lagen bei 510nm bis 550nm und wurden in Kanal FL1 gemessen, die des in Kanal FL3 gemessenen PI-Signals bei 560nm bis 600nm. Bei der Auswertung der Messungen mit Hilfe des Programms *CXP Analysis* wurde eine graphische Darstellung der Ergebnisse gewählt, bei welcher FL1 (logarithmisch) gegen FL3 (linear aufgetragen) wurde. Für jede Probe wurden 20000 einzelne Zellen durchflusszytometrisch ausgewertet.

2.2.9 Zytogenetische Ansätze

Zur Untersuchung von Schwesterchromatidaustauschen (SCEs) und chromosomalen Aberrationen in mitotischen Zellen wurde eine Metaphasenpräparation durchgeführt. Für die Analyse von Chromosomen der G2-Phase wurde das Verfahren der frühzeitigen Chromosomenkondensation (engl. premature chromosome condensation, PCC) angewendet.

2.2.9.1 Analyse von SCEs und chromosomalen Aberrationen in mitotischen Zellen

Für zytogenetische Studien an Mitosen wurden 48h vor der Analyse 5×10^5 Zellen in Zellkulturschalen mit einer Fläche von $22,1 \text{ cm}^2$ ausgesät. Sollten SCEs beobachtet werden, wurde dem Medium bei der Aussaat BrdU hinzugefügt.

2.2.9.1.1 BrdU-Markierung von Zellen

Für die Analyse von SCEs ist es notwendig eine Inkorporation des BrdUs über die Dauer von zwei Replikationszyklen einer Zelle zu gewährleisten. Das Resultat eines BrdU-Einbaus in die DNA über zwei S-Phasen hinweg ist ein unifilar- und ein bifilar-substituiertes Chromtid eines jeden Chromosoms der Zellen. Durch eine Behandlung der fixierten Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff und folgender UV-Bestrahlung sowie einer Giemsa-Färbung ist es möglich diesen Unterschied sichtbar zu machen. Für die Markierung mit BrdU wurden Zellen für 48h mit einer BrdU-Konzentration von $10 \mu\text{M}$ bei 37°C inkubiert. Wurde das Medium bei der Behandlung mit CPT und MMS ersetzt, so wurde mit und nach der Behandlung BrdU dem Medium hinzugefügt, um einen konstanten Einbau des Thymidinanalogs zu gewährleisten.

2.2.9.1.2 Metaphasepräparation

Nach entsprechenden Reparaturzeiten wurde den Ansätzen für eine Anreicherung von mitotischen Zellen drei Stunden vor der Fixierung Colcemid in einer Konzentration von 100 ng/ml hinzugefügt. Colcemid ist ein Giftstoff der Herbstzeitlosen und verhindert während der Mitose die Ausbildung des Spindelapparats, sodass die Chromosomen nicht auf die Tochterzellen aufgeteilt werden können.

Um einen G2/M-Checkpoint aufzuheben und mitotische Zellen zu Akkumulieren, wurde drei Stunden vor der Fixierung, sprich zusammen mit der Gabe von Colcemid, 2mM Koffein dem Medium hinzugefügt. Koffein gilt als Kinase-Inhibitor, welcher unter Anderem ATM und ATR inhibiert, wohingegen die Aktivität der DNA-PK weniger beeinträchtigt wird (Block et al. 2004). Infolgedessen werden Zellzyklus-Checkpoints effizient aufgehoben, was in der vorliegenden Arbeit vor allem G2/M-Checkpoints und bei einer Behandlung von S-Phase-Zellen auch Intra-S-Phase-Checkpoints betrifft.

Nach der drei stündigen Anreicherung von Mitosen wurden die Zellen fixiert. Da sich Zellen während der Mitose leichter vom Kulturschalenboden lösen lassen, wurden das Medium und das zum Waschen verwendete 1xPBS in Reaktionsgefäßen gesammelt, um keine mitotischen Zellen zu verlieren. Hierzu wurde zunächst das Medium von den Ansätzen abgenommen und in ein 15ml-Falcongefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 2ml 1xPBS gewaschen und nach Zugabe von 1ml Trypsin/EDTA-Lösung für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellsuspension wurde nun zu dem gesammelten Medium in das 15ml Falcongefäß gegeben und bei 300 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Es folgte eine 30 minütige Inkubation der Zellen in hypotoner Lösung bei 37°C. Hierzu wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 10ml auf 37°C-temperiertem 75mM KCl resuspendiert. Nach der 30-minütigen Inkubation folgte ein Zentrifugationsschritt bei 300 x g für 10 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden durch eine tropfenweise Zugabe von 10ml Fixativ (3 Teile 100% Methanol, 1 Teil 100% Eisessig) unter ständigem Vortexen fixiert. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Lösung erneut bei 300 x g für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 10 ml frischem Fixativ aufgenommen. Nach einer Lagerung der Proben bei -20°C über Nacht oder bis zur weiteren Versuchsdurchführung, erfolgte ein weiterer Fixierungsschritt. Das nun erhaltene Zellpellet wurde je nach Größe in 200µl bis 1ml Fixativ resuspendiert. Je 25µl dieser Zellsuspension wurden mit Hilfe einer Pipette auf feuchte Objektträger getropft. Während der Trocknung platzten die gequollenen, mitotischen Zellen auf und es kam zu einer Spreitung der Chromosomen, was als „Chromosomenspread“ bezeichnet wird

2.2.9.1.3 Fluoreszenz plus Giemsa (FpG) -Färbung

Für die Analyse BrdU-markierter Chromosomen wurden die Metaphasenpräparate zunächst für 1h in einer 0,5% Bisbenzimid-Lösung (in destilliertem Wasser) unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Bisbenzimid zählt zu den fluoreszierenden Hoechst-Farbstoffen, welche in DNA interkalieren und von ultraviolettem Licht angeregt werden. BrdU-substituierte Bereiche der DNA binden Bisbenzimid wesentlich stärker als un- oder weniger substituierte Regionen. Durch die Bestrahlung mit energiereichem, ultraviolettem Licht wird die DNA in BrdU-doppeltsubstituierten Bereichen aufgrund des höheren Gehalts an Bisbenzimid zerstört, was auf sogenannte Quenching-Effekte zurückzuführen ist. Die zerstörten Bereiche von Chromosomen können in einem weiteren Schritt ausgewaschen werden, sodass bei einer Färbung mit einem Farbstoff diese Regionen heller erscheinen, als Bereiche in denen noch ein höherer Anteil an DNA vorhanden ist.

Der Bisbenzimid-Behandlung folgten zwei kurze Waschschrte der Objektträger mit destilliertem Wasser, bevor 200µl Bestrahlungspuffer (97,5% 0,2M Natriumhydrogenphosphat, 2,5% 0,1M Zitronensäure) auf die Präparate gegeben und zur Verteilung der Flüssigkeit als auch zum Schutz vor Austrocknung ein Deckglas aufgelegt wurde. Anschließend wurden die Objektträger für eine Stunde mit UV-Licht bestrahlt. Nach zwei weiteren Waschschrten mit destilliertem Wasser wurden die zerstörten Bereiche

auf den Chromosomen entfernt, indem die Objektträger für 30 Minuten mit einem 2xSSC-Puffer bei 60°C gewaschen wurden. Es folgten zwei weitere Waschvorgänge mit destilliertem Wasser, bevor eine Giemsa-Färbung durchgeführt wurde. Hierzu wurden die Objektträger für 10 Minuten mit einer 6%-igen Giemsalösung (in destilliertem Wasser) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach je drei 5-minütigen Waschschritten mit destilliertem Wasser konnten die Präparate getrocknet und bei Raumtemperatur gelagert werden.

2.2.9.2 Analyse von Aberrationen in frühzeitig kondensierten G2-Phase-Chromosomen

Für die PCC-Analyse von frühzeitig kondensierten Chromosomen in der G2 Phase des Zellzyklus wurde das Agens Calyculin A genutzt. Calyculin A ist eine toxische Okadasäure, welche erstmals aus marinen Schwämmen isoliert wurde. Dieses Toxin ist ein Serin-/Threonin-spezifischer Phosphatase-Inhibitor und kondensiert Chromatin auch in der Interphase des Zellzyklus, was zytogenetische Studien auch außerhalb der Metaphase möglich macht (Gotoh 2009).

Für die frühzeitige Kondensation von G2-Phase-Zellen wurde 1h Stunde vor der Fixierung Calyculin A mit einer Endkonzentration von 50nM dem Medium hinzugefügt und die Inkubation der Zellen bei 37°C fortgesetzt. Die Fixierung der Zellen erfolgte analog zur Metaphasepräparation mit Ausnahme der Zellernte. Hierzu brauchten die Zellen nicht mit Trypsin/EDTA-Lösung vom Zellkulturschalenboden abgelöst werden, da nach einstündiger Inkubation mit Calyculin A der Großteil der Zellen nicht mehr adhärent vorlag. Die Zellsuspension wurde direkt aus der Zellkulturschale in ein 15ml Falcongefäß überführt und es wurde mit der Fixierung wie unter 2.2.9.1.2 beschrieben fortgefahren.

Anstelle einer FpG-Färbung wurde ausschließlich eine Giemsa-Behandlung zur Färbung der Präparate durchgeführt. Hierzu wurden die PCC-Präparate analog zum letzten Schritt der FpG-Färbung für 10 Minuten mit einer 6%-igen Giemsalösung (in destilliertem Wasser) bei Raumtemperatur inkubiert und nach je drei 5-minütigen Waschschritten mit destilliertem Wasser bei Raumtemperatur getrocknet und gelagert.

2.2.9.3 Mikroskopische Analyse und Auswertung der Chromosomen-Präparate

Sowohl Metaphase- als auch PCC-Präparate wurden mit Hilfe der Software *Metafer* mikroskopisch analysiert. Das Modul *MSearch* diente dabei der automatisierten Suche von Chromosomenspreads auf einem Objektträger. Bei 100x Vergrößerung werden hierbei durch definierte Suchparameter Chromosomenspreads erkannt und deren Koordinaten gespeichert, wodurch eine spätere Relokalisation ermöglicht wird. Nach manueller Überprüfung der gefundenen Objekte wurden anschließend Aufnahmen der Chromosomenspreads bei 63x Vergrößerung mit dem Modul *Autocapt* angefertigt und diese gespeichert. Mit Hilfe der Software *ImageJ* wurden die Bilder anschließend ausgewertet.

3 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Ausbildung und Reparatur von DNA-Schäden, welche durch chemische Agenzien in der S-Phase des Zellzyklus induziert werden. Hierzu wurde der Topoisomerase-Inhibitor CPT und das Alkylanz MMS verwendet. Die genauen Mechanismen der Erzeugung und Reparatur von MMS-induzierten DNA-Schäden sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Der Induktion von schwerwiegenden DSBs durch MMS werden jedoch Einzelstrangbruch-Intermediate zu Grunde gelegt, welche im Zuge der Replikation zu DSBs umgewandelt werden (Wyatt and Pittman 2006). Für einen Vergleich wurde in der vorliegenden Arbeit der Topoisomerase 1-Inhibitor Camptothecin herangezogen, welcher gezielt zu einer Akkumulation von Einzelstrangbrüchen in Zellen führt (Pommier 2006). Vergleichende Analysen der durch die beiden Agenzien verursachten DNA-Schäden sollten genauere Erkenntnisse über die Entstehung und Reparatur CPT- und MMS-induzierter DNA-Schäden geben und Unterschiede aufdecken.

3.1 Die Analyse von DSBs anhand der γ H2AX-Foci-Methode

Die Detektion von CPT- und MMS-induzierten DNA-Schäden erfolgte in erster Linie mit der Methode der γ H2AX-Foci-Analyse. Diese Methode ist in den letzten Jahren der Forschung zu einem gängigen Instrument zur Beobachtung von DNA-Schäden, insbesondere von DNA-Doppelstrangbrüchen, geworden. Die hohe Korrelation der induzierten Anzahl an DSBs mit dem simultanen Auftreten von γ H2AX-Foci beziehungsweise der Reparatur und dem gleichzeitigen Verschwinden der γ H2AX-Foci ermöglicht einen sensitiven Ansatz, um DSBs auf Einzelzellebene zu analysieren. Für die Untersuchung von strahleninduzierten DSBs, vor allem in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus, ist die γ H2AX-Foci-Analyse etabliert und in der Wissenschaft als Marker für DSBs anerkannt (Lobrich et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit sollte unter anderem dieser Marker auf seine Sensitivität gegenüber replikationsassoziierten DNA-Schäden getestet werden.

3.1.1 CPT und MMS induzieren dosisabhängig γ H2AX-Foci in der S-Phase

Für eine γ H2AX-Foci-Analyse zur Entstehung von CPT- und MMS-induzierten DNA-Schäden in der S-Phase wurden zunächst Dosen ermittelt, mit welchen das Auftauchen einer gut analysierbaren Foci-Anzahl beobachtet werden konnte. Für die vergleichende Analyse von CPT- und MMS-induzierten γ H2AX-Foci wurden hierzu A549-Zellen für 1h mit CPT oder MMS in Kombination mit dem Thymidin-Analogen EdU behandelt. Letzteres wird während der S-Phase im Zuge der Replikation in die DNA eingebaut, sodass dieses in der Zellanalyse mittels eines Fluoreszenzfarbstoffs sichtbar gemacht werden kann und so S-Phase-Zellen von der restlichen Zellpopulation differenziert werden können (Abbildung 29). Nach der einstündigen Behandlung mit CPT oder MMS zusammen mit EdU wurden die Zellen fixiert und einer Immunfluoreszenzfärbung gegen γ H2AX sowie einer Fluoreszenzfärbung gegen EdU unterzogen. Im Fluoreszenz-Mikroskop konnten anschließend S-Phase-Zellen selektiert und spezifisch ausgewertet werden.

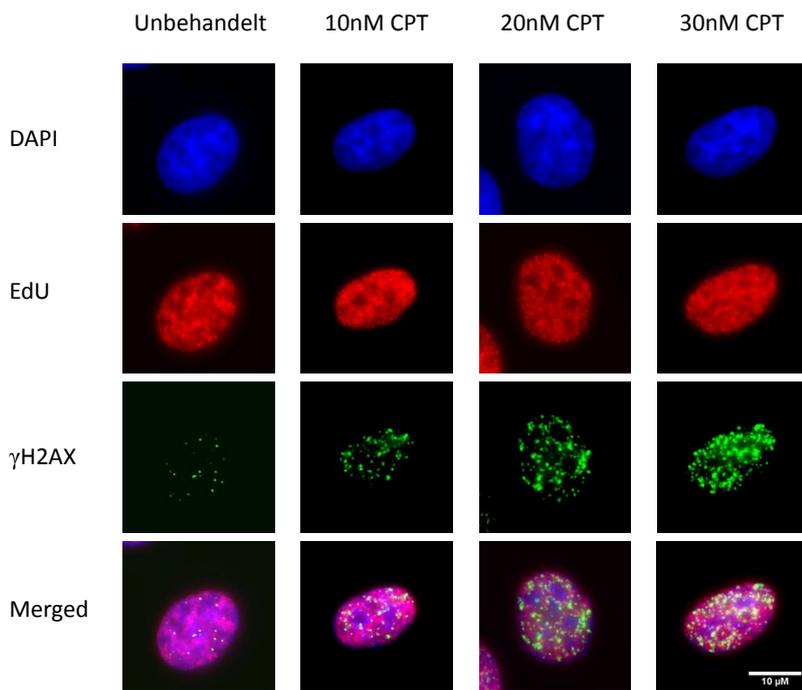


Abbildung 29: Konzentrationsabhängige Induktion von γ H2AX-Foci nach einer einstündigen CPT-Behandlung

Exemplarisch ist die S-Phase-spezifische Auswertung von γ H2AX-Foci mittels Immunfluoreszenzfärbung dargestellt. Nach einer einstündigen Behandlung mit unterschiedlichen CPT-Dosen in Kombination mit EdU wurden A549-Zellen fixiert und mittels Immunfluoreszenzfärbung gegen γ H2AX sowie einer Färbung von EdU markiert, woraufhin mikroskopische Aufnahmen der gefärbten Zellen angefertigt wurden. Eine einstündige EdU-Behandlung ohne CPT diente als Kontrolle. Als DNA-Farbstoff wurde DAPI verwendet. Die CPT-induzierten DNA-Schäden wurden durch Analyse der entstandenen γ H2AX-Foci ermittelt. Die dargestellten Bilder wurden bei 100-facher Vergrößerung aufgenommen.

Für die Messung der γ H2AX-Foci-Anzahl wurden CPT-Dosen von 10nM, 20nM und 30nM sowie MMS-Dosen von 0,5mM, 1,5mM und 2,5mM verwendet. Als Kontrollen dienten ausschließlich mit EdU behandelte Zellen (Abbildung 30).

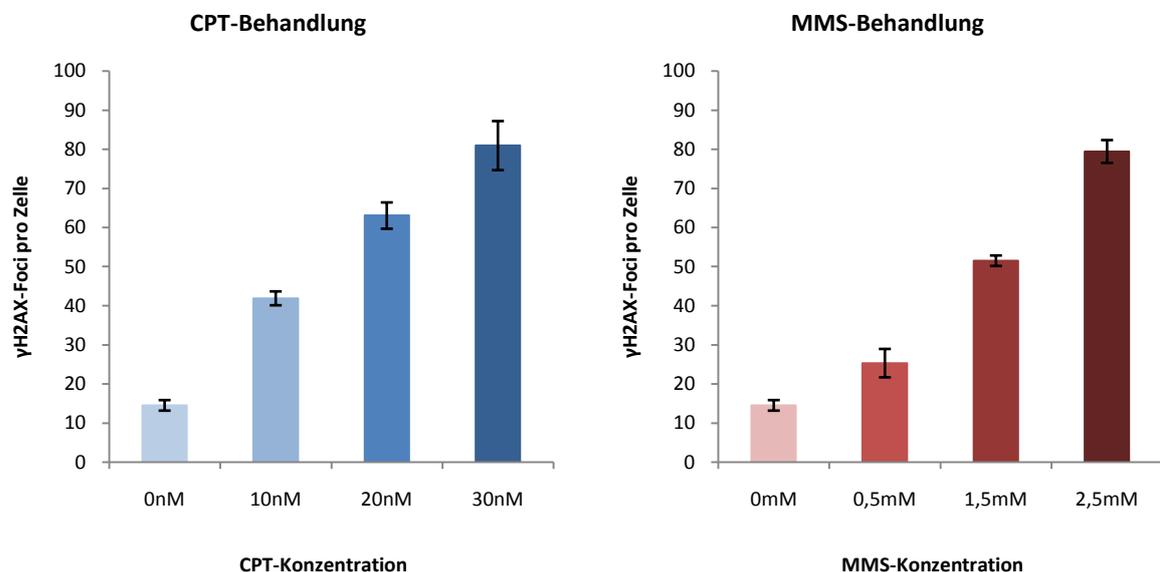


Abbildung 30: γ H2AX-Foci-Induktion nach unterschiedlichen Dosen von CPT und MMS

A549-Zellen wurden 48h nach Aussaat für 1h mit CPT bzw. MMS zusammen mit 10 μ M EdU behandelt. Anschließend wurde das Medium entfernt, frisches Medium ohne Agenzien hinzugefügt und die Zellen 15min später fixiert. Nach einer EdU- und γ H2AX-Färbung wurden ausschließlich EdU-positive Zellen ausgewertet, welche sich zum Zeitpunkt der Behandlung in der S-Phase des Zellzyklus befanden. Pro Experiment wurde für jede Kondition die Anzahl an γ H2AX-Foci in je 40 Zellen ausgewertet. Die Balken stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dar, wobei die Fehlerbalken den Standardfehler dieser Mittelwerte anzeigen.

Wie aus Abbildung 30 ersichtlich wird, konnten γ H2AX-Foci durch eine Behandlung mit CPT und MMS induziert werden. Unbehandelte S-Phase-Zellen wiesen dabei bereits ein Level von durchschnittlich 15 γ H2AX-Foci auf, was auf endogene, replikationsassoziierte DNA-Schäden zurückgeführt wurde. Durch eine einstündige Behandlung mit CPT oder MMS konnte ein deutlicher Anstieg der γ H2AX-Foci-Anzahl mit zunehmender Konzentration der Agenzien in S-Phase-Zellen beobachtet werden, was eine Dosis-abhängige Erzeugung der γ H2AX-markierten DNA-Schäden zu Grunde legte. G1- und G2-Phase-Zellen zeigten nach einer CPT- oder MMS-Behandlung keine erhöhten γ H2AX-Foci-Werte, sodass eine S-Phase-spezifische Schädigung der DNA durch die verwendeten Agenzien angenommen wurde (quantitativ nicht erfasst). Desweiteren konnten mit den verwendeten CPT-Dosen im nanomolaren Bereich sowie MMS-Dosen im millimolaren Bereich Äquivalenzdosen ermittelt werden, was vergleichende Studien dieser zwei Agenzien ermöglichte. Die eingesetzten CPT-Dosen im nanomolaren Bereich verdeutlichten zudem die enorme Sensitivität der γ H2AX-Foci-Methode, da beispielsweise für biochemische Analysen weitaus höhere Dosen an CPT im mikromolaren Bereich Verwendung finden, um DNA-schädigende Effekte zu erzielen und analysieren zu können. In der vorliegenden Arbeit ermöglichten der Einsatz der γ H2AX-Foci-Analyse und die Verwendung niedriger Dosen an CPT und MMS sogar die Analyse einzelner DSBs, welche durch die Chemikalien erzeugt und anschließend repariert wurden.

3.1.2 Analyse CPT- und MMS-induzierter DNA-Schäden anhand von Kinetiken

Um das Auftauchen und Verschwinden von γ H2AX-Foci in einem zeitlichen Verlauf analysieren zu können, wurden γ H2AX-Foci-Kinetiken angefertigt. Analog zum bereits dargestellten Experiment der γ H2AX-Foci-Induktion wurden hierzu A549-Zellen für eine Stunde mit CPT oder MMS in Kombination mit EdU behandelt. Anschließend wurde die Behandlung durch Gabe von frischem Medium ohne Agenzien abgebrochen. Bis zum Zeitpunkt der Fixierung folgte eine Inkubation der Zellen ohne schädigende Agenzien für 15min, 2h, 4h und 8h. Für einen Vergleich der γ H2AX-Foci-Kinetiken nach einer CPT- oder MMS-Behandlung wurden je zwei verschiedene Konzentrationen sowie ein Kontrollansatz analysiert (Abbildung 31). Nach einer Pulsbehandlung von A549-Zellen mit CPT oder MMS konnte ein unterschiedliches Reparaturverhalten beobachtet werden. Eine einstündige Pulsbehandlung von Zellen mit CPT zeigte bereits innerhalb der folgenden, ersten beiden Stunden eine Abnahme des γ H2AX-Foci-Levels (Abbildung 31 A). Diese Abnahme setzte sich sowohl bei der Behandlung mit 10nM als auch mit 20nM CPT bis zum 4h-Punkt fort und erreichte 8h nach der Pulsbehandlung nahezu ein Hintergrundlevel von unbehandelten Zellen von 15 bis 20 Foci. Die konstante Abnahme des Foci-Levels wurde dabei zunächst mit einer effizienten Reparatur der CPT-induzierten DSBs erklärt. Eine Pulsbehandlung mit MMS führte hingegen, je nach Dosis, zu einem Anstieg der Foci-Level während der ersten Stunden auf über 30 bzw. knapp 60 γ H2AX-Foci pro Zelle (Abbildung 31 B). Bei einer MMS-Behandlung mit 0,5mM MMS wurde das Maximum an γ H2AX-Foci 2h und mit 1,5mM MMS 4h nach der Behandlung erreicht. In den darauf folgenden Stunden nahm das γ H2AX-Foci-Level bis 8h nach der Behandlung ab. Sowohl nach einer 0,5mM als auch einer 1,5mM MMS-Behandlung lag der γ H2AX-Foci-Wert zum 8h-Punkt auf einem vergleichbaren Level mit dem Induktionswert bei 15 Minuten. Aufgrund des Anstiegs der γ H2AX-Foci-Anzahl in den ersten Stunden nach einer MMS-Behandlung, konnte auf eine schädigende Wirkung von MMS auch nach Entzug des Agens geschlossen werden.

Der starke Unterschied der γ H2AX-Foci-Kinetiken nach einer Pulsbehandlung mit CPT oder MMS führte zu der Vermutung, dass CPT ausschließlich während der Behandlung DNA-Schäden induzierte, wo-

hingegen MMS auch nach einer Pulsbehandlung noch zu DNA-Schäden führte. Um diese Annahme zu überprüfen wurden Zellen einer kontinuierlichen CPT-Behandlung unterzogen, wobei sich ein ähnlicher Verlauf der MMS-Kinetiken durch eine Dauerbehandlung von Zellen mit CPT erzielen ließ. Wurden die Zellen nach der einstündigen CPT- und EdU-Pulsbehandlung weiterhin mit CPT behandelt, so konnte auch hier ein Anstieg der γ H2AX-Foci-Werte innerhalb der ersten Stunden beobachtet werden (Abbildung 31 C). Nachdem die γ H2AX-Foci-Level bei einer CPT-Dauerbehandlung nach 2h auf ein Maximum von ~55 bzw. ~85 Foci gestiegen waren, nahm sowohl bei der niedrigen als auch bei der höheren CPT-Dauerbehandlung die Anzahl der Foci zwischen 2h und 8h wieder ab.

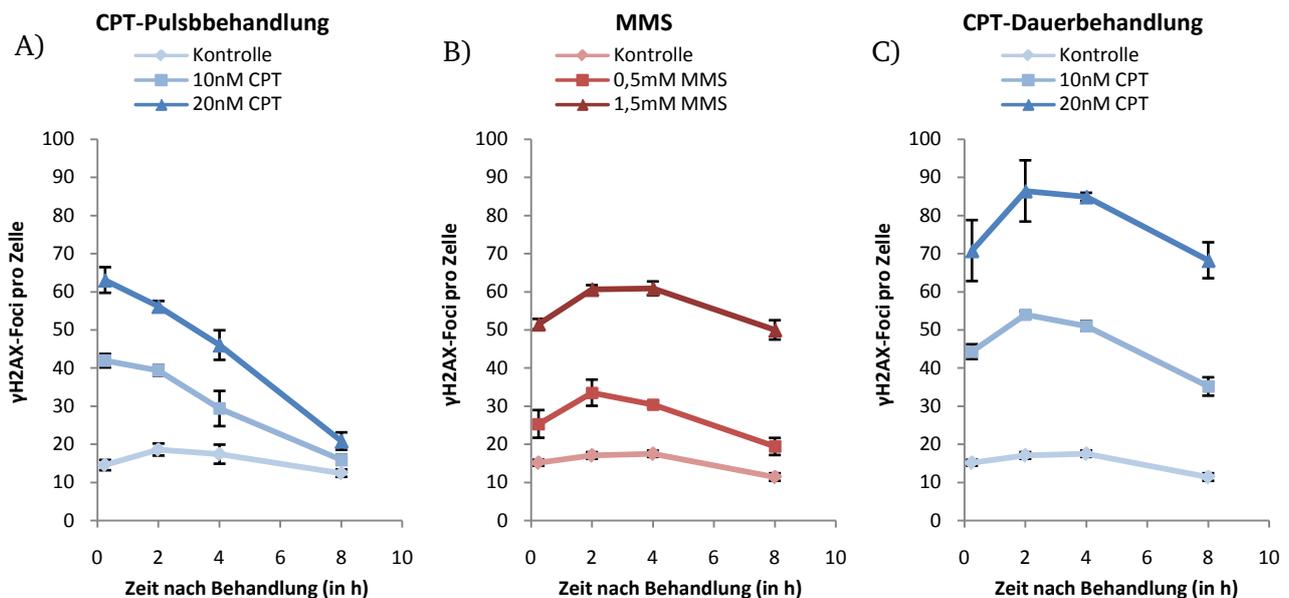


Abbildung 31: Reparaturkinetiken nach einer Pulsbehandlung mit CPT oder MMS sowie einer Dauerbehandlung mit CPT

A549-Zellen wurden 48h nach Aussaat für 1h mit CPT (A) bzw. MMS (B) zusammen mit EdU behandelt und anschließend nach 15min, 2h, 4h und 8h fixiert. Für eine CPT-Dauerbehandlung (C) wurde nach Entfernung des CPT- und EdU-haltigen Mediums die CPT-Behandlung in entsprechenden Dosen ohne EdU fortgesetzt. Nach einer EdU- und γ H2AX-Immunofluoreszenz-Färbung wurden ausschließlich EdU-positive Zellen ausgewertet, um somit spezifisch Zellen zu analysieren, welche sich zum Beginn der Behandlung in der S-Phase befanden. Pro Experiment wurde für jede Kondition die Anzahl an γ H2AX-Foci in je 40 Zellen ausgewertet. Die Punkte der Graphen stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dar, wobei die Fehlerbalken die Standardfehler dieser Mittelwerte anzeigen.

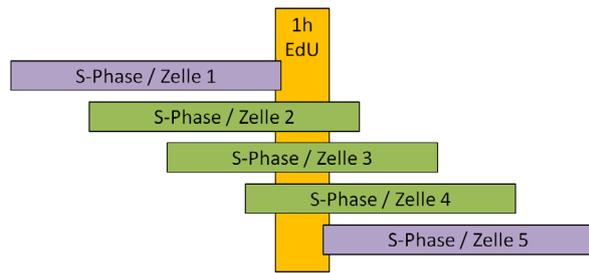
Das Ergebnis ließ darauf schließen, dass Zellen γ H2AX-Foci während der S-Phase akkumulierten, je länger sie mit CPT behandelt wurden. Eine CPT-Pulsbehandlung von einer Stunde induzierte dabei eine gewisse Anzahl an γ H2AX-Foci, welche anschließend repariert wurde. Im Gegensatz hierzu wurden bei einer CPT-Dauerbehandlung über einige Stunden hinweg γ H2AX-Foci in der S-Phase akkumuliert. Durch CPT wurden demzufolge nur DNA-Schäden während der Behandlung von Zellen induziert. Die CPT-Dauerbehandlung entsprach dabei einer Pulsbehandlung von MMS, wobei MMS auch noch nach Entzug des Agens eine DNA-schädigende Wirkung besaß, wohingegen CPT ausschließlich für die Dauer der Behandlung DNA-Schäden verursachte.

3.1.3 Die Zahl an induzierten DNA-Schäden variiert innerhalb der S-Phase

Innerhalb der Experimente zur Erstellung von γ H2AX-Foci-Kinetiken fiel auf, dass die ermittelten γ H2AX-Foci-Werte zu späten Zeitpunkten wesentlich mehr um den Mittelwert streuten als zu frühen Zeiten. Der angewendete EdU-Ansatz ermöglichte dabei eine Differenzierung zwischen S-Phase-Zellen und Zellen anderer Zellzyklusphasen. Verschiedene Stadien von Zellen innerhalb der S-Phase konnten jedoch mittels des EdU-Signals nicht unterschieden werden. Aufgrund der hohen Streuung der γ H2AX-Foci-Anzahlen zu späten Zeiten der Analyse von replikationsassoziierten DNA-Schäden schien es jedoch von großer Bedeutung zu sein, ob sich eine Zelle zum Zeitpunkt der CPT- oder MMS-Behandlung am Anfang oder am Ende der S-Phase befand. Es konnte davon ausgegangen werden, dass die verwendeten Agenzien, je nach Stadium einer Zelle innerhalb der S-Phase, eine stark variierende Anzahl an DNA-Schäden induzierten.

Der einstündige EdU-Einbau, welcher den Beginn einer CPT-Dauerbehandlung oder die Dauer der MMS-Behandlung markierte, konnte zu einem beliebigen Zeitpunkt innerhalb der S-Phase stattgefunden haben. Zellen, die nur einige Minuten EdU einbauen konnten, wiesen ein deutlich reduziertes EdU-Signal auf, da sie entweder gerade in die S-Phase oder aus der S-Phase heraus progressierten (Abbildung 32 A, violette Balken). Dieses EdU-Signal zeigte anstelle eines flächigen (pan-nuklearen) Musters ein Foci-ähnliches EdU-Muster und wurde zum Ausschluss der Zellen genutzt. Bei Zellen mit flächigem EdU-Muster und mittlerem DAPI-Gehalt wurde davon ausgegangen, dass diese eine komplette Stunde EdU während der S-Phase eingebaut hatten (Abbildung 32 A, grüne Balken). Trotz dieser Auswahl wiesen EdU-positive Zellen eine hohe Heterogenität des Zellzyklusstadiums innerhalb der S-Phase auf, welche sich vor allem zu späten Zeitpunkten in den γ H2AX-Foci-Level der Reparatur-Kinetiken äußerte. Innerhalb eines Experiments streuten dabei die γ H2AX-Foci-Werte nach 8-stündiger CPT-Dauerbehandlung bzw. 8 Stunden nach einer MMS-Behandlung wesentlich mehr um den Mittelwert als bei den Induktionswerten (Abbildung 32 B). Diese Heterogenität der γ H2AX-Foci-Werte wurde auf die unterschiedliche Aufenthaltsdauer von Zellen in der S-Phase nach der Behandlung mit MMS und während der Behandlung mit CPT zurückgeführt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass Zellen in einer frühen S-Phase mehr CPT- oder MMS-induzierte DNA-Schäden ausbildeten als Zellen, welche sich bei Behandlungsbeginn bereits in einem späten Stadium der S-Phase befanden.

A)



B)

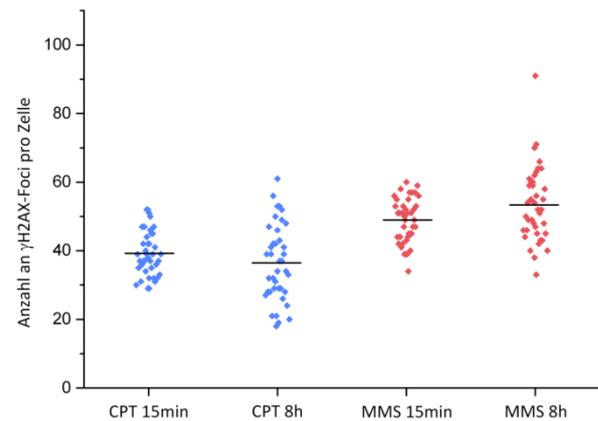


Abbildung 32: Varianz der γ H2AX-Foci-Anzahl einer CPT- oder MMS-behandelten Zellpopulation

A) Schematische Darstellung der EdU-Inkorporation von Zellen in unterschiedlichen Stadien der S-Phase. Zellen, welche sich während der einstündigen EdU-Markierung in einem sehr frühen oder späten Stadium der S-Phase befinden (Zellen 1 und 5), inkorporieren nur einige Minuten EdU, was zu einem Foci-ähnlichen EdU-Muster und zum Ausschluss der Zellen aus der Analyse führt (violette Balken). Eine vollständige Inkorporation von EdU während der Behandlung (grüne Balken) führt zu einem flächigen EdU-Signal, kann jedoch nicht für eine genauere Differenzierung der Zellprogression in der S-Phase genutzt werden. Die Zellen 2 bis 4 inkorporieren jeweils für eine Stunde EdU, befinden sich jedoch in unterschiedlichen Stadien der S-Phase. Die Behandlung mit S-Phase-schädigenden Agenzien führt demnach je nach Status der Zellen innerhalb der S-Phase zu einer größeren Varianz an γ H2AX-Foci zu späten Analysezeitpunkten.

B) Verteilung der γ H2AX-Foci-Werte einzelner Zellen zu frühen und späten Zeiten innerhalb eines Experiments. Zu frühen Zeitpunkten (15min) nach der kombinierten EdU/CPT- bzw. EdU/MMS-Behandlung streuen die γ H2AX-Foci-Werte der 40 einzelnen Zellen wesentlich geringer um den jeweiligen Mittelwert als zu späten Zeiten (8h). Für die Darstellung dienten die ermittelten γ H2AX-Foci-Werte eines Experiments, in welchem A549-Zellen mit 10nM CPT dauerbehandelt oder 1,5mM MMS pulsbehandelt wurden.

Eine genauere Analyse zur Abhängigkeit der Anzahl an induzierten γ H2AX-Foci durch S-Phase schädigende Agenzien von der Progression der Zellen innerhalb der S-Phase sollte eine Kombination aus *Life cell*-Mikroskopie und γ H2AX-Foci-Analyse bieten.

3.1.4 Abhängigkeit der γ H2AX-Foci-Anzahl von zellulären Aufenthaltsdauer in der S-Phase

Um einen Zusammenhang zwischen der Anzahl an induzierten γ H2AX-Foci und der Aufenthaltsdauer von Zellen in der S-Phase herstellen zu können, wurde die γ H2AX-Foci-Analyse mit der Methode der *Life cell*-Mikroskopie verknüpft. Hierzu wurden Zellen in *Ibidis* inkubiert, welche eine mikroskopische Analyse von lebenden Zellen über einen Zeitraum von mehreren Stunden ermöglichen. Für die anschließende Immunfluoreszenzfärbung wurden Zellen fixiert und gegen γ H2AX gefärbt, um sie in einem weiteren Schritt analysieren zu können. Für die Versuche diente eine stabil-transfizierte U2OS-LIG1dsRed-Zelllinie, bei welcher Ligase 1 mit einem rot-fluoreszierendem Fluorochrom gekoppelt wurde. Das Gen LIG1 codiert für das Protein Ligase 1, welches während der Replikation zur Verknüpfung von Okazaki-Fragmenten dient, nachdem die Primer vom Folgestrang entfernt wurden (Tomkinson and Mackey 1998). Außerdem wird der Ligase 1 eine Rolle in der BER zugeschrieben (Sattler et al. 2003). In der S-Phase erzeugt Ligase 1 ein spezifisches Signal-Muster und kann somit zur Diskriminierung von S-Phase-Zellen herangezogen werden (Abbildung 33).

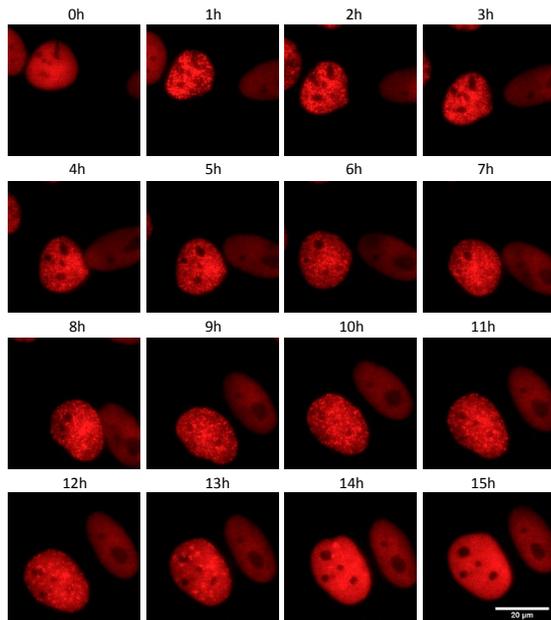


Abbildung 33: Verfolgung der S-Phase-Progression mittels Life cell-Mikroskopie

U2OS-LIG1dsRed-Zellen weisen in der G1- und G2-Phase ein flächiges Signal auf, wobei kein spezifisches LIG1-Muster erkennbar ist (0h- und 15h-Aufnahmen). Eine Stunde nach Beginn der *Life cell*-Aufnahme weist die beobachtete Zelle ein Foci-ähnliches Muster auf, welches durch aktive Replikationsprozesse hervorgerufen wird, an welchen LIG1 beteiligt ist. Das LIG1-Muster bleibt während der S-Phase bestehen und nimmt zum Ende der Phase langsam ab, bis nur noch wenige LIG1-Foci zu erkennen sind (13h- und 14h-Aufnahmen). Bei einem Vergleich des 0h- und 15h-Punktes ist eine deutliche Größenänderung des Zellkerns zu beobachten, was auf die Verdopplung des Genoms und damit des Zellkern-Volumens zurückzuführen ist. Die Aufnahmen sind während eines Experiments mit einer 10nM CPT-Behandlung entstanden, wobei U2OS-LIG1dsRed-Zellen über 20h analysiert wurden und jede Stunde eine Aufnahme angefertigt wurde. Die dargestellten Bilder wurden bei 63-facher Vergrößerung aufgenommen.

Aufgrund der ähnlichen γ H2AX-Kinetiken nach einer MMS-Pulsbehandlung und einer CPT-Dauerbehandlung konnte davon ausgegangen werden, dass die Ausbildung von MMS-induzierten DSBs auch nach Entzug des Agens stattfand und deshalb einer CPT-Dauerbehandlung ähnelte. Um die Abhängigkeit der Anzahl dieser replikationsassoziierten DNA-Schäden von der Behandlungszeit mit S-Phase-schädigenden Agenzien genauer zu untersuchen, wurden LIG1-Zellen einer 10nM CPT-Dauerbehandlung unterzogen und mittels kombinierter *Life cell*/ γ H2AX-Immunfluoreszenz-Färbung analysiert. Für den Kombinationsansatz von *Life cell*-Mikroskopie und Immunfluoreszenz-Färbung wurden zunächst lebende, positiv-transfizierte LIG1-Zellen ausgewählt, welche entweder aufgrund ihrer Größe der G1-Phase zugeschrieben werden konnten und kein S-Phase-typisches LIG1-Signal besaßen sowie Zellen, welche bereits in der S-Phase waren und demzufolge ein Foci-ähnliches LIG1-Muster aufwiesen. Es folgte eine 10nM CPT-Dauerbehandlung und eine 6-stündige Verfolgung der Zellen mittels einer Positionsliste. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrollen. Für die Verfolgung der Zellen wurden automatisch Aufnahmen der lebenden Zellen in einem Intervall von 30 Minuten erstellt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und einer γ H2AX-Immunfluoreszenz-Färbung unterzogen. Anhand der Positionsliste konnten die Zellen relokalisiert, fotografiert und ausgewertet werden (Abbildung 34).

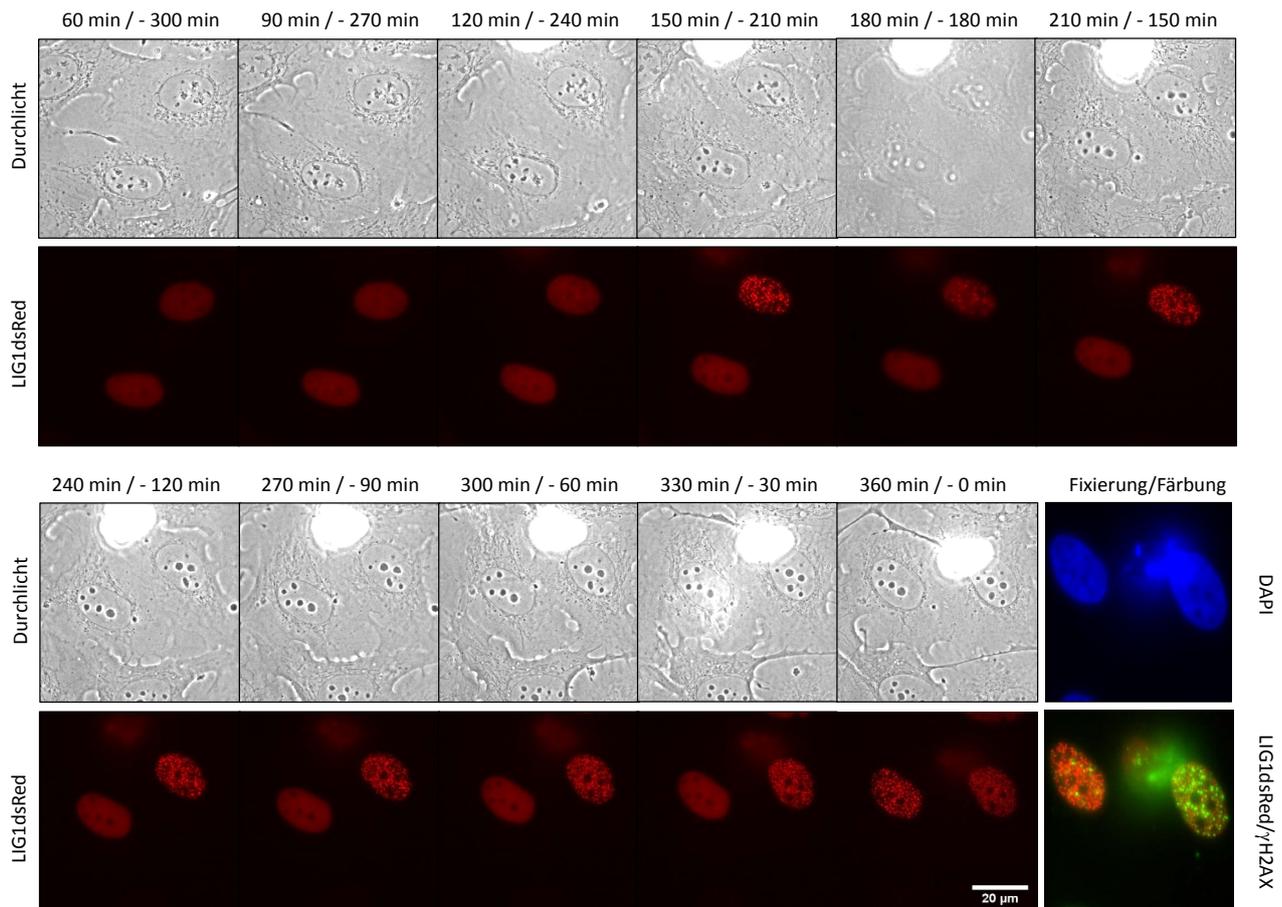


Abbildung 34: Kombinierte *Life cell*-Mikroskopie und Immunfluoreszenzanalyse

Die Grafik zeigt die Progression zweier U2OS-LIG1dsRed-Zellen in die S-Phase zu unterschiedlichen Zeiten sowie Bilder der γ H2AX-Färbung nach erfolgreicher, 6-stündiger Verfolgung der Zellen (Die erste Stunde ist nicht dargestellt). 150 Minuten nach Beginn der Analyse, was einer Zeit von 210 Minuten vor der Fixierung entspricht, gelangte die obere (später rechte) der beiden Zellen in die S-Phase, wohingegen die untere (später linke) erst innerhalb der letzten 30 Minuten vor der Fixierung in die S-Phase progressierte. Das LIG1-Muster (rot) änderte sich an diesen Zeitpunkten von einem pan-nuklearen in ein stark fluoreszierendes, gepunktetes Signal. Die Immunfluoreszenz-Färbung nach Fixierung der Zellen zeigt einen deutlichen Unterschied in der Anzahl an γ H2AX-Foci (grün), wobei die Zelle, welche sich mehrere Stunden in der S-Phase aufhielt (rechts), ein wesentlich höheres Foci-Level aufweist, als die Zelle, die innerhalb der letzten halben Stunde in die S-Phase progressierte (links). Die Aufnahmen der *Life cell*-Analyse wurden bei 40-facher Vergrößerung, die der fixierten Zellen bei 63-facher Vergrößerung aufgenommen.

Die ermittelten γ H2AX-Foci-Werte der fixierten Proben nach erfolgreicher *Life cell*-Analyse wurden in drei verschiedenen Zellpopulationen eingeteilt. Einerseits wurden Zellen ausgewertet, die innerhalb der 6-stündigen *Life cell*-Analyse in die S-Phase progressierten (Abbildung 35 A). Eine zweite Gruppe bildeten Zellen, die bereits bei Beginn des Experiments in der S-Phase waren und während des kompletten Beobachtungszeitraums in der S-Phase verblieben (Abbildung 35 B). Außerdem wurden Zellen ausgewertet, die zu Beginn der Analyse in der S-Phase waren und innerhalb des Versuchszeitraums von 6 Stunden die Replikation anhand des verschwundenen Ligase Musters abgeschlossen hatten (Abbildung 36). Für die Analyse wurden die ermittelten Foci-Werte einstündigen Zeitintervallen zugeordnet und die jeweiligen Mittelwerte errechnet. Bei Zellen, welche aufgrund ihres Ligase-Musters während des gesamten *Life cell*-Zeitraums der S-Phase zugeschrieben werden konnten (zweite Gruppe), war es nicht möglich eine spezifische Aufenthaltsdauer in der S-Phase zu bestimmen, weshalb diese in einer Kategorie >360 Minuten zusammengefasst wurden. G1-Phase-Zellen, die während des Beobach-

tungszeitraums kein S-Phase-spezifisches γ H2AX-Muster aufwiesen und demzufolge nicht in die S-Phase progressierten, wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

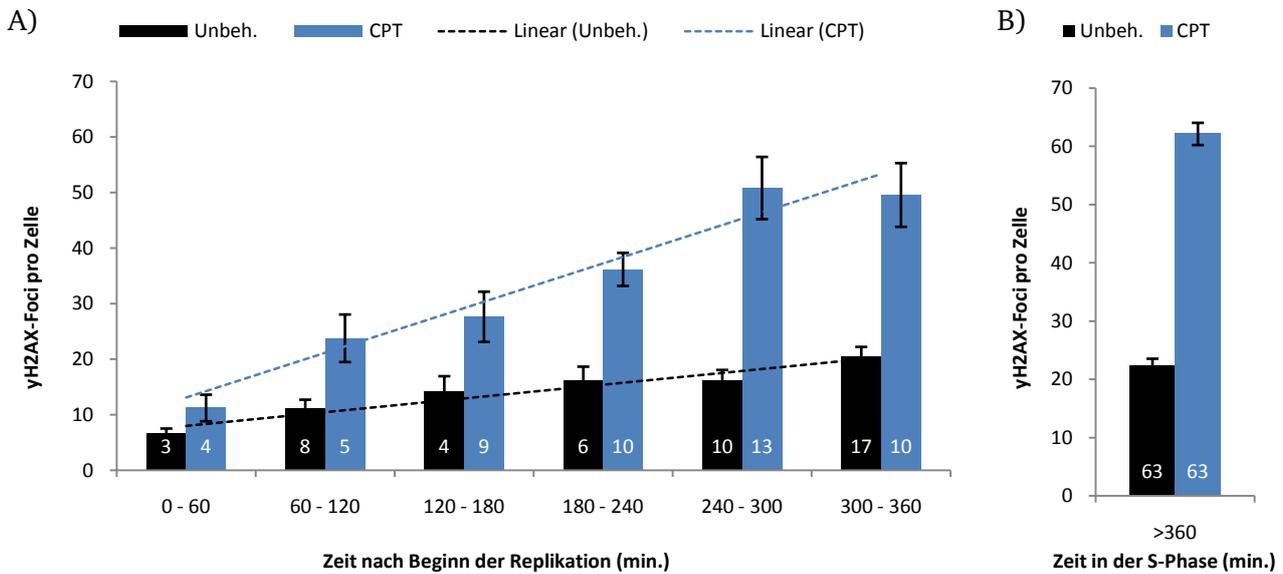


Abbildung 35: Induktion von γ H2AX-Foci in Abhängigkeit von der zellulären Aufenthaltsdauer in der S-Phase

U2OS-LIG1dsRed-Zellen wurden für 48h in *Ibidis* inkubiert. Pro Experiment erfolgte eine softwaregestützte Auswahl von 100 bis 150 G1- und S-Phase-Zellen sowie die Erstellung einer Positionsliste. Mit Beginn der *Life cell*-Mikroskopie wurde die Hälfte der Zellen in einem Kanal des *Ibidis* mit 10nM CPT behandelt (blaue Balken), wohingegen die andere, unbehandelte Hälfte in einem weiteren Kanal als Kontrolle diente (schwarze Balken). Über 6 Stunden erfolgte in 13 Zyklen die Verfolgung der Zellen, wobei alle 30 Minuten sowohl eine Durchlicht-Aufnahme als auch Stapelaufnahmen mit roter Fluoreszenz automatisch angefertigt wurden. Nach der *Life cell*-Mikroskopie wurden die Zellen fixiert und mittels einer γ H2AX-Antikörper-Behandlung per Immunfluoreszenz gefärbt. Die dargestellten Balken stellen Mittelwerte der ermittelten γ H2AX-Werte dar, wobei je zwei 30-minütige Zyklen zu einstündigen Zeitintervallen zusammengefasst wurden (A). Zellen, welche bereits bei Beginn der Analyse aufgrund des charakteristischen Ligase 1-Musters der S-Phase zugeschrieben wurden und innerhalb der 6-stündigen Beobachtung die Replikation nicht vollendeten, wurden der Kategorie >360min zugeteilt (B). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus 12 unabhängigen Experimenten, wobei die Zahlen an der Basis der Balken die Anzahl an ausgewerteten Zellen je Kategorie angeben und die Fehlerbalken den Standardfehler der Werte anzeigen. Um den zeitlichen Verlauf der γ H2AX-Werte zu veranschaulichen wurden Regressionsgeraden eingefügt (gestrichelte Linien).

Mit dem Eintritt in die S-Phase begannen die Zellen ihre DNA zu replizieren, wobei CPT durch Inhibition der notwendigen Topoisomerase 1 zu DNA-Schäden führte, was wiederum zur Ausbildung von γ H2AX-Foci beitrug. Zellen, welche nicht unter dem Einfluss von CPT standen, wiesen zu Beginn der S-Phase im Schnitt 6 γ H2AX-Foci auf, was auf endogene DNA-Schäden in der S-Phase zurückgeführt wurde. Diese endogenen Schäden stiegen mit der Progression durch die S-Phase auf ~20 γ H2AX-Foci an. Die Zunahme wurde auf replikationsbedingte, endogene DNA-Schäden zurückgeführt, da die Replikation des gesamten Genoms in der S-Phase die größte Quelle endogener DSBs in Zellen darstellt (Oza et al. 2009). Die CPT-induzierten γ H2AX-Foci-Werte zeigten eine wesentlich größere Zunahme während des Beobachtungszeitraums von 6 Stunden. Dabei konnte ein nahezu linearer Anstieg an Foci mit fortschreitender Aufenthaltsdauer der Zellen in der S-Phase beobachtet werden, was in Abbildung 35 A durch eine eingefügte Gerade verdeutlicht wird. Zellen, die unter dem Einfluss von CPT innerhalb der letzten Stunde der Analyse in die S-Phase progressierten, wiesen einen Wert von ~11 γ H2AX-Foci, was einer CPT-abhängigen Induktion von 5 γ H2AX-Foci entsprach. Je früher Zellen in die S-Phase progressierten, desto länger wurde folglich die Aufenthaltsdauer in der S-Phase unter dem Einfluss von CPT, und desto mehr γ H2AX-Foci konnten analysiert werden. Die CPT-induzierten γ H2AX-Foci stiegen

in Zellen, welche sich 5 bis 6 Stunden in der S-Phase befanden auf eine Zahl von durchschnittlich 35 an. War das S-Phase-typische LIG1-Muster bereits bei der ersten Aufnahme zu erkennen und blieb während des 6-stündigen Beobachtungszeitraum erhalten, so wurden die Zellen in einer Kategorie >360 Minuten zusammengefasst (Abbildung 35 B) und wiesen durchschnittlich 40 CPT-induzierte γ H2AX-Foci auf. Demzufolge konnte eine deutliche Abhängigkeit der Anzahl an CPT-induzierten γ H2AX-Foci von der Aufenthaltsdauer der Zellen in der S-Phase unter Einfluss des Agens CPT beobachtet werden, wobei eine proportionale Zunahme an γ H2AX-Foci pro Zeitintervall festgestellt werden konnte.

3.1.5 Der Großteil CPT-induzierter γ H2AX-Foci verschwindet erst nach weitgehend vollendeter Replikation

Wie das Auftauchen von γ H2AX-Foci in Abhängigkeit von der Aufenthaltsdauer der Zellen in der S-Phase ermittelt werden konnte, so war es auch möglich das Verschwinden der Foci mittels *Life cell*-Analyse zu beobachten. Hierzu wurden in den Ansätzen, die unter 3.1.4 dargestellt sind, Zellen untersucht, welche sich bei Beginn der *Life cell*-Analyse bereits in der S-Phase befanden und innerhalb des 6-stündigen Beobachtungszeitraums das spezifische Ligase1-Muster verloren. Demzufolge wurde die γ H2AX-Foci-Anzahl in Zellen bestimmt, welche die Replikation weitgehend abgeschlossen hatten oder kein detektierbares LIG1-Muster mehr an aktiven Replikationsgabeln zeigten. Die γ H2AX-Foci-Werte dieser Zellen wurden ebenfalls in einstündige Zeitintervalle gruppiert und spezifisch ausgewertet (Abbildung 36). In unbehandelten Zellen konnte direkt nach Verschwinden des S-Phase-spezifischen LIG1-Signals ein durchschnittliches Level von ~ 24 γ H2AX-Foci pro Zelle ermittelt werden (Abbildung 36, schwarzer Balken, 0 – 60 min.). Mit zunehmender Zeit nach Verlust des LIG1-Signals reduzierte sich dieses γ H2AX-Level auf weniger als 10 Foci pro Zelle. CPT-behandelte Zellen, welche innerhalb der ersten Stunde nach Verlust des typischen LIG1-Musters analysiert wurden (Abbildung 36, blauer Balken, 0 – 60 min.), wiesen eine Anzahl von ca. 50 γ H2AX-Foci auf, was einer CPT induzierten Anzahl von 26 Foci entsprach. Zu späteren Zeitintervallen nach Verschwinden des LIG1-Musters, konnte eine deutliche Reduktion der γ H2AX-Foci-Werte beobachtet werden. CPT-behandelte Zellen, die 4 bis 5 Stunden vor der Fixierung das LIG1-Muster verloren, wiesen lediglich Werte auf Hintergrundniveau von 5 bis 10 γ H2AX-Foci auf (Abbildung 36, blauer Balken, 240 – 300 min.).

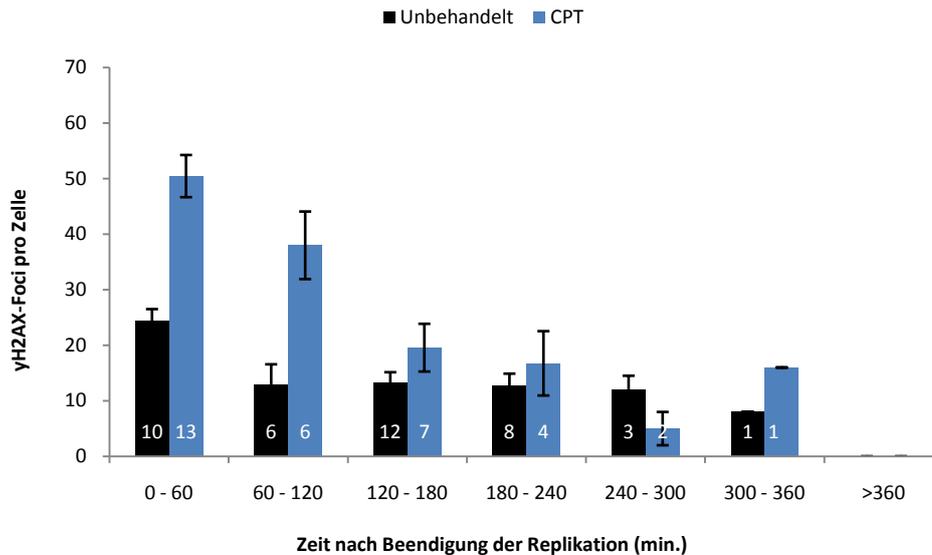


Abbildung 36: Verschwinden von γ H2AX-Foci nach weitgehender Beendigung der Replikation

U2OS-LIG1dsRed-Zellen wurden für 48h in *Ibidis* inkubiert. Pro Experiment erfolgte eine softwaregestützte Auswahl von ~50 S-Phase-Zellen sowie die Erstellung einer Positionsliste. Mit Beginn der *Life cell*-Mikroskopie wurde die Hälfte der Zellen in einem Kanal des *Ibidis* mit 10nM CPT behandelt (blaue Balken), wohingegen die andere, unbehandelte Hälfte in einem anderen Kanal als Kontrolle diente (schwarze Balken). Über 6 Stunden erfolgte in 13 Zyklen eine Verfolgung der Zellen, indem alle 30 Minuten sowohl eine Durchlicht-Aufnahme als auch Stapelaufnahmen mit roter Fluoreszenz automatisch angefertigt wurden. Nach abgeschlossener *Life cell*-Mikroskopie wurden die Zellen fixiert und mittels einer γ H2AX-Antikörper-Behandlung per Immunofluoreszenz gefärbt. Die dargestellten Balken stellen Mittelwerte der ermittelten γ H2AX-Werte dar, wobei je zwei 30-minütige Zyklen zusammengefasst wurden. Es wurden ausschließlich Zellen analysiert, welche innerhalb des Beobachtungszeitraums das S-Phase-spezifische LIG1-Muster verloren (ähnlich Abbildung 33 zu späten Zeiten). Die Zeitintervalle geben die Dauer nach dem Verlust des LIG1-Musters an. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus 12 unabhängigen Experimenten, wobei die Zahlen an der Basis der Balken die Anzahl an ausgewerteten Zellen je Kategorie angeben und die Fehlerbalken den Standardfehler der Werte anzeigen.

Mit den ermittelten Daten aus den *Life cell*-Analysen konnte eine deutliche Abhängigkeit zwischen der Anzahl an induzierten γ H2AX-Foci und der Aufenthaltsdauer von Zellen in der S-Phase gezeigt werden. Sowohl die unter 3.1.2 dargestellten γ H2AX-Foci-Kinetiken nach einer CPT- oder MMS-Behandlung als auch die Kombinationsexperimente aus *Life cell*-Mikroskopie und Immunfluoreszenz-Färbung ließen außerdem auf eine Reparatur der induzierten DNA-Schäden in der S-Phase und vor allem nach weitgehender Vollendung der Replikation schließen. Dabei konnte aufgrund des verschwundenen LIG1-Musters gezeigt werden, dass ein bedeutender Teil replikationsassoziiertes DNA-Schäden erst repariert wurde, als die Replikation weitgehend abgeschlossen war. Um nun das Verschwinden von γ H2AX-Foci mit der Reparatur der CPT- und MMS-induzierten DNA-Schäden genauer zu charakterisieren, wurden wichtige Reparaturfaktoren der beiden Hauptreparaturwege NHEJ und HR supprimiert.

3.2 Wie werden CPT- und MMS-induzierte DSBs repariert?

Für die Reparatur von DSBs stehen einer Zelle zwei Hauptreparaturwege zur Verfügung, welche das NHEJ und die HR repräsentieren. Um herauszufinden welchen Beitrag diese beiden Wege an der Repa-

ratur CPT- und MMS-induzierter DNA-Schäden leisten, wurden essentielle Faktoren des jeweiligen Wegs mittels RNA-Interferenz depletiert.

3.2.1 Die Reparatur CPT- und MMS-induzierter DSBs ist unabhängig von KU80 und DNA-PKcs jedoch abhängig von RAD51

Da die Reparaturfaktoren des NHEJ einer hohen Expression unterliegen, wurden zur Inhibition dieses Reparaturwegs zwei Proteine supprimiert, wohingegen die HR durch Suppression eines Schlüsselfaktors inhibiert werden sollte. Um das NHEJ zu unterbinden, wurden die Faktoren KU80 und DNA-PKcs mittels SiRNA supprimiert (Abbildung 37 A und B). Die HR wurde mittels RAD51-SiRNA inhibiert (Abbildung 37 C und D). Für die Analyse wurden EdU-positive S-Phase-Zellen über einen Zeitraum von mehreren Stunden zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert und ausgewertet. Da sich aufgrund der Zellteilung die DNA-Menge halbierte, wurde die Bestimmung des γ H2AX-Foci-Levels nur in Zellen durchgeführt, welche innerhalb des Analysezeitraums noch nicht in die G1-Phase progressiert waren. Durch eine CPT-Dauerbehandlung und MMS-Pulsbehandlung ließen sich EdU-markierte Zellen über einen Zeitraum von bis zu 20 Stunden verfolgen bis diese in die Mitose progressierten, wohingegen unbehandelte, EdU-markierte Zellen nur bis zu 8 Stunden analysiert werden konnten. Diese Unterschiede des Zellzyklusverhaltens ließen bereits auf einen Einfluss von CPT und MMS auf die Zellzyklus-Progression von Zellen vermuten, was in Kapitel 3.2.4 genauer beschrieben wird.

Eine Suppression von NHEJ-Faktoren besaß keinen Einfluss auf die Reparatur CPT- und MMS induzierter DNA-Schäden (Abbildung 37 A und B). Sowohl während der CPT-Dauerbehandlung als auch nach der MMS-Behandlung konnte der bereits unter 3.1.2 und 3.1.4 beschriebene Anstieg an γ H2AX-Foci innerhalb der ersten Stunden beobachtet werden, welcher auf die Ausbildung von CPT- und MMS-induzierten, replikationsassoziierten DNA-Schäden zurückzuführen war, solange Zellen DNA replizieren. Die anschließende Reduktion der γ H2AX-Foci-Werte in Kontroll-SiRNA- sowie KU80-/DNA-PKcs-SiRNA-Ansätzen setzte sich bis zu 20 Stunden nach der EdU-Markierung fort. Die Kinetiken zeigten selbst 20 Stunden nach einer MMS-Behandlung bzw. CPT-Dauerbehandlung durchschnittliche Werte von über 30 γ H2AX-Foci, unabhängig davon ob Zellen unter dem Einfluss von Kontroll- oder KU80-/DNA-PKcs-SiRNA standen. Die unter 3.1.3 beschriebene Varianz der γ H2AX-Foci-Werte zu späten Zeitpunkten konnte zum 20h-Zeitpunkt ebenfalls beobachtet werden. 20-Stunden nach Beginn der CPT- oder MMS-Behandlung streuten die ermittelten Foci-Werte sogar weitaus mehr um den Mittelwert als 8h nach der CPT- oder MMS-Behandlung. Einige Zellen hatten zu diesem Zeitpunkt alle induzierten Schäden repariert, wohingegen andere Zellen über 60 γ H2AX-Foci aufwiesen und subjektiv noch der S-Phase zugeschrieben werden konnten. Eine Auswirkung der KU80- und DNA-PKcs-Suppression auf das Verschwinden von γ H2AX-Foci konnte zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden (Abbildung 37 A und B). Die Reparatur sowohl CPT-dauerbehandelter als auch MMS-behandelter Zellen erfolgte somit NHEJ-unabhängig. Im Gegensatz hierzu wiesen RAD51-depletierte Zellen einen deutlichen Reparaturdefekt gegenüber Kontroll-SiRNA-behandelten Zellen auf (Abbildung 37 C und D). Die Ausbildung von γ H2AX-Foci wurde hierbei nicht gestört, die induzierten γ H2AX-Foci persistierten jedoch zum großen Teil über einen Zeitraum von 20h.

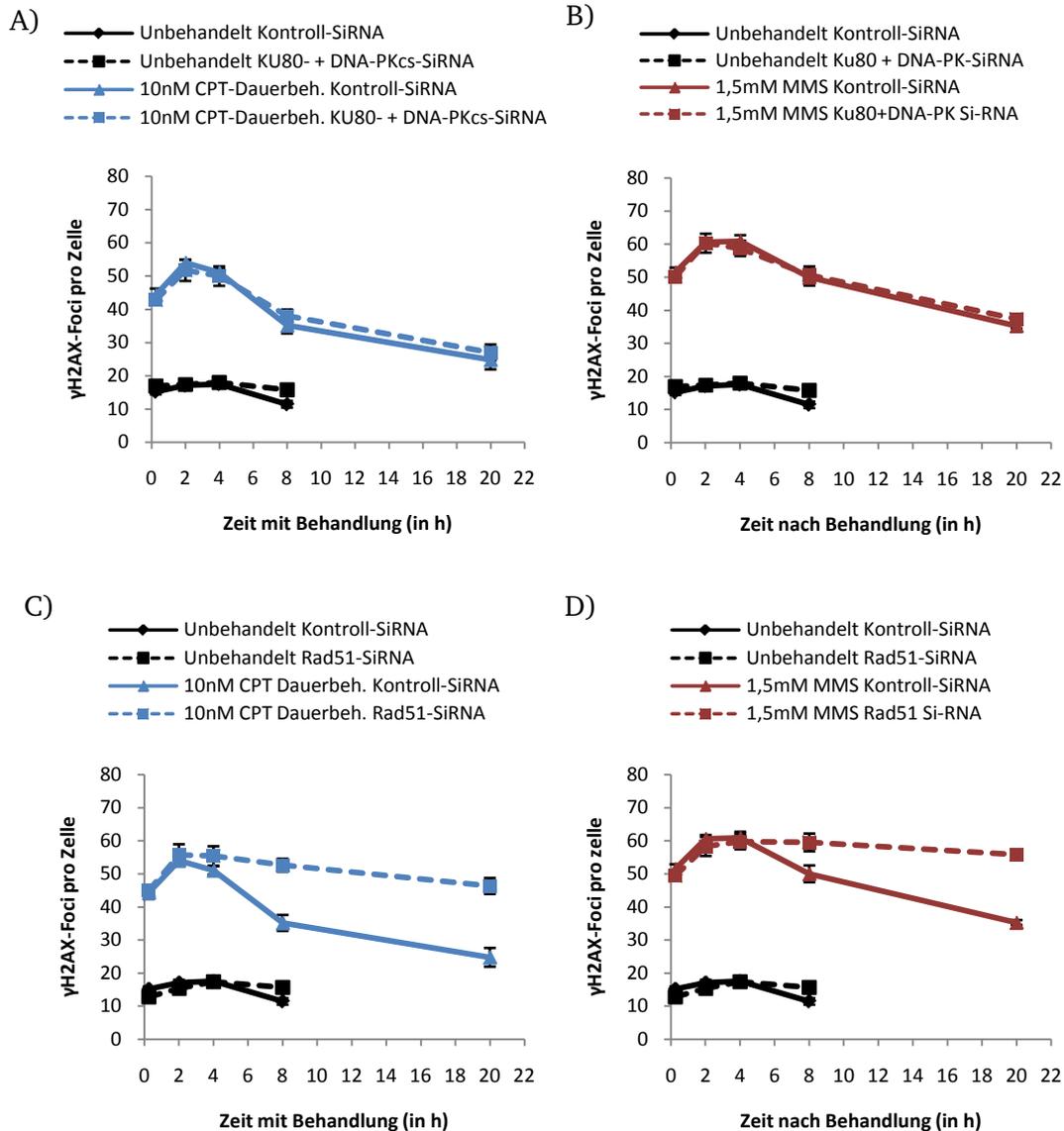


Abbildung 37: Reparaturkinetiken von Zellen nach Suppression von NHEJ- und HR-Faktoren

A549-Zellen wurden mit den angegebenen SiRNAs transfiziert und anschließend für 48h inkubiert. Es folgte eine 10nM CPT-Dauerbehandlung (A und C) oder eine einstündige 1,5mM MMS-Pulsbehandlung (B und D), jeweils in Kombination mit einer einstündigen EdU-Markierung. Im Anschluss wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeiten fixiert. Nach einer EdU- und γ H2AX-Färbung wurden ausschließlich EdU-positive Zellen ausgewertet, welche sich zu Beginn der Behandlung in der S-Phase des Zellzyklus befanden. Pro Experiment wurde für jede Kondition die Anzahl an γ H2AX-Foci in je 40 Zellen ausgewertet. Die Punkte der Graphen stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dar, wobei die Fehlerbalken die Standardfehler dieser Mittelwerte anzeigen.

Eine ineffiziente Depletion von RAD51 hätte zu einer Restaktivität der HR-vermittelten Reparatur führen können, weshalb eine simultane Färbung von RAD51 die Möglichkeit erbrachte ausschließlich γ H2AX-Foci in RAD51-Foci-negativen Zellen auszuwerten. Im Gegensatz zu KU80 und DNA-PKcs, welche für die Reparatur von DSBs nur in geringen Mengen am Schadensort lokalisiert sein müssen, bildet RAD51 Foci aus, welche mit γ H2AX-Foci kolokalisieren. Demzufolge konnten durch einen kombinierten γ H2AX/RAD51-Immunfluoreszenz-Ansatz ausschließlich Zellen ausgewertet werden, welche keine RAD51-Foci aufwiesen und somit als Positivkontrollen zur SiRNA-Effizienz dienten (Abbildung 38).

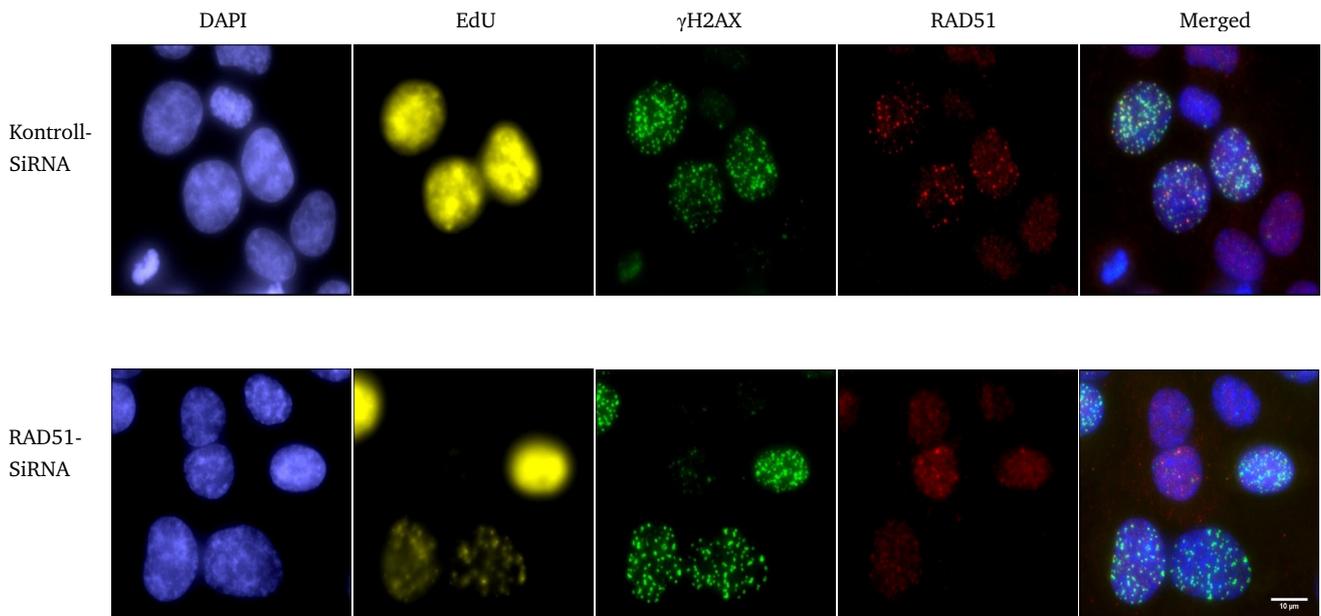


Abbildung 38: Nachweis der SiRNA-vermittelten Rad51-Suppression per Immunfluoreszenz

Nach einer Transfektion mit Kontroll- oder Rad51-SiRNA wurden A549-Zellen für 48h inkubiert und anschließend für 1h mit 10nM CPT und EdU behandelt. Nach einer Fixierung und Färbung der Zellen mittels Immunfluoreszenz konnten γ H2AX-Foci zellzyklusspezifisch ausgewertet werden. Die obere Bilderreihe zeigt einen Ansatz mit Kontroll-SiRNA, wobei im EdU-Kanal drei EdU-positive Zellkerne zu erkennen sind, welche demzufolge Zellen darstellen, die sich zum Zeitpunkt der Behandlung in der S-Phase befanden (gelber Kanal). Diese Zellen weisen im stark erhöhte γ H2AX-Foci-Werte auf, während umliegende Zellen keine Foci während der Behandlung ausgebildet (grüner Kanal). Ein großer Anteil dieser Foci kolokalisiert mit Rad51-Foci, welche im roten Kanal zu erkennen sind. Die untere Bilderreihe zeigt einen RAD51-SiRNA-Ansatz, wobei im mittleren und unteren Teil der Bildausschnitte ebenfalls drei EdU-positive Zellkerne zu erkennen sind, welche aufgrund der Schädigung in der S-Phase γ H2AX-Foci aufweisen. Ein Zellkern im unteren, rechten Bereich weist hierbei jedoch keine RAD51-Foci auf, was auf eine positive Transfektion mittels RAD51-SiRNA schließen lässt. Die dargestellten Bilder wurden bei 63-facher Vergrößerung aufgenommen.

Das KU80- und DNA-PKcs-unabhängige sowie RAD51-abhängige Verschwinden CPT- und MMS-induzierter γ H2AX-Foci stellte einen starken Hinweis auf eine HR-vermittelte Reparatur der replikationsassoziierten Schäden dar. Diese HR-Abhängigkeit sollte durch zytogenetische Studien bestätigt werden.

3.2.2 CPT und MMS führen zur Ausbildung von Schwesterchromatidaustauschen

Einen wichtigen Indikator für die erfolgreiche Reparatur von DSBs durch den Mechanismus der HR stellen SCEs dar. Je nachdem wie Strukturen, die sich während des Prozesses der HR bilden, aufgelöst werden (siehe 1.3.2.3 und 1.4.2), kommt es zu *Crossover*-Ereignissen, welche durch den zytogenetischen Nachweis von SCEs sichtbar gemacht werden könne. Um CPT- und MMS-induzierte SCEs sowie die HR-Abhängigkeit der induzierten DSBs zu analysieren, wurden humane HeLa-Zellen mit Kontroll- oder RAD51-SiRNA transfiziert, für 48h mit BrdU inkubiert und anschließend mit CPT oder MMS behandelt. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen. Die Studien der γ H2AX-Foci-Kinetiken konnten zeigen, dass 10nM CPT- und 1,5mM MMS-behandelte Zellen zwischen 10 und 20 Stunden benötigen, um von der S-Phase in die Mitose zu gelangen, sodass Zellen, welche zum Zeitpunkt der Behandlung in der S-Phase waren, 14 bis 17 Stunden nach der Behandlung mittels Colcemid und Koffein in der

Mitose angereichert und anschließend fixiert werden konnten. Zu diesem Zeitpunkt sollten Zellen, die sich während der Behandlung in der späten S-Phase oder sogar G2-Phase befanden, und somit wenig oder nicht geschädigt wurden, bereits in die G1-Phase progressiert sein und so aus der Analyse ausgeschlossen werden. Zellen, welche erst während der Behandlung in die S-Phase progressierten wurden hingegen analysiert, da sie im Fall der CPT-Dauerbehandlung mindestens ebenso geschädigt wurden wie Zellen, die zum Beginn der Behandlung bereits in der S-Phase waren. Ähnlich hierzu wurde nach einer MMS-Behandlung verfahren. Da MMS zellzyklusunabhängig Methylierungen im Genom induziert, bildeten behandelte G1-Phase-Zellen, die nach der Pulsbehandlung in die S-Phase progressierten MMS-induzierte DNA-Schäden aus. Unbehandelte Zellen wurden nach der 48-stündigen Inkubation mit BrdU fixiert und wiesen im Durchschnitt 7 SCEs auf (Abbildung 39). Eine Suppression von RAD51 hatte nur einen geringen Einfluss auf die Ausbildung dieser spontanen SCEs. Durch eine Behandlung mit CPT konnte jedoch eine massive Ausbildung an SCEs beobachtet werden. So induzierte eine Dosis von 10nM CPT knapp 65 SCEs pro Zelle. Mit 1,5mM MMS ließen sich durchschnittlich über 50 SCEs pro Zelle induzieren. Die Suppression von RAD51 mittels SiRNA senkte die Induktion von SCEs im Fall von CPT auf ca. 20 und im Fall von MMS auf ca. 10 Ereignisse pro Zelle, was eine deutliche Reduktion an erfolgreichen, HR-abhängigen Reparaturvorgängen implizierte. Eine komplette Reduktion der SCEs auf ein Hintergrundlevel von ca. 10 SCEs konnte nach einer Suppression von RAD51 mittels SiRNA nicht beobachtet werden.

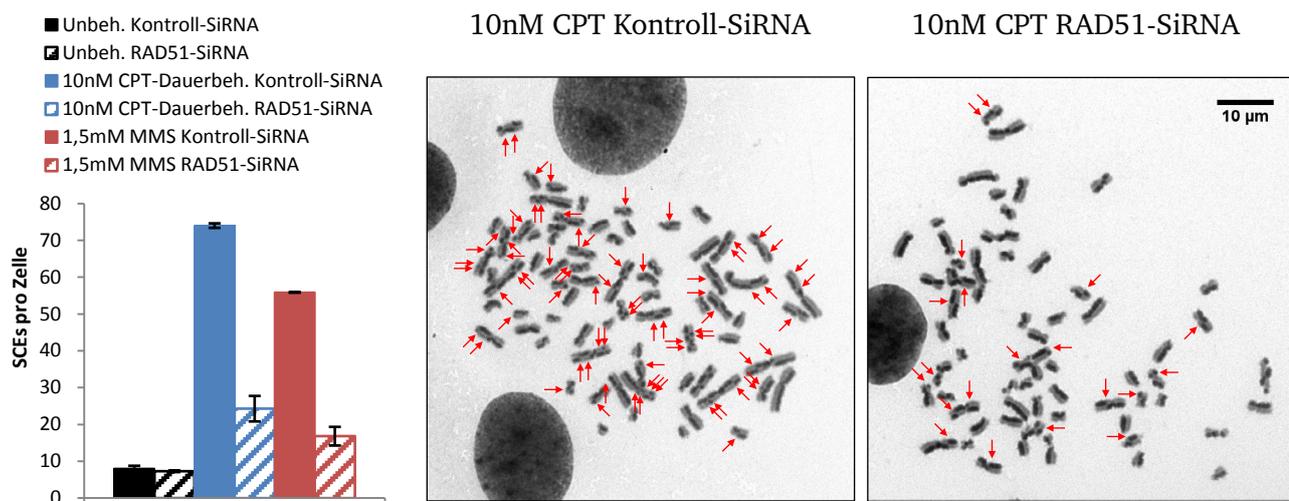


Abbildung 39: SCEs nach CPT- und MMS-Behandlung sowie Depletion von RAD51 mittels SiRNA

HeLa-Zellen wurden mit angegebenen SiRNAs transfiziert und für 48h mit BrdU inkubiert. Es folgte eine CPT-Dauerbehandlung bzw. MMS-Puls-Behandlung mit anschließender Fixierung der Zellen. Unbehandelte Zellen dienen als Kontrolle. Für eine Anreicherung von mitotischen Zellen wurde dem Medium 14h bis 17h nach der Behandlung 100ng/ml Colcemid und 2mM Koffein hinzugefügt, bevor die Zellen fixiert wurden. Pro Kondition wurden SCEs in je 40 Zellen ausgewertet. Die dargestellten Werte stellen Mittelwerte aus zwei Experimenten dar, wobei die Fehlerbalken den Standardfehler dieser Mittelwerte anzeigen. Die dargestellten Aufnahmen von Chromosomenspreitungen zeigen beispielhaft die massive Induktion von Schwesterchromatidaustauschen (durch rote Pfeile markiert) nach einer 10nM CPT-Dauerbehandlung mit Kontroll-SiRNA auf der linken Seite sowie die reduzierte Ausbildung dieser HR-Ereignisse unter RAD51-Suppression mittels SiRNA auf der rechten Seite. Die dargestellten Bilder wurden bei 63-facher Vergrößerung aufgenommen.

Die Depletionseffizienz von RAD51 mittels SiRNA konnte in den Immunfluoreszenzversuchen (3.2.1) auf Einzelzellebene durch die RAD51-Foci-Bildung optimal gewährleistet werden, da ausschließlich

RAD51-defiziente Zellen ausgewertet wurden. Für die zytogenetischen Studien und Zellzyklusanalysen mittels Durchflusszytometrie konnte eine spezifische Analyse von ausschließlich RAD51-depletierten Zellen nicht stattfinden, sodass die Transfektionseffizienz der RAD51-SiRNA in der gesamten Zellpopulation ermittelt werden sollte. Hierzu wurde eine proteinbiochemische Westernblotanalyse durchgeführt. Da in der vorliegenden Arbeit auch murine Zellen mit der gleichen RAD51-SiRNA-Sequenz transfiziert werden sollten, wurde zunächst ein Sequenzvergleich der vorliegenden RAD51-SiRNA (siehe 2.2.3, Tabelle 2) mit den Sequenzen des RAD51-Gens der unterschiedlichen Spezies durchgeführt. Die SiRNA-Sequenz konnte mit 100%iger Übereinstimmung in den RAD51-Genen der jeweiligen Spezies wiedergefunden werden (siehe Anhang 1), sodass für humane sowie für murine Zellen die gleiche SiRNA verwendet werden konnte. Nach einer SiRNA-Transfektion der menschlichen HeLa- sowie von embryonalen Mausfibroblasten (MEF) wurden Zellysate hergestellt und eine Elektrophorese mit anschließendem Westernblot durchgeführt (Abbildung 40).

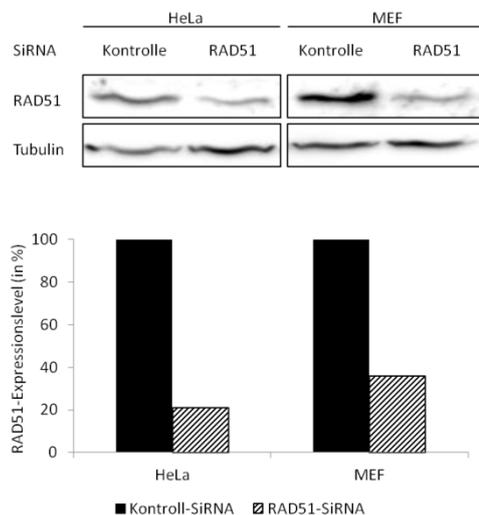


Abbildung 40: Nachweis der RAD51-Suppression mittels Westernblot

HeLa- sowie MEF-Zellen wurden mit Kontroll- oder RAD51-SiRNA transfiziert, für 48h inkubiert und anschließend lysiert. Nach einer Auftrennung der Proteine in einer SDS-Page mit anschließendem Westernblot wurden die Expressionslevel mittels Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente hierzu das Strukturprotein β -Tubulin. Das Balkendiagramm zeigt die normierten Intensitätswerte der Proteinbanden. Dabei wurden die Unterschiede der RAD51-SiRNA-Banden ins Verhältnis zu den Intensitäten der jeweiligen Kontroll-SiRNA-Banden unter Berücksichtigung des Verhältnisses der Tubulin-Banden gesetzt

Die Westernblotanalyse ergab eine Reduktion des RAD51-Expressionslevels von ~60 bis ~80%. Eine komplette Depletion von RAD51 konnte mit der Methode der RNA-Interferenz mittels SiRNA nicht erreicht werden. Die erzielte Reduktion des RAD51-Expressionslevels reichte jedoch aus, um deutliche Effekte bei den durchgeführten Analysen zu beobachten.

Wie unter 1.3.2.3 beschrieben wurde, führt die Reparatur von DSBs mittels HR nur in wenigen Fällen zur Ausbildung von SCEs. In Anbetracht der induzierten Anzahl an DSBs, welche durch die γ H2AX-Foci-Werte in Immunfluoreszenzversuchen quantifiziert wurde, bildeten die ermittelten SCE-Werte eine vergleichsweise hohe Anzahl an Ereignissen. Obwohl gezeigt werden konnte, dass die HR den einzigen Weg zur Reparatur der induzierten DSBs darstellte (siehe 3.2.1), konnten die ermittelten 50 bis 65 SCEs nicht mit der vergleichbaren Anzahl an induzierten γ H2AX-Foci korreliert werden. In diesem Fall hätte jeder Focus zu einem SCE führen müssen, was unter Berücksichtigung der Seltenheit eines SCEs als unwahrscheinlich erschien. Somit stellte sich die Frage, wie die hohe Anzahl an SCEs mit der Ausbildung von γ H2AX-Foci zu korrelieren ist oder genauer: Induzieren CPT und MMS DNA-Schäden, die keine γ H2AX-Foci bilden, jedoch zu SCEs führen können?

3.2.3 Zusammenhang von CPT- oder MMS-induzierten SCEs und DSBs

Die Entstehungsmechanismen CPT-induzierter DNA-Schäden sind im Vergleich zu MMS-induzierten Schäden weitestgehend erforscht. Dies liegt hauptsächlich an der wesentlich größeren Vielfalt der MMS-induzierten DNA-Läsionen (siehe 1.6.1). Bei der Ausbildung von DSBs sind die beiden Agenzien jedoch zu vergleichen, da beide zunächst zur Ausbildung von SSBs führen, welche im Verlauf der Replikation zur Entstehung von DSBs beitragen. Die Induktion der SSBs wird dabei allerdings über unterschiedliche Mechanismen herbeigeführt. Während CPT die Ligation der Topoisomerase 1-induzierten SSBs inhibiert, liegt der Erzeugung von SSBs im Fall von MMS eine Methylierung von DNA-Basen zu Grunde. Letzteres führt durch den Einsatz von Glycosylasen, welche der BER dienen, temporär zu abasischen Stellen im Genom, die durch Endonukleasen erkannt werden. Diese spalten das Zuckerphosphatrückgrat an der abasischen Stelle und erzeugen damit einen SSB. Um diesen Prozess genauer zu untersuchen und die Häufigkeit von CPT- und MMS-induzierten SCEs mit der Anzahl an γ H2AX-Foci zu korrelieren, wurden Studien mit Glycosylase- (Alkyladenin-DNA-Glycosylase, AAG) defizienten Zellen durchgeführt, welche nicht in der Lage sind die durch MMS methylierten Basen zu entfernen. Infolgedessen werden keine abasischen Stellen in der DNA ausgebildet. Demzufolge weisen Glycosylase-defiziente Zellen weniger SSBs auf, was in der S-Phase zu weniger replikationsassoziierten DSBs führen sollte. Unveröffentlichte Studien der Arbeitsgruppe Löbrich konnten bereits zeigen, dass AAG-defiziente Zellen nach einer MMS-Behandlung wesentlich weniger γ H2AX-Foci aufweisen als Kontrollzellen (nach mündlicher Mitteilung von Dr. Michael Ensminger). Mit Hilfe von zytogenetischen Analysen sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob unter AAG-defizienten Bedingungen SCEs durch MMS induziert werden können, obwohl diese Zellen keine γ H2AX-Foci aufweisen (Abbildung 41).

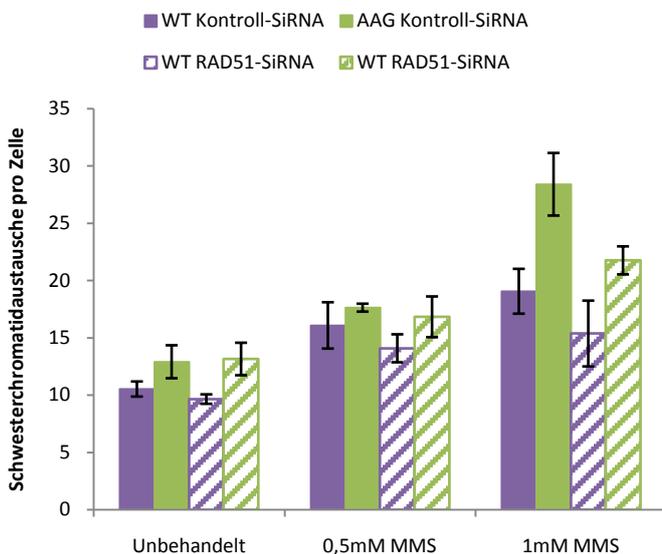


Abbildung 41: SCEs in AAG-defizienten MEFs aufgrund MMS-induzierter DNA-Schäden

Wildtyp- (WT) und AAG-defiziente (AAG) MEFs wurden mit Kontroll- oder RAD51-SiRNA transfiziert und für 48h mit BrdU-haltigem Medium inkubiert. Es folgte eine einstündige Behandlung mit 0,5 oder 1mM MMS. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrollen. Mitotische Zellen wurden bei einer Konzentration von 0,5mM MMS von 6h bis 8h und bei einer 1mM MMS-Konzentration von 10h bis 12h nach der MMS-Behandlung mittels Colcemid und Koffein angereichert und anschließend fixiert. Pro Kondition wurden SCEs in je 40 Zellen ausgewertet. Die dargestellten Werte stellen Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten dar, wobei die Fehlerbalken den Standardfehler dieser Mittelwerte anzeigen.

Sowohl nach einer 0,5mM als auch nach einer 1mM MMS-Behandlung ließen sich SCEs in WT- und AAG-Zellen induzieren. Nach einer hohen Dosis von 1mM MMS wurden in AAG-defizienten Zellen sogar deutlich mehr SCEs erzeugt als in WT-Zellen. Im Zusammenhang mit den geringen γ H2AX-Foci-Werten unterstützte dieses Ergebnis die Vermutung, dass auch nicht Foci-bildende, MMS-induzierte

DNA-Läsionen zu *Crossover*-Ereignissen führen können. Die HR-Abhängigkeit dieser Strukturen konnte durch die Suppression von RAD51 mittels SiRNA bestätigt werden. Wurde RAD51 in WT- und AAG-defizienten Zellen durch RNA-Interferenz supprimiert, so konnte eine deutliche Reduktion der SCEs beobachtet werden. Demzufolge entstanden durch eine MMS-Behandlung DNA-Schäden, welche keine γ H2AX-Foci bildeten, jedoch RAD51-abhängig repariert wurden und zu SCEs führten.

Die vergleichbare Anzahl an CPT-induzierten γ H2AX-Foci und SCEs ließ darauf schließen, dass auch nach einer CPT-Behandlung replikationsassoziierte DNA-Schäden in der S-Phase induziert wurden, welche nicht zu einem γ H2AX-Focus, wohl aber zu einem SCE führten. Um nun das Zellzyklusverhalten von CPT- und MMS-behandelten Zellen analysieren und weitere zytogenetische Studien durchführen zu können, sowie den Zellzyklusstatus von behandelten Zellen mit den ermittelten γ H2AX-Foci-Kinetiken abgleichen zu können, wurden durchflusszytometrische Studien durchgeführt. Desweiteren sollte der Einfluss von Checkpoints auf das Zellzyklusverhalten von CPT- und MMS-behandelten Zellen analysiert werden.

3.2.4 Zellzyklusverhalten von CPT- und MMS-behandelten Zellen und die Bedeutung von Checkpoints

Für eine Analyse des Zellzyklusverhaltens CPT- und MMS-behandelter Zellen wurden umfangreiche Durchflusszytometrie-Studien durchgeführt. Hierzu wurde zunächst das Zellzyklusverhalten von CPT- und MMS-behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen über einen Zeitraum von 20 Stunden beobachtet. Die Zellzyklusprogression konnte verfolgt werden, indem je 6 Ansätze identisch behandelt und anschließend in Abständen von 4h fixiert wurden. Die spezifische Analyse einer behandelten S-Phase-Population ermöglichte dabei eine einstündige BrdU-Behandlung (Abbildung 42).

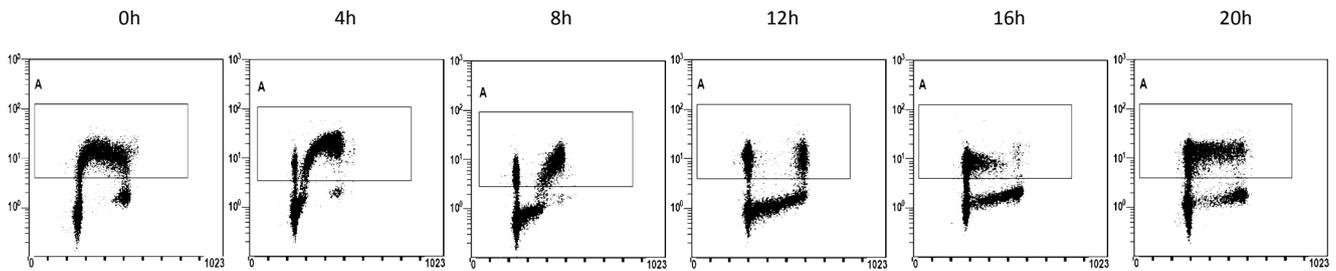


Abbildung 42: Durchflusszytometrie von Zellen mit inkorporiertem BrdU

A549-Zellen wurden für eine Stunde mit dem Thymidinanalogon BrdU behandelt und anschließend in einem Zeitraum von 20 Stunden zu unterschiedlichen Zeiten fixiert. Nach einer DNA-Färbung mittels Propidiumiodid (PI) und einer Immunfluoreszenzfärbung gegen BrdU wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die dargestellten Graphen zeigen die Zellverteilungen von 6 Zeitpunkten, wobei auf der Abszisse die PI-Intensität und der Ordinate die BrdU-Intensität aufgetragen ist. Jeder Punkt eines Graphen stellt dabei eine analysierte Zelle dar. Pro Zeitpunkt wurden 20.000 Zellen ausgewertet. Am Beispiel des 0h-Punktes ist eine hufeisenähnliche Form zu erkennen, wobei das linke Ende eine Zellpopulation mit geringer PI- als auch BrdU-Intensität zeigt. Diese Punktwolke stellt G1-Phase-Zellen dar, welche aufgrund des einfachen DNA-Gehalts eine geringe PI-Intensität aufweisen und aufgrund nicht vorhandener Replikation kein BrdU inkorporiert haben. Dem gegenüber liegt am anderen Ende der Verteilung eine BrdU-negative G2-Phase-Population mit doppeltem DNA-Gehalt und folglich stärkerer PI-Intensität. Dazwischen befindet sich die heterogene S-Phase-Population, welche aufgrund des inkorporierten BrdUs eine erhöhte BrdU-Immunfluoreszenz aufweist und aufgrund des intermediären DNA-Gehalts eine PI-Intensität aufweist, welche zwischen der von G1- und G2-Phase-Zellen liegt (Kasten). Verfolgt man diese BrdU-positive Zellpopulation über einen Zeitraum von 20h, so erkennt man in der grafischen Auftragung aufgrund des zunehmenden DNA-/PI-Gehalts während der S-Phase eine Verschiebung nach rechts. Bereits 4h nach der BrdU-Behandlung haben sich die ersten BrdU-positiven, ehemaligen S-Phase-Zellen geteilt und tauchen am linken Rand als BrdU-positive G1-Population auf. 12h nach der BrdU-Pulsbehandlung befindet sich der Großteil der BrdU-positiven Zellen in der G1-Phase, wohingegen der andere Teil noch mit einem doppelten DNA-Gehalt in einer späten S- oder G2-Phase lokalisiert ist. 16h nach der Behandlung erkennt man bereits ein erneutes Progressieren BrdU-positiver Zellen in die nächste S-Phase. Betrachtet man die BrdU-negativen Zellen, so erkennt man innerhalb der ersten 8h ein Verschwinden der G2-Population und eine Progression von G1-Phase-Zellen in die S-Phase. Diese Zellen inkorporieren kein BrdU, da die BrdU-Behandlung nur anfänglich für eine Stunde erfolgte. Anhand der BrdU-negativen Zellen ist bei einem Vergleich des 0h- und 12h-Punktes zu erkennen, dass Zellen ca. 12h von der G1-Phase in die G2-Phase benötigen, womit deutlich wird, dass unbehandelte A549-Zellen ca. 12h für die Duplizierung ihrer DNA in der S-Phase benötigen.

Für die Analyse der Zellzyklusprogression CPT- und MMS-behandelter Zellen wurden BrdU-positive Zellen differenziert ausgewertet und die Anteile der Zellen an den drei Zellzyklusphasen S, G2 und G1 prozentual in einem Diagramm aufgetragen. Hierzu diente die BrdU-negative Population von G1- und G2-Phase-Zellen zur Definition der Grenzen zwischen den unterschiedlichen Zellzyklusphasen BrdU-positiver Zellen. Nach der Einteilung der BrdU-positiven Population in die verschiedenen Zellzyklusphasen konnte das Zellzyklusverhalten von unbehandelten und geschädigten Zellen unter Aufhebung von Checkpoints durch Koffein analysiert werden (Abbildung 43). Im direkten Anschluß einer einstündigen BrdU-Behandlung befanden sich unabhängig von weiteren Behandlungen noch ca. 85% aller BrdU-positiven Zellen in der S-Phase (0h). Ca. 15% der BrdU-positiven Zellen progressierten innerhalb der einstündigen BrdU-Behandlung in die G2-Phase oder besaßen zum Zeitpunkt der Fixierung ein nahezu vollständig dupliziertes Genom. Eine Differenzierung von sehr späten S-Phase-Zellen und G2-Phase-Zellen war anhand des PI-Signals nicht möglich.

Der Graph unbehandelter, BrdU-positiver Zellen wurde sowohl für den Vergleich einer CPT- als auch einer MMS-Behandlung auf beiden Seiten der Abbildungen 43 und 44 aufgeführt (in schwarz und grau dargestellt). Zum 12h-Zeitpunkt hatten sich nahezu alle BrdU-positiven, unbehandelten Zellen geteilt und befanden sich in der G1-Phase. Zum 16h- und 20h-Zeitpunkt progressierten unbehandelte Zellen bereits in die nächste S-Phase. Der Vergleich dieser Zellzyklusprogression mit der nach einer 10nM

CPT-Behandlung (in dunkel-blau dargestellt) konnte eine deutliche Verlangsamung der Progression von CPT-behandelten Zellen in der S-Phase beobachtet werden.

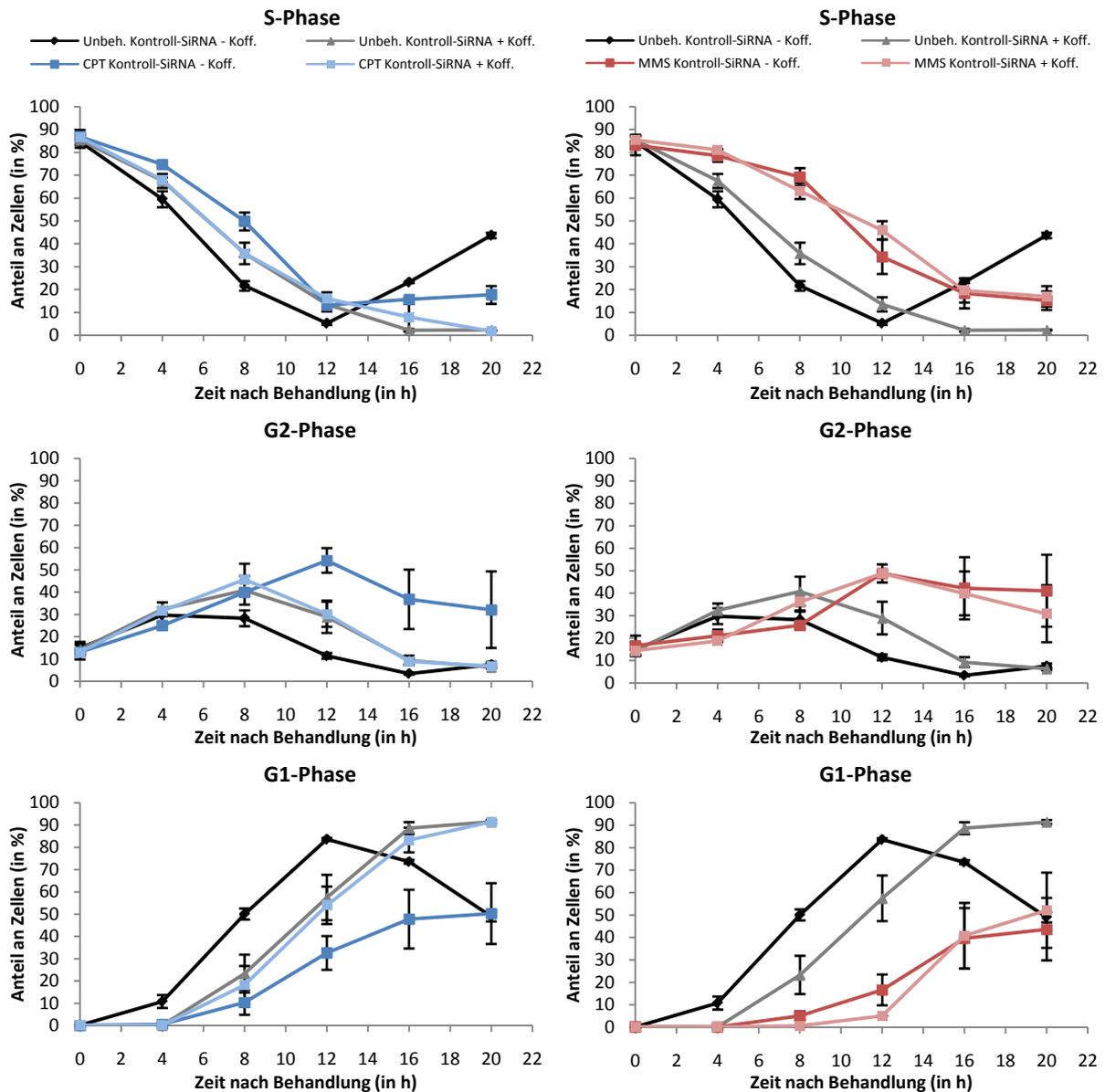


Abbildung 43: Zellzyklusprogression von CPT- und MMS-behandelten Zellen in Abhängigkeit von Zellzykluscheckpoints

A549-Zellen wurden mit Kontroll-SiRNA transfiziert und nach 48h mit 10nM CPT dauerbehandelt oder für 1h mit 1,5mM MMS pulsbehandelt. Gleichzeitig erfolgte mit Beginn der Behandlung eine einstündige Gabe von BrdU und gegebenenfalls eine Behandlung der Zellen mit 2mM Koffein, um die Aktivierung von Checkpoints zu inhibieren. In einem Zeitraum von 20 Stunden wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeiten fixiert. Nach einer DNA-Färbung mittels PI und einer Immunfluoreszenzfärbung gegen BrdU wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die dargestellten Graphen zeigen die Zellverteilungen ausschließlich BrdU-positiver Zellen bestehend aus 6 Zeitpunkten, wobei die Verteilung der Zellpopulation eines Zeitpunkts in drei Zellzyklusphasen prozentual eingeteilt wurde (S-Phase, G2-Phase, G1-Phase). Die dargestellten Werte stellen Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten dar, wobei die Fehlerbalken den Standardfehler dieser Mittelwerte anzeigen.

Der Graph CPT-behandelter Zellen veranschaulicht einen abnehmenden Anteil an S-Phase Zellen, welcher jedoch während der ersten 8h weniger stark abnimmt, als der von unbehandelten Zellen. Demzufolge waren CPT-behandelte Zellen in Ihrer Progression durch die S-Phase gehemmt. Desweiteren war eine Akkumulation von Zellen in der G2-Phase zu beobachten, wobei der Anteil an G2-Phase-Zellen

auf ein Maximum von 60% zum Zeitpunkt 12h anstieg. Dies resultierte im Vergleich zu unbehandelten Zellen in deutlich weniger Zellen, welche bei einer 10nM CPT-Dauerbehandlung in die G1-Phase progressierten. Demzufolge führte CPT zu einer Verzögerung von Zellen in der S-Phase, einer Akkumulation von Spät S-/G2-Phase Zellen zu einem späteren Zeitpunkt (>12h) sowie zu einer verspäteten Progression in die G1-Phase. Ein ähnliches Zellzyklusverhalten wurde nach einer 1,5mM MMS-Behandlung beobachtet (in dunkel-rot dargestellt), wobei die Verzögerung innerhalb der S-Phase sowie der verspätete G1-Phase-Eintritt stärker ausgeprägt war als nach einer CPT-Behandlung. Zellen, welche lediglich mit Koffein behandelt wurden (in grau dargestellt) wiesen ebenfalls eine leichte Verzögerung der S-Phase-Progression und einen um ca. 2h Stunden-verspäteten G1-Phase-Eintritt auf.

Einen großen Unterschied zeigte das Zellzyklusverhalten von CPT- und MMS-behandelten Zellen nach Aufhebung von Checkpoints durch Koffein. CPT-behandelte Zellen, die zusätzlich unter dem Einfluss von Koffein standen (in hell-blau dargestellt), progressierten genauso schnell durch den Zellzyklus wie Zellen, die lediglich mit Koffein behandelt wurden. Dies stellte einen deutlichen Hinweis auf eine Checkpoint-abhängige Verzögerung der Zellzyklusprogression CPT-behandelter Zellen dar. Im Gegensatz hierzu war bei einer MMS-Behandlung keine Beschleunigung der Zellzyklusprogression durch Koffein induzierbar (in hell-rot dargestellt). Die Progression MMS- und Koffein-behandelter Zellen ließ sogar einen additiven, negativen Effekt von Koffein erkennen, da noch weniger Zellen bis zum Zeitpunkt von 12h in die G1-Phase progressierten. Demzufolge existierte nach einer MMS-Behandlung ein Checkpoint-unabhängiger Weg, welcher die Progression geschädigter Zellen stark verzögerte.

Für die Analyse des Zellzyklusverhaltens RAD51-defizienter Zellen wurden analog zu den bisher dargestellten, durchflusszytometrischen Studien Versuche mit RAD51-supprimierten Zellen durchgeführt (Abbildung 44). Ein Einfluss der RAD51-Defizienz auf die Zellzyklusprogression von unbehandelten, CPT- oder MMS-behandelten Zellen (gestrichelte Graphen) im Vergleich zu Kontroll-SiRNA-Zellen (durchgezogene Graphen) konnte hierbei innerhalb der S-Phase nicht festgestellt werden. Unterschiede in der Zellzyklusprogression zwischen Kontroll- und RAD51-SiRNA-transfizierten Zellen zeigten sich erst in der Progression in die G2- und G1-Phase. Unbehandelte Zellen zeigten unter RAD51-Defizienz (gestrichelter, schwarzer Graph) im Vergleich zu unbehandelten Kontroll-SiRNA-Zellen (schwarzer Graph) eine leichte Akkumulation in der G2-Phase, was sich in einer verzögerten Progression in die G1-Phase auswirkte. Dies könnte auf einen Defekt in der Reparatur endogener DNA-Schäden in der S-Phase zurückzuführen sein, welcher in einer verminderten Progression resultiert. Eine Auswirkung der RAD51-SiRNA auf lediglich Koffein-behandelte Zellen (gestrichelter, grauer Graph) konnte im Vergleich zu den Kontroll-SiRNA-transfizierten Zellen (grauer Graph) nicht beobachtet werden. Einen deutlichen Effekt zeigte die RAD51-Defizienz nach einer 10nM CPT-Behandlung ohne Koffein (gestrichelter, dunkelblauer Graph) im Vergleich zu RAD51-profizienten, CPT-behandelten Zellen (dunkelblauer Graph). Da die CPT-induzierten DNA-Schäden ohne RAD51 nicht repariert werden konnten, akkumulierten geschädigte Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt in der G2-Phase, was in einem verminderten Anteil an G1-Phase-Zellen resultierte. CPT- und zusätzlich Koffein-behandelte, RAD51-defiziente Zellen (gestrichelter, hellblauer Graph) zeigten trotz des massiven Reparaturdefekts eine nahezu ungehinderte, Kontroll-SiRNA-ähnliche Zellzyklusprogression. Demzufolge lag in CPT-behandelten Zellen kein zusätzlicher, Checkpoint-unabhängiger Mechanismus vor, welcher die Zellzyklusprogression verlangsamte.

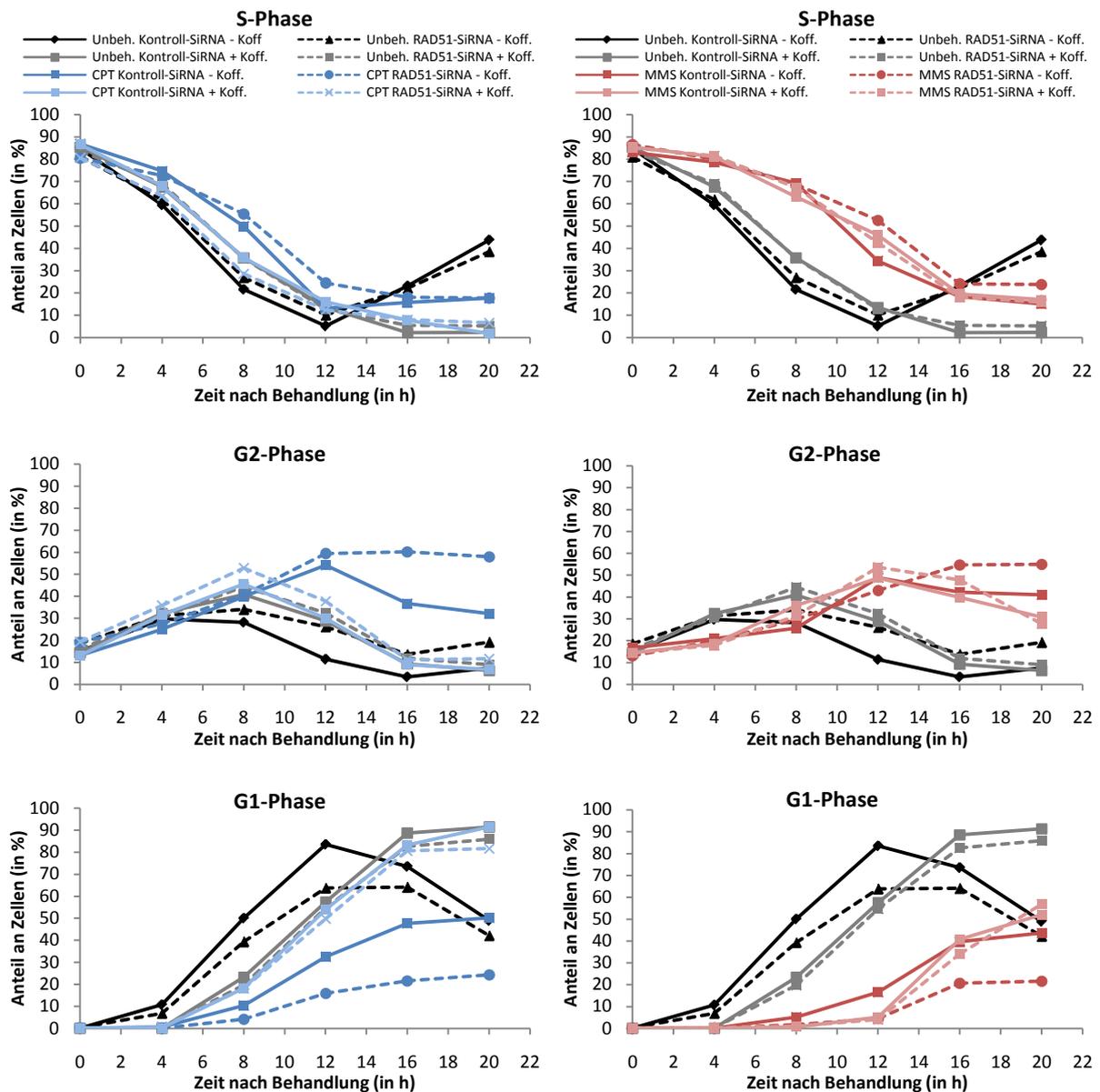


Abbildung 44: Zellzyklusprogression von CPT- und MMS-behandelten, RAD51-defizienten Zellen in Abhängigkeit von Zellzykluscheckpoints

A549-Zellen wurden mit Kontroll-SiRNA oder RAD51-SiRNA transfiziert und nach 48h mit 10nM CPT dauerbehandelt oder für 1h mit 1,5mM MMS pulsbehandelt. Gleichzeitig erfolgten mit Beginn der Behandlung eine einstündige Gabe von BrdU und gegebenenfalls eine Behandlung der Zellen mit 2mM Koffein, um die Aktivierung von Checkpoints zu inhibieren. In einem Zeitraum von 20 Stunden wurden die Zellen der verschiedenen Konditionen zu unterschiedlichen Zeiten fixiert. Nach einer DNA-Färbung mittels PI und einer Immunfluoreszenzfärbung gegen BrdU wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die dargestellten Graphen zeigen die Zellverteilungen ausschließlich BrdU-positiver Zellen bestehend aus 6 Zeitpunkten, wobei die Verteilung der Zellpopulation eines Zeitpunkts in drei Zellzyklusphasen prozentual eingeteilt wurde (S-Phase, G2-Phase, G1-Phase). Die dargestellten Werte stellen Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten dar. Fehlerbalken wurden aufgrund einer besseren Übersichtlichkeit in dieser Abbildung nicht dargestellt, sind jedoch unter Anhang 2 einzusehen. Die Kontroll-SiRNA-Werte wurden aus Abbildung 43 übernommen.

Eine RAD51-Defizienz wirkte sich im Zusammenhang mit einer MMS-Behandlung vergleichbar mit einer RAD51-Defizienz nach einer CPT-Behandlung aus. Auch hier konnte eine Akkumulation von MMS-behandelten, RAD51-SiRNA-transfizierten Zellen (gestrichelter, dunkelroter Graph) in der G2-Phase beobachtet werden, welche auf den Reparaturdefekt der Zellen zurückzuführen ist und sich in

einer verminderten G1-Progression fortsetzt. MMS- und zusätzlich Koffein-behandelte, RAD51-defiziente Zellen (gestrichelter, hellroter Graph) zeigten ähnlich den Nicht-Koffein-behandelten Zellen (dunkelroter Graph) bis zum Zeitpunkt von 12h eine Akkumulation in der G2-Phase, progressierten anschließend jedoch vermehrt in die G1-Phase. Demzufolge besaß Koffein erst zu späten Zeiten und nach weitgehend vollendeter Replikation einen Einfluss auf die Zellzyklusprogression MMS-behandelter Zellen.

Zusammenfassend ergaben die durchflusszytometrischen Studien, dass sowohl eine CPT-Behandlung als auch eine MMS-Behandlung zu einer verzögerten S-Phase-Progression und einer Akkumulation von Zellen in der späten S/G2-Phase führte. Dies resultierte in einer zeitlich-verzögerten Progression in die Mitose von CPT- und MMS-geschädigten S-Phase-Zellen. Eine RAD51-Defizienz verstärkte diese Verzögerung, da der Hauptreparaturweg für CPT- und MMS-induzierte DNA-Schäden die HR darstellt, und Checkpoints die Progression von geschädigten Zellen in die Mitose unterbinden. Eine zusätzliche Behandlung von CPT-geschädigten Zellen mit Koffein bewirkte sowohl eine Aufhebung der S-Phase-Verzögerung als auch der verminderten Progression in die Mitose, sodass CPT- und Koffein-behandelte Zellen eine nahezu ungehinderte Zellzyklusprogression aufwiesen. Eine Defizienz von RAD51 führte unter diesen Konditionen zu keinem Unterschied der Zellzyklusprogression. Eine Koffein-Behandlung von MMS-geschädigten Zellen führte hingegen nicht zu einer Aufhebung der verzögerten S-Phase-Progression, sodass davon ausgegangen werden kann, dass ein zusätzlicher, Checkpoint-unabhängiger Prozess für die Verzögerung von MMS-behandelten Zellen innerhalb der S-Phase verantwortlich ist. Zu späten Zeiten konnte jedoch auch nach einer MMS-Behandlung zumindest bei RAD51-defizienten Zellen ein Einfluss auf die Zellzyklusprogression beobachtet werden, da hier G2-Phase-Zellen früher in die Mitose progressierten als RAD51-defiziente, MMS-behandelte Zellen ohne den Einfluss von Koffein. Demzufolge hatte der Checkpoint-unabhängige Prozess vor allem während der S-Phase einen Einfluss auf die Zellzyklusprogression. Wurden Zellen lediglich mit Koffein behandelt, so konnte eine leichte Verzögerung der Zellzyklusprogression von ca. 2 Stunden beobachtet werden, welche sich während der S-Phase ausbildete und sich anschließend in einer Verzögerung der Progression in die darauffolgenden Zellzyklusstadien manifestierte. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob das Verschwinden von γ H2AX-Foci mit der ermittelten Zellzyklusprogression CPT- und MMS-behandelter Zellen korreliert werden konnte.

3.3 Wann werden CPT- und MMS-induzierte DSBs repariert?

Eine wichtige Frage zur Reparatur CPT- und MMS-induzierter DSBs bezog sich auf den Zeitraum, in welchem die induzierten DSBs repariert werden. So sollte vor allem untersucht werden, in welchen Zellzyklusphasen die replikationsassoziierten DNA-Schäden vollständig behoben sind. Eine Differenzierung von Zellen in der späten S-Phase und Zellen in der G2-Phase konnte mit keiner der verwendeten Analysen gewährleistet werden. Die *Life cell*-Studien zeigten jedoch eine Vielzahl an persistierenden CPT- und MMS-induzierten γ H2AX-Foci in Zellen, welche kein S-Phase-typisches LIG1-Muster mehr aufwiesen und demzufolge der G2-Phase zugeschrieben werden konnten. Eine Replikationsaktivität an den verbliebenen DSBs konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, sodass die Zellen ebenso einer sehr späten S-Phase hätten zugeschrieben werden können, in welcher die gesamte Replikation bis auf einige Replikationsgabeln, welche womöglich an der Replikation gehindert wurden, abgeschlossen war. Da somit die späte S-Phase nicht von der G2-Phase unterschieden werden konnte, sollte unter-

sucht werden, ob CPT- und MMS-behandelte Zellen mit unreparierten DSBs in die Mitose progressieren, welche klar von anderen Zellzyklusphasen abgegrenzt werden kann. Hierzu wurden zunächst Immunfluoreszenz-Versuche durchgeführt, wobei mitotische A549-Zellen 16h nach einer CPT- oder MMS-Behandlung analysiert wurden. Um ausschließlich behandelte S-Phase-Zellen untersuchen zu können, wurden Zellen zum Zeitpunkt ihrer Behandlung mit EdU markiert. Mitosen konnten aufgrund des charakteristischen DAPI-Signals kondensierter Chromosomen gut von anderen Zellen unterschieden werden, wurden jedoch zusätzlich mit Hilfe des spezifischen Mitose-Markers pH3 identifiziert (Abbildung 45 D, untere Zelle). In den EdU/pH3-positiven Zellen wurden γ H2AX-Foci ausgewertet, um hiermit das Maß an CPT- und MMS-induzierten DSBs zu bestimmen. Als Vergleich hierzu dienten Zellen des gleichen Ansatzes, welche ebenfalls einen 16-stündigen Zeitraum besaßen, um entstandene DNA-Schäden zu reparieren, sich zum Zeitpunkt der Fixierung allerdings noch in einer späten S- oder G2-Phase aufhielten und dementsprechend EdU-positiv, jedoch pH3-negativ waren (Abbildung 45 D, obere Zelle). 16 Stunden nach einer CPT-Dauerbehandlung bzw. MMS-Pulsbehandlung zeigten Zellen, welche sich zum Zeitpunkt der Fixierung noch in der späten S- oder der G2-Phase befanden durchschnittlich 26 γ H2AX-Foci nach einer 10nM CPT-, 75 γ H2AX-Foci nach einer 20nM CPT- und 44 γ H2AX-Foci nach einer 1,5mM MMS-Behandlung (Abbildung 45 A). Im Gegensatz hierzu zeigten Zellen, welche unter den getesteten Konditionen bereits die Mitose erreicht hatten, weniger als 10 γ H2AX-Foci (Abbildung 45 B), und somit einen vergleichbaren Wert an Foci zu unbehandelten, mitotischen Zellen. Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass Zellen CPT- oder MMS-induzierte DSBs bis zur Mitose vollständig repariert hatten, unabhängig davon ob 20 oder 50 γ H2AX-Foci durch die Agenzien erzeugt wurden. In die Mitose gelangten somit ausschließlich Zellen mit einem γ H2AX-Foci-Level auf Hintergrund-Niveau.

Daraufhin sollte untersucht werden, welcher Mechanismus die Zellen daran hindert mit erhöhten γ H2AX-Foci-Level in die Mitose zu progressieren. G2-Phase-Zellen, die durch eine Bestrahlung mit Röntgenstrahlen geschädigt werden, progressieren mit stark erhöhten DSB-Leveln in die Mitose (Deckbar et al. 2007). Diese Progression wurde auf einen insensitiven G2/M-Checkpoint zurückgeführt. Wäre solch ein insensitiver Checkpoint auf CPT- und MMS-induzierte, replikationsassoziierte DSBs übertragbar, müssten Zellen, welche mit DNA-Schäden in die G2-Phase progressieren auch in der Mitose noch stark erhöhte γ H2AX-Foci-Level aufweisen. Um den Einfluss eines möglichen G2/M-Checkpoints zu untersuchen, wurden CPT- und MMS-behandelten Zellen zwei Stunden vor der Fixierung mit Koffein behandelt, welches durch Inhibition wichtiger Checkpoint-Kinasen einen Checkpoint-vermittelten Zellzyklusarrest aufhebt (Block et al. 2004). Das γ H2AX-Foci-Level verblieb jedoch auch unter Einfluss von Koffein und somit ohne zelluläre Checkpoints nach einer CPT- oder MMS-Behandlung unverändert auf niedrigem Niveau (Abbildung 45 C). Infolgedessen musste ein G2/M-Checkpoint-unabhängiger Mechanismus für die Arretierung von Zellen verantwortlich sein, welcher es ermöglicht die Reparatur von CPT- und MMS-induzierten DNA-Schäden vor Eintritt in die Mitose zu gewährleisten. Da gezeigt werden konnte, dass Zellen CPT- und MMS-induzierte, replikationsabhängige DSBs ausschließlich über den Prozess der HR reparieren, sollte im Folgenden analysiert werden, ob Zellen mit einer RAD51-Defizienz mit erhöhten γ H2AX-Foci-Werten in die Mitose progressieren.

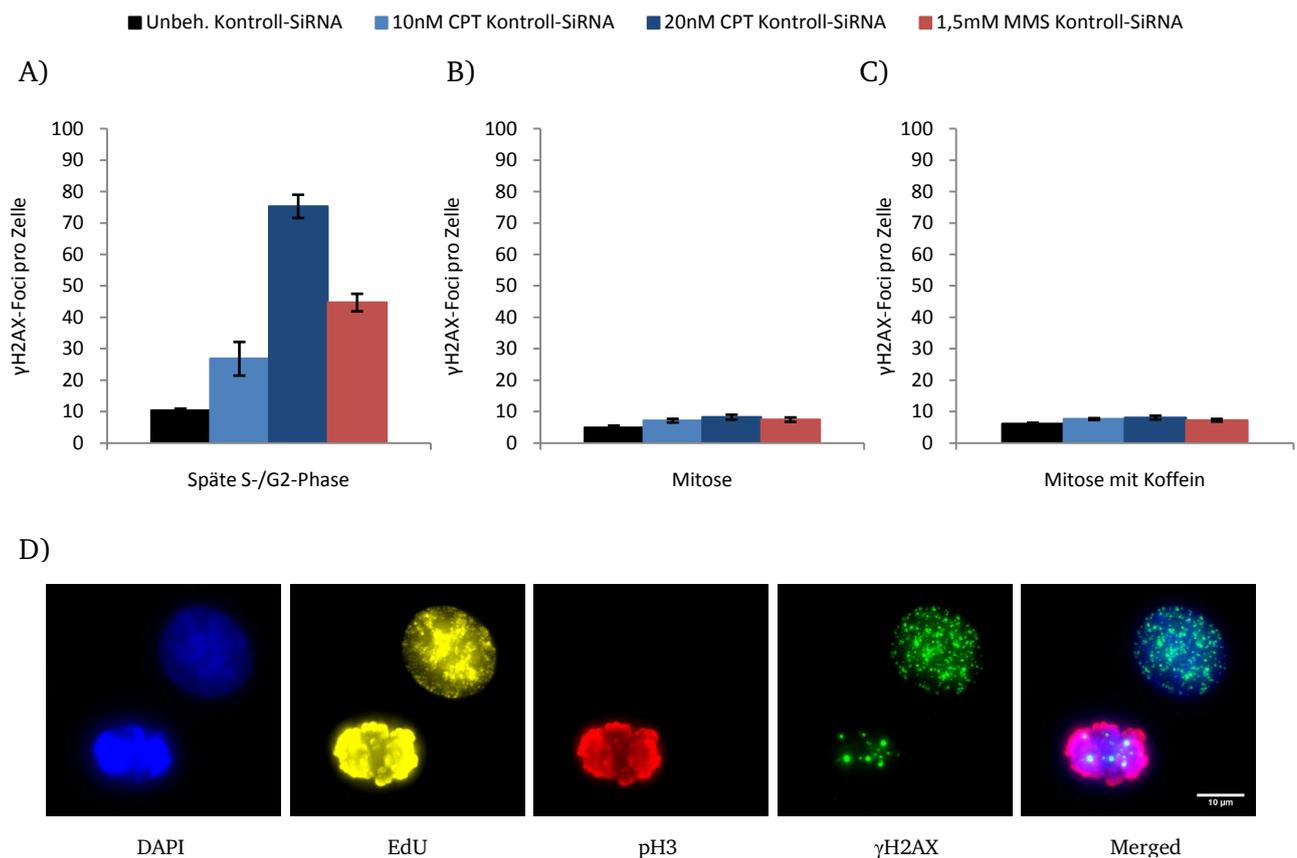


Abbildung 45: γ H2AX-Foci in S-Phase- und mitotischen Zellen 16 Stunden nach CPT- oder MMS-Behandlung

A,B,C) A549-Zellen wurden mit Kontroll-SiRNA transfiziert und für 48h inkubiert. Es folgte eine einstündige Behandlung mit 1,5mM MMS und EdU oder eine Dauerbehandlung mit 10nM bzw. 20nM CPT mit einer anfänglichen, einstündigen EdU-Behandlung. Unbehandelte Zellen wurden 8h nach der EdU-Markierung, CPT- und MMS-behandelte Zellen 16h nach der Behandlung fixiert. In Ansätzen mit Koffein, wurde dieses 3h vor der Fixierung in einer Konzentration von 2mM hinzugefügt. Nach einer EdU-, pH3- und γ H2AX-Färbung wurden ausschließlich EdU-positive Zellen ausgewertet, welche sich zum Anfang der Behandlung in der S-Phase des Zellzyklus befanden. Mitosen wurden durch eine positive pH3-Färbung identifiziert. Pro Experiment wurde für jede Kondition die Anzahl an γ H2AX-Foci in je 40 Zellen ausgewertet. Die Balken stellen Mittelwerte aus zwei bis fünf unabhängigen Experimenten dar, wobei die Fehlerbalken den Standardfehler der jeweiligen Mittelwerte anzeigen.

D) Exemplarische Aufnahmen von Zellen 16h nach einer 20nM CPT-Dauerbehandlung. Zu erkennen sind zwei Zellkerne (DAPI), welche zum Zeitpunkt der einstündigen EdU-Behandlung, also 16 Stunden vor der Fixierung, EdU inkorporierten und somit der S-Phase zugeschrieben werden konnten (EdU). Zum Zeitpunkt der Fixierung befand sich die untere der beiden Zellen in der Mitose, wohingegen sich die obere Zelle noch in einer früheren Zellzyklusphase befand (pH3). Die mitotische Zelle wies im Vergleich zur spät S-/G2-Phase-Zelle deutlich weniger γ H2AX-Foci auf (γ H2AX). Die Überlagerung des DAPI-, pH3- und γ H2AX-Kanals gibt das Summenbild wieder (Merged). Die Bilder wurden bei 100-facher Vergrößerung aufgenommen.

3.3.1 CPT- und MMS-induzierte DSBs gelangen ausschließlich unter einem Reparaturdefekt und zusätzlicher Aufhebung von Checkpoints in die Mitose

Um die Frage zu beantworten, was mit Zellen geschieht, welche die CPT- und MMS-induzierten, HR-abhängigen DSBs nicht reparieren können, wurden γ H2AX-Foci in der Mitose nach RAD51-Suppression analysiert. Hierzu wurden A549-Zellen mit Kontroll- oder RAD51-SiRNA transfiziert und für 48h inkubiert, bevor eine Behandlung mit CPT bzw. MMS zusammen mit EdU erfolgte. Analog zum beschriebenen Experiment unter 3.3 wurden die Zellen nach 16h fixiert, gefärbt und anschließend analysiert. Um

herauszufinden, wie sich eine Aufhebung von Checkpoints auf das Zellzyklusverhalten von Zellen mit unreparierten DSBs auswirkt, wurde in einem zusätzlichen Ansatz drei Stunden vor der Fixierung Koffein hinzugefügt.

Die Suppression von RAD51 induzierte in Zellen, welche sich zum Zeitpunkt der Fixierung nach einer 10nM und 20nM CPT-Dauerbehandlung sowie nach einer 1,5mM MMS-Behandlung (Abbildung 46 A, schraffierte Balken) immer noch in einer späten S/G2-Phase befanden, einen erkennbaren Reparaturdefekt. Erstaunlicherweise progressierten auch im Ansatz mit RAD51-SiRNA ausschließlich Zellen in die Mitose, welche kaum erhöhte γ H2AX-Foci-Werte aufwiesen (Abbildung 46 B). Demzufolge wurden Zellen mit unreparierten DSBs an der Progression in die Mitose gehindert. Wenn Zellen jedoch nicht mit unreparierten DSBs in die Mitose gelangten und durch die RAD51-Suppression an der Reparatur gehindert wurden, hätten überhaupt keine Zellen in der Mitose ausgewertet werden können. Die Analyse von mitotischen Zellen des RAD51-RNA-Ansatzes ließ jedoch auf eine Selektion von Zellen schließen, welche vergleichsweise wenige DSBs ausgebildet hatten (aufgrund eines späten S-Phase-Status mit Beginn der Behandlung) oder bei welchen die RAD51-Suppression ungenügend war, sodass eine Reparatur mittels HR trotz SiRNA stattfinden konnte. Für diese Hypothese sprach eine, in den Experimenten beobachtete, geringe Ausbeute an mitotischen Zellen unter RAD51-Suppression, welche jedoch nicht quantitativ erfasst wurde. Wurde den Zellen 3h vor der Fixierung Koffein hinzugefügt, um zelluläre Checkpointsignale zu inhibieren und mitotische Zellen anzureichern, so konnte ein deutlicher Anstieg an γ H2AX-Foci in mitotischen Zellen unter RAD51-Suppression festgestellt werden (Abbildung 46 C).

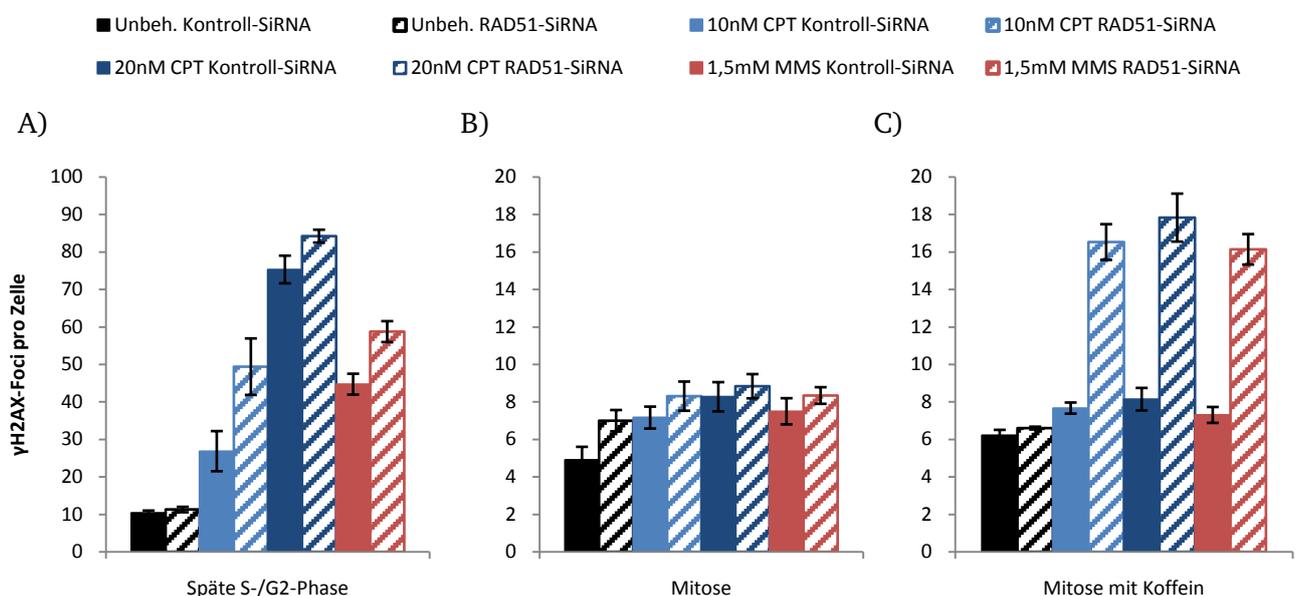


Abbildung 46: γ H2AX-Foci in S-Phase- und mitotischen Zellen 16 Stunden mit/nach Behandlung

A, B, C) A549-Zellen wurden mit Kontroll-SiRNA (ausgefüllte Balken) oder RAD51-SiRNA (schraffierte Balken) transfiziert und für 48h inkubiert. Es folgte eine einstündige Behandlung mit 1,5mM MMS und EdU oder eine Dauerbehandlung mit 10nM bzw. 20nM CPT zusammen mit einer anfänglichen, einstündigen EdU-Behandlung. Unbehandelte Zellen wurden 8h nach der EdU-Behandlung fixiert, CPT- und MMS-behandelte Zellen wurden 16h nach der Behandlung fixiert. In Ansätzen mit Koffein wurde dies 3h vor der Fixierung in einer Endkonzentration von 2mM hinzugefügt (C). Nach einer EdU-, pH3- und γ H2AX-Färbung wurden ausschließlich EdU-positive Zellen ausgewertet, welche sich zu Beginn der Behandlung in der S-Phase des Zellzyklus befanden. Die Kontroll-SiRNA-Daten (ausgefüllte Balken) wurden aus Abbildung 45 übernommen. Pro Experiment wurde für jede Kondition die Anzahl an γ H2AX-Foci in je 40 Zellen ausgewertet. Die Balken stellen Mittelwerte aus zwei bis fünf unabhängigen Experimenten dar, wobei die Fehlerbalken den Standardfehler dieser Mittelwerte anzeigen.

Wurden demzufolge Zellen an der Reparatur CPT- und MMS-induzierter DNA-Schäden durch Inhibition der HR gehindert, so konnten sie durch Aufhebung von Checkpoints mittels Koffein mit unreparierten DSBs in die Mitose gelangen.

Die dargestellten Ergebnisse verdeutlichten, dass unter einer RAD51-Profizienz die Aufhebung von Checkpoints nicht zu erhöhten DSB-Level in der Mitose führte. Wurde die Reparatur jedoch durch eine RAD51-Defizienz unterbunden, so schienen Checkpoints wichtig zu sein, um die Progression von Zellen mit unreparierten DSBs in die Mitose zu verhindern. Demzufolge konnte RAD51 eine Funktion für die Arretierung des Zellzyklus von geschädigten Zellen innerhalb der S-Phase zugeschrieben werden. In einem folgenden Ansatz sollte nun untersucht werden, ob sich die ermittelten γ H2AX-Foci-Daten durch zytogenetischen Studien belegen ließen und wie sich „mitotische γ H2AX-Foci“ in chromosomalen Aberrationen manifestierten. Zusätzlich sollte analysiert werden, wie sich eine Inhibition von Intra-S-Phase-Checkpoints durch eine fortwährende Koffeinbehandlung seit Beginn der CPT- und MMS-Behandlung auf das Reparaturverhalten und die Zellzyklusprogression von Zellen auswirkte.

3.3.2 CPT und MMS führen zu Chromatidbrüchen in der Mitose nach Inhibition von Checkpoints und der HR

Für die Validierung der Ergebnisse aus den Immunfluoreszenz-Studien wurden in zytogenetischen Ansätzen Metaphasepräparate hergestellt. Um zusätzlich den Einfluss von Intra-S-Phase-Checkpoints auf die Reparatur von CPT- und MMS-induzierten DNA-Schäden sowie die Zellzyklusprogression geschädigter Zellen zu untersuchen, wurde dem Zellmedium in einem weiteren Ansatz Koffein seit Beginn der CPT- und MMS-Behandlung zugefügt.

Mit zytogenetischen Studien ließen sich die γ H2AX-Foci-Daten aus Kapitel 3.3.1 bestätigen. Ohne Koffein zeigten mitotische Zellen selbst nach RAD51-Depletion kaum erhöhte Level an Chromatidbrüchen (Abbildung 47 A). Bei einem Vergleich der Chromatidbruchwerte (Abbildung 47 B) mit γ H2AX-Foci-Zahlen in mitotischen Zellen nach einer 3-stündigen Koffeinbehandlung (Abbildung 46 C) wurde eine deutliche Korrelation der Werte festgestellt. So wurden selbst bei einer Inhibition des G2/M-Checkpoints keine CPT- oder MMS-induzierten Chromatidbrüche detektiert. Erst durch eine Inhibition der HR mittels Depletion von RAD51 und zusätzlicher Aufhebung von Checkpoints durch Koffein konnte eine Steigerung der Anzahl an DSBs in mitotischen Zellen in Form von γ H2AX-Foci und Chromatidbrüchen beobachtet werden (Abbildung 47 B). Eine verlängerte Koffein-Behandlung zeigte in den analysierten, mitotischen Zellen nur eine geringfügige Zunahme an Chromatidbrüchen nach RAD51-Depletion (Abbildung 47 C). Demzufolge besaß die Aufhebung von Intra-S-Phase-Checkpoints keinen additiven Einfluss auf die Ausbildung von Chromatidbrüchen in RAD51-defizienten Zellen während der Progression durch die S-Phase.

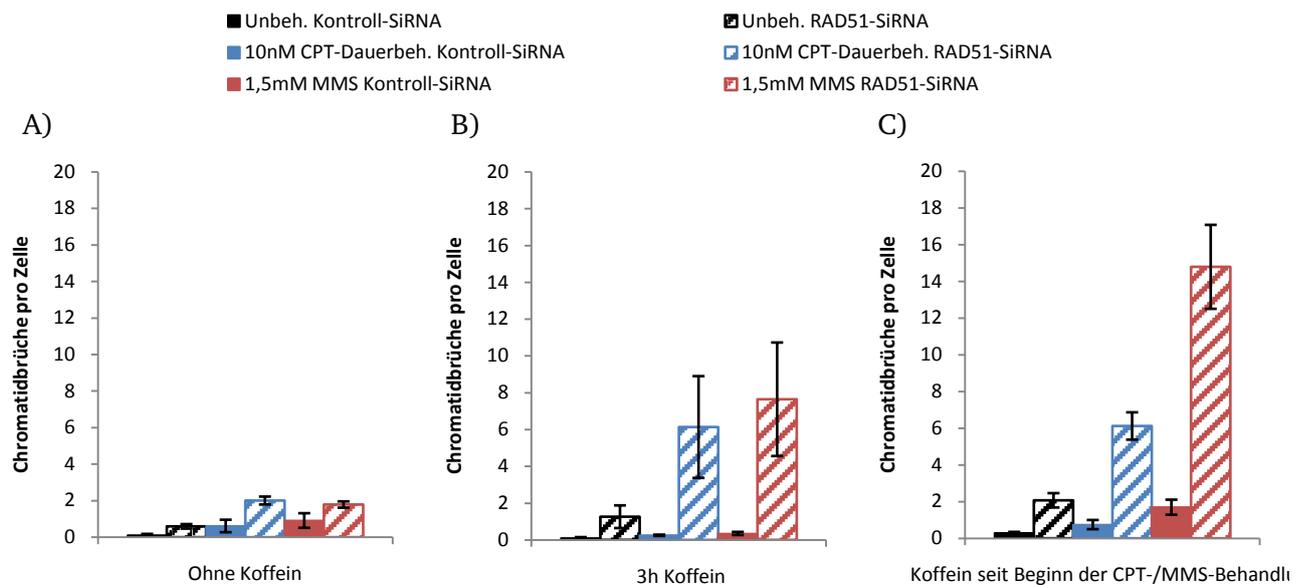


Abbildung 47: Chromatidbrüche nach CPT- oder MMS- sowie Koffein-Behandlung und Depletion von RAD51 mittels SiRNA

HeLa-Zellen wurden mit Kontroll-SiRNA (ausgefüllte Balken) oder RAD51-SiRNA (schraffierte Balken) transfiziert und für 48h inkubiert. Es folgte eine einstündige Behandlung mit 1,5mM MMS und EdU oder eine Dauerbehandlung mit 10nM CPT. CPT- und MMS-behandelte Zellen wurden von 14h bis 17h nach Beginn der Behandlung mit Colcemid behandelt und anschließend fixiert. Je nach Ansatz erfolgte eine Behandlung ohne Koffein (A), eine 2mM Koffein-Behandlung entweder zusammen mit der Colcemid-Behandlung (B) oder eine Koffein-Behandlung seit Beginn der CPT- und MMS-Behandlung (C). Unbehandelte Zellen konnten nach 3-stündiger Colcemid- und ggf. Koffeingabe zu einem beliebigen Zeitpunkt fixiert werden. Für den Vergleich einer andauernden Koffein-Behandlung ohne CPT- oder MMS-Behandlung wurden Zellen 7 Stunden mit Koffein behandelt, wobei vor der Fixierung von 4h bis 7h Colcemid hinzugefügt wurde. Ein Zeitraum von 4h bis 7h wurde gewählt, um eine zu den CPT- und MMS-Ansätzen vergleichbare Population zu analysieren, welche sich zu Beginn der Koffein-Behandlung in der S-Phase befand. Für die zytogenetische Analyse wurden Chromatidbrüche in je 40 Zellen ausgewertet. Die dargestellten Werte stellen Mittelwerte aus mindestens 2 Experimenten dar, wobei die Fehlerbalken den Standardfehler dieser Mittelwerte anzeigen.

Die Korrelation zwischen γ H2AX-Foci- und Chromatidbruchwerten implizierte eine Induktion von DSBs durch CPT und MMS sowie eine RAD51-abhängige Reparatur dieser DSBs in der S-Phase und späten S-/G2-Phase des Zellzyklus. Die unter 3.1.5 dargestellten Ergebnisse der *Life cell*-/Immunfluoreszenz-Analysen konnten bereits verdeutlichen, dass RAD51-profiziente Zellen auch nach Verschwinden des LIG1-Signals noch einen Großteil an CPT-induzierten γ H2AX-Foci aufwiesen. Die Beobachtung, dass diese γ H2AX-Foci bis zur Mitose verschwunden waren, ließ darauf schließen, dass die meisten CPT-induzierten DNA-Schäden zwischen einem Zeitpunkt der weitgehend abgeschlossenen Replikation und dem Eintritt in die Mitose repariert wurden. Mittels frühzeitiger Chromosomenkondensation sollte nun überprüft werden, ob in CPT- und MMS-behandelten, RAD51-defizienten Zellen Chromatidbrüche in der G2-Phase nachgewiesen werden konnten, um hiermit den Reparaturzeitpunkt auf die S- oder G2-Phase begrenzen und die arretierende Funktion von RAD51 bestätigen zu können.

3.3.3 RAD51 verhindert die Progression von CPT- und MMS-behandelten S-Phase-Zellen in die G2-Phase/Mitose

Um eine frühzeitige Chromosomenkondensation, kurz PCC, zu induzieren, wurden Zellen nach einer CPT- oder MMS-Behandlung für eine Stunde mit Calyculin A behandelt. Der PCC-Ansatz stellt eine einfache und nützliche Methode dar, um strukturelle und numerische Aberrationen in Zellen auch vor

der Mitose zu analysieren (Gotoh 2009). Die spezifische Analyse von G2-Phase Zellen sollte durch die Auswahl von Zellen gewährleistet werden, welche zwei getrennte Chromatiden, jedoch kein ausgebildetes Centromer erkennen ließen. S-Phase-Zellen in einem frühen oder mittleren Stadium wiesen diffus-kondensiertes Chromatin auf und konnten ebenso aus der Analyse ausgeschlossen werden wie mitotische Zellen, welche eine deutliche X-förmige Struktur der Chromosomen zeigten. Um die Auswirkung einer RAD51-Depletion in Zellen vor der Mitose zu untersuchen, wurden spät S-/G2-Phase-Zellen 12 bis 13 Stunden nach einer CPT- oder MMS-Behandlung analysiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrollen und konnten zu einem beliebigen Zeitpunkt mittels Calyculin für eine Stunde behandelt und anschließend fixiert werden (Abbildung 48). Die zytogenetischen Studien frühzeitig-kondensierter Chromosomen zeigten, dass RAD51-profiziente Zellen kaum Chromatidbrüche nach einer 10nM CPT-Dauerbehandlung oder 1,5mM MMS-Behandlung aufwiesen. Demzufolge wurde innerhalb des 12-stündigen Zeitraums nach Beginn der Behandlung der Großteil an DSBs repariert. Eine RAD51-Defizienz hingegen führte zu einem starken Reparaturdefekt, welcher in frühzeitig kondensierten Zellen zu einer massiven Erhöhung der Chromatidbruchraten führte. Demzufolge spiegelten frühzeitig kondensierte, RAD51-defiziente Zellen, welche mit CPT oder MMS behandelt wurden, den gleichen Effekt wieder, wie RAD51-defiziente Zellen, die nach Aufhebung des G2/M-Checkpoints mittels Koffein in die Mitose progressierten (siehe Abbildung 46 C oder 47 B).

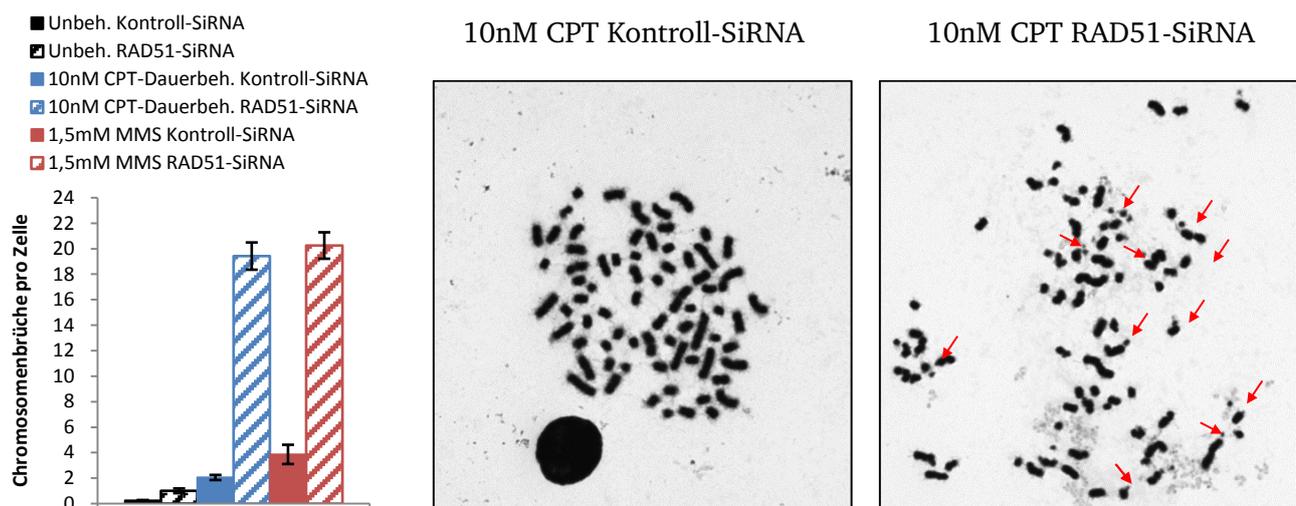


Abbildung 48: Chromatidbrüche in frühzeitig kondensierten Chromosomen nach Behandlung mit CPT und MMS sowie Depletion von RAD51

HeLa Zellen wurden mit entsprechenden SiRNAs transfiziert und für 48h inkubiert. Es folgte eine CPT-Dauerbehandlung, bzw. einstündige Behandlung mit MMS. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrollen. Nach 12h wurde dem Medium für eine Stunde Calyculin A hinzugefügt, bevor die Zellen fixiert wurden. Pro Experiment wurden für jede Kondition 40 Zellen ausgewertet. Die dargestellten Werte stellen Mittelwerte aus 3 bis 7 unabhängigen Experimenten dar, wobei die Fehlerbalken den Standardfehler dieser Mittelwerte anzeigen.

Die dargestellten Bilder zeigen beispielhaft die massive Induktion von Chromatidbrüchen nach einer 10nM CPT-Dauerbehandlung unter RAD51-Suppression mittels SiRNA im Vergleich zu Kontroll-SiRNA. Die Bilder wurden bei 63-facher Vergrößerung aufgenommen.

Die dargestellten Ergebnisse ließen darauf schließen, dass CPT und MMS replikationsassoziierte DSBs induzieren, welche unter Abhängigkeit von RAD51 noch vor der Mitose bzw. vor der G2-Phase repariert werden. Dabei schien RAD51 eine stabilisierende Funktion der CPT- und MMS-induzierten DSBs zu besitzen, welche für eine Arretierung von geschädigten Zellen zu einem späten Zeitpunkt der S-Phase sorgte. In diesem Fall konnten RAD51-profiziente Zellen nach weitestgehend abgeschlossener Replikation die induzierten DSBs zunächst reparieren, bevor sie in die G2-Phase und später in die Mitose progressierten. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass dieses Verhalten Checkpoint-unabhängig war, da bei einer RAD51-Profizienz Koffein keine Auswirkung auf die Anzahl an γ H2AX-Foci oder Chromatidbrüchen aufwies. RAD51-defiziente Zellen akkumulierten hingegen DSBs in der S-Phase und gelangten auch ohne Inhibition von Checkpoints mit erhöhten Chromatidbruchlevel in die G2-Phase, jedoch nicht in die Mitose. Wurden unter RAD51-defizienten Bedingungen Checkpoints durch Koffein aufgehoben, so gelangten die Zellen mit stark erhöhten DSB-Raten in die Mitose.

4 Diskussion

CPT und MMS sind chemische Substanzen, welche eine DNA-schädigende, karzinogene Wirkung besitzen und in Form vieler Derivate in der Medizin als Cytostatika Anwendung finden. Die schädigende Wirkung der beiden Agenzien ist dabei auf die Induktion von replikationsassoziierten DSBs in der S-Phase des Zellzyklus zurückzuführen (Kaina 2004, Pommier 2013). Wie genau und vor allem wann die DSBs repariert werden, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Zudem wurden in der Vergangenheit hauptsächlich zellzyklusunabhängige Studien und aufgrund insensitiver Methoden hohe Dosen der beiden Agenzien zur Aufklärung der schädigenden Wirkung verwendet. Der Induktion von DSBs durch MMS werden SSBs als BER-Intermediate zugrunde gelegt, welche während der Replikation zu DSBs konvertiert werden (Wyatt and Pittman 2006). Für vergleichende Studien zur Erzeugung und Reparatur dieser DSBs wurde CPT als Agens herangezogen, welches gezielt SSBs in der S-Phase durch Inhibition der Topoisomerase 1 akkumuliert (Tomicic and Kaina 2013).

4.1 Untersuchungen zur Induktion von DSBs durch CPT und MMS

Ein Großteil an Studien zur Erzeugung und Reparatur CPT- und MMS-induzierter DSBs wurde in proliferierenden Zellpopulationen und mit hohen Dosen der Agenzien durchgeführt. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete γ H2AX-Foci-Analyse ermöglichte hingegen die Untersuchung einzelner DSBs auf Einzelzellebene per Immunfluoreszenz-Färbung. Dieser hoch-sensitive Ansatz erlaubte den Einsatz sehr niedriger Dosen an CPT und MMS, was der besseren Aufklärung physiologischer Prozesse diene. Ein weiterer, wichtiger Vorteil der γ H2AX-Foci-Methode bestand in der zellzyklusspezifischen Analyse von geschädigten Zellen durch die Markierung von S-Phase-Zellen mittels Thymidinanaloga wie BrdU oder EdU. Hierfür wurden zunächst Dosen an CPT und MMS ermittelt, welche eine auswertbare Anzahl an γ H2AX-Foci induzierten, wobei bis zu 100 distinkte γ H2AX-Foci pro Zelle problemlos detektiert und ausgewertet werden konnten. Die Spezifität von γ H2AX als DSB-Marker wurde jedoch immer wieder in Frage gestellt, da γ H2AX-Foci keinen direkten Nachweis von DSBs in Zellen darstellen, sondern lediglich Aufschluss über eine Modifikation von Proteinen am Schadensort geben. Außerdem können Foci durch Faktoren beeinflusst werden, welche beispielsweise die Aufenthaltsdauer des Schadensmarkers modulieren (Karanam et al. 2012). Zusätzlich können sich DSBs in Clustern anordnen, sodass mehrere DSBs einen einzigen Focus bilden. Ebenso wurde die Spezifität von γ H2AX gegenüber DSBs diskutiert. Eine Ausbildung von γ H2AX-Foci an SSBs konnte ausgeschlossen werden, indem Zellen mit 0,1 mM H₂O₂ behandelt wurden, was eine massive Ausbildung von SSBs jedoch keine γ H2AX-Foci induzierte (Lobrich et al. 2010). Außerdem korrelierten Ergebnisse zum Induktions- und Reparaturverhalten, welche mittels der γ H2AX-Foci-Analyse ermittelt wurden, mit solchen, die mit rein physikalischen Methoden wie der Pulsfeld-Gelelektrophorese erlangt wurden (Kuhne et al. 2004, Riballo et al. 2004), sodass die Methode der γ H2AX-Foci-Analyse einen geeigneten Ansatz für die vergleichenden Studien CPT- und MMS-induzierter DNA-Schäden bieten sollte.

4.1.1 Analyse von CPT- und MMS-induzierten DSBs anhand von γ H2AX-Foci

Nachdem in der vorliegenden Arbeit A549-Zellen für eine Stunde mit verschiedenen Dosen an CPT und MMS in Kombination mit dem Thymidinanalogon EdU behandelt sowie anschließend fixiert und

gefärbt wurden, konnten γ H2AX-Foci per Immunfluoreszenz-Mikroskopie ausgewertet werden. Dabei erwiesen sich CPT-Dosen von 10nM und MMS-Dosen von 1,5mM als geeignet, um eine Zahl von durchschnittlich 25 bis 45 γ H2AX-Foci pro Zelle zu induzieren. Unbehandelte Zellen wiesen in der S-Phase bereits ca. 15 γ H2AX-Foci auf, sodass behandelte Zellen zwischen 40 und 60 Foci besaßen und somit ideale Voraussetzungen für eine vergleichende Analyse boten. Durch eine Erhöhung der CPT- und MMS-Konzentration konnte die Anzahl an induzierten γ H2AX-Foci gesteigert werden. Dies ließ auf eine Dosis-abhängige Induktion von DSBs während der Replikation schließen. In der S-Phase sind ca. 3000 bis 12000 Replikationsgabeln aktiv (Chaudhuri et al. 2012), welche jedoch an den jeweiligen Replikationsursprüngen nicht gleichzeitig mit Beginn der S-Phase initiiert werden (Ge and Blow 2010). Die Dosisabhängigkeit der induzierten DSBs während der einstündigen Behandlung ließ demzufolge darauf schließen, dass nicht alle aktiven Replikationsgabeln durch die CPT- oder MMS-Behandlung kollabierten und zu einem DSB führten. Zudem ist zu berücksichtigen, dass CPT reversibel an TOP1-CCs bindet und es somit während der CPT-Behandlung zügig zu einem Equilibrium zwischen ternären CPT-DNA-TOP1-Komplexen und der dissoziierten Form kommt (Pommier et al. 2006). Zusätzlich können durch CPT-induzierte TOP1-CCs durch den Prozess der *fork regression* oder Exzision mittels TDP1 entfernt werden, bevor Replikationsgabeln mit diesen kollidieren. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass CPT nicht alle TOP1-Topoisomerasen inhibiert, sondern lediglich solche mit einem Guanin am 5'-Ende des induzierten SSBs (Leteurtre et al. 1993). Mit steigender Dosis an CPT erhöht sich jedoch die Wahrscheinlichkeit, dass Replikationsgabeln auf TOP1-CCs treffen und somit potentiell in der Lage sind DSBs und γ H2AX-Foci herbei zu führen. Studien von Y. Pommier zeigten einen Mechanismus für die Erzeugung von DSBs durch CPT, wobei Replikationsgabeln auf SSBs treffen (Pommier 2004). Bei der Kollision einer Replikationsgabel mit einem SSB kann es demnach zu einem *replication fork run-off* kommen, wobei die Replikationsmaschinerie samt eines DNA-Strangs von der DNA dissoziiert und damit ein ein-endiger DSB erzeugt wird (Strumberg et al. 2000).

Ähnlich verhält es sich mit dem Agens MMS, welches mit steigender Konzentration eine höhere Anzahl an Methylierungen im Genom verursacht (Groth et al. 2010) und hiermit die Wahrscheinlichkeit eines Aufeinandertreffens von Replikationsgabeln und BER-Intermediaten erhöht. Ebenso wäre im Fall von MMS jedoch auch eine Induktion von DSBs durch einen weiteren Mechanismus denkbar. K. Larson konnte bereits 1985 zeigen, dass Methylierungen im Genom dazu in der Lage sind, die Replikation in der S-Phase zu blockieren (Larson et al. 1985). *In vitro*-Studien konnten belegen, dass vor allem von N3-Methyladenin eine replikationsblockierende Wirkung ausgeht, wohingegen N7-Methyladenin weniger Einfluss auf die Replikationsgeschwindigkeit besitzt (Engelward et al. 1998). Die dadurch induzierten, arretierten Replikationsgabeln könnten durch einen Kollaps zu der Ausbildung von ein-endigen DSBs führen, welche durch die Markierung von γ H2AX als Foci sichtbar wären. An diesen Strukturen ist eine Re-Initiierung der Replikation nicht möglich, sodass durch den Endonuklease-Komplex MUS81-EME1 gezielt ein-endige DSBs generiert werden, um hiermit ein Substrat für die DSB-Reparatur via HR zu ermöglichen. Dieser Mechanismus wurde jedoch vorrangig für Agenzien wie Hydroxyharnstoff (engl. *Hydroxyurea*, HU) beschrieben, welche die Replikation durch Depletion des Nukleotidpools arretieren (Hanada et al. 2007). Nach einer andauernden HU-Behandlung zeigen Zellen erst nach einigen Stunden ein Auftreten von DSBs (Saintigny et al. 2001). Von einer temporären Arretierung der Replikationsgabeln ist im Fall von MMS durch die hohe Anzahl an methylierten Basen ebenfalls auszugehen, das Auftreten von MUS81-EME1-vermittelten DSBs durch einen langanhaltenden Arrest von Replikationsgabeln sollte jedoch, wenn überhaupt, erst zu späteren Zeiten eintreten.

Studien der Erzeugung von MMS-induzierten DSBs durch die Kollision von Replikationsgabeln mit temporären BER-Intermediaten stellen hingegen eine wahrscheinlichere Erklärung dar. Diese Studien stützen ihr Modell auf Ergebnisse von Versuchen mit BER-defekten Zelllinien, welche SSBs nach einer Behandlung mit Alkylanzien stark akkumulieren und eine hohe Empfindlichkeit gegenüber MMS aufweisen (Thompson et al. 1982). Aufgrund unveröffentlichter Studien der Arbeitsgruppe Löbrich mit BER-defizienten Zellen (XRCC1-defizient), welche eine um 15-fach erhöhte γ H2AX-Foci-Induktion im Vergleich zu Wildtyp-Zellen aufweisen, kann davon ausgegangen werden, dass der größte Teil der MMS-erzeugten γ H2AX-Foci auf die replikationsassoziierte Induktion von DSBs durch SSBs zurückzuführen ist (unveröffentlichte Ergebnisse von M. Ensminger und C. Ebel). Außerdem konnte gezeigt werden, dass MMS in der Lage ist über einen zusätzlichen, replikationsunabhängigen Weg DSBs zu erzeugen. Mit steigender Anzahl an MMS-induzierten Methylierungen, kann es aufgrund gegenüberliegender, mittels BER-erzeugter, temporärer SSBs zu DSBs kommen (Ma et al. 2011). Im Vergleich zu replikationsassoziierten, MMS-induzierten DSBs in der S-Phase ist dies jedoch als seltenes Ereignis einzustufen.

Die dargestellten Modelle lassen deshalb darauf schließen, dass γ H2AX-Foci nach einer CPT- oder MMS-Behandlung aufgrund von ein-endigen DSBs gebildet werden, welche hauptsächlich durch den Mechanismus des *replication fork run-off* entstehen.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete, EdU-Markierung von CPT- und MMS-behandelten S-Phase-Zellen ermöglichte eine zeitliche Analyse der Entstehung und Reparatur von CPT- oder MMS-induzierten DSBs anhand von γ H2AX-Foci-Kinetiken. Hierzu wurden CPT-, MMS- und unbehandelte Zellen zu unterschiedlichen Zeiten nach der einstündigen EdU-Inkorporation fixiert und mittels Immunfluoreszenz gefärbt. Nach einer einstündigen Pulsbehandlung mit CPT und EdU konnte hierbei eine stetige Abnahme der durchschnittlichen γ H2AX-Foci-Anzahl pro Zelle beobachtet werden. Nachdem durch eine Behandlung mit unterschiedlichen Dosen von CPT eine Vielzahl an Foci induziert werden konnte, wurden 8 Stunden nach Entzug des Agens kaum noch γ H2AX-Foci beobachtet. Demzufolge wurde der Großteil der CPT-induzierten DNA-Schäden innerhalb von 8 Stunden repariert. Der schnelle Abfall der Kinetik ließ darauf schließen, dass nach Entzug des Agens keine neuen, CPT-induzierten DNA-Schäden entstanden, oder dass erheblich weniger DSBs erzeugt, als in der gleichen Zeit repariert wurden. Dieses Ergebnis ist konsistent mit Studien, welche zeigen konnten, dass sich nach einem Entzug von CPT die induzierten TOP1-CCs rasch auflösen (Covey et al. 1989) und die Replikation anschließend voranschreiten kann, ohne dabei auf neue Replikationshindernisse zu stoßen.

Von diesem Verlauf abweichende Kinetiken zeigten Zellen nach Pulsbehandlungen mit verschiedenen Dosen an MMS. Nach einer einstündigen Pulsbehandlung mit MMS konnte zunächst ein Anstieg der durchschnittlichen γ H2AX-Foci-Anzahlen innerhalb der ersten Stunden beobachtet werden. Hieraus kann geschlossen werden, dass auch nach Entzug des Agens DSBs induziert werden oder, falls bereits eine Reparatur vorliegt, innerhalb der ersten Stunden mehr DSBs erzeugt als repariert werden. Diese Beobachtung ist damit zu erklären, dass die durch MMS induzierten Basenmethylierungen zwar nur während der einstündigen Pulsbehandlung induziert werden, aber über mehrere Stunden persistieren können (Osborne and Phillips 2000). Demzufolge können unentwegt neue DSBs nach einer MMS-Behandlung entstehen, solange sich eine Zelle in der S-Phase befindet und Replikationsgabeln auf BER-induzierte SSBs treffen. In diesem Fall ist eine Abnahme der durchschnittlichen γ H2AX-Foci-Anzahl pro Zelle erst dann zu erwarten, wenn der Großteil der DNA repliziert wurde und eine erfolg-

reiche Reparatur die Induktion neuer DSBs überwiegt. Für diese Annahme sprechen die Zeitpunkte, an welchen die Maxima an γ H2AX-Foci bei unterschiedlichen Dosen an MMS erreicht werden. Je höher dabei die eingesetzte MMS-Konzentration ist, desto mehr Foci werden induziert und desto später wird ein Zeitpunkt erreicht, bei welchem erfolgreiche Reparaturprozesse die Ausbildung von neuen DSBs überwiegen. Es ist somit anzunehmen, dass die Replikation bei höheren MMS-Dosen erst zu einem späteren Zeitpunkt abgeschlossen ist als bei niedriger-dosierten Pulsbehandlungen. Diese Annahme steht in Einklang mit den durchflusszytometrischen Studien dieser Arbeit, in welchen gezeigt werden konnte, dass MMS-behandelte Zellen eine langsamere Zellzyklusprogression während der S-Phase aufweisen als unbehandelte Zellen. Je höher dabei die eingesetzte MMS-Konzentration ist, desto langsamer progressieren Zellen durch die S-Phase (siehe Anhang 3). Nachdem in den γ H2AX-Kinetiken das Maximum an γ H2AX-Foci erreicht wurde (ca. 4 Stunden nach der Behandlung), traten nach einer MMS-Behandlung kaum noch neue DSBs auf, was durch die Kinetiken von HR-defizienten, MMS-behandelten Zellen verdeutlicht werden kann. Da RAD51-defiziente Zellen die induzierten DSBs nicht reparieren können, müssten die γ H2AX-Foci-Kinetiken auch zu späteren Zeiten fortwährend ansteigen. Nach Ausbildung des γ H2AX-Foci-Maximums verläuft die Kinetik der MMS-behandelten, RAD51-supprimierten Zellen jedoch über den kompletten Beobachtungszeitraum von 20 Stunden auf einem gleichbleibenden Level.

Die Kinetiken einer CPT-Behandlung ließen sich der einer MMS-Behandlung angleichen, indem eine kontinuierliche Behandlung von Zellen mit CPT erfolgte. Durch eine CPT-Dauerbehandlung wurden somit DSBs analog zu einer MMS-Behandlung über die komplette Dauer der S-Phase induziert. Demzufolge trat auch nach einer CPT-Dauerbehandlung ein biphasischer Verlauf der Kinetik auf, bei welchem die durchschnittliche γ H2AX-Foci-Anzahl während der ersten zwei bis vier Stunden der Behandlung anstieg und sich anschließend wieder reduzierte. Dieses Verhalten ist mit der Wirkungsweise von CPT zu erklären. Da Topoisomerasen hauptsächlich an aktiven Replikationsgabeln für die Entspiralisierung der DNA-Duplex bei Torsionsstress verantwortlich sind (Pommier 2009), jedoch davon auszugehen ist, dass bei den eingesetzten CPT-Dosen nicht alle Topoisomerasen gleichzeitig inhibiert werden, kommt es während der gesamten S-Phase immer wieder zu einem Aufeinandertreffen von Replikationsgabeln mit CPT-induzierten SSBs bzw. CPT-DNA-TOP1-Komplexen und damit zur Ausbildung von DSBs und γ H2AX-Foci. Vergleichbar mit einer MMS-Behandlung führt eine CPT-Dauerbehandlung somit zu charakteristischen Kinetiken, welche verdeutlichen, dass Zellen während der S-Phase CPT- und MMS-induzierte DSBs ausbilden und diese erst zu späteren Stadien der S-Phase oder nach abgeschlossener Replikation reparieren. In der vorliegenden Arbeit sollte nun ein direkter Zusammenhang zwischen der Induktion von DSBs mit der Aufenthaltsdauer und Replikationsaktivität von Zellen in der S-Phase hergestellt werden.

4.1.2 Limitierungen der einstündigen Markierung von S-Phase-Zellen mittels EdU

Eine einstündige Pulsmarkierung von Zellen mit EdU während der Behandlung mit CPT oder MMS ermöglichte es, geschädigte S-Phase-Zellen bis zu 20 Stunden nach der Markierung zu analysieren. Innerhalb der EdU-markierten S-Phase-Population konnte jedoch eine große Varianz der Anzahl an γ H2AX-Foci nach einer Behandlung von Zellen mit CPT oder MMS ermittelt werden, welche sich vor allem zu späten Zeitpunkten manifestierte. Diese Varianz der γ H2AX-Foci-Anzahl wurde auf einen unterschiedlichen Replikationsfortschritt von Zellen innerhalb der S-Phase zurückgeführt. Dabei konnte

zunächst davon ausgegangen werden, dass Zellen, die zum Beginn der EdU- und CPT- bzw. MMS-Behandlung bereits einen Großteil der DNA repliziert hatten, weniger geschädigt wurden, als Zellen, welche am Anfang der Replikation standen. Da in beiden Fällen jedoch eine komplette Stunde EdU von Zellen eingebaut wurde, war eine Differenzierung von unterschiedlichen Stadien innerhalb der S-Phase nicht möglich. In einem kombinierten *Life cell*/ γ H2AX-Foci-Ansatz wurde deshalb ein Zusammenhang zwischen der Induktion an DSBs mittels γ H2AX-Foci-Analyse und der Aufenthaltsdauer von Zellen in der S-Phase mittels *Life cell*-Mikroskopie untersucht.

4.1.3 Zusammenhang von γ H2AX-Foci-Anzahl und Zellzyklusstatus innerhalb der S-Phase

Durch die Anwendung eines kombinierten *Life cell*/ γ H2AX-Foci-Ansatzes war es möglich die Anzahl von γ H2AX-Foci in Zellen zu bestimmen, die zuvor über 6 Stunden mittels *Life cell*-Mikroskopie verfolgt wurden. Dies erlaubte es, die DNA-schädigende Wirkung von CPT in Abhängigkeit des Zellzyklusstatus zu untersuchen. Um den Zeitpunkt des Beginns und des Endes der Replikation ermitteln zu können, wurden mit LIG1dsRed stabil-transfizierte U2OS-Zellen verwendet. Diese Zellen weisen in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus ein pan-nukleäres, rot-fluoreszierendes Signal auf, während sie in der S-Phase ein charakteristisches, Foci-ähnliches Muster zeigen. Durch die Verfolgung dieser Zellen mittels *Life cell*-Mikroskopie konnten demnach der Eintritt von Zellen in die S-Phase als auch die Beendigung der Replikation zeitlich bestimmt und kategorisiert werden.

In Zellen, welche innerhalb des Beobachtungszeitraums in die S-Phase progressierten, konnte ein linearer Anstieg der γ H2AX-Anzahlen mit zunehmender Aufenthaltsdauer der Zellen in der S-Phase festgestellt werden. Demzufolge wurde eine Abhängigkeit von CPT-induzierten DSBs und der S-Phase-Progression postuliert. Ein direkter Zusammenhang der CPT-induzierten DSBs mit der Replikationsaktivität der Zellen konnte zunächst jedoch nicht hergestellt werden, da das LIG1-Muster nicht quantitativ bestimmt werden konnte. Um die Induktion von CPT-induzierten DSBs in eine direkte Relation zu aktiven Replikationsprozessen zu setzen, erfolgte ein Vergleich der erlangten *Life-cell*-Ergebnisse mit bereits bestehenden Studien zum Replikationsverhalten von Zellen. In Hefen konnte zunächst gezeigt werden, dass die höchste Startfrequenz von Replikationsursprüngen (engl. *replication origin firing*) in der Mitte der S-Phase auftritt (Raghuraman et al. 2001). Die Replikationsaktivität innerhalb der S-Phase ist im humanen System weniger gut erforscht (Karanam et al. 2012). Eine Gruppe von Forschern um K. Woodfine konnte jedoch zeigen, dass die Replikationsrate über einen Großteil der S-Phase (zwischen 30%- und 80%-abgeschlossener S-Phase) konstant verbleibt und somit einen linearen Verlauf aufweist, in welchem ca. 14% des Genoms in einem Intervall von einem Zehntel der S-Phase repliziert wird (Woodfine et al. 2004). Zu Beginn und am Ende der S-Phase wird vergleichsweise weniger DNA dupliziert (Abbildung 49).

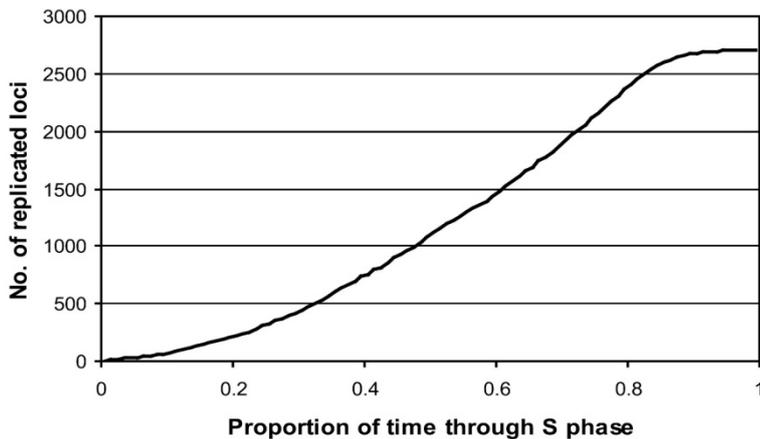


Abbildung 49: Replikationsverhalten von Zellen innerhalb der S-Phase

Die S-Phase wurde anhand eines S:G1-Verhältnisses in zeitliche Intervalle eingeteilt (X-Achse), wobei der Wert 0 einen prozentualen Anteil von 0% und der Wert 1 einen Anteil von 100% an abgeschlossener Replikation repräsentiert. Die Zahl an Replikationsloci (Y-Achse) gibt Auskunft über die Anzahl an vollständig replizierten Bereichen auf der DNA. Anhand des dargestellten Graphen kann somit die Replikationsverhalten innerhalb der S-Phase abgelesen werden (Woodfine et al. 2004).

Die in den *Life cell*-Studien ermittelte, lineare Zunahme an γ H2AX-Foci sowohl von unbehandelten als auch von CPT-behandelten Zellen in Abhängigkeit von der Verweildauer in der S-Phase kann zum großen Teil mit einer linearen, zellulären Replikationsrate, die von K. Woodfine beschrieben wurde, korreliert werden. Unter Berücksichtigung des in Abbildung 49 dargestellten Replikationsverhaltens humaner Zellen kann davon ausgegangen werden, dass während der ersten drei Stunden der S-Phase die Replikationsrate etwas niedriger ist als in den darauf folgenden drei Stunden, in welchen die Replikationsrate relativ konstant bleibt. Der lineare Anstieg an γ H2AX-Foci innerhalb der ersten drei Stunden in den *Life cell*-Experimenten könnte demzufolge bedeuten, dass in der frühen S-Phase überproportional viele DSBs sowohl endogen als auch durch CPT erzeugt werden. Aufgrund der geringen Anzahl an ausgewerteten Zellen vor allem zu frühen Zeitpunkten kann jedoch nicht festgestellt werden, ob das Auftreten von γ H2AX-Foci während der ersten Stunden linear verläuft, oder der Replikationsrate aus Abbildung 49 gleicht. Die beobachtete lineare Zunahme an γ H2AX-Foci zwischen 3 und 6 Stunden nach Beginn der Replikation stimmt jedoch mit der von K. Woodfine beschriebenen Replikationsaktivität von Zellen in der Mitte der S-Phase überein, und weist somit auf eine direkte Abhängigkeit der durch CPT-induzierten DSBs von der Replikationsaktivität von Zellen hin. Allerdings muss in den Ergebnissen der *Life cell*-Studien zur Induktion von CPT-induzierten DSBs berücksichtigt werden, dass während des 6-stündigen Analysezeitraums bereits DSBs repariert werden können. Dieser Reparatur während der S-Phase ist jedoch eine untergeordnete Rolle zuzuschreiben, da HR-defiziente Zellen, welche CPT- und MMS-induzierte DSBs nicht reparieren können keine deutlich erhöhten γ H2AX-Foci-Maxima in den erstellten Reparatur-Kinetiken aufwiesen. Sollten HR-profiziente Zellen bereits während der S-Phase einen erheblichen Teil von CPT- oder MMS-induzierten DSBs reparieren, so sollte ein geringeres Maximum an induzierten γ H2AX-Foci zu detektieren sein. Trotzdem kann die in den *Life cell*-Studien ermittelte Anzahl an CPT-induzierten γ H2AX-Foci vor allem zu späten Zeiten etwas unter der tatsächlich induzierten Gesamtanzahl liegen, da eine geringe Reparatur CPT-induzierter DSBs während des Analysezeitraums nicht ausgeschlossen werden kann. Übergreifend kann die ermittelte, zeitliche Zunahme von CPT-induzierten DSBs in der S-Phase mit dem für humane Zellen beschriebenen Replikationsverhalten korreliert werden.

Unbehandelte Zellen zeigten zu frühen Zeitpunkten, unter Berücksichtigung der geringen Replikationsaktivität zum Beginn der S-Phase, relativ hohe γ H2AX-Foci-Werte. Unbehandelte G1-Phase-Zellen anderer Zelllinien weisen in der Regel 0 bis 1 γ H2AX-Foci auf. Die verwendete U2OS-LIG1-Zelllinie zeigte jedoch auch in G1-Phase-Zellen bereits eine erhöhte Anzahl von durchschnittlich 1 bis 3 γ H2AX-

Foci, sodass die hohen γ H2AX-Foci-Werte zu frühen Zeitpunkten der S-Phase durch ein hohes spontan-Level erklärt werden kann.

Zellen, welche bereits bei Beginn der Analyse anhand des LIG1-Musters der S-Phase zugeschrieben werden konnten und während des gesamten Beobachtungszeitraums von 6 Stunden diese nicht verließen, wurden in einer Kategorie >360 Minuten zusammengefasst. Demnach wurden in dieser Gruppe auch Zellen analysiert, welche sich bereits einige Stunden vor Beginn der Beobachtung in der S-Phase befanden. Die durchschnittliche Anzahl an γ H2AX-Foci in der CPT-behandelten Zellpopulation betrug durchschnittlich über 60 γ H2AX-Foci pro Zelle. Bei einem Vergleich der γ H2AX-Foci-Werte der *Life cell*/ γ H2AX-Foci-Analyse mit der Anzahl an ermittelten γ H2AX-Foci-Werten der Immunfluoreszenz-Kinetiken fiel auf, dass sich die Maximalwerte der ermittelten γ H2AX-Foci sowie der Zeitpunkt des Erreichens dieser Maxima voneinander unterschied. Während in den Kinetiken das Maximum an γ H2AX-Foci nach einer 10nM CPT-Dauerbehandlung mit 55 γ H2AX-Foci bereits nach zwei bis vier Stunden erreicht wurde, zeigten die U2OS-Zellen in den *Life cell*-Experimenten erst nach 6 Stunden ihr Maximum an ausgebildeten DSBs. Ein grundsätzlich unterschiedliches Verhalten in der Ausbildung und Reparatur von γ H2AX-Foci zwischen den verschiedenen Zelllinien A549 und U2OS-LIG1dsRed konnte ausgeschlossen werden, da sowohl die Anzahlen endogener als auch CPT-induzierter γ H2AX-Foci zum Großteil miteinander übereinstimmten. Die Unterschiede zwischen den erlangten γ H2AX-Foci-Werten konnten vielmehr mit der Auswertung verschiedener Zellpopulationen in den beiden Ansätzen erklärt werden. In den Ansätzen zur Erstellung der Kinetiken wurden Zellen für eine Stunde mit EdU markiert und anschließend zu unterschiedlichen Zeiten analysiert. Somit flossen auch Zellen mit in die Auswertung ein, welche kurze Zeit nach der EdU-Markierung die S-Phase bereits abgeschlossen hatten und dementsprechend wenige DSBs durch die CPT-Behandlung ausbildeten. Demzufolge wurde die maximale Anzahl an CPT-induzierten DSBs durch die Einbeziehung minder geschädigter Zellen in den Kinetiken reduziert, während in den *Life cell*-Studien ausschließlich definierte Zellpopulationen analysiert wurden, welche sich zum Zeitpunkt der Fixierung noch innerhalb der S-Phase befanden und stetig CPT-induzierte DSBs ausbildeten. Mit zunehmender Zeit stieg in den Immunfluoreszenz-Kinetiken jedoch der Anteil von Zellen, welche bereits einen Teil der induzierten DSBs reparieren konnten, sodass hier das Maximum an γ H2AX-Foci früher erreicht wurde als in den *Life cell*-Studien.

Zusammenfassend konnte durch die Kombination aus *Life cell*- und γ H2AX-Foci-Analyse sowie einem Vergleich der erlangten Ergebnisse mit bestehenden Studien zum Replikationsverhalten humaner Zellen der indirekte Nachweis geliefert werden, dass CPT-induzierte DNA-Schäden in proportionaler Abhängigkeit von aktiven Replikationsprozessen ausgebildet werden.

4.2 Die Reparatur MMS- und CPT-induzierter DSBs erfolgt HR-abhängig und NHEJ-unabhängig

Für die Reparatur von DSBs stehen einer Zelle hauptsächlich das NHEJ und die HR zur Verfügung. Um Aufschluss über die Reparaturmechanismen von CPT- und MMS-induzierten DSBs zu erhalten, wurden γ H2AX-Foci-Kinetiken in NHEJ- und HR-supprimierten Zellen angefertigt. Für eine effektive Suppression des NHEJs wurden die für diesen Reparaturweg essentiellen Faktoren KU80 sowie DNA-PKcs in einem Kombinationsansatz mittels SiRNA supprimiert. Die HR wurde durch die Transfektion von Zellen mittels RAD51-SiRNA inhibiert. Die erstellten γ H2AX-Foci-Kinetiken ermöglichten die Analyse des

Reparaturverhaltens von CPT- und MMS-geschädigten Zellen über einen Zeitraum von 20 Stunden, bevor sich die EdU-markierten Zellen mehrheitlich teilten und aufgrund des verminderten DNA/DSB-Gehalts nicht mehr analysiert wurden. 20 Stunden nach der einstündigen EdU-Markierung war eine Analyse von unbehandelten Zellen nicht mehr möglich, da zu diesem Zeitpunkt alle EdU-positiven Zellen in die Mitose und darüber hinaus progressiert waren. Diese Beobachtung ließ bereits eine CPT- und MMS-bedingte Arretierung von Zellen in der S- oder G2-Phase vermuten und führte später zu der umfangreichen Analyse des Zellzyklusverhaltens CPT- und MMS-behandelter Zellen.

Ein deutlicher Reparaturdefekt war sowohl nach einer CPT- als auch MMS-Behandlung ausschließlich in RAD51-supprimierten Zellen zu detektieren. Nachdem zwischen zwei und vier Stunden ein Maximum an γ H2AX-Foci erreicht wurde, persistierten die ermittelten γ H2AX-Foci-Werte über den gesamten Analysezeitraum bis zu 20 Stunden auf einem hohen Level. Hieraus konnte eine deutliche Abhängigkeit der CPT- und MMS-induzierten DSBs von der Reparatur durch die HR abgeleitet werden. Da sich die detektierten γ H2AX-Foci-Level RAD51-profizienter und -defizienter Zellen zu frühen Zeitpunkten nicht voneinander unterschieden, konnte davon ausgegangen werden, dass die Ausbildung von γ H2AX-Foci unabhängig von RAD51 stattfindet. Eine selektive Auswahl von RAD51-depletierten Zellen konnte durch die gleichzeitige Analyse von γ H2AX-Foci und RAD51-Foci gewährleistet werden, wobei γ H2AX-Foci ausschließlich in RAD51-Foci-negativen Zellen ausgewertet wurden. Das bereits beobachtete, langsame Verschwinden der γ H2AX-Foci nach einer CPT-Dauer- oder MMS-Behandlung in den γ H2AX-Foci-Kinetiken bildete erste Hinweise darauf, dass die Reparatur dieser DNA-Schäden mehr Zeit in Anspruch nimmt, als beispielsweise strahleninduzierte DSBs in der G1- oder G2-Phase, welche hauptsächlich durch den Reparaturmechanismus des NHEJ repariert werden (Lobrich and Jeggo 2005). Da die HR als die langsame Komponente der DSB-Reparatur beschrieben wurde (Beucher et al. 2009), konnte der langsame Abfall der γ H2AX-Foci-Werte nach einer CPT- oder MMS-Behandlung auf eine Reparatur mittels HR hindeuten. Sowohl für CPT- als auch für MMS-induzierte DSBs wurde die HR bereits als vorherrschender Reparaturweg beschrieben (Dasika et al. 1999, Tomicic and Kaina 2013). So konnte nach einer MMS-Behandlung von HR-defizienten Zellen vor allem ein geringeres Zellüberleben festgestellt werden (Lundin et al. 2005, Smiraldi et al. 2005, Hinz et al. 2006). Eine HR-Abhängigkeit von CPT-induzierten DNA-Schäden konnte ebenfalls durch umfangreiche Studien mit HR-defizienten Zellen gezeigt werden, welche die Ergebnisse dieser Arbeit bekräftigen. So führten Defizienzen wichtiger HR-Faktoren wie BRCA2, CtIP, RAD54 oder XRCC3 zu einer Hypersensitivität gegenüber CPT (Hinz et al. 2003, Marple et al. 2006, Nakamura et al. 2010). Der Großteil dieser Publikationen bezog sich dabei auf die CPT- und MMS-Sensitivität von proliferierenden Zellpopulationen, ohne dabei unterschiedliche Zellzyklusphasen differenziert zu analysieren. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode der γ H2AX-Foci-Analyse ermöglichte jedoch im Gegensatz zu den aufgeführten Studien eine zellzyklusspezifische Bewertung des Reparaturverhaltens unter Verwendung von sehr niedrigen Konzentrationen der Agenzien CPT und MMS, und konnte so mittels zellzyklusspezifischer Analysen eine HR-Abhängigkeit von in der S-Phase erzeugten DSBs belegen.

Ein Reparaturdefekt in NHEJ-supprimierten Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden, da die Kinetiken KU80- und DNA-PKcs-supprimierter Zellen den Kinetiken von Kontroll-SiRNA-transfizierten Zellen glichen. Dies steht jedoch zunächst im Widerspruch zu Studien, welche sowohl für CPT als auch für MMS eine Empfindlichkeit von Zellen auf diese beiden Agenzien beschrieben haben. Dabei ist jedoch festzuhalten, dass auch hier die Sensitivität von NHEJ-defizienten Zellen deutlich schwächer ausgeprägt war als in HR-defizienten Zellen. In Studien konnte nach einer MMS-

Behandlung ein schlechteres Überleben von Zellen festgestellt werden, welche eine Defizienz in den NHEJ-Faktoren KU80 und DNA-PKcs aufwiesen (Lundin et al. 2005, Nikolova et al. 2010). Demzufolge war zunächst ein Einfluss von Faktoren des NHEJs an der Reparatur MMS-induzierter DNA-Schäden nicht auszuschließen. Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch, dass die in der S-Phase entstandenen DSBs komplett NHEJ-unabhängig repariert werden, da NHEJ-defiziente Zellen keinen Reparaturdefekt nach einer CPT- oder MMS-Behandlung aufwiesen. Mit steigender MMS-Konzentration ist es jedoch möglich, dass auch in der G1- und G2-Phase DSBs entstehen, indem zwei SSBs auf gegenüberliegenden DNA-Strängen erzeugt werden, die temporär durch die BER induziert wurden (Nikolova et al. 2010). Eine Reparatur dieser DSBs über den Weg des NHEJ erscheint in der G1- oder G2-Phase plausibel und kann für ein schlechteres Überleben NHEJ-defizienter Zellen nach einer MMS-Behandlung verantwortlich sein. Eine MMS-abhängige Induktion dieser Ereignisse ist in der S-Phase ebenfalls vorstellbar. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen jedoch darauf hin, dass diese Schäden, falls vorhanden, ebenfalls durch den Prozess der HR repariert werden.

Ebenso wurden Studien veröffentlicht, welche für eine Sensitivität von NHEJ-defizienten Zellen gegenüber CPT sprechen. So wurde für humane Zellen, in welchen KU70 oder DNA-PKcs mittels RNA-Interferenz supprimiert wurde, eine niedrigere Proliferations- und erhöhte Apoptoserate nach einer Behandlung mit dem CPT-Derivat TPT beschrieben (Tian et al. 2007). Desweiteren konnten Überlebensstudien zeigen, dass XRCC4-defiziente Zellen ein verringertes Überleben nach einer CPT-Behandlung aufwiesen (Katsube et al. 2011). Diese Sensitivität ist jedoch nicht auf die verminderte Reparaturkapazität von replikationsassoziierten DSBs zurückzuführen, sondern wahrscheinlich auf eine Aktivität der Topoisomerase 1 während der Transkription von Genen. Studien konnten zeigen, dass TOP1 auch während der Transkription eine wichtige Rolle spielt, um Torsionsstress der DNA aufzuheben (Zhang et al. 1988, Durand-Dubief et al. 2011). So konnte eine inhibierende Wirkung von hohen Konzentration an CPT auf die Transkription beobachtet werden (Leppard and Champoux 2005, Pommier et al. 2006). Demzufolge können hohe Dosen von CPT DNA-Schäden in der G1- und G2-Phase induzieren und so eine Sensitivität von NHEJ-defizienten Zellen gegenüber CPT erklären. Da in der vorliegenden Arbeit vorrangig die Reparatur von CPT-induzierten, replikationsassoziierten DNA-Schäden analysiert wurde und die verwendeten CPT-Konzentrationen die Transkription nicht beeinträchtigen sollten, ist die beobachtete NHEJ-unabhängige Reparatur der induzierten DNA-Schäden plausibel.

Die Reparatur ein-endiger DSBs ohne zweites DSB-Ende bedingt eine Reparatur über den HR-Weg, da für eine direkte Verknüpfung durch das NHEJ ein zweites DSB-Ende fehlt. Für die Reparatur replikationsabhängiger ein-endiger DSBs ist die Verwendung des NHEJ nur dann möglich, wenn ein zweites, „freies“ DNA-Ende eines anderen DSBs in räumlicher Nähe verfügbar ist. Werden DSB-Enden verschiedener DSBs miteinander verknüpft, so können diese *end joining*-Prozesse in einer Ausbildung von Chromosomenaberrationen, welche unter anderem Fusionen verschiedener Chromatiden, Inversionen, Deletionen und weitere Translokationen darstellen, resultieren (Bogomazova et al. 2011). Neuere Studien zeigten jedoch noch einen weiteren Weg, über den während der Replikation Substrate für NHEJ-Prozesse geschaffen werden könnten. Mittels des Ansatzes des sogenannten *Fiber assays* und einer Behandlung von Zellen mit HU wurde zunächst beobachtet, dass ein Großteil der kollabierten Replikationsgabeln nach einer andauernden HU-Behandlung den Replikationsprozess nicht wieder aufnimmt, was infolge einer Reparatur mittels der BIR zu erwarten gewesen wäre. Stattdessen konnte eine vermehrte Initiierung neuer RFs in räumlicher Nähe zu kollabierten RFs festgestellt werden (Petermann et

al. 2010). Durch die Replikation einer neuen RF bis zu dem Punkt der kollabierten RF könnte theoretisch ein zweites ein-endiges DSB-Ende geschaffen werden, was die Reparatur über den Weg der HR oder des NHEJs ermöglichen würde (Petermann et al. 2010) (Abbildung 50). Sollte dieser Prozess auch nach einer CPT- oder MMS-Behandlung stattfinden, so konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch kein Hinweis auf eine Beteiligung des NHEJs an der Reparatur solcher replikationsinduzierten, zwei-endigen DSBs festgestellt werden. Dies kann womöglich an einer starken Resektion von ein-endigen DSBs liegen, welchen zum Zeitpunkt ihrer Entstehung kein zweites Bruchende zur Verfügung steht. Das KU70/KU80-Heterodimer stellt den initialen Faktor des NHEJs dar und lagert sich innerhalb weniger Sekunden an die doppelsträngigen Enden von DSBs an (Uematsu et al. 2007). Es konnte zwar eine Bindung von KU70/KU80 an kurze, einzelsträngige Überhänge beobachtet werden (Weterings and Chen 2008), die HR-vermittelte Resektion eines DSB-Endes umfasst jedoch einen wesentlich größeren Bereich der DNA (Mimitou and Symington 2009). Es kann davon ausgegangen werden, dass bevor ein zweites DSB-Ende durch die Initiierung einer neuen, benachbarten Replikationsgabel erzeugt wird, das bereits bestehende DSB-Ende resektiert wird, um die Reparatur durch HR-Prozesse zu ermöglichen. Diese Theorie steht ebenfalls mit Studien von Bunting et al. in Einklang, welche zeigen konnten, dass NHEJ-Prozesse an replikationsassoziierten DSBs unterdrückt werden, um somit die entstandenen Läsionen der HR zuzuführen (Bunting et al. 2010).

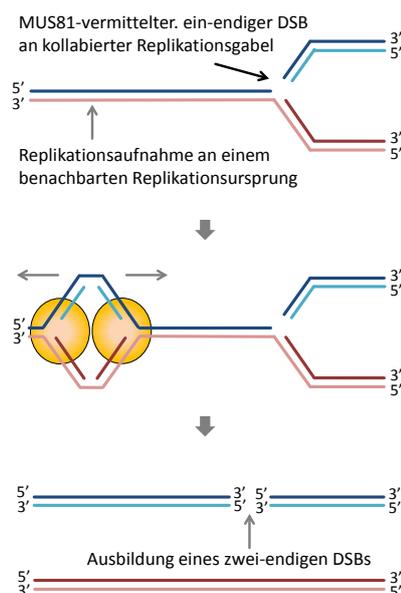


Abbildung 50: Modell zur Entstehung zwei-endiger DSBs in der S-Phase

In Studien mit HU konnte gezeigt werden, dass nach einer andauernden HU-Behandlung von Zellen vermehrt kollabierte Replikationsgabeln entstehen, welche durch MUS81 prozessiert werden, was zu ein-endigen DSB führt. Jedoch konnte hierbei keine Reinitiiierung direkt an den kollabierten Replikationsgabeln festgestellt werden, was durch Prozesse wie der BIR ermöglicht wird. Vielmehr konnte eine Initiierung neuer Replikationsgabeln in räumlicher Nähe zu den erzeugten, ein-endigen DSBs beobachtet werden. Durch das Aufeinandertreffen dieser neuen Replikationsgabeln mit den kollabierten Replikationsgabeln ist eine Ausbildung zwei-endiger, replikationsassoziiierter DSBs möglich (Petermann et al. 2010).

Demzufolge sprechen die in der vorliegenden Arbeit erlangten Ergebnisse dafür, dass die Reparatur selbst unter der möglichen Ausbildung eines zwei-endigen DSBs nicht vom NHEJ abhängig ist, sondern ausschließlich durch die HR bewerkstelligt wird.

4.2.1 CPT und MMS führen zur massiven Ausbildung von SCEs

Die Analyse von Schwesterchromatidaustauschen ist eine bewährte Methode, um homologe Rekombinationsereignisse nachzuweisen (Sonoda et al. 1999, Natarajan and Palitti 2008). In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb die Anzahl an SCEs in CPT- und MMS-behandelten Zellen ermittelt werden, um

einerseits die HR-abhängige Reparatur der induzierten DSBs mit einer weiteren Methode zu bestätigen und zum anderen Rückschlüsse auf die Häufigkeit von SCEs bei der Reparatur replikationsassoziiierter DSBs ziehen zu können. Für die Analyse von SCEs wurden Zellen für zwei Zellzyklen mit dem Thymidinanalogon BrdU inkubiert, wobei die Auswirkung von CPT und MMS in mitotischen Zellen analysiert wurde, welche in der zweiten S-Phase unter dem Einfluss dieser beiden Agenzien standen. Dabei ist zu beachten, dass auch während der ersten S-Phase zusätzliche, endogene Rekombinationsereignisse auftreten können, welche mit in die Auswertung eingehen (Abbildung 51).

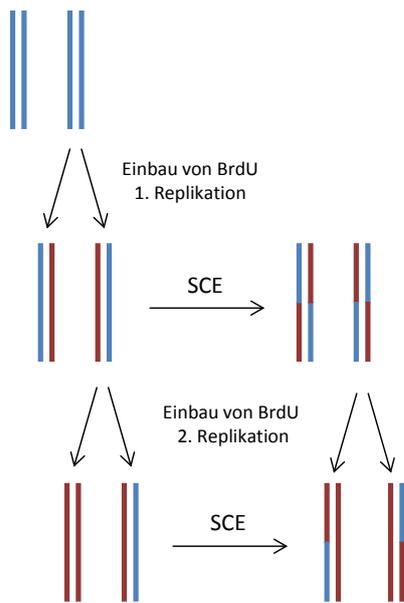


Abbildung 51: Detektion von Schwesterchromatidaustauschen

SCEs stellen eine Folge von homologen Rekombinationsereignissen zwischen Schwesterchromatiden dar. Diese können durch den Einbau von BrdU, welches während der Replikation anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird, sichtbar gemacht werden. Wird BrdU über zwei Zellzyklen hinweg in die DNA inkorporiert, so können anschließend doppelt-substituierte (zwei rote Balken) von einfach-substituierten Chromatiden (ein roter und ein blauer Balken) durch den Intensitätsunterschied eines DNA-Farbstoffs unterschieden werden. Findet während eines HR-Ereignisses ein Austausch von Schwesterchromatiden statt, so führt dies in der Auswertung zu einem reziproken Farbwechsel der beiden Chromatiden. Zu beachten ist, dass auch SCEs während des ersten Zellzyklus mit dieser Methode detektiert werden können, sodass die Anzahl an Ereignissen aus zwei Zellzyklen analysiert wird.

Unbehandelte HeLa-Zellen zeigten in den SCE-Studien eine durchschnittliche Anzahl von ~7 endogenen SCEs. Es ist somit davon auszugehen, dass in zwei Zellzyklen etwa 7 Rekombinationsereignisse stattfinden die so aufgelöst werden, dass es zu der Ausbildung eines SCEs führt. Diese Anzahl an spontanen SCEs korreliert mit Ergebnissen bereits publizierter Studien (Vilenchik and Knudson 2003, Conrad et al. 2011). Die Anzahl aller Rekombinationsereignisse ist jedoch wesentlich höher einzuschätzen, da die vorherrschenden Mechanismen zur Auflösung von doppelten Hollidaystrukturen nicht zu einer Ausbildung von SCEs führen (siehe 1.3.2.3). Eine Suppression von RAD51 mittels SiRNA führte in unbehandelten Zellen nicht zu einer Reduktion dieser endogenen SCEs. Dies könnte durch die verminderte Suppression der HR innerhalb der ersten Stunden der Experimente zu erklären sein. Wie aus Abbildung 51 ersichtlich wird, können SCEs auch bereits während der ersten S-Phase stattfinden und bei der Analyse nach der zweiten S-Phase detektiert werden. Da SiRNA post-transkriptionell wirkt, dauert es je nach Halbwertszeit der zu regulierenden Proteine einige Stunden, bis sich die Suppression eines Proteins auf die Zelle auswirkt. In der Regel sind deutlich verminderte Proteinlevel 48 bis 72 Stunden nach der Transfektion mittels Si-RNA zu erkennen. Deshalb ist davon auszugehen, dass Zellen innerhalb des ersten Zellzyklus noch RAD51-vermittelte SCEs ausbilden konnten. Außerdem erfolgte wahrscheinlich keine komplette Depletion des RAD51-Pools, da auch nach einer CPT- oder MMS-Behandlung die SCE-Rate von RAD51-supprimierten Zellen nicht auf ein Hintergrundlevel reduziert werden konnte.

Da sowohl in den zytogenetischen Ansätzen als auch durchflusszytometrischen Analysen dieser Arbeit keine spezifische Auswahl von RAD51-depletierten Zellen möglich war, wurde die Depletionseffizienz der verwendeten RAD51-SiRNA in relevanten Zellsystemen getestet. Hierbei konnte mittels Westernblotanalyse eine durch SiRNA verminderte RAD51-Expression von mindestens 60 bis 80% ermittelt werden. Eine Depletionseffizienz von 60 bis 80 % kann sich jedoch sehr unterschiedlich auf zelluläre Prozesse auswirken, je nachdem welches Protein supprimiert wird. So kann bei einigen Proteinen eine geringe Suppression bereits ausreichen, um die Funktionalität einzuschränken, wohingegen selbst geringe Mengen anderer Proteine noch ausreichen können, um alle nötigen Funktion aufrechtzuerhalten. Der geringe Effekt der RAD51-Suppression in unbehandelten Zellen der SCE-Experimente ist somit zum einen auf die geringe Suppression innerhalb des Anfangszeitraums der Experimente als auch auf die Restaktivität der verbliebenen RAD51-Proteine nach der Suppression mittels SiRNA zurückzuführen.

Durch eine Behandlung von Zellen mit 10nM CPT oder 1,5mM MMS konnte eine erstaunlich hohe Anzahl an SCEs induziert werden. Durch die Suppression von RAD51 mittels SiRNA konnte diese Anzahl deutlich reduziert werden, was eindeutig eine Abhängigkeit der CPT- und MMS-induzierten DNA-Schäden von der Reparatur durch die HR belegt. Als interessant erwies sich dabei einerseits die erhöhte Anzahl an CPT-induzierten SCEs im Vergleich zu MMS-induzierten HR-Ereignissen und andererseits die hohen Gesamtanzahlen an SCEs nach einer CPT- oder MMS-Behandlung.

Vergleicht man zunächst die induzierten γ H2AX-Foci-Werte der Kinetiken miteinander, so stellt sich heraus, dass durch eine Behandlung mit 1,5mM MMS mehr γ H2AX-Foci induziert werden als durch eine 10nM CPT-Behandlung. Bei Verwendung gleicher Dosen konnten jedoch nach einer CPT-Behandlung mehr SCEs nachgewiesen werden als nach einer MMS-Behandlung. Es stellte sich somit die Frage warum CPT zwar weniger γ H2AX-Foci, jedoch mehr SCEs als MMS erzeugte. Hierzu ist zunächst festzuhalten, dass in den γ H2AX-Foci-Analysen eine heterogene S-Phase Population analysiert wurde, da die einstündige EdU-Behandlung alle Zellen unterschiedlicher S-Phase-Stadien markierte. In den SCE-Studien wurden hingegen lediglich Zellen ausgewertet, welche zu einem definierten Zeitpunkt die Mitose erreichten. In den *Life cell*-Studien konnte gezeigt werden, dass die CPT-induzierte Anzahl von DSBs mit der Aufenthaltsdauer von Zellen in der S-Phase zunimmt. Unter dem Einfluss von CPT kann somit davon ausgegangen werden, dass Zellen, welche nach Behandlungsbeginn gerade in die S-Phase progressierten, am stärksten in der S-Phase-Progression gestört wurden, wohingegen Zellen, die bereits bei Behandlungsbeginn die Hälfte ihrer DNA repliziert hatten weniger verlangsamt wurden und Zellen welche erst nach fast vollständiger Replikation unter dem Einfluss von CPT standen kaum eine Verzögerung aufwiesen. Demzufolge progressierten stärker-geschädigte Zellen wesentlich später in die Mitose als schwach-geschädigte Zellen. Zu dem bereits vorhandenen Fortschritt in der Zellzyklusprogression von späten S-Phase-Zellen im Vergleich zu frühen S-Phase-Zellen addierte sich noch eine Verlangsamung der Zellzyklusprogression aufgrund der induzierten DNA-Schäden. In den durchflusszytometrischen Analysen konnte bestätigt werden, dass die Zellzyklusprogression von 1,5mM MMS-behandelten Zellen stärker durch die Behandlung verzögert wurde, als jene von 10nM CPT-behandelten Zellen. Für die SCE-Studien wurden jedoch sowohl CPT- als auch MMS-behandelte Zellen zum gleichen Zeitpunkt nach Beginn der Behandlung analysiert. Die unterschiedlichen SCE-Raten sind somit auf unterschiedliche Zellpopulationen zurückzuführen, die zum gleichen Zeitpunkt fixiert wurden. Während nach einer CPT-Behandlung 14 bis 17 Stunden nach Beginn der Behandlung Zellen analysiert wurden, welche wahrscheinlich eine komplette S-Phase durchlaufen hatten und dem-

zufolge das Maximum an induzierbaren DSBs und SCEs ausgebildet hatten, wurde zum gleichen Zeitpunkt nach einer MMS-Behandlung eine Population analysiert, die wesentlich weniger DSBs und SCEs ausbilden konnte. Für einen idealen Vergleich der beiden Agenzien hätte ein späterer Zeitpunkt für die Analyse von MMS-behandelten Zellen gewählt werden müssen, um auch hier das Maximum an induzierten DSBs sowie SCEs in Zellen analysieren zu können, welche die komplette S-Phase unter dem Einfluss von MMS standen. Folglich wäre auch ein früherer Analysezeitpunkt der CPT-behandelten Zellen oder eine Anpassung der CPT- und MMS-Dosen möglich gewesen, um vergleichbare Werte zu erzielen. Anhand dieser Analyse wird deutlich, welches großes Augenmerk auf die Wahl der zu analysierenden Zellpopulation gelegt werden muss, um die erhaltenen Daten spezifisch miteinander vergleichen zu können. In zytogenetischen Studien, welche die Auswirkung von zellzyklusspezifisch wirkenden Noxen beurteilen sollen, ist deshalb eine genaue Analyse des Zellzyklusverhaltens von Zellen unabdingbar.

Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass MMS und CPT eine bestimmte Anzahl von SCEs induzieren, welche im Verhältnis zur induzierten Anzahl an DSBs steht. Die zweite Beobachtung betraf die Korrelation der verhältnismäßig hohen Gesamtanzahl an induzierten SCEs mit den vergleichsweise niedrigen γ H2AX-Foci-Werten. Unter Berücksichtigung der seltenen Ausbildung von SCEs ließ die hohe Anzahl an SCEs lediglich den Schluss zu, dass auch γ H2AX-Foci-unabhängige CPT- und MMS-induzierte DNA-Schäden zur Ausbildung von SCEs beitrugen.

4.2.2 MMS und CPT erzeugen Strukturen, welche zu SCEs jedoch nicht zu γ H2AX-Foci führen

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte von über 50 CPT- und MMS-induzierten SCEs konnten nicht mit den beobachteten, niedrigeren γ H2AX-Foci-Anzahlen korreliert werden, weshalb überprüft wurde, ob es γ H2AX-negative Strukturen gibt, welche HR-abhängig prozessiert werden und somit zur Ausbildung von SCEs beitragen. Hierzu wurden Zellen verwendet, welche einen Defekt in der Basenexzisionsreparatur besitzen und aufgrund einer Defizienz der Methylpurin-Glycosylase (AAG) methylierte Basen nicht entfernen können. In den Zellen werden folglich nach einer MMS-Behandlung wesentlich weniger SSBs erzeugt, welche mit Replikationsgabeln interferieren können. Somit kommt es zu einer verringerten Induktion von MMS-induzierten DSBs. Eine reduzierte Ausbildung von γ H2AX-Foci nach einer MMS-Behandlung konnte bereits in noch unveröffentlichten Studien der Arbeitsgruppe Löbrich gezeigt werden (mündliche Mitteilung Dr. Michael Ensminger). Um nun eine Entkopplung der Erzeugung von SCEs von der Ausbildung an γ H2AX-Foci nachzuweisen, wurde die Ausbildung von SCEs in AAG-defizienten Zellen nach einer MMS-Behandlung untersucht. Sollten nach einer MMS-Behandlung SCEs auftreten, so stellten diese einen starken Hinweis auf γ H2AX-unabhängige HR-Ereignisse dar, da nach gleicher MMS-Behandlung keine erhöhten γ H2AX-Foci-Level detektiert werden konnten.

Unbehandelte Wildtyp (WT)- sowie AAG-defiziente Zellen wiesen durchschnittlich 10 bis 13 SCEs auf, was mit ermittelten Daten muriner Zellen anderer Studien in Einklang steht (Ju et al. 2013). Eine Suppression von RAD51 mittels SiRNA erbrachte in beiden Zelllinien keine Reduktion der spontanen SCEs-Raten, was analog zu den Studien in humanen Zellen mit einer verminderten RAD51-Suppression innerhalb des ersten Tages nach der SiRNA-Transfektion sowie einer Aktivität von verbliebenen RAD51-Proteinen erklärt werden kann. Durch eine Behandlung mit 0,5mM oder 1mM MMS

ließen sich sowohl in WT- als auch in AAG-defizienten Zellen SCEs induzieren. Dabei konnten nach einer 1mM MMS-Behandlung sogar deutlich mehr SCEs in AAG-defizienten Zellen festgestellt werden als in WT-Zellen. Durch eine Suppression von RAD51 mittels siRNA ließen sich diese Ereignisse reduzieren. Dieses Ergebnis lässt zusammen mit den bestehenden γ H2AX-Daten in AAG-defizienten Zellen darauf schließen, dass MMS DNA-Läsionen erzeugt, welche nicht zu γ H2AX-Foci jedoch zu SCEs führen können. Die Ausbildung dieser γ H2AX-unabhängigen SCEs ist ebenso RAD51-abhängig wie die HR-vermittelte Reparatur γ H2AX-positiver DSBs, sodass vermutet werden kann, dass bei diesem Prozess zwischenzeitlich ähnliche Strukturen entstehen, welche auch bei der HR auftauchen.

Es ist davon auszugehen, dass eine Vielzahl an MMS-induzierten Methylierungen zu Komplikationen während der Replikation der DNA führt, wobei die replikationsblockierende Läsion hauptsächlich N3meA darstellt (Larson et al. 1985, Groth et al. 2010). Dabei werden Strukturen erzeugt, welche keine freiliegenden DSBs darstellen, da γ H2AX-Foci zumindest in AAG-defizienten Zellen nicht durch MMS induziert werden. Diese Strukturen erfordern allerdings eine HR-abhängige Reparatur, die zu Crossover-Produkten führen kann, was durch die RAD51-Abhängigkeit dieser SCEs gezeigt werden konnte. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Studien von P. Groth et al., welche zeigen konnten, dass methylierte DNA zu einer physikalischen Replikationsblockade führt, welche unabhängig von einer DNA-Schadensantwort stattfinden kann (Groth et al. 2010). Dabei wurde mit steigender MMS-Konzentration eine verminderte Elongation an Replikationsgabeln beobachtet. Da gezeigt wurde, dass arretierte Replikationsgabeln potentiell zu der Ausbildung von *chicken foot*-Strukturen führen können (Bugreev et al. 2011) und diese bei Ihrer Auflösung zur Ausbildung von SCEs beitragen, sollte eine Zunahme an Methylierungen zu mehr SCEs führen. Mit diesem Modell ist auch das erhöhte SCE-Level von AAG-defizienten Zellen im Vergleich zu WT-Zellen zu erklären. Da AAG-defiziente Zellen nicht in der Lage sind methylierte Basen zu entfernen, werden diese nach einer MMS-Behandlung massiv akkumuliert, wodurch es zu einer verstärkten Blockade von Replikationsgabeln an methylierten Basen kommt. Die starke Erhöhung der SCE-Rate von AAG-defizienten Zellen nach einer 1mM MMS-Behandlung lässt darauf schließen, dass mit steigender MMS-Dosis γ H2AX-Foci-negative „Läsionen“ wie *chicken foot*-Strukturen sogar vermehrt zur Ausbildung von SCEs beitragen.

Einen ersten Hinweis darauf, dass die Anzahl an replikationsassoziierten, SCE-induzierenden Strukturen höher liegen muss als das durchschnittliche γ H2AX-Foci-Level von unbehandelten Zellen in der S-Phase, gaben bereits Studien mit BLM-defizienten Zellen. M. Vilenchik und G. Knudson nahmen dabei in ihren Studien an, dass Zellen von Patienten mit dem Bloom's Syndrom einen besseren Aufschluss über die spontane Anzahl an DSBs pro Zellzyklus geben könnten. Unbehandelte BLM-Zellen weisen bereits eine stark erhöhte, endogene Rate an SCEs auf. Da davon ausgegangen wird, dass eine Hauptfunktion des BLM-Proteins in der Prozessierung von DNA-Strukturen an arretierten und kollabierten Replikationsgabeln sowie bei der Auflösung von dHJ liegt und so zur Vermeidung von SCEs beiträgt, sollten die SCE-Raten in BLM-defizienten Zellen eine bessere Näherung der Anzahl an endogenen DSBs liefern, die in der S-Phase über den HR-Weg repariert werden (Vilenchik and Knudson 2003). Voraussetzung hierfür ist natürlich, dass ein BLM-Defekt keinen Einfluss auf die Ausbildung von DSBs besitzt. So vermuteten Vilenchik und Knudson, dass BLM-defiziente Zellen, welche unbehandelt ~50 SCEs pro Zellzyklus zeigen, mindestens 50 endogene DSBs in jedem Zellzyklus ausbilden müssen (Vilenchik and Knudson 2003). Da jedoch selbst bei einer BLM-Defizienz nur ein Teil der DSBs durch den Prozess der *Resolution* zur Ausbildung von SCEs führt, müsste ein Vielfaches der beobachteten DSBs vorhanden sein, um die massive Ausbildung von SCEs erklären zu können. Selbst BLM-Zellen, in

welchen SCEs häufiger auftauchen, müssten demnach mehrere hundert DSBs pro Zellzyklus ausbilden, um eine Anzahl von 50 SCEs erklären zu können. Eine starke Erhöhung von DSB-Leveln konnte jedoch in BLM defizienten Zellen nicht festgestellt werden (Rao et al. 2005, Lahkim Bennani-Belhaj et al. 2010). Demzufolge ist von einem Modell auszugehen, bei welchem auch in BLM-Zellen replikationsabhängig Strukturen entstehen, welche keine „freien“ DSBs darstellen, die jedoch einer Reparatur über den HR-Weg bedürfen um aufgelöst zu werden und somit zu SCEs führen können.

Für MMS wurde demzufolge anhand der Studien mit AAG-defizienten Zellen gezeigt, dass durch eine Behandlung DNA-Strukturen erzeugt werden, welche keine γ H2AX-Foci ausbilden, wohl aber zur Ausbildung von SCEs führen können. Da in der vorliegenden Arbeit eine ähnliche Relation zwischen γ H2AX-Foci-Level und SCE-Raten nach einer CPT-Behandlung festgestellt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass auch CPT zu replikationsabhängigen Strukturen führt, welche kein γ H2AX-Signal induzieren und dennoch HR-abhängig repariert werden und damit SCEs ausbilden können. Sowohl für MMS- als auch für CPT-induzierte, γ H2AX-negative Strukturen stellen arretierte Replikationsgabeln, welche nicht direkt re-initiiert werden können, eine plausible Erklärung für die erhöhten SCE-Raten im Vergleich zu den ermittelten γ H2AX-Foci-Leveln dar. Diese arretierten Replikationsgabeln können zu *chicken-foot*-Strukturen konvertiert werden.

Ausgehend von einer *chicken-foot*-Struktur wird es einer Zelle ermöglicht die Replikation durch die Ausbildung einer dHJ wieder aufzunehmen. Die Idee einer dHJ-vermittelten Re-Initiierung an einer arretierten Replikationsgabel ohne Ausbildung eines DSBs konnte hauptsächlich durch die Notwendigkeit von RAD51 jedoch nicht von MUS81 bei der Reparatur solcher Strukturen hergeleitet werden (Petermann and Helleday 2010). Dabei wird RAD51 zwingend für die Ausbildung einer dHJ benötigt, wohingegen MUS81 bei der Reparatur arretierter Replikationsgabeln durch die gezielte Induktion eines ein-endigen DSBs gebraucht wird, um die BIR zu initiieren. In Studien mit HU konnte gezeigt werden, dass ein RAD51-abhängiger Neustart von kurzzeitig arretierten Replikationsgabeln (2h) möglich ist, jedoch nicht nach langen Zeiten einer HU-Behandlung (24h) (Petermann et al. 2010). Demzufolge ist aufgrund der hohen SCE-Raten nach einer MMS-Behandlung davon auszugehen, dass infolge der zahlreichen Methylierungen eine Vielzahl an arretierten Replikationsgabeln entsteht, welche nicht zu ein-endigen DSBs und somit zur Ausbildung von γ H2AX-Foci führt, sondern die Ausbildung von *chicken foot*-Strukturen und deren Auflösung mittels RAD51 fördert. Für CPT ist ein ähnlicher Mechanismus vorstellbar. Das klassische Modell CPT-induzierter DNA-Schäden ist die Ausbildung von ein-endigen DSBs durch den Mechanismus des *replication fork run off* (Pommier 2006), welcher hauptsächlich die BIR initiiert. In den vorliegenden Studien konnten jedoch, ähnlich zu einer MMS-Behandlung, wesentlich mehr RAD51-abhängige SCEs als γ H2AX-Foci beobachtet werden, sodass auch hier ein HR-Prozess postuliert werden muss, welcher nicht auf die Induktion von ein-endigen DSBs zurückzuführen ist. Neben dem Modell des *replication fork run off* müsste somit nach einer CPT-Behandlung ebenfalls ein Arretieren von Replikationsgabeln angenommen werden, welches über die Ausbildung von *chicken foot*-Strukturen zu einer Re-Initiierung des Replikationsprozess durch einen HR-abhängigen Mechanismus führt. In Studien mit Hefen konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter Torsionsstress vor aktiven Replikationsgabeln nach Inhibition der Topoisomerase 1 besteht (Koster et al. 2007). Neuere Studien konnten mit der sensitiven Methode des *fiber assays* eine Verlangsamung und Arretierung von Replikationsgabeln nach einer CPT-Behandlung zeigen. Hierbei wurde eine deutlich verminderte Progression einzelner Replikationsgabeln nach einer Behandlung von Zellen mit 25nM CPT festgestellt (Chaudhuri et al. 2012). In derselben Studie konnte gezeigt werden, dass nach

einer Behandlung mit 25nM CPT ca. 25 bis 40% aller aktiven Replikationsgabeln zu *chicken foot*-Strukturen führen, was einer Anzahl von 1000 bis 5000 Replikationsgabeln entspricht (Chaudhuri et al. 2012). Wenn diese Strukturen HR-abhängig aufgelöst werden, bildet dies einen guten Ansatz zur Erklärung der hohen Anzahl an SCEs im Vergleich zu CPT-induzierten γ H2AX-Foci. Es ist somit davon auszugehen, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendete CPT-Konzentration von 10nM zur Ausbildung von mehreren hundert *chicken foot*-Strukturen führt. Demzufolge ist eine Ausbildung von SCEs durch die Auflösung γ H2AX-negativer *chicken foot*-Strukturen nach einer Behandlung mit CPT plausibel.

Zusammenfassend führen sowohl CPT als auch MMS im Zuge der Replikation einerseits zu DSBs, welche durch γ H2AX-Foci detektiert werden können, und andererseits durch das Arretieren von Replikationsgabeln zu Strukturen, welche womöglich *chicken foot*-Strukturen darstellen und keine γ H2AX-Foci ausbilden, jedoch durch HR-vermittelte Prozesse ebenso wie DSBs zu SCEs führen können. Die Anzahl dieser γ H2AX-negativen Strukturen, welche zur Entstehung von SCEs beitragen, scheint nach einer 10nM CPT-Behandlung sowie einer 1,5mM MMS-Behandlung vergleichbar zu sein.

4.3 Zusammenhang von Zellzyklusprogression und Reparatur CPT- und MMS-induzierter DNA-Schäden

Nachdem in der vorliegenden Arbeit zunächst aufgezeigt wurde wie CPT- und MMS-induzierte DSBs induziert und repariert werden, bestand ein primäres Ziel der Studien in der Beantwortung der Frage wann die induzierten DSBs in Abhängigkeit der Zellzyklusprogression repariert werden.

4.3.1 Der Großteil CPT-induzierter DSBs wird nach weitgehend abgeschlossener S-Phase repariert

Innerhalb der S-Phase konnte sowohl in den γ H2AX-Kinetiken als auch in den *Life cell*-Studien keine Reduktion der Anzahl an γ H2AX-Foci beobachtet werden. Deshalb wurden für die Analyse der Reparatur CPT-induzierter DSBs γ H2AX-Foci in Zellen analysiert, welche die Replikation größtenteils abgeschlossen hatten. Hierzu dienten Zellen, die während des 6-stündigen Analysezeitraums der *Life cell*-Studien das S-Phase-typische LIG1-Signal verloren hatten. Je nach Zeitpunkt des Verlusts des LIG1-Signals vor der Fixierung der Zellen konnte das Ende der Replikation zeitlich festgehalten werden und γ H2AX-Foci-Anzahlen pro Zelle bestimmt werden. In diesen Analysen konnte erstaunlicherweise festgestellt werden, dass der Großteil an CPT-induzierten sowie endogen-entstandenen γ H2AX-Foci auch noch nach weitgehend abgeschlossener Replikation persistiert. Die γ H2AX-Foci-Werte von CPT-behandelten Zellen, welche innerhalb einer Stunde vor der Fixierung die Replikation beendet hatten, lagen ca. 10 Foci unterhalb des Wertes von Zellen, die während des gesamten Analysezeitraums der S-Phase zugeschrieben werden konnten. Dies ließ zunächst eine Reparatur von CPT-induzierten DSBs innerhalb der späten S-Phase vermuten. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass die Zellen, welche innerhalb einer Stunde vor der Fixierung die Replikation abgeschlossen hatten zum Zeitpunkt der CPT-Behandlung wahrscheinlich bereits in der Mitte der S-Phase lokalisiert waren. Aufgrund einer 10- bis 14-stündigen S-Phase standen die Zellen somit erst unter dem Einfluss von CPT, als bereits über 50% der Replikation stattgefunden hatte. Aus Abbildung 49 wird erkenntlich, dass die Replikationsrate zum Ende der S-Phase abnimmt. Die Zellpopulation, welche während des gesamten Beobachtungszeitraums

in der S-Phase verblieb beinhaltete jedoch Zellen, die wahrscheinlich eine durchweg konstante und erhöhte Replikationsrate aufwiesen und deshalb mehr CPT-induzierte γ H2AX-Foci ausbilden konnten. Demzufolge bildeten Zellen, welche erst kurz vor der Fixierung die Replikation vollendeten, insgesamt weniger DSBs aus. Desweiteren beinhaltet der γ H2AX-Foci-Wert zum Zeitpunkt 0-60 Minuten potentiell Zellen, welche die Replikation bereits seit 60 Minuten abgeschlossen hatten. Diese Zellen konnten zum einen bereits einige der induzierten DNA-Schäden reparieren und standen außerdem nur für ca. 5 Stunden unter dem Einfluss von CPT. Somit kann der Unterschied der CPT-induzierten γ H2AX-Foci-Werte zwischen Zellen, welche gerade die Replikation beendet haben, und Zellen, die sich den kompletten Analysezeitraum in der S-Phase befanden, sowohl auf bereits stattgefundene Reparaturprozesse nach weitgehend abgeschlossener Replikation als auch auf eine verminderte Induktion von DSBs zurückgeführt werden und muss nicht zwingend auf eine Reparatur von CPT-induzierten DSBs innerhalb der S-Phase hindeuten.

Eine eindeutige Abnahme der γ H2AX-Foci-Anzahl konnte erst nach Verlust des S-Phase-typischen LIG1-Musters beobachtet werden. 4 bis 5 Stunden nach dem Verschwinden des LIG1-Musters konnten keine CPT-induzierten γ H2AX-Foci mehr detektiert werden. Die Anzahl an endogen-erzeugten γ H2AX-Foci nahm ebenfalls erst nach Verlust des LIG1 ab und erreichte 5 bis 6 Stunden nach abgeschlossener Replikation ein Minimum von 8 Foci. Einen wichtigen Aspekt, welcher bei der Auswertung der γ H2AX-Foci-Anzahlen nach Verschwinden des LIG1-Signals beachtet werden muss, stellt die Aufenthaltsdauer von Zellen in der S-Phase dar. Auch wenn CPT durch eine Dauerbehandlung eine kontinuierliche Ausbildung von DSBs in der S-Phase gewährleisten konnte, so wurden Zellen, die bereits kurz nach Behandlungsbeginn aus der S-Phase in die G2-Phase progressierten und demzufolge im Zeitintervall 330 – 360 Minuten analysiert wurden, verhältnismäßig wenig geschädigt. Die niedrige Anzahl an γ H2AX-Foci zu späteren Zeitpunkten kann somit hauptsächlich auf zwei Erklärungen zurückgeführt werden. Zum einen hatten die Zellen nach Abschluss der Replikation wesentlich mehr Zeit die CPT-induzierten DNA-Schäden innerhalb des 6-stündigen Versuchszeitraums zu reparieren und zum anderen wurden vergleichsweise wenige DSBs induziert, da sich die Zellen wesentlich kürzer in der S-Phase aufhielten. Zusätzlich führte die niedrigere Replikationsaktivität von Zellen in der späten S-Phase zu einer verminderten Ausbildung von replikationsassoziierten DSBs. Demzufolge kann aufgrund der *Life cell* Ergebnisse zum Verschwinden der CPT-induzierten γ H2AX Foci kein Rückschluss auf die Geschwindigkeit der Reparatur gezogen werden.

Aufgrund der hohen Anzahl an CPT-induzierten γ H2AX-Foci direkt nach Verschwinden des LIG1-Signals ist jedoch von einer Reparatur S-Phase-induzierter DSBs nach weitgehender Vollendung der Replikation auszugehen. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit Studien von G. Karras und S. Jentsch, welche zeigen konnten, dass die Reparatur von replikationsassoziierten DNA-Schäden in Eukaryoten erst postreplikativ stattfindet. Hierbei fanden sie unter anderem heraus, dass die TLS nicht zwingend zur Überwindung einer Replikationsblockade an arretierte Replikationsgabeln innerhalb der S-Phase dient, sondern vielmehr „hinter“ Replikationsgabeln, und sogar außerhalb der S-Phase operiert (Karras and Jentsch 2010). Dabei wurde ein Model beschrieben, in dem Replikationsgabeln direkt hinter einer DNA-Läsion neu gestartet werden, um so die Replikation zunächst vollenden zu können (Karras and Jentsch 2010). Demzufolge könnte eine Zelle zunächst die Replikation an unbeschädigten Bereichen beenden, bevor die Reparatur an arretierten und kollabierten Replikationsgabeln sowie von replikationsassoziierten DSBs stattfindet.

Um eine mögliche Replikationsaktivität von Zellen nach Verschwinden des S-Phase-typischen LIG1-Musters auszuschließen, wurde Zellen in einigen *Life cell*-Ansätzen 10 Minuten vor der Fixierung EdU hinzugefügt. In Zellen, welche das LIG1-Muster innerhalb der letzten halben Stunde vor der Fixierung verloren, konnte keine EdU-Inkorporation beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies spricht dafür, dass nach dem Verlust des LIG1-Musters keine Replikation mehr stattfand oder, falls EdU eingebaut wurde, dass das hiervon emittierte Signal unterhalb der Detektionsgrenzen lag. In Zellen, die zum Zeitpunkt der Fixierung noch in der S-Phase waren und deshalb ein LIG1-Muster aufwiesen, korrelierte das EdU-Signal mit dem LIG1-Signal. Dies spricht für die spezifische Markierung von aktiven Replikationsprozessen mit Hilfe des LIG1-Signals.

Eine Kolokalisation von γ H2AX-Foci mit dem LIG1-Muster konnte nicht beobachtet werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Analyse des kombinierten *Life cell*-/ γ H2AX-Foci-Ansatzes in fixierten Proben nach Beendigung des 6-stündigen Beobachtungszeitraums stattfand. Demnach wurden durch das LIG1-Muster ausschließlich die Orte der Replikation markiert, welche zum Zeitpunkt der Fixierung aktiv waren. Die detektierten γ H2AX-Foci konnten jedoch während des gesamten Analysezeitraums oder sogar zuvor in der S-Phase entstanden sein, da γ H2AX-Foci, je nach Geschwindigkeit der Reparatur, über einen Zeitraum von mehreren Stunden persistieren können (Lobrich et al. 2010). Die Replikation hingegen wurde an anderen Stellen des Genoms während des Analysezeitraums fortgesetzt, sodass in fixierten Zellen das LIG1-Muster unabhängig von γ H2AX-Foci lokalisiert sein konnte. Hierbei kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Replikationsprozesse in geringem Ausmaß an Stellen im Genom stattfinden, die aufgrund der Detektionsgrenze anhand des LIG1-Signals nicht erfasst werden können. Demzufolge ist es möglich, dass Reparatur- oder Replikationsereignisse an CPT- oder MMS-induzierten DSBs nicht mit einem LIG1- oder EdU-Signal korrelieren.

Anhand der *Life cell*-Daten konnte somit geschlussfolgert werden, dass ein großer Teil CPT-induzierter DSBs erst nach weitgehend abgeschlossener Replikation repariert wird, wobei anhand eines LIG1-Musters nicht unterschieden werden kann, ob sich Zellen in der G2-Phase oder einer sehr späten S-Phase befinden, in welcher die komplette DNA, bis auf die geschädigten Bereiche repliziert vorliegt.

4.3.2 CPT- und MMS-induzierte DSBs werden pre-mitotisch repariert

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Großteil an CPT- und MMS-induzierten DSBs erst repariert wird, nachdem der Großteil der DNA repliziert wurde, sollte untersucht werden, ob Zellen mit erhöhten DSB-Level in die Mitose progressieren. Hierzu wurden in mitotischen Zellen sowohl γ H2AX-Foci per Immunfluoreszenz als auch Chromatidbrüche durch zytogenetischen Studien analysiert. Für die Analyse wurde Zellen, welche in der S-Phase durch CPT oder MMS geschädigt wurden, zunächst ausreichend Zeit gegeben in die Mitose zu progressieren. In den Immunfluoreszenzstudien wurde dabei ein Analysezeitpunkt von 16 Stunden nach einer Behandlung mit CPT oder MMS gewählt. Für zytogenetische Studien wurden mitotische Zellen 14 bis 17 Stunden nach einer Behandlung durch die Gabe von Colcemid akkumuliert und anschließend fixiert. Unter Berücksichtigung der durchflusszytometrischen Analysen des Zellzyklusverhaltens nach einer 10nM CPT-Dauerbehandlung sowie einer 1,5mM MMS-Behandlung wird deutlich, dass zu diesen Zeitpunkten bereits 40% der markierten S-Phase-Population in die G1-Phase progressiert waren. Aufgrund des durch die *Life cell*-Studien hergestellten Zusammenhangs zwischen zellulärer Aufenthaltsdauer in der S-Phase unter Einfluss von CPT bzw. MMS und der Ausbildung von DSBs kann davon ausgegangen werden, dass die bereits in die G1-Phase

progressierten Zellen ehemalige S-Phasen darstellen, welche zum Zeitpunkt des Behandlungsbeginns bereits in einem späten Stadium der S-Phase waren. Demzufolge wurden in einem Untersuchungszeitraum von 14 bis 17 Stunden Zellen aus der zytogenetischen Analyse ausgeschlossen, welche aufgrund kurzer Aufenthaltsdauer in der S-Phase weniger Schäden ausbildeten. Dieser späte Analysezeitpunkt konnte somit sicherstellen, dass nicht gänzlich unterschiedliche S-Phase-Populationen nach einer CPT- oder MMS-Behandlung untersucht wurden. In beiden Ansätzen wurden somit sowohl nach einer CPT als auch nach einer MMS-Behandlung zum großen Teil Zellen ausgewertet, welche bei Beginn der Behandlung in der Mitte der S-Phase oder in einem früheren Zellzyklusstadium-Stadium vorlagen. Befanden sich Zellen zu Beginn der CPT- oder MMS-Behandlung in der G1-Phase und progressierten während des 16- oder 17-stündigen Versuchs-Zeitraums durch die S-Phase in die Mitose, so konnte davon ausgegangen werden, dass diese Zellen ein Maximum an induzierten DNA-Schäden aufwiesen. Bei einer MMS-Behandlung war jedoch zu berücksichtigen, dass der Versuchs-Zeitraum nicht zu lange gewählt werden durfte, da die MMS-Behandlung in Form eines einstündigen Pulses stattfand. Bei Zellen, welche einige Stunden nach der einstündigen Pulsbehandlung noch in der G1-Phase verblieben und erst anschließend in die S-Phase progressierten, kann angenommen werden, dass diese Zellen weniger MMS-induzierte Läsionen in der S-Phase ausbildeten, da in der G1-Phase Zeit bestand die durch MMS-induzierten Methylierungen zu beheben, bevor diese in der S-Phase zu DSBs führen konnten.

Interessanterweise führten sowohl Behandlungen mit CPT als auch mit MMS zu keinen erhöhten γ H2AX-Foci-Werten und nur geringen Chromatidbruchlevel in der Mitose, obwohl in der S-Phase eine beträchtliche Anzahl an DSBs erzeugt wurde. Selbst nach einer Induktion von knapp 80 γ H2AX-Foci durch die Behandlung von Zellen mit 20nM CPT konnten keine erhöhten Foci-Level in der Mitose detektiert werden. Zusammen mit der Beobachtung, dass die meisten CPT- und MMS-induzierten DSBs auch nach weitgehend abgeschlossener Replikation persistieren, kann demnach angenommen werden, dass die induzierten Schäden in einer sehr späten S- oder der G2-Phase vollständig repariert werden. Die Experimente belegen demzufolge, dass ausschließlich Zellen die Mitose erreichen, welche sämtliche CPT- und MMS-induzierten DSBs vollständig repariert haben.

Das Ergebnis, dass CPT- und MMS-behandelte Zellen kaum erhöhte Raten an Chromatidbrüchen in der Mitose aufwiesen, stellte einen Widerspruch zu vielen Studien aus der Vergangenheit dar, welche sowohl CPT als auch MMS als starke Klastogene beschrieben (Lynch et al. 2008). Als Klastogene werden Stoffe bezeichnet, welche dazu in der Lage sind Chromosomenbrüche zu induzieren (Raszewski 2007). Diese Eigenschaft von CPT und MMS konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit zunächst nicht bestätigt werden. Es konnte zwar eine geringe Erhöhung von Chromatidbrüchen nach einer CPT- oder MMS-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellendetektiert werden, diese wurde jedoch als vergleichsweise gering eingestuft. Allerdings muss an diesem Punkt herausgestellt werden, dass selbst geringste Anzahlen von chromosomalen Aberrationen schwerwiegende Auswirkungen für eine Zelle haben können. Ein einziger DSB kann in der Mitose zum Verlust von DNA und somit zu funktionalen Störungen einer Zelle oder gar zum Zelltod führen (Durante et al. 2013). Desweiteren ist zu bemerken, dass in der vorliegenden Arbeit ausschließlich chromosomale Aberrationen analysiert wurden, welche in der ersten Mitose nach einer CPT- oder MMS-Behandlung vorhanden waren. Es ist nicht auszuschließen, dass in weiteren Zellzyklusstadien, bei erhöhten Konzentrationen der verwendeten Agenzien oder bei längerer Behandlungsdauer vermehrt chromosomale Aberrationen nach einer CPT- oder MMS-Behandlung auftreten. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und den verwendeten Dosen

der Agenzien ist jedoch davon auszugehen, dass Zellen die größte Anzahl an induzierten DNA-Schäden durch erfolgreiche Reparaturprozesse bewältigen und durch zellzyklusregulierende Mechanismen die in der S-Phase induzierten DSBs noch vor der Mitose erfolgreich reparieren können.

4.3.3 Aufgaben von RAD51 und Checkpoints nach einer CPT- oder MMS-Behandlung

Nach einer Schädigung von S-Phase-Zellen durch eine CPT- oder MMS-Behandlung kann aufgrund der niedrigen, mitotischen DSB-Level von einem hocheffizienten Mechanismus ausgegangen werden, welcher Zellen mit DNA-Schäden von der Progression in die Mitose abhält. Dem gegenüber konnte von D. Deckbar et al. gezeigt werden, dass in der G2-Phase geschädigte Zellen mit stark erhöhten DSB-Level in die Mitose progressieren (Deckbar et al. 2007). Dabei wurden G2-Phase-Zellen mit Röntgenstrahlen geschädigt und anschließend eine frühzeitige Aufhebung des G2/M-Checkpoints beobachtet, obwohl Zellen noch ca. 20 γ H2AX-Foci aufwiesen. Nach einer Bestrahlung von G2-Phase-Zellen mit ionisierender Strahlung kann der G2/M-Checkpoint somit als ineffizient beschrieben werden. Um in der vorliegenden Arbeit eine Beteiligung des G2/M-Checkpoints an der zellulären Schadensantwort nach einer Induktion von DNA-Läsion mittels CPT oder MMS zu untersuchen, wurde dieser durch eine zusätzliche Behandlung von Zellen mit Koffein drei Stunden vor der Fixierung inhibiert. Selbst unter G2/M-Checkpoint-defizienten Konditionen konnten jedoch in der vorliegenden Arbeit kaum erhöhte Schadenswerte in Form von γ H2AX-Foci oder Chromatidbrüchen beobachtet werden. Es handelt sich somit um einen G2/M-Checkpoint-unabhängigen Mechanismus, welcher CPT- und MMS-geschädigt Zellen an der Progression mit unreparierten DSBs in die Mitose hindert.

Um die Auswirkung von Intra-S-Phase-Checkpoints auf die Zellzyklusprogression geschädigter Zellen zu untersuchen, wurde in zytogenetischen Ansätzen außerdem eine Koffein-Behandlung seit Beginn des Versuchs-Zeitraums von 17 Stunden angewandt, um CPT- und MMS-induzierte Checkpoint-Signale bereits seit Behandlungsbeginn in der S-Phase zu unterbinden. Unter diesen Bedingungen konnte lediglich eine geringfügige Erhöhung der Chromatidbruchlevel sowohl in RAD51-profizienten als auch RAD51-defizienten Zellen im Vergleich zur drei-stündigen Koffein-Behandlung beobachtet werden. Demzufolge dienen Intra-S-Phase-Checkpoints nicht zur Reduktion der Klastogenität von CPT und MMS.

Bei der Analyse RAD51-defizienter Zellen konnte beobachtet werden, dass eine alleinige Suppression von RAD51 einen vergleichsweise geringen Einfluss auf die γ H2AX-Foci-Level oder Chromatidbruchraten in der Mitose besaß. Dieses Ergebnis war zunächst verwunderlich, da HR-defiziente Zellen in der Literatur als hoch empfindlich gegenüber CPT und MMS beschrieben sowie hohe Anzahlen an chromosomalen Aberrationen beobachtet wurden (Andersson and Kihlman 1992, Nikolova et al. 2010). So wurde beschrieben, dass vertebrale Zellen bei Suppression von Rad51 hohe Zahlen an chromosomalen Aberrationen akkumulieren und aufhören sich zu teilen (Sonoda et al. 1998). Rad51-defiziente Mausezellen sind zudem als embryonal letal beschrieben worden (Tsuzuki et al. 1996). In einem Analysezeitraum von bis zu 17h nach einer Behandlung von RAD51-defizienten Zellen mit 10nM CPT oder 1,5mM MMS konnten lediglich leicht erhöhte γ H2AX-Foci-Level und Chromatidbruchraten detektiert werden. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen stellt ein durchschnittliches Auftreten von knapp zwei Chromatidbrüchen in RAD51-defizienten Zellen nach einer CPT- oder MMS-Behandlung jedoch einen hohen Wert dar, sodass von einer Klastogenität der beiden Agenzien in RAD51-defizienten Zellen gesprochen werden kann, zumal davon ausgegangen werden muss, dass mittels SiRNA lediglich eine Supprimie-

rung und nicht eine komplette Deletion von RAD51 stattgefunden hat. Durch eine zusätzliche Behandlung von Zellen mit Koffein konnte jedoch eine vielfache Steigerung der Klastogenität von CPT und MMS beobachtet werden. Da dies jedoch erst in der Kombination aus RAD51-Defizienz und Aufhebung des G2/M-Checkpoints beobachtet werden konnte, kann eine Funktion von RAD51 postuliert werden, welche es verhindert, dass CPT- oder MMS-geschädigte S-Phase-Zellen in die G2-Phase progressieren.

Um das für RAD51-postulierte Modell zu bestätigen, in welchem das Protein dafür sorgt, dass CPT- oder MMS-geschädigte S-Phase-Zellen noch vor der G2-Phase arretiert werden, wurden Analysen in frühzeitig-kondensierten G2-Phase-Chromosomen durchgeführt. Durch eine frühzeitige Chromosomenkondensation konnten CPT- und MMS-geschädigte S-Phase-Zellen 13 Stunden später in der G2-Phase spezifisch analysiert werden. Für die Analyse von G2-Phase-Chromosomen wurden RAD51-profiziente sowie RAD51-supprimierte HeLa-Zellen 12 bis 13 Stunden nach der CPT- oder MMS-Behandlung mit Calyculin behandelt und anschließend fixiert. Aus den Durchflusszytometrie-Studien ist zu erkennen, dass 12 Stunden nach einer 10nM CPT-Behandlung sowohl unter RAD51-profizienten als auch RAD51-supprimierten Bedingungen bereits der Großteil der Zellen (ca. 60%) die Replikation weitgehend abgeschlossen hat. Die RAD51-Suppression hatte demnach keine Auswirkung auf die Zellzyklusprogression innerhalb der S-Phase, und es konnte davon ausgegangen werden, dass in den G2-PCC-Studien ähnliche Zellpopulationen von RAD51-profizienten und RAD51-defizienten Zellen analysiert wurden. Das Zellzyklusverhalten von CPT- oder MMS-behandelten Zellen zeigte nach 12 Stunden ebenfalls einen ähnlichen Anteil an RAD51-profizienten und RAD51-defizienten Zellen in der G2-Phase. Bei dem Vergleich der PCC-Studien mit den durchflusszytometrischen Analysen des Zellzyklusverhaltens ist jedoch zu berücksichtigen, dass die PCC-Analysen mit HeLa-Zellen und die Durchflusszytometrie-Studien mit A549-Zellen durchgeführt wurden. Für Chromosomenstudien wurden in der vorliegenden Arbeit HeLa-Zellen verwendet, da diese bessere Chromosomenpräparate lieferten, wohingegen A549-Zellen für Immunfluoreszenz-Analysen besser geeignet waren. A549-Zellen wiesen bei Immunfluoreszenz-Studien vor allem in der S-Phase ein geringeres Hintergrund-Signal und deutlichere Foci auf, was die Auswertung erleichterte. Gerade zu frühen Zeitpunkten nach einer CPT- oder MMS-Behandlung war eine visuelle Analyse der Foci in HeLa-Zellen aufgrund eines diffusen γ H2AX-Signals nicht möglich. Die Zellzyklusprogression dieser beiden humanen Zelllinien ist jedoch ähnlich, was einen Vergleich der dargelegten Studien ermöglicht.

Unter RAD51-profizienten Bedingungen konnten in den G2-PCC-Studien kaum erhöhte Chromatidbruchwerte nach einer CPT- oder MMS-Behandlung festgestellt werden. Von einer Arbeitsgruppe um F. Palitti konnten in menschlichen G0- und G1-Phase-Lymphozyten mittels der PPC-Technik jedoch erhöhte Bruchlevel nach einer CPT- oder MMS-Behandlung festgestellt werden. Diese wurden im Fall von MMS auf eine erhöhte Apoptoserate von behandelten Zellen und im Fall von CPT auf CPT-induzierte SSBs zurückgeführt, welche aufgrund der frühzeitigen Kondensation von G0-Phase-Zellen zu replikationsunabhängigen Chromatidbrüchen führten (Mosesso et al. 1999, Garcia et al. 2001). Für CPT-Studien wurden hierfür G0-Lymphozyten mit einer Dosis von 25 μ M CPT behandelt (Mosesso et al. 1999). Bei solch hohen Dosen (Faktor 2500x höher als die in der vorliegenden Arbeit verwendete Dosis von 10nM CPT) konnte gezeigt werden, dass CPT eine inhibierende Wirkung auf die Transkription besitzt (Pommier et al. 2006), sodass die Entstehung der von P. Mosesso et al. detektierten Chromatidbrüche auf die Wirkung von CPT auf Transkriptionsprozesse zurückzuführen sein kann. Es ist unwahrscheinlich, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendete Dosis von 10nM CPT einen Einfluss auf die Transkription in der G2-Phase besitzt, sodass in den durchgeführten PCC-Experimenten keine zu-

sätzlichen Chromatidbrüche zu erwarten sind. Garcia et al. konnten jedoch eine erhöhte Apoptoserate von ca. 10% in Zellen feststellen, welche 12 Stunden zuvor mit einer Dosis von 1,3mM MMS behandelt wurden (Garcia et al. 2001). Diese MMS-Dosis ist vergleichbar zu der in der vorliegenden Arbeit verwendeten MMS-Konzentration von 1,5mM, sodass eine erhöhte Fragmentierung von Chromosomen aufgrund apoptotischer Ereignisse sowohl in PCC als auch in anderen zytogenetischen Studien nicht ausgeschlossen werden kann. Die ermittelten γ H2AX-Foci-Daten sowie die Ergebnisse aus den zytogenetischen Experimenten lassen jedoch darauf schließen, dass apoptotischen Prozessen nur eine geringfügige Rolle zugeschrieben werden kann.

RAD51-defiziente G2-Phase-Zellen wiesen nach einer CPT- oder MMS-Behandlung ähnlich hohe Chromatidbruchlevel auf wie Zellen, die bei einer RAD51-Defizienz unter Aufhebung des G2/M-Checkpoints in die Mitose progressierten. Dieses Ergebnis stützt somit die postulierte Funktion von RAD51, welche geschädigte S-Phase Zellen an einer Progression in die G2-Phase hindert.

Der drastische Unterschied in den Chromatidbruchwerten zwischen RAD51-profizienten und -defizienten Zellen ist dabei nicht alleine durch den Reparaturdefekt RAD51-defizienter Zellen zu erklären. Sowohl die in dieser Arbeit erstellten γ H2AX-Kinetiken als auch die detektierten γ H2AX-Foci-Werte mitotischer Zellen zeigen, dass 16h nach einer CPT- oder MMS-Behandlung RAD51-defiziente Zellen unter Aufhebung des G2/M-Checkpoints doppelt so hohe DSB-Zahlen aufweisen wie RAD51-profiziente Zellen. Da die zytogenetisch-ermittelten Chromatidbruchanzahlen jedoch in RAD51-defizienten Zellen um ein Vielfaches höher liegen, muss von einem RAD51-abhängigen Mechanismus ausgegangen werden, welcher unabhängig von dem Reparaturdefekt für die massive Anzahl von detektierten DSBs in der Mitose (mit Koffein) oder der G2-Phase verantwortlich ist. Hierfür muss angenommen werden, dass bei einer RAD51-Defizienz ein wesentlich höherer Anteil an γ H2AX-postiven DSBs zu detektierbaren Chromatidbrüchen führt als in RAD51-profizienten Zellen. Dies könnte damit zu erklären sein, dass die Reparatur mittels HR ohne RAD51 bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach der Resektion eines DSBs inhibiert wird, während bei einer RAD51-Profizienz die HR korrekt ablaufen kann. γ H2AX-Foci RAD51-profizienter Zellen können demnach fortgeschrittene HR-Strukturen darstellen, die zwar noch nicht vollständig repariert vorliegen, jedoch weniger zur Ausbildung von detektierbaren Chromatidbrüchen führen.

Durchschnittlich zeigten sowohl mitotische als auch frühzeitig kondensiert G2-Phase-Zellen wesentlich weniger Chromatidbrüche im Vergleich zur Anzahl an γ H2AX-Foci in Immunfluoreszenz-Analysen. Diese Beobachtung steht jedoch in Einklang mit weiteren Studien aus der Vergangenheit, welche in mitotischen Zellen ein Verhältnis von \sim 1:10 DSBs und in frühzeitig kondensierten G2-Phase-Zellen von \sim 1:3-6 DSBs feststellen konnten (Cornforth and Bedford 1993, Deckbar et al. 2007, Lobrich et al. 2010). Warum grundsätzlich nur ein Teil der γ H2AX-markierten DSBs als Chromatidbruch sichtbar wird, konnte jedoch noch nicht herausgefunden werden.

Zusammenfassend ist demnach festzuhalten, dass frühzeitig kondensierte G2-Phase-Zellen und mitotische Zellen, bei welchen der G2/M-Checkpoint inhibiert wurde, ein vergleichbar geringes Level an CPT- und MMS-induzierten Chromatidbrüchen aufweisen. Eine RAD51-Suppression führt nach einer CPT- oder MMS-Behandlung in beiden Ansätzen jedoch zu einer massiven Zunahme an Chromatidbrüchen. Dies stärkt ein Arbeitsmodell, in welchem RAD51 für eine Checkpoint-unabhängige Arretierung von geschädigten S-Phase-Zellen vor dem Eintritt in die G2-Phase dient. Bei einer RAD51-Defizienz progressieren Zellen in die G2-Phase, in welcher die unreparierten DSBs zu Chromatidbrüchen von

frühzeitig kondensierten Chromosomen führen. Eine Aufhebung des G2/M-Checkpoints bewirkt eine Progression von Zellen mit unreparierten DSBs in die Mitose, in welcher diese ebenso in Form von Chromatidbrüchen oder als γ H2AX-Foci detektiert werden können (Abbildung 52). Die hieraus abgeleitete Funktion von RAD51, geschädigte S-Phase Zellen äußerst effektiv durch einen Checkpoint-unabhängigen Mechanismus in einer späten S-Phase zu arretieren, wohingegen bestrahlte G2-Phase-Zellen mit erhöhten DSB-Level in die Mitose progressieren, lässt darauf schließen, dass eine Zelle besser mit DNA-Schäden umgehen kann, welche in der S-Phase induziert wurden, da diese den größten Quell endogener DNA-Schäden darstellt. Somit haben sich in der Evolution vorrangig Mechanismen weiterentwickelt, welche replikationsassoziierte DSB reparieren können oder die Progression von geschädigten S-Phase-Zellen verhindern.

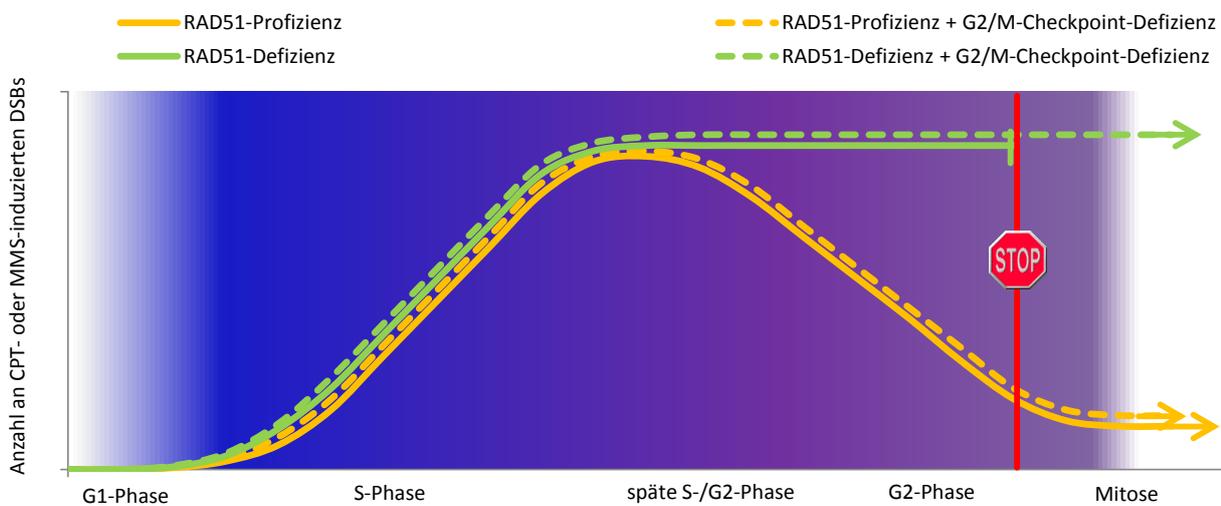


Abbildung 52: Schematische Darstellung der Zellzyklusprogression nach einer CPT- oder MMS-Behandlung

Unbehandelte Zellen weisen kurz vor der S-Phase kaum DSBs auf. Werden proliferierende Zellen mit CPT oder MMS behandelt, so werden durch die Agenzien in der S-Phase replikationsabhängige DSBs induziert. In RAD51-profizienten Zellen überwiegt gegen Ende der S-Phase die Reparatur der induzierten Schäden die Ausbildung von DSBs (gelber Graph), sodass nach weitgehend vollendeter Replikation eine Abnahme an DSBs zu beobachten ist. Eine Aufhebung des G2/M-Checkpoints (rote Linie/STOP) hat in RAD51-profizienten Zellen keinen Einfluss auf die Progression von geschädigten Zellen in die Mitose (gelber, gestrichelter Graph), da bis zu diesem Zeitpunkt bereits alle DSBs repariert wurden. RAD51-defiziente Zellen sind aufgrund des HR-Defekts nicht in der Lage CPT- oder MMS-induzierte DSBs zu reparieren. Nach abgeschlossener Replikation progressieren diese Zellen aufgrund der fehlenden, stabilisierenden Funktion von RAD51 in die G2-Phase, in welcher mittels PPC-Analysen stark erhöhte Chromatidbruchlevel ermittelt werden können. Ohne die Inhibition des G2/M-Checkpoints progressieren diese Zellen jedoch nicht mit erhöhten Chromatidbruchlevel in die Mitose (grüner Graph). Erst unter Aufhebung des G2/M-Checkpoints mittels Koffein kann eine stark erhöhte Klastogenität von CPT und MMS in der Mitose beobachtet werden (grüner, gestrichelter Graph).

Rad51 kann demzufolge eine stabilisierende Funktion von CPT- und MMS-induzierten DSBs zugeschrieben werden, welche die Progression in die G2-Phase und folglich in die Mitose verhindert. Erst kürzlich wurde eine stabilisierende Funktion von replikationsassoziierten DNA-Strukturen durch HR-Faktoren beschrieben. Mittels der Methode des *fiber-assays* konnte in Studien der Arbeitsgruppe um M. Jasin gezeigt werden, dass neusynthetisierte DNA-Bereiche nach einem Arretieren von Replikationsgabeln in Folge einer HU-Behandlung durch den MRN-Komplex degradiert werden, wenn BRCA2 nicht vorhanden ist (Schlachter et al. 2011). Die für BRCA2 in erster Linie beschriebene Funktion liegt in der Beladung von einzelsträngigen DNA-Bereichen mit RAD51, welche im Zuge der HR zuvor mit RPA

flankiert wurden. Schlacher et al. konnten eine konservierte C-terminale Domäne des BRCA2-Proteins identifizieren, welche die ausgebildeten RAD51-Nukleoproteinfilamente stabilisiert und für den Schutz der Replikationsgabeln essentiell ist. Diese Funktion von BRCA2 wird jedoch für den Prozess der Beladung von DNA mit RAD51 nicht benötigt (Schlacher et al. 2011). Für den Schutz der neusynthetisierten Bereiche vor einer Degradation scheint es jedoch wichtig zu sein, dass RAD51 an arretierten Replikationsgabeln durch BRCA2 stabilisiert wird. Eine langandauernde Arretierung von Replikationsgabeln ist im Gegensatz zu einer Behandlung von Zellen mit HU nach einer CPT- oder MMS-Behandlung jedoch nicht anzunehmen, sodass der stabilisierenden Funktion von arretierten Replikationsgabeln womöglich eine untergeordnete Rolle nach einer CPT- oder MMS-Behandlung zu Teil wird. Die in der vorliegenden Arbeit erlangten Ergebnisse lassen jedoch eine ähnliche Funktion von RAD51 an CPT- und MMS-induzierten DSBs vermuten, welche diese Schäden stabilisiert und somit Zellen in einer späten S-Phase arretiert. Daher ist es für die Zukunft höchst interessant die genaue Funktion von RAD51 an CPT- und MMS-induzierten DSBs genauer zu charakterisieren.

4.3.4 Zellzyklusprogression von CPT- oder MMS-behandelten Zellen in Abhängigkeit von Checkpoints

Für die Analyse des Zellzyklusverhaltens nach einer CPT- oder MMS-Behandlung in Abhängigkeit des RAD51-Status sowie von Checkpoints, wurden umfangreiche Durchflusszytometrie-Studien durchgeführt. Betrachtet man sich zunächst die Zellzyklusprogression unbehandelter Zellen, so ist direkt nach einer einstündigen BrdU-Inkorporation zum Zeitpunkt 0h eine Verteilung von ~90% S-Phase-Zellen, ~10% G2-Phase-Zellen und 0% G1-Phase-Zellen zu erkennen. Demzufolge kann angenommen werden, dass innerhalb der einstündigen BrdU-Pulsbehandlung bereits einige S-Phase Zellen in die G2-Phase progressieren. Da zum 0h-Zeitpunkt in der BrdU-positiven Population keine genaue Differenzierung zwischen der S- und G2-Phase getroffen werden kann, wurde die Grenze anhand der BrdU-negativen G2-Phase-Population gewählt und auf die BrdU-positive Verteilung übertragen. Für die Differenzierung zwischen früher S-Phase und G1-Phase war dies nicht notwendig, da davon ausgegangen werden konnte, dass innerhalb der einstündigen BrdU-Pulsbehandlung nicht genug Zeit für die verwendete, humane Zelllinie bestand, um von der S-Phase in die nächste G1-Phase zu progressieren.

Verfolgt man die BrdU-markierte Population von unbehandelten Zellen, so ist innerhalb von 12 Stunden eine Abnahme des S-Phase-Anteils von ~90% auf ~10% zu beobachten. Gleichzeitig ist eine Zunahme sowohl des G2-Phase-Anteils als auch des G1-Phase-Anteils zu erkennen. Der G2-Phase-Anteil steigt dabei nicht über 30%, sodass davon ausgegangen werden kann, dass unbehandelte Zellen nicht über einen längeren Zeitraum in der G2-Phase verweilen und stattdessen in die Mitose und anschließend in die G1-Phase progressieren. Vor allem zwischen 4 und 12 Stunden ist deshalb eine gleichmäßige Zunahme in der G1-Phase zu erkennen, während der Anteil an S-Phase-Zellen entsprechend schwindet. Zwischen 12 und 20 Stunden nimmt der Anteil an S-Phase Zellen wieder bis ~50% zu und der Anteil an BrdU-positiven G1-Phase-Zellen demzufolge wieder ab, was mit einer erneuten Progression von Zellen in die S-Phase zu erklären ist. Anhand dieser Zellzyklusprogression von unbehandelten Zellen kann der Einfluss einer Koffeinbehandlung sowie der S-Phase-schädigenden Agenzien CPT und MMS auf die Zellzyklusprogression analysiert werden.

Sowohl eine Behandlung von Zellen mit CPT als auch mit MMS induzierte im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine deutliche Verlangsamung der Zellzyklusprogression innerhalb der S-Phase sowie

eine Akkumulation von BrdU-positiven, geschädigten Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt. So konnte eine Verzögerung der S-Phase-Progression von 3 bis 4 Stunden innerhalb der ersten 12h nach einer 10nM CPT-Behandlung und von ~5 Stunden nach einer 1,5mM MMS-Behandlung beobachtet werden. 12h nach der BrdU-Markierung akkumulierten CPT- und MMS-behandelte Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt bis zu einem maximalen Anteil von 50% der BrdU-positiven Zellpopulation, was in einer stark verzögerten Progression von Zellen in die G1-Phase resultierte. Während sich 12h nach der BrdU-Markierung knapp 90% der unbehandelten Zellen bereits geteilt hatten, betrug der Anteil an CPT-behandelten Zellen ~30% und an MMS-behandelten Zellen ~20%. Für zytogenetische Studien wurde demzufolge nach einer CPT- oder MMS-Behandlung ein späterer Zeitpunkt als 12h gewählt, um einerseits die ersten mitotischen Zellen auszuschließen und hiermit eine repräsentativere Zellpopulation auszuwerten und zum anderen innerhalb der 3-stündigen Colcemid-Behandlung eine Akkumulation von Zellen zu erzielen. So wurde in zytogenetischen Studien ein Analysezeitpunkt von 14 bis 17 Stunden und in Immunfluoreszenz-Analysen mitotischer Zellen ein Analysezeitpunkt von 16h nach einer Behandlung gewählt, bei welchem sich sowohl nach einer CPT- als auch nach einer MMS-Behandlung gleich viele Zellen (40% der BrdU-positiven Zellpopulation) geteilt hatten.

Aufgrund der CPT- und MMS-induzierten Verzögerung der Zellzyklusprogression innerhalb der S-Phase sollte beurteilt werden, ob eine Abhängigkeit der Verlangsamung von Intra-S-Phase-Checkpoints besteht. Hierzu wurde das Zellzyklusverhalten von unbehandelten sowie CPT- oder MMS-behandelten Zellen unter der Checkpoint-inhibierenden Wirkung von Koffein beobachtet, welches seit Beginn eines Experiments zusammen mit der BrdU- und CPT- bzw. MMS-Behandlung in einer Konzentration von 2mM dem Medium hinzugefügt wurde. Der alleinige Einsatz von Koffein seit Beginn des Analysezeitraums induzierte dabei in S-Phase-Zellen eine leichte Verzögerung der Zellzyklusprogression. Neben der beschriebenen Aufhebung des G2/M-Checkpoints durch Inhibierung der Kinase ATM (Blasina et al. 1999) konnte ebenso eine inhibierende Wirkung von Koffein auf die Aktivität von ATR bestätigt werden (Lu et al. 2008). Als inhibitorische Konzentration, bei welcher noch 50% an Substrataktivität vorhanden ist (IC₅₀), konnte im Fall von ATM eine Koffein-Konzentration von 0,2mM und im Fall von ATR von 1,1mM festgestellt werden (Sarkaria et al. 1999). Da in der vorliegenden Arbeit eine Koffein-Konzentration von 2mM verwendet wurde, ist mit einer beinahe vollständigen ATM-Inhibition und einer um ~60% reduzierten ATR-Aktivität zu rechnen. Desweiteren konnte bereits in Studien von P. Groth et al. gezeigt werden, dass die S-Phase-Progression durch eine Koffein-Behandlung gestört wird und Replikationsgabeln in der S-Phase verlangsamt werden. Hierbei konnte mittels der Methode des *Fiber-Assays* eine verminderte Replikationsgeschwindigkeit von Replikationsgabeln nach einer Koffein-Behandlung festgestellt werden (Groth et al. 2010). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Verlangsamung der S-Phase-Progression nach einer Koffein-Behandlung kann somit auf die Abhängigkeit der Replikationsrate von der regulierenden ATR/CHK1-Funktion zurückgeführt werden, welche durch Koffein aufgrund der Inaktivierung von ATR gestört wird (Petermann and Caldecott 2006). Die durch Koffein induzierte Verlangsamung der S-Phase-Progression rief hierbei eine Verzögerung von maximal zwei Stunden hervor. Außerdem konnte eine Akkumulation von Koffein-behandelten Zellen in der G1-Phase beobachtet werden. Eine erneute Progression von BrdU-positiven Zellen unter dem Einfluss von Koffein in die nächste S-Phase konnte auch 20h nach der Markierung nicht beobachtet werden. Diese Beobachtung kann auf den Einfluss von Koffein auf Cyclin-abhängige Kinasen in der G1-Phase zurückgeführt werden und steht in Einklang mit Studien, welche ebenfalls einen Koffein-abhängigen Arrest in der G0- oder G1-Phase feststellen konnten (Qi et al. 2002, Hashimoto et al. 2004).

Eine Koffein-Behandlung rief in Kombination mit einer CPT- oder MMS-Behandlung ein unterschiedliches Zellzyklusverhalten innerhalb der S-Phase hervor. Während die Behandlung von Zellen mit Koffein in Kombination mit einer 10nM CPT-Behandlung die verlangsamende Wirkung von 10nM CPT komplett aufhob, konnte nach einer MMS-Behandlung kein Effekt von Koffein auf die Zellzyklusprogression innerhalb der S-Phase beobachtet werden. Die zuvor beschriebene, CPT-induzierte Verzögerung konnte nach einer zusätzlichen Behandlung von Zellen mit Koffein nicht mehr festgestellt werden, sodass sich das Zellzyklusverhalten von CPT- und Koffein-behandelten Zellen mit dem von lediglich mit Koffein-behandelten Zellen über den kompletten Analysezeitraum von 20h glich. Besonders anschaulich wird dies anhand der stark beschleunigten Progression von CPT- und Koffein-behandelten Zellen in der S-Phase und an der weiteren Progression dieser Zellen in die G1-Phase verdeutlicht. Hieraus kann geschlussfolgert werden, dass die zusätzliche Verzögerung einer CPT-Behandlung durch Checkpoints induziert wird, welche durch Koffein aufgehoben werden kann. Da Koffein in der angewendeten Dosis sowohl ATM als auch ATR inhibiert, kann davon ausgegangen werden, dass ein CHK2-vermittelter Checkpoint aufgrund der hohen Inhibition von ATM nicht einsetzen kann und durch die reduzierte Aktivität von ATR ein verminderter CHK1-vermittelter Checkpoint induziert wird. Eine Aktivierung der Checkpointkinasen CHK1 und CHK2 durch Topoisomerase 1-induzierte DNA-Schäden wurde bereits beschrieben. J. Agner et al. konnten eine schnelle Aktivierung von CHK1 und CHK2 durch eine Behandlung von Zellen mit CPT erzielen (Agner et al. 2005), was auf eine gleichzeitige Aktivierung sowohl des ATR/CHK1- als auch des ATM/CHK2-Signalwegs schließen lässt (Pommier et al. 2006). Eine Arretierung des Zellzyklus mittels Checkpoints nach einer DNA-Schädigung innerhalb der S-Phase erscheint in doppelter Hinsicht als sinnvoll, da zum einen Zeit für die Reparatur geschaffen werden kann und zum anderen die Erzeugung weiterer, replikationsabhängiger DNA-Schäden vermieden wird (Pommier et al. 2006). Im Fall von CPT ist davon auszugehen, dass eine Arretierung von Replikationsgabeln durch auftretende einzelsträngige Bereiche, welche mit RPA beladen werden, zu einer Aktivierung von ATR und CHK1 führt, wohingegen CPT-induzierte DSBs zu einer ATM-Aktivierung und CHK2-vermittelten Checkpoint-Induktion führen. Anhand der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Zellzyklusanalysen kann somit bestätigt werden, dass eine Checkpoint-abhängige Verlangsamung innerhalb der S-Phase aufgrund einer CPT-Behandlung stattfindet und mittels der ATM- und ATR-inhibierenden Wirkung von Koffein aufgehoben werden kann.

Aufgrund von Studien von A. R. Chaudhuri ist davon auszugehen, dass bei einer Konzentration von 10nM CPT hunderte Replikationsgabeln zur Ausbildung von *chicken foot*-Strukturen führen. Da A. R. Chaudhuri et al. jedoch keine DSBs nach einer Behandlung von Zellen mit 25nM CPT beobachten konnten, wurde hieraus geschlussfolgert, dass DNA-Strukturen, welche sich von DSBs unterscheiden für die Verlangsamung der Replikationsgabeln und Aktivierung von Checkpoints verantwortlich sein müssen (Chaudhuri et al. 2012). Für die Detektion von DSBs wurde allerdings die Methode einer modifizierten Pulsfeldgelelektrophorese verwendet, welche vergleichsweise insensitiv ist und erst DSB-Anzahlen größer 100 detektiert. Ein Einfluss der verhältnismäßig geringen Anzahl an DSBs auf das Arretieren von Replikationsgabeln wurde somit ausgeschlossen. Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch eine deutliche Abhängigkeit der Zellzyklusprogression von CPT-induzierten Zellzyklus-Checkpoints. Demzufolge ist davon auszugehen, dass die in der vorliegenden Arbeit detektierte Verzögerung innerhalb der S-Phase nach einer 10nM CPT-Behandlung nicht auf arretierte Replikationsgabeln, wohl aber auf Zellzykluscheckpoints zurückzuführen ist, die durch DSBs hervorgerufen werden, welche wiederum mit sensitiven Methoden wie der γ H2AX-Foci-Analyse detektiert werden konnten.

Demgegenüber steht eine Koffein-Behandlung in Kombination mit einer MMS-Behandlung, welche keinen Effekt auf die Progression von Zellen innerhalb des 20-stündigen Analysezeitraums zeigte. Koffein- und MMS-behandelte Zellen progressierten ähnlich durch den Zellzyklus wie lediglich mit MMS-behandelte Zellen. Hieraus kann eine verzögerte Zellzyklusprogression nach einer MMS-Behandlung abgeleitet werden, welche komplett entkoppelt von zellulären Zellzyklus-Checkpoints stattfindet. Dieses Ergebnis ist konsistent mit Studien von P. Groth et al., welche ebenfalls eine verminderte Replikationsrate von MMS-behandelten Zellen feststellen konnten, die nicht durch eine DNA-Schadensantwort eingeleitet wird, sondern vielmehr durch eine physikalische Blockade der Replikationsgabeln durch das Auftreten zahlreicher Methylierungen nach einer MMS-Behandlung erklärt werden konnte (Groth et al. 2010). Nach einer Behandlung mit 1,5mM MMS, welche allerdings „nur“ für 40 Minuten erfolgte, konnte dabei eine Anzahl von $1,3 \cdot 10^6$ Methylierungen pro Zelle errechnet werden (Groth et al. 2010). Diese Methylierungen können über mehrere Stunden hinweg persistieren (Osborne and Phillips 2000) und scheinen in der Lage zu sein, die Replikation deutlich zu verzögern. So konnte nach einer 40-minütigen Behandlung von Zellen mit 1,5mM MMS eine um 60% reduzierte Replikationsrate mittels des *Fiber-Assays* ermittelt werden (Groth et al. 2010). Hinsichtlich der hohen Anzahl an Methylierungen ist jedoch die Ausbildung eines DSBs ein seltenes Ereignis, sodass angenommen werden kann, dass Replikationsgabeln nur sehr selten auf temporäre SSBs treffen, welche im Zuge der BER erzeugt werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass die MMS-induzierten DSBs ebenso zu einem Checkpoint-vermittelten Zellzyklusarrest innerhalb der S-Phase führen wie es nach einer CPT-Behandlung beobachtet werden konnte. Die resultierende Checkpoint-vermittelte Verzögerung kann jedoch nach einer MMS-Behandlung mittels Durchflusszytometrie-Studien nicht beobachtet werden, da die physikalische Verlangsamung der Replikation aufgrund der Vielzahl an methylierten Basen anscheinend einen wesentlich größeren Einfluss auf die Zellzyklusprogression innerhalb der S-Phase besitzt. Somit könnten mittels Koffein durchaus DSB-induzierte Checkpointsignale nach einer MMS-Behandlung aufgehoben worden sein, was jedoch nicht wie im Fall von CPT zu einer schnelleren Zellzyklusprogression, sondern aufgrund der hohen Anzahl an Methylierungen weiterhin zu einer deutlichen Verzögerung der S-Phase Progression von MMS-behandelten Zellen führte.

Somit ist zunächst festzuhalten, dass sowohl nach einer CPT-Behandlung als auch nach einer MMS-Behandlung eine deutliche Verzögerung der S-Phase-Progression beobachtet werden konnte. Diese wurde im Fall von CPT durch die Inhibierung von Checkpoints aufgehoben, wobei im Fall von MMS keine Beschleunigung der S-Phase-Progression durch eine Koffein-Behandlung festgestellt wurde. Die MMS-induzierte Verzögerung kann somit auf eine weitreichende, physikalische Arretierung von Replikationsgabeln zurückgeführt werden, wohingegen die CPT-induzierte Verzögerung auf deutlich weniger arretierte Replikationsgabeln und hauptsächlich auf die Induktion von Intra-S-Phase-Checkpoints schließen lässt. Demzufolge kann davon ausgegangen werden, dass bei gleicher Anzahl an induzierten DSBs die verwendete Konzentration von MMS eine deutlich höhere Anzahl an arretierten Replikationsgabeln erzeugt als die verwendete Konzentration von CPT. Da jedoch die induzierten SCE-Level bei den eingesetzten Konzentrationen vergleichbar sind, ist davon auszugehen, dass etwa gleich viele SCE-bildende *chicken foot*-Strukturen nach einer CPT- oder MMS-Behandlung ausgebildet werden. Hieraus kann geschlossen werden, dass nach einer CPT-Behandlung ein wesentlich höherer Anteil an arretierten Replikationsgabeln zur Ausbildung von *chicken foot*-Strukturen und SCEs führt als nach einer MMS-Behandlung. Dies ist womöglich darauf zurückzuführen, dass die Replikationsblockaden nach einer CPT- oder MMS-Behandlung auf unterschiedlichen Mechanismen beruhen und der Zelle daher

auch verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung stehen diese zu überwinden. Werden Replikationsgabeln durch methylierte Basen (vor allem durch N3MeA) arretiert, so kann postuliert werden, dass ein großer Teil dieser arretierten Replikationsgabeln über den Mechanismus der TLS überwunden wird (Johnson et al. 2007), und somit nicht zu einer *fork regression* und Ausbildung von *chicken foot*-Strukturen führt. Da dieser Mechanismus jedoch für CPT-induzierte Replikationsblockaden nicht beschrieben wurde, könnte ein wesentlich größerer Anteil an arretierten Replikationsgabeln nach einer CPT-Behandlung zur Ausbildung von *chicken foot*-Strukturen und detektierbaren SCEs führen (Abbildung 53).

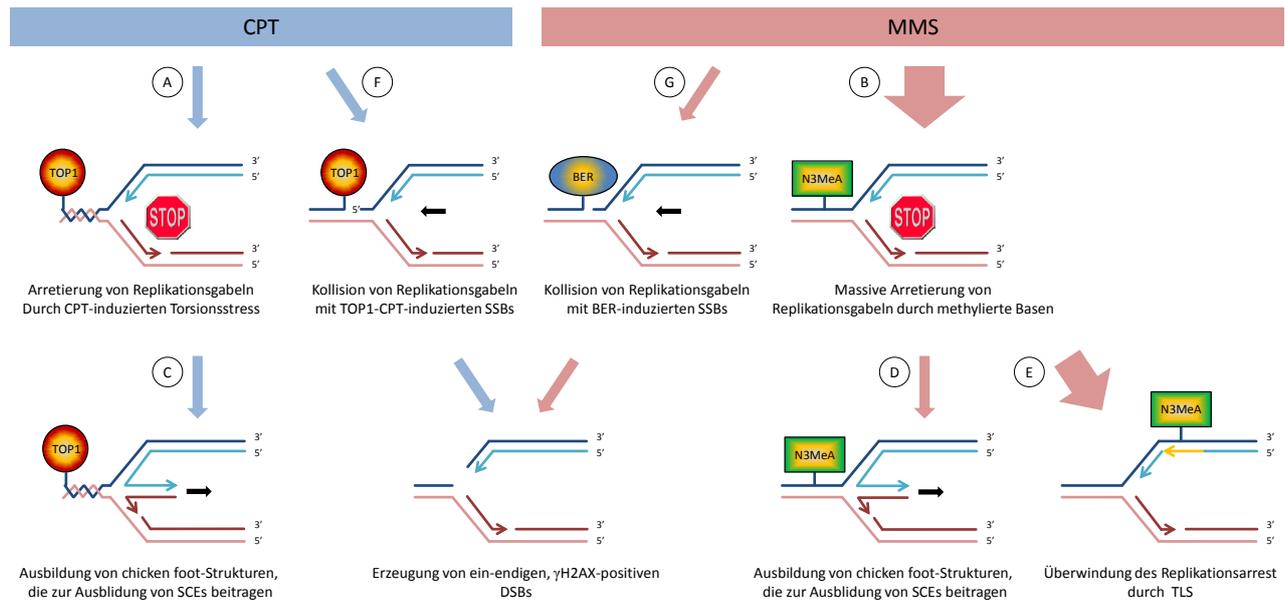


Abbildung 53: Modell zur verstärkten Arretierung von Replikationsgabeln nach einer MMS-Behandlung im Vergleich zu einer CPT-Behandlung

Während Torsionsstress aufgrund der inhibierenden Wirkung von CPT zu einer Arretierung von Replikationsgabeln führt (A), wird dies im Fall von MMS durch ein weitreichendes Aufeinandertreffen von Replikationsgabeln mit Basenmethylierungen, vor allem mit N3MeA verursacht (B). Diese physikalische Arretierung scheint nach einer MMS-Behandlung jedoch wesentlich stärker ausgeprägt zu sein, da die Zellzyklusprogression MMS-behandelter Zellen nicht durch die Aufhebung von Intra-S-Phase-Checkpoints beschleunigt werden kann. Aufgrund der ermittelten SCE-Daten kann davon ausgegangen werden, dass die verwendeten Konzentrationen der beiden Agenzien eine ähnliche Anzahl an *chicken foot*-Strukturen erzeugen (C und D). Dies lässt darauf schließen, dass nach einer CPT-Behandlung ein wesentlich größerer Anteil an arretierten Replikationsgabeln zur Ausbildung von *chicken foot*-Strukturen und SCEs führt. Es wird postuliert, dass der Großteil an arretierten Replikationsgabeln nach einer MMS-Behandlung zu der beobachteten, physikalischen Verzögerung der S-Phase-Progression führt, jedoch über den Weg der TLS überwunden wird und so nicht zur Ausbildung von *chicken foot*-Strukturen beiträgt (E). Die verwendeten Konzentrationen an CPT und MMS induzieren jedoch beide SSBs, welche bei Kollision mit einer Replikationsgabel durch den Mechanismus des *replication fork run off* zur Ausbildung von vergleichbaren Raten an DSBs führen. Während nach einer CPT-Behandlung DSBs durch die Kollision von Replikationsgabeln mit TOP1-induzierten SSBs erzeugt werden (F), kollidieren nach einer MMS-Behandlung Replikationsgabeln mit SSBs, welche temporär durch die Basenexzisionsreparatur erzeugt wurden (G).

Eine Suppression des HR-Faktors RAD51 hatte keinen Einfluss auf die Zellzyklusprogression innerhalb der S-Phase. Unbehandelte sowie CPT- oder MMS-behandelte Zellen wiesen keine Unterschiede der S-Phase-Progression nach einer Suppression von RAD51 mittels SiRNA auf. Eine RAD51-Suppression induzierte jedoch sowohl nach einer CPT- als auch nach einer MMS-Behandlung eine deutliche Akkumulation von Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt und infolgedessen eine stark verminderte Anzahl an

G1-Phase-Zellen zu späten Zeiten des Analysezeitraums von 20 Stunden. Dieses Zellzyklusverhalten kann auf einen Reparaturdefekt der HR-defizienten Zellen zurückgeführt werden. Unter 3.2.1 wurde gezeigt, dass sämtliche CPT- und MMS-induzierte DSBs über den Mechanismus der HR repariert werden und bei einer RAD51-Depletion unrepariert verbleiben. Außerdem kann davon ausgegangen werden, dass die Replikation an ungeschädigten Bereichen der DNA in der S-Phase vollendet wird. Da in RAD51-defizienten G2-Phase-Zellen nach einer CPT- oder MMS-Behandlung erhöhte Chromatidbruchraten in frühzeitig kondensierten Chromosomen mittels der PCC-Analyse detektiert werden konnten, ist davon auszugehen, dass Zellen mit einer RAD51-Defizienz nach vollständiger Duplikation des Genoms mit unreparierten DSBs in die G2-Phase progressieren. Eine Progression in die Mitose ist anscheinend aufgrund des G2/M-Checkpoints nicht möglich, da in mitotischen Zellen keine stark erhöhten γ H2AX-Foci-Level oder Chromatidbruchraten nachgewiesen werden konnten. Erst nach einer Aufhebung des G2/M-Checkpoints konnten Chromatidbrüche in mitotischen Zellen detektiert werden. Somit ist die Akkumulation von CPT- oder MMS-behandelten Zellen in durchflusszytometrischen Studien mit einem G2/M-Checkpoint zu erklären, welcher Zellen mit unreparierten DSBs an einer Progression in die G1-Phase hindert. In den durchflusszytometrischen Studien konnte allerdings innerhalb des 20-stündigen Analysezeitraums ein Anteil von ~20% G1-Phase-Zellen nach einer CPT- oder MMS-Behandlung zu späten Zeiten beobachtet werden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass es sich hierbei einerseits um Zellen handelt, welche sich zu Beginn der CPT- oder MMS-Behandlung am Ende der S-Phase befanden und demzufolge wenig geschädigt wurden, und es sich andererseits um Zellen handeln kann, bei welchen keine vollständige RAD51-Depletion mittels SiRNA erreicht wurde und deshalb eine Reparatur der DSBs stattfinden konnte. Infolgedessen setzte der G2/M-Checkpoint bei ~20% der BrdU-positiven, CPT- oder MMS-behandelten Zellen nicht ein, sodass diese innerhalb des 20-stündigen Beobachtungszeitraums in die Mitose progressieren konnten.

RAD51-supprimierte Zellen, welche mit CPT und zusätzlich mit Koffein behandelt wurden, zeigten keinen Unterschied der Zellzyklusprogression im Vergleich zu RAD51-profizienten Zellen. Die Checkpoint-inhibierende Wirkung von Koffein beschleunigte die Zellzyklusprogression unabhängig davon, ob DSBs aufgrund der RAD51-Profizienz repariert werden konnten oder im Fall einer RAD51-Suppression unrepariert verblieben. Im Gegensatz hierzu konnte ein deutlicher Einfluss von Koffein auf die Progression von MMS-geschädigten, RAD51-defizienten Zellen von der G2-Phase in die G1-Phase beobachtet werden. Während RAD51-defiziente Zellen auch zu späten Zeitpunkten zum Großteil in der G2-Phase arretiert wurden, progressierten mit Koffein-behandelte RAD51-defiziente Zellen zwischen 12 und 20 Stunden nach einer MMS-Behandlung vermehrt in die G1-Phase. Demzufolge hatte Koffein erst zu späten Zeiten einen Einfluss auf die Zellzyklusprogression von MMS-behandelten Zellen. Die Progression von MMS- und Koffein-behandelten, RAD51-defizienten Zellen in die G1-Phase lässt sich mit der Aufhebung des G2/M-Checkpoints erklären. Während Koffein zwar keinen Einfluss auf die Zellzyklusprogression von RAD51-profizienten und RAD51-defizienten Zellen innerhalb der S-Phase besitzt, da hier hauptsächlich die durch MMS-induzierten Basenmethylierungen für die Verlangsamung sorgen, progressieren RAD51-defiziente Zellen zu späten Zeitpunkten in die G2-Phase und durch die Aufhebung des G2/M-Checkpoints mittels Koffein in die G1-Phase. Ohne die Aufhebung des G2/M-Checkpoints weisen RAD51-defiziente Zellen keine erhöhten Chromatidbruchlevel auf, da der G2/M-Checkpoint die HR-defizienten Zellen an einer Progression mit unreparierten DSBs in die Mitose hindert. Da RAD51-defiziente Zellen jedoch mit unreparierten DSBs in die G2-Phase progressieren ist mittels der PCC-Analyse von G2-Phase-Zellen ein stark erhöhtes Level an Chromatidbrüchen nach einer

MMS-Behandlung detektierbar. Eine RAD51-Profizienz hingegen verhindert eine Progression von geschädigten Zellen in die G2-Phase, sodass mittels der PCC-Analyse von G2-Phase-Zellen keine erhöhten Chromatidbruchlevel detektiert werden können und kein Einfluss von Koffein nachgewiesen werden kann. Die folgende Übersicht fasst die dargelegten Ergebnisse und Schlussfolgerungen zusammen (Abbildung 54).

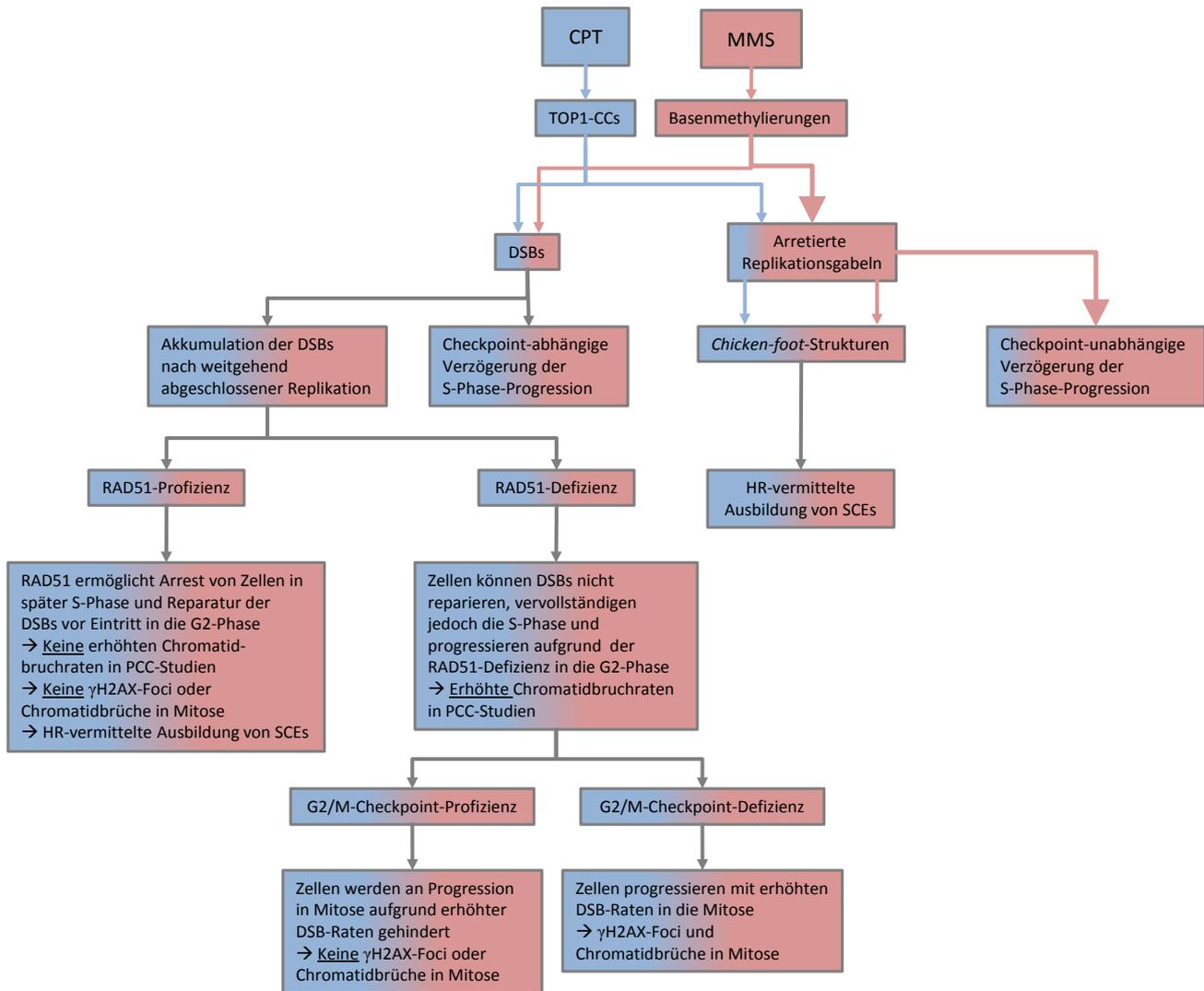


Abbildung 54: Modell zur Induktion und Reparatur CPT- und MMS-induzierter DNA-Schäden

CPT-induzierte Topoisomerase1-cleavage complexe sowie MMS-induzierte Basenmethylierungen können im Zuge der Replikation zu DSBs führen, wenn Replikationsgabeln auf SSBs treffen. Hierbei stellt der Mechanismus des replication fork run-off den vorherrschenden Weg zur Erzeugung CPT- und MMS-induzierter DSBs dar. Unabhängig hiervon werden durch CPT jedoch auch Replikationsgabeln arretiert, was in mehreren hundert Fällen zur Ausbildung von *chicken foot*-Strukturen führen kann, die HR-vermittelt aufgelöst werden und so zur Entstehung von SCEs beitragen können, ohne dabei jedoch einen γ H2AX-Focus zu bilden. Die arretierten Replikationsgabeln führen im Fall von CPT jedoch nicht zu einer deutlichen Verzögerung der Zellzyklusprogression innerhalb der S-Phase. Allerdings können durch DSBs Checkpoints ausgelöst werden, welche die Progression verzögern und mittels Koffein inhibiert werden können. MMS induziert auf der einen Seite ebenfalls arretierte Replikationsgabeln, welche zu *chicken foot*-Strukturen und SCEs führen können, die induzierten Millionen von Basenmethylierungen führen jedoch zusätzlich zu einer globalen Verzögerung der Replikation. Diese Verzögerung der S-Phase-Progression ist Checkpoint-unabhängig und kann somit auch nicht durch die Gabe von Koffein beeinflusst werden. Die durch CPT- oder MMS-induzierten DSBs akkumulieren in der Zelle zu einem Zeitpunkt, an welchem der Großteil der DNA repliziert vorliegt. Es folgt die HR-abhängige Reparatur der induzierten DSBs noch vor Eintritt in die G2-Phase, sodass in frühzeitig kondensierten G2-Phase-Chromosomen keine erhöhten Chromatidbruchraten detektiert werden können. Folglich sind bei einer RAD51-Profizienz auch keine erhöhten DSB-Raten in Form von γ H2AX-Foci oder Chromatidbrüchen in der Mitose festzustellen. Die Ausbildung von SCEs läßt auf erfolgreiche Reparaturereignisse mittels HR schließen. Ist RAD51 nicht vorhanden, so können CPT- oder MMS-geschädigte Zellen die induzierten DSBs nicht reparieren und progressieren in die G2-Phase. Hier können bei einer RAD51-Defizienz erhöhte Chromatidbruchraten in G2-PCC-Analysen detektiert werden. Demzufolge kann von einer arretierenden Funktion von RAD51 ausgegangen werden, welche Zellen an der Progression in die G2-Phase hindert. Mitotische Zellen weisen jedoch selbst unter einer RAD51-Defizienz vergleichsweise wenig γ H2AX-Foci oder Chromatidbrüche auf. Durch eine Koffein-Behandlung konnten diese Anzahlen jedoch drastisch gesteigert werden, was darauf schließen lässt, dass der G2/M-Checkpoint eine effektive Barriere für S-Phase-geschädigte Zellen bildet, um so eine Progression von Zellen mit DSBs in die Mitose zu unterbinden.

5 Zusammenfassung/Summary

Die Agenzien Camptothecin (CPT) und Methylmethansulfonat (MMS) werden aufgrund ihrer DNA-schädigenden Wirkung seit vielen Jahren untersucht. Vor allem in proliferierenden Zellen konnte dabei eine verstärkte Induktion von DNA-Schäden beobachtet werden, was zum Einsatz dieser Agenzien als Chemotherapeutika zur Behandlung von Krebserkrankungen führte. CPT ist ein Inhibitor, welcher eine Topoisomerase-katalysierte Religation von Einzelstrangbrüchen (SSBs) verhindert, wohingegen MMS ein Alkylanz ist, welches Basenmethylierungen an diversen Stellen im Genom verursacht. Basenmethylierungen werden durch den Mechanismus der Basenexzisionsreparatur behoben, wobei ebenfalls temporär SSBs entstehen. Die Wirkung von CPT und MMS wird auf eine massive Ausbildung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) in der S-Phase des Zellzyklus zurückgeführt, welche durch die Interferenz aktiver Replikationsgabeln mit SSBs induziert werden. Da DSBs den schwerwiegendsten Schaden für die genomische Integrität einer Zelle darstellen, haben sich Mechanismen entwickelt, welche DSBs effizient reparieren können. In der S-Phase wird die Reparatur jedoch durch die gleichzeitige Replikation der DNA verkompliziert. Außerdem können während der Replikation ein-endige DSB-Strukturen entstehen, welche sich von zwei-endigen DSBs unterscheiden. Die Reparatur von zwei-endigen DSBs, welche zum Beispiel durch ionisierende Strahlung verursacht werden können, ist vergleichsweise gut erforscht. So wird der Großteil dieser zwei-endigen DSBs in der G1- und G2-Phase des Zellzyklus durch die Nichthomologe-Endverknüpfung (NHEJ) bewerkstelligt, wobei in der G2-Phase zusätzlich die Homologe Rekombination (HR) einen Teil der DSBs repariert. Die HR bedient sich dabei bereits replizierter DNA als Vorlage zur Reparatur des geschädigten Bereichs auf dem Schwesterchromatid. Obwohl in der S-Phase je nach Fortschritt der Replikation womöglich keine Kopie eines geschädigten DNA-Bereichs vorliegt, konnte in den letzten Jahren beobachtet werden, dass die HR gerade für die Reparatur replikationsassoziiierter DNA-Schäden eine große Rolle spielt. So ist es nicht verwunderlich, dass HR-defiziente Zellen besonders sensitiv auf Behandlungen mit MMS oder CPT reagieren, welche gezielt die Replikation von Zellen stören und in der S-Phase zu ein-endigen DSBs führen. HR-defiziente Zellen zeigen ein vermindertes Überleben und erhöhte chromosomale Aberrationen nach einer CPT- oder MMS-Behandlungen.

Die molekularen Mechanismen sowohl der Entstehung von CPT- und MMS- induzierten DSBs als auch der Reparatur sind bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Die vorliegende Arbeit konnte mittels sensibler und zellzyklusspezifischer Analysen zunächst die Entstehung von CPT- und MMS-induzierten DSBs auf Einzelzellebene durch die Bildung von γ H2AX-Foci in der S-Phase nachweisen. Desweiteren konnte eine HR-abhängige Reparatur der CPT- und MMS-induzierten DSBs bestätigt werden, wobei im Gegensatz zu beschriebenen Studien eine Beteiligung des NHEJs ausgeschlossen werden konnte. Anhand der Analyse von Schwesterchromatidaustauschen (SCEs) sowohl in humanen als auch Basenexzisionsreparatur (BER) -defekten, murinen Zellen konnte gezeigt werden, dass CPT und MMS während der Replikation DNA-Strukturen erzeugen, welche γ H2AX-negativ sind und dennoch zur Ausbildung von SCEs führen. Diese Strukturen werden wahrscheinlich durch arretierte Replikationsgabeln hervorgerufen, welche durch CPT und MMS vermehrt induziert werden und so zu einer *fork regression* und Ausbildung von *chicken foot*-Strukturen führen können. Die Auflösung dieser Strukturen benötigt HR-Prozesse und kann ohne die Ausbildung von γ H2AX-Foci zu *crossover*-Ereignissen und SCEs führen.

Durch den innovativen Ansatz der kombinierten *Life cell*/ γ H2AX-Foci-Analyse konnte beobachtet werden, dass CPT DSBs in Abhängigkeit von der Aufenthaltsdauer von Zellen in der S-Phase induziert.

Hieraus konnte geschlussfolgert werden, dass die Anzahl an induzierten DSBs direkt mit der Replikationsaktivität einer Zelle zusammenhängt und deshalb die in zellzyklusspezifischen Experimenten beobachtete Varianz der Anzahl an induzierten DSBs von Zellen stammt, welche unterschiedlich lange unter dem Einfluss von S-Phase-schädigenden Agenzien in der S-Phase standen.

Mit durchflusszytometrischen Studien konnte das Zellzyklusverhalten von CPT- und MMS-behandelten Zellen analysiert werden, wobei festgestellt wurde, dass sowohl CPT als auch MMS zu einer Verzögerung der S-Phase-Progression und Akkumulation von Zellen mit doppeltem DNA-Gehalt führen. Dies resultierte in einer verminderten Progression von behandelten Zellen in die G1-Phase. Wurden zelluläre Checkpoint-Signale bereits innerhalb der S-Phase durch eine zusätzliche Koffein-Behandlung aufgehoben, so zeigten CPT-behandelte Zellen eine Beschleunigung der Progression, wohingegen MMS-behandelte Zellen nicht durch die Gabe von Koffein in Ihrer Progression beeinflusst wurden. Dies ließ im Fall von MMS auf einen Checkpoint-unabhängigen Mechanismus schließen, welcher Zellen in der S-Phase verlangsamt. Obwohl CPT und MMS in der Literatur als starke Klastogene beschrieben wurden, konnten in mitotischen Zellen, die zuvor in der S-Phase unter dem Einfluss von CPT oder MMS standen, weder erhöhte γ H2AX-Foci-Level noch erhöhte Chromatidbruchraten detektiert werden. Selbst unter Suppression des essentiellen HR-Faktors RAD51 konnten vergleichsweise wenige induzierte γ H2AX-Foci oder Chromatidbrüche in CPT- oder MMS-behandelten Zellen festgestellt werden. Erst durch eine zusätzliche Aufhebung des G2/M-Checkpoints konnte bei einer RAD51-Defizienz eine massive Klastogenität der beiden Agenzien in mitotischen Zellen beobachtet werden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass Zellen höchst-effektive Mechanismen entwickelt haben, um replikationsassoziierte DNA-Schäden noch vor der Progression in die Mitose zu reparieren oder falls dies nicht möglich ist, eine Progression mit DSBs in die Mitose zu unterbinden. Womöglich können Zellen auf replikationsabhängige DNA-Schäden wesentlich besser reagieren als auf DNA-Schäden in der G1- oder G2-Phase, da die S-Phase den größten Quell endogener DNA-Schäden darstellt.

Um herauszufinden, wann CPT- und MMS-induzierte DNA-Schäden repariert werden, wurden in der vorliegenden Arbeit neben den zytogenetischen Studien mitotischer Zellen zusätzlich Analysen von frühzeitig kondensierten Chromosomen der G2-Phase (G2-PCCs) durchgeführt. Die Ergebnisse ließen zusammen mit den Zellzyklusanalysen und den *Life cell*-Studien auf eine RAD51-vermittelte Arretierung von CPT- oder MMS-geschädigten Zellen in einer späten S-Phase schließen, da RAD51-profiziente Zellen keine erhöhten Chromatidbruchlevel in der G2-Phase aufwiesen. Mit einer RAD51-Defizienz hingegen progressierten Zellen mit unreparierten DSBs in die G2-Phase, wo sie mittels der PCC-Analyse in Form von Chromatidbrüchen detektiert werden konnten.

Zusammenfassend weisen die in der vorliegenden Arbeit erlangten Ergebnisse auf eine Funktion von RAD51 in einer Checkpoint-unabhängigen Arretierung von CPT- oder MMS-behandelten Zellen zu einem späten Zeitpunkt der S-Phase hin. Dabei konnte gezeigt werden, dass RAD51 die Progression von Zellen mit CPT- oder MMS-induzierten DSBs in die G2-Phase verhindert. Ohne RAD51 progressieren Zellen mit erhöhten DSB-Raten in die G2-Phase, jedoch nicht in die Mitose, da der G2/M-Checkpoint die Progression geschädigter Zellen verhindert. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass sowohl CPT als auch MMS Strukturen erzeugen, welche nicht zur Ausbildung von „freien“ DSBs und damit zu γ H2AX-Foci führen, allerdings HR-vermittelt aufgelöst werden und zur Entstehung von SCEs beitragen. Außerdem induziert MMS im Gegensatz zu CPT eine massive Anzahl an Methylierungen, welche zusätzlich zu einer Checkpoint-unabhängigen Verzögerung der S-Phase-Progression führen.

On account of their DNA-damaging effects, Camptothecin (CPT) and Methyl methanesulfonate (MMS) have been under investigation during the past decades. Due to the strong induction of DNA-damage in proliferating cells, CPT and MMS have become important chemotherapeutic drugs. CPT unfolds its toxicity by inhibiting a topoisomerase-catalyzed religation of single strand breaks (SSBs), whereas MMS causes methylated DNA-bases throughout the genome. These methylations are usually removed by the mechanism of base excision repair (BER), which causes transient SSBs as well. SSBs can lead to double strand breaks (DSBs) when replication forks encounter SSBs during S-Phase. Since DSBs are known to be the most severe lesions of DNA, cells have developed ingenious repair mechanisms to prevent genomic instability. Repair of DNA-damage during the S-Phase of the cell-cycle becomes complicated because replication-induced DSBs form one-ended DSBs which must be repaired by mechanisms other than two-ended DSBs. Two-ended DSBs can be induced by several endogenous processes as well as ionizing radiation for example. The repair of two-ended DSBs is carried out by two key repair pathways: Nonhomologous end joining (NHEJ) and homologous recombination (HR). While HR is limited to the S- and G2-Phase, due to the dependency on a sister chromatid as a template, NHEJ accomplishes the repair of all DSBs in G1-Phase and almost 80% of DSBs in the G2-Phase, despite HR being available in the G2-Phase. Interestingly, one-ended DSBs are preferentially repaired by HR. Thus HR-deficient cells are particularly sensitive to CPT and MMS, which cause SSBs that are converted to one-ended DSBs when cells undergo replication. However, the molecular mechanisms of the induction and repair of CPT- or MMS-induced DSBs are still unclear.

In this study CPT- and MMS-induced DSBs were analyzed by cell cycle specific approaches. First of all, an induction of DSBs was observed within the S-Phase of CPT or MMS treated cells by γ H2AX-foci-analysis. Next, a dependency of CPT and MMS induced DSBs on HR could be confirmed, whereas SiRNA-experiments excluded an involvement of NHEJ. By analyzing sister chromatid exchanges (SCEs) in human A549 cells and murine BER defective cells, it was shown that CPT and MMS cause DNA-structures which lead to SCEs but not to γ H2AX-foci. These structures may display stalled replication forks which contribute to the formation of *chicken foot* structures by the mechanism of fork regression. The dissolution of reversed replication forks may lead to the formation of SCEs without forming any γ H2AX-foci.

Using cutting edge live cell microscopy combined with γ H2AX-foci analysis it was possible to track the induction of DSBs induced by CPT within the S-Phase. This attempt revealed that the amount of CPT-induced DSBs is strictly bound to the time cells spend in S-phase and replication activity. Regarding cell cycle specific analysis of damaged S-phase cells a variety in the number of CPT or MMS induced DSBs could be observed especially at later time points after treatment, which is due to the different amount of DSBs cells acquired during replication.

Flow cytometry allowed an analysis of the cell cycle behavior of CPT and MMS treated cells. CPT and MMS caused a slowed S-phase progression and an accumulation of cells with doubled DNA content, which resulted in a reduced G1-Phase progression. The inhibition of intra S-Phase checkpoints by caffeine led to an accelerated S-Phase progression and an abolished slowing effect of CPT. On the contrary, MMS treated cells expressed no response to caffeine and still showed a slowed S-Phase progression. Thus, MMS induced a delay independent of S-phase checkpoints, whereas the CPT-induced slowing was checkpoint dependent.

CPT and MMS have been described as clastogenic reagents. Against expectation neither γ H2AX-foci nor chromatid breaks could be observed in mitotic cells after treatment with CPT or MMS. Even in the absence of RAD51, an essential factor of HR, no γ H2AX-foci or chromatid breaks were detected after CPT or MMS treatment. It was not until the inhibition of the G2/M checkpoint by caffeine that massive clastogenic effects were observed in CPT and MMS treated RAD51 deficient cells. This demonstrates the effective and strong mechanisms that cells have developed during evolution to hinder replication associated lesions from progression to mitosis. This could be explained by the mechanisms that cells have developed to handle endogenously induced DNA-damage best, which mainly occurs in S-phase. To investigate when CPT and MMS induced DSBs are repaired, studies with prematurely condensed chromosomes were carried out. Together with the results of cell cycle and Life cell studies, the G2-PCC technique revealed a RAD51-dependent arrest of CPT and MMS treated cells within the S-Phase, since no chromatid breaks could be observed in RAD51 proficient G2-Phase cells in contrast to RAD51 deficient cells.

Overall this study shows a function of RAD51 that leads to a checkpoint independent arrest of CPT and MMS treated cells at a late stage of S-Phase. Although CPT and MMS treated cells finish the bulk of replication before repairing replication associated DSBs, they do not enter mitosis with elevated DSB levels. By analyzing prematurely condensed G2-chromosomes it can be shown that CPT and MMS treated cells do not even enter G2-Phase with unrepaired DSBs. Without RAD51, cells progress into G2-Phase with high levels of unrepaired DSBs, however they do not enter mitosis unless the G2/M checkpoint is aborted. In addition, this work shows the existence of a mechanism that leads to the formation of CPT and MMS induced SCEs without the necessity of "free" DSBs but rather the presence of *chicken foot* structures. Furthermore MMS induces a checkpoint independent slowing of S-Phase progression which could be explained by the massive induction of methylations that physically block replication.

6 Literaturverzeichnis

- Agner, J., J. Falck, J. Lukas and J. Bartek (2005). "Differential impact of diverse anticancer chemotherapeutics on the Cdc25A-degradation checkpoint pathway." *Exp Cell Res* **302**(2): 162-169.
- Andersson, H. C. and B. A. Kihlman (1992). "Induction of chromosomal aberrations by camptothecin in root-tip cells of *Vicia faba*." *Mutat Res* **268**(2): 167-181.
- Aquilina, G., M. Crescenzi and M. Bignami (1999). "Mismatch repair, G(2)/M cell cycle arrest and lethality after DNA damage." *Carcinogenesis* **20**(12): 2317-2326.
- Bachrati, C. Z. and I. D. Hickson (2003). "RecQ helicases: suppressors of tumorigenesis and premature aging." *Biochem J* **374**(Pt 3): 577-606.
- Baker, S. D., R. M. Wadkins, C. F. Stewart, W. T. Beck and M. K. Danks (1995). "Cell cycle analysis of amount and distribution of nuclear DNA topoisomerase I as determined by fluorescence digital imaging microscopy." *Cytometry* **19**(2): 134-145.
- Bakkenist, C. J. and M. B. Kastan (2003). "DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation." *Nature* **421**(6922): 499-506.
- Bartek, J., C. Lukas and J. Lukas (2004). "Checking on DNA damage in S phase." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(10): 792-804.
- Bartek, J. and J. Lukas (2001). "Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage." *FEBS Lett* **490**(3): 117-122.
- Bartek, J. and J. Lukas (2003). "Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer." *Cancer Cell* **3**(5): 421-429.
- Baumann, P., F. E. Benson and S. C. West (1996). "Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro." *Cell* **87**(4): 757-766.
- Baute, J. and A. Depicker (2008). "Base excision repair and its role in maintaining genome stability." *Crit Rev Biochem Mol Biol* **43**(4): 239-276.
- Beranek, D. T. (1990). "Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents." *Mutat Res* **231**(1): 11-30.
- Berquist, B. R. and D. M. Wilson, 3rd (2012). "Pathways for repairing and tolerating the spectrum of oxidative DNA lesions." *Cancer Lett* **327**(1-2): 61-72.
- Beucher, A., J. Birraux, L. Tchouandong, O. Barton, A. Shibata, S. Conrad, A. A. Goodarzi, A. Krempler, P. A. Jeggo and M. Lobrich (2009). "ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2." *EMBO J* **28**(21): 3413-3427.
- Bjornsti, M. A., P. Benedetti, G. A. Viglianti and J. C. Wang (1989). "Expression of human DNA topoisomerase I in yeast cells lacking yeast DNA topoisomerase I: restoration of sensitivity of the cells to the antitumor drug camptothecin." *Cancer Res* **49**(22): 6318-6323.
- Blasina, A., B. D. Price, G. A. Turenne and C. H. McGowan (1999). "Caffeine inhibits the checkpoint kinase ATM." *Curr Biol* **9**(19): 1135-1138.
- Block, W. D., D. Merkle, K. Meek and S. P. Lees-Miller (2004). "Selective inhibition of the DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) by the radiosensitizing agent caffeine." *Nucleic Acids Res* **32**(6): 1967-1972.

- Bloom, D. (1954). "Congenital telangiectatic erythema resembling lupus erythematosus in dwarfs; probably a syndrome entity." AMA Am J Dis Child **88**(6): 754-758.
- Bogomazova, A. N., M. A. Lagarkova, L. V. Tskhovrebova, M. V. Shutova and S. L. Kiselev (2011). "Error-prone nonhomologous end joining repair operates in human pluripotent stem cells during late G2." Aging (Albany NY) **3**(6): 584-596.
- Bowen, S., D. Wangsa, T. Ried, F. Livak and R. J. Hodes (2013). "Concurrent V(D)J recombination and DNA end instability increase interchromosomal trans-rearrangements in ATM-deficient thymocytes." Nucleic Acids Res.
- Bowman, K. J., D. R. Newell, A. H. Calvert and N. J. Curtin (2001). "Differential effects of the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor NU1025 on topoisomerase I and II inhibitor cytotoxicity in L1210 cells in vitro." Br J Cancer **84**(1): 106-112.
- Branzei, D. and M. Foiani (2010). "Maintaining genome stability at the replication fork." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(3): 208-219.
- Brierley, D. J. and S. A. Martin (2012). "Oxidative Stress and the DNA Mismatch Repair Pathway." Antioxid Redox Signal.
- Brogden, R. N. and L. R. Wiseman (1998). "Topotecan. A review of its potential in advanced ovarian cancer." Drugs **56**(4): 709-723.
- Brown, E. J. and D. Baltimore (2000). "ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality." Genes Dev **14**(4): 397-402.
- Brown, E. J. and D. Baltimore (2003). "Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance." Genes Dev **17**(5): 615-628.
- Bugreev, D. V., O. M. Mazina and A. V. Mazin (2006). "Rad54 protein promotes branch migration of Holliday junctions." Nature **442**(7102): 590-593.
- Bugreev, D. V., M. J. Rossi and A. V. Mazin (2011). "Cooperation of RAD51 and RAD54 in regression of a model replication fork." Nucleic Acids Res **39**(6): 2153-2164.
- 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 (2010). "53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks." Cell **141**(2): 243-254.
- Burgin, A. B., Jr., B. N. Huizenga and H. A. Nash (1995). "A novel suicide substrate for DNA topoisomerases and site-specific recombinases." Nucleic Acids Res **23**(15): 2973-2979.
- Bzymek, M., N. H. Thayer, S. D. Oh, N. Kleckner and N. Hunter (2010). "Double Holliday junctions are intermediates of DNA break repair." Nature **464**(7290): 937-941.
- Calabrese, C. R., R. Almassy, S. Barton, M. A. Batey, A. H. Calvert, S. Canan-Koch, B. W. Durkacz, Z. Hostomsky, R. A. Kumpf, S. Kyle, J. Li, K. Maegley, D. R. Newell, E. Notarianni, I. J. Stratford, D. Skalitzky, H. D. Thomas, L. Z. Wang, S. E. Webber, K. J. Williams and N. J. Curtin (2004). "Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361." J Natl Cancer Inst **96**(1): 56-67.
- Caldecott, K. W. (2003). "XRCC1 and DNA strand break repair." DNA Repair (Amst) **2**(9): 955-969.
- Caldecott, K. W. (2008). "Single-strand break repair and genetic disease." Nat Rev Genet **9**(8): 619-631.

- Caldecott, K. W., S. Aoufouchi, P. Johnson and S. Shall (1996). "XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro." Nucleic Acids Res **24**(22): 4387-4394.
- Caldecott, K. W., J. D. Tucker, L. H. Stanker and L. H. Thompson (1995). "Characterization of the XRCC1-DNA ligase III complex in vitro and its absence from mutant hamster cells." Nucleic Acids Res **23**(23): 4836-4843.
- Chapman, J. R., M. R. Taylor and S. J. Boulton (2012). "Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice." Mol Cell **47**(4): 497-510.
- Chaudhuri, A. R., Y. Hashimoto, R. Herrador, K. J. Neelsen, D. Fachinetti, R. Bermejo, A. Cocito, V. Costanzo and M. Lopes (2012). "Topoisomerase I poisoning results in PARP-mediated replication fork reversal." Nature Structural & Molecular Biology **19**(4): 417-423.
- Ciccina, A., A. Constantinou and S. C. West (2003). "Identification and characterization of the human mus81-eme1 endonuclease." J Biol Chem **278**(27): 25172-25178.
- Ciccina, A. and S. J. Elledge (2010). "The DNA damage response: making it safe to play with knives." Mol Cell **40**(2): 179-204.
- Ciccina, A., N. McDonald and S. C. West (2008). "Structural and functional relationships of the XPF/MUS81 family of proteins." Annu Rev Biochem **77**: 259-287.
- Conrad, S., J. Kunzel and M. Lobrich (2011). "Sister chromatid exchanges occur in G2-irradiated cells." Cell Cycle **10**(2): 222-228.
- Constantinou, A., M. Tarsounas, J. K. Karow, R. M. Brosh, V. A. Bohr, I. D. Hickson and S. C. West (2000). "Werner's syndrome protein (WRN) migrates Holliday junctions and co-localizes with RPA upon replication arrest." EMBO Rep **1**(1): 80-84.
- Cornforth, M. N. and J. S. Bedford (1993). "Ionizing-Radiation Damage and Its Early Development in Chromosomes." Advances in Radiation Biology, Vol 17 **17**: 423-496.
- Cortez, D., S. Guntuku, J. Qin and S. J. Elledge (2001). "ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling." Science **294**(5547): 1713-1716.
- Covey, J. M., C. Jaxel, K. W. Kohn and Y. Pommier (1989). "Protein-linked DNA strand breaks induced in mammalian cells by camptothecin, an inhibitor of topoisomerase I." Cancer Res **49**(18): 5016-5022.
- Crawford, T. O. (1998). "Ataxia telangiectasia." Semin Pediatr Neurol **5**(4): 287-294.
- Dasika, G. K., S. C. Lin, S. Zhao, P. Sung, A. Tomkinson and E. Y. Lee (1999). "DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis." Oncogene **18**(55): 7883-7899.
- Davies, S. L., P. S. North and I. D. Hickson (2007). "Role for BLM in replication-fork restart and suppression of origin firing after replicative stress." Nat Struct Mol Biol **14**(7): 677-679.
- Deans, A. J. and S. C. West (2011). "DNA interstrand crosslink repair and cancer." Nat Rev Cancer **11**(7): 467-480.
- Debethune, L., G. Kohlhagen, A. Grandas and Y. Pommier (2002). "Processing of nucleopeptides mimicking the topoisomerase I-DNA covalent complex by tyrosyl-DNA phosphodiesterase." Nucleic Acids Res **30**(5): 1198-1204.
- Deckbar, D., J. Birraux, A. Krempler, L. Tchouandong, A. Beucher, S. Walker, T. Stiff, P. Jeggo and M. Lobrich (2007). "Chromosome breakage after G2 checkpoint release." J Cell Biol **176**(6): 749-755.

- Deem, A., A. Keszthelyi, T. Blackgrove, A. Vayl, B. Coffey, R. Mathur, A. Chabes and A. Malkova (2011). "Break-induced replication is highly inaccurate." *PLoS Biol* **9**(2): e1000594.
- Dendouga, N., H. Gao, D. Moechars, M. Janicot, J. Vialard and C. H. McGowan (2005). "Disruption of murine Mus81 increases genomic instability and DNA damage sensitivity but does not promote tumorigenesis." *Mol Cell Biol* **25**(17): 7569-7579.
- Deng, C., J. A. Brown, D. You and J. M. Brown (2005). "Multiple endonucleases function to repair covalent topoisomerase I complexes in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **170**(2): 591-600.
- DePamphilis, M. L. (2006). "DNA Replication and Human Disease." *Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S. 2nd revised edition*.
- Desai, S. D., L. F. Liu, D. Vazquez-Abad and P. D'Arpa (1997). "Ubiquitin-dependent destruction of topoisomerase I is stimulated by the antitumor drug camptothecin." *J Biol Chem* **272**(39): 24159-24164.
- Dexheimer, T. S., S. Antony, C. Marchand and Y. Pommier (2008). "Tyrosyl-DNA phosphodiesterase as a target for anticancer therapy." *Anticancer Agents Med Chem* **8**(4): 381-389.
- Donzelli, M. and G. F. Draetta (2003). "Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation." *EMBO Rep* **4**(7): 671-677.
- Durand-Dubief, M., J. P. Svensson, J. Persson and K. Ekwall (2011). "Topoisomerases, chromatin and transcription termination." *Transcription* **2**(2): 66-70.
- Durante, M., J. S. Bedford, D. J. Chen, S. Conrad, M. N. Cornforth, A. T. Natarajan, D. C. van Gent and G. Obe (2013). "From DNA damage to chromosome aberrations: Joining the break." *Mutat Res*.
- El Hage, A., S. L. French, A. L. Beyer and D. Tollervey (2010). "Loss of Topoisomerase I leads to R-loop-mediated transcriptional blocks during ribosomal RNA synthesis." *Genes Dev* **24**(14): 1546-1558.
- Elliott, B., C. Richardson, J. Winderbaum, J. A. Nickoloff and M. Jasin (1998). "Gene conversion tracts from double-strand break repair in mammalian cells." *Mol Cell Biol* **18**(1): 93-101.
- Eng, W. K., L. Faucette, R. K. Johnson and R. Sternglanz (1988). "Evidence That DNA Topoisomerase-I Is Necessary for the Cyto-Toxic Effects of Camptothecin." *Molecular Pharmacology* **34**(6): 755-760.
- Engelward, B. P., J. M. Allan, A. J. Dreslin, J. D. Kelly, M. M. Wu, B. Gold and L. D. Samson (1998). "A chemical and genetic approach together define the biological consequences of 3-methyladenine lesions in the mammalian genome." *J Biol Chem* **273**(9): 5412-5418.
- Falnes, P. O. (2004). "Repair of 3-methylthymine and 1-methylguanine lesions by bacterial and human AlkB proteins." *Nucleic Acids Res* **32**(21): 6260-6267.
- Forterre, P., S. Gribaldo, D. Gadelle and M. C. Serre (2007). "Origin and evolution of DNA topoisomerases." *Biochimie* **89**(4): 427-446.
- Fortini, P., B. Pascucci, E. Parlanti, R. W. Sobol, S. H. Wilson and E. Dogliotti (1998). "Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells." *Biochemistry* **37**(11): 3575-3580.
- Fricke, W. M. and S. J. Brill (2003). "Slx1-Slx4 is a second structure-specific endonuclease functionally redundant with Sgs1-Top3." *Genes Dev* **17**(14): 1768-1778.
- Froget, B., J. Blaisonneau, S. Lambert and G. Baldacci (2008). "Cleavage of stalled forks by fission yeast Mus81/Eme1 in absence of DNA replication checkpoint." *Mol Biol Cell* **19**(2): 445-456.

-
- Garcia, C. L., M. Carloni, N. P. de la Pena, E. Fonti and F. Palitti (2001). "Detection of DNA primary damage by premature chromosome condensation in human peripheral blood lymphocytes treated with methyl methanesulfonate." *Mutagenesis* **16**(2): 121-125.
- Ge, X. Q. and J. J. Blow (2010). "Chk1 inhibits replication factory activation but allows dormant origin firing in existing factories." *J Cell Biol* **191**(7): 1285-1297.
- German, J., S. Schonberg, E. Louie and R. S. Chaganti (1977). "Bloom's syndrome. IV. Sister-chromatid exchanges in lymphocytes." *Am J Hum Genet* **29**(3): 248-255.
- Goldmacher, V. S., R. A. Cuzick, Jr. and W. G. Thilly (1986). "Isolation and partial characterization of human cell mutants differing in sensitivity to killing and mutation by methylnitrosourea and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine." *J Biol Chem* **261**(27): 12462-12471.
- Goodarzi, A. A., A. T. Noon, D. Deckbar, Y. Ziv, Y. Shiloh, M. Lobrich and P. A. Jeggo (2008). "ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin." *Mol Cell* **31**(2): 167-177.
- Goscin, L. P. and J. J. Byrnes (1982). "DNA polymerase delta: one polypeptide, two activities." *Biochemistry* **21**(10): 2513-2518.
- Gotoh, E. (2009). "Drug-induced premature chromosome condensation (PCC) protocols: cytogenetic approaches in mitotic chromosome and interphase chromatin." *Methods Mol Biol* **523**: 83-92.
- Gottlieb, J. A., A. M. Guarino, J. B. Call, V. T. Oliverio and J. B. Block (1970). "Preliminary pharmacologic and clinical evaluation of camptothecin sodium (NSC-100880)." *Cancer Chemother Rep* **54**(6): 461-470.
- Graw, J. (2006). *Genetik*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Groth, P., S. Auslander, M. M. Majumder, N. Schultz, F. Johansson, E. Petermann and T. Helleday (2010). "Methylated DNA causes a physical block to replication forks independently of damage signalling, O(6)-methylguanine or DNA single-strand breaks and results in DNA damage." *J Mol Biol* **402**(1): 70-82.
- Gu, H., J. D. Marth, P. C. Orban, H. Mossmann and K. Rajewsky (1994). "Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting." *Science* **265**(5168): 103-106.
- Hanada, K., M. Budzowska, S. L. Davies, E. van Drunen, H. Onizawa, H. B. Beverloo, A. Maas, J. Essers, I. D. Hickson and R. Kanaar (2007). "The structure-specific endonuclease Mus81 contributes to replication restart by generating double-strand DNA breaks." *Nat Struct Mol Biol* **14**(11): 1096-1104.
- Hans, F. and S. Dimitrov (2001). "Histone H3 phosphorylation and cell division." *Oncogene* **20**(24): 3021-3027.
- Hartwell, L. H. and T. A. Weinert (1989). "Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events." *Science* **246**(4930): 629-634.
- Hashimoto, T., Z. He, W. Y. Ma, P. C. Schmid, A. M. Bode, C. S. Yang and Z. Dong (2004). "Caffeine inhibits cell proliferation by G0/G1 phase arrest in JB6 cells." *Cancer Res* **64**(9): 3344-3349.
- Helleday, T., J. Lo, D. C. van Gent and B. P. Engelward (2007). "DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment." *DNA Repair (Amst)* **6**(7): 923-935.
- Heyer, W. D., K. T. Ehmsen and J. Liu (2010). "Regulation of homologous recombination in eukaryotes." *Annu Rev Genet* **44**: 113-139.

-
- Higgins, N. P., K. Kato and B. Strauss (1976). "A model for replication repair in mammalian cells." *J Mol Biol* **101**(3): 417-425.
- Hinz, J. M., T. Helleday and M. Meuth (2003). "Reduced apoptotic response to camptothecin in CHO cells deficient in XRCC3." *Carcinogenesis* **24**(2): 249-253.
- Hinz, J. M., R. S. Tebbs, P. F. Wilson, P. B. Nham, E. P. Salazar, H. Nagasawa, S. S. Urbin, J. S. Bedford and L. H. Thompson (2006). "Repression of mutagenesis by Rad51D-mediated homologous recombination." *Nucleic Acids Res* **34**(5): 1358-1368.
- Hoadley, K. A., D. Xu, Y. Xue, K. A. Satyshur, W. Wang and J. L. Keck (2010). "Structure and cellular roles of the RMI core complex from the bloom syndrome dissolvasome." *Structure* **18**(9): 1149-1158.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." *Nature* **411**(6835): 366-374.
- Holliday, R. (1966). "Studies on mitotic gene conversion in *Ustilago*." *Genet Res* **8**(3): 323-337.
- Hsiang, Y. H., R. Hertzberg, S. Hecht and L. F. Liu (1985). "Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I." *J Biol Chem* **260**(27): 14873-14878.
- Huberman, J. A. and A. D. Riggs (1966). "Autoradiography of chromosomal DNA fibers from Chinese hamster cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **55**(3): 599-606.
- Ikegami, S., T. Taguchi, M. Ohashi, M. Oguro, H. Nagano and Y. Mano (1978). "Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase-alpha." *Nature* **275**(5679): 458-460.
- Imlay, J. A. and S. Linn (1988). "DNA damage and oxygen radical toxicity." *Science* **240**(4857): 1302-1309.
- Interthal, H., J. J. Pouliot and J. J. Champoux (2001). "The tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1 is a member of the phospholipase D superfamily." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(21): 12009-12014.
- Ira, G., A. Malkova, G. Liberi, M. Foiani and J. E. Haber (2003). "Srs2 and Sgs1-Top3 suppress crossovers during double-strand break repair in yeast." *Cell* **115**(4): 401-411.
- Izhar, L., O. Ziv, I. S. Cohen, N. E. Geacintov and Z. Livneh (2013). "Genomic assay reveals tolerance of DNA damage by both translesion DNA synthesis and homology-dependent repair in mammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Jain, S., N. Sugawara, J. Lydeard, M. Vaze, N. Tanguy Le Gac and J. E. Haber (2009). "A recombination execution checkpoint regulates the choice of homologous recombination pathway during DNA double-strand break repair." *Genes Dev* **23**(3): 291-303.
- Jares, P., A. Donaldson and J. J. Blow (2000). "The Cdc7/Dbf4 protein kinase: target of the S phase checkpoint?" *EMBO Rep* **1**(4): 319-322.
- Jeggo, P. A., V. Geuting and M. Lobrich (2011). "The role of homologous recombination in radiation-induced double-strand break repair." *Radiother Oncol* **101**(1): 7-12.
- Jeggo, P. A. and M. Lobrich (2005). "Artemis links ATM to double strand break rejoining." *Cell Cycle* **4**(3): 359-362.
- Jeggo, P. A. and M. Lobrich (2006). "Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability." *DNA Repair (Amst)* **5**(9-10): 1192-1198.

- Johnson, R. D. and M. Jasin (2000). "Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells." *EMBO J* **19**(13): 3398-3407.
- Johnson, R. E., S. L. Yu, S. Prakash and L. Prakash (2007). "A role for yeast and human translesion synthesis DNA polymerases in promoting replication through 3-methyl adenine." *Mol Cell Biol* **27**(20): 7198-7205.
- Jones, R. M. and E. Petermann (2012). "Replication fork dynamics and the DNA damage response." *Biochem J* **443**(1): 13-26.
- Ju, L., J. Wing, E. Taylor, R. Brandt, P. Slijepcevic, M. Horsch, B. Rathkolb, I. Racz, L. Becker, W. Hans, T. Adler, J. Beckers, J. Rozman, M. Klingenspor, E. Wolf, A. Zimmer, T. Klopstock, D. H. Busch, V. Gailus-Durner, H. Fuchs, M. H. Angelis, G. van der Horst and A. R. Lehmann (2013). "SMC6 is an essential gene in mice, but a hypomorphic mutant in the ATPase domain has a mild phenotype with a range of subtle abnormalities." *DNA Repair (Amst)* **12**(5): 356-366.
- Kadyk, L. C. and L. H. Hartwell (1992). "Sister chromatids are preferred over homologs as substrates for recombinational repair in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **132**(2): 387-402.
- Kaina, B. (2004). "Mechanisms and consequences of methylating agent-induced SCEs and chromosomal aberrations: a long road traveled and still a far way to go." *Cytogenet Genome Res* **104**(1-4): 77-86.
- Karanam, K., R. Kafri, A. Loewer and G. Lahav (2012). "Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase." *Mol Cell* **47**(2): 320-329.
- Karras, G. I. and S. Jentsch (2010). "The RAD6 DNA damage tolerance pathway operates uncoupled from the replication fork and is functional beyond S phase." *Cell* **141**(2): 255-267.
- Kastan, M. B. and J. Bartek (2004). "Cell-cycle checkpoints and cancer." *Nature* **432**(7015): 316-323.
- Kastan, M. B. and D. S. Lim (2000). "The many substrates and functions of ATM." *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(3): 179-186.
- Katsube, T., M. Mori, H. Tsuji, T. Shiomi, N. Shiomi and M. Onoda (2011). "Differences in sensitivity to DNA-damaging Agents between XRCC4- and Artemis-deficient human cells." *J Radiat Res* **52**(4): 415-424.
- Kawamoto, T., K. Araki, E. Sonoda, Y. M. Yamashita, K. Harada, K. Kikuchi, C. Masutani, F. Hanaoka, K. Nozaki, N. Hashimoto and S. Takeda (2005). "Dual roles for DNA polymerase eta in homologous DNA recombination and translesion DNA synthesis." *Mol Cell* **20**(5): 793-799.
- Kehrer, D. F., O. Soepenber, W. J. Loos, J. Verweij and A. Sparreboom (2001). "Modulation of camptothecin analogs in the treatment of cancer: a review." *Anticancer Drugs* **12**(2): 89-105.
- Khanna, K. K. and S. P. Jackson (2001). "DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection." *Nat Genet* **27**(3): 247-254.
- Kinner, A., W. Wu, C. Staudt and G. Iliakis (2008). "Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin." *Nucleic Acids Res* **36**(17): 5678-5694.
- Kitagawa, R., C. J. Bakkenist, P. J. McKinnon and M. B. Kastan (2004). "Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway." *Genes Dev* **18**(12): 1423-1438.
- Kogoma, T. (1997). "Stable DNA replication: interplay between DNA replication, homologous recombination, and transcription." *Microbiol Mol Biol Rev* **61**(2): 212-238.

-
- Koster, D. A., K. Palle, E. S. M. Bot, M. A. Bjornsti and N. H. Dekker (2007). "Antitumour drugs impede DNA uncoiling by topoisomerase I." *Nature* **448**(7150): 213-217.
- Kottemann, M. C. and A. Smogorzewska (2013). "Fanconi anaemia and the repair of Watson and Crick DNA crosslinks." *Nature* **493**(7432): 356-363.
- Krogh, B. O. and L. S. Symington (2004). "Recombination proteins in yeast." *Annu Rev Genet* **38**: 233-271.
- Kuhne, M., E. Riballo, N. Rief, K. Rothkamm, P. A. Jeggo and M. Lobrich (2004). "A double-strand break repair defect in ATM-deficient cells contributes to radiosensitivity." *Cancer Res* **64**(2): 500-508.
- Lahkim Bennani-Belhaj, K., G. Buhagiar-Labarchede, N. Jmari, R. Onclercq-Delic and M. Amor-Gueret (2010). "BLM Deficiency Is Not Associated with Sensitivity to Hydroxyurea-Induced Replication Stress." *J Nucleic Acids* **2010**.
- Larson, K., J. Sahm, R. Shenkar and B. Strauss (1985). "Methylation-induced blocks to in vitro DNA replication." *Mutat Res* **150**(1-2): 77-84.
- Laval, F. (1985). "Repair of methylated bases in mammalian cells during adaptive response to alkylating agents." *Biochimie* **67**(3-4): 361-364.
- Lee, S., L. Cavallo and J. Griffith (1997). "Human p53 binds Holliday junctions strongly and facilitates their cleavage." *J Biol Chem* **272**(11): 7532-7539.
- Leppard, J. B. and J. J. Champoux (2005). "Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles, and damage control." *Chromosoma* **114**(2): 75-85.
- Leteurtre, F., M. Fesen, G. Kohlhagen, K. W. Kohn and Y. Pommier (1993). "Specific interaction of camptothecin, a topoisomerase I inhibitor, with guanine residues of DNA detected by photoactivation at 365 nm." *Biochemistry* **32**(34): 8955-8962.
- Levin, D. S., A. E. McKenna, T. A. Motycka, Y. Matsumoto and A. E. Tomkinson (2000). "Interaction between PCNA and DNA ligase I is critical for joining of Okazaki fragments and long-patch base-excision repair." *Curr Biol* **10**(15): 919-922.
- Lieber, M. R. (2010). "The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway." *Annu Rev Biochem* **79**: 181-211.
- Liu, C., J. J. Pouliot and H. A. Nash (2002). "Repair of topoisomerase I covalent complexes in the absence of the tyrosyl-DNA phosphodiesterase Tdp1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(23): 14970-14975.
- Llorente, B., C. E. Smith and L. S. Symington (2008). "Break-induced replication - What is it and what is it for?" *Cell Cycle* **7**(7): 859-864.
- Lobrich, M. and P. A. Jeggo (2005). "Harmonising the response to DSBs: a new string in the ATM bow." *DNA Repair (Amst)* **4**(7): 749-759.
- Lobrich, M. and P. A. Jeggo (2007). "The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction." *Nat Rev Cancer* **7**(11): 861-869.
- Lobrich, M., A. Shibata, A. Beucher, A. Fisher, M. Ensminger, A. A. Goodarzi, O. Barton and P. A. Jeggo (2010). "gamma H2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair Strengths, limitations and optimization." *Cell Cycle* **9**(4): 662-669.
- Lobrich, M., A. Shibata, A. Beucher, A. Fisher, M. Ensminger, A. A. Goodarzi, O. Barton and P. A. Jeggo (2010). "gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization." *Cell Cycle* **9**(4): 662-669.

-
- Lopes, M., C. Cotta-Ramusino, A. Pelliccioli, G. Liberi, P. Plevani, M. Muzi-Falconi, C. S. Newlon and M. Foiani (2001). "The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks." Nature **412**(6846): 557-561.
- Lu, Y. P., Y. R. Lou, Q. Y. Peng, J. G. Xie, P. Nghiem and A. H. Conney (2008). "Effect of caffeine on the ATR/Chk1 pathway in the epidermis of UVB-irradiated mice." Cancer Res **68**(7): 2523-2529.
- Lukas, J., C. Lukas and J. Bartek (2004). "Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time." DNA Repair (Amst) **3**(8-9): 997-1007.
- Lukas, J., C. Lukas and J. Bartek (2011). "More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance." Nat Cell Biol **13**(10): 1161-1169.
- Lundin, C., K. Erixon, C. Arnaudeau, N. Schultz, D. Jenssen, M. Meuth and T. Helleday (2002). "Different roles for nonhomologous end joining and homologous recombination following replication arrest in mammalian cells." Mol Cell Biol **22**(16): 5869-5878.
- Lundin, C., M. North, K. Erixon, K. Walters, D. Jenssen, A. S. Goldman and T. Helleday (2005). "Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks." Nucleic Acids Res **33**(12): 3799-3811.
- Lydeard, J. R., S. Jain, M. Yamaguchi and J. E. Haber (2007). "Break-induced replication and telomerase-independent telomere maintenance require Pol32." Nature **448**(7155): 820-823.
- Lydeard, J. R., Z. Lipkin-Moore, Y. J. Sheu, B. Stillman, P. M. Burgers and J. E. Haber (2010). "Break-induced replication requires all essential DNA replication factors except those specific for pre-RC assembly." Genes Dev **24**(11): 1133-1144.
- Lynch, A. M., A. G. Mahabir, A. Bradford, K. Brockhurst, J. van Benthem, H. van Steeg and R. W. Rees (2008). "IS Muta (TM) Mouse insensitive to clastogens?" Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis **652**(2): 145-150.
- Ma, W., J. W. Westmoreland, D. A. Gordenin and M. A. Resnick (2011). "Alkylation base damage is converted into repairable double-strand breaks and complex intermediates in G2 cells lacking AP endonuclease." PLoS Genet **7**(4): e1002059.
- Machwe, A., R. Karale, X. Xu, Y. Liu and D. K. Orren (2011). "The Werner and Bloom syndrome proteins help resolve replication blockage by converting (regressed) holliday junctions to functional replication forks." Biochemistry **50**(32): 6774-6788.
- Marini, V. and L. Krejci (2012). "Unwinding of synthetic replication and recombination substrates by Srs2." DNA Repair (Amst) **11**(10): 789-798.
- Marple, T., T. M. Kim and P. Hasty (2006). "Embryonic stem cells deficient for Brca2 or Blm exhibit divergent genotoxic profiles that support opposing activities during homologous recombination." Mutat Res **602**(1-2): 110-120.
- Maya, R., M. Balass, S. T. Kim, D. Shkedy, J. F. Leal, O. Shifman, M. Moas, T. Buschmann, Z. Ronai, Y. Shiloh, M. B. Kastan, E. Katzir and M. Oren (2001). "ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage." Genes Dev **15**(9): 1067-1077.
- Mazloun, N. and W. K. Holloman (2009). "Brh2 promotes a template-switching reaction enabling recombinational bypass of lesions during DNA synthesis." Mol Cell **36**(4): 620-630.

- McIlwraith, M. J., A. Vaisman, Y. Liu, E. Fanning, R. Woodgate and S. C. West (2005). "Human DNA polymerase eta promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination." *Mol Cell* **20**(5): 783-792.
- Mechali, M. (2010). "Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(10): 728-738.
- Mimitou, E. P. and L. S. Symington (2009). "Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination." *Trends Biochem Sci* **34**(5): 264-272.
- Mohaghegh, P., J. K. Karow, R. M. Brosh, Jr., V. A. Bohr and I. D. Hickson (2001). "The Bloom's and Werner's syndrome proteins are DNA structure-specific helicases." *Nucleic Acids Res* **29**(13): 2843-2849.
- Morgan, D. O. (1997). "Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors." *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 261-291.
- Morham, S. G., K. D. Kluckman, N. Voulomanos and O. Smithies (1996). "Targeted disruption of the mouse topoisomerase I gene by camptothecin selection." *Mol Cell Biol* **16**(12): 6804-6809.
- Mosesso, P., E. Fonti, L. Bassi, C. Lorenti Garcia and F. Palitti (1999). "The involvement of chromatin condensation in camptothecin-induced chromosome breaks in G0 human lymphocytes." *Mutagenesis* **14**(1): 103-105.
- Mosig, G. (1987). "The essential role of recombination in phage T4 growth." *Annu Rev Genet* **21**: 347-371.
- Muggia, F. M., P. J. Creaven, H. H. Hansen, M. H. Cohen and O. S. Selawry (1972). "Phase I clinical trial of weekly and daily treatment with camptothecin (NSC-100880): correlation with preclinical studies." *Cancer Chemother Rep* **56**(4): 515-521.
- Muller, M. T., W. P. Pfund, V. B. Mehta and D. K. Trask (1985). "Eukaryotic type I topoisomerase is enriched in the nucleolus and catalytically active on ribosomal DNA." *EMBO J* **4**(5): 1237-1243.
- Musiol G., R. J., Reif R., Seeliger D. (1995). "Kern- und Elementarteilchenphysik."
- 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 (2010). "Collaborative action of Brca1 and CtIP in elimination of covalent modifications from double-strand breaks to facilitate subsequent break repair." *PLoS Genet* **6**(1): e1000828.
- Nakanishi, K., T. Taniguchi, V. Ranganathan, H. V. New, L. A. Moreau, M. Stotsky, C. G. Mathew, M. B. Kastan, D. T. Weaver and A. D. D'Andrea (2002). "Interaction of FANCD2 and NBS1 in the DNA damage response." *Nat Cell Biol* **4**(12): 913-920.
- Natarajan, A. T. and F. Palitti (2008). "DNA repair and chromosomal alterations." *Mutat Res* **657**(1): 3-7.
- Neale, M. J. and S. Keeney (2006). "Clarifying the mechanics of DNA strand exchange in meiotic recombination." *Nature* **442**(7099): 153-158.
- Niedernhofer, L. J., H. Odijk, M. Budzowska, E. van Drunen, A. Maas, A. F. Theil, J. de Wit, N. G. Jaspers, H. B. Beverloo, J. H. Hoeijmakers and R. Kanaar (2004). "The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks." *Mol Cell Biol* **24**(13): 5776-5787.

-
- Nikolova, T., M. Ensminger, M. Lobrich and B. Kaina (2010). "Homologous recombination protects mammalian cells from replication-associated DNA double-strand breaks arising in response to methyl methanesulfonate." *DNA Repair (Amst)* **9**(10): 1050-1063.
- O'Driscoll, M., V. L. Ruiz-Perez, C. G. Woods, P. A. Jeggo and J. A. Goodship (2003). "A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome." *Nat Genet* **33**(4): 497-501.
- Ogi, T., S. Walker, T. Stiff, E. Hobson, S. Limsirichaikul, G. Carpenter, K. Prescott, M. Suri, P. J. Byrd, M. Matsuse, N. Mitsutake, Y. Nakazawa, P. Vasudevan, M. Barrow, G. S. Stewart, A. M. Taylor, M. O'Driscoll and P. A. Jeggo (2012). "Identification of the first ATRIP-deficient patient and novel mutations in ATR define a clinical spectrum for ATR-ATRIP Seckel Syndrome." *PLoS Genet* **8**(11): e1002945.
- Osborne, M. R. and D. H. Phillips (2000). "Preparation of a methylated DNA standard, and its stability on storage." *Chem Res Toxicol* **13**(4): 257-261.
- Osman, F. and M. C. Whitby (2007). "Exploring the roles of Mus81-Eme1/Mms4 at perturbed replication forks." *DNA Repair (Amst)* **6**(7): 1004-1017.
- Oza, P., S. L. Jaspersen, A. Miele, J. Dekker and C. L. Peterson (2009). "Mechanisms that regulate localization of a DNA double-strand break to the nuclear periphery." *Genes & Development* **23**(8): 912-927.
- Paques, F. and J. E. Haber (1999). "Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*." *Microbiol Mol Biol Rev* **63**(2): 349-404.
- Pardo, B., B. Gomez-Gonzalez and A. Aguilera (2009). "DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship." *Cell Mol Life Sci* **66**(6): 1039-1056.
- Petermann, E. and K. W. Caldecott (2006). "Evidence that the ATR/Chk1 pathway maintains normal replication fork progression during unperturbed S phase." *Cell Cycle* **5**(19): 2203-2209.
- Petermann, E. and T. Helleday (2010). "Pathways of mammalian replication fork restart." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(10): 683-687.
- Petermann, E., M. L. Orta, N. Issaeva, N. Schultz and T. Helleday (2010). "Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair." *Mol Cell* **37**(4): 492-502.
- Pommier, Y. (2004). "Camptothecins and topoisomerase I: a foot in the door. Targeting the genome beyond topoisomerase I with camptothecins and novel anticancer drugs: importance of DNA replication, repair and cell cycle checkpoints." *Curr Med Chem Anticancer Agents* **4**(5): 429-434.
- Pommier, Y. (2006). "Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond." *Nat Rev Cancer* **6**(10): 789-802.
- Pommier, Y. (2009). "DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition." *Chem Rev* **109**(7): 2894-2902.
- Pommier, Y. (2013). "Drugging topoisomerases: lessons and challenges." *ACS Chem Biol* **8**(1): 82-95.
- Pommier, Y., J. M. Barcelo, V. A. Rao, O. Sordet, A. G. Jobson, L. Thibaut, Z. H. Miao, J. A. Seiler, H. Zhang, C. Marchand, K. Agama, J. L. Nitiss and C. Redon (2006). "Repair of topoisomerase I-mediated DNA damage." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **81**: 179-229.

-
- Pommier, Y. and C. Marchand (2012). "Interfacial inhibitors: targeting macromolecular complexes." *Nat Rev Drug Discov* **11**(1): 25-36.
- Pommier, Y., P. Pourquier, Y. Urasaki, J. Wu and G. S. Laco (1999). "Topoisomerase I inhibitors: selectivity and cellular resistance." *Drug Resist Updat* **2**(5): 307-318.
- Pouliot, J. J., K. C. Yao, C. A. Robertson and H. A. Nash (1999). "Yeast gene for a Tyr-DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase I complexes." *Science* **286**(5439): 552-555.
- Pray, L. A. (2008). "DNA Replication and Causes of Mutation." *Nature Education* **1**.
- Qi, W., D. Qiao and J. D. Martinez (2002). "Caffeine induces TP53-independent G(1)-phase arrest and apoptosis in human lung tumor cells in a dose-dependent manner." *Radiat Res* **157**(2): 166-174.
- Raghuraman, M. K., E. A. Winzeler, D. Collingwood, S. Hunt, L. Wodicka, A. Conway, D. J. Lockhart, R. W. Davis, B. J. Brewer and W. L. Fangman (2001). "Replication dynamics of the yeast genome." *Science* **294**(5540): 115-121.
- Rao, V. A., A. M. Fan, L. Meng, C. F. Doe, P. S. North, I. D. Hickson and Y. Pommier (2005). "Phosphorylation of BLM, dissociation from topoisomerase IIIalpha, and colocalization with gamma-H2AX after topoisomerase I-induced replication damage." *Mol Cell Biol* **25**(20): 8925-8937.
- Rass, U., S. A. Compton, J. Matos, M. R. Singleton, S. C. Ip, M. G. Blanco, J. D. Griffith and S. C. West (2010). "Mechanism of Holliday junction resolution by the human GEN1 protein." *Genes Dev* **24**(14): 1559-1569.
- Raszewski, R. (2007). "The American Heritage (R) Medical Dictionary." *Library Journal* **132**(10): 148-148.
- Redinbo, M. R., L. Stewart, P. Kuhn, J. J. Champoux and W. G. Hol (1998). "Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA." *Science* **279**(5356): 1504-1513.
- 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 (2004). "A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci." *Mol Cell* **16**(5): 715-724.
- Rothenberg, M. L. (2001). "Irinotecan (CPT-11): recent developments and future directions--colorectal cancer and beyond." *Oncologist* **6**(1): 66-80.
- Rothkamm, K., I. Kruger, L. H. Thompson and M. Lobrich (2003). "Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle." *Mol Cell Biol* **23**(16): 5706-5715.
- Rothkamm, K. and M. Lobrich (2003). "Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(9): 5057-5062.
- Saintigny, Y., F. Delacote, G. Vares, F. Petitot, S. Lambert, D. Averbeck and B. S. Lopez (2001). "Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells." *EMBO J* **20**(14): 3861-3870.
- Samson, L. and J. Cairns (1977). "A new pathway for DNA repair in Escherichia coli." *Nature* **267**(5608): 281-283.
- Sarkaria, J. N., E. C. Busby, R. S. Tibbetts, P. Roos, Y. Taya, L. M. Karnitz and R. T. Abraham (1999). "Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine." *Cancer Res* **59**(17): 4375-4382.

-
- Sartori, A. A., C. Lukas, J. Coates, M. Mistrik, S. Fu, J. Bartek, R. Baer, J. Lukas and S. P. Jackson (2007). "Human CtIP promotes DNA end resection." *Nature* **450**(7169): 509-514.
- Sattler, U., P. Frit, B. Salles and P. Calsou (2003). "Long-patch DNA repair synthesis during base excision repair in mammalian cells." *EMBO Rep* **4**(4): 363-367.
- Satyanarayana, A. and P. Kaldis (2009). "Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms." *Oncogene* **28**(33): 2925-2939.
- Schlacher, K., N. Christ, N. Siaud, A. Egashira, H. Wu and M. Jasin (2011). "Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11." *Cell* **145**(4): 529-542.
- Schoeffler, A. J. and J. M. Berger (2005). "Recent advances in understanding structure-function relationships in the type II topoisomerase mechanism." *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 6): 1465-1470.
- Schwacha, A. and N. Kleckner (1995). "Identification of double Holliday junctions as intermediates in meiotic recombination." *Cell* **83**(5): 783-791.
- Scorah, J. and C. H. McGowan (2009). "Claspin and Chk1 regulate replication fork stability by different mechanisms." *Cell Cycle* **8**(7): 1036-1043.
- Seol, Y., H. Zhang, Y. Pommier and K. C. Neuman (2012). "A kinetic clutch governs religation by type IB topoisomerases and determines camptothecin sensitivity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(40): 16125-16130.
- Shechter, D., V. Costanzo and J. Gautier (2004). "Regulation of DNA replication by ATR: signaling in response to DNA intermediates." *DNA Repair (Amst)* **3**(8-9): 901-908.
- 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 (2011). "Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase." *EMBO J* **30**(6): 1079-1092.
- Shiloh, Y. (2003). "ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity." *Nat Rev Cancer* **3**(3): 155-168.
- Smiraldo, P. G., A. M. Gruver, J. C. Osborn and D. L. Pittman (2005). "Extensive chromosomal instability in Rad51d-deficient mouse cells." *Cancer Res* **65**(6): 2089-2096.
- Smith, L. M., E. Willmore, C. A. Austin and N. J. Curtin (2005). "The novel poly(ADP-Ribose) polymerase inhibitor, AG14361, sensitizes cells to topoisomerase I poisons by increasing the persistence of DNA strand breaks." *Clin Cancer Res* **11**(23): 8449-8457.
- Sobol, R. W., D. E. Watson, J. Nakamura, F. M. Yakes, E. Hou, J. K. Horton, J. Ladapo, B. Van Houten, J. A. Swenberg, K. R. Tindall, L. D. Samson and S. H. Wilson (2002). "Mutations associated with base excision repair deficiency and methylation-induced genotoxic stress." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(10): 6860-6865.
- Sonoda, E., M. S. Sasaki, J. M. Buerstedde, O. Bezzubova, A. Shinohara, H. Ogawa, M. Takata, Y. Yamaguchi-Iwai and S. Takeda (1998). "Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death." *EMBO J* **17**(2): 598-608.
- Sonoda, E., M. S. Sasaki, C. Morrison, Y. Yamaguchi-Iwai, M. Takata and S. Takeda (1999). "Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells." *Mol Cell Biol* **19**(7): 5166-5169.

- Sordet, O., S. Laroche, E. Nicolas, E. V. Stevens, C. Zhang, K. M. Shokat, R. P. Fisher and Y. Pommier (2008). "Hyperphosphorylation of RNA polymerase II in response to topoisomerase I cleavage complexes and its association with transcription- and BRCA1-dependent degradation of topoisomerase I." *J Mol Biol* **381**(3): 540-549.
- Staszewski, O., T. Nikolova and B. Kaina (2008). "Kinetics of gamma-H2AX Focus Formation Upon Treatment of Cells With UV Light and Alkylating Agents." *Environmental and Molecular Mutagenesis* **49**(9): 734-740.
- Stork, G. and A. G. Schultz (1971). "The total synthesis of dl-camptothecin." *J Am Chem Soc* **93**(16): 4074-4075.
- Strumberg, D., A. A. Pilon, M. Smith, R. Hickey, L. Malkas and Y. Pommier (2000). "Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5'-phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff." *Mol Cell Biol* **20**(11): 3977-3987.
- Sung, P. and H. Klein (2006). "Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(10): 739-750.
- Szostak, J. W., T. L. Orr-Weaver, R. J. Rothstein and F. W. Stahl (1983). "The double-strand-break repair model for recombination." *Cell* **33**(1): 25-35.
- Takashima, H., C. F. Boerkoel, J. John, G. M. Saifi, M. A. Salih, D. Armstrong, Y. Mao, F. A. Quijcho, B. B. Roa, M. Nakagawa, D. W. Stockton and J. R. Lupski (2002). "Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy." *Nat Genet* **32**(2): 267-272.
- Taylor, E. R. and C. H. McGowan (2008). "Cleavage mechanism of human Mus81-Eme1 acting on Holliday-junction structures." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(10): 3757-3762.
- Tebbs, R. S., M. L. Flannery, J. J. Meneses, A. Hartmann, J. D. Tucker, L. H. Thompson, J. E. Cleaver and R. A. Pedersen (1999). "Requirement for the Xrcc1 DNA base excision repair gene during early mouse development." *Dev Biol* **208**(2): 513-529.
- Thompson, L. H., K. W. Brookman, L. E. Dillehay, A. V. Carrano, J. A. Mazrimas, C. L. Mooney and J. L. Minkler (1982). "A CHO-cell strain having hypersensitivity to mutagens, a defect in DNA strand-break repair, and an extraordinary baseline frequency of sister-chromatid exchange." *Mutat Res* **95**(2-3): 427-440.
- Thompson, L. H., K. W. Brookman, L. E. Dillehay, A. V. Carrano, J. A. Mazrimas, C. L. Mooney and J. L. Minkler (1982). "A Cho-Cell Strain Having Hypersensitivity to Mutagens, a Defect in DNA Strand-Break Repair, and an Extraordinary Baseline Frequency of Sister-Chromatid Exchange." *Mutation Research* **95**(2-3): 427-440.
- Tian, X., G. Chen, H. Xing, D. Weng, Y. Guo and D. Ma (2007). "The relationship between the down-regulation of DNA-PKcs or Ku70 and the chemosensitization in human cervical carcinoma cell line HeLa." *Oncol Rep* **18**(4): 927-932.
- Tomicic, M. T. and B. Kaina (2013). "Topoisomerase degradation, DSB repair, p53 and IAPs in cancer cell resistance to camptothecin-like topoisomerase I inhibitors." *Biochim Biophys Acta* **1835**(1): 11-27.
- Tominaga, H., S. Kodama, N. Matsuda, K. Suzuki and M. Watanabe (2004). "Involvement of reactive oxygen species (ROS) in the induction of genetic instability by radiation." *J Radiat Res* **45**(2): 181-188.
- Tomita, K., A. Matsuura, T. Caspari, A. M. Carr, Y. Akamatsu, H. Iwasaki, K. Mizuno, K. Ohta, M. Uritani, T. Ushimaru, K. Yoshinaga and M. Ueno (2003). "Competition between the Rad50 complex

and the Ku heterodimer reveals a role for Exo1 in processing double-strand breaks but not telomeres." Mol Cell Biol **23**(15): 5186-5197.

Tomkinson, A. E. and Z. B. Mackey (1998). "Structure and function of mammalian DNA ligases." Mutat Res **407**(1): 1-9.

Tsuzuki, T., Y. Fujii, K. Sakumi, Y. Tominaga, K. Nakao, M. Sekiguchi, A. Matsushiro, Y. Yoshimura and Morita T (1996). "Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(13): 6236-6240.

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 (2007). "Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks." J Cell Biol **177**(2): 219-229.

Usdin, K. and K. J. Woodford (1995). "CGG repeats associated with DNA instability and chromosome fragility form structures that block DNA synthesis in vitro." Nucleic Acids Res **23**(20): 4202-4209.

Uziel, T., Y. Lerenthal, L. Moyal, Y. Andegeko, L. Mittelman and Y. Shiloh (2003). "Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage." EMBO J **22**(20): 5612-5621.

Veld, C. W. O. H., J. Jansen, M. Z. Zdzienicka, H. Vrieling and A. A. van Zeeland (1998). "Methyl methanesulfonate-induced hprt mutation spectra in the Chinese hamster cell line CH09 and its xrccl-deficient derivative EM-C11." Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **398**(1-2): 83-92.

Verma, R. P. and C. Hansch (2009). "Camptothecins: a SAR/QSAR study." Chem Rev **109**(1): 213-235.

Viard, T. and C. B. de la Tour (2007). "Type IA topoisomerases: a simple puzzle?" Biochimie **89**(4): 456-467.

Vidal, A. E., S. Boiteux, I. D. Hickson and J. P. Radicella (2001). "XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions." EMBO J **20**(22): 6530-6539.

Vilenchik, M. M. and A. G. Knudson (2003). "Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(22): 12871-12876.

Walker, J. R., R. A. Corpina and J. Goldberg (2001). "Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair." Nature **412**(6847): 607-614.

Wall, M. E. and M. C. Wani (1996). "Camptothecin. Discovery to clinic." Ann N Y Acad Sci **803**: 1-12.

Wall, M. E., M. C. Wani, C. E. Cook, K. H. Palmer, A. T. Mcphail and G. A. Sim (1966). "Plant Antitumor Agents .I. Isolation and Structure of Camptothecin a Novel Alkaloidal Leukemia and Tumor Inhibitor from *Camptotheca Acuminata*." Journal of the American Chemical Society **88**(16): 3888-3890.

Wang, J. C. (2002). "Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(6): 430-440.

Weterings, E. and D. J. Chen (2007). "DNA-dependent protein kinase in nonhomologous end joining: a lock with multiple keys?" J Cell Biol **179**(2): 183-186.

Weterings, E. and D. J. Chen (2008). "The endless tale of non-homologous end-joining." Cell Res **18**(1): 114-124.

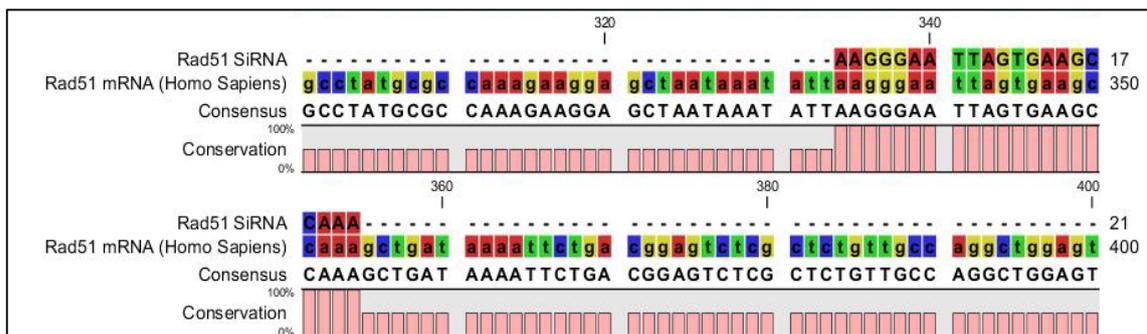
Weterings, E. and D. C. van Gent (2004). "The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synapsis." DNA Repair (Amst) **3**(11): 1425-1435.

-
- Whitehouse, C. J., R. M. Taylor, A. Thistlethwaite, H. Zhang, F. Karimi-Busheri, D. D. Lasko, M. Weinfeld and K. W. Caldecott (2001). "XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair." *Cell* **104**(1): 107-117.
- Wilson, S. H., R. W. Sobol, W. A. Beard, J. K. Horton, R. Prasad and B. J. Vande Berg (2000). "DNA polymerase beta and mammalian base excision repair." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **65**: 143-155.
- Woodfine, K., H. Fiegler, D. M. Beare, J. E. Collins, O. T. McCann, B. D. Young, S. Debernardi, R. Mott, I. Dunham and N. P. Carter (2004). "Replication timing of the human genome." *Hum Mol Genet* **13**(2): 191-202.
- Wu, L. and I. D. Hickson (2003). "The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination." *Nature* **426**(6968): 870-874.
- Wyatt, M. D. and D. L. Pittman (2006). "Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks." *Chem Res Toxicol* **19**(12): 1580-1594.
- Yang, H., Q. Li, J. Fan, W. K. Holloman and N. P. Pavletich (2005). "The BRCA2 homologue Brh2 nucleates RAD51 filament formation at a dsDNA-ssDNA junction." *Nature* **433**(7026): 653-657.
- Zhang, C. X., A. D. Chen, N. J. Gettel and T. S. Hsieh (2000). "Essential functions of DNA topoisomerase I in *Drosophila melanogaster*." *Dev Biol* **222**(1): 27-40.
- Zhang, H., J. C. Wang and L. F. Liu (1988). "Involvement of DNA topoisomerase I in transcription of human ribosomal RNA genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(4): 1060-1064.
- Zhang, Y. W., M. Regairaz, J. A. Seiler, K. K. Agama, J. H. Doroshov and Y. Pommier (2011). "Poly(ADP-ribose) polymerase and XPF-ERCC1 participate in distinct pathways for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage in mammalian cells." *Nucleic Acids Res* **39**(9): 3607-3620.
- Zhou, C., Z. Li, H. Diao, Y. Yu, W. Zhu, Y. Dai, F. F. Chen and J. Yang (2006). "DNA damage evaluated by gammaH2AX foci formation by a selective group of chemical/physical stressors." *Mutat Res* **604**(1-2): 8-18.
- Zou, L. and S. J. Elledge (2003). "Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes." *Science* **300**(5625): 1542-1548.

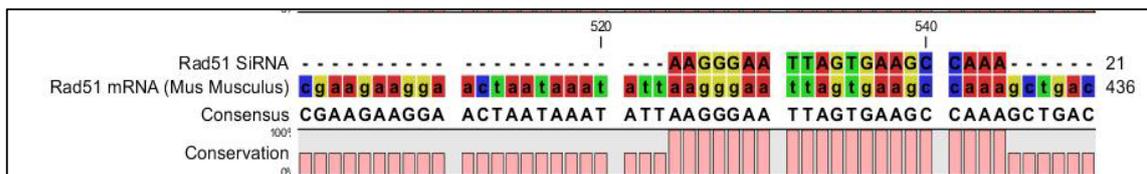
Anhang

Anhang 1) Sequenzabgleich der RAD51-SiRNA-Sequenz mit den RAD51-Gensequenzen des humanen und murinen Genoms mittels der Software *CLC sequence viewer*. Die in der vorliegenden Arbeit genutzte RAD51-SiRNA stimmt in beiden Systemen komplett mit der Zielsequenz der RAD51-Gene des humanen (*Homo sapiens*) und murinen (*Mus musculus*) Genoms überein, sodass die Verwendung der RAD51-SiRNA in beiden Systemen möglich ist.

Homo sapiens – A549-/HeLa-cells

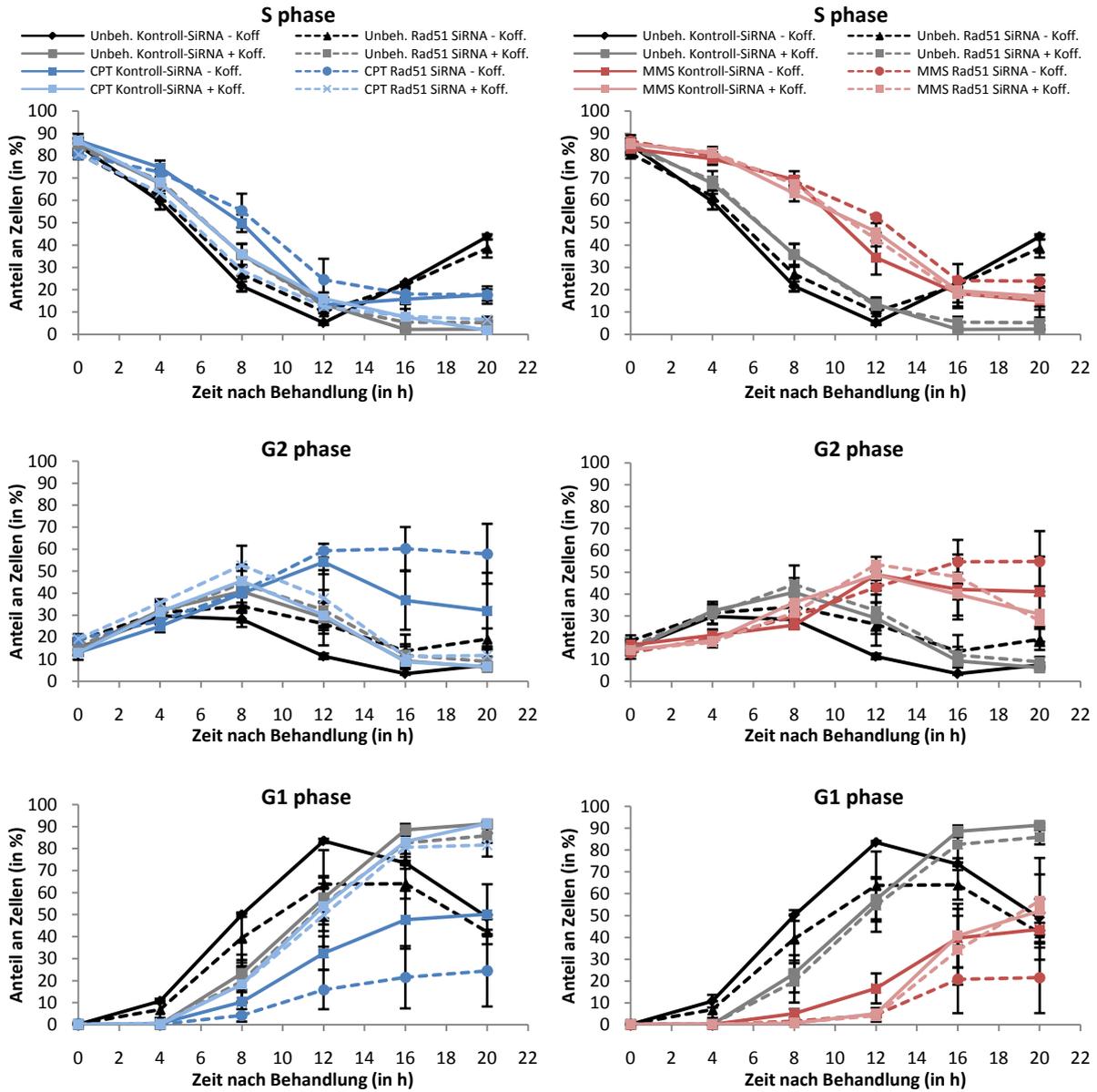


Mus musculus – Mouse embryonic fibroblasts (WT/AAG)

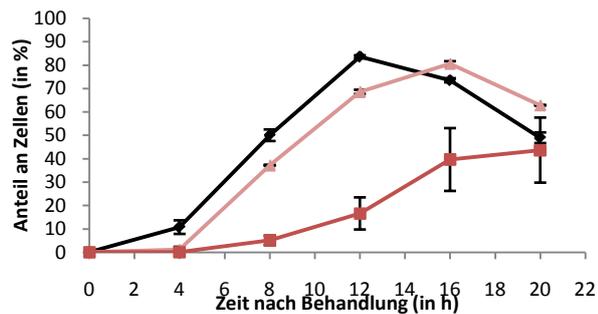
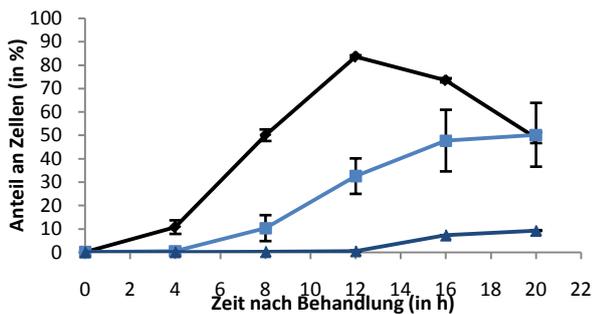
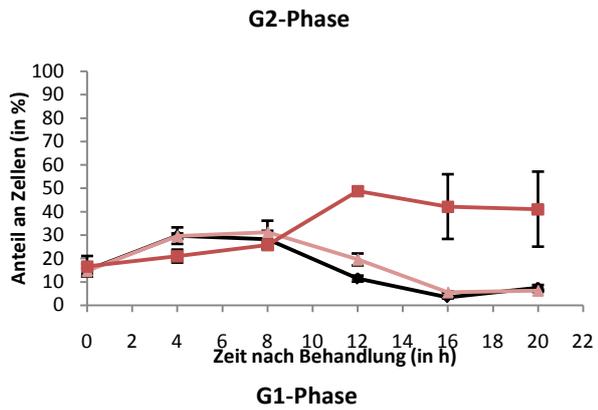
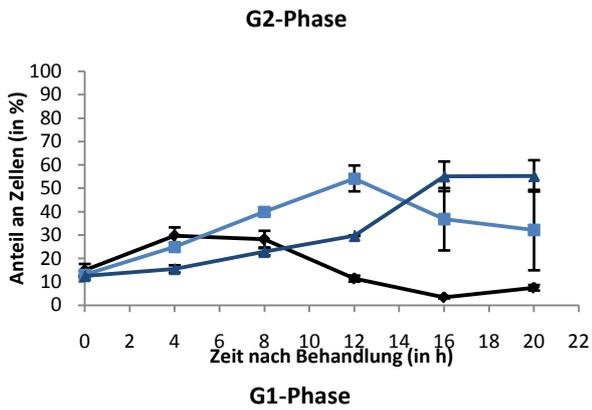
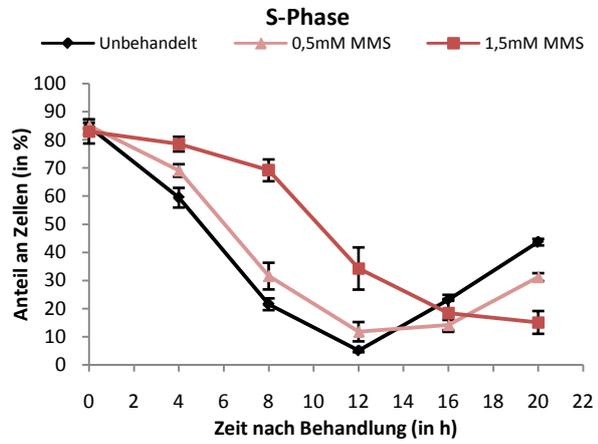
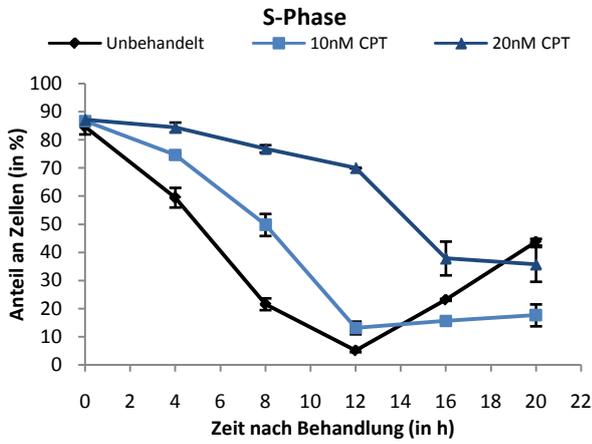


Sequence alignment with
CLC Sequence Viewer 6 (CLC bio)

Anhang 2) Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen aus Abbildung 44 mit angegebenen Werten des Standardfehlers.



Anhang 3) Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen von Zellen nach einer CPT- oder MMS-Behandlung mit unterschiedlichen Dosen. Durch eine Behandlung von A549-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von CPT oder MMS ist eine dosisabhängige Verlangsamung der Zellzyklusprogression zu erkennen. Mit steigender Konzentration von CPT oder MMS wird sowohl die S-Phase-Progression als auch der Eintritt in die G1-Phase zunehmend verzögert.



Lebenslauf

Persönliche Daten

Christian Ebel
Kiesstr. 107
64287 Darmstadt

Telefon: 0177 5558675
E-mail: chris.ebel@freenet.de

geboren am 17.06.1982 in Dortmund
Familienstand: Ledig

Schulbildung

20.06.1988 – 02.06.1992 Grundschule „Schule an den Linden“, Rödermark
04.08.1992 – 30.05.2001 Gymnasium „Eleonorenschule“ Darmstadt
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Wehr-/Zivildienst

03.09.2001 – 30.06.2002 Johanniter-Unfall-Hilfe Darmstadt,
Aufgabenbereich Behindertentransport

Studium und Ausbildung

01.09.2002 – 28.02.2003 Studium der Biotechnologie auf Diplom, Fachhochschule Gießen
01.04.2003 – 30.05.2006 Studium Molekulare Biologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Abschluss: Bachelor of Science
23.10.2006 – 30.09.2008 Studium Biomedizin, Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Abschluss: Master of Science
05.01.2009 – Heute Promotion im Bereich Strahlenbiologie und DNA-Reparatur, Technische Universität Darmstadt

Berufs- und Auslandsfahrten

1998 dreimonatiges Student-Exchange-Program, Colorado, USA
1999 - 2005 Jugend-Assistenztrainer des Hessischen Tennis-Verbands
01.02.2003 – 30.09.2003 Teilzeitkraft im Bereich Telekommunikationsmarketing
01.03.2005 – 31.12.2005 Teilzeitkraft beim Institut Fresenius, Analytik
11.08.2005 – 09.10.2005 Werkstudent bei Sanofi-Aventis, S&MA TD Metabolism
01.06.2006 – 13.10.2006 Werkstudent bei Sanofi-Aventis, S&MA Logistics Site Management
06.08.2007 – 19.10.2007 Werkstudent bei Sanofi-Aventis, S&MA Cardio-Vascular

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Markus Löbrich für die Bereitstellung des interessanten Themas meiner Dissertation, die gute Unterstützung, seinen Führungsstil und für die vielen innovativen Ratschläge danken.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Gerhard Thiel für die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung dieser Arbeit sowie bei Frau Prof. Beatrix Süß und Herrn Prof. Marco Durante für die Bereitschaft als Prüfer zu agieren.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Michael Ensminger für die umfassende Betreuung und große Unterstützung meiner Arbeit, die stets aufbauenden Worte, die vielen wissenschaftlichen und privaten Gespräche sowie für die Korrektur der Dissertation.

Außerdem möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe Löbrich für die schöne Zeit, das gute Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft bedanken.

Bei meinen Eltern und Großeltern sowie meiner Freundin Vanessa bedanke ich mich für den großen Rückhalt, das Vertrauen und den Glauben an mich.