

**Funktionelle Untersuchungen
zur Rolle des RAD50 Proteins
in der zellulären Schadensantwort
und in der Mitose**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

-Dr.rer.nat.-

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem. Bianca Schröder-Heurich
geboren am 29.01.1982, in Burgwedel

2014

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Helmut Holtmann
Institut für Physiologische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent: Prof. Dr. med. Detlev Schindler
Institut für Humangenetik, Universität Würzburg

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Ekkehard Dikomey
Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie
Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Tag der Promotion: 16.12.2013

**Diese Arbeit ist
meiner Familie
gewidmet.**

Zusammenfassung

DNA-Schäden stellen ein potentiell letales Ereignis für eine Zelle dar. Die zelluläre Antwort auf DNA-Schäden ist vielschichtig und kann zu Zellzyklusarrest, Reparatur des Schadens oder Apoptose führen. Abhängig von der Art des DNA-Schadens wird die zelluläre Schadensantwort über den ATR- oder den ATM-Signalweg eingeleitet. Der MRN-Komplex, bestehend aus den Proteinen RAD50, MRE11 und NBN, spielt eine essentielle Rolle in der Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen und in der Reparatur dieses Schadens. Ein Defekt in dieser komplexen Signalkaskade kann zu einer genomischen Instabilität und zu Chromosomenfehlsegregationen unter Ausbildung von Chromatin-Brücken führen. Fehlfunktionen in diesen Proteinen sind mit der Entstehung von Krebserkrankungen, unter anderem Brustkrebs, verbunden. Eine Untersuchung der Proteine des MRN-Komplexes in Brustkrebszelllinien identifizierte eine Aminosäuresubstitution p.R215W im *NBN* Gen der Brustkrebszelllinie HCC1395. Das mutierte NBN in dieser Zelllinie war instabil und zeigte keine fokale Akkumulation nach DNA-Schädigung. Weitere funktionelle Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass diese Mutation nicht mit einer signifikanten Beeinträchtigung der ATM-Kinaseaktivität, jedoch mit einer reduzierten Verbreitung von Reparaturfoci der Proteine γ H2AX, MDC1 und 53BP1 assoziiert war. Dies steht im Einklang mit einer dualen Funktion des MRN-Komplexes in der primären Schadenserkenkung wie auch der späteren Propagation des Signals. Während die Funktion des MRN-Komplexes in der ATM-vermittelten Schadensantwort bereits gut charakterisiert ist, gibt es noch wenige Erkenntnisse über die Funktion in der ATR-vermittelten Schadensantwort sowie in der Mitose und Cytokinese. In dieser Arbeit wurde die Relevanz des RAD50 Proteins im ATR-Signalweg und in der Mitose untersucht. Bei der funktionellen Charakterisierung einer RAD50-defizienten Zelllinie konnte ein partieller Defekt in der ATR-vermittelten Schadensantwort nachgewiesen werden, der sich in der Bildung von γ H2AX Reparaturfoci, aber nicht im G2/M-Zellzyklusarrest manifestierte. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine RAD50-Defizienz mit einer Centrosomenaberration einhergeht, ein Ereignis, welches mit einer abnormalen Cytokinese und der Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht wird. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass ein RAD50 *knock-down* zu einer zeitlich verlängerten Mitose führt und dass ein reduzierter RAD50 Proteinspiegel mit einer Reduktion von Chromatin-Brücken einhergeht. Immuncytochemische Untersuchungen zeigten, dass RAD50 in der abnormalen Cytokinese und der abnormalen Mitose mit Chromatin colokalisiert vorliegt. Es konnte eine Interaktion von RAD50 mit dem phosphorylierten Histon H3 nachgewiesen werden sowie eine verstärkte Bindung von RAD50 an Chromatin zu Beginn der Mitose. Zusätzlich konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass RAD50 mit Aurora B in der abnormalen Cytokinese auf den Chromatin-Brücken sowie in der Interphase interagiert. Die Interaktionen von Aurora B und phospho-Histon H3 mit RAD50 sind vermutlich mit einer stabilisierenden und schützenden Funktion von RAD50 in der abnormalen Cytokinese verbunden. Insgesamt erweitern die Ergebnisse dieser Arbeit das bisher bekannte Spektrum an Funktionen für den MRN-Komplex, speziell für das RAD50 Protein, und zeigen neue Interaktionen von RAD50 mit Regulatoren der Mitose und Cytokinese.

Schlagwörter: RAD50, Chromatin-Brücken, abnormale Cytokinese

Abstract

DNA damage represents a potentially lethal event for a cell. The response to cellular damage is diverse and includes cell cycle arrest, DNA damage repair or apoptosis of the cell. Depending on the type of damage, cellular damage response is initiated by signaling through the ATR or ATM kinases. The MRN complex, consisting of the proteins RAD50, MRE11 and NBN, plays an essential role in the early detection of DNA double-strand breaks and in the repair of this damage. Defects in this complex signal cascade can lead to genomic instability and chromosome segregation defects such as chromatin bridges. These events are associated with the development of cancer, including breast cancer. A screen of the MRN complex proteins in breast cancer cell lines identified an amino acid substitution p.R215W in the *NBN* gene of the breast cancer cell line HCC1395. In this cell line, the mutant NBN was unstable and was poorly recruited to damage sites. Further functional studies in this work showed that this mutation was not associated with a significant impairment of ATM kinase activity but with a defect in γ H2AX, MDC1 and 53BP1 foci extension. This seems to be in line with a dual function of the MRN complex in the primary detection as well as the subsequent propagation of the damage signal. While the function of the MRN complex has been well characterized in the ATM-mediated damage response, relatively little is known about its possible roles in other damage responses or in mitosis and cytokinesis. In the present thesis the relevance of the RAD50 protein in the ATR pathway and in mitosis was investigated. Functional investigation of a RAD50-deficient cell line identified a partial defect in the ATR-mediated damage response, manifesting in the formation of γ H2AX foci, but not in a G2/M cell cycle arrest. Furthermore, RAD50-deficiency was associated with centrosome aberrations, an event which is associated with abnormal cytokinesis and cancer development. In addition, RAD50 knock-down lead to a temporally extended mitosis, and reduced RAD50 protein level was associated with a reduced number of chromatin bridges. Immunocytochemical studies showed that RAD50 colocalised with chromatin in both abnormal cytokinesis and abnormal mitosis. Binding of RAD50 to chromatin was increased at mitosis onset, and colocalisation and direct interaction of RAD50 with the phosphorylated histone H3 was detected. Further, it was found that RAD50 interacts with Aurora B. This interaction was observed during abnormal cytokinesis on chromatin bridges as well as in interphase. This interaction of Aurora B and phosphorylated Histone H3 with RAD50 are probably connected with a stabilizing and protective function of RAD50 in abnormal cytokinesis. Overall, the work presented here extends the previously known range of functions for the MRN complex, especially the RAD50 protein, and provides evidence for interplay of RAD50 with regulators of mitosis and cytokinesis.

Keywords: RAD50, chromatin bridges, abnormal cytokinesis

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Eukaryotischer Zellzyklus und Zellzyklusregulation	1
1.1.1	Zellzyklus	1
1.1.2	Cytokinese	2
1.1.3	Zellzyklusregulation und Zellzykluskontrollpunkte	5
1.2	Entstehung von DNA-Schäden	7
1.3	Erkennung und Weiterleitung von DNA-Schadenssignalen.....	8
1.3.1	Primäre Schadensantwort.....	8
1.3.2	Primäre Schritte im ATM-Signalweg	9
1.3.3	Primäre Schritte im ATR-Signalweg	10
1.3.4	Interaktionen des ATM- und ATR-Signalweges	11
1.4	DNA-Reparaturwege	12
1.4.1	Möglichkeiten der DNA-Reparatur.....	12
1.4.1	Nicht-Homologe-Endverknüpfung.....	13
1.4.2	Homologe Rekombinationsreparatur	14
1.5	DNA-Reparatur-Defizienz-Syndrome	15
1.5.1	Mögliche Auswirkungen eines Defekts in der DNA-Reparatur	15
1.5.1	Ataxia Teleangiectatica	15
1.5.2	Nijmegen Breakage Syndrom, <i>AT-like disorder</i> und <i>NBS-like disorder</i>	16
1.6	Der MRE11-RAD50-NBN (MRN)-Komplex	17
1.6.1	MRE11	17
1.6.2	NBN	18
1.6.3	RAD50	19
1.6.4	Bindung des MRN-Komplexes an einen Doppelstrangbruch	20
1.7	Zellteilung und DNA-Schadensproteine.....	20

2	Zielsetzung der Arbeit	22
3	Material und Methoden	23
3.1	Zellbiologische Methoden	23
3.1.1	Zelllinien	23
3.1.2	Kultivierung und Passagierung von adhärennten Zelllinien	25
3.1.3	Kultivierung und Passagierung von Suspensionszellen	25
3.1.4	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	26
3.2	Bestrahlung von Zellen	26
3.3	Synchronisation von Zellen	27
3.4	Transfektion von eukaryotischen Zellen.....	27
3.5	Immuncytochemie.....	27
3.5.1	Immuncytochemische Färbung	27
3.5.2	Bestimmung des Mitotischen Index	28
3.5.3	Proliferationsanalyse einer Gesamtzellpopulation	29
3.5.4	Foci Analyse.....	30
3.5.5	G2/M-Zellzykluskontrollpunkt-Analyse	30
3.6	<i>Proximity Ligation Assay (PLA)</i>	31
3.7	Mikroskopie	32
3.7.1	Fluoreszenzmikroskopie.....	32
3.7.2	Konfokale Laser-Mikroskopie	32
3.7.3	Lebendzellmikroskopie	33
3.7.4	Bildverarbeitung.....	33
3.8	Proteinanalysen	34
3.8.1	Proteinextraktion	34
3.8.1.1	Extraktion von Proteinen	34
3.8.1.2	Fraktionierte Extraktion von Proteinen.....	34

3.8.2	Proteinbestimmung.....	35
3.8.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ...	35
3.8.4	Immunoblot	37
3.9	Durchflusszytometrie	37
3.10	Statistische Auswertung.....	38
3.11	Antikörper	39
3.11.1	Primäre Antikörper	39
3.11.2	Sekundäre Antikörper	40
3.12	Chemikalien und Lösungen	40
3.12.1	Chemikalien	40
3.12.2	Puffer und Lösungen	41
3.13	Enzyme, Kits, biologische Substanzen, Reagenzien.....	44
3.13.1	Enzyme, biologische Substanzen	44
3.13.2	Protein-Marker	44
3.13.3	Transfektionsreagenzien.....	44
3.13.4	Kits	44
3.14	Zellkulturmedien und zugehörige Reagenzien	45
3.14.1	Reagenzien und Material.....	45
3.14.2	Zellkulturmedien	45
3.15	Geräte und verwendete Materialien	46
3.15.1	Geräte	46
3.15.2	Verbrauchsmaterial	48
4	Ergebnisse	49
4.1	Funktionelle Untersuchungen zur Rolle von RAD50 im ATR-Signalweg	49
4.1.1	Defekt der ATR-abhängigen γ H2AX Phosphorylierung in RAD50-defizienten Zellen.....	49

4.1.2	Analyse des G2/M-Zellzykluskontrollpunktes in RAD50-defizienten Zellen.....	52
4.1.3	RAD50-defiziente Zellen weisen einen erhöhten Anteil an mitotischen Zellen mit <i>supernumerary centrosomes</i> auf.....	53
4.2	Lokalisation von RAD50 auf Chromatin-Brücken.....	54
4.3	Einfluss eines RAD50 <i>knock-downs</i> auf den Anteil an Zellen mit Chromatin-Brücken.....	58
4.4	Lokalisation von Proteinen des ATM-Signalweges auf Chromatin-Brücken	59
4.5	RAD50 interagiert mit cytokinetischen Proteinen.....	62
4.5.1	RAD50 colokalisiert mit alpha-Tubulin und Aurora B während der abnormalen Cytokinese.....	62
4.5.2	Aurora B und RAD50 interagieren <i>in situ</i>	63
4.6	Allgemeine Rolle von RAD50 in der Mitose und Cytokinese.....	65
4.6.1	RAD50-Lokalisation während der Mitose.....	65
4.6.2	RAD50 interagiert mit phospho-H3 (S10) <i>in situ</i>	68
4.6.3	Ein RAD50 <i>knock-down</i> führt zu einer Verlängerung der Zellteilungszeit.....	69
4.7	Zellzyklusprogression von Zellen mit einer RAD50-Brücke.....	71
4.8	Cyto-/nucleoplasmische und chromatingebundene Verteilung von RAD50 nach Bestrahlung in der Mitose.....	72
4.9	Untersuchung von RAD50 in der Mitose und der abnormalen Cytokinese in epithelialen Brustkrebszelllinien.....	76
4.9.1	RAD50-Lokalisation während der Mitose in den Brustkrebszelllinien HCC1395 und HCC1937.....	76
4.9.2	Analyse von RAD50-Brücken in epithelialen Brustkrebszelllinien.....	78
4.10	Funktionelle Charakterisierung der epithelialen Brustkrebszelllinie HCC1395.....	79
4.10.1	Reduzierte NBN Proteinmenge in der Zelllinie HCC1395.....	79
4.10.2	Sequenzanalyse von <i>NBN</i> in HCC1395.....	81
4.10.3	Untersuchung der ATM-Schadensantwort in HCC1395.....	82

4.10.4	Strahleninduzierte Foci Analyse von γ HA2X, 53BP1 und MDC1 in HCC1395 und HCC1937	83
4.10.4.1	Induktion von γ HA2X, 53BP1 und MDC1 Foci in HCC1395	83
4.10.4.2	Vermessung der γ HA2X, 53BP1 und MDC1 Foci	85
4.10.4.3	NBN Foci Analyse in HCC1395	87
5	Diskussion	88
5.1	Die ATR-vermittelte Schadensantwort in der NBS-like disorder	88
5.1.1	Relevanz von RAD50 für die Aktivierung des ATR-Signalweges.....	88
5.1.2	Relevanz von RAD50 für die Aktivierung des G2/M-Kontrollpunktes ..	90
5.1.3	Eine RAD50-Defizienz führt zu einer Aberration der Centrosomenanzahl	91
5.2	Einfluss von RAD50 auf Chromatin-Brücken	92
5.2.1	Lokalisation und Schutzfunktion von RAD50 auf Chromatin-Brücken..	92
5.2.2	Rolle des ATM-Signalweges in der Ausbildung von Chromatin-Brücken	93
5.2.3	Repräsentiert RAD50 DNA-Doppelstrangbrüche auf Chromatin-Brücken?	94
5.2.4	Wird RAD50 für die Stabilisierung und Auflösung von Chromatin-Brücken benötigt?	96
5.2.5	Zellzyklusprogression von Zellen mit einer RAD50-Brücke	98
5.3	Funktion von RAD50 in der Mitose	99
5.3.1	Lokalisation von RAD50 in der normalen und abnormalen Mitose	99
5.3.2	Ist RAD50 essentiell für die Zellteilung?.....	100
5.3.3	Funktionalität von RAD50 in der Mitose und der abnormalen Cytokinese	102
5.3.4	Die Rolle von RAD50 in der Mitose und abnormalen Cytokinese in epithelialen Brustkrebszellen	104
5.4	Die <i>missense</i> Mutation p.R215W ist mit einem Defekt in der DNA-Schadensantwort durch den MRN-Komplex assoziiert	105

6	Abbildungsverzeichnis	108
7	Literaturverzeichnis	109
8	Schriftenverzeichnis	126
9	Danksagung	128
10	Lebenslauf	129

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
A-T	Ataxia-telangiectasia, Louis-Bar-Syndrome
AT-LD	<i>AT-like disorder</i>
ATM	<i>A-T mutated</i>
ATR	<i>ATM and Rad3-related kinase</i>
ATMi	ATM-Inhibitor
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , Rinderserum
bzw.	beziehungsweise
CPK	Chromosomaler <i>Passenger</i> Komplex
CuSO ₄	Kupfersulfat
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	<i>double strand break</i> , Doppelstrangbruch
DDR	<i>DNA damage response</i> , DNA-Schadensantwort
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EdU	5-Ethynyl-2'-desoxyuridin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraacetat
EBV	Epstein-Barr-Virus
EtOH	Ethanol
<i>et al.</i>	et alii/aliae, und Andere
FKS	Fötales Kälberserum
FP	Fläche der Pixelanzahl
Gy	Gray
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ O	Wasser

HPLC	<i>high performance liquid</i>
HBO-Lampe	Quecksilberhöchstdrucklampe
HRP	<i>horse radish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HRR	Homologe Rekombinationsreparatur
HU	Hydroxyharnstoff
J	Joule
kDa	kilo Dalton
KCl	Kaliumchlorid
k.A.	keine Angabe
l	Liter
MRN	MRE11-RAD50-NBN
M	Molar
m	milli
m ²	Quadratmeter
mg	milli-Gramm
mM	milli-Molar
ml	milli-Liter
min	Minute(n)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
µg	mikro-Gramm
µm	mikro-Meter
µl	mikro-Liter
NGS	<i>normal goat serum</i> , normales Ziegen Serum
NRS	<i>normal rabbit serum</i> , normales Kaninchenserum
NBS	Nijmegen-Breakage-Syndrom
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaF	Natriumfluorid
NAHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NHEJ	<i>Non-homologous end-joining</i> , Nicht-Homologe-Endverknüpfung
PBS	<i>Phosphate buffered Saline</i> , physiologische Kochsalzlösung
PBS-T	<i>Phosphate buffered Saline/Tween-20</i>
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

PIKK	<i>phosphatidylinositol-3-kinase-related kinase</i>
pH	<i>potentia Hydrogenii</i> , Wasserstoffionenexponent
rcf	Relative Zentrifugalbeschleunigung
RNA	Ribonukleinsäure
RE	relative Einheit
RNase	Ribonuklease
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Ser, S	Serin
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TBS-T	Tris-gepufferte Saline; Tween 20
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i> , Einheiten (Enzym)
UV	ultraviolette Strahlung
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>

1 Einleitung

1.1 Eukaryotischer Zellzyklus und Zellzyklusregulation

1.1.1 Zellzyklus

“Jede Zelle entsteht durch die Teilung einer bereits existierenden Zelle“, dies wurde bereits von Rudolf Virchow 1858 in seinem Epigramm *Omnis cellula e cellula* postuliert (Virchow, 1858). Die Zellteilung ist eine essentielle Grundlage des Wachstums und der Erhaltung der genomischen Integrität der Zelle und somit des gesamten Organismus. Der Zellzyklus lässt sich in zwei Phasen unterteilen: die Mitose und die Interphase. Die Interphase ist wiederum in drei Stadien unterteilbar, die G1 (*gap1*)-Phase, die G2 (*gap2*)-Phase und die S (Synthese)-Phase (Howard und Pelc, 1953). Die Dauer der einzelnen Phasen ist zelltypabhängig. Die G1-Phase ist die Phase, die sich direkt nach der Zellteilung anschließt und zur Vorbereitung der S-Phase dient. In der G1-Phase werden bestimmte Zellbestandteile wie Organellen und Cytoplasma vermehrt produziert, so dass die G1-Phase auch als Wachstumsphase einer Zelle gesehen wird. Des Weiteren kommt es zur vermehrten Synthese von Enzymen und Desoxyribonukleosid-Triphosphaten, welche für die anschließende S-Phase benötigt werden. In der S-Phase wird die DNA eines Zellkerns verdoppelt. Durch DNA-Replikation wird aus dem Chromatid eines Chromosoms ein identisches Schwesterchromatid synthetisiert, welches für die spätere Aufteilung der genetischen Information auf zwei Tochterzellen genutzt wird. Nach Beendigung der S-Phase geht die Zelle in die G2-Phase über, in der vermehrt Proteine für die Mitose produziert werden und ein Wachstum der Zelle stattfindet (Sisken und Morasca, 1965). In der Mitose wird die genetische Information einer Zelle auf zwei Tochterzellen aufgeteilt. Die Mitose kann in vier Phasen untergliedert werden und wurde zuerst von Walter Flemming im Jahre 1878 beschrieben (Flemming, 1878). 1) In der Prophase kommt es zur Trennung der Centrosomen, die an die entgegengesetzten Zellpole wandern und als Ausgang der späteren Mitosespindel dienen (Alberts *et al.*, 2004). Die Chromosomen beginnen zu kondensieren und sammeln sich in der Zellmitte an. Es kommt zu einem Abbau der Kernhülle und zur Ausbildung des Spindelapparates. 2) In der Metaphase werden die kondensierten Chromosomen in der Äquatorialebene zwischen den Spindelpolen angeordnet. Dies geschieht mit Hilfe des Spindelapparates, der ausgehend von den Centrosomen an die Kinetochore der Chromosomen bindet (Alberts *et al.*, 2004). 3) In der anschließenden Anaphase kommt es durch ein Verkürzen der Spindelfasern zu einer Trennung der Tochterchromatiden, die in entgegengesetzte Richtung zu den

Spindelpolen gezogen werden. 4) In der Telophase kommt es zur Ausbildung der zwei Kernhüllen sowie zur Dekondensation der Chromosomen in den Kernen. Die Trennung der cytoplasmatischen Komponenten der zwei Tochterzellen und die damit verbundene Vervollständigung der Zellteilung findet in der sich anschließenden Cytokinese statt (Alberts *et al.*, 2004).

1.1.2 Cytokinese

Die Cytokinese ist der finale Schritt der Zellteilung nach der Mitose und beinhaltet die räumliche Trennung der nukleären und cytoplasmatischen Komponenten in zwei unabhängige Tochterzellen. Der Prozess der Cytokinese kann in vier Abschnitte unterteilt werden: 1.) Ausbildung der Teilungsebene (*cleavage plane*), 2.) die Ingression der Spaltungsfurche (*cleavage furrow*), 3.) Formierung des Mittelkörpers (*Midbody*, zentrale Spaltungsebene zwischen zwei Tochterzellen) und 4.) abschließende Teilung (*Abscission*) der cytoplasmatischen Komponenten der zwei Tochterzellen (Normand und King, 2010). Die Cytokinese beginnt nach Ende der Telophase mit der Ausbildung einer äquatorialen Ebene und der Akkumulation von Proteinen und regulatorischen Komplexen an der Teilungsebene. Der „Chromosomale *Passenger* Komplex“ (CPC), bestehend aus den Proteinen Aurora B-Kinase, INCENP (*inner centromer protein*), Borealin und Survivin, relokalisiert vom centromerischen Chromatin zu der entstehenden Teilungsebene bereits nach der Anaphase (Vagnarelli und Earnshaw, 2004, Wadsworth, 2005). Ein weiterer Proteinkomplex, das Centralspindlin, lokalisiert an der zentralen Spindel in der Nähe des Kortex der Zellmembran. Die zentrale Spindel ist ein Bereich aus antiparallel ausgerichteten Mikrotubuli, die zur Ausbildung die Mikrotubuli-verknüpfenden Proteine PRC1 und KIF4 benötigt werden. Die Regulation erfolgt dabei über die Kinaseaktivität des Chromosomalen *Passenger* Komplex (Green *et al.*, 2012). Über die zentrale Spindel werden die GTPase RhoA (*Ras homology gene family, member A*) und der Rho Austauschfaktor Ect2 rekrutiert. RhoA wird in seine aktive GTP-gebundene Form überführt und kann C-terminal an die Plasmamembran binden und weitere Proteine aktivieren (Lacroix und Maddox, 2012). Die aktive RhoA-Form steuert die Assemblierung des kontraktilen Ringes der Spaltungsfurche. Der kontraktile Ring ist ein Netzwerk bestehend aus Formin-gebundenen Aktin-Filamenten, Myosin II, Membran-assoziierten Septin-Filamenten und dem Filament-verknüpfenden Protein Anilin (Green *et al.*, 2012) (Abbildung 1).

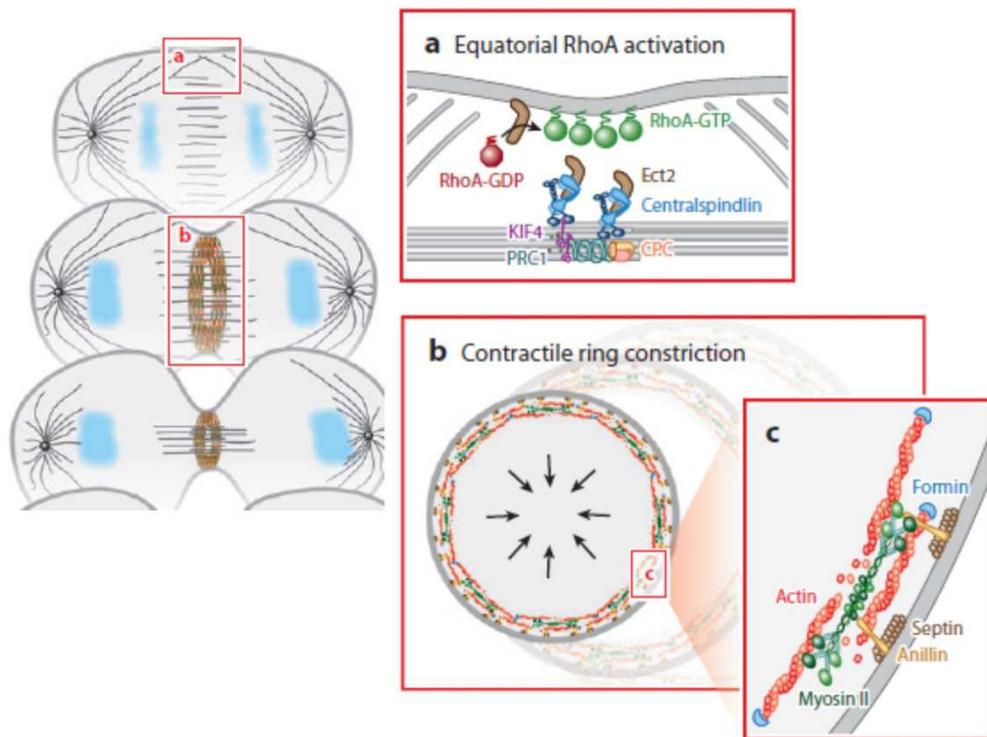


Abbildung 1: Zusammenfassung der ersten Schritte in der Cytokinese. (a) Die Cytokinese beginnt mit der Ausbildung der äquatorialen Teilungsebene zwischen der Anaphase-Spindel und dem Kortex der Zellmembran (*cleavage plane*). Die zentrale Spindel bildet sich aus und rekrutiert RhoA, welches nach Aktivierung in die Membran eingebunden wird und für die Ausbildung des kontraktilen Ringes wichtig ist. (b) Die Assemblierung bewirkt eine Einschnürung in der Teilungsebene der Zellmembran (*cleavage furrow*). (c) Der kontraktile Ring besteht aus einem filamentösen Netzwerk aus Aktin und Myosin II-Molekülen. Modifiziert nach (Green *et al.*, 2012).

Die verschiedenen Filamente bewirken aufgrund ihrer Motoraktivität und Struktur eine Einschnürung der Zellmembran. Die physikalische Breite dieser zellulären Struktur beträgt zwischen 0.1 - 0.2 μm . Im Gegensatz dazu ist der Querschnitt des kontraktilen Ringes variabel innerhalb verschiedener Spezies (zwischen $< 1 \mu\text{m}$ – 20 μm) (Schroeder, 1990, Green *et al.*, 2012). Die vermehrte Einschnürung des kontraktilen Ringes bewirkt die Bildung des Mittelkörpers (*Midbody*), welcher die interzelluläre Brücke organisiert.

Die Proteine am *Midbody* können dabei in drei Gruppen unterteilt werden. 1) Die Proteine der ersten Gruppe, KIF4 und PRC1, verbleiben mit der zentralen Zone der Mikrotubuli assoziiert und bilden so den *Midbody*-Kern aus. 2) Weitere Proteine der zentralen Spindel wie Centralspindlin und Ect2 werden von den Mikrotubuli freigesetzt und lokalisieren an den äußeren Randbereichen des *Midbody*-Kerns. Dort colokalisieren sie mit den kontraktilen Ringkomponenten Anillin, RhoA und Cep55. Diese flankierende Hülle um den *Midbody*-Kern wird dann als *Midbody*-Ring bezeichnet. Die zentrale Region des *Midbody*-Kerns zeichnet sich durch eine sehr dicht gepackte Struktur aus. 3) Die dritte Gruppe der

zentralen Spindel-Proteine, CENP-E, MKLP2 und Aurora B, bilden flankierende Bereiche zum *Midbody*-Ring und -Kern aus und colokalisieren mit den Mikrotubuli des *Midbody*s (Green *et al.*, 2012). Der finale Schritt der Cytokinese beinhaltet die Abtrennung der Zellmembran der zwei Tochterzellen. Erst kürzlich wurde bekannt, dass Proteine des ESRCT (*endosomal sorting complex required for transport*)-Komplexes diesen Prozess katalysieren (Abbildung 2).

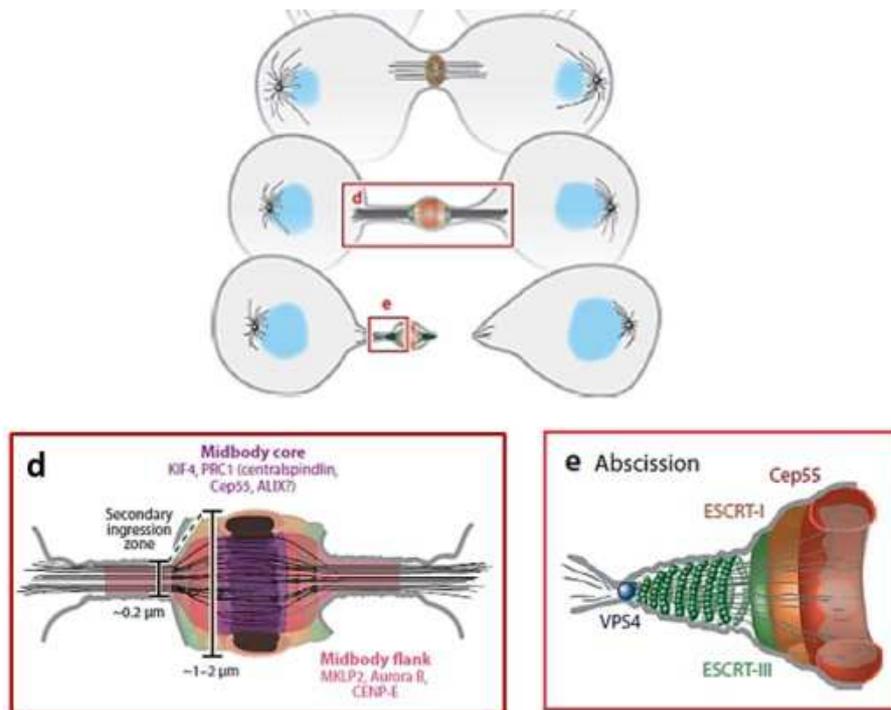


Abbildung 2: Ausbildung des *Midbody* und Abspaltung in der Cytokinese. Die fortschreitende Bildung des kontraktiven Ringes führt zum *Midbody*, der zentral in der Ebene der interzellulären Brücke angeordnet ist. (d) Am *Midbody* findet eine Relokalisierung und Akkumulierung verschiedener Proteine statt, die im Kern, im Ring oder am Rand des *Midbody* lokalisieren. Die schwarze Region bezeichnet die dicht gepackte Struktur des *Midbody*. (e) Die Abspaltung der Membran und die Generierung zweier Tochterzellen wird durch den ESRCT-III Komplex auf einer Seite des *Midbody* katalysiert. Aus (Green *et al.*, 2012).

Die Spaltung der Membran erfolgt dabei durch ein spiralförmiges Membran-assoziiertes Polymer der ESRCT-Proteine. Die zeitliche Abfolge der Abspaltung wird durch die Inaktivierung der mitotischen Kinase Plk1 und Aurora B kontrolliert. In cytokinetischen Zellen verhindert Aurora B eine frühzeitige Abspaltung durch Phosphorylierung einer regulatorischen Einheit des ESRCT-III-Komplexes (Capalbo *et al.*, 2012, Carlton *et al.*, 2012). Nach erfolgter Abtrennung verbleibt der *Midbody* als Rest an einer der beiden Tochterzellen und wird durch Autophagie degradiert (Pohl und Jentsch, 2008).

Eine fehlerhafte Cytokinese kann zu chromosomalen Aberrationen, aneuploiden Zellen und somit auch zu Krebs führen. Dementsprechend ist die Cytokinese genau wie die Mitose ein hochregulierter Prozess.

1.1.3 Zellzyklusregulation und Zellzykluskontrollpunkte

Die Zellteilung ist ein wesentlicher Bestandteil bei der Entwicklung eines multizellulären Organismus und ein hochregulierter Prozess, da eine Entartung dieses Gleichgewichts eine unkontrollierte Zellteilung zur Folge hat, welche zur Entstehung von Krebszellen führen kann. Die Regulation des Zellzyklus erfolgt durch Wechselwirkungen von spezifischen Proteinen.

Die Cycline steuern zusammen mit den Cdk (*cyclin dependent kinases*) das Durchlaufen jeder einzelnen Zellzyklusphase (Pines 1995). Die Expression der verschiedenen Cyclin-Cdk-Komplexe wird, je nach Phase, hochreguliert und diese bewirken eine weiterlaufende Progression durch die Zellzyklusphase. In der G1-Phase ist der CyclinD-Cdk4/6-Komplex hochreguliert, gegen Ende der G1-Phase kommt es zu einer vermehrten Expression von CyclinE-Cdk2. Beim Durchlaufen der S-Phase wird das CyclinA-Cdk2 hochreguliert und die Zelle progressiert weiter in der S-Phase bis zur G2-Phase. Beim Erreichen der M-Phase wird der Cyclin A/B-Cdk1-Komplex vermehrt exprimiert, welcher für den Eintritt der Zelle in die Mitose verantwortlich ist (Wamerdam und Kanaar, 2010) (Abbildung 3).

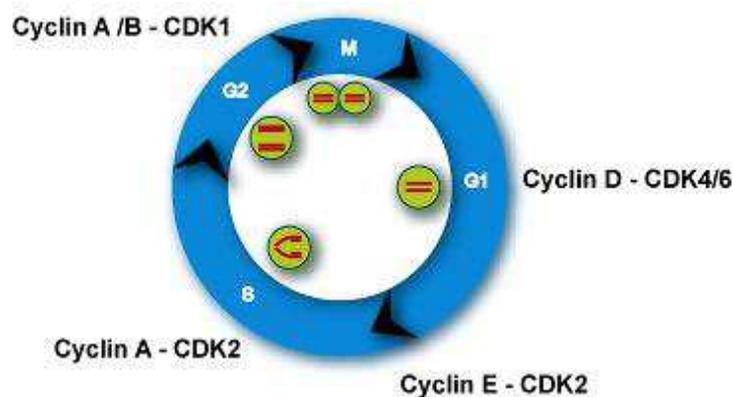


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Cyclin–CDK-abhängigen Progression einer Zelle durch den Zellzyklus. Die verschiedenen Cyclin-Cdk-Komplexe werden phasenabhängig hochreguliert, sodass die Zelle in die nächste Phase des Zellzyklus übergehen kann. Aus (Wamerdam und Kanaar, 2010).

Die Zelle wird beim Durchlaufen der einzelnen Phasen auf mögliche Schäden an der DNA kontrolliert. Tritt eine Schädigung der Zelle ein, kann der Zellzyklus in den verschiedenen Phasen angehalten werden, damit die Zelle Zeit hat, den Schaden zu reparieren. Ist der Schaden irreparabel oder zu groß, kann die Apoptose eingeleitet werden. Die Arretierung der Zelle erfolgt an den sogenannten Zellzykluskontrollpunkten (*Checkpoints*). Die Aktivierung der Zellzykluskontrollpunkte G1/S, Intra-S und G2/M wird bei der Detektion eines Schadens an der DNA durch *Checkpoint*-Kinasen (Chk) eingeleitet. Durch das Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen (DNA-DSB) in der G1-Phase wird der G1/S-

Kontrollpunkt aktiviert, was zu einer Inhibierung der Replikation der DNA führt (Wamerdam und Kanaar, 2010). Die Induktion des Arrests erfolgt nach der Detektion eines DNA-DSB durch die ATM (Ataxia telangiectasia *mutated*)-Kinase und den MRN (MRE11-RAD50-NBN)-Komplex. ATM wird aktiviert und phosphoryliert unter anderem die *Checkpoint* Kinase 2 (Chk2) und p53 (Zhao *et al.*, 2002). Chk2 phosphoryliert die Phosphatase Cdc25A, wodurch diese inaktiviert und proteosomal abgebaut wird. Cdc25A ist eine Phosphatase, die bei Beginn der Replikation den Cyclin-E/Cdk2-Komplex dephosphoryliert und somit aktiviert. Durch Anreicherung des inaktiven Cyclin-E/Cdk2-Komplexes kommt es zu einer Arretierung am G1/S-Übergang des Zellzyklus (Mailand *et al.*, 2000). Die Phosphorylierung von p53 bewirkt die Transkription von spezifischen Genen, wie zum Beispiel dem Cdk Inhibitor p21, was den Zellzyklusarrest weiter aufrechterhält (Morgan, 2007).

Bei Auftreten anderer DNA-Schäden, wie zum Beispiel Einzelstrangbrüchen durch ultraviolettes (UV)-Licht oder Hydroxyharnstoff (HU), kommt es zu einer ähnlichen Schadensantwort, die jedoch über die ATR (ataxia telangiectasia *and* Rad3 *related protein*)-Kinase gesteuert wird. Durch ATR werden Einzelstrangbrüche detektiert, wobei ATR durch Phosphorylierung von Chk1 eine Inhibierung von Cdc25A und somit einen G1/S-Arrest einleitet (Tasat und Yakisich, 2010).

Die Aktivierung des Intra-S-Phase-Kontrollpunktes bewirkt im Gegensatz zum G1/S-Kontrollpunkt nur eine Verzögerung der Replikation der DNA. Dies geschieht durch Inhibierung der Replikationsgabeln und liefert der Zelle die Zeit, den Schaden zu reparieren. Beim Auftreten von DSB in der S-Phase kommt es zu einer Aktivierung des ATM-MRN-Signalweges, ähnlich wie im G1/S-Arrest. Über Phosphorylierung von Chk2 und Aktivierung von p53 wird der Intra-S-Kontrollpunkt durch Inhibierung des Cdk2/Cyclin-A-Komplexes aktiviert (Bartek *et al.*, 2004). Auch Proteine des *Origin recognition complex* (ORC) und der *Structural maintenance of chromosomes* (SMC)-Familie gehören zu den Substraten von ATM/ATR, die vermutlich an der Regulation des Intra-S-Kontrollpunktes beteiligt sind (Shechter und Gautier, 2005, Matsuoka *et al.*, 2007).

Der G2/M-Kontrollpunkt verhindert, dass sich Zellen mit DNA-Schäden teilen und diese Schäden an nachfolgende Generationen von Zellen weitergegeben werden können. Dies ist essentiell für den Erhalt der genomischen Integrität. Die Aktivierung des G2/M-Kontrollpunktes verläuft wie beim G1/S-Kontrollpunkt über den ATM/ATR-Signalweg. Die aktivierten Kinasen Chk1 und Chk2 phosphorylieren und inaktivieren dabei die

Phosphatase Cdc25C. Cdc25C ist für den Fortschritt der Zelle von der G₂-Phase in die M-Phase wichtig, da es den Cdk1/CyclinB-Komplex dephosphoryliert und somit aktiviert (Okubo *et al.*, 2003). Der Zellzyklusarrest an den genannten Kontrollpunkten bietet der Zelle die Möglichkeit zur intrazellulären Schadensregulierung, bevor der Schaden an Tochterzellen weitergegeben wird.

Die Freisetzung aus den jeweiligen Zellzyklusarresten ist dabei abhängig von der Effizienz der Reparatur des DNA-Schadens.

1.2 Entstehung von DNA-Schäden

Die DNA einer Zelle ist verschiedenen exo- und endogenen Einflüssen ausgesetzt, die eine mannigfaltige Schädigung hervorrufen können. Dabei unterscheidet man endogene Einflüsse wie das reaktive Milieu in einer Zelle durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (De Bont und van Larebeke, 2004), Replikationsfehler oder Basenverluste. Exogene Schäden können durch chemische Agenzien, UV-Licht oder ionisierende Strahlen entstehen. Ionisierende Strahlung besteht aus Teilchen- (Gamma-Strahlung) oder elektromagnetischer Strahlung und bewirkt eine Ionisierung von Atomen und Molekülen. In geringem Maß ist sie bereits durch körpereigene Isotope in der Zelle stets präsent. DNA-Schädigung kann durch direkte oder indirekte Interaktion zwischen Gamma-Strahlung und der DNA entstehen (Hall und Giaccia, 2006).

Bei der indirekten Interaktion generiert die Wechselwirkung von biologischer Materie mit ionisierender Strahlung Radikale, insbesondere reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Diese Radikale können eine chemische Reaktion an der DNA bewirken, die zu einer Schädigung (direkte Interaktion) (Hall und Giaccia, 2006) führen kann. Pro Strahlungseinheit [Gray (Gy), letale Dosis 50 (LD₅₀) ~4 (Hall und Giaccia, 2006)] entstehen zahlreiche Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüche oder auch Basenschäden in der DNA, die von der Zelle repariert werden müssen oder zur Apoptose der Zelle führen können (Löbrich, 1995, Ward, 1988).

1.3 Erkennung und Weiterleitung von DNA-Schadenssignalen

1.3.1 Primäre Schadensantwort

DNA-Schäden bewirken eine Abfolge verschiedener Prozesse in Abhängigkeit von der Art des DNA-Schadens. Die Protein-Kinasen ATM (ataxia teleangiectasia, *mutated*), ATR (ataxia teleangiectasia *and* Rad3-related protein) und DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) gehören strukturell zu der PIKK-Familie (*phosphatidylinositol-3-kinase-related kinase*) und sind essentiell für die Einleitung der primären Schadensantwort (Abraham *et al.*, 2001). Dies kann über Aktivierung von Zellzykluskontrollpunkten (*Checkpoints*), die Reparatur der DNA über die Nicht-Homologe-Endverknüpfung (NHEJ) oder die homologe Rekombinationsreparatur (HRR) erfolgen (Abraham, 2001, Zhou und Elledge, 2000). Sind die Schäden zu groß oder irreparabel, kann die Apoptose der Zelle eingeleitet werden (Sengupta und Harris, 2005). DNA-Schäden, insbesondere DNA-Doppelstrangbrüche, sind potenziell letal für die Zelle (Abbildung 4).

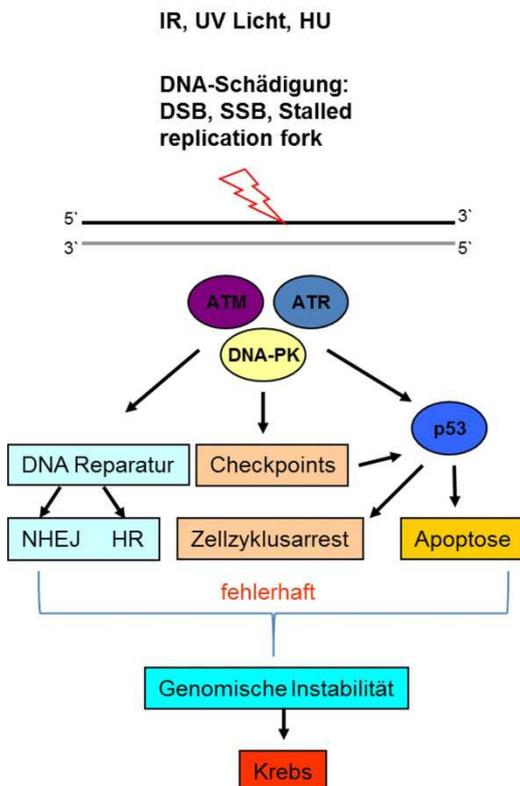


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Schadensantwort in einer Zelle nach DNA-Schädigung. Durch ionisierende Strahlung, UV-Licht oder chemische Agenzien entstehen Schäden an der DNA wie zum Beispiel DNA-Doppelstrangbrüche (DSB), Einzelstrangbrüche (SSB) oder arretierte Replikationsgabeln (*stalled replication fork*). Die Serin/Threonin-Kinasen ATM, ATR und DNA-PKcs leiten die primäre Schadensantwort ein. Durch Aktivierung von Zellzykluskontrollpunkten (*Checkpoints*) wird die Zelle arretiert und die Reparatur der DNA durch Nicht-Homologe-Endverknüpfung (NHEJ) oder durch homologe Rekombinationsreparatur (HRR) abhängig von der Zellzyklusphase eingeleitet. Irreparable Schäden bewirken eine Induktion der Apoptose durch den p53-Signalweg. Eine fehlerhafte Reparatur oder inkorrekte Signalweiterleitung kann zur genomischen Instabilität und somit zu Krebs führen (modifiziert nach Abraham, 2001)

Eine Fehlerhaftigkeit in dieser Signalkaskade oder eine fehlerhafte Reparatur kann aufgrund von Verlust genetischen Materials zur genetischen Instabilität und somit auch zur Entstehung von Krebs führen (Karagiannis *et al.*, 2004; Sedelnikova *et al.*, 2003).

1.3.2 Primäre Schritte im ATM-Signalweg

Die frühe zelluläre Reaktion auf einen Doppelstrangbruch (DSB) ist die Weiterleitung des Schadenssignals in Signalkaskaden, die den Schaden an der DNA erkennen und weitere Prozesse einleiten. Es erfolgt eine Signalamplifikation, die die Reparatur des Schadens und einen Zellzyklusarrest induziert, um eine weitere Progression der Zelle zu unterbinden. Durch die Signalamplifikation werden verschiedene Proteine, die für die Weiterleitung und Aufrechterhaltung des Signals verantwortlich sind, zum Schadensort rekrutiert, wo ihre fokale Akkumulation nachweisbar ist („Reparaturfoci“) (Abbildung 5). Ein DSB initiiert mindestens drei primäre Ereignisse: 1.) eine Modifikation des Chromatins, die den Zugang zur DNA für die Reparatur vereinfacht, 2.) die Bindung des MRN (MRE11-NBN-RAD50)-Komplexes und 3.) die Resektion der doppelsträngigen DNA am Bruchende, um Einzelstrangbereiche freizulegen (Su, 2006). Der erste Schritt in der Einleitung der DNA-Schadensantwort (*DNA damage response*, DDR) beruht auf der Aktivierung von ATM, für die es mindestens zwei Szenarien gibt. Das erste Modell beinhaltet, dass der MRN-Komplex an den DNA-DSB bindet und die ATM-Kinase rekrutiert, welche unter Acetylierung und Autophosphorylierung an Ser1981 (Serin an Position 1981) monomerisiert und aktiviert wird (Savic *et al.*, 2009). Das zweite Modell beruht auf Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung von ATM auch unabhängig vom MRN-Komplex erfolgen kann. Dies geschieht durch Konformationsänderungen an der DNA als Resultat von lokalen Chromatinmodifikationen (Kinner *et al.*, 2008, Painter *et al.*, 1985). Die aktivierte ATM-Kinase phosphoryliert wiederum eine große Anzahl an Proteinen (Matsuoka *et al.*, 2007). Substrate von ATM sind unter anderem die Histon Variante H2AX, die Zellzykluskontrollpunkt-Serin/Threonin-Kinase Chk2, sowie p53, welche unterschiedliche Funktionen im Zellzyklusarrest, bei der Reparatur und in der Apoptose einnehmen. Die Phosphorylierung von H2AX zu γ H2AX erfolgt an Serin (S) Rest 139 innerhalb eines hoch konservierten SQEY Motivs, welches ein gemeinsames Substrat für die Familie der PIKK darstellt. γ H2AX akkumuliert in großen Mengen am DSB, wobei ein γ H2AX Focus mit einem Doppelstrangbruch korreliert (Mah *et al.*, 2010).

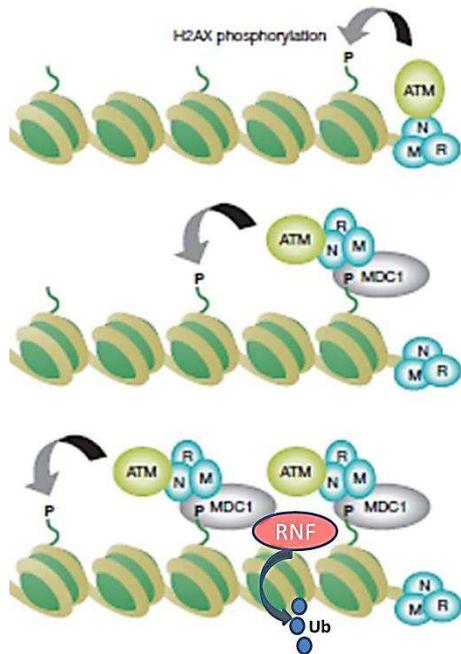


Abbildung 5: Primäre Schritte in der DNA-Schadensantwort bei Auftreten eines DSBs. Der MRN-Komplex erkennt und bindet das Ende eines DNA-Doppelstrangbruches. ATM wird rekrutiert und durch Autophosphorylierung aktiviert. Die aktivierte ATM-Kinase phosphoryliert H2AX. MDC1 wird über den MRN-Komplex rekrutiert und bindet an γ H2AX, welches wiederum eine verstärkte Rekrutierung von MRN und ATM zur Folge hat. RNF8 bindet an MDC1 und ubiquitiniert γ H2AX, welches eine Relaxation des Chromatins bewirkt. Darstellung modifiziert nach (West und van Attikum, 2006).

Pro DSB akkumulieren bis zu 2000 Moleküle γ H2AX, was sich mittels spezifischer Antikörperfärbung nachweisen lässt und als DNA-Doppelstrangbruchmarker etabliert ist (Löbrich *et al.*, 2010). MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) wird aufgrund der eingeleiteten DNA-Schadensantwort phosphoryliert und bindet über seine BRCT (BRCA1 C-terminal)-Domäne an γ H2AX (Stucki *et al.*, 2004). Dies fördert die Akkumulation weiterer Zellzyklus kontroll- und DNA-Reparaturfaktoren (Bunz, 2011). Die E3 ubiquitin ligase RNF8 bindet durch ihre FHA (*fork-head associated*)-Domäne an das phosphorylierte MDC1 und ubiquitiniert γ H2AX und H2AX (Bennett und Harper, 2008, Mailand *et al.*, 2007). Zusammen mit dem E2 Ubiquitin-konjugierenden Enzym UBC13 katalysiert RNF8 die Anheftung von Ubiquitin-Ketten an Histone nahe des DNA-DSB (Blundred und Stewart, 2011). Dies bewirkt eine Relaxation des Chromatins im Bereich des DSB, der somit für weitere Reparaturproteine wie 53BP1 (*p53 binding protein*) oder BRCA1 (*breast cancer susceptibility 1*) zugänglich wird.

1.3.3 Primäre Schritte im ATR-Signalweg

DNA-Schäden, die durch chemische Agenzien oder UV-Licht auftreten, aktivieren den Signalweg über die ATR-Kinase. ATR verfügt über eine signifikante Sequenzhomologie zu ATM (Ball *et al.*, 2005). Der Verlust von ATM oder ATR führt zu einem ähnlichen zellulären Phänotyp und zu einer verstärkten Sensitivität gegenüber DNA-Schäden (Shiloh, 2001). Der Unterschied der beiden Kinasen liegt in ihrer Aktivierung abhängig vom DNA-Schaden. ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*) ist eine Serin/Threonin-

Kinase und wird bei auftretenden Einzelstrangbrüchen durch arretierte Replikationsgabeln aktiviert. Einzelsträngige Bereiche der DNA werden durch RPA (*replication protein A*) gebunden, wodurch eine Anlagerung des ATR-ATRIP (*ATR-interacting protein*)-Komplexes erfolgen kann (Abbildung 6). Der Rad9-Rad1-Hus-Komplex und Rad17 werden ebenfalls zu dem Bereich transloziert und interagieren mit RPA (Wu *et al.*, 2005).

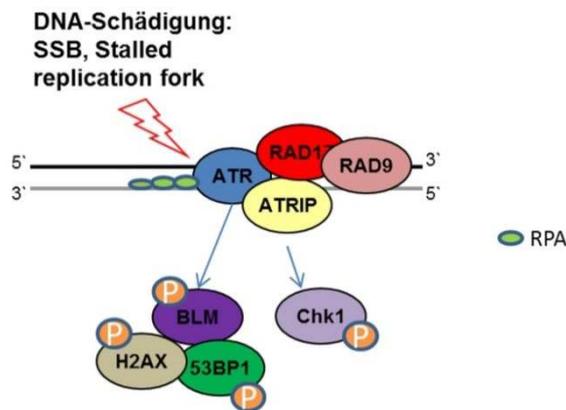


Abbildung 6: Primäre Schritte im ATR-Signalweg. Durch UV-Licht induzierte Einzelstrangbrüche oder arretierte Replikationsgabeln werden durch den ATR-ATRIP-Komplex detektiert. Der Rad9-Rad1-Hus-Komplex und Rad17 unterstützen die Schadenserkenkung. Über den ATR-Chk1-Signalweg werden weitere Proteine der Signalkaskade phosphoryliert (modifiziert nach Sengupta und Harris, 2005).

ATR hat wie auch ATM einige hundert Substrate (Matsuoka *et al.*, 2007). Unter anderem wird die Checkpoint Kinase 1 (Chk1) ATR-abhängig phosphoryliert und phosphoryliert wiederum H2AX und BLM (*Bloom Syndrome protein*), was zu weiterer Akkumulation wichtiger Proteine am Schadensort führt (Sengupta und Harris, 2005), die für die Aufrechterhaltung des Signals und die Einleitung der Schadensantwort sorgen.

1.3.4 Interaktionen des ATM- und ATR-Signalweges

Ein zentrales Dogma auf dem Gebiet der DNA-Schadensantwort ist, dass der ATM-Signalweg durch strahleninduzierte DSB und der ATR-Signalweg durch UV-Licht-induzierte Schäden oder arretierte Replikationsgabeln aktiviert wird. Zunächst wurde angenommen, dass beide Signalwege unabhängig voneinander agieren. Verschiedene Studien konnten bereits belegen, dass der ATM- und der ATR-Signalweg zur Aktivierung und Erhaltung eines Zellzyklusarrestes interagieren und kooperieren (Abbildung 7). Bei der Prozessierung von DNA-DSB durch den MRN-Komplex im ATM-Signalweg entstehen einzelsträngige DNA-Bereiche, die eine Aktivierung des ATR-Signalweges zur Folge haben (Jazayeri *et al.*, 2006). Des Weiteren konnte eine ATR-abhängige ATM Phosphorylierung an Ser1981 und eine Aktivierung nach UV-Schäden nachgewiesen werden (Stiff *et al.*, 2006).

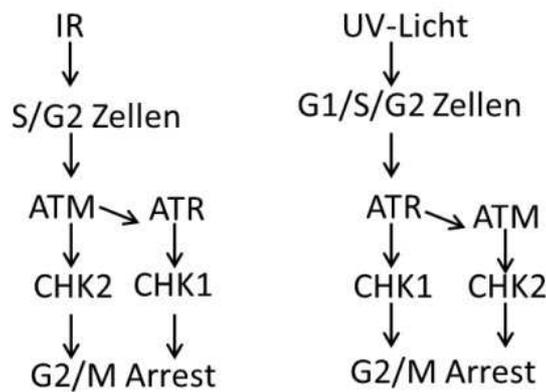


Abbildung 7: Interaktionen des ATM- und ATR-Signalweges nach DNA-Schäden. Durch ionisierende Strahlung induzierte DNA-Doppelstrangbrüche erfolgt eine Aktivierung des ATM-Signalweges. In der S- und G2-Phase entstehen durch den MRN-Komplex einzelsträngige DNA-Bereiche für die Vorbereitung auf die anschließende Reparatur, was den ATR-Signalweg aktiviert. UV-Licht aktiviert ATR, welches ATM phosphoryliert und aktiviert. Die Einleitung und Erhaltung des G2/M-Arrestes erfolgt über die Phosphorylierung von Chk1 bzw. Chk2. Modifiziert nach (Stiff *et al.*, 2006).

Ein weiterer Hinweis auf die Interaktion beider Signalwege ist die Substratspezifität, beispielweise für p53 und BRCA1. Beide Proteine können durch ATM und ATR phosphoryliert werden (Yajima *et al.*, 2006). p53 ist für die Induktion der Antwort auf den DNA-Schaden verantwortlich. Diese Antwort kann zu Zellzyklusarrest, Apoptose, Seneszenz oder der Reparatur über verschiedene Reparaturwege wie zum Beispiel die Basen-Exzisions-Reparatur, homologe Rekombinationsreparatur oder die Nicht-Homologe-Endverknüpfung führen (Sengupta und Harris, 2005). Während ATR durch ATRIP an die Schadensstelle rekrutiert wird, geschieht dies bei ATM durch den MRN-Komplex. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass der MRN-Komplex auch bei Replikationsarrest oder UV-induzierten Schäden benötigt wird (Robison *et al.*, 2004, Limoli *et al.*, 2002).

Bislang ist noch nicht abschließend erforscht, welche Relevanz die Proteine des MRN-Komplexes für den ATR-Signalweg, unabhängig vom ATM-Signalweg, haben.

1.4 DNA-Reparaturwege

1.4.1 Möglichkeiten der DNA-Reparatur

Die Reparatur von DSB erfolgt bei grober Einteilung über den Mechanismus der Nicht-Homologen-Endverknüpfung (NHEJ) oder durch die homologe Rekombinationsreparatur (HRR) (Takata *et al.*, 1998). Die NHEJ ist ein Reparaturweg, der in jeder Zellzyklusphase aktiv ist (Mao *et al.*, 2008) und bei dem die direkte Verknüpfung freier DNA-Enden erfolgt (Weterings und van Gent, 2004). Diese Art der DNA-Reparatur ist einer höheren Fehlerhäufigkeit ausgesetzt (Odersky *et al.*, 2002) als die HRR, weil sie verloren gegangene Basen nicht ersetzt. Die homologe Rekombinationsreparatur ist ein prinzipiell fehlerfreier Mechanismus, benötigt jedoch eine homologe Sequenz als Reparaturvorlage

(Takata *et al.*, 1998) und ist daher auf die S- und G₂-Phase im Zellzyklus beschränkt (Mao *et al.*, 2008).

1.4.1 Nicht-Homologe-Endverknüpfung

Bei der NHEJ erfolgt die einfache Ligation der DNA-Bruchenden. Für die Reparatur sind die drei Untereinheiten der DNA-Protein-Kinase (DNA-PK), sowie XRCC4 und die DNA-Ligase IV essentiell (Takata *et al.*, 1998). Die DNA bindende Untereinheit der DNA-PK, Ku, ist ein Heterodimer, bestehend aus einer 70 kDa und einer 80 kDa großen Untereinheit (Takata *et al.*, 1998). Ku₇₀/Ku₈₀ bindet an die freien DNA-Bruchenden (Walker *et al.*, 2001), gleichzeitig erfolgt eine Rekrutierung und Bindung der dritten und katalytischen Untereinheit DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit*) (Ahnesorg *et al.*, 2006) (Abbildung 8).

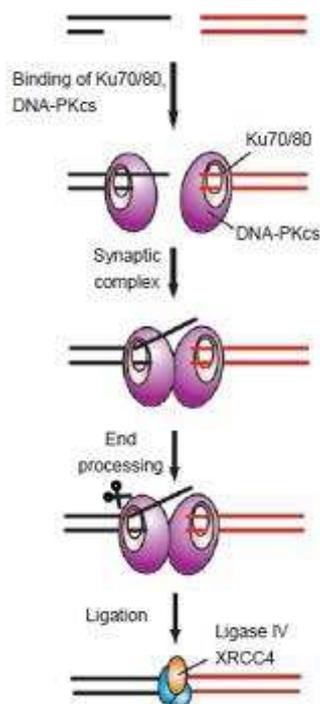


Abbildung 8: Schematische Darstellung der NHEJ. Die freien DNA-Enden werden durch Bildung eines synaptischen Komplexes zusammengebracht, bestehend aus den zwei DNA-Enden, zwei Ku₇₀/Ku₈₀ und zwei DNA-PKcs-Molekülen. Nicht passende Enden werden prozessiert und anschließend über den XRCC4/DNA-Ligase-IV-Komplex und XLF ligiert. Aus (Weterings und Chen, 2008).

Dies ermöglicht den Zugang weiterer Proteine für die Prozessierung der DNA-Enden wie die Artemis-Nuklease (Moshous *et al.*, 2001) und MRE11 (Zha *et al.*, 2009). Das Auffüllen der DNA-Enden erfolgt über DNA-Polymerasen (Ma *et al.*, 2004), die anschließende Ligation über den XRCC4/DNA-Ligase-IV/XLF-Komplex (Ahnesorg *et al.*, 2006).

1.4.2 Homologe Rekombinationsreparatur

Die homologe Rekombinationsreparatur (HRR) ist ein wichtiger Mechanismus für die Reparatur von DNA-DSB. Bei der HRR wird anhand eines Schwesterchromatids, welches als Matrize dient, die genetische Information kopiert. Dieser zentrale Prozess wird durch die konservierte RAD51-Proteinfamilie katalysiert (Mazon *et al.*, 2010, San Filippo, 2008). Damit RAD51 binden kann, müssen zuerst die DNA-Enden des DSB zu einzelsträngiger DNA reseziert werden. Dies erfolgt durch Bindung des MRN-Komplexes an den DSB. Die freien DNA-Enden werden durch dessen Exonuklease-Aktivität reseziert und es entstehen kurze, einzelsträngige 3'-Enden (Lavin, 2004). Die freien einzelsträngigen 3'-Enden werden durch RPA (*replication protein A*) gebunden, wodurch sie stabilisiert werden (Wold, 1997). RPA interagiert mit RAD51, was an die DNA bindet und helikale Filamente an den Einzelstrangbereichen ausbildet. RAD52 vermittelt den Austausch von RPA durch RAD51, wodurch es zur Bildung eines Nukleoprotein-Komplexes aus DNA und RAD51 kommt (Stauffer und Chazin, 2004, Sugiyama und Kowalczykowski, 2002). Nach Auffinden einer intakten homologen Sequenz im Schwesterchromatid durch den Nucleoprotein-Komplex kommt es zur Stranginvasion in die Duplex DNA (Baumann *et al.*, 1996), was durch die Proteine BRCA1, BRCA2 und RAD52 vermittelt wird (Ting und Lee, 2004). Die homologe Paarung der DNA-Moleküle durch RAD51 stimuliert RAD54. Der Einzelstrang wird verdrängt und es kommt zur Ausbildung eines *displacement loop* (*D-loop*) (Mazon *et al.*, 2010). RAD51 wird durch RAD54 von der DNA verdrängt, was für die anschließende DNA-Synthese wichtig ist (San Filippo *et al.*, 2008). Die Enden des geschädigten Stranges werden mit Hilfe der DNA-Polymerase δ und mit dem Matrizenstrang als Vorlage verlängert (Li *et al.*, 2009, Mazon *et al.*, 2010) (Abbildung 9). Dabei kommt es zur Ausbildung von kreuzförmigen Bereichen zwischen den beiden Einzelsträngen, den sogenannten *Holliday junctions* (Holliday 1964).

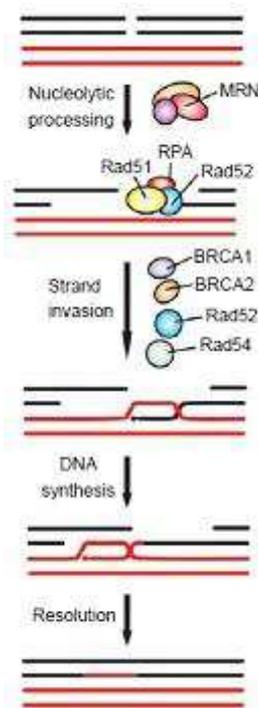


Abbildung 9: Schematische Darstellung der HRR. Bei der HRR wird ein homologer Sequenzstrang zur Reparatur benötigt. Die DNA-Enden werden durch den MRN-Komplex prozessiert. Es erfolgt eine Bindung an die entstehenden Einzelstrangbereiche durch RPA, RAD51 und RAD52. Nach vermittelter Strandinvasion durch RAD52, RAD54, BRCA1 und BRCA2 kann die DNA-Neusynthese stattfinden. Die Reparatur des DSB wird durch Auflösung der *Holliday junctions* vollendet (aus Weterings und Chen, 2008).

Nach der DNA-Synthese werden die entstandenen *Holliday junctions* über Resolvasen aufgelöst (Svendsen und Harper, 2010).

1.5 DNA-Reparatur-Defizienz-Syndrome

1.5.1 Mögliche Auswirkungen eines Defekts in der DNA-Reparatur

Die effiziente und korrekte Reparatur von DNA-Schäden ist essentiell für verschiedene physiologische Prozesse, die zur Erhaltung und Integrität des Genoms von großer Bedeutung sind. Eine Störung in diesem sensiblen Ablauf kann zur genetischen Instabilität und somit auch zu Krebs führen. Bislang sind bereits einige verschiedene Syndrome bekannt, die mit einem Defekt in der DNA-Reparatur assoziiert sind.

1.5.1 Ataxia Teleangiectatica

Die Ataxia Teleangiectatica (AT), auch als Louis-Bar-Syndrom bekannt, ist eine neurodegenerative Erkrankung, die bereits im frühen Kindesalter beginnt (Louis-Bar, 1941). AT wird rezessiv autosomal vererbt (Savitsky *et al.*, 1995) und beruht auf verschiedenen Keimbahnmutationen im *ATM* Gen, wobei bislang mehr als 250 Mutationen bekannt sind (Concannon und Gatti, 1997). Die klinischen Charakteristika der AT zeichnen sich durch eine fortschreitende neuromotorische Funktionsstörung (Ataxie), eine Immundefizienz sowie durch das Auftreten von Teleangiektasien (Arteriolenenerweiterung)

aus (Shiloh, 1997). Auf zellulärer Ebene finden sich eine erhöhte Chromosomeninstabilität, Strahlensensibilität sowie Defekte in den Zellzykluskontrollpunkten (G1/S und G2/M) und der DNA-DSB-Reparatur (Shiloh, 1997). Die Krankheit zeichnet sich durch eine erhöhte Prädisposition für Krebs aus (Taylor *et al.*, 1996), wobei eine Behandlung der Patienten aufgrund der Strahlensensibilität stark eingeschränkt ist.

1.5.2 Nijmegen Breakage Syndrom, AT-like disorder und NBS-like disorder

Mutationen in den Komponenten des MRE11/RAD50/NBN (MRN)-Komplexes führen zu einer Hypersensibilität gegenüber ionisierender Strahlung, teils auch anderen DNA-schädigenden Agenzien wie zum Beispiel UV-Licht, und zählen zu den Ursachen von humanen DNA-Reparatur-Defizienz-Syndromen.

Eine der AT ähnliche Erkrankung ist die *AT-like disorder* (ATLD), welche die zerebelläre Symptomatik, aber bei den bekannten Patienten im Gegensatz zu AT keine Teleangiektasien oder Immundefizienz aufweist. Die zellulären Charakteristika der ATLD sind eine Chromosomeninstabilität und Strahlensensibilität. Ursache der ATLD sind hypomorphe Mutationen im *MRE11* Gen (Stewart *et al.*, 1999).

Das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS) wird durch Mutationen im *NBN* Gen ausgelöst (Carney *et al.*, 1998, Varon *et al.*, 1998) und zeichnet sich durch eine Mikrozephalie (Schädelfehlbildung), mentale Retardierung und eine Wachstumsstörung aus (Blundred und Stewart, 2011). Ähnlich zum AT- und ATLD-Phänotyp weisen NBS-Patienten eine erhöhte Sensibilität gegenüber ionisierender Strahlung sowie eine erhöhte Chromosomeninstabilität, Tumordisposition und Immundefizienz auf (Blundred und Stewart, 2011).

Die *NBS-like disorder* basiert auf zwei trunkierenden heterozygot vorliegenden Mutationen (3277 C→T, R1093 X und 3939A→T, X1313 Y ext X*66) im *RAD50* Gen, die einen stark reduzierten RAD50 Proteinlevel zur Folge haben. Bislang ist weltweit nur ein Patient mit einer RAD50-Defizienz identifiziert worden (Walters *et al.*, 2009). Der klinische und zelluläre Phänotyp ist dabei ähnlich der von NBS-Patienten, wobei die Patientin jedoch keine Immundefizienz aufweist. Die RAD50-Defizienz zeichnet sich durch eine reduzierte Phosphorylierung von ATM an Ser1981 sowie dessen Substraten SMC1 (Ser957) oder p53 (Ser15) aus. Des Weiteren konnte auch eine verminderte Phosphorylierung des ATR-Substrates Chk1 nachgewiesen werden (Walters *et al.*, 2009).

Die ähnlichen zellulären Merkmale dieser drei Syndrome zeigen die bedeutende Rolle des MRN-Komplexes in der DNA-Schadensantwort auf. Bislang konnte jedoch noch keine genetische Basis gefunden werden, die eine Erklärung dafür liefert, dass Mutationen von Proteinen, die in einem gemeinsamen Proteinkomplex interagieren, zu unterschiedlichen klinischen Charakteristika führen, da eine sekundäre Funktion der einzelnen Proteine bislang noch nicht bekannt ist.

1.6 Der MRE11-RAD50-NBN (MRN)-Komplex

Der MRN-Komplex ist ein hoch konservierter Proteinkomplex und agiert als DNA-Doppelstrangbruchsensor, Co-Aktivatoren von DSB-induzierten Zellzykluskontroll-Signalwegen sowie als Effektor in der DNA-Reparatur (Lamarche *et al.*, 2010, Lavin, 2007). Die Interaktion der Proteine des Komplexes, Mre11 (*meiotic recombination 11*), Rad50 und Xrs2 (*Saccharomyces cerevisiae* homolog zu Vertebraten-spezifischen NBN), wurden 1995 bei einer genetischen Analyse von *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen (Ogawa *et al.*, 1995). Der MRN-Komplex lokalisiert in nukleären Foci an DNA-DSB (Nelms *et al.*, 1998). Durch die Bindung des Komplexes an den DNA-DSB werden die freien Enden der DNA zusammengehalten, um die sich anschließende Reparatur zu ermöglichen. Die individuellen Komplex-Proteine, MRE11, RAD50 und Xrs2 bzw. NBN, übernehmen verschiedene Aufgaben bei der Bindung an den DSB, die im Folgenden erläutert werden sollen.

1.6.1 MRE11

MRE11 ist ein hoch konserviertes Protein, bestehend aus einer N-terminalen Mn^{2+}/Mg^{2+} -abhängigen Phosphoesterase-Domäne und zwei C-terminalen DNA-bindenden Domänen (Lamarche *et al.*, 2010, Williams *et al.*, 2007, D'Amours und Jackson, 2002) (Abbildung 10). Zusätzlich verfügt MRE11 über eine Mn^{2+} -abhängige Einzelstrang-Endonuklease und eine 3'-5' Doppelstrang-Exonuklease-Aktivität (Stracker und Petrini, 2011, Trujillo *et al.*, 1998, Paull und Gellert, 1998).



Abbildung 10: Domänen-Struktur von MRE11. Schematischer Aufbau der zwei DNA-bindenden Domänen (DBD), der Phosphoesterase-Domäne und der Bindungsstellen von NBN und RAD50 im MRE11 Protein. Die Grafik wurde modifiziert nach Lamarche *et al.* (2010).

MRE11 besteht *in vivo* als MRE11₂RAD50₂-Komplex, wobei jedes MRE11 Molekül ein einzelnes RAD50 Molekül bindet.

1.6.2 NBN

NBN besteht aus einer FHA (*forkhead associated domain*)-Domäne, zwei N-terminalen BRCT (BRCA1 Terminus)-Domänen sowie einer MRE11-Interaktionsdomäne am C-Terminus (Lloyd *et al.*, 2009, Williams *et al.*, 2009, Lamarche *et al.*, 2010) (Abbildung 11). Die FHA-Domäne bindet an phosphorylierte Threoninreste in Ser-X-Thr-Motiven, die in DNA-Reparaturproteinen wie MDC1 vorkommen. Die zwei BRCT-Domänen in humanen NBN binden an phosphorylierte Serinreste in Ser-X-Thr-Motiven (Lloyd *et al.*, 2009, Williams *et al.*, 2009, Lamarche *et al.*, 2010). Am C-Terminus enthält NBN eine ATM-interagierende Domäne, die verantwortlich ist für die Rekrutierung von ATM zum Schadensort (Falck *et al.*, 2005, You *et al.*, 2005, Lamarche *et al.*, 2010).



Abbildung 11: Struktureller Aufbau von NBN. Schematischer Aufbau der N-terminalen FHA und der zwei BRCT-Domänen sowie der MRE11- und ATM-Bindungsstellen am C-Terminus. Die Grafik wurde modifiziert nach Lamarche *et al.* (2010).

NBN ist für den nukleären Transport des MRN-Komplexes in den Kern verantwortlich, verfügt jedoch selber über keine enzymatische Aktivität (Lamarche *et al.*, 2010).

1.6.3 RAD50

RAD50 ist ein Protein, welches strukturell der SMC (*structural maintenance of chromosomes*)-Proteinfamilie angehört. Die SMC-Proteinfamilie reguliert die Dynamik, funktionelle Organisation und Struktur von Chromatin (Hirano, 2006, Lamarche *et al.*, 2010). In Eukaryoten wurden bislang sieben hochkonservierte Gene, die für SMC-Proteine kodieren (SMC1-SMC6), gefunden (Hirano, 2005). SMC-Proteine besitzen zwei strukturelle Charakteristika: eine ABC-Domäne mit ATPase Funktion und eine zentral gelegene Region, die eine stabile Heterodimerisierung ermöglicht (Harvey *et al.*, 2002) (Abbildung 12). Diese antiparallele Anordnung der SMC-Proteine führte zu der Annahme, dass SMC-Dimere in einer V-förmigen Struktur mit der DNA interagieren. Die SMC-Dimere bilden demnach eine ringförmige Struktur um ein oder mehrere DNA-Moleküle aus und können so regulatorisch auf die Chromosomensegregation während der Zellteilung einwirken (Kinoshita *et al.*, 2009). Die Aminosäuresequenz und die Proteinstruktur von SMC-Proteinen und RAD50 sind in sehr vielen Bereichen homolog.



Abbildung 12: Domänen-Struktur von RAD50. RAD50 verfügt N- und C-terminal über zwei ATP-bindende Kassetten, die über *coiled-coil* Motive und ein –CXXC- Sequenzmotiv verbunden sind. Die Grafik wurde modifiziert nach Lamarche *et al.* (2010).

RAD50 besitzt zwei Nukleotid-bindende Domänen (Walker A und Walker B), die als ATP-bindende Kasette fungieren. Zwischen den beiden Domänen befinden sich zwei lange *coiled-coil* Motive, die über ein –CXXC-Sequenz Motiv verbunden sind (Hirano, 2006). Diese –CXXC-Domäne ist kürzer als bei den SMC-Proteinen, daher findet eine stabile Dimerisierung von RAD50 nicht über diese Region, sondern über MRE11 statt (Kinoshita *et al.*, 2009).

1.6.4 Bindung des MRN-Komplexes an einen Doppelstrangbruch

Die Bindung des MRE11/RAD50-Heterotetramer-Komplexes ($MRE11_2RAD50_2$) an DNA ermöglicht den räumlichen Zusammenhalt der freien DNA-Enden eines Doppelstrangbruchs (de Jager *et al.*, 2001). Die Bindung erfolgt über die zwei DNA-bindenden Motive von MRE11, welches wiederum mit den Walker A und Walker B Motiven von RAD50 als globuläre Domäne verbunden ist. Der Zusammenhalt der DNA-Moleküle erfolgt über die –CXXC-Sequenz in RAD50, die durch Koordination eines Zn^{2+} Ions eine Dimerisierung bewirkt (Lavin, 2007) (Abbildung 13).

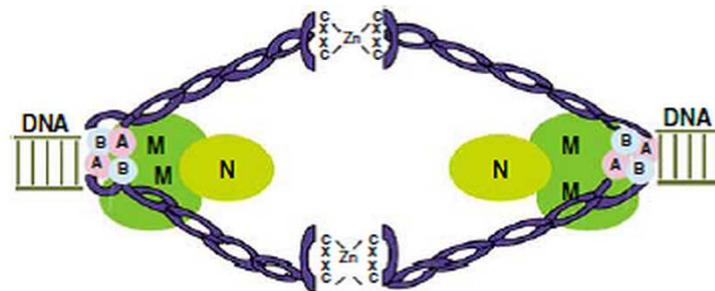


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Bindung des MRN-Komplexes an die freien DNA-Enden eines DSB. Die Bindung des RAD50 Proteins und MRE11 erfolgt über die Walker A und Walker B Motive. NBS bindet an MRE11, welches über seine DNA-bindenden-Domänen an die freien Enden gebunden ist. Aus (Lavin, 2007).

NBN bindet an MRE11, was zur Bildung des $MRE11_2RAD50_2NBN_2$ -Komplexes führt, in dem jedoch die genaue Anzahl der gebundenen NBN Proteine pro $MRE11_2RAD50_2$ -Heterotetramer bislang noch nicht abschließend geklärt ist (Trujillo *et al.*, 1998, van der Linden *et al.*, 2009, Lamarche, 2010).

1.7 Zellteilung und DNA-Schadensproteine

Verschiedene Studien konnten bereits zeigen, dass Proteine der DNA-Schadensantwort auch in die Zellteilung involviert sind (Daniels *et al.*, 2004, Vinciguerra *et al.*, 2010). Erst kürzlich wurde bewiesen, dass der MRN-Komplex essentiell für die Chromosomenanordnung während der normalen mitotischen Progression ist (Rozier *et al.*, 2013).

In Chk1-defizienten Zellen konnte ein erhöhter Level an Chromosomenfehlsegregationen und chromosomaler Instabilität nachgewiesen werden (Zachos *et al.*, 2007).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass BRCA2, welches normalerweise eine Rolle in der homologen Rekombinationsreparatur bei der DNA-Reparatur spielt, während der Cytokinese am *Midbody* lokalisiert. Eine BRCA2-Inaktivierung in embryonalen murinen Fibroblastenzellen und HeLa-Zellen führte zu einer Verzögerung in der Cytokinese (Daniels *et al.*, 2004). Vinciguerra *et al.* (2010) berichten von einer abnormalen Cytokinese in Fanconi-Anämie-Zellen, die in der Folge eine höhere Rate an binukleären Zellen aufweisen. Proteine des Fanconi-Signalweges spielen bei der DNA-Reparatur eine wichtige Rolle und werden unter anderem durch ATM phosphoryliert (Matsuoka *et al.*, 2007).

Die Verknüpfung von DNA-Reparaturwegen mit der Mitose und Cytokinese könnte eine zentrale Rolle spielen. Eine Unterdrückung der Zellteilung bei noch nicht reparierter oder fehlerhaft reparierter DNA im Bereich der Teilungsebene (Normand und King, 2010) könnte eine Art Rettungsmechanismus der Zelle darstellen. Auch post-translationale Modifikationen können die Cytokinese als Antwort auf DNA-Schädigung regulieren (Normand und King, 2010). Es konnte eine verstärkte poly-ADP-Ribosylierung von Aurora B nach DNA-Schädigung nachgewiesen werden, was die Kinaseaktivität von Aurora B inhibiert (Monaco *et al.*, 2005). Eine Inhibierung von Aurora B als ein essentielles Protein der Chromosomensegregation (Hegarati *et al.*, 2011) und der Cytokinese kann somit nach DNA-Schädigung zu einer Beeinträchtigung der Chromosomensegregation und Cytokinese führen. Eine mögliche Konsequenz von chromosomaler Instabilität kann die Bildung von Chromatin-Brücken sein (Hoffelder *et al.*, 2004). Diese Brücken bilden sich während der Anaphase der Mitose aus und reflektieren eine unvollendete Chromosomensegregation (Laulier *et al.* 2011). Diese Segregationsdefekte können durch dysfunktionale Telomere (Stewenius *et al.*, 2005) oder unvollständig reparierte DNA-DSB entstehen (Acilan *et al.* 2007). Chromatin-Brücken führen zu einer abnormalen Cytokinese, da die Teilung der zwei Tochterzellen durch die vorhandene DNA in der Teilungsebene gestört ist. Es kommt zur Ausbildung des *Midbodies* und zur Zentrierung der Proteine, die für die Abtrennung essentiell sind. Ein Bruch der Chromatin-Brücke kann eine Abtrennung zur Folge haben, geht aber mit einem Verlust von genetischem Material einher. Des Weiteren wurde beschrieben, dass eine verlängerte Kinaseaktivität von Aurora B am *Midbody* eine zeitliche Verzögerung der Abtrennung zur Folge hat, die zur Auflösung der Brücke benötigt wird (Steigemann *et al.*, 2009). Der molekulare Mechanismus der Abtrennungsphase der Tochterzellen mit Chromatin in der Teilungsebene ist jedoch noch weitgehend unerforscht.

2 Zielsetzung der Arbeit

Die Reparatur von DNA-Schäden ist essentiell für das Überleben eines Organismus. Die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität ist ein komplexes und ineinandergreifendes Netzwerk aus DNA-Schadensdetektion, Signalübermittlungen, DNA-Reparatur und Zellzyklusregulation. Ein dem Nijmegen Breakage Syndrom verwandtes Strahlensensibilitätssyndrom, die *NBS-like disorder* wird durch hypomorphe Mutationen im *RAD50* Gen verursacht und führt zu einer Reduktion des *RAD50* Proteinspiegels und damit zu einem Defekt in der DNA-Schadensantwort. Die in dieser Arbeit verwendeten *RAD50*-defizienten Zelllinien (F239 SV40 bzw. HA239) sind aufgrund ihrer zellulären und phänotypischen Charakteristika sowie ihrer Defekte in der Aktivierung der DNA-Schadensreparatur im ATM-Signalweg als Modell für die *RAD50*-Defizienz etabliert (Waltes *et al.*, 2009). In der hier vorgestellten Arbeit sollten die *RAD50*-defizienten Zelllinien zunächst weitergehend im ATR-Signalweg charakterisiert werden. Hierfür dienten die ATR-abhängige H2AX Phosphorylierung und die Aktivierung des G2/M-Zellzykluskontrollpunktes als funktionelle Marker. Dabei sollte ermittelt werden, welche Relevanz das *RAD50* Protein im ATR-Signalweg hat.

Darüber hinaus sollte eine potenzielle Rolle des *RAD50* Proteins in der Mitose und Cytokinese untersucht werden. Aus einzelnen Studien hatten sich Hinweise ergeben, dass Proteine, die an der DNA-Schadensantwort beteiligt sind, mit Proteinen der Zellteilung interagieren oder selbst in die Regulation der Mitose involviert sein könnten (1.7). In dieser Arbeit war daher zu prüfen, ob *RAD50* eine Relevanz in der Zellteilung besitzt. Der Einfluss von *RAD50* auf die Zellteilung wurde mittels eines *RAD50 knock-downs* ermittelt. Des Weiteren sollte geprüft werden, ob *RAD50* als *SMC-like*-Protein eine Funktion in der Chromosomensegregation einnimmt. Hierfür sollte die Lokalisation von *RAD50* während der Mitose sowie eine bestrahlungsdosisabhängige Bindung von *RAD50* an Chromatin untersucht werden. Zusätzlich sollte geprüft werden, ob *RAD50* in dieser Zellzyklusphase weitere Interaktionspartner, außer NBN und MRE11, besitzt. Die Analysen sollten anhand von humanen und murinen Fibroblastenzellen erfolgen.

Mit Blick auf die Rolle von *RAD50* als Brustkrebs susceptibilitäts-Gen war es außerdem naheliegend, die erhaltenen Ergebnisse auch vergleichend an Brustdrüsenepithelzellen und zwei humanen epithelialen Brustkrebs-Zelllinien (HCC1937, HCC1395) zu validieren. Für die in dieser Arbeit verwendeten Brustkrebszelllinien sollte zusätzlich eine funktionelle Charakterisierung im ATM-Signalweg erfolgen.

3 Material und Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden Suspensionszellen sowie adhären wachsende Zellen verwendet. Die Arbeiten mit humanen und murinen Zellen erfolgten unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank. Die Zellen wurden im Kulturschrank bei 37°C, 5 % CO₂, 21 % O₂ Gehalt und einer relativen Luftfeuchte von 90-100 % inkubiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Polyethylenzellkulturflaschen mit einem gasdurchlässigen Deckel. Für experimentelle Arbeiten wurden die adhären wachsenden Zellen je nach Versuchsablauf in anderen Gefäßen kultiviert.

F239 SV40:

F239 SV40 Zellen sind humane Fibroblastenzellen, die ursprünglich aus einer Biopsie der Haut einer Patientin mit einem NBS-like Syndrom (RAD50-Defizienz) gewonnen worden sind. Die Zelllinie F239 SV40 wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Detlev Schindler (Universität Würzburg, Institut für Humangenetik, Würzburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Die Immortalisierung der primären Zellen erfolgte mit dem transformierenden Virus SV40.

HA239:

HA239 sind humane lymphoblastoide Zellen, die derselben Patientin wie die F239 SV40 entstammen. Die Zellen wurden aus Blut isoliert und mittels EBV (Epstein-Barr-Virus) immortalisiert. Die Isolation und Immortalisierung der Zellen wurde im Forschungsbereich der Frauenklinik, Medizinische Hochschule Hannover, durch die Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Thilo Dörk-Bousset durchgeführt.

HA517:

Die HA517 sind ATR-defiziente Zellen, die aus einer Blutprobe eines Patienten mit Seckel-Syndrom (ATR-Seckel) isoliert worden sind (lymphoblastoide Zellen). Die Zellen wurden mittels EBV immortalisiert und freundlicherweise von Frau Prof. Penelope Jeggo

(University of Sussex, Genome and Damage and Stability Centre, Großbritannien) zur Verfügung gestellt.

HA325:

HA325 sind humane lymphoblastoide Zellen, die aus Blut einer gesunden Kontroll-Person isoliert und mittels EBV immortalisiert worden sind. Die Immortalisierung der Zellen wurde im Forschungsbereich der Frauenklinik, Medizinische Hochschule Hannover, durch die Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Thilo Dörk-Bousset durchgeführt. Die Zellen haben eine voll ausgeprägte ATM-Aktivierung nach Bestrahlung und dienen als Referenzzelllinie (Wildtyp).

ADP SV40:

ADP SV40 Zellen sind humane Fibroblasten aus einer Hautbiopsie einer gesunden Kontroll-Person und dienen als Referenzzelllinie. Die Immortalisierung der Zellen erfolgte mit dem transformierenden Virus SV40. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Detlev Schindler (Universität Würzburg, Institut für Humangenetik, Würzburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

NIH3T3:

NIH3T3 Zellen sind murine embryonale Fibroblastenzellen, die erstmals 1962 an der New York Universität, *School of Medicine Department of Pathology* etabliert worden sind (Todaro und Green, 1963). Die Zellen sind spontan immortalisiert und wurden freundlicherweise von Frau Prof. Penelope Jeggo (University of Sussex, Genome and Damage and Stability Centre, Großbritannien) zur Verfügung gestellt.

HCC 1395:

HCC1395 entstammen aus humanem tumorösen Brustepithelgewebe einer 43-jährigen Patientin aus dem Jahre 1994 (Gazdar AF, *et al.*, 1988). Die Zelllinie wurde über die *American Type Culture Collection* (ATCC) bezogen.

HCC 1937:

HCC1937 sind humane Brustkrebsepithelzellen, die aus einem duktalem Karzinom einer 23-jährigen Patientin isoliert worden sind. Die Zellen weisen Homozygotie für eine Mutation in *BRCA1* auf (5382insC, heute als c.5266dupC bezeichnet) (Tomlinson GE, *et al.*, 1998). Die Zelllinie wurde über die *American Type Culture Collection* (ATCC) bezogen.

MCF10A:

MCF10A ist eine humane nicht-tumorigene Brustepithelzelllinie, die von einer 36-jährigen gesunden Kontroll-Person aus einer Brustbiopsie gewonnen worden ist (McGrath und Soule, 1991). Die Zellen dienen als Referenzzelllinie und wurden über die *American Type Culture Collection* (ATCC) bezogen.

3.1.2 Kultivierung und Passagierung von adhärennten Zelllinien

Für die Subkultivierung von adhärennten Zellen müssen die Zellen zunächst vom Zellkulturflaschenboden abgelöst werden. Das Passagieren von adhärennten Zelllinien erfolgte bei einer optischen Konfluenz von ca. 80 - 90 %. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit 1x PBS-Lösung gewaschen und mit einer Trypsin/EDTA-Lösung für 2-5 min inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde optisch unter einem Durchlichtmikroskop kontrolliert. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mit einem gleichen Volumenanteil Medium versetzt, um eine weitere Trypsinaktivität zu unterbinden. Die Zellen wurden bei 201 rcf für 5 min zentrifugiert und anschließend durch mehrfaches Pipettieren vereinzelt. Die Zellen wurden je nach Wachstumsrate 1/2 bis 1/20 in eine neue Zellkulturflasche mit vorgewärmtem Medium ausgesät und kultiviert. Für die Kultivierung der Zellen erfolgte ein Mediumwechsel 2x pro Woche.

3.1.3 Kultivierung und Passagierung von Suspensionszellen

Das Anlegen einer lymphoblastoiden Zelllinie erfolgte durch eine Immortalisierung von B-Lymphozyten mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) (Neitzel, 1986). Die Infektion der B-Lymphozyten bewirkt eine unbegrenzte Teilungsrate der Zellen, die durch das episodale EBV-Genom gesteuert wird. Die lymphoblastoiden Zellen wurden 2x in der Woche mit frischem Medium versorgt. Dafür wurde ein Teil des alten Mediums vorsichtig an der

Flüssigkeitskante abgesaugt und mit frischem Medium wieder ersetzt. Für die Passagierung der Zellen wurde die Hälfte der vorhandenen Zellen abgenommen und in eine neue Polyethylenkulturflasche überführt. Die Zellen wurden mit gleichem Volumenanteil frischen Mediums aufgefüllt.

3.1.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die Kryokonservierung von Zellen dient als Langzeitlagerung und als Schutz vor möglichen Veränderungen der Zellen durch die Kultivierung. Das Einfrieren erfolgte unter Zusatz von DMSO, welches die Eiskristallbildung und damit verbundene Schäden an den Zellen verhindern soll (Cavins *et al.*, 1965). Für das Einfrieren wurden die Zellen bei 201 rcf für 5 min zentrifugiert und das Zellsediment in 1,5 ml Einfriermedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein 2 ml Kryo-Röhrchen überführt und in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter bei -80°C für 2 - 3 Tage gelagert. Anschließend erfolgte eine Lagerung der Kryo-Röhrchen in flüssigem Stickstoff bei -196°C. Das Auftauen adhärenter Zellen und Suspensionszellen erfolgt bei 37°C im Wasserbad. Die Zellsuspension wurde in 5 ml Medium überführt und für 5 min bei 201 rcf zentrifugiert. Bei Suspensionszellen wurde das Zellsediment in 5 ml Medium aufgenommen und in eine Polyethylenkulturflasche überführt. Die Aussaat der adhärenen Zellen erfolgte wie beim Passagieren der Zellen.

3.2 Bestrahlung von Zellen

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte je nach Versuchsablauf in Polyethylenzellkulturflaschen oder in 6-*well*-Platten. Die Bestrahlung erfolgte mit einem Linearbeschleuniger Mevatron MD2 in der Klinik für Strahlentherapie der Medizinischen Hochschule Hannover. Am Vortag der Bestrahlung wurden die Zellen mit frischem Medium versehen. Die Bestrahlungsdosis sowie die zeitliche Aufarbeitung der Zellen nach Bestrahlung richteten sich nach dem experimentellen Versuchsaufbau. Die UV-Bestrahlung erfolgte mit einer UV-C Quelle mit 2,5 J m⁻² in der Abteilung der Virologie der Medizinischen Hochschule Hannover. Die zeitliche Aufarbeitung erfolgte nach dem experimentellen Versuchsaufbau.

3.3 Synchronisation von Zellen

In Kultur wachsende Zellen laufen asynchron durch die verschiedenen Zellzyklusphasen. Um ein Arretieren der Zellen in der G2/M-Phase zu ermöglichen, wurden die Zellen zunächst für 3 Tage bei 30°C inkubiert, um die Zellzyklusprogression zu verlangsamen (Kumar *et al.*, 2007). Anschließend wurden die Zellen mit 500 nM Nocodazol versetzt und für 20 h bei 37°C inkubiert. Nocodazol bewirkt eine Depolymerisierung der Mikrotubuli (Baran *et al.*, 2008) und verhindert somit eine Progression der Zellen durch die M-Phase, die Zellen werden somit am Übergang der G2/M-Phase arretiert. Eine Entlassung aus dem Arrest erfolgte durch Absaugen des Mediums, einmaliges Waschen der Zellen mit sterilem PBS und Zugabe von frischem Medium. Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte dann zu definierten Zeitpunkten nach Entfernung des Nocodazols.

3.4 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Mit Hilfe der Transfektion können Zellen genetisch modifiziert werden. Das Einbringen von siRNA in eine Zelle wurde mit dem Transfektionsreagenz Metafectene®Si durchgeführt. Metafectene®Si basiert auf kationischen Liposomen. Für die Transfektion wurden 11.9 µl Metafectene®Si Reagenz pro *well* auf sterilen Deckgläsern in einer 6-*well*-Platte als Tropfen vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 12 µl (180 pmol) siRNA in den vorgelegten Tropfen des Transfektionsreagenzes. Durch einmaliges vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurden die beiden Lösungen vermischt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 8×10^4 exponentiell wachsende Zellen pro *well* zu dem Gemisch hinzugegeben und für 72 h Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

3.5 Immuncytochemie

3.5.1 Immuncytochemische Färbung

Die Immuncytochemie ermöglicht die spezifische Markierung von Proteinen und somit auch die visuelle Detektion der Lokalisation der Proteine in verschiedenen Zellarten oder Geweben. Die Markierung der Proteine erfolgt mittels mono- oder polyklonaler Antikörper, die an ein spezifisches Antigen im Protein binden. Die Detektion erfolgt über einen Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper, der an die Fc-Region des Primärantikörpers bindet und ein mikroskopisches Signal liefert.

Für die immuncytochemische Markierung wurden die Zellen vor Beginn des Experiments in 6-*well*-Platten auf Deckgläsern kultiviert. Um Lebensvorgänge in Zellen abzustoppen, wurden die Zellen mit einer 3 % PFA (w/v), 2 % (w/v) Sucrose Lösung für 10 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und die fixierten Zellen mit 2 % (w/v) NGS/NRS in PBS für 20 min vorinkubiert. Dann erfolgte eine Permeabilisierung der Zellen mit 0,2 % (v/v) Triton X-100 in PBS für 3 min bei humanen Zellen und 6 min bei murinen Zellen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte im Antikörperdiluent (2 % (w/v) NGS/NRS in PBS) für 120 min. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper im Antikörperdiluent für 90 min inkubiert und dreimal mit PBS gewaschen. Die Markierung der Zellkerne, speziell des Chromatins, erfolgte mit einer 0,3 μ M 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI)-Lösung (1:50.000) in PBS für 10 min. Die Zellen wurden einmal mit PBS gespült und für die mikroskopische Dokumentation mit 15 μ l ProLongGold Antifade Reagenz auf Deckgläsern eingebettet. Für die immuncytochemische Färbung von Suspensionszellen wurden die Zellen nach der Behandlung in Polyethylenzellkulturflaschen (T25 cm²) mittels Cytospin auf Objektträger aufgezogen. Dafür wurden 200 μ l der Zellsuspension in die vorgefertigte Cytospinapparatur mit Objektträger pipettiert und bei 111 rcf für 3 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und der Objektträger bei Raumtemperatur für 2 min getrocknet. Die Zellen wurden mit 3 % PFA (w/v), 2 % (w/v) Sucrose-Lösung für 10 min fixiert und anschließend simultan zu den adhärenen Zellen immuncytochemisch markiert.

3.5.2 Bestimmung des Mitotischen Index

Um Informationen über den Zellteilungsindex einer Zellpopulation zu erhalten, kann man den Anteil der Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Auswertung in der M-Phase befinden, bestimmen. Hierfür wurden die Zellen wie unter Punkt 3.5.1 beschrieben verarbeitet und mit einem phospho-Histone H3 (Ser10) Antikörper gefärbt. Histon H3 gehört zum Histon-Proteinkomplex des Chromatins und wird zu Beginn der Mitose spezifisch an der Aminosäure Serin 10 phosphoryliert, nach Beenden der Mitose erfolgt wieder eine Dephosphorylierung des Histon H3 (Li *et al.*, 2005, Van Hooser *et al.*, 1998). Eine Auswertung des Mitotischen Index erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMI 6000 B). Hierzu wurde aus einer Gesamtzellpopulation (mindestens 500 Zellen) der Anteil der phospho-H3 Ser10 positiven Zellen ausgezählt.

Der Mitotische Index wurde wie folgt definiert:

$$\text{Mitotischer Index (MI)} = \frac{\text{Anzahl der pH3 (S10)-positiven Zellen}}{\text{Gesamtzahl der Zellen (mind.500)}}$$

3.5.3 Proliferationsanalyse einer Gesamtzellpopulation

Die Anzahl der aktiv replizierenden Zellen einer Zellpopulation geben Aufschluss über die Proliferationsrate. Die Anzahl der S-Phase-Zellen einer Zellpopulation ist von vielen Zelllinien bereits bekannt und bei tumorigenen Zellen stark erhöht. Die Bestimmung der DNA-Syntheserate erfolgte mit Hilfe von EdU. EdU ist ein Nucleosid-Analogon zu Thymidin und lagert sich in aktiv replizierende DNA-Stränge ein. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des Click iT[®] EdU Imaging Kits von Invitrogen/ Molecular Probes. Die Reaktion basiert auf einer Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Addition, die chemisch zu Reaktionen der Klick-Chemie gehört, die 2001 von Barry Sharpless (Kolb *et al.*, 2001) definiert wurde. Die Zellen wurden 24 h vor Beginn des Experimentes in 6-well-Platten ausgesät und bei 37°C im Kulturschrank inkubiert. Die Zellen wurden bestrahlt und für weitere 24 h - 48 h kultiviert. Die Inkubation mit 25 µM EdU erfolgte für 20 min im Kulturschrank. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit einer 3 % PFA, 2 % Sucrose (v/w) Lösung für 10 min fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit einer 0,2 % Triton-X-100 Lösung permeabilisiert. Anschließend wurden pro well 100 µl Reaktionsansatz pipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Reaktionsansatz für ein well:

1x Click iT [®] Reaktions Puffer	86 µl
CuSO ₄	4 µl
Alexa Fluor [®] Azide 555	0,24 µl
Reaktions Puffer Additiv	10 µl

Die Lösung wurde entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Eine immuncytochemische Detektion anderer Proteine mittels immuncytochemischer Markierung sowie der DNA mittels DAPI konnte im Anschluss, wie unter Punkt 3.5.1 beschrieben, erfolgen.

3.5.4 Foci Analyse

Um eine Aussage über die Strahlensensibilität von Zellen treffen zu können, hat sich die Auswertung von Doppelstrangbrüchen bewährt. Bei Auftreten eines Doppelstrangbruchs in einer Zelle wird das Histon H2AX spezifisch an der Aminosäure Serin 139 phosphoryliert (Mah *et al.*, 2010). Ein weiterer Doppelstrangbruchmarker ist das Protein 53BP1, welches genau wie γ H2AX in großen Mengen am DNA-Doppelstrangbruch akkumuliert vorliegt. Für eine Foci Analyse wurden die Zellen immunocytochemisch mit γ H2AX und 53BP1 Antikörpern gefärbt und mittels eines Fluoreszenzmikroskops (Leica DMI 6000 B) ausgewertet. Pro Auswertung einer γ H2AX/MDC1 Foci Analyse erfolgte eine optische Auszählung der Anzahl der Foci pro Zelle in einer Reihe von mindestens 30 Zellen einer Gesamtzellpopulation. Für die 53BP1 Foci Analyse wurde ein Schwellenwert von 5 Foci angesetzt. Die Anzahl der 53BP1 Foci wurden ab >5 Foci pro Zelle gezählt. Für die Analyse der γ H2AX-positiven Zellen wurde eine Zelle ab ≥ 1 γ H2AX Focus als positiv gewertet. Pro Auswertung erfolgte eine Auszählung von mindestens 100 Zellen einer Gesamtzellpopulation:

$$\begin{aligned} \gamma\text{H2AX/MDC1 Foci} & \quad \Sigma = \frac{\text{Mittelwert der Foci Anzahl aller ausgewerteten Zellen}}{\text{Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen (mind.30)}} \\ \text{53BP1 Foci} & \quad \Sigma = \frac{\text{Mittelwert der Foci Anzahl aller ausgewerteter Zellen}}{\text{Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen (mind.30)}} \\ \gamma\text{H2AX-positiv} & \quad \Sigma = \frac{\text{Anzahl der } \gamma\text{H2AX-positiven Zellen}}{\text{Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen (mind.100)}} \end{aligned}$$

3.5.5 G2/M-Zellzykluskontrollpunkt-Analyse

Die Analyse des G2/M-Kontrollpunktes (1.1.3) beruhte auf einer immunocytochemischen Färbung mit dem phospho-spezifischen Antikörper gegen Histon H3 (S10) (Stiff *et al.*, 2006). Hierzu wurden lymphoblastoide Zellen mit 5 J/m^2 UV-Licht bestrahlt, mit $1,5 \mu\text{M}$ Nocodazol versetzt und für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 201 rcf zentrifugiert und das Sediment in $200 \mu\text{l}$ PBS aufgenommen. $100 \mu\text{l}$ der Zelllösung wurden mittels einer Cytospin-Zentrifuge bei 111 rcf für 3 min auf Objektträger übertragen und wie unter 3.5.1 beschrieben fixiert und immunocytochemisch markiert. Die Analyse erfolgte mittels eines Fluoreszenzmikroskops, wobei die Anzahl der sich in der Mitose befindenden

Zellen ausgewertet (Mitotischer Index) wurden. Dies ermöglichte eine Aussage über die Funktionalität des G2/M-Kontrollpunktes.

3.6 Proximity Ligation Assay (PLA)

Die PLA-Methode ist eine fluoreszenzbasierte Methode zur Untersuchung von Proteinen, Protein-Protein-Interaktionen und posttranslationalen Modifizierungen von Proteinen *in situ* (Weibrecht *et al.*, 2010). Sie basiert darauf, dass primäre Antikörper mittels Antikörper-Antigen-Reaktion das zu untersuchende Antigen binden. Die Bindung von Spezies-spezifischen Oligonukleotid-konjugierten Sekundärantikörpern (PLA *Probes*) an die Primärantikörper bewirkt eine Hybridisierung der Oligonukleotidenschwänze der PLA *Probes*, wenn diese sich proximal (~40 nm) zueinander befinden. Mittels einer anschließenden enzymkatalysierten Ligation und *rolling circle* Amplifizierung kann die Detektion aufgrund einer Hybridisierung von fluoreszenzbasierten komplementären Oligonukleotiden mit dem *rolling circle* Amplifizierungsprodukt erfolgen (Weibrecht *et al.*, 2010). Für die Durchführung wurden Zellen in 6-well-Platten ausgesät und bis zu einer optischen Konfluenz von 60 % kultiviert, das Medium wurde entfernt, die Zellen 3x mit PBS gewaschen und 10 min mit 3 % PFA, 2 % Sucrose Lösung fixiert. Die anschließende immunocytochemische Markierung mittels Primärantikörper erfolgte wie unter 3.5.1 beschrieben. Die PLA *Probes* wurden zunächst 1:5 in 2 % NGS verdünnt und 20 min bei RT inkubiert.

Reaktionsansatz für ein *well*:

8 µl PLA *Probe* Minus Stock

8 µl PLA *Probe* Plus Stock

24 µl 2% NGS in PBS

Nach Zugabe der Lösung erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37°C. Die Lösung wurde entfernt, die Proben 2x 5 min unter leichtem Schütteln mit Waschpuffer A gewaschen, dann die Ligation-Ligase-Lösung zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert.

Reaktionsansatz für ein *well*:

8 µl Ligation Stock

31 µl HPLC H₂O

1 µl Ligase

Die Proben wurden unter vorsichtigem Schütteln 2x 2 min mit Waschpuffer A gewaschen, die Amplifizierungs-Polymerase-Lösung hinzugegeben und für 100 min bei 37°C inkubiert.

Reaktionsansatz für ein *well*:

8 µl Amplification Stock

31,5 µl HPLC H₂O

0,5 µl Polymerase

Nach 2x Waschen in Waschpuffer B für 10 min und 1x 1 min Waschen in 0.01 % Waschpuffer B wurden die Proben in einer 1:1000 DAPI-ProLongGold®-Lösung eingebettet. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte mit einem inversen Leica DMI 6000 B Fluoreszenzmikroskop.

3.7 Mikroskopie

3.7.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die Aufnahmen der Zellen erfolgten unter einem abteilungseigenen inversen Leica DMI6000B Fluoreszenzmikroskop oder an einem konfokalen Leica TCS SP2 Mikroskop der Zentralen Forschungseinrichtung Lasermikroskopie an der Medizinischen Hochschule Hannover.

Für die Aufnahmen am Leica DMI6000B wurden folgende Objektive verwendet: NPLAN L (20x, numerische Apertur 0.40), PLAN L PH2 (40x), HCX PLAN L (63x, 0.70) und HCX PLAN L Oil (100x, 1.30). Die Aufnahmen erfolgten mit den Filtereinsätzen A (Anregung: BP 400/20 nm), L5 (Anregung: BP 480/40 nm) und Y3 (Anregung: BP 545/40 nm) (Leica) und mit einer Quecksilberhöchstdrucklampe (HBO-Lampe).

3.7.2 Konfokale Laser-Mikroskopie

Das Prinzip der konfokalen Bildgebung wurde 1957 von Marvin Minsky zum Patent angemeldet (Minsky, 1957). In der konfokalen Mikroskopie werden mit Hilfe eines Laserstrahls die Fluoreszenzmoleküle einer Probe angeregt und bildlich dargestellt. Das zu untersuchende Objekt kann so in verschiedenen Ebenen gerastert werden (Semwogere *et al.*, 2005). Für die Aufnahmen am Leica TCS SP2 wurden die Öl-Immersionsobjektive

HCX PL APO CS40 (40x, numerische Apertur 1,25) und HCX PL APO BL (63x, numerische Apertur 1,4) verwendet. Für die Analyse und optische Darstellung immuncytochemisch markierter Zellen (3.5) wurden die Aufnahmen als z-Stapel (*xy wide, between frames*) aufgenommen und die Intensitäten in einem Vmax Bild gemittelt. Für die Aufnahmen wurden ein Multi-Line Argon-Laser (458nm, 476 nm, 488 nm, 514 nm), ein HeNe-Laser (543nm) und eine HBO-Lampe verwendet.

3.7.3 Lebendzellmikroskopie

Die erste Zeitrafferaufnahme (Lebendzellmikroskopie) von Zellen wurde 1907 in Paris von Julius Ries praktiziert (Landecker, 2009). Die Lebendzellmikroskopie ermöglicht die Analyse von einzelnen Zellen oder Zellverbänden und deren zellulärer komplexer Dynamik. Dabei können Zellen unter nicht-invasiven Bedingungen mittels eines Phasenkontrast- oder Fluoreszenzmikroskops über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. Dies ermöglicht die Untersuchungen verschiedenster molekularer und zellulärer Prozesse wie Migration, Zellinteraktionen oder Einfluss verschiedener Agenzien *in situ*. Die Analyse der Zellen in dieser Arbeit erfolgte bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt an dem inversen Leica DMI6000B Phasenkontrastmikroskop, welches mit einer Inkubatorkammer BL ausgestattet ist. Die Aufnahmen erfolgten in einer zeitlichen Bildauflösung von 8 - 30 min für 48 h - 72 h mittels eines 20x Durchlichtobjektivs. Die zu untersuchenden Zellen wurden einen Tag vor Beginn des Experimentes in eine 6-*well*-Platte in einer optischen Konfluenz von 50 - 60 % ausgesät und für 24 h bei 37°C im Kulturschrank inkubiert. Das Medium wurde vor Beginn des Experimentes ausgetauscht. Die zeitliche Analyse begann unmittelbar nach Behandlung der Zellen.

3.7.4 Bildverarbeitung

Die Bildverarbeitung und Auswertung erfolgte mit den Programmen Leica Application Suite 1.9.0, CorelPhotoPaintX4, GraphPadPrism4 und ImageJ.

3.8 Proteinanalysen

3.8.1 Proteinextraktion

3.8.1.1 Extraktion von Proteinen

Um Proteine für weiterführende Analysen zugänglich zu machen, müssen diese zuerst aus Zellen isoliert werden. Die Proteinextraktion erfolgte für adhärente und lymphoblastoide Zellen auf gleiche Weise. Die Zellen wurden bei 201 rcf für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 5 ml PBS gewaschen. Nach erneuter Sedimentierung bei 201 rcf für 5 min wurde das Zellsediment in 1ml PBS aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde bei 0,8 rcf für 7,5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet anschließend in Proteinlysepuffer resuspendiert. Es erfolgte eine Inkubation bei 4°C für 30 min. Die Zellsuspension wurde bei 16100 rcf für 15 min zentrifugiert und der Überstand mit den Proteinen in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Langzeitlagerung der Proteinextrakte erfolgte bei -80°C.

3.8.1.2 Fraktionierte Extraktion von Proteinen

Um eine Auftrennung des komplexen Proteingemisches in einer Zelle in eine cyto-/nukleoplasmische und eine chromatingebundene Fraktion zu ermöglichen, bedurfte es einer besonderen Aufarbeitung. Die Zellen wurden für 5 min bei 201 rcf zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 5 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden erneut bei 201 rcf für 5 min zentrifugiert, das Zellpellet in 1 ml PBS aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation für 7,5 min bei 0,8 rcf und 4°C wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in Proteinlysepuffer resuspendiert. Es erfolgte eine Inkubation auf Eis für 10 min. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 13000 rcf für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt (cyto-/nukleoplasmische Proteinfraction). Das Pellet wurde mit 30 Units DNase1 versetzt, resuspendiert und bei 37°C für 30 min in einem Thermoblock inkubiert. Nach erneuter Sedimentierung bei 1300 rcf für 15 min und 4°C wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt (chromatingebundene Proteinfraction). Die Langzeitlagerung erfolgte bei -80°C.

3.8.2 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford Methode, die darauf beruht, dass der Triarylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau-G250 an Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen binden kann. Dadurch erfährt der Farbstoff eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 365 nm zu 595 nm (Bradford, 1976). Pro Reaktionsansatz wurden 800 µl H₂O und 200 µl Bradford-Reagenz mit 1 µl Probe versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Kalibrierung (Standardkurve) wurde BSA in den Konzentrationen 0, 2, 4, 6, 8 und 10 mg/ml verwendet. Die Bestimmung des Leerwertes erfolgte mit 1 µl Proteinextraktionspuffer. Die kolorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte bei $\lambda = 595$ nm in einem Bio-Photometer.

3.8.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese in einem Natriumdodecylsulfat-haltigen Polyacrylamid-Gel können komplexe Proteingemische aufgetrennt und weitergehenden Analysen zugänglich gemacht werden. Natriumdodecylsulfat ist ein anionisches Detergenz, welches durch Bindung an hydrophobe Bereiche im Protein diese denaturiert. Die Eigenladung der Proteine wird dabei überdeckt, sodass die Proteine nur über ihr Molekulargewicht im Gel aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Die Kombination von 2 Gelen, die sich in ihrem pH-Wert und in der Porengröße unterscheiden, bestimmt die Laufgeschwindigkeit der einzelnen Proteine. Im Sammelgel werden die Proteine aufgrund ihrer gleichen Ladung in einer Bande fokussiert, im sich anschließenden Trenngel erfolgt die Auftrennung der Proteine aufgrund der geringeren Porengröße nach ihrer Masse.

Zunächst wurde ein 7,5 - 10 % Trenngel gegossen und mit 70 % Ethanol überschichtet bis zur vollständigen Polymerisation des Gels (20 min). Anschließend wurde ein 5 %iges Sammelgel auf das Trenngel gegossen und zur Bildung der Probenaschen ein 10er beziehungsweise 20er Kamm (0,8 mm) eingeführt. Die zu untersuchenden Proben wurden mit Probenauftragpuffer versehen, 5 min bei 95°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Soweit nicht anders angegeben, wurden pro Tasche 40 µg Protein geladen. Die anschließende Elektrophorese erfolgte in einer Bio-Rad-II-Kammer oder einer PerfectBlue-Doppelgelsystem Twin ExWs-Kammer bei einer konstanten Spannung von 60 V im Sammelgel und 100 V im Trenngel, bis die Lauffront das Gel-Ende erreicht hatte.

Tabelle 1: Lösungen zur Herstellung des Sammelgels für die SDS-PAGE

Sammelgel (Ansatz für 2 Gele)	5%	
	Bio-Rad II	PerfectBlue-Doppelgelsystem Twin ExWs
ddH ₂ O [ml]	2,75	5,5
40 % Acrylamid [ml]	0,64	1,28
2 % Bis-Acrylamid [ml]	0,35	0,7
Sammelgelpuffer pH 6,8 [ml]	1,23	2,46
20% SDS [μl]	25	50
TEMED [μl]	20	40
APS [μl]	40	80

Tabelle 2: Lösungen zur Herstellung des Trenngels für die SDS-PAGE

Trenngel (Ansatz für 2 Gele)	7.5 %		10%	
	Bio-Rad II	PerfectBlue-Doppelgelsystem Twin ExWs	Bio-Rad II	PerfectBlue-Doppelgelsystem Twin ExWs
ddH ₂ O [ml]	3,38	6,76	3,06	4,0
Trenngelpuffer (pH 8,8) [ml]	3,76	7,52	3,76	7,52
40 % Acrylamid [ml]	1,87	3,74	2,5	7,6
2% Bis-Acrylamid [ml]	0,95	1,9	0,66	0,88
20% SDS [μl]	50	100	50	100
TEMED [μl]	10	20	10	20
APS [μl]	50	100	50	100

3.8.4 Immunoblot

Um elektrophoretisch aufgetrennte Proteine einer Antikörper-Detektion zugänglich zu machen, werden Proteine mit Hilfe des Immunoblot-Verfahrens elektrophoretisch auf eine Membran (Nitrocellulose, PVDF) übertragen. Die Proteine können durch Verwendung spezifischer Antikörper markiert und analysiert werden (Towbin *et al.*, 1979). Der Nachweis der gebundenen Primärantikörper erfolgt über Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper, wobei Peroxidase die Oxidation von Luminol katalysiert. Die Emission der dabei entstehenden Lichtquanten wird durch Densitometrie der Signale auf einem Röntgenfilm dokumentiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode des Tank-Blottings verwendet. Hierzu wurde die Kassette der Blot-Apparatur in folgender Weise beschickt: Schwamm, 2 Filterpapiere, Gel, Membran, 2 Filterpapiere, Schwamm. Die Kassette wurde in den Tank eingespannt, wobei die Membran zur Anode und das Gel zur Kathode zeigte. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte in einem elektrischen Feld bei einer Spannung von 35 V für 140 min. Im Anschluss erfolgte die Blockierung freier Bindungsstellen mit einer 5 % Milchpulverlösung (w/v) für 1 h bei Raumtemperatur. Die Membran wurde anschließend über Nacht bei 4°C mit der Primärantikörperlösung (5 % Milchpulverlösung) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 15 min mit PBS-T wurde die Membran mit dem Sekundärantikörper für 2 h inkubiert. Nach 3 Waschschritten in PBS-T für 15 min erfolgte eine Inkubation mit dem Luminol-Detektionsreagenz oder mit Pierce-ECL-Substratlösung (abhängig vom verwendeten Primärantikörper) für 5 min bei Raumtemperatur. Die Membran wurde anschließend in eine Plastikfolie eingeschweißt, ein Röntgenfilm aufgelegt und je nach Signalintensität zwischen 1 sec und 1 h exponiert. Die entwickelten Röntgenfilme wurden mit einem Scanner digitalisiert und mittels ImageJ densitometrisch ausgewertet.

3.9 Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie ermöglicht die Messung einzelner Zellen in einer Durchflusskammer. Dabei können anhand des Vorwärts- und Seitwärts-Streulichtes, welches beim Durchfluss einer Zelle durch die Messkammer entsteht, Rückschlüsse auf bestimmte Parameter wie Größe und Inhalt der Zelle gezogen werden (Dittrich und Göhde, 1968). Des Weiteren kann mittels eines Durchflusszytometers auch Fluoreszenzlicht gemessen werden. Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes einer Zelle wird dafür DNA interkalierendes Propidiumiodid verwendet. Für die durchflusszytometrischen Analysen

wurden exponentiell wachsende Zellen in 175 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert und mit Nocodazol (wie unter Punkt 3.3 beschrieben) synchronisiert. Die Zellen wurden abtrypsiniert, für 5 min bei 201 rcf zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet zweimal mit PBS gewaschen und anschließend zentrifugiert (201 rcf, 5min). Vom Zellsediment wurden 1 x 10⁶ Zellen in eiskaltes 70 % Ethanol aufgenommen und über Nacht (mind. 12 h) bei 4°C fixiert. Anschließend wurde die Zelllösung zentrifugiert (201 rcf, 5min) und das Zellpellet in 400 µl Propidiumiodid-Lösung aufgenommen und 30 min bei RT lichtgeschützt inkubiert. Die Messung des DNA-Gehaltes erfolgte mittels eines FACSCalibur *flow cytometer* (BD Biosciences). Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Summit V5.1 und GraphPadPrism4.

3.10 Statistische Auswertung

Soweit nicht anders angegeben, wurden die gesammelten Einzelmesswerte (n) aus verschiedenen häufig durchgeführten Experimenten (N) mit dem Programm GraphPadPrism4 auf ihre statistische Relevanz mittels eines *two-tailed student's* t-test analysiert. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an (SEM). Eine signifikante Abweichung der Wertepaare von der Nullhypothese wird durch einen p-Wert (<0,05, <0,01 oder <0,001) und durch einen oder mehrere Asterisk (*) angegeben. Die statistischen Angaben werden zusätzlich in einem entsprechenden Text für jede Abbildung ausgeführt.

3.11 Antikörper

3.11.1 Primäre Antikörper

Antigen	Wirts- spezies	Western Blot	ICC	Größe des Antigens (kDa)	Hersteller
Aurora B	Maus	-	1:50	39	Abcam, ab3609
beta-Actin	Maus	1:3000	-	37	Sigma, clone AC-15, A-5441
BLM	Ziege	-	1:150	180	Santa Cruz, sc 7790
53BP1	Kaninchen	-	1:200	430	Bethyl Laboratories, A300-272A-2
Chk2 pS19	Kaninchen	1:1000	-	62	Cell Signalling, 9701
H3	Kaninchen	1:2000	1:2000	17	Abcam, ab1791
pH3 pS10	Kaninchen	1:2000	1:200	17	Cell Signalling, 9701
pH3 pS10	Maus	1:2000	1:200	17	Cell Signalling, 9706
H2AX pS139	Kaninchen	1:2000	1:200	17	Epitomics, 2212-1
H2AX pS139	Maus	1:2000	1:200	17	Millipore, 05-636
KAP1 pS824	Kaninchen	1:5000	-	130	Bethyl Laboratories, A300-767-A1
MRE11	Maus	1:1000	1:100	81	Genetex, GTX 70212
MRE11	Kaninchen	-	1.200	81	Cell Signalling, 4895
MDC1	Kaninchen	-	1:100	250	Abcam, ab11169
NBN	Kaninchen	1:5000	1:200	95	Novus Biologicals, NB100-143
RAD50	Kaninchen	1:1000	1:200	154	Millipore, 07-1781
RAD50	Kaninchen	-	1:200	154	Millipore, AB3754
RAD50	Maus	1:500	1:100	154	Abcam, ab 89
alpha-Tubulin	Kaninchen	1:10.000	1:500	55	Epitomics, 2871-1
alpha-Tubulin FITC	Maus	-	1:500	k.A.	Sigma, F 2168
γ -Tubulin	Kaninchen	-	1:200	48	Sigma, T5192
SMC1	Kaninchen	-	1:200	160	Bethyl Laboratories, A300-055A
SMC1 pS966	Kaninchen	-	1:2000	160	Bethyl Laboratories, A300-050A
<i>cleaved</i> PARP	Maus	1:1000	-	89	Thermo Scientific, MA1-20829

3.11.2 Sekundäre Antikörper

Antigen	Wirtsspezies	Western Blot	ICC	Größe des Antigens (kDa)	Hersteller
anti-Maus IgG-HRP	Esel	1:5000	-	k.A.	GE Healthcare, NA 9310
anti-Kaninchen IgG-HRP	Esel	1:5000	-	k.A.	GE Healthcare, NA 9340
anti-Maus Alexa 546	Ziege	-	1:200	k.A.	Invitrogen, A11018
anti-Kaninchen Alexa 546	Ziege	-	1:200	k.A.	Invitrogen, A11071
anti-Kaninchen Alexa 488	Ziege	-	1:200	k.A.	Invitrogen, A11070
anti-Maus FITC	Ziege	-	1:200	k.A.	Zymed, 62-6511
anti-Ziege Alexa 488	Kaninchen	-	1:200	k.A.	Invitrogen, A21222

3.12 Chemikalien und Lösungen

3.12.1 Chemikalien

Acrylamid, 40%	Bio-Rad-Laboratories, München, D
Aprotinin	Serva, Feinbiochemie, Heidelberg, D
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad-Laboratories, München, D
β -Glycerophosphat	Merck, Darmstadt, D
Bis-Acrylamid, 2%	Bio-Rad-Laboratories, München, D
Bromphenolblau	Sigma Chemie, Deisenhofen, D
p-Cumarsäure (4-Hydroxycinnamoylsäure)	Merck, Darmstadt, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Chemie, Deisenhofen, D
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Invitrogen,
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Steinheim, D
Ethylenglycoltetraacetat (EGTA)	Sigma-Aldrich Steinheim, D
Ethanol, abs. 99,8%	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Entwicklerlösung	Kodak, Sigma-Aldrich, Steinheim, D
p-Formaldehyd	Sigma-Aldrich Steinheim, D
Fixierer	Kodak, Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Glycerol, abs.	Merck, Darmstadt, D
Glycin	Roth, Karlsruhe, D
HPLC-Wasser	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Hydroxyharnstoff	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, D

Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, D
Luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phtalazinediane)	Sigma Chemie, Steinheim, D
Leupeptin	Serva, Feinbiochemika, D
Mercaptoethanol	Sigma Chemie, Steinheim, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Natriumfluorid	Sigma Chemie, Steinheim, D
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, D
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, D
Natriummetavandat	Sigma Chemie, Steinheim, D
NP-40 (NonidetP-40)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Phenylmethansulphonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
ProLong Gold Antifade	Invitrogen, Karlsruhe, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, D
30% Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe, D
D-Sucrose	Roth, Karlsruhe, D
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Bio-Rad-Laboratories, München, D
Tris	Merck, Darmstadt, D
Tris-HCl	Merck, Darmstadt, D
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt, D

3.12.2 Puffer und Lösungen

Beschwerungspuffer (5x)

1 M Tris HCl pH 6,8
 14,25 % (w/v) SDS
 47,5 % (v/v) Glycin
 14,25 % (v/v) β -Glycerophosphat
 1,4 % (w/v) Bromphenolblau

10x PBS

1,4 M NaCl
 27 mM KCl
 90 mM Na₂HPO₄
 15 mM KH₂PO₄
 ad 1 l H₂O

1x PBS

100 ml 10x PBS
 ad 900 ml H₂O

10 x GTS	1,9 M Glycin 0,25 M Tris 1% (w/v) SDS ad 1 l H ₂ O
10x Carbonatpuffer	0,1 M NaHCO ₃ 30 mM Na ₂ CO ₃ ad 1 l H ₂ O
Waschpuffer (PBS-T)	1x PBS 0,05 % (v/v) Tween 20 ad 1 l H ₂ O
Blockingpuffer	1x PBS 5 % (w/v) Marvel Milchpulver 0,05 % (v/v) Tween 20 ad 1 l H ₂ O
PLA Waschpuffer A pH mit HCl auf 7,4 einstellen	0,15 mM NaCl 0,01 M Tris base 0,05 % Tween 20 ad 1 l H ₂ O
PLA Waschpuffer B pH mit HCl auf 7,5 einstellen	0,2 M Tris 0,1 M NaCl ad 1 l H ₂ O
PLA Waschpuffer B 0,01 %	10 ml PLA Waschpuffer B 90 ml HPLC- H ₂ O
Permeabilisierungslösung	1x PBS 0,2 % (v/v) TritonX-100
Fixierlösung	3 % (w/v) PFA 2% (w/v) D-Sucrose 1x PBS

Proteinlysepuffer	50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl 2 mM EGTA 2 mM EDTA 25 mM NaF 0.1 mM Na ₃ VO ₄ 0.1 mM PMSF 2 mg/ml Leupeptin 2 mg/ml Aprotinin 0.2 % (v/v) Triton X-100 0.3 % (v/v) NonidetP-40
Trenngelpuffer	1 M Tris-Cl ad 1 l H ₂ O pH mit HCl auf 8,7 einstellen
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-Cl ad 1 l H ₂ O pH mit HCl auf 6,8 einstellen
20 % SDS	200 g SDS ad 1 l H ₂ O
10 % APS	100 g APS ad 1 l H ₂ O
Luminol, 250 mM	440 mg Luminol ad 10 ml DMSO
p-Cumarsäure, 90 mM	150 mg p-Cumarsäure ad 10 ml DMSO

Luminol Detektionsreagenz:

Lösung 1: 500 µl Luminol (250 mM)
220 µl p-Cumarsäure (90 mM)
ad 45 ml ddH₂O
ad 50 ml Tris-HCl pH 8,7

Lösung 2: 100 mM Tris-HCl pH 8,7
ad 30,5 µl H₂O₂

-> Lösung 1 und Lösung 2 mischen und 5 min bei RT inkubieren

3.13 Enzyme, Kits, biologische Substanzen, Reagenzien

3.13.1 Enzyme, biologische Substanzen

DNase1	New England Biolabs, Ipswich, USA
Magermilchpulver	Marvel/Premier Foods plc, St Albans, UK
RNaseH	New England Biolab, Ipswich, USA
ATM Inhibitor KU-55933	KuDos Pharmaceuticals, Cambridge, UK
Nocodazol	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Cytochalasin B	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Normales Ziegen Serum (NGS)	Dianova, Hamburg, D
Normales Kaninchenserum (NRS)	Dianova, Hamburg, D

3.13.2 Protein-Marker

Precision Plus Protein All Blue Standards	Bio-Rad Laboratories, München, D
---	----------------------------------

3.13.3 Transfektionsreagenzien

METAFACTENE® SI ⁺	Biontex Laboratories, Martinsried, D
esiRNA RAD50 mouse	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

3.13.4 Kits

Click-iT® EdU Alexa Fluor® 555 Imaging Kit	Invitrogen/ life technologies, Kalifornien, USA
<i>Proximity Ligation Assay (PLA)</i>	Olink, Duolink Bioscience, Uppsala, SE
PIERCE-Super Signal West Dura Extended Substrate	Pierce/Thermo Scientific, Rockford, USA
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad-Laboratories, München, D

3.14 Zellkulturmedien und zugehörige Reagenzien

3.14.1 Reagenzien und Material

Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin, D
L-Glutamin	PAA, Pasching, AT
Penicillin/ Streptomycin	PAA, Pasching, AT
RPMI 1640 + L-Glutamin	Gibco/ life technologies, Kalifornien, USA
DMEM	Gibco/ life technologies, Kalifornien, USA
Trypsinlösung/EDTA, 0, 25 %	Gibco-BRL, Eggenstein, D
Trypsinlösung	Lonza, Basel, BE
MEBM Basalmedium	Lonza, Basel, BE
Single Quots	Lonza, Basel, BE
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Sterilfilter (Minisart 0.45µm und 0.2 µm)	Sartorius, Göttingen, D
Zellkulturflaschen (T25 cm ² , T75 cm ² & T175 cm ²)	Nunc/ Thermo Scientific, Rockford, USA
6- <i>well</i> -Platten	BD Bioscience, Kalifornien, USA
Zellkulturschaber	Sarstedt, Nümbrecht, D
Kryoröhrchen	Greiner, Frickenhausen, D

3.14.2 Zellkulturmedien

Proliferationsmedium für NIH3T3, F239 SV40 und ADP SV40 Zellen:

Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)

10 % (v/v)	Fetales Kälberserum
2 mM	L-Glutamin
500 U/ml	Penicillin
0,5 mg/ml	Streptomycin

Proliferationsmedium für HCC1395 und HCC1937:

RPMI 1640 Medium

10 % (v/v)	Fetales Kälberserum
2 mM	L-Glutamin
500 U/ml	Penicillin
0, 5 mg/ml	Streptomycin

Proliferationsmedium für lymphoblastoide Zellen:

RPMI 1640 Medium

15 % (v/v)	Fetales Kälberserum
2 mM	L-Glutamin
500 U/ml	Penicillin
0,5 mg/ml	Streptomycin

Proliferationsmedium für MCF-10A Zellen:

MEBM Basalmedium

ad Single Quots:

BPE (pituitary extract)	2 ml
hEGF	0,5 ml
Hydrocortison	0,5 ml
GA-1000 (gentamycin/amphotericin)	0,5 ml
Insulin	0,5 ml

Einfriermedien:

Lymphoblastoide Zelllinien:

20 % FKS

10% Glycerin

Proliferationsmedium

Adhärente Zelllinien:

10% DMSO

Proliferationsmedium

3.15 Geräte und verwendete Materialien

3.15.1 Geräte

Autoklav	Zirbus, Bad Grund, D
<hr/>	
Brutschränke	
Hera SaFE	Heraeus Instruments, Hanau, D
MCO-20AIC	Sanyo/ Panasonic, Holzkirchen, D
<hr/>	
Durchfluscytometer	BD Biosciences, Kalifornien, USA
Einschweißgerät	Serverin Folio, Sundern, D
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen, D
<hr/>	
Elektrophoresekammern	
TwinEx ws	Peqlab, Erlangen, D
Protean II® LKammer	Bio-Rad, München, D
Heizblock	Eppendorf, Hamburg, D

Inkubatorkammer BL für Fluoreszenzmikroskop	Leica, Heidelberg, D
Linearbeschleuniger Mevatron MD-2	Siemens, München, D
Mikroskope	
Durchlichtmikroskop IX 52 Olympus	Olympus, Hamburg, D
Fluoreszenzmikroskop DMI 6000B	Leica, Heidelberg, D
Konfokales Mikroskop TCS SP2	Leica, Heidelberg, D
pH-Meter	Landgraf Laborsysteme, Langenhagen, D
Pipettierhilfe(n)	
Pipetboy	Thermo Scientific, Braunschweig, D
0,5 µl-10 µl	Eppendorf, Hamburg, D
10 µl - 100µl	Eppendorf, Hamburg, D
50 µl - 200 µl	Eppendorf, Hamburg, D
100µl - 1000µl	Eppendorf, Hamburg, D
Photometer	Eppendorf, Hamburg, D
Schütteltisch	Heidolph, Schwabach, D
Sicherheitswerkbank	Heraeus Sepatech, Osterode, D
Scanner	Canon, Middlesex, UK
Transfereinheit	
Hoefer TE62	Amersham, Buckinghamshire, UK
Mini Protean II	Bio-Rad, München, D
UV-C Quelle	HOEFER Scientific Instruments, San Diego, USA
Vortex Genie-Mixer	Jürgens, Hannover, D
Waagen	Sartorius, Göttingen, D
Wasserbad	Jürgens, Hannover, D
Zentrifugen	
5810 R	Eppendorf, Hamburg, D
Rotina 35R	Hettich, Tuttlingen, D
Mini Spin	Eppendorf, Hamburg, D

3.15.2 Verbrauchsmaterial

Autoradiographiekassette	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Deckgläser	Roth, Karlsruhe, D
Einmalhandschuhe	Kimberly-Clark, Roswell, USA
Einmalspritzen	Braun, Melsungen, D
Einmalpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, D
Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK
Kleenex	Kimberly-Clark, Roswell, USA
Nitrocellulose-Membran	Amersham, Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Objektträger	Thermo Scientific, Braunschweig, D
Pipettenspitzen	
200 µl, 1000µl	Sarstedt, Nümbrecht, D
Kristallspitzen	Eppendorf, Hamburg, D
Parafilm	Bemis, Wisconsin, USA
Pinzetten	Omnilab, Bremen, D
Plastikfolie	Omnilab, Bremen, D
Reaktionsgefäße	
50ml	BD Biosciences, Kalifornien, USA
15ml	BD Biosciences, Kalifornien, USA
1,5ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
0,5ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Skalpelle	Feather, pfm medical AG, Köln, D
Uvette	Eppendorf, Hamburg, D
Whatman Papier	Whatman, Maidstone, UK

4 Ergebnisse

4.1 Funktionelle Untersuchungen zur Rolle von RAD50 im ATR-Signalweg

4.1.1 Defekt der ATR-abhängigen γ H2AX Phosphorylierung in RAD50-defizienten Zellen

Der ATR-Signalweg wird durch verschiedene DNA-schädigende Agenzien aktiviert wie zum Beispiel ultraviolettes (UV) Licht und chemische Inhibitoren der DNA-Replikation wie Hydroxyharnstoff (*Hydroxyurea*, HU). HU bewirkt eine Abnahme des Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)-Levels während der DNA-Synthese und führt zu einer Arretierung der Replikationsgabeln (*stalled replication forks*) (Koc *et al.*, 2004). Diese Arretierung kann primär zu Einzelstrang- oder sekundär zu Doppelstrangbrüchen führen. Verschiedene Studien konnten bereits eine Interaktion zwischen dem ATM- und ATR-Signalweg belegen (Stiff *et al.*, 2006, Bunz, 2011). In einer vorangegangenen Arbeit konnte gezeigt werden, dass RAD50-defiziente Zellen bei der Aktivierung des ATR-Signalweges durch HU-Behandlung eine verminderte p53 (Ser15) Phosphorylierung und eine reduzierte Chk1 Ser317 Phosphorylierung aufwiesen (Walters *et al.*, 2009). Diesbezüglich sollte im Rahmen dieser Arbeit eine weitere funktionelle Charakterisierung des RAD50 Proteins im ATR-Signalweg erfolgen.

Um die funktionelle Relevanz des RAD50 Proteins im ATR-Signalweg weitergehend zu untersuchen, wurden RAD50-defiziente lymphoblastoide Zellen (HA239) mit 5 mM HU versetzt und für 2 h bei 37°C kultiviert. ATR-defiziente Zellen (HA517, ATR-Seckel) dienten dabei als Negativkontrolle und Wildtypzellen (HA325) als Positivkontrolle. Die Zellen wurden immunocytochemisch mit einem spezifischen Antikörper gegen γ H2AX markiert und der Anteil der γ H2AX-positiven Zellen ausgewertet (3.5.4) (Abb. 14). Für die Positivkontrolle konnte ein signifikanter Anstieg ($p=0,002$) der γ H2AX-positiven Zellen von $6,1 \pm 0,5$ % auf $19,4 \pm 1,7$ % beobachtet werden. Die RAD50-defizienten Zellen zeigten jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied zur Negativkontrolle. Die Anzahl der γ H2AX-positiven Zellen wiesen einen simultanen basalen Level von $5,8 \pm 0,3$ % wie die Negativkontrolle ($6,2 \pm 0,5$ %) auf (Abb. 14, B).

Um die zeitliche Abhängigkeit der γ H2AX-Foci-Induktion näher zu untersuchen, wurden die Zellen (RAD50-defizient, ATR-defizient, Wildtyp) simultan mit 5 mM HU behandelt und nach verschiedenen Zeitpunkten (1 h, 3 h, 6 h) analysiert. Dabei konnte ein Anstieg auf 15,7 % der γ H2AX-positiven Zellen nach 6 h in den RAD50-defizienten Zellen detektiert werden. Dies entsprach dem Anteil der Positivkontrolle nach nur 1 h HU-

Inkubation (15,4 %) (Abb. 14, C). Eine Phosphorylierung von γ H2AX kann durch Apoptose induziert werden (Lu *et al.*, 2006). Um zu differenzieren, ob der γ H2AX-Anstieg durch ATR oder Apoptose bedingt ist, wurden RAD50-defiziente Zellen, ATR-defiziente Zellen (ATR-Seckel) und Wildtypzellen mit 5 mM HU für 1 h, 3 h und 6 h kultiviert. Nach Aufarbeitung der Lysate und anschließender Separation der Proteine mittels SDS-PAGE und Immunoblot-Verfahren wurde der Proteinspiegel des apoptotischen Markers *cleaved* PARP untersucht. β -Actin diente als Ladekontrolle und wurde zur Normalisierung verwendet. Die Werte wurden als relative Einheit (RE) ermittelt.

In den unbehandelten RAD50-defizienten Zellen war ein erhöhter Grundgehalt von *cleaved* PARP (1,0 RE) im Vergleich zu den unbehandelten Wildtypzellen (0,0 RE) und den ATR-defizienten Zellen vorhanden (0,0 RE) (Abb. 14, E, F). Nach HU-Behandlung konnte in den RAD50-defizienten Zellen ein Anstieg von *cleaved* PARP nach 1 h (3,1 RE), 3 h (3,8 RE) und 6 h (4,1 RE) beobachtet werden, wobei in den Wildtypzellen sowie in der ATR-defizienten Zelllinie kein Anteil an *cleaved* PARP detektierbar war. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von H2AX in der Apoptose ATM-abhängig ist (Rogakou *et al.*, 2000). Der Anstieg von γ H2AX-positiven Zellen nach 6 h HU-Behandlung (Abb. 14, C) sowie der Anstieg von *cleaved* PARP (Abb. 14, E, F) in den RAD50-defizienten Zellen deuten auf eine ATM-abhängige γ H2AX Phosphorylierung hin. Um die ATM-Abhängigkeit der späten γ H2AX Foci zu untersuchen, wurden die Zellen mit einem spezifischen ATM-Inhibitor (ATMi, KU-55933, 10 μ M) und 5 mM HU versetzt, 6 h kultiviert und anschließend immunocytochemisch mit einem anti γ H2AX Antikörper markiert (Abb. 14, D). Nach 6 h Inkubation mit HU und gleichzeitiger ATM-Inhibierung wurde in den Wildtypzellen eine signifikante Reduktion ($p=0,01$) der γ H2AX-positiven Zellen auf $7,8 \pm 0,4$ % im Vergleich zu $30,8 \pm 2,6$ % der nicht-inhibierten Zellen gemessen. Bei ATM-Inhibierung der RAD50-defizienten Zellen sank der Wert der γ H2AX-positiven Zellen von $23,1 \pm 0,4$ % auf $13,8 \pm 1,55$ % signifikant ($p=0,02$) ab. In der Positivkontrolle sowie auch in der RAD50-defizienten Zelllinie konnte ein vergleichbarer Anteil der γ H2AX-positiven Zellen nach ATM-Inhibition ähnlich dem Wert der unbehandelten Zellen gemessen werden.

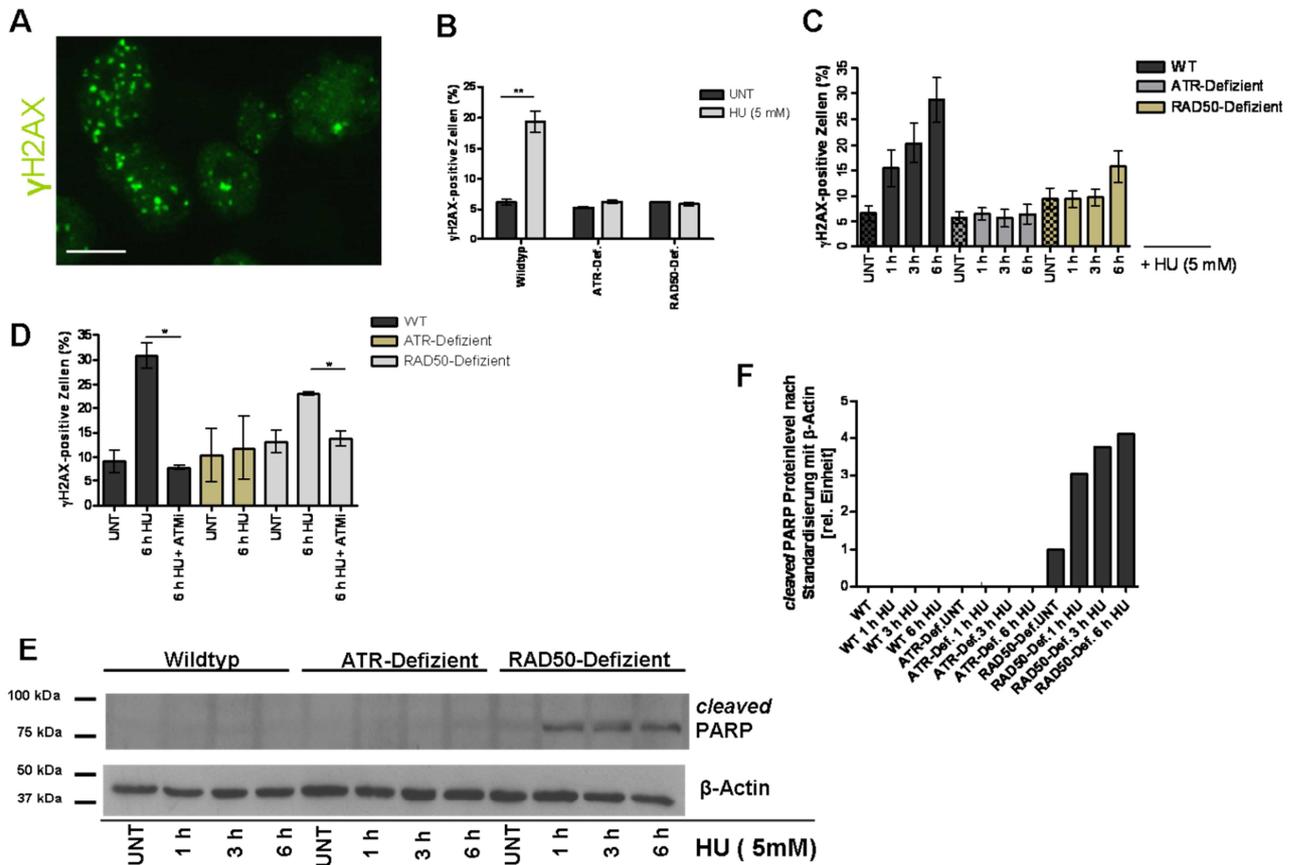


Abbildung 14: ATR-abhängige Phosphorylierung von γ H2AX. (A) Repräsentative Darstellung der immunocytochemischen Färbung von γ H2AX Foci in Wildtypzellen (HA325) nach HU-Induktion. Messbalken=10 μ m. (B, C) Die Zellen (RAD50-defiziente Zellen (HA239), ATR-defiziente (HA517) Zellen und Wildtypzellen (HA325) wurden mit Hydroxyharnstoff (HU) (5 mM) behandelt und nach (B) einer 2-stündigen Kultivierung oder nach (C) 1 h, 3 h und 6 h immunocytochemisch mit einem γ H2AX Antikörper (05-636) markiert und der Anteil der γ H2AX-positiven Zellen ausgewertet. Als Kontrolle dienten Wildtypzellen (Positivkontrolle, HA325) und ATR-defiziente Zellen (Negativkontrolle, HA517). Die statistische Auswertung der γ H2AX-positiven Zellen erfolgte anhand von drei unabhängigen Experimenten (N=3) mittels eines *unpaired* t-test (Mittelwerte \pm Standardfehler). ** $p < 0.01$, UNT=unbehandelt. (D) Für die Bestimmung der ATM-Abhängigkeit in der Phosphorylierung von H2AX wurden die Zellen zusätzlich zur HU-Behandlung (5 mM) mit ATM-Inhibitor (10 μ m) behandelt und nach 6 h der Anteil der γ H2AX-positiven Zellen immunocytochemisch bestimmt. Die statistische Auswertung mittels eines *unpaired* t-test erfolgte an drei unabhängigen Versuchen (Mittelwerte \pm Standardfehler). ATMi=ATM-Inhibitor. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (E, F) RAD50-, ATR-defiziente Zellen und Wildtypzellen wurden mit HU (5 mM) behandelt und nach 1 h, 3 h und 6 h Inkubation aufgearbeitet. (E) Nach SDS-PAGE und Immunoblot erfolgte die Detektion des apoptotischen Markers *cleaved* PARP mittels eines Antikörpers, wobei β -Actin als Referenz verwendet wurde. (F) Densitometrische Auswertung des relativen *cleaved* PARP Proteinanteils der Immunoblot-Analyse nach Normalisierung mit β -Actin. HU=Hydroxyharnstoff. UNT=unbehandelt. WT=Wildtyp.

Dies zeigte, dass die Phosphorylierung von γ H2AX nach mehrstündiger HU-Induktion ATM-abhängig ist.

4.1.2 Analyse des G2/M-Zellzykluskontrollpunktes in RAD50-defizienten Zellen

Ein Charakteristikum von ATR-defizienten Zellen ist ein Defekt in der Aktivierung des G2/M-Kontrollpunktes nach DNA-Schäden. Durch UV-Licht-induzierte Einzelstrangbrüche rufen eine Aktivierung des ATR-Signalweges hervor. Die Phosphorylierung des ATR-Substrates Chk1 (Ser317) nach UV-Schädigung führt zu einer Aktivierung des Intra-S- und des G2/M-Kontrollpunktes (Alderton *et al.*, 2004). Für die Untersuchung des G2/M-Kontrollpunktes wurden die RAD50-defizienten lymphoblastoiden Zellen (HA239), sowie die Positivkontrolle (Wildtypzellen, HA325) und Negativkontrolle (ATR-Defizient, HA517) mit UV-Licht ($2,5 \text{ J m}^{-2}$) bestrahlt, fixiert und immunocytochemisch mit einem mitosespezifischen Antikörper (phospho-H3 (Ser10) (3.5.5) markiert (Abb. 15, B). Die Aktivierung des G2/M-Kontrollpunktes in den Wildtypzellen zeigte sich in der signifikanten Reduzierung ($p=0,007$) des Anteils mitotischer Zellen von $15,7 \pm 1,4 \%$ auf $7,9 \pm 0,6 \%$.

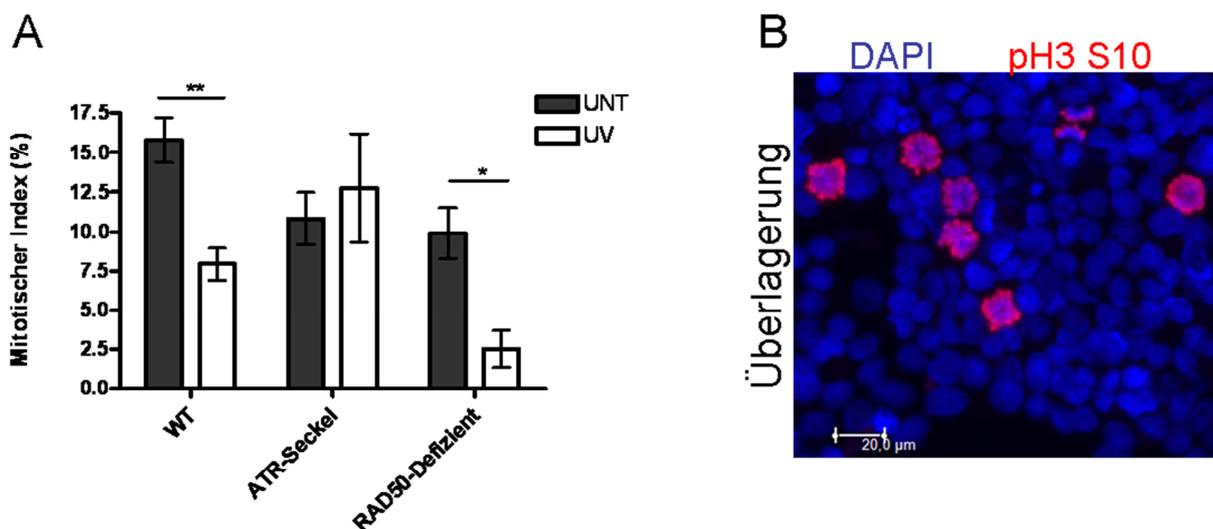


Abbildung 15: G2/M-Kontrollpunkt-Aktivierung nach Bestrahlung mit UV-Licht. (A, B) RAD50-defiziente Zellen (HA239), ATR-defiziente Zellen (HA517) und Wildtypzellen (HA325) wurden mit UV-Licht bestrahlt ($2,5 \text{ J m}^{-2}$), immunocytochemisch mit einem anti phospho-H3 (Ser10) Antikörper (9706) markiert und der Anteil der mitotischen Zellen ausgewertet. (A) Die statistische Auswertung von drei unabhängigen Experimenten ($N=3$) erfolgte mittels eines *unpaired t-test* (Mittelwerte \pm Standardfehler), $*p < 0.05$, $**p < 0.01$. UNT=unbehandelt. WT=Wildtyp. (B) Repräsentative Darstellung der immunocytochemischen Färbung von pH3 (S10)-positiven Zellen in einer Zellpopulation (rot). Die DNA wurde mittels DAPI gefärbt (blau). Das Bild ist als Überlagerung dargestellt. Messbalken=20 µm

Auch bei den RAD50-defizienten Zellen war eine signifikante Reduzierung ($p=0,01$) der mitotischen Zellen von $9,9 \pm 1,6 \%$ auf $2,5 \pm 0,7 \%$ zu beobachten (Abb. 15, A). Bei ATR-defizienten Zellen konnte keine signifikante Veränderung des mitotischen Index nach UV-Bestrahlung festgestellt werden.

4.1.3 RAD50-defiziente Zellen weisen einen erhöhten Anteil an mitotischen Zellen mit *supernumerary centrosomes* auf

Normal mitotische Zellen weisen zwei Centrosomen in der Mitose auf, die als Zellorganell die korrekte Anordnung der Chromosomen vor der Cytokinese organisieren (Alberts *et al.*, 2008). Eine Studie konnte bereits zeigen, dass ein Defekt im ATR-Signalweg mit einer erhöhten Anzahl von Centrosomen (*supernumerary centrosomes*) in der Mitose einhergeht (Alderton *et al.*, 2004). Eine Aberration der Centrosomenanzahl führt zur Bildung von mono- oder multipolaren Spindeln während der Mitose mit der Folge einer Aneuploidie (Meraldi *et al.*, 2002, Ghadimi *et al.*, 2000). Unter der Vermutung eines ATR-ähnlichen Phänotyps sollte die Centrosomenanzahl in RAD50-defizienten Zellen analysiert werden. Dafür wurde die RAD50-defiziente lymphoblastoide Zelllinie (HA239) auf ihre Centrosomenanzahl im Vergleich zu Wildtypzellen (Negativkontrolle, HA325) und ATR-defizienten Zellen (ATR-Seckel, Positivkontrolle, HA517) untersucht. Die Zellen wurden fixiert, immunocytochemisch mit einem anti phospho-H3 (Ser10) Antikörper als Mitosemarker und einem anti γ -Tubulin Antikörper als Centrosomenmarker markiert und die Centrosomenanzahl analysiert (Abb. 16 A, B). In den ATR-defizienten (ATR-Seckel) Zellen konnte ein signifikant erhöhter Anteil ($24,3 \pm 1,33 \%$) an mitotischen Zellen mit erhöhter Centrosomenanzahl (>2) im Vergleich zu den Wildtypzellen ($11,3 \pm 2,3 \%$) nachgewiesen werden ($p= 0,008$) (Abb. 16 A). Ein Anteil von $22,0 \pm 1,5 \%$ der mitotischen Zellen der RAD50-defizienten Zelllinie wiesen eine gegenüber der Wildtypkontrolle signifikant erhöhte Anzahl an Centrosomen auf ($p=0,02$).

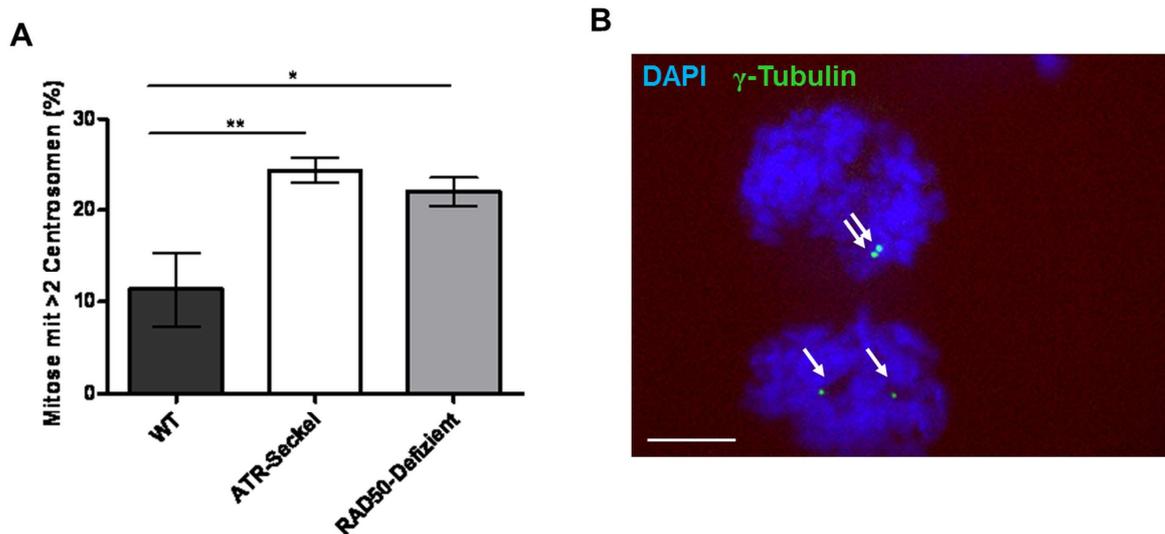


Abbildung 16: Die Anzahl der Centrosomen ist erhöht in RAD50-defizienten Zellen. (A, B) RAD50-defiziente Zellen (HA239), ATR-defiziente Zellen (HA517) und Wildtypzellen (HA325) wurden fixiert und immunocytochemisch mit einem anti λ -Tubulin und einem anti phospho-H3 (Ser10) (9706) Antikörper markiert. (A) Die Analyse der Centrosomenanzahl in mitotischen Zellen erfolgte in drei unabhängigen Experimenten (N=3). WT=Wildtyp. Der Mittelwert (\pm Standardfehler) des prozentualen Zellenanteils ist angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit einem *unpaired* t-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (B) Repräsentative Darstellung der immunocytochemischen Färbung von Centrosomen (weiße Pfeile) in mitotischen Wildtypzellen (HA325). Das Bild ist als Überlagerung dargestellt. Die DNA wurde mit DAPI (blau) gefärbt, die Centrosomen wurden mit einem anti λ -Tubulin Antikörper (grün) markiert.

Es war kein signifikanter Unterschied zwischen ATR- und RAD50-defizienten Zellen zu erkennen. Demnach hatte eine Defizienz im ATR-Signalweg wie auch eine RAD50-Defizienz einen Einfluss auf die Centrosomenanzahl in mitotischen Zellen.

4.2 Lokalisation von RAD50 auf Chromatin-Brücken

Wie im vorausgegangenen Abschnitt beschrieben, konnte eine vermehrte Anzahl an Centrosomen in mitotischen Zellen der RAD50-defizienten Zelllinie nachgewiesen werden (4.1.3). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Centrosomenaberration zu einer chromosomalen Instabilität führt (Meraldi *et al.*, 2002, Alderton *et al.*, 2004), was eine Bildung von Chromatin-Brücken zur Folge haben kann. Chromatin-Brücken entstehen während der Mitose durch inkorrekte Segregation der Schwesterchromatiden (Hoffelder *et al.*, 2004). Um den Einfluss des RAD50 Proteins auf Chromosomensegregationsdefekte zu untersuchen, sollten RAD50-defiziente Zellen immunocytochemisch auf die Anzahl von Chromatin-Brücken in einer Zellpopulation untersucht werden. Es wurden humane RAD50-defiziente SV40-transformierte Fibroblasten (F239 SV40), Wildtyp-SV40-transformierte Fibroblasten (ADP SV40) und murine NIH3T3 Zellen verwendet. Die

Menge des RAD50 Proteins in den RAD50-defizienten Zellen wurde vergleichend mit Wildtypzellen mittels SDS-PAGE und Immunoblot-Verfahren densitometrisch evaluiert. Dabei bestätigte sich, dass der residuale RAD50 Proteinlevel in RAD50-defizienten Zellen bei unter 10 % im Vergleich zu der Kontrolle lag (ADP SV40) (Abb. 17, A). Für die immunocytochemische Analyse wurden die Zellen auf Deckgläsern in 6-well-Platten kultiviert und mit 6 Gy oder 12 Gy bestrahlt. Die Bestrahlung diente zur Induktion von Chromatin-Brücken, die durch eine fehlerhafte Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen entstehen können (Acilan *et al.*, 2007). Nach einer 24-stündigen Inkubation wurde die DNA mittels DAPI und RAD50 Protein immunocytochemisch mit einem anti RAD50 Antikörper in den Zellen markiert (Abb. 17). Hierbei konnte 24 h nach Bestrahlung ein signifikanter Anstieg in der Anzahl von Chromatin-Brücken nach 6 Gy Bestrahlung ($7,6 \pm 0,4$ %) ($p=0,0005$) und nach 12 Gy Bestrahlung ($8,2 \pm 0,5$ %) ($p=0,0006$) in den Wildtypzellen nachgewiesen werden. In RAD50-defizienten Zellen war ein erhöhter Grundgehalt von Chromatin-Brücken zu verzeichnen ($3,7 \pm 1,1$ %), der im Vergleich zu den Wildtypzellen ($1,7 \pm 0,4$ %), nach Bestrahlung nicht anstieg (Abb. 17, B). Durch die Bestrahlung und die daraus resultierenden DNA-Schäden wird in den Zellen sofort ein Zellzyklusarrest eingeleitet. Um einen möglichen Zellzyklusarrest und die damit ausbleibende Fähigkeit zur Ausbildung von Zellen mit Chromatin-Brücken in den RAD50-defizienten Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen auf ihren mitotischen Index analysiert (Abb. 17 C).

Die Zellen wurden nach Bestrahlung (6 Gy und 12 Gy) für 24 h kultiviert und immunocytochemisch mit dem spezifischen Mitosemarker anti phospho-H3 (S10) gefärbt (Abb. 17, C). Simultan zu den Wildtypzellen zeigte sich, dass die RAD50-defizienten Zellen keine signifikant reduzierte Teilungsrate 24 h nach 6 Gy Bestrahlung aufwiesen. Der mitotische Index in den RAD50-defizienten Zellen lag nach 6 Gy bei $2,6 \pm 0,6$ % und nach 12 Gy Bestrahlung bei $2 \pm 0,4$ %. In den Wildtypzellen war zu diesem Zeitpunkt ein vergleichbarer Level von $2,2 \pm 0,2$ % nach 6 Gy und $1 \pm 0,2$ % nach 12 Gy zu messen (Abb. 17, C), wobei sich der mitotische Index nach Bestrahlung in den Wildtypzellen und den RAD50-defizienten Zellen nicht signifikant unterschied (6 Gy: $p=0,6376$; 12 Gy: $p=0,0829$).

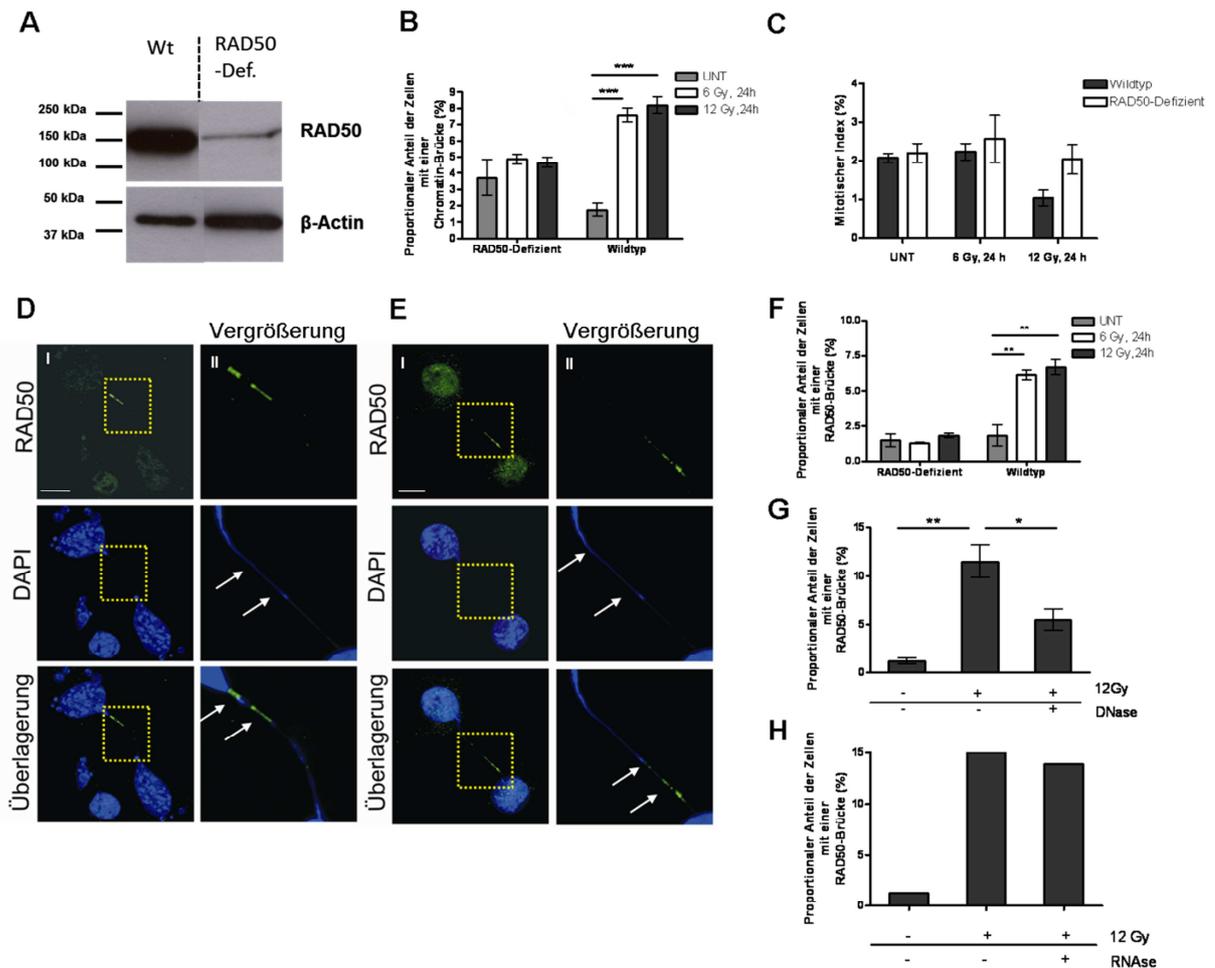


Abbildung 17. RAD50-Lokalisation auf Chromatin-Brücken. (A) Immunoblot zur Bestimmung der Proteinmenge von RAD50 nach SDS-PAGE mittels eines anti RAD50 Antikörpers (ab 89) in humanen Wildtypzellen (ADP SV40) und humanen RAD50-defizienten (F239 SV40) Fibroblasten. (B, F) Analyse der DAPI- bzw. RAD50-positiven Chromatin-Brücken. Humane Wildtypzellen (ADP SV40) und RAD50-defiziente Fibroblasten (F239 SV40) wurden mit 6 Gy bzw. 12 Gy bestrahlt, 24 h inkubiert und anschließend immunocytochemisch mit einem anti RAD50 Antikörper (07-1781) markiert. Die DNA wurde mittels DAPI-Färbung markiert. Die Analyse einer Gesamtzellpopulation (n=500) erfolgt nach (B) dem proportionalen Anteil der Zellen mit einer DAPI-positiven Chromatin-Brücke und nach (F) dem proportionalen Anteil der Zellen mit Chromatin-Brücke, auf der RAD50 lokalisiert vorliegt (RAD50-Brücke). UNT= unbehandelt. Die statistische Auswertung mittels eines *unpaired* t-test erfolgte an drei unabhängigen Versuchen (N=3). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. **p < 0.005, ***p < 0.001. (C) Mitotischer Index 24 h nach Bestrahlung in Wildtyp- und RAD50-defizienten Fibroblasten. Die Zellen wurden mit 6 Gy und 12 Gy bestrahlt und nach 24 h immunocytochemisch mit einem phospho-H3 (S10) (9701) Antikörper markiert. UNT= unbehandelt. Die statistische Auswertung erfolgt mittels eines *unpaired* t-test an drei unabhängigen Versuchen (N=3). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. (D, E) Darstellung der verschiedenen RAD50-Lokalisationen auf Chromatin-Brücken (weiße Pfeile, II) in NIH3T3 Zellen, die 24 h nach Bestrahlung (12 Gy) mit einem anti RAD50 Antikörper (07-1781) markiert wurden. Die DNA wurde mittels DAPI markiert. (D) Zentrale Lokalisation von RAD50 auf einer Chromatin-Brücke (weiße Pfeile, II) und (E) punktförmige Lokalisation von RAD50 (weiße Pfeile, II) auf der gesamten Brücke in NIH3T3 Zellen. II stellt die Vergrößerung des gelb umrahmten Areals aus I dar. Messbalken= 20 µm. (G, H) Murine Fibroblasten-(NIH3T3) zellen wurden mit 12 Gy (+) bestrahlt und für 24 h inkubiert. Die Zellen wurden von der immunocytochemischen Markierung mit einem anti RAD50 Antikörper (07-1781) einer (G) DNase1-(10U/10min) (+) oder einer (H) RNaseH-Behandlung (50U/20min) (+) unterzogen. Die DNA wurde mittels DAPI markiert. UNT= unbehandelt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels eines *unpaired* t-test (G:N=3; H:N=1) (Mittelwerte ± Standardfehler). *p < 0.05., **p < 0.01.

Es konnte ein Einfluss der RAD50-Defizienz auf die Bildung von Chromatin-Brücken nachgewiesen werden (Abb. 17, B). Um die Rolle von RAD50 weitergehend zu spezifizieren, wurden NIH3T3 Zellen immunocytochemisch mittels eines anti RAD50 Antikörpers auf die RAD50-Lokalisation untersucht werden. Die Zellen wurden vor der immunocytochemischen Markierung mit 12 Gy bestrahlt und 24 h inkubiert. Dabei zeigte sich, dass RAD50 eine spezielle Lokalisation auf den Chromatin-Brücken aufwies (Abb. 17, D, E). Es konnten zwei Verteilungsmuster in der Lokalisation von RAD50 beobachtet werden, zum einen eine punktförmige Lokalisation, die sich über die gesamte Länge der Chromatin-Brücke erstreckte (Abb.17, E), zum anderen eine mehr fokal-zentrierte, signalintensivere Verteilung (Abb.17, D). Eine Analyse der Anzahl der Zellen (Wildtyp und RAD50-defizient) mit einer Chromatin-Brücke mit RAD50-Lokalisation (RAD50-Brücke) zeigte einen signifikanten Anstieg von $1,8 \pm 0,8$ % Grundgehalt auf $6,1 \pm 0,4$ % ($p=0,006$) nach 6 Gy Bestrahlung und $6,7 \pm 0,5$ % ($p=0,006$) nach 12 Gy Bestrahlung in den Wildtypzellen, jedoch einen gleichbleibenden Level in RAD50-defizienten Zellen (Abb.17, F). Des Weiteren wiesen 86 % aller Chromatin-Brücken eine RAD50-Lokalisation auf den Brücken auf.

Um nachzuweisen, ob RAD50 an DNA gebunden auf den Chromatin-Brücken vorliegt, wurden murine Fibroblasten (NIH3T3) verwendet, da die immunocytochemische Darstellung der Chromatin-Brücken in diesen Zellen visuell besser zu detektieren war und zusätzlich ein Vergleich zu den humanen Fibroblasten (ADP SV40) gezogen werden sollte. NIH3T3 Zellen wurden bestrahlt (12 Gy), 24 h kultiviert und vor der immunocytochemischen Markierung mit einem anti RAD50 Antikörper einer DNase1-Behandlung (10U/10 min) unterzogen. Es zeigte sich, dass der Anteil an RAD50-Brücken (Chromatin-Brücke mit RAD50-Lokalisation) nach DNase-Behandlung signifikant von $11,5 \pm 1,6$ % auf $5,4 \pm 1,1$ % ($p=0,04$) abnahm (Abb. 17, G). Eine Behandlung mit RNase (50U/30 min) wies keine Abnahme im Anteil der RAD50-Brücken auf (Abb. 17, H).

Darüber hinaus konnte eine RAD50-Lokalisation auf Chromatin-Brücken in humanen sowie in murinen Zellen nachgewiesen werden, wobei der Anteil nach 12 Gy Bestrahlung in den murinen Zellen höher war ($11,5 \pm 1,6$ %) als in den humanen Zellen ($8,2 \pm 0,5$ %) (Abb. F, G).

4.3 Einfluss eines RAD50 *knock-downs* auf den Anteil an Zellen mit Chromatin-Brücken

Um die funktionelle Bedeutung des RAD50 Proteins auf die Bildung von Chromatin-Brücken weitergehend zu untersuchen, wurden NIH3T3 Zellen verwendet. Die Zellen wurden mit einer RAD50 siRNA in einer 6-*well*-Platte transfiziert (3.4) und die Reduktion des Proteinlevels 72 h nach der Transfektion mittels SDS-PAGE und Immunoblot densitometrisch überprüft (Abb. 18, A). β -Actin diente als Auftragskontrolle und wurde zur Normalisierung der Daten verwendet.

Der Proteinlevel des RAD50 Proteins lag nach erfolgreicher Transfektion bei 15 %. Um die Relevanz von RAD50 für die Ausbildung von Chromatin-Brücken zu analysieren, wurden die transfizierten Zellen 72 h nach Transfektion mit 12 Gy bestrahlt und nach 24 h Inkubation immunocytochemisch mit einem anti RAD50 Antikörper markiert und analysiert (Abb. 18, B). Als Kontrolle dienten Zellen, die nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt wurden (Mock). Nach Bestrahlung (12 Gy) konnte ein Anteil von $6,6 \pm 1,3$ % an Zellen mit einer Chromatin-Brücke gemessen werden, der bei reduziertem RAD50 Proteinlevel zu einer signifikanten Abnahme ($p=0,04$) auf $2,1 \pm 0,8$ % führte.

Um die Relevanz der ATM-Kinaseaktivität in der Brückenbildung zu analysieren, wurden die Zellen 1 h vor Bestrahlung (12 Gy) mit einem ATM-Inhibitor (ATMi, KU-55933) (10 μ m) behandelt und 24 h später ausgezählt. Die ATM-Inhibition führte zu einer Reduktion von 51 % von Zellen mit einer Chromatin-Brücke (von $11,9 \pm 2,01$ % auf $5,9 \pm 1,87$ %) im Vergleich mit der Kontrollgruppe (nicht-inhibierte Zellen) (Abb. 18, C).

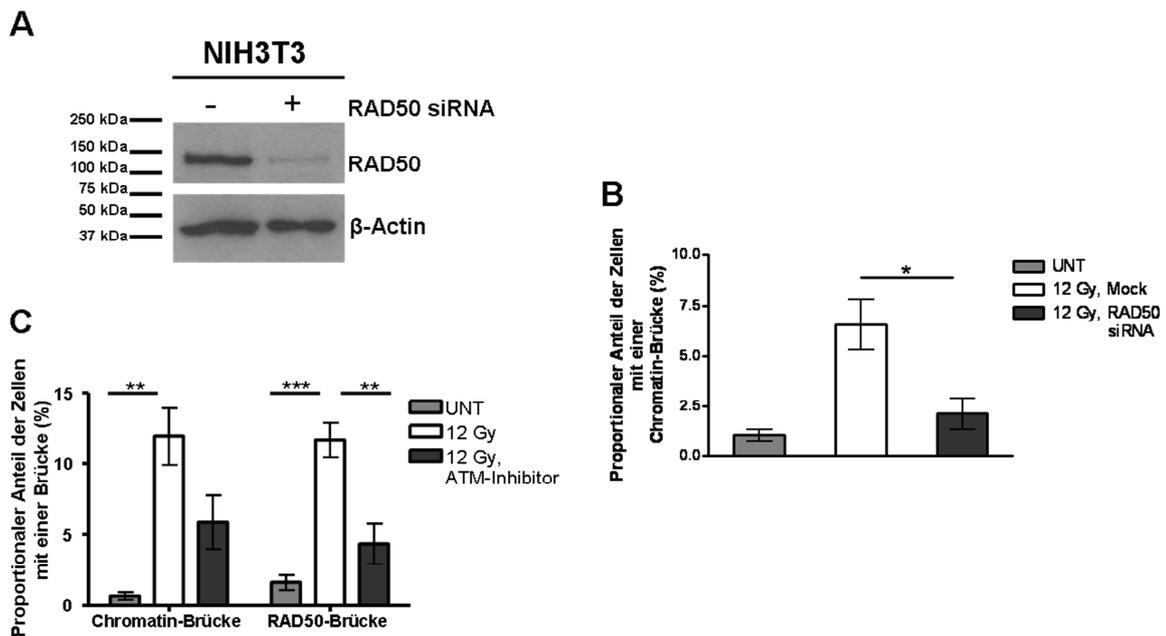


Abbildung 18: siRNA-vermittelte Reduktion des RAD50 Proteinspiegels und Inhibierung der ATM-Kinaseaktivität führen zu einer Reduktion von Chromatin-Brücken und RAD50-Brücken. (A) NIH3T3 Zellen wurden in 6-well-Platten kultiviert und mittels einer murinen RAD50 siRNA transfiziert (+). 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen auf ihren RAD50 Proteinlevel mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert. Als Kontrolle dienten nicht-transfizierte Zellen (-). β -Actin diente als Ladekontrolle und wurde zur Normalisierung verwendet. (B) RAD50 siRNA-transfizierte NIH3T3 Zellen wurden 72 h nach der Transfektion mit 12 Gy bestrahlt. Nach 24 h Inkubation wurde die Gesamtzellpopulation auf den Anteil an Chromatin-Brücken untersucht. Als Kontrolle dienten mit 12 Gy bestrahlte, nur mit Transfektionsreagenz behandelte (Mock) oder unbestrahlte (UNT) NIH3T3 Zellen. Pro Experiment (N=3) wurden n=500 Zellen einer Zellpopulation ausgezählt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels eines *unpaired* t-test (Mittelwerte \pm Standardfehler. * $p < 0.05$). (C) Die Analyse der Relevanz der ATM-Kinaseaktivität wurde mittels ATM-Inhibition in NIH3T3 Zellen untersucht. Die Zellen wurden 1 h vor der Bestrahlung (12 Gy) mit einem ATM-Inhibitor (KU-55933) (10 μ m) versetzt und 24 h nach Bestrahlung analysiert. Die Zellen wurden immunocytochemisch mit DAPI und einem anti RAD50 Antikörper (07-1781) gefärbt. UNT=unbehandelt. Mock=Mit Transfektionsreagenz behandelte Zellen. Die statistische Auswertung erfolgt mittels eines *unpaired* t-test an vier unabhängigen Versuchen (N=4) mit n=300 Zellen pro Experiment. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Der Anteil an RAD50-Brücken zeigte nach ATM-Inhibition eine vergleichbare Reduktion von $11,6 \pm 1,21$ % auf $4,4 \pm 1,42$ % ($p=0,08$) (Abb. 18, C). Dies zeigte, dass eine ATM-Inhibition zu einer Abnahme von Chromatin- und RAD50-Brücken führt.

4.4 Lokalisation von Proteinen des ATM-Signalweges auf Chromatin-Brücken

Um zu untersuchen, ob weitere Proteine des ATM-Signalweges eine Funktion in der Bildung von Chromatin-Brücken einnehmen, wurde immunocytochemisch deren Lokalisation in humanen (ADP SV40) und murinen (NIH3T3) Wildtypzellen untersucht. Die Zellen wurden in 6-well-Platten kultiviert, mit 12 Gy bestrahlt und 24 h inkubiert. Nach Fixierung wurden die Zellen immunocytochemisch mit den entsprechenden

Antikörpern markiert und die Lokalisation der Proteine in Zellen, die durch eine Chromatin-Brücke verbunden sind, analysiert (Abb. 19).

Die Komplexpartner von RAD50, MRE11 und NBN, wiesen eine nukleäre sowie eine cytoplasmatische ubiquitäre Verteilung auf. Die cytoplasmatische Verteilung von MRE11 und NBN erstreckte sich bis auf den Bereich der interzellulären Brücke der zwei Tochterzellen, zeigte jedoch keine zentrale Lokalisation auf der Chromatin-Brücke selbst (Abb. 19, A).

Weitere Proteine des ATM-Signalweges, SMC1, BLM und MDC1, wiesen ebenfalls eine nukleäre und cytoplasmatische diffuse Lokalisation auf. Eine Lokalisation auf den Brücken war jedoch, genau wie bei MRE11 und NBN, nicht detektierbar (Abb. 19, B, C).

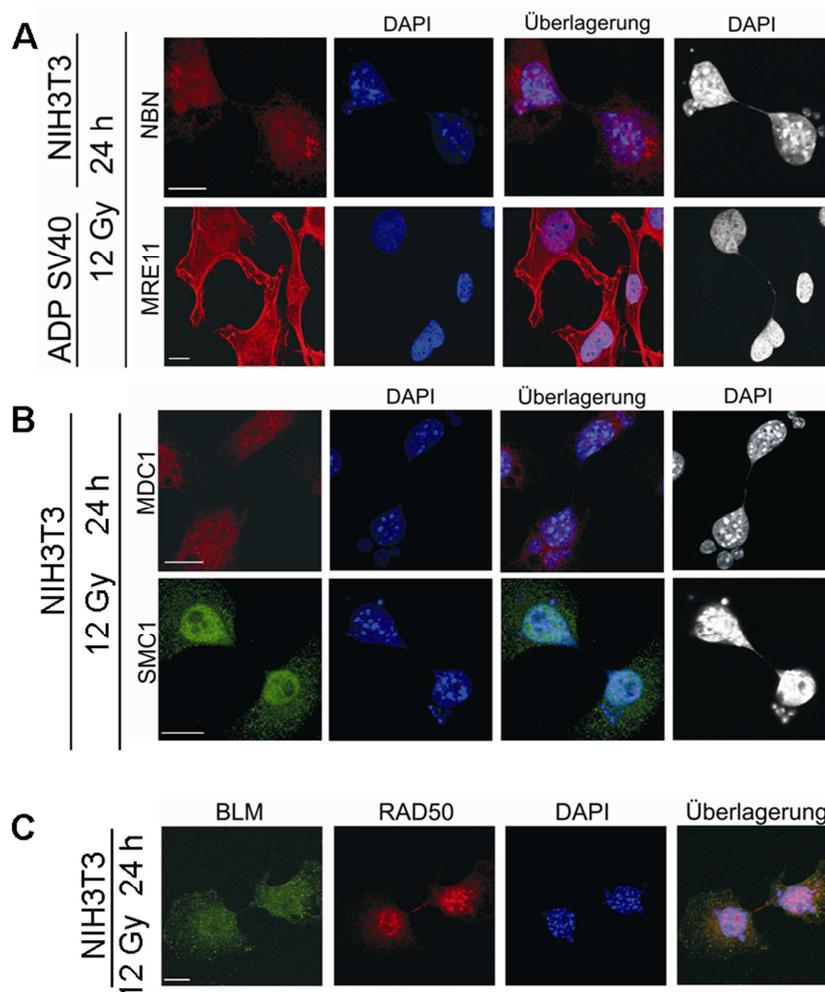


Abbildung 19: Lokalisation verschiedener Proteine des ATM-Signalweges in Zellen mit einer Chromatin-Brücke. (A-C) Murine (NIH3T3) und humane (ADP SV40) Wildtypzellen wurden mit 12 Gy bestrahlt, für 24 h kultiviert, fixiert und immunocytochemisch mit spezifischen Antikörpern gegen verschiedene Proteine des ATM-Signalweges und des MRN-Komplexes markiert. Repräsentative Darstellung der Lokalisation von (A) MRE11 und NBN, (B) SMC1 und MDC1 und (C) BLM. Die DNA wurde mittels DAPI markiert. Die Graudarstellung der DAPI-Färbung dient zur besseren Visualisierung der Chromatin-Brücke. Messbalken= 20 µm. N=3.

In einer vorangehenden Studie konnte belegt werden, dass γ H2AX auf DNA-Brücken lokalisiert vorliegt und DNA-Doppelstrangbrüche repräsentiert (Huang *et al.*, 2008). Für eine Analyse wurden NIH3T3 Zellen wie oben bereits beschrieben simultan bestrahlt und immunocytochemisch mit einem anti γ H2AX Antikörper und einem anti 53BP1 Antikörpern markiert. Die Untersuchung mit den Doppelstrangbruchmarkern γ H2AX und 53BP1 zeigte eine verstärkte Lokalisation dieser Proteine an den Enden der Brücken nahe des Zellkerns (Abb. 20, A). Im Nukleus selbst konnten punktförmige Strukturen (Foci) beobachtet werden. Bei einer Doppelfärbung mit einem anti RAD50 Antikörper und einem anti γ H2AX Antikörper in simultan behandelten humanen Wildtypzellen (ADP SV40) konnte jeweils eine punktförmige Struktur von RAD50 (Abb. 20, B, gelber Pfeil) und γ H2AX (Abb. 20, B, weißer Pfeil) auf der Chromatin-Brücke detektiert werden, wobei die Proteine aber keine Colokalisation aufwiesen.

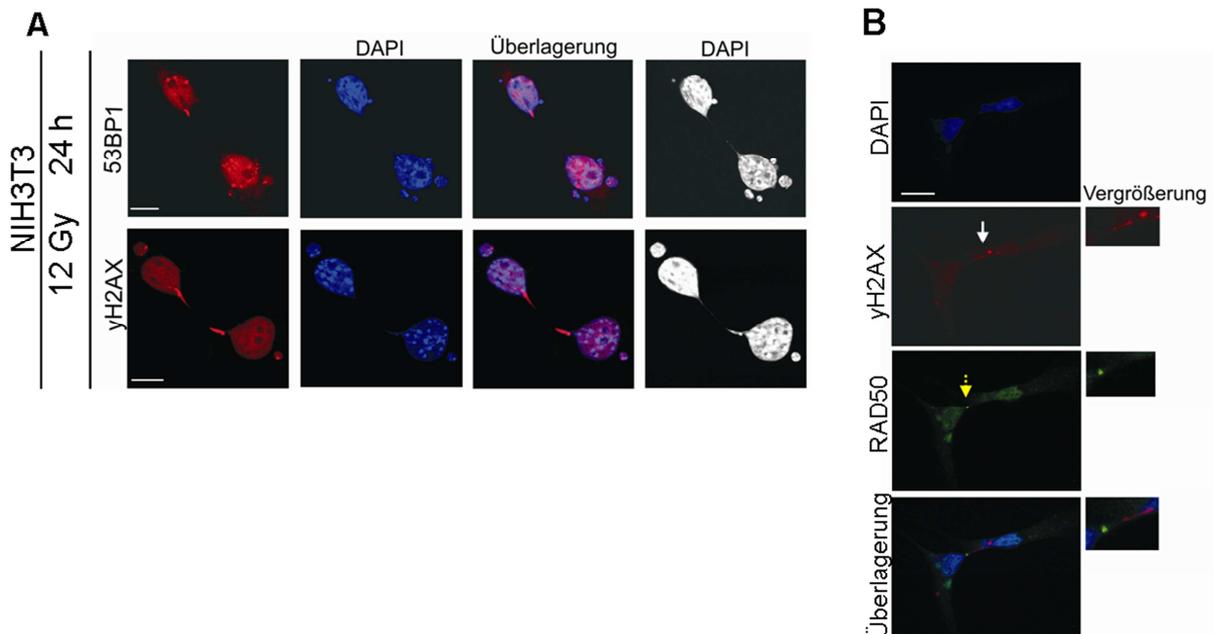


Abbildung 20: Lokalisation von γ H2AX und 53BP1 auf Chromatin-Brücken. (A) NIH3T3 Zellen wurden bestrahlt (12 Gy) und 24 h später immunocytochemisch mit Antikörpern gegen γ H2AX und anti 53BP1 markiert. Die DNA wurde mittels DAPI gefärbt. Die Graudarstellung der DAPI-Färbung dient zur deutlicheren Visualisierung der Chromatin-Brücke. Messbalken= 20 μ M. N=3. (B) Immunocytochemische Doppelfärbung von RAD50 (AB3754) und γ H2AX (05-636) auf einer Chromatin-Brücke in humanen Wildtypzellen (ADP SV40). RAD50 liegt als punktförmige Struktur auf der Brücke vor (gelber Pfeil), colokalisiert aber nicht mit γ H2AX (weißer Pfeil). Die Bilder sind exemplarisch dargestellt. Die rechten Bilder stellen eine Vergrößerung der linken Bilder dar. N=3; Messbalken= 20 μ m.

Zusammenfassend gelang es nicht, für die untersuchten Proteine des ATM-Signalweges und etablierten Marker von DNA-Doppelstrangbrüchen eine Colokalisation mit RAD50

auf den Chromatin-Brücken nachzuweisen, auch nicht für seine beiden Bindungspartner im MRN-Komplex.

4.5 RAD50 interagiert mit cytokinetischen Proteinen

4.5.1 RAD50 colokalisiert mit alpha-Tubulin und Aurora B während der abnormalen Cytokinese

Verschiedene Arbeiten weisen auf mögliche Interaktionen von Proteinen des ATM-Signalweges mit Proteinen der Cytokinese hin (Daniels *et al.*, 2004, Schweitzer *et al.*, 2005, Vinciguerra *et al.*, 2010). Bislang ist das Gebiet der Chromatin-Brückenbildung und deren Auflösung jedoch noch weitgehend unerforscht. Da eine erfolgreiche Chromosomensegregation das Cytoskelett und mitotische Kinasen benötigt, wurde die intrazelluläre Verteilung eines cytoskeletalen und eines cytokinetischen Proteins in Zellen mit einer RAD50-Brücke untersucht werden. Hierfür wurden humane (ADP SV40) und murine (NIH3T3) Wildtypzellen zur Induktion von Chromatin-Brücken mit 12 Gy bestrahlt und 24 h später immunocytochemisch untersucht.

Eine Co-Markierung mit dem cytoskeletalen Protein alpha-Tubulin und RAD50 zeigte eine Colokalisation beider Proteine auf der DNA-Brücke (Abb. 21). Alpha-Tubulin war aufgrund des cytokinetischen Progresses mit zentraler Lokalisation im Bereich der Teilungsebene zu detektieren. Dabei konnte eine Zunahme der RAD50-Lokalisation am *Midbody* von der frühen (Abb. 21, A, I, offener Pfeil) bis zur späten Abtrennungsphase (Abb. 21, A, II, offener Pfeil) und am *Midbody* Rest beobachtet werden (Abb. 21, A, III, offener Pfeil). Die DNA in der Teilungsebene verhindert eine Vollendung der Abtrennung der cytoplasmatischen Komponenten der zwei Tochterzellen und bewirkt eine Rückbildung der Teilungsebene. Der *Midbody* bleibt dabei als Rest an der interzellulären Brücke vorhanden (*Midbody* Rest).

In Interphase-Zellen zeigte sich eine punktartige Struktur von RAD50, die sich über die gesamte DNA-Brücke erstreckte (Abb. 21, A, IV, offener Pfeil). Eine Untersuchung mit RAD50 und Aurora B, einem essentiellen Protein der Cytokinese, zeigte eine Colokalisation beider Proteine während der Abtrennungsphase und am *Midbody* Rest (Abb. 21, B, II & III, offene Pfeile). In der Interphase war eine punktförmige Lokalisation von RAD50 auf der Chromatin-Brücke zu detektieren, jedoch keine Aurora B-Lokalisation (Abb. 21, B, IV, offener Pfeil).

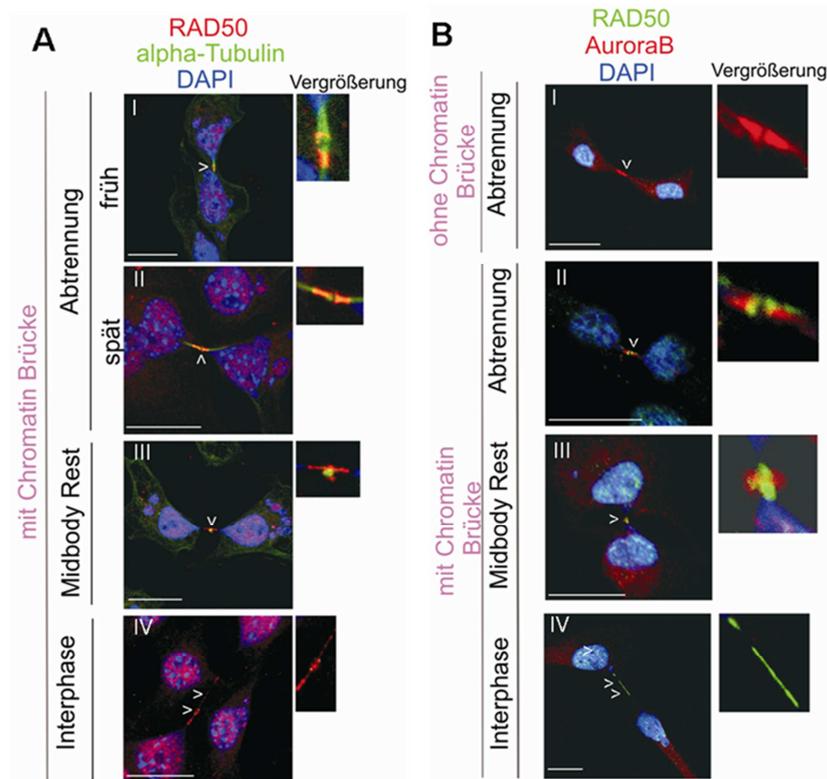


Abbildung 21: Colokalisation von RAD50 mit cytoskeletalen und cytokinetischen Proteinen in verschiedenen Phasen der (abnormalen) Cytokinese. NIH3T3 und ADP SV40 Wildtypzellen wurden mit 12 Gy bestrahlt, 24 h inkubiert und mittels spezifischer Antikörper gegen anti RAD50 (07-1781), anti alpha-Tubulin und anti Aurora B markiert. **(A)** Eine Colokalisation von alpha-Tubulin (grün) und RAD50 (rot) konnte während der (I) frühen und (II) späten Abtrennungsphase sowie am (III) *Midbody* Rest in der abnormalen Cytokinese von NIH3T3 Zellen nachgewiesen werden. In (IV) Interphase-Zellen liegt RAD50 allein auf den DNA-Brücken vor. **(B)** (I) Normale cytokinetische Zellen (ADP SV40) ohne Chromatin-Brücke. Colokalisation von RAD50 (07-1781) (grün) und Aurora B (rot) während der (II) Abtrennung und am (III) *Midbody* Rest in Zellen mit einer Chromatin-Brücke. In (IV) Interphase-Zellen ist nur eine RAD50-Lokalisation auf der Brücke detektierbar. Die Pfeile zeigen die Bereiche der Vergrößerung an. Die DNA wurde mittels DAPI markiert. Die Bilder sind als Überlagerungen dargestellt. Messbalken= 20 µm. N=3

Eine immunocytochemische Analyse von normalen cytokinetischen Zellen ohne DNA-Brücke zeigte eine Verteilung von Aurora B in der Teilungsebene ohne RAD50-Lokalisation (Abb. 21, B, I, offener Pfeil).

4.5.2 Aurora B und RAD50 interagieren *in situ*

Aufgrund der beobachteten Colokalisation von Aurora B und RAD50 sollte auch eine potentielle direkte Interaktion beider Proteine *in situ* untersucht werden. Hierfür wurden humane Wildtypzellen (ADP SV40) in 6-well-Platten kultiviert, unbehandelt oder mit 6 Gy bestrahlt, und für 24 h kultiviert. Die Analyse erfolgt mit einer Markierung mit Antikörpern gegen Aurora B und RAD50 und mittels des *Proximity Ligation Assays* (3.6) (Abb. 22). Als Positivkontrolle für eine Proteininteraktion diente die Markierung mit einem MRE11 Antikörper und einem RAD50 Antikörper in Wildtypzellen. Die Färbung

mit dem MRE11 Antikörper und dem RAD50 Antikörper in RAD50-defizienten (F239 SV40) Zellen diente als Negativkontrolle.

Dabei konnte gezeigt werden, dass die Aurora B/RAD50 Markierung in unbehandelten sowie auch in bestrahlten Zellen mehrere punktförmige Strukturen aufwies (Abb. 22, A, c, d, weiße Pfeile). Vergleichbare punktförmige Strukturen waren auch in der Positivkontrolle der MRE11/RAD50-Markierung nachzuweisen (Abb. 22, A, a, b, weiße Pfeile).

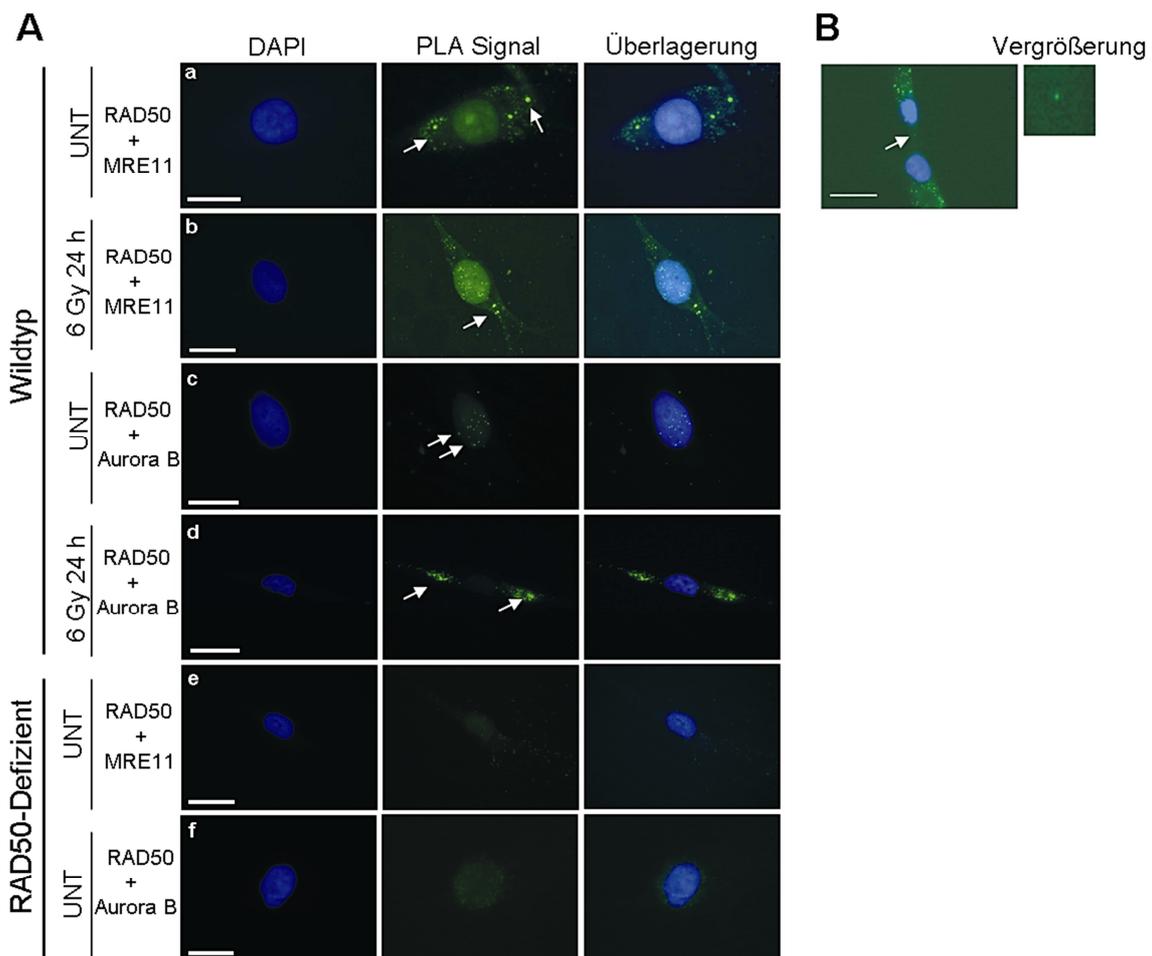


Abbildung 22: Interaktion von RAD50 mit Aurora B *in situ*. (A) Humane Wildtypzellen (ADP SV40) wurden bestrahlt (6 Gy) und 24 h später mittels eines *Proximity Ligation Assay* mit anti RAD50, anti Aurora B und anti MRE11 Antikörpern markiert. Als Positivkontrolle diente die Interaktion zwischen MRE11 und RAD50 in (a) unbehandelten Zellen oder in (b) bestrahlten Interphase-Zellen. Als Negativkontrolle diente die Untersuchung der (e) MRE11/RAD50 und (f) Aurora B/RAD50 Interaktion in unbehandelten Interphase-Zellen der RAD50-defizienten Zelllinie (F239 SV40). Die Interaktion zwischen Aurora B und RAD50 in (c) unbehandelten und (d) bestrahlten Zellen sind als punktförmige Strukturen sichtbar (weiße Pfeile). n=15; N=2 (B) Die Interaktion auf einer Chromatin-Brücke zwischen Aurora B und RAD50 ist als zentrale punktförmige Struktur sichtbar (weißer Pfeil). n=5; N=2. Das rechte Bild stellt eine Vergrößerung des linken Bildes dar. Die DNA wurde mittels DAPI gefärbt. Messbalken= 20 μ m

Ein solches PLA-Signal für RAD50/MRE11 und RAD50/Aurora B konnte in RAD50-defizienten Zellen nicht nachgewiesen werden (Abb. 22, A, e, f). Bei der Analyse von

Aurora B/RAD50 auf Chromatin-Brücken konnte in einzelnen Fällen (n=5) eine punktförmige Struktur im Zentrum der Chromatin-Brücke detektiert werden (Abb. 22, B, weißer Pfeil). Zusammenfassend ergab der *Proximity Ligation Assay* Hinweise auf eine bisher unbekannte direkte Interaktion von RAD50 und Aurora B auf Chromatin-Brücken. Aufgrund der geringen Anzahl der Zellen, die diese Strukturen ausbildeten, und des insgesamt schwächeren Signals findet diese Interaktion möglicherweise nur temporär statt.

4.6 Allgemeine Rolle von RAD50 in der Mitose und Cytokinese

4.6.1 RAD50-Lokalisation während der Mitose

Die bisher beschriebenen immunocytochemischen Untersuchungen zur Funktion von RAD50 während der Cytokinese lieferten den Ansatz für weitere Untersuchungen zur Rolle von RAD50 während der Mitose. Von besonderem Interesse war dabei die Lokalisation des RAD50 Proteins in verschiedenen Phasen der Mitose. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass der MRN-Komplex eine wesentliche Rolle in der Mitose spielt (Rozier *et al.*, 2013). Für die Analyse wurden humane Wildtypzellen (ADP SV40) sowie RAD50-defiziente Zellen (F239 SV40) und murine NIH3T3 Zellen in 6-*well*-Platten kultiviert und die Verteilung von RAD50 mittels immunocytochemischer Färbung untersucht. Zur Identifizierung der mitotischen Zellen wurde der mitosespezifische Marker phospho-H3 (S10) genutzt. Humane Wildtypzellen und RAD50-defiziente Zellen wiesen eine perinukleäre punktuelle Lokalisation von RAD50 in der Prophase auf, wobei die Signalintensität in den RAD50-defizienten Zellen aufgrund des geringen Proteinlevels von RAD50, im Vergleich zu den Wildtypzellen, deutlich schwächer war (Abb. 23, A, B). Diese Lokalisation war teilweise als Colokalisation mit phospho-H3 (S10) zu beobachten (Abb. 23, A, B, weiße Pfeile). In der Metaphase (Abb. 23, A, b; B, e) und Anaphase (Abb. 23, A, c; B, f) konnte das perinukleäre Verteilungsmuster von RAD50 in den Wildtyp- und den RAD50-defizienten Zellen nicht detektiert werden. Hier zeigte RAD50 eine diffuse cytoplasmatische Lokalisation. In bestrahlten Zellen konnte ein Unterschied im Verteilungsmuster beobachtet werden (Abb. 23, C). In humanen Wildtypzellen (ADP SV40), die 24 h vor der Analyse bestrahlt (12 Gy) und mit anti RAD50 und anti phospho-H3 (S10) Antikörpern markiert worden waren, zeigte sich eine vermehrte perinukleäre Verteilung von RAD50 auch während der Anaphase (Abb. 23, C, a). Die RAD50-Lokalisation war als Saum um die kondensierten Chromosomen sichtbar. In der Telophase von bestrahlten (12 Gy) murinen NIH3T3 Zellen wies RAD50 eine punktförmige Struktur

auf, die mit den kondensierten Chromosomen und dem cytoskeletalen Protein alpha-Tubulin colokalisiert vorlag (Abb. 23, C, b).

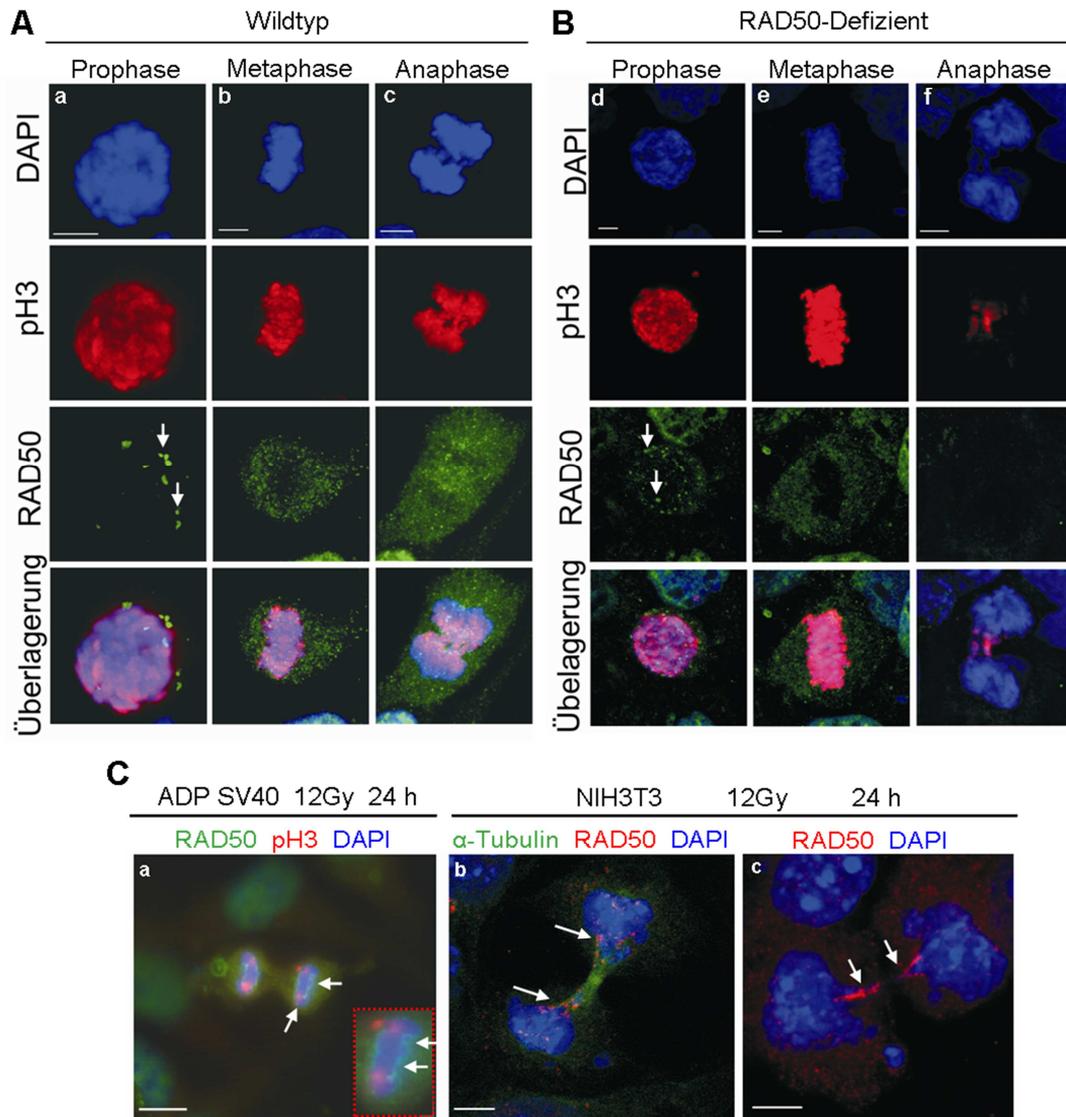


Abbildung 23: Die Verteilung von RAD50 in verschiedenen Phasen der normalen und abnormalen Mitose. (A, B) Normale Mitose: RAD50 (grün, 07-1781) ist perinukleär in der Prophase in Wildtypzellen (a) (ADP SV40) und in (d) RAD50-defizienten Zellen als punktförmige Struktur um die kondensierten Chromosomen (pH3, rot, 9701) lokalisiert (weiße Pfeile). Während der Metaphase (b, e) und Anaphase (c, f) ist die Lokalisation von RAD50 diffus cytoplasmatisch. N=3. (C) Abnormale Mitose: 24 h nach Bestrahlung (12 Gy) liegt RAD50 in Wildtypzellen (ADP SV40) als eine saumartige, perinukleäre Verteilung (a) während der Anaphase vor. Die Pfeile zeigen den Bereich der Vergrößerung (rot umrandetes Bild) an. Messbalken= 20 μ m. (b) Murine Wildtypzellen (NIH3T3), die mit alpha-Tubulin und RAD50 immunocytochemisch nach Bestrahlung (12 Gy, 24 h) markiert worden sind, zeigen eine fokale Verteilung von RAD50 während der Telophase und eine Colokalisation von RAD50 und alpha-Tubulin bei der Ausbildung der Teilungsebene (weiße Pfeile). (c) In abnormal cytokinischen Zellen liegt RAD50 lokalisiert auf einer Chromatin-Brücke vor (weiße Pfeile). Die DNA wurde mittels DAPI markiert. Die Bilder sind exemplarisch und als Überlagerungen dargestellt. Messbalken= 5 μ m.

In cytokinetischen Zellen war eine RAD50-Verteilung und Colokalisation mit der DNA auf der Chromatin-Brücke zu beobachten (Abb. 23, C, c), die auch schon in den vorangegangenen Untersuchungen dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Mit Hilfe einer immunocytochemischen Markierung mit einem anti phospho-H3 (S10) Antikörper und einem anti RAD50 Antikörper sollte die Verteilung der Proteine in der abnormalen Cytokinese von bestrahlten (12 Gy) Wildtypzellen (ADP SV40) weitergehend untersucht werden.

Es konnte eine Colokalisation von pH3 und RAD50 in Zellen mit einer Chromatin-Brücke nachgewiesen werden (Abb. 24, a), die auch noch am *Midbody* Rest zu beobachten war (Abb. 24, b).

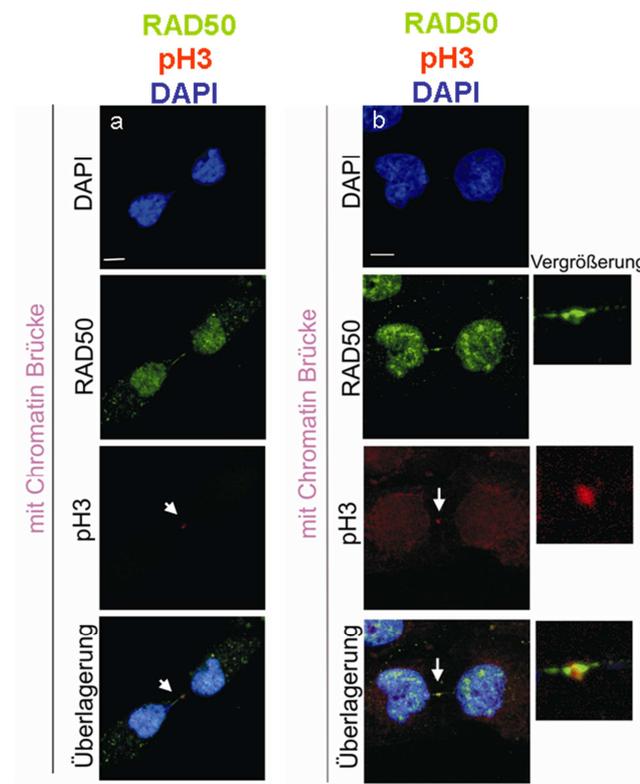


Abbildung 24: Colokalisation von phospho-H3 (S10) und RAD50 in der abnormalen Cytokinese. Wildtypzellen (ADP SV40) wurden bestrahlt (12 Gy) und 24 h später immunocytochemisch mit phospho-H3 S10 (rot, 9701) und RAD50 (grün, 071781) markiert. Die Colokalisation von RAD50 und pH3 ist in abnormalen cytokinetischen Zellen auf Chromatin-Brücken (a, weiße Pfeile) sowie auch am *Midbody* Rest detektierbar (b, weiße Pfeile). Die DNA wurde mit DAPI gefärbt (blau). Messbalken= 5 μ m.

Es konnte gezeigt werden, dass RAD50 in der Prophase der normalen Mitose ein diskretes Verteilungsmuster aufweist, welches sich nach Bestrahlung auch in späteren Phasen der Mitose und in der abnormalen Cytokinese nachweisen lässt.

4.6.2 RAD50 interagiert mit phospho-H3 (S10) *in situ*

Die Phosphorylierung von H3 an Serin 10 wird bei Beginn der Mitose durch Aurora B-Kinase vermittelt (Crosio *et al.*, 2002). Die spezifische Phosphorylierung von H3 an S10 wird während der G2-Phase initiiert und erreicht ein Maximum in der Metaphase des Zellzyklus, bevor es wieder zu einer Signalabnahme während der Anaphase und Telophase kommt (Van Hooser *et al.*, 1998).

Die beschriebene Interaktion von RAD50 und Aurora B *in situ* (Abb. 22) sowie die perinukleäre Lokalisation von RAD50 an den kondensierten Chromosomen (Abb. 23) und die Colokalisation in der abnormalen Cytokinese (Abb. 24) deuten auf eine direkte oder indirekte Proteininteraktion von RAD50 und phospho-H3 S10 hin. Des Weiteren war bekannt, dass RAD50 nach Bestrahlung chromatingebunden vorliegt (Gatei *et al.*, 2011). Um eine mögliche Interaktion von phospho-H3 (S10) und RAD50 zu prüfen, wurden humane Wildtypzellen (ADP SV40) mittels des *Proximity Ligation Assays* und einem anti RAD50 Antikörper und einem anti pH3 (S10) Antikörper (3.6) untersucht. Es konnten mehrere positive PLA-Signale von RAD50/pH3 in Interphase-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 25). Zellen mit einer Chromatin-Brücke zeigten zusätzlich ein zentrales positives PLA-Signal auf der Brücke.

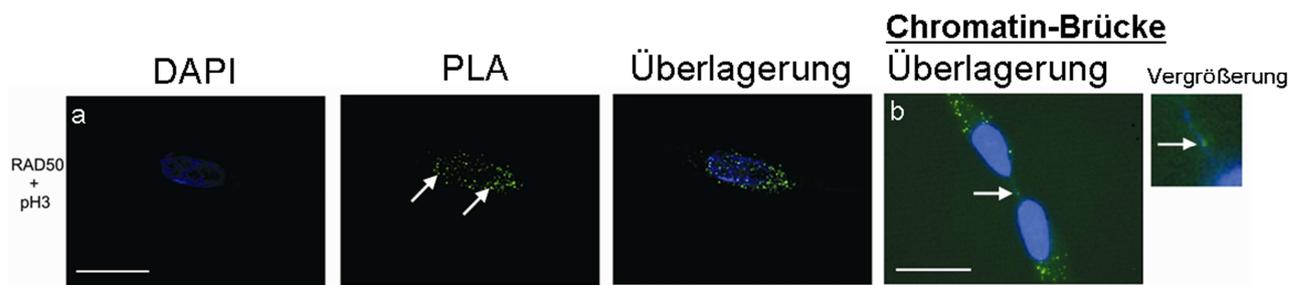


Abbildung 25: phospho-H3 und RAD50 interagieren *in situ* in Interphase-Zellen und auf Chromatin-Brücken. (a) Humane Wildtypzellen (ADP SV40) wurden mit spezifischen Antikörpern gegen RAD50 (07-1781) und pH3 (S10) (9701) markiert und die Interaktion der Proteine mittels des *Proximity Ligation Assays* nachgewiesen. Mehrere positive PLA-Signale (a, weiße Pfeile, grün) sind in Interphase-Zellen zu detektieren. (b) Positives PLA-Signal (grün) auf einer Chromatin-Brücke (weißer Pfeil). Das Bild ist als Überlagerung dargestellt. Die DNA wurde mittels DAPI markiert. Messbalken= 20µm. N=2

Diese Ergebnisse belegen erstmals eine direkte Verbindung von einem Protein der Cytokinese (Abb. 22) und einem Protein der Mitose (Abb. 25) mit einem Protein (RAD50) des ATM-Signalweges.

4.6.3 Ein RAD50 *knock-down* führt zu einer Verlängerung der Zellteilungszeit

Um weiterführend die Funktion und den Einfluss von RAD50 in der Mitose und Cytokinese zu untersuchen, sollte mittels Zeitrafferaufnahmen die Konsequenz eines RAD50 *knock-downs* analysiert werden. Murine NIH3T3 Zellen wurden mit der entsprechenden esiRNA in 6-well-Platten transfiziert und für 72 h kultiviert (3.4). Anschließend wurden die Zellen in ein Phasenkontrastmikroskop mit Inkubatorkammer mit 37°C und 5 % CO₂ Gehalt überführt und die Zeitrafferaufnahme gestartet (3.7.3). Es erfolgte alle 8 min eine Phasenkontrastaufnahme für eine gesamte Dauer von 48 h. Als Vergleich wurden unbehandelte oder bestrahlte NIH3T3 Zellen (12 Gy) einer Analyse mittels Zeitrafferaufnahmen unterzogen, wobei die Aufnahme der Zellen direkt nach der Bestrahlung gestartet wurde. Die zeitliche Abfolge der Zellteilung wurde direkt nach Beginn der Pro-/Metaphase bis zur kompletten Teilung der zwei Tochterzellen ausgewertet (Abb. 26, A).

Unbehandelte Zellen zeigten eine mediane Zellteilungszeit von 104 min (Mittelwert: 99,3 ± 5,85 min) (Abb. 26, B). In den bestrahlten Zellen konnte eine verlängerte mediane Zellteilungszeit von 174 min (Mittelwert: 299,8 ± 51,36 min) ermittelt werden. Die Analyse der Zeitrafferaufnahmen zeigte eine Verzögerung der Zellteilung, die sich mehr auf den zeitlichen Abschnitt der Teilung und Abtrennung der Tochterzellen auswirkte (Cytokinese) als auf den Vorgang der Mitose. Es war zu beobachten, dass 66 % der mitotischen Zellen über mehrere Stunden hinweg am *Midbody* über eine cytoplasmatische Brücke verbunden blieben und 22 % der Zellen die Cytokinese nicht abschließen konnten (Endwert der Messung: 48 h) (Abb. 26, A). Diese Zellen wurden entweder apoptotisch oder zeigten einen binukleären Phänotyp.

Simultan zu diesen Ergebnissen ergab ein RAD50 *knock-down* eine wesentliche Verzögerung der Zellteilungszeit mit einem Median von 380 min (Mittelwert: 525,3 ± 80,54 min), wobei 74 % der Zellen eine verlängerte Teilung aufwiesen und 9 % die Cytokinese nicht beenden konnten (Endwert der Messung: 48 h).

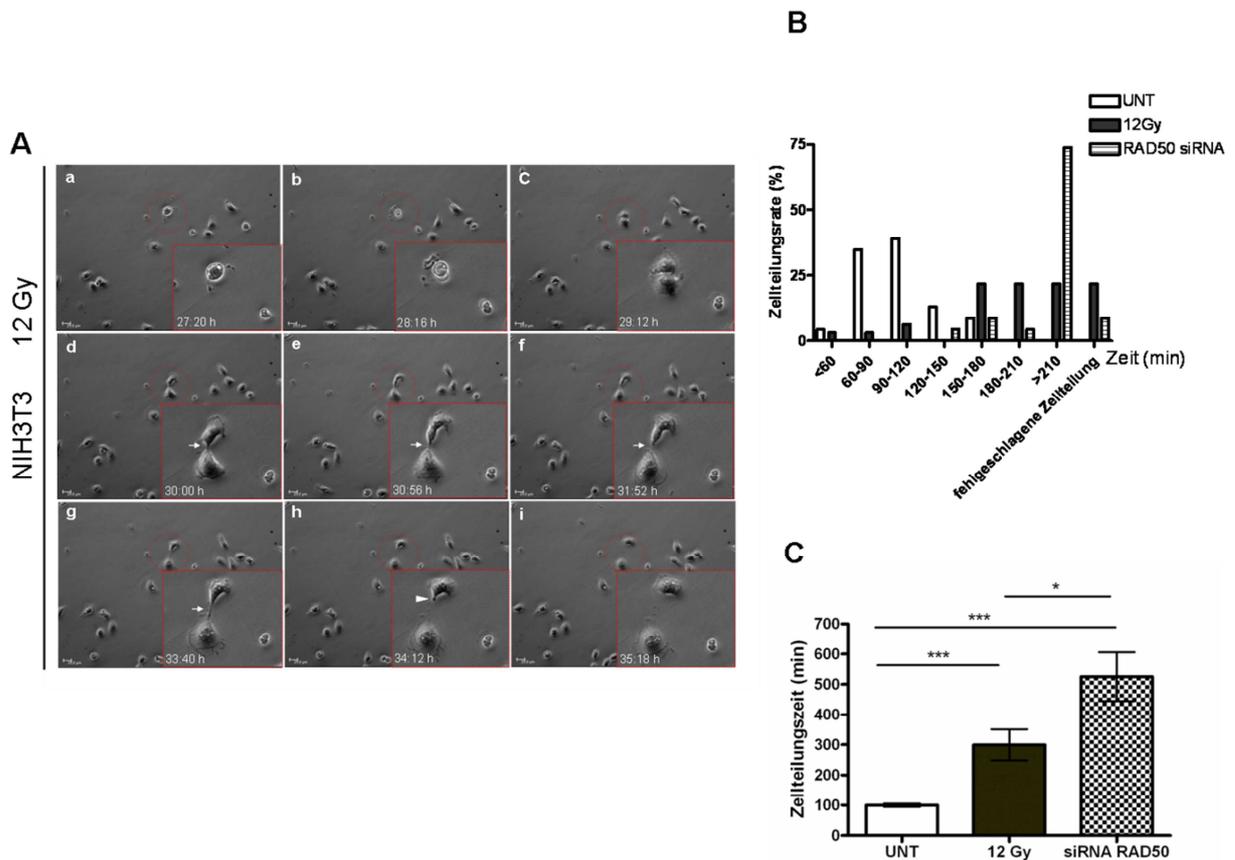


Abbildung 26: Verlängerung der Zellteilungszeit in NIH3T3 Zellen durch Bestrahlung oder RAD50 knock-down. NIH3T3 Zellen wurden mit einer RAD50 gerichteten siRNA transfiziert und für 72 h kultiviert. Die Zellen wurden mittels eines Phasenkontrastmikroskops mit Inkubator-kammer für 48 h einer Zeitrafferaufnahme unterzogen. Die zeitliche Bildauflösung lag bei 8 min. Die Aufnahmen wurden mit einem 20x Objektiv durchgeführt. Simultan erfolgten die Aufnahmen der unbehandelten und bestrahlten Zellen (12 Gy). (A) Zeitrafferaufnahme einer verlängerten Zellteilung in bestrahlten NIH3T3 Zellen. Die Analyse beginnt mit Ausbildung der Pro-/Metaphase (a). Die Zellen durchlaufen die Anaphase/Telophase (b, c, d) und bleiben in der Cytokinese über den *Midbody* verbunden (d-g, weißer Pfeil), bis es zur Abtrennung kommt (h, weißer Pfeil). Vollständige Trennung der zwei Tochterzellen nach der Cytokinese (i). Messbalken= 25 μ m. (B) Die statistische Auswertung ergab eine mediane Zellteilungszeit bei unbehandelten (UNT) NIH3T3 Zellen von 104 min (n=22), 174 min nach Bestrahlung mit 12 Gy (n=32) und 380 min nach RAD50 knock-down (n=23). (C) Die statistische Auswertung der Mittelwerte erfolgte mittels eines *unpaired* t-test (\pm Standardfehler). * $p < 0.05$., *** $p < 0.001$. UNT=unbehandelt

Eine statistische Auswertung der Mittelwerte mittels eines *unpaired* t-test wies eine signifikante Verlängerung der Zellteilungszeit der mit 12 Gy bestrahlten NIH3T3 Zellen ($p=0,0009$) und der RAD50 knock-down NIH3T3 Zellen ($p= <0,0001$) im Vergleich zu den unbehandelten NIH3T3 Zellen auf (Abb. 26, C).

4.7 Zellzyklusprogression von Zellen mit einer RAD50-Brücke

Eine verlängerte oder nicht beendete Cytokinese kann durch DNA in der Teilungsebene hervorgerufen werden. NIH3T3 Zellen, die durch eine RAD50-Brücke (Chromatin-Brücke mit RAD50-Lokalisation) verbunden sind, sollten auf ihre Fähigkeit in ihrer Zellzyklusprogression untersucht werden. Die Zellzyklusprogression sollte anhand der mitotischen Zellen sowie der S-Phase-Zellen analysiert werden. Für die Analyse der S-Phase-Zellen wurden NIH3T3 Zellen 24 h nach Bestrahlung mit 12 Gy in EdU-(25 μ M) haltigem Medium für 20 min kultiviert (3.5.3). EdU wird in aktiv replizierenden Zellen während der S-Phase in die DNA inkorporiert. Die Zellen wurden fixiert und immunocytochemisch mit einem anti RAD50 Antikörper markiert. Des Weiteren wurden NIH3T3 Zellen (24 h nach Bestrahlung mit 12 Gy) simultan mit dem mitosespezifischen Marker phospho-H3 (S10) immunocytochemisch gefärbt.

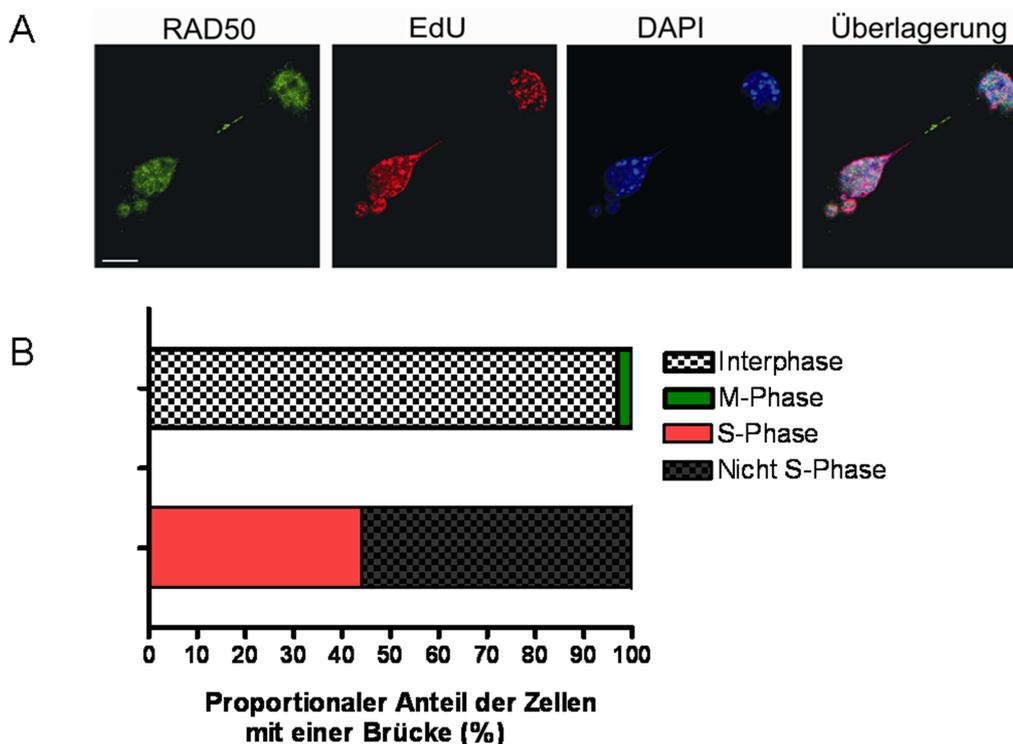


Abbildung 27: Progression von Zellen mit RAD50-Brücken durch die S- und M-Phase des Zellzyklus. (A) Exemplarische Darstellung für RAD50-Brückenzellen, die sich in der S-Phase befinden. NIH3T3 Zellen wurden mit 12 Gy bestrahlt und 24 h später immunocytochemisch mit EdU (25 μ M) und einem anti RAD50 Antikörper (07-1781) markiert. Die DNA wurde mit DAPI gefärbt. Messbalken= 20 μ m. (B) Auswertung der sich in der M-Phase, S-Phase und Interphase befindenden Zellen mit einer RAD50-Brücke. NIH3T3 Zellen wurden mit 12 Gy bestrahlt, für 24 h inkubiert und mittels eines S-Phase Markers (EdU) und mit anti phospho-H3 (S10) (9701) und anti RAD50 Antikörpern (07-1781) immunocytochemisch markiert. Für die Analyse wurden n=48 Paare von Zellen mit einer RAD50-Brücke (gesamt 96 Einzelzellen) ausgewertet.

Ein Anteil von 44 % aller Zellen mit einer RAD50-positiven Chromatin-Brücke befanden sich in der S-Phase (Abb. 27, A, B). Es konnte in diesen Fällen beobachtet werden, dass entweder eine oder beide der Tochterzellen sich in der S-Phase befanden (Abb. 27, A).

Die restlichen durch eine RAD50-Brücke verbundenen Zellen (56 %) befanden sich nicht in der S-Phase. Die Analyse der mitotischen Zellen zeigte, dass 3 % der Zellen mit einer RAD50-Brücke sich in der M-Phase befanden, wobei 97 % nicht mitotisch waren (Abb. 27, B). Dies bedeutet, dass der Großteil der Zellen, die RAD50 auf der Chromatin-Brücke aufweisen, sich in der Interphase befinden und nicht mitotisch sind.

4.8 Cyto-/nucleoplasmische und chromatingebundene Verteilung von RAD50 nach Bestrahlung in der Mitose

RAD50 ist ein nukleäres Protein, welches nach der Proteinbiosynthese auch in geringen Mengen im Cytoplasma vorliegt (Seno und Dynlacht, 2004). In einer früheren Studie konnte bereits gezeigt werden, dass RAD50 nach Bestrahlung chromatingebunden vorliegt (Gatei *et al.*, 2011). Bislang sind noch keine Studien dazu bekannt, ob die nukleäre Verteilung des RAD50 Proteins sich in der mitotischen Progression verändert. Es ist weiterhin nicht bekannt, ob die Bindung von RAD50 an Chromatin in der Mitose, abhängig von der Bestrahlungsdosis, verstärkt werden kann. Deswegen sollte der RAD50 Proteinlevel zu Beginn der Mitose und am Ende der mitotischen Phase vergleichend auf seine cyto-/nucleoplasmische und chromatingebundene Verteilung untersucht werden. Für die Analyse musste zuerst eine Arretierung der Zellen zu Beginn der Mitose und der Zeitpunkt, der einem Ende der mitotischen Phase entspricht, optimiert werden. Die Arretierung der Zellen zu Beginn der Mitose sollte durch eine Behandlung mit Nocodazol erfolgen (3.3). NIH3T3 Zellen wurden drei Tage bei 30°C kultiviert und dann für 20 h mit 500 nM Nocodazol bei 37°C kultiviert. Das Medium wurde entfernt, die Zellen gewaschen und durch Zusatz von frischem Medium aus dem mitotischen Arrest entlassen. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen aufgearbeitet und die Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie (3.9) auf ihren Anteil der G2/M-Population analysiert. Da Nocodazol in DMSO gelöst vorliegt, wurden parallel dazu Zellen mit DMSO versetzt und als Kontrolle verwendet. Als zusätzlicher Vergleich wurden unbehandelte NIH3T3 Zellen, die entweder 4 Tage bei 37°C oder 3 Tage bei 30°C und 20 h bei 37°C kultiviert worden sind, mitgeführt. Nach Entlassen aus dem Arrest (Beginn der Mitose) (t=0 h) konnte ein G2/M-Anteil von 78 % gemessen werden (Abb. 28, d). Der G2/M-Anteil der Zellen stieg

30 min nach dem Entlassen aus dem Arrest auf 93 % an (Abb. 28, e) und sank nach 60 min auf 88 % (Abb. 28, f). Nach 1,5 h Stunden konnte eine weitere Abnahme der G2/M-Population verzeichnet werden (67 %) (Abb. 28, g), die sich nach 2.5 h auf 58 % (Abb. 28, i), nach 3.5 h auf 54 % (Abb. 28, j) und nach 4.5 h auf 53 % (Abb. 28, k) weiter reduzierte.

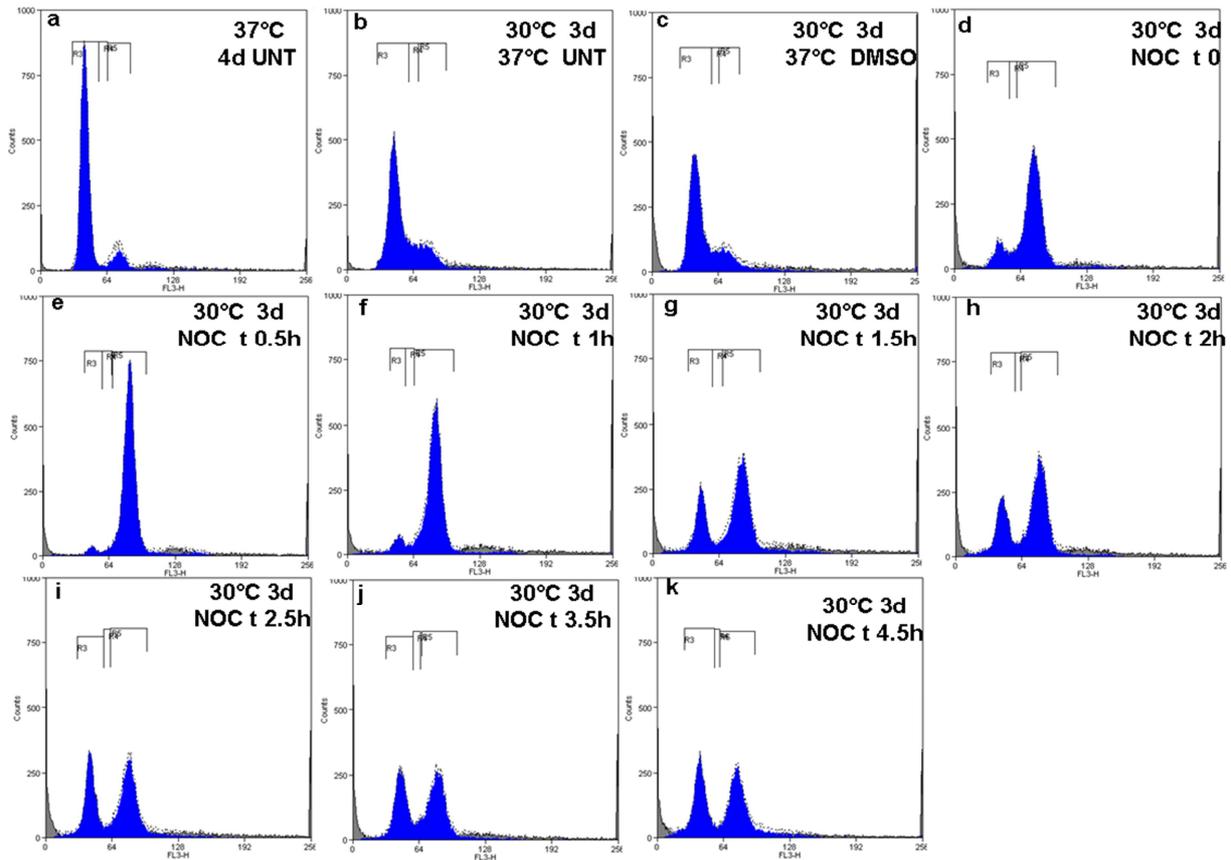


Abbildung 28: Durchflusszytometrische Analyse mit Nocodazol behandelter NIH3T3 Zellen. NIH3T3 Zellen wurden bei 30°C/37°C kultiviert, mit 500 mM Nocodazol behandelt und 20 h später aus dem Arrest entlassen. Die Zellen wurden in 70% Ethanol fixiert und die DNA mit Propidiumiodid markiert. G2/M Zellpopulationsanalyse von wie folgt kultivierten Zellen: (a) unbehandelte Zellen, 4 Tage 37°C, (b) unbehandelte Zellen, 3 Tage 30°C / 20 h bei 37°C, (c) 37°C 3 Tage/ DMSO behandelt 20 h /37°C, (d-k): 30°C 3Tage/ 20 h 500 nM Nocodazol 37°C. Zeitpunkte: (d) t=0 h, (e) t=0,5 h, (f) t=1 h, (g) t=1,5 h, (h) t=2 h, (i) t=2,5 h, (j) t=3,5 h, (k) t=4,5 h. d=Tage, NOC=Nocodazol, h=Stunde. N=2. n=10⁴ Zellen pro Messansatz.

Die durchflusszytometrische Analyse zeigt, dass ein Großteil (78 %) der Zellpopulation nach direkter Freisetzung aus dem Arrest (t=0 h) sich in der G2/M-Phase befand, wobei 30 min nach Beendigung des Arrestes sich fast die gesamte Zellpopulation (93 %) in der G2/M-Phase befand. Die Reduzierung des Zellpopulationsanteils nach einer Stunde (t=1 h) impliziert, dass die Zellen zu diesem Zeitpunkt die Mitose beenden. Dies wird weiter verdeutlicht durch die zeitabhängige Reduzierung der G2/M-Zellpopulation. In Abschnitt

4.6.3 konnte bereits gezeigt werden, dass NIH3T3 Zellen eine mediane Zellteilungszeit von 104 min aufwiesen (Abb. 26). Dies konnte mit der durchflusscytometrischen zeitlichen Analyse der G2/M-Population bestätigt werden, die eine Abnahme der G2/M-Population ab $t=1$ h aufzeigte.

Zur Bestimmung der RAD50 Proteinmengen in der cyto-/nucleoplasmischen (FCN) und der chromatingebundenen (CB) Fraktion während der Mitose wurden NIH3T3 Zellen mit Nocodazol inkubiert (3.3), mit verschiedenen Dosen bestrahlt (1 Gy, 6 Gy, 12 Gy) (3.2) und nach der Bestrahlung aus dem Arrest entlassen. Die Aufarbeitung erfolgte unmittelbar ($t=0$ h) oder nach 1 h ($t=1$ h). Die Lysate wurden extrahiert (3.8.1.2) und die CB Fraktion sowie die FCN Fraktion mittels SDS-PAGE und Immunoblot-Verfahren aufgetrennt (Abb. 29, A). Die Bandenintensitäten wurden quantifiziert und gegen den Proteinspiegel von H3 und alpha-Tubulin normalisiert (Abb. 29, B, C). Die Werte wurden als relative Einheit ermittelt (RE).

Der Proteinlevel von RAD50 in der CB Fraktion (Abb. 29, C) zeigte beim Zeitpunkt $t_1=0$ h der nicht-bestrahlten Zellen einen basalen Level von $1,10 \pm 0,19$ RE, der nach einer Stunde ($t_1=1$ h) auf $0,90 \pm 0,15$ RE sank. Nach Bestrahlung der Zellen mit 1 Gy war eine Zunahme der RAD50 Immunreaktivität von $0,62 \pm 0,05$ RE ($t_2=0$ h) im Vergleich zu $t_2=1$ h ($0,93 \pm 0,04$ RE) zu beobachten. Im Vergleich dazu war der Wert von $t_2=0$ h ($0,62 \pm 0,05$ RE) nach 1 Gy Bestrahlung niedriger als in den unbestrahlten Proben ($t_1=0$ h; $1,1 \pm 0,19$ RE). Nach 6 Gy Bestrahlung war keine Veränderung der chromatingebundenen Fraktion von RAD50 in den Zeitpunkten $t_3=0$ h ($0,64 \pm 0,13$ RE) und $t_3=1$ h ($0,62 \pm 0,16$ RE) im Vergleich zu 1 Gy Bestrahlung zu detektieren. Die Bestrahlung mit 12 Gy zeigte eine Tendenz zur Erhöhung der chromatingebundenen RAD50 Fraktion. Der Proteinlevel zeigte bei Zeitpunkt $t_4=0$ h einen erhöhten Anteil von $1,38 \pm 0,14$ RE im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen ($1,10 \pm 0,19$ RE, $t_1=0$ h). Eine Stunde nach 12 Gy Bestrahlung sank die Bandenintensität auf $0,81 \pm 0,18$ RE ($t_4=1$ h) ab.

Im Vergleich dazu konnte in der cyto-/nucleoplasmischen Fraktion (Abb. 29, B) keine wesentliche Veränderung des RAD50 Proteinlevels zwischen den Zeitpunkten $t_1=0$ h ($0,85 \pm 0,09$ RE) und $t_1=1$ h ($0,88 \pm 0,17$ RE) in unbestrahlten Zellen beobachtet werden. Nach Bestrahlung mit 1 Gy oder 6 Gy ($t_2=0$ h, $0,80 \pm 0,14$ RE; $t_2=1$ h, $0,89 \pm 0,04$ RE; $t_3=0$ h, $0,93 \pm 0,16$ RE; $t_3=1$ h, $1 \pm 0,05$ RE) konnte eine tendenzielle Erhöhung des RAD50 Immunreaktivität in der FCN Fraktion festgestellt werden. Nach Bestrahlung mit 12 Gy war bei $t_4=0$ h ($2,10 \pm 1,01$ RE) eine nicht signifikante Erhöhung im Vergleich zu $t_4=1$ h ($1,0 \pm 0,04$ RE) zu beobachten.

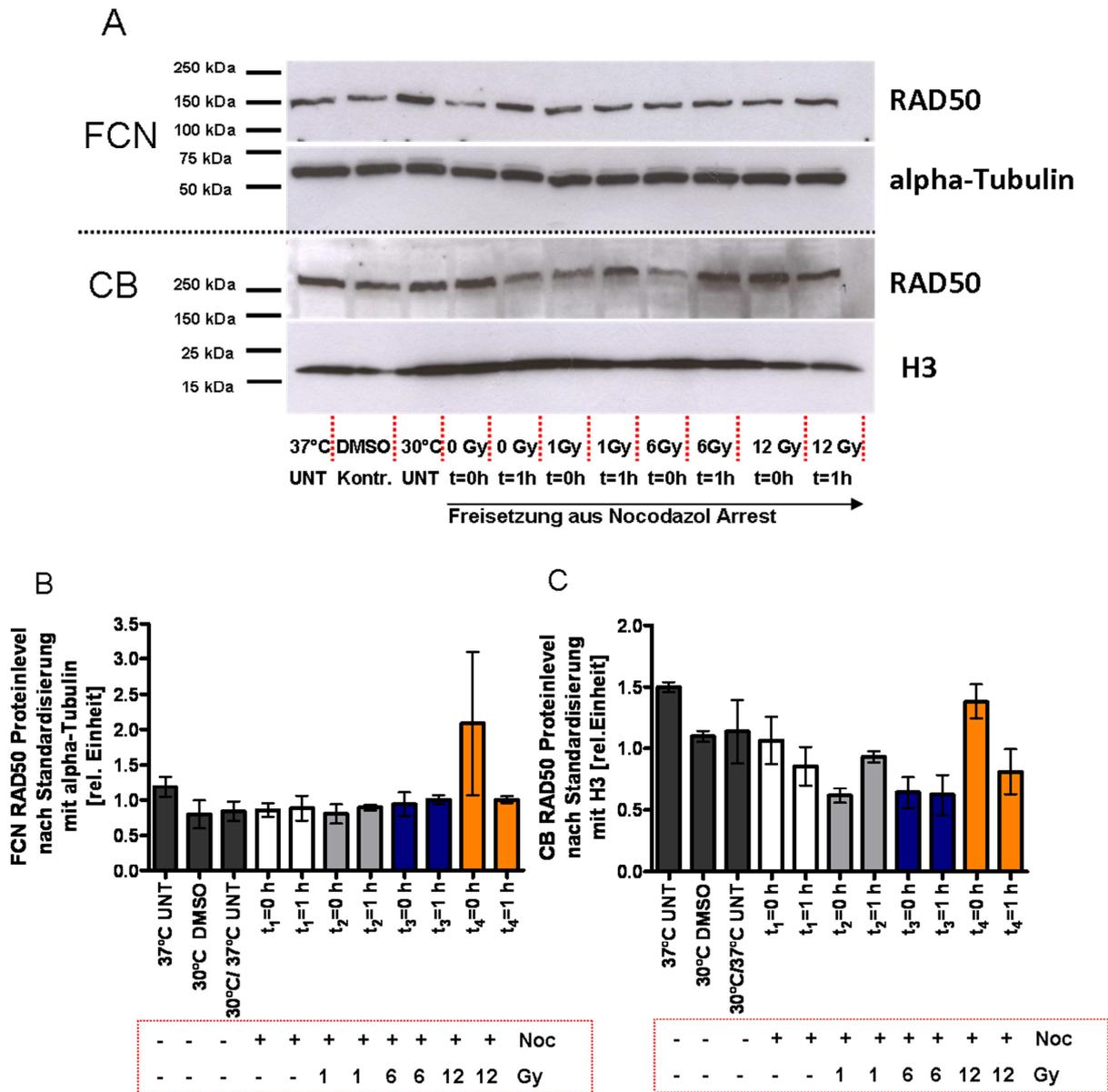


Abbildung 29: Chromatingebundener und cyto-/nucleoplasmischer Proteinanteil von RAD50 in der Mitose. (A, B, C) NIH3T3 Zellen wurden bei 30°C/37°C 3 Tage kultiviert, mit 500 mM Nocodazol behandelt und 20 h später aus dem Arrest entlassen. Die Zellen wurden bestrahlt (1 Gy, 6 Gy, 12 Gy) und die chromatingebundene Fraktion der Proteine direkt (t=0 h) oder nach t=1 h extrahiert. (A) Mittels SDS-PAGE und Immunoblot-Analyse und anschließender Immunreaktion mit einem anti RAD50 Antikörper (07-1781) wurde der RAD50 Proteinlevel bestimmt. Als Auftragskontrolle und zur Normalisierung wurden H3 und alpha-Tubulin verwendet. Proteinauftragsmenge: 60 µg. (B, C) Analyse der (B) Cyto-/nucleoplasmischen Fraktion und der (C) chromatingebundenen Fraktion des RAD50 Proteins. UNT=unbehandelt; CB=chromatingebundene Fraktion. FCN=cyto-/nucleoplasmische Fraktion. Noc=Nocodazol, +=mit Nocodazol behandelte Zellen; -=unbehandelte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler. N=3

Die Analyse gab Anlass zur Vermutung, dass der cyto-/nucleoplasmische Anteil von RAD50 zu dem Zeitpunkt t₄=0 h nach 12 Gy Bestrahlung größer war als in den unbestrahlten oder den mit 1 Gy und 6 Gy bestrahlten Zellen und

dass RAD50 zu Beginn der Mitose ($t_1=0$ h) zu einem höheren Anteil an Chromatin gebunden ist als beim Durchlaufen bzw. Beenden der Mitose ($t_1=1$ h). Nach Bestrahlung mit 12 Gy erschien der chromatingebundene Anteil von RAD50 zu Beginn der Mitose ($t_4=0$ h) zusätzlich erhöht.

4.9 Untersuchung von RAD50 in der Mitose und der abnormalen Cytokinese in epithelialen Brustkrebszelllinien

4.9.1 RAD50-Lokalisation während der Mitose in den Brustkrebszelllinien HCC1395 und HCC1937

In den vorangegangenen Abschnitten dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass RAD50 eine Rolle in der abnormalen Cytokinese (Abb. 21) einnimmt und während der Mitose ein bestimmtes Verteilungsmuster aufweist (Abb. 23). Diesbezüglich sollte geprüft werden, ob RAD50 auch eine Relevanz in der abnormalen Cytokinese und Mitose von Krebszellen zuzuschreiben ist. Krebszellen haben durch Verlust oder Mutation bestimmter Gene die Eigenschaft der ungehinderten Zellteilung erworben, die auch mit einer erhöhten Chromosomenbrüchigkeit und somit einer genetischen Instabilität einhergeht. Die Untersuchungen wurden mit zwei epithelialen Brustkrebszelllinien (HCC1937, HCC1395) durchgeführt.

Für die Analyse der mitotischen Lokalisation von RAD50 wurden die Zellen immunocytochemisch mit einem anti RAD50 und einem anti phospho-H3 (S10) Antikörper markiert. Als Kontrollzellen dienten epitheliale Brustgewebszellen (MCF10A). In der Brustkrebszelllinie HCC1937 war ein punktuell Verteilungsmuster von RAD50 in mitotischen Zellen zu beobachten (Abb. 30, A, c). Dabei war diese Verteilung von RAD50 cytoplasmisch und perinukleär zu detektieren. Im Vergleich dazu war eine rein diffuse Verteilung von RAD50 in HCC1395 (Abb. 30, A, b) und in der Kontrolle zu beobachten (Abb. 30, A, a). Eine weiterführende Analyse der einzelnen mitotischen Phasen in der Linie HCC1937 erfolgte mittels einer immunocytochemischen Färbung mit einem anti RAD50 Antikörper und einem anti alpha-Tubulin Antikörper (Abb. 30, B). Dabei war zu beobachten, dass die punktierte Lokalisation von RAD50 in der Prophase (Abb. 30, B, a), der Metaphase (Abb. 30, B, b), der Anaphase (Abb. 30, B, c) sowie in cytokinetischen Zellen (Abb. 30, B, d) zu detektieren war.

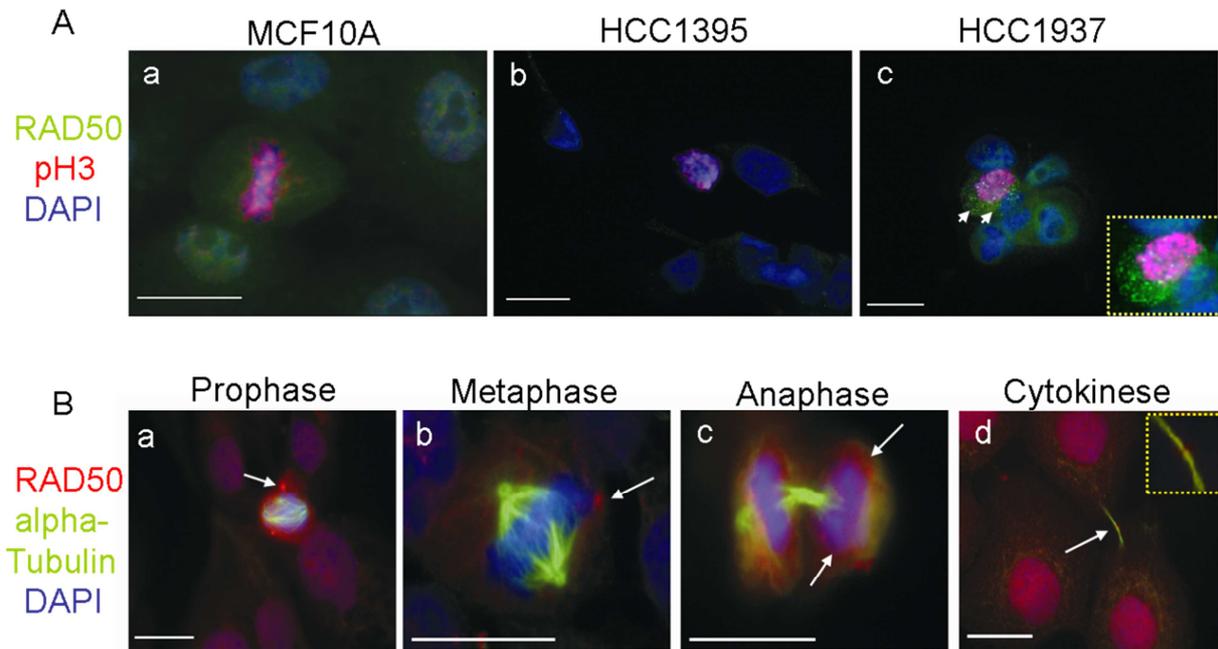


Abbildung 30: Lokalisation von RAD50 in Brustkrebsepithelzellen. (A) Epitheliale Brustkrebszellen (HCC1395, HCC1937) und Wildtypzellen (MCF10A) wurden immunocytochemisch mit phospho-H3 (S10) (9706) (rot) und RAD50 (07-1781) (A: grün, B: rot) Antikörpern markiert und die Lokalisation von RAD50 in mitotischen Zellen bestimmt. (a) MCF10A, (b) HCC1395, (c) punktuelle Lokalisation von RAD50 in der Mitose in HCC1937 (weiße Pfeile) (gelb umrandetes Bild=Vergrößerung des Areals der weißen Pfeile). Die Bilder sind exemplarisch als Überlagerungen dargestellt. (B) Immunocytochemische Färbung von HCC1937 Zellen mit RAD50 (rot) (07-1781) und alpha-Tubulin (grün) Antikörpern in verschiedenen Phasen der Mitose. (a) Prophase, (b) Metaphase, (c) Anaphase, (d) Cytokinese (gelb umrandetes Bild=Vergrößerung des Areals des weißen Pfeiles). Die weißen Pfeile zeigen die punktuelle Lokalisation von RAD50. Die DNA wurde mit DAPI (blau) markiert. Messbalken= 20 μ m

Die RAD50-Lokalisation war in der Prophase, der Metaphase und in der Anaphase nahe des Bereiches der kondensierten Chromosomen nachzuweisen. In der Cytokinese colokalisierte RAD50 mit alpha-Tubulin im Bereich des *Midbody*. Es war auffällig, dass RAD50 im Vergleich zu der Kontrolle (MCF10A) und der Linie HCC1395 (Abb. 23) eine durchgängige Lokalisation in der Mitose von HCC1937 Zellen aufwies.

4.9.2 Analyse von RAD50-Brücken in epithelialen Brustkrebszelllinien

Es konnte bereits eine spezielle Lokalisation von RAD50 in normalen Fibroblasten (4.6.1, Abb. 23) und in der epithelialen Brustkrebszelllinie HCC1937 (Abb. 30, A, B) gezeigt werden. Im Vergleich dazu war keine spezielle Verteilung des RAD50 Proteins in der Brustkrebszelllinie HCC1395 oder in den Wildtypzellen (MCF10A) nachzuweisen (Abb. 30, A). Diesbezüglich wurde weitergehend die abnormale Cytokinese, insbesondere die RAD50-Lokalisation auf Chromatin-Brücken, analysiert. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt, nachfolgend 30 min, 24 h und 48 h inkubiert, immunocytochemisch mit einem anti RAD50 Antikörper markiert und die Anzahl der Chromatin-Brücken mit einer RAD50-Lokalisation (RAD50-Brücken) ausgewertet (Abb. 31, A, B).

Dabei zeigte sich ein vergleichbarer basaler Level (UNT, unbehandelt) an RAD50-Brücken von $1,0 \pm 0,3$ % in der HCC1395 und von $1,6 \pm 0,7$ % in der HCC1937 im Vergleich zu den Wildtypzellen ($1,0 \pm 0,5$ %) (Abb. 31, B).

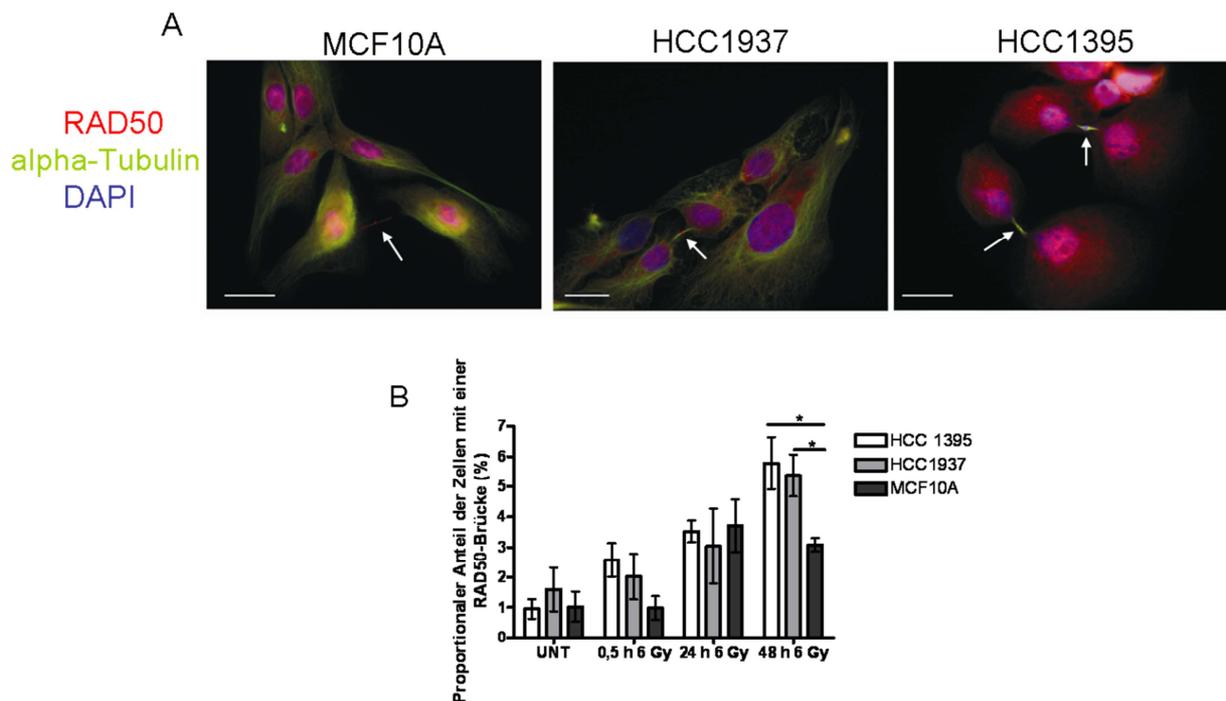


Abbildung 31: RAD50-Brücken in epithelialen Brustkrebszellen. Epitheliale Brustkrebszellen (HCC1395, HCC1937) und Wildtypzellen (MCF10A) wurden bestrahlt (6 Gy) und 24 h später immunocytochemisch mit alpha-Tubulin (grün) und RAD50 (rot) Antikörpern markiert. (A) Lokalisation von RAD50 auf Chromatin-Brücken in MCF10A (Wildtyp-), HCC1937 und HCC1395 Zellen in cytokinetischen Zellen mit einer Chromatin-Brücke (weiße Pfeile). Die Bilder sind als Überlagerung dargestellt. Der Kern wurde mit DAPI gefärbt (blau). (B) Analyse der RAD50-Brücken in HCC1395, HCC1937 und MCF10A, 0,5 h, 24 h und 48 h nach Bestrahlung mit 6 Gy. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. UNT=unbehandelt. Messbalken= 20 μ m. N=4. * $p < 0,05$.

30 min nach Bestrahlung konnte ein erhöhter Anteil von RAD50-Brücken von $2,6 \pm 0,5$ % in den HCC1395 Zellen und $2,2 \pm 0,7$ % in den HCC1937 Zellen gegenüber der Kontrolle ($1,0 \pm 0,4$ %) detektiert werden. 24 h nach der Bestrahlung stieg der Anteil der RAD50-Brücken in HCC1395 ($3,5 \pm 0,4$ %), HCC1937 ($3 \pm 1,2$ %) und der Kontrolle MCF10A ($3,7 \pm 0,9$ %) weiter an.

Nach 48 h war eine leichte Reduktion auf $3,1 \pm 0,2$ % in der Wildtypzelllinie zu detektieren. Im Gegensatz war der Anteil der Zellen mit einer RAD50-Brücke in der HCC1395 ($5,7 \pm 0,8$ %) ($p=0,02$) und der HCC1937 ($5,4 \pm 0,7$ %) ($p=0,02$) signifikant im Vergleich zur Kontrolle erhöht. In der HCC1395 konnte 30 min, 24 h und 48 h nach Bestrahlung ein insgesamt höherer Anteil an RAD50-Brücken festgestellt werden als in der Kontrolle und in der HCC1937.

4.10 Funktionelle Charakterisierung der epithelialen Brustkrebszelllinie HCC1395

4.10.1 Reduzierte NBN Proteinmenge in der Zelllinie HCC1395

In den vorangegangenen Experimenten dieser Arbeit wurde eine Zunahme von RAD50-Brücken in den Brustkrebszelllinien HCC1937 und HCC1395 (Abb. 31, B) beschrieben, ein Zeichen für genomische Instabilität. HCC1937 Zellen weisen eine Homozygotie für eine Mutation im Gen *BRCA1* (c5282insC) auf und sind darüber hinaus mutiert im Gen *p53*. HCC1395 ist eine epitheliale Brustkrebszelllinie, die ebenfalls homozygot für Mutationen in *BRCA1* und *p53* ist. Allerdings wiesen die beiden Linien Unterschiede in der mitoseabhängigen RAD50-Lokalisation auf (Abb. 30, A). HCC1395 wie auch die Kontrollzellen (MCF10A) zeigten eine eher diffuse RAD50-Verteilung. Um weiterführend zu analysieren, warum die Brustkrebszelllinie HCC1395 im Vergleich zu der HCC1937 eine diffuse RAD50-Verteilung in der Mitose aufweist, sollte eine funktionelle Charakterisierung von HCC1395 durchgeführt werden.

Hierfür sollte zuerst die Funktionalität der HCC1395 im durch den MRN-Komplex stimulierten ATM-Signalweg geprüft werden. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt, nach 30 min die Lysate aufgearbeitet und der Proteinanteil der MRN-Komplex Proteine (NBN, MRE11 und RAD50) mittels SDS-PAGE und Immunoblot-Analyse densitometrisch evaluiert. Dabei wurden die Werte gegen β -Actin als Standard normalisiert und als relative Einheit ermittelt (RE). Zum Vergleich wurden die epitheliale Brustkrebszelllinie HCC1937 sowie normale Brustepithelzellen (MCF10A) mitgeführt.

Der NBN Proteinlevel der unbehandelten HCC1395 Zellen erschien signifikant reduziert (38 %) ($p=0,004$) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen MCF10A (HCC1395: $0,38 \pm 0,04$ RE; MCF10A: $1,0 \pm 0,005$ RE) (Abb. 32, A, B). Auch nach 6 Gy Bestrahlung zeigte der NBN Proteinlevel in HCC1395 eine signifikante Reduktion ($p=0,004$) ($0,45 \pm 0,04$ RE) im Vergleich zu den bestrahlten Kontrollzellen ($1,1 \pm 0,02$ RE). Es war kein signifikanter Unterschied in NBN zwischen den unbehandelten HCC1395 Zellen und nach 6 Gy Bestrahlung zu erkennen.

Die unbehandelten HCC1937 Zellen wiesen eine geringer ausgeprägte Abnahme ($p=0,02$) von NBN ($0,7 \pm 0,04$ RE) auf 70 % im Vergleich zur Kontrolle auf ($1,0 \pm 0,005$ RE). Mit 6 Gy bestrahlte HCC1937 Zellen zeigten keinen Unterschied im NBN Proteinanteil im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

Unabhängig vom NBN Proteinspiegel konnte eine Phosphorylierung von NBN nach Bestrahlung (6 Gy) in der Kontrollzelllinie (MCF10A) sowie auch in HCC1395 und HCC1937 durch eine elektrophoretische Mobilitätsverzögerung (*mobility shift*) nachgewiesen werden (Abb. 32, A, siehe unbestrahlt und bestrahlt).

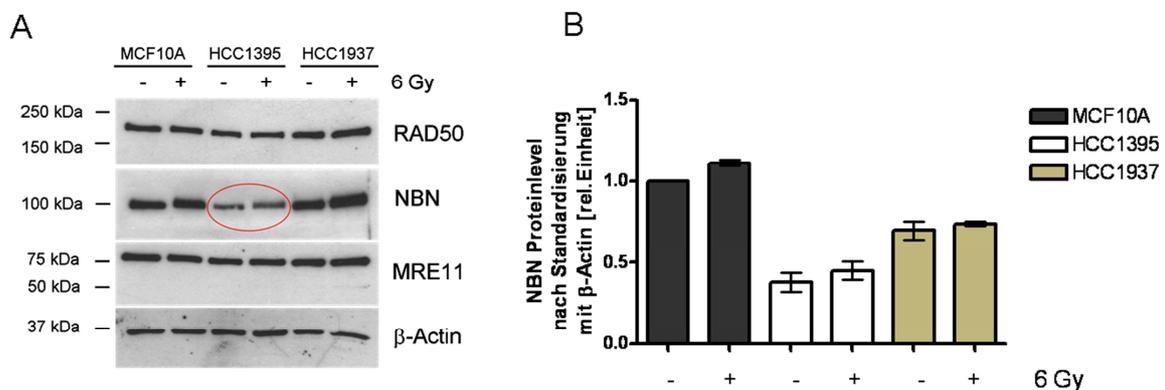


Abbildung 32: Immunoblot-Analyse der MRN-Komplex Proteine in epithelialen Brustkrebszelllinien. (A) HCC1937, HCC1395 und Wildtypzellen (MCF10A) wurden mit 6 Gy bestrahlt, die Lysate 30 min später extrahiert und mittels SDS-PAGE und Immunoblot-Verfahren aufgetrennt. (A) Der Proteinlevel von MRE11, NBN und RAD50 (ab 89) wurde mittels spezifischer Antikörper detektiert. Als Auftragskontrolle diente β -Actin. (B) Analyse der densitometrischen Auswertung der Bandenintensitäten von (A). Die statistische Auswertung erfolgte mittels eines *unpaired* t-test ($N=2$). roter Kreis=NBN Proteinlevel in HCC1395 in unbestrahlten Proben und mit einem Mobilitätsverzögerung nach Bestrahlung mit 6 Gy. - = unbehandelt, + = bestrahlt

Es war eine Verschiebung der NBN Proteinbande nach Bestrahlung im Vergleich zu den unbestrahlten Proben in den Zelllinien zu beobachten. Dies zeigte, dass eine Phosphorylierung von NBN durch die aktivierte ATM-Kinase nach Bestrahlung stattfand.

4.10.2 Sequenzanalyse von *NBN* in HCC1395

Um den molekularen Hintergrund des reduzierten *NBN* Proteinlevels in der Brustkrebszelllinie (HCC1395) im Vergleich zur Kontrolle zu bestimmen, wurde eine Sequenzanalyse von *NBN* in genomischer DNA von HCC1395 Zellen durchgeführt. Die Daten der Sequenzierung wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Thilo Dörk-Bousset (Frauenklinik im Forschungszentrum, Medizinische Hochschule Hannover) durch Fr. Dr. Natalia Bogdanova erhoben und zur Verdeutlichung der Daten dieser Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

In der genetischen Analyse von *NBN* in der Zelllinie HCC1395 konnte die *missense* Mutation p.R215W (c.645C>T) in homozygoter Ausprägung nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigte eine Sequenzanalyse der lymphoblastoiden Zellen der gleichen Brustkrebspatientin (HCC1395 BL) Heterozygotie für die p.R215W Mutation in *NBN* (Abb. 33) (Schröder-Heurich *et al.*, 2013, unter Begutachtung).

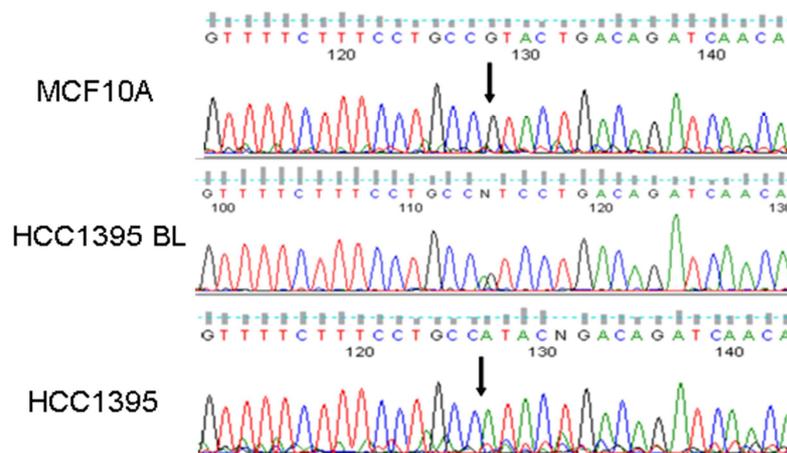


Abbildung 33: Sequenzanalyse von *NBN* in HCC1395. Die genomische DNA aus der epithelialen Brustkrebszelllinie HCC1395 wurde mittels Proteinase K-Verdau und Phenol-Chloroform extrahiert. Die codierende Region von *NBN* wurde mittels *Polymerase-Chain-Reaction* (PCR) mit folgenden Primern amplifiziert: 5'-CCTTTTGAGTGTTCAGATAGTC-3'; 5'-TGAAATACGTTAACAACACTACT-3'. Die PCR-Produkte wurden in einem 3100 Avant Kapilar Sequenzierer sequenziert und mit der Sequencing Analysis 5.1.1 Software analysiert. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen den Bereich des Basenaustauschs in MCF10A und HCC1395.

Das Ergebnis legte nahe, dass es in der HCC1395 im Vergleich zu den lymphoblastoiden Zellen (HCC1395 BL) zu einem Verlust der Heterozygotie kam. Dies wäre das erste identifizierte Modellsystem mit der p.R215W Mutation im homozygoten Status.

4.10.3 Untersuchung der ATM-Schadensantwort in HCC1395

Die zelluläre Schadensantwort wird durch den MRN-Komplex und ATM vermittelt. Um die Auswirkung des reduzierten Proteinlevels und die Funktionalität des NBN Proteins mit der p.R215W Mutation in HCC1395 zu überprüfen, sollte eine Analyse der ATM-vermittelten Schadensantwort durchgeführt werden. Die zelluläre Schadensantwort wird durch den MRN-Komplex und ATM vermittelt. Dabei sollte die ATM-Kinaseaktivität nach verschiedenen Bestrahlungsdosen (0,5, 1, 2, 4, 6 Gy) in HCC1395 Zellen überprüft werden. Die Zellen wurden bestrahlt und die Lysate nach 30 min extrahiert. Nach SDS-PAGE und Immunoblot wurden die Proteinlevel der ATM-Substrate phospho-S966 SMC1, phospho-S824 KAP1 und phospho-S19 Chk2 mittels Antikörpermarkierung auf einer Membran densitometrisch bestimmt. Der Phosphorylierungsstatus von SMC1, KAP1 und Chk2 war bereits in unbehandelten HCC1395 Zellen leicht erhöht, wies jedoch nach Bestrahlung die gleiche Intensität wie die Kontrollzellen auf (Abb. 34).

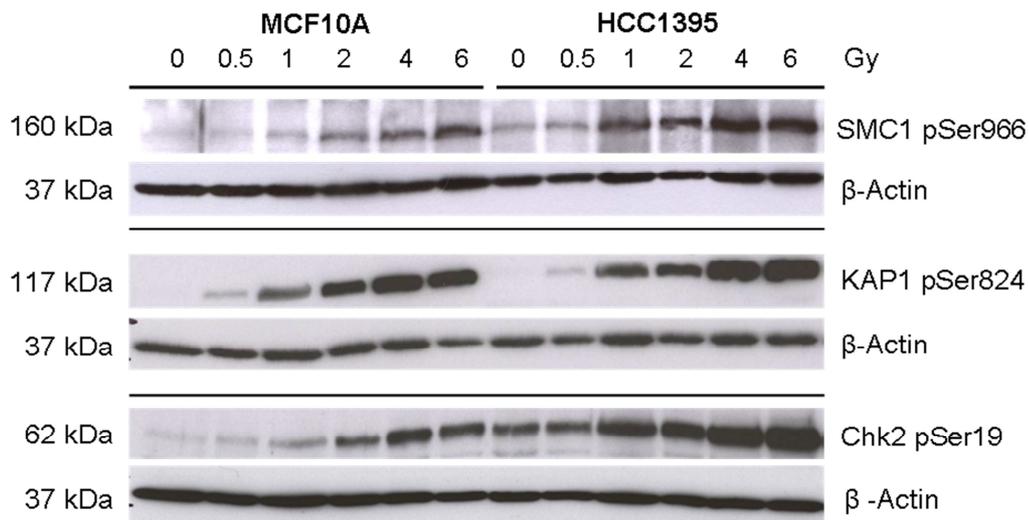


Abbildung 34: Immunoblot-Analyse der ATM-Schadensantwort in HCC1395. (A) HCC1395 und Wildtypzellen (MCF10A) wurden mit 0,5, 1, 2, 4 und 6 Gy bestrahlt, die Lysate 30 min später extrahiert und mittels SDS-PAGE und Immunoblot-Verfahren aufgetrennt. (A) Die Level von phospho-S966 SMC1, phospho-S824 KAP1 und phospho-S19 Chk1 wurden mittels spezifischer Antikörper detektiert. Als Auftragskontrolle diente β -Actin.

Eine dosisabhängige Verstärkung des Phosphorylierungsgrades von SMC1 S966, KAP1 S824 und Chk2 S19 war somit in der Linie HCC1395 gleichermaßen wie in den Kontrollzellen (MCF10A) zu beobachten.

4.10.4 Strahleninduzierte Foci Analyse von γ HA2X, 53BP1 und MDC1 in HCC1395 und HCC1937

4.10.4.1 Induktion von γ HA2X, 53BP1 und MDC1 Foci in HCC1395

Für die Analyse der Radiosensitivität wurden die Brustkrebszelllinien HCC1395 und HCC1937 auf Proteine der zellulären DNA-Schadensreparatursignalkaskade untersucht. Als Kontrolle dienten normale Brustepithelzellen (MCF10A). Die Zellen wurden mit 1,5 Gy und 6 Gy bestrahlt, nach 30 min, 24 h, 48 h fixiert und immunocytochemisch mit spezifischen Antikörpern gegen γ H2AX, 53BP1 und MDC1 markiert. Die Anzahl der Foci wurde quantitativ ausgewertet (Abb. 35).

In der HCC1937 war 30 min nach der Bestrahlung mit 1,5 Gy ein signifikanter Anstieg der γ H2AX Foci ($45,0 \pm 7,3$) im Vergleich zu den unbestrahlten HCC1937 Zellen ($3,0 \pm 0,4$) ($p=0,001$) zu detektieren. Auch 24 h ($7,0 \pm 2,2$) und 48 h ($5,0 \pm 1,8$) nach Bestrahlung war die Anzahl der γ HA2X Foci in den HCC1937 Zellen noch erhöht im Vergleich zur Kontrolle (24 h: $1,0 \pm 0,2$; 48 h: $0,7 \pm 0,2$). Die Analyse von 53BP1 und MDC1 Foci in HCC1937 zeigte, dass es nach Bestrahlung mit 1,5 Gy zu einem Anstieg an Foci nach 30 min kommt. Es konnten im Mittel $39,0 \pm 8,7$ 53BP1 Foci und $46,0 \pm 7,0$ MDC1 Foci pro Zelle detektiert werden. 24 h nach Bestrahlung sank der Anteil der 53BP1 Foci auf $18,0 \pm 4,7$ und die Anzahl der MDC1 Foci auf $27,0 \pm 1,5$. Es zeigte sich jedoch nach 48 h ($11,0 \pm 3,1$ 53BP1 Foci; $22,0 \pm 4,6$ MDC1 Foci) noch ein erhöhter Anteil im Vergleich zur Kontrolle ($6,0 \pm 3,7$ 53BP1 Foci, $0,4 \pm 0,1$ MDC1 Foci). Mit 6 Gy Bestrahlung konnte eine dosisabhängige Verstärkung der Foci Bildung in HCC1937 Zellen beobachtet werden. Die Zellen wiesen 30 min nach Bestrahlung eine mittlere Zahl von $45,0 \pm 7,3$ γ H2AX Foci, $70,0 \pm 17,5$ 53BP1 Foci und $46,0 \pm 7,0$ MDC1 Foci pro Zelle auf. Nach 24 h und 48 h war die mittlere Anzahl der γ H2AX Foci im Vergleich zu der MCF10A signifikant gesunken (24 h: $16,0 \pm 3,2$; $p=0,001$; 48 h: $10,6 \pm 2,5$; $p=0,01$). Auch für 53BP1 und MDC1 Foci konnte eine signifikante Reduzierung (53BP1 Foci $20,0 \pm 6,1$; $p=0,04$; MDC1 Foci $22,0 \pm 4,6$, $p=0,004$) der Foci Anzahl nach 48 h gemessen werden. In HCC1395 konnte dagegen 30 min ($4,0 \pm 1,2$), 24 h ($2,0 \pm 0,6$) und 48 h ($1,0 \pm 0,06$) nach Bestrahlung mit 1,5 Gy kein Anstieg der γ H2AX Foci detektiert werden. 30 min nach Bestrahlung war die Anzahl der γ H2AX im Vergleich zu der Kontrolle ($29,4 \pm 4,3$) signifikant geringer ($p=0,001$). Die MDC1 FociAnalyse in HCC1395 zeigte gleichfalls keinen Anstieg der mittleren Zahl der Foci 30 min ($4,0 \pm 1,4$), 24 h ($2,0 \pm 0,5$) und 48 h ($1,0 \pm 0,2$) nach Bestrahlung mit 1,5 Gy.

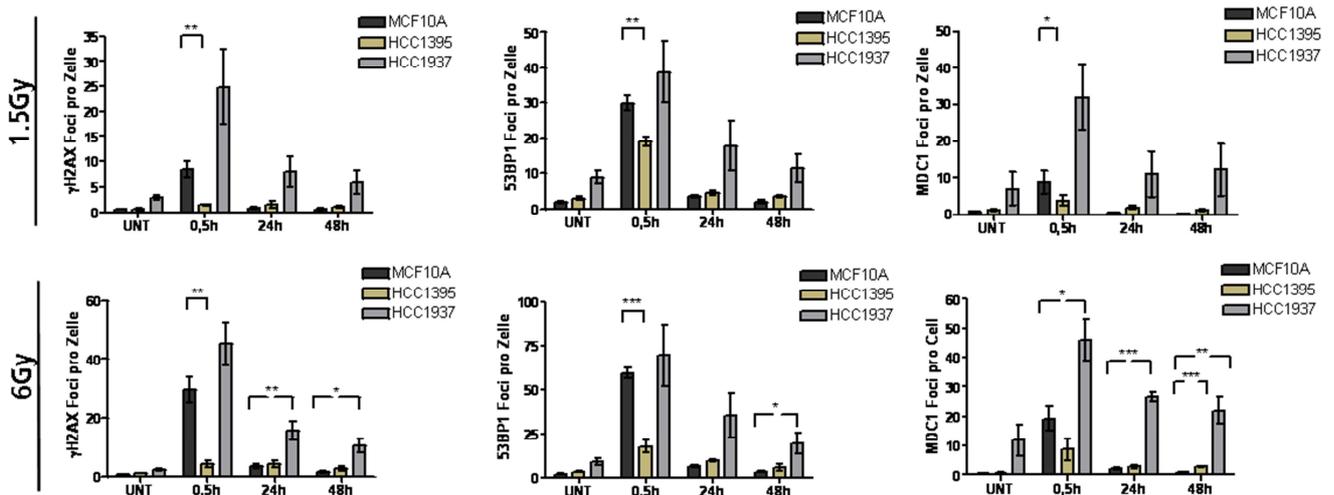


Abbildung 35: Immuncytochemische Analyse der γ H2AX, 53BP1 und MDC1 Foci nach Bestrahlung in HCC1395, HCC1937 und MCF10A. Die Zellen (HCC1395, HCC1937, MCF10A) wurden mit 1,5 Gy (obere Reihe) und 6 Gy (untere Reihe) bestrahlt und nach 0,5 h, 24 h und 48 h immuncytochemisch mit Antikörpern gegen γ H2AX (links) (05-636), 53BP1 (Mitte) und MDC1 (rechts) markiert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels eines *unpaired* t-test an vier unabhängigen Experimenten (N=4). UNT=unbehandelt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Bei der Analyse der 53BP1 Foci konnte ein signifikanter Anstieg ($p = 0,005$) von $19,0 \pm 1,2$ Foci 30 min nach Bestrahlung im Vergleich zur Kontrolle ($30,0 \pm 2,1$) (MCF10A) beobachtet werden.

Eine Bestrahlung mit 6 Gy zeigte eine signifikant ($p = 0,001$) niedrigere Anzahl von γ H2AX ($4,0 \pm 1,2$), 53BP1 ($18,0 \pm 3,6$, $p = 0,0001$) und MDC1 ($9,0 \pm 3,7$) Foci nach 30 min im Vergleich zu der Kontrollzelllinie MCF10A. Auch nach 24 h und 48 h konnte kein Anstieg der Foci von γ H2AX (24 h: $4,0 \pm 1,1$, 48 h: $3,0 \pm 0,8$) 53BP1 (24 h: $10,0 \pm 0,7$; 48 h: $6,0 \pm 1,9$) und MDC1 (24 h: $3,0 \pm 0,6$; 48 h: $3,0 \pm 0,2$) in der HCC1395 detektiert werden.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass nach 1,5 Gy Bestrahlung besonders die HCC1937 Zellen eine erhöhte Zahl an γ H2AX Foci aufwiesen, die mit der Zeit wieder abnahm. In der HCC1395 konnte nach 1,5 Gy nur ein geringer Effekt auf die Zahl der γ H2AX und MDC1 Foci detektiert werden, der nach 0,5 h wieder nachließ.

Vergleichend dazu zeigten alle Zelllinien nach 1,5 Gy Bestrahlung eine erhöhte Zahl an Foci von 53BP1, besonders prominent in der HCC1937.

Eine Bestrahlung mit 6 Gy zeigte eine erhöhte Anzahl an γ H2AX, 53BP1 und MDC1 Foci in HCC1937 und in der Kontrollzelllinie MCF10A. In HCC1395 konnte auch nach 6 Gy Bestrahlung eine erhöhte Anzahl von 53BP1 Foci gemessen werden, die Anzahl der

γ H2AX und MDC1 Foci zeigten vergleichbare Werte zu der Foci Anzahl nach 1,5 Gy Bestrahlung.

Dies zeigte, dass die HCC1937 eine verstärkte Strahlensensibilität aufwies. Die geringe Anzahl der Foci in HCC1395 deuteten auf einen Defekt in der Foci Bildung hin, der mit der *NBN* p.R215W Mutation korreliert.

4.10.4.2 Vermessung der γ HA2X, 53BP1 und MDC1 Foci

Die quantitative Analyse der Anzahl der Reparaturfoci zeigte einen Defekt in der Strahlenantwort der HCC1395 Zelllinie (Abb. 35). Es war bereits bekannt, dass NBN über seine BRCT-Domänen an phosphoryliertes γ H2AX bindet (Kobayashi *et al.*, 2002). Die hier vorgestellte Mutation p.R215W in der Linie HCC1395 liegt zwischen den beiden BRCT-Domänen des NBN Proteins (1.6.2). Ein verringerter NBN Proteinanteil sowie die Präsenz dieser *NBN* Mutation im MRE11-RDA50-NBN-Komplex könnte zu einer verminderten Akkumulation von DNA-Schadensantwortproteinen und somit zu einer geringeren Foci Signalintensität der entsprechenden Foci führen.

Aufgrund der vorliegenden Mutation im *NBN* Gen der HCC1395 Zelllinie (Abb. 33) und des reduzierten NBN Proteinlevels (Abb. 32) sollte mittels hochauflösender mikroskopischer Bildgebung analysiert werden, ob sich die detektierbaren MDC1, γ H2AX und 53BP1 Foci in HCC1395 Zellen in ihrer physikalischen Größe im Vergleich zu der Kontrollzelllinie (MCF10A) unterscheiden.

Die Zellen (HCC1395 und MCF10A) wurden mit 6 Gy bestrahlt, fixiert und immunocytochemisch mit spezifischen Antikörpern gegen γ H2AX, 53BP1 und MDC1 markiert. Die Analyse der Foci Größe wurde mit einem konfokalen Mikroskop und mit der Software ImageJ durchgeführt (3.7.2). Es wurde die Foci Fläche gemessen und der Wert als Fläche der Pixelanzahl ermittelt (FP). Es konnten Foci von γ H2AX, 53BP1 und MDC1 in HCC1395 beobachtet werden, jedoch wiesen die Foci eine diffuse Struktur im Vergleich zu der Kontrolle (MCF10A) auf (Abb. 36, A, B, C).

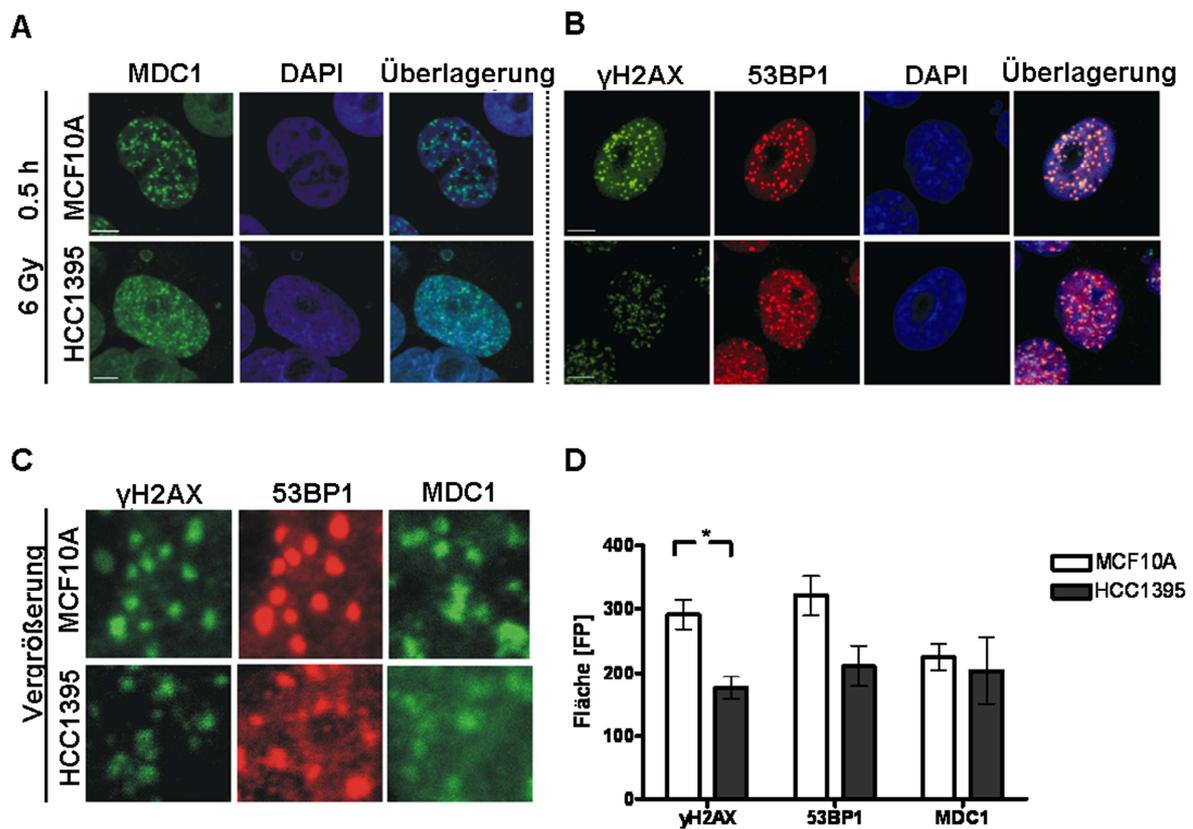


Abbildung 36: Foci Areale von γ H2AX, 53BP1 und MDC1 in HCC1395. HCC1395 Zellen wurden mit 1,5 und 6 Gy bestrahlt und nach 0,5 h immunocytochemisch mit spezifischen Antikörpern gegen γ H2AX (05-636), 53BP1 und MDC1 markiert. Als Kontrolle dienten Wildtypzellen (MCF10A). (A, B) Exemplarische Darstellung der γ H2AX, 53BP1 und MDC1 Foci in HCC1395 und MCF10A Zellen. Messbalken= 5 μ m (C) Vergrößerung von (A, B). (D) Quantitative Auswertung der Foci Durchmesser in HCC1395 und MCF10A.* $p < 0,05$

Die Foci waren kleiner und weniger klar abgegrenzt als die Foci in der Kontrollzelllinie. Eine quantitative Ausmessung der Foci Areale zeigte, dass γ H2AX Foci in HCC1395 Zellen einen signifikant ($p=0,03$) reduzierten Durchmesser ($176,2 \pm 17,3$ FP) im Vergleich zu den γ H2AX Foci der Kontrolle ($290,8 \pm 22,8$ FP) aufwiesen (Abb. 36, D).

Die 53BP1 Foci waren in ihrem Durchmesser kleiner ($210,4 \pm 32,18$ FP) als die 53BP1 Foci in der MCF10A ($321,2 \pm 31,3$ FP). Die Durchmesser der MDC1 Foci wiesen keinen signifikanten Unterschied in der HCC1395 ($203,1 \pm 52,6$ FP) zu den MDC1 Foci in der Kontrolle ($225 \pm 20,6$ FP) auf.

Insgesamt lieferten diese Versuche Evidenz dafür, dass eine Bildung von Reparaturfoci in den *NBN*-mutierten HCC1395 Zellen generell stattfinden kann, die Foci aber deutlich kleiner und diffuser sind als in den Wildtypzellen (MCF10A).

4.10.4.3 NBN Foci Analyse in HCC1395

Bei einer zusätzlichen Analyse sollte die HCC1395 Linie auf ihre Fähigkeit der NBN Foci Bildung untersucht werden. Es wurden HCC1395 Zellen sowie Kontrollzellen (MCF10A) simultan mit 1,5 Gy bestrahlt, nach 3 h Inkubation immunocytochemisch gegen NBN und γ H2AX markiert (Abb. 37) und mittels eines konfokalen Mikroskops die Foci detektiert. Dabei war zu beobachten, dass in der Kontrolle nach Bestrahlung NBN und γ H2AX Foci detektierbar waren, die colokalisiert vorlagen. In der HCC1395 Linie konnten im Vergleich dazu kleinere γ H2AX Foci nachgewiesen werden, NBN Foci waren jedoch nicht detektierbar.

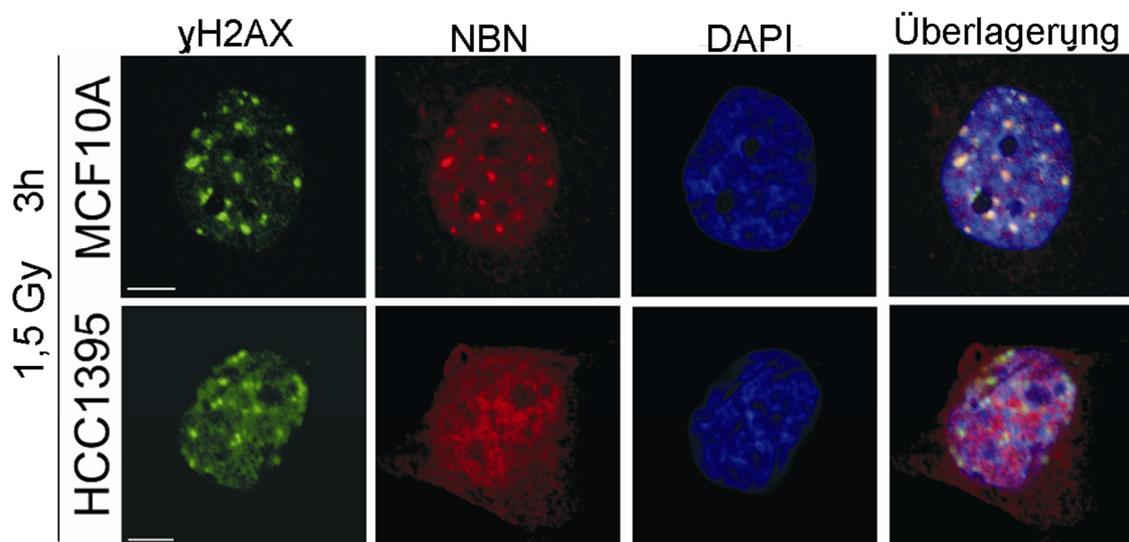


Abbildung 37: Immunocytochemische Analyse der NBN Foci in HCC1395 und MCF10A nach Bestrahlung. Die Zellen (HCC1395, MCF10A) wurden mit 1,5 Gy bestrahlt, 3 h inkubiert und immunocytochemisch mit einem anti γ H2AX Antikörper (05-636) und einem anti NBN Antikörper markiert. Messbalken= 5 μ m. N=3

Dies zeigte, dass der reduzierte NBN Proteinlevel sowie die p.R215W Mutation in der HCC1395 Linie zu einem Defekt in der Akkumulation des residualen NBN Proteins in Reparaturfoci führten.

5 Diskussion

5.1 Die ATR-vermittelte Schadensantwort in der NBS-like disorder

5.1.1 Relevanz von RAD50 für die Aktivierung des ATR-Signalweges

Proteine der DNA-Schadensreparatur spielen eine wesentliche Rolle im Erhalt der genomischen Integrität und sind daher von besonderer Relevanz für die Zelle. Der MRE11-RAD50-NBN (MRN)-Komplex ist essentiell für die Erkennung und Bindung eines DNA-Doppelstrangbruches (1.6). Eine Defizienz in einem der Proteine dieses Komplexes kann dementsprechend schwerwiegende Auswirkungen auf die korrekte Reparatur von DNA-Schäden und somit auf den gesamten Organismus haben. Im Rahmen dieser Dissertation sollten mehrere Fragestellungen bezüglich der Rolle und Relevanz des RAD50 Proteins untersucht werden. Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Relevanz des RAD50 Proteins im ATR-Signalweg. Anhand von RAD50-defizienten Zellen konnte eine Interaktion des ATR- und ATM-Signalweges belegt werden. Darüber hinaus konnte eine Assoziation zwischen RAD50 und einem Defekt in der Chromosomensegregation gezeigt werden.

Eine Aktivierung des ATR-Signalweges erfolgt durch einzelsträngige DNA-Intermediate, die bei der DNA-Replikation, der Einwirkung durch UV-Licht oder chemische Agenzien wie Hydroxyharnstoff (HU) entstehen können (Stiff *et al.*, 2006, Ward *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass RAD50-defiziente Zellen einen Defekt in der ATR-vermittelten Phosphorylierung von H2AX nach HU-Behandlung aufwiesen (4.1.1, Abb. 14, B). Die verlängerte Inkubation mit HU führte zu einer ATM-abhängigen H2AX Phosphorylierung (Abb. 14, D). Der eingesetzte Inhibitor der ATM-Kinase, KU-55933, ist bei einer Konzentration von 10 μM für ATM spezifisch (Hickson *et al.*, 2004). Darüber hinaus konnte mit einem apoptotischen Marker nachgewiesen werden, dass die RAD50-defizienten Zellen einen erhöhten Anteil von Apoptose aufzeigten (Abb. 14, E, F).

Diese Beobachtungen führen zu der Annahme, dass RAD50 eine relevante Rolle in der Aktivierung des ATR-Signalweges spielt. In früheren Studien konnte bereits eine Interaktion des ATM- und ATR-Signalweges belegt werden (Lin und Dutta, 2007, Stiff *et al.*, 2006, Stiff *et al.*, 2008). Studien in *Saccharomyces cerevisiae* haben eine Rolle des MRX (Xrs2, homolog zu humanen NBN) Komplexes in der HU-vermittelten Aktivierung des ATR-Signalweges belegen können (D'Amours und Jackson, 2001, Chahwan *et al.*, 2003). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Defizienz von MRE11 zur Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen während der DNA-Replikation in *Xenopus* führte

(Costanzo *et al.*, 2001). Dies weist darauf hin, dass der MRN-Komplex bei den durch Replikationsstress entstandenen Läsionen im Kontext des DNA-Doppelstrangbruchreparaturweges agiert. Bei Auftreten zu großer DNA-Schäden kann eine ATM-vermittelte Apoptose der Zellen eingeleitet werden, wobei es zu einer Phosphorylierung von H2AX an Ser139 kommt (Rogakou *et al.*, 2000). Weitere Untersuchungen mit einem ATR-Inhibitor könnten zusätzlich belegen, dass die in dieser Arbeit beobachtete H2AX Phosphorylierung ATM- und nicht ATR-abhängig ist. Ferner bleibt dabei zu klären, warum in der Wildtypzelllinie nach 6 HU-Inkubation kein Anteil des apoptotischen Markers *cleaved* PARP zu detektieren war. Zusätzliche Immunoblot-Analysen und eine verlängerte Expositionszeit des Filmes könnten belegen ob der apoptotische Marker auch in der Wildtypzelllinie zu detektieren ist.

Der Defekt in der ATR-abhängigen Phosphorylierung von H2AX führte zu der Frage, ob RAD50 eine Rolle in der Signalverstärkung des ATR-Signalweges einnimmt oder auch für die Aktivierung relevant ist. Waltes *et al.*, (2009) konnten eine verminderte Chk1 Phosphorylierung nach HU-Induktion in RAD50-defizienten Zellen nachweisen, was für eine funktionelle Relevanz von RAD50 in der Signalverstärkung im ATR-Signalweg spricht. Alternativ ist die Restfunktion des RAD50 Proteins für die residuale ATR-Aktivierung und Chk1 Phosphorylierung hinreichend. Ferner bleibt zu klären, ob der Defekt in der ATR-vermittelten H2AX Phosphorylierung durch die Defizienz von RAD50 bedingt ist.

In RAD50-defizienten Zellen konnte ein reduzierter Proteinlevel von NBN (20 % - 40 %) nachgewiesen werden (Waltes *et al.*, 2009). Der in dieser Arbeit beobachtete Defekt der H2AX Phosphorylierung in den RAD50-defizienten Zellen könnte daher auch durch den verminderten NBN Proteingehalt verursacht sein. Diese Hypothese wird durch eine ähnliche Untersuchung gestützt, bei der gezeigt werden konnte, dass NBN für die vollständige Phosphorylierung der ATR-Substrate Chk1 und p53 relevant ist (Stiff *et al.*, 2005). NBN-defiziente Zellen wiesen genau wie ATR-defiziente Zellen einen Defekt in der Aktivierung des UV-induzierten G2/M-Kontrollpunktes auf. Im Gegensatz dazu zeigten ATM- oder MRE11-defiziente Zellen keinen Defekt in der Aktivierung des ATR-Signalweges (Stiff *et al.*, 2005). Dies steht im Gegensatz zu einer aktuellen Untersuchung in *Xenopus Oocyten*, in der gezeigt wurde, dass der MRN-Komplex für die Aktivierung des ATR-Signalweges benötigt wird (Duursma *et al.*, 2013). Duursma *et al.* (2013) berichten, dass der MRN-Komplex eine Rolle in der Rekrutierung von TOPBP1 spielt. TOPBP1 interagiert mit dem ATR-ATRIP-Komplex und wird für die Phosphorylierung

von Chk1 benötigt. Die Hypothese, dass RAD50 relevant für die Aktivierung des ATR-Signalweges ist, wird durch diese verschiedenen Studien unterstützt, die zeigen konnten, dass NBN sowie auch der MRN-Komplex in den ATR-Signalweg involviert sind. Weiterführende Untersuchungen in RAD50 *knock-down* Zellen mit normalem NBN Proteinlevel könnten Aufschluss über die Abhängigkeit von RAD50 in der ATR-vermittelten H2AX Phosphorylierung und im ATR-Signalweg geben. Ferner bleibt dabei zu klären, welche funktionelle Aufgabe RAD50 im ATR-Signalweg übernimmt. Ein Aufschluss der Rolle von RAD50 im ATR-Signalweg könnte beitragen zu klären, warum eine Defizienz von RAD50 eine andere phänotypische Auswirkung in der Aktivierung des ATR-Signalweges aufweist als MRE11-defiziente Zellen.

5.1.2 Relevanz von RAD50 für die Aktivierung des G2/M-Kontrollpunktes

Im Gegensatz zu NBS- (Stiff *et al.*, 2005) und ATR-defizienten Zellen konnte in dieser Arbeit in den RAD50-defizienten Zellen kein Defekt im G2/M-Zellzykluskontrollpunkt nachgewiesen werden (4.1.2, Abb. 15). Durch die Induzierung eines DNA-Schadens mittels UV-Licht kommt es primär zu einer Aktivierung des ATR/Chk1-Signalweges, der wiederum zu einer Aktivierung des G2/M-Kontrollpunktes führt. Eine Aktivierung des G2/M-Kontrollpunktes kann sekundär zu einem späteren Zeitpunkt auch durch den ATM/Chk2-Signalweg erfolgen, wobei die ATM-Aktivierung dabei ATR-abhängig ist (Stiff *et al.*, 2006). Stiff *et al.* (2006) konnten weiterhin belegen, dass eine verminderte Chk1-Kinaseaktivität keinen Defekt in der Aktivierung des G2/M-Kontrollpunktes hervorruft. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Verlust der ATM-Kinaseaktivität oder der Chk1- und Chk2-Funktion allein keinen Einfluss auf den G2/M-Kontrollpunkt hat, wobei der kombinierte Verlust von Chk1 und Chk2 zu einem Defekt in der Aktivierung des G2/M-Kontrollpunktes führte (Stiff *et al.*, 2006). Dies spricht dafür, dass der verminderte Level von phosphoryliertem Chk1 in den RAD50-defizienten Zellen (Walters *et al.*, 2009) ausreichend für eine vollständige Aktivierung des G2/M-Kontrollpunktes nach UV-Licht-Behandlung ist. Darüber hinaus deutete dies darauf hin, dass die Rolle von RAD50 im ATR-Signalweg bifunktionell relevant sein könnte, da eine HU-Induktion zu einem Defekt in der Aktivierung des ATR-Signalweges (4.1.1., Abb. 14, Walters *et al.*, 2009) führte, eine UV-induzierte Aktivierung des ATR-Signalweges jedoch keinen Defekt aufweist (4.1.2, Abb. 15). Einzelsträngige DNA-Bereiche entstehen nach UV-Läsionen über die Basenexzisionsreparatur, nach Hydroxyharnstoff jedoch durch eine

polymerase stalling (Okano *et al.*, 2000, Barnes und Lindahl, 2004, Koc *et al.*, 2004). Eine möglicherweise unterschiedliche Rolle von RAD50 in beiden Situationen müsste in Folgeexperimenten durch eine parallele Versuchsdurchführung mit gleichen Endpunkten analysiert werden.

5.1.3 Eine RAD50-Defizienz führt zu einer Aberration der Centrosomenanzahl

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Auswirkung des *RAD50* Defekts auf die Centrosomenanzahl nachgewiesen werden (Abb. 16). Eine Aberration der Centrosomenanzahl und die damit verbundene Bildung multipolarer Spindeln konnte bereits in Zellen mit Defekten in *BRCA2* und *ATR* beobachtet werden (Alderton *et al.*, 2004, Meraldi *et al.*, 2002, Daniels *et al.*, 2004). Eine Centrosomenaberration ist mit chromosomaler Instabilität und mit einer abnormalen Cytokinese verbunden und wird mit der Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht (Normand und King, 2010). Eine erhöhte Centrosomenanzahl kann zu einem frühzeitigen Zelltod während der Entwicklung führen, was eine mögliche Erklärung für die klinischen Charakteristika des Nijmegen Breakage Syndrom und der *NBS-like disorder* wie mentale Retardierung, Mikrozephalie und die Wachstumsstörung sein kann (Alderton *et al.*, 2004). Es wurde bereits darüber berichtet, dass manche Formen einer hereditären Mikrozephalie wahrscheinlich durch eine defekte Expression von centrosomalen Proteinen verursacht werden (Shimada und Komatsu, 2009). Das Centrosom ist ein wichtiges Zellorganell, das während des Zellzyklus dupliziert und dann während der Mitose auf zwei Tochterzellen aufgeteilt wird (Shimada und Komatsu, 2009). Obwohl der Mechanismus der Centrosomenduplikation noch nicht abschließend erforscht ist, konnte bereits gezeigt werden, dass Proteine der DNA-Schadensreparatur eine Rolle in der Regulation der Centrosomenanzahl übernehmen. Eine centrosomale Lokalisation konnte unter anderem für ATM, ATR, NBN und BRCA1 gezeigt werden (Shimada und Komatsu, 2009). Es wird angenommen, dass ATM die Centrosomenanzahl über Zellzykluskontrollpunkte regulieren kann (Zhang *et al.*, 2007, Bourke *et al.*, 2007). Eine siRNA-vermittelte Reduktion von ATM führte dabei zu einer Unterdrückung der Centrosomenduplikation (Shimada und Komatsu, 2009), wogegen siRNA-vermittelte ATR-Defizienz zu einer erhöhten Anzahl von Centrosomen führte (*supernumerary centrosomes*) (Collis *et al.*, 2008). Die in dieser Arbeit beobachtete erhöhte Centrosomenanzahl entspricht mehr dem zellulären Phänotyp einer siRNA-vermittelten ATR-Defizienz als der einer ATM-Defizienz. Dabei bleibt zu klären, ob

RAD50 über eine Interaktion mit ATR einen Einfluss auf die Centrosomenanzahl hat. Eine Interaktion von NBN und ATR, die eine BRCA1-vermittelte Ubiquitinierung von λ -Tubulin bewirkt, konnte bereits beobachtet werden (Shimada *et al.*, 2009). Weiterführende Studien sind daher von besonderer Relevanz für die Klärung der Rolle der verschiedenen DNA-Schadensantwortproteine bei der centrosomalen Stabilität und der damit verbundenen humanen Erkrankungen.

5.2 Einfluss von RAD50 auf Chromatin-Brücken

5.2.1 Lokalisation und Schutzfunktion von RAD50 auf Chromatin-Brücken

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von RAD50 auf die Chromosomensegregation untersucht. Die RAD50-defiziente Zelllinie zeigte einen durch die Bestrahlung induzierten Defekt in der Ausbildung von Chromatin-Brücken, wogegen die Ausbildung der Chromatin-Brücken in den Kontrollzellen erhöht war (4.2, Abb. 17). Bei der immunocytochemischen Untersuchung von RAD50 in bestrahlten Zellen konnte eine spezifische Lokalisation von RAD50 auf den Chromatin-Brücken nachgewiesen werden (Abb. 17, D, E). Die Lokalisation von RAD50 auf den Brücken zeigte entweder eine punktuelle Verteilung, die sich über die gesamte Brücke erstreckte, oder RAD50 war lokalzentriert im Zentrum der Chromatin-Brücke zu detektieren (Abb. 17, D, E). Zusätzlich konnte durch Behandlung mit DNase gezeigt werden, dass RAD50 auf den Brücken chromatingebunden vorliegt (Abb. 17, G).

Ein siRNA-vermittelter *knock-down* des endogenen RAD50 Proteins in murinen NIH3T3 Zellen führte zu einer Abnahme an Chromatin-Brücken (4.3, Abb. 18, A). Der reduzierte RAD50 Proteinlevel in den NIH3T3 Zellen ähnelte dabei der Situation des Proteinlevels von RAD50 in der RAD50-defizienten Zelllinie. Dieses Experiment bestätigte daher modellübergreifend eine entscheidende Rolle von RAD50 für die Bildung und/oder Stabilität von Chromatin-Brücken.

Die korrekte Segregation von Chromosomen in der Mitose ist ein bedeutsamer Mechanismus für die korrekte Weitergabe der Erbinformation in einer Zelle. In verschiedenen humanen Tumorzellen konnten bereits Defekte in Proteinen, die in der Chromosomensegregation eine Rolle spielen, nachgewiesen werden (de Castro *et al.*, 2007). Ein Defekt in der korrekten Aufteilung der Chromosomen kann zur Ausbildung von Chromatin-Brücken und Aneuploidie, der numerischen Chromosomenaberration, führen. Aneuploidie ist ein häufig beobachtetes Merkmal in Krebszellen, wobei bislang noch nicht

hinreichend geklärt ist, ob sie eine Ursache oder eine Konsequenz von Krebs ist (Sen, 2000).

Die Auswirkung des RAD50 Proteinlevels auf die Bildung von Chromatin-Brücken führt zu der Annahme, dass möglicherweise ein Zusammenhang in dem Bildungsmechanismus der Chromatin-Brücken und der Proteinfunktion von RAD50 besteht. Die Bildung von Chromatin-Brücken ist ein relativ seltenes Ereignis, konnte aber einheitlich in verschiedenen Säugetierzellen mit cytokinetischem Defekt nachgewiesen werden (Naim und Rosselli, 2009, Huang *et al.*, 2008). Die Auswirkungen auf die Zellen, die durch eine Chromatin-Brücke verbunden sind, sind mannigfaltig. Die Zellen können fusionieren und multinukleär werden oder in die Apoptose gehen. Des Weiteren kann die Brücke aufgrund von Zellmigrationskräften brechen, was mit einem Verlust von genetischem Material einhergeht (Huang *et al.*, 2008). Chromatin-Brücken entstehen durch eine fehlerhafte Segregation von Schwesterchromatiden während der Mitose (Hoffelder *et al.*, 2004) und führen zu einer abnormalen Cytokinese. Rozier *et al.* (2013) berichteten darüber, dass der MRN-Komplex für eine korrekte Chromosomensegregation benötigt wird. Darüber hinaus weisen verschiedene Studien darauf hin, dass die Regulation der Cytokinese mit Proteinen der DNA-Schadenssignalkaskade verbunden ist (Vinciguerra *et al.*, 2010, Daniels *et al.*, 2004). Die Involvierung der DNA-Schadenssignalkaskade, insbesondere von RAD50 in der abnormalen Cytokinese, könnte eine wichtige Rolle in der Unterdrückung der Abtrennung der beiden Tochterzellen haben, wenn DNA in der Teilungsebene vorhanden ist (Normand und King, 2010).

5.2.2 Rolle des ATM-Signalweges in der Ausbildung von Chromatin-Brücken

In früheren Studien wurde berichtet, dass ein Defekt in der homologen Rekombinationsreparatur (HRR) und eine ATM-Defizienz zu einem erhöhten Anteil an Chromatin-Brücken führt (Acilan *et al.*, 2007, Huang *et al.*, 2008). Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine ATM-Inhibition zu einer Verringerung der Zellen mit strahleninduzierten Chromatin- und RAD50-Brücken (Chromatin-Brücke mit RAD50-Lokalisation) führte (4.3, Abb. 18, C).

Dies deutet darauf hin, dass die Kinasefunktion von ATM eine wesentliche Rolle in der Bildung der Chromatin-Brücken spielt. Alternativ könnten auch die Stabilität oder die Auflösung der Brücken durch ATM reguliert werden. Die Relevanz von ATM für die Ausbildung oder den Erhalt der Brücken könnte durch eine Phosphorylierung von RAD50

bedingt sein. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die strahleninduzierte Phosphorylierung von RAD50 am Serin 635 durch die ATM-Kinase essentiell für die Zellzykluskontrolle und die DNA-Reparatur ist (Gatei *et al.*, 2011). RAD50-defiziente Zellen, die einen moderaten Defekt im ATM-Signalweg aufweisen, zeigten einen erhöhten Level an Chromosomenaberrationen (Waltes *et al.*, 2009, Gatei *et al.*, 2011). Transduktion von Wildtyp *RAD50* in die RAD50-defiziente Zelllinie zeigte einen reduzierten basalen Level von Chromosomenaberrationen vergleichbar mit der Wildtypzelllinie (Gatei *et al.*, 2011). Gatei *et al.* konnten zusätzlich belegen, dass RAD50-defiziente Zellen einen Defekt in der homologen Rekombinationsreparatur und der Nicht-Homologen-Endverknüpfung aufweisen. Dies zeigte, dass die Phosphorylierung von RAD50 essentiell ist für die Reparatur von DNA-Schäden sowie auch als *downstream* Effektor für weitere Proteine der DNA-Schadensreparatur. Die Beobachtung in dieser Arbeit, dass die ATM-Kinase ein entscheidender Faktor für die Ausbildung von Chromatin-Brücken ist, bestätigt dies. Da ATM in verschiedenen Signal- und Reparaturwegen eine essentielle Rolle spielt sollte weitergehend untersucht werden inwiefern eine ATM-Inhibierung eine Reduktion von Chromatin-Brücken bewirkt.

5.2.3 Repräsentiert RAD50 DNA-Doppelstrangbrüche auf Chromatin-Brücken?

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass RAD50-defiziente Zellen einen erhöhten Grundgehalt an Chromatin-Brücken im Vergleich zu den Kontrollzellen aufwiesen. Die Einwirkung ionisierender Strahlen bewirkte keine signifikante Zunahme an Brücken in der RAD50-defizienten Zelllinie (4.2, Abb. 17, B). Bislang wurde angenommen, dass Chromatin-Brücken durch fehlerhaft oder nicht-reparierte DNA-DSB entstehen (Acilan *et al.*, 2007). Die Lokalisationsanalyse der beiden Interaktionspartner von RAD50, MRE11 und NBN, zeigte, dass diese nicht auf den Chromatin-Brücken detektierbar waren (Abb. 19, A). Dies macht es unwahrscheinlich, dass RAD50 auf den Chromatin-Brücken DNA-DSB repräsentiert, denn die Erkennung von DSB erfolgt nach bisherigem Kenntnisstand durch den MRN-Komplex. Eine singuläre Funktion von RAD50 in der Bindung von DNA-DSB ohne seine Komplexpartner MRE11 und NBN ist bislang nicht bekannt. In der Vergangenheit konnte jedoch gezeigt werden, dass RAD50 in chromatingebundenem oder freiem Status ohne MRE11 agieren kann (Hopfner *et al.*, 2000). RAD50, als Protein der SMC-Familie, kann aufgrund seiner molekularen Struktur als Dimer vorliegen und freie DNA-Enden in naher räumlicher Distanz zusammenhalten (Tittel-Elmer *et al.*, 2012)

wobei Bereiche bis zu 100 nm überbrückt werden können (van der Linden *et al.*, 2009). Die Lokalisation von RAD50 auf den Chromatin-Brücken könnte durch einen doppelstrangbruchunabhängigen Mechanismus erklärt werden. Dies wird dadurch unterstützt, dass weitere Proteine der DNA-Schadensantwort wie MDC1, SMC1 und BLM nicht auf den Chromatin-Brücken nachgewiesen wurden (Abb. 19, B, C).

Bei der Untersuchung der Doppelstrangbruchmarker γ H2AX und 53BP1 konnte zwar eine Verteilung auf den Chromatin-Brücken detektiert werden (Abb. 20, A). Die Überprüfung einer Colokalisation von γ H2AX und RAD50 zeigte jedoch, dass beide Proteine nicht in den gleichen Bereichen der Brücken vorkamen. Dies unterstützt die Hypothese, dass die RAD50-Lokalisation auf den Brücken keine DNA-Doppelstrangbrüche repräsentiert.

Die Abwesenheit von MRE11 und NBN sowie weiterer DNA-Schadensreparaturproteine auf den Chromatin-Brücken könnte auch durch den Ort der Entstehung des DNA-Schadens erklärbar sein. Goodarzi *et al.* (2009) konnten zeigen, dass die Reparatur von DNA-DSB in Heterochromatin mit einer langsameren Kinetik vonstattengeht als die Reparatur von DSB in Euchromatin. Heterochromatin ist aufgrund seiner dicht gepackten Struktur weniger zugänglich für die ATM-vermittelte Reparatur von DSB, was auch ein Grund dafür ist, dass γ H2AX Foci nur an der Peripherie von Heterochromatin beobachtet werden konnten (Goodarzi *et al.*, 2009). Eine Untersuchung der Lokalisationsfähigkeiten von RAD50 an DSB in Heterochromatinbereichen wurde bislang noch nicht untersucht. Um zu beantworten, ob RAD50 solche DNA-Doppelstrangbrüche auf den Chromatin-Brücken repräsentiert, die in Heterochromatinbereichen der DNA entstanden sind, könnten zusätzliche Analysen der RAD50-Lokalisation nach Bestrahlung in Eu- und Heterochromatinbereichen durchgeführt werden.

Ferner ist die immuncytochemische und zeitliche Auflösung ein weiterer limitierender Faktor der Detektionsgrenze von Proteinen auf den Chromatin-Brücken. Eine signalintensive Lokalisation von Proteinen benötigt die Akkumulation mehrerer tausend Proteinmoleküle. Die maximale Akkumulation von Proteinen der DNA-Schadensantwort konnte bereits 3 Minuten nach DNA-Schädigung als Foci an DNA-DSB nachgewiesen werden (Löbrich *et al.*, 2010), wobei die Foci der verschiedenen Proteine sich in ihrer Größe und lokal-abgegrenzten Struktur ähneln, sich aber dennoch immuncytochemisch in ihrer Signalintensität und Diffusität unterscheiden. Die Analyse von NBN, MRE11, SMC1, MDC1 und BLM auf Chromatin-Brücken könnte aufgrund einer zu geringen Anzahl von Proteinmolekülen unter der visuellen Detektionsgrenze liegen. Gegenwärtig ist auch noch nicht erforscht, ob der visuelle immuncytochemische Verlust von Foci zeitlich direkt mit

dem finalen Schritt der Reparatur korreliert oder ob eine zeitliche Differenz von 1-2 Stunden besteht (Löbrich *et al.*, 2010). Eine Analyse mittels Zeitrafferaufnahmen von fluoreszenzmarkierten Proteinen könnte belegen, ob zu früheren Zeitpunkten bei der Ausbildung der Chromatin-Brücke in der Mitose DNA-Schadensreparaturproteine auf den Brücken detektierbar wären.

5.2.4 Wird RAD50 für die Stabilisierung und Auflösung von Chromatin-Brücken benötigt?

Die korrekte Aufteilung der Chromosomen in der Mitose benötigt Proteine des Cytoskeletts und des Chromosomalen *Passenger* Komplexes (CPK). Proteine des Chromosomalen *Passenger* Komplexes, wie Aurora B, assoziieren mit den Chromosomen in der Mitose und sind für den cytokinetischen Progress der Zelle verantwortlich (Vagnarelli und Earnshaw, 2004, Wadsworth, 2005). Funktionsstörungen der Proteine des CPK führten zu Segregations- und Cytokinesedefekten, weshalb der CPK auch als zentrale Schnittstelle zwischen der Chromosomensegregation und der Cytokinese angesehen wird (Terada, 2001).

Die Lokalisation von RAD50 auf den Chromatin-Brücken (4.2, Abb. 17) führte zu der Frage, ob RAD50 eine Relevanz im cytokinetischen Progress der Zellen mit einer Chromatin-Brücke hat. Eine Lokalisationsanalyse von RAD50 in der abnormalen Cytokinese zeigte eine Colokalisation mit alpha-Tubulin und Aurora B (4.5, Abb. 21, A, B). Es war eine zentrierte Lokalisation von RAD50 in den cytokinetischen Phasen der Abtrennung und am *Midbody* Rest zu detektieren. In Interphase-Zellen zeigte RAD50 eine punktierte Verteilung, die sich über den gesamten Bereich der Chromatin-Brücke erstreckte. Dies deutet darauf hin, dass RAD50 eine wesentliche Rolle bei der Stabilisierung oder Auflösung der Chromatin-Brücke während der abnormalen Cytokinese einnimmt.

Eine Interaktion mit Proteinen des Cytoskeletts und Proteinen der DNA-Schadensreparatur ist naheliegend, da eine erfolgreiche Chromosomensegregation das Cytoskeletton benötigt (Gerisch *et al.*, 2004). In der Vergangenheit konnte bereits eine Colokalisation von cytoskeletalen Proteinen mit BRCA2 beschrieben werden (Daniels *et al.*, 2004). Ferner wurde bereits eine Korrelation zwischen DNA-Schadensantwortproteinen und der Regulation der Cytokinese beobachtet. Es konnte eine Assoziation von Septin und rad53, welches eine Rolle in der Stabilisierung von arretierten Replikationsgabeln einnimmt

(Szyjka *et al.*, 2008), in *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt werden (Smolka *et al.*, 2006). Die Rolle des humanen Chk2 (homolog zu rad53) ist in der Mitose und Cytokinese derzeit Gegenstand aktueller Forschung (Sato *et al.*, 2010, Chouinard *et al.*, 2013).

In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass cytokinetische Zellen mit einer Chromatin-Brücke eine Verzögerung in der Abtrennungsphase der Cytokinese aufweisen (Steigemann *et al.*, 2009). Der molekulare Mechanismus, ob Chromatin-Brücken während der Cytokinese stabilisiert oder aufgelöst werden können, ist bislang weitgehend unerforscht. Steigemann *et al.* (2009) konnten zeigen, dass die zeitliche Verzögerung der Cytokinese durch eine verlängerte Kinaseaktivität von Aurora B gesteuert wird. Aufgrund der Aurora B-Kinaseaktivität kommt es zu einer Stabilisierung der interzellulären Brücke zwischen den beiden Tochterzellen durch Aktin-Moleküle. In *Saccharomyces cerevisiae* Zellen konnte gezeigt werden, dass Chromatin in der *Midbody* Region zu einer Inhibierung der frühzeitigen Abtrennung führt (Norden *et al.*, 2006).

Die Colokalisation von RAD50 und Aurora B auf den Chromatin-Brücken kann demnach in direktem Zusammenhang mit der Stabilisierung oder der Auflösung der Brücken stehen. Aufgrund der molekularen Struktur von RAD50 könnte eine Stabilisierung der DNA stattfinden, indem freie DNA-Enden zusammengehalten werden. Die nachgewiesene Interaktion der beiden Proteine mit Hilfe des *Proximity Ligation Assays* unterstützt diese Hypothese. Damit konnte eine räumliche Nähe und Interaktion von RAD50 und Aurora B in abnormal cytokinetischen und Interphase-Zellen *in situ* nachgewiesen werden (Abb. 22). Eine mögliche Erklärung der Interaktion in Interphase-Zellen wäre eine temporäre Interaktion des RAD50 Proteins mit Aurora B, die sich im Progress bei der Ausbildung einer Chromatin-Brücke bis zur abnormalen Cytokinese fortsetzt. Aurora B ist ein nukleäres Protein, welches in Interphase-Zellen jedoch auch cytoplasmatisch vorkommt (Rannou *et al.*, 2008). In der Pro-/Metaphase lagert sich Aurora B als Teil des Chromosomalen *Passenger* Komplexes an das Chromatin an und stabilisiert die zentrale Spindel in der Ana- und Telophase der Mitose (Terada, 2001).

Eine Interaktion von Aurora B und RAD50 könnte bei der Ausbildung einer Chromatin-Brücke während der Mitose relevant sein. Dabei führt dies zu der Frage, ob RAD50 auch ein Phosphorylierungssubstrat von Aurora B sein könnte. Eine ATM-abhängige Phosphorylierung von RAD50 an Ser635 konnte bereits im Zusammenhang der Zellzykluskontrolle festgestellt werden (Gatei *et al.*, 2011). Eine Phosphorylierung durch Aurora B-Kinase ist jedoch nicht bekannt. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit eine Colokalisation von RAD50 und pH3 in der abnormalen Cytokinese festgestellt werden

(4.6.1, Abb. 24). pH3 ist ein Phosphorylierungssubstrat von Aurora B (Crosio *et al.*, 2002), sodass nicht ausgeschlossen ist, dass die beobachtete räumliche Nähe zwischen RAD50 und Aurora B-Kinase indirekt über pH3 vermittelt sein könnte. Weiterführende Untersuchungen zur Phosphorylierung von RAD50 oder eine Behandlung mit einem Aurora B-Inhibitor wären daher von besonderem Interesse.

Aufgrund der erzielten Ergebnisse in dieser Arbeit konnte erstmals eine Interaktion von Proteinen des Chromosomalen *Passenger* Komplexes und DNA-Reparaturproteinen in der abnormalen Cytokinese bestätigt werden. Es bleibt noch zu klären, ob RAD50 auch mit weiteren Proteinen des Chromosomalen *Passenger* Komplexes interagiert.

5.2.5 Zellzyklusprogression von Zellen mit einer RAD50-Brücke

Ionisierende Strahlen und die damit verbundenen DNA-Schäden bewirken eine Aktivierung der Zellzykluskontrollpunkte und führen zu einem Arrest der Zelle, bis die entstandenen DNA-Schäden repariert sind. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der Zellen mit einer RAD50-Brücke (Chromatin-Brücke mit RAD50-Lokalisation) dennoch aktiv DNA replizieren (4.7, Abb. 27). Dies wurde durch den Einbau von EdU in S-Phase-Zellen nachgewiesen.

Die Zellen unterlagen keinem Zellzyklusarrest und durchliefen offenbar trotz der vorhandenen Chromatin-Brücke weiter den Zellzyklus. Diese Beobachtungen stehen nicht allein. In einer Arbeit von Huang *et al.* (2008) konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen den G2/M-Zellzykluskontrollpunkt trotz DNA-Schädigung aufheben können und weiter den Zellzyklus durchlaufen, was eine vermehrte Bildung von Chromatin-Brücken zur Folge hatte. Es konnte belegt werden, dass ein durch DNA-Schäden induzierter Zellzyklusarrest nicht von permanenter Dauer ist (Lee *et al.*, 2000). Zellen besitzen die Fähigkeit zu adaptieren und können sogar in der Präsenz von einem gebrochenen Chromosom weiter den Zellzyklus durchlaufen (Sandell und Zakian 1993, Toczyski *et al.*, 1997, Lee *et al.*, 1998). Über die genaue zeitliche Limitierung der Zellzykluskontrollpunkte ist wenig bekannt. Es konnte festgestellt werden, dass der G1/S-Kontrollpunkt mit einer langsamen Kinetik aktiviert wird, die ein Eintreten in die S-Phase von Zellen mit DNA-DSB noch 4-6 Stunden nach Bestrahlung ermöglicht. Bei dem G2/M-Kontrollpunkt konnte nachgewiesen werden, dass unter einem Schwellenwert von 10-20 DSB der Arrest aufgehoben wird (Deckbar *et al.*, 2011). Der in dieser Arbeit bestimmte mitotische Index der Zellen (Wildtypzellen und RAD50-defiziente Zellen) nach

Bestrahlung (Abb. 17, C) zeigte, dass die Zellen keinem Zellzyklusarrest mehr unterlagen. Darüber hinaus konnten in den Chromatin-Brücken Zellen residuale γ H2AX und 53BP1 Foci (4.4, Abb. 20) detektiert werden. Zusammenfassend bestätigen diese Daten die Ergebnisse von Deckbar *et al.*, (2011).

Ferner konnten Lee *et al.* (1998) belegen, dass Zellen, die einen einzigen DNA-Doppelstrangbruch aufweisen, der nicht durch homologe Rekombinationsreparatur (HRR) repariert werden kann, für 8-12 Stunden arrestieren und nach 24 Stunden eine Aufhebung des Zellzyklusarrests aufweisen. In dieser Arbeit wurden aktiv replizierende Zellen mit einer RAD50-Lokalisation auf einer Chromatin-Brücke gefunden, was darauf hindeutet, dass Zellen mit einer Chromatin-Brücke weiter den Zellzyklus durchlaufen, um die noch vorhandenen DNA-Schäden effizient in der späten S-Phase reparieren zu können. Eine fehlerfreie Reparatur durch die HRR in der späten S-Phase wäre effizienter als die NHEJ-Reparatur in mitotisch arretierten Zellen. Bis dahin könnte RAD50 eine stabilisierende und schützende Funktion auf der Chromatin-Brücke einnehmen, um den Übergang der verbundenen Tochterzellen in die nächste Zellzyklusphase zu ermöglichen. Der geringe Anteil an mitotischen Zellen mit einer Chromatin-Brücke unterstützen diese Hypothese (Abb. 27). Dabei bleibt zu klären, welchem Fatum die Zellen mit einer RAD50-Brücke unterliegen. Eine Langzeitanalyse der Brückenzellen mittels Zeitrafferaufnahmen könnte klären, ob die Zellen in der Lage sind, die Chromatin-Brücken aufzulösen, und welche Auswirkungen dies auf die weitere Proliferation und Differenzierung der Zellen haben könnte.

5.3 Funktion von RAD50 in der Mitose

5.3.1 Lokalisation von RAD50 in der normalen und abnormalen Mitose

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigten, dass RAD50 eine Rolle in der abnormalen Cytokinese einnimmt. Die Cytokinese ist der finale Schritt nach der Mitose. Um einen Einfluss des RAD50 Proteins in der Mitose zu analysieren, wurde immunocytochemisch die RAD50-Lokalisation in mitotischen Zellen untersucht (4.6.1). Dabei ergab sich, dass RAD50 ein spezielles perinukleäres, punktiert erscheinendes Verteilungsmuster in der Prophase von Wildtypzellen (ADP SV40) sowie in geringerem Maß in RAD50-defizienten Zellen aufwies. RAD50 war teilweise mit phospho-H3 (pH3) colokalisiert (Abb. 23, A, B). Nach Bestrahlung war eine saumartige, verstärkte Signalintensität von RAD50 um den Bereich der kondensierten Chromosomen sichtbar, der sich als punktförmige Verteilung in

der Telophase und der Cytokinese fortsetzte (Abb. 23, C). Die hier aufgeführten Befunde führten zu der Frage nach der Rolle der RAD50-Lokalisation in der Mitose.

Die perinukleäre Lokalisation von RAD50 in unbestrahlten mitotischen (Abb. 23 A, B, Abb. 30) und bestrahlten mitotischen Zellen (Abb. 23, C) könnte durch eine Zugehörigkeit von RAD50 zu der Gruppe der Proteine der perichromosomalen Region erklärt werden. Die perichromosomale Region enthält Proteine, die für die mRNA Synthese, die DNA-Doppelstrangbruchreparatur und die Regulation der Apoptose relevant sind (Van Hooser *et al.*, 2005). Perichromosomale Proteine akkumulieren in der Prophase an der Peripherie der Chromosomen und sind in der Interphase in Nucleoli, im Nucleoplasma, Heterochromatin oder Cytoplasma lokalisiert (Van Hooser *et al.*, 2005). Die funktionelle Relevanz der Proteine der perichromosomalen Region ist dabei vielfältig und beinhaltet 1) die Chromosomenorganisation, 2) die Ausbildung einer Barriere zwischen Chromosomen und Cytoplasma und 3) Bindungsstellen für Proteine des Chromosomalen *Passenger* Komplexes (Hernandez-Verdun und Gautier, 1994).

Ferner könnte RAD50 auch eine Funktion in der Chromosomensegregation oder Chromatinkondensation nach DNA-Schädigung übernehmen. Ein Hinweis darauf liefert die nachgewiesene RAD50 und phospho-H3-Interaktion auf Chromatin-Brücken und in Interphase-Zellen (Abb. 25). Die durch Aurora B vermittelte Phosphorylierung von H3 an Ser10 wird für die korrekte Chromosomensegregation (Wei *et al.*, 1999) sowie für die Rekrutierung verschiedener SMC Proteine an die mitotischen Chromosomen benötigt (Losada und Hirano, 2001, Harvey *et al.*, 2002, Schmiesing *et al.*, 2000). Die Kondensation des Chromatins in der Prophase wird durch einen SMC-Komplex, das Condensin, und über die Phosphorylierung von H3 gesteuert (Schmiesing *et al.*, 2000). Aufgrund der molekularen Struktur von RAD50 ist es möglich, dass es in diesem Prozess ebenfalls eine wesentliche Rolle einnimmt. Dies könnte auf eine Relevanz des Proteins in der Prophase bei der Kondensation der Chromosomen hindeuten. Eine Analyse einer möglichen Colokalisation von RAD50 und Aurora B in der Mitose könnte Aufschluss zu dieser Annahme geben.

5.3.2 Ist RAD50 essentiell für die Zellteilung?

Um den potentiellen Einfluss des RAD50 Proteins in der Mitose weitergehend zu untersuchen, wurde ein RAD50 *knock-down* in NIH3T3 Zellen durchgeführt. Der RAD50 *knock-down* führte zu einer Verdopplung der Zellteilungszeit, wobei ein Teil der Zellen die

Cytokinese nicht vollenden konnte (4.6.3, Abb. 26, B). Diese Ergebnisse zu der verlängerten Zellteilungszeit nach RAD50 *knock-down* bestätigen zusätzlich die Hypothese, dass RAD50 eine funktionelle Rolle in der Mitose einnimmt (5.3.1) und dass es einen Einfluss auf die Zellteilung hat. Diese Beobachtung steht nicht allein. In einer aktuellen Studie konnte kürzlich von anderen gezeigt werden, dass der MRN-Komplex eine relevante Funktion in der Mitose einnimmt. Ein MRE11 *knock-down* sowie eine Behandlung mit dem MRN-Komplex-Inhibitor Mirin bewirkte eine signifikante Verzögerung der Metaphase in *Xenopus Ocyten* (Rozier *et al.*, 2013).

Die Annahme der Relevanz von RAD50 in der Mitose wird auch durch die Immunoblot-Analyse der chromatingebundenen Fraktion von RAD50 in mitotischen NIH3T3 Zellen unterstützt. Es konnte gezeigt werden, dass RAD50 zu Beginn der Mitose einen höheren chromatingebundenen Anteil aufwies als gegen Ende der Mitose (4.7, Abb. 29, C). Die chromatingebundene Fraktion von RAD50 konnte durch 12 Gy Bestrahlung verstärkt werden (Abb. 29, C). Zusätzlich zeigte der cyto-/nucleoplasmische Proteinlevel von RAD50 eine Tendenz zur Zunahme nach 12 Gy Bestrahlung, was auf eine vermehrte Proteinbiosynthese von RAD50 deuten könnte. Um dies weiterführend zu bestätigen, könnten zusätzliche mRNA Expressionsanalysen von RAD50 in der Mitose nach 12 Gy Bestrahlung sinnvoll sein. Nach 1 Gy und 6 Gy Bestrahlung konnte keine signifikante Erhöhung der chromatingebundenen oder der cyto-/nucleoplasmischen Fraktion von RAD50 im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen in der Mitose beobachtet werden. Vielmehr war der Anteil an chromatingebundenem RAD50 nach 1 Gy und 6 Gy Bestrahlung eher geringer als in den unbestrahlten mitotischen Zellen. Dies war insofern unerwartet, als die durch Strahlung induzierte DNA-Schädigung eine Bindung von RAD50, als Teil des MRN-Komplexes, an das Chromatin bewirken sollte. Dies deutet darauf hin, dass unter den gegebenen experimentellen Bedingungen nur sehr hohe Bestrahlungsdosen eine Veränderung im Gleichgewicht der chromatingebundenen Form von RAD50 bewirken.

Darüber hinaus war zu beobachten, dass die chromatingebundene Fraktion von RAD50 in einer asynchronen Zellpopulation größer war als in den mitotischen Zellen (Abb. 29, C). Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass RAD50 als Teil des MRN-Komplexes in Interphase-Zellen transient an die DNA bindet, um potenzielle DNA-Schäden zu detektieren und sich in einem Gleichgewicht zwischen gebundener und ungebundener Form befindet. In einer Studie konnte bereits gezeigt werden, dass der MRN-Komplex einer erhöhten Chromatinbindung in S-Phase-Zellen im Vergleich zu G1- und G2/M-

Zellen unterliegt, was eine Relevanz für den Intra-S-Kontrollpunkt hat (Mirzoeva und Petrini, 2003). Des Weiteren konnten Mirzoeva und Petrini (2003) feststellen, dass die chromatingebundene Fraktion des MRN-Komplexes in S-Phase-Zellen sich nicht durch Bestrahlung verstärkte. Diese Beobachtung würde auch mit der hier durchgeführten Analyse der mit 6 Gy bestrahlten mitotischen Zellen übereinstimmen.

Um dies zu verifizieren, sollten vergleichende Analysen der chromatingebundenen Fraktion von RAD50 in G1-, S-, und G2-Phase-Zellen mit der chromatingebundenen Fraktion in der Mitose durchgeführt werden. Ferner bleibt dabei zu klären, ob die Unterschiede der chromatingebundenen Fraktionen von RAD50 nach verschiedenen Bestrahlungsdosen auf dem Effekt der Bindung des MRN-Komplexes an DNA-Doppelstrangbrüchen basiert oder ob RAD50 eine singuläre Funktion in der Chromatinassoziation einnimmt. Die Detektion von DNA-DSB erfolgt durch den MRN-Komplex (Williams *et al.*, 2009), wobei bislang noch nicht bekannt ist, aufgrund welcher molekularer Strukturen oder Konformationsänderungen am DNA-DSB der MRN-Komplex zeitnah den Bruch detektieren kann. Es könnte eine Interaktion von 53BP1, einem Protein der ATM-Schadensantwort, mit methylierten Lysinresten von Histon H3 und Histon H4 gezeigt werden. 53BP1 kann an Histone binden, wenn es aufgrund von Konformationsänderungen zu einer Auflösung der hochgeordneten Chromatinstruktur kommt (Lee *et al.*, 2010, Huyen *et al.* 2004; Botuyan *et al.*, 2006).

Die beobachteten Ergebnisse der nachgewiesenen Interaktion von pH3 und RAD50 in der Interphase (Abb. 25) deuten darauf hin, dass RAD50 über Histon H3 an Chromatin gebunden werden könnte und dadurch eine Funktion in der Mitose und möglicherweise auch in Interphase-Zellen übernimmt. Weiterführende Analysen mittels einer Co-Immunoprecipitation könnten die hier nachgewiesene Interaktion bestätigen.

5.3.3 Funktionalität von RAD50 in der Mitose und der abnormalen Cytokinese

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse der Lokalisation und der Relevanz von RAD50 in der Mitose und der Cytokinese (4.2 - 4.7) führten zu der Entwicklung eines hypothetischen Modells der Funktionalität von RAD50 (Abb. 37).

Durch eine Interaktion mit Aurora B und pH3 wird RAD50 in der Prophase transient verstärkt an Chromatin gebunden und übernimmt eine Aufgabe in dem Prozess der Chromosomenkondensation und der Chromosomensegregation. Beim weiteren Durchlaufen der Mitose dissoziiert RAD50 teilweise wieder von Chromatin und weist eine

durchgehende nucleoplasmische beziehungsweise cytoplasmische Verteilung auf. Bei Auftreten eines oder mehrerer DNA-Schäden wird die Bindung von RAD50 an das Chromatin in der Mitose verstärkt und verbleibt über die Prophase hinaus bis hin zur Cytokinese bestehen. Dies stellt eine Schutzfunktion von RAD50 in der Chromosomensegregation nach DNA-Schädigung dar.

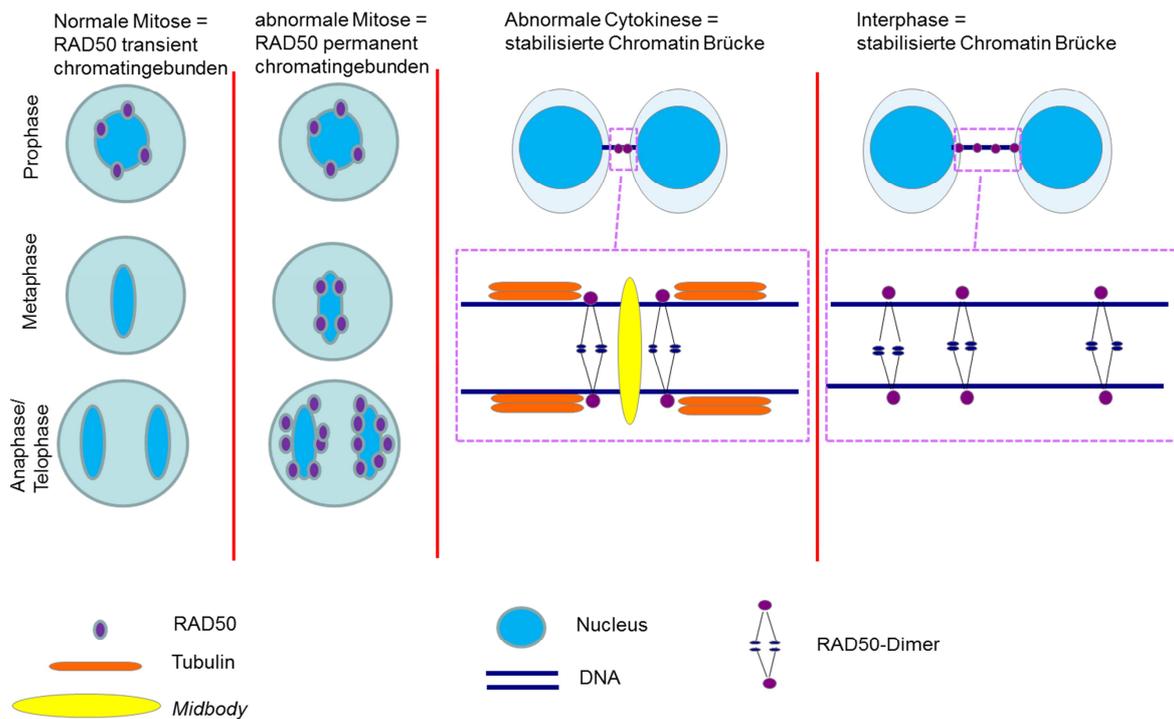


Abbildung 38: Hypothetisches Modell der Bindung von RAD50 in der normalen Mitose und in der abnormalen Mitose und Cytokinese nach DNA-Schädigung. RAD50 ist in der normalen Mitose transient in der Prophase an Chromatin gebunden, nach DNA-Schädigung bleibt die Bindung von RAD50 auch in späteren Phasen der Mitose bestehen. Bei Ausbildung einer Chromatin-Brücke stabilisiert RAD50 die DNA im Bereich der Teilungsebene als Dimer. Die Stabilisierung der Brücken bleibt auch in späteren Zellzyklusphasen der Zellen mit einer Brücke bestehen.

Bei der Ausbildung einer Chromatin-Brücke in der Mitose wird RAD50 als Faktor auf den Brücken vermehrt lokalisiert und übernimmt eine stabilisierende Funktion im Bereich der Teilungsebene. RAD50 stabilisiert als Dimer die Chromatin-Brücke über die Bindung oder Wechselwirkung mit der DNA. Diese stabilisierende Funktion wird durch eine Interaktion mit Proteinen des *Midbody* verstärkt oder bewirkt, bis es zur Auflösung der Chromatin-Brücke kommt. Bei nicht vorhandener Auflösung der Chromatin-Brücke verbleibt RAD50 auf den Brücken und stabilisiert diese, um eine Reparatur oder Auflösung der Brücke in einer späteren Zellzyklusphase zu ermöglichen.

5.3.4 Die Rolle von RAD50 in der Mitose und abnormalen Cytokinese in epithelialen Brustkrebszellen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass RAD50 eine relevante Funktion in der Mitose einnimmt. Die mitotische Rolle könnte dazu beitragen, dass Mutationen in RAD50 die Disposition für Brustkrebs erhöhen (Ripperberger *et al.*, 2009). In weiterführenden Untersuchungen in epithelialen Brustkrebszellen sollte die Relevanz von RAD50 in der Mitose vertieft untersucht werden. Dabei konnte festgestellt werden, dass die epithelale Brustkrebszelllinie HCC1937 eine RAD50-Lokalisation in der Mitose aufweist, die in Wildtypzellen (MCF10A), aber auch in einer weiteren Brustkrebszelllinie, HCC1395, nicht nachzuweisen war (4.9.1, Abb. 30). Die mitotische Verteilung von RAD50 in der HCC1937 ähnelte dabei dem RAD50 Verteilungsmuster in der abnormalen Mitose von bestrahlten Fibroblasten (Abb. 23). In Bezug auf die erhaltenen Ergebnisse zur RAD50-Lokalisation in Fibroblasten und RAD50-defizienten Zellen stellt sich die Frage, warum die Wildtypzelllinie MCF10A und die Brustkrebszelllinie HCC1395 keine nachweisbare RAD50-Lokalisation in der Mitose aufwiesen. Eine mögliche Erklärung könnte der zeitliche Aspekt der Untersuchung sein. Die Dauer der einzelnen Phasen der Mitose ist Zelltypabhängig. Die nicht nachweisbare Lokalisation von RAD50 in HCC1395 und MCF10A könnte durch eine temporär sehr kurz begrenzte RAD50-Lokalisation in der Prophase der Mitose erklärbar sein. Vergleichend dazu war die RAD50-Verteilung in der Mitose von Fibroblasten und RAD50-defizienten Zellen auf die Prophase beschränkt (Abb. 23). Eine Analyse mittels Zeitrafferaufnahme von einem fluoreszenzmarkierten-RAD50 Protein in mitotischen Zellen der HCC1395 und MCF10A könnte klären, ob RAD50 in der Mitose eine spezielle Verteilung aufweist.

Darüber hinaus könnte der Unterschied der RAD50-Lokalisation durch die hier untersuchten verschiedenen Zelltypen erklärbar sein. Fibroblasten und Epithelzellen unterscheiden sich aufgrund ihrer morphologischen und phänotypischen Eigenschaften trotz gleichen Genotyps (Marceau *et al.*, 1980). Eine vergleichende Analyse der mitotischen RAD50-Verteilung in verschiedenen Zelltypen könnte weiteren Aufschluss über die Generalisierbarkeit der Beobachtungen bringen.

Weitergehend konnte gezeigt werden, dass es in beiden Brustkrebszelllinien zu einem Anstieg von Chromatin-Brücken nach Bestrahlung kam (4.9.2, Abb. 31). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Zellen mit einem Defekt in der homologen Rekombinationsreparatur einen erhöhten Anteil an Chromatin-Brücken aufweisen (Huang *et al.*, 2008, Acilan *et al.*, 2007). Dies legte nahe, dass die in dieser Arbeit vorgestellte

p.R215W Mutation in HCC1395 (Abb. 33) zu einem Defekt in der homologen Rekombinationsreparatur nach DNA-Schädigung führt, was zur Ausbildung von Chromatin-Brücken führt, allerdings trägt diese Zelllinie ebenso wie die HCC1937 auch eine *BRCA1* Mutation. Ferner bleibt dabei zu klären, warum eine *RAD50* Mutation (F239 SV40) einen Defekt in der Ausbildung von Chromatin-Brücken bewirkt, eine *NBN* Mutation (HCC1395) oder eine *BRCA1* Mutation (HCC1937) jedoch nicht. Um das zu verifizieren, sollten vergleichende Analysen der Chromatin-Brückenbildung in Zellen mit verschiedenen Defizienzen in Proteinen des ATM/ATR-Signalweges erfolgen.

Darüber hinaus bleibt zu klären, ob die hier vorgestellte *NBN* oder die *BRCA1* Mutation einen Einfluss auf die mitotische *RAD50*-Lokalisation hat. Eine Möglichkeit zur Klärung dieser Frage besteht in der Untersuchung der mitotischen *RAD50*-Verteilung in einer *NBN*-komplementierten HCC1395 und einer *BRCA1*-komplementierten HCC1937 Zelllinie. Weitergehend sollte auch die mitotische Lokalisation der beiden Interaktionspartner von *RAD50*, *MRE11* und *NBN*, untersucht werden. Dabei könnte eine Aussage über die Relevanz des MRN-Komplexes in der Mitose getroffen werden.

5.4 Die *missense* Mutation p.R215W ist mit einem Defekt in der DNA-Schadensantwort durch den MRN-Komplex assoziiert

Im Rahmen der Untersuchungen des *MRE11-RAD50-NBN*-Komplexes konnte nebenbefundlich eine homozygot vorliegende *missense* Mutation in *NBN* (p.R215W) (4.10.2, Abb. 33) sowie ein reduzierter *NBN* Proteinlevel (4.10.1, Abb. 32) in der Brustkrebszelllinie HCC1395 nachgewiesen werden, der zu einem Defekt in der MRN- und ATM-vermittelten Schadensantwort führte (4.9).

Das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS) ist eine autosomal rezessive Erkrankung, die eine chromosomale Instabilität, Radiosensitivität und eine erhöhte Prädisposition für Krebs aufweist (Blundred und Stewart, 2011). *NBN* interagiert mit *MRE11* und *RAD50* und bildet den MRN-Komplex aus, welcher eine wichtige Aufgabe in der Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen sowie in der Akkumulation wichtiger DNA-Schadensreparaturproteine wie γ H2AX und *MDC1* übernimmt (Zha *et al.*, 2009). Der Verlust der *NBN* Proteinfunktion führt zu einer radioresistenten DNA-Synthese und einer Defizienz in der korrekten Reparatur von DNA-DSB (Varon *et al.*, 1998).

Brustkrebs wurde bereits mit Mutationen in Proteinen der DNA-Doppelstrangbruchreparatur in Verbindung gebracht (Walsh und King, 2007). Bislang

konnte gezeigt werden, dass bi-allelische Mutationen im *NBN* Gen mit der Entwicklung von NBS im Zusammenhang stehen, wohingegen mono-allelische Mutationen in *NBN* mit einem erhöhten Risiko der Krebsentwicklung einhergehen (Semanova *et al.*, 2007). In mehreren Studien, die an Brustkrebspatientinnen im osteuropäischen Raum durchgeführt worden sind, konnte eine erhöhte Frequenz der am meisten verbreiteten *NBN* Mutation, c.657del5, festgestellt werden (Varon *et al.*, 1998). Eine *compound*-Heterozygotie der p.R215W Mutation mit der c.657del5 Mutation konnte bei zwei NBS Patienten mit schwerwiegender Symptomatik festgestellt werden (Seemanova *et al.*, 2006). Aufgrund der Analyse der lymphblastoiden Zellen der Brustkrebspatientin (4.10.2, Abb. 33, HCC1395 BL) wurde deutlich, dass p.R215W eine ursprünglich heterozygot vorliegende Keimbahnmutation ist, wobei es in der Entwicklung des Tumors zu einem Verlust der Heterozygotie in *NBN* kam.

Der reduzierte NBN Proteinlevel in der HCC1395 deutet auf eine geringere Stabilität des NBN Proteins als Konsequenz der p.R215W Mutation hin (Abb. 32). Ein ähnlich reduzierter NBN Proteinlevel konnte auch in einem *compound*-heterozygoten (p.R215W/c.657del5) NBS Patienten beobachtet werden (Bogdanova *et al.*, 2008, Seemanova *et al.*, 2006). Des Weiteren konnte eine Mobilitätsverzögerung (*mobility shift*) von NBN in der Immunoblot-Analyse beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass die p.R215W Mutation keinen Effekt auf Phosphorylierung von NBN durch ATM hat (Abb. 32). Die Analyse weiterer Proteine des ATM-Signalweges wies ebenfalls keinen Defekt in der Phosphorylierung der ATM-Substrate SMC1, KAP1 und Chk2 nach Bestrahlung auf (Abb. 34).

Die Relevanz von NBN in der ATM-induzierten Phosphorylierung wurde in der Vergangenheit widersprüchlich diskutiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass NBN nicht für die Chk2 Phosphorylierung benötigt wird (Falck *et al.*, 2002, Yazdi *et al.*, 2002). Buscemi *et al.*, (2001) berichteten jedoch von einer NBN-Abhängigkeit in der Chk2 und SMC1 Phosphorylierung, wobei die Expression von *NBN* Mutanten mit Punktmutationen in der FHA-Domäne oder der BRCT-Domänen in *NBN*-defizienten Zellen zu einer Wiederherstellung der Chk2 und SMC1 Phosphorylierung führte (Cerasoletti und Concannon, 2003). In einer anderen Studie konnte allerdings gezeigt werden, dass retroviral-transduzierte p.R215W Fibroblasten einen Defekt in der ATM-induzierten Phosphorylierung der DNA-Schadensantwortproteine aufwiesen (Mendez *et al.*, 2012). Dies war in den Untersuchungen der HCC1395 Zellen in dieser Arbeit nicht erkennbar. Da bewusst gleiche Strahlendosen eingesetzt wurden, sind die Unterschiede zwischen Mendez

et al. und dieser Arbeit vermutlich auf den Zelltyp oder das experimentelle System zurückzuführen.

In vitro Untersuchungen konnten zeigen, dass die p.R215W Mutation einen Einfluss auf die Interaktion von NBN und γ H2AX hat (di Masi *et al.*, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass die Bildung der γ H2AX und MDC1 Foci Bildung in der HCC1395 nach Bestrahlung einen Defekt aufwies (Abb. 35, 36), der auf eine Störung in der Bindung von NBN an γ H2AX hindeutet. Die Mutation p.R215W ist im Bereich zwischen der zwei BRCT-Domänen von NBN lokalisiert. Die BRCT-Domänen sind Phosphoprotein-bindende Module (Bork *et al.*, 1997, Callebaut *et al.*, 1997), die für die Bindung von γ H2AX und NBN verantwortlich sind (Kobayashi *et al.*, 2002).

Die Foci Anzahl von γ H2AX, 53BP1 und MDC1 war bei der Auswertung mit konventioneller Mikroskopietechnik in der HCC1395 stark verringert, wobei die Foci mit der konfokalen Mikroskopie allerdings nachweisbar waren. Dies war durch die mikroskopische Auflösung bedingt. Die Foci in HCC1395 wiesen eine kleinere und diffusere Struktur auf (4.10.4.2, Abb. 36). Die visuelle Detektion der Foci mit konventioneller Mikroskopietechnik benötigt die Akkumulation mehrerer tausend Proteinmoleküle (Mah *et al.*, 2010). Obwohl bereits kurz nach Bestrahlung ein Maximum der Foci prinzipiell nachweisbar ist, ist die Detektion aufgrund ihrer geringen Größe zu diesem Zeitpunkt schwierig und wird erst mehrere Minuten nach der Bestrahlung quantitativ auswertbar (Löbrich *et al.*, 2010).

In einer Studie von retroviralen transduzierten Fibroblasten konnte mittels Immunpräzipitation gezeigt werden, dass die Bindung von p.R215W NBN an γ H2AX defekt ist, welches eine Auswirkung der p.R215W Mutation auf die Proteininteraktion aufzeigt (di Masi *et al.*, 2008). Der Verlust der Akkumulation von γ H2AX fördert auch einen Defekt in der Akkumulation von MDC1 Foci, da MDC1 an phosphoryliertes H2AX bindet (Stucki *et al.*, 2005). Die Foci Bildung von 53BP1 Foci ist wiederum abhängig von MDC1, wobei auch ein Einfluss von 53BP1 auf die ATM-Aktivität durch den MRN-Komplex *in vitro* berichtet wurde (Lee *et al.*, 2010). Die hier aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass in der HCC1395 eine Phosphorylierung der ATM-Substrate stattfindet, die Akkumulation der verschiedenen DNA-Schadensantwortproteine in Foci jedoch einen Defekt aufweist. Die Daten legen nahe, dass die *missense* p.R215W Mutation in *NBN* einen Einfluss auf dessen Bindung an γ H2AX hat und damit auf die Rekrutierung und Stabilisierung von ATM und weiteren ATM-Substraten, die für eine Aufrechterhaltung und Signalverstärkung am DNA-Doppelstrangbruch verantwortlich sind.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zusammenfassung der ersten Schritte in der Cytokinese.	3
Abbildung 2: Ausbildung des <i>Midbody</i> und Abspaltung in der Cytokinese	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Cyclin–CDK-abhängigen Progression einer Zelle durch den Zellzyklus.....	5
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Schadensantwort in einer Zelle nach DNA-Schädigung.	8
Abbildung 5: Primäre Schritte in der DNA-Schadensantwort bei Auftreten eines DSBs.	10
Abbildung 6: Primäre Schritte im ATR-Signalweg.	11
Abbildung 7: Interaktionen des ATM- und ATR-Signalweges nach DNA-Schäden.....	12
Abbildung 8: Schematische Darstellung der NHEJ.	13
Abbildung 9: Schematische Darstellung der HRR.	15
Abbildung 10: Domänen-Struktur von MRE11.....	18
Abbildung 11: Struktureller Aufbau von NBN.	18
Abbildung 12: Domänen-Struktur von RAD50.	19
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Bindung des MRN-Komplexes an die freien DNA-Enden eines DSB.	20
Abbildung 14: ATR-abhängige Phosphorylierung von γ H2AX.	51
Abbildung 15: G2/M-Kontrollpunkt-Aktivierung nach Bestrahlung mit UV-Licht.....	52
Abbildung 16: Die Anzahl der Centrosomen ist erhöht in RAD50-defizienten Zellen.....	54
Abbildung 17: RAD50-Lokalisation auf Chromatin-Brücken.	56
Abbildung 18: siRNA-vermittelte Reduktion des RAD50 Proteinspiegels und Inhibierung der ATM-Kinaseaktivität führen zu einer Reduktion von Chromatin-Brücken und RAD50-Brücken.	59
Abbildung 19: Lokalisation verschiedener Proteine des ATM-Signalweges in Zellen mit einer Chromatin-Brücke.....	60
Abbildung 20: Lokalisation von γ H2AX und 53BP1 auf Chromatin-Brücken.....	61
Abbildung 21: Colokalisation von RAD50 mit cytoskeletalen und cytokinetischen Proteinen in verschiedenen Phasen der (abnormalen) Cytokinese.....	63
Abbildung 22: Interaktion von RAD50 mit Aurora B <i>in situ</i>	64
Abbildung 23: Die Verteilung von RAD50 in verschiedenen Phasen der normalen und abnormalen Mitose.	66
Abbildung 24: Colokalisation von phospho-H3 (S10) und RAD50 in der abnormalen Cytokinese.	67
Abbildung 25: phospho-H3 und RAD50 interagieren <i>in situ</i> in Interphase-Zellen und auf Chromatin-Brücken.....	68
Abbildung 26: Verlängerung der Zellteilungszeit in NIH3T3 Zellen durch Bestrahlung oder RAD50 <i>knock-down</i>	70
Abbildung 27: Progression von Zellen mit RAD50-Brücken durch die S- und M-Phase des Zellzyklus.	71
Abbildung 28: Durchflusscytometrische Analyse mit Nocodazol behandelter NIH3T3 Zellen	73
Abbildung 29: Chromatingebundener und cyto-/nucleoplasmischer Proteinanteil von RAD50 in der Mitose.....	75
Abbildung 30: Lokalisation von RAD50 in Brustkrebsepithelzellen	77
Abbildung 31: RAD50-Brücken in epithelialen Brustkrebszellen	78
Abbildung 32: Immunoblot-Analyse der MRN-Komplex Proteine in epithelialen Brustkrebszelllinien.....	80
Abbildung 33: Sequenzanalyse von <i>NBN</i> in HCC1395.....	81
Abbildung 34: Immunoblot-Analyse der ATM-Schadensantwort in HCC1395.	82
Abbildung 35: Immunocytochemische Analyse der γ H2AX, 53BP1 und MDC1 Foci nach Bestrahlung in HCC1395, HCC1937 und MCF10A.	84
Abbildung 36: Foci Areale von γ H2AX, 53BP1 und MDC1 in HCC1395.	86
Abbildung 37: Immunocytochemische Analyse der NBN Foci in HCC1395 und MCF10A nach Bestrahlung.	87
Abbildung 38: Hypothetisches Modell der Bindung von RAD50 in der normalen Mitose und in der abnormalen Mitose und Cytokinese nach DNA-Schädigung.	103

7 Literaturverzeichnis

- Abraham, R.T.**, 2001. "Cell Cycle Checkpoint Signaling through the Atm and Atr Kinases." *Genes Dev*, 15(17), pp. 2177-96.
- Acilan, C.**; Potter, D.M. and Saunders, W.S., 2007. "DNA Repair Pathways Involved in Anaphase Bridge Formation." *Genes Chromosomes Cancer*, 46(6), pp. 522-31.
- Ahnesorg, P.**; Smith, P. and Jackson, S.P., 2006. "Xlf Interacts with the Xrcc4-DNA Ligase Iv Complex to Promote DNA Nonhomologous End-Joining." *Cell*, 124(2), pp. 301-13.
- Alberts, B.e.a.**, 2008. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, New York.
- Alberts, B.J., L.**, 2004. *Molekularbiologie Der Zelle*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Alderton, G.K.**; Joenje, H.; Varon, R.; Borglum, A.D.; Jeggo, P.A. and O'Driscoll, M., 2004. "Seckel Syndrome Exhibits Cellular Features Demonstrating Defects in the Atr-Signalling Pathway." *Hum Mol Genet*, 13(24), pp. 3127-38.
- Ball, H.L.**; Myers, J.S. and Cortez, D., 2005. "Atrip Binding to Replication Protein a-Single-Stranded DNA Promotes Atr-Atrip Localization but Is Dispensable for Chk1 Phosphorylation." *Mol Biol Cell*, 16(5), pp. 2372-81.
- Baran, I.**, C. Ganea, I. Ursu, F. Musumeci, A. Scordino, S. Tudisco; S. Privitera, L.L., E. Katona, V. Baran, G. A. P. Ciprone, and G. Cuttone, L.R., L. M. Valastro, 2009. "Effects of Nocodazole and Ionizing Radiation on Cell Proliferation and Delayed Luminescence." *BIOPHYSICS Rom. Journ.*, Vol. 54., pp. P. 557-67.
- Barnes, D.E. and Lindahl, T.**, 2004. "Repair and Genetic Consequences of Endogenous DNA Base Damage in Mammalian Cells." *Annu Rev Genet*, 38, pp. 445-76.
- Bartek, J.**; Lukas, C. and Lukas, J., 2004. "Checking on DNA Damage in S Phase." *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(10), pp. 792-804.
- Bartek, J. and Lukas, J.**, 2001. "Mammalian G1- and S-Phase Checkpoints in Response to DNA Damage." *Curr Opin Cell Biol*, 13(6), pp. 738-47.
- Baumann, P.**; Benson, F.E. and West, S.C., 1996. "Human Rad51 Protein Promotes Atp-Dependent Homologous Pairing and Strand Transfer Reactions in Vitro." *Cell*, 87(4), pp. 757-66.
- Bennett, E.J. and Harper, J.W.**, 2008. "DNA Damage: Ubiquitin Marks the Spot." *Nat Struct Mol Biol*, 15(1), pp. 20-2.
- Blundred, R.M. and Stewart, G.S.**, 2011. "DNA Double-Strand Break Repair, Immunodeficiency and the Riddle Syndrome." *Expert Rev Clin Immunol*, 7(2), pp. 169-85.

- Bogdanova, N.**; Feshchenko, S.; Schurmann, P.; Waltes, R.; Wieland, B.; Hillemanns, P.; Rogov, Y.I.; Dammann, O.; Bremer, M.; Karstens, J.H.; Sohn, C.; Varon, R. and Dork, T., 2008. "Nijmegen Breakage Syndrome Mutations and Risk of Breast Cancer." *Int J Cancer*, 122(4), pp. 802-6.
- Bork, P.**; Hofmann, K.; Bucher, P.; Neuwald, A.F.; Altschul, S.F. and Koonin, E.V., 1997. "A Superfamily of Conserved Domains in DNA Damage-Responsive Cell Cycle Checkpoint Proteins." *FASEB J*, 11(1), pp. 68-76.
- Botuyan, M.V.**; Lee, J.; Ward, I.M.; Kim, J.E.; Thompson, J.R.; Chen, J. and Mer, G., 2006. "Structural Basis for the Methylation State-Specific Recognition of Histone H4-K20 by 53bp1 and Crb2 in DNA Repair." *Cell*, 127(7), pp. 1361-73.
- Bourke, E.**; Dodson, H.; Merdes, A.; Cuffe, L.; Zachos, G.; Walker, M.; Gillespie, D. and Morrison, C.G., 2007. "DNA Damage Induces Chk1-Dependent Centrosome Amplification." *EMBO Rep*, 8(6), pp. 603-9.
- Bradford, M.M.**, 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Anal Biochem*, 72, pp. 248-54.
- Bunz, F.**, 2011. *Molecular Determinants of Radiation Response*. Springer New York.
- Buscemi, G.**; Savio, C.; Zannini, L.; Micciche, F.; Masnada, D.; Nakanishi, M.; Tauchi, H.; Komatsu, K.; Mizutani, S.; Khanna, K.; Chen, P.; Concannon, P.; Chessa, L. and Delia, D., 2001. "Chk2 Activation Dependence on Nbs1 after DNA Damage." *Mol Cell Biol*, 21(15), pp. 5214-22.
- Callebaut, I. and Mornon, J.P.**, 1997. "From Brca1 to Rap1: A Widespread Brct Module Closely Associated with DNA Repair." *FEBS Lett*, 400(1), pp. 25-30.
- Capalbo, L.**; Montembault, E.; Takeda, T.; Bassi, Z.I.; Glover, D.M. and D'Avino, P.P., 2012. "The Chromosomal Passenger Complex Controls the Function of Endosomal Sorting Complex Required for Transport-Iii Snf7 Proteins During Cytokinesis." *Open Biol*, 2(5), pp. 120070.
- Carlton, J.G.**; Caballe, A.; Agromayor, M.; Kloc, M. and Martin-Serrano, J., 2012. "Escrt-Iii Governs the Aurora B-Mediated Abcission Checkpoint through Chmp4c." *Science*, 336(6078), pp. 220-5.
- Carney, J.P.**; Maser, R.S.; Olivares, H.; Davis, E.M.; Le Beau, M.; Yates, J.R., 3rd; Hays, L.; Morgan, W.F. and Petrini, J.H., 1998. "The Hmre11/Hrad50 Protein Complex and Nijmegen Breakage Syndrome: Linkage of Double-Strand Break Repair to the Cellular DNA Damage Response." *Cell*, 93(3), pp. 477-86.
- Cavins, J.A.**; Djerassi, I.; Roy, A.J. and Klein, E., 1965. "Preservation of Viable Human Granulocytes at Low Temperatures in Dimethyl Sulfoxide." *Cryobiology*, 2(3), pp. 129-33.

Cerosaletti, K.M. and Concannon, P., 2003. "Nibrin Forkhead-Associated Domain and Breast Cancer C-Terminal Domain Are Both Required for Nuclear Focus Formation and Phosphorylation." *J Biol Chem*, 278(24), pp. 21944-51.

Chahwan, C.; Nakamura, T.M.; Sivakumar, S.; Russell, P. and Rhind, N., 2003. "The Fission Yeast Rad32 (Mre11)-Rad50-Nbs1 Complex Is Required for the S-Phase DNA Damage Checkpoint." *Mol Cell Biol*, 23(18), pp. 6564-73.

Chouinard, G.; Clement, I.; Lafontaine, J.; Rodier, F. and Schmitt, E., 2013. "Cell Cycle-Dependent Localization of Chk2 at Centrosomes During Mitosis." *Cell Div*, 8 (1), pp.7.

Collis, S.J.; Ciccia, A.; Deans, A.J.; Horejsi, Z.; Martin, J.S.; Maslen, S.L.; Skehel, J.M.; Elledge, S.J.; West, S.C. and Boulton, S.J., 2008. "Fancm and Faap24 Function in Atr-Mediated Checkpoint Signaling Independently of the Fanconi Anemia Core Complex." *Mol Cell*, 32(3), pp. 313-24.

Concannon, P. and Gatti, R.A., 1997. "Diversity of Atm Gene Mutations Detected in Patients with Ataxia-Telangiectasia." *Hum Mutat*, 10(2), pp. 100-7.

Costanzo, V.; Robertson, K.; Bibikova, M.; Kim, E.; Grieco, D.; Gottesman, M.; Carroll, D. and Gautier, J., 2001. "Mre11 Protein Complex Prevents Double-Strand Break Accumulation During Chromosomal DNA Replication." *Mol Cell*, 8(1), pp. 137-47.

Crosio, C.; Fimia, G.M.; Loury, R.; Kimura, M.; Okano, Y.; Zhou, H.; Sen, S.; Allis, C.D. and Sassone-Corsi, P., 2002. "Mitotic Phosphorylation of Histone H3: Spatio-Temporal Regulation by Mammalian Aurora Kinases." *Mol Cell Biol*, 22(3), pp. 874-85.

D'Amours, D. and Jackson, S.P., 2002. "The Mre11 Complex: At the Crossroads of Dna Repair and Checkpoint Signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(5), pp. 317-27.

D'Amours, D. and Jackson, S.P., 2001. "The Yeast Xrs2 Complex Functions in S Phase Checkpoint Regulation." *Genes Dev*, 15(17), pp. 2238-49.

Daniels, M.J.; Wang, Y.; Lee, M. and Venkitaraman, A.R., 2004. "Abnormal Cytokinesis in Cells Deficient in the Breast Cancer Susceptibility Protein Brca2." *Science*, 306(5697), pp. 876-9.

De Bont, R. and van Larebeke, N., 2004. "Endogenous DNA Damage in Humans: A Review of Quantitative Data." *Mutagenesis*, 19(3), pp. 169-85.

de Castro, P.,I.; de Carcer, G. and Malumbres, M., 2007. "A Census of Mitotic Cancer Genes: New Insights into Tumor Cell Biology and Cancer Therapy." *Carcinogenesis*, 28(5), pp. 899-912.

de Jager, M.; van Noort, J.; van Gent, D.C.; Dekker, C.; Kanaar, R. and Wyman, C., 2001. "Human Rad50/Mre11 Is a Flexible Complex That Can Tether DNA Ends." *Mol Cell*, 8(5), pp. 1129-35.

Deckbar, D.; Birraux, J.; Krempler, A.; Tchouandong, L.; Beucher, A.; Walker, S.; Stiff, T.; Jeggo, P. and Lobrich, M., 2007. "Chromosome Breakage after G2 Checkpoint Release." *J Cell Biol*, 176(6), pp. 749-55.

Deckbar, D.; Jeggo, P.A. and Lobrich, M., 2011. "Understanding the Limitations of Radiation-Induced Cell Cycle Checkpoints." *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 46(4), pp. 271-83.

di Masi, A. and Antocchia, A., 2008. "Nbs1 Heterozygosity and Cancer Risk." *Curr Genomics*, 9(4), pp. 275-81.

Dittrich, W., Göhde, W., 1968. "Flow-through Chamber for Photometers to Measure and Count Particles in a Dispersed Medium," In: Patent Number: DE1815352

Duursma, A.M.; Driscoll, R.; Elias, J.E. and Cimprich, K.A., 2013. "A Role for the Mre11 Complex in ATR Activation Via TopBP1 Recruitment." *Mol Cell*, 50(1), pp. 116-22.

Falck, J.; Coates, J. and Jackson, S.P., 2005. "Conserved Modes of Recruitment of ATR, ATR and DNA-PKcs to Sites of DNA Damage." *Nature*, 434(7033), pp. 605-11.

Falck, J.; Petrini, J.H.; Williams, B.R.; Lukas, J. and Bartek, J., 2002. "The DNA Damage-Dependent Intra-S Phase Checkpoint Is Regulated by Parallel Pathways." *Nat Genet*, 30(3), pp. 290-4.

Flemming, W., 1878. "Zur Kenntnis Der Zelle Und Ihre Teilungserscheinungen," In *Schriften des Naturwissenschaftlichen Vereins für Schleswig-Holstein*, 23-27.

Gatei, M.; Jakob, B.; Chen, P.; Kijas, A.W.; Becherel, O.J.; Gueven, N.; Birrell, G.; Lee, J.H.; Paull, T.T.; Lerenthal, Y.; Fazry, S.; Taucher-Scholz, G.; Kalb, R.; Schindler, D.; Waltes, R.; Dork, T. and Lavin, M.F., 2011. "ATR Protein-Dependent Phosphorylation of Rad50 Protein Regulates DNA Repair and Cell Cycle Control." *J Biol Chem*, 286(36), pp. 31542-56.

Gatti, R.A.; Boder, E.; Vinters, H.V.; Sparkes, R.S.; Norman, A. and Lange, K., 1991. "Ataxia-Telangiectasia: An Interdisciplinary Approach to Pathogenesis." *Medicine (Baltimore)*, 70(2), pp. 99-117.

Gazdar, A.F.; Kurvari, V.; Virmani, A.; Gollahon, L.; Sakaguchi, M.; Westerfield, M.; Kodagoda, D.; Stasny, V.; Cunningham, H.T.; Wistuba, II; Tomlinson, G.; Tonk, V.; Ashfaq, R.; Leitch, A.M.; Minna, J.D. and Shay, J.W., 1998. "Characterization of Paired Tumor and Non-Tumor Cell Lines Established from Patients with Breast Cancer." *Int J Cancer*, 78(6), pp. 766-74.

- Gerisch, G.**; Faix, J.; Kohler, J. and Muller-Taubenberger, A., 2004. "Actin-Binding Proteins Required for Reliable Chromosome Segregation in Mitosis." *Cell Motil Cytoskeleton*, 57(1), pp. 18-25.
- Ghadimi, B.M.**; Sackett, D.L.; Difilippantonio, M.J.; Schrock, E.; Neumann, T.; Jauho, A.; Auer, G. and Ried, T., 2000. "Centrosome Amplification and Instability Occurs Exclusively in Aneuploid, but Not in Diploid Colorectal Cancer Cell Lines, and Correlates with Numerical Chromosomal Aberrations." *Genes Chromosomes Cancer*, 27(2), pp. 183-90.
- Goodarzi, A.A.**; Noon, A.T. and Jeggo, P.A., 2009. "The Impact of Heterochromatin on Dsb Repair." *Biochem Soc Trans*, 37(Pt 3), pp. 569-76.
- Green, R.A.**; Paluch, E. and Oegema, K., 2012. "Cytokinesis in Animal Cells." *Annu Rev Cell Dev Biol*, 28, pp. 29-58.
- Hall, E., Giaccia, AJ**, 2006. "Radiobiology for the Radiologist." Lippincott Williams & Wilkins.
- Harvey, S.H.**; Krien, M.J. and O'Connell, M.J., 2002. "Structural Maintenance of Chromosomes (Smc) Proteins, a Family of Conserved ATPases." *Genome Biol*, 3(2), pp. REVIEWS3003.
- Hegarati, N.**; Smith, E.; Nayak, G.; Takeda, S.; Evers, P.A. and Hochegger, H., 2011. "Aurora a and Aurora B Jointly Coordinate Chromosome Segregation and Anaphase Microtubule Dynamics." *J Cell Biol*, 195(7), pp. 1103-13.
- Hernandez-Verdun, D. and Gautier, T.**, 1994. "The Chromosome Periphery During Mitosis." *Bioessays*, 16(3), pp. 179-85.
- Hickson, I.**; Zhao, Y.; Richardson, C.J.; Green, S.J.; Martin, N.M.; Orr, A.I.; Reaper, P.M.; Jackson, S.P.; Curtin, N.J. and Smith, G.C., 2004. "Identification and Characterization of a Novel and Specific Inhibitor of the Ataxia-Telangiectasia Mutated Kinase Atm." *Cancer Res*, 64(24), pp. 9152-9.
- Hirano, T.**, 2006. "At the Heart of the Chromosome: Smc Proteins in Action." *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(5), pp. 311-22.
- Hirano, T.**, 2005. "Smc Proteins and Chromosome Mechanics: From Bacteria to Humans." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 360(1455), pp. 507-14.
- Hoffelder, D.R.**; Luo, L.; Burke, N.A.; Watkins, S.C.; Gollin, S.M. and Saunders, W.S., 2004. "Resolution of Anaphase Bridges in Cancer Cells." *Chromosoma*, 112(8), pp. 389-97.
- Holliday, R.**, 1964. "Mechanism for Gene Conversion in Fungi " *GENETICAL RESEARCH*, 5((2)), pp. 282-&.

- Hopfner, K.P.**; Karcher, A.; Shin, D.S.; Craig, L.; Arthur, L.M.; Carney, J.P. and Tainer, J.A., 2000. "Structural Biology of Rad50 Atpase: Atp-Driven Conformational Control in DNA Double-Strand Break Repair and the Abc-Atpase Superfamily." *Cell*, 101(7), pp. 789-800.
- Howard, A.P., Pelc S.**, 1953. "Synthesis of Desoxyribunuclein Acid in Normal and Irradiated Cells and Its Relation to Chromosome Breakage." *Heredity*, 6, Suppl.261.
- Huang, H.**; Fletcher, L.; Beeharry, N.; Daniel, R.; Kao, G.; Yen, T.J. and Muschel, R.J., 2008. "Abnormal Cytokinesis after X-Irradiation in Tumor Cells That Override the G2 DNA Damage Checkpoint." *Cancer Res*, 68(10), pp. 3724-32.
- Huyen, Y.**; Zgheib, O.; Ditullio, R.A., Jr.; Gorgoulis, V.G.; Zacharatos, P.; Petty, T.J.; Sheston, E.A.; Mellert, H.S.; Stavridi, E.S. and Halazonetis, T.D., 2004. "Methylated Lysine 79 of Histone H3 Targets 53bp1 to DNA Double-Strand Breaks." *Nature*, 432(7015), pp. 406-11.
- Jazayeri, A.**; Falck, J.; Lukas, C.; Bartek, J.; Smith, G.C.; Lukas, J. and Jackson, S.P., 2006. "Atr- and Cell Cycle-Dependent Regulation of Atr in Response to DNA Double-Strand Breaks." *Nat Cell Biol*, 8(1), pp. 37-45.
- Karagiannis, T.C. and El-Osta, A.**, 2004. "Double-Strand Breaks: Signaling Pathways and Repair Mechanisms." *Cell Mol Life Sci*, 61(17), pp. 2137-47.
- Kinner, A.**; Wu, W.; Staudt, C. and Iliakis, G., 2008. "Gamma-H2ax in Recognition and Signaling of DNA Double-Strand Breaks in the Context of Chromatin." *Nucleic Acids Res*, 36(17), pp. 5678-94.
- Kinoshita, E.**; van der Linden, E.; Sanchez, H. and Wyman, C., 2009. "Rad50, an Smc Family Member with Multiple Roles in DNA Break Repair: How Does Atp Affect Function?" *Chromosome Res*, 17(2), pp. 277-88.
- Kobayashi, J.**; Tauchi, H.; Sakamoto, S.; Nakamura, A.; Morishima, K.; Matsuura, S.; Kobayashi, T.; Tamai, K.; Tanimoto, K. and Komatsu, K., 2002. "Nbs1 Localizes to Gamma-H2ax Foci through Interaction with the Fha/Brct Domain." *Curr Biol*, 12(21), pp. 1846-51.
- Koc, A.**; Wheeler, L.J.; Mathews, C.K. and Merrill, G.F., 2004. "Hydroxyurea Arrests DNA Replication by a Mechanism That Preserves Basal Dntp Pools." *J Biol Chem*, 279(1), pp. 223-30.
- Kolb, H.C.**; Finn, M.G. and Sharpless, K.B., 2001. "Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions." *Angew Chem Int Ed Engl*, 40(11), pp. 2004-21.
- Kumar, N.**; Gammell, P. and Clynes, M., 2007. "Proliferation Control Strategies to Improve Productivity and Survival During Cho Based Production Culture : A Summary of

Recent Methods Employed and the Effects of Proliferation Control in Product Secreting Cho Cell Lines." *Cytotechnology*, 53(1-3), pp. 33-46.

Lacroix, B. and Maddox, A.S., 2012. "Cytokinesis, Ploidy and Aneuploidy." *J Pathol*, 226(2), pp. 338-51.

Laemmli, U.K., 1970. "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature*, 227(5259), pp. 680-5.

Lamarche, B.J.; Orazio, N.I. and Weitzman, M.D., 2010. "The Mrn Complex in Double-Strand Break Repair and Telomere Maintenance." *FEBS Lett*, 584(17), pp. 3682-95.

Landecker, H., 2009. "Seeing Things: From Microcinematography to Live Cell Imaging." *Nat Methods*, 6(10), pp. 707-09.

Laulier, C.; Cheng, A. and Stark, J.M., 2011. "The Relative Efficiency of Homology-Directed Repair Has Distinct Effects on Proper Anaphase Chromosome Separation." *Nucleic Acids Res*, 39(14), pp. 5935-44.

Lavin, M.F., 2007. "Atm and the Mre11 Complex Combine to Recognize and Signal DNA Double-Strand Breaks." *Oncogene*, 26(56), pp. 7749-58.

Lavin, M.F., 2004. "The Mre11 Complex and Atm: A Two-Way Functional Interaction in Recognising and Signaling DNA Double Strand Breaks." *DNA Repair (Amst)*, 3(11), pp. 1515-20.

Lee, J.H.; Goodarzi, A.A.; Jeggo, P.A. and Paull, T.T., 2010. "53bp1 Promotes Atm Activity through Direct Interactions with the Mrn Complex." *EMBO J*, 29(3), pp. 574-85.

Lee, S.E.; Moore, J.K.; Holmes, A.; Umez, K.; Kolodner, R.D. and Haber, J.E., 1998. "Saccharomyces Ku70, Mre11/Rad50 and Rpa Proteins Regulate Adaptation to G2/M Arrest after DNA Damage." *Cell*, 94(3), pp. 399-409.

Lee, S.E.; Pellicioli, A.; Demeter, J.; Vaze, M.P.; Gasch, A.P.; Malkova, A.; Brown, P.O.; Botstein, D.; Stearns, T.; Foiani, M. and Haber, J.E., 2000. "Arrest, Adaptation, and Recovery Following a Chromosome Double-Strand Break in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 65, pp. 303-14.

Li, D.W.; Yang, Q.; Chen, J.T.; Zhou, H.; Liu, R.M. and Huang, X.T., 2005. "Dynamic Distribution of Ser-10 Phosphorylated Histone H3 in Cytoplasm of Mcf-7 and Cho Cells During Mitosis." *Cell Res*, 15(2), pp. 120-6.

Li, X.; Stith, C.M.; Burgers, P.M. and Heyer, W.D., 2009. "Pcna Is Required for Initiation of Recombination-Associated DNA Synthesis by DNA Polymerase Delta." *Mol Cell*, 36(4), pp. 704-13.

- Limoli, C.L.;** Giedzinski, E.; Bonner, W.M. and Cleaver, J.E., 2002. "Uv-Induced Replication Arrest in the Xeroderma Pigmentosum Variant Leads to DNA Double-Strand Breaks, Gamma -H2ax Formation, and Mre11 Relocalization." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(1), pp. 233-8.
- Lin, J.J. and Dutta, A.,** 2007. "Atr Pathway Is the Primary Pathway for Activating G2/M Checkpoint Induction after Re-Replication." *J Biol Chem*, 282(42), pp. 30357-62.
- Lloyd, J.;** Chapman, J.R.; Clapperton, J.A.; Haire, L.F.; Hartsuiker, E.; Li, J.; Carr, A.M.; Jackson, S.P. and Smerdon, S.J., 2009. "A Supramodular Fha/Brct-Repeat Architecture Mediates Nbs1 Adaptor Function in Response to DNA Damage." *Cell*, 139(1), pp. 100-11.
- Lobrich, M.;** Rydberg, B. and Cooper, P.K., 1995. "Repair of X-Ray-Induced DNA Double-Strand Breaks in Specific Not I Restriction Fragments in Human Fibroblasts: Joining of Correct and Incorrect Ends." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(26), pp. 12050-4.
- Lobrich, M.;** Shibata, A.; Beucher, A.; Fisher, A.; Ensminger, M.; Goodarzi, A.A.; Barton, O. and Jeggo, P.A., 2010. "Gammah2ax Foci Analysis for Monitoring DNA Double-Strand Break Repair: Strengths, Limitations and Optimization." *Cell Cycle*, 9(4), pp. 662-9.
- Losada, A. and Hirano, T.,** 2001. "Shaping the Metaphase Chromosome: Coordination of Cohesion and Condensation." *Bioessays*, 23(10), pp. 924-35.
- Louis-Bar, D.,** 1941. "Sur Un Syndrome Progressif Comprenant Des Téliangiectasies Capillaires Cutanées Et Conjonctivales Symétriques, À Disposition Naevoïde Et Des Troubles Cérébelleux" *Confinia Neurologica*, 4(1-2), pp. 32-42.
- Lu, C.;** Zhu, F.; Cho, Y.Y.; Tang, F.; Zykova, T.; Ma, W.Y.; Bode, A.M. and Dong, Z., 2006. "Cell Apoptosis: Requirement of H2ax in DNA Ladder Formation, but Not for the Activation of Caspase-3." *Mol Cell*, 23(1), pp. 121-32.
- Ma, Y.;** Lu, H.; Tippin, B.; Goodman, M.F.; Shimazaki, N.; Koiwai, O.; Hsieh, C.L.; Schwarz, K. and Lieber, M.R., 2004. "A Biochemically Defined System for Mammalian Nonhomologous DNA End Joining." *Mol Cell*, 16(5), pp. 701-13.
- Mah, L.J.;** El-Osta, A. and Karagiannis, T.C., 2010. "Gammah2ax: A Sensitive Molecular Marker of DNA Damage and Repair." *Leukemia*, 24(4), pp. 679-86.
- Mailand, N.;** Bekker-Jensen, S.; Faustrup, H.; Melander, F.; Bartek, J.; Lukas, C. and Lukas, J., 2007. "Rnf8 Ubiquitylates Histones at DNA Double-Strand Breaks and Promotes Assembly of Repair Proteins." *Cell*, 131(5), pp. 887-900.
- Mailand, N.;** Falck, J.; Lukas, C.; Syljuasen, R.G.; Welcker, M.; Bartek, J. and Lukas, J., 2000. "Rapid Destruction of Human Cdc25a in Response to DNA Damage." *Science*, 288(5470), pp. 1425-9.

- Mao, Z.;** Bozzella, M.; Seluanov, A. and Gorbunova, V., 2008. "DNA Repair by Nonhomologous End Joining and Homologous Recombination During Cell Cycle in Human Cells." *Cell Cycle*, 7(18), pp. 2902-6.
- Marceau, N.;** Goyette, R.; Deschenes, J. and Valet, J.P., 1980. "Morphological Differences between Epithelial and Fibroblast Cells in Rat Liver Cultures, and the Roles of Cell Surface Fibronectin and Cytoskeletal Element Organization in Cell Shape." *Ann N Y Acad Sci*, 349, pp. 138-52.
- Matsuoka, S.;** Ballif, B.A.; Smogorzewska, A.; McDonald, E.R., 3rd; Hurov, K.E.; Luo, J.; Bakalarski, C.E.; Zhao, Z.; Solimini, N.; Lerenthal, Y.; Shiloh, Y.; Gygi, S.P. and Elledge, S.J., 2007. "Atm and Atr Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage." *Science*, 316(5828), pp. 1160-6.
- Mazon, G.;** Mimitou, E.P. and Symington, L.S., 2010. "Snapshot: Homologous Recombination in DNA Double-Strand Break Repair." *Cell*, 142(4), pp. 646, 46 e1.
- McGrath, C., Soule, H.,**1991. "Immortal Human Mammary Epithelial Cell Lines," In. USA.Patent Number:US5026637 A
- Mendez, G.;** Cilli, D.; Berardinelli, F.; Viganotti, M.; Ascenzi, P.; Tanzarella, C.; Antoccia, A. and di Masi, A., 2012. "Cleavage of the Brct Tandem Domains of Nibrin by the 657del5 Mutation Affects the DNA Damage Response Less Than the Arg215trp Mutation." *IUBMB Life*, 64(10), pp. 853-61.
- Meraldi, P.;** Honda, R. and Nigg, E.A., 2002. "Aurora-a Overexpression Reveals Tetraploidization as a Major Route to Centrosome Amplification in P53^{-/-} Cells." *EMBO J*, 21(4), pp. 483-92.
- Minsky, M.,**1957. "Microscopy Apparatus," In.Patent Number:3013467
- Mirzoeva, O.K. and Petrini, J.H.,** 2003. "DNA Replication-Dependent Nuclear Dynamics of the Mre11 Complex." *Mol Cancer Res*, 1(3), pp. 207-18.
- Monaco, L.;** Kolthur-Seetharam, U.; Loury, R.; Murcia, J.M.; de Murcia, G. and Sassone-Corsi, P., 2005. "Inhibition of Aurora-B Kinase Activity by Poly(Adp-Ribosyl)ation in Response to DNA Damage." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(40), pp. 14244-8.
- Morgan, D.,** 2007. *The Cell Cycle:Prinicples of Control*. Oxford University Press.
- Moshous, D.;** Callebaut, I.; de Chasseval, R.; Corneo, B.; Cavazzana-Calvo, M.; Le Deist, F.; Tezcan, I.; Sanal, O.; Bertrand, Y.; Philippe, N.; Fischer, A. and de Villartay, J.P., 2001. "Artemis, a Novel DNA Double-Strand Break Repair/V(D)J Recombination Protein, Is Mutated in Human Severe Combined Immune Deficiency." *Cell*, 105(2), pp. 177-86.

Naim, V. and Rosselli, F., 2009. "The Fanc Pathway and Blm Collaborate During Mitosis to Prevent Micro-Nucleation and Chromosome Abnormalities." *Nat Cell Biol*, 11(6), pp. 761-8.

Neitzel, H., 1986. "A Routine Method for the Establishment of Permanent Growing Lymphoblastoid Cell Lines." *Hum Genet*, 73(4), pp. 320-6.

Nelms, K.; Huang, H.; Ryan, J.; Keegan, A. and Paul, W.E., 1998. "Interleukin-4 Receptor Signalling Mechanisms and Their Biological Significance." *Adv Exp Med Biol*, 452, pp. 37-43.

Norden, C.; Mendoza, M.; Dobbelaere, J.; Kotwaliwale, C.V.; Biggins, S. and Barral, Y., 2006. "The Nocut Pathway Links Completion of Cytokinesis to Spindle Midzone Function to Prevent Chromosome Breakage." *Cell*, 125(1), pp. 85-98.

Normand, G. and King, R.W., 2010. "Understanding Cytokinesis Failure." *Adv Exp Med Biol*, 676, pp. 27-55.

Odersky, A.; Panyutin, I.V.; Panyutin, I.G.; Schunck, C.; Feldmann, E.; Goedecke, W.; Neumann, R.D.; Obe, G. and Pfeiffer, P., 2002. "Repair of Sequence-Specific 125i-Induced Double-Strand Breaks by Nonhomologous DNA End Joining in Mammalian Cell-Free Extracts." *J Biol Chem*, 277(14), pp. 11756-64.

Ogawa, H.; Johzuka, K.; Nakagawa, T.; Leem, S.H. and Hagihara, A.H., 1995. "Functions of the Yeast Meiotic Recombination Genes, Mre11 and Mre2." *Adv Biophys*, 31, pp. 67-76.

Okano, S.; Kanno, S.; Nakajima, S. and Yasui, A., 2000. "Cellular Responses and Repair of Single-Strand Breaks Introduced by Uv Damage Endonuclease in Mammalian Cells." *J Biol Chem*, 275(42), pp. 32635-41.

Okubo, E.; Lehman, J.M. and Friedrich, T.D., 2003. "Negative Regulation of Mitotic Promoting Factor by the Checkpoint Kinase Chk1 in Simian Virus 40 Lytic Infection." *J Virol*, 77(2), pp. 1257-67.

Painter, R.B., 1985. "Radiation Sensitivity and Cancer in Ataxia-Telangiectasia." *Ann N Y Acad Sci*, 459, pp. 382-6.

Paull, T.T. and Gellert, M., 1998. "The 3' to 5' Exonuclease Activity of Mre 11 Facilitates Repair of DNA Double-Strand Breaks." *Mol Cell*, 1(7), pp. 969-79.

Pines, J., 1995. "Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases: Theme and Variations." *Adv Cancer Res*, 66, pp. 181-212.

Pohl, C. and Jentsch, S., 2009. "Midbody Ring Disposal by Autophagy Is a Post-Abscission Event of Cytokinesis." *Nat Cell Biol*, 11(1), pp. 65-70.

- Rannou, Y.;** Troadec, M.B.; Petretti, C.; Hans, F.; Dutertre, S.; Dimitrov, S. and Prigent, C., 2008. "Localization of Aurora a and Aurora B Kinases During Interphase: Role of the N-Terminal Domain." *Cell Cycle*, 7(19), pp. 3012-20.
- Ripperger, T.;** Gadzicki, D.; Meindl, A. and Schlegelberger, B., 2009. "Breast Cancer Susceptibility: Current Knowledge and Implications for Genetic Counselling." *Eur J Hum Genet*, 17(6), pp. 722-31.
- Robison, J.G.;** Elliott, J.; Dixon, K. and Oakley, G.G., 2004. "Replication Protein a and the Mre11.Rad50.Nbs1 Complex Co-Localize and Interact at Sites of Stalled Replication Forks." *J Biol Chem*, 279(33), pp. 34802-10.
- Rogakou, E.P.;** Nieves-Neira, W.; Boon, C.; Pommier, Y. and Bonner, W.M., 2000. "Initiation of DNA Fragmentation During Apoptosis Induces Phosphorylation of H2ax Histone at Serine 139." *J Biol Chem*, 275(13), pp. 9390-5.
- Rozier, L.;** Guo, Y.; Peterson, S.; Sato, M.; Baer, R.; Gautier, J. and Mao, Y., 2013. "The Mrn-Ctip Pathway Is Required for Metaphase Chromosome Alignment." *Mol Cell*, 49(6), pp. 1097-107.
- San Filippo, J.S., P.,** Klein, H., 2008. "Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination." *Annu Rev Biochem*, 77.
- Sandell, L.L. and Zakian, V.A.,** 1993. "Loss of a Yeast Telomere: Arrest, Recovery, and Chromosome Loss." *Cell*, 75(4), pp. 729-39.
- Sato, K.;** Ohta, T. and Venkitaraman, A.R., 2010. "A Mitotic Role for the DNA Damage-Responsive Chk2 Kinase." *Nat Cell Biol*, 12(5), pp. 424-5.
- Savic, V.;** Yin, B.; Maas, N.L.; Bredemeyer, A.L.; Carpenter, A.C.; Helmink, B.A.; Yang-Iott, K.S.; Sleckman, B.P. and Bassing, C.H., 2009. "Formation of Dynamic Gamma-H2ax Domains Along Broken DNA Strands Is Distinctly Regulated by Atm and Mdc1 and Dependent Upon H2ax Densities in Chromatin." *Mol Cell*, 34(3), pp. 298-310.
- Savitsky, K.;** Bar-Shira, A.; Gilad, S.; Rotman, G.; Ziv, Y.; Vanagaite, L.; Tagle, D.A.; Smith, S.; Uziel, T.; Sfez, S.; Ashkenazi, M.; Pecker, I.; Frydman, M.; Harnik, R.; Patanjali, S.R.; Simmons, A.; Clines, G.A.; Sartiel, A.; Gatti, R.A.; Chessa, L.; Sanal, O.; Lavin, M.F.; Jaspers, N.G.; Taylor, A.M.; Arlett, C.F.; Miki, T.; Weissman, S.M.; Lovett, M.; Collins, F.S. and Shiloh, Y., 1995. "A Single Ataxia Telangiectasia Gene with a Product Similar to Pi-3 Kinase." *Science*, 268(5218), pp. 1749-53.
- Schmiesing, J.A.;** Gregson, H.C.; Zhou, S. and Yokomori, K., 2000. "A Human Condensin Complex Containing Hcap-C-Hcap-E and Cnap1, a Homolog of Xenopus Xcap-D2, Colocalizes with Phosphorylated Histone H3 During the Early Stage of Mitotic Chromosome Condensation." *Mol Cell Biol*, 20(18), pp. 6996-7006.

Schroeder, T.E., 1990. "The Contractile Ring and Furrowing in Dividing Cells." *Ann N Y Acad Sci*, 582, pp. 78-87.

Schweitzer, J.K. and D'Souza-Schorey, C., 2005. "A Requirement for Arf6 During the Completion of Cytokinesis." *Exp Cell Res*, 311(1), pp. 74-83.

Sedelnikova, O.A.; Pilch, D.R.; Redon, C. and Bonner, W.M., 2003. "Histone H2ax in DNA Damage and Repair." *Cancer Biol Ther*, 2(3), pp. 233-5.

Seemanova, E.; Jarolim, P.; Seeman, P.; Varon, R.; Digweed, M.; Swift, M. and Sperling, K., 2007. "Cancer Risk of Heterozygotes with the Nbn Founder Mutation." *J Natl Cancer Inst*, 99(24), pp. 1875-80.

Seemanova, E.; Sperling, K.; Neitzel, H.; Varon, R.; Hadac, J.; Butova, O.; Schrock, E.; Seeman, P. and Digweed, M., 2006. "Nijmegen Breakage Syndrome (Nbs) with Neurological Abnormalities and without Chromosomal Instability." *J Med Genet*, 43(3), pp. 218-24.

Semwogerere, D., Weeks, ER., 2005: "Confocal Microscopy." *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, Nov.28 10; (1-10)

Sen, S., 2000. "Aneuploidy and Cancer." *Curr Opin Oncol*, 12(1), pp. 82-8.

Sengupta, S. and Harris, C.C., 2005. "P53: Traffic Cop at the Crossroads of DNA Repair and Recombination." *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(1), pp. 44-55.

Seno, J.D. and Dynlacht, J.R., 2004. "Intracellular Redistribution and Modification of Proteins of the Mre11/Rad50/Nbs1 DNA Repair Complex Following Irradiation and Heat-Shock." *J Cell Physiol*, 199(2), pp. 157-70.

Shechter, D. and Gautier, J., 2005. "Atm and Atr Check in on Origins: A Dynamic Model for Origin Selection and Activation." *Cell Cycle*, 4(2), pp. 235-8.

Shiloh, Y., 1997. "Ataxia-Telangiectasia and the Nijmegen Breakage Syndrome: Related Disorders but Genes Apart." *Annu Rev Genet*, 31, pp. 635-62.

Shiloh, Y., 2001. "Atm and Atr: Networking Cellular Responses to DNA Damage." *Curr Opin Genet Dev*, 11(1), pp. 71-7.

Shimada, M. and Komatsu, K., 2009. "Emerging Connection between Centrosome and DNA Repair Machinery." *J Radiat Res*, 50(4), pp. 295-301.

Shimada, M.; Sagae, R.; Kobayashi, J.; Habu, T. and Komatsu, K., 2009. "Inactivation of the Nijmegen Breakage Syndrome Gene Leads to Excess Centrosome Duplication Via the Atr/Brcal Pathway." *Cancer Res*, 69(5), pp. 1768-75.

Sisken, J.E. and Morasca, L., 1965. "Intrapopulation Kinetics of the Mitotic Cycle." *J Cell Biol*, 25(2), pp. 179-89.

Smolka, M.B.; Chen, S.H.; Maddox, P.S.; Enserink, J.M.; Albuquerque, C.P.; Wei, X.X.; Desai, A.; Kolodner, R.D. and Zhou, H., 2006. "An Fha Domain-Mediated Protein Interaction Network of Rad53 Reveals Its Role in Polarized Cell Growth." *J Cell Biol*, 175(5), pp. 743-53.

Stauffer, M.E. and Chazin, W.J., 2004. "Physical Interaction between Replication Protein a and Rad51 Promotes Exchange on Single-Stranded DNA." *J Biol Chem*, 279(24), pp. 25638-45.

Steigemann, P.; Wurzenberger, C.; Schmitz, M.H.; Held, M.; Guizetti, J.; Maar, S. and Gerlich, D.W., 2009. "Aurora B-Mediated Abscission Checkpoint Protects against Tetraploidization." *Cell*, 136(3), pp. 473-84.

Stewart, G.S.; Maser, R.S.; Stankovic, T.; Bressan, D.A.; Kaplan, M.I.; Jaspers, N.G.; Raams, A.; Byrd, P.J.; Petrini, J.H. and Taylor, A.M., 1999. "The DNA Double-Strand Break Repair Gene Hmre11 Is Mutated in Individuals with an Ataxia-Telangiectasia-Like Disorder." *Cell*, 99(6), pp. 577-87.

Stewenius, Y.; Gorunova, L.; Jonson, T.; Larsson, N.; Hoglund, M.; Mandahl, N.; Mertens, F.; Mitelman, F. and Gisselsson, D., 2005. "Structural and Numerical Chromosome Changes in Colon Cancer Develop through Telomere-Mediated Anaphase Bridges, Not through Mitotic Multipolarity." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(15), pp. 5541-6.

Stiff, T.; Cerosaletti, K.; Concannon, P.; O'Driscoll, M. and Jeggo, P.A., 2008. "Replication Independent Atr Signalling Leads to G2/M Arrest Requiring Nbs1, 53bp1 and Mdc1." *Hum Mol Genet*, 17(20), pp. 3247-53.

Stiff, T.; Reis, C.; Alderton, G.K.; Woodbine, L.; O'Driscoll, M. and Jeggo, P.A., 2005. "Nbs1 Is Required for Atr-Dependent Phosphorylation Events." *EMBO J*, 24(1), pp. 199-208.

Stiff, T.; Walker, S.A.; Cerosaletti, K.; Goodarzi, A.A.; Petermann, E.; Concannon, P.; O'Driscoll, M. and Jeggo, P.A., 2006. "Atr-Dependent Phosphorylation and Activation of Atm in Response to Uv Treatment or Replication Fork Stalling." *EMBO J*, 25(24), pp. 5775-82.

Stracker, T.H. and Petrini, J.H., 2011. "The Mre11 Complex: Starting from the Ends." *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(2), pp. 90-103.

Stucki, M.; Clapperton, J.A.; Mohammad, D.; Yaffe, M.B.; Smerdon, S.J. and Jackson, S.P., 2005. "Mdc1 Directly Binds Phosphorylated Histone H2ax to Regulate Cellular Responses to DNA Double-Strand Breaks." *Cell*, 123(7), pp. 1213-26.

Stucki, M. and Jackson, S.P., 2004. "Mdc1/Nfbd1: A Key Regulator of the DNA Damage Response in Higher Eukaryotes." *DNA Repair (Amst)*, 3(8-9), pp. 953-7.

Su, T.T., 2006. "Cellular Responses to DNA Damage: One Signal, Multiple Choices." *Annu Rev Genet*, 40, pp. 187-208.

Sugiyama, T. and Kowalczykowski, S.C., 2002. "Rad52 Protein Associates with Replication Protein a (Rpa)-Single-Stranded DNA to Accelerate Rad51-Mediated Displacement of Rpa and Presynaptic Complex Formation." *J Biol Chem*, 277(35), pp. 31663-72.

Svendsen, J.M. and Harper, J.W., 2010. "Gen1/Yen1 and the Slx4 Complex: Solutions to the Problem of Holliday Junction Resolution." *Genes Dev*, 24(6), pp. 521-36.

Swift, M.; Morrell, D.; Cromartie, E.; Chamberlin, A.R.; Skolnick, M.H. and Bishop, D.T., 1986. "The Incidence and Gene Frequency of Ataxia-Telangiectasia in the United States." *Am J Hum Genet*, 39(5), pp. 573-83.

Szyjka, S.J.; Aparicio, J.G.; Viggiani, C.J.; Knott, S.; Xu, W.; Tavare, S. and Aparicio, O.M., 2008. "Rad53 Regulates Replication Fork Restart after DNA Damage in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Genes Dev*, 22(14), pp. 1906-20.

Takata, M.; Sasaki, M.S.; Sonoda, E.; Morrison, C.; Hashimoto, M.; Utsumi, H.; Yamaguchi-Iwai, Y.; Shinohara, A. and Takeda, S., 1998. "Homologous Recombination and Non-Homologous End-Joining Pathways of DNA Double-Strand Break Repair Have Overlapping Roles in the Maintenance of Chromosomal Integrity in Vertebrate Cells." *EMBO J*, 17(18), pp. 5497-508.

Tasat, D., Yakisich, JS, 2010. *DNA Damage Repair, Repair Mechanisms and Aging*. Nova Science Publisher

Taylor, A.M.; Metcalfe, J.A.; Thick, J. and Mak, Y.F., 1996. "Leukemia and Lymphoma in Ataxia Telangiectasia." *Blood*, 87(2), pp. 423-38.

Terada, Y., 2001. "Role of Chromosomal Passenger Complex in Chromosome Segregation and Cytokinesis." *Cell Struct Funct*, 26(6), pp. 653-7.

Ting, N.S. and Lee, W.H., 2004. "The DNA Double-Strand Break Response Pathway: Becoming More Braish Than Ever." *DNA Repair (Amst)*, 3(8-9), pp. 935-44.

Tittel-Elmer, M.; Lengronne, A.; Davidson, M.B.; Bacal, J.; Francois, P.; Hohl, M.; Petrini, J.H.; Pasero, P. and Cobb, J.A., 2012. "Cohesin Association to Replication Sites Depends on Rad50 and Promotes Fork Restart." *Mol Cell*, 48(1), pp. 98-108.

Toczyski, D.P.; Galgoczy, D.J. and Hartwell, L.H., 1997. "Cdc5 and Ckii Control Adaptation to the Yeast DNA Damage Checkpoint." *Cell*, 90(6), pp. 1097-106.

- Todaro, G.J. and Green, H.**, 1963. "Quantitative Studies of the Growth of Mouse Embryo Cells in Culture and Their Development into Established Lines." *J Cell Biol*, 17, pp. 299-313.
- Tomlinson, G.E.**; Chen, T.T.; Stastny, V.A.; Virmani, A.K.; Spillman, M.A.; Tonk, V.; Blum, J.L.; Schneider, N.R.; Wistuba, II; Shay, J.W.; Minna, J.D. and Gazdar, A.F., 1998. "Characterization of a Breast Cancer Cell Line Derived from a Germ-Line Brca1 Mutation Carrier." *Cancer Res*, 58(15), pp. 3237-42.
- Towbin, H.**; Staehelin, T. and Gordon, J., 1979. "Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(9), pp. 4350-4.
- Trujillo, K.M.**; Yuan, S.S.; Lee, E.Y. and Sung, P., 1998. "Nuclease Activities in a Complex of Human Recombination and DNA Repair Factors Rad50, Mre11, and P95." *J Biol Chem*, 273(34), pp. 21447-50.
- Vagnarelli, P. and Earnshaw, W.C.**, 2004. "Chromosomal Passengers: The Four-Dimensional Regulation of Mitotic Events." *Chromosoma*, 113(5), pp. 211-22.
- van der Linden, E.**; Sanchez, H.; Kinoshita, E.; Kanaar, R. and Wyman, C., 2009. "Rad50 and Nbs1 Form a Stable Complex Functional in DNA Binding and Tethering." *Nucleic Acids Res*, 37(5), pp. 1580-8.
- Van Hooser, A.**; Goodrich, D.W.; Allis, C.D.; Brinkley, B.R. and Mancini, M.A., 1998. "Histone H3 Phosphorylation Is Required for the Initiation, but Not Maintenance, of Mammalian Chromosome Condensation." *J Cell Sci*, 111 (Pt 23), pp. 3497-506.
- Van Hooser, A.A.**; Yuh, P. and Heald, R., 2005. "The Perichromosomal Layer." *Chromosoma*, 114(6), pp. 377-88.
- Varon, R.**; Vissinga, C.; Platzer, M.; Cerosaletti, K.M.; Chrzanowska, K.H.; Saar, K.; Beckmann, G.; Seemanova, E.; Cooper, P.R.; Nowak, N.J.; Stumm, M.; Weemaes, C.M.; Gatti, R.A.; Wilson, R.K.; Digweed, M.; Rosenthal, A.; Sperling, K.; Concannon, P. and Reis, A., 1998. "Nibrin, a Novel DNA Double-Strand Break Repair Protein, Is Mutated in Nijmegen Breakage Syndrome." *Cell*, 93(3), pp. 467-76.
- Vinciguerra, P.**; Godinho, S.A.; Parmar, K.; Pellman, D. and D'Andrea, A.D., 2010. "Cytokinesis Failure Occurs in Fanconi Anemia Pathway-Deficient Murine and Human Bone Marrow Hematopoietic Cells." *J Clin Invest*, 120(11), pp. 3834-42.
- Virchow, R.**, 1858. "Die Cellularpathologie in Ihrer Begründung Und in Ihrer Auswirkung Auf Die Physiologische Und Pathologische Gewebelehre," In. Berlin: Verlag A. Hirschwald.
- Wadsworth, P.**, 2005. "Cytokinesis: Rho Marks the Spot." *Curr Biol*, 15(21), pp. R871-4.

- Walker, J.R.;** Corpina, R.A. and Goldberg, J., 2001. "Structure of the Ku Heterodimer Bound to DNA and Its Implications for Double-Strand Break Repair." *Nature*, 412(6847), pp. 607-14.
- Walsh, T. and King, M.C.,** 2007. "Ten Genes for Inherited Breast Cancer." *Cancer Cell*, 11(2), pp. 103-5.
- Waltes, R.;** Kalb, R.; Gatei, M.; Kijas, A.W.; Stumm, M.; Sobeck, A.; Wieland, B.; Varon, R.; Lerenthal, Y.; Lavin, M.F.; Schindler, D. and Dork, T., 2009. "Human Rad50 Deficiency in a Nijmegen Breakage Syndrome-Like Disorder." *Am J Hum Genet*, 84(5), pp. 605-16.
- Ward, I.M.;** Minn, K. and Chen, J., 2004. "Uv-Induced Ataxia-Telangiectasia-Mutated and Rad3-Related (Atr) Activation Requires Replication Stress." *J Biol Chem*, 279(11), pp. 9677-80.
- Ward, J.F.,** 1988. "DNA Damage Produced by Ionizing Radiation in Mammalian Cells: Identities, Mechanisms of Formation, and Reparability." *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 35, pp. 95-125.
- Warmerdam, D.O. and Kanaar, R.,** 2010. "Dealing with DNA Damage: Relationships between Checkpoint and Repair Pathways." *Mutat Res*, 704(1-3), pp. 2-11.
- Wei, Y.;** Yu, L.; Bowen, J.; Gorovsky, M.A. and Allis, C.D., 1999. "Phosphorylation of Histone H3 Is Required for Proper Chromosome Condensation and Segregation." *Cell*, 97(1), pp. 99-109.
- Weibrecht, I.;** Leuchowius, K.J.; Clausson, C.M.; Conze, T.; Jarvius, M.; Howell, W.M.; Kamali-Moghaddam, M. and Soderberg, O., 2010. "Proximity Ligation Assays: A Recent Addition to the Proteomics Toolbox." *Expert Rev Proteomics*, 7(3), pp. 401-9.
- West, A.G. and van Attikum, H.,** 2006. "Chromatin at the Crossroads. Meeting on Signalling to Chromatin Epigenetics." *EMBO Rep*, 7(12), pp. 1206-10.
- Weterings, E. and Chen, D.J.,** 2008. "The Endless Tale of Non-Homologous End-Joining." *Cell Res*, 18(1), pp. 114-24.
- Weterings, E. and van Gent, D.C.,** 2004. "The Mechanism of Non-Homologous End-Joining: A Synopsis of Synapsis." *DNA Repair (Amst)*, 3(11), pp. 1425-35.
- Williams, R.S.;** Dodson, G.E.; Limbo, O.; Yamada, Y.; Williams, J.S.; Guenther, G.; Classen, S.; Glover, J.N.; Iwasaki, H.; Russell, P. and Tainer, J.A., 2009. "Nbs1 Flexibly Tethers Ctp1 and Mre11-Rad50 to Coordinate DNA Double-Strand Break Processing and Repair." *Cell*, 139(1), pp. 87-99.

Williams, R.S.; Williams, J.S. and Tainer, J.A., 2007. "Mre11-Rad50-Nbs1 Is a Keystone Complex Connecting DNA Repair Machinery, Double-Strand Break Signaling, and the Chromatin Template." *Biochem Cell Biol*, 85(4), pp. 509-20.

Wold, M.S., 1997. "Replication Protein A: A Heterotrimeric, Single-Stranded DNA-Binding Protein Required for Eukaryotic DNA Metabolism." *Annu Rev Biochem*, 66, pp. 61-92.

Wu, X.; Shell, S.M. and Zou, Y., 2005. "Interaction and Colocalization of Rad9/Rad1/Hus1 Checkpoint Complex with Replication Protein a in Human Cells." *Oncogene*, 24(29), pp. 4728-35.

Yajima, H.; Lee, K.J. and Chen, B.P., 2006. "Atr-Dependent Phosphorylation of DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit in Response to Uv-Induced Replication Stress." *Mol Cell Biol*, 26(20), pp. 7520-8.

Yazdi, P.T.; Wang, Y.; Zhao, S.; Patel, N.; Lee, E.Y. and Qin, J., 2002. "Smc1 Is a Downstream Effector in the Atm/Nbs1 Branch of the Human S-Phase Checkpoint." *Genes Dev*, 16(5), pp. 571-82.

You, Z.; Chahwan, C.; Bailis, J.; Hunter, T. and Russell, P., 2005. "Atm Activation and Its Recruitment to Damaged DNA **Require Binding to the C Terminus of Nbs1.**" *Mol Cell Biol*, 25(13), pp. 5363-79.

Zachos, G.; Black, E.J.; Walker, M.; Scott, M.T.; Vagnarelli, P.; Earnshaw, W.C. and Gillespie, D.A., 2007. "Chk1 Is Required for Spindle Checkpoint Function." *Dev Cell*, 12(2), pp. 247-60.

Zha, S.; Boboila, C. and Alt, F.W., 2009. "Mre11: Roles in DNA Repair Beyond Homologous Recombination." *Nat Struct Mol Biol*, 16(8), pp. 798-800.

Zhang, S.; Hemmerich, P. and Grosse, F., 2007. "Centrosomal Localization of DNA Damage Checkpoint Proteins." *J Cell Biochem*, 101(2), pp. 451-65.

Zhao, H.; Watkins, J.L. and Piwnica-Worms, H., 2002. "Disruption of the Checkpoint Kinase 1/Cell Division Cycle 25a Pathway Abrogates Ionizing Radiation-Induced S and G2 Checkpoints." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(23), pp. 14795-800.

Zhou, B.B. and Elledge, S.J., 2000. "The DNA Damage Response: Putting Checkpoints in Perspective." *Nature*, 408(6811), pp. 433-9.

8 Schriftenverzeichnis

1) Originalarbeiten:

1. **Heurich, B.**, el Idrissi, NB., Donev, RM., Petri, S., Claus, P., Neal, J., Morgan, BP., Ramaglia, V., (2011): Complement upregulation and activation on motor neurons and neuromuscular junction in the SOD1 G93A mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 235: 104-109
2. **Schröder-Heurich, B.**, Wieland, B., Lavin, MF., Schindler, D, Dörk, T. , (2013) Protective role of RAD50 on chromatin bridges during abnormal cytokinesis (The FASEB Journal, in press)
3. **Schröder-Heurich, B.**, Bogdanova, N., Wieland, B., Xie, X., Noskowicz, M., Park-Simon, TW., Hillemanns, P., Christiansen, H., Dörk, T., (2013): Functional deficiency of NBN, the Nijmegen Breakage Syndrome protein, in a p.R215W mutant breast cancer cell line (zur Veröffentlichung eingereicht)

2) Publierte Abstracta:

1. **Schröder-Heurich, B.**, Wieland, B., Schindler, D, Dörk, T. , (2012): RAD50 als zentraler Bestandteil von Chromatinbrücken nach Strahlenschäden. 26. Tagung der Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung, P22, Online Publication, https://www.gum-net.de/fileadmin/user_upload/Tagungen/Tagung_2012/GUM-Abstractbandb.pdf
2. Bogdanova, N., **Schröder-Heurich, B.**, Wieland, B., Christiansen, H., Dörk, T., (2013): Funktionelle Untersuchungen an einer lymphoblastoiden Zelllinie mit der krebsassoziierten Mutation *CHEK2**I157T im Vergleich zu Zellen mit Mutationen in den zentralen Doppelstrangbruchreparaturgenen *ATM* und *NBN*. 22. Symposium Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie; P123-127.
3. Bogdanova, N., **Schröder-Heurich, B.**, Wieland B., Dörk, T., (2012): Monitoring the G2/M checkpoint and repair defects in LCLs with mutations of the NBN/ATM/CHEK2 pathway. 26. Tagung der Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung, P17. Online Publication, https://www.gum-net.de/fileadmin/user_upload/Tagungen/Tagung_2012/GUM-Abstractbandb.pdf
4. Dannemann, N., Bednarski, C., Mussolino C., **Schröder-Heurich, B.**, Dreyer, AK., Khan, K., Dörk-Bousset, T., Cathomen, T., (2012): Extrinsic Determinants of ZFN and TALEN-Mediated Gene Disruption, American Society of Gene & Cell Therapy, RNA Viral Vectors-Nature: S25, P60.

3) Nicht-publizierte/ eingereichte Abstracta:

1. **Schröder-Heurich, B.**, Bogdanova, N., Xie, X., Wieland, B., Park-Simon, TW, Dörk, T. (2012): Differential DNA damage responses in breast cancer cells with genetic deficiencies in *BRCA1* or *NBN*. European Human Genetics Conference (ESHG) 2012, Nürnberg.

2. **Schröder-Heurich, B.**, Bogdanova, N., Wieland, B., Christiansen, H., Dörk, T., (2013): DNA damage response in breast cancer cells with genetic mutations in double-strand break repair pathway genes. Wolfsberg Meeting on Molecular Radiation Biology/Oncology 2013, Wolfsberg.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Holtmann danke ich herzlich für die Betreuung meiner Dissertation sowie für seine wissenschaftliche und persönliche Unterstützung.

Herrn Dr. Dörk-Bousset möchte ich herzlichst für die Anleitung und Unterstützung sowie für die Bereitstellung und die Hilfe bei der Gestaltung des interessanten Themas danken. Der mir dabei gewährte Freiraum hat zu meiner persönlichen Entwicklung als Naturwissenschaftlerin wesentlich beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. Hillemans bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme in die Abteilung der Frauenklinik der MHH, die Unterstützung meiner Arbeit sowie für das mir entgegengebrachte Vertrauen während der Durchführung der Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Schindler bedanke ich mich herzlich für die Übernahme des Korreferats und für die gute Zusammenarbeit und seine Hilfsbereitschaft.

Bei Herrn Prof. Dr. Huchzermeyer möchte ich mich ganz besonders für die Übernahme des Vorsitzes und für die Unterstützung bedanken.

Weiterhin möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Karstens und Herrn Prof. Dr. Christiansen sowie den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Abteilung Strahlentherapie der MHH für die freundliche Hilfe und Unterstützung während meiner Arbeit bedanken.

Des Weiteren danke ich ganz besonders allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der genannten Institutionen für das angenehme Arbeitsklima und die stetige Hilfsbereitschaft. Die Diskussionen von Ergebnissen und wissenschaftlichen Fragestellungen sowie schöne Stunden und Gespräche machten das Arbeiten sehr angenehm. Mein besonderer Dank gilt meinen Arbeitskollegen/-innen Natalia Bogdanova, Peter Schürmann, Britta Wieland und Sonja Helbig die am Gelingen dieser Arbeit einen großen Anteil haben.

Ein herzlicher Dank gilt auch Anke Hofmeister-Brix und Julia Debora Sürth, die mich bereits im Studium und auch während dieser Dissertation begleitet haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie für die großartige und stetige Unterstützung in den letzten Jahren bedanken, insbesondere bei meiner Schwester Meike, die stets wusste mich zu motivieren und mit der man spannende, wissenschaftliche Diskussionen führen kann.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Ehemann für die wundervollen letzten zehn Jahre bedanken. Mit deiner Hilfe, deiner Unterstützung und deinem großartigen Optimismus hast du einen wesentlichen Anteil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Bianca Schröder-Heurich, geb. Heurich
 Geburtsdatum: 29.01.1982
 Geburtsort: Burgwedel
 Familienstand: verheiratet
 Wohnsitz: Dorfstraße 44, 30916 Isernhagen

Schulbildung:

1988 - 1992 Grundschule Bissendorf, Wedemark
 1992 - 1994 Orientierungsstufe Bissendorf, Wedemark
 1994 - 1998 Gymnasium Mellendorf, Wedemark
 1998 - 2001 Gymnasium Leibnizschule, Hannover
 19.06. 2001 Zuerkennung der Allgemeinen Hochschulreife

Studium:

Fachrichtung: Diplom Biochemie
 10/2002 – 09/2005 Grundstudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 28.09.2005 Zuerkennung des Vordiploms
 10/ 2005 - 04/2009 Hauptstudium an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
 07/2008 – 03/2009 Diplomarbeit im Institut für Neuroanatomie, Medizinische Hochschule Hannover. Diplomarbeitsthema: „Das Aktincytoskelett bei der Amyotrophen Lateralsklerose“.

 15.5.2009 Abschluss mit dem Hochschulgrad Diplom-Biochemikerin an der Gottfried Willhelm Leibniz Universität
 Abschlussnote: sehr gut

 04/2009-06/2009 Gastwissenschaftlerin im Department of Infection, Immunity and Biochemistry, School of Medicine, Cardiff University, UK

 03/2010-05/2010 Gastwissenschaftlerin im Genome Damage and Stability Centre, University of Sussex, UK

Dissertation:

07/2009-06/2013 Wissenschaftliche Angestellte/ Promotionsstudentin
 Molekulare Gynäkologie und Onkologie
 Medizinische Hochschule Hannover