

DNA-Doppelstrangbruchreparatur im DT40-Zellsystem

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biol. Julia Krasnyanska

aus Charkow/Ukraine

Darmstadt 2014

D17

Referent: Prof. Dr. Markus Löbrich
Ko-Referentin: Prof. Dr. Felicitas Pfeifer

Tag der Einreichung: 09. Mai 2014
Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juli 2014

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Februar 2009 bis August 2013 am Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt in der Abteilung Strahlenbiologie und DNA-Reparatur unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Markus Löbrich angefertigt.

„Persönlichkeiten werden nicht durch schöne Reden geformt,
sondern durch Arbeit und eigene Leistung“.

Albert Einstein (* 14. März 1879; † 18. April 1955), deutscher Physiker

„Ein Gelehrter in seinem Laboratorium ist nicht nur ein Techniker;
er steht auch vor den Naturgesetzen wie ein Kind vor der Märchenwelt“.

Marie Curie (* 7. November 1867; † 4. Juli 1934, geborene Maria Salomea Skłodowska)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	5
2.1 Strahleninduzierte DNA-Schäden	5
2.2 Induktion von DSBs und Schadensweiterleitung in der eukaryotischen Zelle	6
2.2.1 Bedeutung der H2AX-Phosphorylierung	7
2.2.2 Zellzyklus und Mechanismen der Zellzykluskontrolle	8
2.2.3 DNA-Doppelstrangbruchreparatur	11
2.2.3.1 Prozess der klassischen Nichthomologen Endverknüpfung (c-NHEJ)	12
2.2.3.2 Prozess der Homologen Rekombination (HR).....	15
2.2.3.3 Alternative Mechanismen	19
2.2.3.4 Reparatur von Replikation-assoziierten DNA-Schäden.....	21
2.3 DT40-Zellsystem	24
2.4 Funktionen des Proteins Artemis	25
2.5 Zielsetzung	26
3 Material und Methoden	29
3.1 Materialien	29
3.1.1 Verwendete Zelllinien.....	29
3.1.2 Kulturmedien und Lösungen	29
3.1.3 Chemikalienbehandlung.....	30
3.1.4 Immunfluoreszenzfärbung	30
3.1.5 Chromosomale Analysen.....	31
3.1.6 Durchflusszytometrische Methoden	32
3.1.7 Elutriation für die Synchronisation der Zellen.....	32
3.1.8 Verbrauchsmaterialien	32
3.1.9 Geräteliste	33
3.1.10 Computer- <i>Software</i> und <i>Online</i> -Programme	34
3.2 Methoden	34
3.2.1 Kultivierung von Zellen	34
3.2.2 Funktion von β -Mercaptoethanol in der Zellkultur.....	35
3.2.3 Bestrahlung der Zellen mit Röntgenstrahlung	35

3.2.4	Zellzyklusphasen-spezifische Reparaturstudien mittels Quantifizierung der γ H2AX-Foci	36
3.2.4.1	EdU-basierte γ H2AX-Foci-Analyse.....	36
3.2.4.2	γ H2AX-Foci-Analyse unter Replikation-inhibierenden Bedingungen	37
3.2.5	Chromosomale Studien	37
3.2.5.1	Metaphasen-Präparation	37
3.2.5.2	Immunfluoreszenzfärbungen der Chromosomen.....	38
3.2.6	Überlebensexperimente.....	38
3.2.6.1	Überlebensfähigkeit der exponentiell wachsenden Zellen.....	38
3.2.6.2	Zellzyklusphasen-spezifische Überlebensmessung: Überlebensfähigkeit der synchronisierten Zellen	39
3.2.6.3	Synchronisation der Zellen in der G2/M-Phase mittels Nocodazol.....	39
3.2.6.4	Synchronisation der Zellen mittels der Elutriation	39
3.2.6.5	Überlebensmessung und γ H2AX-Foci-Analyse synchronisierter Zellen durch den gesamten Zellzyklus.....	41
3.2.7	2D-Zellzyklus Analyse.....	42
3.2.7.1	BrdU-Pulsmarkierung und Färbung für die Durchflusszytometrie	42
3.2.7.2	Durchflusszytometrische Messungen des Zellzyklus	42
4	Ergebnisse	44
4.1	Überlebensfähigkeit der exponentiell wachsenden Zellen.....	44
4.2	Überlebensfähigkeit der DT40-Zellen in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase nach Synchronisation mit Nocodazol	46
4.3	Etablierung der Zellzyklusphasen-abhängigen γH2AX-Foci-Analyse in DT40-Zellen.	50
4.4	Reparatur in den bestrahlten G1- bzw. G2-Phase Zellen	52
4.5	Etablierung einer innerhalb der S-Phase spezifischen Reparaturanalyse im DT40-Zellsystem	56
4.5.1	Einfluss der Replikation auf die Ausbildung der γ H2AX-Foci in unbestrahlten und mit 1 Gy bestrahlten Zellen in der S-Phase	58
4.5.2	Beitrag von c-NHEJ und HR zur Reparatur der strahleninduzierten DSBs in der frühen, mittleren und späten S-Phase bestrahlten Zellen.....	61
4.5.3	γ H2AX-Foci-Analyse unter Replikation-inhibierenden Bedingungen.....	64
4.5.3.1	Etablierung der Methode, welche Ausbildung der sekundären DSBs inhibiert	64
4.5.3.2	γ H2AX-Kinetiken der unbestrahlten sowie mit 1 Gy bestrahlten S-Phase Zellen des WT unter den Replikation-inhibierenden Bedingungen	68
4.5.3.3	Beitrag von c-NHEJ und HR zu Reparatur der durch Strahlung erzeugten primären DSBs in der S-Phase	70

4.6	Etablierung der Zellzyklusphasen-abhängigen chromosomalen Studien nach Bestrahlung mit 1 Gy	72
4.6.1	Bedeutung von c-NHEJ und HR in der mittleren S- bzw. G2-Phase bestrahlten Zellen auf der chromosomalen Ebene	74
4.7	Direkter Vergleich zwischen der Zellzyklusphasen-abhängigen Reparatur und der entsprechenden Überlebensfähigkeit.....	75
4.7.1	Etablierung der Synchronisation mit Hilfe der Methode der Elutriation.....	75
4.7.2	Zellzyklusphasen-abhängige Messungen des Überlebens und der Reparatur nach Synchronisation mit Hilfe der Elutriation.....	78
4.8	Funktionen von Artemis während der DSB-Reparatur	80
4.8.1	Überlebensexperimente mit exponentiell wachsenden Artemis-Mutanten.....	80
4.8.2	Zellzyklusphasen-abhängige γ H2AX-Foci Analysen in den Artemis-Mutanten.....	82
4.8.3	Analyse der DSB-Reparatur in der G1- und der G2-Phase bestrahlten Artemis-Mutanten.....	82
4.8.4	Analyse der DSB-Reparatur in den Artemis-Mutanten nach Bestrahlung in der S-Phase	84
4.8.5	Zellzyklusphasen-abhängige chromosomale Studien in den Artemis-Mutanten nach Bestrahlung mit 1 Gy	87
5	Diskussion	89
5.1	Charakterisierung der klassischen Reparaturwege im DT40-Zellsystem.....	89
5.1.1	Etablierung der Zellzyklusphasen-spezifischen Analysen im DT40-Zellsystem.....	90
5.1.2	Reparatur der strahleninduzierten DSBs in den G1-Phase Zellen.....	91
5.1.3	Reparatur der strahleninduzierten DSBs in den G2-Phase Zellen.....	93
5.1.4	Unterteilung der S-Phase in frühe, mittlere und späte S-Phase	95
5.1.5	Einfluss der Replikation und deren Inhibition auf die DSB-Reparatur	96
5.1.6	Beitrag von c-NHEJ und HR bei der Reparatur primärer und sekundärer DSBs nach Bestrahlung in der S-Phase	98
5.1.7	Modell zur Erklärung der Wahl der Reparaturwege durch den DT40-Zellzyklus....	103
5.1.8	Einfluss von Qualität der Reparatur auf das zelluläre Überleben	105
5.2	Einordnung von Artemis in die DSB-Reparatur im DT40-Zellsystem.....	108
5.2.1	Einfluss der Deletion der <i>snm1a-</i> , <i>snm1b-</i> und <i>snm1c/artemis</i> -Gene auf das klonogene Überleben und die Zellzyklusphasen-abhängige Reparatur	109
5.2.2	Funktion von Artemis als ein molekularer Schalter	112
6	Ausblick.....	115
7	Literaturverzeichnis.....	117

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Zellreaktionen nach einem DNA-Doppelstrangbruch	7
Abb. 2.2: Regulation des Zellzyklus	10
Abb. 2.3: Klassische Nichthomologe Endverknüpfung (<i>canonical non-homologous end-joining, c-NHEJ</i>)	12
Abb. 2.4: Vereinfachte Darstellung der V(D)J-Rekombination.....	14
Abb. 2.5: Modell der Homologen Rekombination.....	15
Abb. 2.6: Wege zur Auflösung der D-Loop Strukturen.....	17
Abb. 2.7: Schematische Darstellung von A-EJ-Mechanismen (A-NHEJ und MMEJ) und der daran beteiligten Proteine	20
Abb. 2.8: Reparaturwege der HR an den arretierten/kollabierten Replikationsgabeln	23
Abb. 3.1: Ein typischer für die Elutriation benötigter Aufbau mit einer Ultrazentrifuge J2-21M und mit dem darin eingebauten JE-6 Elutriationsrotor.....	40
Abb. 3.2: Vorgänge in der Elutriationskammer	41
Abb. 4.1: Überlebenskurven der exponentiell wachsenden WT- und Reparaturmutanten-Zelllinien	45
Abb. 4.2: Synchronisation mit Nocodazol	48
Abb. 4.3: EdU-basierter Ansatz	51
Abb. 4.4: Charakteristische Zellzyklus- (<i>Dot-Plot</i>) Verteilungen der WT-Zellen im Verlauf der Reparaturkinetik im EdU-basierten Ansatz	52
Abb. 4.5: Ergebnisse der γ H2AX-Foci-Analyse der in der G1-Phase bestrahlten Zellen.....	54
Abb. 4.6: Ergebnisse der γ H2AX-Foci-Analyse der in der G2-Phase bestrahlten Zellen.....	55
Abb. 4.7: Heterogenität des EdU-Musters in den S-Phase Zellen des DT40-Zellsystems.....	57
Abb. 4.8: Progression der frühen-, mittleren- und späten S-Phase Zellen durch den Zellzyklus	58
Abb. 4.9: Entwicklung der spontanen und nach 1 Gy Bestrahlung entstandenen γ H2AX-Foci ab früher, mittlerer und später S-Phase	60
Abb. 4.10: Beitrag von c-NHEJ und HR zur DSB-Reparatur in den bestrahlten S-Phase Zellen	62
Abb. 4.11: Einfluss von Aphidicolin zusammen mit Bestrahlung auf die Proliferation des WT	65
Abb. 4.12: Einfluss von 1 μ M Aphidicolin auf den EdU-Einbau	67
Abb. 4.13: Einfluss der moderaten Aphidicolin-Behandlung auf die in der S-Phase spontan oder nach 1 Gy entstandenen γ H2AX-Foci im WT	68
Abb. 4.14: Reparatur der in der frühen, mittleren und späten S-Phase bestrahlten Zellen unter Replikation-inhibierenden Bedingungen	71
Abb. 4.15: Repräsentative Immunfluoreszenzbilder der Metaphasen der mit BrdU pulsmarkierten WT-Zellen	73
Abb. 4.16: Chromosomenbrüche, die in den BrdU-positiven bzw. -negativen Metaphasen analysiert wurden	74
Abb. 4.17: Fraktionen, die während der Elutriation des WT und der $Ku70^{-/-}$ -Mutante gesammelt wurden.....	76
Abb. 4.18: Synchronität der Zellen nach Elutriation in später S/G2 und nach der 2-stündigen Nachsynchronisation mit Nocodazol	77
Abb. 4.19: Vergleich der Zellzyklusphasen-spezifischen Überlebensfähigkeit mit der entsprechenden Reparatur 4 und 24 h nach IR	79
Abb. 4.20: Überlebensmessung der exponentiell wachsenden Artemis-Mutanten zusammen mit dem der c-NHEJ- und der HR-Mutanten	81
Abb. 4.21: Analyse der DSB-Reparatur in G1 bestrahlten WT- und Artemis-defizienten Zellen zusammen mit der c-NHEJ und der HR-Mutante	83
Abb. 4.22: Analyse der DSB-Reparatur in G2 bestrahlten WT- und Artemis-defizienten Zellen zusammen mit der c-NHEJ- und der HR-Mutante	84
Abb. 4.23: Analyse der DSB-Reparatur in S bestrahlten WT- und Artemis-defizienten Zelllinien zusammen mit der c-NHEJ- und der HR-Mutante	86
Abb. 4.24: Chromosomenbrüche der Artemis-defizienten Zelllinien zusammen mit c-NHEJ und HR-Mutanten	88
Abb. 5.1: Reparaturmodell zum Gebrauch von c-NHEJ und HR durch den DT40-Zellzyklus	104
Abb. 5.2: Gebrauch von c-NHEJ und HR im Überleben durch den DT40-Zellzyklus.....	108
Abb. 5.3: Einordnung von Artemis in die DSB-Reparatur im DT40-Zellsystem.	114

Abkürzungsverzeichnis

53BP1	<i>p53 binding protein 1</i>
A-EJ	<i>alternative end-joining</i>
A-NHEJ	alternative Nichthomologe Endverknüpfung (<i>alternative non-homologous end-joining</i>)
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>ATM and Rad3 related</i>
BER	Basen-Exzisionsreparatur
BIR	<i>break-induced replication</i>
bp	Basenpaar
BLM	Bloom-Protein
BRCA1/2	<i>breast cancer associated 1/2</i>
BrdU	5-Bromo-2'-desoxy-Uridin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
c-NHEJ	klassische Nichthomologe Endverknüpfung (<i>canonical non-homologous end-joining</i>)
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (<i>Cyclin-dependent kinase</i>)
Chk1/2	<i>cell cycle checkpoint kinase 1/2</i>
CHO	Ovarienzellen des chinesischen Hamsters (<i>Chinese hamster ovary</i>)
CPT	Camptotecin
CtIP	<i>CtBP-interacting protein</i>
DAPI	4'-6'-Diamino-2-Phenyl-indoldihydrochlorid
dHJ	Doppelte Holliday-Struktur (<i>double holliday junction</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DNA-PKcs	Katalytische Untereinheit der DNA-PK (<i>catalytic subunit of DNA-PK</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
EdU	5-Ethynyl-2'-desoxy-Uridin
Eme1	<i>essential meiotic endonuclease 1</i>
eV	Elektronenvolt
FACS	<i>fluorescence activated cell scanning/sorting</i>
FCS	fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Gen1	<i>XPG-like endonuclease 1</i>
Gy	Gray
HR	Homologe Rekombination (<i>homologous recombination</i>)
IgH	Immunglobulin H

IR	ionisierende Strahlung (<i>ionising radiation</i>)
LET	Linearer Energie-Transfer (<i>linear energy transfer</i>)
LMDS	<i>locally multiply damaged sites</i>
MMC	Mitomycin
MMEJ	<i>microhomology-mediated end-joining</i>
MMS	Methylmethansulfonat
MRE11	<i>meiotic recombination 11</i>
MRN	MRE11/Rad50/NBS1-Komplex
Mus81	<i>MMS and UV sensitive 81</i>
NBS1	<i>Nijmegen breakage syndrome 1</i>
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PI	Propidiumiodid
PIKK	Phosphatidylinositol-3'-OH-Kinase ähnliche Kinase
PP2A	Phosphatase 2A
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies (<i>reactive oxygen species</i>)
RPA	Replikationsprotein A (<i>replication protein A</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotation per minute</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RS-SCID	<i>radiation-sensitive severe combined immunodeficiency</i>
RT	Raumtemperatur
SCE	<i>sister chromatid exchange</i>
SDSA	<i>synthesis dependent strand annealing</i>
siRNA	<i>small interference RNA</i>
si53BP1	Herunterregulation des 53BP1-Proteins mittels siRNA
SSB	<i>single-strand break</i>
SSC	<i>Saline-sodium citrat buffer</i>
ssDNA	einzelsträngigen DNA-Bereiche (<i>single-stranded DNA</i>)
TLS	<i>translesion synthesis</i>
Tcr	<i>T-cell receptor</i>
UV	Ultraviolett
üN	über Nacht
V(D)J	<i>variable (diversity) joining</i>
WRN	Werner-Protein
WT	Wildtyp
XLF	<i>XRCC4-like factor</i>

1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung des Beitrags der zur Verfügung stehenden Wege und deren Regulation bei der Reparatur der strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) im DT40-Zellsystem. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Wechselwirkungen der beiden klassischen DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturwege, c-NHEJ (*canonical non-homologous end-joining*) und HR (*homologous recombination*) durch den Zellzyklus untersucht. Anhand von WT und Reparaturmutanten, die einen Defekt im c-NHEJ (Ku70^{-/-}) bzw. in der HR (Rad54^{-/-}) oder in beiden Reparaturwegen (Ku70^{-/-}/Rad54^{-/-}) aufweisen, wurden das klonogene Überleben und die Reparatur genauer analysiert. Mithilfe der Überlebensexperimente mit exponentiell wachsenden Zellen konnte gezeigt werden, dass die Zellen der Doppelmutante (Ku70^{-/-}/Rad54^{-/-}) die strahlenempfindlichste Zelllinie darstellen, was die Wichtigkeit der beiden Reparaturwege für das Überleben nach ionisierender Strahlung unterstreicht. Die Zellen der HR-Mutante (Rad54^{-/-}) zeigten eine moderate Strahlenempfindlichkeit. Interessanterweise wies die Überlebenskurve der c-NHEJ-Mutante (Ku70^{-/-}) ein biphasisches Verhalten auf, welches sich bei niedrigen Dosen (bis 2 Gy) in einer Strahlensensitivität, bei höheren Strahlendosen (4-10 Gy) jedoch in einer Strahlenresistenz gegenüber dem WT äußerte. Die in dieser Arbeit etablierte Messung der Zellzyklusphasen-abhängigen Reparatur in DT40-Zellen unterstützte nur partiell das aus dem Säugetierzellsystem bekannte Reparaturmodell und das biphasische Verhalten der Ku70^{-/-}-Mutante im Überlebensexperiment. Analysen der γ H2AX-Foci zeigten, dass auch im DT40-Zellsystem das c-NHEJ der dominante Weg für die in der G1-Phase bestrahlten Zellen ist. Die Reparaturstudien der in der G2-Phase bestrahlten Zellen verdeutlichen, dass trotz der hohen HR-Frequenz in den DT40-Zellen, das c-NHEJ den größeren Anteil an DSBs als der Vorgang der HR beseitigt. Um einen genaueren Einblick in den Beitrag der jeweiligen Reparaturwege nach Bestrahlung in der S-Phase zu gewinnen, wurden S-Phase Zellen anhand spezifischer EdU-Muster in drei Untergruppen (frühe, mittlere und späte S) unterteilt. Es konnte gezeigt werden, dass die in der frühen S-Phase bestrahlten Zellen das c-NHEJ bevorzugt nutzen, während für die in der mittleren und späten S-Phase bestrahlte Zellen die HR der dominierende Schritt in der Reparatur ist. Aufgrund der verbesserten Reparatur der in der mittleren S-Phase bestrahlten Zellen der c-NHEJ-Mutante im Vergleich zum WT, wurde angenommen, dass das c-NHEJ für diese Zellzyklusphase keine Rolle spielt. Aufgrund der Restreparatur in der Doppelmutante konnte der Einfluss eines zusätzlichen Reparaturweges wie eines A-EJ

(*alternative end-joinig*)-Mechanismus in den DT40-Zellen nicht ausgeschlossen werden. Die Reparaturstudien ließen vermuten, dass die in der mittleren S-Phase bestrahlten Zellen der c-NHEJ-Mutante aufgrund ihres gegenüber dem WT vorhandenen Reparaturvorteils zur verbesserten Überlebensfähigkeit beitragen. Für die Überprüfung dieser Annahme wurden die Zellzyklusphasen-spezifische Überlebensfähigkeit und die Reparaturmessungen in synchronisierten Zellen betrachtet. Aus diesem Experiment wurde ersichtlich, dass die in der späten S/G2-Phase bestrahlten Zellen der c-NHEJ-Mutante trotz eines Reparaturdefektes eine bessere Überlebensfähigkeit als der WT aufweisen. Die in der mittleren S-Phase bestrahlten Zellen der c-NHEJ-Mutante zeigen dagegen trotz des Reparaturvorteils eine im Vergleich zum WT deutlich niedrigere Überlebensrate. Diese sich widersprechenden Ergebnisse weisen daraufhin, dass die Qualität der Reparatur ein entscheidender Faktor für die Überlebensfähigkeit der Zelle ist.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Funktion des Proteins Artemis während der DSB-Reparatur genauer untersucht. Aus Studien mit Säugetierzellen ist bekannt, dass Artemis-defiziente Zellen empfindlich auf Strahlung reagieren und dass Artemis zusammen mit ATM an der langsamen Reparaturkomponente von strahleninduzierten DSBs sowohl in der G1- als auch in der G2-Phase beteiligt ist. In der G1-Phase beteiligt sich Artemis am c-NHEJ. In der G2-Phase ist es während der HR für die Reparatur heterochromatischer DSBs verantwortlich. In den Überlebensexperimenten mit DT40-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass Artemis-defiziente Zelllinien strahlenempfindlich sind. Mithilfe der γ H2AX-Foci-Analyse wurde festgestellt, dass Artemis während der Reparatur nach Bestrahlung in der G1, G2, sowie in der frühen und der späten S-Phase wichtig ist. Dagegen läuft die Reparatur der in der mittleren S-Phase bestrahlten Zellen in der Abwesenheit von Artemis schneller als im WT ab, was die chromosomalen Studien ebenfalls unterstützen. Die Reparatur in den $Ku70^{-/-}/Art^{-/-}$ - sowie $Rad54^{-/-}/Art^{-/-}$ -Doppelmutanten verläuft nahezu in allen Zellzyklusphasen besser als in den $Ku70^{-/-}$ - und $Rad54^{-/-}$ -Einzelmutanten. Die $Rad54^{-/-}/Art^{-/-}$ -Doppelmutante bildet jedoch in der G1-Phase einen mit der $Art^{-/-}$ -defizienten Zelllinie vergleichbaren Reparaturdefekt aus. Das Aufheben der Reparaturdefekte in der c-NHEJ- und HR-Mutante durch die Artemis-Deletion deutet daraufhin, dass die DSBs ungehindert über alternative Mechanismen repariert werden. Diese werden insbesondere aktiviert, wenn klassische Reparaturwege fehlen. Somit scheint Artemis eine neue Funktion auszuführen, indem es als ein molekularer Schalter die Wahl der Reparaturwege, c-NHEJ, HR und A-EJ-Mechanismen regelt.

Summary

The present thesis is concentrated on contribution and regulation of the available DSB repair pathways in DT40 cells. The main aim of the first part was the investigation of the interactions between two classical DNA-double strand break repair mechanisms, c-NHEJ (canonical non-homologous end-joining) and HR (homologous recombination) through out the cell cycle. Using WT cells and mutants with lack of c-NHEJ-gene (*ku70*) or HR-gene (*rad54*) or even of the both pathways clonogenic cell survival and DSB repair capacity were investigated. The survival assay with asynchronous cells, that are deficient in both pathways as well in c-NHEJ as in HR, has shown the poorest survival, supporting the importance of both repair pathways for survival after ionizing radiation. The HR-mutant had a moderate sensitivity toward the irradiation, whereas the survival of c-NHEJ-mutant was described by the biphasic survival curve, indicating cell cycle phase dependency. One subpopulation was more sensitive (up to 2 Gy) and the other subpopulation was more resistant (4-10 Gy) than the WT cells. In this work the new established cell-cycle dependent methods for evaluation of DSB repair in DT40 cells supported only partially the known mammals' repair model and the biphasic survival curve of the c-NHEJ mutant. By the means of γ H2AX-foci it was shown, that the c-NHEJ is also the mostly dominant pathway in DT40 cells during repair of radiation-induced DSBs in G1. Despite higher frequencies of HR in DT40 cells than in mammals they prefer c-NHEJ over the HR after they irradiated in G2. For detailed analysis of contribution of repair pathways after irradiation in the S-phase, the S-phase cells were differentiated by various EdU-patterns in three different groups (early, middle and late S-phase cells). c-NHEJ is active preferentially in the cells, which are irradiated in early S. HR is the dominant repair pathway in the cells, which are irradiated in the middle or late of the S phase. The absence of c-NHEJ in the *Ku70*^{-/-} cells, which are irradiated in the middle S phase, leads to more rapid repair than in WT. An other observation was that the double-mutant cells with the absence of *Ku70* and *Rad54* have a slight repair, suggesting that the action of A-EJ (alternative end-joining) mechanisms for DSB repair can not be completely excluded. The γ H2AX foci measurements in the irradiated cells in the middle of the S phase and in G2 were confirmed by cell-cycle dependent chromosomal analysis. The repair studies implied a presumption that the middle S phase cells of c-NHEJ mutant are the better survived subpopulation. To verify this hypothesis the measurements of repair and the cell cycle dependent survival in synchronous cells were performed. This experiment demonstrated that late S/G2 cells of c-NHEJ mutant had a

better survival than the WT, despite the repair defect. The cells irradiated in the middle of the S phase in the c-NHEJ mutant had a poor survival, although these cells showed less γ H2AX-foci than the WT cells. These apparently contradicting findings are the strong indication that the quality of repair is a decisive factor for the cell survival.

The second part of the thesis was the investigation of the function of protein Artemis during DSB repair. From the studies with mammalian cells it is known that Artemis-deficient cells are sensitive toward ionizing radiation. Together with ATM, Artemis is required for the slow DSB-repair process after irradiation in G1 and G2 phases. In G1 Artemis seems to be a part of c-NHEJ during the fast and a part of A-EJ during the slow component. The slow repair process in G2 represents HR and repairs preferentially heterochromatic DSBs. In the present study the results of clonogenic survival assay with exponential growing cells showed that Artemis-deficient cells are more sensitive to radiation than the WT. With γ H2AX foci analysis it was demonstrated that Artemis is involved in the DSB repair after irradiation in G1, G2, early and late S phase. The Artemis-deficient cells after irradiation in the middle of the S phase had an advantage in the repair, in comparison to WT. The repair in $Ku70^{-/-}/Art^{-/-}$ and $Rad54^{-/-}/Art^{-/-}$ -double-mutants had an improved repair after irradiation in all cycle phases compared with $Ku70^{-/-}$ and $Rad54^{-/-}$ -single-mutants. The $Rad54^{-/-}/Art^{-/-}$ -double-mutant showed a comparable repair defect with $Art^{-/-}$ -single-mutant after irradiation in G1. The abrogation of repair defects in the c-NHEJ- and HR-mutant after deletion of Artemis is indicating that DSBs can be repaired unhampered by alternative repair pathways, which are more activated, if classical repair pathways are absent. These findings are suggesting a new function of Artemis as a molecular switch for regulating the choice between repair pathways, like HR, c-NHEJ and A-EJ-mechanisms.

2 Einleitung

2.1 Strahleninduzierte DNA-Schäden

Elektromagnetische Strahlung kann häufig durch eine indirekte Wirkungsweise, über Bildung hochreaktiver Radikale eine Vielzahl unterschiedlicher Schäden in der DNA induzieren. Je nach Schweregrad und Häufigkeit werden DNA-Schäden in mehrere Klassen unterteilt. Neben Veränderungen an den Basen wie Modifikationen, Dimer-Bildung oder deren Verlust, kommt es im Wesentlichen zu den Schäden am Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA. Die Veränderungen an den Basen sind aber auch ein relativ häufiger Effekt der Strahlung. Ihre Anzahl wird auf 1000 bis 2000 Schäden pro Gy geschätzt. Daneben können Einzelstrangbrüche (SSBs, *single-strand breaks*) induziert werden, deren Anzahl zwischen 500-1000 pro Gy liegt. Auch DSBs können durch die Strahlung induziert werden. In einer menschlichen Zelle mit haploidem Chromosomensatz beträgt die Anzahl von DSBs ca. 20-30 pro Gy (Löbrich *et al.*, 1995). Außerdem können durch 1Gy 30 DNA-DNA- und 150 DNA-Protein-Vernetzungen (*Cross links*) erzeugt werden (Ward, 1995). Während die Basenschäden oder SSBs relativ schnell über die Mechanismen wie die Basen (*base excision repair*, BER)-, Nukleotid-Excisions (*nucleotide excision repair*, NER)- oder Einzelstrangbruchreparatur (*single-strand repair*, SSR) beseitigt werden und keine Auswirkung auf das Zellüberleben haben, kann ein einziger unreparierter DNA-Doppelstrangbruch die genomische Integrität gefährden und somit die Überlebensfähigkeit beeinträchtigen. An den DSB-Enden kommt es oft zu weiteren Veränderungen, indem OH-Gruppe am 3'-Ende oder Phosphatgruppe am 5'-Ende verloren gehen. Es können Modifikationen durch das Anhängen von z. B. Phosphoglycolaten an der OH-Gruppe auftreten. Alle diese Faktoren können die Reparatur erschweren, da die Enden zunächst einer Prozessierung unterzogen werden müssen, bevor sie ligiert werden können (Hall *et al.*, 2006). Die Zelle hat für die Reparatur der DSBs effektive Mechanismen entwickelt, welche für die genomische Stabilität sorgen (Kiefer 1990; Knowls & Selby 2005; Kegel *et al.*, 2007). Kommt es zu einer mehrfachen Schädigung in einem lokal begrenzten Bereich weniger Nanometer auf der DNA, so können sich die einzelnen Schadensarten anhäufen. Diese Stellen werden als *locally multiply damaged sites* (LMDS) bezeichnet (Ward, 1985).

2.2 Induktion von DSBs und Schadensweiterleitung in der eukaryotischen Zelle

Die Zellen eines jeden lebenden Organismus haben im Verlauf der Evolution viele Strategien entwickelt, um auf die exogenen oder endogenen Noxen zu reagieren und um die genomische Integrität zu bewahren. Dabei gilt es für jede Zelle die schädigenden Signale richtig zu erkennen, zu verarbeiten und weiterzuleiten. Diese Signaltransduktionskaskade wird als *DNA Damage Response* (DDR) bezeichnet (Abb. 2.1). Die DDR ist komplex und beinhaltet zwei wichtige Reaktionen, eine schnelle Aktivierung der Checkpoints (Kontrollpunkte) im Zellzyklus und eine Rekrutierung der Proteine der DNA-Reparaturmaschinerie an den DSB (Price & D'Andrea, 2013). DSBs können durch endogene Prozesse oder auch durch exogen einwirkende Faktoren entstehen. Solche Prozesse wie V(D)J-Rekombination, *Class Switch Recombination* und der Vorgang der Meiose sind endogene Quellen für die DSB-Entstehung. Aber auch durch toxische Stoffwechselprodukte wie ROS (*reactive oxygen species*) und Replikation können DSBs induziert werden (Wallace *et al.*, 2002; Bravard *et al.*, 2006; Montaner *et al.*, 2007). Zu den exogen wirkenden Faktoren gehören chemische Agenzien, Chemotherapeutika und die ionisierende Strahlung (IR).

Wird in einer Zelle ein DSB induziert, so wird dieser zunächst von den unterschiedlichen Proteinen wie Ku, MRN-Komplex (MRE11-NBS1-RAD50) oder auch PARP1 (Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1) erkannt. Sie alle können an die DNA-Enden binden und diese stabilisieren (D'Amours & Jackson, 2002). MRE11 (*meiotic recombination 11*) rekrutiert und aktiviert anschließend ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), eine PI3K-ähnliche Kinase, die als zentrales Protein während der DDR fungiert und durch Phosphorylierung weiterer Proteine das Schadenssignal weiterleitet (Lavin, 2008; Sun *et al.*, 2010). So können zum einen Proteine aktiviert werden, die einen Checkpoint und damit Zellzyklusarrest an einem bestimmten Kontrollpunkt im Zellzyklus einleiten (z. B. p53 und Chk2 (*cell cycle checkpoint kinase 2*)). Durch diesen Arrest hat die Zelle Zeit, die geschädigte DNA zu reparieren (Mu *et al.*, 2007). Neben der Proteine, die an der Progression im Zellzyklus beteiligt sind, phosphoryliert ATM auch eine Vielzahl von Proteinen der DNA-Reparatur, wie z. B. BRCA1 (*breast cancer associated 1*) und 53BP1 (*p53 binding protein 1*) (Ciccia & Elledge, 2010; Jackson & Bartek, 2009; Kennedy & D'Andrea, 2006). Ohne Reparaturprozesse gehen der Zelle wichtige genetische Informationen verloren. Kommt es zu Fehlern in der Zellzyklusregulation sowie in der Reparatur selbst, können Mutationen und Krebs entstehen. Sind die Schäden zu komplex und bleiben lange Zeit unrepariert, kann die Zelle Apoptose einleiten.

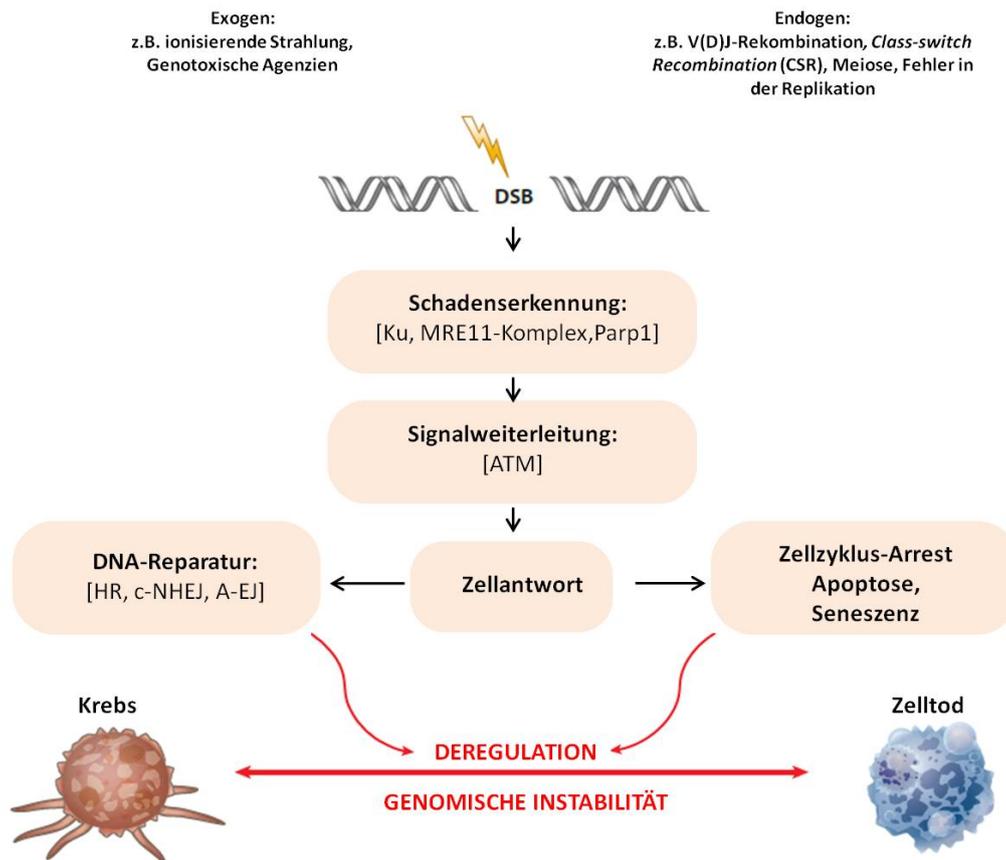


Abb. 2.1: Zellreaktionen nach einem DNA-Doppelstrangbruch

Die in der Zelle endogen auftretenden Mechanismen (V(D)J-Rekombination, *Class Switch Recombination* (CSR), Meiose, Fehler in der Replikation) sowie exogen einwirkende Faktoren (ionisierende Strahlung, genotoxische Agenzien) können DSBs induzieren. Die Schadenserkenkung kann entweder durch die Proteine Ku oder MRN-Komplex oder Parp1 stattfinden. Die Signalweiterleitung wird unter anderem durch das Protein ATM bewerkstelligt, welches als Kinase eine Vielzahl an Proteinen der DNA-Reparatur und der Zellzyklusregulation phosphoryliert. Die inadäquate Nutzung der DNA-Reparaturwege (HR, c-NHEJ oder A-EJ) und der Zellzyklus-kontrollmechanismen (Zellzyklus-Arrest, etc.) können zu einer Deregulation der genomischen Stabilität führen, so dass entweder Krebs entstehen oder Zelltod eintreten kann (Verändert nach Deriano & Roth, 2013).

2.2.1 Bedeutung der H2AX-Phosphorylierung

Die DNA von eukaryotischen Zellen liegt im Zellkern in kompakten, hoch organisierten Strukturen, den Chromosomen, vor. In diesen Strukturen ist die DNA mit Histonen und chromosomalen nicht Histon-Proteinen assoziiert. Dabei stellen die Histone die grundlegende Struktur der Chromosomenorganisation dar, um die die DNA als jeweils 147-Basenpaare langer Abschnitt 1,7-mal umwunden ist. Ein Histonoktamer setzt sich aus H2A-H2AB und H3-H4-Paaren zusammen (Luger *et al.*, 1997). Für bestimmte regulatorische Prozesse an der DNA können Histone phosphoryliert, acetyliert, ubiquitiniert sowie methyliert werden (Price & D'Andrea, 2013). Die am besten charakterisierte Modifikation während der DDR ist die Phosphorylierung des Histons H2AX. Das Protein H2AX ist eine Variante des Histons H2A und

repräsentiert abhängig von der untersuchten Zelllinie oder Gewebe 2-25% des gesamten H2A-Pools in den menschlichen Zellen (West & Bonner, 1980). Die Phosphorylierung von H2A findet am Serin-Rest 139 im SQE-Motiv am C-terminalen Ende statt. Die SQE-Sequenz stellt dabei die spezifische Erkennungsstelle für die Proteine der Phosphatidylinositol-3'-OH-Kinase ähnlichen Kinasen (PIKK) wie ATM, DNA-PKcs (*catalytic subunit of DNA-PK*) und ATR (*ATM and Rad3 related*) dar. Alle drei Kinasen tragen zur Phosphorylierung von H2AX bei (Stiff *et al.* 2004, Wang *et al.* 2005a, Kinner *et al.* 2008, Löbrich *et al.* 2010). Die phosphorylierte Form wird als γ H2AX bezeichnet und entsteht binnen 1-3 Min nach Induktion eines DSBs. Die Phosphorylierung von H2AX betrifft nicht nur ein einziges Molekül. Vielmehr erfahren alle H2AX-Moleküle, die im 2 MBp-großen DNA-Bereich um den DSB herum vorkommen, diese Modifikation (Rogakou *et al.*, 1998, 1999). Mittels Immunfluoreszenz-basierten Methoden lassen sich die akkumulierten γ H2AX-Moleküle als Reparatur-Foci nachweisen. Diese Foci markieren nicht nur die DSBs, sondern bilden auch eine Plattform aus, um weitere Reparaturfaktoren an den Schadensort zu rekrutieren (Celeste *et al.*, 2003). So werden die DNA-Enden am DSB stabilisiert und vor falschen Verknüpfungen geschützt. Die Phosphorylierung von H2AX führt zu einer lokalen und temporären Veränderung im Chromatin. Um die ursprüngliche Integrität wiederherzustellen, muss diese Veränderung wieder rückgängig gemacht werden. Nach der erfolgreichen Reparatur eines DSBs wird γ H2AX zu H2AX dephosphoryliert. In den Säugetierzellen scheint die Phosphatase 2A (PP2A) daran beteiligt zu sein (Chowdhury *et al.*, 2005). Die γ H2AX-Foci kommen sowohl in geschädigten als auch in nichtgeschädigten Zellen vor. Diese spontanen Foci sind infolge des Stoffwechsels der Zelle entstanden und sind in einer geringen Anzahl anzutreffen. Nach Bestrahlung steigt die Anzahl der γ H2AX-Foci massiv an (Induktion von DSBs). Mit fortschreitender Zeit, die als Zeit nach Bestrahlung bzw. als Reparaturzeit bezeichnet wird, nimmt die Anzahl der Foci ab. Die Abnahme der Foci kann mit der Reparatur der DSBs gleichgesetzt werden und findet mit einer definierten Geschwindigkeit (Kinetik) statt, die für die jeweiligen Zelllinien und deren Zellzyklusphasen spezifisch ist.

2.2.2 Zellzyklus und Mechanismen der Zellzykluskontrolle

Der Zellzyklus ist ein grundlegender Mechanismus der Vermehrung eines jeden Organismus und umfasst eine genau kontrollierte Abfolge von Ereignissen zwischen zwei Zellteilungen. Der Zellzyklus wird in der Regel in vier Phasen unterteilt, welche als G1 (1. *gap*), S, G2 (2.

gap) und Mitose bezeichnet werden (Sisken & Morasca, 1965). G1, S und G2 bilden zusammen die Interphase, die in den eukaryotischen Zellen am längsten dauert. Während der G1-Phase, die auch als Präsynthesephase bezeichnet wird, gewinnt die Zelle an Größe. Es werden mRNAs für die Proteine der Replikationsmaschinerie synthetisiert, die während der anschließenden S (Synthese-Phase) benötigt werden. Auch Zellbestandteile wie Zytosol und Zellorganellen werden in der G1-Phase produziert. Die G1-Phase hat eine regulatorische Funktion. Hier wird entschieden, ob die Zelle weiter im Zellzyklus bleibt oder in ein Ruhestadium (G0) wechselt. In G0 kann sie über einen längeren Zeitraum verbleiben. Durch ein mitogenes Signal kann die Zelle aber wieder in einen Zellzyklus zurückkehren. Während der S-Phase beginnt die DNA-Synthese, bei der Chromosomen verdoppelt werden. Nach der erfolgreichen Replikation geht die Zelle in die G2-Phase über, wo sie sich auf die bevorstehende Mitose vorbereitet, indem sie z. B. Replikation-bedingte Schäden korrigiert. In der Mitose findet die Verteilung der verdoppelten Chromosomen auf die Tochterzellen statt. Durch die Karyokinese (Kernteilung) und die anschließende Zytokinese (zytoplasmatische Zellteilung) werden die Tochterzellen voneinander getrennt und können so einen weiteren Zellzyklus durchlaufen.

Das Kontrollsystem des Zellzyklus besteht hauptsächlich aus Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks, *cyclin dependent kinases*) und ihren regulatorischen Untereinheiten, den Cyclinen, welche die Kinasefunktion der Cdks aktivieren und so die Substratspezifität der Cdks kontrollieren. Die Zellzyklusphasen-spezifische Expression der Cdks und der Cycline führt dazu, dass nur ein spezifischer Cyclin/Cdk-Komplex den Übertritt von einer Zellzyklusphase in die andere kontrolliert. Dabei phosphorylieren die aktivierten Cdks weitere Proteine, die ihrerseits z. B. Transkription von Genen in Gang setzen können, die den Übertritt ermöglichen (Koff *et al.*, 1992; Boonstra, 2003). So wird z. B. der CyclinE/Cdk2-Komplex in der späten G1-Phase hochreguliert, um den Übergang von G1 in S zu erlauben. Dadurch werden S-Phase spezifische Gene transkribiert, um die DNA-Replikation zu initiieren (Jackmann *et al.*, 2002). Werden in der Zelle Schäden detektiert, so ist es notwendig die Zellzyklusprogression anzuhalten. Ein solcher Arrest wird als Checkpoint bezeichnet und ist zwischen der G1- und S-Phase (G1/S-Checkpoint), innerhalb der S-Phase (S-Checkpoint) sowie zwischen der G2- und der M-Phase (G2/M-Checkpoint) anzutreffen (Bartek *et al.*, 2004; Deckbar *et al.*, 2011). Die Funktionalität der Checkpoints ist sehr wichtig. Die Checkpoints verhindern, dass die Zellen mit den unreparierten Schäden von einer Zellzyklusphase in die Nachfolgende übertreten. So verhin-

den G1/S- und G2/M-Checkpoints, dass die Zelle mit unreparierten Schäden entsprechend von G1- in die S-Phase und von G2- in die Mitose gelangt. Der intra-S-Checkpoint unterscheidet sich von den G1/S und G2/M-Checkpoints, indem er kein Anhalten, sondern nur eine Verlangsamung der Progression der Zellen im Zellzyklus initiiert.

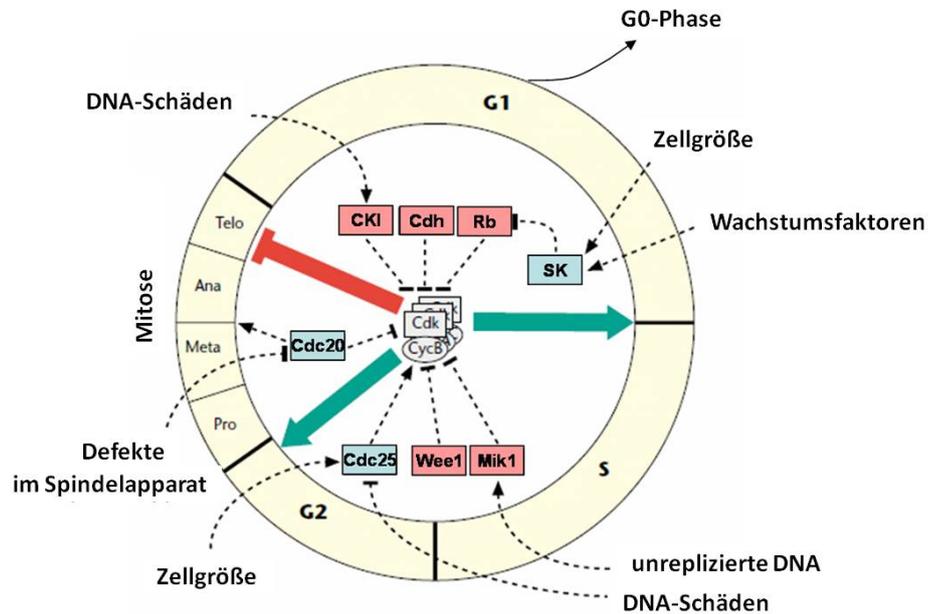


Abb. 2.2: Regulation des Zellzyklus

Dargestellt sind die Reaktionen, die die Zellzyklusmaschinerie beschleunigen (grüne Pfeile) oder sie unterbrechen (roter Balken). Checkpoints (gestrichelte Linien) modulieren die Aktivität der Faktoren, die den Zellzyklus beschleunigen oder anhalten. Pro, Prophase; Meta, Metaphase; Ana, Anaphase; Telo, Telophase; CKI, Cyclin Kinase Inhibitor; Rb, Retinoblastoma Protein; Sk, Starter Kinase (Verändert nach „Checkpoints in the Cell Cycle“ von Novák Béla, Jill C Sible, John J Tyson, Encyclopedia of Life Sciences (2002)).

Werden DNA-Schäden nicht innerhalb der S-Phase repariert, können sie anschließend in der G2-Phase zum Einleiten eines G2/M-Arrestes führen und erst dann repariert werden (Nyberg *et al.*, 2002). Generell werden die Checkpoints so lange aufrechterhalten bis die Schäden behoben werden. Falls jedoch ein Checkpoint aufgrund der genetischen Prädisposition inaktiv oder ineffizient ist, können die Zellen mit den Schäden von einer Zellzyklusphase in die Nachfolgende übertreten. So können z. B. die in der G1-Phase induzierten Schäden in den p53-defizienten Zellen bei der Abwesenheit des G1/S-Checkpoints, während der S-Phase verdoppelt werden. Die Aktivierung der Checkpoints erfolgt über ATM und ATR, deren wichtigsten Zielproteine entsprechend Chk2 und Chk1 (*cell cycle checkpoint kinase 1/2*) sind. Diese Checkpoint-Kinasen können dann über mehrere Zwischenschritte die Cyclin/Cdk-Komplexe inaktivieren, was letztlich zum Anhalten des Zellzyklus führt (van den Heuvel & Harlow, 1993) (Abb. 2.2).

2.2.3 DNA-Doppelstrangbruchreparatur

Zur Reparatur der DSBs stehen der Zelle zwei Hauptreparaturwege zur Verfügung, HR und c-NHEJ, die von Hefen bis zu Säugern konserviert sind. Homologe Rekombination (HR) ist auf die Anwesenheit der homologen Schwesterchromatiden als Matrizen für *de novo* Synthese der zu reparierenden DNA-Stränge angewiesen (Johnson & Jasin, 2001). Für die kanonische (klassische) Nichthomologe Endverknüpfung (*canonical non-homologous end joining*, c-NHEJ) ist die Homologie der Sequenzen nicht notwendig. Die gebrochenen DNA-Enden werden bei c-NHEJ miteinander ligiert (van Gent & van der Burg, 2007). Niedere Eukaryoten, wie *Saccharomyces cerevisiae*, sind meistens auf die HR bei der DSB-Reparatur angewiesen. Nur in einem HR-defizienten Hintergrund lässt sich in diesem Organismus eine c-NHEJ-vermittelte Reparatur beobachten (Schar *et al.*, 1997; Teo & Jackson, 1997). Neben den beiden Hauptreparaturwegen wurden in den letzten Jahren weitere Mechanismen der DSB-Reparatur entdeckt, die als A-NHEJ (*alternative non-homologous end joining*) und MMEJ (*microhomology-mediated end joining*) bezeichnet und unter dem Begriff A-EJ- (*alternative end-joining*) Mechanismen zusammengefasst werden (Corneo *et al.*, 2007; McVey & Lee 2008). Die Wahl des Reparaturweges wird im Wesentlichen durch drei Faktoren bestimmt, die Zellzyklusphase, die Struktur des DSBs und seine Lokalisation im Chromatin (Rothkamm *et al.*, 2003; Goodarzi *et al.*, 2008; Symington *et al.*, 2011). Im Chromatin wird generell zwischen dem locker gepackten, transkriptionsaktiven Euchromatin (EC) und dem dicht gepackten, transkriptionsinerten Heterochromatin (HC) unterschieden. Es wurde gezeigt, dass strahleninduzierte DSBs über eine schnelle und eine langsame Komponente repariert werden. Die im EC lokalisierten DSBs werden schnell repariert. Dagegen werden die im HC auftretenden DSBs mit einer langsamen Kinetik behoben. Dieses biphasische Reparaturverhalten betrifft sowohl die G1 als auch die G2-Phase des Zellzyklus, und es wurde gezeigt, dass die Reparatur der HC-DSBs über die Beteiligung von ATM und Artemis abläuft (Riballo *et al.*, 2004; Goodarzi *et al.*, 2008; Beucher *et al.*, 2009). Ein aktuelles Reparaturmodell beschreibt, dass das c-NHEJ die schnelle Komponente darstellt und als erstes alle DSBs zu reparieren versucht. Danach entscheiden die Lokalisation der DSBs im HC und ihre Komplexität darüber, ob die Reparatur über c-NHEJ fortgesetzt, oder ob das c-NHEJ inhibiert wird. Falls c-NHEJ die DSBs nicht mehr reparieren kann, werden die DSBs der langsamen Reparaturkomponente zugeleitet. Dort werden sie resektiert und von der Nuklease Artemis prozessiert. Bei der langsamen Komponente in der G2-Phase sind die HR-Faktoren (BRCA2, Rad51, Rad54) betei-

ligt (Shibata *et al.*, 2011). Für die langsame Komponente in der G1-Phase wird dagegen ein A-EJ-Mechanismus vermutet (Goodarzi & Jeggo, 2012).

2.2.3.1 Prozess der klassischen Nichthomologen Endverknüpfung (c-NHEJ)

Die molekularen Mechanismen des c-NHEJ sind in der Abb. 2.3 dargestellt.

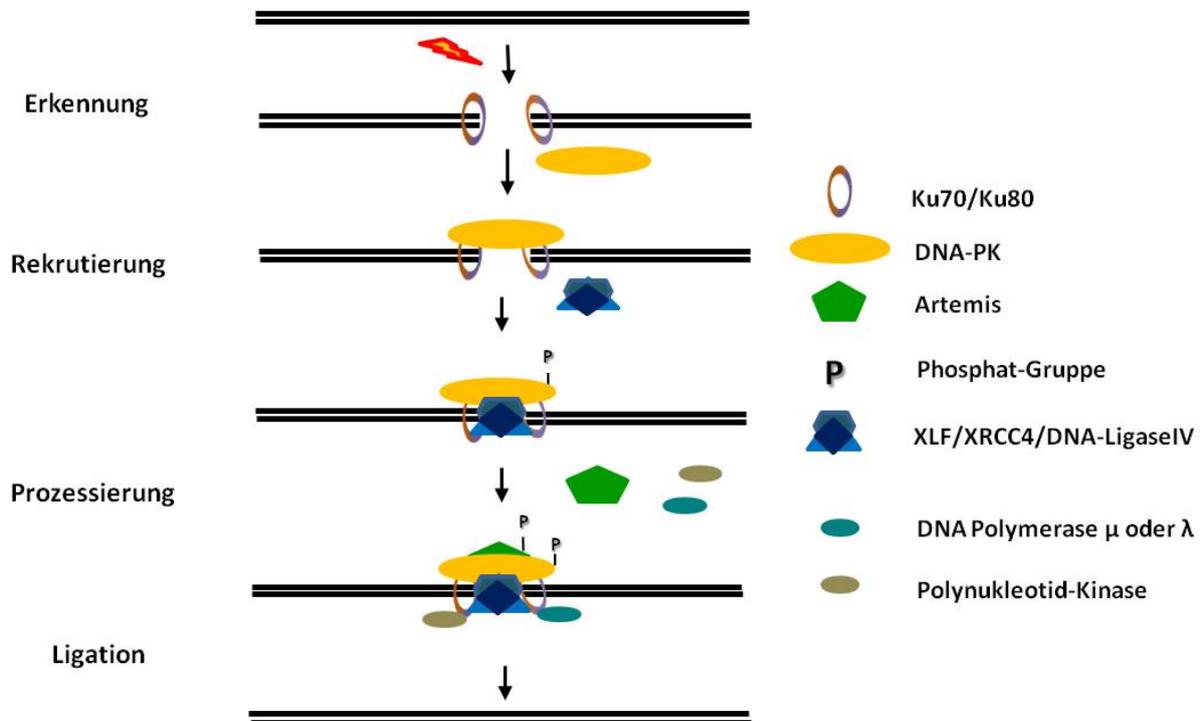


Abb. 2.3: Klassische Nichthomologe Endverknüpfung (*canonical non-homologous end-joining, c-NHEJ*)

Die Enden eines DSBs werden durch das Ku70/Ku80-Heterodimer erkannt und gebunden. Daran schließt unmittelbar die Rekrutierung der katalytischen Untereinheit der DNA-PK, der DNA-PKcs, an, so dass Ku70/Ku80 und DNA-PKcs ein Holoenzym ausbilden. Durch das Holoenzym werden die DNA-Enden geschützt und in der räumlichen Nähe gehalten. Durch die Autophosphorylierung erfährt die DNA-PK eine Konformationsänderung, so dass andere Proteine des Ligationskomplexes wie XLF/XRCC4/DNA-LigaseIV an die Enden rekrutiert werden können. Die Bruchenden ohne Modifikationen werden direkt ligiert. Falls DNA-Enden Modifikationen enthalten, werden Prozessierungsfaktoren, wie Artemis, DNA-Polymerasen μ oder λ und Polynukleotid-Kinase gebraucht, bevor der Ligationsschritt das c-NHEJ abschließen kann.

Die freien Enden des entstandenen DNA-Doppelstranges werden zunächst von einem Protein-Heterodimer, bestehend aus Ku70/Ku80 erkannt und in die räumliche Nähe gebracht (Walker *et al.*, 2001; Weterings & van Gent, 2004; Weterings & Chen, 2008). Die an die DNA-Enden gebundenen Ku70/Ku80-Proteine schützen die DSB-Enden und stellen ein Signal dar, um die katalytische Untereinheit der DNA-PK (DNA-PKcs) anzulocken (Smith & Jackson, 1999). Die Bindung von DNA-PKcs an Ku70/Ku80 aktiviert die Kinase-Aktivität von DNA-PKcs, wobei DNA-PKcs autophosphoryliert wird (Chen *et al.*, 2005). Diese Phosphorylierung dient der Regulation von c-NHEJ. Es kommt zu einer Konformationsänderung in der DNA-PKcs, so dass weitere Proteine an DSB rekrutiert werden können (Block *et al.*, 2004;

Wetterings & Chen, 2008). Die nicht-modifizierten DSB-Enden können direkt über DNA-LigaseIV/XRCC4, vermittelt über XLF/*Cernunnos* (*XRCC4-like factor*) miteinander ligiert werden (Ahnese *et al.*, 2006). Es werden jedoch des Öfteren DNA-DSBs induziert, deren Bruchenden komplexer sind und Modifikationen enthalten (z. B. 3'-Phosphate oder 3'-Phosphoglycolate). Bevor solche Enden miteinander ligiert werden, müssen sie prozessiert werden. Zu den prozessierenden Faktoren des c-NHEJ gehören Artemis, DNA-Polymerase μ oder λ und Polynucleotid-Kinase, die eine duale Funktion besitzt. An 5'-Enden führt sie eine Phosphorylierung durch, während sie an 3'-Enden die Phosphatgruppe abspaltet (Koch *et al.*, 2004). Nach der Prozessierung müssen die vorhandenen Lücken vor der Ligation durch die DNA-Polymerasen μ oder λ aufgefüllt werden (Capp *et al.*, 2006, 2007).

Das c-NHEJ wird als ein schneller, jedoch fehlerbehafteter Mechanismus beschrieben, weil er jegliche, frei stehende DNA-Enden miteinander verknüpfen kann. Dadurch, dass dabei auf die Korrektheit der zu verknüpfenden Enden nicht geachtet wird, können fehlerbehaftete DNA-Produkte entstehen, die für die Zelle fatale Folgen haben können. So entstehen zum Beispiel Mutationen, die später zur Krebs-Entstehung und zum Zelltod beitragen können.

Die Aktivität von c-NHEJ im Säugetiersystem ist für alle Zellzyklusphasen beschrieben, weil es unresektierte DNA-Enden repariert und keine homologen Sequenzen benötigt. In der G0/G1- und G2-Phase stellt das c-NHEJ die schnelle Komponente in der Reparatur dar, die im Säugetiersystem ca. 80% der strahleninduzierten DSBs repariert (Rothkamm *et al.*, 2003). Dieser relativ hohe Anteil an DSBs ist vermutlich im Euchromatin lokalisiert. Oder die Reparatur dieser DSBs läuft ohne Prozessierung durch Artemis ab (Goodarzi & Jeggo, 2012).

Der Prozess des c-NHEJ wird in der Zelle aktiviert, um nicht nur die strahleninduzierten, sondern auch natürlich vorkommende DSBs z. B. im Zuge der V(D)J-Rekombination während den Reifungsprozessen der T- und B-Lymphozyten zu beseitigen. Durch V(D)J-Rekombination wird eine Variabilität in der Kombination der Gensegmente geschaffen, woraus eine Vielzahl von B-, T- Rezeptoren sowie der Immunglobuline resultiert. Die Gene der B- und T-Zellrezeptoren, die als *variable* (V), *diversity* (D) und *joining* (J) Segmente bezeichnet werden, liegen in den Lymphozyten in einer inaktiven Form vor (Ferguson & Alt, 2001; Revy *et al.*, 2005). Während der V(D)J-Rekombination werden zunächst gezielte Schnitte und damit DNA-DSBs durch RAG1 und RAG2 (*Recombination-Activating Genes*) an spezifischen Rekombinationssignalsequenzen gesetzt. So werden vier gebrochene DNA-Enden generiert, die unter Beteiligung von c-NHEJ miteinander verknüpft werden. Es wird ein D- mit einem J-

Segment ligiert. Durch die daran anschließende Verbindung des DJ-Segments mit einem V-Segment wird ein aktives IgH- (Immunglobulin H) Gen gebildet (Abb. 2.4, A; VDJ-Bereich).

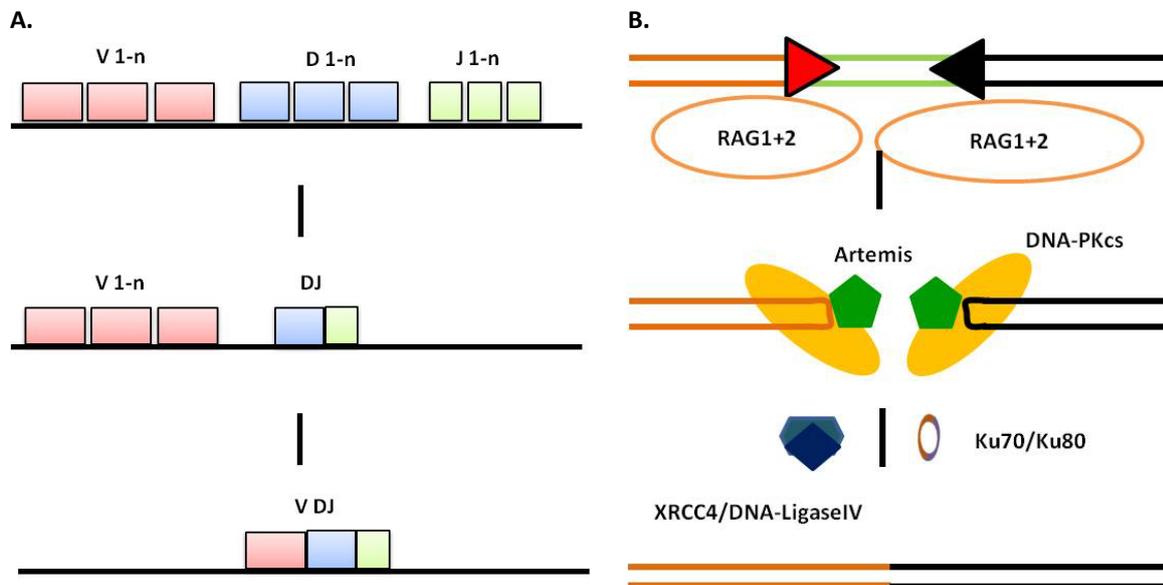


Abb. 2.4: Vereinfachte Darstellung der V(D)J-Rekombination

A. Zusammensetzung der Gensegmente eines reifen Ig oder Tcr. V-, D- und J-Gensegmente eines unreifen Antikörpers (Ig) oder Rezeptors (Tcr). Nach der Verknüpfung der D- und J-Segmente miteinander entsteht ein DJ-Segment, welches mit V-Segment verknüpft wird. Die Kombination von VDJ ist eine Gensequenz eines reifen Ig oder Tcr.

B. RAG-induzierten DSBs und deren Reparatur über c-NHEJ. RAG1 und RAG2 Proteine setzen gezielt DSBs an den spezifischen Rekombinationssignalsequenzen. Die zwischen den Segmenten liegende DNA wird entfernt. Die Enden der Gensegmente bilden Haarnadelstrukturen aus, die durch Artemis entfernt werden. Die Aktivierung von Artemis erfolgt durch die DNA-PK-vermittelte Phosphorylierung. Die DSB-Enden werden von Ku70/Ku80 erkannt und gebunden. Die durch XRCC4/LigaseIV-Komplex vermittelte Ligation schließt den Vorgang des c-NHEJ und damit der V(D)J-Rekombination ab.

Die Enden der Gensegmente werden kodierende Enden genannt. Sie sind dadurch charakterisiert, dass sie Haarnadel-Strukturen ausbilden. Diese müssen durch Artemis geöffnet werden, damit die Ligation stattfinden kann (Moshous *et al.*, 2001). Dadurch, dass auch Ku70/Ku80, DNA-PKcs sowie XRCC4/LigaseIV dabei aktiv sind, wird die Beteiligung von c-NHEJ an der Reparatur von RAG-induzierten DSBs deutlich (Gellert, 2002). Die DNA-Bereiche, die zwischen den Segmenten liegen, werden schließlich entfernt (Abb. 2.4, B).

Die B-Zellen stellen ihr Repertoire an verschiedenen Immunglobulinen durch die weiteren Vorgänge wie *class switch recombination* (CSR) und Somatische Mutation (*somatic hypermutation*, SH), die ebenfalls von einer gezielten Schadensinduktion und der anschließenden Reparatur über BER, MMR (*mismatch repair*), c-NHEJ sowie A-EJ-Wege begleitet werden (Petersen-Mahrt *et al.*, 2002; Chaudhuri & Alt, 2004).

2.2.3.2 Prozess der Homologen Rekombination (HR)

Im Vergleich zu c-NHEJ ist HR ein nahezu fehlerfreier Reparaturmechanismus, weil dieser Vorgang die Informationen einer homologen Schwesterchromatide zur Wiederherstellung der geschädigten DNA als Vorlage nutzt. Aus diesem Grund ist die HR-Aktivität nur auf die S- und G2-Phasen des Zellzyklus begrenzt. HR ist ein langsamer Prozess, der in der G2-Phase in Säugetierzellen 10-15% der im Heterochromatin lokalisierten DSBs repariert.

Im Allgemeinen umfasst der Ablauf der HR drei aufeinanderfolgende Schritte, Praesynapsis, Synapsis und Postsynapsis (Abb. 2.5).

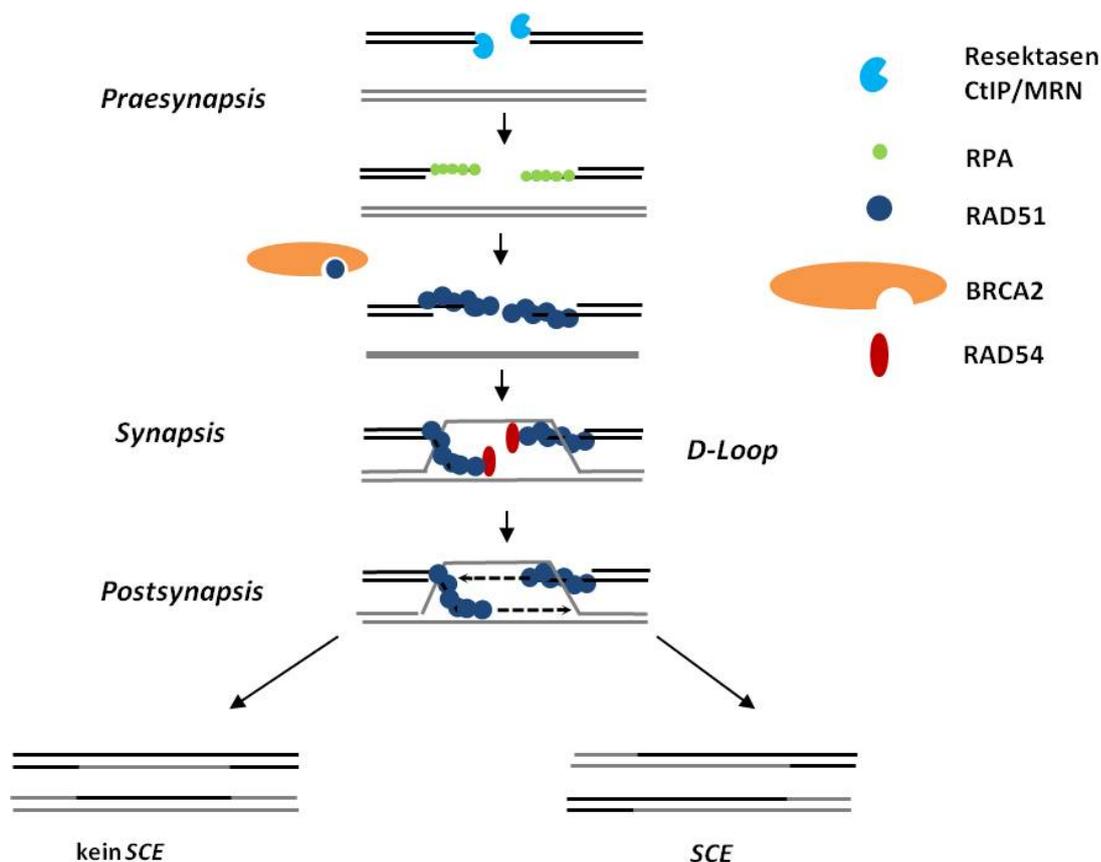


Abb. 2.5: Modell der Homologen Rekombination

Ein DSB wird vom MRN-Komplex erkannt und durch Mre11, CtIP und Exo1 in 5'-3' Richtung resektiert. Das RPA lagert sich an die einzelsträngige DNA und wird durch Rad51 mithilfe von BRCA2 ausgetauscht (Praesynapsis). Das an die DNA gebundene Rad51 bildet ein Nukleoproteinfilament aus. Diese Struktur führt durch eine unterstützende Funktion von Rad54-Motorprotein eine Homologiesuche auf der homologen Schwesterchromatide aus (Synapsis). Bevor die DNA neu synthetisiert wird, dissoziiert Rad51 von der DNA ab (Postsynapsis). Es kann dabei zur Ausbildung von SCEs kommen.

Während der Praesynapsis werden die Enden des DSBs zunächst durch den MRN-Komplex erkannt und zusammengehalten. Der MRN-Komplex setzt sich in den Vertebraten aus MRE11, NBS1 (*Nijmegen breakage syndrome 1*) und RAD50 zusammen. Die Proteine des

MRN-Komplexes haben aber auch andere Funktionen. So ist z. B. NBS1 ein Interaktionspartner von ATM. Durch die Bindung von NBS1 an das ATM wird eine Signalweiterleitung in Gang gesetzt, bei der Proteine der Reparatur und der Checkpointkontrolle durch ATM phosphoryliert und aktiviert werden (Dupre *et al.*, 2006). Nach der Brucherkennung folgt eine Resektion der Bruchenden. Dieses wird zunächst durch MRE11 und CtIP (*CtBP-interacting protein*) in 5'-3'-Richtung bewerkstelligt (Paull & Gellert, 1998; Sartori *et al.*, 2007). Eine weitere Resektion, die über relativ große DNA-Bereiche reicht, wird durch EXO1 durchgeführt (Trujillo *et al.*, 1998). An diesem Schritt sind auch weitere Faktoren wie BLM (*Bloom protein*) und DNA2 beteiligt. BLM ist eine Helikase und entwindet die DNA, so dass einzelsträngige DNA-Bereiche geschaffen werden (Ellis *et al.*, 1995). DNA2 entfernt als Nuklease den 5'-Strang (Zhu *et al.*, 2008). Durch diese ausgedehnte Prozessierung der DNA, die sich über mind. 50-100 Nucleotide erstreckt (Mimitou & Symington, 2009), wird sichergestellt, dass die DSB-Reparatur über HR abläuft. Die 3'-Überhänge der einzelsträngigen DNA-Bereiche (ssDNA) werden durch das Replikationsprotein A (RPA) gebunden und somit vor dem Abbau und der Ausbildung sekundärer DNA-Strukturen geschützt (Binz *et al.*, 2004).

Im nachfolgenden Schritt wird RPA durch die Hauptkomponente der HR, das Rad51, verdrängt. Dieser Schritt wird durch das BRCA2-Protein (*breast cancer associated 2*) und seine Interaktionspartner BRCA1 und PALB2 katalysiert. Der Verlust eines dieser Proteine führt zur Beeinträchtigung in der HR (Sy *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). Durch die Anlagerung von RAD51 an die ssDNA bildet sich eine charakteristische Struktur aus Protein-DNA aus, die als Nukleoproteinfilament bezeichnet wird. Die Ausbildung eines Nukleoproteinfilamentes wird durch weitere Faktoren, Rad51-Paraloge, wie Rad52, Rad51D, XRCC3 unterstützt. Ein Defekt in einem dieser Rad51-Paraloge kann die HR und die Ausbildung der Rad51-Foci beeinträchtigen (Takata *et al.*, 2001). Das Rad51-Nukleoproteinfilament führt eine Stranginvasion und die Homologiesuche auf der homologen Schwesterchromatide aus (Synapsis). Diese Funktion wird dabei von Rad54, welches eine ATP-abhängige Helikase Aktivität beinhaltet, unterstützt. Das Rad54 dient zum einen als ein Stabilisator für das Rad51 und verstärkt somit die Ausbildung des D-Loops. Zum anderen fördert es die Ablösung von Rad51 von der Heteroduplex-DNA, wodurch die anschließende DNA-Synthese beginnen kann (Heyer *et al.*, 2006). Dies ist die Postsynapsis der HR. Während dieses Vorganges entstehen so genannte Holliday-Intermediate (*Holliday junctions*), die nach Beenden der Synthese aufgelöst werden müssen, um die DNA wiederherzustellen und den HR-Vorgang abzuschließen. Dabei sind BLM- und

WRN- (Werner-Protein) Helikasen sowie Mus81 (*MMS and UV sensitive 81*)/Eme1- (*essential meiotic endonuclease 1*) und Gen1- (*XPG-like endonuclease 1*) Nucleasen beteiligt (Iijima *et al.*, 2008; Mimitou & Symington, 2009). Beim Auflösen der HJ kann es zum Austausch der DNA-Abschnitte zwischen den beteiligten DNA-Strängen kommen (*sister chromatid exchange, SCE*). Während des letzten Schritts der HR, der Postsynapsis, können drei verschiedene Wege zur Auflösung der D-Loop-Struktur verwendet werden, welche spezifische enzymatische Schritte beinhalten und eigenständig agieren können (Abb. 2.6).

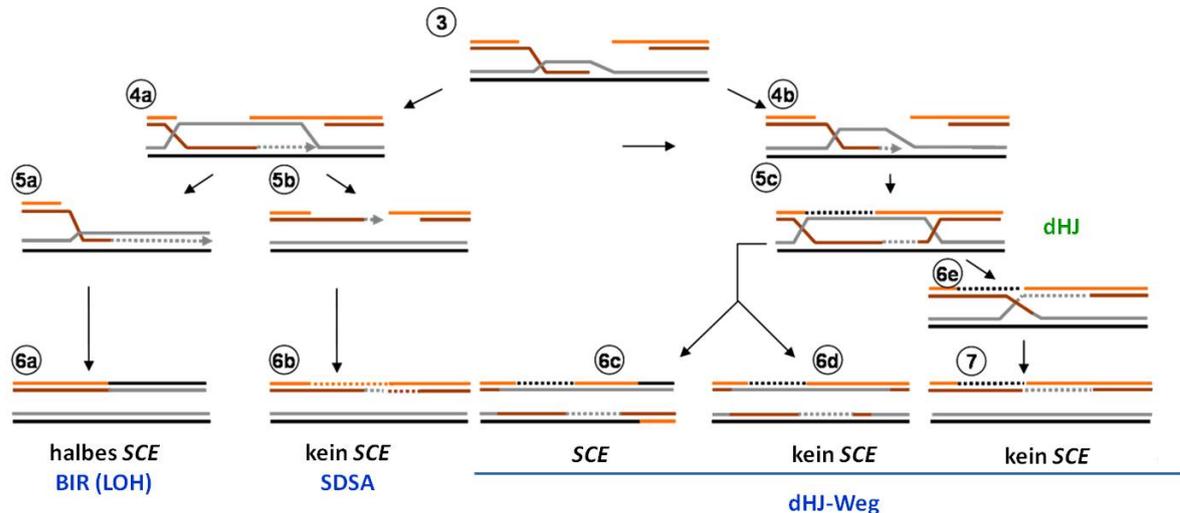


Abb. 2.6: Wege zur Auflösung der D-Loop Strukturen

Während der Postsynapsis können drei unterschiedliche Wege zur Auflösung der D-Loop Strukturen (Struktur 3) verwendet werden. BIR ist mit dem Verlust der Heterozygotie (LOH, *loss of heterozygosity*) verbunden. Dabei wird eine BIR-spezifische Replikationsgabel ausgebildet und der eingewanderte Strang um mehr als 100 kb verlängert (Strukturen 4a-5a-6a). Während der SDSA (*synthesis-dependent strand annealing*) paart sich das nach der DNA-Synthese freigemachte DNA-Ende mit dem zweiten DNA-Ende der gebrochenen DNA. Es bildet sich dabei kein SCE aus (Strukturen 4a-5b-6b). Der dHJ-Weg (Strukturen 4b-5c-6(c-e)-7) beinhaltet die Ausbildung der doppelten Holliday junction (Struktur 5c). Beide DNA-Enden führen unabhängig voneinander oder durch das Erfassen des zweiten DNA-Endes (*strand capture*) eine Stranginvasion durch. Die Auflösung der dHJ-Struktur erfolgt durch Resolvasen (Mus81-Eme1-Gen1), wobei ein SCE auftreten kann (Strukturen 6 c-d). Die Auflösung der dHJ-Struktur kann weiterhin über BLM-vermittelte Bewegung des Kreuzungspunktes (*branch migration*), welcher schließlich durch eine TopoIII α -katalysierte Reaktion geschnitten wird, erfolgen. Bei diesem Vorgang wird ebenfalls kein SCE gebildet (Struktur 7) (Li & Heyer, 2008).

Die D-Loop-Struktur (Abb.2.6, Struktur 3) stellt den Verzweigungspunkt dar, von dem aus BIR (*break-induced replication*), SDSA (*synthesis-dependent strand annealing*) und dHJ-Weg (Auflösung einer doppelten *Holliday junction*) ausgehen. Der BIR-Weg bezieht sich auf die Rekombination-abhängige DNA-Synthese, welche von einem DNA-Bruchende aus initiiert wird und sich über mehr als 100 kb erstreckt (Donniani & Symington, 2013). Mit diesem Prozess ist es möglich lange Chromosombereiche zu duplizieren, und somit scheint dieser Mechanismus während der Replikation in der S-Phase eine Rolle zu spielen (George & Kreuzer,

1996). BIR wird aber auch an einem DSB aktiviert. Hierbei erfolgt eine Strang-invasion des gebrochenen DNA-Endes in die homologe Matrize (Abb. 2.6, Struktur 4a), welcher sowohl Rad51-unabhängig als auch Rad51-abhängig ablaufen kann (Malkova *et al.*, 1996, 2005). Dieses wird gefolgt von der Synthese, die sich dann über mehr als 100 Kilobasen ausdehnen kann (Abb. 2.6, Struktur 5a). Die BIR wird bei der Reparatur mehrerer DNA-Schäden verwendet. So werden z. B. Schäden an den arretierten Replikationsgabeln bevorzugt über BIR repariert (Deem *et al.*, 2011). Weiterhin wird die BIR auch während des Mechanismus der alternativen Telomerverlängerung (ALT) genutzt, um die ungeschützten (*uncapped*) Telomerenden zu stabilisieren (Reddel, 2003). Der BIR-Prozess läuft langsam ab, da es zur Ausbildung von BIR-spezifischen Replikationsgabeln kommen muss. Eine weitere Erklärung für die zeitliche Verzögerung der BIR kann ein weiterer in der Nähe gelegener DSB sein, der die Reparatur über diesen Weg unterdrückt und die anderen Reparaturwege wie SDSA oder dHJ bevorzugt aktiviert (Jain *et al.*, 2009). Durch die Verwendung von BIR kann es zum Verlust der Heterozygotie (LOH, *loss of heterozygosity*) kommen (Abb.2.6, Struktur 6a), da das zweite DNA-Bruchende sich an der Reparatur nicht beteiligt und somit diese Information für immer verloren geht (Pierce *et al.*, 2001a). Als physiologische Konsequenz der BIR können schließlich Translokationen der Chromosomen entstehen, welche des Öfteren mit der Entstehung von Krebs einhergehen (Mitelman *et al.*, 2007).

Der Weg der SDSA ist im Vergleich zur BIR ein Mechanismus, welcher die genomische Integrität bewahrt. Ein resektiertes Bruchende wird verlängert, indem die Information der homologen Matrize genutzt wird. Anschließend lagert sich das verlängerte DNA-Stück an das gebrochene DNA-Ende an (Abb. 2.6, Struktur 5b). Bei diesem Prozess werden keine *Holliday junctions* und keine SCEs ausgebildet (Abb. 2.6, Struktur 6b), was dazu führt, dass die ursprüngliche genetische Information erhalten bleibt (Grabarz *et al.*, 2012). Aus diesem Grund wird SDSA als Prozess der *Gene Conversion* bezeichnet und scheint der dominante Mechanismus bei der HR während der Reparatur von zwei-endigen DSBs zu sein. Im Vergleich zur BIR ist der SDSA-Weg fehlerfrei (Helleday *et al.*, 2007).

Bei der dritten Möglichkeit der Auflösung der D-Loop-Strukturen kommt es zur Ausbildung einer doppelten *Holliday junction* (Abb. 2.6, Struktur 5c). Diese Struktur ist insbesondere im Zusammenhang mit der Rekombination während der Meiose bekannt, wurde aber auch während der Reparatur in den somatischen Zellen detektiert (Bzymek *et al.*, 2010). Bei diesem Vorgang führen beide Bruchenden unabhängig voneinander eine Stranginvasion an der

homologen Matrize durch (Abb. 2.6, Struktur 5c). Die dHJ-Struktur wird schließlich von BLM-TopoIII α unter Entstehung der nicht-SCE-Produkte aufgelöst (Abb. 2.6, Struktur 7). Durch spezifische Resektasen wie Mus81-Eme1-Gen1 kann dHJ geschnitten werden. Dabei kann es entweder zur Ausbildung eines SCE oder zu keinem SCE kommen (Mimitou & Symington, 2009). Das Auftreten der dHJ-Struktur in somatischen Zellen ist jedoch ein seltenes Ereignis, was wiederum die Annahme unterstützt, dass SDSA bevorzugt genutzt wird (Ira *et al.*, 2003).

2.2.3.3 Alternative Mechanismen

Neben der HR und c-NHEJ existieren alternative Reparaturmechanismen (A-EJ) zur Reparatur von DNA-DSBs. Diese Wege wurden vor allem in c-NHEJ-Mutanten entdeckt. So konnte von Boulton & Jackson gezeigt werden, dass Hefe-Zellen trotz der Ku70-Defizienz die DSBs reparieren konnten. Diese Reparatur verlief jedoch deutlich langsamer als im entsprechenden WT. Neben der verlangsamten Reparatur wurde festgestellt, dass die reparierte DNA Deletionen und sich überlappende Mikrohomologien aufwies (Boulton & Jackson, 1996). Auch in Säugetierzellen konnten diese Beobachtungen bestätigt werden (Kabotyanski *et al.*, 1998). Somit wurden zwei wichtige Eigenschaften der alternativen Reparaturwege postuliert. Es handelt sich zum einen um eine Reparatur, die, im Vergleich zum c-NHEJ, deutlich langsamer abläuft. Zum anderen ist diese Reparatur fehlerbehaftet, weil die reparierte DNA Deletionen, Translokationen und Fusionen aufweist. Somit stellen A-EJ-Mechanismen eine Quelle für die genomische Instabilität dar und sind Ursache für viele Tumore (Lieber, 2010). In einer WT-Zelle werden A-EJ-Mechanismen durch c-NHEJ und HR unterdrückt. Kommt es zu Defekten in c-NHEJ und HR, so können die A-EJ-Mechanismen aktiviert werden. Gleichzeitig aber, wie es die neueren Studien zeigen, können sie als eigenständig wirkende *back-up* Reparaturprozesse fungieren, auch wenn die Faktoren des c-NHEJ und der HR vorhanden sind (Kinner *et al.*, 2008; Mladenov & Iliakis, 2011; Dueva & Iliakis, 2013).

Basierend auf den Ergebnissen der aktuellen Forschung werden A-EJ-Mechanismen in A-NHEJ und MMEJ unterschieden. Der wesentliche Unterschied zwischen den beiden Mechanismen besteht in der Notwendigkeit der Mikrohomologien, die für das MMEJ gebraucht werden. Die enzymatischen Schritte des A-NHEJ und MMEJ sind in der Abb. 2.7 zusammengefasst, bei denen eine Vielzahl von Proteinen beteiligt ist.

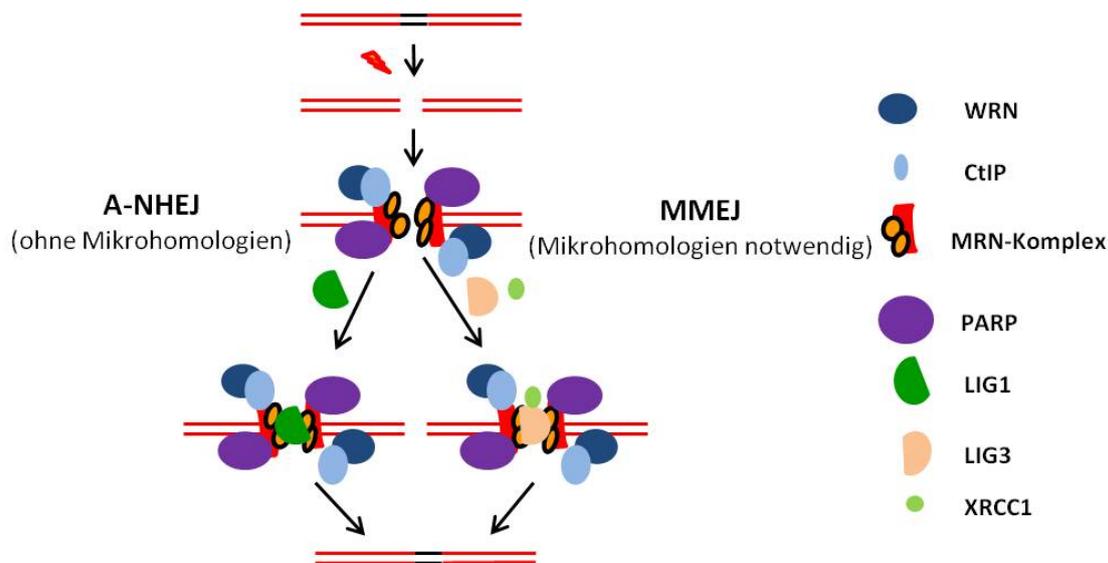


Abb. 2.7: Schematische Darstellung von A-EJ-Mechanismen (A-NHEJ und MMEJ) und der daran beteiligten Proteine

Die Reparatur eines DSBs erfolgt unter der Beteiligung des MRN-Komplexes, welcher an die DSB-Enden bindet und diese stabilisiert. Die WRN-Helicase entwindet die DNA, so dass CtIP-abhängige Resektion stattfinden kann. PARP ist hier ebenso beteiligt. Für die Reparatur über MMEJ sind Mikrohomologien notwendig. LIG3/XRCC1 sind für den Ligationsschritt verantwortlich. Beim A-NHEJ sind keine Mikrohomologien notwendig. Die Enden werden durch die LIG1 ligiert (Dueva & Iliakis, 2012).

Hierbei sind DNA-LigaselIII/XRCC1, die Poly(ADP)ribose Polymerase-1 (PARP-1), der MRN-Komplex (Mre11/Rad50/Nbs1), WRN und CtIP zu erwähnen (Audebert *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2006, Rass *et al.*, 2009, Robert *et al.*, 2009, Xie *et al.*, 2009, Lee-Theilen *et al.*, 2011, Cheng *et al.*, 2011, Zhang & Jasin, 2011). Die DSB-Enden werden sowohl für das A-NHEJ als auch für das MMEJ mithilfe von CtIP resektiert. Im Vergleich zur Resektion im Zuge der HR, die sich über 50-100 Nucleotide ausdehnt, werden während MMEJ 5-25 Nucleotide entfernt (Truong *et al.*, 2013). Nach der Resektion der DSB-Enden entstehen einzelsträngige DNA-Bereiche, die eine Diskontinuität darstellen und von PARP-1 erkannt werden. PARP-1 modifiziert sich selbst und andere Proteine durch das Anhängen von ADP-Ribose-Molekülen. Neben der Funktion in der Basen-Exzisionsreparatur und Einzelstrangbruchreparatur wurde seine Beteiligung in den A-EJ-Mechanismen beobachtet (Caldecott, 2001). Es konkurriert direkt mit Ku um die DSB-Enden (Wang *et al.*, 2006). In der Abwesenheit von Ku wird PARP-1 an DSBs rekrutiert (Cheng *et al.*, 2011). Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal zwischen A-NHEJ und MMEJ ist der Ligationsschritt. Im Fall von A-NHEJ wird dieser durch Ligase 1 (LIG1) und im Fall von MMEJ durch Ligase 3 (LIG3)/XRCC1 erfüllt (Audebert *et al.*, 2004, Haber, 2008; Paul *et al.*, 2012).

So wie bei den klassischen Reparaturwegen, stellt sich auch hier die Frage, wie die A-EJ-Mechanismen während des Zellzyklus reguliert werden. Es wurde gezeigt, dass A-EJ-

Mechanismen in allen Zellzyklusphasen funktionsfähig sind, ihre Aktivität jedoch während der späten S- und G2-Phase ansteigt (Wu *et al.*, 2008; Guirouilh-Barbat *et al.*, 2008). Des Weiteren wurden auch andere Funktionen der A-EJ-Mechanismen beschrieben. Einige Arbeiten haben gezeigt, dass diese Mechanismen in die Aufrechterhaltung der Telomer-Struktur involviert sind (Rai *et al.*, 2010). Weiterhin können sie auch die Funktion des c-NHEJ während der CSR (*class switch recombination*) und V(D)J-Rekombination in den c-NHEJ-Mutanten ersetzen (Lee *et al.*, 2004; Corneo *et al.*, 2007; Jones & Simkus, 2009).

2.2.3.4 Reparatur von Replikation-assoziierten DNA-Schäden

DNA-Replikation ist ein evolutionär hochkonservierter Prozess sowohl in den Pro- als auch in den Eukaryoten und stellt sicher, dass die DNA dupliziert wird und die Tochterzellen während der Mitose eine Kopie des parentalen Genoms erhalten. Es existiert eine Vielzahl von Kontrollmechanismen, die einen akkuraten Ablauf der Replikation steuern. Alle diese Prozesse zielen auf die Stabilität der Replikationsgabel ab, welche die zentrale Struktur während der Replikation darstellt (Leman & Noguchi, 2013).

Die Replikationsgabel ist jedoch eine verwundbare Struktur, an der trotz der hohen Korrekturlesemechanismen der replikativen DNA-Polymerasen spontane Fehler auftreten können, die die genomische Integrität gefährden. So führen z. B. die häufig auftretenden Basenmodifikationen wie Methylierungen, Oxidierungen oder Desaminierungen auf dem Matrizenstrang zu einer Blockierung der Neusynthese des Tochterstranges, weil kein passendes Nukleotid von der replikativen DNA-Polymerase in den neu synthetisierten Strang eingebaut werden kann. Einzelstrangbrüche (SSB) der DNA sind eine weitere Schadensart, die das Fortschreiten der Replikation verzögern kann. Diese Schäden können spontan aus den unreparierten Basenschäden, die durch die Nucleotidexcisions- (NER) oder Basenexcisionsreparatur (BER) nicht beseitigt wurden, entstehen. Sie werden aber auch in einer viel höheren Anzahl durch Strahlung oder durch chemische Agenzien wie z. B. Camptotecin (CPT) induziert (Adachi *et al.*, 2004). Werden diese Schäden nicht durch die Einzelstrangbruchreparaturmechanismen repariert, werden sie im Zuge der Replikation in die einendigen DNA-DSBs (*one-ended* DSBs) umgewandelt (Strumberg *et al.*, 2000). Neben den DNA-Schäden können sekundäre DNA-Strukturen während der Replikation auftreten, die die Replikationsmaschinerie behindern können (Mirkin & Mirkin, 2007). Die Replikationsgabel kann auch mit der Transkriptionsmaschinerie kollidieren. Und obwohl die Zelle diese negati-

ve Interaktion durch bestimmte Mechanismen vermeiden kann, kann die Replikation trotzdem angehalten werden (Brewer & Fangman, 1988; Deshpande & Newlon, 1996). Weiterhin gibt es natürlich vorkommende DNA-Sequenzen, die schwer zu replizieren sind und zum Arrest sowie dem Abfallen der Replikationsgabel führen können. Diese Sequenzen werden als *Common fragile sites* (CFS) bezeichnet und sind insbesondere gegenüber den Replikationsstress-aktivierenden Agenzien empfindlich (Freudenreich, 2007). Wenn also die Replikation gestört wird, können die Replikationsgabeln arretieren oder kollabieren (Petermann & Helleday, 2010; Jones & Petermann, 2012), was zur Aktivierung eines intra-S-Phase Checkpoints führt und Reparaturprozesse in Gang setzt (Jackson, 2002; Willis & Rind, 2009; Polo & Jackson, 2011).

Aufgrund der Antiparallelität der DNA-Doppelhelix, wo einer der Stränge in 5'-3'-Richtung und der andere in 3'-5'-Richtung verläuft, weist die Replikationsgabel eine asymmetrische Y-förmige Form auf. Die DNA-Polymerasen besitzen jedoch nur eine Aktivität in 5'-3'-Richtung, so dass die Replikation teilweise diskontinuierlich ablaufen kann. Der Tochterstrang der kontinuierlich synthetisiert wird, wird als Leitstrang (*leading strand*) bezeichnet. Demgegenüber steht der Tochterstrang, der diskontinuierlich synthetisiert wird. Dieser wird als Folgestrang (*lagging strand*) bezeichnet (Goulian *et al.*, 1990). Die Unterschiede in der Synthese des Leit- und Folgestranges der Replikationsgabel führen dazu, dass die DNA-Schäden auf dem Leit- bzw. Folgestrang auf verschiedenen Wegen repariert werden (Abb. 2.8). Diese beinhalten *translesion synthesis* (TLS; Abb. 2.8, A: 1-2b-3b; B: 1-2c), *template switching* während der Regression der Replikationsgabel (Abb. 2.8, A: 1-2b-3d-4d-4d-5d) sowie die HR (Abb. 2.8, A: 1-2b-3c-4c-5c; B: 1-2a/b-3a/b) (Branzei *et al.*, 2008). Aufgrund der Blockierung der replikativen DNA-Polymerasen durch die Läsionen am Folge- und Leitstrang werden die hochspezialisierten TLS-Polymerasen aktiviert, welche die unspezifischen, von dem Watson-Crick-Modell abweichenden Basen einfügen (Li & Heyer, 2008). Die TLS-Polymerasen, z. B. Pol η , Pol ι und Pol κ gehören zur Y-Familie der DNA-Polymerasen und unterscheiden sich stark in ihrer Substrataffinität (Prakash *et al.*, 2005). Nachdem trotz des Schadens durch TLS-Polymerasen repliziert wurde, kommt es zu einer Rückaktivierung der replikativen DNA-Polymerasen, die die weitere Replikation durchführen (Prakash *et al.*, 2005). Obwohl TLS ein fehlerbehafteter Mechanismus ist und Punktmutationen hervorrufen kann, wird dieser bevorzugt genutzt, wenn Replikation infolge der Basenschädigung arretiert wird (Heller & Marians, 2006a).

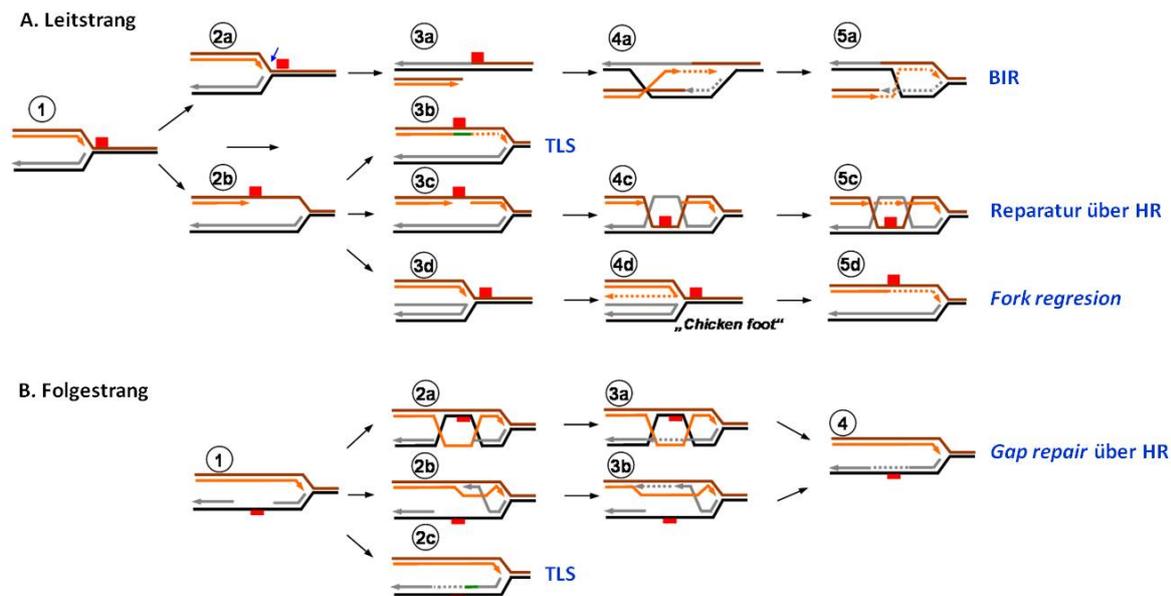


Abb. 2.8: Reparaturwege der HR an den arretierten/kollabierten Replikationsgabeln

A. Möglichkeiten einen DNA-Schaden am Leitstrang einer Replikationsgabel zu reparieren. Arretierte Replikationsgabel (Struktur 1) kann durch eine Endonuclease geschnitten werden (Struktur 2a, blauer Pfeil), um einen ein-endigen DSB zu generieren. Der Schaden kann über BIR repariert werden (Strukturen 2a-3a-4a-5a), indem eine Stranginvasion und Ausbildung eines *Holliday junction* erfolgt. Es findet somit eine Reorganisation einer funktionierenden Replikationsgabel statt. Der initiale blockierende Schaden kann durch die TLS-Polymerasen behoben werden. TLS kann zu einem direkten *bypass* des Schadens führen, bei dem Polymerasen über den Schaden hinweg replizieren (Struktur 3b, grüne Linie). Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Synthese des Folgestranges entkoppelt von der Synthese des Leitstranges stattfindet (Struktur 2b). Dieses kann dann zum *bypass* durch TLS führen (Struktur 3b). Oder es entsteht infolge der Wiederaufnahme der Leitstrang-Synthese eine Lücke am Leitstrang. Diese wird durch den HR-Vorgang geschlossen (3c-4c-5c). Die verschiedenen Möglichkeiten der Stranginvasion sind unten bei der Reparatur des Schadens am Folgestrang dargestellt (2a-3a-4; 2b-3b-4). Alternativ zu TLS kann die Replikationsgabel eine so genannte „*Chicken foot*“ Struktur ausbilden, bei der der Folgestrang als Matrize für den Leitstrang dient (3d-4d). Der Rückgang der „*Chicken foot*“ Struktur ermöglicht die Progression der Replikation und schließlich die Reparatur. **B.** Möglichkeiten der Reparatur des Schadens, welcher sich am Folgestrang der Replikationsgabel ereignet hat. Die Wiederaufnahme der Folgestrang-Synthese, nachdem die Replikationsgabel zum Stehen kommt, hinterlässt eine Lücke auf dem Folgestrang (Struktur 1). Diese Lücke wird über HR repariert (2a-3a/b-4). Der Schaden kann aber auch direkt über TLS-Polymerasen behoben werden (Struktur 2c, grüne Linie) (Li & Heyer, 2008).

Beim Vorgang der Regression der Replikationsgabel bilden sich so genannte „*Chicken foot*“ Intermediate aus, welche analog zu der Struktur der *Holliday junction* sind (Abb. 2.8, A: 4d). Es kommt zum Wechsel der Matrizen. An Stelle von blockiertem 3'-Ende wird der aufkeimende Schwesterstrang als Vorlage genutzt. Bei dem Matrizenwechsel findet keine Stranginvasion statt. Dieser Prozess scheint unabhängig von Rad51 abzulaufen. RPA, Rad52 sowie weitere Motorproteine sind an der Ausbildung und der Auflösung der „*Chicken foot*“ Strukturen beteiligt (Heller & Marians, 2006b).

Die HR wird für die Reparatur der Lücken (*gaps*) sowie der ein-endigen DSBs verwendet (Helleday *et al.*, 2007).

2.3 DT40-Zellsystem

DT40-Zellen sind entartete Hühner B-Lymphozyten. Sie sind durch die Transformation mittels des AL (*avian leukosis*)-Virus entstanden und wurden aus einem Lymphom, aus der *Bursa fabricii* isoliert (Baba *et al.*, 1985). *Bursa fabricii* stellt ein einzigartiges Körperorgan dar und wird als eine Drüse definiert, in der die primäre Differenzierung der Lymphozyten bei einem Huhn bzw. generell bei Vögeln stattfindet (Ratcliffe, 2006). Als in Suspension gehaltene Zelllinie wurden die DT40-Zellen im Labor von Eric H. Humphries etabliert (Baba *et al.*, 1985). Eine weitere Studie hat gezeigt, dass DT40-Zellen gegenüber den Säugetierzellen fremde DNA häufiger gezielt als zufällig in die genomische DNA einbauen können (Buerstedde & Takeda, 1991). Das Verhältnis zwischen einem zufälligen und gezielten Einbau beträgt dabei mehr als 1:2 (Winding & Berchtold, 2001). Dieses hängt unter anderem damit zusammen, dass die Hühnerzellen, im Vergleich zu Säugetierzellen, einen geringeren Anteil an sich wiederholenden DNA-Bereichen, *IRS* (*interspersed repetitive sequences*) wie z. B. Satellit-DNA, aufweisen (*IRS*-Anteil in den Hühnerzellen: 9%; *IRS*-Anteil in den Säugetierzellen: 40-50%; Brown *et al.*, 2003; International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2004).

Die Eigenschaft der DT40-Zellen fremde DNA mit hoher Frequenz ins Genom zu integrieren, konnte in der Forschung genutzt werden, um ein breites Spektrum an *knock-out* Mutanten zu generieren. Insbesondere für die Bearbeitung der Fragestellungen auf dem Gebiet der DNA-Reparatur wurden viele Mutanten hergestellt, die Einzel-, Doppel- und sogar Dreifach-Mutationen mehrerer unterschiedlicher Gene gleichzeitig tragen (Bezzubova *et al.*, 1997; Takata *et al.*, 1998; Sonoda *et al.*, 1998; Ishiai *et al.*, 2004). Im Vergleich dazu wird die Herstellung und Untersuchung von *Knock-out*-Mutanten im Säugetiermodell oftmals durch nicht lebensfähige Phänotypen erschwert. Es existiert zwar eine Vielzahl an natürlich vorkommenden Mutanten, jedoch ist deren genetischer Status des Öfteren hypomorph, d. h., dass die WT-Funktion des ausgeschalteten Gens teilweise vorhanden bleibt (z. B. bei BRCA1-, BRCA2-Mutationen). Für Säugetierzellen wurde an dieser Stelle die RNAi-Technik etabliert, deren Wirkung allerdings instabiler als bei einem kompletten *Knock-out* ist. Die Besonderheit der DT40-Zellen, sie als vielseitig einsetzbares Modell zu nutzen, hat den Wissenschaftlern verholfen und verhilft immer noch viele evolutionär konservierte Reparaturwege und deren Regulation aufzuklären und die gewonnenen Erkenntnisse auf die Situation in anderen höheren Organismen wie Maus und Mensch zu übertragen.

Die DT40-Zellen sind relativ klein. Ihre Größe beträgt ca. 10 µm, wobei das Verhältnis Zellkern zum Zytoplasma sehr hoch ist (Winding & Berchtold, 2001). Die Genomgröße beträgt 1000 Mb und ist somit ungefähr um zwei Drittel kleiner als die eines Menschen (International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2004). Die Gene werden auf 80 Chromosomen verteilt, die der Größe nach in 11 Makro- und 67 Mikrochromosomen unterteilt werden. Zusätzlich gibt es ein Paar Geschlechtschromosomen, ZZ oder ZW (Sonoda *et al.*, 1998). Der Karyotyp der DT40 ist auch über eine längere Kultivierungsdauer stabil. Der Zellzyklus der DT40-Zellen dauert, abhängig vom WT oder Mutante zwischen 8 und 12 h, was für die phänotypischen Studien von großem Vorteil ist. Die Abwesenheit von p53 in diesen Zellen verursacht, dass der G1/S-Checkpoint inaktiv bleibt und die Zellen nach Bestrahlung keinen G1-Arrest aufweisen. Ein Vorteil der p53-Defizienz liegt darin, dass die DNA-Schäden in den Reparaturmutanten keine Überexpression von p53 induzieren, was sonst die Wachstumsfähigkeit beeinträchtigen und die Apoptose einleiten würde (Takao *et al.*, 1999).

2.4 Funktionen des Proteins Artemis

Artemis ist eine Nuklease und gehört zur Proteinsuperfamilie der Metallo-β-Lactamasen. Eine andere Bezeichnung von Artemis ist SNM1C (Ishiai *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2010). Es wurde als erstes bei der Charakterisierung der RS-SCID (*radiation sensitive severe combined immunodeficiency*)-Patienten entdeckt. Bei diesen Patienten führt die Mutation im Artemis-Gen zu einer Empfindlichkeit gegenüber der ionisierenden Strahlung (Moshous *et al.*, 2001). Die Funktion von Artemis als Nuclease ist aus dem Vorgang der V(D)J-Rekombination bekannt. Mithilfe dieses Proteins werden dort entstandene Loop-Strukturen aufgelöst, die als Folge der RAG-vermittelten DSB-Induktion in den unreifen Lymphozyten entstehen und bei Artemis-Abwesenheit unaufgelöst verbleiben (Pannicke *et al.*, 2004).

Aktivierung von Artemis geschieht durch DNA-PKcs-vermittelte Phosphorylierung. Es ist aber auch bekannt, dass Artemis durch ATM und ATR reguliert wird (Poinsignon *et al.*, 2004). Insbesondere nach niedrigen Dosen (2-3 Gy) wird Artemis durch ATM phosphoryliert. Erst nach hohen Dosen (10 Gy) trägt DNA-PKcs zu dieser Artemis-Modifikation bei. *In vitro*, ohne Interaktionspartner, besitzt Artemis eine 5'-3' DNA Exonuclease-Aktivität, während seine endonukleolytische Funktion für das Auflösen der Loop-Strukturen durch Interaktion mit DNA-PKcs und durch deren Phosphorylierung aktiviert wird. Die genaue Funktion von Artemis während der DSB-Reparatur ist bislang relativ wenig bekannt. Es wurde gezeigt, dass

etwa 10-15% der strahleninduzierten DSBs in Säugetierzellen sowohl in der G1- als auch in der G2-Phase des Zellzyklus unter der Beteiligung von Artemis repariert werden (Ma *et al.*, 2005; Riballo *et al.*, 2004). In Epistasis-Studien mit humanen Fibroblasten wurde gezeigt, dass ATM und Artemis im selben Weg während der langsamen Reparaturkomponente beteiligt sind. In der G1-Phase ist es ein alternativer Reparaturprozess, in der G2-Phase ist es die HR (Beucher *et al.*, 2009; Goodarzi & Jeggo, 2012). Alle bisherigen Studien zeigten, dass ein ausgeprägter Reparaturdefekt in den Artemis-defizienten Zellen insbesondere nach langen Reparaturzeiten ausgebildet wird (Wang *et al.*, 2005b; Darroudi *et al.*, 2007). Dabei wird angenommen, dass es sich um komplexere DSBs handelt, welche dazu tendieren, Loop-Strukturen auszubilden und daher einer Prozessierung bedürfen (Pfeiffer *et al.*, 2004). Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass die Etoposid-induzierten DSBs, die glatte DNA-Enden aufweisen, keine Artemis-Beteiligung benötigen. Außerdem steigt der Anteil der Artemis-abhängigen DSB-Reparatur mit der Höhe des LET (*linear energy transfer*) an, da nach der Bestrahlung mit α -Teilchen oder Kohlenstoff der Anteil an komplexen DSBs zunimmt (Riballo *et al.*, 2004). Neben der DSB-Reparatur wurde eine Funktion von Artemis während der Zellzykluskontrolle nachgewiesen, indem gezeigt wurde, dass Artemis-defiziente Zellen einen länger andauernden G2/M-Checkpoint im Vergleich zum WT aufweisen (Krempler *et al.*, 2007). Eine neuere Studie mit humanen Zelllinien beschreibt Artemis als einen Schalter, welcher die DSBs von unvollständig abgeschlossenem c-NHEJ in die HR oder A-EJ-Mechanismen überführt (Kurosawa *et al.*, 2013).

2.5 Zielsetzung

DSBs sind schwerwiegendste Läsionen in der DNA, die, falls sie unrepariert verbleiben, die genomische Stabilität beeinträchtigen. Dieses kann die Entstehung von Mutationen sowie Krebs begünstigen und zum Zelltod führen. Die Vertebraten haben eine Vielzahl an Reparaturwegen, wie c-NHEJ, HR und A-EJ etabliert, um diese DSBs zu reparieren. Die Interaktionen zwischen den Reparaturwegen sind Gegenstand der heutigen Forschung. Insbesondere beschäftigen sich derzeit viele Arbeitsgruppen mit der Aufklärung der Mechanismen, welche die Wahl des jeweiligen Weges steuern. So wurde z. B. mehrfach gezeigt, dass die Nutzung des jeweiligen Reparaturweges unter anderem von der Art des Schadens, dessen Lokalisation in der DNA sowie der Position der Zellen im Zellzyklus zum Zeitpunkt der Schädigung abhängig ist.

Dadurch, dass DT40-Zellen eingebrachte DNA häufiger gezielt als zufällig in die genomische DNA integrieren, wurde gezeigt, dass sie auch gegenüber den Säugetierzellen eine erhöhte Frequenz der HR aufweisen. Daher wurde diese Zelllinie als ein gutes Modell für die Untersuchungen der HR-Ereignisse gesehen. Weitere Studien unter der Verwendung von Überlebensexperimenten und chromosomalen Studien zeigten, dass neben der HR auch das c-NHEJ in diesen Zellen für die Überlebensfähigkeit und die chromosomale Stabilität wichtig sind und dass die HR und das c-NHEJ auch in den DT40-Zellen Zellzyklusphasen-abhängig ablaufen. Eine interessante Feststellung war, dass die Wegnahme vom c-NHEJ-Faktor Ku70 zu einer partiellen Strahlensresistenz aufgrund der dadurch gesteigerten HR-Aktivität in der späten S/G2-Phase führt. Die bisher verwendeten Methoden, wie das klonogene Überleben sind jedoch nur indirekte Nachweismethoden für die DSB-Reparatur. Auch die bisher durchgeführten chromosomalen Analysen mit DT40-Zellen wurden unabhängig von der Zellzyklusphase durchgeführt. Die aus den Studien mit Säugetierzellen bekannten und zur Verfügung stehenden Zellzyklusphasen-spezifischen Methoden ermöglichen dagegen eine genaue Charakterisierung des Beitrages der jeweiligen Reparaturwege durch den Zellzyklus. Da die Zellzyklusphasen-spezifische Analyse der Reparaturereignisse auf der Ebene der γ H2AX-Foci und Chromosomenbrüche für das DT40-Zellsystem noch nicht beschrieben sind, sollten daher die entsprechenden Methoden im ersten Teil der vorliegenden Arbeit etabliert werden. Insbesondere das im Überlebensexperiment mit exponentiell wachsenden Zellen auftretende biphasische Verhalten der c-NHEJ-Mutante sollte mithilfe der Zellzyklusphasen-spezifischen Analysen näher charakterisiert werden. Des Weiteren sollte das aus den Untersuchungen mit Säugetierzellen bekannte Reparaturmodell in den G1-, und G2- bestrahlten Zellen überprüft werden. Die in der Literatur gut beschriebenen in der S-Phase ablaufenden Reparaturprozesse werden durch die Aktivität der Replikation stark beeinflusst. Mit einer genaueren Unterteilung der S-Phase in frühe, mittlere und späte S-Phase sollten Erkenntnisse über die Beteiligung des HR- bzw. des c-NHEJ-Weges und deren Wechselwirkungen innerhalb der S-Phase unter dem Einfluss von Replikation und deren Inhibition gewonnen werden. Bei den chromosomalen Studien sollte ein besonderes Augenmerk auf die Unterschiede zwischen der Reparatur nach Bestrahlung in der mittleren S- gegenüber der G2-Phase gelegt werden. Für die Herstellung einer Korrelation zwischen Reparatur und der Überlebensfähigkeit sollten schließlich Zellzyklusphasen-spezifische Reparaturstudien mit der Zellzyklusphasen-

spezifischen Überlebensfähigkeit mithilfe eines neu entwickelten Konzeptes direkt miteinander verglichen werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Funktion des Proteins Artemis genauer untersucht werden. Bisherige Untersuchungen mit Artemis-defizienten DT40-Zellen zeigten mithilfe der Messungen der Überlebensfähigkeit, dass sie sensitiv gegenüber der ionisierenden Strahlung reagieren. Die mit Säugetierzellen durchgeführten Zellzyklusphasen-spezifischen Analysen der DSB-Reparatur zeigten, dass Artemis als Nuclease, während der langsamen Reparaturkomponente in der G1- und G2-Phase aktiv ist. Über die Beteiligung von Artemis während der Reparatur in der S-Phase ist noch wenig bekannt. Es gibt einige wenige Hinweise darauf, dass Artemis in der S-Phase nicht gebraucht wird. Für die Überprüfung dieser Modelle sollten die im ersten Teil dieser Arbeit etablierten Zellzyklusphasen-spezifischen Untersuchungen mit Artemis-defizienten DT40-Zellen durchgeführt werden. Durch eine genauere Charakterisierung der Beteiligung von Artemis bei der DSB-Reparatur in den einzelnen Zellzyklusphasen, sollte dieses Protein in das komplexe Geschehen der miteinander wechselwirkenden Reparaturwege, HR, c-NHEJ und A-EJ eingeordnet werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Verwendete Zelllinien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden, wenn nicht anders vermerkt ist, freundlicherweise von Prof. Dr. Shunichi Takeda und seinen Mitarbeitern aus der Abteilung für Strahlen-Genetik (Japan, Kyoto) zur Verfügung gestellt.

DT40 (WT) (parentale Zelllinie):	B-Lymphozyten, isoliert aus der Bursa fabricii eines Huhns; durch <i>ALV</i> (<i>avian leucosis virus</i>) transformierte Lymphoblasten; p53-defizient, freundlicherweise von J-M. Buerstedde (Heinrich-Pette-Institut, Hamburg) zur Verfügung gestellt
Ku70^{-/-} :	HL077; eine homozygote Mutante (beide Allele des <i>ku70</i> -Gens sind deletiert)
Rad54^{-/-} :	HL033; eine homozygote Mutante (beide Allele des <i>rad54</i> -Gens sind deletiert)
Ku70^{-/-} / Rad54^{-/-} :	HL100; eine homozygote Mutante, bei der beide Allele beider Gene deletiert sind: <i>ku70</i> und <i>rad54</i>
SNM1A/B/C^{-/-} :	Eine homozygote Mutante, bei der alle Allele (jeweils zwei von <i>snm1a</i> , <i>snm1b</i> und <i>snm1c</i>) deletiert sind. Ein anderer Name für das Protein SNM1C ist unter anderem Artemis (Yan <i>et al.</i> , 2010).

Bei den unten stehenden Zelllinien handelt es sich ebenfalls um homozygote Mutanten, bei welchen beide Allele der jeweiligen Gene fehlen.

Artemis^{-/-} :	Klon #1688
Ku70^{-/-}/Artemis^{-/-} :	Klon #3391
Rad54^{-/-} / Artemis^{-/-} :	Klon #3287

3.1.2 Kulturmedien und Lösungen

- Zusammensetzung des DT40- Zellkulturmediums:

RPMI-1640 (500ml):	Sigma
10% FCS (hitzeinaktiviert) (v/v)	Biochrom
1% CS (hitzeinaktiviert) (v/v)	Sigma
1% Pen/Strep	Biochrom
100µM β-Mercaptoethanol	Sigma

Die Hitzeinaktivierung des Komplements in den Seren wurde bei 56°C für 45min durchgeführt.

- Medium für Überlebensexperimente:
0,15% Agarose (v/v) im DT40-Medium

Agarose Stock-Konzentration: 1% (v/v) in PBS angesetzt und autoklaviert	Roth
➤ Kryomedium: 70% RPMI-1640 20% FCS 10% DMSO	
• Trypan-Blau 0,36% (v/v) in PBS	Sigma
3.1.3 Chemikalienbehandlung	
• DMSO	Roth
• Aphidicolin Stock-Konzentration: 1mg/ml in DMSO Arbeitskonzentration: 1µM	Calbiochem
• Nocodazol Stock-Konzentration: 500mg/ml in DMSO Arbeitskonzentration: 100ng/ml	Sigma
3.1.4 Immunfluoreszenzfärbung	
• PBS (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)	Biochrom
• EdU Stock-Konzentration: 100µM in DMSO Arbeitskonzentration: 0,1µM	Invitrogen
• <u>Fixierung:</u>	
• Formaldehyd-Lösung Stock-Konzentration: 37%-ige, filtrierte Lösung Arbeitskonzentration: 4% (v/v) in PBS	Roth
• <u>Permeabilisierung:</u>	
• Triton-Lösung: TritonX-100 0,2%(v/v) in 1%FCS(hi)/PBS	Roth
➤ <u>Wasch-, Antikörperverdünnungs- und Blockierungslösung</u> FCS(hitzeinaktiviert), 1%(v/v) in PBS	
➤ <u>Antikörper:</u>	
• primärer Antikörper: α γH2AX (Ser139) mouse monoclonal, 1:1000 üN bei 4°C	Millipore
• sekundärer Antikörper: goat α mouse Alexa Fluor 488®, 1:500 1h bei RT	Molecular probes
• EdU- Detektionskit mit Alexa Fluor 594 azide Click-iT® EdU Imaging Kit	Invitrogen™

- DAPI-Lösung:
DAPI
0,2µg/ml in 1x PBS
Sigma
- *Mounting medium Vectashield®*
Vector Laboratories

3.1.5 Chromosomale Analysen

- Colcemid
Stock-Konzentration: 100µg/ml in DMSO
Arbeitskonzentration: 0,1µg/ml
Sigma
- BrdU
Stock-Konzentration: 1mM in PBS
Arbeitskonzentration: 20µM
BD Bioscience
- Fixativ:
75% Methanol
25% Essigsäure Rotipuran® 100%, p.a.
Roth
Roth
- Hypotone KCl-Lösung:
75mM KCl
in MilliQ
Roth
- Pepsin-Lösung:
Pepsin
Stock-Konzentration: 20µg/ml
Arbeitskonzentration: 0,1µg/ml
Sigma
- 1M HCl
MilliQ
Roth
- RNAse-Lösung:
Stock-Konzentration: 10mg/ml
Arbeitskonzentration: 4mg/ml
in 2xSSC pH 7,4
Sigma
- SSC-Puffer (Stock-Konzentration, 20x):
3 M NaCl
300mM tri-Natriumcitrat-Dihydrat
Arbeitskonzentration: 2xSSC pH7,4; 0,1xSSC pH7,4
Roth
Roth
- Denaturierungslösung
NaOH
Stock-Konzentration: 10M
Arbeitskonzentration: 0,07M
in Ethanol (rein, 99,8%)
Roth
Roth

- Blockierungslösung/Antikörperverdünnungslösung:
Milch
1% (w/v) in PBS
Reformhaus
- Antikörper-Lösung:
 α -BrdU-FITC
mouse monoclonal, gekoppelt mit fluoreszierendem Farbstoff
1:10 verdünnt in 1% Milch/PBS
BD Bioscience

3.1.6 Durchflusszytometrische Methoden

- BrdU
Stock-Konzentration: 1mM in PBS
Arbeitskonzentration: 20 μ M
- Denaturierungs-/Permeabilisierungslösung:
2 M HCl (v/v) (1:5 verdünnte 10 M HCl in PBS)
0,2% (v/v) TritonX-100
in PBS
- Neutralisierungslösung
0,1 M (w/v) Natriumtetraborat pH8,5 in MilliQ
- Permeabilisierungs-/Blockierungslösung:
1% (w/v) BSA
0,1% Tween-20 (v/v)
in PBS
Applichem
Roth
- Propidiumiodidlösung:
PI (Propidium-Iodid)
Stock-Konzentration: 1 mg/ml in PBS
Arbeitskonzentration: 0,1mg/ml
RNase (Ribonuklease)
Stock-Konzentration: 10 mg/ml
Arbeitskonzentration: 50 μ g/ml
Roth
Sigma
- Antikörper
 α -BrdU-FITC
mouse monoclonal, gekoppelt mit fluoreszierendem Farbstoff,
fertige Gebrauchslösung
BD Bioscience

3.1.7 Elutriation für die Synchronisation der Zellen

- S-MEM Medium
Sigma-Aldrich

3.1.8 Verbrauchsmaterialien

- Deckgläser für die Neubauerkammer, rechteckig
Roth
- Deckgläser (20x20), (20x50), (20x60)
Roth

- Kryoröhrchen, 2ml Sarstedt
- Objektträger, unbeschichtet Roth
- Objektträger, poly-L-Lysin-beschichtet Menzel
- Pasteurpipetten, Glas Roth
- Pasteurpipetten, Kunststoff Roth
- Pipettenspitzen Sarstedt
- Reaktionsgefäße, 1,5ml, 2ml Eppendorf, Roth
- Tücher, KimWipes Neolab
- Vinylhandschuhe
- Zellkulturflaschen, verschiedene Größen: Biochrom
 - T-25 25 cm²
 - T-75 75 cm²
 - T-150 150 cm²
- Zellkulturtestplatten: Biochrom, Greiner
 - 6-Well Platten
 - 24-Well Platten
 - 96-Well Platten
- Zellkulturschalen, 35X10mm; 65x15mm VWR
- Zentrifugenröhrchen (*Falcon*) 15ml, 50ml Biochrom

3.1.9 Geräteliste

- Durchflusszytometer FC500 Becton Dickinson
- Einfrierbox MrFreeze Nalgene
- Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 Zeiss
 - Axiovert 200M
 - ReloSys
- Inversmikroskop Durchlicht, Zellkultur, Nikon
 - Eclipse TS100
- Heizplatte Präzitherm W. Krannich GmbH + Co. KG
- Kühl- und Gefrierschränke -20°C Liebherr
 - 80°C Thermo Scintific
- Laborwaage TE1502S Sartorius
 - TE153S-DS Mechatronics
- Magnetrührplatte Varimag[®] H+P Labortechnik
 - MRH-Standard Heidolph Instruments GmbH & CoKG
- Mikroliterpipetten Gilson, Eppendorf
- Multikanalpipette Dunn
- Neubauer-Zählkammer als Zytometer Marienfeld GmbH & CoKG
- pH-Meter (pMX2000) WTW
- Pipettierhilfe Pipetboy Integra
- Reinstwasseranlage Astacus BI µS MT MembraPure GmbH
- Röntgenröhre MCN 165/796704 Philips
 - Isovolt Titan E GE

- | | | |
|---------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| • Standzentrifuge | J2-21M
(mit Elutriations-Rotor JE-6) | BD |
| • Sterilwerkbänke | Hera safe | Thermo Scientific |
| • Stickstofftank | Locator 8 Plus | Thermolyne |
| • Tischzentrifugen | Mini-Zentrifuge | Neolab Spectrafuge® |
| • Vortexer | Genie 2 | Scientific Industries |
| • Wasserbäder | Julabo
Memmert
GFL 1083 | Julabo Labortechnik GmbH
Memmert GmbH
Gesellschaft für
Labortechnik GmbH |
| • Zellkulturinkubator | Hera cell 240 | Thermo Scientific |
| • Zentrifuge (mit Kühlfunktion) | | Eppendorf |

3.1.10 Computer-Software und Online-Programme

Adobe acrobat reader	Adobe Inc.
Axiovision	Zeiss
Analysis (FACS)	Becton Dickinson
ImageJ	National Institutes of Health
Isis	Metasystems
Metafer	Metasystems
Microsoft Office	Microsoft Corporation
OriginPro 7.5	OriginLab
WinMDI2.9 (Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry)	Scripps Research Institute
Pubmed/Medline	NIH Software

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung von Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden im geeigneten Kulturmedium bei 39,5°C unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre und 5%-igem CO₂-Gehalt kultiviert. Für das optimale Wachstum wurden die Zellen in einer definierten Zelldichte ausgesät und jeden zweiten Tag verdünnt. Dabei wurde eine routinemäßige Zellzahlbestimmung mithilfe einer Neubauer-Kammer und einer Färbung mit Trypanblau durchgeführt. Trypanblau ist ein anionischer Farbstoff, welcher ausschließlich die Membran abgestorbener Zellen passiert und diese dunkelblau anfärbt. Durch diese Methode konnten die lebenden Zellen (Trypanblau-negativ) von den toten Zellen (Trypanblau-positiv) unterschieden und die Zelldichte in Bezug auf die Trypanblau-negativen Zellen für die nachfolgende Aussaat eingestellt werden. Die verwendeten Zellen, Wildtyp und die Mutanten-Zelllinien, wachsen mit unterschiedlicher Verdopplungszeit. Um sicherzustellen, dass die Wachstumsbedingungen noch das exponentielle Wachstum ermöglichen, wurden die Zellen abhängig von der Kultivierungsdauer in einer definierten Zelldichte ausgesät, so dass die Zelldichte am Versuchstag $1 \cdot 10^6$ /ml nicht überschritten hat. Das Auftauen von Zellen fand immer sehr schnell statt, um den Stress für die Zellen zu minimieren. Die Kryoröhrchen wurden aus dem Stickstofftank herausgeholt und im

Wasserbad inkubiert. Die angetaute Zellsuspension wurde dann in ein mit 10ml warmem Medium vorbereitetes 15ml-Röhrchen vorsichtig überführt und bei 250xg und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entsorgt und die Zellen wurden im frischen Medium (5ml) aufgenommen. Nachdem die Zellen vorsichtig vereinzelt wurden, konnten sie in eine T-25 Zellkulturflasche überführt und weiter kultiviert werden.

Für die Kryokonservierung der Zellen wurden exponentiell wachsende Zellkulturen in einem 50-ml Falcon gesammelt. Anschließend erfolgte die Zellzahl-Bestimmung (wie bereits oben beschrieben). Es wurden mindestens 3 Mio. bzw. maximal 5 Mio. Zellen pro Kryoröhrchen einkalkuliert. Die gesammelten Zellen wurden bei 250xg und RT für 10 min zentrifugiert. Nachdem das alte überstehende Medium verworfen wurde, wurden die Zellen im frischen, kalten Zellkulturmedium aufgenommen und vereinzelt. Hinzu kam die gleiche Menge an Kryomedium. Das Gemisch aus Zellen und beider Medien wurde auf die Kryoröhrchen verteilt (1,8 ml pro Röhrchen) und über Nacht bei -80 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen für die Langzeit-Lagerung in die Behälter mit flüssigem Stickstoff überführt.

3.2.2 Funktion von β -Mercaptoethanol in der Zellkultur

Das β -Mercaptoethanol als Zusatz für das Kulturmedium der DT40- B- Lymphozyten stellt eine Besonderheit dar. Im Gegensatz zu den humanen Zelllinien sind die Hühner B-Lymphozyten nicht in der Lage, das im FCS des Kulturmediums in großen Mengen vorhandene Cystin in die Aminosäure Cystein umzuwandeln. Das β -Mercaptoethanol dient als Reduktionsmittel und spaltet die Bindung im Cystin, so dass eine für die Zellen transportfähige Form entsteht. Diese wird schließlich in Cystein umgewandelt, welches für das Zellwachstum gebraucht wird.

Eine weitere Funktion des β -Mercaptoethanols ist, eine Vielzahl von Metaboliten aus dem Zellstoffwechsel zu reduzieren und damit unschädlich zu machen. Diese Abfallprodukte werden von den B-Lymphozyten ins Medium abgegeben und sind für die Zellen toxisch. Durch Zugabe von β -Mercaptoethanol werden die Abfallprodukte inaktiviert, so dass gewährleistet werden kann, dass die Zellen vom oxidativen Stress geschützt werden („scavenger“-Funktion) (Bannai, 1992; Ishii *et al.*, 1981).

3.2.3 Bestrahlung der Zellen mit Röntgenstrahlung

Alle Bestrahlungen von Zellen wurden in Plastikgefäßen (Schalen bzw. Zellkulturflaschen) durchgeführt. Es wurde hierbei eine Röntgenröhre mit einer Wolfram-Anode verwendet, bei der eine Spannung von 90 kV und eine Stromstärke von 19 mA eingestellt wurde. Die Filtrierung erfolgte durch eine 1mm Aluminiumplatte, auf der die Zellkulturflaschen mit Zellen positioniert waren. Der Abstand der Aluminiumplatte zum Beryllium-Austrittsfenster der Röntgenröhre wurde bei 30 cm für die Versuchsanordnungen wie die Foci-, Chromosomen-Analysen und für die Überlebensexperimente eingehalten. Die Dosisleistung betrug 2,05 Gy/min. Die Angaben der Dosisleistungen kamen hauptsächlich durch die Fricke-Dosimetrie zustande. Bei den Experimenten, die in Essen (Nordrhein-Westfalen) durchgeführt wurden, wurde eine ähnliche Röhre verwendet, jedoch mit anderen Voreinstellungen. Der Röhren-Abstand betrug 50 cm. Die Spannung und Stromstärke wurde auf 320 kV bzw. auf 10 mA eingestellt.

3.2.4 Zellzyklusphasen-spezifische Reparaturstudien mittels Quantifizierung der γ H2AX-Foci

Für die DNA-DSB-Reparaturstudien wurden γ H2AX-Foci als Doppelstrangbruchmarker verwendet. Sie wurden Zellzyklusphasen-spezifisch direkt am Fluoreszenzmikroskop mit 1000-facher Vergrößerung per Auge quantifiziert. Es wurden pro Zeitpunkt 40 Zellen ausgewertet. Bei den unbestrahlten Kontrollen wurden so viele Zellen analysiert, bis 40 Foci in der Summe erreicht wurden.

Um das Reparaturverhalten aller Zellzyklusphasen zu studieren, wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche experimentelle Ansätze der γ H2AX-Foci-Analyse genutzt. Zum einen wurde ein EdU-basierter Ansatz gewählt (siehe Kap. 3.2.4.1). Zum anderen wurde ein Versuchsansatz der γ H2AX-Foci-Analyse unter den Replikation-inhibierenden Bedingungen etabliert (siehe Kap. 3.2.4.2).

3.2.4.1 EdU-basierte γ H2AX-Foci-Analyse

Mithilfe vom EdU-basierten Ansatz können Foci-Analysen in allen Zellzyklusphasen durchgeführt werden. Die Voraussetzung hierfür ist eine Pulsmarkierung der Zellen mit 0,1 μ M EdU (5-ethynyl-2'-Deoxyuridin) für 20 min bei 39,5 °C. Nach dem Auswaschen von EdU wurden die Zellen mit dem frischen Medium versetzt und mit 1 Gy bestrahlt. EdU ist ein Nucleosid-Analogon und wird während der Replikation in der S-Phase in die DNA eingebaut. Für die Analyse der G1-Phase wurden die Zellen mit 100 ng/ml Nocodazol dauerbehandelt. Nach 0,25h Bestrahlung mit 1 Gy wurden eine Induktionsprobe, bei der das Maximum an γ H2AX-Foci erreicht wurde, und eine unbestrahlte Kontrolle fixiert. Die weiteren Zeitpunkte wurden auf 1, 2, 4 und 6 h nach Bestrahlung festgelegt. Weiterhin wurde zu jedem Zeitpunkt eine unbestrahlte Kontrolle mitgeführt. Die zu fixierenden Zellen wurden in 15-ml *Falcon*-Röhrchen gesammelt und bei 250xg 4 °C für 7 min zentrifugiert. Danach erfolgte zunächst der erste Fixierungsschritt mit 4%FA/PBS auf dem Vortexer. Nach 5-7-minütiger Inkubation bei RT wurden die Zellen bei den gleichen Einstellungen wie bei dem Zentrifugationsschritt davor zentrifugiert und in 100 μ l PBS aufgenommen. Die vereinzelt Zellen wurden auf die Poly-L-Lysine beschichteten Objektträger pipettiert und für 15 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit konnten sich die Zellen durch elektrostatische Wechselwirkung zwischen der positiv geladenen Beschichtung der Objektträger und der durch die in die Zellmembran eingelagerten negativ geladenen Phosphatgruppen, absinken. Alle Inkubationsschritte wurden horizontal nicht unter Schwenken durchgeführt. Nachdem sich die Zellen auf dem Objektträger abgesetzt haben, erfolgte ein zweiter Fixierungsschritt mit 4%FA/PBS (Crosslink an die Objektträger). Nach dem zweimaligen jeweils 10-minütigem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 0,2%TritonX-100/1%FCS(hi)/PBS bei 4 °C für 10 min permeabilisiert. Danach wurde 3x10 min mit 1%FCS(hi)/PBS gewaschen und in der Blockierungslösung für mind. 30 min bei RT oder bei 4 °C üN stehen gelassen. Die Inkubation mit dem primären α - γ H2AX-AK erfolgte entweder 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Am darauf folgenden Tag wurden die Proben 3x10 min mit 1%FCS(hi)/PBS gewaschen. Daran schloss die Detektion des eingebauten EdUs an, die mittels der Click-iT-Reaktion entsprechend der Hersteller-Angaben durchgeführt wurde. Nach mehreren Waschvorgängen wurden die Proben mit dem sekundären AK Alexa Fluor 488 1h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die DNA der Zellkerne mit DAPI (4'-6'-Diamino-2-Phenyl-indoldihydrochlorid) gegengefärbt. Die gefärbten Präparate wurden mit *Mounting medium Vectashield*[®], 20x20mm Deckglas und Nagellack haltbar gemacht. Durch das Einscannen der fertigen Präparate mit *Metafer*-Software und Mikroskop war es möglich die ein-

zelen Zellzyklusphasen zu identifizieren. Die *Metafer*-Software, Modul *MetaCyte*, nutzt die Zellgröße sowie die Intensitäten der einzelnen Signale, DAPI und EdU, um jede Zelle einer bestimmten Zellzyklusphase zuzuordnen. Die DAPI-Intensität wird mit dem DNA-Gehalt der Zelle gleichgesetzt, so dass die Unterscheidung der Zellzyklusphasen primär nach DAPI-Intensität (DNA-Gehalt) erfolgt. Die G2-Phase Zellen weisen aufgrund des doppelten DNA-Gehaltes eine doppelt so hohe DAPI-Intensität im Vergleich zu den G1-Phase Zellen auf. Die G1-Phase Zellen haben einen einfachen DNA-Gehalt und somit eine geringere DAPI-Intensität. Der DNA-Gehalt der S-Phase Zellen liegt zwischen dem der G1- und G2-Phase. Ein weiterer Parameter, welcher für die Eingruppierung der Zellen in unterschiedliche Zellzyklusphasen hinzugezogen wird, ist das EdU. Infolge des EdU-Einbaus erscheinen die S-Phase Zellen EdU-positiv, wohingegen G1- und G2-Phase Zellen EdU-negativ sind. Die Auswertung der γ H2AX-Foci erfolgte in den Zellen, indem ihre Position auf den Objektträgern automatisch angefahren wurde.

3.2.4.2 γ H2AX-Foci-Analyse unter Replikation-inhibierenden Bedingungen

Für die Inhibition der Replikation wurde Aphidicolin verwendet. Die aus *Nigrospora sphaerica* isolierte Chemikalie inhibiert die Replikation-spezifischen Polymerasen und hält somit die S-Phase Zellen in ihrer Progression. Solange die Wirksamkeit von Aphidicolin besteht, verbleiben die S-Phase Zellen über mehrere Stunden dort und progressieren nicht in die G2-Phase. Die inhibierende Wirkung von Aphidicolin ist von der Höhe der eingesetzten Konzentration abhängig. Hohe Konzentrationen von Aphidicolin erzeugen in der S-Phase ein hohes Maß an Schäden, so dass die S-Phase Zellen ein flächiges (pannukleäres) γ H2AX-Foci-Signal aufweisen. Dieser Ansatz ist jedoch für die Analyse der S-Phase Zellen ungeeignet. Eine geringe Konzentration dagegen (1 μ M) schädigt die S-Phase Zellen nicht und reicht aus, um die Replikation in den DT40-Zellen für einige Stunden anzuhalten. So konnten quantifizierbare Foci unter Aphidicolin-Bedingungen in der S-Phase detektiert werden. Die Zellen wurden zunächst mit EdU für 20 min bei 39,5 °C inkubiert. Nach dem Auswaschen von EdU wurden die Zellen mit frischem Medium und Aphidicolin versetzt und mit 1 Gy bestrahlt. Die nachfolgenden Schritte wurden analog zu dem EdU-basierten Ansatz durchgeführt.

3.2.5 Chromosomale Studien

3.2.5.1 Metaphasen-Präparation

Die verbleibenden, unreparierten Doppelstrangbrüche können sich in den chromosomalen Brüchen manifestieren. Um die chromosomalen Brüche analysieren zu können, wurden Metaphasen angefertigt. Dabei war das Ziel die Untersuchung in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase zu gestalten. Analog zu den Foci-Analysen wurden die Zellen mit einem weiteren Thymidin-Analogen, BrdU (5-Bromo-2'-desoxy-Uridin), pulsmarkiert. Dieses wird während der Replikation in der S-Phase statt Thymidin in die DNA eingebaut, so dass die Metaphasen, die aus der S-Phase stammen, nach der Immunfärbung BrdU-positiv erscheinen. Mit dieser Methode konnte sichergestellt werden, dass die S-Phase Zellen von den G2-Phase Zellen unterschieden werden konnten. Nach der Pulsmarkierung wurden die Zellen gewaschen, ins frische Medium überführt und mit 1Gy bestrahlt. Die unbestrahlten Kontrollzellen wurden 1 h nach Bestrahlung mit 0,1 μ g/ml Colcemid für 2 Stunden inkubiert. Die bestrahlten Proben wurden 2 h nach Bestrahlung mit 0,1 μ g/ml Colcemid für 2 Stunden inkubiert. Colcemid ist ein Spindelgift. Es verhindert die Ausbildung des Spindelapparates und somit die

Trennung der Schwesterchromatiden während der Mitose. Die Zellen verbleiben so in der Metaphase des Zellzyklus, einem Zustand wo die einzelnen Chromosomen gut sichtbar sind. Bei der Ernte der Proben wurden die Zellen bei 22°C und 250xg für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 0,5 ml verworfen. Nachdem das Zellpellet resuspendiert wurde, erfolgte eine hypotone Behandlung mit 10 ml vorgewärmter 75 mM KCl-Lösung für 25 min bei RT. Nach der hypotonen Behandlung wurden die Zellen bei 250xg für 7 Min und 22°C pelletiert und mit 10 ml eiskaltem Methanol:Eisessig (3:1) zunächst für 30 Min bei RT fixiert. Danach wurden die Zellen bei 250xg für 5 Min und 22°C zentrifugiert und erneut mit Methanol:Eisessig-Gemisch versetzt. Die fixierten Proben wurden bis zum nächsten Tag bei -20°C aufbewahrt. Schließlich wurden die fixierten Zellen auf die Objektträger getropft und luftgetrocknet.

3.2.5.2 Immunfluoreszenzfärbungen der Chromosomen

Die luftgetrockneten Objektträger mit Metaphasen wurden zunächst mit einer Pepsin-HCl-Lösung für 8 Min bei 37°C vorbehandelt, um das restliche Cytoplasma zu entfernen. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Objektträger mit 4 mg/ml RNase für 1 h bei 37°C inkubiert, um die bei der Färbung störende RNA zu eliminieren. Nach drei 5 Min-Waschschriften mit 2xSSC wurde die DNA der Proben in 2xSSC-Puffer bei 70°C für 30 Min denaturiert. Nach dem Abkühlen der Objektträger auf RT, wurden diese jeweils 5 Min mit 2xSSC und 0,1xSSC gewaschen und anschließend mit 0,07 M NaOH/Ethanol (< 99,9%) für 1 Min bei RT denaturiert. Nach den 5 Min-Waschschriften mit 0,1xSSC und 2xSSC wurden die Objektträger in 1% Milch/PBS für mindestens 30 Min geblockt. Die anschließende Färbung mit *mouse-monoclonal* anti-BrdU-FITC Antikörper erfolgte bei 37°C für 1h. Nach den 3x5 Min-Waschschriften mit 2xSSC wurden die Metaphase-Chromosomen sowie die Zellkerne mit DAPI gegengefärbt. Für eine längere Haltbarkeit wurden die Objektträger mit *Mounting medium Vectashield*[®] und Deckglas versehen und mit Nagellack versiegelt. Die fertigen Präparate wurden mit *Metafer*-Software, mit dem Modul *MetaSearch*, eingescannt. Es wurden Bilder im DAPI- und FITC-Kanal aufgenommen. Der FITC-Kanal entsprach dabei der Intensität von BrdU. Anhand der ausgewählten Erntezeitpunkte konnten die BrdU-positiven Metaphasen mit einem gleichmäßigen BrdU-Signal den Zellen zugeordnet werden, die sich zum Zeitpunkt der Pulsmarkierung und der Bestrahlung in der mittleren S-Phase befunden haben, während die BrdU-negativen Metaphasen als Metaphasen der in der G2-Phase bestrahlten Zellen definiert wurden (verändert nach McQueen *et al.*, 1998). Es wurden pro Datenpunkt mindestens 100 Metaphasen mit 11-13 Makrochromosomen mittels Software *ImageJ* ausgewertet.

3.2.6 Überlebensexperimente

Die Qualität der DSB-Reparatur nach Bestrahlung hat einen Einfluss auf das Überleben der Zellen. Für die Untersuchung der Korrelation zwischen der Reparaturkapazität und dem Überleben der Zellen nach Bestrahlung wurde zum einen das klonogene Überleben exponentiell wachsender Zellen analysiert und zum anderen wurden Zellzyklusphasen-spezifische Messungen des Überlebens in den synchronisierten Zellen durchgeführt.

3.2.6.1 Überlebensfähigkeit der exponentiell wachsenden Zellen

Für die Koloniebildung der Suspensionskulturen wurde das herkömmliche DT40-Zellkulturmedium mit 0,15% (v/v) Agarose gemischt. In diesem semi-viskosen Medium kann-

ten die Zellen und später die von ihnen gebildeten Kolonien, immobilisiert werden. Es wurden Verdünnungsreihen je nach Zelltyp und Bestrahlungsdosis angefertigt. Für jede Bestrahlungsdosis wurde eine 6-Well-Platte mit 2 ml Agarose-Medium in einer und 2,5 ml in der anderen Drei-Well-Reihe vorbereitet. Jede Verdünnung der Zellsuspension wurde so eingestellt, dass in die erste Drei-Well-Reihe 1 ml und in die Zweite 0,5 ml pipettiert wurden. Nach der Bestrahlung wurden Platten mit den Zellen in den Brutschrank zurückgestellt, wo sie 7-10 Tage inkubiert wurden. Nach Ablauf der Inkubationszeit konnten Kolonien identifiziert und per Auge quantifiziert werden. Es ist bislang noch keine Fixierungs-Methode für die Kolonien der Suspensionskulturen bekannt, so dass hier eine Lebend-Auswertung durchgeführt wurde.

Die wichtigsten Parameter, die das Überleben beschreiben, sind *Plating efficiency (PE)* und *Surviving fraction (SF)*/Überlebensfraktion (ÜF). Der *PE*-Wert gibt an, wie hoch der Anteil der Überlebenden von den ausgesäten Zellen ist und wird mit der Formel $PE(\text{Dosis}) = \frac{\text{Anzahl der Kolonien (Dosis)}}{\text{Anzahl der ausgesäten Zellen (Dosis)}}$ berechnet. Der *SF/ÜF*-Wert gibt an, wie viele Zellen in Bezug auf die unbestrahlte Kontrolle überlebt haben ($SF/ÜF(\text{Dosis}) = \frac{PE(\text{Dosis})}{PE(0\text{Gy})}$). Durch die Auftragung der ÜF-Werte (y-Achse, logarithmisch) gegen die dazugehörigen Bestrahlungsdosen (x-Achse) in einem 2-dimensionalen Koordinatensystem konnten Überlebenskurven generiert werden.

3.2.6.2 Zellzyklusphasen-spezifische Überlebensmessung: Überlebensfähigkeit der synchronisierten Zellen

Für die Untersuchung des Überlebens in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus, wurden die Zellen synchronisiert. Für die DT40-Zellen wurden zwei Methoden bereits mehrfach beschrieben (Takata, *et al.*, 1998, E. Sonoda, *Reviews and Protocols in DT40 Research*). Dabei wird zwischen einer chemischen Methode, bei der 100 ng/ml Nocodazol für lange Inkubationszeiten angewendet wird und einer physikalischen, für die Zellen besonders schonenden Methode, unterschieden. Bei dieser Methode handelt es sich um eine als Elutriation bezeichnete Anwendung eines zentrifugalen Gegenstroms zur Anreicherung einzelner Subpopulationen einer Zellkultur (Zachos *et al.*, 2005).

3.2.6.3 Synchronisation der Zellen in der G2/M-Phase mittels Nocodazol

Nocodazol ist eine Chemikalie, welche die Polymerisation der Mikrotubuli während der Mitose blockiert, so dass die Zellen in der Prometaphase (G2/M-Übergang) angereichert werden. Die Zellteilung wird während der Nocodazol-Behandlung unterbunden. Bei diesem Ansatz wurden die DT40-Zellen mit 100 ng/ml Nocodazol für 7 h inkubiert. Anschließend wurde das Nocodazol gründlich mit Zellkulturmedium ausgewaschen, und die Zellen wurden in frischem Medium ausgesät. Zu jedem Zeitpunkt wurde eine definierte Anzahl an Zellen pro Petrischale ausplattiert und bestrahlt bzw. unbestrahlt belassen. Parallel dazu wurde eine Kontrolle der Zellzyklusverteilung durchgeführt.

3.2.6.4 Synchronisation der Zellen mittels der Elutriation

Bei der Elutriation werden die Zellen spezifisch ihrer Größe und Dichte nach mit Hilfe der Zentrifugation in einzelne Zellzyklusphasen, G1-, S- und G2-Phase aufgetrennt. Ein Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die Zellen besonders schonend in einer bestimmten Zellzyklusphase angereichert werden können.

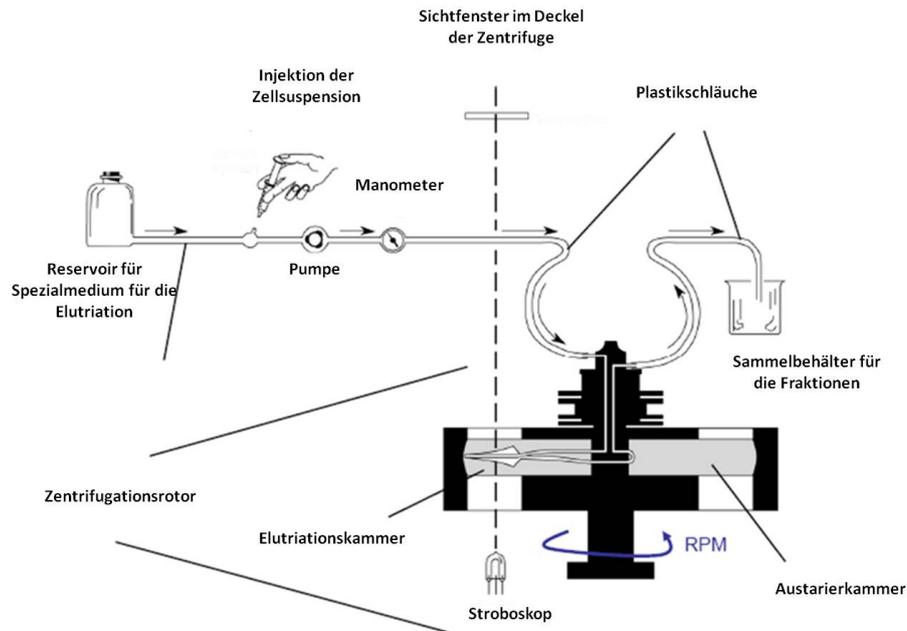


Abb. 3.1: Ein typischer für die Elutriation benötigter Aufbau mit einer Ultrazentrifuge J2-21M und mit dem darin eingebauten JE-6 Elutriationsrotor

Der Rotor setzt sich aus der Elutriationskammer und Austrierkammer sowie einem Schlauchsystem für den In-/Ausfluss zusammen. Der Schlauch ist mit einem Reservoir fürs Elutriationsmedium, der Elutriationskammer und schließlich mit dem Sammelbehälter verbunden. Im Schlauch befindet sich eine Injektionsstelle für die zu trennende Zellsuspension. Eine integrierte Pumpe kontrolliert die Flussrate des Elutriationsmediums mit den Zellen. Durch das in die Zentrifuge integrierte Stroboskop ist es möglich die sedimentierten Zellen im Sichtfenster zu sehen. In den Sammelbehältern werden einzelne Fraktionen gesammelt (Verändert nach George Zachos: „Cell cycle analysis: Synchronization of DT40 cells“).

Für die Elutriation wurde eine auf RT eingestellte J2-21M Standzentrifuge mit einem eingebauten Elutriations-Rotor JE-6 benutzt. Die Abb. 3.1 zeigt den groben Aufbau des Systems für die Elutriation. Für den Vorgang der Elutriation wurden max. $350 \cdot 10^6$ Zellen der exponentiell wachsenden WT- und Ku70^{-/-}-Kulturen verwendet. Zunächst wurden sie bei 1200 rpm für 5 Min bei RT zentrifugiert und in 10 ml S-MEM Medium aufgenommen. Die Pumpe wurde auf die Elutriationsdurchflussrate von 25 ml/min eingestellt. Danach folgte die Injektion der Zellsuspension ins Elutriator-System. Die Startgeschwindigkeit des Rotors lag bei 4100 rpm. Nach einem Vorlauf, bei dem die störenden Zelltrümmer ausgeschwemmt wurden, konnten die ersten Fraktionen mit den Zellen gesammelt werden. Die physikalischen Vorgänge zur Trennung einzelner Fraktionen finden in der Elutriationskammer statt und sind in der Abb. 3.2 dargestellt.

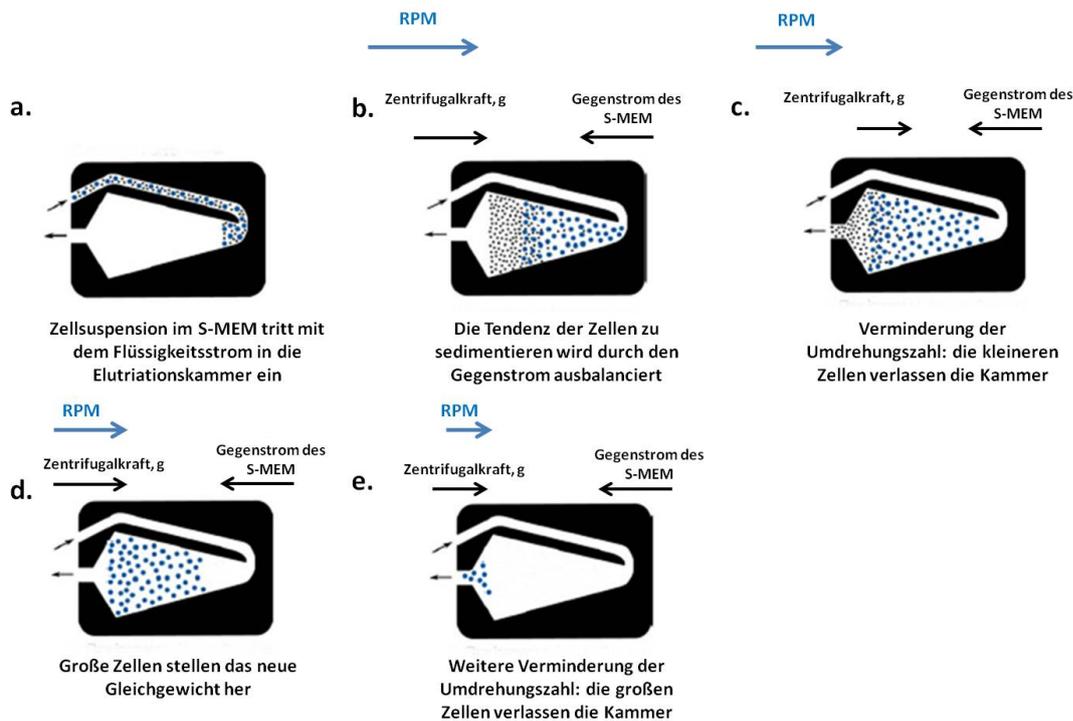


Abb. 3.2: Vorgänge in der Elutriationskammer

a. Die Zellen gelangen in die Elutriationskammer, wo zwei entgegengesetzte Kräfte auf sie einwirken, Zentrifugalkraft g und der Gegenstrom des S-MEM-Mediums. **b.** Die Umdrehungszahl ist zunächst hoch, um die störenden Zelltrümmer auszuschwemmen (Vorlauf), und die Zentrifugalkraft g sowie der Gegenstrom befinden sich im Gleichgewicht. **c.** Durch die Verringerung der Umdrehungszahl erhöht sich die Wirkung des Gegenstroms, so dass die kleineren Zellen die Kammer verlassen können. **d.** Die verbliebenen größeren Zellen stellen ein neues Gleichgewicht zwischen Zentrifugalkraft und Gegenstrom her. **e.** Durch eine weitere Verringerung der Umdrehungszahl können nun die großen Zellen die Kammer verlassen (Verändert nach George Zachos: „Cell cycle analysis: Synchronization of DT40 cells“).

Die einzelnen Fraktionen wurden zwischen 2800-2200 rpm in 100-er rpm-Schritten gesammelt. Von jeder Fraktion wurde anschließend eine Messung der Zellgröße mittels eines *Cell-Counter* Gerätes sowie die Zellzyklusverteilung mit Hilfe eines Durchflusszytometers durchgeführt. Die Fraktionen mit dem höchsten G2-Phase-Anteil wurden für die weiterführenden Experimente verwendet.

3.2.6.5 Überlebensmessung und γ H2AX-Foci-Analyse synchronisierter Zellen durch den gesamten Zellzyklus

Die mit dem höchsten G2-Phase-Anteil elutrierten Zellen wurden im frischen Zellkulturmedium aufgenommen. Für den Zeitpunkt 0h (direkt nach der Elutriation) wurden jeweils $1 \cdot 10^6$ Zellen für die BrdU-Pulsmarkierung zur Überprüfung der Zellzyklusverteilung sowie für die Immunfluoreszenzfärbung der γ H2AX-Foci und ein Aliquot für das Überlebensexperiment genommen. Der Rest der Zellen wurde für 2 h mit 25 ng/ml Nocodazol inkubiert. Die kurze Behandlung mit dieser Nocodazol-Konzentration diente dazu, die Zellen in der Mitose anzureichern und damit die Synchronität der Zellen nach Nocodazol-Entfernung gewährleisten zu können. Direkt nach der Nocodazol-Behandlung wurde ein Aliquot der Zellen erneut für die Zellzyklus-, γ H2AX-Foci- Analyse und das Überlebensexperiment abgenommen. Die restlichen Zellen wurden gründlich mit dem Zellkulturmedium gewaschen und auf 24x60 mm-große Petrischalen (je 3x Petrischalen/Zeitpunkt für die Ansätze, Zellzyklus-, γ H2AX-Foci-

Analyse und Überlebensexperiment) verteilt. Zu jedem Zeitpunkt wurden die Proben entsprechend aufgearbeitet. Für die Zellzyklus-Analyse wurden die Zellen mit BrdU für 20 Min pulsmarkiert, gewaschen und mit eiskaltem 70% Ethanol fixiert und bei -20 °C bis zur Färbung gelagert. Fürs Überlebensexperiment wurde die Zellzahl mit der Neubauer-Kammer bestimmt, eine Verdünnungsreihe in Agarose-haltigem Medium angesetzt und eine definierte Zellzahl in die 30 mm-große Petrischale (in Triplets/Dosis) ausgesät. Anschließend wurden die Petrischalen mit 0, 1, 2 und 4 Gy bestrahlt und für 10 Tage in den Brutschrank zurückgestellt. Für die γ H2AX-Foci Analyse wurden die Zellen mit 1 Gy bestrahlt, nach 4 und 24 h Reparatur geerntet und für die Immunfärbung weiter verarbeitet (siehe Kap. 3.2.4.1). Zu jedem Reparatur-Zeitpunkt wurde eine unbestrahlte Kontrolle mitgeführt.

3.2.7 2D-Zellzyklus Analyse

3.2.7.1 BrdU-Pulsmarkierung und Färbung für die Durchflusszytometrie

Die 2D-Analyse des Zellzyklus mittels Durchflusszytometrie ermöglicht eine schnelle Charakterisierung der Zellzyklusphasen analysierter Zellpopulationen. Für die Unterscheidung einzelner Zellzyklusphasen wird der DNA-Gehalt der Zelle, repräsentiert durch die PI-Färbung, gegen das Ausmaß der BrdU-Inkorporation in einem 2D-Koordinatensystem aufgetragen (BrdU-Plot). Anhand dieser Auftragung können G1-, G2-(BrdU-negative Zellen) und S-Phase Zellen (BrdU-positive Zellen) voneinander unterschieden werden. Für den Einbau von BrdU wurden die Zellen mit 20 μ M BrdU für 20 Min markiert. Nach der Pulsmarkierung wurden die Zellen in speziellen Plastikröhrchen gesammelt und bei 250xg, 4°C und 10 Min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Mit tropfenweiser Zugabe von 2 ml eiskaltem 70% Ethanol wurden die Zellen unter ständigem Durchmischen auf dem Vortexer fixiert. Die fixierten Zellen wurden bei -20°C bis zur Färbung aufbewahrt. Die Färbung erfolgte nach Julian Sale und Roger Franklin (J.M. Buerstedde and S. Takeda, Book, *Reviews and Protocols in DT40 Research*). Zunächst wurden die Zellen bei 250xg, 4°C für 10 Min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Unter der Zugabe von 2 ml kaltem PBS auf dem Vortexer wurden die Zellen rehydriert. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgesaugt, und es erfolgte die Denaturierung der DNA mit 1 ml 2M HCl/0,2%Triton X-100/PBS Lösung für 30 Min bei RT. Dieser Schritt ist notwendig, um die DNA-Doppelstränge voneinander zu trennen und den Zugang des α -BrdU-FITC Antikörpers zu ermöglichen. Danach wurden die Zellen erneut zentrifugiert, und der Überstand wurde erneut abgesaugt. Es folgte eine partielle Renaturierung der DNA unter der Zugabe von 1 ml 0,1 M Natriumtetraborat-Lösung pH 8,5 für 1 Min bei RT. Die Zellen wurden pelletiert und mit 1%BSA/0,1%Tween-20/PBS versetzt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach dem erneuten Zentrifugieren wurden die Zellen mit 20 μ l α -BrdU FITC gekoppeltem Antikörper bei RT für 30 Min inkubiert, anschließend mit 2 ml PBS gewaschen und zentrifugiert (250xg, 10 Min, 4°C). Die Färbung der DNA erfolgte mit einer 500 μ l PI-Lösung für 30 Min im Dunkeln.

3.2.7.2 Durchflusszytometrische Messungen des Zellzyklus

Die Analyse der Zellen hinsichtlich ihres Zellzyklusverhaltens wurde am FC500 (Beckmann Coulter) durchgeführt. Es handelt sich hierbei um einen Durchflusszytometer mit einem Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm. Das Propidiumiodid, welches in die doppelsträngige DNA interkaliert hat, wurde mit der Software *CXP Acquisition* im Bereich zwischen 564 und 606 nm linear aufgenommen, wogegen das FITC-Signal gekoppelt an α -

BrdU-Antikörper im Wellenlängenbereich 505-545 nm logarithmisch gemessen wurde. Die Identifizierung der Zellen wurde mit der Darstellung *Forward Light Scatter* (FSC) gegen *Side Scatter* (SSC) festgehalten. Mit FSC ließ sich die Zellgröße darstellen, während SSC als Parameter für die Beschreibung der Granularität der Zellen benutzt wurde. Eine weitere Darstellung war die Auftragung der PI-Intensität (linear) gegen AUX (*AUXiliary Parameter* = integrale Fluoreszenz des PI-Signals), um die Dubletten (z. B. G0/G1- Aggregate), die infolge der Fixierung entstanden sind, aus der Analyse zu eliminieren. An dieser Auftragung wurde *Gate* um die Einzelzellen (*singles*) gelegt und auf die anderen Darstellungen, PI-BrdU- und PI-Darstellung, angewandt. Es wurden 10.000-30.000 Zellen gemessen. Die prozentualen Anteile an BrdU-negativen G1- bzw. G2- sowie an BrdU-positiven S-Phase Zellen wurden mit *CXP Analysis* bzw. *WinMDI* ermittelt.

4 Ergebnisse

4.1 Überlebensfähigkeit der exponentiell wachsenden Zellen

Mit Überlebensexperimenten (*colony forming assays*) kann der Anteil an überlebenden klonogenen Zellen (Überlebensfraktion, ÜF) z. B. nach Bestrahlung gemessen werden. Für die Überlebensfraktion wird zunächst ein Parameter bestimmt, welcher die Ausplattierungseffizienz (*Plating efficiency*) einer Zelllinie beschreibt und als direktes Maß für die klonogene Reproduktivität angesehen werden kann. Die Überlebensfraktion bei einer bestimmten Dosis ist eine Normierung der Ausplattierungseffizienz bei dieser Dosis auf die Ausplattierungseffizienz der unbestrahlten Kontrolle. Wird der Logarithmus der Überlebensfraktion gegen die Bestrahlungsdosis (linear) aufgetragen, entsteht eine Dosis-Wirkungskurve, welche die physiologische Relevanz der ionisierenden Strahlung auf die zu untersuchenden Zellen beschreibt und Informationen über die Strahlenempfindlichkeit bzw. -resistenz gibt. Als klonogen bezeichnet man das Potential einer Zelle, die nach Bestrahlung ihre proliferativen Fähigkeiten beibehalten hat und nach einer entsprechenden Inkubationszeit eine aus mindestens 50 Zellen bestehende Kolonie ausbilden kann. Das Überlebensexperiment wurde in 1956 von Puck und Marcus entwickelt und gehört bis Heute zum „Goldstandard“ der Strahlenbiologie (Hall, 2006). Bei den DT40-Zellen handelt es sich um Suspensionskulturen, die für die Koloniebildung ein viskoses Medium benötigen (verändert nach Takata *et al.*, 1998). Zunächst wurden die Überlebensexperimente mit exponentiell wachsenden Zellkulturen durchgeführt. Nach der Aussaat entsprechender Zellzahlen und anschließender Bestrahlung mit 1-10 Gy, konnte die Anzahl der Kolonien und damit die PE- sowie ÜF-Werte bestimmt werden. Die berechneten Überlebensfraktionen wurden halb-logarithmisch gegen die entsprechende Bestrahlungsdosis in einem Koordinatensystem aufgetragen. Die so entstandenen Überlebenskurven von WT und Reparaturmutanten sind in der Abb. 4.1 dargestellt. Nach der Bestrahlung des WT wird ein sukzessiver Abfall der Überlebensfraktion mit steigender Dosis beobachtet (Abb. 4.1, schwarze Kurve). Nach 10 Gy Röntgenstrahlung betrug der Anteil an Überlebenden des WT ca. 0,16%. Für die Doppelmutante, der die Faktoren des c-NHEJ (Ku70) und der HR (Rad54) fehlen, betrug die maximal anwendbare Dosis 3 Gy (Abb. 4.1, grüne Kurve). Bei dieser Dosis lag der Anteil an Überlebenden bei ca. 0,22%, was marginal höher als der des Wildtypes nach 10 Gy Bestrahlung ist. Das bedeutet, dass schon ein Drittel der Dosis ausreicht, um ein vergleichbares Absterben der Zellen der Doppelmutante

hervorzurufen. Die Doppelmutante reagiert demnach extrem empfindlich auf die Strahlung. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass beide Reparaturmechanismen, c-NHEJ und HR, für das Überleben nach Röntgenstrahlung wichtig sind.

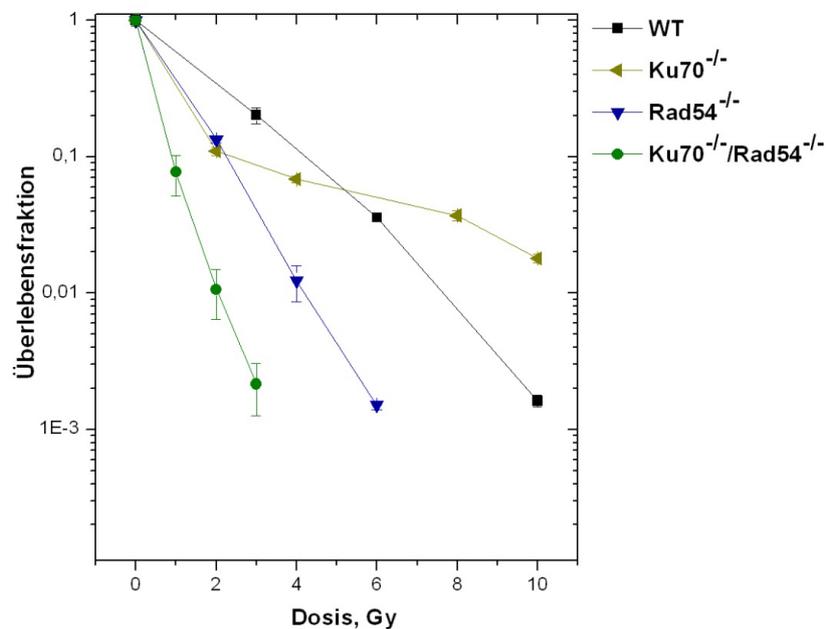


Abb. 4.1: Überlebenskurven der exponentiell wachsenden WT- und Reparaturmutanten-Zelllinien

Die exponentiell wachsenden Kulturen wurden in Abhängigkeit von der Dosis in einem Agarose/Medium-Gemisch verdünnt. Eine entsprechende Anzahl wurde in die *Wells* einer 6-Well-Kulturschale ausgesät. Nach 7-10-tägiger Inkubation wurden die Kolonien, die mehr als 50 Zellen beinhalteten, gezählt. Die daraus resultierenden Überlebensfraktionen wurden gegen die entsprechenden Dosen in einem halb-logarithmischen Koordinatensystem aufgetragen. Die Fehlerindikatoren sind die Standardfehler zwischen 3-6 unabhängigen Experimenten.

Die Überlebenskurve der Rad54^{-/-}-Einzelmutante, die einen Defekt in der HR hat, liegt zwischen den Überlebenskurven vom WT und der Doppelmutante (Abb. 4.1, blaue Kurve). Nach 6 Gy liegt der Anteil der überlebenden Zellen bei 0,15%. Dieser Wert liegt nah am Wert des WT bei 10 Gy. Somit ist in der Rad54^{-/-}-Einzelmutante ca. 2/3 der Dosis ausreichend, um ein vergleichbares Absterben der Zellen dieser Mutante wie im WT hervorzurufen. Die moderate Strahlenempfindlichkeit deutet darauf hin, dass obwohl der HR-Weg ausgeschaltet ist, die Zelle c-NHEJ benutzen kann und, dass sie deshalb im Vergleich zur Situation, wenn beide Wege fehlen, eine bessere Überlebensfähigkeit aufweist.

Eine Besonderheit in diesen Überlebensexperimenten stellt die Ku70^{-/-}-Mutante dar (Abb. 4.1, dunkel-gelbe Kurve). Die Zellen dieser Mutante zeigen ein biphasisches Verhalten im Überleben, was bereits in Takata *et al.*, 1998 gezeigt und in dieser Arbeit reproduziert wurde. Das biphasische Überleben ist einzigartig und wurde bislang in keinem weiteren

etablierten Zellsystem beobachtet. Dieses Verhalten konnte auch in keiner weiteren c-NHEJ-Mutante im DT40-Zellsystem detektiert werden (Adachi *et al.*, 2001). Für ein besseres Verständnis wurde die Überlebenskurve der Ku70^{-/-}-Mutante in eine empfindliche und eine resistente Subpopulation aufgeteilt. Die empfindliche Subpopulation war bis 2 Gy und die resistente im Dosisbereich zwischen 2-10 Gy zu finden. Der größte Anteil an Zellen (ca. 90%) wurde bereits nach 2 Gy abgetötet und stellte die empfindliche Subpopulation dar. Demgegenüber konnte ein geringerer Anteil an Zellen (ca. 10%), der zwischen 2 und 10 Gy eine bessere Überlebensfähigkeit aufwies als der WT, der resistenten Subpopulation zugeordnet werden. Das biphasische Verhalten der Ku70^{-/-}-Mutante impliziert die Annahme, dass das Überleben der Zellen Zellzyklusphase-abhängig ist. Es kann hier vermutet werden, dass die Zellzyklusphasen, die auf die Ku70-abhängige Reparatur über c-NHEJ angewiesen sind, eine schlechtere Überlebensfähigkeit vorweisen. Die Resistenz nach hohen Dosen könnte durch das Umschalten zu einem weiteren DSB-Reparaturweg erklärt werden, der im Fall einer Ku70-Defizienz effektiver repariert als im WT.

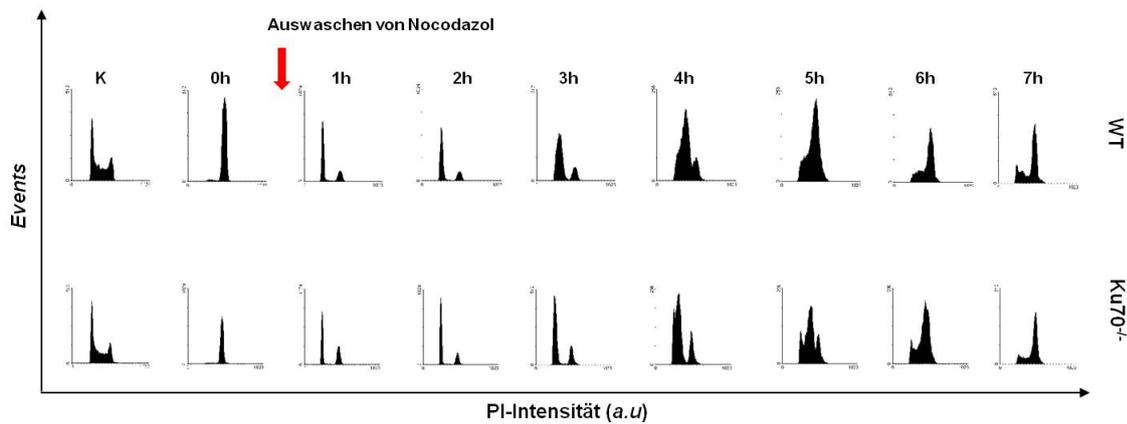
Der experimentelle Ansatz zur Untersuchung der Überlebensfähigkeit mit exponentiell wachsenden Zellen erlaubt nun eine Aussage über eine gemittelte Strahlenantwort über alle Zellzyklusphasen zu treffen. Für die Überprüfung der Annahme, dass das biphasische Zellüberleben auf die Zellzyklusphasenspezifität zurückzuführen ist, sollten weitere strahlenbiologische Methoden wie γ H2AX- und chromosomale Analysen sowie Überlebensexperimente in synchronisierten Zellen durchgeführt und gegenübergestellt werden.

4.2 Überlebensfähigkeit der DT40-Zellen in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase nach Synchronisation mit Nocodazol

Um herauszufinden welche Zellzyklusphasen der Ku70^{-/-}-Mutante für das differenzielle Verhalten im Überleben verantwortlich sind, wurde zunächst die Synchronisationsmethode mit Nocodazol angewendet. Diese Methode ermöglichte eine Zellzyklusphase-abhängige Messung der Überlebensfähigkeit. Hierfür wurden exponentiell wachsende Zellen des WT und der Ku70^{-/-}-Mutante für 7 Stunden einer Nocodazol-Behandlung unterzogen (Takata *et al.*, 1998; Sonoda *et al.*, 2006). Bei dieser Art der Synchronisation werden die Zellen über die Blockierung des Polymerisationsschrittes der Mikrotubuli am G2/M-Übergang angehalten (Takata *et al.*, 1998). Nach dem Auswaschen von Nocodazol nehmen die Zellen den Zellzyklus wieder auf und zyklieren relativ synchron durch den ersten Zellzyklus. Der Zellzyklus dau-

ert bei WT-Zellen und den Zellen der Ku70^{-/-}-Mutante ca. 8 h, so dass jede Zellzyklusphase relativ kurz ist. Als erstes wurde die Effizienz der Nocodazol-Wirkung sowie der Synchronität der Zellen nach dem Auswaschen von Nocodazol überprüft. Hierfür wurden die Zellen 20 Min vor jedem Erntezeitpunkt mit BrdU pulsmarkiert. Nach der Fixierung und BrdU/PI-Färbung wurde der Zellzyklus der Proben mit einer durchflusszytometrischen Analyse gemessen. Diese Analyse wurde später als Kontrolle bei jedem Experiment durchgeführt. In der Abbildung 4.2, A sind repräsentative Zellzyklusverteilungen als PI-Plots dargestellt, welche die Progression von WT- und Ku70^{-/-}-Zellen im Zellzyklus nach Synchronisation charakterisieren. Die prozentualen Anteile der Zellzyklusphasen wurden am BrdU-Plot ermittelt (hier nicht dargestellt). Die durchflusszytometrischen Analysen der exponentiell wachsenden Kulturen der WT-Zellen und der Ku70^{-/-}-Mutante zeigten zu erwartende Zellzyklusverteilungen, bei denen die S-Phase Zellen den größten Anteil ausmachen, 71% beim WT und 68% bei der Mutante. Die Anteile der G1- und der G2-Phasen lagen jeweils bei 16-18% bzw. 9-10%. Nach 7-stündiger Nocodazol-Behandlung befanden sich die meisten Zellen am G2/M-Übergang (Abb. 4.2 A, 0 h; WT: obere Reihe, Ku70^{-/-} untere Reihe). Nach dem Auswaschen des Nocodazols wurden die Zellen wieder in den Zellzyklus entlassen, indem sie in einem frischen Medium ausgesät wurden. Nach 1 h ist bei beiden Zelllinien ein beträchtlicher Anteil an Zellen bereits in G1 progressiert. Nach 2 h hat ein Teil der Zellen die frühe S-Phase erreicht. Die meisten frühen S-Phase Zellen wurden jedoch beim WT nach 3 h und bei der Mutante nach 4 h detektiert. Zwischen 4 und 5 h ist die Majorität der WT-Zellen in der mittleren S-Phase zu finden. Die Zellen der Ku70^{-/-}-Mutante kommen verzögert, nach 5h, in der mittleren S-Phase an. Nach 6 h ist die Mehrheit der WT-Zellen in die späte S-Phase progressiert, während in der Mutante zum gleichen Zeitpunkt ein Gemisch aus mittleren und späten S-Phase Zellen entsteht. Die Mehrheit der späten S-Phase Zellen in der Mutante wird nach 7 h detektiert. Zu diesem Zeitpunkt haben die WT-Zellen bereits die G2-Phase erreicht. Somit zeigt die durchflusszytometrische Analyse der mit Nocodazol synchronisierten Zellen, dass die WT- und Ku70^{-/-}-Zellen synchron durch den Zellzyklus zyklieren. Dabei ist jedoch anzumerken, dass es immer noch einen gewissen Anteil an G2-Phase Zellen gibt, welcher lange Zeit in der G2-Phase verbleibt und nicht mehr herausläuft.

A.



B.

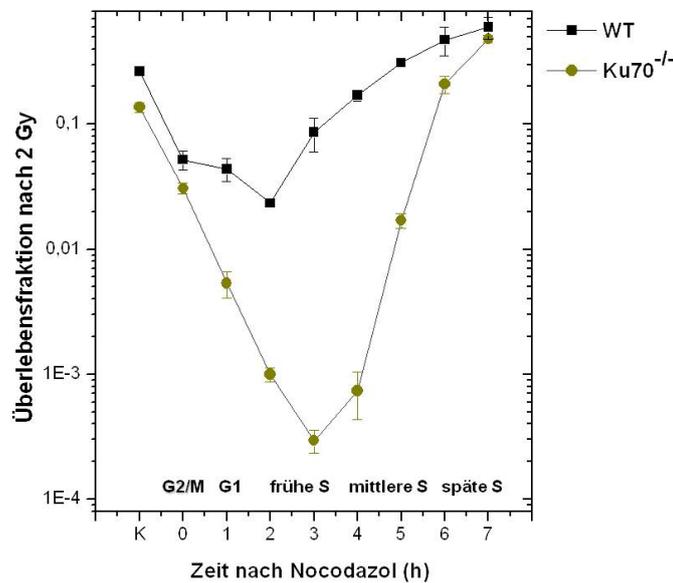


Abb. 4.2: Synchronisation mit Nocodazol

A. Synchronität nach Nocodazol-Block: WT (obere Reihe), Ku70^{-/-}-Mutante (untere Reihe). Dargestellt sind repräsentative Zellzyklusverteilungen als Histogramme der Kontrollzellen (K), welche die exponentiell wachsende Kultur darstellen, der mit 100 ng/ml Nocodazol für 7 h behandelten Zellen (0 h) sowie die Zellzyklusverteilungen der Zellen, die zwischen 1-7 h nach Auswaschen von Nocodazol geerntet wurden. Die Zellen wurden vor der Fixierung mit BrdU pulsmarkiert. Nach der Färbung gegen BrdU und mit PI wurden die Zellen mit der Durchflusszytometrie analysiert. Histogramme sind durch die Auftragung der PI-Intensitäten (X-Achse) gegen die gemessene Zellzahl (= Events, Y-Achse) entstanden und definieren den aktuellen Zellzyklusstatus zum Zeitpunkt der Fixierung.

B. Zellzyklusphasen-spezifisches Überleben von WT und Ku70^{-/-}-Mutante nach der Synchronisation mit Nocodazol und Bestrahlung mit 2 Gy. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde eine definierte Anzahl an Zellen fürs Überleben ausgesät und mit 0 und 2 Gy bestrahlt. Nach 7 Tagen wurden die Kolonien quantifiziert und PE- sowie SF-Werte bestimmt. K: Überleben der exponentiell wachsenden Kulturen. Aufgetragen ist der Logarithmus der ÜF-Werte gegen die Zeit nach der Synchronisation mit Nocodazol. Die Ermittlung der zum jeweiligen Zeitpunkt dominierenden Zellzyklusphase wurde an der zuvor gemessenen Zellzyklusverteilung vorgenommen. Die Fehlerindikatoren sind die Standardfehler zwischen mind. 3 unabhängigen Experimenten.

Ein möglicher Grund könnte ein Effekt der langen Inkubationszeit mit Nocodazol sein, welcher in den G2-Phase Zellen ein hohes Maß an DSBs erzeugt und somit zu einem lang anhal-

tenden Arrest in der G2-Phase führt. Da aber diese G2-Phase Zellen nicht mehr progressieren und daher keine Kolonien bilden können, ist ihre Anwesenheit für die Messung der Überlebensfähigkeit nicht weiter störend.

Zu jedem Zeitpunkt nach Synchronisation wurde eine definierte Anzahl an Zellen für das klonogene Überleben ausgesät und mit 2 Gy bestrahlt. Die Auftragung der Überlebensfraktionen (Üf-Werte) gegen die Zeit erfolgte halblogarithmisch. In der Abbildung 4.2, B sind Überlebenskurven der WT- und Ku70^{-/-}-Zellen dargestellt. Die Überlebensrate der exponentiell wachsenden Zellen (K) des WT lag höher als bei der Ku70^{-/-}-Mutante. Dieses Ergebnis war bereits in der Abb. 4.1 bei 2 Gy zu sehen. Die zum Zeitpunkt 0 h gemessene Überlebensrate repräsentiert den Anteil an überlebenden Zellen, die nach 7-stündiger Nocodazol-Inkubation direkt ausgesät und bestrahlt wurden. Die Überlebensrate beider Zelllinien war unter diesen Bedingungen geringer, als die der exponentiell wachsenden Kulturen (Abb. 4.2, B, G2/M, 0 h = Probe im Nocodazol). Es überlebten hier geringfügig mehr WT-Zellen als die Zellen der Mutante. Eine Stunde, nachdem Nocodazol entfernt wurde, befanden sich die meisten Zellen in der G1-Phase, die in der Ku70^{-/-}-Mutante deutlich empfindlicher als im WT war. Die frühe S-Phase beider Zelllinien war aber die strahlenempfindlichste Population, wobei die Ku70^{-/-}-Mutante hier ebenso massivere Strahlenempfindlichkeit gegenüber dem WT zeigte (2-3 h nach Synchronisation). Zwischen 4 und 7 h nahm die Überlebensfraktion beider Zelllinien zu. Nach 5 h befanden sich die meisten Zellen in der mittleren S-Phase. Auch hier zeigte die Mutante eine deutliche Verminderung der Überlebensfähigkeit. Mit der Progression der Zellen in die späte S/G2-Phase näherten sich die Überlebenskurven der Mutante und des WT an. Sieben Stunden, nachdem Nocodazol entfernt wurde, haben jedoch immer noch mehr WT- als Ku70^{-/-}-Zellen überlebt.

Mithilfe dieser Synchronisationsmethode zeigte sich, dass alle Zellzyklusphasen der Ku70^{-/-}-Mutante empfindlicher im Vergleich zum WT auf die Bestrahlung mit 2 Gy reagieren. Die Verbesserung der Überlebensfähigkeit findet in der Ku70^{-/-}-Mutante erst ab der späten S-Phase statt. Es konnte jedoch mit dieser Methode keine Population gefunden werden, welche in der Ku70^{-/-}-Mutante resistenter als im WT ist. Für eine genauere Untersuchung dieses Verhaltens wurden in nachfolgenden Experimenten Reparaturstudien durchgeführt. Diese beinhalteten γ H2AX-Foci sowie chromosomale Analysen.

4.3 Etablierung der Zellzyklusphasen-abhängigen γ H2AX-Foci-Analyse in DT40-Zellen

Das klonogene Überleben nach ionisierender Strahlung hängt stark mit der Reparaturfähigkeit der bestrahlten Zellen zusammen. Für die Durchführung von Reparaturstudien hat sich in den letzten Jahren eine Methode etabliert, welche auf der Quantifizierung des DNA-DSB-Markers γ H2AX basiert. In der Literatur finden sich mehrere Beiträge zur Zellzyklusphasenspezifischen Untersuchung der DSB-Reparatur an adhärenenten Zellen (Rothkamm *et al.*, 2001; Beucher *et al.*, 2009). Es gibt jedoch kaum Analysen, die in den Suspensionskulturen und speziell im DT40-Zellsystem, in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase durchgeführt wurden. In dieser Arbeit wurde zunächst ein experimenteller Ansatz für die Reparaturanalysen in den DT40-Zellen etabliert, welcher hier als EdU-basierter Ansatz bezeichnet wird. Für diesen Ansatz wurde das Thymidin-Analogon EdU als S-Phase Marker verwendet, welches über eine Klick-iT-Reaktion mittels der Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden kann. Die 20-minütige Pulsmarkierung der exponentiellen DT40-Zellen mit EdU stellt sicher, dass die S-Phase von G1- und G2-Phase Zellen unterschieden werden können. Der Zeitpunkt der Pulsmarkierung legt somit die Zellzyklusphase fest, in der die Zellen anschließend bestrahlt werden. Nach der Bestrahlung mit 1 Gy wurden die immungefärbten Zellen mit Hilfe der *Metafer*-Software nach DAPI- und EdU-Intensitäten eingescannt. Jeder Punkt der in der Abb. 4.3, A gezeigten Zellzyklusverteilung entspricht einer Zelle mit einer definierten DAPI-(X-Wert) und EdU-(Y-Wert) Intensität. Dabei sind die G1- bzw. G2-Phase Zellen mit entsprechenden einfachen bzw. doppelten DAPI-Intensitäten EdU-negativ. Die S-Phase Zellen mit den intermediären DAPI-Intensitäten haben dagegen EdU während der Replikation eingebaut und sind daher EdU-positiv. Aufgrund der hohen EdU-Intensität in der S-Phase, erfahren diese Zellen eine Verschiebung in der Zellzyklusverteilung zu höheren Intensitäten auf der Y-Achse.

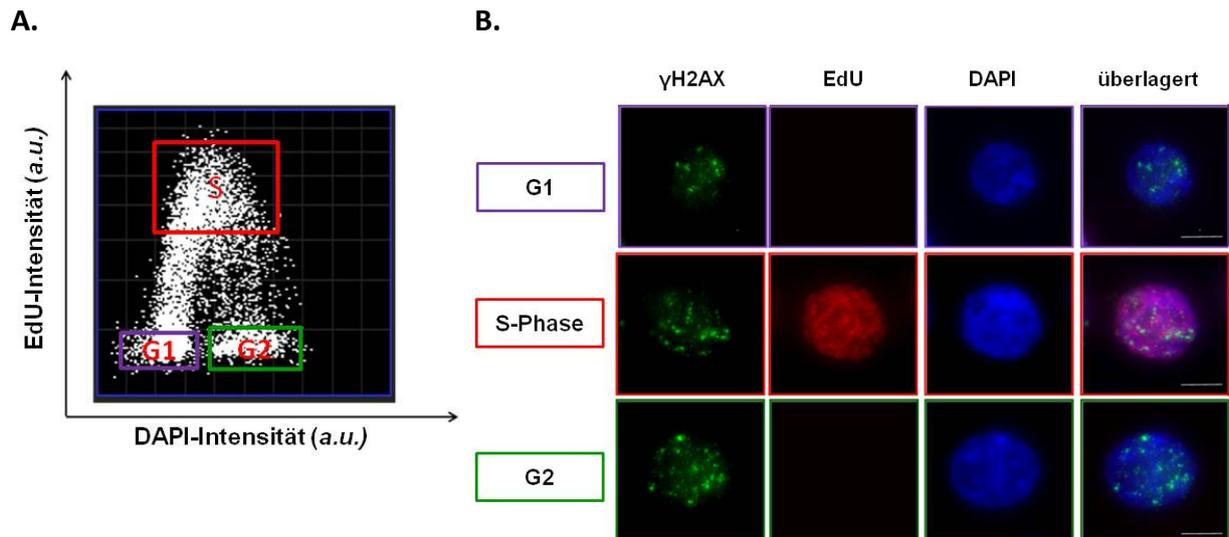


Abb. 4.3: EdU-basierter Ansatz

A. Als *Dot-Plot* dargestellte Zellzyklusverteilung von WT-Zellen nach 20-minütiger Pulsmarkierung mit EdU und der Fixierung 0,25 h nach IR mit 1 Gy. Die Zellzyklusverteilung entsteht durch das Einscannen der Zellen mit *Metafer*-Software. Aufgetragen sind die DAPI-(X-Achse) gegen die EdU-(Y-Achse) Intensitäten. Eingezeichnet sind die Markierungen für die G1-, G2- und S-Phase.

B. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Zellzyklusphasen der in A abgebildeten WT-Zellen. Die Bilder wurden mit FITC-, TRITC- bzw. DAPI-Filter bei 1000xfacher Vergrößerung aufgenommen. Der FITC-Kanal stellt die γ H2AX- (grün) und der TRITC-Kanal die EdU- (rot) Intensität dar. Der DAPI-Kanal (blau) repräsentiert den DNA-Gehalt der Zelle. Im Überlagerungsbild wurden FITC-, TRITC- und DAPI-Signale aufeinander gelegt. Der in das Überlagerungsbild eingezeichnete Maßstabsbalken beträgt 5 μ m.

Nachdem die Diskriminierung der einzelnen Zellzyklusphasen für den EdU-basierten Ansatz zum Zeitpunkt 0,25 h im DT40-Zellsystem etabliert wurde, wurden Zellzyklusverteilungen im zeitlichen Verlauf analysiert. Hierfür wurden die Zellen mit EdU-pulsmarkiert und mit 1 Gy bestrahlt. Die Zellen wurden 0,25, 1, 2 und 4 h nach IR fixiert und gefärbt. Die ermittelten Zellzyklusverteilungen sowohl der unbestrahlten als auch der bestrahlten Zellen sind in der Abb. 4.4 dargestellt. Damit wird verdeutlicht, dass das DT40-Zellsystem ein schnell wachsendes Zellkultursystem ist und die Dauer der G1- sowie der G2-Phase relativ kurz ist. Dieses wird insbesondere an der Abnahme der Anteile der EdU-negativen G2-Phase Zellen im Verlauf der Zeit festgemacht (Abb. 4.4, grünes Kästchen). Die G1-Phase Zellen progressieren in die S-Phase, während die G2-Phase Zellen sich teilen. Aus diesem Grund konnten die Reparaturkinetiken der G1- sowie der G2-Phase Zellen bis 4 h nach IR durchgeführt werden (Abb. 4.4, G1: lila Kästchen; G2: grünes Kästchen). Der Anteil der G1-Phase ist zu späteren Zeitpunkten relativ schwierig zu bestimmen. Es wurde vermutet, dass die „neuen“ G1-Phase Zellen die ursprüngliche G1-Population vermischen. Diese „neuen“ G1-Phase Zellen entstehen aus den G2-Phase Zellen, welche sich im beobachteten Zeitraum teilen. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt eine Optimierung vorgenommen. Es wurde ein Kontrolllex-

periment durchgeführt, bei dem G2-Phase Zellen in der Mitose angehalten wurden. Hierbei wurden die Zellen vor der Bestrahlung und direkt nach der EdU-Pulsmarkierung mit 100 ng/ml Nocodazol behandelt.

A.

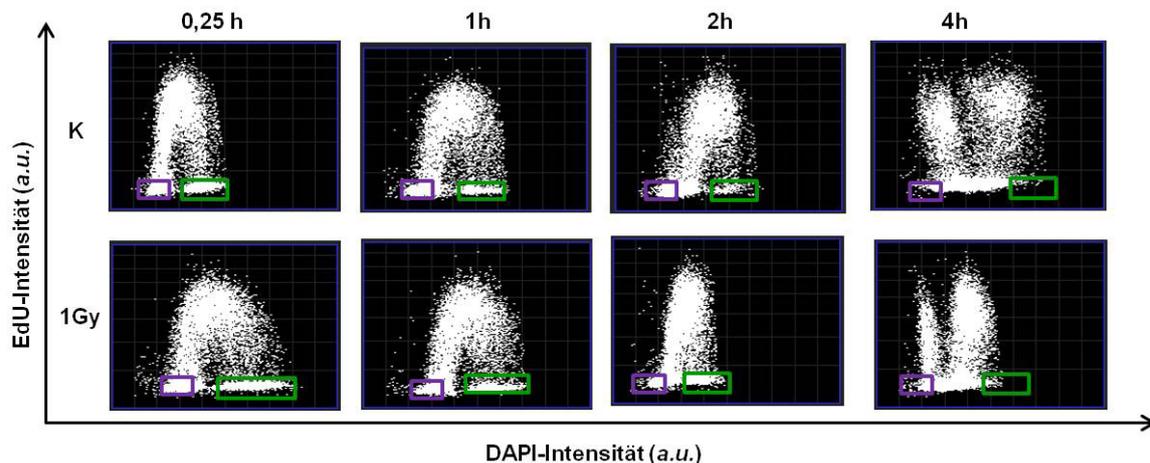


Abb. 4.4: Charakteristische Zellzyklus-(Dot-Plot) Verteilungen der WT-Zellen im Verlauf der Reparaturkinetik im EdU-basierten Ansatz

Die WT-Zellen wurden mit EdU pulsmarkiert und mit 1 Gy bestrahlt. Zu jedem Zeitpunkt wurde eine eigene unbestrahlte Kontrolle mitgeführt. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen fixiert und gegen γ H2AX/EdU sowie mit DAPI gefärbt. Das Einscannen der Präparate mit *MetaCyte* der *Metafer*-Software nach EdU- und DAPI-Intensitäten ergab zu jedem Analysepunkt eine spezifische Zellzyklusverteilung. An diesen konnten G1- und G2-Phase Zellen markiert werden.

Die Behandlung der Zellen mit Nocodazol sowohl in den unbestrahlten als auch in den bestrahlten Zellen bewirkt, dass die G1-Population nicht mehr durch die G2-Phase Zellen vermischt wird. Die G2-Phase Zellen verbleiben in der Mitose.

Innerhalb der markierten Populationen der G1- und der G2-Phase Zellen konnte dann jede Zelle mit dem Mikroskopisch relokieren werden, um in ihr γ H2AX-Foci zu quantifizieren. So wurden Reparaturkinetiken in G1- und G2- bestrahlten Zellen angefertigt.

4.4 Reparatur in den bestrahlten G1- bzw. G2-Phase Zellen

Mit Reparaturstudien der in G1- und G2-Phase bestrahlten Zellen sollte nun die Frage geklärt werden, welche Reparaturwege welchen Beitrag in der G1- bzw. der G2-Phase im DT40-Zellsystem leisten und ob diese Reparatur das Zellzyklusphase-abhängige biphasische Überleben der $Ku70^{-/-}$ -Mutante erklären kann. Hierfür wurden die WT-Zellen sowie die Reparaturmutanten in den Hauptproteinen Ku70 und Rad54 hinsichtlich ihrer Reparaturfähigkeit überprüft. Die Zellen wurden vor der Bestrahlung mit EdU pulsmarkiert und mit 1 Gy be-

strahlt. Parallel dazu wurde ein Teil der Zellen im zweiten Ansatz vor der Bestrahlung mit Nocodazol behandelt, um G1-Phase Zellen zu analysieren. Mit Hilfe der entsprechenden Zellzyklusverteilungen wurden die Zellen der G1- und G2-Phasen ausgewählt. Anschließend wurden Reparaturkinetiken der G1- und G2-Phasen der unbestrahlten sowie bestrahlten Zellen erstellt. Die Reparaturkinetiken der induzierten DSBs der in der G1-Phase bestrahlten Zellen mit und ohne Nocodazol-Vorbehandlung sind in der Abb. 4.5, A dargestellt.

In den G1-Phase Zellen aller untersuchten Zelllinien werden 0,25 h nach Bestrahlung zwischen 10 und 11 γ H2AX-Foci induziert. Die G1-Phase Zellen des WT reparieren diese in 4 h bis auf 1 Focus (Abb. 4.5, schwarze Balken). Zum gleichen Zeitpunkt weisen die Reparaturmutanten, bei denen die c-NHEJ-Komponente Ku70 deletiert ist, einen ausgeprägten Reparaturdefekt auf, der sich bei der Ku70^{-/-}-Einzelmutante durch ca. 9 und bei der Ku70^{-/-}/Rad54^{-/-}-Doppelmutante durch ca. 10 unreparierter DSBs äußert (Abb. 4.5, dunkel-gelbe und grüne Balken). Die Rad54^{-/-}-Mutante zeigt 3 γ H2AX-Foci nach 4 h (Abb. 4.5, blaue Balken). Die Differenz zwischen der Foci-Anzahl im WT und der Rad54^{-/-}-Mutante beträgt somit ca. 1,6 DSBs und deutet auf einen vermeintlichen Reparaturdefekt in der Rad54^{-/-}-Mutante hin. Rad54 ist jedoch ein HR-Faktor. In der G1-Phase kann HR nicht durchgeführt werden. Es kann angenommen werden, dass diese erhöhte Anzahl an DSBs auf die Art der Auswertung zurückzuführen ist. Bei Zellen, die für den gemessenen Reparaturdefekt verantwortlich sind, kann es sich um die aus der Teilung der G2-Phase entstandenen G1-Phase Zellen handeln. Der Übertritt der Zellen aus der G2- in die G1-Phase wurde im EdU-Ansatz, Abb. 4.4 beschrieben. Obwohl die Rad54^{-/-}-Mutante einen G2/M-Checkpoint besitzt, scheint dieser insensitiv zu sein. Einige G2-Phase Zellen teilen sich vermutlich ungehindert und nehmen die DSBs über die Mitose in die G1-Phase mit, was sich in einer leichten Erhöhung der γ H2AX-Foci niederschlägt. In der Tat zeigt das Experiment mit Nocodazol-behandelten G1-Phase Zellen, dass die Reparatur der Rad54^{-/-}-Mutante, solange die G2-Phase Zellen in der Mitose zurückgehalten wurden, wie erwartet, dem Reparaturverhalten des WT gleicht (Abb. 4.5, B). Vergleicht man die 4 h-Ergebnisse miteinander, so wird deutlich, dass die Anteile der unreparierten DSBs der jeweiligen Zelllinie im EdU-Ansatz ohne Nocodazol höher liegen, als im EdU-Ansatz mit Nocodazol. Trotz der Diskrepanzen wird eine starke Abhängigkeit der Ku70-abhängigen Reparatur über c-NHEJ in der G1-Phase sichtbar. Es wird dadurch bestätigt, dass c-NHEJ auch im DT40-Zellsystem der wirksamste Reparaturmechanismus nach der Bestrahlung in der G1-Phase ist.

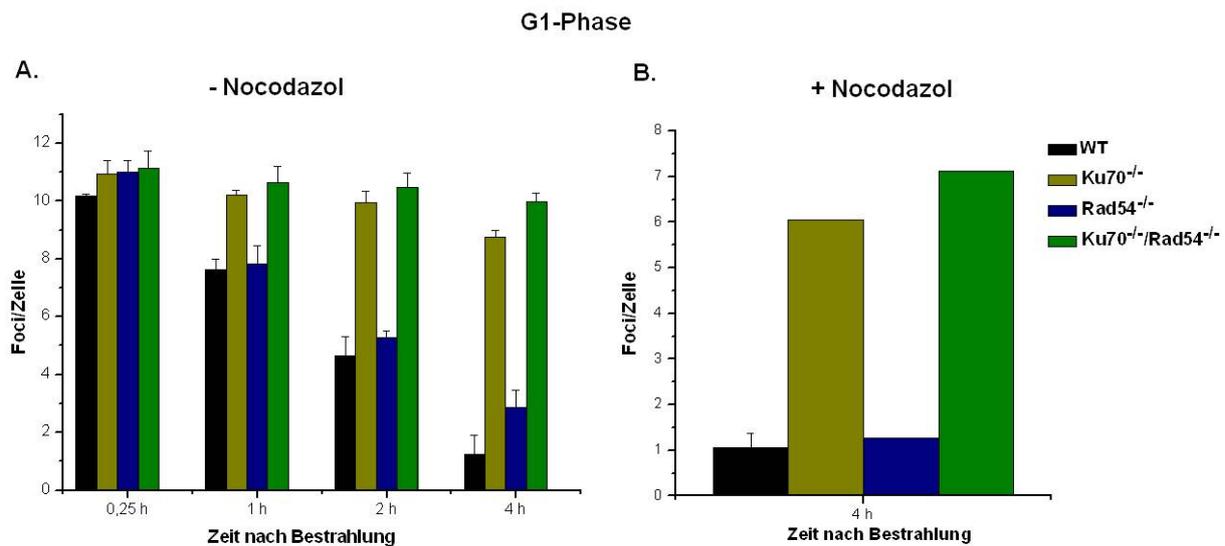


Abb. 4.5: Ergebnisse der γ H2AX-Foci-Analyse der in der G1-Phase bestrahlten Zellen

Die Zellen wurden mit EdU pulsmarkiert. Nach der Pulsmarkierung wurden sie mit/ohne Nocodazol behandelt und mit 1 Gy bestrahlt oder unbestrahlt belassen. Nach den angegebenen Zeiten wurden bestrahlte und unbestrahlte Proben fixiert und gegen γ H2AX sowie EdU gefärbt. Als DNA-Marker wurde DAPI verwendet. Die Präparate wurden eingescannt. Die Analyse erfolgte in den EdU-negativen G1-Phase Zellen.

A. Auftragung der induzierten γ H2AX-Foci ohne Nocodazol-Behandlung der WT-, c-NHEJ-, HR-Zellen sowie der Zellen der Doppelmutanten gegen die Zeit. Die über die Zeit gemittelten Kontrollwerte betragen im WT: $1,2 \pm 0,2$; in der c-NHEJ-Mutante: $1,9 \pm 0,3$; in der HR-Mutante: $1,2 \pm 0,01$; in der Doppelmutante: $1,5 \pm 0,3$. Die Balken stehen für die Mittelwerte der 3 unabhängigen Experimente. Die Fehlerindikatoren repräsentieren die Standardfehler zwischen diesen Experimenten. **B.** Induzierte γ H2AX-Foci der mit Nocodazol behandelten Zellen von WT, c-NHEJ-, HR-Mutante sowie der Zellen der Doppelmutanten 4 h nach IR. Die über die Zeit gemittelten Kontrollwerte in diesem Experiment lagen beim WT bei $1,1 \pm 0,2$; bei der c-NHEJ-Mutante: $1,6 \pm 0,5$; bei der HR-Mutante: $1,3 \pm 0,3$; bei der Doppelmutante: $1,3 \pm 0,3$. Nur der Balken des WT ist Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten. Mit den Mutanten wurde jeweils ein Experiment durchgeführt.

Im gleichen Versuchsansatz mit den G1-Phase Zellen ohne Verwendung von Nocodazol wurden G2-Phase Zellen ausgewertet. Für die DSB-Reparatur in der G2-Phase des Zellzyklus in den Säugetierzellen wurde beschrieben, dass dort c-NHEJ und HR gebraucht werden (Rothkamm *et al.*, 2003). Für die DT40-Zellen ist bekannt, dass der Prozess der homologen Rekombination mit höherer Frequenz abläuft als in den Säugetierzellen (Sonoda *et al.*, 2001). Es ist dennoch unklar, welchen Beitrag das c-NHEJ bei der Reparatur von DSBs im DT40-Zellsystem in der G2-Phase leistet. Die G2-Phase Zellen besitzen gegenüber den G1-Phase Zellen einen doppelten DNA-Gehalt. Konsistent mit dem doppelten DNA-Gehalt wurde eine doppelte Anzahl an γ H2AX-Foci im Vergleich zu den G1-Phase Zellen induziert (Abb. 4.6, 18-19 Foci zum Zeitpunkt 0,25 h). Vier Stunden nach IR hat der WT 18 induzierter DSBs auf das Niveau von ca. 4 DSBs repariert. Somit verbleiben im WT ca. 20% der induzierten DSBs unrepariert. Im Vergleich hierzu zeigen die G2-Phase Zellen der c-NHEJ-, HR- oder Doppelmutante eine erhöhte Anzahl an unreparierten DSBs bereits nach 1 h Reparatur, was sich über alle Zeitpunkte der Analyse fortsetzt und schließlich nach 4 h als Reparaturdefekt in

allen Mutanten manifestiert. Zu diesem Zeitpunkt machen die residualen Schäden in der c-NHEJ-Mutante ca. 69% aus. Dagegen ist der Anteil der unreparierten DSBs in der HR-Mutante geringer und liegt bei 57%. Das bedeutet, dass die G2-Phase Zellen der c-NHEJ-Mutante schlechter als die der HR-Mutante reparieren. Die Doppelmutante hat 4 h nach IR immer noch 80% der induzierten DSBs unrepariert. Also zeigen die Zellen der Doppelmutante, trotz der Abwesenheit beider Reparaturwege eine gewisse Reparatur. Dieses deutet daraufhin, dass es noch einen weiteren Mechanismus gibt, welcher die strahleninduzierten DSBs in G2 beseitigt.

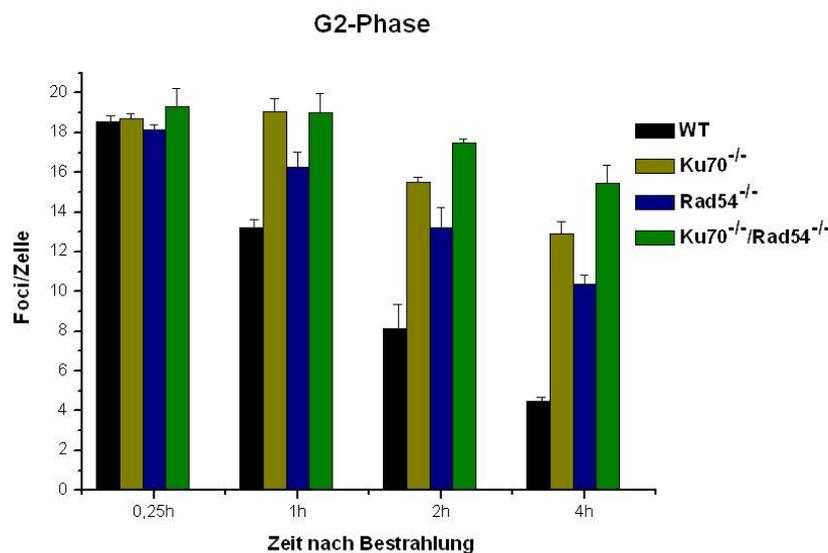


Abb. 4.6: Ergebnisse der γ H2AX-Foci-Analyse der in der G2-Phase bestrahlten Zellen

Die Zellen wurden mit EdU-Puls markiert. Nach der Pulsmarkierung wurden sie mit 1 Gy bestrahlt oder unbestrahlt belassen. Nach den angegebenen Zeiten wurden bestrahlte und unbestrahlte Proben fixiert und gegen γ H2AX sowie EdU gefärbt. Als DNA-Marker wurde DAPI verwendet. Die Präparate wurden eingescannt, und die Analyse erfolgte in den EdU-negativen G2-Phase Zellen. Auftragung der induzierten γ H2AX-Foci von WT-, c-NHEJ-, HR-Zellen sowie der Zellen der Doppelmutanten gegen die Zeit. Die über die Zeit gemittelten Kontrollwerte betragen im WT: $3 \pm 0,5$; bei der c-NHEJ-Mutante: $6,3 \pm 2,1$; bei der HR-Mutante: $6,5 \pm 1,9$; bei der Doppelmutante: $7,2 \pm 3,5$. Die Balken stehen für Mittelwerte der 3 unabhängigen Experimente. Die Fehlerindikatoren repräsentieren die Standardfehler zwischen diesen Experimenten.

Durch die Reparaturdefekte in den Ku70^{-/-}- und Rad54^{-/-}-Mutanten konnte eine Beteiligung des c-NHEJ und der HR im DT40-Zellsystem bei der Reparatur der strahleninduzierten DSBs in der G2-Phase nachgewiesen werden, wobei die Wirkung von c-NHEJ eine bedeutendere Rolle als die der HR spielt. Das ist eine trotz der erhöhten HR-Aktivität in diesem Zellsystem unerwartete Beobachtung und mit den Analyseergebnissen der Säugetierzellen konsistent.

Für die Erklärung der biphasischen Überlebenskurve der Ku70^{-/-}-Mutante nach Bestrahlung (Abb. 4.1) kann an dieser Stelle angenommen werden, dass die ermittelten Reparaturdefekte in den G1- bzw. G2-Phase Zellen der Mutante nur zu einer verminderten Überlebensfähigkeit

keit beitragen können und daher eine sensitive Subpopulation darstellen. Die Frage, welche Zellzyklusphasen die resistente Teilpopulation bilden, konnte durch die Untersuchungen der G1- und G2-Phase noch nicht beantwortet werden. Als nächstes wurde deshalb die S-Phase analysiert.

4.5 Etablierung einer innerhalb der S-Phase spezifischen Reparaturanalyse im DT40-Zellsystem

Die EdU-basierte Methode ermöglicht eine Analyse der S-Phase Zellen, welche EdU während der Replikation in die DNA einbauen und anhand der EdU-Färbung als EdU-positive Zellen erkannt werden. Da DNA-Replikation an definierten Orten stattfindet, können diese Stellen mithilfe von EdU-Einbau sichtbar gemacht werden. In den DT40-Zellen wird das EdU während einer 20-minütigen Pulsmarkierung in neusynthetisierte DNA-Bereiche eingebaut.

Entsprechend dem spezifischen EdU-Einbau während der Pulsmarkierung bilden sich unterschiedliche EdU-Muster aus. Anhand dieser EdU-Muster können die S-Phase Zellen, deren Anteil in den DT40-Zellen in Kultur ca. 70% beträgt, in drei Gruppen unterteilt werden (Abb. 4.7). Die Menge des eingebauten EdU und somit die EdU-Intensität können als ein Maß für die Anzahl an DNA-Bereichen gesehen werden, die während der Pulsmarkierung repliziert wurden. Je mehr Replikation in einer Zelle stattfindet, desto mehr EdU wird in die neusynthetisierte DNA eingebaut und desto homogener ist schließlich das EdU-Muster.

Die frühen S-Phase Zellen befinden sich am Anfang der Replikation und werden durch eine geringere Menge an Replikations-aktiven Bereichen gekennzeichnet. Sie haben somit eine geringere EdU-Menge eingebaut und weisen ein schwaches EdU-Signal auf. Als besonderes Charakteristikum besitzen die frühen S-Phase Zellen eine Aussparung im EdU-Signal, die in den anderen S-Phase Untergruppen nicht mehr zu detektieren ist. Der DNA-Gehalt dieser Zellen liegt zwischen dem der G1- und der mittleren S-Phase Zellen (Abb. 4.7, A, B; oranges Kästchen).

Das flächige EdU-Muster ist charakteristisch für die mittleren S-Phase Zellen. Diese Zellen weisen maximale EdU-Intensitäten und einen intermediären DNA-Gehalt zwischen dem der G1- und G2-Phase Zellen auf (Abb. 4.7, A, B; rotes Kästchen).

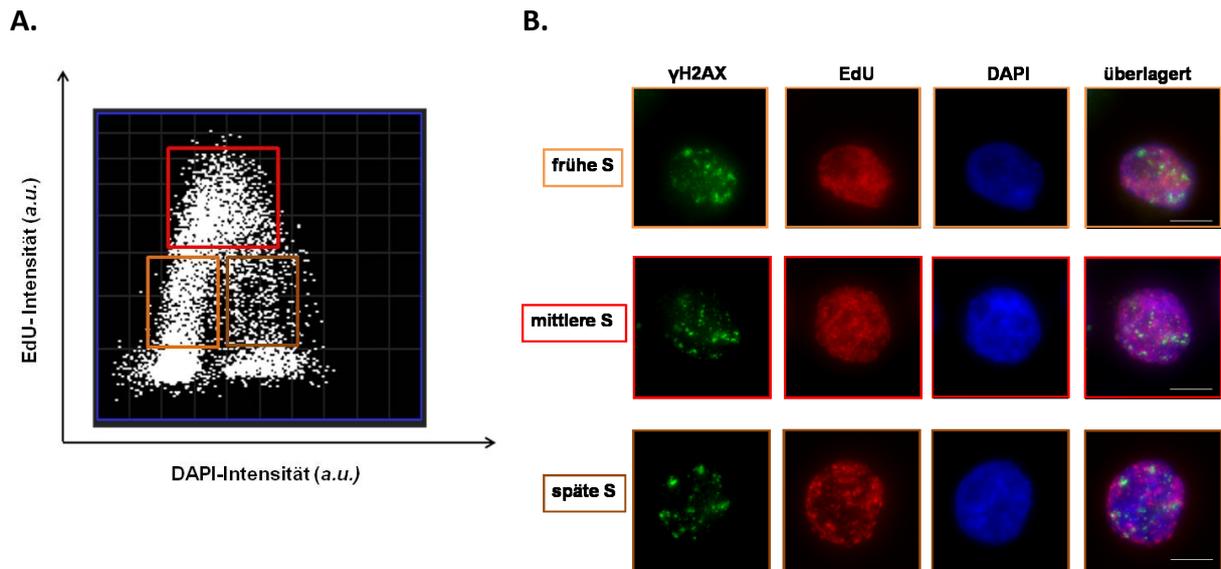


Abb. 4.7: Heterogenität des EdU-Musters in den S-Phase Zellen des DT40-Zellsystems

A. Dargestellt ist eine *Dot-Plot*-Verteilung der mit 1Gy bestrahlten und nach 0,25 h fixierten WT-Zellen. Diese Verteilung wurde mithilfe *Metafer*-Software erzeugt. In der Verteilung sind Bereiche mit mittleren S-Phase Zellen (rotes Kästchen), die Zellen der frühen S-Phase (violette Kästchen) sowie der späten S-Phase (grünes Kästchen) markiert. **B.** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der drei verschiedenen S-Phase Subpopulationen von γ H2AX (grün), EdU (rot) und DNA (blau). Der in das Überlagerungsbild eingezeichnete Maßstabsbalken beträgt 5 μ M.

Die Zellen der späten S-Phase haben die Replikation zum größten Teil abgeschlossen. Es befinden sich nur einige wenige Replikationsgabeln im aktiven Zustand, so dass diese Zellen nur wenig EdU eingebaut haben. Dieses wird durch ein inhomogenes, nur über Teilbereiche des Zellkerns verteiltes und als punktförmiges EdU-Muster sichtbar. Der DNA-Gehalt dieser Zellen ist ca. doppelt so groß, als bei frühen S-Phase Zellen. Die späten S-Phase Zellen sind demnach zwischen mittleren S- und G2-Phase Zellen in der Zellzyklusverteilung zu finden (Abb. 4.7, A, B; braunes Kästchen).

Infolge der Progression durch die S-Phase findet eine Veränderung des DNA-Gehaltes statt, was in der Abb. 4.8 am Beispiel der WT-Zellen verdeutlicht wird. Eine frühe S-Phase Zelle hat zum Zeitpunkt 0,25 h einen DNA-Gehalt, welcher marginal größer ist als der DNA-Gehalt einer G1-Phase Zelle. Im Verlauf der Zeit nimmt der DNA-Gehalt der frühen S-Phase Zellen kontinuierlich zu. Nach 2 h befinden sich diese Zellen in der mittleren S-Phase, nach 6 h in der späten S/G2-Phase zu finden. Entsprechend wurde auch bei der Analyse der mittleren- und späten S-Phase Zellen vorgegangen. Die Zellen, die in der mittleren S-Phase bestrahlt wurden, wurden nach 6 h in G2 analysiert. Diejenigen, die in der späten S-Phase bestrahlt wurden, konnten bis max. 4 h nach Bestrahlung analysiert werden. Nach 6 h haben sie sich bereits geteilt. An der als späte S/G2-markierten Population zum Zeitpunkt 6 h wurde festge-

stellt, dass dort überwiegend Zellen mit dem für die frühe S-Phase charakteristischen EdU-Muster vorzufinden sind (Abb. 4.8, 6 h; hell-oranges Kästchen). Daraus wurde geschlossen, dass die erworbenen EdU-Muster während der gesamten Analysezeit unverändert bleiben und dass sie für jede S-Phase zu jedem Analysezeitpunkt wiedergefunden werden können. Dieses Verhalten wurde bei der Erstellung der γ H2AX-Kinetiken berücksichtigt.

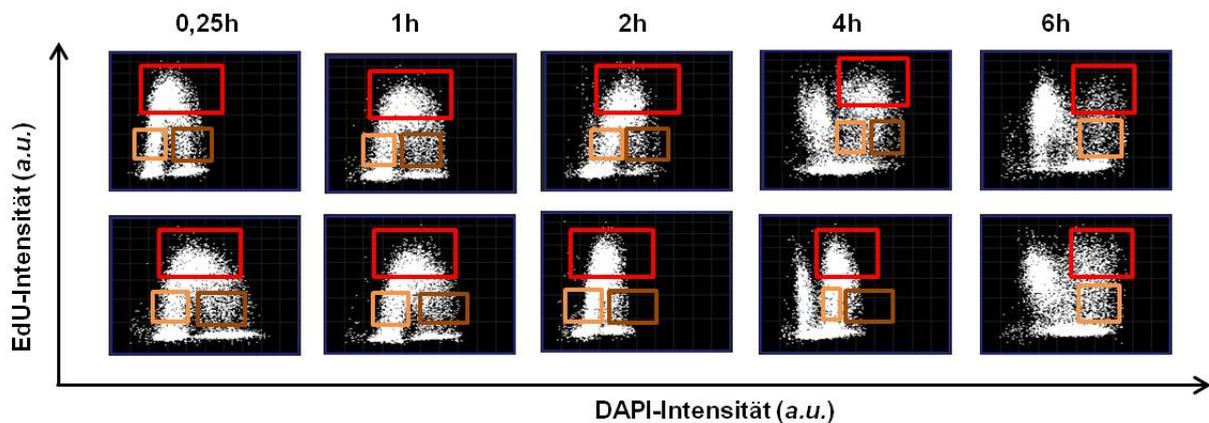


Abb. 4.8: Progression der frühen-, mittleren- und späten S-Phase Zellen durch den Zellzyklus

Dargestellt sind die *Dot-Plot*-Verteilungen der WT-Zellen im Verlauf der Zeit. Die Zellen wurden mit EdU pulsmarkiert und mit 1 Gy bestrahlt bzw. unbestrahlt belassen. Nach Immunfärbung gegen γ H2AX/EdU und mit DAPI wurden die Zellen mit *Metafer*-Software eingescannt. Obere Reihe: unbestrahlte Zellen; untere Reihe: mit 1 Gy bestrahlte Zellen. Die eingezeichneten Kästchen in Orange, Rot und Braun markieren die Population der zum Zeitpunkt der EdU-Pulsmarkierung als frühe-, mittlere- bzw. späte S-Phase detektierten Zellen.

Zusammengefasst wurden die Analysen der S-Phase Zellen unter der Berücksichtigung der spezifischen EdU-Muster und deren Verfolgung durch den Zellzyklus durchgeführt. Die entsprechenden γ H2AX-Kinetiken stellen somit das Verhalten der DSBs dar, welche in einer spezifischen Untergruppe innerhalb der S-Phase nach IR induziert und in den nachfolgenden Zellzyklusphasen repariert wurden. Da nur eine marginale Verzögerung in der Zellprogression durch die S-Phase nach Bestrahlung detektiert wurde, wurde angenommen, dass der intra-S Checkpoint hier keine besondere Rolle spielt, so dass gleiche Populationen sowohl bei unbestrahlten als auch bestrahlten Proben analysiert werden konnten.

4.5.1 Einfluss der Replikation auf die Ausbildung der γ H2AX-Foci in unbestrahlten und mit 1 Gy bestrahlten Zellen in der S-Phase

Neben exogen induzierten DSBs treten in Zellen auch endogene DSBs auf. Sie können die Folge von Prozessen, wie V(D)J-Rekombination oder Radikalentstehung während des zellulären Stoffwechsels sein. Gerade in der S-Phase entstehen während der Replikation spontane DSBs. Dieses geschieht hauptsächlich, wenn z. B. die Replikation durch endo- oder exogene Einwirkungen angehalten wird. Die Folge ist, dass die Replikationsgabeln kollabieren und

weitere DSBs induzieren. Eine weitere Quelle für das Auftreten endogener DSBs können SSBs sein, die infolge der Radikalbildung entstehen können. Auch durch IR wird neben DSBs eine hohe Anzahl an SSBs induziert. Sowohl spontane als auch strahleninduzierte SSBs stellen für die replikationsaktiven Zellen eine weitere potenzielle Gefahr dar. Läuft eine Replikationsgabel in einen SSB hinein, kann hierdurch ein neuer, sekundärer DSB entstehen. So findet in einer replikationsaktiven Zelle eine Zunahme von DSBs infolge der Replikation und der Progression in die nachfolgende Zellzyklusphase statt, die anhand von Foci in der γ H2AX-Foci-Analyse quantifiziert werden können.

Dieses Verhalten sollte nun in frühen, mittleren und späten S-Phase Zellen im WT der DT40-Zellen überprüft werden. Die exponentiell wachsenden WT-Zellen wurden mit EdU pulsmarkiert und mit 1 Gy bestrahlt. Die Quantifizierung der γ H2AX-Foci erfolgte in den bestrahlten und unbestrahlten Zellen, die zum Zeitpunkt der EdU-Pulsmarkierung in der frühen, mittleren und späten S-Phase waren und zu späteren Zeitpunkten in den nachfolgenden Untergruppen innerhalb der S-Phase anhand der charakteristischen EdU-Muster detektiert wurden. Die in der Abb. 4.9 dargestellten Ergebnisse fassen die Entwicklung der γ H2AX-Foci in unbestrahlten und mit 1 Gy bestrahlten WT-Zellen zusammen. Wie in der Abb. 4.9 zu sehen ist, weisen die unbestrahlten Zellen, welche ab der frühen, mittleren oder späten S-Phase beobachtet wurden, eine unterschiedlich hohe Anzahl an DSBs auf. Unbestrahlte Zellen, die ab der frühen S-Phase analysiert wurden, weisen ein DSB-Niveau von ca. 5 auf, welches im weiteren Verlauf durch die S-Phase bis auf ca. 12 DSBs nach 4 h ansteigt und anschließend auf 8 DSBs nach 6 h absinkt (Abb. 4.9, obere Teilabbildung, schraffierte Balken). In unbestrahlten Zellen, die ab der mittleren S-Phase beobachtet wurden, wurde dagegen ein DSB-Niveau von ca. 11 detektiert, welches nach 2 h auf den Wert von ca. 13 anstieg und zwischen 2 und 6 h auf ca. 9 DSBs sank (Abb. 4.9, mittlere Teilabbildung, schraffierte Balken). Unbestrahlte Zellen, die ab der späten S-Phase beobachtet wurden, wiesen 11 DSBs auf, die nach 4 h auf 6 DSBs repariert wurden (Abb. 4.9, untere Teilabbildung, schraffierte Balken). Der Verlauf der γ H2AX-Foci der bestrahlten S-Phase Zellen ist ähnlich. Dabei liegt die Anzahl der DSBs jedoch auf einem höheren Niveau, als in den unbestrahlten Zellen. Der initiale Anstieg der DSBs in den frühen und mittleren S-Phase Zellen wird gefolgt von einer Abnahme der DSBs. In den Zellen, die ab der späten S-Phase beobachtet wurden, nimmt die Anzahl der Foci sukzessive bis 4 h nach Bestrahlung ab (Abb. 4.9, schwarze Balken).

Für die endogen auftretenden und durch IR induzierten DSBs können generell zwei Phasen beschrieben werden, eine Ausbildungsphase und eine Reparaturphase. In den Zellen, die ab der frühen oder der mittleren S-Phase beobachtet wurden, konnten beide Phasen detektiert werden. Dagegen tritt in den Zellen, die ab der späten S-Phase verfolgt wurden, nur eine Reparaturphase auf.

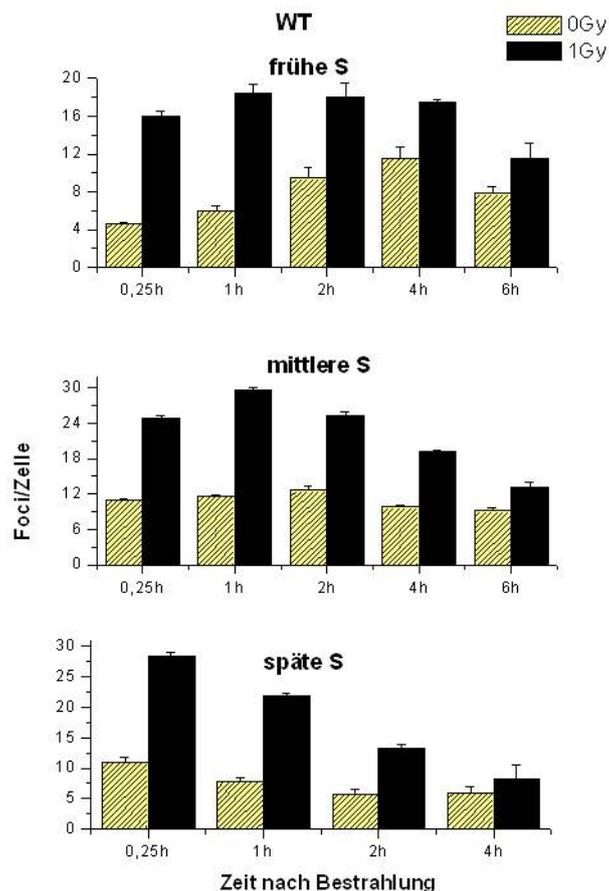


Abb. 4.9: Entwicklung der spontanen und nach 1 Gy Bestrahlung entstandenen γ H2AX-Foci ab früher, mittlerer und später S-Phase

Es sind Werte der γ H2AX-Foci gegen die Zeit nach Bestrahlung aufgetragen. Die S-Phase Zellen wurden entsprechend ihrer EdU-Muster ausgewertet. Die Balken sind die Mittelwerte aus 3-5 Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardfehler zwischen diesen Mittelwerten.

Am Beispiel des WT konnte noch eine weitere Beobachtung gemacht werden. Die Ausbildung und auch die Reparatur der DSBs sind mit der Position in der S-Phase und damit mit der Aktivität der Replikation verbunden. Die Zellen, die zum Zeitpunkt der EdU-Pulsmarkierung in der frühen S-Phase waren und dann durch die S-Phase verfolgt wurden, bekamen über eine 4 h lang andauernde Zunahme an sekundären DSBs. Die Zellen, die zum Zeitpunkt der EdU-Pulsmarkierung in der mittleren S-Phase waren und durch die S-Phase verfolgt wurden, erlangten sekundäre DSBs über eine kurze Dauer. In den Zellen die zum

Zeitpunkt der EdU-Pulsmarkierung in der späten S-Phase waren, kamen keine zusätzlichen DSBs hinzu, weil in diesen Zellen die Replikation nahezu abgeschlossen war.

Analog verhalten sich die spontanen und nach IR induzierten DSBs in den unterschiedlichen S-Phase Untergruppen der Reparaturmutanten im zeitlichen Verlauf. Das Grundniveau an DSBs liegt in allen Mutanten im Vergleich zum WT auf einem höheren Niveau (Abb. 4.10).

4.5.2 Beitrag von c-NHEJ und HR zur Reparatur der strahleninduzierten DSBs in der frühen, mittleren und späten S-Phase bestrahlten Zellen

Es gibt bislang kaum Reparaturstudien, die Wirkungsweise der jeweiligen Reparaturwege in Abhängigkeit von der Position in der S-Phase zum Zeitpunkt der Bestrahlung analysieren. Nachdem das endogene und strahleninduzierte DSB-Niveau im Verlauf durch die S-Phase in den DT40-Zellen charakterisiert wurde, sollte nun das Reparaturverhalten von induzierten DSBs im WT mit demjenigen der Reparaturmutanten verglichen werden.

In der Literatur wird das c-NHEJ als ein Mechanismus beschrieben, der DSBs in allen Zellzyklusphasen reparieren kann (Rothkamm *et al.*, 2003). Der über HR ablaufende Reparaturweg ist auf die späte S/G2-Phase begrenzt, da dort homologe Schwesterchromatiden vorhanden sind, die als Matrize zur Wiederherstellung der geschädigten DNA-Bereiche genutzt werden. Die Regulation dieses Mechanismus durch die S-Phase wurde für Säugetierzellen so beschrieben, dass Zellen in der mittleren S-Phase nicht nur ihre maximale Replikationsaktivität, sondern auch ihre höchste HR-Frequenz erreichen (Karanam *et al.*, 2013). Aufgrund der Tatsache, dass DT40-Zellen deutlich mehr HR durchführen (Buerstedde & Takeda, 1991), kann in diesem Zusammenhang die Hypothese aufgestellt werden, dass die HR-defizienten Zellen nach Bestrahlung in der mittleren S-Phase eine starke Beeinträchtigung in der Reparatur bekommen. Des Weiteren konnte erwartet werden, dass auch in der frühen und späten S-Phase bestrahlte Zellen der HR-Mutante, die ebenfalls Replikation durchführen, einen Reparaturdefekt ausbilden.

In den Zellen, die in der frühen S-Phase bestrahlt wurden, findet in allen Mutanten ein ähnlicher initialer Anstieg statt, gefolgt von der vergleichbaren Abnahme der γ H2AX-Foci bis 2 h bei den Einzelmutanten. In der Doppelmutante bildet sich bereits nach 1 h ein Reparaturdefekt aus, welcher bei den Einzelmutanten erst nach 4 h beobachtet wird. Der ausgebildete und bis zu 6 h persistierende Reparaturdefekt der Doppelmutante liegt um ca. 5 DSBs höher, als der Reparaturdefekt der Einzelmutanten (Abb. 4.10, B; obere Teilabbildung).

Die Ausbildungsphase der in der mittleren S-Phase bestrahlten Zellen verlief in allen Zelllinien identisch. Während der Reparaturphase zeichnete sich allerdings ein Reparaturvorteil in der $Ku70^{-/-}$ -Mutante gegenüber dem WT aus. Dieser ist zwischen 2 und 6 h zu beobachten (Abb. 4.10, B; mittlere Teilabbildung; dunkel-gelbe Balken). In der HR-Mutante wird ein Reparaturdefekt detektiert, welcher ungefähr genau so groß ist, wie nach Bestrahlung in der frühen S-Phase (Abb. 4.10, B; mittlere Teilabbildung, blaue Balken). In der Doppelmutante ist das Verhalten der γ H2AX-Foci mit dem der HR-Mutante vergleichbar.

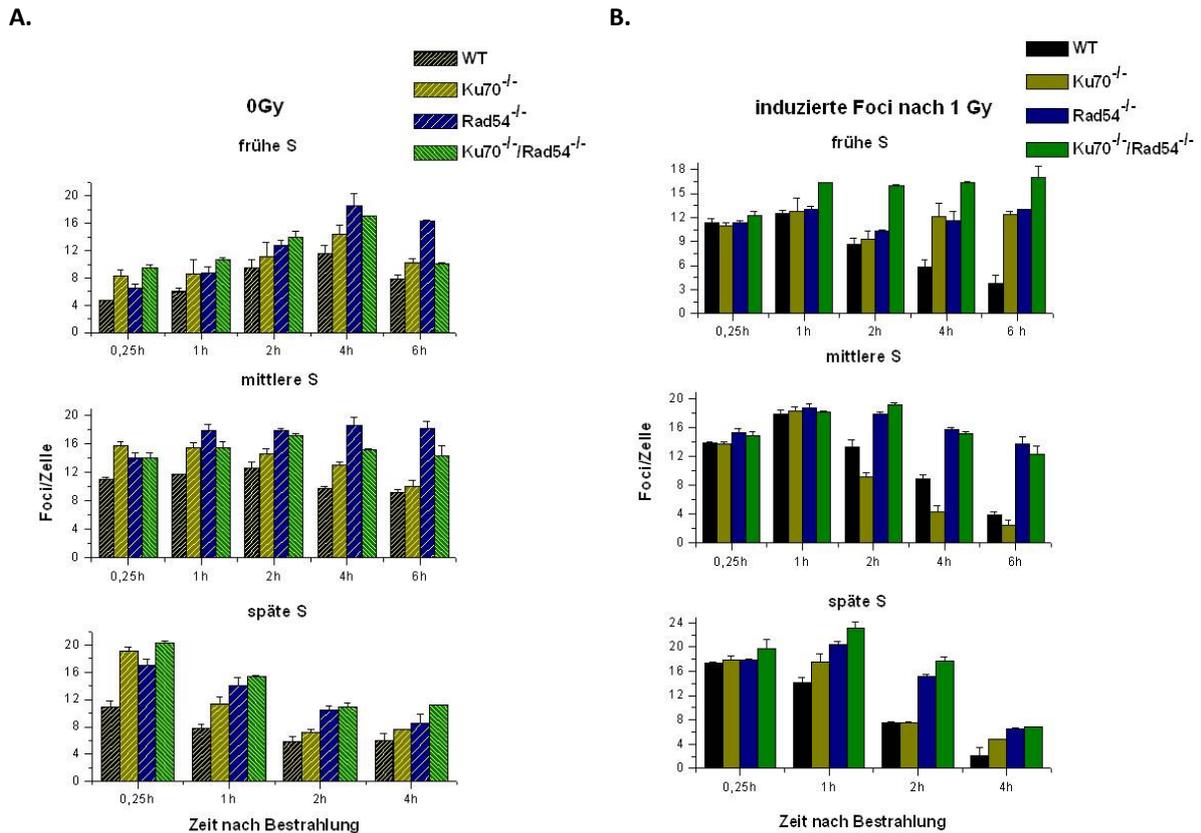


Abb. 4.10: Beitrag von c-NHEJ und HR zur DSB-Reparatur in den bestrahlten S-Phase Zellen

Dargestellt ist das Reparaturverhalten der WT-, $Ku70^{-/-}$ -, $Rad54^{-/-}$ -Zellen sowie der Zellen der Doppelmutante, die nach der EdU-Pulsmarkierung mit 1 Gy bestrahlt wurden. Nach den Fixierungsschritten zu den angegebenen Zeiten erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung gegen γ H2AX/EdU. Die DNA wurde mit DAPI angefärbt. Die gefärbten Präparate wurden mit *Metafer*-Software eingescannt. Die Auswahl der entsprechenden S-Phase Zellen erfolgte anhand der spezifischen EdU-Muster. **A.** Aufgetragen ist die Anzahl der in der S-Phase spontan auftretenden γ H2AX-Foci in **B.** Auftragung der nach 1 Gy induzierten γ H2AX-Foci gegen die Zeit. Die Balken sind Mittelwerte aus mind. 3 unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Fehlerindikatoren sind Standardfehler zwischen den Mittelwerten.

In den Zellen, die in der späten S-Phase bestrahlt wurden, läuft die im WT stattfindende Reparatur zwischen 0,25 und 4 h in der $Ku70^{-/-}$ -Mutante verzögert ab. Zwischen 0,25 und 1 h ist nahezu kein Rückgang der γ H2AX-Foci festzustellen. Erst nach 2 h haben die Zellen der $Ku70^{-/-}$ -Mutante die DSBs repariert und zeigen ein mit dem WT vergleichbares DSB-Niveau. Nach 4 h hat sich ein leichter Reparaturdefekt in der $Ku70^{-/-}$ -Mutante ausgebildet (Abb. 4.10,

B; untere Teilabbildung; gelbe Balken). In der Rad54^{-/-}- und der Ku70^{-/-}/Rad54^{-/-}-Mutante zeigte sich zunächst eine Zunahme der DSBs zwischen 0,25 und 1 h, die beim WT und der Ku70^{-/-}-Mutante fehlte (Abb. 4.10, B; untere Teilabbildung; blaue und grüne Balken). Schließlich lag der Reparaturdefekt in der Rad54^{-/-}- und der Ku70^{-/-}/Rad54^{-/-}-Mutante höher als in der Ku70^{-/-}-Mutante.

Zusammen mit den Ergebnissen der Einzelmutanten können in Bezug auf die DSB-Reparatur in verschiedenen S-Phase Untergruppen folgende Aussagen getroffen werden. Die γ H2AX-Kinetik der Zellen, die in der frühen bzw. in der mittleren S-Phase bestrahlt wurden, setzt sich aus der Ausbildungs- und Reparaturphase zusammen. Ein solcher Verlauf der γ H2AX-Kinetiken hängt damit zusammen, dass die Zellen im Zuge der Replikation mehr γ H2AX-Foci und damit DSBs erwerben. Diese Schäden werden als sekundäre Replikation-assoziierte DSBs bezeichnet.

In den WT-Zellen, die in der frühen S-Phase bestrahlt und ab da durch die S-Phase beobachtet wurden, bilden sich zwei Phasen aus (Ausbildungsphase-Reparaturphase). In den Zellen der Ku70^{-/-}-, Rad54^{-/-}-Einzelmutanten und der Doppelmutante, die in der frühen S-Phase bestrahlt wurden, scheint die Ausbildungsphase stärker ausgeprägt zu sein, als die Reparaturphase, so dass keine Aussage über Reparatur getroffen werden kann. In den Zellen der Doppelmutante zeigte sich im Zeitintervall zwischen 2 und 6 h eine sukzessive Erhöhung der γ H2AX-Foci-Werte, was vermutlich auf eine Verdopplung einiger DSBs zurückzuführen ist. Aufgrund der ausgeprägten Reparaturdefekte in den Einzel- und Doppelmutanten zum Zeitpunkt 6 h, werden sowohl Ku70 als auch Rad54 für die Reparatur von DSBs benötigt und das stärker als für die Zellen, die in der mittleren bzw. in der späten S-Phase bestrahlt wurden. Die Reparatur nach Bestrahlung in der frühen S-Phase scheint sowohl von HR als auch von c-NHEJ gleichermaßen abhängig zu sein.

Die Reparatur in den Zellen, die in der mittleren S-Phase bestrahlt wurden, folgt einem biphasischen Verlauf (Ausbildungsphase-Reparaturphase). Diese Zellen reparieren DSBs verstärkt über HR. Überraschenderweise scheint das c-NHEJ für die Reparatur der in der mittleren S-Phase bestrahlten Zellen keine Rolle zu spielen. Es wurde vermutet, dass der Reparaturdefekt der HR-Mutante bzw. der Reparaturvorteil in der c-NHEJ-Mutante auf die Effekte der Replikation, welche mit der Reparatur wechselwirkt, zurückzuführen sein könnte.

Für die in der späten S-Phase bestrahlten Zellen ist die Reparaturphase stärker ausgeprägt als die Ausbildungsphase. Hier ist die Aktivität sowohl von c-NHEJ als auch von HR notwen-

dig. Die Abnahme der γ H2AX-Foci in den Zellen, die in der späten S-Phase bestrahlt wurden, lässt insbesondere in der Doppelmutante eine Möglichkeit zu, Reparatur über einen alternativen Reparaturweg durchzuführen.

Die Ergebnisse der in der frühen bzw. mittleren S-Phase bestrahlten Zellen deuten stark daraufhin, dass sekundäre DSBs das Reparaturverhalten stark beeinflussen. Um diesen Einfluss genauer untersuchen zu können, sollte ein experimenteller Ansatz etabliert werden, welcher Replikation inhibiert und somit das Auftreten der sekundären DSBs unterdrückt. Mit diesem Ansatz soll ebenfalls überprüft werden, ob Reparaturvorgänge in S dadurch beeinflusst werden.

4.5.3 γ H2AX-Foci-Analyse unter Replikation-inhibierenden Bedingungen

Der in der S-Phase stattfindende Prozess der Replikation führt zu einer Verdopplung der DNA. Die DSBs, die spontan aus SSBs bzw. durch Strahlung entstehen, müssen parallel zur Replikation repariert werden, um die chromosomale Stabilität der Zelle zu gewährleisten (Zannis-Hadjopoulos & Rampakakis). Es ist bekannt, dass die Entstehung Replikation-assoziiierter Schäden stark mit der Reparatur wechselwirkt, so dass die Reparaturanalysen in der S-Phase und die Aussage über den reinen strahleninduzierten Effekt auf die Reparatur der primären DSBs erschwert wird (Helleday *et al.*, 2007). Um die Entstehung der sekundären DSBs im Verlauf der Reparaturkinetik zu unterdrücken, wurde ein experimenteller Ansatz etabliert, welcher das Fortschreiten der Replikation verzögert.

4.5.3.1 Etablierung der Methode, welche Ausbildung der sekundären DSBs inhibiert

Um die sekundären DSBs zu unterdrücken, wurde der Replikationsinhibitor Aphidicolin gewählt. Aphidicolin greift speziell in den Elongationsschritt dieses Prozesses ein (Levenson & Hamlin, 1993), indem es die DNA-Polymerase α blockiert (Oguro *et al.*, 1979; Ichikawa *et al.*, 1980). Generell bewirkt eine Dauerbehandlung mit Aphidicolin, dass die S-Phase Zellen durch den Zellzyklus langsam progressieren oder bei hohen Aphidicolin-Konzentrationen ihre Progression sogar unterbinden. Im Vergleich zu Aphidicolin-basierten Analyseverfahren, bei denen hohe Aphidicolin-Konzentrationen verwendet werden und eine massive Schädigung der S-Phase Zellen induziert wird, sollte eine Konzentration gefunden werden, welche lediglich die Progression der S-Phase Zellen hemmt, ohne zusätzliche DSBs zu erzeugen.

Für die Bestimmung einer optimalen Aphidicolin-Konzentration wurde zunächst eine Konzentrationsreihe mit Aphidicolin durchgeführt. Hierfür wurde eine durchflusszytometrische

Analyse des Zellzyklus am Beispiel der WT-Zellen gewählt. Die exponentiell wachsenden WT-Zellen wurden mit BrdU für 20 min pulsmarkiert. BrdU ist ein Thymidin-Analogon und wird während der Replikation in die DNA eingebaut. Dadurch können die S-Phase Zellen, die nach der Färbung gegen BrdU BrdU-positiv erscheinen, von den BrdU-negativen G1- und G2-Phase Zellen unterschieden werden. Nach der Pulsmarkierung wurden die Zellen mit DMSO als Negativkontrolle sowie mit 1 μ M Aphidicolin behandelt und mit 1 Gy bestrahlt oder unbestrahlt belassen. Zu den Zeitpunkten 2 und 4 h nach der Behandlung wurden die Proben fixiert, gegen BrdU sowie mit PI als DNA-Marker gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die aus dieser Analyse resultierenden Zellzyklusverteilungen der bestrahlten und unbestrahlten WT-Zellen sind in der Abb. 4.11 zusammengefasst.

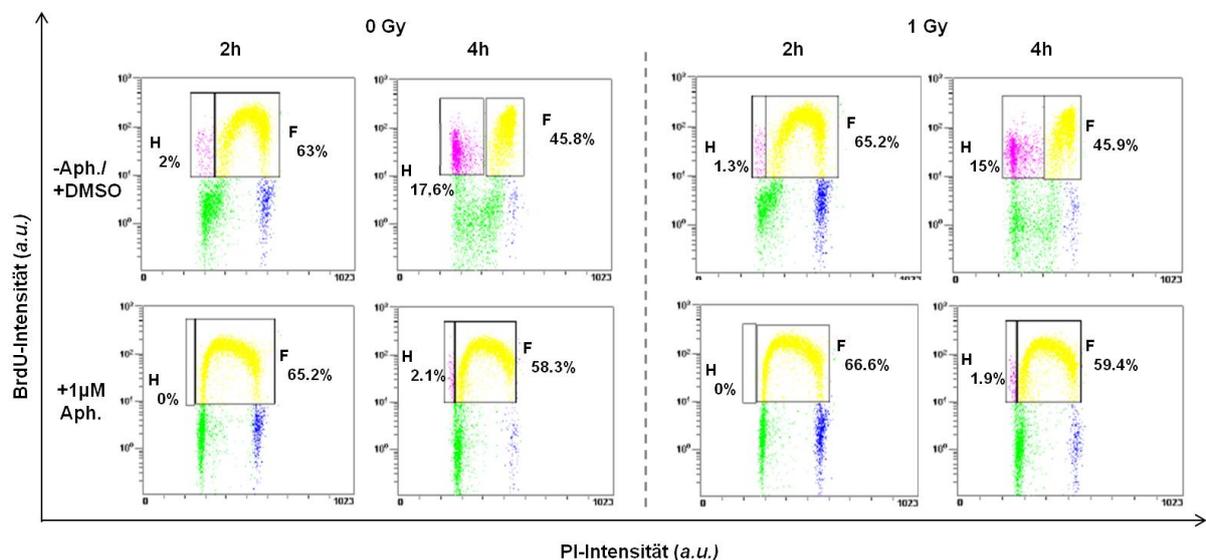


Abb. 4.11: Einfluss von Aphidicolin zusammen mit Bestrahlung auf die Proliferation des WT

Die exponentiell wachsenden WT-Zellen wurden mit BrdU pulsmarkiert. Nach der Pulsmarkierung wurden sie mit DMSO als Negativkontrolle sowie mit 1 μ M Aphidicolin dauerbehandelt und mit 1Gy bestrahlt oder unbestrahlt belassen. Nach der Fixierung zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen gegen BrdU sowie mit PI gefärbt und mit dem Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt sind die Zellzyklusverteilungen der behandelten oder unbehandelten sowie bestrahlten und unbestrahlten Proben. Eingezeichnet sind die *gates*, die die neu entstandenen (linkes *gate*, Population H) und die bestehenden zum Zeitpunkt der BrdU-Pulsbehandlung markierten S-Phase Zellen (rechtes *gate*, Population F) hervorheben.

Um beurteilen zu können, ob 1 μ M Aphidicolin als optimale Konzentration für die Hemmung der Progression der S-Phase Zellen gewählt wurde, sollte ein Augenmerk auf die Progression der BrdU-positiven S-Phase Zellen von mittlerer S- in die späte S-Phase gelegt werden. Hieran kann dann abgelesen werden, ob die DNA-Replikation und die Zunahme des DNA-Gehaltes inhibiert werden. Des Weiteren sollte beobachtet werden, ob die Entstehung neuer BrdU-positiver S-Phase Zellen ebenfalls unterdrückt wird. Das ist ein Indiz dafür, dass die Zellen, die zum Zeitpunkt der BrdU-Pulsbehandlung in der S-Phase waren, sich noch nicht

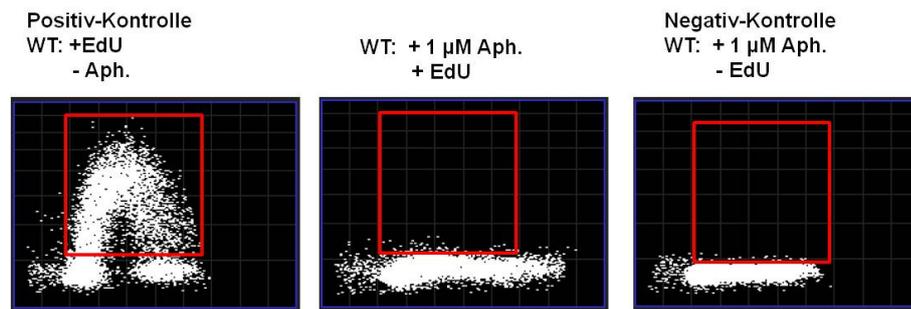
geteilt haben. Dieses verdeutlicht ebenfalls die Inhibition der Progression von S-Phase Zellen im Zellzyklus.

Wie in der Abb. 4.11 gezeigt wird, bleibt die Proliferation der mit DMSO behandelten sowohl in den unbestrahlten als auch in den mit 1 Gy bestrahlten WT-Zellen ungestört. Von 2 bis 6 h wird eine kontinuierliche Zunahme an neu entstandenen BrdU-positiven frühen S-Phase Zellen beobachtet. Die Vorbehandlung mit 1 μ M Aphidicolin führt zu einer deutlichen Verlangsamung in der Progression der Zellen durch die S-Phase, und das unabhängig davon, ob die Zellen anschließend bestrahlt oder unbestrahlt werden. Es entstehen keine neuen BrdU-positiven S-Phase Zellen nach 2 h mehr. Erst zum Zeitpunkt 4 h steigt deren Anteil geringfügig an.

Also zeigt dieses Kontrollexperiment, dass bereits 1 μ M Aphidicolin ausreichend ist, um die Progression der S-Phase Zellen im Zellzyklus zu verlangsamen, was wiederum die Replikation-inhibierende Wirkung von Aphidicolin bestätigt.

Um die inhibierende Wirkung von Aphidicolin zu untermauern, wurde ein auf EdU-Einbau basierendes Kontrollexperiment durchgeführt. Hierfür wurden die exponentiell wachsenden WT-Zellen mit 1 μ M Aphidicolin behandelt und anschließend mit EdU pulsmarkiert. Die Proben wurden dann nach 0,25 h fixiert (Abb. 4.12, A). Es zeigte sich, dass die S-Phase Zellen der Positivkontrolle EdU während der 20-minütigen Pulsmarkierung eingebaut haben. Dagegen zeigten die Zellen, die mit 1 μ M Aphidicolin vorbehandelt und anschließend mit EdU für 20 Min pulsmarkiert wurden, keinen EdU-Einbau mehr. Für die Negativkontrolle wurden die Zellen mit Aphidicolin aber ohne EdU-Pulsmarkierung behandelt. Sie zeigten erwartungsgemäß keinen durch EdU-substituierten Anteil an S-Phase Zellen. Die Inhibition des EdU-Einbaus mit 1 μ M Aphidicolin bekräftigt somit ebenfalls die Replikation-inhibierende Wirkung von Aphidicolin. Eine weitere Beobachtung war, dass eine durch Aphidicolin-Behandlung detektierbare Erhöhung des Hintergrundes im γ H2AX-Signal nicht hinderlich war, distinkte Foci zu detektieren (Abb. 4.12, B; Probe +1 μ M Aph./+EdU).

A.



B.

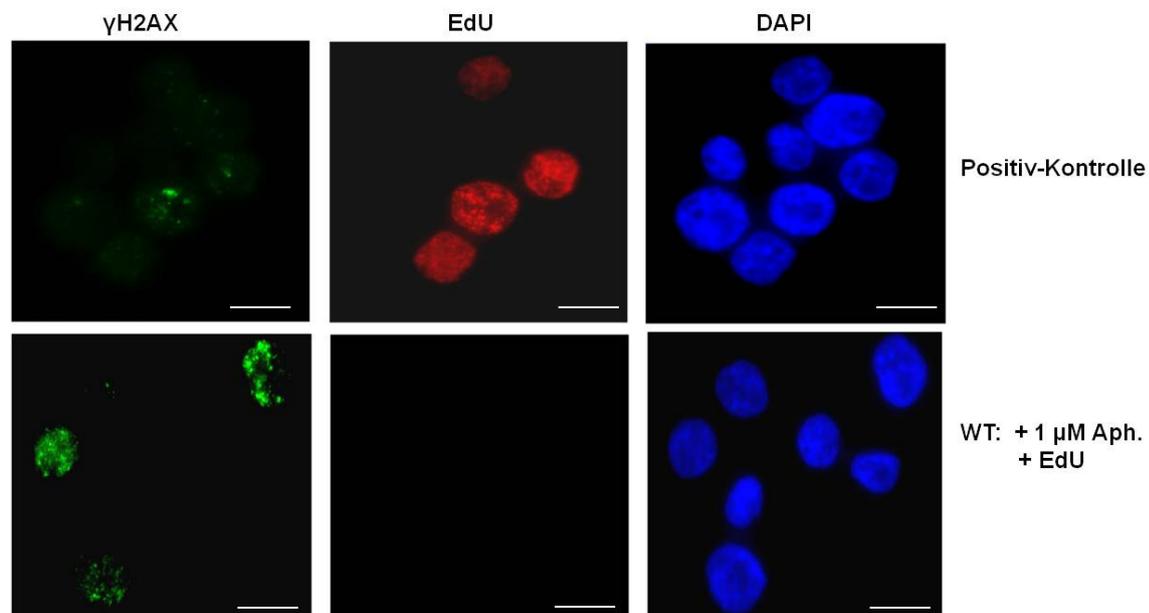


Abb. 4.12: Einfluss von 1 μ M Aphidicolin auf den EdU-Einbau

Die Zellen wurden mit 1 μ M Aphidicolin für 10 Min vorbehandelt. Nach dem Waschen mit 1xPBS, wurden sie mit EdU pulsmarkiert. Nach dem erneuten Waschen mit 1xPBS wurden die Zellen mit 1 μ M Aphidicolin behandelt. Die Zellen der Positivkontrolle wurden nur mit EdU pulsmarkiert. Nach 15 Min wurden alle Proben fixiert. Anschließend erfolgte die Färbung gegen γ H2AX/EdU und mit DAPI. **A.** Die gefärbten Proben wurden mit *Metafer*-Software eingescannt. Die spezifischen Zellzyklusverteilungen wurden aus der Auftragung der DAPI- (X-Achse) gegen die EdU- (Y-Achse) Intensitäten erstellt. Der rote Rahmen ist die Markierung der EdU-positiven Zellen. **B.** Gezeigt sind die entsprechenden fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Positivkontrolle (obere Reihe) sowie der Probe nach 1 μ M Aphidicolin-Behandlung und EdU-Pulsmarkierung (untere Reihe). Dargestellt sind mit einer 1000x Gesamtvergrößerung aufgenommenen Bilder der DAPI- (blau), EdU- (rot) γ H2AX- (grün) Färbung. Der in das Überlagerungsbild eingezeichnete Maßstabsbalken beträgt 10 μ M.

Die Anwendung von 1 μ M Aphidicolin führte zu einem gewünschten Ergebnis hinsichtlich der starken Verzögerung der Zellzyklusprogression durch die Inhibition der Replikation und wurde daher in den nachfolgenden Experimenten verwendet.

4.5.3.2 γ H2AX-Kinetiken der unbestrahlten sowie mit 1 Gy bestrahlten S-Phase Zellen des WT unter den Replikation-inhibierenden Bedingungen

Es konnte gezeigt werden, dass 1 μ M Aphidicolin eine geeignete Konzentration ist, um eine Inhibition der Replikation und damit die Inhibition der Progression der S-Phase Zellen hervorzurufen. Nun sollte die DSB-Reparatur anhand der γ H2AX-Foci unter replikationshemmenden Bedingungen zunächst im WT analysiert werden. Diese Kinetiken sollen dann mit den Kinetiken ohne Aphidicolin-Behandlung verglichen werden. Die Abbildung 4.13 stellt diesen Vergleich dar.

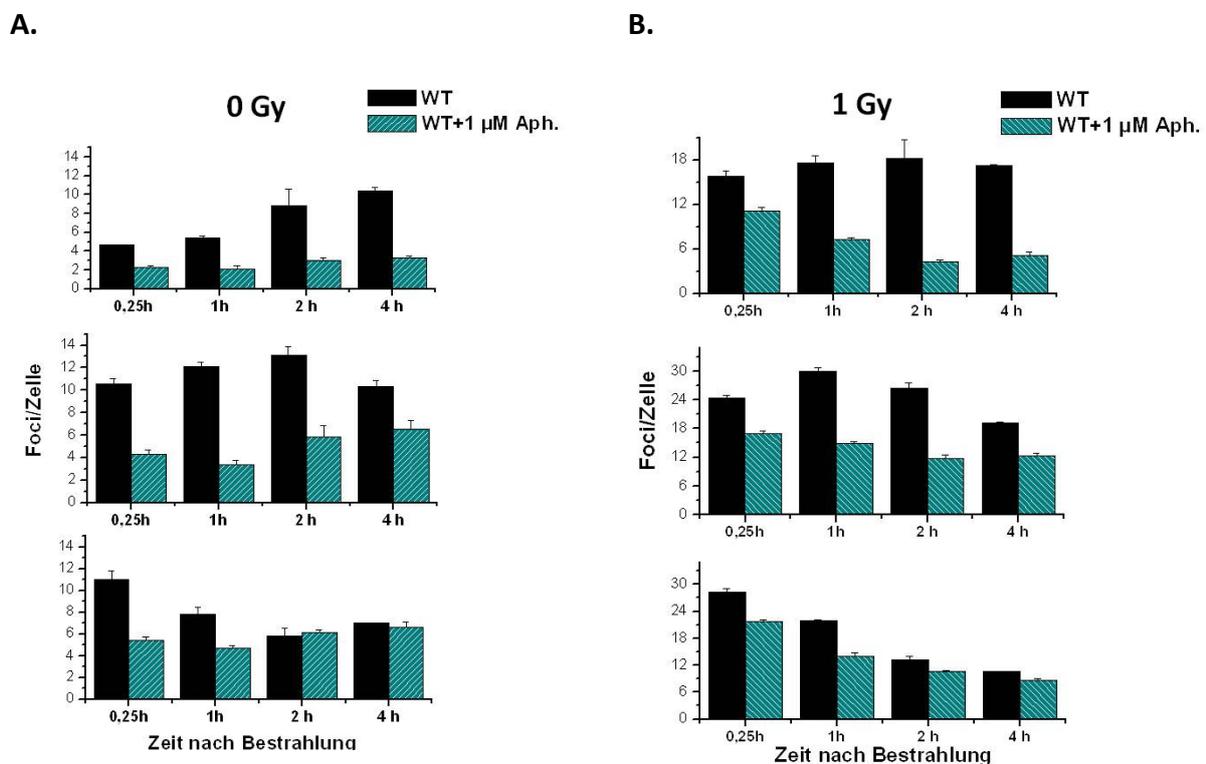


Abb. 4.13: Einfluss der moderaten Aphidicolin-Behandlung auf die in der S-Phase spontan oder nach 1 Gy entstandenen γ H2AX-Foci im WT

Die Zellen wurden mit EdU pulsmarkiert. Nach der Pulsmarkierung wurden sie mit 1 μ M Aphidicolin behandelt oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 Gy bestrahlt oder unbestrahlt belassen. Nach der Fixierung zu den angegebenen Zeiten wurden sie gegen γ H2AX/EdU und mit DAPI gefärbt. Es wurden die frühen, mittleren und späten S-Phase markierten Zellen entsprechend der DAPI- und EdU-Intensität anhand der spezifischen Zellzyklusverteilung ausgewählt. In den ausgewählten Zellen wurden γ H2AX-Foci quantifiziert. Aufgetragen sind die γ H2AX-Foci im Verlauf der Zeit. **A.** Analyse der unbestrahlten S-Phase Zellen. **B.** Analyse der mit 1 Gy bestrahlten Zellen. Balken sind Mittelwerte aus den mind. 3 unabhängigen Experimenten. Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler zwischen den Experimenten.

In der Teilabbildung A sind die γ H2AX-Kinetiken der unbestrahlten Zellen mit und ohne Aphidicolin-Behandlung, in der Teilabbildung B sind die analogen Kinetiken der mit 1 Gy bestrahlten S-Phase Zellen des WT zusammengefasst. In dieser Abbildung ist deutlich zu sehen, dass 1 μ M Aphidicolin sowohl die Anzahl der spontanen, ohne Bestrahlung, als auch die nach

1 Gy detektierten γ H2AX-Foci über den gesamten Analysezeitraum in allen S-Phase Zellen des WT reduziert. Besonders auffällig war jedoch, dass bereits nach 0,25 h eine drastische Reduktion in der Foci-Anzahl insbesondere bei den unbestrahlten Proben detektiert wurde (Abb. 4.12, B).

In den Zellen, die ohne Aphidicolin behandelt und ab der frühen S-Phase verfolgt wurden, wurde eine Ausbildungsphase sowohl in den bestrahlten als auch in den unbestrahlten Zellen beobachtet. Es trat hier keine Reparaturphase auf. Nach der Zugabe von 1 μ M Aphidicolin wurde sowohl in den unbestrahlten als auch in den bestrahlten Zellen zu allen Analysezeitpunkten eine geringere Foci-Zahl detektiert. In den unbestrahlten frühen S-Phase Zellen blieb das DSB-Niveau relativ konstant. In den bestrahlten Zellen nahm die DSB-Anzahl ab (Abb. 4.13, A, B, jeweils obere Teilabbildung).

In den Zellen, die ohne Aphidicolin behandelt und ab der mittleren S-Phase verfolgt wurden, wurden eine Ausbildungs- sowie eine Reparaturphase sowohl in den unbestrahlten als auch in den bestrahlten Zellen beobachtet. Die Ausbildungsphase in den unbestrahlten Zellen dauerte bis 2 h und in den bestrahlten Zellen bis 1 h an. Die daran anschließende Reparaturphase zeigte sich in den unbestrahlten Zellen zwischen 2 und 4 h und in den bestrahlten Zellen ab der ersten Stunde. Die Zugabe von 1 μ M Aphidicolin bewirkte, dass bereits nach 0,25 h eine Reduktion der DSBs um ca. 50% in den unbestrahlten und um ca. 30% in den bestrahlten Zellen erreicht wurde. In den mit Aphidicolin behandelten und unbestrahlten mittleren S-Phase Zellen war eine leichte Ausbildungsphase zwischen 1 und 4 h zu sehen, während in den bestrahlten Zellen eine direkt einsetzende Reparaturphase detektiert wurde (Abb. 4.13, A, B, jeweils mittlere Teilabbildung).

In den Zellen, die in der späten S-Phase analysiert wurden, zeigte sich, dass die Behandlung mit 1 μ M Aphidicolin die Anzahl der DSBs reduzierte. Es wurden in den unbestrahlten Zellen nach 0,25 h um ca. 50% weniger DSBs gemessen, wenn die Zellen mit Aphidicolin behandelt wurden. Nach der Aphidicolin-Behandlung und Bestrahlung war dieser reduzierende Effekt geringer. Im Vergleich zu den unbehandelten und bestrahlten Zellen wurde eine Reduktion um ca. 23% erreicht (Abb. 4.13, B, jeweils untere Teilabbildung). Analog zum WT wurden die Zellen der $Ku70^{-/-}$, $Rad54^{-/-}$ und $Ku70^{-/-}/Rad54^{-/-}$ einer Aphidicolin-Behandlung von 1 μ M unterzogen. Auch in den Reparaturmutanten wurde eine geringere γ H2AX-Foci-Anzahl in den mit Aphidicolin behandelten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen detektiert (Abb. 4.14, A).

Diese Ergebnisse zeigen, dass der experimentelle Ansatz mit 1 μM Aphidicolin geeignet ist, um die Anzahl der endogen auftretenden DSBs in der S-Phase zu reduzieren. Im nächsten Schritt sollte nun untersucht werden, welchen Beitrag c-NHEJ und HR bei der Reparatur der in der S-Phase durch Strahlung induzierten, primären DSBs leisten.

4.5.3.3 Beitrag von c-NHEJ und HR zu Reparatur der durch Strahlung erzeugten primären DSBs in der S-Phase

Nachdem festgestellt wurde, dass eine Aphidicolin-Konzentration von 1 μM in DT40-Zellen die Bildung sekundärer DSBs in der S-Phase reduziert, wurden nun Reparaturstudien der primären, nur durch Strahlung induzierten DSBs durchgeführt. Dabei sollte der Beitrag der Reparaturwege, c-NHEJ und HR analysiert werden. Es wurden WT, $\text{Ku70}^{-/-}$, $\text{Rad54}^{-/-}$ sowie $\text{Ku70}^{-/-}/\text{Rad54}^{-/-}$ -Mutanten mit EdU pulsmarkiert und mit 1 μM Aphidicolin behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 1 Gy bestrahlt. Zu jedem Zeitpunkt wurde eine unbestrahlte Kontrolle mitgeführt. Die ermittelten Kontrollwerte in den unbestrahlten Proben wurden von den Werten der bestrahlten Proben abgezogen. Die entsprechenden Reparaturkinetiken sind in der Abb. 4.14 dargestellt.

Verglichen mit der in der Abb. 4.10 dargestellten Ergebnissen der unbehandelten Zellen, wurde keine signifikante Abweichung in der Induktion in allen untersuchten S-Phase Zellen gemessen (Abb. 4.14, 0,25 h). Eine Reparaturphase konnte in allen untersuchten Zelllinien beobachtet werden. In den mit Aphidicolin vorbehandelten WT-Zellen wurden in nahezu allen S-Phase Untergruppen mehr DSBs repariert. In der frühen S-Phase fand die Abnahme von 52% auf 20%, in der mittleren von 65% auf 43% statt. Ähnliche Effekte wurden in den Reparaturmutanten beobachtet.

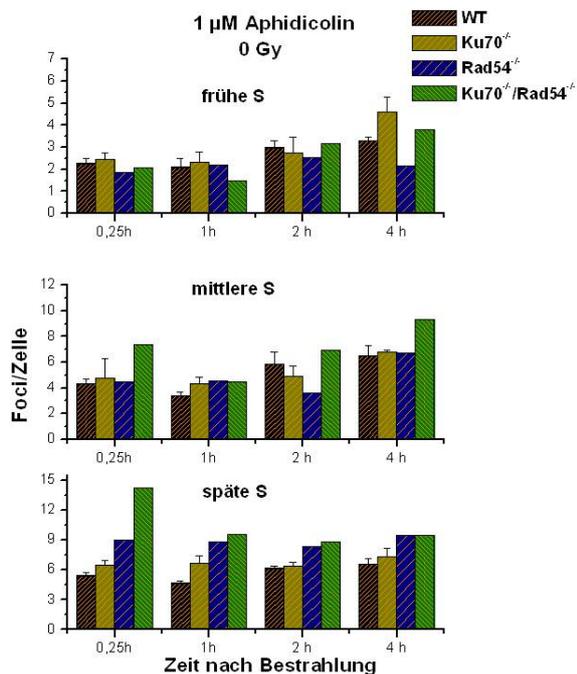
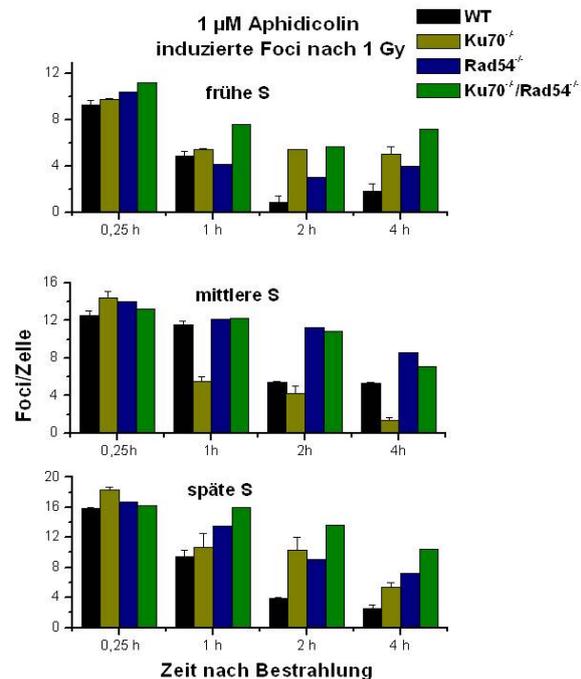
A.**B.**

Abb. 4.14: Reparatur der in der frühen, mittleren und späten S-Phase bestrahlten Zellen unter Replikationsinhibierenden Bedingungen

Die Zellen wurden mit EdU pulsmarkiert und mit 1 µM Aphidicolin behandelt. Nach der Bestrahlung und der Fixierung der Proben zu den angegebenen Zeiten erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung gegen γH2AX/EdU und mit DAPI. An den spezifischen Zellzyklusverteilungen, die nach dem Einscannen im Mikroskop entstanden waren, wurden die als frühe, mittlere- und späte S-Phase klassifizierten Zellen entsprechend des EdU-Musters ausgewählt. In den ausgewählten Zellen wurden γH2AX-Foci quantifiziert. **A.** Aufgetragen sind die in der S-Phase spontan entstandene γH2AX-Foci im Verlauf der Zeit; **B.** Werte der induzierten γH2AX-Foci nach Abzug der entsprechenden Kontrollen. Die Fehlerindikatoren im WT und der c-NHEJ-Mutante sind die Standardfehler aus mind. 2 unabhängigen Experimenten. Bei der HR- und der Doppelmutante ist jeweils nur ein Experiment gezeigt.

In der Ku70^{-/-}-Mutante, die in der frühen S-Phase bestrahlt und ab da beobachtet wurde, fand ohne Aphidicolin eine Akkumulation der DSBs statt. Die Aphidicolin-Behandlung bewirkte, dass die Anzahl der unreparierten DSBs auf 51% reduziert wurde. In mittleren S-Phase Zellen kam es zu einer Reduktion von 31% unreparierten DSBs auf 9,7%.

In frühen S-Phase Zellen der Rad54^{-/-}-Mutante und der Doppelmutante, die ohne Aphidicolin-Behandlung bestrahlt wurden, fand ohne Aphidicolin eine Akkumulation der DSBs statt. Nach der Aphidicolin-Behandlung und der Bestrahlung wurde eine verminderte Anzahl an unreparierten DSBs detektiert. In der Rad54^{-/-}-Mutante betrug der Anteil der unreparierten DSBs an 38%, in der Doppelmutante verblieben dagegen noch 64% unrepariert. In den Zellen, die in der mittleren S-Phase bestrahlt wurden, war in der Rad54^{-/-}-Mutante eine Abnahme von akkumulierten DSBs auf 61% und in der Doppelmutante auf 54% zu erkennen.

Die späten S-Phase Zellen stellten in diesem Ansatz eine Ausnahme dar. In dieser Phase wurden tendenziell mehr unreparierte Brüche gemessen, als in den Zellen, die keine Aphidicolin-Behandlung erfahren haben. Im WT war eine 3%-ige in der Ku70^{-/-}-Mutante eine 2%-ige und in der Rad54^{-/-}-Mutante eine 7%-ige Erhöhung zu erkennen. In der Doppelmutante stieg der Anteil an unreparierten DSBs von 35% auf 64% an.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Tendenz in der Reparatur durch die Behandlung mit Aphidicolin nahezu unverändert bleibt. Auffällig ist jedoch das Ergebnis der in der frühen S-Phase bestrahlten Zellen. In diesem experimentellen Ansatz zeigt sich, dass das c-NHEJ eine größere Rolle als HR spielt. Die meisten primären strahleninduzierten DSBs in der mittleren S-Phase bestrahlten Zellen werden über HR repariert. Das c-NHEJ spielt hier keine Rolle. In der späten S-Phase bestrahlten Zellen sind sowohl c-NHEJ als auch HR bei der Reparatur der primären strahleninduzierten DSBs beteiligt.

4.6 Etablierung der Zellzyklusphasen-abhängigen chromosomalen Studien nach Bestrahlung mit 1 Gy

In den bisherigen Untersuchungen wurde das Zellzyklusphasen-abhängige Zusammenspiel der klassischen Reparaturwege, c-NHEJ und HR, auf der Ebene der DSB-Reparatur mittels γ H2AX-Foci-Analyse durchgeführt. Es zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen der Reparatur nach Bestrahlung in der mittleren S- und in der G2-Phase. Während HR der dominante Weg der in der mittleren S-Phase bestrahlten Zellen ist, beteiligen sich c-NHEJ und HR an der Reparatur in der G2-Phase bestrahlten Zellen. Diese Strahleneffekte sollten nun mit einer weiteren Methode auf der chromosomalen Ebene überprüft werden. Es wurde ein analoger experimenteller Ansatz zu der EdU-basierten γ H2AX-Foci-Methode etabliert, welcher eine Differenzierung der in S bzw. in G2 bestrahlten Zellen, die später in der Mitose ausgewertet werden, erlaubt. Statt EdU wurde in diesem Ansatz BrdU verwendet. Anhand einer durchflusszytometrischen Analyse im Vorversuch wurde zunächst ein geeignetes Zeitfenster für die Ernte der Metaphasen festgelegt. Obwohl Foci-Analysen der G2-Phase Zellen bis 4 h durchgeführt wurden, wurde anhand der Zellzyklusverteilungen ersichtlich, dass der größte Anteil an G2-Phase Zellen in den unbestrahlten Zellen zwischen 1 und 3 h in die Mitose progressierte. In den bestrahlten Zellen lief der größte Anteil an G2-Phase Zellen etwas verzögert zwischen 2 und 4 h in die Mitose. Auch ein beträchtlicher Anteil an S-Phase Zellen konnte in den jeweiligen Proben detektiert werden. Im Falle der bestrahlten Proben deutet

dieses darauf hin, dass der intra S-Checkpoint bei 1 Gy keine Rolle spielt. Durch diese Ergebnisse wurden die Erntezeitpunkte der Metaphasen für die unbestrahlten Zellen zwischen 1-3 h und für bestrahlte Zellen zwischen 2-4 h festgelegt, um eine maximale Ausbeute von BrdU-positiven wie auch BrdU-negativen Metaphasen in derselben Probe zu erhalten. Innerhalb der bestimmten Zeitpunkte konnten Metaphasen mit unterschiedlichen BrdU-Mustern geerntet werden. Die Zellen die kein BrdU enthielten, gehörten ursprünglich der G2-Phase an, da diese Phase zur Mitose zeitlich am nächsten liegt. Die Zellen, die eine sehr geringe Menge an BrdU aufgenommen haben, befanden sich mit großer Wahrscheinlichkeit in der späten S-Phase. Die Metaphasen dieser Zellen zeigten einen partiellen BrdU-Einbau, der bevorzugt an den großen bis mittleren Chromosomen lokalisiert war. Die Zellen, die sich zum Zeitpunkt der BrdU-Pulsmarkierung in der mittleren S-Phase befanden, hatten ein breites und flächiges BrdU-Signal, welches sowohl Mikro- als auch Makrochromosomen bedeckte (Abb. 4.15). Alle anderen Zellzyklusphasen konnten durch die Festlegung der Erntezeitpunkte aus der Analyse ausgeschlossen werden.

Der Chromosomensatz der DT40 Zellen besteht aus insgesamt 80 Chromosomen, 11 Makrochromosomen, 67 Mikrochromosomen sowie ein Paar Geschlechtschromosomen ZZ oder ZW (Sonoda et al., 1998). In dieser Arbeit umfasste die Auswertung 11 Makrochromosomen und 1 Geschlechtschromosom in den BrdU-positiven Metaphasen der aus mittlerer S-Phase stammenden Zellen sowie BrdU-negativen Metaphasen, die aus der G2-Phase stammten.

0 Gy, 1-3 h

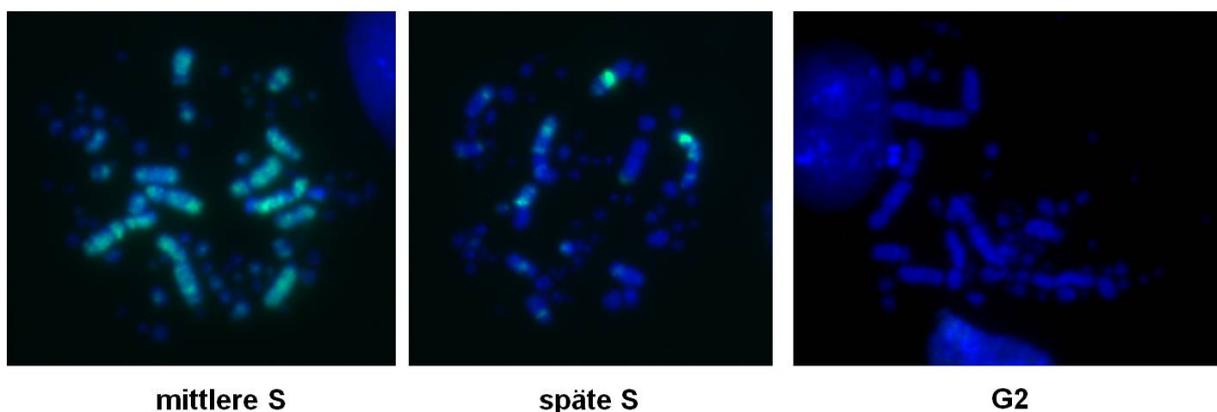


Abb. 4.15: Repräsentative Immunfluoreszenzbilder der Metaphasen der mit BrdU pulsmarkierten WT-Zellen
Die Metaphasen wurden nach Colcemid-Methode präpariert und gegen BrdU und mit DAPI gefärbt. Dargestellt sind die Metaphasen der unbestrahlten Proben, die zwischen 1 und 3 h gesammelt wurden und der mittleren, späten S- und G2-Phase bestrahlten Zellen entstammen.

4.6.1 Bedeutung von c-NHEJ und HR in der mittleren S- bzw. G2-Phase bestrahlten Zellen auf der chromosomalen Ebene

In diesem Abschnitt soll überprüft werden, welche Bedeutung das c-NHEJ und die HR bei der Reparatur auf chromosomaler Ebene haben. Die Abb. 4.16 veranschaulicht die Ergebnisse der Chromosomenbrüche in den unbestrahlten und bestrahlten Zellen, welche durch die BrdU-Markierung als in der S-Phase oder in der G2-Phase markierte Zellen identifiziert werden konnten.

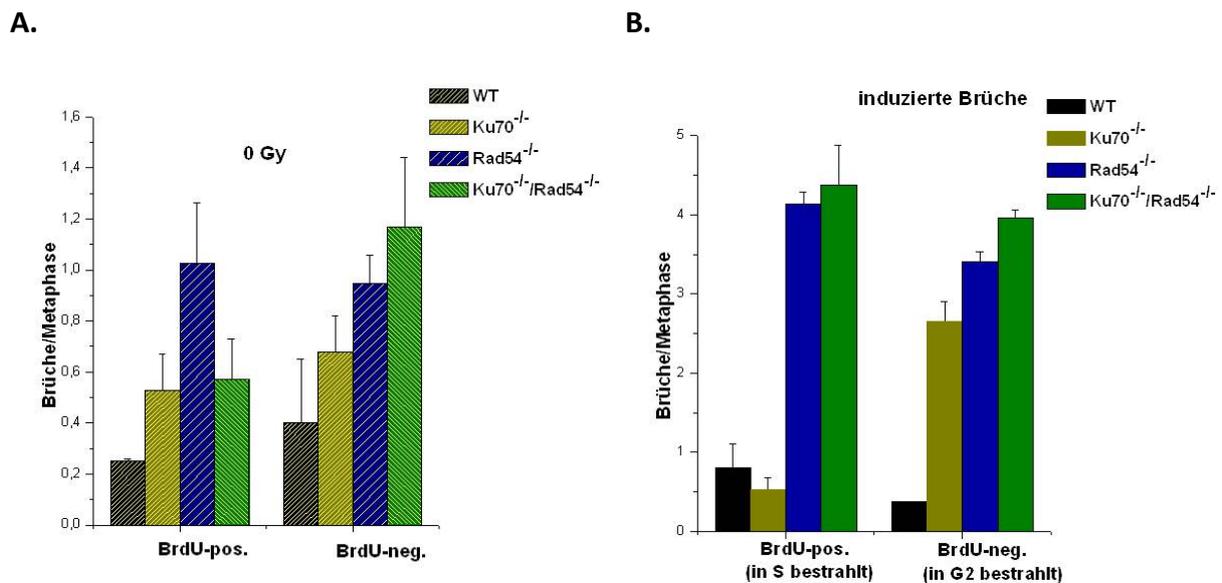


Abb. 4.16: Chromosomenbrüche, die in den BrdU-positiven bzw. -negativen Metaphasen analysiert wurden
Die exponentiell wachsenden Zellen wurden mit BrdU pulsmarkiert und mit 1 Gy bestrahlt bzw. unbestrahlt belassen. Metaphasen der unbestrahlten Zellen wurden mit Colcemid zwischen 1-3 h, die Metaphasen der bestrahlten Zellen wurden entsprechend zwischen 2-4 h gesammelt. **A.** Aufgetragen ist die Anzahl der spontanen und **B.** mit 1 Gy induzierten Chromosomenbrüche in WT-Zellen und Reparaturmutanten. Balken sind die Mittelwerte aus 2-3 unabhängigen Experimenten. Fehlerindikatoren sind die Standardfehler zwischen diesen Mittelwerten.

Die Werte in den unbestrahlten Proben lagen bei 0,25-0,56 Brüche/BrdU-positive und bei 0,4-1,2 Brüche/BrdU-negative Metaphasen (Abb. 4.16, A). Die Analyse der BrdU-positiven Metaphasen und damit der in der mittleren S-Phase bestrahlten Zellen zeigte durchschnittlich 0,8 Brüche im WT und ca. 0,5 Brüche/Metaphase in der Ku70^{-/-}-Mutante. Dagegen wiesen die BrdU-positiven Metaphasen der Rad54^{-/-}-Mutante sowie der Doppelmutante einen massiven Reparaturdefekt von jeweils 4 unreparierten Brüchen pro Metaphase auf (Abb. 4.16, B; BrdU-pos.). Das bedeutete, dass die in der mittleren S-Phase bestrahlten Zellen nur auf die Beteiligung von Rad54 für die Reparatur angewiesen sind. Bei Abwesenheit von Ku70 war eine marginal verbesserte Reparaturrate im Vergleich zum WT zu beobachten.

In den BrdU-negativen Metaphasen und damit in der G2-Phase bestrahlten Zellen zeigte der WT 0,8 Brüche pro analysierte Metaphase. In der Ku70^{-/-}-Mutante wurden dagegen ca. 3 Brüche/Metaphase detektiert. Auch in der Rad54^{-/-}-Mutante wurde eine erhöhte Anzahl an unreparierten Brüchen festgestellt, die bei ca. 3,4 Brüche/Metaphase lag. Die Doppelmutante wies einen Reparaturdefekt auf. Die Anzahl betrug ca. 4 Brüche/Metaphase (Abb. 4.16, B; BrdU-neg.).

Im Vergleich zu in der mittleren S-Phase bestrahlten Zellen, die nur HR für die DSB-Reparatur nutzen, konnte für die in der G2-Phase bestrahlten Zellen gezeigt werden, dass sowohl Ku70 als auch Rad54 für die Reparatur von Bedeutung sind. Somit wurden die γ H2AX-Foci-Analysen mit den chromosomalen Studien im Wesentlichen bestätigt.

4.7 Direkter Vergleich zwischen der Zellzyklusphasen-abhängigen Reparatur und der entsprechenden Überlebensfähigkeit

Mithilfe der Synchronisationsmethode mit Nocodazol für 7 h zeigte sich, dass alle Zellzyklusphasen der Ku70^{-/-}-Mutante empfindlicher im Vergleich zum WT auf die Bestrahlung mit 2 Gy reagieren. Eine im Vergleich zum WT bessere Reparatur der in der mittleren S-Phase bestrahlten Zellen der Ku70^{-/-}-Mutante, die mithilfe der γ H2AX-Foci und Chromosomenbrüche gemessen wurde, konnte in diesem Experiment nicht in einer verbesserten Überlebensfähigkeit wiedergefunden werden. Besonders anzumerken ist, dass es immer noch einen gewissen Anteil an G2-Phase Zellen gab, welcher lange Zeit in der G2-Phase verblieben und nicht mehr herausgelaufen ist. Ein möglicher Grund könnte ein Effekt der langen Inkubationszeit mit Nocodazol sein, welcher in den G2-Phase Zellen ein hohes Maß an DSBs erzeugt und somit zu einem lang anhaltenden Arrest in der G2-Phase führt. Aufgrund dieser massiven DSB-Induktion in G2-Phase Zellen durch Nocodazol-Behandlung konnten keine Reparaturstudien durchgeführt werden, so dass diese Methode keinen Aufschluss über einen direkten Vergleich zwischen Reparatur und der Überlebensfähigkeit gab. Um das Phänomen der Ku70^{-/-}-Mutante genauer charakterisieren zu können, wurde nach einer alternativen Methode gesucht, die keine zusätzlichen DSBs in den Zellen induziert und mit deren Hilfe sowohl Reparatur als auch Überleben im selben Experiment gemessen werden können.

4.7.1 Etablierung der Synchronisation mit Hilfe der Methode der Elutriation

Eine weitaus schonendere Methode die Zellen in einer definierten Zellzyklusphase anzureichern, ist die Methode der Elutriation (Banfalvi, 2008). Dabei werden die Zellen abhängig

von ihrer Größe und ihrem spezifischen Sedimentationskoeffizienten, nach Zellzyklusphasen in einer Elutriationskammer einer Ultrazentrifuge getrennt, ohne dass negative Auswirkungen auf die Vitalität und Proliferation der Zellen entstehen. Diese Methode ermöglichte eine Messung der Reparatur und der Überlebensfähigkeit in einem experimentellen Ansatz, um einen direkten Vergleich zwischen beiden Prozessen herzustellen.

Die Experimente mittels Elutriation wurden in der medizinischen Strahlenbiologie der Uniklinik Essen im Labor von Herrn Prof. Dr. Iliakis durchgeführt. Im Vergleich zu der Nocodazol-basierten Synchronisationsmethode, bei der sich die Zellen am G2/M-Übergang ansammeln, wurden die Zellen mithilfe der Elutriation als ein Gemisch aus der späten S- und G2-Phase angereichert. Eine reine G2-Phase Population war nicht möglich. Der Grund hierfür war eine für die späten S- und G2-Phase Zellen ähnliche Größenverteilung der Zelldurchmesser, um 10 μm . Um den Ablauf der Elutriation zu kontrollieren, wurden auch andere Populationen elutriert. Diese wurden jedoch für weitere Versuche nicht verwendet. In der Abb. 4.17 ist das Ergebnis einer repräsentativen Elutriation mit WT und mit der $\text{Ku70}^{-/-}$ -Mutante als Abfolge der gesammelten Fraktionen dargestellt. Die Histogramme sind Zellzyklusverteilungen, die mittels Durchflusszytometer gemessen wurden.

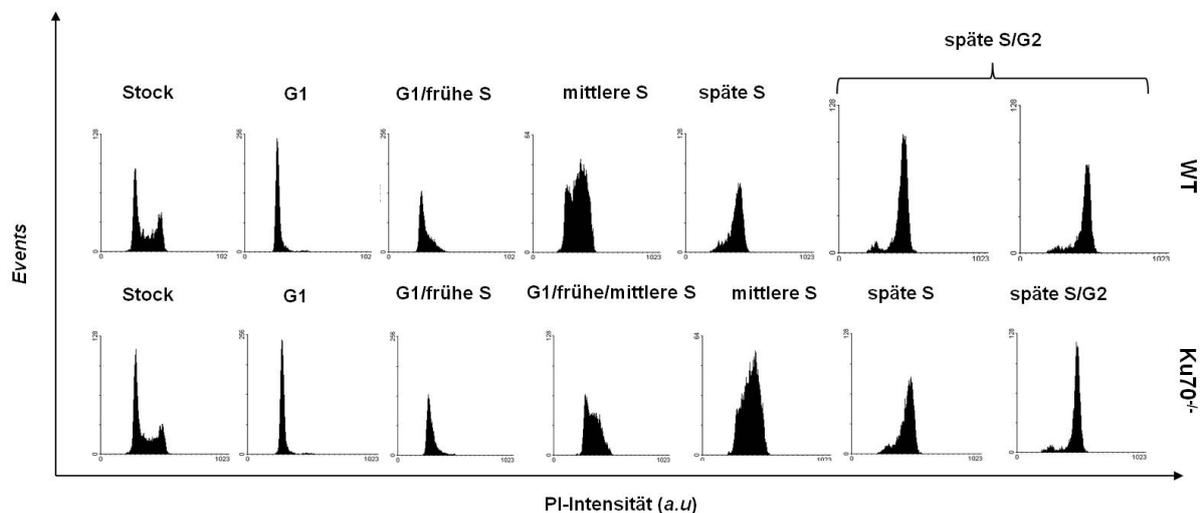


Abb. 4.17: Fraktionen, die während der Elutriation des WT und der $\text{Ku70}^{-/-}$ -Mutante gesammelt wurden

Exponentielle Kultur wurde in die Elutriationskammer eingeführt. Dargestellt sind Fraktionen, die während der Elutriation gesammelt wurden; **WT** (obere Reihe): G1: 2800 rpm, 9,2 μm ; G1/frühe S: 2600 rpm, 9,6 μm ; mittlere S: 2500 rpm, 9,9 μm ; späte S: 2400 rpm, 10,4 μm ; späte S/G2: 2300 rpm, 10,8 μm ; **$\text{Ku70}^{-/-}$ -Mutante** (untere Reihe): G1: 2800 rpm, 8,9 μm ; G1/frühe S: 2600 rpm, 9,2 μm ; G1/frühe/mittlere S: 2500 rpm, 9,5 μm ; mittlere S: 2400 rpm, 9,4 μm ; späte S: 2300 rpm, 10,2 μm ; späte S/G2: 2200 rpm, 10,5 μm . Zellzyklusverteilungen der angegebenen Fraktionen sind als Histogramme in einem 2D-Koordinatensystem dargestellt, wobei die PI-Intensität (X-Achse) gegen die Anzahl der Zellen (*Events*) (Y-Achse) aufgetragen ist.

Für die weitere Vorgehensweise wurden Fraktionen der späten S/G2 ausgewählt. Diese Fraktion wurde anschließend wieder in Kultur genommen. In einem Vorexperiment wurden die

Zellzyklusverteilungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Elutriation mittels Durchflusszytometer bestimmt. Es zeigte sich ein asynchrones Verhalten der Zellen, was damit erklärt werden kann, dass die späten S/G2-Zellen nicht simultan in die Mitose progressierten und nicht alle Zellen sich während der Mitose gleichzeitig geteilt haben. Für eine Verbesserung der Synchronität der Zellen durch den Zellzyklus hat sich eine Nachsynchronisierung mit einer niedrigen Dosis Nocodazol von 25 ng/ml für 2 h als geeignet herausgestellt. Es wurde erwartet, dass diese geringe Nocodazol-Konzentration die Zellen am G2/M-Übergang anhält, jedoch die G2-Phase Zellen nicht mehr schädigt. Die Effizienz der Synchronisation wurde nach jeder Elutriation und Nachsynchronisation mit Nocodazol mittels Durchflusszytometrie überprüft. Die Zellen wurden 20 Min vor Ablauf der jeweiligen Erntezeit mit BrdU pulsmarkiert. Nach der Fixierung und Immunfärbung sowie der Gegenfärbung mit PI wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Bestimmung der Anteile der jeweiligen Zellzyklusphasen erfolgte am BrdU-Plot (hier nicht dargestellt). In der Abb. 4.18 wird eine repräsentative Messung von WT-Zellen und der $Ku70^{-/-}$ -Mutante nach dem Vorgang der Elutriation und der Nachsynchronisation gezeigt.

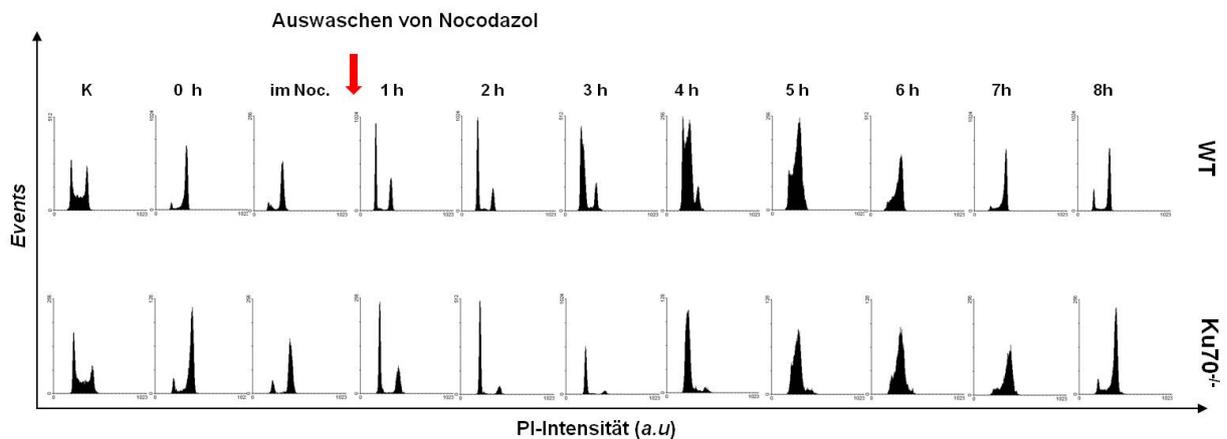


Abb. 4.18: Synchronität der Zellen nach Elutriation in später S/G2 und nach der 2-stündigen Nachsynchronisation mit Nocodazol

Dargestellt sind die Zellzyklusverteilungen eines repräsentativen Experimentes mit WT (obere Reihe) und mit der $Ku70^{-/-}$ -Mutante (untere Reihe). Die Zellen wurden in der späten S/G2-Phase mithilfe der Elutriation angereichert (Material und Methoden). Die Fraktionen der späten S/G2-Zellen wurden mit 25 ng/ml Nocodazol für 2 h am G2/M-Übergang arretiert. Nach Auswaschen von Nocodazol wurden die Zellen in den Zellzyklus entlassen. 20 Min vor Ablauf der angegebenen Zeit wurden die Zellen mit BrdU pulsmarkiert. Nach der Fixierung und der BrdU-PI-Färbung wurden die Proben im Durchflusszytometer FC500 gemessen. Die Abbildungen sind Histogramme in einem 2D-Koordinatenkreuz. Die PI-Intensität (X-Achse) ist gegen die Anzahl der Zellen (Y-Achse) aufgetragen. Die Verteilungen geben den aktuellen Zellzyklusstatus an.

Die elutrierten und nachsynchronisierten WT-Zellen als auch die Zellen der Mutante zyklieren synchron durch alle Zellzyklusphasen. Eine Stunde nachdem Nocodazol ausgewaschen wurde, war die Mehrheit der Zellen sowohl im WT als auch in der $Ku70^{-/-}$ -Mutante in

G1. In der frühen S-Phase waren die ersten Zellen nach 2 h, die meisten jedoch nach 3 h. Nach 4 h konnte ein geringer Anteil an mittleren S-Phase Zellen detektiert werden. Die Majorität der mittleren S-Phase wurde nach 5 h beobachtet. Zwischen 6-7 h wurden die Zellen in später S/G2-Phase detektiert. Nach 8 h haben die beiden Zelllinien den Zellzyklus abgeschlossen, was an einem erhöhten Anteil an G1-Phase Zellen erkennbar war.

4.7.2 Zellzyklusphasen-abhängige Messungen des Überlebens und der Reparatur nach Synchronisation mit Hilfe der Elutriation

Nachdem die Synchronisationsmethode mittels Elutriation in den WT-Zellen und der Ku70^{-/-}-Mutante etabliert wurde, wurden ausgehend von einer definierten Anzahl an synchronisierten Zellen stundenweise nach der Synchronisation die Überlebensfähigkeit, die Reparatur und die Zellzyklusverteilung gemessen. Anschließend wurde eine Korrelation zwischen Zellzyklusphasen-spezifischer Überlebensfähigkeit und der entsprechenden Reparaturkapazität in dieser Phase hergestellt. In der Abbildung 4.19 sind die Überlebensmessung nach 1 Gy und das residuale DSB-Niveau 4 bzw. 24 h nach Bestrahlung mit 1 Gy dargestellt.

Betrachtet man die Ergebnisse der γ H2AX-Analyse (Abb. 4.19, A), so wird ersichtlich, dass die Verhältnisse zwischen WT-Zellen und der Ku70^{-/-}-Mutante in verschiedenen Zellzyklusphasen nach 4 h und auch nach 24 h Reparaturzeit vergleichbar sind. In allen Zellzyklusphasen bis auf die mittlere S- (5 h) und die späte S/G2-Phase (6-7 h) wies die Ku70^{-/-}-Mutante beträchtliche Reparaturdefekte gegenüber dem WT auf. Dagegen hatte die Ku70^{-/-}-Mutante nach Bestrahlung in der mittleren S-Phase und am Übergang zwischen der späten S und der G2-Phase einen Reparaturvorteil. Die Ergebnisse des dazu parallel durchgeführten Überlebens-experiments zeigten ein zum Teil von der Reparatur abweichendes Verhalten (Abb. 4.19, B). Der Verlauf der Überlebenskurven ähnelt im Wesentlichen dem, der mit Nocodazol-basierter Synchronisationsmethode ermittelt wurde. Es fällt auf, dass nach der Elutriation, zum Zeitpunkt 0 h in der späten S/G2-Phase, mehr Zellen der Ku70^{-/-}-Mutante als des WT überlebten. Die Überlebensrate der Zellen, die für 2 h im Kontakt mit Nocodazol geblieben sind (im Noc.) und sich in G2/M befanden, war beim WT höher als bei der Ku70^{-/-}-Mutante. Nach der Nachsynchronisation blieb das Überleben des WT relativ unverändert. In der Ku70^{-/-}-Mutante waren dagegen gravierende Änderungen zu verzeichnen. Zwischen 1 und 3 h nahm die Überlebensrate der Mutante drastisch ab. Dieses war das Zeitintervall, in welchem sich die Zellen mehrheitlich in der G1- und in der frühen S-Phase aufhielten. Ab dem Zeitpunkt 5 h stieg die

Überlebenskurve der $Ku70^{-/-}$ -Mutante bis zum Zeitpunkt 7 h wieder an. Nach 5 h wurde die Überlebensfähigkeit der in der mittleren S-Phase bestrahlten Zellen analysiert. Es haben wesentlich weniger Zellen der Mutante im Vergleich zum WT überlebt. Nach 7 h, als die Majorität der Zellen sich in der späten S/G2-Phase befand, lag die Überlebensrate der Mutante immer noch niedriger als im WT. Mit dem Beginn des nächsten Zellzyklus nach 8 h änderte sich die Überlebensrate nicht mehr.

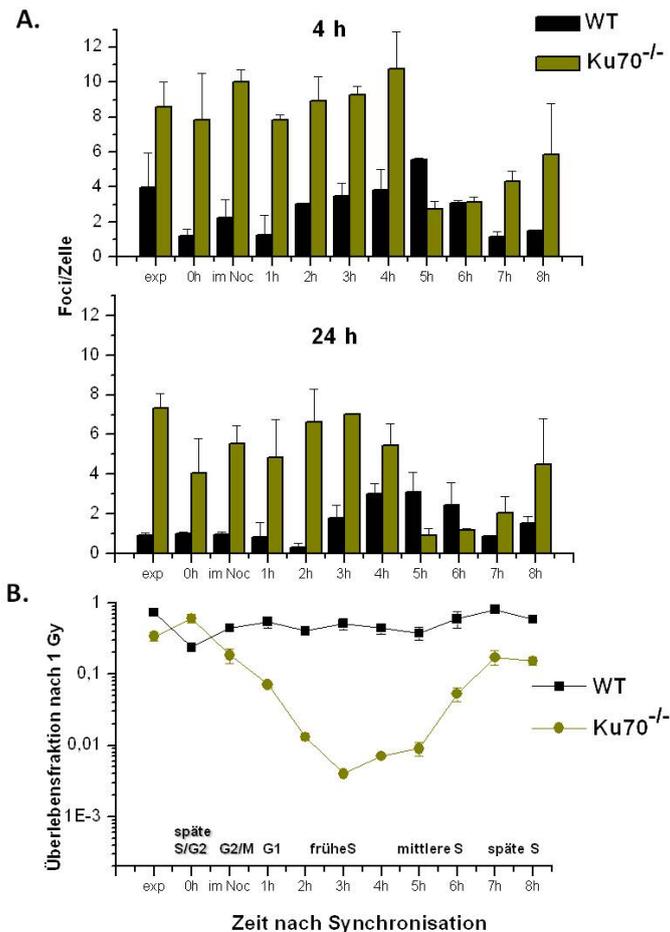


Abb. 4.19: Vergleich der Zellzyklusphasen-spezifischen Überlebensfähigkeit mit der entsprechenden Reparatur 4 und 24 h nach IR

WT und $Ku70^{-/-}$ -Mutante wurden mittels der Elutriation in spät S/G2 angereichert. Anschließend wurden die späten S/G2-Zellen in G2/M mit 25 ng/ml Nocodazol nachsynchronisiert. Nach dem Auswaschen von Nocodazol wurden die Zellen in den Zellzyklus entlassen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden entsprechende Proben aufgearbeitet. Für die γ H2AX-Analyse wurden die Zellen für die Zeitpunkte 4 und 24 h sowie in bestrahlte (1Gy) und unbestrahlte (0Gy) Proben aufgeteilt. Für die Überlebensmessung wurde eine definierte Anzahl der Zellen ausgesät und mit 1Gy bestrahlt oder unbestrahlt belassen. **A. oben:** Auftragung der γ H2AX-Foci gegen die Zeit nach der Nachsynchronisation und 4 h **unten:** 24 h nach Bestrahlung mit 1 Gy. **B.** Die Zellzyklusphasen-abh. Überlebensfähigkeit der WT und der $Ku70^{-/-}$ -Zellen nach 1 Gy; K: Überlebensfähigkeit der exponentiellen Zellen; 0h: Proben direkt nach der Elutriation; in Noc.=Probe, die 2 h mit Nocodazol inkubiert wurde. Foci-Werte der dazugehörigen unbestrahlten Proben im WT bewegten sich im Bereich von $1,8 \pm 0,3$ bis $7,1 \pm 1,7$ (4 h) und $3,5 \pm 1,4$ bis $5,5 \pm 1,8$ (24 h). Bei der $Ku70^{-/-}$ -Mutante bewegten sich die Kontrollwerte im Bereich von $4,8 \pm 1,6$ bis $8 \pm 0,6$ (4 h) und $5 \pm 1,5$ bis $6,8 \pm 0,8$ (24 h). Die Kontrollwerte wurden von den nach Bestrahlung gemessenen Werten abgezogen. Die Balken sind Mittelwerte aus 2 unabh. Experimenten. Fehlerindikatoren repräsentieren die Standardfehler zwischen diesen Experimenten.

Als Zusammenfassung kann an dieser Stelle festgehalten werden, dass in den Zellzyklusphasen, G1 und frühe S-Phase die Reparaturkinetik mit der Überlebensfähigkeit korreliert. In diesen Zellzyklusphasen hat ein Reparaturdefekt der Ku70^{-/-}-Mutante eine schlechte Überlebensfähigkeit zur Folge. Für die Zellzyklusphasen der mittleren S und späten S/G2-Phase ist eine Antikorrelation zu erkennen. Die Zellen der Ku70^{-/-}-Mutante, die in der mittleren S-Phase bestrahlt wurden, zeigten eine schlechtere Überlebensfähigkeit als der WT, obwohl sie bis zu 24 h nach Bestrahlung ein im Vergleich zum WT besseres Reparaturverhalten aufwiesen. Dagegen zeigten die Ku70^{-/-}-Zellen, welche direkt nach Elutriation in der späten S/G2-Phase bestrahlt wurden, trotz des ausgeprägten Reparaturdefektes eine gegenüber zum WT verbesserte Überlebensfähigkeit.

4.8 Funktionen von Artemis während der DSB-Reparatur

Artemis ist eine Nuclease, welche sich im Säugetiersystem an der Reparatur der strahleninduzierten DSBs beteiligt. Für die DT40-Zellen ist die Zellzyklusphasen-abhängige Beteiligung von Artemis in der DSB-Reparatur nur wenig beschrieben. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen mithilfe von Artemis-Mutanten geben die ersten Einblicke über Artemis als Reparaturfaktor im DT40-Zellsystem.

4.8.1 Überlebensexperimente mit exponentiell wachsenden Artemis-Mutanten

Aus den Ergebnissen im Säugerzellsystem ist bekannt, dass das Protein Artemis eine sehr wichtige Rolle in der Strahlenantwort hat. Die Zellen, die Mutationen im *artemis*-Gen tragen oder Artemis-defizient sind, sind gegenüber ionisierender Strahlung moderat empfindlich (Wang *et al.*, 2005b). Die primäre Funktion von Artemis wird bei der Ausführung der V(D)J-Rekombination zugeordnet. Da das c-NHEJ die dabei entstandenen DSBs repariert, gilt dieses Protein als c-NHEJ-Faktor (Moshous D. *et al.*, 2001). Eine weitere Studie beschreibt ebenso die Rolle von Artemis während der HR (Beucher *et al.*, 2009). Im DT40-Zellsystem ist die Funktion von Artemis wenig untersucht. Es gibt Hinweise, dass die Artemis-defizienten Zellen eine moderate Strahlenempfindlichkeit aufweisen (Iwabuchi *et al.*, 2006). Des Weiteren wurde eine Dreifach-Mutante SNM1 beschrieben, bei der die Komponenten A, B und C deletiert wurden. Die Komponenten A und B sind vor allem bei der ICL-Reparatur (*inter strand cross link repair*) beteiligt, während die Komponente C (auch Artemis genannt) in die Reparatur strahleninduzierter Schäden involviert ist (Ishiai *et al.*, 2004). Diese Erkenntnisse sollten nun in dieser Arbeit zunächst im Überlebensexperiment überprüft und später mit

Reparaturstudien verglichen werden. Hierfür wurden exponentiell wachsende Zellen des WT, der $Art^{-/-}$, $SNM1A/B/C^{-/-}$, $Ku70^{-}/Art^{-/}$ sowie $Rad54^{-}/Art^{-/}$ -Mutanten hinsichtlich ihrer klonogenen Überlebensfähigkeit untersucht. In der Abb. 4.20 sind die Überlebensfraktionen (ÜF) halb-logarithmisch gegen die Bestrahlungsdosis aufgetragen. Es zeigt sich, dass alle untersuchten Artemis-Mutanten eine schlechtere Überlebensfähigkeit als der WT aufweisen. Dabei stellt die $SNM1A/B/C^{-/-}$ -Dreifachmutante die strahlenempfindlichste Zelllinie dar. Die Überlebenskurve der $Art^{-/-}$ -Einzelmutante verläuft oberhalb der Überlebenskurve der Artemis-Doppelmutanten, bei denen neben Artemis Ku70 bzw. Rad54 fehlt.

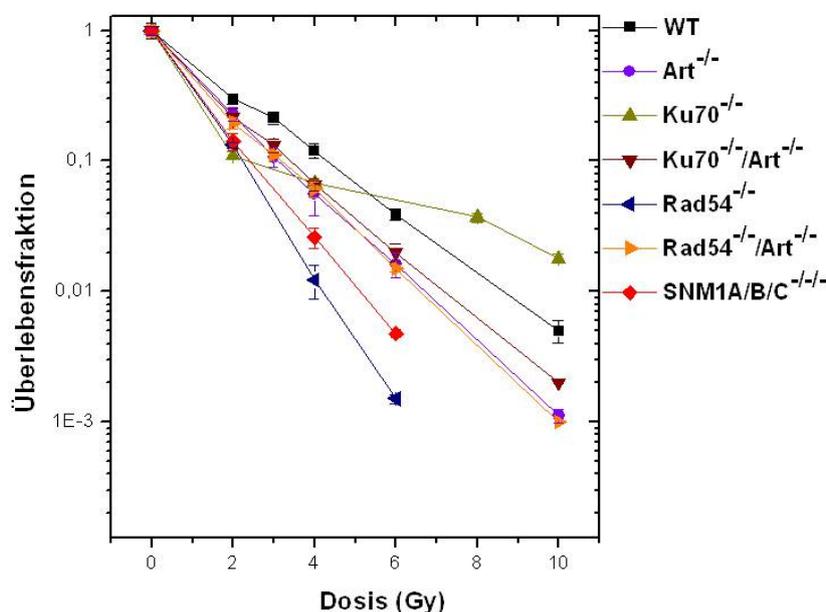


Abb. 4.20: Überlebensmessung der exponentiell wachsenden Artemis-Mutanten zusammen mit dem der c-NHEJ- und der HR-Mutanten

Asynchron wachsende Zellen des WT, der $Art^{-/-}$, $SNM1A/B/C^{-/-}$, $Ku70^{-}/Art^{-/}$ sowie der $Rad54^{-}/Art^{-/}$ -Mutanten wurden in einer definierten Anzahl im Agarose-haltigen Kulturmedium ausgesät und mit 2, 3, 4, 6 und 10 Gy bestrahlt. Die Inkubationsdauer betrug 7-10 Tage bis sich erkennbare Kolonien gebildet haben. Diese wurden quantifiziert. Daraus wurden anschließend PE- sowie ÜF-Werte berechnet. Die Überlebenskurven der $Ku70^{-/-}$ und der $Rad54^{-/-}$ -Mutanten wurden ebenfalls eingetragen. Die Fehlerindikatoren sind Standardfehler aus mind. 3 unabhängigen Experimenten.

Um die Funktion von Artemis noch genauer zu beschreiben und in den Kontext mit den c-NHEJ- und HR-Reparaturwegen einzubeziehen, wurden die Überlebenskurven der exponentiell wachsenden Zelllinien von $Ku70^{-/-}$ und $Rad54^{-/-}$ in den Graphen Abb. 4.20 zusammengetragen. Die Überlebenskurve der $Rad54^{-}/Art^{-/}$ (Abb. 4.20, orange Kurve) verläuft deutlich oberhalb der Überlebenskurve von $Rad54^{-/-}$ -Zellen (Abb.4.20, blaue Kurve). Dieser Effekt wird bei der $Ku70^{-}/Art^{-/}$ -Mutante nicht beobachtet. Die Zellen der $Ku70^{-}/Art^{-/}$ -Mutante sind auf dem gesamten untersuchten Dosisbereich strahlenempfindlich (Abb. 4.20,

braune Kurve). Das biphasische Verhalten der $Ku70^{-/-}$ -Einzelmutante (Abb. 4.20, dunkelgelbe Kurve) konnte in dieser Doppelmutante nicht mehr detektiert werden. Zusammenfassend bewirkt das Fehlen von Artemis eine deutliche Verbesserung im Überleben, wenn Rad54 fehlt. Es wurde nur eine partielle Verbesserung der Überlebensfähigkeit in der $Ku70^{-/-}/Art^{-/-}$ -Mutante erreicht (bis 4 Gy). Für die Klärung der Fragen, ob es einen Zusammenhang zwischen Reparatur und Überlebensfähigkeit gibt und, um welchen Reparaturweg es sich hier handeln könnte, wurden Zellzyklusphasen-abhängige Reparaturstudien auf der Ebene der γ H2AX-Foci und der Chromosomen durchgeführt.

4.8.2 Zellzyklusphasen-abhängige γ H2AX-Foci Analysen in den Artemis-Mutanten

Im nächsten Schritt sollten γ H2AX-Foci-Analysen durchgeführt werden, welche das Protein Artemis in die Zellzyklusphase-abhängige DSB-Reparatur einordnen. Des Weiteren sollten die ersten Erkenntnisse über das Wechselspiel unter Einbeziehung des Proteins Artemis in die klassischen Reparaturwege c-NHEJ und HR gewonnen werden.

4.8.3 Analyse der DSB-Reparatur in der G1- und der G2-Phase bestrahlten Artemis-Mutanten

In der Abb. 4.21 ist die EdU-basierte Analyse der in der G1-Phase bestrahlten Zellen der Artemis-Mutanten sowie der c-NHEJ- und HR-Mutante im Vergleich zu WT-Zellen unter Nocodazol-Bedingungen dargestellt. Die γ H2AX-Foci-Analyse ergab, dass alle untersuchten Artemis-Mutanten einen Reparaturdefekt nach Bestrahlung in der G1-Phase aufweisen. Dieser Reparaturdefekt bildet sich bereits nach der ersten Stunde aus und ist nach 4 h bei allen Zelllinien vergleichbar. Nach 4 h Reparaturzeit hat der WT 87% der induzierten DSBs repariert (Abb. 4.21, schwarze Balken). Die Artemis-Einzelmutante weist zu diesem Zeitpunkt immer noch 49% der unreparierten DSBs auf (Abb. 4.21, violette Balken). Die Dreifachmutante, $SNM1A/B/C^{-/-}$, hat einen mit der $Art^{-/-}$ -Mutante vergleichbaren Wert an residualen Schäden, der bei ca. 45% liegt (Abb.4.21, rote Balken). Die Artemis-Doppelmutanten $Ku70^{-/-}/Art^{-/-}$ sowie $Rad54^{-/-}/Art^{-/-}$ weisen 39-40% der induzierten DSBs auf, die noch unrepariert verblieben sind (Abb. 4.21, braune und orange Balken). Dies ist der erste Hinweis darauf, dass Artemis bei der Reparatur der in der G1-Phase strahleninduzierten DSBs im DT40-Zellsystem beteiligt ist. Das überraschende Ergebnis ist hier die Reparatur der $Ku70^{-/-}/Art^{-/-}$ -Mutante. In dieser Zelllinie tritt der Reparaturdefekt der $Ku70^{-/-}$ -Mutante nicht mehr auf. Vielmehr weisen die Zellen der $Ku70^{-/-}/Art^{-/-}$ -Mutante eine mit $Art^{-/-}$ vergleichbare An-

zahl an unreparierten DSBs auf. Die $Ku70^{-/-}$ -Mutante scheint von der Abwesenheit von Artemis während der Reparatur zu profitieren. Die Wegnahme von Artemis in der $Rad54^{-/-}$ -Mutante führt erst nach 4 h zu einem Artemis-spezifischen Reparaturdefekt.

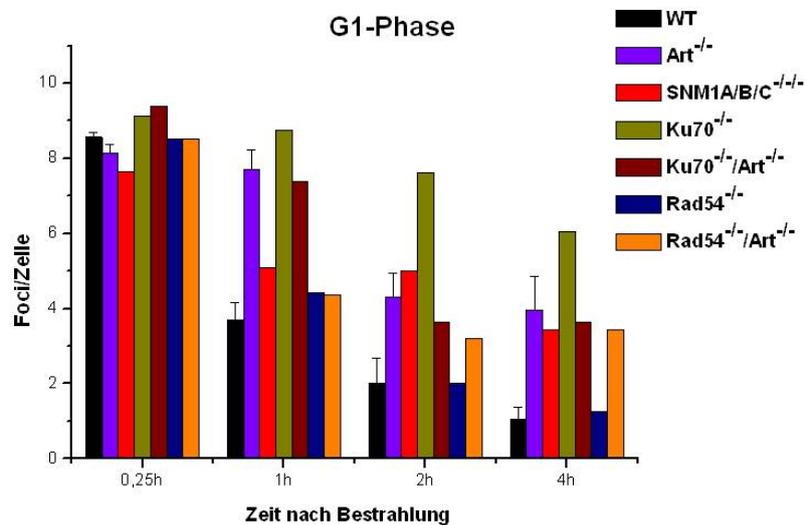


Abb. 4.21: Analyse der DSB-Reparatur in G1 bestrahlten WT- und Artemis-defizienten Zellen zusammen mit der c-NHEJ und der HR-Mutante

Die exponentiell wachsenden Zellen wurden mit EdU pulsmarkiert. Nach der Pulsmarkierung wurden sie mit 100 ng/ml Nocodazol versetzt. Anschließend wurden die Zellen bestrahlt bzw. unbestrahlt belassen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden bestrahlte und unbestrahlte Proben fixiert und gegen γ H2AX/EdU und mit DAPI gefärbt. Die Präparate wurden eingescannt, und die Analyse erfolgte in den EdU-negativen G1-Phase Zellen. Aufgetragen ist die Anzahl der induzierten γ H2AX-Foci gegen die Zeit nach Bestrahlung. Die Balken sind Mittelwerte der mind. 3 durchgeführten Experimente beim WT und bei der $Art^{-/-}$ -Mutante. Bei den $SNM1A/B/C^{-/-}$, $Ku70^{-/-}/Art^{-/-}$, $Ku70^{-/-}$, $Rad54^{-/-}$ sowie $Rad54^{-/-}/Art^{-/-}$ ist jeweils nur ein Experiment gezeigt. Die Fehlerindikatoren sind die Standardfehler zwischen den Mittelwerten. Die über die Zeit gemittelten Kontrollwerte betragen im WT: $1 \pm 0,2$; in der $Art^{-/-}$ -Mutante: $1,1 \pm 0,1$, in der $SNM1A/B/C^{-/-}$ -Mutante: $1,6 \pm 0,4$; in der $Ku70^{-/-}$ -Mutante: $1,9 \pm 0,3$; in der $Ku70^{-/-}/Art^{-/-}$: $1,7 \pm 0,3$ in der $Rad54^{-/-}$ -Mutante: $1,2 \pm 0,01$; in der $Rad54^{-/-}/Art^{-/-}$ -Mutante: $1,3 \pm 0,3$.

Um den Beitrag von Artemis zur DSB-Reparatur nach Bestrahlung in der G2-Phase zu bestimmen, wurden entsprechende γ H2AX-Kinetiken der in der G2-Phase bestrahlten Zellen erstellt (Abb. 4.22). Am Verlauf der Kinetik vom WT und der Artemis-Einzelmutante findet man bis 2 h noch keine auffälligen Unterschiede. Erst 4 h nach Bestrahlung ist eine signifikante Erhöhung der Foci-Zahl in der Artemis-Mutante zu verzeichnen. In der $SNM1A/B/C^{-/-}$ -Mutante bildet sich bereits in den ersten Stunden ein Reparaturdefekt aus, welcher bis nach 4 h bestehen bleibt und höher liegt als der der Artemis ($SNM1C$)-Einzelmutante. Die Anzahl der γ H2AX-Foci der $Ku70^{-/-}/Art^{-/-}$ - sowie $Rad54^{-/-}/Art^{-/-}$ -Mutanten liegen deutlich niedriger als beim WT. Dieser Effekt ist bereits nach 2 h detektierbar und verbleibt bis zum Zeitpunkt 4 h nach Bestrahlung.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Artemis für die Reparatur der in G2 strahleninduzierten DSBs benötigt wird. Die SNM1A und B sind ebenfalls daran beteiligt. Die Reparaturdefekte der Ku70^{-/-}- und Rad54^{-/-}-Einzelmutanten werden auch in dieser Zellzyklusphase nach Artemis-Deletion aufgehoben.

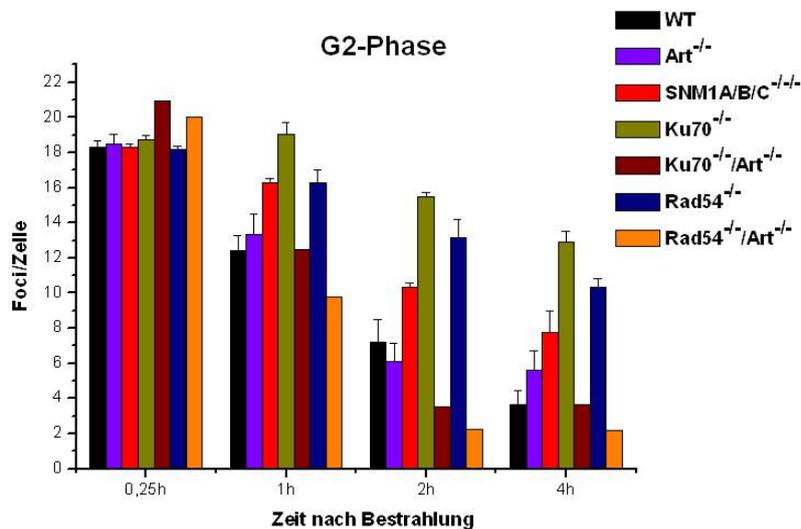


Abb. 4.22: Analyse der DSB-Reparatur in G2 bestrahlten WT- und Artemis-defizienten Zellen zusammen mit der c-NHEJ- und der HR-Mutante

Die exponentiell wachsenden Zellen wurden mit EdU pulsmarkiert. Anschließend wurden die Zellen bestrahlt bzw. unbestrahlt belassen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden bestrahlte und unbestrahlte Proben fixiert und gegen γ H2AX/EdU sowie mit DAPI gefärbt. Die Präparate wurden eingescannt, und die Analyse erfolgte in den EdU-negativen G2-Phase Zellen. Aufgetragen ist die Anzahl der induzierten γ H2AX-Foci gegen die Zeit nach Bestrahlung. Die Balken sind Mittelwerte der mind. 3 durchgeführten Experimente beim WT sowie bei der Art^{-/-}, SNM1A/B/C^{-/-}, c-NHEJ- und HR-Mutante. Bei den Ku70^{-/-}/Art^{-/-} und Rad54^{-/-}/Art^{-/-} ist jeweils nur ein Experiment gezeigt. Die Fehlerindikatoren sind die Standardfehler zwischen den Mittelwerten. Die über die Zeit gemittelten Kontrollwerte betragen im WT: $3 \pm 0,5$; in der Art^{-/-}-Mutante: $3,1 \pm 0,2$; in der SNM1A/B/C^{-/-}-Mutante: $5,5 \pm 0,7$; in der Ku70^{-/-}-Mutante: $6,3 \pm 2,2$; in der Ku70^{-/-}/Art^{-/-}: $4 \pm 0,4$ in der Rad54^{-/-}-Mutante: $6,5 \pm 1,9$; in der Rad54^{-/-}/Art^{-/-}-Mutante: $3,6 \pm 0,3$.

4.8.4 Analyse der DSB-Reparatur in den Artemis-Mutanten nach Bestrahlung in der S-Phase

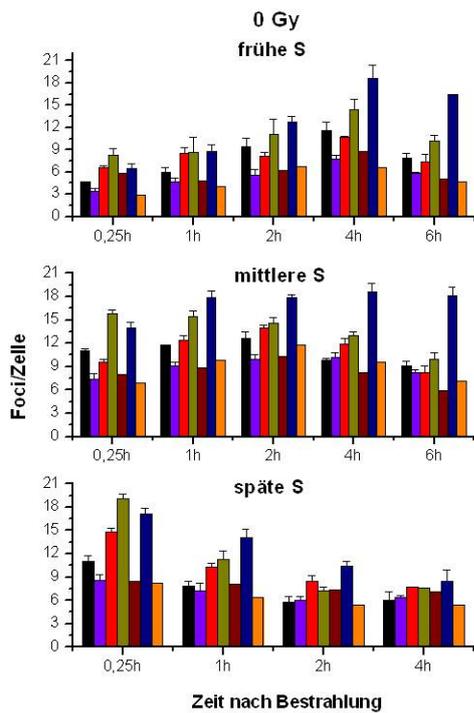
Um den Beitrag von Artemis in der S-Phase zu bestimmen, wurden analog zu den vorangegangenen Reparaturstudien mit den HR- bzw. c-NHEJ-Mutanten (Kap. 4.5) entsprechende Analysen mit Artemis-Mutanten durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen mit EdU pulsmarkiert und mit 1 Gy bestrahlt. Die Abbildung 4.23 veranschaulicht die Ergebnisse der γ H2AX-Foci-Analyse der als frühe, mittlere und späte S-Phase identifizierten Artemis-Mutanten zusammen mit c-NHEJ- und HR-defizienten Zellen im Vergleich zum WT ohne Bestrahlung (Abb. 4.23, A) und nach IR mit 1 Gy (Abb. 4.23, B.).

Aus den Studien mit HR- und c-NHEJ-Mutanten ist bekannt, dass die γ H2AX-Kinetiken der in der frühen und mittleren S-Phase bestrahlten Zellen in mehreren Phasen verlaufen. Ein solcher Verlauf beinhaltet eine Ausbildungsphase, die von einer Reparaturphase abgelöst wird. Das Auftreten einer Ausbildungsphase hängt mit der Entstehung sekundärer DSBs im Verlauf der Replikation zusammen. Für die in der späten S-Phase bestrahlten Zellen ist nur eine Reparaturphase zu beobachten.

So verlaufen γ H2AX-Kinetiken der in der frühen S-Phase bestrahlten Zellen der SNM1A/B/C^{-/-}- und Ku70⁻/Art⁻-Mutanten in vier Phasen (Abb. 4.23, B; obere Teilabbildung, rote und braune Balken). In der ersten Phase zwischen 0,25 und 1 h steigt die Anzahl der Foci an. Die zweite Phase liegt zwischen 1 und 2 h. Dort findet der Abfall statt. In der dritten Phase, zwischen 2 und 4 h steigt die Anzahl der DSBs wieder an. Schließlich kommt es zu einer Verringerung der Foci-Zahl zwischen 4 und 6 h. In den in der frühen S-Phase bestrahlten Zellen der Art⁻- und Rad54⁻/Art⁻-Mutanten findet die Reparatur bereits ab der ersten Phase (0,25-1 h) statt. Auch im Vergleich zum WT kommen im Verlauf der Kinetik dieser Mutanten keine zusätzlichen γ H2AX-Foci hinzu (Abb. 4.23; B, obere Teilabbildung, lila und orange Balken). Vergleicht man Foci-Werte aller untersuchten Zelllinien nach 6 h, so findet sich eine Artemis-Abhängigkeit bei der Reparatur strahleninduzierter DSBs in der frühen S-Phase bestrahlten Zellen. Die Komponenten A und B in der SNM1A/B/C^{-/-}-Mutante erhöhen den Reparaturdefekt von Artemis, was darauf hindeutet, dass A- und B-Proteine nicht nur die Rolle in der Reparatur von *Inter-Strand Crosslinks* teilhaben, sondern auch an der DSB-Reparatur nach IR beteiligt sind.

Die γ H2AX-Kinetiken der in der mittleren S-Phase bestrahlten Zellen verlaufen in einem biphasischen Verhalten. Die Ausbildungsphase der induzierten γ H2AX-Foci ist hier zwischen 0,25 und 1 h deutlich anzutreffen und findet in allen Zelllinien statt (Abb. 4.23, B; mittlere Teilabbildung, 0,25-1 h). In der Artemis-Einzelmutante ist dieser initialer Anstieg relativ gering (Abb. 4.23, B; mittlere Teilabbildung 0,25-1 h, lila Balken). An eine Ausbildungsphase schließt eine Reparaturphase an, die für die in der mittleren S-Phase bestrahlten Zellen nach 6 h abgeschlossen ist. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die zu Anfang der Analyse als mittlere S-Phase markierte Zellen in der späten S/G2-Phase. Dort weisen alle Artemis-Mutanten weniger γ H2AX-Foci als der WT auf.

A.



B.

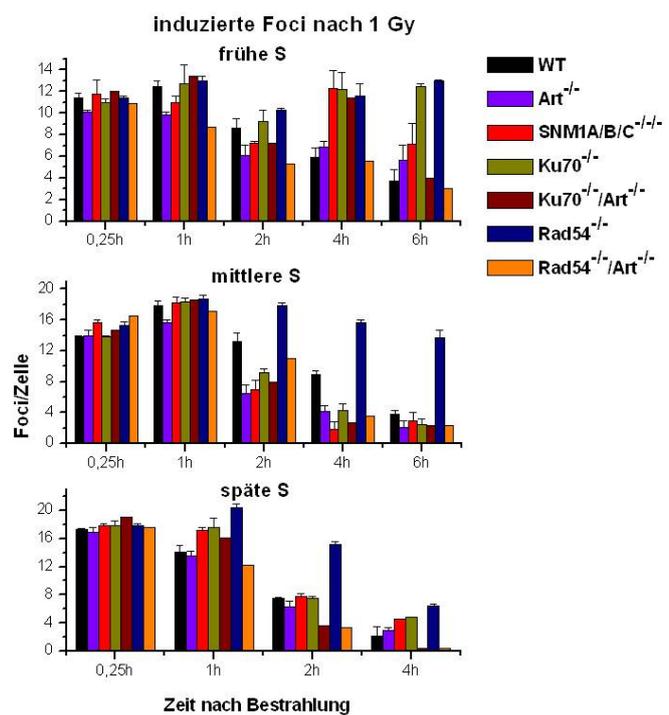


Abb. 4.23: Analyse der DSB-Reparatur in S bestrahlten WT- und Artemis-defizienten Zelllinien zusammen mit der c-NHEJ- und der HR-Mutante

Die exponentiell wachsenden Zellen wurden mit EdU pulsmarkiert. Anschließend wurden die Zellen bestrahlt bzw. unbestrahlt belassen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden bestrahlte und unbestrahlte Proben fixiert und gegen γ H2AX/EdU und mit DAPI gefärbt. Die Präparate wurden eingescannt, und die Analyse erfolgte in den EdU-positiven Zellen mit dem für die jeweilige Untergruppe der S-Phase charakteristischen Mustern. **A.** Aufgetragen ist die Anzahl der in der S-Phase spontan auftretenden γ H2AX-Foci gegen die Zeit. **B.** Auftragung der nach 1 Gy induzierten γ H2AX-Foci nach Abzug der Kontrollwerte. Die Balken sind Mittelwerte der mind. 3 durchgeführten Experimente bei WT sowie bei der $Art^{-/-}$, c-NHEJ-, HR- und $SNM1A/B/C^{-/-}$ -Mutante. Bei den $Ku70^{-/-}/Art^{-/-}$ und $Rad54^{-/-}/Art^{-/-}$ ist nur ein Experiment gezeigt. Die Fehlerindikatoren sind die Standardfehler zwischen diesen Mittelwerten.

Die in der späten S-Phase bestrahlten Zellen haben die Replikation nahezu abgeschlossen. Es gibt kaum sekundäre, Replikation-assoziierte DSBs in dieser Phase, so dass die Zellen nach Bestrahlung direkt mit der Reparatur beginnen. Im Vergleich zum WT kommt es zu den erhöhten Foci-Zahlen in den $SNM1A/B/C^{-/-}$ - und $Ku70^{-/-}/Art^{-/-}$ -Mutanten nach 1 h, die dann nur bei $SNM1A/B/C^{-/-}$ -Zellen nach 2 h sich an das Niveau des WTs angleichen und nach 4 h wieder eine Erhöhung zeigen. Die Artemis-Abhängigkeit kann erst nach 4 h detektiert werden. In den Zellen der $Ku70^{-/-}/Art^{-/-}$ - bzw. $Rad54^{-/-}/Art^{-/-}$ -Mutanten findet die Reparatur im Vergleich zum WT schneller statt (Abb. 4.23, B; untere Teilabbildung).

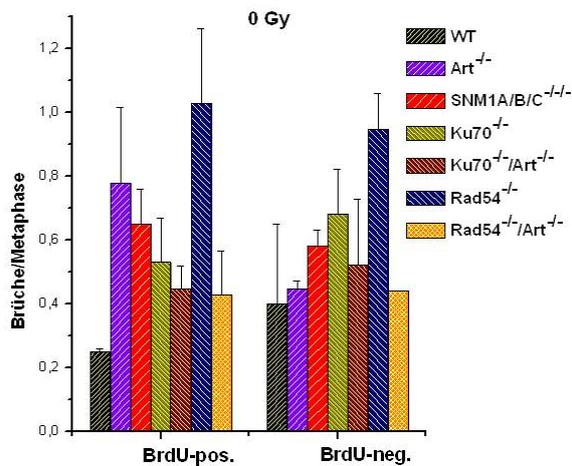
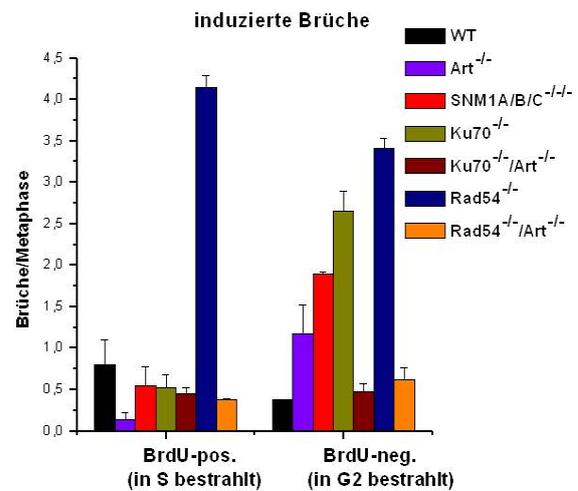
Für die Einordnung von Artemis während der S-Phase in die bereits untersuchten Reparaturwege c-NHEJ und HR konnte an den Reparaturkinetiken der $Ku70^{-/-}$ - bzw. der $Rad54^{-/-}$ - Einzelmutanten und den entsprechenden $Ku70^{-/-}/Art^{-/-}$ - und $Rad54^{-/-}/Art^{-/-}$ -Doppelmutanten

abgelesen werden, dass in der frühen S-Phase bestrahlten Zellen die Abwesenheit von Artemis in den Ku70^{-/-} und Rad54^{-/-}-Zellen ihre Reparaturdefekte aufhebt. Die Anzahl der Foci in der Ku70^{-/-}/Art^{-/-}-Mutante sinkt auf das Foci-Niveau des WT ab und diejenige der Rad54^{-/-}/Art^{-/-}-Mutanten sogar unterhalb dieses Niveaus. In der mittleren S-Phase bestrahlten Zellen hat die Abwesenheit von Artemis im Ku70-defizienten Hintergrund keinen weiteren Einfluss auf die Reparaturkinetik, dagegen geht der Reparaturdefekt der Rad54-Mutante stark zurück, wenn Artemis deletiert wird. Auch in der späten S-Phase bestrahlten Zellen hebt die Abwesenheit von Artemis die Reparaturdefekte der Rad54^{-/-}- und Ku70^{-/-}-Einzelmutanten auf.

Als vorläufige Zusammenfassung für die Funktion des Proteins Artemis allein und kombiniert mit anderen Proteinen des c-NHEJ sowie der HR bei der DSB-Reparatur durch den DT40-Zellzyklus ist, dass die Reparatur in der G1-Phase eine Artemis-Abhängigkeit aufzeigt. Nach Bestrahlung in der frühen S-Phase nimmt die Wichtigkeit von Artemis ab, bis hin zur mittleren S-Phase, wo die Reparatur komplett Artemis-unabhängig abläuft. In der späten S- und G2-Phase bestrahlten Zellen wird Artemis wieder gebraucht. Die SNM1 A- und B-Komponenten tragen zur DSB-Reparatur während der G1-, frühen, späten S- und der G2-Phasen bei. Die in der mittleren S-Phase bestrahlten Zellen scheinen SNM1 A und B nicht zu benötigen. Die Abwesenheit von Artemis in Kombination mit dem c-NHEJ-Faktor Ku70 bzw. mit dem HR-Faktor Rad54 scheint in allen Zellzyklusphasen die DSB-Reparatur zu verbessern. Die Ausnahme stellt hier die G1-Phase dar. Dort zeigt die Rad54^{-/-}/Art^{-/-}-Mutante einen Artemis-spezifischen Reparaturdefekt auf.

4.8.5 Zellzyklusphasen-abhängige chromosomale Studien in den Artemis-Mutanten nach Bestrahlung mit 1 Gy

Für die chromosomalen Studien der Artemis-Mutanten wurde ein BrdU-basierter Ansatz genutzt (Kap. 4.6). Die mit Colcemid gesammelten Metaphasen der Zellen, die in der mittleren S-Phase bestrahlt wurden, konnten so von den Metaphasen der in der G2-Phase bestrahlten Zellen unterschieden werden. Die Anzahl der spontanen und mit 1 Gy induzierten Chromosomenbrüche in den BrdU-positiven und -negativen Metaphasen sind in der Abb. 4.24 dargestellt.

A.**B.****Abb. 4.24: Chromosomenbrüche der Artemis-defizienten Zelllinien zusammen mit c-NHEJ und HR-Mutanten**

Die exponentiell wachsenden Zellen wurden mit BrdU pulsmarkiert und mit 1 Gy bestrahlt bzw. unbestrahlt belassen. Metaphasen der unbestrahlten Zellen wurden mit Colcemid zwischen 1-3 h gesammelt, die Metaphasen der bestrahlten Zellen wurden entsprechend zwischen 2-4h gesammelt. **A.** Aufgetragen ist die Anzahl der spontanen und **B.** mit 1 Gy induzierten Chromosomenbrüche in WT-Zellen und Reparaturmutanten. Balken sind die Mittelwerte aus 2-3 unabhängigen Experimenten. Fehlerindikatoren sind die Standardfehler zwischen diesen Mittelwerten.

Die Anzahl der induzierten Chromosomenbrüche in den BrdU-positiven Metaphasen der Artemis-Einzelmutante liegt niedriger als im WT. Eine ähnliche Beobachtung wurde für die BrdU-positiven Metaphasen der *SNM1A/B/C*^{-/-}, *Ku70*^{-/-}/*Art*^{-/-} sowie *Rad54*^{-/-}/*Art*^{-/-} Mutanten gemacht (Abb. 4.24, BrdU-pos.).

Die Anzahl der induzierten Brüche in den BrdU-negativen Metaphasen des WT zeigten ca. 0,3 Brüche. In der Artemis-Mutante dagegen wurde eine ca. 4-fache, in der *SNM1A/B/C*^{-/-} Mutante ca. 6-fache Erhöhung induzierter Chromosomenbrüche detektiert. In der *Ku70*^{-/-}/*Art*^{-/-} Mutante wurde eine mit WT vergleichbare Anzahl an induzierten Brüchen gezählt, wohingegen in *Rad54*^{-/-}/*Art*^{-/-} Mutante eine signifikante Erhöhung der Bruchzahl detektiert werden konnte (Abb. 4.24, BrdU-neg.). Die Aufhebung der Reparaturdefekte der *Ku70*^{-/-} und *Rad54*^{-/-} Einzelmutanten wurde auch in diesem experimentellen Ansatz beobachtet, was die γ H2AX-Foci-Analysen der in der mittleren S- und G2-Phase bestrahlten Zellen bestätigt.

5 Diskussion

5.1 Charakterisierung der klassischen Reparaturwege im DT40-Zellsystem

Als Ausgangspunkt für die vorliegenden Untersuchungen zur Charakterisierung von c-NHEJ und HR im DT40-Zellsystem diente die Studie von Takata *et al.*, 1998, anhand welcher die ersten Erkenntnisse über diese klassischen Reparaturwege in diesem Zellsystem gewonnen wurden. Anhand von Untersuchungen zur Überlebensfähigkeit nach ionisierender Strahlung mit exponentiell wachsenden Zellen wurde auch in dieser Arbeit gezeigt, dass die Doppelmutante, der die Proteine Ku70 und Rad54 fehlen, die niedrigste Überlebensrate aufweist. Die Einzelmutante mit fehlendem Rad54-Protein zeigt eine moderate Strahlenempfindlichkeit auf. In der Ku70^{-/-}-Einzelmutante trat dagegen ein biphasisches Überlebensverhalten hervor (Abb. 4.1). Anhand der Ergebnisse der Doppelmutante wird deutlich demonstriert, dass HR und c-NHEJ wichtige Reparaturmechanismen darstellen und dass deren intakte Aktivität für das Zellüberleben essentiell ist. Wenn beide Reparaturwege fehlen, kommt es zu einer synergistischen Verschlechterung der Überlebensfähigkeit, im Vergleich zu der Abwesenheit von HR bzw. c-NHEJ allein (Sonoda *et al.*, 2006).

Die Sensitivität der Rad54^{-/-}-Mutante gegenüber der Strahlung ist nicht nur für die DT40-Zellen beschrieben. In den Studien mit embryonalen Stammzellen der Maus (ES-Mauszellen) und menschlichen Nalm6-Lymphozyten wurden Rad54^{-/-}-defiziente Zellen ebenfalls als strahlenempfindlich charakterisiert (Bezzubova *et al.*, 1997; Wesoly *et al.*, 2006; Kurosawa *et al.*, 2013). Das Rad54 ist ein Motorprotein mit einer ATP-abhängigen Helikase-Aktivität und hat eine unterstützende Funktion während der Homologiesuche in der HR. Es verhilft unter anderem dem Rad51-Nucleofilament bei der Ausbildung von D-Loop-Strukturen. Im Vergleich zu Rad51, welches eine essentielle Funktion in der HR ausübt, spielt Rad54 dort eine weniger bedeutende Rolle. Während Rad51-defiziente Zellen nach IR Chromosomenbrüche akkumulieren und schließlich absterben, sind Rad54-defiziente Zellen weniger strahlenempfindlich (Bezzubova *et al.*, 1997; Essers *et al.*, 1997; Sonoda *et al.*, 1998;). Dieses könnte damit erklärt werden, dass in Zellen Rad54 Homologe vorhanden sind, welche die fehlende Funktion von Rad54 ersetzen können (Bezzubova *et al.*, 1997).

Das beobachtete biphasische Verhalten der Ku70^{-/-}-Mutante kann damit erklärt werden, dass es sich um zwei Subpopulationen handelt, die zu diesem differentiellen Überleben beitragen. Bei der sensitiven Subpopulation handelt es sich um die Zellzyklusphasen, deren

Überlebensfähigkeit sehr stark von der c-NHEJ-Aktivität abhängt. Dagegen repräsentiert die resistente Subpopulation diejenigen Zellzyklusphasen, die von der Abwesenheit des c-NHEJ profitieren und aus diesem Grund eine höhere Überlebensrate als der WT aufweisen. In der Studie von Takata *et al.*, 1998 wurden diese Daten so interpretiert, dass die sensitive Subpopulation der Ku70^{-/-}-Mutante der G1/frühen S-Phase, während die resistente Subpopulation der späten S/G2-Phase angehört. Einen möglichen Erklärungsansatz lieferten die Ergebnisse der Messung der Zellzyklusphasen-abhängigen Überlebensfähigkeit (Abb. 4.2). Dort zeigte sich, dass die Zellen der Ku70^{-/-}-Mutante, die in der G1- bzw. in der frühen S-Phase bestrahlt wurden, eine deutlich niedrigere Überlebensrate im Vergleich zum WT aufwiesen. Dagegen zeigte sich bei den Zellen der Ku70^{-/-}-Mutante, die in der späten S/G2-Phase bestrahlt wurden, eine Verbesserung in der Überlebensfähigkeit gegenüber der frühen S- und G1-Phase. Die in der späten S/G2 bestrahlte Subpopulation der Ku70^{-/-}-Mutante blieb jedoch, im Vergleich zum WT, strahlenempfindlich. Es wurde im Rahmen der Studie von Takata *et al.*, 1998 und in dieser Arbeit angenommen, dass die Reparatur in der c-NHEJ-Mutante während der späten S- und der G2-Phase über HR abläuft. Eine schlechte Überlebensfähigkeit der Ku70^{-/-}-Mutante nach Bestrahlung in der G1- und in der frühen S-Phase, wurde damit erklärt, dass während der G1- und der frühen S-Phase noch keine homologen Schwesterchromatiden zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund kann in diesen Zellzyklusphasen keine HR ablaufen. In der späten S/G2-Phase dagegen sind homologe Schwesterchromatiden bereits vorhanden, so dass die HR genutzt werden kann. Daher trägt die HR zum Anstieg der Überlebensrate in der Ku70^{-/-}-Mutante bei. Um die mithilfe von Überlebensstudien beobachteten Effekte genauer zu charakterisieren, wurden im ersten Teil dieser Arbeit weitere strahlenbiologische Methoden am DT40-Zellsystem etabliert, welche es ermöglichen Zellzyklusphase-abhängige γ H2AX-Foci- und chromosomale Analysen in diesen Zellen zu untersuchen. Dabei sollte das für die Ku70^{-/-}-Mutante charakteristische biphasische Verhalten im Überleben in Reparaturstudien wiedergefunden werden. Ein weiterer Fokus wurde auf die Herstellung eines Zusammenhanges zwischen der DSB-Reparatur und des Zellüberlebens nach ionisierender Strahlung gelegt.

5.1.1 Etablierung der Zellzyklusphasen-spezifischen Analysen im DT40-Zellsystem

Es gibt bislang kaum Studien, die an Suspensionskulturen und speziell an DT40-Zelllinien die DSB-Reparatur in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase untersucht haben. Die bisherigen

Studien zu Reparaturmessungen, wurden ohne die Berücksichtigung der Zellzyklusphasen durchgeführt (Sonoda *et al.*, 1998). In dieser Arbeit wurden deshalb Methoden der γ H2AX-Analyse sowie eine Methode zur Bestimmung der chromosomalen Brüche in den DT40-Zellen etabliert, die eine Zellzyklusphasenspezifität der Reparaturwege berücksichtigen. Aufgrund einer relativ kurzen Dauer des Zellzyklus der DT40-Zellen (8 bis max. 12 h) bestand die Schwierigkeit eine strenge Unterscheidung zwischen den einzelnen Zellzyklusphasen vorzunehmen. Dieses wurde für die γ H2AX- sowie chromosomalen Analysen anhand der EdU- bzw. BrdU-Pulsmarkierung und der Auswahl der geeigneten Erntezeitpunkte nach IR durchgeführt.

Die γ H2AX-Foci-Methode hat sich in den letzten Jahren für die strahlenbiologischen Fragestellungen bewährt und ist zu einem Standardverfahren geworden (Löbrich *et al.*, 2010). Anhand des EdU-Einbau während der S-Phase können G1-, S- und G2-Phase Zellen voneinander unterschieden werden. Zur quantitativen Messung der DSBs und damit zur Bestimmung des Reparaturvermögens der WT- und der Reparaturmutanten durch den Zellzyklus können die Zellzyklusphasen an einer spezifischen Zellzyklusverteilung identifiziert werden, um in den Zellen dieser Zellzyklusphasen γ H2AX-Foci zu quantifizieren. Ein weiterer positiver Aspekt dieser Methode ist, dass sie einen Fortschritt für eine in die Tiefe greifende Analyse der S-Phase Zellen liefert. Sie ermöglicht die Unterteilung der S-Phase in frühe, mittlere und späte S-Phase Zellen. Mit einer Erweiterung der EdU-Methode, bei der eine geringe Konzentration des DNA-Polymerase-Inhibitors Aphidicolin verwendet wurde, konnte untersucht werden, welchen Einfluss die Replikation auf die DSB-Entstehung und ihre Reparatur nach der Bestrahlung hat.

Mit chromosomalen Studien sollen die auf der Ebene der γ H2AX-Foci beobachteten Strahleneffekte bekräftigt werden. In dieser Arbeit wurde angestrebt, sowohl die in der mittleren S als auch die in der G2-Phase bestrahlten Zellen in einem Ansatz mithilfe der Colcemid-Methode zu analysieren.

5.1.2 Reparatur der strahleninduzierten DSBs in den G1-Phase Zellen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen in bestrahlten G1-Phase Zellen zeigten, dass in allen untersuchten DT40-Zelllinien eine vergleichbare Anzahl an DSBs induziert wurde. Nach 1 Gy lagen die Induktionswerte bei 8-10 γ H2AX-Foci/Zelle. Dieses Ergebnis ist damit konsistent, dass alle Zelllinien, unabhängig vom genetischen Status, eine gleiche DNA-Menge

pro Zellkern aufweisen. Im Vergleich zum menschlichen Genom, welches $3,2 \cdot 10^9$ bp enthält, ist das haploide Genom eines Huhns ca. $1 \cdot 10^9$ bp groß (NCBI-Internetseite; Genomgröße von *Gallus gallus (chicken)*). Das bedeutet, dass sich der Unterschied in der Genomgröße zwischen Mensch und Huhn bei der Induktion der DSBs bemerkbar machen sollte. In den humanen Fibroblasten, die mit 1 Gy bestrahlt wurden, werden ca. 20-25 DSBs induziert (Beucher *et al.*, 2009). Das Verhältnis zwischen den Induktionswerten einer G1-Phase Zelle des DT40-Zellsystems und derjenigen der humanen Fibroblasten liegt demnach bei etwa 1/3 und kommt der Diskrepanz zwischen den Genomgrößen relativ nahe.

In dieser Arbeit wurde anhand der Reparaturkinetiken der in der G1-Phase bestrahlten Zellen gezeigt, dass sich der c-NHEJ-Reparaturdefekt in den $Ku70^{-/-}$ - und der $Ku70^{-/-}/Rad54^{-/-}$ -Mutanten bereits in der ersten Stunde entwickelte und bis 4 h nach Bestrahlung bestehen blieb (Abb. 4.5, A). Die $Rad54^{-/-}$ -Mutante zeigte dagegen eine mit WT vergleichbare Reparatur (Abb. 4.5, B). Diese Ergebnisse werden durch sehr frühe Studien mit CHO (Hamster)-Zelllinien und auch spätere Studien mit humanen Fibroblasten unterstützt. In ihnen wurde gezeigt, dass die Reparaturmutanten, denen Faktoren des c-NHEJ wie z. B. DNA-PKcs oder LIG4 fehlten, einen Reparaturdefekt bereits nach 2 h entwickelten, welcher dann über mehrere Stunden persistierte. Dagegen zeigten die Zellen, die HR-Defizienz aufweisen, keine Verminderung in der Reparatur nach Bestrahlung in der G1-Phase (Iliakis 1991; Beucher *et al.*, 2009).

Eine weitere Beobachtung war, dass in der Doppelmutante eine Restreparatur gemessen wurde. Es stellte sich die Frage, welcher Mechanismus für die Reparatur der restlichen DSBs in dieser Zelllinie verantwortlich ist. In einigen Studien wurde gezeigt, dass auch die c-NHEJ-Mutanten einen beträchtlichen Anteil an langsam erfolgender Reparatur aufweisen (Singh *et al.*, 2009; Mladenov & Iliakis, 2011). Aus diesen Ergebnissen heraus konnte eine Beteiligung von alternativen Mechanismen (A-EJ) wie A-NHEJ und MMEJ postuliert werden, die in den Zellen mit der intakten c-NHEJ-Aktivität nur einen geringen Beitrag leisten (Sallmyr *et al.*, 2008), jedoch bei c-NHEJ-Abwesenheit vermehrt aktiviert werden (Nussenzweig & Nussenzweig, 2007).

Als Bestätigung zu den Studien im Säugetiersystem, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das bekannte Reparaturmodell für die Reparatur in der G1-Phase strahleninduzierter DSBs auch für das DT40-Zellsystem gilt. Das c-NHEJ repariert den größten Anteil an Schäden, während HR in der G1-Phase keine Rolle spielt.

5.1.3 Reparatur der strahleninduzierten DSBs in den G2-Phase Zellen

Die Reparaturuntersuchungen der in der G2-Phase bestrahlten Zellen haben gezeigt, dass in allen untersuchten Zelllinien 18-19 DSBs induziert wurden. Die ca. doppelt so hohen Induktionswerte in der G2-Phase, im Vergleich zu G1, sind damit konsistent, dass in einer Zelle mit doppelt so viel DNA die doppelte Anzahl an DSBs induziert wird (Hall & Giaccia, 2006). In der vorliegenden Arbeit konnten deutliche Reparaturdefekte in allen untersuchten Reparaturmutanten detektiert werden. Die verminderte Reparatur entwickelte sich bereits ab der 1 h und war bis 4 h nach Bestrahlung noch deutlich erkennbar. Der ermittelte Anteil an unreparierten DSBs zum Zeitpunkt 4 h nach Bestrahlung lag in der *Ku70^{-/-}*-Mutante höher als in der *Rad54^{-/-}*-Mutante. In der Doppelmutante wurde der größte Anteil an unreparierten DSBs detektiert (Abb. 4.6). Das ist eine analoge Situation, wie sie für die primären humanen Fibroblasten und MEFs beschrieben wurde. Dort zeigten die c-NHEJ-Mutanten einen deutlich höheren Reparaturdefekt als die HR-Mutanten (Beucher *et al.*, 2009). Das für Säugetierzellen beschriebene Reparaturmodell zeigt, dass im Gegensatz zur G1-Phase in der G2-Phase sowohl c-NHEJ als auch HR an der Reparatur strahleninduzierter DSBs beteiligt sind. Die Beteiligung von HR in der G2-Phase beruht auf der Anwesenheit der homologen Schwesterchromatiden, die als Matrize für die Reparatur der geschädigten Chromatide zur Verfügung stehen (Alberts, 2008). Der größte Anteil der strahleninduzierten DSBs wird im Säugetiersystem über c-NHEJ repariert, während HR für die Reparatur von einigen wenigen DSBs verantwortlich ist (Riballo *et al.*, 2004; Beucher *et al.*, 2009). Überraschend ist, dass sowohl die c-NHEJ- als auch die HR-Mutante Reparaturdefekte ausbilden. Dadurch, dass in der G2-Phase beide Wege aktiv sind, wäre zu erwarten, dass c-NHEJ und HR sich gegenseitig kompensieren können. Da es nicht beobachtet wird, kann damit erklärt werden, dass durch Strahlung DSBs induziert werden, welche nur für einen bestimmten Weg determiniert sind. So werden DSBs, die direkt miteinander ligiert werden können, dem c-NHEJ-Weg zugeleitet. Andere Arten von DSBs, welche eine ausgedehnte Resektion benötigen, sind für die HR prädestiniert. Das bedeutet also, dass c-NHEJ und HR sich gegenseitig nicht unterstützen können.

Vergleicht man den Anteil der HR-abhängigen DSBs zwischen Säugetier- und Hühnerzellen, so wird erkennbar, dass in einer Hühnerzelle ein ca. drei-mal so hoher DSB-Anteil, als in einer Säugetierzelle, über HR repariert wird. Dieses bestätigt somit die Eigenschaft der DT40-Zellen, HR mit hoher Frequenz zu nutzen. Trotz der Tatsache, dass DT40-Zellen erhöhte Frequenzen an HR, im Vergleich zu Säugetierzellen, aufweisen (Buerstedde & Takeda *et al.*,

1991), liegt der Defekt der Ku70^{-/-}-Mutante höher im Vergleich zur Rad54^{-/-}-Mutante. Das bedeutet, dass auch im DT40-Zellsystem c-NHEJ eine wichtigere Rolle als die HR bei der Reparatur strahleninduzierter DSBs in der G2-Phase spielt.

Anhand der in dieser Arbeit gemessenen Restreparatur in der Doppelmutante, können alternative Reparaturwege auch in der G2-Phase nicht ausgeschlossen werden.

Chromosomale Analysen der in der G2-Phase bestrahlten Zellen unterstützten weitestgehend die Ergebnisse der γ H2AX-Foci. Alle Reparaturmutanten weisen unreparierte Brüche auf (Abb. 4.16, B; BrdU-neg.). Eine marginale Abweichung war jedoch anhand dieser Methode gegenüber der γ H2AX-Foci-Methode zwischen der c-NHEJ- und der HR-Mutante zu sehen. Die HR-Mutante zeigte in diesem Ansatz einen höheren Reparaturdefekt als die c-NHEJ-Mutante. Eine mögliche Erklärung liegt in der Aktivierung des G2/M-Checkpoints. Die Inkubation der Zellen mit Colcemid führt dazu, dass die Zellen in der Mitose arretieren und als Metaphase-Chromosomen sichtbar werden. Die Zellen werden als Metaphasen nur dann sichtbar, wenn sie den G2/M-Checkpoint überwinden (Bryant & Mozdarani, 2007). Während die unbestrahlten Zellen keinen G2/M-Checkpoint induzieren, wird dieser nach der Bestrahlung durch DSB-Induktion aktiviert. Die Zellen verbleiben am G2/M-Übergang, so lange sie die DSBs bis zu einem bestimmten Schwellenwert repariert haben. Danach werden die Zellen aus dem Arrest mit einer gewissen Anzahl an unreparierten DSBs entlassen, die später als Chromosomenbrüche detektiert werden können. Die Anzahl der Chromosomenbrüche kann somit davon abhängen, wie die Zellen den G2/M-Checkpoint überwinden. Das bedeutet, dass die Zellen, die mehr unreparierte DSBs aufweisen und den entsprechenden Schwellenwert noch nicht erreicht haben, im Zellzyklus zurückgehalten werden. Die Zellen, in denen die Anzahl der residualen DSBs dem Schwellenwert entspricht, progressieren ungestört in die Mitose. Es konnte somit postuliert werden, dass die Aktivierung des G2/M-Checkpoints einen Einfluss auf die Reparaturkinetik der DSBs und damit auf die Entstehung der Chromosomenbrüche in der Mitose hat (Terzoudi *et al.*, 2005; Löbrich & Jeggo, 2007). Des Weiteren gilt die Effizienz des G2/M-Checkpoints als ein entscheidender Faktor, ob die geschädigten Zellen am G2/M-Übergang zurückgehalten werden oder ungehindert in die Mitose progressieren. So könnte die Ku70^{-/-}-Mutante einen effizienteren G2/M-Checkpoint besitzen als die Rad54^{-/-}-Mutante, deren Checkpoint unempfindlich zu sein scheint. Einen starken Hinweis für die Insensitivität des G2/M-Checkpoints der Rad54^{-/-}-Mutante liefern die Ergebnisse der γ H2AX-Kinetiken der in der G1-Phase bestrahlten Zellen, welche ohne der Anwen-

derung von Nocodazol analysiert wurden (Kap. 4.4, Abb. 4.5, A). Dort zeigte sich ein Reparaturdefekt in der Rad54^{-/-}-Mutante. Ohne Nocodazol-Behandlung teilten sich die bestrahlten G2-Phase Zellen der Rad54^{-/-}-Mutante trotz des Reparaturdefektes ungehindert und progressierten in die G1-Phase. Dieses führte zu einer Erhöhung der Anzahl der γ H2AX-Foci in den G1-Phase Zellen. Auch in einer Studie mit humanen Zelllinien wurde die Insensitivität des G2/M-Checkpoints beobachtet. In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Zellen der HR-Mutanten dem G2/M-Checkpoint mit unreparierten DSBs entkommen können und schließlich eine erhöhte Bruchzahl in der Mitose aufweisen, als die Zellen, deren G2/M-Checkpoint effizient ist (Kremler *et al.*, 2007).

Zusammenfassend konnte mit der EdU-basierten γ H2AX-Foci-Methode die Reparatur der G1- sowie G2-Phase-Zellen nach Bestrahlung untersucht werden. Mit chromosomalen Studien konnten die Strahleneffekte der in der G2-Phase bestrahlten Zellen bestätigt werden. Die G1- und G2-Phasen der Ku70^{-/-}-Mutante zeigen eine stark beeinträchtigte Reparaturkapazität, so dass sie nicht die resistente Subpopulation ausmachen können. Es wurde angenommen, dass es sich um die S-Phase handeln könnte, die für eine höhere Überlebensrate verantwortlich ist. Im Vergleich mit anderen Zellzyklusphasen liegt die DNA in der S-Phase aufgrund der Replikation in einer für Reparaturproteine zugänglichen Form vor. Dieses führt dazu, dass die S-Phase als Zellzyklusphase beschrieben wird, in der sich die Strahlenresistenz entwickelt (Quitet *et al.*, 1991; Tell *et al.*, 1998). Um zu überprüfen, ob die in der S-Phase bestrahlten Zellen der Ku70^{-/-}-Mutante eine verbesserte Reparatur im Vergleich zum WT aufweisen, wurden Reparaturstudien in der S-Phase durchgeführt.

5.1.4 Unterteilung der S-Phase in frühe, mittlere und späte S-Phase

Eine eindeutige Unterscheidung der S-Phase Zellen von G1- bzw. G2-Phase Zellen im DT40-Zellsystem war durch den EdU-Einbau in der S-Phase möglich. Der EdU-Einbau kann als ein direktes Maß für die Aktivität der Replikation gesehen werden (Buck *et al.*, 2008). Je mehr EdU von einer Zelle während der Pulsmarkierung eingebaut wurde, desto mehr Replikationsereignisse haben in dieser Zelle stattgefunden. So verteilt sich das EdU-Signal der mittleren S-Phase Zellen über den gesamten Zellkern (Abb. 4.7). Dieses ist mit der Begründung konsistent, dass die mittlere S-Phase als Phase mit der höchsten Replikationsaktivität beschrieben wird (Karanam *et al.*, 2012). In der frühen S-Phase wurde dagegen weniger EdU eingebaut, was damit zusammenhängt, dass nicht alle Replikationsgabeln dieser Zellen zum

Zeitpunkt der EdU-Pulsmarkierung im aktiven Zustand vorlagen. Auch die Zellen der späten S-Phase weisen ein geringes EdU-Signal auf. Dieses kann damit begründet werden, dass die Replikationsaktivität in dieser Phase abnimmt, so dass nur sehr wenige Replikationsgabeln zum Zeitpunkt der Pulsmarkierung noch aktiv waren. Das Maß der Replikationsaktivität lässt folglich eine Aufteilung der gesamten DNA in unreplizierte bzw. in replizierte Bereiche zu. Eine frühe S-Phase Zelle besitzt mehr unreplizierte als replizierte Bereiche, während eine mittlere S-Phase Zelle mehr replizierte DNA-Bereiche aufweist. In einer späten S-Phase Zelle liegt die DNA nahezu vollständig verdoppelt vor. Nur einige wenige DNA-Bereiche sind in unreplizierten Regionen lokalisiert.

Dadurch dass EdU während der Pulsmarkierung nicht in alle DNA-Bereiche eingebaut wurde, resultieren die für die frühen, mittleren und späten S-Phase Zellen charakterische EdU-Muster (Abb. 4.7). Somit hängt der EdU-Einbau stark von der Position der Zellen in der S-Phase zum Zeitpunkt der EdU-Pulsmarkierung ab.

Die EdU-basierte Methode ermöglichte die S-Phase Zellen im DT40-Zellsystem in drei Untergruppen einzuteilen. Dadurch, dass durch die Pulsmarkierung erworbene EdU-Muster beibehalten wurden, konnten die S-Phase Zellen durch den Zellzyklus verfolgt werden. Des Weiteren ermöglichte diese Methode die feinen Unterschiede der Reparaturkapazitäten der in der frühen, mittleren und späten S-Phase bestrahlten Zellen herauszuarbeiten und die Beteiligung sowie Wechselwirkungen zwischen HR und c-NHEJ in diesen Untergruppen zu untersuchen.

5.1.5 Einfluss der Replikation und deren Inhibition auf die DSB-Reparatur

Aufgrund eines relativ hohen Anteils an S-Phase Zellen im DT40-Zellsystem (ca. 70%) und der Dauer von ca. 4,5 h finden hier sehr viele Replikationsereignisse statt. Bei den Untersuchungen in der S-Phase wurde festgestellt, dass der Verlauf der γ H2AX-Kinetiken sich aus zwei Phasen zusammensetzt. Diese werden als Ausbildungs- und Reparaturphase bezeichnet. Während der Ausbildungsphase steigt die DSB-Anzahl an. Die daran anschließende Reparaturphase ist mit der Abnahme der DSB-Anzahl verbunden. Insbesondere für die Zellen, die ab den Zellzyklusphasen mit einer hohen Replikationsaktivität beobachtet wurden, sind diese beiden Phasen anzutreffen (Abb. 4.9, frühe und mittlere S-Phase Zellen). In den Zellen, die die Replikation nahezu abgeschlossen haben, konnte nur eine Reparaturphase beobachtet werden (Abb. 4.9, späte S-Phase). Alle diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass mit

dem Fortschreiten der Replikation zusätzliche, als sekundär erzeugte DSBs sowohl spontan, als auch nach Bestrahlung in allen untersuchten Zelllinien entstanden sind und dass die Ausprägung der Ausbildungs- bzw. Reparaturphasen von der Replikationsaktivität in der jeweiligen Untergruppe innerhalb der S-Phase abhängig ist. Während der Replikation können viele spontane DNA-Schäden auftreten. Neben Basenschäden, kommen auch Einzelstrangbrüche (SSBs) vor. Die SSBs wiederum, die lange Zeit unrepariert verbleiben, können in DSBs umgewandelt werden (Strumberg *et al.*, 2000; Pommier, 2004). Dieser Prozess findet hauptsächlich an der Replikationsgabel statt, wenn die Replikationsgabeln in die SSBs hineinlaufen. Nach dem so genannten *replication fork runoff*, bei dem ein Arm einer Replikationsgabel infolge der Abdissoziation der DNA-Polymerasen von der DNA abfällt, bildet sich ein ein-endiger DSB aus (Strumberg *et al.*, 2000; Helleday, 2003). Die entstehenden ein-endigen DSBs während der Replikation werden als sekundär erzeugte DSBs bezeichnet, während die zwei-endigen DSBs, welche direkt durch die Strahlung gesetzt werden, als primäre Schäden beschrieben werden (Groth *et al.*, 2012). Die Anzahl der SSBs wird durch die ionisierende Strahlung maßgeblich erhöht, was dazu führen kann, dass die Anzahl an ein-endigen DSBs ebenfalls erhöht wird. Sowohl die ein- als auch die zwei-endigen DSBs werden durch γ H2AX-Foci markiert, so dass eine quantitative Bestimmung aller DSB-Arten mithilfe der γ H2AX-Foci-Analyse möglich ist. Ein Nachteil dieser Analyse ist, dass die Prozesse der Neuentstehung und der Reparatur sich überlagern können, so dass eine Bestimmung des reinen strahleninduzierten Effekts erschwert wird. Um die Effekte der Replikation-assoziierten sekundären DSBs auf die γ H2AX-Kinetiken gering zu halten, wurde in dieser Arbeit eine Erweiterung der EdU-Methode vorgenommen. Hierbei wurde eine moderate Konzentration des Replikationsinhibitors Aphidicolin angewendet. Die Vorexperimente mit DT40-Zellen zeigten, dass eine Zugabe von 1 μ M Aphidicolin kurze Zeit vor der Bestrahlung die Progression der Zellen durch die S-Phase deutlich verlangsamt und den Eintritt in die G2-Phase verhindert (Abb. 4.11). Der Vorteil dieser Methode gegenüber der Methode ohne Aphidicolin ist, dass durch die Verlangsamung der Replikation die Entstehung sekundär erzeugter DSBs stark reduziert wird, weil die Zellen in der Progression durch die S-Phase zurückgehalten werden. Durch die Aphidicolin-Vorbehandlung verbleiben sie in der gleichen Position innerhalb der S-Phase während des gewählten Zeitintervalls. Dieses hat zur Folge, dass spontane und nach Bestrahlung detektierte DSBs bereits initial reduziert werden und dass sich relativ wenige bis keine sekundären DSBs im gesamten Beobachtungszeitraum ausbilden. So konnte in vergleichen-

den Analysen zwischen WT und Reparaturmutanten beobachtet werden, dass die Vorbehandlung mit Aphidicolin in der frühen sowie in der mittleren S-Phase, sowohl in den unbestrahlten als auch nach Bestrahlung analysierten Zellen die Ausbildungsphase unterdrückte (Abb. 4.14; A und B, jew. obere und mittlere Teilabb.). Auch in der späten S-Phase wurde zum Teil eine geringere DSB-Anzahl gemessen (Abb. 4.14; A und B, jew. untere Teilabb.). Die inhibierende Wirkung von Aphidicolin auf die Entstehung sekundärer DSBs ist aus Studien mit Hamster-Zelllinien und humaner Tumorzelllinie, U2OS, bekannt (Groth *et al.*, 2012). Diese Studie zeigte, dass HR-defiziente Hamster-Zelllinien von der Aphidicolin-Behandlung profitieren und eine höhere Überlebensrate aufweisen, als HR-defiziente Zellen ohne Aphidicolin-Behandlung. Dagegen trat der Anstieg der Überlebensrate in der entsprechenden WT-Zelllinie nach Aphidicolin-Behandlung nur geringfügig auf. Daraus wurde geschlossen, dass toxische Strahlenwirkung auf die HR-Mutante durch die Entstehung sekundärer DSBs zustande kommt und sich in einer schlechten Überlebensfähigkeit äußert. Anhand der γ H2AX-Foci-Analyse in der U2OS-Zelllinie wurde in der Studie gezeigt, dass die Anzahl nach Bestrahlung auftretender DSBs in den mit Aphidicolin behandelten Zellen geringer ausfällt, als in den Zellen ohne Aphidicolin-Behandlung. Auch mit diesem Ergebnis wurde die protektive Wirkung von Aphidicolin bestätigt. Es wurden in der Studie jedoch keine c-NHEJ-Mutanten untersucht, um die schützende Wirkung von Aphidicolin als allgemeingültig herauszustellen. Der neue Aspekt der vorliegenden Arbeit war, dass die γ H2AX-Foci unter der Berücksichtigung der Zellzyklusphasen sowohl in der HR als auch c-NHEJ-Einzelmutanten sowie Doppelmutanten durchgeführt wurden. Die Aussage, dass Aphidicolin die Entstehung spontaner, sekundärer DSBs unterdrückt und zusammen mit der Bestrahlung weniger DSBs erzeugt werden, konnte mit den Ergebnissen aller untersuchten DT40-Zelllinien weitestgehend in allen Untergruppen innerhalb der S-Phase belegt werden.

5.1.6 Beitrag von c-NHEJ und HR bei der Reparatur primärer und sekundärer DSBs nach Bestrahlung in der S-Phase

Anhand von Reparaturkinetiken strahleninduzierter DSBs in der frühen S-Phase bestrahlten Zellen ohne Aphidicolin-Vorbehandlung zeigte sich, dass die Ausbildungsphase in allen Zelllinien stark ausgeprägt ist. Die daran anschließende Reparaturphase ist im WT deutlich zu sehen, während in den Ku70^{-/-}- und Rad54^{-/-}-Mutanten die Reparaturphase nicht klar definiert werden kann. Insbesondere zwischen 2 und 4 h nach Bestrahlung findet ein erneuter

Anstieg der DSBs in den Einzelmutanten statt. In der Doppelmutante findet eine Akkumulation von DSBs statt (Abb. 4.10, B; obere Teilabbildung). Dieses kann damit erklärt werden, dass die zu Beginn der Analyse markierten frühen S-Phase Zellen über die mittlere S-Phase bis zum Übergang zwischen der späten S- und der G2-Phase progressierten und im Zuge der DNA-Replikation einige DSBs verdoppelt haben. Da die zusätzliche DSB-Zunahme nur für Reparaturmutanten beobachtet wurde, wurde angenommen, dass die Replikation nur für Reparaturmutanten und nicht für den WT toxisch ist. Dieses wird durch Studien belegt, die zeigen, dass Ku70 und Rad54 auch mit in den Vorgang der Replikation involviert sind (Tuteja and Tuteja, 2000; Rampakakis *et al.*, 2009; Rampakakis *et al.*, 2008; Sibani *et al.*, 2005). Eine weitere Beobachtung war, dass alle untersuchten Mutanten 6 h nach IR ausgeprägte Reparaturdefekte zeigten. Dabei waren die Reparaturdefekte von Ku70^{-/-}- und Rad54^{-/-}-Mutante vergleichbar. Der Reparaturdefekt der Doppelmutante lag wesentlich höher, als in den Einzelmutanten. Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass die in der frühen S-Phase bestrahlten Zellen c-NHEJ und HR in vergleichbaren Anteilen nutzen und dass, wenn einer der Wege fehlt, der andere die Reparatur übernehmen kann. Basierend auf den Ergebnissen des EdU-Einbaus in der S-Phase wurde jedoch angenommen, dass die frühen S-Phase Zellen mehr unreplizierte, als replizierte DNA-Bereiche aufweisen. Für die unreplizierten Bereiche, die hauptsächlich zwei-endige DSBs enthalten, ist die Reparatur über c-NHEJ beschrieben (Helleday *et al.*, 2007). In den replizierten Bereichen können dagegen sowohl ein-endige als auch zwei-endige DSBs auftreten. Während die Reparatur von ein-endigen DSBs über HR abläuft, können zwei-endige DSBs sowohl über c-NHEJ als auch über HR repariert werden. So wurde erwartet, dass die c-NHEJ-Mutante einen höheren Reparaturdefekt als eine HR-Mutante aufweist. Der vergleichbare Reparaturdefekt der Einzelmutanten kann mit der gesteigerten HR-Aktivität begründet werden. Durch das Fortschreiten der Replikation werden die homologen Schwesterchromatiden ausgebildet. Dadurch kann die Aktivität von c-NHEJ abgeschwächt werden. Die HR gewinnt mehr an Bedeutung, so dass einige DSBs über HR repariert werden. Dadurch, dass in der frühen S-Phase die Ausbildungsphase die Reparaturphase überlagert, konnte die DSB-Reparatur der in der frühen S-Phase bestrahlten Zellen nur schwer charakterisiert werden. Der starke Einfluss der Replikation auf die DSB-Reparatur in diesen Zellen wurde mit der Vorbehandlung der Zellen mit moderater Aphidicolin-Konzentration gemindert. Die Bedeutung von c-NHEJ ist in diesem Ansatz stärker ausgeprägt, als die der HR (Abb. 4.14, B; obere Teilabb.). Durch die Vorbehandlung mit Aphidicolin

wurden die Replikation und die Progression durch die S-Phase stark verlangsamt, so dass die zu Beginn der Analyse als frühe S-Phase markierten Zellen in der frühen S-Phase verblieben sind. Dadurch dass die Replikation stark unterbunden wurde, konnten die unreplizierten DNA-Bereiche auch zum späteren Zeitpunkt nicht verdoppelt werden. Erst mit diesem Ansatz wurde verdeutlicht, dass die frühen S-Phase Zellen mehr DNA-Regionen besitzen, die noch nicht repliziert wurden, als diejenigen, die eine Verdopplung bereits erfahren haben. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die γ H2AX-Foci-Kinetiken unter Replikation-inhibierenden Bedingungen vermehrt die Reparatur darstellen, welche in den geschädigten und unreplizierten DNA-Bereichen abläuft. Die Reparatur dieser DSBs erfolgt überwiegend über c-NHEJ, weil sich die homologen Schwesterchromatiden in der frühen S-Phase noch nicht vollständig ausgebildet haben. Dadurch aber, dass die Doppelmutante einen beträchtlichen Anteil an Reparatur im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, welche DSBs akkumulierten, zeigt, ist es ein Hinweis auf eine Beteiligung alternativer Reparaturmechanismen insbesondere, wenn die klassischen Reparaturwege abwesend sind (Wang *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2008).

Die Reparaturkinetiken der in der mittleren S-Phase bestrahlten Zellen weisen eine Ausbildungs- und eine Reparaturphase auf. Die Ausbildungsphase läuft in den Zellen, die ab der mittleren S-Phase verfolgt wurden, kürzer ab, als in den Zellen die in der frühen S-Phase bestrahlt und ab da verfolgt wurden. Es konnte ebenfalls beobachtet werden, dass die Reparatur strahleninduzierter DSBs in der mittleren S-Phase hauptsächlich über HR abläuft. Dieses war anhand von ausgeprägten Reparaturdefekten in der $\text{Rad54}^{-/-}$ sowie in der $\text{Ku70}^{-/-}/\text{Rad54}^{-/-}$ -Mutante zu sehen (Abb. 4.10, B; jeweils mittlere Teilabbildung). Interessanterweise reparierte die $\text{Ku70}^{-/-}$ -Mutante nahezu alle strahleninduzierten Brüche und zwar schneller als der WT. Auch die Analyse der Metaphasen nach Bestrahlung in der mittleren S-Phase unterstützte diese Daten (Abb. 4.16, B; BrdU-pos.). Die Zellen profitieren von der Abwesenheit des Ku70-Proteins, wenn sie in der mittleren S-Phase bestrahlt werden. Die ermittelten Tendenzen der Reparaturwege wurden auch nach Aphidicolin-Zugabe beobachtet (Abb. 4.14, B; mittlere Teilabbildung). Sowohl die HR- als auch die Doppelmutante zeigten in diesem experimentellen Ansatz einen deutlichen Reparaturdefekt. Der Reparaturvorteil der c-NHEJ-Mutante konnte hier ebenfalls bestätigt werden. Bei den Untersuchungen mit unterschiedlichen Säugetierzelllinien nach Bestrahlung hat sich gezeigt, dass HR ein vorherrschender Reparaturweg in der S-Phase ist (Helleday, 2003; Nikolova *et al.*, 2010). Basierend auf

dem für die mittleren S-Phase Zellen charakteristischen EdU-Muster in den DT40-Zellen, wurde verdeutlicht, dass in der mittleren S-Phase das Maximum an Replikation stattfindet. Ebenfalls finden hier HR-Ereignisse sehr häufig statt. Dieses wurde durch eine Studie belegt, die mithilfe von *Life-Cell-Imaging*-Auswertungen zeigte, dass HR-Faktoren am häufigsten in der mittleren S-Phase an DSBs rekrutiert werden (Karanam *et al.*, 2012). Eine mögliche Erklärung für die erhöhte HR-Frequenz in der mittleren S-Phase ist, dass in dieser Phase mehr DNA-Bereiche als in der frühen S-Phase bereits verdoppelt wurden. Deshalb werden mehr DSBs in den bereits replizierten DNA-Bereichen, als in den Unreplizierten erzeugt. Des Weiteren bilden sich in der mittleren S-Phase homologe Schwesterchromatiden aus, die bevorzugt genutzt werden, um geschädigte DNA über HR zu reparieren. Folglich zeigt die *Rad54^{-/-}*-Mutante im DT40-Zellsystem keine Reparatur, wenn sie in der mittleren S-Phase bestrahlt wird. Die erhöhte Beteiligung der HR bestätigt wiederum die Eigenschaft der DT40-Zellen HR mit hoher Frequenz zu nutzen. Die Erkenntnis, dass in den mittleren S-Phase Zellen viele HR-Ereignisse stattfinden, steht im Gegensatz zu der Annahme von Takata *et al.*, 1998, welcher postulierte, dass die HR-Wirkung erst in der späten S/G2-Phase das Maximum erreicht. Eine im Vergleich zum WT bessere Reparatur der c-NHEJ-Mutante wurde bislang noch in keinem anderen Zellsystem gezeigt. Es gibt zwei Möglichkeiten DSBs in der Abwesenheit von Ku70 zu reparieren, Alternative Mechanismen und HR. Die Bedeutung von alternativen Mechanismen nimmt in den c-NHEJ-defizienten Zellen zu (Nussenzweig & Nussenzweig, 2007). Die HR ist in den Ku70-defizienten Zellen dennoch aktiv. Die in Pierce *et al.*, 2001b gezeigten Daten verdeutlichen, dass in den Zellen, denen Ku fehlt und homologe Schwesterchromatiden vorhanden sind, bevorzugt HR eingeleitet wird. Dieses kann für die *Ku70^{-/-}*-Mutante im DT40-Zellsystem durchaus angenommen werden. Eine mögliche Erklärung für eine verlangsamte Reparatur im WT ist, dass dort Reparaturproteine aller Wege um DSB-Enden konkurrieren können. Eine Studie zeigte, dass Ku70 immer als erstes an die DSBs bindet. Es bindet nicht nur bevorzugt, die DNA-Schadensbereiche mit den glatten Enden, sondern besitzt auch eine verminderte Affinität zu anderen, als HR-Substrate definierten, DNA-Strukturen (Postow, 2011). Das sind DSB-Enden, deren DNA über ausgedehnte Bereiche resektiert ist. Durch die sterischen Wechselwirkungen der Ku-Heterodimere mit für die HR-determinierten DNA-Strukturen, kann der Zugang für die HR-Proteine blockiert werden und die Verlangsamung in der Reparaturgeschwindigkeit bewirken. Das gebundene Ku-Protein muss zunächst von den Bruchenden abdissoziieren, um die Reparatur über HR zu ermöglichen. Fehlt der Zelle Ku70,

so können HR oder ein A-EJ-Mechanismus ungehindert eingeleitet werden. Der Reparaturvorteil der in der mittleren S-Phase bestrahlten Zellen deutet darauf hin, dass die Zellen dieser Zellzyklusphase für den partiellen Überlebensvorteil der Ku70^{-/-}-Mutante im Vergleich zum WT verantwortlich sind.

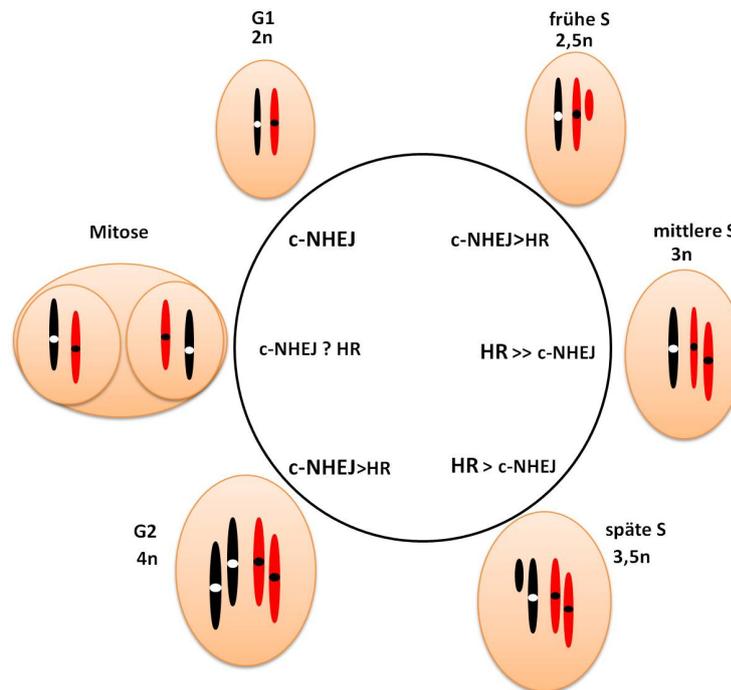
Die Analysen der in der späten S-Phase bestrahlten Zellen zeigten, dass die Replikation in ihnen nahezu abgeschlossen war, was sich in einem charakteristischen EdU-Muster widerspiegelte. Aufgrund der nur noch geringen Rolle der Replikation in diesen Zellen, wurde keine Ausbildungsphase im WT und in der Ku70^{-/-}-Mutante detektiert. Dagegen kamen in der Rad54^{-/-}- und der Doppelmutante nach 1 Gy immer noch sekundäre DSBs hinzu (Abb. 4.10, B; untere Teilabbildung). Alle Reparaturmutanten wiesen Reparaturdefekte auf. Auffällig war, dass die Doppelmutante einen beträchtlichen Anteil an DSBs repariert hat. Die Vorbehandlung der Zellen mit 1 µM Aphidicolin änderte nichts an den generellen Unterschieden zwischen WT und Reparaturmutanten. Auch mit diesem Ansatz wurden Reparaturdefekte der c-NHEJ- bzw. HR-Mutante und einer Restreparatur in der Doppelmutante bestätigt (Abb. 4.14, B; untere Teilabbildung). In der späten S-Phase überwiegt immer noch die HR-Aktivität. Die Bedeutung von c-NHEJ nimmt hier im Vergleich zu den in der mittleren S-Phase bestrahlten Zellen zu. Der Zusammenhang zwischen der Lokalisation der DSBs in den unreplizierten und replizierten Bereichen wird auch hier ersichtlich. Die als späte S-Phase identifizierten Zellen weisen mehrheitlich replizierte DNA-Bereiche auf, so dass in ihnen lokalisierten DSBs bevorzugt über HR repariert werden. Nur einige wenige vorhandene unreplizierte DNA-Bereiche beinhalten DSBs, die über c-NHEJ repariert werden. Im Gegensatz zu den in der frühen und mittleren S-Phase bestrahlten Zellen wurden nach Aphidicolin-Behandlung zum Teil mehr residuale Schäden als in den Zellen ohne Aphidicolin-Behandlung detektiert. Dieses kann damit zusammenhängen, dass in der späten S-Phase die Reparatur von der Replikation nur in einem geringen Maße beeinflusst wird. Wie von Waters (1981) gezeigt wurde, beeinträchtigt Aphidicolin nicht nur replikative DNA-Polymerasen sondern auch die Polymerasen, die an der Reparatur beteiligt sind. Hinzu kommt, dass in dieser Phase spät-replizierte DNA-Bereiche verdoppelt werden. Einige Studien zeigten, dass durch die Behandlung mit Aphidicolin und auch andere Replikationsstress-hervorrufende Chemikalien die Replikation an den im Genom definierten DNA-Bereichen angehalten wird (*stalled replication forks*) oder sogar zum Kollabieren der Replikationsgabeln kommen kann (*collapsed replication forks*). Die kollabierten Replikationsgabeln resultieren in DNA-DSBs und schließlich in Chromosomen-

brüchen bzw. -lücken in der Mitose (Richards, 2001; Arlt *et al.*, 2003). Diese spezifischen DNA-Regionen werden als *Common Fragile Sites* (CFS) definiert und sind evolutionär hochkonserviert (Elder & Robinson, 1989; Stone *et al.*, 1991, 1993; Yang & Long, 1993; McAllister & Greenbaum, 1997; Loeb *et al.*, 2001). Basierend auf den Studien mit humanen Zelllinien stellen die CFS normale Bestandteile einer Zelle dar und sind unter normalen Kulturbedingungen stabil. Die CFS beinhalten AT-reiche DNA-Bereiche, die das Potential haben, Sekundärstrukturen in der DNA auszubilden und damit das Fortschreiten der Replikation zu blockieren (Zlotorynski *et al.*, 2003). Eine weitere Eigenschaft der CFS ist ihre Lokalisation in den spät-replizierten DNA-Bereichen (Laird *et al.* 1987; Ma *et al.*, 2012), was dazu führt, dass durch Aphidicolin-Zugabe die Replikation der CFS weiterhin verzögert wird und die DNA schließlich gebrochen wird. Die Entstehung von CFS aktiviert die Reparaturmaschinerie, an der ATR, Chk1, BRCA1, RAD51 u. v. a. Proteine beteiligt sind (Durkin & Glover, 2007). Die Beteiligung von RAD51 impliziert, dass die Reparatur von CFS primär über HR stattfindet (Ma *et al.*, 2012). Die Studie von Schwartz *et al.*, 2005 postulierte, dass die DSBs in den CFS auch über c-NHEJ repariert werden. Die Abwesenheit von RAD51 und DNA-PKcs unter Replikation-inhibierenden Bedingungen führte zu einer signifikanten Expression der CFS, was nahe legte, dass sowohl HR als auch c-NHEJ für die Stabilität der CFS gebraucht werden, wenn die Replikation inhibiert wird. Es ist denkbar, dass die Ausbildung von CFS auch in den DT40-Zellen durch Zugabe der moderaten Aphidicolin-Konzentration in der späten S-Phase induziert wird. Die in dieser Arbeit gewonnene Erkenntnis zur Reparatur der in der späten S-Phase induzierten DSBs wird durch die Studie von Schwartz *et al.*, 2005 dahingehend unterstützt, dass die in den spät-replizierten DNA-Bereichen erzeugten DSBs, sowohl über c-NHEJ als auch HR repariert werden. Auch weitere Studien haben die Nutzung von HR in der späten S-Phase bekräftigt (Takata *et al.*, 1998; Sonoda *et al.*, 2006). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Analyse der primären, strahleninduzierten DSBs nur für die in der frühen und mittleren S-Phase bestrahlten DT40-Zellen valide ist. Dagegen ist dieser Ansatz für die in der späten S-Phase bestrahlten Zellen wenig geeignet.

5.1.7 Modell zur Erklärung der Wahl der Reparaturwege durch den DT40-Zellzyklus

Anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse wurde ein Schema erstellt, welches die Wichtigkeit des jeweiligen Reparaturweges während der DSB-Reparatur und mögliche Übergänge zwischen den Reparaturwegen im Zellzyklus beschreibt (Abb. 5.1).

A.



B.

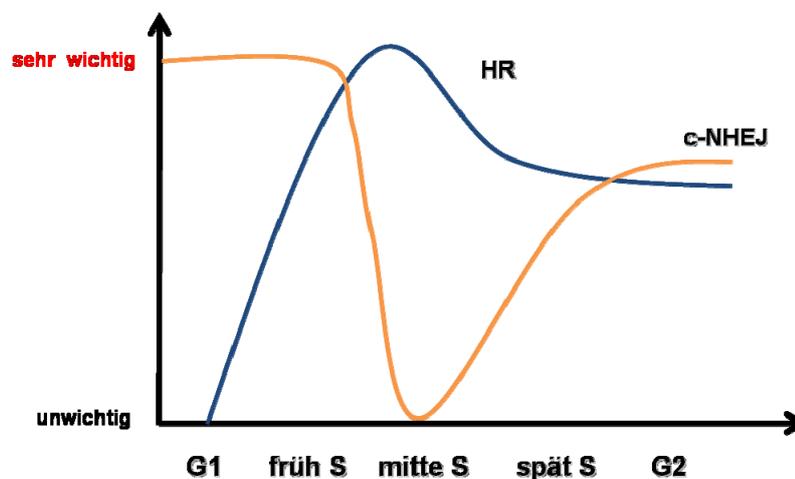


Abb. 5.1: Reparaturmodell zum Gebrauch von c-NHEJ und HR durch den DT40-Zellzyklus

A. Basierend auf den Ergebnissen der γ H2X-Foci-Analysen sind die Zellzyklusphasen mit den jeweiligen Chromosomensätzen und dem vorherrschenden Reparaturweg dargestellt. Die Chromosomensätze (xn) verdeutlichen den Replikationsstatus der DNA. Das Fragezeichen bedeutet, dass die Reparatur in dieser Phase noch nicht untersucht wurde.

B. Schematische Darstellung, welche die Wichtigkeit von c-NHEJ und HR für die DSB-Reparatur im DT40-Zellzyklus sowie deren Übergänge im Zellzyklus beschreibt. Die blaue Kurve beschreibt den Gebrauch von HR. Die orange-gefärbte Kurve beschreibt den Gebrauch von c-NHEJ.

In dieser Arbeit wurde anhand der Ergebnisse der in der G1- bzw. G2-Phase bestrahlten Zellen gezeigt, dass trotz der hohen HR-Frequenz der DT40-Zellen, c-NHEJ der vorherrschende Mechanismus für IR-induzierte DSBs in diesem Zellsystem ist. Bei den Untersuchungen der

Reparatur der in der S-Phase bestrahlten Zellen hat sich gezeigt, dass die DSB-Reparatur stark von der Position innerhalb der S-Phase zum Zeitpunkt der Bestrahlung abhängt und dass Replikation die Reparatur im hohen Maße beeinflusst. Die Wahl des Reparaturweges wird durch die Lokalisation strahleninduzierter DSBs in unreplizierten oder bereits replizierten DNA-Bereichen festgelegt. Die in der frühen S-Phase bestrahlten Zellen, deren DNA einen höheren Anteil an unreplizierten als bereits replizierten DNA-Bereichen aufweist, nutzen mehr c-NHEJ als HR. Die Situation der in der mittleren S-Phase bestrahlten Zellen ändert sich. Hier liegt DNA vermehrt im replizierten als im unreplizierten Zustand vor. Deshalb nimmt die HR-Aktivität für die Reparatur der replizierten DNA-Bereiche stark zu. Die Abwesenheit von c-NHEJ in der mittleren S-Phase führt zu einem Reparaturvorteil, im Vergleich zur Situation, wo c-NHEJ und HR anwesend sind. In der späten S-Phase nimmt Replikationsaktivität ab. Dieses führt dazu, dass zunächst bestehende HR-Aktivität zu späten Zeitpunkten in der Reparaturkinetik wieder abnimmt. Die c-NHEJ-Aktivität nimmt in dieser Zellzyklusphase wieder zu. Aufgrund einer relativ schwachen c-NHEJ-Aktivität in der späten S-Phase wird vermutet, dass ein eindeutiger Übergang von HR zu c-NHEJ in der G₂-Phase stattfindet. Dort ist das c-NHEJ bedeutender als die HR.

5.1.8 Einfluss von Qualität der Reparatur auf das zelluläre Überleben

Insbesondere für die Klärung der Fragestellung, welche Subpopulationen der Ku70^{-/-}-Mutante zu einer verbesserten Überlebensfähigkeit und welche zu einer Verminderung der Überlebensrate im Vergleich zum WT beitragen und ob diese Strahlenantwort mit der Reparatur korreliert, war der Vergleich der Reparatur mit der Überlebensfähigkeit wichtig. Das klonogene Überleben nach ionisierender Strahlung hängt primär von den zellulären Fähigkeiten ab, die entstandenen DNA-Schäden zu erkennen und zu reparieren (Khanna & Jackson, 2001). Ionisierende Strahlung induziert viele Schadensarten in der DNA, wobei die unreparierten bzw. falsch reparierten DSBs die gefährlichsten Läsionen darstellen (Iliakis, 1991). Die Beziehung zwischen der DSB-Reparatur und dem Absterben der Zellen ist noch nicht vollständig aufgeklärt (Olive, 1998). Viele Studien haben versucht, diese Beziehung in den humanen Zelllinien herzustellen. Es zeigten sich Widersprüche in den ermittelten Ergebnissen. Während einige Studien nahelegten, dass eine direkte Korrelation zwischen Induktion/Reparatur und Strahlenempfindlichkeit existiert (MacPhail *et al.*, 2003; Taneja *et al.*, 2004; Banath *et al.*, 2004), konnten andere Studien diese Korrelation widerlegen (Mahrhofer

et al., 2006, Yoshikawa *et al.*, 2009). Unter der Annahme, dass eine direkte Korrelation zwischen Reparatur und dem Überleben existiert, so sollten die Zellen der G1-, frühen, späten S- sowie der G2-Phase der Ku70^{-/-}-Mutante zu einer strahlenempfindlichen Subpopulation gehören, während die Zellen der mittleren S-Phase die resistente Subpopulation darstellen. Um diese Hypothese überprüfen zu können, wurde die Überlebensfähigkeit zusammen mit der Reparaturfähigkeit anhand von γ H2AX-Foci nach der Synchronisation mithilfe von Elutriation gemessen. Die Reparatur der Zellen, die in der G1-, in der frühen S-, späten S/G2-Phase (nach 8 h nach Elutriation) bestrahlten Zellen der Ku70^{-/-}-Mutante korreliert mit der entsprechenden Überlebensfähigkeit (Abb. 4.19). Der ausgeprägte Reparaturdefekt sowohl nach 4 als auch nach 24 h führte zu einer schlechten Überlebensfähigkeit. Dagegen zeigte sich eine Antikorrelation bei den Zellen der c-NHEJ-Mutante, die in der späten S/G2-Phase (0h: direkt nach Elutriation) bestrahlt wurden. Obwohl diese Population unreparierte DSBs immer noch nach 24 h aufwies, zeigte sie eine höhere Überlebensrate als der WT. Das bedeutet, dass diese Population als einzige zur Resistenz der c-NHEJ-Mutante beiträgt. Eine höhere Überlebensrate der in der späten S/G2 bestrahlten Population der c-NHEJ-Mutante deutet nun daraufhin, dass diese Zellen DSBs langsam und fehlerfrei über HR repariert haben, während im WT neben der fehlerfreien HR fehleranfällige Mechanismen c-NHEJ und A-EJ agieren und um die DSBs konkurrieren. Da nur die Hälfte der DSBs im Zeitraum zwischen 4 und 24 h nach IR repariert wurden, könnte es ein Hinweis darauf sein, dass die Reparatur langsam abläuft und dass 24 h ein zu früh gewählter Zeitpunkt ist (Abb. 4.18, A; orange Balken, 0 h).

Auch für die in der mittleren S-Phase bestrahlten Zellen wurde eine Antikorrelation festgestellt. Trotz der geringeren Anzahl an residualen γ H2AX-Foci in der c-NHEJ-Mutante nach 24 h, wies sie eine viel niedrigere Überlebensrate als der WT auf. Dieses deutet daraufhin, dass die wenigen residualen DSBs, die nach Bestrahlung in der mittleren S-Phase noch verbleiben, das c-NHEJ zur Reparatur benötigen und nicht über HR repariert werden können. Es könnten DSBs sein, die in den unreplicierten DNA-Bereichen lokalisiert sind und die nicht mithilfe von homologen Schwesterchromatiden repariert werden können. Die alternativen Prozesse, wie MMEJ und A-NHEJ können nicht ausgeschlossen werden und sind insbesondere unter Ku70-defizienten Bedingungen aktiv (Dueva & Iliakis, 2013; Truong *et al.*, 2013). Als fehlerbehaftete Mechanismen sind sie für die Zelle sehr toxisch, so dass die in der mittleren S-Phase bestrahlten Zellen der Ku70^{-/-}-Mutante trotz der schnellen Reparatur, schlechte Reparaturpro-

dukte bilden. Weiterhin wurde beobachtet, dass die in der späten S/G2-Phase bestrahlte Population, welche 7 h nach der Synchronisation analysiert wurde, eine verminderte Überlebensfähigkeit im Vergleich zum WT und zu der Population, die direkt nach der Elutriation auch in der späten S/G2-Phase bestrahlt wurde, zeigte. Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede im Überleben dieser in der späten S/G2-Phase bestrahlten Population könnten Unterschiede in der Qualität der Reparatur sein. Während die Zellen der späten S/G2-Population, die direkt nach der Elutriation bestrahlt wurden eine fehlerfreie Reparatur durchgeführt haben, scheint die Reparatur der nach 7 h nach Synchronisation bestrahlten späten S/G2-Zellen fehleranfälliger zu sein. Dieses könnte damit zusammenhängen, dass die späten S/G2-Zellen (7 h) Replikation-assoziierte DSBs angehäuft haben, welche c-NHEJ benötigen.

Es kann an dieser Stelle zusammengefasst werden, dass die Ergebnisse der Zellzyklusphasen-abhängigen Überlebensfähigkeit und der Zellzyklusphasen-abhängigen Reparatur nicht in allen Zellzyklusphasen auf einander abgestimmt waren und dass sie sich teilweise widersprechen. Es können somit Limitierungen der angewandten Methoden dafür verantwortlich sein, dass es nicht ausreicht, das biphasische Verhalten der $Ku70^{-/-}$ -Mutante endgültig zu erklären. Da die γ H2AX-Foci-Methode eine quantitative und keine qualitative Methode darstellt, ist die Etablierung weiterer Methoden zur Qualitätsmessung der Reparatur erforderlich, um diese Fragestellung weiter zu bearbeiten. Die Zellzyklusphasen-spezifische Überlebensfähigkeit der HR-Mutante wurde aus zeitlichen Gründen nicht untersucht. Unter der Zuhilfenahme der Daten aus den Synchronisationsexperimenten von Takata *et al.*, 1998 wurde eine mögliche schematische Darstellung der Zellüberlebensfähigkeit in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase erstellt (Abb. 5.2).

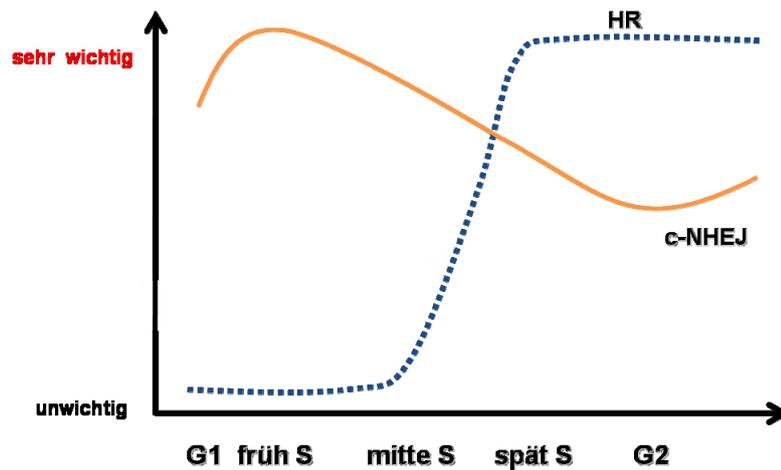


Abb. 5.2: Gebrauch von c-NHEJ und HR im Überleben durch den DT40-Zellzyklus

Schematische Darstellung, welche die Wichtigkeit von c-NHEJ und HR für die Überlebensfähigkeit im DT40-Zellzyklus sowie deren Übergänge im Zellzyklus beschreibt. Die blaue Kurve beschreibt den Gebrauch von HR (Takata *et al.*, 1998). Die orange-gefärbte Kurve beschreibt den Gebrauch von c-NHEJ.

5.2 Einordnung von Artemis in die DSB-Reparatur im DT40-Zellsystem

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde das Protein Artemis in das DSB-Reparaturmodell nach Bestrahlung im DT40-Zellsystem eingeordnet. Bislang war bekannt, dass Artemis hauptsächlich während c-NHEJ beteiligt ist und dass Artemis-defiziente Zellen sehr empfindlich auf genotoxischen Stress, wie ionisierende Strahlung, reagieren (Ma *et al.*, 2002; Jeggo & Neill, 2002). Diese Erkenntnisse betreffen sowohl Säugetierzellen als auch die DT40-Zellen (Ishiai *et al.*, 2004; Iwabuchi *et al.*, 2006; van Gent & van de Burg, 2007; Kurosawa *et al.*, 2013). Eine weitere Studie verdeutlichte, dass die Zellen Artemis bei der Reparatur der ca. 10-15% der strahleninduzierten DSBs benötigen (Riballo *et al.*, 2004). Sowohl für die in der G1-Phase als auch in der G2-Phase bestrahlten Zellen wurde gezeigt, dass es sich um die langsam ablaufende Reparaturkomponente handelt. Für die G1-Phase wird ein A-EJ-Mechanismus vermutet (Goodarzi & Jeggo, 2012). Dagegen handelt es sich in der G2-Phase um die HR (Beucher *et al.*, 2009). Alle bisherigen Studien zur Funktion von Artemis in DT40-Zellen wurden mit Hilfe von Überlebensexperimenten durchgeführt. Mit den neu an DT40-Zellen etablierten Methoden, die eine Durchführung der Zellzyklusphasen-abhängigen γ H2AX-Foci- und Chromosomenstudien erlauben, konnte die Funktion von Artemis während der DSB-Reparatur genauer betrachtet werden. Die Untersuchungen mit den Mutanten, in denen die Komponenten anderer Reparaturwege, wie SNM1 A und B (ICL-Reparatur), Ku70 (c-NHEJ) und Rad54 (HR) zusammen mit Artemis ausgeschaltet wurden, zeigen, wie die Artemis-

abhängige Reparatur mit anderen Reparaturwegen wechselwirkt und welche weitere Funktion das Protein Artemis ausübt.

5.2.1 Einfluss der Deletion der *snm1a*-, *snm1b*- und *snm1c/artemis*-Gene auf das klonogene Überleben und die Zellzyklusphasen-abhängige Reparatur

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse der Überlebensexperimente mit exponentiell wachsenden Artemis-Einzel-, Doppel- und Dreifachmutanten bestätigen die Aussage, dass diese Zellen strahlenempfindlich sind. Die Dreifachmutante SNM1A/B/C^{-/-} stellte dabei die strahlenempfindlichste Zelllinie dar (Abb. 4.20). Die in der Studie von Ishiai *et al.*, 2004 untersuchten Funktionen der SNM1A-, B(Apollo)- und C(Artemis)-Proteinen in den DT40-Zellen nach der Bestrahlung und nach Inkubation mit ICL-induzierenden Agenzien zeigten, dass die Deletion der *snm1a*- und *snm1b*-Gene zu einer Hypersensibilisierung gegenüber der ICL-induzierenden Agenzien, wie Cisplatin bzw. MMC und nicht gegenüber der ionisierenden Strahlung führte. Daraufhin wurde die Beteiligung der SNM1A- und SNM1B-Nucleasen an der ICL- und nicht an der DSB-Reparatur postuliert. In den DT40-Zellen (Ishiai *et al.*, 2004) und in vielen anderen Säugetierzellen (Yan *et al.*, 2010) wurde gezeigt, dass die SNM1C(Artemis)-defizienten Zellen eine Empfindlichkeit gegenüber der Strahlung und keine Empfindlichkeit gegenüber den ICL-induzierenden Agenzien aufzeigen. Da die Funktion der Komponenten A und B bei der Strahlenantwort im DT40-Zellsystem bis jetzt noch nicht beschrieben ist, wurde erwartet, dass die Überlebenskurve der SNM1A/B/C^{-/-}-Mutante auf der Höhe der Artemis-Mutante verläuft. Wie die Überlebensexperimente der Artemis (SNM1C)-Einzelmutante gezeigt haben, sind sie nur im Vergleich zum WT moderat strahlenempfindlich. Die viel größere Differenz der Überlebensfähigkeit zwischen WT- und SNM1A/B/C^{-/-}- als zwischen WT- und Art^{-/-}-Kurven lässt vermuten, dass es entgegen den zuvor durchgeführten Untersuchungen mit der SNM1A/B^{-/-}-Doppelmutante im DT40-Zellsystem eine Beteiligung der A- und B-Komponenten bei der Strahlenantwort gibt. Die Funktionen von SNM1A und SNM1B/Apollo werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Wie auch Artemis/SNM1C wurden diese Proteine als Nucleasen charakterisiert (Sengerová *et al.*, 2012). Eine Studie mit Mauszellen und humanen Krebszellen zeigte, dass SNM1A eine wenig bedeutende bis keine Rolle bei der DSB-Reparatur hat. Lediglich wird der SNM1A-Nuclease in den Säugetierzellen eine Zellzyklus-regulatorische Funktion zugeschrieben. Vermutlich ist sie an der Aktivierung des G2/M-Checkpoints beteiligt (Akhter & Legerski, 2008). Eine Studie, welche die Funktion

von SNM1B in den humanen Zellen untersucht hat, beschrieb, dass dieser Faktor ebenfalls eine spezifische Rolle in der Reparatur von MMC- oder Cisplatin-induzierten *ICL*-Schäden spielt und sich nicht an der Reparatur der strahleninduzierten Läsionen beteiligt (Bae *et al.*, 2008). Auf der anderen Seite gab es jedoch eine frühere Arbeit mit der HeLa-Zelllinie, die eine gewisse Bedeutung von SNM1B/Apollo in der Reparatur nach ionisierender Strahlung nachweisen konnte. Es wurde für die Zellen, deren SNM1B/Apollo-Aktivität mittels siRNA (*small interference RNA*) herunterreguliert wurde, eine mit si53BP1-Zellen vergleichbare Strahlenempfindlichkeit im Überlebensexperiment festgestellt. Diese Studie postulierte, dass die SNM1B/Apollo-Nuclease in die Strahlenantwort eingeordnet werden kann (Demuth *et al.*, 2004). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Zellzyklusphasen-spezifischen Reparaturstudien der *Art^{-/-}* und der *SNM1A/B/C^{-/-}*-Mutante, sowohl auf der Ebene der γ H2AX-Foci, als auch auf der chromosomalen Ebene, zeigen, dass die Abwesenheit der Proteine SNM1 A, B und C in allen Phasen des Zellzyklus, bis auf die mittlere S-Phase, zu einer verminderten Reparaturkapazität geführt hat. Des Weiteren wurde beobachtet, dass es eine differentielle Beteiligung der drei Proteine gibt. So liegt der Reparaturdefekt der Dreifachmutante in der G1-Phase auf der Höhe der Artemis (SNM1C)-Einzelmutante (Abb. 4.21). Das würde bedeuten, dass in dieser Zellzyklusphase die SNM1A und B-Proteine keine Beteiligung in der DSB-Reparatur haben und nur das SNM1C-Protein (Artemis) hier gebraucht wird. Artemis ist während c-NHEJ beteiligt und agiert als Exonuclease um DNA-Loop-Strukturen aufzulösen, die sich im Zuge dieses Vorganges, ähnlich wie auch während der V(D)J-Rekombination, ausbilden (Jeggo & O'Neill, 2002). Dieser Schritt ist notwendig, um die DNA-Enden auf die Ligation vorzubereiten und um die korrekte Reparatur zu gewährleisten. Wenn also Artemis (SNM1C) fehlen, können die DNA-DSB-Enden, die diese Prozessierung benötigen, nicht mehr über das c-NHEJ repariert werden. In der G1-Phase findet auch keine HR statt, so dass der ausgebildete Reparaturdefekt in der *Art^{-/-}* und der *SNM1A/B/C^{-/-}*-Mutante auf die Beeinträchtigung des c-NHEJ zurückzuführen ist. Die Reparaturkapazität der in der frühen S-Phase bestrahlten Zellen unterscheidet sich deutlich von derjenigen der G1-Phase Zellen. Dort wurde ein Reparaturdefekt in der *Art^{-/-}* und ein noch höherer Defekt in der *SNM1A/B/C^{-/-}*-Mutante detektiert (Abb. 4.23, B; obere Teilabbildung). Frühere Arbeiten zeigten, dass Artemis sowohl während der Reparatur über c-NHEJ als auch über HR beteiligt ist (van Gent & van der Burg M., 2007; Beucher *et al.*, 2009). Eine spätere Arbeit beschreibt eine Möglichkeit Artemis-abhängigen DSBs über ein A-EJ-Mechanismus zu reparieren (Goodarzi & Jeggo,

2012). Wie im ersten Teil dieser Arbeit anhand der c-NHEJ- und HR-Mutante gezeigt wurde, nutzen die in der frühen S-Phase bestrahlten Zellen sowohl HR als auch c-NHEJ, was mit der Lokalisation der DSBs in den replizierten bzw. in den unreplizierten Bereichen zusammenhängt. Der Reparaturdefekt der Artemis-Einzelmutante ist viel kleiner als derjenige der c-NHEJ- bzw. der HR-Mutanten (Abb. 4.23 B, obere Teilabbildung), was darauf hindeutet, dass nur ein ganz geringer Anteil der c-NHEJ- bzw. HR-abhängigen DSBs Artemis benötigen. Der noch höhere Reparaturdefekt der SNM1A/B/C^{-/-}-Mutante könnte auf die synergistische Beteiligung von allen drei Komponenten SNM1 A, B und C in der DSB-Reparatur in der frühen S-Phase bestrahlten Zellen sein. Zusammen mit der Studie von Demuth *et al.*, 2004 kann zumindest eine Beteiligung von SNM1B bei der DSB-Reparatur vorgeschlagen werden.

Die in der mittleren S-Phase bestrahlten Zellen der Art^{-/-} und der SNMA/B/C^{-/-}-Mutanten wiesen einen Reparaturvorteil gegenüber dem WT auf (Abb. 4.23, B; mittlere Teilabb.). Auch die chromosomale Analyse bestätigte diesen Effekt. Dieses ist eine analoge Situation, wie sie bereits in dieser Arbeit für die Ku70^{-/-}-Mutante beschrieben wurde. Es handelt sich vermutlich um einen Mechanismus, welcher schnell abläuft, jedoch fehlerbehaftet ist.

In der späten S-Phase wird die Funktion von Artemis allein und in Kombination mit SNM1 A und B wieder wichtig (Abb. 4.23, untere Teilabbildung). Wobei der Reparaturdefekt der SNMA/B/C^{-/-}-Mutante mit dem der Ku70^{-/-}-Mutante vergleichbar ist. Wie auch im Fall von Ku70, hängt die Reparatur der in der späten S-Phase induzierten DSBs, die in noch wenigen unreplizierten Bereichen lokalisiert sind, von Artemis und auch von allen drei Faktoren SNM1 A, B und Artemis/C ab.

Die Reparatur in der G2-Phase benötigt die Beteiligung von Artemis und stärker noch die Kombination aus SNM1 A, B und C (Artemis), was sich in den Reparaturdefekten bei Abwesenheit dieser Proteine widerspiegelt (Abb. 4.22). Dieses Verhalten wurde mit der Analyse der BrdU-negativen Metaphasen belegt (Abb. 4.24). In der G2-Phase sind alle Reparaturwege aktiv, c-NHEJ, HR und alternative Wege, die um DNA-DSB-Enden konkurrieren (Kass & Jasin, 2010). Die Beteiligung von Artemis in G2 ist für die langsame Komponente in der HR beschrieben (Deckbar *et al.*, 2007). Aufgrund des detektierten Reparaturdefektes der Art^{-/-}-Mutante erst nach 4 h, wurde vermutet, dass auch in dieser Studie die Funktion von Artemis während der HR zukommt. Die Dreifachmutante weist einen größeren Reparaturdefekt als die Art^{-/-}-Mutante auf. Dieses ist nun ein weiterer Hinweis darauf, dass SNM1 A und SNM1 B zusammen mit Artemis an der Reparatur der strahleninduzierten DSBs beteiligt sind.

5.2.2 Funktion von Artemis als ein molekularer Schalter

Die bisherigen Arbeiten mit dem DT40-Zellsystem haben die Rolle von Artemis als nur einen c-NHEJ-Faktor beleuchtet (Iwabuchi *et al.*, 2006). Seine Funktion während der HR wurde noch nicht beschrieben. Die in dieser Arbeit erstellten Reparaturkinetiken der in der G2-Phase bestrahlten Zellen geben einen Hinweis darauf, dass einige wenige DSBs auch im DT40-Zellsystem unter Beteiligung von Artemis über den HR-Weg repariert werden. Neben der Funktion während der HR zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Artemis eine weitere Funktion übernimmt, insbesondere wenn c-NHEJ oder HR abwesend ist. Um Artemis in den Zusammenhang in die HR einzubeziehen, wurden $Rad54^{-/-}/Art^{-/-}$ für das klonogene Überleben bestrahlt. Die Überlebenskurve dieser Doppelmutante verlief unter der des WT, auf der Höhe von $Art^{-/-}$ -Mutante. Im Vergleich zu der $Rad54^{-/-}$ -Einzelmutante waren die Zellen jedoch deutlich resistenter (Abb. 4.20). Die HR-defizienten Zellen profitieren somit von der Artemis-Abwesenheit. Das bedeutet, dass diese Zellen ein effizientes c-NHEJ oder aber einen alternativen Reparaturweg zur Verfügung haben. Diese Wege sollten dann zu einer verbesserten Überlebensfähigkeit der $Rad54^{-/-}/Art^{-/-}$ -Mutante im Vergleich zur $Rad54^{-/-}$ -Einzelmutante beitragen. Ein alternativer Prozess wird jedoch als ein langsamer und fehleranfälligerer Mechanismus als c-NHEJ beschrieben (Dueva & Iliakis, 2013). Basierend auf den Studien des klonogenen Überlebens kann zunächst das c-NHEJ als möglicher Mechanismus in der $Rad54^{-/-}/Art^{-/-}$ -Mutante angenommen werden. Das bedeutet, dass diese Zellen sowohl in der G1/frühen S- als auch in der späten S/G2-Phase einen ausgeprägten Reparaturdefekt auf der Ebene der γ H2AX-Foci haben sollten. Dieses war jedoch nicht der Fall. Nur die Zellen der G1-Phase haben einen Artemis-spezifischen Reparaturdefekt aufgewiesen (Abb. 4.21). Für die G1-Phase scheint also das c-NHEJ nur bis zum Artemis-Schritt in der Transduktionskaskade möglich zu sein. Da das Ku-Protein anwesend ist und als erstes an die Bruchenden bindet, wird c-NHEJ aktiviert. Ein korrektes c-NHEJ benötigt aber auch die Anwesenheit von Artemis. Es könnte somit zu einem Wechsel zwischen c-NHEJ und A-EJ-Mechanismus beim Artemis-abhängigen Schritt kommen. In den anderen Zellzyklusphasen wurde der $Rad54^{-/-}$ -bedingte Reparaturdefekt aufgehoben (Abb. 4.22; 4.23). Auch die chromosomalen Studien haben diesen Effekt untermauert (Abb. 4.24, B). Bis auf die G2-Phase handelte es sich um die Replikation-assoziierte DSB-Reparatur. Wie bereits anhand der $Rad54^{-/-}$ -Einzelmutante gezeigt wurde, sind in ihr viele sekundäre DSBs aufgetreten. Diese Schäden werden in der mittleren und späten S-Phase bestrahlten Zellen in einer starken Abhängigkeit und nach der Bestrahlung in

der frühen S-Phase in einer schwächeren Abhängigkeit über HR repariert (Abb. 4.23, B). Dieses wurde für die Rad54^{-/-}-Einzelmutante auch mit dem Ansatz der moderaten Aphidicolin-Konzentration gezeigt (Abb. 4.13). Wenn Rad54^{-/-}/Art^{-/-}-Zellen eine bessere Überlebensfähigkeit besitzen und besser reparieren als die Rad54^{-/-}-Einzelmutante, insbesondere in den Zellzyklusphasen, in denen die Rad54^{-/-}-Einzelmutante eine Beeinträchtigung der Reparatur hat, so könnte es bedeuten, dass Artemis eine störende Funktion in der HR-Mutante während der frühen, mittleren und späten S-Phase besitzt. Im Gegensatz zur Rad54^{-/-}-Einzelmutante werden in der Rad54^{-/-}/Art^{-/-}-Doppelmutante keine sekundären DSBs angehäuft. Sekundäre DSBs in der HR-Mutante kommen hauptsächlich dadurch zustande, dass die für die HR determinierten ein-endigen DSBs unrepariert verbleiben und in die zwei-endigen DSBs umgewandelt werden. Das in der HR-Mutante aktive c-NHEJ kann die ein-endigen DSBs nur teilweise reparieren, wohingegen Faktoren der A-EJ-Wege eine möglicherweise höhere Affinität zu diesen Schäden haben. Fehlt in der HR-Mutante die Artemis-abhängige Reparatur über c-NHEJ, können die Schäden den alternativen Reparaturwegen zugeleitet werden. Auch die Situation der in der späten S- und G2-Phase bestrahlten Zellen zeigte eine Verbesserung der Reparatur gegenüber der Rad54^{-/-}-Einzelmutante. Auch in diesen Zellzyklusphasen kann die Abwesenheit von Rad54 und Artemis die A-EJ-Mechanismen aktivieren.

Für die Analyse der Funktion von Artemis in einem c-NHEJ-defizienten Hintergrund, wurden die Zellen der Ku70^{-/-}/Art^{-/-}-Mutante untersucht. Das klonogene Überleben dieser Zelllinie zeigte, dass die Zellen keinen für die Ku70^{-/-}-Einzelmutante typischen biphasischen Verlauf mehr aufweisen. Die Zellen waren, verglichen mit dem WT, auf dem gesamten untersuchten Bestrahlungsbereich strahlensensitiv. Die Überlebenskurve lag auf der Höhe der Art^{-/-} und Rad54^{-/-}/Art^{-/-}-Mutanten (Abb. 4.20). Ku70 und Art sind Faktoren des c-NHEJ, so dass wenn sie fehlen, die Reparatur entweder über die HR oder über alternative Wege ablaufen kann. Auf der Ebene der γ H2AX-Foci in G1 hat sich gezeigt, dass die Abwesenheit von Artemis in den Ku70^{-/-}-Zellen die Reparatur verbessert (Abb. 4.21). Da die HR in G1 unterdrückt wird, kommt hier nur ein alternativer Weg in Frage, welcher durch das Fehlen der c-NHEJ Faktoren Ku70 und Artemis, die mit den Faktoren des A-NHEJ um DSB-Enden konkurrieren, volle Aktivierung erlangt (Wang *et al.*, 2006). Ähnlich, wie bei den Rad54^{-/-}/Art^{-/-}-Zellen, läuft die Reparatur der Ku70^{-/-}/Art^{-/-}-Zellen in allen anderen Zellzyklusphasen schneller als in der Ku70^{-/-}-Einzelmutante ab, was darauf hindeutet, dass die Reparatur über einen A-EJ-Mechanismus

abläuft. Eine aktuelle Studie von Kurosawa *et al.*, 2013 hat einen analogen verbessernden Effekt der Artemis-Deletion in den menschlichen c-NHEJ-defizienten Zellen gezeigt.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit scheint Artemis eine Funktion eines molekularen Schalters auszuführen. Dieser Schalter reguliert nicht nur den von Kurosawa *et al.*, 2013 beschriebenen Übergang von c-NHEJ zu HR, sondern kann den Wechsel von c-NHEJ- bzw. HR- zu einem alternativen Weg ermöglichen, damit die Zelle trotz der Abwesenheit der wichtigen Reparaturwege überlebensfähig bleibt. Im Umkehrschluss bedeutet das, dass Artemis die alternativen Wege unterdrückt und für die korrekte Reparatur über HR und c-NHEJ sorgt (Abb. 5.3).

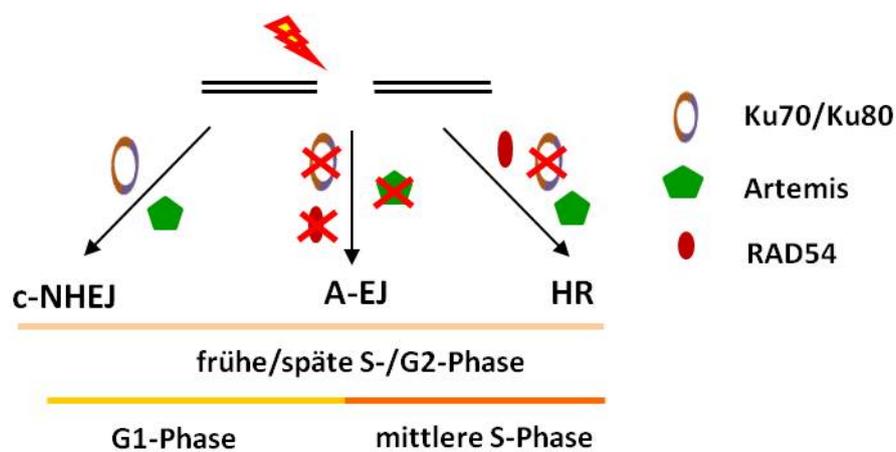


Abb. 5.3: Einordnung von Artemis in die DSB-Reparatur im DT40-Zellsystem.
Artemis ist ein molekularer Schalter, der die DSBs von c-NHEJ und HR ins A-EJ überführt.

6 Ausblick

Mit Hilfe der Zellzyklusphasen-spezifischen γ H2AX-Foci-Analysen, Chromosomen-Untersuchungen und Überlebensexperimenten konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das aus Studien mit Säugetierzellen bekannte Reparaturmodell zum Gebrauch von Reparaturwegen durch den Zellzyklus auch für das DT40-Zellsystem gültig ist. Eine Ausnahme zum Modell stellt jedoch die mittlere S-Phase dar. Dort zeigte sich dass die Zellen der c-NHEJ-Mutante eine schnellere Reparatur als WT-Zellen aufweisen. Der Hauptreparaturweg zur Reparatur strahleninduzierter DSBs nach Bestrahlung in G1- und G2-Phase ist sowohl für das Säugetiersystem als auch für das DT40-Zellsystem das c-NHEJ. Aber auch für die Reparatur der DSBs in unreplizierten DNA-Bereichen, die vermehrt nach Bestrahlung in der frühen S-Phase induziert werden, ist das c-NHEJ verantwortlich. Die HR ist für die Reparatur von DSBs in bereits replizierten Bereichen zuständig und ist daher ab der mittleren S- bis in die späte S-Phase der dominierende Prozess. Anhand der Ergebnisse mit der Doppelmutante, der ein wichtiges Protein zur DSB-Erkennung (Ku70) und ein weiteres Protein zur Homologiesuche (Rad54) fehlen, wurde in dieser Arbeit beobachtet, dass sie einen gewissen Anteil an DSBs reparieren kann. Es wird daher angenommen, dass es sich um alternative Reparaturwege, MMEJ und A-NHEJ, handelt. In Säugetierzellen werden diese Reparaturwege als ein langsamer, jedoch sehr fehleranfälliger Prozess beschrieben. Für DT40-Zellen ist noch unklar, mit welcher Kinetik diese Prozesse ablaufen, was in weiterführenden Studien bestimmt werden soll. Für MMEJ und A-NHEJ ist bislang bekannt, dass sie Ku70-unabhängig ablaufen. Beide Wege benötigen die Beteiligung vom MRN-Komplex und von seinem Partner CtIP. Weitere Proteine, wie WRN und PARP-1 sind ebenfalls daran beteiligt. Nach der Prozessierung der Enden werden diese via LIG1 (A-NHEJ) und LIG3 (MMEJ) verknüpft. Es bleibt zu klären, welchen Beitrag die genannten Wege zur Reparatur von DSBs leisten und wie sie durch den Zellzyklus reguliert werden. Für die Untersuchung, ob generell ein Ku70-unabhängiger Mechanismus vorliegt, sollten die DT40-Zellen mit einem PARP-1-Inhibitor behandelt werden und hinsichtlich der Reparatur untersucht werden. Ob es sich um eine Aktivierung von MMEJ handelt, würde die Anwendung von LIG1-Inhibitor Hinweise liefern. Für das A-NHEJ sollte ein LIG3-Inhibitor verwendet werden. Ein anderes Unterscheidungskriterium zwischen MMEJ und A-NHEJ ist das Auftreten von Mikrohomologien, die den Literaturhinweisen nach nur während MMEJ auftreten. Mit DNA-Sequenziermethoden können diese Bereiche entschlüsselt werden. CtIP ist ein weiterer Kandidat, welcher die Funktion von MMEJ aber auch die

der HR unterstützt. Entscheidender Unterschied zwischen der Resektion während MMEJ und HR ist die Länge der resektierten DNA-Bereiche. Für die DT40-Zellen ist bekannt, dass neben der Resektion in der späten S- und der G2-Phase während der HR, dieser Faktor während der Resektion in der G1-Phase beteiligt ist. Reparaturstudien mit der CtIP-Mutante können die Reparatur über MMEJ charakterisieren. Als Ergänzung zu den bereits in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten soll die Messung der Resektion in der S- und G2-Phase mithilfe von Rad51-Foci durchgeführt werden. Das Rad51 wird als ein etablierter HR-Marker beschrieben. Etablierung der Rad51-Foci-Analyse nach 1 Gy-Bestrahlung wird eine genauere Bestimmung des Anteils an HR während der S- und der G2-Phase in DT40-Zellen ermöglichen. Bei den Experimenten dieser Arbeit, die einen Vergleich zwischen der Zellzyklusphasen-spezifischen Überlebensfähigkeit und der Reparatur aufstellten, hat sich indirekt gezeigt, dass die Qualität der Reparatur die Zellüberlebensfähigkeit bedingt. Angenommen, dass die in der mittleren S-Phase bestrahlten Zellen der Ku70^{-/-}-Mutante über ein A-EJ-Mechanismus reparieren, so sollten die Metaphasen dieser Zellen viele Translokationen zeigen, welche dann als ein Hinweis auf qualitativ schlechte Reparaturprodukte gesehen werden können (Weinstock *et al.*, 2007). Für die Messung der Translokationen sollen geeignete Protokolle entwickelt werden.

Um die Untersuchungen der Artemis-Funktion während der DSB-Reparatur zu erweitern, sollten Zellzyklusphasen-spezifische Überlebensexperimente durchgeführt und mit Reparaturstudien direkt verglichen werden. Ebenso sollten Untersuchungen zu Translokationen in den Artemis-defizienten Zellen durchgeführt werden, um die Schalter-Funktion zugunsten der A-EJ-Mechanismen zu bestätigen.

7 Literaturverzeichnis

- Adachi N., Ishino T., Ishii Y., Takeda S., Koyama H. (2001).** DNA ligase IV-deficient cells are more resistant to ionizing radiation in the absence of Ku70: Implications for DNA double-strand break repair. *PNAS, Genetics*. **98(21)**: 12109-12113.
- Adachi N., So S., Koyama H. (2004).** Loss of Nonhomologous End-Joining Confers Camptothecin Resistance in DT40 Cells: Implications For the Repair of Topoisomerase I-mediated DNA Damage. *J. Biol. Chem.* **279**: 37343-37348.
- Ahnesorg P., Smith P., Jackson S. P. (2006).** XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell*. **124**: 301-313.
- Akhter S., Legerski R. J. (2008).** SNM1A acts downstream of ATM to promote the G1 cell cycle checkpoint. *Bioch. and Bioph. Res. Comm.* **377**: 236-241.
- Arlt M. F., Casper A. M., Glover T. W. (2003).** Common fragile sites. *Cytogenet. Genome Res.* **100**: 92-100.
- Audebert M., Salles B., Calsou P. (2004).** Involvement of poly(ADPribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J. Biol. Chem.* **279**: 55117-55126.
- Baba T. W., Giroir B. P., Humphries E. H. (1985).** Cell lines derived from avian lymphomas exhibit two distinct phenotypes. *Virology*. **144(1)**: 139151.
- Bae J-B., Mukhopadhyay S. S., Liu L., Zhang N., Tan J., Akhter S., Liu X., Shen X., Li L., Legerski R. J. (2008).** Snm1B/Apollo mediates replication fork collapse and S Phase checkpoint activation in response to DNA interstrand cross-links. *Oncogene*. **27**: 5045-5056.
- Banath J. P., MacPhail S. H., Olive P. L. (2004).** Radiation Sensitivity, H2AX Phosphorylation, and Kinetics of Repair of DNA Strand Breaks in Irradiated Cervical Cancer Cell Lines. *Cancer Research*. **64**: 7144-7149.
- Banfalvi G. (2008).** Cell cycle synchronization of animal cells and nuclei by centrifugal elutriation. *Nature Protocols*. **3(4)**: 663-673.
- Bannai S. (1992).** Use of 2-mercaptoethanol in cell culture. *Hum Cell*. **5(3)**: 292-297.
- Bartek J., Lukas C., Lukas J. (2004).** Checking on DNA damage in S phase. *Nature*. **5**: 792-803.
- Beucher A., Birraux J., Tchouandong L., Barton O., Shibata A., Conrad S., Goodarzi A. A., Krempler A., Jeggo P. A., Löbrich M. (2009).** ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *The EMBO Journal*. 1-15.
- Bezzubova O., Silbergleit A., Yamaguchi-Iwai Y., Takeda S., Buerstedde J-M. (1997).** Reduced X-Ray Resistance and Homologous Recombination Frequencies in a *RAD54*^{-/-} Mutant of the Chicken DT40 Cell Line; *Cell*. **18(89)**: 185-193.

-
- Binz S. K., Sheehan A. M., Wold M. S. (2004).** Replication Protein A phosphorylation and the cellular response to DNA damage. *DNA Repair*. **3**: 1015-1024.
- Block W. B., Yu Y., Merkle D., et al. (2004).** Autophosphorylation-dependent remodeling of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit regulates ligation of DNA ends. *Nucleic Acids Res.* **32**: 4351-4357.
- Boonstra J. (2003).** Progression through the G1-phase of the ongoing cell cycle. *J. Cell Biochem.* **90**: 244-252.
- Boulton S., Jackson S. P. (1996).** *Saccharomyces cerevisiae* Ku70 potentiates illegitimate DNA double-strand break repair and serves as a barrier to error-prone DNA repair pathways. *EMBO J.* **15**: 5083-5103.
- Branzei D., Foiani M. (2008).** Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 297-308.
- Bravard A., Vacher M., Gouget B., Coutant A., de Boisferon F. H., Marsin S., Chevillard S., Radicella J. P. (2006).** Redox regulation of human OGG1 activity in response to cellular oxidative stress. *Mol. Cell. Biol.* **26**: 7430-7436.
- Brewer B. J., Fangman W. L. (1988).** A replication fork barrier at the 3' end of yeast ribosomal RNA genes. *Cell.* **55**: 637-643.
- Brown W. R. A., Hubbard S. J., Tickle C. Wilson S. A. (2003).** The Chicken as a Model for Large-Scale Analysis of Vertebrate Gene Function. *Nat. Rev. Gen.* **4**: 87-98.
- Bryant P. E., Mozdarani H. (2007).** A comparison of G2 phase radiation-induced chromatid break kinetics using calyculin-PCC with those obtained using colcemid block. *Mutagenesis*. **22 (5)**: 359-362.
- Buck S. B., Bradford J., Gee K. R., Agnew B. J., Clarke S. T., Salic A. (2008).** Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies. *Bio Techniques*. **44**: 927-929.
- Buerstedde J-M., Takeda S. (1991).** Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. *Cell.* **67**: 179-188.
- Buerstedde J. M., Takeda S. (2006).** Reviews and Protocols in DT40 Research. *Springer Sub-cellular Biochemistry*. Vol. **40**.
- Bzymek M., Thayer N. H., Oh S. D., Kleckner N., Hunter N. (2010).** Double Holliday junctions are intermediates of DNA break repair. *Nature*. **464**: 937-941.
- Capp J. P., Boudsocq F., Bertrand P., Laroche-Clary A., Pourquier P., Lopez B. S. et al. (2006).** The DNA polymerase lambda is required for the repair of non-compatible DNA double strand breaks by NHEJ in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **34**: 2998-3007.

-
- Capp J. P., Boudsocq F., Besnard A. G., Lopez B. S., Cazaux C., Hoffmann J. S. et al. (2007).** Involvement of DNA polymerase mu in the repair of a specific subset of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **35**: 3551–3560.
- Celeste A., Fernandez-Capetillo O., Kruhlak M. J., Pilch D. R., Staudt D. W., Lee A., Bonner R. F., Bonner W. M., Nussenzweig A. (2003).** Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nature Cell Biology.* **5**: 675- 679.
- Chaudhuri J., Khuong, C., Alt F. W. (2004).** Replication protein A interacts with AID to promote deamination of somatic hypermutation targets. *Nature.* **430**: 992-998.
- Chen B. P., Chan D. W., Kobayashi J., Burma S., Asaithamby A., Morotomi-Yano K., Botvinick E., Qin J., Chen D. J. (2005).** Cell cycle dependence of DNA-dependent protein kinase phosphorylation in response to DNA double strand breaks. *J. Biol. Chem.* **280**: 14709-14715.
- Cheng Q., Barboule N., Frit P., Gomez D., Bombarde O., Couderc B., Ren G. S., Salles B., Calsou P. (2011).** Ku counteracts mobilization of PARP1 and MRN in chromatin damaged with DNA double-strand breaks. *Nucl. Ac. Res.* Epub ahead of print.
- Ciccia A., Elledge S. J. (2010).** The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell.* **40**: 179-204.
- Corneo B., Wendland R. L., Deriano L., Cui X., Klein I. A., Wong S.-Y., Arnal S., Holub A. J., Weller G. R., Pancake B. A., Shah S., Brandt V. L., Meek K., Roth D. B. (2007).** Rag mutations reveal robust alternative end joining. *Nature.* **449**: 483-486.
- D'Amours D., Jackson S. P. (2002).** The Mre11 complex: At the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* **3**: 317-327.
- Darroudi F., Wiegant W., Meijers M., Friedl A. A., van der Burg M., Fomina J. et al. (2007).** Role of Artemis in DSB repair and guarding chromosomal stability following exposure to ionizing radiation at different stages of cell cycle. *Muta. Res.* **615**: 111-124.
- Deem A., Keszthelyi A., Blackgrove T., Vayl A., Coffey B., Mathur R., Chabes A., Malkova A. (2011).** Break-Induced Replication Repair Is Highly Inaccurate. *PLoS Biology.* **9(2)**.
- Demuth I., Digweed M., Concannon P. (2004).** Human SNM1B is required for normal cellular response to both DNA interstrand crosslink-inducing agents and ionizing radiation. *Oncogene.* **23**: 8611-8618.
- Deriano L., Roth D. B. (2013).** Modernizing the Nonhomologous End-Joining Repertoire: Alternative and Classical NHEJ Share the Stage. *Annu. Rev. Genet.* **47**: 451-473.
- Deshpande A. M., Newlon C. S. (1996).** DNA replication fork pause sites dependent on transcription. *Science.* **272**: 1030-1033.
- Dueva R., Iliakis G. (2013).** Alternative pathways of non-homologous end joining (NHEJ) in genomic instability and cancer. *Transl Cancer Res.* **2(3)**: 163-177.

Dupre A., Boyer-Chatenet L., Gautier J. (2006). Two-step activation of ATM by DNA and the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nature Structural & Molecular Biology*. **13**: 451-457.

Durkin S. G., Glover T. W. (2007). Chromosome fragile sites. *Annu. Rev. Genet.* **41**: 169-192.

Elder F. F. B., Robinson T. J. (1989). Rodent fragile sites: are they conserved? Evidence from mouse and rat. *Chromosoma*. **97**: 459-464.

Ellis N. A., Groden J., Ye T. Z., Straughen J., Lennon D. J., Ciocci S., Proytcheva M., German J. (1995). The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell*. **83**: 655-666.

Essers J., Hendriks R. W., Swagemakers S. M. A., Troelstra C., de Wit J., Bootsma D., Hoeijmakers J. H. J., Kanaar R. (1997). Disruption of mouse RAD54 reduces ionizing radiation resistance and homologous recombination. *Cell*. **89**: 195-204.

Ferguson D. O., Alt F. W. (2001). DNA double strand break repair and chromosomal translocation: lessons from animal models. *Oncogene*. **20(40)**: 5572-5579.

Freudenreich C. H. (2007). Chromosome fragility: molecular mechanisms and cellular consequences. *Front Biosci*. **12**: 4911-4924.

Gellert M. (2002). V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **71**: 101-132.

George J. W., Kreuzer K. N. (1996). Repair of double-strand breaks in bacteriophage T4 by a mechanism that involves extensive DNA replication. *Genetics*. **143**: 1507-1520.

Goodarzi A. A., Jeggo P. A. (2012). The Heterochromatic Barrier to DNA Double Strand Break Repair: How to Get the Entry Visa. *Int. J. Mol. Sci.* **13**: 11844-11860.

Goodarzi A. A., Noon A. T., Deckbar D., Ziv Y., Shiloh Y., Löbrich M., Jeggo P. A. (2008). ATM Signaling Facilitates Repair of DNA Double-Strand Breaks Associated with Heterochromatin. *Molecular Cell*. **31(2)**.

Goulian M., Richards S. H., Heard C. J., Bigsby B. M. (1990). Discontinuous DNA synthesis by purified mammalian proteins. *J. Biol Chem.* **265**: 18461-18471.

Grabarz A., Barascu A., Guirouilh-Barbat J., Lopez B. S. (2012). Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining. *Am. J. Cancer Res.* **2(3)**: 249-268.

Groth P., Orta M. L., Elvers I., Majumder M. M., Lagerqvist A., Helleday T. (2012). Homologous recombination repairs secondary replication induced DNA double-strand breaks after ionizing radiation. *Nucleic Acids Research*. 1-10.

Guirouilh-Barbat J., Huck S., Lopez B. S. (2008). S-phase progression stimulates both the mutagenic KU-independent pathway and mutagenic processing of KU-dependent intermediates, for nonhomologous end joining. *Oncogene*. **27**: 1726-1736.

-
- Haber J. E. (2008).** Alternative endings. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105(2):** 405-406.
- Hall E. J., Giaccia A. J. (2006).** Radiobiology for the Radiologist. 6. Auflage. *Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia USA.*
- Helleday T. (2003).** Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mutation Research.* **532:** 103-115.
- Helleday T., Lo J., van Gent D. C., Engelward B. P. (2007).** DNA double-strand break repair: From mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair.* **6:** 923-935.
- Heller R. C., Marians K. J. (2006a).** Replisome assembly and the direct restart of stalled replication forks. *Nat Rev. Mol. Cell. Biol.* **7:** 932-943.
- Heller R. C., Marians K. J. (2006b).** Replication fork reactivation downstream of a blocked nascent leading strand. *Nature.* **439:** 557-562.
- Heyer W. D., Li X., Rolfmeier M., Zhang X. P. (2006).** Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination? *Nucleic Acids Res.* **34:** 4115-4125.
- Ichikawa A., Negishi M., Tomita K., Ikegami S. (1980).** Aphidicolin: a specific inhibitor of DNA synthesis in synchronous mastocytoma P-815 cells. *Japan. J. Pharmacology.* **30:** 301-308.
- Iijima K., Ohara M., Seki R., Tauchi H. (2008).** Dancing on Damaged Chromatin: Functions of ATM and the RAD50/MRE11/NBS1 Complex in Cellular Responses to DNA Damage. *Journal of Radiation Research.* **49:** 451-464.
- Iliakis G. (1991).** The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *Bioessays.* **13(12):** 641-648.
- International Chicken Genome Sequencing Consortium (2004).** Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature.* **432(9):** 695-777.
- Ira G., Malkova A., Liberi G., Foiani M., Haber J. E. (2003).** Srs2 and Sgs1-Top3 suppress crossovers during double-strand break repair in yeast. *Cell.* **115:** 401-411.
- Ishiai M., Kimura M., Namikoshi K., Yamazoe M., Yamamoto K., Arakawa H., Agematsu K., Matsushita N., Takeda S., Buerstedde J-M., Takata M. (2004).** DNA Cross-Link Repair Protein SNM1A Interacts with PIAS1 in Nuclear Focus Formation. *Molecular and Cellular Biology.* **24(24):** 10733-10741.
- Ishii T., Sugita Y., Bannai S. (1981).** Mechanism of growth promotion of mouse lymphoma L1210 cells in vitro by feeder layer or 2-mercaptoethanol. *J. Cell Physiol.* **107(2):** 283-293.
- Iwabuchi K., Hashimoto M., Matsui T., Kurihara T., Shimizu H., Adachi N., Ishiai M., Yamamoto K., Tauchi H., Takata M., Koyama H., Date T. (2006).** 53BP1 contributes to survival of cells irradiated with X-ray during G1 without Ku70 or Artemis. *Genes to Cells.* **11:** 935-948.

-
- Jackson S. P. (2002).** Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*. **23** (5): 687-696.
- Jackson S. P., Bartek J. (2009).** The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. **461**: 1071-1078.
- Jackman M., Kubota Y., den Elzen N., Hagting A., Pines J. (2002).** Cyclin A- and cyclin E-Cdk complexes shuttle between the nucleus and the cytoplasm. *Mol. Biol. Cell*. **13**: 1030-1045.
- Jain S., Sugawara N., Lydeard J., Vaze M., Tanguy L. G. N., Haber J. E. (2009).** A recombination execution checkpoint regulates the choice of homologous recombination pathway during DNA double-strand break repair. *Genes Dev*. **23**: 291-303.
- Jeggo P., O'Neill P. (2002).** The Greek Goddess, Artemis, reveals the secrets of her cleavage. *DNA Repair*. **1**: 771-777.
- Johnson R. D., Jasin M. (2001).** Double-strand-break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Biochemical Society Transactions*. **29(2)**: 196-201.
- Jones J., Simkus C. (2009).** The roles of the RAG1 and RAG2 "non-core" regions in V(D)J recombination and lymphocyte development. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. **57**: 105-116.
- Kabotyanski E. B., Gomelsky L., Han J. O., Stamato T. D., Roth D. B. (1998).** Double-strand break repair in Ku86- and XRCC4-deficient cells. *Nucleic Acids Research*. **26**: 5333-5342.
- Karanam K., Ran Kafri R., Loewer A., Lahav G., (2012).** Quantitative Live Cell Imaging Reveals a Gradual Shift between DNA Repair Mechanisms and a Maximal Use of HR in Mid S Phase. *Mol. Cell*. **47(2)**: 320-329.
- Kass E. M., Jasin M. (2010).** Collaboration and competition between DNA double-strand break repair pathways. *FEBS Letters*. **584**: 3703-3708.
- Kegel P., Riballo E., Kuhne M., Jeggo P. A., Lobrich M. (2007).** X-irradiation of cells on glass slides has a dose doubling impact. *DNA Repair*. **6**: 1692-1697.
- Kennedy R. D., D'Andrea A. D. (2006).** DNA repair pathways in clinical practice: lessons from pediatric cancer susceptibility syndromes. *J. Clin. Oncol*. **24**: 3799-3808.
- Khanna K. K., Jackson S. P. (2001).** DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*. **27**: 247-254.
- Kiefer J. (1990).** Biological radiation effects. *Springer Berlin, Heidelberg, New York, Tokio*.
- Kinner A., Wu W. Q., Staudt C., Iliakis G. (2008).** gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Research*. **36**: 5678-5694.
- Koch C. A., Agyei R., Galicia S., Metalnikov P., O'Donnell P., Starostine A. et al. (2004).** Xrcc4 physically links DNA end processing by polynucleotide kinase to DNA ligation by DNA ligase IV. *EMBO J*. **23**: 3874-3885.

Koff A., Giordano A., Desai D., Yamashita K., Harper J. W., Elledge S., Nishimoto T., Morgan D. O., Franza B. R., Roberts J. M. (1992). Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science*. **257**: 1689-1694.

Krempler A., Deckbar D., Jeggo P. A., Löbrich M. (2007). An Imperfect G2/M Checkpoint Contributes to Chromosome Instability Following Irradiation of S and G2 Phase Cells. *Cell Cycle*. **6(14)**: 1682-1686.

Kurosawa A., Saito S., So S., Hashimoto M., Iwabuchi K., Watabe H., Adachi N. (2013). DNA ligase IV and Artemis Act Cooperatively to Suppress Homologous Recombination in Human Cells: Implications for DNA Double-Strand Break Repair. *PlosOne*. **8(8)**: 1-11.

Lavin M. F. (2008). Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signaling and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 759-769.

Lee G. S., Neiditch M. B., Salus S. S., Roth D. B. (2004). RAG Proteins Shepherd Double-Strand Breaks to a Specific Pathway, Suppressing Error-Prone Repair, but RAG Nicking Initiates Homologous Recombination. *Cell*. **117**: 171-184.

Lee-Theilen M., Matthews A. J., Kelly D., Zheng S., Chaudhuri J. (2011). CtIP promotes microhomology-mediated alternative end joining during class-switch recombination. *Nature Struct. and Mol. Biol.* **18(1)**: 75-79.

Levenson V., Hamlin J. L. (1993). A general protocol for evaluating the specific effects of DNA replication inhibitors. *Nucleic Acids Res.* **21(17)**: 3997-4004.

Leman A. R., Nocguchi E. (2013). The Replication Fork: Understanding the Eukaryotic Replication Machinery and the Challenges to Genome Duplication. *Genes (Basel)*. **4(1)**: 1-32.

Li X., Heyer W-D. (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res.* **18**: 99-113.

Lieber M. R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **79**: 181-211.

Löbrich M., Rydberg B., Cooper P. K. (1995). Repair of x-ray-induced DNA double-strand breaks in specific Not I restriction fragments in human fibroblasts: joining of correct and incorrect ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 12050-12054.

Löbrich M., Jeggo P. A. (2007). The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat. Rev. Cancer.* **7**: 861-869.

Löbrich M., Shibata A., Beucher A., Fisher A., Ensminger M., Goodarzi A. A., Barton O., Jeggo P. A. (2010). gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle*. **9**: 662-669.

Loeb A. M., Arlt M. F., Morrish T. A., Glover T. W. (2001). Conservation of FRA3B and FRAXB in the great apes. *Am. J. Hum. Genet.* **69**: 329.

-
- Luger K., Mader A. W., Richmond R. K., Sargent D. F., Richmond T. J. (1997).** Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8Å resolution. *Nature*. **389**: 251-260.
- Ma K., Qiu L., Mrasek K., Zhang J., Liehr L., Gonçalves Quintana L., Li Z. (2012).** Common Fragile Sites: Genomic Hotspots of DNA Damage and Carcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **13**: 11974-11999.
- Ma Y., Pannicke U., Lu H., Niewolik D., Schwarz K., Lieber M. R. (2005).** The DNA-dependent protein kinase catalytic subunit phosphorylation sites in human Artemis. *J. Biol. Chem.* **280**: 33839-33846.
- Ma Y., Pannicke U., Schwarz K., Lieber M. R. (2002).** Hairpin Opening and Overhang Processing by an Artemis/DNA-Dependent Protein Kinase Complex in Nonhomologous End-Joining and V(D)J Recombination. *Cell*. **108 (22)**: 781-794.
- Mahrhofer H., Burger S., Oppitz U., Flentje M., Djuzenova C. S. (2006).** Radiation induced DNA damage and damage repair in human tumor and fibroblast cell lines assessed by histone H2AX phosphorylation. *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* **64**: 573-580.
- Malkova A., Ivanov E. L., Haber J. E. (1996).** Double-strand break repair in the absence of *RAD51* in yeast: a possible role for break-induced DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**: 7131-7136.
- Malkova A., Naylor M. L., Yamaguchi M., Ira G., Haber J. E. (2005).** *RAD51*-dependent break-induced replication differs in kinetics and checkpoint responses from *RAD51*-mediated gene conversion. *Mol. Cell Biol.* **25**: 933-944.
- McAllister B. F., Greenbaum I. F. (1997).** How common are common fragile Sites: variation of aphidicolin-induced chromosomal fragile sites in a population of the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*). *Hum. Genet.* **100**: 182-188.
- McQueen H. A., Siriaco G., Bird A. P. (1998).** Chicken Microchromosomes Are Hyperacetylated, Early Replicating and Gene Rich. *Genome Research*. **8**: 621-630.
- McVey M., Lee S. E. (2008).** MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends in Genetics*. **24(11)**: 529-538.
- Mimitou E. P., Symington L. S. (2009).** Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends Biochem. Sci.* **34**: 264-272.
- Mirkin E. V., Mirkin S. M. (2007).** Replication fork stalling at natural impediments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**: 13-35.
- Mitelman F., Johansson B., Mertens F. (2007).** The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat. Rev. Cancer*. **7**: 233-245.
- Mladenov E., Iliakis G. (2011).** Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end-joining pathways. *Mutat Res.* **711**: 61-72.

Montaner B., O'Donovan P., Reelfs O., Perrett C. M., Zhang X., Xu Y. Z., Ren X., Macpherson P., Frith D., Karran P. (2007). Reactive oxygen-mediated damage to a human DNA replication and repair protein. *EMBO Rep.* **8**: 1074-1079.

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., de Villartay J. P. (2001). Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell.* **105**: 177-186.

Mu J. J. et al. (2007). A proteomic analysis of ataxia telangiectasia-mutated (ATM)/ATM-Rad3-related (ATR) substrates identifies the ubiquitin-proteasome system as a regulator for DNA damage checkpoints. *J. Biol. Chem.* **282**: 17330-17334.

Nikolova T., Ensminger M., Löbrich M., Kaina B. (2010). Homologous recombination protects mammalian cells from replication-associated DNA double-strand breaks arising in response to methyl methanesulfonate. *DNA Repair.* **9**: 1050-1063.

Nussenzweig A., Nussenzweig M. C. (2007). A backup DNA repair pathway moves to the forefront. *Cell.* **131**: 223-225.

Nyberg K. A., Michelson R. J., Putnam C. W., Weinert T. A. (2002). Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu. Rev. Genet.* **36**: 617-656.

Oguro M., Suzuki-Hori C., Nagano H., Mano Y., Ikegami S. (1979). The mode of inhibitory action by aphidicolin on eukaryotic DNA polymerase alpha. *Eur. J. Biochem.* **97(2)**: 603-607.

Olive P. L. (1998). The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiat Res.* **150**: 42-51.

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

Paul K., Wang M., Mladenov E., et al. (2012). DNA Ligases I and III Cooperate in Alternative Non-Homologous End-Joining in Vertebrates. *PLoS One.* **8(3)**: 1-15.

Paull T. T., Gellert M. (1998). The 3' to 5' exonuclease activity of Mre11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol. Cell.* **1**: 969-979.

Petersen-Mahrt S. K., Harris R. S., Neuberger M. S. (2002). AID mutates *E. coli* suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature.* **418**: 99-103.

Pierce A. J., Stark J. M., Araujo F. D., Moynahan M. E., Berwick M., Jasin M. (2001a). Double-strand breaks and tumorigenesis. *Trends Cell. Biol.* **11**: 52-59.

Pierce A. J., Hu P., Han M., Ellis N., Jasin M. (2001b). Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells. *Genes Dev.* **15**: 3237-3242.

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

Polo S. P., Jackson S. P. (2011). Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev*. **25**: 409-433.

Pommier Y. (2004). Camptothecins and topoisomerase I: a foot in the door. Targeting the genome beyond topoisomerase I with camptothecins and novel anticancer drugs: importance of DNA replication, repair and cell cycle checkpoints. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*. **4**: 429-434.

Postow L. (2011). Destroying the ring: Freeing DNA from Ku with ubiquitin. *FEBS Letters*. Review.

Prakash S., Johnson R. E., Prakash L. (2005). Eukaryotic translesion synthesis DNA-polymerases: Specificity of structure and function. *Annu. Rev. Biochem*. **74**: 317-353.

Price B. D., D'Andrea A. D. (2013). Chromatin Remodeling at DNA Double-Strand Breaks. *Cell*. **152**(14).

Quitet C. A., Weichselbaum R. R., Gradina D. J. (1991). Variation in radiation sensitivity during the cell cycle of two human squamous cell carcinomas. *Int J Rad. Oncol. Bio-Phys*. **20**(4): 733-738.

Rai R., Zheng H., He H., Luo Y., Multani A., Carpenter P. B., Chang S. (2010). The function of classical and alternative non-homologous end-joining pathways in the fusion of dysfunctional telomeres. *EMBO J*. **29**: 2598-2610.

Rampakakis E., Arvanitis D. N., Di Paola D., Zannis-Hadjopoulos M. (2009). Metazoan origins of DNA replication: regulation through dynamic chromatin structure. *J. Cell. Biochem*. **106**: 512-520.

Rampakakis E., Di Paola D., Zannis-Hadjopoulos M. (2008). Ku is involved in cell growth, DNA replication and G1-S transition. *J. Cell. Sci*. **121**: 590-600.

Rass E., Grabarz A., Plo I., Gautier J., Bertrand P., Lopez B. S. (2009). Role of Mre11 in chromosomal nonhomologous end-joining in mammalian cells. *Nat. Struct. Mol. Biol*. **16**(8): 819-824.

Ratcliffe M. J. H. (2006). Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development. *Developmental and Comparative Immunology*. **30**: 101-118.

Reddel R. R. (2003). Alternative lengthening of telomeres, telomerase and cancer. *Cancer Lett*. **194**: 155-162.

Revy P., Buck D., le Deist F., de Villartay J. P. (2005). The repair of DNA damages/modifications during the maturation of the immune system: lessons from human primary immunodeficiency disorders and animal models. *Adv. Immunol*. **87**: 237-295.

Riballo E., Kühne M., Rief N., Doherty A., Smith G. C. M., Recio M-J., Reis C., Dahm K., Fricke A., Krempler A., Parker A. R., Jackson S. P., Gennery A., Jeggo P. A., Löbrich M. (2004). Pathway of Double-Strand Break Rejoining Dependent upon ATM, Artemis, and Proteins Locating to γ -H2AX Foci. *Molecular Cell*. **16**, **5(3)**: 715–724.

Richards R. I. (2001). Fragile and unstable chromosomes in cancer: Causes and consequences. *Trends Genet.* **17**: 339-345.

Robert I., Dantzer F., Reina-San-Martin B. (2009). Parp1 facilitates alternative NHEJ, whereas Parp2 suppresses IgH/c-myc translocations during immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* **206(5)**: 1047-1056.

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

Rogakou E. P., Boon C., Redon C., Bonner W. M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol.* **146**: 905-916.

Rothkamm K., Kühne M., Jeggo P. A., Löbrich M. (2001). Radiation-induced Genomic Rearrangements Formed by Nonhomologous End-Joining of DNA Double-Strand Breaks. *Cancer Research*. **61**: 3886-3893.

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

Sallmyr A., Tomkinson A. E., Rassool F. V. (2008). Up-regulation of WRN and DNA ligase IIIalpha in chronic myeloid leukemia: consequences for the repair of DNA double-strand breaks. *Blood*. **112(4)**: 1413-1423.

Sartori A. A., Lukas C., Coates J., Mistrik M., Fu S., Bartek J., Baer R., Lukas J., Jackson S. P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*. **450(7169)**: 509-514.

Schar P., Herrmann G., Daly G., Lindahl T. (1997). A newly identified DNA ligase of *Saccharomyces cerevisiae* involved in RAD52-independent repair of DNA double-strand breaks. *Genes Dev.* **11**: 1912-1924.

Schwartz M., Zlotorynski E., Goldberg M., Ozeri E., Rahat A., le Sage C., Chen B. P. C., Chen D. J., Agami R., Kerem B. (2005). Homologous recombination and nonhomologous end-joining repair pathways regulate fragile site stability. *Genes and Development*. **19**: 2715-2726.

Sengerová B., Allerston C. K., Abu M., Lee S. Y., Hartley J., Kiakos K., Schofield C. J., Hartley J. A., Gileadi O., McHugh P. J. (2012). Characterization of the Human SNM1A and SNM1B/Apollo DNA Repair Exonucleases. *J. Biol. Chem.* **287**: 26254-26267.

Shibata A., Conrad S., Birraux J., Geuting V., Barton O., Ismail A., Kakarougkas A., Meek K., Taucher-Scholz G., Löbrich M., Jeggo P. A. (2011). Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *EMBO J.* **30**: 1079-1092.

-
- Sibani S., Price G. B., Zannis-Hadjopoulos M. (2005).** Decreased origin usage and initiation of DNA replication in haploinsufficient HCT116 Ku80^{+/-} cells. *J. Cell. Sci.* **118**: 3247-3261.
- Singh S. K., Wu W., Wu W., Wang M., Iliakis G. (2009).** Extensive repair of DNA double-strand breaks in cells deficient in the DNA-PK-dependent pathway of NHEJ after exclusion of heat-labile sites. *Radiat Res.* **172(2)**: 152-164.
- Sisken J. E., Morasca L. (1965).** Intrapopulation kinetics of the mitotic cycle. *J. Cell Biol.* **25**: 179-189.
- Smith G. C., Jackson S. P. (1999).** The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev.* **13**: 916-934.
- Sonoda E., Sasaki M. S., Buerstedde J-M., Bezzubova O., Shinohara A., Ogawa H., Takata M., Yamaguchi-Iwai Y., Takeda S. (1998).** Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *The EMBO Journal.* **17(2)**: 598-608.
- Sonoda E., Hohegger H., Saberi A., Taniguchi Y., Takeda S. (2006).** Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair *DNA Repair.* **5**: 1021-1029.
- Sonoda E., Takata M., Yamashita Y. M., Morrison C., Takeda S. (2001).** Homologous DNA recombination in vertebrate cells. *PNAS.* **98(15)**: 8388-8394.
- Stiff T., O'Driscoll M., Rief N., Iwabuchi K., Löbrich M., Jeggo P. A. (2004).** ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.* **64**: 2390-2396.
- Stone D. M., Jacky P. B., Hancock D. D., Prieur D. J. (1991).** Chromosomal fragile site expression in dogs. *Am. J. Med. Genet.* **40**: 214-222.
- Stone D. M., Stephens K. E., Doles J. (1993).** Folate-sensitive and aphidicolin-inducible fragile sites are expressed in the genome of the domestic cat. *Cancer Genet. Cytogenet.* **65**: 130-134.
- Strumberg D., Pilon A. A., Smith M., Hickey R., Malkas L., Pommier Y. (2000).** Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5'-phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff. *Mol. Cell Biol.* **20**: 3977-3987.
- Sun Y., Jiang X., Price B. D. (2010).** Tip60: connecting chromatin to DNA damage signaling. *Cell Cycle.* **9**: 930-936.
- Sy S. M., Huen M. S., Chen J. (2009).** PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**: 7155-7160.
- Symington L. S., Gautier J. (2011).** Double-Strand Break End Resection and Repair Pathway Choice *Annu. Rev. Genet.* **45**: 247-271.

-
- Takao N., Kato H., Mori R., Morrison C., Sonada E., Sun X., Shimizu H., Yoshioka K., Takeda S., Yamamoto K. (1999).** Disruption of ATM in p53-null cells causes multiple functional abnormalities in cellular response to ionizing radiation. *Oncogene*. **18**: 7002-7009.
- Takata M., Sasaki M. S., Tachiiri S., Fukushima T., Sonoda E., Schild D., Thompson L. H., Takeda S. (2001).** Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Mol. Cell Biol.* **21**: 2858-2866.
- Takata T., Sasaki M. S., Sonoda E., Morrison C., Hashimoto M., Utsumi H., Yamaguchi-Iwai Y., Shinohara A., 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. *The EMBO Journal*. **17(18)**: 5497-5508.
- Taneja N., Davis M., Choy J. S., et al. (2004).** Histone H2AX phosphorylation as a predictor of radiosensitivity and target for radiotherapy. *J. Biol. Chem.* **279**: 2273-2280.
- Tell R., Heiden T., Granath F., Borg A. L., Skog S., Lewensohn R. (1998).** Comparison between radiation-induced cell cycle delay in lymphocytes and radiotherapy response in head and neck cancer. *British J Cancer*. **77(4)**: 643-649.
- Teo S. H., Jackson S. P. (1997).** Identification of *Saccharomyces cerevisiae* DNA ligase IV: involvement in DNA double-strand break repair. *EMBO J.* **16**: 4788-4795.
- Terzoudi G. I., Manola K. N., Pantelias G. E., Iliakis G. (2005).** Checkpoint abrogation in G2 compromises repair of chromosomal breaks in ataxia telangiectasia cells. *Cancer Res.* **65**: 11292-11296.
- Trujillo K. M., Yuan S. S. F., Lee E. Y. H. P., Sung P. (1998).** Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11 and p95. *Journal of Biological Chemistry*. **273**: 21447-21450.
- Truong L. N., Lia Y., Shib L. Z., Yi-Hwa Hwanga P., Hea J., Wanga H., Razaviana N., Bernsb M. W., Wua X. (2013).** Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. *PNAS. Cell Biology. Early Edition*. 1-6.
- van Gent D. C., van der Burg M. (2007).** Non-homologous end-joining, a sticky affair. *Oncogene*. **26**: 7731-7740.
- Walker J. R., Corpina R. A., Goldberg J. (2001).** Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*. **412**: 607-614.
- Wallace S. S. (2002).** Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic. Biol.* **33**: 1-14.
- Wang H., Zeng Z., Bui T., Sonoda E., Takata M., Takeda S., Iliakis G. (2001):** Efficient rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in vertebrate cells deficient in genes of the RAD52 epistasis group. *Oncogene*. **20**: 2212-2224.

-
- Wang H. Y., Wang M. L., Wang H. C., Bocker W., Iliakis G. (2005a).** Complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM and DNA- PK in human cells exposed to ionizing radiation and treated with kinase inhibitors. *Journal of Cellular Physiology*. **202**: 492-502.
- Wang J., Pluth J. M., Cooper P. K., Cowan M. J., Chen D. J., Yannone S. M. (2005b).** Artemis deficiency confers a DNA double-strand break repair defect and Artemis phosphorylation status is altered by DNA damage and cell cycle progression. *DNA Repair(Amst)*. **4(5)**: 556-570.
- Wang M., Wu W., Wu W., Rosidi B., Zhang L., Wang H., Iliakis G. (2006).** PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res*. **34(21)**: 6170–6182.
- Ward J. F. (1985).** Biochemistry of DNA lesions. *Radiat. Res. Suppl.* **8**: 103-111.
- Ward J. F. (1995).** Radiation Mutagenesis – the Initial Dna Lesions Responsible. *Radiation Research*. **143**: 355.
- Waters R. (1981).** Aphidicolin: an inhibitor of DNA repair in human fibroblasts. *Carcinogenesis*. **2(8)**: 795-797.
- Weinstock D. M., Brunet E., Jasin M. (2007).** Formation of NHEJ-derived reciprocal chromosomal translocations does not require Ku70. *Nat. Cell. Biol.* **9**: 978-981.
- Wesoly J., Agarwal S., Sigurdsson S., Bussen W., van Komen S. Qin J., van Steeg H., van Benthem J., Wassenaar E., Baarends W. M., Ghazvini M., Tafel A. A., Heath H., Galjart N., Essers J., Grootegoed A. J., Arnheim N., Bezzubova O., Buerstedde J-M, Sung P., Kanaar R. (2006).** Differential Contributions of Mammalian Rad54 Paralogs to Recombination, DNA Damage Repair, and Meiosis. *Molecular and Cellular Biology*. **26(3)**: 976-989.
- West M. H., Bonner W. M. (1980).** Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species. *Biochemistry*. **19**: 3238-3245.
- Weterings E., Chen D. J. (2008).** The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res*. **18**: 114-124.
- Weterings E., van Gent D. C. (2004).** The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synapsis. *DNA Repair (Amst)*. **3**: 1425-1435.
- Willis N., Rhind N. (2009).** Regulation of DNA replication by the S-phase DNA damage Checkpoint. *Cell Division*. **4(13)**: 1-10.
- Winding P., Berchtold M. W. (2001).** The chicken B cell line DT40: a novel tool for gene disruption experiments. *J. of Immunol. Meth.* **249**: 1-16.
- Wu W., Wang M., Wu W., Singh S. K., Mussfeldt T., Iliakis G. (2008).** Repair of radiation induced DNA double strand breaks by backup NHEJ is enhanced in G2. *DNA Repair*. **7**: 329-338.

Xie A., Kwok A., Scully R. (2009). Role of mammalian Mre11 in classical and alternative nonhomologous end-joining. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16(8)**: 814-818.

Yan Y., Akhter S., Zhang X., Legerski R. (2010). The multifunctional *SNM1* gene family: not just nucleases. *Future Oncol.* **6(6)**: 1015-1029.

Yang M. Y., Long S. E. (1993). Folate sensitive common fragile sites in chromosomes of the domestic pig (*Sus scrofa*). *Res. Vet. Sci.* **55**: 231-235.

Yoshikawa T., Kashino G., Ono K., Watanabe M. (2009). Phosphorylated H2AX Foci in Tumor Cells Have No Correlation with Their Radiation Sensitivities. *J. Radiat. Res.* **50**: 151-160.

Zachos G., Rainey M. D., Gillespie D. A. F. (2005). Chk1-Dependent S-M Checkpoint Delay in Vertebrate Cells Is Linked to Maintenance of Viable Replication Structures. *Molecular and Cellular Biol.* **25(2)**: 563-574.

Zannis-Hadjopoulos M., Rampakakis E. Synergy Between DNA Replication and Repair Mechanisms *www.intechopen.com*

Zhang Y., Jasin M. (2011). An essential role for CtIP in chromosomal translocation formation through an alternative end-joining pathway. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18(1)**: 80-84.

Zhang F., Ma J., Wu J., Ye L., Cai H., Xia B., Yu X. (2009). PALB2 links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-damage response. *Curr. Biol.* **19**: 524-529.

Zhu Z., Chung W. H., Shim E. Y., Lee S. E., Ira G. (2008). Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell.* **134**: 981-994.

Zlotorynski E., Rahat A., Skaug J., Ben-Porat N., Ozeri E., Hershberg R., Levi A., Scherer S. W., Margalit H., Kerem B. (2003). Molecular basis for expression of common and rare fragile sites. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 7141-7151.

Internetseiten:

www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed. Genome. Gallus gallus, Homo sapiens (human)

Tagungsbeiträge

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in Form von Tagungsbeiträgen veröffentlicht.

Krasnyanska J., Quenett V., Löbrich M. (2009): Pathways of DNA Double Strand Break Repair in DT40 Cells. 12. Tagung der Gesellschaft für biologische Strahlenforschung (GBS) in Essen, Poster.

Krasnyanska J., Geuting V., Löbrich M. (2010): A Comparison of DNA Double-Strand Break Repair and Survival in DT40 Chicken B Lymphocytes Following Exposure to X-ray Irradiation. 13. Tagung der GBS in Hamburg, Poster, ausgezeichnet mit einem Posterpreis.

Krasnyanska J., Geuting V., Löbrich M. (2011): DNA Repair in DT40 Chicken B Lymphocytes Following Exposure to X-ray Irradiation and MMS Treatment. 14. Tagung der GBS in Rheinbach, Poster.

Krasnyanska J., Geuting V., Bednar T., Iliakis G., Löbrich M. (2013): Regulation of Double Strand Break Repair through out the DT40 Cell Cycle: Correlation between Repair and Survival. 16. Tagung der GBS in Darmstadt, Poster.

Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Markus Löbrich für die Bereitstellung eines interessanten Themas und für die Möglichkeit dieses Thema in seiner Arbeitsgruppe bearbeiten zu können, ausrichten. Besonders möchte ich seine umfassende und gute Betreuung, seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft sowie viele Ideen und Anregungen hervorheben, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ebenfalls möchte ich Frau Prof. Dr. Pfeifer herzlich für die Übernahme des Koreferats danken.

Bedanken möchte ich mich beim Herrn Prof. Dr. George Iliakis sowie bei seiner gesamten AG für die Möglichkeit meine Experimente in seinem Labor durchführen zu dürfen.

Ich möchte mich bei den aktuellen und ehemaligen Kollegen der AG Löbrich für eine angenehme und lustige Atmosphäre, den Zusammenhalt und für die Hilfsbereitschaft bedanken. Ohne diese Leute hätte die Arbeit nur halb so viel Spaß gemacht.

Frau Dr. Verena Geuting, Herrn Dr. Steffen Naumann sowie Frau Dr. Olivia Barton danke ich herzlichst für ihre Gesprächsbereitschaft, ihre Unterstützung sowie für ihr unermüdliches Korrekturlesen meiner Arbeit.

Mein größtes Dankeschön gilt meiner Familie, meinem Freund Christof und seinem Sohn Fabian, die mich immer unterstützen und auf die ich mich immer verlassen kann. Tausend Dank für eure Kraft und euer Glauben an mich.

Lebenslauf

Name Julia Krasnyanska

Geburtsdatum 11.07.1980

Geburtsort Charkow, Ukraine

Berufstätigkeit im Rahmen der Promotion

02/2009 - 08/2013 Technische Universität Darmstadt
Abteilung Strahlenbiologie und DNA-
Reparatur - Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Löbrich

Sonstige Berufstätigkeit

02/2007-12/2008 Wissenschaftliche Mitarbeit an der Uni-Klinik
Würzburg, Abteilung Strahlentherapie

Studium

10/2001- 12/2006 Studium an der Westfälischen Wilhelms-
Universität in Münster, Studienfach Biologie
Hauptfach: Zellbiologie
Nebenfach: Mikrobiologie
Zusatzfach: physikalische Chemie
Abschluss: Diplom

Schulbildung

03/1997-06/2001 Gesamtschule mit gymnasialer Oberstufe,
Friedensschule in Münster
Abschluss: Abitur

08/1996-03/1997 Förderunterricht zur Erlernung der deutschen
Sprache

09/1990-05/1996 Staatliches Gymnasium Nr.163 in Charkow

09/1987-05/1990 Allgemeinbildende Schule Nr.85 in Charkow

Ehrenwörtliche Erklärung:

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

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

Darmstadt, den 09.05.14



.....
(Julia Krasnyanska)