

Untersuchungen zur Induktion und Reparatur von DNA-Schäden durch Hydroxyurea

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt
zur
Erlangung des akademischen Grades
eines Doctor rerum naturalium
genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biol. Lucie Iloff
aus Mannheim

1. Referent: Prof. Dr. Markus Löbrich
2. Referent: Prof. Dr. Bodo Laube

Tag der Einreichung: 27.06.2014
Tag der mündlichen Prüfung: 15.08.2014
Darmstadt 2014
D 17

**The great tragedy of Science - the slaying
of a beautiful hypothesis by an ugly fact.**

**Thomas Henry Huxley
(Britischer Biologe 1825 – 1895)**

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
1.....Zusammenfassung / Summary	1
2.....Einleitung	4
2.1. Schädigende Einflüsse auf die DNA	4
2.2. Zelluläre Antwort auf die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen	4
2.2.1. Erkennung von DNA-Doppelstrangbrüchen	5
2.2.2. Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	7
2.2.2.1. Homologe Rekombination	7
2.2.2.2. Nicht-homologe Endverknüpfung	9
2.2.3. Aktivierung der Zellzykluskontrolle durch DSBs	10
2.2.3.1. Der S-Phase-Arrest	11
2.2.3.2. Der G2/M-Arrest	12
2.3. DNA-Schadensantwort während der Replikation	13
2.4. Wirkmechanismus einer Hydroxyurea-Behandlung	15
2.5. Zielsetzung	17
3.....Material und Methoden	18
3.1. Materialien	18
3.1.1. Chemikalien	18
3.1.1.1. Inhibitoren	19
3.1.2. siRNA	19
3.1.3. Antikörper und Kits	19
3.1.3.1. Primärantikörper	19
3.1.3.2. Sekundärantikörper	19
3.1.3.3. Benutzte Kits	20
3.1.4. Lösungen und Puffer	20
3.1.4.1. Biochemische Methoden	20
3.1.4.2. Durchflusszytometrische Analysen	21
3.1.4.3. Chromosomenpräparation	21
3.1.5. Transfektionsreagenzien	21
3.1.6. Längenstandards	21
3.1.7. Lösungen und Medien für die Zellkultur	21
3.1.8. Zelllinien	22
3.1.9. Verbrauchsmaterialien	22
3.1.10. Software	23
3.2. Methoden	23
3.2.1. Zellkulturmethoden	23

3.2.1.1.	Kultivierung und Aussaat von Zellen	23
3.2.1.2.	siRNA Transfektion von Zellen	23
3.2.2.	Induktion von DNA Schäden	24
3.2.2.1.	Behandlung von Zellen mit Hydroxyurea (HU)	24
3.2.2.2.	Bestrahlung von Zellen mit einer Röntgenröhre	24
3.2.3.	Immunhistochemie	24
3.2.3.1.	Fixierung von Zellen	24
3.2.3.2.	Immunfluoreszenzfärbung von Zellen	25
3.2.3.3.	Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen am Mikroskop	25
3.2.4.	Biochemische Methoden	26
3.2.4.1.	Ernte von Zelllysaten	26
3.2.4.2.	Sonifizierung von Zelllysaten	26
3.2.4.3.	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	26
3.2.4.4.	SDS-Page und Western Blot	26
3.2.5.	Durchflusszytometrische Methoden (FACS)	28
3.2.5.1.	Fixierung von Zellen für eine FACS Analyse	28
3.2.5.2.	Färbung von Zellen für eine FACS Messung	28
3.2.6.	Chromosomale Methoden	28
3.2.6.1.	Chromosomenpräparation in der G2-Phase	28
3.2.6.2.	Chromosomenpräparation in der Mitose	29
3.2.6.3.	Sequentielle EdU/DAPI und Giemsa Färbung	30
3.2.6.4.	Fluoreszenz-plus-Giemsa Färbung	30
4.....	Ergebnisse	31
4.1.	Induktion von DNA-Schäden durch Hydroxyurea	31
4.1.1.	Einfluss der PIK-Kinasen ATM und ATR auf die DSB-Induktion durch Hydroxyurea	36
4.1.2.	Einfluss des Mediatorproteins MDC1 auf die Doppelstrangbruch-Induktion durch HU	39
4.2.	Charakterisierung des Reparatur- und Zellzyklusverhaltens nach 24 h Hydroxyurea	41
4.2.1.	Untersuchung des Zellzyklusverhaltens nach 24 h HU-Behandlung	41
4.2.2.	Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen nach 24 h HU-Behandlung	46
4.2.2.1.	Analyse der Induktion sekundärer DSBs nach HU-Behandlung	54
4.2.3.	Untersuchung der <i>Checkpoint</i> -Profizienz HU-behandelter Zellen	57
4.2.3.1.	Untersuchung der HU-induzierten Zellzyklusarrest-Signalkaskade	61
4.2.4.	Untersuchung der Struktur HU-induzierter DSBs	68
4.3.	Charakterisierung des Reparatur- und Zellzyklusverhaltens nach 10 h Hydroxyurea	75
4.3.1.	Untersuchung des DSB-Reparaturverhaltens nach 10-stündiger HU-Behandlung	75
4.3.2.	Untersuchung der Zellzyklusprogression nach 10 h HU-Behandlung	77
4.3.3.	Untersuchung der DSB-Struktur nach 10 h HU-Behandlung	80
5.....	Diskussion	82
5.1.	Die Dauer der HU-Behandlung ist entscheidend für die Induktion von DSBs	82
5.1.1.	Einfluss von ATM, ATR und MDC1 auf die DSB-Induktion nach HU-Behandlung	85
5.2.	HU-behandelte Zellen zeigen eine ineffiziente DSB-Reparatur und keinen G2/M-Arrest	89
5.2.1.	Ursachen für den fehlenden G2/M-Arrest nach HU-Behandlung	91
5.2.2.	Ursachen für die ineffiziente DSB-Reparatur nach HU-Behandlung	97

5.3.	Ausblick	105
6.....	Literaturverzeichnis	107
7.....	Anhang	X
7.1.	Lebenslauf	X
7.2.	Publikationen und Tagungsbeiträge	XI
7.3.	Danksagung	XII
7.4.	Ehrenwörtliche Erklärung	XIII

Abkürzungsverzeichnis

53BP1	<i>p53 binding protein 1</i>
Abb.	Abbildung
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>ATM- and Rad3-related</i>
ATRIP	<i>ATR interacting protein</i>
BD	Becton Dickinson
BIR	<i>break induced replication</i>
bp	Basenpaar
BRCA1/2	<i>breast cancer associated 1/2</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CDC	<i>cell division cycle</i>
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase (<i>Cyclin-dependent kinase</i>)
Chk1/2	Checkpointkinase 1/2
CO ₂	Kohlendioxid
CtIP	<i>CtBP interacting protein</i>
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DMEM	<i>Dulbecco's minimal essential medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNA-PK	<i>DNA dependent protein kinase</i>
DNA-PK _{cs}	<i>DNA dependent kinase catalytic subunit</i>
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DSB	Doppelstrangbruch (<i>double strand break</i>)
dsDNA	Doppelsträngige DNA (<i>double-stranded DNA</i>)
EdU	Ethynyl-desoxyuridin
Eme1	<i>essential meiotic endonuclease 1</i>
FA	Formaldehyd
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Scanning/Sorting</i>
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FPG	Fluoreszenz plus Giemsa
g	Beschleunigung

Gen1	<i>XPG-like endonuclease 1</i>
Gy	Gray (Einheit der Strahlendosis)
h	Stunde
HC	Heterochromatin
HCl	Salzsäure
HR	Homologe Rekombination
hTert	<i>human Telomerase reverse transcriptase</i>
HU	Hydroxyurea
IFM	Immunfluoreszenz-Mikroskopie
IR	Ionisierende Strahlung (<i>ionizing radiation</i>)
kbp	Kilobasenpaar
keV	Kiloelektronenvolt
Konz.	Konzentration
kV	Kilovolt (Einheit der Spannung)
L	Liter
LigIV	Ligase IV
LMDS	<i>locally multiply damage sites</i>
mA	Milliamper
Mbp	Megabasenpaare
MDC1	<i>mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>
MEM	<i>Minimal essential medium</i>
MeV	Mega-Elektronenvolt
min	Minute
ml	Milliliter
μ l	Microliter
MMS	Methylmethansulfonat
MRE11	<i>meiotic recombination 11</i>
MRN	Komplex aus MRE11, Rad50 und NBS1
Mus81	<i>MMS and UV sensitive 81</i>
NBS1	<i>Nijmegen Breakage Syndrome</i>
NEAA	Nicht essentielle Aminosäuren (<i>Non-essential amino acids</i>)
NHEJ	Nicht-homologe Endverknüpfung (<i>Non-homologous End-joining</i>)
n.s.	nicht signifikant
NT	Unbehandelt (<i>no treatment</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Saline (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCC	<i>premature chromosome condensation</i>

PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PI	Propidiumiodid
PIKK	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-ähnliche Kinase
Pol	DNA Polymerase
Rad	<i>Radiation Repair Protein</i>
Rb	Retinoblastoma suppressor Protein
RDS	Strahlungs-resistente DNA-Synthese (<i>radioresistant DNA synthesis</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuclease
RNR	Ribonukleotidreduktase
RPA	Replikationsprotein A
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SCE	Schwesterchromatidaustausch (<i>sister chromatid exchange</i>)
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SDSA	<i>synthesis dependent strand anealing</i>
SEM	Standardfehler aus dem Mittelwert (<i>standard error of the mean</i>)
siRNA	<i>small interference RNA</i>
SSB	Einzelstrangbruch (<i>single strand break</i>)
ssDNA	einzelsträngige DNA (<i>single-stranded DNA</i>)
Tab.	Tabelle
TLS	<i>translesion synthesis</i>
TopBP1	Topoisomerase DNA II Bindeprotein (<i>Topoisomerase DNA II binding protein 1</i>)
Triton X-100	Alkylphenylpolyethylenglykol (C ₃₃ H ₆₀ O ₁₀)
TUD	Technische Universität Darmstadt
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V(D)J	<i>Variable (Diversity) Joining</i>
WT	Wild typ
XLF	<i>XRCC4-like factor</i>
XRCC	<i>X-Ray Repair Cross-Complementing</i>
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der zellulären Antwort auf die Induktion von DSBs	5
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der HR an einem zweiendigen DSB	8
Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der DSB-Reparatur durch das NHEJ	10
Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Expressionslevels der Cyclin-Cdk-Komplexe während des Zellzyklus	11
Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Entkopplung von Polymerase und Helikase an einer Replikationsgabel und die daraus resultierende ATR-Aktivierung	14
Abbildung 4.1: Darstellung exemplarischer Mikroskop-Scans zur spezifischen Auswahl der S-Phase-Zellen	32
Abbildung 4.2: Induktion von γ H2AX-Foci nach unterschiedlicher Hydroxyurea-Behandlungsdauer ...	33
Abbildung 4.3: Induktion von γ H2AX- und 53BP1-Foci nach 24-stündiger HU-Behandlung	34
Abbildung 4.4: Streubreite der γ H2AX- und 53BP1-Foci-Zahl in einzelnen Zellen	35
Abbildung 4.5: Induktion von γ H2AX-Foci nach HU-Behandlung in ATR-depletierten Zellen	37
Abbildung 4.6: Induktion von γ H2AX-Foci nach HU-Behandlung in Zellen ohne funktionsfähiges ATM	38
Abbildung 4.7: Induktion von γ H2AX-Foci nach HU-Behandlung in Zellen nach MDC1- Depletion	40
Abbildung 4.8: Exemplarische FACS-Blots einer durchflusszytometrischen Analyse von A549-Zellen ..	42
Abbildung 4.9: Zellzyklusverhalten von A549- und 82-6hTert-Zellen nach 24-stündiger HU-Behandlung	45
Abbildung 4.10: Darstellung exemplarischer Mikroskop-Scans zur spezifischen Auswahl von S/G2-Phase-Zellen	46
Abbildung 4.11: γ H2AX- und 53BP1-Reparaturkinetiken nach 24 h HU-Behandlung sowie in unbehandelten A549 und 82-6hTert Zellen	47
Abbildung 4.12: γ H2AX-Foci-Kinetik nach 24 h HU-Behandlung in mitotischen Tumorzellen	49
Abbildung 4.13: Darstellung exemplarischer Mikroskop-Scans zur spezifischen Auswahl von G1-Phase-Zellen	50
Abbildung 4.14: γ H2AX-Foci-Kinetik nach 24 h HU-Behandlung in G1-Phase-Zellen	51
Abbildung 4.15: Chromatidbrüche nach 24 h HU-Behandlung in G2-Phase-Zellen	52
Abbildung 4.16: Chromatidbrüche nach 24 h HU-Behandlung in mitotischen Zervixkarzinomzellen ...	53
Abbildung 4.17: γ H2AX-Reparaturkinetik nach 24 h HU-Behandlung in A549 Zellen nach BRCA2-Depletion	55
Abbildung 4.18: Schwesterchromatidaustausche nach 24 h HU-Behandlung	56

Abbildung 4.19: Zellzyklusverhalten nach HU-Behandlung, Röntgenbestrahlung, MMS-Behandlung sowie einer kombinierten Behandlung aus HU und Röntgenstrahlung oder aus HU- und MMS-Behandlung.....	59
Abbildung 4.20: Biochemische Analyse von <i>Checkpoint</i> -Proteinen in HU-behandelten und bestrahlten Tumorzellen.....	62
Abbildung 4.21: Biochemische Analyse von <i>Checkpoint</i> -Proteinen nach 24-stündiger HU-Behandlung, 1-stündiger MMS-Behandlung oder 5 Gy Röntgenstrahlung.....	63
Abbildung 4.22: Biochemische Analyse von <i>Checkpoint</i> -Proteinen nach kombinierter Behandlung aus 24 h 0,5 mM HU und 5 Gy Röntgenstrahlung	65
Abbildung 4.23: Biochemische Analyse von <i>Checkpoint</i> -Proteinen nach 2 h und 24 h HU-Behandlung	66
Abbildung 4.24: Beladung von einzelsträngigen DNA-Bereichen an DSBs mit Rad51 und RPA in humanen Tumorzellen und humanen, immortalisierten Fibroblasten	70
Abbildung 4.25: Kollokalisierung von γ H2AX-Foci mit Rad51 bzw. RPA-Foci nach 24 h HU-Behandlung	71
Abbildung 4.26: Einfluss einer Rad51-Depletion auf die γ H2AX- und RPA-Foci-Zahl nach 24 h HU-Behandlung.....	72
Abbildung 4.27: Einfluss einer Rad54-Depletion auf die γ H2AX-, Rad51- und RPA-Foci-Zahl nach 24 h HU-Behandlung.....	74
Abbildung 4.28: γ H2AX-Foci-Reparaturkinetik nach 10 h HU-Behandlung in humanen Lungentumorzellen	76
Abbildung 4.29: γ H2AX-Foci-Kinetik nach 10 h HU-Behandlung in mitotischen Tumorzellen.....	77
Abbildung 4.30: Chromatidbrüche nach 10 h HU-Behandlung in G2-Phase-Zellen.....	78
Abbildung 4.31: Chromatidbrüche nach 10 h HU-Behandlung in mitotischen Zervixkarzinomzellen...	79
Abbildung 4.32: Beladung von einzelsträngigen DNA-Bereichen mit Rad51 und RPA in humanen Tumorzellen nach 10 h HU.....	81
Abbildung 5.1: HR-abhängige Reparatur eines HU-induzierten DSBs.....	99

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: siRNA Transfektionsbedingungen.....	24
Tabelle 3.2: Verwendete Antikörperkombinationen sowie ihre Verdünnung	25
Tabelle 3.3: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für eine SDS-Page.....	27
Tabelle 3.4: Im Western Blot verwendete Primärantikörper und deren Verdünnung	27

1. Zusammenfassung / Summary

Die durch eine Hydroxyurea-Behandlung (HU) induzierte Depletion von Desoxyribonukleotiden wurde über einen langen Zeitraum zur Therapie von Krankheiten wie HIV und verschiedener Krebsarten, insbesondere von Leukämien eingesetzt. Durch die Arretierung von Replikationsgabeln, die von der Depletion des Desoxyribonukleotid-Pools ausgelöst wird, bietet sich eine HU-Behandlung von Zellen außerdem für Untersuchungen des zellulären Verhaltens nach Replikationsstress an. Bei früheren Untersuchungen konnte mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese gezeigt werden, dass eine HU-Behandlung zeitabhängig zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) führt. In der vorliegenden Arbeit konnte dies mit immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen jedoch zum ersten Mal auf Einzelzellebene bestätigt werden.

Bei der Untersuchung des Zellzyklusverhaltens sowie der DSB-Reparatur nach einer 24-stündigen HU-Behandlung zeigte sich das erstaunliche Ergebnis, dass nach dieser Behandlung kein G2/M-Arrest induziert wird und gleichzeitig nur eine ineffiziente DSB-Reparatur erfolgt. Durch den Einsatz von Zellen mit einer Defizienz im Reparaturweg der homologen Rekombination (HR) konnte die bereits in früheren Arbeiten mit Überlebensexperimenten gezeigte HR-abhängige Reparatur HU-induzierter DSBs auf Einzelzellebene bestätigt werden. Außerdem konnte mit diesem Experiment gezeigt werden, dass die detektierte ineffiziente Reparatur nicht durch ein Gleichgewicht zwischen effizienter Reparatur von DSBs und der Induktion neuer DSBs über einen sekundären Mechanismus nach Ende der HU-Behandlung zustande kommt, sondern möglicherweise auf die Struktur der HU-induzierten DSBs zurückzuführen ist. Die ineffiziente DSB-Reparatur in Kombination mit dem fehlenden G2/M-Arrest führten dazu, dass Zellen mit einer signifikant erhöhten Anzahl an γ H2AX-Foci und Chromatidbrüchen durch die G2-Phase, die Mitose sowie die G1-Phase progressierten. Diese Situation stellt für Zellen eine ernste Bedrohung ihrer genomischen Integrität dar und wurde aufgrund dessen im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit näher untersucht.

Bei der Untersuchung der *Checkpoint*-Profizienz HU-behandelter Zellen zeigte sich, dass nach der Kombination einer HU-Behandlung und Röntgenbestrahlung oder einer kombinierten Behandlung mit HU und Methylmethansulfonat (MMS) ein G2/M-Arrest induziert wird. Da Zellen nach einer solchen kombinierten Behandlung zwar einen G2/M-Arrest induzierten, diesen aber früher aufhoben als Zellen, die nur bestrahlt wurden bzw. nur mit MMS behandelt wurden, scheint eine HU-Behandlung eine Störung in der Aufrechterhaltung des G2/M-Arrests hervorzurufen. Für die genauere Charakterisierung der durch die verschiedenen Behandlungen induzierten Zellzykluskontroll-Signalkaskade wurden die beiden phosphorylierten und damit aktiven Checkpointkinasen Chk1 und Chk2 untersucht. Während Chk2 durch eine HU-Behandlung nur sehr schwach aktiviert wird, induziert sowohl eine kurze (2 h) als auch eine lange (24 h) HU-Behandlung ein sehr starkes pChk1-Signal. Da Chk1 nicht nur durch resektierte DSBs sondern auch durch arretierte Replikationsgabeln aktiviert wird,

könnte die, von den arretierten Replikationsgabeln ausgelöste, lang anhaltende Aktivierung von Chk1 zur Depletion des intrazellulären Chk1-Pools führen. Da in der Literatur bereits mehrfach die wichtige Rolle von Chk1 bei der Aufrechterhaltung des G2/M-Arrests diskutiert wurde, könnte diese Depletion zusammen mit der nur sehr geringen Aktivierung von Chk2, die durch eine HU-Behandlung ausgelöst wird, eine Erklärung für die fehlende Induktion eines G2/M-Arrests nach einer 24-stündigen HU-Behandlung darstellen.

Um die ineffiziente Reparatur nach einer 24-stündigen HU-Behandlung zu analysieren, wurde mit Hilfe von Rad51- und Rad54-Depletion die Struktur der HU-induzierten DSBs charakterisiert. Rad51 und Rad54 spielen wichtige Rollen in der Reparatur von DSBs über die HR. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigten, dass sich 30 – 40 % der HU-induzierten DSBs in einem späten Schritt der HR befinden, während dem die DNA-Reparatur-Synthese stattfinden sollte. Möglicherweise wird die für die HR-abhängige DSB-Reparatur nötige DNA-Synthese bereits während der HU-Behandlung induziert. Da diese unter HU-Einfluss aber nicht ablaufen kann, könnte es zu einem Kollaps des DNA-Reparatur-Synthese-Komplexes kommen, wie er für die Replikationsgabeln in der S-Phase beschrieben ist. Diese Vermutung wird von der effizienteren Reparatur nach einer kürzeren, 10-stündigen HU-Behandlung unterstützt, da die DNA-Reparatur-Synthese über einen kürzeren Zeitraum inhibiert wird. Die übrigen durch HU induzierten DSBs befinden sich in einem früheren Schritt der HR, vermutlich bei der von Rad51 vermittelten Homologiesuche im Schwesterchromatid. Warum diese Homologiesuche während und nach der HU-Behandlung so viel Zeit in Anspruch nimmt, könnte möglicherweise auf die während der S-Phase aufgelockerte Chromatinstruktur zurückzuführen sein. Die Überprüfung dieser Theorien sowie der Fragestellung, ob es zu einer Depletion des Chk1-Pools durch die langanhaltende Aktivierung aufgrund der arretierten Replikationsgabeln kommt, wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Hydroxyurea (HU) was used for treating diseases such as HIV and cancer, especially leukemia, for decades because HU depletes the deoxyribonucleotide pool. Since the exhaustion of deoxyribonucleotides stalls replication forks in S-phase cells, HU is a good model drug to study cellular behavior after replication stress. With puls-field gel electrophoresis it has been shown that HU induces double-strand breaks (DSBs) in a time-dependent manner. In this study, I was able to confirm these findings within single cells by using immunofluorescence analysis.

Cells treated for 24 h with HU showed inefficient DSB repair and did not elicit an efficient G2/M checkpoint. The repair of HU induced DSBs via a homologous recombination (HR) repair pathway had already been shown with survival assays. By depleting essential HR factors, this finding was confirmed in this study. In addition, the results of my experiments clarify that the reason for the inefficient repair is not a steady state between efficient DSB repair and newly generated DSBs via a secondary

mechanism after the removal of HU, but rather arises from the structure of the HU-induced DSBs. The combination of inefficient DSB repair and the missing G2/M-checkpoint results in progression of cells to G2 phase, mitosis, and G1 phase with highly elevated numbers of γ H2AX foci as well as chromatid breaks. As this situation is a major threat for the genomic integrity of cells, it was further investigated in this study.

Using a combination of HU treatment and irradiation or a combination of HU and methyl methanesulfonate (MMS) treatment, I was able to show that HU treated cells are still checkpoint proficient. Nevertheless, cells treated with one of the above mentioned combinations showed impaired G2/M checkpoint maintenance. This means that although HU has no impact on the induction it affects the maintenance of the G2/M checkpoint. To better understand the underlying mechanism, the two phosphorylated and thereby activated checkpoint kinases Chk1 and Chk2 were further investigated. There was only a slight activation of Chk2 after HU treatment, whereas both a short (2 h) and a long (24 h) HU treatment induced a robust pChk1 signal. Since Chk1 is activated by stalled replication forks as well as by resected DSBs, the persistent Chk1 activation as a result of the stalled replication forks could induce a depletion of the intracellular Chk1 pool. In previous studies the importance of the Chk1 signal for the maintenance of the G2/M checkpoint was highlighted. Hence, the exhaustion of Chk1 and the weak activation of Chk2 by HU treatment could be the reason for the absent G2/M checkpoint. To investigate the inefficient DSB repair post HU treatment the depletion of Rad51 and Rad54 was used to analyze the DSB structure. Rad51 and Rad54 are essential proteins for the HR repair pathway. The results of these experiments show that 30-40% of the HU induced DSBs occur during an HR step in which the DNA synthesis should take place. Hence, it is possible that the DNA synthesis is already induced at a time when cells are still exposed to HU. Since DNA synthesis cannot proceed during HU treatment, the DNA synthesis complex could collapse in a manner comparable to the mechanism which is postulated for replication fork collapse in S-phase cells. The more efficient repair of DSBs after shorter (10h) HU treatment provides further evidence for this theory as DSB repair is inhibited for a shorter time period. The remaining DSBs occur in an early step of HR probably during Rad51 mediated homology search. The long-lasting homology search could be due to the unwinding of the chromatin during S phase. The verification of these theories, as well as the question if Chk1 is exhausted by long-lasting HU treatment, will be part of further studies.

2. Einleitung

2.1. Schädigende Einflüsse auf die DNA

Zellen sind ständig der Gefahr ausgesetzt, dass exogene Faktoren zu einer Schädigung ihrer DNA führen, dabei gehört es zu den wichtigsten Aufgaben einer Zelle ihre genomische Integrität zu wahren. Die Induktion von DNA-Schäden kann in der Veränderung einzelner Basen bestehen (z.B. durch Methylierungen, Alkylierungen, Oxygenierungen) oder in der Induktion von Einzel- oder Doppelstrangbrüchen (Frankenberg-Schwager, 1990; Frankenberg-Schwager & Frankenberg, 1990). DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) werden im Allgemeinen als schwerwiegendster DNA-Schaden angesehen, da es durch den Bruch beider Zucker-Phosphat-Rückgrate leicht zum Verlust genetischer Information kommen kann. Doch alle unreparierten oder falsch reparierten DNA-Schäden können Mutationen induzieren, durch die Erbkrankheiten oder Tumore entstehen können. Eine exogene Schädigung der DNA kann z.B. aufgrund von ionisierender Strahlung (IR) induziert werden. Der menschliche Körper ist ständig der terrestrischen Hintergrundstrahlung, die von radioaktiven Elementen im Boden generiert wird, ausgesetzt. Dazu kommt eine Strahlenbelastung die z.B. bei Diagnoseverfahren in der Medizin oder bei der Therapie bestimmter Tumorarten appliziert wird. Weiterhin können DNA-Schäden durch Chemikalien (z.B. Hydroxyurea, Methylmethansulfonat) induziert werden, welche zum einen ebenfalls zu therapeutischen Zwecken eingesetzt werden (z.B. in der Tumorthherapie) zum anderen aber auch unbeabsichtigt aufgenommen werden. Es gibt neben der Gefahr durch exogene Schädigung auch eine Vielzahl von endogenen Ereignissen die zur Induktion von DNA-Schäden führen. Einer der bekanntesten Vorgänge bei dem endogene DSBs induziert werden, ist die im Immunsystem zur Produktion von Antikörpern durchgeführte V(D)J-Rekombination (Bassing et al, 2002; Gellert, 2002). Weiterhin entstehen während des Zellmetabolismus reaktive Sauerstoffspezies die zur Induktion von oxidativen Basenschäden führen können. Während der Replikation der DNA in der S-Phase entstehen zudem besonders häufig DSBs durch den Kollaps von Replikationsgabeln. Aufgrund dieser Gefahren haben Zellen eine Vielzahl von Mechanismen entwickelt um mit DNA-Schäden umzugehen. Dazu gehören je nach induziertem Schaden verschiedenste Reparaturwege sowie die Möglichkeit einen Zellzyklusarrest zu induzieren, der Zellen davor schützt die geschädigte DNA zu replizieren oder sich mit DNA-Schäden zu teilen. Diese Mechanismen ermöglichen es den Zellen ihre genomische Integrität zu erhalten und sich vor Mutationen und Zell-Entartung zu schützen.

2.2. Zelluläre Antwort auf die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen

DSBs stellen für eine Zelle die gefährlichsten DNA-Schäden dar (Ward, 1975), da ein DSB leicht zum Verlust genetischer Information führen kann. Wird ein DSB induziert, werden in einer Zelle verschiedene Mechanismen aktiviert (Abbildung 2.1). Zunächst erkennen Sensorproteine den Bruch, diese geben das Signal an Mediatorproteine weiter, welche für eine Signalverstärkung sorgen. Im

Anschluss werden Effektorproteine aktiviert, welche die DSB-Reparatur induzieren und entscheiden, ob ein Zellzyklusarrest eingeleitet werden muss. Letzteres geschieht, um den Zellen mehr Zeit für die Reparatur zu verschaffen und zu verhindern, dass Zellen sich mit DSBs teilen oder die DSBs replizieren (Khanna & Jackson, 2001). Sind die DNA-Schäden irreparabel kann eine Zelle den programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten und wird dadurch aus dem Zellverband entfernt. Im Folgenden soll die zelluläre Antwort auf die Induktion eines DSBs genauer beleuchtet werden.

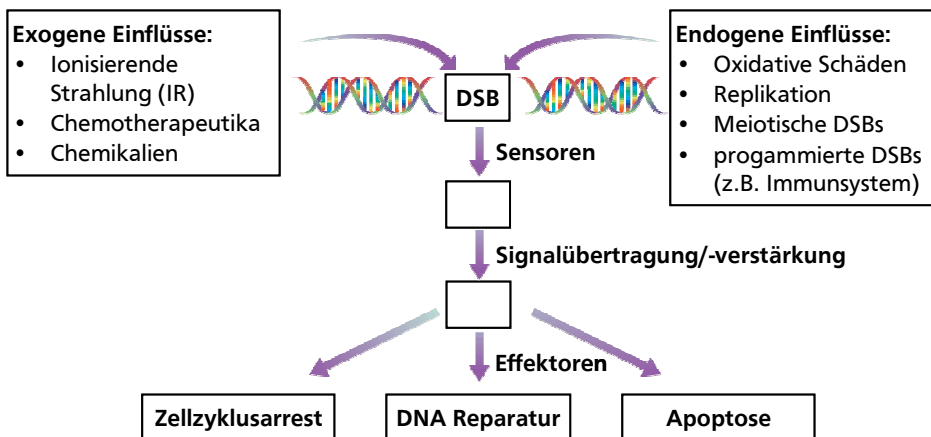


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der zellulären Antwort auf die Induktion von DSBs

Die genomische Integrität von Zellen wird ständig durch die Induktion von DNA-Schäden durch exo- und endogene Einflüsse bedroht. Wird ein DSBs induziert wird er von Sensorproteinen erkannt, welche zur Aktivierung von Proteinen führen, die zur Signalübertragung und -amplifizierung benötigt werden. Die anschließend aktivierten Effektorproteine können verschiedene Mechanismen wie einen Zellzyklusarrest, DNA Reparatur oder Apoptose einleiten. Frei nach Khanna and Jackson (2001)

2.2.1. Erkennung von DNA-Doppelstrangbrüchen

Die freien Enden von DNA-DSBs werden vom MRN-Komplex, bestehend aus Mre11 (*meiotic recombination 11*), Rad50 (*radiation repair protein 50*) und NBS1 (*Nijmegen Breakage Syndrome 1*) erkannt und gebunden (de Jager et al, 2001; Kobayashi et al, 2002; Petrini & Stracker, 2003). Anschließend rekrutiert der MRN-Komplex die Proteinkinase ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*), welche zur Familie der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-ähnlichen Kinasen (PIKKs) (Savitsky et al, 1995) gehört, zum DSB (Carson et al, 2003; Horejsi et al, 2004; Lee & Paull, 2005; Uziel et al, 2003). Dort wird ATM durch eine Autophosphorylierung am Serin 1981 aktiviert und das als Homodimer oder -multimer vorliegende ATM zerfällt in Monomere (Bakkenist & Kastan, 2003). ATM ist durch seine Kinaseaktivität an der Induktion und Regulation vieler Signalkaskaden beteiligt (Abraham, 2001; Kim et al, 1999), z.B. bei der Induktion von Zellzykluskontroll-Mechanismen (siehe Abschnitt 2.2.3) und der Regulation der Replikation. Eine weitere wichtige Funktion von ATM ist die Induktion der Resektion von DSBs, welche zur Aktivierung von ATR führt (Bhatti et al, 2011; Jazayeri et al, 2006). Die für die DSB-Erkennung wichtigste Funktion von ATM ist jedoch die Phosphorylierung des Histons H2AX am Serin 139 (Kinner et al, 2008), da ein zentraler Teil der zellulären Schadensantwort auf

dieser Phosphorylierung beruht. Das Histon H2AX gehört zu der Histonfamilie H2A und macht 2 % - 10 % der Gesamtpopulation dieser Histonfamilie aus (Baxevanis & Landsman, 1996). H2AX ist gleichmäßig über das Chromatin verteilt (West & Bonner, 1980) und die am Serin 139 phosphorylierte Form wird als γ H2AX bezeichnet. Die Phosphorylierung von H2AX kann während des gesamten Zellzyklus stattfinden (Jazayeri et al, 2006) und erfolgt nicht nur in der unmittelbaren Nähe des DSBs sondern bis zu 2 Mbp um den Bruch herum (Bhatti et al, 2011; Redon et al, 2002; Rogakou et al, 1998). Die Bildung eines γ H2AX-markierten DNA-Bereiches (Focus) um einen DSB wird genutzt um einzelne DSBs in einer Zelle zu visualisieren (Löbrich et al, 2010; Rothkamm & Löbrich, 2003). Hierfür werden phosphospezifische Antikörper gegen γ H2AX verwendet und mit einer Immunfluoreszenz-Färbung nachgewiesen. Diese Methode ermöglicht die Untersuchung von DSBs auf Einzelzellebene und gehört damit zu den Standardverfahren zum Nachweis von DSBs. Neben ATM können auch andere Familienmitglieder der PIKKs wie z.B. *ATM- and Rad3-related* (ATR) oder *DNA dependent kinase* (DNA-PK) H2AX phosphorylieren (Furuta et al, 2003; Stiff et al, 2004; Wang et al, 2005a; Ward & Chen, 2001). ATR wird durch RPA-beladene, einzelsträngige DNA-Bereiche aktiviert, die durch Replikationsstress oder die Resektion von DSB-Enden induziert werden (siehe Abschnitt 2.3). DNA-PK besteht aus drei Untereinheiten, dem Heterodimer Ku70/Ku80 sowie der katalytischen Untereinheit der DNA-PK der DNA-PKcs (Gottlieb & Jackson, 1993). Die DNA-PK spielt in der Phosphorylierung von H2AX wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle und ist in erster Linie wichtig für die Reparatur von DSBs über das NHEJ (siehe Abschnitt 2.2.2.2).

Das phosphorylierte H2AX ist für den weiteren Fortgang der durch DSBs induzierten Signalkaskade von besonderer Bedeutung, da es als Plattform für die Aktivierung, Rekrutierung und den Verbleib verschiedenster Reparatur- und Zellzykluskontroll-Faktoren dient (Celeste et al, 2003). Zu den durch γ H2AX rekrutierten Proteinen gehören 53BP1 (*p53 binding protein 1*) und MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint protein 1*). Neben der Phosphorylierung von H2AX kommt es auch zu Ubiquitinylierungen des Histons um weitere Reparaturfaktoren zu rekrutieren und zu binden. 53BP1 gehört zu den Proteinen die an diese Ubiquitinketten binden und lässt sich daher als Focus am DSB nachweisen (Doil et al, 2009; Stewart et al, 2009). MDC1 bindet dagegen direkt an das phosphorylierte Serin 139 des H2AX-Histons, an NBS1 (Wang et al, 2011) sowie an ATM und sorgt dadurch für eine anhaltende Akkumulation von ATM am DNA-Schaden und eine Verstärkung des DNA-Schadenssignals durch die Ausweitung der H2AX-Phosphorylierung (Bhatti et al, 2011; Lou et al, 2006). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass 53BP1 und BRCA1 (*breast cancer associated 1*) in Zellen ohne MDC1 keine *ionising radiation-induced foci* (IRIF) am DSB bilden (Lou et al, 2006; Pei et al, 2011). MDC1 spielt sowohl bei der Initiierung (nach niedrigen Dosen ionisierender Strahlung), als auch bei der Aufrechterhaltung des G2/M-Arrests (Shibata et al, 2010) und bei der Aktivierung des S-Phase-Arrests eine Rolle (Goldberg et al, 2003; Wu et al, 2008). MDC1 sorgt also sowohl für die Aktivierung von Reparaturfaktoren als auch für die Induktion eines Zellzyklusarrests. In den folgenden

Kapiteln soll auf die DSB-Reparatur (siehe Abschnitt 2.2.2) und die Zellzykluskontrolle (siehe Abschnitt 2.2.3) näher eingegangen werden.

2.2.2. Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

In eukaryotischen Zellen gibt es zwei Hauptreparaturwege für DSBs, zum einen die nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) (siehe Abschnitt 2.2.2.2) und zum anderen die homologe Rekombination (HR) (siehe Abschnitt 2.2.2.1) (Kanaar et al, 1998). Die Reparatur eines DSBs über den Weg der HR ist auf die späte S- und die G2-Phase beschränkt, da für diesen Reparaturweg das homologe Schwesterchromatid als *Template* benötigt wird (Johnson & Jasin, 2000; Rothkamm et al, 2003). Das NHEJ ist der Hauptweg der DSB-Reparatur in Wirbeltierzellen und während des gesamten Zellzyklus aktiv, da keine Vorlage für die Reparatur nötig ist (Rothkamm et al, 2003). Da während der HR das Schwesterchromatid als Vorlage für die DNA-Synthese verwendet wird, gilt es als fehlerfreier Reparaturweg. Bei der DSB-Reparatur durch das NHEJ kann es dagegen aufgrund von Resektion an den DSB-Enden zum Verlust von Basen kommen, weswegen das NHEJ als fehlerbehafteter Reparaturweg angesehen wird. Für die vorliegende Arbeit ist besonders erwähnenswert, dass Replikations-assoziierte DSBs hauptsächlich über die HR oder einen Unterweg der HR repariert werden (Lundin et al, 2002; Rothkamm et al, 2003; Saintigny et al, 2001), da Replikationsstress einendige DSBs induziert bei denen das zweite Bruchende zur Ligation durch das NHEJ fehlt.

2.2.2.1. Homologe Rekombination

Die homologe Rekombination lässt sich in 3 Schritte unterteilen, die Präsynapsis, die Synapsis und die Postsynapsis. Während der Präsynapsis wird die DNA prozessiert und einzelsträngige DNA-Bereiche (ssDNA) induziert. In der Synapsis erfolgen die Homologiesuche im Schwesterchromatid, die Strang-invasion und die D-Loop-Ausbildung. Während der Postsynapsis wird der fehlende DNA-Bereich synthetisiert und die beiden Schwesterchromatiden getrennt (Heyer et al, 2010; Heyer et al, 2006). Im Folgenden soll genauer auf die einzelnen Schritte eingegangen werden.

Während der Präsynapsis wird der DSB vom MRN-Komplex gebunden, stabilisiert und die Bruchenden werden so in räumlicher Nähe zueinander gehalten (Abbildung 2.2) (Tauchi et al, 2002). Anschließend werden die Bruchenden von Mre11, CtIP, BLM und Exo1 resektiert und ssDNA-Bereiche induziert (Langerak et al, 2011; Mimitou & Symington, 2009; Sartori et al, 2007; Zhu et al, 2008). RPA (*replication protein A*) bindet direkt bei der Bildung der ssDNA an diese, um sie vor dem Abbau durch Nukleasen sowie der Bildung von Sekundärstrukturen zu schützen (Binz et al, 2004; Chen et al, 2013; Zou & Elledge, 2003). Rad51 wird von BRCA2 auf die ssDNA geladen und verdrängt dabei RPA (Jensen et al, 2010; Yuan et al, 1999). Bei diesem Schritt bildet Rad51 mit der DNA ein Nukleoproteinfilament, wobei weitere Proteine der Rad52-Epistasisgruppe, zu der auch Rad51 zählt, beteiligt sind (Symington, 2002).

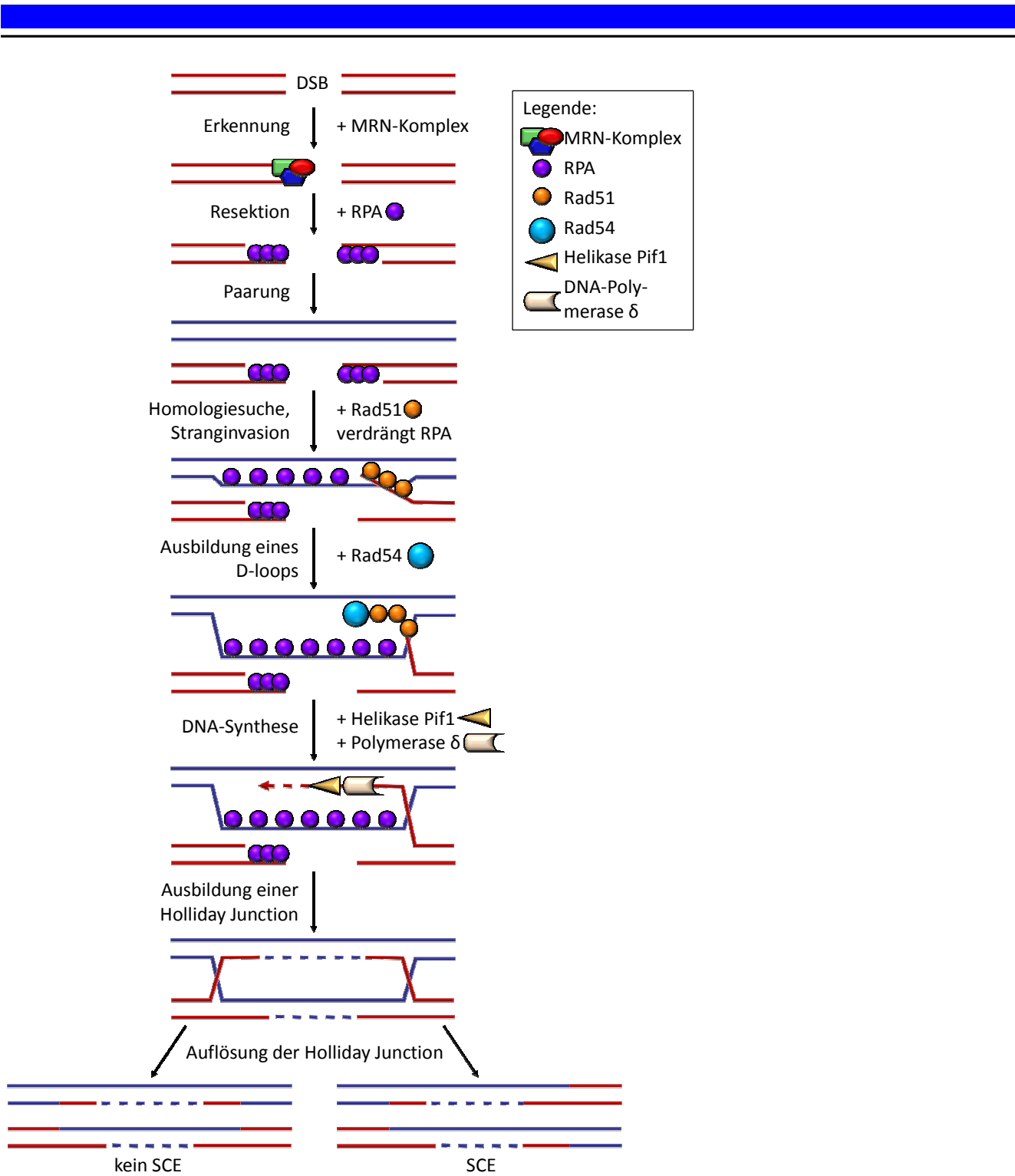


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der HR an einem zwiendingen DSB

Tritt ein DSB in einer Zelle auf wird er vom MRN-Komplex erkannt und gebunden. Es erfolgt eine Resektion durch Mre11, CtIP und/oder Exo1 und die induzierten, einzelsträngigen DNA-Bereiche (ssDNA) werden von RPA gebunden. Rad51 wird von BRCA2 auf die ssDNA geladen, verdrängt dabei RPA und bildet mit der DNA ein Nukleoproteinfilament. Das Rad51-Nukleoproteinfilament induziert zusammen mit einigen Rad51-Paralogen die Suche nach homologen Sequenzen im Schwesterchromatid sowie die Stranginvasion. Wurde eine homologe Sequenz gefunden, wird Rad54 rekrutiert, welches die Bildung eines *D-Loops* induziert und Rad51 vom eingewanderten DNA-Strang entfernt. RPA bindet den durch die D-Loop-Bildung verdrängten DNA-Strang, sowie den für die DNA-Synthese verwendeten *Template*-Strang. Die Helikase Pif1 und die Polymerase δ werden rekrutiert und die DNA-Reparatur-Synthese wird durchgeführt. Bei der Ligation der DNA-Stränge kommt

es zur Ausbildung einer *Holliday Junction* die auf zwei unterschiedliche Arten aufgelöst werden kann, wodurch entweder ein Schwesterchromatidaustausch (SCE) induziert wird (rechts) oder nicht (links).

Während der Synapsis führt das Rad51-Nukleoproteinfilament die Homologiesuche sowie die Stranginvasion in das unbeschädigte, homologe Schwesterchromatid durch. Aufgrund dieser wichtigen Funktion von Rad51 in der HR und der Akkumulation des Proteins am DSB, welche man mit einer Immunfluoreszenzfärbung als Focus nachweisen kann, dient Rad51 oft als Marker für HR Vorgänge. Wurde eine homologe Sequenz gefunden, wird die durch die Stranginvasion induzierte Ausbildung des *D-Loops* von Rad51 und Rad54 durchgeführt. Anschließend entfernt Rad54 Rad51 von den eingewanderten ssDNA-Bereichen (Solinger et al, 2002), dies ist essentiell um die DNA-Synthese im *D-Loop* zu induzieren. Ab diesem Schritt können verschiedene Unterwege der HR ablaufen, wie das *synthesis dependent strand annealing* (SDSA) oder die *break induced replication* (BIR) (Heyer et al, 2010). Im Folgenden wird auf den klassischen Weg der HR über eine doppelte *Holliday Junction* eingegangen.

Während der Postsynapsis rekrutiert das an den verdrängten Strang des *D-Loops* gebundene RPA den *replication factor C* (RFC), welcher PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) auf den als *Template* genutzten DNA-Strang lädt, wodurch wiederum die DNA-Polymerase δ rekrutiert wird (Eggler et al, 2002; Li et al, 2013; Sneed et al, 2013). Zusammen mit der Helikase Pif1 bildet die Polymerase δ den DNA-Reparatur-Synthese-Komplex im *D-Loop* und synthetisiert die fehlenden DNA-Stücke (Wilson et al, 2013). Durch die Ligation der DNA-Enden entsteht die *Holliday Junction*, die durch verschiedene Mechanismen aufgelöst werden kann. Erfolgt die Auflösung über einen Bloom-abhängigen (BLM) Weg, werden keine Schwesterchromatidaustausche (SCEs) induziert, während bei der Auflösung durch Gen1 (*XPG-like endonuclease 1*) (Ip et al, 2008; Rass et al, 2010) oder Mus81-Eme1 (*MMS and UV sensitive 1 - essential meiotic endonuclease 1*) (Constantinou et al, 2002; Taylor & McGowan, 2008) SCEs induziert werden.

2.2.2.2. Nicht-homologe Endverknüpfung

Die nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) ist ein deutlich weniger komplizierter DSB-Reparaturweg als die HR und beschränkt sich weitestgehend darauf, glatte DSB-Enden bzw. Enden mit kurzen ssDNA-Bereichen zu ligieren (Weterings & Chen, 2008; Weterings & van Gent, 2004). Dafür spielt das NHEJ auch bei der Reparatur von durch V(D)J-Rekombination induzierten DSBs, bei der Induktion von Apoptose und der Aufrechterhaltung von Telomer-Enden eine Rolle (Burma & Chen, 2004). Das NHEJ wird über die Bindung eines aus Ku70 und Ku80 bestehenden Heterodimers an jeweils eines der DSB-Enden eingeleitet (Abbildung 2.3). Das Ku70/Ku80 Heterodimer bindet die DNA-Enden unabhängig von deren Sequenz und verhindern dadurch die Degradation der DNA (Liang et al, 1996; Weterings et al, 2003). Zusätzlich rekrutiert das Heterodimer Ku70/Ku80 die katalytische Untereinheit

der DNA-PK (DNA-PKcs) zum DSB und bildet mit dieser den vollständigen DNA-PK Proteinkomplex (Lees-Miller et al, 1990). Durch die Bindung jeweils eines DNA-PK-Komplexes an die beiden Bruch-Enden des DSB werden diese in räumlicher Nähe zueinander gehalten (Meek et al, 2008; Weterings & Chen, 2007). Im Anschluss kommt es zu einer Autophosphorylierung des DNA-PK-Komplexes in *trans* und einer weiteren Phosphorylierung durch ATM. Diese Phosphorylierungen führen zu einer Konformationsänderung des Komplexes und dadurch zur Freigabe der DNA-Enden damit diese ligiert werden können (Burma & Chen, 2004; Ding et al, 2003; Uematsu et al, 2007; Weterings et al, 2003). Falls nötig können die freigegebenen DNA-Enden vor der Ligation von der Nuklease Artemis prozessiert werden, welche von DNA-PK aktiviert wird (Ma et al, 2002; Wang et al, 2005b). Die Ligation der Bruch-Enden erfolgt durch einen aus DNA-Ligase IV, XRCC4 (*X-Ray Repair Cross-Complementing*) und XLF (*XRCC4-like factor*) bestehenden Komplex (Ahnesorg et al, 2006; Grawunder et al, 1998a; Grawunder et al, 1998b; Grawunder et al, 1998c; Uematsu et al, 2007). Durch die Prozessierung der DSB-Enden während der Reparatur über das NHEJ kann es zum Verlust von Nukleotiden kommen, weswegen das NHEJ als fehlerbehafteter Reparaturweg gilt.

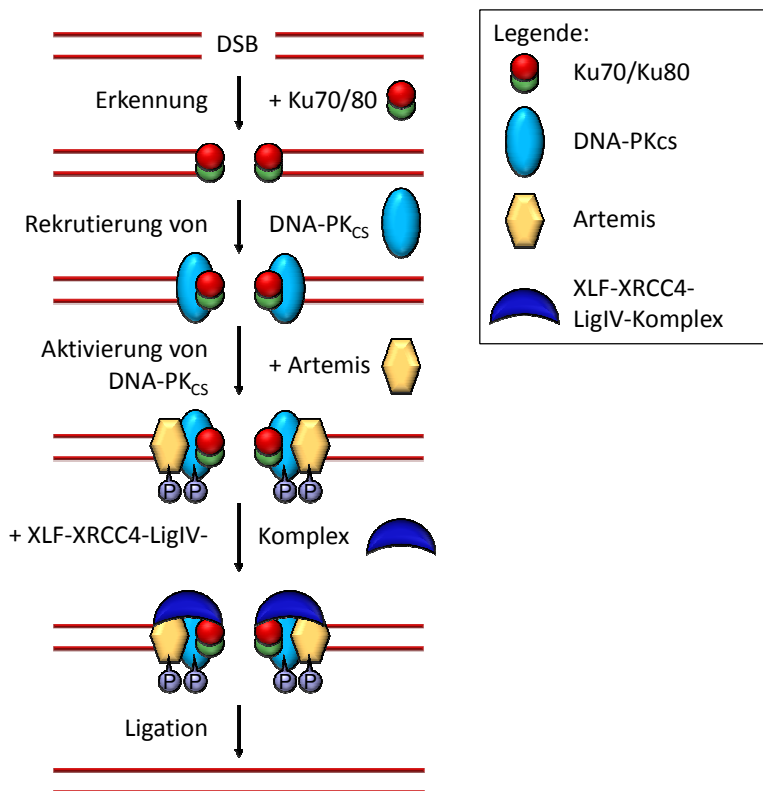


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der DSB-Reparatur durch das NHEJ. Die DSB-Enden werden von einem aus Ku70 und Ku80 bestehenden Heterodimer gebunden. Dieses Heterodimer rekrutiert die katalytische Untereinheit der DNA-PK, die DNA-PKcs, und bildet mit ihr den vollständigen DNA-PK-Komplex. Der DNA-PK-Komplex wird durch eine Autophosphorylierung in *trans* sowie eine Phosphorylierung durch ATM aktiviert. Die Aktivierung führt zu einer Konformationsänderung durch die die DSB-Enden freigegeben werden. Ist die Prozessierung der DSB-Enden notwendig wird Artemis rekrutiert und durch die DNA-PK aktiviert. Die Ligation der Bruchenden erfolgt durch einen Komplex aus XLF, XRCC4 und der Ligase IV (LigIV). Frei nach Misteli and Soutoglou (2009)

2.2.3. Aktivierung der Zellzykluskontrolle durch DSBs

Neben DSB-Reparaturmechanismen werden nach der Erkennung von DSBs auch Zellzykluskontroll-Mechanismen aktiviert. Die Steuerung der Zellzyklusprogression erfolgt über das Zusammenspiel von Cdk's (*cyclin-dependent kinase*) und Cyclinen, die als Komplexe in der Zelle vorliegen und je nach

Zellzyklusphase unterschiedlich stark expremiert werden (Abbildung 2.4). Dabei stellen die Cdks die katalytische, die Cycline die regulatorische Untereinheit dar. Zusätzlich zu der Regulation durch die Komplexbildung unterliegt der Komplex an sich ebenfalls einer Regulation durch Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen (Morgan, 1995).

Durch die Induktion von DNA-Schäden oder durch das Auftreten von Replikationsstress werden ATM und ATR aktiviert. ATM aktiviert die Checkpointkinase 2 (Chk2) über eine Phosphorylierung am Threonin 68 (Lukas et al, 2003; Matsuoka et al, 1998; Matsuoka et al, 2000), während ATR Chk1 am Serin 345 phosphoryliert und dadurch aktiviert (Liu et al, 2000; Lopez-Girona et al, 2001; Sorensen et al, 2005; Zachos et al, 2003; Zou & Elledge, 2003). Die beiden Checkpointkinasen führen im weiteren Verlauf der Signalkaskaden zu einer Inhibition der Zellzyklusprogression. In den folgenden beiden Abschnitten soll auf die spezifische Regulation des S-Phase-Arrests, der verhindert dass DNA-Schäden repliziert werden und des G2/M-Arrests, der den Eintritt von Zellen mit DNA-Schäden in die Mitose inhibiert, eingegangen werden.

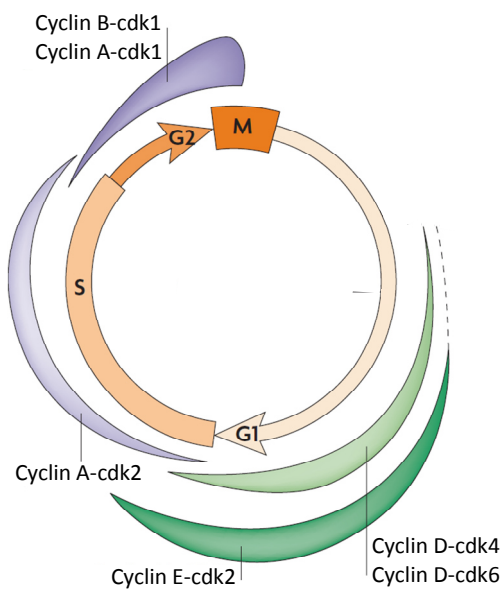


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Expressionslevels der Cyclin-Cdk-Komplexe während des Zellzyklus

Während verschiedener Zellzyklusphasen kommt es zur Expression unterschiedlicher Cyclin-Cdk-Komplexe die den Übergang von einer Zellzyklusphase in die Nächste regulieren. Cyclin D und Cdk4 bzw. Cdk6 regulieren die G1-Phase. Der Cyclin E-Cdk2-Komplex wird in der späten G1-Phase aktiviert und reguliert den Übertritt in die S-Phase. Während der S-Phase ist der Cyclin A-Cdk2-Komplex aktiv. Der Cyclin A-Cdk1-Komplex wird im Laufe der G2-Phase immer stärker expremiert. Cyclin B und Cdk1 bilden zusammen den MPF (*mitosis promoting factor*), der den Übergang in die Mitose reguliert. Frei nach Collier (2007)

2.2.3.1. Der S-Phase-Arrest

In der S-Phase reguliert die Phosphatase CDC25A (*cell division cycle A*) die Replikation der DNA, indem sie die inhibitorische Phosphorylierung des Tyrosin 15 von Cdk2 entfernt und diese dadurch aktiviert (Falck et al, 2001; Shechter et al, 2004a; Shechter et al, 2004b; Sørensen et al, 2003). Die Aktivität von CDC25A ist daher für eine normale S-Phase-Progression nötig. Die Überexpression von CDC25A, wie sie vermehrt in Tumorerkrankungen zu finden ist, führt jedoch zu einer Erhöhung der Replikationsrate (Shechter et al, 2004a) und dadurch zu einer ungeordneten Replikation (Molinari et al, 2000; Sørensen et al, 2003; Vigo et al, 1999). Werden in der S-Phase DSBs induziert führt dies zur Aktivierung von Chk1 und Chk2. Die beiden Checkpointkinasen phosphorylieren CDC25A an mehreren

Phosphorylierungsstellen, dabei scheint die Phosphorylierung des Serin 123 von besonderer Bedeutung für die Induktion eines Zellzyklusarrests und der Inhibition der Replikation zu sein (Sorensen & Syljuasen, 2012; Sørensen et al, 2003). Durch diese Phosphorylierung wird die Bindung von CDC25A an den 14-3-3-Komplex induziert und dadurch eine Degradation des Proteins ausgelöst (Donzelli & Draetta, 2003). Diese Degradation führt dazu, dass die inhibitorische Phosphorylierung des Tyrosins 15 von Cdk2 erhalten bleibt und die Aktivierung neuer Replikationsursprünge verhindert wird. Dadurch wird die Replikation inhibiert und ein Zellzyklusarrest induziert. Wird CDC25A nicht inaktiviert, kommt es zur Strahlungs-resistenten DNA-Synthese (RDS) wie sie z.B. nach einer Depletion von ATM oder ATR auftritt (Painter & Young, 1980; Shechter et al, 2004a; Sorensen & Syljuasen, 2012). RDS bezeichnet das Phänomen, dass eine Zelle trotz der Induktion von DNA-Schäden die DNA-Replikation nicht anhält (Bartek et al, 2004).

In der S-Phase wird zwischen mehreren Checkpoints unterschieden, je nachdem durch welchen Schaden sie induziert wurden (Bartek et al, 2004). Dabei wird zwischen dem Replikations-*Checkpoint*, dem *intra-S-Phase-Checkpoint* und dem, in der vorliegenden Arbeit als G2/M-Arrest bezeichneten, *S/M-Checkpoint* unterschieden. Auf letzteren wird im folgenden Abschnitt (2.2.3.2) näher eingegangen. Der Replikations-*Checkpoint* wird durch Arretierung der Replikationsgabeln oder durch Kollision von Replikationsgabeln mit beschädigten DNA-Strukturen induziert und seine Hauptaufgaben sind es die Aktivierung neuer Replikationsursprünge zu verhindern (Dimitrova & Gilbert, 2000; Nyberg et al, 2002) sowie die Stabilität der arretierten Replikationsgabeln zu unterstützen (Lopes et al, 2001; Tercero & Diffley, 2001). Die Aktivität dieses *Checkpoints* wird in erster Linie von RPA und ATR reguliert. Der *intra-S-Phase-Checkpoint* wird dagegen Replikations-unabhängig durch DSBs induziert und ist nicht in der Lage die bereits aktiven Replikationsgabeln zu inhibieren (Merrick et al, 2004; Painter & Young, 1980). Dies erklärt, warum die Replikation nach Bestrahlung nur verlangsamt und nicht vollständig inhibiert wird. Dieser *Checkpoint* scheint durch ATM und die Mediatoren 53BP1, MDC1 und BRCA1 reguliert zu werden (Abraham, 2001; Falck et al, 2001; Falck et al, 2002).

2.2.3.2. Der G2/M-Arrest

Den Übergang von der G2-Phase in die Mitose reguliert der aus einem Komplex von Cyclin B und Cdk1 bestehende *mitosis promoting factor* (MPF) (Dunphy et al, 1988). CDC25C entfernt die inhibitorischen Phosphatgruppen von Tyrosin 15 und Threonin 14 am Cdk1 und aktiviert dadurch den Komplex, der dann der Zelle den Übertritt in die Mitose ermöglicht (Nigg, 2001).

Nach der Induktion von DSBs phosphorylieren Chk1 und Chk2 CDC25C am Serin 216, wodurch dieses an den 14-3-3-Komplex bindet (Matsuoka et al, 1998; Peng et al, 1997; Sanchez et al, 1997). Diese Bindung verhindert zum einen die Interaktion von CDC25C mit Cdk1 und führt zum anderen zum Export von CDC25C aus dem Zellkern (Graves et al, 2001; Kumagai et al, 1998; Peng et al, 1997; Sanchez et al, 1997). Durch diesen Export werden die normalerweise von CDC25C durchgeführten De-

phosphorylierungen von Tyrosin 15 und Threonin 14 von Cdk1 verhindert und es kommt nicht zu einem Eintritt in die Mitose.

Chk1 und Chk2 sind bei der Induktion und der Aufrechterhaltung des G2/M-Arrests aufgrund der Aktivierung durch verschiedene Substrate auf unterschiedliche Weisen beteiligt. Außerdem spielt der Zeitpunkt der Induktion der DNA-Schäden (erfolgte diese in der S- oder in der G2-Phase) eine Rolle für die Beteiligung der beiden Checkpointkinasen. So wird nach Bestrahlung in der G2-Phase ATM für die Induktion eines G2/M-Arrests benötigt, während nach Bestrahlung in der S-Phase ein ATM-unabhängiger G2/M-Arrest induziert wird (Beamish & Lavin, 1994; Xu et al, 2002). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass eine anhaltende Chk1-Aktivierung besonders für die Aufrechterhaltung des G2/M-Arrests benötigt wird, während über die Beteiligung von Chk1 an der Induktion des G2/M-Arrests in der Literatur diskutiert wird (Bhatti et al, 2011; Cortez et al, 2001; Jazayeri et al, 2006; Kousholt et al, 2012; Lam et al, 2004; Shibata et al, 2010; Zachos et al, 2003).

2.3. DNA-Schadensantwort während der Replikation

In der S-Phase können durch eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen DNA-Schäden induziert werden, dabei ist es für die genomische Integrität einer Zelle von besonderer Bedeutung, die Replikation der DNA fehlerfrei durchzuführen. Daher wird die DNA von hochgradig präzise arbeitenden DNA-Polymerasen repliziert, denen weniger als ein Fehler beim Einbau von 10^5 Basen unterläuft (Lange et al, 2011).

Die DNA-Replikation wird an Replikationsursprüngen, welche über das ganze Genom verteilt in sogenannten Replikationsfabriken vorliegen, initiiert und die dort gebildeten Replikationsgabeln replizieren die DNA. Replikationsfabriken bezeichnen mehrere Replikationsursprünge, die in räumlicher Nähe zueinander liegen und gleichzeitig aktiviert werden (Gillespie & Blow, 2010; Hozák & Cook, 1994). Es werden jedoch weit mehr Replikationsursprünge auf der DNA angelegt als während der Replikation genutzt werden (Burkhart et al, 1995; Lei et al, 1996; Rowles et al, 1996). Diese zusätzlichen, normalerweise inaktiven Replikationsursprünge dienen der Vervollständigung der Replikation sollte eine Replikationsgabel aufgrund von DNA-Schäden oder Replikationsstress die DNA-Synthese nicht abschließen können (Sorensen & Syljuasen, 2012; Woodward et al, 2006). Die DNA-Synthese läuft daher hoch koordiniert ab und ist stark reguliert um die Aktivierung einer zu hohen Anzahl an Replikationsursprüngen zu verhindern. Weiterhin wird die Aktivierung der passiven Replikationsursprünge stark reguliert um sicherzustellen, dass nur dann ein neuer Replikationsursprung aktiviert wird, wenn eine oder einige wenige Replikationsgabeln arretiert wurden. Werden jedoch alle Replikationsgabeln arretiert, wie es z.B. durch eine Depletion der Desoxyribonukleotide der Fall ist, wird die Aktivierung neuer Replikationsursprünge verhindert, um die Situation der Zelle nicht weiter zu verschlimmern (Dimitrova & Gilbert, 2000; Woodward et al, 2006).

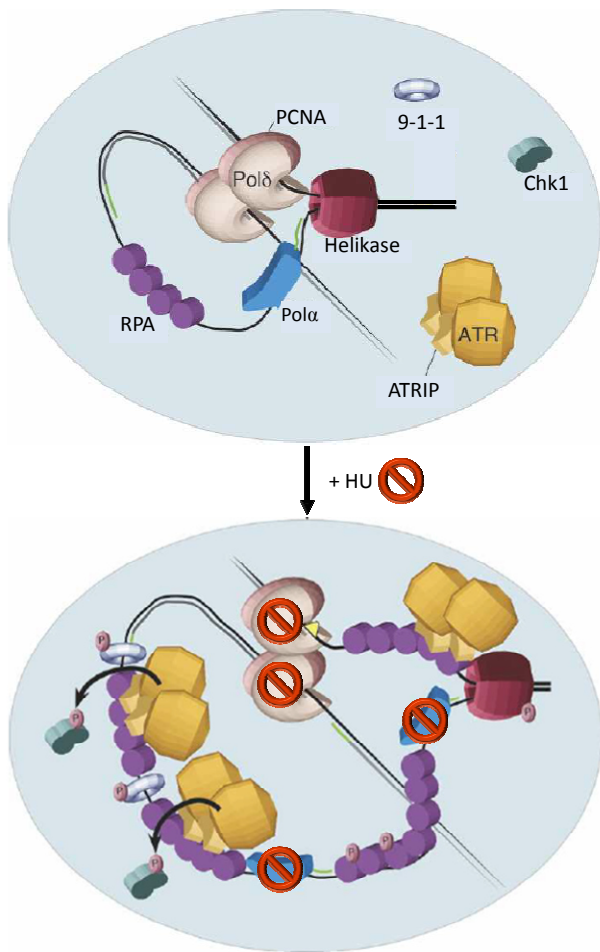


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Entkopplung von Polymerase und Helikase an einer Replikationsgabel und die daraus resultierende ATR-Aktivierung

Eine HU-Behandlung inhibiert die DNA-Polymerase und induziert dadurch eine funktionale Entkopplung der DNA-Polymerase und der Helikase (Replikationsgabelkollaps). Durch diesen Replikationsgabelkollaps werden lange ssDNA-Bereiche induziert, die von RPA gebunden werden. RPA rekrutiert Komplexe aus ATR und ATRIP zur ssDNA und der 9-1-1-Komplex wird auf ssDNA-dsDNA-Kreuzungen geladen. Durch diese und weitere Protein-Akkumulationen wird ATR aktiviert und phosphoryliert Chk1 am Serin 345, um dieses zu aktivieren und einen Replikations-abhängigen S-Phase-Checkpoint zu induzieren. Frei nach Cortez (2005)

Durch eine HU-Behandlung kommt es zu der eben beschriebenen Depletion der Desoxyribonukleotide (siehe Abschnitt 2.4), die zu einer Arretierung der DNA-Polymerase führt. Wird die DNA-Polymerase arretiert während die Helikase weiterhin funktional ist und die DNA entwindet, spricht man von einer Entkopplung der DNA-Polymerase und der Helikase (Abbildung 2.5). Diese Entkopplung bezeichnet man auch als Replikationsgabelkollaps, welcher auch durch andere Agenzien wie z.B. Aphidicolin oder durch UV-induzierte DNA-Schäden hervorgerufen werden kann (Byun et al, 2005; Görisch et al, 2008; Li & Heyer, 2008; Pacek & Walter, 2004; Walter & Newport, 2000). Weiterhin werden durch die Entkopplung lange einzelsträngige DNA-Bereiche (ssDNA) induziert, die von RPA gebunden und stabilisiert werden (Görisch et al, 2008; Sogo et al, 2002). Auch durch andere Ursachen induzierter Replikationsstress oder die Resektion von DSBs führt zur Induktion von ssDNA, die von RPA gebunden wird (Wold, 1997; Zou & Elledge, 2003; Zou et al, 2003). Diese führt zur Aktivierung von ATR, der in der S-Phase hauptsächlich für die Aktivierung der DNA-Schadensantwort verantwortlichen Proteinkinase. Die Aktivierung von ATR ist ein komplexer Prozess und läuft unter Beteiligung verschiedener Proteine ab. Zunächst rekrutiert RPA Komplexe aus ATRIP (*ATR interacting protein*) und ATR, wobei ATRIP die Bindung des Komplexes an RPA vermittelt (Cortez et al, 2001; Liu et al, 2011; Zou & Elledge, 2003). Im weiteren Verlauf der ATR-Aktivierung erfolgt eine Autophosphorylierung von

ATR in *trans* am Threonin 1989 (Liu et al, 2011). Der Rad17-RFC-Komplex assoziiert mit ssDNA (Zou et al, 2003) und erkennt ssDNA-dsDNA-Kreuzungen, auf die er den 9-1-1-Komplex (Rad9-Rad1-Hus1) lädt (Ellison & Stillman, 2003; Zou et al, 2003). TopBP1 (*Topoisomerase DNA II binding protein 1*) bindet an Rad9 und kann dadurch mit ATR interagieren und es stimulieren (Duursma et al, 2013; Liu et al, 2011; Sorensen et al, 2005). Zusätzlich fördert MDC1 die Akkumulation von TopBP1 an arretierten Replikationsgabeln (Wang et al, 2011). Nach der vollständigen Aktivierung von ATR kann dieses verschiedene Proteine durch Phosphorylierungen aktivieren und dadurch zur Stabilisierung von Replikationsgabeln beitragen sowie einen Zellzyklusarrest induzieren. Außerdem phosphoryliert ATR Chk1 am Serin 345 (Lopez-Girona et al, 2001; Sorensen et al, 2005; Sorensen & Syljuasen, 2012; Zachos et al, 2003) und reguliert über diesen Weg u.a. Zellzyklusarrestkontroll-Mechanismen in der S- sowie in der G2-Phase (siehe Abschnitt 2.2.3) (Maya-Mendoza et al, 2007; Peng et al, 1997; Sanchez et al, 1997; Sørensen et al, 2003).

2.4. Wirkmechanismus einer Hydroxyurea-Behandlung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Induktion und Reparatur von DNA-Schäden nach Hydroxyurea-Behandlung untersucht werden. Die Behandlung von Zellen mit Hydroxyurea (HU) führt zur Inhibition der Ribonukleotidreduktase (RNR) (Eklund et al, 2001; Krakoff et al, 1968). Da es keine spezifische Bindungsstelle für HU an der RNR gibt (Eklund et al, 2001), erfolgt die Inhibition der enzymatisch aktiven R2-Untereinheit der RNR vermutlich indem HU das Tyrosylradikal unzugänglich macht (Brown et al, 1969; Ehrenberg & Reichard, 1972; Sneed & Loeb, 2004). Die funktionsfähige RNR entfernt die 2'-Hydroxylgruppe von den Ribonukleotiden und bildet dadurch die für die DNA-Synthese benötigten Desoxyribonukleotide. Die durch HU-induzierte Inhibition der RNR führt daher zu einer Unterversorgung der DNA-Polymerasen mit Desoxyribonukleotiden (Bianchi et al, 1986), wodurch die DNA-Replikation inhibiert wird. Eine HU-Behandlung hat jedoch keinen Einfluss auf die RNA- oder die Protein-Synthese (Yarbro et al, 1965; Young & Hodas, 1964) und hat keine Beeinträchtigung des intrazellulären ATP-Pools zur Folge (Young & Hodas, 1964). Die Inhibition der DNA-Synthese erfolgt innerhalb der ersten Minuten nach Zugabe von HU und die Replikation ist während der weiteren Behandlung vollständig unterbunden (Bianchi et al, 1986). Durch das Entfernen von HU von den Zellen und der Zugabe von frischem Medium kann die Blockade der DNA-Replikation jedoch innerhalb weniger Minuten wieder aufgehoben werden (Young & Hodas, 1964).

Aufgrund der Inhibition der Replikation durch eine HU-Behandlung, wurde HU während vieler Jahre für die Therapie von HIV (Gao et al, 1993; Lori & Lisziewicz, 1998; Lori et al, 1994) und verschiedener Tumorerkrankungen, insbesondere von Leukämien, eingesetzt (Donehower, 1992; Kennedy, 1992; Stehman, 1992). Der für die Therapie gewünschte, toxische Effekt von HU beruht auf der Blockade der Replikationsgabeln während der S-Phase durch die Depletion des Desoxyribonukleotid-Pools. Steht den DNA-Polymerasen keine ausreichende Menge an Desoxyribonukleotiden zur Verfügung, führt dies

zur Arretierung der Replikationsgabel. Die Replikationsgabeln verbleiben für einige Zeit stabil und bei einer nur kurz andauernden Arretierung können diese die DNA-Synthese wieder aufnehmen (Hanada et al, 2007; Petermann et al, 2010a). Bei längerer Blockade der Replikation werden die Replikationsgabeln dagegen instabil und kollabieren schlussendlich (Petermann et al, 2010a). Der Kollaps einer Replikationsgabel beschreibt die funktionale Entkopplung der Helikase und der DNA-Polymerase, wodurch ein großer Bereich einzelsträngiger DNA induziert wird (siehe Abschnitt 2.3 und Abbildung 2.5) (Byun et al, 2005; Görisch et al, 2008; Li & Heyer, 2008; Pacek & Walter, 2004; Walter & Newport, 2000). Kollabierte Replikationsgabeln werden durch Mus81 (Hanada et al, 2007) oder Artemis (Unno et al, 2013) prozessiert, wodurch ein einendiger DSB induziert wird. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Dauer des Replikationsblocks für die Ausbildung von DNA-Schäden durch den Kollaps von Replikationsgabeln entscheidend ist (Hanada et al, 2007; Petermann et al, 2010a; Saintigny et al, 2001; Toledo et al, 2013). Eine kurze HU-Behandlung (z.B. 2 h) führt zu einem γ H2AX-Signal welches nach Entfernung von HU rasch wieder abnimmt, eine lange HU-Behandlung (z.B. 24 h) führt dagegen zu einem persistierenden γ H2AX-Signal (Petermann et al, 2010a). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass die Beladung der einzelsträngigen DNA-Bereichen der Replikationsgabeln mit RPA einen kritischen Schritt in der Induktion von DSBs durch eine HU-Behandlung darstellt (Toledo et al, 2013). Die Beladung mit RPA schützt die arretierten Replikationsgabeln während einer HU-Behandlung vor dem Kollaps und erst wenn der intrazelluläre RPA-Pool depletiert ist kommt es zur Induktion von DSBs (Toledo et al, 2013).

Wie die durch HU-induzierten DSBs repariert werden wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Zellen, die aufgrund einer Mutation oder einer Depletion kein NHEJ (siehe Abschnitt 2.2.2.2) durchführen können, zeigen in Überlebensexperimenten eine leichte Sensitivität gegenüber einer HU-Behandlung (Lundin et al, 2002; Saintigny et al, 2001). Diese Sensitivität wird entweder auf den Kollaps zweier benachbarter Replikationsgabeln, welche durch NHEJ verknüpft werden können, zurückgeführt (Lundin et al, 2002) oder darauf, dass die Zellen zunächst versuchen alle DSBs über NHEJ zu reparieren und die HR (siehe Abschnitt 2.2.2.1) erst aktiviert wird, wenn das NHEJ überlastet ist (Saintigny et al, 2001). Weiterhin könnte nach der Entfernung von HU durch die Replikation eines benachbarten Origins ein zweiter DNA-Strang synthetisiert werden, welcher dann für die Reparatur eines einendigen DSBs über NHEJ zur Verfügung stehen würde (Petermann et al, 2010a). Zellen mit einer Defizienz in der HR zeigen im Überleben eine deutliche Sensitivität gegenüber einer HU-Behandlung (Lundin et al, 2002; Saintigny et al, 2001; Sorensen et al, 2005). Rad51, ein Schlüsselprotein in der HR (Moynahan et al, 2001; Xia et al, 2001), wird außerdem eine Rolle beim Neustart der angehaltenen Replikationsgabel zugeschrieben (Petermann et al, 2010a). Im Allgemeinen wird angenommen, dass DNA-Schäden die in der S-Phase induziert wurden hauptsächlich über HR repariert werden, da dieser Reparaturweg als fehlerfrei gilt (Lundin et al, 2002; Rothkamm et al, 2003; Saintigny et al, 2001).

2.5. Zielsetzung

Trotz der Verwendung von HU für die Therapie verschiedener Krankheitsbilder ist die Wirkung einer HU-Behandlung auf zellulärer Ebene bisher nicht vollständig geklärt. Es gibt zwar Studien über die DSB-Induktion nach HU-Behandlungen von unterschiedlicher Dauer, diese wurden jedoch fast ausschließlich mittels Pulsfeldgelelektrophorese durchgeführt. Diese Methode ist sehr insensitiv und es ist nicht möglich, eine Induktion von DSBs auf Einzelzellebene oder ohne Synchronisation der Zellen Zellzyklusphasen-spezifisch zu analysieren. Da eine HU-Behandlung jedoch durch die Inhibition der DNA-Synthese in erster Linie S-Phase-Zellen schädigt, ist eine Zellzyklus-spezifische Untersuchung der DSB-Induktion durch eine HU-Behandlung von großem Interesse. Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Charakterisierung der DSB-Induktion durch Immunfluoreszenzanalysen in einzelnen Zellen und Zellzyklusphasen-spezifisch. Der in unserer Arbeitsgruppe bereits etablierte Ansatz der spezifischen Messung von γ H2AX-Foci in S-Phase-Zellen bot sich für diese Untersuchungen an. Weiterhin sollte in dieser Arbeit der Einfluss verschiedener Proteine auf die DSB-Induktion durch eine HU-Behandlung untersucht werden.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war es, die Reparatur der durch eine HU-Behandlung induzierten DSBs zu analysieren. Da bisher in verschiedenen Studien sowohl eine Beteiligung der HR, als auch eine Beteiligung des NHEJ an der Reparatur HU-induzierter DSBs nachgewiesen wurde, sollte in der vorliegenden Arbeit auf Einzelzellebene eine Charakterisierung des Reparaturmechanismus erfolgen. Die Reparatur HU-induzierter DSBs wurde bisher fast ausschließlich mit Überlebensexperimenten untersucht. In der vorliegenden Arbeit sollte daher die DSB-Reparatur durch Immunfluoreszenzanalysen im ersten Zellzyklus nach der DSB-Induktion charakterisiert werden. Dies ermöglicht eine Untersuchung der direkten Effekte einer HU-Behandlung auf Zellen, während mit Überlebensexperimenten nur die Langzeitfolgen in Form von Zelltod analysiert werden können.

Es ist bekannt, dass nach der Induktion von DSBs verschiedene Zellzykluskontroll-Mechanismen aktiviert werden. Es wurden zwar bereits erste Studien über die Aktivierung der Checkpointkinasen 1 und 2 nach einer HU-Behandlung durchgeführt, eine genau Analyse der Zellzyklus-Progression nach DSB-Induktion durch HU ist jedoch nicht bekannt. Daher sollte in dieser Arbeit die Zellzyklus-Progression nach einer HU-Behandlung untersucht und mit der nach Bestrahlung bzw. einer MMS-Behandlung verglichen werden. Ziel dieser Untersuchungen war es, zu analysieren, inwiefern die Induktion von DSBs durch unterschiedliche Agenzien einen Einfluss auf die Aktivierung der Checkpointkinasen sowie auf die Zellzyklus-Progression hat.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
BrdU (1 mM in 1x PBS)	BD Bioscience
BSA	AppliChem
BSA	PAA Laboratories
DAPI (1mg/ml in 1xPBS)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
DNase (1mg/ml in 50% Glycerin +0,15 M NaCl)	Roche
EDTA	Roth
EdU	Invitrogen, 10 mM
Essigsäure (Eisessig)	Roth
Ethanol, vergällt	Roth
Formaldehyd (>37% säurefrei)	Roth
Giemsa	Roth
Glycin	Sigma
Hydroxyurea	Sigma
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid	USB
Magermilchpulver	Reformhaus
Methanol	Roth, 99,99 %
<i>Mounting Medium</i>	Vectashield® Axxora Alexis
Natriumazid	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natrium-Tetraborat-Decahydrat	Roth
NP40	Calbiochem
10xPBS	Biochrom
Ponceau S	Sigma
Penicillin-Streptomycin	Biochrom
PhosphoSTOP	Roche
Propidiumiodid	Roth
RNAseA (10 mg/ml PBS, 20 min bei 75 °C hitzeinaktiviert)	Sigma;
Salzsäure, HCL	Roth
Tris	Roth
Triton X-100	Roth
Trypsin	Biochrom
Tween®20	Roth
Zitronensäure	Sigma

3.1.1.1. Inhibitoren

Inhibitor	Hersteller
Calyculin A	LC Laboratories
Colcemid	Sigma
ATM Inhibitor	Tocris
DNA-PK Inhibitor	Tocris

3.1.2. siRNA

RNA	Sequenz	Stammkonz.	Endkonz.	Hersteller
ATM	CACCGTTTTGTTAGTTTATTA	20 μ M	15 nM	Qiagen
BRCA2	TTG GAG GAA TAT CGT AGG TAA	20 μ M	25 nM	Qiagen
Kontrolle	AATTCTCCGAACGTGTCACGT	20 μ M	10 nM	Qiagen
MDC1	CCA GAA ATC TTT ATG AAT AAA	20 μ M	10 nM	Qiagen
Rad51	AAGGGAATTAGTGAAGCCAAA	20 μ M	10 nM	Qiagen
Rad54	GAACTCCCATCCAGAATGATT	20 μ M	25 nM	Qiagen

3.1.3. Antikörper und Kits

3.1.3.1. Primärantikörper

Antikörper	Hersteller	Methode
FITC mouse-anti-BrdU	BD Pharmingen	FACS
goat-anti-Rad54 polyklonal	Santa Cruz	IFM
mouse-anti-phospho-H2AX (Ser 139)	Millipore	IFM/WB
mouse-anti-H3 monoklonal	Abcam	WB
mouse-anti-RPA2	Calbiochem	WB
mouse-anti-RPA	Neomarkers	IFM
rabbit-anti-53BP1	Biomol	IFM
rabbit-anti-phospho-H2AX (Ser139)	Millipore	IFM/WB
rabbit-anti-Rad51 polyklonal	Abcam	IFM/WB
rabbit-anti-phospho-Chk1 (Ser345) monoklonal	Cell signaling technology	WB
rabbit-anti-phospho-Chk2 (Thr68)	Cell signaling technology	WB
rabbit-anti-GAPDH polyclonal	Santa Cruz	WB

3.1.3.2. Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Methode
donkey-anti-rabbit	1:1000	Dianova	WB
goat-anti-mouse	1:1000	Santa Cruz	WB
goat-anti-rabbit 594	1:1000	Molecular Probes	IFM
goat-anti-rabbit 488	1:500	Molecular Probes	IFM
goat-anti-mouse 594	1:1000	Molecular Probes	IFM
goat-anti-mouse 488	1:500	Molecular Probes	IFM
chicken-anti-goat 594	1:700	Invitrogen	IFM

3.1.3.3. Benutzte Kits

Produkt	Hersteller	Methode
Click-iT™ EdU Alexa Fluor®594 Imaging Kit	Invitrogen	IFM
Click-iT™ EdU Alexa Fluor®647 Imaging Kit	Invitrogen	IFM

3.1.4. Lösungen und Puffer

3.1.4.1. Biochemische Methoden

Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Puffer in MilliQ angesetzt.

Gesamtzelleextrakt Puffer:

20 mM Tris-HCl
1 mM EDTA
5 % Glycin
pH 8,5

Lyse-Puffer:

1 ml Puffer Gesamtzelleextrakt
5 µl PMSF in EtOH (100 mM)
1 µl Sodiumorthovanadat

Trenngelpuffer:

1,5 M Tris-HCl pH 8,8

Sammelgelpuffer:

1,5 M Tris-HCl pH 6,8

5x Laufpuffer (5 l):

150 g 0,25 M Tris
720 g 1,92 M Glycin
5 l MilliQ

Laufpuffer (1 l):

800 ml VE Wasser
200 ml 5x Laufpuffer
10 ml 10 % SDS

Blotpuffer (1 l):

600 ml VE Wasser
200 ml 5x Laufpuffer
200 ml Methanol
Bei bloten über Nacht zusätzlich 5 ml 10 % SDS

Strippuffer:

2M Glycin

pH 2,2

0,1 % (w/v) SDS

1 % (v/v) Tween20

3.1.4.2. Durchflusszytometrische Analysen

PI Lösung:

50 µl RNase (10 mg/ml)

850 µl PBS

100 µl PI Stock-Lösung (0,1 mg/ml in PBS)

3.1.4.3. Chromosomenpräparation

Fixativ (100 ml):

25 ml Essigsäure

75 ml Methanol

Bisbenzimid-Lösung:

Höchst 33258 (5 µg/ml in Milli Q)

Bestrahlungspuffer:

0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat

0,1 M Zitronensäure

pH 7,2

3.1.5. Transfektionsreagenzien

Produkt

HiPerFect Transfection Reagent

Hersteller

Qiagen

3.1.6. Längenstandards

Produkt

PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder

HiMark™ Prestained HMW Protein Standard

Hersteller

Fermentas

Invitrogen

3.1.7. Lösungen und Medien für die Zellkultur

Produkt

Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM)

Fetal calf serum (FCS)

Minimal Essential Medium (MEM)

Non-essential amino acids (NEAA)

Trypsin-EDTA-Lösung

Hersteller

Biochrom

Biochrom

Biochrom

Biochrom

0,02 % Trypsin-Lösung (2,5 %)

0,05 % 0,5 mM Na₂-EDTA, pH8
in 1x PBS

3.1.8. Zelllinien

82-6hTert

primäre, humane Hautfibroblasten von einem männlichen Spender die mittels Telomerase immortalisiert wurden. Die Zellen wurden freundlicherweise von Prof. P. Jeggo (*University of Sussex*) zur Verfügung gestellt, in MEM mit 20 % FCS, 1 NEAA kultiviert und zweimal pro Woche 1:6 gesplittet.

A549

humane Lungenkarzinomzellen, die 1972 von D. J. Giard aus dem Tumor eines 58-jährigen Mannes entnommen wurden (Giard et al, 1973). Die Zellen wurden in DMEM mit 10 % FCS, 1 % NEAA kultiviert und zweimal pro Woche 1:6 - 1:10 gesplittet.

HeLa

humane Zervixkarzinomzellen, die 1951 aus dem Tumor einer Frau entnommen wurden. Die Zellen wurden freundlicherweise von Prof. M. Montenarh (Universität des Saarlandes) zur Verfügung gestellt, in DMEM mit 10 % FCS, 1 % NEAA kultiviert und zweimal pro Woche 1:8 - 1:10 gesplittet.

3.1.9. Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Chemiglow	Biozym
Cryo-Einfrierröhrchen	VWR
Deckgläser (rund Durchmesser 15mm; eckig 24x60 mm)	Roth
Gelladespitzen	Roth
Immersionsöl	Zeiss
Küvetten (Kunststoff)	Roth
Latexhandschuhe Micro-Touch	VWR
Objektträger superfrost	Roth
Parafilm	Roth
Pasteurpipetten (Glas)	Roth
Pasteurpipetten (Kunststoff)	Roth
Pipettenspitzen	Sarstedt
Pipettenspitzen (gestopft)	Roth
Nitrocellulosemembran	Roth
Reaktionsgefäße 1,5 ml; 2 ml	Roth
Rundbodenröhrchen für FACS	Beckman Coulter
Wägebapier	Roth
Wägeschalen	Roth
Wischtücher KimWipes	NeoLab
Zellkulturflaschen 25 cm ² /75 cm ²	Biochrom
Zellkulturschalen 100x20 mm	Biochrom

Zellkulturschalen 35x10 mm/60x15 mm	VWR
Zellschaber	Biochrom
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Biochrom
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Sarstedt

3.1.10. Software

Zur Aufnahme von Membranen	ChemiCapt (Vilber Lourmat)
Zur Aufnahme am Fluoreszenzmikroskop	Metafer (Metasystems)
	Isis (Metasystems)
Zur Aufnahme von Chromosomenspreitungen	MSearch (Metasystems)
	AutoCapt (Metasystems)
Zur Auswertung von Membranen und Fluoreszenzbildern	ImageJ
Zur Auswertung von FACS Messungen	CXP Analysis (FC500)

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkulturmethoden

3.2.1.1. Kultivierung und Aussaat von Zellen

Die Zellen wurden in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Das verwendete Medium, Supplemente sowie die jeweilige Splittrate der Zelllinien befinden sich unter Abschnitt 3.1.8. Um die Zellen zu passagieren, wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen anschließend mit 1x PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden je nach Größe des Zellkulturgefäßes 1 ml oder 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben und die Zellen bis zum Ablösen im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen in frischem, vorgewärmtem Medium aufgenommen und entsprechend der Splittrate in neue Zellkulturgefäße überführt.

Alternativ wurden die Zellen nach der Aufnahme in frischem Medium mit Hilfe eines Hämocytometers gezählt und die Zellzahl pro ml bestimmt. Für die Aussaat von FACS-, Chromosomen- und Western Blot-Experimenten wurde eine definierte Zellzahl in ein Zellkulturgefäß mit frischem Medium gegeben. Für Immunhistochemische-Experimente wurden Deckgläser in Zellkulturschalen ausgelegt und diese mit frischem Medium überschichtet. Anschließend wurde ein der Zellzahl entsprechendes Volumen der Ausgangslösung in die Zellkulturschale überführt.

3.2.1.2. siRNA Transfektion von Zellen

Die Transfektion mit siRNA erfolgte direkt nach der Aussaat der Zellen. Die siRNA wurde, der jeweiligen Endkonzentration entsprechend (siehe Abschnitt 3.1.2), in Medium ohne Zusätze verdünnt. Danach wurde ein definiertes Volumen Hiperfect (siehe Tabelle 3.1) dazugegeben und die Lösung 1 min gevortext. Nach 10 min Inkubationszeit wurde der siRNA Ansatz unter leichtem Schwenken der

Zellkulturschale tropfenweise zu den Zellen gegeben. Bis zur weiteren Behandlung der Zellen wurden diese bei wasserdampfgesättigter Atmosphäre, 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Tabelle 3.1: siRNA Transfektionsbedingungen

Zellkulturschale	Transfektionsdauer	Zellzahl	Volumen Medium	Volumen Medium ohne alles	Volumen Hiperfect
Kleine Schale	48 h	4*10 ⁵	2,2 ml	100 µl	12 µl
Kleine Schale	72 h	3*10 ⁵	2,2 ml	100 µl	12 µl
Mittlere Schale	48 h	1*10 ⁶	5,5 ml	240 µl	28,8 µl
Mittlere Schale	72 h	8*10 ⁵	5,5 ml	240 µl	28,8 µl

3.2.2. Induktion von DNA Schäden

3.2.2.1. Behandlung von Zellen mit Hydroxyurea (HU)

Die Zellen wurden abhängig von der Dauer der Hydroxyurea-Inkubation bzw. der verwendeten siRNA 36 h, 48 h oder 72 h nach der Aussaat behandelt. Die Endkonzentration im Zellkulturgefäß betrug 0,5 mM HU. Während der HU-Behandlungszeit von 2 h, 4 h, 10 h, 24 h oder 48 h wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach Ende der Behandlung wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen, anschließend mit neuem Medium versetzt und bis zur Fixierung bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Für eine Markierung der Zellen, die sich zu Beginn der Behandlung in der S-Phase befanden, wurde die HU-Behandlung mit einer BrdU- (für FACS-Messungen) bzw. EdU-Pulsmarkierung (für IFM- und Chromosomen-Experimente) kombiniert. Hierfür wurde den Zellen vor der HU Behandlung für 1 h 10 µM BrdU bzw. 5 µM EdU zugesetzt. Nach Ablauf der Behandlungsdauer wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt.

3.2.2.2. Bestrahlung von Zellen mit einer Röntgenröhre

Die Zellen wurden bei einem Abstand von 30 cm entweder mit 19 mA und 90 kV (Dosisleistung = 2,9786 Gy/min) oder bei 33,7 mA und 90 kV (Dosisleistung = 5,1985 Gy/min), bestrahlt. Dies bedeutet, dass für 1 Gy 10 s bzw. 2 Gy 20 s mit der niedrigeren Dosisleistung und für 5 Gy 58 s mit der höheren Dosisleistung bestrahlt wurde.

3.2.3. Immunhistochemie

3.2.3.1. Fixierung von Zellen

Zur Fixierung von Zellen für Immunfluoreszenzfärbungen wurde 3,7 % Formaldehyd verwendet. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden für 10 min mit Formaldehyd-Lösung inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal für 10 min mit 1x PBS gewaschen, für 15 min mit 0,1 % Triton-

X 100 permeabilisiert und zweimal für 10 min mit 1x PBS gewaschen. Die Zellen wurden in einer Blocklösung (1 % FCS, 0,1 % Tween20, 5 % BSA in 1x PBS) bei 4 °C bis zur IFM-Färbung gelagert.

3.2.3.2. Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Zellen mit dem in 1x PBS, 1 % FCS, 0,1 % Tween20 verdünnten Primärantikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert (siehe Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Verwendete Antikörperkombinationen sowie ihre Verdünnung

Mouse-anti- γ H2AX (1:2000)	Rabbit-anti-Rad51 (1:10.000)
Mouse-anti- γ H2AX (1:2000)	Rabbit-anti-Rad54 (1:200)
Mouse-anti- γ H2AX (1:2000)	Rabbit-anti-pH3 (1:1000)
Mouse-anti- γ H2AX (1:2000)	Rabbit-anti-53BP1 (1:2000)
Rabbit-anti- γ H2AX (1:1000)	Mouse-anti-RPA (1:400)
Rabbit-anti-Rad51 (1:10.000)	Mouse-anti-RPA (1:400)
Rabbit-anti-Rad51 (1:10.000)	Goat-anti-Rad54 (1:200)

Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Deckgläser dreimal für jeweils 10 min in 1x PBS, 1 % FCS, 0,1 % Tween20 gewaschen. Anschließend erfolgte eine *Click-IT* Reaktion (Wang et al, 2003) gegen EdU mit einer Reaktionslösung, die nach der Anleitung des Kits zusammengesetzt wurde. Die Zellen wurden für 30 min bei RT und Dunkelheit mit der Reaktionslösung inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit 1x PBS, 1 % FCS, 0,1 % Tween20 gewaschen und für 1 h bei RT und Dunkelheit mit Sekundärantikörper behandelt (siehe Abschnitt 3.1.3.2). Die folgenden Arbeitsschritte wurden unter Lichtausschluss durchgeführt. Die Zellen wurden viermal für jeweils 15 min in 1x PBS gewaschen und anschließend für 5 min bei RT in einer DAPI-Lösung (0,4 μ g/ml) gefärbt. Es erfolgten zwei Waschschrte für je 5 min in 1x PBS. Als letzter Schritt wurden die Deckgläser mit der Zellseite auf einen Objektträger mit 3 μ l *Mounting Medium* gelegt und mit Nagellack versiegelt.

3.2.3.3. Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen am Mikroskop

Zur Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop in jeweils 40 Zellen Foci gezählt. Dazu wurden die Deckgläser zunächst mit *MetaCyte* abgescannt und anhand des DNA- und des EdU-Signals eine Zellzyklusverteilung erstellt. Über die Zellzyklusverteilung konnte eine Zellzyklusphase ausgewählt und entsprechende Zellen automatisch angefahren werden. Für die in dieser Arbeit hauptsächlich untersuchten S-Phase-Zellen wurden Zellen mit einem starken EdU-Signal ausgewählt.

3.2.4. Biochemische Methoden

3.2.4.1. Ernte von Zelllysaten

Für die Ernte von Zelllysaten wurde das Medium von den Zellen entfernt, anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem 1x PBS gewaschen. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen von den Zellkulturschalen abgekratzt und in ein 15 ml Falcon überführt. Die Zellkulturschale wurde zweimal mit 1x PBS gespült, das 1x PBS wurde ebenfalls in das Falcon überführt und bei 4 °C und 400 g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet je nach Größe in 100 µl – 150 µl Lysepuffer (siehe Abschnitt 3.1.4.1) aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

3.2.4.2. Sonifizierung von Zelllysaten

Für die Sonifizierung der Zelllysate wurden diese aufgetaut und gevortext. Danach wurden die Proben für 30 s bei 40 % sonifiziert. Nach der Sonifizierung wurden die Proben bei 16.100 g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen.

3.2.4.3. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford wurde für jede Probe in einem Eppendorf Reaktionsgefäß 800 µl MilliQ, 1 µl Probe und 200 µl Bradford Reagenz gemischt. Nach 3-minütiger Inkubationszeit wurde die Absorption bei 590 nm in einem Nanophotometer vermessen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte für jede Probe als Doppelbestimmung, die beiden Werte wurden anschließend gemittelt.

3.2.4.4. SDS-Page und Western Blot

Die Proteine wurden entsprechend ihrer Molekülmasse mit Hilfe einer diskontinuierlichen SDS-Page aufgetrennt. Hierfür wurden 12 %ige oder 14 %ige Polyacrylamidtrenngele mit einem 4 %igen Polyacrylamidsammelgel verwendet. Die Trenngele wurden den Angaben entsprechend gemischt (siehe Tabelle 3.3), wobei mit APS und TEMED die Polymerisation initiiert wurde. Die Gellösung wurde bis zu einer Füllhöhe von circa $\frac{3}{4}$ in die Gelgießkammer gegeben, mit Isopropanol überschichtet und 30 min zur Polymerisation stehen gelassen. Das Isopropanol wurde entfernt und das Sammelgel in die Gelgießkammer gegeben (siehe Tabelle 3.3). Nach dem Einfügen eines Probenkammes wurde das Gel 30 min polymerisieren gelassen.

Tabelle 3.3: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für eine SDS-Page

	12 %iges Trenngel	14 %iges Trenngel	4 %iges Sammelgel
MilliQ	3,4 ml	2,7 ml	6,1 ml
Acrylamid	4,0 ml	4,7 ml	1,3 ml
Gelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10 %iges SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
APS	50 μ l	50 μ l	50 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l	10 μ l

Auf die Gele wurden pro Probe 80 μ g Protein aufgetragen. Während die Proteine sich im Sammelgel befanden wurde eine elektrische Spannung von 70 V, im Trenngel von 90 – 110 V angelegt. Die Proteine wurden mittels Western Blot bei einer elektrischen Stromstärke von 300 mA auf eine Nitrocellulose Membran übertragen. Zum Blockieren von unspezifischen Antikörperbindestellen wurde die Membran für mindestens 1 h in 5 % BSA oder 2,5 % Magermilchpulver in 1x TBS, 0,1 % Tween20 geschwenkt. Die Inkubation im Primärantikörper (siehe Abschnitt 3.1.3.1, Tabelle 3.4) erfolgte über Nacht bei 4 °C und unter Rotation.

Tabelle 3.4: Im Western Blot verwendete Primärantikörper und deren Verdünnung

Antikörper	Verdünnung	Lösung
GAPDH	1:1000	2,5 % Magermilchpulver
pChk1	1:1000	5 % BSA
pChk2	1:1000	2,5 % Magermilchpulver
pRPA	1:10.000	5 % BSA
Rad51	1:2000	5 % BSA
RPA2	1:2000	2,5 % Magermilchpulver
γ H2AX	1:1000	5 % BSA

Um den Primärantikörper zu entfernen, wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min in 1x TBS, 0,1 % Tween20 gewaschen und danach für mindestens 1 h in einem Meerrettichperoxidasegekoppelten Sekundärantikörper (siehe Abschnitt 3.1.3.2) schüttelnd inkubiert. Vor der Detektion erfolgten drei Waschschritte von jeweils 10 min in 1x TBS, 0,1 % Tween20. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Kits.

Wenn Proteine mit einer ähnlichen Molekülmasse (kDa) auf der gleichen Membran aufgenommen werden sollten, wurde diese nach der Detektion für 60 – 90 min in einem Strippuffer (siehe Abschnitt 3.1.4.1) inkubiert um den Primär- und Sekundärantikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal für jeweils 10 min in 1x TBS, 0,1 % Tween20 gewaschen und konnte dann in

einem anderen Primärantikörper und anschließend in einem Sekundärantikörper inkubiert werden. Die Auswertung der aufgenommenen Proteinbanden erfolgte mit *ImageJ*.

3.2.5. Durchflusszytometrische Methoden (FACS)

3.2.5.1. Fixierung von Zellen für eine FACS Analyse

Proben für FACS Analysen wurden vor der Schadensinduktion für 1 h mit 10 μM BrdU behandelt. Nach der jeweiligen Reparaturzeit wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und anschließend je nach Größe des Zellkulturgefäßes 1 ml oder 2 ml Trypsin zugegeben. Die Zellen wurden bis zum Ablösen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Trypsinreaktion durch Zugabe von Medium abgestoppt. Das Medium mit den abgelösten Zellen wurde in ein FACS-Röhrchen überführt, das Zellkulturgefäß mit 1x PBS gespült und das 1x PBS ebenfalls in das FACS-Röhrchen gegeben. Die Proben wurden bei 400 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 2 ml eiskaltem 70 %igem Ethanol aufgenommen. Die fixierten Proben wurden bis zur Färbung bei -20 °C gelagert.

3.2.5.2. Färbung von Zellen für eine FACS Messung

Vor Beginn der Färbung wurden die Proben bei 400 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2 ml 1x PBS resuspendiert. Nach einem weiteren 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 400 g und 4 °C wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 1 ml 2 M HCl resuspendiert und für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde jede Probe mit 1 ml 1x PBS, 1 % FCS versetzt und bei 400 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 500 μl 0,1 M Natrium-Tetraborat (pH 8,5) aufgenommen und darin 2 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 1 ml 1x PBS, 1 % FCS zugesetzt und bei 400 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 20 μl FITC-gekoppelter BrdU Antikörperlösung resuspendiert. Die Zellen wurden im Dunkeln für 30 min mit dem Antikörper inkubiert bevor 2 ml 1x PBS, 1 % FCS zugegeben wurde. Die Proben wurden zentrifugiert (400 g, 4 °C, 10 min), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 500 μl frisch angesetzter Propidiumiodid-Lösung (siehe Abschnitt 3.1.4.2) für 30 min bei RT und im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Zellzyklusverteilung in einem Fluoreszenz-aktivierten Zellscanner. Die Auswertung wurde mit CXP Analysis (FC500) durchgeführt.

3.2.6. Chromosomale Methoden

3.2.6.1. Chromosomenpräparation in der G2-Phase

Vor der HU-Behandlung der Zervixkarzinomzellen (HeLa) wurden diese für 1 h mit 5 μM EdU versetzt. Eine Stunde vor der Ernte wurde 1 $\mu\text{l/ml}$ Calyculin A in das Kulturmedium der Zellen gegeben. Für die

Ernte der Zellen wurde zunächst das Medium abgenommen und in ein 15 ml Falcon überführt, anschließend wurde das Zellkulturgefäß mit 1x PBS gespült und das PBS ebenfalls in das Falcon gegeben. Nach der Zentrifugation (200 g, 4 °C, 10 min) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 5 ml warmer KCl-Lösung (75 mM) resuspendiert. In dieser Lösung wurden die Zellen bei 37 °C für 30 min im Wasserbad inkubiert, wobei nach der Hälfte der Zeit das Falcon invertiert wurde. Als nächstes wurden die Zellen bei 200 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet unter leichtem vortexen in 10 ml frisch angesetztem Fixativ (siehe Abschnitt 3.1.4.3) gelöst. Nach 10 min Inkubationszeit wurde die Probe zentrifugiert (200 g, 4 °C, 10 min), der Überstand verworfen und das Zellpellet erneut unter leichtem vortexen in 10 ml Fixativ resuspendiert. Anschließend wurde die Probe bei 4 °C über Nacht gelagert und danach wieder zentrifugiert (200 g, 4 °C, 10 min). Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte ein weiterer Fixierungsschritt wobei das Zellpellet wieder in 10 ml Fixativ aufgenommen und anschließend für mindestens 30 min auf Eis inkubiert wurde. Die fixierten Zellen wurden bei -20 °C gelagert.

Zur Herstellung der Chromosomen-Spreitungen wurden die Proben zentrifugiert (200 g, 4 °C, 10 min) und der Überstand bis auf 1 ml abgesaugt. Das Zellpellet wurde in der Restflüssigkeit resuspendiert und 20 µl dieser Zelllösung senkrecht auf einen feuchten Objektträger getropft. Die Objektträger wurden bei RT getrocknet.

3.2.6.2. Chromosomenpräparation in der Mitose

Das Kulturmedium der Zervixkarzinomzellen (HeLa), deren Chromosomen für die Auswertung von Schwesterchromatidaustauschen (SCEs) vorgesehen waren, wurde 48 h vor der Ernte mit 10 µl/ml BrdU versetzt. Dies erfolgte um die Fluoreszenz-plus-Giemsa (FPG) Färbung (siehe Abschnitt 3.2.6.4) durchzuführen mit deren Hilfe SCEs nachgewiesen werden können. Das Kulturmedium der Zellen, deren Chromosomen für die Auswertung von Chromatidbrüchen vorgesehen waren, wurde vor der HU-Behandlung für 1 h mit 5 µM EdU markiert. Diese Markierung erfolgte, um bei der Auswertung die S-Phase-Zellen von Zellen aus anderen Zellzyklusphasen zu unterscheiden.

Drei Stunden vor der Ernte wurden die Zellen mit 2 µl/ml Colcemid behandelt. Zum Erntezeitpunkt wurde das Medium von den Zellen abgenommen und in ein Falcon überführt. Anschließend wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und dieses ebenfalls in dem Falcon gesammelt. Nach Zugabe von 1 ml oder 2 ml Trypsin (je nach Größe es Zellkulturgefäßes) wurden die Zellen bis zum Ablösen bei 37 °C und 5 % CO₂ gelagert. Die Trypsin-Reaktion wurde durch die Zugabe von 2 ml Medium abgestoppt und das Medium mit den abgelösten Zellen in das Falcon überführt. Die Fixierung der Zellen sowie die Herstellung der Chromosomenpräparate erfolgte wie bei der Präparation von Chromosomen in der G2 Phase (siehe Abschnitt 3.2.6.1) beschrieben.

3.2.6.3. Sequentielle EdU/DAPI und Giemsa Färbung

Bei Chromosomen-Spreitungen aus der G₂-Phase und der Mitose, welche zur Auswertung von Chromatidbrüchen benutzt wurden, wurde eine sequentielle EdU/DAPI und Giemsa-Färbung durchgeführt. Die EdU/DAPI-Färbung diente der Unterscheidung zwischen S-Phase-Zellen und Zellen aus anderen Zellzyklusphasen. Die Giemsa-Färbung wurde für die Zählung der Chromatidbrüche verwendet.

Die Chromosomenspreitungen wurden mit einer Click-IT Reaktion (Wang et al, 2003) nach Angaben des Herstellers gegen EdU gefärbt. Anschließend wurden die Objektträger zweimal mit 1x PBS gewaschen und 5 min mit DAPI (0,4 µg/ml) gefärbt. Nach zwei Waschschritten von jeweils 5 min in 1x PBS wurden die Objektträger mit 40 µl *Mounting Medium* betropft und ein Deckglas auf die Chromosomen gelegt. Nach Aufnahme der Chromosomen mit der Software *MSearch* und *AutoCapt* von *Metafer* wurde das Deckglas entfernt und das *Mounting Medium* mit 70 % Ethanol abgespült. Die Objektträger wurden für 10 min in einer 6 %igen Giemsa-Lösung gefärbt, getrocknet, mit Hilfe der *Metafer* Software relokier und erneut aufgenommen. Zur Auswertung wurden mindestens 40 EdU-positive Chromosomenspreitungen ausgezählt, wobei die Anzahl der Chromosomen und deren Brüch auf einen Referenzwert von 70 Chromosomen normiert wurde.

3.2.6.4. Fluoreszenz-plus-Giemsa Färbung

Für die Analyse von SCEs in mitotischen Chromosomenspreitungen wurde eine FPG-Färbung durchgeführt.

Die Chromosomenspreitungen wurden zunächst für 1 h im Dunkeln in Bisbenzimidlösung (siehe Abschnitt 3.1.4.3) inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger zweimal mit MilliQ gewaschen und luftgetrocknet. Danach wurden die Chromosomen mit Bestrahlungspuffer (siehe Abschnitt 3.1.4.3) überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt. Im Anschluss erfolgte für 1 h eine UV-Bestrahlung bei 254 nm, das Deckglas wurde entfernt und erneut zweimal mit MilliQ gewaschen. Die Objektträger wurden in vorgewärmtem 2x SSC für 30 min bei 55 °C inkubiert. Als letztes erfolgte die 10-minütige Färbung in 6 % Giemsa-Lösung und zwei Waschschriffe von je 10 min in MilliQ. Nach dem die Objektträger getrocknet waren, wurden sie mit Hilfe der Metasystems Software *MSearch* abgescann und dann mit *AutoCapt* aufgenommen. Zur Auswertung wurden mindestens 40 Chromosomenspreitungen ausgezählt, wobei die Anzahl der Chromosomen und deren SCEs auf einen Referenzwert von 70 Chromosomen normiert wurde.

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss einer Hydroxyurea-Behandlung auf die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) sowie deren Reparatur untersucht werden. Außerdem sollte das Zellzyklusverhalten von HU-behandelten Zellen charakterisiert werden.

Hydroxyurea (HU) ist eine Chemikalie, die die DNA-Replikation in der S-Phase stört. HU inhibiert die Ribonukleotidreduktase (Eklund et al, 2001; Krakoff et al, 1968) und führt dadurch zu einer Unterversorgung der DNA-Polymerasen mit Nukleotiden (Bianchi et al, 1986). Wenn den DNA-Polymerasen während der Replikation keine ausreichende Menge an Nukleotiden zur Verfügung steht, führt dies zu einem Arrest der Replikationsgabeln. Arrestierte Replikationsgabeln verbleiben für einige Zeit stabil, bei längerer Blockade der Replikation werden sie jedoch instabil und kollabieren schlussendlich (Petermann et al, 2010a). Kollabierte Replikationsgabeln werden durch Mus81 (Hanada et al, 2007) oder Artemis (Unno et al, 2013) prozessiert, wodurch ein einendiger DNA-Doppelstrangbruch entsteht. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Länge des Replikationsblocks für die Ausbildung von DNA-Schäden durch den Kollaps von Replikationsgabeln entscheidend ist (Hanada et al, 2007; Petermann et al, 2010a; Saintigny et al, 2001; Toledo et al, 2013).

4.1. Induktion von DNA-Schäden durch Hydroxyurea

In dieser Arbeit sollte zunächst der Einfluss der Behandlungsdauer mit HU auf die Zahl und die Art der DNA-Schäden insbesondere der Doppelstrangbrüche (DSBs) untersucht werden. Hierfür wurde der γ H2AX-Foci-Assay angewendet (Löbrich et al, 2010; Rothkamm & Löbrich, 2003). Wird ein DSB induziert, wird die Histonvariante H2AX bis zu 2 Mbp um den Schaden durch ATM, ATR oder DNA-PK am Serin 139 phosphoryliert (Bhatti et al, 2011; Rogakou et al, 1998). Die phosphorylierte Form von H2AX wird als γ H2AX bezeichnet und kann durch Färbung mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht werden, hierbei markiert jeder γ H2AX-Focus einen DSB (Rogakou et al, 1998).

Für die Untersuchung der DSB-Induktion nach HU-Behandlung wurden humane Lungenkrebszellen (A549) für 1 h mit 5 μ M des Thymidin-Analogons EdU markiert und anschließend für unterschiedliche Zeiten (0 h – 48 h) mit 0,5 mM HU inkubiert. EdU wird anstelle von Thymidin während der Replikation in die DNA eingebaut und kann mittels einer *Click-IT*-Reaktion nachgewiesen werden (Wang et al, 2003). Durch diesen Nachweis ist es möglich, S-Phase-Zellen von Zellen in anderen Zellzyklusphasen zu unterscheiden. Nach Ende der Behandlungszeit wurden die Zellen fixiert und gegen γ H2AX, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Zur Auswertung wurden die Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop gescannt und der DNA-Gehalt (gemessen anhand der DAPI-Intensität) und die EdU-Intensität gegeneinander aufgetragen (Abbildung 4.1). Mit Hilfe dieser Auftragung konnten die EdU-markierten S-Phase-Zellen (gelb hervor gehoben) von Zellen in anderen Zellzyklusphasen

unterschieden und für die Auswertung angezeigt werden. Bei dieser Auftragung wurde deutlich, dass die Behandlungsdauer mit HU die Zellzyklusverteilung der untersuchten Zellen beeinflusst. Durch eine lange HU-Behandlung (24 h HU) akkumulierten die Zellen an der Grenze zwischen G1- und S-Phase, während unbehandelte (NT) und kürzer mit HU-behandelte (10 h HU) Zellpopulationen eine Verteilung zwischen Zellen in der G1-, S- und G2-Phase zeigten.

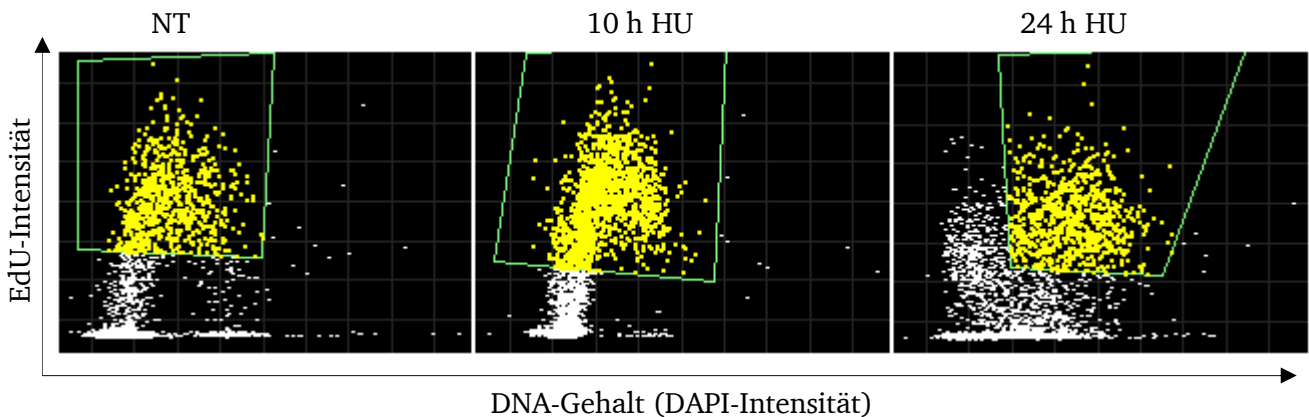


Abbildung 4.1: Darstellung exemplarischer Mikroskop-Scans zur spezifischen Auswahl der S-Phase-Zellen Exponentiell wachsende, humane Lungenkrebszellen (A549) wurden für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und anschließend für 10 h bzw. 24 h mit 0,5 mM Hydroxyurea behandelt oder unbehandelt belassen (NT). Nach Ende der Behandlung wurden die Zellen fixiert und gegen EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Die Zellen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop mit der Software *MetaCyte* eingescannt und die hier dargestellte Auftragung der EdU-Intensität gegen die DAPI-Intensität erzeugt. Gelb hervorgehoben sind die EdU-positiven S-Phase-Zellen, welche für die weitere Analyse der DSB-Induktion durch HU-Behandlung herangezogen wurden.

In Vorexperimenten zeigte sich, dass nach einer HU-Behandlung nur in den Zellen γ H2AX-Foci nachweisbar waren, die sich zum Zeitpunkt der Behandlung in der S-Phase befanden bzw. die während der HU-Behandlung am G1/S-Phase-Übergang akkumulierten. Dies ist auf den durch HU-Behandlung induzierten Replikationsstress zurückzuführen. Die Zellen, die am G1/S-Übergang akkumulierten, waren nicht während der gesamten Behandlungszeit dem HU ausgesetzt und wurden daher von der Auswertung ausgeschlossen. Im folgenden Experiment wurden 40 EdU-positive S-Phase-Zellen ausgewertet.

Die Anzahl der in diesen Zellen gemessenen γ H2AX-Foci nahm mit der Dauer der HU-Behandlung zu (Abbildung 4.2 A). In unbehandelten S-Phase-Zellen lagen ca. 11 γ H2AX-Foci pro Zelle vor (0 h). Bei einer 2- oder 4-stündigen HU-Behandlung stieg das γ H2AX-Foci-Level nur leicht an. Bei einer längeren Behandlungszeit von 10 h oder 24 h kam es dagegen zu einer deutlichen Zunahme der γ H2AX-Foci, während der Zuwachs an γ H2AX-Foci zwischen 24 h und 48 h Behandlungszeit weniger stark ausgeprägt war. Nach 2 h HU-Behandlung war das Hintergrundlevel der γ H2AX-Färbung deutlich erhöht, aber es konnten nur einige wenige γ H2AX-Foci detektiert werden (Abbildung 4.2 B). Dagegen zeigten die untersuchten Zellen nach einer längeren HU-Behandlung (hier beispielhaft nach 24-

stündiger Behandlung dargestellt) eine schwache γ H2AX-Hintergrundfärbung und klar definierte γ H2AX-Foci.

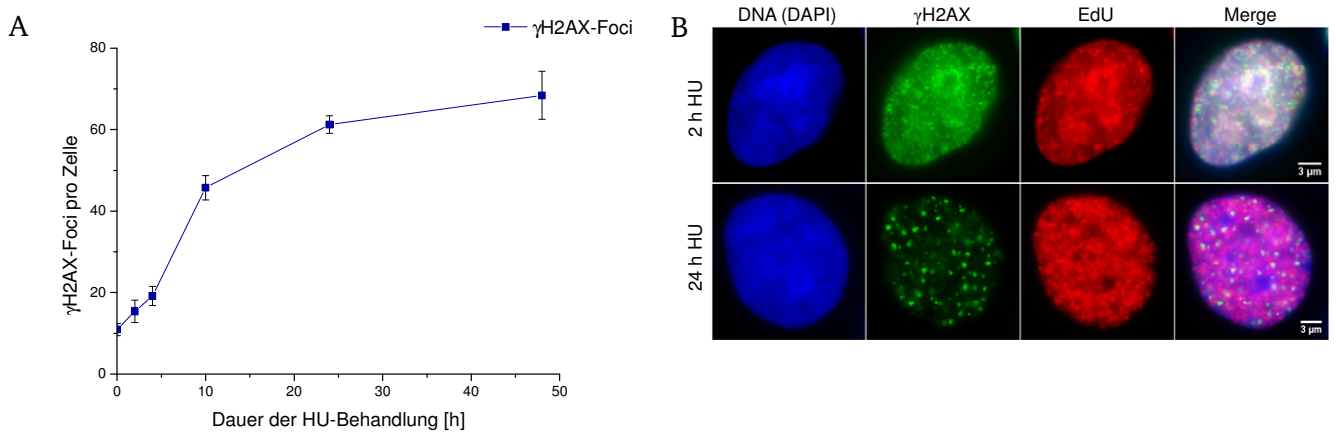


Abbildung 4.2: Induktion von γ H2AX-Foci nach unterschiedlicher Hydroxyurea-Behandlungsdauer

Exponentiell wachsende, humane Lungenkrebszellen (A549) wurden für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und anschließend für unterschiedliche Inkubationszeiten (0 h - 48 h) mit 0,5 mM Hydroxyurea behandelt. Nach Ende der Behandlung wurden die Zellen fixiert und gegen γ H2AX, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. (A) γ H2AX-Induktionsreihe. Es wurden pro Experiment 40 EdU-positive S-Phase-Zellen ausgewertet. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert aus $n \geq 3$ Experimenten dar, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. (B) Exemplarische Immunfluoreszenzaufnahmen nach 24 h (oben) und 2 h HU-Behandlung (unten), in denen γ H2AX (grün), EdU (rot) und die DNA (DAPI, blau) sowie eine Überlagerung der 3 Kanäle (*Merge*) dargestellt sind. Der dargestellte Maßstabsbalken entspricht 3 μ m (Aufnahmen erfolgten mit 1000x Vergrößerung).

Dieses Ergebnis deutet auf eine Induktion von DSBs nach längerer (> 10 h) HU-Behandlung hin, während nach kurzen HU-Behandlungszeiten (2 h – 4 h) die Replikationsgabeln nur arretiert werden. Das pannukleare γ H2AX-Hintergrundlevel in den nur kurz mit HU behandelten Zellen ist sehr wahrscheinlich auf die große Zahl an arretierten Replikationsgabeln zurückzuführen. Um zu untersuchen, ob die γ H2AX-Foci nach langer HU-Behandlung tatsächlich DSBs darstellen und nicht andere Strukturen wie z.B. arretierte Replikationsgabeln markieren, wurde eine Doppelfärbung zusammen mit dem p53 *binding protein 1* (53BP1) durchgeführt. 53BP1 wird nach der Induktion von DSBs an diese rekrutiert (Anderson et al, 2001; Rappold et al, 2001; Schultz et al, 2000) und kann mit Hilfe von spezifischen Antikörpern angefärbt werden.

Humane Tumorzellen (A549) wurden 1 h mit 5 μ M EdU markiert und für 0 h oder 24 h mit 0,5 mM HU behandelt. Nach Ende der Behandlung wurden die Zellen fixiert und gegen γ H2AX, 53BP1, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Es wurden pro Experiment 40 EdU-positive Zellen ausgewertet.

Die Anzahl an 53BP1-Foci lag in unbehandelten Zellen mit durchschnittlich 9,5 Foci pro Zelle leicht unter der Zahl an γ H2AX-Foci (ca. 12) (Abbildung 4.3 A). Nach einer 24-stündigen HU-Behandlung stieg die Anzahl der γ H2AX- und 53BP1-Foci deutlich an (61 respektive 52 Foci pro Zelle). Die Differenz zwischen den beiden Werten ist nicht statistisch signifikant. Auch die in Abbildung 4.3 B

dargestellten Beispielbilder zeigen ein hohes Maß an Kolo-kalisation zwischen γ H2AX- (grün) und 53BP1-Foci (rot) sowohl in den unbehandelten (NT) als auch in den HU-behandelten (24 h HU) S-Phase-Zellen.

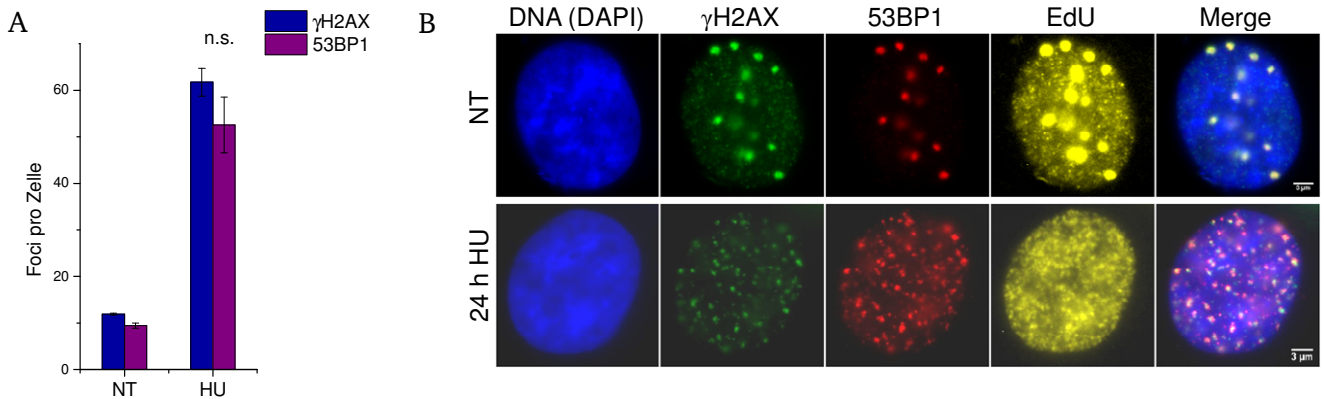


Abbildung 4.3: Induktion von γ H2AX- und 53BP1-Foci nach 24-stündiger HU-Behandlung

Exponentiell wachsende, humane Lungenkrebszellen (A549) wurden für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und anschließend für 24 h mit 0,5 mM Hydroxyurea behandelt. Nach Ende der Behandlung wurden die Zellen fixiert und gegen γ H2AX, 53BP1, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. (A) Induktion von γ H2AX- und 53BP1-Foci in unbehandelten (NT) und HU-behandelten (HU) Zellen. Es wurden pro Experiment 40 EdU-positive S-Phase-Zellen ausgewertet. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert aus n=3 Experimenten dar, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die statistische Signifikanz wurde mit dem *Students t-Test* berechnet. n.s. = nicht signifikant (B) Exemplarische Immunfluoreszenzaufnahmen von unbehandelten Zellen (NT) und nach 24 h HU-Behandlung, in denen γ H2AX (grün), 53BP1 (rot), EdU (gelb) und die DNA (DAPI, blau) sowie eine Überlagerung von γ H2AX, 53BP1 und der DNA (*Merge*) dargestellt sind. Der dargestellte Maßstabsbalken entspricht 3 μ m (Aufnahmen erfolgten mit 1000x Vergrößerung).

Die durch eine lange HU-Behandlung (24 h) verursachte Erhöhung an γ H2AX- und 53BP1-Foci im Vergleich zu unbehandelten Zellen deutet auf eine massive DSB-Induktion hin. Dies ist wahrscheinlich auf die durch HU-Behandlung arretierten und daraufhin kollabierten Replikationsgabeln zurückzuführen.

Die in Abbildung 4.2 und Abbildung 4.3 gezeigten Fehlerbalken stellen jeweils den Standardfehler der Mittelwerte aus mindestens 3 Experimenten dar. Diese zeigen, dass die Mittelwerte der Experimente sehr ähnlich sind, lassen jedoch keine Aussage über die Streubreite der Foci-Anzahl in den einzelnen Zellen zu. Bei einer Behandlung mit einem S-Phase-interagierenden Agens wie HU ist die Induktion von DNA-Schäden stark vom Stadium der Replikation zum Zeitpunkt der Behandlung abhängig. In den in dieser Arbeit gezeigten Immunfluoreszenz-Experimenten wurden die S-Phase-Zellen mit Hilfe von EdU markiert. Dies ermöglicht es, nur Zellen auszuwerten, die sich zu Beginn der Behandlung in der S-Phase befanden. Es lässt aber keinen Rückschluss darauf zu, ob die Zellen sich in einem frühen,

mittleren oder späten Stadium der S-Phase befanden. Da die Anzahl der aktiven Replikationsgabeln während des Durchlaufens der S-Phase variiert (Jackson & Pombo, 1998), ist dies aber entscheidend für die Anzahl der durch die HU-Behandlung induzierten DNA-Schäden. Um dies näher zu charakterisieren, wurde die Streuung der γ H2AX- und 53BP1-Foci-Anzahl nach 24 h HU-Behandlung in 120 Zellen analysiert (Abbildung 4.4).

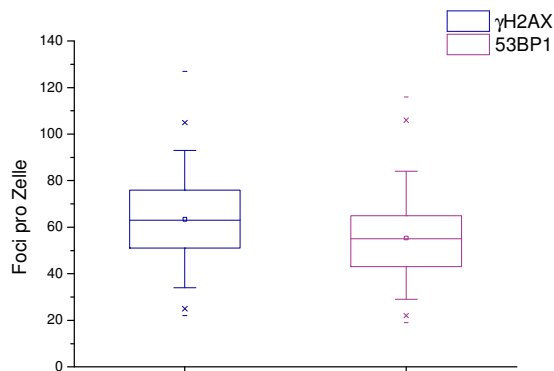


Abbildung 4.4: Streubreite der γ H2AX- und 53BP1-Foci-Zahl in einzelnen Zellen

Exponentiell wachsende, humane Lungenkrebszellen (A549) wurden für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und anschließend für 24 h mit 0,5 mM Hydroxyurea behandelt. Nach Ende der Behandlung wurden die Zellen fixiert und gegen γ H2AX, 53BP1, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Dargestellt ist die Streubreite der γ H2AX- und 53BP1-Foci-Zahl in 120 Zellen. Die Box des Boxplots gibt den Bereich an, in dem 50 % der Werte liegen, die Linie in der Box gibt den Median an, die Antennen geben das Intervall an, indem 90 % der Werte liegen. Die Kreuze bzw. Striche ober- und unterhalb der Antennen geben die Ausreißer der Foci-Anzahl an.

Die Anzahl der γ H2AX-Foci schwankte sehr stark und lag zu 90 % zwischen 35 und 90 Foci pro Zelle. Auch die Anzahl der 53BP1-Foci unterlag großen Schwankungen, allerdings auf einem etwas niedrigeren Niveau als das der γ H2AX-Foci. Das Minimum an 53BP1-Foci pro Zelle lag bei 30, während sich das Maximum bei ca. 80 Foci pro Zelle befand. Sowohl bei den γ H2AX- als auch bei den 53BP1-Foci gab es einige wenige Ausreißer nach oben bzw. nach unten, bei denen die Anzahl der Foci pro Zelle über 100 respektive unter 30 lag (markiert durch die Kreuze bzw. Striche unter- und oberhalb des Boxplots in Abbildung 4.4).

Diese Auswertung zeigt, dass durch eine 24-stündige HU-Behandlung in unterschiedlichen Zellen eine sehr unterschiedliche Anzahl an DSBs induziert werden kann. Dies ist sehr wahrscheinlich auf die unterschiedliche Anzahl an aktiven Replikationsgabeln zum Zeitpunkt der HU-Behandlung zurückzuführen. Trotzdem verdeutlichen die sehr ähnlichen Mittelwerte in den unabhängigen Experimenten, dass die durchschnittliche Foci-Zahl geeignet ist, um das Auftreten von DSBs nach HU-Behandlung zu beschreiben.

4.1.1. Einfluss der PIK-Kinasen ATM und ATR auf die DSB-Induktion durch Hydroxyurea

Die Proteinkinasen *Ataxia telangiectasia mutated* (ATM) und *ATM- and Rad3-related* (ATR) gehören zu den Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-ähnlichen Kinasen (PIKKs) (Hoekstra, 1997; Savitsky et al, 1995) und stellen wichtige Faktoren in den Signalnetzwerken der DNA-Schadensantwort dar. Wird ATR nicht expremiert, ist dies embryonal letal (Brown & Baltimore, 2000; de Klein et al, 2000), was verdeutlicht, dass ATR für das Überleben von Zellen essentiell ist. ATR bildet mit ATRIP einen Komplex (Cortez et al, 2001), welcher durch RPA-gebundene, einzelsträngige DNA-Bereiche zu den DNA-Schäden rekrutiert wird (Liu et al, 2011; Zou & Elledge, 2003). An der Rekrutierung und der vollständigen Aktivierung von ATR sind weitere Proteine wie TopBP1, der Rad9-Rad1-Hus1-Komplex sowie Rad17 beteiligt (Liu et al, 2011; Sorensen & Syljuasen, 2012). Außerdem wurde kürzlich gezeigt, dass die Phosphorylierung des Ser4/Ser8 von RPA durch die DNA-PKcs, einen kritischen Schritt für die vollständige Aktivierung von ATR darstellt (Liu et al, 2012). ATR ist an der Regulation der Replikation beteiligt (Shechter et al, 2004a; Shechter et al, 2004b), indem es die Aktivierung und Unterdrückung neuer Replikationsursprünge steuert (Maya-Mendoza et al, 2007). Dadurch ist ATR ein wichtiger Faktor in der Regulation des S-Phase-Arrests, welcher die Aktivierung neuer Replikationsursprünge bei Replikationsstress verhindert (Dimitrova & Gilbert, 2000; Feijoo et al, 2001; Maya-Mendoza et al, 2007; Woodward et al, 2006) und damit auch die Induktion von DSBs verringert (Petermann et al, 2010b). Toledo et al (2013) zeigten kürzlich, dass eine ATR-Inhibition zusammen mit einer 2 mM HU-Behandlung zur Depletion des zellulären RPA-Pools führt und dadurch zu einer massiven Induktion von DSBs nach sehr kurzen HU-Behandlungszeiten. Laut dieser Studie kommt es durch die ATR-Inhibition zu der unplanmäßigen Aktivierung vieler neuer Replikationsursprünge. Werden diese durch eine HU-Behandlung arretiert, werden sie mit RPA beladen, um sie zu stabilisieren. Durch diesen erhöhten RPA-Bedarf kommt es zu der bereits erwähnten Depletion des intrazellulären RPA-Pools. Werden nach der Depletion des RPA-Pools weitere Replikationsgabeln arretiert, können diese nicht mehr stabilisiert werden, kollabieren und induzieren einendige DSBs.

Aufgrund der beschriebenen, wichtigen Rolle von ATR in der S-Phase-Regulation wurde im Folgenden die Induktion von DSBs nach HU-Behandlung in ATR-depletierten Zellen untersucht. Humane Tumorzellen (A549) wurden mit ATR- oder Kontroll-siRNA behandelt, 72 h später für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und entweder für 24 h mit 0,5 mM HU inkubiert oder nicht behandelt. Nach Ende der Behandlung wurden die Zellen fixiert und gegen γ H2AX, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Es wurden jeweils 40 EdU-positive S-Phase-Zellen ausgewertet.

In unbehandelten Zellen zeigte sich sowohl nach Kontroll- als auch nach ATR-siRNA-Behandlung ein niedriges γ H2AX-Foci-Induktionslevel von ca. 10 Foci pro Zelle (Abbildung 4.5). Beide siRNA-Behandlungen führten zu einem deutlichen Anstieg auf 60 γ H2AX-Foci pro Zelle. Ein Unterschied zwischen Kontroll- und ATR-siRNA-Behandlung wurde nicht detektiert. Dieses Ergebnis war

unerwartet, da ATR bereits mehrfach eine wichtige Rolle in der Regulation der ungestressten Replikation (Maya-Mendoza et al, 2007; Sorensen & Syljuasen, 2012) sowie der Induktion des S-Phase-Arrests nach Replikationsstress (Dimitrova & Gilbert, 2000; Woodward et al, 2006) zugeschrieben wurde. Um dieses Ergebnis besser einordnen zu können wurde im Folgenden die zweite für die Induktion von Signalkaskaden nach DNA-Schäden wichtige Proteinkinase (ATM) depletiert.

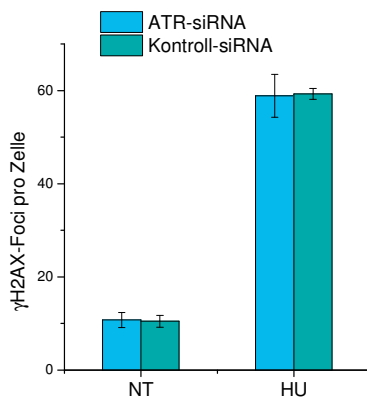


Abbildung 4.5: Induktion von γ H2AX-Foci nach HU-Behandlung in ATR-depletierten Zellen

Exponentiell wachsende, humane Lungenkrebszellen (A549) wurden direkt nach der Aussaat mit ATR- bzw. Kontroll-siRNA behandelt. Die Zellen wurden 72 h später für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und anschließend nicht oder für 24 h mit 0,5 mM Hydroxyurea behandelt. Die Zellen wurden nach der HU-Zugabe mit ATR- bzw. Kontroll-siRNA nachtransfiziert, um auch während des Behandlungszeitraums einen *knockdown* von ATR zu gewährleisten. Nach Ende der Behandlung wurden die Zellen fixiert und gegen γ H2AX, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Es wurden pro Experiment 40 EdU-positive S-Phase-Zellen ausgewertet. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert aus n=3 Experimenten dar, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an.

ATM wird nach der Induktion von DSBs durch den MRN-Komplex zum Schaden rekrutiert (Carson et al, 2003; Lee & Paull, 2005; Uziel et al, 2003), dort wird es durch eine Autophosphorylierung am Serin 1981 aktiviert und das als Homodimer vorliegende ATM zerfällt in Monomere (Bakkenist & Kastan, 2003). ATM ist durch seine Kinaseaktivität an der Induktion und Regulation vieler Signalkaskaden beteiligt (Abraham, 2001; Kim et al, 1999). Während der S-Phase ist ATM in die Regulation des zeitlichen Ablaufs der Replikation involviert (Shechter et al, 2004a), außerdem kommt es ohne ATM zum Phänomen der Strahlungs-resistenten DNA-Synthese (Falck et al, 2001; Shechter et al, 2004a). Wird ATM während der S-Phase inhibiert, führt dies zu einer erhöhten Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinase 2 (Cdk2) (Shechter et al, 2004a), was über weitere Schritte einer Signalkaskade wiederum zu gesteigerter Aktivierung von neuen Replikationsursprüngen führt.

Aufgrund des Einflusses von ATM auf die Replikation wurde im Folgenden untersucht, ob sich die γ H2AX-Foci-Induktion durch ATM-Depletion oder ATM-Inhibition verändert. Hierfür wurden humane Tumorzellen (A549) mit ATM- oder Kontroll-siRNA behandelt, 48 h später für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und mit 0,5 mM HU inkubiert. Die Zellen wurden nach unterschiedlicher HU-

Behandlungsdauer (0 h – 24 h) fixiert und gegen γ H2AX, pATM, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Es wurden jeweils 40 S-Phase-Zellen ausgewertet, die EdU-positiv und pATM-negativ waren. Letzteres wurde genutzt, um nur Zellen auszuwerten, in denen die ATM-Depletion erfolgreich war.

Das Hintergrundniveau (0 h) lag in den mit ATM- und den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen bei 12 γ H2AX-Foci (Abbildung 4.6 A). Bei kurzen Behandlungszeiten mit HU (2 h – 4 h) zeigte ein siRNA-*knockdown* von ATM keinen Einfluss auf die γ H2AX-Foci-Induktion. Nach 4 h HU war eine leichte Erhöhung der γ H2AX-Foci-Zahl nach ATM-siRNA im Gegensatz zu den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen zu erkennen, welche nach 10 h und 24 h HU-Behandlung statistisch signifikant war.

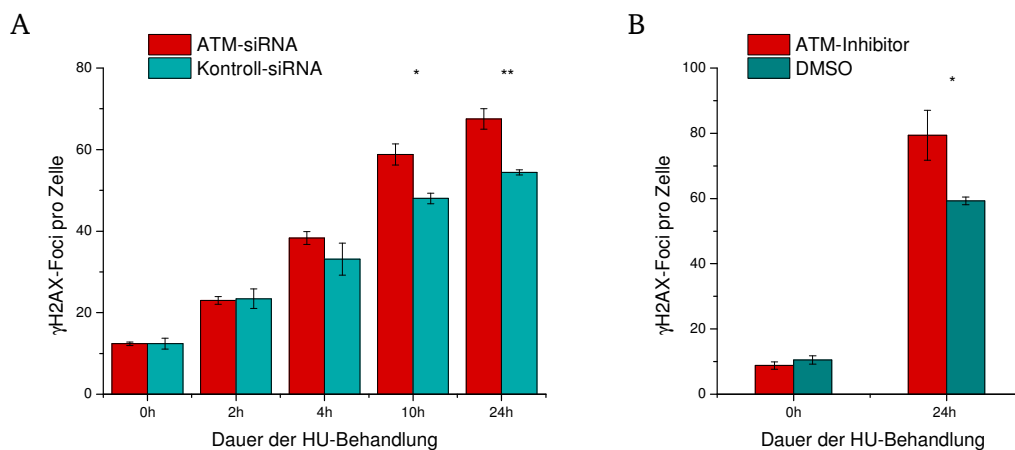


Abbildung 4.6: Induktion von γ H2AX-Foci nach HU-Behandlung in Zellen ohne funktionsfähiges ATM

(A) Exponentiell wachsende, humane Lungenkrebszellen (A549) wurden direkt nach der Aussaat mit ATM- bzw. Kontroll-siRNA behandelt. Die Zellen wurden 48 h später für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und anschließend für unterschiedliche Zeiten (0 h - 24 h) mit 0,5 mM Hydroxyurea behandelt. Die Zellen wurden nach der HU-Zugabe mit ATM- bzw. Kontroll-siRNA nachtransfiziert, um auch während des Behandlungszeitraums einen *knockdown* von ATM zu gewährleisten. Nach Ende der Behandlung wurden die Zellen fixiert und gegen γ H2AX, pATM, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Es wurden pro Experiment 40 EdU-positive und ATM-negative S-Phase-Zellen ausgewertet. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert aus n=3 Experimenten dar, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die statistische Signifikanz wurde mit dem *Students t-Test* berechnet. * P<0,05; ** p<0,01 (B) Exponentiell wachsende Lungenkrebszellen (A549) wurden für 1,5 h mit 10 nM ATM-Inhibitor oder DMSO behandelt, während der letzten Stunde dieser Behandlung wurden die Zellen zusätzlich mit EdU markiert. Danach wurden die Zellen für 24 h mit 0,5 mM HU inkubiert. Die Zellen wurden nach dem Ende der Behandlung fixiert und gegen γ H2AX, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Es wurden pro Experiment 40 EdU-positive S-Phase-Zellen ausgewertet. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert aus n \geq 4 Experimenten dar, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die statistische Signifikanz wurde mit dem *Students t-Test* berechnet. * p<0,05

Da in den mit Kontroll-siRNA versetzten Zellen nach 24-stündiger HU-Behandlung weniger γ H2AX-Foci induziert wurden als in den zuvor gezeigten Experimenten (siehe Abbildung 4.2, Abbildung 4.3), wurden als Kontrolle Experimente mit einem ATM-Inhibitor durchgeführt. Für diese Experimente wurden humane Tumorzellen (A549) 1,5 h vor der HU-Behandlung mit 10 nM ATM-Inhibitor oder DMSO inkubiert und während der letzten Stunde der Inhibitor-Behandlung mit 5 μ M EdU markiert. Zusammen mit 0,5 mM HU wurde 10 nM ATM-Inhibitor bzw. DMSO zu den Zellen gegeben. Nach 0 h

bzw. 24 h wurden die Zellen fixiert und gegen γ H2AX, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Es wurden jeweils 40 EdU-positive S-Phase-Zellen ausgewertet.

Das γ H2AX-Foci-Niveau nach 0 h unterscheidet sich nur leicht in Zellen die mit DMSO (10 Foci) und Zellen die mit ATM-Inhibitor (7 Foci) behandelt wurden (Abbildung 4.6 B). Nach einer 24-stündigen HU-Behandlung wurde dagegen in den mit ATM-Inhibitor behandelten Zellen im Gegensatz zu den mit DMSO behandelten Zellen eine statistisch signifikante Erhöhung der γ H2AX-Foci-Zahl detektiert.

Dieses Experiment unterstützt das mit ATM-siRNA gezeigte Ergebnis, dass eine ATM-Depletion oder eine ATM-Inhibition nach langen HU-Behandlungszeiträumen (10 h oder länger) zu einer erhöhten Induktion an γ H2AX-Foci führen.

Während nach einer Inhibition oder Depletion von ATM und einer langen HU-Behandlung eine statistisch signifikante Zunahme an γ H2AX-Foci pro Zelle gemessen wurde, zeigte sich nach ATR-Depletion kein Effekt. Wie bereits beschrieben, wurde dieses Ergebnis nicht erwartet, da eine Beteiligung von ATR an der Regulation der Replikation sowie der Induktion des S-Phase-Arrests bereits mehrfach gezeigt wurde (Dimitrova & Gilbert, 2000; Feijoo et al, 2001; Maya-Mendoza et al, 2007; Woodward et al, 2006). Die höhere DSB-Induktion nach ATM-Depletion deutet daraufhin, dass es während der HU-Behandlung zur Induktion eines DSB-abhängigen *Checkpoints* kommt, da ATM in erster Linie von Doppelstrangbrüchen aktiviert wird. Dieser könnte durch die endogen induzierten DSBs aktiviert werden oder, da er erst bei einer längeren HU-Behandlung eine Rolle zu spielen scheint, durch die HU-abhängig induzierten DSBs. Da in dieser Arbeit die Depletion von ATR keinen Effekt zeigte, führt die verwendete, geringere HU-Konzentration möglicherweise nicht zu einer vollständigen Depletion des RPA-Pools, wie es Toledo et al (2013) für eine höhere HU-Konzentration beschreiben. Die in dieser Arbeit verwendete HU-Konzentration ist möglicherweise physiologischer als eine Behandlung mit 2 mM HU, wie sie Toledo et al (2013) verwendet haben.

Das bedeutet, dass durch die DSBs, die entweder endogen oder während einer langen HU-Behandlung induziert werden, möglicherweise ein Replikations-unabhängiger (damit ATR-unabhängiger) aber ATM-abhängiger (da durch DSBs ausgelöst) S-Phase-Arrest induziert wird. Diese Theorie wird durch Veröffentlichungen unterstützt, die zeigen, dass sowohl ein Replikations-abhängiger als auch ein Replikations-unabhängiger S-Phase-Arrest induziert werden kann (Bartek et al, 2004).

4.1.2. Einfluss des Mediatorproteins MDC1 auf die Doppelstrangbruch-Induktion durch HU

Das Mediatorprotein *mediator of DNA damage checkpoint protein 1* (MDC1) wird von ATM und dem MRN-Komplex zum DSB rekrutiert. Dort bindet MDC1 an γ H2AX und ATM, sorgt für eine anhaltende Akkumulation von aktivem ATM am Schaden und eine Verstärkung des DNA-Schadenssignals (Lou et al, 2006). MDC1 wird für eine effiziente Aktivierung des S-Phase-Arrests benötigt und eine MDC1 Depletion führt zu Strahlungs-resistenter DNA-Synthese (RDS) (Goldberg et al, 2003; Wu et al, 2008).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass MDC1 zu angehaltenen Replikationsgabeln rekrutiert wird und dort die Akkumulation von TopBP1 fördert, welches benötigt wird, um ATR zu aktivieren (Wang et al, 2011). Weiterhin wird MDC1 für die Phosphorylierung der Checkpointkinase 1 (Chk1) und der Untereinheit 2 des Replikationsproteins A (RPA2) benötigt (Wang et al, 2011), welche beide eine entscheidende Rolle in der zellulären Antwort auf Replikationsstress spielen. Aufgrund der Beteiligung von MDC1 an Vorgängen an arretierten Replikationsgabeln und an der durch diese ausgelöste DNA-Schadenssignalkaskade sollte in den folgenden Experimenten der Einfluss einer MDC1 Depletion auf die γ H2AX-Foci-Induktion durch HU-Behandlung untersucht werden.

Für diese Experimente wurden humane Lungenkrebszellen (A549) direkt nach der Aussaat mit MDC1-siRNA transfiziert, nach 72 h mit 5 μ M EdU markiert und für unterschiedliche Zeiten (0 h – 24 h) mit 0,5 mM HU behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit MDC1-siRNA nachtransfiziert, um einen effizienten MDC1-*knockdown* zu gewährleisten. Die Zellen wurden nach Ende der HU-Behandlung fixiert und gegen γ H2AX, 53BP1, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Die Färbung gegen 53BP1 erfolgte, um die siRNA-Transfektion zu überprüfen. Zellen, in denen MDC1 erfolgreich depletiert wurde, zeigen keine 53BP1-Foci (Pei et al, 2011), daher wurden jeweils 40 Zellen ausgewertet, die EdU-positiv und 53BP1-negativ waren.

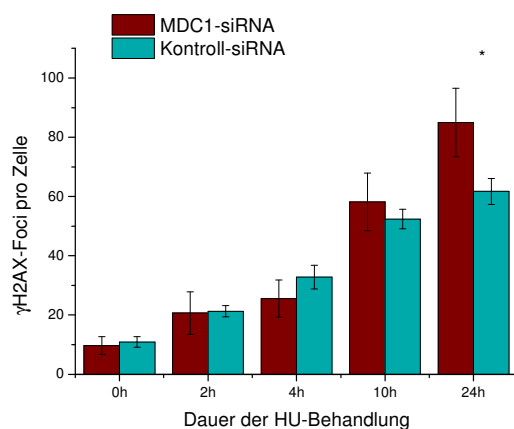


Abbildung 4.7: Induktion von γ H2AX-Foci nach HU-Behandlung in Zellen nach MDC1- Depletion

Exponentiell wachsende, humane Lungenkrebszellen (A549) wurden direkt nach der Aussaat mit MDC1- bzw. Kontroll-siRNA behandelt. Die Zellen wurden 72 h später für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und anschließend für unterschiedliche Zeiten (0 h - 24 h) mit 0,5 mM Hydroxyurea behandelt. Die Zellen wurden nach der HU-Zugabe mit MDC1- bzw. Kontroll-siRNA nachtransfiziert, um während des Behandlungszeitraums einen effizienten MDC1-*knockdown* zu gewährleisten. Nach Ende der Behandlung wurden die Zellen fixiert und gegen γ H2AX, 53BP1, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Es wurden pro Experiment 40 EdU-positiv, 53BP1-negativ S-Phase-Zellen ausgewertet. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert aus $n \geq 2$ Experimenten dar, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die statistische Signifikanz wurde mit dem *Students t-Test* berechnet. * $p < 0,05$

In unbehandelten Zellen (0 h) zeigte sich kein Unterschied zwischen MDC1- (10 γ H2AX-Foci) und Kontroll-siRNA-Behandlung (11 γ H2AX-Foci) (Abbildung 4.7). Auch bei kurzen HU-Behandlungs-

zeiträumen wie 2 h, 4 h oder 10 h war der Unterschied zwischen Zellen, die mit MDC1- oder Kontroll-siRNA transfiziert wurden, nur gering. Nach 10 h HU-Behandlung lag die Zahl der γ H2AX-Foci in MDC1-siRNA behandelten Zellen mit 58 zum ersten Mal leicht über der der mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen (52 γ H2AX-Foci). Nach 24-stündiger HU-Behandlung zeigten die Zellen, die mit MDC1-siRNA transfiziert wurden, eine statistisch signifikant erhöhte Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle gegenüber den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen.

In diesem Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Dauer der HU-Behandlung ein entscheidender Faktor für die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen ist. Dieser Effekt wird verstärkt durch die Depletion oder die Inhibition von Faktoren wie z.B. ATM und MDC1, die für die Signalkaskade nach der Induktion von DSBs und die Regulation der Replikation in der S-Phase benötigt werden. Die Inhibition von ATM und MDC1 könnte zu einer erhöhten Anzahl an aktiven Replikationsgabeln führen, welche durch eine HU-Behandlung arretiert würden und kollabieren könnten. Dies wiederum würde zu einer erhöhten Anzahl an DSBs sowohl in ATM- als auch in MDC1-depletierten Zellen führen.

Eine ATR-Depletion zeigte in dem in dieser Arbeit dargestellten Experiment erstaunlicherweise keinen Einfluss auf die DSB-Induktion. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die in dieser Arbeit verwendete HU-Konzentration den zellulären RPA-Pool nicht vollständig depletiert, wodurch es zu keinem weiteren Kollaps arretierter Replikationsgabeln kommt. Die auch in Kontroll-siRNA-behandelten Zellen induzierten DSBs dagegen führen zur Aktivierung eines ATM-abhängigen S-Phase-Arrests, was mit der höheren DSB-Induktion nach ATM- oder MDC1-Depletion zusammen passt.

4.2. Charakterisierung des Reparatur- und Zellzyklusverhaltens nach 24 h Hydroxyurea

Für die Untersuchung des Reparaturverhaltens HU-induzierter DSBs und deren Einfluss auf den Zellzyklus wurde eine 24-stündige HU-Behandlungsdauer gewählt. Diese lange Behandlungsdauer bietet den Vorteil, dass eine ausreichende Anzahl an DSBs induziert wird, um deren Reparatur sowie deren Einfluss auf das Zellzyklusverhalten zu untersuchen. Außerdem konnte in den bisherigen Experimenten gezeigt werden, dass sich der Einfluss verschiedener Proteine auf die Induktion von DSBs nach einer 24-stündigen HU-Behandlung gut charakterisieren lässt.

4.2.1. Untersuchung des Zellzyklusverhaltens nach 24 h HU-Behandlung

Nach Induktion von DNA-Schäden sind Zellen in der Lage einen Zellzyklusarrest zu induzieren, der verhindert, dass sie im Zellzyklus fortschreiten. Zellen haben zu bestimmten Zeitpunkten während des Zellzyklus die Möglichkeit einen solchen Arrest einzuleiten. Während der S-Phase kann bei Replikationsstress ein S-Phase-*Checkpoint* induziert werden. Am Ende der G2-Phase können Zellen durch

die Induktion des G2/M-Arrests verhindern, dass sie sich mit DNA-Schäden teilen, und der G1/S-Arrest schützt Zellen vor der Replikation von geschädigter DNA.

Aufgrund der wichtigen Rolle dieser *Checkpoints* in der Erhaltung der genomischen Integrität sollte zunächst untersucht werden, ob sie durch die hohe Induktion von DSBs nach 24 h HU-Behandlung aktiviert werden. Dafür wurden S-Phase-Zellen mit dem Thymidin-Analogon BrdU markiert, die DNA mit dem Farbstoff Propidiumiodid (PI) angefärbt und die Intensitäten der beiden Färbungen gegeneinander aufgetragen (Abbildung 4.8).

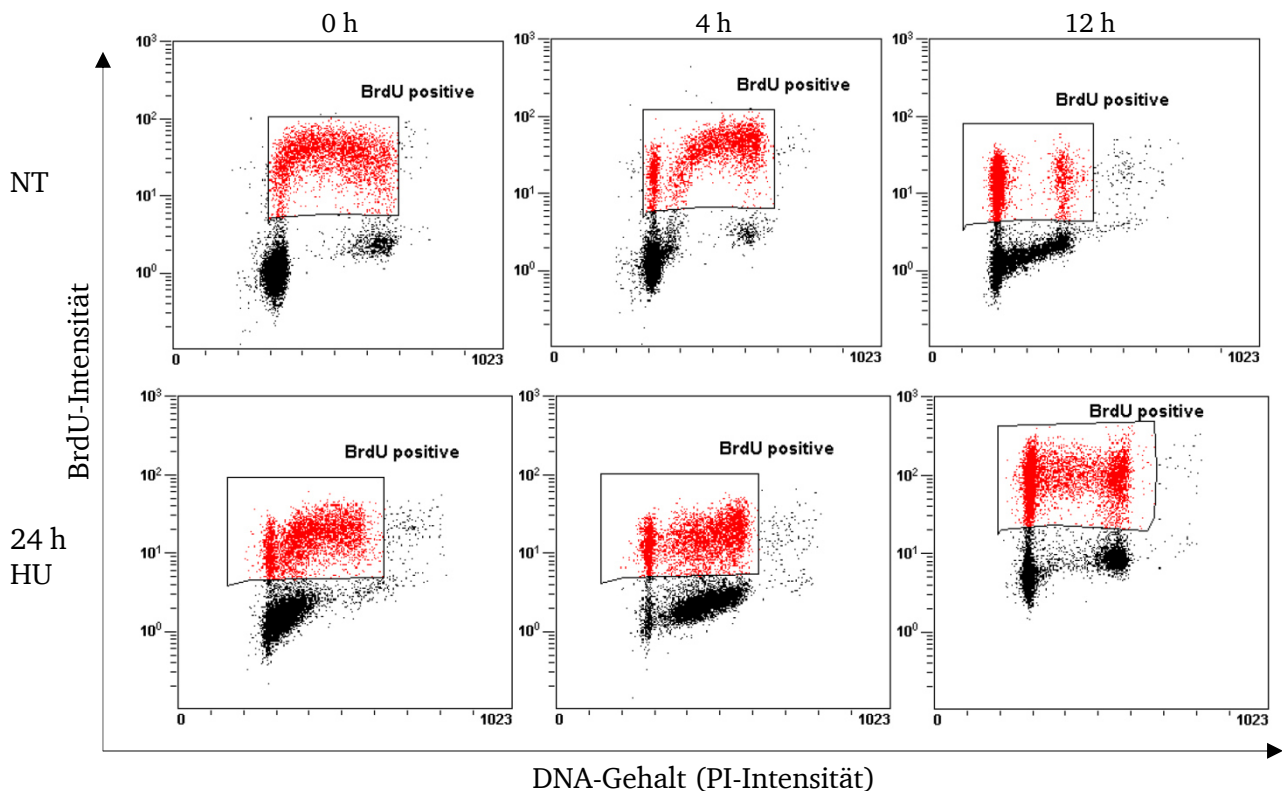


Abbildung 4.8: Exemplarische FACS-Plots einer durchflusszytometrischen Analyse von A549-Zellen

Exponentiell wachsende, humane Lungentumorzellen (A549) wurden 48 h nach der Aussaat für 1 h mit 10 μ M BrdU markiert, zu unterschiedlichen Zeiten fixiert (0 h – 12 h) und gegen BrdU und die DNA (PI) gefärbt. Es wurde eine zweidimensionale FACS-Analyse durchgeführt, bei der pro Zeitpunkt 15.000 Zellen vermessen wurden. Gezeigt werden je 3 exemplarische FACS-Blots von charakteristischen Zeitpunkten in unbehandelten Zellen (NT) und 24h HU-behandelten Zellen (24 h HU). Die BrdU-positiven Zellen wurden rot markiert.

Durch die Messung des in die DNA interkalierten PIs war es möglich, zwischen Zellen mit einem einfachen DNA-Gehalt (G1-Phase) und einem doppelten DNA-Gehalt (G2-Phase) zu unterscheiden. Durch die Markierung von S-Phase-Zellen mittels BrdU konnten diese in ihrem weiteren Verlauf durch den Zellzyklus verfolgt werden. Abbildung 4.8 zeigt repräsentative FACS-Blots von unbehandelten (NT) und HU-behandelten (24 h HU) humanen Tumorzellen (A549) zu unterschiedlichen Reparaturzeiten in denen die S-Phase-Zellen rot hervorgehoben wurden. In unbehandelten Zellen führte die BrdU-Markierung der S-Phase-Zellen dazu, dass sich eine Hufeisen-ähnliche Verteilung ergab. Die G1-

Phase-Zellen befinden sich bei dieser Verteilung links unten (einfacher DNA-Gehalt) und die G2-Phase-Zellen rechts unten (doppelter DNA-Gehalt), während sich die S-Phase-Zellen durch die BrdU-Markierung oberhalb und durch den zunehmenden DNA-Gehalt zwischen G1- und G2-Phase-Zellen befinden. Beim Fortschreiten durch den Zellzyklus verschoben sich die Populationen. Nach 4 h befand sich ein Teil der BrdU-positiven Zellen noch immer in der S-Phase und ein großer Anteil in der G2-Phase (erkennbar an der Verschiebung der BrdU-positiven Zellpopulation nach rechts), während sich ein kleinerer Teil bereits geteilt hatte. Diese BrdU-positiven G1-Phase-Zellen erschienen in den FACS-Blots als neue Population links neben den S-Phase-Zellen und über den BrdU-negativen G1-Phase-Zellen. Zum 12 h-Zeitpunkt hatten so gut wie alle BrdU-positiven Zellen die S-Phase verlassen und befanden sich entweder in der G2-Phase oder in der G1-Phase, erkennbar an den beiden starken Zellpopulationen die durch eine Lücke getrennt wurden. In der Zwischenzeit hatten die BrdU-negativen Zellen die S-Phase erreicht.

Die HU-behandelten Zellen zeigten keine Hufeisen-ähnliche Verteilung, ihnen fehlte die BrdU-negative Zellpopulation in der G2-Phase. Dies liegt daran, dass während der 24-stündigen Arretierung der S-Phase-Zellen die G2-Phase-Zellen Zeit hatten sich zu teilen und in die G1-Phase zu gelangen. Die Zellen wurden durch die HU-Behandlung an der DNA-Synthese gehindert, dies führte zu der bereits in Kapitel 4.1 beschriebenen Akkumulation von Zellen am G1/S-Übergang. Dass es auch eine BrdU-positive Zellpopulation am G1/S-Übergang gab (erkennbar durch die links neben den S-Phase-Zellen abgesetzte BrdU-positive Zellpopulation) verdeutlicht, dass einige Zellen während der BrdU-Markierung bzw. zu Beginn der HU-Behandlung, während der noch Nukleotide zur Verfügung standen, die S-Phase verließen und während der folgenden 24 h die G1-Phase erreichten. Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden diese Zellen aufgrund der BrdU-Markierung der S-Phase-Population zugeordnet, da es nicht möglich gewesen wäre, sie bei der Analyse späterer Zeitpunkte von den S-Phase-Zellen zu unterscheiden. Die Akkumulation von BrdU-positiven Zellen am G1/S-Übergang ist möglich, da die BrdU-Markierung vor der HU-Behandlung erfolgte und es einige Zeit benötigte bis nach der HU-Zugabe alle Nukleotide verbraucht waren. Dies führte ebenfalls dazu, dass einige BrdU-negative Zellen am Anfang der HU-Behandlung in die S-Phase eintraten. Nach 4 h hatte sich auch in den HU-behandelten Zellen die S-Phase-Population nach rechts Richtung G2-Phase verschoben, in diesem Fall gilt dies sowohl für die BrdU-positive als auch für die BrdU-negative S-Phase-Population. Ähnlich wie bei den unbehandelten Zellen zeigten sich 4 h nach Ende der HU-Behandlung die ersten BrdU-positiven G1-Phase-Zellen. Diese konnten jedoch nicht von am G1/S-Übergang akkumulierten Zellen unterschieden werden, sollten sich diese zu einem so späten Zeitpunkt nach Ende der HU-Behandlung noch dort befunden haben. Nach 12 h befand sich ein Teil der BrdU-positiven Zellpopulation noch immer in der G2-Phase, ein großer Teil hatte sich aber bereits geteilt und befand sich in der G1-Phase bzw. hatte bereits erneut die S-Phase erreicht.

Für die Untersuchung des Zellzyklusverhaltens nach HU-Behandlung wurden sowohl Lungentumorzellen (A549) als auch immortalisierte, humane Fibroblasten (82-6hTert) verwendet. Beide Zelllinien wurden 48 h nach der Aussaat für 1 h mit 10 μ M BrdU markiert und danach für 24 h mit 0,5 mM HU behandelt. Anschließend wurden die Zellen in frisches Medium überführt und nach unterschiedlichen Zeiten fixiert (0 h – 12 h). Nach der Färbung gegen BrdU und PI wurden pro Zeitpunkt 15.000 Zellen in einem Durchflusszytometer gemessen. Es wurde der jeweilige Anteil der G1-, S- oder G2-Phase-Zellen an der Gesamtzahl der BrdU-positiven Zellpopulation ermittelt.

Die Anzahl der unbehandelten Tumorzellen (NT) in der S-Phase sank während der Zeit nach Ende der BrdU-Markierung kontinuierlich von 94 % auf 8 % ab (Abbildung 4.9 A). In der G2-Phase des Zellzyklus stieg der Anteil der unbehandelten Zellen von 5 % (0 h) bis zum 4 h-Zeitpunkt auf 29 % an (Abbildung 4.9 B). Anschließend sank die Anzahl der G2-Phase-Zellen langsam auf 14 % nach 12 h ab. Die unbehandelten Zellen erreichten nach 4 h die G1-Phase (Abbildung 4.9 C). In den folgenden Stunden nahm der Anteil der G1-Phase-Population kontinuierlich bis auf 72 % zu.

Von den HU-behandelten Zellen befanden sich direkt nach Ende der Behandlung 93 % der Zellen in der S-Phase, in den nächsten 8 h sank dieser Wert kontinuierlich auf 21 % ab (Abbildung 4.9 A). In der G2-Phase des Zellzyklus befanden sich zunächst 5 % (0 h) der HU-behandelten Zellen (Abbildung 4.9 B). Dieser Anteil nahm bis auf 30 % nach 6 h zu und sank dann auf 24 % ab. Nach 4 h wurden die ersten HU-behandelten Zellen in der G1-Phase detektiert (Abbildung 4.9 C). Im Laufe der Untersuchung nahm der Anteil der HU-behandelten G1-Phase-Zellen auf maximal 56 % zu.

Die HU-behandelten Tumorzellen zeigten somit nicht genau den gleichen Zellzyklusverlauf wie die unbehandelten Tumorzellen, es ließ sich jedoch weder ein signifikanter Unterschied in der Zellzyklusprogression erkennen noch das Einsetzen eines Zellzyklusarrests.

90 % der unbehandelten, immortalisierten, humanen Fibroblasten (NT) befanden sich zu Beginn der Messung in der S-Phase (Abbildung 4.9 D). In den folgenden Stunden nahm der S-Phase-Anteil rasch auf 2 % ab. Der Anteil der unbehandelten Zellen in der G2-Phase nahm rasch auf 48 % (4 h) zu und sank dann bis auf 4 % (12 h) ab (Abbildung 4.9 E). Nach 4 h erreichten die ersten unbehandelten Fibroblasten die G1-Phase, anschließend stieg der Anteil der G1-Phase-Zellen bis auf 91 % an (Abbildung 4.9 F).

Von den HU-behandelten Fibroblasten (HU) befanden sich zunächst 90 % in der S-Phase (Abbildung 4.9 D). Auch in diesem Zellsystem nahm der Anteil der S-Phase-Zellen im Verlauf des Versuchs ab und erreichte nach 10 h ein Minimum. Der G2-Phase-Anteil der HU-behandelten Zellen stieg von 10 % auf 40 % nach 6 h an und nahm dann ab (Abbildung 4.9 E). Auch die HU-behandelten Zellen erreichten nach 4h die G1-Phase (Abbildung 4.9 F). Der Anteil der G1-Phase-Zellen stieg kontinuierlich bis auf 86 % an.

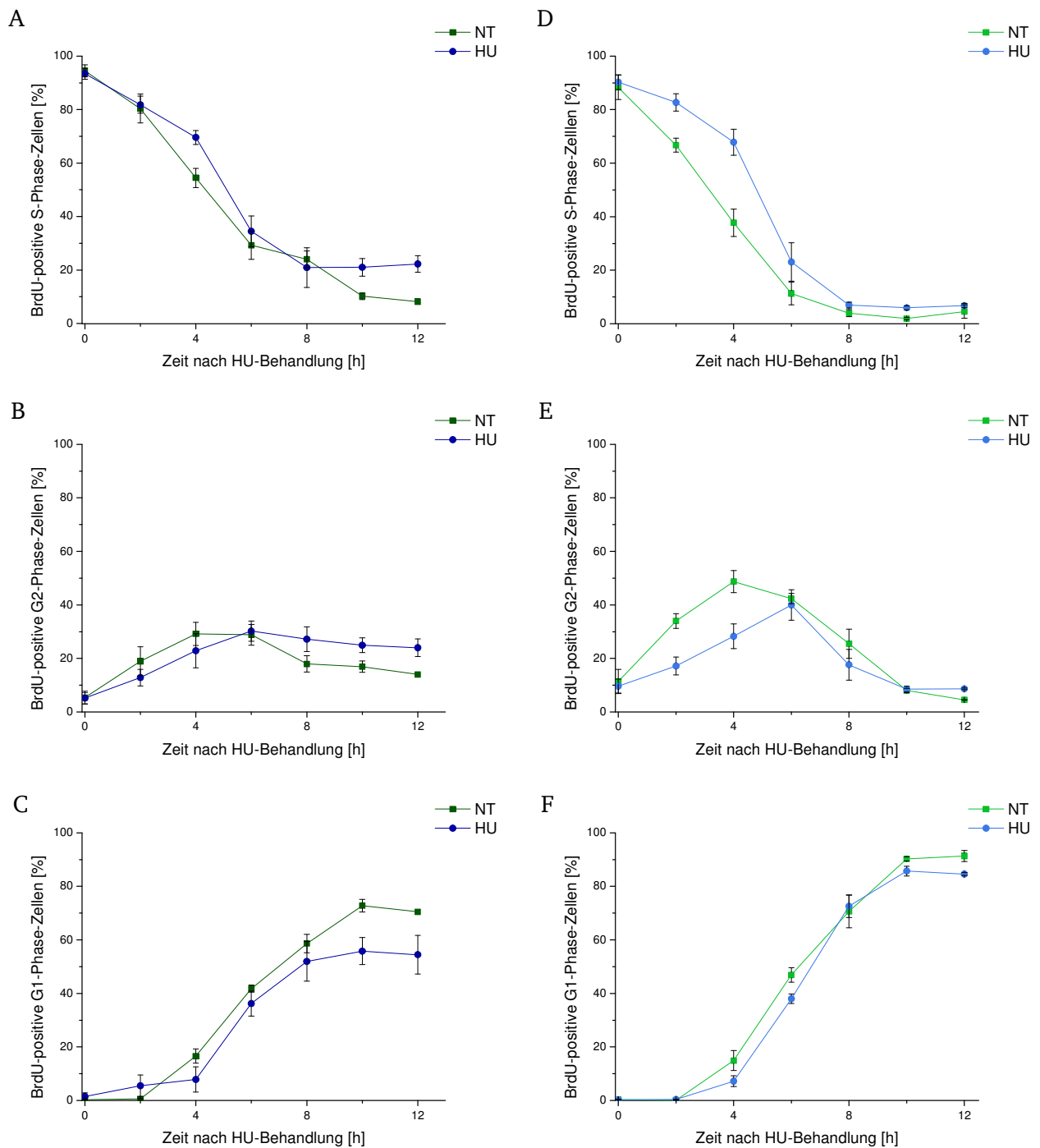


Abbildung 4.9: Zellzyklusverhalten von A549- und 82-6hTert-Zellen nach 24-stündiger HU-Behandlung

Exponentiell wachsende, humane Lungentumorzellen (A549) (A - C) bzw. humane, immortalisierte Fibroblasten (82-6hTert) (D - F) wurden 48 h nach der Aussaat für 1 h mit 10 μ M BrdU markiert und anschließend entweder nicht behandelt (NT) oder für 24 h mit 0,5 mM HU behandelt (HU). Nach Ende der Behandlungszeit wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeiten fixiert (0 h - 12 h) und gegen BrdU und die DNA (PI) gefärbt. Es wurde eine zweidimensionale FACS-Analyse durchgeführt, bei der pro Zeitpunkt 15.000 Zellen vermessen wurden. Es wurden nur BrdU-positive Zellen in die Auswertung aufgenommen. Die Graphen zeigen die Entwicklung des Anteils der BrdU-positiven Zellen (A) + (D) in der S-Phase, (B) + (E) in der G2-Phase und (C) + (F) in der G1-Phase, jeweils bezogen auf die gesamte BrdU-positive Zellpopulation. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert aus $n \geq 8$ (A - C) bzw. $n = 4$ (D - F) Experimenten dar. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an.

HU-behandelte Fibroblasten zeigten in den ersten 4 h der S-Phase eine Verzögerung gegenüber den unbehandelten Zellen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die nach einer HU-Behandlung fehlenden Nukleotide zunächst neusynthetisiert werden müssen. Diese Verzögerung führte auch zu einem verzögerten Eintritt in die G2-Phase nach HU-Behandlung. Bei der weiteren Progression der Zellen und dem Übertritt in die G1-Phase ließ sich kein Unterschied zwischen HU-behandelten und unbehandelten Zellen erkennen. Die Fibroblasten zeigten genau wie die Tumorzellen weder die Induktion eines G2/M-Arrests noch ein verzögertes Eintreten in die G1-Phase. Dieses Ergebnis war unerwartet, da zunächst vermutet wurde, dass es aufgrund der hohen DSB-Induktion nach einer 24-stündigen HU-Behandlung zu einer Verzögerung im Zellzyklus kommen würde, um den Brüchen Zeit für die Reparatur zu geben. Da die Zellzyklusprogression nicht verzögert wurde, deutete dies darauf hin, dass die HU-induzierten DSBs schnell und effizient repariert wurden. Um diese Theorie zu belegen, wurde im Folgenden die Reparatur HU-induzierter DSBs analysiert.

4.2.2. Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen nach 24 h HU-Behandlung

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, wie humane Zellen die durch eine 24-stündige HU-Behandlung induzierten DSBs reparieren. Hierfür wurden sowohl humane Lungentumorzellen (A549) als auch immortalisierte, humane Fibroblasten (82-6hTert) zunächst 1 h mit 5 μ M EdU markiert und dann für 24 h mit 0,5 mM HU behandelt. Nach Ende der Behandlung wurden die

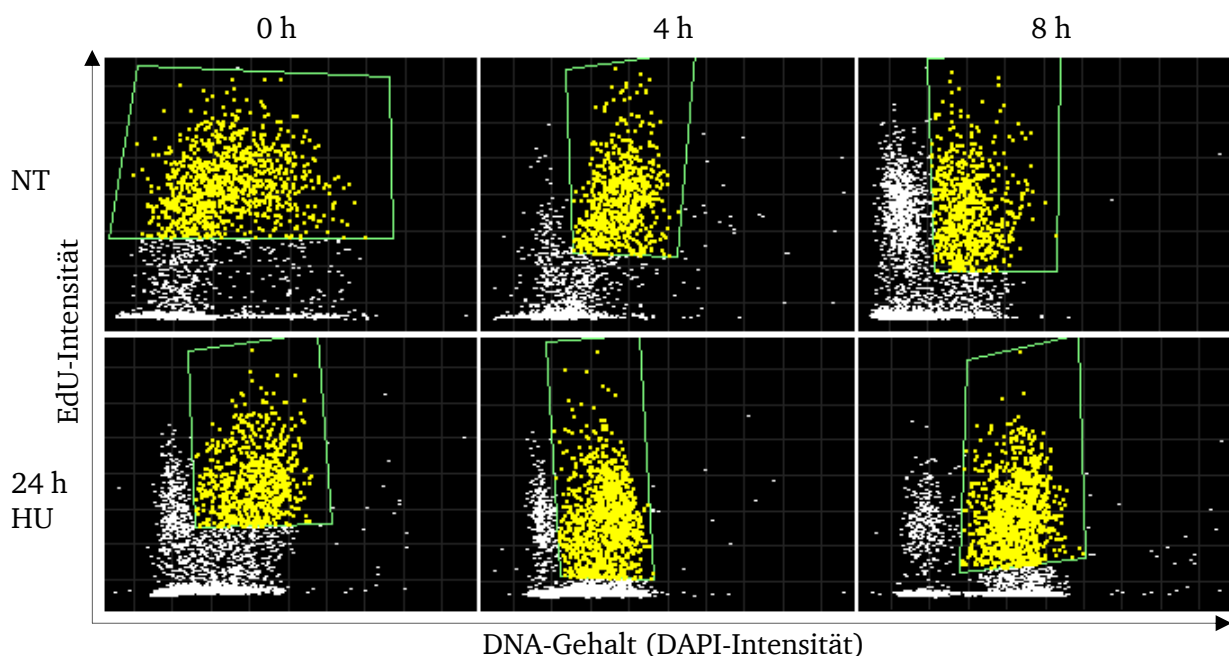


Abbildung 4.10: Darstellung exemplarischer Mikroskop-Scans zur spezifischen Auswahl von S/G2-Phase-Zellen

Exponentiell wachsende, humane Lungentumorzellen (A549) wurden für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und anschließend für 24 h mit 0,5 mM Hydroxyurea (24 h HU) behandelt oder unbehandelt (NT) belassen. Nach Ende der Behandlung wurden die Zellen fixiert und gegen EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Anschließend wurden die Zellen am Fluoreszenzmikroskop eingescannt und eine Auftragung der EdU-Intensität gegen die DAPI-Intensität erstellt. Gelb hervorgehoben sind die EdU-positiven S/G2-Phase-Zellen, welche für die weitere Analyse des Reparaturverhaltens herangezogen wurden.

Zellen zu unterschiedlichen Zeiten fixiert (0 h – 10 h). Die Zellen wurden gegen γ H2AX, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. In den Tumorzellen wurde zusätzlich eine Färbung gegen 53BP1 durchgeführt.

Die Zellen wurden für die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop gescannt und anhand ihrer DAPI- und EdU-Intensität nach Zellzyklusphasen aufgetrennt (Abbildung 4.10). Dieses Verfahren ermöglichte es, Zellen durch den Zellzyklus zu verfolgen und eine spezifische Zellzyklusphase auszuwerten. Pro Experiment wurden 40 EdU-positive S/G2-Phase-Zellen ausgewertet (in Abbildung 4.10 gelb hervorgehoben). Auch hier zeigte sich die bereits zuvor beschriebene Akkumulation HU-behandelter Zellen

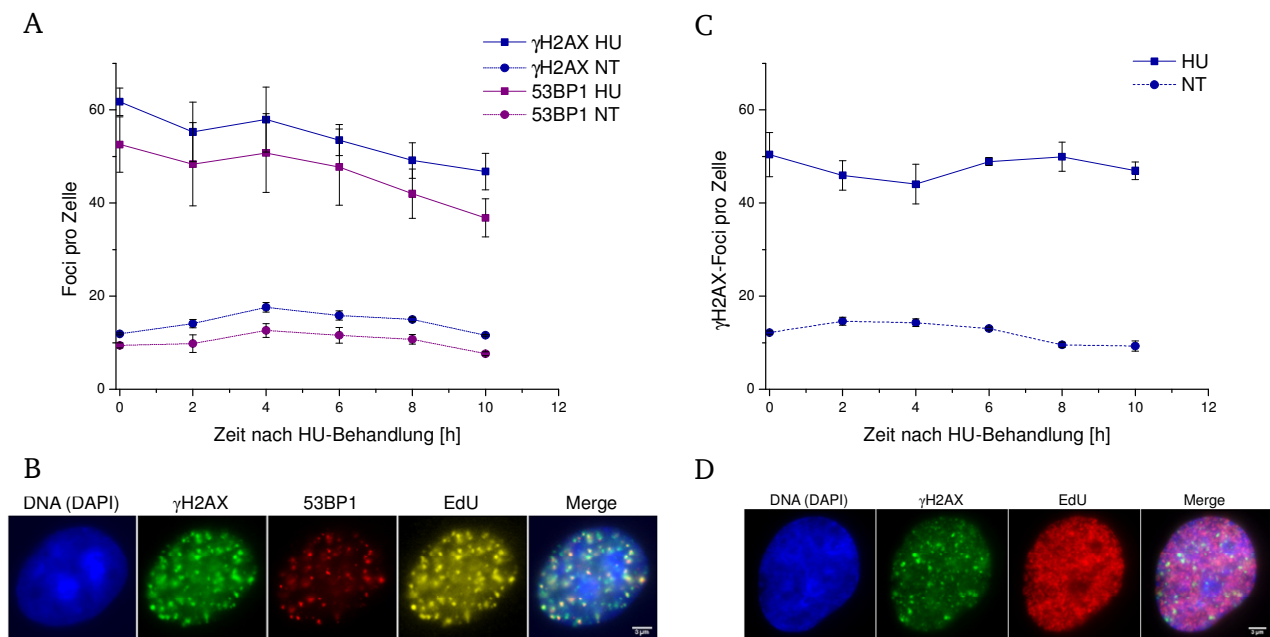


Abbildung 4.11: γ H2AX- und 53BP1-Reparaturkinetiken nach 24 h HU-Behandlung sowie in unbehandelten A549- und 82-6hTert-Zellen

(A) + (B) Exponentiell wachsende, humane Lungenkrebszellen (A549) wurden 48 h nach der Aussaat für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und anschließend für 24 h mit 0,5 mM Hydroxyurea behandelt. Nach unterschiedlichen Reparaturzeiten (0 h – 10 h) wurden die Zellen fixiert und gegen γ H2AX, 53BP1, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. (A) γ H2AX- und 53BP1-Reparaturkinetik in unbehandelten (NT) und HU-behandelten (HU) Zellen. Es wurden pro Experiment 40 EdU-positive Zellen ausgewertet. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert aus $n \geq 3$ Experimenten dar, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. (B) Exemplarische Immunfluoreszenzaufnahmen nach 24 h HU-Behandlung, in denen γ H2AX (grün), 53BP1 (rot), EdU (gelb) und die DNA (DAPI, blau) sowie eine Überlagerung von γ H2AX, 53BP1 und der DNA (*Merge*) dargestellt sind. Der dargestellte Maßstabsbalken entspricht 3 μ m (Aufnahmen erfolgten mit 1000x Vergrößerung).

(C) + (D) Exponentiell wachsende, humane, immortalisierte Fibroblasten (82-6hTert) wurden für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und anschließend für 24 h mit 0,5 mM Hydroxyurea behandelt. Nach unterschiedlichen Reparaturzeiten (0 h – 10 h) wurden die Zellen fixiert und gegen γ H2AX, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. (C) γ H2AX-Reparaturkinetik in unbehandelten (NT) und HU-behandelten (HU) Zellen. Es wurden pro Experiment 40 EdU-positive Zellen ausgewertet. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert aus $n = 4$ Experimenten dar, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. (D) Exemplarische Immunfluoreszenzaufnahmen nach 24 h HU-Behandlung, in denen γ H2AX (grün), EdU (rot) und die DNA (DAPI, blau) sowie eine Überlagerung der 3 Kanäle (*Merge*) dargestellt sind. Der dargestellte Maßstabsbalken entspricht 3 μ m (Aufnahmen erfolgten mit 1000x Vergrößerung).

am G1/S-Übergang. Da diese Zellen nicht während der gesamten Behandlungszeit dem HU ausgesetzt waren, wurden sie von der Auswertung zur Analyse von γ H2AX- und 53BP1-Foci ausgeschlossen.

In unbehandelten Tumorzellen (NT) zeigte sich eine leichte Schwankung in der Anzahl der γ H2AX- und 53BP1-Foci während der Reparaturzeit. Die Anzahl der γ H2AX-Foci pro Zelle lag zwischen 11 und 17 Foci. Die 53BP1-Foci-Zahl schwankte zwischen 7 und 12 Foci pro Zelle. Nach einer 24-stündigen HU-Behandlung wurden in Tumorzellen 61 γ H2AX- und 52 53BP1-Foci induziert, diese Werte nahmen während der 10-stündigen Reparaturzeit langsam ab (Abbildung 4.11 A). Innerhalb dieser Zeit sank die Anzahl der γ H2AX-Foci um 14 Foci und die der 53BP1-Foci um 15 Foci. Das entspricht einer prozentualen Abnahme von 23 % bei den γ H2AX-Foci und 28 % bei den 53BP1-Foci. Dies ist im Vergleich mit der DSB-Reparatur nach Bestrahlung oder nach einem anderen S-Phase-schädigenden Agens wie Methylmethansulfonat eine sehr geringe Abnahme. Während der gesamten Reparaturzeit kolokalisierten γ H2AX- und 53BP1-Foci in den mit HU behandelten Zellen in einem hohen Maße (Abbildung 4.11 B).

Um zu untersuchen, ob die langsame Reparatur der γ H2AX- und 53BP1-Foci lediglich auf das Zellsystem zurückzuführen ist wurde das DSB-Reparaturverhalten nach 24 h HU-Behandlung auch in immortalisierten, humanen Fibroblasten (82-6hTert) untersucht.

In unbehandelten Fibroblasten war wie bei den Tumorzellen eine leichte Schwankung der γ H2AX-Foci-Anzahl zu erkennen (Abbildung 4.11 C). Es wurden mindestens 9 und maximal 14 γ H2AX-Foci pro Zelle detektiert. Die für 24 h mit HU behandelten Fibroblasten zeigten mit 50 γ H2AX-Foci ein etwas niedrigeres Induktionslevel als die Tumorzellen (61 γ H2AX-Foci). Die γ H2AX-Foci-Zahl in den Fibroblasten schwankte während der 10-stündigen Reparaturzeit, eine eindeutige Abnahme war nicht zu erkennen. In Abbildung 4.11 D sind exemplarische Bilder eines HU-behandelten Fibroblasten dargestellt.

Humane Tumorzellen und humane Fibroblasten zeigen nach 24-stündiger HU-Behandlung innerhalb einer Reparaturzeit von 10 h eine sehr langsame und ineffiziente, respektive gar keine Reparatur der induzierten DSBs. In Studien nach ionisierender Strahlung sowie nach anderen S-Phase-schädigenden Agenzien wie Methylmethansulfonat (MMS) wurde dagegen eine deutlich schnellere und effizientere Reparatur von DSBs beschrieben (Ensminger et al, 2014). Nach MMS konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der γ H2AX-Foci innerhalb von 10 h um 70 % absinkt.

Fasst man die Ergebnisse der letzten beiden Kapitel zusammen so ergibt sich die erstaunliche Beobachtung, dass sowohl die untersuchten Tumorzellen als auch die untersuchten Fibroblasten nach der Induktion von DSBs durch eine 24-stündige HU-Behandlung eine verminderte Reparatur (Abbildung 4.11) und keine Induktion eines G2/M-Arrests zeigen (Abbildung 4.9). Zu Zeiten nach der HU-Behandlung, bei denen die untersuchten Zellen in die Mitose eintraten, zeigten sie somit noch ein deutlich erhöhtes Schadenslevel. Da in dem oben beschriebenen Experiment nur die EdU-positiven

S/G2-Phase-Zellen untersucht und die G1-Phase-Zellen aus der Analyse ausgeschlossen wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Zellen, welche bereits in die Mitose und die G1-Phase progressiert waren, die Reparatur der HU-induzierten DSBs bereits abgeschlossen hatten. Die Analyse der γ H2AX-Foci in den S/G2-Phase-Zellen könnte somit die Analyse einer Subpopulation bedeuten, die nicht das Verhalten der gesamten Zellpopulation widerspiegelt. Dies würde die hohe Anzahl an γ H2AX-Foci in den S/G2-Phase-Zellen und die trotzdem fehlende Induktion eines G2/M-Arrests erklären. Um dies zu überprüfen, wurde im Folgenden die Anzahl an γ H2AX-Foci in Mitosen und G1-Phase-Zellen untersucht.

Es wurden exponentiell wachsende Lungenkarzinomzellen (A549) 48 h nach der Aussaat mit $5 \mu\text{M}$ EdU markiert und für 24 h mit 0,5 mM HU behandelt. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeiten nach Ende der HU-Behandlung fixiert (4 h – 12 h) und gegen γ H2AX, pH3, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Das am Serin 10 phosphorylierte H3 (pH3) diente als Marker für mitotische Zellen (Prigent & Dimitrov, 2003). Es wurden pro Experiment 40 EdU- und pH3-positive Zellen analysiert. Die

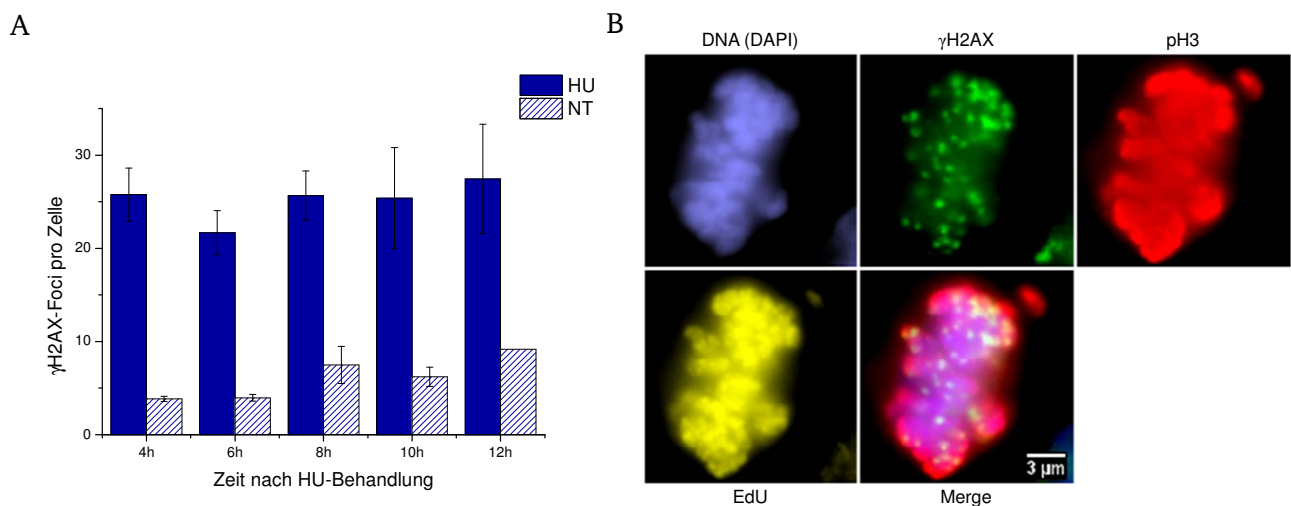


Abbildung 4.12: γ H2AX-Foci-Kinetik nach 24 h HU-Behandlung in mitotischen Tumorzellen

Exponentiell wachsende, humane Lungenkrebszellen (A549) wurden 48 h nach der Aussaat für 1 h mit $5 \mu\text{M}$ EdU markiert und für 24 h mit 0,5 mM Hydroxyurea behandelt. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeiten fixiert (4 h – 12 h) und gegen γ H2AX, pH3, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Es wurden pro Experiment 40 EdU- und pH3-positive Zellen ausgewertet. (A) γ H2AX-Foci-Kinetik in unbehandelten (NT) und HU-behandelten (HU) Mitosen. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert aus $n \geq 3$ Experimenten dar, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Mit dem *Students t-Test* konnte gezeigt werden, dass die HU-behandelten Zellen eine statistisch signifikant höhere Anzahl an γ H2AX-Foci aufwiesen als die unbehandelten Zellen. (4 h, 12 h * $p < 0,05$; 6 h, 8 h, 10 h ** $p < 0,01$) (B) Exemplarische Immunfluoreszenzaufnahmen einer mitotischen Zelle nach 24 h HU-Behandlung, in der γ H2AX (grün), pH3 (rot), EdU (gelb) und die DNA (DAPI, blau) sowie eine Überlagerung von γ H2AX, pH3 und der DNA (*Merge*) dargestellt sind. Der dargestellte Maßstabsbalken entspricht $3 \mu\text{m}$ (Aufnahmen erfolgten mit 1000x Vergrößerung).

mitotischen Zellen wurden ab 4 h nach Ende der HU-Behandlung ausgewertet, da die Analyse der Zellzyklusprogression ergab, dass zu diesem Zeitpunkt die ersten HU-behandelten Zellen die Mitose erreicht hatten (Abbildung 4.9).

In unbehandelten Mitosen schwankte die Anzahl der γ H2AX-Foci pro Zelle zwischen 4 und 9 Foci (Abbildung 4.12 A). In HU-behandelten Zellen wurde eine deutlich höhere Anzahl von ca. 25 γ H2AX-Foci pro Zelle detektiert, welche zu den untersuchten Zeitpunkten kaum Schwankungen zeigte. Allerdings zeigten einzelne HU-behandelte, mitotische Zellen eine extrem erhöhte Anzahl an γ H2AX-Foci (Abbildung 4.12 B). Dieses Ergebnis spricht gegen die Möglichkeit, dass bei der Analyse der γ H2AX-Foci in der S/G2-Population eine Subpopulation analysiert wurde. Vielmehr scheinen tatsächlich Zellen trotz einer massiv erhöhten γ H2AX-Foci-Zahl in der G2-Phase keinen G2/M-Arrest zu induzieren und mit dieser erhöhten Anzahl an DSBs in die Mitose zu progressieren.

Um den Einfluss der Teilung mit erhöhter γ H2AX-Foci-Zahl nach HU-Behandlung zu untersuchen, wurden im folgenden Experiment G1-Phase-Zellen analysiert, die sich zum Zeitpunkt der HU-Behandlung in der S-Phase befanden. Exponentiell wachsende Lungenkarzinomzellen wurden 48 h nach der Aussaat mit 5 μ M EdU markiert und für 24 h mit 0,5 mM HU behandelt. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeiten nach Ende der HU-Behandlung fixiert (6 h – 12 h) und gegen γ H2AX, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Die Zellen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop eingescannt und anhand ihres DNA-Gehalts (gemessen mittels der DAPI-Intensität) und der EdU-Intensität in die

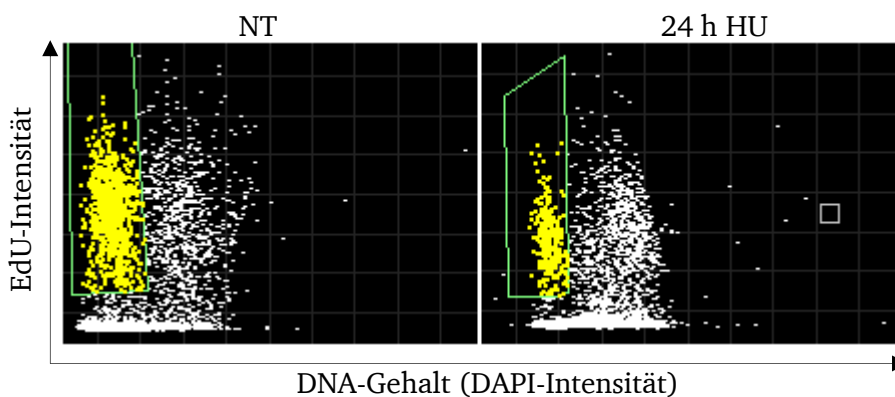


Abbildung 4.13: Darstellung exemplarischer Mikroskop-Scans zur spezifischen Auswahl von G1-Phase-Zellen

Exponentiell wachsende, humane Lungenkrebszellen (A549) wurden für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und anschließend für 24 h mit 0,5 mM Hydroxyurea behandelt (24 h HU) oder unbehandelt belassen (NT). Nach Ende der Behandlung wurden die Zellen fixiert und gegen EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Anschließend wurden die Zellen am Fluoreszenzmikroskop eingescannt und eine Auftragung der EdU-Intensität gegen die DAPI-Intensität erstellt. Gelb hervorgehoben sind die EdU-positiven G1-Phase-Zellen die für die Analyse der DSBs in der G1-Phase herangezogen wurden.

verschiedenen Zellzyklusphasen eingeteilt. In Abbildung 4.13 ist an einem Fluoreszenzmikroskop-Scan-Blot exemplarisch die Auswahl von unbehandelten (NT) und HU-behandelten (24 h HU) EdU-positiven G1-Phase-Zellen dargestellt. Es wurden pro Experiment 40 EdU-positive G1-Phase-Zellen

ausgewertet. Die G1-Phase-Zellen wurden ab 6 h nach Ende der HU-Behandlung ausgewertet, da die Analyse der Zellzyklusprogression ergab, dass zu diesem Zeitpunkt eine ausreichende Anzahl an EdU-positiven Zellen die G1-Phase erreicht hatte (Abbildung 4.9).

Die unbehandelten G1-Phase-Zellen zeigten ein niedriges Hintergrundlevel an γ H2AX-Foci, welches im Durchschnitt bei 2 γ H2AX-Foci pro Zelle lag (Abbildung 4.14 A). Die Anzahl an γ H2AX-Foci in HU-behandelten Zellen lag 6 h nach Ende der Behandlung bei 10 und schwankte im weiteren Verlauf der Reparaturzeit nur leicht um diesen Wert. In Abbildung 4.14 B ist exemplarisch eine HU-behandelte G1-Phase-Zelle dargestellt.

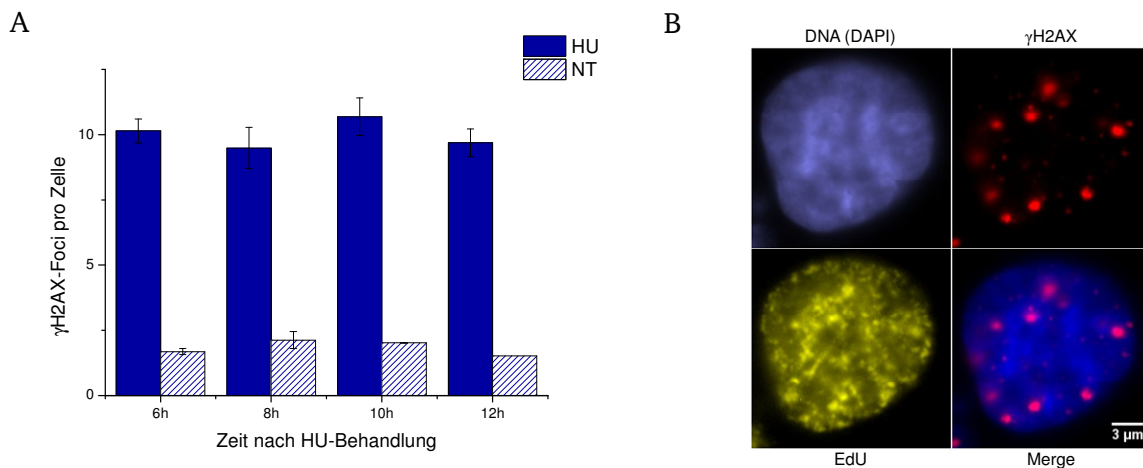


Abbildung 4.14: γ H2AX-Foci-Kinetik nach 24 h HU-Behandlung in G1-Phase-Zellen

Exponentiell wachsende, humane Lungenkrebszellen (A549) wurden 48 h nach der Aussaat für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und für 24 h mit 0,5 mM Hydroxyurea behandelt. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeiten fixiert (6 h – 12 h) und gegen γ H2AX, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Die Zellen wurden gescannt und anhand ihrer EdU- und DAPI-Intensität aufgetragen. Durch diese Auftragung konnten spezifisch EdU-positive G1-Phase-Zellen ausgewählt werden, von denen pro Experiment 40 ausgewertet wurden. (A) γ H2AX-Foci Kinetik in unbehandelten (NT) und HU-behandelten (HU) G1-Phase-Zellen. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert aus $n \geq 3$ Experimenten dar, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Mit dem *Students t-Test* konnte gezeigt werden, dass die HU-behandelten Zellen eine statistisch signifikant höhere Anzahl an γ H2AX-Foci aufwiesen als die unbehandelten Zellen. (alle Datenpunkte *** $p < 0,001$) (B) Exemplarische Immunfluoreszenzaufnahme einer EdU-positiven G1-Phase-Zelle nach 24 h HU-Behandlung, in der γ H2AX (rot), EdU (gelb) und die DNA (DAPI, blau) sowie eine Überlagerung von γ H2AX und der DNA (*Merge*) dargestellt sind. Der dargestellte Maßstabsbalken entspricht 3 μ m (Aufnahmen erfolgten mit 1000x Vergrößerung).

Die zuletzt beschriebenen Experimente machen deutlich, dass nach einer 24-stündigen HU-Behandlung tatsächlich Zellen mit einem deutlich erhöhten Level an γ H2AX-Foci in die Mitose und die G1-Phase gelangen. Die HU-behandelten Zellen heben demnach nicht aufgrund der vollständigen Reparatur den G2/M-Arrest auf sondern scheinen nicht in der Lage den Arrest lange genug aufrechtzuerhalten, um zu verhindern, dass Zellen mit einem massiv erhöhten γ H2AX-Foci-Level die Mitose und die G1-Phase erreichen. Da diese Situation für das Überleben sowie die genomische Integrität von Zellen kritisch ist, sollte im Folgenden untersucht werden, ob die bisher gemessenen γ H2AX-Foci tatsächlich DSBs

darstellen und als Chromatidbrüche nachgewiesen werden können. Hierfür wurden in der G2-Phase und der Mitose chromosomale Studien durchgeführt.

In diesen Studien wurde die Ausbildung von Chromatidbrüchen nach 24-stündiger HU-Behandlung untersucht. Für die Messung von Chromatidbrüchen wurden humane Zervixkarzinomzellen (HeLa) 48 h nach der Aussaat mit 5 μ M EdU markiert und für 24 h mit 0,5 mM HU versetzt. 7 h nach Ende dieser Behandlung wurden die Zellen für 1 h mit Calyculin A inkubiert. Calyculin A inhibiert Typ 1- und Typ 2A-Protein-Phosphatasen, was in der G2-Phase des Zellzyklus unter anderem zur Aktivierung des *mitosis-promoting factors* (MPF) und dadurch zu einer vorzeitigen Kondensation der Chromosomen führt (Alsbeih & Raaphorst, 1999; Gotoh, 1995). Nach der Inkubation mit Calyculin A wurden die Zellen fixiert und auf Objektträger getropft, um eine Spreitung der Chromosomen zu erreichen. Die Chromosomen wurden gegen EdU und die DNA (DAPI) gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Anschließend wurden die Chromosomen-Spreitungen mit 70 % Ethanol entfärbt, mit Giemsa gefärbt und erneut aufgenommen. Diese Doppelfärbung wurde durchgeführt, um zwischen

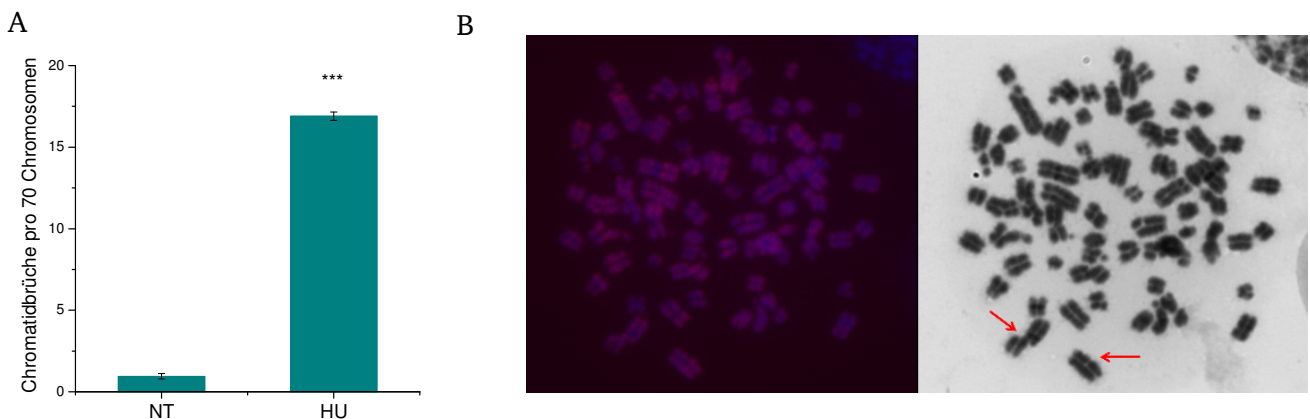


Abbildung 4.15: Chromatidbrüche nach 24 h HU-Behandlung in G2-Phase-Zellen

Exponentiell wachsende, humane Zervixkarzinomzellen (HeLa) wurden 48 h nach der Aussaat mit 5 μ M EdU markiert und für 24 h mit 0,5 mM Hydroxyurea behandelt. 7 h nach Ende der Behandlung wurden die Zellen für 1 h mit Calyculin A versetzt, um eine vorzeitige Kondensation der G2-Phase-Chromosomen zu erreichen. Anschließend wurden die Zellen fixiert, auf Objektträger getropft und gegen EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Nachdem die so gefärbten Zellen aufgenommen waren, wurden die Chromosomen entfärbt, mit Giemsa gefärbt und erneut aufgenommen. (A) Chromatidbrüche in unbehandelten (NT) und HU-behandelten (HU) G2-Phase-Zellen. Die Brüchen wurden auf 70 Chromosomen pro Chromosomenspreitung normiert. Es wurden pro Experiment 40 EdU-positive Chromosomen-Spreitungen ausgewertet. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert aus n=6 Experimenten dar, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die statistische Signifikanz wurde mit dem *Students t-Test* berechnet. *** $p < 0,001$ (B) Exemplarische Aufnahmen einer Chromosomenspreitung in der G2-Phase nach 24 h HU-Behandlung (630x Vergrößerung). Die linke Abbildung zeigt die Überlagerung der EdU- und DAPI-Färbung, die rechte die Giemsa-Färbung. Die roten Pfeile in der Giemsa-Darstellung markieren beispielhaft zwei Chromatidbrüche.

EdU-negativen und EdU-positiven Chromosomen-Spreitungen unterscheiden zu können. Pro Experiment wurden 40 EdU-positive Chromosomen-Spreitungen ausgewertet und die Anzahl der Chromatidbrüche auf 70 Chromosomen normiert.

Unbehandelte G2-Phase-Zellen zeigten 0,9 Chromatidbrüche pro 70 Chromosomen (Abbildung 4.15 A). Dieser Wert wurde durch eine 24-stündige HU-Behandlung auf 17 Chromatidbrüche erhöht. Der Unterschied zwischen unbehandelten und HU-behandelten Zellen war statistisch hoch signifikant. Abbildung 4.15 B zeigt beispielhaft die Chromosomen-Spreitung einer G2-Phase-Zelle, links die Überlagerung der DAPI- und EdU-Färbung, rechts die Giemsa-Färbung. In der Giemsa-Färbung sind zur Veranschaulichung 2 Chromatidbrüche mit roten Pfeilen markiert.

Für die Untersuchung der Chromatidbrüche in der ersten Metaphase nach Ende der 24-stündigen HU-Behandlung wurden humane Zervixkarzinomzellen (HeLa) 48 h nach der Aussaat mit $5\ \mu\text{M}$ EdU behandelt. Anschließend wurden die Zellen für 24 h mit $0,5\ \text{mM}$ HU versetzt und 7 h nach Ende dieser Behandlung für 3 h mit Colcemid inkubiert. Colcemid ist ein pflanzliches Gift, welches die Ausbildung des Spindelapparats in mitotischen Zellen unterbindet und dadurch zu einer Akkumulation von Zellen in der Metaphase führt. Nach der Inkubation mit Colcemid wurden die Zellen fixiert und auf

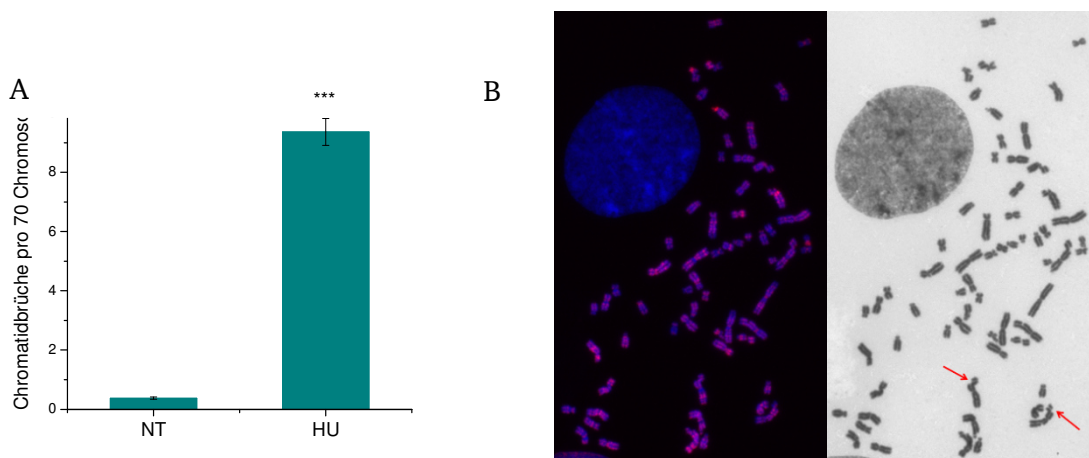


Abbildung 4.16: Chromatidbrüche nach 24 h HU-Behandlung in mitotischen Zervixkarzinomzellen

Exponentiell wachsende, humane Zervixkarzinomzellen (HeLa) wurden 48 h nach der Aussaat mit $5\ \mu\text{M}$ EdU markiert und für 24 h mit $0,5\ \text{mM}$ Hydroxyurea behandelt. 7 h nach Ende der Behandlung wurden die Zellen für 3 h mit Colcemid versetzt, um mitotische Zellen anzureichern. Anschließend wurden sie fixiert, auf Objektträger getropft und gegen EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Nachdem diese Färbung aufgenommen war, wurden die Chromosomen entfärbt, mit Giemsa gefärbt und erneut aufgenommen. (A) Chromatidbrüche in unbehandelten (NT) und HU-behandelten (HU) Zellen, normiert auf 70 Chromosomen pro Metaphase. Es wurden pro Experiment 40 EdU-positive Metaphasen ausgewertet. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert aus $n=3$ Experimenten dar, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die statistische Signifikanz wurde mit dem *Students t-Test* berechnet. *** $p < 0,001$ (B) Exemplarische Aufnahmen einer EdU-positiven Metaphasen-Spreitung nach 24 h HU-Behandlung (630x Vergrößerung). Die linke Abbildung zeigt die Überlagerung der EdU- und DAPI-Färbung, die rechte die Giemsa-Färbung. Die roten Pfeile in der Giemsa-Darstellung markieren beispielhaft zwei Chromatidbrüche.

Objektträger getropft, um eine Spreitung der Chromosomen zu erreichen. Die Chromosomen wurden gegen EdU und die DNA (DAPI) gefärbt, aufgenommen, mit 70 % Ethanol entfärbt, mit Giemsa gefärbt und erneut aufgenommen. Pro Experiment wurden 40 EdU-positive Metaphasen ausgewertet und die Anzahl der Chromatidbrüche auf 70 Chromosomen normiert.

Durch eine 24-stündige HU-Behandlung wurde die Anzahl an Chromatidbrüchen in mitotischen HeLa-Zellen von 0,4 auf 9 pro 70 Chromosomen erhöht (Abbildung 4.16 A). Dieser Anstieg war statistisch hoch signifikant. In Abbildung 4.16 B ist links die Überlagerung der DAPI- und EdU-Färbung dargestellt, rechts die Giemsa-Färbung. In letzterer markieren die roten Pfeile beispielhaft zwei Chromatidbrüche.

Anhand der chromosomalen Studien konnte gezeigt werden, dass sich die durch γ H2AX- und 53BP1-Foci gekennzeichneten DSBs auch in Form von Chromatidbrüchen widerspiegeln. Dieses Ergebnis wirft erneut die Frage auf, warum G2-Phase-Zellen mit einer deutlich erhöhten Anzahl an DSBs keinen G2/M-Arrest induzieren. Es wäre möglich, dass die initial induzierten DSBs repariert werden, dass es aber über sekundäre Mechanismen auch noch nach Ende der HU-Behandlung zur Ausbildung weiterer Schäden kommt, wodurch eine stattfindende Reparatur überlagert werden würde. Die erstellten γ H2AX-Foci-Kinetiken würden somit ein Gleichgewicht zwischen DSB-Induktion und -Reparatur widerspiegeln. Da für eine Behandlung mit dem S-Phase-interagierenden Agens MMS bereits gezeigt wurde, dass es auch nach dem Ende der Behandlung weiterhin zur Induktion von DSBs kommt (Nikolova et al, 2010), wurde im Folgenden untersucht, ob durch die lange Arretierung der Replikationsgabeln auch noch nach Ende der HU-Behandlung DNA-Schäden induziert werden.

4.2.2.1. Analyse der Induktion sekundärer DSBs nach HU-Behandlung

In der Literatur wurde bereits mehrfach die Rolle der beiden Hauptreparaturwege homologe Rekombination (HR) und nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) bei der Reparatur von HU-induzierten DSBs diskutiert. NHEJ-Mutanten zeigen in Überlebensexperimenten eine leichte Sensitivität gegenüber einer HU-Behandlung (Lundin et al, 2002; Saintigny et al, 2001), während die Wirkung auf das Überleben von HR-Mutanten sehr groß ist (Lundin et al, 2002; Saintigny et al, 2001; Sorensen et al, 2005). Außerdem wurde gezeigt, dass die Anzahl an Zellen mit Rad51-Foci nach HU-Behandlung deutlich erhöht ist (Petermann et al, 2010a; Saintigny et al, 2001). Rad51 ist ein Schlüsselprotein der HR und daher ein guter Marker für diesen Reparaturweg. Aufgrund der in den genannten Veröffentlichungen beschriebenen deutlichen Beteiligung der HR an der Reparatur HU-induzierter DSBs wurde dieser Reparaturweg inhibiert und es wurde analysiert, ob nach Ende der HU-Behandlung weiterhin neue DSBs induziert werden. Da neben Rad51 auch BRCA2 zu den essentiellen Proteinen im HR-Reparaturweg gehört (Moynahan et al, 2001; Xia et al, 2001), wurde im folgenden

Experiment BRCA2 durch siRNA-Behandlung depletiert und anschließend die Reparatur mittels γ H2AX-Foci analysiert.

Für dieses Experiment wurden humane Lungenkrebszellen (A549) direkt nach der Aussaat mit BRCA2- bzw. Kontroll-siRNA behandelt, 48 h später für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und für 24 h mit 0,5 mM HU behandelt. Anschließend wurden die Zellen nach unterschiedlichen Reparaturzeiten (0 h – 10 h) geerntet und gegen γ H2AX, Rad51, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. BRCA2 ist essentiell für die Rekrutierung von Rad51 an einen DSB, daher werden ohne BRCA2 keine Rad51-Foci gebildet (Tarsounas et al, 2002; Yuan et al, 1999). Aus diesem Grund wurde die Färbung gegen Rad51 genutzt, um den BRCA2-*knockdown* zu überprüfen. Es wurden pro Experiment 40 Zellen ausgewertet, die EdU-positiv und gleichzeitig Rad51-negativ waren.

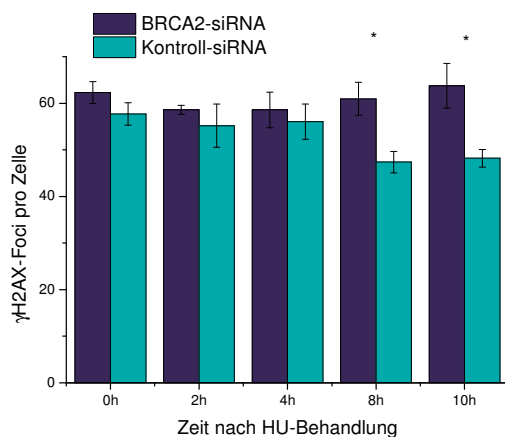


Abbildung 4.17: γ H2AX-Reparaturkinetik nach 24 h HU-Behandlung in A549-Zellen nach BRCA2-Depletion

Exponentiell wachsende, humane Lungenkrebszellen (A549) wurden direkt nach der Aussaat mit BRCA2- bzw. Kontroll-siRNA behandelt. Die Zellen wurden 48 h später für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und für 24 h mit 0,5 mM Hydroxyurea behandelt. Die Zellen wurden nach der HU-Zugabe mit BRCA2- bzw. Kontroll-siRNA nachtransfiziert, um während des Behandlungs- und des Reparaturzeitraums eine effiziente BRCA2-Depletion zu gewährleisten. Nach Ende der Behandlung wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeiten fixiert (0 h – 10 h) und gegen γ H2AX, Rad51, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Es wurden pro Experiment 40 EdU-positive, Rad51-negative Zellen ausgewertet. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert aus n=4 Experimenten dar, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die statistische Signifikanz wurde mit dem *Students t-Test* berechnet. * p<0,05

Die mit BRCA2-siRNA behandelten Zellen wiesen direkt nach Ende der HU-Behandlung 62 γ H2AX-Foci pro Zelle auf (Abbildung 4.17). Während der 10-stündigen Reparaturzeit schwankte die Anzahl der γ H2AX-Foci in den mit BRCA2-siRNA behandelten Zellen zwar leicht, es konnte jedoch keine Abnahme detektiert werden. Die Kontroll-siRNA-behandelten Zellen zeigten im Gegensatz dazu eine Reduktion der γ H2AX-Foci von 58 auf 48 im Laufe der Reparaturzeit. 8 h und 10 h nach Ende der HU-Behandlung zeigte sich eine statistisch signifikante Erhöhung der γ H2AX-Foci-Zahl in BRCA2-siRNA-behandelten Zellen im Gegensatz zu den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen.

Die Ergebnisse zeigen nicht nur, dass nach HU-Behandlung nur eine geringe Zahl an DSBs repariert wird, sie verdeutlichen zudem, dass nach der HU-Behandlung keine weiteren DSBs induziert werden, da sich dies in einem Anstieg der γ H2AX-Foci-Zahl in BRCA2-depletierten Zellen widerspiegelt hätte. Die geringe Abnahme der γ H2AX-Foci während der S/G2-Phase ist also nicht auf eine Überlagerung der DSB-Reparatur durch Induktion neuer DSBs zurückzuführen, sondern tatsächlich auf die ineffiziente Reparatur der HU-induzierten DSBs.

Um dieses Ergebnis mit einer weiteren Methode zu überprüfen, wurden abgeschlossene HR-Reparaturereignisse in Form von Schwesterchromatidaustauschen (SCEs) gemessen. Während der homologen Rekombination wird eine doppelte *holliday junction* ausgebildet, bei deren Auflösung es zur Induktion eines SCEs kommen kann. Ob ein SCE ausgebildet wird oder nicht, ist davon abhängig, wie die doppelte *holliday junction* geschnitten wird (Orr-Weaver & Szostak, 1983; Szostak et al, 1983; Wilson III & Thompson, 2007). Würden viele DSBs repariert werden und die hohe Anzahl an γ H2AX-Foci wäre auf die Induktion neuer DSBs zurückzuführen, würde man einen deutlichen Anstieg der SCEs erwarten.

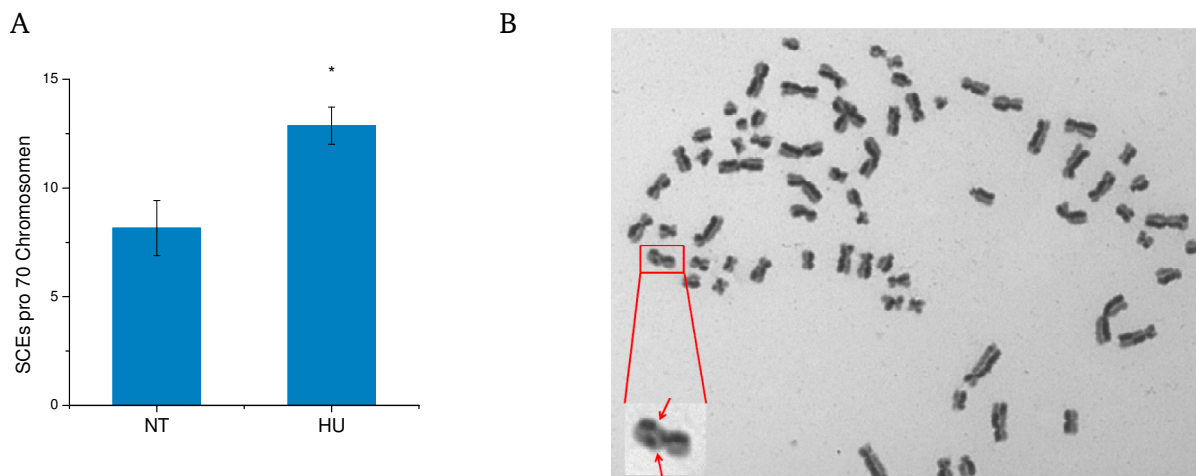


Abbildung 4.18: Schwesterchromatidaustausche nach 24 h HU-Behandlung

Exponentiell wachsende, humane Zervixkarzinomzellen (HeLa) wurden direkt nach der Aussaat mit $10 \mu\text{M}$ BrdU und 48 h später für 24 h mit $0,5 \text{ mM}$ Hydroxyurea behandelt. 7 h nach Ende der Behandlung wurden die Zellen für 3 h mit Colcemid versetzt, um mitotische Zellen anzureichern. Anschließend wurden sie fixiert, auf Objektträger getropft und FPG-gefärbt. (A) Schwesterchromatidaustausche (SCEs) in unbehandelten (NT) und HU-behandelten (HU) Zellen, normiert auf 70 Chromosomen pro Metaphase. Es wurden pro Experiment 40 Metaphasen ausgewertet. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert aus $n=2$ Experimenten dar, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die statistische Signifikanz wurde mit dem *Students t-Test* berechnet. * $p < 0,05$ (B) Exemplarische Aufnahme einer Metaphasen-Spreitung nach 24 h HU-Behandlung ($630\times$ Vergrößerung). Ein Chromosom wurde vergrößert dargestellt, die roten Pfeile markieren beispielhaft SCEs.

Im folgenden Experiment wurde daher die SCE-Ausbildung nach 24-stündiger HU-Behandlung untersucht. Humane Zervixkarzinomzellen (HeLa) wurden direkt nach der Aussaat für 2 Zellzyklen (48 h) mit $10 \mu\text{M}$ BrdU behandelt. Dann wurden die Zellen für 24 h mit $0,5 \text{ mM}$ HU versetzt, 7 h nach Ende dieser Behandlung wurden die Zellen für 3 h mit Colcemid inkubiert. Nach der Inkubation mit

Colcemid wurden die Zellen fixiert und auf Objektträger getropft, um eine Spreitung der Chromosomen zu erreichen. Die SCEs wurden mit einer Fluoreszenz-plus-Giemsa (FPG) Färbung angefärbt. Pro Experiment wurden 40 Metaphasen ausgewertet und die Anzahl der SCEs auf 70 Chromosomen normiert.

In unbehandelten Zellen (NT) wurden 8 SCEs pro 70 Chromosomen detektiert, dieser Wert wurde durch eine 24-stündige HU-Behandlung auf 13 erhöht (Abbildung 4.18 A). Der Unterschied zwischen unbehandelten und HU-behandelten Zellen ist statistisch signifikant. Abbildung 4.18 B zeigt eine exemplarische Metaphasen-Spreitung nach 24 h HU-Behandlung, eingefügt ist die Vergrößerung eines Chromosoms welches 2 SCEs enthält. Die roten Pfeile markieren beispielhaft diese SCEs.

Die Anzahl der SCEs nimmt nach HU-Behandlung leicht zu, was auf die kaum stattfindende Reparatur in der S/G2-Phase zurückzuführen ist. Würde die sekundäre Induktion neuer DSBs die Reparatur der initialen DSBs überlagern, würde man eine deutliche Zunahme der SCE-Anzahl erwarten. Daher belegt auch dieses Ergebnis, dass nach Ende der HU-Behandlung keine weiteren DSBs durch sekundäre Mechanismen entstehen, sondern dass die langsame Abnahme der DSBs nach HU-Behandlung auf eine ineffiziente Reparatur zurückzuführen ist.

Die in diesem Kapitel gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass HU-behandelte Zellen trotz hoher Zahlen an γ H2AX-Foci und Chromatidbrüchen nicht in der Lage sind einen G2/M-Arrest zu induzieren. Da die Teilung mit DSBs zu genomischer Instabilität und dadurch zur Induktion von Krankheiten wie Krebs führen kann, besitzen Zellen Mechanismen, um sich davor zu schützen. Warum diese nach einer HU-Behandlung nicht aktiviert werden, kann mehrere Gründe haben. Zum Einen könnte die lange Zeit der Behandlung (24 h) dazu führen, dass die Zellen die Möglichkeit zur Induktion eines Zellzyklusarrests verlieren. Zum Anderen könnte der ausbleibende Zellzyklusarrest auf die von einer HU-Behandlung induzierte, möglicherweise gestörte DNA-Schadenssignalkaskade zurückzuführen sein. Um zu überprüfen, ob die HU-behandelten Zellen die Möglichkeit zur Induktion eines G2/M-Arrests verlieren, wurde im Folgenden untersucht, ob Behandlungen, für die eine starke Aktivierung der Zellzykluskontrolle beschrieben wurde (Bestrahlung oder Behandlung mit MMS), auch nach einer HU-Behandlung zur Induktion eines G2/M-Arrests führen.

4.2.3. Untersuchung der *Checkpoint*-Profizienz HU-behandelter Zellen

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob Zellen auch nach einer 24-stündigen HU-Behandlung noch die Fähigkeit besitzen einen Zellzyklusarrest zu induzieren. Für diese Untersuchung wurden zwei verschiedene Versuchsansätze gewählt. Im ersten wurden Zellen zunächst für 24 h mit 0,5 mM HU behandelt und direkt im Anschluss daran mit 5 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt. Im zweiten

Versuchsansatz wurde die HU-Behandlung mit einer Methylmethansulfonat-Behandlung (MMS) kombiniert. Es konnte bereits in einer früheren Veröffentlichung gezeigt werden, dass eine 1-stündige Behandlung mit 1,5 mM MMS zur Induktion eines lang anhaltenden G2/M-Arrests führt (Nikolova et al, 2010). Um zu analysieren, ob der durch ein S-Phase-schädigendes Agens induzierte G2/M-Arrest durch eine HU-Behandlung verhindert werden kann, wurden die Zellen zunächst für 24 h mit 0,5 mM HU behandelt und direkt im Anschluss für 1 h mit 1,5 mM MMS.

Humane Lungentumorzellen (A549) wurden 48 h nach der Aussaat für 1 h mit 10 μ M BrdU markiert. Nach der Markierung wurden die Zellen nicht behandelt (NT), für 24 h mit 0,5 mM HU behandelt (HU), mit 5 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt (IR) oder für 24 h mit 0,5 mM HU behandelt und direkt im Anschluss mit 5 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt (HU+IR). Nach Ende der jeweiligen Behandlung wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeiten fixiert (0 h – 24 h) und gegen BrdU und die DNA (PI) gefärbt. Es wurden in einer zweidimensionalen FACS-Analyse pro Probe 15.000 Zellen analysiert. Die BrdU-positiven Zellen wurden aufgrund ihres DNA-Gehalts in S-, G2- und G1-Phase-Zellen unterteilt. Zur Vereinfachung wird die Behandlung mit HU und Röntgenbestrahlung zusammen im Folgenden als „kombinierte Behandlung“ bezeichnet.

Zu Beginn der Messung waren 94 % der unbehandelten A549-Zellen in der S-Phase, innerhalb von 10 h sank dieser Anteil kontinuierlich ab (Abbildung 4.19 A). Der Anteil der unbehandelten Zellen in der G2-Phase nahm bis auf 30 % nach 6 h zu und verringerte sich anschließend wieder (Abbildung 4.19 B). Die ersten unbehandelten Zellen erreichten nach 4 h die G1-Phase, nach 12 h befanden sich 78 % der Zellen in der G1-Phase (Abbildung 4.19 C).

HU-behandelte Zellen zeigten, wie bereits zuvor beschrieben, einen ähnlichen Verlauf wie die unbehandelten Zellen. Der Anteil der Zellen in der S-Phase nahm innerhalb von 10 h nach Ende der HU-Behandlung kontinuierlich ab (Abbildung 4.19 A). Zum 0 h Zeitpunkt waren 6 % der HU-behandelten Zellen in der G2-Phase, dieser Anteil nahm innerhalb von 6 h deutlich zu, um dann rasch abzufallen (Abbildung 4.19 B). Die ersten HU-behandelten Zellen erreichten bereits nach 2 h die G1-Phase und nach 12 h befanden sich 62 % der BrdU-positiven Zellen in der G1-Phase (Abbildung 4.19 C). Die mit Röntgenstrahlung behandelten Zellen verließen die S-Phase rasch und nach 12 h befanden sich nur noch 12 % dort (Abbildung 4.19 A). In der G2-Phase akkumulierten die bestrahlten Zellen innerhalb der ersten 10 h und die G2-Population erreichte einen Anteil von 76 %. Anschließend verließen die Zellen rasch die G2-Phase (Abbildung 4.19 B). Die ersten bestrahlten Zellen erreichten nach 6 h die G1-Phase, ein wirklicher Anstieg der G1-Population erfolgte aber erst 12 h nach der Bestrahlung (Abbildung 4.19 C). Danach nahm der Anteil der bestrahlten G1-Phase-Zellen kontinuierlich zu und nach 24 h befanden sich 70 % der Zellen in der G1-Phase. Nach der kombinierten Behandlung aus HU und Röntgenbestrahlung befanden sich 90 % der Zellen in der S-

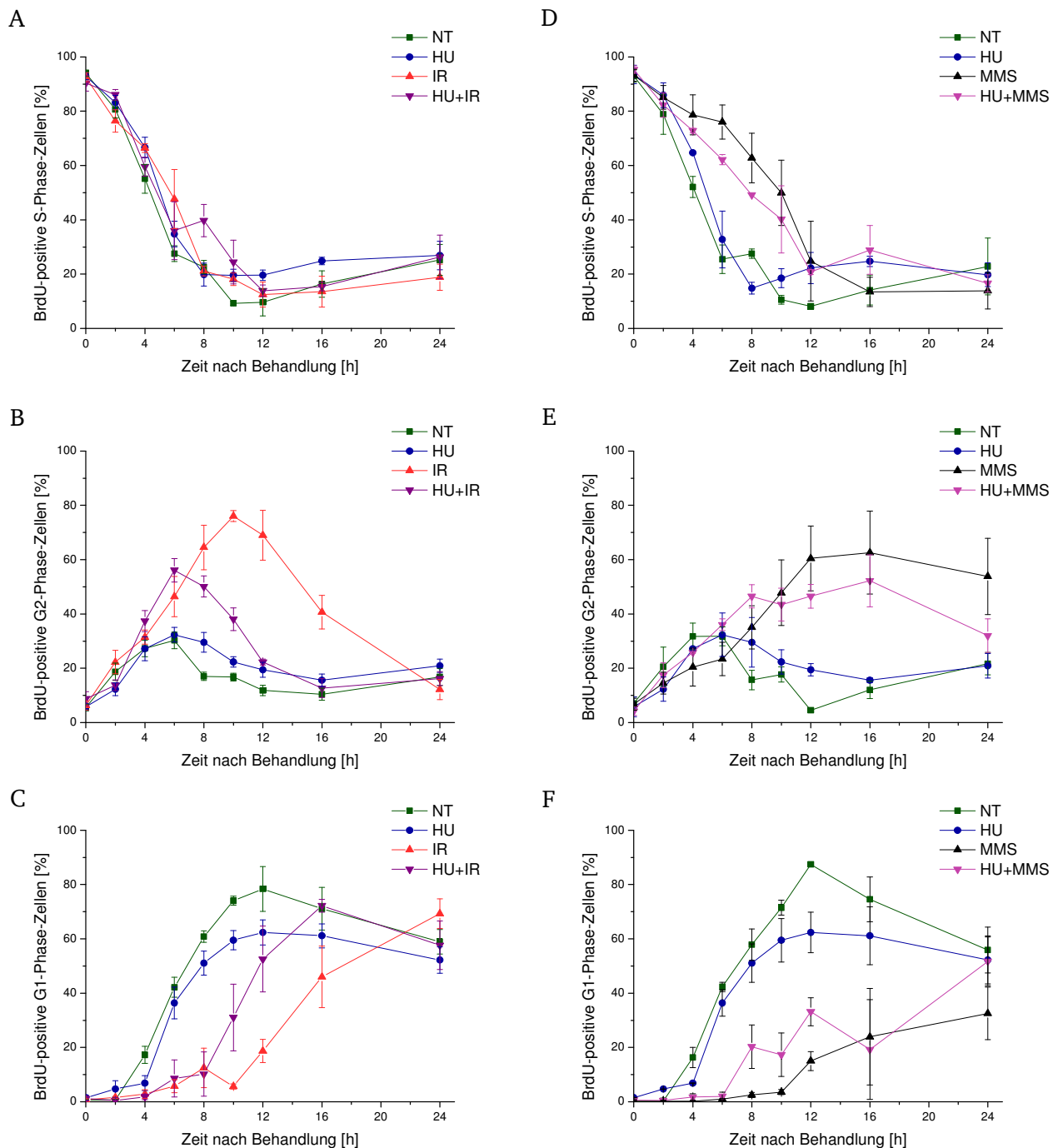


Abbildung 4.19: Zellzyklusverhalten nach HU-Behandlung, Röntgenbestrahlung, MMS-Behandlung sowie einer kombinierten Behandlung aus HU und Röntgenbestrahlung oder aus HU- und MMS-Behandlung

(A – C) Exponentiell wachsende, humane Lungentumorzellen (A549) wurden 48 h nach der Aussaat für 1 h mit 10 μ M BrdU markiert und anschließend entweder nicht behandelt (NT), für 24 h mit 0,5 mM HU behandelt (HU), mit 5 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt (IR) oder zunächst für 24 h mit 0,5 mM HU behandelt und direkt im Anschluss mit 5 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt (HU+IR). (D – F) Exponentiell wachsende, humane Lungentumorzellen (A549) wurden 48 h nach der Aussaat für 1 h mit 10 μ M BrdU markiert und anschließend entweder nicht behandelt (NT), für 24 h mit 0,5 mM HU behandelt (HU), für 1 h mit 1,5 mM MMS behandelt (MMS) oder zunächst für 24 h mit 0,5 mM HU behandelt und direkt im Anschluss für 1 h mit 1,5 mM MMS behandelt (HU+MMS). Nach Ende der Behandlung wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeiten fixiert (0 h – 24 h) und gegen BrdU und die DNA (PI) gefärbt. Es wurde eine zweidimensionale FACS-Analyse durchgeführt, bei der pro Zeitpunkt 15.000 Zellen vermessen wurden. Es wurden nur BrdU-positive Zellen in die Auswertung aufgenommen. (A) + (D) Zeigen den Anteil der BrdU-positiven S-Phase-Population, (B) + (E) der BrdU-positiven G2-Phase-Population und (C) + (F) der

BrdU-positiven G1-Phase-Population an der gesamten BrdU-positiven Zellpopulation. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert aus n=4 (A – C) bzw. n=3 (D – F) Experimenten dar. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an.

Phase (Abbildung 4.19 A). Der S-Phase-Anteil nahm bis auf 14 % nach 12 h ab. Der Anteil der G2-Phase-Zellen an der Gesamtpopulation nahm während des Beobachtungszeitraums kontinuierlich zu und erreichte nach 8 h mit 50 % ihren Höchstwert (Abbildung 4.19 B). Nach 16 h hatte der Anteil der G2-Phase-Zellen auf 13 % abgenommen. 6 h nach Ende der kombinierten Behandlung befanden sich 9 % der Zellen in der G1-Phase, dieser Anteil nahm im Folgenden rasch zu (Abbildung 4.19 C).

Für die Kombination einer HU- mit einer MMS-Behandlung wurden humane Lungentumorzellen (A549) 48 h nach der Aussaat für 1 h mit 10 μ M BrdU markiert. Nach der Markierung wurden die Zellen nicht behandelt (NT), für 24 h mit 0,5 mM HU behandelt (HU), für 1 h mit 1,5 mM MMS behandelt (MMS) oder für 24 h mit 0,5 mM HU behandelt und direkt im Anschluss für 1 h mit 1,5 mM MMS behandelt (HU+MMS). Nach Ende der jeweiligen Behandlung wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeiten fixiert (0 h – 24 h) und gegen BrdU und die DNA (PI) gefärbt. Es wurden in einer zweidimensionalen FACS-Analyse pro Probe 15.000 Zellen gemessen. Die BrdU-positiven Zellen wurden aufgrund ihres DNA-Gehalts in S-, G2- und G1-Phase-Zellen unterteilt.

Unbehandelte und HU-behandelte Zellen zeigten auch in diesem Experiment den bereits beschriebenen, einander sehr ähnlichen Verlauf, bei dem sie 4 h nach Ende der Behandlung die G1-Phase erreichten (Abbildung 4.19 D – F). Nach einer MMS-Behandlung zeigten die Zellen eine Verzögerung in der S-Phase und anschließend eine Akkumulation in der G2-Phase (Abbildung 4.19 D + E). Nach 12 h erreichten die ersten MMS-behandelten Zellen die G1-Phase, im weiteren Verlauf der Analyse stieg der G1-Phase-Anteil kontinuierlich an (Abbildung 4.19 F). Nach einer Kombination der HU- mit der MMS-Behandlung zeigten die Zellen ähnlich wie die nur mit MMS-behandelten Zellen eine Verzögerung in der S-Phase und eine Akkumulation in der G2-Phase (Abbildung 4.19 D + E). Der Arrest der G2-Phase-Population wurde nach HU- und MMS-Behandlung etwas früher aufgehoben als nach der reinen MMS-Behandlung, was dazu führte, dass die ersten Zellen nach 8 h die G1-Phase erreichten (Abbildung 4.19 F).

Die mit 5 Gy bestrahlten Zellen zeigten die erwartete Induktion eines G2/M-Arrests, während sich die HU-behandelten Zellen auch in diesem Experiment sehr ähnlich zu den unbehandelten Zellen verhielten. Nach einer kombinierten Behandlung aus HU und Röntgenbestrahlung wurde dagegen ein G2/M-Arrest induziert. Auch die Behandlung mit MMS sowie die Kombination aus MMS- und HU-Behandlung führten zur Induktion eines G2/M-Arrests. Dies zeigt, dass Zellen nicht aufgrund der langen HU-Behandlung die Möglichkeit zur Induktion eines G2/M-Arrests verlieren. Allerdings wird sowohl bei der Kombination aus HU-Behandlung und Bestrahlung sowie bei der Kombination aus HU- und MMS-Behandlung der G2/M-Arrest früher aufgehoben als bei den Zellen, die nur bestrahlt bzw.

nur mit MMS behandelt wurden. Dieses Verhalten deutet auf eine Einschränkung der Aufrechterhaltung des G2/M-Arrests nach HU-Behandlung hin. Diese Einschränkung könnte auf Probleme in der *Checkpoint*-Signalkaskade zurückzuführen sein, die durch die lange HU-Behandlung ausgelöst wurden. Um dieses Phänomen genauer zu untersuchen, wurden im Folgenden biochemische Analysen einiger an der Signalkaskade beteiligter Proteine durchgeführt.

4.2.3.1. Untersuchung der HU-induzierten Zellzyklusarrest-Signalkaskade

Nach der Induktion von DSBs kommt es in einer Zelle zur Aktivierung unterschiedlicher Mechanismen, dazu gehören sowohl die Aktivierung von Reparaturprozessen als auch die Induktion eines Zellzyklusarrests. Letztere variiert je nachdem in welcher Zellzyklusphase sich die geschädigte Zelle befindet, sowie aufgrund der Anzahl und der Art der Schäden. Unresektierte, zweiendige DSBs aktivieren ATM, was zur Phosphorylierung von Chk2 am Threonin 68 führt, welches für die Aktivierung eines Zellzyklusarrests nötig ist (Matsuoka et al, 1998; Matsuoka et al, 2000; Shibata et al, 2010). Einendige Brüche, wie sie nach HU-Behandlung auftreten, liegen oft resektiert vor. Die durch die Resektion entstandenen, einzelsträngigen DNA-Bereiche werden vom Replikationsprotein A (RPA) gebunden und dadurch stabilisiert (Fairman & Stillman, 1988; Wold & Kelly, 1988). RPA wird an der einzelsträngigen DNA phosphoryliert (Shiotani & Zou, 2009) und ist wichtig für die Aktivierung von ATR (Liu et al, 2011; Zou & Elledge, 2003). Nach der Aktivierung phosphoryliert ATR Chk1 am Serin 345 (Lopez-Girona et al, 2001; Shechter et al, 2004b; Sorensen & Syljuasen, 2012; Zachos et al, 2003) und initiiert über diesen Weg eine Zellzyklusarrest-Signalkaskade (Peng et al, 1997; Sanchez et al, 1997). Um eine mögliche Störung der nach HU-Behandlung induzierten Signalkaskade zu untersuchen, wurden im Folgenden biochemische Proteinanalysen nach HU-Behandlung durchgeführt und mit der nach Röntgenbestrahlung induzierten Signalkaskade verglichen.

Humane Lungenkrebszellen (A549) wurden 48 h nach der Aussaat für 24 h mit 0,5 mM HU behandelt oder mit 5 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt. Die Zellen wurden nach unterschiedlichen Zeiten fixiert (0 h – 8 h) und Gesamtzellextrakte hergestellt. Es wurden 80 µg Gesamtprotein mit einer *SDS-Page* aufgetrennt, die Proteine auf eine Membran übertragen und mit Antikörpern gegen pChk1 (Ser345), pChk2 (Thr68), pRPA (Ser4/Ser8), RPA, γH2AX (Ser139) und GAPDH inkubiert. Die Detektion der Banden erfolgte mittels eines Chemilumineszenz-Kits.

Phosphoryliertes Chk1 (pChk1) und phosphoryliertes RPA (pRPA), die infolge einer DNA-Schädigung auftreten waren in unbehandelten Kontrollzellen (NT) nicht nachweisbar (Abbildung 4.20 A). Bei beiden Proteinen konnte hingegen ein hohes Level ihrer phosphorylierten Form in den ersten 4 h nach HU-Behandlung detektiert werden, anschließend nahm das Signal der beiden Proteine ab (24 h HU). Nach Röntgenbestrahlung wurden beide Proteine nur in geringem Ausmaß nachgewiesen (5 Gy IR), allerdings nahm das pChk1-Signal nach Bestrahlung mit der Zeit leicht zu. Das pRPA-Signal war in den ersten 2 h nach Bestrahlung nicht detektierbar, danach nahm es langsam zu. Das γH2AX-Signal wurde

bei der längeren Belichtungszeit (mit * markiert) in unbehandelten Kontrollzellen schwach nachgewiesen. Nach 24 h 0,5 mM HU und nach 5 Gy IR war das γ H2AX-Signal etwa gleich stark. Nach HU-Behandlung blieb das Signal bis 8 h nach Ende der Behandlung auf dem gleichen Niveau, nach Röntgenbestrahlung nahm das Signal ab und war 8 h später nur noch knapp über Hintergrundniveau. Die GAPDH- und RPA-Signale dienten als Ladekontrollen.

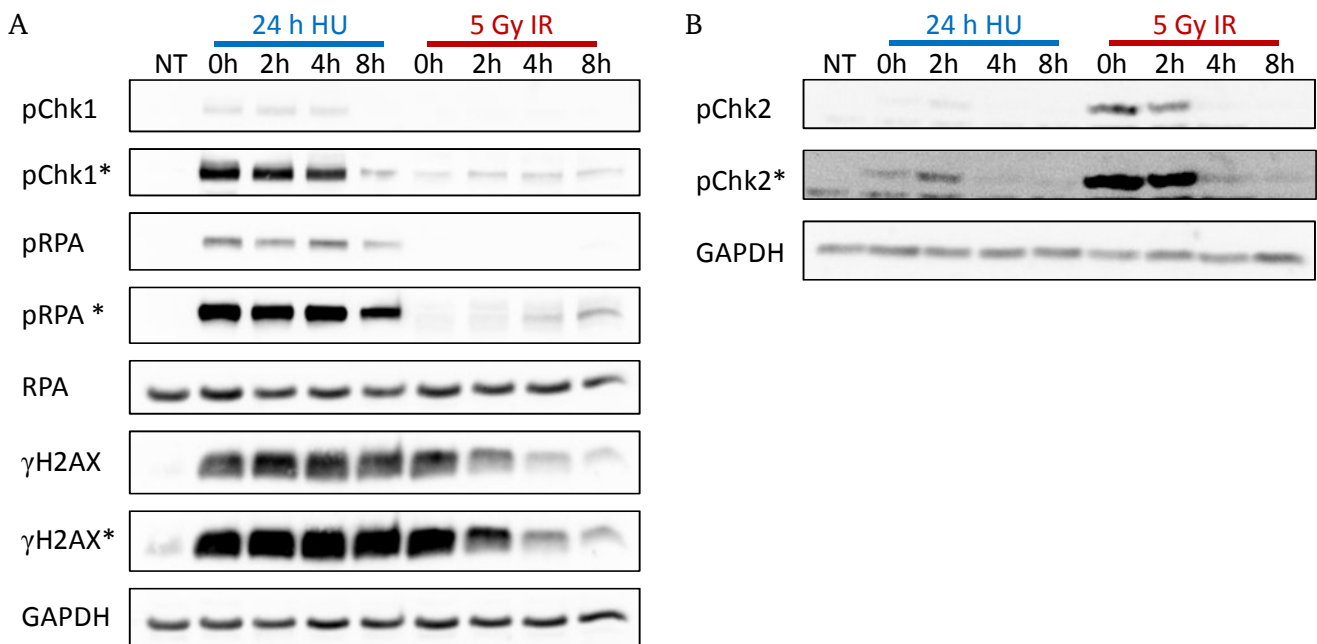


Abbildung 4.20: Biochemische Analyse von *Checkpoint*-Proteinen in HU-behandelten und bestrahlten Tumorzellen

Exponentiell wachsende, humane Lungentumorzellen (A549) wurden 48 h nach ihrer Aussaat für 24 h mit 0,5 mM HU behandelt (HU) oder mit 5 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt (IR). Zusätzlich wurde eine unbehandelte Kontrolle (NT) mitgeführt. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeiten fixiert (0 h – 8 h) und mit Ultraschall aufgeschlossen. Es wurden 80 μ g Gesamtprotein mittels einer *SDS-Page* aufgetrennt, mit Hilfe eines Western Blots auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und mit Antikörper gegen (A) pChk1 (Ser345), pRPA (Ser4/Ser8), RPA, γ H2AX (Ser139) und GAPDH bzw. (B) pChk2 (Thr68) und GAPDH inkubiert. Die Detektion der Banden erfolgte mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Kits. GAPDH und RPA dienten als Ladekontrollen. Die mit * markierten Banden wurden nach einer längeren Belichtungszeit aufgenommen.

In einer weiteren biochemischen Analyse wurde das Signal der phosphorylierten Checkpointkinase 2 (pChk2) nach HU-Behandlung bzw. Röntgenbestrahlung verglichen. Das pChk2-Signal war in unbehandelten Kontrollzellen (NT) nicht nachweisbar (Abbildung 4.20 B). In den ersten 2 h nach 5 Gy Röntgenstrahlung (0 h) wurde ein starkes pChk2-Signal detektiert, anschließend nahm die Signalstärke rapide ab. Nach HU-Behandlung konnte das pChk2-Signal nur in den ersten 2 h und nur nach einer längeren Belichtungszeit nachgewiesen werden. Das GAPDH-Signal diente als Ladekontrolle.

Das pChk1-Signal zeigte zwischen 4 h und 8 h nach HU-Behandlung eine deutliche Reduktion. Das pChk2-Signal war zu diesen Zeitpunkten bereits nicht mehr nachweisbar. In den Analysen des Zellzyklusverhaltens nach HU-Behandlung wurde gezeigt, dass die Zellen ab dem 4 h-Zeitpunkt

beginnen in die G1-Phase einzutreten (Abbildung 4.19 C). Der Zeitpunkt des Verlusts des Checkpointkinasen-Signals korreliert somit zeitlich mit dem Eintreten der HU-behandelten Zellen in die Mitose bzw. G1-Phase aber nicht mit der Reparatur der induzierten DSBs (Abbildung 4.11 A).

Bei der Untersuchung der Zellzyklusprogression nach der Behandlung mit S-Phase-schädigenden Agenzien wie MMS und HU fiel auf, dass MMS einen G2/M-Arrest induziert, während HU-behandelte Zellen ungehindert in die G1-Phase eintraten. Aufgrund dieses Unterschieds sollte im folgenden Experiment die Aktivierung der Checkpointkinasen nach HU- und MMS-Behandlung verglichen werden. Hierfür wurden humane Lungenkrebszellen (A549) 48 h nach der Aussaat für 24 h mit 0,5 mM HU behandelt, mit 5 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt oder für 1 h mit 1,5 mM MMS behandelt. Die Zellen wurden nach unterschiedlichen Zeiten fixiert (0 h – 8 h) und Gesamtzellextrakte hergestellt. Es wurden 80 µg Gesamtprotein mit einer *SDS-Page* aufgetrennt, die Proteine auf eine Membran übertragen und mit Antikörpern gegen pChk1 (Ser345), pChk2 (Thr68), γH2AX (Ser139) und GAPDH inkubiert. Die Detektion der Banden erfolgte mittels eines Chemilumineszenz-Kits.

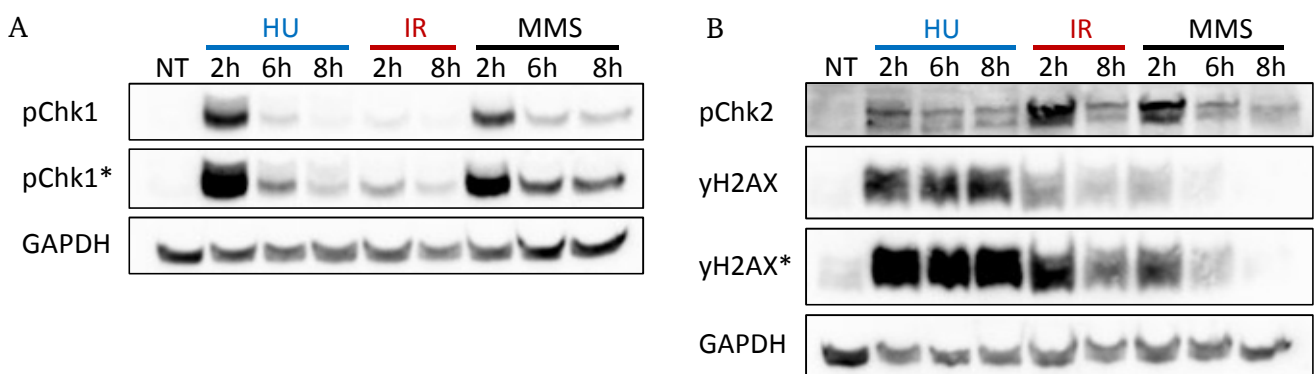


Abbildung 4.21: Biochemische Analyse von *Checkpoint*-Proteinen nach 24-stündiger HU-Behandlung, 1-stündiger MMS-Behandlung oder 5 Gy Röntgenstrahlung

Exponentiell wachsende, humane Lungentumorzellen (A549) wurden 48 h nach ihrer Aussaat für 24 h mit 0,5 mM HU behandelt (HU), mit 5 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt (IR) oder für 1 h mit 1,5 mM MMS behandelt (MMS). Zusätzlich wurde eine unbehandelte Kontrolle (NT) mitgeführt. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeiten fixiert (0 h – 8 h) und mit Ultraschall aufgeschlossen. Es wurden 80 µg Gesamtprotein mittels einer *SDS-Page* aufgetrennt, die Proteine durch einen Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und mit Antikörper gegen (A) pChk1 (Ser345) und GAPDH bzw. (B) gegen pChk2 (Thr68), γH2AX (Ser139) und GAPDH inkubiert. Die Detektion der Banden erfolgte mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Kits. GAPDH diente als Ladekontrolle. Die mit * markierten Banden wurden nach einer längeren Belichtungszeit aufgenommen.

Wie bereits im vorherigen Experiment beschrieben, war das pChk1-Signal nach HU-Behandlung zunächst stark und nahm dann rapide ab (Abbildung 4.21 A), während das pChk2-Signal zu allen untersuchten Zeitpunkten kaum nachweisbar war (Abbildung 4.21 B). Eine Bestrahlung führte zu einem kaum nachweisbaren pChk1-Signal und einem starken pChk2-Signal, welches zu einem späten Zeitpunkt deutlich abgenommen hatte. Die Behandlung mit MMS führte sowohl zu einem starken

pChk1- als auch zu einem starken pChk2-Signal. Bei beiden Proteinen wurde 6 h nach Ende der Behandlung ein deutlich schwächeres Signal detektiert. Das γ H2AX-Signal war nach HU-Behandlung erneut zu allen Zeitpunkten gleich stark, während das Signal nach Bestrahlung und MMS-Behandlung im Laufe der Analyse deutlich abnahm. In unbehandelten Zellen (NT) konnte weder ein pChk1- noch ein pChk2-Signal detektiert werden und nur bei einer längeren Belichtungszeit ein schwaches γ H2AX-Signal.

Die Aktivierung der Checkpointkinasen 1 und 2 unterschied sich deutlich nach den beiden S-Phase-schädigenden Agenzien. Dies ist sehr wahrscheinlich auf die Zeitspanne in der die DNA-Schäden durch die beiden Chemikalien induziert wurden zurückzuführen. HU arretiert die Replikationsgabeln aufgrund eines Mangels an dNTPs (Sneeden & Loeb, 2004; Yarbrow et al, 1965; Young & Hodas, 1964), dies führt dazu, dass über einen Zeitraum von mehreren Stunden immer wieder vereinzelte DSBs induziert werden. Bei einer MMS-Behandlung dagegen verhindern methylierte Basen das Fortschreiten der Replikationsgabeln (Wyatt & Pittman, 2006). Bei dem Versuch die methylierten Basen über die Basenexzisionsreparatur zu reparieren kann es bei der Kollision des Reparaturintermediates mit der Replikationsgabel zur Induktion eines DSBs kommen (Ensminger et al, 2014). Die unterschiedlichen Zeiträume während derer durch eine HU- bzw. eine MMS-Behandlung DSBs induziert werden, könnten eine unterschiedlich starke Zellzyklusarrest-Signalkaskade aktivieren. Die Ergebnisse aus diesem Experiment deuten auf eine Beteiligung von pChk2 an der Aufrechterhaltung des G2/M-Arrests hin, da eine MMS-Behandlung im Gegensatz zu einer HU-Behandlung zur Induktion des G2/M-Arrests und einer Aktivierung von Chk2 führt.

Da eine kombinierte Behandlung aus HU und Röntgenbestrahlung in den Zellzyklusuntersuchungen ebenfalls zur Induktion eines Arrests in der G2-Phase führte, wurde im folgenden Experiment die Aktivierung der Checkpointkinasen nach dieser Behandlung untersucht. Hierfür wurden humane Lungenkrebszellen (A549) 48 h nach der Aussaat für 24 h mit 0,5 mM HU behandelt, mit 5 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt oder zuerst für 24 h mit 0,5 mM HU behandelt und anschließend bestrahlt. Die Zellen wurden nach unterschiedlichen Zeiten fixiert (0 h – 8 h) und Gesamtzellextrakte hergestellt. Es wurden 80 μ g Gesamtprotein mit einer *SDS-Page* aufgetrennt, die Proteine auf eine Membran übertragen und mit Antikörpern gegen pChk1 (Ser345), pChk2 (Thr68), pRPA (Ser4/Ser8), γ H2AX (Ser139) und GAPDH inkubiert. Die Detektion der Banden erfolgte mittels eines Chemilumineszenz-Kits.

Nach einer kombinierten Behandlung aus 24 h 0,5 mM HU und 5 Gy Röntgenstrahlung (HU+IR) war in den ersten 2 h nach der Behandlung ein starkes pChk1-Signal detektierbar (Abbildung 4.22 A). Im weiteren Verlauf sank das Signal deutlich ab. Dies war vergleichbar mit dem Verlauf nach einer Behandlung für 24 h mit 0,5 mM HU alleine (HU). Proben, die nur bestrahlt wurden, und die unbehandelten Kontrollen zeigten kein pChk1-Signal. Das pChk2-Signal war nach der kombinierten

Behandlung sehr stark (2 h HU+IR; Abbildung 4.22 B), nahm mit der Zeit aber ebenfalls ab. Nach 8 h war das Signal nur noch etwas stärker als das Signal nach Bestrahlung alleine (8 h IR). Die nur mit HU behandelten Zellen zeigten 4 h nach der Behandlung ein schwaches pChk2-Signal, welches mit der Zeit weiter abnahm. Das pRPA-Signal verhielt sich nach der kombinierten Behandlung ähnlich wie nach der HU-Behandlung. Es war 2 h nach Ende der Behandlung stark und nahm zwischen 4 h und 8 h deutlich ab. Das γ H2AX-Signal war sowohl nach der kombinierten Behandlung als auch der HU-Behandlung alleine stark und nahm im Beobachtungszeitraum nicht oder nur geringfügig ab. Bestrahlte Zellen dagegen zeigten 8 h nach der Röntgenbestrahlung kein γ H2AX-Signal. In unbehandelten Zellen (NT) war weder ein pChk2-, noch ein pRPA- oder γ H2AX-Signal nachweisbar.

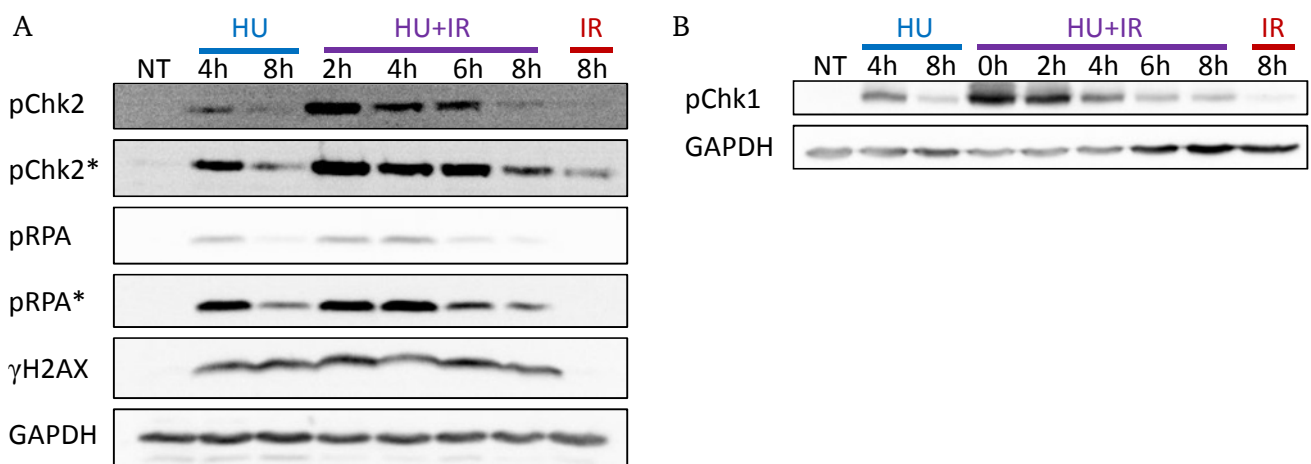


Abbildung 4.22: Biochemische Analyse von *Checkpoint*-Proteinen nach kombinierter Behandlung aus 24 h 0,5 mM HU und 5 Gy Röntgenstrahlung

Exponentiell wachsende, humane Lungentumorzellen (A549) wurden 48 h nach ihrer Aussaat für 24 h mit 0,5 mM HU behandelt (HU), mit 5 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt (IR) oder zunächst mit 0,5 mM HU für 24 h behandelt und anschließend mit 5 Gy Röntgenstrahlung bestrahlt (HU+IR). Zusätzlich wurde eine unbehandelte Kontrolle (NT) mitgeführt. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeiten fixiert (0 h – 8 h), geerntet und mit Ultraschall aufgeschlossen. Es wurden 80 μ g Gesamtprotein mittels einer *SDS-Page* aufgetrennt, die Proteine durch einen Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und mit Antikörper gegen (A) pChk1 (Ser345) und GAPDH bzw. (B) gegen pChk2 (Thr68), pRPA (Ser4/Ser8), γ H2AX (Ser139) und GAPDH inkubiert. Die Detektion der Banden erfolgte mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Kits. GAPDH diente als Ladekontrolle. Die mit * markierten Banden wurden nach einer längeren Belichtungszeit aufgenommen.

Beim Vergleich von Zellen, die nur mit HU behandelt wurden, und Zellen, die mit einer Kombination aus HU und Röntgenbestrahlung behandelt wurden, fiel auf, dass beide Behandlungen in den ersten Stunden zu einem sehr starken pChk1-Signal führen. Das Signal sank jedoch ab bevor die Zellen die durch HU-induzierten, einendigen DSBs reparieren können (Abbildung 4.11). Dies wirft die Frage auf, ob das pChk1-Signal durch diese einendigen Brüche induziert wird oder ob andere Strukturen wie z.B. die durch HU-Behandlung angehaltenen aber nicht kollabierten Replikationsgabeln dafür verantwortlich sind. In einer replizierenden Zelle sind gleichzeitig mehrere tausend Replikationsgabel

aktiv (Huberman & Riggs, 1966; Méchali, 2010). Die HU-Behandlung führt zu einer Blockade aller Replikationsgabeln, von denen nur ein kleiner Teil instabil wird, kollabiert und zu einem einendigen DSB führt. RPA bindet auch während einer ungestörten Replikation an Replikationsgabeln (Zou & Elledge, 2003) und wird dort phosphoryliert (Shechter et al, 2004b). Außerdem schützt RPA Replikationsgabeln vor dem Kollaps (Toledo et al, 2013). Es ist ebenfalls bekannt, dass Chk1 an der Stabilisierung von Replikationsgabeln beteiligt ist (Feijoo et al, 2001; Petermann et al, 2010a; Sorensen & Syljuasen, 2012; Zachos et al, 2003) und nach der Induktion von Replikationsstress phosphoryliert wird (Shechter et al, 2004b). Die starken, nach einer 24-stündigen HU-Behandlung gemessenen pChk1- und pRPA-Signale könnten daher auch auf die hohe Anzahl an angehaltenen, aber nicht kollabierten Replikationsgabeln zurückzuführen sein. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde im folgenden Experiment ein Ansatz gewählt, bei dem in den Zellen hauptsächlich angehaltene und nur wenige kollabierte Replikationsgabeln vorlagen. In Abbildung 4.2 wurde gezeigt, dass nach einer 2-stündigen HU-Behandlung nur geringfügig mehr DSBs induziert wurden als in unbehandelten Kontrollzellen. Diese kurze Behandlung mit HU reicht jedoch aus, um alle in den Zellen befindlichen Replikationsgabeln zu arretieren (Bianchi et al, 1986; Young & Hodas, 1964). Damit ist eine 2-stündige HU-Behandlung der ideale Ansatz, um das pChk1-Signal spezifisch für arretierte Replikationsgabeln zu untersuchen.

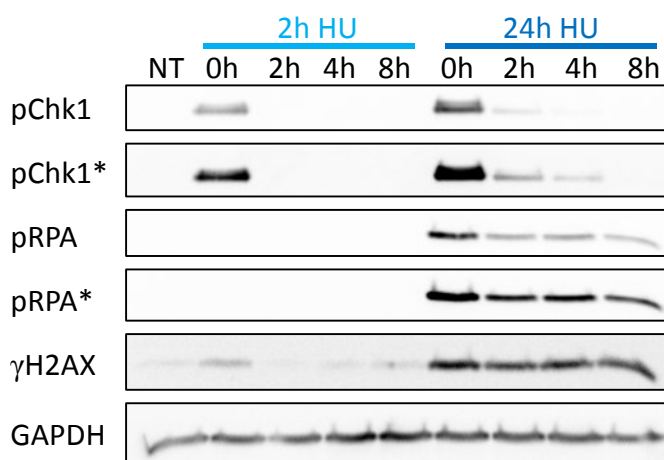


Abbildung 4.23: Biochemische Analyse von *Checkpoint*-Proteinen nach 2 h und 24 h HU-Behandlung

Exponentiell wachsende, humane Lungentumorzellen (A549) wurden 48 h nach ihrer Aussaat für 2 h oder 24 h mit 0,5 mM HU behandelt. Zusätzlich wurde eine unbehandelte Kontrolle (NT) mitgeführt. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeiten fixiert (0 h – 8 h), geerntet und mit Ultraschall aufgeschlossen. Es wurden 80 µg Gesamtprotein mittels einer *SDS-Page* aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und mit Antikörper gegen pChk1 (Ser345), pRPA (Ser4/Ser8), γH2AX (Ser139) und GAPDH inkubiert. Die Detektion der Banden erfolgte mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Kits. GAPDH diente als Ladekontrolle. Die mit * markierten Banden wurden nach einer längeren Belichtungszeit aufgenommen.

Humane Lungenkrebszellen (A549) wurden 48 h nach der Aussaat für 2 h oder 24 h mit 0,5 mM HU behandelt. Die Zellen wurden nach unterschiedlichen Zeiten fixiert (0 h – 8 h) und Gesamtzellextrakte hergestellt. Es wurden 80 µg Gesamtprotein mit einer *SDS-Page* aufgetrennt, die Proteine auf eine

Membran übertragen und diese mit Antikörpern gegen pChk1 (Ser345), pRPA (Ser4/Ser8), γ H2AX (Ser139) und GAPDH inkubiert. Die Detektion der Banden erfolgte mittels eines Chemilumineszenz-Kits. Direkt nach einer 2-stündigen HU-Behandlung wurde ein starkes pChk1-Signal detektiert, anschließend konnte selbst bei einer längeren Belichtungszeit kein pChk1-Signal mehr nachgewiesen werden (Abbildung 4.23). Nach 24 h HU-Behandlung zeigte sich das bereits bekannte Bild einer starken pChk1-Induktion und einer Abnahme im weiteren Verlauf. Das pChk1-Signal war dabei nach 24-stündiger HU-Behandlung etwas stärker als nach der 2-stündigen. Nach 2 h HU-Behandlung konnte kein pRPA detektiert werden, während das Signal nach einer 24-stündigen Behandlung stark war und im Laufe des Beobachtungszeitraums abnahm. Das γ H2AX-Signal nach 2 h HU war schwach und nur direkt nach der Behandlung detektierbar, nach der langen Behandlungszeit blieb das starke γ H2AX-Signal dagegen bis 8 h nach Ende der Behandlung bestehen. In unbehandelten Zellen (NT) konnten weder pChk1, noch pRPA oder γ H2AX nachgewiesen werden.

Bei den biochemischen Analysen der *Checkpoint*-Signalkaskade musste beim Vergleich von 24-stündiger HU-Behandlung mit Bestrahlung, MMS-Behandlung oder 2-stündiger HU-Behandlung der Anteil an Zellen in der S-Phase beachtet werden. Wie bereits in Kapitel 4.1 und 4.2 gezeigt, akkumulierten während einer 24-stündigen HU-Behandlung die Zellen in der S-Phase bzw. am G1/S-Übergang. Daher wurde das in den biochemischen Analysen gemessene Signal nach 24 h HU-Behandlung von annähernd 100 % der Zellen erzeugt, während sich nach Bestrahlung, MMS- oder 2-stündiger HU-Behandlung nur ein Teil der Zellen in der S-Phase befanden. Ensminger et al (2014) konnten zeigen, dass in der für die Experimente verwendeten Tumorzelllinie (A549) nach einer 1-stündigen Markierung ca. 40% der Zellen EdU-positiv waren und sich daher in der S-Phase befanden. Dies bedeutete, dass das S-Phase-spezifische Signal, welches in dieser Arbeit von Interesse war nach Bestrahlung, MMS-Behandlung oder 2-stündiger HU-Behandlung unterschätzt wurde, da es in anderen Zellzyklusphasen schwächer oder nicht vorhanden war.

Die in diesem Experiment erlangten Erkenntnisse deuten daraufhin, dass zumindest ein Großteil des pChk1-Signals, welches nach 24-stündiger HU-Behandlung detektiert wurde, auf die angehaltenen Replikationsgabeln zurückzuführen ist. Da die Replikation nach der Entfernung von HU innerhalb von kurzer Zeit wieder aufgenommen wird (Feijoo et al, 2001; Hanada et al, 2007; Petermann et al, 2010a), erlischt die durch die angehaltenen Replikationsgabeln induzierte Signalkaskade rasch. Dies erklärt, warum das pChk1-Signal innerhalb weniger Stunden und noch vor der Reparatur der einseitigen DSBs verschwindet. Weiterhin ist zu beachten, dass das pChk1-Signal nach 24 h HU-Behandlung zwar etwas stärker ist als nach 2 h HU-Behandlung, allerdings auch nur von ca. 40 % der Zellen generiert wird. Dieser Befund gibt einen ersten Hinweis darauf, welcher Faktor der Zellzyklus-kontroll-Signalkaskade nach langer HU-Behandlung gestört ist. Möglicherweise führt die lang

anhaltende (~ 24 h) Aktivierung von Chk1 zu einer Depletion des Chk1-Pools und dadurch zu einem verminderten *Checkpoint*-Signal.

Das Signal des am Serin 4 / Serin 8 phosphorylierten RPA ist vollständig auf die nach 24 h HU-Behandlung induzierten DSBs zurückzuführen. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass das RPA am Serin 4 / Serin 8 durch DNA-PK bzw. ATM phosphoryliert wird (Liu et al, 2012), also von Kinasen, die an arretierten Replikationsgabeln nicht aktiviert werden.

In diesem Kapitel konnte anhand der Kombination aus HU- und MMS-Behandlung (HU+MMS) sowie der Kombination aus HU-Behandlung und Bestrahlung (HU+IR) gezeigt werden, dass HU-behandelte Zellen einen G2/M-Arrest induzieren können, diesen aber nicht aufrechterhalten bis die Reparatur der DSBs abgeschlossen ist. Die verheerenden Konsequenzen aus dem ineffizienten *Checkpoint*-Signal wurden bereits in Kapitel 4.2 dargestellt. Die Stärke des Chk1-Signals nach 2-stündiger HU-Behandlung sowie das vorzeitige Aufheben des G2/M-Arrests nach HU+MMS- bzw. HU+IR-Behandlung geben erste Hinweise drauf, dass möglicherweise der zelluläre Chk1-Pool depletiert sein könnte. Da nach HU-Behandlung Chk1 die Hauptkinase für die Induktion eines G2/M-Arrests ist, würde dies erklären warum HU-behandelte Zellen keinerlei Verzögerung während der G2-Phase und beim Übertritt in die Mitose zeigen. Da Chk1 für die Aufrechterhaltung des G2/M-Arrests benötigt wird (Kousholt et al, 2012; Shibata et al, 2010), würde dies ebenfalls die vorzeitige Aufhebung des Checkpoints nach HU+IR und HU+MMS erklären.

4.2.4. Untersuchung der Struktur HU-induzierter DSBs

In den vorangegangenen Kapiteln dieser Arbeit wurde gezeigt, dass nach einer 24-stündigen HU-Behandlung kein G2/M-Arrest induziert wird, obwohl die Zellen in der G2-Phase eine massive Anzahl an DSBs und Chromatidbrüchen aufweisen. Dies führt dazu, dass geschädigte Zellen die Mitose und die G1-Phase mit einer deutlich erhöhten Anzahl an DSBs erreichen. Da diese Situation die genomische Integrität der Zellen gefährdet, wird dies normalerweise durch effiziente Reparatur- und Zellzyklus-kontrollmechanismen verhindert. In diesem Teil der vorliegenden Arbeit sollte daher analysiert werden, warum HU-induzierte DSBs ineffizient repariert werden und ob dies möglicherweise anhand der speziellen Struktur HU-induzierter DSBs erklärt werden kann. Dazu wurde diese DSB-Struktur näher charakterisiert.

Einzelsträngige DNA-Bereiche werden vom Replikationsprotein A (RPA) gebunden, um diese zu stabilisieren und die Ausbildung von Sekundärstrukturen zu verhindern (Chen et al, 2013; Zou & Elledge, 2003). Erfolgt die Reparatur von DSBs durch die HR, wird RPA durch Rad51 ersetzt, welches von BRCA2 auf die einzelsträngigen DNA-Bereiche geladen wird (Golub et al, 1998; Yuan et al, 1999). In einem späten Schritt der HR, nach der Bildung des *D-Loops* für die DNA-Synthese, wird Rad51 von den Brüchen entfernt (Kilianitsa et al, 2006; Solinger et al, 2002) und RPA bindet an den verdrängten

Strang des *D-Loops* sowie an den als *Template* benutzten DNA-Strang (Eggler et al, 2002; Sneed et al, 2013). Beide Proteine lassen sich durch eine Immunfluoreszenzfärbung in Form von Foci nachweisen (Golub et al, 1998; Tarsounas et al, 2002; Yuan et al, 1999). Die Anwesenheit von Rad51- und RPA-Foci in den Zellen gibt somit Auskunft darüber, ob bereits die Reparatur über HR initialisiert wurde und wie groß der Anteil an DSBs mit einzelsträngigen DNA-Bereichen ist.

Für die Experimente wurden humane Lungentumorzellen (A549) bzw. humane, immortalisierte Fibroblasten (82-6hTert) 48 h nach der Aussaat für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und für 24 h mit 0,5 mM HU behandelt. Die Zellen wurden nach Ende der Behandlung zu unterschiedlichen Zeiten fixiert (0 h – 10 h) und anschließend gegen Rad51, RPA, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Pro Experiment wurden 40 EdU-positive Zellen ausgewertet.

In den unbehandelten Zellen schwankte die Anzahl der Rad51-Foci pro Zelle leicht und lag zunächst bei ca. 11, um zu den späteren Zeitpunkten abzusinken (Abbildung 4.24 A). Die Zahl an RPA-Foci in den unbehandelten Zellen schwankte in einem sehr geringen Maße zwischen 3 und 4 Foci pro Zelle. Nach Ende der HU-Behandlung (0 h) wurden 42 Rad51-Foci pro Zelle detektiert. Die Anzahl der Rad51-Foci nahm mit der Reparaturzeit kontinuierlich ab und erreichte nach 10 h einen Wert von 23 Foci. Die RPA-Foci zeigten ein sehr ähnliches Verhalten. Es wurden 40 RPA-Foci durch die Behandlung induziert (0 h), nach 10 h hatte sich die Anzahl auf 28 Foci pro Zelle verringert. Sowohl die Rad51- als auch die RPA-Foci-Abnahme zwischen dem 0 h und dem 10 h Zeitpunkt war statistisch signifikant. Die hohe Zahl der Rad51- und RPA-Foci nach HU-Behandlung im Vergleich zur Zahl an γ H2AX-Foci (Abbildung 4.11; Abbildung 4.25) deutete auf einen großen Anteil an DSBs mit einzelsträngigen DNA-Bereichen hin. Bei der genaueren Betrachtung der Zellen wurde festgestellt, dass die Rad51- und RPA-Foci sowohl kolokalisierend in den Zellen vorkamen, als auch einzeln (Abbildung 4.24 B). Die nur mit RPA-beladenen DSBs befanden sich entweder in einem sehr frühen Schritt der HR oder bereits in einem sehr späten HR-Schritt, bei dem Rad51 bereits wieder vom DSB entfernt wurde und RPA an den verdrängten DNA-Strang sowie an den *Template*-Strang im *D-Loop* gebunden hatte. Die nur mit Rad51-beladenen DSBs befanden sich dagegen in einem mittleren Stadium der HR, während dessen die Homologiesuche sowie die Einwanderung in das Schwesterchromatid stattfanden.

Um einen Einfluss des Zellsystems auf die Ergebnisse auszuschließen, wurde die gleiche Untersuchung auch mit immortalisierten, humanen Fibroblasten durchgeführt (Abbildung 4.24 C). Die Rad51- und RPA-Foci-Zahl in den unbehandelten Fibroblasten (NT) zeigte ein vergleichbares Verhalten zu den Rad51- und RPA-Foci in den unbehandelten A549-Zellen. Die Anzahl der Foci in den HU-behandelten Fibroblasten unterlag dabei einer größeren Schwankung als die in den Tumorzellen, zeigte insgesamt aber keine Abnahme während des Beobachtungszeitraums. Auch in diesen Zellen lagen die Rad51- und RPA-Foci sowohl kolokalisierend, als auch einzeln vor (Abbildung 4.24 D).

Beide Zelllinien zeigten eine hohe Anzahl an Rad51- und RPA-Foci im Vergleich zur Anzahl der γ H2AX- und 53BP1-Foci (Abbildung 4.11). Dies deutet daraufhin, dass ein Großteil oder sogar alle

DSBs einzelsträngige DNA-Bereiche besitzen, die mit Rad51 oder RPA beladen sind. Um dies zu überprüfen, wurde eine Doppelfärbung mit γ H2AX und Rad51 bzw. γ H2AX und RPA durchgeführt. In Abbildung 4.25 ist dargestellt, dass die analysierten Rad51- und RPA-Foci mit γ H2AX-Foci

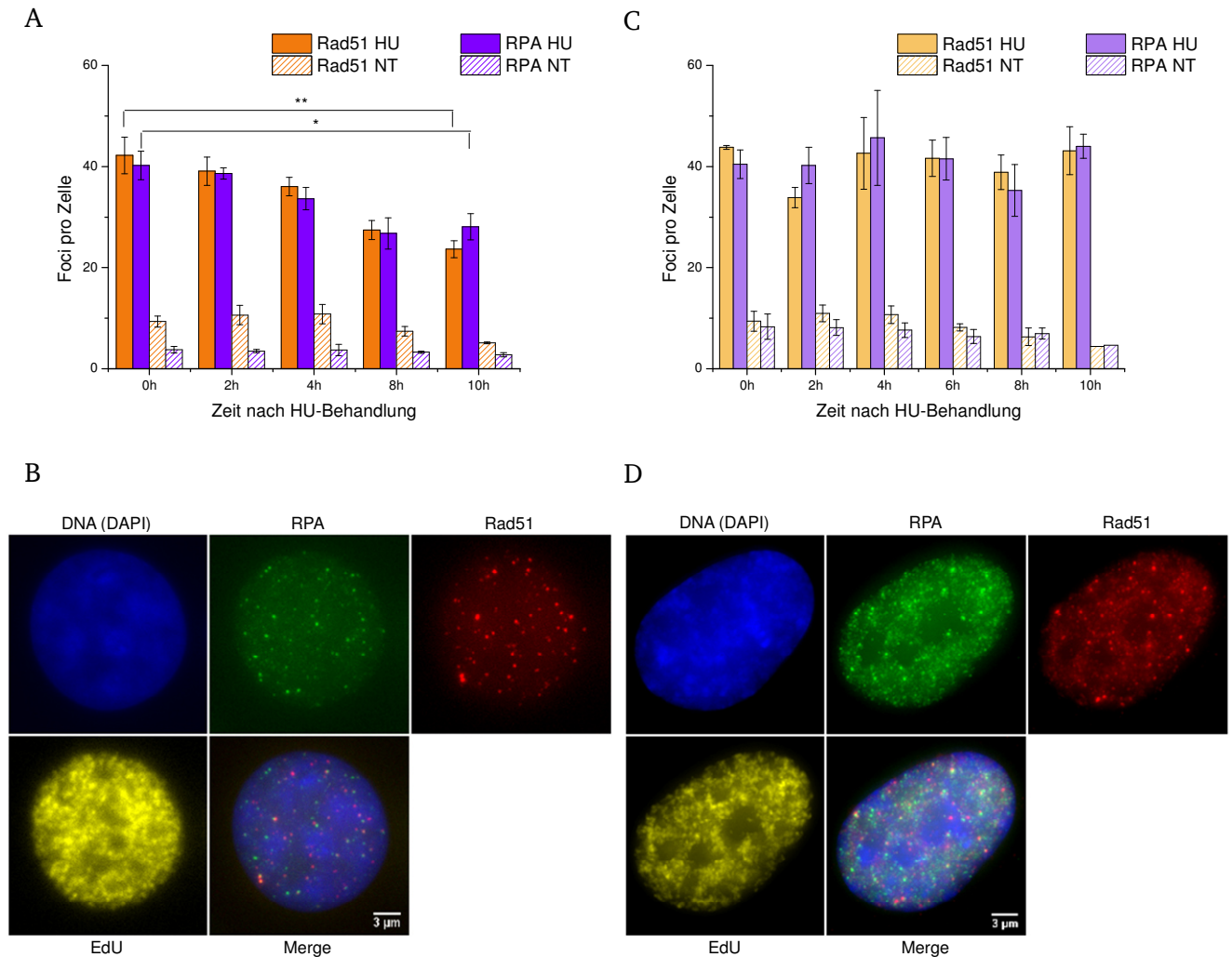


Abbildung 4.24: Beladung von einzelsträngigen DNA-Bereichen an DSBs mit Rad51 und RPA in humanen Tumorzellen und humanen, immortalisierten Fibroblasten

(A) + (B) Exponentiell wachsende, humane Lungenkrebszellen (A549) und (C) + (D) exponentiell wachsende, humane, immortalisierte Fibroblasten (82-6hTert) wurden 48 h nach der Aussaat für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und anschließend für 24 h mit 0,5 mM Hydroxyurea behandelt. Nach unterschiedlichen Reparaturzeiten (0 h – 10 h) wurden die Zellen fixiert und gegen Rad51, RPA, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. (A) Rad51- und RPA-Foci-Kinetik in A549-Zellen. Es wurden pro Experiment 40 EdU-positive Zellen ausgewertet. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert aus n=3 Experimenten dar, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die statistische Signifikanz wurde mit dem *Students t-Test* berechnet. * p<0,05; ** p<0,01 (B) Exemplarische Immunfluoreszenzaufnahmen einer A549-Zelle nach 24 h HU-Behandlung, in der RPA (grün), Rad51 (rot), EdU (gelb) und die DNA (DAPI, blau) sowie eine Überlagerung von RPA, Rad51 und der DNA (*Merge*) dargestellt sind. Der dargestellte Maßstabsbalken entspricht 3 μ m (Aufnahmen erfolgten mit 1000x Vergrößerung). (C) Rad51- und RPA-Foci-Kinetik in 82-6hTert-Zellen. Es wurden pro Experiment 40 EdU-positive Zellen ausgewertet. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert aus n=3 Experimenten dar, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. (D) Exemplarische Immunfluoreszenzaufnahmen einer 82-6hTert-Zelle nach 24 h HU-Behandlung, in der RPA (grün), Rad51 (rot), EdU (gelb) und die DNA (DAPI, blau) sowie eine Überlagerung von RPA, Rad51 und der DNA (*Merge*) dargestellt sind. Der dargestellte Maßstabsbalken entspricht 3 μ m (Aufnahmen erfolgten mit 1000x Vergrößerung).

kolokalisieren, es sich also tatsächlich um die Markierung einzelsträngiger DNA-Bereiche an DSBs handelt und die Rad51- und RPA-Foci nicht unabhängig von den DSBs auftreten. In einigen Zellen wurde exemplarisch der Anteil an DSBs bestimmt, die mit RPA alleine, Rad51 alleine oder beiden Proteinen beladen waren. Diese Auswertung ergab, dass direkt nach Ende der HU-Behandlung ca. 40 % der DSBs nur von RPA gebunden vorlagen, während 35 % der DSBs sowohl von Rad51 als auch von RPA gebunden waren. Nur mit Rad51 markiert waren ca. 25 % der DSBs.

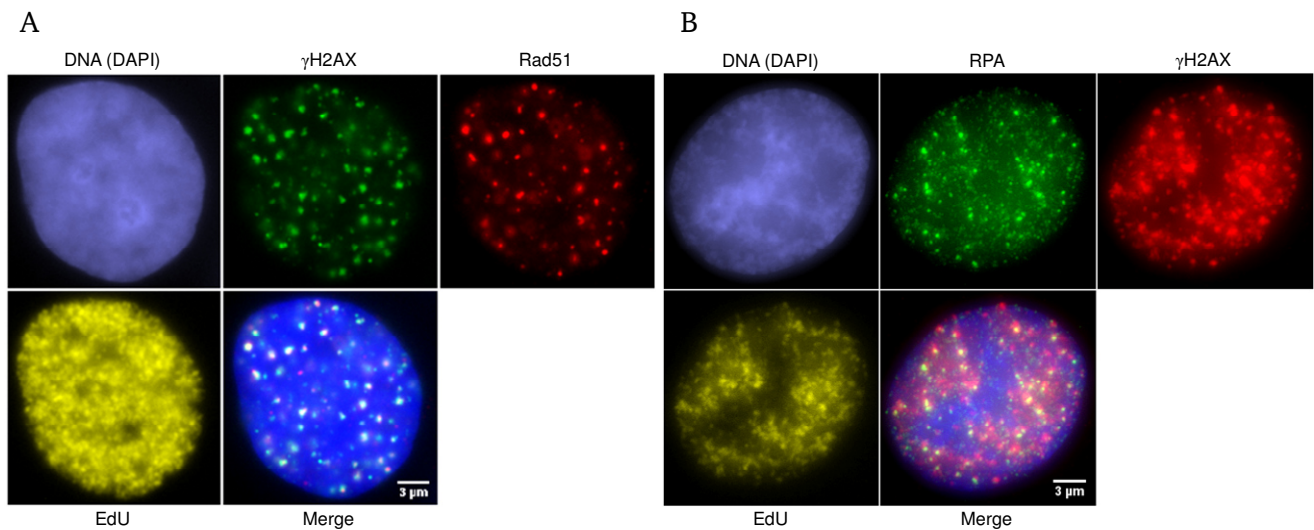


Abbildung 4.25: Kolokalisation von γ H2AX-Foci mit Rad51- bzw. RPA-Foci nach 24 h HU-Behandlung

Exponentiell wachsende, humane Lungenkrebszellen (A549) wurden 48 h nach der Aussaat für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und anschließend für 24 h mit 0,5 mM Hydroxyurea behandelt. Die Zellen wurden fixiert und (A) gegen γ H2AX, Rad51, EdU und die DNA (DAPI) oder (B) gegen γ H2AX, RPA, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Dargestellt sind exemplarische Immunfluoreszenzaufnahmen die (A) γ H2AX (grün), Rad51 (rot), EdU (gelb) und die DNA (DAPI, blau) sowie eine Überlagerung von γ H2AX, Rad51 und der DNA (*Merge*) bzw. (B) RPA (grün), γ H2AX (rot), EdU (gelb) und die DNA (DAPI, blau) sowie eine Überlagerung von RPA, γ H2AX und der DNA (*Merge*) zeigen. Der dargestellte Maßstabsbalken entspricht 3 μ m (Aufnahmen erfolgten mit 1000x Vergrößerung).

Im folgenden Experiment sollte geklärt werden, was für einen Einfluss die Depletion von Rad51 auf die Anzahl an γ H2AX- und RPA-Foci in den Zellen hat. Da sowohl RPA als auch Rad51 nur transient an die einzelsträngigen DNA-Bereiche gebunden vorliegen, gibt die Untersuchung der Foci-Zahl nur eine Momentaufnahme wieder, die keine Aussage über die Gesamtzahl an RPA- bzw. Rad51-Foci während des Reparaturprozesses erlaubt. Wird dagegen Rad51 depletiert, wird RPA nicht mehr von den einzelsträngigen DNA-Bereichen verdrängt und es kann analysiert werden, wie viele DSBs RPA-beladene DNA-Bereiche besitzen. Toledo et al (2013) zeigten, dass es bei einer Behandlung mit sehr hohen, unphysiologischen HU-Konzentrationen schon nach kurzer Zeit zur Depletion des intrazellulären RPA-Pools kommt und dadurch zur Induktion von DSBs. Mit diesem Experiment kann daher auch untersucht werden, ob der intrazelluläre RPA-Pool bei der in dieser Arbeit verwendeten Konzentration und Behandlungsdauer erschöpft ist, da dann keine weiteren DSBs mit RPA markiert

werden könnten. Wäre dies der Fall, würde es der Theorie, dass in der vorliegenden Arbeit eine physiologischere HU-Konzentration und Behandlungsdauer verwendet wurden, widersprechen.

Humane Lungenkrebszellen (A549) wurden direkt nach der Aussaat mit Rad51-siRNA transfiziert. 48 h später wurden die Zellen für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und für 24 h mit 0,5 mM HU behandelt. Nach der HU-Zugabe wurden die Zellen mit Rad51-siRNA nachtransfiziert, um eine effiziente Depletion während des gesamten Versuchszeitraums zu gewährleisten. Nach Ende der HU-Behandlung wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeiten fixiert und gegen γ H2AX, Rad51, EdU und die DNA (DAPI) oder RPA, Rad51, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Pro Experiment wurden 40 EdU-positive, Rad51-negative Zellen ausgewertet.

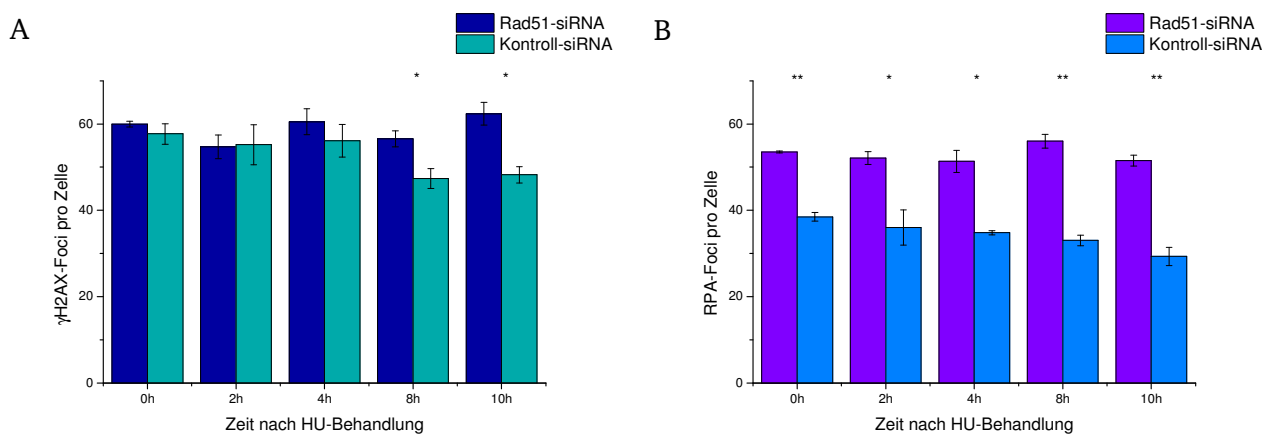


Abbildung 4.26: Einfluss einer Rad51-Depletion auf die γ H2AX- und RPA-Foci-Zahl nach 24 h HU-Behandlung

Exponentiell wachsende, humane Lungenkrebszellen (A549) wurden direkt nach der Aussaat mit Rad51- bzw. Kontroll-siRNA behandelt. Die Zellen wurden 48 h später für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und für 24 h mit 0,5 mM Hydroxyurea behandelt. Die Zellen wurden nach der HU-Zugabe mit Rad51- bzw. Kontroll-siRNA nachtransfiziert, um während des Behandlungs- und des Reparaturzeitraums einen Rad51-*knockdown* zu gewährleisten. Nach Ende der Behandlung wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeiten fixiert (0 h – 10 h) und (A) gegen γ H2AX, Rad51, EdU und die DNA (DAPI) oder (B) gegen RPA, Rad51, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Es wurden pro Experiment 40 EdU-positive, Rad51-negative Zellen ausgewertet. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert aus (A) n=4 oder (B) n=2 Experimenten dar, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die statistische Signifikanz wurde mit dem *Students t-Test* berechnet. * p<0,05; ** p<0,01

In Zellen, die mit Kontroll-siRNA behandelt wurden, konnten zum 0 h-Zeitpunkt 58 γ H2AX-Foci pro Zelle detektiert werden (Abbildung 4.26 A). Die Anzahl der γ H2AX-Foci nahm bis auf 48 Foci pro Zelle nach 10 h ab. In Rad51-depletierten Zellen wurden durch eine 24-stündige HU-Behandlung 60 γ H2AX-Foci induziert. Während der Reparaturzeit von 10 h konnte keine Abnahme der γ H2AX-Foci-Zahl beobachtet werden. Die γ H2AX-Foci-Zahl war in den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen zum 8 h- und zum 10 h-Zeitpunkt statistisch signifikant niedriger als die in den Rad51-depletierten Zellen.

Bei der Untersuchung der RPA-Foci-Kinetik nach Kontroll-siRNA-Behandlung wurden 38 RPA-Foci pro Zelle gemessen (Abbildung 4.26 B). Im weiteren Verlauf der Untersuchung nahm die Anzahl der RPA-Foci pro Zelle ab. Nach Depletion von Rad51 wurde mit 54 RPA-Foci pro Zelle eine höhere Foci-Zahl

als in den Kontroll-siRNA-behandelten Zellen induziert. Die RPA-Foci-Zahl blieb in den folgenden 10 h relativ konstant auf diesem Niveau. Die RPA-Foci pro Zelle lagen in Rad51-depletierten Zellen somit während der gesamten Versuchszeit höher als in den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen und der Unterschied war zu jedem der untersuchten Zeitpunkte statistisch signifikant. Der Großteil der HU-induzierten DSBs besitzt bereits direkt nach Ende der HU-Behandlung einzelsträngige DNA-Bereiche, die mit RPA beladen sind. Erfolgt durch eine Rad51-Depletion kein Austausch von RPA gegen Rad51 werden die DSBs nicht repariert (die Anzahl der γ H2AX-Foci sinkt nicht) und RPA bleibt an die einzelsträngigen DNA-Bereiche gebunden (Anzahl der RPA-Foci bleibt konstant). Dieses Ergebnis zeigt, dass der intrazelluläre RPA-Pool bei der in dieser Arbeit verwendeten HU-Konzentration und Behandlungsdauer nicht depletiert wurde. Dies unterstützt die bereits aufgestellte Theorie, dass in dieser Arbeit eine physiologischere Bedingung untersucht wurde als in vielen anderen Veröffentlichungen.

Um zu analysieren, ob sich ein Teil der HU-induzierten DSBs bereits in einem späten Schritt der HR befanden, bei dem Rad51 bereits entfernt wurde und nur noch RPA gebunden war, wurde die Zahl an γ H2AX-, Rad51- und RPA-Foci nach einer Depletion von Rad54 bestimmt. Rad54 ist unter anderem für die Entfernung von Rad51 von den einzelsträngigen DNA-Bereichen nach Ende der Homologiesuche zuständig (Solinger et al, 2002). Eine Rad54-Depletion führt dazu, dass alle einzelsträngigen DNA-Bereiche, die bereits während der HU-Behandlung mit Rad51 beladen wurden dieses noch immer als Focus zeigen. Es ist daher mit diesem Experiment möglich zu analysieren, wie viele der DSBs sich bereits in einem späten Schritt der HR befinden und ob Rad51 einen limitierenden Faktor für die Reparatur von DSBs durch HR darstellt.

Humane Lungenkrebszellen (A549) wurden direkt nach der Aussaat mit Rad54-siRNA transfiziert. 48 h später wurden die Zellen für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und für 24 h mit 0,5 mM HU behandelt. Nach der HU-Zugabe wurden die Zellen mit Rad54-siRNA nachtransfiziert, um einen effizienten *knockdown* während des gesamten Versuchszeitraums zu gewährleisten. Nach Ende der HU-Behandlung wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeiten fixiert (0 h – 10 h) und gegen Rad54, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Zusätzlich erfolgte, je nachdem was untersucht werden sollte, eine γ H2AX-, Rad51- oder RPA-Färbung. Pro Experiment wurden 40 EdU-positive, Rad54-negative Zellen ausgewertet.

In Kontroll-siRNA-behandelten Zellen wurde direkt nach der HU-Behandlung eine Zahl von 59 γ H2AX-Foci ermittelt, diese nahm in den folgenden 10 h leicht ab (Abbildung 4.27 A). In Rad54-depletierten Zellen wurde nach 24-stündiger HU-Behandlung eine etwas höhere Anzahl an γ H2AX-Foci induziert als in den Kontroll-siRNA-behandelten Zellen. Die Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle schwankte leicht, blieb aber während des gesamten Untersuchungszeitraums auf einem hohen Niveau. Die Anzahl der γ H2AX-Foci in den mit Rad54-siRNA-behandelten Zellen war zum 4 h-, 8 h- und 10 h-Zeitpunkt statistisch signifikant höher als in den Kontroll-siRNA-behandelten Zellen.

In den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen wurden 39 Rad51-Foci induziert, die Anzahl sank während des Untersuchungszeitraums langsam ab (Abbildung 4.27 B). Nach Rad54-Depletion wurde initial eine um ca. 1/3 erhöhte Rad51-Foci-Zahl detektiert, die ebenfalls während der Reparaturzeit langsam abnahm. Neben dem erhöhten Induktionslevel zeigten Rad54-depletierte Zellen zu allen Zeitpunkten eine statistisch signifikant erhöhte Rad51-Foci-Zahl.

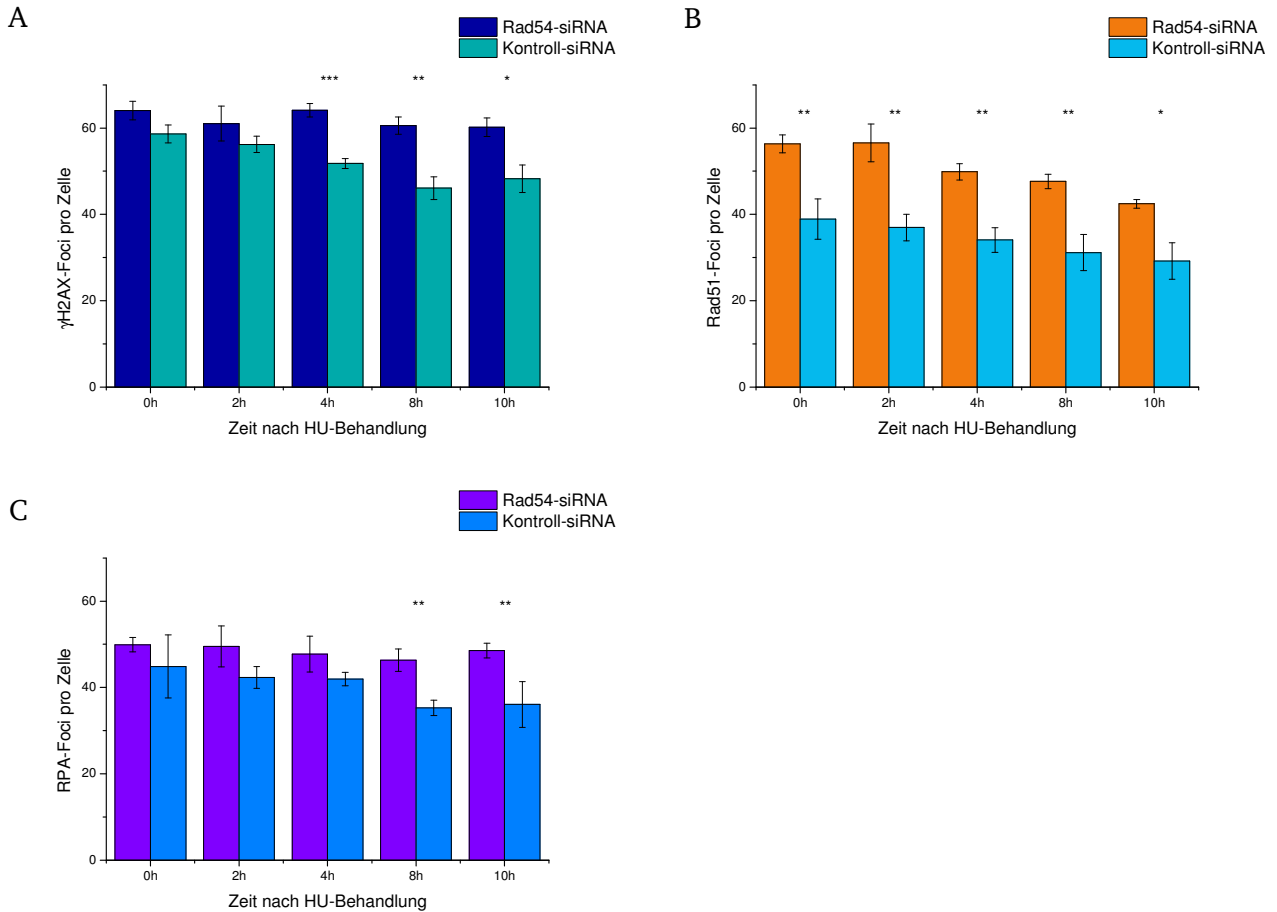


Abbildung 4.27: Einfluss einer Rad54-Depletion auf die γ H2AX-, Rad51- und RPA-Foci-Zahl nach 24 h HU-Behandlung

Exponentiell wachsende, humane Lungenkrebszellen (A549) wurden direkt nach der Aussaat mit Rad54- bzw. Kontroll-siRNA transfiziert. Die Zellen wurden 48 h später für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und für 24 h mit 0,5 mM Hydroxyurea behandelt. Die Zellen wurden nach der HU-Zugabe mit Rad54- bzw. Kontroll-siRNA nachtransfiziert, um während des Behandlungs- und des Reparaturzeitraums einen Rad54-*knockdown* zu gewährleisten. Nach Ende der Behandlung wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeiten fixiert (0 h – 10 h) und (A) gegen γ H2AX, Rad54, EdU und die DNA (DAPI), (B) gegen Rad51, Rad54, EdU und die DNA (DAPI) oder (C) RPA, Rad54, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Es wurden pro Experiment 40 EdU-positive, Rad54-negative Zellen ausgewertet. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert aus (A) n=4, (B) n=5 oder (C) n=3 Experimenten dar, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die statistische Signifikanz wurde mit dem *Students t-Test* berechnet. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

In Zellen, die mit Kontroll-siRNA behandelt wurden, wurden nach 24-stündiger HU-Behandlung 45 RPA-Foci induziert, diese nahmen im Verlauf der Analyse langsam ab (Abbildung 4.27 C). Die Anzahl der RPA-Foci lag nach Rad54-Depletion initial etwas über der in Zellen mit Kontroll-siRNA-

Behandlung. Im weiteren Verlauf des Experiments blieb die Anzahl an RPA-Foci pro Zelle relativ konstant. 8 h und 10 h nach Ende der HU-Behandlung war die Anzahl der RPA-Foci in den Kontroll-siRNA-behandelten Zellen statistisch signifikant niedriger als in den Rad54-depletierten Zellen.

Fasst man diese Ergebnisse zusammen, zeigten Zellen mit Rad54-Depletion zu späten Zeiten (4 h – 10 h) eine erhöhte Anzahl an γ H2AX- und RPA-Foci. Dies deutet auf einen Reparaturdefekt nach Rad54-Depletion hin. Die Anzahl an Rad51-Foci in den Rad54-depletierten Zellen war bereits direkt nach Ende der HU-Behandlung statistisch signifikant erhöht und blieb dies auch während des gesamten Beobachtungszeitraums. Dies verdeutlicht, dass in den Kontroll-siRNA-behandelten Zellen Rad51 an einem Teil der DSBs bereits während der HU-Behandlung durch Rad54 entfernt wurde. Diese DSBs befinden sich in einem späten Schritt der HR ohne angelagertes Rad51 aber mit gebundenem RPA. In der Abwesenheit von Rad54 wird Rad51 nicht entfernt und die Zellen zeigen folglich eine erhöhte Anzahl an Rad51-Foci.

Die in diesem Kapitel gezeigten Ergebnisse deuten daraufhin, dass während einer HU-Behandlung bereits die Reparatur von DSBs über HR induziert wird. Da nach Rad54-Depletion mehr DSBs mit Rad51 beladen sind, stellt Rad51 ebenfalls keinen limitierenden Faktor dar und ist in einem ausreichenden Maße für einen normalen Ablauf der Reparatur vorhanden. Ungefähr 1/3 der durch eine 24-stündige HU-Behandlung induzierten DSBs befindet sich in einem späten Schritt der HR, indem Rad51 bereits von den Brüchen entfernt wurde und RPA wieder gebunden ist. Der nächste Schritt in der HR wäre die DNA-Synthese, welche während der HU-Behandlung aufgrund des Desoxyribonukleotid-Mangels nicht möglich ist. Möglicherweise ist die DNA-Synthese auch nach Ende der HU-Behandlung und trotz der Neusynthese von Desoxyribonukleotiden noch immer gestört.

4.3. Charakterisierung des Reparatur- und Zellzyklusverhaltens nach 10 h Hydroxyurea

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine 24-stündige HU-Behandlung zu einer ineffizienten DSB-Reparatur und einem vorzeitigen Aufheben des G2/M-Arrests führt. In dem folgenden Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob dies ein generelles Phänomen von HU-induzierten DSBs ist oder ob die lange Behandlungsdauer und die daraus resultierende, lange Verzögerung der DNA-Replikation und der DSB-Reparatur der Grund für dieses Verhalten sind. Deshalb wurde im Folgenden das DSB-Reparaturverhalten nach einer kürzeren Behandlungsdauer von 10 h untersucht.

4.3.1. Untersuchung des DSB-Reparaturverhaltens nach 10-stündiger HU-Behandlung

Für die Erstellung einer γ H2AX-Foci-Reparaturkinetik nach einer 10-stündigen HU-Behandlung wurden exponentiell wachsende Lungentumorzellen (A549) 36 h nach der Aussaat für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und für 10 h mit 0,5 mM HU behandelt. Die Zellen wurden nach der Behandlung zu

unterschiedlichen Zeiten fixiert (0 h – 10 h) und gegen γ H2AX, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Es wurden pro Experiment 40 EdU-positive Zellen ausgewertet.

In unbehandelten Zellen schwankte die Anzahl der γ H2AX-Foci zwischen 11 Foci und 17 Foci (Abbildung 4.28 A). Nach Ende der 10-stündigen HU-Behandlung wurden 57 γ H2AX-Foci pro Zelle detektiert. In den folgenden 10 h sank die Foci-Zahl langsam ab. Die γ H2AX-Foci nach 10-stündiger HU-Behandlung waren dabei ebenso klar definiert wie die nach einer 24-stündigen HU-Behandlung (Abbildung 4.28 B; Abbildung 4.2).

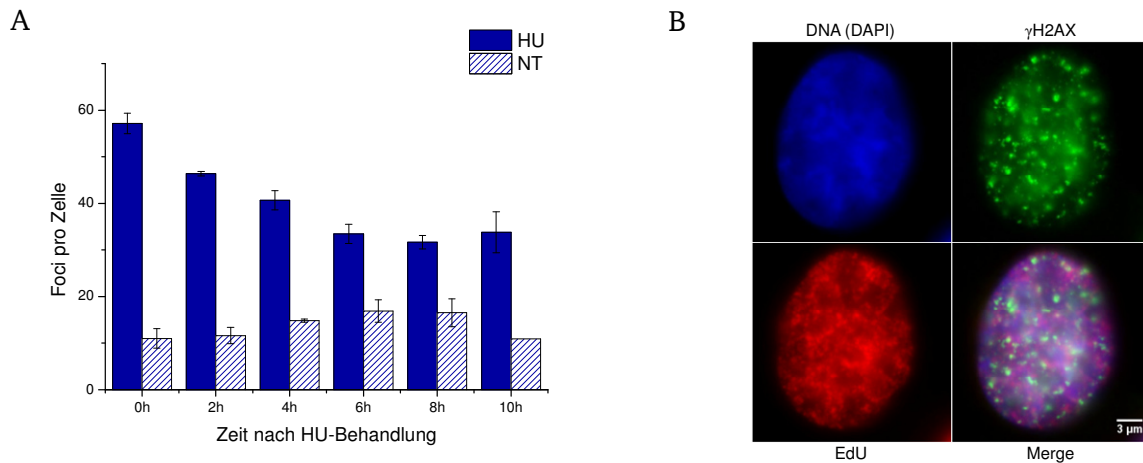


Abbildung 4.28: γ H2AX-Foci-Reparaturkinetik nach 10 h HU-Behandlung in humanen Lungentumorzellen

Exponentiell wachsende, humane Lungentumorzellen (A549) wurden 36 h nach der Aussaat für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und anschließend für 10 h mit 0,5 mM Hydroxyurea behandelt. Nach unterschiedlichen Reparaturzeiten (0 h – 10 h) wurden die Zellen fixiert und gegen γ H2AX, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. (A) γ H2AX-Reparaturkinetik in unbehandelten (NT) und HU-behandelten (HU) Zellen. Es wurden pro Experiment 40 EdU-positive Zellen ausgewertet. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert aus n=3 Experimenten dar, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. (B) Exemplarische Immunfluoreszenzaufnahmen nach 10 h HU-Behandlung, in denen γ H2AX (grün), EdU (rot) und die DNA (DAPI, blau) sowie eine Überlagerung von γ H2AX, EdU und der DNA (*Merge*) dargestellt sind. Der dargestellte Maßstabsbalken entspricht 3 μ m (Aufnahmen erfolgten mit 1000x Vergrößerung).

Die untersuchten Zellen zeigten nach 10 h HU-Behandlung eine niedrigere Induktion an DSBs und eine effizientere Reparatur als nach 24 h HU. Die Anzahl an γ H2AX-Foci sank nach 10 h HU-Behandlung innerhalb von 10 h von 57 auf 34 Foci, während nach 24-stündiger HU-Behandlung 61 γ H2AX-Foci induziert wurden und dieser Wert innerhalb von 10 h auf 47 Foci absank (Abbildung 4.11). Dies entspricht einer prozentualen Abnahme der γ H2AX-Foci von 40 % nach 10 h HU und 23 % nach 24 h HU. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass die Reparatur der HU-induzierten DSBs nach einer längeren Replikationsblockade bzw. nach einer längeren Arretierung der Reparatur weniger effizient abgeschlossen werden kann als nach einer kürzeren.

4.3.2. Untersuchung der Zellzyklusprogression nach 10 h HU-Behandlung

In einem weiterführenden Experiment sollte geklärt werden, ob die Zellen nach 10 h HU-Behandlung trotz der effizienteren Reparatur in der S/G2-Phase mit unreparierten Brüchen in die Mitose gelangen. Hierfür wurde die Zahl an γ H2AX-Foci in mitotischen Zellen nach 10 h HU-Behandlung bestimmt. Humane Lungenkrebszellen (A549) wurden 36 h nach der Aussaat für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und für 10 h mit 0,5 mM HU behandelt. Die Zellen wurden nach der Behandlung zu unterschiedlichen Zeiten fixiert (4 h – 10 h) und gegen γ H2AX, pH3, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Das am Serin 10 phosphorylierte H3 (pH3) diente als Marker für mitotische Zellen (Prigent & Dimitrov, 2003). Es wurden pro Experiment 40 EdU- und pH3-positive Zellen ausgewertet.

In unbehandelten Mitosen wurde ein sehr konstantes γ H2AX-Foci-Hintergrundlevel von ca. 7 Foci pro Zelle gemessen (Abbildung 4.29 A). Nach einer 10-stündigen HU-Behandlung wurde in mitotischen Zellen eine deutlich erhöhte Zahl an γ H2AX-Foci (\sim 20) detektiert. In Abbildung 4.29 B sind exemplarische Immunfluoreszenzaufnahmen einer mit 10 h HU behandelten Mitose dargestellt.

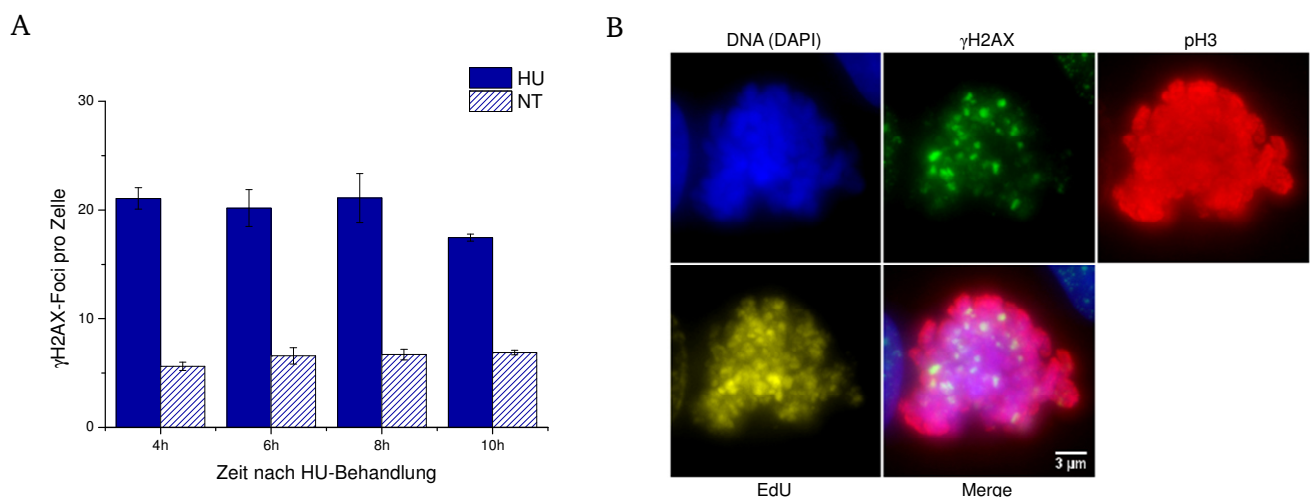


Abbildung 4.29: γ H2AX-Foci-Kinetik nach 10 h HU-Behandlung in mitotischen Tumorzellen

Exponentiell wachsende, humane Lungenkrebszellen (A549) wurden 36 h nach der Aussaat für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und für 10 h mit 0,5 mM Hydroxyurea behandelt. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeiten fixiert (4 h – 10 h) und gegen γ H2AX, pH3, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Es wurden pro Experiment 40 EdU- und pH3-positive Zellen ausgewertet. (A) γ H2AX-Foci-Kinetik in unbehandelten (NT) und HU-behandelten (HU) Mitosen. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert aus n=3 Experimenten dar, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Mit dem *Students t-Test* konnte gezeigt werden, dass die HU-behandelten Zellen eine statistisch signifikant höhere Anzahl an γ H2AX-Foci aufwiesen als die unbehandelten Zellen. (4 h, 6 h, 10 h *** p<0,001; 8 h ** p<0,01) (B) Exemplarische Immunfluoreszenzaufnahme einer mitotischen Zelle nach 10 h HU-Behandlung in der γ H2AX (grün), pH3 (rot), EdU (gelb) und die DNA (DAPI, blau) sowie eine Überlagerung von γ H2AX, pH3 und der DNA (*Merge*) dargestellt sind. Der dargestellte Maßstabsbalken entspricht 3 μ m (Aufnahmen erfolgten mit 1000x Vergrößerung).

Da die Zellen nach einer 10-stündigen HU-Behandlung ähnlich wie nach 24 h HU die Mitose mit einer erhöhten Anzahl an γ H2AX-Foci erreichten, deutete dies auf eine unzureichende Induktion des G2/M-

Arrests hin. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurden im Folgenden Chromosomenstudien nach 10 h HU-Behandlung in G2-Phase- und mitotischen Zellen durchgeführt.

Für diese Experimente wurden exponentiell wachsende, humane Zervixkarzinomzellen (HeLa) 36 h nach ihrer Aussaat für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und anschließend für 10 h mit 0,5 mM HU behandelt. Die Zellen wurden 7 h nach Ende der Behandlung für 1 h mit Calyculin A inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert und auf Objektträger getropft, um eine Spreitung der Chromosomen zu erreichen. Die Chromosomen wurden gegen EdU und die DNA (DAPI) gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop mit den Programmen *MSearch* und *Autocapt* von *Metasystems* aufgenommen. Anschließend wurden die Chromosomenspreitungen mit 70 % Ethanol entfärbt, mit Giemsa gefärbt und erneut aufgenommen. Pro Experiment wurden 40 EdU-positive Chromosomen-Spreitungen ausgewertet und die Anzahl der Chromatidbrüche auf 70 Chromosomen normiert.

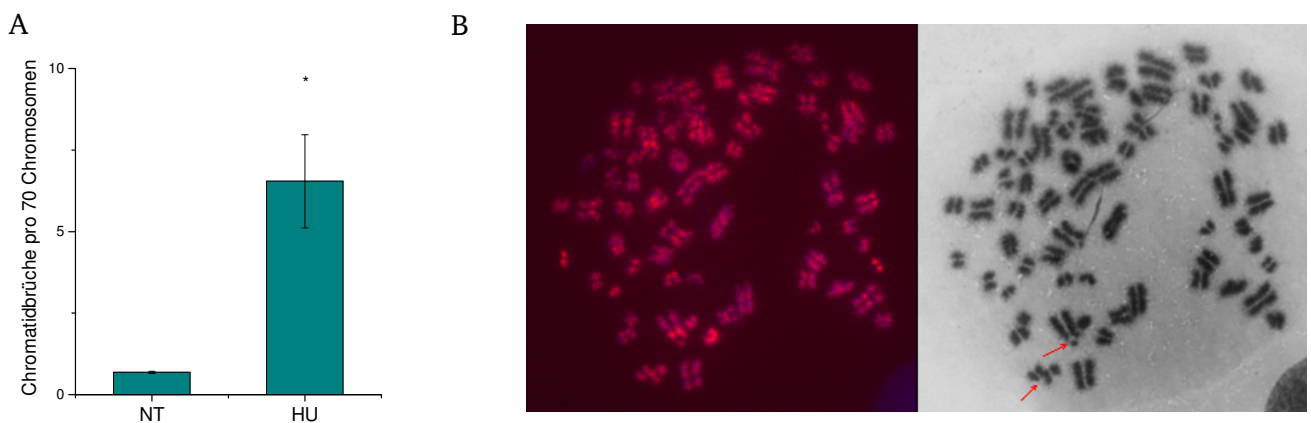


Abbildung 4.30: Chromatidbrüche nach 10 h HU-Behandlung in G2-Phase-Zellen

Exponentiell wachsende, humane Zervixkarzinomzellen (HeLa) wurden 36 h nach der Aussaat mit 5 μ M EdU markiert und für 10 h mit 0,5 mM Hydroxyurea behandelt. 7 h nach Ende der Behandlung wurden die Zellen für 1 h mit Calyculin A versetzt, um eine vorzeitige Kondensation der G2-Phase-Chromosomen zu erreichen. Anschließend wurden die Zellen fixiert, auf Objektträger getropft und gegen EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Nachdem diese Färbung aufgenommen war, wurden die Chromosomen entfärbt, mit Giemsa gefärbt und erneut aufgenommen. (A) Chromatidbrüche in unbehandelten (NT) und HU-behandelten (HU) G2-Phase-Zellen. Die Brüche wurden auf 70 Chromosomen pro Chromosomenspreitung normiert. Es wurden pro Experiment 40 EdU-positive Chromosomenspreitungen ausgewertet. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert aus $n=3$ Experimenten dar, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die statistische Signifikanz wurde mit dem *Students t-Test* berechnet. * $p<0,05$ (B) Exemplarische Aufnahmen einer Chromosomenspreitung in der G2-Phase nach 10 h HU-Behandlung (630x Vergrößerung). Die linke Abbildung zeigt die Überlagerung der EdU- und DNA-Färbung (DAPI) und rechts die Giemsa-Färbung. Die roten Pfeile in der Giemsa-Darstellung markieren beispielhaft zwei Chromatidbrüche.

In unbehandelten Zellen wurden 0,7 Chromatidbrüche pro 70 Chromosomen detektiert, nach einer 10-stündigen HU-Behandlung stieg dieser Wert auf 6,5 an (Abbildung 4.30 A). Abbildung 4.30 B zeigt exemplarisch eine Chromosomenspreitung nach 10 h HU, links die Überlagerung der EdU- und DNA-Färbung (DAPI) und rechts die Giemsa-Färbung. In der Giemsa-Färbung sind zwei Chromatidbrüche exemplarisch mit roten Pfeilen markiert.

Für die Untersuchung der Chromatidbrüche in der ersten Metaphase nach Ende der 10-stündigen HU-Behandlung wurden humane Zervixkarzinomzellen (HeLa) 36 h nach der Aussaat mit 5 μ M EdU behandelt. Anschließend wurden die Zellen für 10 h mit 0,5 mM HU versetzt und 7 h nach Ende dieser Behandlung für 3 h mit Colcemid inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert und auf Objektträger getropft. Die Chromosomen wurden gegen EdU und die DNA (DAPI) gefärbt, aufgenommen, mit 70 % Ethanol entfärbt, mit Giemsa gefärbt und erneut aufgenommen. Pro Experiment wurden 40 EdU-positive Metaphasen ausgewertet und die Anzahl der Chromatidbrüche auf 70 Chromosomen normiert.

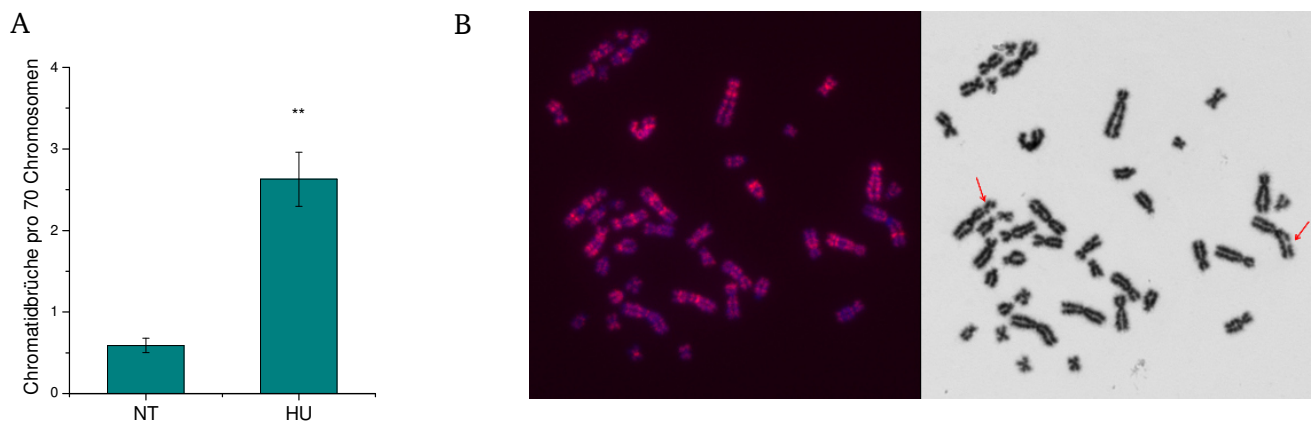


Abbildung 4.31: Chromatidbrüche nach 10 h HU-Behandlung in mitotischen Zervixkarzinomzellen

Exponentiell wachsende, humane Zervixkarzinomzellen (HeLa) wurden 36 h nach der Aussaat mit 5 μ M EdU markiert und für 10 h mit 0,5 mM Hydroxyurea behandelt. 7 h nach Ende der Behandlung wurden die Zellen für 3 h mit Colcemid versetzt, um mitotische Zellen anzureichern. Anschließend wurden sie fixiert, auf Objektträger getropft und gegen EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Nachdem diese Färbung aufgenommen war, wurden die Chromosomen entfärbt, mit Giemsa gefärbt und erneut aufgenommen. (A) Chromatidbrüche in unbehandelten (NT) und HU-behandelten (HU) Zellen, normiert auf 70 Chromosomen pro Metaphase. Es wurden pro Experiment 40 EdU-positive Metaphasen ausgewertet. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert aus $n=3$ Experimenten dar, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die statistische Signifikanz wurde mit dem *Students t-Test* berechnet. ** $p<0,01$ (B) Exemplarische Aufnahme einer EdU-positiven Metaphasen-Spreitung nach 10 h HU-Behandlung (630x Vergrößerung). Die linke Abbildung zeigt die Überlagerung aus EdU- und DAPI-Färbung, die rechte die Giemsa-Färbung. Die roten Pfeile in der Giemsa-Darstellung markieren beispielhaft zwei Chromatidbrüche.

Unbehandelte Zellen zeigten ein Hintergrundniveau von 0,6 Chromatidbrüchen pro 70 Chromosomen, nach 10 h HU-Behandlung wurden 2,6 Chromatidbrüche ermittelt (Abbildung 4.31 A). Abbildung 4.31 B zeigt exemplarisch eine Chromosomenspreitung nach 10 h HU, links die Überlagerung der EdU- und DNA-Färbung (DAPI) und rechts die Giemsa-Färbung. In der Giemsa-Färbung sind zwei Chromatidbrüche exemplarisch mit roten Pfeilen markiert.

Nach einer 10-stündigen HU-Behandlung wurde in G2-Phase-Zellen und Mitosen eine statistisch signifikant erhöhte Anzahl an Chromatidbrüchen detektiert. Die Anzahl der Chromatidbrüche in den G2-Phase-Zellen und Mitosen war nach 10-stündiger HU-Behandlung zwar niedriger als nach 24-

stündiger, trotzdem deutet auch dieses Ergebnis auf einen ineffizienten G2/M-Arrest nach 10 h HU-Behandlung hin. Weiterhin legen diese Ergebnisse nahe, dass die ineffiziente Reparatur und das vorzeitige Aufheben des G2/M-Arrests ein generelles Phänomen nach HU-Behandlung sind und nicht oder nur zum Teil auf die Länge des HU-Blocks zurückzuführen sind.

4.3.3. Untersuchung der DSB-Struktur nach 10 h HU-Behandlung

In dieser Arbeit wurde bereits die Bedeutung der DSB-Struktur für die ineffiziente DSB-Reparatur nach 24-stündiger HU-Behandlung beschrieben (siehe Abschnitt 4.2.4). Da die DSB-Reparatur nach 10 h HU-Behandlung effizienter abläuft, wirft dies die Frage auf, ob sich die Struktur der DSBs nach 10 h und nach 24 h HU-Behandlung unterscheidet. Um die Struktur der nach 10 h HU-Behandlung induzierten DSBs mit der nach 24-stündiger HU-Behandlung zu vergleichen, wurde im folgenden Experiment die Beladung der einzelsträngigen DNA-Bereiche der DSBs mit Rad51 und RPA nach 10 h HU untersucht.

Für dieses Experiment wurden exponentiell wachsende, humane Lungenkrebszellen (A549) 36 h nach der Aussaat für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und anschließend für 10 h mit 0,5 mM HU behandelt. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeiten (0 h - 10 h) fixiert und gegen Rad51, RPA, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Pro Experiment wurden 40 EdU-positive Zellen ausgewertet.

Die unbehandelten Zellen zeigten ein relativ konstantes Hintergrundlevel von ca. 8 Rad51- und 4,5 RPA-Foci (Abbildung 4.32). Direkt nach Ende der HU-Behandlung wurden 40 Rad51-Foci pro Zelle gemessen. Die Anzahl der Rad51-Foci nahm während des 10-stündigen Beobachtungszeitraums auf 16 Foci pro Zelle ab. Die Abnahme der Rad51-Foci pro Zelle zwischen dem 0 h- und dem 10 h-Zeitpunkt war statistisch signifikant. Durch die 10-stündige HU-Behandlung wurden 40 RPA-Foci induziert, nach 10 h hatte sich die Anzahl der RPA-Foci auf 28 verringert.

Nach einer 10-stündigen HU-Behandlung wurden etwa genauso viele Rad51- und RPA-Foci induziert wie nach einer 24-stündigen HU-Behandlung (Abbildung 4.24; Abbildung 4.32). Die Rad51-Foci lagen 10 h nach Ende der 10-stündigen HU-Behandlung niedriger als nach der langen HU-Behandlung. Die RPA-Foci-Zahl sank nach beiden Behandlungszeiträumen auf den gleichen Wert ab. Nach der kürzeren HU-Behandlung zeigte sich zwischenzeitlich (4 h – 6 h) ein Anstieg an RPA-Foci pro Zelle.

Die Untersuchung der einzelsträngigen DNA-Bereiche an den DSBs erbrachte nach 10 h HU-Behandlung ähnliche Ergebnisse wie nach 24 h HU. Allerdings war die Abnahme der Rad51-Foci bei gleicher Induktion nach 10 h HU größer als nach 24 h HU. Die RPA-Foci dagegen verhielten sich nach 10 h HU ähnlich wie nach 24-stündiger HU-Behandlung, den einzigen Unterschied stellte der leichte Anstieg der RPA-Foci-Zahl zwischen 4 h und 6 h nach HU-Behandlung dar.

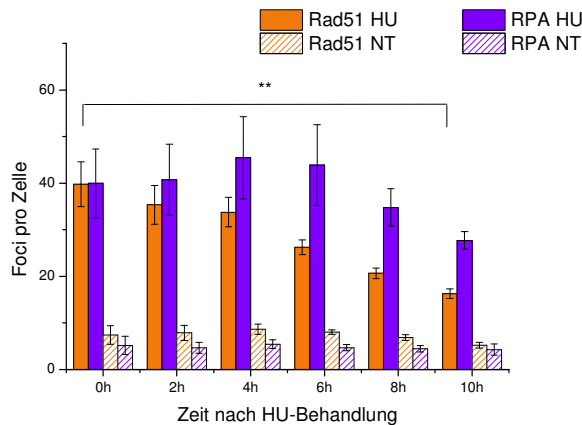


Abbildung 4.32: Beladung von einzelsträngigen DNA-Bereichen mit Rad51 und RPA in humanen Tumorzellen nach 10 h HU. Exponentiell wachsende, humane Lungenkrebszellen (A549) wurden 36 h nach der Aussaat für 1 h mit 5 μ M EdU markiert und anschließend für 10 h mit 0,5 mM Hydroxyurea behandelt. Nach unterschiedlichen Reparaturzeiten (0 h – 10 h) wurden die Zellen fixiert und gegen Rad51, RPA, EdU und die DNA (DAPI) gefärbt. Es wurden pro Experiment 40 EdU-positive Zellen ausgewertet. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert aus n=3 Experimenten dar, die Fehlerbalken geben den Standardfehler der Mittelwerte an. Die statistische Signifikanz wurde mit dem *Students t-Test* berechnet. ** $p < 0,01$

Zusammengefasst zeigten Tumorzellen nach einer 10-stündigen HU-Behandlung eine etwas effizientere DSB-Reparatur als nach 24 h HU. Trotzdem führte auch diese Behandlung dazu, dass Zellen mit einer erhöhten Anzahl an γ H2AX-Foci und Chromatidbrüchen die Mitose erreichten. Dies lässt vermuten, dass auch nach 10 h HU-Behandlung kein G2/M-Arrest induziert wird. Die Struktur der DSBs nach kurzer HU-Behandlung scheint sich nur leicht von der Struktur nach 24 h HU zu unterscheiden. Die Anzahl der Rad51-Foci fiel deutlicher ab, was zu der stärkeren Abnahme der γ H2AX-Foci passt und eine effizientere DSB-Reparatur unterstreicht. Der kurze Anstieg der RPA-Foci könnte ebenfalls auf die Reparatur der DSBs zurückzuführen sein und zwar auf die Beladung des *D-Loops* mit RPA in einem späten HR-Schritt. Dies würde bedeuten, dass die Länge des HU-Blocks zumindest einen kleinen Einfluss auf die Reparatur und die Struktur der HU-induzierten DSBs besitzt.

5. Diskussion

Hydroxyurea (HU) inhibiert die Ribonukleotidreduktase, verhindert so die Umwandlung der Ribonukleotide in Desoxyribonukleotide und führt dadurch zu einer Depletion des intrazellulären Desoxyribonukleotid-Pools (Bianchi et al, 1986; Eklund et al, 2001; Krakoff et al, 1968). Da Desoxyribonukleotide für die DNA-Synthese benötigt werden, führt diese Depletion zur Arretierung der Replikationsgabeln in der S-Phase (Yarbro et al, 1965). Aufgrund dieser Wirkung wurde HU sowohl zur Behandlung von HIV (Gao et al, 1993; Lori & Lisziewicz, 1998; Lori et al, 1994) als auch zur Behandlung von Krebs und dabei besonders bei einigen Leukämien eingesetzt (Donehower, 1992; Kennedy, 1992; Stehman, 1992). Neben dieser Verwendung in der Medizin bietet sich eine HU-Behandlung von Zellen für die Untersuchung der Wirkung von Replikationsstress durch arretierte Replikationsgabeln und der dadurch ausgelösten Signalkaskaden an. Da durch eine HU-Behandlung auch Doppelstrangbrüche (DSBs) induziert werden, ist es ebenfalls möglich die Reparatur von spezifisch in der S-Phase induzierten Brüchen zu analysieren und deren Reparaturwege zu charakterisieren.

5.1. Die Dauer der HU-Behandlung ist entscheidend für die Induktion von DSBs

Durch die von einer HU-Behandlung ausgelöste Unterversorgung der DNA-Polymerasen mit Nukleotiden kommt es zu einem Arrest der aktiven Replikationsgabeln während der S-Phase (Bianchi et al, 1986). Werden Replikationsgabeln über einen längeren Zeitraum arretiert, werden sie instabil und kollabieren (Petermann et al, 2010a). Als Kollaps einer Replikationsgabel bezeichnet man den Vorgang der Entkopplung von Helikase und DNA-Polymerase an der Replikationsgabel. Diese Dissoziation wird induziert wenn nur die DNA-Polymerase inhibiert wird (z.B. durch HU oder Aphidicolin), während die Helikase weiter die DNA entwindet (Byun et al, 2005; Görisch et al, 2008; Li & Heyer, 2008; Pacek & Walter, 2004; Walter & Newport, 2000). Die kollabierten Replikationsgabeln können durch Mus81 (Hanada et al, 2007) oder Artemis (Unno et al, 2013) prozessiert werden, wodurch ein einendiger DSB induziert wird. Es konnte bereits in früheren Studien gezeigt werden, dass die Länge des Replikationsblocks entscheidend für die Ausbildung von DSBs durch den Kollaps von Replikationsgabeln ist (Hanada et al, 2007; Petermann et al, 2010a; Saintigny et al, 2001; Toledo et al, 2013). In den genannten Veröffentlichungen wurde die Induktion von DSBs durch HU-Behandlung in erster Linie mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) untersucht. Diese Methode ist jedoch insensitiv und es ist nicht möglich die DSB-Anzahl auf Einzelzellebene zu analysieren. Eine Zellzyklusphasen-spezifische Analyse von HU-induzierten DSBs ist mit der PFGE nur nach vorheriger Synchronisation der Zellen möglich, was zu unerwünschten Nebeneffekten führen kann. In der vorliegenden Arbeit konnte das mit PFGE erzeugte Ergebnis, dass die Dauer des HU-Blocks entscheidend für die Induktion von DSBs ist, mit Hilfe des deutlich sensitiveren und Zellzyklusphasen-

spezifischen γ H2AX-Foci-Assays bestätigt werden (Abbildung 4.2). Dabei konnte außerdem gezeigt werden, dass nur Zellen, die sich zur Zeit der Behandlung in der S-Phase befanden, und Zellen, die während der Behandlung am G1/S-Übergang akkumulierten, γ H2AX-Foci aufwiesen. Dies ist auf den durch eine HU-Behandlung ausgelösten Replikationsstress zurückzuführen, der die DNA-Synthese inhibiert. Da dieser Prozess nur in S-Phase-Zellen stattfindet, führt eine HU-Behandlung auch nur in dieser Zellzyklusphase zur Induktion von DSBs. Die Akkumulation von Zellen am G1/S-Übergang tritt nur bei einer langen HU-Behandlung auf, da durch HU lediglich die S-Phase-Zellen in ihrer Progression durch den Zellzyklus gestört werden, während Zellen, die sich in der G2- oder der G1-Phase befinden, ungehindert bis zum G1/S-Übergang progressieren können. Bei einer kurzen HU-Behandlung erreichen nur einige wenige Zellen, die sich bereits zu Beginn der Behandlung am Ende der G1-Phase befanden, den G1/S-Übergang und akkumulieren dort, während bei einer langen HU-Behandlung auch G2-Phase-Zellen ausreichend Zeit haben die Mitose und die G1-Phase zu durchlaufen, was zu einer deutlichen Akkumulation von Zellen am G1/S-Übergang führt (Abbildung 4.1). In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass während der 1-stündigen BrdU-Markierung und dem Beginn der HU-Behandlung ein nicht zu unterschätzender Anteil an BrdU-positiven Zellen die S-Phase verlässt und bei einer langen HU-Behandlung ebenfalls am G1/S-Übergang akkumuliert. Da sich diese Zellen während der BrdU-Behandlung noch in der S-Phase befanden, sind sie BrdU-positiv, doch durch das Abschließen der Replikation vor Beginn der HU-Behandlung weisen diese Zellen zunächst keine DNA-Schäden auf. Erreichen die Zellen allerdings während der langen HU-Behandlung den G1/S-Übergang wird die Replikation initiiert und es treten DSBs auf. Diese Zellpopulation verhält sich daher im Bezug auf die Anzahl der γ H2AX-Foci vergleichbar zu EdU-negativen G2-Zellen, welche während der HU-Behandlung den G1/S-Übergang erreichen. Da diese Zellen beim Übergang von der G1- in die S-Phase die Replikation induziert haben, zeigen sie γ H2AX-Foci, jedoch sehr wahrscheinlich eine geringere Anzahl als Zellen, welche sich während der HU-Behandlung in der Mitte der S-Phase befanden. In den Immunfluoreszenzanalysen wurden diese Zellen bei den frühen Reparaturzeiten soweit möglich aus der Auswertung ausgeschlossen, um das Foci-Induktionslevel nicht zu unterschätzen. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Induktionslevel der γ H2AX- und 53BP1-Foci in den einzelnen Zellen stark schwankte, die Mittelwerte der unabhängigen Experimente jedoch sehr ähnliche Werte zeigten (Abbildung 4.4). Diese starke Schwankung ist sehr wahrscheinlich auf die unterschiedliche Anzahl an aktiven Replikationsgabeln zum Zeitpunkt der HU-Zugabe zurückzuführen, welche durch das Fortschreiten der einzelnen Zelle in der S-Phase bestimmt wird. Dass die Mittelwerte in den einzelnen Experimenten sehr ähnlich sind, unterstreicht jedoch, dass der γ H2AX-Foci-Assay für die Analyse der DSB-Induktion und -Reparatur nach HU-Behandlung geeignet ist.

Bei den durchflusszytometrischen Analysen war es nicht möglich, die am G1/S-Übergang akkumulierten BrdU-positiven Zellen aus der Auswertung auszuschließen, da sie bei späteren Zeitpunkten nicht von den Zellen zu unterscheiden waren, welche sich bereits zu Beginn der HU-

Behandlung am Anfang der S-Phase befanden (Abbildung 4.8). Ein Ausschluss dieser Zellen bei frühen Reparaturzeiten hätte zu einer Überschätzung der S-Phase-Population zu späten Reparaturzeiten geführt.

Bei der Analyse der γ H2AX-Foci nach kurzer HU-Behandlungsdauer (2 h) zeigte sich ein flächiges γ H2AX-Hintergrundsignal mit nur einigen wenigen γ H2AX-Foci (Abbildung 4.2). Diese starke H2AX-Phosphorylierung ist sehr wahrscheinlich auf ein Signal von den arretierten Replikationsgabeln zurückzuführen. Um zu zeigen, dass die nach langer HU-Behandlungsdauer analysierten γ H2AX-Foci tatsächlich DSBs markieren und nicht wie die γ H2AX-Signale nach 2h HU-Behandlung auf arretierte Replikationsgabeln zurückzuführen sind, wurde eine Doppelfärbung mit 53BP1 durchgeführt. 53BP1 ist ein Mediatorprotein, welches nach der Induktion von DSBs rasch zu diesen rekrutiert wird und dort bindet (Anderson et al, 2001; Rappold et al, 2001; Schultz et al, 2000). Daher eignet sich 53BP1 gut als Marker für DSBs. Eine 24-stündige HU-Behandlung führte zu einer ähnlich hohen Anzahl an 53BP1- wie γ H2AX-Foci, welche sehr stark miteinander kolokalisierten (Abbildung 4.3). Auch die hohe Anzahl an Chromatidbrüchen, die in der G2-Phase nach einer 24-stündigen HU-Behandlung gemessen wurde (Abbildung 4.15), unterstützt die Schlussfolgerung, dass nach einer langen HU-Behandlung DSBs induziert werden und die analysierten γ H2AX-Foci nicht auf arretierte Replikationsgabeln zurückzuführen sind.

Bei der Induktion der γ H2AX-Foci fiel auf, dass es bei Behandlungsdauern zwischen 4 h und 10 h bzw. 10 h und 24 h zu einem deutlichen Anstieg der γ H2AX-Foci-Zahl kam. Wurde die HU-Behandlung der Zellen weiter auf 48 h ausgedehnt, nahm die Zahl der γ H2AX-Foci zwar immer noch zu, jedoch in einem deutlich geringeren Ausmaß. Bisher wurden in den meisten Studien keine HU-Behandlungszeit genutzt, welche länger als 24 h war. Einzig Hanada et al (2007) haben die Induktion von DSBs nach 30 h HU-Behandlung mittels PFGE analysiert. In dieser Studie zeigte sich ebenfalls nur ein leichter Anstieg zwischen 24- und 30-stündiger HU-Behandlung, der allerdings nicht näher diskutiert wurde. Da in einer S-Phase-Zelle während der Replikation zu jedem Zeitpunkt mehrere tausend Replikationsgabeln gleichzeitig aktiv sind (Maya-Mendoza et al, 2007), verwundert dieses Ergebnis und wirft die Frage auf, was die nach 24 h bzw. 30 h HU-Behandlung kollabierten Replikationsgabeln von den auch nach dieser langen Behandlung immer noch stabilen Replikationsgabeln unterscheidet. Der Kollaps von Replikationsgabeln wird auf die Entkopplung der DNA-Polymerase und der Helikase an der Replikationsgabel zurückgeführt. Durch diese Entkopplung wird das gesamte Replisom instabil und dissoziiert von der DNA (Lundin et al, 2002). Dieser Vorgang wird als Grund für die DSB-Induktion während einer HU-Behandlung angesehen. Warum dieser Vorgang nur an einigen wenigen Replikationsgabeln stattfindet, ist bisher aber nicht bekannt. Einen möglichen Hinweis geben die Studien von Toledo et al (2013), die zeigen konnten, dass während einer HU-Behandlung nur dann DSBs auftreten, wenn der zelluläre RPA-Pool erschöpft ist und die einzelsträngigen DNA-Bereiche an den Replikationsgabeln nicht länger von RPA stabilisiert werden können. In der genannten Studie wurde

die Depletion des intrazellulären RPA-Pools durch eine hohe HU-Konzentration (2 mM) und gleichzeitiger Behandlung mit einem ATR-Inhibitor erreicht. Bei dieser Behandlung trat bereits nach kurzen Zeiten eine massive DSB-Induktion auf. Dass die Erschöpfung des intrazellulären RPA-Pools bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten HU-Konzentration nicht der Grund für die Induktion der DSBs sein kann, wurde dadurch gezeigt, dass eine ATR-Depletion nicht zu einer erhöhten DSB-Induktion führte (Abbildung 4.5). Außerdem sind nach der Depletion von Rad51 alle DSBs mit RPA markiert (Abbildung 4.26), was ebenfalls zeigt, dass der RPA-Pool nicht depletiert sein kann. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass in der vorliegenden Arbeit durch die Wahl der 50-75 % niedrigeren HU-Konzentration in den Zellen eine physiologischere Situation herrscht als die in vielen anderen Studien untersuchte (Hanada et al, 2007; Petermann et al, 2010a; Saintigny et al, 2001; Toledo et al, 2013). Warum trotzdem DSBs induziert werden, könnte auf die auch während der Arretierung der Replikation stattfindende Transkription zurückzuführen sein (Toledo et al, 2013). Kollidiert die Transkriptionsmaschinerie mit einer arretierten Replikationsgabel, könnte dies zum Kollaps der Replikationsgabel und zur Induktion von DSBs führen. Mit Hilfe eines *Chromatin-Immunoprecipitation-Sequencing*-Experiments konnte in Kooperation mit Dr. A. Rapp und W. Yu (AG Cardoso, TU Darmstadt) kürzlich gezeigt werden, dass nach 24-stündiger HU-Behandlung in langen Genen und an Telomeren besonders oft γ H2AX-Foci und damit DSBs auftreten. Helmrich et al (2011) zeigten, dass die Transkription sehr langer Gene länger als ein Zellzyklus dauert und es daher zu einer Kollision der Transkriptionsmaschinerie mit den Replikationsgabeln kommen kann. Weiterhin gibt es Replikons (DNA-Bereiche, die von einem einzigen Replikationsursprung aus repliziert werden), welche die gesamte Dauer der S-Phase benötigen, um repliziert zu werden (Berezney et al, 2000; Yurov & Liapunova, 1977). Auch in diesen ist die Wahrscheinlichkeit besonders hoch, dass sich dort arretierte Replikationsgabeln befinden, mit denen die Transkriptionsmaschinerie kollidieren könnte. Aufgrund dessen deuten die hier vorgestellten Ergebnisse auf eine Beteiligung der Transkription an der Induktion von DSBs nach Arretierung von Replikationsgabeln hin, zumindest in einer Situation, in welcher der intrazelluläre RPA-Pool nicht depletiert ist.

5.1.1. Einfluss von ATM, ATR und MDC1 auf die DSB-Induktion nach HU-Behandlung

ATM und MDC1 sind in erster Linie für ihre Rollen als Sensor- und Mediatorproteine an Bestrahlungs-induzierten DSBs mit glatten Enden bekannt. Beide Proteine sind jedoch auch an der Regulation der S-Phase und der Antwort auf Replikationsstress beteiligt. ATM ist in die Regulation der Initiation der Replikation und damit in den zeitlichen Ablauf der DNA-Synthese involviert (Gamper et al, 2012; Shechter et al, 2004a), wodurch es ohne ATM zu Strahlungs-resistenter DNA-Synthese (*radioresistent DNA synthesis*; RDS) kommt (Falck et al, 2001; Painter & Young, 1980). RDS beschreibt das Unvermögen von Zellen die DNA-Replikation nach Bestrahlung oder Behandlung mit DNA-schädigenden Chemikalien zu verlangsamen oder zu inhibieren. Übereinstimmend mit diesen

Befunden und einer erhöhten Aktivität von Cdk2 nach ATM-Inhibition (Shechter et al, 2004a) zeigten die in dieser Arbeit untersuchten, ATM-depletierten Zellen nach einer langen HU-Behandlung (10 h, 24 h) eine statistisch signifikant erhöhte Anzahl an DSBs im Vergleich zu ATM-profizienten Zellen (Abbildung 4.6). ATM unterdrückt in der S-Phase die Aktivierung von zusätzlichen, passiven Replikationsursprüngen durch die Inhibition von Cdk2. Wird dies durch eine ATM-Inhibition verhindert, kommt es zu vermehrter Aktivierung von Replikationsgabeln, welche während der HU-Behandlung arretieren und kollabieren können, was die höhere DSB-Zahl erklären könnte. Gamper et al (2012) konnten zeigen, dass ATM in ungestressten Zellen direkt mit PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) interagiert und dadurch die DNA-Synthese steuert. In der genannten Veröffentlichung wurde gezeigt, dass die Inhibition aber nicht die Depletion von ATM die DNA-Synthese inhibiert, weshalb die Autoren spekulierten, dass die ATM-Inhibition zu einer physischen Blockade der DNA-Synthese führt. In der vorliegenden Arbeit war der Effekt einer ATM-Inhibition auf die DSB-Induktion nach HU-Behandlung größer als der Effekt einer ATM-Depletion, was jedoch wahrscheinlich eher auf die höhere Effizienz des Inhibitors zurückzuführen ist, als auf eine physische Blockade der DNA-Synthese, da durch die HU-Behandlung die DNA-Synthese bereits inhibiert wird.

Kommt es in S-Phase-Zellen zur Arretierung eines einzelnen oder einiger weniger Replikationsursprünge, werden benachbarte Replikationsursprünge innerhalb der gleichen Replikationsfabriken (auch als Replikations-Cluster bezeichnet) aktiviert, um die DNA-Synthese abschließen zu können (Shechter et al, 2004a; Woodward et al, 2006). Als Replikationsfabrik wird eine Gruppe von Replikationsursprüngen bezeichnet, die sich in räumlicher Nähe zueinander befinden und die gleichzeitig aktiviert werden (Gillespie & Blow, 2010). Die Replikationsfabrik enthält aber auch passive Replikationsursprünge, die in ungestressten Zellen unterdrückt werden, aber als *back-up* dienen, um die Arretierung einzelner Replikationsgabeln ausgleichen zu können (Shechter et al, 2004a; Woodward et al, 2006). Werden dagegen alle Replikationsgabeln durch das Auftreten von Replikationsstress arretiert, inhibiert der S-Phase-Arrest die Aktivierung von passiven Replikationsursprüngen, um die Situation für die Zelle nicht noch zu verschlimmern (Dimitrova & Gilbert, 2000; Woodward et al, 2006).

Eine MDC1-Depletion führt zu Strahlungs-resistenter DNA-Synthese, da es für die Aktivierung eines Schadens-abhängigen S-Phase-Arrests benötigt wird (Goldberg et al, 2003; Wu et al, 2008). Zudem wird MDC1 eine Rolle bei der Akkumulation von TopBP1 zugesprochen, welches für die Aktivierung von ATR benötigt wird (Wang et al, 2011). MDC1 phosphoryliert außerdem weitere *downstream*-Faktoren des *intra-S-Phase-Checkpoints* wie Chk1 und RPA und amplifiziert das ATR-Signal nach Replikationsstress (Wang et al, 2011). Diese Beobachtungen stellen eine Erklärung für die erhöhte DSB-Induktion durch HU-Behandlung nach MDC1-Depletion dar, wie sie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte (Abbildung 4.7). Da ohne MDC1 der *intra-S-Phase-Checkpoint* nicht induziert wird, führt dies zu einer verstärkten Aktivierung neuer Replikationsgabeln, welche bei HU-Behandlung

arretiert werden und kollabieren können. Die Aktivierung neuer Replikationsursprünge erfolgt wie oben beschrieben in ungestressten Zellen, um die Replikation bei der Arretierung einzelner Replikationsgabeln durch die Aktivierung benachbarter, passiver Replikationsursprünge abzuschließen. Da durch die MDC1-Depletion der Mechanismus gestört wird, welcher normalerweise bei der Arretierung aller Replikationsgabeln die Aktivierung neuer Replikationsursprünge verhindert, führt diese zu einer erhöhten DSB-Induktion bei HU-Behandlung.

ATR ist in der S-Phase als wichtigste DNA-Schadenssignalkinase bekannt, da es durch einzelsträngige DNA-Bereiche aktiviert wird, welche oft an Replikationsintermediaten entstehen (Liu et al, 2011; Shiotani & Zou, 2009; Zou & Elledge, 2003). ATR ist genau wie ATM an der Regulation der Replikation und des S-Phase-Arrests beteiligt und steuert die Aktivierung und Unterdrückung von Replikationsursprüngen (Dimitrova & Gilbert, 2000; Feijoo et al, 2001; Maya-Mendoza et al, 2007; Shechter et al, 2004a; Shechter et al, 2004b; Woodward et al, 2006). Es wurde bereits gezeigt, dass ATR durch HU-Behandlung aktiviert wird (Feijoo et al, 2001) und dass es an der Stabilisierung arretierter Replikationsgabeln beteiligt ist (Sorensen et al, 2005; Toledo et al, 2013). Toledo et al (2013) zeigten kürzlich, dass eine ATR-Inhibition bereits bei sehr kurzen HU-Behandlungszeiten zu einer massiven Induktion von DSBs führt. Die Autoren dieser Veröffentlichung begründen diesen Effekt mit der durch ATR-Inhibition ausgelösten Aktivierung neuer Replikationsursprünge. Diese werden durch HU arretiert und zur Stabilisierung von RPA gebunden. Werden so viele Replikationsursprünge aktiviert, dass der intrazelluläre RPA-Pool nicht ausreicht, um diese weiterhin zu stabilisieren, kommt es zum Kollaps von Replikationsgabeln und zur Induktion von DSBs. In dieser Studie wurde allerdings eine HU-Konzentration von 2 mM verwendet, für die in dieser Veröffentlichung ebenfalls gezeigt wurde, dass sie zusammen mit einer ATR-Inhibition zu Anzeichen von Seneszenz in den behandelten Zellen führt. Trotz der beschriebenen Rolle von ATR bei der Aktivierung passiver Replikationsursprünge konnte in der vorliegenden Arbeit erstaunlicherweise keine Erhöhung der DSB-Induktion nach langer HU-Behandlung nachgewiesen werden (Abbildung 4.5). Dieses Resultat könnte mehrere Ursachen haben. Zunächst könnte die ATR-Depletion aufgrund einer geringen siRNA-Effizienz nicht ausgereicht haben, um ATR vollständig aus den Zellen zu entfernen. Da die verwendete HU-Konzentration niedriger war als die in den meisten Veröffentlichungen, könnte es aber auch sein, dass in der vorliegenden Arbeit eine physiologischere Situation nachgeahmt wurde als in anderen Veröffentlichungen. In dieser Situation könnte eine Restaktivität von ATR für die Stabilisierung der Replikationsgabeln ausreichend gewesen sein und dadurch eine höhere DSB-Induktion verhindert haben. Sollte die ATR-Depletion ausgereicht haben, um zu einer unplanmäßigen Aktivierung vieler, neuer Replikationsursprünge zu führen, konnte dies möglicherweise nicht durch eine höhere Anzahl an γ H2AX-Foci nachgewiesen werden, da sich die Replikationsursprünge, die nach Replikationsstress neu aktiviert werden, in den bereits aktiven Replikationsfabriken befinden (Maya-Mendoza et al, 2007; Toledo et al, 2013). Da sich die Replikationsgabeln einer Replikationsfabrik in räumlicher Nähe

zueinander befinden, ist es vielleicht nicht möglich zwei direkt nebeneinander kollabierte Replikationsgabeln als zwei unabhängige γ H2AX-Foci aufzulösen. Das Gleiche sollte dann jedoch auch bei den ATM- und MDC1-depletierten Zellen der Fall sein, außer eine Inhibition der ATM-abhängigen Signalkaskade führt über einen anderen Weg zur Induktion von DSBs als die ATR-abhängige Signalkaskade.

Dies wirft die Frage auf, welcher initiale Schaden nach HU-Behandlung zur Aktivierung von ATM, MDC1 und ATR führt und welche Signalkaskade durch diesen Schaden ausgelöst wird. Wenn die ATR-, ATM- oder MDC1-Depletion unabhängig von HU zur Fehlregulation der Replikation und damit zu einer unkontrollierten Aktivierung von neuen Replikationsursprüngen führen würde, müsste sich die DSB-Induktion auch in unbehandelten Zellen erhöhen. Dieser Effekt wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit bei keiner der Behandlungen beobachtet, während es in der Literatur Hinweise gibt, dass zumindest die Inhibition von ATR alleine bereits zu erhöhtem Replikationsstress und DSB-Induktion führt (Murga et al, 2009; Ragland et al, 2009; Sørensen et al, 2004). Dies legt wiederum nahe, dass ATR-depletierte Zellen eine ATR-Restaktivität besitzen, die für die Regulation der Replikation in ungestressten Zellen genügt und so eine höhere DSB-Induktion verhindert. Dass in dieser Arbeit Zellen mit einer ATR-Restaktivität ausgewertet wurden, könnte auch dadurch zustande kommen, dass vollständig ATR-depletierte Zellen massive Probleme haben die Replikation durchzuführen und sie daher möglicherweise aufgrund einer veränderten bzw. deutlich erhöhten γ H2AX-Hintergrundfärbung von der Auswertung der Zellen ausgeschlossen wurden.

Da unbehandelte Zellen weder nach ATR- noch nach ATM- oder MDC1-Depletion eine erhöhte Anzahl an γ H2AX-Foci aufweisen, kann eine Fehlregulation der Replikation durch das Fehlen eines dieser drei Faktoren in den HU-behandelten Zellen nicht der Grund für eine Erhöhung der γ H2AX-Foci-Zahl sein. Dies bedeutet, dass entweder die durch HU-Behandlung arretierten Replikationsgabeln oder die durch HU-Behandlung induzierten DSBs ein Signal auslösen, welches nach ATM- und MDC1-Depletion gestört ist wodurch eine erhöhte Anzahl an γ H2AX-Foci induziert wird, nach ATR-Depletion jedoch nicht. Die arretierten Replikationsgabeln führen aufgrund der langen, einzelsträngigen DNA-Bereiche zu einer ATR Aktivierung (Liu et al, 2011; Zou & Elledge, 2003), während die DSBs zu einer Aktivierung von ATM und MDC1 führen (Bhatti et al, 2011; Lee & Paull, 2005; Shiotani & Zou, 2009). Wird ATR, welches durch die arretierten Replikationsgabeln aktiviert wird, depletiert, hat dies keinen Einfluss auf die DSB-Induktion. Daher scheinen die durch HU-Behandlung induzierten, arretierten Replikationsgabeln keinen Einfluss auf die DSB-Induktion zu haben. ATM und MDC1 dagegen werden durch die HU-induzierten DSBs aktiviert und ihre Depletion führt zu einer erhöhten Anzahl an γ H2AX-Foci. Dies weist darauf hin, dass die durch HU-Behandlung induzierten DSBs ein Signal auslösen, welches durch ATM- oder MDC1-Depletion gestört wird. Diese Störung des Signals wiederum führt zu einer erhöhten Anzahl an γ H2AX-Foci nach HU-Behandlung. Die in dieser Arbeit beobachtete Erhöhung der DSB-Induktion nach ATM- oder MDC1-Depletion scheint also auf einen DSB-abhängigen aber ATR-

unabhängigen Mechanismus zurückzuführen zu sein. Unno et al (2013) zeigten, dass es nach einer langen HU-Behandlung und der Induktion von DSBs zu einer Aktivierung von ATM kommt, was diese Theorie unterstützt. Auch Bartek et al (2004) beschreiben, dass es während der S-Phase zur Induktion von verschiedenen *Checkpoints* kommen kann, je nachdem welcher Schaden das *Checkpoint*-Signal auslöst. In der vorliegenden Arbeit scheint die HU-Behandlung die Induktion eines DSB-abhängigen, Replikationsgabel-unabhängigen S-Phase-Arrests ausgelöst zu haben. Dieser S-Phase-Arrest ist in ATM- und MDC1-depletierten Zellen gestört und kann dadurch zu einer erhöhten DSB-Induktion in diesen Zellen führen.

5.2. HU-behandelte Zellen zeigen eine ineffiziente DSB-Reparatur und keinen G2/M-Arrest

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Reparatur von HU-induzierten DSBs untersucht und es konnte gezeigt werden, dass humane Tumorzellen eine sehr ineffiziente und humane Fibroblasten sogar keine detektierbare DSB-Reparatur nach 24-stündiger HU-Behandlung aufweisen (Abbildung 4.11). Dies ist ein sehr ungewöhnlicher Befund, da Zellen, denen eine Dosis ionisierender Strahlung appliziert wurde, welche eine ähnliche oder sogar höhere Zahl an DSBs induziert, in der gleichen Zeit einen Großteil der DSBs reparieren (Abbildung 4.20) (Deckbar et al, 2007; Jeggo et al, 2011; Rothkamm et al, 2003). Auch Zellen, in denen mit einem anderen S-Phase-schädigenden Agens wie MMS eine ähnliche Zahl an γ H2AX-Foci induziert wurde, zeigen in der gleichen Zeit eine deutlich effizientere DSB-Reparatur als HU-behandelte Zellen (Abbildung 4.21) (Ensminger et al, 2014; Nikolova et al, 2010).

Zunächst wurde vermutet, dass möglicherweise nicht die DSB-Reparatur nach HU-Behandlung ineffizient ist, sondern dass es über einen sekundären Mechanismus auch nach Ende der HU-Behandlung weiterhin zur Induktion von DSBs kommt. Überwiegt die Anzahl der neu induzierten DSBs die der reparierten, würde die Anzahl der γ H2AX-Foci bei der Untersuchung der DSB-Reparatur nicht abnehmen sondern ansteigen. Die ausbleibende Abnahme an γ H2AX-Foci nach HU-Behandlung könnte daher ein Gleichgewicht zwischen DSB-Induktion und -Reparatur widerspiegeln. Nach einer Behandlung mit MMS konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der DSBs nach Ende der Behandlung zunächst weiter ansteigt, da die Induktion neuer DSBs die Reparatur der während der Behandlung induzierten DSBs überwiegt (Nikolova et al, 2010). Aufgrund dessen wurde die DSB-Reparatur nach HU-Behandlung in Zellen mit einem HR-Defekt untersucht. Zellen, welche die HU-induzierten DSBs nicht reparieren können, sollten eine ansteigende Anzahl an γ H2AX-Foci zeigen, falls es zu einer Induktion weiterer DSBs kommt. Daher ermöglichte die Analyse von Reparatur-defizienten Zellen die Unterscheidung zwischen einer ineffizienten Reparatur der bereits während der HU-Behandlung induzierten DSBs und der Induktion neuer DSBs. Es wurde bereits in mehreren Studien mit Hilfe von Überlebensexperimenten und der Messung von Rad51-Foci gezeigt, dass HU-induzierte DSBs hauptsächlich durch die HR repariert werden (Lundin et al, 2002; Petermann et al, 2010a; Saintigny et

al, 2001; Sorensen et al, 2005). Aus diesem Grund wurde die Reparatur der HU-induzierten DSBs in BRCA2-depletierten Zellen untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Anzahl der γ H2AX-Foci in BRCA2-depletierten Zellen nach Ende der HU-Behandlung nicht anstieg. Es zeigte sich aber auch keine DSB-Reparatur während der untersuchten 10-stündigen Reparaturzeit (Abbildung 4.17). Dieses Ergebnis sowie der nur geringe Anstieg der SCEs (Abbildung 4.18) zeigen, dass nach HU-Behandlung tatsächlich nur eine sehr ineffiziente DSB-Reparatur stattfindet und keine neuen DSBs nach Ende der Behandlung entstehen. Zusätzlich wurde mit diesen Experimenten die Theorie, dass HU-induzierte DSBs über die HR repariert werden, untermauert.

Bei der Untersuchung der Zellzyklusprogression HU-behandelter Zellen stellte sich heraus, dass sich diese weder bei den untersuchten Tumorzellen noch bei den Fibroblasten von unbehandelten Zellen unterscheidet (Abbildung 4.9). Aufgrund der hohen Zahl an γ H2AX-Foci in der S/G2-Phase nach HU-Behandlung war dies ein unerwarteter Befund, da bereits in früheren Veröffentlichungen gezeigt wurde, dass sowohl eine durch MMS als auch eine durch IR induzierte, hohe Anzahl an DSBs in der G2-Phase zur Induktion des G2/M-Arrests führt (Abraham, 2001; Kousholt et al, 2012; Krempler et al, 2007; Nikolova et al, 2010; Sancar et al, 2004; Shibata et al, 2010). Bei der Überprüfung der Frage, ob möglicherweise nur Zellen, welche die Reparatur bereits abgeschlossen hatten, den G2/M-Arrest aufheben, stellte sich heraus, dass Zellen nach HU-Behandlung mit einer statistisch signifikant erhöhten Zahl an γ H2AX-Foci die Mitose und die G1-Phase erreichten (Abbildung 4.12; Abbildung 4.14). Auch die Anzahl der Chromatidbrüche in der Mitose nach 24-stündiger HU-Behandlung war statistisch signifikant erhöht (Abbildung 4.16) (Hanada et al, 2007; Toledo et al, 2013). Dass diese Ergebnisse nicht alleine auf die sehr lange Behandlungsdauer mit HU und der damit einhergehenden Arretierung der Replikation zurückgeführt werden können, wurde in der vorliegenden Arbeit mit der Analyse von Zellen nach einer 10-stündigen HU-Behandlung gezeigt. Nach 10 h HU-Behandlung wurde ebenfalls eine ineffiziente Reparatur detektiert (Abbildung 4.28), auch wenn diese etwas effizienter zu sein scheint als nach einer 24-stündigen Behandlung. Weiterhin konnte nach einer 10-stündigen HU-Behandlung eine statistisch signifikante Erhöhung der Chromatidbrüche in der G2-Phase (Abbildung 4.30) sowie in der Mitose (Abbildung 4.31) detektiert werden und eine deutlich erhöhte Anzahl an γ H2AX-Foci in der Mitose (Abbildung 4.29).

Dass diese Ergebnisse kein für S-Phase-interagierende Agenzien typisches Verhalten zeigen, wird bei dem Vergleich mit MMS-behandelten Zellen deutlich. Diese induzieren einen G2/M-Arrest (Abbildung 4.19) und zeigen nach dessen Aufhebungen nur eine sehr geringe Zahl an γ H2AX-Foci und Chromatidbrüchen in der Mitose (Ensminger et al, 2014; Nikolova et al, 2010). Die Arretierung von Replikationsgabeln durch die Depletion des Nukleotid-Pools stellt daher für Zellen eine besonders große Bedrohung dar, da sie zur Zellteilung mit unreparierten DNA-Schäden führt. Dies ist für die genomische Integrität der Zellen sehr gefährlich und kann zur Induktion von Mutationen und chromosomalen Rearrangements führen. Normalerweise würden Zellen nach einer solchen Schädigung

Apoptose induzieren, doch es konnte in Überlebensexperimenten gezeigt werden, dass nur ca. 30 % der für 24 h mit 0,5 mM HU behandelten Zellen absterben (persönliche Mitteilung Dr. M. Ensminger). Dies unterstreicht zusätzlich die Gefährdung, die für Zellen von einer Depletion des Nukleotid-Pools ausgeht. Aufgrund dieser Ergebnisse sollten im weiteren Verlauf der Arbeit die Gründe für den fehlenden G2/M-Arrest und die ineffiziente DSB-Reparatur nach HU-Behandlung analysiert werden.

5.2.1. Ursachen für den fehlenden G2/M-Arrest nach HU-Behandlung

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst analysiert, ob HU-behandelte Zellen aufgrund der langen Blockade in der S-Phase die Möglichkeit zur Induktion eines G2/M-Arrests verlieren. Dieser Effekt könnte z.B. auf eine durch HU-Behandlung ausgelöste Depletion des ATP-Pools zurückzuführen sein, wie sie bereits in einer frühen Veröffentlichung diskutiert wurde (Fishbein & Carbone, 1963). In Experimenten, in denen die 24-stündige HU-Behandlung mit einer Bestrahlung (HU+IR) oder einer MMS-Behandlung (HU+MMS) kombiniert wurde, stellte sich jedoch heraus, dass HU-behandelte Zellen einen G2/M-Arrest induzieren können (Abbildung 4.19). Aufgrund dieser Ergebnisse konnte ein Einfluss der HU-Behandlung auf den intrazellulären ATP-Pool ausgeschlossen werden. Dies wird ebenfalls von den Analysen durch Young and Hodas (1964) unterstützt, die für ihre zellulären Studien über den Effekt von HU auf den Metabolismus keine zusätzlich ATP-generierende Quelle verwenden mussten. Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass auch während der HU-Behandlung Proteine phosphoryliert werden können (Abbildung 4.20; Abbildung 4.23), woraus abzuleiten ist, dass ein ausreichender Vorrat an ATP in den Zellen vorhanden ist.

Zellen, die nur bestrahlt wurden, zeigten fast keine Verzögerung in der S-Phase, während Zellen nach MMS-Behandlung in der S-Phase deutlich verlangsamt wurden (Abbildung 4.19). Dass eine Röntgenstrahlungsdosis von bis zu 9 Gy keine starke Verzögerung der S-Phase-Progression hervor ruft, wurde bereits in einer früheren Publikation gezeigt (Krempler et al, 2007). Der *intra-S-Phase-Checkpoint* wird also erst durch höhere Strahlendosen aktiviert. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die bereits mehrfach beobachtete Verzögerung von S-Phase-Zellen nach MMS-Behandlung zum größten Teil auf die Arretierung der Replikationsgabeln an methylierten Basen zurückzuführen ist und weniger auf die Induktion eines ATM/ATR-abhängigen *Checkpoints* (Ensminger et al, 2014; Groth et al, 2010). Nach einer Bestrahlung sowie einer MMS-Behandlung von S-Phase-Zellen wurde ein robuster G2/M-Arrest induziert (Abbildung 4.19), was mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen überein stimmt (Krempler et al, 2007; Nikolova et al, 2010).

Bei der Untersuchung des G2/M-Arrests nach den kombinierten Behandlungen aus HU und MMS bzw. HU und Bestrahlung zeigte sich allerdings, dass der Arrest in diesen Zellen früher aufgehoben wurde als nach MMS-Behandlung bzw. Bestrahlung alleine (Abbildung 4.19). Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass die *Checkpoint*-Signalkaskade durch eine HU-Behandlung zwar nicht vollständig außer Kraft gesetzt wird, aber auch nicht vollständig funktionstüchtig verbleibt. Eine HU-Behandlung

hat daher zwar möglicherweise keinen Einfluss auf die Induktion, aber auf die Aufrechterhaltung des G2/M-Arrests. Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit die *Checkpoint*-Signalkaskade, die nach einer HU-Behandlung induziert wird, mit der nach einer MMS-Behandlung, einer Bestrahlung und einer kombinierten Behandlung aus HU und Bestrahlung verglichen.

ATR und ATM sind die beiden Proteinkinasen, die durch die Phosphorylierung der Checkpointkinasen 1 und 2 hauptsächlich für die Induktion eines Zellzyklusarrests nach DNA-Schäden zuständig sind. Während ATM in erster Linie von glatten DSB-Enden aktiviert wird und Chk2 phosphoryliert (Feijoo et al, 2001; Lukas et al, 2003; Matsuoka et al, 1998; Matsuoka et al, 2000; Shiotani & Zou, 2009), erfolgt die Aktivierung von ATR über die Induktion von einzelsträngigen DNA-Bereichen (ssDNA) und führt zu einer Phosphorylierung von Chk1 (Jazayeri et al, 2006; Liu et al, 2011; Lopez-Girona et al, 2001; Sorensen et al, 2005; Zachos et al, 2003; Zou & Elledge, 2003). Es gibt verschiedene Studien, die sich mit der Beteiligung der beiden Checkpointkinasen Chk1 und Chk2 an der Initiierung und der Aufrechterhaltung des G2/M-Arrests befassen. Cortez et al (2001) konnten zeigen, dass in humanen Zervixkarzinomzellen (HeLa) der ATR-ATRIP-Komplex für einen Bestrahlungs-induzierten G2/M-Arrest benötigt wird. Weiterhin ist bekannt, dass nach Bestrahlung in Hühnerzellen (DT40) Chk1 essentiell für den G2/M-Arrest ist und Chk1-defiziente Zellen daher keinen G2/M-Arrest induzieren (Zachos et al, 2003). Auch in Chk1-heterozygoten Mäusezellen konnte gezeigt werden, dass es trotz eines hohen, endogenen DNA-Schadenslevels zu einem vorzeitigen Eintreten in die Mitose kommt (Lam et al, 2004). Nach Bestrahlung von humanen Tumorzellen (U2OS) in der G2-Phase konnten Kousholt et al (2012) zeigen, dass ATR und Chk1 sowohl für die Induktion als auch für die Aufrechterhaltung des G2/M-Arrests benötigt werden. ATM dagegen wird für die Initiierung benötigt, während es bei der Aufrechterhaltung des G2/M-Arrests nur eine indirekte Rolle spielt, indem es durch die Aktivierung der Resektion zu einer ATR-Aktivierung beiträgt (Bhatti et al, 2011; Jazayeri et al, 2006). Shibata et al (2010) zeigten dagegen nach der Bestrahlung von humanen Fibroblasten und embryonalen Mäusefibroblasten (MEFs) in der G2-Phase, dass ohne ATR und Chk1 der G2/M-Arrest normal induziert, aber nicht aufrechterhalten wird. Diese Studie zeigt zwar eine Redundanz von Chk1 und Chk2 bei der Induktion des G2/M-Arrests, aber nicht bei dessen Aufrechterhaltung. Für diese wird sowohl das durch die resektierten DSBs induzierte pChk1-Signal als auch das durch die noch unreparierten DSBs mit glatten Bruchenden induzierte pChk2-Signal benötigt. Beamish and Lavin (1994) untersuchten den Unterschied in der Induktion des G2/M-Arrests nach Bestrahlung in der S- oder der G2-Phase. Dabei zeigte sich, dass ATM-defiziente Zellen nach der Bestrahlung in der G2-Phase keinen oder einen kurzen G2/M-Arrest induzierten, während nach Bestrahlung in der S-Phase ein G2/M-Arrest induziert wurde. Diese Ergebnisse wurden in einer weiteren Veröffentlichung durch Xu et al (2002) bestätigt.

Bei der Untersuchung der phosphorylierten und damit aktiven Form der beiden Checkpointkinasen im Vergleich von HU-Behandlung und ionisierender Strahlung (IR) fiel auf, dass eine HU-Behandlung in

erster Linie zu einer starken Aktivierung von Chk1 führt. Nach Bestrahlung ist pChk1 dagegen fast nicht nachweisbar und das Signal wird erst zu späten Zeiten etwas stärker (Abbildung 4.20). Ähnliche Ergebnisse zeigten Feijoo et al (2001), die nach HU-Behandlung eine starke Zunahme der Chk1-Kinaseaktivität beschrieben, während die Aktivität nach Bestrahlung auf Hintergrundniveau lag. Dies deutete zunächst auf die Induktion langer, einzelsträngiger DNA-Bereiche während der HU-Behandlung hin, die zu einer ATR- und Chk1-Aktivierung führten. Es ist auch bekannt, dass arretierte Replikationsgabeln mit RPA beladen werden, um diese zu stabilisieren, und dass dadurch ATR sowie Chk1 aktiviert werden (Michael et al, 2000; Sogo et al, 2002; Walter & Newport, 2000; Zou & Elledge, 2003). Um zu klären, ob das starke pChk1-Signal durch die arretierten Replikationsgabeln oder durch die einseitigen DSBs hervorgerufen wird, wurde eine 2-stündige mit einer 24-stündigen HU-Behandlung verglichen (Abbildung 4.23). Nach 2-stündiger HU-Behandlung wird nur eine geringfügige Anzahl an DSBs induziert (Abbildung 4.2), aber alle Replikationsgabeln werden arretiert (Bianchi et al, 1986; Petermann et al, 2010a; Young & Hodas, 1964). Dadurch wird das in diesen Zellen gemessene pChk1-Signal fast ausschließlich durch die arretierten Replikationsgabeln induziert. Das pChk1-Signal war nach 24-stündiger HU-Behandlung stärker als nach 2-stündiger, allerdings wurde es auch durch 100 % der untersuchten Zellen ausgelöst, da sich durch die bereits beschriebene Akkumulation während der langen HU-Behandlung alle Zellen in der S-Phase bzw. am G1/S-Übergang befanden (Abbildung 4.1; Abbildung 4.8). Durch eine kurze HU-Behandlung werden die Zellen nicht akkumuliert und es befinden sich nur maximal 40 % der Zellen in der S-Phase (Ensminger et al, 2014). Die arretierten Replikationsgabeln nach 2 h HU-Behandlung induzierten also ein sehr starkes pChk1-Signal, welches innerhalb von 2 h nach Ende der HU-Behandlung nicht mehr detektierbar war, was erklärt, warum das pChk1-Signal bereits deutlich abnahm, bevor die durch HU induzierten DSBs repariert wurden. Das bereits nach einer kurzen HU-Behandlung starke pChk1-Signal, welches bezogen auf den Anteil der untersuchten S-Phase-Zellen gleich stark oder möglicherweise sogar stärker war als das nach 24 h HU-Behandlung, könnte auf eine Depletion des intrazellulären Chk1-Pools während einer anhaltenden HU-Behandlung hindeuten. Möglicherweise ist nach einer über 24 h kontinuierlichen Chk1-Aktivierung nicht mehr ausreichend Chk1-Protein in den Zellen vorhanden, um das durch die DSBs ausgelöste Signal adäquat aufrechtzuerhalten. Dies könnte erklären, warum nach einer Doppelbehandlung mit HU und MMS bzw. mit HU und Bestrahlung ein weniger effizienter G2/M-Arrest induziert wurde, als nach MMS-Behandlung oder Bestrahlung alleine, da es bei der Bestrahlung bzw. der MMS-Behandlung alleine nicht zu einer Depletion des Chk1-Pools kommt. Die bereits mehrfach beschriebene wichtige Rolle von pChk1 bei der Aufrechterhaltung des G2/M-Arrests (Cortez et al, 2001; Kousholt et al, 2012; Lam et al, 2004; Shibata et al, 2010; Zachos et al, 2003) passt zu dieser Theorie. Allerdings zeigen einige der genannten Veröffentlichungen, dass pChk1 bereits eine wichtige Rolle bei der Induktion des G2/M-Arrests spielt (Cortez et al, 2001; Zachos et al, 2003). Sollte das pChk1-Signal für die Induktion eines G2/M-Arrests essentiell sein, so kann die Theorie, dass

es nach einer 24-stündigen HU-Behandlung aufgrund der langen Aufrechterhaltung der Phosphorylierung durch die arretierten Replikationsgabeln depletiert wurde, nicht zutreffen, da nach der Kombination aus HU- und MMS-Behandlung bzw. HU und Bestrahlung ein G2/M-Arrest induziert werden kann. Allerdings weisen diese Behandlungen ein sehr starkes pChk2-Signal auf, welches möglicherweise den Verlust des pChk1-Signals kompensieren könnte. Dass nach der Bestrahlung von G2-Phase-Zellen das pChk2-Signal ausreicht, um einen G2/M-Arrest zu induzieren, konnte bereits gezeigt werden (Shibata et al, 2010). Eine alternative Erklärungsmöglichkeit für die Induktion eines G2/M-Arrests nach HU+MMS bzw. HU+IR wäre, dass das pChk1-Signal nach HU-Behandlung und der daraus resultierenden Depletion des Chk1-Pools zwar noch ausreicht, um einen G2/M-Arrest zu induzieren, aber nicht für dessen Aufrechterhaltung. Die Theorie, dass der pChk1-Pool durch die 24-stündige HU-Behandlung depletiert wurde, müsste mit weiteren Experimenten belegt werden. Man könnte z.B. Zellen nach Bestrahlung mit einem Chk1-Inhibitor behandeln. Trifft die aufgestellte Theorie eines depletierten Chk1-Pools nach HU-Behandlung zu, würde man hier eine vergleichbare Zellzyklus-Progression erwarten wie nach einer Kombination aus HU-Behandlung und Bestrahlung, da die Behandlung mit Chk1-Inhibitor die möglicherweise durch HU-ausgelöste Depletion des Chk1-Pools imitieren würde. Die Inhibition von Chk2 in Zellen, die mit einer Kombination aus HU und Bestrahlung behandelt wurden, sollte dann zu einer Zellzyklusprogression ähnlich der nach einer alleinigen HU-Behandlung führen, da dadurch die von der Bestrahlung ausgelöste Chk2-Aktivierung unterbunden werden würde, was die Situation nach alleiniger HU-Behandlung imitieren würde.

Der in der Literatur diskutierte, unterschiedliche Beitrag von pChk1 und pChk2 zur Induktion und der Aufrechterhaltung des G2/M-Arrests ist möglicherweise eher auf den Zeitpunkt der Aktivierung der beiden Checkpointkinasen zurückzuführen als auf eine unterschiedliche Rolle in der Zellzykluskontroll-Signalkaskade, da beide Kinasen zu einer Phosphorylierung von CDC25C am Serin 216 führen. Auf diese Weise modifiziertes CDC25C interagiert mit dem 14-3-3-Protein, welches den Transport von CDC25C aus dem Zellkern vermittelt (Peng et al, 1997; Sanchez et al, 1997). Der Export von CDC25C aus dem Zellkern führt zur Induktion eines G2/M-Arrests, da dadurch verhindert wird, dass CDC25C im Zellkern inhibitorische Phosphatgruppen an den CDK/Cyclin-Komplexen entfernt (Reinhardt & Yaffe, 2009). Diese Ergebnisse unterstützen die Theorie, dass ein starkes pChk2-Signal, wie es durch Bestrahlung oder MMS-Behandlung ausgelöst wird, für die Induktion des G2/M-Arrests ausreicht. Nach Bestrahlung in der G2-Phase wird ein Teil der DSBs resektiert, wodurch eine ATR-aktivierende Struktur induziert wird, welche gleichzeitig für eine Abschwächung der ATM-Aktivierung sorgt (Bhatti et al, 2011; Shiotani & Zou, 2009). Dies führt zu einer Verschiebung der Aktivität der *Checkpointkinasen* von Chk2 zu Chk1. Dieser Prozess legt nahe, warum pChk1 in vielen Veröffentlichungen nach Bestrahlung von G2-Phase-Zellen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des G2/M-Arrests zugeschrieben wird (Kousholt et al, 2012; Shibata et al, 2010).

Das oben erwähnte, schwache pChk1-Signal nach Bestrahlung ist daher zum Einen auf den geringeren Anteil an Zellen in der S- und G2-Phase zurückzuführen, da im Gegensatz zu einer HU-Behandlung die Zellen nach IR nicht akkumulieren, und zum Anderen auf den geringen, resektierten Anteil der DSBs in S- und G2-Phase-Zellen. Die Resektion strahlungsinduzierter DSBs erfolgt erst zu späten Zeiten nach der DSB-Induktion, weshalb das pRPA- und das pChk1-Signal auch erst später detektiert werden konnte (Abbildung 4.20).

Das pChk2-Signal ist nach Bestrahlung in den ersten beiden Stunden sehr stark, während eine 24-stündige HU-Behandlung ein kaum detektierbares Signal auslöst. Das schwache pChk2-Signal nach HU-Behandlung könnte auf die verzögerte DSB-Induktion zurückzuführen sein. Während einer HU-Behandlung können jederzeit Replikationsgabeln kollabieren, was dazu führt, dass zu jedem gemessenen Zeitpunkt nur eine geringe Anzahl an DSBs mit glatten Enden existiert, da die DSBs nach der Induktion wahrscheinlich rasch resektiert werden und ATM dann nicht mehr aktivieren. Während einer 24-stündigen HU-Behandlung entstehen ca. 50 zusätzliche DSBs, von denen ca. 35 bereits in den ersten 10 h der HU-Behandlung entstehen. Das entspricht einer durchschnittlichen DSB-Induktion von 3,5 DSBs pro Stunde in den ersten 10 h der HU-Behandlung und von 1 DSB pro Stunde in den folgenden 14 h der HU-Behandlung. Dieses Phänomen führt wahrscheinlich dazu, dass ATM zwar immer wieder aktiviert wird, aber jedes Mal nur aufgrund eines einzigen oder einiger weniger DSBs, wodurch nur eine sehr schwache Chk2-Aktivierung messbar ist. Es wurde bereits gezeigt, dass das pChk2-Signal ohne kontinuierliche Aktivierung durch ATM rasch abnimmt (Shibata et al, 2010), was diese Theorie unterstützt.

HU-behandelte und anschließend bestrahlte Zellen zeigten die Induktion eines G2/M-Arrests (Abbildung 4.19) und sowohl ein starkes pChk1- als auch ein starkes pChk2-Signal (Abbildung 4.22). Das pChk1-Signal nach der kombinierten Behandlung war in Intensität und Dauer mit dem nach einer HU-Behandlung zu vergleichen, während das pChk2-Signal dem nach IR alleine glich. Das nach IR aktivierte Chk2 reicht alleine für die Induktion eines G2/M-Arrests aus, während das durch eine HU-Behandlung induzierte Chk1 keinen G2/M-Arrest auslöst. Daher trägt vermutlich das pChk1-Signal nach HU+IR ebenfalls nicht zur Induktion des G2/M-Arrests bei. Die Induktion des Zellzyklusarrests nach HU+IR ist deshalb sehr wahrscheinlich auf das starke pChk2-Signal, sowie eine dadurch ausgelöste Signalkaskade zurückzuführen. Dies wird durch das Ergebnis unterstützt, dass nach einer MMS-Behandlung ebenfalls ein starkes pChk2-Signal detektiert wurde (Abbildung 4.21). Zusammengefasst bedeutet dies, dass die Behandlungen, nach denen der G2/M-Arrest aufrechterhalten wird, ein starkes pChk2-Signal hervorrufen. Allerdings war das pChk2-Signal nach allen Behandlungen zum Zeitpunkt, zu dem der G2/M-Arrest aufgehoben wurde, bereits nicht mehr detektierbar. Die Aufrechterhaltung des Zellzyklusarrests scheint daher über Faktoren *downstream* von Chk1 und Chk2 zu erfolgen. Wie oben beschrieben, phosphoryliert sowohl aktives Chk1 als auch aktives Chk2 CDC25C am Serin 216, wodurch CDC25C an das 14-3-3-Protein bindet und aus dem

Zellkern exportiert wird (Peng et al, 1997; Sanchez et al, 1997). Da der Zellkern-Export von CDC25C zur Induktion des G2/M-Arrests führt (Graves et al, 2001; Kumagai et al, 1998; Peng et al, 1997), wären sowohl die Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von CDC25C als auch die Charakterisierung des CDC25C-Exports aus dem Zellkern interessante Experimente, um zu klären, ob die *downstream*-Faktoren von Chk1 und Chk2 für die Aufrechterhaltung des G2/M-Arrests nach Bestrahlung verantwortlich sind. Möglicherweise würden diese Experimente auch zur Klärung der nach HU induzierten Zellzykluskontroll-Signalkaskade beitragen. Bei Untersuchungen in der Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die Aufrechterhaltung des G2/M-Arrests nach MMS-Behandlung nur zum Teil *Checkpoint*-abhängig ist, da sie durch die Behandlung mit Coffein (einem Inhibitor der PIK-Kinasen) nicht vollständig aufgehoben werden konnte. Trotzdem ist die Länge des Zellzyklusarrests abhängig von der Anzahl der DSBs, da die Zellzyklusblockade unter Bedingungen, die zu einer erhöhten Anzahl an DSBs führen, über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten wurde (persönliche Mitteilung Dr. M. Ensminger).

Es wurde kürzlich in einer Veröffentlichung von Toledo et al (2013) gezeigt, dass Zellen nach einer 2,5-stündigen Behandlung mit 2 mM HU und ATR-Inhibitor einen G2/M-Arrest induzieren, was den in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnissen widerspricht. Wie bereits zuvor diskutiert, scheint die hier verwendete HU-Konzentration von 0,5 mM eine physiologischere Situation zu simulieren als die 2-millimolare Behandlung in der genannten Veröffentlichung, da es in der vorliegenden Arbeit durch die HU-Behandlung auch nicht zu einer Depletion des RPA-Pools kam (Abbildung 4.26 B). Außerdem zeigten Toledo et al (2013), dass die Zellen, die mit 2 mM HU und ATR-Inhibitor behandelt wurden, Anzeichen von Seneszenz wie z.B. eine dramatische Zunahme der Zellkerngröße aufweisen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der in der Veröffentlichung gemessene G2/M-Arrest auf eine erhebliche Schädigung der Zellen zurückzuführen ist, welche in der vorliegenden Arbeit nicht induziert wurde. Weiterhin ist die HU-Behandlungsdauer mit 2,5 h deutlich kürzer als die 24-stündige Behandlung, die in der vorliegenden Arbeit verwendete wurde. Es ist unwahrscheinlich dass die Depletion des Chk1-Pools, welche als Begründung für das Fehlen des G2/M-Arrests nach 24-stündiger HU-Behandlung diskutiert wurde, bereits nach einer 2,5-stündigen HU-Behandlung auftritt. Sollten also nicht die massive Schädigung und die Induktion von Seneszenz zu der Aktivierung des G2/M-Checkpoints geführt haben, so dürfte nach dieser kurzen Behandlungsdauer noch ausreichend Chk1 in den Zellen vorhanden sein, um einen G2/M-Arrest zu induzieren. Außerdem wird in dieser Studie während der 2,5-stündigen HU-Behandlung eine massive Anzahl an DSBs induziert. Diese Induktion vieler DSBs innerhalb eines kurzen Zeitfensters könnte zu einem starken pChk2-Signal führen, wie es auch für eine MMS-Behandlung sowie für Bestrahlung gezeigt wurde. Dieses starke pChk2-Signal könnte ebenfalls zur Induktion und Aufrechterhaltung des von Toledo et al (2013) gemessenen G2/M-Arrests beitragen.

5.2.2. Ursachen für die ineffiziente DSB-Reparatur nach HU-Behandlung

HU-behandelte Zellen zeigten eine sehr ineffiziente DSB-Reparatur im Gegensatz zu der nach Bestrahlung oder MMS-Behandlung beobachteten (Abbildung 4.20) (Deckbar et al, 2007; Ensminger et al, 2014; Jeggo et al, 2011; Nikolova et al, 2010; Rothkamm et al, 2003). Während von den durch MMS-induzierten DSBs innerhalb von 10 h ca. 70 % repariert wurden (Ensminger et al, 2014), beläuft sich die in der vorliegenden Arbeit gemessene Reparatur von HU-induzierten DSBs im gleichen Zeitraum nur auf ca. 23 %. Dass die für die Reparaturstudien gemessenen γ H2AX- und 53BP1-Foci tatsächlich DSBs markieren, konnte durch die hohe Zahl an Chromatidbrüchen in der G2-Phase und der Mitose belegt werden (Abbildung 4.15; Abbildung 4.16). In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Depletion von BRCA2, Rad51 oder Rad54 die in Kontroll-siRNA-behandelten Zellen detektierte geringe Reparatur vollständig unterbunden werden (Abbildung 4.17; Abbildung 4.26; Abbildung 4.27), womit auf Einzelzellebene bestätigt werden konnte, dass HU-induzierte DSBs über einen HR-abhängigen Reparaturmechanismus repariert werden. Diese Ergebnisse passen zu dem bereits mehrfach gezeigten Resultat, dass HR-defiziente Zellen in Überlebensexperimenten eine hohe Sensitivität gegenüber einer HU-Behandlung zeigen (Lundin et al, 2002; Saintigny et al, 2001; Sorensen et al, 2005). Lundin et al (2002) sowie Saintigny et al (2001) zeigten im Überlebensexperiment auch für NHEJ-defiziente Zellen eine höhere Sensitivität gegenüber einer HU-Behandlung. Diese Ergebnisse passen zunächst nicht zu den hier dargestellten, da in der vorliegenden Arbeit nach der Depletion essentieller HR-Faktoren keinerlei Reparatur mehr detektierbar war. Dies spricht gegen eine Beteiligung des NHEJ an der Reparatur HU-induzierter DSBs. Saintigny et al (2001) zeigten jedoch, dass sich die HU-Sensitivität der verwendeten Ku80-Mutante besonders bei kurzen Behandlungszeiten (< 3 h) manifestierte, während sie bei einer 24-stündigen HU-Behandlung die gleiche Sensitivität zeigte wie die dazugehörige Wild typ-Zelllinie. Da in der vorliegenden Arbeit die DSB-Reparatur nicht nach einer solch kurzen HU-Behandlungsdauer untersucht wurde, erscheint es nicht verwunderlich, dass ein Effekt des NHEJs auf die DSB-Reparatur nicht detektiert werden konnte. Lundin et al (2002) zeigten dagegen eine Konzentrations-abhängige Sensitivität einer DNA-PKcs-Mutante gegenüber einer HU-Behandlung. Da in der genannten Studie die für die HU-Behandlung verwendete Dauer nicht angegeben wurde, könnte es sein, dass die Sensitivität der NHEJ-Mutante auf den gleichen Grund wie in der Studie von Saintigny et al (2001) zurückzuführen ist. Ein weiterer Grund für die Sensitivität der DNA-PKcs-Mutante gegenüber HU könnte auch eine kürzlich beschriebene Rolle von DNA-PKcs an arretierten Replikationsgabeln sein (Unno et al, 2013; Vidal-Eychenie et al, 2013). Unno et al (2013) zeigten, dass DNA-PKcs an arretierten Replikationsgabeln akkumuliert und dort die Induktion von DSBs durch Artemis induziert. Wird die DNA-PKcs-Aktivität inhibiert, werden keine DSBs induziert und ATM wird nicht aktiviert. Vidal-Eychenie et al (2013) zeigten dagegen, dass eine DNA-PKcs-Inhibition zum Verlust der Phosphorylierung von RPA, Chk1 und

TopBP1 führt, was nahe legt, dass DNA-PKcs eine Rolle in der Signalamplifizierung von ATR spielt. Werden nach der Induktion von Replikationsstress durch HU ATR oder ATM nicht vollständig aktiviert oder das ATR-Signal nicht ausreichend amplifiziert, so könnte dies aufgrund der wichtigen Rolle dieser Proteine beim S-Phase-Arrest und der Stabilisierung arretierter Replikationsgabeln zu einer höheren Sensitivität von DNA-PKcs-Mutanten in Überlebensexperimenten führen. Daher könnte die von Lundin et al (2002) gemessene Sensitivität einer DNA-PKcs-Mutante gegenüber einer HU-Behandlung auch mit einer Interaktion von DNA-PKcs und ATR begründet werden.

Wie bereits diskutiert, erfolgt die Reparatur HU-induzierter DSBs über die HR. Daher sollte im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die ineffiziente Reparatur auf eine Störung im Ablauf der HR zurückzuführen ist. Nach der Induktion eines einseitigen DSBs wird dieser resektiert und die einzelsträngigen DNA-Bereiche werden von RPA gebunden, um die Induktion von Sekundärstrukturen sowie die Degradation durch Nukleasen zu verhindern (Abbildung 5.1 A – E) (Binz et al, 2004; Chen et al, 2013; Wold, 1997; Zou & Elledge, 2003). Im folgenden Schritt wird Rad51 durch BRCA2 auf die einzelsträngigen DNA-Bereiche geladen und RPA dadurch verdrängt (Esashi et al, 2005; Golub et al, 1998; Pellegrini et al, 2002; Thorslund & West, 2007; Yuan et al, 1999). Rad51 bildet mit der DNA ein Nukleoproteinfilament und induziert die Suche nach homologen Sequenzen im Schwesterchromatid sowie die Einwanderung in dieses (Baumann & West, 1998; Sung & Roberson, 1995). Bei der Einwanderung wird der dadurch verdrängte DNA-Strang sehr wahrscheinlich wieder von RPA gebunden. Wurde eine homologe Sequenz gefunden, induziert Rad51 eine *D-Loop* und entfernt Rad51 von den einzelsträngigen DNA-Bereichen (Heyer et al, 2006; Kianitsa et al, 2006; Solinger et al, 2002). Die Entfernung von Rad51 muss vor der Induktion der DNA-Synthese im *D-Loop* erfolgen, welche von der Polymerase δ und der Helikase Pif1 durchgeführt wird (Sneeden et al, 2013; Wilson et al, 2013). Während der DNA-Synthese im *D-Loop* sind sowohl der verdrängte DNA-Strang als auch der *Template*-Strang, welcher sich vor der Polymerase befindet, durch RPA gebunden (Eggleter et al, 2002; Sneeden et al, 2013). Nach Ende der DNA-Synthese wird der *D-Loop* aufgelöst und die beiden Schwesterchromatiden werden separiert.

Um die Ursache für die ineffiziente Reparatur HU-induzierter DSBs zu ergründen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Struktur dieser DSBs nach Entfernung von Hydroxyurea charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass nach einer HU-Behandlung eine hohe Anzahl an DSBs (gemessen durch γ H2AX-Foci) mit Rad51, RPA oder beiden Proteinen kolokalisierte (Abbildung 4.24; Abbildung 4.25). Die Bildung von Rad51-Foci erscheint zunächst verwunderlich, da Sorensen et al (2005) zeigten, dass eine Interaktion zwischen Chk1 und Rad51 für die Rad51-Focus-Bildung und eine effiziente HR benötigt wird. Da im vorherigen Kapitel diskutiert wurde, dass nach einer langen HU-Behandlung möglicherweise der intrazelluläre Chk1-Pool depletiert wird, scheint dieses Ergebnis der aufgestellten Theorie zu widersprechen. Allerdings konnten die Rad51-Foci bereits direkt nach der Entfernung des Hydroxyureas detektiert werden, was bedeutet, dass die Rad51-Focus-Bildung bereits während der

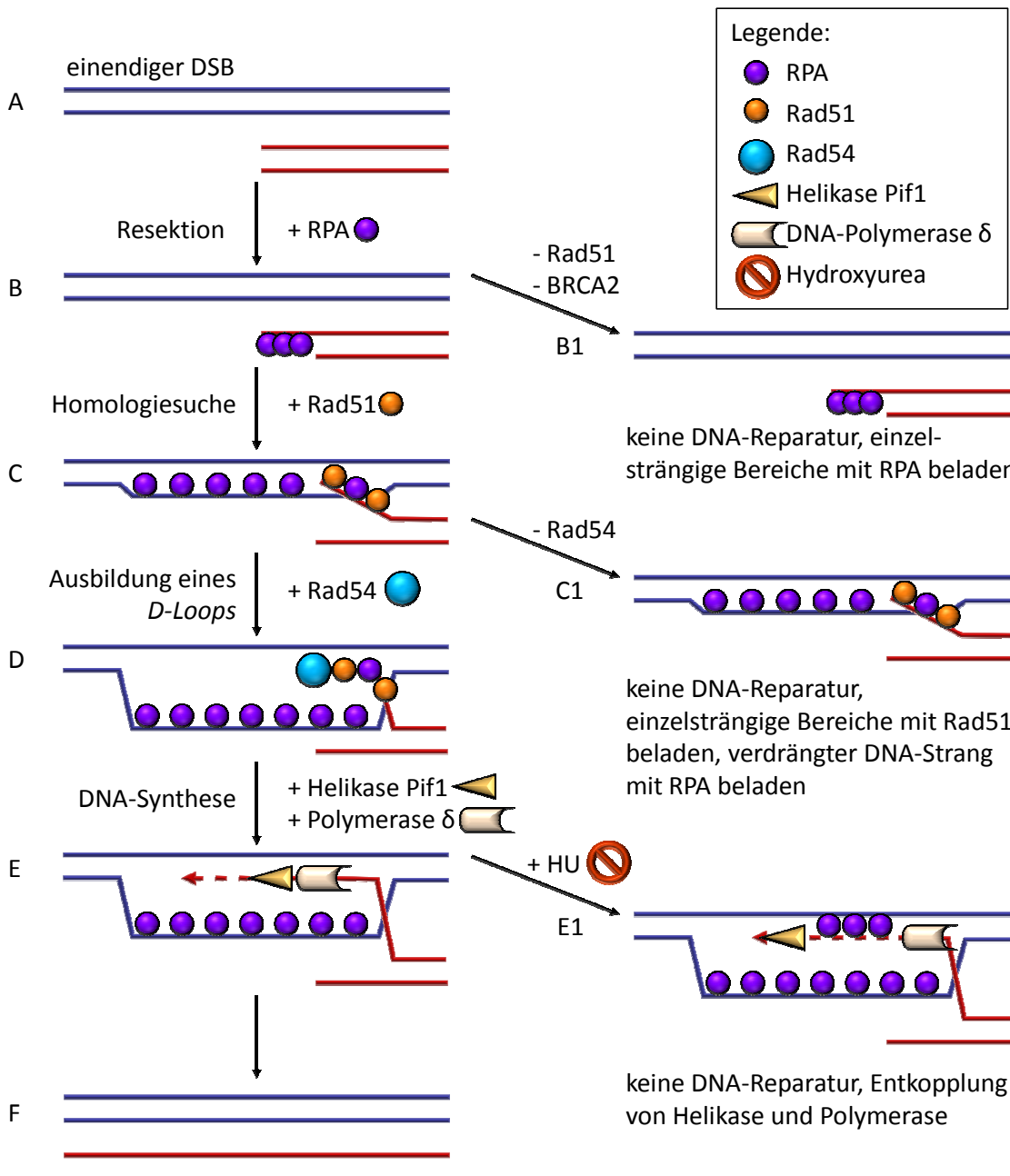


Abbildung 5.1: HR-abhängige Reparatur eines HU-induzierten DSBs

(A) – (F) Nach der Induktion eines einseitigen DSBs (rot dargestellt) durch eine HU-Behandlung wird dieser resektiert und der entstehende einzelsträngige DNA-Bereich wird von RPA (lila) gebunden. Anschließend wird Rad51 (orange) von BRCA2 auf die einzelsträngigen DNA-Bereiche geladen und verdrängt dabei RPA. Diese Verdrängung ist nicht vollständig und ein Teil der einzelsträngigen DNA-Bereiche ist höchstwahrscheinlich auch weiterhin mit RPA beladen. Rad51 induziert die Einwanderung in das Schwesterchromatid (blau dargestellt) und die Homologiesuche. RPA bindet in diesem Schritt sehr wahrscheinlich bereits an den durch die Homologiesuche verdrängten DNA-Strang. Rad54 (blau) wird für die Ausbildung des *D-Loops* benötigt und entfernt vor Beginn der DNA-Synthese Rad51 von dem eingewanderten DNA-Strang. Das an den verdrängten DNA-Strang gebundene RPA unterstützt die Beladung der Polymerase δ (beige), welche zusammen mit der Helikase Pif1 (gelb) die DNA-Synthese durchführt. Nach der DNA-Synthese wird das Reparaturintermediat aufgelöst und die Reparatur ist abgeschlossen. (B1) Durch eine Rad51- oder BRCA2-Depletion wird der Austausch des an die einzelsträngigen DNA-Bereiche gebundenen RPA durch Rad51 verhindert und die Zellen zeigen eine erhöhte Anzahl an RPA-Foci. (C1) Durch eine Rad54-Depletion kann kein vollständiger *D-Loop* ausgebildet werden und Rad51 wird nicht von den einzelsträngigen DNA-Bereichen entfernt. Dadurch sind alle DSBs mit Rad51 markiert und zeigen gleichzeitig durch die unvollständige Verdrängung an den

einzelsträngigen DNA-Bereichen eine hohe Anzahl an RPA-Foci. (E1) Wird die DNA-Reparatur-Synthese im *D-Loop* bereits während der HU-Behandlung induziert, kommt es zu einer Entkopplung der Helikase und der Polymerase im *D-Loop* und der DNA-Reparatur-Synthese-Komplex dissoziiert. Die Folge ist eine unvollendete DSB-Reparatur.

HU-Behandlung stattgefunden hat. Während dieser Zeit ist noch aktives Chk1 vorhanden, welches die Phosphorylierung von Rad51 am Threonin 309 induzieren kann und dadurch die Rad51-Focus-Bildung ermöglicht. Auch das CDK-Level ist während der HU-Behandlung niedrig, da sich die Zellen in der S-Phase befinden, was nach der Veröffentlichung von Esashi et al (2005) die Interaktion von BRCA2 mit Rad51 ermöglicht. Da die Rad51-Focus-Bildung bereits während der HU-Behandlung stattfindet, widersprechen daher die in den genannten Veröffentlichungen gezeigten Ergebnisse nicht der in der vorliegenden Arbeit detektierten Rad51-Foci-Bildung.

Rad51 und RPA spielen eine wichtige Rolle bei der HR, daher deutet die hohe Foci-Zahl direkt nach Ende der HU-Behandlung (Abbildung 4.24) sowie die Kollokalisierung der Rad51- bzw. RPA-Foci mit den γ H2AX-Foci (Abbildung 4.25) daraufhin, dass die Reparatur der durch HU-Behandlung induzierten DSBs über die HR bereits begonnen hat, bevor das HU von den Zellen entfernt wurde. Da die Rad51- und die γ H2AX-Foci kollokalisieren, deutet dies auf eine Funktion von Rad51 bei der Reparatur der DSBs hin und nicht auf eine Funktion beim Replikationsgabelneustart. Dies wird durch die Studie von Petermann et al (2010a) unterstützt, die zeigten, dass Rad51 zwar für den Neustart arretierter Replikationsgabeln benötigt wird, bei diesem Prozess jedoch nicht als Focus nachgewiesen werden kann. Die in den humanen Tumorzellen (A549) detektierte Abnahme und die Stagnation der Rad51- und RPA-Foci in den humanen Fibroblasten (82-6hTert) korreliert damit, dass in den Tumorzellen eine wenn auch geringe DSB-Reparatur detektiert wurde, während die Fibroblasten keinerlei DSB-Reparatur zeigten (Abbildung 4.11). Die Abnahme der Rad51- und RPA-Foci könnte daher auf einen stattfindenden Reparaturprozess hindeuten, welcher nicht in allen Zellen vollständig abgeschlossen wurde. Da die einzelsträngigen DNA-Bereiche der DSBs von Rad51 und RPA nur transient gebunden werden, gibt diese Untersuchung nur eine Momentaufnahme im Reparaturprozess wider. Um die Struktur der DSBs und das Stadium, in dem sich die DSBs zum Zeitpunkt des HU-Entzugs befinden, genauer zu charakterisieren, wurde zunächst Rad51 depletiert. Rad51 verdrängt RPA von den einzelsträngigen DNA-Bereichen, bevor es mit der Homologiesuche im Schwesterchromatid beginnt. Rad51-beladene DSBs befinden sich daher in einem mittleren Schritt der HR (Abbildung 5.1 B - C). Nach einer Rad51-Depletion zeigte sich auf Ebene der γ H2AX-Foci ein Reparaturdefekt (Abbildung 4.26 A), welcher den bereits diskutierten Befund, dass HU-induzierte DSBs über HR repariert werden, weiter unterstützte (Abbildung 5.1 B1). Die Zahl der RPA-Foci war zu allen untersuchten Zeitpunkten nach Rad51-Depletion statistisch signifikant erhöht gegenüber der in mit Kontroll-siRNA-behandelten Zellen und zeigte während der gesamten Reparaturzeit keinen Rückgang (Abbildung 4.26 B). Die zu allen gemessenen Reparaturzeiten erhöhte RPA-Foci-Zahl

unterstützt die bereits diskutierte Theorie, dass der RPA-Pool nach der in dieser Arbeit verwendeten HU-Konzentration nicht depletiert sein kann. Dass die RPA-Foci-Zahl nach Rad51-Depletion nicht absinkt, wie sie es nach Kontroll-siRNA-Behandlung tut, unterstützt die Vermutung, dass die Abnahme der RPA-Foci nach HU-Behandlung auf einen aktiven Reparaturprozess zurückzuführen ist und nicht auf eine passive Dissoziation des Proteins von den einzelsträngigen DNA-Bereichen.

Für die weitere Charakterisierung der DSB-Struktur wurde in dieser Arbeit Rad54 depletiert, ein Protein welches in einem späteren Schritt der HR benötigt wird, um die Ausbildung des *D-Loops* zu unterstützen und anschließend Rad51 von dem eingewanderten DNA-Strang zu entfernen (Abbildung 5.1 D + C1). Erwartungsgemäß zeigte sich auf γ H2AX-Foci-Ebene ein DSB-Reparaturdefekt nach Rad54-Depletion (Abbildung 4.27 A). Auch die Anzahl der RPA-Foci blieb ähnlich wie nach Rad51-Depletion auf einem konstanten, hohen Niveau, was auf den Verlust der Reparatur von HU-induzierten DSBs zurückzuführen ist (Abbildung 4.27 C). Die Rad51-Foci-Zahl war nach Rad54-Depletion um ca. 1/3 erhöht und glich der Anzahl der γ H2AX-Foci (Abbildung 4.27 B). Dieses Ergebnis zeigte zunächst, dass Rad51 keinen limitierenden Faktor für die DSB-Reparatur über die HR darstellt. Da Rad51 ein essentielles Protein für die Reparatur von DSBs durch die HR ist, hätte dies eine ineffiziente DSB-Reparatur erklären können. Rad54 sorgt, wie beschrieben, in einem späten Schritt der HR für die Entfernung von Rad51 von dem in das Schwesterchromatid eingewanderten DNA-Strang. Daher zeigte dieses Ergebnis außerdem, dass sich die 20 Brüche, die nach Rad54-Depletion zusätzlich mit Rad51 markiert waren, bereits in einem späten Schritt der HR befanden. Denn Rad51 wäre in Anwesenheit von Rad54 bereits entfernt worden. Da die Anzahl der Rad51-Foci nach Rad54-Depletion um ca. 20 Foci erhöht war, gilt dies für ca. 1/3 der nach HU-Behandlung detektierten DSBs.

Während der Reparatur durch die HR folgt auf die Entfernung von Rad51 die Rekrutierung der Polymerase und der Helikase für die DNA-Synthese im *D-Loop*. Letztere kann während der HU-Behandlung aufgrund des Mangels an Nukleotiden jedoch nicht stattfinden. Warum die DNA-Synthese nicht erfolgt, nachdem das HU entfernt wurde und erneut Nukleotide zur Verfügung stehen, ist unklar. In S-Phase-Zellen führt eine Inhibition oder Blockade der DNA-Polymerase dazu, dass die DNA-Polymerase und die Helikase entkoppelt werden (Byun et al, 2005; Görisch et al, 2008; Li & Heyer, 2008; Pacek & Walter, 2004; Walter & Newport, 2000). Dieser Prozess wird als Replikationsgabel-Kollaps bezeichnet und führt nach einer Prozessierung durch Mus81 (Hanada et al, 2007) oder Artemis (Unno et al, 2013) zu einem einendigen DSBs, wie er in dieser Arbeit untersucht wurde. Es gibt in der Literatur eine Kontroverse darüber, ob die durch HU arretierten Replikationsgabeln in der S-Phase die DNA-Synthese nach Ende der HU-Behandlung wieder aufnehmen können oder nicht. Hanada et al (2007) beschrieben, dass die durch HU arretierten Replikationsgabeln die DNA-Synthese sowohl nach kurzem (6 h) als auch nach langem (24 h) HU-Block wieder aufnehmen. Petermann et al (2010a) zeigten dagegen, dass die DNA-Synthese nach kurzem HU-Block (1 h oder 2 h) an den arretierten Replikationsgabeln wieder aufgenommen wird, während die Replikationsgabeln nach

einem langen Block (24 h) dauerhaft inaktiviert werden und die DNA-Synthese durch neu startende Replikationsgabeln beendet wird. In beiden Veröffentlichungen wurde die Wiederaufnahme der Replikation mit der DNA *fibre technique* analysiert (Henry-Mowatt et al, 2003; Merrick et al, 2004). Die Diskrepanz der Resultate in diesen beiden Veröffentlichungen könnte auf die verwendete Zelllinie zurückzuführen sein. Petermann et al (2010a) analysierten humane Tumorzellen (HeLa), während Hanada et al (2007) embryonale Mäusestammzellen verwendeten. Möglicherweise ist der Neustart von Replikationsgabeln in Stammzellen anders reguliert als in ausdifferenzierten Zellen oder es gibt einen Spezies-spezifischen Unterschied. Da in der vorliegenden Arbeit ausdifferenzierte, humane Zellen verwendet wurden, kann man annehmen, dass in den hier untersuchten Zellen nach einer 24-stündigen HU-Behandlung in der S-Phase die DNA-Synthese an einer kollabierten Replikationsgabel nicht wieder aufgenommen werden kann. Die Prozesse, die bei der DNA-Synthese in der S-Phase und während der DNA-Reparatur im *D-Loop* ablaufen, unterscheiden sich zwar, es konnte jedoch kürzlich gezeigt werden, dass die Polymerase δ , welche bei der DNA-Replikation in der S-Phase die Synthese des Folgestrangs durchführt (Kunkel & Burgers, 2008), zusammen mit PCNA und der Helikase Pif1 im *D-Loop* ebenfalls für die DNA-Synthese verantwortlich ist (Li et al, 2013; Sneed et al, 2013; Wilson et al, 2013). Dieser DNA-Synthese-Komplex könnte durch die von HU induzierte lange Blockade der DNA-Reparatur-Synthese instabil werden. Dies bedeutet, dass es möglicherweise auch im *D-Loop* zur Dissoziation der Helikase und der Polymerase kommt, wodurch ein Kollaps des DNA-Synthese-Komplexes induziert werden würde. Dieser könnte auf den gleichen oder einen ähnlichen Mechanismus zurückzuführen sein wie der, der während der HU-Behandlung in den S-Phase-Zellen zu einem Kollaps der Replikationsgabeln führt (Abbildung 5.1 E1). Dies könnte die erneute Aufnahme der DNA-Synthese im *D-Loop* nach Ende der HU-Behandlung verzögern oder sogar ganz verhindern und dadurch zu der nach HU-Behandlung detektierten, ineffizienten DSB-Reparatur beitragen. Um diese Theorie zu überprüfen, könnte zu einem späten Zeitpunkt nach Ende der HU-Behandlung, zu dem die DNA-Replikation in der S-Phase abgeschlossen ist, die DNA-Synthese in den *D-Loops* mit Hilfe des BrdU-Einbau-Assays analysiert werden. Beim BrdU-Einbau-Assay wird den Zellen während der DNA-Synthese das Thymidin-Analogon BrdU zur Verfügung gestellt, was dazu führt, dass das BrdU in die DNA eingebaut wird und es anschließend als Foci nachgewiesen werden kann (Beucher et al, 2009). Der späte Zeitpunkt nach Ende der HU-Behandlung ist für dieses Experiment wichtig, da BrdU auch während der DNA-Synthese in der S-Phase in die DNA eingebaut wird. Um zu verhindern, dass die DNA-Synthese an den Replikationsgabeln fälschlicherweise für DNA-Reparatur-Synthese im *D-Loop* gehalten wird, müssen daher Zellen analysiert werden, die die S-Phase bereits abgeschlossen haben. Mit dieser Analyse könnte untersucht werden, ob die DNA-Synthese während der HR nach einer HU-Behandlung tatsächlich der Schritt ist, welcher durch die Behandlung beeinträchtigt wird oder ob die Synthese stattfindet und ein späterer Schritt wie z.B. die Auflösung des *D-Loops* gestört wird. Ein weiteres Experiment, um diese Theorie zu belegen, könnte mit einem Rad51-Inhibitor durchgeführt

werden. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, sind nach einer Rad51-Depletion alle einzelsträngigen DNA-Bereiche an den durch HU-Behandlung induzierten DSBs mit RPA beladen. Dies legt nahe, dass sich alle DSBs im gleichen Schritt der HR befinden und zwar in dem Schritt vor der Beladung der einzelsträngigen DNA-Bereiche mit Rad51. Durch die Depletion von Rad51 wird also eine Synchronisation des Reparaturablaufs herbeigeführt. Wird der Rad51-Inhibitor nach Ende der HU-Behandlung entfernt, könnte die DSB-Reparatur normal weiterlaufen und alle DSBs würden sich im gleichen Reparaturschritt befinden. Bei diesem Versuchsansatz würde die DNA-Reparatur-Synthese nicht während der HU-Behandlung starten, die DNA-Synthese-Komplexe würden daher auch nicht kollabieren. Sollten nach dem Entzug des Rad51-Inhibitors die HU-induzierten DSBs effizient repariert werden, würde dies die Theorie unterstützen, dass ein Problem am DNA-Synthese-Komplex im *D-Loop* der Grund für die ineffiziente DSB-Reparatur ist.

Wie bereits beschrieben, sind nur ca. 33 % der HU-induzierten DSBs in der Reparatur bereits soweit fortgeschritten, dass die Behinderung der DNA-Synthese durch die HU-Behandlung eine Begründung für die ineffiziente Reparatur darstellt. Bei der Analyse, wie viele DSBs mit Rad51, RPA oder beiden Proteinen beladen sind, zeigte sich, dass ca. 40 % der DSBs nur mit RPA beladen sind. Diese nur mit RPA beladenen DSBs könnten sich theoretisch sowohl in einem sehr frühen HR-Schritt befinden (vor der Verdrängung von RPA durch Rad51) oder in dem eben diskutierten, sehr späten HR-Schritt, bei dem Rad51 bereits wieder entfernt wurde. Da in Rad54-depletierten Zellen alle γ H2AX-Foci mit Rad51 markiert sind, bedeutet dies, dass die in den Rad54-depletierten Zellen gemessenen RPA-Foci mit den Rad51-Foci kolokalisieren, da kein RPA-Focus ohne kolokalisierenden γ H2AX-Focus detektiert wurde. Es hat also bereits an allen DSBs eine Rad51-Beladung stattgefunden. Dieses Ergebnis legt nahe, dass sich in den mit Kontroll-siRNA-behandelten Zellen alle DSBs, die nur mit RPA beladen sind, in einem späten HR-Schritt befinden. Möglicherweise wurde der Anteil der nur mit RPA beladenen DSBs etwas überschätzt, da diese Analyse nur exemplarisch mit einigen wenigen Zellen durchgeführt wurde. Damit liegt der Anteil der DSBs, deren Reparatur während der DNA-Synthese gestört wurde, über dem Anteil der DSBs, welche auch nach einer 24-stündigen HU-Behandlung repariert werden (23 %). Möglicherweise konnten DSBs, die erst gegen Ende der HU-Behandlung den DNA-Synthese-Schritt erreichten, die Reparatur abschließen, da der DNA-Synthese-Komplex aufgrund der nur kurzen Arretierung durch HU nicht dissoziierte. Dass die Länge der Blockade der DNA-Synthese auch im *D-Loop* bei der Wiederaufnahme eine Rolle spielen könnte, wird von den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen nach einer 10-stündigen HU-Behandlung unterstützt. Nach einer 10-stündigen HU-Behandlung ist die DSB-Reparatur etwas effizienter (Abbildung 4.28) als nach einer 24-stündigen HU-Behandlung (Abbildung 4.11). Bei der kürzeren HU-Behandlung wird die DNA-Reparatur-Synthese nicht so lange arretiert wie bei der längeren HU-Behandlung und dadurch sind möglicherweise noch an mehr DSBs die DNA-Synthese-Komplexe aktiv und können die Synthese nach der Entfernung des HUs wieder aufnehmen. Auch die stärkere Abnahme der Rad51-Foci nach 10-stündiger HU-Behand-

lung (Abbildung 4.32) passt zu der Theorie, dass hier eine effizientere Reparatur stattfinden kann als nach der 24-stündigen Behandlung.

Dass während einer HU-Behandlung, wie bereits diskutiert, nicht alle DSBs zum gleichen Zeitpunkt induziert werden, sondern es jederzeit zum Kollaps einer Replikationsgabel kommen kann, ist höchstwahrscheinlich der Grund für die verschiedenen Stadien der Reparatur, in der sich die DSBs nach HU-Behandlung befinden. Die nur von RPA markierten DSBs sind wahrscheinlich die, welche die während der HR stattfindende DNA-Synthese bereits eingeleitet haben. Da die DNA-Synthese in einem späten Schritt der HR stattfindet, wurden diese DSBs vermutlich bereits frühzeitig während der HU-Behandlung induziert. Neben diesen Brüchen wurden in der vorliegenden Arbeit nach einer 24-stündigen HU-Behandlung auch DSBs detektiert, die nur mit Rad51 oder mit RPA und Rad51 markiert waren. Die nur mit Rad51 markierten DSBs befinden sich in einem sehr frühen Schritt der HR (Abbildung 5.1 B - C) und stellen daher möglicherweise die Brüche dar, welche erst kurz vor Ende der HU-Behandlung induziert wurden. Die nur mit Rad51 markierten DSBs stellen mit 25 % den kleinsten Anteil dar, was zur Beobachtung passt, dass innerhalb der letzten Stunden der HU-Behandlung weniger DSBs induziert werden als in den ersten 10 h. Somit sollten sich die meisten Brüche nicht mehr in einem frühen Schritt der DSB-Reparatur befinden. Während der durch Rad51 durchgeführten Homologiesuche im Schwesterchromatid befindet sich höchstwahrscheinlich auch RPA an den DSBs und zwar an dem durch die Rad51-vermittelte Einwanderung in das Schwesterchromatid verdrängten DNA-Strang (Abbildung 5.1 C). Die sowohl mit Rad51 als auch mit RPA beladenen DSBs befinden sich daher höchstwahrscheinlich in diesem Schritt des HR-Reparaturvorgangs. Warum die Homologiesuche an den durch HU-induzierten DSBs nicht bereits abgeschlossen ist, sondern sich über einen längeren Zeitraum hinzuziehen scheint, könnte an der Auflockerung der Chromatinstruktur liegen, die während der S-Phase stattfindet. Um die DNA während der S-Phase replizieren zu können, muss die Chromatinstruktur im Zellkern aufgelockert werden (Falbo & Shen, 2006; MacAlpine & Almouzni, 2013). Für die Reparatur von DSBs über die HR wird das Chromatin in G2-Phase-Zellen zunächst ebenfalls aufgelockert um die Resektion durchführen zu können. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass in G2-Phase-Zellen das Chromatin anschließend kondensiert sein muss, damit DSBs über HR repariert werden können (Geuting et al, 2013). Die Reparatur von DSBs über die HR in der G2-Phase stellt einen Spezialfall dar, da hier hauptsächlich DSBs im stark kondensierten Heterochromatin über HR repariert werden. Trotzdem legen die in dieser Veröffentlichung gezeigten Ergebnisse nahe, dass die Homologiesuche ein in räumlicher Nähe befindliches Schwesterchromatid benötigt. Möglicherweise führt die durch den Replikationsprozess aufgelockerte Chromatinstruktur dazu, dass die Homologiesuche mehr Zeit benötigt, wodurch sich 35 % der durch HU-induzierten DSBs nach Ende der HU-Behandlung noch im Schritt der Homologiesuche befinden.

5.3. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Analysen auf Einzelzellebene bestätigt werden, dass die Dauer einer HU-Behandlung einen entscheidenden Einfluss auf die Anzahl der durch die Behandlung induzierten DSBs hat. Verwunderlich erscheint jedoch, dass die DSB-Induktion bei einer längeren Behandlungsdauer (> 10 h) abflacht und dass eine Vielzahl an Replikationsgabeln über diesen Zeitraum stabil bleiben, während nur einige wenige kollabieren. Die Dissoziation der Helikase und der Polymerase an der Replikationsgabel scheint nicht der entscheidende Grund für die Induktion von DSBs nach einer HU-Behandlung zu sein. Aufgrund der in Kollaboration mit Dr. A. Rapp und W. Yu (AG Cardoso, TUD) generierten Ergebnisse, dass eine 24-stündige HU-Behandlung hauptsächlich DSBs in langen Genen und an Telomeren induziert, liegt eine Beteiligung des Transkriptionsvorgangs nahe. In weiterführenden Experimenten, bei denen Zellen gleichzeitig mit HU und einem Transkription-inhibitor behandelt werden, soll daher geklärt werden, ob die Kollision der Transkriptionsmaschinerie mit arretierten Replikationsgabeln der Grund für die Induktion von DSBs nach HU-Behandlung ist. Sollte die Anzahl der induzierten DSBs bei gleichzeitiger Behandlung mit HU und einem Transkription-inhibitor sinken, würde dies bestätigen, dass die Kollision der Transkriptionsmaschinerie mit arretierten Replikationsgabeln der Grund für die HU-abhängige DSB-Induktion ist.

Der erstaunliche Befund, dass Zellen nach einer 24-stündigen HU-Behandlung keinen G2/M-Arrest induzieren und gleichzeitig eine ineffiziente DSB-Reparatur zeigen, soll ebenfalls genauer analysiert werden. Um die Theorie der Depletion des Chk1-Pools durch die lange Arretierung der Replikationsgabeln während der HU-Behandlung zu bestätigen, sollen verschiedene Experimente mit Chk1- und Chk2-Inhibitoren durchgeführt werden. Dabei soll überprüft werden, ob sich der nach einer kombinierten Behandlung aus HU und Bestrahlung induzierte G2/M-Arrest mittels einer Chk1-Inhibition aufheben lässt. Auch die Behandlung von bestrahlten Zellen mit Chk1- und Chk2-Inhibitor könnte einen Aufschluss darüber geben, ob die Depletion von Chk1 und die ausbleibende Aktivierung von Chk2 nach HU-Behandlung zu einem vollständigen Verlust des G2/M-Arrests führen können. Weiterhin ist es eine interessante Fragestellung zu klären, wie das CDC25C-Level im Zellkern nach einer HU-Behandlung reguliert ist. Da CDC25C durch Chk1 und Chk2 am Serin 216 phosphoryliert wird und es dadurch zum Export des Proteins aus dem Zellkern kommt, würde es sich anbieten die Phosphorylierung an dieser Stelle mittels biochemischer Analysen nachzuweisen. Weiterhin könnte man durch biochemische Analysen untersuchen, ob sich das Proteinlevel im Zellkern nach der HU-Behandlung verändert. Außerdem soll das Zellzyklusverhalten sowie das Chk1- und Chk2-Signal nach einer 10-stündigen HU-Behandlung untersucht werden. Durch die kürzere Behandlungsdauer könnte es sein, dass der Chk1-Pool noch nicht oder zumindest noch nicht vollständig depletiert wurde und es daher zu einer längeren Aufrechterhaltung des G2/M-Arrests kommt.

Um die ineffiziente DSB-Reparatur nach einer 24-stündigen HU-Behandlung genauer zu analysieren, soll die DNA-Reparatur-Synthese im *D-Loop* mit Hilfe des BrdU-Einbau-Assays untersucht werden. Sollte die Dissoziation der DNA-Synthesekomplexe im *D-Loop* der Grund für die ineffiziente Reparatur sein, sollte keine oder kaum DNA-Synthese nachweisbar sein. Hier bieten sich ebenfalls vergleichende Experimente nach 10- und 24-stündiger HU-Behandlung an, um zu untersuchen, ob nach einer 10-stündigen HU-Behandlung an mehr DSBs eine DNA-Synthese nachweisbar ist. Auch die Synchronisation des Reparaturvorgangs durch die parallele Behandlung von Zellen mit HU und Rad51-Inhibitor wäre eine interessante Möglichkeit, um zu überprüfen, ob die DNA-Synthese im *D-Loop* durch die HU-Behandlung gestört ist. Da alle DSBs durch eine Rad51-Inhibition im gleichen Reparaturschritt vor der Beladung der einzelsträngigen DNA-Bereiche mit Rad51 akkumulieren würden, würde an keinem der DSBs schon während der HU-Behandlung die DNA-Reparatur-Synthese induziert werden. Dadurch wird der DNA-Synthesekomplex im *D-Loop* nicht von der HU-Behandlung beeinträchtigt und gemäß der in dieser Arbeit aufgestellten Theorie sollten dann alle DSBs repariert werden. Sollte die DNA-Synthese nicht der Grund für die ineffiziente DSB-Reparatur sein, wäre es interessant die Auflösung des *D-Loops* durch Mus81 oder ähnliche Proteine genauer zu untersuchen. Auch die genauere Charakterisierung des Reparaturvorgangs nach einer 10-stündigen HU-Behandlung wäre interessant. Dazu könnten ebenfalls Studien nach Rad51- und Rad54-Depletion durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob die DSBs die gleiche Struktur aufweisen wie die nach einer 24-stündigen HU-Behandlung induzierten.

Um zu untersuchen, ob die durch HU-induzierten DSBs lediglich deutlich mehr Zeit benötigen, um repariert zu werden, dies aber durch die Aufhebung des G2/M-Arrests nicht möglich ist, soll eine *phospho-mimic*-Mutante vom Serin 216 des CDC25C hergestellt werden. Durch Expression dieser Mutante, die einen dauerhaft inaktiven Zustand von CDC25C imitiert, könnte ein G2/M-Arrest nach HU-Behandlung erzwungen werden. Diese Situation würde den HU-behandelten Zellen mehr Zeit in der G2-Phase verschaffen und es kann untersucht werden, ob die DSBs zu einem späteren Zeitpunkt repariert werden.

Weiterhin sollen die bereits begonnen, parallelen Studien mit verschiedenen S-Phase-schädigenden Agenzien wie MMS und Camptothecin (CPT) fortgesetzt werden. Dies ermöglicht den Vergleich von spezifisch während der Replikation induzierten DNA-Schäden miteinander und die Untersuchung der durch die verschiedenen, in der S-Phase induzierten DNA-Schäden ausgelösten Signalkaskaden. Dieser Vergleich ist besonders bei der Analyse der Zellzykluskontroll-Signalkaskade interessant, da im Gegensatz zu einer Behandlung mit HU, sowohl eine MMS- als auch eine CPT-Behandlung einen starken G2/M-Arrest induzieren.

6. Literaturverzeichnis

Abraham RT (2001) Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes & Development* **15**: 2177-2196

Ahnesorg P, Smith P, Jackson SP (2006) XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* **124**: 301-313

Alsbeih G, Raaphorst GP (1999) Differential induction of premature chromosome condensation by calyculin A in human fibroblast and tumor cell lines. *Anticancer research* **19**: 903-908

Anderson L, Henderson C, Adachi Y (2001) Phosphorylation and Rapid Relocalization of 53BP1 to Nuclear Foci upon DNA Damage. *Molecular and cellular biology* **21**: 1719-1729

Bakkenist CJ, Kastan MB (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**: 499-506

Bartek J, Lukas C, Lukas J (2004) Checking on DNA damage in S phase. *Nature reviews Molecular cell biology* **5**: 792-804

Bassing CH, Swat W, Alt FW (2002) The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* **109 Suppl**: S45-55

Baumann P, West SC (1998) Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. *Trends in Biochemical Sciences* **23**: 247-251

Baxevanis AD, Landsman D (1996) Histone Sequence Database: A Compilation of Highly-Conserved Nucleoprotein Sequences. *Nucleic acids research* **24**: 245-247

Beamish H, Lavin MF (1994) Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: anomalies in radiation-induced cell cycle delay. *International journal of radiation biology* **65**: 175-184

Berezney R, Dubey DD, Huberman JA (2000) Heterogeneity of eukaryotic replicons, replicon clusters, and replication foci. *Chromosoma* **108**: 471-484

Beucher A, Birraux J, Tchouandong L, Barton O, Shibata A, Conrad S, Goodarzi AA, Krempler A, Jeggo PA, Löbrich M (2009) ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *The EMBO journal* **28**: 3413-3427

Bhatti S, Kozlov S, Farooqi AA, Naqi A, Lavin M, Khanna KK (2011) ATM protein kinase: the linchpin of cellular defenses to stress. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **68**: 2977-3006

Bianchi V, Pontis E, Reichard P (1986) Changes of deoxyribonucleoside triphosphate pools induced by hydroxyurea and their relation to DNA synthesis. *Journal of Biological Chemistry* **261**: 16037-16042

-
- Binz SK, Sheehan AM, Wold MS (2004) Replication protein A phosphorylation and the cellular response to DNA damage. *DNA repair* **3**: 1015-1024
- Brown EJ, Baltimore D (2000) ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes & Development* **14**: 397-402
- Brown NC, Eliasson R, Reichard P, Thelander L (1969) Spectrum and iron content of protein B2 from ribonucleoside diphosphate reductase. *European journal of biochemistry / FEBS* **9**: 512-518
- Burkhart R, Schulte D, Hu D, Musahl C, Gohring F, Knippers R (1995) Interactions of human nuclear proteins P1Mcm3 and P1Cdc46. *European journal of biochemistry / FEBS* **228**: 431-438
- Burma S, Chen DJ (2004) Role of DNA-PK in the cellular response to DNA double-strand breaks. *DNA repair* **3**: 909-918
- Byun TS, Pacek M, Yee M-c, Walter JC, Cimprich KA (2005) Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes & Development* **19**: 1040-1052
- Carson CT, Schwartz RA, Stracker TH, Lilley CE, Lee DV, Weitzman MD (2003) The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint. *The EMBO journal* **22**: 6610-6620
- Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Kruhlak MJ, Pilch DR, Staudt DW, Lee A, Bonner RF, Bonner WM, Nussenzweig A (2003) Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nature cell biology* **5**: 675-679
- Chen H, Lisby M, Symington LS (2013) RPA coordinates DNA end resection and prevents formation of DNA hairpins. *Molecular cell* **50**: 589-600
- Coller HA (2007) What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation. *Nature reviews Molecular cell biology* **8**: 667-670
- Constantinou A, Chen XB, McGowan CH, West SC (2002) Holliday junction resolution in human cells: two junction endonucleases with distinct substrate specificities. *The EMBO journal* **21**: 5577-5585
- Cortez D (2005) Unwind and slow down: checkpoint activation by helicase and polymerase uncoupling. *Genes & Development* **19**: 1007-1012
- Cortez D, Guntuku S, Qin J, Elledge SJ (2001) ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* **294**: 1713-1716
- de Jager M, van Noort J, van Gent DC, Dekker C, Kanaar R, Wyman C (2001) Human Rad50/Mre11 Is a Flexible Complex that Can Tether DNA Ends. *Molecular cell* **8**: 1129-1135

de Klein A, Muijtjens M, van Os R, Verhoeven Y, Smit B, Carr AM, Lehmann AR, Hoeijmakers JHJ (2000) Targeted disruption of the cell-cycle checkpoint gene ATR leads to early embryonic lethality in mice. *Current Biology* **10**: 479-482

Deckbar D, Birraux J, Krempler A, Tchouandong L, Beucher A, Walker S, Stiff T, Jeggo P, Löbrich M (2007) Chromosome breakage after G2 checkpoint release. *The Journal of cell biology* **176**: 749-755

Dimitrova DS, Gilbert DM (2000) Temporally coordinated assembly and disassembly of replication factories in the absence of DNA synthesis. *Nature cell biology* **2**: 686-694

Ding Q, Reddy YV, Wang W, Woods T, Douglas P, Ramsden DA, Lees-Miller SP, Meek K (2003) Autophosphorylation of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase is required for efficient end processing during DNA double-strand break repair. *Molecular and cellular biology* **23**: 5836-5848

Doil C, Mailand N, Bekker-Jensen S, Menard P, Larsen DH, Pepperkok R, Ellenberg J, Panier S, Durocher D, Bartek J, Lukas J, Lukas C (2009) RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell* **136**: 435-446

Donehower RC (1992) An overview of the clinical experience with hydroxyurea. *Seminars in oncology* **19**: 11-19

Donzelli M, Draetta GF (2003) Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO reports* **4**: 671-677

Dunphy WG, Brizuela L, Beach D, Newport J (1988) The *Xenopus* cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell* **54**: 423-431

Duursma AM, Driscoll R, Elias JE, Cimprich KA (2013) A role for the MRN complex in ATR activation via TOPBP1 recruitment. *Molecular cell* **50**: 116-122

Egglar AL, Inman RB, Cox MM (2002) The Rad51-dependent pairing of long DNA substrates is stabilized by replication protein A. *Journal of Biological Chemistry*

Ehrenberg A, Reichard P (1972) Electron spin resonance of the iron-containing protein B2 from ribonucleotide reductase. *The Journal of biological chemistry* **247**: 3485-3488

Eklund H, Uhlin U, Farnegardh M, Logan DT, Nordlund P (2001) Structure and function of the radical enzyme ribonucleotide reductase. *Progress in biophysics and molecular biology* **77**: 177-268

Ellison V, Stillman B (2003) Biochemical characterization of DNA damage checkpoint complexes: clamp loader and clamp complexes with specificity for 5' recessed DNA. *PLoS biology* **1**: E33

Ensminger M, Iloff L, Ebel C, Nikolova T, Kaina B, Löbrich M (2014) DNA breaks and chromosomal aberrations arise when replication meets base excision repair. *The Journal of cell biology* **(in press)**

-
- Esashi F, Christ N, Gannon J, Liu Y, Hunt T, Jasin M, West SC (2005) CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature* **434**: 598-604
- Fairman MP, Stillman B (1988) Cellular factors required for multiple stages of SV40 DNA replication in vitro. *The EMBO journal* **7**: 1211-1218
- Falbo KB, Shen X (2006) Chromatin remodeling in DNA replication. *Journal of Cellular Biochemistry* **97**: 684-689
- Falck J, Mailand N, Syljuasen RG, Bartek J, Lukas J (2001) The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* **410**: 842-847
- Falck J, Petrini JHJ, Williams BR, Lukas J, Bartek J (2002) The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat Genet* **30**: 290-294
- Feijoo C, Hall-Jackson C, Wu R, Jenkins D, Leitch J, Gilbert DM, Smythe C (2001) Activation of mammalian Chk1 during DNA replication arrest: a role for Chk1 in the intra-S phase checkpoint monitoring replication origin firing. *The Journal of cell biology* **154**: 913-923
- Fishbein W, Carbone P (1963) Hydroxyurea: Mechanism of Action. *Science* **142**: 1069-1070
- Frankenberg-Schwager M (1990) Induction, repair and biological relevance of radiation-induced DNA lesions in eukaryotic cells. *Radiation and environmental biophysics* **29**: 273-292
- Frankenberg-Schwager M, Frankenberg D (1990) DNA double-strand breaks: their repair and relationship to cell killing in yeast. *International journal of radiation biology* **58**: 569-575
- Furuta T, Takemura H, Liao Z-Y, Aune GJ, Redon C, Sedelnikova OA, Pilch DR, Rogakou EP, Celeste A, Chen HT, Nussenzweig A, Aladjem MI, Bonner WM, Pommier Y (2003) Phosphorylation of Histone H2AX and Activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in Response to Replication-dependent DNA Double-strand Breaks Induced by Mammalian DNA Topoisomerase I Cleavage Complexes. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 20303-20312
- Gamper AM, Choi S, Matsumoto Y, Banerjee D, Tomkinson AE, Bakkenist CJ (2012) ATM protein physically and functionally interacts with proliferating cell nuclear antigen to regulate DNA synthesis. *The Journal of biological chemistry* **287**: 12445-12454
- Gao WY, Cara A, Gallo RC, Lori F (1993) Low levels of deoxynucleotides in peripheral blood lymphocytes: a strategy to inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**: 8925-8928
- Gellert M (2002) V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annual review of biochemistry* **71**: 101-132
- Geuting V, Reul C, Löbrich M (2013) ATM Release at Resected Double-Strand Breaks Provides Heterochromatin Reconstitution to Facilitate Homologous Recombination. *PLoS Genet* **9**: e1003667

-
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP (1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute* **51**: 1417-1423
- Gillespie PJ, Blow JJ (2010) Clusters, factories and domains: The complex structure of S-phase comes into focus. *Cell Cycle* **9**: 3218-3226
- Goldberg M, Stucki M, Falck J, D'Amours D, Rahman D, Pappin D, Bartek J, Jackson SP (2003) MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint. *Nature* **421**: 952-956
- Golub EI, Gupta RC, Haaf T, Wold MS, Radding CM (1998) Interaction of human Rad51 recombination protein with single-stranded DNA binding protein, RPA. *Nucleic acids research* **26**: 5388-5393
- Görisch SM, Sporbert A, Stear JH, Grunewald I, Nowak D, Warbrick E, Leonhardt H, Cardoso MC (2008) Uncoupling the replication machinery: Replication fork progression in the absence of processive DNA synthesis. *Cell Cycle* **7**: 1983-1990
- Gotoh EA, Y.; Kosaka, H. (1995) Inhibition of protein serine/threonine phosphatases directly induces premature chromosome condensation in mammalian somatic cells. *Biomedical Research* **16**: 63-68
- Gottlieb TM, Jackson SP (1993) The DNA-dependent protein kinase: Requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* **72**: 131-142
- Graves PR, Lovly CM, Uy GL, Piwnicka-Worms H (2001) Localization of human Cdc25C is regulated both by nuclear export and 14-3-3 protein binding. *Oncogene* **20**: 1839-1851
- Grawunder U, Zimmer D, Fugmann S, Schwarz K, Lieber MR (1998a) DNA ligase IV is essential for V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in human precursor lymphocytes. *Molecular cell* **2**: 477-484
- Grawunder U, Zimmer D, Kulesza P, Lieber MR (1998b) Requirement for an interaction of XRCC4 with DNA ligase IV for wild-type V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in vivo. *The Journal of biological chemistry* **273**: 24708-24714
- Grawunder U, Zimmer D, Lieber MR (1998c) DNA ligase IV binds to XRCC4 via a motif located between rather than within its BRCT domains. *Current biology : CB* **8**: 873-876
- Groth P, Auslander S, Majumder MM, Schultz N, Johansson F, Petermann E, Helleday T (2010) Methylated DNA causes a physical block to replication forks independently of damage signalling, O(6)-methylguanine or DNA single-strand breaks and results in DNA damage. *Journal of molecular biology* **402**: 70-82
- Hanada K, Budzowska M, Davies SL, van Drunen E, Onizawa H, Beverloo HB, Maas A, Essers J, Hickson ID, Kanaar R (2007) The structure-specific endonuclease Mus81 contributes to replication restart by generating double-strand DNA breaks. *Nature structural & molecular biology* **14**: 1096-1104

Helmrich A, Ballarino M, Tora L (2011) Collisions between Replication and Transcription Complexes Cause Common Fragile Site Instability at the Longest Human Genes. *Molecular cell* **44**: 966-977

Henry-Mowatt J, Jackson D, Masson JY, Johnson PA, Clements PM, Benson FE, Thompson LH, Takeda S, West SC, Caldecott KW (2003) XRCC3 and Rad51 modulate replication fork progression on damaged vertebrate chromosomes. *Molecular cell* **11**: 1109-1117

Heyer WD, Ehmsen KT, Liu J (2010) Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annual review of genetics* **44**: 113-139

Heyer WD, Li X, Rolfsmeier M, Zhang XP (2006) Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination? *Nucleic acids research* **34**: 4115-4125

Hoekstra MF (1997) Responses to DNA damage and regulation of cell cycle checkpoints by the ATM protein kinase family. *Current Opinion in Genetics & Development* **7**: 170-175

Horejsi Z, Falck J, Bakkenist CJ, Kastan MB, Lukas J, Bartek J (2004) Distinct functional domains of Nbs1 modulate the timing and magnitude of ATM activation after low doses of ionizing radiation. *Oncogene* **23**: 3122-3127

Hozák P, Cook PR (1994) Replication factories. *Trends in Cell Biology* **4**: 48-52

Huberman JA, Riggs AD (1966) Autoradiography of chromosomal DNA fibers from Chinese hamster cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **55**: 599-606

Ip SC, Rass U, Blanco MG, Flynn HR, Skehel JM, West SC (2008) Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. *Nature* **456**: 357-361

Jackson DA, Pombo A (1998) Replicon Clusters Are Stable Units of Chromosome Structure: Evidence That Nuclear Organization Contributes to the Efficient Activation and Propagation of S Phase in Human Cells. *The Journal of cell biology* **140**: 1285-1295

Jazayeri A, Falck J, Lukas C, Bartek J, Smith GC, Lukas J, Jackson SP (2006) ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nature cell biology* **8**: 37-45

Jeggo PA, Geuting V, Löbrich M (2011) The role of homologous recombination in radiation-induced double-strand break repair. *Radiotherapy and Oncology* **101**: 7-12

Jensen RB, Carreira A, Kowalczykowski SC (2010) Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. *Nature* **467**: 678-683

Johnson RD, Jasin M (2000) *Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells*, Vol. 19.

-
- Kanaar R, Hoeijmakers JHJ, van Gent DC (1998) Molecular mechanisms of DNA double-strand break repair. *Trends in Cell Biology* **8**: 483-489
- Kennedy BJ (1992) The evolution of hydroxyurea therapy in chronic myelogenous leukemia. *Seminars in oncology* **19**: 21-26
- Khanna KK, Jackson SP (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* **27**: 247-254
- Kiianitsa K, Solinger JA, Heyer WD (2006) Terminal association of Rad54 protein with the Rad51-dsDNA filament. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 9767-9772
- Kim S-T, Lim D-S, Canman CE, Kastan MB (1999) Substrate Specificities and Identification of Putative Substrates of ATM Kinase Family Members. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 37538-37543
- Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G (2008) Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic acids research* **36**: 5678-5694
- Kobayashi J, Tauchi H, Sakamoto S, Nakamura A, Morishima K-i, Matsuura S, Kobayashi T, Tamai K, Tanimoto K, Komatsu K (2002) NBS1 Localizes to γ -H2AX Foci through Interaction with the FHA/BRCT Domain. *Current Biology* **12**: 1846-1851
- Kousholt AN, Fugger K, Hoffmann S, Larsen BD, Menzel T, Sartori AA, Sorensen CS (2012) CtIP-dependent DNA resection is required for DNA damage checkpoint maintenance but not initiation. *The Journal of cell biology* **197**: 869-876
- Krakoff IH, Brown NC, Reichard P (1968) Inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by hydroxyurea. *Cancer research* **28**: 1559-1565
- Krempler A, Deckbar D, Jeggo PA, Lobrich M (2007) An Imperfect G₂M Checkpoint Contributes to Chromosome Instability Following Irradiation of S and G₂ Phase Cells. *Cell Cycle* **6**: 1682-1686
- Kumagai A, Yakowec PS, Dunphy WG (1998) 14-3-3 proteins act as negative regulators of the mitotic inducer Cdc25 in Xenopus egg extracts. *Molecular biology of the cell* **9**: 345-354
- Kunkel TA, Burgers PM (2008) Dividing the workload at a eukaryotic replication fork. *Trends in Cell Biology* **18**: 521-527
- Lam MH, Liu Q, Elledge SJ, Rosen JM (2004) Chk1 is haploinsufficient for multiple functions critical to tumor suppression. *Cancer Cell* **6**: 45-59
- Lange SS, Takata K, Wood RD (2011) DNA polymerases and cancer. *Nat Rev Cancer* **11**: 96-110

-
- Langerak P, Mejia-Ramirez E, Limbo O, Russell P (2011) Release of Ku and MRN from DNA ends by Mre11 nuclease activity and Ctp1 is required for homologous recombination repair of double-strand breaks. *PLoS Genet* **7**: e1002271
- Lee J-H, Paull TT (2005) ATM Activation by DNA Double-Strand Breaks Through the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex. *Science* **308**: 551-554
- Lees-Miller SP, Chen YR, Anderson CW (1990) Human cells contain a DNA-activated protein kinase that phosphorylates simian virus 40 T antigen, mouse p53, and the human Ku autoantigen. *Molecular and cellular biology* **10**: 6472-6481
- Lei M, Kawasaki Y, Tye BK (1996) Physical interactions among Mcm proteins and effects of Mcm dosage on DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **16**: 5081-5090
- Li J, Holzschu DL, Sugiyama T (2013) PCNA is efficiently loaded on the DNA recombination intermediate to modulate polymerase delta, eta, and zeta activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 7672-7677
- Li X, Heyer W-D (2008) Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Res* **18**: 99-113
- Liang F, Romanienko PJ, Weaver DT, Jeggo PA, Jasin M (1996) Chromosomal double-strand break repair in Ku80-deficient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 8929-8933
- Liu Q, Guntuku S, Cui XS, Matsuoka S, Cortez D, Tamai K, Luo G, Carattini-Rivera S, DeMayo F, Bradley A, Donehower LA, Elledge SJ (2000) Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* **14**: 1448-1459
- Liu S, Opiyo SO, Manthey K, Glanzer JG, Ashley AK, Amerin C, Troksa K, Shrivastav M, Nickoloff JA, Oakley GG (2012) Distinct roles for DNA-PK, ATM and ATR in RPA phosphorylation and checkpoint activation in response to replication stress. *Nucleic acids research* **40**: 10780-10794
- Liu S, Shiotani B, Lahiri M, Maréchal A, Tse A, Leung Charles Chung Y, Glover JNM, Yang Xiaohong H, Zou L (2011) ATR Autophosphorylation as a Molecular Switch for Checkpoint Activation. *Molecular cell* **43**: 192-202
- Löbrich M, Shibata A, Beucher A, Fisher A, Ensminger M, Goodarzi AA, Barton O, Jeggo PA (2010) γ H2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: Strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle* **9**: 662-669
- Lopes M, Cotta-Ramusino C, Pelliccioli A, Liberi G, Plevani P, Muzi-Falconi M, Newlon CS, Foiani M (2001) The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. *Nature* **412**: 557-561

Lopez-Girona A, Tanaka K, Chen X-B, Baber BA, McGowan CH, Russell P (2001) Serine-345 is required for Rad3-dependent phosphorylation and function of checkpoint kinase Chk1 in fission yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 11289-11294

Lori F, Lisziewicz J (1998) Hydroxyurea: mechanisms of HIV-1 inhibition. *Antiviral therapy* **3 Suppl 4**: 25-33

Lori F, Malykh A, Cara A, Sun D, Weinstein JN, Lisziewicz J, Gallo RC (1994) Hydroxyurea as an inhibitor of human immunodeficiency virus-type 1 replication. *Science* **266**: 801-805

Lou Z, Minter-Dykhouse K, Franco S, Gostissa M, Rivera MA, Celeste A, Manis JP, van Deursen J, Nussenzweig A, Paull TT, Alt FW, Chen J (2006) MDC1 Maintains Genomic Stability by Participating in the Amplification of ATM-Dependent DNA Damage Signals. *Molecular cell* **21**: 187-200

Lukas C, Falck J, Bartkova J, Bartek J, Lukas J (2003) Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nature cell biology* **5**: 255-260

Lundin C, Erixon K, Arnaudeau C, Schultz N, Jenssen D, Meuth M, Helleday T (2002) Different roles for nonhomologous end joining and homologous recombination following replication arrest in mammalian cells. *Molecular and cellular biology* **22**: 5869-5878

Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR (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**: 781-794

MacAlpine DM, Almouzni G (2013) Chromatin and DNA Replication. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*

Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ (1998) Linkage of ATM to Cell Cycle Regulation by the Chk2 Protein Kinase. *Science* **282**: 1893-1897

Matsuoka S, Rotman G, Ogawa A, Shiloh Y, Tamai K, Elledge SJ (2000) Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 10389-10394

Maya-Mendoza A, Petermann E, Gillespie DA, Caldecott KW, Jackson DA (2007) Chk1 regulates the density of active replication origins during the vertebrate S phase. *The EMBO journal* **26**: 2719-2731

Méchal M (2010) Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers. *Nature reviews Molecular cell biology* **11**: 728-738

Meek K, Dang V, Lees-Miller SP (2008) DNA-PK: the means to justify the ends? *Advances in immunology* **99**: 33-58

Merrick CJ, Jackson D, Diffley JF (2004) Visualization of altered replication dynamics after DNA damage in human cells. *The Journal of biological chemistry* **279**: 20067-20075

-
- Michael WM, Ott R, Fanning E, Newport J (2000) Activation of the DNA replication checkpoint through RNA synthesis by primase. *Science* **289**: 2133-2137
- Mimitou EP, Symington LS (2009) DNA end resection: many nucleases make light work. *DNA repair* **8**: 983-995
- Misteli T, Soutoglou E (2009) The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nature reviews Molecular cell biology* **10**: 243-254
- Molinari M, Mercurio C, Dominguez J, Goubin F, Draetta GF (2000) Human Cdc25 A inactivation in response to S phase inhibition and its role in preventing premature mitosis. *EMBO reports* **1**: 71-79
- Morgan DO (1995) Principles of CDK regulation. *Nature* **374**: 131-134
- Moynahan ME, Pierce AJ, Jasin M (2001) BRCA2 Is Required for Homology-Directed Repair of Chromosomal Breaks. *Molecular cell* **7**: 263-272
- Murga M, Bunting S, Montana MF, Soria R, Mulero F, Canamero M, Lee Y, McKinnon PJ, Nussenzweig A, Fernandez-Capetillo O (2009) A mouse model of ATR-Seckel shows embryonic replicative stress and accelerated aging. *Nat Genet* **41**: 891-898
- Nigg EA (2001) Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature reviews Molecular cell biology* **2**: 21-32
- Nikolova T, Ensminger M, Lobrich 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
- Nyberg KA, Michelson RJ, Putnam CW, Weinert TA (2002) Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annual review of genetics* **36**: 617-656
- Orr-Weaver TL, Szostak JW (1983) Yeast recombination: the association between double-strand gap repair and crossing-over. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **80**: 4417-4421
- Pacek M, Walter JC (2004) *A requirement for MCM7 and Cdc45 in chromosome unwinding during eukaryotic DNA replication*, Vol. 23.
- Painter RB, Young BR (1980) Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: a new explanation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **77**: 7315-7317
- Pei H, Zhang L, Luo K, Qin Y, Chesi M, Fei F, Bergsagel PL, Wang L, You Z, Lou Z (2011) MMSET regulates histone H4K20 methylation and 53BP1 accumulation at DNA damage sites. *Nature* **470**: 124-128

-
- Pellegrini L, Yu DS, Lo T, Anand S, Lee M, Blundell TL, Venkitaraman AR (2002) Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature* **420**: 287-293
- Peng CY, Graves PR, Thoma RS, Wu Z, Shaw AS, Piwnica-Worms H (1997) Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* **277**: 1501-1505
- Petermann E, Orta ML, Issaeva N, Schultz N, Helleday T (2010a) Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. *Molecular cell* **37**: 492-502
- Petermann E, Woodcock M, Helleday T (2010b) Chk1 promotes replication fork progression by controlling replication initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 16090-16095
- Petrini JHJ, Stracker TH (2003) The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends in Cell Biology* **13**: 458-462
- Prigent C, Dimitrov S (2003) Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *Journal of Cell Science* **116**: 3677-3685
- Ragland R, Arlt M, Hughes E, Saunders T, Glover T (2009) Mice hypomorphic for Atr have increased DNA damage and abnormal checkpoint response. *Mamm Genome* **20**: 375-385
- Rappold I, Iwabuchi K, Date T, Chen J (2001) Tumor Suppressor P53 Binding Protein 1 (53bp1) Is Involved in DNA Damage-Signaling Pathways. *The Journal of cell biology* **153**: 613-620
- Rass U, Compton SA, Matos J, Singleton MR, Ip SC, Blanco MG, Griffith JD, West SC (2010) Mechanism of Holliday junction resolution by the human GEN1 protein. *Genes Dev* **24**: 1559-1569
- Redon C, Pilch D, Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, Bonner W (2002) Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Current Opinion in Genetics & Development* **12**: 162-169
- Reinhardt HC, Yaffe MB (2009) Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. *Current Opinion in Cell Biology* **21**: 245-255
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 5858-5868
- Rothkamm K, Krüger I, Thompson LH, Löbrich M (2003) Pathways of DNA Double-Strand Break Repair during the Mammalian Cell Cycle. *Molecular and cellular biology* **23**: 5706-5715
- Rothkamm K, Löbrich M (2003) Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 5057-5062
- Rowles A, Chong JP, Brown L, Howell M, Evan GI, Blow JJ (1996) Interaction between the origin recognition complex and the replication licensing system in *Xenopus*. *Cell* **87**: 287-296

Saintigny Y, Delacote F, Vares G, Petitot F, Lambert S, Averbek D, Lopez BS (2001) Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells. *The EMBO journal* **20**: 3861-3870

Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry* **73**: 39-85

Sanchez Y, Wong C, Thoma RS, Richman R, Wu Z, Piwnicka-Worms H, Elledge SJ (1997) Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* **277**: 1497-1501

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

Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NG, Taylor AM, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS, Shiloh Y (1995) A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* **268**: 1749-1753

Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A, Halazonetis TD (2000) P53 Binding Protein 1 (53bp1) Is an Early Participant in the Cellular Response to DNA Double-Strand Breaks. *The Journal of cell biology* **151**: 1381-1390

Shechter D, Costanzo V, Gautier J (2004a) ATR and ATM regulate the timing of DNA replication origin firing. *Nature cell biology* **6**: 648-655

Shechter D, Costanzo V, Gautier J (2004b) Regulation of DNA replication by ATR: signaling in response to DNA intermediates. *DNA repair* **3**: 901-908

Shibata A, Barton O, Noon AT, Dahm K, Deckbar D, Goodarzi AA, Lobrich M, Jeggo PA (2010) Role of ATM and the damage response mediator proteins 53BP1 and MDC1 in the maintenance of G(2)/M checkpoint arrest. *Molecular and cellular biology* **30**: 3371-3383

Shiotani B, Zou L (2009) Single-Stranded DNA Orchestrates an ATM-to-ATR Switch at DNA Breaks. *Molecular cell* **33**: 547-558

Sneeden JL, Grossi SM, Tappin I, Hurwitz J, Heyer W-D (2013) Reconstitution of recombination-associated DNA synthesis with human proteins. *Nucleic acids research* **41**: 4913-4925

Sneeden JL, Loeb LA (2004) Mutations in the R2 subunit of ribonucleotide reductase that confer resistance to hydroxyurea. *The Journal of biological chemistry* **279**: 40723-40728

Sogo JM, Lopes M, Foiani M (2002) Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science* **297**: 599-602

Solinger JA, Kiianitsa K, Heyer W-D (2002) Rad54, a Swi2/Snf2-like Recombinational Repair Protein, Disassembles Rad51:dsDNA Filaments. *Molecular cell* **10**: 1175-1188

Sorensen CS, Hansen LT, Dziegielewski J, Syljuasen RG, Lundin C, Bartek J, Helleday T (2005) The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nature cell biology* **7**: 195-201

Sorensen CS, Syljuasen RG (2012) Safeguarding genome integrity: the checkpoint kinases ATR, CHK1 and WEE1 restrain CDK activity during normal DNA replication. *Nucleic acids research* **40**: 477-486

Sørensen CS, Syljuåsen RG, Falck J, Schroeder T, Rønnstrand L, Khanna KK, Zhou B-B, Bartek J, Lukas J (2003) Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* **3**: 247-258

Sørensen CS, Syljuåsen RG, Lukas J, Bartek J (2004) ATR, Claspin and the Rad9-Rad1-Hus1 Complex Regulate Chk1 and Cdc25A in the Absence of DNA Damage. *Cell Cycle* **3**: 939-943

Stehman FB (1992) Experience with hydroxyurea as a radiosensitizer in carcinoma of the cervix. *Seminars in oncology* **19**: 48-52

Stewart GS, Panier S, Townsend K, Al-Hakim AK, Kolas NK, Miller ES, Nakada S, Ylanko J, Olivarius S, Mendez M, Oldreive C, Wildenhain J, Tagliaferro A, Pelletier L, Taubenheim N, Durandy A, Byrd PJ, Stankovic T, Taylor AM, Durocher D (2009) The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage. *Cell* **136**: 420-434

Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Löbrich M, Jeggo PA (2004) ATM and DNA-PK Function Redundantly to Phosphorylate H2AX after Exposure to Ionizing Radiation. *Cancer research* **64**: 2390-2396

Sung P, Robberson DL (1995) DNA strand exchange mediated by a RAD51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA. *Cell* **82**: 453-461

Symington LS (2002) Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **66**: 630-670, table of contents

Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ, Stahl FW (1983) The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* **33**: 25-35

Tarsounas M, Davies D, West SC (2002) BRCA2-dependent and independent formation of RAD51 nuclear foci. *Oncogene* **22**: 1115-1123

Tauchi H, Kobayashi J, Morishima K, van Gent DC, Shiraishi T, Verkaik NS, vanHeems D, Ito E, Nakamura A, Sonoda E, Takata M, Takeda S, Matsuura S, Komatsu K (2002) Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells. *Nature* **420**: 93-98

-
- Taylor ER, McGowan CH (2008) Cleavage mechanism of human Mus81-Eme1 acting on Holliday-junction structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 3757-3762
- Tercero JA, Diffley JF (2001) Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. *Nature* **412**: 553-557
- Thorslund T, West SC (2007) BRCA2: a universal recombinase regulator. *Oncogene* **26**: 7720-7730
- Toledo LI, Altmeyer M, Rask MB, Lukas C, Larsen DH, Povlsen LK, Bekker-Jensen S, Mailand N, Bartek J, Lukas J (2013) ATR Prohibits Replication Catastrophe by Preventing Global Exhaustion of RPA. *Cell* **155**: 1088-1103
- Uematsu N, Weterings E, Yano K, Morotomi-Yano K, Jakob B, Taucher-Scholz G, Mari PO, van Gent DC, Chen BP, Chen DJ (2007) Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *The Journal of cell biology* **177**: 219-229
- Unno J, Takagi M, Piao J, Sugimoto M, Honda F, Maeda D, Masutani M, Kiyono T, Watanabe F, Morio T, Teraoka H, Mizutani S (2013) Artemis-dependent DNA double-strand break formation at stalled replication forks. *Cancer science* **104**: 703-710
- Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y (2003) Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *The EMBO journal* **22**: 5612-5621
- Vidal-Eychenie S, Decaillet C, Basbous J, Constantinou A (2013) DNA structure-specific priming of ATR activation by DNA-PKcs. *The Journal of cell biology* **202**: 421-429
- Vigo E, Muller H, Prosperini E, Hateboer G, Cartwright P, Moroni MC, Helin K (1999) CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S phase. *Molecular and cellular biology* **19**: 6379-6395
- Walter J, Newport J (2000) Initiation of eukaryotic DNA replication: origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA polymerase alpha. *Molecular cell* **5**: 617-627
- Wang H, Wang M, Wang H, Böcker 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, Gong Z, Chen J (2011) MDC1 collaborates with TopBP1 in DNA replication checkpoint control. *The Journal of cell biology* **193**: 267-273
- Wang J, Pluth JM, Cooper PK, Cowan MJ, Chen DJ, Yannone SM (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* **4**: 556-570

-
- Wang Q, Chan TR, Hilgraf R, Fokin VV, Sharpless KB, Finn MG (2003) Bioconjugation by copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition. *Journal of the American Chemical Society* **125**: 3192-3193
- Ward IM, Chen J (2001) Histone H2AX Is Phosphorylated in an ATR-dependent Manner in Response to Replicational Stress. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 47759-47762
- Ward JF (1975) Radiation-induced strand breakage in DNA. *Basic life sciences* **5B**: 471-472
- West MHP, Bonner WM (1980) Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species. *Biochemistry* **19**: 3238-3245
- Weterings E, Chen DJ (2007) DNA-dependent protein kinase in nonhomologous end joining: a lock with multiple keys? *The Journal of cell biology* **179**: 183-186
- Weterings E, Chen DJ (2008) The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Res* **18**: 114-124
- Weterings E, van Gent DC (2004) The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synopsis. *DNA repair* **3**: 1425-1435
- Weterings E, Verkaik NS, Bruggenwirth HT, Hoeijmakers JH, van Gent DC (2003) The role of DNA dependent protein kinase in synopsis of DNA ends. *Nucleic acids research* **31**: 7238-7246
- Wilson III DM, Thompson LH (2007) Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **616**: 11-23
- Wilson MA, Kwon Y, Xu Y, Chung W-H, Chi P, Niu H, Mayle R, Chen X, Malkova A, Sung P, Ira G (2013) Pif1 helicase and Pol[dgr] promote recombination-coupled DNA synthesis via bubble migration. *Nature* **502**: 393-396
- Wold MS (1997) REPLICATION PROTEIN A: A Heterotrimeric, Single-Stranded DNA-Binding Protein Required for Eukaryotic DNA Metabolism. *Annual review of biochemistry* **66**: 61-92
- Wold MS, Kelly T (1988) Purification and characterization of replication protein A, a cellular protein required for in vitro replication of simian virus 40 DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **85**: 2523-2527
- Woodward AM, Göhler T, Luciani MG, Oehlmann M, Ge X, Gartner A, Jackson DA, Blow JJ (2006) Excess Mcm2-7 license dormant origins of replication that can be used under conditions of replicative stress. *The Journal of cell biology* **173**: 673-683
- Wu L, Luo K, Lou Z, Chen J (2008) MDC1 regulates intra-S-phase checkpoint by targeting NBS1 to DNA double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 11200-11205
- Wyatt MD, Pittman DL (2006) Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. *Chemical research in toxicology* **19**: 1580-1594

-
- Xia F, Taghian DG, DeFrank JS, Zeng Z-C, Willers H, Iliakis G, Powell SN (2001) Deficiency of human BRCA2 leads to impaired homologous recombination but maintains normal nonhomologous end joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 8644-8649
- Xu B, Kim ST, Lim DS, Kastan MB (2002) Two molecularly distinct G(2)/M checkpoints are induced by ionizing irradiation. *Molecular and cellular biology* **22**: 1049-1059
- Yarbro JW, Kennedy BJ, Barnum CP (1965) Hydroxyurea inhibition of DNA synthesis in ascites tumor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **53**: 1033-1035
- Young CW, Hodas S (1964) Hydroxyurea: Inhibitory Effect on DNA Metabolism. *Science* **146**: 1172-1174
- Yuan S-SF, Lee S-Y, Chen G, Song M, Tomlinson GE, Lee EY-HP (1999) BRCA2 Is Required for Ionizing Radiation-induced Assembly of Rad51 Complex in Vivo. *Cancer research* **59**: 3547-3551
- Yurov YB, Liapunova N (1977) The units of DNA replication in the mammalian chromosomes: Evidence for a large size of replication units. *Chromosoma* **60**: 253-267
- Zachos G, Rainey MD, Gillespie DA (2003) Chk1-deficient tumour cells are viable but exhibit multiple checkpoint and survival defects. *The EMBO journal* **22**: 713-723
- Zhu Z, Chung WH, Shim EY, Lee SE, Ira G (2008) Sgs1 helicase and two nucleases Dna2 and Exo1 resect DNA double-strand break ends. *Cell* **134**: 981-994
- Zou L, Elledge SJ (2003) Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes. *Science* **300**: 1542-1548
- Zou L, Liu D, Elledge SJ (2003) Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 13827-13832

7. Anhang

7.1. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Lucie Iloff
Geburtstag	12.12.1985
Geburtsort	Mannheim

Promotion

Seit 12/2010	Technische Universität Darmstadt Fachbereich Biologie Arbeitsgruppe Strahlenbiologie und DNA-Reparatur, Prof. Dr. M. Löbrich
--------------	--

Studium

01/2010 – 10/2010	Diplomarbeit an der Technischen Universität Darmstadt, Fachbereich Biologie, Arbeitsgruppe Strahlenbiologie und DNA-Reparatur, Prof. Dr. M. Löbrich
10/2005 – 10/2010	Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt Abschluss Diplom Biologe

Schulbildung

1996 – 2005	Leininger Gymnasium Grünstadt
1992 – 1996	Grundschule Carlsberg

7.2. Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen:

Michael Ensminger, Lucie Iloff, Christian Ebel, Teodora Nikolova, Bernd Kaina and Markus Löbrich
DNA breaks and chromosomal aberrations arise when replication meets base excision repair
The Journal of Cell Biology 2014 (in press)

Tagungsbeiträge:

Lucie Iloff, Michael Ensminger, Christian Ebel, Sandro Conrad, Markus Löbrich
“DNA damage response after HU, MMS and CPT”
Posterpräsentation, 26. Tagung der Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung (2012)
Mainz, Deutschland

Lucie Iloff, Michael Ensminger, Markus Löbrich
“Who is HU? The DNA damage response post Hydroxyurea”
Vortrag, 12. Tagung der DGDR / 15. Jahrestagung der GBS (2012)
München, Deutschland

Lucie Iloff, Michael Ensminger, Markus Löbrich
“Who is HU? - The DNA damage response post Hydroxyurea”
Posterbeitrag, 16. Jahrestagung der GBS (2013)
Darmstadt, Deutschland

Lucie Iloff, Michael Ensminger, Markus Löbrich
“Who is HU? - The DNA damage response post Hydroxyurea”
Posterbeitrag, EMBO Conference “The DNA damage response in cell physiology and disease” (2013)
Cape Sounio, Griechenland

Auszeichnungen:

Reisestipendium anlässlich der 12. Tagung der DGDR / der 15. Jahrestagung der GBS, München 2012

7.3. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Markus Löbrich für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe meine Promotion durchzuführen. Ihre immerwährende Diskussionsfreude auch bis spät in die Nacht hinein hat mir oft weitergeholfen und mich ermutigt mich weiter mit meinem Thema auseinanderzusetzen.

Bei Herrn Prof. Dr. Bodo Laube möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Frau Prof. Dr. Cristina Cardoso und Herrn Prof. Dr. Franz Rödel möchte ich für die Bereitschaft danken, als Prüfer bei meiner Disputation zu fungieren.

Dr. Michael Ensminger möchte ich für die Betreuung während meiner Arbeit und besonders die hilfreichen Diskussionen danken. Ein weiterer Dank gebührt dir für die Korrektur dieser Arbeit. Und wie du siehst, wird es eben doch ganz schön!

Ratna Weimer, Johanna Mirsch, Adriana Längle, Britta Muster und Marcus Beuke möchte ich ebenfalls für die Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit danken.

Meiner Arbeitsgruppe möchte ich für die lustigen Pausen danken, die mich immer wieder auf ganz andere Gedanken brachten. Bei euch liegen Genie und Wahnsinn eben ganz nah zusammen. Außerdem möchte ich euch besonders dafür danken, dass ihr mir während meiner langen Zeit in dieser AG immer wieder kleine und große Gefallen getan habt. Besonders die besten TAs der Welt (Christel, Conny und Bettina) machen einem das Leben im Labor oft einfacher. Für die aufbauenden Worte, die gemeinsamen Frustrationsmomente sowie deren Überwindung und die einfach schöne Zeit möchte ich besonders Toni, Johanna, Ratna und dem Fräulein Kü danken. Bei Doro möchte ich mich dafür bedanken, dass sie für meine Sorgen und Probleme immer ein offenes Ohr hatte.

Den Mitgliedern des Grk, allen voran Adri, Anke, Belle, Britta, Sabine, Conny, Laurin und Christine möchte ich für die schöne Zeit während der gemeinsamen Kurse und *Retreats* danken.

Meinen Freunden Caro, Adri, Britta, Belle, Lena und Katrin möchte ich dafür danken, dass sie während meines ganzen Studiums und der intensiven Zeit meiner Promotion immer zu mir gehalten haben. Dass ihr mir nicht jedes, wegen der Arbeit abgesagte Treffen übel nimmt weiß ich zu schätzen!

Meiner Mama, meinem Bruder Johannes und Regina möchte ich für ihren Glauben an mich und meine Arbeit danken. An eurer Unterstützung liegt mir viel und ohne euch und eure Gewissheit, dass ich das schon schaffen werde wäre ich nicht so weit gekommen.

Meinem Freund Marcus möchte ich ganz besonders für seine Unterstützung in allen Lebenslagen danken. Du weißt am besten wie viel du für mich getan hast. Danke, dass du immer für mich da bist, zu mir hältst und mich auffängst!

7.4. Ehrenwörtliche Erklärung

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

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

Darmstadt, den 27.06.2014

.....
(Lucie Iloff)