

Untersuchung der DNA- Doppelstrangbruch-Reparatur über Homologe Rekombination am Übergang von der G2-Phase in die Mitose

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biol. Andreas Taubmann

aus Heidelberg

Referent: Prof. Dr. Markus Löbrich

Koreferent: Prof. Dr. Paul Layer

Tag der Einreichung: 20. 01. 2015

Tag der mündlichen Prüfung: 27. 03. 2015

Darmstadt 2015

D 17





*When you study natural science and the miracles of creation,
if you don't turn into a mystic you are not a natural scientist.*

Albert Hofmann (1906-2008)



Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung.....	3
2.1 Grundlagen ionisierender Strahlung und Strahlungsarten.....	4
2.2 Wechselwirkung von ionisierender Strahlung mit Materie.....	5
2.3 Direkte und indirekte Wechselwirkung von Strahlung mit DNA	6
2.4 Erkennung des DNA-Doppelstrangbruchs.....	6
2.5 DSB-Reparatur.....	8
2.5.1 Die Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ)	8
2.5.2 Homologieabhängige DNA-Reparatur.....	11
2.6 Auswirkungen von DNA-Doppelstrangbrüchen auf die Zellzykluskontrolle.....	15
2.6.1 Der G1/S- und Intra-S-Checkpoint	17
2.6.2 Der G2/M- und der Mitose-Checkpoint.....	18
2.6.3 Das Zusammenspiel von DNA-Reparatur in G2 und dem G2/M-Checkpoint.....	19
2.6.4 Die Beteiligung von Rad52 an der DNA-Reparatur	20
2.7 Fragestellung.....	23
3 Material und Methoden	24
3.1 Material.....	24
3.1.1 Puffer, Lösungen und Medien.....	28
3.2 Zellbiologische Methoden	32
3.2.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	32
3.2.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	32
3.2.3 Chemische Transformation mittels Hitzeschock.....	33
3.2.4 Glycerol-Stocks	33
3.2.5 Humane Zellkultur.....	34
3.2.6 Generierung transgener Zelllinien	35
3.2.7 Anlegen von Kryo-Stocks.....	37
3.2.8 Auftauen von Zellen aus dem Kryo-Stock	37
3.2.9 Bestrahlung.....	38
3.2.10 Behandlung mit dem Rad51-Inhibitor B02	38
3.2.11 Behandlung mit Hydroxyurea.....	39
3.2.12 Behandlung mit EdU	39
3.3 Molekulargenetische Methoden.....	40
3.3.1 Verwendete Vektoren.....	40
3.3.2 RNA-Isolation.....	40
3.3.3 Plasmidisolation.....	40
3.3.4 PCR.....	41
3.3.5 Restriktion	46
3.3.6 Ligation.....	46
3.3.7 Agarose-Gelelektrophorese.....	47

3.3.8	Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	47
3.3.9	Bestimmung des Nukleinsäuregehalts einer Lösung.....	48
3.4	Proteinbiochemische Methoden	49
3.4.1	Zellernte und Zellaufschluss.....	49
3.4.2	Proteinbestimmung nach Bradford	49
3.4.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	50
3.4.4	Western-Blot.....	50
3.5	Mikroskopie.....	51
3.5.1	Immunfluoreszenz-Mikroskopie	51
3.5.2	Live Cell Imaging	55
4	Ergebnisse	57
4.1	Herstellung von DNA-Konstrukten und Zelllinien.....	57
4.1.1	hRad51	59
4.1.2	hRad52.....	60
	hRad54.....	62
4.1.3	hRPA32.....	63
4.1.4	hMus81.....	64
4.1.5	Gen1	66
4.1.6	Herstellung einfach transfizierter Zelllinien.....	68
4.2	Herstellung doppelt transfizierter Zelllinien.....	69
4.3	Rad51 und Rad54 als Marker von HR-Prozessen in fixierten Zellen.....	72
4.3.1	Messung von Rad51 und Rad54-Foci-Kinetiken nach Bestrahlung in G2.....	72
4.3.2	Detektion von HR-Reparaturfaktoren an DSBs in Mitose nach Bestrahlung in der G2-Phase.....	75
4.3.3	Messung von Rad54-GFP-Foci-Kinetiken nach IR mittels Lebendzellmikroskopie.....	76
4.4	Charakterisierung des DNA-Reparaturfaktors Rad52.....	79
4.4.1	Messung von Rad52-GFP-Foci-Kinetiken mittels Lebendzellmikroskopie nach Bestrahlung in der G2-Phase	80
4.4.2	Rad52-, Rad51- und γ H2AX-Foci-Kinetiken nach Bestrahlung in der G2-Phase	85
4.4.3	Untersuchung der Kolo­kalisierung von Rad52-GFP mit pRPA32	88
4.5	Die Auflösung von HR-Reparaturintermediaten in mitotischen Zellen	92
4.5.1	Kolo­kalisierung von Rad52, Mus81 und γ H2AX in mitotischen Zellen	92
4.6	Rad52-GFP-Foci-Kinetiken in der G2-Phase nach Rad51-Inhibition	94
4.7	Rad52-GFP- und γ H2AX-Foci in Mitose nach Rad51-Inhibition.....	101
5	Diskussion	104
5.1	Ektopische Überexpression Fluorochrom-gekoppelter HR-Faktoren.....	104
5.2	Bestimmung der Zellzyklusphasen in der Lebendzellmikroskopie.....	107
5.3	Das Zusammenspiel von Rad51, Rad54 und Rad52 in der späten G2-Phase	108
5.3.1	Auswirkungen der Rad51-Inhibition auf die DSB-Reparatur am G2/M-Übergang.....	116
5.4	Alternative Modelle zur Rolle von Rad52 in der späten G2-Phase.....	118
6	Ausblick.....	121
	Anhang	123

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Erkennung eines DSBs und daran beteiligte Faktoren..	7
Abbildung 2: Reparatur eines DSBs mittels c-NHEJ.	9
Abbildung 3: Reparatur eines DSBs mittels alt-NHEJ.	10
Abbildung 4: Reparatur eines DSBs mittels HR.	12
Abbildung 5: Reparatur eines DSB mittels SSA.	15
Abbildung 6: Checkpoint- vermittelte Zellzykluskontrolle.	16
Abbildung 7: (A) Repräsentativer Dot-Plot.	54
Abbildung 8: (A) Vektorkarte des DNA-Konstrukts pEGFP-Rad51 (L79)	59
Abbildung 9: (A) Vektorkarte des DNA-Konstrukts pEGFP-Rad52 (L60).	61
Abbildung 10: (A) Vektorkarte des DNA-Konstrukts pmCherry-Rad54 (L67).	62
Abbildung 11: (A) Vektorkarte des DNA-Konstrukts pEGFP-hRPA32 (L152).	64
Abbildung 12: (A) Vektorkarte des DNA-Konstrukts pEGFP-Mus81 (L98).	65
Abbildung 13: (A) Vektorkarte des DNA-Konstrukts pEGFP-Gen1 (L153).	66
Abbildung 14: Vektorkarte des DNA-Konstrukts pTK-Hyg (L141)	69
Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbung in U2OS WT-Zellen.	73
Abbildung 16: γ H2AX-, Rad54- und Rad51-Foci-Kinetiken nach Bestrahlung.	74
Abbildung 17: Darstellung der DNA-Reparaturfaktoren Rad51 und Rad54	76
Abbildung 18: Darstellung eines Lebendzellexperiments.	78
Abbildung 19: Darstellung des DNA-Reparaturfaktors Rad52-GFP.	79
Abbildung 20: Repräsentative Darstellung von U2OS-Zellen.	81
Abbildung 21: Darstellung einer <i>Time-Lapse</i> -Aufnahme	83
Abbildung 22: Messung von Rad52-GFP-Foci-Kinetiken nach Bestrahlung	84
Abbildung 23: Foci-Kinetiken von U2OS Rad52-GFP Klon 1-Zellen.	86
Abbildung 24: Immunfluoreszenzfärbung in U2OS Rad52-GFP Klon 1-Zellen.	87
Abbildung 25: Foci-Kinetiken von HeLa Rad52-GFP Klon A-Zellen	88
Abbildung 26: γ H2AX, pRPA und Rad52-GFP-Foci-Kinetiken	90
Abbildung 27: Immunfluoreszenzfärbung in HeLa WT-Zellen in der G2-Phase	91
Abbildung 28: Kollokalisierung von Rad52-GFP und Mus81 in mitotischen Zellen.	93

Abbildung 29: γ H2AX- und Rad52-GFP-Foci-Kinetik in der G2-Phase	95
Abbildung 30: Immunfluoreszenzfärbung in U2OS Rad52-GFP Klon 1	96
Abbildung 31: γ H2AX- und Rad52-GFP-Foci-Kinetik in der G2-Phase	97
Abbildung 32: pRPA-Foci-Kinetik in der G2-Phase nach Bestrahlung	99
Abbildung 33: Immunfluoreszenzfärbung in HeLa Rad52-GFP Klon A.	100
Abbildung 34: Rad52-GFP- und γ H2AX-Foci in Mitose.....	102
Abbildung 35: Schematische Darstellung der Rad52-assoziierten Reparaturwege	115

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien	24
Tabelle 2: Chemikalien.....	25
Tabelle 3: Kits	26
Tabelle 4: Restriktionsendonukleasen.....	26
Tabelle 5: Transfektionsreagenzien	27
Tabelle 6: Geräte.....	27
Tabelle 7: Software	27
Tabelle 8: Objektive	27
Tabelle 9: Antikörper	28
Tabelle 10: LB-Festmedium	28
Tabelle 11: LB-Flüssigmedium.....	28
Tabelle 12: SOB-Medium	29
Tabelle 13: 2 M Mg ²⁺ -Lösung.....	29
Tabelle 14: Puffer RF1.....	29
Tabelle 15: Puffer RF2.....	29
Tabelle 16: Trypsin-EDTA-Lösung	29
Tabelle 17: Einfriermedium.....	30
Tabelle 18: 50x TAE-Puffer	30
Tabelle 19: RIPA-Puffer	30
Tabelle 20: SDS-Polyacrylamidgel	30
Tabelle 21: Puffer B.....	30
Tabelle 22: Puffer C	31
Tabelle 23: 5x Lämmli-Puffer	31
Tabelle 24: 10x Elektrophoresepuffer	31
Tabelle 25: 10x Transferpuffer	31
Tabelle 26: TBS-T-Puffer	31
Tabelle 27: Verwendete humane Zelllinien.....	34
Tabelle 28: Verwendete Transfektionsreagenzien	36

Tabelle 29: Ausgangsvektoren	40
Tabelle 30: Oligonukleotidprimer.....	41
Tabelle 31: Pipettierschema Standard-PCR.....	43
Tabelle 32: PCR-Programm Standard -PCR.....	44
Tabelle 33: Pipettierschema <i>Proofreading</i> -PCR.....	45
Tabelle 34: PCR-Programm Proofreading PCR.....	45
Tabelle 35: Restriktionsansatz	46
Tabelle 36: Ligationsreaktion	47
Tabelle 37: Eingesetzte Primärantikörper für WB	50
Tabelle 38: Verwendete Sekundärantikörper für WB	51
Tabelle 39: Verwendete Mikroskope.....	51
Tabelle 40: Primärantikörper für IFM	52
Tabelle 41 Eingesetzte Sekundärantikörper für IFM	53
Tabelle 42: Erzeugte Expressionsvektoren auf Basis von G418-Resistenz vermittelnden Vektoren	58
Tabelle 43: Erzeugte transgene Zelllinien auf Basis der G418/Neomycin-Resistenzvermittelnden Vektoren	68
Tabelle 44: Erzeugte Expressionsvektoren auf Basis des Vektors pTK-Hyg (L141).....	70
Tabelle 45: Erzeugte doppelt transgene Zelllinien	71

Abkürzungsverzeichnis

53BP1	p53 <i>binding protein 1</i>
Abb.	Abbildung
APC	<i>Anaphase promoting complex</i>
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>ATM- and Rad3-related</i>
ATRIP	<i>ATR interacting protein</i>
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaar
BRCA1 /2	<i>Breast cancer susceptibility gene 1/2</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CDC25	<i>Cell division cycle</i>
CDK	<i>Cyclin dependent kinase</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CDS	<i>Coding sequence</i>
CHK1/2	CheckpointKinase 1/2
CtIP	<i>CtBP interacting protein</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DG	Deckglas
DMEM	<i>Dulbecco's minimal essential medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	<i>DNA dependent protein kinase</i>
DNA-PKcs	<i>DNA dependent protein kinase catalytic subunit</i>
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DSB	<i>Double strand break</i> , Doppelstrangbruch
DSBR	<i>Double strand break repair</i> , Doppelstrangbruchreparatur
dsDNA	<i>Double stranded DNA</i> , Doppelsträngige DNA
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EdU	5-Ethynyl-2'-deoxyuridine
Eme1	<i>Essential meiotic endonuclease 1</i>
FA	Formaldehyd
FCS	<i>Fetal calf serum</i> , Fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FRAP	<i>Fluorescence recovery after photobleaching</i>
GOI	<i>Gene of interest</i>
HC	Heterochromatin
HCl	Salzsäure
HJ	Holliday-Junction
HR	Homologe Rekombination
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
hTERT	Humane Telomerase reverse Transkriptase

HU	Hydroxyurea
Hyg	Hygromycin
IFM	Immunfluoreszenz-Mikroskopie
IR	<i>Ionizing radiation</i> , Ionisierende Strahlung
IRIF	<i>Ionizing radiation induced focus</i>
Kan	Kanamycin
kbp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
LCI	<i>Live Cell Imaging</i>
LigI/IV	Ligase I/IV
MDC1	<i>Mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>
MEM	<i>Minimal essential medium</i>
MP	Milchprotein
MRE11	<i>Meiotic recombination 11</i>
MRN	MRE11, Rad50, NBS1
Mus81	<i>MMS and UV sensitive 81</i>
NBS1	<i>Nijmegen Breakage Syndrome 1</i>
NEAA	<i>Non-essential amino acids</i>
NHEJ	<i>Non-homologous End-joining</i>
Nts	Nukleotide
NLS	<i>Nuclear localzation signal</i> , Kernlokalisierungssignal
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PI	Propidiumiodid
PIKK	<i>Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase-like Kinase</i>
PLK	<i>Polo like kinase</i>
Pol	DNA Polymerase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rad	<i>Radiation Repair Protein</i>
Rb	<i>Retinoblastoma suppressor Protein</i>
RE	Restriktionsendonuklease
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffverbindung
RPA	<i>Replication Protein A</i>
RT	Raumtemperatur
SAC	<i>Spindle assembly checkpoint</i>
SCE	<i>Sister chromatid exchange</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SDSA	<i>Synthesis dependent strand annealing</i>
SF	<i>Serum free</i>
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SSA	<i>Single strand annealing</i>
SSB	<i>Single strand break</i> , Einzelstrangbruch
ssDNA	<i>Single-stranded DNA</i> , einzelsträngige DNA

TUD	Technische Universität Darmstadt
u.a.	Unter anderem
UV	Ultraviolett
V(D)J	<i>Variable (Diversity) Joining</i>
WRN	Werner Helicase
WT	Wildtyp
XLF	<i>XRCC4-like factor</i>
XRCC	<i>X-Ray Repair Cross-Complementing</i>
z.B.	zum Beispiel

1 Zusammenfassung

Für die Erhaltung der genomischen Integrität einer Zelle ist das koordinierte Zusammenspiel von DNA-Doppelstrangbruch (DSB)-Reparatur und Zellzykluskontrolle von essentieller Bedeutung. Die Aktivierung des G2/M-Checkpoints ist ein schneller Prozess, jedoch wird der Checkpoint bereits aufgehoben bevor die Reparatur abgeschlossen ist. Infolge dessen können Zellen mit einem erhöhten Level an DSBs in die Mitose eintreten. Frühere Arbeiten führten zu der Erkenntnis, dass in der späten G2-Phase DSBs überwiegend über den Weg der Homologen Rekombination (HR) repariert werden. Diese Beobachtungen ließen vermuten, dass das Aufheben des G2/M-Arrests vor Abschluss der Reparatur dazu führt, dass Zellen mit HR-Reparatur-Intermediaten in die Mitose eintreten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden DNA-Konstrukte hergestellt, welche es ermöglichen sollten, das Reparaturverhalten von HR-Faktoren (Rad51, Rad52, Rad54, Mus81) am Übergang von der G2-Phase in die Mitose genauer zu charakterisieren. Hierzu wurden basierend auf den Vektoren Zelllinien hergestellt und auf ihre Funktionalität hin untersucht. Einige der Zelllinien kamen bei der Beantwortung der nachfolgenden Fragestellung mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie (IFM) und Lebendzellmikroskopie zum Einsatz. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob sich diese Intermediate in der Mitose nachweisen lassen und welche Faktoren weiterhin an der Reparatur beteiligt sind. Zudem sollte ein tieferer Einblick in die Struktur der Intermediate gewonnen werden.

Im Laufe dieser Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass die bekannten HR-Faktoren Rad51 und Rad54 in der späten G2-Phase vom Chromatin dissoziieren und in der Mitose nicht an den DSBs lokalisieren. Im Gegensatz zu Rad51 und Rad54 ist nur wenig über die Rolle von Rad52 während der HR in Säugerzellen bekannt. Nach IR wird Rad52-GFP langsam rekrutiert und hat das Maximum zu späten Zeiten. Rad52-GFP-Foci kolokalisieren zudem in der späten G2-Phase mit Rad51-Foci und phosphoryliertem RPA (pRPA), was einen Hinweis auf eine Rolle von Rad52 in einem späten Schritt der HR liefert. Um festzustellen, ob eine Rad52-GFP-Foci-Ausbildung von vorangegangenen HR-Ereignissen abhängt, wurde Rad51 inhibiert. Interessanterweise nehmen die Foci-Zahlen von Rad52-GFP und pRPA nach Rad51-Inhibition zu. Dies lässt darauf schließen, dass Rad52 auch eine Funktion unabhängig von einer vorhergehenden Rad51-Rekrutierung, dem Schlüsselschritt der HR, wahrnehmen kann. Ob diese Funktion identisch zu der zu späten Zeitpunkten in der G2-Phase in Rad51-profizienten Zellen ist, ist Gegenstand nachfolgender Projekte. Darüber hinaus sind die Rad52-Foci auch in der Pro- und in der Metaphase nachweisbar, wo sie mit der bekanntermaßen an der Auflösung sogenannter *Chromatin entanglements* beteiligten Nuklease

Mus81 kolokalisieren. Dies bestätigt zum einen die Hypothese, dass HR-Intermediate in die Mitose eintreten, zum anderen deutet dies auf deren Auflösung hin. In der Arbeit werden verschiedene Modelle diskutiert, welche Rolle Rad52 bei der Reparatur in der späten G2-Phase und am Übergang in die Mitose einnehmen könnte.

The coordinated interplay of DNA double-strand break (DSB) repair and cell cycle control is essential for the maintenance of a cell's genomic integrity. The activation of the G2/M checkpoint is a fast process, but the checkpoint is abrogated before the repair is complete. As a result, cells can enter mitosis with an increased level of DSBs. Previous work led to the conclusion, that in late G2 phase DSBs are repaired predominantly by homologous recombination (HR). These observations suggested that the abrogation of the G2/M-arrest prior to the completion of DSB repair results in cells entering mitosis with HR repair-intermediates. In this work, DNA vectors have been constructed and used for establishing cell lines to characterize the repair behavior at the transition from the G2 phase into mitosis by immunofluorescence microscopy (IFM) and live cell microscopy. Moreover, it was investigated whether these intermediates could be detected in mitosis and what factors are still involved in the repair. Finally, the aim of this work was to get a deeper insight into the structure of the intermediates.

During this work it was first shown that the common HR factors Rad51 and Rad54 dissociate from chromatin in late G2 phase and cannot be detected at the DSBs in mitosis. In contrast to Rad51 and Rad54, only little is known about the role of Rad52 during HR in mammalian cells. After IR, Rad52-GFP is recruited slowly and has the maximum at later times. Rad52-GFP foci colocalize with Rad51 foci in late G2-phase, indicating a function of Rad52 in a late step of HR. In addition, the Rad52 foci are also detectable in metaphase, where they colocalize with the endonuclease Mus81 which is known for its involvement in the resolution of so-called chromatin entanglements. This confirms the hypothesis that HR intermediates enter mitosis. It was further shown that IR-dependent phosphorylated RPA (pRPA) co-localizes with Rad52-GFP in the course of the G2-phase. To determine whether Rad52-GFP foci formation depends on previous HR events, Rad51 was inhibited. Interestingly, the foci numbers of Rad52-GFP and pRPA are elevated due to Rad51 inhibition. This suggests that Rad52 also functions independently of a previous Rad51 recruitment, the key process of HR. Whether in this case the function of Rad52 is identical to that at later times in the G2-phase in Rad51-proficient cells, is the subject of subsequent projects. In this study, various models are discussed concerning the role of Rad52 in the transition of G2 phase induced DSBs into mitosis.

2 Einleitung

Das humane Genom ist Träger der gesamten Erbinformation unseres Organismus und speichert diese in Form der Desoxyribonukleinsäure (DNA). Die etwa $3,2 \times 10^9$ Basen unseres Genoms sind ständig der Gefahr ausgesetzt, durch eine Vielzahl von endogenen und exogenen Noxen Schaden zu nehmen. Die schwerwiegendste und für die genomische Integrität gefährlichste Läsion stellt der DNA-Doppelstrangbruch (DSB) dar. Endogen können DSBs z.B. durch die als Nebenprodukte des Metabolismus entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) induziert werden. Eine weitere endogene Ursache der Entstehung eines DSBs liegt in der DNA-Replikation. Trifft eine Replikationsgabel auf ein Hindernis wie z.B. spontan desaminierte Basen, apurine Stellen, Einzelstrangbrüche (SSBs) oder durch UV-Strahlung verursachte Photoprodukte kann es zur Störung der Replikation und zur Entstehung eines DSB führen. Zudem existieren zelluläre Mechanismen, welche gezielt DSBs induzieren, wie z.B. bei der Gametogenese während der Meiose (Panizza et al. 2011) oder bei der V(D)J-Rekombination während der Reifung von Lymphozyten (Schatz und Swanson 2011).

Als exogene Ursachen für die Entstehung von DSBs sind Umweltgifte, Medikamente als auch ionisierende Strahlung, zu nennen. Die Quellen ionisierender Strahlung sind dabei recht vielfältig und können medizinischen Anwendungen wie Therapie und Diagnostik oder natürlichen Quellen, wie z.B. der terrestrischen oder der kosmischen Hintergrundstrahlung entstammen. Es wird geschätzt, dass in jeder Zelle des Körpers etwa 10 DSBs pro Tag auftreten (Gospodinov und Herceg 2013). Im Rahmen einer Strahlentherapie kann ein Vielfaches davon induziert werden, um gezielt Tumorgewebe zu zerstören.

Um die genomische Integrität wieder herzustellen und negative Folgen für die Zelle abzuwenden, müssen entstandene DSBs so schnell wie möglich erkannt und beseitigt werden. Ein unreparierter bzw. fehlerhaft reparierter DSB kann bereits zu Informationsverlust, Translokationen, Chromosomenaberrationen, Zelltod oder zu dereguliertem Wachstum und somit zur Transformation einer Zelle führen, mit zum Teil schwerwiegenden Folgen für den Organismus (Khanna und Jackson 2001). Der Organismus schützt sich hiervoor durch die Reparatur entstandener Schäden, dem Verhindern oder Verlangsamen der Proliferation oder indem er die Zellen gezielt zugrunde gehen lässt (Apoptose). Dass diese Mechanismen zuweilen auch versagen können, zeigt eine Vielzahl von Krankheitsbildern, welche auf genomische, oft sogar monogene Veränderungen (Mutationen) zurückzuführen sind. Hierzu zählen Chromosomeninstabilitätssyndrome (z.B. Ataxia telangiectasia, Li-Fraumeni-Syndrom, Nijmegen-breakage Syndrom) und zahlreiche Krebsarten (z.B. Lymphome, Leukämie, Brustkrebs), welche zum Teil auf denselben Gendefekten beruhen (Ciccia und Elledge 2010).

Das Verständnis der Ursache dieser Krankheitsbilder ist hierbei gleichzeitig der Schlüssel zur Prävention bzw. zur Behandlung der Folgen solcher Gendefekte. Erste erfolgreiche Ansätze gibt es auf dem Gebiet der Krebstherapie. Häufig führen Defekte in wichtigen Regulatorgenen zu einem unkontrollierten Zellwachstum. Während gesunde Zellen meist über redundante Kontrollmechanismen verfügen, kann ein solcher Gendefekt genutzt werden, um gezielt die entarteten Zellen zu schädigen, ohne dass dies Folgen für die gesunden Zellen nach sich zieht. Es sind bereits sogenannte synthetisch letale Therapieansätze, also selektive Antitumor-Therapien (Bryant et al. 2005; Chen et al. 2006) beschrieben, für deren Entwicklung die intensive Erforschung von dem Zusammenspiel der DNA-Reparaturwege und den Mechanismen der Zellzykluskontrolle essentiell gewesen ist. Das höhere Verständnis der Vielzahl bisher weniger erforschter Interaktionen und deren Auswirkung auf die Tumorkontrolle wird auch in Zukunft die Grundlage zur Entwicklung verbesserter Krebstherapie- und Präventionsansätze darstellen.

2.1 Grundlagen ionisierender Strahlung und Strahlungsarten

Unter ionisierender Strahlung (IR) versteht man Teilchen- als auch Photonenstrahlungen, welche in der Lage sind, einem Atom oder einem Molekül Elektronen zu entziehen und es somit zu ionisieren. Teilchenstrahlung ist stets mit einem Massetransport verbunden und schließt α -Teilchen (Heliumkerne), Elektronen, Neutronen, Protonen und Schwerionen mit ein. Photonenstrahlung ist masselos und transportiert Energie in Form einer elektromagnetischen Welle. Natürliche Photonenstrahlung entsteht in Form von γ -Strahlung bei dem Zerfall radioaktiver Atomkerne, wohingegen künstliche Photonenstrahlung (Röntgenstrahlung) mithilfe einer Röntgenröhre erzeugt werden kann.

In einer Röntgenröhre stehen sich in einem Vakuum eine Glühkathode und eine Wolframanode gegenüber. Wird die Glühkathode bei Betrieb aufgeheizt entsteht eine Elektronenwolke, welche bei gleichzeitigem Anlegen einer hohen Spannung zwischen Kathode und Anode in Richtung Anode beschleunigt wird. Überschreitet bei dem Beschuss die Elektronenenergie die Bindungsenergie der Elektronen im Anodenmaterial, können Elektronen aus einer Atomschale entfernt werden (Sekundärelektronen). Um die Elektronenlücke in der Schale auszugleichen, wird diese durch ein Elektron aus einer höheren Schale oder durch ein freies Elektron aufgefüllt. Die bei dem Auffüllen der Schale auftretende Energiedifferenz wird in Form von Röntgenstrahlung (Photonenstrahlung) freigesetzt. Eine weitere Quelle von Röntgenstrahlung bei dem Betrieb einer Röntgenröhre stellt die sogenannte Bremsstrahlung dar. Diese entsteht, wenn ein beschleunigtes Elektron aufgrund

von Wechselwirkungen mit dem Anodenmaterial seine Geschwindigkeit ändert und der Energieverlust in Form eines Röntgenquants frei wird. Das hierfür benötigte Elektron kann direkt aus der Kathode oder aus einem vorangegangenen Ionisationsprozess im Anodenmaterial (Sekundärelektron) stammen.

2.2 Wechselwirkung von ionisierender Strahlung mit Materie

Bei der Wechselwirkung von γ - und Röntgenstrahlung mit Materie kann es zur Absorption oder zur Streuung der Photonen kommen. Dabei entstehende geladene Sekundärteilchen wie Elektronen oder Positronen können ebenfalls das umgebende Material ionisieren. Da die ionisierende Wirkung der Photonenstrahlung überwiegend auf die genannten Sekundärteilchen und weniger auf eine direkte Ionisierung durch Photonen zurückzuführen ist, spricht man bei Photonenstrahlung auch von einer indirekt ionisierenden Strahlungsart.

Die maßgeblich bei der Ionisierung von Materie beteiligten Wechselwirkungen sind der Compton- und der photoelektrische Effekt. Beim Compton-Effekt wechselwirkt ein Photon mit einem äußeren Hüllelektron des Absorbers. Dabei überträgt das Photon einen Teil seiner Energie auf das Elektron, was auch als elastischer Stoß bezeichnet wird. Das gestoßene Elektron verlässt die Atomhülle, wodurch diese einfach ionisiert wird (Krieger, 2007). Das frei gewordene Elektron (Sekundärelektron) kann durch Wechselwirkung mit anderen Molekülen des absorbierenden Materials ebenfalls Ionisationen hervorrufen bzw. zur Erzeugung von Bremsstrahlung führen. Das Photon selbst wird durch die Wechselwirkung gestreut. Es besitzt aufgrund des Energieverlusts eine größere Wellenlänge und ist bei ausreichender verbliebener Energie in der Lage, weitere Ionisationen zu bewirken.

Beim photoelektrischen Effekt (Photoeffekt) absorbiert ein Elektron einer inneren Schale die gesamte Energie eines Photons. Übersteigt die Energie des Photons die Elektronenbindungsenergie, wird das Elektron aus seiner Atomschale gestoßen und ionisiert somit den Elektronendonator. Das energiereiche Elektron kann bei weiteren Wechselwirkungen Bremsstrahlung auslösen oder andere Atome ionisieren. Das in der Atomhülle fehlende Elektron muss aus einer höheren Atomschale oder durch ein freies Elektron aufgefüllt werden. Bei dem Übergang in den energieärmeren Zustand wird die Energiedifferenz des Elektrons in Form eines Röntgenquants frei. Das emittierte Röntgenquant besitzt eine der Energie der Ursprungsschale entsprechende charakteristische Wellenlänge.

Ein weiterer Prozess, der bei der Ionisierung von Materie eine Rolle spielt, ist die Wechselwirkung von hochenergetischen Photonen (> 1 MeV) und dem elektrischen Feld der Atomkerne, der sogenannte Paarbildungseffekt. Hierbei wird ein Photon in ein Elektron und

ein Positron (Teilchen-Antiteilchen-Paar) verwandelt, welche Bremsstrahlung erzeugen oder andere Atome ionisieren können.

2.3 Direkte und indirekte Wechselwirkung von Strahlung mit DNA

Bei einer direkten Wechselwirkung von ionisierender Strahlung mit der DNA werden durch Ionisationen und Anregungen direkt Radikale in der DNA gebildet oder ihre Struktur z.B. durch das Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen verändert (Krieger, 2007). Schädigungen der DNA durch direkte Strahlenwirkungen sind aufgrund des relativ geringen Masseanteils vergleichsweise selten und machen nur einen geringen Anteil aus.

Der größte Anteil der durch ionisierende Strahlung verursachten DNA-Schäden wird auf indirektem Wege, also am Ende eines mehrstufigen Ionisationsprozesses, erzeugt. Aufgrund des hohen relativen Massenanteils der Wassermoleküle in der Zelle ist das Wasser der wichtigste Wechselwirkungspartner mit ionisierender Strahlung. Die Ionisation eines Wassermoleküls kann zur Radiolyse, d.h. dem Zerfall in Molekülbruchstücke mit radikalischem Charakter führen. Organischen Verbindungen werden durch die Wasserradikale meist Wasserstoffatome entzogen, was z.B. in der Auflösung von Wasserstoffbrückenbindungen in der DNA resultieren kann. Der im Zellplasma vorhandene freie Sauerstoff erhöht die Ausbeute an entstehenden Wasserradikalen zusätzlich und führt auch zur Bildung von Perhydroxyl- und Peroxidradikalen. Aufgrund der höheren Strahlenwirkung in Anwesenheit von freiem Sauerstoff spricht man auch von einem Sauerstoff-Verstärkungsfaktor (Krieger, 2007). Die Verstärkung lässt sich zwar auf ausreichend perfundiertes Gewebe, nicht jedoch auf die hypoxischen Bedingungen im Inneren eines Tumors übertragen. Dies gilt es z.B. bei der Planung einer Strahlentherapie zu beachten.

2.4 Erkennung des DNA-Doppelstrangbruchs

Von den spontan als auch den induziert auftretenden DNA-Schädigungen stellt der DSB die schwerwiegendste Beeinträchtigung der genomischen Integrität dar. Um deren Fortbestehen zu gewährleisten und einen Informationsverlust, Mutationen oder die Transformation einer Zelle zu verhindern, dirigiert die Zelle fein aufeinander abgestimmte Mechanismen. So kann durch das Einsetzen eines Zellzyklus-Arrests das Proliferieren geschädigter Zellen verhindert oder verlangsamt, die Reparatur entstandener Schäden eingeleitet oder als letzter Ausweg die Zelle in die Apoptose getrieben werden (Jeggo und Löbrich 2006). Allen drei Mechanismen

gemein ist die Notwendigkeit der schnellen Erkennung eines vorhandenen DSBs durch Sensoren und die effektive Transduktion des Schadenssignals zu den Effektororganen. Eine wichtige Rolle bei der frühen Erkennung des DSBs spielt der MRE11/Rad50/NBS1 (MRN)-Komplex. Dieser bindet an den DSB und rekrutiert die Proteinkinase *Ataxia telangiectasia mutated* (ATM). Daraufhin autophosphoryliert sich ATM und geht von dem inaktiven Dimer in den Zustand des aktiven Monomers (pATM) über. Das Monomer ist in der Lage, eine Variante des Histons 2A, das H2AX zu phosphorylieren und erzeugt somit γ H2AX (Rogakou 1999; Burma et al. 2001).

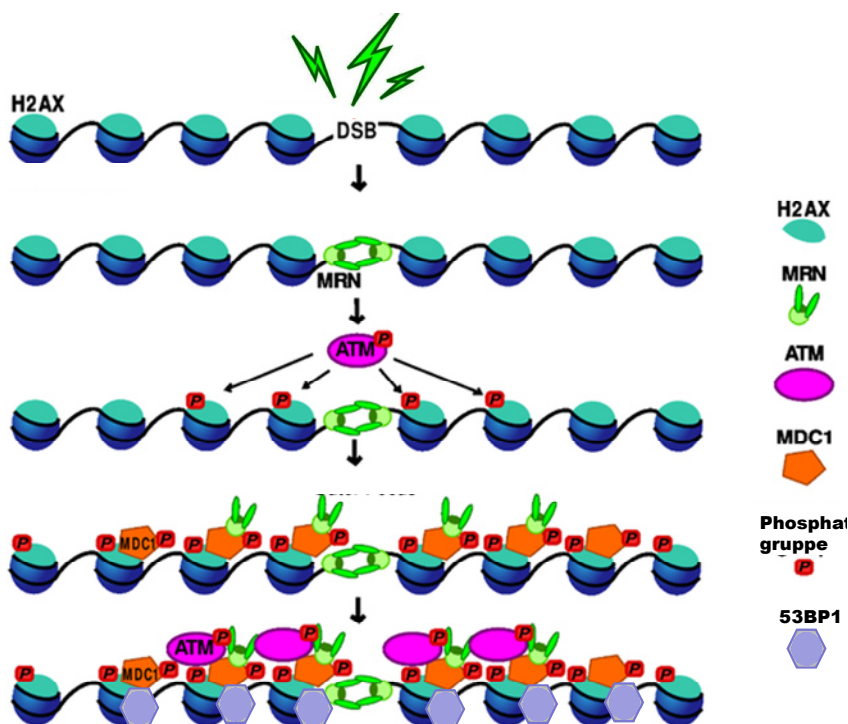


Abbildung 1: Erkennung eines DSBs und daran beteiligte Faktoren. MRN bindet am Bruch und aktiviert ATM. Dieses kann nun H2AX phosphorylieren. An γ H2AX bindet MDC1 welches weiteres MRN und ATM rekrutiert. MDC1 rekrutiert zudem Ubiquitin-Ligasen, welche γ H2AX ubiquitinieren. Ubiquitiniertes γ H2AX wird durch 53BP1 erkannt. (Abbildung verändert nach Tobias et al. 2013)

Der auch als γ H2AX-Sensor bezeichnete Faktor *Mediator of DNA damage checkpoint protein 1* (MDC1) bindet an das γ H2AX und rekrutiert weiteres MRN, woraufhin weiteres pATM bindet. Dies führt wiederum zur Phosphorylierung von benachbartem H2AX (Lukas et al. 2011). Die γ H2AX-Phosphorylierung und die damit einhergehende MRN-, MDC1- und pATM-Rekrutierung breitet sich somit über einen mehrere Megabasen erstreckenden Bereich aus. Die damit verbundene Rekrutierung weiterer Schadensmarker führt schnell zu einer Amplifikation des Schadenssignals, welche für die folgenden Prozesse wie DNA-Reparatur und Zellzykluskontrolle von entscheidender Bedeutung ist. MDC1 kann nun seinerseits die Ubiquitin-Ligasen RNF8 und RNF168 rekrutieren und führt hierdurch zur Ubiquitinierung von H2A/X. Diese Art der Modifikation wird sowohl von dem *p53 binding protein 1* (53BP1) als

auch durch das *Breast cancer susceptibility gene 1* (BRCA1) erkannt (Fradet-Turcotte et al. 2013). Beide Faktoren sind für die Wahl des Reparaturwegs von großer Bedeutung. Die Rekrutierung von Ubiquitin-Ligasen und die Phosphorylierung von Histonen führen zu einer Reihe weiterer, die Chromatinstruktur modifizierender Schritte, welche besonders für eine Reparatur in heterochromatischen Bereichen wichtig sind (Murray et al. 2012; Gospodinov und Herceg 2013; Jeggo und Downs 2014).

Ein Großteil der an der Erkennung des DSBs und bei der Amplifikation des Schadenssignals beteiligten Proteine tritt in so großen Mengen am Bruch auf, dass sie sich mit immunzytochemischen Methoden mikroskopisch in Form sogenannter strahleninduzierter Foci (IRIF) detektieren lassen. So ermöglicht z.B. die Detektion von γ H2AX oder 53BP1 auf Einzelzellebene eine quantitative Aussage, über die Anzahl der durch Strahlung induzierten DSBs sowie über deren Reparatur (Löbrich et al. 2010). Während für den Nachweis von DSBs mit z.B. elektrophoretischen Methoden sehr hohe Strahlungsdosen notwendig sind, ist die Detektion der Foci wesentlich sensitiver. Diese ermöglicht eine Reparaturmessung auf Einzelzellebene, da bereits einzelne DSBs nachgewiesen werden können. Dies ermöglicht es, Bestrahlungsexperimente auch mit relativ geringen, physiologischen bzw. medizinisch relevanten Dosen durchführen zu können. Die Abfolge der Rekrutierung und Derekrutierung oder der Modifikation verschiedener Reparatur-assoziiierter Proteine ermöglicht darüber hinaus eine Aussage über die zeitliche Organisation der Schadensantwort innerhalb eines strahleninduzierten Focus bzw. über die Wahl des DSB-Reparaturweges (Lukas et al. 2011).

2.5 DSB-Reparatur

In Eukaryoten existieren im Wesentlichen zwei DSB-Reparaturwege: Die Nicht-homologe Endverknüpfung (*Non-homologous end joining*; NHEJ) und die Homologe Rekombination (HR). Für beide Reparaturwege sind Unterwege beschrieben, deren genaue Mechanismen Gegenstand aktueller Forschung sind. Im Folgenden werden zunächst die Grundmechanismen beschrieben und daran anschließend wird auf das Zusammenspiel der Reparaturwege mit dem Zellzyklus bzw. der Checkpoint-Kontrolle eingegangen.

2.5.1 Die Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ)

Die Reparatur eines DSBs mittels NHEJ benötigt keine intakte homologe Sequenz als Vorlage und steht daher während des gesamten Zellzyklus zur Verfügung. Der Prozess des core-NHEJ (c-NHEJ) (siehe Abbildung 2) wird durch die hochaffine Bindung des Ku70/80-Heterodimers

über das Phosphatrückgrat der DNA-Enden initiiert und ist somit sequenzunspezifisch (Walker et al. 2001). Die Bindung des Heterodimers schützt die Enden vor einem nukleolytischen Abbau. Das Heterodimer rekrutiert die katalytische Untereinheit DNA-PKcs, um das aktive DNA-PK-Holoenzym zu bilden.

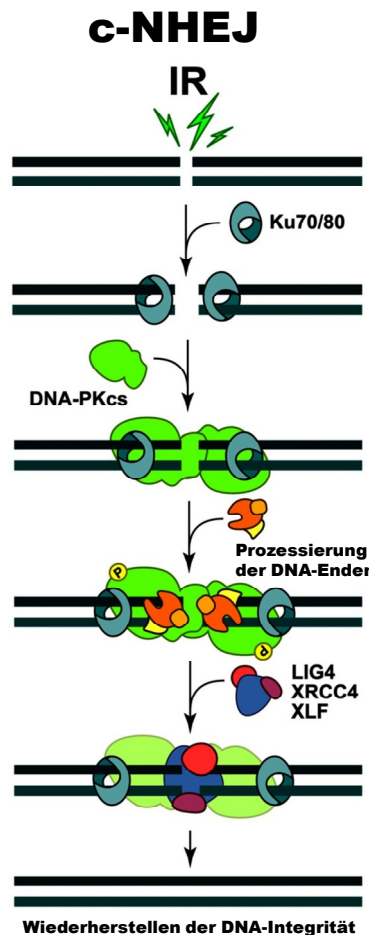


Abbildung 2: Reparatur eines DSBs mittels c-NHEJ. Nach Induktion des DSBs erkennt das Ku70/80-Heterodimer die Bruchenden, rekrutiert die katalytische Untereinheit DNA-PKcs und wird somit zum aktiven DNA-PK-Holoenzym. Nach einer limitierten Prozessierung der DNA-Enden können die Bruchenden unter Mithilfe der Faktoren XRCC4 und XLF von LIG4 ligiert werden. (Abbildung verändert nach Mladenov et al. 2013)

Der entstandene Enzymkomplex stabilisiert die Position der Bruchenden zueinander und führt zur Autophosphorylierung von DNA-PK. Die hierdurch bewirkte Konformationsänderung macht die DNA-Enden wieder zugänglich. Nun können Faktoren für eine begrenzte Prozessierung der DNA-Enden rekrutiert werden (Artemis, Pol μ und Pol λ). Die Prozessierung ist wichtig, da viele DSBs kein 5'-P oder 3'-OH-Ende besitzen, welche für eine angestrebte Ligation notwendig sind. Die Ligrationsreaktion wird durch den DNA-Ligase IV/*X-Ray Cross Complementing 4* (XRCC4)-Komplex mit Unterstützung des *XRCC4-like factor* (XLF) bewerkstelligt. Die Wiederherstellung der DNA-Integrität mittels c-NHEJ ist ein schneller, aufgrund des partiellen Informationsverlusts bei der End-Prozessierung jedoch ein mit Fehlern behafteter Prozess. Da die Ligrationsreaktion keine Homologie benötigt, können

freie DNA-Enden jedweder Herkunft miteinander verknüpft werden, was in seltenen Fällen auch zu Translokationen führen kann.

Das c-NHEJ findet bevorzugt innerhalb der ersten Stunden nach Schadensinduktion statt. Kann der Schaden z.B. bei einer Ku-Defizienz (c-NHEJ-Mutante) oder aufgrund einer höheren Komplexität des Schadens nicht durch c-NHEJ repariert werden, kann ein langsamerer Reparaturweg, das alternative NHEJ (alt-NHEJ) (siehe Abbildung 3), die Integrität der DNA wieder herstellen. Bei der Entscheidung, ob über alt-NHEJ repariert wird, hat der Faktor Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP)-1 eine fördernde, PARP-2 hingegen eine unterdrückende Funktion. PARP-1 bindet bevorzugt am Bruchende, wenn des Ku-Heterodimer fehlt. Für die Reparatur über den alternativen Weg scheinen Mikrohomologien von Vorteil zu sein, welche mithilfe einer CtIP- und MRE11-abhängigen Resektion zugänglich gemacht werden können (Mladenov et al. 2013). Neueste Studien zeigten, dass CtIP dabei von PLK3 aktiviert wird (Barton et al. 2014). Die Ligationsreaktion wird durch die Ligase 3 (LIG3) im Komplex mit XRCC1 oder durch Ligase 1 (LIG1) bewerkstelligt. Weiter wird die Helikase WRN mit dem alt-NHEJ assoziiert (Sallmyr et al. 2008).

In der G1-Phase stellt das alt-NHEJ vermutlich die letzte Instanz der DNA-Reparatur vor dem Eintritt in die S-Phase dar, mit dem Preis einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der Erzeugung von Translokationen (Barton et al. 2014).

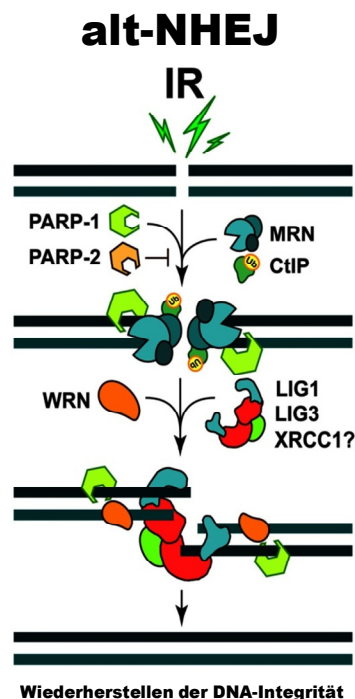


Abbildung 3: Reparatur eines DSBs mittels alt-NHEJ. Wird der Bruch nicht direkt durch c-NHEJ repariert, kann durch die PARP-1-Aktivität eine MRN- und CtIP-vermittelte Resektion eingeleitet werden. Für die Ligation der Bruchenden wird ein Komplex aus LIG1, LIG3 und vermutlich XRCC1 benötigt. (Abbildung verändert nach Mladenov et al. 2013)

2.5.2 Homologieabhängige DNA-Reparatur

Während das NHEJ weitestgehend unabhängig von einer Sequenzhomologie operieren kann, existieren weitere DNA-Reparaturwege, für deren Funktion das Vorhandensein von Homologien essentiell ist. Bei der HR sind interchromosomale Homologien für ein exaktes Wiederherstellen verlorener Information notwendig. Bei dem *Single strand annealing* (SSA) hingegen führen überwiegend intrachromosomale Homologien zur DSB-Reparatur mit einhergehendem Sequenzverlust und somit mutagenem Potential. Beide Mechanismen bedienen sich einer weitreichenden Resektion, um die benötigten homologen Sequenzen erschließen zu können.

2.5.2.1 Homologe Rekombination (HR)

Die HR setzt das Vorhandensein einer intakten homologen Kopiervorlage voraus. Das Prinzip beruht auf der Synthese der verlorenen Information des beschädigten Chromatids, wobei das intakte Schwesterchromatid als Matrize dient. Diese Grundvoraussetzung ist nur nach bereits erfolgter Replikation, also in der fortgeschrittenen S-Phase und in der G2-Phase gegeben. Zunächst erfolgt eine schnelle Erkennung des DSB durch den MRN-Komplex. Hierbei erzeugt die MRE11-Endonukleaseaktivität einen Einzelstrangbruch in dem 5'-Strang in der Nähe des DSBs. Anschließend erfolgt eine bidirektionale Resektion an der Inzisionsstelle mittels MRE11 (3'-5'-Resektion), Exo1/BLM und DNA2 (5'-3'-Resektion) (Shibata et al. 2014). Zudem startet CtIP unter Mithilfe von BRCA1 die Resektion vom 5'-Ende her (Cruz-García et al. 2014), wodurch schließlich eine bis zu 3,5 kb lange (Zhou et al. 2014) 3'-überhängende einzelsträngige DNA (ssDNA) entsteht und somit der DSB für die Reparatur mittels HR lizenziert wird. In der Folge wird der DNA-Einzelstrang durch den heterotrimeren Proteinkomplex *Replication Protein A* (RPA) vor der Degradation durch Nukleasen geschützt. RPA bindet mit hoher Affinität an ssDNA und erzeugt zudem eine Konformationsänderung, welche die DNA für das Schlüsselprotein der HR, Rad51, leichter zugänglich macht (McIlwraith et al. 2000). Anschließend wird RPA mithilfe von Mediatorproteinen wie dem *Breast cancer susceptibility gene 2* (BRCA2) und Rad51-Paralogen (Rad51B, Rad51C, Rad51D, XRCC2, XRCC3) durch die Rekombinase Rad51 ersetzt. Im Schlüsselschritt der HR invadiert das Rad51-Nukleoproteinfilament mithilfe von Rad54 in die intakte dsDNA des Schwesterchromatids und sucht nach der homologen Sequenz. Hierbei wird der komplementäre intakte Strang verdrängt, was zur Ausbildung eines *Displacement-Loop* (D-Loop) und einer sogenannten Holliday-Junction (HJ) führt.

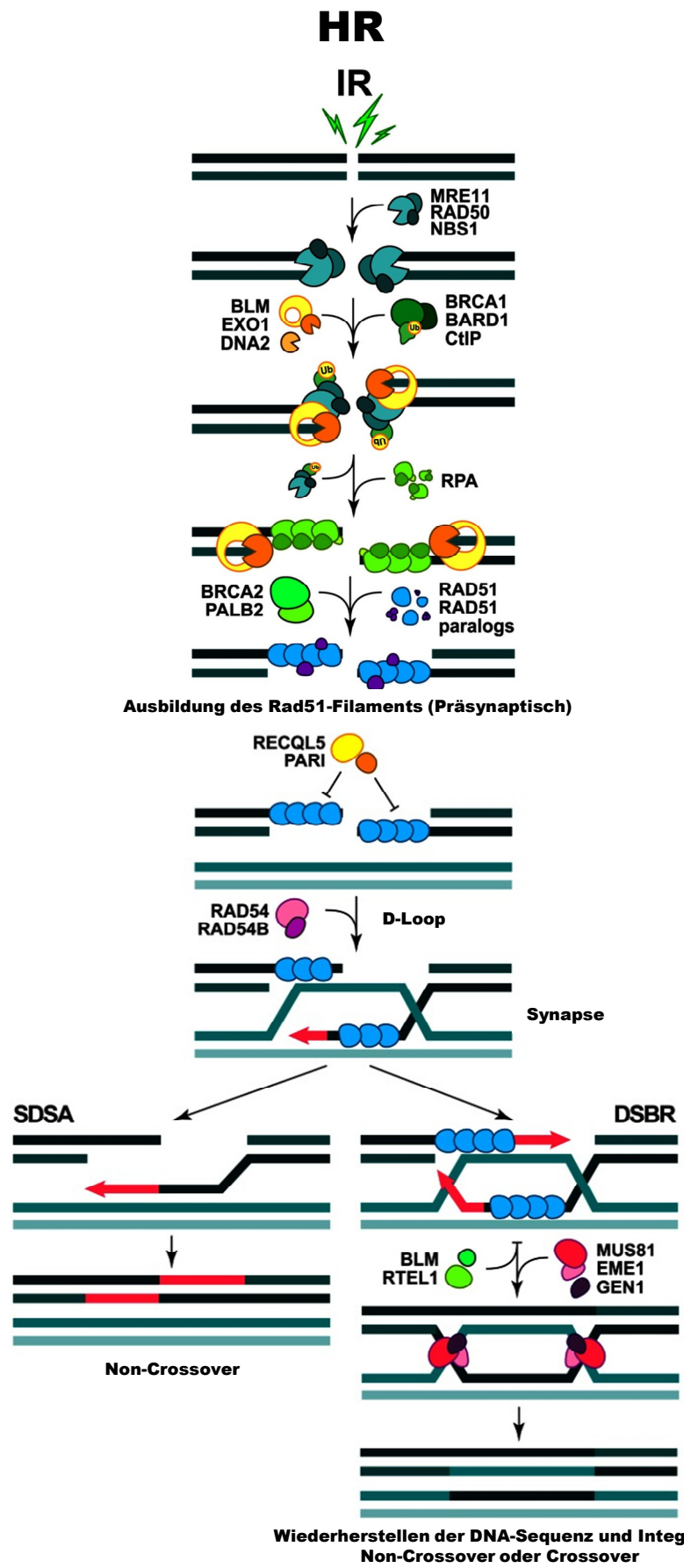


Abbildung 4: Reparatur eines DSBs mittels HR. Der Bruch wird durch den MRN-Komplex erkannt. Eine Vielzahl von Nukleasen bewerkstelligt die Resektion, welche die Bruchenden für die Beladung mit RPA und somit für die HR lizenziert. PALB2 rekrutiert BRCA2, welches zusammen mit Rad51-Paralogen die Rekombinase Rad51 an Stelle von RPA auf die einzelsträngige DNA lädt. Rad54 und Rad54B begünstigen das Invadieren des DNA-Proteinfilaments in das Schwesterchromatid. Nach der homologen Paarung wird Rad51 vom 3'-Ende entfernt und die Synthese beginnt. Die Reparatur kann nun den Weg des SDSA oder DSBR nehmen. Beim SDSA wird der neu synthetisierte Bereich mit dem zweiten Bruchende annealt und fehlende Bereiche aufgefüllt, mit dem Ergebnis eines Non-Crossover Produkts. Bei der DSBR bildet sich eine zweite HJ aus. Diese Struktur kann durch mehrere Mechanismen mit dem Ergebnis eines Crossover- oder Non-Crossover-Produkts aufgelöst werden. (Abbildung verändert nach Mladenov et al. 2013)

Wurde die Homologie gefunden (Synapse), muss Rad51 vom 3'-OH-Ende durch Rad54/Rad54B entfernt werden, damit der invadierte Strang durch DNA-Synthese verlängert werden kann. Rad54 hat eine ATP-abhängige Translokationsaktivität und kann so die HJ vor sich her treiben (*Branch Migration*). An diesem Punkt bestehen zwei verschiedene Möglichkeiten der Homologie-abhängigen Reparatur, deren genaue Regulation noch erforscht wird (siehe Abbildung 4).

Eine Möglichkeit der Reparatur infolge einer Rad51-Stranginvasion ist das *Synthesis-dependent strand annealing* (SDSA). Hierbei wird nach ausreichender Elongation (DNA-Synthese) des invadierten Strangs das Rad51-Filament und somit die Synapse von einer Anti-Rekombinase (z.B. RTEL1) aufgelöst (Barber et al. 2008). Beim SDSA kommt es anschließend zum Annealing mit dem zweiten resekierten DSB-Ende. Dies führt zur Bildung eines Non-Crossover-Produktes (Lok und Powell 2012).

Alternativ kann es nach der Branch-Migration zum Einfangen des zweiten resekierten DSB-Endes durch den D-Loop kommen (*Second-End-Capture*), und auch der zweite Strang kann durch Synthese verlängert werden. Für die hierbei ausgebildete Doppel-Holliday-Junction (dHJ) sind verschiedene Mechanismen beschrieben, welche eine Auflösung des HR-Intermediats ermöglichen. Abhängig davon, welche Nukleasen sich an dem Prozess der dHJ-Resolution beteiligen (Gen1, Mus81, SLX1-SLX4-Komplex), entstehen Crossover- oder Non-Crossover-Produkte (Wechsler et al. 2011).

Sowohl das SDSA als auch das als *Double strand break repair* (DSBR) bezeichnete Modell der HR gewährleisten durch eine äußerst exakte Wiederherstellung der DNA-Sequenz den Fortbestand der genomischen Integrität.

2.5.2.2 Single strand annealing (SSA)

Ein weiterer von Homologien abhängiger DNA-Reparaturweg ist das SSA. Wird ein DSB durch repetitive Sequenzen flankiert, welche in diesem Fall die Homologie darstellen, ist eine Reparatur mittels SSA möglich. Diese Art der Reparatur ist im Hefe-System gut beschrieben und konnte *in vitro* auch im humanen System gezeigt werden (Symington 2002). Da etwa 50 % des humanen Genoms aus repetitiven Sequenzen bestehen, ist eine *in vivo*-Rolle des SSA bei der humanen DNA-Reparatur wahrscheinlich, jedoch noch nicht final aufgeklärt. Grundvoraussetzung für den Reparaturweg ist eine weitreichende Resektion mittels CtIP und dem MRN-Komplex und der daraus resultierenden Beladung der ssDNA-Bereiche mit RPA. Somit können die den DSB umgebenden repetitiven Sequenzen zugänglich gemacht werden, und in Folge kommt es zum hRad52-vermittelten Annealing zwischen den repetitiven

Sequenzen. *In vitro* kann SSA auch an Stellen mit DNA-Repeats auftreten, welche durch heterologe Sequenzen von bis zu 170 bp getrennt vorliegen (van Dyck et al. 2001). Durch das Annealing der homologen, unter Umständen weiter vom Bruch entfernten Sequenzen, bleiben die heterologen 3'-überhängenden Enden als sogenannte Flap-Strukturen bestehen. Diese können vermutlich durch die Interaktion des Annealers hRad52, dem Endonukleasekomplex XPF/ERCC1 und weiterer durch den Komplex rekrutierter strukturspezifischer Endonukleasen entfernt werden (Motycka et al. 2004; Al-Minawi et al. 2008). Somit geht der ursprünglich zwischen den repetitiven Sequenzen gelegene Teil verloren. Aufgrund des Verlusts genomischer Information ist dieser Reparaturweg potentiell mutagen und prägt daher auch den Begriff der nicht-konservativen HR.

Während BRCA1 vermutlich in Kombination mit CtIP sowohl HR als auch SSA begünstigt, wirkt BRCA2 in seiner Funktion als Rad51-Loader hemmend auf das SSA (Stark et al. 2004). Es wird vermutet, dass die hohe chromosomale Instabilität in BRCA2-defizienten Zellen unter anderem auf der Erhöhung fehleranfälliger Reparaturwege wie dem SSA beruht (Larminat et al. 2002). Weiter haben sowohl eine Rad51- als auch eine Rad54-Defizienz eine Erhöhung des SSA zur Folge (Bennardo et al. 2008; Dronkert, M. L. G. et al. 2000). SSA ist somit nicht von einer Stranginvasion bzw. einer Rad51-Filamentbildung für die Homologiesuche abhängig und schließt somit nachfolgende Ereignisse wie z.B. HJ-Auflösung aus. (Symington 2002).

Auch wenn gewisse mechanistische Ähnlichkeiten zum alt-NHEJ bestehen, so ist das SSA aufgrund der Größe der benötigten resektierten Bereiche und Homologien verschieden. Während das alt-NHEJ mit Mikrohomologien von wenigen Basen auskommt, benötigt das SSA eine weitreichendere Resektion, um den nötigen Grad an Homologie zu erreichen. Um das SSA einzuleiten, sind ERCC1 und hRad52 wichtige Faktoren, für alt-NHEJ und HR sind diese jedoch nicht notwendig (Stark et al. 2004).

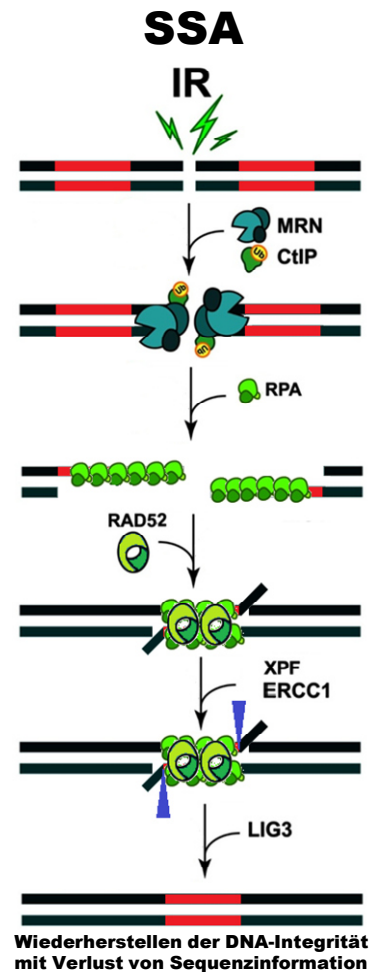


Abbildung 5: Reparatur eines DSB mittels SSA. Die Bruchstelle wird von zwei repetitiven, zueinander homologen Sequenzen flankiert. Nach der Erkennung des DSB folgt die Resektion vom 5'-Ende her. Hierdurch werden die homologen Bereiche freigelegt. Die einzelsträngige DNA wird durch Beladung mit RPA vor dem nukleolytischen Abbau geschützt. Rad52 begünstigt das Annealing der komplementären Sequenzen. Die heterologen Bereiche am jeweiligen 3'-Ende bilden Flap-Strukturen aus. Diese werden durch den Endonukleasenkomplex aus XPF und ERCC1 prozessiert. Die Ligation der Einzelstränge erfolgt vermutlich durch die DNA-Ligase3. (Abbildung frei verändert nach Mladenov et al. 2013)

2.6 Auswirkungen von DNA-Doppelstrangbrüchen auf die Zellzykluskontrolle

Die wichtigste Funktion der Zellzykluskontrolle ist die Gewährleistung einer exakten und vollständigen Genomduplikation und die gleichmäßige Verteilung der genetischen Information auf die Tochterzellen (Lukas et al. 2004). Der Zellzyklus ist in G1-, S-, G2-Phase (werden auch als Interphase bezeichnet) und in die Mitose eingeteilt. Eine G1-Phase-Zelle besitzt den einfachen diploiden Chromosomensatz und kann die Entscheidung treffen, ob sie aktiv in den Zellzyklus eintritt (Proliferation) oder in diesem Zustand für längere Zeit verharrt (Quieszenz). Nicht-proliferierende Zellen werden auch als G0-Phase-Zellen bezeichnet und machen den größten Anteil der Zellen im menschlichen Körper aus. In der G1-Phase wird eine bevorstehende Proliferation vorbereitet. Sind alle benötigten Faktoren vorhanden, tritt die Zelle in die S-Phase ein und beginnt mit der DNA-Replikation. Nach erfolgter Verdoppelung des Chromosomensatzes werden in der G2-Phase die Voraussetzungen für eine Zellteilung geschaffen. Die Mitose selbst wird in weitere Phasen unterteilt. Zu Beginn kondensiert das Chromatin (Prophase) und die Kernhülle löst sich auf (Prometaphase). Die Chromosomen

werden mithilfe der Mikrotubuli des Spindelapparats entlang der Äquatorialebene angeordnet (Metaphase). Anschließend werden die Schwesterchromatiden segregiert und in Richtung der zwei Zellpole transportiert (Anaphase). Die Ausbildung einer neuen Kernhülle um das Chromatin (Telophase) beendet die Kernteilung, und schließlich teilt sich die Zelle in zwei genetisch identische Tochterzellen (Cytokinese).

Das Voranschreiten der Zelle im Zellzyklus wird durch zwei Klassen miteinander interagierender Proteine, die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) und die Cycline gewährleistet. Die Cycline tragen ihren Namen aufgrund ihrer zellzyklusphasenabhängigen Expression und somit zyklierenden Konzentration in der Zelle. Erreicht eines der vier Cycline (A, B, D, E) seine maximale Konzentration ist somit auch die interagierende Kinase (CDK) maximal aktiv. Die aktiven Kinasen gewährleisten das Voranschreiten im Zellzyklus durch Phosphorylierung von Proteinen, welche für nachfolgende Schritte benötigt werden

Kann ein ungestörtes Durchlaufen des Zellzyklus nicht gewährleistet werden, etwa durch das Auftreten von DSBs, reagiert die Zelle darauf, indem sie die Proliferation mithilfe sogenannter *Checkpoints* verhindert oder verlangsamt (siehe Abbildung 6). Dabei kommt es zur Aktivierung von Signalkaskaden, welche die Aktivität der Cyclin/CDK-Komplexe hemmen. Über die Regulation der Aktivität von CDKs ist die Zelle in der Lage drei spezifische Kontrollpunkte (Checkpoints) zu steuern. Die Checkpoints treten am Übergang von der G1-zur S-Phase (vor der Replikation), in der S-Phase, und am Übergang von der G2-Phase zur Mitose (postreplikativ) auf. Sie werden dementsprechend als G1/S-, Intra-S- und G2/M-Checkpoint bezeichnet.

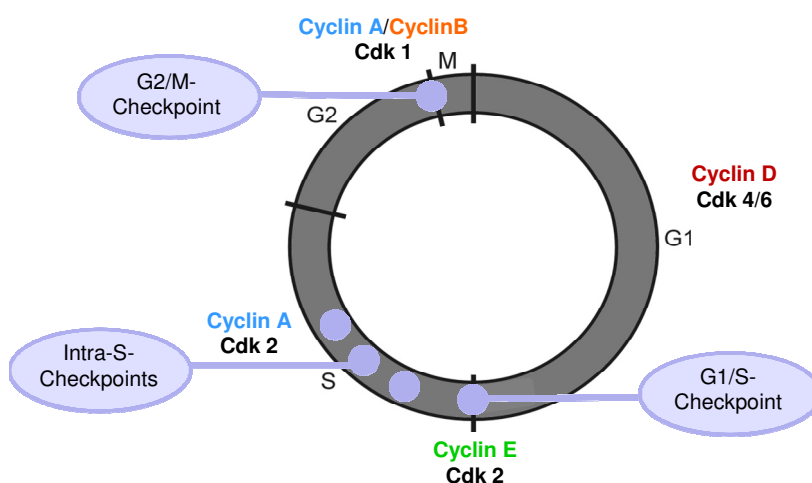


Abbildung 6: Checkpoint-vermittelte Zellzyklus-kontrolle. Die zyklische Expression und Degradation der Cycline im Verlauf des Zellzyklus steuert die Aktivität der assoziierten CDKs und somit die Progression im Zellzyklus. Die Induktion von DSBs führt zur Aktivierung der Checkpoints. (Abbildung verändert nach Rothkamm et al. 2003)

2.6.1 Der G1/S- und Intra-S-Checkpoint

Der G1/S-Checkpoint reguliert den Eintritt einer Zelle in die Synthese-Phase (S-Phase) und wird über zwei Mechanismen gesteuert. Zum einen wird in der G1-Phase in Folge einer DSB-Induktion (siehe Punkt 2.4) die Transduktionskinase CHK2 durch ATM aktiviert. CHK2 inaktiviert daraufhin die Phosphatase CDC25A und die aktivierende Dephosphorylierung von CDK2 bleibt aus. Hierdurch ist CDK2 inaktiviert, der G1/S-Checkpoint setzt ein und verzögert das Eintreten in die S-Phase (Deckbar et al. 2010). Dieser Prozess wird rein posttranslational reguliert und führt zu einer schnellen Aktivierung der Signalkaskade. Die zweite Möglichkeit besteht in der Aktivierung des Tumorsuppressors p53 durch ATM und CHK2. Das aktive p53 ist ein aktivierender Transkriptionsfaktor für die Expression des CDK-Inhibitors p21. Die Inhibition von CDK2 durch p21 ist ein Prozess, welcher aufgrund der transkriptionellen Regulation erst nach einigen Stunden den Eintritt in die S-Phase verhindert. Die posttranslationale, wie auch die transkriptionelle Regulation können jedoch nicht das Eintreten von in der späten G1-Phase geschädigter Zellen in die S-Phase verhindern. Dies führt dazu, dass das Einsetzen des G1-Checkpoints erst später zu beobachten ist. Zu späteren Zeiten nach IR führt das Zusammenspiel der beiden Mechanismen, p53-unabhängig bzw. p53-abhängig, zu einem lang anhaltenden und unempfindlichen G1/S-Arrest (Deckbar et al. 2010).

Die Signalkaskaden nach Bestrahlung in der S-Phase sind ähnlich denen in der G1-Phase. Der Unterschied besteht darin, dass es bei Auftreten von DSBs nicht wie in der G1-Phase zu einem Arrest kommt, sondern lediglich zu einer Verlangsamung des Zellzyklus durch das Anhalten bestehender Replikationsgabeln oder dem Verhindern der Induktion neuer Replikationsgabeln. An die, an den blockierten Replikationsgabeln persistierenden, RPA beladenen ssDNA-Bereiche wird ein Komplex aus *Ataxia telangiectasia and Rad3 related* (ATR) und dem *ATR interacting protein* (ATRIP) rekrutiert. Dabei kommt es zur Autophosphorylierung von ATR, welches anschließend CHK1 phosphoryliert. Aktiviertes CHK1 kann nun CDC25A inaktivierend phosphorylieren, wodurch CDK2 inaktiv bleibt (Löbrich und Jeggo 2007). Tritt durch Bestrahlung ein DSB unabhängig von einer Replikationsgabel auf, wird die schnelle, p53-unabhängige Kaskade analog zur G1-Phase aktiviert. Findet an diesem DSB Resektion statt, aktivieren die entstehenden, RPA-beladenen ssDNA-Bereiche wiederum ATR. Die Inhibition von CDK2 in der S-Phase verhindert das Beladen des Replikations-Initiationsfaktors CDC45 auf das Chromatin und inhibiert somit die Aktivierung weiterer Replikationsursprünge (Bartek et al. 2004). Da durch einen intra-S-Checkpoint der Zellzyklus nicht vollständig

angehalten wird, treten Zellen mit verbliebenen DNA-Schäden in die G2-Phase ein und aktivieren den G2/M-Checkpoint.

2.6.2 Der G2/M- und der Mitose-Checkpoint

Der G2/M-Checkpoint verhindert, dass Zellen mit einem erhöhten Level an DSBs in die Mitose eintreten können. Die Steuerung des Eintritts einer Zelle in die Mitose erfolgt über den *Mitosis/maturation promoting factor* (MPF). Dieser besteht aus Cyclin B und CDK1 und muss zu Beginn der Mitose durch die Phosphatase CDC25C aktivierend dephosphoryliert werden. In der G2-Phase können die Kinasen ATM und ATR durch zwei verschiedene Substrate aktiviert werden. Zum einen wird ATM direkt durch einen DSB aktiviert, zum anderen können resektierte und somit einzelsträngige DNA-Bereiche ATR aktivieren. In der Folge werden die Checkpoint-Kinasen CHK1/CHK2 durch Phosphorylierung aktiviert. Diese bewirken durch die Phosphorylierung der CDC25C-Phosphatase deren Bindung an den 14-3-3-Komplex und damit deren Export aus dem Zellkern. Somit bleibt die aktivierende Dephosphorylierung des MPF aus (Kumagai et al. 1998). Inaktives CDK1 führt zu einem, im Vergleich zum G1/S-Checkpoint, schnellen Einsetzen des G2/M-Checkpoints und dem Verhindern des Eintritts in die Mitose (Bartek und Lukas 2003, 2007). Jedoch ist der G2/M-Checkpoint weniger sensitiv, so dass Zellen mit 10-15 DSBs bereits wieder in die Mitose eintreten (Deckbar et al. 2011). Somit ist der G2/M-Checkpoint nicht in der Lage, der Entstehung von chromosomalen Brüchen in der Mitose vollständig entgegen zu wirken, stellt jedoch mehr Zeit für eine Reparatur in der G2-Phase zur Verfügung.

Ein weiterer Mechanismus zur Verhinderung der Entstehung genomischer Instabilität ist der Metaphase-Checkpoint, auch bezeichnet als Spindel-Assemblierungs-Checkpoint (SAC). Dieser reguliert die Progression von der Metaphase zur Anaphase, um eine exakte Chromosomensegregation sicherzustellen. Falsch oder nicht über die Kinetochore am Spindelapparat befestigte Chromatiden aktivieren den SAC und verhindern so die Segregation. In mitotischen Zellen kann ATM die Zentrosomen-abhängige Spindelausbildung vermutlich über den SAC verhindern und so einen mitotischen Arrest induzieren (Eliezer et al. 2014). ATM, γ H2AX und MDC1 sind Teil des mitotischen Kinetochors und regulieren dort die richtige Positionierung der *Mitotic checkpoint complex* (MCC)-Untereinheiten Mad2 und CDC20 und somit die Integrität des MCC. Mit dem Einsetzen des SAC bindet der MCC an CDC20 und verhindert die Aktivierung des *Anaphase promoting complex* (APC) und somit den Eintritt in die Anaphase. Trotz der Beteiligung wichtiger Komponenten der DNA-Schadensantwort am SAC, ist eine DSB-abhängige Induktion des SAC nicht nachgewiesen.

2.6.3 Das Zusammenspiel von DNA-Reparatur in G2 und dem G2/M-Checkpoint

Nach der Induktion von DSBs durch IR ist das NHEJ der Hauptreparaturweg während aller Zellzyklusphasen (Beucher et al. 2009). Die HR ist dagegen aufgrund der Notwendigkeit einer Kopiervorlage in Form des vorhandenen Schwesterchromatids auf die späte S- und G2-Phase beschränkt. Die Reparatur von DSBs in der G2-Phase weist eine biphasische Kinetik auf, welche die beiden beteiligten Reparaturwege repräsentiert. Innerhalb der ersten Stunden nach Bestrahlung werden etwa 80 % der DSBs durch NHEJ repariert, was der schnellen Komponente entspricht. Die HR hingegen ist ein komplexer, daher langwieriger Prozess und entspricht somit der langsamen Komponente. Die Faktoren, welche die Wahl des Reparaturweges beeinflussen, wurden in den letzten Jahren immer besser untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass Brüche, die z.B. aufgrund ihrer Komplexität oder ihrer Lokalisation in schwer zugänglichen Chromatinbereichen lange unrepariert verbleiben, präferentiell über die HR repariert werden, während einfache und leicht zugängliche Brüche eher über das NHEJ repariert werden (Murray et al. 2012).

Man geht davon aus, dass das Ku-Heterodimer zunächst an allen DSB-Enden bindet und dieses, sofern keine Ligation stattfindet, vermutlich durch den MRN-Komplex wieder entfernt werden kann (Symington und Gautier 2011). Die Nukleasefunktion von MRN initiiert zusammen mit CtIP die Resektion, welche durch Exo1/BLM und DNA2 fortgeführt werden kann (Symington und Gautier 2011). Somit wird die DNA-Reparatur mittels Resektion in Richtung HR gelenkt (Shibata et al. 2014). Die für die Resektion und der davon abhängigen Homologiesuche benötigte Zeit wird dabei durch den G2/M-Checkpoint zur Verfügung gestellt (Löbrich und Jeggo 2007).

Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Dauer des Checkpoints abhängig von der Dosis und somit von der Menge der induzierten DSBs ist, aufgrund der Kommunikation zwischen der DSB-Reparatur und der Zellzykluskontrolle (Deckbar et al. 2007; Krempler et al. 2007). Interessanterweise findet eine Aufhebung des G2/M-Checkpoints bereits bei einem verbliebenen Level von 10-15 DSBs statt, mit welchen die geschädigten Zellen in die Mitose eintreten. Die Frage nach der Ursache für das verfrühte Aufheben des Checkpoints ist dabei noch nicht vollständig geklärt. Es wurde beobachtet, dass Zellen welche zu späten Zeiten nach Bestrahlung verbliebene DSBs besitzen, diese überwiegend über den Weg der HR reparieren (Beucher et al. 2009). Dies führte zu Spekulationen, dass möglicherweise zu späten Zeiten vorhandene HR-Reparaturintermediate, welche resektierte DNA-Bereiche darstellen und somit Bestandteil der ATR-Signalkaskade sind, kein ausreichendes Signal für eine Aufrechterhaltung des G2/M-Checkpoints bereitstellen. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass es sich bei

der verfrühten G2/M-Transition um einen aktiven Prozess handelt, bei dem die Zelle bewusst mit Reparaturintermediaten in die Mitose eintritt

Es gibt Hinweise darauf, dass bei einem bevorstehenden Eintritt in die Mitose die DNA-Reparatursignalkaskade *upstream* der bereits beschriebenen RNF8-Rekrutierung (siehe Punkt 2.4) unterbrochen wird. Dieser Prozess wird bereits in der G2-Phase initiiert (Nelson et al. 2009) und inhibiert durch die in der G2-Phase und Mitose aktiven Kinasen CDK1 und Plk1 die Rekrutierung von RNF8 und 53BP1 an das DSB-flankierende Chromatin (Orthwein et al. 2014). Die CDK1-abhängige Phosphorylierung von RNF8 verhindert die Interaktion zwischen RNF8 und MDC1. Auch wenn γ H2AX und MDC1 noch beim Eintritt in die Mitose am Schadensort nachweisbar sind, findet vermutlich keine Signalverstärkung mehr statt. Die Folge sind in die Mitose eintretende DSBs, welche wahrscheinlich HR-Intermediate darstellen. Diese können in der Mitose zur Entstehung von chromosomalen Brüchen führen. Es ist unklar, was mit diesen Reparaturintermediaten in der Mitose passiert. Dabei sind mitotische Zellen gegenüber DSBs sehr empfindlich, weil sie die DNA-Reparatur aktiv inhibieren. Da Telomere einendige DSBs darstellen, besteht bei einer mitotischen DNA-Reparatur die Gefahr der Entstehung von Telomerefusionen und somit einer Genom-Destabilisierung. Es muss also dafür Sorge getragen werden, dass keine aktiven Reparaturprozesse in die Mitose eintreten bzw. in der Mitose aktiviert werden (Orthwein et al. 2014).

2.6.4 Die Beteiligung von Rad52 an der DNA-Reparatur

Ein großer Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit dem bereits im Zusammenhang mit dem SSA erwähnten Faktor Rad52. Im Folgenden wird auf den Aufbau und die Funktionen des Faktors genauer eingegangen.

Aufgrund besonders hoher Homologien im N-Terminus in *Saccharomyces cerevisiae* (scRad52), Maus und Mensch (hRad52) wurde zunächst von einer hochkonservierten Funktion von Rad52 in diesen Organismen ausgegangen (Shen et al. 1995). Das hRad52 besitzt wie auch das scRad52 vier funktionelle Domänen für DNA-Bindung, Selbstassoziiierung, RPA-Interaktion und Rad51-Interaktion. Beide Rad52-Homologe bilden oligomere Ringe überwiegend in Form eines Heptamers aus (Shinohara et al. 1998; van Dyck et al. 1998; Stasiak et al. 2000). *Saccharomyces cerevisiae* besitzt im Gegensatz zum humanen System kein BRCA2. Stattdessen übernimmt scRad52 die Rad51-vermittelte Rekombination und ist in Hefen der hierfür essentielle HR-Faktor (Shinohara und Ogawa 1998). Im humanen System konnte eine hRad52-Abhängigkeit der Rad51-Rekrutierung lediglich *in vitro* gezeigt werden (Sugiyama et al. 2006). *In vitro* können RPA und hRad52 zudem die Stranginvasion des

Rad51-Filaments stimulieren (McIlwraith et al. 2000). Vermutlich hat hRad52 jedoch im humanen System aufgrund des Vorhandenseins von BRCA2 seine Rolle bei der Rad51-Beladung verloren. So konnte *in vivo* gezeigt werden, dass Rad51-Foci bereits nach 2-4 h, hRad52-Foci hingegen erst 4-6 h nach Bestrahlung ihr Maximum erreichen und dass sich Rad51-Foci selbst in Rad52-defizienten Zellen normal ausbilden können (Wray et al. 2008). Dies schließt eine essentielle Funktion von hRad52 bei präsynaptischen Vorgängen aus.

Die starke Kolo-kalisation von Rad51 und hRad52 nach der Gabe von Hydroxyurea (S-Phase schädigendes Agens) lässt eine Funktion von hRad52 eher in einem HR-vermittelten Replikationsgabelneustart, wie es auch im Hefesystem existiert, vermuten (Wray et al. 2008). Alternativ könnte hRad52 auch an der Reparatur komplexer DNA-Schäden beteiligt sein, welche nicht über den ursprünglichen Rad51-abhängigen Prozess repariert werden können (Wray et al. 2008). Auch wenn in Primatenzellen hRad52 eine HR-stimulierende Funktion besitzt (Park et al. 1996) ist die *in vivo*-Funktion in humanen G2-Zellen hingegen nicht gesichert.

Eine weitere Funktion wird dem hRad52 beim *Second-End-Capture* zugeschrieben, dem Prozess bei dem nach fortgeschrittener *Branch Migration* der D-Loop die homologe Sequenz des zweiten resektierten DNA-Endes präsentiert und somit das Annealing ermöglicht (siehe Punkt 2.5.2.1). An diesem Vorgang ist vermutlich hRad52 als Annealer beteiligt. In Bakterien konnte gezeigt werden, dass RecQ und SSB, die funktionellen Homologe von hRad52 und RPA, diese konservierte Reaktion bewerkstelligen können (Sugiyama et al. 2006). Darüber hinaus zeigten *in vitro*-Versuche, dass eine Interaktion zwischen hRad52 und RPA für eine *Second-End-Capture*-Reaktion notwendig ist, um somit ein Template für die DNA-Synthese durch DNA-Polymerase η erzeugen zu können (McIlwraith und West 2008). Auch wenn *in vitro*-Ansätze Hinweise auf eine konservierte Funktion von hRad52 im *Second-End-Capture* liefern, ist die Beteiligung *in vivo* weiterhin unklar.

Bis zum heutigen Tag stammen die meisten übereinstimmenden Daten zu hRad52 aus *in vitro* Experimenten, Bedingungen unter denen nur die Interaktion und Funktion einer geringen Anzahl an Faktoren unter künstlichen Bedingungen untersucht werden können. Die Anzahl der *in vivo*-Experimente im humanen System ist hingegen recht überschaubar und die Ergebnisse sind zum Teil widersprüchlich zu den Ergebnissen aus *in vitro*-Ansätzen.

Rad52-Knockout-Mäuse zeigen keine auffälligen Abnormalitäten, die Lebensfähigkeit ist nicht beeinträchtigt und die Tiere sind fertil (Rijkers et al. 1998). Im humanen System sind keine natürlichen hRad52-Defizienzen bekannt, jedoch sind hRad52-*Non-sense*-Mutationen beschrieben, welche mit keinem auffälligen Phänotyp in Verbindung stehen (Bell et al. 1999).

Auch wenn es in Folge von genotoxischem und Replikationsstress zu einer Umverteilung des hRad52 im Kern kommt ist es überraschend, dass eine Rad52-Defizienz kaum zu Auswirkungen auf die HR-Frequenz und auf die Sensitivität gegenüber genotoxischen Agenzien führt (Shen und Huhn 2013). Aufgrund der Redundanz von Rad52 mit BRCA2 in höheren Eukaryoten, zeigen Rad52-Knockout-Zellen von Wirbeltieren nur einen milden Phänotyp nach Bestrahlung, ohne größere Beeinträchtigungen der HR (Stark et al. 2004; Cramer-Morales et al. 2013).

2.7 Fragestellung

Das gut koordinierte Zusammenspiel von DNA-Reparatur und Zellzykluskontrolle ist wichtig für die Erhaltung der genomischen Integrität. Die zellzyklusspezifische Untersuchung der DSB-Reparatur auf Einzelzellebene brachte hierbei neue Erkenntnisse zur Regulation dieser Mechanismen im humanen System. So konnte in vorangegangenen Arbeiten in fixierten Zellen (Dissertation Dorothee Deckbar, 2007), als auch mithilfe der Lebendzellmikroskopie (Dissertation Eik Schumann, 2011) gezeigt werden, dass bestrahlte Zellen trotz profizienter G2/M-Checkpoint-Induktion mit unreparierten Brüchen in die Mitose eintreten. Zudem zeigte sich bei der zellzyklusspezifischen Analyse der DNA-Reparatur in fixierten Zellen, dass die schnelle Reparaturkomponente (NHEJ) beim Eintritt in die Mitose weitestgehend abgeschlossen ist und die noch vorhandenen Brüche über die langsame Komponente der HR repariert werden (Beucher et al. 2009; Deckbar et al. 2011). Dies deutete darauf hin, dass der verbliebene Schaden, welcher nach Aufhebung des G2/M-Checkpoints in die Mitose überführt wird, vermutlich HR-Reparatur-Intermediate darstellt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die genauere Charakterisierung des Zusammenspiels von der DNA-Reparatur und der G2/M-Checkpointkontrolle in lebenden Zellen. Der Schwerpunkt der Betrachtung sollte dabei auf den Vorgängen in der späten G2-Phase und dem Übergang in die Mitose liegen.

Eine Aufgabe bestand in der Herstellung von Zelllinien, welche verschiedene Fluorochromgekoppelte DNA-Reparaturfaktoren exprimieren. Da in früheren Arbeiten bereits Studien mit allgemeinen DSB-Markern durchgeführt wurden, sollten nun spezielle Marker für die HR etabliert werden.

Im Anschluss sollte anhand dieser Zelllinien sowie mittels Lebendzellmikroskopie und der Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht werden, mit welchen Kinetiken verschiedene an der HR beteiligten Proteine nach Bestrahlung in der G2-Phase an die induzierten Brüche rekrutiert werden und ob diese Faktoren auch in der Mitose nachweisbar sind. Diese Untersuchungen sollten Aufschluss über die HR-Vorgänge in der späten G2-Phase und über die Beschaffenheit der in die Mitose transferierten Schadensstrukturen geben.

Im Laufe der Arbeit entstand eine weitere Aufgabenstellung durch den Einsatz des Faktors Rad52 als HR-Marker. Da über dessen Funktion in der humanen HR weniger bekannt ist, sollte dieser Faktor genauer charakterisiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Steril durchzuführende Arbeiten wurden in dafür vorgesehenen Sterilbänken des Typs Hera Safe (Thermo Scientific) angefertigt. Mikrobiologische und molekulargenetische Arbeiten wurden strikt getrennt von den Arbeiten mit humanen Zellen an verschiedenen Sterilbänken durchgeführt. Alle Arbeitsflächen und unter den Sterilbänken verwendete Materialien wurden mit 70 % Ethanol desinfiziert. Glaswaren und Impfösen wurden vor Verwendung abgeflammt bzw. ausgeglüht. Wiederverwendbare Glaswaren wurden vor Gebrauch autoklaviert. Verbrauchsmaterialien wurden steril erworben oder vor der Verwendung autoklaviert. Herzustellende Flüssigmedien wurden autoklaviert, temperatursensible Reagenzien hingegen wie z.B. Antibiotika wurden zunächst gelöst und mit 0,22 μm Spritzenfiltern sterilfiltriert.

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Anbieter
Kryoröhrchen	VWR
Deckgläser (rund Durchmesser 9 mm)	Roth
Halbmikro-Küvetten (Kunststoff)	Brandt
Immersionsöl	Zeiss
Latexhandschuhe Micro-Touch	VWR
Mikroliter-Pipettenspitzen	Sarstedt
Mounting Medium Vectashield	Vectorlabs
Nagellack	Lacura
Objektträger Superfrost	Roth
Papiertücher KimWipes	NeoLab
Parafilm	Roth
Pasteurpipetten (Glas)	Roth
Pasteurpipetten (Kunststoff)	Roth
PVDF-Membran	Roth
Reaktionsgefäße 1,5 ml; 2 ml	Roth
Sterilfilter Rotilabo 0,22 μm	Roth
Wägebapier	Roth
Wägeschalen	Roth
Zellkulturflaschen 25 cm ² /75 cm ²	Biochrom
Zellkulturschalen 100x20 mm	Biochrom
Zellkulturschalen 35x10 mm/90x15 mm	VWR
Zellschaber	Biochrom
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Sarstedt

Tabelle 2: Chemikalien

Bezeichnung	Anbieter
10xPBS	Biochrom
Acrylamid 30 %	Roth
Agar-Agar	Roth
Agarose	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Ampicillin Natriumsalz	Roth
Bradford-Reagenz	Roth
BSA	AppliChem
CaCl ₂ *2H ₂ O	Roth
DAPI (1mg/ml in 1xPBS)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
DNase	Roche
EDTA	Roth
EdU, 10 mM	Invitrogen
Ethanol, vergällt	Roth
<i>Fetal calf serum</i> (FCS)	Biochrom
Formaldehyd (>37% säurefrei)	Roth
Glycerin	Roth
Hefeextrakt	Roth
Hydroxyurea	Sigma
Isopropanol	Roth
Kaliumacetat	Roth
Kanamycin A Monosulfat	Roth
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Roche
Magermilchpulver	Reformhaus
Methanol	Roth
MgCl ₂ *6H ₂ O	Roth
MgSO ₄ *7H ₂ O	Roth
MnCl ₂ *4H ₂ O	Roth
MOPS	Sigma
Na-Desoxycholat	Roth
Natriumazid	Roth
Natriumchlorid	Roth
<i>Non-essential amino acids</i> (NEAA)	Biochrom
Penicillin-Streptomycin	Biochrom
Propidiumiodid	Roth
Rad51 Inhibitor B02	Calbiochem
RbCl	Roth
Salzsäure, HCL	Roth
SDS	Roth
Tris	Roth
Triton X-100	Roth
Trypsin	Biochrom
Tween®20	Roth
Western Bright Chemilumineszenz Substrat Quantum	Advansta

β-Mercaptoethanol	Roth
-------------------	------

Tabelle 3: Kits

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
Click-iT™ EdU Alexa Fluor®647 Imaging Kit	Detektion EdU-Inkorporation	Invitrogen
DNA Clean & Concentrator-5 Kit	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	Zymo Research
MasterPure™ Complete DNA & RNA Purification Kit	RNA-Extraktion aus humanen Zellen	Epicentre
peqGOLD XChange Plasmid Maxi-EF Kit	Maxi-Plasmidisolierung aus Bakterien	Peqlab
RevertAid H minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Erststrangsynthese, reverse Transkription	Thermo Scientific
Silica Bead DNA Gel Extraction Kit	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	Fermentas
T4 DNA Ligase	Ligation von DNA-Fragmenten	Fermentas
ZR Plasmid miniprep-Classic Kit	Mini-Plasmidisolierung aus Bakterien	Zymo Research

Tabelle 4: Restriktionsendonukleasen

Enzym	Puffer	Inkubations-temperatur [°C]	Hersteller
Age I FD	FastDigest	37	Thermo Scientific
BamH I FD	FastDigest	37	Thermo Scientific
Bgl II FD	FastDigest	37	Thermo Scientific
BsrGI FD	FastDigest	37	Thermo Scientific
Cfr42 I (Sac II)	Tango, B	37	Fermentas
DpnI	4	37	Biolabs
EcoRI FD	FastDigest	37	Thermo Scientific
Eco105 I (SnaB I)	Tango	37	Fermentas
FastAP	FastDigest	21	Thermo Scientific
Hind III FD	FastDigest	37	Thermo Scientific
KpnI FD	FastDigest	37	Thermo Scientific
Mlu I	Tango, R	37	Fermentas
Nco I	Tango	37	Fermentas
NdeI FD	FastDigest	37	Thermo Scientific
NheI FD	FastDigest	37	Thermo Scientific
NotI FD	FastDigest	37	Thermo Scientific
PstI FD	FastDigest	37	Thermo Scientific
Sal I FD	FastDigest	37	Thermo Scientific
SmaI FD	FastDigest	30	Thermo Scientific
Smi I (Swa I)	Tango, O	30	Fermentas
Ssp I	Tango, G	37	Fermentas
Xba I FD	FastDigest	37	Thermo Scientific
XhoI FD	FastDigest	37	Thermo Scientific

Tabelle 5: Transfektionsreagenzien

Reagenz	Hersteller
Effectene	Qiagen
Lipofectamine LTX	Lifetechnologies
Genejuice	Novagen

Tabelle 6: Geräte

Gerät	Hersteller
Mikroskop Observer D1	Zeiss, Jena
Mikroskop Axio Imager Z2	Zeiss, Jena
Implen Nanophotometer	Implen, München
Chemi-Smart 2126	Vilber Lourmat

Tabelle 7: Software

Name	Hersteller
ChemiCapt	Vilber Lourmat
ImageJ	NIH
μManager	Vale Lab
MetaCyte	Metafer Altlußheim

Tabelle 8: Objektive

Objektiv	Vergrößerung	Numerische Apertur	Berechnet für Deckgläser der Stärke [mm]	Phasenkontrast	Hersteller
EC Plan- NEOFLUAR	10x	0,3	∞/-	Ph1	Zeiss
LD Plan- NEOFLUAR	40x	0,6	∞/ 0-1,5	Ph2	Zeiss
Plan- Aplanachromat	63x	1,4 oil	∞/ 0,17	Ph3	Zeiss
Plan- Aplanachromat	100x	1,3 oil	∞/ 0,17	Ph3	Zeiss
CP-Achromat	100x	1,25 oil	∞/ 0,17	-	Zeiss

Tabelle 9: Antikörper

Name Antikörper	Anbieter	Bestellnummer
Alexa Fluor® 488 Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	Invitrogen	A21202
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Invitrogen	A11001
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Invitrogen	A11008
Alexa Fluor® 594 Goat Anti-Chicken IgG (H+L)	Invitrogen	A11042
Alexa Fluor® 647 Goat Anti-Rabbit SFX	Invitrogen	A31634
GAPDH	SantaCruz	SC-25778
GFP	Roche	11814460001
GFP	SantaCruz	Sc-8334
Goat anti-mouse IgG-HRP	SantaCruz	Sc-2031
Goat anti-rabbit IgG-HRP	SantaCruz	Sc-2030
Mus81	SantaCruz	Sc-53382
PCNA	SantaCruz	Sc-56
pRPA (pT21)	Abcam	Ab109394
pRPA (pT21)	Abcam	Ab109394
Rad51	Abcam	Ab63801
Rad51	Abcam	Ab213
Rad52 F-7	SantaCruz	Sc-365341
Rad54 D-18	SantaCruz	Sc-5849
RPA32	Abcam	Ab2175
γH2AX	Millipore	05-636
γH2AX S139	Epitomics	2212-1

3.1.1 Puffer, Lösungen und Medien

Tabelle 10: LB-Festmedium

Komponenten	Konzentration	Menge für 1l Medium
Hefeextrakt	0,5% (w/v)	5 g
Trypton	1% (w/v)	10 g
NaCl	1% (w/v)	10 g
Agar-Agar	1,5% (w/v)	15 g

Tabelle 11: LB-Flüssigmedium

Komponenten	Konzentration	Menge für 1l Medium
Hefeextrakt	0,5% (w/v)	5 g
Trypton	1% (w/v)	10 g
NaCl	1% (w/v)	10 g

Tabelle 12: SOB-Medium

Komponenten	Konzentration	Menge für 1l Medium
Hefeextrakt	0,5% (w/v)	5 g
Trypton	2% (w/v)	20 g
KCl	2,5 mM	0,2 g
NaCl	10 mM	0,6 g
2 M Mg ²⁺ -Lösung	20 mM	10 ml

Tabelle 13: 2 M Mg²⁺-Lösung

Komponenten	Konzentration	Menge für 20 ml Lösung
MgSO ₄ *7H ₂ O	1 M	4,93 g
MgCl ₂ *6H ₂ O	1 M	4,07 g
auf pH 6,8-7 einstellen		

Tabelle 14: Puffer RF1

Komponenten	Konzentration	Menge für 200 ml Puffer
RbCl	100 mM	2,4 g
MnCl ₂ *4H ₂ O	50 mM	2 g
5M Kaliumacetat-Lösung	30 mM	1,2 ml
CaCl ₂ *2H ₂ O	10 mM	0,3 g
Glycerin	15 % w/v	30 g
mit CH ₃ COOH auf pH 5,8 einstellen		

Tabelle 15: Puffer RF2

Komponenten	Konzentration	Menge für 100 ml Puffer
MOPS	10 mM	0,21 g
RbCl	10 mM	0,12 g
CaCl ₂ *2H ₂ O	75 mM	1,1 g
Glycerin	15 % w/v	15 g
mit NaOH auf pH 6,8 einstellen		

Tabelle 16: Trypsin-EDTA-Lösung

Komponenten	Konzentration	Menge für 500 ml Puffer
Trypsin 2,5%	0,05 % v/v	10 ml
EDTA 0,5 M pH 8	0,02 % v/v	0,5 ml
1x PBS		489,5 ml

Tabelle 17: Einfriermedium

Komponenten	Konzentration	Menge für 50 ml Medium
FCS	60% (vw/v)	30 ml
DMSO	20% (v/v)	10 ml
Zellkulturmedium	20% (v/v)	10 ml

Tabelle 18: 50x TAE-Puffer

Komponenten	Menge
2M Tris	242,3g/l
50mM EDTA	18,6g/l
mit CH ₃ COOH (etwa 100 ml) auf pH 7,5 einstellen	

Tabelle 19: RIPA-Puffer

Komponenten	Konzentration	Menge für 200 ml Puffer
Tris	50 mM	1,21 g
NaCl	150 mM	1,752 g
Na-Desoxycholat	0,5 % w/v	1 g
Triton X100	1 % v/v	2 ml
SDS	0,1 % w/v	0,2 g
Auf pH 8,0 einstellen		

Tabelle 20: SDS-Polyacrylamidgel

Komponenten	Trenngel 10 %	Sammelgel 4 %
ddH ₂ O	7,5 ml	4,5 ml
Puffer B	4,5 ml	-
Puffer C	-	1,9 ml
Acrylamid 30 %	6 ml	1,1 ml
APS 10 %	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	20 µl

Tabelle 21: Puffer B

Komponenten	Konzentration	Menge für 500 ml Puffer
Tris	1,5 M	90,91 g
SDS	14 mM	2,02 g
Auf pH 8,8 einstellen		

Tabelle 22: Puffer C

Komponenten	Konzentration	Menge für 500 ml Puffer
Tris	495 mM	30 g
SDS	14 mM	2,02 g
Auf pH 6,8 einstellen		

Tabelle 23: 5x Lämmli-Puffer

Komponente	Konzentration
Bromphenolblau	0,012 % (w/v)
Glycerin	10 % (v/v)
SDS	2 % (w/v)
TRIS	62,5 mM
β-Mercaptoethanol	5 % (v/v)

Tabelle 24: 10x Elektrophoresepuffer

Komponenten	Konzentration	Menge für 1 l Puffer
Tris	250 mM	30,3 g
SDS	5 % w/v	50 g
Glycin	2 M	150,14 g
Auf pH 8,8 einstellen		

Tabelle 25: 10x Transferpuffer

Komponenten	Konzentration	Menge für 1 l Puffer
Tris	100 mM	24,24 g
Glycin	1,5 M	112,61 g
Auf pH 8,3 einstellen		

Tabelle 26: TBS-T-Puffer

Komponente	Konzentration
NaCl	137 mM
TRIS	20 mM
Tween 20	0,1 % (v/v)
mit HCl auf pH 7,6 einstellen	

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung der *E. coli* DH5 α auf LB-Festmedium (siehe Tabelle 10) wurde in 90 mm-Petrischalen durchgeführt. Je nach den Plasmid-vermittelten Resistenzen wurde den Medien 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin oder 30 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin zugesetzt. Zur Vereinzelnung von Bakterienklonen wurde eine Bakteriensuspension mithilfe eines Drigalski-Spatels ausplattiert oder mit einer Impföse ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C Ü/N. Die Kultivierung der *E. coli* DH5 α in LB-Flüssigmedium (siehe Tabelle 11) erfolgte unter Zugabe der spezifischen Antibiotika 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin oder 30 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin in Reagenzröhrchen oder Erlenmeyerkolben. Ü/N-Kulturen wurden mit 1 % (v/v) Suspension aus einer bestehenden Kultur bzw. mit einem sterilen Zahnstocher aus einem Glycerol-Stock heraus angeimpft. Die Inkubation erfolgte auf einem Rotationschüttler bei 37 °C Ü/N.

3.2.2 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Die für eine Transformation benötigten chemisch kompetenten Bakterien wurden nach Hanahan (1983) wie folgt hergestellt.

Es wurden kompetente *E. coli* DH5 α auf einer LB-Agar-Platte zur Kultivierung Ü/N bei 37 °C ausgestrichen. Am Folgetag wurden 50 ml SOB-Medium mit einer Kolonie der Ü/N-Kultur angeimpft. Das SOB-Medium wurde zunächst ohne die 2 M Mg^{2+} -Lösung angesetzt und autoklaviert. Anschließend wurde die sterilfiltrierte Mg^{2+} -Lösung zugegeben. Es erfolgte eine Kultivierung bei 37 °C Ü/N auf einem Rotationschüttler. Am Folgetag wurden 50 ml vorgewärmtes SOB-Medium mit 1 ml Ü/N-Kultur angeimpft. Es folgte die Kultivierung (etwa 2 h) bei 37 °C auf einem Rotationsschüttler bis zu einer OD_{600} von 0,35–0,6. Bei Erreichen der Bakteriendichte wurden je 50 ml der Suspension in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min auf Eis gelagert. Ab diesem Punkt wurde auf Eis gearbeitet und es wurden vorgekühlte Puffer verwendet. Die Bakteriensuspension wurde für 15 min bei 1000 g bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das Bakterienpellet wurde mit 20 ml RF1-Puffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Erneut wurde die Bakteriensuspension für 15 min bei 1000 g bei 4 °C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 4 ml RF2-Puffer resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde in 100 μl -Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2.3 Chemische Transformation mittels Hitzeschock

Für eine Transformation wurde ein Aliquot kompetenter *E. coli* DH5 α auf Eis aufgetaut und nach Zugabe der zu transformierenden DNA 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 90 s bei 42 °C im Wasserbad. Nach weiteren 2 min Inkubation auf Eis wurde den Zellen 800 μ l frisches LB-Medium zugeben und die Zellen für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (16.000 g für 3 min) und 750 μ l des Überstands verworfen. Das Pellet wurde in dem verbliebenen Medium resuspendiert und auf einer mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum versetzten LB-Agar-Platte ausplattiert. Es erfolgte eine Inkubation Ü/N bei 37 °C. Am Folgetag konnten die angewachsenen Bakterienkolonien z.B. für eine Kolonie-PCR eingesetzt werden.

3.2.4 Glycerol-Stocks

Um Dauerkulturen von mit Plasmid transfizierten Bakterienkulturen anzulegen, wurden 250 μ l einer Ü/N-Kultur mit 250 μ l einer sterilen 65 %igen Glycerollösung (v/v) gemischt und bei -80 °C gelagert.

3.2.5 Humane Zellkultur

3.2.5.1 Humane Zelllinien

Tabelle 27: Verwendete humane Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Beschreibung
82-6hTERT	primäre Fibroblasten	Durch das hTERT-Gen immortalisierte humane primäre Fibroblasten-Zelllinie eines gesunden männlichen Spenders. Bezug durch Prof. P. Jeggo (<i>University of Sussex</i>) Zellkulturmedium: MEM versetzt mit 20 % FCS und 1 % NEAA
A549	Lungen-Karzinom-Zellen	Durch D.J. Giard et al. (1972) entwickelte Zelllinie aus einem Explantat eines Lungen-Karzinoms eines 58 Jahre alten männlichen Spenders. Bezug durch <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC). Zellkulturmedium: DMEM versetzt mit 10 % FCS
HeLa S3	Adenosarkom-Zellen	Durch T.T. Puck, P.I. Marcus und S.J. Cieciura (1955) entwickelte Zelllinie. S3 ist ein Klon abgeleitet aus der parentalen HeLa-Zelllinie (ATCC CCL-2) eines Sarkoms des Gebärmutterhalses einer 31 Jahre alten Frau. Bezug durch ATCC. Zellkulturmedium: DMEM versetzt mit 10 % FCS und 1 % NEAA
U2OS	Osteosarkom-Zellen	Durch J. Ponten und E. Saksela (1964) entwickelte Zelllinie (ursprünglich 2T) aus einem moderat differenzierten Sarkom des Schienbeins eines 15 Jahre alten Mädchens. Bezug durch ATCC. Zellkulturmedium: DMEM versetzt mit 10 % FCS und 1 % NEAA

3.2.5.2 Passagieren von Zellen

Zur Subkultivierung von adhärennten Zellen muss die Zellpopulation in Suspension gebracht werden, um diese in neue Zellkulturgefäße aussäen zu können. Das Ablösen vom Boden des Zellkulturgefäßes erfolgte durch den Einsatz der Protease Trypsin, welche die Zell-Oberflächenkontakte der adhärennten Zellen auflöst. Hierzu wurden die adhärennten Zellen mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit einer Trypsin-EDTA-Lösung überschichtet (etwa 1/10 des für das spezifische Zellkulturgefäß üblichen Volumen an Zellkulturmedium). Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für etwa 5 min. Hatten sich die Zellen von der Oberfläche des Zellkulturgefäßes gelöst, wurde die Reaktion mit dem doppelten Volumen an fetalem Kälberserum (FCS) supplementierten Zellkulturmedium abgestoppt. Zu passagierende Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:10 in 75 cm²-Zellkulturflaschen ausgesät. Zum Aussäen einer definierten Zellzahl, wurde diese mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und entsprechende Volumina in die Kulturgefäße gegeben. Die Kultivierung erfolgte in dem entsprechenden Zellkulturmedium supplementiert mit FCS und ggf. nichtessentiellen Aminosäuren (NEAA) bei 37 °C 5 % CO₂.

3.2.6 Generierung transgener Zelllinien

3.2.6.1 Ermitteln der optimalen Konzentration der Selektionsantibiotika

Die Grundlage der Erzeugung einer transgenen (monoklonalen) Zelllinie ist die Selektierbarkeit der mit dem *gene of interest* (GOI) transfizierten Zellen. Diese Voraussetzung wird in der Regel durch ein auf dem zu transfizierenden Vektor befindliches, selektierbares Markergen erfüllt. Die in dieser Arbeit verwendeten Markergene vermitteln Resistenzen gegen die Selektionsantibiotika G418 und Hygromycin. Die natürliche Toleranz der verwendeten WT-Zelllinien gegenüber den Selektionsantibiotika kann durch eine Verdünnungsreihe bestimmt werden. Hierfür wurden jeweils 1×10^5 Zellen in sechs 35 mm-Petrischalen oder Wells einer 6-Wellplatte ausgesät und am Folgetag mit verschiedenen Konzentrationen des Selektionsantibiotikums versetzt. Im Abstand von 2 Tagen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach 7 bis 14 Tagen sollte bei Proben mit hohen Konzentrationen eine erhöhte Zellsterblichkeit zu beobachten sein. Spätestens nach 14 Tagen wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit einer Kristallviolettlösung für 10 min überschichtet. Anschließend wurde 3x 2 min mit Leitungswasser entfärbt. Die für die Selektion einzusetzende Konzentration entsprach der Probe, in der gerade keine angewachsenen WT-Kolonien mehr nachzuweisen waren. Diese Konzentration sollte in einem Selektionsansatz untransfizierte WT-Zellen abtöten und transfizierte, das resistenzvermittelnde Markergen exprimierende Zellen nicht an ihrem Wachstum und bei der Koloniebildung hindern.

3.2.6.2 Transfektion

Um ein GOI in einer Zelle zur Expression zu bringen, muss zuerst die hydrophile Fremd-DNA durch die hydrophobe Zellmembran in die Zelle eingebracht werden. Dazu wurde in dieser Arbeit die Methode der Lipofektion verwendet. Durch den Einsatz kationischer Lipide bilden sich zusammen mit der negativ geladenen DNA-Lipid-Vesikel (Liposomen) aus, welche die Zellmembran passieren können. Sämtliche eingesetzten Transfektionsreagenzien basieren auf dem Prinzip der kationischen Lipofektion. Am Vortag der Transfektion wurden $2,5 \times 10^5$ Zellen in 35 mm-Schalen ausgesät. Die Transfektion wurde wie in Tabelle 28 dargestellt durchgeführt. Das Expressionsmaximum wurde nach 24-48 h erreicht.

Tabelle 28: Verwendete Transfektionsreagenzien

Verwendete Reagenz	Zelllinie	Protokoll für 35 mm Schalen
Effectene (Qiagen)	HeLa S3	Optimiertes Protokoll nach Dissertation Olivia Barton (2010): 98 μl EC-Puffer + 2 μg DNA vermischen, 3,2 μl Enhancer-Lösung zugeben, 10 s vortexen und anschließend 5 min bei RT inkubieren. 10 μl Effectene-Lösung zugeben, 10 s vortexen und 20 min bei RT inkubieren. 500 μl von Medium zu der Lösung geben (Vorverdünnung) und anschließend auf die Schalen bzw. Zellen tropfen. Das Gesamtvolumen in den Zellkulturschalen beträgt etwa 2,5 ml.
Lipofectamine LTX (Lifetechnologies)	HeLa S3	500 μl Serum-freies (SF) Medium + 1,25 μg DNA + 5 μl Lipofectamine LTX vorsichtig mischen. Anschließend 25 min Inkubation bei RT. Lösung zu den Zellen pipettieren. Das Gesamtvolumen in den Zellkulturschalen beträgt etwa 2,5 ml.
Genejuice (Novagen)	U2OS	3 μl Genejuice + 100 μl SF-Medium mischen, kurz vortexen und 5 min Inkubation bei RT. 1 μg DNA zugeben und 15 min Inkubation bei RT. Lösung zu den Zellen pipettieren. Das Gesamtvolumen in den Zellkulturschalen beträgt etwa 2,1 ml.

3.2.6.3 Klonale Selektion stabil exprimierender Zellen

Die transiente Expression eines GOI in transfizierten Zellen führt in der Regel zu starken Schwankungen des Expressionsniveaus innerhalb der Zellpopulation. Um eine Zellpopulation mit homogener Genexpression zu erhalten, wurden Zellen vereinzelt und mittels Antibiotika selektiert. Somit konnten stabil exprimierende, monoklonale Populationen herangezogen werden.

Hierzu wurden die Zellen wie in Punkt 3.2.6.2 beschrieben ausgesät und am Folgetag transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert und je 30.000 Zellen in fünf 90 mm-Petrischalen ausgesät. Am Tag nach der Aussaat erfolgte die erste Zugabe des Selektionsantibiotikums (AB) und alle zwei Tage ein Mediumswechsel mit erneuter Antibiotikagabe. Etwa 14 Tage nach Zugabe der Antibiotika wurden die Petrischalen auf vereinzelt definierte Kolonien im Gegenlicht untersucht. Die so identifizierten Zellhaufen wurden markiert und mit einem Lebendzellmikroskop bei 37 °C, 5 % CO₂ auf Fluoreszenz des entsprechenden Fluorophors und somit auf die Expression des GOI kontrolliert. Hierzu wurde ein LD Plan NEOFLUAR 40x Objektiv verwendet, welches eine ausreichende Vergrößerung unter Berücksichtigung der höheren Schichtdicke des Plexiglasbodens liefert.

Sämtliche verwendete GOI enthielten ein Kernlokalisationssignal (NLS), so dass nur Zellen mit fluoreszierendem Zellkern als positiv gewertet wurden. Zeigte eine Kolonie das erwartete

Expressionsmuster, wurde dies an der Position auf dem Plexiglas-Boden markiert, um anschließend diese Kolonie gezielt aus der 90 mm-Kulturschale in ein neues Kulturgefäß zu überführen. Hierzu wurden eigens angefertigte sterile Edelstahlzylinder (Höhe 10 mm, Außendurchmesser 10 mm, Innendurchmesser 6 mm) verwendet. Die Stahlzylinder wurden auf einer Stirnseite mit steriler Vaseline als Flüssigkeitssperre beschichtet und über die Zellkolonie in die Petrischale eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen innerhalb des Zylinders mit 1x PBS gewaschen und 50 μ l Trypsin zugegeben. Nach etwa 5 min Inkubation wurden die Zellen resuspendiert und in ein neues Kulturgefäß überführt. Um die Splitting-Rate zugunsten eines verbesserten Zellwachstums niedrig zu halten (\sim 1:3), wurden die Kolonien zunächst in ein Well einer 24er-Well-Platte überführt. Anschließend wurden die Zellen schrittweise in den Wells einer 12er-Well, 6er-Well-Platte, und schließlich in 25 cm²- und 75 cm²-Zellkulturflaschen unter Selektionsdruck vermehrt.

3.2.7 Anlegen von Kryo-Stocks

Zur langfristigen Lagerung von Zelllinien wurden Kryo-Stocks angelegt. Hierzu wurden die zu lagernden Zellen trypsiniert, die Reaktion mit Zellkulturmedium abgestoppt und die Suspension abzentrifugiert (300 g, 4 °C für 10 min). Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt und es wurde nur gekühltes Medium verwendet. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden 1-2 x 10⁶ Zellen in maximal 0,9 ml Zellkulturmedium in Kryoröhrchen auf Eis gestellt. Anschließend wurde dasselbe Volumen Einfriermedium (siehe Tabelle 17) zu der vorgelegten Zellsuspension gegeben und gemischt. Die gefüllten Kryoröhrchen wurden in einen Gefrierkontainer (Mr. Freeze, Thermofisher) überführt und Ü/N bei - 80 °C gelagert, um eine schonende Abkühlung von etwa -1 °C/ min zu erreichen. Am Folgetag wurden die Kryoröhrchen in einen Flüssigstickstofftank überführt.

3.2.8 Auftauen von Zellen aus dem Kryo-Stock

Für die Reaktivierung einer kryo-konservierten Zelllinie wurde das Kryoröhrchen für 1-2 min in einem 37 °C Wasserbad bis zum vollständigen Auftauen erwärmt. Die Zellen wurden in einem Volumen von 10 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium aufgenommen und bei 300 g für 7 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen und in eine 25 cm²-Zellkulturflasche überführt. Nach dem Adhären der Zellen wurde am selben oder spätestens am Folgetag das Medium gewechselt, um verbliebene DMSO-Reste zu entfernen. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂.

3.2.9 Bestrahlung

Die Bestrahlung der Proben erfolgte mit 16 cm Abstand zum Austrittsfenster und einer Filterung der Strahlung durch 1 mm Aluminium bei 90 kV und 19 mA (Dosisleistung etwa 2,96 Gy/ min) mit einer Isovolt Titan E Röntgenröhre (GE München) mit Wolframanode. Bei der Bestrahlung von Materialien aus Atomen mit hoher Ordnungszahl entstehen mehr Sekundärelektronen als bei Materialien aus Atomen mit einer geringeren Ordnungszahl. Silizium, ein wichtiger Bestandteil von Glas, besitzt eine hohe Ordnungszahl und folglich werden bei Bestrahlung des Materials mehr Sekundärelektronen freigesetzt als in den Zellen. Auf Glas-DG bestrahlte adhärenente Zellen werden aufgrund dessen etwa doppelt so stark geschädigt wie eine auf Kunststoff bestrahlte Vergleichskultur (Grenzflächeneffekt) (Kegel et al. 2007). Um die gewünschte Dosis zu erreichen, wurde bei auf Glas-DG adhärenent wachsenden Zellen die Bestrahlungszeit um die Hälfte verringert. Die angegebenen Dosiswerte entsprechen stets der effektiven Dosis. In Ibidi μ -Slides angewachsene Zellen wurden in einer speziell angefertigten Bestrahlungsmaske ebenfalls mit 16 cm Abstand zum Austrittsfenster bestrahlt (Dissertation Eik Schumann, 2011). Auf der Kunststoffoberfläche angewachsene Zellen sind nicht von dem Grenzflächeneffekt betroffen.

Da in der angefertigten Arbeit ausschließlich mithilfe einer Röntgenröhre bestrahlt wurde, wird im Folgenden die Einheit 1 Gy synonym für 1 Gy Röntgenstrahlen verwendet.

3.2.10 Behandlung mit dem Rad51-Inhibitor B02

Der Rad51-Inhibitor B02 (Calbiochem) wurde eingesetzt, um eine Rad51-abhängige Reparatur von DSBs zu unterbinden. B02 ist ein synthetischer *Small-Molecule*-Inhibitor, welcher spezifisch die Bindung von Rad51 an die DNA und folglich die Bildung des charakteristischen Nukleoproteinfilaments blockiert (Huang et al. 2012). Inhibitoren weisen einige Vorteile gegenüber siRNA-Behandlungen auf. Inhibitoren können schnell und reversibel wirken und somit zu einem spezifischen Zeitpunkt im Zellzyklus zum Einsatz kommen. Für die Inhibition der Rad51-abhängigen Reparatur wurde 50 μ M des Inhibitors eingesetzt. Es wurde zunächst eine Vorverdünnung (1/5 des Endvolumens) mit vorgewärmtem Zellkulturmedium hergestellt und diese anschließend zu den Zellen gegeben, um eine homogene Verteilung des Inhibitors zu gewährleisten. Die Zugabe des Inhibitors erfolgte 30 min vor der Bestrahlung.

3.2.11 Behandlung mit Hydroxyurea

Die Chemikalie Hydroxyurea (HU) inhibiert die für die Nukleotidsynthese essentielle Ribonukleotid-Reduktase und führt somit zu einer fortschreitenden Depletion des Nukleotidpools. Der auftretende Mangel an Nukleotiden führt zu einer Verlangsamung und bei andauernder Inhibition zu einem möglichen Blockieren und Kollabieren der Replikationsgabeln in replizierenden Zellen (Petermann et al. 2010). Für die Induktion blockierter bzw. geschädigter Replikationsgabeln wurde den Zellen für 24 h 0,5 mM HU zugegeben und anschließend wurden die Zellen fixiert. Da HU in Lösung instabil ist, wurde die Lösung stets frisch angesetzt.

3.2.12 Behandlung mit EdU

Für eine zellzyklusspezifische Analyse des Verhaltens bestimmter DNA-Reparatur-assoziiierter Faktoren ist es essentiell, einzelne Zellen einer Zellzyklusphase zuordnen zu können. Nach Zugabe des Thymidin-Analogons 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) können DNA-replizierende Zellen, durch Detektion der EdU-Inkorporation in ihre DNA, als S-Phase-Zellen identifiziert werden. Hierzu wurde den lebenden Zellen 30 min vor der Bestrahlung 5 μ M EdU zugegeben. Die Färbung wurde bis auf folgende Modifikation nach Herstellerangaben durchgeführt: Der für die Click-It-Reaktion benötigte Katalysator-Puffer enthält Kupfer(I), welches sich nachteilig für eine etwaig vorhandene GFP-Fluoreszenz auswirkt. Um dies zu vermeiden wurde nur die Hälfte der angegebenen Puffer-Konzentration eingesetzt. Weiter wurde der Farbstoff in einer 1/40-Verdünnung eingesetzt, um eine zu starke Färbung und das Einstrahlen in angrenzende Fluoreszenzspektren zu verringern.

3.3 Molekulargenetische Methoden

3.3.1 Verwendete Vektoren

Sämtliche im Laufe der Arbeit angefertigten DNA-Konstrukte basieren auf den in Tabelle 29 aufgeführten Ausgangsvektoren.

Tabelle 29: Ausgangsvektoren

Bezeichnung Datenbank AG Löbrich	Plasmidbezeichnung	Größe [bp]	Resistenz	Bezogen von
L 4	pEGFP-C1	4731	Kan / G418	Clontech
L 7	pEGFP-N1	4733	Kan / G418	Clontech
L16	pEGFP-53BP1	10609	Kan / G418	Prof. Claudia Lukas, Kopenhagen
L17	pEGFP-MDC1	~11000	Kan / G418	Prof. Claudia Lukas, Kopenhagen
L 30	pDsRed LigaseI	7497	Kan / G418	Prof. Christina Cardoso TU Darmstadt
L63	pEGFP-Rad54	~7000	Kan / G418	Prof. Roland Kanaar, Rotterdam
L76	pEGFP-Rad54 siRNA- resistent	~7000	Kan / G418	Dr. Olivia Barton, Mutagenese L63
L139	pmCherry-C1	4722	Kan / G418	Clontech
L140	pmCherry-N1	4722	Kan / G418	Clontech
L141	pTK-Hyg	5036	Amp / Hyg	Clontech
L142	pTagBFP	4707	Kan / G418	Evrogen
L154	pH2B_mCherry_IRES_puro2	5835	Amp / Puro	Addgene

Amp= Ampicillin, Hyg= Hygromycin, Kan= Kanamycin, Puro= Puromycin

3.3.2 RNA-Isolation

Für das Erstellen einer genspezifischen cDNA wurde zunächst gesamt-RNA aus der 82-6hTERT-Zelllinie isoliert. Die gesamt-RNA-Isolation erfolgte mit dem MasterPure™ Complete DNA & RNA Purification Kit (Epicentre) nach den Angaben des Herstellers. Es wurden etwa 1×10^6 Zellen eingesetzt.

3.3.3 Plasmidisolation

Für Klonierungen und Transfektionen wurden große Mengen an Plasmid-DNA benötigt. Zu diesem Zweck wurden die Plasmide in *E. coli* DH5 α vermehrt und mittels alkalischer Lyse und Aufreinigung über Silica-Säulen isoliert. Isolationen im kleinen Maßstab bis zu 30 μ g

DNA-Ausbeute wurden mit dem ZR Plasmid miniprep-Classic Kit (Zymo Research) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für höhere DNA-Ausbeuten bis zu 500 μ g Plasmid-DNA wurde das peqGOLD XChange Plasmid Maxi-EF Kit (Peqlab) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Beide Methoden liefern hochreine, endotoxinfreie DNA, welche für Folgeanwendungen wie z.B. Plasmid-Transfektionen auf Säugerzellen benötigt wurden.

3.3.4 PCR

Die spezifische Vervielfältigung von DNA-Fragmenten für analytische Zwecke oder Folgeanwendungen wie Klonierungen wurde mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt.

3.3.4.1 Primerdesign

Die Oligonukleotid-Primer wurden mithilfe der Software Primer Premier 5 (Biosoft) erstellt und durch MWG Eurofins Europe synthetisiert oder waren bereits vorhanden. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 30 aufgelistet.

Tabelle 30: Oligonukleotidprimer

Oligonukleotid Bezeichnung	Anzahl Nukleotide	Tm [°C]	Sequenz 5'-3'
P002_Rad51_fw_C1_Sal I	31	69,5	agagtcgacatggcaatgcagatgcagctt g
P009_GFP_rev	21	49,1	gcaagtaaacctctacaaat
P016_pDSRed1-C1_+pEGFP1-C1-re	24	61	gaggtgtgggaggtttttaaacg
P017_pDSRed1-N1_+pEGFP1-N1-forw	24	71,3	cgtaacaactcgcaccttgacg
P019_pEGFP1-C1_forw	22	65	catggctctgctggagttcgtg
P020_pEGFP1-N1_rev	22	61	ctcgaccaggatgggac c
P026_Rad54_fw_C1_SalI	30	65,7	aaagtcgacatgaggaggagcttgctccc
P036_Rad54_forw	20	61,4	atgaggaggagcttgctccc
P044_Rad52forw_Sal I	29	68,1	aaagtcgacatgtctgggactgaggaagc
P050_HygATG_fw	29	65,3	aggatcgtttcgcgatgaaaaagcctgaac
P051_HygStop_rev	29	73,7	ccagagteccctcagtttagcctcccaca
P052_HygExpVStop_fw	29	>75	gggggaggctaactgagcgggactctggg
P053_HygExpVATG_rev	29	65,3	gttcaggcttttcatgcgaaacgatcct
P054_CMVFPpolyA_rev	21	55,9	accctatctcgtctattctt
P055_CMVFPpolyA_fw	19	54,5	gtttcttctcgttatcc
P056_Rad51BamHIrevC1	28	66,6	taggatcctcagcttttggcatctccc

P057 Rad52revBamH1C1	28	62,2	ggtgatccttaagatggatcatatttc
P058 hphCDSnativ_fw	25	63	atgaaaaagcctgaactcaccgcga
P059 hphCDSnativ_rev	32	74,6	ctattcctttgccctcgacgagtgctggggc
P060 clontech-R_fw	19	63,3	gcgggactctggggttcga
P061 clontech-R_rev	20	59,4	gcgaaacgatcctcatcctg
P062 Rad54_rev_SacII	27	>75	tctccggtcagcggaggccccctg
P063 MDC1_fw_Sall	22	65,8	gcagtcgacatggaggacacc
P064 MDC1_rev_SacII	19	63,1	acgccggtcaggtggat
P065 LigaseInternFw	21	61,8	cactcagaagccccgttcac
P066 LigaseInternR	21	65,7	gtgaggctcactgctgggag
P067 pmCherryfw1	22	56,5	tacaacgtcaacatcaagttgg
P068 tagBFPfw	25	66,3	caaggaggccaacaacgagacctac
P069 Rad54Megafw	35	71,8	aagcttcgaattctgcagtcgacatgaggaggagc
P070 Rad54Megarev	34	>75	tatctagatccggtggccggtcagcggaggcc
P071 PuroRCDS 5`P fw	23	64,2	atgaccgagtacaagccccggt
P072 PuroRCDS 5`P rev	18	62,8	tcaggcaccggcttgcg
P073 LigaseIntern2 Fw	20	65,5	cctgtcgcctccagacctc
P074 hphCDS 5'P fw	22	58,4	atgaaaaagcctgaactcaccg
P075 hphCDS 5'P rev	21	61,8	ctattcctttgccctcgacg
P076 Rad54_rev_Sall	22	69,9	tctgtcgaccagcggaggcccc
P077 pTK-R fw	21	61,8	atcaagctgatctgcccagc
P078 pTK-R rev	25	63	aacacggaaggagacaataaccgaa
P079 CMV_fw	30	59,9	tagttattaatagtaataattacggggctc
P080 PolyA_rev	26	58,5	acgcgtaagatacattgatgagttt
P087 Mus81C1fw	24	69,9	atagtcgacatggcggccccggtc
P088 Mus81C1rev	28	68	aatggatccttaggtcaagggccgtag
P089 Mus81Nfw	22	69,9	acagtcgacatggcggccccgg
P090 Mus81Nrev	24	67,8	attggatccagggtcaagggccc
P095 Mus81seq	20	59,4	ccagccaggtactcattgac
P109 PCNA rev	24	62,9	acgggatccctaagatccttctc
P110 Mus81N II fw	24	69,6	tatgctagcatggcggccccggtc
P111 Mus81N II r	29	69,5	ttaaagcttggtcaagggccgtagctgc
P112 Mus81 int r	25	63,6	atgctgctgcaaaggtatccagtc
P113 Gen1N fw	29	68,8	tatgctagcatgggagtgatgactgtg
P114 Gen1Nrev	35	69,2	ctactgcagagtgttggaaatcttagtttaac
P116 MDC1_fw_Sall	31	>72	gcagtcgacatggaggacaccaggctattg
P117 MDC1_rev_SacII	32	>72	acgccggtcaggtggatgacatctcacaag
P130 Gen1C fw	29	69,7	aaagtcgacatgggagtgatgactgtg

P131 Gen1C rev	38	72,7	tatggatcctcaagtgctttggaatcttagtttaatc
P133 RPA32 fw	42	58,9	cagatctcgaggtggaggcatgtggaacagtgattcgaaag
P134 RPA32 rev	39	58,1	cccgcggtaccttattctgcacatctgtggatttaaaatgg

3.3.4.2 Reverse Transkriptase PCR

Um nach einer gesamt-RNA-Isolation (siehe 3.3.2) eine genspezifische cDNA zu erzeugen, wurde die gesamt-mRNA mittels eines Poly-T-Primers und einer viralen reversen Transkriptase zunächst in einzelsträngige DNA (Minus-Strang) transkribiert. Hierfür wurde das RevertAid H minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Bei der anschließenden genspezifischen Amplifikation der cDNA wurde 1 μ l des Reaktionsansatzes für eine *Proofreading*-PCR eingesetzt (siehe 3.3.4.5).

3.3.4.3 Standard PCR

Um zu überprüfen, ob eine Lösung eine gesuchte DNA-Sequenz enthält, wurde eine Standard-PCR durchgeführt. Hierfür wurde eine kostengünstige Taq-Polymerase (NEB) eingesetzt. Diese DNA-Polymerase wurde aufgrund der relativ hohen Fehlerrate bei der Synthese lediglich für analytische Zwecke eingesetzt. Das Pipettierschema für eine Standard-PCR ist in Tabelle 31 dargestellt

Tabelle 31: Pipettierschema Standard-PCR

Komponenten	Volumen
10x Thermopol Buffer	1,25 μ l
dNTPs (10 mM)	0,25 μ l
Primer forward (10 μ M)	0,25 μ l
Primer revers (10 μ M)	0,25 μ l
Template 50 ng	0,5 μ l
Taq-Polymerase (NEB)	0,06 μ l
ddH ₂ O	9,94 μ l
Gesamtvolumen Ansatz	12,5 μ l

Das PCR-Programm einer Standard-PCR ist in Tabelle 32 dargestellt. Die *Annealing*-Temperatur wurde *online* mithilfe des Tm-Calculator (NEB) bestimmt.

Tabelle 32: PCR-Programm Standard -PCR

Schritt	Temperatur	t	
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1x
Denaturierung	95 °C	30 s	30x
Annealing	X °C	30 s	
Elongation	72 °C	1 min/ kb	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1x
Store	4 °C	∞	

3.3.4.4 Kolonie-PCR

Um zu überprüfen, ob Bakterienklone ein gewünschtes Plasmid durch Transformation aufgenommen haben, wurde die zeit- und kosteneffiziente Methode der Kolonie-PCR eingesetzt. Hierbei wurde von einer Agar-Platte eine vereinzelt Kolonie mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in 10 μl LB-Medium resuspendiert. Ohne einen weiteren Inkubationsschritt wurden 0,5 μl der Suspension als Template für die Kolonie-PCR eingesetzt. Eine Kolonie-PCR entspricht prinzipiell einer Standard-PCR (siehe Kapitel 3.3.4.3). Um jedoch das Plasmid-Template in den Bakterien für die PCR-Reaktion zugänglich zu machen, wurde die Dauer der initialen Denaturierung zugunsten des Zellaufschlusses auf 7 min verlängert. Die *Annealing*-Temperatur wurde *online* mithilfe des Tm-Calculator (NEB) bestimmt. Der Erfolg der Reaktion wurde mittels eines analytischen Agarosegels überprüft (siehe 3.3.7). Wurde eine Kolonie als positiv identifiziert, dienten die restlichen 9,5 μl der angeimpften Bakteriensuspension dem Animpfen einer Ü/N-Kultur (siehe 3.2.1).

3.3.4.5 Proofreading-PCR

Sollten PCR-Produkte für Anwendungen eingesetzt werden, welche eine besonders geringe Fehlerrate bei der Amplifikation voraussetzen, wurde eine *Proofreading*-Polymerase verwendet. Zu diesen Anwendungen zählen z.B. genspezifische Amplifikationen einer cDNA oder das Anfügen von Restriktions-Schnittstellen durch PCR. Die Phusion-Polymerase ist eine *Blunt-End*-Polymerase, welche neben der hohen Genauigkeit auch den direkten Einsatz des Amplifikats für *Blunt-End*-Klonierungen ermöglicht. Das Pipettierschema einer *Proofreading*-PCR ist in Tabelle 33 dargestellt.

Tabelle 33: Pipettierschema *Proofreading*-PCR

Komponenten	Volumen
5x GC-Buffer alpha	10 μ l
dNTPs (10 mM)	1 μ l
Primer forward (10 μ m)	2,5 μ l
Primer revers (10 μ m)	2,5 μ l
Template 20 ng	1 μ l
DMSO %	1 μ l
Phusion-Polymerase (NEB)	0,5 μ l
ddH ₂ O	31 μ l
Gesamtvolumen Ansatz	50 μ l

Das PCR-Programm für eine *Proofreading*-PCR ist in Tabelle 34 dargestellt. Die *Annealing*-Temperatur wurde *online* mithilfe des T_m-Calculator (NEB) bestimmt.

Tabelle 34: PCR-Programm *Proofreading* PCR

Schritt	Temperatur	t	
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1x
Denaturierung	98 °C	10 s	
Annealing	X °C	30 s	30x
Elongation	72 °C	30 s /kb	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1x
Store	4 °C	∞	

3.3.4.6 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden von Qiagen bzw. MWG Eurofins Sequencing Service durchgeführt. Die Sequenzen wurden mit der Vector NTI Software mit den zuvor berechneten Sequenzen verglichen.

3.3.5 Restriktion

Typ II-Restriktionsendonukleasen (RE) bewerkstelligen das Schneiden von DNA-Sequenzen an definierten Erkennungssequenzen. Somit ermöglichen diese Werkzeuge das für Klonierungen wichtige Herstellen von DNA-Fragmenten mit komplementären überhängenden (*Sticky Ends*) oder glatten Enden (*Blunt Ends*). Weiter kann das charakteristische Schnittmuster der REs der Analyse von DNA-Molekülen dienen. In der Regel wurden Restriktionsverdau in einem Gesamtvolumen von 30 µl mit einem DNA-Gehalt von 0,5-1 µg angesetzt. Die verwendeten REs sind in Tabelle 4 dargestellt. Um in einer späteren Ligation die Rezirkularisierung von Blunt-End-Vektoren oder von potentiell vorhandenen einfach geschnittenen Vektoren zu verhindern, wurde zu den Restriktionsansätzen 1 µl FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Fermentas) zugegeben. Sollte durch den Verdau ein geschnittenes Insert erzeugt werden, wurde der Reaktion keine FastAP zugegeben. Es wurde darauf geachtet, die vorgeschriebene maximale Enzym-Konzentration in der Gesamtreaktion von 10 % v/v nicht zu überschreiten. In Tabelle 35 ist beispielhaft ein Restriktionsansatz dargestellt.

Tabelle 35: Restriktionsansatz

Komponenten	Volumen [µl]
10x Buffer	3
Template 500ng	15,82
Restriktionsendonukleasen	2
FastAP (Fermentas)	1
ddH2O	9,18
Gesamtvolumen Ansatz	30

Der Verdau erfolgte für 1 h bei 37 °C. Anschließend wurden die Restriktionsansätze mittels DNA Clean & Concentrator-5 Kit (Zymo Research) nach Herstellerangaben aufgereinigt und der DNA-Gehalt photometrisch bestimmt (siehe 3.3.9).

3.3.6 Ligation

Um aus einem mittels RE geschnittenen Vektor und einem Insert ein funktionelles Plasmid zu erzeugen, wurde eine Ligation mit der T4 DNA Ligase (Fermentas) durchgeführt. Es wurden stets 50 ng Vektor-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:3 (*Sticky-End Ligation*) bzw. 1:5 (*Blunt-End Ligation*) zum Insert eingesetzt. In Tabelle 36 ist beispielhaft eine Ligrationsreaktion dargestellt.

Tabelle 36: Ligationsreaktion

Komponenten	<i>Sticky-End Ligation</i> [μ l]	<i>Blunt-End Ligation</i> [μ l]
Vektor 50 ng	1,25	1,25
Insert	1,06	1,77
10x Ligase Puffer	2	2
50% PEG 4000	0	2
T4-Ligase Fermentas	0,2	1
ddH ₂ O	15,49	11,98
Gesamtvolumen Ansatz μ l	20	20

Die Ligationsreaktion erfolgte für 1 h bei RT oder bei 4 °C Ü/N. Anschließend wurden 5 μ l des Ligationsansatzes für eine Transformation auf *E. coli* DH5 α eingesetzt (siehe 3.2.3).

3.3.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht eine größenabhängige Trennung von negativ geladenen DNA-Fragmenten in einer Agarosegel-Matrix durch Anlegen einer Spannung. Hierzu wurde 0,5x TAE-Puffer mit 1 % Agarose (w/v) aufgekocht und anschließend mit 5 μ l /100 ml des nicht interkalierenden DNA-Fuoreszenzmarkers Roti-Safe (Roth) versetzt. Bevor die Agaroselösung den Gelpunkt erreichte, wurde sie in eine horizontale Gelcast-Kammer gegossen und ein entsprechender Taschen-Kamm eingesetzt. Auf den Einsatz von TBE-Puffer wurde verzichtet, da sich dieser bei der DNA-Extraktion aus Agarosegelen (siehe 3.3.8) negativ auf die DNA-Ausbeute auswirkt. Nach Aushärten der Agarose wurde das Gel in die Laufkammer eingesetzt und mit 0,5x TAE-Laufpuffer überschichtet. Die Proben wurden mit entsprechendem Volumen von 6x Ladepuffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Als DNA-Größenstandard wurden 3 μ l Generuler 100 bp DNA Ladder Plus bzw. Generuler 1 kb DNA Ladder eingesetzt. Die Elektrophorese wurde für etwa 40 min bei 120 V Spannung durchgeführt. Anschließend erfolgte die Visualisierung mithilfe des Chemi-Smart 2126 Transilluminator bei 312 nm und der ChemiCapt Software.

3.3.8 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Nach PCR- oder Restriktions-Reaktionen ist es für Folgeanwendungen sinnvoll, die Ziel-DNA von z.B. unerwünschten Pufferrückständen, Primern, Amplifikaten oder DNA-Fragmenten abzutrennen. Für eine größenspezifische Aufreinigung wurde ein Reaktionsansatz auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde die Bande von

gewünschter Größe mittels einer sterilen Skalpellklinge ausgeschnitten. Die Ziel-DNA wurde aus dem Gel mithilfe eines Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas) extrahiert. Für eine Abtrennung von DNA-Fragmenten unter 50 bp von einer größeren Ziel-DNA wurde das DNA Clean & Concentrator-5 Kit (Zymo Research) verwendet.

3.3.9 Bestimmung des Nukleinsäuregehalts einer Lösung

Die Bestimmung des Nukleinsäuregehalts einer wässrigen Lösung erfolgte mithilfe des Photometers Nanophotometer P-Class (Implen) in einem Volumen von etwa 1-2 μl . Hierbei wird die optische Dichte (OD) einer Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, bestimmt. RNA liegt teilweise einzelsträngig vor und weist daher eine höhere Absorption auf als DNA (Hyperchromizität). Daher wurden die Konzentrationen für RNA und DNA entsprechend der Absorption wie folgt berechnet:

RNA-Gehalt: $OD_{260} = 1 \triangleq 40 \mu\text{g} / \text{ml RNA}$

DNA-Gehalt: $OD_{260} = 1 \triangleq 50 \mu\text{g} / \text{ml DNA}$

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Zellernte und Zellaufschluss

Bei der Zellernte wurden in einer 35 mm-Petrischale adhärent wachsende Zellen zunächst mit kaltem 1x PBS gewaschen und mithilfe eines Zellschabers vom Boden gelöst. Die Zellen wurden anschließend mit 1 ml kaltem 1x PBS (Biochrom) resuspendiert und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 1000 U/ min für 5 min abzentrifugiert. Von dem resultierenden Zellpellet wurde der Überstand abgenommen. Das Pellet konnte nun in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden und bei -80 °C gelagert oder direkt für den Zellaufschluss weiterverwendet werden. Für den Zellaufschluss wurde das Pellet in 80-120 μ l RIPA-Puffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch 3x 1 min Sonifizieren im Ultraschallbad (Bandelin, Sonorex) mit zwischenzeitlichen Pausen von 1 min auf Eis. Anschließend folgte eine Inkubationszeit von 30 min auf Eis. Nach der Lyse wurde für 30 min bei 16.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand mit löslichem Protein wurde in neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

3.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Eine quantitative photometrische Methode zur Bestimmung des Proteingehalts einer Lösung ist die Proteinbestimmung nach Bradford. Hierbei bindet Coomassie-Brilliantblau (Bradford-Reagenz) unspezifisch an kationische und hydrophobe unpolare Seitenketten der Proteine und bildet einen Komplex, welcher bei 595 nm sein Absorptionsmaximum hat. Durch das Erstellen einer Eichgeraden mit definierten Konzentrationen (0, 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 5,0, 7,5 μ g/ μ l) des Proteins bovines Serumalbumin (BSA) erhält man Referenzwerte, welche zur Bestimmung des Proteingehalts einer Lösung von unbekannter Proteinkonzentration herangezogen werden können. Hierzu wurden zu 800 μ l ddH₂O je 200 μ l Bradford-Reagenz und 1 μ l BSA-Lösung gegeben. Die Lösung wurde für 10 s gevortext und für 5 min bei RT inkubiert. Die Messung wurde mit dem Photometer Nanophotometer P-Class (Implen) in 1,5 ml Halbmikro-Küvetten bei 595 nm durchgeführt. Pro BSA-Lösung wurden zwei Messungen angefertigt und der Mittelwert gebildet. Die Konzentrationsbestimmung der Proteinlysate (siehe 3.4.1) erfolgte wie bereits für die BSA-Lösungen beschrieben. Als Leerprobe diente 800 μ l ddH₂O, 200 μ l Bradford-Reagenz und 1 μ l RIPA-Puffer.

3.4.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Für eine größenabhängige Auftrennung von in einem Lysat enthaltenen Proteinen wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Das hierbei verwendete anionische Tensid SDS überdeckt die Eigenladung der Proteine und ermöglicht bei Anlegen einer Spannung die Größentrennung der Proteine in einer Polyacrylamid-Gelmatrix. Es wurden 4 %ige Sammelgele und 10 %ige Trenngele (siehe Tabelle 20) in Mighty Small II Deluxe mini Vertical Electrophoresis Unit Apparaturen (Hoefer) verwendet. Die aufzutragenden Proben wurden mit 5x Lämmli-Puffer (siehe Tabelle 23) versetzt, bei 95°C für 5 min denaturiert, auf Eis abgekühlt und schließlich auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurden 6 µl ProSieve Prestained Protein Marker (Lonza Rockland) eingesetzt. Die Elektrophorese wurde bei 25 mA (Sammelgel) bzw. bei 30 mA (Trenngel) pro eingesetztem Gel in 1x Elektrophoresepuffer durchgeführt.

3.4.4 Western-Blot

Im Anschluss an eine SDS-PAGE wurden die nach der Größe aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen um eine Detektion mittels Antikörper (AK) zu ermöglichen. Der Western-Blot wurde nach dem Tank-Blotting-Verfahren (Biorad) in 1x Transferpuffer mit 300 mA für 2-3 h durchgeführt. Nach dem erfolgreichem Transfer wurde die Membran mit 5 % Milchpulver (w/v) in TBS-T-Puffer (siehe Tabelle 26) (MP-TBS-T) für 1 h bei RT geblockt. Der Primär-AK wurde in 1 % MP-TBS-T Ü/N inkubiert. Die Verdünnung der im Western-Blot eingesetzten Primär-AK sind in Tabelle 37 dargestellt.

Tabelle 37: Eingesetzte Primärantikörper für WB

Name Antikörper	Anbieter	Bestellnummer	Wirt Klonalität	Eingesetzte Verdünnung WB
GAPDH	SantaCruz	SC-25778	Rabbit poly	1:1000
GFP	Roche	11814460001	Mouse mono	1:2000
GFP	SantaCruz	Sc-8334	Rabbit poly	1:1000
pRPA (pT21)	Abcam	Ab109394	Rabbit mono	1:4000
Rad52 F-7	SantaCruz	Sc-365341	Mouse mono	1:500

Am Folgetag wurde die Membran 3x 5 min mit 1 % MP-TBS-T gewaschen und anschließend mit dem HRP-gekoppelten Sekundär-AK in 1 % MP-TBS-T für 1 h bei RT inkubiert. Es wurde 3x 5 min mit TBS-T gewaschen. Schließlich erfolgte die Detektion des gebundenen Sekundär-AK mittels Enhanced Chemiluminescence (ECL) Lumi-Light Western Blotting Substrate bzw.

Western Bright Chemilumineszenz Substrat Quantum. Die Verdünnung der im Western-Blot eingesetzten Sekundär-AK sind in Tabelle 38 dargestellt.

Tabelle 38: Verwendete Sekundärantikörper für WB

Name Antikörper	Bestellnummer	Anbieter	Eingesetzte Verdünnung WB
Goat anti-rabbit IgG-HRP	Sc-2030	SantaCruz	1:30.000
Goat anti-mouse IgG-HRP	Sc-2031	SantaCruz	1:10.000

Die Visualisierung erfolgte mithilfe des Chemi-Smart 2126 und der ChemiCapt Software

3.5 Mikroskopie

In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich zwei Mikroskoptypen verwendet Für die Durchführung von Lebendzell-Experimenten (LCI) und der dadurch bedingt genutzten Kulturgefäße (Ibidi μ -Slide) wurde ein inverses Mikroskop vom Typ Observer D1 eingesetzt. Die für den experimentellen Aufbau wichtigen Spezifikationen sind in Punkt 3.5.2 genauer dargestellt. Für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurde ein aufrechtes Mikroskop vom Typ Axio Imager Z2 benutzt. Die Mikroskopsteuerungssoftware Metafer 4 (Metasystems) ermöglichte das Einscannen und die Bildaufnahme von fixierten und immunfluoreszent gefärbten Zellen. Auf diese Methode wird in Punkt 3.5.1 weiter eingegangen. Mit beiden Mikroskopsystemen ist eine vollautomatische Bildaufnahme durch einen motorisierten Kreuztisch, z-Focus und Fluoreszenzfilter-Wechsler möglich.

Tabelle 39: Verwendete Mikroskope

Mikroskop	Bauart	Steuerungssoftware	Kamera	Lichtquelle
Observer D1, Zeiss	Invers	μ Manager	UK1158M, ABS Jena	HXP 120, Zeiss
Axio Imager Z2, Zeiss	Aufrecht	Metacyte-Metafer 4	Cool Cube 1, Metasystems	HBO 100, Zeiss

Mit den verwendeten Mikroskopen kamen die in Tabelle 8 aufgelisteten Objektive zum Einsatz.

3.5.1 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie (IFM) wird eingesetzt, um zu untersuchende Proteine mittels einer Antikörper-Antigen-Reaktion für den Betrachter sichtbar zu machen. Bei dem angewendeten Verfahren der indirekten Immunfluoreszenz bindet zunächst ein Primär-AK an

das Zielprotein und in einer zweiten, getrennten Reaktion binden mehrere mit einem Fluorophor markierte Sekundär-AK an den Primär-AK, was zu einer Verstärkung des Signals führt.

3.5.1.1 Immunzytochemische Färbung

Für die IFM wurden fünf 9 mm-Deckgläschen (DG) in einer 35 mm-Petrischale ausgelegt und darauf 2 Tage vor Versuchsdurchführung $2-3 \times 10^5$ Zellen ausgesät. Nach der Versuchsdurchführung wurde das Medium abgenommen, und die Fixierung der Zellen erfolgte für 10 min mit 2,5 % FA in 1x PBS bei RT. Anschließend wurde die Fixierlösung abgenommen und die DG mit 1x PBS gewaschen. Mit 1x PBS/1% FCS/0,1 % Triton X100 wurde für 20 min permeabilisiert. Anschließend wurde zweimal mit 1x PBS/1 % FCS für 5 min gewaschen. Um unspezifische Antikörperreaktionen zu vermindern, wurde für ein Minimum von 30 min mit 1x PBS/ 3 % BSA/ 1 % FCS/ 0,1 % Tween20 (Blocking-Lösung) geblockt. Die DG wurden bis zur Färbung bei 4 °C gelagert.

Das Ansetzen des Primärantikörpers erfolgte in Blocking-Lösung. Für die AK-Reaktion wurden einzelne DG auf Parafilm in einer feuchten Kammer mit der Zellseite nach oben platziert. Die DG wurden mit 30 μ l Primär-AK-Lösung überschichtet. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT oder Ü/N bei 4 °C. Die Verdünnung der in der IFM eingesetzten Primär-AK sind in Tabelle 40 aufgeführt.

Tabelle 40: Primärantikörper für IFM

Name Antikörper	Anbieter	Bestellnummer	Wirt Klonalität	Eingesetzte Verdünnung IFM
GFP	Roche	11814460001	Mouse mono	1:800
Mus81	SantaCruz	Sc-53382	Mouse mono	1:200
pRPA	Abcam	Ab109394	Rabbit mono	1:10.000
Rad51	Abcam	Ab63801	Rabbit poly	1:10.000
Rad51	Abcam	Ab213	Mouse mono	1:1000
Rad52 F-7	SantaCruz	Sc-365341	Mouse mono	1:1000
Rad54 D-18	SantaCruz	Sc-5849	Goat poly	1:400
PCNA	SantaCruz	Sc-56	Mouse mono	1:2000
RPA32	Abcam	Ab2175	Mouse mono	1:200
γ H2AX	Millipore	05-636	Mouse mono	1:1000
γ H2AX S139	Epitomics	2212-1	Rabbit mono	1:2000

Nach der Primär-AK-Inkubation wurde 3x 5 min mit 1x PBS/0,1 % Tween20 gewaschen und die EdU-Inkorporation mittels des EdU Cell Proliferation Kit 647 mit Modifikationen (siehe 3.5.1.2) nach Herstellerangaben durchgeführt. Anschließend wurde 3x5 min mit

1x PBS/1 % FCS/0,1 % Tween20 gewaschen. Der Sekundär-AK wurde in 1x PBS/1 % FCS/0,1 % Tween20 angesetzt und einzelne DG mit 50 μ l Sekundär-AK-Lösung auf Parafilm überschichtet. Die Inkubation wurde für 1 h bei RT durchgeführt. Die Verdünnung der in der IFM eingesetzten Sekundär-AK sind in Tabelle 41 aufgeführt.

Tabelle 41 Eingesetzte Sekundärantikörper für IFM

Wellenlänge Antikörper	Anbieter	Bestellnummer	Wirt	Spezifität gegen Spezies	Eingesetzte Verdünnung IFM
488	Invitrogen	A21202	donkey	mouse	1:1000
488	Invitrogen	A11008	goat	rabbit	1:1000
594	Invitrogen	A11042	chicken	goat	1:1000
594	Invitrogen	A11001	goat	mouse	1:1000
647	Invitrogen	A31634	goat	rabbit	1:1000

Anschließend wurden die fixierten Zellen 3x 5 min 1x PBS/ 0,1 % Tween20 gewaschen und mit einer 0,4 μ g/ml DAPI-Lösung in 1x PBS für 5 min inkubiert. Nach erneutem Waschen von 3x 5 min mit 1x PBS/ 0,1 % Tween20 wurden die DG einmal mit ddH₂O gewaschen und schließlich getrocknet. Die DG wurden mit 2 μ l Vectashield Mounting Medium auf Objektträger aufgebracht und mit Nagellack versiegelt.

3.5.1.2 Differenzierung der Zellzyklusphasen anhand der DAPI- und EdU-Intensität

Die DNA-Schadensantwort nach ionisierender Strahlung ist abhängig von der Zeit nach DNA-Schädigung, der Dosis und der Zellzyklusphase der zu untersuchenden Zellen. Aufgrund der verschiedenen DNA-Reparaturwege und deren unterschiedlichen Rollen während des Zellzyklus, ist es notwendig die Zellzykluspopulationen getrennt zu betrachten.

Eine erste Unterscheidung der Zellzyklusphasen ermöglicht der unterschiedliche DNA-Gehalt von G1- und G2-Zellen. Der für die IF eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff DAPI interkaliert in die DNA und führt folglich zu einer intensiveren DAPI-Färbung in S/G2-Zellen als in G1-Zellen. Eine weitere Methode ermöglicht die Identifizierung von Zellen, welche sich zum Zeitpunkt der Behandlung in S-Phase befinden. Die Inkorporation des Thymidin-Analogons 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) und die bei der IF-Färbung durchgeführte EdU-Detektion durch eine Click-It-Reaktion ermöglicht eine Identifikation und sofern gewünscht den Ausschluss EdU-positiver und somit während der Behandlung in S-Phase befindlicher Zellen (siehe Punkt 3.2.12). Somit kann eine Population von Zellen selektiert werden, welche sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in G2-Phase befand und nach der gegebenen Inkubationszeit

noch in G2 verweilt. Das Scannen der gefärbten Zellen erfolgte mit einem 10x Objektiv (siehe Tabelle 8) mithilfe des motorisierten Mikroskops Axioplan Z2 (Zeiss) und der Steuerungs- und Auswertungssoftware Metacyte-Metafer4.

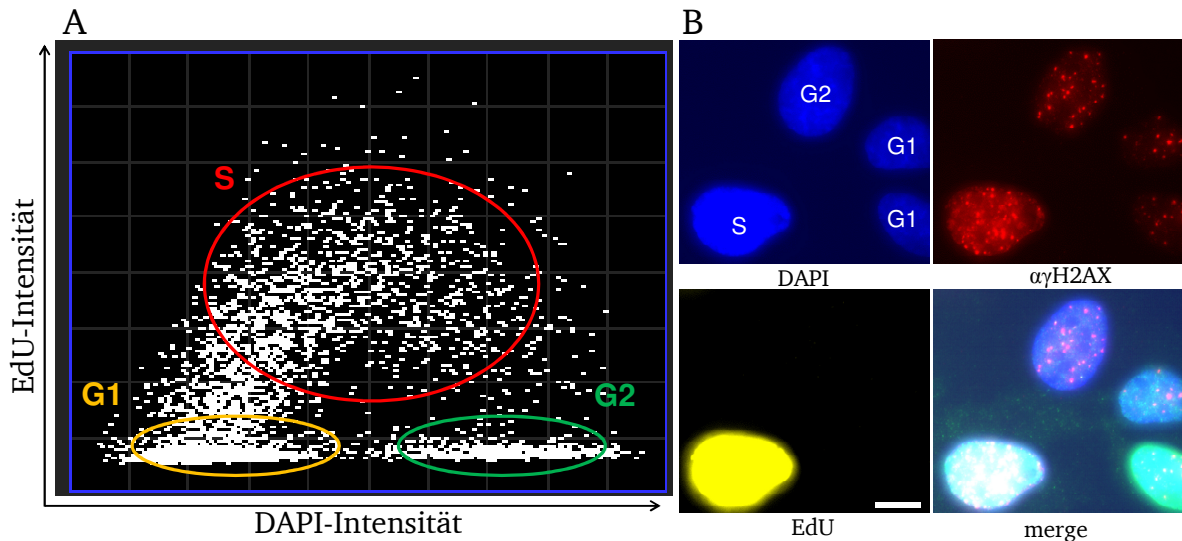


Abbildung 7: (A) Repräsentativer Dot-Plot. Nach dem Einscannen und der Messung der DAPI- und der EdU-Intensität werden die Werte der Einzelzellen in einem Dot-Plot aufgetragen. Ein Punkt entspricht hierbei einer Zelle der Zellpopulation. Es lassen sich drei Subpopulationen identifizieren. G1-Phase: Zellen ohne inkorporiertes EdU und einfachem DAPI-Gehalt. S-Phase: Zellen mit inkorporiertem EdU und einfachem bis doppeltem DAPI-Gehalt. G2-Phase: Zellen ohne inkorporiertes EdU und doppeltem DAPI-Gehalt. (B) Darstellung von für die Scanning-Funktion von Metacyte-Metafer 4 gefärbten Zellen. Mittels des DAPI-Signals ermittelt die Software den DNA-Gehalt der Zellen. Durch Detektion der EdU-Inkorporation können S-Phase-Zellen diskriminiert werden.

Die Software-basierte Erkennung von einzelnen Zellkernen aufgrund der DAPI-Färbung ermöglicht eine zellspezifische Messung der EdU-Färbung. Die Kombination der zwei Signalintensitäten ermöglicht eine Auftragung der DAPI-Konzentration gegen die EdU-Konzentration in einem Dot-Plot (siehe Abbildung 7). Für G2-Phase-spezifische DNA-Reparaturkinetiken wurden von den als G2-Phase identifizierten Zellen mit einem CP-Achromat 100x Objektiv Stapelaufnahmen angefertigt (12 Ebenen, 0,5 μm Abstand) und mithilfe von Metacyte-Metafer4 zu einer Maximum-Intensitäts-Projektion (MIP) verrechnet. Nach Export der MIPs wurden die erhaltenen Bilder unter Zuhilfenahme der Bildanalyse-Software ImageJ (Schneider et al. 2012) manuell ausgewertet. Pro Experiment wurden mindestens 30 Zellen je Zeitpunkt der Fixierung nach Bestrahlung ausgewertet.

3.5.2 Live Cell Imaging

Neben der bereits in Punkt 3.5.1.2 beschriebenen Methode zur Analyse des Reparaturverhaltens nach Bestrahlung innerhalb einer Zellzykluspopulation, besteht auch die Möglichkeit der Untersuchung der DNA-Schadensantwort auf Einzelzellebene. Um einzelne lebende Zellen über einen bestimmten Zeitraum zu beobachten, wurden *Time-Lapse*-Aufnahmen angefertigt. Für die durchgeführten Lebendzellversuche wurde mit L-Glutamin supplementiertes DMEM-Flüssigmedium ohne Phenolrot (DMEM^{PR}) verwendet. Pro Versuchsbedingung wurden Zellen in je einen Kanal eines Ibidi μ -Slide VI^{0.4} (Ibidi) Mehrkanal-Objektträgers ausgesät. Hierzu wurden 30 μ l einer Verdünnung der trypsinierten Zellen (300.000/ml für 2 Tage, 150.000/ml für 3 Tage) in einen Ibidi-Kanal gegeben. Nach dem Adhärenzieren der Zellen auf der Oberfläche des Kunststoffs (30-60 min) wurden die Reservoirs mit je 60 μ l DMEM^{PR}/10 % FCS/1 % NEAA aufgefüllt. Zum Schutz vor Austrocknung wurde jedes Reservoir mit 15 μ l Silikonöl überschichtet. Das Silikonöl wie auch der Boden des Ibidi μ -Slides sind gaspermeabel und ermöglichen somit die ausreichende Permeation des Mediums mit dem 5 % CO₂-Gasgemisch. Die Begasung erfolgte mithilfe eines CO₂-Controllers (Pecon) in einem auf 37 °C aufgeheizten Mikroskop-Inkubator (Inkubator und Heizung hergestellt durch Werkstatt FB Biologie, TU Darmstadt). Die Planung und Realisation des LCI-Mikroskops auf Basis eines Observer D1-Stativs (Zeiss) wurde von Dr. Eik Schumann durchgeführt.

Die Steuerung des Mikroskops erfolgte durch die Mikroskopie-Software μ Manager (Edelstein et al. 2010). Diese ermöglichte eine *multidimensional acquisition*, d.h. wiederholtes Relokieren zuvor festgelegter Positionen, eine Autofokussierung und die Aufnahme von z-Bilderstapeln in mehreren Farbkanälen. Bei einem Versuch mit z.B. 4 Ibidi-Kanälen wurden 2x 30 Positionen den bestrahlten und 2x 20 Positionen den unbestrahlten Proben zugewiesen. Die wiederholte Bildaufnahme erfolgte mit einer Zyklusdauer von 30 min bei einer maximalen Gesamtdauer von bis zu 16 h (32 Zyklen).

Da lebende adhärenz Zelle eine gewisse Mobilität aufweisen, eine Korrektur der Positionslisten während eines Experiment jedoch nicht möglich war, war ein ausreichend großes Bildfeld wichtig, um die Zellen über mehrere Stunden verfolgen zu können. Daher wurde für die Lebendzellmikroskopie ein Plan-Apochromat 63x Objektiv (Zeiss) mit Phasenkontrast eingesetzt, da es dieselbe Auflösung bei größerem Bildfeld im Vergleich zu einem Plan-Apochromat 100x Objektiv (Zeiss) liefert. Als Durchlichtquelle diente eine Weißlicht-LED vom Typ KSL 70 (Rapp Optoelectronic) in Verbindung mit einer Phasenkontrast-Blende. Der Phasenkontrast diente der Autofokussierung (Festlegung der

Schärfeebene) mithilfe des JAF (H&P)-Algorithmus von μ Manager. Die Weißlicht-LED wurde mit einer Intensität von 130 und einer Belichtungszeit von 6 ms betrieben. Die fluoreszierenden Proteine wurden durch eine HXP 120 Quecksilber-Kurzbogenlampe (Zeiss) in Kombination mit für die Fluorophore typischen Filtersets FITC/ Alexa 488/ GFP und Texas Red/ Alexa 594/ dsRed (Semrock) angeregt und die Emission durch eine CCD-Kamera (ABS Jena) detektiert. Die Kamera wurde zugunsten einer höheren Lichtausbeute auf den Binning-Modus 2 und Gain 14 eingestellt. Die Quecksilber-Kurzbogenlampe wurde bei einer Intensität von 1/4 mit zugeschaltetem 25 % Reduktionsfilter betrieben. Die Belichtungszeiten betragen für GFP 150 ms und für dsRed 200 ms. Es wurden z-Stapel mit einer Ausdehnung von $-1,5 \mu\text{m}$ bis $3,0 \mu\text{m}$ relativ zur Schärfeebene mit 10 Einzelbildern ($0,5 \mu\text{m}$ Abstand) angefertigt. Die Auswertung der Time-Lapse-Aufnahmen erfolgte mithilfe der μ Manager-Software in den Einzelebenen.

4 Ergebnisse

In früheren Arbeiten wurde beobachtet, dass Zellen trotz einer profizienten Checkpoint-Induktion, nach Bestrahlung in der G2-Phase, verfrüht mit unreparierten DSBs in die Mitose eintreten. Aufgrund der Beobachtung, dass zu Zeiten der G2/M-Transition noch DSBs über den Weg der HR repariert werden, wurde zu Beginn dieser Arbeit angenommen, dass G2-bestrahlte Zellen mit HR-Intermediaten in die Mitose eintreten.

Im ersten Teil der Arbeit wurden Plasmide hergestellt, welche verschiedene Fluorochromgekoppelte, Foci-bildende DNA-Reparatur- und DSB-Marker kodieren. Diese Konstrukte wurden für die Herstellung von stabil transfizierten Zelllinien eingesetzt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden diese Zelllinien verwendet, um DNA-Reparaturprozesse nach IR in der G2-Phase in fixierten und in lebenden Zellen zu untersuchen. Darüber hinaus sollte untersucht werden, welche Schadensstrukturen aufgrund der G2/M-Checkpoint-Insensitivität in die Mitose transferiert werden.

4.1 Herstellung von DNA-Konstrukten und darauf basierender einfach transfizierter Zelllinien

Ein Ziel der Arbeit war es Zelllinien herzustellen, welche Fluorochrom-gekoppelte DNA-Reparaturproteine exprimieren, so dass DNA-Reparaturprozesse mithilfe der Lebendzellmikroskopie untersucht werden können. Allgemeine DSB-Marker wie das 53BP1-GFP und MDC1-GFP (bezogen von Prof. Claudia Lukas, Kopenhagen) waren in der Arbeitsgruppe bereits vorhanden und wurden schon in früheren Arbeiten für DNA-Reparaturanalysen in lebenden Zellen eingesetzt (Dissertation Barbara Koch, 2010; Eik Schumann, 2011). Um einen besseren Einblick in den Beitrag der beteiligten DNA-Reparaturwege zu erhalten, sollten speziell Marker für die HR etabliert werden. Hierfür wurden genspezifische cDNAs aus 82-6 hTERT-Zellen isoliert und DNA-Konstrukte erstellt, welche die Expression eines fluoreszierenden Fusionsproteins in humanen Zellen ermöglichen. Teilweise wurden DNA-Konstrukte aus anderen Quellen bezogen bzw. waren bereits in der Arbeitsgruppe vorhanden (siehe Tabelle 29) und wurden für Subklonierungen eingesetzt. Eine Liste der erzeugten Expressionsvektoren ist in Tabelle 42 dargestellt.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Herstellung der mit DNA-Reparaturprozessen assoziierten Faktoren Rad51, Rad52, Rad54, RPA32, Mus81 und Gen1 erläutert. Zur Validierung der Konstrukte wurden diese sequenziert und anhand *online* verfügbarer Datenbanken (NCBI GenBank; UniProt) auf das Auftreten von wildtypischen Isoformen oder Polymorphismen überprüft. Die Funktionalität wurde durch Analyse der subzellulären

Lokalisation und der Ausbildung von Strahlen- bzw. chemisch-induzierten Foci untersucht. Vektoren, welche funktionelle Proteine codierten, wurden für weitere Subklonierungen eingesetzt, um diese mit verschiedenfarbig fluoreszierenden Proteinen zu kombinieren.

Tabelle 42: Erzeugte Expressionsvektoren auf Basis von G418-Resistenz vermittelnden Vektoren

Bezeichnung Datenbank AG Löbrich	Plasmidbezeichnung	Größe [bp]	Resistenz	Ursprung des Inserts
L59	pmCherry-Rad52	5964	Kan/G418	SalI/BamHI aus L60 in L139
L60	pEGFP-Rad52	5973	Kan/G418	amplifizierte cDNA SalI/BamHI in L4
L65	ptagBFP-LigaseI	7518	Kan/G418	XhoI/SacII aus L30 in L142
L67	pmCherry-Rad54	6926	Kan/G418	amplifizierte cDNA SalI/SacII in L139
L79	pEGFP-Rad51	5736	Kan/G418	amplifizierte cDNA SalI/BamHI in L4
L81	pmCherry-53BP1	10600	Kan/G418	NheI/SalI aus L139 in L16
L98	pEGFP-Mu81N	6361	Kan/G418	amplifizierte cDNA NheI/HindIII in L7
L99	pmCherry-Mus81N	6388	Kan/G418	NheI/HindIII aus L98 in L140
L106	pmCherry-MDC1	10988	Kan/G418	P116/P117 amplifizierte cDNA aus L17 SalI/SacII in L139
L152	pEGFP-hRPA32	5526	Kan/G418	amplifizierte cDNA XhoI/KpnI in L4
L153	pEGFP-Gen1-C	7438	Kan/G418	amplifizierte cDNA SalI/BamHI in L4

Kan= Kanamycin

4.1.1 hRad51

Das humane Rad51 (hRad51) gilt als das essentielle Schlüsselprotein der HR, da es für die Stranginvasion und die Homologiesuche benötigt wird. hRad51 ist im Kern lokalisiert und bildet nach IR DNA-Reparatur-Foci aus, welche resektierte, ssDNA-Bereiche markieren (Haaf et al. 1995).

Die hRad51-genspezifische cDNA (1017 bp/ 339 AS; GenBank: BAA03189.1, Yoshimura et al. 1993) wurde mit dem Primer P002 (Dissertation Barbara Koch, 2010) und dem Primer P056 amplifiziert. Die CDS wurde nach Amplifikation und Aufreinigung mittels der RE-Schnittstellen SalI und BamHI in den Vektor pEGFP-C1 (L4) einkloniert (siehe Abbildung 8A).

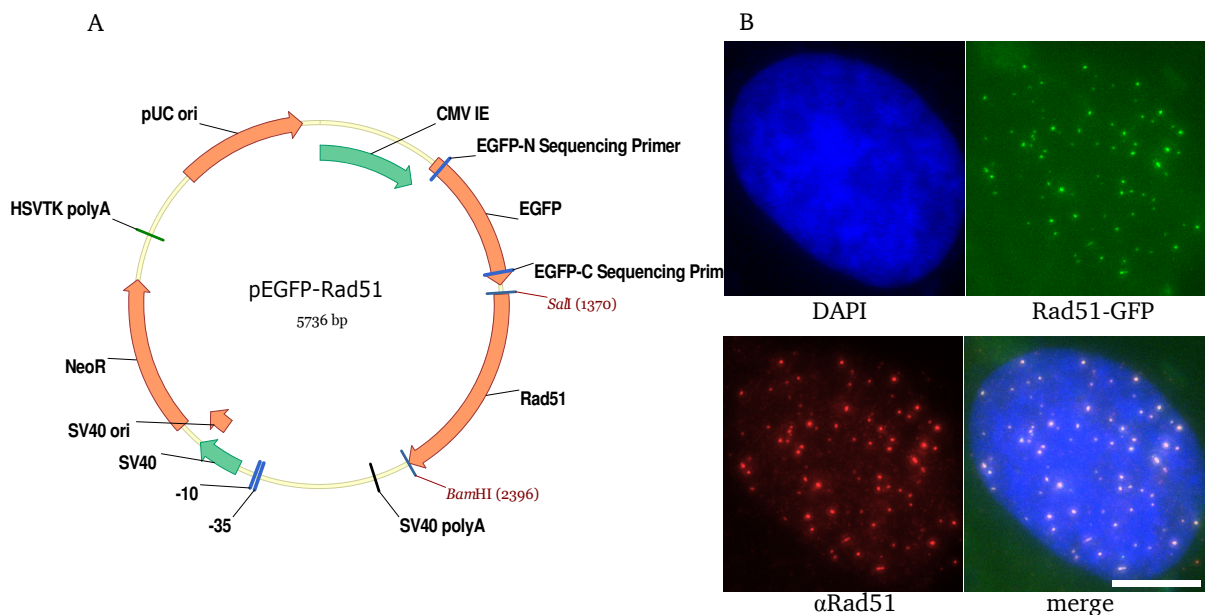


Abbildung 8: (A) Vektorkarte des DNA-Konstrukts pEGFP-Rad51 (L79) mit den verwendeten RE-Schnittstellen. (B) Dargestellt ist eine Zelle der stabil transfizierten Zelllinie U2OS Rad51-GFP Klon A. Die Zelle wurde 4 h nach einer Bestrahlung mit 2 Gy fixiert. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit einem AK gegen Rad51 durchgeführt. Der Maßstab entspricht 10 μm .

Durch die Sequenzierung des Inserts im Vektor pEGFP-Rad51 (L79) wurde bestätigt, dass dieses mutationsfrei ist. Um die Funktionalität des Konstruktes zu testen, wurden Zellen mit 2 Gy bestrahlt, nach 4 h fixiert und mit einem AK gegen ein Rad51-Epitop gefärbt. (siehe Abbildung 8B). Das erstellte Konstrukt L79 zeigte bei transients Transfektion eine Fluoreszenz im Kern, und in bestrahlten Zellen konnten Kernfoci beobachtet werden, welche eindeutig mit dem durch den AK detektierten Epitop kolokalisierten. In Zellen mit einem hohen Expressionslevel zeigten sich jedoch auch filamentöse fluoreszierende Strukturen, sogenannte Nukleoproteinfilamente, welche auch in unbestrahlten Zellen vorzufinden waren.

Unbestrahlte überexprimierende Zellen bildeten spontane Kernfoci aus, und die Überexpression führte zudem zu einer erhöhten Sterblichkeit der Zellen. Dies ist konsistent mit früheren Beobachtungen, dass die Überexpression des essentiellen HR-Faktors zu einer zellulären Beeinträchtigung führen kann. So führt bereits eine Verdoppelung des Rad51-Proteinlevels zu spontanen Kernfoci, zur Multimerisierung von Rad51 und der Ausbildung linearer Strukturen höherer Ordnung, welche nicht mit DNA-Schäden assoziiert vorliegen (Raderschall et al. 2002). Vermutlich führt eine Erhöhung der nukleären Konzentration zu einer spontanen Rekrutierung von Rad51 an ssDNA-Bereiche, was besonders in der S-Phase zu großen Problemen bei der Replikation führt (Raderschall et al. 2002).

Um eine einheitlichere Zellpopulation mit geringerem Expressionslevel zu erzeugen, wurden Zellen mit dem Selektionsantibiotikum G418 selektiert. Somit konnte die stabile transgene Zelllinie U2OS Rad51-GFP Klon A isoliert werden. Ein Großteil der Zellen besitzt ein sehr geringes Expressionslevel des Transgens, so dass der Kern nur eine sehr schwache Fluoreszenz aufweist. Trotzdem wurde neben den strahleninduzierten Foci auch ein erhöhtes Level spontaner hRad51-Foci beobachtet, was auf ein erhöhtes Schadenslevel dieser Zelllinie hindeutet. Daher wurde diese Zelllinie im Rahmen dieser Arbeit nicht für die Lebendzellmikroskopie eingesetzt. Ein Einsatz der Zelllinie für Experimente, in denen ein leicht erhöhtes spontanes Rad51-Foci-Level nicht von entscheidender Bedeutung oder sogar Teil des experimentellen Ansatzes ist, wäre möglich.

4.1.2 hRad52

Der bereits einleitend beschriebene Faktor hRad52 ist eng mit DNA-Reparaturprozessen wie dem SSA und der HR verknüpft. Er ist jedoch im Gegensatz zu hRad51 kein essentieller Faktor der HR, so dass eine Überexpression einen geringen Einfluss auf die Vitalität der Zelle hat. hRad52 wurde bereits in vorherigen Arbeiten als Lebendzellmarker für HR-Prozesse beschrieben (Rijkers et al. 1998; van Veelen, Lieneke R et al. 2005; Karanam et al. 2012).

Die hRad52-genspezifische cDNA (1254 bp, 418 AS; GenBank: AAA85793, Shen et al. 1995) wurde mit den Primern P044 und P057 amplifiziert. Die CDS wurde nach Amplifikation mittels der RE-Schnittstellen Sall und BamHI in den Vektor pEGFP-C1 (L4) inkloniert (siehe Abbildung 9A). Durch die Sequenzierung des Inserts im Vektor pEGFP-Rad52 (L60) wurde bestätigt, dass dieses mutationsfrei ist. In Folge einer transienten Transfektion von U2OS-Zellen zeigte das Fusionsprotein die erwartete Kernlokalisation (siehe Abbildung 9B).

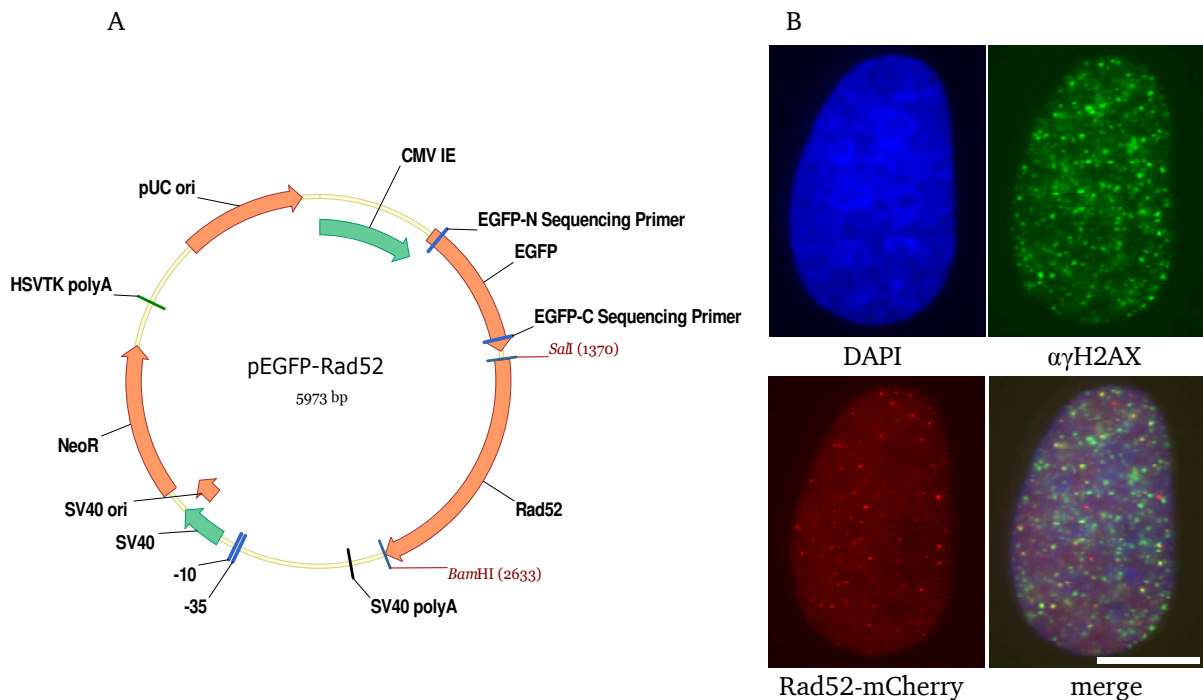


Abbildung 9: (A) Vektorkarte des DNA-Konstrukts pEGFP-Rad52 (L60) mit den verwendeten RE-Schnittstellen. (B) Mit dem Konstrukt pmCherry-Rad52 (L59) transient transfizierte U2OS-Zelle in S/G2-Phase, fixiert nach 24 h-Behandlung mit 0,5 mM HU. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mit einem AK gegen γ H2AX. Der Maßstab entspricht 10 μ m.

Die Funktionalität des transgenen Proteins wurde zunächst durch eine 24 h-Behandlung mit HU ausgetestet. Die durch das HU induzierte Depletion des Nukleotidpools führt zu Replikationsstress und erzeugt somit ein Substrat an das hRad52 binden kann (Petermann et al. 2010). Wie erwartet zeigten mit HU behandelte Zellen eine Vielzahl von hRad52-Foci, welche zudem in hohem Maße mit γ H2AX kolokalisierten (siehe Abbildung 9B). Da für die Färbung von Kernfoci kein funktioneller anti-Rad52-AK kommerziell erhältlich war, wurde keine Gegenfärbung gegen endogenes hRad52 durchgeführt. Aus selbigem Grund wurden für spätere Reparaturstudien stabil transfizierte Zelllinien verwendet. Die Liste von auf Basis der Rad52-Plasmide erzeugten Zelllinien sind in Tabelle 43 zu finden.

hRad54

Rad54 ist ein zentraler Bestandteil der HR in eukaryotischen Zellen. Durch die Interaktion mit Rad51 stimuliert es die Stranginvasion und durch das Entfernen von Rad51 am distalen 3'-OH-Ende die DNA-Synthese. Das Motorprotein kann sich unter ATP-Hydrolyse auf doppelsträngiger DNA fortbewegen, Proteine von der DNA verdrängen und durch Bindung an HJs die *Branch migration* vorantreiben (Mazin et al. 2010).

Die hRad54-genspezifische cDNA (2241 bp, 746 AS; GenBank: CAA66379.1, Kanaar et al. 1996) wurde mit den Primern P026 und P062 amplifiziert und über die Schnittstellen Sall und SacII in den Vektor pmCherry-C1 (L139) inkloniert (siehe Abbildung 10A). Die Sequenzierung des Inserts im Vektor pmCherry-Rad54 (L67) zeigte, dass die klonierte Sequenz von der ursprünglich durch Kanaar et al. (1996) veröffentlichten Sequenz abweicht, was zu einem AS-Austausch führt (H738R). Dieser Sequenzkonflikt beruht auf einem möglichen Sequenzierfehler der ursprünglichen Sequenz (Quelle: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q92698>) und war bereits als solcher ausgewiesen. Dieser Austausch sollte keinen Einfluss auf die Funktion haben und wurde folglich ignoriert.

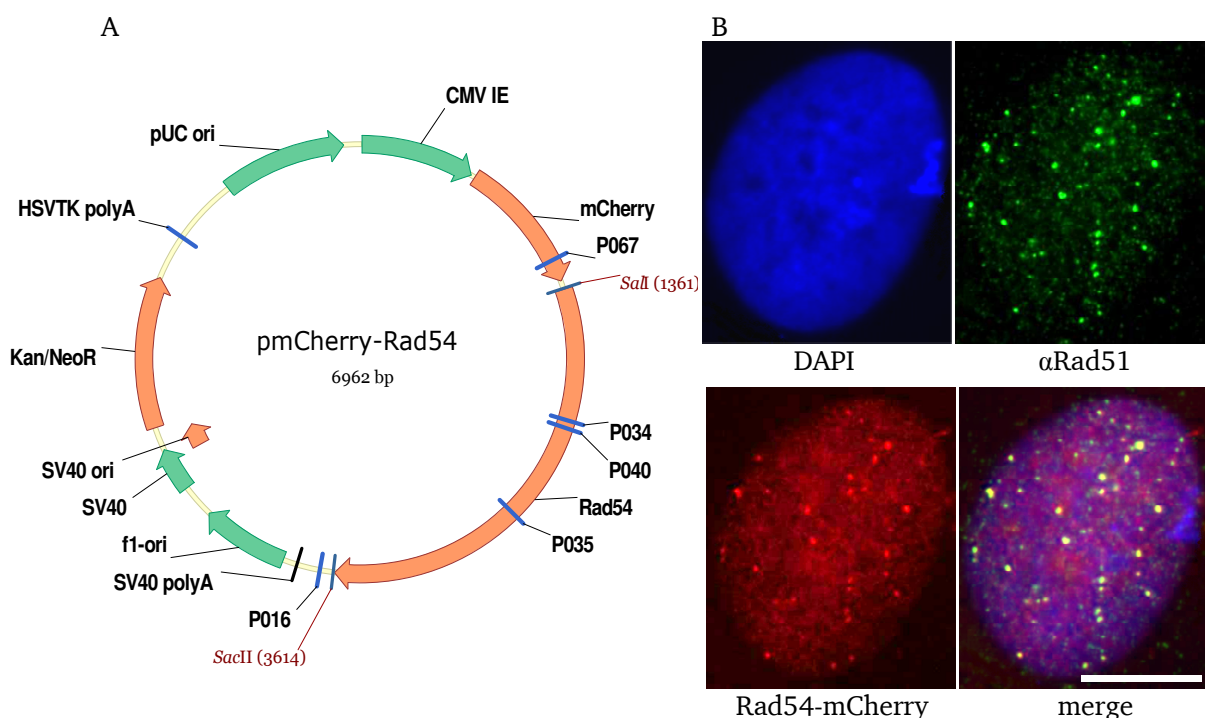


Abbildung 10: (A) Vektorkarte des DNA-Konstrukts pmCherry-Rad54 (L67) mit den verwendeten RE-Schnittstellen. (B) Mit dem Konstrukt transient transfizierte U2OS-Zelle in S/G2-Phase. Es wurde nach 4 h Bestrahlung mit 2 Gy fixiert. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mit einem anti-Rad51-AK. Der Maßstab entspricht 10 µm.

Um die Funktionalität des Fusionsproteins zu testen, wurden bestrahlte Zellen fixiert und die Kollokalisierung zwischen einem Rad51-AK und transient transfiziertem Rad54-mCherry untersucht (siehe Abbildung 10B).

Das Fusionsprotein zeigte eine Lokalisation im Kern. Nach Bestrahlung bildete das Rad54-mCherry Foci aus, welche mit Rad51 kollokalisieren. Das Konstrukt wurde daher als funktionell eingestuft. Da zeitgleich mit der Erstellung des Konstrukts eine grüne Variante des fluoreszenzmarkierten Rad54 (L63) verfügbar wurde (bezogen von Roland Kanaar, Rotterdam), basieren die in Folge erstellten Rad54-Konstrukte bzw. stabil transfizierten Zelllinien auf Vektoren verschiedenen Ursprungs (siehe Tabelle 44, Tabelle 45). Es zeigte sich, dass stabil überexprimierende Zellen keinen abnormen Phänotyp wie im Fall von Rad51 ausbildeten. In vielen Zellen war zudem eine zyklische Regulation des Transgens zu beobachten. So nahm die Fluoreszenz in mitotischen Zellen stark ab, um vermutlich in der späteren G1-Phase wieder anzusteigen. Dies stimmt mit Berichten über die Regulation des hRad54 überein. Aufgrund der posttranslationalen Steuerung des zellulären Proteinlevels ist es daher möglich, hRad54 ohne offensichtliche Beeinträchtigungen in den Zellen zur Überexpression zu bringen (Mazin et al. 2010).

4.1.3 hRPA32

Die als hRPA32 bezeichnete mittlere Untereinheit des RPA-Heterotrimer ist ebenso wie hRad51 ein Interaktionspartner von hRad52 und liegt an ssDNA-Bereichen vor, um diese vor nukleolytischer Degradation zu schützen. Das Heterotrimer erfüllt diese Funktion während der Replikation sowie nach einer Resektion, so dass es in der G2-Phase resektierte und somit für die HR lizenzierte Bereiche markiert. Das hRPA32 ist ein essentieller Faktor bei der DSB-Reparatur und der Checkpoint-Aktivierung (Wu et al. 2005).

Die hRPA32-genspezifische cDNA (810 bp, 270 AS; GenBank: BC001630.1, Strausberg et al. 2002) wurde mit den Primern P133 und P134 amplifiziert und über die Schnittstellen XhoI und KpnI in den Vektor pEGFP-C1 (L4) inkloniert (siehe Abbildung 11A). Durch die Sequenzierung des Inserts im Vektor pEGFP-hRPA32 (L152) wurde bestätigt, dass dieses mutationsfrei ist.

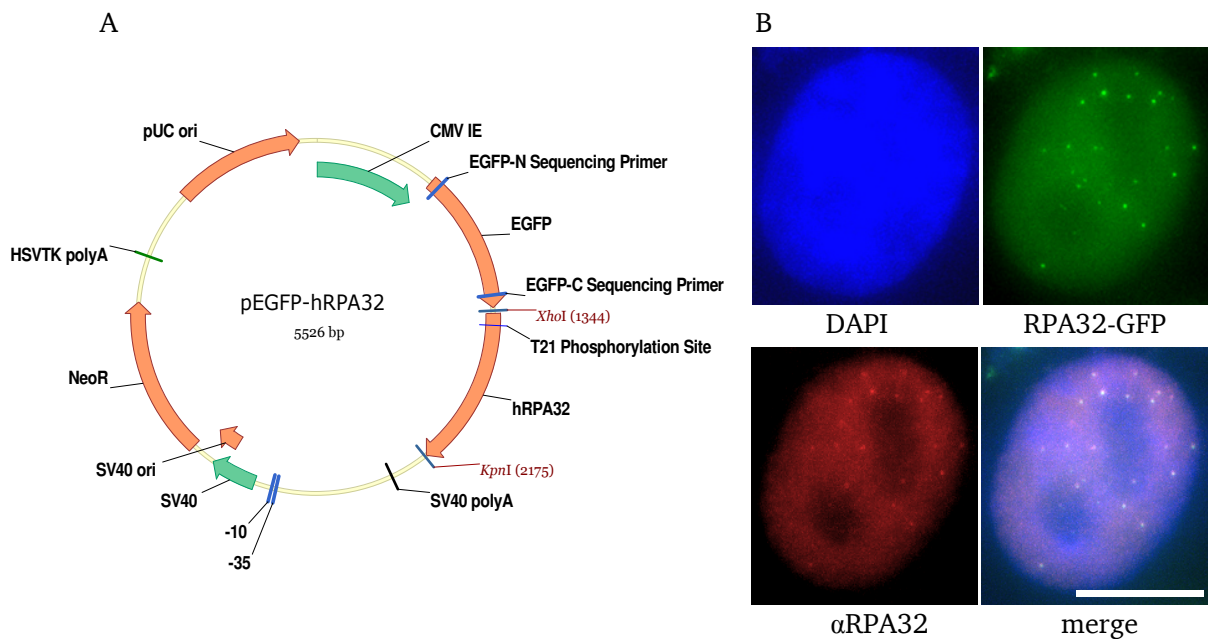


Abbildung 11: (A) Vektorkarte des DNA-Konstrukts pEGFP-hRPA32 (L152) mit den verwendeten RE-Schnittstellen. (B) Mit dem Konstrukt transient transfizierte HeLa-Zelle in S/G2-Phase. Es wurde 7 h nach Bestrahlung mit 2 Gy fixiert. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit einem anti-RPA-AK durchgeführt. Der Maßstab entspricht 10 μm .

In HeLa-Zellen transient transfiziertes RPA32-GFP war im Kern lokalisiert, bildete nach Bestrahlung Foci aus welche mit dem durch AK detektierten RPA32-Epitop kolokalisierten (siehe Abbildung 11B). Daher wurde das Konstrukt als funktionell eingestuft.

4.1.4 hMus81

Die humane *Crossover junction endonuclease* Mus81 ist eine Endonuklease mit einer Funktion bei der Auflösung von HJs, 3'-Flap-Strukturen und blockierten Replikationsgabeln (Ciccia et al. 2003). Sie ist im Cytoplasma, im Zellkern und gehäuft in den Nukleoli lokalisiert. Nukleoli befinden sich in Genomregionen mit rRNA-Gen-kodierenden Bereichen und Bereichen mit hoher transkriptioneller Aktivität. Aufgrund der hochrepetitiven Genomsequenzen in diesen Abschnitten sind diese möglicherweise anfällig für rekombinatorische Vorgänge, was das Vorkommen von Mus81 erklären könnte (Gao et al. 2003). Da Mus81 als Endonuklease bei der Auflösung von DNA-Reparaturintermediaten beteiligt ist, sollte dieser Faktor als Marker für späte Schritte der HR für die Lebendzellmikroskopie etabliert werden. Die Mus81-genspezifische cDNA (1653 bp/ 551 AS; GenBank: AF425646.1, Chen et al. 2001) wurde mit den Primern P110 und P111 amplifiziert und mittels der RE-Schnittstellen NheI und HindIII in den Vektor pEGFP-C1 (L4) inkloniert (siehe Abbildung 12A).

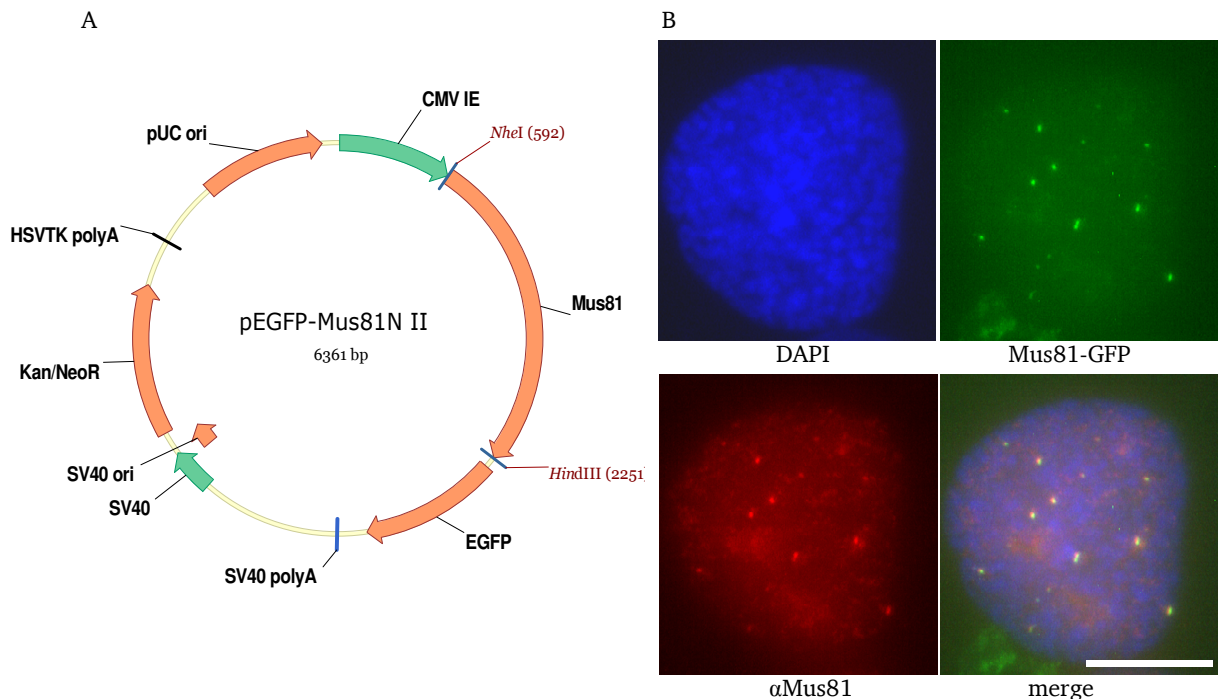


Abbildung 12: (A) Vektorkarte des DNA-Konstrukts pEGFP-Mus81 (L98) mit den verwendeten RE-Schnittstellen. (B) Stabil transfizierte Zelllinie U2OS Mus81-GFP Klon 2. Dargestellt ist eine mitotische Zelle (Prophase), fixiert 7 h nach 2 Gy Bestrahlung. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mit einem anti-Mus81-AK. Der Maßstab entspricht 10 μm .

Die Sequenzierung des Inserts des Vektors pEGFP-Mus81 (L98) zeigte zwei Abweichungen von der durch Chen et al. (2001) veröffentlichten Sequenz, welche zu zwei AS-Substitutionen führen (R37H, R350W). Bei diesen AS-Substitutionen handelt es sich nach Angabe der Datenbank UniProt (Quelle: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q96NY9>) um natürlich vorkommende Polymorphismen. Da mit den hergestellten Mus81-Konstrukten Lebendzellmikroskopie-Experimente durchgeführt werden sollten, wurden mit dem Selektionsantibiotikum G418 stabil exprimierende Zelllinien selektiert. Die stabil transfizierten Zellen zeigten jedoch gegenüber WT-Zellen ein eingeschränktes Wachstum. Daher wurden diese Zelllinien nicht für die Lebendzellmikroskopie eingesetzt, sondern dienten der Etablierung von anti-Mus81-AKs für die IF (siehe Abbildung 12B). Die Liste von auf Basis der Mus81-Plasmide erzeugten Zelllinien sind in Kapitel 4.1.6 zu finden. Möglicherweise könnten zukünftig Zelllinien mit geringeren Fusionsprotein-Expressionslevels und weniger beeinträchtigten Zellwachstum etabliert und für die Lebendzellmikroskopie verwendet werden.

4.1.5 Gen1

Aufgrund seiner beschriebenen Endonukleasefunktion bei der Auflösung von HJ-Strukturen sollte der Faktor Gen1 als Marker für späte HR-Schritte etabliert werden. Als klassische HJ-Resolvase induziert Gen1 an einer dHJ zwei perfekt symmetrische Schnitte, was je nach Orientierung der Schnitte, entweder zu einem Crossover- oder Non-Crossover-Produkt führt. Die Gen1-genspezifische cDNA (2724bp/ 908 AS; GenBank: AAI17205.1, Strausberg et al. 2002) wurde mithilfe der Primer P130 und P131 amplifiziert und mittels der RE-Schnittstellen SalI und BamHI in den Vektor pEGFP-C1 (L4) inkloniert (siehe Abbildung 13A).

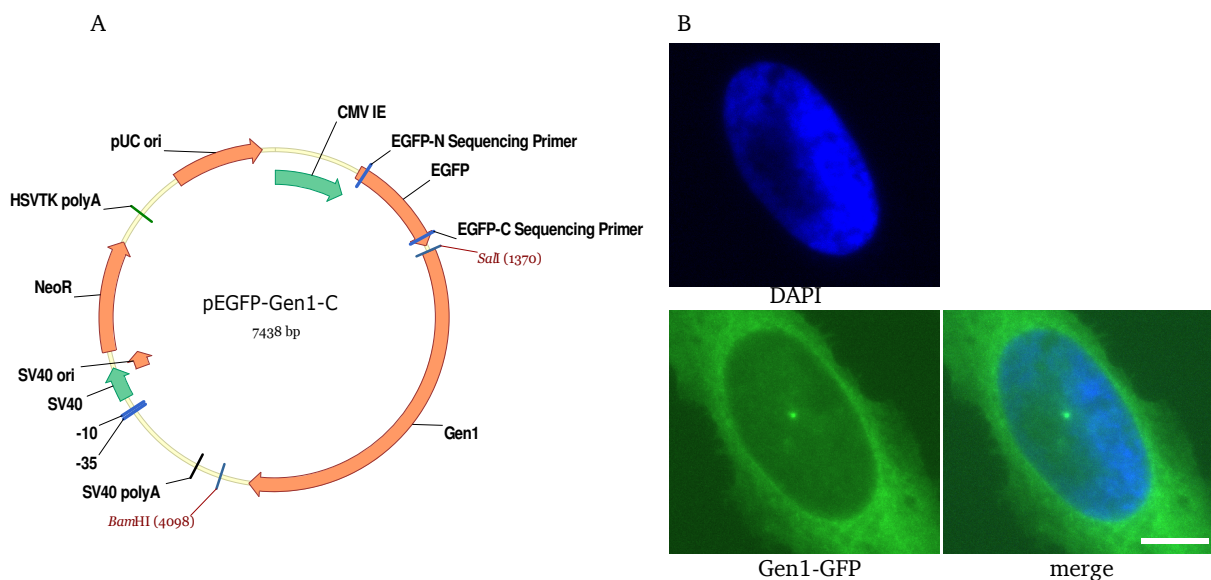


Abbildung 13: (A) Vektorkarte des DNA-Konstrukts pEGFP-Gen1 (L153) mit den verwendeten RE-Schnittstellen. (B) Transient transfizierte U2OS-Zelle in Interphase; der Maßstab entspricht 10 μ m.

Zwei unabhängig voneinander durchgeführte cDNA-Isolationen (je drei sequenzierte Klone) führten zu Plasmiden, welche alle identische Variationen zu der durch Strausberg et al. (2002) beschriebenen Sequenz aufwiesen. Somit kann angenommen werden, dass es sich hierbei um eine für die Zelllinie 82-6 hTERT spezifische Isoform des Gen1 handelt. Bei dieser putativen Isoform wird durch eine Deletion von 5 bp ein verfrühtes Stopp-Codon an der Deletionsstelle eingeführt. Sie besitzt somit einen verkürzten C-Terminus und ist nur 839 AS lang. Zudem finden sich in dem sequenzierten Bereich (kodierender Bereich für AS 1-270, 577-839) der verkürzten Variante verschiedene Punktmutationen, welche zu AS-Substitutionen führen (S92T, T680I, K839E). Bei der AS-Substitution an Position 92 und 680 handelt es sich nach Angabe der Datenbank UniProt (Quelle:

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q17RS7>) um natürlich vorkommende Polymorphismen. Der Austausch an Position 839 wird durch die 5 bp-Deletion und die dadurch entstehende Leserasterverschiebung des letzten Triplets verursacht. Der verkürzte C-Terminus hat vermutlich keine Auswirkung auf die Nukleaseaktivität von Gen1, da sich die hierfür essentiellen AS-Reste im N-Terminus befinden (E134/E136/E157). Für eine nukleolytische Aktivität des verkürzten Proteins spricht zudem das Vorhandensein des intakten, hochkonservierten Zentrosom-Lokalisationssignals im N-Terminus (AS 128-148). Dieses führt dazu, dass Gen1 in Interphase-Zellen am Zentrosom lokalisiert ist (Gao et al. 2012). Auch wenn nach transienter Transfektion der Zellen das Fluoreszenzsignal erwartungsgemäß im Kern detektiert wurde (siehe Abbildung 13B), konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden, ob das Fusionsprotein seine Funktion behalten hat und ob die Funktion dieser Isoform in den 82-6 hTERT-Zellen erhalten geblieben ist. Daher wurde mit dem vorhandenen Vektor nicht weiter gearbeitet. Sollte sich herausstellen, dass es sich um eine funktionelle Isoform handelt, könnte das Konstrukt bei der weiteren Aufklärung der Gen1-Funktion eingesetzt werden. Alternativ könnte die auf dem Vektor fehlende 5 bp-Sequenz mithilfe einer Mutagenese-PCR eingefügt und somit die Vollängensequenz wieder hergestellt werden. Weiter könnte auch die cDNA aus einer anderen Zelllinie isoliert und das Plasmid für das Gen1-Fusionsprotein erneut kloniert werden.

4.1.6 Herstellung einfach transfizierter Zelllinien

Die in Tabelle 42 aufgelisteten erzeugten DNA-Konstrukte enthielten ein selektierbares Markergen in Form einer Resistenz gegen das Selektionsantibiotikum G418/Neomycin. Auf Basis dieser Resistenz wurden nach einer Transfektion stabil exprimierende Zellen selektiert (siehe Punkt 3.2.6). Für die Herstellung der meisten Zelllinien wurden U2OS-Zellen verwendet. Dies ist eine Standardzelllinie, welche aufgrund ihrer flachen Morphologie und der geringen Migration gut für die Lebendzellmikroskopie geeignet ist und auch schon in früheren Arbeiten Verwendung fand (Dissertation Eik Schumann, 2011). Um zelltypspezifische Phänomene ausschließen zu können, wurden für die Herstellung von Zelllinien außerdem HeLa-Zellen verwendet. Die erzeugten Zelllinien sind in Tabelle 43 aufgelistet.

Tabelle 43: Erzeugte transgene Zelllinien auf Basis der G418/Neomycin-Resistenz-vermittelnden Vektoren

Bezeichnung Datenbank AG Löbrich	Transfizierter Vektor	Resistenz	Ursprüngliche Zelllinie
HeLa Rad52GFP Klon A	L60	G418	HeLa S3
HeLa Rad52GFP Klon B	L60	G418	HeLa S3
HeLa Rad52GFP Klon C	L60	G418	HeLa S3
U2OS mCherry-53BP1 Klon A	L81	G418	U2OS
U2OS mCherry-53BP1 Klon B	L81	G418	U2OS
U2OS mCherry-53BP1 Klon C	L81	G418	U2OS
U2OS Mus81-GFP Klon 2	L98	G418	U2OS
U2OS Rad51-GFP Klon A	L79	G418	U2OS
U2OS Rad52GFP	L60	G418	U2OS
U2OS Rad52GFP Klon X2	L60	G418	U2OS
U2OS Rad52GFP Klon X3	L60	G418	U2OS
U2OS Rad52GFP Klon X4	L60	G418	U2OS
U2OS Rad52GFP Klon X6	L60	G418	U2OS
U2OS Rad52-GFP Klon 1	L60	G418	U2OS
U2OS Rad54-GFP Klon A	L63	G418	U2OS
U2OS Rad54-GFP Klon C	L63	G418	U2OS
U2OS Rad54-GFP Klon D	L63	G418	U2OS
U2OS Rad54-GFP Klon E	L63	G418	U2OS
U2OS Rad54-GFP Klon F	L63	G418	U2OS
U2OS tagBFP-LigaseI	L65	G418	U2OS

G418: HeLa 800 $\mu\text{g/ml}$, U2OS 400 $\mu\text{g/ml}$

4.2 Herstellung doppelt transfizierter Zelllinien

Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, die simultane Analyse von Zellzyklusphase und DSB-Reparatur in lebenden Zellen mittels LCI zu ermöglichen. Hierbei hatte sich gezeigt, dass die transiente Transfektion mit zwei verschiedenen fluoreszenzgekoppelten Faktoren nur eine geringe Ausbeute von doppelt transfizierten Zellen lieferte. Zudem variierten die Expressionslevel zwischen den Zellen sehr stark, wodurch keine konstanten Versuchsbedingungen gewährleistet waren. Zur Erhöhung der Ausbeute doppelt transfizierter Zellen mit vergleichbaren Expressionniveaus wurde die Erzeugung mehrfach transgener Zelllinien angestrebt. Hierzu waren zunächst, wie in den vorigen Kapiteln beschrieben, einfach stabil transfizierte Zelllinien auf Basis eines G418/Neomycin-Resistenz-vermittelnden Vektors hergestellt worden (siehe Punkt 3.2.6). Diese bildeten die Basis für die Herstellung der doppelt transfizierten Zelllinien.

Für das Erzeugen von stabil doppelt transfizierten Zellen musste ein neues Vektorsystem, welches eine weitere Selektionsantibiotikaresistenz vermittelt, etabliert werden. Das zweite GOI wurde durch Amplifikation der Expressionskassette aus einem G418-Vektor mit den Primern P079 und P080 und einer anschließenden *Cut*-Ligation in den Vektor pTK-Hyg eingefügt (siehe Abbildung 14).

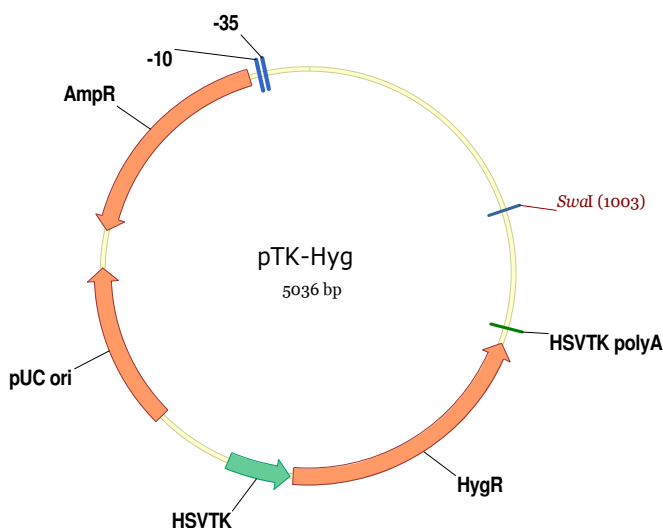


Abbildung 14: Vektorkarte des DNA-Konstrukts pTK-Hyg (L141) mit der verwendeten Schnittstelle *SwaI* als Insertionslocus für eine *Blunt-End*-amplifizierte Expressionskassette. Die Erkennungssequenz $ATTT^VAAAT$ kommt nur etwa alle 4^8 bp vor und eignet sich daher für eine *Cut*-Ligation.

Eine *Cut*-Ligation ist eine Ligrationsreaktion, welche durch Zugabe einer RE die gleichzeitige Restriktion und Ligation ermöglicht. Als RE wird ein Enzym mit einer seltenen Erkennungssequenz gewählt, in diesem Fall *SwaI*, um das Zerschneiden des Inserts zu vermeiden. Das mittels *Proofreadig*-PCR erzeugte *Blunt-End*-Amplifikat konnte somit *Blunt-End* in den Vektor pTK-Hyg einligiert werden, während der *SwaI*-Verdau in derselben

Reaktion durchgeführt wurde. Diese Strategie führt zu einer hohen Ausbeute an Insert-tragendem Vektor und verhindert gleichzeitig die Rezirkularisierung des Ziel-Vektors.

Die auf Basis des Vektors pTK-Hyg (L141) erstellen DNA-Konstrukte wurden sequenziert und somit bestätigt, dass diese frei von Mutationen sind. Die Expression und die Funktionalität der Fusionsproteine wurden zudem durch eine transiente Transfektion, wie bereits in den vorigen Kapiteln beschrieben, verifiziert.

Die durch Cut-Ligation erzeugten, Hygromycinresistenz-vermittelnden Vektoren sind in Tabelle 44 aufgeführt.

Tabelle 44: Erzeugte Expressionsvektoren auf Basis des Vektors pTK-Hyg (L141)

Bezeichnung Datenbank AG Löbrich	Plasmidbezeichnung	Größe [bp]	Resistenz	Ursprung der durch Cut-Ligation eingefügten Expressionskassette
L71	pTK-HygmCherry-Rad54	9103	Amp/ Hyg	L67 pmCherry-Rad54
L72	pTK-HygmCherry-C1	6854	Amp/ Hyg	L139 mCherry-C1
L73	pTK-HygmCherry-Rad52	8096	Amp/ Hyg	L59 pmCherry-Rad52
L83	pTK-HygRad54-EGFP	9103	Amp/ Hyg	L76 pEGFP-Rad54 (Quelle: Dr. Olivia Barton)
L84	pTK-HygRad52-EGFP	8050	Amp/ Hyg	L60 pEGFP-Rad52
L100	pTK-HygmCherry-Mus81N	8513	Amp/ Hyg	L99 pmCherry-Mus81N
L108	pTK-Hyg-dsRedLigaseI	9448	Amp/ Hyg	L30 pdsRed-LigaseI (Quelle: Prof. Christina Cardoso)

Amp= Ampicillin, Hyg= Hygromycin

Die Hygromycinresistenz-vermittelnden Vektoren wurden schließlich eingesetzt, um bereits einfach stabil transfizierte Zellen zu transfizieren und stabile doppelt transfizierte Zelllinien zu selektieren. Die hieraus hervorgegangen Zelllinien sind in Tabelle 45 aufgelistet.

Tabelle 45: Erzeugte doppelt transgene Zelllinien

Bezeichnung Datenbank AG Löbrich	Transfizierter Resis- Vektor	Resis- tenz	Ursprüngliche Zelllinie
HeLa Rad52GFP dsRed-LigaseI Klon A	L108	Hyg	HeLa Rad52GFP Klon A
HeLa Rad52GFP dsRed-LigaseI Klon B	L108	Hyg	HeLa Rad52GFP Klon A
HeLa Rad52GFP dsRed-LigaseI Klon C	L108	Hyg	HeLa Rad52GFP Klon A
HeLa Rad52GFP dsRed-LigaseI Klon D	L108	Hyg	HeLa Rad52GFP Klon A
HeLa Rad52GFP dsRed-LigaseI Klon E	L108	Hyg	HeLa Rad52GFP Klon A
U2OS 53BP1-GFP dsRed-LigaseI Klon 1	L108	Hyg	U2OS 53BP1-GFP (Quelle: C. Lukas)
U2OS 53BP1-GFP dsRed-LigaseI Klon 2	L108	Hyg	U2OS 53BP1-GFP (Quelle: C. Lukas)
U2OS 53BP1-GFP Rad54mCherry Klon1211L71		Hyg	U2OS 53BP1-GFP (Quelle: C. Lukas)
U2OS MDC1-GFP dsRed-LigaseI Klon 1	L108	Hyg	U2OS MDC1-GFP (Quelle: C. Lukas)
U2OS MDC1-GFP dsRed-LigaseI Klon 2	L108	Hyg	U2OS MDC1-GFP (Quelle: C. Lukas)
U2OS MDC1-GFP Mus81mCherry Klon b2	L100	Hyg	U2OS MDC1-GFP (Quelle: C. Lukas)
U2OS MDC1-GFP Mus81mCherry Klon b4	L100	Hyg	U2OS MDC1-GFP (Quelle: C. Lukas)
U2OS MDC1-GFP Mus81mCherry Klon Y5	L100	Hyg	U2OS MDC1-GFP (Quelle: C. Lukas)
U2OS MDC1-GFP Mus81mCherry Klon Y6	L100	Hyg	U2OS MDC1-GFP (Quelle: C. Lukas)
U2OS MDC1-GFP Rad52mCherry (L73)	L73	Hyg	U2OS MDC1-GFP (Quelle: C. Lukas)
U2OS Rad52GFP dsRed-LigaseI Klon 1	L108	Hyg	U2OS Rad52-GFP Klon 1
U2OS Rad52GFP dsRed-LigaseI Klon C	L108	Hyg	U2OS Rad52-GFP Klon 1
U2OS Rad52GFP dsRed-LigaseI Klon D	L108	Hyg	U2OS Rad52-GFP Klon 1
U2OS Rad52GFP H2BCherry Klon X	L154	Puro	U2OS Rad52-GFP Klon 1
U2OS Rad52GFP H2BCherry Klon Y	L154	Puro	U2OS Rad52-GFP Klon 1
U2OS Rad52GFP H2BCherry Klon Z	L154	Puro	U2OS Rad52-GFP Klon 1
U2OS Rad54GFP dsRed-LigaseI Klon U	L108	Hyg	U2OS Rad54-GFP Klon F
U2OS Rad54GFP dsRed-LigaseI Klon W	L108	Hyg	U2OS Rad54-GFP Klon F
U2OS Rad54GFP dsRed-LigaseI Klon X	L108	Hyg	U2OS Rad54-GFP Klon F
U2OS Rad54GFP dsRed-LigaseI Klon Y	L108	Hyg	U2OS Rad54-GFP Klon F
U2OS Rad54GFP dsRed-LigaseI Klon Z	L108	Hyg	U2OS Rad54-GFP Klon F

Hyg=Hygromycin: 200 µg/ml; Puro=Puromycin: 0,1 µg/ml

4.3 Rad51 und Rad54 als Marker von HR-Prozessen in fixierten Zellen

In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass Zellen zu späten Zeitpunkten nach Bestrahlung trotz eines erhöhten Levels von unreparierten Brüchen in die Mitose eintreten. Aufgrund der Beobachtung, dass zu Zeiten der G2/M-Transition noch DSBs über den Weg der HR repariert werden, wurde angenommen, dass G2-bestrahlte Zellen mit HR-Intermediaten in die Mitose eintreten. Um diese Hypothese zu testen, wurden die Foci-Kinetiken verschiedener HR-Marker in der G2-Phase gemessen und anschließend das Auftreten von Foci dieser Proteine in der Mitose untersucht.

4.3.1 Messung von Rad51 und Rad54-Foci-Kinetiken nach Bestrahlung in G2

Der am besten beschriebene HR-Marker ist das Rad51. Der Schlüssel-Faktor besetzt die in Folge der Resektion entstandenen RPA-beladenen Bereiche und stellt aufgrund seiner massenhaften Rekrutierung ein ideales Substrat für eine IF-Färbung dar. Rad54 ist ein direkter Interaktionspartner von Rad51 und hat eine Rolle bei der Stranginvasion in die homologe Schwesterchromatide, sowie bei der Entfernung von Rad51 zur Initiation der Reparatursynthese.

Aufgrund der engen Zusammenarbeit der zwei Faktoren, ist in der IFM eine hohe Kolo-kalisation nach Bestrahlung in der G2-Phase, und daher eine ähnliche Rekrutierungskinetik zu erwarten. Um dies zu überprüfen, wurden U2OS-Zellen bestrahlt, fixiert und für die IFM gefärbt. Da die Foci-Kinetiken ausschließlich in der G2-Phase gemessen werden sollten, wurde lebenden U2OS-Zellen 30 min vor der Bestrahlung EdU zugegeben. Somit konnten S-Phase-Zellen durch eine Detektion der EdU-Inkorporation ausgeschlossen werden. Die Zellen wurden 15 min, 2 h, 4 h, 6 h und 8 h nach Bestrahlung mit 1 Gy fixiert und für die IFM gegen γ H2AX, Rad54 und EdU oder gegen Rad51, Rad54 und EdU gefärbt. Die Bestimmung der Foci-Werte in den G2-bestrahlten Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde wie in Kapitel 3.5.1.2 beschrieben durchgeführt.

Zusätzlich wurden mit dem 0,25 h-Zeitpunkt unbestrahlte Zellen fixiert, um das Hintergrundlevel aufgrund spontaner Foci zu bestimmen. Um die tatsächlichen strahlungsinduzierten DSBs analysieren zu können, wurden die in Kontrollzellen ermittelten spontanen Foci-Zahlen von dem Wert der bestrahlten Proben abgezogen. Die verrechneten Werte sind in den Abbildungsunterschriften der jeweilige Experimente angegeben.

Wie in Abbildung 15 dargestellt, kolo-kalisiert Rad54 wie erwartet stark (~95%) mit γ H2AX und mit Rad51. Da Rad54-Foci in der IFM kleiner ausfallen als Rad51-Foci, lassen sie sich

etwas schwerer detektieren. Um zu überprüfen, ob die Foci-Kinetik der beiden Faktoren nach Bestrahlung in G2-Phase identisch ist, wurden Foci in 40 Zellen pro Probe ausgezählt und Kinetiken erstellt (Abbildung 16).

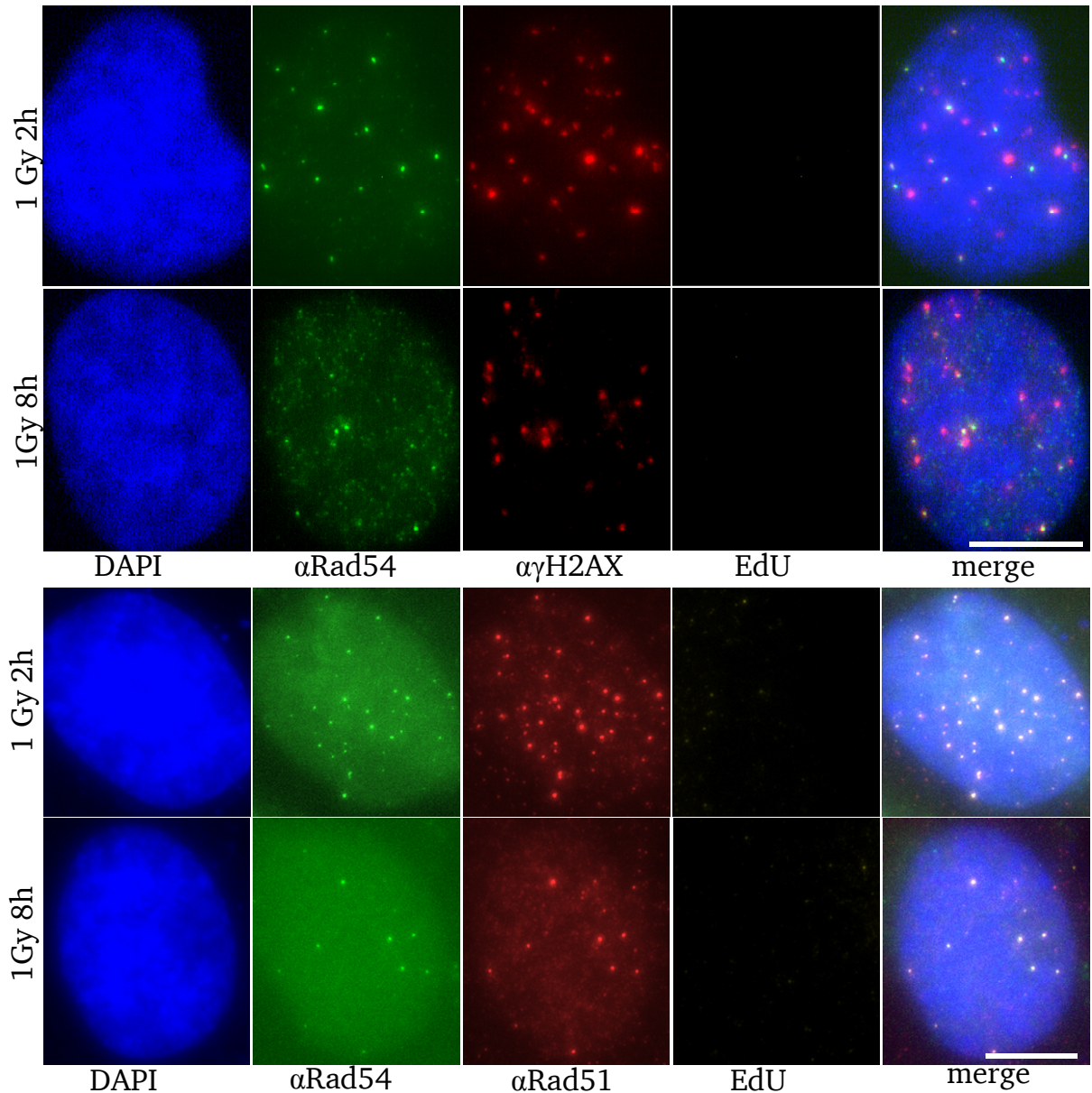


Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbung in U2OS WT-Zellen. Den Zellen wurden 30 min vor Bestrahlung EdU zugegeben. Nach Bestrahlung mit 1 Gy wurden die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert und mit Antikörpern gegen Rad54 und γ H2AX bzw. Rad54 und Rad51 gefärbt. G2-Phase-Zellen wurden mithilfe der Scanning-Funktion von Metafer 4-MetaCyte ausgewählt. Der Maßstab entspricht 10 μ m.

Nach Bestrahlung zeigt das Level der γ H2AX-Foci in U2OS WT-Zellen sein Maximum von etwa 44 Foci pro Zelle nach 0,25 h. Zwischen 0,25 h und 2 h nach Bestrahlung fallen die Foci-

Werte schnell auf etwa die Hälfte ab. Im Zeitraum von 2-8 h nach Bestrahlung fallen die γ H2AX-Foci langsamer, aber weiterhin kontinuierlich von 22 auf etwa 9 Foci pro Zelle ab. Rad51 und Rad54 besitzen identische Kinetiken, welche sich zu der von γ H2AX unterscheiden. Beide Proteine bilden 0,25 h nach Bestrahlung etwa einem Focus pro Zelle aus. Beide Proteine erreichen das Maximum der Rekrutierung bei 2 h nach Bestrahlung mit etwa 13 Foci pro Zelle. Die Foci-Werte beider Faktoren fallen von 2-8 h kontinuierlich auf etwa 5 Foci pro Zelle ab.

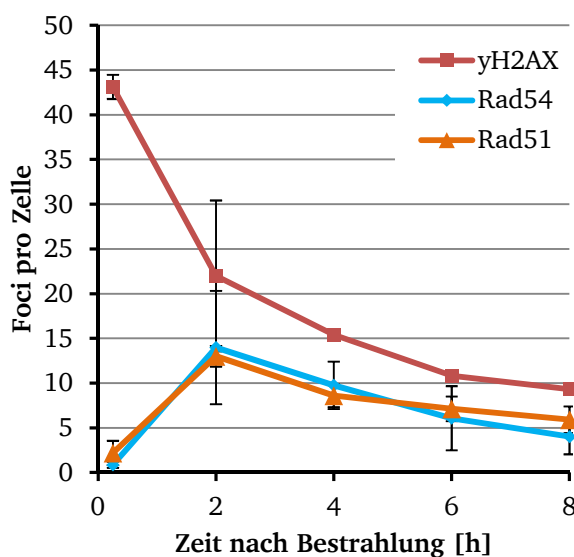


Abbildung 16: γ H2AX-, Rad54- und Rad51-Foci-Kinetiken nach Bestrahlung in der G2-Phase. Den U2OS-Zellen wurde 30 min vor Bestrahlung EdU zugegeben. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 1 Gy fixiert und gegen γ H2AX, Rad54 und Rad51 gefärbt. Die Foci wurden in G2-Phase-Zellen ausgewertet. Die γ H2AX- und Rad54-Foci-Werte entstammen zwei Experimenten und die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte aus zwei Experimente dar. Die Rad51-Foci-Werte entstammen drei Experimenten und die Fehlerbalken stellen den Standardfehler der Mittelwerte aus drei Experimenten dar. Die Foci-Werte der unbestrahlten Kontrollzellen wurden abgezogen (γ H2AX: 10,7; Rad54: 4,5; Rad51: 5,9).

Der Versuch bestätigt anhand der γ H2AX-Foci, dass die DSB-Reparatur biphasisch verläuft, wobei zunächst 2/3 der Brüche innerhalb der ersten 4 h, und verbliebene Brüche langsam in den folgenden Stunden repariert werden. Durch die Analyse der Rad51- und Rad54-Foci kann auf den Anteil der HR bei der DSB-Reparatur in der G2-Phase geschlossen werden. Beide Faktoren bilden ihr Maximum bei 2 h nach Bestrahlung aus und markieren hier die meisten über HR reparierenden DSBs. In Folge kommt es zu einem langsamen Abfall der Foci-Werte parallel mit den Werten der γ H2AX-Foci. Dies lässt darauf schließen, dass die zu späten Zeiten langsam reparierten Brüche über die HR repariert werden. Dies ist konsistent mit früheren Arbeiten (Beucher et al. 2009). Auch zu späten Zeitpunkten sind die HR-Faktoren Rad51 und Rad54 noch an DSBs nachweisbar. Da aus anderen Arbeiten bekannt ist, dass Zellen zu diesen Zeitpunkten bereits wieder in die Mitose eintreten (Deckbar et al. 2007; Dissertation Eik Schumann, 2011), liegt die Vermutung nahe, dass die Zellen mit HR-Intermediaten in die Mitose eintreten.

4.3.2 Detektion von HR-Reparaturfaktoren an DSBs in Mitose nach Bestrahlung in der G2-Phase

Nachdem gezeigt werden konnte, dass zu späten Zeiten nach IR unreparierte Brüche durch die HR-Marker Rad51 und Rad54 detektiert werden können, stellte sich die Frage, ob Zellen in der Tat mit HR-Reparaturintermediaten in die Mitose eintreten. Daher sollte untersucht werden, ob Rad51- oder Rad54-Foci in der Mitose nachweisbar sind.

Dazu wurden adhärent auf DG wachsende Zellen mit 2 Gy bestrahlt, nach 7 h fixiert und mit AKs gegen γ H2AX und Rad51 bzw. γ H2AX und Rad54 für die IFM gefärbt. Anhand der DAPI-Färbung des kondensierten Chromatins konnten mitotische Zellen identifiziert werden. Um den Erfolg der Färbung selbst zu überprüfen, wurden G2-Zellen als Positivkontrolle herangezogen (siehe Abbildung 17).

Zum Zeitpunkt 7 h nach Bestrahlung zeigten die G2-Phase-Zellen deutliche Rad51- bzw. Rad54-Foci. Interessanterweise waren diese in mitotischen Zellen durch eine IF-Färbung nicht detektierbar. Der erhöhte γ H2AX-Foci-Wert weist jedoch darauf hin, dass die Reparaturprozesse noch nicht abgeschlossen sind. Es wäre möglich, dass Rad51 und Rad54 aufgrund der Chromatin-Umstrukturierung nicht mehr binden können oder aktiv verdrängt werden, obwohl noch HR-Strukturen vorhanden sind. Alternativ könnte die Reparatur so weit fortgeschritten sein, dass die Strukturen, an welche die Proteine binden, nicht mehr bestehen. Daher ergab sich die Frage, wann die Rad51/Rad54-Foci vor dem Eintritt in die Mitose von den DSBs verschwinden.

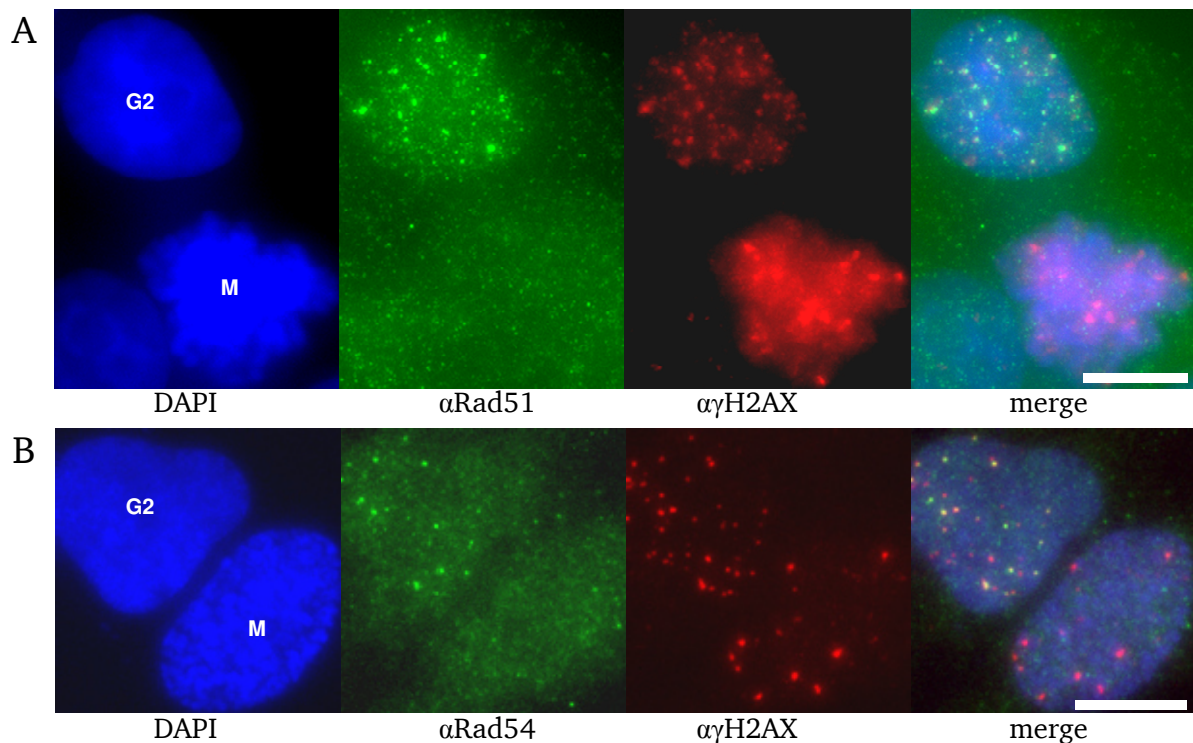


Abbildung 17: Darstellung der DNA-Reparaturfaktoren Rad51 und Rad54 in HeLa-Zellen nach Bestrahlung mit 2 Gy. Die Zellen wurden 7 h nach Bestrahlung fixiert und mit AKs gegen γ H2AX und Rad51 bzw. Rad54 gefärbt. Durch die γ H2AX-Färbung wird das erhöhte DSB-Level in den mitotischen Zellen sichtbar. M=Mitose, G2= G2-Phase-Zelle (A) HeLa WT-Zellen. Rad51 kann in G2-Phase-Zellen angefärbt werden, jedoch nicht in Mitose. (B) HeLa WT-Zellen. Rad54 ist nur in G2-Zellen detektierbar, jedoch nicht in Mitose. Der Maßstab beträgt 10 μ m.

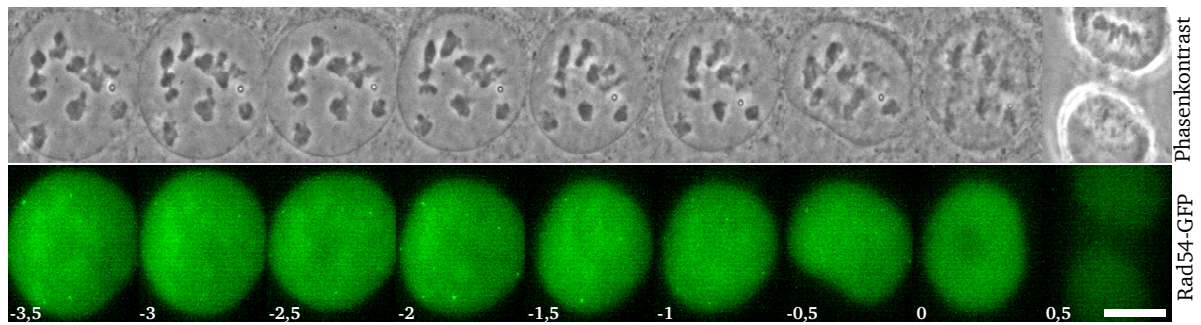
4.3.3 Messung von Rad54-GFP-Foci-Kinetiken nach IR mittels Lebendzellmikroskopie

Das Fehlen der Rad51- und Rad54-Foci in der Mitose führte zu der Annahme, dass diese vor dem Eintritt in die Mitose von den noch unreparierten Brüchen entfernt werden. Wie in fixierten Zellen gezeigt werden konnte, sind diese Faktoren in der späten G2-Phase noch detektierbar. Daher stellte sich die Frage, wann die Faktoren die vorhandenen DSBs verlassen. In den bisher angefertigten Versuchen wurden stets fixierte Zellen betrachtet. Experimente mit fixierten Zellen erlauben quantitative Aussagen über eine große Zellpopulation, jedoch ohne einen Einblick zu geben, an welcher genauen Position des Zellzyklus eine einzelne Zelle steht. So ist z.B. keine Aussage möglich, wie weit eine fixierte Zelle noch von der Mitose entfernt ist. Die Lebendzellmikroskopie hingegen ermöglicht die Quantifizierung der Foci fluoreszenzmarkierter Proteine und die Verfolgung des Zellzyklusverhaltens auf Einzelzellebene.

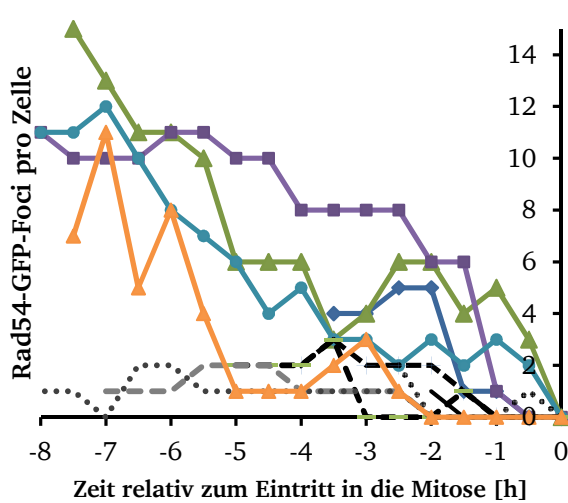
Rad51 eignet sich aufgrund der bereits beschriebenen Probleme bei einer Überexpression kaum für eine Detektion von HR-Ereignissen in lebenden Zellen. Das posttranslational regulierte Rad54 ermöglicht hingegen die Markierung von HR-Ereignissen auch ohne negative Nebeneffekte für das Überleben der exprimierenden Zellen.

Zur Charakterisierung der Rad54-GFP-Foci beim Eintritt bestrahlter Zellen in die Mitose wurden U2OS Rad54-GFP Klon F-Zellen in zwei Kanäle eines Ibidi μ -Slides ausgesät. 48 h nach Aussaat wurde ein Kanal mit 2 Gy bestrahlt. Nach etwa 3 h wurden die Zellen in das Lebendzellmikroskop überführt und eine Positionsliste von Zellen angefertigt. Der Zeitraum wurde so gewählt, da sich die Rad54-GFP-Foci erst zu späteren Zeiten nach Bestrahlung ausbilden und nur Rad54-GFP-Foci-positive Zellen, welche sich also in S-/G2-Phase befinden, analysiert werden sollten. Die unbestrahlten Kontrollzellen wurden nach der Größe ausgewählt. Sehr kleine Zellen wurden nicht in die Positionsliste aufgenommen, da diese vermutlich G1-Phase-Zellen darstellten und diese nicht im geplanten Zeitraum in die Mitose eintreten würden. 4 h nach Bestrahlung wurde die Bildaufnahme gestartet. Für die folgende Auswertung des Experiments wurden nur Zellen herangezogen, welche nach Start der Mikroskopie weniger als 9 h benötigten, um in die Mitose einzutreten. Somit waren diese Zellen maximal 13 h in S-/G2-Phase. In Abbildung 18A ist exemplarisch eine U2OS Rad54-GFP Klon F-Zelle abgebildet. Diese zeigte 3,5 h vor dem Eintritt in die Mitose noch Rad54-GFP-Foci. Über den Verlauf der Zeit nimmt die Anzahl der Rad54-GFP-Foci ab und vor dem Eintritt in die Mitose sind diese kaum noch detektierbar. In Abbildung 18B ist die Anzahl der Rad54-GFP-Foci in einzelnen Zellen über den Verlauf der Zeit aufgetragen. Auffällig sind hierbei die z.T. erheblichen Schwankungen der Foci-Werte zwischen zwei Zeitpunkten. Dies liegt vermutlich an intranukleären Bewegungen oder an der abweichenden Fokussierung durch die Autofokusfunktion der μ Manager-Software zwischen zwei Zeitpunkten. Dennoch wird deutlich, dass in S-/G2-Phase bestrahlte Zellen (farbige durchgängige Linien) Rad54-GFP-Foci mit maximal 15 Foci 4 h nach Bestrahlung starten und die Foci bis zum Eintritt der Zellen in die Mitose kontinuierlich abnehmen. Bereits eine halbe Stunde vor dem Eintritt in die Mitose sind nur noch maximal drei Foci in einer Zelle detektierbar. Im Gegensatz dazu ist das Foci-Level in unbestrahlten Zellen (unterbrochene Linien) über den gesamten Beobachtungszeitraum mit maximal 2-3 Foci sehr gering. Vor dem Eintritt in die Mitose verringert sich die Zahl der Rad54-GFP-Foci weiter. In Abbildung 18C sind die Mittelwerte aller bestrahlten und unbestrahlten Zellen aufgetragen. Diese Auftragung lässt einen kontinuierlichen Abfall der Rad54-GFP-Foci bis zu 3,5 h vor dem Eintritt in die Mitose erkennen. In den folgenden 1,5 h scheint sich ein Plateau auszubilden. Schließlich kommt es ab 2 h vor dem Eintritt in die Mitose zu einem schnellen Abfallen der Rad54-GFP-Foci-Zahlen.

A



B



C

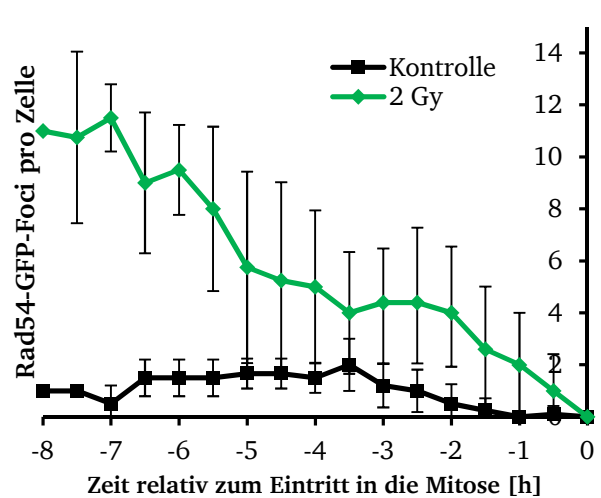


Abbildung 18: Darstellung eines Lebendzellexperiments zur Untersuchung der Rad54-GFP-Foci in lebenden U2OS Rad54-GFP Klon F-Zellen nach Bestrahlung mit 2 Gy. (A) Die Bildaufnahme von Rad54-GFP-Foci-positiven Zellen wurde 4 h nach Bestrahlung gestartet. Daher zeigen die Zellen zu Beginn des Experiments ein erhöhtes Rad54-GFP-Foci-Level. Die Foci-Zahlen wurden in den Einzelebenen der Stapelaufnahmen ausgezählt. Dargestellt ist der Verlauf einer Zelle ab 3,5 h vor dem Eintritt in die Mitose. Der Zeitpunkt des Eintritts in die Mitose wurde anhand der Phasenkontrastaufnahme ermittelt. Dieser lässt die Chromatinkondensation und somit den Beginn der Prophase erkennen. (B) Auftragung des Rad54-GFP-Foci-Level relativ zum Eintritt in die Mitose einzelner Zellen. Farbige durchgehende Linien stellen mit 2 Gy bestrahlte Zellen und unterbrochene farblose Linien Kontrollzellen dar. Der Beginn einer jeden Linie stellt den Zeitpunkt des Starts der Bildaufnahme dar und lässt den Verlauf der Foci-Zahlen bis zum Eintritt in die Mitose verfolgen. (C) Darstellung des Verlaufs der Rad54-GFP-Foci bis zum Eintritt in die Mitose als Mittelwerte aus den einzelnen Zellen. Die Fehlerbalken sind die Standardabweichung zwischen bestrahlten Zellen (5 Zellen) bzw. unbestrahlten Kontrollzellen (10 Zellen).

Auch wenn bei der Auswertung vermutlich sowohl S- als auch G2-Phase bestrahlte Zellen in die Auswertung einfließen, wird deutlich, dass sich das Rad54-GFP-Foci-Level in lebenden Zellen anders verhält, als es die Analyse in G2-Phase-fixierten Zellen vermuten lässt. So lässt die Lebendzellmikroskopie ein vollständiges Verschwinden der Rad54-GFP-Foci in der G2-Phase bis zum Eintritt der Zellen in die Mitose erkennen. Dies war in fixierten Zellen nicht zu beobachten. Das schnellere Absinken der Rad54-GFP-Foci-Werte in den letzten 2 h vor der

Mitose könnte hier möglicherweise auf einen aktiven Mechanismus der Entfernung von Rad54-GFP hindeuten.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass nach IR in G2 in fixierten Zellen auch zu späten Zeiten noch Rad51/Rad54-Foci detektiert werden können. Die Lebendzellmikroskopie zeigt, dass Rad54-GFP-Foci in mitotischen Zellen nicht nachweisbar sind, da sie bereits in der späten G2-Phase kurz vor der Mitose dissoziieren.

4.4 Charakterisierung des DNA-Reparaturfaktors Rad52

Die vorangegangenen Versuche zeigten, dass die HR-Faktoren Rad51 und Rad54 auch zu späten Zeitpunkten nach IR in G2-Phase-Zellen Foci ausbilden, während in mitotischen Zellen zum selben Zeitpunkt keine Foci detektierbar sind. Das in beiden Zellzyklusphasen erhöhte γ H2AX-Level deutet darauf hin, dass DSBs, welche vermutlich HR-Intermediate darstellen, in die Mitose eintreten. Möglicherweise sind die HR-Faktoren nicht detektierbar, weil diese vor dem Eintritt in die Mitose trotz vorhandener HR-Strukturen nicht mehr binden können oder derekrutiert werden. Daher wurde das Auftreten von Foci eines weiteren, mit HR-Prozessen assoziierten Faktors in der G2-Phase und in mitotischen Zellen untersucht. Das vermutlich im *Second-End-Capture*-Schritt der HR involvierte Protein Rad52 konnte mangels spezifischer Antikörper nicht durch IFM detektiert werden. Daher wurde für die folgenden Untersuchungen eine HeLa-Zelllinie (HeLa Rad52-GFP Klon A), welche das fluoreszenzgetagte Protein überexprimiert, herangezogen (siehe Kapitel 4.1.6).

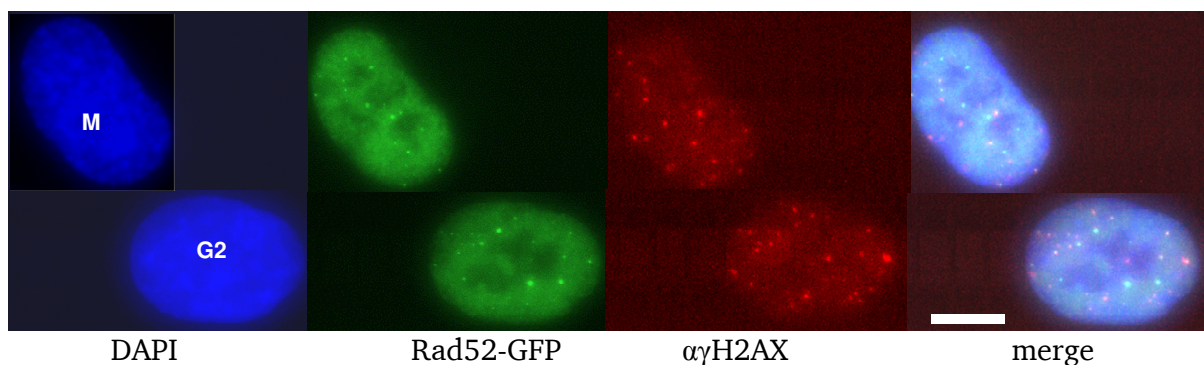


Abbildung 19: Darstellung des DNA-Reparaturfaktors Rad52-GFP in HeLa Rad52-GFP Klon A-Zellen nach Bestrahlung. Die Zellen wurden 7 h nach Bestrahlung mit 2 Gy fixiert und für die IFM gefärbt. Die γ H2AX-Färbung verdeutlicht das erhöhte Schadenslevel. M=Mitose, G2= G2-Phase-Zelle. Der Faktor Rad52-GFP ist sowohl in G2-Phase-Zellen als auch in mitotischen Zellen nach Bestrahlung nachweisbar. Dargestellt ist das intrinsische Rad52-GFP-Signal. Der Maßstab beträgt 10 μ m.

Überraschenderweise konnten in Rad52-GFP-exprimierenden Zellen 7 h nach Bestrahlung sowohl in G2- als auch in mitotischen Zellen Rad52-GFP-Foci detektiert werden (siehe Abbildung 19). Da diese Rad52-GFP-Foci in beiden Zellzyklusphasen zu einem großen Anteil mit den γ H2AX-Foci kolokalisierten, lag die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um die verbliebenen strahleninduzierten Brüche handelt. Dies war der erste direkte Hinweis, dass in der Tat Zellen mit HR-Reparaturintermediaten in die Mitose eintreten.

Um zu untersuchen, ob die beobachteten mitotischen Rad52-GFP-Foci den HR-Prozessen aus der G2-Phase entstammen, wurden nachfolgend Versuche zum Reparaturverhalten von Rad52-GFP durchgeführt.

4.4.1 Messung von Rad52-GFP-Foci-Kinetiken mittels Lebendzellmikroskopie nach Bestrahlung in der G2-Phase

Die vorangegangenen Versuche hatten gezeigt, dass Zellen nach Bestrahlung in der G2-Phase trotz verbliebener Brüche in die Mitose eintreten. Aufgrund der Feststellung, dass Brüche, welche zu späten Zeiten langsam repariert werden HR-Prozesse darstellen, wurde angenommen dass HR-Reparatur-Intermediate in die Mitose eintreten können. Da die Kolokalisation von Rad52-GFP mit γ H2AX in der Mitose gezeigt werden konnte, wurde angenommen, dass es sich bei den markierten DSBs um HR-Prozesse handelt, welche der G2-Phase entstammen. Da Rad52 bereits als HR-Marker in der Lebendzellmikroskopie eingesetzt wurde (Karanam et al. 2012), sollte die Rekrutierungskinetik von Rad52-GFP nach Bestrahlung in der G2-Phase und speziell das Verhalten am G2/M-Übergang untersucht werden.

Aufgrund einer berichteten Funktion von Rad52 bei einem Replikationsgabelneustart (Wray et al. 2008) sollten für eine Charakterisierung von Rad52-GFP in der G2-Phase S-Phase-Zellen ausgeschlossen werden. Hierfür wurde der Zellzyklusmarker DNA-LigaseI für die Lebendzellmikroskopie eingesetzt (Easwaran et al. 2005). Die DNA-LigaseI ist ein in humanen Zellen nicht-essentieller Faktor (Han et al. 2014), und eine Überexpression desselben hat keinen Effekt auf das Zellwachstum oder die DNA-Reparatur (Paul et al. 2013). In Abbildung 20 ist beispielhaft das typische LigaseI-Muster, dem die Beurteilung des S-Phase-Fortschritts zugrunde lag, dargestellt. Das spezifische Muster beruht auf der Funktion der LigaseI bei der Ligation der Okazaki-Fragmente und markiert somit Zentren der Replikation. Dieses spezifische Muster tritt nur in S-Phase-Zellen auf, in G1- und G2-Phase liegt die LigaseI gleichmäßig pan-nukleär verteilt vor.

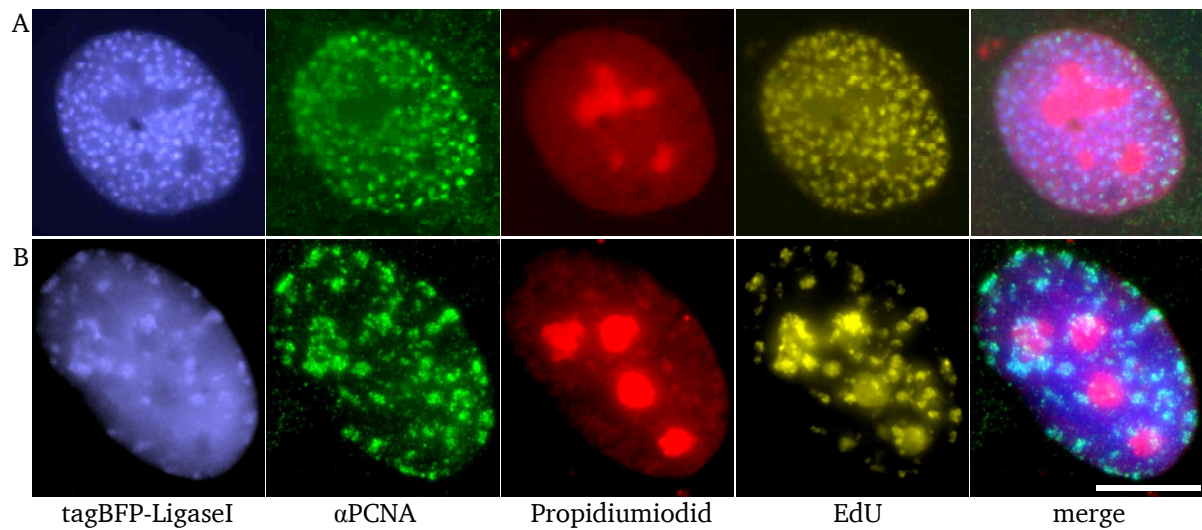


Abbildung 20: Repräsentative Darstellung von U2OS-Zellen in verschiedenen Stadien der S-Phase anhand des LigaseI-Musters. Mit ptagBFP-LigaseI (L65) transient transfizierte U2OS-Zellen wurden für 30 min mit EdU behandelt und sofort fixiert. Nach Fixierung der Zellen wurde eine IF-Färbung gegen das an der Replikation beteiligte PCNA und eine Detektion der EdU-Inkorporation durchgeführt. Die Gegenfärbung des Kerns erfolgte mit Propidiumiodid. (A) Frühe S-Phase. Das plötzliche Auftreten einer großen Anzahl kleinerer LigaseI-Foci repräsentiert die Aktivierung der Replikationsursprünge und die sich hierbei ausbildenden Replikationsgabeln. (B) Späte S-Phase. Es werden weniger Replikationsursprünge aktiviert und die aktiven Replikationsgabeln laufen in größeren Replikationszentren zusammen. Der Maßstab entspricht 10 μm .

Für die Selektion stabil transfizierter Klone wurde der Vektor pTK-Hyg-dsRedLigaseI (L108) kloniert (siehe Kapitel 4.2). Es wurden Zelllinien hergestellt, welche das Rad52-GFP zusammen mit dem Zellzyklusmarker dsRed-LigaseI stabil exprimieren (siehe Kapitel 4.2). Der Zellzyklusmarker ermöglichte die Identifikation der in der S-Phase befindlichen Zellen aufgrund des spezifischen LigaseI-Signals. Zudem konnte über das Muster des S-Phase-Signals eine Einteilung in frühe, mittlere und späte S-Phase erfolgen (Easwaran et al. 2005). Bei der Erstellung von Positionslisten vor dem Start des Lebendzellexperiments wurden nur jene Zellen in die Positionsliste aufgenommen, welche sich zu Beginn des Experiments in spät-S befanden. Dieses Vorgehen ermöglichte die effiziente Lokalisation von Zellen in einer asynchronen Population, welche sich voraussichtlich zum Zeitpunkt der Bestrahlung (etwa 2 h nach Start des Experiments) in der G2-Phase befinden werden. Für eine G2-spezifische Analyse wurden letztlich nur Zellen ausgewertet, welche zum Zeitpunkt der Bestrahlung keine replikationsassoziierten LigaseI-Foci mehr aufzeigten. Die Bildaufnahme wurde anhand der Positionsliste gestartet und erfolgte zunächst mit einer Zyklusdauer von 30 min über die Dauer von 2 h. Nach Ende des Vorfilms wurde das die Zellen tragende Ibidi μ -Slide aus dem Mikroskop entnommen und ein Kanal mithilfe einer Bestrahlungsmaske mit 2 Gy bestrahlt. Anschließend wurde das Ibidi μ -Slide wieder in das Mikroskop eingesetzt. Die Bildaufnahme

wurde anhand der Positionsliste erneut gestartet und erfolgte nun über einen Zeitraum von 11 h. Schließlich wurden nur Zellen ausgewertet, welche bei Bestrahlung negativ für Replikationsfoci waren, somit die S-Phase verlassen hatten und in einem Zeitfenster von 5-9 h nach Bestrahlung in die Mitose eintraten. Da unbestrahlte Zellen in der Regel keinen G2/M-Checkpoint induzieren, wurden für die unbestrahlte Kontrolle auch Zellen mit deutlich kürzeren G2-Phasen ausgewertet.

In Abbildung 21 ist die *Time-Lapse*-Aufnahme einer bestrahlten Zelle im Phasenkontrast und in den Fluoreszenzkanälen exemplarisch dargestellt. Der Zeitpunkt 0 h beschreibt den sichtbaren Eintritt der Zelle in die Mitose, hier im Stadium der Metaphase. Zu Beginn der Aufnahme (-8 h) ist die Zahl der Rad52-GFP-Foci gering. Das punktförmige dsRed-LigaseI-Signal zeigt an, dass sich diese Zelle in S-Phase befand. Im Laufe der folgenden Stunde nimmt die Zahl der Replikationsfoci stetig ab, bis zum Zeitpunkt -6,5 h keine dsRed-LigaseI-Foci mehr zu erkennen sind. Somit befindet sich die Zelle zum Zeitpunkt der Bestrahlung (gelber Balken) bereits in G2.

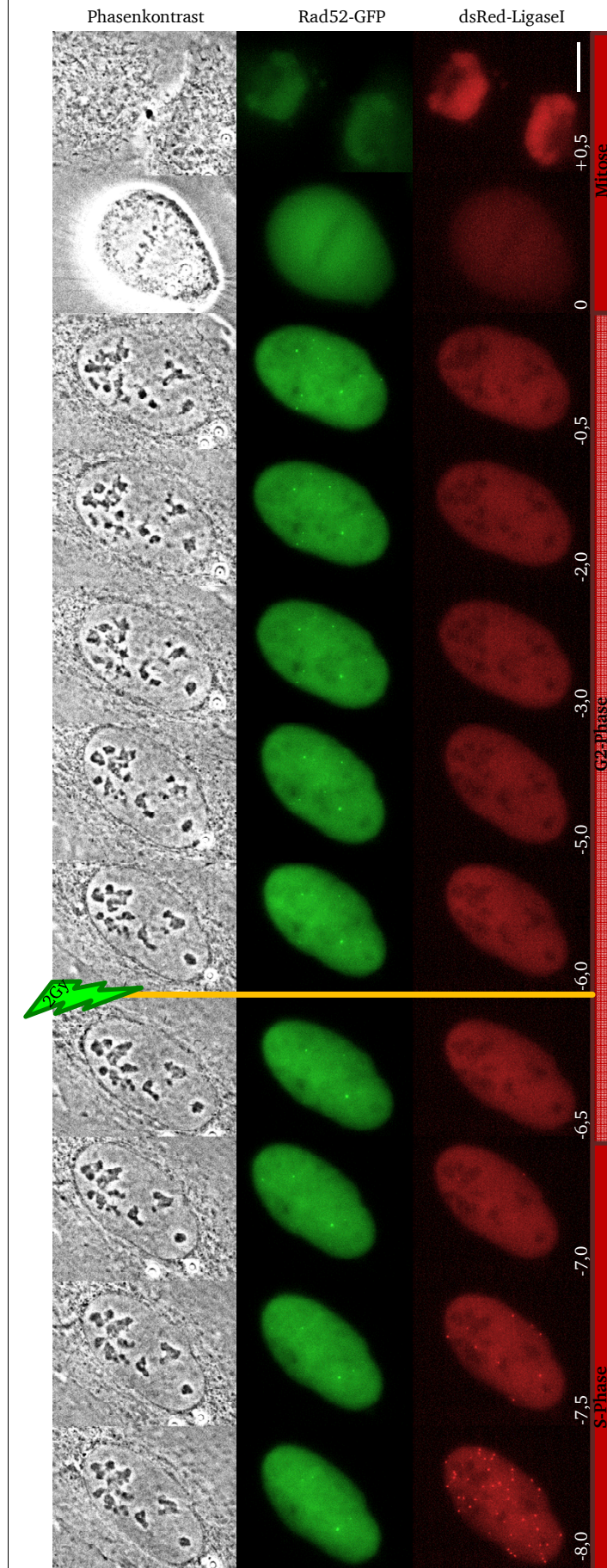


Abbildung 21: Darstellung einer *Time-Lapse*-Aufnahme einer in G2-Phase bestrahlten U2OS Rad52-GFP dsRed-LigaseI Klon 1-Zelle. Gezeigt sind die Fluoreszenzsignale von Rad52-GFP und dsRed-LigaseI nach Bestrahlung relativ zum Eintritt in die Mitose. Die Zelle wurde etwa 6 h vor dem Eintritt in die Mitose mit 2 Gy bestrahlt (gelber Balken). Der Zeitpunkt des Eintritts in die Mitose wurde anhand der Phasenkontrastaufnahme ermittelt. Dieser lässt in der Regel bereits eine Chromatinkondensation und somit den Beginn der Prophase erkennen. Dargestellt ist eine Zelle im Stadium der Metaphase. Der Maßstab entspricht $10 \mu\text{m}$

Nach der Bestrahlung lässt sich ein kontinuierlicher Anstieg der Rad52-GFP-Foci erkennen. 6 h nach der Bestrahlung befindet sich die Zelle in der Mitose.

Die Rad52GFP-Foci-Kinetik wurde in 18 bestrahlten und 39 unbestrahlten Zellen erstellt und die Werte relativ zum Eintritt der Zellen in die Mitose sortiert. Die Mittelwerte der Rad52-GFP-Foci sind in Abbildung 22 dargestellt.

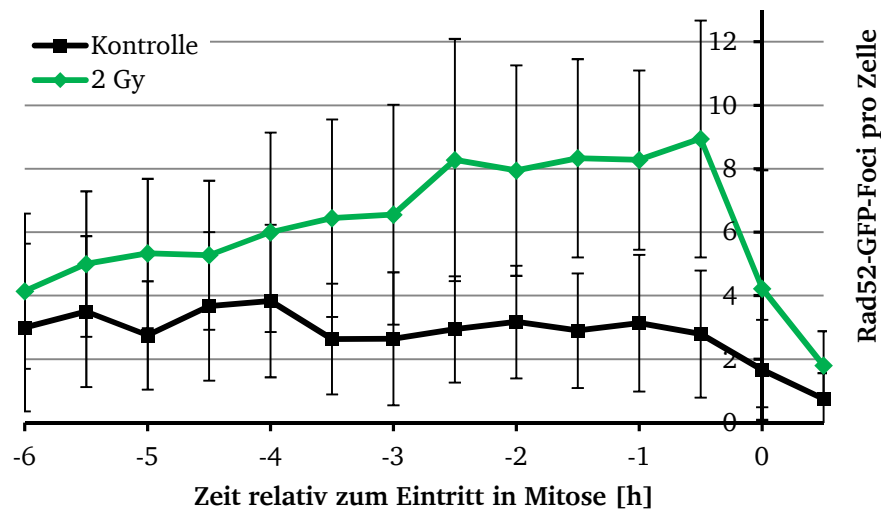


Abbildung 22: Messung von Rad52-GFP-Foci-Kinetiken nach Bestrahlung in der G2-Phase mittels Lebendzellmikroskopie. U2OS Rad52-GFP dsRed-LigaseI Klon 1-Zellen wurden mit 2 Gy bestrahlt. Es wurden nur in G2-Phase bestrahlte Zellen ausgewertet, welche zwischen 5-9 h nach Bestrahlung in die Mitose eintraten. Die Werte wurden relativ zum Eintritt der Zellen in die Mitose sortiert. (0 h). Die Fehlerbalken sind die Standardabweichung zwischen bestrahlten Zellen (18 Zellen) bzw. unbestrahlten Kontrollzellen (39 Zellen). Es wurden 4 Experimente angefertigt.

Unbestrahlte Kontrollzellen besitzen ein spontanes Level an Rad52-GFP-Foci von etwa 3 Foci pro Zelle, welches nur gering über den betrachteten Zeitraum schwankt. Im Gegensatz dazu steigt das Rad52-GFP-Foci-Level in den mit 2 Gy bestrahlten Zellen bis auf etwa 9 Foci pro Zelle 0,5 h vor der Mitose an. Zum Zeitpunkt 0 h, welcher mitotischen Zellen entspricht, fiel der Wert auf etwa 4 Foci pro Zelle ab. Nach der Mitose liegt der Rad52-GFP-Foci-Wert auf Hintergrundniveau.

Durch den Versuch konnte gezeigt werden, dass Rad52-GFP nach Bestrahlung im Verlauf der G2-Phase kontinuierlich an den Schadensort rekrutiert wird und dass Zellen mit diesen Foci in die Mitose eintreten. Erst in der Mitose dissoziieren die Foci vom Chromatin, so dass die Foci-Zahlen nach der Zellteilung wieder auf Hintergrundniveau sind. Dieses Ergebnis war überraschend, da die zuvor untersuchten HR-Faktoren Rad51 und Rad54 das Maximum 2 h nach Bestrahlung ausbilden und daraufhin langsam abfallen. Zudem bildet Rad52-GFP in der

Mitose Foci aus, was bei Rad51/54 nicht beobachtet wurde. Diese Ergebnisse geben erstmals Hinweise darauf, dass Zellen in der Tat mit HR-Strukturen in die Mitose eintreten.

4.4.2 Rad52-, Rad51- und γ H2AX-Foci-Kinetiken nach Bestrahlung in der G2-Phase

Vorherige Experimente zeigten, dass Rad52-GFP im Gegensatz zu den HR-Markern Rad51 und Rad54 in der Mitose an den verbliebenen DSBs detektierbar ist. Dazu zeigte sich, dass Rad52-GFP eine andere Rekrutierungskinetik aufweist. Es sollte sichergestellt werden, dass Rad52 wirklich dieselben DSBs markiert wie Rad51 und Rad54. Hierzu wurde die Rekrutierung dieses Faktors nach Bestrahlung in der G2-Phase genauer untersucht. Es wurden Foci-Kinetiken analog zu denen von Rad51 und Rad54 angefertigt (siehe Kapitel 4.3.1). Zusätzlich zu der Bestimmung der absoluten Rad52-GFP-Foci-Zahlen, wurde auch deren Kolokalisation mit γ H2AX und Rad51 untersucht. Die Kolokalisation von Rad52-GFP mit γ H2AX sollte die Rekrutierung an DSBs aufzeigen. Das Maß der Kolokalisation von Rad52 mit Rad51 sollte zudem aufzeigen, ob es sich bei den durch Rad52-GFP detektierten Strukturen in der Tat um Brüche handelt, die über den Weg der HR repariert werden.

Die Auswertung der γ H2AX-Foci in den U2OS Rad52-GFP Klon 1-Zellen (siehe Abbildung 23A) zeigte, dass diese etwa 44 Foci pro Zelle 0,25 h nach Bestrahlung aufweisen. Die Kinetik des Abfalls der Foci-Zahlen zeigt das bereits beschriebene biphasische Verhalten. 8 h nach Bestrahlung weisen die Zellen etwa 7 verbliebende γ H2AX-Foci pro Zelle auf. Bei der Betrachtung der Kinetik von Rad52-GFP wird die sehr langsame Rekrutierung nach Bestrahlung deutlich. So sind zum Zeitpunkt 0,25 h nach Bestrahlung nur geringfügig mehr Rad52-GFP-Foci detektierbar als in unbestrahlten Zellen. Die Anzahl der Foci steigt jedoch stetig bis zu einem Maximum von etwa 5 Rad52-GFP-Foci pro Zelle bei 8 h nach Bestrahlung an, welche stark mit γ H2AX kolokalisieren (siehe auch Abbildung 24). Um sicherzugehen, dass die Rad52-GFP-Foci wirklich Strukturen der HR markieren, wurden die Foci auf ihre Kolokalisation mit Rad51 untersucht. Die Rad51-Foci zeigten auch in dieser Rad52-überexprimierenden Zelllinie das Maximum nach 2 h, gefolgt von der langsamen Verringerung der Foci-Zahlen zu späteren Zeiten. Dies lässt darauf schließen, dass die HR trotz der Überexpression von Rad52-GFP in den Zellen normal verläuft. Zum Zeitpunkt 8 h nach Bestrahlung kolokalisieren Rad52-GFP und Rad51 sehr stark, so dass es sich bei den durch Rad52-GFP-markierten Strukturen sehr wahrscheinlich um HR-Prozesse handelt (siehe auch Abbildung 24). Die langsame Rekrutierung von Rad52-GFP könnte darauf hinweisen, dass es an einem späten Schritt der HR beteiligt ist.

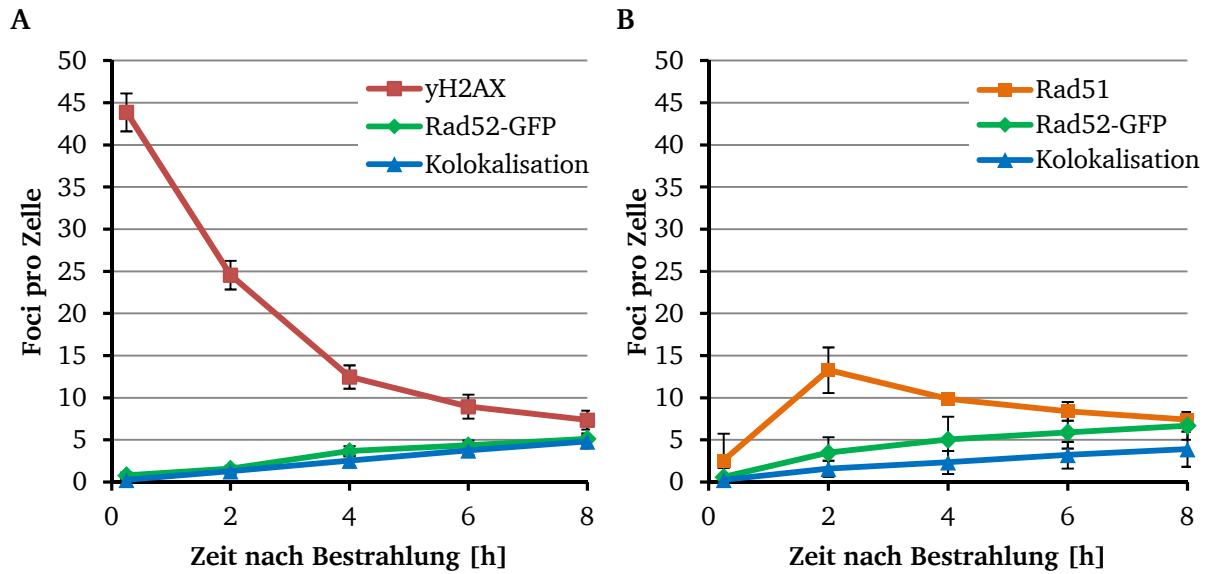


Abbildung 23: Foci-Kinetiken von U2OS Rad52-GFP Klon 1-Zellen. Den Zellen wurde 30 min vor Bestrahlung EdU zugegeben. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 1 Gy fixiert und für die IFM gefärbt. (A) Analyse der Foci-Werte von γ H2AX, Rad52-GFP und deren Kolokalisation in G2-Phase-Zellen. Die Fehlerbalken sind der Standardfehler der Mittelwerte aus vier Experimenten. Foci-Werte von unbestrahlten Kontrollzellen wurden abgezogen (γ H2AX: 9,2; Rad52-GFP: 4,6 Kolokalisation: 1,1) (B) Analyse der Foci-Werte von Rad51, Rad52-GFP und deren Kolkalisation in G2-Phase-Zellen. Die Fehlerbalken sind die Standardabweichung der Mittelwerte aus zwei Experimenten. Die Foci-Werte von unbestrahlten Kontrollzellen wurden abgezogen (Rad51: 4,8; Rad52-GFP: 6,4; Kolokalisation: 0,5)

Um zu überprüfen, ob die späte Rekrutierung von Rad52-GFP in den U2OS-Zellen ein generelles Phänomen oder rein zelltypspezifisch ist, wurde eine Rad52-GFP-Foci-Kinetik in HeLa Rad52-GFP Klon A-Zellen nach Bestrahlung in der G2-Phase angefertigt. Die Zellen wurden mit 2 Gy bestrahlt, zum einen um den G2/M-Checkpoint länger aufrecht zu erhalten und zum anderen, um die gemessenen Werte zu vergrößern.

Die γ H2AX-Foci-Kinetik zeigt nach Bestrahlung erneut das erwartete biphasische Verhalten auf (siehe Abbildung 25). Das Maximum liegt 0,25 h nach Bestrahlung bei etwa 55 Foci pro Zelle. Zuerst fallen die Foci-Werte bis 4 h stetig auf etwa 18 Foci pro Zelle ab. Ab diesem Zeitpunkt fällt das Foci-Level langsamer. Bei 8 h nach Bestrahlung liegt das Rest-Foci-Level bei etwa 7 γ H2AX-Foci pro Zelle. Erstaunlicherweise zeigt Rad52-GFP bis zu 6 h nach Bestrahlung einen fortschreitenden Anstieg der Foci-Werte mit dem Maximum von etwa 10 Rad52-GFP-Foci pro Zelle. Die Rad52-GFP-Foci kolokalisieren zu allen Zeiten mit γ H2AX. Im Gegensatz zu den untersuchten U2OS-Zellen fällt zum Zeitpunkt 8 h nach Bestrahlung das Rad52-GFP-Foci-Level auf etwa 2,5 pro Zelle ab. Der Grund hierfür könnte in einer voranschreitenden Reparatur in G2-Phase-Zellen liegen.

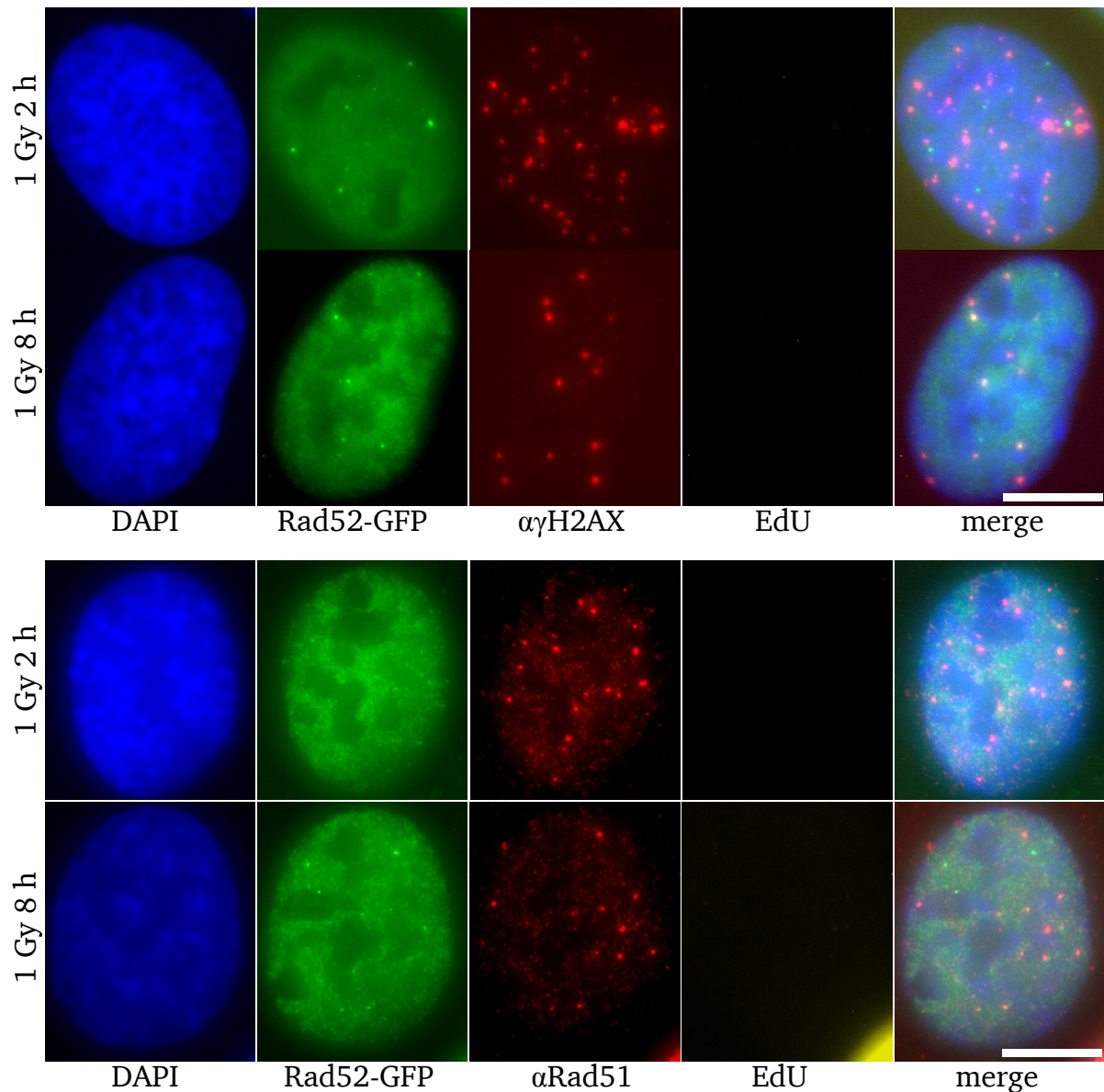


Abbildung 24: Immunfluoreszenzfärbung in U2OS Rad52-GFP Klon 1-Zellen. Den Zellen wurden 30 min vor Bestrahlung EdU zugegeben. Nach Bestrahlung mit 1 Gy wurden die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert und mit Antikörpern gegen die Epitope Rad51 bzw. γ H2AX gefärbt. G2-Phase-Zellen wurden mithilfe der Scanning-Funktion von Metafer 4-Metacyte ausgewählt. Der Maßstab entspricht 10 μ m.

HeLa- und U2OS-Zellen zeigen prinzipiell dasselbe Verhalten in Bezug auf die langsame Rekrutierung von Rad52-GFP nach IR in der G2-Phase. Bei HeLa-Zellen tritt das Maximum bereits früher auf als bei den U2OS-Zellen. Möglicherweise verläuft die DSB-Reparatur über HR in HeLa-Zellen generell etwas schneller. Trotzdem sind die Kinetiken mit der Annahme konsistent, dass Rad52-GFP in späten Schritten der HR-beteiligt sein könnte.

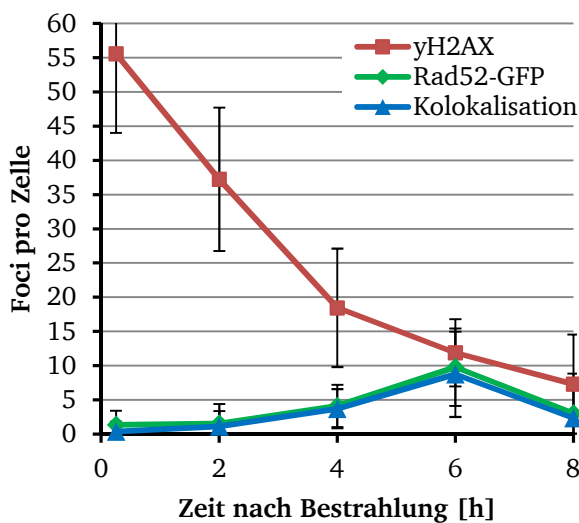


Abbildung 25: Foci-Kinetiken von HeLa Rad52-GFP Klon A-Zellen. Analyse der Foci-Werte von γ H2AX, Rad52-GFP und deren Kolokalisation in G2-Phase-Zellen nach 2 Gy Bestrahlung. Den Zellen wurde 30 min vor Bestrahlung EdU zugegeben. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung fixiert und für die IFM gefärbt. Die Fehlerbalken sind die Standardabweichung der Foci-Werte von 40 Zellen innerhalb eines Experiments. Die Foci-Werte von unbestrahlten Kontrollzellen wurden abgezogen (γ H2AX: 9,3; Rad52-GFP: 2,8 Kolokalisation: 1,3)

4.4.3 Untersuchung der Kolokalisation von Rad52-GFP mit pRPA32

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass Rad52-GFP an DSBs nach Bestrahlung erst im späteren Verlauf der G2-Phase rekrutiert wird und mit dem DNA-Schadensmarker γ H2AX und dem HR-Faktor Rad51 kolokalisiert. Da Rad51 nicht mehr in der Mitose an den DSBs lokalisiert ist, sehr wohl aber Rad52-GFP, wurde angenommen, dass Rad51 nicht der entscheidende Interaktionspartner von Rad52-GFP für einen Verbleib an den DSBs ist. Daher wurde ein weiterer Interaktionspartner von Rad52 untersucht, das RPA, deren gemeinsame Rolle bei der HR bereits gezeigt werden konnte (Park et al. 1996). Durch IR induziertes phosphoryliertes RPA interagiert zudem verstärkt mit Rad51 und Rad52 (Wu et al. 2005). Infolge einer DNA-Schädigung wird unter anderem die mittlere Untereinheit RPA32 durch Mitglieder der Phosphatidylinositol 3-Kinase-like Kinase (PIKK)-Familie (ATM, ATR und DNA-PK) an Position T21 phosphoryliert und ist somit ein Bestandteil der DNA-Schadensantwort. Das Fehlen der Phosphorylierungsstelle führt zu einem erhöhten Zellsterben besonders nach der Einwirkung von genotoxischem Stress (Vassin et al. 2009).

Durch den Einsatz Phospho-spezifischer Antikörper kann gezielt phosphoryliertes RPA32 (pRPA) an einzelsträngigen Bereichen detektiert werden.

Für die Untersuchung der Kolokalisation des Rad52-GFP mit dem ssDNA-Marker pRPA wurden in der G2-Phase bestrahlte U2OS Rad52-GFP Klon 1-Zellen zu den bereits genannten Zeiten nach Bestrahlung fixiert und für die IFM gefärbt. Dabei zeigte sich, dass die U2OS Rad52-GFP Klon 1-Zelllinie den bereits mehrfach beschriebenen langsamen Anstieg der Rad52-GFP-Foci über die Dauer der G2-Phase in bestrahlten Zellen aufweist (siehe Abbildung 26A). Mit Ausnahme des 4 h Zeitpunktes liegt das pRPA-Level um 1-2 Foci höher und zeigt

ebenfalls einen gleichmäßigen Anstieg. Rad52-GFP kolokalisiert mit pRPA sehr stark und beide erreichen ihr Maximum zum Zeitpunkt 8 h nach Bestrahlung.

Die beobachtete pRPA-Kinetik in den bestrahlten U2OS Rad52-GFP Klon 1-Zellen ist anders als erwartet. Da RPA wie auch Rad51 an resektierte Bereiche bindet, sollte der Wert zum 2 h-Zeitpunkt deutlich über dem hier gemessenen Wert liegen. Vorangegangene Versuche hatten bereits die maximale Rad51-Foci-Zahl zum 2 h-Zeitpunkt gezeigt, deren Voraussetzung eine erfolgte Resektion und RPA-Beladung sind (siehe Kapitel 4.3.1). Zudem haben Studien gezeigt, dass RPA eine mit Rad51 vergleichbare Kinetik aufweist (Shibata et al. 2011). Um zu überprüfen, ob die späte RPA-Phosphorylierung ein generelles Phänomen oder U2OS-spezifisch ist, wurden vergleichbare Experimente mit HeLa Rad52-GFP Klon-A-Zellen (Abbildung 26B) durchgeführt

Hierbei zeigte sich erneut das langsame Ansteigen der Rad52-GFP-Foci, ein Maximum bei 6 h nach 2 Gy Bestrahlung und das Abfallen der Foci zum 8 h Zeitpunkt hin. Anders verhielt sich hierbei die pRPA-Foci-Kinetik. Diese zeigte ihr Maximum bereits zum 2 h Zeitpunkt und fiel zu den späteren Zeitpunkten hin ab. Die Kinetik entsprach den Erwartungen bei einer vorangegangenen Resektion. Aufgrund der Diskrepanz zwischen den Zelllinien in Bezug auf die pRPA-Kinetik, wurden in weiteren Zelllinien (HeLa WT und A549 WT) Foci-Kinetiken erstellt (siehe Abbildung 26C und D). In beiden WT-Zellen zeigen sich die Maxima der durch pRPA markierten resektierten Bereiche wie erwartet zum 2 h-Zeitpunkt nach Bestrahlung (siehe Abbildung 27). Auch wenn aufgrund der geringen Anzahl der durchgeführten Experimente keine exakte Bestimmung der pRPA-Werte in den spezifischen Zelllinien möglich war, verdeutlichen die Experimente, dass das langsame Ansteigen der pRPA-Foci-Werte in U2OS Rad52-GFP-Zellen U2OS-spezifisch ist.

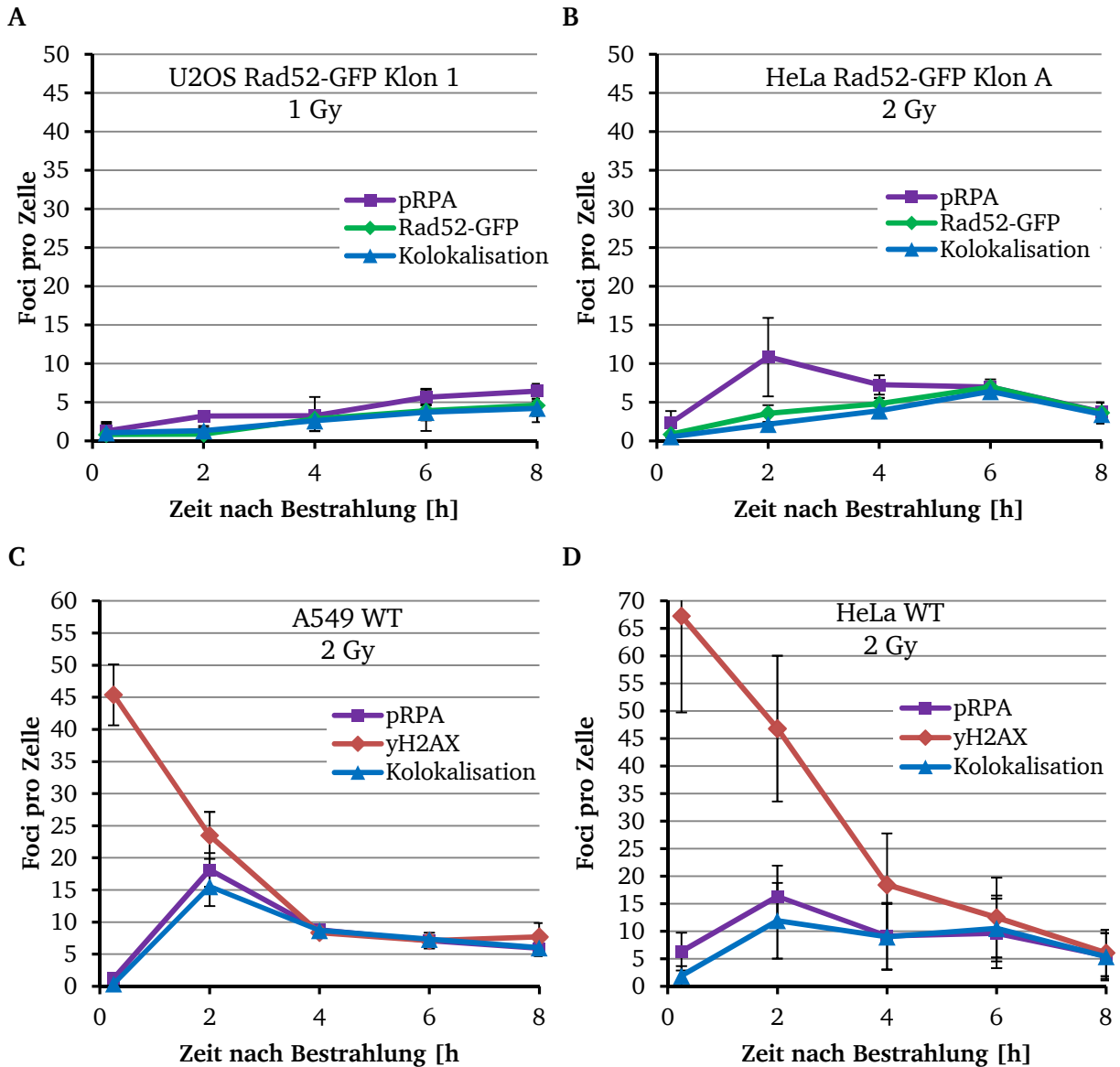


Abbildung 26: γ H2AX, pRPA und Rad52-GFP-Foci-Kinetiken. Den Zellen wurde 30 min vor Bestrahlung EdU zugegeben. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung fixiert und für die IFM gefärbt. (A) U2OS Rad52-GFP Klon 1-Zellen. Analyse der Foci-Werte von pRPA, Rad52-GFP und deren Kolokalisation in G2-Phase nach 1 Gy Bestrahlung. Die Fehlerbalken sind der Standardfehler der Mittelwerte aus drei Experimenten. Foci-Werte von unbestrahlten Kontrollzellen wurden abgezogen (pRPA: 10,1; Rad52-GFP: 4,9; Kolokalisation: 3,6) (B) HeLa Rad52-GFP Klon A-Zellen. Analyse der Foci-Werte von pRPA, Rad52-GFP und deren Kolokalisation in G2-Phase nach 2 Gy Bestrahlung. Die Fehlerbalken sind die Standardabweichung der Mittelwerte aus 2 Experimenten. Foci-Werte von unbestrahlten Kontrollzellen wurden abgezogen (pRPA: 7,9; Rad52-GFP: 1,6; Kolokalisation: 1,1) (C) A549 WT-Zellen. Analyse der Foci-Werte von pRPA, γ H2AX und deren Kolokalisation in G2-Phase nach 2 Gy Bestrahlung. Die Fehlerbalken sind die Standardabweichung der Mittelwerte aus zwei Experimenten. Die Foci-Werte von unbestrahlten Kontrollzellen wurden abgezogen (pRPA: 3,1; γ H2AX: 8,6; Kolokalisation: 1,5) (D) HeLa WT-Zellen. Analyse der Foci-Werte von pRPA, γ H2AX und deren Kolokalisation in G2-Phase nach 2 Gy Bestrahlung. Die Fehlerbalken sind die Standardabweichung der Foci-Werte von 40 Zellen eines Experiments. Die Foci-Werte von unbestrahlten Kontrollzellen wurden abgezogen (pRPA: 4; γ H2AX: 7,7; Kolokalisation: 1,3)

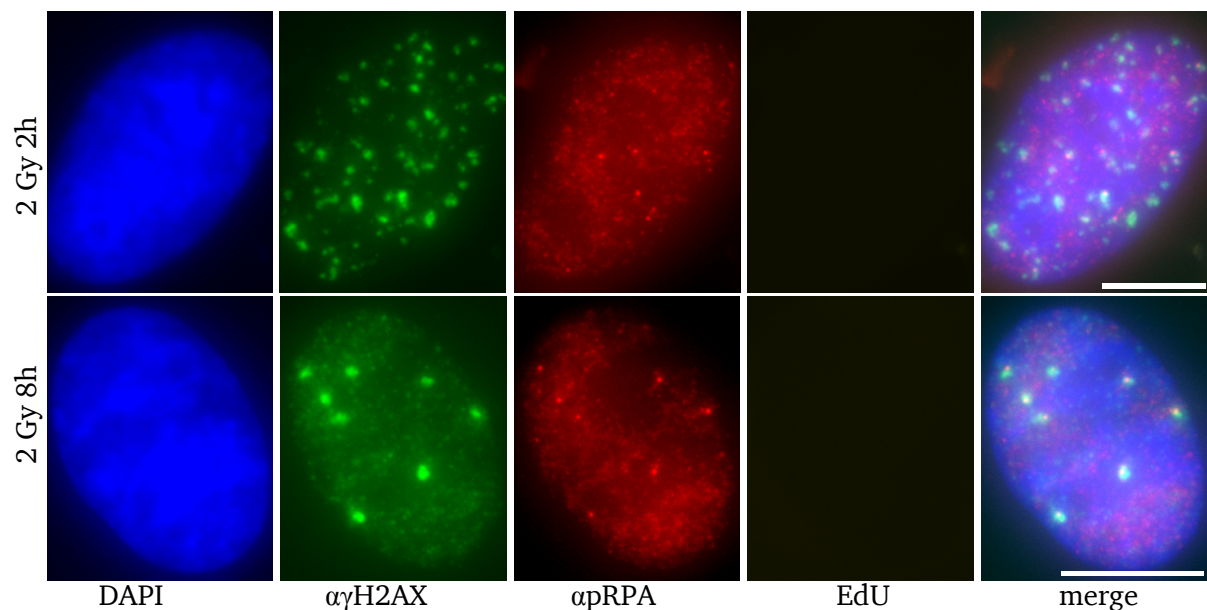


Abbildung 27: Immunfluoreszenzfärbung in HeLa WT-Zellen in der G2-Phase. Die Zellen wurden 30 min vor Bestrahlung mit EdU behandelt. Die Zellen wurden mit 2 Gy bestrahlt und zu den angegebenen Zeitpunkten fixiert. Die IF-Färbung wurde mit Antikörpern gegen die γ H2AX und pRPA durchgeführt. G2-Phase-Zellen wurden mithilfe der Scanning-Funktion von Metafer 4-MetaCyte ausgewählt. Der Maßstab beträgt 10 μ m

Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass zusätzlich zu den Faktoren γ H2AX und Rad51 auch ein Marker für ssDNA, das pRPA, zu späten Zeiten in der G2-Phase maximal mit Rad52-GFP kolokalisiert. Auch wenn RPA schon zu frühen Zeiten phosphoryliert vorliegt, so bindet der Interaktionspartner Rad52-GFP erst zu späteren Zeiten nach Bestrahlung. Dies spricht erneut dafür, dass Rad52 bei der fortgeschrittenen, HR in der späten G2-Phase an Bedeutung gewinnt. Somit stellen die in der späten G2-Phase verbliebenen Strukturen vermutlich HR-Prozesse dar, welche durch Rad52-GFP markiert in die Mitose eintreten können. Sollten HR-Intermediate in die Mitose eintreten, müssen diese aufgelöst werden, um das Zerreißen der intermediären Struktur und damit der Chromatiden in der Anaphase zu verhindern. Die mögliche Auflösung von HR-Intermediaten in der Mitose sollte in weiteren Versuchen aufgeklärt werden.

4.5 Die Auflösung von HR-Reparaturintermediaten in mitotischen Zellen

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass Zellen mit unreparierten DSBs in die Mitose eintreten. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die an früheren Schritten der HR beteiligten Faktoren Rad51 und Rad54 bereits in der späten G2-Phase von den Brüchen dissoziieren. Die Detektion von pRPA32 ließ die Vermutung zu, dass die verbliebenen Strukturen ssDNA-Bereiche beinhalten. Rad52-GFP wird erst spät an die Brüche rekrutiert und bleibt auch bei Eintritt in die Mitose an die Schadensstruktur gebunden. Diese Strukturen stellen vermutlich HR-Intermediate wie D-Loops oder HJs dar. Die Auflösung der HR-Intermediate ist vor der Chromatidsegregation besonders wichtig, um ein Zerreißen der Chromatiden in der Anaphase und die Induktion neuer Schäden zu verhindern. Eine an der Auflösung solcher HR-Strukturen möglicherweise beteiligte Endonuklease ist das bereits beschriebene Mus81. Mithilfe des hergestellten Konstrukts pEGFP-Mus81 N (L98) und der erzeugten Zelllinie U2OS Mus81-GFP Klon A konnte ein AK für den Einsatz in der IFM etabliert werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Detektion von Mus81 in mitotischen Zellen nach Bestrahlung dargestellt.

4.5.1 Kolokalisation von Rad52, Mus81 und γ H2AX in mitotischen Zellen

Um zu untersuchen, ob Mus81 an Bruchstrukturen bindet, die aufgrund der Checkpoint-Insensitivität aus der G2-Phase in die Mitose transferiert werden, wurden IF-Färbungen mit einem AK gegen Mus81 durchgeführt. Hierzu wurden U2OS Rad52-GFP-Klon 1-Zellen mit 2 Gy bestrahlt und nach 7 h fixiert. Die Zellen wurden mit AKs gegen Mus81 und γ H2AX gefärbt, um eine mögliche Lokalisation der Faktoren Rad52-GFP und Mus81 am DSB detektieren zu können. Die mitotischen Zellen wurden mittels der durch eine DAPI-Färbung feststellbaren Chromatinkondensation identifiziert. Wie in Abbildung 28A dargestellt, bilden Rad52-GFP- und Mus81 in mitotischen Zellen Foci aus, welche zudem kolokalisieren. Die Nuklease Mus81 wird also in der Tat auch nach IR in der späten S/G2-Phase in der Mitose an die Schadensstrukturen rekrutiert, welche HR-Reparaturintermediate darstellen. Im Folgenden sollte das zeitliche Verhalten der Foci-Level untersucht werden. Dazu wurden von mitotischen Zellen Bilder aufgenommen, die Zellen in die verschiedenen Mitosephasen eingeteilt und die jeweiligen Foci-Level quantifiziert. Da die verwendeten U2OS-Zellen bereits ein erhöhtes spontanes Level von Rekombinationsassoziierten Foci aufweisen wurden hier die bestrahlten und unbestrahlten Proben in separaten Grafiken aufgetragen (Abbildung 28B und C). Beschrieben wird die Differenz aus den beiden Ansätzen um den IR-Effekt hervorzuheben.

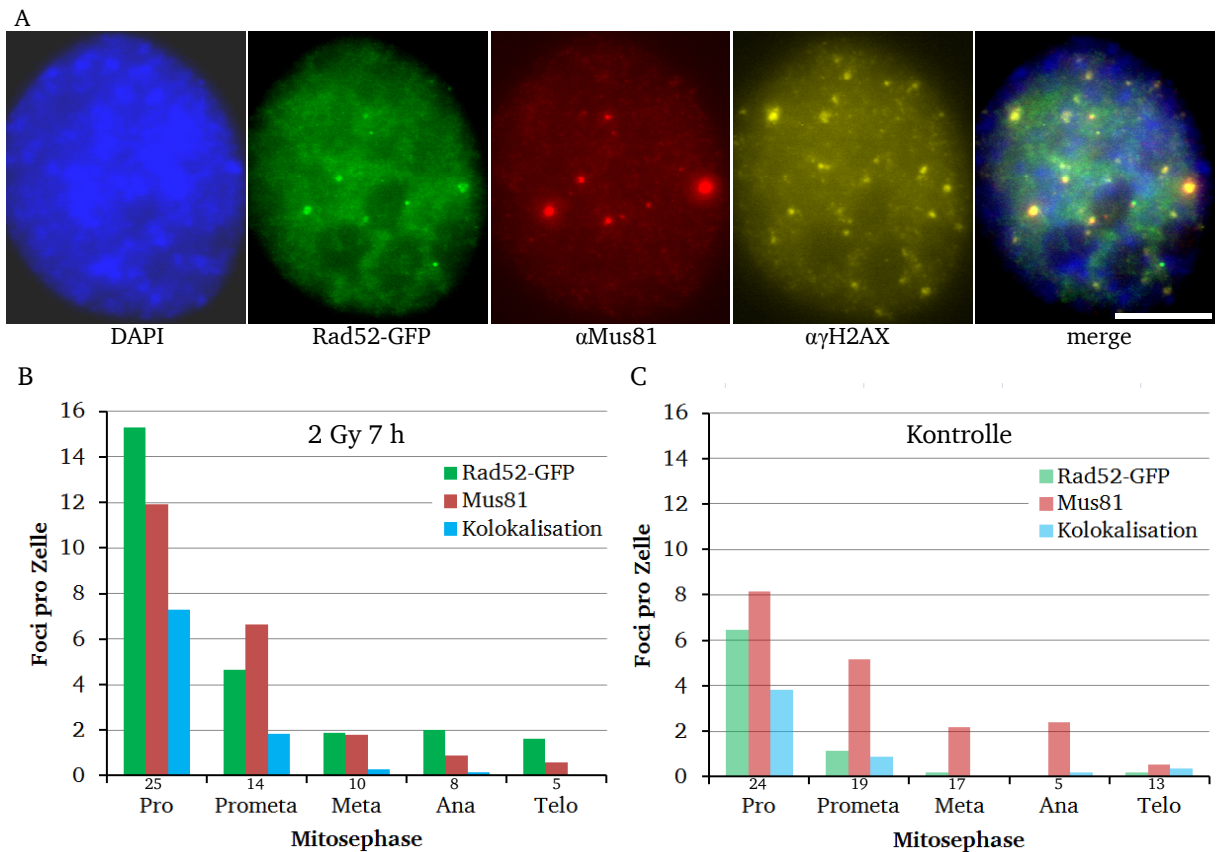


Abbildung 28: Kolokalisation von Rad52-GFP und Mus81 in mitotischen Zellen. U2OS Rad52-GFP Klon 1-Zellen wurden mit 2 Gy bestrahlt, nach 7 h fixiert und mit AKs gegen Mus81 und γ H2AX gefärbt. Unter den Säulen ist die Anzahl der für die jeweilige Gruppierung ausgewerteten M-Phase-Zellen angegeben. (A) Exemplarische Darstellung einer Prophase-Zelle. Maßstab beträgt 10 μ m. (B) In bestrahlten mitotischen Zellen wurden die Rad52-GFP-, Mus81-Foci-Werte und deren Kolokalisation bestimmt. Die Einteilung der Zellen in die verschiedenen Mitosestadien wurde anhand der DAPI-Kernfärbung durchgeführt. (C) In unbestrahlten mitotischen Zellen wurden die Rad52-GFP-, Mus81-Foci-Werte und deren Kolokalisation bestimmt. Die Einteilung der Zellen in die verschiedenen Mitosestadien wurde anhand der DAPI-Kernfärbung durchgeführt.

Wie bereits in der Lebendzellmikroskopie beobachtet, treten die bestrahlten Zellen mit einem erhöhten Rad52-GFP-Foci-Level in die Mitose ein. Zum Beginn der Mitose besitzen die Zellen im Mittel etwa 9 Foci pro Zelle. In derselben Phase sind etwa 3,5 strahleninduzierte Mus81-Foci pro Zelle vorhanden, welche sehr gut mit Rad52-GFP kolokalisieren. Es ist ein starker Abfall der Foci-Zahlen im Verlauf bis zur Metaphase zu beobachten. In der Prometaphase sind nur noch etwa 3,5 Rad52-GFP-Foci pro Zelle vorhanden. Von den etwa 1,5 Mus81-Foci in Prometaphase kolokalisiert mit Rad52-GFP noch etwa 1 Focus pro Zelle. In den folgenden Mitose-Phasen ist nur noch ein Rest-Level von Rad52-GFP-Foci detektierbar.

Der Versuch zeigt, dass durch Rad52-GFP markierte DNA-Bereiche in die Mitose transferiert werden und dort mit Mus81 kolokalisieren. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die überführten Strukturen HR-Intermediate darstellen, welche in der Mitose vor der

Chromatidsegregation von der Endonuklease Mus81 aufgelöst werden. Dass etwas weniger als die Hälfte der in Pro- und Prometaphase detektierten Rad52-GFP-Foci mit Mus81 kolokalisiert, könnte ein Anzeichen dafür sein, dass nicht alle HR-Intermediate dieselbe Struktur aufweisen und möglicherweise nicht im gleichen Maße ein Substrat für Mus81 darstellen. Zudem könnten andere strukturspezifische Endonukleasen an der Auflösung von HR-Intermediaten in der Mitose beteiligt sein.

4.6 Rad52-GFP-Foci-Kinetiken in der G2-Phase nach Rad51-Inhibition

Aufgrund der Beobachtung, dass Rad52-GFP erst spät nach der Bestrahlung in der G2-Phase rekrutiert wird, wurde zunächst vermutet, dass Rad52 eine Rolle in späten Schritten der HR hat, was konsistent mit der Literatur wäre. Hieraus entstand die Hypothese, dass die Rad52-Foci-Ausbildung unterbleiben sollte, wenn frühe Schritte der HR inhibiert werden. Um diese Hypothese zu testen, wurde der Rad51-*small molecule*-Inhibitor B02 eingesetzt. Durch Inhibition der Rad51-DNA-Interaktion (Huang et al. 2012), wird die Nukleoproteinfilament-Ausbildung verhindert, und in Folge bleiben die Rad51-vermittelte Stranginvasion, die D-Loop-Ausbildung sowie die *Second-End-Capture-Reaktion* aus.

Hierzu wurde U2OS Rad52-GFP Klon1-Zellen 30 min vor Bestrahlung der Inhibitor zusammen mit EdU zugegeben. Die Zellen wurden mit 1 Gy bestrahlt und Kinetiken bis zu 8 h nach Bestrahlung angefertigt. Es wurden die γ H2AX- und Rad52-GFP-Foci in G2-Zellen quantifiziert.

Wie Abbildung 29 A zeigt, sind zum Zeitpunkt 0,25 h nach Bestrahlung die γ H2AX-Foci-Level in den Proben mit und ohne Inhibitor mit etwa 45 γ H2AX-Foci pro Zelle annähernd gleich und fallen über den Zeitraum von 2 h im gleichen Maße auf etwa 25 Foci pro Zelle ab. Ab dem Zeitpunkt 4 h nach Bestrahlung kann in den Proben mit B02-Zugabe ein erhöhtes γ H2AX-Level gegenüber den Proben ohne Inhibitor verzeichnet werden. Während in B02-Inhibitor behandelten Zellen ab 4 h der Wert um etwa 16 Foci pro Zelle stagniert, sinkt der Wert in den unbehandelten Zellen stetig bis zu einem Minimum von etwa 7 Foci pro Zelle bei 8 h nach Bestrahlung. Dies lässt darauf schließen, dass der verwendete Inhibitor einen Reparaturdefekt in der langsamen Komponente erzeugt und folglich in der Lage ist, die HR zu inhibieren.

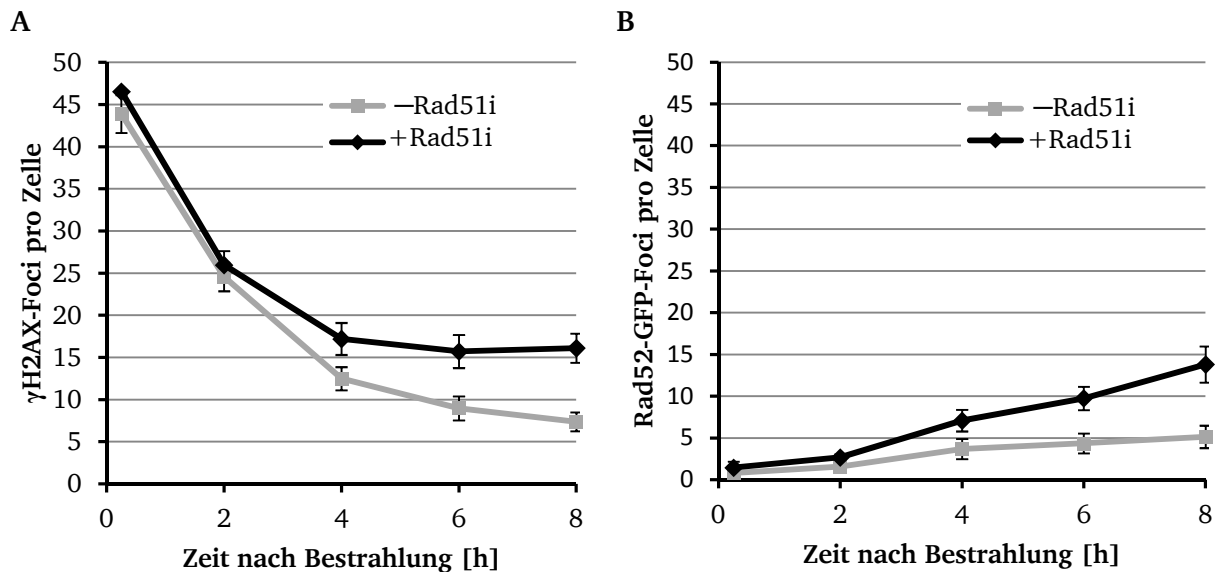


Abbildung 29: γ H2AX- und Rad52-GFP-Foci-Kinetik in der G2-Phase nach 1 Gy Bestrahlung ohne und mit Rad51-Inhibitor B02. U2OS Rad52-GFP Klon 1-Zellen wurde 30 min vor Bestrahlung EdU und B02 zugegeben. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung fixiert und für die IFM gefärbt. (A) Analyse der Foci-Werte von γ H2AX in G2-Phase-Zellen nach Bestrahlung. Die Fehlerbalken der unbehandelten Zellen sind der Standardfehler der Mittelwerte aus 4 Experimenten. Die Fehlerbalken der B02-behandelten Zellen sind der Standardfehler der Mittelwerte aus drei Experimenten. Foci-Werte von unbestrahlten Kontrollzellen wurden abgezogen (unbehandelt: 9,2; B02-Inhibitor: 11,6) (B) Analyse der Foci-Werte von Rad52-GFP in G2-Phase-Zellen nach Bestrahlung. Die Fehlerbalken der unbehandelten Zellen sind der Standardfehler der Mittelwerte aus vier Experimenten. Die Fehlerbalken der B02-behandelten Zellen sind der Standardfehler der Mittelwerte aus drei Experimenten. Foci-Werte von unbestrahlten Kontrollzellen wurden abgezogen (unbehandelt: 4,6; B02-Inhibitor: 5,8)

Im Gegensatz zu den hohen γ H2AX-Foci-Zahlen direkt nach Bestrahlung, zeigen dieselben Zellen direkt nach Bestrahlung nur etwa einen Rad52-GFP-Focus (siehe Abbildung 29 B). In den folgenden 8 h Reparaturzeit steigen die Rad52-GFP-Foci in den unbehandelten Zellen kontinuierlich bis zu einem Maximum von etwa 5 Foci pro Zelle an. Dies wurde bereits in vorigen Experimenten beobachtet. Überraschenderweise wurde in den B02-behandelten Zellen ein noch stärkerer Anstieg der Rad52-GFP-Foci ab 2 h nach Bestrahlung beobachtet. Zum Zeitpunkt 8 h nach IR erreichten die Rad52-GFP-Foci das Maximum von etwa 14 Foci pro Zelle. In Abbildung 30 sind U2OS-Rad52-GFP Klon 1-Zellen zu den Zeitpunkten 2 h und 8 h nach Bestrahlung mit 1 Gy mit und ohne Inhibitor dargestellt. Deutlich wird hierbei das erhöhte Rad52-GFP- und γ H2AX-Foci-Level in den mit Inhibitor behandelten Zellen.

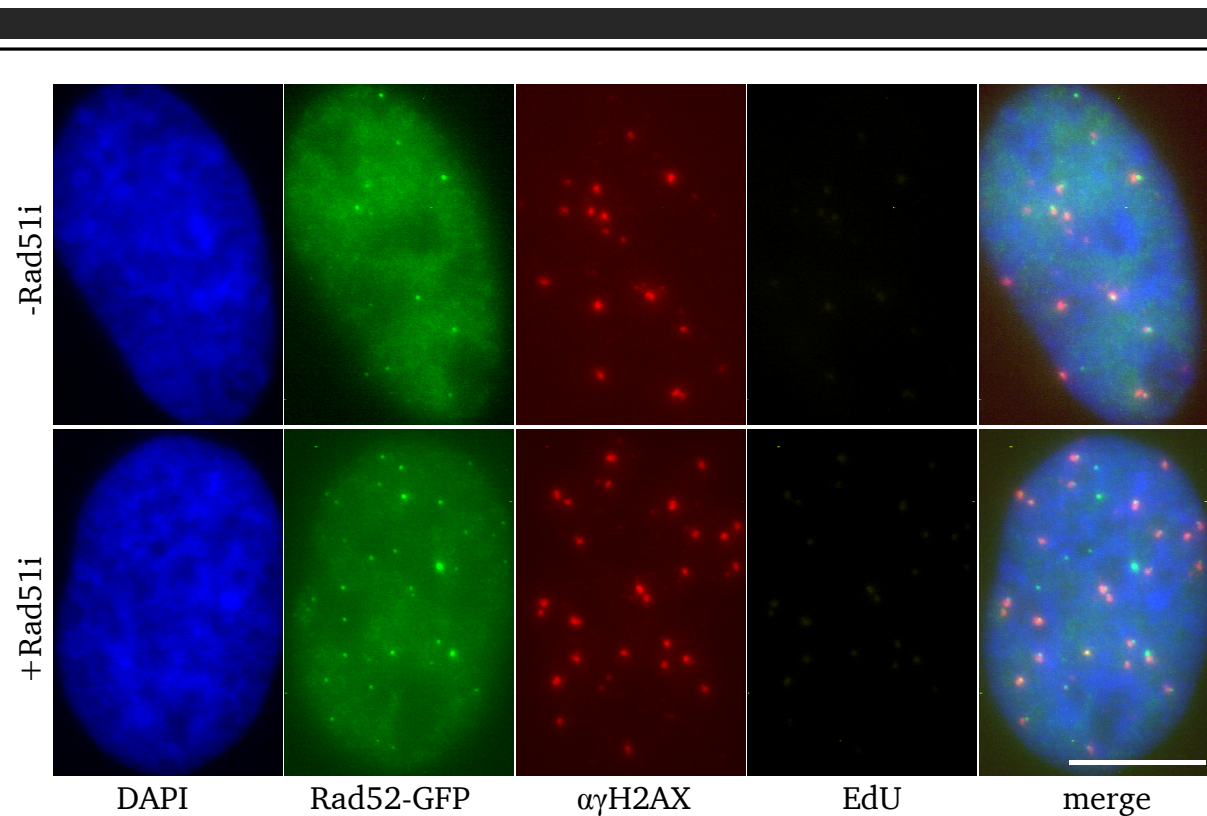


Abbildung 30: Immunfluoreszenzfärbung in U2OS Rad52-GFP Klon 1-Zellen. Die Zellen wurden 30 min vor Bestrahlung mit EdU und dem Inhibitor B02 behandelt. Die Zellen wurden mit 1 Gy bestrahlt und nach 8 h fixiert. Die IF-Färbung wurde mit Antikörpern gegen γ H2AX durchgeführt. G2-Phase-Zellen wurden mithilfe der Scanning-Funktion von Metafer 4-MetaCyte ausgewählt. Der Maßstab beträgt 10 μ m.

Um auszuschließen, dass dieses Ergebnis U2OS-zelltypspezifisch ist, wurde das vergleichbare Experiment in HeLa Rad52-GFP Klon A-Zellen durchgeführt. Auch in diesen Zellen konnte durch eine Rad51-Inhibition der HR-Reparaturdefekt auf Ebene der γ H2AX-Foci in den G2-Phase-Zellen gezeigt werden (Abbildung 31A). Bei der Quantifizierung der Rad52-GFP-Foci wurde erneut ein stärkeres Ansteigen ab 2 h nach Bestrahlung beobachtet. Wie bereits in den unbehandelten HeLa Rad52-GFP Klon A-Zellen nach IR beschrieben, zeigen auch B02-behandelte Zellen das Maximum der Rad52-GFP-Foci bei 6 h nach Bestrahlung. Erstaunlicherweise liegt der Wert in behandelten Zellen mit etwa 24 Foci pro Zelle bei fast dem 2,5fachen des Werts in unbehandelten Zellen (siehe Abbildung 31).

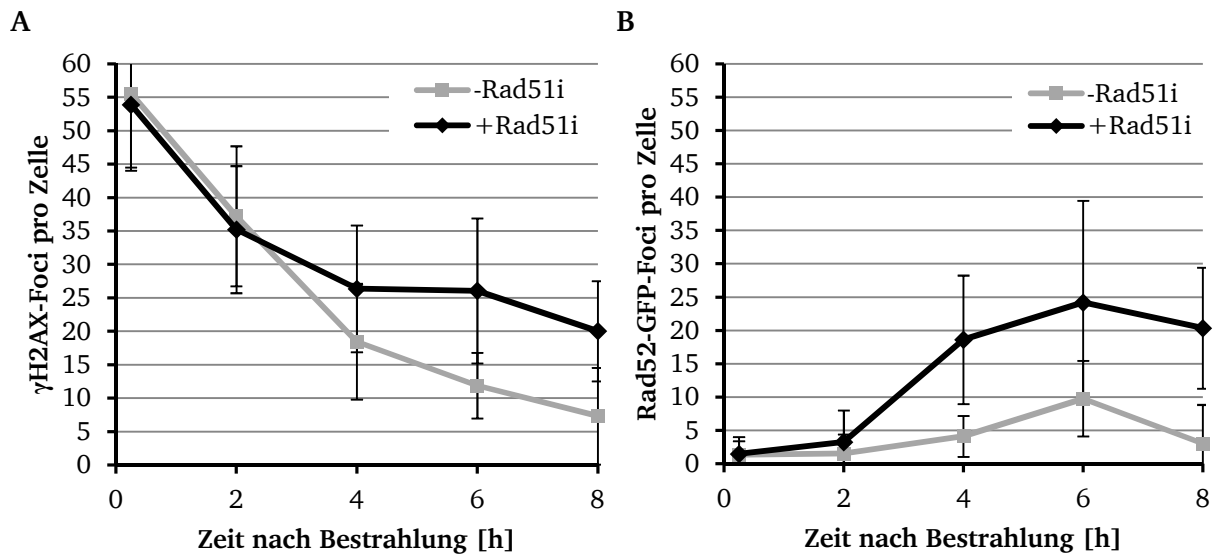


Abbildung 31: γ H2AX- und Rad52-GFP-Foci-Kinetik in der G2-Phase nach 2 Gy Bestrahlung ohne und mit Rad51-Inhibitor B02. HeLa Rad52-GFP Klon A-Zellen wurde 30 min vor Bestrahlung EdU und B02 zugegeben. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung fixiert und für die IFM gefärbt. (A) Analyse der Foci-Werte von γ H2AX nach Bestrahlung. Die Fehlerbalken der unbestrahlten Zellen sind die Standardabweichung der Einzelwerte aus einem Experiment. Die Fehlerbalken der B02-behandelten Zellen sind der Standardfehler der Einzelwerte aus einem Experiment. Die Foci-Werte von unbestrahlten Kontrollzellen wurden abgezogen (unbehandelt: 9,3; B02-Inhibitor: 10,3) (B) Analyse der Foci-Werte von Rad52-GFP nach Bestrahlung. Die Fehlerbalken der unbestrahlten Zellen sind die Standardabweichung der Einzelwerte aus 40 Zellen. Die Fehlerbalken der B02-behandelten Zellen sind die Standardabweichung der Einzelwerte aus 40 Zellen. Die Foci-Werte von unbestrahlten Kontrollzellen wurden abgezogen (unbehandelt: 2,9; B02-Inhibitor: 2,3)

Die Messung der γ H2AX-Foci-Kinetiken zeigt, dass die Inhibition von Rad51 zu dem bereits beschriebenen HR-Reparaturdefekt in der G2-Phase führt. Dieser manifestiert sich erst zu den späteren Zeitpunkten, wenn die schnelle Reparaturkomponente (NHEJ) größtenteils abgeschlossen ist und die langsame Reparatur durch HR an Bedeutung gewinnt. Im Gegensatz zu den γ H2AX-Foci, deren Werte das Maximum direkt nach der Bestrahlung haben und dann im Zuge der Reparatur abfallen, zeigen die Rad52-GFP-Foci einen langsamen aber stetigen Anstieg über die Zeit. Eine Inhibition von Rad51 führt dazu, dass sich sogar mehr Rad52-GFP-Foci ausbilden. Dies deutet darauf hin, dass die Rad52-GFP-Rekrutierung nicht oder nicht ausschließlich von einer Rad51-vermittelten Stranginvasion und einem darauf folgenden *Second-End-Capture*-Schritt abhängig ist.

Auffällig ist zudem, dass nahezu alle in der späten G2-Phase akkumulierenden Rad52-GFP-Foci mit den verbliebenden γ H2AX-Foci kolokalisieren. Somit bindet Rad52-GFP an jeden mit γ H2AX markierten DSB, welcher im Zuge der G2-Phase nicht über den Rad51-abhängigen Pfad der HR repariert wurde.

Wird die HR durch Inhibition von Rad51 an der Reparatur von DSBs gehindert, sollten die *upstream* von Rad51 stattfindenden Reaktionen dennoch intakt bleiben. Können sich keine Rad51-Filamente ausbilden, verbleiben somit mehr für die HR-lizensierte, resektierte und in Folge mit RPA beladene DNA-Bereiche unrepariert. Da RPA als Interaktionspartner von Rad52 beschrieben ist, sollte nun untersucht werden, ob das hohe Rad52-GFP-Level darauf zurückzuführen ist, dass es an RPA an resektierten Bereichen bindet.

Die Kinetiken wurden zunächst in U2OS Rad52-GFP Klon 1-Zellen angefertigt. Wie aus Abbildung 32A ersichtlich, führt eine B02-vermittelte HR-Inhibition nach Bestrahlung zu einem verstärkten Anstieg der pRPA-Foci über den beobachteten Zeitraum. 8 h nach Bestrahlung stehen etwa 6,5 pRPA-Foci in unbehandelten den etwa 13 pRPA-Foci pro Zelle in den behandelten Proben gegenüber. Auffällig ist die nahezu identische Kinetik im Vergleich zu den Rad52-GFP-Foci in Zellen mit und ohne Inhibitor (siehe Abbildung 29). Wie bereits zuvor beschrieben (siehe Kapitel 4.4.3), lassen sich in den U2OS Rad52-GFP Klon 1-Zellen die vermutlich vorhandenen resektierten Bereiche zum frühen 2 h-Punkt nicht anhand des pRPA-Signals detektieren. Dies könnte an einer verzögerten Phosphorylierung des RPA32 liegen. Dagegen tritt das Maximum der pRPA-Foci in HeLa-Zellen schon nach 2 h auf (siehe Kapitel 4.4.3). Daher sollte die Auswirkung der Inhibition auf das pRPA-Level auch in diesen Zellen gemessen werden.

Die pRPA-Kinetiken in HeLa WT- und Rad52-GFP Klon A-Zellen lassen die durch pRPA markierte, strahleninduzierte und zum 2 h-Zeitpunkt maximale Resektion erkennen (siehe Abbildung 32B und C). Zu den folgenden Zeitpunkten fällt das pRPA-Foci-Level vermutlich aufgrund der Reparatur durch HR ab. Durch den Einsatz des Rad51-Inhibitors B02 kann in beiden Zelllinien der HR-Defekt nach Bestrahlung auf pRPA-Ebene gezeigt werden. In beiden Zelllinien steigt das Level der pRPA-Foci bis zum 2 h-Punkt vergleichbar mit den unbehandelten Zellen an. In mit Inhibitor behandelten HeLa Rad52-GFP Klon A-Zellen steigt der Wert weiter auf etwa 23 Foci pro Zelle bis 6 h nach Bestrahlung an. In der HeLa WT-Zelllinie steigt der Wert nur gering auf etwa 19 Foci pro Zelle bis 6 h nach Bestrahlung an. In Abbildung 33 sind HeLa Ra52-GFP Klon A-Zellen zum 6 h-Zeitpunkt nach Bestrahlung mit 2 Gy mit und ohne Inhibitor dargestellt. Hierbei wird das erhöhte Rad52-GFP- und pRPA-Foci-Level in mit Inhibitor behandelten Zellen deutlich. Zudem kolokalisieren beide Faktoren stark. In beiden Zelllinien fällt der pRPA-Wert zwischen 6 und 8 h wieder ab. Ein Abfall der Foci-Werte zwischen dem 6 und 8 h-Zeitpunkt trat auch bei den unbehandelten Zellen auf. Dieser Effekt wurde erstmals bei Rad52-GFP-Foci in HeLa Rad52-GFP Klon A-Zellen beobachtet (siehe Kapitel 4.4.2), und zunächst der fortschreitenden Reparatur mittels HR zugeschrieben.

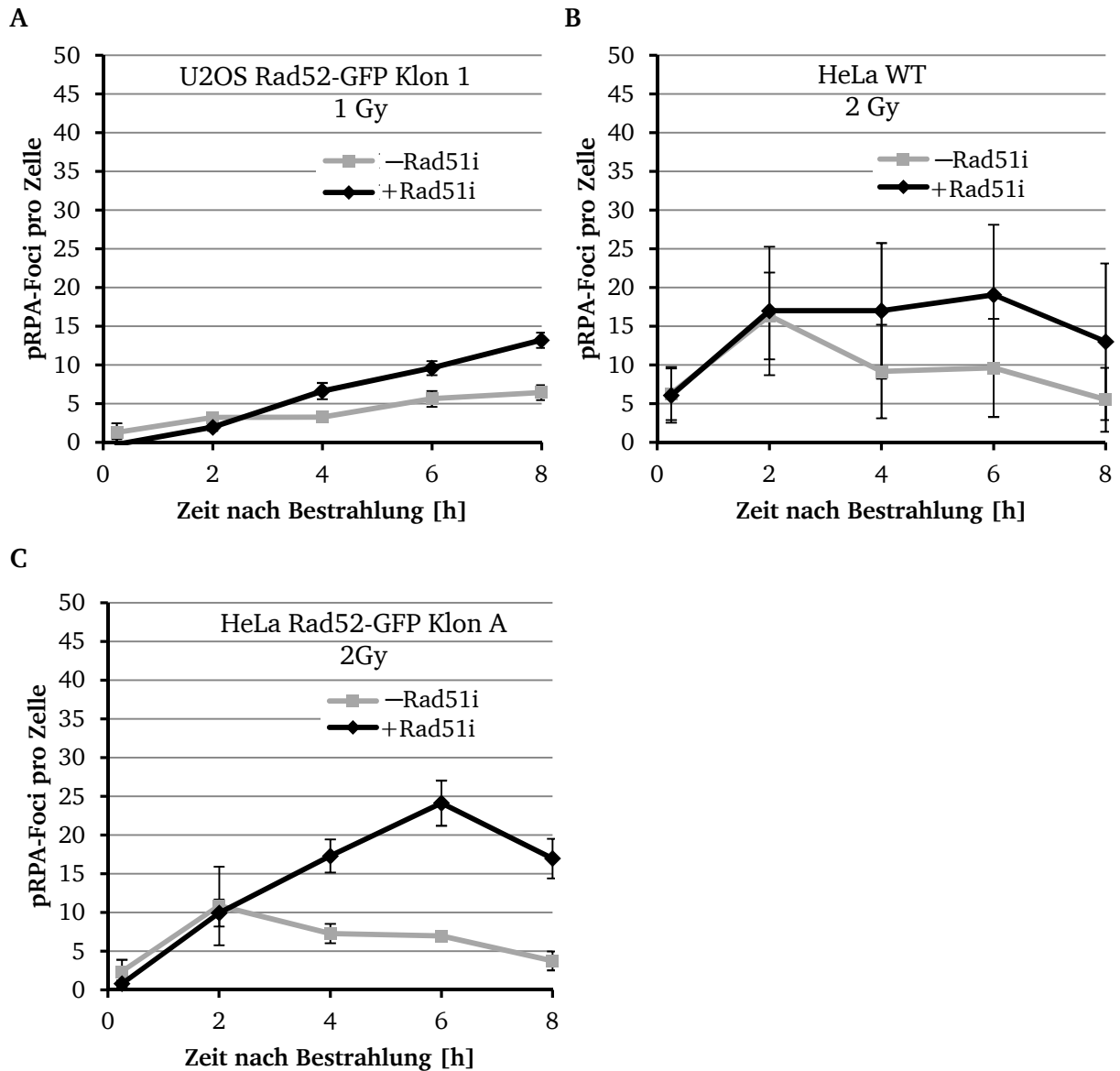


Abbildung 32: pRPA-Foci-Kinetik in der G2-Phase nach Bestrahlung nach 1 Gy oder 2 Gy ohne und mit Rad51-Inhibitor B02. Den Zellen wurde 30 min vor Bestrahlung EdU und B02 zugegeben. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung fixiert und für die IFM gefärbt. (A) U2OS Rad52-GFP Klon A-Zellen. Die Fehlerbalken der unbestrahlten Zellen sind der Standardfehler der Mittelwerte aus vier Experimenten. Die Fehlerbalken der B02-behandelten Zellen sind der Standardfehler der Mittelwerte aus drei Experimenten. Foci-Werte von unbestrahlten Kontrollzellen wurden abgezogen (unbehandelt: 10,1; B02-Inhibitor: 12,5) (B) HeLa WT-Zellen. Die Fehlerbalken der B02-behandelten und der unbestrahlten Zellen sind die Standardabweichung von 40 Zellen eines Experiments. Foci-Werte von unbestrahlten Kontrollzellen wurden abgezogen (unbehandelt: 4,0; B02-Inhibitor: 2,7). (C) HeLa Rad52-GFP Klon A-Zellen. Die Fehlerbalken der B02-behandelten und der unbestrahlten Zellen sind die Standardabweichung der Mittelwerte aus zwei Experimenten. Foci-Werte von unbestrahlten Kontrollzellen wurden abgezogen (unbehandelt: 7,9; B02-Inhibitor: 7,6)

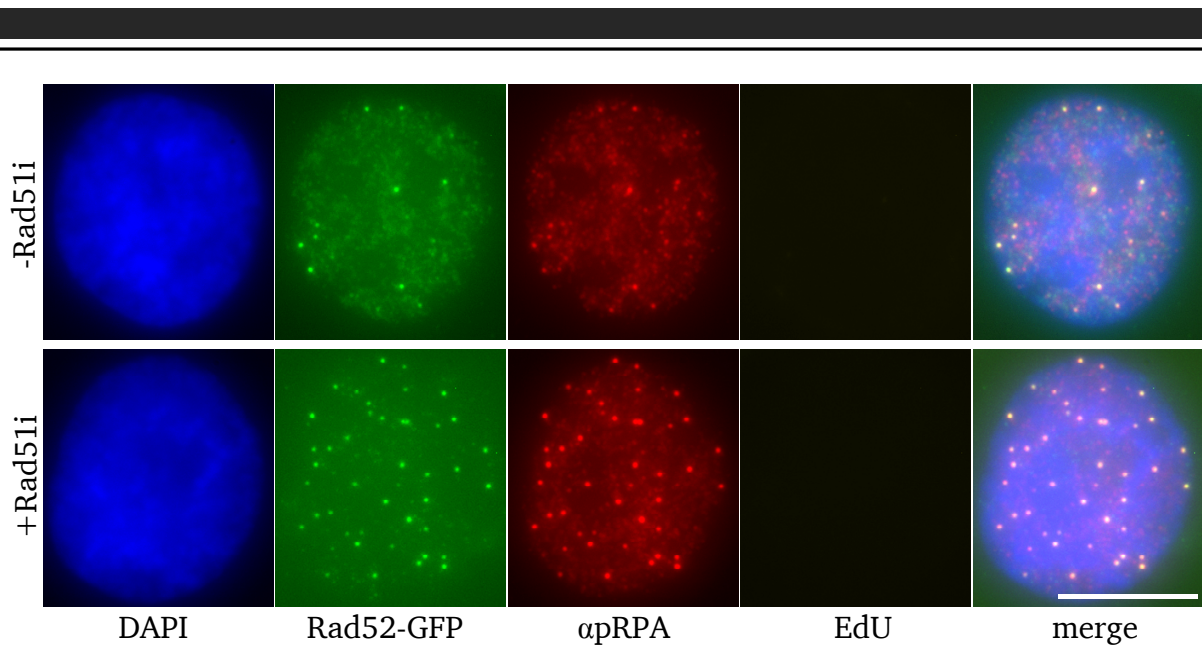


Abbildung 33: Immunfluoreszenzfärbung in HeLa Rad52-GFP Klon A-Zellen. Die Zellen wurden 30 min vor Bestrahlung mit EdU und dem Inhibitor B02 behandelt. Die Zellen wurden mit 2 Gy bestrahlt und nach 6 h fixiert. Die IF-Färbung wurde mit Antikörpern gegen das Epitop pRPA32 durchgeführt. G2-Phase-Zellen wurden mithilfe der Scanning-Funktion von Metafer 4-MetaCyte ausgewählt. Der Maßstab beträgt 10 μm .

Da sich der Wert aber auch in den HR-inhibierten Zellen verringert, bleibt fraglich, ob der Abfall in WT-Zellen wirklich durch die Reparatur der DSBs zustande kommt.

Die Versuche zeigen, dass durch den Einsatz des Rad51-Inhibitors nach Bestrahlung ein HR-Reparaturdefekt entsteht. Hieraus resultiert ein erhöhtes γH2AX -Foci-Level. An den hierdurch vermehrt auftretenden, durch pRPA markierten resektierten Bereichen ist zu späten Zeitpunkten in hohem Maße Rad52-GFP lokalisiert. Somit ist die Rekrutierung des Faktors Rad52-GFP zu späten Zeitpunkten nicht abhängig von einer Rad51-Filamentausbildung und den daraus resultierenden Strukturen. Stattdessen wird Rad52-GFP an seinen Interaktionspartner, das pRPA rekrutiert. Findet keine Rad51-Beladung und Stranginvasion statt, kann mehr Rad52-GFP an die vermehrt unreparierten pRPA-beladenen Bereiche binden. Somit bindet Rad52-GFP wohl nicht ausschließlich an *Second-End-Capture*-Strukturen sondern möglicherweise generell an pRPA-beladene Strukturen zu späten Zeiten in der G2-Phase.

4.7 Rad52-GFP- und γ H2AX-Foci in Mitose nach Rad51-Inhibition

Da die HR-Inhibition in der G2-Phase zu einem Reparaturdefekt führte, war nach Bestrahlung das γ H2AX- und das Rad52-GFP-Foci-Level in der späten G2-Phase erhöht. Daher sollte untersucht werden, ob die Zellen aufgrund des hohen DSB-Levels in der G2-Phase verbleiben oder dennoch in die Mitose eintreten. Dazu wurden HeLa Rad52-GFP Klon A-Zellen 30 min vor der Bestrahlung mit EdU und mit oder ohne Inhibitor behandelt. Die Zellen wurden mit 2 Gy bestrahlt, nach 7 h fixiert und gegen γ H2AX für die IFM gefärbt. Mitotische Zellen wurden anhand des DAPI-gefärbten Chromatins identifiziert, wobei nur EdU-negative Zellen in die Auswertung einfließen.

Wie in Abbildung 34A dargestellt, konnten bestrahlte Zellen, welche mit dem HR-Inhibitor behandelt wurden, auch mit einem erhöhten Schadenslevel in die Mitose eintreten. Bestrahlte HeLa Rad52-GFP Klon A-Zellen weisen 7 h nach Bestrahlung etwa 9,5 γ H2AX-Foci pro Zelle auf (siehe Abbildung 34B). Bis zur Prometaphase fällt der Wert auf etwa 8,4 Foci pro Zelle ab. Die Behandlung mit dem Inhibitor führt dazu, dass Prophase-Zellen mit etwa 27 γ H2AX-Foci pro Zelle ein deutlich erhöhtes Foci-Level aufweisen. In der Prometaphase fällt der Foci-Wert auf etwa 23,5 Foci pro Zelle ab.

In bestrahlten Proben ohne Inhibitor zeigen Prophase-Zellen etwa 8,5 Rad52-GFP-Foci pro Zelle (siehe Abbildung 34B). Der Wert fällt bis zur Prometaphase auf etwa 4 Foci pro Zelle ab. Nach Einsatz des Inhibitors weisen Prophase-Zellen etwa 25 Rad52-GFP-Foci pro Zelle auf, was einer Verdreifachung der Foci-Werte durch die Behandlung gleich kommt. In der Prometaphase fällt der Rad52-GFP-Foci-Wert auf etwa 14,5 Foci pro Zelle ab. Während in den behandelten und den unbehandelten Zellen der Abfall der Rad52-GFP-Foci-Werte zwischen Pro- und Prometaphase recht deutlich ist, ist dieser Rückgang auf γ H2AX-Foci-Level weniger stark ausgeprägt.

Das Experiment zeigt deutlich, dass der durch die Rad51-Inhibition induzierte Reparaturdefekt auch in der Mitose sichtbar ist. Hierbei fiel die Anzahl der γ H2AX-Foci zwischen Pro- und Prometaphase in behandelten und unbehandelten auf etwa 87% ab. Dies ist überraschend, da in unbehandelten Zellen ein Abfall der γ H2AX-Foci in der Mitose als eine Auflösung von HR-Intermediaten, gefolgt von einer γ H2AX-Dephosphorylierung interpretiert werden könnte. Ein prozentual gleichstarker Abfall in HR-inhibierten Zellen widerspricht dieser Annahme jedoch. Der Abfall der Foci-Zahlen könnte daher auch auf Chromatinstrukturänderungen und somit einen anderen Mechanismus der Foci-Auflösung zurückgeführt werden.

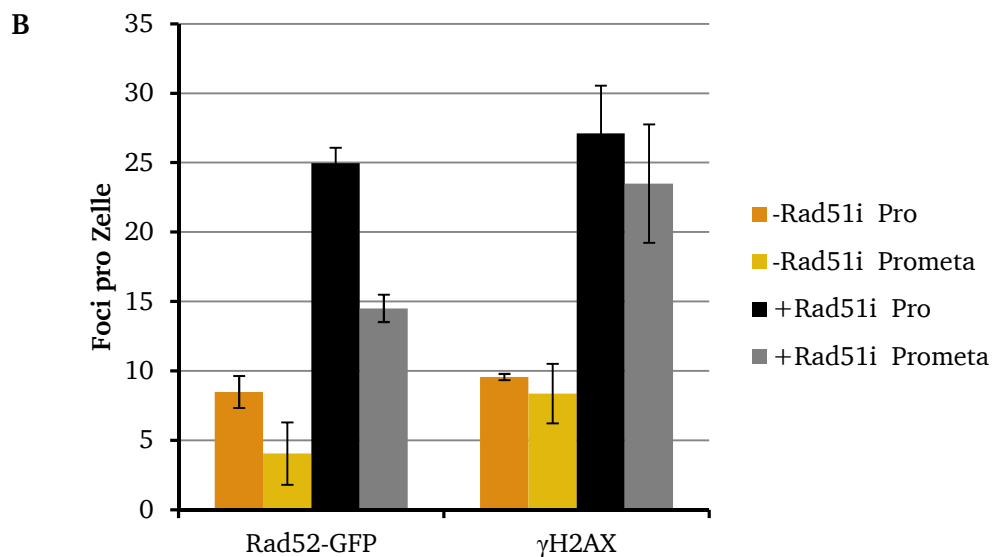
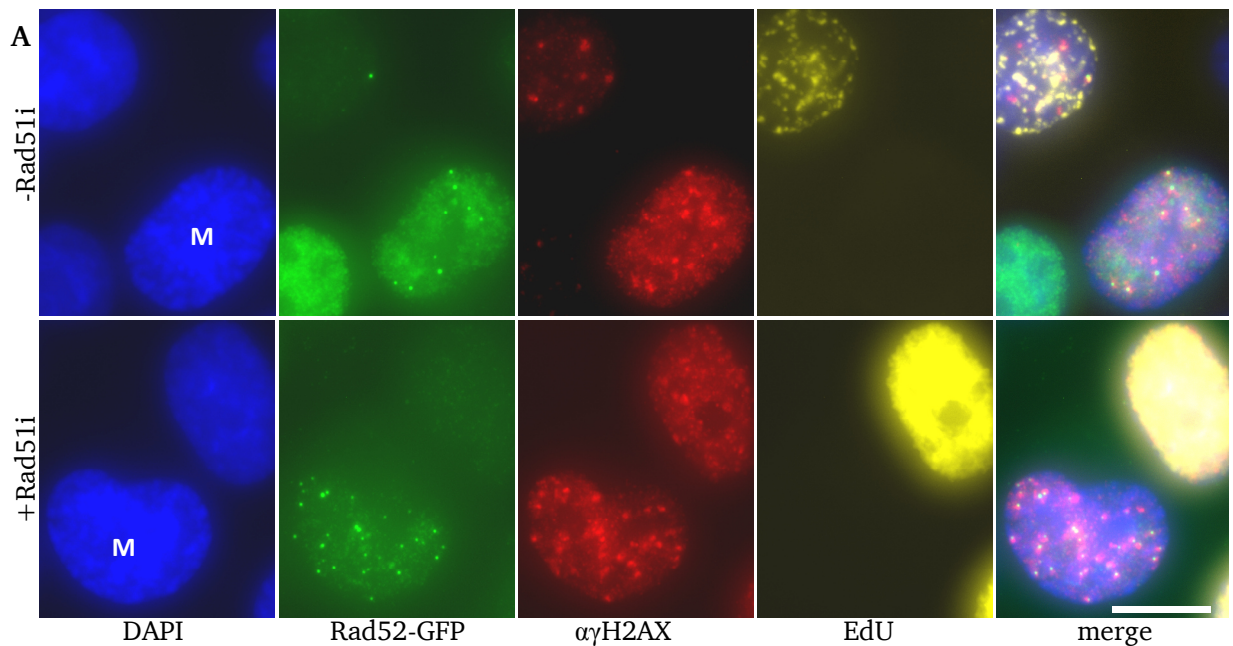


Abbildung 34: Rad52-GFP- und γ H2AX-Foci in Mitose nach Behandlung mit Rad51-Inhibitor. In G2-Phase bestrahlte HeLa Rad52-GFP Klon A-Zellen. Den Zellen wurde 30 min vor Bestrahlung EdU und der Inhibitor B02 zugegeben. Die Zellen wurden 7 h nach Bestrahlung fixiert und für die IFM gefärbt. (A) Beispielhafte Darstellung der Differenzierung der Zellzyklusphasen zur Bestimmung der Foci-Zahlen von Rad52-GFP und γ H2AX in mitotischen Zellen. (B) Analyse der Foci-Werte von γ H2AX und Rad52-GFP nach 2 Gy Bestrahlung. Es wurden Pro- und Prometaphase-Zellen ausgewertet. Die Fehlerbalken sind die Standardabweichung der Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten. Foci-Werte von unbestrahlten Kontrollzellen wurden abgezogen (Rad52-GFP Prophase unbehandelt=1,78 Prometaphase unbehandelt=0,25; Prophase Rad51i=2; Prometaphase Rad51i=2,3; γ H2AX: Prophase unbehandelt=5,4; Prometaphase unbehandelt=4,25; Prophase Rad51i=6,9; Prometaphase Rad51i=5,3)

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Rad51-Inhibition zu mehr pRPA-Foci nach IR in der G2-Phase führt, da die resektierten Bereiche nicht weiter prozessiert werden. Zudem führt die Rad51-Inhibition zu mehr Rad52-GFP-Foci zu späten Zeiten, welche mit pRPA kolokalisieren. Das erhöhte Level ist zudem ebenfalls in der Mitose sichtbar. Dies lässt darauf schließen, dass Rad52-GFP in der späten G2-Phase offensichtlich nicht nur an Strukturen *downstream* der Stranginvasion bindet, sondern generell an RPA beladene ssDNA-Bereiche.

5 Diskussion

Im ersten Teil der Arbeit sollten Plasmide und transgene Zelllinien hergestellt werden, die eine Untersuchung der DSB-Induktion und -Reparatur über verschiedene Wege auf Einzelzellebene erlauben. Im ersten Kapitel der Diskussion sollen die Aspekte der in dieser Arbeit verwendeten Methoden eingegangen werden. Hierzu zählen die Klonierung der DNA-Konstrukte und die darauf basierende Herstellung transgener Zelllinien für Immunfluoreszenz- wie auch Lebendzellmikroskopie-Experimente. Diese vorangegangenen Arbeiten waren für die Gewinnung wissenschaftlich relevanter Erkenntnisse essentiell gewesen.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollten basierend auf den Zelllinien DNA-Reparaturprozesse nach IR in Abhängigkeit zur Zellzyklusphase untersucht werden. In den weiteren Kapiteln werden die mithilfe der vorangegangenen Arbeiten erlangten Ergebnisse aus der Immunfluoreszenz und der Lebendzellmikroskopie in Bezug auf der Suche nach in die Mitose eintretenden HR-Strukturen diskutiert.

5.1 Ektopische Überexpression Fluorochrom-gekoppelter HR-Faktoren

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Vielzahl von DNA-Konstrukten mit dem Ziel erstellt, Faktoren für spezifische DNA-Reparaturprozesse und Zellzyklusmarker mit Fluorochromen zu koppeln, so dass sie für IFM und Lebendzellmikroskopie genutzt werden können. Die Großzahl der kommerziell erhältlichen Vektorsysteme basiert auf dem Prinzip der Expression des GOI unter der Kontrolle des starken konstitutiv aktiven *Immediate-early* Promotor des humanen Cytomegalovirus (CMV). Dieser Promotor kam in allen erzeugten DNA-Konstrukten zum Einsatz. Bringt man ein zelleigenes Gen zur konstitutiven Überexpression ignoriert man dabei gleichzeitig, dass die überwiegende Anzahl der endogenen Proteine abhängig von der Zellzyklusphase und inneren sowie äußeren Einflüssen exprimiert wird. Fluorochrom-gekoppelte Proteine werden meist überexprimiert, um sich ihre Funktion in Signalkaskaden oder in Komplexen mit anderen Proteinen zu betrachten. Dabei kann gerade diese Überexpression zu einer Beeinträchtigung des intrazellulären Milieus und zellulärer Fehlregulation bis hin zur Apoptose führen. Im Fall der Überexpression von Rad51, hatte die Erhöhung der intrazellulären Konzentration einen unmittelbaren Effekt auf Proteinebene. Wurde hierbei eine Konzentrationsschwelle überschritten, verlagerte sich das Gleichgewicht aus frei gelöstem und spontan gebundenem Protein derart, dass es zu der ungesteuerten Polymerisierung des Rad51-Monomers an ssDNA-Bereichen kam. Dies hatte eine erhöhte

spontane Rekombination und Zellsterblichkeit zur Folge und machte diesen HR-Marker für die Untersuchung von HR-Ereignissen in lebenden Zellen unbrauchbar.

Im Gegensatz zu Rad51 stellten sich Rad54-Konstrukte für eine konstitutive Überexpression des Fluorochrom-gekoppelten Rad54 als geeignet heraus. Die Ursache hierfür liegt neben der transkriptionellen vor allem in der postrationalen Regulation des zellulären Rad54-Proteinlevels (Mazin et al. 2010). Somit reguliert die Zelle auch das Transgen konzentrations- und zellzyklusabhängig und verhindert somit, dass Rad54-regulierte Prozesse aus dem Gleichgewicht geraten. In dieser Arbeit wurde eine U2OS Rad54-GFP-Zelllinie verwendet, welche bereits gute Ergebnisse lieferte. Zeitgleich wurde eine Zelllinie hergestellt (U2OS 53BP1-GFP Rad54-mCherry Klon 1211), welche 53BP1-GFP und Rad54-mCherry überexprimiert. Diese erwies sich nach eingänglichen Tests als gut geeignet, um HR-Prozesse bei gleichzeitiger DSB-Markierung zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit kam die Zelllinie nicht zum Einsatz, da Rad54 wie auch 53BP1 nicht in Form von DSB-assoziierten Foci bei der G2/M-Transition zu beobachten sind. Für zukünftige Studien, welche sich mit z.B. mit HR-Prozessen in S- oder G2-Phase beschäftigen, würde sich diese jedoch ausgezeichnet eignen. Nur noch wenige Schritte wären notwendig, um mit dem vorhandenen Plasmid ptagBFP-Ligase (L65) eine dreifarbige Zelllinie für zellzyklusspezifische Untersuchungen in lebenden Einzelzellen zu erzeugen.

Während es sich bei Rad51 und Rad54 um für die HR essentielle Faktoren handelt, wird Rad52 aufgrund des in der Evolution höherer Eukaryoten entstandenen BRCA2 als nicht essentielles Protein betrachtet. Nichtessentielle Proteine ektopisch zur Expression zu bringen ist prinzipiell weniger kritisch, da die Zelle über redundante Regulationsmechanismen verfügt und eine einseitige Veränderung der Proteinkonzentration kaum eine Auswirkung hat. Dennoch kann die Möglichkeit einer ungewollten Veränderung der zellulären Prozesse nicht vollkommen ausgeschlossen werden, so dass dies zunächst überprüft werden sollte. Aufgrund der Beteiligung von Rad52 an mehreren DNA-Reparaturwegen (HR, SSA) wurden die Rad52-GFP-Zelllinien auf ihre DNA-Reparatur-Kapazität mittels γ H2AX-Foci-Analyse hin überprüft. WT- und transgene Zelllinien wiesen dabei das gleiche biphasische Reparaturverhalten auf. Auch in der Entstehung und Auflösung der Rad51- und pRPA-Foci, welche die Reparatur über die langsame Komponente der HR repräsentieren, zeigten die Zelllinien ein identisches Verhalten. Daher wurden die Zellen äquivalent verwendet.

Neben diesen biochemischen Gründen sprechen auch technische Gründe für das Anstreben einer möglichst geringen Expression des Transgens.

So sind gerade für die Lebendzellmikroskopie geringere Expressionsstärken von erheblichem Vorteil, wenn es darum geht, subzelluläre Vorgänge zu beobachten. Hier kann durch ein

geringeres Proteinlevel die Hintergrundfluoreszenz verringert werden, um somit einen höheren Kontrast z.B. im Fall einer Foci-Bildung nach Bestrahlung zu erhalten. Die in dieser Arbeit etablierten Zelllinien weisen überwiegend moderate Expressionsstärken auf, jedoch ist es auch hier für den ungeübten Betrachter häufig schwieriger, die Signale IR-induzierter Foci von dem pan-nukleären Hintergrundsignal zu unterscheiden.

Um die vielzähligen Probleme einer ektopischen Überexpression zu reduzieren, könnten in zukünftigen Arbeiten Expressionsvektoren mit Promotoren von geringerer Aktivität zum Einsatz kommen. Eine Expression des Fusionsproteins unter Kontrolle des nativen endogenen Promotors wird wegen der Größe der genomischen Promotorsequenzen und den Größenlimitierungen eines Transfektionsvektors bei einer Transfektion in den wenigsten Fällen praktikabel sein. Dennoch gibt es die Möglichkeit, auf andere Promotorsysteme zurückzugreifen, welche eine geringe Expression des GOI ermöglichen.

Die klassischen Vektorsysteme, wie sie auch in der Arbeit verwendet wurden, exprimieren die selektierbare Resistenz gegen das Selektionsantibiotikum unter der Kontrolle eines separaten Promotors. Dies führt bei der Selektion zu falsch-positiven Klonen, wenn diese nur das Resistenzgen, aber nicht das eigentliche GOI exprimieren. Bei der durchgeführten Selektion der einfach und doppelt transfizierten Zelllinien ergab ein Verhältnis von nur etwa 1:20 von fluoreszierenden Zellen zu Zellen, welche nur die Resistenz exprimierten. Eine weitere Verbesserung zu den bisherigen Klonierungsstrategien würde der Einsatz von Vektoren mit einer sogenannten *Internal ribosome entry site* (IRES) darstellen. Durch den Einsatz einer IRES kann unter der Kontrolle eines einzigen Promotors das GOI und die Resistenz in Form einer polycistronischen mRNA transkribiert werden. Somit erlangen Zellklone nur dann die selektierbare Resistenz, wenn sie gleichzeitig das GOI exprimieren. Ein solcher Vektor ist z.B. das Plasmid pH2B_mCherry_IRES_puro2 (L154), welches die Expression des GOI nach einer Selektion mit Puromycin garantiert. Der Einsatz dieses Vektorsystems könnte in zukünftigen Arbeiten den Aufwand bei der Suche nach positiven Klonen verringern.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass das verwendete Promotor/Vektorsystem für die konstitutive Expression fluoreszenzmarkierter Proteine nicht optimal, für die meisten im Rahmen dieser Arbeit zu exprimierenden GOI jedoch als ausreichend angesehen werden kann. Durch den Einsatz verschiedener selektierbarer Markergene konnten Zelllinien erzeugt werden, welche es ermöglichen, simultan verschiedene subzelluläre Prozesse im lebenden System zu verfolgen und zu analysieren.

5.2 Bestimmung der Zellzyklusphasen in der Lebendzellmikroskopie

In der angefertigten Arbeit sollte das Reparaturverhalten nach Bestrahlung in der G2-Phase untersucht werden. Die Voraussetzung hierfür ist die exakte Bestimmung der Zellzyklusphase in asynchron proliferierenden Zellen auf Einzelzellebene. Die Lebendzellmikroskopie besitzt einige Vorteile bei der Analyse des Zellzyklusverhaltens im Vergleich zu der klassischen Methode der IFM mit fixierten Zellen. Bei der IFM ist es möglich eine Zelle aufgrund ihres DNA-Gehalts und einer möglichen EdU-Inkorporation in eine bestimmte Zellzyklus-Phase einzuordnen. Da es sich jedoch nur um eine Momentaufnahme handelt, kann keine Aussage getroffen werden, wie sich die betrachtete Zelle zu früheren Zeitpunkten verhalten hat bzw. sich in Zukunft verhalten wird. Anders verhält es sich bei der Betrachtung lebender Zellen mittels der Lebendzellmikroskopie. Hier ist es möglich, einzelne Zellen bereits vor der geplanten Behandlung hinsichtlich ihres Zellzyklusverhaltens über einen längeren Zeitraum zu beurteilen. So erlauben bereits Phasenkontrastaufnahmen, anhand derer Zellteilungen detektiert werden können, Aussagen über das Proliferationsverhalten. Zusätzlich zu der lichtmikroskopischen Auswertung im Phasenkontrast besteht die Möglichkeit Fluorochromgekoppelte Proteine, die Zellzyklusabhängig exprimiert werden oder ihre Lokalisation über den Zellzyklus hinweg ändern mittels Fluoreszenzmikroskopie zu verfolgen. Im Laufe der Arbeit wurde der S-Phase-Marker dsRed-LigaseI eingesetzt, um mit hoher Effizienz gezielt in G2-Phase-Zellen analysieren zu können. Hierfür wurden Zellen ausgesucht, welche sich in der späten S-Phase befanden und voraussichtlich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der G2-Phase sein werden.

Die eigentlich als S-Phase-Marker eingesetzte DNA-LigaseI vereint einige positive Eigenschaften gegenüber Zellzyklusmarkern bei denen eine Aussage über die Zellzyklusphase aufgrund der Proteinkonzentration getroffen wird. Aufgrund der Ligase-Funktion an den Okazaki-Fragmenten während der Replikation, kann eine fluoreszenzmarkierte DNA-LigaseI anhand ihrer intranukleären Lokalisation in den Replikationszentren den Fortschritt der S-Phase anzeigen (Easwaran et al. 2005). Das Ende der S-Phase wird durch den Übergang eines punktförmigen Musters in ein flächig pan-nukleäres Signal im Zellkern markiert.

Diese exakte Trennung von S- und G2-Phase war bei den durchgeführten Versuchen von besonderer Bedeutung, da der verwendete DNA-Reparaturfaktor Rad52 nachgewiesenermaßen eine starke Akkumulation an arretierten Replikationsgabeln aufzeigt (Petermann et al. 2010) und zudem nur in G2-Phase bestrahlten Zellen analysiert werden sollte. Das LigaseI-Muster ermöglichte hierbei nicht nur den Ausschluss von S-Phase-Zellen aus der Auswertung, sondern erlaubte auch Aussagen darüber, in welchem Stadium der

S-Phase sich diese befanden. Somit konnte die Ausbeute von Zellen, welche sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung, die etwa 2 h nach der ersten Bildaufnahme stattfand, in der G2-Phase befinden sollten, erhöht werden.

Abschließend ist festzustellen, dass der Zellzyklusmarker DNA-LigaseI am besten geeignet ist um die Zellzyklusphasen S- und G2-Phase in der Lebendzellmikroskopie voneinander zu trennen. Der Grund hierfür liegt in der zellzyklusspezifischen intranukleären Lokalisation, welche eine exakte Aussage über die Beendigung der Replikation und somit den Eintritt in die G2-Phase liefert.

5.3 Das Zusammenspiel von Rad51, Rad54 und Rad52 in der späten G2-Phase

In früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Zellen nach IR in der G2-Phase, mit einer erhöhten Anzahl unreparierter Brüche wieder in die Mitose eintreten (Deckbar et al. 2007; Dissertation Eik Schumann, 2011). Zu diesen Zeiten ist die Reparatur über NHEJ weitestgehend abgeschlossen, und die noch verbliebenen Brüche werden über den langsamen Weg der HR repariert (Beucher et al. 2009). Dies zeigt sich z.B. darin, dass zu späten Zeiten nach IR γ H2AX-Foci mit den an der HR-beteiligten Proteinen Rad51 und Rad54 kolokalisieren (siehe 4.3.1). Somit lag zu Beginn der Arbeit die Vermutung nahe, dass diese Zellen mit HR-Strukturen in die Mitose eintreten. Allerdings konnten in mitotischen Zellen keine Rad51/54-Foci nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass beide Faktoren in einer wechselseitigen Abhängigkeit zueinander stehen. Rad54 wird benötigt, um Rad51 vom invadierten Strang zu entfernen und somit die Reparatursynthese zu ermöglichen. Fehlt Rad54, kann dieser Prozess nicht stattfinden und die Rad51-Filamente bleiben bestehen. Ebenso ist Rad54 von Rad51 abhängig, da ohne die Rad51-Filamentausbildung auch kein Rad54 binden kann (Takata et al. 2000; van Veelen, Lieneke R et al. 2005; Wesoly et al. 2006).

Aufgrund der Beobachtung, dass Rad54-GFP-Foci in der späten G2-Phase noch vorhanden waren, in der Mitose jedoch nicht mehr detektiert werden konnten, wurde das Verhalten von Rad54-GFP-Foci am G2/M-Übergang in dieser Arbeit mittels Lebendzellmikroskopie untersucht. Hierbei zeigte sich, dass sich die Foci-Zahlen im Laufe der G2-Phase langsam verringern, was als fortschreitende Reparatur interpretiert wurde. Interessanterweise konnte ein schnellerer Abfall der Foci-Zahlen in den letzten 2 h vor der Mitose beobachtet werden. Eine erste Erklärung hierfür könnte sein, dass auch die verbliebenen Brüche repariert werden. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da die DSBs in der Mitose noch nachweisbar sind und in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte, dass diese zur Entstehung von Chromosomen-

brüchen führen (Deckbar et al. 2007). Dass dieses schnellere Abfallen in der IFM nicht beobachtet werden konnte, könnte möglicherweise an der geringen Anzahl der zu jedem betrachteten Zeitpunkt kurz vor dem Eintreten in die Mitose stehenden Zellen liegen. Wenige Zellen mit wenigen Foci beeinflussen den Gesamtwert nicht so sehr, dass dies zu einem sichtbaren Abfall in der Kinetik führen würde. Dies könnte auch ein Grund dafür sein, warum in den Kinetiken zu späten Zeiten nicht alle γ H2AX-Foci mit Rad54 kolokalisieren und der Rad54-Foci-Wert etwas geringer ist. Weshalb es zu dem in der Lebendzellmikroskopie beobachteten Abfall kommt, kann nicht abschließend geklärt werden, allerdings gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Zum einen könnte dies an einer beginnenden Chromatinkondensation liegen, in deren Konsequenz sich das Chromatin vielleicht derart ändert, dass Rad54 allein aus sterischen Gründen nicht mehr binden kann. Aufgrund des Abfalls der Werte bereits 2 h vor dem Mitoseeintritt ist dies jedoch weniger wahrscheinlich, da die Chromatinkondensation auch im Phasenkontrast hätte detektiert werden können. Wahrscheinlicher ist, dass es sich um einen aktiven Prozess der Derekrutierung der HR-Faktoren handeln könnte. Im Folgenden werden die Möglichkeiten der Zelle, rekombinatorische Vorgänge zu unterdrücken bzw. rückgängig zu machen, in Verbindung mit der Zellzyklusregulation zu den späten Zeiten in der G2-Phase diskutiert.

Im Zuge der DSB-Reparatur stellt die HR zwar einen langsamen, jedoch den für die Wahrung der genomischen Integrität am besten geeigneten Prozess dar, da die Reparatur weitestgehend fehlerfrei verläuft. Trotzdem muss die HR strikt reguliert werden, um eine spontane Rekombination zu unterdrücken und somit *Genome rearrangements* wie dem Verlust der Heterozygotie, Chromosomendeletionen, Inversionen oder Translokationen vorzubeugen (Branzei und Foiani 2007). Ein kritischer und daher stringent zu regulierender Schritt während der HR ist die Ausbildung des präsynaptischen Rad51-Filaments. Dies zeigt sich unter anderem darin, dass eine Überexpression des für diesen Schritt zentralen Proteins Rad51 zu illegitimen Rekombinationsereignissen und chromosomaler Instabilität führt und im Zusammenhang mit einer Tumorentstehung steht (Richardson et al. 2004). Bereits in Hefen sind früh Mechanismen beschrieben worden, welche eine übermäßige Aktivierung und Rad51-Filamentausbildung verhindern oder wieder rückgängig machen können. Wichtiger Bestandteil dieser Regulation ist die in Eukaryoten hochkonservierte Familie der RecQ-Helikasen. Im Hefe-System verhindern RecQ-Helikasen zusammen mit der Helikase Srs2 die spontane Ausbildung von Rad51-Filamenten und somit eine spontane Rekombination. Hierbei stellt das Srs2 den wichtigsten Antagonisten zu überschüssigem Rad51 dar, um den bekannten Phänotyp der Rad51-Überexpression zu unterdrücken (Paffett et al. 2005).

Während die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nur ein RecQ-Gen besitzt (Sgs1), wurden in Mensch bisher fünf beschrieben (WRN, BLM, RECLQ4, RECQL1, und RECQL5) (Branzei und Foiani 2007). Ein Teil der humanen RecQ-Proteine werden zusammen mit weiteren Helikasen aufgrund ihrer antagonistischen Wirkung der Rad51-Filamentausbildung auch als Anti-Rekombinasen bezeichnet. An der Schlüsselstelle der HR setzen die diversen Anti-Rekombinasen an, um bestehende freie (FBH1, RECQL5, PARI) bzw. bereits invadierte Rad51-Filamente (BLM, RTEL1) wieder aufzulösen (Hu et al. 2007; Barber et al. 2008; Fugger et al. 2009; Moldovan et al. 2012; Mladenov et al. 2013). Einen besonders interessanten Faktor stellt hierbei das RecQ5L dar, ein potentiell Ortholog zu Srs2 aus *S. cerevisiae*, das eine Rolle bei der Prozessierung von späten HR-Intermediaten hat. In Folge einer normal stattfindenden Stranginvasion bildet sich zunächst ein D-Loop aus, und die Reparatursynthese findet statt. Das humane RTEL1 (Srs2-Homolog) kann die Auflösung von D-Loop-Rekombinationsintermediaten in einer ATP-abhängigen Reaktion bewerkstelligen. Der in der Folge freie Invasionsstrang mit neusynthetisierten Anteilen wäre prinzipiell erneut ein Substrat für eine erneute Rad51-Nukleation. Die erneute Rad51-Beladung wird allerdings durch RecQ5L aktiv inhibiert (Hu et al. 2007; Paliwal et al. 2014). Das Entladen von Rad51 durch RecQ5L ist von der RecQ5L-ATPase-Domäne abhängig. RPA verstärkt hierbei die Reaktion und verhindert eine Rad51-Renukleation. Somit wird bei ausreichender Reparatursynthese die DSB-Reparatur in Richtung des SDSA (Abbildung 35B) umgelenkt und verhindert die Ausbildung von dHJ-Strukturen des DSBR-Weges (Abbildung 35A). Auf diese Weise fördert RecQ5L die Bildung von NCO-Produkten in humanen Zellen nach einer zuvor erfolgten Stranginvasion und Reparatursynthese, den Schlüsselschritten der HR (Paliwal et al. 2014).

Auch wenn der beschriebene Mechanismus nicht G2-Phase-spezifisch untersucht wurde, ist der Vorgang deshalb so interessant, weil er eine aktive Rad51-Derekrutierung bei einer bereits fortgeschrittenen HR beschreibt. Es ist dabei nicht vollkommen klar, auf welche Weise das RecQ5L im Laufe des Zellzyklus oder etwa spät in der G2-Phase reguliert wird. Ebenfalls ungeklärt bleibt, und ob es sich bei der in dieser Arbeit beobachteten Rad51-Derekrutierung vor der Mitose um einen RecQ5L-abhängigen Prozess handelt.

Ein weiterer beschriebener Prozess der Anti-Rekombination basiert auf einem Kinase-abhängigen Mechanismus bei der die Tyrosinkinase c-Abl den Schlüsselfaktor darstellt. c-Abl wurde aufgrund des bei der Translokation von Chromosom 9 und 22, dem Philadelphia-Chromosom, entstehenden neuen Fusionsprotein Bcr-Abl entdeckt. Dieses stellt eine konstitutiv überaktive Form der Tyrosinkinase dar, wirkt deregulierend auf den Zellzyklus

und ist der Auslöser der chronischen myeloischen Leukämie (CML). Die c-Abl-Tyrosinkinase liegt normalerweise autoinhibitiert vor, wird in Folge der Entstehung von DSBs durch ATM aktiviert (Baskaran et al. 1997) und begünstigt einen p53-abhängigen Zellzyklusarrest und Apoptose. Zudem konnte auch eine DNA-PK-abhängige Aktivierung von c-Abl nach IR durch Phosphorylierung gezeigt werden (Kharbanda et al. 1997). c-Abl rückphosphoryliert ATM und verstärkt somit dessen Aktivierung (Meltser et al. 2010).

In der aktivierten Form phosphoryliert c-Abl zudem die Faktoren Rad51, Rad52, WRN, DDB1 und BRCA1. Hierbei ist zunächst die Interaktion mit Rad51 von besonderem Interesse. Die Phosphorylierung von Rad51 durch c-Abl an Tyrosin-54 inhibiert dessen DNA-Bindung und in Folge die Rad51-Filamentausbildung und daran anschließende Prozesse (Yuan 1998). Trotz der Beteiligung von c-Abl an frühen Schritten der Schadensantwort nach IR konnte zunächst gezeigt werden, dass dessen Aktivität in HEK293-Zellen erst nach 4 h das Maximum erreichte und bis zu 12 h nach Bestrahlung abfiel (Foray et al. 2002). Neuere Studien konnten ebenfalls zeigen, dass das Ausmaß der Kinaseaktivität von der Reparaturzeit abhängig ist. So konnte nach Bestrahlung ein kontinuierlicher Anstieg der c-Abl-Aktivität mit einem Maximum nach 24 h beobachtet werden, welche in der Folge zu einer funktionellen Herunterregulation der HR zu späten Zeitpunkten führte (Meltser et al. 2010).

Die negative Regulation der HR über c-Abl könnte somit ein weiterer Grund für die Dissoziation der HR-Faktoren in der späten G2-Phase trotz unrepariert verbliebener Brüche sein. Je länger die Brüche in der G2-Phase unrepariert bleiben, desto mehr steigt die Aktivität von c-Abl. Dies führt zur Rad51-Phosphorylierung an Tyrosin-54 und zur Dissoziation vom DSB.

Den beschriebenen Prozessen gemein ist, dass diese dem Eintreten von Rad51-Filamenten bzw. invadierten Strukturen, welche eine Rad51-Aktivierung voraussetzen, in die Mitose entgegenwirken. Somit stellt sich die Frage, welche Strukturen letztlich in die Mitose eintreten können. Hierbei lieferten die durchgeführten Versuche mit Rad52 eine mögliche Erklärung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mithilfe der IFM beobachtet, dass das Rad52-GFP-Level zu späten Zeiten (HeLa 6 h, U2OS 8 h nach IR) am höchsten ist. Zusätzlich konnte mittels der Lebendzellmikroskopie auf Einzelzellebene beobachtet werden, dass Rad52-GFP nach IR in der G2-Phase langsam an die Brüche rekrutiert wird und die Anzahl der Foci beim Eintritt in die Mitose maximal ist. Vor dem Eintritt der Zellen in die Mitose erreichte das Rad52-Foci-Level das Maximum und war auch beim Erreichen der Prophase noch detektierbar. Die in dieser Arbeit gemachten Beobachtung sind konsistent mit früheren Arbeiten, in denen eine langsame Rekrutierung von Rad52 an IR-induzierte DSBs gezeigt wurde (Wray et al. 2008).

In der genannten Publikation wird die langsame Rad52-Rekrutierung jedoch mit gestörten Replikationsprozessen in Verbindung gebracht. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Beteiligung von S-Phase-Zellen in der IFM sowie in der Lebendzellmikroskopie durch die gleichzeitige Detektion von EdU bzw. DNA-LigaseI ausgeschlossen werden. Somit ist dies der erste Hinweis darauf, dass Rad52 auch in G2-Phase-Zellen eine langsame Rekrutierung aufweist.

Um einen Einblick zu bekommen, an welche Strukturen das Rad52-GFP rekrutiert wird, wurden Foci-Kolokalisationsstudien in fixierten Zellen nach Bestrahlung in der G2-Phase angefertigt. Die Detektion von DSBs durch eine γ H2AX-Färbung in Rad52-GFP-Zelllinien zeigte die zunehmende Rekrutierung von Rad52-GFP an den Schadensort. Somit wurde deutlich, dass in der späten G2-Phase die meisten verbliebenen Brüche das Rad52-GFP rekrutiert hatten. Aufgrund der zuvor angefertigten Rad51/Rad54-Kinetiken wurde angenommen, dass die zu späten Zeiten langsam reparierten DSBs über den Weg der HR prozessiert werden. Um eine Verbindung der spät auftretenden Rad52-GFP-Foci zu HR-Prozessen herstellen zu können, wurden weitere Kolokalisationsstudien mit Rad51 in den Rad52-GFP-Zelllinien hergestellt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Brüche, an welchen zu späten Zeiten noch Rad51 vorhanden ist, zunehmend Rad52-GFP rekrutieren, je länger die Zellen in der G2-Phase verweilen. Somit konnte eine Verbindung der späten Rad52-GFP-Rekrutierung mit aktiven HR-Prozessen bestätigt werden. Die späte Rekrutierung von Rad52-GFP im Vergleich zu Rad51/Rad54 zeigt zudem, dass letztere nicht von Rad52-GFP abhängig sind. Dies ist konsistent mit früheren Arbeiten in Hamster CHO-Rad52^{-/-}-Zellen, in denen die Rad51/54-Rekrutierung nach Bestrahlung vergleichbar zu WT-Zellen verläuft (van Veelen, Lieneke R et al. 2005).

Alle bisher gemachten Beobachtungen sind mit einer vermuteten Funktion des Rad52 bei fortgeschrittenen HR-Prozessen in der G2-Phase konsistent. Eine mögliche Funktion stellt hierbei die *Second-End-Capture*-Reaktion (Abbildung 35A) an einen D-Loop nach vorangeschrittener Reparatursynthese dar. Hierbei wird das zweite resektierte DSB-Ende mit dem in Form des als D-Loops verdrängten DNA-Bereichs annealt.

Da bei Rad52-vermittelten Annealing-Reaktionen RPA einen weiteren Interaktionspartner von Rad52 darstellt, wurde zudem die Kolokalisation mit diesem Faktor untersucht. RPA liegt nach einer DSB-Induktion durch IR phosphoryliert vor und ist an ssDNA-Bereichen lokalisiert, wie sie nach Resektion oder bei Ausbildung eines D-Loops auftreten können. Die beschriebene Interaktion von Rad52 und pRPA (Jackson et al. 2002; Deng et al. 2009) konnte ebenfalls in der späten G2-Phase mittels IFM bestätigt werden. Hierbei stellte sich heraus, dass in U2OS-

Zellen die erwartete pRPA-Foci-Bildung nicht zu frühen Zeitpunkten detektiert werden konnte, obwohl zu selbigen Zeiten bereits Rad51-Foci messbar waren. In den verwendeten HeLa-Zelllinien, wie auch in A549-Zellen zeigte die pRPA-Foci-Kinetik jedoch ihr Maximum bei 2 h nach Bestrahlung. Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass zu diesem Zeitpunkt die meisten über HR reparierten Brüche resektiert sind und somit auch das Maximum der Rad51/54-Foci auftritt. Daher wurde die abweichende pRPA-Foci-Kinetik auf ein U2OS-spezifisches Phänomen zurückgeführt. Möglicherweise ist die Phosphorylierung in diesen Zellen langsamer oder es handelt sich um ein technisches Problem bei der Detektion in diesem Zelltyp. Zu späten Zeitpunkten nach IR in der G2-Phase konnte jedoch in allen Zelllinien das verbliebene pRPA-Foci-Level detektiert werden. In den Rad52-GFP-Zellen kolokalisierte pRPA mit Rad52-GFP. Die Beobachtung, dass Rad52-GFP erst später rekrutiert wird, obwohl sein Interaktionspartner bereits nach 2 h die maximalen Foci-Werte zeigt, führte zu der Frage nach der Regulierung der Rad52-Rekrutierung.

Die bereits im Zusammenhang mit der Rad51-Derekrutierung genannte Tyrosinkinase c-Abl ist im aktiven Zustand in der Lage, Rad51 am Tyrosin 315 zu phosphorylieren. Dies führt zu einer stärkeren Interaktion mit Rad52 nach IR (Chen et al. 1999). c-Abl phosphoryliert nach IR zudem hRad52 am Tyrosin-104, was für die Rad52-Foci-Bildung nach Bestrahlung notwendig ist (Kitao und Yuan 2002). Hierbei ist die Reihenfolge der Phosphorylierung nicht ganz aufgeklärt. In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass Rad52-GFP an das bereits bestehende Rad51-Filament rekrutiert wird. Daher könnte angenommen werden, dass zunächst mit der aktivierenden Phosphorylierung von Rad52 am Tyrosin-104 und des Rad51 am Tyrosin-315 die Interaktion von Rad52 mit Rad51 hergestellt und verstärkt wird. Somit könnte das Rad52 an den DSB rekrutiert werden, um dort eine *Second-End-Capture*-Reaktion zu begünstigen. Anschließend könnte Rad51 durch die Modifikation an Tyrosin-54 derekrutiert werden. Um die gleichzeitige Derekrutierung von Rad52 zu verhindern, müsste ein Umschalten auf einen anderen Bindungspartner stattfinden. Hierfür könnte pRPA in Frage kommen, welches wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, besonders zu späten Zeiten mit Rad52-GFP kolokalisiert. Für deren Interaktion ist das RQK-Motiv des hRad52 verantwortlich (Grimme et al. 2010). Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von RPA die Selbstassoziation des hRad52 zu multimeren Ringen verhindert. Das hRad52 kann somit den heterotrimeren Komplex RPA an den Untereinheiten RPA70 und RPA32 binden. Hierbei erhöht die Interaktion mit RPA32 die Affinität von Rad52 für ssDNA maßgeblich (Jackson et al. 2002). Im humanen System wird Rad52 daher mit RPA-abhängigen DNA-Annealingreaktionen in Verbindung gebracht, wie diese etwa bei dem *Second-End-Capture*,

dem SSA oder dem SDSA auftreten können. Neueste *in vitro*-Hefe-Studien beschreiben die Ausbildung eines RPA-Rad52-Rad51-ssDNA-Intermediats in einem fortgeschrittenen HR-Stadium, welches eine *Second-End-Capture*-Reaktion ermöglicht (Gibb et al. 2014). Ein vergleichbares Intermediat wäre aufgrund der konservierten Interaktionsdomänen von Rad52 ebenfalls im humanen System vorstellbar und wäre mit der in der späten G2-Phase nachgewiesenen Kollokalisierung von Rad51, Rad52-GFP und pRPA konsistent.

Da intermediäre HR-Strukturen in der Anaphase zu Problemen bei der Chromatidsegregation führen, stellte sich die Frage, ob diese Strukturen noch zuvor aufgelöst werden können. Es sind verschiedene Endonukleasen beschrieben worden, welche eine Rolle bei der Auflösung von verzweigten DNA-Strukturen haben, z.B. Flap-Strukturen, HJs, und D-Loops, wie sie bei HR-Prozessen auftreten können. Eine dieser strukturspezifischen Endonukleasen ist das Mus81. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden, dass Mus81 in der Mitose Foci ausbildet, welche mit γ H2AX kollokalisieren. Kurz nach dieser Entdeckung wurden von Naim et al. (2013) die Mus81-Foci-Ausbildung in der Mitose nach Replikationsstress publiziert. Dies war ein weiterer Hinweis, dass die Zelle mit HR-Strukturen in die Mitose kommt. Durch die Detektion von Mus81 in der Mitose und deren Kollokalisierung mit Rad52-GFP wurde eine Verbindung zwischen HR-Prozessen in der G2-Phase und der Auflösung von HR-Intermediaten in der Mitose hergestellt. Interessant ist hierbei, dass Mus81 durch Phosphorylierung an seiner regulatorischen Untereinheit Eme1 durch die Kinase Plk1 aktiviert wird. Plk1 besitzt seine maximale Aktivität in der Mitose, so dass es sich hierbei um eine Mitose-spezifische Aktivierung dieser Endonuklease handelt (Matos et al. 2011).

In der angefertigten Arbeit wurde beobachtet, dass nach IR in den mitotischen Zellen nur ein Teil der Rad52-GFP-Foci mit den Mus81-Foci kollokalisierte. Das deutet darauf hin, dass die Struktur des durch Rad52-GFP gebundenen Substrats nicht immer gleich ist, oder weitere strukturspezifische Endonukleasen eine Rolle bei der Auflösung der intermediären Strukturen spielen. Weitere jüngere Arbeiten stellten diesen Sachverhalt dar. So konnten nicht nur Mus81 sondern auch die Nukleasen XPF-ERCC1, SLX1-SLX4 und Gen1 in mitotischen Zellen in Form von DSB-assoziierten Foci nachgewiesen werden (Naim et al. 2013; Garner et al. 2013; Pepe und West 2014). Dies lässt darauf schließen, dass viele in der Mitose aktive Endonukleasen existieren, welche die verschiedenen während der HR entstehenden Strukturen wie z.B. Flap-Strukturen, HJs und D-Loops auflösen können (Schwartz und Heyer 2011).

(Abbildung frei verändert
nach Mladenov et al. 2013)

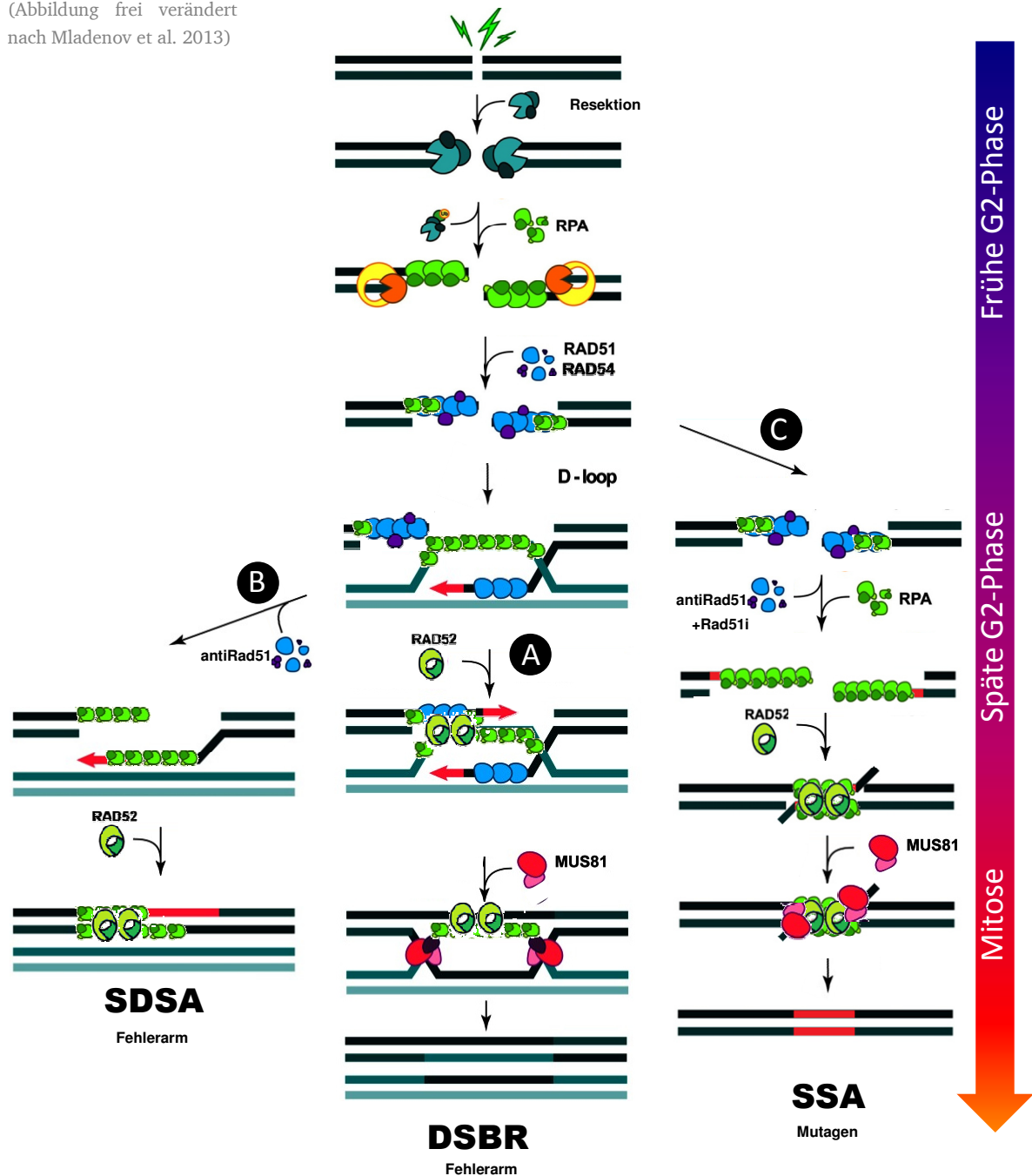


Abbildung 35: Schematische Darstellung der Rad52-assoziierten Reparaturwege nach einer Bestrahlung in der G2-Phase. Allen Wegen geht eine u.a. CtIP abhängige Resektion, RPA und Rad51-Beladung voraus. Nach einer erfolgten Stranginvasion und D-Loop-Ausbildung findet die Reparatursynthese und *Branch migration* statt. (A) DSBR: Mithilfe von Rad52 kommt es zum *Second-End-Capture* des zweiten resectierten DSB-Endes. Nach fortgeschrittener Synthese kann sich eine dHJ-Struktur ausbilden. Diese kann in der Mitose z.B. durch Mus81 aufgelöst werden. (B) SDSA: Nach dem Beginn der Reparatursynthese wird in der späten G2-Phase das Rad51-Filament (antiRad51) aufgelöst. Bei ausreichender Synthese können die einander komplementären Bereiche unter mithilfe von Rad52 annealt werden. (C) SSA: Finden resectierte DNA-Bereiche keine komplementäre Sequenz auf der Schwesterchromatide bleiben die Rad51-Filamente bestehen, bis sie in der späten G2-Phase aufgelöst werden (antiRad51). Im Falle der Rad51-Inhibition (+Rad51i) wird das Rad51-Filament nicht ausgebildet. Durch Resektion zugänglich gemachte intrachromosomale Homologien dienen dazu, den DSB zu reparieren. Auftretende Flap-Strukturen können z.B. durch Mus81 prozessiert werden. "antiRad51" beschreibt die Rad51-Entfernung in spät-G2 durch die im Text diskutierten Mechanismen.

Somit besitzen Zellen offenbar mehrere Mechanismen, um Rekombinationsintermediate in der Mitose aufzulösen. Hierbei stellt sich die Frage, ob das Eintreten der DSBs in die Mitose die Ursache für die Entstehung solcher Mechanismen ist. Alternativ wäre vorstellbar, dass die Zelle gezielt mit HR-Intermediaten in die Mitose eintritt, da sie in dieser Phase die Werkzeuge besitzt, diese Strukturen aufzulösen.

5.3.1 Auswirkungen der Rad51-Inhibition auf die DSB-Reparatur am G2/M-Übergang

Der in der Arbeit eingesetzte Rad51-Inhibitor führte in behandelten Zellen zu einem Reparaturdefekt in der langsamen Komponente (HR) und zu einem höheren Foci-Level am Ende der G2-Phase nach Bestrahlung. Mit dem γ H2AX-Reparaturdefekt ging ein Anstieg der Rad52-GFP-Foci in der G2-Phase einher. Dieses Ergebnis war zunächst überraschend, da erwartet wurde, dass aufgrund der fehlenden Rad51-Filament-Ausbildung bzw. Rad51-Rad52-Interaktion weniger Rad52-GFP-Foci auftreten würden und weil davon ausgegangen wurde, dass Rad52 eine Rolle in der späten HR beim *Second-End-Capture* hat. Da sich trotz der Rad51-Inhibition dennoch Rad52-GFP-Foci ausbildeten, ist davon auszugehen, dass eine Interaktion mit Rad51 in der G2-Phase nicht der Grund für die Rad52-Rekrutierung darstellt. Die Erhöhung der Rad52-GFP-Foci-Werte liegt vielmehr in den vermehrt unrepariert verbliebenen, durch pRPA markierten ssDNA-Bereichen begründet. Somit ist vermutlich das Vorhandensein von pRPA die Grundvoraussetzung für die Rad52-GFP-Rekrutierung in der späten G2-Phase und nicht das Rad51-Filament. Dies ist mit früheren Berichten über die starke Interaktion von Rad52 und RPA konsistent (Jackson et al. 2002; Deng et al. 2009). Die möglichen Gründe für die zeitliche Abfolge der Rad52-GFP-Rekrutierung mit dem Maximum zum G2/M-Übergang wurden zuvor beschrieben (siehe Kapitel 5.3)

Die aufgrund der Rad51-Inhibition erhöhten γ H2AX- und Rad52-GFP-Werte konnten sogar in mitotischen Zellen nachgewiesen werden. Dies ist überraschend, da in früheren Arbeiten die Abhängigkeit des G2/M-Checkpoints von einem Rest-Schadenslevel gezeigt werden konnte (Deckbar et al. 2011). Das beschriebene DSB-Level von etwa 15 γ H2AX-Foci pro Zelle, bei welchem die Zellen erst wieder den G2/M-Checkpoint aufheben, wird nach Rad51-Inhibition weit überschritten. Trotzdem sind die Zellen in der Lage, in die Mitose einzutreten. Dies führt vermutlich im Zuge der Mitose zu großen Problemen. Es war auffällig, dass bestrahlte und mit dem Inhibitor behandelte Zellen kaum in der Lage waren, über die Metaphase hinaus zu gelangen. Die Bestimmung der Foci-Werte in weiter fortgeschrittenen Mitosen war nicht möglich, da die mit Inhibitor-behandelten Zellen vermutlich beim Alignment der Chromosomen Probleme haben und daher in der Metaphase arretierten. Dieses Verhalten

wurde bereits für weitere HR-Mutanten beschrieben, z.B. MRE11 (Gao et al. 2009). Die mit Inhibitor behandelten mitotischen Zellen gestalteten sich derart, dass die kondensierten Chromosomen weniger fein strukturiert und teilweise verklumpt erschienen. In Zellen, welche unbestrahlt waren und mit dem Inhibitor behandelt wurden, war diese Art der kondensierten Chromosomen nicht auffällig. Die Frage, die sich hierbei stellt, ist ob die dysfunktionale Mitose durch ein erhöhtes DSB-Level verursacht wird und in der Folge zu einem Intra-M-Checkpoint führt (z.B. SAC) oder ob das Vorhandensein bestimmter HR-Faktoren für eine erfolgreiche Mitose notwendig ist. Da dieser Phänotyp in unbestrahlten Inhibitor-behandelten Zellen kaum zu beobachten war, wäre eher ein mit der DSB-Signalkaskade assoziierter Prozess vorstellbar. In diesem Fall stellt sich jedoch die Frage, warum die Zellen überhaupt erst mit dem erhöhten Level in die Mitose eintreten und nicht weiter den Checkpoint aufrecht erhalten. Eine Möglichkeit wäre die Rad52-Rekrutierung an RPA in der späten G2-Phase. Aufgrund der starken Interaktion des Rad52 könnte es zu einem verminderten ATR-Signalling kommen. Dies könnte zu einer verfrühten Aufhebung des G2/M-Checkpoints führen. Diese Argumentation würde auch die Vorgänge in den Rad51-profizienten Zellen erklären. Da in der späten G2-Phase HR-Intermediate bestehen, deren Prozessierung sehr wahrscheinlich die erst in der Mitose aktivierten Nukleasen benötigt, muss die Zelle einen Weg finden den Checkpoint aufzuheben. Eine durch Rad52 inhibierte RPA-ATR-Signalkette würde sicherstellen, dass verbliebene freie DSB-Enden einer Annealing-Reaktion zugeführt wurden. Ob die Annealing-Produkte Resultat eines SSA, SDSA oder *Second-End-Capture*-Schritts sind, würde schließlich in der Mitose darüber entscheiden, welche strukturspezifische Endonuklease die intermediären Strukturen auflösen kann. Dies könnte auch ein Grund für die Vielzahl der in der Mitose aktivierten Endonukleasen mit unterschiedlichen Substratspezifitäten darstellen.

Es konnte nicht abschließend geklärt werden, ob die Rad51-Inhibition eine Auswirkung auf die Mus81-Foci-Werte in der M-Phase hat. Sollte es sich bewahrheiten, dass die Endonuklease neben HJ-Strukturen auch 3'-Flaps schneidet, wäre auch in Rad51-inhibierten Zellen eine Erhöhung der Mus81-Foci zu erwarten. Aufgrund der teilweise wenig aussagekräftigen IF-Färbungen wäre es ratsam, eine der erzeugten Mus81-Zelllinien für ein einfaches Bestrahlungsexperiment nach Rad51-Inhibition einzusetzen. Dies könnte Auskunft über die Beteiligung von Mus81 an den möglicherweise stattfindenden Reaktionen am G2/M-Übergang geben.

5.4 Alternative Modelle zur Rolle von Rad52 in der späten G2-Phase

In den vorangegangenen Ausführungen wurde deutlich, dass Rad52 erst zu späten Zeiten nach der Bestrahlung in der G2-Phase an die verbliebenen HR-Prozesse rekrutiert wird. Aufgrund der verzögerten Kinetik im Vergleich zu Rad51/54 und pRPA konnte spekuliert werden, dass die Rad52-Rekrutierung durch die Verweildauer der Zelle in der G2-Phase bzw. die zeitliche Nähe zur Mitose reguliert wird. Da, wie in dieser Arbeit beobachtet, der bekannte Interaktionspartner Rad51 zum Eintritt in die Mitose von der gemeinsamen Bindungsstelle dissoziiert, Rad52-GFP jedoch weiter gebunden bleibt, spielt hierbei wahrscheinlich der zweite Interaktionspartner von Rad52, das RPA, eine wichtigere Rolle. Im Gegensatz zu Rad51 ist für RPA beschrieben, dass es bei allen Funktionen von Rad52 mit diesem interagiert. Die Bindung von RPA unterdrückt die Ausbildung von Sekundärstrukturen und begünstigt dadurch die Bildung des Rad51-Nukleoproteinfilaments. Im Hefesystem wurde gezeigt, dass erst ein Rad51-Rad52-Komplex den Zugang zu der ssDNA herstellen kann, wobei die Interaktion von Rad52 und RPA daraufhin zur Rad51-Beladung auf die ssDNA führt (Sugiyama und Kowalczykowski 2002). Das humane Rad52 hat jedoch aufgrund des Vorhandenseins von BRCA2 seine essentielle Funktion als Rad51-Mediator bzw. -Loader verloren. Lediglich in einem BRCA2-defizienten Hintergrund scheint das Rad52 noch eine Rest-Funktion wahrnehmen zu können (Lok und Powell 2012).

Wie bereits zuvor beschrieben, existieren anti-rekombinatorische Mechanismen, welche das Rad51-Filament aktiv entfernen können. Nach einer Stranginvasion und einer kurzen DNA-Synthese könnte der invadierte ssDNA-Strang mittels der Antirekombinasen wieder aus dem D-Loop entfernt werden. Sollte der ssDNA-Strang ausreichend verlängert worden sein, würde dieser nun die Homologie zu dem anderen resektierten DSB-Ende aufweisen. Bei einer folgenden SDSA-Reaktion könnten Rad52 und RPA die beiden homologen Sequenzen annealen (Abbildung 35B) (Paliwal et al. 2014). Da RecQ5L das gebundene Rad51 entfernt und somit ein Annealing der einzelsträngigen homologen Bereiche durch Rad52 ermöglicht, wäre es der essentielle Faktor, der den HR-Prozess in einen SDSA-Weg umleitet. Für eine solche Annahme spricht, dass eine Rad52 bzw. RecQ5L-Depletion zu weniger SSA als auch SDSA führt (Paliwal et al. 2014). In der genannten Publikation handelt es sich jedoch um S-Phase-abhängige Effekte, da ein S-Phase-schädigendes Agens (Camptothecin) zum Einsatz kam. Da nicht bekannt ist, wie RecQ5L zellzyklusabhängig reguliert wird, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob dieser Prozess auch in der späten G2-Phase stattfindet.

Ein interessantes Phänomen in CML-Zellen, ist das durch die überaktivierte Tyrosinkinase Bcr-Abl erhöhte SSA. Durch die dauerhafte Aktivität verschiebt Bcr-Abl das Gleichgewicht

zwischen der HR (aufgrund der Phosphorylierung von Rad51 an Tyrosin-54) und dem SSA in Richtung des Rad51-unabhängigen Reparaturwegs des mutagenen SSA (Abbildung 35C) (Cramer et al. 2008). Da SSA durch die DNA-Annealing-Funktion von Rad52 begünstigt wird, wirkt sich die Bcr-Abl bzw. c-Abl vermittelte Phosphorylierung am Tyrosin-104 vermutlich zusätzlich positiv auf diesen Weg der DNA-Reparatur aus. So konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Tyrosin-104-Phosphorylierung von Rad52 durch c-Abl dieses affiner für ssDNA macht, und somit die Annealing-Aktivität verstärkt (Honda et al. 2011). Da die Tyrosin-104-Phosphorylierungsstelle und auch ein c-Abl-Homolog in Hefen nicht existieren, ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um keinen konservierten Regulationsmechanismus und somit um keine ursprüngliche Funktion von Rad52 handelt. Aufgrund der kontinuierlich ansteigenden Aktivität von c-Abl nach Bestrahlung und der dadurch bedingten Derekrutierung von Rad51 (Meltser et al. 2010), wäre ebenfalls die gesteigerte Tyrosin-104-Phosphorylierung und die damit gesteigerte Rad52-GFP-Rekrutierung zu erklären, die in dieser Arbeit zu späten Zeiten nach IR beobachtet werden konnte. Sollte es Rad51-ssDNA-Bereiche geben, welche keine Homologiesuche durchgeführt haben, wäre möglicherweise ebenfalls nur noch das SSA ein Ausweg, um die DNA-Integrität wieder herzustellen. Hierbei ist fraglich, ob durch eine weitreichende Resektion die hierfür benötigte intrachromosomale Homologie zu Verfügung gestellt werden kann. Dennoch ließen die beobachteten Ereignisse nach Inhibition von Rad51 in der G2-Phase ebenfalls eine Beteiligung von RPA und Rad52 an einem möglichen Last-Resort-Mechanismus, in Form des SSA, am G2/M-Übergang vermuten.

Sehr wahrscheinlich kann in Folge der Rad51-Inhibition kein SDSA mehr stattfinden, da aufgrund der ausbleibenden Stranginvasion auch keine Reparatursynthese stattfinden konnte. Dies würde bedeuten, dass die inhibierten Zellen die resektierten Bereiche dem SSA (Abbildung 35C) zuführen müssten. Würde trotz ausreichender Resektion jedoch fehlender Homologie keine RPA-Rad52-vermittelte Annealingreaktion auf dem beschädigten Chromatid zustande kommen, könnte dies ein Grund für das erhöhte DSB-Level und die assoziierten Rad52-GFP-Foci in den inhibierten Zellen sein. In der vorliegenden Arbeit konnte in HeLa-Zellen ein Absinken der γ H2AX-Foci-Werte in den Kinetiken zwischen 6-8 h beobachtet werden. Ebendieser Abfall wurde ebenfalls in Rad51-inhibierten Zellen detektiert und war auch auf Rad52-GFP-Foci-Level zu beobachten. Möglich wäre, dass in diesen Zellen zum späten Zeitpunkt ein Teil der resektierten Brüche dem SSA zugeführt wird und dieses das Absinken der Foci-Werte verursacht. Auch wenn dieser Effekt in G2-Phase-U2OS-Zellen nicht beobachtet wurde, könnte es sein, dass hier das SSA in der G2-Phase durch Rad52-Rekrutierung vorbereitet wird und erst mit dem Eintritt in die Mitose aktiviert wird.

Ein weiteres bei der Rad52-Regulation beteiligtes Protein ist das *Phosphatase und Tensin Homolog* (PTEN). Dieses Protein ist nach p53 der wichtigste Tumorsuppressor in humanen Zellen. PTEN interagiert und kolokalisiert mit hRad52 genauso wie mit γ H2AX nach genotoxischem Stress und ist an der Regulierung einer Rad52-Sumoylierung involviert (Choi et al. 2013). Da die Rad52-Sumoylierung sowohl in Hefen als auch in humanen HEK293-Zellen durch das DNA-alkylierende Agens MMS induziert werden konnte, handelt es sich vermutlich um einen hochkonservierten Prozess (Sacher et al. 2006). In Hefen hat die Rad52-Sumoylierung zur Folge, dass Rad51-Filamente, die mit keinem aktiven Reparaturprozess mehr assoziiert und somit unproduktiv waren, entfernt werden können. Somit können deren toxische Auswirkungen bei der Zellteilung verhindert werden (Esta et al. 2013). In Hefe WT-Zellen entfernt die Anti-Rekombinase Srs2 (das funktionelle Homolog zum humanen RTEL1) postsynaptische Rad51-Filamente, damit verwundene HR-Reparaturintermediate aufgelöst werden können (Esta et al. 2013). Sumoylierungs-defiziente Hefe-Mutanten hingegen zeigen eine Verschiebung der spontanen mitotischen Rekombination vom SSA in Richtung der Gen-Konversion, einen Prozess der äquivalent zu dem DSBR-Weg der HR ist (Altmannova et al. 2010). Vermutlich kann sumoyliertes scRad52 die Rad51-Filamenstruktur derart modifizieren, dass es zu einer Dissoziation von der ssDNA kommt. Auf diese Weise würde eine übermäßige spontane Rekombination, und damit das Eintreten verwundener HR-Intermediat-Strukturen in die Mitose verhindert werden.

Auch wenn die exakte Regulation der Rad52-Sumoylierung durch die E3-Ligase MMS21 im humanen System nicht vollständig geklärt ist (Ouyang et al. 2013), zeigen sich dennoch Überschneidungen mit einer möglichen Funktion des modifizierten Rad52 bei dem Entfernen des Rad51 von der ssDNA vor dem Eintritt in die Mitose.

Der Tumorsuppressor PTEN spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Übergangs von der G2-Phase in die Mitose. Dieser ist mit einer zunehmenden PTEN-Phosphorylierung durch Plk1 assoziiert (Choi et al. 2014). Plk1 übernimmt Funktionen bei der DNA-Reparatur und dem Eintritt in die Mitose. Es konnte gezeigt werden, dass eine erste Aktivierung von Plk1 in der G2-Phase durch die Kinase Aurora-A zusammen mit dem Kofaktor Bora bereits einige Stunden vor dem Eintritt in Mitose stattfinden kann. Die Bora/Aurora-A-abhängige Phosphorylierung von Plk1 ist eine Voraussetzung, um den Eintritt der Zellen in die Mitose zu ermöglichen. Die Abhängigkeit der Rad52-Sumoylierung von den Faktoren PTEN und Plk1 und deren mögliche Rolle bei der Entfernung von Rad51-Filamenten steht somit in einem direkten Zusammenhang mit dem Übergang von der G2-Phase in die Mitose (Macúrek et al. 2008).

Alle hier beschriebenen Regulationsmechanismen deuten darauf hin, dass die Entfernung von Rad51 und die Rekrutierung von Rad52 aktive Prozesse in der G2-Phase und am Übergang in die Mitose sind. Die Frage nach der funktionellen Rolle von Rad52 an der Schadensstruktur bzw. wie diese Struktur aussieht, kann bis heute nicht geklärt werden. Es wäre möglich, dass es zu einer Art Pathway-Switch kommt. Z.B. könnte nach der Entfernung des Rad51-Filaments der invadierte Strang wieder aus dem D-Loop entfernt werden, und das Rad52 das Annealing mit dem zweiten resektierten DSB-Ende ermöglichen (SDSA). Sollte noch keine Stranginvasion stattgefunden haben oder der synthetisierte Bereich nicht lang genug sein, könnte auch ein SSA stattfinden. Dennoch stellt sich die Frage, welche Rolle dieser Mechanismus am G2/M-Übergang spielt. Zudem bleibt ungeklärt, welche Art von Strukturen tatsächlich in die Mitose eintreten, ob und wie diese Strukturen prozessiert werden.

6 Ausblick

Einen interessanten Ansatz zur Untersuchung der Zellzykluspezifischen Funktion von Rad52 in humanen Zellen bietet die Rad52-Depletion durch den Einsatz von RNA-Interferenz. Diese Methode nutzt zelleigene Mechanismen, um mit einer spezifischen RNA-Sequenz als Sonde eine komplementäre RNA zu erkennen und abzubauen. Ist das Ziel eine *messenger* RNA (mRNA) führt dies zu einer verringerten Translation und somit zur Herunterregulation des Proteins in der Zelle. Um konstante Versuchsbedingungen herzustellen ist es sinnvoll, einen Faktor in den Zellen dauerhaft herunterzuregulieren. Dies kann durch den Einsatz einer ektopisch exprimierten *short hairpin* RNA (shRNA) erreicht werden. Gegen Ende der vorliegenden Arbeit wurde dies mit einem gegen das Rad52 gerichteten shRNA-Plasmid durchgeführt. Dieses sollte dazu dienen, Zelllinien mit einer konstitutiven Herunterregulation des Faktors Rad52 zu erzeugen. Es wurden HeLa S3-Zellen transfiziert und mit Puromycin als Selektionsantibiotikum selektiert. Die erstellten Zelllinien werden derzeit in der Arbeitsgruppe auf die gewünschte Herunterregulation hin untersucht. Da die Funktion von Rad52 in der vorhandenen Literatur bisher überwiegend in asynchronen Populationen beschrieben wurde, in denen G1/S-Phase-Zellen überwiegen, war es kaum möglich, einen zellulären Phänotyp für eine Rad52-Defizienz zu beschreiben. In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass Rad52 eine Rolle bei der DNA-Reparatur in der späten G2-Phase haben könnte. Einen tieferen Einblick in die Funktion von Rad52 könnten zukünftige Überlebensexperimente, Reparaturmessungen und chromosomale Studien in G2-synchronisierten Zellen geben.



Anhang

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 1. April 2015

(Andreas Taubmann)

Curriculum Vitae: Andreas Taubmann

Persönliches

Geburtsdatum: 24.08.1983
Geburtsort: Heidelberg
Anschrift: Gaustraße 43
55116 Mainz
E-Mail: ataubman@students.uni-mainz.de

Studium

10/2013 – heute **Johannes Gutenberg-Universität in Mainz**
Studiengang Zahnmedizin
Angestrebter Abschluss: Staatsexamen

04/2011 – heute: **Technische Universität Darmstadt, Doktorarbeit am Fachbereich**
Biologie/ Strahlenbiologie und DNA-Reparatur;
Graduiertenkolleg 1657, Abschluss: Dr. rer. nat.
Titel der Dissertation: „Untersuchung der DNA-Doppelstrangbruch-
Reparatur über Homologe Rekombination am Übergang von der
G2-Phase in die Mitose“

10/2004–11/2010: **Johannes Gutenberg-Universität in Mainz**
Studiengang Biologie, Diplomabschluss
Titel der Diplomarbeit: „Überexpression eines Fusionskonstruktes aus
 γ -Tubulin und grün fluoreszierendem Protein in *Nicotiana tabacum*
BY2-Zellen“

Tagungsbeiträge

10/2013 **International Space University Strasbourg–Illkirch, Frankreich** ,
Posterpräsentation „Interplay of DNA Repair and Checkpoint Control
throughout the Mammalian Cell Cycle: Transition of Homologous
Recombination Intermediates from G2 into Mitosis“, German-French DNA
repair meeting on Epigenetics and Genome Integrity, Co-organized by SFTG,
DGDR, GUM and IREBS

09/2013 **Technische Universität Darmstadt**
Posterpräsentation: „Interplay of DNA Repair and Checkpoint Control
throughout the Mammalian Cell Cycle: Transition of Homologous
Recombination Intermediates from G2 into Mitosis“, German Society for
Research on DNA Repair; 16th Annual Meeting of the GBS, Gesellschaft für
biologische Strahlenforschung

09/2012 **Helmholzzentrum München**
Posterpräsentation: „The DNA double strand break repair throughout the
mammalian cell cycle in living cells“ 12th Biennial Meeting of DGDR, German
Society for Research on DNA Repair; 15th Annual Meeting of the GBS,
Gesellschaft für biologische Strahlenforschung

Zivildienst und Schule

08/2003 – 05/2004: **Zivildienst**
Bluttransportdienst Universitätsklinikum Mainz

08/2000 – 03/2003: **Staatliches Aufbaugymnasium Alzey**
Abschluss mit Abitur

Danksagung

Hiermit danke ich herzlich...

Herrn Prof. Dr. Markus Löbrich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Vergabe des interessanten und vielseitigen Themas und für die vielen Ideen und Anregungen zur Realisierung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Paul Layer für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Dr. Tobias Meckel und Herrn Prof. Dr. Franz Rödel für die Bereitschaft, als Prüfer an meiner Verteidigung teilzunehmen.

Frau Dr. Dorothee Deckbar für die Korrektur und die wirklich intensive und aufopferungsvolle Betreuung. Danke Doro. Das kann kein Kaffee oder Kuchen auf der Welt, seien sie auch noch so groß, wieder gut machen.

(I thank) my friend Thamby, with all your patience, goodwill and heart I will always be grateful to have learned from you and to have spend time with you in Dallas.

der gesamten AG Löbrich. Für die vielseitigen Charaktere, die Witze, Trockeneisbomben, die immer da gewesene Hilfsbereitschaft, die Spaziergänge bei Regen, Eis, Schnee und Sonnenschein in die Mensa. Und unseren TAs unter anderem für das Wegfrieren von wirklich vielen Klonen. Das waren echt viele.

dem GRK1657 und damit der DFG für die Vergabe des Förderungsstipendiums und die Möglichkeit soviele Erfahrungen zu sammeln und Kontakte zu großartigen Wissenschaftlern und Menschen zu knüpfen.

meiner Freundin Natascha für die großartige Unterstützung. Und die Nerven die ich gekostet habe.

zu guter Letzt meiner Familie, ohne die ich nicht wäre wo und wer ich jetzt bin.

Noch eins: Danke Papa.

7 Literaturverzeichnis

- Al-Minawi, Ali Z.; Saleh-Gohari, Nasrollah; Helleday, Thomas (2008): The ERCC1/XPF endonuclease is required for efficient single-strand annealing and gene conversion in mammalian cells. In: *Nucleic acids research* 36 (1), S. 1–9. DOI: 10.1093/nar/gkm888.
- Altmannova, Veronika; Eckert-Boulet, Nadine; Arneric, Milica; Kolesar, Peter; Chaloupkova, Radka; Damborsky, Jiri et al. (2010): Rad52 SUMOylation affects the efficiency of the DNA repair. In: *Nucleic acids research* 38 (14), S. 4708–4721. DOI: 10.1093/nar/gkq195.
- Barber, Louise J.; Youds, Jillian L.; Ward, Jordan D.; McIlwraith, Michael J.; O'Neil, Nigel J.; Petalcorin, Mark I R et al. (2008): RTEL1 maintains genomic stability by suppressing homologous recombination. In: *Cell* 135 (2), S. 261–271. DOI: 10.1016/j.cell.2008.08.016.
- Bartek, Jiri; Lukas, Claudia; Lukas, Jiri (2004): Checking on DNA damage in S phase. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 5 (10), S. 792–804. DOI: 10.1038/nrm1493.
- Bartek, Jiri; Lukas, Jiri (2003): Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. In: *Cancer cell* 3 (5), S. 421–429.
- Bartek, Jiri; Lukas, Jiri (2007): DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. In: *Current opinion in cell biology* 19 (2), S. 238–245. DOI: 10.1016/j.ceb.2007.02.009.
- Barton, Olivia; Naumann, Steffen C.; Diemer-Biehs, Ronja; Künzel, Julia; Steinlage, Monika; Conrad, Sandro et al. (2014): Polo-like kinase 3 regulates CtIP during DNA double-strand break repair in G1. In: *The Journal of cell biology* 206 (7), S. 877–894. DOI: 10.1083/jcb.201401146.
- Baskaran, R.; Wood, L. D.; Whitaker, L. L.; Canman, C. E.; Morgan, S. E.; Xu, Y. et al. (1997): Ataxia telangiectasia mutant protein activates c-Abl tyrosine kinase in response to ionizing radiation. In: *Nature* 387 (6632), S. 516–519. DOI: 10.1038/387516a0.
- Bell, D. W.; Wahrer, D. C.; Kang, D. H.; MacMahon, M. S.; FitzGerald, M. G.; Ishioka, C. et al. (1999): Common nonsense mutations in RAD52. In: *Cancer research* 59 (16), S. 3883–3888.
- Bennardo, Nicole; Cheng, Anita; Huang, Nick; Stark, Jeremy M. (2008): Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. In: *PLoS genetics* 4 (6), S. e1000110. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000110.
- Beucher, Andrea; Birraux, Julie; Tchouandong, Leopoldine; Barton, Olivia; Shibata, Atsushi; Conrad, Sandro et al. (2009): ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. In: *The EMBO journal* 28 (21), S. 3413–3427. DOI: 10.1038/emboj.2009.276.
- Branzei, Dana; Foiani, Marco (2007): RecQ helicases queuing with Srs2 to disrupt Rad51 filaments and suppress recombination. In: *Genes & development* 21 (23), S. 3019–3026. DOI: 10.1101/gad.1624707.
- Bryant, Helen E.; Schultz, Niklas; Thomas, Huw D.; Parker, Kayan M.; Flower, Dan; Lopez, Elena et al. (2005): Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. In: *Nature* 434 (7035), S. 913–917. DOI: 10.1038/nature03443.
- Burma, S.; Chen, B. P.; Murphy, M.; Kurimasa, A.; Chen, D. J. (2001): ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. In: *J. Biol. Chem.* 276 (45), S. 42462–42467. DOI: 10.1074/jbc.C100466200.
- Chen, G.; Yuan, S.-S. F.; Liu, W.; Xu, Y.; Trujillo, K.; Song, B. et al. (1999): Radiation-induced Assembly of Rad51 and Rad52 Recombination Complex Requires ATM and c-Abl. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (18), S. 12748–12752. DOI: 10.1074/jbc.274.18.12748.
-

Chen, Xiao-Bo; Melchionna, Roberta; Denis, Cecile-Marie; Gaillard, Pierre-Henri L.; Blasina, Alessandra; Van de Weyer, Inez et al. (2001): Human Mus81-Associated Endonuclease Cleaves Holliday Junctions In Vitro. In: *Molecular cell* 8 (5), S. 1117–1127. DOI: 10.1016/S1097-2765(01)00375-6.

Chen, Zehan; Xiao, Zhan; Gu, Wen-Zhen; Xue, John; Bui, Mai H.; Kovar, Peter et al. (2006): Selective Chk1 inhibitors differentially sensitize p53-deficient cancer cells to cancer therapeutics. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer* 119 (12), S. 2784–2794. DOI: 10.1002/ijc.22198.

Choi, Byeong Hyeok; Chen, Yan; Dai, Wei (2013): Chromatin PTEN is involved in DNA damage response partly through regulating Rad52 sumoylation. In: *Cell Cycle* 12 (21), S. 3442–3447. DOI: 10.4161/cc.26465.

Choi, Byeong Hyeok; Pagano, Michele; Dai, Wei (2014): Plk1 protein phosphorylates phosphatase and tensin homolog (PTEN) and regulates its mitotic activity during the cell cycle. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (20), S. 14066–14074. DOI: 10.1074/jbc.M114.558155.

Ciccia, Alberto; Constantinou, Angelos; West, Stephen C. (2003): Identification and characterization of the human mus81-eme1 endonuclease. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (27), S. 25172–25178. DOI: 10.1074/jbc.M302882200.

Ciccia, Alberto; Elledge, Stephen J. (2010): The DNA damage response: making it safe to play with knives. In: *Molecular cell* 40 (2), S. 179–204. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.09.019.

Cramer, Kimberly; Nieborowska-Skorska, Margaret; Koptyra, Mateusz; Slupianek, Artur; Penserga, Emir Tyrone P; Eaves, Connie J. et al. (2008): BCR/ABL and other kinases from chronic myeloproliferative disorders stimulate single-strand annealing, an unfaithful DNA double-strand break repair. In: *Cancer research* 68 (17), S. 6884–6888. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1101.

Cramer-Morales, Kimberly; Nieborowska-Skorska, Margaret; Scheibner, Kara; Padget, Michelle; Irvine, David A.; Sliwinski, Tomasz et al. (2013): Personalized synthetic lethality induced by targeting RAD52 in leukemias identified by gene mutation and expression profile. In: *Blood* 122 (7), S. 1293–1304. DOI: 10.1182/blood-2013-05-501072.

Cruz-García, Andrés; López-Saavedra, Ana; Huertas, Pablo (2014): BRCA1 Accelerates CtIP-Mediated DNA-End Resection. In: *Cell reports* 9 (2), S. 451–459. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.08.076.

Deckbar, Dorothee; Birraux, Julie; Krempler, Andrea; Tchouandong, Leopoldine; Beucher, Andrea; Walker, Sarah et al. (2007): Chromosome breakage after G2 checkpoint release. In: *The Journal of cell biology* 176 (6), S. 749–755. DOI: 10.1083/jcb.200612047.

Deckbar, Dorothee; Jeggo, Penny A.; Löbrich, Markus (2011): Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. In: *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 46 (4), S. 271–283. DOI: 10.3109/10409238.2011.575764.

Deckbar, Dorothee; Stiff, Thomas; Koch, Barbara; Reis, Caroline; Löbrich, Markus; Jeggo, Penny A. (2010): The limitations of the G1-S checkpoint. In: *Cancer research* 70 (11), S. 4412–4421. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3198.

Deng, Xiaoyi; Prakash, Aishwarya; Dhar, Kajari; Baia, Gilson S.; Kolar, Carol; Oakley, Greg G.; Borgstahl, Gloria E O (2009): Human replication protein A-Rad52-single-stranded DNA complex: stoichiometry and evidence for strand transfer regulation by phosphorylation. In: *Biochemistry* 48 (28), S. 6633–6643. DOI: 10.1021/bi900564k.

Dronkert, M. L. G.; Beverloo, H. B.; Johnson, R. D.; Hoeijmakers, J. H. J.; Jasin, M.; Kanaar, R. (2000): Mouse RAD54 Affects DNA Double-Strand Break Repair and Sister Chromatid Exchange. In: *Molecular and cellular biology* 20 (9), S. 3147–3156. DOI: 10.1128/MCB.20.9.3147-3156.2000.

-
- Easwaran, Hariharan P.; Leonhardt, Heinrich; Cardoso, M. Cristina (2005): Cell cycle markers for live cell analyses. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 4 (3), S. 453–455.
- Edelstein, Arthur; Amodaj, Nenad; Hoover, Karl; Vale, Ron; Stuurman, Nico (2010): Computer control of microscopes using μ Manager. In: *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]* Chapter 14, S. Unit14.20. DOI: 10.1002/0471142727.mb1420s92.
- Eliezer, Yifat; Argaman, Liron; Kornowski, Maya; Roniger, Maayan; Goldberg, Michal (2014): Interplay between the DNA damage proteins MDC1 and ATM in the regulation of the spindle assembly checkpoint. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (12), S. 8182–8193. DOI: 10.1074/jbc.M113.532739.
- Esta, Aline; Ma, Emilie; Dupaigne, Pauline; Maloisel, Laurent; Guerois, Raphaël; Le Cam, Eric et al. (2013): Rad52 sumoylation prevents the toxicity of unproductive Rad51 filaments independently of the anti-recombinase Srs2. In: *PLoS genetics* 9 (10), S. e1003833. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003833.
- Foray, N.; Marot, D.; Randrianarison, V.; Venezia, N. D.; Picard, D.; Perricaudet, M. et al. (2002): Constitutive Association of BRCA1 and c-Abl and Its ATM-Dependent Disruption after Irradiation. In: *Molecular and cellular biology* 22 (12), S. 4020–4032. DOI: 10.1128/MCB.22.12.4020-4032.2002.
- Fradet-Turcotte, Amélie; Canny, Marella D.; Escribano-Díaz, Cristina; Orthwein, Alexandre; Leung, Charles C Y; Huang, Hao et al. (2013): 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. In: *Nature* 499 (7456), S. 50–54. DOI: 10.1038/nature12318.
- Fugger, Kasper; Mistrik, Martin; Danielsen, Jannie Rendtlew; Dinant, Christoffel; Falck, Jacob; Bartek, Jiri et al. (2009): Human Fbh1 helicase contributes to genome maintenance via pro- and anti-recombinase activities. In: *The Journal of cell biology* 186 (5), S. 655–663. DOI: 10.1083/jcb.200812138.
- Gao, Guanjun; Bi, Xiaolin; Chen, Jie; Srikanta, Deepa; Rong, Yikang S. (2009): Mre11-Rad50-Nbs complex is required to cap telomeres during *Drosophila* embryogenesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (26), S. 10728–10733. DOI: 10.1073/pnas.0902707106.
- Gao, Hui; Chen, Xiao-Bo; McGowan, Clare H. (2003): Mus81 endonuclease localizes to nucleoli and to regions of DNA damage in human S-phase cells. In: *Molecular biology of the cell* 14 (12), S. 4826–4834. DOI: 10.1091/mbc.E03-05-0276.
- Gao, Min; Rendtlew Danielsen, Jannie; Wei, Lei-Zhen; Zhou, Dong-Ping; Xu, Qian; Li, Miao-Miao et al. (2012): A novel role of human holliday junction resolvase GEN1 in the maintenance of centrosome integrity. In: *PLoS ONE* 7 (11), S. e49687. DOI: 10.1371/journal.pone.0049687.
- Gibb, Bryan; Ye, Ling F.; Kwon, YoungHo; Niu, Hengyao; Sung, Patrick; Greene, Eric C. (2014): Protein dynamics during presynaptic-complex assembly on individual single-stranded DNA molecules. In: *Nature structural & molecular biology* 21 (10), S. 893–900. DOI: 10.1038/nsmb.2886.
- Gospodinov, Anastas; Herceg, Zdenko (2013): Chromatin structure in double strand break repair. In: *DNA repair* 12 (10), S. 800–810. DOI: 10.1016/j.dnarep.2013.07.006.
- Grimme, Jill M.; Honda, Masayoshi; Wright, Rebecca; Okuno, Yusuke; Rothenberg, Eli; Mazin, Alexander V. et al. (2010): Human Rad52 binds and wraps single-stranded DNA and mediates annealing via two hRad52-ssDNA complexes. In: *Nucleic Acids Res.* 38 (9), S. 2917–2930. DOI: 10.1093/nar/gkp1249.
- Haaf, T.; Golub, E. I.; Reddy, G.; Radding, C. M.; Ward, D. C. (1995): Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (6), S. 2298–2302.
-

-
- Han, Li; Masani, Shahnaz; Hsieh, Chih-lin; Yu, Kefei (2014): DNA ligase I is not essential for mammalian cell viability. In: *Cell reports* 7 (2), S. 316–320. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.03.024.
- Honda, Masayoshi; Okuno, Yusuke; Yoo, Jungmin; Ha, Taekjip; Spies, Maria (2011): Tyrosine phosphorylation enhances RAD52-mediated annealing by modulating its DNA binding. In: *The EMBO journal* 30 (16), S. 3368–3382. DOI: 10.1038/emboj.2011.238.
- Hu, Yiduo; Raynard, Steven; Sehorn, Michael G.; Lu, Xincheng; Bussen, Wendy; Zheng, Lu et al. (2007): RECQL5/Recql5 helicase regulates homologous recombination and suppresses tumor formation via disruption of Rad51 presynaptic filaments. In: *Genes & development* 21 (23), S. 3073–3084. DOI: 10.1101/gad.1609107.
- Huang, Fei; Mazina, Olga M.; Zentner, Isaac J.; Cocklin, Simon; Mazin, Alexander V. (2012): Inhibition of homologous recombination in human cells by targeting RAD51 recombinase. In: *J. Med. Chem.* 55 (7), S. 3011–3020. DOI: 10.1021/jm201173g.
- Jackson, Doba; Dhar, Kajari; Wahl, James K.; Wold, Marc S.; Borgstahl, Gloria E O (2002): Analysis of the human replication protein A:Rad52 complex: evidence for crosstalk between RPA32, RPA70, Rad52 and DNA. In: *J. Mol. Biol.* 321 (1), S. 133–148.
- Jeggo, Penny A.; Downs, Jessica A. (2014): Roles of chromatin remodellers in DNA double strand break repair. In: *Experimental cell research* 329 (1), S. 69–77. DOI: 10.1016/j.yexcr.2014.09.023.
- Jeggo, Penny A.; Löbrich, Markus (2006): Contribution of DNA repair and cell cycle checkpoint arrest to the maintenance of genomic stability. In: *DNA repair* 5 (9-10), S. 1192–1198. DOI: 10.1016/j.dnarep.2006.05.011.
- Kanaar, R.; Troelstra, C.; Swagemakers, S. M.; Essers, J.; Smit, B.; Franssen, J. H. et al. (1996): Human and mouse homologs of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD54 DNA repair gene: evidence for functional conservation. In: *Current biology : CB* 6 (7), S. 828–838.
- Karanam, Ketki; Kafri, Ran; Loewer, Alexander; Lahav, Galit (2012): Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase. In: *Mol. Cell* 47 (2), S. 320–329. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.05.052.
- Kegel, Peter; Riballo, Enriqueta; Kühne, Martin; Jeggo, Penny A.; Löbrich, Markus (2007): X-irradiation of cells on glass slides has a dose doubling impact. In: *DNA Repair (Amst.)* 6 (11), S. 1692–1697. DOI: 10.1016/j.dnarep.2007.05.013.
- Khanna, K. K.; Jackson, S. P. (2001): DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. In: *Nature genetics* 27 (3), S. 247–254. DOI: 10.1038/85798.
- Kharbanda, S.; Pandey, P.; Jin, S.; Inoue, S.; Bharti, A.; Yuan, Z. M. et al. (1997): Functional interaction between DNA-PK and c-Abl in response to DNA damage. In: *Nature* 386 (6626), S. 732–735. DOI: 10.1038/386732a0.
- Kitao, Hiroyuki; Yuan, Zhi-Min (2002): Regulation of ionizing radiation-induced Rad52 nuclear foci formation by c-Abl-mediated phosphorylation. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (50), S. 48944–48948. DOI: 10.1074/jbc.M208151200.
- Krempler, Andrea; Deckbar, Dorothee; Jeggo, Penny A.; Löbrich, Markus (2007): An imperfect G2M checkpoint contributes to chromosome instability following irradiation of S and G2 phase cells. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 6 (14), S. 1682–1686.
- Kumagai, A.; Yakowec, P. S.; Dunphy, W. G. (1998): 14-3-3 proteins act as negative regulators of the mitotic inducer Cdc25 in *Xenopus* egg extracts. In: *Molecular biology of the cell* 9 (2), S. 345–354.
- Larminat, Florence; Germanier, Maryse; Papouli, Efterpi; Defais, Martine (2002): Deficiency in BRCA2 leads to increase in non-conservative homologous recombination. In: *Oncogene* 21 (33), S. 5188–5192. DOI: 10.1038/sj.onc.1205659.
-

-
- Löbrich, Markus; Jeggo, Penny A. (2007): The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. In: *Nature reviews. Cancer* 7 (11), S. 861–869. DOI: 10.1038/nrc2248.
- Löbrich, Markus; Shibata, Atsushi; Beucher, Andrea; Fisher, Anna; Ensminger, Michael; Goodarzi, Aaron A. et al. (2010): gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 9 (4), S. 662–669.
- Lok, Benjamin H.; Powell, Simon N. (2012): Molecular pathways: understanding the role of Rad52 in homologous recombination for therapeutic advancement. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18 (23), S. 6400–6406. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3150.
- Lukas, Jiri; Lukas, Claudia; Bartek, Jiri (2004): Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. In: *DNA repair* 3 (8-9), S. 997–1007. DOI: 10.1016/j.dnarep.2004.03.006.
- Lukas, Jiri; Lukas, Claudia; Bartek, Jiri (2011): More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. In: *Nature cell biology* 13 (10), S. 1161–1169. DOI: 10.1038/ncb2344.
- Macurek, Libor; Lindqvist, Arne; Lim, Dan; Lampson, Michael A.; Klompaker, Rob; Freire, Raimundo et al. (2008): Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. In: *Nature* 455 (7209), S. 119–123. DOI: 10.1038/nature07185.
- Matos, Joao; Blanco, Miguel G.; Maslen, Sarah; Skehel, J. Mark; West, Stephen C. (2011): Regulatory control of the resolution of DNA recombination intermediates during meiosis and mitosis. In: *Cell* 147 (1), S. 158–172. DOI: 10.1016/j.cell.2011.08.032.
- Mazin, Alexander V.; Mazina, Olga M.; Bugreev, Dmitry V.; Rossi, Matthew J. (2010): Rad54, the motor of homologous recombination. In: *DNA Repair (Amst.)* 9 (3), S. 286–302. DOI: 10.1016/j.dnarep.2009.12.006.
- McIlwraith, M. J.; van Dyck, E.; Masson, J. Y.; Stasiak, A. Z.; Stasiak, A.; West, S. C. (2000): Reconstitution of the strand invasion step of double-strand break repair using human Rad51 Rad52 and RPA proteins. In: *Journal of molecular biology* 304 (2), S. 151–164. DOI: 10.1006/jmbi.2000.4180.
- McIlwraith, Michael J.; West, Stephen C. (2008): DNA repair synthesis facilitates RAD52-mediated second-end capture during DSB repair. In: *Mol. Cell* 29 (4), S. 510–516. DOI: 10.1016/j.molcel.2007.11.037.
- Meltser, V.; Ben-Yehoyada, M.; Reuven, N.; Shaul, Y. (2010): c-Abl downregulates the slow phase of double-strand break repair. In: *Cell death & disease* 1, S. e20. DOI: 10.1038/cddis.2009.21.
- Mladenov, Emil; Magin, Simon; Soni, Aashish; Iliakis, George (2013): DNA double-strand break repair as determinant of cellular radiosensitivity to killing and target in radiation therapy. In: *Front Oncol* 3, S. 113. DOI: 10.3389/fonc.2013.00113.
- Moldovan, George-Lucian; Dejsuphong, Donniphat; Petalcorin, Mark I R; Hofmann, Kay; Takeda, Shunichi; Boulton, Simon J.; D'Andrea, Alan D. (2012): Inhibition of homologous recombination by the PCNA-interacting protein PARI. In: *Molecular cell* 45 (1), S. 75–86. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.11.010.
- Motycka, Teresa A.; Bessho, Tadayoshi; Post, Sean M.; Sung, Patrick; Tomkinson, Alan E. (2004): Physical and functional interaction between the XPF/ERCC1 endonuclease and hRad52. In: *J. Biol. Chem.* 279 (14), S. 13634–13639. DOI: 10.1074/jbc.M313779200.
- Murray, Johanne M.; Stiff, Tom; Jeggo, Penny A. (2012): DNA double-strand break repair within heterochromatic regions. In: *Biochemical Society transactions* 40 (1), S. 173–178. DOI: 10.1042/BST20110631.
-

-
- Naim, Valeria; Wilhelm, Therese; Debatisse, Michelle; Rosselli, Filippo (2013): ERCC1 and MUS81-EME1 promote sister chromatid separation by processing late replication intermediates at common fragile sites during mitosis. In: *Nat. Cell Biol.* 15 (8), S. 1008–1015. DOI: 10.1038/ncb2793.
- Nelson, Glyn; Buhmann, Matthias; Zglinicki, Thomas von (2009): DNA damage foci in mitosis are devoid of 53BP1. In: *Cell Cycle* 8 (20), S. 3379–3383.
- Orthwein, Alexandre; Fradet-Turcotte, Amélie; Noordermeer, Sylvie M.; Canny, Marella D.; Brun, Catherine M.; Strecker, Jonathan et al. (2014): Mitosis inhibits DNA double-strand break repair to guard against telomere fusions. In: *Science (New York, N.Y.)* 344 (6180), S. 189–193. DOI: 10.1126/science.1248024.
- Ouyang, Karen J.; Yagle, Mary K.; Matunis, Michael J.; Ellis, Nathan A. (2013): BLM SUMOylation regulates ssDNA accumulation at stalled replication forks. In: *Front Genet* 4, S. 167. DOI: 10.3389/fgene.2013.00167.
- Paffett, Kimberly S.; Clikeman, Jennifer A.; Palmer, Sean; Nickoloff, Jac A. (2005): Overexpression of Rad51 inhibits double-strand break-induced homologous recombination but does not affect gene conversion tract lengths. In: *DNA repair* 4 (6), S. 687–698. DOI: 10.1016/j.dnarep.2005.03.003.
- Paliwal, Shreya; Kanagaraj, Radhakrishnan; Sturzenegger, Andreas; Burdova, Kamila; Janscak, Pavel (2014): Human RECQ5 helicase promotes repair of DNA double-strand breaks by synthesis-dependent strand annealing. In: *Nucleic Acids Res.* 42 (4), S. 2380–2390. DOI: 10.1093/nar/gkt1263.
- Panizza, Silvia; Mendoza, Marco A.; Berlinger, Marc; Huang, Lingzhi; Nicolas, Alain; Shirahige, Katsuhiko; Klein, Franz (2011): Spo11-accessory proteins link double-strand break sites to the chromosome axis in early meiotic recombination. In: *Cell* 146 (3), S. 372–383. DOI: 10.1016/j.cell.2011.07.003.
- Park, M. S.; Ludwig, D. L.; Stigger, E.; Lee, S. H. (1996): Physical interaction between human RAD52 and RPA is required for homologous recombination in mammalian cells. In: *J. Biol. Chem.* 271 (31), S. 18996–19000.
- Paul, Katja; Wang, Minli; Mladenov, Emil; Bencsik-Theilen, Alena; Bednar, Theresa; Wu, Wenqi et al. (2013): DNA ligases I and III cooperate in alternative non-homologous end-joining in vertebrates. In: *PloS one* 8 (3), S. e59505. DOI: 10.1371/journal.pone.0059505.
- Pepe, Alessandra; West, Stephen C. (2014): MUS81-EME2 promotes replication fork restart. In: *Cell reports* 7 (4), S. 1048–1055. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.04.007.
- Petermann, Eva; Orta, Manuel Luís; Issaeva, Natalia; Schultz, Niklas; Helleday, Thomas (2010): Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. In: *Molecular cell* 37 (4), S. 492–502. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.01.021.
- Raderschall, Elke; Bazarov, Alex; Cao, Jiangping; Lurz, Rudi; Smith, Avril; Mann, Wolfgang et al. (2002): Formation of higher-order nuclear Rad51 structures is functionally linked to p21 expression and protection from DNA damage-induced apoptosis. In: *Journal of cell science* 115 (Pt 1), S. 153–164.
- Richardson, Christine; Stark, Jeremy M.; Ommundsen, Melissa; Jasin, Maria (2004): Rad51 overexpression promotes alternative double-strand break repair pathways and genome instability. In: *Oncogene* 23 (2), S. 546–553. DOI: 10.1038/sj.onc.1207098.
- Rijkers, T.; Van Den Ouweland, J; Morolli, B.; Rolink, A. G.; Baarends, W. M.; Van Sloun, P P et al. (1998): Targeted inactivation of mouse RAD52 reduces homologous recombination but not resistance to ionizing radiation. In: *Molecular and cellular biology* 18 (11), S. 6423–6429.
- Rogakou, E. P. (1999): Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-Strand Breaks In Vivo. In: *The Journal of cell biology* 146 (5), S. 905–916. DOI: 10.1083/jcb.146.5.905.
-

-
- Rothkamm, K.; Kruger, I.; Thompson, L. H.; Lobrich, M. (2003): Pathways of DNA Double-Strand Break Repair during the Mammalian Cell Cycle. In: *Molecular and cellular biology* 23 (16), S. 5706–5715. DOI: 10.1128/MCB.23.16.5706-5715.2003.
- Sacher, Meik; Pfander, Boris; Hoege, Carsten; Jentsch, Stefan (2006): Control of Rad52 recombination activity by double-strand break-induced SUMO modification. In: *Nature cell biology* 8 (11), S. 1284–1290. DOI: 10.1038/ncb1488.
- Sallmyr, Annahita; Tomkinson, Alan E.; Rassool, Feyruz V. (2008): Up-regulation of WRN and DNA ligase IIIalpha in chronic myeloid leukemia: consequences for the repair of DNA double-strand breaks. In: *Blood* 112 (4), S. 1413–1423. DOI: 10.1182/blood-2007-07-104257.
- Schatz, David G.; Swanson, Patrick C. (2011): V(D)J recombination: mechanisms of initiation. In: *Annual review of genetics* 45, S. 167–202. DOI: 10.1146/annurev-genet-110410-132552.
- Schneider, Caroline A.; Rasband, Wayne S.; Eliceiri, Kevin W. (2012): NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. In: *Nat Meth* 9 (7), S. 671–675. DOI: 10.1038/nmeth.2089.
- Schwartz, Erin K.; Heyer, Wolf-Dietrich (2011): Processing of joint molecule intermediates by structure-selective endonucleases during homologous recombination in eukaryotes. In: *Chromosoma* 120 (2), S. 109–127. DOI: 10.1007/s00412-010-0304-7.
- Shen, Zhiyuan; Denison, Karen; Lobb, Rebecca; Gatewood, Joe M.; Chen, David J. (1995): The human and mouse homologs of the yeast RAD52 gene: cDNA cloning, sequence analysis, assignment to human chromosome 12p12.2–p13, and mRNA expression in mouse tissues. In: *Genomics* 25 (1), S. 199–206. DOI: 10.1016/0888-7543(95)80126-7.
- Shen, Zhiyuan; Huhn, Steven (2013): PTEN sumo-wrestles human RAD52 to mystery land. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 12 (23), S. 3585. DOI: 10.4161/cc.26820.
- Shibata, Atsushi; Conrad, Sandro; Birraux, Julie; Geuting, Verena; Barton, Olivia; Ismail, Amani et al. (2011): Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. In: *The EMBO journal* 30 (6), S. 1079–1092. DOI: 10.1038/emboj.2011.27.
- Shibata, Atsushi; Moiani, Davide; Arvai, Andrew S.; Perry, Jefferson; Harding, Shane M.; Genoio, Marie-Michelle et al. (2014): DNA double-strand break repair pathway choice is directed by distinct MRE11 nuclease activities. In: *Mol. Cell* 53 (1), S. 7–18. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.11.003.
- Shinohara, A.; Ogawa, T. (1998): Stimulation by Rad52 of yeast Rad51-mediated recombination. In: *Nature* 391 (6665), S. 404–407. DOI: 10.1038/34943.
- Shinohara, Akira; Shinohara, Miki; Ohta, Tsutomu; Matsuda, Shimako; Ogawa, Tomoko (1998): Rad52 forms ring structures and co-operates with RPA in single-strand DNA annealing. In: *Genes Cells* 3 (3), S. 145–156. DOI: 10.1046/j.1365-2443.1998.00176.x.
- Stark, Jeremy M.; Pierce, Andrew J.; Oh, Jin; Pastink, Albert; Jasin, Maria (2004): Genetic steps of mammalian homologous repair with distinct mutagenic consequences. In: *Molecular and cellular biology* 24 (21), S. 9305–9316. DOI: 10.1128/MCB.24.21.9305-9316.2004.
- Stasiak, Alicja Z.; Larquet, Eric; Stasiak, Andrzej; Müller, Shirley; Engel, Andreas; van Dyck, Eric et al. (2000): The human Rad52 protein exists as a heptameric ring. In: *Current Biology* 10 (6), S. 337–340. DOI: 10.1016/S0960-9822(00)00385-7.
- Strausberg, Robert L.; Feingold, Elise A.; Grouse, Lynette H.; Derge, Jeffery G.; Klausner, Richard D.; Collins, Francis S. et al. (2002): Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (26), S. 16899–16903. DOI: 10.1073/pnas.242603899.
- Sugiyama, Tomohiko; Kantake, Noriko; Wu, Yun; Kowalczykowski, Stephen C. (2006): Rad52-mediated DNA annealing after Rad51-mediated DNA strand exchange promotes second ssDNA capture. In: *EMBO J.* 25 (23), S. 5539–5548. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601412.
-

Sugiyama, Tomohiko; Kowalczykowski, Stephen C. (2002): Rad52 protein associates with replication protein A (RPA)-single-stranded DNA to accelerate Rad51-mediated displacement of RPA and presynaptic complex formation. In: *J. Biol. Chem.* 277 (35), S. 31663–31672. DOI: 10.1074/jbc.M203494200.

Symington, L. S. (2002): Role of RAD52 Epistasis Group Genes in Homologous Recombination and Double-Strand Break Repair. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66 (4), S. 630–670. DOI: 10.1128/MMBR.66.4.630-670.2002.

Symington, Lorraine S.; Gautier, Jean (2011): Double-strand break end resection and repair pathway choice. In: *Annual review of genetics* 45, S. 247–271. DOI: 10.1146/annurev-genet-110410-132435.

Takata, M.; Sasaki, M. S.; Sonoda, E.; Fukushima, T.; Morrison, C.; Albala, J. S. et al. (2000): The Rad51 Paralog Rad51B Promotes Homologous Recombinational Repair. In: *Molecular and cellular biology* 20 (17), S. 6476–6482. DOI: 10.1128/MCB.20.17.6476-6482.2000.

Tobias, Frank; Löb, Daniel; Lengert, Nicor; Durante, Marco; Drossel, Barbara; Taucher-Scholz, Gisela; Jakob, Burkhard (2013): Spatiotemporal dynamics of early DNA damage response proteins on complex DNA lesions. In: *PLoS one* 8 (2), S. e57953. DOI: 10.1371/journal.pone.0057953.

van Dyck, E.; Hajibagheri, N. M.; Stasiak, A.; West, S. C. (1998): Visualisation of human rad52 protein and its complexes with hRad51 and DNA. In: *Journal of molecular biology* 284 (4), S. 1027–1038. DOI: 10.1006/jmbi.1998.2203.

van Dyck, E.; Stasiak, A. Z.; Stasiak, A.; West, S. C. (2001): Visualization of recombination intermediates produced by RAD52-mediated single-strand annealing. In: *EMBO Rep.* 2 (10), S. 905–909. DOI: 10.1093/embo-reports/kve201.

van Veelen, Lieneke R; Essers, Jeroen; van de Rakt, Mandy W M M; Odijk, Hanny; Pastink, Albert; Zdzienicka, Małgorzata Z. et al. (2005): Ionizing radiation-induced foci formation of mammalian Rad51 and Rad54 depends on the Rad51 paralogs, but not on Rad52. In: *Mutation research* 574 (1-2), S. 34–49. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2005.01.020.

Vassin, Vitaly M.; Anantha, Rachel William; Sokolova, Elena; Kanner, Shlomo; Borowiec, James A. (2009): Human RPA phosphorylation by ATR stimulates DNA synthesis and prevents ssDNA accumulation during DNA-replication stress. In: *J Cell Sci* 122 (22), S. 4070–4080. DOI: 10.1242/jcs.053702.

Walker, J. R.; Corpina, R. A.; Goldberg, J. (2001): Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. In: *Nature* 412 (6847), S. 607–614. DOI: 10.1038/35088000.

Wechsler, Thomas; Newman, Scott; West, Stephen C. (2011): Aberrant chromosome morphology in human cells defective for Holliday junction resolution. In: *Nature* 471 (7340), S. 642–646. DOI: 10.1038/nature09790.

Wesoly, Joanna; Agarwal, Sheba; Sigurdsson, Stefan; Bussen, Wendy; van Komen, Stephen; Qin, Jian et al. (2006): Differential contributions of mammalian Rad54 paralogs to recombination, DNA damage repair, and meiosis. In: *Molecular and cellular biology* 26 (3), S. 976–989. DOI: 10.1128/MCB.26.3.976-989.2006.

Wray, Justin; Liu, Jingmei; Nickoloff, Jac A.; Shen, Zhiyuan (2008): Distinct RAD51 associations with RAD52 and BCCIP in response to DNA damage and replication stress. In: *Cancer research* 68 (8), S. 2699–2707. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6505.

Wu, Xiaoming; Yang, Zhengguan; Liu, Yiyong; Zou, Yue (2005): Preferential localization of hyperphosphorylated replication protein A to double-strand break repair and checkpoint complexes upon DNA damage. In: *The Biochemical journal* 391 (Pt 3), S. 473–480. DOI: 10.1042/BJ20050379.

Yoshimura, Y.; Morita, T.; Yamamoto, A.; Matsushiro, A. (1993): Cloning and sequence of the human RecA-like gene cDNA. In: *Nucleic acids research* 21 (7), S. 1665.

Yuan, Z.-M. (1998): Regulation of Rad51 Function by c-Abl in Response to DNA Damage. In: *Journal of Biological Chemistry* 273 (7), S. 3799–3802. DOI: 10.1074/jbc.273.7.3799.

Zhou, Yi; Caron, Pierre; Legube, Gaëlle; Paull, Tanya T. (2014): Quantitation of DNA double-strand break resection intermediates in human cells. In: *Nucleic acids research* 42 (3), S. e19. DOI: 10.1093/nar/gkt1309.
