Bedeutung von Rad51 für die Reparatur Replikationsassoziierter DNA-Schäden in humanen Tumorzellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

> vorgelegt von Ann Christin Parplys aus Brunsbüttel

Hamburg, August 2011

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Prof. Dr. E. DIKOMEY Weiterer Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. W. SCHÄFER Tag der Disputation: 15. Juli 2011

Hamburg, den 01. Juli 2011

.

A. Temmil Professor Dr. Axel Temming Leiter des Fachbereichs Biologie

Für meine Eltern.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
 1.1 1.2 1.3 1.4 1.5.1 1.5.2 1.5.3 1.5.4 1.6 1.7 1.8 1.9 	Tumortherapie Replikative S-Phase Schadenserkennung in der S-Phase Intra-S-Phase-Kinasen DNA-Reparaturwege in der S-Phase Nukleotid-Exzision-Reparatur Translesions-Synthese Basen-Exzision-Reparatur Doppelstrangbruch-Reparatur HR während der Replikation Die Rolle von Rad51 während der Replikation DNA Fibre Assay Ziel der Arbeit	1 2 3 7 7 8 9 9 10 11 13 14 15
2	MATERIAL UND METHODEN	16
$\begin{array}{c} 2.1.1\\ 2.1.2\\ 2.1.3\\ 2.1.4\\ 2.1.5\\ 2.1.6\\ 2.1.7\\ 2.1.8\\ 2.1.9\\ \textbf{2.2.1}\\ 2.2.1\\ 2.2.\\ 2.2.2\\ 2.2.2\\ 2.2.3\\ 2.2.2\\ 2.2.3\\ $	Chemikalien Antikörper DNA-Farbstoffe Puffer und Lösungen Größenstandards Reagenzien und Medien für die Zellkultur Verbrauchsmaterialien Geräte Software und Datenbanken Methoden Zellkulturtechniken 1.1 Zellkultvierung 1.3 Kryokonservierung Generierung verschiedener DNA Schäden DNA Fibre Assay 3.1 Markierung der Zellen mit CldU und IdU 3.2 Spreizen der DNA auf einem Objektträger 3.3 Immunfärbung der Chromatin-Fasern 3.4 Auswertung mit ImageJ Western-Blot 4.1 Proteinisolierung 4.2 Proteinbestimmung 4.3 SDS-Geleektophorese und Nachweis von Proteinen Detektion von γH2AX-Foci Chromosomenaberrationen 5.1 Präparation der Metaphasen Koloniebildungstest 7.1 Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen DNA Schäden	16 16 17 17 19 19 20 20 20 21 21 21 22 22 22 22 23 23 23 23 23 24 24 24 25 25 26 26 26 27 28 29 29 30 30 30
3	EDGERNISSE	20
3.1	Etablierung des DNA Fibre Assay	32

_1

6	ANHANG	96
5 I	ITERATUR	88
4.5	Zusammenfassung	86
4.3.3 4.4	Kaus r oberexpression und replikationsassozilerte DNA-Schauen	04 85
	Pad51 Überevpression und renlikationsassazijorta DNA Schödon	ປ ຊ⁄≀
4.3.4 Übarau	Aktivierung von Replikationsursprungen nach DNA-Schädigung bei Rad51	00
4.3.3	Reaktivierung angehaltener Replikationsgabeln bei Rad51 Uberexpression	82
4.3.2	Bedeutung von Rad51 für die Reparatur replikationsassoziierter DNA-Schäden	n81
4.3.1	Bedeutung von Rad51 auf die Replikationsprozesse	80
4.3	Bedeutung von Rad51 für die Replikation	80
4.2.5	Einfluss von ionisierender Strahlung auf die S-Phase	79
4.2.4	Einfluss von Doppelstrangbrüchen auf die S-Phase	78
4.2.3	Einfluss von DNA-DNA-Quervernetzungen auf die S-Phase	77
4.2.2	Einfluss von Einzelstrangbrüchen auf die S-Phase	76
4.2.1	Einfluss von Basenschäden auf die S-Phase	75
4.2	Untersuchung verschiedener DNA-Schäden auf die S-Phase	74
4.1.2	Symmetrische und asymmetrische Replikationsgabeln	73
4.1.1	Auswirkungen der Markierungszeit auf Replikations-Strukturen	72
4.1	Etablierung des DNA Fibre Assay	72
4 I	DISKUSSION	72
3.3.0		[1]
replikati	DISASSOZIIERTEN SCHADEN	68 74
3.3.5	Bedeutung der Rado i Oberexpression für das Zeilulare Überleben nach	60
う.う.4 こうを	Genomische Instabilität del Kadbi Uberexpression Rodoutung der Rod51 Überexpression für des Folkulärs Überlehen rest	66
J.J.J 2.2.4	DINA-Doppeistrangbruche nach Benandlung mit Wasserstomperoxid	64
Bestrahl	UNG DNA Dependetrepekrücke nach Deberdlung mit Massart für anstallt	63
J.J.Z	Unk I-Aktivierung nach induktion von Einzeistrangbrüchen, einseitigen DSB uf	IU 60
3.3.1.	o Angeriaitene una neulnitierende Keplikationsgabeln bei Kad51 Überexpression Chk1 Aktiviorung pach Induktion von Einzeletrenshrüchen, einesitigen DCD ut	60 50
3.3.1.	4 Neustart der Replikation nach DNA-Schädigung bei Rad51 Uberexpression	59
3.3.1.	3 Elongation nach DNA-Schädigung bei Rad51 Uberexpression	57
3.3.1.	2 Verteilung der Replikations-Strukturen bei Rad51 Überexpression	56
3.3.1.	1 Elongation bei Rad51 Überexpression	54
3.3.1	Replikation ungeschädigter Zellen mit Rad51 Überexpression	54
3.3	Bedeutung der Rad51 Überexpression für DNA Schäden in der Replikation	54
3.2.4	Zusammenfassung Teil 1	53
3.2.3	Genomische Instabilität von Chromosomen nach Schadensinduktion	52
3.2.2.	3 Angehaltene und neuinitierende Replikationsgabeln	49
3.2.2.	2 Verteilung der Replikations-Strukturen	47
3.22	1 Elongation	46
322	Auswirkungen verschiedener DNA-Schäden auf den Benlikationsannarat	46
321	Aktivierung des Intra-S-Phase Kontrollpunktes nach DNA-Schädigung	+ 44
32	Redeutung verschiedener DNA-Schäden für die Penlikationenrozese	+2 ΔΛ
315	Angehaltene Renlikationsgabeln und Initiationsereignissen nach Schädigung	41
311	Elongation	39 11
3.1.Z	Chromotin Essere mit symmetrischer und ssymmetrischer Einhaurste	20
3.1.1	Charaktensierung verschiedener Replikations-Strukturen	33
211	Charaktericierung verschiedener Denliketione Strukturen	22

1 Einleitung

Die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität ist das fundamentale Ziel der Zelle. Eine korrekte Weitergabe der DNA an jede Tochterzelle ist dabei von großer Bedeutung. Kommt es zur Schädigung der DNA, kann dies einen ersten Schritt im Verlauf der Tumorigenese zur Folge haben. Die Zelle hat eine Vielzahl molekularer Mechanismen entwickelt, um DNA-Schäden zu erkennen und sie fehlerfrei zu reparieren. Sie durchläuft während des Zellzykluses mehrere Phasen, in denen die Erkennung von DNA-Schäden spezifisch erfolgt und je nach Art des DNA-Schadens zu einer Signalkaskade führt, die entweder einen Reparaturprozess aktiviert oder den Zelltod einleitet. Der Zellzyklus teilt sich dabei in G1-, S-, G2- und M-Phase. Die S-Phase und die M-Phase sind dabei die funktionell bedeutsamen Zellzyklusphasen, die durch die Ruhephasen G1 und G2 (Gap) voneinander getrennt sind. In der Synthese oder S-Phase wird die gesamte DNA verdoppelt und in der Mitose oder M-Phase, auf zwei Tochterzellen verteilt.

Die Replikation ist während der S-Phase für die Verdoppelung der DNA zuständig. Trifft die Replikationsmaschinerie auf geschädigte DNA kann dies ein Anhalten oder Kollabieren des Replikationsapparates bedeuten mit der Folge von DNA-Doppelstrangbrüchen, die ein letales Ereignis für die Zelle bedeuten, bleiben sie unrepariert (Branzei and Foiani, 2010). Diverse Reparaturmechanimen sind für eine fehlerfreie Replikation zuständig (Hoeijmakers, 2001).

Die moderne Tumortherapie macht sich gerade die Sensibilität der S-Phase zunutze, indem spezifisch Agenzien eingesetzt werden, um Tumorzellen gezielter zu schädigen.

1.1 Tumortherapie

Die Tumortherapie beinhaltet die effiziente Behandlung von Tumoren bei größtmöglicher Schonung des gesunden Gewebes. Das chirurgische Entfernen des Tumors, die Strahlentherapie und die Chemotherapie sind dabei die drei Haupt-Pfeiler einer effizienten Tumorbehandlung, die entscheidend das lokoregionale Rezidiv und die Vermehrung oder Entstehung von Metastasen beeinflusst (Bartelink et al., 2001).

Tumoren entstehen häufig durch Mutationen von Genen des Zellwachstums, der Zellteilung und Zelldifferenzierung und gehen einher mit einer unkontrollierten Proliferation der entarteten Zelle. Viele Behandlungsansätze einer Tumortherapie machen sich den erhöhten Anteil an proliferierenden Zellen in Tumoren zu Nutze, greifen die replikative S-Phase der Zellen an und schonen somit das gesunde Gewebe, aufgrund des geringen Anteils proliferierender Zellen (Helleday et al., 2008). Es werden DNA-Schäden induziert, die entweder zum Anhalten des Zellzykluses führen können, dabei werden Signalkaskaden aktiviert, die der Zelle Zeit für Reparaturen geben. Ist der Schaden zu groß wird der programmierte Zelltod eingeleitet. Zu diesen induzierten Schäden zählen unter anderem monofunktionale und bifunktionale Alkylatoren, die entweder eine chemische Modifikation von DNA-Basen oder Quervernetzungen zwischen den DNA-Strängen verursachen (Sedgwick, 2004). Zytostatische Alkaloide wie Topotecan erzeugen Einzelstrangbrüche in der DNA-Doppelhelix und werden durch den aktiven Replikationsprozess zu replikationsassoziierten Doppelstrangbrüchen umgewandelt, die zu den toxischsten Schäden einer Zelle zählen (Hsiang et al., 1989). Die Behandlung von Tumoren mit ionisierender Bestrahlung verursacht ein ganzes Kollektiv an DNA-Schäden. Ein Gray Röntgenstrahlung führt zu 3000 bis 4000 Basenschäden pro Zelle, zu 1000 Einzelstrangbrüchen und 40 Doppelstrangbrüchen (Dikomey, 2001). Es treten gehäufte Läsionen und Vernetzungen zwischen Proteinen und DNA sowie zwischen den DNA-Strängen auf (150 bis 200/Zelle/Gy).

Im Zellzyklus variiert die Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Bestrahlung beträchtlich. Während Zellen in der G2/M-Phase am empfindlichsten auf Bestrahlung reagieren, zeigten sich Zellen in der frühen S-Phase besonders empfindlich (Terasima and Tolmach, 1963). Die detaillierte Untersuchung der Radiosensivität der S-Phase zeigte, dass Zellen am Übergang von G1 zur S-Phase sehr empfindlich reagieren und im Verlauf der späten S-Phase allerdings resistent werden.

Eine Erweiterung des Grundwissens der Wirkung einzelner Agenzien auf die S-Phase könnte die Behandlung von Tumoren effizienter machen.

1.2 Replikative S-Phase

Die Replikation ist die Verdopplung der genomischen DNA, die während der S-Phase des Zellzykluses stattfindet. Sie unterteilt sich in Initiation, Elongation und Termination. Dabei leitet die Initiation die Replikation ein, während der Elongation wird der neue DNA-Strang synthetisiert und mit der Termination wird der Replikationsvorgang beendet. In eukaryotischen Zellen dauert die S-Phase typischerweise 8-10 h, wobei unterschiedliche DNA-Bereiche in einer fest-gelegten Reihenfolge repliziert werden (Masai et al., 2010).

Die Initiation der Replikation erfolgt von sogenannten Replikationsursprüngen, die in Abständen von 110 bis 150 kb über die gesamte DNA verteilt sind (Edenberg and Huberman, 1975). Bereits in der G1-Phase erfolgt die Anordnung eines Multiprotein-Komplexes, dem präreplikativen Komplex, bestehend aus ORC, Cdc6, Cdt1 und den MCM Proteinen 2-7 ans Chromatin (Bell and Stillman, 1992). Am Übergang von der G1 zur S-Phase findet die Aktivierung des prä-replikativen Komplexes statt, in dem Cdc7-Dbf4 und CDK, die Rekrutierung von Cdc45, MCM10 und den DNA-Polymerasen erleichtern (Remus and Diffley, 2009). In Abhängigkeit von Cdc45 und MCM 10 erfolgt die Entwindung des DNA Doppelstranges und an jeden Replikationsursprung werden zwei Replikationsgabeln geladen. Diese synthetisieren von dort in bidirektionale Richtung den neuen DNA Strang bis sie auf Replikationsgabeln benachbarter Replikationsursprünge treffen und terminieren. Während der Elongation dient jeder der Einzelstrang der DNA-Doppelhelix als Vorlage für die komplementären Töchterstränge. Am Ende des wachsenden DNA-Stranges fügen DNA-Polymerasen Nukleotide durch die Verknüpfung von neuen Phosphodiesterbindungen hinzu. Sie benötigen zum Start einen Primer, ein kurzes RNA-Molekül, an welches das erste Nukleotid angeknüpft werden kann (Johnson and O'Donnell, 2005). Augrund der antiparallelen Natur der DNA Stränge und der Notwendigkeit für die Polymerasen in 5'3'-Richtung zu synthetisieren, gibt es einen kontinuierlich synthetisierten Leitstrang und einen Folgestrang aus sogenannten Okazaki-Fragmenten, dessen Synthese diskontinuierlich erfolgt.

Allgemein wird angenommen, dass für die Synthese des DNA-Stranges insgesamt drei replikative Polymerasen zuständig sind (Burgers, 2009). Die DNA Polymerase alpha (Pol α), DNA Polymerase delta (Pol δ) und die DNA Polymerase epsilon (Pol ϵ). Die DNA Polymerase α ist die einzige Polymerase, die durch ihre zusätzliche Primase-Aktiviät Synthese der Okazaki-Fragmente und des Leitstranges initiieren kann. Die Pol δ ist für die Elongation und zusammen mit Fen1 und DNA Ligase für die Prozessierung der Okazaki-Fragmente zuständig. Pol ϵ synthetisiert dabei den Leitstrang.

Am Ende der Replikation treffen Replikationsgabeln eines Replikationsabschnittes auf die entgegen kommenden Gabeln der benachbarten Abschnitte. Dabei entstehen positive Umwindungen, die in sogenannte Precatenanes umgewandelt werden und dann aufgelöst werden (Postow et al., 2001).

Für die Zelle ist es von großer Bedeutung, dass eine akkurate Reparatur in der S-Phase gewährleistet wird, um eine fehlerfreie Kopie der DNA zu erstellt. Trifft der Replikationsapparat auf DNA-Schäden, werden diese von spezifischen Sensorproteinen erkannt, die dann eine Signalkaskade aktivieren und entweder eine Reparatur oder den Zelltod initiieren.

1.3 Schadenserkennung in der S-Phase

Bevor die Zelle die Reparatur von DNA-Schäden einleiten kann, muss ein entsprechendes Signal durch spezifische Signal- oder Aktivatorproteine erteilt werden. Diese Aktivierung von spezifischen Proteinen wird unter dem Begriff *DNA Damage Response* (DDR) zusammengefasst und erfolgt über eine Signalkaskade, bei der Zellzyklusübergänge, Replikation, DNA Reparatur und Apoptose koordiniert werden (Ciccia and Elledge, 2010).

Schlüsselproteine der DDR in Eukaryoten sind die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K-Kinase), Ataxia-Telangiectasia and Rad3 related (ATR), Ataxia-Telangiectasia Mutated (ATM) und DNA-PKcs. Die PI3KK's sind Serin-/Threonin–Kinasen, die ihre Zielproteine spezifisch aktivieren, indem sie Phosphatgruppen übertragen. Alle drei Kinasen teilen viele biochemische und funktionelle Ähnlichkeiten und werden nach Induktion spezifischer DNA Schäden durch Interaktionspartner zur DNA rekrutiert. Dort aktivieren sie eine Vielzahl von Zielstrukturen und kontrollieren so Zellzyklusarrest und DNA Reparatur.

Die für die S-Phase bedeutsamste Kinase ist ATR, da sie nicht nur bei DNA-Schädigung sondern auch für die Regulation der Replikation von großer Bedeutung ist (Cimprich and Cortez, 2008). Die entscheidende Struktur zur Aktivierung von ATR ist die Bildung von einzelsträngiger DNA (ssDNA) (Zou and Elledge, 2003). Einzelstrangüberhänge entstehen automatisch während der Replikation bei der Entwindung der Replikationsursprünge, um die DNA Polymerase auf die DNA zu laden und eine bidirektionale Replikation zu starten (Bell and Dutta, 2002). Das Einzelstrang-Bindungsprotein RPA bindet an die entstehende ssDNA und wird von dem ATR-ATRIP-Komplex erkannt. Die Bindung erfolgt dabei über die Bindungsdomänen von ATRIP an RPA. Bereits nach 2 Stunden ko-lokalisiert der ATR-ATRIP-Komplex an mit RPA beladene ssDNA. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Bindung von ATRIP an die ssDNA längenabhängig ist. Der Schwellenwert für die Bindung von ATRIP andie ssDNA liegt bei 50 und 75 Nukleotiden (Zou and Elledge, 2003). Während RPA den ATR-ATRIP Komplex zur ssDNA rekrutiert, wird zur Aktivierung ein weiterer Komplex benötigt.

Der 9-1-1-Komplex (Rad9-Rad1-Hus1) ist ein heterotrimerer Ring der mit ATR-ATRIP kolokalisiert. Für das Laden des 9-1-1-Komplexes ist der Rad17-Komplex notwendig. Rad17 benötigt ebenfalls die Anwesenheit von RPA, um in einem ATP- abhängigen Prozess den 9-1-1-Komplex an das 5' –Ende oder 3'-Ende der DNA zu binden (Zou et al., 2003).

Der 9-1-1-Komplex bringt den eigentlichen Aktivator TopBP1 zu ATR. TopBP1 bindet an das C-terminale Ende von Rad9 und phosphoryliert ATR über die ATR-Aktivierungsdomäne (Kumagai et al., 2006). Somit sind für die Aktivierung von ATR sowohl ssDNA und RPA als auch 5' oder 3' DNA- Enden notwendig. Phosphoryliertes ATR aktiviert im Folgenden die Reparaturmaschinerie und unter anderem die Intra-S-Phase Kinase Chk1.



Abbildung 1: Aktivierung des ATR-Chk1-Signalweges.

Während der Replikation ist die DNA-Synthese durch die Polymerasen und die DNA-Entwindung durch die Helikase in einem Gleichgewicht. Es entstehen lediglich kurze Bereiche von ssDNA und es kommt zu einer schwachen Aktivierung von ATR. Ein größerer Bereich von ssDNA entsteht, wenn zum Beispiel die DNA-Polymerase inhibiert wird, die Helikase aber weiter den DNA-Doppelstrang entwindet. So kommt es nach verschiedenen DNA-Schäden, wie Basenschäden, die zum Anhalten der Polymerase führen zu einer Aktivierung von ATR. Untersuchungen an *Xenopus* Ei-Extrakten konnten zeigen, dass es bei Inhibition der Polymerase und fortlaufendem Entwinden der DNA zu einer Abkopplung der MCM-Helikase kommt. Daraus resultierend entstehen größere Bereiche von ssDNA und eine vermehrte Bindung von RPA und ATR an das Chromatin (Byun et al., 2005). Die Arbeit konnte zeigen, dass mit ansteigender Menge von entwundener DNA die Menge an phosphorylieren Chk1 zunimmt. Dabei ist eine Mindestlänge von 800bp notwendig.

Während für die Aktivierung von ATR in der S-Phase eine Mindestlänge an RPA gebundener ssDNA notwendig ist, werden direkte DNA-Doppelstrangbrüche in allen Zellzyklusphasen, so auch in der S-Phase, von der PI3K-Kinase ATM erkannt. ATM erlangt dabei seine volle Aktivität zusammen mit dem MRN-Komplex. Dieser besteht aus den Proteinen Nibrin, MRE11 und Rad50. Der Komplex lokalisiert sehr schnell nach Bestrahlung zu nukleären Foci (Maser et al., 1997). Die Bindung des Komplexes erfolgt als Heterotetramer über die Bindungsmotive des MRE11 (de Jager et al., 2001). Die Verbindung der offenen DNA-Stränge erfolgt über eine CXXC Sequenz des Rad50 Proteins. Der gebundene MRN-Komplex rekrutiert dann ATM an den DNA-Doppelstrangbruch.

ATM liegt in ungeschädigten Zellen als Dimer oder Multimer vor und dissoziiert durch die Bindung an den MRN-Komplex und Autophosphorylierung an Ser 1981 zu hochaktiven Monomeren (Bakkenist and Kastan, 2003). Dadurch kommt es zur Signalauslösung und die Reparatur des Doppelstrangbruches wird gewährleistet (Pardo et al., 2009). Die Arbeit von Shiotani et al. konnte zeigen, dass ATM in zellfreien Extrakten nur nach Zugabe von doppelsträngiger DNA aktiviert wird (Shiotani and Zou, 2009). Die Arbeit beschreibt ebenfalls den Wechsel der beiden PI3K-Kinasen ATR und ATM an einem Doppelstrangbruch. Dabei wird ATM als erste Kinase zum Doppelstrangbruch rekrutiert, der Doppelstrangbruch wird prozessiert und ATR nach Bildung eines Einzelstrang-Überhangs aktiviert.

Neben ATR und ATM wird nach DNA-Schädigung auch die PI3K-Kinase DNA-PKcs aktiviert. DNA-PKcs wird allerdings nicht als klassisches Aktivatorprotein angesehen, sondern eher als ein Bestandteil der DNA-Reparaturmaschinerie des Nicht-Homologen-Endjoinings (NHEJ). Sie wird durch die Interaktion mit dem Ku70/Ku80-Komplex, der als Heterodimer an die DNA bindet, zu Doppelstrangbrüchen rekrutiert. In einer NHEJ-vermittelten Reparatur werden die DNA-Enden nach eventuell vorangegangener Prozessierung durch anschließende Ligation wieder verknüpft. Neben dem Endjoining-Mechanismus ist außerdem die Homologe Rekombination für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen zuständig.

Zusammenfassend kann man sagen, dass für die Reparatur in der S-Phase, die Aktivierung von ATR eine zentrale Rolle einnimmt. Für die Aktivierung von ATR ist die Bildung von ssDNA und deren Bindung durch RPA ausschlaggebend (Abbildung 1). ssDNA entsteht in der S-Phase während der normalen Replikation, bei Replikations-Stress sowie durch unterschiedliche DNA-schädigende Agenzien. Vergleichend mit ATR wird ATM hauptsächlich bei direkten Doppel-strangbrüchen aktiviert. Somit bedient ATR ein größeres Spektrum an Schäden, die in der S-Phase auftreten können. Des Weitern ist ATM nicht nur für DNA-Reparatur, sondern auch für die Aktivierung der G1-, S-, und G2/M-Kontrollpunkte verantwortlich. In der S-Phase erfolgt die Aktivierung des Checkpoints spezifisch über die Phosphorylierung von Chk2 (Abbildung 2). Die Aktivierung der Reparaturmaschinerie durch ATR erfolgt über die Checkpointkinase Chk1.



Abbildung 2: Aktivierung des ATM-Chk2-Signalweges.

1.4 Intra-S-Phase-Kinasen

Um eine akkurate Reparatur in der S-Phase gewährleisten zu können, muss die Zelle Zeit gewinnen, um die Reparatur durchzuführen, bevor die Replikationsgabeln mit den Schäden kollidiert. Während ATM schnell und in jeder Zellzyklusphase nach DNA-Schädigung aktiviert wird, ist ATR hauptsächlich in der S- und G2-Phase aktiv und spielt somit für die Reparatur in der S-Phase eine besondere Rolle (Jazayeri et al., 2006). ATR phosphoryliert sowohl Proteine, die für das Fortschreiten der Replikation von Bedeutung sind, als auch reparaturspezifische Proteine.

Ein Substrat von ATR-ATRIP ist die humane Chk1 Kinase. Zur Aktivierung benötigt sie eine Phosphorylierung an Ser 317 und Ser 345. Chk1 wird zu der Stelle des DNA-Schadens transloziert (Liu et al., 2000), dabei dient Claspin als Adaptorprotein und ist für die Interaktion von ATR und Chk1 zuständig. Claspin benötigt dafür eine Phosphorylierung an mindestens zwei Serin-Resten, Ser 864 und Ser 895 (Kumagai and Dunphy, 2000).

Sobald Chk1 phosphoryliert ist, verlässt es das Chromatin um seine Zielstruktur zu phosphorylieren. Das Hauptsubstrat von Chk1 ist die CDC25 Phosphatase, die den Zellzyklusfortschritt kontrolliert (Smits et al., 2006).

Diese Checkpointaktivierung über ATR-Chk1 und CDC25 verzögert den Fortschritt der S-Phase und somit den Eintritt in die Meiose bei bestehender DNA-Schädigung (Boutros et al., 2006). Angehaltene oder kollabierte Replikationsgabeln bilden durch das fortlaufende Entwinden des DNA-Doppelstrangs ssDNA, welche ATR-Chk1 aktiviert und so zu Teilen das Feuern von Replikationsursprüngen inhibiert (Shechter et al., 2004). Die Chk1 vermittelten Reparaturprozesse in der Zelle sorgen dafür, dass eine Re-initiation der Replikation stattfinden kann.

Die signalvermittelte Aktivierung von Chk1 durch ATR ist auch für die Regulation der Replikation zuständig. Die Depletion von Chk1 inhibiert zu 50 % die Elongationsrate was zeigt, dass Chk1 ebenfalls entscheidend für die ungestörte Replikation ist (Petermann et al., 2006).

ATM ist hauptsächlich nach der Induktion von Doppelstrangbrüchen aktiv und nimmt über die Phosphorylierung von Chk2 Einfluss auf den Fortschritt der S-Phase. Die Aktivierung von Chk2 führt genauso wie die Phosphorylierung von Chk1 zur Degradation von Cdc25A, welches die Initiation von Replikationsursprüngen unterdrückt und dadurch zu einer Verzögerung der S-Phase führt (Costanzo et al., 2000).

1.5 DNA-Reparaturwege in der S-Phase

Während der Neusynthese des Tochterstranges kann der Replikations-Apparat auf DNA-Schäden treffen, die repariert werden müssen, um den Erhalt der Erbinformation zu gewährleisten. Zu diesen DNA Schäden zählen Basenschäden, Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüche

7

und DNA-Quervernetzungen. Durch Basenaddukte kann das Fortschreiten der Polymerase inhibiert werden. Ebenso stellen Einzelstrangbrüche und Doppelstrangbrüche ein Hindernis für den Replikationsapparat da. Quervernetzende Agenzien und strukturveränderte DNA behindern dabei den Fortschritt der Helikase. Je nach Schadensart werden verschiedene Reparaturwege in der S-Phase aktiv. Die Nukleotid Excisions Reparatur (NER) und die Basen Excisions Reparatur (BER) sorgen für das Entfernen strukturell veränderter DNA wie geschädigte Nukleotide oder Basen. Das Nicht-Homologe-Endjoining (NHEJ), die Homolge Rekombination (HR) und das Single Strand Annealing (SSA) sind für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen zuständig.

1.5.1 Nukleotid-Exzision-Reparatur

NER ist der Hauptreparaturweg, den Zellen nutzen, um strukturell veränderte DNA, wie Thymin-Dimere, welche nach UV-Bestrahlung auftreten, zu entfernen und den Schaden zu reparieren. In eukaryotischen Zellen benötigt NER 25 Proteine, um den DNA Schaden zu erkennen, den DNA-Doppelstrang einzuschneiden, das Nukleotid zu entfernen und die entstandene Lücke zu ligiieren (Thoma and Vasquez, 2003). Unter den NER-Proteinen ist XPA (xeroderma pigmentosa group A) dafür zuständig den Schaden zu erkennen und es wird benötigt um die Reparatur zu koordinieren. Für die Reparatur in der S-Phase ist entscheidend, welche PI3K-Kinasen den Schaden detektieren und die Reparatur initiieren.

Die Arbeit von Wu et al. konnte zeigen, dass das Reparaturprotein XPA nach UV-Bestrahlung von ATR phosphoryliert wird (Wu et al., 2006). Weitere Arbeiten belegen, dass NER während der Replikation eine Rolle bei der ATR-vermittelten Checkpointaktivierung spielt (Rouse and Jackson, 2002). Es wird angenommen, dass die Checkpoint Aktivierung durch das Anhalten der replikativen Polymerase durch UV-geschädigte DNA resultiert (Ward et al., 2004). Die Checkpoint Aktivierung entsteht dabei durch die Anhäufung von ssDNA und der Rekrutierung des ATR-ATRIP-Komplexes (Byun et al., 2005). NER und die ATR Checkpoint Aktivierung interagieren in diesem Fall als zelluläre Antwort auf die UV-Bestrahlung. Dabei akkumuliert XPA nach UV-Bestrahlung in einer ATR-abhängig Weise zu nukleären FOCI (Wu et al., 2007).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, XPA-defiziente Zellen einen Defekt in der ATR-Aktivierung aufweisen. Diese Untersuchung wird gestützt durch die Beobachtung, dass es nach UV-Bestrahlung zu einer Abnahme der Ko-Lokalisation des ATR-ATRIP-Komplexes an der geschädigten DNA kommt. XPA-defiziente Zellen weisen ebenfalls eine verringerte Phosphorylierung von Chk1 an Ser345 auf (Bomgarden et al., 2006).

Im Fall der Nukleotid-Exzisions-Reparatur ist es der ATR vermittelte Signalweg, der aktiviert wird, um strukturell veränderte Nukleotide zu entfernen. Eine Beteiligung einer ATM-vermittelten Reparatur konnte bisher nicht gezeigt werden.

1.5.2 Translesions-Synthese

Während NER der Hauptreparaturweg zur Entfernung UV-geschädigter DNA ist, konnte in Zellen mit verminderter NER-Aktivität, bei ansteigendem UV-Schaden, kein Anstieg des ATR-Signals gemessen werden (Bomgarden et al., 2006). Dies führte zu der Hypothese, dass ein zweiter Prozess für NER kompensiert.

Die Translesion-Synthese-Polymerase (TLS) Pol η ist eine Polymerase, die über UVgeschädigte Bereiche repliziert, indem sie während der Replikation Adenin über Cyclobutan Pyrimidine (CPD) einbringen kann (Lehmann, 2005). Zellen, die defizient in Pol η sind, zeigten einen verlängerten S-Phase Arrest nach UV-Bestrahlung und eine erhöhte γ H2AX-Phosphorylierung, was auf eine erhöhte Anzahl von Doppelstrangbrüchen zurück zu führen ist (Limoli et al., 2002). Es wird angenommen, dass diese Brüche aus dem schadensinduzierten Kollabieren von Replikationsgabeln resultieren.

Des Weiteren weisen Zellen, die defizient in der TLS-Polymerase Pol η sind, einen Anstieg von Chk1-Phosphorylierung nach UV-Bestrahlung auf. Ein Anstieg von Chk1-Phosphorylierung konnte auch in Zellen beobachtet werden, die defizient für Pol κ sind, eine weitere TLS-Polymerase, die benötigt wird um über nicht UV-abhängige Addukte zu replizieren. In diesem Fall zeigten die Zellen einen Anstieg der Chk1-Phosphorylierung nach der Behandlung mit Benzol(α)-Pyrene-Dihydrodiol Epoxide (Bi et al., 2005).

Weitere Beobachtungen in Hefezellen, die ebenfalls defizient in TLS sind, wiesen eine Anhäufung von kleinen Einzelstrang-Lücken auf. Diese Anhäufung von ssDNA und gesteigerter Chk1-Phosphorylierung deutet darauf hin, dass die TLS das Anhalten von Replikationsgabeln reduzieren und damit die Bildung von ssDNA vermindern.

1.5.3 Basen-Exzision-Reparatur

Die häufigsten Veränderungen in der Struktur der DNA entstehen durch Basenmodifikationen, ein Vorgang, der zum Einbau einer falschen Base und somit zu einer Punktmutation führen kann. Durch zelluläre Metabolite wie reaktive Sauerstoffspezies, Methylierungen, Deaminierungen und Alkylierungen können Basenschäden entstehen, die hauptsächlich durch die Basen-Exzisions-Reparatur (BER) entfernt werden. Der BER-Reparaturweg besteht aus einer Abfolge von Schritten, die den Schaden detektieren und prozessieren. XRCC1 und die DNA-Polymerase β übernehmen wichtige Funktion in diesem Reparaturweg. Nachdem die geschädigte Base entfernt wurde, wird die entstandene Lücke durch die DNA-Polymerase β gefüllt und die Enden werden durch die DNA-Ligase III verknüpft (Mitra et al., 1997).

BER-defiziente Zellen sind genetisch instabil und sensitiv gegenüber methylierenden Agenzien wie MMS oder Einzelstrangbruch-induzierenden Agenzien, was darauf zurück zu führen sein könnte, dass es während der Reparatur zur Bildung von ssDNA als Reparatur-Intermediat kommt (Horton et al., 2008). Man geht davon aus, dass unreparierte Basenschäden zu der Erzeugung eines Einzelstrangbruches führen und diese in der Regel zum Kollabieren von Replikationsgabeln in der S-Phase führen, was zur Entstehung von Doppelstrangbrüchen führt (Sobol et al., 2003).

Für XRCC1 und für Pol ß ist beschrieben, dass beide eine besondere Rolle beim Erhalt der Genomischen Stabilität spielen, denn Zellen, die defizient für XRCC1 oder defizient für Pol ß sind, weisen vermehrt einen Schwesterchromatidaustauch (SCE) auf (Thompson et al., 1982). SCE sind das Ergebnis der Homolgen Rekombination und diese findet nur in der späten S-Phase oder G2-Phase statt. Diese Untersuchung stützt wiederum die Annahme, dass offene Einzelstrangbruch-Intermediate der BER zu Doppelstrangbrüchen führen können.

Im Falle der Basen-Exzisions-Reparatur ist bisher nicht eindeutig geklärt, welche PI3K-Kinase Basenschäden erkennt. Hierfür ist es wichtig zu wissen, welche Art von physikalischen DNA-Enden bei der Basenreparatur entsteht. Wie aus dem vorangegangen Absatz hervorgeht, wird ATR durch ssDNA aktiviert und ATM durch direkte Doppelstrangbrüche. Die Arbeit von Brem et al. konnte zeigen, dass XRCC1-defiziente Zellen nach Behandlung mit MMS einen S-Phase Arrest zeigten, der sowohl ATM als auch ATR benötigt (Brem et al., 2008). Sie konnte auch zeigen, dass XRCC1-defiziente Zellen eine erhöhte Anzahl von Rad51-Foci nach MMS-Behandlung aufweisen. Eine weitere Arbeit beschreibt, dass XRCC1 von Chk2 an Thr284 phosphoryliert wird. In CHO-Zellen mit einer Mutation in Thr 284 kommt es zur Anhäufung von Einzelstrangbrüchen nach Behandlung mit MMS (Chou et al., 2008).

Es ist vorstellbar, dass die Reparatur von Basenschäden eine gemeinschaftliche Signalweiterleitung von ATR und ATM benötigt, da während der Prozessierung des Schadens sowohl ssDNA als auch Doppelstrangbrüche entstehen können. Zusammengefasst wird bei einem Basenschaden sowohl der ATR-Chk1-Signalweg aktiviert, als auch der ATM-Chk2-Signalweg. Sicher ist zumindest, dass die Reparatur von Basenschäden Einfluss auf den Fortschritt der S-Phase die Basen-Exzisions-Reparatur nimmt und somit eine wichtige Rolle während der S-Phase spielt.

1.5.4 Doppelstrangbruch-Reparatur

Zu den bedrohlichsten Läsionen für die Zelle zählen DNA-Doppelstrangbrüche (DSB), da diese beide Stränge der DNA betreffen und bleiben sie unrepariert kann ein einzelner DSB ein letales Ereignis für die Zelle sein (van Gent et al., 2001). Somit nimmt die Reparatur der Doppelstrangbrüche, die wichtigste Rolle in der S-Phase ein. DSB entstehen auf unterschiedlichste Weise. Sie können spontan entstehen, wenn eine Replikationsgabel auf einen unreparierten Schaden trifft, oder durch exogene Quellen wie ionisierende Bestrahlung oder DNA-schädigende Agenzien. Während der laufenden Replikationsprozesse in der S-Phase kommt es

des Weiteren sehr häufig zur Erzeugung von Replikations-assoziierten DSB (Saleh-Gohari et al., 2005).

Zur Reparatur von DSB haben sich zwei Reparturwege entwickelt. Die Reparatur über die Homologe Rekombination und das Nicht-homologe Endjoining.

Das Nicht-homologe Endjoining (NHEJ) ist ein effizienter Doppelstrangbruch-Reparatur-Weg in Eukaryoten, der in allen Zellzyklusphasen aktiv ist. Mittels NHEJ werden zwei DNA-Enden unabhängig von ihrer Sequenz miteinander ligiert. Die DNA-Enden werden wenn nötig prozessiert dabei ist das initiale Ereignis des NHEJ die Bindung des KU80/KU70-Komplexes an die DSB-Enden. DNA-Pkcs, Artemis, Ligase IV und XRCC4 sind des Weiteren an Prozessierung und Ligation der DSB-Enden beteiligt. Der Prozess ist in der Regel ungenau, da der DSB zunächst in eine ligierbare Form überführt wird und dabei Insertionen oder Deletionen auftreten können (Lieber, 2008).

Der zweite wichtige Reparaturweg von DSB ist die Homologe Rekombination. Dieser Reparaturmechanismus verwendet homologe Sequenzen des Schwesterchromatids für die Reparatur und ist im Gegensatz zum NHEJ ein langsamerer dafür aber sehr akkurater Mechanismus. Die Homologe Rekombination ist hauptsächlich in der späten S-Phase und G2-Phase aktiv (San Filippo et al., 2008). Der MRN-Komplex erkennt den DSB und leitet die Prozessierung der DSB-Enden ein. Der initiale Schritt ist dabei die Resektion am DSB zur Erzeugung eines 3' Einzelstrang-Überhanges. ATM ist dabei die Kinase, den Doppelstrangbruch erkennt und die Reparatur initiiert, indem es eine Reihe von Reparaturproteinen aktiviert. Die Hauptrolle in der Homologen Rekombination spielt Rad51. Für die Invasion des Schwesterchromatids muss RPA auf dem 3' Einzelstrang-Überhang durch Rad51 ersetzt werden. Für die Bildung des Rad51-Filaments stehen weitere Proteine zur Verfügung, die diesen Prozess erleichtern. Dazu gehören die Rad51 Paraloge Rad51B, Rad51C, Rad51D, XRCC2 und XRCC3. Ebenso spielt BRCA2 eine wichtige Rolle beim Laden des Rad51-Proteins auf die ssDNA. Die Stranginvasion wird von Rad54 stimuliert, in dem es negative Supercoils formt. Nach der Invasion kommt es zur Synthese des DNA-Stranges über die DSB-Sequenz hinweg. Es entsteht eine Holliday Junction (HJ) im Bereich der invasierten Stelle, welche sich von dort in beide Richtungen bewegt.

Die HJ wird im Weiteren aufgelöst und es resultiert entweder ein Cross-over-Ereignis oder ein nicht Cross-over-Ereignis (Helleday, 2003).

1.6 HR während der Replikation

Viele Arbeiten konnten zeigen, dass die Homologe Rekombination während der Replikation eine wichtige Rolle spielt (Cox, 2001; Michel et al., 2001; Al-Minawi et al., 2008; Lu et al., 2005). Es konnten einige Mechanismen entdeckt werden, die auf der Basis der Homologen Rekombination reparieren und dabei nicht nur den klassischen zweiseitigen DSB bedienen, sondern auch für die Reparatur angehaltener oder kollabierter Replikationsgabeln zuständig sind.

Die HR-abhängigen Reparaturmechanismen umfassen die klassische bereits im vorherigen Absatz beschriebene DSB-Reparatur (DSBR), das Synthese-abhängige Single-Strand-Annealing (SDSA) und die *Break-induced* Replikation (BIR) sowie die Reparatur von angehaltenen Replikationsgabeln und die Crosslink-Reparatur während der S-Phase.

Ein DSB kann entstehen, wenn eine Replikationsgabel auf einen nicht reparierten Einzelstrangbruch trifft. Solche Replikations-assoziierten DSB können zum Beispiel durch den Topoisomerase-I-Inhibitor Camptothecin entstehen. Die Reparatur dieser Schäden wird auch als *Breakage-Induced* Replikation (BIR) bezeichnet. Der Unterschied zwischen BIR und der klassischen Homologen Rekombination liegt darin, dass nur ein DNA-Ende zur Invasion zur Verfügung steht. Dabei handelt es sich um den Leitstrang der Replikationsgabel, der in den erzeugten Einzelstrangbruch "reinläuft" und so zu einem Doppelstrangbruch führt. Das 5'-Ende der Template-DNA wird resiziert und das jetzt einzelsträngig vorliegende 3'-Ende des neusynthetisierten DNA-Stranges dient zur Stranginvasion (Llorente et al., 2008). Nach Sequenz-Synthese über den Einzelstrangbruch, wandert das freie DNA-Ende in das intakte DNA-Molekül ein und die Replikation wird wieder aufgenommen. Aus diesem Reparaturereignis resultiert ein SCE ohne Genkonversion (Strumberg et al., 2000). Bislang konnte die Reparatur über BIR ausschließlich für den Leitstrang, aber nicht für den Folgestrang beobachtet werden.

Des Weiteren ist beschrieben, dass die Homologe Rekombination auch bei angehaltenen Replikationsgabeln aktiv wird. Das Anhalten einer Replikationsgabel erfolgt unter anderem nach der Gabe von Hydroxy-Harnstoff (HU). Es gibt eindeutige Hinweise aus Bakterien und auch aus eukaryotischen Zellen, dass angehaltene Replikationsgabeln umdrehen und in die inverse Richtung synthetisieren. Dabei entsteht eine Zwischenform, die als *chicken-foot* bezeichnet wird, die in einer Holliday Junction resultiert (Kuzminov, 2001). Die Bildung des *chicken-foot* wird vermutlich durch die Mus81-Eme1 Endonuklease erreicht. Nach Auflösung der HJ kann die Replikation wieder aufgenommen werden. BLM, WRN und weitere RecQ-Helikasen sind an diesem Prozess beteiligt (Constantinou et al., 2000);(Karow et al., 2000).

Weitere Strukturen, die zur Blockade der Replikation führen, sind DNA-DNA-Quervernetzungen (sogenannte *intra-strand-crosslinks*, ICL). ICL entstehen unter anderem nach Gabe von MMC und sie führen zum Kollabieren der Replikationsgabel, wodurch es wiederum zur Erzeugung von Doppelstrangbrüchen kommt (Niedernhofer et al., 2004). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von Zellen mit ICL-induzierenden Agenzien zu einer ATR-Aktivierung, wodurch FANCD2 phosphoryliert wird. Phosphoryliertes FANCD2 wird von FANCL des Fanconi-Core-Komplexes monoubiquitiniert. Dies führt zur Aktivierung einer Reihe von Proteinen, die für die HR als auch für die Translesion-Synthese zuständig sind. Das SDSA ist ein Reparaturprozess, der aktiv wird, wenn ein Doppelstrangbruch in einem Bereich einer repetitiven Sequenz auftritt. Hierbei kommt es durch das Einzelstrangprotein RPA und Rad52 zur Initiation des Reparaturereignisses. Nachdem die repetitiven Bereiche verlängert worden sind, kommt es durch die Proteine ERCC1/XPF zur Entfernung der geschädigten Sequenz (Al-Minawi et al., 2008).



Abbildung 3: HR-abhängige Reparaturmechanismen: DSB-Reparatur (DSBR), Synthese-abhängige Single-Strand-Annealing (SDSA) und die *Break-induced* Replikation (BIR). Abbildung verändert nach (Aguilera and Boulton, 2007).

1.7 Die Rolle von Rad51 während der Replikation

Rad51 ist das Hauptprotein der Homologen Rekombination und ist für die Homologiesuche, den Strangtransfer und den Strangaustausch nach DSB zuständig. Die Rekrutierung von Rad51

erfolgt an ssDNA über den Austausch von RPA und wird durch die Rad51 Paraloge Rad51B, Rad51C, Rad51D, XRCC2 und XRCC3 erleichtert. Rad51 polymerisiert dabei auf der ssDNA und bildet ein charakteristisches Nukleoproteinfilament aus (Sung and Robberson, 1995; Benson et al., 1994; Ogawa et al., 1993). Das Nukleoproteinfilament katalysiert die Suche nach Homologen Sequenzen und führt die Strangpaarung und den Strangaustausch durch (Baumann et al., 1996; Baumann and West, 1998). Da Rad51 und HR-Knockout Mäuse embryonal letal sind, ist es schwer die genaue Rolle von HR-Proteinen während der Replikation zu untersuchen (Lim and Hasty, 1996; Deans et al., 2003; Tsuzuki et al., 1996). Eine transiente Rad51-Depletion konnte allerdings zeigen, dass Rad51 / Zellen chromosomale Brüche nach der ersten Replikationsrunde aufwiesen, in der G2-/M-Phase akkumulierten und den Zelltod einleiteten (Sonoda et al., 1998). Dies lässt vermuten, dass Rad51 eine Rolle für die Reparatur von DSB spielt, die während der Replikation durch das Kollidieren der Replikations-Maschinerie mit einem Einzelstrangbruch spielt. Eine weitere Arbeit konnte zeigten, dass Rad51-defizienten Zel-Ien eine Akkumulation von DSB nach induziertem Replikations-Stress aufwiesen (Game et al., 2003). HR und Rad51 sind ebenfalls an der Reparatur einseitiger DSB beteiligt, die während der Replikation auftreten und werden zur Auflösung der chicken-foot Struktur während der Replikation benötigt (Saleh-Gohari et al., 2005).

Während der Prozessierung von DSB, kommt es zur Bildung eines 3' Einzelstrang-Überhanges, der dann für die Stranginvasion in das Schwesterchromatid zuständig ist. Durch RPA an ssDNA wird der Intra-S-Phase-Kontrollpunkt über ATR-Chk1 ausgelöst. Es konnte gezeigt werden, dass Chk1 direkt an der Rekrutierung von Rad51 ans Chromatin beteiligt ist (Sorensen et al., 2005). Die Chk1-abhängige Phosphorylierung von Rad51 an Thr 309 ist notwendig für eine effiziente HR-vermittelte Reparatur und für das zelluläre Überleben nach Replikations-Stress.

Chk1 ist ebenfalls für den Austausch von RPA und Rad51 am Einzelstrang-Überhang notwendig (Sleeth et al., 2007). Wird Chk1 inhibiert, gibt es weniger Chromatin-gebundenes Rad51 und RPA bleibt am Einzelstrang gebunden.

Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass Rad51 während der Replikation mit der MCM-Helikase assoziiert ist (Shukla et al., 2005). Sowohl Rad51 als auch Rad52 konnte eine direkte Interaktion mit MCM2 und MCM3 nachgewiesen werden.

1.8 DNA Fibre Assay

Genomische Instabilität ist ein Charakteristikum von Tumor Zellen. Dabei weist der klinische Phänotyp einer Tumorzelle, chromosomale Veränderungen wie Translokationen, Duplikationen, Amplifikationen oder Deletionen auf (Loeb and Loeb, 2000). Die Mechanismen, die zu diesen Veränderungen führen, können unter anderem falsch reparierte DNA-Schäden, defekte Segregation während der Mitose, oder auch eine fehlerhafte Replikation sein.

Dabei wurden in den letzten Jahrzehnten verschiedenste Methoden entwickelt, um die genomische Instabilität zu detektieren und zu untersuchen (Conti et al., 2001).

Der DNA Fibre Assay bietet unter diesen die Möglichkeit, die Initiation der Replikation, die Elongation und das Anhalten von Replikationsgabeln zu analysieren. Der Nachweis erfolgt durch Analoga des Thymidins, welche replizierenden Zellen angeboten werden, die DNA wird aus den Zellen isoliert und die Thymidin-Analoga werden immunologisch mit verschieden farblichen Fluoreszenz-Antikörpern an Chromatin-Fasern nachgewiesen.

Durch den kontinuierlichen Einbau der Nukleotid-Analoga können verschiedene Replikations-Strukturen charakterisiert werden, die neben der Richtung der Replikation auch Aufschluss darüber geben, mit welcher Einbaurate die DNA verdoppelt wurde, wie häufig und in welchen Abständen Replikationsursprünge initiiert wurden und wie häufig Replikationsgabeln benachbarter Replikationsursprünge terminieren (Detailierter Beschreibung siehe Etablierung des DNA Fibre Assay).

Neben der detaillierten Analyse der Replikation, konnten verschiedenste Arbeitsgruppen ebenfalls Genamplifikationen, Tandem Repeats, Gensequenzen direkt an Chromatin-Fasern durch Anwendung des DNA Fibre Assays nachgewiesen (Weier, 2001).

Somit bietet der DNA Fibre Assay eine weitere Methode Instabilität von Chromosomen zu untersuchen.

1.9 Ziel der Arbeit

Die Bewahrung der genomischen Stabilität ist das fundamentale Ziel der Zelle. Dabei ist eine fehlerfreie DNA-Replikation in jedem Zellzyklus von größter Bedeutung. Trifft ein Replikationsapparat auf einen DNA-Doppelstrangbruch, so bewirkt dies, dass die Homologe Rekombination mit ihrem zentralen Protein Rad51 der Hauptreparaturmechansimus aktiv wird.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, wie sich ionisierende Strahlung und die durch Bestrahlung erzeugten DNA-Schäden auf den Replikationsapparat, die Aktivierung des Intra-S-Phase Kontrollproteins Chk1 und die genomische Instabilität auswirken. Dabei sollte der Effekt von Basenschäden (*Base Damage*, BD), Einzelstrangbrüchen (*SingleStrand-Break*, SSB), DNA-DNA-Quervernetzungen (*Intra-Strand-Crosslink*, ICL), zweiseitigen und einseitigen Doppelstrangbrüchen (*Double-Strand-Break*, DSB) jeweils spezifisch untersucht werden, um dies mit dem durch ionisierende Strahlen erzeugten Schadensspektrum vergleichen zu können.

Von besonderem Interesse war es zu überprüfen, inwieweit sich diese Schadensreaktionen verändert, wenn Rad51 hoch reguliert ist, wie es in vielen Tumorzellen der Fall ist.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in *p.A.* Qualität von folgenden Firmen bezogen: Fluka (Buchs, CH), J. T. Baker (Deventer, NL), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (St. Louis, USA), Serva (Heidelberg).

2.1.2 Antikörper

Für die Detektion von Western-Blot-Extrakten wurde das Licor System verwendet. Die primären Antikörper wurden von Cell Signaling (USA) und die sekundär-Antikörper wurden von Licor (Nebraska, USA) bezogen.

Tabelle	1:	Antikörper	für	den	Western-Blot.
rabono	•••	/			Hootonn Biot.

Antikörper	Hersteller	Nummer	Konzentration
Chk1 (clone 2G1D5)	Cell Signaling Technology	# 2360	1:750 in Odyssey Blocking Buffer
mouse monoclonal IgG	Denvers, USA		über Nacht bei 4°C
Phospho-Chk1 (Ser345)	Cell Signaling Technology	# 2341	1:750 in Odyssey Blocking Buffer
rabbit polyclonal IgG	Denvers, USA		über Nacht bei 4°C
Anti-Rad51 (clone 3C10)	Millipore	# 05-530	1µg/ml in Odyssey Blocking Buffer
mouse monoclonal IgG ₁	Billerica, USA		über Nacht bei 4°C
Anti-ß-Aktin (clone AC-74)	Sigma	# A-2228	1:50000 in Odyssey Blocking Buffer
mouse monoclonal IgG2a	St.Louis, USA		1h RT
Goat anti-mouse	Licor	# B90706-02	1:7500 in Odyssey Blocking Buffer
IRDYE® 680	Nebraska, USA		1h RT
Goat anti-rabbit	Licor	# B90629-03	1:7500 in Odyssey Blocking Buffer
IRDYE® 800 CW	Nebraska, USA		1h RT

Tabelle 2: Antikörper für die Detektion der Nukleotid-Analoga des DNA Fibre Assays.

Antikörper	Hersteller	Nummer	Konzentration
Anti BrdU	Abd Serotec	# ABT0030G	1:1000 in PBS + 1% BSA + 0.1% Tween20
rat monoclonal IgG2a	Oxford, UK		1 h RT
Anti-BrdU (Clone B44)	Becton Dickinson	# 347580	1:1500 in PBS + 1% BSA + 0.1% Tween20
mouse monoclonal IgG	New Jersey, USA		4°C über Nacht
Alexa Fluor [®] 555	Invitrogen	# A21434	1:500 in PBS + 1% BSA + 0.1% Tween20
Goat anti-rat IgG (H+L)	Darmstadt		1,5 h RT
Alexa Fluor [®] 488	Invitrogen	# A-11001	1:500 in PBS + 1% BSA + 0.1% Tween20
Goat anti-mouse IgG (H+L)	Darmstadt		1,5 h RT

Tabelle 3: Antikörper für die Detektion von yH2AX FOCI.

Antikörper	Hersteller	Nummer	Konzentration
Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser 139)	Millipore	# 05-636	1:500 in PBS + 1 % BSA + 0,5 % Tween20
mouse polyclonal IgG (Clone JBW 301)	Schwalbach/Ts		1 h RT
Alexa Fluor [®] 594 <i>goat anti mouse</i>	Invitrogen Darmstadt	# A-11005	1:2000 in PBS + 1 % BSA + 0,5 % Tween20 1h RT

2.1.3 DNA-Farbstoffe

Es wurde der DNA-Farbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) eingesetzt, um bei der mikroskopischen Analyse fixierter Zellen den Kern zu färben und Giemsa, um die DNA von in der Metaphase arretierten Zellen zu färben.

Tabelle 4: Fluoreszenzfarbstoff zur Färbung von DNA und Metaphasen.

Name	Hersteller	Zusammensetzung
DAPI/Antifade	Qbiogene, Heidelberg	0,1 µg/ml in Antifade
Giemsas Azur-Eosin-Methylenblaulösung	Merck, Darmstadt	4 % (v/v) Giemsa in 1xPBS

2.1.4 Puffer und Lösungen

Das verwendete Wasser wurde, soweit nicht anders angegeben, mit einer Millipore-Anlage (Milli-Q académic, Millipore, Molsheim, F) aufbereitet. Es wird im Folgenden als H₂O bidest. bezeichnet. Wenn angegeben, wurden Lösungen für 20 min bei 121 °C und 100 K autoklaviert (2540 EL, Tuttnauer, GD Breda, NL) bzw. steril filtriert (Schleicher & Schuell, Riviera Beach, USA; Qualilab, Merck Labor und Chemie Vertrieb, Bruchsal). Elektrolytlösung für den Coulter Counter (Isoton II) wurde von Beckman Coulter (Krefeld) bezogen.

Tabelle 5: Puffer und Medien.

Name	Zusammensetzung
Blockierungslösung	1xPBS + 3 % BSA
Carnoys Fixativ	75 % (v/v) Methanol
Colcemid	25% (V/V) EISESSIG
Colcennia	steril filtriert
Ethanol	70% (v/v)
2 % Formaldehyd	5,4 % (v/v) Formaldehyd in 1xPBS
	(Stamm 37 % w/v, End 2 % w/v)
4 % Paraformaldehyd	4 % (w/v) in 1xPBS
	unter Rühren bei 65°C lösen
HCL-Lösung	2,5 mM rauchende HCL-Lösung
Giemsa-Farbelosung	4 % (V/V) Glemsa
-	in 1xPBS
KCL	0,075 M (w/v)
Kristallviolett-Farbelosung	0,1 % (w/v) in H ₂ O bidest.
1xLaufpuffer	10 % (v/v) 10 x TG-Puffer
PMSF	200 mM in Isopropanol
Puffer A	20 mM Hepes
	450 MM NaCl
	0.2 mM EDTA
	0.5 mM DTT
	0,5 µg/ml Leupeptin
	0,5 µg/ml Pepstatin A
	1,0 µg/ml Trypsin Inhibitior
	0,5 µg/ml Aprotinin
	40 µg/ml Bestatin
1xPBS	
	$2 \text{ mm} \text{ Kr}_2 \text{ FO}_4$ 10 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
	autoklaviert
DBST	
Permeabilisierungslösung	1% BSA
r enneablisierangsiosang	0.2% Triton X-100
	in 1xPBS
Probenpuffer nach Laemmli	Laemmli Sample Buffer (Biorad)
· · ·	5 % (v/v) ß-Mercaptoethanol
10 % SDS	10 % (w/v) SDS in H_2O bidest.
Spreading buffer	200mM Tris-HCL pH: 7,4
	50mM EDTA
	0,5% SDS
TBS	150mM NaCl
	50mM Tris-HCL pH = 7,5
IBS-I	18S + 0,05 % Tween20
Tx transferputier nach Towbin	10%(V/V) 10x1G-Puller 20%(V/V) Methanol
	Kühlen bei 4 °C im Eis
	0.5% (v/v) SDS
	(Stamm 10 % w/v, End 0,05 % w/v)
10x Tris-Glycin (TG)-Puffer	1,92 M Glycin
	250 mM Tris Base
	pH = 8,3, nicht korrigiert
	0.445 M Tris Poret
JAIDE	
	pH = 8.3
Waschlösung I (DNA-Fibre-Assav)	1xPBS + 1 % BSA + 0.1 % Tween20
Waschlösung II (yH2AX-Färbung)	1xPBS + 1 % BSA + 0,5 % Tween20

2.1.5 Größenstandards

Folgende Größenstandards wurden verwendet, um das Molekulargewicht von Chk1, pChk1 Rad51 und ß-Aktin in Polyacrylamidgelen zu überprüfen:

Tabelle 6: Größenstandards für Western-Blot-Analysen

Name	Anwendung
Two Colour Marker	Standardbanden sind bereits im Gel und direkt
Licor (Nebraska, USA)	nach dem Transfer auf der Membran sichtbar.
Kaleidoscope Prestained Standards	Standardbanden sind bereits im Gel und direkt
Bio-Rad (München)	nach dem Transfer auf der Membran sichtbar.

2.1.6 Reagenzien und Medien für die Zellkultur

Tabelle 7: Reagenzien für die Zellkultur.

Name / Zusammenstzung	Hersteller
CldU-Medium (2,5 mM in DMEM / 10% FCS)	Sigma, Seelze
DMEM	Invitrogen, Darmstadt
Einfriermedium	DMEM ohne Zusätze
	10 % (v/v) DMSO
IdU-Medium (2,5 mM in DMEM/ 10% FCS)	Sigma, Seelze
H_2O_2	Calbiochem, Darmstadt
L-Glutamine	Invitrogen, Darmstadt
Zeocin	Invitrogen, Darmstadt
MMC 0,01 % (w/v) in H_2O bidest. (0,1mg/ml)	medac, Hamburg
MMS	Merck, Darmstadt
Neomycin	Sigma, Seelze
Topotecan	Sigma, Seelze
Ponasterone A	Invitrogen, Darmstadt

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien wurden im Allgemeinen über die Firmen Becton Dickinson (Heidelberg), Brand (Melsungen), Corning (Corning, NY), eppendorf (Hamburg) und Sarstedt (Nürmbrecht) bezogen. Gewebekulturflaschen und -schalen (Cellstar) wurden bei Greiner Bio-One, (Frickenhausen) bestellt, *6-Well-*Gewebekulturplatten und *Culture Slides* bei Becton Dickinson. Criterion Tris-HCI-Polyacrylamidgele wurden bei Bio-Rad Laboratories (München) erworben, Deckgläser und Objektträger bei Marienfeld (Lauda-Königshofen), *Plastic Coverslips* bei Appligene Oncor (Illkirch Graffenstaden, F).

2.1.8 Geräte

Tabelle 8: Fabrikate der verwendeten Geräte.

Name	Fabrikat
Autoklav	Meditech, Norderstedt
Blotkammer	Criterion Blotter, Bio-Rad, München
CO ₂ -Inkubator MCO-20AIC	Sanyo Medical, Bad Nenndorf
Coulter Counter	Modell Z1, Beckman Coulter, Krefeld
Elektrophoresekammer	Criterion Cell, Bio-Rad, München
Heizblock	Thermostat 5320, eppendorf, Hamburg
Kamerasysteme	AxioCam MRm, Zeiss, Göttingen
Magnetrührer	Ikamag Ret, Ika, Staufen
Mikroskope	Axiovision Observer Z1, Zeiss, Göttingen
	<u>AlexaFluor488-Filter (Filtersatz 38HE)</u> : Anregungsfilter BP 440 bis 470 nm, Emissionsfilter BP 525-550 nm
	<u>AlexaFluor555-Filter (Filtersatz 43HE):</u> Anregungsfilter BP 525 bis 550 nm, Emissionsfilter BP 605-670 nm <u>DAPI-Filter (Filtersatz 49)</u> : Anregungsfilter G 365nm, Emissionsfilter BP 445-450 nm Diavert, Leitz, Wetzlar
Netzgeräte	Consort E455, Fröbel Laborgeräte, Lindau
	Consort E802, Fröbel Laborgeräte, Lindau
pH-Meter	
Photometer	Bio-Photometer, eppendorf, Hamburg
Schüttler	Edmund Bühler, Johanna Otto GmbH, Hechingen
	Mini-Shaker, Modell Kühner, Braun, Melsungen
	Polymax 1040, Heidolph, Schwabach
Röntgenröhre	Gulmay, Surrey (UK)
Sterile Werkbank	Herasafe, Heraeus, Hanau
Vakuumpumpe	Oerlikon Leybold Vacuum, Pfäffikon, CH
Waagen	P1200, Mettler Toledo, Giessen
	AE160, Mettler Toledo, Giessen
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Wasserbäder	Haake W19/D3, Karlsruhe
Zentrifugen	Biofuge 15R, Heraeus, Hanau
Ğ	Labofuge 400 R, Heraeus, Hanau
	Microfuge R, Beckman Coulter, Krefeld
	Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau

2.1.9 Software und Datenbanken

Folgende Programme wurden zur Aufnahme und Analyse von Daten genutzt: AxioVision Rel. 4.7, Image J, GraphPrisma.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturtechniken

2.2.1.1 Zelllinie

Die Experimente wurden mit der Zelllinie UiRad durchgeführt. Diese Zelllinie wurde aus einem Osteosarkom mit geringer endogener Rad51-Expression generiert (Maacke et al., 2000). In die Osteosarkom-Zellen wurde mittels eines Plasmids die Sequenz des humanen Rad51-Gens stabil integriert und unter die Kontrolle eines durch das Juvenilhormon Ponasterone A induzierbaren Promoters gestellt. Zur Aufrechterhaltung der Transfektion wurde das Plasmid mit jeweils einem Resistenz-Gen gegen Zeocin und Neomycin ausgestattet. Die Expression des Rad51-Gens wurde durch Zugabe von Ponasterone A (1µl/ml) und einer Inkubationszeit von 24 Stunden induziert. Die Rad51-Überexpression wurde mittels Western-Blot-Analyse kontrolliert. Die nicht induzierten Zellen dienten als Wildtyp-Zellen und werden im Weiteren als WT-U2OS-Zellen bezeichnet.



Abbildung 4: Modell-System für die Rad51-Überexpression.

2.2.1.2 Zellkultivierung

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank mit vertikalem Luftstrom durchgeführt. Das Zellwachstum wurde im inversen Mikroskop überprüft. Die Stammhaltung der Zellen erfolgte in 25 cm²-Gewebekulturflaschen in Brutschränken mit einer Wasserdampf-gesättigten, 10 % CO₂ enthaltenden Atmosphäre. Als Nährmedium wurde DMEM mit 10 % FCS 0,05 % Neomycin und 100 µg/ml Zeocin eingesetzt. Die Zellen wurden alle fünf bis sieben Tage passagiert. Das Nährmedium wurde verworfen und der Zellrasen mit 37 °C warmen Trypsin für 2 min inkubiert. Die Zellen wurden durch Klopfen vom Flaschenboden gelöst und das Trypsin durch Zugabe von 37 °C warmem Nährmedium inaktiviert. Die Zelldichte wurde im Coulter Counter ermittelt und die Zellen in einer neuen Kulturflasche subkultiviert.

2.2.1.3 Kryokonservierung

Subkonfluent gewachsene Zellen wurden mit Trypsin abgelöst und mit Nährmedium versetzt, die Zellen wurden zentrifugiert und die Zellzahl auf 1 bis 3 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium aufgenommen und resupendiert sowie in Kryoröhrchen verteilt. Die Kryoröhrchen waren bereits vorab auf Eis gekühlt worden. Die Zellen wurden über Nacht in Isopropanol bei -80 °C und schließlich langfristig bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Wiederanzucht wurden die gefrorenen Zellsuspensionen im Wasserbad (37 °C) angetaut und noch teilweise gefroren in eine mit Nährmedium versetzte Kulturflasche inkubiert. Nach einem Tag wurde ein Mediumswechsel durchgeführt.

2.2.2 Generierung verschiedener DNA Schäden

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden U2OS-Zellen, entweder als Wildtyp-Zelle (WT-U2OS-Zelle) oder als RAD51 überexpremierende Zelle (UiRad-Zelle), verschiedenen DNA Schäden ausgesetzt. Untersucht werden sollte der Einfluss von Basenschäden, Einzelstrangbrüchen, DNA-DNA-Quervernetzungen, zweiseitigen Doppelstrangbrüchen, einseitigen Doppelstrangbrüchen und ionisierender Strahlung in verschiedenen Assays. Zur Induktion dieser Schäden wurden die in Tabelle 9 aufgeführten Agenzien verwendet. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wurde eingesetzt, um zwei unterschiedliche DNA Schäden zu induzieren. Eine niedrige Konzentration H_2O_2 verursacht Einzelstrangbrüche (Benitez-Bribiesca and Sanchez-Suarez, 1999) und eine hohe Konzentration Doppelstrangbrüche (Wojewodzka et al., 2002).

DNA-Schaden	Agenzien
Basenschäden	0,1-0,5 mM MMS
Einzelstrangbrüche	10µM H ₂ O ₂
Intra-Strand-Crosslinks	40-80 ng/ml MMC
Zweiseitige Doppelstrangbrüche	200μΜ Η ₂ Ο ₂
Einseitige Doppelstrangbrüche	0,5-10 μM Topotecan
Alle Schäden	0-6 Gy Ionisierende Bestrahlung

Tabelle 9: Agenzien mit Konzentrationsangaben und die erzeugten DNA-Schäden

Die Bestrahlung erfolgte mit einer technischen Röntgenröhre bei 15 mA und 200 kV. Zur Aufhärtung der Strahlung wurde ein 0,5 mm starker Kupferfilter angebracht. Die Röntgenröhre wurde mit Hilfe eines Duplexdosimeters geeicht, welches mit einer Strontium-Radium-Quelle kalibriert worden war. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte je nach Größe der Kulturflasche und der benötigten Gesamtdosis mit 1 Gy/min bzw. 2 Gy/min.

Die Auswirkungen der verschiedenen Typen von DNA Schäden wurden im DNA Fibre Assay, im Western-Blot, an γH2AX-FOCI und Chromosomaberrationen sowie im Kolonie-Assay untersucht. Die verwendten Methoden werden im Folgenden vorgestellt.

2.2.3 DNA Fibre Assay

Der DNA Fibre Assay bietet die Möglichkeit die Initiation, die Elongation und die Termination der Replikation zu analysieren. Mit Hilfe von Thymidinanaloga kann replizierte DNA an Chromatin Fasern nachwiesen werden. Die Thymidin-Analoga Chlordesoxyuridine (CldU) und Iododesoxyuridine (IdU) wurden der Zelle über das Medium angeboten und während der Synthesephase anstelle der Base Thymidin eingebaut. Anschließend erfolgte eine Immunfärbung der CldU und IdU Nukleotide.

2.2.3.1 Markierung der Zellen mit CldU und IdU

Exponentiell wachsende U2OS Zellen wurden für jeweils 20 min (oder 45 min) mit CldUhaltigem Medium versehen (0,025 mM), das CldU-haltige Medium wurde abgenommen und IdU-haltiges Medium (0,25 mM) zu den Zellen für 20 min (oder 45 min) gegeben. Anschließend wurde das IdU-haltige Medium abgenommen und die Zellen wurden mit eiskaltem PBS zweimal gewaschen. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Zellen ständig auf Eis gehalten. Das PBS wurde abgesaugt und 1 ml PBS zu den Zellen gegeben, um die Zellen mit einem Zellscharber vom Flaschenboden zu ernten. Die Zellen wurden in ein 1,5 ml eppendorf-Gefäß überführt und die Zellzahl wurde mittels Coulter Counter bestimmt. Die Zellsuspension wurde auf 5 x 10⁵/ml eingestellt, um im nächsten Schritt die DNA der Zellen auf einem Objektträger aufzuspreizen.

2.2.3.2 Spreizen der DNA auf einem Objektträger

Für die Präparation der DNA aus den Zellen wurden pro Versuch 2 µl der Zellen auf einen Objektträger pipettiert. Die Zellen wurden 3-5 min trocknen gelassen, um an den Objektträger zu haften. Anschließend wurden 7 µl des Lysispuffers auf die Zellen pipettiert und für 2 min inkubiert. Der Lysispuffer bringt die Zellen zum Platzen, die Proteine in den Zellen werden denaturiert. Nach der Inkubation mit dem Lysispuffer wurde der Objektträger leicht gekippt, bis der Tropfen mit den Zellen und dem Lysispuffer am Objektträger herunter lief. Sobald der Tropfen in Bewegung war, wurde der Objektträger leicht schräg gestellt, bis der Tropfen das Ende des Objektträgers erreicht hatte.

Anschließend wurde der Objektträger luftgetrocknet und in Methanol/Essigsäure für 10 min fixiert. In diesem Zustand können die Objektträger für mindestens 1 Jahr im Kühlschrank in einer Objektträgerbox gelagert werden.

2.2.3.3 Immunfärbung der Chromatin-Fasern

Die DNA auf den Objektträgern wurde einmal für 5 min mit H2O gespült, um die DNA zu rehydrieren. Für die Immunfärbung der eingebauten CldU und IdU Nukleotide, muss die DNA denaturiert werden. Dafür wurde die DNA einmal für 5 min mit 2,5 M HCL äquilibriert und anschließend weitere 75 min mit 2,5 M HCL inkubiert. Die Objektträger wurden dreimal kurz in PBS gespült und es erfolgte die Blockierung mit Waschlösung I für 1 h, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Für die Detektion der CldU-Nukleotide wurde ein primärer, monoklonaler anti-BrdU aus der Ratte eingesetzt (Tabelle 2). Der Antikörper wurde 1:1000 in Waschlösung I verdünnt. Jeder Objektträger wurde mit 115 µl Antikörper-Lösung versehen und mit einem Glas-Deckglas versehen, um den Antikörper gleichmäßig auf dem Objektträger zu verteilen. Die Inkubation erfolgte 1 h bei RT in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Objektträger erneut einmal kurz und dreimal 10 min mit Waschlösung I gewaschen. Die DNA und der anti-BrdU-Antikörper wurden im nächsten Schritt mit 4 % Paraformaldehyd für 10 min fixiert. Anschließend wurden die Objektträger einmal kurz und dreimal 10 min mit Waschlösung I gewaschen. Für die Detektion des anti-BrdU-Antikörpers wurde ein sekundärer anti-rat AlexaFluor 555 (Tabelle 2) verwendet. Dieser wurde 1:500 in Waschlösung I verdünnt. Alle folgenden Schritte wurden ohne direkte Lichteinstrahlung durchgeführt. Erneut wurde jeder Objektträger mit 115 µl Antikörper-Lösung bedeckt und mit einem Deckglas versehen. Die Inkubation erfolgte 1,5 h bei RT in einer feuchten, abgedunkelten Kammer. Anschließend wurden die Objektträger erneut einmal kurz und dreimal 10 min mit Waschlösung I gewaschen. Die Detektion der eingebauten IdU-Nukleotide erfolgte mit dem primären monoklonalen anti-BrdU-

Antikörper aus der Maus. Der Antikörper wurde 1:1500 in Waschlösung I verdünnt. Jeder Objektträger wurde mit 115 µl Antikörper-Lösung bedeckt und mit einem Deckglas versehen. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Kühlraum in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Objektträger erneut einmal kurz und dreimal 10 min Waschlösung I gewaschen. Der anti-BrdU aus der Maus wurde mit einem sekundären anti-mouse AlexaFluor 488 (Tabelle 2) detektiert. Der Antikörper wurde 1:500 in Waschlösung I verdünnt. Jeder Objektträger wurde mit 115 µl Antikörper-Lösung bedeckt und mit einem Deckglas bedeckt. Die Inkubation erfolgte 1,5 h bei RT in einer feuchten, abgedunkelten Kammer. Anschließend wurden die Objektträger erneut einmal kurz und dreimal 10 min mit Waschlösung I gewaschen. Die Objektträger wurden mit dem Eindeckmittel Vectashield mounting medium versehen und mit Nagellack in Glas verschlossen. Für die Auswertung der Chromatin Fasern wurden mit dem 63er Öl-Objektiv Bildaufnahmen gemacht. Die Detektion des sekundären Fluoreszenz-Antikörpers AlexaFluor 555 erfolgte mit dem Filtersatz 43. Der Fluoreszenz-Farbstoff wird bei einer Wellenlänge von 553 nm angeregt und bei einer Wellenlänge von 568 emitierte. Für die Detektion des sekundären Fluoreszenz-Antikörpers AlexaFluor 488 wurde der Filtersatz 38 verwendet. Der Fluoreszenz-Farbstoff wird bei einer Wellenlänge von 493 nm anregt und bei einer Wellenlänge von 520 emitiert. Die Bildaufnahmen wurden mit der AxioCam MRm gemacht. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von ImageJ.

2.2.3.4 Auswertung mit ImageJ

Für die Auswertung der Chromatin-Fasern wurden pro Experiment 10 Fluoreszenzaufnahmen gemacht. Für die Analyse der verschiedenen Replikations-Strukturen wurde das Plug-In Analyze von ImageJ verwendet.

Zur Bestimmung der Länge der Chromatin Fasern wurde das Instrument Segmented lines von ImageJ verwendet. Um der Länge eine Einheit zu geben, wurde zunächst ein Umrechnungsfaktor für das Mikroskop berechnet, um µm Einheiten zu erhalten. Dafür wurde ein 10 µm Balken in die Bildaufnahme eingebrannt und mit ImageJ vermessen. Die erhaltene Länge von 98 wurde durch 10 µm geteilt und der Umrechnungsfaktor betrug somit 9,8 µm. Die erhaltene Länge der Chromatin Fasern wurde jeweils mit dem spezifischen Umrechnungsfaktor (9,8) in µm umgerechnet.

Um die Länge in kb/min umzurechnen, wurde der Umrechnungsfaktor 1 μ m = 2,59 kb (Jackson and Pombo, 1998) verwendet.

2.2.4 Western-Blot

Die Expression von Rad51, Chk1 und pChk1 wurde nach Induktion unterschiedlicher DNA Schäden im Western-Blot untersucht. Hierfür wurden die Zellen kontinuierlich mit den angegebenen Agenzien geschädigt und die Proteine wurden nach 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 24 h aus den Zellen isoliert und gelelektrophoretisch separiert. RAD51, Chk1 und pChk1 wurden nach dem Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran immunologisch nachgewiesen. Als Ladungskontrolle diente das Housekeeping-Protein ß-Aktin.

2.2.4.1 Proteinisolierung

Die Extraktion von Proteinen aus Zellen wurde nach (Finnie et al., 1995) durchgeführt. Bei dieser Methode wird ein Extrakt der ganzen Zelle gewonnen. Zunächst wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und in DMEM mit 10 % FCS aufgenommen. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis und unter einer sterilen Werkbank, um eine Degradation oder Kontamination des Proteins zu verhindern. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt und die Kulturflasche mit kaltem PBS gewaschen, um die verbliebenen Zellen zu gewinnen. Die Zellen wurden 5 min mit 1.200 rcf bei 4 °C zentrifugiert (Labofuge 400R). Anschließend wurde der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe vorsichtig abgesaugt. Das Zellsediment wurde in 10 ml kaltem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand erneut abgesaugt. Das Zellsediment wurde in 1 ml kaltem PBS resuspendiert und in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß transferiert. Die Zellsupension wurde erneut bei 4 °C mit 1.200 rcf für 5 min zentrifugiert (Microfuge R). Parallel wurde ein 146 µl-Aliquot des Puffers A auf Eis aufgetaut, mit 5 µl PMSF sowie 50 µl Glycerol versetzt und gemischt. Das Volumen des Zellsediments wurde abgeschätzt und das einfache Volumen (1:1) an Extraktionspuffer zugegeben. War kein Pellet sichtbar, so wurden 20 µl Extraktionspuffer eingesetzt. Die Zellen wurden mit der Pipette resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen durch Schockgefrieren im flüssigen Stickstoff aufgebrochen. Hierfür wurde das Reaktionsgefäß abwechselnd 1 min in flüssigem Stickstoff und 1 min im 37 °C warmen Wasserbad inkubiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Anschließend wurden die Zelltrümmer 10 min bei 10.800 rcf und 4 °C (Microfuge R) sedimentiert. Der Extrakt wurde abgenommen, in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und gemischt. Für die Proteinbestimmung wurden 2 µl des Extraktes abgenommen. Der verbleibende Zellextrakt wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.4.2 Proteinbestimmung

Zur Quantifizierung des extrahierten Proteins wurde die sogenannte BCA-Methode eingesetzt (Smith et al., 1985). Sie basiert auf der Biuret-Reaktion, bei der Cu2+-Ionen durch das Protein zu Cu+-Ionen reduziert werden. Die Cu+-Ionen bilden einen Komplex mit einem kolorimetrischen Reagenz, das Bicinchoninsäure (BCA) enthält. Der Komplex absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 562 nm. Die Absorption steigt im Messbereich zwischen 20 und 2.000 µg/ml linear mit der Proteinkonzentration an. Es wurde das Bicinchoninic Acid Kit der Firma Sigma verwendet. 2 µl des Proteinextraktes wurden in 48 µl autoklaviertem H2O bidest. verdünnt. Als Blindprobe diente 48 µl H2O bidest. und 2 µl Proteinisolationspuffer. Das Farbreagenz wurde durch Mischen von 50 Teilen Reagenz A mit einem Teil Reagenz B angesetzt. Zu den verdünnten Proteinextrakten und der Blindprobe wurden je 1 ml Farbreagenz gegeben. Die Proben wurden gemischt und 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Proben kurz bei RT abgekühlt, in Küvetten transferiert und die Extinktion bei 562 nm im Photometer gemessen. Jede Messung wurde innerhalb von 10 min vollendet.

Als Standard diente bovines Serumalbumin (BSA, Sigma). Die Standardreihe wurde mit sechs Verdünnungen zwischen 25 und 1.000 µg/ml BSA aufgenommen und im Gerät gespeichert. Jeder Standardwert wurde dreifach bestimmt.

2.2.4.3 SDS-Gelelektophorese und Nachweis von Proteinen

Die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Es wurde das Criterion-System (Bio-Rad Laboratories) verwendet. Die Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulose Membran erfolgte in einem Criterion Blotter von Biorad.

Für die Gelelektrophorese wurden 40 µg Proteinextrakt mit 10x Bio-Rad-Lämmli und H2O bidest. versetzt, gemischt, anzentrifugiert und für 5 min im 100° C Wasserbad denaturiert und erneut anzentrifugiert. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis ausgeführt. Das Volumen der Proben durfte 20 µl nicht übersteigen. Erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung nicht direkt im Anschluss, so wurden die vorbereiteten Proben bei -80 °C gelagert.

Die elektrophoretische Auftrennung wurde in einem gradienten (4%-15%) Tris-HCl Polyacrylamid-Gel (Bio-Rad Laboratories) durchgeführt. Das Gel wurde vor dem Einsetzen in die Elektrophoresekammer in H2O bidest. und Laufpuffer gespült. Die Pufferreservoirs wurden mit Laufpuffer gefüllt, der Kamm gezogen und die Taschen gespült. Luftblasen am unteren Gelrand wurden entfernt. Die Proben wurden vor dem Beladen des Gels gemischt und das gesamte Volumen einer jeden Probe in die jeweilige Tasche pipettiert. In mindestens eine Spur wurde ein Größenstandard pipettiert. Dabei handelte es sich um 4 µl Two Color Molecular Weight Marker (Licor), der vorab gemischt wurde. Der Two Color Molecular Weight Marker ist sofort im Gel sichtbar. Verbleibende leere Taschen wurden mit 1x Probenpuffer + H2O bidest (1:1) beladen. Die Elektrophorese erfolgte in einem Eisbad für 10 min bei 100 V (Sammelphase) und für 80 min bei 200 V (Trennphase).

Anschließend wurden die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine im Criterion Blotter auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Vor dem Transfer wurde die Membran 10 s in Wasser aktiviert und anschließend wurden sowohl das Gel als auch die Membran 15 min in Transferpuf-

28

fer äquilibriert. Die Apparatur wurde gemäß den Herstellerangaben zusammengebaut. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 10 V im Kühlraum. Am darauffolgenden Tag wurde noch einmal für 0,5 h bei 100 V transferiert. Der Transferpuffer wurde während der gesamten Zeit durch Rühren umgewälzt. Die Effektivität des Transfers wurde anhand des Two Color Molecular Weight Markers überprüft. Nach dem Transfer wurde die Membran einmal kurz mit TBS abgespült und anschließend für mindestens vier Stunden in Odyssey Blocking Buffer (Licor) unter Schwenken im Kühraum inkubiert. Durch diesen Schritt werden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran blockiert. Für die Detektion wurden alle Antikörper in Odyssey Blocking Buffer (Licor) inkubiert. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Proteine mit monoklonale oder polyklonale Antikörper nachgewiesen, die in Tabelle 1 aufgelistet sind. Anschließend wurde die Membran einmal kurz in TBST abgespült und dreimal 10 min mit TBST unter Schütteln gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Alle folgenden Schritte wurden ohne direkte Lichteinstrahlung durchgeführt. Die Inkubation mit den sekundären IRDye 680 oder 800 CW Antikörper (Licor) erfolgte in abgedunkelten Inkubationskammern unter Schwenken. Die Membran wurde einmal kurz in TBST abgespült und dreimal 10 min mit TBST unter Schütteln gewaschen. Zur Detektion wurden die Antikörper mit dem Odyssey Infrared Imaging System detektiert und quantitativ analysiert. Nach Detektion des gewünschten Protein-Signals wurde auf derselben Membran als Kontrolle ß-Aktin nachgewiesen. Die Membran wurde kurz mit TBS abgespült und über Nacht mit Odyssey Blocking Buffer blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern nach dem gleichen Schema wie zuvor für die anderen Proteine.

Die Auswertung der aufgenommenen Fluoreszenz-Signale erfolgte mit Hilfe der Software des Odyssey Infrared Imaging Systems. Die Software zieht automatisch den Hintergrund ab und es wird ein Wert für eine relative Protein-Menge erhalten.

2.2.5 Detektion von γH2AX-Foci

Die Detektion von γ H2AX-Foci als Nachweis von Doppelstrangbrüchen wurde nach Rothkamm et al. 2009 modifiziert. Die Zellen wurden auf Objektträgern (CultureSlides) ausgesät und nach vier Stunden wurde den Zellen Ponasterone A gegeben, um die Überexpression von Rad51 zu induzieren. In jedem Versuch wurden nicht induzierte U2OS-Zellen mitgeführt. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Ponasterone-Gabe mit verschiedenen Konzentrationen H₂O₂ behandelt, um Einzelstrangbrüche und Doppelstrangbrüche zu induzieren und weitere 4 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion der γ H2AX-Foci. Die Kammern wurden von den Objektträgern gelöst. Die Objektträger wurden einmal kurz in PBS gespült und anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen in 2 % Formaldehyd in PBS für 15 min bei RT. Die Objektträger wurden viermal mit 1 x PBS gewaschen und dann für 5 min in der Permeabili-

sierungslösung inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit der Blockierungslösung für 1 h. Als erster Primär-Antiköper wurde ein monoklonaler γH2AX Antikörper aus der Maus eingesetzt (Tabelle 3). Der Antikörper wurde 1:100 in Waschlösung II (PBS + 1% BSA + 0,5 % Tween20) verdünnt. Jeder Objektträger wurde mit 50 µl Antikörper-Lösung versehen und mit einem Kunststoff-Deckglas (Plastic Coverslip) geschützt. Die Inkubation erfolgte 1 h bei RT in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Objektträger erneut einmal kurz und dreimal 10 min in Waschlösung II gewaschen. Bei dem sekundären Antikörper handelte es sich um einen Fluorescein-markierten goat-anti-mouse Alexa Fluor 594 Antikörper (Tabelle 3). Der zweite Antikörper wurde 1:2000 in Waschlösung II verdünnt. Alle folgenden Schritte wurden ohne direkte Lichteinstrahlung durchgeführt. Erneut wurde jeder Objektträger mit 50 µl Antikörper-Lösung versehen und mit einem Kunststoff-Deckglas geschützt. Die Inkubation erfolgte 1 h bei RT in einer feuchten, abgedunkelten Kammer. Anschließend wurden die Objektträger erneut einmal kurz und dreimal 10 min in Waschlösung II und anschließend 10 min in PBS gewaschen. Zur Färbung der Kerne und zum Verschluß der Objekträger wurde Vectashield mounting medium mit 0,1 µg/ml DAPI verwendet und die Objektträger wurden mit Nagellack in Glas verschlossen. Die Auswertung erfolgte verschlüsselt am Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2 (Zeiss). Für die quantitative Analyse wurden die FOCI manuell gezählt. Es wurden nur FOCI gezählt, die im Zellkern lagen, der durch DAPI angefärbt wurde. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen, als Positivkontrolle mit 6 Gy bestrahlte Zellen. Pro Objektträger wurden 100 Zellen ausgewertet.

2.2.6 Chromosomenaberrationen

Für die Analyse von Chromosomenaberrationen wurden exponentiell wachsende U2OS-Zellen verwendet. Für die Rad51 Überexpression wurden die Zellen 24 h vor Schadensinduktion mit Ponasterone A behandelt (Tabelle 9). Die Zellen wurden für eine Stunde geschädigt mit Ausnahme von H₂O₂, das den Zellen nur für 20 min gegeben wurde. Nach einer Stunde wurde das Medium abgenommen, die Zellen wurden mindestens zweimal mit 1 x PBS gewaschen und die Zellen wurden mit frischem Medium versehen, das Colcemid enthielt. Colcemid enthält Colchicin, ein Alkaloid der Herbstzeitlosen, das die Ausbildung der Kernspindel inhibiert. Die Zellen können keine intakten Spindelfasern ausbilden und werden daher in der Metaphase arretiert. Das Colcemid wurde über Nacht gegeben und am nächsten Tag wurde die Methaphasen-Präparation durchgeführt.

2.2.6.1 Präparation der Metaphasen

Die mitotischen Zellen wurden trypsiniert und in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt und 5 min bei 1200 rcf zentrifugiert (Megafuge 1.0). Der Überstand wurde mit der Vakuumpumpe

abgesaugt und das Zellsediment in 10 ml PBS resuspendiert. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation. Zu dem Zellsediment wurde tröpfchenweise 10 ml 0,075 M KCl unter Rütteln zugegeben. Durch diese hypotone Behandlung quellen die Zellen auf. Es wurde zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, und die Zellen wurden durch tröpfchenweise Zugabe von 10 ml Carnoys Fixativ unter Rütteln fixiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde die Fixierung wiederholt, um verbliebene wässrige Anteile zu entfernen und die Zellen vollständig zu konservieren. Der Überstand wurde bis auf 1 ml abgesaugt und die Zellen wurden auf 1x106/ml eingestellt. Die fixierten mitotischen Zellen konnten so bei -20 °C für mehrere Monate gelagert werden.

Zur mikroskopischen Auswertung wurden die mitotischen Zellen auf Objektträger getropft. Dabei spreiten sich die kondensierten Chromosomen. Hierfür wurde der Objektträger mit einem homogenen Wasserfilm bedeckt und 25 µl der Zellsupension aufgetropft. Der Alkohol verdrängt das Wasser, die dabei entstehende Energie erleichtert das Spreiten der Chromosomen. Die Objektträger wurden mindestens 20 min getrocknet. Anschließend wurden die Metaphasen-Präparate für 15 min in 4 % Giemsa in einem Hellendahl-Färbekasten gefärbt. Der überschüssige Farbstoff wurde durch sechsmaliges Waschen in H2O entfernt. Die Objektträger wurden erneut getrocknet und mit dem Eindeckmittel Entellan verschlossen. Die Präparate wurden lichtmikroskopisch analysiert, pro Probe wurden 50 Metaphasen ausgewertet. Für die Analyse wurden G1-Aberrationen und G2-Aberrationen getrennt analysiert. Zunächst wurde die Anzahl der Zellen mit triradialen Chromosomen bestimmt. Anschließend wurde die Anzahl der azentrischen und dizentrischen Chromosomen ermittelt.

2.2.7 Koloniebildungstest

Die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Basenschäden, Einzelstrangbrüchen, DNA-DNA-Quervernetzungen, einseitigen Doppelstrangbrüchen, zweiseitigen Doppelstrangbrüche und ionisierender Strahlung wurde mit Hilfe des Koloniebildungstests bestimmt. Dabei wurden die Zellen in so geringer Konzentration ausgesät, dass jede Zelle sich einzeln absetzen und sich klonal vermehren konnte. Innerhalb von 7 -14 Tagen bilden sich aus überlebenden Einzelzellen sichtbare Kolonien, die gezählt werden können.

2.2.7.1 Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen DNA Schäden

Um die Empfindlichkeit gegenüber verschiedener DNA-Schäden zu untersuchen, wurden U2OS-Zellen in Ø 10 cm-Gewebezuchtschalen für den Koloniebildungstest ausgesät. Vier Stunden nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten, wurde Ponasterone A zu den Zellen gegeben, die das Rad51 überexpremieren sollten. 18 h nach der Aussaht wurden die Zellen in den angegebenen Konzentrationen geschädigt und die Inkubation erfolgte für den jeweiligen DNA-Schaden wie in Tabelle 9 aufgelistet. Wurde das Agenz nicht kontinuierlich gegeben, dann wur-

de nach Schadensinduktion mindestens zweimal mit 1 x PBS gewaschen und anschließend frisches Medium gegeben. Die Zellen wurden für 7-14 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien gefärbt und analysiert (2.2.7.2).

2.2.7.2 Färbung und Analyse der Kolonien

Die Kolonien wurden durch Färbung mit Kristallviolett sichtbar gemacht. Das Medium wurde verworfen und die Zellen für 5 min mit 70 % Ethanol fixiert. Der Ethanol wurde verworfen und die Zellen wurden mit 0,1 % Kristallviolett für 5 min gefärbt. Das Kristallviolett wurde abgekippt und überschüssige Farbe mit Leitungswasser entfernt. Die Platten wurden getrocknet. Bei der anschließenden Analyse wurden die Petrischalen mit einem Keimzählgerät ausgewertet, nur Kolonien mit mehr als 50 Zellen wurden gezählt. Die Überlebensrate wurde durch das Verhältnis gebildeter Kolonien zur Anzahl eingegebener Zellen bestimmt (Angehrate). Zur Kalkulation der Koloniebildungsfähigkeit wurde die Überlebensrate auf die Angehrate (plating efficiency) der jeweiligen Zellen normiert. Die Angehrate wurde mit unbehandelten Zellen ermittelt.
3 Ergebnisse

Die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität ist das fundamentale Ziel der Zelle. Dabei ist eine fehlerfreie DNA-Replikation in jedem Zellzyklus von größter Bedeutung. Trifft ein Replikationsapparat auf einen DNA-Doppelstrangbruch, ist die Homologe Rekombination mit ihrem zentralen Protein Rad51 der Hauptreparaturmechansimus, welcher aktiv wird. Der DNA-Schaden wird dabei von sogenannten Sensorproteinen erkannt, die wiederum Zellzykluskon-trollproteine aktivieren und zu einem Anhalten der S-Phase führen. Weitere Initiationsereignisse der Replikation werden unterdrückt, Reparaturprozesse in Gang gesetzt und der Schaden behoben.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie sich ionisierende Strahlung und die durch Bestrahlung erzeugten DNA-Schäden auf den Replikationsapparat, die Aktivierung des Intra-S-Phase Kontrollproteins Chk1 und die genomische Instabilität auswirken. Dabei sollte der Effekt von Basenschäden (Base-Damage, BD), Einzelstrangbrüchen (Single-Strand-Break, SSB), DNA-DNA-Quervernetzungen (Intra-Strand-Crosslink, ICL), zweiseitigen und einseitigen Doppelstrangbrüchen (Double-Strand-Break, DSB) im Einzelnen und mit der Induktion aller Schäden gleichzeitig durch ionisierende Strahlung verglichen werden. Von besonderem Interesse war es zu überprüfen, ob eine Hochregulation von Rad51 zu einer veränderten Antwort der Replikationsprozesse und der genomischen Stabilität nach DNA-Schädigung führt.

Für diese Untersuchungen musste zunächst der DNA Fibre Assay etabliert werden, der als einzige Methode die Analyse von Replikationsprozessen zulässt.

3.1 Etablierung des DNA Fibre Assay

Der DNA Fibre Assay bietet die Möglichkeit, die Initiation der Replikation, die Elongation und das Anhalten von Replikationsgabeln zu analysieren. Der Nachweis erfolgt durch Analoga des Thymidins, welche replizierenden Zellen angeboten werden. Den Zellen wird Chlorodesoxyuridine (CldU) und Iododesoxyuridine (IdU) zum Einbau angeboten, die DNA aus den Zellen isoliert und die Thymidinanaloga werden immunologisch mit spezifischen Antikörpern an Chromatin-Fasern nachgewiesen. Die Detektion von CldU erfolgt mit einem rot fluoreszierenden sekundären Antikörper, die von IdU mit einem grün fluoreszierenden sekundären Antikörper. Abbildung 5 zeigt eine schematische Darstellung einer Replikationsgabel mit inkooperierten CldU-Nukleotiden (rot) und IdU-Nukleotiden (grün).



Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Replikationsgabel mit eingebauten CldU- (rot) und IdU- (grün) Nukleotiden. Abildung verändert nach (Moldovan and D'Andrea, 2009).

3.1.1 Charakterisierung verschiedener Replikations-Strukturen

Alle Untersuchungen durch den DNA Fibre Assay wurden mit asynchronen Zellen durchgeführt. Exponentiell wachsende U2OS-Zellen wurden nacheinander jeweils für 20 min mit CldU und IdU markiert. Die DNA wurde auf einem Objektträger präpariert und eingebaute CldU und IdU Nukleotide wurden mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Abbildung 6 zeigt schematisch das Markierungsprotokoll der Thymidin-Analoga mit der entsprechenden Replikationsrichtung. Rot markierte Bereiche zeigen den Einbau von CldU-Nukleotiden, grün markierte den Einbau der IdU-Nukleotide. Abbildung 6 unten zeigt exemplarisch den kontinuierlichen Einbau der Nukleotid-Analoga in verschiedenen Anordnungen. Im Folgenden wurden die verschiedenen Chromatin-Fasern mit ihren unterschiedlichen Markierungsmustern in sogenannte Replikations-Strukturen unterteilt (Tabelle 10).

Replizierende Zellen, die nur CldU-Nukleotide (rot) eingebaut hatten, wurden als terminierende Replikationsgabeln 1. Ordnung bezeichnet (Replikationsstruktur 1). Zellen, die sowohl CldU-Nukleotide (rot) und angrenzend IdU-Nukleotide (grün) eingebaut hatten, wurden als elongierende Replikationsgabeln beschrieben (Replikationsstruktur 2). Diese Struktur kann in zwei Anordnungen auftreten: Die Replikationsstruktur 3 zeigt einen Replikationsursprung 1. Ordnung mit zwei elongierende Replikationsgabeln, die von einem Replikationsursprung in bidirektionale Richtung synthetisiert haben. Replikationsstruktur 4 zeigt terminierende Replikationsgabeln 2. Ordnung mit zwei sich aufeinander zu bewegenden elongierenden Replikationsgabeln und zeigt, dass zwei Replikationsgabeln terminieren.



Abbildung 6: Schematisches Markierungsprotokoll (oben). Chromatin-Fasern in ungeschädigten U2OS-Zellen (unten). Exponentielle Zellen wurden für jeweils 20 min mit CldU und IdU markiert, die DNA präpariert und eingebaute Nukleotide detektiert. Für die Detektion von CldU wurde anti-rabbit-BrdU und ein sekundärer Antikörper Alexa-Fluor555 (rot) verwendet. Für IdU wurde anti-mouse-BrdU und ein sekundärer Antikörper Alexa-Fluor488 (grün) verwendet. Die Chromatin- Fasern wurden mikroskopisch mit einer 1.000fachen Vergrößerung analysiert. Die Aufnahme der Bilder erfolgte über eine Digitalkamera mit Hilfe von AxioVision Rel.4.7.

Replizierende Zellen, die nur IdU-Nukleotide (grün) eingebaut hatten, wurden als Replikationsursprung 2. Ordnung bezeichnet (Replikationsstruktur 5).

Die Charakterisierung der unterschiedlichen Chromatin-Fasern zeigte, dass es drei Haupt-Replikationsmuster gab: Elongierende Replikationsgabeln, mit eingebauten CldU-Nukleotiden (rot) und angrenzenden IdU-Nukleotiden (grün), terminierende Replikationsgabeln 1. Ordnung, mit eingebauten CldU-Nukleotiden (rot), 3. Replikationsursprung 2. Ordnung, mit eingebauten IdU-Nukleotiden (grün).

	Replikationsstrukturen	Beschreibung	Bezeichnung
1	CIdU - CIdU	Zwei Replikationsgabeln, die aus bidirektionaler Richtung fusionieren und die Replikation während der CldU Markierungszeit terminieren.	Terminierende Replikationsgabeln 1. Ordnung
2	CidU - IdU	Eine Replikationsgabel mit eingebauten CldU und IdU Nukleotiden.	Elongierende Replikationsgabel
3 (ldU - CldU CldU - IdU	Zwei elongierende Replikationsgabeln, die von einem Replikationsursprung in bidirektionale Richtung laufen	Replikationsursprung 1. Ordnung
4	CldU - IdU IdU - CldU	Zwei Replikationsgabeln, die nach der CldU und IdU Markierung die Replikation terminieren.	Terminierende Replikationsgabeln 2. Ordnung
5	IdU - IdU	Zwei Replikationsgabeln, die während der ldU Markierungszeit, die Replikation in bidirektionale Richtung starten.	Replikationsursprung 2. Ordnung

Tabelle 10: Übersicht der Replikationsstrukturen.

Im Folgenden sollten elongierende Replikationsgabeln, terminierende Replikationsgabeln 1. Ordnung und Replikationsursprünge 2. Ordnung quantifiziert werden. Ein Replikationsursprung 1. Ordnung (Struktur 3) und terminierende Replikationsgabeln 2. Ordnung (Struktur 4) wurden jeweils als zwei elongierende Replikationsgabeln bewertet. Abbildung 7 zeigt die prozentuale Verteilung der drei Replikations-Strukturen. 77 % der Zellen zeigten elongierende Replikationsgabeln, 14,5 % terminierende Replikationsgabeln 1. Ordnung und 8,4 % Replikationsursprünge 2. Ordnung. Da nach einer Markierungszeit von 40 min hauptsächlich elongierende Replikationsgabeln beobachtet wurden, sollten die Zellen ebenfalls für einen längeren Zeitraum mit CldU und IdU markiert werden.

Exponentiell wachsende U2OS-Zellen wurden nacheinander jeweils für 45 min mit CldU und IdU markiert. Die DNA wurde auf einem Objektträger präpariert und eingebaute CldU- und IdU-Nukleotide mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.



Abbildung 7: Verteilung der Replikations-Strukturen nach einem Markierungszeitraum von 40 min. Exponentielle U2OS-Zellen wurden jeweils 20 min mit CldU und IdU markiert, die DNA präpariert, eingebaute Nukleotide detektiert und Replikations-Strukturen mit ImageJ quantifiziert. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der Replikations-Strukturen mit dem Fehler des Mittelwertes.

Abbildung 8 zeigt die prozentuale Verteilung elongierender Replikationsgabeln, terminierender Replikationsgabeln 1. Ordnung und Replikationsursprünge 2. Ordnung nach einem Markierungszeitraum von 90 min. Ein Replikationsursprung 1. Ordnung (Struktur 3) und terminierende Replikationsgabeln 2. Ordnung (Struktur 4) wurden jeweils als zwei elongierende Replikationsgabeln bewertet.

Ungeschädigte Zellen zeigten 37,7 % elongierende Replikationsgabeln, 37,9 % terminierende Replikationsgabeln 1. Ordnung und 24,3 % Replikationsursprünge 2. Ordnung. So zeigte sich nach einer Markierungszeit von 90 min eine deutlich veränderte Verteilung der Replikations-Strukturen. Während nach 40 min hauptsächlich elongierende Replikations-Strukturen beobachtet wurden, zeigte sich nach 90 min eine klare Verschiebung zu mehr Terminations- und Initiationsereignissen.

Für die Untersuchung der Elongation wurde deshalb im Folgenden das Markierungsprotokoll 1 verwendet und für die Untersuchung von Termination und Initiation das Markierungsprotokoll 2.



Abbildung 8: Verteilung der Replikations-Strukturen nach einem Markierungszeitraum von 90 min. Exponentielle U2OS-Zellen wurden für jeweils 45 min mit CldU und IdU markiert, die DNA präpariert, eingebaute Nukleotide detektiert und Replikations-Strukturen wurden mit ImageJ quantifiziert. Dargestellt ist die prozentuale Verteilung der Replikations-Strukturen mit dem Fehler des Mittelwertes.

3.1.2 Einbaurate der Nukleotid-Analoga

Es konnte gezeigt werden, dass in einer asynchronen Zellpopulation drei Haupt-Replikations-Strukturen gebildet wurden, die sich je nach Markierungsprotokoll in ihrer Verteilung unterschieden. Im Weiteren war von Interesse, mit welcher Einbaurate die Nukleotid-Analoga in die DNA eingebaut wurden. Für die Analyse der Einbaurate wurden das Markierungsprotokoll 1 verwendet. Es wurden 1558 Chromatin-Fasern analysiert, wobei nur elongierende Replikationsgabeln berücksichtigt wurden. Die Längen der CldU und IdU markierten Chromatin-Fasern wurden separat vermessen und die erhaltene Länge wurde in kb/min umgerechnet. Abbildung 9 zeigt eine typische Normalverteilung der Einbaurate der CldU-Nukleotide (A) und IdU-Nukleotide (B) in kb/min. 1,6 % der Zellen hatten CldU mit einer Einbaurate von 0,2 kb/min eingebaut, 11,91 % mit 0,4 kb/min, 23,7 % mit 0,6 kb/min, 23 % mit 0,8 kb/min und 16 % mit 1 kb/min. 13 %, 6,2 %, 3,6 % und 1,4 % hatten CldU mit einer Einbaurate von 1,2, 1,4, 1,6 und 1,8 kb/min eingebaut. IdU-Nukleotide wurden in 4,8 % der Zellen mit einer Einbaurate von 0,2 kb/min eingebaut, 19,6 % mit 0,4 kb/min, 29,5 % und 25 % der Zellen mit 0,6 kb/min und 0,8 kb/min, 12,6 % mit 1 kb/min. 5,5 %, 1,8 %, 0,9 % und 0,1 % hatten IdU mit einer Einbaurate von 1,2, 1,4, 1,6 und 1,8 kb/min eingebaut. Für beide Nukleotide befanden sich die Werte der Einbaurate zwischen 0,1-1,8 kb/min, wobei die Verteilung zeigt, dass CldU-Nukleotide mit einer höheren Einbaurate als IdU in die DNA gebaut wurde. Das zeigte sich ebenfalls in der mittleren Einbaurate, die für CldU $0,86 \pm 0,009$ kb/min und für IdU $0,69 \pm 0,0069$ kb/min ergab (Abbildung **10**).



Abbildung 9: Verteilung der Einbaurate von CldU (A) und IdU (B). Exponentielle U2OS-Zellen wurden für 40 min mit CldU und IdU markiert, die DNA präpariert, eingebaute Nukleotide detektiert und die Länge der Chromatin-Fasern wurde bestimmt und in kb/min umgerechnet.



Abbildung 10: Mittlere Einbaurate von CldU und IdU. Exponentielle U2OS-Zellen wurden für 40 min mit CldU und IdU markiert, die DNA präpariert, eingebaute Nukleotide detektiert, die Länge der Chromatinfasern bestimmt und in kb/min umgerechnet. Dargestellt ist die mittlere Einbaurate für CldU und IdU von 1558 Chromatin-Fasern. Der Fehler ist Fehler des Mittelwertes.

3.1.3 Chromatin-Fasern mit symmetrischer und asymmetrischer Einbaura-

te

Im Folgenden sollte festgestellt werden, in welchem Verhältnis die Thymidin-Analoga zueinander eingebaut wurden. Dazu wurde das Verhältnis der Einbauraten von IdU zu CldU (IdU/CldU) ermittelt und elongierende Replikationsgabeln wurden in drei Gruppen unterteilt (Tabelle 2). Ergibt das IdU/CldU Verhältnis einen Wert der < 1 ist, handelt es sich um asymmetrische Chromatin-Fasern (Gruppe1), die CldU länger eingebaut hatten. Bei einem Verhälnis von ≈ 1 lagen symmetrische Chromatin-Fasern vor (Gruppe 2) und bei einem Verhältnis > 1 handelt es sich um asymmetrische Chromatin-Fasern (Gruppe 3), die IdU länger eingebaut hatten. Das IdU/CldU Verhältnis wurde für alle elongierende Replikations-Strukturen bestimmt und den Gruppen zugeteilt (Tabelle 11).

Gruppe	Тур	Verhältnis I/C	Fibre	
1	asymmetrisch <1	0-0.8	CldU 20'	IdU 20'
2	asymmetricab -1	0 9 1 2	CldU 20'	IdU 20'
3	symmetrisch – r	0,0-1,2		
Ũ	asymmetrisch >1	1,2-2,6	CIdU 20 [.]	IdU 20 [.]

Tabelle 11: Symmetrische und asymmetrische Chromatin-Fasern.

Abbildung 11 zeigt die prozentuale Verteilung des IdU/CldU Verhältnisses nach einer DNA-Markierung für CldU und IdU von jeweils 20 min. 53,27 % der Zellen hatten beide Nukleotide gleichmäßig eingebaut, 35,05 % hatten mehr CldU und 11,68 % der Zellen mehr IdU eingebaut. Somit wiesen nur 53 % der Zellen symmetrische Chromatin-Fasern auf.



Abbildung 11: Verhältnis von IdU zu CldU. Exponentielle U2OS-Zellen wurden für 40 min mit CldU und IdU markiert, die DNA präpariert, Nukleotide detektiert, die Länge bestimmt und in kb/min umgerechnet. Dargestellt ist die Verteilung der IdU/CldU Verhältnis von 1558 Chromatin- Fasern.



Abbildung 12: Mittlere Einbaurate von CldU und IdU. Exponentielle U2OS-Zellen wurden für 40 min mit CldU und IdU markiert, die DNA präpariert, eingebaute Nukleotide detektiert, die Länge bestimmt und in kb/min umgerechnet. Dargestellt ist die mittlere Einbaurate symmetrischer Chromatin-Fasern. Der Fehler ist Fehler des Mittelwertes.

3.1.4 Elongation

Für die detaillierte Untersuchung von Effekten verschiedener DNA-Schäden auf die Elongation sollte zunächst die Replikation unbehandelter Zellen untersucht werden. Dafür wurde das Markierungsprotokoll 1 verwendet und es wurden nur symmetrische Chromatin-Fasern bewertet. Abbildung 12 zeigt die mittlere Einbaurate von symmetrischen Chromatin-Fasern für CldU von 0,81 ± 0,01 kb/min und für IdU mit 0,77 ± 0,01 kb/min. Diese Einbauraten wurden im Weiteren für unbehandelte Zellen verwendet.

Dieses Markierungsprotokoll wurde ebenfalls für alle weiteren Untersuchungen von Effekten verschiedener DNA-Schäden auf die Elongation verwendet. Dafür werden in folgenden Experimenten exponentiell wachsende Zellen nacheinander jeweils für 20 min mit CldU und IdU markiert und während des zweiten Markierungsintervalls wird der Schaden induziert (Abbildung 13). Für den Effekt von DNA-Schädigung auf die Elongation wird dann die Einbaurate von unbehandelten symmetrischen Zellen mit den Einbauraten geschädigter Zellen verglichen



Abbildung 13: A) Schematisches Markierungsprotokoll zur Untersuchung der Elongation mit und ohne Schädigung. **B)** Chromatin-Fasern ungeschädigter und geschädigter Zellen. Exponentielle Zellen wurden für 40 min mit CldU und IdU markiert, geschädigt, die DNA präpariert und eingebaute Nukleotide detektiert. CldU wurde mit anti-rabbit-BrdU und mit sekundärem Fluoreszenz-Antikörper Alexa-Fluor555 (rot) detektiert. IdU wurde mit anti-mouse-BrdU und mit sekundärem Fluoreszenz-Antikörper Alexa-Fluor488 (grün) detektiert. Die Chromatin-Fasern wurden mikroskopisch mit einer 1.000fachen Vergrößerung analysiert. Die Aufnahme der Bilder erfolgte über eine Digitalkamera mit Hilfe von AxioVision Rel.4.7.

3.1.5 Angehaltene Replikationsgabeln und Initiationsereignissen nach Schädigung

Für die weitere Analyse war von Interesse, ob eine Zelle nach Schadensinduktion in der Lage ist, die Replikation ungehindert fortzusetzten, der induzierte Schaden zum Anhalten von Replikationsgabeln führt oder ob weitere Initiationsereignisse aktiviert oder inhibiert werden. Für diesen Aspekt wurde das Markierungsprotokoll 2 verwendet. Zudem sollte der Schaden bereits im ersten Markierungszeitraum induziert werden, um der Zelle entsprechend Zeit zu geben, auf den Schaden zu reagieren (Abbildung 14).



± Schadensinduktion 30⁴

Abbildung 14: Schematisches Markierungsprotokoll für die Analyse von angehaltenen Replikationsgabeln und Initiationsereignissen mit und ohne Schadensinduktion.

Für die Analyse der Aspekte soll zunächst die Verteilung der Haupt-Replikations-Strukturen bestimmt werden. Um den Anteil an angehaltenen Replikationsgabeln zu bestimmen, sollen die terminierenden Replikationsgabeln 1. Ordnung in Relation zu elongierenden Replikationsgabeln gestellt werden. Die Frequenz von Neuinitiationsereignissen ergibt sich, indem man Replikationsurprünge 2. Ordnung in Relation zu elongierenden Replikationsgabeln 15).

Fasst man die methodischen Vorarbeiten zusammen, so konnte sehr deutlich herausgearbeitet werden, dass für die Untersuchung der unterschiedlichen Replikations-Strukturen verschiedene Markierungsprotokolle verwendet werden müssen.

So wird die Elongation am deutlichsten abgebildet, wenn ein kurzer Markierungszeitraum mit jeweils 20 min Einbau der beiden Nukleotide eingesetzt wird. Ist die Untersuchung von angehaltenen oder sogar neu initiierten Replikationsereignissen von Interesse, sollte das Markierungsprotokoll 2 verwendet werden, welches einen Markierungszeitraum von jeweils 45 min vorsieht, mit einer Schädigung der Zellen während der ersten Markierungsphase.



3.2 Bedeutung verschiedener DNA-Schäden für die Replikationsprozesse

Es sollte der Effekt von ionisierender Strahlung sowie der Effekt einzelner, durch Strahlung erzeugter Schäden wie Basenschäden, Einzelstrangbrüchen, DNA-DNA Quervernetzungen, zweiund einseitige Doppelstrangbrüche auf die S-Phase untersucht werden. Dabei war die Aktivierung der Intra-S-Phase-Kinase Chk1 sowie die Auswirkung der Schäden auf die Elongation der Replikation, das Anhalten von Replikationsgabeln und der Aktivität von Initiationsereignissen von Interesse. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob die DNA-Schäden Einfluss auf die genomische Instabilität von Chromosomen haben.

Tabelle 12 zeigt die verschiedenen DNA-Schäden und die dazu gehörigen Agenzien, die für die Untersuchungen verwendet wurden.

DNA-Schaden	Agenzien	Abkürzung
Basenschäden	MMS	BD
Einzelstrangbrüche	10µM H ₂ O ₂	SSB
Intra-Strand-Crosslinks	MMC	ICL
Zweiseitige Doppelstrangbrüche	200µM H ₂ O ₂	zweiseitige DSB
Einseitige Doppelstrangbrüche	Topotecan	einseitige DSB
Alle Schäden	Bestrahlung	Gy

 Tabelle 12: Agenzien zur Erzeugung einzelner DNA-Schäden.

3.2.1 Aktivierung des Intra-S-Phase Kontrollpunktes nach DNA-Schädigung

Kommt es während der S-Phase zur Blockierung der Replikation, verhindert Chk1 den Fortschritt der S-Phase und somit den Eintritt in die Mitose. Chk1 wird dazu phosphoryliert und unterdrückt die Initiation von Replikationsursprüngen und stabilisiert angehaltene Replikationsgabeln (Zachos et al., 2003; Feijoo et al., 2001).

Es sollte untersucht werden, welche DNA-Schäden zu einer Phosphorylierung von Chk1 führen. Exponentiell wachsende U2OS-Zellen wurden mit den in der Tabelle **12** aufgelisteten Agenzien geschädigt und in einem Zeitraum von 24 h wurde Proteine isoliert und die Phosphorylierung von Chk1 im Western-Blot nachgewiesen.



Abbildung 16: Phosphorylierung von Chk1 im Western-Blot. Exponentielle U2OS-Zellen wurden geschädigt und Gesamtprotein wurde nach 0,25, 0,5, 1, 2, 4 und 24 h extrahiert. pChk1 wurde mittels primärem anti-pChk1 (Ser 345) aus Kaninchen und sekundärem *IRDYE* aus Ziege detektiert. Chk1 wurde mit anti-Chk1 Antikörper aus Maus und *IRDYE* aus Ziege nachgewiesen. Die Detektion erfolgte mit dem *Odyssey Infrared Imaging* System.

Die Detektion von Chk1 und pChk1 erfolgte gleichzeitig mit verschiedenen Fluoreszenz-Antikörpern. Chk1 wurde mit einem rot-markierten sekundären Antikörper nachgewiesen und pChk1 mit einem grün-markierten. ß-Aktin, ebenfalls in rot, diente als Ladekontrolle.

Abbildung 16 zeigt sehr deutlich, dass es nach allen Schadenstypen zu einer Phosphorylierung von Chk1 kam. Dabei zeigte sich das deutlichste Signal nach einseitigen Doppelstrangbrüchen. Die Aktivierung setzte bereits 15 min nach Schadensinduktion ein und hielt bis zu 24 h an, wobei nach 24 h eine Abschwächung der Aktivierung beobachtet wurde.

Im Vergleich dazu führte die Induktion von Basenschäden zu einer leichten Phosphorylierung von Chk1. Die Phosphorylierung setzte nach 15 min ein, 30 min nach Schadensinduktion zeigte sich das stärkste Signal, welches nach einer Stunde bereits wieder abnahm. Zwei, vier und 24 h nach Induktion zeigte sich keine Phosphorylierung von Chk1 mehr.

Einzelstrangbrüche führten ebenfalls zu einer schwachen Phosphorylierung von Chk1, die 15 min nach Schadensinduktion einsetzte. 30 min und eine Stunde nach Schadensinduktion war ein etwa gleich starkes Phosphorylierungssignal messbar, nach zwei h wurde das Signal deutlich schwächer und nach vier und 24 h war keine Phosphorylierung mehr messbar.

Die Induktion von DNA-DNA-Quervernetzungen führte zu einer sehr deutlichen Phosphorylierung von Chk1, allerdings erst zwei h nach Schadensinduktion, mit einem weiteren Anstieg nach vier und 24 h.

Zweiseitige Doppelstrangbrüche führten ebenfalls zu einer starken Phosphorylierung von Chk1. Die Phosphorylierung setzte 30 min nach Schadensinduktion ein, mit dem stärksten Signal nach zwei h, welches nach vier h wieder abnahm. Nach 24 h konnte keine Phosphorylierung von Chk1 beobachtet werden.

Nach Bestrahlung zeigte sich dagegen nur ein schwaches Phosphorylierungssignal von Chk1, welches erst nach zwei h einsetzte, aber bis 24 h konstant blieb.

Es zeigte sich somit für alle induzierten DNA-Schäden eine Phosphorylierung von Chk1, die am stärksten und längsten für einseitige DSB ausfiel, etwas kürzer, aber ähnlich stark für zweiseitigen DSB vorlag, ebenfalls stark aber später für ICL war und am schwächsten und kürzesten für SSB und BD gesehen wurde. Interessanterweise zeigte ionisierende Strahlung ein schwaches aber langes Signal, obwohl durch Bestrahlung alle einzeln untersuchten DNA Schäden beteiligt sind.

3.2.2 Auswirkungen verschiedener DNA-Schäden auf den Replikationsapparat

Da sich deutliche Unterschiede in der Chk1-Phosphorylierung nach verschiedenen DNA-Schäden zeigten, sollte geklärt werden, ob dies auf eine mögliche Inhibition der Elongation oder/und auf angehaltene Replikationsgabeln zurückzuführen ist und ob die Chk1-Phosphorylierung zu einer Veränderung in der Anzahl neuinitiierter Replikationsereignisse führt.

3.2.2.1 Elongation

Zur Untersuchung der Auswirkung einzelner DNA-Schäden auf den Elongationsprozess wurden exponentiell wachsende U2OS-Zellen nacheinander jeweils für 20 min mit CldU dann mit IdU markiert und während des zweiten Markierungsintervalls mit den in Tabelle 12 aufgeführten Agenzien geschädigt. Die DNA wurde auf einem Objektträger präpariert und eingebaute Nukleotide wurden mit Antikörpern nachgewiesen.

Die Längen der IdU markierten Chromatin-Fasern wurden bestimmt und in kb/min umgerechnet. Abbildung 17 zeigt die Einbaurate der IdU-Nukleotide unbehandelter und mit Basenschäden, Einzelstrangbrüchen, DNA-DNA-Quervernetzungen, zwei- und einseitigen DSB behandelter sowie bestrahlter Zellen. Unbehandelte Zellen zeigten eine Einbaurate von 0,77 ± 0,01 kb/min. Die Induktion von zweiseitigen und einseitigen DSB sowie Bestrahlung zeigte mit einer signifikanten Verkürzung auf $0,43 \pm 0,09$, $0,39 \pm 0,009$ und $0,44 \pm 0,01$ kb/min den deutlichsten Effekt auf den Fortschritt der Replikation. Dagegen zeigten Basenschäden und Einzel-



Abbildung 17: Mittlere Einbaurate nach Schadensinduktion. Exponentielle U2OS-Zellen wurden 40 min mit CldU und IdU markiert und während des 2. Markierungsintervalls geschädigt, die DNA präpariert und eingebaute Nukleotide detektiert, die Länge wurde bestimmt und in kb/min umgerechnet. Dargestellt ist die mittlere Einbaurate von mindestens drei unabhängigen Experimenten, der Fehler ist der Fehler des Mittelwertes. unbe= unbehandelte Kontrolle, BD= Basenschäden, SSB= Einzelstrangbrüche, ICL= DNA-DNA- Vernetzungen, 2-DSB = zweiseitige Doppelstrangbrüche, 1-DSB = einseitige Doppelstrangbrüche. Die Unterschiede zwischen unbehandelter Kontrolle und nach BD, SSB, 2-seitigen und einseitigen DSB waren hoch signifikant (T-Test P < 0.0001) und für ICL signifikant P = 0,0182.

strangbrüche mit 0,61 \pm 0,01 und 0,60 \pm 0,01 kb/min nur eine leichte, aber signifikante Reduktion der IdU-Einbaurate. Den geringsten aber ebenfalls signifikanten Effekt auf die Elongation zeigten DNA-DNA-Quervernetzungen mit 0,72 \pm 0,02 kb/min.

3.2.2.2 Verteilung der Replikations-Strukturen

Es sollte der Effekt einzelner DNA-Schäden auf die Verteilung der Replikations-Strukturen untersucht werden. Exponentiell wachsende Zellen wurden nacheinander jeweils für 20 min mit CldU und IdU markiert und während des 2. Markierungsintervalls mit den in Tabelle 12 aufgeführten Agenzien geschädigt. Die DNA wurde auf einem Objektträger präpariert, CldU und IdU nachgewiesen und die Verteilung der Replikations-Strukturen bestimmt. Die Werte für unbe handelte Zellen wurden von den Werten behandelter Zellen subtrahiert.



Abbildung 18: Verteilung der Replikationsstrukturen. Exponentielle U2OS-Zellen wurden für jeweils 20 min mit CldU und IdU markiert, die DNA präpariert und eingebaute Nukleotide detektiert und die Replikationsstrukturen quantifiziert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil (A) für elongierende Replikationsgabeln, (B) für terminierende Replikationsgabeln 1. Ordnung und (C) für Initiationsereignisse 2. Ordnung nach Induktion von BD, SSB, ICL, 2 -und 1-seitigen DSB sowie Bestrahlung abzüglich der unbehandelten Kontrolle. Der Fehler ist Fehler des Mittelwertes.

Abbildung 18 zeigt den prozentualen Anteil elongierender Replikationsgabeln (A), terminierenden Replikationsgabeln 1. Ordnung (B) und von Replikationsursprüngen 2. Ordnung (C) nach Induktion von Basenschäden, Einzelstrangbrüchen, DNA-DNA Quervernetzungen, zweiund einseitigen DSB und Bestrahlung. Fast alle induzierten DNA-Schäden führten zu einer Reduktion der elongierenden Replikations-Strukturen. Dabei zeigten Basenschäden und DNA-DNA-Quervernetzungen mit 27 % und 34 % den stärksten Effekt, gefolgt von 25 % für einseitige DSB. Zweiseitige DSB und Bestrahlung zeigten mit 13 % und 12 % Reduktion einen um die Hälfte geringeren Effekt. Interessanterweise zeigte die Behandlung mit einem Einzelstrangbruch-induzierenden Agenz eine Zunahme der elongierenden Replikationsstrukturen um 7,5 %.

Abbildung 18 (B) zeigt den prozentualen Anteil terminierender Replikationsgabeln 1. Ordnung. Nach fast allen DNA Schäden wurde ein Anstieg terminierender Replikationsgabeln 1. Ordnung beobachtet, wobei BD, ICL und einseitige DSB mit 27 %, 30 % und 27 % die stärkste Zunahme und zweiseitige DSB und Bestrahlung mit 20 % und 15 % eher eine moderate Zunahme zeigten. Die Induktion von Einzelstrangbrüchen führte dagegen zu einer leichten Abnahme um 4 %.

Die Untersuchung der Replikationsursprünge 2. Ordnung zeigte dagegen nur eine sehr geringe Veränderung nach Schädigung. Ein leichter Anstieg war für BD, ICL mit 4 % und 7 % zu beobachten, keine Veränderung zeigten einseitige DSB und Bestrahlung mit 0.8 % und 0 % und eine geringfügige Reduktion konnte für SSB und zweiseitige DSB mit 4,3 % und 3.4 % beobachtet werden. Betrachtet man die einzelnen Schäden, so fällt sehr deutlich auf, dass BD, ICL und einseitige DSB sich am stärksten auf elongierende Replikationsgabeln und terminierende Replikationsgabeln 1. Ordnung in spiegelbildlicher Weise auswirkten. Dagegen zeigten zweiseitige DSB und Bestrahlung einen moderateren Effekt. Interessanterweise zeigte die Schädigung durch SSB als einziges Agenz ein gegenteiliges Bild, mit mehr elongierenden und weniger terminierenden Strukturen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sich die DNA-Schädigung in erster Linie auf elongierende und terminierende Strukturen auswirkte, dagegen nur sehr wenig auf die Replikationsursprünge. Dies ist möglicherweise auf den mit 40 min doch sehr kurzen Markierungszeitraum zurückzuführen.

3.2.2.3 Angehaltene und neuinitierende Replikationsgabeln

Es sollte untersucht werden, ob es möglicherweise nach längeren Inkubationszeiträumen vermehrt zum Anhalten von Replikationsgabeln, sowie parallel dazu zu einer Aktivierung oder Inhibition von normalerweise ruhenden Replikationsursprüngen kommt. Zu diesem Zweck wurde der Markierungszeitraum deutlich verlängert. Exponentiell wachsende Zellen wurden für 45 min mit CldU markiert und für die letzten 30 min der CldU-Markierungszeit geschädigt. Anschließend wurde IdU für 45 min zu den Zellen gegeben, die DNA auf einem Objektträger präpariert und eingebaute CldU- und IdU-Nukleotide wurden detektiert. Der prozentuale Anteil elongierender Replikationsgabeln, terminierenden Replikationsgabeln 1. Ordnung und Replikationsürsprünge 2. Ordnung wurde bestimmt (Daten nicht gezeigt) und der Anteil terminierender Replikationsgabeln in Relation zu elongierenden Chromatin-Fasern gestellt. Die Werte für die unbehandelten Kontrollen wurden subtrahiert.

Abbildung 19 zeigt den prozentualen Anteil angehaltener Replikationsgabeln nach Basenschäden, Einzelstrangbrüchen, DNA-DNA Quervernetzungen, zwei- und einseitigen DSB und Bestrahlung. Nach fast allen DNA-Schäden wurde ein deutlicher Anstieg angehaltener Replikationsgabeln beobachtet, wobei zweiseitige und einseitige DSB mit 19,5 % und 19 % den stärksten Effekt zeigten und SSB, BD, ICL mit 8,7 %, 6,3 % und 6,3 % einen etwas schwächeren Effekt aufwiesen. Nach Bestrahlung zeigte sich interessanterweise ein vollständig anderes Bild, mit einer leichten Reduktion angehaltener Replikationsgabeln um 1 %.



Abbildung 19: Frequenz angehaltener Replikationsgabeln nach DNA-Schädigung. Exponentielle Zellen wurden für jeweils 45 min mit CldU und IdU markiert, 15 min nach Beginn der Markierung geschädigt, die DNA präpariert und Chromatin-Fasern detektiert. Die Replikationsstrukturen wurden quantifiziert und angehaltene Replikationsgabeln berechnet. Dargestellt ist die mittlere Frequenz angehaltener Replikationsgabeln nach BD, SSB, ICL, 2 -und 1-seitigen DSB sowie Bestrahlung abzüglich der unbehandelten Kontrolle. Der Fehler ist Fehler des Mittelwertes.

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die Inhibition der Elongation sowie das Anhalten von Replikationsgabeln zu einer veränderten Aktivität von Neuinitiationsereignissen führt. Der Anteil von Replikationsursprüngen 2. Ordnung wurde in Relation zu elongierenden Chromatin-Fasern gestellt. Abbildung 20 A zeigt den prozentualen Anteil von Neuinitiationsereignissen nach Basenschäden, Einzelstrangbrüchen, DNA-DNA-Quervernetzungen, zwei- und einseitigen DSB und Bestrahlung. Unbehandelte Zellen zeigten 39,2 % Neuinitiationsereignisse. Dagegen konnte für ein- und zweiseitige DSB, Bestrahlung und ICL Behandlung eine Reduktion zwischen 5-7 % im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Für Basenschäden und Einzelstrangbrüchen 2% und 4 % im Vergleich zur Kontrolle.

Die Initiation der Replikation wird maßgeblich von Chk1 reguliert, deshalb sollte die Phosphorylierung von Chk1 mit der Aktivierung der Neuinitiationsereignisse verglichen werden. Für den Vergleich wurde der zwei Stunden Wert der Westernblot-Analyse quantifiziert (Abbildung **16**), die Werte der unbehandelten Kontrolle auf 1 gesetzt und die Werte nach DNA-Schädigung auf 1 normiert. Zweiseitige und einseitige DSB zeigten mit Werten von 5,5 und 4,7 die stärkste Phosphorylierung von Chk1, während Einzelstrangbrüche, ICL und Bestrahlung mit 2,5 eine etwas schwächere Phosphorylierung und Basenschäden mit einem Wert von 2 die geringste Phosphorylierung aufwiesen.



Abbildung 20: Frequenz von Neuinitiationsereignisse (A) im Vergleich zur Phosphorylierung von Chk1 (B) nach DNA-Schädigung. (A) Exponentielle Zellen wurden jeweils 45 min mit CldU und IdU markiert und 15 min nach CldU-Gabe geschädigt, die DNA wurde präpariert und eingebaute Nukleotide detektiert. Replikationsstrukturen wurden quantifiziert und neuinitiierte Replikationsereignisse berechnet. Dargestellt ist die mittlere Frequenz der Neuinitiationsereignisse. Fehler ist der Fehler des Mittelwertes. B) Quantifizierung der Chk1 Phosphorylierung. Parallel zum DNA Fiber Assay wurden Gesamtproteinextrakte präpariert und pChk1 und Chk1 wurde mittels Western Blot detektiert und mit *Odyssey Infrared Imaging* System quantifiziert. Die Werte der unbehandelt Kontrolle wurden auf 1 normiert.

Faßt man die Untersuchungen der Chk1-Phosphorylierung und der Messung von Neuinitiationsereignissen zusammen, kam es nach der Induktion von ein- und zweiseitigen DSB zur stärksten Phosphorylierung von Chk1 und zur deutlichsten Reduktion von Neuinitiationsereignissen. Während ICL und Bestrahlung eine moderate Phosphorylierung von Chk1 zeigten, fiel die Reduktion von Neuinitiationsereignissen ebenfalls etwas schwächer aus. Nach der Induktion von Basenschäden zeigte sich die schwächste Phosphorylierung von Chk1 und eine leichte Aktivierung der Neuinitiationsereignisse.

3.2.3 Genomische Instabilität von Chromosomen nach Schadensinduktion

Es sollte im Folgenden untersucht werden, ob sich die beobachteten Effekte in der S-Phase in Form chromosomaler Veränderungen manifestieren. Dafür wurden exponentiell wachsende U2OS-Zellen mit den in Tabelle 12 aufgeführten Agenzien geschädigt, in der nächsten Metaphase arretiert, anschließend auf Objektträgern präpariert, gefärbt und die Anzahl der Zellen mit radialen Chromosomen bestimmt.

Abbildung 21 zeigt den Prozentsatz der Zellen mit Radialen nach Induktion von Basenschäden, Einzelstrangbrüchen, DNA-DNA-Quervernetzungen, einseitigen DSB und Bestrahlung im Vergleich zu unbehandelten U2OS-Zellen. Es wurden keine Radialen in unbehandelten Zellen beobachtet. Bestrahlung und die Induktion von Basenschäden führten dagegen zu einer deutlichen Zunahme mit 4,7 % und 3,7 % Zellen mit radialen Chromosomen. Einseitige DSB führten ebenfalls zu radialen Chromosomen, mit einem Anteil von 2,7%. Dagegen konnte nach Induktion von DNA-DNA-Quervernetzungen und Einzelstrangbrüchen mit 0,55 % und 0,52 % nur ein sehr geringer Effekt auf die Bildung radialer Chromosomen beobachtet werden.

Somit zeigten Zellen nach Bestrahlung und Basenschäden den stärksten Anstieg an Radialen, gefolgt von einseitigen DSB und ICL und Einzelstrangbrüchen.



Abbildung 21: Prozentualer Anteil radialer Chromosomen. Exponentielle U2OS-Zellen wurden geschädigt und durch die Gabe von Colcemid in der Metaphase arretiert. Die Metaphasen wurden auf Objektträgern präpariert und gefärbt. Am Durchlichtmikroskop wurden die Zellen mit radialen Chromosomen quantifiziert. Dargestellt ist der mittlere prozentuale Anteil von Zellen mit radialen Chromosomen. Fehler ist Fehler des Mittelwertes.

3.2.4 Zusammenfassung Teil 1

Es konnte sehr deutlich gezeigt werden, dass es durch die Induktion von ein- und zweiseitigen DSB mit den durch Strahlung induzierten Schäden zu einer vergleichbar starken Inhibition der Elongation kam. Dagegen zeigte sich nach Basenschäden und Einzelstrangbrüchen nur ein moderater und nach ICL fast kein Effekt auf die Elongation.

Die Analyse von aktiven Replikationsgabeln zeigte, dass nach allen DNA-Schäden bis auf Bestrahlung eine Reduktion der Aktivität beobachtet werden konnte, wobei zweiseitige und einseitige DSB den stärksten Effekt zeigten und SSB, BD und ICL einen schwächeren. Bestrahlung wirkte sich dagegen nicht auf die Aktivität der Replikationsgabeln aus. Nach Bestrahlung gab es interessanterweise keine angehaltenen Replikationsgabeln.

Des Weiteren zeigte die Induktion von ein- und zweiseitigen DSB gefolgt von DNA-DNA-Quervernetzungen und Bestrahlung eine Inhibition von Initiationsereignissen, die mit einer Phosphorylierung von Chk1 im Western-Blot bestätigt werden konnte. Die Induktion von Einzelstrangbrüchen und Basenschäden zeigte keine Veränderung der Aktivität der Initiationsereignisse, die Western-Blot-Analyse zeigte ebenfalls das schwächste Chk1 Signal.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass vor allem Basenschäden, Bestrahlung und einseitigen DSB zur Bildung radialer Chromosomen führten, während es nach DNA-DNA-Quervernetzungen und Einzelstrangbrüchen keine Radialen gab.

3.3 Bedeutung der Rad51 Überexpression für DNA Schäden in der Replikation

Rad51 ist das Hauptprotein der Homologen Rekombination und spielt insbesondere für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen in der S- und G2-Phase eine entscheidende Rolle. Es sollte überprüft werden, ob sich ein Überangebot von Rad51 auf die Reparatur replikationsassoziierter DNA-Schäden auswirkt. Die Experimente wurden mit U2OS-Zellen durchgeführt, in denen durch Transfektion des Rad51 Gens unter Kontrolle eines hormoninduzierbaren Promoters die transiente Überexpression von Rad51 (UiRad) erzielt wurde. Als Kontrolle dienten U2OS-Zellen ohne Hormoninduktion, die bereits im ersten Teil der Arbeit verwendet wurden. Vorangegange Arbeiten (Wrona, 2010) konnten zeigen, dass die Rad51 Überexpression zu einem genomisch-instabilen Phänotyp führte. Ungeschädigte UiRad-Zellen wiesen vermehrt spontane Doppelstrangbrüche auf, mehr G2-Aberrationen, eine deutliche Akkumulation in der G2-Phase und eine erhöhte Sensitivität nach Behandlung mit MMC. Diese Beobachtungen sind sehr deutliche Hinweise auf eine fehlgeleitete Reparatur in der S-Phase.

In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob die genomische Instabilität der Rad51 überexprimierenden Zellen durch nicht reparierte, spontane oder replikationsassoziierte DNA-Schäden in der S-Phase hervorgerufen wird. Mit Hilfe des DNA Fibre Assays sollten zunächst alle Aspekte der Replikation in ungeschädigten und geschädigten Zellen untersucht werden. Im Koloniebildungsassay sollte überprüft werden, ob die UiRad-Zellen im Vergleich zum Wildtyp auf besondere DNA Schäden empfindlich reagieren. Die Analyse von radialen Chromosomen sollte Aufschluss über Fehlreparaturereignisse geben.

3.3.1 Replikation ungeschädigter Zellen mit Rad51 Überexpression

Es konnte beobachtet werden, dass Zellen mit Rad51 Überexpression im unbehandelten Zustand vermehrt Doppelstrangbrüche aufwiesen und in G2 arretierten. Es sollte überprüft werden, ob sich ein Überangebot von Rad51 schon im ungeschädigten Zustand auf Replikationsprozesse wie die Einbaurate, das Anhalten von Replikationsgabeln oder die Aktivität der Initiationsereignisse auswirkt.

3.3.1.1 Elongation bei Rad51 Überexpression

Es sollte zunächst untersucht werden, ob sich ein Überangebot von Rad51 auf den Einbau von Nukleotiden in den neusynthetisierten DNA-Strang im Vergleich zum Wildtyp unterscheidet. Für die Analyse der Rad51 Überexpression wurde 24 h vor Versuchsdurchführung die Rad51 Überexpression durch die Gabe von Ponasterone A induziert und U2OS-Zellen ohne Hormonbehandlung als Wildtyp mitgeführt. Exponentiell wachsende U2OS-Zellen wurden nacheinander jeweils für 20 min mit CldU und IdU markiert, die DNA auf einem Objektträger präpariert und eingebaute Nukleotide mit Antikörpern nachgewiesen. Für die Analyse der Einbaurate wurden nur elongierende Replikationsgabeln bewertet. Die Gesamtlänge der Chromatin-Fasern wurde bestimmt, die erhaltene Länge wurde in kb/min umgerechnet, das IdU/CldU Verhältnis wurde ermittelt und es wurden nur symmetrische Chromatin-Fasern für die Berechnung der mittleren Einbaurate hinzugezogen und mit dem Wildtyp verglichen.

Abbildung 22 zeigt die mittlere Einbaurate von überexprimierenden und Wildtyp-Zellen, dabei zeigten überexprimierende Zellen mit $0,69 \pm 0,01$ kb/min im Vergleich zu $0,82 \pm 0,01$ kb/min in Wildtyp-Zellen eine deutlich geringere Einbaurate. Der Unterschied war hoch signifikant.



Abbildung 22: Mittlere Einbaurate von Zellen mit und ohne Rad51 Überexpression. 24 h vor Versuchsdurchführung wurde die Rad51 Überexpression induziert. Exponentielle Zellen wurden für 40 min mit CldU und IdU markiert, die DNA präpariert und die eingebauten Nukleotide mit Antikörpern detektiert. Die Länge der Chromatin-Fasern wurde bestimmt und in kb/min umgerechnet. Dargestellt ist die mittlere Gesamt-Einbaurate symmetrischer Chromatin-Fasern. Der Fehler ist Fehler des Mittelwertes. Die Unterschiede der beiden Einbauraten war hochsignifikant (T-Test P< 0.0001).

3.3.1.2 Verteilung der Replikations-Strukturen bei Rad51 Überexpression

Es sollte untersucht werden, ob sich ein Überangebot von Rad51 auf die Verteilung der Replikations-Strukturen auswirkt. Für die Analyse der Rad51 Überexpression wurde 24 h vor Versuchsdurchführung die Rad51 Überexpression durch die Gabe von Ponasterone A induziert und U2OS-Zellen ohne Hormonbehandlung mitgeführt. Exponentiell wachsende Zellen wurden für jeweils 45 min mit CldU und IdU markiert, die DNA auf einem Objektträger präpariert und eingebaute CldU- und IdU-Nukleotide nachgewiesen. Zunächst sollte die Verteilung der Replikations-Strukturen bestimmt werden.

Abbildung 23 zeigt das Verhältnis von elongierenden, terminierenden Replikationsgabeln 1. Ordnung, sowie Replikationsursprüngen 2. Ordnung. Es zeigten sich sehr deutliche Unterschiede bei einer Überexpression von Rad51. Überexprimierende Zellen zeigten mit 56 % deutlich mehr elongierende Replikations-Strukturen im Vergleich zum Wildtyp mit nur 37,7 %. Dies wirkte sich ebenfalls auf den Anteil terminierender Replikationsgabeln aus mit einer deutlichen Reduktion um 7,4 %, von 37,9 % im Wildtyp auf 30,5 % bei Rad51 Überexpression, sowie auf den Anteil der Replikationsursprünge 2. Ordnung ebenfalls mit einer deutlichen Reduktion um 11,1 % von 24,8 % im Wildtyp im Vergleich zu 13,7 % bei Rad51 Überexpression. Zusammenfassend betrachtet, zeigte sich für Zellen mit einer Rad51 Überexpression neben einer signifikanten Reduktion in der Einbaurate ebenfalls deutlich weniger Terminations- und Neuinitiations-Ereignisse im Vergleich zum Wildtyp.



Abbildung 23: Verteilung der Replikations-Strukturen von Zellen mit und ohne Rad51 Überexpresssion. 24 h vor Versuchsdurchführung wurde die Rad51 Überexpression induziert. Exponentielle Zellen wurden für jeweils 45 min mit CldU und IdU markiert, die DNA präpariert und die eingebauten Nukleotide detektiert. Die Replikations-Strukturen wurden quantifiziert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil elongierender Replikationsgabeln, terminierender Replikationsgabeln 1. Ordnung und Initiationsereignissen 2. Ordnung. Der Fehler ist Fehler des Mittelwertes.

3.3.1.3 Elongation nach DNA-Schädigung bei Rad51 Überexpression

Zellen mit Rad51 Überexpression wiesen bereits im unbehandelten Zustand eine veränderte Replikation auf. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich die Rad51 Überexpression ebenfalls auf die Elongation nach DNA-Schädigung im Vergleich zum Wildtyp auswirkt. Dazu wurde die Rad51 Überexpression durch die Gabe von Ponasterone A 24 h vor Versuchsdurchführung induziert und U2OS-Zellen ohne Hormonbehandlung mitgeführt. Exponentiell wachsende Zellen wurden für jeweils 20 min mit CldU und IdU markiert und während des zweiten Markierungsintervalls mit den in Tabelle 12 aufgeführten Agenzien geschädigt. Die DNA wurde auf einem Objektträger präpariert, die eingebauten CldU- und IdU-Nukleotide nachgewiesen und die Längen der eingebauten IdU-Nukleotide elongierender Replikationsgabeln vermessen und in kb/min umgerechnet. Die Werte für ungeschädigte Zellen wurden für jede Zelllinie auf 1 gesetzt und die Werte nach Basenschäden, Einzelstrangbrüchen, DNA-DNA-Quervernetzungen, zwei- und einseitigen DSB sowie nach Bestrahlung auf die unbehandelte Kontrolle normiert.

Abbildung 24 zeigt deutliche Unterschiede für Zellen mit Rad51 Überexpression nach DNA-Schädigung im Vergleich zum Wildtyp. Dabei zeigten DNA-DNA-Quervernetzungen den



Abbildung 24: Normalisierte Einbaurate von Zellen mit Rad51 Überexpression im Vergleich zum Wildtyp nach Schädigung. 24 h vor Versuchsdurchführung wurde die Rad51 Überexpression induziert. Exponentielle Zellen wurden für 40 min mit CldU und IdU markiert, zum 2. Markierungsintervall wurde geschädigt, die DNA präpariert und eingebaute Nukleotide detektiert. Die Länge der IdU-Nukleotide wurde bestimmt und in kb/min umgerechnet. Unbe= unbehandelte Kontrolle, BD= Basenschäden, SSB= Einzelstrangbrüche, ICL= DNA-DNA-Quervernetzungen, 2-DSB = zweiseitige Doppelstrangbrüche, 1-DSB = einseitige Doppelstrangbrüche, Gy = Bestrahlung. Die Unterschiede zwischen Wildtyp-Zellen und UiRad-Zellen waren außer nach Bestrahlung hoch signifikant (T-Test P < 0.0001). Dargestellt ist die normierte IdU-Einbaurate symmetrischer Chromatin-Fasern. Der Fehler ist Fehler des Mittelwertes.

deutlichsten Unterschied mit einer Reduktion um 34 % auf 0,66 von 1 in unbehandelten Zellen im Vergleich zu 7 % auf 0,93. Basenschäden und Einzelstrangbrüche zeigten mit einer Reduktion um 31 % auf 0,69 und 34 % auf 0,66 im Vergleich zu 22 % auf 0,78 und 21 % auf 0,79 einen etwas schwächeren Unterschied. Die deutlichste Reduktion der Elongation, aber der geringste Unterschied zwischen den Zellen zeigte sich mit 52 % Reduktion auf 0,48 und 56 % auf 0,44 nach zweiseitigen und einseitigen DSB im Vergleich zu 45 % auf 0,55 und 50 % auf 0,5. Nach Bestrahlung zeigten sich die Zellen mit Rad51 Überexpression resistenter, mit nur einer Reduktion um 37 % auf 0,63 im Vergleich zu 44 % auf 0,56.

3.3.1.4 Neustart der Replikation nach DNA-Schädigung bei Rad51 Überexpression

DSB mit einer Reduktion um 65 % im Vergleich zu 7 %. Nach zweiseitigen DSB und DNA-DNA-Quervernetzungen zeigten sich etwas geringere Unterschiede mit einer Reduktion um 49 % zu 30 % und 28 % zu 6 %. Den geringsten Unterschied zeigten Basenschäden mit einer Reduktion um 15 % im Vergleich zu einem leichten Anstieg um 1 % im Wildtyp. Dagegen zeigte sich auch nach Überexpression von Rad51 kein Effekt nach Bestrahlung wie im Wildtyp.

Somit gab es die deutlichsten Unterschiede bei Rad51 Überexpression nach Induktion von einseitigen DSB und Einzelstrangbrüchen im Vergleich zum Wildtyp.

Da sich nach den kurzen Einbauzeiten ein so deutlicher Unterschied auf die Elongation zwischen UiRad- und Wildtyp-Zellen zeigte, sollte der Anteil an Zellen die nach Schadensinduktion in der Lage waren, die Replikation fortzusetzen, bestimmt werden. Dafür wurde das Markierungsprotokoll 2 verwendet und exponentiell wachsende UiRad- und Wildtyp-Zellen wurden für 45 min mit CldU markiert und für die letzten 30 min der CldU-Markierungszeit geschädigt. Anschließend wurde IdU für 45 min zu den Zellen gegeben, die DNA wurde auf einem Objektträger präpariert und eingebaute Nukleotid-Analoga wurden mit Antikörpern nachgewiesen. Zunächst wurde die Verteilung der elongierenden Replikationsgabeln nach DNA-Schädigung betrachtet. Die Werte für die unbehandelte Kontrolle wurden jeweils auf 1 gesetzt und die Werte nach Basenschäden, Einzelstrangbrüchen, DNA-DNA Quervernetzungen, zwei- und einseitigen DSB sowie nach Bestrahlung auf die unbehandelte Kontrolle normiert.

Abbildung 25 zeigt die normierten Werte von elongierenden Replikationsgabeln in unbehandelten Rad51 überexprimierenden Zellen sowie nach Induktion der oben aufgeführten Schäden im Vergleich zum Wldtyp. Es zeigten sich eindeutige Unterschiede zwischen überexprimierenden und Wildtyp-Zellen. Am deutlichsten fiel der Unterschied nach Einzelstrangbrüchen mit einer Reduktion um 61 % im Vergleich zu 17 % im Wildtyp sowie nach einseitigen



Abbildung 25: Anteil elongierender Replikationsgabeln in Zellen mit und ohne Rad51 Überexpression nach Schädigung Exponentielle Zellen wurden für 90 min mit CldU und IdU markiert, zur CldU-Markierung ein Schaden induziert und die DNA präpariert. Die Nukleotide wurden detektiert und die Replikations-Strukturen quantifiziert und angehaltene Replikationsgabeln berechnet. Dargestellt ist die mittlere Frequenz angehaltener Replikationsgabeln nach Schädigung. Beschriftung wie Abbildung 24. Der Fehler ist Fehler des Mittelwertes.

3.3.1.5 Angehaltene und neuinitierende Replikationsgabeln bei Rad51 Überexpression

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, wie groß der Anteil an angehaltenen Replikationsgabeln und Neuinitiationsereignissen nach Induktion von DNA-Schäden ist. Dafür wurde der Anteil an terminierenden Replikationsgabeln 1. Ordnung in Relation zu elongierenden Replikationsgabeln gestellt (Abbildung 15). Die Werte für die unbehandelte Kontrolle wurden jeweils auf 1 gesetzt und die Werte nach Basenschäden, Einzelstrangbrüchen, DNA-DNA-Quervernetzungen, zwei- und einseitigen DSB sowie nach Bestrahlung auf die unbehandelte Kontrolle normiert.

Abbildung 26 zeigt die normierten Werte von angehaltenen Replikationsgabeln in Zellen mit und ohne Rad51 Überexpression nach Induktion der oben aufgeführten DNA-Schäden im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Es zeigten sich sehr deutliche Unterschiede nach Schadensinduktion in Zellen mit einer Überexpression an Rad51 im Vergleich zum Wildtyp, mit den deutlichsten Effekten nach Induktion von Einzelstrangbrüchen sowie einseitigen DSB. Nach Einzelstrangbrüchen stieg der Anteil an angehaltenen Replikationsgabeln um 100 % auf 2 von 1 in



Abbildung 26: Anteil der Terminations-Ereignisse in Zellen mit und ohne Rad51 Überexpression. Exponentielle Zellen wurden für 90 min mit CldU und IdU markiert, zur CldU-Markierung ein Schaden induziert und die DNA präpariert. Die Nukleotide wurden detektiert und die Replikations-Strukturen quantifiziert und angehaltene Replikationsgabeln berechnet. Dargestellt ist die mittlere Frequenz angehaltener Replikationsgabeln nach Schädigung. Beschriftung wie Abbildung 24. Der Fehler ist Fehler des Mittelwertes.

unbehandelten Zellen mit Rad51 Überexpression, während im Wildtyp nur ein Anstieg um 20 % auf 1,2 von 1 zu beobachten war. Derselbe Effekt war auch nach einseitigen DSB zu beobachten. Der Anteil an angehaltenen Replikationsgabeln stieg um 100 % im Vergleich zu nur 36 %. Nach zweiseitigen DSB fiel der Anstieg um 80 % im Vergleich zu 40 % geringer aus. Dies zeigte sich ebenfalls nach DNA-DNA-Quervernetzungen und Basenschäden mit einem Anstieg von 25 % und 10 % im Vergleich zu 20 % und 5 %. Nach Bestrahlung zeigte sich kein Effekt auf die Aktivität von Replikationsgabeln, weder in Zellen mit Rad51 Überexpression noch im Wild-typ.

Nachdem deutliche Effekte auf elongierende Replikations-Strukturen und angehaltene Replikationsgabeln nach Induktion von Einzelstrangbrüchen und einseitigen DSB beobachtet wurden, sollte im Folgenden geklärt werden, ob sich dies auf die Aktivität von Initiationsereignissen 2.Ordung auswirkt. Zur Ermittlung des Anteils an Neuinitiationsereignissen nach Schädigung wurden Replikationsursprüngen 2. Ordnung in Relation zu elongierenden Replikationsgabeln gestellt (Abbildung 15). Die Werte für die unbehandelte Kontrolle wurden jeweils auf 1 gesetzt und die Werte nach Basenschäden, Einzelstrangbrüchen, DNA-DNA-Quervernetzungen, zweiund einseitigen DSB sowie nach Bestrahlung auf die unbehandelte Kontrolle normiert.



Abbildung 27: Anteil von Neuinitiations-Ereignissen mit und ohne Rad51 Überexpression nach Schädigung. 24 h vor Versuchsdurchführung wurde die Rad51 Überexpression induziert. Exponentielle Zellen wurden für 90 min mit CldU und IdU markiert, zur CldU Markierung ein Schaden induziert und die DNA präpariert. Die Nukleotide wurden detektiert und die Replikations-Strukturen quantifiziert und Neuinitiationsereignisse berechnet. Dargestellt ist die mittlere Frequenz von Neuinitiationsereignissen. Beschriftung wie Abbildung 24. Der Fehler ist Fehler des Mittelwertes.

Abbildung 27 zeigt den Anteil neuer Initiationsereignisse nach DNA-Schädigung in Zellen mit Rad51 Überexpression im Vergleich zum Wildtyp. Es zeigte sich nach allen Agenzien eine vermehrte Neuinitiation in Zellen mit einer Rad51 Überexpression, im Wildtyp zeigte sich dagegen ein vollständig anderes Muster. Der deutlichste Effekt war wieder nach Induktion von Einzelstrangbrüchen und einseitigen DSB zu sehen. Nach Einzelstrangbrüchen stieg der Anteil von Neuinitiationsereignissen um fast das dreifache auf 2,7 von 1, während sich diese in Wildtyp-Zellen nicht auf die Neuinitiation auswirkten. Ebenso deutlich zeigte sich nach einseitigen DSB ein drastischer Anstieg an Neuinitiations-Ereignissen um das etwa dreifache auf 2,8, wohingegen es eine Reduktion um 17 % im Wildtyp gab. DNA-DNA-Quervernetzungen und zweiseitigen DSB wirkten sich bei Rad51 Überexpression in gleicher Weise aus, mit einem Anstieg um 100 % und 95 % auf 2 und 1,95, während im Wildtyp eine Reduktion um 13 % und 17 % beobachtet werden konnte. Nach Basenschäden stieg der Anteil um 60 % bei Rad51 Überexpression im Vergleich zu nur 9 % im Wildtyp und nach Bestrahlung gab es nur einen sehr geringen Unterschied mit einem Anstieg um 20 % im Vergleich zu einer Reduktion um 15 %. Somit zeigte sich auch hier sehr deutlich, dass sich überexprimierende und Wildtyp-Zellen sehr gegensätzlich verhielten. Während es bei Rad51 Überexpression nach allen DNA-Schäden bis auf Bestrahlung zu einem deutlichen Anstieg von Neuinitiationsereignissen kam, reduzierten sich diese in Wildtyp-Zellen.

Fasst man alle Untersuchungen der Replikationsereignisse zusammen, zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen Zellen mit Rad51 Überexpression im Vergleich zum Wildtyp. Während es bei der Untersuchung der Elongation die größten Unterschiede zwischen den Zellen nach DNA-DNA-Quervernetzungen, Basenschäden und Einzelstrangbrüchen gab und weniger nach ein- und zweiseitigen DSB und Bestrahlung, zeigte sich nach Untersuchung neustartender elongierender Strukturen, angehaltener Replikationsgabeln und Neuinitiationsereignissen immer wieder die größten Unterschiede nach Einzelstrangbrüchen und einseitigen DSB und keine Effekte nach ionisierender Strahlung.

3.3.2 Chk1-Aktivierung nach Induktion von Einzelstrangbrüchen, einseitigen DSB und Bestrahlung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es die größten Unterschiede nach Induktion von Einzelstrangbrüchen und einseitigen DSB in Zellen mit Rad51 Überexpression im Vergleich zum Wildtyp gab und kein Effekt nach Bestrahlung zu sehen war, sollte überprüft werden, wie sich die Phosphorylierung von Chk1 nach Schädigung verhält. Für die Analyse der Rad51 Überexpression wurde 24 h vor Versuchsdurchführung die Rad51 Überexpression durch die Gabe von Ponasterone A induziert. Exponentielle Zellen wurden jeweils mit Einzelstrangbrüchen, einseitigen DSB induziert oder mit 6 Gy bestrahlt. Innerhalb von 24 h wurden Proteine isoliert und die Phosphorylierung von Chk1 wurde im Western-Blot analysiert.



Abbildung 28: Phosphorylierung von Chk1 im Western-Blot. Exponentielle WT-U2OS-Zellen (links) und UiRad-Zellen (rechts) wurden geschädigt und Gesamtprotein wurde nach 0,25, 0,5, 1, 2, 4 und 24 h extrahiert. pChk1 wurde mittels primärem anti-pChk1 (Ser 345) aus Kaninchen und sekundärem *IRDYE* aus Ziege detektiert. Chk1 wurde mit anti-Chk1 Antikörper aus Maus und *IRDYE* aus Ziege nachgewiesen. Die Detektion erfolgte mit dem *Odyssey Infrared Imaging* System.

Die Detektion von Chk1 und pChk1 erfolgte gleichzeitig und mit verschiedenen Fluoreszenz-Antikörpern.

Abbildung 28 zeigt, dass es deutliche Unterschiede in der Phosphorylierung von Chk1 bei Rad51 Überexpression im Vergleich zum Wildtyp nach Schadensinduktion gab. Während Einzelstrangbrüche im Wildtyp zu einer deutlicheren Phosphorylierung führten, die bereits 15 min nach Schadensinduktion einsetzte und sich bis zu 2 h verstärkte, zeigte sich in Zellen mit Rad51 Überexpression ein sehr schwaches Chk1 Phosphorylierungssignal, in einem Zeitraum von 15 min bis 1 h.

Auch bei der Induktion einseitiger Doppelstrangbrüche zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen Rad51 überexprimierenden und Wildtyp-Zellen. So zeigten Wildtyp-Zellen eine sehr starke Phosphorylierung von Chk1, die bereits nach 15 min einsetzte und bis zu 24 h nach Schadensgabe anhielt. Dagegen konnte in Zellen mit Rad51 Überexpression nur eine sehr schwache Phosphorylierung beobachtet werden und dies nur in einem Zeitraum von 30 min und 1 h nach Behandlung.

Deutlich Unterschiede zeigten sich ebenfalls nach Bestrahlung. Während Wildtyp-Zellen erst zu späteren Zeitpunkten eine Phosporylierung von Chk1 aufwiesen, von 2 h bis 24 h, zeigten Zellen mit Rad51 Überexpression zwar bereits nach 15 min ein Phosphorylierungssignal, dieses fiel allerdings deutlich schwächer aus als im Wildtyp.

Somit zeigten sich deutliche Unterschiede in der Chk1-Phosphorylierung bei Überexpression von Rad51 im Vergleich zum Wildtyp.

3.3.3 DNA-Doppelstrangbrüche nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Zellen mit einer Rad51 Überexpression nach der Induktion von Einzelstrangbrüchen besonders empfindlich während der Replikation reagierten, sollte überprüft werden, ob sich dies auf die Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen im Vergleich zum Wildtyp auswirkt. Für den Nachweis von Doppelstrangbrüchen wurden in den Ui-Rad-Zellen 24 h vor Versuchsdurchführung die Rad51 Überexpression induziert, dann mit verschiedenen Konzentrationen Wasserstoffperoxid (H_2O_2) behandelt, um sowohl Einzelstrangbrüche als auch Doppelstrangbrüche zu induzieren. Die Zellen wurden für 4 h inkubiert, um γ H2AX-Foci auszubilden. Diese wurden immunzytometrisch sichtbar gemacht und quantifiziert.

Abbildung 29 zeigt die Anzahl von γ H2AX-Foci pro Zelle in Zellen mit Rad51 Überexpression nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid im Vergleich zum Wildtyp. Für Wildtyp-Zellen zeigte sich bis zu einer Konzentration von 100 μ M nur ein sehr geringer Anstieg der γ H2AX-Foci von



Abbildung 29: Anzahl der γ H2AX-Foci pro Zelle nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid. Die Rad51 Überexpression wurde induziert Exponentielle Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen H₂O₂ geschädigt und nach 4 h wurden γ H2AX FOCI immunzytometrisch nachgewiesen. Der Fehler ist Fehler des Mittwertes.

unbehandelten Zellen mit 0,37 \pm 0,04 zu 0,24 \pm 0,09 nach 25 µM, 0,73 \pm 0,06 bei 50 µM und 1 \pm 0,15 bei 100 µM H₂O₂. Erst bei einer Konzentration von 200 µM zeigte sich ein deutlicher Anstieg mit 2,8 \pm 0,18 γ H2AX-Foci pro Zelle. In Zellen mit Rad51 Überexpression zeigte sich bereits in unbehandelten Zellen eine deutliche Bildung von Doppeltsrangbrüchen mit 1,3 \pm 0,06 γ H2AX-Foci pro Zelle. Bereits nach sehr geringen Konzentration konnte eine weitere Zunahme von DNA-Doppelstrangbrüchen beobachtet werden, mit 3,05 \pm 0,29 bei 25 µM, 4,35 \pm 0,12 bei 50 µM. Die Anzahl der Doppelstrangbrüche nahm bei höheren Konzentrationen leicht ab und näherte sich den Werten des Wildtyps mit 3,6 \pm 0,15 bei 100 µM und 2,8 \pm 0,37 bei 200 µM. Die Unterschiede zwischen den Zelllinien waren für Unbehandelte nach 50 µM H₂O₂ und 100 µM H₂O₂ mit P< 0,0001 hochsignifikant und für 25 µM H₂O₂ mit P< 0,0002 ebenfalls hochsignifikant.

3.3.4 Genomische Instabilität bei Rad51 Überexpression

In Zellen mit Rad51 Überexpression konnte bereits im unbehandelten Zustand eine deutliche Anzahl von Doppelstrangbrüchen detektiert werden. Im Folgenden sollte überprüft werden, ob sich diese im Verlaufe des Zellzyklus als chromosomale Aberrationen manifestieren. Dafür wurden exponentiell wachsende Zellen in der Metaphase mittels Colcemid arretiert und anschließend Metaphasen auf Objektträgern präpariert, gefärbt und der Anteil von Zellen mit radialen Chromosomen bestimmt. Abbildung 30 zeigt den Anteil der Zellen mit radialen Chromsomen in Zellen mit Rad51 Überexpression im Vergleich zum Wildtyp. Es konnte ein deutlicher Unterschied beobachtet werden. Rad51 überexprimierende Zellen zeigten einen deutlich höheren Anteil an Zellen mit radialen Chromosomen im Vergleich zum Wildtyp mit 8,3 % zu 0,33%.



Abbildung 30: Prozentualer Anteil von Zellen mit radialen Chromosomen ohne exogene Schädigung. Exponentielle Zellen mit und ohne Rad51 Überexpression wurden in der Metaphase arretiert, präpariert, gefärbt und der Anteil an Zellen mit radialen Chromosomen quantifiziert. Dargestellt ist der mittlere prozentuale Anteil von Zellen mit radialen Chromosomen. Fehler ist Fehler des Mittelwertes.

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob sich die Rad51 Überexpression nach Schädigung durch Einzelstrangbrüche, einseitige DSB oder Bestrahlung auf die Bildung von radialen Chromosomen auswirkt. Dafür wurden exponentielle UiRad- und WT-U2OS Zellen für eine Stunde bzw. 20 min mit den angegeben Schäden inkubiert, mit Colcemid behandelt und anschließend wurden die Metaphasen auf Objektträgern präpariert und gefärbt.

Abbildung 31 zeigt den Anteil von Zellen mit radialen Chromosomen nach Schädigung mit Einzelstrangbrüchen, einseitigen DSB und Bestrahlung in Zellen mit Rad51 Überexpression im Vergleich zum Wildtyp. Es wurde für alle Agenzien ein deutlich höherer Anteil an radialen Chromosomen in Zellen mit Rad51 Überexpression beobachtet. So zeigte sich nach Induktion von Einzelstrangbrüchen ein deutlich höherer Wert mit 4,5 % zu 0,52 %. Auch nach Bestrahlung zeigte sich ein höherer Anteil in den Rad51 überexprimierenden Zellen mit 5,8 % zu 4,65 %. Der deutlichste Unterschied zeigte sich allerdings nach Induktion von einseitigen DSB mit 15,2 % zu 2,7 %.



Abbildung 31: Prozentualer Anteil von Zellen mit radialen Chromosomen nach exogener Schädigung. Zellen mit und ohne Rad51 Überexpression wurden geschädigt, in der Metaphase arretiert, Metaphasen präpariert, gefärbt und der Anteil an Zellen mit radialen Chromosomen quantifiziert. Dargestellt ist der mittlere prozentuale Anteil von Zellen mit radialen Chromosomen. Fehler ist Fehler des Mittelwertes.
3.3.5 Bedeutung der Rad51 Überexpression für das zelluläre Überleben nach replikationsassoziierten Schäden

Es sollte untersucht werden, ob sich eine Überexpression von Rad51 auf das zelluläre Überleben nach Induktion von Einzelstrangbrüchen, einseitigen und zweiseitigen DSB sowie nach Bestrahlung im Vergleich zum Wildtyp auswirkt. Die Zellen wurden mit sehr geringer Dichte ausplattiert, die Überexpression von Rad51 wurde 4 h danach induziert, 24 h später wurden die Zellen für 20 min bzw. 1 h geschädigt und 14 Tage nach Schadensinduktion erfolgte die Fixierung der Zellen mit anschließender Färbung und Quantifizierung der Kolonien.

Abbildung 32 zeigt die Überlebensrate in Abhängigkeit von der Strahlendosis in Zellen mit Rad51 Überexpresssion im Vergleich zum Wildtyp. Es zeigte sich kein Unterschied in Zellen mit Rad51 Überexpression im Vergleich zum Wildtyp. Beide Zelllinien zeigten eine deutliche, aber vergleichbare Abnahme der Überlebensrate mit zunehmender Dosis.



Abbildung 32: Zelluläres Überleben nach Bestrahlung. Zellen mit und ohne Rad51 Überexpression wurden ausplattiert, geschädigt und nach 14 Tagen wurden die Zellen fixiert, gefärbt und die Anzahl der Kolonien bestimmt. Dargestellt ist das zelluläre Überleben mit ansteigender Dosis. Fehler ist Fehler des Mittelwertes.

Abbildung 33 zeigt das zelluläre Überleben in Abhängigkeit der H_2O_2 -Konzentration in Zellen mit Rad51 Überexpresssion im Vergleich zum Wildtyp. Es zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen Zellen mit Rad51 Überexpression und Wildtypzellen. So reduzierte sich die Überlebensrate bei einer Konzentration von nur 10 μ M H_2O_2 um 73 % bei Rad51 Überexpression im Vergleich zu 42 % im Wildtyp. Dieser deutliche Unterschied blieb bis zu einer Konzentration von 100 μ M erhalten, mit 75 % zu 46 %, 79 % zu 48 %, 79 % zu 53 % und 78 % zu 60 %. Bei einer Konzentration von 200 μ M ändert sich das Bild: Zellen mit einer Rad51 Überexpression zeigten sich weniger sensitiv mit einer Reduktion um 70 % im Vergleich zu 53 % im Wildtyp. Der Kurvenverlauf beider Linien verlief sehr ähnlich, mit einer deutlich stärkeren Sensitivität in Zellen mit Rad51 Überexpression.

Abbildung 34 zeigt das zelluläre Überleben in Abhängigkeit der Topotecan-Konzentration in Zellen mit Rad51 Überexpression im Vergleich zum Wildtyp. Es zeigte sich für beide Zelllinien eine Abnahme des zellulären Überlebens mit ansteigender Topotecan-Konzentration. Zellen mit einer Rad51 Überexpression zeigten sich dabei jedoch deutlich empfindlicher als der Wildtyp, mit einer Reduktion der Überlebensrate um 87 % im Vergleich zu 72 % bei einer Konzentration

von 0,5 μ M Topotecan und einer Reduktion um 94,7 % im Vergleich zu 76,9 % bei 1 μ M Topotecan. Dieser Unterschied von ca. 20 % bleibt auch bei höheren Konzentrationen erhalten,



Abbildung 33: Zelluläres Überleben nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid. Zellen mit und ohne Rad51 Überexpression wurden ausplattiert, geschädigt und nach 14 Tagen wurden die Zellen fixiert, gefärbt und die Anzahl der Kolonien bestimmt. Dargestellt ist das zelluläre Überleben mit ansteigender Dosis. Fehler ist Fehler des Mittelwertes.

mit einer Reduktion um 95,4 und 95% in Zellen mit Rad51 Überexpression im Vergleich zu 77 % und 82% im Wildtyp. Somit konnte sehr deutlich gezeigt werden, dass Zellen mit einer Überexpression von Rad51 deutlich empfindlicher gegenüber Topotecan als der Wildtyp waren.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Zellen mit einer Überexpression von Rad51 deutlich empfindlicher nach Induktion von Einzelstrangbrüchen und einseitige DSB reagierten, während sich nach Bestrahlung kein Unterschied zum Wildtyp zeigte.



Abbildung 34: Zelluläres Überleben nach Behandlung mit Topotecan. Zellen mit und ohne Rad51 Überexpression wurden ausplattiert, geschädigt und nach 14 Tagen wurden die Zellen fixiert, gefärbt und die Anzahl der Kolonien bestimmt. Dargestellt ist das zelluläre Überleben mit ansteigender Dosis. Fehler ist Fehler des Mittelwertes.

3.3.6 Zusammenfassung Teil 2

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob eine Hochregulation von Rad51 zu einer veränderten Antwort der Replikation nach Induktion verschiedener DNA-Schäden führte. Mit Hilfe des DNA Fibre Assays konnte gezeigt werden, dass eine Rad51 Überexpression bereits im unbehandelten Zustand zu einer deutlich langsameren Replikationsrate führte, es weniger terminierende Replikationsgabeln gab und weniger Initiationsereignisse gebildet wurden. Außerdem wiesen Zellen mit einer Rad51 Überexpression bereits im unbehandelten Zustand zu einer Rad51 überexpression bereits im unbehandelten Zustand.

Nach Induktion von DNA-Schäden zeigte sich, dass Zellen mit Rad51 Überexpression besonderes empfindlich auf DNA-DNA-Quernetzungen, Einzelstrangbrüche und Basenschäden während des Elongations-Prozesses reagierten. Außerdem zeigten Zellen mit Rad51 Überexpression deutlich mehr angehaltene Replikationsgabeln nach Induktion von Einzelstrangbrüchen und einseitigen DSB. Die Anzahl der Neuinitiationsereignisse stieg nach Induktion von Einzelstrangbrüchen und einseitigen DSB stark an, während in Wildtyp-Zellen keine Veränderung der Neuinitiationsereignisse bestimmt wurde. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Chk1-Phosphorylierung in Zellen mit Rad51 Überexpresion nach Einzelstrangbrüchen und einseitigen DSB ausblieb, während in Wildtyp-Zellen eine sehr starke Phosphorylierung gemessen wurde.

Die Analyse von yH2AX-FOCI als Nachweis von Doppelstrangbrüchen zeigte, dass in Rad51 überexpremierenden Zellen bereits nach Induktion von Einzelstrangbrüchen vermehrt Doppelstrangbrüche aufwiesen.

Die Untersuchung von Chromosomen nach Schadensinduktion zeigte, dass Rad51 überexprimierende Zellen deutlich mehr Zellen mit radialen Chromosomen nach Einzelstrangbrüchen und einseitigen DSB aufiwiesen nicht aber nach und ionisierender Bestrahlung.

Die Untersuchung des zellulären Überlebens nach Einzelstrangbrüchen, einseitigen DSB und ionisierender Bestrahlung zeigte ebenfalls eine deutlich stärker Empfindlichkeit von Zellen mit Rad51 Überexpression nach Einzelstrangbrüchen und einseitige DSB. Nach Bestrahlung gab es dagegen keinen Unterschied im zellulären Überleben für überexprimiernde und Wildtyp-Zellen.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, wie sich ionisierende Strahlung und die durch Bestrahlung erzeugten Basenschäden, Einzelstrangbrüche, DNA-DNA-Vernetzungen, zweiseitigen und einseitigen Doppelstrangbrüche (DSB) im Einzelnen und als Kollektiv auf die Aktivierung sowie den Prozess der Replikation und auf die genomische Stabilität auswirken. Im Weiteren sollte untersucht werden, ob ein Überangebot von Rad51, dem Hauptprotein der Homologen Rekombination (HR), welche insbesondere in der S-Phase für die Reparatur von DSB zuständig ist, zu einer veränderten Antwort der Replikationsprozesse sowie der genomischen Instabilität in unbehandelten Zellen und nach DNA-Schädigung führt.

4.1 Etablierung des DNA Fibre Assay

Für die Untersuchungen musste zunächst der DNA Fibre Assay etabliert werden, der durch den Einbau von Nukleotid-Analoga CldU und IdU, die genaue Analyse der Initiation der Replikation, der Elongation des neusynthetisierten DNA-Stranges sowie der Termination von Replikationsgabeln erlaubt.

Durch die sequentielle Markierung mit CldU und IdU konnte die Richtung der Replikation und die Einbaurate durch die Bildung verschiedener Replikations-Strukturen bestimmt werden.

4.1.1 Auswirkungen der Markierungszeit auf Replikations-Strukturen

In eukaryotischen Zellen erfolgt die Initiation der Replikation von sogenannten Replikationsursprüngen, die in der Regel 110 bis 150 kb voneinander entfernt liegen und über einen Zeitraum von 8-10 h zu unterschiedlichen Zeitpunkten aktiviert werden (Edenberg and Huberman, 1975). An einen Replikationsursprung werden zwei Replikationsgabeln geladen, die von dort in bidirektionale Richtung den neuen DNA-Strang synthetisieren bis sie auf Replikationsgabeln benachbarter Replikationsursprünge treffen und terminieren (Jackson and Pombo, 1998). Erst nachdem eine gewisse Anzahl an Replikationsgabeln terminieren, werden weitere Replikationsursprünge geöffnet. Für die Untersuchung der Initiation, Elongation und Termination ist es entscheidend, das richtige Zeitfenster für jeden einzelnen Aspekt zu bestimmen. Zunächst wurden zwei Markierungsprotokolle verglichen, die sich in der Dauer der Markierungszeit der Nukleotid-Analoga unterschieden. In Anlehnung an die Arbeit von (Wilsker et al., 2008) wurden exponentiell wachsende U2OS-Zellen nacheinander jeweils für 20 min mit CldU und IdU (Markierungsprotokoll 1) markiert. Für unbehandelte U2OS-Zellen konnte eine mittlere Einbaurate von 0,82 kb/min bestimmt werden. Bezieht man diese Einbaurate auf die Markierungszeit von ins

gesamt 40 min ergibt dies 32,8 kb neusynthetisierte DNA in beide Richtungen. Da die Replikationsursprünge bis zu 150 kb auseinander liegen, sollte es in diesem kurzen Zeitraum von 40 min wenige Terminations-Ereignisse geben. Durch den kontinuierlichen Einbau der Nukleotid-Analoga konnten fünf verschiedene Replikations-Strukturen charakterisiert werden und die quantitative Analyse zeigte, dass nach einer kurzen Markierungszeit hauptsächlich elongierende Replikations-Strukturen gebildet wurden. In Arbeiten mit einer ähnlich kurzen Markierungszeit wurde ebenfalls eine vergleichbare Charakterisierung der Replikations-Strukturen vorgenommen und es wurden hauptsächlich elongierende Replikations-Strukturen quantifiziert (Shimura et al., 2008; Schwab et al., 2010; Maya-Mendoza et al., 2007; Unsal-Kacmaz et al., 2007). Lediglich die Arbeiten von Maya-Mendoza et al. und Schwab et al. beschrieben eine weitere Replikations-Struktur, die zwei aneinander (Schwab et al.) grenzende Replikationsursprünge 1. Ordnung zeigte. Diese Struktur konnte in U2OS-Zellen nicht beobachtet werden. Bei Betrachtung des prozentualen Anteils dieser Replikations-Struktur in HeLa- und MRC5-Zellen ist diese Struktur ein sehr seltenes Ereignis und könnte deshalb der Grund sein, warum diese Struktur in U2OS-Zellen nicht beobachtet wurde.

Das Markierungsprotokoll 2 sah eine Markierungszeit von insgesamt 90 min vor (Seiler et al., 2007). Bezieht man die längere Markierungszeit von 90 min auf die Einbaurate von 0,82 kb/min entspricht dies 73,8 kb neusynthetisierter DNA in beide Richtungen vom Replikationsursprung und somit einer höheren Wahrscheinlichkeit, in dieser Zeit die Replikation zwischen zwei Replikationsursprüngen zu terminieren. Nach der längeren Markierungszeit konnten ebenfalls fünf Replikations-Strukturen bestimmt werden, in diesem Fall zeigte sich derselbe Anteil an elongie-renden und terminierenden Replikationsgabeln.

Auf Grund der deutlichen Unterschiede in der Verteilung der Replikations-Strukturen nach der kurzen und langen Markierungszeit sollte somit das kurze Markierungsprotokoll hauptsächlich für die Untersuchung des Elongations-Prozesses verwenden werden, das lange Protokoll wurde für die Untersuchung von Terminationsereignissen und für die Aktivierung von Neuinitiationsereignissen angewandt.

4.1.2 Symmetrische und asymmetrische Replikationsgabeln

Die Untersuchungen der Einbaurate der Nukleotid-Analoga CldU und IdU haben gezeigt, dass diese nicht gleichmäßig lang in die DNA eingebaut wurden. Während CldU mit einer Einbaurate von 0,86 ± 0,009 kb/min inkooperiert wurde, zeigte sich für den zweiten Markierungszeitraum mit IdU eine Einbaurate von 0,69 ± 0,007 kb/min. Nachdem das Verhältnis der beiden Einbauraten zueinander bestimmt wurde, zeigte sich, dass die Hälfte der Zellen symmetrische Chromatinfasern gebildet hatten, also CldU und IdU gleichmäßig eingebaut wurden. Von den asymmetrischen Chromatin-Fasern hatten 35 % das zweite Nukleotid IdU kürzer eingebaut. Eine ähnliche Beobachtung konnte auch in der Arbeit von Petermann et al. gemacht werden (Petermann et al., 2006). Obwohl das zweite Nukleotid länger appliziert wurde, zeigte sich eine kürzere Einbaurate. Auch die Gabe der Nukleotid-Analoga mit verschiedenen Konzentrationen für jeweils 60 min zeigte, dass IdU deutlich kürzer eingebaut wurde. Dass die kürzere Einbauzeit von IdU, nicht auf das IdU selber zurückzuführen ist, zeigte die Arbeit von Seiler et al., in der mit einer veränderten Reihenfolge der Nukleotid-Analoga inkubiert und die DNA zuerst mit IdU dann mit CldU markiert wurde (Seiler et al., 2007). Auch in diesem Fall zeigte sich, dass die Zellen im zweiten Markierungszeitraum die Nukleotide deutlich kürzer eingebaut hatten. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass die Polymerase sich während der Neusynthese noch aus einem verbleibenden Nukleotid-Pool bedient und somit zunächst das erste Nukleotid verbraucht bevor das zweite eingebaut wird.

Um zweifelsfrei sicherzustellen, dass bereits im unbehandelten Zustand Diskontinuitäten der Elongation vorliegen, wurde in dieser Arbeit durch das Verhältnis der IdU zu CldU Einbaurate nur symmetrische Chromatin Fasern berücksichtigt, entsprechend (Daboussi et al., 2008).

4.2 Untersuchung verschiedener DNA-Schäden auf die S-Phase

Tumoren werden häufig durch Mutationen in Genen des Zellwachstums, der Zellteilung und Zelldifferenzierung initiiert und gehen mit einer unkontrollierten Proliferation der entarteten Zelle einher. Sowohl die Strahlentherapie als auch die Chemotherapie macht sich den höheren Anteil an proliferierenden Tumorzellen zu Nutze, greift die replikative S-Phase der Zellen an und schont somit den geringeren Anteil proliferierender, gesunder Zellen. Chemotherapeutika und ionisierende Strahlung induzieren ein breites Feld an DNA-Schäden, zu denen Basenschäden, Einzelstrangbrüche, DNA-DNA-Quervernetzungen und Doppelstrangbrüche zählen (Helleday et al., 2008). Bis heute ist allerdings nicht genau geklärt wie sich diese induzierten Schäden auf die S-Phase auswirken.

Der DNA Fibre Assay bietet die Möglichkeit den Effekt jedes einzelnen Schadens auf die Prozesse der Replikation zu untersuchen. Jeder der oben genannten Schäden stellt in seiner Art ein individuelles Hindernis für den Replikationsapparat dar und kann einerseits die replikative Helikase behindern, die den DNA-Doppelstrang entwindet oder den Fortschritt der Polymerase stören, die den neuen DNA-Strang synthetisiert.

Kommt es zur Entkopplung der Helikase von der Polymerase, wird lange einzelsträngige DNA gebildet (ssDNA) (Byun et al., 2005). Diese Struktur und die Länge dieses Bereiches führt über den ATR-ATRIP-Komplex zur Phosphorylierung von Chk1 (MacDougall et al., 2007). Phosphoryliertes Chk1 inhibiert alle weiteren Replikationsprozesse und der Intra-S-Phase Kontrollpunkt wird ausgelöst (Conti et al., 2007).

Zunächst wurde der Effekt aller oben genannten Schäden auf die Phosphorylierung der Intra-S-Phase Kinase Chk1 untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Induktion von Basenschäden und Einzelstrangbrüchen eine frühe und kurze Chk1 Antwort auslöste, DNA-DNA-Quervernetzungen und Strahlung hingegen eine späte Phosphorylierung zeigten, während Doppelstrangbrüche sowohl ein frühes als auch ein lang anhaltendes Chk1 Signal aufwiesen. Im Weiteren wurde untersucht, ob die Phosphorylierung von Chk1 durch die Inhibition der Elongation oder das Anhalten von Replikationsgabeln hervorgerufen wurde und ob die Aktivität von Initiationsereignissen beeinflusst wird. Eine detaillierte Untersuchung wurde mit dieser Arbeit erstmalig durchgeführt.

4.2.1 Einfluss von Basenschäden auf die S-Phase

Für die Untersuchung von Basenschäden wurde das Alkylsulphonat Methyl-Methan-Sulfonat (MMS) verwendet, das die DNA an Position N7-deoxyguanin oder N3-deoxyadenin methyliert (Sedgwick, 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Basenschäden vor allem die Elongation störten, es kam zu einem kurzfristigen Anhalten der Replikationsgabeln, aber bereits nach 90 min konnten die Zellen die Aktivität der angehaltenen Gabeln wieder voll herstellen und die Zellen waren in der Lage, die Replikation fortzusetzen. Des Weiteren hatten Basenschäden keinen nennenswerten Einfluss auf die Aktivität von Neuinitiationsereignissen. Andere Arbeiten zeigten dagegen mittels Zellzyklusanalysen eine Inhibition der Syntheserate während der S-Phase (Tercero and Diffley, 2001). Die detaillierte Analyse zeigte jedoch, dass ein Rückgang der Replikationsrate und eine Akkumulation von S-Phase-Zellen unabhängig von einer Aktivierung des Intra-S-Phase-Kontrollpunktes ist (Groth et al., 2010). Es ist somit denkbar, dass die Methylierung durch MMS ein physikalisches Hindernis für die Polymerase darstellt und es nur kurzfristig zur Inhibition der Polymerase kommt. Dies würde eine Entkopplung von Helikase und Polymerase bedeuten und einhergehen mit der Entstehung von ssDNA. Das frühe und kurze Chk1 Signal nach Induktion von Basenschäden könnte somit durch die Inhibition der Polymerase entstanden sein.

Der Entkopplungsprozess der Helikase von der Polymerase führt zu einer Monoubiquitinierung der PCNA-Ringklemme und rekrutiert eine Translesion-Synthese-Polymerase (TLS), die über Replikationshindernisse synthetisieren kann (Chang et al., 2006). Anstelle der replikativen Pol ε , synthetisiert die TLS-Polymerase η über das Hindernis. Die Rekrutierung der TLS zur angehaltenen Replikationsgabel, ermöglicht somit den späteren Fortschritt der Replikation.

Die Untersuchung von Basenschäden zeigte außerdem, dass in der folgenden Metaphase ein deutlicher Anstieg an radialen Chromosomen beobachtet werden konnte. Dies lässt die Vermutung zu, dass nicht reparierte Schäden aus der S-Phase zu Chromosomenschäden führen.

Diese Untersuchungen und Beobachtungen anderer Arbeiten zeigen ein komplexes Bild der Wirkung von Basenschäden auf die S-Phase. Vorstellbar ist, dass eine modifizierte Base ein physikalisches Hindernis für die Polymerase darstellt, diese anhält, während die Helikase weiter den DNA-Doppelstrang entwindet und es zur Entstehung von ssDNA kommt, die wiederum eine Chk1-Phosphorylierung induziert. Durch die Chk1-Phosphorylierung kommt es zur Rekrutierung einer TLS-Polymerase, die zwar über die Strukturveränderung der DNA synthetisieren kann, jedoch in ihrer Durchführung sehr fehlerhaft ist und einen unreparierten Schaden hinter der Replikationsgabel lässt. Die Zelle nimmt diese unreparierten Schäden mit in die nächste Zell-zyklusphase und es kommt zur Formation radialer Chromosomen. Diese Annahme wird durch Beobachtungen von Kaina et al. unterstützt, denn unreparierte Basenschäden wirken sich erst auf die folgende Replikation aus, die dann über HR repariert werden, was anhand eines Schwesterchromatidaustausches (SCE) in der zweiten Metaphase nach Inkubation zu sehen war (Kaina, 2004).

4.2.2 Einfluss von Einzelstrangbrüchen auf die S-Phase

Einzelstrangbrüche sind Unterbrechungen der DNA-Doppelhelix, die auf einer Seite des Doppelstranges vorliegen. Sie entstehen unter anderem durch endogene, reaktive Sauerstoffspezies, die Nebenprodukte des Stoffwechsels sind. Dabei kommt es durch Oxidationsprozesse des Sauerstoffes zur Entstehung von Hydroxylradikalen, die das Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat der DNA angreift und zum Verlust einzelner Nukleotide oder beschädigter 5'- und/oder 3'- DNA Enden führen (Caldecott, 2008). Bleiben diese Schäden unrepariert, stellen sie eine Gefahr für die Bewahrung der genomischen Stabilität dar. Um den Einfluss von Einzelstrangbrüchen auf die S-Phase zu untersuchen wurde Wasserstoffperoxid (H₂O₂) in niedrigen Konzentrationen verwendet (Wojewodzka et al., 2002), das durch den Zerfall in Wasser und Sauerstoff ebenfalls Hydroxylradikale freisetzt und nach niedrigen Konzentrationen sowohl Basenschäden als auch Einzelstrangbrüche induziert.

Die Analyse der Chk1-Phosphorylierung im Western-Blot zeigte ähnlich wie nach der Inkubation von Basenschäden eine frühe und kurze Phosphorylierung von Chk1, die Effekte auf den Replikationsapparat unterschieden sich aber deutlich von denen nach Basenschäden. Die Induktion von Einzelstrangbrüchen wirkte sich ausschließlich auf die Elongation der Replikation aus. Da es sich im Falle von Einzelstrangbrüchen um eine Unterbrechung des Desoxyribose-Phosphat-Rückgrats handelt, könnte dieser durch eine Invasion in den intakten Tochterstrang behoben werden, der zu keiner Zeit ein Anhalten des Replikations-Apparates bewirken würde. Die vorliegende Beobachtung wird durch Asagoshi (Asagoshi et al., 2010) unterstützt, die ebenfalls keinen Effekt auf die Aktivität von Replikationsgabeln sehen konnten. Somit stellen Einzelstrangbrüche nur ein geringfügiges Hindernis für den Replikationsapparat dar. Da möglicherweise der Einzelstrangbruch kein physikalisches Hindernis darstellt, ist der Replikationsapparat in der Lage über die Break-induced Replikation (BIR) eine HR-vermittelte Reparatur durchzuführen (Llorente et al., 2008), mit dem Resultat, dass zu keinem Zeitpunkt ein Anhalten des Replikationsprozesses vorzufinden ist. Dabei erfolgt eine Invasion des 3'-Endes der neusynthetisierten DNA, das 5'-Ende der DNA-Vorlage wird durch Endonukleasen abgebaut bis das 3-Ende lang genug ist um in den Tochterstrang zu invadieren und nach homologen Sequenzen zu suchen. Der 3- Einzelstrang-Überhang wird von RPA vor Degradation geschützt und durch die Bindung von RPA an ssDNA kommt es zur Aktivierung des ATR-ATRIP Signalweges und zur Phosphorylierung von Chk1.

Im Gegensatz zu Basenschäden konnten nach Einzelstrangbrüchen keine radialen Chromosomen bestimmt werden. Dies unterstützt die Annahme, dass eine HR-vermittelte Reparatur keine unreparierten DNA-Schäden zurücklässt, weitere Aufschlüsse könnten Analysen von SCE geben.

4.2.3 Einfluss von DNA-DNA-Quervernetzungen auf die S-Phase

DNA-DNA-Quervernetzungen (ICL) sind Läsionen, die unter anderem durch das Chemotherapeutikum Mitomycin C (MMC) hervorgerufen werden können und durch kovalente Verbindung der beiden DNA-Stränge sowohl die Transkription als auch die Replikation behindern und die Struktur der DNA-Doppelhelix verändern (Dronkert and Kanaar, 2001).

Im Gegensatz zu Basenschäden und Einzelstrangbrüchen konnte nach ICL-Induktion eine späte Phosphorylierung von Chk1 beobachtet werden und es wurde nur ein sehr geringer Effekt auf die Elongation der Replikation beobachtet. Es wird vermutet, dass ICL eher ein Hindernis für die Helikase als für die Polymerase darstellen und daher keine Entkopplung der beiden Komplexe stattfindet. Dies bestätigte sich durch eine geringe Menge an ssDNA nach ICL-Induktion (Huang et al., 2010). FANCM und FAAP24 sind des Weiteren entscheidend für die ICL-induzierte RPA-Foci-Formation und für die Rekrutierung des ATR-ATRIP-Komplexes notwendig, während nach Inkubation mit Hydroxy-Harnstoff (HU), Camptothecin (CPT) und UV-Strahlung die Formation dieser Komplexe unabhängig von FANCM und FAAP24 geschieht. Das würde bedeuten, dass die Quervernetzung zunächst von Fanconi Proteinen erkannt werden muss, um ssDNA-RPA-Intermediate generieren zu können. Dabei werden FANCM und FANCJ Helikase- und Translokase- Aktivitäten zugesprochen, die die DNA entwinden und RPA und ATR-ATRIP den Zugang zu ssDNA ermöglichen (Wang, 2007). Ebenso konnte die Arbeit von

Ben-Yehoyada bestätigen, dass der Fanconi-Signalweg notwendig für die RPA-ATR-Chk1-Aktivierung ist und dessen Aktivierung möglicherweise durch Reparatur-Prozesse hervorgerufen wird (Ben-Yehoyada et al., 2009).

Die Reparatur von ICL ist an die Replikation gekoppelt und ein mehrstufiger Reparaturprozess. Durch FANCM und FANCJ wird die DNA an der Quervernetzung entwunden, die Polymerase kann bis an die Quervernetzung synthetisieren (Knipscheer et al., 2009), erst eine Base vor der Vernetzung wird einen Schnitt gesetzt und der Schaden wird mit Hilfe von Proteinen des Nukleotid-Exzisions-Reparaturweges (NER) entfernt (Ciccia and Elledge, 2010). Proteine der NER entfernen dabei den Schaden und es kommt verzögert zur HR-vermittelten Reparatur (Wang, 2007).

Die späte Chk1-Phosphorylierung wäre in diesem Fall ein Produkt von Reparatur-Intermediaten und dies lässt vermuten, dass ICL SCE als Produkt einer erfolgten Homologer Rekombination induzieren. Diese Annahme wird in dieser Arbeit unterstützt durch das Fehlen von radialen Chromosomen.

4.2.4 Einfluss von Doppelstrangbrüchen auf die S-Phase

Doppelstrangbrüche an Replikationsgabeln können entweder einen oder beide DNA-Stränge betreffen. Für die Induktion von DSB eines DNA-Stranges, so genannte einseitige DSB, wurde Topotecan verwendet, ein Inhibitor der Topoisomerase 1 (Top1). Top1 induziert einen transienten Einzelstrangbruch vor der Replikationsgabel zur Relaxierung der entstehenden Torsionsspannung während der Replikation. Topotecan verhindert die Re-Ligation dieses Einzelstrangbruches wodurch ein einseitiger, bzw. replikationsassoziierter DSB in der Replikationsgabel entsteht (Pommier, 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass einseitige DSB zur stärksten und längsten Phosphorylierung von Chk1 führten, die stärkste Inhibition der Elongation zeigten, zum Anhalten von Replikationsgabeln und zur Inhibition von Neuinitiationsereignissen führten. Die Untersuchung von einseitigen DSB durch Topotecan oder Topotecan-Derviate gehört zu den am besten untersuchten Schäden der S-Phase (Hsiang et al., 1989; Ryan et al., 1991). Die Replikationsgabel kollidiert mit Top1 und dem induzierten Einzelstrangbruch und der DSB entstehen dabei immer auf dem Leitstrang der Replikations-Maschinerie (Strumberg et al., 2000). Dieser, als replication-run-off bezeichneter Mechanismus wird durch eine HR-vermittelte Reparatur behoben. Dabei wird die Top1-gebundene DNA mit Hilfe von 3'-Endonukleasen entfernt, ein ssDNA-Überhang entsteht, der zur Stranginvasion für die Homologe Rekombination dient (Pommier et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, das eine Untereinheit von RPA, das RPA2 nach Induktion von replikationsassoziierten DSB phosphoryliert wird (Shao et al., 1999) und somit die Induktion des Intra-S- Phase Kontrollpunktes als iniitiales Ereignis für die ATR-ATRIP Rekrutierung einleitet. Im Weitern führte die Induktion von replikationsassoziierten DNA-Schäden zu einem späten S-Phase Arrest, der eine anhaltende Inhibition der Synthese zur Folge hatte (Conti et al., 2007). In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sich einseitige DSB negativ auf die Elongation und das Aktivieren von Replikationsursprüngen auswirkt, und dass Chk1 bereits nach einigen Minuten phosphoryliert wurde (Cliby et al., 2002). Einseitige DSB führten in der Folge zu einem Anstieg an radialen Chromosomen und die Vermutung liegt nahe, dass es ebenso zu einem Anstieg von SCE kommen könnte, da die HR aktiviert wird.

Für die Induktion von zweiseitigen DSB wurde eine hohe Konzentration Wasserstoffperoxid (H_2O_2) verwendet (Benitez-Bribiesca and Sanchez-Suarez, 1999). DSB entstehen dabei sekundär durch eine hohe Frequenz an Einzelstrangbrüchen und Basenschäden (Dahm-Daphi et al., 2000). Genauso wie einseitige DSB wirkten sich zweiseitige DSB drastisch auf die Elongation, das Anhalten von Replikationsgabeln und es kam zu einer Reduktion von Neuinitiationsereignissen. Nach H_2O_2 Inkubation konnten keine Metaphasen gewonnen werden, da vermutlich ein G2-Arrest induziert wurde. Dies wird bestätigt durch die Beobachtung, dass Zellen vor allem in der S-Phase gegenüber hohen H_2O_2 -Behandlung empfindlich reagierten, deutlich resistenter sind Zellen in der G1-Phase und es wird angenommen, dass die durch H_2O_2 induzierte DSB hauptsächlich durch Single-Strand-Annealing (SSA) und HR repariert werden (Frankenberg-Schwager et al., 2008).

4.2.5 Einfluss von ionisierender Strahlung auf die S-Phase

Nach Bestrahlung erhält man ein Schadens-Spektrum, das alle im Einzelnen untersuchten DNA-Schäden beinhaltet. 1 Gy ionisierende Strahlung erzeugt 3.000 bis 4.000 Basenschäden pro Zelle, sowie 1.000 Einzelstrangbrüche und 40 Doppelstrangbrüche. Des Weiteren treten gehäufte Läsionen (200 bis 400/Zelle/Gy) und Vernetzungen zwischen Proteinen und DNA und den beiden DNA-Strängen (150 bis 200/Zelle/Gy) auf (Dikomey et al., 2001). Während DSB als die gefährlichsten Schäden in Zellen gelten, stellen Basenschäden und Einzelstrangbrüche durch ihre hohe Anzahl ebenfalls ein erhebliches Gefahrenpotential da. Im Zellzyklus variiert die Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung beträchtlich. Während Zellen in der G2/M-Phase am empfindlichsten auf Bestrahlung reagieren, zeigte sich eine geringere Sensitivität in der G1-Phase und die größte Resistenz in der S-Phase (Terasima and Tolmach, 1963). Eine detaillierte Untersuchung der Radiosensitivität in der S-Phase zeigte allerdings, dass Zellen beim Eintritt in die S-Phase sehr empfindlich reagieren und erst im Verlauf der späten S-Phase resistent werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Bestrahlung sich lediglich auf die Elongation der Replikation, nicht aber auf das Anhalten von Replikationsgabeln auswirkte. Es zeigte sich ebenfalls kein Einfluss auf Initiationsereignisse und zunächst nur eine schwache, gefolgt von einer stärkeren Phosphorylierung von Chk1. Das frühe Aktivierungssignal könnte durch Basenschäden und Einzelstrangbrüche induziert werden, das späte durch ICL, während DSB über den gesamten Zeitraum potentiell zum Aktivierungssignal und der Inhibition der beschriebenen Replikationsereignisse beitragen könnten. Dies wurde in dieser Arbeit nicht beobachtet und es gibt nur eine weitere Untersuchung, welche die Wirkung von Strahlung auf die Replikationsprozesse, allerdings beschränkt auf die frühe S-Phase untersuchte. Auch diese Arbeit zeigte keinen Effekt auf das Anhalten von Replikationsgabeln und die Aktivität von Neuinitiationsereignissen (Merrick et al., 2004). Es konnte allerdings auch kein Effekt auf die Elongation beobachtet werden. Dies ist möglicherweise auf den frühen Zeitpunkt in der S-Phase zurück zuführen an dem diese Untersuchung durchgeführt wurde. Es wäre demzufolge von großem Interesse in synchronisierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten in der S-Phase die Elongation und das Anhalten von Replikationsgabeln zu untersuchen.

Fraglich ist allerdings, warum Bestrahlung sich nicht entsprechend der einzelnen Agenzien auf die Aktivierung von Chk1 auswirkte. Möglicherweise kommt es nach Bestrahlung in erster Linie zur Aktivierung von ATM, die Aktivierung von ATR und Chk1 könnte erst deutlich später von Bedeutung sein. Dies müsste entsprechend in weiteren Experimenten geklärt werden, beispielsweise durch Untersuchungen in Anwesenheit eines ATM-Inhibitors.

4.3 Bedeutung von Rad51 für die Replikation

Der bedeutendste Reparaturweg für DSB in der S-Phase ist die Homologe Rekombination (HR) mit seinem Hauptprotein Rad51. In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob sich ein Überangebot von Rad51 auf die Elongation der Replikation, die Aktivität von Replikationsgabeln oder Initiationsereignissen auswirkt und in welcher Weise diese Replikationsprozesse beeinträchtigt werden, induziert man Basenschäden, Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüche oder DNA-DNA-Quervernetzungen oder bestrahlt die Zellen.

4.3.1 Bedeutung von Rad51 auf die Replikationsprozesse

Eine einwandfreie Elongation der Replikation ist entscheidend für das zelluläre Überleben und die genomische Stabilität. In Bakterien konnte mit Hilfe von genetischen und biochemischen Analysen Rekombinationsfaktoren der Homologen Rekombination identifiziert werden, die während der Replikation geschädigter DNA beteiligt sind, dabei werden neben Rad51 auch BRCA2, Rad52, Rad51B-Rad51C, Rad51D-XRCC2 und Rad51C-XRCC3 einzelstrangbindende und rekombinationsvermittelnde Funktionen zugesprochen (Seigneur et al., 1998; McGlynn et al., 2000; San Filippo et al., 2008). Die Gene für Rad51B, Rad51C, Rad51D, XRCC2 und XRCC3 kodieren für die fünf Paraloge von Rad51, die alle entscheidend an der Anordnung und Aufrechterhaltung des präsynaptischen Komplexes beteiligt sind. Viele Arbeiten konnten zeigen, dass die HR mit seinem Hauptprotein Rad51 während der Replikation eine wichtige Rolle spielt und diese insbesondere an der Reparatur kollabierter Replikationsgabeln oder für die Reaktivierung angehaltener Gabeln zuständig ist (Cox, 2001; Lu et al., 2005; Michel et al., 2001; Al-Minawi et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich ein Überangebot von Rad51 auf die Elongation der Replikation auswirkte, indem eine signifikant geringere Einbaurate im Vergleich zum Wildtyp bestimmt wurde. Diese Beobachtung wird durch Daboussi et al. bestätigt, die ebenfalls in einer Rad51 überexprimierenden Zelllinie eine Reduktion in der Elongation unbehandelter Zellen zeigten (Daboussi et al., 2008). In beiden Arbeiten zeigte diese deutliche Reduktion dasselbe Ausmaß auf die Elongation wie in HR-defizienten Zellen mit einer Mutation in BRCA2 und XRCC2. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Rad51 Überexpression sowie Mutationen der Paraloge von Rad51 bereits im unbehandelten Zustand zu mehr endogene Schäden führten und diese möglicherweise auf einen Reparaturdefekt der Zellen zurückzuführen sein könnten. Ein Defekt in der Reparatur weist auf eine genomische Instabilität hin und diese konnte auf Basis chromosomaler Aberrationen und einer verminderten HR mehrfach gezeigt werden (Takata et al., 2001; Lambert and Lopez, 2000).

4.3.2 Bedeutung von Rad51 für die Reparatur replikationsassoziierter DNA-Schäden

Da Zellen mit einer Rad51 Überexpression bereits im unbehandelten Zustand deutlich langsamer replizierten, könnte dies ein Indikator einer verminderten Prozessierung endogener Schäden sein. Um zu überprüfen und herauszufinden, welcher Schaden verantwortlich ist, wurde überprüft, ob sich nach Induktion von Basenschäden, Einzelstrangbrüchen, ein- und zweiseitige DSB, ICL und ionisierende Strahlung einer dieser Schäden in der S-Phase manifestiert.

Zunächst wurde untersucht, wie sich die einzelnen Schäden auf die Elongation auswirkten. Nach einer Rad51 Überexpression zeigte sich sehr deutlich, dass sich alle Schäden wesentlich stärker auf die Elongation auswirkten. Der größte Unterschied zwischen überexprimierender und Wildtyp Zelle zeigte sich nach ICL, gefolgt von Basenschäden und Einzelstrangbrüchen. In HR-defizienten Zellen konnte ebenfalls ein deutlicher Effekt auf die Elongation beobachtet werden. So zeigten sich Zellen mit einem Defekt in XRCC3 deutlich empfindlicher gegenüber UV-Strahlung (Henry-Mowatt et al., 2003). Sowohl in XRCC3 defizienten Zellen als auch anderen HR-Mutanten äußerte sich dies auch in einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber genotoxischen Agenzien wie MMS, MMC und ionisierender Strahlung (Game and Mortimer, 1974; Liu et al., 1998; Game et al., 2003).

Zwar zeigte die Untersuchung der Elongation eine größere Empfindlichkeit in Rad51 überexprimierenden Zellen, dennoch konnte diese Empfindlichkeit nicht auf einen bestimmten Schaden zurückgeführt werden, da sich eine Reduktion der Einbaurate nach allen Agenzien auf ein gleiches Niveau senkte. Die Untersuchung der Elongation gibt lediglich wieder, wie sich verschiedene Hindernisse auf den Fortschritt der Polymerase auswirken, nicht aber, ob eine Reparatur oder eine Reaktivierung von angehaltenen Replikationsgabeln stattgefunden hat. Entscheidend ist es zu überprüfen, ob Zellen nach einer Inhibition der Polymerase in der Lage sind, angehaltene Gabeln zu reaktivieren, denn bleiben Replikationsgabeln über einen längeren Zeitraum inaktiv, kommt es zu einem Anstieg replikationsassoziierter Schäden in der S-Phase (Saintigny et al., 2001).

4.3.3 Reaktivierung angehaltener Replikationsgabeln bei Rad51 Überexpression

Eine detaillierte Untersuchung sollte klären, ob Zellen nach starker Inhibition der Elongation in der Lage sind, die Replikation fortzusetzen. Es zeigte sich, dass Rad51 überexprimierende Zellen nach allen induzierten Schäden deutlich größere Schwierigkeiten hatten, mit der Replikation fortzufahren, was sich in einem geringeren Anteil elongierender Replikations-Strukturen nach Schadensinduktion widerspiegelte. Der größte Unterschied zwischen überexprimierender und Wildtyp Zelle zeigte sich nach der Induktion von Einzelstrangbrüchen und einseitigen DSB. Interessanterweise gab es keine Unterschiede nach ionisierender Strahlung.

Es wird vermutet, dass die Reaktivierung angehaltener Replikationsgabeln durch einen Rekombinations-abhängigen Neustart erfolgt (Saintigny et al., 2001; Arnaudeau et al., 2001; Lundin et al., 2002) und dass die Rekombination dabei durch einen einseitigen DSB initiiert wird (Heller and Marians, 2006; Helleday, 2003). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass sowohl Rad51 als auch XRCC3 entscheidend an der Reaktivierung angehaltener Replikationsgabeln beteiligt sind und dabei ein früher Neustart begünstigt wird (Petermann et al., 2010). Nicht nur eine Depletion von Rad51 und XRCC3 führte zur verminderten Reaktivierung angehaltener Replikationsgabeln, sondern auch Zellen mit einem Defekt in Fanconi, BLM, Mus81 und WRN. Dabei zeigten FANCM defiziente Zellen nach einer Induktion von einseitigen DSB einen deutlichen Anstieg angehaltener Replikationsgabeln (Schwab et al., 2010). In der Abwesenheit von WRN konnte eine Akkumulation von Doppelstrangbrüchen und die Dissoziation replikationsassoziierter Proteine gezeigt werden, während MUS81 in dem Fall die Rekrutierung von Rad51 ans Chromatin übernimmt (Franchitto et al., 2008). MUS81 und BLM sind des Weiteren für die Reaktivierung angehaltener Replikationsgabeln zuständig, indem transiente DSB induziert werden (Shimura et al., 2008). Diese Vergleichbarkeit der Effekte aufgezählter Mutanten und der Rad51 Überexpression deutet sehr klar darauf hin, dass bei einer Rad51 Überexpression ein Reparaturdefekt vorliegt, der sich möglicherweise in einer veränderten Schadensantwort manifestieren könnte.

4.3.4 Aktivierung von Replikationsursprüngen nach DNA-Schädigung bei Rad51 Überexpression

Die Aktivität neuinitiierter Replikationsursprünge nach DNA-Schädigung sollte Aufschluss darüber geben, in welchem Ausmaß sich die erzeugten Schäden auf die Replikation auswirkten. Kommt es während der S-Phase zur Blockierung der Replikation verhindert Chk1 den Fortschritt der S-Phase und unterdrückt die Initiation von Replikationsursprüngen und stabilisiert angehaltene Replikationsgabeln (Zachos et al., 2003; Feijoo et al., 2001).

In Wildtyp-Zellen führte eine Inhibition der Elongation zu einer frühen und kurzen Phosphorylierung von Chk1, während es nach angehaltenen Replikationsgabeln eine lang anhaltende Phosphorylierung von Chk1 gab. Es konnte gezeigt werden, dass einhergehend mit dem Anstieg angehaltener Replikationsgabeln sich die Anzahl der Initiationsereignisse nach DNA-Schädigung reduzierte. Dies lässt vermuten, dass ein Chk1 vermittelter Intra-S-Phase-Arrest ausgelöst wurde, der einen Reparaturweg aktiviert, um die vorliegenden Schäden zu beheben

In Rad51 überexprimierenden Zellen zeigte sich ein völlig anderes Bild. Ein deutlich stärkerer Effekt der induzierten Schäden und eine größere Anzahl angehaltener Replikationsgabeln führten zu einer vermehrten Neuinitiation von Replikationsursprüngen. Der deutlichste Effekt zeigte sich dabei nach Induktion von Einzelstrangbrüchen und einseitigen DSB. Es konnte gezeigt werden, dass in Rad51 überexprimierenden Zellen keine Phosphorylierung von Chk1 nach Induktion von einseitigen DSB und Einzelstrangbrüchen erfolgte. Dies lässt vermuten, dass durch einen nicht ausgelösten Intra-S-Phase-Arrest, Zellen mit Rad51 Überexpression vorhandene Schäden nicht reparieren können.

Neben der Vorstellung, dass die Chk1-vermittelte Aktivierung des Intra-S-Phase-Kontrollpunktes zur Reaktivierung angehaltener Replikationsgabeln führt, wird angenommen, dass eukaryotische Replikationsgabeln nicht notwendigerweise eine Reaktivierung angehaltener Replikationsgabeln benötigen, da eine Aktivierung weiterer Neuinitiationsereignisse eine vollständige Replikation gewährleistet kann (Branzei and Foiani, 2007; Paulsen and Cimprich, 2007). Es ist bekannt, dass der Proteinkomplex MCM 2-7, der für die Initiation der Replikationsursprünge zuständig ist, als Überschuss in Zellen vorliegt und nennenswerten Einfluss auf die Aktivität der Initiation hat (Bowers et al., 2004; Edwards et al., 2002; Ibarra et al., 2008). Vieles spricht dafür, dass der MCM-Komplex für die Aktivierung benachbarter Replikationsursprünge als Backup zuständig ist, die genaue Regulation der Aktivierung von Neuinitiationsereignissen ist allerdings bis heute nicht endgültig geklärt. Vor- und Nachteile von Backup-Aktivierung von Replikationsursprüngen sollten anhand von DNA-Schäden oder chromosomalen Schäden messbar sein. Replikationsgabeln, die über einen längeren Zeitraum inaktiv bleiben, resultieren in replikationsassoziierter DSB. Eine mögliche Instabilität von Replikationsgabeln würde sich somit in einer höheren Anzahl chromosomaler Schäden äußern.

4.3.5 Rad51 Überexpression und replikationsassoziierte DNA-Schäden

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Rad51 überexprimierenden Zellen besonders empfindlich auf die Induktion von Einzelstrangbrüchen und einseitigen DSB mit einem deutlichen Anstieg angehaltener Replikationsgabeln reagierten.

Weitere Untersuchungen mit Hilfe von γ H2AX-Foci konnten zeigen, dass die Induktion von Einzelstrangbrüchen in Rad51 überexprimierenden Zellen zu einer erhöhten Anzahl an DSB führte. Die Analyse von Chromosomen nach Schadensinduktion zeigte, dass es nach der Induktion von Einzelstrangbrüchen und von einseitigen DSB eine erhöhte Anzahl radialer Chromosomen bestimmt werden konnte.

Alles deutet darauf hin, dass die Aktivierung von Neuinitiationsereignissen in Zellen mit einer Rad51 Überexpression keinen Vorteil bringt. Alle untersuchten Aspekte lassen vermuten, dass durch eine nicht vorhandene Phosphorylierung von Chk1, eine Unterdrückung weiterer Initiationsereignisse unterbunden wird, angehaltene Replikationsgabeln instabil werden und zu DSB in der S-Phase führen, die sich dann durch eine fehlgeleitete Reparatur in chromosomalen Aberrationen äußern.

Die Empfindlichkeit im zellulären Überleben nach Einzelstrangbrüchen und einseitigen DSB spricht ebenfalls dafür, dass die Zellen deutliche Probleme mit der Prozessierung dieser Schäden haben.

Betrachtet man den Signalweg, der zur Inhibition der Replikationsursprünge führt, geschieht dies über die Generierung ssDNA, die über RPA und der Rekrutierung des ATR-ATRIP-Komplex zu einer Phosphorylierung von Chk1 führt.

Sowohl nach Einzelstrangbrüchen als auch nach einseitigen DSB kommt es zur Generierung ssDNA und in der vorliegenden Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass Wildtyp-Zellen nach diesen Schäden eine deutliche Phosphorylierung von Chk1 zeigten. In Rad51 überexprimierenden Zellen hingegen zeigte sich nur eine sehr schwache Phosphorylierung nach Schadensinduktion. Dies lässt vermuten, dass im Fall einer Rad51 Überexpression ein Defekt in der signalvermittelten Chk1-Phosphorylierung vorliegt.

Es wäre denkbar, dass eine Rad51 Überexpression zu einem Überschuss an Rad51 im Kern führt und sich an ssDNA anlagert und somit den Signalweg zur Chk1-Phosphorylierung stört.

Allerdings zeigte sich, wie schon im Wildtyp beschrieben, kein Effekt nach Behandlung mit ionisierender Strahlung. Möglicherweise kommt auch hier wieder die Aktivierung von ATM ins Spiel.

4.4 Konklusion

Der vorliegende Phänotyp der Rad51 Überexpression weist möglicherweise auf eine sehr komplexe Dysregulation der HR-vermittelten Reparatur während der Replikation hin. Initial könnte sich das Überangebot von Rad51 als ein physikalisches Hindernis für den Replikationsapparat darstellen. Die Entwindung der DNA-Doppelhelix generiert per se Bereiche ssDNA, an die Rad51 möglicherweise unkontrolliert bindet, wenn es im Überschuss vorliegt und stört somit die Elongation in unbehandelten Zellen. Diese Annahme wird gestützt durch die hohe Bindungsaffinität von Rad51 an ssDNA (Sung and Robberson, 1995; Benson et al., 1994; Raderschall et al., 1999). Dies würde sich dann ebenfalls auf durch Einzelstrangbrüche und einseitige DSB geschädigte DNA auswirken, da es nach diesen Schadenstypen zur Generierung von ssDNA kommt. In Folge der vermehrten Rad51-Bindung an ssDNA würde das Aktivierungssignal für Chk1 ausbleiben, wodurch die Neuinitiation von Replikationsursprüngen, wie beobachtet, nicht unterdrückt werden kann. Eine deutliche Assoziation von Chk1 und Rad51 konnte bereits beschrieben werden. So konnte gezeigte werden, dass Chk1 direkt an der Rekrutierung von Rad51 ans Chromatin nach DNA-Schädigung beteiligt ist und für die Phosphorylierung von Rad51 an Thr 309 benötigt wird, Garant einer effizienten HR-vermittelten Reparatur (Sorensen et al., 2005). Darüber hinaus könnte das Überangebot von Rad51 das Gleichgewicht der Assoziation von Rad51 an die MCM-Helikase stören (Shukla et al., 2005), daraus folgend den Fortschritt der Polymerase behindern, was sich ebenfalls auf den Elongationsprozess auswirken würde.

Parallel dazu könnte aber auch der Beladungsprozess generell gestört sein, mit Bereichen die einen Überschuss an Rad51 vorweisen und anderen an denen eine verminderte Rad51 Anlagerung vorliegt. Normalerweise wird Rad51 durch BRCA2 und FANCD2 auf die DNA geladen. Eine verminderte FANCD2 Monoubiquitinierung, Grundvoraussetzung für Chromatingebundenes FANCD2, aufgrund einer reduzierten Expression von FANCA, konnte für diese Zellen bereits beobachtet werden (Wrona, 2010). Diese Störung in der Regulation des Fanconi-Komplexes könnte sich dann wiederum durch eine verminderte Chk1-Phosphorylierung auswirken, wie sie beispielsweise für FANCM defiziente Zellen beobachtet wurde (Schwab et al., 2010). Das Zusammenspiel dieser sehr komplexen Prozesse könnte dann Ursache der extrem erhöhten Empfindlichkeit der Zellen nach MMC (Wrona, 2010), Topotecan und H₂O₂ sein.

Es könnte darüber hinaus erklären, warum nach Bestrahlung keine erhöhte Sensitivität zu beobachten war, da hier zunächst die durch ATM vermittelte Signalkaskade der Reparatur aktiviert wird, eine Chk1 Aktivierung über ATR ist erst deutlich später von Bedeutung.

4.5 Zusammenfassung

Die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität ist das fundamentale Ziel der Zelle. Dabei ist eine fehlerfreie DNA-Replikation in jedem Zellzyklus von größter Bedeutung. Trifft ein Replikationsapparat auf einen DNA-Doppelstrangbruch, bewirkt dies, dass die Homologe Rekombination mit seinem zentralen Protein Rad51 als der Hauptreparaturmechansimus aktiv wird. Der DNA-Schaden wird dabei von sogenannten Sensorproteinen erkannt, die wiederum Zellzykluskontrollproteine aktivieren und zu einem Anhalten der S-Phase führen. Weitere Initiationsereignisse der Replikation werden unterdrückt, Reparaturprozesse in Gang gesetzt und der Schaden behoben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich ionisierende Strahlen und die durch Bestrahlung erzeugten DNA-Schäden auf den Replikationsapparat, die Aktivierung des Intra-S-Phase-Kontrollproteins Chk1 und ihren Folgen für die genomische Instabilität auswirken. Es sollte der spezifische Effekt von Basenschäden, Einzelstrangbrüchen, DNA-DNA-Quervernetzungen, sowie zweiseitigen und einseitigen Doppelstrangbrüchen untersucht werden, um dies dann mit dem Schadensspektrum der ionisierenden Strahlen zu vergleichen. Von besonderem Interesse war es zu überprüfen, ob eine Hochregulation von Rad51, zu einer veränderten Antwort der Replikationsprozesse und der genomischen Stabilität nach DNA-Schädigung führt.

Die Experimente wurden mit U2OS-Zellen durchgeführt, in denen durch Transfektion des Rad51-Gens eine transiente Überexpression von Rad51 durch einen hormoninduzierbaren Promoter erzielt werden konnte (Maacke et al., 2000). Als Kontrolle dienten U2OS-Zellen, bei denen keine Hormoninduktion durchgeführt wurde. Die Auswirkungen der verschiedenen DNA-Schäden wurden im DNA Fibre Assay, im Western-Blot, an γH2AX-FOCI und Chromosomaberrationen sowie im Koloniebildungsassay untersucht.

Für Zellen mit normaler Rad51 Expression zeigte es sich, dass DNA-Doppelstrangbrüche die toxischsten Schäden während der Replikation waren. Sowohl zweiseitige, als auch einseitige DSB führten zur starken Inhibition der Elongation, zum Anhalten von Replikationsgabeln und zu einer schnellen und langen Aktivierung des Intra-S-Phase Kontrollproteins Chk1. Dies ging einher mit der Inhibition weiterer Initiationsereignisse. Eine ionisierende Bestrahlung wirkte sich nur

auf den Elongationsprozess, nicht aber auf das Anhalten von Replikationsgabeln aus. Sie bewirkte außerdem nur eine schwache und späte Aktivierung von Chk1, sowie eine geringere Inhibition von Initiationsereignissen.

Zellen mit einer Überexpression von Rad51 zeigten ein völlig anderes Bild. Schon im unbehandelten Zustand wiesen diese Zellen spontane DNA-Doppelstrangbrüche, radiale Chromosomen sowie eine deutlich langsamere Replikation auf. Des Weiteren zeigten sich diese Zellen gegenüber Einzelstrangbrüchen sowie einseitige DSB weitaus empfindlicher als die Kontrollzellen mit niedriger Rad51 Expression. Dies äußerte sich durch eine stärkere Inhibition der Elongation und durch ein deutlich stärkeres Anhalten von Replikationsgabeln. Interessanterweise führte diese massive Inhibition der Replikation nicht zur Aktivierung von Chk1. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen wurden vermehrt Initiationsereignisse aktiviert und nicht inhibiert. Die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Einzelstrangbrüchen und replikationsassoziierten DSB zeigte sich ebenfalls im Koloniebildungsassay. Des Weiteren führten Einzelstrangbrüche in Rad51-überexpremierenden Zellen zu einer signifikant erhöhten Anzahl von Doppelstrangbrüchen und zu einem Anstieg radialer Chromosomen. Nach Bestrahlung verhielten sich die Zellen mit einem Überangebot von Rad51 allerdings wie Zellen mit geringer endogener Rad51 Expression.

Diese Daten lassen insgesamt die Schlussfolgerung zu, dass Zellen mit einer Überexpression an Rad51 nicht nur eine erhöhte genomische Instabilität aufweisen, sondern auch besonders empfindlich auf replikationsassoziierte DNA-Schäden reagieren. Diese Beobachtung wird erklärt durch die unterschiedliche Detektion der Schadenstypen über die Sensorproteine ATR und ATM. Replikationsassoziierte Schäden wie Einzelstrangbrüche oder einseitige DSB führen vor allem zur Bildung von expandierter einzelsträngiger DNA, die durch die Bindung des Einzelstrangbindungsproteins RPA den ATR-ATRIP rekrutiert und dies zu einer Aktivierung von Chk1 führt. Die Affinität von Rad51 gegenüber einzelsträngiger DNA könnte die Bindung von RPA kompetitiv hemmen und die Schadensantwort über ATR behindern. Nach Bestrahlung oder zweiseitigen Doppelstrangbrüchen erfolgt die Detektion des Schadens hauptsächlich über das Sensorprotein ATM. In diesem Fall kommt es erst nach Prozessierung des DSB zur Bildung von einzelsträngiger DNA.

Für die Tumortherapie könnten diese Ergebnisse von entscheidender Bedeutung sein, da Rad51 in einigen Tumorentitäten dysreguliert ist. Dabei sollten Tumoren mit einer Überexpression von Rad51 besser auf eine Behandlung mit Agenzien ansprechen, durch die replikationsassoziierte Schäden induziert werden.

5 Literatur

- Aguilera, A., and Boulton, S.J. (2007) How to exchange your partner. Workshop on recombination mechanisms and the maintenance of genomic stability. EMBO reports 8:28-33.
- Al-Minawi, A.Z., Saleh-Gohari, N., and Helleday, T. (2008) The ERCC1/XPF endonuclease is required for efficient single-strand annealing and gene conversion in mammalian cells. Nucleic acids research 36:1-9.
- Arnaudeau, C., Lundin, C., and Helleday, T. (2001) DNA double-strand breaks associated with replication forks are predominantly repaired by homologous recombination involving an exchange mechanism in mammalian cells. Journal of molecular biology 307:1235-1245.
- Asagoshi, K., Tano, K., Chastain, P.D., 2nd, Adachi, N., Sonoda, E., Kikuchi, K., Koyama, H., Nagata, K., Kaufman, D.G., Takeda, S., Wilson, S.H., Watanabe, M., Swenberg, J.A., and Nakamura, J. (2010) FEN1 functions in long patch base excision repair under conditions of oxidative stress in vertebrate cells. Mol Cancer Res 8:204-215.
- Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. Nature 421:499-506.
- Bartelink, H., Horiot, J.C., Poortmans, P., Struikmans, H., Van den Bogaert, W., Barillot, I., Fourquet, A., Borger, J., Jager, J., Hoogenraad, W., Collette, L., and Pierart, M. (2001) Recurrence rates after treatment of breast cancer with standard radiotherapy with or without additional radiation. The New England journal of medicine 345:1378-1387.
- Baumann, P., Benson, F.E., and West, S.C. (1996) Human Rad51 protein promotes ATPdependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. Cell 87:757-766.
- Baumann, P., and West, S.C. (1998) Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. Trends in biochemical sciences 23:247-251.
- Bell, S.P. and Dutta, A. (2002) DNA replication in eukaryotic cells. Annual review of biochemistry 71:333-374.
- Bell, S.P., and Stillman, B. (1992) ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. Nature 357:128-134.
- Ben-Yehoyada, M., Wang, L.C., Kozekov, I.D., Rizzo, C.J., Gottesman, M.E., and Gautier, J. (2009) Checkpoint signaling from a single DNA interstrand crosslink. Molecular cell 35:704-715.
- Benitez-Bribiesca, L., and Sanchez-Suarez, P. (1999) Oxidative damage, bleomycin, and gamma radiation induce different types of DNA strand breaks in normal lymphocytes and thymocytes. A comet assay study. Annals of the New York Academy of Sciences 887:133-149.
- Benson, F.E., Stasiak, A., and West, S.C. (1994) Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of E. coli RecA. The EMBO journal 13:5764-5771.
- Bi, X., Srikanta, D., Fanti, L., Pimpinelli, S., Badugu, R., Kellum, R., and Rong, Y.S. (2005) Drosophila ATM and ATR checkpoint kinases control partially redundant pathways for telomere maintenance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102:15167-15172.
- Bomgarden, R.D., Lupardus, P.J., Soni, D.V., Yee, M.C., Ford, J.M., and Cimprich, K.A. (2006) Opposing effects of the UV lesion repair protein XPA and UV bypass polymerase eta on ATR checkpoint signaling. The EMBO journal 25:2605-2614.
- Boutros, R., Dozier, C., and Ducommun, B. (2006) The when and wheres of CDC25 phosphatases. Current opinion in cell biology 18:185-191.
- Bowers, J.L., Randell, J.C., Chen, S., and Bell, S.P. (2004) ATP hydrolysis by ORC catalyzes reiterative Mcm2-7 assembly at a defined origin of replication. Molecular cell 16:967-978.
- Branzei, D., and Foiani, M. (2007) Interplay of replication checkpoints and repair proteins at stalled replication forks. DNA repair 6:994-1003.
- Branzei, D., and Foiani, M. (2010) Maintaining genome stability at the replication fork. Nature reviews 11:208-219.

- Brem, R., Fernet, M., Chapot, B., and Hall, J. (2008) The methyl methanesulfonate induced Sphase delay in XRCC1-deficient cells requires ATM and ATR. DNA repair, pp. 849-857.
- Burgers, P.M. (2009) Polymerase dynamics at the eukaryotic DNA replication fork. The Journal of biological chemistry 284:4041-4045.
- Byun, T.S., Pacek, M., Yee, M.C., Walter, J.C., and Cimprich, K.A. (2005) Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. Genes & development 19:1040-1052.
- Caldecott, K.W. (2008) Single-strand break repair and genetic disease. Nat Rev Genet 9:619-631.
- Chang, D.J., Lupardus, P.J., and Cimprich, K.A. (2006) Monoubiquitination of proliferating cell nuclear antigen induced by stalled replication requires uncoupling of DNA polymerase and mini-chromosome maintenance helicase activities. The Journal of biological chemistry 281:32081-32088.
- Chou, W.C., Wang, H.C., Wong, F.H., Ding, S.L., Wu, P.E., Shieh, S.Y., and Shen, C.Y. (2008) Chk2-dependent phosphorylation of XRCC1 in the DNA damage response promotes base excision repair. The EMBO journal 27:3140-3150.
- Ciccia, A., and Elledge, S.J. (2010) The DNA damage response: making it safe to play with knives. Molecular cell 40:179-204.
- Cimprich, K.A., and Cortez, D. (2008) ATR: an essential regulator of genome integrity. Nature reviews 9:616-627.
- Cliby, W.A., Lewis, K.A., Lilly, K.K., and Kaufmann, S.H. (2002) S phase and G2 arrests induced by topoisomerase I poisons are dependent on ATR kinase function. The Journal of biological chemistry 277:1599-1606.
- Constantinou, A., Tarsounas, M., Karow, J.K., Brosh, R.M., Bohr, V.A., Hickson, I.D., and West, S.C. (2000) Werner's syndrome protein (WRN) migrates Holliday junctions and colocalizes with RPA upon replication arrest. EMBO reports 1:80-84.
- Conti, C., Caburet, S., Schurra, C., and Bensimon, A. (2001) Molecular combing. Current protocols in cytometry / editorial board, J. Paul Robinson, managing editor ... [et al Chapter 8:Unit 8 10.
- Conti, C., Seiler, J.A., and Pommier, Y. (2007) The mammalian DNA replication elongation checkpoint: implication of Chk1 and relationship with origin firing as determined by single DNA molecule and single cell analyses. Cell cycle (Georgetown, Tex 6:2760-2767.
- Costanzo, V., Robertson, K., Ying, C.Y., Kim, E., Avvedimento, E., Gottesman, M., Grieco, D., and Gautier, J. (2000) Reconstitution of an ATM-dependent checkpoint that inhibits chromosomal DNA replication following DNA damage. Molecular cell 6:649-659.
- Cox, M.M. (2001) Recombinational DNA repair of damaged replication forks in Escherichia coli: questions. Annual review of genetics 35:53-82.
- Daboussi, F., Courbet, S., Benhamou, S., Kannouche, P., Zdzienicka, M.Z., Debatisse, M., and Lopez, B.S. (2008) A homologous recombination defect affects replication-fork progression in mammalian cells. Journal of cell science 121:162-166.
- Dahm-Daphi, J., Sass, C., and Alberti, W. (2000) Comparison of biological effects of DNA damage induced by ionizing radiation and hydrogen peroxide in CHO cells. International journal of radiation biology 76:67-75.
- de Jager, M., van Noort, J., van Gent, D.C., Dekker, C., Kanaar, R., and Wyman, C. (2001) Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. Molecular cell 8:1129-1135.
- Deans, B., Griffin, C.S., O'Regan, P., Jasin, M., and Thacker, J. (2003) Homologous recombination deficiency leads to profound genetic instability in cells derived from Xrcc2-knockout mice. Cancer research 63:8181-8187.
- Dronkert, M.L., and Kanaar, R. (2001) Repair of DNA interstrand cross-links. Mutation research 486:217-247.
- Edenberg, H.J., and Huberman, J.A. (1975) Eukaryotic chromosome replication. Annual review of genetics 9:245-284.

- Edwards, M.C., Tutter, A.V., Cvetic, C., Gilbert, C.H., Prokhorova, T.A., and Walter, J.C. (2002) MCM2-7 complexes bind chromatin in a distributed pattern surrounding the origin recognition complex in Xenopus egg extracts. The Journal of biological chemistry 277:33049-33057.
- Feijoo, C., Hall-Jackson, C., Wu, R., Jenkins, D., Leitch, J., Gilbert, D.M., and Smythe, C. (2001) Activation of mammalian Chk1 during DNA replication arrest: a role for Chk1 in the intra-S phase checkpoint monitoring replication origin firing. The Journal of cell biology 154:913-923.
- Finnie, N.J., Gottlieb, T.M., Blunt, T., Jeggo, P.A., and Jackson, S.P. (1995) DNA-dependent protein kinase activity is absent in xrs-6 cells: implications for site-specific recombination and DNA double-strand break repair. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92:320-324.
- Franchitto, A., Pirzio, L.M., Prosperi, E., Sapora, O., Bignami, M., and Pichierri, P. (2008) Replication fork stalling in WRN-deficient cells is overcome by prompt activation of a MUS81dependent pathway. The Journal of cell biology 183:241-252.
- Frankenberg-Schwager, M., Becker, M., Garg, I., Pralle, E., Wolf, H., and Frankenberg, D. (2008) The role of nonhomologous DNA end joining, conservative homologous recombination, and single-strand annealing in the cell cycle-dependent repair of DNA doublestrand breaks induced by H(2)O(2) in mammalian cells. Radiation research 170:784-793.
- Game, J.C., Birrell, G.W., Brown, J.A., Shibata, T., Baccari, C., Chu, A.M., Williamson, M.S., and Brown, J.M. (2003) Use of a genome-wide approach to identify new genes that control resistance of Saccharomyces cerevisiae to ionizing radiation. Radiation research 160:14-24.
- Game, J.C., and Mortimer, R.K. (1974) A genetic study of x-ray sensitive mutants in yeast. Mutation research 24:281-292.
- Groth, P., Auslander, S., Majumder, M.M., Schultz, N., Johansson, F., Petermann, E., and Helleday, T. (2010) Methylated DNA causes a physical block to replication forks independently of damage signalling, O(6)-methylguanine or DNA single-strand breaks and results in DNA damage. Journal of molecular biology 402:70-82.
- Helleday, T. (2003) Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. Mutation research 532:103-115.
- Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B., and Sharma, R.A. (2008) DNA repair pathways as targets for cancer therapy. Nat Rev Cancer 8:193-204.
- Heller, R.C., and Marians, K.J. (2006) Replication fork reactivation downstream of a blocked nascent leading strand. Nature 439:557-562.
- Henry-Mowatt, J., Jackson, D., Masson, J.Y., Johnson, P.A., Clements, P.M., Benson, F.E., Thompson, L.H., Takeda, S., West, S.C., and Caldecott, K.W. (2003) XRCC3 and Rad51 modulate replication fork progression on damaged vertebrate chromosomes. Molecular cell 11:1109-1117.
- Hoeijmakers, J.H. (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature 411:366-374.
- Horton, J.K., Watson, M., Stefanick, D.F., Shaughnessy, D.T., Taylor, J.A., and Wilson, S.H. (2008) XRCC1 and DNA polymerase beta in cellular protection against cytotoxic DNA single-strand breaks. Cell research 18:48-63.
- Hsiang, Y.H., Lihou, M.G., and Liu, L.F. (1989) Arrest of replication forks by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin. Cancer research 49:5077-5082.
- Huang, M., Kim, J.M., Shiotani, B., Yang, K., Zou, L., and D'Andrea, A.D. (2010) The FANCM/FAAP24 complex is required for the DNA interstrand crosslink-induced check-point response. Molecular cell 39:259-268.
- Ibarra, A., Schwob, E., and Mendez, J. (2008) Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105:8956-8961.

- Jackson, D.A., and Pombo, A. (1998) Replicon clusters are stable units of chromosome structure: evidence that nuclear organization contributes to the efficient activation and propagation of S phase in human cells. The Journal of cell biology 140:1285-1295.
- Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G.C., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2006) ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. Nature cell biology 8:37-45.
- Johnson, A., and O'Donnell, M. (2005) Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. Annual review of biochemistry 74:283-315.
- Kaina, B. (2004) Mechanisms and consequences of methylating agent-induced SCEs and chromosomal aberrations: a long road traveled and still a far way to go. Cytogenetic and genome research 104:77-86.
- Karow, J.K., Constantinou, A., Li, J.L., West, S.C., and Hickson, I.D. (2000) The Bloom's syndrome gene product promotes branch migration of holliday junctions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97:6504-6508.
- Knipscheer, P., Raschle, M., Smogorzewska, A., Enoiu, M., Ho, T.V., Scharer, O.D., Elledge, S.J., and Walter, J.C. (2009) The Fanconi anemia pathway promotes replicationdependent DNA interstrand cross-link repair. Science (New York, N.Y 326:1698-1701.
- Kumagai, A., and Dunphy, W.G. (2000) Claspin, a novel protein required for the activation of Chk1 during a DNA replication checkpoint response in Xenopus egg extracts. Molecular cell 6:839-849.
- Kumagai, A., Lee, J., Yoo, H.Y., and Dunphy, W.G. (2006) TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. Cell 124:943-955.
- Kuzminov, A. (2001) DNA replication meets genetic exchange: chromosomal damage and its repair by homologous recombination. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98:8461-8468.
- Lambert, S., and Lopez, B.S. (2000) Characterization of mammalian RAD51 double strand break repair using non-lethal dominant-negative forms. The EMBO journal 19:3090-3099.
- Lehmann, A.R. (2005) Replication of damaged DNA by translesion synthesis in human cells. FEBS letters 579:873-876.
- Lieber, M.R. (2008) The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. The Journal of biological chemistry 283:1-5.
- Lim, D.S., and Hasty, P. (1996) A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. Molecular and cellular biology 16:7133-7143.
- Limoli, C.L., Laposa, R., and Cleaver, J.E. (2002) DNA replication arrest in XP variant cells after UV exposure is diverted into an Mre11-dependent recombination pathway by the kinase inhibitor wortmannin. Mutation research 510:121-129.
- Liu, N., Lamerdin, J.E., Tebbs, R.S., Schild, D., Tucker, J.D., Shen, M.R., Brookman, K.W., Siciliano, M.J., Walter, C.A., Fan, W., Narayana, L.S., Zhou, Z.Q., Adamson, A.W., Sorensen, K.J., Chen, D.J., Jones, N.J., and Thompson, L.H. (1998) XRCC2 and XRCC3, new human Rad51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. Molecular cell 1:783-793.
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., Donehower, L.A., and Elledge, S.J. (2000) Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. Genes & development 14:1448-1459.
- Llorente, B., Smith, C.E., and Symington, L.S. (2008) Break-induced replication: what is it and what is it for? Cell cycle (Georgetown, Tex 7:859-864.
- Loeb, K.R., and Loeb, L.A. (2000) Significance of multiple mutations in cancer. Carcinogenesis 21:379-385.
- Lu, H., Guo, X., Meng, X., Liu, J., Allen, C., Wray, J., Nickoloff, J.A., and Shen, Z. (2005) The BRCA2-interacting protein BCCIP functions in RAD51 and BRCA2 focus formation and homologous recombinational repair. Molecular and cellular biology 25:1949-1957.

- Lundin, C., Erixon, K., Arnaudeau, C., Schultz, N., Jenssen, D., Meuth, M., and Helleday, T. (2002) Different roles for nonhomologous end joining and homologous recombination following replication arrest in mammalian cells. Molecular and cellular biology 22:5869-5878.
- Maacke, H., Opitz, S., Jost, K., Hamdorf, W., Henning, W., Kruger, S., Feller, A.C., Lopens, A., Diedrich, K., Schwinger, E., and Sturzbecher, H.W. (2000) Over-expression of wild-type Rad51 correlates with histological grading of invasive ductal breast cancer. International journal of cancer 88:907-913.
- MacDougall, C.A., Byun, T.S., Van, C., Yee, M.C., and Cimprich, K.A. (2007) The structural determinants of checkpoint activation. Genes & development 21:898-903.
- Masai, H., Matsumoto, S., You, Z., Yoshizawa-Sugata, N., and Oda, M. (2010) Eukaryotic chromosome DNA replication: where, when, and how? Annual review of biochemistry 79:89-130.
- Maser, R.S., Monsen, K.J., Nelms, B.E., and Petrini, J.H. (1997) hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. Molecular and cellular biology 17:6087-6096.
- Maya-Mendoza, A., Petermann, E., Gillespie, D.A., Caldecott, K.W., and Jackson, D.A. (2007) Chk1 regulates the density of active replication origins during the vertebrate S phase. The EMBO journal 26:2719-2731.
- McGlynn, P., Mahdi, A.A., and Lloyd, R.G. (2000) Characterisation of the catalytically active form of RecG helicase. Nucleic acids research 28:2324-2332.
- Merrick, C.J., Jackson, D., and Diffley, J.F. (2004) Visualization of altered replication dynamics after DNA damage in human cells. The Journal of biological chemistry 279:20067-20075.
- Michel, B., Flores, M.J., Viguera, E., Grompone, G., Seigneur, M., and Bidnenko, V. (2001) Rescue of arrested replication forks by homologous recombination. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98:8181-8188.
- Mitra, S., Hazra, T.K., Roy, R., Ikeda, S., Biswas, T., Lock, J., Boldogh, I., and Izumi, T. (1997) Complexities of DNA base excision repair in mammalian cells. Molecules and cells 7:305-312.
- Moldovan, G.L., and D'Andrea, A.D. (2009) FANCD2 hurdles the DNA interstrand crosslink. Cell 139:1222-1224.
- Niedernhofer, L.J., Odijk, H., Budzowska, M., van Drunen, E., Maas, A., Theil, A.F., de Wit, J., Jaspers, N.G., Beverloo, H.B., Hoeijmakers, J.H., and Kanaar, R. (2004) The structurespecific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-linkinduced double-strand breaks. Molecular and cellular biology 24:5776-5787.
- Ogawa, T., Shinohara, A., Nabetani, A., Ikeya, T., Yu, X., Egelman, E.H., and Ogawa, H. (1993) RecA-like recombination proteins in eukaryotes: functions and structures of RAD51 genes. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology 58:567-576.
- Pardo, B., Gomez-Gonzalez, B., and Aguilera, A. (2009) DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. Cell Mol Life Sci 66:1039-1056.
- Paulsen, R.D., and Cimprich, K.A. (2007) The ATR pathway: fine-tuning the fork. DNA repair 6:953-966.
- Petermann, E., Maya-Mendoza, A., Zachos, G., Gillespie, D.A., Jackson, D.A., and Caldecott, K.W. (2006) Chk1 requirement for high global rates of replication fork progression during normal vertebrate S phase. Molecular and cellular biology 26:3319-3326.
- Petermann, E., Orta, M.L., Issaeva, N., Schultz, N., and Helleday, T. (2010) Hydroxyurea-stalled replication forks become progressively inactivated and require two different RAD51-mediated pathways for restart and repair. Molecular cell 37:492-502.
- Pommier, Y. (2006) Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. Nat Rev Cancer 6:789-802.
- Pommier, Y., Barcelo, J.M., Rao, V.A., Sordet, O., Jobson, A.G., Thibaut, L., Miao, Z.H., Seiler, J.A., Zhang, H., Marchand, C., Agama, K., Nitiss, J.L., and Redon, C. (2006) Repair of

topoisomerase I-mediated DNA damage. Progress in nucleic acid research and molecular biology 81:179-229.

- Postow, L., Crisona, N.J., Peter, B.J., Hardy, C.D., and Cozzarelli, N.R. (2001) Topological challenges to DNA replication: conformations at the fork. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98:8219-8226.
- Raderschall, E., Golub, E.I., and Haaf, T. (1999) Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions formed after DNA damage. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96:1921-1926.
- Remus, D., and Diffley, J.F. (2009) Eukaryotic DNA replication control: lock and load, then fire. Current opinion in cell biology 21:771-777.
- Rouse, J., and Jackson, S.P. (2002) Interfaces between the detection, signaling, and repair of DNA damage. Science (New York, N.Y 297:547-551.
- Ryan, A.J., Squires, S., Strutt, H.L., and Johnson, R.T. (1991) Camptothecin cytotoxicity in mammalian cells is associated with the induction of persistent double strand breaks in replicating DNA. Nucleic acids research 19:3295-3300.
- Saintigny, Y., Delacote, F., Vares, G., Petitot, F., Lambert, S., Averbeck, D., and Lopez, B.S. (2001) Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells. The EMBO journal 20:3861-3870.
- Saleh-Gohari, N., Bryant, H.E., Schultz, N., Parker, K.M., Cassel, T.N., and Helleday, T. (2005) Spontaneous homologous recombination is induced by collapsed replication forks that are caused by endogenous DNA single-strand breaks. Molecular and cellular biology 25:7158-7169.
- San Filippo, J., Sung, P., and Klein, H. (2008) Mechanism of eukaryotic homologous recombination. Annual review of biochemistry 77:229-257.
- Schwab, R.A., Blackford, A.N., and Niedzwiedz, W. (2010) ATR activation and replication fork restart are defective in FANCM-deficient cells. The EMBO journal 29:806-818.
- Sedgwick, B. (2004) Repairing DNA-methylation damage. Nature reviews 5:148-157.
- Seigneur, M., Bidnenko, V., Ehrlich, S.D., and Michel, B. (1998) RuvAB acts at arrested replication forks. Cell 95:419-430.
- Seiler, J.A., Conti, C., Syed, A., Aladjem, M.I., and Pommier, Y. (2007) The intra-S-phase checkpoint affects both DNA replication initiation and elongation: single-cell and -DNA fiber analyses. Molecular and cellular biology 27:5806-5818.
- Shao, R.G., Cao, C.X., Zhang, H., Kohn, K.W., Wold, M.S., and Pommier, Y. (1999) Replication-mediated DNA damage by camptothecin induces phosphorylation of RPA by DNAdependent protein kinase and dissociates RPA:DNA-PK complexes. The EMBO journal 18:1397-1406.
- Shechter, D., Costanzo, V., and Gautier, J. (2004) ATR and ATM regulate the timing of DNA replication origin firing. Nature cell biology 6:648-655.
- Shimura, T., Torres, M.J., Martin, M.M., Rao, V.A., Pommier, Y., Katsura, M., Miyagawa, K., and Aladjem, M.I. (2008) Bloom's syndrome helicase and Mus81 are required to induce transient double-strand DNA breaks in response to DNA replication stress. Journal of molecular biology 375:1152-1164.
- Shiotani, B., and Zou, L. (2009) Single-stranded DNA orchestrates an ATM-to-ATR switch at DNA breaks. Molecular cell 33:547-558.
- Shukla, A., Navadgi, V.M., Mallikarjuna, K., and Rao, B.J. (2005) Interaction of hRad51 and hRad52 with MCM complex: a cross-talk between recombination and replication proteins. Biochemical and biophysical research communications 329:1240-1245.
- Sleeth, K.M., Sorensen, C.S., Issaeva, N., Dziegielewski, J., Bartek, J., and Helleday, T. (2007) RPA mediates recombination repair during replication stress and is displaced from DNA by checkpoint signalling in human cells. Journal of molecular biology 373:38-47.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical biochemistry 150:76-85.

- Smits, V.A., Reaper, P.M., and Jackson, S.P. (2006) Rapid PIKK-dependent release of Chk1 from chromatin promotes the DNA-damage checkpoint response. Curr Biol 16:150-159.
- Sobol, R.W., Kartalou, M., Almeida, K.H., Joyce, D.F., Engelward, B.P., Horton, J.K., Prasad, R., Samson, L.D., and Wilson, S.H. (2003) Base excision repair intermediates induce p53-independent cytotoxic and genotoxic responses. The Journal of biological chemistry 278:39951-39959.
- Sonoda, E., Sasaki, M.S., Buerstedde, J.M., Bezzubova, O., Shinohara, A., Ogawa, H., Takata, M., Yamaguchi-Iwai, Y., and Takeda, S. (1998) Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. The EMBO journal 17:598-608.
- Sorensen, C.S., Hansen, L.T., Dziegielewski, J., Syljuasen, R.G., Lundin, C., Bartek, J., and Helleday, T. (2005) The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. Nature cell biology 7:195-201.
- Strumberg, D., Pilon, A.A., Smith, M., Hickey, R., Malkas, L., and Pommier, Y. (2000) Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5'-phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff. Molecular and cellular biology 20:3977-3987.
- Sung, P., and Robberson, D.L. (1995) DNA strand exchange mediated by a RAD51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA. Cell 82:453-461.
- Takata, M., Sasaki, M.S., Tachiiri, S., Fukushima, T., Sonoda, E., Schild, D., Thompson, L.H., and Takeda, S. (2001) Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. Molecular and cellular biology 21:2858-2866.
- Terasima, T., and Tolmach, L.J. (1963) X-ray sensitivity and DNA synthesis in synchronous populations of HeLa cells. Science (New York, N.Y 140:490-492.
- Tercero, J.A., and Diffley, J.F. (2001) Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. Nature 412:553-557.
- Thoma, B.S., and Vasquez, K.M. (2003) Critical DNA damage recognition functions of XPChHR23B and XPA-RPA in nucleotide excision repair. Molecular carcinogenesis 38:1-13.
- Thompson, L.H., Brookman, K.W., Dillehay, L.E., Carrano, A.V., Mazrimas, J.A., Mooney, C.L., and Minkler, J.L. (1982) A CHO-cell strain having hypersensitivity to mutagens, a defect in DNA strand-break repair, and an extraordinary baseline frequency of sister-chromatid exchange. Mutation research 95:427-440.
- Tsuzuki, T., Fujii, Y., Sakumi, K., Tominaga, Y., Nakao, K., Sekiguchi, M., Matsushiro, A., Yoshimura, Y., and MoritaT (1996) Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93:6236-6240.
- Unsal-Kacmaz, K., Chastain, P.D., Qu, P.P., Minoo, P., Cordeiro-Stone, M., Sancar, A., and Kaufmann, W.K. (2007) The human Tim/Tipin complex coordinates an Intra-S check-point response to UV that slows replication fork displacement. Molecular and cellular biology 27:3131-3142.
- van Gent, D.C., Hoeijmakers, J.H., and Kanaar, R. (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. Nat Rev Genet 2:196-206.
- Wang, W. (2007) Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anaemia and BRCA proteins. Nat Rev Genet 8:735-748.
- Ward, I.M., Minn, K., and Chen, J. (2004) UV-induced ataxia-telangiectasia-mutated and Rad3related (ATR) activation requires replication stress. The Journal of biological chemistry 279:9677-9680.
- Weier, H.U. (2001) DNA fiber mapping techniques for the assembly of high-resolution physical maps. J Histochem Cytochem 49:939-948.
- Wilsker, D., Petermann, E., Helleday, T., and Bunz, F. (2008) Essential function of Chk1 can be uncoupled from DNA damage checkpoint and replication control. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105:20752-20757.

- Wojewodzka, M., Buraczewska, I., and Kruszewski, M. (2002) A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-singlestranded DNA antibody. Mutation research 518:9-20.
- Wu, X., Shell, S.M., Liu, Y., and Zou, Y. (2007) ATR-dependent checkpoint modulates XPA nuclear import in response to UV irradiation. Oncogene 26:757-764.
- Wu, X., Shell, S.M., Yang, Z., and Zou, Y. (2006) Phosphorylation of nucleotide excision repair factor xeroderma pigmentosum group A by ataxia telangiectasia mutated and Rad3related-dependent checkpoint pathway promotes cell survival in response to UV irradiation. Cancer research 66:2997-3005.
- Zachos, G., Rainey, M.D., and Gillespie, D.A. (2003) Chk1-deficient tumour cells are viable but exhibit multiple checkpoint and survival defects. The EMBO journal 22:713-723.
- Zou, L., and Elledge, S.J. (2003) Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPAssDNA complexes. Science (New York, N.Y 300:1542-1548.
- Zou, L., Liu, D., and Elledge, S.J. (2003) Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100:13827-13832.

6 Anhang

7-AAD	7-Amino-Aktinomycin D
Ab	Antibody/Antikörper
ATM	Ataxia teleangiectasia mutated
ATR	Ataxia teleangiectasia mutated related
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BCA	Bicinchoninsäure
hidest	hidestilliert
BIR	break-induced replication
BIM	Bloom Syndrom Protein
	broast cancer
	bovinos Sorumalbumin
	Chinopa Hamatar Quary
	Chiorodesoxyundine
DAPI	4',6-Diamidino-2-pnenylindoldinydrochlorid
DMSO	Dimetnyisuifoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure/deoxyribonucleic acid
DSB	double strand break/Doppelstrangbruch
DSBR	DSB-Reparatur
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	1,4-Dithiothreit
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E. coli	Escherichia coli
EMS	Ethyl-Methansulfonat
Ercc/ERCC	Excision repair cross complementing
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fötales Kälberserum
Hepes	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HNPCC	hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom
HR	homologe Rekombination
HRP	Meerrettich-Peroxidase/Horseradish-Peroxidase
H. sapiens	Homo sapiens
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
ldU	Iododesoxyuridine
la	Immunglobulin
irs	ionizing radiation-sensitive
kd	Kilo-Dalton
Kb/min	Kilobasen in der Minute
k.o.	Knockout
LFA	Lipofectamine 2000
MEM	Minimum Essential Medium
MMC	Mitomycin C
MMS	Methyl-Methan-Sulfonat
mRNA	messenger RNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NER	Nukleotidevzisionsrenaratur
	nicht-bomologes Endioining
	ohne alles"_Medium
	Nigofectamine
μ. <i>Α</i> .	zui Allaiyst
FDO	ทางรุกาลเย-มนแยเยน รสแแย

PBST	PBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20
PBS+	PBS mit 0,15 % Glycin und 0,5 % BSA
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rad	Strahlung/radiation
Rad51	Gen aus Nagern
RAD51	Protein aus Nagern, Menschen, Hühnern
RAD51	Gen aus Hefe, Menschen, Hühnern
RAD51H	RAD51-Homolog
RAD51L	RAD51-like
Rad51p	Protein aus Hefe
RecA	bakterielles Protein
recA	bakterielles Gen
RNA(s)	Ribonukleinsäure/ribonucleic acid(s)
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RPA	Replikationsprotein A
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat/Dodecylsulfat Natriumsalz
SDSA	synthesis-dependent strand annealing
ssDNA	einzelsträngige DNA
SSA	single strand annealing
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TG	Tris-Glycin-Puffer
ТКО	TransIT-TKO
Tyr	Tyrosin
wt	Wildtyp
Xrcc/XRCC	x-ray cross complementing
xrs	x-ray-sensitive

Publikationen

A.Parplys, Eva Petermann, Cordula Petersen, Ekkehard Dikomey, Kerstin Borgmann. DNA damage by X-rays and their impact on replication processes. Submitted to Radiotherapy and Oncology, August 2011.

Präsentationen

A.Parplys, Eva Petermann, Ekkehard Dikomey, Kerstin Borgmann. DSBs are the most toxic lesions for the replication elongation and origin firing induced by irradiation. Poster presentation at the International Wolfsberg meeting on Molecular Radiobiology and Oncology, Ermatingen, Schweiz, 2011

A.Parplys, Eva Petermann, Horst-Werner Stürzbecher, Ekkehard Dikomey, Kerstin Borgmann. Excess of RAD51 affects replication initiation and elongation after DNA-damage induction. Poster presentation at the 56th annual meeting of the Radiation research society "Oceans of opportunity", Maui, Hawaii, 2010.

A.Parplys, Eva Petermann, Horst-Werner Stürzbecher, Ekkehard Dikomey, Kerstin Borgmann. Excess of RAD51 affects replication initiation and elongation after DNA-damage induction. Poster Präsentation bei der GBS Tagung in Hamburg, 2010.

A.Parplys, Eva Petermann, Horst-Werner Stürzbecher, Ekkehard Dikomey, Kerstin Borgmann. Effect of RAD51 overexpression on replication initiation and elongation after DNA damage induction. Poster Präsentation bei der GBS Tagung in Essen, 2009.

A.Parplys, Eva Petermann, Ekkehard Dikomey, Kerstin Borgmann. Rad51 overexpression reduces replication fork progression. Poster presentation at the Workshop "Women in Radiation Sciences- a Century after Marie Curie", München, 2009

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei PD Dr. Kerstin Borgmann bedanken, die meine Arbeit betreut hat. Würde es das Wort Doktormutter nicht geben, müsste es für Kerstin neu erfunden werden: es war eine großartige Betreuung in den letzten Jahren. Ich danke Kerstin für die große Unterstützung und Motivation zu jeder Zeit, für das Vertrauen in meine Arbeit, die große Begeisterung gemeinsam die neuen Wege der DNA-Replikation zu gehen, für die vielen Chancen, die ich durch sie bekommen habe und für die Möglichkeit an so vielen Tagungen an den schönsten Orten der Welt teilzunehmen.

Ein ebenso großer Dank geht an Prof. Dr. Ekkehard Dikomey, der mir die Möglichkeit gegeben hat, die Arbeit an diesem Institut durchzuführen. Ich danke Ekkehard für die guten Diskussionen, für seinen scharfen Blick auf die Daten, indem er aus komplizierten Ansichten von Kerstin und mir ganz einfach klare Zusammenhänge schaffen konnte und vorallem für die tolle Unterstützung in meiner Endphase als mein persönlicher Held der Formatierungskünste

Bei Prof. Dr. W. Schäfer möchte ich mich für die Betreuung seitens des Fachbereiches Biologie und für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Prof. Dr. U.Wienand möchte ich für die Übernahme des Disputationsgutachtens danken.

PD Dr. H. Lüthen danke ich für die Übernahme der Leitung des Promotionsausschusses.

Prof. Dr. Jochen Dahm-Daphi danke ich für vielen guten Diskussionen und Anregungen und für das große Interesse an meiner Arbeit.

Ich möchte mich bei Dr. Eva Petermann bedanken. Dank ihrer Hilfe konnte ich die Technik des DNA-Fibre-Assays erlernen. Außerdem stand Eva mir bei Problemen ständig und sofort mit Rat und Tat zur Seite.

Ganz besonders möchte ich mich bei Alexandra Zielinski bedanken. Alex ist nicht nur die gute Seele unserer Arbeitsgruppe, sie hat diese Arbeit auch durch ihr ständiges Engagement in Sachen Western-Blot und Chromosomenaberrationen unterstützt. Dazu wurde man immer mit kleinen Aufmerksamkeiten aus der Heimat oder aus der Snackbox versorgt.

Jasna Seelbach danke ich als neues Mitglied unserer Arbeitsgruppe für das unermütliche Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ich möchte mich besonders bei Sabrina Köcher bedanken. Die gemeinsamen Jahre als Tischnachbarin, Kollegin und Freundin waren sehr schön und haben die Doktorandenzeit zu einer tollen Zeit gemacht.

Ich bedanke mich bei allen weiteren und ehemaligen Mitarbeitern des Labors. Jeder einzelne hat zu dem großen Spaß und der Freunde jeden Tag gerne zur Arbeit zu kommen beigetragen. Hervorheben möchte ich die tolle Organisation innerhalb des Labors, die ohne Britta Riepen nicht möglich wäre.

Ich danke meinen Mädels, die mich in den letzten Monaten ertragen haben. Danke an Kerstin, Doro und Celine fürs Korekturlesen; Laura und Benny für das Bereitstellen ihrer Wohnung in der Endphase. Ein ganz besonderer Dank geht an dieser Stelle vor allem an Meike und Nico, die in dieser Zeit besonders für mich da waren.

Ich danke Hendrik für die Versorgung mit Motivations- und Durchhalte-Paketen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner ganzen Familie, die mich immer unterstützt haben und immer an mich geglaubt haben. Ohne euch hätte ich es nicht so weit bringen können.