

Bedeutung der Expression von RAD51
für die Reparatur von DNA-Schäden mittels
Homologer Rekombination in humanen
Tumorzelllinien

Dissertation

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

vorgelegt von
Jasna Irena Seelbach
aus Bremen

Hamburg, August 2014

1. Gutachter: Prof. Dr. Ekkehard Dikomey

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Christian Betzel

Tag der Disputation: 24. Oktober 2014

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	vii
1 Zusammenfassung	1
2 Summary	3
3 Einleitung	5
3.1 Tumorthherapie	5
3.1.1 RAD51 als Biomarker für die Tumorthherapie	6
3.2 Bedeutung der Homologen Rekombination für die Tumorentstehung	7
3.2.1 Brustkrebstumoren	8
3.2.2 Kopf-Hals-Tumore	8
3.3 Auswirkung einer RAD51-Überexpression in Tumorzellen	8
3.4 Bedeutung der Homologen Rekombination in der DNA-Reparatur . .	11
3.4.1 DNA-Doppelstrangbruchreparatur	11
3.4.2 Reparatur von DNA-DNA-Vernetzungen	17
3.4.3 Basenexzisionsreparatur	18
3.5 DNA-Schadensantwort in der S-Phase	18
3.6 Ziel der Arbeit	19
4 Material und Methoden	21
4.1 Material	21
4.1.1 Zelllinien	21
4.1.2 Plasmide	22
4.1.3 Antikörper	22
4.1.4 Chemikalien	24
4.1.5 Zusammensetzung der Puffer und Lösungen	27
4.1.6 Kits	29

4.1.7	Verbrauchsmaterialien	31
4.1.8	Geräte	32
4.1.9	Software	33
4.2	Methoden	34
4.2.1	Zellkultivierung	34
4.2.2	Schädigung der Zellen	35
4.2.3	Inhibition von RAD51	36
4.2.4	siRNA Behandlung	36
4.2.5	Bestimmung der Reparaturkompetenz durch Homologe Re- kombination (HR-Kapazität)	37
4.2.6	Nachweis von Proteinen der Homologen Rekombination	43
4.2.7	Zellulärer Nachweis von RAD51- und 53BP1-Foci	48
4.2.8	Zellzyklusuntersuchung am Durchflusszytometer	50
4.2.9	Zelluläres Überleben im Koloniebildungstest	51
4.2.10	Statistik	51
5	Ergebnisse	53
5.1	Methodische Vorarbeiten	54
5.1.1	Etablierung des Plasmid-Rekonstruktions-Assay zum Nach- weis der DSB-induzierten Reparatur mittels HR in Tumor- zelllinien	54
5.1.2	Vergleichbarkeit der RAD51- und 53BP1-Foci-Zählung mit dem Auge und nach automatisierter Zählung	59
5.1.3	Inhibition von RAD51 mittels Inhibitor	62
5.1.4	Inhibition von RAD51 mittels siRNA	66
5.2	Einfluss von RAD51 auf die HR-Kapazität in BrCa- und HNSCC- Zelllinien	67
5.2.1	Endogene RAD51-Expression in BrCa- und HNSCC-Zelllinien	67
5.2.2	HR-Kapazität in BrCa- und HNSCC-Zelllinien	71
5.2.3	Auswirkung von Einflussfaktoren auf die relative HR-Kapazität	73
5.3	Zelluläres Überleben nach MMC-Schädigung in BrCa- und HNSCC- Zelllinien	79
5.4	Phosphorylierung von CHK1 nach MMC-Schädigung in BrCa- und HNSCC-Zelllinien	82
5.5	Phosphorylierung von CHK1 nach UV-Behandlung in <i>FaDu</i> - und <i>HSC4</i> -Zellen	85
5.6	Zusammenfassung 1	86

5.7	RAD51- und 53BP1-Foci nach MMC-Schädigung in <i>FaDu</i> - und <i>HSC4</i> -Zellen	87
5.8	S/G2-Phase-Arrest nach MMC-Schädigung in <i>FaDu</i> - und <i>HSC4</i> -Zellen	89
5.9	Auswirkung einer RAD51-Inhibition auf das zelluläre Überleben nach MMC-Schädigung	90
5.10	Auswirkung einer RAD51-Inhibition auf die relative HR-Kapazität .	92
5.11	Zusammenfassung 2	94
6	Diskussion	95
6.1	Methodische Vorarbeiten	95
6.2	RAD51-Expression in BrCa- und HNSCC-Zelllinien	98
6.3	Auswirkung von Unterschieden in der RAD51-Expression auf die HR-Kapazität	99
6.3.1	Einfluss der Zellzyklusverteilung auf die HR-Kapazität	101
6.3.2	Fähigkeit zur RAD51-Filamentbildung	101
6.3.3	Fähigkeit zum Transport von RAD51 in den Kern	102
6.3.4	Expression weiterer HR-assoziiierter Proteine	102
6.4	Bedeutung der RAD51-Expression für das zelluläre Überleben nach MMC-Schädigung	103
6.5	Aktivierung des Intra-S-Phase-Kontrollpunktes nach MMC-Schädigung	106
6.6	Bedeutung der Aktivierung von CHK1 für die MMC-Empfindlichkeit	108
6.6.1	Doppelstrangbrüche in replizierenden Zellen	108
6.6.2	Zellzyklusverteilung nach MMC-Schädigung	109
6.7	Abgrenzung zwischen der HR-Kapazität und der zellulären MMC-Empfindlichkeit	110
6.8	Modell	110
	Literaturverzeichnis	113
	Abkürzungsverzeichnis	135
	Auflistung der Gefahrstoffe nach GHS	139
	Danksagung	141
	Publikationen	143
	Eidesstattliche Erklärung	145

Abbildungsverzeichnis

3.1	DNA-Schadensspektrum für die Reparatur mittels Homologer Rekombination.	11
3.2	Reparaturwege für DNA-Doppelstrangbrüche.	13
3.3	Reparatur von zwei- und ein-endigen Doppelstrangbrüchen über die Homologe Rekombination.	15
4.1	Schematische Darstellung des Reparaturkonstrukts pGC.	38
4.2	Schematische Darstellung der Zellfraktionierung.	45
5.1	Vergleich der Transfektionseffizienz und des Verhältnisses von Transfektionsagenz zu Kontrollplasmid zweier Transfektionsagenzien nach transienter Transfektion.	55
5.2	Einfluss des Inkubationszeitraumes auf die HR-Kapazität in vier Zelllinien.	57
5.3	Immunfluoreszenz-Nachweis von RAD51 und 53BP1 im Zellkern einer S-Phase-Zelle.	59
5.4	Anzahl an RAD51- und 53BP1-Foci in replizierenden Zellen nach Zählung mit dem Auge und nach automatisierter Zählung.	61
5.5	HR-Kapazität nach Inhibition von RAD51 durch den Inhibitor RI-1.	63
5.6	Anzahl an RAD51- und 53BP1-Foci nach Inhibition mit RI-1 16 h nach Bestrahlung in <i>HSC4</i> -Zellen.	65
5.7	Inhibition der RAD51-Expression nach siRNA <i>Knockdown</i> in zwei HNSCC-Zelllinien.	66
5.8	Endogene RAD51-Expression in zehn BrCa-Zelllinien.	68
5.9	Endogene RAD51-Expression in zehn HNSCC-Zelllinien.	68
5.10	Vergleich der endogenen RAD51-Expression in BrCa- und HNSCC-Zelllinien.	69
5.11	Anteil an S/G2-Phase-Zellen in BrCa- und HNSCC-Zelllinien.	70

5.12	HR-Kapazität im Plasmid-Rekonstruktions-Assay in BrCa- und HNSCC-Zelllinien.	72
5.13	S-Phase-Anteil nach Plasmid-Transfektion in BrCa- und HNSCC-Zelllinien.	74
5.14	Endogene Expression von BRCA2, ATR und FANCD2 in BrCa-Zelllinien.	76
5.15	Anteil von RAD51 im Kern nach DNA-Schädigung in vier HNSCC-Zelllinien.	78
5.16	RAD51-Fokusbildung in HNSCC-Zelllinien mit moderat oder viel RAD51.	79
5.17	Zelluläres Überleben nach MMC-Schädigung in BrCa-Zelllinien . . .	80
5.18	Zelluläres Überleben nach MMC-Schädigung in HNSCC-Zelllinien .	81
5.19	Phosphorylierung von CHK1 nach MMC-Schädigung in BrCa-Zelllinien.	83
5.20	Phosphorylierung von CHK1 nach MMC-Schädigung in HNSCC-Zelllinien mit viel RAD51.	84
5.21	Phosphorylierung von CHK1 nach UV-Bestrahlung in <i>FaDu</i> - und <i>HSC4</i> -Zellen.	86
5.22	RAD51- und 53BP1-Foci in replizierenden <i>FaDu</i> - und <i>HSC4</i> -Zellen nach MMC-Schädigung.	88
5.23	S/G2-Phase-Anteil nach MMC-Schädigung in <i>FaDu</i> - und <i>HSC4</i> -Zellen.	89
5.24	Einfluss der Inhibition der RAD51-Expression auf die zelluläre Empfindlichkeit nach MMC-Schädigung in <i>FaDu</i> - und <i>HSC4</i> -Zellen. . . .	91
5.25	Einfluss der RAD51-Inhibition auf die HR-Kapazität in HNSCC-Zelllinien.	93
6.1	Modell zur Erklärung der unterschiedlichen MMC-Empfindlichkeit in Zellen mit einer hohen RAD51-Expression	111

Tabellenverzeichnis

3.1	Prognostischer Wert einer RAD51-Überexpression für das Überleben von Tumorpatienten.	6
4.1	Tumorzelllinien.	21
4.2	Plasmide.	22
4.3	Antikörper.	23
4.4	Chemikalien.	24
4.5	Zusammensetzung der Puffer und Lösungen.	27
4.6	Kits.	29
4.7	Verbrauchsmaterialien.	31
4.8	Geräte.	32
4.9	Kulturmedien für die verwendeten Zelllinien	34
4.10	Zielsequenzen der siGENOME SMARTpool siRNA gegen RAD51.	37
4.11	Bedingungen für den Kontrollverdau von p-EGFPN1 und pGC	40
5.1	Transfektionseffizienzen in BrCa- und HNSCC-Zelllinien.	58
6.2	Auflistung der Gefahrstoffe nach GHS.	139

KAPITEL 1

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es zu klären, warum eine erhöhte RAD51-Expression, welches das Schlüsselprotein der Homologen Rekombination (HR) ist, in vielen Tumorentitäten zu einer negativen Prognose für das Überleben der Tumorpatienten führt. Für Brust (BrCa)- und Kopf-Hals (HNSCC)-Tumore sollte daher anhand von jeweils zehn Zelllinien untersucht werden, wie sich Unterschiede in der RAD51-Expression auf die Kapazität und Funktionalität der DSB-Reparatur mittels HR auswirken.

Es konnte gezeigt werden, dass für beide Tumorentitäten die Zelllinien jeweils ein sehr breites Spektrum in der RAD51-Expression aufwiesen, mit einer sehr niedrigen bis sehr hohen Expression. Die unterschiedliche Menge hatte in beiden Entitäten einen erheblichen Einfluss auf die Kapazität der HR. Zum Nachweis wurde dabei ein Reparaturplasmid verwendet, bei dem die intakte Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSBs) mit zwei offenen Enden (zwei-endig) mittels HR bestimmt wurde. Bei einer geringen RAD51-Expression war die HR-Kapazität jeweils nur sehr gering, bei einer moderaten RAD51-Expression dagegen immer am höchsten und bei einer hohen RAD51-Expression wiederum sehr gering. Für die BrCa-Zelllinien wurde ein Verhältnis von 0,4:1,0:0,3 und HNSCC-Zelllinien ein Verhältnis von 0,3:1,0:0,2 gefunden. Somit ermöglicht nur eine moderate RAD51-Expression eine maximale HR-Kapazität.

Die geringe HR-Kapazität in Zelllinien mit hoher RAD51-Expression ließ sich weder auf einen verminderten Kerntransport noch auf eine reduzierte Ausbildung von RAD51-Reparaturaggregaten zurückführen. Eine verminderte Akkumulation von Zellen in der S-Phase, welches eine Voraussetzung für die HR ist, konnte ebenfalls ausgeschlossen werden.

Die bei hoher RAD51-Expression beobachtete geringe HR-Kapazität bewirkte in fünf von sieben Zelllinien eine sehr hohe zelluläre Empfindlichkeit gegenüber

Mitomycin C (MMC). Zwei der Zelllinien zeigten jedoch trotz einer verminderten HR-Kapazität eine Resistenz gegenüber MMC. MMC führt dabei über eine Störung der Replikation zu DSBs mit nur einem offenen Ende (ein-endig). Diese Resistenz war abhängig von RAD51, da eine RAD51 Inhibition zu einer starken Sensitivierung der Zellen gegenüber MMC führte. In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der Intra-S-Phase Signalkaskade hierfür entscheidend war. Bei Zelllinien, die eine hohe RAD51-Expression aufwiesen, bewirkte damit eine erhöhte CHK1 (*Checkpoint* Kinase 1)-Expression mit einer intakten Aktivierung eine Resistenz gegenüber MMC.

Zusammenfassend kann in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass eine erhöhte RAD51-Expression immer zu einer verminderten Reparatur von zwei-endigen DSBs mittels HR führte. Die Reparatur von ein-endigen DSBs an der Replikationsgabel mittels HR wird aber neben der RAD51-Expression auch durch die Stärke der übergeordneten CHK1-vermittelten Signalkaskade bestimmt.

Die negative Prognose für Tumorpatienten mit erhöhter RAD51-Expression kann somit in der Regel auf eine verminderte HR-Kapazität und damit erhöhte genomische Instabilität der Zellen zurückgeführt werden. Bei gleichzeitig erhöhter CHK1 Expression mit entsprechend ausgeprägter Signalkaskade könnte aber auch eine Zunahme in der Therapieresistenz die Ursache für die schlechte Prognose sein. Deshalb sollte in zukünftigen klinischen Studien sowohl die RAD51-Expression als auch die CHK1-Expression als Biomarker für eine Prognose überprüft werden.

KAPITEL 2

Summary

The aim of this study was to elucidate why a highly elevated expression of RAD51, key player of homologous recombination (HR), was identified as a negative prognostic marker for the survival of tumor patients in several kinds of tumor. For investigations ten breast cancer (BrCa) and ten head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cell lines were chosen, in which the effect of different levels of RAD51-expression on capacity and functionality of double-strand break (dsb) repair via HR was analyzed.

This study revealed a broad spectra of RAD51-expression in each tumor entity, ranging from a very low to a very high RAD51-expression. Differences in RAD51-expression highly influenced the capacity of HR.

For investigations of the HR-capacity a repair plasmid containing a dsb with two open ends (two-ended) was used. A low RAD51-expression revealed a low HR-capacity, a moderate RAD51-expression the highest HR-capacity and a high RAD51-expression a low HR-capacity again. BrCa cell lines displayed a ratio of 0,4:1,0:0,3 und HNSCC cell lines a ratio of 0,3:1,0:0,2. Therefore, only a moderate RAD51-expression allowed a maximal HR-capacity.

The low HR-capacity in cell lines with a high RAD51-expression was neither due to a diminished transport to the nucleus nor a reduced formation of RAD51-foci. A reduced accumulation of cells in the S-phase in cell lines with a high RAD51-expression, which is a requirement for HR, was also excluded.

A high RAD51-expression with a low HR-capacity revealed a high cellular sensitivity to treatment with Mitomycin C (MMC) in five out of seven cell lines. Although two cell lines expressed a great resistance against MMC, despite their low HR-capacity. MMC causes dsbs with only one open end (one-ended) by interfering with replication. This resistance was due to RAD51, because inhibition of RAD51 sensitized those cells to MMC-treatment. Further experiments showed that activation of the intra-s-phase cascade was crucial for the mentioned cellular sensitivity. In

cell lines with a high RAD51-expression an elevated CHK1-expression in addition to a its proper activation contributed to the observed resistance.

Taken together, this study shows for the first time that a high RAD51-expression always caused a diminished repair of two-ended dsbs via HR. In contrast, for repair of one-ended dsbs at replication forks via HR the level of upstream CHK1-faciliated signaling was crucial in addition to a high RAD51-expression.

In conclusion, the negative prognosis for tumor patients with a high RAD51-expression ordinarily can be attributed to a diminished HR-capacity and an elevated genomic instability of tumor cells. A simultaneously elevated CHK1-expression in addition to a functional signaling can also cause a higher resistance to tumor therapie. Therefore, in future clinical trials the RAD51-expression as well as the CHK1-expression should be included as biomarkers for prognosis.

KAPITEL 3

Einleitung

Das mittlere 5-Jahresüberleben aller Krebserkrankungen liegt bei nur etwa 60 % [132]. Daher ist es dringend erforderlich, aktuelle Therapien, die in der Regel aus Chirurgie in Kombination mit einer Radio- und/oder Chemotherapie bestehen, gezielt zu intensivieren. Voraussetzung für eine Intensivierung ist das genauere Verständnis der Überlebensstrategien von Tumorzellen, insbesondere der molekularen Reparaturmechanismen und der entsprechenden Signalkaskaden, sowie die Identifizierung von prädiktiven Biomarkern. Der für eine Zelle schwerwiegendste Schaden ist der DSB. Die HR ist der Hauptreparaturweg von DSBs während der S-Phase. In Tumoren sind Reparaturwege häufig dereguliert, was einen großen Einfluss auf die Prognose haben kann. So wird für Patienten, deren Tumore das Schlüsselprotein der HR RAD51 überexprimieren, ein deutlich kürzeres Überleben beobachtet. Eine hohe Expression von RAD51 in Tumoren könnte somit ein potentieller Biomarker für die intensivierte Tumorthherapie sein. Es wird daher vermutet, dass die Überexpression von RAD51 entweder eine Resistenz gegenüber den eingesetzten Tumorthérapien bewirkt oder aber durch unkontrollierte Reparatur zur Malignität der Tumore beiträgt.

3.1 Tumorthherapie

Das Ziel einer jeden Tumorthherapie ist die maximale Eliminierung von Tumorzellen. Die Tumorthherapie lässt sich in drei Säulen untergliedern: Die operative Entfernung von Tumorgewebe, die Strahlentherapie und die Chemotherapie. Dabei werden diese drei Therapieformen häufig kombiniert. Bei der Strahlen- und Chemotherapie steht die maximale DNA-Schädigung von Tumorzellen im Vordergrund. Bei der Strahlentherapie wird ein breites Schadensspektrum induziert. So induziert eine Dosis von 1 Gy in einer humanen Zelle etwa 4000–5000 Basenschäden (BDs), 1000

DNA-Einzelstrangbrüche (SSBs), 150 DNA-DNA- und DNA-Proteinvernetzungen sowie 20–40 DSBs auf [9]. In der Chemotherapie wird dagegen gezielt die replikative S-Phase durch DNA-DNA-vernetzende Agenzien oder Inhibitoren angegriffen [60].

Der Gegenspieler bei der Eliminierung von Tumorzellen ist die DNA-Reparatur, deren Inhibition in der modernen, vermehrt individualisierten Tumorthherapie zur Sensitivierung der Tumore genutzt wird [60]. Eine Vielzahl von Tumoren entwickelt im Laufe ihrer Tumorigenese außerdem Defekte in der DNA-Reparatur. Diese Defekte können über den gezielten Einsatz von Chemotherapeutika ausgenutzt werden. Für die Identifizierung dieser Defekte müssen jedoch zunächst Biomarker erkannt werden.

3.1.1 RAD51 als Biomarker für die Tumorthherapie

RAD51 ist das Schlüsselprotein der HR, dem Hauptreparaturweg von DSBs in der S-Phase. In Tumorgewebe unterscheidet sich die RAD51-Expression deutlich und das Tumorgewebe kann hinsichtlich der RAD51-Expression in folgende Gruppen klassifiziert werden: RAD51-negative Tumore, Tumore mit einer schwachen RAD51-Expression, einer moderaten RAD51-Expression und einer Überexpression von RAD51 [3, 85, 87, 109, 125, 146, 154, 165].

Für Tumoren mit einer RAD51-Überexpression konnte mehrheitlich eine negative Prognose für das Überleben der Patienten beschrieben werden, sodass Patienten mit einer Überexpression von RAD51 in ihren Tumoren eine besondere Therapieform benötigen könnten. Tabelle 3.1 stellt eine Übersicht der klinischen Studien dar, die einen prognostischen Wert einer RAD51-Überexpression für das Überleben von Tumorpatienten beschreiben.

Tabelle 3.1: Prognostischer Wert einer RAD51-Überexpression für das Überleben von Tumorpatienten.

Studie	Tumorentität	Patienten	Prognose
Qiao et al., 2005 [125]	Lunge	383	negativ
Mitra et al., 2009 [109]	Prostata	20	negativ
Le Scodan et al., 2010 [85]	Brust	97	negativ
Li et al., 2011 [87]	Speiseröhre	230	negativ
Tennstedt und Fresow, 2012 [154]	Kolon	1206	negativ
Allera-Moreau et al., 2012 [3]	Lunge	93	negativ
Söderlund et al., 2007 [146]	Brust	212	positiv

weiter auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle 3.1

Studie	Tumorentität	Patienten	Prognose
Welsh et al., 2009 [165]	Gliom	68	positiv

Die Ursache für die mehrheitlich negative Prognose für das Überleben von Tumorpatienten mit einer RAD51-Überexpression in den Tumoren ist biologisch nicht geklärt. Ein mögliche Erklärung wäre eine Therapieresistenz durch eine verbesserte DNA-Reparatur mittels HR. So konnten Tennstedt und Fresow (2012) [154] zeigen, dass kolorektale Adenokarzinome mit einer Überexpression nach einer Strahlen- und Chemotherapie eine deutlich geringere Überlebensrate zeigten. Eine weitere Erklärung könnte eine erhöhte genomische Instabilität in den Tumoren sein, die zu einer höheren Malignität der Tumore führen würde. So konnte bei einer RAD51-Überexpression eine höhere Aggressivität von Tumoren beobachtet werden [96, 105, 109, 131]. Mitra et al. (2009) [109] konnten diesbezüglich für Tumorpatienten mit einer Überexpression von RAD51 in ihren Tumoren, die lediglich operiert wurden, eine negative Prognose für das Überleben zeigen. Diese Studie stellt die weitverbreitete Annahme in Frage, dass Tumorpatienten mit einer Überexpression an RAD51 durch eine Therapieresistenz der Tumore sterben.

3.2 Bedeutung der Homologen Rekombination für die Tumorentstehung

Endogene DNA-Schäden wie BDs, SSBs und DSBs können bei einer defekten DNA-Reparatur zu Mutationen führen. Chromosomale Mutationen wie Translokationen, Insertionen oder Deletionen stellen dabei die größte Gefahr für das Genom dar. Diese Art von chromosomalen Mutationen resultieren mehrheitlich aus nicht reparierten DSBs, die während der Replikation entstehen und mittels HR repariert werden. Defekte in der HR führen damit vermehrt zu solchen Mutationen, die zu einer genomischen Instabilität beitragen, die wiederum die Ursache für die Entstehung von Tumoren sein kann. Defekte in der HR rühren dabei vermehrt aus Mutationen in für die HR relevanten Genen; beispielsweise BRCA1 (*breast cancer 1*) und BRCA2 in Brustkrebstumoren [107, 168], RAD54 und CtIP (*C-terminal-binding protein interacting protein*) in Non-Hodgkin-Lymphome und Kolonkarzinome sowie BLM (*Bloom's syndrome*) [62, 167], WRN (*Werner syndrome*) und NBS1 (*Nijmegen-Breakage-syndrom 1*) in anderen Tumorentitäten [48, 106, 111]. Für RAD51 konnte kein solches Phänomen beobachtet werden. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass

eine Deletion von RAD51 embryonal lethal ist [156].

3.2.1 Brustkrebstumoren

Die vermehrte Entstehung von Brustkrebstumoren bei Defekten in Genen der HR ist am besten beschrieben. Es ist eine Vielzahl an Risikogenen identifiziert worden, die entweder direkt oder regulatorisch dem DSB-Reparaturweg der HR zuzuordnen sind [162]. Zu den Hoch-Risikogenen zählen BRCA1 und BRCA2, p53 und PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), gefolgt von den Risiko-Genen, CHK2 (*checkpoint Kinase 2*), ATM (*Ataxia-Telangiectasia-mutated*), NBS1, RAD50, BRIP1 (*BRCA1-interacting protein 1*) und PALB2 (*Partner and localizer of BRCA2*). Trägerinnen dieser Gene oder Patientinnen, die mit Trägerinnen im ersten Grad verwandt sind, haben ein deutlich erhöhtes Risiko, frühzeitig Brustkrebs zu entwickeln [35, 162]. In diesem Zusammenhang ist besonders interessant, dass gerade solche Patienten mit Gendefekten in der HR junge Patientinnen sind. Etwa eine von 300 Frauen mit der Diagnose Brustkrebs ist jünger als 40 Jahre, bei den unter 45jährigen liegt der Anteil bei etwa 10% [114]. Das frühzeitige Auftreten eines Mammakarzinoms zeigt sich als Haupttodesursache bei jungen Frauen mit Krebs [1].

Erste Untersuchungen unter Verwendung eines Plasmid-Rekonstruktionsassays zeigten, dass in primären Zellen von Patientinnen mit sporadischem Brustkrebs vermehrt fehlerhafte DNA-Reparaturprozesse aktiv sind, wie die Mikro-Homologie vermittelte und die nicht-konservative HR [73, 74]. Diese Verlagerung zu fehlerhaften Reparaturprozessen wird als Hinweis auf eine erhöhte genomische Instabilität und damit als Antrieb einer frühzeitigen Tumorigenese angesehen.

3.2.2 Kopf-Hals-Tumore

Für die Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren ist bislang keine höhere Inzidenz für Mutationsträger der HR beschrieben. Hier konnten lediglich eine höhere Inzidenz zur Entstehung von HNSCC Tumoren bei Fanconi Anemia (FA) Patienten beobachtet werden. Zu den FA-Genen zählen jedoch wiederum Gene der HR wie BRCA1 und BRCA2 und PALB2. Deswegen gibt es auch für diese Tumorentität erste Hinweise auf eine Rolle von HR bei der Entstehung [83, 101, 133].

3.3 Auswirkung einer RAD51-Überexpression in Tumorzellen

RAD51 ist das Schlüsselprotein der HR, dem Hauptreparaturweg von DSBs in der S-Phase. Es bindet transient an einzel- und doppelsträngige DNA (ssDNA, dsDNA) und kann somit den für die HR entscheidende Strandinvasion und die

Homologiesuche vollführen. RAD51 ist außerdem während der Replikation von großer Bedeutung: einerseits für die Reparatur von Replikations-assoziierten DSBs [134] und andererseits für die Stabilisierung von Replikationsgabeln [56, 138].

In ausdifferenziertem Normalgewebe wird RAD51 nicht exprimiert, lediglich in proliferierendem, nicht ausdifferenziertem Gewebe wie Thymus, Testis oder Ovar [112, 141, 156]. Die Untersuchung der zellulären Funktion ist dadurch erschwert, dass Mausembryonen mit einem *Knock-out* des RAD51 Gens nicht lebensfähig sind [156]. In Tumorgewebe ist mehrheitlich eine erneute Expression von RAD51 zu beobachten [3, 85, 87, 95, 109, 125, 146, 154, 165]. Auch in Tumorzelllinien ist im Vergleich zu Fibroblastenzelllinien eine erhöhte RAD51-Expression beschrieben [41, 126]. Die erhöhte RAD51-Expression in Tumorzelllinien ist dabei durch eine erhöhte Expression des Proteins oder post-translationale Modifikationen bedingt, nicht durch Genamplifikationen [126]. Die Expression von RAD51 ist Zellzyklus-abhängig reguliert mit einer maximalen Expression in der S- und G2-Phase [19, 44].

Die Überexpression von RAD51 in Tumoren ist assoziiert mit onkogenen Veränderungen in der Genexpression von Tumorzellen, die sich während der Tumorigenese entwickeln. So führen Mutationen im Tumorsuppressorprotein p53 zu einer erhöhten Expression von RAD51, während die Wildtyp-Form die Expression von RAD51 unterdrückt [4, 55, 123]. Dies ist insofern bemerkenswert, als dass p53 als Wächter des Genoms angesehen wird. In Leukämiezellen konnte eine erhöhte RAD51-Expression durch die Expression der Tyrosin-Kinase BCR/ABL beobachtet werden. Diese Überexpression wurde einerseits durch eine erhöhte STAT5-abhängige Transkription von RAD51 bedingt und andererseits durch Inhibition der Degradation von RAD51 über Caspase-3 [64, 143]. Eine erhöhte RAD51-Expression wurde ebenfalls als Folge einer Überexpression der Onkogene *c-myc*, β -Catenine oder humanes Papilloma-Virus (HPV) Protein E7 beobachtet [123]. In jedem Fall stellt die erhöhte RAD51-Expression in Tumoren ein Ereignis dar, für das alle Tumorzelllinien im Verlauf ihrer Tumorigenese onkogene Mechanismen entwickelt haben müssen. Somit können alle beschriebenen Onkogene individuell ihren Einfluss haben. Auch eine fehlerhafte Regulation der Unterdrückung der RAD51-Expression durch microRNAs oder durch eine geringere PARP-1-Expression könnte zur erneuten Expression von RAD51 geführt haben [46, 57, 164].

Die transiente Überexpression von RAD51 führte in Tumorzellen zu einer Akkumulation der G2-Phase und induzierte Apoptose [77]. Eine erhöhte genomische Instabilität wurde ebenfalls mit einer Überexpression von RAD51 assoziiert. Dabei wurden vermehrt Translokationen und Aneuploidie beobachtet [131].

Die Auswirkung einer RAD51-Überexpression auf die DSB-Reparatur mittels HR ist sehr heterogen. *In-vitro*-Studien zeigen in isogenen Modellen einerseits eine

vermehrte Reparatur von DSBs mittels HR in Reporter-Assays [84, 174]. Andererseits ist jedoch auch eine Reduktion der DSB-induzierten Reparatur mittels HR beschrieben [76, 119]. Generell spiegelte sich bei Defekten in der HR die reduzierte Kompetenz in der Reparatur von DSBs mittels HR in einer erhöhten zellulären Empfindlichkeit von Zelllinien gegenüber verschiedenen Agenzien wider [89, 143, 179].

Für das zelluläre Überleben konnten infolge einer Überexpression von RAD51 ebenfalls konträre Beobachtungen gemacht werden. So konnte einerseits eine zelluläre Resistenz nach ionisierender Bestrahlung und Behandlung mit Agenzien, die Replikations-assozierte DSBs induzieren, beobachtet werden [94, 160]. Ein geringeres zelluläres Überleben wurde jedoch ebenfalls gezeigt [14, 102]. Dies jedoch lediglich, wenn die für die HR essentiellen Proteine BRCA1 und BRCA2 in ihrer Wildtyp-Form vorlagen. Bei Mutationen der Gene BRCA1 und BRCA2 bewirkte die Überexpression von RAD51 hingegen eine erhöhte Resistenz gegenüber DNA-DNA-vernetzenden Agenzien.

Ein vielfach erhöhtes Level an spontaner HR wurde nach einer RAD51-Überexpression in isogenen Modellen ebenfalls beobachtet [5, 160]. Die spontane HR ist nicht mit der DSB-induzierten HR zu verwechseln, sondern spiegelt wahrscheinlich die Reparatur von Replikations-assozierten Schäden oder aber eine unkontrollierte Reparatur wider. Dies könnten einerseits angehaltene Replikationsgabeln sein, die HR für die Wiederaufnahme der Replikation HR benötigen oder Replikations-assozierte DSB sein, die beim Kollabieren von Replikationsgabeln entstehen [134, 153].

Für die Reparatur eines DSBs mittels HR wird RAD51 zu einem Filament verknüpft, welches als so genannter RAD51-Fokus bezeichnet wird. Nach einer Überexpression von RAD51 konnte in Tumorzellen spontan, ohne exogene Schädigung, eine erhöhte Formation von RAD51-Foci beobachtet werden [94, 128, 174]. Dabei wurden vermehrt längere RAD51-Filamente beschrieben [128, 174]. Aufgrund der hohen Affinität von RAD51 gegenüber ssDNA, könnte die erhöhte Anzahl von RAD51-Foci auf ein unkontrolliertes Binden von RAD51 an ssDNA darstellen, wie sie an Replikationsgabel vorliegt [30, 147]. So konnte gerade in der Abwesenheit von RPA (*Replication protein A*), welches die Rekrutierung von RAD51 kontrolliert, ein stärkeres Binden von RAD51 an ssDNA beobachtet werden [147].

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die HR-Maschinerie zur Reparatur von DSBs nur funktional ist, wenn die beteiligten Proteine sich in einem stöchiometrischen Gleichgewicht zueinander befinden [86].

3.4 Bedeutung der Homologen Rekombination in der DNA-Reparatur

Die HR ist ein Multiproteinkomplex, der primär DSBs in der S-Phase repariert [72]. Einzigartig an der HR ist, dass sie nicht nur zwei-endige DSBs repariert, sondern auch ein-endige DSBs, wie sie während der Replikation generiert werden (vgl. Abbildung 3.1) [134]. Dies lässt die HR mit einer Vielzahl an Reparaturwegen wechselwirken und HR kann kompensatorisch für andere Reparaturwege eingreifen.

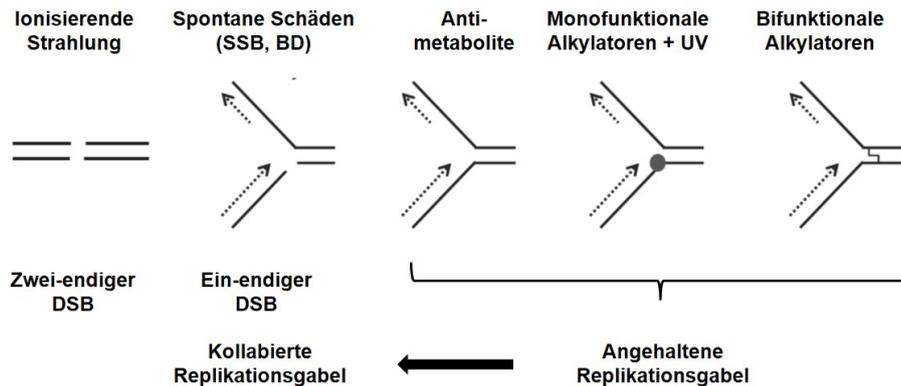


Abbildung 3.1: DNA-Schadensspektrum für die Reparatur mittels Homologer Rekombination (modifiziert nach Helleday (2010) [58]).

Die HR repariert DSBs mit zwei offenen Enden (zwei-endig) und einem offenen Ende (ein-endig). Zwei-endige DSBs werden beispielsweise durch ionisierende Strahlung induziert. Ein-endige DSBs entstehen replikations-assoziiert infolge der Prozessierung einer Vielzahl von DNA-Schäden.

BD Basenschaden, DSB Doppelstrangbruch, SSB Einzelstrangbruch, UV Ultraviolette Strahlung.

In der Reparatur von zwei-endigen DSBs konkurriert HR mit dem Nicht-homologen *Endjoining* (NHEJ) und dem *Single-Strand Annealing* (SSA). HR ist außerdem für die Reparatur von DNA-DNA-Vernetzungen (ICL-Reparatur) essentiell, bei der infolge der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) und *Translesionsynthesis* (TLS) ein replikations-assoziiertes DSB generiert wird, der HR für die Reparatur benötigt. SSBs werden mehrheitlich über die Basenexzisionsreparatur (BER) beseitigt. Trifft jedoch eine Replikationsgabel auf einen SSB, wird dieser in einen ein-endigen DSB umgewandelt, der wiederum HR für die Reparatur benötigt.

3.4.1 DNA-Doppelstrangbruchreparatur

Der DSB stellt für die Zelle den schwerwiegendsten DNA-Schaden dar, da beide Stränge der DNA-Doppelhelix gebrochen sind und somit keine direkte Sequenzvor-

lage für die Reparatur vorliegt. So kann ein einziger DSB bei einer nicht erfolgten Reparatur ein lethales Ereignis für die Zelle darstellen und die Zelle in den mitotischen Zelltod führen [47]. Die Generierung von DSBs hat verschiedene Ursachen. Sie können endogen Replikations-assoziiert in der S-Phase oder durch exogene Faktoren wie ionisierende Bestrahlung und DNA-schädigende Agenzien entstehen [9, 37, 134].

DSBs weisen verschiedene Strukturen auf, nämlich zwei-endige und ein-endige DSBs, wobei letztere Replikations-assoziiert sind [134]. Für die DSB-Reparatur stehen der Zelle in Abhängigkeit der Schadensstruktur und der Zellzyklusphase im Wesentlichen drei verschiedene Reparaturwege zur Verfügung: Das NHEJ, die HR und das SSA (vgl. Abbildung 3.2). Das NHEJ ist dabei der Hauptreparaturweg für DSBs. Für sterisch komplexe DSBs oder ein-endige DSBs in der S-Phase ist HR der Hauptreparaturweg [72]. Ob ein DSB über NHEJ oder HR repariert wird, wird durch die Proteine 53BP1 und BRCA1 bestimmt. Diese werden nach Induktion eines DSBs mittels RNF168 (*RING finger nuclear factor 168*) Zellzyklus-abhängig an den DSB rekrutiert. 53BP1 (p53-bindendes Protein 1) stimuliert das NHEJ, während BRCA1 die Homologie-vermittelte Reparatur (HR oder SSA) durch die Komplexbildung mit den Nuklease MRE11 und CtIP über die Resektion einleitet [21, 40, 136, 177]. Wurde die Homologie-vermittelte Reparatur eingeleitet, stellt die HR den Hauptreparaturmechanismus dar, der RAD51-vermittelt ist. Das SSA kann kompensatorisch bei Defekten in der HR eingreifen und ist unabhängig von RAD51 [99].

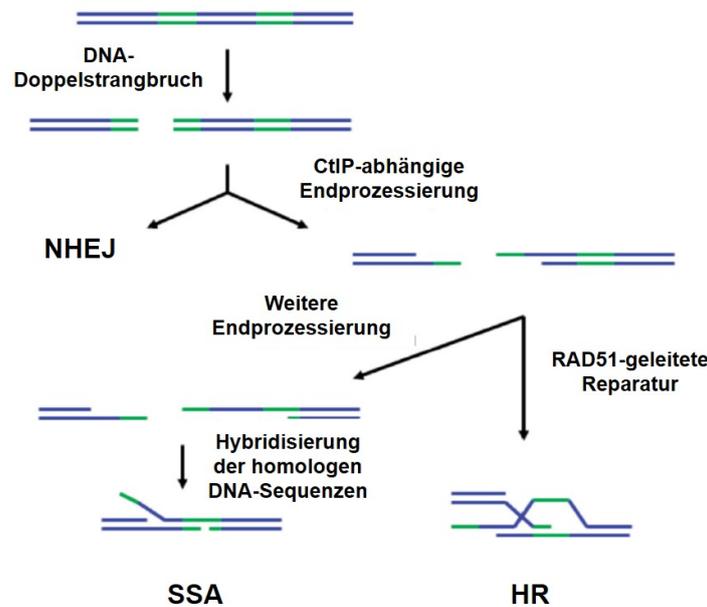


Abbildung 3.2: Reparaturwege für DNA-Doppelstrangbrüche (modifiziert nach Budke et al., 2012 [16]).

Nach Induktion eines DSBs wird die Reparatur entweder mittels dem NHEJ oder nach einer CtIP-abhängigen Resektion mittels der Homologie-vermittelten Reparaturwege HR und alternativ SSA eingeleitet.

HR Homologe Rekombination, NHEJ Nicht-homologes *Endjoining*, SSA *Single-Strand Annealing*

Nicht-homologes *Endjoining*

Das NHEJ stellt den Hauptreparaturweg für DSBs dar. Etwa 80 % aller DSBs werden mittels NHEJ repariert [34]. Das NHEJ ist während aller Zellzyklusphasen aktiv, besonders aber in der G₀/G₁- und der frühen S-Phase von Bedeutung [32]. Durch das NHEJ werden DSB-Enden direkt ligiert. Dieser Reparaturmechanismus benötigt keine Sequenzvorlage für die Reparatur, weswegen er in jeder Zellyklusphase agieren kann und besonders schnell ist [28].

Das NHEJ wird durch das Binden des Heterodimers KU70/80, das eine hohe DSB-Struktur-spezifische Bindungsaffinität zur DNA aufweist, an die gebrochenen DNA-Enden eingeleitet [17, 161]. KU70/80 rekrutiert den Cofaktor DNA-PK_{CS} (*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*) und bildet ein Holoenzym, wodurch dessen Kinaseaktivität aktiviert wird [173]. Dadurch wird die Prozessierung der DSB-Enden eingeleitet, damit die für die Ligation der DSB-Enden benötigten 5'-Phosphatende und 3'-Hydroxylende vorliegen. Dies erfolgt durch Endo- und Exonukleasen sowie Helikasen wie beispielsweise Artemis und WRN [20, 28]. Letztlich

werden die DSB-Enden durch den XRCC4-Ligase IV-XLF-Komplex (X-ray cross-complementig 1, *Xeroderma Pigmentosum group F*) ligiert [51].

Das NHEJ ist ein potentiell fehlerhafter Reparaturweg. Einerseits können bei der Prozessierung von DSB-Enden Deletionen auftreten oder aber nach Induktion von einer Mehrzahl an DSBs falsche Enden miteinander verknüpft werden [88].

Homologie-vermittelte Reparatur

Homologie-vermittelte Reparaturwege sind die HR mit RAD51 als seinem Hauptreparaturprotein und das SSA, das unabhängig von RAD51 ist. Während das SSA in allen Zellzyklusphasen aktiv sein kann, ist die HR lediglich in der S- und G2-Phase aktiv und stellt in der S-Phase des Zellzyklus den Hauptreparaturweg dar [72]. Die HR ist ein prinzipiell fehlerfreier Reparaturweg, da fehlerhafte oder fehlende Sequenzen neusynthetisiert werden können. Dafür benötigt die HR jedoch homologe Sequenzen, die in Form des Schwesterchromatids in der späten S- und G2-Phase vorliegen. Sie repariert sowohl zwei- als auch ein-endige DSBs, die während der Replikation generiert werden. Ein ein-endiger DSB ist das Resultat einer kollabierten Replikationsgabel, die nach dem Treffen auf einen DNA-Schaden generiert wird (vgl. Abbildung 3.1) [60].

Für die HR sind drei verschiedene Reparaturwege beschrieben: Das *Synthesis-dependent strand Annealing* (SDSA), das klassische *double-Holliday Junction* Modell und die *Breakage induced-Replication* (BIR) [60]. All diesen Wegen, auch dem SSA, geht jedoch als initiales Ereignis die 5'-3' Resektion und der dadurch resultierende einzelsträngige 3'-Überhang voraus, was durch den MRN (MRE11, RAD50, NBS1)-Komplex geschieht. Mit Ausnahme des SSA ist RAD51 das Schlüsselprotein dieser Reparaturwege. Der wichtigste Homologie-vermittelte Reparaturmechanismus für die Reparatur von zwei-endigen DSBs ist das SDSA [120]. Ein-endige DSBs werden über BIR repariert. Im Folgenden werden daher lediglich das SDSA, die BIR und das SSA näher beschrieben.

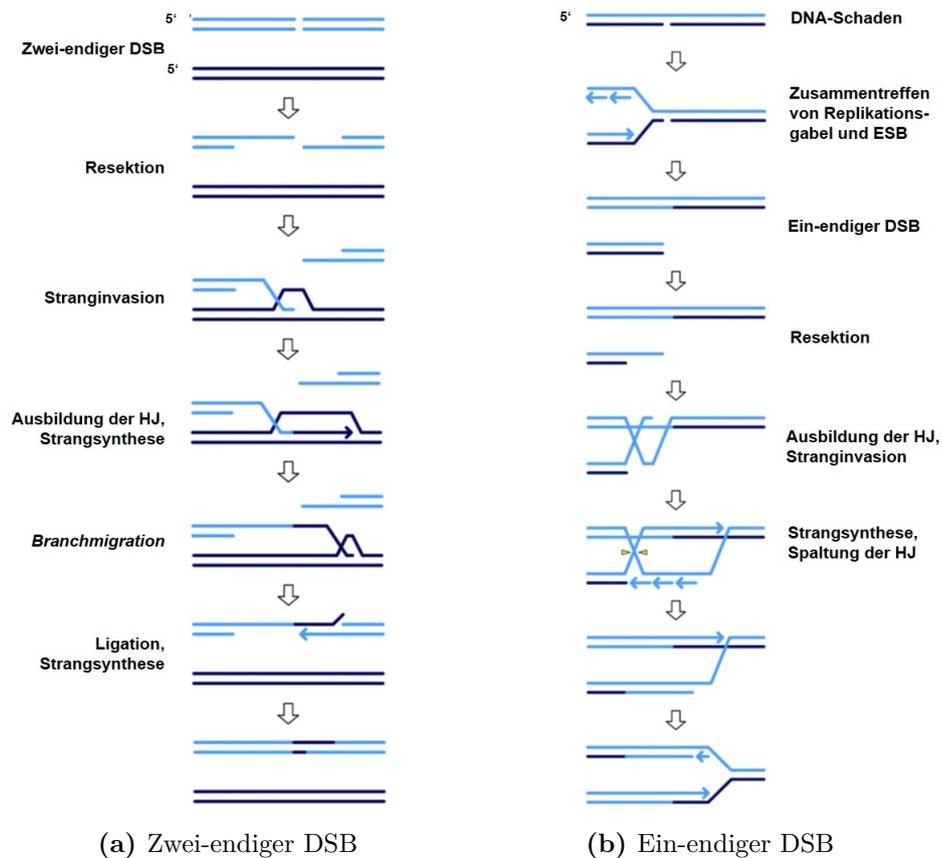


Abbildung 3.3: Reparatur von ein- und zwei-endigen Doppelstrangbrüchen über die Homologe Rekombination (modifiziert nach Helleday et al. (2008) [60]). Mittels HR können sowohl zwei- als auch ein-endigen DSBs repariert werden. Dargestellt ist das SDSA (a, Reparatur von zwei-endigen DSBs) und die BIR (b, Reparatur von ein-endigen DSBs). Eine nähere Beschreibung der Reparaturwege befindet sich im Text.
DSB Doppelstrangbruch, HJ *Holliday-Junction*

Zwei-endige DSB-Reparatur mittels HR Das SDSA wird als Hauptreparaturweg der HR für zwei-endige DSB beschrieben (vgl. Abbildung 3.3a). Die Resektion stellt das initiale Ereignis dar und ist in zwei Schritte unterteilt. Zunächst wird ein 3'-Überhang bis zu 100 bp über die Nukleasen MRE11 und CtIP induziert [136, 151]. Die weitere Resektion erfolgt über die Nukleasen DNA2 und EXO1 unter Mitwirken der Helikase BLM. Die generierte ssDNA wird von RPA gebunden und dadurch ein unkontrolliertes Binden der ssDNA an homologe Sequenzen oder untereinander verhindert. Über RPA wird dann über die Proteine ATRIP (*ATR-interacting protein*)/ATR/Claspin/CHK1 der Reparaturkomplex der HR eingeleitet

[61]. Das entscheidende Ereignis dafür stellt der Aufbau des RAD51 Nukleofilamentes dar, wodurch RPA von der ssDNA verdrängt wird. Dieser Prozess wird durch die Proteine BRCA2, RAD52, RAD54, PALB2 sowie den RAD51-Paralogen RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 und XRCC3 erleichtert [59, 172]. RAD51 ermöglicht die Invasion in das Schwesterchromatid und die Bildung einer Heteroduplex, bei der ein Strang des Schwesterchromatids verdrängt wird und ein sogenannter D-Loop entsteht. An der Schnittstelle zwischen Homo- und Heteroduplex wird eine X-förmige Struktur ausgebildet, die als *Holliday-Junction* (HJ) bezeichnet wird. Die HJ kann in beide Richtungen gleiten, was als *Branch-Migration* bezeichnet wird. Gleitet die HJ in Richtung der Replikation, wird der neusynthetisierte Strang freigegeben. Wenn der neusynthetisierte DNA die DSB-Sequenz überschritten hat, kann der neusynthetisierte Strang auf der anderen Seite des DSB wieder die Homoduplex ausbilden. Dieser Prozess wird durch die Proteine Pol η , WRN, BLM, p53, RAD54, RAD52, BLAP75 (*Bloom-associated protein of 75 kD*), hMSH2–hMSH6 (*human MutS Homolog 2–6*) unterstützt [59]. Überschüssige ssDNA wird durch die strukturspezifischen Endonukleasen XPF/ERCC1 (*Excision repair cross complementation group 1*) entfernt. Die Homoduplex wird ligiert und die fehlende einzelsträngige DNA aufgefüllt, wahrscheinlich unter Beteiligung der Proteine Pol δ/ϵ (Polymerase δ/ϵ), PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) und DNA-Ligase I [59].

Ein-endige DSB-Reparatur mittels HR Ein-endige DSBs werden Replikations-assoziiert generiert, beispielsweise wenn eine Replikationsgabel auf einen SSB trifft. Dieser Reparaturweg wird häufig als BIR bezeichnet. Im Gegensatz zu der Reparatur von zwei-endigen DSBs, für die es alternative Reparaturwege gibt, können ein-endige DSBs nur mittels HR repariert werden.

Der Prozess ist zunächst vergleichbar mit dem SDSA. Im Wesentlichen wird ebenfalls durch Resektion erneut lange ssDNA generiert, um die sich das RAD51 Nukleofilament bildet. Dadurch wird die Stranginvasion ermöglicht und die HJ ausgebildet. Diese wird jedoch im Gegensatz zum SDSA gespalten, wodurch die Replikationsgabel wieder aufgebaut wird. Dieser Prozess wird resultiert für die Zelle jedoch in einem Schwesterchromatidaustausch [59].

Single-Strand Annealing Das SSA stellt einen alternativen Reparaturweg für die Reparatur von zwei-endigen DSBs dar und wird vermehrt bei Defekten in der HR eingesetzt [16, 99]. Dieser Reparaturweg nutzt für die DSB-Reparatur zwei nah beieinander gelegene repetitive homologe Sequenzen. Im Wesentlichen werden durch Resektion lange einzelsträngige 3'-Überhänge generiert, die übereinander gelegt und ligiert werden. Dieser Prozess verläuft im Gegensatz zur HR unabhängig von RAD51,

jedoch in Abhängigkeit von RPA und RAD52 [59]. Die 3'-Überhänge werden durch die Endonukleasen ERCC1/XPF entfernt [54].

SSA ist damit jedoch immer mit einer Deletion verbunden, was dieser Reparaturweg fehlerhaft macht.

3.4.2 Reparatur von DNA-DNA-Vernetzungen

Für die Reparatur von DNA-DNA-Vernetzungen, die benachbarte oder gegenüberliegende Basen vernetzen und dadurch die Replikationsmaschinerie stoppen, wird die DNA-*Crosslink*-Reparatur (ICL-Reparatur) eingesetzt [116]. An der ICL-Reparatur sind mehrere Reparaturwege beteiligt. Dazu gehören die Proteinkomplexe HR und FA, die NER und die TLS [60]. So wird in diesem Prozess die DNA-DNA-Vernetzung zu einem Replikations-assoziierten, häufig ein-endigen DSB umgewandelt, der als Substrat für die HR dient [2, 29, 117].

Bei der ICL-Reparatur wird zwischen der Replikations-assoziierten und der nicht Replikations-assoziierten ICL-Reparatur unterschieden. Während HR essentiell für die Replikations-assoziierte Reparatur ist, verläuft die nicht Replikations-assoziierte ICL-Reparatur unabhängig von HR, lediglich in Abhängigkeit von FA, NER und TLS [24, 140]. Von der Replikations-assoziierten HR wird jedoch angenommen, dass sie von größerer Bedeutung ist [129]. Deswegen wird im Folgenden lediglich auf die Replikations-assoziierte ICL-Reparatur eingegangen.

Die Reparatur von DNA-DNA-Vernetzungen wird über FA-Proteine eingeleitet. FA-Proteine stellen eine Gruppe aus 15 Proteinen dar, die bei genetischen Mutationen im Menschen zu Fehlbildungen, einer Knochenmarksinsuffizienz sowie einer verfrühten Tumorentstehung führen. FA-Zellen zeichnen sich durch eine erhöhte zelluläre Empfindlichkeit gegenüber DNA-DNA-vernetzenden Agenzien wie MMC aus. Die DNA-DNA-Vernetzung wird durch den Komplex FANCM (Fanconi M)-FAAP24 (FA-assoziiertes Protein)-MHF1/2 erkannt. FANCM aktiviert die DNA-Schadens-Signalkaskade über die Proteine RPA-ATR-CHK1. Dies führt einerseits zur Rekrutierung und Aktivierung des sogenannten FA-*Core*-Komplexes, der sich aus acht FA-Proteinen (FANCA/B/C/E/F/G/L/M) besteht. Dieser FA-Core Komplex monoubiquitiniert dann den FANCD2-FANCI Komplex, das das Schlüsselereignis für die ICL-Reparatur darstellt [78]. Dieser Komplex rekrutiert Nukleasen wie ERCC1-XPF und MUS81-EME1, die auf einem DNA-Strang zu beiden Seiten des ICLs schneiden. Dadurch wird ein DSB generiert, der entweder ein- oder zwei-endig ist, je nach dem, ob eine oder zwei Replikationsgabeln auf die DNA-DNA-Vernetzung getroffen sind. Im Weiteren wird auf der dem DNA-Strang, an dem das DNA-Addukt hängt, durch die TLS-Polymerasen REV1 oder Pol ζ

der induzierten SSB repariert. Die FA-Proteine D1 (BRCA2)/J/N (PALB2)/O (RAD51C) leiten die DSB-Reparatur, indem sie RAD51 auf die DNA laden und an der Auflösung des Rekombinationsintermediats beteiligt sind. Die Entfernung des DNA-Adduktes erfolgt über die NER [75].

3.4.3 Basenexzisionsreparatur

Die BER ist für das Erhalten der genomischen Stabilität außerordentlich wichtig, da täglich bis zu 20.000 endogen induzierte DNA-Schäden/Zelle repariert werden müssen [36]. Dabei wird sie für die Reparatur von SSBs, BDs sowie apurine bzw. apyrimidine Stellen (AP-Stelle) [166] benötigt. Die BER ist während aller Zellzyklusphasen aktiv, trifft jedoch in der S-Phase auf die HR. Wenn ein SSB, der nicht über BER repariert wurde, auf eine Replikationsgabel trifft, wird der SSB in einen ein-endigen DSB umgewandelt, der mittels HR repariert wird [150].

Im Wesentlichen wird in der BER die modifizierte Base mittels DNA-Glykosylasen ausgeschnitten, der intakte Desoxyribosephosphat-Rest an der daraus resultierenden AP-Stelle mittels Endonukleasen eingeschnitten und das ausgeschnittene durch ein akkurates Nukleotid ersetzt [166].

3.5 DNA-Schadensantwort in der S-Phase

Nach Entstehung eines DNA-Schadens leiten eukaryotische Zellen über Signalproteine die DNA-Schadensantwort ein. Die prominentesten Signalproteine in der S-Phase des Zellzyklus sind die Serin-/Threonin-Kinasen der PI3K (Phosphoinositid-3)-Familie: ATM, ATR (ATM and *Rad3-related*), und DNA-PK_{CS}. Diese Kinasen sind für die Regulation des Zellzykluses, der Replikation, der DNA-Reparatur und der Apoptose essentiell [22].

ATR ist dabei die für die S-Phase bedeutsamste Kinase, da sie neben der DNA-Reparatur auch für die Regulation der Replikation von großer Bedeutung ist [23]. ATR wird dabei nach Induktion verschiedener DNA-Schäden phosphoryliert, ist jedoch besonders wichtig für die DNA-Reparatur nach Behandlung mit ultravioletter (UV)-Strahlung und DNA-DNA-vernetzenden Agenzien [26, 67, 78, 129]. Auch nach Induktion von DSBs wird ATR aktiviert und vermittelt die Homologie-vermittelte Reparatur. ATR wird durch die Generierung von ssDNA aktiviert [180]. Diese entsteht einerseits infolge der Prozessierung von DSBs oder an Replikationsgabeln, die auf einen DNA-Schaden treffen [10]. RPA bindet zunächst an die generierte ssDNA, die mindestens 50 Nukleotide umfasst, und wird von dem ATR-ATRIP-Komplex erkannt [180]. Während über RPA der ATR-ATRIP Komplex zur ssDNA

rekrutiert wird, erfolgt die Aktivierung über den 9-1-1-Komplex (Rad9-Rad1-Hus1) und TOPBP1. Der 9-1-1-Komplex benötigt dabei für das Binden entweder ein 5' oder 3'-DNA-Ende. Somit sind für die Aktivierung von ATR sowohl ssDNA sowie 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 über Claspin [82]. So wird einerseits die Reparatur und andererseits der Intra-S-Kontrollpunkt aktiviert.

ATM wird in jeder Zellzyklusphase nach DNA-Schädigung aktiviert, hauptsächlich nach Induktion von DSBs. DSBs werden unabhängig von der Zellzyklusphase immer über ATM erkannt, das nach Interaktion mit dem MRN-Komplex die DNA-Schadensantwort einleitet. Dabei gibt es ebenfalls einen Wechsel der beiden PI3-Kinase ATM und ATR an einem DSB [142]. Dabei wird ATM als erste Kinase zum DSB rekrutiert, der DSB wird prozessiert und ATR nach Bildung eines Einzelstrang-Überhangs aktiviert. So konnte nach Bestrahlung eine schnelle Bildung von nukleären Foci beobachtet werden [103]. Es kann jedoch ebenfalls über CHK2 die Kinase CHK1 aktivieren, was den Fortschritt der S-Phase beeinflusst [25].

3.6 Ziel der Arbeit

Das mittlere 5-Jahresüberleben aller Krebserkrankungen liegt bei nur etwa 60 % [132]. Daher ist es dringend erforderlich, aktuelle Therapien, die in der Regel aus Chirurgie in Kombination mit einer Radio- und/oder Chemotherapie bestehen, gezielt zu intensivieren. Voraussetzung für eine Intensivierung ist das genauere Verständnis der Überlebensstrategien von Tumorzellen, insbesondere der molekularen Reparaturmechanismen und der entsprechenden Signalkaskaden, sowie die Identifizierung von prädiktiven Biomarkern. Der für eine Zelle schwerwiegendste Schaden ist der DSB. Die HR ist der Hauptreparaturweg von DSBs während der S-Phase. In Tumoren sind Reparaturwege häufig dereguliert, was einen großen Einfluss auf die Prognose haben kann. So wird für Patienten, deren Tumore das Schlüsselprotein der HR RAD51 überexprimieren, ein deutlich kürzeres Überleben beobachtet. Eine hohe Expression von RAD51 in Tumoren könnte somit ein potentieller Biomarker sein. Es wird daher vermutet, dass dieser Überschuss an RAD51 entweder eine Resistenz gegenüber den eingesetzten Tumortherapien bewirkt oder aber zur Malignität der Tumore beiträgt.

Das Ziel dieser Arbeit war es daher aufzuklären, welchen Einfluss die RAD51-Expression auf die Resistenz gegenüber klassischer Chemo- bzw. Radiotherapie hat und welche Rolle hierbei der HR und der entsprechenden intrazellulären Signalkaskade zukommt.

Diese Fragestellung wurde experimentell an je zehn Brustkrebs- (BrCa) und Kopf-Hals (HNSCC)- Tumorzelllinien untersucht. Die zehn BrCa und zehn HNSCC-Zelllinien wurden hinsichtlich ihrer endogenen RAD51-Expression charakterisiert und überprüft, wie sich diese geringfügigen Unterschiede auf die Fähigkeit zur Reparatur von DNA-DSBs mittels HR auswirkten. Im Weiteren wurde die Bedeutung der RAD51-Expression für das zelluläre Überleben nach Behandlung mit MMC, einem Therapeutikum, das zu DNA-DNA-Vernetzungen führt, untersucht und inwieweit diese mit der Fähigkeit zur Phosphorylierung der Kinase CHK1, die die Zellzykluskontrolle in der S- und G2-Phase aktiviert, nach Behandlung mit MMC und UV-Strahlung korreliert. Dabei waren die Fähigkeit zur Ausbildung von RAD51- und 53BP1-Foci in replizierenden Zellen und die Auswirkung auf den Zellzyklus nach MMC-Schädigung von Interesse. Abschließend wurde die Abhängigkeit der HR-Kapazität und der zellulären MMC-Empfindlichkeit von der RAD51-Expression nach Inhibition von RAD51 untersucht.

KAPITEL 4

Material und Methoden

In diesem Kapitel werden das verwendete Material und die Methoden dargestellt. Im Materialteil (vgl. Abschnitt 4.1) werden die verwendeten Zelllinien genauer beschrieben und es erfolgt eine Auflistung aller verwendeten Antikörper, Plasmide, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte und Kits sowie die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer. Im Methodenteil (vgl. Abschnitt 4.1) werden Versuchsprinzipien und -protokolle sowie Inkubationen erklärt.

Gesetzlich geschützte eingetragene Warenzeichen sind im Text mit dem Zusatz „®“ oder „TM“ versehen.

4.1 Material

4.1.1 Zelllinien

Es wurde mit zehn Brustkrebszelllinien und zehn Kopf-Hals-Tumorzelllinien gearbeitet, die in folgender Tabelle 4.1 aufgelistet sind.

Tabelle 4.1: Tumorzelllinien.

Zelllinie	Ursprungsgewebe
Brustkrebszelllinien (BrCa)	
BT-20	basal
BT-474	luminal
BT-549	basal
GI-101	luminal
HS-578T	basal
MCF-7	luminal

weiter auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle 4.1

Zelllinie	Ursprungsgewebe
MDA-MB-231 (MDA-231)	basal
MDA-MB-468 (MDA-468)	basal
SKBR-3	basal
T-47D	luminal
Kopf-Hals-Tumorzelllinien (HNSCC)	
Cal33	Primärtumor der Zunge
FaDu	Primärtumor des Hypopharynx
HSC4	Primärtumor der Zunge
SAS	Primärtumor der Zunge
UTSCC-14 (UT-14)	Primärtumor der Zunge
UTSCC-15 (UT-15)	Primärtumor der Zunge
UTSCC-45 (UT-45)	Primärtumor des Mundbodens
UTSCC-5 (UT-5)	Primärtumor der Zunge
UTSCC-8 (UT-8)	Primärtumor des Larynx
XF-354	Metastase des Mundbodens
Neve et al., 2006 [115], Hollestelle et al., 2009 [63]	

4.1.2 Plasmide

Bei der Bestimmung der HR-Kapazität in einem Plasmid-Rekonstruktionsassay (vgl. Abschnitt 4.2.5) wurde mit folgenden, in der Tabelle aufgelisteten Plasmiden gearbeitet.

Tabelle 4.2: Plasmide.

Plasmid	Hersteller	Größe	Resistenz
pEGFP-N1	Addgene, #6085-1	4733 bp	Kanamycin, Neomycin
pGC	vom Labor konstruiert	6621 bp	Ampicillin

4.1.3 Antikörper

Die verwendeten Antikörper, einschließlich Hersteller und Verwendung, sind in folgender Tabelle 4.3 aufgelistet. Soweit nicht anders gekennzeichnet, wurden die Antikörper in *Odyssey Blocking Buffer* (LI-COR, Nebraska, USA) angesetzt.

Tabelle 4.3: Antikörper.

Antikörper	Hersteller	Verwendung
Western Blot Detektion		
Anti- β -Actin, Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich, Steinheim, #A-2228	1:20000, 1 h bei RT*
Anti-ATR [2B5], Maus, monoklonal	abcam®, Cambridge, UK, #ab4471	1:2000, μ N* ¹ bei 4 °C
Anti-Calpain-1/2, Small Subunit Mouse mAb (28F3), Maus, monoklonal	Calbiochem®, Merck KGaA, Darmstadt, #208730	1:1000, μ N* ¹ bei 4 °C
CHK1 (2G1D5) Mouse mAb, Maus, monoklonal	Cell Signaling Technology®, Denver, USA, #2360	1:750, μ N* ¹ bei 4 °C
FANCD2 (FI17), Maus, monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, #sc-20022	1:2000, μ N* ¹ bei 4 °C
Histone H2B (CT), Kaninchen, polyklonal	Imgenex, San Diego, DA, #IMG-359	1:500, μ N* ¹ bei 4 °C
Phospho-CHK1 (Ser354), Kaninchen, polyklonal	Cell Signaling Technology®, Denver, USA, #2341	1:750, μ N* ¹ bei 4 °C
RAD51 [14B4], Maus, monoklonal	GeneTex, Hsinchu City, Taiwan, #GTX70230	1:2000, μ N* ¹ bei 4 °C
SP1 (H-225), Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, #sc-14027	1:800, μ N* ¹ bei 4 °C
IRDye® 800CW Goat Anti-Mouse IgG (H+L), Maus, polyklonal	LI-COR, Nebraska, USA #926-32210	1:7500, 1 h bei RT*
IRDye® 800CW Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), Kaninchen, polyklonal	LI-COR, Nebraska, USA #926-32211	1:7500, 1 h bei RT*
IRDye® 680RD Goat Anti-Mouse IgG (H+L), Maus, polyklonal	LI-COR, Nebraska, USA #926-68070	1:15000, 1 h bei RT*
IRDye® 680RD Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), Kaninchen, polyklonal	LI-COR, Nebraska, USA #926-68071	1:15000, 1 h bei RT*

weiter auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle 4.3

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
ECL TM Anti-Mouse IgG, Maus, polyklonal	GE Healthcare, Little Chalfont, UK #NA931V	1:2000 ^{*3} , 1 h bei RT*
ECL TM Anti-Rabbit IgG, Kaninchen, polyklonal	GE Healthcare, Little Chalfont, UK #NA934V	1:2000 ^{*3} , 1 h bei RT*
Immunfluoreszenz		
RAD51 [14B4], Maus, monoklonal	GeneTex, Hsinchu City, Taiwan, #GTX70230	1:500 ^{*2} , üN ^{*1} bei 4 °C
53BP1, Kaninchen, polyklonal	Novus Biologicals, Littleton, USA, NB100-305	1:250 ^{*2} , üN ^{*1} bei 4 °C
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, #A11001	1:500 ^{*2} , 1 h bei RT*
Alexa Fluor® 549 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, #A11005	1:600 ^{*2} , 1 h bei RT*

* RT: Raumtemperatur

*¹ üN: über Nacht

*² gelöst in Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) mit 1,5 % BSA und 0,5 % Tween20

*³ gelöst in Trispuffer (TBS) mit 0,1 % Tween20

4.1.4 Chemikalien

Tabelle 4.4: Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller
Amersham TM ECL TM Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, Little Chalfont, UK #NA934V
Aprotinin	Sigma-Adrich, Steinheim, #A6279
Bicinchoninsäure-Lösung (BCA)	Sigma-Adrich, Steinheim, #B9643
BD FACS Clean	Becton Dickson Biosciences, Erembodegem, BE, #340345
BD FACS Flow	Becton Dickson Biosciences, Erembodegem, BE, #342003

weiter auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle 4.4

Bezeichnung	Lieferant
BD FACS Rinse	Becton Dickson Biosciences, Erembodegem, BE, #340346
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, #B-5525
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma-Adrich, Steinheim, #A7030
CL-X Posure TM Film (5 × 7 inches)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA, #34090
Coulter® Isoton® II Lösung	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, #8448011
Diamidinophenylindole (DAPI)	Merck KGaA, Darmstadt, #1246530100
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #D2650
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt, #106586
Dithioerythritol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #43816
Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies, Carlsbad, CA, #10938025
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg, #11280
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, #100983
Ethidium Bromid (EtBr)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #E7637
Formaldehyd (37% (wt/vol))	Merck KGaA, Darmstadt, #104002
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom GmbH, Merck KGaA, Darmstadt, #S0615
FuGENE® HD Transfection Reagent	Roche, 04709713001
Gibco® (Trypsin-EDTA, 0,05 %)	Life Technologies, Carlsbad, CA, #25300
Glutamin	Life Technologies, Carlsbad, CA, #25030081
Glycerin	Roth, Karlsruhe, #3783
Glycine	Thermo Fisher Scientific, Fair Lawn, USA, #381
Immersionsöl	Zeiss, Göttingen, #444969-0000-000
Kaleidoscope TM Prestained Standards	Bio-Rad, , München, #1610324
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt, #104936
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt, #104873
Kanamycinsulfat	Sigma-Adrich, Steinheim, #K4378

weiter auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle 4.4

Bezeichnung	Lieferant
Kristallviolett	Merck KGaA, Darmstadt, #115940
Kupfer(II)-sulfat-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, #C2284
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Steinheim, #L2884
Lipofectamine TM 2000	Life Technologies, Carlsbad, CA, #11668
MagicMark TM XP Western Protein Standard	Life Technologies, Carlsbad, CA, #LC5602
Methanol	J.T.Bakker, Pleasant Prairie, #8045
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, #M3148
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #M8266
Micrococcus Nuklease	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, #88216
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #S6150
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #S8045
Odyssey® Two-Color Protein Molecular Weight Marker	LI-COR, Nebraska, USA #928-40001
Odyssey® Blocking Buffer	LI-COR, Nebraska, USA, #927-40000
Oligofectamine TM Reagent	Life Technologies, Carlsbad, CA, #12252
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Life Technologies, Carlsbad, CA, #15140
2-Propanol	Merck KGaA, Darmstadt, #8187662500
Propidium Iodid (PI)	Merck KGaA, Darmstadt, #537059
RI-1 (RAD51 Inhibitor)	Axon Medchem BV, Groningen, NL, #1885
Ribonuklease A (RNase)	Serva, Heidelberg, #34388
Roswell Park Memorial Institut (RPMI) 1640 Medium	Life Technologies, Carlsbad, CA, #52400
SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard	Life Technologies, Carlsbad, CA, #LC5925
siGENOME SMARTpool siRNA (RAD51)	Thermo Fisher Scientific, Fair Lawn, USA, #M-003530-04
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #L4509
Triamcilonone acetone (TA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, #T6501

weiter auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle 4.4

Bezeichnung	Lieferant
Tris-Base	Sigma-Aldrich, Steinheim, #T1503
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, #T8787)
Tris-Borat-EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, #93290
Tris-EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, #T9285
Tris HCl	Sigma-Aldrich, #T3253
Trypsin-EDTA	Life Technologies, Carlsbad, CA, #25300054
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, #P1379
UltraPure TM Distilled Water	Life Technologies, Carlsbad, CA, #10977
Vectashield® Mounting Medium	Vector Laboratories, Burlingame, CA, #H-1000

4.1.5 Zusammensetzung der Puffer und Lösungen

Tabelle 4.5: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Gehalt	Substanz
Zellkultur		
DMEM	10% (v/v)	FCS
	2% (v/v)	L-Glutamin
	100 U/mL	Penicillin (ggf.)
	100 µg/mL	Streptomycin (ggf.)
RPMI	10% (v/v)	FCS
	1% (v/v)	L-Glutamin
	100 U/mL	Penicillin
	100 µg/mL	Streptomycin
Einfriermedium	90% (v/v)	FCS
	10% (v/v)	DMSO
Trypsin-Lösung	PBS-EDTA	
	0,25% (v/v)	Trypsin
1x PBS, pH 7,4	137 mM	NaCl
	10 mM	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O
	2,7 mM	KCl

weiter auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle 4.5

Bezeichnung	Gehalt	Substanz
	2 mM	KH ₂ PO ₄
Nachweis von Proteinen der Homologen Rekombination		
Laufpuffer	10 % (v/v)	10× TG-Puffer
	10 % (v/v)	SDS
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) in Isopropanol	200 mM	
5× Probenpuffer nach Laemmli	50 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	100 mM	DTT
	2 % (w/v)	SDS
	0,1 % (w/v)	Bromphenolblau
	10 % (w/v)	Glycerol
Puffer A	20 mM	Hepes
	450 mM	NaCl
	50 mM	NaF
	0,2 mM	EDTA
	0,5 mM	DTT
	0,5 µg/ml	Leupeptin
	0,5 µg/ml	Pepstatin A
	1,0 µg/ml	Trypsin Inhibitor
	0,5 µg/ml	Aprotinin
	40 µg/ml	Bestatin
	137 mM	NaCl
SDS	10 % (w/v)	
10× Tris-Glycin (TG)-Puffer	1,92 M	Glycin
	250 mM	Tris Base
10× TBS	150 mM	NaCl
	50 mM	Tris-HCL (pH 7,5)
10× TBS-T	TBS	
	0,05 %	Tween20
	10 % (v/v)	10xTG-Puffer
1xTransferpuffer nach Towbin	10 % (v/v)	10xTG-Puffer
	20 % (v/v)	Methanol
Nachweis von 53BP1- und RAD51-Foci		
Blockierungslösung	1×	PBS

weiter auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle 4.5

Bezeichnung	Gehalt	Substanz
	3 %	BSA
Fixierlösung	1×	PBS
	4 %	PFA
Permeabilisierungslösung	1x	PBS
	0,2 %	Triton X-100
PB	100 mM	KAc
	30 mM	KCl
	10 mM	Na ₂ HPO ₄
	1 mM	MgCl ₂
	1 mM	DTT
PB-T		PB
	0,5 % (v/v)	Tween20
Waschlösung 2	1×	PBS
	0,5 %	Tween20
Kolonietest		
Fixierlösung	70 % (v/v)	Ethanol
Färbelösung	0,1 % (w/v)	Kristallviolett

4.1.6 Kits

Tabelle 4.6: Kits.

Bezeichnung	Fabrikat
Click-iT® EdU Imaging Kit,	
Life Technologies, Carlsbad, CA, #C10340	
EdU	5 mg, Lagerung bei -20 °C
Alexa Fluor® azide 647	1 Ampulle, Lagerung bei -20 °C
DMSO	4 mL, Lagerung bei RT*
Click-iT® EdU reaction buffer	4 mL, Lagerung bei 2–6 °C
CuSO ₄	1 Ampulle, 2–6 °C
Click-iT® EdU buffer additive	400 mg, Lagerung bei -20 °C
Hoechst 33342, 10 mg mL ⁻¹	35 µl, Lagerung bei -20 °C
illustraTM, GFX PCR DNA and GelBand Purification Kit,	

weiter auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle 4.6

Bezeichnung	Fabrikat
GE Healthcare, Little Chalfont, UK #28-9034-70	
Capture buffer type 3	55 mL, Lagerung bei 20–25 °C
Wash buffer type 1	25 mL, Lagerung bei 20–25 °C
Elution buffer type 4	12 mL, Lagerung bei 20–25 °C
Elution buffer type 6	12 mL, Lagerung bei 20–25 °C
illustra TM GFX TM MicroSpin TM columns	2·50 Stück, Lagerung bei 20–25 °C
NucleoBond® Xtra Maxi Kit	
Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, #740414.10	
NucleoBond® Xtra Maxi Columns	10 Stück
NucleoBond® Xtra Column Filters	10 Stück
Elution buffer (ELU)	900 mL, Lagerung bei RT*
Equilibration buffer (EQU)	1000 mL, Lagerung bei RT*
Lysis buffer (LYS)	750 mL, Lagerung bei RT*
Neutralization buffer (NEU)	750 mL, Lagerung bei RT*
Resuspension buffer (RES) + RNase	750 mL, Lagerung bei 4°C
Washing buffer (WASH)	1000 mL, Lagerung bei RT*
Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells,	
Thermo Fisher Scientific, #78840	
Cytoplasmic Extraction Buffer (CEB)	10 mL, Lagerung bei -20 °C
Membrane Extraction Buffer (MEB)	10 mL, Lagerung bei 4 °C
Nuclear Extraction Buffer (NEB)	10 mL, Lagerung bei 4 °C
Pellet Extraction Buffer (PEB)	5 mL, Lagerung bei RT
Mikrokokkus Nuklease	≥ 100 Units/μl, 150 μl, Lagerung bei -20 °C
Calcium Chloride (CaCl ₂)	100 mM, 250 μl, Lagerung bei 4 °C
Halt TM Protease Inhibitor Cocktail	100×, 350 μl, Lagerung bei 4 °C

* RT: Raumtemperatur

4.1.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4.7: Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
Uvette®(220 – 1600 nm)	Eppendorf AG, Hamburg, #952010051
CL-XPosure Film	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, #34090
Criterion Tris-HCl Gel, 4–15%	Bio-Rad Laboratories, München, #345-0028
Deckgläschen, 24 × 60 mm	Roth, Karlsruhe, #K12460A1.0
Erlenmeyerkolben 2000 ml WH	Roth, Karlsruhe, #X742.2
Erlenmeyerkolben 1000 ml WH	Roth, Karlsruhe, #X741.2
Filterpapier Critterion Blotter	Bio-Rad Laboratories, München, #170-4085
Handschuhe, Nitril S–L	Supermax, Kamen, #9239
Kolbenhubpipetten	Eppendorf (Hamburg)
Kulturflasche T-25	Rotilab, Karlsruhe, #83.3910.002
Kulturflasche T-75	Rotilab, Karlsruhe, #83.3911.002
Kulturflasche T-175	Rotilab, Karlsruhe, #83.3912.002
Messzylinder, 250 mL	Roth, Karlsruhe, #K259.2
Messzylinder, 500 mL	Roth, Karlsruhe, #K260.2
Messzylinder, 1000 mL	Roth, Karlsruhe, #K261.2
Objetträger Superfrost	Roth, Karlsruhe, #1880.1
Odyssey® Nitrozellulose Membran (0,22 µm 30 cm × 3 m)	LI-COR, Nebraska, USA, #926-31092
Pasteur-Plast-Pipette 1–2 mL, steril	#734-0354
Pipette serolog. 1 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht, #86.1252.001
Pipette serolog. 2 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht, #86.1252.001
Pipette serolog. 5 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht, #86.1253.001
Pipette serolog. 10 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht, #86.1254.001
Pipette serolog. 25 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht, #86.1685.001
Pipette serolog. 50 ml steril	Sarstedt, Nümbrecht, #86.1689.001
Pippettenspitzen, 0,5–20 µl	Eppendorf #0030 000.854
Pippettenspitzen, 0,5–20 µl	Eppendorf #0030 000.854
Pippettenspitzen, 2–250 µl, PCR	Eppendorf #70.760.451
Pippettenspitzen, 50–1000 µl, PCR	Eppendorf #0030 000.919

weiter auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle 4.7

Bezeichnung	Hersteller
PVDF-Membran	GE Healthcare, Little Chalfont, UK, #RPN303F
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, #72.690.001
Reaktionsgefäß 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht, #62.554.502
Reaktionsgefäß 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, #62.554.501
Sterilfilter für Pipetboy	Integra Bioscience, Fernwald, #153015
Zellkulturplatte 6-well	Sarstedt, Nümbrecht, #83.3920
Zellkulturplatte 12-well	Sarstedt, Nümbrecht, #83.3921

4.1.8 Geräte

Tabelle 4.8: Geräte.

Bezeichnung	Fabrikat
Autoklav	Mediatech, Norderstedt
Blotkammer	Criterion Precast, Bio-Rad, München
CO ₂ -Inkubator	MCO-20AIC, Sanyo Medical, Bad Nenndorf
Durchflusszytometer	BD FACScan TM , BD FACScan Canto TM , Becton Dickson Biosciences, Erembodegem, BE
Entwicklungsmaschinen	Curix 60 AGFA, Greenville, SC, USA EG&G Berthold Molecular Light Imager, Berthold Technologies, Bad Wildbad Odyssey CLX 289, Li-Cor Biosciences
Elektrophoresekammer	Criterion Cell, Bio-Rad, München
Heizblock	Thermostat 5320, Eppendorf, Hamburg
Kamerasysteme	AxioCam MRm, Zeiss, Göttingen
Kolbenhubpipetten	0,5–10 µl; 10–100 µl; 100–1000 µl, Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer	Ikamag Ret, IKA Labortechnik, Staufen
Mikroskope	Axiovision Observer Z1, Zeiss, Göttingen Diavert, Leitz, Wetzlar BD Pathway 435 bioimager

weiter auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle 4.8

Bezeichnung	Fabrikat
	Becton Dickson Biosciences, Erembodegem, BE
Netzgeräte	Consort E455, Fröbel Laborgeräte, Lindau Consort E802, Fröbel Laborgeräte, Lindau
pH-Meter	φ300, Beckman Coulter, Krefeld
Photometer	Bio-Photometer, Eppendorf, Hamburg
Röntgenröhre	Gulmay, Surrey, UK
Schüttler	Edmund Bühler, Johanna Otto GmbH, Hechingen Mini-Shaker, Modell Kühner, Braun, Melsungen Polymax 1040, Heidolph, Schwabach
Sterile Werkbank	HeraSafe, Heraeus, Hanau
UV-Kammer	GS Gene Linker TM , UV Chamber, Bio-Rad Laboratories, München,
Vakuumpumpe	Oerlikon Leybold Vacuum, Pfäffikon, CH
Vortexer	Vortex-Genie® 2, Scientific Industries, Bohemia, USA
Waagen	P1200, Mettler Toledo, Giessen AE160, Mettler Toledo, Giessen
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Wasserbäder	Haake W19/D3, Karlsruhe Lauda, Lauda-Königshofen
Zellzählgerät	Coulter Counter Modell Z1, Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge	Biofuge 15R, Heraeus, Hanau Labofuge 400 R, Heraeus, Hanau Microfuge R, Beckman Coulter, Krefeld Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau

4.1.9 Software

Folgende Programme wurden zur Aufnahme und Analyse von Daten genutzt: Axio-Vision Rel. 4.7, CellProfiler 2.0, GraphPad Prism 5, Image Studio Version 2.1.10, Microsoft Office Excel 2007 und ModFit 2.0.

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultivierung

Das Passagieren der Zellen und die Inkubation wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Alle eingesetzten Lösungen und Puffer sowie das Medium und die verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt und vor Gebrauch sterilfiltriert bzw. autoklaviert.

Versuche wurden mit humanen Brust- und Kopf-Hals-Tumorzelllinien (Auflistung der Zelllinien in Tabelle 4.1, Abschnitt 4.1.1) der Passagen 10 bis 36 durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte als Zellrasen in *Dulbecco's Modified Eagle* Medium (DMEM) bei 37 °C, 10% CO₂-Atmosphäre und 100% Luftfeuchtigkeit (ggf. 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin) oder Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium (100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin) bei 37 °C, 5% CO₂-Atmosphäre und 100% Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen mit einem Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (FKS) und 2 %-Glutamin (DMEM) bzw. 1 % (RPMI). Die Zellen wurden mindestens alle 5–7 Tage passagiert. Dazu wurde das Medium zunächst abgesaugt und der Zellrasen einmal mit PBS gespült, um Mediumreste zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in Abhängigkeit der Zellkulturflaschengröße (T25, T75 oder T175) mit 0,5 mL, 1 mL oder 3 mL 0,25%-iger Trypsinlösung versetzt, um den Zellrasen abzulösen. Nach einer Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen in 5 mL Medium (T25), 10 mL Medium (T75) oder 25 mL Medium (T175) resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Zellzählgerät (Coulter Counter®) in isotonischer Lösung (Coulter-Backman solution®). Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff (-196 °C) in Einfriermedium (90 % FKS und 10 % DMSO) aufbewahrt.

In Tabelle 4.9 ist aufgelistet, mit welchem Medium die verschiedenen Zelllinien kultiviert wurden.

Tabelle 4.9: Kulturmedien für die verwendeten Zelllinien

Medium	Zelllinien
DMEM*	alle HNSCC-Zelllinien
DMEM + Pen/Strep* ¹	BT-20, GI-101, HS-578T, MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468, SKBR-3
RPMI* ² + Pen/Strep* ¹	BT-474, BT-549, T-47D

* DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

*¹ PenStrep: Penicillin Streptomycin

weiter auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle 4.9

Medium	Zelllinien
--------	------------

*2 RPMI: Roswell Park Memorial Institute

4.2.2 Schädigung der Zellen

Ionisierende Strahlung

Ionisierende Strahlung induziert eine Bandbreite von DNA-Schäden, hauptsächlich BDs und SSBs sowie in geringerem Maß DSBs und DNA-DNA-Vernetzungen. In Tumorzelllinien werden dabei bei einer Bestrahlung mit einem Gray 14–27 DSBs pro diploiden DNA-Gehalt induziert [37].

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte bei Raumtemperatur (RT) mit einer Röntgenröhre (Gulmay RS225) bei 200 kV und 15 mA mit einer Dosisrate von $1,2 \text{ Gy}\cdot\text{min}^{-1}$ (0,5 mm Cu- und 0,8 mm Be-Filter).

Für den Nachweis von 53BP1- und RAD51-Foci nach Inhibition von RAD51 (vgl. Abschnitte 4.2.3 und 4.2.7) wurden die Zellen mit 10 Gy bestrahlt.

Ultraviolette Strahlung

UV-Strahlung induziert DNA-Addukte, die die Replikation und Transkription behindern [116].

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte bei RT in einer UV-Kammer (GS Gene Linker®, UV Chamber) mit einer Energie von $5 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Für den Nachweis von Proteinen aus Gesamtzellextrakten wurden Zellen mit einer UV-Dosis von $50 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$ bestrahlt. Dafür wurden $2\cdot 10^6$ Zellen 48 h vor UV-Bestrahlung in 10 cm^2 -Zellkulturschalen ausgelegt. Für die UV-Bestrahlung wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit PBS gespült und das PBS verworfen. Nachfolgend wurde den Zellen das Medium erneut zugeführt und die Zellen für 15 min und 1 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Es folgten die Zellernte und der Proteinnachweis (vgl. Abschnitt 4.2.6).

Mitomycin C

MMC ist ein DNA-DNA-vernetzendes Agens, das bis zu 90 % Vernetzungen auf einem DNA-Strang und zu 5–10 % Vernetzungen zwischen zwei DNA-Strängen, welche zu erheblichen Störungen der Replikation und Transkription führen [31].

Sowohl die MMC-Stammlösung als auch die Verdünnung wurden mit destilliertem, autoklaviertem Wasser in 50 mL bzw. 15 mL-Probenröhrchen hergestellt. Für die

Herstellung der Stammlösung (0,3 mM) wurden 2 mg MMC (eine Flasche) in 20 mL Wasser gelöst und 30 min bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Stammlösung wurde je nach Anwendung um den Faktor 10 verdünnt (30 μ M) und lichtgeschützt innerhalb von einer Stunde auf die Zellen gegeben. MMC ist über einen Zeitraum von etwa 6 h stabil.

Für den Nachweis von Proteinen aus Gesamt- und fraktionierten Zellextrakten (vgl. Abschnitt 4.2.6) wurden Zellen für 6 h mit 1,5 μ M MMC bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und die Zellen anschließend geerntet. Beim Koloniebildungstest (vgl. Abschnitt 4.2.9) wurden die Zellen für 1 h mit 1,5 μ M MMC bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Der Zellrasen wurde anschließend zweimal mit PBS gespült, frisches Medium dazugegeben und für die Bildung von Zellkolonien 7–14 Tage im Brutschrank inkubiert.

4.2.3 Inhibition von RAD51

Für die Inhibition von RAD51 wurde der RAD51-Inhibitor RI-1, ein *small molecule inhibitor*, verwendet, der die Filamentbildung von RAD51 inhibiert. Er bindet kovalent an die Oberfläche von RAD51 am Cystein 319 und destabilisiert damit wahrscheinlich die Bindungsstelle zwischen RAD51-Monomeren [16].

Die erfolgreiche Inhibition von RAD51 durch RI-1 wurde in Form der Reduktion der RAD51-Foci Bildung nachgewiesen (vgl. Abschnitte 4.2.2 und 4.2.7). Für die Bestimmung der Reparaturkompetenz mittels HR (HR-Kapazität) wurde RI-1 in Konzentrationen von 10, 20 und 30 μ M 6h vor transienter Transfektion der Zellen dazugegeben (vgl. Abschnitt 4.2.5).

4.2.4 siRNA Behandlung

Für die Inhibition der Proteinexpression von RAD51 in Zellen wurde mit einer *siGENOME SMARTpool siRNA* (Thermo Fisher Scientific) gegen RAD51 gearbeitet. Die *siGENOME SMARTpool siRNA* ist ein Gemisch aus vier verschiedenen siRNAs gegen RAD51 (vgl. Tabelle 4.10). Sie wurde in RNase/DNase-freiem, sterilem Wasser gelöst (100 μ M Stammlösung) und die siRNA-Konzentration am Photometer überprüft. Für eine effiziente Inhibition der RAD51-Expression wurden vier Konzentrationen (25, 50, 100 und 150 nM siRNA) und drei verschiedene Transfektionsagenzien (HiPerFect, LipocetamineTM 2000 und OligofectamineTM) getestet. Die effizienteste Inhibition der RAD51-Expression in Zellen wurde bei einer siRNA-Konzentration von 50 nM und dem Transfektionsagens OligofectamineTM beobachtet.

Tabelle 4.10: Zielsequenzen der siGENOME SMARTpool siRNA gegen RAD51.

<i>siGENOME SMARTpool siRNA</i>	Zielsequenz
D-003530-02	GAAGCUAUGUUCGCCAUUA
D-003530-05	GCAGUGAUGUCCUGGAUAA
D-003530-07	CCAACGAUGUGAAGAAAUU
D-003530-08	AAGCUAUGUUCGCCAUUAA

Für die siRNA-Behandlung wurden $2 \cdot 10^5$ Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte in Antibiotika-freiem Medium ausgelegt. Nach 16 h erfolgte die Transfektion der Zellen mit siRNA mittels OligofectaminTM. Dafür wurden in separaten 1,5 mL Reaktionsgefäßen pro Loch siRNA (Endkonzentration pro Loch: 50 nM) in OptiMEM Medium (37 °C) mit einem Endvolumen von 185 µl sowie 11 µl OptiMEM Medium und 4 µl OligofectamineTM angesetzt. Die Gemische wurden für 10 min im Dunklen bei RT inkubiert, anschließend zusammengeführt und für weitere 20 min zur Komplexbildung stehengelassen. In der Zwischenzeit wurde das Medium von den Zellen aspiriert, mit 1 mL PBS gewaschen und 800 µl Opti-MEM Medium pro Loch vorgelegt. 200 µl des Transfektionsgemisches wurden pro Loch dazugegeben, die Zellen für 8 h bei 37 °C inkubiert und anschließend 1 mL Medium mit 20 % FCS dazugegeben. Die Zellen wurden für 24 h inkubiert, in T75-Zellkulturflaschen umgesetzt und nach weiteren 24 h der Koloniebildungstest ausgelegt (vgl. Abschnitt 4.2.9). Die erfolgreiche Reduktion des RAD51-Proteingehaltes in Zellen erfolgte parallel durch den Nachweis von RAD51 (vgl. Abschnitt 4.2.6).

4.2.5 Bestimmung der Reparaturkompetenz durch Homologe Rekombination (HR-Kapazität)

Die Fähigkeit von Zellen DSBs mittels HR zu reparieren (HR-Kapazität) wurde anhand eines Plasmid-Rekonstruktions-Assays gemessen. Dabei wurde mit zwei Plasmiden (pEGFP-N1 und pGC) gearbeitet, die transient in die zu untersuchenden Zelllinien transfiziert wurden. pGC ist ein Reparaturkonstrukt und enthält zwei inaktive GFP-Gene. Ein GFP-Gen trägt eine I-Sce-I-Schnittstelle und das andere ist trunziert. Durch Inkubation mit dem Restriktionsenzym I-Sce-I wird der mutierte Genabschnitt der I-Sce-I-Schnittstelle entfernt und ein DSB generiert. Während der Replikation wird das Plasmid analog zum Rest des Genoms dupliziert, wodurch ein zweites Reparaturkonstrukt entsteht, welches als Schwesterchromatid dient. Die homologe Sequenz des trunzierten GFP-Gens des Schwesterchromatids wird als

homologe Sequenz für die Reparatur des DSBs verwendet. Erfolgt eine fehlerfreie Reparatur mittels HR, wird GFP exprimiert. Das GFP-exprimierende Plasmid pEGFP-N1 diente der Bestimmung der Transfektionseffizienz. Der prozentuale Anteil GFP-positiver Zellen wurde am Durchflusszytometer gemessen [99].

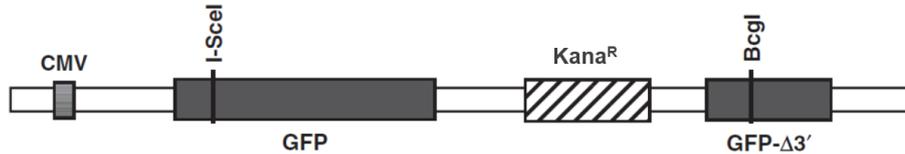


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Reparaturkonstrukts pGC (modifiziert nach Mansour et al.(2008) [99]).

Die Expression des Reparaturkonstrukts pGC wird durch den CMV Promotor reguliert und trägt unter anderem ein Kanamycin-resistentes Gen. Eine mutierte GFP-Sequenz besitzt die 18 bp I-Sce-I-Schnittstelle. Das andere GFP-Gen ist trunkeert. Die inaktiven GFP-Gene trennen 2200 bp und sind in der gleichen Richtung orientiert. Die gemeinsame homologe Sequenz ist 520 bp lang, mit 219 bp oberhalb und 301 bp unterhalb der I-Sce-I Schnittstelle.

CMV: Cytomegalovirus; GFP: green fluorescence protein; Kana^R: Kanamycinresistenz

Transformation und Vervielfältigung der Plasmide in *E. Coli*

Die Plasmide pGC und pEGFP-N1 wurden in elektrokompenten *E. Coli* (EC100) vervielfacht und durch Elektroporation in die Bakterien gebracht. Dafür wurden zunächst 15 μl Bakteriensuspension mit 20 μl der jeweiligen Plasmidlösung ($0,05 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) vermischt und in einer Elektroporationsküvette elektroporiert. Dabei sollte die Zeitkonstante zwischen 4–5 liegen. Die Bakterien-Plasmid-Suspension wurde mit 800 μl LB-Medium verdünnt und 100 μl dieses Gemisches auf Antibiotikahaltige LB-Agarplatten mit der sogenannten Dreiösenausstrich verteilt. Für die Vervielfältigung von pGC (Ampicillin-Resistenz) wurden Ampicillin-haltige-Agar-Platten ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) und für pEGFP-N1 (Kanamycin-Resistenz) Kanamycin-LB-Agar-Platten ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) verwendet. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bakterien, die das Plasmid erfolgreich aufgenommen hatten und dadurch die Antibiotika-Resistenz besaßen, bildeten Kolonien. Eine Kolonie pro Platte wurde für die Vorkultur in 5 mL LB-Medium bei 37 °C und 220 rpm für 6–8 h inkubiert. 2 mL der trüben Bakteriensuspension wurden anschließend in 200 mL LB-Medium, das mit dem entsprechenden Anibiotikum versetzt war, verdünnt und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert (Übernachtskultur).

Extraktion der Plasmid-DNA aus *E. Coli*

Die Plasmid-Isolierung aus EC100 erfolgte unter Verwendung des *NucleoBond® Xtra Maxi Kits* (Maxi-Präparation).

Zunächst wurde die Bakteriensuspension der Übernachtskultur in Zentrifugenbehälter (50 mL) überführt, zentrifugiert ($6000\times g$, 10 min) und der Mediumüberstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 12 mL RES-Puffer, der RNase enthielt, resuspendiert und mit 12 mL LYS-Puffer versetzt. Die Puffer wurden durch 5-maliges Invertieren der Zentrifugenbehälter gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Die mit den *NucleoBond® Xtra* Säulenfiltern versehenen *NucleoBond® Xtra* Säulen wurden mit 25 mL EQU-Puffer äquilibriert. Die Lyse der Bakterien wurde durch Zugabe von 12 mL NEU-Puffer und 10–15-maliges Invertieren des Gemisches unterbrochen. Das viskose Lysat sollte nach Zugabe des NEU Puffers dünnflüssig sein und eine homogene Suspension mit flockigen, weißen Präzipitaten ausbilden. Zur Klärung des Lysates und Beladen der Säule wurde es auf die *NucleoBond® Xtra* Säulenfilter gegeben und die Filter sowie Säulen mit 15 mL EQU-Puffer gewaschen. Die Säulenfilter wurden entfernt und die Säulen mit 25 mL WASH-Puffer gewaschen. Für die Elution der Plasmid-DNA wurde 15 mL ELU-Puffer auf die Säule gegeben und das Eluat in einem neuen Zentrifugenbehälter aufgefangen. Die eluierten Plasmiden wurden mit 10,5 mL Isopropanol präzipitiert und durch Zentrifugation pelletiert ($10000\times g$, 30 min). Das Isopropanol wurde vorsichtig abdekantiert und die Plasmid-DNA mit 5 mL Ethanol (70 %) gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde abermals zentrifugiert ($15000\times g$, 15 min), das Ethanol abdekantiert und die DNA bei Raumtemperatur trocknen gelassen. Die Plasmid-DNA wurde in 200 μ l RNase/DNase freiem, sterilen Wasser gelöst. Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte am Photometer. Dafür wurden 2 μ l Plasmid-DNA-Lösung in 48 μ l Wasser gelöst und in einer UV-transparente Küvette die DNA-Konzentrationen bei einer Extinktion von 260 nm gemessen. Die Reinheit der DNA konnte anhand des Verhältnisses von E_{260} zu E_{280} überprüft werden, das bei 1,8 liegen sollte.

Kontrollverdau von pGC und pEGFP-N1

Zur Kontrolle der Gesamtheit der isolierten Plasmide wurden diese mit Restriktionsenzymen inkubiert, die die Plasmide in definierte Basenpaar-Längen schnitten. Die Bedingungen dafür sind folgend in Tabelle 4.11 zusammengefasst. Die restringierte DNA wurde auf einem 1 %-igem Agarosegel mit 3 % Ethidiumbromid in $1\times$ TBE-Puffer elektrophoretisch (100 V, 80 min) aufgetrennt, sodass anhand der DNA-Fragmentgröße (vgl. Tabelle 4.11) die Gesamtheit der Plasmide überprüft werden konnte.

Tabelle 4.11: Bedingungen für den Kontrollverdau von p-EGFPN1 und pGC

	Enzym	Plasmid-DNA	NEB-Puffer	10×BSA	Ges.-Vol.	Ink.-Zeit	DNA-Frag.
pGC	EcoR V	10 μ g	NEB3, 2 μ l	2 μ l	20 μ l	1 h	6621 bp
	Apa I	10 μ g	NEB4, 2 μ l	2 μ l	20 μ l	1 h	2951 bp, 3670 bp
pEGFP-N1	EcoR I	10 μ g	NEB2, 2 μ l	2 μ l	20 μ l	1 h	4733 bp
	Pvu II	10 μ g	NEB2, 2 μ l	2 μ l	20 μ l	1 h	610 bp, 4123 bp

NEB: *New England Biolabs*

Ges.-Vol.: Gesamtvolumen

Ink.-Zeit: Inkubationszeit

DNA-Frag.: DNA-Fragment

Linearisierung von pGC

Die DSB-Induktion auf dem Plasmid pGC erfolgte durch Inkubation mit dem Restriktionsenzym I-Sce-I (Linearisierung des Plasmid). Dafür wurden 40 μ g pGC mit 10 μ l 10×BSA, 10 μ l *I-Sce-I-Restriction-Buffer* und 8 μ l I-Sce-I (8 Units) (Gesamtvolumen: 100 μ l) für 5 h bei 37 °C inkubiert. Die Überprüfung der Linearisierung erfolgte wie zuvor auf einem 1 %-igem Agarosegel mit 3 % Ethidiumbromid (EtBr) in 1×TBE-Puffer. Nach der elektrophoretischen Auftrennung (100 V, 80 min) der DNA sollte nur eine Bande mit einer DNA-Fragmentgröße von 6621 bp zu detektieren sein. Bei einer unvollständigen Linearisierung wären mehrere Banden zu sehen (*nicked circled DNA*, lineare DNA und *supercoiled DNA*). Das linearisierte pGC wurde mit dem *illustraTM GFX PCR DNA and GelBand Purification Kit* aufgereinigt. Dafür wurden maximal 100 μ l pGC mit 500 μ l *Capture buffer type 3* in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß gemischt. Zur Gewährleistung des richtigen pH-Wertes sollte sich die Lösung dabei nicht verfärben und einen gelben Ton beibehalten. Das Gemisch wurde dann auf eine *GFX MicroSpin*-Säule gegeben, die in einem *Collection tube* stand, und zentrifugiert (16000×g, 30 sec). Dabei band die DNA an die Säule und das Filtrat wurde verworfen. Es wurden 500 μ l *Wash buffer type 1* auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert (16000×g, 30 sec) und das Filtrat

verworfen. Da der *Wash buffer type 1* Ethanol enthielt, wurde abermals zentrifugiert ($16000\times g$, 30 sec), um eine vollständige Eluation zu gewährleisten. Die Säule wurde in ein DNase/RNase-freies 1,5 mL-Reaktionsgefäß gesetzt und 10–50 μl *Eluation buffer type 6* auf die Säule gegeben. Der Puffer wurde 1 min bei RT auf der Säule inkubiert und anschließend zentrifugiert ($16000\times g$, 1 min), wobei pGC eluiert wurde. Es folgte eine DNA-Konzentrationsbestimmung am Photometer ($E=260\text{ nm}$) und die DNA wurde bis zur Transfektion bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Versuchsprotokoll

$1-1,5\cdot 10^5$ Zellen wurden pro Loch einer 12-Loch-Platte in 1 mL Antibiotika-freiem Medium ausgelegt und nach 24 h mit dem jeweiligen Plasmid transient transfiziert. Nach weiteren 24 h, in denen die Reparatur des durch I-SceI generierten DSBs und die Expression von GFP erfolgte, wurden die Zellen geerntet und in 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt. Durch Zentrifugation (5 min, $0,3\times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) wurden die Zellen pelletiert und das Medium abgesaugt. In Abhängigkeit der Zellpelletgröße wurden die Zellen in 0,5–1 mL PBS resuspendiert und durch Gase in FACS-Röhrchen überführt. Die Messung der GFP-positiven Zellen fand am Durchflusszytometer statt.

Bei einer RAD51-Inhibition wurde der RAD51-Inhibitor RI-1 6 h vor der transienten Transfektion dazugegeben (vgl. Abschnitt 4.2.3).

Transfektion

Die transiente Transfektion der Plasmide erfolgte mit zwei Transfektionsagenzien, FuGENE® HD oder LipofectamineTM 2000. Transfektionsagenzien sind in der Regel Formulierungen, die zu großen Teilen aus kationischen und neutralen Lipiden (Helfer-Lipide) zusammengesetzt sind. Kationische Lipide interferieren mit der negativ geladenen Plasmid-DNA, was zur Aggregatbildung führt. Dadurch wird die DNA vor dem Abbau durch DNasen geschützt und das Aggregat kann mit der negativ geladenen Zellmembranoberfläche wechselwirken. Dies wiederum ermöglicht die Endozytose der Aggregate [42, 149, 169, 170]. Die Rolle der neutralen Lipide ist nicht vollständig geklärt. Es wird jedoch eine erhöhte Aggregation zwischen kationischen Lipiden und DNA beobachtet [65].

FuGENE® HD und LipofectamineTM 2000 wurden in den Verhältnissen von 2:1, 4:1,6 und 3:1 [$\mu\text{l}:\mu\text{g}$] zu dem jeweiligen Plasmid eingesetzt.

FuGENE® HD Für das Transfektionsgemisch wurden für ein Loch einer 12-Loch-Platte 50 μl Opti MEM I Medium in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß vorgelegt und die

entsprechenden Volumen an Plasmid und FuGENE® HD direkt in das Opti MEM I-Medium gegeben. Die Aggregatbildung zwischen Plasmid und FuGENE® HD erfolgte für mindestens 20 min im Dunkeln. Anschließend wurden 50 μl des Transfektionsgemisches pro Loch appliziert. Die Zellen sollten sich zum Zeitpunkt der Transfektion in der exponentiellen Wachstumsphase befinden und zu 80–90 % konfluent sein.

LipofectamineTM 2000 LipofectamineTM 2000 und das jeweilige Plasmid wurden zunächst separat in jeweils 100 μl Opti MEM I-Medium angesetzt und für 5 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden das LipofectamineTM 2000-Opti MEM I-Gemisch und das Plasmid-Opti MEM I-Gemisch zusammengeführt und für weitere 20 min im Dunkeln für die Aggregatbildung stengelassen. 200 μl des Transfektionsgemisches wurden pro Loch appliziert. Zellen sollten sich zum Zeitpunkt der Transfektion in der exponentiellen Wachstumsphase befinden und zu über 90 % konfluent sein.

GFP-Messung am Durchflusszytometer

GFP-positive Zellen wurden am Durchflusszytometer (BD FACScanTM) gemessen. Dabei wurden die Hauptpopulation der Zellen über ihre Größe (FSC) und Granularität (SSC) definiert. Der prozentuale Anteil GFP-positiver Zellen konnte anschließend über die Fluoreszenzmessung definiert werden.

Auswertung der HR-Kapazität

Bei der Auswertung wurde zunächst die Transfektionseffizienz der jeweiligen Zelllinie bestimmt, was dem prozentualen Anteil GFP-positiver Zellen (GFP⁺) nach transienter Transfektion mit pEGFP-N1 entspricht. Anteilig auf die Transfektionseffizienz wurde der Anteil GFP-positiver Zellen nach transienter Transfektion mit dem Reparaturkonstrukt pGC berechnet, was der absoluten HR-Kapazität (abs. HR-Kapazität) entspricht.

$$\text{Abs. HR - Kapazität} = \frac{\% \text{ GFP}^+ \text{ Zellen (pGC)}}{\% \text{ GFP}^+ \text{ Zellen (pEGFP - N1)}} \quad (4.1)$$

Für den Vergleich von Zelllinien untereinander wurde die abs. HR-Kapazität einer Zelllinien als Standard auf den Wert 1 gesetzt und die abs. HR-Kapazität anderer Zelllinien relativ dazu berechnet, was dann der relativen HR-Kapazität (rel. HR-Kapazität) entspricht. Für die BrCa-Zelllinien wurde *MDA-468* und für die HNSCC-Zelllinien *FaDu* als Standard verwendet.

$$\text{Rel. HR - Kapazität} = \frac{\text{Abs. HR - Kapazität}}{\text{Abs. HR - Kapazität (Standard)}} \quad (4.2)$$

4.2.6 Nachweis von Proteinen der Homologen Rekombination

Der Nachweis von Proteinen erfolgte nach Extraktion der Proteine aus Zellen oder einzelnen Zellkompartimenten. Dafür wurden die Proteine über eine SDS-Polacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ihrer Größe nach aufgetrennt, auf eine Membran elektrophoretisch transferiert (*Western Blot*) und auf der Membran detektiert (Fluoreszenz- oder Chemilumineszenzdetektion). Es wurden einerseits endogene Unterschiede in der Expression von Proteinen zwischen Zelllinien und andererseits Unterschiede in der Phosphorylierung von Proteinen nach Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Agenzien analysiert.

Folgende HR-assoziierte Proteine wurden untersucht: ATR, CHK1, pCHK1, RAD51, FANCD2, BRCA2.

Proteinisolierung

Es wurden wie folgend beschrieben einerseits HR-Proteine von Gesamtzellextrakten und andererseits RAD51 im Kern und Chromatin-gebundenes RAD51 (Zellfraktionierung) detektiert.

Gesamtzellproteinextrakte Proteine aus Gesamtzellextrakten wurden nach [43, Finnie et al., 1995] isoliert. Zellen wurden geerntet, in 15 mL-Probenröhrchen überführt und zentrifugiert (4 °C, 5 min, 0,3×g). Zur Verhinderung der Proteindegradation wurde fortan auf Eis gearbeitet. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen in PBS (≤ 4 °C) resuspendiert und zentrifugiert (4 °C, 5 min, 0,3×g). Das PBS wurde verworfen, die Zellen in 1 mL PBS resuspendiert und in 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt. Das PBS wurde abgesaugt und die Zellpellets optional bei -20 °C eingefroren. Der Extraktionspuffer (Puffer A, PMSF und Glycerol in einem Verhältnis von 294:10:100) wurde im gleichen Volumenverhältnis zum jeweiligen Zellpellet dazugegeben und die Zellen resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch dreimaliges, abwechselndes Gefrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen im Wasserbad bei 37 °C für jeweils 1 min. Die Zelltrümmer wurden anschließend zentrifugiert (4 °C, 10 min, 10800×g). Der Überstand (Gesamtzell-extrakt-Proteine) wurde in 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt und gemischt. Nach der Konzentrationsbestimmung der Proteine wurden sie in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

Fraktionierte Zellextrakte Bei der Analyse von RAD51 im Kern und Chromatin-gebundenem RAD51 wurde für die Zellfraktionierung der Proteine das *Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells* (Thermo Fisher Scientific) verwendet (vgl. Abbildung 4.2).

Es wurden $5 \cdot 10^6$ Zellen pro Probe in T175-Zellkulturflaschen ausgelegt und 24 h nach Aussaat mit $1,5 \mu\text{M}$ MMC für 6 h behandelt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gespült, geerntet und in 50 mL-Probenröhrchen überführt. Das Medium wurde nach Zentrifugation (5 min, 4°C , $0,3\times g$) verworfen, das Zellpellet mit dem gleichen Volumen an eiskaltem PBS gewaschen und abermals zentrifugiert (5 min, 4°C , $0,3\times g$). Die Zellen wurden in 1 mL eiskaltem PBS resuspendiert in 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert. Fortan wurde auf Eis gearbeitet.

In Abhängigkeit der Zellpelletgröße wurden den Herstelleranweisungen entsprechend für die Fraktionierung unterschiedliche Volumen der verschiedenen Extraktionspuffer des Kits in einem Verhältnis von 1:100 mit einem Protease Inhibitor versetzt. Die Zellen wurden zunächst mit dem *cytoplasmic extraction buffer* (CEB) für 10 min bei 4°C vorsichtig invertiert und zentrifugiert (5 min, 4°C , $500\times g$). Der Überstand (Zytoplasma-Proteinfraktion) wurde in eisgekühlte 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt, das Pellet mit eiskaltem *membrane extraction buffer* (MEB) resuspendiert und für 5 sec mit dem Schüttler auf höchster Stufe gemischt. Die Reaktionsgefäße wurden für 10 min bei 4°C vorsichtig invertiert, zentrifugiert (5 min, 4°C , $3000\times g$) und der Überstand (Membran-Proteinfraktion) in eisgekühlte 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt. Das Pellet wurde mit eisgekühltem *nuclear extraction buffer* (NEB) resuspendiert, 15 sec mit dem Schüttler auf höchster Stufe gemischt und für 30 min bei 4°C vorsichtig invertiert. Durch Zentrifugation (5 min, 4°C , $5000\times g$) wurde die Kern-Proteinfraktion (Überstand) gewonnen und in eisgekühlte 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt. Zur Extraktion der Chromatin-gebundenen Proteine wurde der NEB bei RT (RT) mit $5 \mu\text{l}$ CaCl_2 (100mM) und $3 \mu\text{l}$ Mikrococcus Nuklease (300 Units) pro $100 \mu\text{l}$ NEB versetzt. Das NEB-Gemisch wurde mit dem Pellet resuspendiert, 15 sec mit dem Schüttler auf höchster Stufe gemischt und bei RT 15 min inkubiert. Es wurde zentrifugiert (5 min, $16.000\times g$) und der Überstand (Chromatin-gebundene Proteinfraktion) in eisgekühlte 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt. Die Proteinkonzentration wurde bestimmt und die Proteinextrakte bei -80°C gelagert.

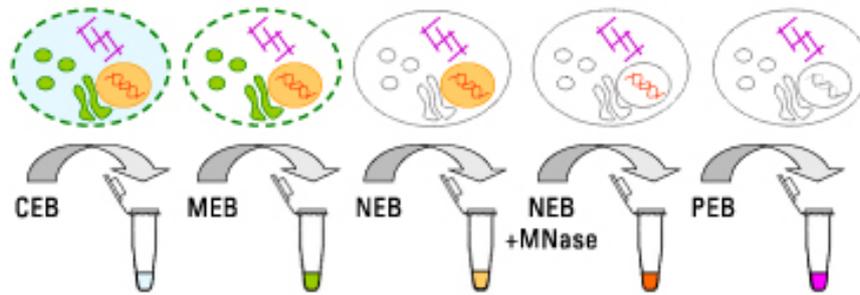


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Zellfraktionierung.

Zelluläre Kompartimente wurden schrittweise durch Inkubation der Zellpellets mit CEB (Zytoplasmafraktion), MEB (Membranfraktion) und NEB (Kernfraktion) extrahiert. Durch die Zugabe der Mikrokoccus-Nuklease zum NEB wurden die Chromatin-gebundenen Proteine isoliert und die Zytoskelettproteine durch den PEB. CEB: *cytoplasmic extraction buffer*; MEB: *membrane extraction buffer*; NEB: *nuclear extraction buffer*; PEB: *pellet extraction buffer*

Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung von Zellextrakten erfolgte über die BCA-Bestimmung, die auf der *Biuret*-Reaktion beruht [144]. Im Wesentlichen wird der Farbumschwung, der mit der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} durch die Aldehydgruppen der Proteine einhergeht, am Photometer gemessen. Cu^{+} -Ionen bilden einen Komplex mit BCA, der Licht bei einer Wellenlänge von 562 nm absorbiert. Die Absorption steigt im Messbereich zwischen $20\text{--}27\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ nach dem Lambert-Beerschen Gesetz linear mit der Proteinkonzentration an. Bovines Serumalbumin (BSA) wurde als Standard mit sechs Verdünnungen zwischen $25\text{--}1000\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ für die Kalibration des Photometers verwendet.

Für die Bestimmung wurden ein Bicinchoninsäure-Lösung (Reagenz A) und Kupfer(II)-sulfat-Lösung (Reagenz B) verwendet.

Es wurden $2\text{--}10\ \mu\text{l}$ der Zellysate in $40\text{--}48\ \mu\text{l}$ of H_2O verdünnt, sodass ein Endvolumen von $50\ \mu\text{l}$ resultierte. Zu den Proben wurde je $1\ \text{mL}$ einer BCA-Kupfer(II)-sulfat-Lösung im Volumenverhältnis 50:1 zu den Proben gegeben. Die Proben wurden nach gründlichem Mischen 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert und anschließend die Extinktion der Proben bei einer Wellenlänge von 562 nm in einem Zeitraum von 10 min am Photometer gemessen. Die Messung erfolgte dabei in einer Doppelbestimmung.

SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Bei der SDS-PAGE wurden Proteine elektrophoretisch auf einem gradienten (4-15%) Tris-HCl-Polyacrylamid-Gel nach ihrer Größe aufgetrennt, um sie anschließend wie im folgenden Abschnitt beschrieben auf eine Membran zu transferieren.

Zunächst wurden 40 μg Protein, Wasser und 5 \times Ladepuffer (Gesamtvolumen maximal 30 μl) in 1,5 mL-Reaktionsgefäßen gemischt. Die Proben wurden anzentrifugiert, die Proteine denaturiert (5 min, 95 °C) und die Proben erneut anzentrifugiert. Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte in einer Gelelektrophoresekammer in Laufpuffer auf Eis. Vor dem Einsetzen des Gels in die Kammer wurde es mit Laufpuffer gespült, das Pufferreservoir mit Laufpuffer gefüllt und die Geldaschen mit 30 μl gespült. Luftblasen am unteren Gelrand wurden entfernt und die Proben in die Taschen pipettiert. In mindestens eine Spur wurde ein Größenstandard [SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard (Life Technologies), MagicMarkTM XP Western Protein Standard (Life Technologies), Odyssey® Two-Color Protein Molecular Weight Marker (LI-COR) oder KaleidoscopeTM Prestained Standards (Bio-Rad)] pipettiert. Verbleibende leere Taschen wurden mit 5 \times Probenpuffer und bidestilliertem Wasser im Verhältnis 1:5 beladen. Die Elektrophorese erfolgte für 10 min bei 100 V (Sammelphase) und für 80 min bei 200 V (Trennphase).

Western Blot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden in Abhängigkeit der späteren Detektionsart im *Criterion Blotter* auf eine Nitrozellulose-Membran (Fluoreszenzdetektion) oder eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF, Chemilumineszenzdetektion) elektrophoretisch übertragen. Die Nitrozellulose-Membran wurde 10 s in Wasser aktiviert und anschließend 15 min in Transferpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde 10 s in Methanol und folgend 5 min in Wasser aktiviert und anschließend 10 min in Transferpuffer äquilibriert. Die Apparatur wurde gemäß den Herstellerangaben zusammengesetzt. Der Transfer (10 V über Nacht, anschließend 100 V für 30 min) erfolgte unter ständigem Umwälzen des Transferpuffers im Kühlraum (4 °C).

Proteindetektion

Die Proteindetektion erfolgte entweder mit Hilfe des LI-COR-Systems unter Verwendung von Fluoreszenz-markierten Zweitantikörpern (Fluoreszenz-Detektion, Nitrozellulose-Membran) oder mittels Chemilumineszenz-Detektion (PVDF-Membran) auf den jeweiligen Membranen. Die Fluoreszenz-Detektion eignete sich besonders für

die Detektion von schwer definierten Banden wie der monoubiquitinierten Form von FANCD2. Mit der Chemilumineszenz-Detektion ließen sich endogene Unterschiede in der Proteinmenge zwischen Zelllinien gut darstellen.

Nach dem Transfer wurde die Membran mit TBS gewaschen und anschließend unspezifische Antikörper-Bindungsstellen über Nacht entweder mit 10 %-iger Magermilch in TBS-T (Chemilumineszenz-Detektion) oder *Odyssey® Blocking Buffer* (Fluoreszenz-Detektion) unter Schwenken bei 4 °C blockiert. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper (außer bei der Detektion von β -AKTIN) erfolgte bei 4 °C über Nacht, wobei dieser bis zu sechs Mal wiederverwendet wurden. Die verwendeten Antikörper (Name, Spezies) sowie ihre Verwendung (Lösungsmittel, Verdünnung) sind in Tabelle 4.3 im Abschnitt 4.1.3 aufgelistet. Nach der Inkubation mit dem 1. Antikörper wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min mit 0,1%-igem 10 \times TBS-T gewaschen. Für die Chemilumineszenz- und Fluoreszenzdetektion wurden andere sekundäre Antikörper verwendet, die für die jeweilige Detektionsmethode folgend dargestellt sind.

Als Ladekontrolle diente bei Gesamtzellproteinextrakten β -AKTIN. Bei fraktionierten Proteinextrakten wurde H2B als Kontrolle für Chromatin-gebundene Proteine, SP1 für Kernprotein und CALPAIN für Zytosolproteine verwendet.

Chemilumineszenz-Detektion Bei der Chemilumineszenz-Detektion wurde mit sekundären Antikörpern gearbeitet, an die Meerrettichperoxidase gekoppelt ist (sekundäre ECLTM Antikörper). Die Antikörper (Name, Spezies) und die Verwendung (Lösungsmittel, Verdünnung) sind in Tabelle 4.3 im Abschnitt 4.1.3 gelistet. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mit ECLTM-Reagenzien (*Amersham ECLTM Western Blotting Detection Reagents*), die für 1 min mit der Membran inkubierten. Die Bildaufnahme erfolgte mit dem *EG&G Berthold Molecular Light Imager (Night owl)* und zusätzlich wurden Filme mit einer Entwicklungsmaschine (*Curix 60 AGFA*) belichtet.

Fluoreszenz-Detektion Bei der Detektion mit Fluoreszenz-markierten Zweitantikörpern (LI-COR-System) gibt es für die Spezies „Maus“ und „Kaninchen“ jeweils die Möglichkeit, das Proteinsignal in rot (sekundäre IRDye 680RD Antikörper) und grün (sekundäre IRDye 800CW Antikörper) darzustellen. Die Antikörper (Name, Spezies) und die Verwendung (Lösungsmittel, Verdünnung) sind in Tabelle 4.3 im Abschnitt 4.1.3 dargestellt. Die sekundären Antikörper wurden für 1 h bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Dabei und in allen nachfolgenden Schritten musste die Membran vor direkter Lichteinstrahlung geschützt werden, weshalb mit abgedunkelten Inkubationskammern gearbeitet wurde. Die Membran wurde dreimal für

jeweils 10 min mit 0,1%-igem $10\times$ TBS-T gewaschen. Die Proteine wurden mit dem Odyssey CLX 289 detektiert und quantitativ mit dem *Odyssey® Infrared Imaging System* analysiert. Der Hintergrund wurde automatisch abgezogen und ein Wert für die absolute Proteinmenge erhalten.

Auswertung der Proteinexpression

Für den Vergleich der endogener Expression von Proteinen wurde das jeweilige gemessene Proteinsignal auf das β -AKTIN-Signal mit folgender Formel bezogen.

$$\text{Absolute Proteinmenge} = \frac{\text{Proteinsignal}}{\beta - \text{Aktin} - \text{Signal}} \quad (4.3)$$

Um die Proteinexpression zwischen Zelllinien miteinander in ein Verhältnis zu setzen, wurde die höchste absolute Proteinmenge (abs. Proteinmenge) gleich 1 gesetzt und die Proteinmengen der anderen Zelllinien relativ dazu mit folgender Formel ausgerechnet.

$$\text{Relative Proteinmenge} = \frac{\text{abs. Proteinsignal}}{\text{maximales abs. Proteinsignal}} \quad (4.4)$$

Für die Berechnung der Phosphorylierung eines Proteins nach DNA-Schädigung wurde das abs. Proteinsignal des phosphorylierten Proteins durch das abs. Proteinsignal des Proteins geteilt, siehe folgende Formel. Für den Vergleich der Zelllinien untereinander wurde das höchste Signal auf 1 gesetzt und alle anderen Signale relativ dazu berechnet (vgl. Formel 4.4).

$$\text{Phosphorylierung} = \frac{\text{max.abs. Phospo} - \text{Proteinsignal}}{\text{abs. Proteinsignal}} \quad (4.5)$$

4.2.7 Zellulärer Nachweis von RAD51- und 53BP1-Foci

Der Nachweis von RAD51- und 53BP1-Foci diente der Detektion von DNA-DSBs, wobei 53BP1 als genereller Schadensmarker für DSBs und RAD51 für DSBs, die mittels HR repariert werden, verwendet wurden. RAD51 und 53BP1 wurden fluoreszenzimmunologisch nachgewiesen. Außerdem wurden Zellkerne mit DAPI gefärbt und replizierende Zellen gegebenenfalls mit EdU markiert (Click-iT® EdU Imaging Kit).

RAD51 und 53BP1 Foci in replizierenden Zellen nach MMC-Schädigung

0,5–1·10⁵ Zellen wurden pro Loch einer 12-Loch-Platte auf Deckgläschen ausgelegt. Nach 16–18 h wurden die Zellen für 30 min mit 10 μ M EdU versetzt und anschließend für 30 min mit 1,5 μ M MMC (vgl. Abschnitt 4.2.2) inkubiert. Der Zellrasen wurde zweimal mit PBS gespült und mit frischem Medium weitere 6 h bzw. 24 h bei 37 °C inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden preextrahiert. Dafür wurde der Zellrasen zunächst einmal mit 1 mL PBS (20 °C) und einmal mit 1 mL PB (4 °C) gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte dann mit 1 mL PB-T für 5 min auf Eis. Nachfolgend wurden die Zellen für 3 min mit 1 mL PB (4 °C) gewaschen, 1 mL Permeabilisierungslösung (PBS + 4 % PFA) für 10 min bei RT zugegeben und dreimal 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die fluoreszenzimmunologische Färbung von 53BP1 und RAD51 parallel. Die Zellen wurden für 3 h bei RT mit Blockierungslösung (PBS + 4 % BSA) und anschließend der 1. Antikörper für 53BP1 und RAD51 über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden sechsmal für 10 min mit PBS-T gewaschen und fortan lichtgeschützt gearbeitet. Die 2. Antikörper wurden unter Zugabe von DAPI (1:1000) für 45 min bei RT inkubiert. Die verwendeten Antikörper (Name, Spezies) sowie ihre Verwendung (Lösungsmittel, Verdünnung) sind in Tabelle 4.3 im Abschnitt 4.1.3 aufgelistet. Die Zellen wurden sechsmal für 10 min mit PBS-T gewaschen und anschließend das EdU mit dem Farbstoff *Alexa Fluor® azide 647* für 30 min bei RT gefärbt. Die Zellen wurden dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und in 2,5 μ l *Vectashiel® Mounting-Medium* eingebettet.

Auswertung mit dem Auge am Mikroskop Die Auswertung erfolgte verschlüsselt am Fluoreszenzmikroskop (*Axiovision Observer Z1*). Es wurden zunächst Bilder aufgenommen, um EdU-positive Zellen im (*far red*) Fluoreszenz-Bereich zu identifizieren. Anschließend wurden RAD51 und 53BP1-Foci in in EdU-positiven Zellen in diesen Ausschnitten gezählt. Pro Deckgläschen wurden 50 Zellen ausgewertet.

Automatische Auswertung Die automatisierte Zählung von RAD51- und 53BP1-Foci in EdU-positiven Zellen erfolgte nach automatischer Bildaufnahme am Mikroskop (*BD Pathway 435 bioimager*) über Nacht. Dabei wurden die Emissionskanäle und Positionen der Objektträger programmiert und das Programm über Nacht laufen gelassen. Die automatische Zählung erfolgte mit der Software *CellProfiler*, wobei die Intensitäten der Signale zuvor festgelegt wurden.

RAD51- und 53BP1-Foci nach RAD51-Inhibition

Für die Detektion von RAD51- und 53BP1-Foci nach Inhibition von RAD51 (vgl. Abschnitt 4.2.3) wurden $0,5\text{--}1\cdot 10^5$ Zellen pro Loch einer 12-Loch-Platte auf Deckgläschen ausgelegt. Nach 16–18 h wurden die Zellen mit $20\ \mu\text{M}$ RI-1 6 h inkubiert und anschließend mit 10 Gy bestrahlt. Nach weiteren 16–18 h wurden die Zellen wie zuvor beschrieben lysiert, fixiert und gefärbt, wobei auf eine EdU-Färbung verzichtet wurde. Es wurden 50 Foci pro DAPI-positive Zelle per Auge ausgezählt.

4.2.8 Zellzyklusuntersuchung am Durchflusszytometer

Die Zellzyklusuntersuchung dient der Bestimmung der Anteile einer Zellpopulation in G1-, S- und G2-Phase des Zellzyklusses. Die Unterscheidung der Phasen wird durch den DNA-Gehalt der einzelnen Zellen durch Anfärben der DNA mit Propidiumiodid (PI) gewährleistet, welches mit der DNA interkaliert. So kann zunächst zwischen einem einfachen DNA-Gehalt (G1-Phase) und einem doppeltem DNA-Gehalt (G2-Phase) unterschieden werden. Zellen mit dazwischen liegenden DNA-Gehalten werden der S-Phase zugeordnet. Die PI-Messung erfolgte am Durchflusszytometer und die Auswertung der Zellzyklusverteilung mit Hilfe der Software *ModFit*.

Zellen wurden wie nachfolgend beschrieben wachsen gelassen und geerntet. Die Zellsuspension wurde in 15 mL-Falconröhrchen überführt, zentrifugiert (5 min, $4\ ^\circ\text{C}$, 0,3 g) und das Zellpellet in 1 mL PBS resuspendiert. 4 mL eiskaltes PBS wurde in 15 mL-Falconröhrchen vorgelegt und die Zellsuspension langsam dazugetropft. Die Suspension konnte bei $-80\ ^\circ\text{C}$ eingefroren werden. Für die PI-Färbung wurde die Zellsuspension zentrifugiert (5 min, $4\ ^\circ\text{C}$, 0,3 g) und der Überstand abdekantiert. Die Zellen wurden mit 1 mL PBS mit 0,1 % Tween20 gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, $4\ ^\circ\text{C}$, 0,3 g). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 0,5 mL PI-Lösung ($10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), die frisch mit 1 % RNase versetzt war, für mindestens 30 min gefärbt. Die Proben wurden durch Gase in FACS-Röhrchen gefüllt und am Durchflusszytometer gemessen.

Zellzyklusverteilung in exponentiell wachsenden Zellen

Für den Vergleich der Expression von Proteinen, die Zellzyklus-abhängig reguliert werden, mussten mögliche Zellzykluseffekte auf die Proteinexpression ausgeschlossen werden.

$1\cdot 10^5$ exponentiell wachsende Zellen wurden pro Loch einer 12-Loch-Platte in 1 mL Medium ausgelegt und nach 48 h die Zellzyklusverteilung bestimmt.

Zellzyklusverteilung in mit Plasmiden transfizierten Zellen

Mögliche Zellzykluseffekte auf die Fähigkeit von Zellen DSBs mittels HR zu reparieren (HR-Kapazität), die lediglich in der S- und G2-Phase aktiv ist, mussten ausgeschlossen werden.

$1 \cdot 10^5$ exponentiell wachsende Zellen wurden pro Loch einer 12-Loch-Platte in 1 mL Medium ausgelegt und 24 h später transient mit Plasmiden transient transfiziert (vgl. Abschnitt 4.2.5). Nach weiteren 24 h wurde die Zellzyklusverteilung bestimmt.

Kinetik der Zellzyklusverteilung von Zellen nach MMC-Schädigung

$1 \cdot 10^5$ exponentiell wachsende Zellen wurden pro Loch einer 12-Loch-Platte in 1 mL Medium ausgelegt und 16–18 h für 1 h mit $1,5 \mu\text{M}$ MMC behandelt. Zellen wurden direkt nach MMC-Schädigung sowie 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h und 24 h fixiert und die Zellzyklusverteilung bestimmt.

4.2.9 Zelluläres Überleben im Koloniebildungstest

Der Koloniebildungstest diente der Bestimmung des zellulären Überlebens nach Behandlung der Zellen mit MMC (vgl. Abschnitt 4.2.2). Der RAD51-Proteingehalt wurde gegebenenfalls zuvor mittels siRNA reduziert (vgl. Abschnitt 4.2.4). Es wurde mit exponentiell wachsenden Zellen gearbeitet. Deswegen wurden zunächst $1 \cdot 10^6$ Zellen in T75-Zellkulturflaschen und 24 h später von dieser Kultur 125 Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte in 1,5 mL Medium ausgelegt. Nach einem Anwachszeitraum von 6 h wurden die Zellen für 1 h mit $1,5 \mu\text{M}$ MMC bei 37°C inkubiert, anschließend zweimal mit 1 mL PBS gewaschen und mit 1,5 mL frischem Medium versetzt. 7 – 14 Tage später wurden die Zellen mit 70%-igem Ethanol für 5 min fixiert und mit Kristallviolett gefärbt (5 min). Die 6-Loch-Platten wurden mit Wasser ausgespült und trocken gelassen. Es wurden Kolonien mit mindestens 50 Zellen ausgewertet.

4.2.10 Statistik

Die Ergebnisse der Versuche werden jeweils als arithmetisches Mittel der einzelnen Bestimmungen dargestellt. Der jeweilige Fehler ist als Standardfehler angegeben. Wo ein Signifikanztest durchgeführt wurde, erfolgte dieser als zweiseitiger Student'scher t-Test.

KAPITEL 5

Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung geringfügiger Unterschiede in der RAD51-Expression, von sehr niedrig bis sehr hoch, für die Reparatur von DSBs mittels HR in humanen Tumorzelllinien untersucht. DSBs werden primär durch die beiden Hauptreparaturwege NHEJ und HR repariert. Dabei stellt HR den bedeutendsten Reparaturweg während der S-Phase des Zellzyklus dar.

Das Schlüsselprotein der HR ist RAD51, für das in Tumoren große Unterschiede in der Expression beobachtet wurden. Die Überexpression von RAD51 in Tumoren bedeutete dabei in zahlreichen Entitäten eine negative Prognose für das Überleben der Patienten [3, 85, 87, 95, 125, 154]. Der zugrunde liegende Mechanismus für die negative Prognose bei Überexpression von RAD51 ist bislang unklar und sollte in dieser Arbeit erstmalig untersucht werden. Eine mögliche Ursache wäre eine Therapieresistenz der Tumore aufgrund einer vermehrten Reparatur mittels HR, die mit einem Anstieg der RAD51-Expression einhergeht. Es wäre ebenfalls möglich, dass RAD51-Überexpression zu einer übersteigerten und damit zellulär nicht kontrollierbaren HR (Hyperrekombination) führt. Diese könnte zu einer erhöhten genomischen Instabilität führen, welche deutlich aggressivere Tumore generiert und deshalb eine negative Prognose bedingt [96, 105, 109, 131].

Diese Fragestellung wurde experimentell an je zehn Brustkrebs- (BrCa) und Kopf-Hals (HNSCC)- Tumorzelllinien untersucht.

Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse in verschiedenen Tumorzelllinien und -entitäten waren zunächst Etablierungsexperimente bezüglich des Plasmid-Rekonstruktions-Assays, der Auswertung von DNA-Reparatur-Foci RAD51 und 53BP1 und der Inhibition der RAD51-Expression mittels siRNA oder durch einen *small molecule*-Inhibitor notwendig (vgl. Abschnitt 5.1).

Die Charakterisierung der zehn BrCa- und zehn HNSCC-Zelllinien mit Unterschieden in der endogenen RAD51-Expression hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur

Reparatur von DNA-DSBs mittels HR erfolgte in einem Plasmid-Rekonstruktions-Assay (HR-Kapazität; vgl. Abschnitt 5.2). Im Weiteren wurde die Bedeutung der RAD51-Expression für das zelluläre Überleben nach Behandlung mit dem DNA-DNA-vernetzenden Chemotherapeutikum MMC untersucht und inwieweit dies mit der Fähigkeit zur Phosphorylierung der Kinase CHK1, die die Zellzykluskontrolle in der S- und G2-Phase aktiviert, nach Behandlung mit MMC und UV-Strahlung korreliert (vgl. Abschnitte 5.3, 5.4 und 5.5). Dabei war die Fähigkeit zur Ausbildung von RAD51- und 53BP1-Foci in replizierenden Zellen und die Auswirkung auf den Zellzyklus nach MMC-Schädigung von Interesse (vgl. Abschnitte 5.7 und 5.8). Abschließend wurde die Abhängigkeit der HR-Kapazität und der zellulären MMC-Empfindlichkeit von der RAD51-Expression nach Inhibition von RAD51 untersucht (vgl. Abschnitte 5.9 und 5.10).

5.1 Methodische Vorarbeiten

Zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit verschiedener Tumorzelllinien und -entitäten waren methodische Etablierungsarbeiten notwendig. Diese Vorexperimente wurden für den Plasmid-Rekonstruktions-Assay, für die Detektion von RAD51- und 53BP1-Foci und für die Inhibition der RAD51-Expression mittels siRNA sowie die Inhibition von RAD51 durch den RAD51-Inhibitor RI-1 wie nachfolgend beschrieben durchgeführt.

5.1.1 Etablierung des Plasmid-Rekonstruktions-Assay zum Nachweis der DSB-induzierten Reparatur mittels HR in Tumorzelllinien

Die Auswirkung geringfügiger Unterschiede in der RAD51-Expression für die DSB-induzierte Reparatur mittels HR wurde bislang nicht untersucht. Die Fähigkeit, einen einzelnen DNA-DSB mittels HR zu reparieren, wurde mittels Plasmid-Rekonstruktions-Assay (HR-Kapazität) überprüft (vgl. Kapitel 4, Abschnitt 4.2.5). Für diesen Assay war die erfolgreiche Transfektion des Reparaturkonstruktes (pGC) essentiell. Die Transfektionseffizienz wurde durch parallele Transfektion mit einem das grün fluoreszierende Protein (GFP) exprimierenden Plasmid (pEGFP-N1) kontrolliert. Das Plasmid pGC ist das Reparaturkonstrukt, das nach DSB-Induktion durch die Endonuklease I-Sce-I bei einer fehlerfreien Reparatur ausschließlich mittels HR zur Expression von GFP führt. Die Transfektion erfolgte transient und die Konditionen für den Plasmid-Rekonstruktions-Assay wurden so gewählt, dass eine bestmögliche Vergleichbarkeit sowohl zwischen den Experimenten als auch den Zelllinien gegeben war. Das Ziel war einerseits, eine möglichst hohe Transfektionseffizienz

unter möglichst geringer zytotoxischer Wirkung des Transfektionsagenzes zu erreichen, und andererseits, den optimalen Zeitraum zwischen transienter Transfektion und GFP-Messung (Reparaturzeit) festzulegen.

Die Transfektionseffizienz ist abhängig von dem verwendeten Transfektionsagenz und dem Verhältnis von Transfektionsagenz zu Plasmid [$\mu\text{l}:\mu\text{g}$] [104]. Abbildung 5.1 zeigt die Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von zwei verschiedenen Transfektionsagenzien, die in unterschiedlichen Verhältnissen zum Kontrollplasmid eingesetzt wurden. Die beiden Transfektionsagenzien LipofectamineTM 2000 und FuGENE[®] HD wurden in den Verhältnissen 2:1, 4:1,6 und 3:1 von Transfektionsagenz zu pEGFP-N1 [$\mu\text{l}:\mu\text{g}$] in den Zelllinien *MDA-468* und *FaDu* verwendet. Dafür wurden exponentiell wachsende Zellen transient mit dem GFP-exprimierenden Kontrollplasmid pEGFP-N1 unter Verwendung der Transfektionsagenzien LipofectamineTM 2000 oder FuGENE[®] HD transfiziert. Der prozentuale Anteil GFP-positiver Zellen wurde 24 h nach Transfektion am Durchflusszytometer gemessen.

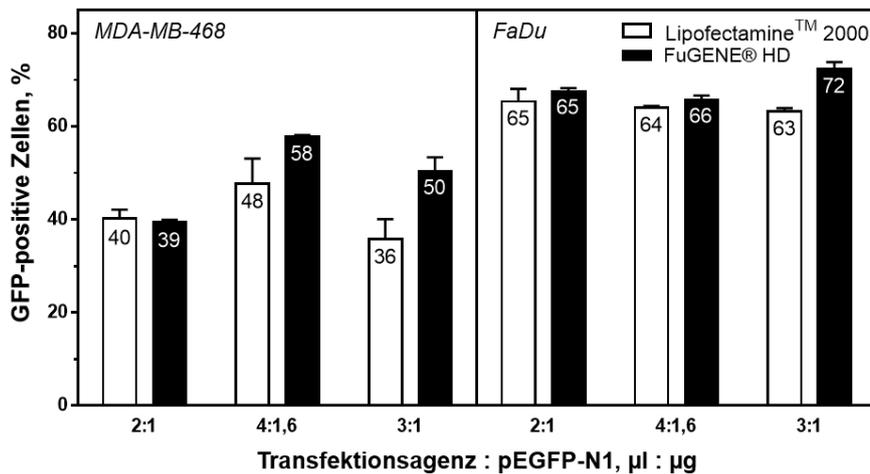


Abbildung 5.1: Vergleich der Transfektionseffizienz und Verhältnis von Transfektionsagenz zu Kontrollplasmid zweier Transfektionsagenzien nach transienter Transfektion.

Exponentiell wachsende Zellen wurden 24 h nach Aussaat transient mit LipofectamineTM 2000 oder FuGENE[®] HD und dem GFP-exprimierenden Plasmid pEGFP-N1 im Verhältnis 2:1, 4:1,6 und 3:1 [$\mu\text{l}:\mu\text{g}$] transfiziert. Der prozentuale Anteil GFP-positiver Zellen wurde 24 h nach Transfektion am Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Doppelbestimmungen + SEM.

Es zeigten sich deutliche Unterschiede in der Transfektionseffizienz zwischen den beiden untersuchten Zelllinien. Während die BrCa-Zelllinie *MDA-468* im Mittel eine Transfektion von etwa 45 % mit einer Variation von 36–58 % aufwies, wurde

eine deutlich höhere Transfektionseffizienz in der HNSCC-Zelllinie *FaDu* mit im Mittel 65 % und einer Variation von 63–72 % beobachtet. Der Einsatz von FuGENE® HD zeigte in beiden Zelllinien höhere Transfektionseffizienzen im Vergleich zu LipfectamineTM 2000. Für die Zelllinie *MDA-468* reichte diese in Abhängigkeit der Verhältnisse 2:1, 4:1,6 und 3:1 [μl Transfektionsagens: μg pEGFP-N1] von $39 \pm 0,4$ % über $58 \pm 0,3$ % bis 50 ± 3 %. Dagegen lag die Transfektionseffizienz mit LipfectamineTM 2000 bei Verhältnissen von 2:1, 4:1,6 und 3:1 [μl : μg] zu pEGFPN1 bei 40 ± 2 %, 48 ± 5 % und 36 ± 4 %. Dies wurde auch für die HNSCC-Zelllinie *FaDu* beobachtet, mit $65 \pm 0,7$ %, 66 ± 1 % und 72 ± 2 % beim Einsatz von FuGENE® HD zu pEGFPN1 im Verhältnis 2:1, 4:1,6 und 3:1 [μl : μg] im Vergleich zu Transfektionseffizienzen von 65 ± 3 %, $64 \pm 0,3$ % und $63 \pm 0,7$ % nach Einsatz von LipfectamineTM 2000. Das Verhältnis von Transfektionsagens zu eingesetztem Plasmid wirkte sich ebenfalls aus, mit höheren Transfektionseffizienzen bei höheren Konzentrationen des Transfektionsagenzes. Darüber hinaus zeigte sich eine deutlich geringere Zytotoxizität nach Transfektion mit FuGENE® HD, sodass für alle folgenden Experimente FuGENE® HD im Verhältnis von 3:1 [μl : μg] zum Plasmid pEGFP-N1 verwendet wurde.

Der Zeitraum zwischen Transfektion mit dem Reparaturplasmid pGC und Bestimmung des Anteils GFP-positiver Zellen (Reparaturzeit) kann sich auf die HR-Frequenz auswirken. Abbildung 5.2 zeigt die relative HR-Kapazität in einem Zeitraum von 24 bis 72 h nach Transfektion in vier Zelllinien. Exponentiell wachsende Zellen wurden in einem parallelen Ansatz transient mit dem GFP-exprimierenden Plasmid pEGFP-N1 oder dem Reparaturkonstrukt pGC transfiziert und der prozentuale Anteil GFP-positiver Zellen 24, 48 und 72 h nach Transfektion in *FaDu*-, *HSC4*-, *MCF-7*- und *MDA-468*-Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. Die relative HR-Kapazität wurde relativ zu der HR-Kapazität von *FaDu*-Zellen nach einer Reparaturzeit von 24 h berechnet.

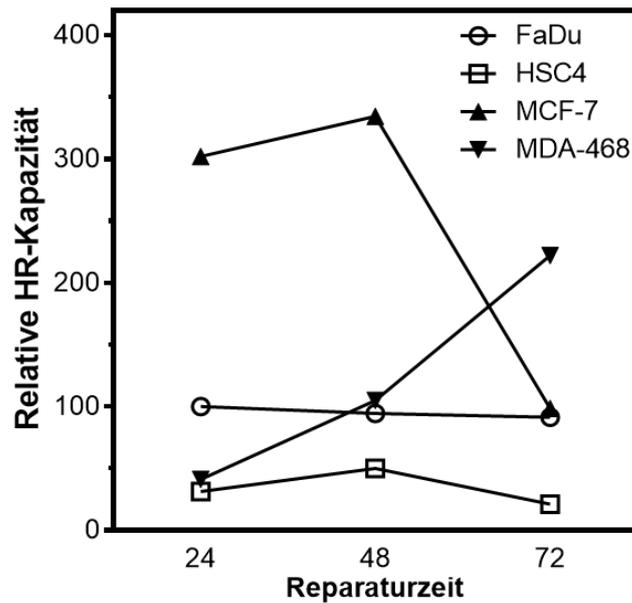


Abbildung 5.2: Einfluss des Inkubationszeitraumes auf die HR-Kapazität in vier Zelllinien.

Exponentiell wachsende Zellen wurden 24 h nach Aussaat transient mit dem GFP-exprimierenden Plasmid pEGFP-N1 oder dem Reparaturkonstrukt pGC in einem Verhältnis von dem Transfektionsagens zum Plasmid von 3:1 [$\mu\text{l}:\mu\text{g}$] transfiziert. Der prozentuale Anteil GFP-positiver Zellen wurde 24, 48 und 72 h nach Transfektion am Durchflusszytometer gemessen. Die relative HR-Kapazität wurde relativ zu der HR-Kapazität in *FaDu*-Zellen berechnet.

Abbildung 5.2 zeigt eine deutliche Veränderung der relativen HR-Kapazität in Abhängigkeit von der Reparaturzeit, insbesondere in den untersuchten BrCa-Zelllinien. Ein deutlicher Anstieg der HR-Kapazität über den gesamten Untersuchungszeitraum wurde für die Zelllinie *MDA-468* beobachtet, mit Werten von 41, 105 und 222 nach 24, 48 bzw. 72 h. Dagegen wurde eine gleichbleibende HR-Kapazität bis 48 h nach Transfektion mit anschließender Reduktion nach 72 h für die Zelllinie *MCF-7* mit Werten von 302 und 334 und 98 beobachtet. In den HNSCC-Zelllinien wurde keine deutliche Variation beobachtet. Während die relative HR-Kapazität von 31, 50 und 21 in Abhängigkeit der Reparaturzeit (24, 48 und 72 h) in *HSC4*-Zellen leicht variierte, zeigte die Zelllinie *FaDu* keine wesentliche Veränderung in der relativen HR-Kapazität, mit Werten von 100, 94 und 91 nach 24, 48 und 72 h.

Unter Berücksichtigung der Zytotoxizität des Transfektionsagens und der unterschiedlichen Proliferationsgeschwindigkeit der einzelnen Zelllinien wurde ein möglichst kurzer Zeitraum von 24 h für alle weiteren Experimente gewählt.

Tabelle 5.1 listet die gemessenen Transfektionseffizienzen in BrCa- und HNSCC-Zelllinien. Dafür wurden exponentiell wachsende Zellen transient mit dem GFP-exprimierenden Plasmid pEGFP-N1 unter Verwendung des Transfektionsagenzes FuGENE® HD in dem Verhältnis von 3:1 [$\mu\text{L}:\mu\text{g}$] zu pEGFP-N1 transfiziert. 24 h nach transienter Transfektion erfolgte die Messung GFP-positiver Zellen am Durchflusszytometer.

Tabelle 5.1: Transfektionseffizienzen in BrCa- und HNSCC-Zelllinien.

BrCa-Zelllinien		HNSCC-Zelllinien	
Zelllinie	Transfektionseffizienz [%]*	Zelllinie	Transfektionseffizienz [%]*
BT-20	15,2 \pm 4,6	Cal33	33,3 \pm 4,4
BT-474	23,2 \pm 5,4	FaDu	59,6 \pm 8,4
BT-549	29,7 \pm 10,1	HSC4	41,0 \pm 16,6
GI-101	13,9 \pm 1,9	SAS	33,2 \pm 13,7
HS-578T	29,4 \pm 1,9	UT-14	30,0 \pm 10,1
MCF-7	44,0 \pm 7,9	UT-15	31,2 \pm 6,0
MDA-231	35,2 \pm 7,9	UT-45	10,9 \pm 4,8
MDA-468	43,4 \pm 7,7	UT-5	44,7 \pm 3,0
SKBR-3	29,5 \pm 5,4	UT-8	29,0 \pm 6,2
T-47D	8,5 \pm 2,7	XF-354	11,6 \pm 3,6

* % GFP-positive Zellen,

Das Verhältnis von FuGENE® HD zu pEGFP-N1 war 3:1 [$\mu\text{L}:\mu\text{g}$].

Tabelle 5.1 zeigt Unterschiede in der Transfektionseffizienz sowohl in BrCa- als auch HNSCC-Zelllinien. Bei BrCa-Zelllinien lag die Schwankungsbreite der Transfektionseffizienz bei 36 %, mit 9 ± 3 % in *T-47D*- und 44 ± 8 % in *MCF-7*-Zellen. Diese war vergleichbar mit der Schwankungsbreite von 49 %, mit 12 ± 4 % in *UT-45*- und 60 ± 8 % in *FaDu*-Zellen. Somit konnten alle zu untersuchenden Zelllinien unter durchgeführten Bedingungen erfolgreich transfiziert werden.

Eine optimale Vergleichbarkeit der relativen HR-Kapazität im Plasmid-Rekonstruktions-Assay zwischen Zelllinien durch eine hohe Transfektionseffizienz und eine geringe Zytotoxizität wurde unter Verwendung von FuGENE® HD im Verhältnis von 3:1 [$\mu\text{L}:\mu\text{g}$] zum Plasmid pEGFP-N1 und einem Inkubationszeitraum von 24 h

erreicht. Die gewählten Konditionen gewährten die Vergleichbarkeit der Zelllinien für die Untersuchung der Bedeutung von Unterschieden in der endogenen RAD51-Expression für die DSB-induzierte HR.

5.1.2 Vergleichbarkeit der RAD51- und 53BP1-Foci-Zählung mit dem Auge und nach automatisierter Zählung

Die Auswirkung gradueller Unterschiede in der RAD51-Expression auf die Reparatur von DSBs mittels HR wurde zusätzlich anhand von Reparatur-Foci überprüft. Ein Reparatur-Focus stellt eine Akkumulation von Reparatur-Proteinen dar, die an die DNA-Schäden rekrutiert werden und durch einen immunologischen Nachweis der Proteine detektiert werden. Nach einer erfolgreichen Reparatur der DNA-Schäden dissoziieren die Reparaturproteine von der DNA, was als Maß für eine erfolgreiche Reparatur gewertet werden kann [90]. Der DSB-Reparaturweg hängt einerseits von der Art des Schadens und andererseits von der Zellzyklusphase ab. HR ist dabei der Hauptreparaturweg in der S-Phase [72].

Abbildung 5.3 zeigt beispielhaft die Ausbildung der Reparatur-Foci von RAD51 und 53BP1 in einer S-Phase-Zelle. RAD51-Foci dienen als Marker für DNA-DSBs, die mittels HR repariert wurden, 53BP1-Foci als genereller DSB-Marker. Die Zellen wurden mit MMC geschädigt, wodurch in der S-Phase Replikations-assoziierte DSBs nach Prozessierung von den induzierten DNA-DNA-Vernetzungen generiert wurden [2, 29, 117]. Zur Kenntlichmachung von replizierenden Zellen wurden Zellen vor MMC-Schädigung mit EdU (Basenanalogue) inkubiert, das bei der Replikation in die DNA eingebaut wurde. Nach der Immunfluoreszenzfärbung von RAD51 und 53BP1 sowie der DAPI- und EdU-Färbung erfolgte die Detektion von RAD51- und 53BP1-Foci nach Schädigung mit MMC in replizierenden Zellen (EdU positiv).

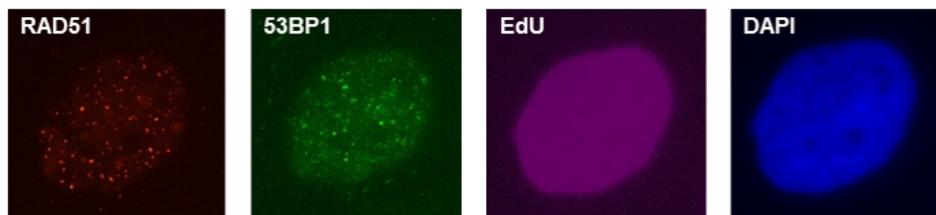
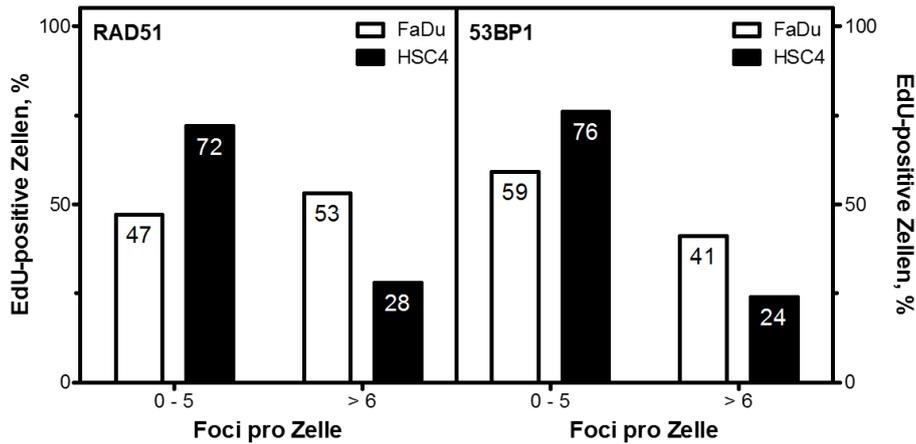


Abbildung 5.3: Immunfluoreszenz-Nachweis von RAD51 und 53BP1 im Zellkern einer S-Phasezelle.

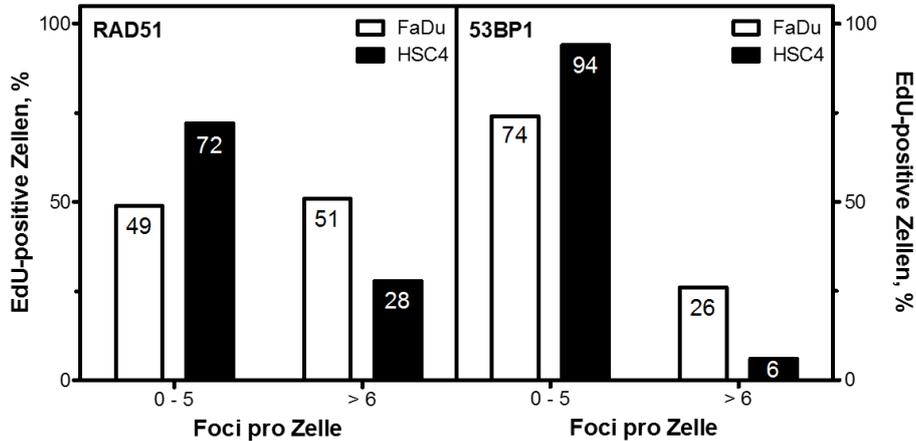
Die exponentiell wachsende HNSCC-Zelllinie *HSC4* wurde 30 min mit 10 μ M EdU (S-Phase) und anschließend 30 min mit 1,5 μ M MMC behandelt. Die Immunfluoreszenzfärbung von RAD51 bzw. 53BP1 erfolgte 6 h nach Schädigung in replizierenden Zellen, der Nachweis von DAPI diente zur Färbung des Zellkerns.

Abbildung 5.3 zeigt die gleichzeitige Färbung von RAD51, 53BP1, EdU und DAPI. Diese war deutlich zu erkennen, sodass die Zählung von RAD51 und 53BP1-Foci in Edu-positiven bzw. -negativen Zellen Rückschlüsse auf die DSB-Reparatur mittels HR in Abhängigkeit der Zellzyklusphase ermöglichte.

Im Weiteren erfolgte die Zählung von RAD51- und 53BP1-Foci in replizierenden Zellen automatisiert (automatische Bildaufnahme und Zählung) mithilfe der Software *Cell profiler*. Für die Gewährleistung der Vergleichbarkeit wurde die automatisierte Zählung zunächst mit der im Labor konventionell verwendeten Methode durch Zählung von Reparatur-Foci mit dem Auge verglichen. Replizierende Zellen wurden durch EdU markiert und anschließend mit MMC behandelt. Die Immunfluoreszenzfärbung von RAD51 bzw. 53BP1 erfolgte 6 h nach Schädigung in replizierenden Zellen (EdU positiv). Präparate wurden mit dem Auge am Mikroskop (vgl. Abbildung 5.4a) und automatisiert (vgl. Abbildung 5.4b) gezählt.



(a) Zählung von RAD51- und 53BP1-Foci in EdU-positiven Zellen mit dem Auge



(b) Automatisierte Zählung von RAD51- und 53BP1-Foci in EdU-positiven Zellen

Abbildung 5.4: Anzahl an RAD51- und 53BP1-Foci in replizierenden Zellen nach Zählung mit dem Auge und nach automatisierter Zählung.

Die exponentiell wachsenden Zellen wurden für jeweils 30 min mit $10 \mu\text{M}$ EdU und anschließend mit $1,5 \mu\text{M}$ MMC behandelt. Die Immunfluoreszenzfärbung von RAD51 bzw. 53BP1 erfolgte 6 h nach Schädigung in replizierenden Zellen (EdU-positiv). Präparate wurden per Auge am Mikroskop (5.4a) und automatisiert (5.4b) gezählt. Für die Auswertung wurden Gruppen für Zellen mit 0–5 und ≥ 6 RAD51- und 53BP1-Foci pro Zelle gebildet.

Abbildung 5.4 zeigt die Vergleichbarkeit der beiden Methoden zur Zählung von 53BP1- und RAD51-Foci in replizierenden Zellen. Beide Methoden wiesen in gleicher Weise deutliche Unterschiede in der Anzahl an RAD51- und 53BP1-Foci in den zwei untersuchten Zelllinien auf.

Die RAD51-Foci-Zählung war in beiden Methoden in der jeweiligen Zelllinie beinahe identisch. Für *FaDu*-Zellen wurden bei der Zählung mit dem Auge 49 % Zellen mit 0–5 sowie 51 % Zellen mit mehr als 6 RAD51-Foci pro EdU-positive Zelle detektiert, bei der automatisierten Auswertung waren es 47 % Zellen mit 0–5 sowie 53 % Zellen mit mehr als 6 RAD51-Foci pro EdU-positive Zelle. *HSC4*-Zellen wiesen sowohl nach automatisierter als auch manueller Zählung die gleiche Anzahl an RAD51-Foci, mit 72 % Zellen mit 0–5 und 28 % mit mehr als 6 RAD51-Foci pro EdU-positive Zelle (vgl. Abbildung 5.4a und 5.4b, rechts).

Durch die Zählung mit dem Auge wurden insgesamt weniger 53BP1-Foci detektiert als bei der automatisierten Zählung. In *FaDu*-Zellen wurden bei der Zählung mit dem Auge 6 h nach MMC-Schädigung 59 % Zellen mit 0–5 sowie 41 % Zellen mit mehr als 6 53BP1-Foci pro EdU-positive Zelle detektiert, bei der automatisierten Zählung waren es 74 % Zellen mit 0–5 sowie 26 % Zellen mit mehr als 6 53BP1-Foci pro EdU-positive Zelle. *HSC4*-Zellen besaßen bei der Zählung mit dem Auge 76 % Zellen mit 0–5 und 24 % Zellen mit mehr als 6 53BP1-Foci pro EdU-positive Zelle, bei der automatisierten Zählung wurden 94 % Zellen mit 0–5 und 6 % Zellen mit mehr als 6 53BP1-Foci pro EdU-positive Zelle gezählt. Für *HSC4*-Zellen wurden bei beiden Auswertungen jedoch etwa 20 % mehr Zellen mit 0–5 53BP1-Foci pro EdU-positive Zelle als für *FaDu*-Zellen und dementsprechend weniger Zellen mit mehr als 6 53BP1-Foci pro EdU-positive Zelle gezählt (vgl. Abbildung 5.4a und 5.4b, links). Für *HSC4*-Zellen wurden damit im Vergleich zu *FaDu*-Zellen in beiden Zählmethoden 6 h nach MMC-Schädigung insgesamt weniger 53BP1-Foci gezählt.

Die Anzahl der 53BP1-Foci war 6 h nach MMC-Schädigung genau wie bei den RAD51-Foci in *HSC4*- in beiden Zählmethoden geringer als in *FaDu*-Zellen.

Aufgrund der guten Vergleichbarkeit der beiden Zählmethoden wurde für folgende Experimente die automatisierte Zählung von RAD51- und 53BP1-Foci in replizierenden Zellen (EdU-positiv) verwendet.

5.1.3 Inhibition von RAD51 mittels Inhibitor

Für die Untersuchung der Bedeutung von RAD51 für die HR im Plasmid-Rekonstruktion-Assay erfolgte die Inhibition von RAD51 durch den *small molecule*-Inhibitor RI-1. RI-1 inhibiert die Filamentbildung von RAD51 [16]. Der Einsatz von *small molecule*-Inhibitoren sollte aufgrund seiner geringen Größe besser aufgenommen werden und so zu einer stärkeren Inhibition der RAD51-Filamentbildung führen. Es wurden verschiedene Konzentrationen RI-1 für die Inhibition von RAD51 überprüft. Als Maß für eine erfolgreiche Inhibition von RAD51 galt die Abnahme

der relativen HR-Kapazität im Plasmid-Rekonstruktions-Assay.

Abbildung 5.5 stellt die Abnahme der relativen HR-Kapazität in Abhängigkeit verschiedener RI-1 Konzentrationen in der Zelllinie *UT-8* dar. Exponentiell wachsende *UT-8* wurden mit 10, 20 und 30 μM RAD51 Inhibitor RI-1 versetzt und nach 6 h transient mit dem GFP-exprimierenden Plasmid pEGFP-N1 oder dem Reparaturkonstrukt pGC transfiziert. Der prozentuale Anteil GFP-positiver Zellen wurde 24 h nach Transfektion am Durchflusszytometer gemessen.

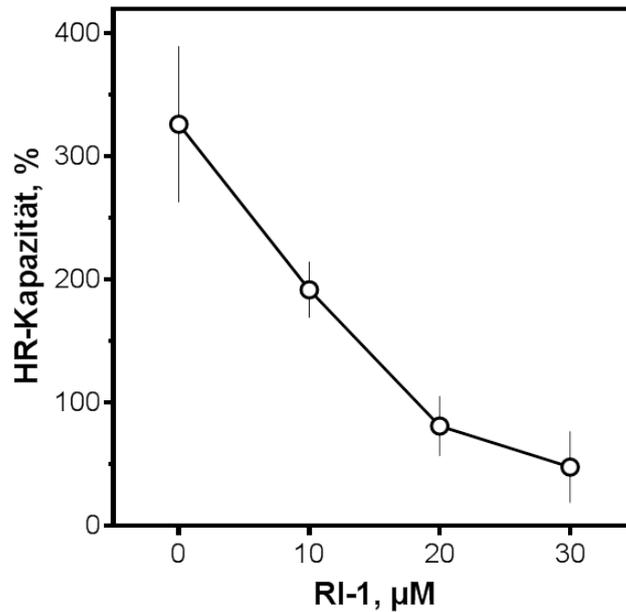


Abbildung 5.5: HR-Kapazität nach Inhibition von RAD51 durch den Inhibitor RI-1.

Exponentiell wachsende Zellen wurden 16 h nach Aussaat mit 10, 20 und 30 μM RAD51 Inhibitor RI-1 versetzt und nach 6 h transient mit dem GFP-exprimierenden Plasmid pEGFP-N1 oder dem Reparaturkonstrukt pGC in einem Verhältnis von dem Transfektionsagens zum Plasmid von 3:1 [$\mu\text{l}:\mu\text{g}$] transfiziert. Der prozentuale Anteil GFP-positiver Zellen wurde 24 h nach Transfektion am Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Doppelbestimmungen +/- SEM.

Es zeigte sich eine deutliche Abnahme der relativen HR-Kapazität in Abhängigkeit der RI-1-Konzentration in *UT-8*-Zellen. Dabei sank die relative HR-Kapazität bei 10 μM um 43 %, bei 20 μM um 75 % und bei 30 μM um 85 %. Bei 30 μM wurde die deutlichste Reduktion der relativen HR-Kapazität von *UT-8* beobachtet, allerdings ebenfalls eine erhebliche Zytotoxizität des Inhibitors RI-1. Da eine vergleichbare

Reduktion der HR-Kapazität bei Inhibition von RAD51 mit 20 und 30 μM RI-1 sowie eine deutlich geringere zytotoxische Wirkung unter Verwendung von 20 μM RI-1 zu beobachten waren, wurde für weitere Experimente eine Konzentration 20 μM RI-1 verwendet.

Die erfolgreiche Unterdrückung der RAD51-Filamentbildung durch RI-1-Inhibition wurde zellulär durch einen Immunfluoreszenz-Nachweis von RAD51- und 53BP1-Foci überprüft und ist in Abbildung 5.6 dargestellt. Exponentiell wachsende Zellen wurden mit 20 μM RI-1 für einen Zeitraum von 6 h behandelt und anschließend mit 10 Gy bestrahlt. Die Immunfluoreszenz-Färbung von RAD51 und 53BP1 erfolgte 16 h nach Schädigung und die Inhibition von RAD51 wurde am Fluoreszenzmikroskop durch das Zählen von RAD51-Foci-positiven Zellen überprüft. Der Nachweis von 53BP1 in bestrahlten Zellen wurde als Positivkontrolle der DSB-Induktion verwendet.

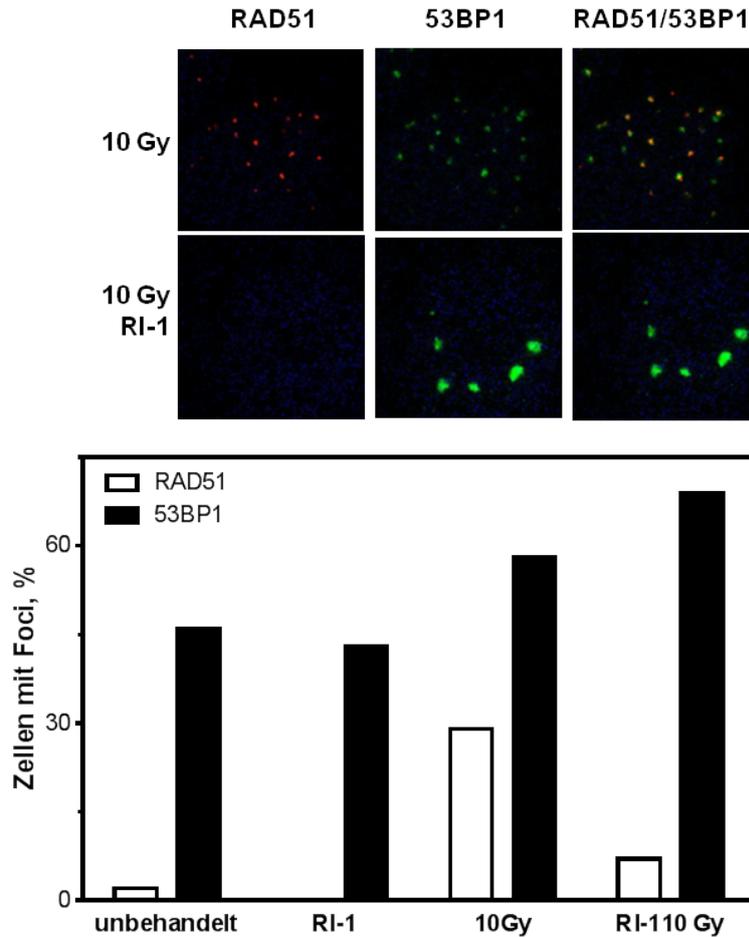


Abbildung 5.6: Anzahl an RAD51- und 53BP1-Foci nach Inhibition mit RI-1 16 h nach Bestrahlung in *HSC4*-Zellen.

Exponentiell wachsende Zellen wurden mit 20 μM RAD51-Inhibitor RI-1 für 6 h behandelt und anschließend mit 10 Gy bestrahlt. Die Immunfluoreszenzfärbung von RAD51 und 53BP1 erfolgte 16 h nach Bestrahlung. Die erfolgreiche Inhibition von RAD51 wurde am Fluoreszenzmikroskop überprüft.

Abbildung 5.6 zeigt den Einfluss des RI-1 Inhibitors auf die Ausbildung des RAD51-Filamentes nach Bestrahlung. Die Detektion von 53BP1-Foci diente dem generellen Nachweis von DNA-DSBs. In unbehandelten Zellen konnte die Anzahl der RAD51-Foci durch alleinige Behandlung mit dem RI-1 Inhibitor mit einer Reduktion um 2 % vollständig verhindert werden. Dabei wurde kein Einfluss auf die Anzahl an DSBs beobachtet, mit einer vergleichbaren Anzahl an 53BP1-Foci positiver Zellen von 46 % und 43 %. Nach Bestrahlung zeigte sich ein Anstieg der RAD51-Foci-positiven Zellen um 27 %, der durch den Inhibitor RI-1 um 74 % auf 7 % reduziert werden konnte. Auch der Anteil an 53BP1-Foci-positiven Zellen stieg nach Bestrahlung. Somit zeigte die Inhibition von RAD51 im unbehandelten

Zustand keinen Effekt auf die Induktion von DSBs. Ein Anstieg von DSBs um 12 % konnte 16 h nach Bestrahlung beobachtet werden, der in Anwesenheit des Inhibitors mit 13 % leicht erhöht war.

Die effiziente Inhibition der RAD51-Filamentbildung durch 20 μM RI-1 wurde sowohl anhand des Plasmid-Rekonstruktions-Assays in Form einer Reduktion der relativen HR-Kapazität als auch anhand der Reduktion der RAD51-Foci Formation nach Bestrahlung erzielt. Für die Untersuchung der Bedeutung von RAD51 für die HR im Plasmid-Rekonstruktion-Assay wurden daher in folgenden Experimenten 20 μM RI-1 verwendet.

5.1.4 Inhibition von RAD51 mittels siRNA

Zur Charakterisierung der Bedeutung von RAD51 für das klonogene Zellüberleben nach MMC-Schädigung in Tumorzelllinien erfolgte die Inhibition der RAD51-Expression mittels siRNA *Knockdown*. In diesem Zusammenhang war eine effiziente Inhibition der RAD51-Expression entscheidend und es wurden verschiedene siRNA Konzentrationen für die Inhibition von RAD51 getestet. Abbildung 5.7 zeigt den Nachweis von RAD51 nach Inhibition der RAD51-Expression unter Einsatz von 25, 50, 100 und 150 nM siRNA in zwei Zelllinien. Exponentiell wachsende Zellen wurden mit siRNA transfiziert und die Expression von RAD51 mittels Western Blot Analyse überprüft.

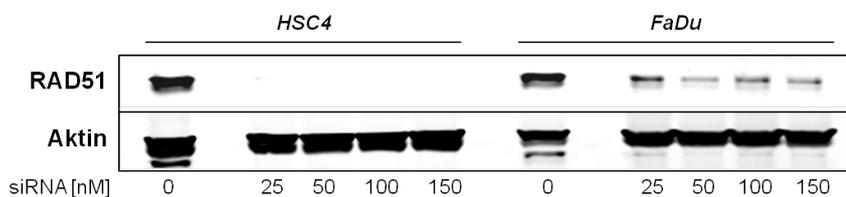


Abbildung 5.7: Inhibition der RAD51-Expression nach siRNA *Knockdown* in zwei HNSCC-Zelllinien.

Exponentiell wachsende Zellen wurden 16 h nach Aussaat mit 25, 50, 100 und 150 nM siRNA gegen RAD51 transfiziert (OligofectamineTM). 48 h nach Transfektion wurden Proteinextrakte erstellt, 30 μg Protein durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und RAD51 mittels Fluoreszenz-Detektion detektiert. β -AKTIN diente als Ladungskontrolle.

Es zeigte sich eine erfolgreiche Inhibition der RAD51-Expression mit ansteigender Konzentration von eingesetzter siRNA in beiden Zelllinien. In der Zelllinie *HSC4* war das Maximum bereits bei einer geringen Konzentration von 25 nM siRNA mit 99 % reduzierter Expression erreicht und ließ sich bei höheren Konzentrationen

nicht weiter steigern. Dagegen zeigte sich in der Zelllinie *FaDu* eine kontinuierliche, Konzentrations-abhängige Zunahme der Inhibition mit einer Reduktion um 75 % unter Einsatz von 25 nM siRNA, um 90 % bei 50 nM siRNA, die sich bei höheren siRNA-Konzentrationen von 100 und 150 nM nicht weiter steigern ließ.

Die effiziente Inhibition der RAD51-Expression mittels 50 nM siRNA wurde in zwei Zelllinien beobachtet und konnte damit für die Untersuchung der Auswirkung einer RAD51-Inhibition auf die zelluläre Empfindlichkeit nach MMC-Schädigung verwendet werden.

5.2 Einfluss von RAD51 auf die HR-Kapazität in BrCa- und HNSCC-Zelllinien

Die Auswirkung geringfügiger Unterschiede in der RAD51-Expression für die DNA-DSB-Reparatur mittels HR ist bislang nicht untersucht. Bisherige Studien untersuchten entweder den vollständigen Verlust von RAD51 oder erzeugten eine endogene Überexpression in einem Modell-System. Dabei zeigten einige Studien, dass eine Überexpression von RAD51, genau wie ein Verlust des RAD51-Proteins, zu einer verminderten Reparatur von DSBs mittels HR führte [16, 76, 119]. Andere Arbeiten zeigten dagegen, dass eine Überexpression von RAD51 zu einer höheren Reparatur-Kompetenz in der DSB-induzierten HR führte [84, 174]. In dieser Arbeit wurde erstmalig untersucht, inwieweit sich ein geringfügiger Unterschied in der RAD51-Expression innerhalb einer Tumorentität auf die DSB-induzierte HR auswirkte. Dies wurde in Zelllinien von zwei Tumorentitäten überprüft, in denen sich die Bedeutung des Reparaturmechanismus HR für die Tumorigenese deutlich unterscheidet; zehn Zelllinien des Mammakarzinoms, für das die große Bedeutung von HR vielfältig beschrieben ist [38, 158, 162], und zehn Zelllinien des Plattenepithels von Kopf-Hals-Tumoren, in denen die Bedeutung von HR für Reparaturmechanismen weitgehend unklar ist. Dafür musste weiter die Funktionalität des RAD51-Proteins charakterisiert werden. Dies wurde auf der Basis der relativen HR-Kapazität, der Zellzyklusverteilung, der Expression von HR-assoziierten Proteinen, der zellulären Lokalisation und der RAD51-Filamentbildung überprüft.

5.2.1 Endogene RAD51-Expression in BrCa- und HNSCC-Zelllinien

Die endogene RAD51-Expression wurde in zehn BrCa-Zelllinien durch *Western Blot*-Analyse detektiert. Es wurden Proteinextrakte von exponentiell wachsenden Zellen nach Finnie et al. (1995) [43] isoliert, die Proteine der Größe nach aufgetrennt

und RAD51 mittels Chemilumineszenz-Messung detektiert.

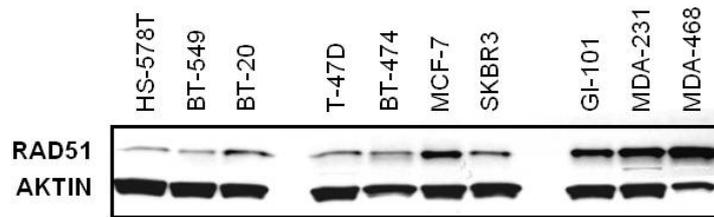


Abbildung 5.8: Endogene RAD51-Expression in zehn BrCa-Zelllinien.

Es wurden 30 μg nach Finnie et al. (1995) [43] isolierte Proteine von exponentiell wachsenden Zellen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mittels Chemilumineszenz-Messung detektiert. β -AKTIN diente der Ladungskontrolle.

Abbildung 5.8 zeigt deutliche Unterschiede in der RAD51-Expression in BrCa-Zelllinien. Dabei konnten drei Gruppen identifiziert werden. Eine geringe RAD51-Expression zeigten die drei Zelllinien *HS-578T*, *BT-549* und *BT-20*, eine moderate RAD51-Expression die vier Zelllinien *T-47D*, *BT-474*, *MCF-7* und *SKBR3* und eine deutlich erhöhte RAD51-Expression in den drei Zelllinien *GI-101*, *MDA-231* und *MDA-468*.

Weiter wurde die endogen vorliegende RAD51-Expression in zehn Zelllinien des Plattenepithels von Kopf-Hals-Tumoren überprüft. Aus exponentiell wachsenden Zellen wurden Proteine nach Finnie et al. (1995) [43] isoliert, die Proteine der Größe nach aufgetrennt und RAD51 mittels Fluoreszenz-Messung detektiert.

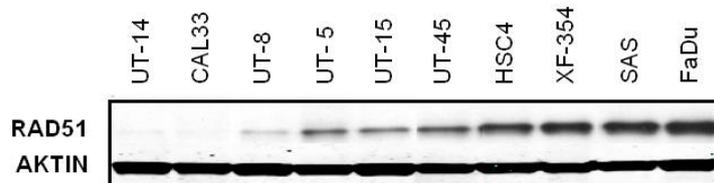


Abbildung 5.9: Endogene RAD51-Expression in zehn HNSCC-Zelllinien.

30 μg nach Finnie et al. (1995) [43] isolierte Proteine von exponentiell wachsenden Zellen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mittels Chemilumineszenz-Messung detektiert. β -AKTIN diente der Ladungskontrolle.

Es wurden ebenfalls deutliche Unterschiede in der endogenen RAD51-Expression in HNSCC-Zelllinien detektiert. Die HNSCC-Zelllinien wurden analog zu den BrCa-Zelllinien hinsichtlich ihrer RAD51-Expression in drei Gruppen eingeteilt. Eine sehr geringe RAD51-Expression wurde in den zwei Zelllinien *UT-14* und *Cal33*

beobachtet, eine moderate RAD51 Expression in den vier Zelllinien *UT-8*, *UT-5*, *UT-15* und *UT-45* und eine erhöhte RAD51-Expression in den vier Zelllinien *HSC4*, *XF-354*, *SAS* und *FaDu*.

Darüber hinaus wurde die Vergleichbarkeit in der RAD51-Expression in den beiden untersuchten Tumorentitäten überprüft. Dafür wurden dieselben in Abbildung 5.8 und 5.9 verwendeten Proteine-Extrakte der Größe nach aufgetrennt und RAD51 mittels Fluoreszenz-Messung detektiert.

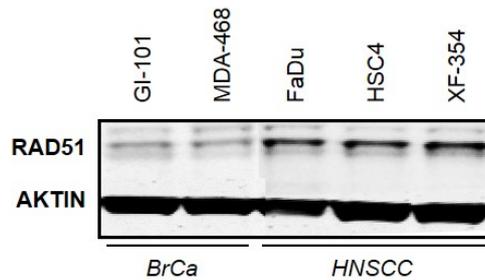


Abbildung 5.10: Vergleich der endogenen RAD51-Expression in BrCa- und HNSCC-Zelllinien.

30 μg nach Finnie et al. (1995) [43] isolierte Proteine von exponentiell wachsenden Zellen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mittels Fluoreszenz-Messung detektiert. β -AKTIN diente der Ladungskontrolle.

Abbildung 5.10 zeigt deutliche Unterschiede in der endogenen RAD51-Expression zwischen BrCa- und HNSCC-Zelllinien. Obwohl jeweils Zelllinien mit der höchsten RAD51-Expression innerhalb einer Tumorentität ausgewählt wurden, wiesen die BrCa-Zelllinien *GI-101* und *MDA-468* eine deutlich geringere RAD51-Expression auf als die HNSCC-Zelllinien *FaDu*, *HSC4* und *XF-354*.

Somit konnte sowohl für BrCa- als auch HNSCC-Zelllinien ein breites Spektrum in der endogenen RAD51-Expression detektiert werden. Es wurde ebenfalls beobachtet, dass in HNSCC-Zelllinien eine höhere RAD51-Expression als in BrCa vorlag. Da RAD51 Zellzyklus-abhängig exprimiert wird, wurde im Folgenden die Zellzyklusverteilung der untersuchten Zelllinien überprüft.

Auswirkung des Anteils von S/G2-Phase-Zellen für die RAD51-Expression

Die Expression von RAD51 ist abhängig von der Zellzyklusphase, mit einer geringen Expression des Proteins in der G0/G1-Phase und einem Maximum in der späten S- und G2-Phase [19, 44]. Es wurde überprüft, ob sich die detektierten Unterschiede in der RAD51-Expression auf Unterschiede in der Zellzyklusverteilung zurückführen

ließen. Dies wurde durch Bestimmung des S/G2-Phase-Anteils untersucht. Unbehandelte, exponentiell wachsende Zellen wurden fixiert, die DNA gefärbt und der Anteil an S/G2-Phase Zellen am Durchflusszytometer gemessen.

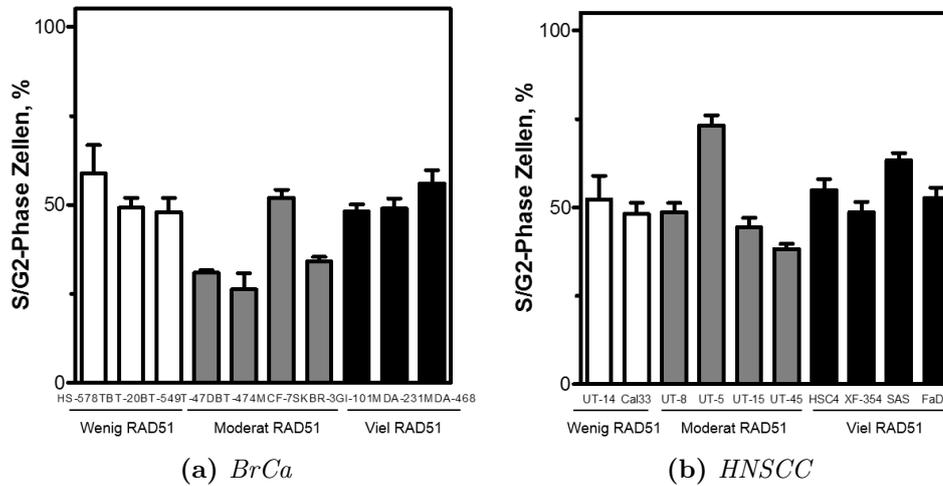


Abbildung 5.11: Anteil an S/G2-Phase-Zellen in BrCa- und HNSCC-Zelllinien. Exponentiell wachsende Zellen wurden fixiert und die DNA mit Propidiumiodid gefärbt. Die Messung der S/G2-Phase-Zellen erfolgte am Durchflusszytometer. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Doppelbestimmungen + SEM.

Abbildung 5.11 zeigt den Anteil an S/G2-Phase-Zellen für BrCa- (Abbildung 5.11a) und HNSCC-Zelllinien (Abbildung 5.11b). Die Anordnung der Zelllinien erfolgte mit ansteigender RAD51-Expression und wurde in die Gruppen wenig, moderat und viel RAD51 unterteilt.

Es zeigte sich eine deutliche Variation um 33 % im Anteil an S/G2-Phase-Zellen in BrCa-Zelllinien mit dem geringsten Anteil in *BT-474* und dem höchsten in *HS-578T*, mit 26 ± 5 % und 59 ± 8 %. Eine vergleichbare Variation im S/G2-Phase-Anteil von 25 % zeigte sich auch in den HNSCC-Zelllinien, mit dem geringsten S/G2-Phase-Anteil in *UT-45* mit 38 ± 1 % und dem höchsten in *SAS* mit 60 ± 2 %. HNSCC-Zelllinien besaßen dabei einen höheren Anteil an S/G2-Phase-Zellen als BrCa-Zelllinien, mit im Mittel 52 ± 9 % bzw. 45 ± 10 %.

Insgesamt wiesen BrCa-Zelllinien mit wenig RAD51 im Vergleich zu Zelllinien mit viel RAD51 einen im Mittel beinahe identischen Anteil an S/G2-Phase-Zellen auf; gering mit 58 ± 8 % (*HS-578T*), 49 ± 3 % (*BT-20*) und 48 ± 4 % (*BT-549*) (im Mittel 52 ± 5 %) und hoch mit 48 ± 2 % (*GI-101*), 49 ± 3 % (*MDA-231*) und 56 ± 4 % (*MDA-468*) (im Mittel 51 ± 3 %). Den geringsten S/G2-Phase-Anteil besaßen Zelllinien mit einer moderaten RAD51-Expression, mit 31 ± 1 %

(*T-47D*), 26 ± 5 % (*BT-474*), 52 ± 2 % (*MCF-7*) und 34 ± 1 % (*SKBR-3*) (im Mittel 36 ± 10 %), allerdings mit dem breitesten Spektrum der Einzelwerte. Darüber hinaus zeigt Abbildung 5.11 sehr deutlich, dass der G1-Phase-Anteil am höchsten in BrCa-Zelllinien mit einer moderaten RAD51-Expression war. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass Unterschiede in der Zellzyklusverteilung die Unterschiede in der RAD51-Expression in BrCa-Zelllinien begründeten.

Für HNSCC-Zelllinien zeigte sich eine vergleichbare Variation wie in BrCa-Zelllinien. So waren im Mittel die Unterschiede im Anteil an S/G2-Phase-Zellen in den drei Gruppen mit 50 ± 2 %, 51 ± 13 % und 55 ± 5 % vergleichbar, wobei Zelllinien mit einer hohen RAD51-Expression einen leicht höheren Anteil aufwiesen. Der Anteil an S/G2-Phase-Zellen lag dabei für Zelllinien mit wenig RAD51 bei 52 ± 7 % (*UT-14*) und 48 ± 3 % (*Cal33*), mit moderat RAD51 bei 49 ± 3 % (*UT-8*), 73 ± 3 % (*UT-5*), 44 ± 3 % (*UT-15*) und 38 ± 1 % (*UT-45*) sowie mit viel RAD51 bei 55 ± 3 % (*HSC4*), 49 ± 3 % (*XF-354*), 63 ± 2 % (*SAS*) und 53 ± 3 % (*FaDu*).

Die detektierten Unterschiede in der endogen vorliegenden RAD51-Expression waren somit sowohl für BrCa- als auch HNSCC-Zelllinien nicht auf Variationen im Anteil an S/G2-Phase-Zellen zurückzuführen.

5.2.2 HR-Kapazität in BrCa- und HNSCC-Zelllinien

In Studien an Modellsystemen konnte sowohl eine verstärkte als auch eine verminderte HR-Kapazität bei einer Überexpression von RAD51 beobachtet werden [76, 84, 119, 174]. In dieser Arbeit wurde erstmalig überprüft, ob sich geringfügige Unterschiede in der RAD51-Expression in Zelllinien einer Tumorentität hinsichtlich ihrer HR-Kapazität auswirken. Dies erfolgte durch einen Plasmid-Rekonstruktions-Assay. Exponentiell wachsende Zellen wurden transient mit dem GFP-exprimierenden Plasmid pEGFP-N1 und dem Reparaturkonstrukt pGC transfiziert und der prozentuale Anteil GFP-positiver Zellen wurde 24 h nach Transfektion am Durchflusssystem gemessen.

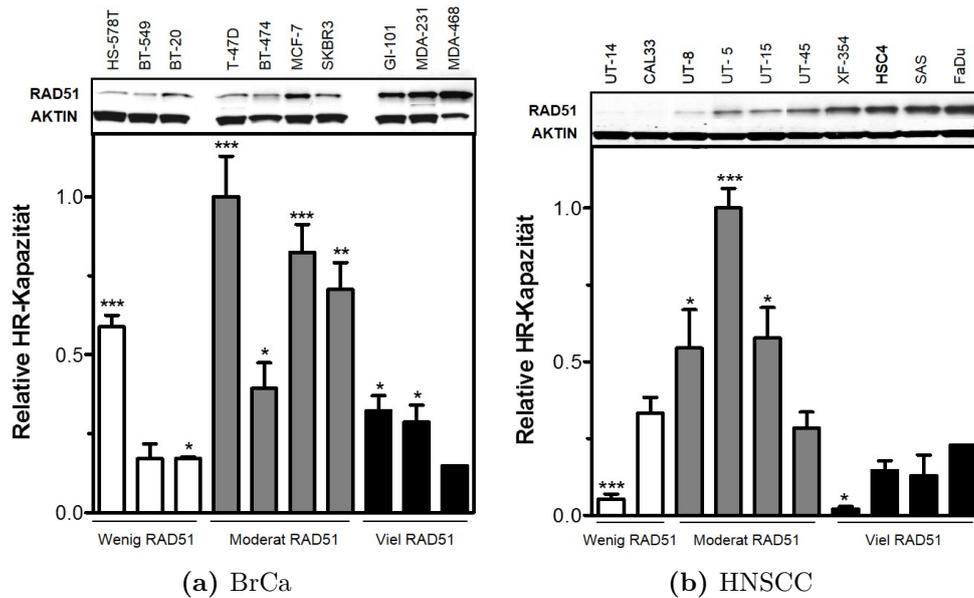


Abbildung 5.12: HR-Kapazität im Plasmid-Rekonstruktions-Assay in BrCa- (5.12a) und HNSCC- (5.12b) Zelllinien.

Exponentiell wachsende Zellen wurden 24 h transient mit dem GFP-exprimierenden Plasmid pEGFP-N1 oder dem Reparaturkonstrukt pGC in einem Verhältnis von dem Transfektionsagens zum Plasmid von 3:1 [$\mu\text{l}:\mu\text{g}$] transfiziert und der prozentuale Anteil GFP-positiver Zellen am Durchflusszytometer gemessen. Die HR-Kapazität wurde relativ zur absoluten HR-Kapazität von *MDA-468* für BrCa- und *FaDu* für HNSCC-Zelllinien berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Doppelbestimmungen + SEM; statistisch signifikant abweichend von *MDA-468* und *FaDu*: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Student' scher t-Test).

Abbildung 5.12 zeigt große Unterschiede für die relative HR-Kapazität sowohl in BrCa- (Abbildung 5.12a) als auch in HNSCC-Zelllinien (Abbildung 5.12b). Die Anordnung der Zelllinien erfolgte mit ansteigender RAD51-Expression und wurde in die Gruppen wenig, moderat und viel RAD51 unterteilt.

In BrCa-Zelllinien zeigte sich eine deutliche Variation der relativen HR-Kapazität um 0,85, wobei *MDA-468*-Zellen mit 0,15 die geringste und *T-47D*-Zellen mit 1,0 die höchste relative HR-Kapazität aufwies. Bei einer geringen RAD51-Expression wurde im Mittel auch eine geringe relative HR-Kapazität beobachtet, die in Zelllinien mit einer moderaten RAD51-Expression im Mittel deutlich zunahm; mit $0,59 \pm 0,04$ (*HS-578T*), $0,17 \pm 0,05$ (*BT-549*) und $0,17 \pm 0,01$ (*BT-20*) auf $1,0 \pm 0,13$ (*T-47D*), $0,39 \pm 0,08$ (*BT-474*), $0,82 \pm 0,09$ (*MCF-7*) und $0,71 \pm 0,09$ (*SKBR-3*). Zelllinien mit viel RAD51 wiesen wiederum eine geringe relative HR-Kapazität auf, die mit der von Zelllinien mit wenig RAD51 vergleichbar war, mit $0,32 \pm 0,05$ (*GI-101*), $0,29 \pm 0,05$ (*MDA-231*) und 0,15 (*MDA-468*). Das Verhältnis der relativen HR-Kapazität zwischen Zelllinien mit wenig, moderat und viel RAD51 war dabei

0,4 : 1,0 : 0,3.

Für HNSCC-Zelllinien wurde eine noch deutlichere Variation in der relativen HR-Kapazität beobachtet, mit 0,98. Es zeigte sich ein den BrCa-Zelllinien vergleichbarer Trend, mit geringer, hoher und ebenfalls wieder geringer relativer HR-Kapazität in Zelllinien mit wenig, moderat und viel RAD51. Dabei wiesen Zelllinien mit wenig RAD51 eine geringe relative HR-Kapazität auf, die wie in den BrCa-Zelllinien mit moderat RAD51 zunahm, mit $0,05 \pm 0,02$ (*UT-14*) und $0,33 \pm 0,05$ (*Cal33*) auf $0,54 \pm 0,12$ (*UT-8*), $1,0 \pm 0,06$ (*UT-5*), $0,58 \pm 0,1$ (*UT-15*) und $0,28 \pm 0,05$ (*UT-45*). Die relative HR-Kapazität von Zelllinien mit viel RAD51 war wiederum sehr gering, mit Werten von $0,15 \pm 0,03$ (*HSC4*), $0,02 \pm 0,01$ (*XF-354*), $0,13 \pm 0,07$ (*SAS*) und $0,23$ (*FaDu*). Es wurde darüber hinaus deutlich, dass HNSCC-mit viel RAD51 im Vergleich zu BrCa-Zelllinien eine geringere relative HR-Kapazität aufwiesen. Die detektierten Unterschiede in der relativen HR-Kapazität zwischen Zelllinien mit wenig, moderat und viel RAD51 waren mit einem relativen Verhältnis von 0,3 : 1,0 : 0,2 größer als in BrCa-Zelllinien.

Es konnten sowohl in BrCa- als auch in HNSCC-Zelllinien in Abhängigkeit der endogenen RAD51-Expression große Unterschiede für die DSB-induzierte HR detektiert werden. Diese Unterschiede waren in HNSCC deutlicher als in BrCa-Zelllinien. Für beide Entitäten wurde jedoch bei einer moderaten RAD51-Expression die höchste relative HR-Kapazität beobachtet. Zelllinien mit entweder wenig oder viel RAD51 wiesen im Mittel eine geringere relative HR-Kapazität auf.

Im Weiteren sollte geklärt werden, ob die beobachteten Unterschiede in der relativen HR-Kapazität auf Unterschiede in der Zellzyklusverteilung, der Expression weiterer HR-assoziiierter Proteine, im Transport von RAD51 in den Kern und RAD51-Filamentbildung zurückzuführen waren.

5.2.3 Auswirkung von Einflussfaktoren auf die relative HR-Kapazität

Unterschiede in der relativen HR-Kapazität könnten auf Unterschiede im Anteil an S-Phase-Zellen, die veränderte Expression weiterer HR-assoziiierter Proteine, den nicht entsprechend verstärkten Transport von RAD51 in den Kern bei einem Überangebot von RAD51 oder eine verminderte Aktivität von RAD51 zurückzuführen sein. Diese Einflussfaktoren auf die relative HR-Kapazität wurden im Folgenden überprüft.

Auswirkung des Anteils an S-Phase-Zellen auf die relative HR-Kapazität

Die DSB-Reparatur mittels HR ist hauptsächlich während der S-Phase aktiv [6, 72]. Es wurde überprüft, ob sich die beobachtete Variation in der relativen HR-Kapazität auf Unterschiede im Anteil an S-Phase-Zellen zurückführen ließ. Dafür wurde der

Anteil an S-Phase-Zellen unter Transfektion mit den Plasmiden pEGFPN1 und pGC überprüft. Exponentiell wachsende Zellen wurden transient mit dem GFP-exprimierenden Plasmid pEGFP-N1 und dem Reparaturkonstrukt pGC transfiziert, die Zellen fixiert und die DNA gefärbt. Die Messung des S-Phase-Anteils in der Zellzyklusverteilung erfolgte am Durchflusszytometer.

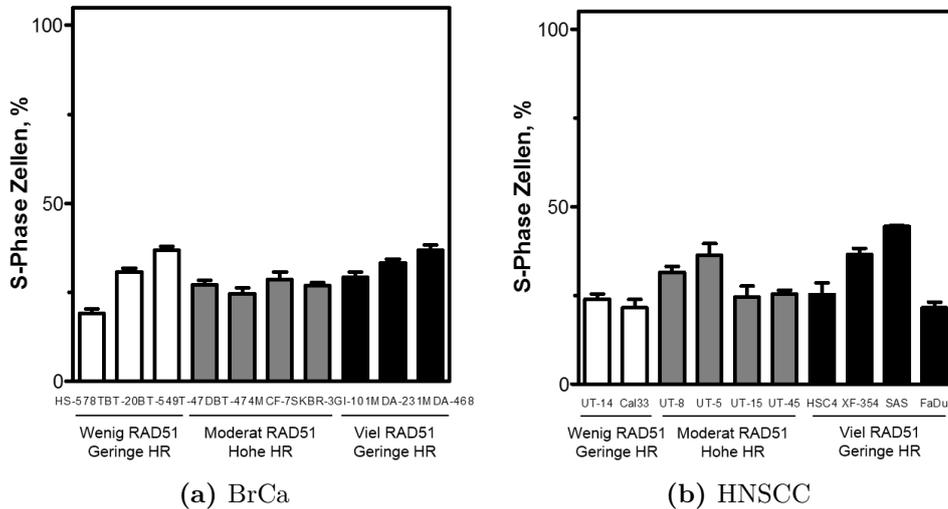


Abbildung 5.13: S-Phase-Anteil nach Plasmid-Transfektion in BrCa- und HNSCC-Zelllinien.

Exponentiell wachsende Zellen wurden 24 h nach Aussaat mit dem GFP-exprimierenden Plasmid pEGFP-N1 oder dem Reparaturkonstrukt pGC in einem Verhältnis von dem Transfektionsagens zu Plasmid von 3:1 [$\mu\text{l}:\mu\text{g}$] transfiziert, anschließend fixiert, die DNA mit Propidiumiodid gefärbt und der Anteil an S-Phase-Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Doppelbestimmungen + SEM.

Abbildung 5.13 zeigt den Anteil an S-Phase-Zellen in mit Plasmiden transfizierten BrCa- (5.13a) und HNSCC-Zelllinien (5.13b). Die Anordnung der Zelllinien erfolgte mit ansteigender RAD51-Expression und wurde in die Gruppen geringe HR mit wenig RAD51, hohe HR mit moderat RAD51 und geringe HR mit viel RAD51 unterteilt.

In BrCa-Zelllinien wurde eine Variation im Anteil an S-Phase-Zellen um $29 \pm 7\%$ beobachtet, mit dem geringsten Anteil in *HS-578T*- und dem höchsten Anteil in *MDA-468*-Zellen, mit $19 \pm 1\%$ und $37 \pm 2\%$. Diese Variation war vergleichbar in HNSCC-Zelllinien mit $29 \pm 5\%$. Hier zeigten *Cal33*- und *FaDu*-Zellen mit 22% den geringsten und *SAS*-Zellen mit 4% den höchsten S-Phase-Anteil.

Die stärkste Variation im Anteil an S-Phase-Zellen wurde in BrCa-Zelllinien mit wenig RAD51 beobachtet, mit $19 \pm 1\%$ (*HS-578T*), $37 \pm 1\%$ (*BT-20*) und $31 \pm 1\%$

(*BT-549*). Zelllinien mit moderat RAD51 zeigten nur eine geringe Variation im Anteil der S-Phase-Zellen, mit $27 \pm 1 \%$ (*T-47D*), $24 \pm 2 \%$ (*BT-474*), $29 \pm 2 \%$ (*MCF-7*) und $27 \pm 1 \%$ (*SKBR-3*). Für Zelllinien mit viel RAD51 konnte der höchste Anteil an S-Phase-Zellen von im Mittel $32 \pm 4 \%$ gemessen werden. Dabei wiesen *GI-101* $29 \pm 1 \%$, *MDA-231* $33 \pm 1 \%$ und *MDA-468*-Zellen $37 \pm 2 \%$ S-Phase-Zellen auf. Somit verhielten sich Zelllinien mit viel RAD51 invers zur Erwartung: Obwohl der höchste S-Phase-Anteil vorlag, wurde die geringste relative HR-Kapazität in diesen Zelllinien beobachtet. Somit konnten Unterschiede im Anteil an S-Phase-Zellen als Ursache für die Unterschiede in der relativen HR-Kapazität in BrCa-Zelllinien ausgeschlossen werden.

In HNSCC-Zelllinien wurde eine mit der in BrCa-Zelllinien vergleichbare Variation für den Anteil an S-Phase-Zellen beobachtet. Dabei wurde der geringste Anteil an S-Phase-Zellen in Zelllinien mit wenig RAD51 gemessen, mit $23 \pm 1 \%$ (*UT-14*) und $22 \pm 2 \%$ (*Cal33*). Dieser war erhöht in Zelllinien mit moderat RAD51, mit $31 \pm 2 \%$ (*UT-8*), $36 \pm 3 \%$ (*UT-5*), $25 \pm 3 \%$ (*UT-15*) und $25 \pm 1 \%$ (*UT-45*). Den höchsten Anteil an S-Phase-Zellen wiesen im Mittel analog zu BrCa-Zelllinien Zellen mit viel RAD51 auf, mit $25 \pm 3 \%$ (*HSC4*), $36 \pm 2 \%$ (*XF-354*), $44 \pm 0,3 \%$ (*SAS*) und $22 \pm 2 \%$ (*FaDu*). HNSCC-Zelllinien mit viel RAD51 verhielten sich ebenfalls entgegen der Erwartung, da sie trotz des höchsten Anteils an S-Phase-Zellen die geringste relative HR-Kapazität aufwiesen.

Auswirkung der Expression von weiteren HR-assoziierten Proteinen

Es ist beschrieben, dass eine Überexpression von RAD51 den mit einer BRCA2-Defizienz einhergehenden Defekt in der DSB-Reparatur mittels HR kompensieren kann [86]. Somit könnte die beobachtete verminderte HR-Kapazität nicht direkt auf die RAD51-Expression zurückzuführen sein, sondern die Folge eines vorliegenden Defekts in der Expression eines HR-assoziierten Proteins darstellen. Dafür wurde die Expression der Proteine BRCA2 und FANCD2, die RAD51 auf die DNA laden, sowie ATR, welches für die Aktivierung der DNA-Reparatur in der S-Phase verantwortlich ist, untersucht. Aus exponentiell wachsenden Zellen wurden Proteine nach Finnie et al. (1995) [43] isoliert, die Proteine der Größe nach getrennt und RAD51 mittels Chemilumineszenz-Messung detektiert.

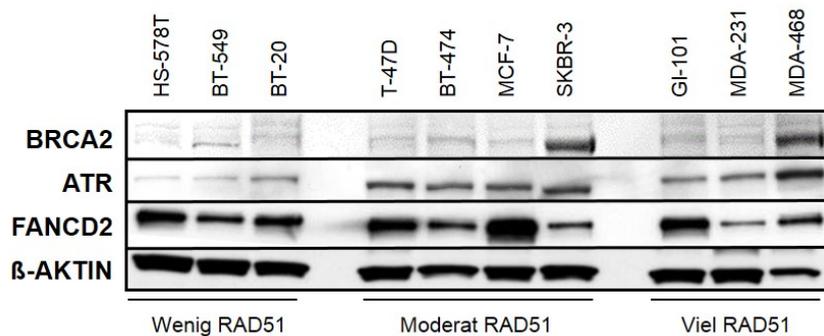


Abbildung 5.14: Endogene Expression von BRCA2, ATR und FANCD2 in BrCa-Zelllinien.

30 μ g nach Finnie et al. (1995) [43] isolierte Proteine von exponentiell wachsenden Zellen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mittels Fluoreszenz-Messung detektiert. β -AKTIN diente der Ladungskontrolle.

Abbildung 5.14 zeigt große Unterschiede in der endogenen Expression von HR-assoziierten Proteinen in BrCa-Zelllinien. Die Anordnung der Zelllinien erfolgte mit ansteigender RAD51-Expression und wurde in die Gruppen wenig, moderat und viel RAD51 unterteilt.

Für die BRCA2-Expression wurde eine große Variation in BrCa-Zelllinien beobachtet, wobei *MDA-468*-Zellen die höchste und *HS-578T*-Zellen die geringste Expression aufwiesen. Zelllinien mit wenig RAD51 (*HS-478T*, *BT-549* und *BT-20*) zeigten eine relativ geringe BRCA2-Expression und keine große Variation zwischen den Zelllinien. Die Variation zwischen Zelllinien mit sowohl moderat als auch viel RAD51 war deutlich größer. Dabei konnte für Zelllinien mit moderat RAD51 in *T-47D*- und *MCF-7*-Zellen eine sehr geringe BRCA2-Expression, für *BT-474*-Zellen eine etwas höhere und für *SKBR-3*-Zellen eine hohe BRCA2-Expression detektiert werden. Für Zelllinien mit viel RAD51 zeigte *MDA-468* eine sehr hohe BRCA2 Expression, im Gegensatz zu *GI-101*- und *MDA-231*-Zellen.

Die ATR-Expression unterschied sich ebenfalls sehr deutlich zwischen den Zelllinien mit wenig, moderat und viel RAD51. *MDA-468*-Zellen zeigten die höchste und *HS-578T*-Zellen die geringste ATR-Expression. Alle Zelllinien mit wenig RAD51 (*HS-478T*, *BT-549* und *BT-20*) wiesen eine geringe und untereinander vergleichbare ATR-Expression auf. Die ATR-Expression in Zelllinien mit einer moderaten RAD51-Expression (*T-47D*, *BT-474*, *MCF-7* und *SKBR3*) war deutlich höher mit einer geringen Variation. Zelllinien mit viel RAD51 zeigten sowohl eine hohe als auch geringere ATR-Expression. Dabei wiesen *MDA-468*-Zellen die höchste und *GI-101*- sowie *MDA-231*-Zellen eine geringere ATR-Expression im Vergleich zu Zelllinien mit moderat RAD51 auf. Unterschiede in der ATR-Expression zeigten somit ein

anderes Muster als das für RAD51, mit der höchsten Expression in Zelllinien mit moderat RAD51 und einer hohen relativen HR-Kapazität.

Die FANCD2-Expression unterschied sich ebenfalls in den BrCa-Zelllinien, wobei *MCF-7*-Zellen die höchste und *MDA-231*-Zellen die geringste FANCD2-Expression aufwiesen. Innerhalb der Gruppen mit wenig, moderat und viel RAD51 war überall eine große Variation in der FANCD2-Expression zu beobachten. Die FANCD2-Expression in Zelllinien mit wenig RAD51 war in *HS-578T*-Zellen am höchsten, gefolgt von *BT-20*- und *BT-549*-Zellen. In Zelllinien mit moderat RAD51 wiesen *T-47D*- sowie *MCF-7*-Zellen eine hohe und *BT-474*- sowie *SKBR-3*-Zellen eine geringe FANCD2-Expression auf. In Zelllinien mit viel RAD51 wurde lediglich in *GI-101*-Zellen eine hohe FANCD2-Expression detektiert, während *MDA-231*- und *MDA-468*-Zellen eine geringe ATR-Expression aufwiesen. Somit konnte für die FANCD2-Expression kein der relativen HR-Kapazität oder der RAD51-Expression entsprechendes Muster beobachtet werden.

Zusammenfassend zeigen die Daten keine generelle Abhängigkeit zwischen der Expression unterschiedlicher HR-assoziiierter Proteine und RAD51. Auffällig war jedoch, dass die ATR-Expression in Zelllinien mit moderat RAD51 und einer hohen relativen HR-Kapazität am höchsten war.

Transport von RAD51 in den Kern nach DNA-Schädigung mit MMC

Das RAD51-Protein besitzt kein eigenes Kernlokalisierungssignal (NLS), wird jedoch nach DNA-Schädigung in den Kern transloziert. Für den Transport von RAD51 in den Kern assoziiert es mit Proteinen, die über ein NLS verfügen, beispielsweise BRCA2 [13, 49]. Es war zu überprüfen, ob ein Überschuss an RAD51 nach DNA-Schädigung auch verstärkt in den Kern transportiert werden kann. Zu diesem Zweck wurde die RAD51-Expression im Kern in Zelllinien mit viel RAD51 vor und nach DNA-Schädigung detektiert. Exponentiell wachsende Zellen wurden mit MMC geschädigt, Kernproteine fraktioniert isoliert und RAD51 mittels Fluoreszenz-Detektion nachgewiesen.

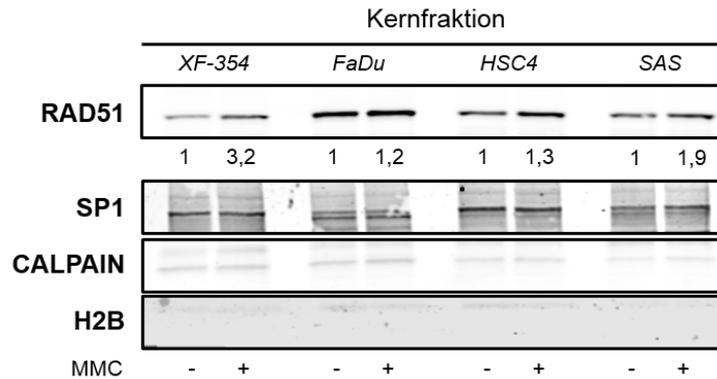


Abbildung 5.15: Anteil von RAD51 im Kern nach DNA-Schädigung in vier HNSCC-Zelllinien.

Exponentiell wachsende Zellen wurden 24 h nach Aussaat mit $1,5 \mu\text{M}$ MMC für 6 h geschädigt, die Fraktion der Kernproteine isoliert und RAD51 mittels Fluoreszenz-Detektion nachgewiesen. Der Nachweis von Zytoplasmaproteinen erfolgte durch CALPAIN, von Chromatin-gebundenen Proteinen durch H2B und von Kernproteinen durch SP1.

Abbildung 5.15 zeigt den Anteil von RAD51 im Kern nach MMC-Schädigung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in vier *HNSCC* Zelllinien. Es zeigte sich eine Erhöhung von RAD51 im Kern nach DNA-Schädigung in allen untersuchten HNSCC-Zelllinien. Die stärkste Anreicherung von RAD51 wurde in *XF-354*-Zellen mit einem Faktor von 3,2 beobachtet, die geringste in *FaDu*-Zellen mit einem Faktor von 1,2, während *HSC4*- und *SAS*-Zellen eine Anreicherung des RAD51-Proteins um 1,3 bzw. 1,9 aufwiesen.

Somit konnte in allen untersuchten Zelllinien mit viel RAD51 ein Kerntransport von RAD51 nach DNA-Schädigung beobachtet werden.

Nachweis der Fähigkeit zur RAD51-Filamentbildung

Für die Reparatur eines DSBs mittels HR wird RAD51 zu einem Filament verknüpft, welches als so genannter RAD51-Fokus bezeichnet wird. Im Folgenden wurde in Zelllinien mit einer moderaten und hohen RAD51-Expression die Fähigkeit zur Filamentbildung überprüft. Dabei war es von besonderem Interesse, DSBs nachzuweisen, die bereits spontan, ohne exogene Schädigung auftreten und mittels HR repariert werden. Dies wurde anhand der Ausbildung von RAD51-Foci in HNSCC-Zelllinien mit moderat RAD51 (hohe HR-Kapazität) im Vergleich zu Zelllinien mit viel RAD51 (geringe HR-Kapazität) überprüft. Exponentiell wachsende HNSCC-Zelllinien wurden auf Objektträgern fixiert, RAD51 mittels Immunfluoreszenz detektiert und die Anzahl an RAD51-Foci pro Zelle mit dem Auge am Mikroskop ausgewertet.

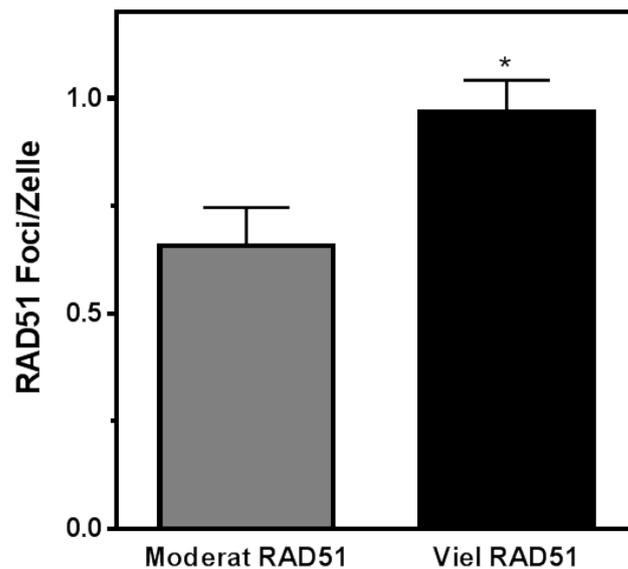


Abbildung 5.16: RAD51-Fokusbildung in HNSCC-Zelllinien mit moderat oder viel RAD51.

Exponentiell wachsende HNSCC-Zelllinien wurden 24 h nach Aussaat fixiert, RAD51 wurde durch Immunfluoreszenz detektiert und RAD51-Foci ausgewertet. Zelllinien mit moderat und viel RAD51 wurden in Gruppen zusammengefasst und die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente + SEM dargestellt; statistisch signifikant abweichend voneinander: * $p < 0,05$ (Student'scher t-Test).

Abbildung 5.16 zeigt die quantitative Darstellung der RAD51-Foci für je vier Zelllinien mit moderat und viel RAD51 ohne exogene Schädigung. RAD51-Foci konnten sowohl in Zelllinien mit moderat als auch viel RAD51 detektiert werden. Dabei zeigten Zellen mit einer moderaten RAD51-Expression im Mittel $0,7 \pm 0,2$ RAD51-Foci pro Zelle. Eine deutlich höhere Anzahl an RAD51-Foci pro Zelle wurde in Zelllinien mit viel RAD51 beobachtet, mit im Mittel $1,0 \pm 0,07$. Somit zeigten Zelllinien mit viel RAD51 die Funktionalität von RAD51 durch die Ausbildung von 30 % mehr spontanen RAD51-Foci im Vergleich zu Zelllinien mit moderat RAD51.

5.3 Zelluläres Überleben nach MMC-Schädigung in BrCa- und HNSCC-Zelllinien

MMC verursacht DNA-DNA-Vernetzungen, welche benachbarte oder gegenüberliegende Basen vernetzen und dadurch die Replikationsmaschinerie stoppen [116]. Zur Beseitigung dieser sehr komplexen DNA-Schäden wird die ICL-Reparatur eingesetzt. An der ICL-Reparatur sind mehrere Reparaturwege beteiligt. Dazu gehören die

Komplexe HR und FA sowie die Nukleotidexzisionsreparatur und die Translesionsynthese [60]. Im ersten Schritt dieses Prozesses werden DNA-DNA-Vernetzungen zu einem einseitigen DSB umgewandelt, der als Substrat für die HR verwendet wird [2, 29, 117]. Deshalb zeigen Zellen mit einem Defekt in HR ein geringes zelluläres Überleben nach Behandlung mit MMC [45, 50, 89, 152, 175, 179].

Zur Überprüfung der Auswirkung von Unterschieden in der RAD51-Expression auf das zelluläre Überleben nach MMC-Schädigung wurde die Koloniebildungsfähigkeit in Zelllinien mit einer moderaten und hohen RAD51-Expression untersucht. Exponentiell wachsende BrCa-Zellen wurden für 1 h mit MMC behandelt und das zelluläre Überleben im Koloniebildungstest überprüft.

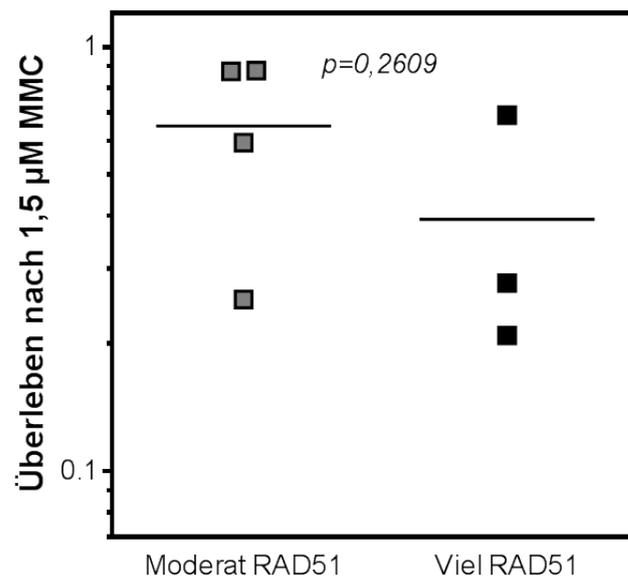


Abbildung 5.17: Zelluläres Überleben nach MMC-Schädigung in BrCa-Zelllinien. Exponentiell wachsende Zellen wurden 6 h nach Aussaat für 1 h mit 1,5 μM MMC inkubiert und das klonogene Überleben nach 7–14 Tagen überprüft. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied: $p=0,045$ (Student'scher t-Test).

Abbildung 5.17 zeigt das zelluläre Überleben nach MMC-Schädigung in BrCa-Zelllinien. Zelllinien mit moderat und viel RAD51 wurden in Gruppen zusammengefasst.

Es zeigten sich sehr deutliche Unterschiede im zellulären Überleben in den untersuchten BrCa-Zelllinien mit resistenten Zellen wie *BT-474* und sehr empfindlichen Zellen wie *MDA-468*, mit Überlebensraten von 86 % und 21 %. Bei Einteilung der Zelllinien hinsichtlich ihrer RAD51-Expression zeigte sich eine deutliche Resistenz in Zelllinien mit moderat RAD51 nach Behandlung mit MMC im Vergleich zu

Zelllinien mit viel RAD51 ($p=0,045$). Das zelluläre Überleben für Zelllinien mit moderat RAD51 lag dabei im Mittel bei 69 ± 9 %. Dabei wiesen die Zelllinien *T-47D* mit 85 %, *BT-474* mit 86 % und *MCF-7* mit 60 % ein hohes zelluläres Überleben auf, nur *SKBR-3*-Zellen zeigten mit 43 % ein geringeres zelluläres Überleben. Zelllinien mit viel RAD51 waren im Mittel jedoch deutlich empfindlicher gegenüber der MMC-Schädigung, mit 32 ± 6 %. Dabei zeigten *GI-101*- und *MDA-468*-Zellen gegenüber MMC ein sehr geringes zelluläres Überleben, mit Überlebensraten von 28 % und 21 %. Nur *MDA-231*-Zellen waren mit 46 % resistenter gegenüber MMC.

Somit waren Zelllinien mit moderater RAD51 im Mittel deutlich resistenter gegenüber einer MMC-Schädigung als Zelllinien mit viel RAD51.

Das zelluläre Überleben nach MMC-Schädigung wurde ebenso in HNSCC-Zelllinien untersucht. Exponentiell wachsende Zellen wurden mit MMC behandelt und das klonogene Überleben im Koloniebildungstest überprüft.

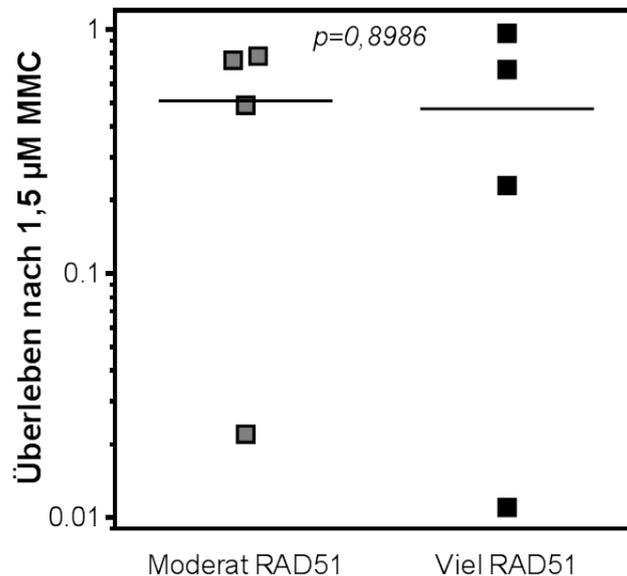


Abbildung 5.18: Zelluläres Überleben nach MMC-Schädigung in HNSCC-Zelllinien.

Exponentiell wachsende Zellen mit moderat und viel RAD51 wurden 6 h nach Aussaat für 1 h mit $1,5 \mu\text{M}$ Mitomycin C inkubiert. Das klonogene Überleben wurde nach 7–14 Tagen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Sechsfachbestimmungen. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied: $p=0,899$ (Student'scher t-Test).

Abbildung 5.18 zeigt das zelluläre Überleben nach MMC-Schädigung in HNSCC-Zelllinien. Die Zelllinien wurden nach ihrer RAD51-Expression in Gruppen mit

moderat und viel RAD51 unterteilt.

Es wurde ein großer Unterschied im zellulären Überleben nach MMC-Schädigung in HNSCC-Zelllinien beobachtet, mit einer Variation um 96 %. Dabei zeigten *FaDu*-Zellen das geringste zelluläre Überleben und *HSC4*-Zellen das höchste, mit 1 % und 97 %. Bei Einteilung der Zelllinien nach Zellen mit moderat und viel RAD51 zeigte sich ein vergleichbares Spektrum der Überlebensrate der beiden Gruppen, mit einer zellulären MMC-Empfindlichkeit von im Mittel 52 ± 15 % für Zelllinien mit moderat RAD51 und 44 ± 20 % für Zelllinien mit viel RAD51 ($p=0,899$).

Zelllinien mit moderat RAD51 wiesen dabei Überlebensraten von 2 % (*UT-5*), 50 % (*UT-15*), 75 % (*UT-45*) und 79 % (*UT-8*) auf und Zelllinien mit viel RAD51 zeigten Überlebensraten von 1 % (*FaDu*), 10 % (*XF-354*), 69 % (*SAS*) und 97 % (*HSC4*). Somit zeigte sich kein den BrCa-Zelllinien vergleichbares Bild mit einem geringeren zellulären Überleben nach MMC-Schädigung in Zelllinien mit viel RAD51. Allerdings zeigte sich unter den Zelllinien mit moderat RAD51 nur eine besonders empfindliche Zelllinie, unter den Zelllinien mit viel RAD51 dagegen zwei. Auffällig ist weiter, dass die Zelllinie *UT-5* trotz einer hohen relativen HR-Kapazität im Plasmid-Rekonstruktions-Assay ein geringes zelluläres Überleben nach MMC-Schädigung aufwies und die Zelllinien *HSC4* und *SAS* beide mit einer geringen relativen HR-Kapazität sich extrem resistent gegenüber MMC zeigten.

5.4 Phosphorylierung von CHK1 nach MMC-Schädigung in BrCa- und HNSCC-Zelllinien

CHK1 ist eine Kinase, die für die DSB-Reparatur mittels HR essentiell ist. Sie aktiviert zum einen die HR-Maschinerie durch Phosphorylierung von RAD51 [7, 148]. Zum anderen arretiert sie Zellen in der S-Phase, wodurch die Reparatur von DSBs mittels HR gewährleistet wird [8]. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Zellen bei Überexpression von RAD51 nach MMC-Schädigung eine geringere Phosphorylierung von CHK1 aufwiesen, die mit einer erhöhten zellulären Empfindlichkeit gegenüber einer MMC-Schädigung einherging [121, 171]. Es wurde überprüft, ob eine geringere Phosphorylierung von CHK1 das geringere zelluläre Überleben von BrCa- und HNSCC-Zelllinien nach MMC-Schädigung bedingte. Dafür wurde die Phosphorylierung von CHK1 nach MMC-Schädigung untersucht.

Exponentiell wachsende BrCa-Zellen wurden mit MMC behandelt, die Proteine nach Finnie et al. (1995) [43] isoliert, der Größe nach aufgetrennt und CHK1 sowie Phospho-CHK1 mittels Fluoreszenz-Detektion nachgewiesen.

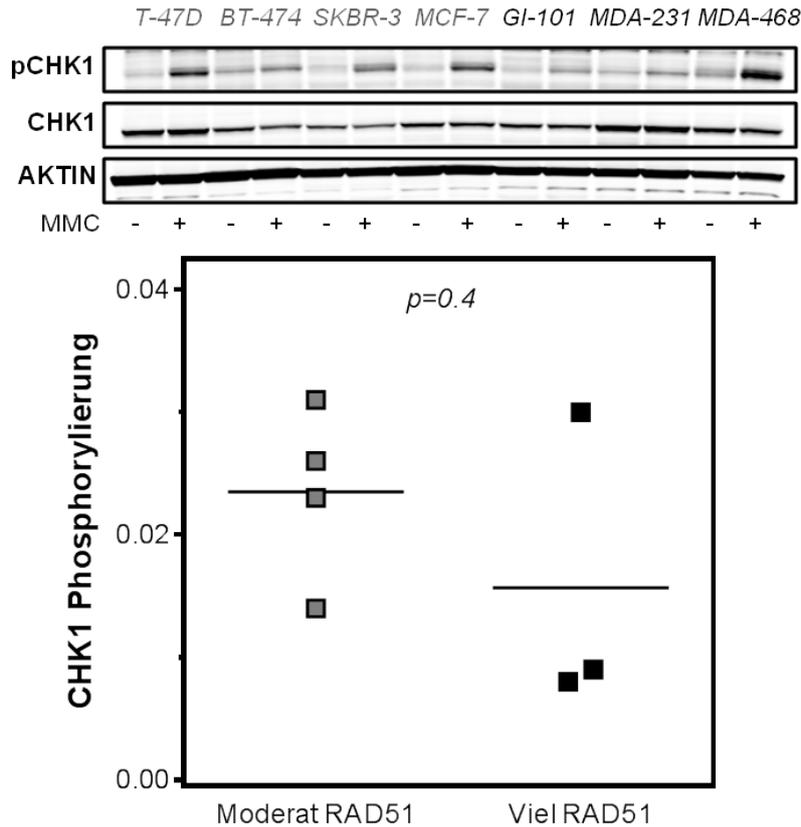


Abbildung 5.19: Phosphorylierung von CHK1 nach MMC-Schädigung in BrCa-Zelllinien.

Exponentiell wachsende Zellen wurden 24 h nach Aussaat für 6 h mit $1,5 \mu\text{M}$ MMC inkubiert, $30 \mu\text{g}$ nach Finnie et al. (1995) [43] isolierte Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und CHK1 sowie Phospho-CHK1 mittels Fluoreszenz-Detektion nachgewiesen. β -AKTIN diente als Ladungskontrolle. Zelllinien mit moderat und viel RAD51 wurden in Gruppen zusammengefasst und Mittelwerte mindestens dreier unabhängigen Experimente dargestellt; statistisch nicht signifikant abweichend voneinander: $p=0,214$ (Student' scher t-Test).

Abbildung 5.19 zeigt die relative Phosphorylierung von CHK1 nach MMC-Schädigung in BrCa-Zelllinien. Die Zelllinien wurden in Gruppen mit moderat und viel RAD51 aufgeteilt.

Es wurden große Unterschiede in der Phosphorylierung von CHK1 nach MMC-Schädigung detektiert, mit 0,8. Die stärkste Phosphorylierung von CHK1 zeigten *MCF-7*-Zellen und die geringste *MDA-231*-Zellen, mit 1,0 und 0,2. Bei Einteilung der Zelllinien hinsichtlich ihrer RAD51-Expression in moderat und viel RAD51 war die Phosphorylierung von CHK1 in Zelllinien mit moderat RAD51 nach MMC-Schädigung im Mittel um den Faktor 1,7 höher als in Zelllinien mit viel RAD51 ($p = 0,214$). Sie lag in Zelllinien mit moderat RAD51 im Mittel bei $0,8 \pm 0,1$.

Dabei wiesen drei Zelllinien hohe Werte von 0,7 (*BT-474*), 1,0 (*SKBR-3*) und 1,0 (*MCF-7*) für die Phosphorylierung von CHK1 auf. Nur *T-47D*-Zellen zeigten mit 0,5 eine geringere Phosphorylierung von CHK1. Für Zelllinien mit viel RAD51 waren die Unterschiede in der Phosphorylierung von CHK1 nach MMC-Schädigung größer. Sie lag im Mittel bei $0,5 \pm 0,2$. Dabei wiesen zwei Zelllinien eine geringe Phosphorylierung von CHK1 auf, mit 0,2 (*GI-101*) und 0,3 (*MDA-231*). In *MDA-468*-Zellen war die Phosphorylierung von CHK1 mit 0,9 stark und vergleichbar mit der von Zelllinien mit moderat RAD51.

Somit zeigte sich ein Trend zu einer höheren CHK1-Phosphorylierung infolge einer MMC-Schädigung in Zelllinien mit moderat RAD51 im Vergleich zu Zelllinien mit viel RAD51.

Aufgrund des beobachteten Trends einer geringeren Phosphorylierung von CHK1 in BrCa-Zelllinien mit viel RAD51 wurde nur HNSCC-Zelllinien mit viel RAD51 nach MMC-Schädigung untersucht. Exponentiell wachsende Zellen wurden mit MMC behandelt, die Proteine nach Finnie et al. (1995) [43] isoliert, nach der Größe aufgetrennt und CHK1 sowie Phospho-CHK1 mittels Fluoreszenz-Detektion nachgewiesen.

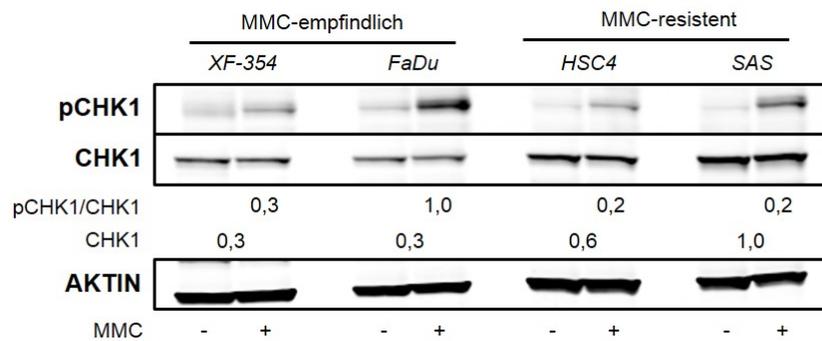


Abbildung 5.20: Phosphorylierung von CHK1 nach MMC-Schädigung in HNSCC-Zelllinien mit viel RAD51.

Exponentiell wachsende Zellen wurden 24 h nach Aussaat für 6 h mit $1,5 \mu\text{M}$ MMC inkubiert, $30 \mu\text{g}$ nach Finnie et al. (1995) [43] isolierte Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und CHK1 sowie Phospho-CHK1 mittels Fluoreszenz-Detektion nachgewiesen. β -AKTIN diente als Ladungskontrolle.

Abbildung 5.20 zeigt die Phosphorylierung von CHK1 nach MMC-Schädigung in HNSCC-Zelllinien mit viel RAD51. Es waren große Unterschiede in der Phosphorylierung von CHK1 nach MMC-Schädigung zu beobachten. Die Zelllinien *XF-354* und *FaDu* wiesen dabei eine stärkere Phosphorylierung auf als *HSC4*- und *SAS*-Zellen, mit 0,3 und 1,0 im Vergleich zu jeweils 0,2. So zeigten alle Zelllinien eine eher vergleichbare Phosphorylierung von CHK1 mit Ausnahme der Zelllinie *FaDu*, welche

die stärkste Phosphorylierung von CHK1 aufwies.

Bei Betrachtung der endogenen CHK1-Expression war auffällig, dass die Zelllinien erhebliche Unterschiede aufwiesen. So zeigten *XF-354*- und *FaDu*-Zellen mit einem Wert von 0,3 eine deutlich geringere Expression als *HSC4* und *SAS* mit Werten von 0,6 und 1,0. Darüber hinaus ist auffällig, dass es sich bei diesen Zelllinien um die MMC-resistenten Zelllinien handelte.

5.5 Phosphorylierung von CHK1 nach UV-Behandlung in *FaDu*- und *HSC4*-Zellen

Die Induktion von DNA-DNA-Vernetzungen kann zu einer globalen Zellzyklusantwort führen, die neben der Aktivierung von CHK1 durch ATR möglicherweise durch andere Proteinkinasen wie beispielsweise ATM oder DNA-PKcs ausgelöst werden kann. Darüber hinaus ist CHK1 in mehreren Zellzyklusphasen aktiv in die Schadensantwort involviert. Eine überlappende Aktivierung von CHK1 durch mehrere PIK3-Kinasen konnte bereits nach ionisierender Bestrahlung beobachtet werden [67] und eine Funktion von CHK1 wurde vielfach bei der Einleitung des G2-Arrestes beobachtet [52]. Eine rein ATR-vermittelte, S-Phase-spezifische Phosphorylierung von CHK1 wurde hingegen lediglich nach UV-Bestrahlung beobachtet [67]. Es wurde daher überprüft, ob Zelllinien mit einem unterschiedlichen zellulären Überleben nach MMC-Schädigung Unterschiede in der Aktivierung von CHK1 nach UV-Bestrahlung und damit in der S-Phase-spezifischen Schadensantwort aufwiesen. Zu diesem Zweck wurde die Phosphorylierung von CHK1 nach UV-Bestrahlung in einer Zelllinie mit viel RAD51 und einem geringen zellulären Überleben nach MMC-Schädigung im Vergleich zu einer Zelllinie mit viel RAD51 und einer MMC-Resistenz untersucht. Exponentiell wachsende Zellen wurden mit UV bestrahlt, Proteine nach Finnie et al. (1995) [43] isoliert und die Proteine über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. CHK1 sowie Phospho-CHK1 wurden mittels Fluoreszenzdetektion nachgewiesen.

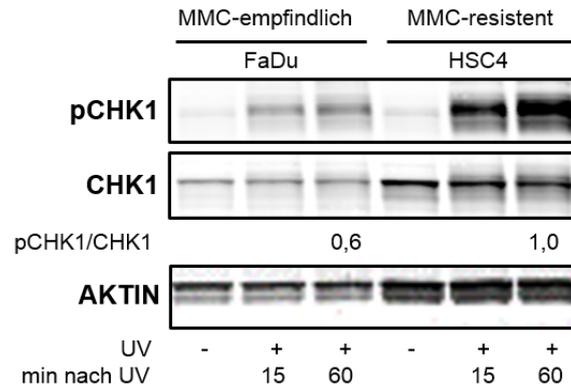


Abbildung 5.21: Exponentiell wachsende Zellen wurden 24 h nach Aussaat mit $50 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$ UV bestrahlt, 30 μg nach Finnie et al. (1995) [43] isolierte Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und CHK1 sowie Phospho-CHK1 mittels Fluoreszenz-Detektion nachgewiesen. β -AKTIN diente als Ladungskontrolle.

Abbildung 5.21 zeigt die Phosphorylierung von CHK1 nach UV-Bestrahlung in einer HNSCC-Zelllinie mit viel RAD51 und hoher MMC-Empfindlichkeit und einer HNSCC-Zelllinie mit viel RAD51 und geringer MMC-Empfindlichkeit. Es waren deutliche Unterschiede in der CHK1-Phosphorylierung nach UV-Bestrahlung zu erkennen. Die MMC-resistente Zelllinie *HSC4* zeigte dabei 60 min nach UV-Bestrahlung eine deutlich stärkere Phosphorylierung von CHK1 als die MMC-empfindliche Zelllinien *FaDu*, mit 1,0 und 0,6.

5.6 Zusammenfassung 1

Es wurde die Auswirkung geringfügiger Unterschiede in der endogen vorliegenden RAD51-Expression für die DSB-induzierte HR, für das zelluläre Überleben nach MMC-Schädigung und die Phosphorylierung der Kinase CHK1, die den Zellzyklus maßgeblich in der S- und G2-Phase kontrolliert, in BrCa- und HNSCC-Zelllinien untersucht.

Sowohl BrCa- als auch HNSCC-Zelllinien konnten hinsichtlich ihrer RAD51-Expression in Gruppen mit wenig, moderat und viel RAD51 eingeteilt werden. Unterschiede in der RAD51-Expression waren dabei nicht auf den Anteil an S/G2-Phase-Zellen zurückzuführen. Die Messung der relativen HR-Kapazität ergab, dass sowohl BrCa- als auch HNSCC-Zelllinien mit wenig RAD51 oder viel RAD51 eine geringe relative HR-Kapazität aufwiesen, während eine hohe relative HR-Kapazität lediglich in Zelllinien mit moderat RAD51 beobachtet wurde. Die detektierten Unterschiede in der relativen HR-Kapazität waren nicht auf Unterschiede im Anteil an

S-Phase-Zellen zurückzuführen. Zelllinien mit einer geringen relativen HR-Kapazität wiesen jedoch eine geringere ATR-Expression und im Besonderen Zelllinien mit einer hohen RAD51-Expression eine verhältnismäßig geringe BRCA2-Expression auf. Darüber hinaus wurde RAD51 nach DNA-Schädigung erfolgreich in den Kern transportiert und eine funktionale RAD51-Filamentbildung beobachtet.

Das zelluläre Überleben nach MMC-Schädigung war sowohl in BrCa- als auch HNSCC-Zelllinien sehr unterschiedlich. BrCa-Zelllinien mit viel RAD51 waren bezogen auf die geringe HR-Kapazität der Erwartung entsprechend empfindlicher als Zelllinien mit moderat RAD51 ($p=0,045$). HNSCC-Zelllinien zeigten dagegen keine Unterschiede in der MMC-Empfindlichkeit ($p=8986$) zwischen moderat und viel RAD51. Darüber hinaus zeigten einige der HNSCC-Zelllinien mit viel RAD51 in Erwartung ein geringes zelluläres Überleben nach MMC-Schädigung, andere dagegen entgegen der Erwartung bei einer geringen HR-Kapazität eine Resistenz.

Die CHK1-Phosphorylierung nach einer MMC-Schädigung war in BrCa-Zelllinien mit moderat RAD51 im Mittel stärker als in Zelllinien mit viel RAD51 ($p=0,214$). In HNSCC-Zelllinien mit viel RAD51 war die Phosphorylierung von CHK1 in MMC-empfindlichen Zellen stärker als in MMC-resistenten. MMC-resistenten Zelllinien wiesen jedoch eine deutlich höhere CHK1-Expression auf. Nach UV-Bestrahlung zeigte sich dagegen, dass die Phosphorylierung von CHK1 in MMC-resistenten HNSCC-Zelllinien deutlich stärker ausgeprägt war als in MMC-empfindlichen HNSCC-Zelllinien. Deshalb wurde davon ausgegangen, dass sich diese Zelllinien hinsichtlich ihrer S-Phase-spezifischen Schadensantwort deutlich unterschieden. Bezogen auf diese Hypothese wurden im Weiteren die HNSCC-Zelllinien *FaDu* und *HSC4* detailliert untersucht, um die Ursache für die starken Unterschiede im zellulären Überleben nach MMC-Schädigung trotz vergleichbar geringer relativer HR-Kapazität zu klären.

5.7 RAD51- und 53BP1-Foci nach MMC-Schädigung in *FaDu*- und *HSC4*-Zellen

Zur Klärung der Beobachtung, dass zwei Zelllinien mit einer hohen RAD51-Expression und geringen relativen HR-Kapazität deutliche Unterschiede im zellulären Überleben nach MMC aufwiesen, wurde im Folgenden die Induktion von DSBs nach MMC-Schädigung untersucht. Dabei diente der Nachweis von RAD51-Foci als Marker für die Reparatur mittels HR und 53BP1-Foci als genereller DNA-DSB-Marker. Die Anzahl an RAD51- und 53BP1-Foci in replizierenden Zellen wurde 6 und 24 h nach MMC-Schädigung in den HNSCC-Zelllinien *FaDu* und *HSC4* untersucht. Zellen wurden mit EdU markiert, mit MMC behandelt und sowohl 6 als auch 24 h nach

MMC-Schädigung fixiert. RAD51- und 53BP1-Foci wurden durch Immunfluoreszenz detektiert und automatisiert gezählt.

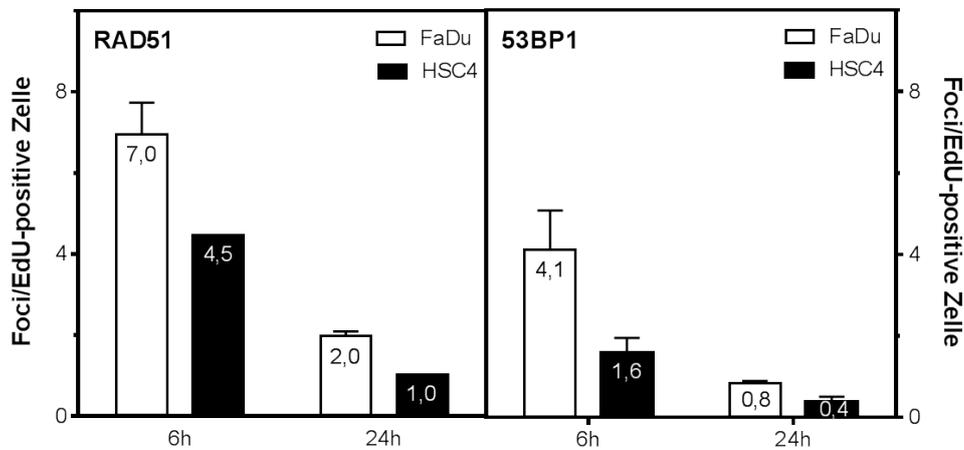


Abbildung 5.22: RAD51- und 53BP1-Foci in replizierenden *FaDu*- und *HSC4*-Zellen nach MMC-Schädigung.

Exponentiell wachsende *HSC4*- und *FaDu*-Zellen (HNSCC) wurden für jeweils 30 min mit 10 μM EdU und 1,5 μM MMC behandelt, RAD51- und 53BP1-Foci nach 6 und 24 h durch Immunfluoreszenz gefärbt und die Anzahl an Foci pro EdU-positive Zelle automatisiert gezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Doppelbestimmungen + SEM.

Abbildung 5.22 zeigt die quantitative Darstellung von RAD51- und 53BP1-Foci sowohl 6 als auch 24 h nach MMC-Schädigung. Es wurden deutliche Unterschiede in der Anzahl an RAD51- und 53BP1-Foci pro EdU-positive Zelle zwischen *FaDu* (MMC-empfindlich)- und *HSC4* (MMC-resistent)-Zellen beobachtet. Während *FaDu*-Zellen sowohl 6 als auch 24 h nach MMC-Schädigung deutlich mehr RAD51-Foci pro EdU-positive Zelle aufwiesen, zeigten *HSC4*-Zellen deutlich geringere Werte, mit $7 \pm 0,8$ und $2 \pm 0,1$ für *FaDu*- und $4,5 \pm 0,4$ und $1 \pm 0,2$ für *HSC4*-Zellen.

Die Anzahl an 53BP1-Foci war deutlich geringer als die Anzahl an RAD51-Foci. Sie variierte jedoch ebenfalls in gleicher Weise zwischen den beiden Zelllinien sowohl 6 als auch 24 h nach MMC-Schädigung. *FaDu*-Zellen zeigten im Vergleich zu *HSC4*-Zellen nach 6 und 24 h ebenfalls deutlich mehr 53BP1-Foci nach MMC-Schädigung, mit $4,1 \pm 1$ und $1,6 \pm 0,04$ Foci sowie $0,8 \pm 0,4$ und $0,4 \pm 0,1$.

Somit konnten in MMC-empfindlichen *FaDu*-Zellen deutlich mehr RAD51- und 53BP1-Foci sowohl 6 als auch 24 h nach MMC-Schädigung detektiert werden als in der MMC-resistenten Zelllinie *HSC4*. Dies spiegelte sich im zellulären Überleben nach MMC-Schädigung wider, nicht aber in der relativen HR-Kapazität.

5.8 S/G2-Phase-Arrest nach MMC-Schädigung in *FaDu*- und *HSC4*-Zellen

Im Weiteren wurde die Hypothese überprüft, dass die MMC-resistente Zelllinie *HSC4* im Vergleich zur sensitiven Zelllinie *FaDu* aufgrund der starken Phosphorylierung von CHK1 eine deutlich ausgeprägtere Intra-S- bzw. G2-Zellzyklusantwort ausüben konnte und sich dadurch möglicherweise die zellulär beobachtete höhere Resistenz erklären ließ. Für die Untersuchung wurden die Zellen mit MMC geschädigt und die zeitliche Veränderung im Anteil an S/G2-Phase-Zellen überprüft. Exponentiell wachsende Zellen wurden mit MMC behandelt, in Zeitabständen von 0, 1, 2, 4, 6, 8 und 24 h fixiert, die DNA gefärbt und der Anteil an S/G2-Phase-Zellen im Durchflusszytometer gemessen.

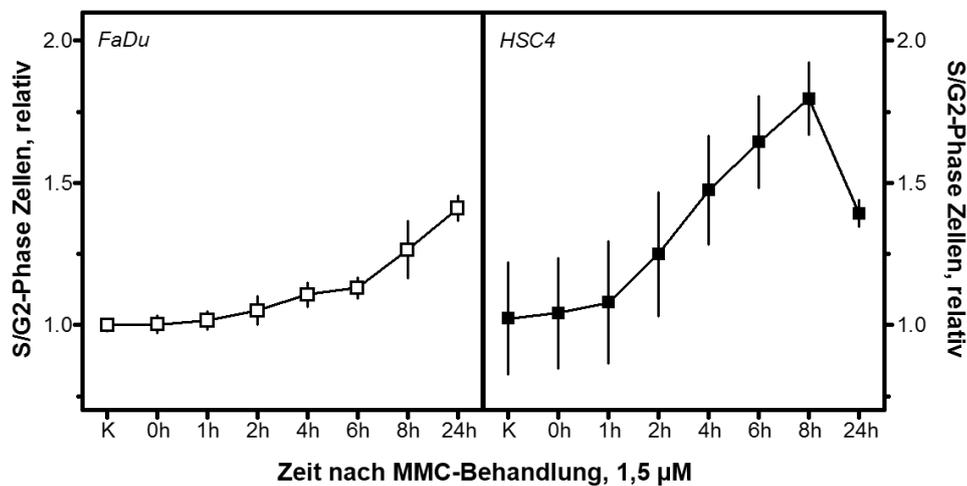


Abbildung 5.23: S/G2-Phase.Anteil nach MMC-Schädigung in *FaDu*- und *HSC4*-Zellen.

Exponentiell wachsende Zellen wurden für 1 h mit $1,5 \mu\text{M}$ MMC behandelt, in Zeitabständen von 0, 1, 2, 4, 6, 8 und 24 h fixiert, die DNA mit Propidiumiodid gefärbt und der Anteil an S/G2-Phase-Zellen am Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Doppelbestimmungen \pm SEM.

Abbildung 5.23 zeigt die relative Veränderung im Anteil an S/G2-Phase-Zellen 0, 1, 2, 4, 6, 8 und 24 h nach MMC-Schädigung in MMC-empfindlichen *FaDu*-Zellen (vgl. Abbildung 5.23 links) und MMC-resistenten *HSC4*-Zellen (vgl. Abbildung 5.23 rechts). Es wurden deutliche Unterschiede in der zeitlichen, relativen Veränderung im Anteil an S/G2-Phase-Zellen nach MMC-Schädigung in beiden Zelllinien beobachtet. Der relative Anteil an S/G2-Phase-Zellen erhöhte sich nach DNA-Schädigung durch MMC zunächst zeitabhängig in beiden Zelllinien, allerdings deutlich stärker in

HSC4-Zellen. So zeigten *FaDu*-Zellen 1 h nach Behandlung keine Veränderung im relativen Anteil an S/G2-Phase-Zellen im Vergleich zu 0 h, nach 2, 4 und 6 h einen Anstieg um 25 % bezogen auf das Maximum, nach 8 h um 75 % gefolgt von dem Maximum nach 24 h mit einem Wert von 1,4 und Einzelwerten von $1,0 \pm 0,03$; $1,0 \pm 0,03$; $1,1 \pm 0,05$; $1,1 \pm 0,04$; $1,1 \pm 0,03$; $1,3 \pm 0,10$ auf $1,4 \pm 0,04$ für die entsprechenden Zeitpunkte. *HSC4*-Zellen zeigten dagegen bereits 1 h nach Behandlung einen Anstieg um 14 % im Anteil der S/G2-Phase-Zellen, der sich mit 28 % nach 2 h, 56 % nach 4 h, 84 % nach 6 h auf ein Maximum nach 8 h erhöhte und dann nach 24 h mit 42 % einen deutlichen Abfall zeigte, mit Einzelwerten von $1,0 \pm 0,18$; $1,1 \pm 0,20$; $1,2 \pm 0,20$; $1,4 \pm 0,18$; $1,6 \pm 0,15$; $1,7 \pm 0,12$ auf $1,3 \pm 0,04$ für die entsprechenden Zeitpunkte. Es zeigte sich darüber hinaus, dass *HSC4*-Zellen deutlich stärker in der S/G2-Phase arretierten, mit einem maximalen Wert von 1,7 im Vergleich zu *FaDu*-Zellen mit nur 1,4.

Zusammenfassend zeigte sich ein schnellerer und verstärkter S/G2-Phase-Arrest in der MMC-resistenten Zelllinie *HSC4*, der nach 24 h bereits wieder aufgelöst wurde. Die MMC-empfindliche Zelllinie *FaDu* reagierte verlangsamt und verblieb dagegen nach 24 h zu einem höheren Anteil in der S/G2-Phase.

5.9 Auswirkung einer RAD51-Inhibition auf das zelluläre Überleben nach MMC-Schädigung

Inwieweit die beobachteten Unterschiede im zellulären Überleben nach MMC-Behandlung auf eine Abhängigkeit von RAD51 als Schlüsselprotein der klassischen HR zurückzuführen waren oder ob ein alternativer Reparaturweg wie beispielsweise SSA die Resistenz der Zellen gegenüber MMC bedingte, wurde im Folgenden überprüft. Dafür wurde RAD51 durch siRNA inhibiert und das zelluläre Überleben nach MMC-Schädigung in Zelllinien mit unterschiedlicher MMC-Sensitivität trotz gleicher geringer HR-Kapazität untersucht. Exponentiell wachsende Zelllinien wurden mit siRNA gegen RAD51 transfiziert, mit MMC behandelt und das klonogene Zellwachstum überprüft. Parallel wurden Proteine nach Finnie et al. (1995) [43] isoliert und RAD51 mittels Fluoreszenzdetektion nachgewiesen.

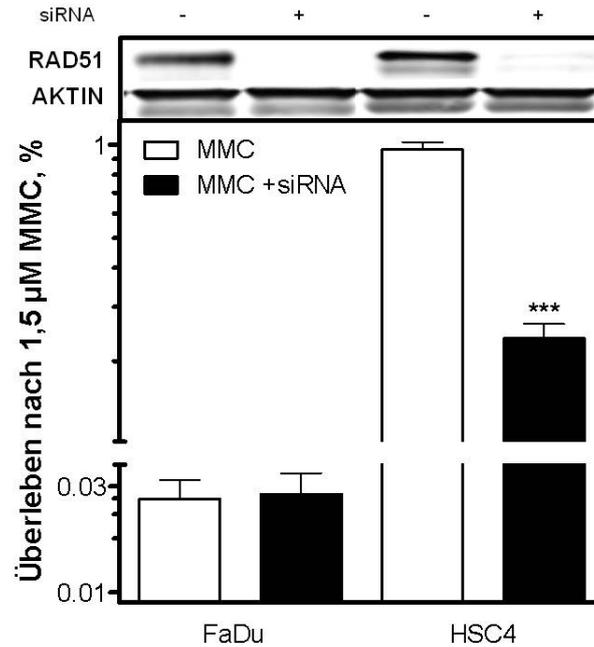


Abbildung 5.24: Einfluss der Inhibition der RAD51-Expression auf die zelluläre Empfindlichkeit nach MMC-Schädigung in *FaDu*- und *HSC4*-Zellen.

In exponentiell wachsenden Zellen wurde RAD51 mittels siRNA reduziert, nach 72 h für 1 h mit 1,5 μM MMC inkubiert und das klonogene Zellwachstum nach 7–14 Tagen überprüft. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Doppelbestimmungen; statistisch signifikant abweichend von MMC-behandelten Zellen: *** $p < 0,001$ (Student' scher t-Test).

Abbildung 5.24 zeigt die Auswirkung der RAD51-Inhibition durch siRNA auf das zelluläre Überleben nach MMC-Schädigung. Es wurden deutliche Unterschiede in der Auswirkung einer RAD51-Inhibition für die MMC-empfindliche Zelllinie *FaDu* und die MMC-resistente Zelllinie *HSC4* beobachtet. Während in der Zelllinie *FaDu* kein Unterschied im zellulären Überleben nach MMC in Abwesenheit von RAD51 beobachtet wurde, zeigte die Zelllinie *HSC4* eine signifikante Reduktion des Überlebens um 73 % nach Inhibition von RAD51, mit $3 \pm 0,01$ % in *FaDu*-mit und ohne siRNA im Vergleich zu $97 \pm 0,06$ % und $24 \pm 0,03$ % mit und ohne siRNA in *HSC4*-Zellen.

Somit zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der Reparatur von DNA-DNA-Vernetzungen in *HSC4*-Zellen im Gegensatz zu *FaDu*-Zellen, die sich in Abwesenheit von RAD51 nicht weiter gegenüber MMC sensitivieren ließen.

5.10 Auswirkung einer RAD51-Inhibition auf die relative HR-Kapazität

Eine Abhängigkeit von RAD51 für die Reparatur von DNA-DNA-Vernetzungen konnte in der MMC-resistenten Zelllinie *HSC4* beobachtet werden, nicht aber in der MMC-empfindlichen Zelllinie *FaDu*. Beide Zelllinien zeichneten sich durch eine geringe relative HR-Kapazität aus. Es wurde untersucht, ob eine Inhibition von RAD51 sich auch auf die relative HR-Kapazität auswirkte. Die relative HR-Kapazität wurde nach Inhibition von RAD51 durch den RAD51-Inhibitor RI-1 in *FaDu*- und *HSC4*-Zellen untersucht. Exponentiell wachsende Zellen wurden mit dem RAD51-Inhibitor RI-1 versetzt, anschließend mit dem GFP-exprimierenden Plasmid pEGFP-N1 sowie dem Reparaturkonstrukt pGC transfiziert und GFP-positive Zellen am Durchflusszytometer gemessen. Die in der relativen HR-Kapazität kompetente Zelllinie *UT-8* wurde als Maß für die erfolgreiche Inhibition der HR-Kapazität verwendet.

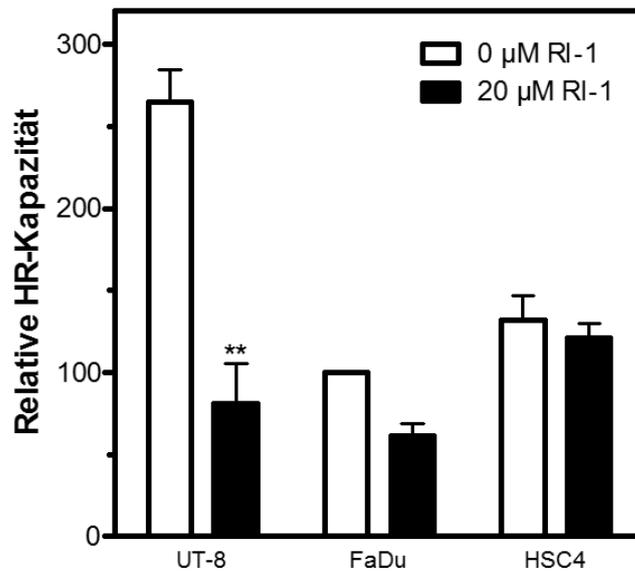


Abbildung 5.25: Einfluss der RAD51-Inhibition auf die HR-Kapazität in HNSCC-Zelllinien.

Exponentiell wachsende Zellen wurden 18 h nach Aussaat mit 20 μM RI-1 (RAD51 Inhibitor) inkubiert, 24 h nach Aussaat transient mit dem GFP-exprimierenden Plasmid pEGFP-N1 oder dem Reparaturkonstrukt pGC in einem Verhältnis von dem Transfektionsagens zu Plasmid von 3:1 [$\mu\text{l}:\mu\text{g}$] transfiziert und der prozentuale Anteil GFP-positiver Zellen nach 24 h am Durchflusszytometer gemessen. Die HR-Kapazität wurde relativ zur absoluten HR-Kapazität von *FaDu* berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte mindestens dreier unabhängiger Doppelbestimmungen + SEM; statistisch signifikant abweichend von 0 μM RI-1: ** $p < 0,01$ (Student'scher t-Test).

Abbildung 5.25 zeigt die Auswirkung einer Inhibition von RAD51 auf die relative HR-Kapazität in *UT-8*-, *FaDu*- und *HSC4*-Zellen. Es waren deutliche Unterschiede der RAD51-Inhibition auf die relative HR-Kapazität zu beobachten. In der HR-kompetenten Zelllinie *UT-8* zeigte sich eine deutliche, signifikante Reduktion der relativen HR-Kapazität nach Inhibition von RAD51 durch RI-1 um den Faktor 3,3, mit 265 ± 19 auf 81 ± 24 . Die relative HR-Kapazität in Zelllinien mit viel RAD51 ließ sich dagegen nicht signifikant durch Inhibition von RAD51 reduzieren. In *HSC4*- und *FaDu*-Zellen sank die relative HR-Kapazität dabei um den Faktor 1,2 und 1,5, mit 132 ± 15 auf 113 ± 1 und 100 ± 0 auf 61 ± 7 .

Somit konnte die relative HR-Kapazität lediglich in der HR-kompetenten Zelllinie *UT-8* signifikant reduziert werden. Die relative HR-Kapazität in Zelllinien mit viel RAD51, die eine geringe relative HR-Kapazität aufwiesen, ließ sich nach Inhibition von RAD51 nur geringfügig reduzieren, was auf einen Defekt in der HR, wie sie mittels Plasmid-Rekonstruktions-Assay nachgewiesen wurde, hindeutete.

5.11 Zusammenfassung 2

Es wurde untersucht, ob die ausgeprägten Unterschiede im zellulären Überleben nach MMC-Schädigung in zwei HNSCC-Zelllinien mit einer geringen relativen HR-Kapazität auf einen Defekt in der HR für die Reparatur von DNA-DNA-Vernetzungen zurückzuführen waren.

Es konnte gezeigt werden, dass die MMC-empfindliche Zelllinie *FaDu* im Vergleich zur MMC-resistenten Zelllinie *HSC4* deutlich mehr RAD51- und 53BP1-Foci in replizierenden Zellen sowohl 6 als auch 24 h nach MMC-Schädigung aufwies. Diese Beobachtungen wurden durch Unterschiede sowohl in der Ausprägung als auch in der zeitlichen Veränderung des relativen Anteils an S/G2-Phase-Zellen nach DNA-Schädigung durch MMC bestätigt. Hier wiesen zwar beide Zelllinien zunächst einen Anstieg im relativen Anteil an S/G2-Phase-Zellen nach MMC-Schädigung auf, allerdings zeitlich versetzt und zu einem geringeren Anteil in der MMC-empfindlichen Zelllinie *FaDu*. Außerdem konnte die MMC-resistente Zelllinien *HSC4* 24 h nach MMC-Schädigung den S/G2-Phase-Arrest weitestgehend wieder aufheben. Deshalb wurde die Abhängigkeit der Reparatur von DNA-DNA-Vernetzungen von RAD51 nach Inhibition von RAD51 mittels siRNA untersucht. Dabei ließen sich MMC-resistente *HSC4*-Zellen durch die Inhibition von RAD51 in ihrem zellulären Überleben nach MMC-Schädigung erheblich sensitivieren, im Gegensatz zu MMC-empfindlichen *FaDu*-Zellen. Dies deutete auf einen Defekt in der Reparatur von DNA-DNA-Vernetzungen mittels HR in der MMC-empfindlichen Zelllinie *FaDu* hin, nicht aber in der MMC-resistenten Zelllinie *HSC4*.

Die Auswirkung der Inhibition von RAD51 auf die relative HR-Kapazität zeigte dagegen in beiden Zelllinien nur einen geringen Effekt.

Diese Beobachtungen weisen auf eine unterschiedliche Regulation der HR für die replikationsassoziierte HR (MMC-Empfindlichkeit) und DSB-induzierte HR (relative HR-Kapazität) in den HNSCC-Zelllinien *FaDu* und *HSC4* hin.

KAPITEL 6

Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war, die Auswirkung von geringfügigen Unterschieden in der Expression von RAD51 auf DNA-Reparaturprozesse mittels HR in humanen Tumorzelllinien zu charakterisieren.

Hintergrund für die Arbeit ist, dass eine Überexpression von RAD51 in den meisten Tumorentitäten als ein negativ prognostischer Marker für das Überleben der Tumor-Patienten identifiziert wurde [3, 85, 87, 95, 125, 154]. Die molekularen Mechanismen, die bei einer hohen RAD51-Expression in Tumoren zu einer negativen Prognose für die Patienten führten, sind bislang unklar. Mögliche Ursachen sind eine Therapieresistenz durch verstärkte Reparatur mittels HR oder eine erhöhte genomische Instabilität durch unkontrollierte Reparatur, die zu einer erhöhten Malignität der Tumore führen würde [96, 105, 109, 131].

Zur Überprüfung dieser beiden Hypothesen wurden zwei Tumorentitäten ausgewählt, für die die HR eine unterschiedliche Bedeutung haben könnte. Für die Entstehung von familiärem Brustkrebs (BrCa) wurden Gene der HR wie BRCA1, BRCA2 und PALB2 eindeutig als Risiko-Gene identifiziert [38, 158, 162]. Die Bedeutung von HR in Tumoren des Kopf-Halsbereiches (HNSCC) ist bislang nicht geklärt. Eine erhöhte Tumorzinzidenz für HNSCCs wurde bisher lediglich für Mutationsträger von FA-Genen beobachtet, mit einem um 700fach erhöhten Risiko für die Entwicklung von HNSCCs [83, 101, 133]. Die beiden Reparaturkomplexe der HR und der FA zeigen jedoch eine überlappende Funktion in der DNA-Reparatur während der Replikation.

6.1 Methodische Vorarbeiten

In dieser Arbeit wurden 20 Tumorzelllinien untersucht, die sich hinsichtlich ihrer endogenen RAD51-Expression unterschieden. Standardisierte Bedingungen für die

Untersuchungen hinsichtlich der DSB-induzierten HR (HR-Kapazität), der Ausbildung von RAD51- und 53BP1-Reparatur-Aggregaten (RAD51- und 53BP1-Foci), sowie eine effiziente Inhibition von RAD51 in den verwendeten Zelllinien waren dafür unerlässlich. Die geeigneten Konditionen wurden in Vorexperimenten etabliert.

Bislang wurden Auswirkungen von Unterschieden in der RAD51-Expression auf die HR-Kapazität nur in isogenen Zellsystemen untersucht, in denen entweder eine Überexpression oder der Verlust von RAD51 experimentell induziert wurde [16, 76, 84, 119, 174]. In dieser Arbeit wurde erstmals die Auswirkung geringfügiger Unterschiede in der endogenen RAD51-Expression in Zelllinien jeweils einer Tumorentität auf die HR-Kapazität überprüft. Für die Untersuchungen wurde ein Plasmid-Rekonstruktions-Assay verwendet, mit dem die Fähigkeit, einen einzelnen DSB mittels HR zu reparieren (HR-Kapazität), überprüft wurde. Für diesen Assay war die erfolgreiche Transfektion der Zellen mit dem Reparaturkonstrukt pGC und dem Kontrollplasmid pN1 essentiell.

Die Transfektion des Reparaturkonstrukts erfolgte transient und nicht stabil, da nur eine transiente Transfektion die Analyse vieler Zelllinien erlaubte und sich für eine spätere klinische Anwendung in Form eines Screenings hinsichtlich der HR-Kapazität von Tumoren eignet.

Zur Anpassung möglicher experimenteller Schwankungen wurde in allen Experimenten eine Zelllinie als Standard mitgeführt, auf die die absoluten gemessenen Werte für die HR-Kapazität korrigiert wurden. Voraussetzung für die Messung der HR-Kapazität war eine möglichst hohe Transfektionseffizienz der Zelllinien unter möglichst geringer zytotoxischer Wirkung des Transfektionsagences [104]. Dies wurde unter Verwendung des Transfektionsagences FuGENE® HD im Verhältnis von 3:1 [$\mu\text{l}:\mu\text{g}$] erreicht (vgl. Abbildung 5.1). Die maximale Transfektionseffizienz lag bei etwa 60 %, was vergleichbar mit den Transfektionseffizienzen anderer Arbeiten ist [80, 157]. Damit wurde die höchste Transfektionseffizienz bei der höchsten Konzentration des Transfektionsagences erzielt. Mit weiter zunehmender Konzentration der in dieser Arbeit verwendeten Transfektions-Formulaturen wurde eine Zunahme der Zytotoxizität beschrieben, jedoch erst bei weitaus höheren Konzentrationen als von den in dieser Arbeit verwendeten [104]. Das Transfektionsagenz LipofectaminTM 2000 war im Vergleich zu FuGENE® HD weitaus zytotoxischer. Deshalb wurde in allen weiteren Zelllinien und Experimenten FuGENE® HD für 24 h im Verhältnis 3:1 [$\mu\text{l}:\mu\text{g}$] eingesetzt.

Für die Zählung von RAD51- und 53BP1-Foci wurden zwei Methoden zur Zählung miteinander verglichen: konventionell per Auge und automatisiert, die ebenfalls

einen weitaus größeren Durchsatz an Proben erlaubte. Es wurden gezielt DSBs untersucht, die mittels HR in der S-Phase repariert wurden. Dafür wurden die Zellen mit Mitomycin C (MMC) behandelt, welches DNA-DNA-Vernetzungen induziert, die an Replikationsgabeln zu DSBs prozessiert werden können [2, 29, 117, 129]. Parallel dazu wurden die Zellen mit dem Basenanalogen EdU markiert [72]. Als genereller DSB-Marker dienten 53BP1-Foci. Die Markierung von γ H2AX eignete sich hierfür nicht, da H2AX während der Replikation auch infolge von nicht DSB-assoziierten, sondern Replikations-assoziierten Schäden phosphoryliert wird [130]. RAD51-Foci dienten als Marker für DSBs, die mittels HR repariert wurden.

Die beiden verwendeten Methoden zur Zählung von RAD51- und 53BP1-Foci führten zu vergleichbaren Resultaten in den beiden untersuchten Zelllinien und erlaubten somit den Einsatz der automatisierten Zählung (vgl. Abbildung 5.4). Während die Anzahl an RAD51-Foci mit beiden Methoden zu identischen Werten in beiden Zelllinien führte, zeigte die automatische Zählung für die Anzahl an 53BP1-Foci geringere Werte im Vergleich zur Zählung mit dem Auge. Es handelte sich hier jedoch um eine parallele Verschiebung, unter der das Verhältnis der Unterschiede in beiden verwendeten Zelllinien gleich blieb. Die Ursache für eine Verschiebung zu geringeren oder höheren Werten in der Anzahl an 53BP1-Foci ist auf die Festlegung des Hintergrunds bei der zur Auswertung verwendeten Software Cell profiler zurückzuführen [15, 71]], sodass innerhalb eines Experimentes bei einmaliger Festlegung des Hintergrundes für alle Zelllinien mögliche Unterschiede mittels automatisierter Zählung gut sichtbar waren.

Zur Untersuchung der Auswirkung der RAD51-Inhibition im Plasmid-Rekonstruktions-Assay wurde der *small molecule*-Inhibitor RI-1 eingesetzt. Die Verwendung eines *small molecule* Inhibitors gewährleistete eine maximale Unterdrückung der RAD51-Filamentbildung, da der Inhibitor durch seine geringe Größe in hoher Konzentration aufgenommen werden kann [16]. Dies wurde unter Einsatz von verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors (10, 20 und 30 μ M) sowohl im Plasmid-Rekonstruktions-Assay in Form einer Reduktion der HR-Kapazität als auch anhand der Reduktion der RAD51-Filamentbildung nach Bestrahlung überprüft (vgl. Abbildungen 5.5 und 5.6). Es zeigte sich eine Reduktion der HR-Kapazität um 75 % im Plasmid-Rekonstruktions-Assay. Dies ist vergleichbar mit der Arbeit von Budke et al. (2012) [16], die ebenfalls eine 75 %ige Reduktion der HR bei 20 μ M zeigten. Durch den Einsatz von 30 μ M RI-1 konnte lediglich eine geringfügige zusätzliche Reduktion der HR-Kapazität von 10 % erzielt werden. Bei dieser Konzentration wurde entsprechend der Arbeit von Budke et al. (2012) [16] jedoch auch eine deutlich höhere Zytotoxizität des Inhibitors beobachtet. Eine funktionelle Inhibition von RAD51 durch

vollständige Unterdrückung der Filamentbildung nach Bestrahlung wurde bereits bei 20 μM RI-1 beobachtet und ist in Übereinstimmung mit Budke et al. (2012) [16].

Aufgrund der erhöhten zytotoxischen Wirkung von RI-1 in einem Langzeit-Assay wurde für die Untersuchung des zellulären Überlebens nach MMC-Schädigung eine siRNA gegen RAD51 zur Inhibition von RAD51 verwendet. Dafür musste die optimale siRNA-Konzentration für die Zelllinien etabliert werden. Bei einer Konzentration von 50 nM siRNA wurde eine nahezu 100 %ige Reduktion der Expression von RAD51 in beiden untersuchten Zelllinien beobachtet (vgl. Abbildung 5.7). Durch die Verwendung einer *siGENOME SMARTpool* siRNA (Thermo Fisher Scientific), die aus einem *Pool* aus vier verschiedene siRNAs gegen RAD51 besteht, konnten mögliche *off-target* Effekte minimiert werden. Eine vergleichbare Inhibition der RAD51-Expression wurde von Bannani-Belhaj et al. (2010) [12] beobachtet, die diesen Effekt bei 100 nM siRNA erzielen konnten.

6.2 RAD51-Expression in BrCa- und HNSCC-Zelllinien

RAD51 ist das Schlüsselprotein der HR, dem Hauptweg zur Reparatur von DSBs in der S-Phase [72]. Es wurden sehr deutliche Unterschiede in der RAD51-Expression sowohl in Tumorbiopsien als auch in Tumorzelllinien unterschiedlicher Herkunft beobachtet [3, 85, 87, 95, 125, 126, 146, 154, 165]. In dieser Arbeit wurde erstmalig innerhalb einer Tumorentität überprüft, ob und in welchem Umfang sich die RAD51-Expression unterschied. Dies wurde in je zehn Tumorzelllinien der Entitäten BrCa und HNSCC überprüft. Innerhalb beider Tumorentitäten wurden deutliche Unterschiede in der RAD51-Expression gezeigt (vgl. Abbildungen 5.8 und 5.9), die jeweils in drei Gruppen unterteilt werden konnten: Zelllinien mit einer geringen, einer moderaten und einer hohen RAD51-Expression. HNSCC-Zelllinien wiesen dabei insgesamt eine höhere RAD51-Expression auf als BrCa-Zelllinien (vgl. Abbildung 5.10). Das Spektrum der Unterschiede umfasste in beiden Tumorentitäten den Faktor drei. Vergleichbare Unterschiede in der Quantität wurde für die BrCa-Zelllinien *BT-20*, *MCF-7* und *SKBR-3* ebenfalls von Raderschall et al. (2002) [126] beobachtet.

RAD51 wird Zellzyklus-abhängig reguliert, mit einer geringen Expression des Proteins in der G0/G1-Phase und einem Maximum in der späten S/G2-Phase [19, 44]. Um dies als Ursache für die Unterschiede in der RAD51-Expression auszuschließen, wurde der Anteil an S/G2-Phase-Zellen analysiert. Dabei zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der RAD51-Expression und dem Anteil an S/G2-

Phase-Zellen in BrCa-Zelllinien (vgl. Abbildungen 5.11). Dasselbe wurde für die HNSCC-Zelllinien beobachtet. Allerdings zeigten HNSCC-Zelllinien einen höheren Anteil an S/G2-Phase-Zellen im Vergleich zu BrCa-Zelllinien, was die insgesamt höheren RAD51-Expression in HNSCC-Zelllinien erklärt.

Für eine erhöhte Expression von RAD51 gibt es eine Reihe möglicher Ursachen. In Leukämiezellen wurde eine erhöhte RAD51-Expression als Folge der Tyrosin-Kinase BCR/ABL-Expression beobachtet. Diese Überexpression kann einerseits durch eine erhöhte STAT5-abhängige Transkription von RAD51 hervorgerufen werden oder andererseits durch eine verminderte Degradation von RAD51 über Caspase-3 [64, 143]. Ebenfalls eine erhöhte RAD51-Expression wurde als Folge einer Überexpression der Onkogene *c-myc*, β -Catenin und des E7 Proteins des humanen Papilloma Virus (HPV) beobachtet [123]. Dies konnte für die in dieser Arbeit verwendete HPV-positive Zelllinie *UT-45* nicht bestätigt werden.

Ein weiterer möglicher Regulator der RAD51-Expression ist das Tumorsuppressorprotein p53, das die Expression von RAD51 in seiner Wildtyp-Form unterdrückt und in seiner mutierten Form stimuliert [55, 123]. Eine Stimulation der RAD51-Expression kann für sieben der zehn untersuchten HNSCC-Zelllinien ausgeschlossen werden, da p53 in allen Zelllinien mutiert ist.

In allen aufgelisteten Fällen muss sich die erhöhte RAD51-Expression im Verlauf der Tumorigenese entwickelt haben, da im gesunden, nicht-proliferierenden Gewebe kein RAD51 exprimiert wird [112, 141]. Somit können alle beschriebenen Onkogene individuell einen Einfluss haben.

6.3 Auswirkung von Unterschieden in der RAD51-Expression auf die HR-Kapazität

HR ist einer der beiden Hauptreparaturmechanismen für DSBs. Eine Reduktion von RAD51 wirkte sich entscheidend auf die HR-Kapazität, mit einer deutlichen Verminderung, aus [16]. Die Auswirkung einer Überexpression von RAD51 auf die HR-Kapazität ist unklar. Bisher wurde die Auswirkung einer deutlich erhöhten RAD51-Expression auf die HR-Kapazität in isogenen Zellsystemen untersucht, in denen eine Überexpression von RAD51 experimentell hergestellt wurde [76, 84, 119, 174]. In dieser Arbeit wurde erstmalig überprüft, inwieweit sich endogen vorliegende, geringfügige Unterschiede in der RAD51-Expression auf die HR-Kapazität auswirken. Dies wurde in zwei Tumorentitäten untersucht. Die Fähigkeit von Zelllinien, DSBs mittels HR zu reparieren (HR-Kapazität), wurde anhand eines Plasmid-

Rekonstruktions-Assays bestimmt. Dabei wurden für BrCa- und HNSCC-Zelllinien erhebliche Unterschiede in ihrer HR-Kapazität in Abhängigkeit des endogenen RAD51s beobachtet (vgl. Abbildung 5.12). Für Zelllinien mit einer moderaten RAD51-Expression wurde in beiden Tumorentitäten die höchste HR-Kapazität gemessen. Dies deutet darauf hin, dass bis zu einer kritischen Menge an RAD51 die HR-Kapazität ansteigt, sich darüber hinaus aber negativ auswirkt und wieder auf ein Niveau abfällt, das vergleichbar mit dem einer geringen RAD51-Expression ist.

Eine den hier präsentierten Daten vergleichbare HR-Kapazität konnte ebenfalls von Mao et al. (2009) [100] für drei der hier untersuchten BrCa-Zelllinien beobachtet werden. So zeigten *MDA-231*-, *MDA-468*- und *T-47D*-Zellen mit 0,29, 0,15 und 1,0 ähnliche Werte. *MCF-7*-Zellen zeigten dagegen eine etwas geringere HR-Kapazität im Vergleich zu den in dieser Arbeit bestimmten Werten [100]. Dies ist auf die Verwendung einer anderen Transfektionsmethode zurückzuführen und verdeutlicht die Wichtigkeit der wie in dieser Arbeit verwendeten Standardisierung für das Erzielen von vergleichbaren Resultaten nach transienter Transfektion verschiedener Tumorzelllinien. In HNSCC-Zelllinien wurde die HR-Kapazität in dieser Arbeit erstmalig untersucht.

Der Vergleich der hier beobachteten Reduktion der HR-Kapazität bei einem endogenen Überangebot von RAD51 mit Untersuchungen, in denen RAD51 experimentell überexprimiert wurde, so zeigt sich ein heterogenes Bild.

Eine vergleichbare Reduktion der HR-Kapazität bei Überexpression von RAD51 konnte von Kim et al. (2001) [76] und Paffet et al. (2005) [119] beobachtet werden. Richardson et al. (2004) [131] zeigte keinen Effekt auf die HR-Kapazität und Lambert und Lopez (2000) [84] sowie Yanez and Porter (2002) [174] zeigten sogar eine deutlich erhöhte Kapazität der HR bei RAD51-Überexpression. Die Ursache für diese Heterogenität könnte auf das Ausmaß der experimentellen RAD51-Überexpression zurückführbar sein. So konnten Lambert und Lopez (2000) [84] bei einer 2–4fachen Erhöhung der RAD51-Expression einen Anstieg der HR-Kapazität zeigen, Kim et al. (2001) [76] dagegen bei einer 4–>10fachen Erhöhung eine Reduktion und dies unter Verwendung desselben Zellsystems. Somit scheint eine geringe Erhöhung der RAD51-Expression stimulierend, eine extreme Überexpression dagegen inhibierend zu wirken. Ein vergleichbares Phänomen wurde ebenfalls für das HR-assoziierte Protein BRCA2 von Magwood et al. (2012) [98] beobachtet. Dabei wurde wie in dieser Arbeit zunächst eine Zunahme der HR-Kapazität mit ansteigender BRCA2-Expression beobachtet, die ebenfalls bei einer Überexpression wieder abnahm.

Es gibt eine Reihe möglicher zellulärer Faktoren, die zu einer Reduktion der HR-Kapazität bei einem Überangebot von RAD51 führen könnten. Dazu gehören Unterschiede in im Anteil an S-Phase-Zellen, in der RAD51-Filamentbildung, im Transport von RAD51 in den Kern und in der Expression weiterer an der HR beteiligter Reparaturproteine.

6.3.1 Einfluss der Zellzyklusverteilung auf die HR-Kapazität

HR ist hauptsächlich in der S-Phase aktiv [6, 72]. Deshalb könnte eine verminderte HR-Kapazität Ausdruck eines geringen Anteils an S-Phase-Zellen sein. Tatsächlich lässt sich diese Annahme in dieser Arbeit nicht bestätigen, eine verminderte HR-Kapazität war nicht auf einen geringeren Anteil an S-Phase-Zellen zurückzuführen. Dies konnte sowohl für die Gruppe der Zelllinien mit geringer als auch mit hoher RAD51-Expression beobachtet werden (vgl. Abbildung 5.13). Untersuchungen an in der S-Phase synchronisierten Zellen zeigten eine 39fach höhere HR-Kapazität im Vergleich zur G0/G1 Phase [135]. Das bedeutet, dass die in dieser Arbeit beobachtete Reduktion in der HR-Kapazität möglicherweise noch ausgeprägter ist, als sie hier in exponentiell wachsenden Zellen beobachtet wurde. Eine mögliche Ursache für die geringere HR-Kapazität trotz hohem S-Phase-Anteil könnte eine geringere Aktivierung von RAD51 durch BRCA2 sein, die durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) vermittelt wird [39].

6.3.2 Fähigkeit zur RAD51-Filamentbildung

Für die Reparatur eines DSBs mittels HR wird RAD51 zu einem Filament verknüpft, welches als so genannter RAD51-Fokus bezeichnet wird. Eine verminderte Fähigkeit zur Filamentbildung wird deshalb allgemein als Charakteristikum einer verminderten HR-Kapazität angesehen. In HNSCC-Zelllinien konnten RAD51-Foci auch in Zelllinien mit einer niedrigen HR-Kapazität bereits ohne exogene Schädigung beobachtet werden (vgl. Abbildung 5.16). Es zeigte sich darüber hinaus, dass Zelllinien mit einer hohen RAD51-Expression deutlich mehr RAD51-Foci bildeten im Vergleich zu Zelllinien mit einer moderaten RAD51-Expression. Dies ist in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten [94, 128, 174], die ebenfalls mehr RAD51-Foci bei RAD51-Überexpression beobachten konnten. Die Ursache für spontan auftretende DSBs sind BDs oder SSBs [145], welche durch Kollision mit Replikationsgabeln in DSBs umgewandelt werden. Sie werden als Substrat für die HR an Replikationsgabeln angesehen [134, 153]. Da RAD51 eine hohe Affinität zu ssDNA aufweist [30, 127, 147] könnte die erhöhte Anzahl der spontan auftretenden RAD51-Foci ein Hinweis auf eine vermehrt initiierte HR sein [5, 160], die im Anschluss nicht wieder aufgelöst

werden kann. Dadurch könnte die niedrigere HR-Kapazität bei gleichzeitig erhöhter RAD51-Foci-Rate erklärt werden. Möglich wäre auch, dass die Reparatur dieser so genannten ein-endigen DSBs, wie sie nur an Replikationsgabeln ausgebildet werden, nicht das Substrat für die HR mittels Plasmid-Rekonstruktions-Assay darstellt. Somit könnte ein Defekt in der HR-Kapazität von zwei-endigen, nicht aber von ein-endigen DSBs vorliegen.

6.3.3 Fähigkeit zum Transport von RAD51 in den Kern

Der Kerntransport von RAD51 erfolgt nach DNA-Schädigung aufgrund des fehlenden eigenen Kernlokalisierungssignals (NLS) mittels HR-assoziiierter Proteine [13]. Die geringe HR-Kapazität in Zelllinien mit einer hohen RAD51-Expression könnte somit auch darauf zurückzuführen sein, dass entsprechende Transportproteine dieses Überangebot nicht in den Kern transportieren und überschüssige RAD51 im Zytoplasma verbleibt. Diese Möglichkeit konnte in der vorliegenden Arbeit für HNSCC-Zelllinien mit einer hohen RAD51-Expression ausgeschlossen werden, da alle Zelllinien eine Erhöhung von RAD51 im Kern nach einer MMC-Schädigung zeigten (vgl. Abbildung 5.15). Die Erhöhung des RAD51-Proteingehaltes im Kern nach MMC-Schädigung variierte dabei um den Faktor 1,2–3,2. Andere Arbeiten zeigten eine vergleichbare Erhöhung des RAD51-Proteingehaltes im Kern nach Bestrahlung [49], allerdings eine noch deutlichere Erhöhung nach MMC-Schädigung [110]. Diese vergleichsweise verminderte Translokierung von RAD51 in den Kern könnte auf einen geringen Gehalt an BRCA2, RAD51C oder eine schwächere DNA-Schadensantwort über ATR/ATM in den hier untersuchten Zellen im Vergleich zu anderen Modellsystemen zurückführbar sein [27, 49, 176].

6.3.4 Expression weiterer HR-assoziiierter Proteine

Für das Protein BRCA2, das maßgeblich am Kerntransport von RAD51 sowie regulatorisch an dem Beladen von ssDNA mit RAD51 beteiligt ist [33, 68, 155], wurde in BrCa-Zelllinien mit Ausnahme von *SKBR-3* (moderate RAD51-Expression) und *MDA-468* (hohe RAD51-Expression) eine geringe Expression beobachtet (vgl. Abbildung 5.14). Da die Expression von BRCA2 in der Regel um etwa 4fach geringer ist als die von RAD51, war dieses schwache Signal für Zelllinien mit einer geringen und moderaten RAD51-Expression zu erwarten. Erstaunlich war, dass in Zellen mit einer hohen RAD51-Expression keine Erhöhung von BRCA2 zu beobachten ist, da bei einer Veränderung der Expression von RAD51 oder BRCA2 die Proteinmenge des jeweils anderen Proteins homöostatisch angepasst wird [97]. Somit könnte sich eine Reduktion der HR-Kapazität auch auf die nicht entsprechend angepasste

Expression von BRCA2 zurückführen lassen. Darüber hinaus könnte die alleinige Reduktion von BRCA2 ausreichen, um einen HR-defizienten Phänotyp zu erzielen [69], dargestellt durch ein deutlich vermindertes zelluläres Überleben nach MMC-Schädigung. Dies könnte die geringe HR-Kapazität in *GI-101*- und *MDA-468*-Zellen erklären, allerdings nicht in *MDA-231*-Zellen, die sowohl eine hohe RAD51 als auch eine hohe BRCA2-Expression aufwiesen bei gleichzeitig geringer HR-Kapazität.

Für FANCD2, das ebenfalls am Beladen der DNA mit RAD51 während der S-Phase beteiligt ist [33], konnte ebenfalls kein Zusammenhang mit der endogenen RAD51-Expression und der HR-Kapazität in BrCa-Zelllinien gezeigt werden. Die FANCD2-Expression variierte sowohl unabhängig von der HR-Kapazität als auch der RAD51-Expression.

ATR und ATM sind verantwortlich für die Aktivierung der DNA-Reparatur in der S-Phase [23]. Für die Expression von ATR zeigte sich dagegen ein anderes Muster, das mit der Verteilung der HR-Kapazität in BrCa-Zelllinien übereinstimmte. Zelllinien mit einer geringen HR-Kapazität wiesen dabei weniger ATR auf als Zelllinien mit einer hohen HR-Kapazität. Die geringe ATR-Expression könnte somit zu einer geringen HR-Kapazität durch eine reduzierte Schadensantwort beigetragen haben, da auch nach Inhibition von Kinasen der PIK-Familie wie ATR eine reduzierte HR-Kapazität und eine geringere Interaktion zwischen BRCA2 und RAD51 beobachtet wurde [70, 148].

Zusammenfassend deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass die HR-Maschinerie zur Reparatur von DSBs lediglich dann funktional ist, wenn sich die beteiligten Proteine in einem stöchiometrischen Gleichgewicht zueinander befinden, wie bereits von Lee et al. (2009) [86] postuliert.

6.4 Bedeutung der RAD51-Expression für das zelluläre Überleben nach MMC-Schädigung

Die DSB-Reparatur mittels HR ist nicht nur für die Reparatur von zwei-endigen DSBs, sondern besonders für die Reparatur von Replikations-assoziierten, ein-endigen DSBs essentiell. Replikations-assoziierte DSBs werden beispielsweise infolge eines Aufeinandertreffens von Replikationsgabeln und DNA-DNA-Vernetzungen induziert [81]. Zur Beseitigung der DNA-DNA-Vernetzungen wird die ICL-Reparatur eingesetzt, bei der die DNA-DNA-Vernetzungen zu einem DSB umgewandelt wird, der mittels HR repariert wird [2, 29, 117]. Somit ist für HR-Mutanten ein ausgesprochen geringes zelluläres Überleben nach Behandlung mit DNA-DNA-vernetzenden

Agenzien wie MMC in isogenen Systemen beschrieben [45, 50, 89, 152, 175, 179]. Deshalb wurde überprüft, ob die beobachteten Unterschiede in der HR-Kapazität (Reparatur von zwei-endigen DSBs) das zelluläre Überleben nach Behandlung mit MMC (Reparatur von Replikations-assoziierten DSBs) reflektieren. Dafür wurde das zelluläre Überleben nach MMC-Schädigung von Zelllinien mit einer moderaten und einer hohen RAD51-Expression einander gegenübergestellt. Die Untersuchungen erfolgten sowohl in BrCa- als auch HNSCC-Zelllinien.

Es zeigte sich eine deutlich höhere zelluläre Empfindlichkeit in BrCa-Zelllinien mit einer hohen RAD51-Expression im Vergleich zu Zelllinien mit einer moderaten RAD51-Expression nach MMC-Schädigung (vgl. Abbildung 5.17). Diese Beobachtungen reflektierten die deutlich geringere HR-Kapazität in Zelllinien mit einer hohen RAD51-Expression im Vergleich zu Zelllinien mit einer moderaten RAD51-Expression. Dies ist im Einklang mit anderen Arbeiten, die bei einer reduzierten HR-Kapazität ein geringeres zelluläres Überleben nach einer MMC-Schädigung zeigten [89, 143, 179]. Auch für eine Überexpression von RAD51 bei einer geringen HR-Kapazität ist ein geringeres zelluläres Überleben nach MMC-Schädigung in einem isogenen Modell beschrieben [171].

Für HNSCC-Zelllinien konnte im Gegensatz zu BrCa-Zelllinien keine eindeutige Abhängigkeit zwischen der RAD51-Expression und dem zellulären Überleben nach MMC-Schädigung gezeigt werden (vgl. Abbildung 5.18). Es korrelierte auch die HR-Kapazität nicht mit dem zellulären Überleben. So zeigten zwar drei der vier Zelllinien mit hoher HR-Kapazität, aber auch zwei der vier Zelllinien mit geringer HR-Kapazität eine Resistenz gegenüber einer MMC-Schädigung.

Eine Heterogenität in der Auswirkung einer RAD51-Überexpression auf das zelluläre Überleben nach MMC-Schädigung wurde ebenfalls in isogenen Modellen beschrieben. Dabei bewirkte eine RAD51-Überexpression einerseits eine Resistenzentwicklung in Zelllinien mit mutiertem BRCA1 oder BRCA2 sowie andererseits eine Sensitivierung in Zelllinien mit Wildtyp-BRCA1 oder -BRCA2 [14, 69, 86, 102]. Diese Studien verdeutlichen die Komplexität der DSB-Reparatur mittels HR und die Wichtigkeit der Regulation sowie dem Gleichgewicht zwischen den HR-assoziierten Proteinen. Darüber hinaus muss zwischen der Reparatur von zwei-endigen und Replikations-assoziierten DSBs mittels HR unterschieden werden [113]. So wurde für eine Mutation des BRCA2-Genes eine HR-unabhängige Funktion an Replikationsgabeln beobachtet. Dies könnte zur Folge haben, dass sich diese HR-unabhängige Funktion in einer Resistenz nach MMC-Schädigung ausdrücken würde [137].

Neben BRCA2 ist auch RAD51 nicht nur essentiell für die HR, sondern auch für die Stabilisierung von Replikationsgabeln. So konnte bereits gezeigt werden, dass ein Defekt in der Stabilisierung von Replikationsgabeln durch die Überexpression von RAD51 kompensiert wurde [56, 124, 137]. Diese Stabilisierung von Replikationsgabeln ist auch für die Replikations-assoziierte ICL-Reparatur von Bedeutung. So konnten Long et al. (2011) [92] zeigen, dass RAD51 vor der Aktivierung der ICL-Reparatur durch FA-Proteine an die angehaltene Replikationsgabel rekrutiert wird und damit ein initiales Ereignis für das Einleiten der DNA-Schadensantwort für die ICL-Reparatur über FA-Proteine und die Signalkaskade RPA-ATR-CHK1 darstellt [11, 26, 78]. Somit könnte das in dieser Arbeit beobachtete geringe zelluläre Überleben in Zelllinien mit hoher RAD51-Expression sich auf eine verminderte DNA-Schadensantwort zurückführen lassen. Dieses Phänomen konnte nach Schädigung mit Etoposid bereits gezeigt werden, mit einer höheren Sensitivität in HR-defizienten Zellen [93].

Neben der Replikations-abhängigen gibt es auch eine Replikations-unabhängige Reparatur von DNA-DNA-Vernetzungen mittels NER und TLS [24]. Diese Reparaturmechanismen werden in ihrer Bedeutung für die ICL-Reparatur aber deutlich geringer eingestuft als die RAD51-abhängige ICL-Reparatur [2, 29, 117, 140]. Dies wird zusätzlich durch die Beobachtung bestätigt, dass obwohl die Erkennung von sowohl Replikations-assoziierten als auch Replikations-unabhängigen ICLs durch FA Proteine erfolgt [140], die Depletion von RAD51 oder BRCA2 in einem deutlich geringeren zellulären Überleben nach MMC-Schädigung resultiert als die Depletion von FANCD2 [118].

Bei Zusammenfassung der hier erhobenen Daten und der Literatur wird von einer weitaus größere Bedeutung für die Reparatur von Replikations-assoziierten DSBs im Vergleich zu klassischen zwei-endigen DSBs mittels HR ausgegangen [134]. Für die Reparatur von zwei-endigen DSBs gibt es eine Vielzahl von alternativen Mechanismen wie das NHEJ oder das SSA [16, 99]. Für Replikations-assoziierte DSBs sind diese jedoch nicht beschrieben. Dies könnte die extreme Empfindlichkeit bei Ausfall des HR-Komplexes erklären. Möglich wäre jedoch auch, dass in MMC-sensitiven Zelllinien der Intra-S-Phase-Kontrollpunkt durch ein Überangebot von RAD51 gestört ist.

6.5 Aktivierung des Intra-S-Phase-Kontrollpunktes nach MMC-Schädigung

CHK1 ist sowohl für die Aktivierung der Reparatur von zwei-endigen DSBs als auch für die Reparatur von Replikations-assoziierten DSBs mittels HR essentiell [11, 26]. Es aktiviert die HR-Maschinerie und phosphoryliert RAD51 dabei direkt [7, 148]. Es wurde überprüft, ob sich das geringere zelluläre Überleben nach MMC-Schädigung auf eine reduzierte Schadensantwort über CHK1 zurückführen ließ. Dafür wurde die Fähigkeit zur Phosphorylierung von CHK1 6 h nach MMC-Schädigung untersucht.

In BrCa-Zelllinien zeigte sich eine deutlich geringere Phosphorylierung von CHK1 in zwei der drei Zelllinien mit einer hohen RAD51-Expression im Vergleich zu Zelllinien mit einer moderaten RAD51-Expression nach MMC-Schädigung (vgl. Abbildung 5.19). Im Mittel korrelierte das zelluläre Überleben nach MMC-Schädigung mit der Fähigkeit der Zellen, CHK1 zu phosphorylieren.

Diese Beobachtung ist in Einstimmung mit anderen Arbeiten, die bei einer Überexpression von RAD51 eine geringere Phosphorylierung von CHK1 in einem isogenen Modellsystem (U2OS-Zellen) zeigen konnten [121]. Eine mögliche Auswirkung der geringeren CHK1-Phosphorylierung könnte eine verminderte Aktivierung von FANCD2 sein [52, 140], welche durch das geringere zelluläre Überleben nach MMC-Schädigung unterstützt wird. Eine mögliche Ursache für die geringere CHK1-Phosphorylierung könnte eine verminderte Aktivierung von FANCD2 durch CHK1 sein, die ebenfalls zu einer Hypersensitivität gegenüber MMC führen kann [163]. Auch die geringere ATR-Expression in diesen Zelllinien, die zur Aktivierung von CHK1 nach Induktion einer DNA-DNA-Vernetzung benötigt wird [11, 26] könnte für die erhöhte MMC-Empfindlichkeit ursächlich sein. Alle genannten Möglichkeiten zeigen sehr deutlich, dass HR direkt mit der FA/ATR/CHK1-Signalkaskade in Wechselwirkung steht und ein Ungleichgewicht von HR zur Intra-S-Phase-Signalkaskade in BrCa -Zelllinien eine negative Auswirkung auf die zelluläre Empfindlichkeit hat.

In HNSCC-Zelllinien konnte diese Abhängigkeit zwischen der Phosphorylierung von CHK1 und dem zellulären Überleben nach einer MMC-Schädigung nicht beobachtet werden (vgl. Abbildung 5.20). So zeigten alle untersuchten Zelllinien eine vergleichbare Phosphorylierung von CHK1, die empfindlichste Zelllinie sogar die stärkste Phosphorylierung. Somit schien das zelluläre Überleben in Zelllinien mit einer hohen RAD51-Expression nicht auf eine veränderte DNA-Schadensantwort nach MMC-Schädigung zurückzuführen zu sein. Jedoch wird CHK1 neben der

ATR-vermittelten Schadensantwort auch durch ATM aktiviert [67]. Nur nach UV-Bestrahlung kann eine rein ATR-vermittelte Phosphorylierung von CHK1 beobachtet werden [67]. So könnte die Phosphorylierung von CHK1 nicht ausschließlich ATR-, sondern auch ATM-vermittelt gewesen sein. Diese Hypothese wurde in zwei HNSCC-Zelllinien mit einer hohen RAD51-Expression und großen Unterschieden in ihrem zellulären Überleben untersucht. Die Zellen wurden mit UV bestrahlt und nach 15 und 60 min die Phosphorylierung von CHK1 überprüft. Es zeigte sich eine deutlich geringere Phosphorylierung von CHK1 in der MMC-empfindlichen Zelllinie *FaDu* im Vergleich zur MMC-resistenten Zelllinien *HSC4* (vgl. Abbildung 5.21). So konnte bereits nach 15 min das erste Signal detektiert werden, das nach einer Stunde sein Maximum erreichte. Somit zeigte sich das Phosphorylierungssignal von CHK1 deutlich früher nach UV-Bestrahlung als nach MMC-Schädigung, wie von Parplys et al. (2012) [122] erst 2 h nach Behandlung beobachtet wurde. Die zelluläre Schadensantwort auf eine einzige mittels Plasmid eingeführte DNA-DNA-Vernetzung zeigte ebenfalls bereits nach einer Stunde ein Maximum der CHK1-Phosphorylierung in Einstimmung mit der S-Phase-spezifischen Schadensantwort nach UV-Bestrahlung [129]. Der Überschuss an Rad51 in der MMC-empfindlichen Zelllinie *FaDu* könnte somit die S-Phase-spezifische Schadensantwort unterdrücken. So wird CHK1 nach Induktion eines ICLs durch ATR phosphoryliert, welches wiederum durch RPA, das an ssDNA bindet, aktiviert wird [11, 26]. Wird die RPA-Bindung inhibiert, unterbleibt die Aktivierung von ATR und CHK1 [11]. Möglich wäre, dass ein Überschuss an RAD51 mit seiner hohen Affinität zu ssDNA, insbesondere in der Abwesenheit von RPA [30, 127, 147], somit zu einem stöchiometrischen Ungleichgewicht zwischen RPA und RAD51 führte und RAD51 infolge einer DNA-Schädigung unkontrolliert an ssDNA binden, die beim Anhalten von Replikationsgabeln induziert wurde. Dies würde eine reduzierte DNA-Schadensantwort über die Proteine RPA und ATR bedeuten, was eine geringere Phosphorylierung von CHK1 zur Folge hätte.

Darüber hinaus fällt sehr deutlich auf, dass nicht nur die Aktivierung, sondern auch die Expression von CHK1 in MMC-resistenten HNSCC-Zelllinien mit einer hohen RAD51-Expression deutlich erhöht war im Vergleich zu den MMC-empfindlichen Zelllinien. Dies deutete sich auch für die BrCa-Zelllinie mit einer hohen RAD51 Expression und dem höchstem zellulären Überleben an. CHK1 besitzt neben seiner Aktivierung zur Schadensantwort darüber hinaus auch eine Rolle im Schutz von Replikationsgabeln [108]. Dies unterstützt die Vermutung, dass der Schutz von Replikationsgabeln bzw. die Stabilisierung von Replikationsgabeln ein wichtiges Ereignis für die ICL-induzierte Reparatur darstellt. Darüber hinaus zeigen Studien, dass das Überleben von Patienten bei kombinierter Analyse von der Proteinexpression machten, dass unter anderem die kombinierte Analyse von RAD51 und Claspin

(aktiviert CHK1) einen deutlich negativeren prädiktiven Wert aufwiesen als die Auswirkung der beiden Proteine einzeln [3]. So könnte die höhere endogene CHK1-Expression zur Wahrung des stöchiometrischen Gleichgewichtes des HR-Komplexes beigetragen haben. In weiteren Experimenten sollte deshalb überprüft werden, ob bei einer hohen RAD51-Expression und einer deutlichen Aktivierung von CHK1, die eine Resistenz vermuten lässt, insbesondere die Anwendung von CHK1-Inhibitoren eine selektive Empfindlichkeit bewirken könnte.

6.6 Bedeutung der Aktivierung von CHK1 für die MMC-Empfindlichkeit

Im Folgenden wurde die Hypothese, dass eine Resistenz bei einer hohen RAD51-Expression nur auftritt, wenn CHK1 hoch exprimiert bzw. deutlich stärker aktiviert ist, im Detail an zwei der vier HNSCC-Zelllinien untersucht. Dabei wurde überprüft, ob sich eine Resistenz anhand der Anzahl von DSBs abbilden ließ, ob ein ausgeprägter Zellzyklusblock in der G2-Phase ursächlich war oder ob die resistente Zelllinie einen anderen so genannten *backup*-DSB-Reparaturweg verwendeten und daher nicht von HR abhing.

6.6.1 Doppelstrangbrüche in replizierenden Zellen

DSBs wurden mittels RAD51-Foci als Marker für die Reparatur mittels HR und 53BP1-Foci als genereller DSB-Marker unter Markierung von replizierenden Zellen mit dem Basenanalogen EdU untersucht. Es zeigten sich eine deutlich höhere Anzahl sowohl an RAD51- als auch 53BP1-Foci in MMC-empfindlichen *FaDu*-Zellen sowohl 6 h als auch 24 h nach MMC-Schädigung als in der MMC-resistenten Zelllinie *HSC4* (vgl. Abbildung 5.22). Dies zeigte deutlich, dass das geringe zelluläre Überleben auf eine höhere Anzahl von DSBs in der S-Phase zurückzuführen war. Beide Zelllinien waren somit fähig, RAD51-Foci auszubilden und die HR konnte eingeleitet werden. Die Foci-Anzahl war dabei in der empfindlichen Zelllinie deutlich höher als in der resistenten.

Nach DNA-Schädigung benötigt die Zelle mindestens 1–3 h zur Formation von RAD51-Foci [53, 66, 91]. In dieser Arbeit wurde die Anzahl der RAD51-Foci 6 h nach MMC-Schädigung untersucht. Somit könnte die geringere Anzahl an RAD51-Foci auf eine bereits erfolgreich durchgeführte Reparatur durch eine verstärkte CHK1-Schadensantwort in den MMC-resistenten *HSC4*-Zellen zurückzuführen sein. Dies wird durch die geringere Anzahl an 53BP1-Foci in *HSC4*-Zellen bestätigt. Eine deutlich erhöhte Anzahl von DSBs bei einer verzögerten CHK1-Aktivierung konnte

auch von anderen beobachtet werden. So zeigten Guervilly et al. (2008) [52] nach Inhibition von CHK1 und Induktion von DNA-DNA-Vernetzungen ebenfalls eine höhere Anzahl an DSBs.

Die höhere Anzahl an RAD51- und 53BP1-Foci in den MMC-empfindlichen *FaDu*-Zellen nach 24 h könnte aber auch als Defekt in der Reparatur von DNA-DNA-Vernetzungen mittels HR gewertet werden. So konnte für HR-Mutanten gezeigt werden, dass 24 h nach Behandlung noch deutlich mehr RAD51-Foci vorlagen im Vergleich zum Wild-Typ [79].

Darüber hinaus wurde beobachtet, dass sowohl in den resistenten als auch den empfindlichen Zellen mehr RAD51- als 53BP1-Foci auftraten. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass RAD51 nicht nur reine DSBs erkennt, sondern auch für die Stabilisierung von Replikationsgabeln verantwortlich ist [56, 137]..

6.6.2 Zellzyklusverteilung nach MMC-Schädigung

Im Weiteren wurde die Hypothese überprüft, ob die MMC-empfindliche Zelllinie *FaDu* im Vergleich zur MMC-resistenten Zelllinie *HSC4* aufgrund der geringeren S-Phase-spezifischen Schadensantwort mittels CHK1 eine verminderte S/G2-Zellzyklusantwort aufwies. Für die Untersuchung wurden die Zellen mit MMC geschädigt und die zeitliche Veränderung im Anteil an S/G2-Phase-Zellen überprüft. Es zeigte sich deutlich, dass MMC-empfindliche *FaDu*-Zellen einen deutlich geringer ausgeprägten Arrest in der S/G2-Phase zeigten als MMC-resistente *HSC4*-Zellen (vgl. Abbildung 5.23). Dieser setzte deutlich später im Vergleich zur MMC-resistenten *HSC4*-Zellen ein und spiegelt damit sehr deutlich die verminderte S-Phase-spezifischen Schadensantwort wider. Darüber hinaus konnte der S/G2-Arrest in *HSC4*-Zellen bereits 24 h nach MMC-Schädigung wieder aufgehoben werden. Für BRCA1-mutierten Zellen konnte ebenfalls ein deutlich längerer Arrest in der S/G2-Phase nach MMC-Schädigung im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden [178]. Die deutlich frühere Arretierung der resistenten Zellen gewährte damit eine frühere Aktivierung der ICL-Reparatur mittels HR und ein frühzeitiges Anhalten der Replikation. Dies verhinderte das Zusammentreffen von Replikationsgabeln und DNA-DNA-Vernetzungen mit einer geringeren Schädigung der Zellen. Dies spiegelte sich auch in der frühzeitigen Auflösung des S/G2-Arrestes 24 h nach MMC-Schädigung wider. Auch die extrem MMC-sensitiven FA-Zellen zeigen keine Auflösung des G2-Arrest 24 h nach Behandlung, vergleichbar mit den hier untersuchten *FaDu*-Zellen [18]. Dies konnte ebenfalls in BRCA1 mutierten Zellen nach MMC-Schädigung beobachtet werden [178].

6.7 Abgrenzung zwischen der HR-Kapazität und der zellulären MMC-Empfindlichkeit

Um sicherzustellen, dass die Resistenz gegenüber MMC in Zelllinien mit einer geringen HR-Kapazität tatsächlich auf den DSB-Reparaturweg mittels HR zurückzuführen war, wurde in diesen Zellen RAD51 mittels siRNA inhibiert und das zelluläre Überleben nach MMC-Schädigung untersucht. Die MMC-resistente Zelllinie zeigte eine deutliche Abhängigkeit von RAD51, bei der das Überleben um 75 % reduziert werden konnte. Für die MMC-empfindliche Zelllinie *FaDu* wurde keine weitere Steigerung der Empfindlichkeit beobachtet. Die beobachtete MMC-Resistenz in *HSC4*-Zellen war damit eindeutig auf eine kompetente Reparatur mittels HR zurückzuführen. Es konnte so ausgeschlossen werden, dass die Zellen auf alternative Reparaturmechanismen wie NHEJ oder SSA zurückgriffen, wie bereits mehrfach beschrieben [16, 99].

Außerdem wurde überprüft, wie sich die Inhibition von RAD51 auf die HR-Kapazität, also die Reparatur von zwei-endigen DSBs auswirkte. Dafür wurde die HR-Kapazität nach Inhibition von RAD51 durch den RAD51-Inhibitor RI-1 in *UT-8*-, *FaDu*- und *HSC4*-Zellen untersucht. Nur in Zellen mit einer hohen HR-Kapazität konnte eine starke Reduktion der HR-Kapazität um den Faktor 3,3 beobachtet werden. Das Ausmaß der Reduktion entsprach dabei der Reduktion, wie sie auch von anderen Gruppen beobachtet wurde, die RAD51 mittels RI-1, mittels siRNA oder microRNA inhibierten [16, 46, 164]. In der MMC-resistenten und der MMC-sensitiven Zelllinie, mit bereits vorher beobachteter geringer HR-Kapazität, konnte diese nicht weiter durch Inhibition von RAD51 gesteigert werden. Dies bestätigt, dass beide Zelllinien eine defekte DSB-Reparatur mittels HR von zwei-endigen DSBs aufweisen.

6.8 Modell

Zusammenfassend zeigen die Daten dieser Arbeit erstmalig, dass bei einer hohen Expression eines Reparaturproteins wie RAD51 nicht automatisch eine hohe Kapazität des Reparaturkomplexes zu erwarten ist. So konnte sehr klar an zwei verschiedenen Tumorentitäten beobachtet werden, dass die Reparaturleistung bei Überschreiten eines optimalen Niveaus wieder abnimmt.

Darüber hinaus zeigt diese Arbeit, dass von dieser beobachteten verminderten HR-Kapazität der Reparatur eines zwei-endigen DSBs nicht immer eine höhere

Empfindlichkeit gegenüber DNA-DNA-vernetzenden Agenzien abzuleiten ist. Vielmehr macht diese Arbeit sehr deutlich, dass zwischen einem zwei-endigen DSB und einem Replikations-assoziierten bzw. einem aus einer DNA-DNA-Vernetzung hervorgehenden DSB unterschieden werden muss. Damit können die bestehenden wissenschaftlichen Kenntnisse sehr deutlich erweitert werden und es wird ein neues Modell zur Reparatur von DNA-Schäden an Replikationsgabeln mittels HR vorgeschlagen (vgl. 6.1).

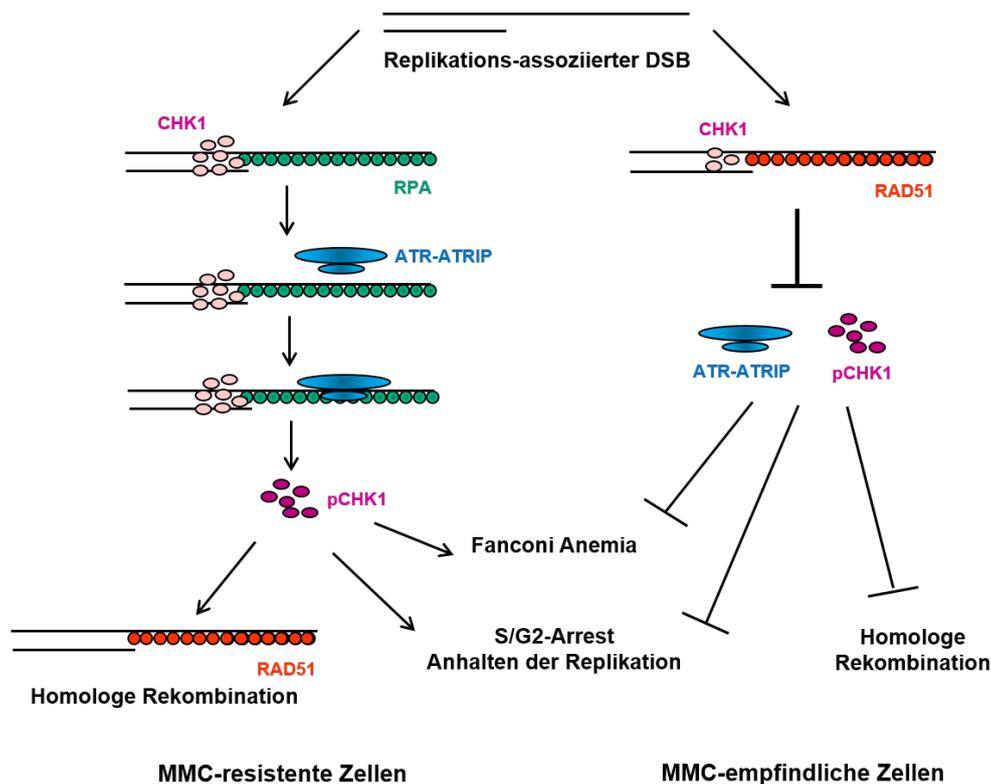


Abbildung 6.1: Modell zur Erklärung der unterschiedlichen MMC-Empfindlichkeit in Zellen mit einer hohen RAD51-Expression (modifiziert nach folgenden Quellen: [108, 139].

Die Erklärung befindet sich im Text. ATR *Ataxia-Telangiectasia-mutated and Rad3-related*, ATRIP *ATR-interacting protein*, CHK1 *Checkpoint Kinase 1*, DSB Doppelstrangbruch, RPA *Replication protein A*

Abbildung 6.1 zeigt das vorgeschlagene Modell, mit dem das unterschiedliche zelluläre Überleben nach MMC-Schädigung in Zellen mit einer hohen RAD51-Expression erklärt werden könnte. In MMC-resistenten Zellen verläuft die Reparatur eines Replikations-assoziierten DSBs wie in Zellen mit moderater RAD51-Expression gut kontrolliert. Nach Induktion der Replikations-assoziierten DSBs wird die Replikationsgabel durch CHK1 geschützt. RPA bindet die ssDNA und die Signalkaskade

über ATRIP-ATR-CHK1 wird sofort aktiviert. Dies ermöglicht die kontrollierte Aktivierung der HR, des FA-Komplexes, des S/G2-Arrestes sowie das Anhalten von Replikationsgabeln, was das resistente Verhalten der Zellen nach MMC-Schädigung erklärt. In MMC-empfindlichen Zellen dagegen kommt es nach Induktion eines Replikations-assoziierten DSBs zur unkontrollierten Bindung von RAD51 an ssDNA, die zuvor nicht mit RPA geschützt wurde. Ursache für das unkontrollierte Binden von RAD51 könnte die hier beobachtete geringere CHK1 Expression sein, wodurch Replikationsgabeln nicht geschützt werden und die hohe Menge an RAD51 kompensatorisch eingreift [108, 137]. Wahrscheinlich ist auch das stöchiometrische Proteingleichgewicht zwischen RPA und RAD51 nicht ausgeglichen, wodurch es aufgrund der hohen Affinität von RAD51 zu ssDNA zur direkten Bindung von RAD51 an ssDNA kommt [30, 127, 147]. Somit kommt es zu einer verminderten Bindung von RPA an ssDNA, wodurch die DNA-Schadensantwort über RPA-ATRCHK1 nicht aktiviert wird [26]. Das Resultat dessen ist ein Defekt in der Aktivierung der HR, des FA-Komplexes, des S/G2-Phase-Arrests und das Anhalten der Replikation [11, 26, 78, 122]. Dabei kommt es durch die parallel auftretende verminderte Zellzykluskontrolle zusätzlich zu einer wesentlich höheren Schadensinduktion mit einer höheren Anzahl von DSBs.

Dieses Modell wird durch die Arbeit von Nakanishi et al. (2011) [113] unterstützt. Diese konnte deutliche Unterschiede in der Reparatur von zwei-endigen DSBs sowie DNA-DNA-Vernetzungen mittels HR unter Verwendung von verschiedenen Plasmid-Konstrukten zeigen. Darüber hinaus konnte die Reparatur mittels HR Replikations-assoziiert durch Verwendung von Konstrukten, die einen Replikationsursprung tragen, untersucht werden. So konnten für verschiedene HR-Mutanten ($BRCA2^{-/-}$, $BRCA1^{-/-}$ und $FANCA^{-/-}$) besonders unter Replikation deutlich unterschiedliche Effekte auf die Reparatur von zwei-endigen DSBs und DNA-DNA-Vernetzungen mittels HR gezeigt werden. In zukünftigen Studien sollte somit immer sehr klar zwischen der HR an Replikationsgabeln und der HR an einem zwei-endigen DSB unterschieden werden.

Literaturverzeichnis

- [1] 2012, American Cancer S.: *Cancer Facts & Figures*. 2012. – URL <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-031941.pdf>
- [2] AKKARI, J. M. N. ; BATEMAN, R. L. ; REIFSTECK, C. A. ; OLSON, S. B. ; GROMPE, M.: DNA Replication Is Required To Elicit Cellular Responses to Psoralen-Induced DNA Interstrand Cross-Links. In: *Molecular and Cellular Biology* 20 (2000), S. 8283–8289
- [3] ALLERA-MOREAU, C. ; ROUQUETTE, I. ; LEPAGE, B. ; OUMOUHOU, N. ; WALSCHAERTS, M. ; LECONTE, E. ; SCHILLING, V. ; GORDIEN, K. ; BROUCHET, L. ; DELISLE, M. B. ; MAZIERES, J. ; HOFFMANN, J. S. ; PASERO, P. ; CAZAU, C.: DNA replication stress response involving PLK1, CDC6, POLQ, RAD51 and CLASPIN upregulation prognoses the outcome of early/mid-stage non-small cell lung cancer patients. In: *Oncogenesis* 1 (2012), S. 1–10
- [4] ARIAS-LOPEZ, C. ; LAZARO-TRUEBA, I. ; KERR, P. ; LORD, C. J. ; DEXTER, T. ; IRAVANI, M. ; ASHWORTH, A. ; SILVA, A.: p53 modulates homologous recombination by transcriptional regulation of the RAD51 gene. In: *The European Molecular Biology Organization Journal* 7 (2006), S. 219–224
- [5] ARNAUDEAU, C. ; HELLEDAY, T. ; JENSSEN, D.: The RAD51 Protein Supports Homologous Recombination by an Exchange Mechanism in Mammalian Cells. In: *Journal of Molecular Biology* 289 (1999), S. 1231–1238
- [6] AYLON, Y. ; LIEFSHITZ, B. ; KUPIEC, M.: The CDK regulates repair of double-strand breaks by homologous recombination during the cell cycle. In: *The European Molecular Biology Organization Journal* 23 (2004), S. 4868–4875
- [7] BAHASSI, E. M. ; OVESEN, J. L. ; RIESENBERG, A. L. ; BERNSTEIN, W. Z. ; HASTY, P. E. ; STAMBROOL, P. J.: The checkpoint kinases Chk1 and Chk2

- regulate the functional associations between hBRCA2 and Rad51 in response to DNA damage. In: *Oncogene* 27 (2008), S. 7347–7357
- [8] BARTEK, J. ; LUKAS, J.: Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. In: *Cancer Cell* 3 (2003), S. 421–429
- [9] BAUMANN, M. ; HERRMANN, T. ; MATTHIESSEN, W. ; R, Koch ; STRELOCKE, K. ; PAUL, U.: CHARTWEL-Bronchus (ARO 97-1): a randomized multicenter trial to compare conventional fractionated radiotherapy with CHARTWEL radiotherapy in inoperable non-small-cell bronchial carcinoma. In: *Strahlentherapie und onkologie* 173 (1997), S. 663–667
- [10] BELL, S. P. ; DUTTA, A.: DNA Replication In Eukaryotic Cells. In: *Annual Review of Biochemistry* 71 (2002), S. 333–374
- [11] BEN-YEHOYADA, M. ; WANG, L. C. ; KOZEKOV, I. D. ; RIZZO, C. J. ; GOTTESMAN, M. E. ; GAUTIER, J.: Checkpoint Signaling from a Single DNA Interstrand Crosslink. In: *Cell* 35 (2009), S. 704–715
- [12] BENNANI-BELHAJ, K. L. ; ROUZEAU, S. ; BUHAGIAR-LABARCHEDE, G. ; CHABOSSEAU, P. ; ONCLERQ-DELIC, R. ; BAYART, E. ; CORDELIERES, F. ; COUTURIER, J. ; AMOR-GUERET, M.: The Bloom Syndrome Protein Limits the Lethality Associated with RAD51 Deficiency. In: *American Association of Cancer Research* 8 (2010), S. 385–394
- [13] BOULIKAS, T.: Nuclear import of DNA repair proteins. In: *Anticancer Research* 17 (1997), S. 843–863
- [14] BROWN, E. T. ; HOLT, J. T.: Rad51 overexpression rescues radiation resistance in BRCA2-defective cancer cells. In: *Molecular Carcinogenesis* 48 (2008), S. 105–109
- [15] BRUHN, C. ; ZHOU, Z.-W. ; AI, H. ; WANG, Z.-Q.: The Essential Function of the MRN Complex in the Resolution of Endogenous Replication Intermediates. In: *Cell Reports* 6 (2014), S. 182–195
- [16] BUDKE, B. ; LOGAN, H. L. ; KALIN, J. H. ; ZELIVIANSKAIA, A. S. ; MCGUIRE, W. C. ; MILLER, L. L. ; STARK, J. M. ; KOZIKOWSKI, A. P. ; BISHOP, D. K. ; CONNELL, P.P.: RI-1: a chemical inhibitor of RAD51 that disrupts homologous recombination in human cells. In: *Nucleic Acids Research* 40 (2012), S. 3977–3985

- [17] CARY, R. B. ; PETERSON, S. R. ; WANG, J. ; BEAR, D. G. ; BRADBURY, E. M. ; CHEN, D. J.: DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (1997), S. 4267–4272
- [18] CECCALDI, R. ; BRIOT, D. ; LARGHERO, J. ; VASQUEZ, N. ; D'ENGHIEN, C. D. ; CHAMOUSSET, D. ; NOGUERA, M.-E. ; WAISFISZ, Q. ; HERMINE, O. ; PONDARRE, C. ; LEBLANC, T. ; GLUCKMAN, E. ; JOENJE, H. ; STOPPA-LYONNET, D. ; SOCIÁ©, G. ; SOULIER, J.: Spontaneous abrogation of the G2 DNA damage checkpoint has clinical benefits but promotes leukemogenesis in Fanconi anemia patients. In: *The Journal of Clinical Investigation* 121 (2011), S. 184–194
- [19] CHEN, F. ; NASTASI, A. ; SHEN, Z. ; BRENNEMAN, M. ; CRISSMAN, H. ; CHEN, D. J.: Cell cycle-dependent protein expression of mammalian homologs of yeast DNA double-strand break repair genes Rad51 and Rad52. In: *Mutation Research* 384 (1997), S. 205–211
- [20] CHEN, L. ; HUANG, S. ; LEE, L. ; DAVALOS, A. ; SCHIESTL, R. H. ; CAMPISI, J. ; OSHIMA, J.: WRN, the protein deficient in Werner syndrome, plays a critical structural role in optimizing DNA repair. In: *Aging Cell* 2 (2003), S. 191–199
- [21] CHEN, L. ; NIEVERA, C. J. ; LEE, A. Y.-L. ; WU, X.: Cell Cycle-dependent Complex Formation of BRCA1-CtIP-MRN Is Important for DNA Double-strand Break Repair. In: *The Journal of Biological Chemistry* 283 (2008), S. 7713–7720
- [22] CICCIA, A. ; ELLEDGE, S. J.: The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. In: *Molecular Cell Review* 40 (2010), S. 179–204
- [23] CIMPRICH, K. A. ; CORTEZ, D.: ATR: an essentiell regulator of genome integrity. In: *Molecular Cell Biology* 9 (2008), S. 616–627
- [24] CLAUSON, C. ; SCHÄRER, O. D. ; NIEDERNHOFER, L.: Advances in Understanding the Complex Mechanism of DNA Interstrand Cross-Link Repair. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (2013), S. 1–25
- [25] COSTANZO, V. ; ROBERTSON, K. ; YING, C. Y. ; KIM, E. ; AVVEDIMENTO, E. ; GOTTESMAN, M. ; GRIECO, D. ; GAUTIER, J.: Reconstitution of an ATM-Dependent Checkpoint that Inhibits Chromosomal DNA Replication following DNA Damage. In: *Molecular Cel* 6 (2000), S. 649–659

- [26] CUI, B. ; JOHNSON, S. P. ; BULLOCK, N. ; ALI-OSMAN, F. ; BIGNER, D. D. ; FRIEDMAN, H. S.: Bifunctional DNA Alkylator 1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea Activates the ATR-Chk1 Pathway Independently of the Mismatch Repair Pathway. In: *Molecular Pharmacology* 75 (2009), S. 1356–1363
- [27] DAVIES, A. A. ; MASSON, J.-Y. ; MCILWRAITH, M. J. ; STASIAK, A. Z. ; STASIAK, A. ; VENKITARAMAN, A. R. ; WEST, S. C.: Role of BRCA2 in Control of the RAD51 Recombination and DNA Repair Protein. In: *Molecular Cell* 7 (2001), S. 273–282
- [28] DAVIS, A. J. ; CHEN, D. J.: DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. In: *Translational Cancer Research* 2 (2013), S. 130–143
- [29] DE SILVA, I. U. ; MCHUGH, P. J. ; CLINGEN, P. H. ; HARTLEY, J. A.: Defining the Roles of Nucleotide Excision Repair and Recombination in the Repair of DNA Interstrand Cross-Links in Mammalian Cells. In: *Molecular and Cellular Biology* 20 (2000), S. 7980–7990
- [30] DE ZUTTER, J. K. ; KNIGHT, K. L.: The hRad51 and RecA proteins show significant differences in cooperative binding to single-stranded DNA. In: *Journal of Molecular Biology* 293 (1999), S. 769–780
- [31] DEANS, A.J. ; WEST, S. C.: DNA interstrand crosslink repair and cancer. In: *Nature Reviews Cancer* 11 (2011), S. 467–480
- [32] DELACÔTE, F. ; LOPEZ, B. S.: Importance of the cell cycle phase for the choice of the appropriate DSB repair pathway, for genome stability maintenance. In: *Cell Cycle* 7 (2008), S. 33–38
- [33] DIGWEED, M. ; ROTHE, S. ; DEMUTH, I. ; SCHOLZ, R. ; SCHINDLER, D. ; STUMM, M. ; GROMPE, M. ; JORDAN, A. ; SPERLING, K.: Attenuation of the formation of DNA-repair foci containing RAD51 in Fanconi Anemia. In: *Nature Reviews Cancer* 11 (2002), S. 467–480
- [34] DIKOMEY, E. ; BORGMANN, K. ; KRIEGS, M. ; MANSOUR, W. ; PETERSEN, C. ; RIECKMANN, T.: *Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen*. In: ZELLER, J.W. (Hrsg.) ; HAUSEN, H zur (Hrsg.): *Onkologie, Grundlagen - Diagnostik - Therapie - Entwicklung*, ecomed Medizin, 2012
- [35] DITE, G. S. ; MAKALIC, E. ; SCHMIDT, D. F. ; GILES, G. G. ; HOPPER, J. L. ; SOUTHEY, M. C.: Tumour morphology of early-onset breast cancers

- predicts breast cancer risk for first-degree relatives: the Australian Breast Cancer Family Registry. In: *Breast Cancer Research* 14 (2012), S. R122
- [36] DONIGAN, K.A. ; SWEASY, J.B.: Sequence Context-Specific Mutagenesis and Base Excision Repair. In: *Molecular Carcinogenesis* 48 (2009), S. 362–368
- [37] EL-AWADY, R. A. ; DIKOMEY, E. ; DAHM-DAPHI, J.: Radiosensitivity of human tumour cells is correlated with the induction but not with the repair of DNA double-strand breaks. In: *British Journal of Cancer* 89 (2003), S. 593–601
- [38] ERKKO, H. ; XIA, B. ; NIKKILÄ, J. ; SCHLEUTKER, J. ; SYRJÄKOSKI, K. ; MANNERMAA, A. ; KALLIONIEMI, A. ; PYLKÄS, K. ; KARPPINEN, S.-M. ; RAPAKKO, K. ; MIRON, A. ; SHENG, Q. ; LI, G. ; MATTILA, H. ; BELL, D. W. ; HABER, M. ; REIMAN, M. ; JUKKOLA-VUORINEN, A. ; MUSTONEN, A. ; KERE, J. ; AATONEN, L. A. ; KOSMA, V.-M. ; KATAJA, V. ; SOINI, Y. ; DRAPKIN, R. I. ; LIVINGSTON, D. M. ; WINQIST, R.: A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families. In: *Nature Letters* 446 (2007), S. 316–319
- [39] ESASHI, F. ; CHRIST, N. ; GANNON, J. ; LIU, Y. ; HUNT, T. ; JASIN, M. ; WEST, S. C.: CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. In: *Nature* 434 (2005), S. 598–604
- [40] ESCRIBANO-DIAZ, C. ; ORTHWEIN, A. ; FRADET-TURCOTTE, M. ; YOUNG, J. T. F. ; TKAC, J. ; COOK, M. A. ; ROSEBROCK, A. P. ; MUNRO, M. ; CANNY, M. D. ; XU, D. ; DUROCHER, D.: A Cell Cycle-Dependent Regulatory Circuit Composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP Controls DNA Repair Pathway Choice. In: *Molecular Cell* 49 (2013), S. 872–883
- [41] FAN, R. ; KUMARAVEL, T. S. ; JALALI, F. ; MARRANO, P. ; SQUIRE, J. A. ; BRISTOW, R. G.: Defective DNA Strand Break Repair after DNA Damage in Prostate Cancer Cells: Implications for Genetic Instability and Prostate Cancer Progression. In: *Cancer Research* 64 (2004), S. 8526–8533
- [42] FELGNER, P. L. ; GADEK, T. R. ; HOLM, M. ; ROMAN, R. ; CHAN, H. W. ; WENZ, M. ; NORTHROP, J. P. ; RINGOLD, G. M. ; DANIELSEN, M.: Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (1987), S. 7413–7417
- [43] FINNIE, T.M. ; BLUNT, T. ; JEGGO, P. ; JACKSON, S.: DNA-dependent protein kinase activity is absent in xrs-6 cells: Implications for site-specific

- recombination and DNA double-strand break repair. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (1995), S. 320–324
- [44] FLYGARE, J. ; BENSON, F. ; HELLGREN, D.: Expression of the human RAD51 gene during the cell cycle in primary human peripheral blood lymphocytes. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1312 (1996), S. 231–236
- [45] FRENCH, C. a. ; MASSON, J-Y ; GRIFFIN, C. S. ; O'REGAN, P. ; WEST, J.: Role of Mammalian RAD51L2 (RAD51C) in Recombination and Genetic Stability. In: *The Journal of Biological Chemistry* 277 (2002), S. 19322–19330
- [46] GASPARINI, P. ; LOVAT, F. ; FASSAN, M. ; CASADEI, L. ; CASCIONE, L. ; JACOB, N. K. ; CARASI, S. ; PALMIERI, D. ; COSTINEAN, S. ; SHAPIRO, C. L. ; HUEBNER, K. ; CROCE, C. M.: Protective role of miR-155 in breast cancer through RAD51 targeting impairs homologous recombination after irradiation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (2014), S. 4536–4541
- [47] GENT, D. C. van ; HOEIJMAKERS, J. H. J. ; KANAAR, R.: Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. In: *Nature Reviews Genetics* 2 (2001), S. 196–206
- [48] GERMAN, J. ; ; BLOOM, D. ; PASSARGE, E.: Bloom's syndrome. V. Surveillance for cancer in affected families. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 12 (1977), S. 162–168
- [49] GILDEMEISTER, O. S. ; SAGE, J. M. ; KNIGHT, K. L.: Cellular Redistribution of Rad51 in Response to DNA Damage. In: *The Journal of Biological Chemistry* 284 (2009), S. 31945–31952
- [50] GODTHELP, B. C. ; WIEGANT, W. W. ; DUIJN-GOEDHART, A. van ; SCHÄERER, O. D. ; BUUL, P. P. van ; KANAAR, R. ; ZDZIENICKA, M. Z.: Mammalian RAD51C contributes to DNA cross-link resistance, sister chromatid cohesion and genomic stability. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 30 (2002), S. 2172–2182
- [51] GRAWUNDER, U. I. ; WILM, M. ; WU, X. ; KULESZA, P. ; WILSON, T. E. ; MANN, M. ; LIEBER, M. R.: Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. In: *Nature* 388 (1997), S. 492–495

- [52] GUERVILLY, J.-H. ; MACÉ-AIMÉ, G. ; ROSSELLI, F.: Loss of CHK1 function impedes DNA damage-induced FANCD2 monoubiquitination but normalizes the abnormal G2 arrest in Fanconi anemia. In: *Human Molecular Genetics* 17 (2008), S. 679–689
- [53] HAAF, T. ; GOLUB, E. I. ; REDDY, G. ; RADDING, C. M. ; WARD, D. C.: Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (1995), S. 2298–2302
- [54] HABER, J. E.: Partners and pathways repairing a double-strand break. In: *Trends in Genetics* 16 (2000), S. 259–264
- [55] HANNAY, J. A. F. ; LIU, J. ; ZHU, Q.-S. ; BOLSHAKOV, S. V. ; LI, P. W. T. ; LAZA, A. J. F. ; YU, D. ; POLLOCK, R. E. ; LEV, D.: Rad51 overexpression contributes to chemoresistance in human soft tissue sarcoma cells: a role for p53/activator protein 2 transcriptional regulation. In: *Molecular Cancer Therapeutics* 6 (2007), S. 1650–1660
- [56] HASHIMOTO, Y. ; CHAUDHURI, A. R. ; LOPES, M. ; COSTANZO, V.: Rad51 protects nascent DNA from Mre11-dependent degradation and promotes continuous DNA synthesis. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (2010), S. 1305–1311
- [57] HEGAN, D. C. ; LU, Y. ; STACHELEK, G. C. ; CROSBY, M. E. ; BINDRA, R. S. ; GLAZER, P. M.: Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase downregulates BRCA1 and RAD51 in a pathway mediated by E2F4 and p130. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (2010), S. 2201–2206
- [58] HELLEDAY, T.: Homologous Recombination in cancer development, treatment and development of drug resistance. In: *Carcinogenesis* 31 (2010), S. 955–960
- [59] HELLEDAY, T. ; LOC, J. ; GENT, D. C. van ; ENGELWARD, B. P.: DNA double-strand break repair: From mechanistic understanding to cancer treatment. In: *DNA Repair* 1 (2008), S. 923–935
- [60] HELLEDAY, T. ; PETERMANN, E. ; LUNDIN, C. ; HODGSON, B. ; SHARMA, R. A.: DNA repair pathways as targets for cancer therapy. In: *Nature Reviews Cancer* 8 (2008), S. 193–204

- [61] HEYER, W.-D. ; EHMSSEN, K. T. ; LIU, J.: Regulation of Homologous Recombination in Eukaryotes. In: *Annual Review of Genetics* 44 (2010), S. 113–139
- [62] HIRAMOTO, T. ; NAKANISHI, T. ; SUMIYOSHI, T. ; FUKUDA, T. ; MATSUURA, S. ; TAUCHI, H. ; KOMATSU, K. ; SHIBASAKI, Y. ; INUI, H. ; WATATANI, M. ; YASUTOMI, M. ; SUMII, K. ; KAJIYAMA, G. ; KAMADA, N. ; MIYAGAWA, K. ; KAMIYA, K.: Mutations of a novel human RAD54 homologue, RAD54B, in primary cancer. In: *Oncogene* 18 (1999), S. 3422–3426
- [63] HOLLESTELLE, A. ; NAGEL, J. H. ; SMID, M. ; LAM, S. ; ELSTRODT, F. ; WASIELEWSKI, M. ; NG, S. S. ; FRENCH, P. J. ; PEETERS, J. K. ; ROZENDAAL, M. J. ; RIAZ, M. ; KOOPMAN, D. G. ; HAGEN, T. L. M. ten ; LEEUW, B. H. de ; ZWARTHOF, E. C. ; TEUNISSE, A. ; SPEK, P. J. van der ; KLIJN, J. G. M. ; DINJENS, W. N. M. ; ETHIER, S. P. ; CLEVERS, H. ; JOCHEMSEN, A. G. ; BAKKER, M. A. den ; FOEKENS, J. A. ; MARTENS, J. W. M. ; SCHUTTE, M.: Distinct Gene Mutation Profiles Among Luminal-Type and Basal-Type Breast Cancer Cell Lines. In: *Breast Cancer Research and Treatment* 121 (2009), S. 53–64
- [64] HUANG, Y. Y. ; NAKADA, S. ; ISHIKO, T. ; UTSUGISAWA, T. ; DATTA, R. ; KHARBANDA, S. ; YOSHIDA, K. ; TALANIAN, R. V. ; WEICHELBAUM, R. ; KUFEL, D. ; YUAN, Z.-M.: Role for Caspase-Mediated Cleavage of RAD51 in Induction of Apoptosis by DNA Damage. In: *Molecular and Cellular Biology* 19 (1999), S. 2986–2997
- [65] HUI, S.W. ; LANGNER, M. ; ZHAO, Y.L. ; ROSS, P. ; HURLEY, E. ; CHAN, K.: The Role of Helper Lipids in Cationic Liposome-Mediated Gene Transfer. In: *Biophysical Journal* 71 (1996), S. 590–599
- [66] HUSSAIN, S. ; WILSON, J. B. ; MEDHURST, A. L. ; HEJNA, J. ; WITT, E. ; ANANTH, S. ; DAVIES, A. ; MASSON, J.-Y. ; MOSES, R. ; WEST, S. C. ; WINTER, J. P. de ; ASHWORTH, A. ; JONES, N. J. ; MATHEW, C. G.: Direct interaction of FANCD2 with BRCA2 in DNA damage response pathways. In: *Human Molecular Genetics* 13 (2004), S. 1241–1248
- [67] JAZAYERI, J. ; FALCK, J. ; LUKAS, C. ; BARTEK, J. ; SMITH, G. C. M. ; LUKAS, J. ; JACKSON, S. P.: ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. In: *Nature Cell Biology* 8 (2006), S. 37–45

- [68] JENSEN, R. B. ; CARREIRA, A. ; KOWALCZYKOWSKI, S. C.: Purified human BRCA2 stimulates RAD51-mediated recombination. In: *Nature* 467 (2010), S. 37–45
- [69] JENSEN, R. B. ; OZES, A. ; KIM, T. ; ESTEP, A. ; KOWALCZYKOWSKI, S. C.: BRCA2 is epistatic to the RAD51 paralogs in response to DNA damage. In: *DNA Repair* 12 (2013), S. 306–3011
- [70] JEYASEKHARAN, A. D. ; AYOUB, N. ; MAHEN, R. ; RIES, J. ; ESPOSITO, A. ; RAJENDRA, E. ; HATTORI, H. ; KULKARNI, R. O. ; VENKITARAMAN, A. R.: DNA damage regulates the mobility of Brca2 within nucleoplasm of living cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (2010), S. 21937–21942
- [71] KAMENTSKY, L. ; JONES, T. R. ; FRASER, A. ; BRAY, M.-A. ; LOGAN, D. J. ; MADDEN, K. L. ; LJOSA, V. ; RUEDEN, C. ; ELICEIRI, K. W. ; CARPENTER, A. E.: Improved structure, function, and compatibility for CellProfiler: modular high-throughput image analysis software. In: *Bioinformatics* 11 (2011), S. 1179–1180
- [72] KARANAM, K. ; KAFRI, R. ; LOEWER, A. ; LAHAV, G.: Quantitative Live Cell Imaging Reveals a Gradual Shift between DNA Repair Mechanisms and a Maximal Use of HR in Mid S Phase. In: *Molecular Cell* 47 (2012), S. 320–329
- [73] KEIMLING, M. ; DENIZ, M. ; VARGA, D. ; STAHL, A. ; SCHREZENMEIER, H. ; KREIENBERG, R. ; HOFFMANN, I. ; KÖNIG, J. ; WIESMÜLLER, L.: The power of DNA double-strand break (DSB) repair testing to predict breast cancer susceptibility. In: *The Journal of the Federation of American Societies For Experimental Biology* 26 (2012), S. 2094–2104
- [74] KEIMLING, M. ; KAUR, J. ; BAGADI, S. A. ; KREIENBERG, R. ; WIESMÄCELLER, L. ; RALHAN, R.: A sensitive test for the detection of specific DSB repair defects in primary cells from breast cancer specimens. In: *International journal of cancer* 123 (2008), S. 730–736
- [75] KIM, H. ; D'ANDREA, A. D.: Regulation of DNA cross-link repair by the Fanconi anemia/BRCA pathway. In: *Genes & Development* 26 (2012), S. 1393–1408
- [76] KIM, P. M. ; ALLEN, C. ; WAGENER, B. M. ; SHEN, Z. ; NICKOLOFF, J. A.: Overexpression of human RAD51 and RAD52 reduces double-strand break-induced homologous recombination in mammalian cells. In: *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America* 29 (2001), S. 4352–4360
- [77] KLEIN, H.: The consequences of Rad51 overexpression for normal and tumor cells. In: *DNA Repair* 7 (2008), S. 686–693
- [78] KNIPSCHER, P. ; RÄSCHLE, M. ; SMOGORZEWSKA, A. ; ENOIU, M. ; HO, T. V. ; SCHÄRER, O. D. ; ELLEDGE, S. J. ; WALTER, J. C.: The Fanconi Anemia Pathway Promotes Replication-Dependent DNA Interstrand Cross-Link Repair. In: *Science* 326 (2009), S. 1698–1701
- [79] KÖCHER, S. ; RIECKMANN, T. ; ROHALY, G. ; MANSOUR, W. Y. ; DIKOMEY, E. ; DORNREITER, I. ; DAHM-DAPHI, J.: Radiation-induced double-strand breaks require ATM but not Artemis for homologous recombination during S-phase. In: *Nucleic Acids Research* 40 (2012), S. 8336–8347
- [80] KOVALA, A. T. ; HARVEY, K. A. ; MCGLYNN, P. ; BOGUSLAWSKI, G. ; GARCIA, J. G. N. ; ENGLISH, D.: High-efficiency transient transfection of endothelial cells for functional analysis. In: *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14 (2000), S. 2486–2494
- [81] KREJCI, L. ; ALTMANNOVA, V. ; SPIREK, M. ; ZHAO, X.: Homologous recombination and its regulation. In: *Nucleic Acids Research* 40 (2012), S. 5795–5818
- [82] KUMAGAI, A. ; DUNPHY, W. G.: Claspin, a Novel Protein Required for the Activation of Chk1 during a DNA Replication Checkpoint Response in *Xenopus* Egg Extracts. In: *Molecular Cell* 6 (2000), S. 839–849
- [83] KUTLER, D. I. ; AUERBACH, A. D. ; SATAGOPAN, J. ; GIAMPIETRO, P. F. ; BATISH, S. D. ; HUVOS, A. G. ; GOBERDHANA. ; SHAH, J. P. ; SINGH, B.: High Incidence of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in Patients With Fanconi Anemia. In: *Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery* 129 (2003), S. 106–112
- [84] LAMBERT, S. ; LOPEZ, B. S.: Characterization of mammalian RAD51 double strand break repair using non-lethal dominant-negative forms. In: *The European Molecular Biology Organization Journal* 19 (2000), S. 3090–3099
- [85] LE SCODAN, R. ; CIZERON-CLAIRAC, G. ; FOURME, E. ; MESEURE, D. ; VACHER, S. ; SPYRATOS, F. ; DE LA LANDE, B. ; CVITKOVIC, F. ; LIDEREAU, R. ; BIECHE, I.: DNA repair gene expression and risk of locoregional relapse

- in breast cancer patients. In: *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 78 (2010), S. 328–336
- [86] LEE, S. A. ; ROQUES, Celine ; MAGWOOD, A. C. ; MASSON, J.-Y. ; BAKER, M. D.: Recovery of deficient homologous recombination in Brca2-depleted mouse cells by wild-type Rad51 expression. In: *DNA Repair* 8 (2009), S. 170–181
- [87] LI, Y. ; YU, H. ; LUO, R.-Z ; ZHANG, Y. ; ZHANG, M.-F. ; WANG, X. ; JIA, W.-H.: Elevated Expression of Rad51 is Correlated With Decreased Survival in Resectable Esophageal Squamous Cell Carcinoma. In: *Journal of Surgical Oncology* 104 (2011), S. 617–622
- [88] LIEBER, M.: The Mechanism of Human Nonhomologous DNA End Joining. In: *The Journal of Biological Chemistry* 283 (2008), S. 1–5
- [89] LIO, Y-C ; SCHILD, D. ; BRENNEMAN, M. A. ; REDPATH, J. L. ; CHEN, D. J.: Human Rad51C Deficiency Destabilizes XRCC3, Impairs Recombination, and Radiosensitizes S/G2-phase Cells. In: *The Journal of Biological Chemistry* 279 (2004), S. 42313–42320
- [90] LISBY, M. ; ROTHSTEIN, R.: DNA damage checkpoint and repair centers. In: *Current Opinion in Cell Biology* 16 (2004), S. 328–334
- [91] LIU, N.: XRCC2 Is Required for the Formation of Rad51 Foci Induced by Ionizing Radiation and DNA Cross-Linking Agent Mitomycin C. In: *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2 (2002), S. 106–113
- [92] LONG, D. T. ; RÄSCHLE, M. ; JOUKOV, W. ; WALTER, J. C.: Mechanism of RAD51-Dependent DNA Interstrand Cross-Link Repair. In: *Science* 333 (2011), S. 84–87
- [93] LUNDIN, C. ; NORTH, M. ; ERIXON, K. ; WALTERS, K. ; JENSSEN, D. ; GOLDMAN, A. S. H. ; HELLEDAY, T.: Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 33 (2005), S. 3799–3811
- [94] LUNDIN, C. ; SCHULTZ, N. ; ARNAUDEAU, C. ; MOHINDRA, A. ; HANSEN, L. T. ; HELLEDAY, T.: RAD51 is Involved in Repair of Damage Associated with DNA Replication in Mammalian Cells. In: *Journal of Molecular Biology* 328 (2003), S. 521–535

- [95] MAACKE, H. ; HUNDERTMARK, C. ; MISKA, S. ; VOSS, M. ; KALTHOFF, H. ; STÜRZBECHER, H.-W.: Autoantibodies in sera of pancreatic cancer patients identify recombination factor Rad51 as a tumour-associated antigen. In: *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 128 (2002), S. 219–222
- [96] MAACKE, H. ; OPITZ, S. ; JOST, K. ; HAMDORF, W. ; HENNING, W. ; KRÜGER, S. ; FELLER, A. C. ; LOPENS, A. ; DIEDRICH, K. ; SCHWINGER, E. ; STÜRZBECHER, H.-W.: Over-expression of wild-type RAD51 correlates with histological grading of invasive ductal breast cancer. In: *International Journal of Cancer* 88 (2000), S. 907–913
- [97] MAGWOOD, A. C. ; MALYSEWICH, M. J. ; CEALIC, I. ; MUNDIA, M. M. ; KNAPP, J. ; BAKER, M. D.: Endogenous levels of Rad51 and Brca2 are required for homologous recombination and regulated by homeostatic re-balancing. In: *DNA repair* 12 (2013), S. 1122–1133
- [98] MAGWOOD, A. C. ; MUNDIA, M. M. ; BAKER, M. D.: High Levels of Wild-Type BRCA2 Suppress Homologous Recombination. In: *Journal of Molecular Biology* 421 (2012), S. 38–53
- [99] MANSOUR, W. Y. ; SCHUMACHER, S. ; ROSSKOPF, R. ; RHEIN, T. ; SCHMIDT-PETERSEN, F. ; F., Gatzemeier ; HAAG, F. ; BORGMANN, K. ; WILLERS, H. ; DAHM-DAPHI, J.: Hierarchy of nonhomologous end-joining, single-strand annealing and gene conversion at site-directed DNA double-strand breaks. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 36 (2008), S. 4088–4098
- [100] MAO, Z. ; JIANG, Y. ; LIU, X. ; SELUANOV, A. ; GORBUNOVA, V.: DNA Repair by Homologous Recombination, But Not by Nonhomologous End Joining, Is Elevated in Breast Cancer Cells. In: *Neoplasia* 11 (2009), S. 683–691
- [101] MARSIT, C. J. ; LIU, M. ; NELSON, H. H. ; POSNER, M. ; SUZUKI, M. ; KELSEY, K. T.: Inactivation of the Fanconi anemia/BRCA pathway in lung and oral cancers: implications for treatment and survival. In: *Oncogene* 23 (2004), S. 1000–1004
- [102] MARTIN, R. W. ; ORELL, B. J. ; YAMAZOE, M. ; MINN, A. J. ; TAKEDA, S. ; BISHOP, D. K.: RAD51 Up-regulation Bypasses BRCA1 Function and Is a Common Feature of BRCA1-Deficient Breast Tumors. In: *Cancer Research* 67 (2007), S. 9658–9665

- [103] MASER, R. S. ; MONSEN, K. J. ; NELMS, B. E. ; PETRINI, J. H. J.: hMre11 and hRad50 Nuclear Foci Are Induced during the Normal Cellular Response to DNA Double-Strand Breaks. In: *Molecular and Cellular Biology* 17 (1997), S. 6087–6096
- [104] MASOTTI, A. ; MOSSAA, G. ; CAMETTI, C. ; ORTAGGI, G. ; BIANCOD, A. ; DEL GROSSO, N. ; MALIZIAD, D. ; ESPOSITO, C.: Comparison of different commercially available cationic liposome-DNA lipoplexes: Parameters influencing toxicity and transfection efficiency. In: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 68 (2009), S. 136–144
- [105] MATHEWS, L. A. ; CABARCAS, S. M. ; HURT, E. M. ; ZHANG, X. ; FAFFEE, W. L.: Increased expression of DNA repair genes in invasive human pancreatic cancer cells. In: *Pancreas* 40 (2011), S. 730–739
- [106] MATSUURA, S. ; TAUCHI, H. ; NAKAMURA, A. ; KONDO, N. ; SAKAMOTO, S. ; ENDO, S. ; SMEETS, D. ; SOLDER, B. ; BELOHRADSKY, B. H. ; DER KALOUS-TIAN, V. M. ; OSHIMURA, M. ; ISOMURA, M. ; NAKAMURA, Y. ; KOMATSU, K.: Positional cloning of the gene for Nijmegen breakage syndrome. In: *Nature Genetics* 19 (1998), S. 179–181
- [107] MIKI, Y. ; SWENSEN, J. ; SHATTUCK-EIDENS, D. ; FUTREAL, P. A. ; HARSHMAN, K. ; TAVTIGIAN, S. ; LIU, Q. ; COCHRAN, C. ; BENNETT, L. M. ; DING, W.: A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. In: *Science* 7 (1994), S. 66–71
- [108] MIN, W. ; BRUH, C. ; GRIGARAVICIUS, P. ; ZHOU, Z.-W. ; LI, F. ; KRÜGER, A. ; SIDDEEK, B. ; GREULICH, K.-O. ; POPP, O. ; MEISEZAHN, C. ; CALKHOVEN, C. F. ; BÜRKLE, A. ; XU, X. ; WANG, Z.-Q.: Poly(ADP-ribose) binding to Chk1 at stalled replication forks is required for S-phase checkpoint activation. In: *Nature Communications* 4 (2014), S. 1–14
- [109] MITRA, A. ; JAMESON, C. ; BARBACHANO, Y. ; SANCHEZ, L. ; KOTE-JARAI, Z. ; PEOCK, S. ; SODHA, N. ; BANCROFT, E. ; FLETCHER, A. ; COOPER, C. ; EASTON, D. ; EELES, R. ; FOSTER, C. S.: Over-expression of RAD51 occurs in aggressive prostate cancer. In: *Histopathology* 55 (2009), S. 696–704
- [110] MLADENOV, E. ; ANACHKOVA, B. ; TSANEVA, I.: Sub-nuclear localization of Rad51 in response to DNA damage. In: *Genes to Cells* 11 (2006), S. 513–524
- [111] MOHAGHEGH, P. ; HICKSON, I. D.: DNA helicase deficiencies associated with

- cancer predisposition and premature ageing disorders. In: *Human Molecular Genetics* 10 (2001), S. 741–746
- [112] MORITA, T. ; YOSHIMURA, Y. ; YAMAMOTO, K. ; MORI, M. ; YAMAMOTO, H. ; MATSUSHIRO, A.: A mouse homolog of the Escherichia coli recA and Saccharomyces cerevisiae RAD51 genes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (1993), S. 6577–6580
- [113] NAKANISHI, K. ; CAVALLO, F. ; PERROUVAULT, L. ; GIOVANNANGELI, C. ; MOYNAHAN, M. E. ; BARCHI, M. ; BRUNET, E. ; JASIN, M.: Homology-directed Fanconi anemia pathway cross-link repair is dependent on DNA replication. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 18 (2011), S. 500–503
- [114] NAROD, S. A.: Breast cancer in young women. In: *Nature reviews* 9 (2012), S. 460–470
- [115] NEVE, R. M. ; CHIN, K. ; FRIDLAND, J. ; YEH, J. ; BAEHNER, F. L. ; FEVR, T. ; CLARK, L. ; BAYANI, N. ; COPPE, J. P. ; TONG, F. ; SPEED, T. ; SPELLMAN, P. T. ; DEVRIES, S. ; LAPUK, A. ; WANG, N. J. ; KUO, W. L. ; STILWELL, J. L. ; PINKEL, D. ; ALBERTSON, D. G. ; WALDMAN, F. M. ; MCCORMICK, F. ; DICKSON, R. B. ; JOHNSON, M. D. ; LIPPMAN, M. ; ETHIER, S. ; GAZDAR, A. ; GRAY, J. W.: A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. In: *Cancer Cell* 10 (2006), S. 515–527
- [116] NIEDERNHOFER, L.J. ; LALAI, A.S. ; HOEIJMAKERS, J. H. J.: Fanconi anemia (cross)linked to DNA repair. In: *Cell* 123 (2005), S. 1191–1198
- [117] NIEDERNHOFER, L.J. ; ODIJK, H. ; BUDZOWSKA, M. ; DRUNEN, E. van ; MAAS, A. ; THEIL, A. F. ; WIT, J. de ; JASPERS, G. J. ; BERVERLOO, H. B. ; ; HOEIJMAKERS, J. H. J. ; KANAAR, R.: The Structure-Specific Endonuclease Ercc1/Xpf Is Required To Resolve DNA Interstrand Cross-Link-Induced Double-Strand Breaks. In: *Molecular and Cellular Biology* 24 (2004), S. 5776–5787
- [118] OHASHI, A. ; ZDZIENICKA, M. Z. ; CHEN, J. ; COUCH, F. J.: Fanconi Anemia Complementation Group D2 (FANCD2) Functions Independently of BRCA2- and RAD51-associated Homologous Recombination in Response to DNA Damage. In: *Molecular and Cellular Biochemistry* 255 (2004), S. 67–78
- [119] PAFFETT, K. S. ; CLIKEMAN, J. A. ; PALMER, S. ; NICKOLOFF, J. A.: Over-expression of Rad51 inhibits double-strand break-induced homologous recom-

- mination but does not affect gene conversion tract lengths. In: *DNA Repair* 4 (2005), S. 687–698
- [120] PAQUES, F. ; HABER, J. E.: Multiple Pathways of Recombination Induced by Double-Strand Breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63 (1999), S. 349–404
- [121] PARPLYS, A. C.: *Bedeutung von Rad51 für die Reparatur Replikations-assoziiierter DNA-schÄ€den in humanen Tumorzellen*, UniversitÄ€t Hamburg, Dissertation, 2011
- [122] PARPLYS, A. C. ; PETERMANN, E. ; PETERSEN, C. ; DIKOMEY, E. ; BORGMANN, K.: DNA damage by X-rays and their impact on replication processes. In: *Radiotherapy and Oncology* 102 (2012), S. 466–471
- [123] PAUKLIN, S. ; KRISTJUHAN, A. ; MAIMETS, T. ; JAKS, V.: ARF and ATM/ATR cooperate in p53-mediated apoptosis upon oncogenic stress. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334 (2005), S. 386–394
- [124] PETERMANN, E. ; ORTA, M. L. ; ISSAEVA, N. ; SCHULTZ, N. ; HELLEDAY, T.: Hydroxyurea-Stalled Replication Forks Become Progressively Inactivated and Require Two Different RAD51-Mediated Pathways for Restart and Repair. In: *Molecular Cell* 37 (2010), S. 492–502
- [125] QIAO, G.-B. ; WU, Y.-L. ; YANG, X.-N. ; ZHONG, W.-Z. ; XIE, D. ; GUAN, X.-Y. ; FISCHER, D. ; KOLBERG, C.-H. ; KRUGER, S. ; STÜRZBECHER, H.-W.: High-level expression of Rad51 is an independent prognostic marker of survival in non-small-cell lung cancer patients. In: *British Journal of Cancer* 93 (2005), S. 137–143
- [126] RADERSCHALL, E. ; BAZAROV, A. ; CAO, J. ; LURZ, R. ; SMITH, A. ; MANN, W. ; ROPERS, H.-H. ; SEDIVY, J. M. ; GOLUB, E. I. ; FRITZ, E. ; HAAF, T.: Formation of higher-order nuclear Rad51 structures is functionally linked to p21 expression and protection from DNA damage-induced apoptosis. In: *Journal of Cell Science* 115 (2002), S. 153–164
- [127] RADERSCHALL, E. ; GOLUB, E. ; HAAF, T.: Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions after DNA-damage. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (1999), S. 1921–1926

- [128] RADERSCHALL, E. ; STOUT, K. ; FREIER, S. ; SUCKOW, S. ; SCHWEIGER, S. ; HAAF, T.: Elevated Levels of Rad51 Recombination Protein in Tumor Cells. In: *Cancer Research* 62 (2002), S. 219–225
- [129] RÄSCHLE, M. ; KNIPSCHER, P. ; ENOLU, M. ; ANGELOV, T. ; SUN, J. ; GRIFFITH, J. D. ; ELLENBERGER, T. E. ; SCHÄERER, O. D. ; ELLEDGE, S. J. ; WALTER, J. C.: Mechanism of Replication-Coupled DNA Interstrand Crosslink Repair. In: *Cell* 134 (2008), S. 969–980
- [130] REVETA, I. ; FEENEYA, L. ; BRUGUERA, S. ; WILSON, W. ; DONGA, T. K. ; OHA, D. H. ; DANKORTC, D. ; CLEAVER, J. E.: Functional relevance of the histone gammaH2Ax in the response to DNA damaging agents. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (2011), S. 8663–8667
- [131] RICHARDSON, C. ; STARK, J. M. ; OMMUNDSEN, M. ; JASIN, M.: Rad51 overexpression promotes alternative double-strand break repair pathways and genome instability. In: *Oncogene* 23 (2004), S. 546–553
- [132] ROBERT KOCH-INSTITUT, Pressemitteilung: *Krebs in Deutschland*. Februar 2012. – URL http://www.rki.de/DE/Content/Service/Presse/Pressemitteilungen/2012/01_2012.html
- [133] ROSENBERG, P. S. ; GREENE, M. H. ; ALTER, B. P.: Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. In: *Blood* 101 (2003), S. 822–826
- [134] SALEH-GOHARI, N. ; BRYANT, H. E. ; SCHULTZ, N. ; PARKER, K. M. ; CASSEL, T. N. ; HELLEDAY, T.: Spontaneous Homologous Recombination Is Induced by Collapsed Replication Forks That Are Caused by Endogenous DNA Single-Strand Breaks. In: *Molecular and Cellular Biology* 25 (2005), S. 7158–7169
- [135] SALEH-GOHARI, N. ; HELLEDAY, T.: Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 32 (2004), S. 3683–3688
- [136] SARTORI, A. A. ; LUKAS, C. ; COATES, J. ; MISTRİK, M. ; FU, S. ; BARTEK, J. ; BAER, R. ; LUKAS, J. ; JACKSON, S. P.: Human CtIP promotes DNA end resection. In: *Nature* 450 (2007), S. 509–515

- [137] SCHLACHER, K. ; CHRIST, N. ; SIAUD, N. ; EGASHIRA, A. ; WU, H. ; JASIN, M.: Double-Strand Break Repair-Independent Role for BRCA2 in Blocking Stalled Replication Fork Degradation by MRE11. In: *Cell* 145 (2011), S. 529–542
- [138] SCHLACHER, K. ; WU, H. ; JASIN, M.: A Distinct Replication Fork Protection Pathway Connects Fanconi Anemia Tumor Suppressors to RAD51-BRCA1/2. In: *Cell* 22 (2012), S. 106–116
- [139] SCULLY, R. ; XIE, A.: In my end is my beginning: control of end resection and DSBR pathway "choice" by cyclin-dependent kinases. In: *Oncogene* 24 (2005), S. 2871–2876
- [140] SHEN, X. ; DO, H. ; LI, Y. ; CHUNG, W.-H. ; TOMASZ, M. ; WINTER, J. P. de ; XIA, B. ; ELLEDGE, S. J. ; WANG, W. ; LI, L.: Recruitment of Fanconi Anemia and Breast Cancer Proteins to DNA Damage Sites Is Differentially Governed by Replication. In: *Molecular Cell* 35 (2009), S. 716–723
- [141] SHINOHARA, A. ; OGAWA, H. ; MATSUDA, Y. ; USHIO, N. ; IKEO, K. ; OGAWA, T.: Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to RAD51 and recA. In: *Nature Genetics* 4 (1993), S. 239–243
- [142] SHIOTANI, B. ; ZOU, L.: Single-Stranded DNA Orchestrates an ATM-to-ATR Switch at DNA Breaks. In: *Molecular Cell* 33 (2009), S. 547–558
- [143] SLUPIANEK, A. ; SCHMUTTE, C. ; TOMBLINE, G. ; NIEBOROWSKA-SKORSKA, M. ; HOSER, G. ; NOWICKI, M. O. ; PIERCE, A. J. ; FISHEL, R. ; SKORSKI, T.: BCR/ABL Regulates Mammalian RecA Homologs, Resulting in Drug Resistance. In: *Molecular Cell* 8 (2001), S. 795–806
- [144] SMITH, P. K. ; KROHN, R. I. ; HERMANSON, G. T. ; MALLIA, A. K. ; GARTNER, F. H. ; FROVENZANO, M. D. ; FUJIMOTO, E. K. ; GOEKE, N. M. ; OLSON, B. J. ; KLENK, D. C.: Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. In: *Analytical Biochemistry* 150 (1985), S. 296–304
- [145] SOBOL, R. W. ; KARTALOU, M. ; ALMEIDA, K. H. ; JOYCE, D. F. ; ENGELWARD, B. P. ; HORTON, J. K. ; PRASAD, R. ; SAMSON, L. D. ; WILSON, S. H.: Base Excision Repair Intermediates Induce p53-independent Cytotoxic and Genotoxic Responses. In: *The Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), S. 39951–39959
- [146] SÖDERLUND, K. ; SKOOG, L. ; FORNANDER, T. ; ASKMALM, M. S.: The BRCA1/BRCA2/Rad51 complex is a prognostic and predictive factor in

- early breast cancer. In: *The Journal of Biological Chemistry* 275 (2000), S. 15895–15904
- [147] SONG, B. ; SUNG, P.: Exchange Replication Protein A in DNA Strand Rad51 Recombinase, Rad52 Mediator, and Functional Interactions among Yeast. In: *Nature Cell Biology* 7 (2005), S. 195–201
- [148] SÖRENSEN, C. S. ; HANSEN, L. T. ; DZIEGIELEWSK, J. ; SYLJUASEN, R. G. ; LUNDIN, C. ; BARTEK, J. ; HELLEDAY, T.: The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. In: *Nature Cell Biology* 7 (2005), S. 195–201
- [149] STAMATATOS, L. ; LEVENTIS, R. ; ZUCKERMANN, M. J. ; SILVIUS, J. R.: Interactions of cationic lipid vesicles with negatively charged phospholipid vesicles and biological membranes. In: *Biochemistry* 27 (1988), S. 3917–3925
- [150] STRUMBERG, D. ; PILON, A. A. ; SMITH, M. ; HICKEY, R. ; MALKAS, L. ; POMMIER, Y.: Interactions of cationic lipid vesicles with negatively charged phospholipid vesicles and biological membranes. In: *Molecular and Cellular Biology* 20 (2000), S. 3977–3987
- [151] SYMINGTON, L. S. ; GAUTIER, J.: Double-Strand Break End Resection and Repair Pathway Choice. In: *Annual Review of Genetics* 45 (2001), S. 247–271
- [152] TAKATA, M. ; SASAKI, M. S. ; TACHIIRI, S. ; FUKUSHIMA, T. ; SONODA, E. ; SCHILD, D. ; THOMPSON, L. H. ; TAKEDA, S.: Conversion of Topoisomerase I Cleavage Complexes on the Leading Strand of Ribosomal DNA into 5'-Phosphorylated DNA Double-Strand Breaks by Replication Runoff. In: *Molecular and Cellular Biology* 28 (2001), S. 2858–2866
- [153] TARSOUNAS, M. ; DAVIES, D. ; WEST, S. C.: BRCA2-dependent and independent formation of RAD51 nuclear foci. In: *Oncogene* 22 (2003), S. 1115–1123
- [154] TENNSTEDT, P. ; FRESOW, R. ; SIMON, R. ; MARX, A. ; TERRACCIANO, L. ; PETERSEN, C. ; SAUTER, G. ; DIKOMEY, E. ; BORGMANN, K.: RAD51 overexpression is a negative prognostic marker for colorectal adenocarcinoma. In: *International Journal of Cancer* 132 (2012), S. 2118–2126
- [155] THORSLUND, T. ; WEST, S. C.: BRCA2: a universal recombinase regulator. In: *Oncogene* 12632 (2007), S. 7720–7730
- [156] TSUZUKI, T. ; FUI, Y. ; SAKUMI, K. ; TOMINAGA, Y. ; NAKAO, K. ; SEKIGUCHI, M. ; MATSUSHIRO, A. ; YOSHIMURA, Y. ; MORITA, T.: Targeted disruption

- of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (1996), S. 6236–6240
- [157] TUCKER, A. T. ; VARGA, V. ; BEBOK, Z. ; ZSEMBERY, A. ; MCCARTY, N. A. ; COLLAWN, J. F. ; SCHWIEBERT, E. M. ; SCHWIEBERT, L. M.: Transient transfection of polarized epithelial monolayers with CFTR and reporter genes using efficacious lipids. In: *Methods in cell physiology* 284 (2003), S. 791–804
- [158] VENKITARANAM, A. R.: Cancer Susceptibility and the Functions of BRCA1 and BRCA2. In: *Cell* 108 (2002), S. 171–182
- [159] VIDAL, A.E. ; BOITEUX, S. ; HICKSON, I.D. ; ; RADICELLA, J.P.: XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. In: *The European Molecular Biology Organization Journal* 20 (2001), Nr. 22, S. 6530–6539
- [160] VISPĚ, S. ; CAZAUX, C. ; LESCA, C. ; DEFAIS, M.: Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 26 (1998), S. 2859–5864
- [161] WALKER, J. R. ; CORPINA, R. A. ; GOLDBERG, J.: Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. In: *Nature* 412 (2001), S. 607–614
- [162] WALSH, T. ; KING, M.-C.: Ten Genes for Inherited Breast cancer. In: *Cancer Cell* 11 (2007), S. 103–105
- [163] WANG, X.Z. ; KENNEDY, R. D. ; RAY, K. ; STUCKERT, P. ; ELLENBERGER, T. ; D'ANDREA, A. D.: Chk1-Mediated Phosphorylation of FANCD1 Is Required for the Fanconi Anemia/BRCA Pathway. In: *Molecular and Cellular Biology* 27 (2007), S. 3098–3108
- [164] WANG, Y. ; HUANG, J.-W. ; CALSES, P. ; KEMP, C. J. ; TANIGUCHI, T.: MiR-96 downregulates REV1 and RAD51 to promote cellular sensitivity to cisplatin and PARP inhibition. In: *Cancer Research* 72 (2012), S. 4037–4046
- [165] WELSH, J. W. ; ELLSWORTH, R. K. ; KUMAR, R. ; FJERSTAD, J. ; MARTINEZ, J. ; NAGE., B. N. ; ESCHBACH, J. ; STEA, B.: Rad51 protein expression and survival in patients with glioblastoma multiforme. In: *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 74 (2009), S. 1251–1255

- [166] WILSON III, D.M. ; BOHR, V.A.: The mechanics of base excision repair, and its relationship with aging and disease. In: *DNA Repair* 6 (2007), S. 544–559
- [167] WONG, A. K. ; ORMONDE, P. A. ; PERO, R. ; CHEN, Y. ; LIAN, L. ; SALADA, G. ; BERRY, S. ; LAWRENCE, Q. ; DAYANANTH, P. ; HA, P. ; TAVTIGIAN, S. V. ; TENG, D. H. ; BARTEL, P. L.: Characterization of a carboxy-terminal BRCA1 interacting protein. In: *Oncogene* 17 (1998), S. 2279–285
- [168] WOOSTER, R. ; BIGNELL, G. ; LANCASTER, J. ; SWIFT, S. ; SEAL, S. ; MANGION, J. ; COLLINS, N. ; GREGORY, C. ; MICKLEM, G. ; BARFOOT, R. ; HAMOUDI, R. ; PATEL, C. ; BIGGS, P. ; HASHIM, Y. ; SMITH, A. ; CONNOR, F. ; ARASON, A. ; GUDMUNDSSON, J. ; FICENEC, D. ; KELSELL, D. ; FORDSTAR, D. ; TONIN, P. ; BISHOP, D. T. ; SPURR, N. K. ; PONDER, B. A. J. ; EELES, R. ; PETOSTAR, J. ; DEVILEE, P. ; CORNELISSE, C. C. ; LYNCH, H. ; NAROD, S. ; LENOIR, G. ; EGILSSON, V. ; BARKADOTTIR, R. B. ; EASTON, D. F. ; BENTLEY, D. R. ; FUTREAL, P. A. ; ASHWORTH, A. ; STRATTON, M. R.: Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. In: *Nature* 378 (1995), S. 789–792
- [169] WROBEL, I. ; COLLINS, D.: Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1235 (1995), S. 296–304
- [170] WROBEL, I. ; COLLINS, D.: Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis. In: *Federation of European Biochemical Societies Letters* 417 (1997), S. 199–202
- [171] WRONA, A.: *Impact of RAD51 overexpression on genomic instability and sensitivity against genotoxic agents in human cancer cell lines*, Department of Applied Radiobiology, Center of Oncology, Cracow, Dissertation, 2010
- [172] XIA, B. ; SHENG, Q. ; NAKANISHI, K. ; OHASHI, A. ; WU, J. ; CHRIST, N. ; LIU, X. ; JASIN, M. ; COUCH, F. J. ; LIVINGSTON, D. M.: Control of BRCA2 Cellular and Clinical Functions by a Nuclear Partner, PALB2. In: *Molecular Cell* 22 (2006), S. 719–729
- [173] YANEVA, M. ; KOWALEWSKI, T. ; LIEBER, M. R.: Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. In: *The European Molecular Biology Organization Journal* 16 (1997), S. 5098–5112

- [174] YANEZ, R. J. ; PORTER, A. C. G.: Differential effects of Rad52p overexpression on gene targeting and extrachromosomal homologous recombination in a human cell line. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 30 (2002), S. 740–748
- [175] YOSHIHARA, T. ; ISHIDA, M. ; KINOMURA, A. ; KATSURA, M. ; TSURUGA, T. ; TASHIRO, S. ; ASAHARA, T. ; MIYAGAWA, K.: XRCC3 deficiency results in a defect in recombination and increased endoreduplication in human cells. In: *The European Molecular Biology Organization Journal* 23 (2004), S. 670–680
- [176] YU, D. S. ; SONODA, E. ; TAKEDA, S. ; HUANG, C. L. H. ; PELLEGRINI, L. ; BLUNDELL, T. L. ; VENKITARANAM, A. R.: Dynamic control of Rad51 Recombinase by Self-Association and Interaction with BRCA2. In: *Molecular Cell* 12 (2003), S. 1029–1041
- [177] YU, X. ; FU, S. ; LAI, M. ; BAER, R. ; CHEN, J.: BRCA1 ubiquitinates its phosphorylation-dependent binding partner CtIP. In: *Genes & Development* 20 (2006), S. 1721–1726
- [178] YUN, Y. ; ZHONG, Q. ; KWAK, J.-Y. ; LEE, W.-H.: Hypersensitivity of Brca1-deficient MEF to the DNA interstrand crosslinking agent mitomycin C is associated with defect in homologous recombination repair and aberrant S-phase arrest. In: *Oncogene* 24 (2005), S. 4009–4016
- [179] ZHANG, F. ; FAN, Q. ; REN, K. ; ANDREASSEN, P. R.: PALB2 Functionally Connects the Breast Cancer Susceptibility Proteins BRCA1 and BRCA2. In: *American Association for Cancer Research* 7 (2009), S. 1110–1118
- [180] ZOU, L. ; ELLEDGE, S. J.: Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes. In: *Science* 300 (2003), S. 1542–1548

Abkürzungsverzeichnis

53BP1	p53-bindendes Protein 1
9-1-1-Komplex	Rad9-Rad1-Hus1-Komplex
ATM	<i>Ataxia-Telangiectasia-mutated</i>
ATR	<i>Ataxia-Telangiectasia-mutated and Rad3-related</i>
ATRIP	<i>ATR-interacting protein</i>
BCA	Bicinchoninsäure-Lösung
BER	Basenexzisionsreparatur
BD	Basenschaden
BIR	<i>Breakage induced-Replication</i>
BLAP75	<i>Bloom-associated protein of 75 kD</i>
BLM	<i>Bloom's syndrome protein</i>
BrCa	Brustkrebstumor
BRCA1	<i>breast cancer Gen 1</i>
BRCA2 (FANCD1)	<i>breast cancer Gen 2</i>
BRIP1	<i>BRCA1-interacting protein 1</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
CEB	<i>Cytoplasmic Extraction Buffer</i>
CHK1/	<i>Checkpoint Kinase 1/2</i>
CtIP	<i>C-terminal-binding protein interacting protein</i>
DAPI	Diamidinophenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
DNA-PK _{CS}	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithioerythritol

weiter auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle 6.1

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine
ein-endiger DSB	Doppelstrangbruch mit einem offenen Ende
ELU	Elutionspuffer
EQU	Equilibrierungspuffer
LYS	Lysispuffer
ERCC1	<i>Excision repair cross complementation group 1</i>
FA	Fanconi Anemia
FAAP24	Fanconi Anämie assoziiertes Protein 24
FANCA-C/D2/E-G/I/L/M	Fanconi A-C/D2/E-G/I/L/M
FANCD1 (BRCA2)	Fanconi D1
FANCD2	Fanconi D2
FANCN (PALB2)	Fanconi N
FANCO (RAD51C)	Fanconi O
FCS	Fötales Kälberserum
EtBr	Ethidium Bromid
HJ	<i>Holliday-Junction</i>
hMSH2-6	<i>human MutS Homolog 2-6</i>
HNSCC	Kopf-Hals-Tumore
HPV	Humanes Papillomavirus
HR	Homologe Rekombination
ICL-Reparatur	Reparatur von DNA-DNA-Vernetzungen
KCl	Kaliumchlorid
MDA-231/468	MDA-MB-231/468
MEB	<i>Membrane Extraction Buffer</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MMC	Mitomycin C
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBS1	<i>Nijmegen-Breakage-syndrom 1</i>
NEB	<i>Nuclear Extraction Buffer</i>
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NEU	Neutralisationspuffer
NHEJ	Nicht-homologes <i>Enjoining</i>
PI3K	Phosphoinositid-3
PALB2 (FANCI)	<i>Partner and localizer of BRCA2</i>

weiter auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle 6.1

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PEB	<i>Pellet Extraction Buffer</i>
PI	Propidium Iodid
Pol $\eta/\delta/\epsilon/\zeta$	Polymerase $\eta/\delta/\epsilon/\zeta$
RES	Resuspensionspuffer
RNase	Ribonuklease A
RNF168	<i>RING finger nuclear factor 168</i>
RPA	<i>Replication protein A</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institut</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polacrylamid-Gelelektrophorese
SDSA	<i>Synthesis-dependent strand Annealing</i>
SSA	<i>Single-Strand Annealing</i>
SSB	Einzelstrangbruch
ssDNA	einzelsträngige DNA
TA	<i>Triamcilonone acetone</i>
TBS	Trispuffer
TLS	<i>Translesionsynthesis</i>
UT-14/15/5/8	UTSCC-14/15/5/8
UV-Strahlung	Ultraviolette Strahlung
WRN	<i>Werner syndrome protein</i>
XPF	<i>Xeroderma Pigmentosum group F</i>
XRCC1-4	<i>X-ray cross-complementing 1-4</i>
WASH	Waschpuffer
zwei-endiger DSB	Doppelstrangbruch mit zwei offenen Enden

Auflistung der Gefahrstoffe nach GHS

Tabelle 6.2: Auflistung der Gefahrstoffe nach GHS.

Bezeichnung	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
DTT	GHS07	302, 315, 319	305+352, 305+351+338
EDTA	GHS07	319	305+351+338
Ethanol	GHS02	225	403+233
EtBr	GHS06, GHS08	341, 330, 302	281, 302+352, 305+351+338, 304+340, 309+310
Formaldehyd	GHS05, GHS06, GHS08	351, 331, 311, 301, 314, 317	301+310, 303+361+353, 305+351+338, 320, 361, 405, 501
HCl	GHS05, GHS07	290?, 314?, ?335?	234, 360, 304+340, 303+361+353, 305+351+338, 309+311, 501
Kristallviolett	GHS05, GHS07, GHS08, GHS09	351, 302, 318, 410	273, 280, 305+351+338, 308+313
Kupfer(II)-sulfat- Lösung	GHS07, GHS09	302, 319, 315, 410	273, 305+351+338, 302+352
Methanol	GHS02, GHS06, GHS08	225, 331, 311, 301, 370	210, 233, 280, 302+352

weiter auf der nächsten Seite

Fortsetzung von Tabelle 6.2

Bezeichnung	Gefahrensymbol	H-Sätze	P-Sätze
β-Mercaptoethanol	GHS02, GHS06, GHS08	301, 310, 330, 315, 318, 410	280, 273, 302+352, 304+340, 305+351+338, 309, 310
MMC	GSH06, GSH08	300,251	264, 281, 301+310
NaOH	GSH05	314, 290	280, 301+330+331, 309+310, 305+351+338
2-Propanol	GSH02, GSH07	225, 319, 336	210, 233, 305+351+338
PI	GSH07	315, 319, 335	261, 305+351+338
SDS	GSH02, GSH06	228, 311, 302, 335, 315, 319	210, 280, 304+340, 305+351+338, 309+310
Tris	GSH07	315, 319, 335	261, 305+351+338
Triton X-100	GSH05, GSH07, GSH09	302, 318, 411	273, 280, 305+351+338

* GHS Global harmonisiertes System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien

Danksagung

Mein erster, herzlichster Dank geht an Frau PD. Dr. Kerstin Borgmann, die diese Arbeit betreut hat. Ich möchte mich für die tolle Unterstützung bedanken, die Begeisterung für das Thema, für den gewährten Freiraum zur Ideen-Umsetzung und für das wissenschaftliche Fordern, was diese Arbeit erst zu dem gemacht hat, was sie ist.

Bei Prof. Dr. Ekkehard Dikomey möchte ich mich zu allererst für die Möglichkeit bedanken, am Institut ein so spannendes Thema bearbeitet haben zu dürfen. Ganz besonders möchte ich ihm aber für sein ehrliches Interesse, für seine Ermutigungen und ehrlichen Worte danken.

Bei Prof. Dr. Dr. Betzel möchte ich mich für die Begutachtung meiner Arbeit und bei Prof. Dr. Sascha Rohn sowie Dr. Lars Redecke für das Bereiterklären zur Prüfung meiner Disputation bedanken.

Bei Alexandra Zielinski möchte ich mich ganz besonders bedanken. Sie stand mir nicht nur im Labor mit ihren tollen Ideen immer hilfsbereit und tatkräftig zur Seite, sondern auch in anderen Fragen des Alltags.

Dr. Wael Yassin Mansour möchte ich für die tollen Diskussionen danken, für sein Interesse an meiner Arbeit, seine Unterstützung.

Nina Struve möchte ich nicht nur für das ausdauernde Lesen dieser Arbeit danken, sondern vor allem für ihre Freundschaft. Das gemeinsame Yoga vor der Arbeit, die immerwährenden aufmunternden Worte und die Freizeitablenkungen jeglicher Art haben mir immer so viel Spaß gemacht. Manchmal hilft viel eben doch viel.

Laura Myllynen danke ich nicht nur als meiner langzeitigen Sitznachbarin, die mir mit ihrer Freude und Herzlichkeit den Laboralltag versüßt hat, sondern auch als Freundin für all die anderen schönen Momente.

Ich danke all den liebe Menschen im Labor, die jeder für sich zu der tollen Atmosphäre im Labor beigetragen haben. Es hat immer Spaß gemacht, zur Arbeit zu kommen, danke Konstantin, Ann, Jenny, Malte, Lisa, Britta, Thorsten, Maria, Fruszina, Hamed und Ali.

Ich hatte die Möglichkeit, währende meiner Zeit im Labor einige Praktikanten zu betreuen, die wesentlich zu den Ergebnissen dieser Arbeit beigetragen haben. Dafür bedanke ich mich bei meiner ersten Praktikantin Kaja Meincke, bei meinen BTA-Schülern Mandy Steis, Anna-Katharina Olsen sowie Jasper Schrammel, bei Marieke Graf und bei meiner kanadischen Praktikantin Michelle Meyer.

Meinen liebsten Bremern danke ich für alles andere drum rum.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, für die Unterstützung und Fürsorge, ohne die dieser Weg deutlich schwieriger gewesen wäre.

Publikationen

Wissenschaftliche Artikel

A.C. Parplys¹, **J.I. Seelbach**¹, A. Wrona, M. Behr, C. Jend, O. Zschenker, W.Y. Mansour, C. Petersen, T. Streichert, S. Joosse, H.-W. Stuerzbecher, E. Dikomey, and K. Borgmann

(¹ shared first authorship)

Impairment of Intra-S-phase checkpoint signalling in cells with RAD51-overexpression

In preperation for publication in Cancer Cell

J.I. Seelbach, A.C. Parplys, C. Petersen, E. Dikomey, K. Borgmann

Keine verstärkte DNA-Reparatur bei Überexpression des Reparaturproteins RAD51 in Kopf-Hals-Tumoren

Proceedings of the 21. Symposium Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie. Hamburg: 2012; ISSN 1432-864X

Wissenschaftliche Vorträge

KVSF (Kompetenzverbund Strahlenforschung)-Meeting, 16. – 18.10.2013, Jena
Different regulation of replication associated and replication independent homologous recombination in HNSCC, but not in BrCa

21. Symposium Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie, 9. – 11.02.2012, Hamburg

Keine verstärkte DNA-Reparatur bei Überexpression des Reparaturproteins RAD51 in Kopf-Hals-Tumoren

KVSF (Kompetenzverbund Strahlenforschung)-Meeting, 18. – 19.06.2012, Hamburg

weiter auf der nächsten Seite

Fortsetzung des Lebenslaufes

The impact of RAD51 expression on homologous recombination

III. UCCH Forschungsretreat, 24. – 25.06.2011, Jeesteburg
 Homologe Rekombination in Plattenepithelzellen von HNO- und
 Brustkrebstumoren

Wissenschaftliche Poster

*16. Jahrestagung der GBS (Gesellschaft für biologische Strahlenforschung),
 25. – 27.09.2013, Darmstadt*

J.I. Seelbach, C. Petersen, E. Dikomey, K. Borgmann

*Low HR capacity does not predict ICL- and radio-sensitivity in human
 tumor cell lines*

*13th International Wolfsberg Meeting on Molecular Radiation Biology/Oncology
 2013, 22. – 24.06.2013, Ermatingen, Schweiz*

J.I. Seelbach, C. Petersen, E. Dikomey, K. Borgmann

*Over-expression of RAD51 inhibits DSB-induced homologous recombination but
 does not affect cellular sensitivity after DNA damage in S-Phase*

*12th Biennial Meeting of the DGDR (German Society for Research on DNA
 Repair, 15th Annual Meeting of the GBS (Gesellschaft für biologische
 Strahlenforschung), 17. – 20.09.2012, München*

J.I. Seelbach, A.C. Parpys, C. Petersen, E. Dikomey, K. Borgmann

RAD51 overexpression: An advanced repair capacity or a fatale mediator?

*14. Jahrestagung der GBS (Gesellschaft für biologische Strahlenforschung),
 13. – 16.09.2011, Köln*

J.I. Seelbach, A.C. Parpys, C. Petersen, E. Dikomey, K. Borgmann

*Bedeutung der Rad51-Expression für die Aktivität der homologen Rekombination
 im Plasmid-Rekonstruktionsassay in humanen Tumorzelllinien*

*39. Deutscher Lebensmittelchemikertag (LCHG/GDCH),
 20. – 22.09.2010, Stuttgart-Hohenheim*

J. I. Seelbach, F. Ebert, T.Schwerdtle

Arsenit wirkt in menschlichen Lungenzellen cogenotoxisch

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation „Bedeutung der Expression von RAD51 für die Reparatur von DNA-Schäden mittels Homologer Rekombination in humanen Tumorzelllinien“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die Zitate deutlich kenntlich gemacht zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Hamburg, den 10. November 2014

Jasna Irena Seelbach

