

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie  
des Onkologischen Zentrums  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Direktor Prof. Dr. Winfried Alberti

# **EINFLUSS DER ÜBEREXPRESSION VON RAD51 AUF DIE CHROMOSOMALE INSTABILITÄT**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

**CAMILLA JEND**

aus Berlin

Hamburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am: 28.05.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. E. Dikomey

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. J. Dahm-Daphi

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: PD Dr. R. Simon

**INHALTSVERZEICHNIS**

1. Arbeitshypothese und Fragestellung.....	5
2. Einleitung .....	6
2.1. Bedeutung der Expression von Reparaturproteinen für die Prognose bei Tumorpatienten .....	6
2.2. Bedeutung der Reparatur von DNA-Schäden zum Erhalt der genomischen Stabilität ...	7
2.3. Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen.....	8
2.3.1. Nicht homologes Endjoining.....	9
2.3.2. Homologe Rekombination .....	10
2.4. RAD51 .....	16
3. Material und Methoden.....	18
3.1 Zelllinien .....	18
3.2 Zellkulturhaltung .....	19
3.3 Western Blot.....	19
3.3.1. Proteinisolierung.....	19
3.3.2. Proteinbestimmung.....	20
3.3.3. Nachweis der Proteine .....	20
3.3.4. Detektion der Proteine.....	21
3.4 Detektion der RAD51-Foci mittels Immunfluoreszenz.....	21
3.5 Chromosomenaberrationen .....	22
3.5.1. Metaphasentechnik .....	22
3.5.2. G0-Assay .....	23
3.5.3. G2-Assay .....	24
3.6 Mikroskopie und Auswertung.....	24
3.7 Zellzyklusanalyse .....	25
3.7.1. Messung von Zellzyklusverteilung und DNA-Gehalt .....	25
3.7.2. Zellfixierung und Messung am FACScan.....	26
3.7.3. Herstellung des Leukozytenstandards für die DNA-Gehaltsbestimmung .....	26
3.8 Koloniebildungstest .....	27
3.9 Bestrahlung und Dosimetrie.....	27
3.10 Puffer und Lösungen.....	28
3.10.1. Reagenzien und Medien für die Zellkultur .....	28
3.10.2. Induktion der Genexpression .....	28
3.10.3. Reagenzien zur Detektion von Proteinen .....	28
3.10.4. DNA-Farbstoff.....	29

---

3.10.5.	Allgemeine Puffer, Lösungen und Chemikalien.....	29
3.10.6.	Antikörper gegen das RAD51, TP53, und p21-Protein.....	31
3.10.7.	Größenstandards.....	32
4.	Ergebnisse .....	33
4.1	Methodische Vorarbeiten .....	33
4.1.1.	Induktion der Rad51-Überexpression .....	33
4.1.2.	Zelluläres Wachstum.....	34
4.1.3.	Rad51-Foci .....	36
4.2	Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung.....	38
4.2.1.	Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung in der G1-Phase .....	39
4.2.2.	Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung in der G2-Phase .....	42
4.3	Zellzyklus.....	44
4.3.1.	Expression von TP53 und p21 .....	45
4.3.2.	Zellzyklusverteilung .....	46
4.4	Zelluläre Strahlenempfindlichkeit.....	47
5.	Diskussion.....	49
5.1.	Methodische Vorarbeiten .....	49
5.1.1.	Induktion der RAD51-Überexpression .....	49
5.1.2.	Zelluläres Wachstum.....	49
5.2.	RAD51-Foci .....	50
5.3.	Chromosomenaberrationen der G1-Phase .....	51
5.4.	Chromatidtyp-Aberrationen der G2-Phase .....	52
5.5.	Zelluläre Strahlenempfindlichkeit.....	52
5.6.	Zellzyklus.....	53
5.6.1.	G1-Arrest .....	53
5.6.2.	G2-Arrest .....	54
5.7.	Genomische Stabilität .....	55
6.	Zusammenfassung .....	58
7.	Literaturverzeichnis.....	60
8.	Lebenslauf .....	65
9.	Danksagung.....	66
10.	Eidesstattliche Erklärung.....	67

## 1. **Arbeitshypothese und Fragestellung**

Ein häufig beobachtetes Phänomen bei der Therapie maligner Tumoren ist die große Variation ihres Ansprechens auf eine Behandlungsstrategie selbst bei identischen Behandlungen. Für diese Variation können neben einer Reihe anderer Faktoren u. a. auch Unterschiede in der Reparaturfähigkeit der Tumorzellen verantwortlich sein sowie ebenso Unterschiede in der genomischen Instabilität. So konnte für einige Tumorentitäten bereits beobachtet werden, dass die Überexpression von Proteinen bestimmter Reparaturwege als Ursache einer deutlich schlechteren Prognose in Betracht kommt.

Mit dieser Arbeit sollte die These überprüft werden, ob sich die Überexpression des RAD51 Proteins, welches für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels homologer Rekombination bedeutsam ist, auf die Resistenzbildung oder die genomische Instabilität der Tumorzellen auswirkt. Diese These sollte anhand eines isogenetischen Tumorzellpaares mit unterschiedlicher RAD51-Expression untersucht werden. Dabei war von besonderem Interesse, ob sich eine Erhöhung der RAD51-Expression auf die Bildung von Chromosomenaberrationen, die Zellzyklusverteilung und die Koloniebildungsfähigkeit nach Bestrahlung auswirkt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten insgesamt folgende Fragestellungen überprüft werden:

1. Welche Bedeutung hat die Überexpression des RAD51 auf die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen?
2. Ist die Überexpression des RAD51 bedeutsam für die Reparatur von Chromosomenaberrationen der G1-Phase und/oder der G2-Phase nach Bestrahlung?
3. Wirkt sich die Überexpression des RAD51 auf die Zellzyklusverteilung aus?
4. Wird das zelluläre Überleben nach Bestrahlung durch die Überexpression von RAD51 verändert?

## 2. Einleitung

Die Therapie maligner Tumoren basiert auf den drei Säulen der Chirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie. In allen drei Therapieansätzen wird die Strategie verfolgt, möglichst jede Tumorzelle zu zerstören, um ein erneutes Wachstum des Tumors zu verhindern. Im Falle der Chirurgie erfolgt dies direkt durch Exzision des Tumorgewebes, bei der Chemo- sowie Strahlentherapie durch möglichst effektive Schädigung der Tumorzellen mit einem daraus resultierenden Absterben der Zellen. Dabei variiert die Empfindlichkeit der Tumoren gegenüber den eingesetzten Agenzien sehr deutlich. So zeigen z.B. Leukämien und Seminome eine deutlich höhere Strahlenempfindlichkeit als Glioblastome und Weichteilsarkome, und werden deshalb mit wesentlich geringeren Dosen bestrahlt. Allerdings gibt es auch innerhalb einer Tumorentität eine eindeutige Variation in der Empfindlichkeit der einzelnen Tumoren. Die Ursachen für diese Variation sind nicht vollständig aufgeklärt. Mit Sicherheit ist der Unterschied in der Oxygenierung der Tumoren einer der wichtigsten Faktoren, die diese unterschiedliche Empfindlichkeit beeinflussen. Als weitere bedeutsame Faktoren werden aber auch eine unterschiedliche Reparaturkapazität der Tumorzellen mit einer möglicherweise daraus folgenden Therapieresistenz sowie eine variable Akzeptanz gegenüber einem genomisch instabilen Karyotyp für das unterschiedliche Therapieansprechen der Tumoren diskutiert.

### 2.1. Bedeutung der Expression von Reparaturproteinen für die Prognose bei Tumorpatienten

Es besteht die Vorstellung, dass eine Überexpression von DNA-Reparaturproteinen eine Resistenzentwicklung gegenüber therapeutisch wirksamen Agenzien wie z.B. platinhaltigen Chemotherapeutika oder ionisierender Strahlung zur Folge haben könnte. Eine hohe Konzentration an Reparaturproteinen würde die Reparatur therapeutisch induzierter DNA-Schäden verbessern und somit der Tumorzelle einen Vorteil verschaffen. Eine schlechtere Therapierbarkeit der Patienten, sowie damit einhergehend eine deutlich schlechtere Prognose wären die Folge. Tatsächlich führten die diesbezüglich durchgeführten Untersuchungen zu sehr gegensätzlichen Ergebnissen.

Wurde die Expression von Proteinen des Nicht-Homologen-Endjoinings (NHEJ), dem für die Doppelstrangbruchreparatur bedeutsamsten Reparaturweg untersucht, so zeigte eine hohe Expression eine reduzierte Prognose für Patienten mit einem Rektumkarzinom (Komuro et al., 2002) und bei akuter lymphatischer Leukämie (ALL, Chen et al., 2005), allerdings eine verbesserte Prognose bei Tonsillenkarzinomen (Friesland et al., 2003). Auf die Prognose beim

kolorektalen Karzinom wurde kein Effekt der Expression der Proteine beobachtet (Grabsch et al., 2006) und sogar eine deutlich bessere Prognose bei niedriger Expression beim Nasopharynx-Karzinom (Lee et al., 2004).

Untersuchungen bezüglich des anderen für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen bedeutsamen und als fehlerfrei postulierten Reparaturweges, der homologen Rekombination (HR), zeigten ebenfalls kein einheitliches aber ein deutlicheres Bild. So konnte eine Überexpression von RAD51 in mehreren Pankreaskarzinomlinien (Maacke et al., 2000a), in Zelllinien von Tumoren unterschiedlicher Herkunft (Raderschall et al., 2002) und in Serien von Patienten mit einem Pankreaskarzinom (Maacke et al., 2002) nachgewiesen werden. In den meisten immunhistochemischen Untersuchungen von Tumorbiopsien zeigte sich, dass die Überexpression von Reparaturproteinen der homologen Rekombination mit einer deutlich verschlechterten Prognose bei Tumorpatienten einhergeht (Maacke et al., 2000b, Qiao et al., 2005, Conell et al., 2006). Allerdings wurde auch beobachtet, dass eine niedrige Expression von Reparaturproteinen der HR zu einer schlechteren Prognose bei prämenopausalen Patientinnen mit einem Mammakarzinom führen kann (Söderlund et al., 2007).

## **2.2. Bedeutung der Reparatur von DNA-Schäden zum Erhalt der genomischen Stabilität**

Der Erhalt und die korrekte Weitergabe des genetischen Materials ist für alle lebenden Organismen von essentieller Bedeutung. Die Integrität des Genoms ist jedoch durch Schädigung der DNA kontinuierlich gefährdet. DNA-Schäden werden durch endogene wie exogene Prozesse verursacht. Endogene DNA-Schäden, beispielsweise durch freie Sauerstoffradikale oder fehlerhaft arbeitende Topoisomerasen erzeugt, entstehen im Laufe des normalen Zellstoffwechsels und können zu einem Kollaps der Replikation führen. Weitere endogen erzeugte Schäden werden durch inkorrekte mitotische oder meiotische Rekombinationsereignisse oder einfach durch thermische Fluktuation erzeugt. Zu den exogenen genotoxischen Substanzen gehören Chemikalien und Strahlung.

Neben UV-Strahlung schädigt vor allem ionisierende Strahlung die DNA, wobei die Belastung der deutschen Bevölkerung durch ionisierende Strahlen zur Hälfte auf natürliche Quellen, wie Radon und seine Zerfallsprodukte, zur anderen Hälfte auf künstliche Quellen, wie die medizinische Röntgendiagnostik zurückzuführen ist. Beispielsweise erzeugt ein Gray Röntgenstrahlung 3000 bis 4000 Basenschäden pro Zelle, 1000 Einzelstrangbrüche und 40 Doppelstrangbrüche (double strand breaks, DSB) (Dikomey et al., 2001). Darüber hinaus treten gehäufte Läsionen (200 bis 400/Zelle/Gy) und Vernetzungen (*crosslinks*) zwischen Proteinen und DNA und den DNA-Strängen (150 bis 200/Zelle/Gy) auf (Dikomey et al., 2001). Bei

fehlender sowie fehlerhafter Entfernung dieser DNA-Schäden können Mutationen entstehen, die ihrerseits zum Absterben der Zelle oder zur Transformation führen können. Das Erkennen und die Reparatur solcher Schäden ist lebensnotwendig für die Zelle, der Erhalt der genomischen Stabilität ihre wichtigste Aufgabe. Zu diesem Zweck existieren in allen Organismen komplexe und genau regulierte Reparaturmechanismen. So gibt es für die einzelnen Schadenstypen entsprechende Reparaturwege, wobei die Reparaturgenauigkeit vor allem in Hinblick auf die Tumorentstehung eine sehr bedeutende Rolle spielt. Basenschäden und Einzelstrangbrüche werden durch die Basenexzisions-, Nukleotidexzisions-, oder Mismatchreparatur beseitigt, indem der intakte komplementäre Strang als Matrize für die Wiederherstellung der Originalsequenz dient. Vernetzungen zwischen beiden DNA-Strängen bzw. zwischen DNA und Protein werden vermutlich durch die Koppelung verschiedener Mechanismen repariert, DNA-Doppelstrangbrüche durch nicht-homologes-Endjoining (NHEJ) oder homologe Rekombination (HR).

Ein Defekt in der Reparatur von DNA-Schäden hat das Potential, die Mutationsrate zu erhöhen. Die dadurch verursachten genetischen Veränderungen können auf die nächste Zellgeneration übertragen werden und in einer zunehmenden Instabilität der genetischen Information resultieren. Ursächlich dafür können Aneuploidie, Translokationen, Telomerverkürzung sowie Mikrosatelliten-Instabilität sein (Prochownik, 2005, Kops et al., 2005, Wagener, 1999, Blasco, 2005). Geht die genomische Instabilität einer Zelle mit einer veränderten Genregulation einher, kann die Zelle transformieren und in der Folge ein Tumor entstehen. Das zeigt sich am Beispiel des hereditären nonpolypösen kolorektalen Karzinoms (HNPCC), einer autosomal-dominant vererbten Tumorerkrankung. Bei den betroffenen Patienten ist die Mismatch-Reparatur beeinträchtigt, so dass Fehler während der Replikation nicht adäquat beseitigt werden können. Dadurch akkumulieren Mutationen in Zellen, aus denen in der Folge ein Karzinom entstehen kann (Wagener, 1999).

Zahlreiche weitere Erkrankungen die mit einer fehlerhaften DNA-Reparatur assoziiert sind führen zu einer vermehrten Tumorentstehung: z.B. *Xeroderma pigmentosum*, *Ataxia teleangiectasia*, das *Nijmegen breakage syndrome*, das Werner Syndrom, das Bloom Syndrom oder die Fanconi Anämie (Pfeiffer et al., 2000; Thompson und Schild, 2002; van Gent et al., 2001).

### **2.3. Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen**

Es wird allgemein angenommen, dass Doppelstrangbrüche die bedrohlichsten Läsionen der Zelle darstellen, da beide Stränge der DNA geschädigt wurden (Khanna und Jackson, 2001; van

Gent et al., 2001), und die Information zur Reparatur nicht vom komplementären Strang abgelesen werden kann. Ein Doppelstrangbruch kann somit zu einem Verlust an genetischer Information von mehr als 100 Millionen Basenpaaren führen, wenn z. B. ein ganzer Chromosomenarm verloren geht (Helleday et al., 2007). In Säugetierzellen erfolgt die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch NHEJ oder HR. Die Wahl des Reparaturweges wird von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst (Helleday et al., 2007). Ein wesentlicher Faktor ist das Zellzyklusstadium, in welchem der Doppelstrangbruch entsteht. Es wird allgemein angenommen, dass das NHEJ, welches eine Verknüpfung der freiliegenden Enden durchführt, in allen Zellzyklusphasen zum Einsatz kommt, während die meisten homologen Ereignisse zwischen Schwesterchromatiden und demnach größtenteils in der S/G2-Phase stattfinden (Stark et al., 2003; Rothkamm et al., 2003). Aus diesem Grund könnte die HR-vermittelte Reparatur besonders in sich replizierenden Zellen, wie z.B. Tumorzellen, von Bedeutung sein. Weiterhin hängt die Wahl des Reparaturweges von der Struktur der freiliegenden DNA-Enden ab.

DNA-Doppelstrangbrüche können mit einem offenen Ende oder mit zwei offenen Enden auftreten. Einseitige Doppelstrangbrüche können entstehen wenn die Replikationsgabel mit einem nicht reparierten DNA-Schaden kollidiert, zweiseitige Doppelstrangbrüche entstehen, wenn ein doppelsträngiges DNA-Molekül in zwei Teile gebrochen wird. Im Gegensatz zu den einseitigen Doppelstrangbrüchen können zweiseitige Doppelstrangbrüche in allen Zellzyklusphasen auftreten und hauptsächlich über das NHEJ repariert werden. Einseitige Doppelstrangbrüche treten dagegen nur in der S-Phase auf und können als sekundäre Doppelstrangbrüche betrachtet werden; sie können aus Basenschäden, Einzelstrangbrüchen und DNA-Vernetzungen entstanden sein, die auf eine Replikationsgabel treffen, zum Zusammenbruch derselben führen und damit zur Entstehung eines Doppelstrangbruchs. Diese an Replikationsgabeln entstandenen Doppelstrangbrüche werden wahrscheinlich ausschließlich durch die HR akkurat repariert (Helleday et al., 2007). Die ausbleibende oder fehlerhafte Reparatur eines Doppelstrangbruchs kann zu Chromosomenaberrationen führen und somit die Integrität des Genoms stark gefährden.

### 2.3.1. Nicht homologes Endjoining

Bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch das NHEJ wird keine oder nur eine 1-6 Basenpaare lange Homologie für die Verknüpfung der beiden DNA-Enden benötigt. Es gibt mindestens zwei verschiedene Wege des NHEJ. Der vorrangige wird durch Bildung eines Heterodimeres der Proteine Ku70 und Ku80 an die freien DNA-Enden, der Aktivierung der katalytischen Untereinheit, DNA-PKCS, unterstützt durch das Protein Artemis vermittelt und

durch den die Ligation durchführenden Komplex IV/XRCC4/XLF abgeschlossen. Der zweite Weg des NHEJ ist nur nachweisbar, wenn das KU70/80-Heterodimer nicht funktional ist. Mittels NHEJ werden zwei DNA-Enden relativ unabhängig von ihrer Sequenz miteinander ligiert. Der Prozess ist bei nicht kompatiblen Enden in der Regel ungenau, da der Doppelstrangbruch zunächst in eine ligierbare Form überführt wird und dabei Insertionen oder Deletionen auftreten (Pfeiffer, 1998; Helleday et al., 2007).

### 2.3.2. Homologe Rekombination

Die HR ist ein universeller Prozess der von Bakterien bis zu Säugetieren hoch konserviert ist. Sie gewährleistet während der Meiose die Schaffung genetischer Vielfalt in Keimzellen (Keeney, 2001), dient neben der fehlerfreien DSB-Reparatur in mitotischen Zellen (Richardson et al., 1998) dem Neustart so genannter angehaltener Replikationsgabeln (*stalled replication forks*, Alberts, 2003) sowie dem Erhalt der Telomerlänge in Zellen mit fehlender Telomerase (Neumann und Reddel, 2002). Ein Defekt in der HR resultiert in einer erhöhten Sensibilität gegenüber genotoxischen Substanzen, mit einer daraus folgenden erhöhten Anzahl von Chromosomenaberrationen und einer erhöhten genomischen Instabilität.

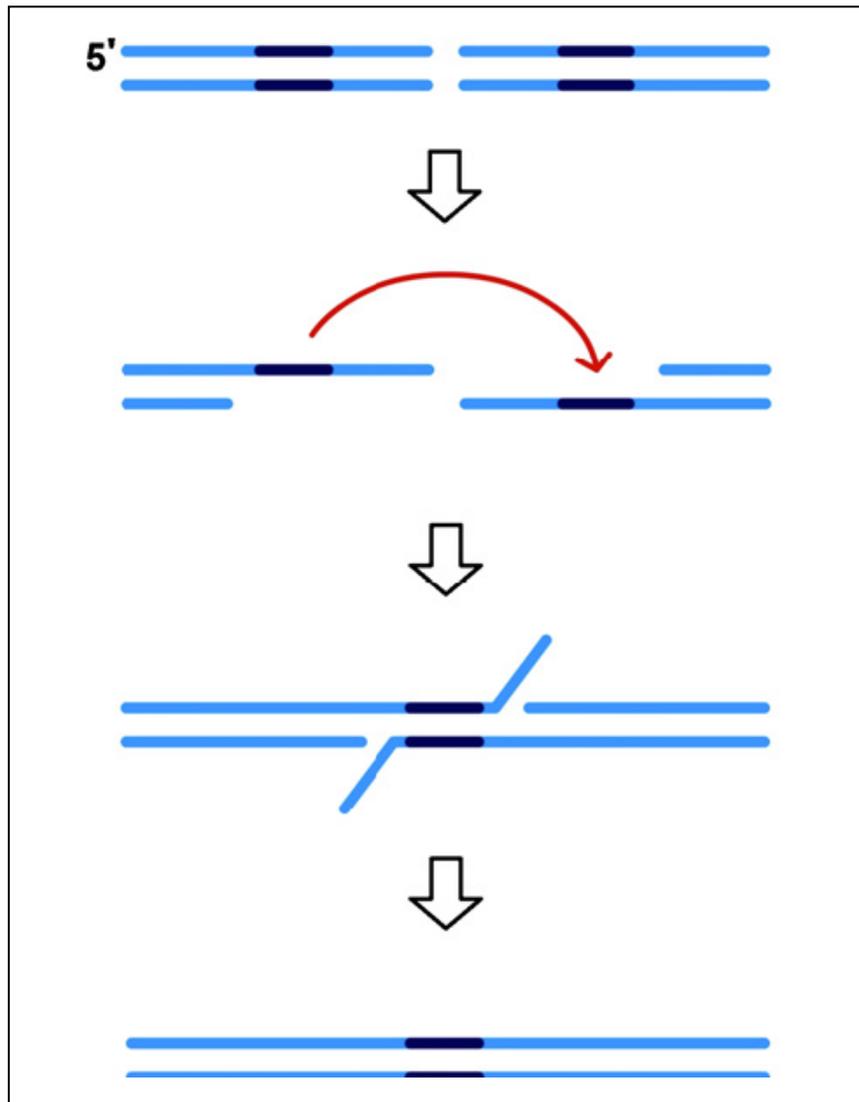
Während durch das NHEJ zwei Enden eines Doppelstrangbruches nicht selten fehlerhaft miteinander ligiert werden, bedient sich die HR einer anderenorts im Genom lokalisierten Matrize, um geschädigte oder fehlende Sequenzinformationen an der Bruchstelle zu resynthesisieren.

Nach Pfeiffer et al. (2004) sowie Paques und Haber (1999) wird die nicht-konservative HR, das sogenannte *single-strand annealing* (SSA), von der konservativen HR (Genkonversion) unterschieden. Die letztgenannte kopiert zur Reparatur des Doppelstrangbruchs das Schwesterchromatid oder das homologe Chromosom und ermöglicht eine fehlerfreie DSB-Reparatur, wohingegen es bei der erstgenannten zum Verlust von DNA-Sequenzen kommen kann. Allen Homologie-vermittelten Reparaturwegen gemeinsam ist der einem Doppelstrangbruch nachstehende in 5'-3'-Richtung erfolgende Abbau von Nukleotiden zur Schaffung eines freien, einzelsträngigen 3'-Endes.

#### 2.3.2.1. Nicht-konservative Homologe Rekombination

Zweiseitige Doppelstrangbrüche, die zwischen zwei sich wiederholenden DNA-Sequenzen, so genannten *repeats* auftreten, können über das *single strand annealing* repariert werden (Abb. 1). Hierbei werden die DNA-Enden reseziert, so dass lange einzelsträngige Enden entstehen. Die Überhänge werden zusammengefügt, wobei die komplementären Stränge der homologen

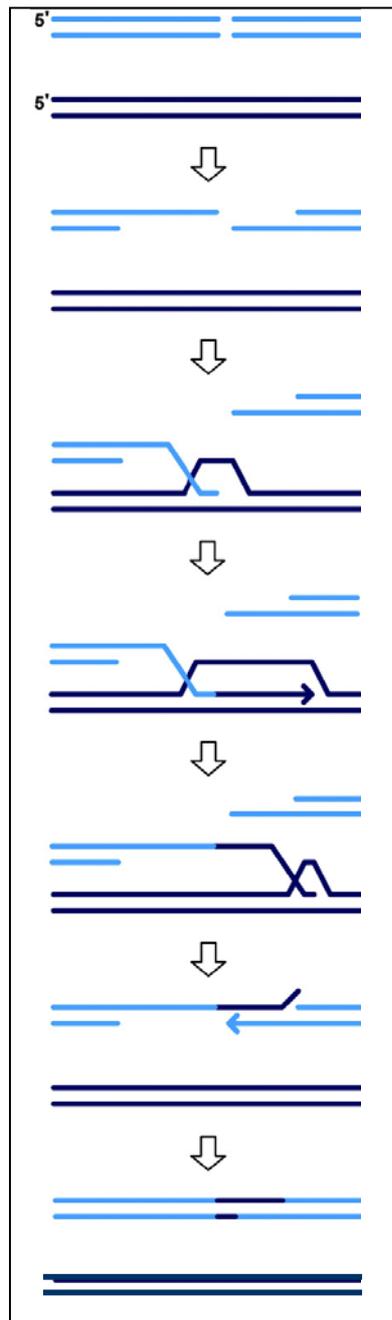
Sequenz hybridisieren und die überstehenden Enden abgebaut werden. Dieser Prozess wird RAD51-unabhängig durch die Proteine RPA und RAD52 ermöglicht. Hierbei gehen sowohl die Sequenzen zwischen den *repeats* als auch ein *repeat* selbst verloren. Dieser Prozess führt zu Deletionen, das SSA gilt daher als fehlerbehaftet.



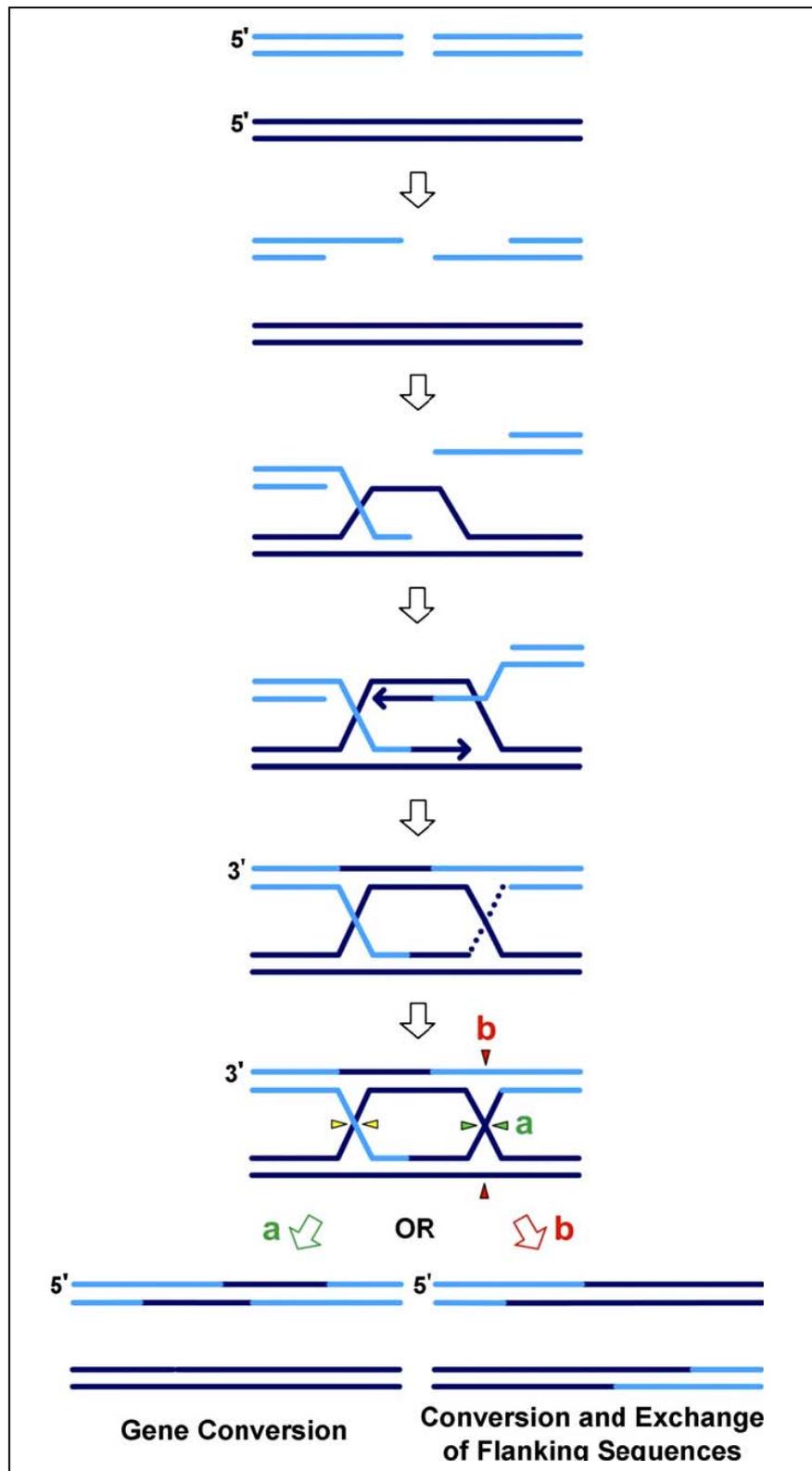
**Abbildung 1:** Modell des *single strand annealing* (SSA). Dunkle Areale markieren homologe Sequenzen von 50-100bp, die für die fehlerfreie Reparatur herangezogen werden (Grafik entnommen aus Helleday et al., 2007).

### 2.3.2.2. Konservative Homologe Rekombination

Der Prozess der konservativen HR wird in die untergeordneten Wege *synthesis dependent strand annealing* (SDSA), klassisches Holliday-Modell mit einer einseitigen oder einer zweiseitigen Holliday-Struktur und *breakage induced replication* (BIR) unterteilt. Allen gemein ist die Möglichkeit zur akkuraten Reparatur des Doppelstrangbruches (Helleday et al., 2007).



**Abbildung 2:** Modell des *synthesis dependent strand annealing* (Entnommen aus Helleday et al., 2007).



**Abbildung 3:** Klassisches Holliday-Modell für die Homologie-vermittelte Reparatur von zweiseitigen DSB (Entnommen aus Helleday et al., 2007).

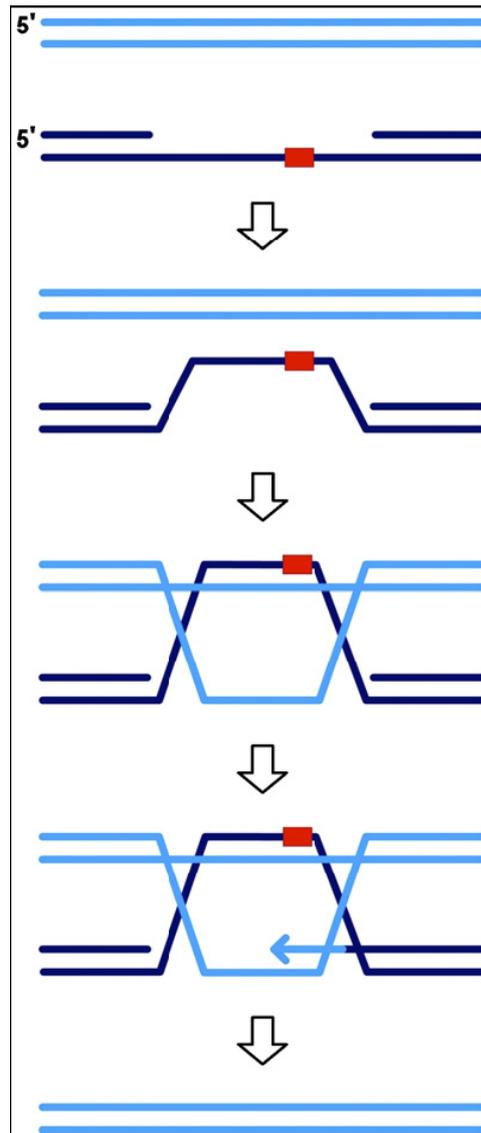
Das *synthesis dependent strand annealing* (Abb. 2) gilt als der bevorzugte Homologie-vermittelte Mechanismus, um zweiseitige Doppelstrangbrüche zu reparieren. Nach dem in 5`-3`-Richtung erfolgenden Abbau der Nukleotide mit einem daraus resultierenden einzelsträngigen Überhang findet eine Proteinbindung unter Ausbildung eines Nukleoproteinfilamentes statt. Dieses Nukleoproteinfilament leitet die Invasion des geschädigten Stranges in das Schwesterchromatid ein, wodurch eine Heteroduplex-DNA entsteht. Durch diesen Prozess wird ein DNA-Strang verdrängt und ein so genannter D-Loop gebildet. Es folgt die DNA-Synthese am 3`-Ende zur Wiederherstellung der fehlenden Sequenzen im Bereich der Bruchstelle. Die Kreuzungsstelle der DNA-Stränge an der Grenze zwischen Hetero- und Homoduplex-DNA wird *Holliday junction* genannt und ist mithilfe von Proteinbindungen in der Lage zu gleiten. Dieser Prozess, der auch als *branch migration* bezeichnet wird, ermöglicht die Freigabe des neusynthetisierten DNA-Stranges und dessen Bindung an das andere Ende des Doppelstrangbruches, wo er nun als Matrize für die Reparatursynthese des zweiten DNA-Stranges dient. Auf diese Weise kommt es zu einem Transfer von Sequenzinformationen, der auch als Genkonversion bezeichnet wird.

Das klassische Holliday junction Modell (Abb. 3) unterscheidet sich vom SDSA nur durch die Ausbildung zweier anstatt einer Holliday-Struktur mit einem D-Loop. Es entspricht dem klassischen Modell der Homologen Rekombination und dient der Erklärung von Genkonversionen und *crossover*-Ereignissen, die simultan nach einem Doppelstrangbruch während der Meiose auftreten können. Bei diesem Modell dringen beide resezierten einzelsträngigen Enden des DNA-Doppelstrangbruches in den intakten homologen DNA-Strang ein und bilden eine doppelte Holliday-Struktur aus, die endonukleolytisch aufgelöst werden muss. Je nachdem, wie die Holliday-Strukturen aufgelöst werden, kommt es zu einem *crossing-over* oder einer Genkonversion.

Die Reparatur mittels BIR erfolgt nur bei der Ausbildung eines einseitigen Doppelstrangbruchs, der durch die Kollision eines Einzelstrangbruches oder eines Basenschadens mit einer Replikationsgabel zum Anhalten derselben und daraus folgend zur Ablösung der Polymerase führt. Erfolgt der Bruch im *leading*-Strang kann es zu einer kovalenten Bindung mit dem neu synthetisierten *lagging*-Strang kommen. Bei Auflösung der Holliday-Struktur führt dies dann zu einem Schwesterchromatid-Austausch.

Es gibt Hinweise darauf, dass die homologe Rekombination auch dazu dient, die Replikation blockierende Läsionen zu umgehen. Wenn die Replikation des *lagging*-Stranges durch die Läsion unterbrochen, die Polymerase entfernt wird, entsteht eine Lücke zwischen den aufeinander folgenden Okazaki-Fragmenten. In diesem Fall kommt es zu dem Prozess des

*template switching* (Abb. 4). Die entstehende Einzelstranglücke initiiert durch Proteinbindung einen vorübergehenden Strangaustausch. So wird, indem der gegenüberliegende Strang als Matrize genutzt wird, die Replikation fortgesetzt. Das sogenannte *template switching* ermöglicht allerdings lediglich die Umgehung der Replikationsblockade; um den eigentlichen Schaden zu entfernen, werden weitere Reparaturmechanismen benötigt.

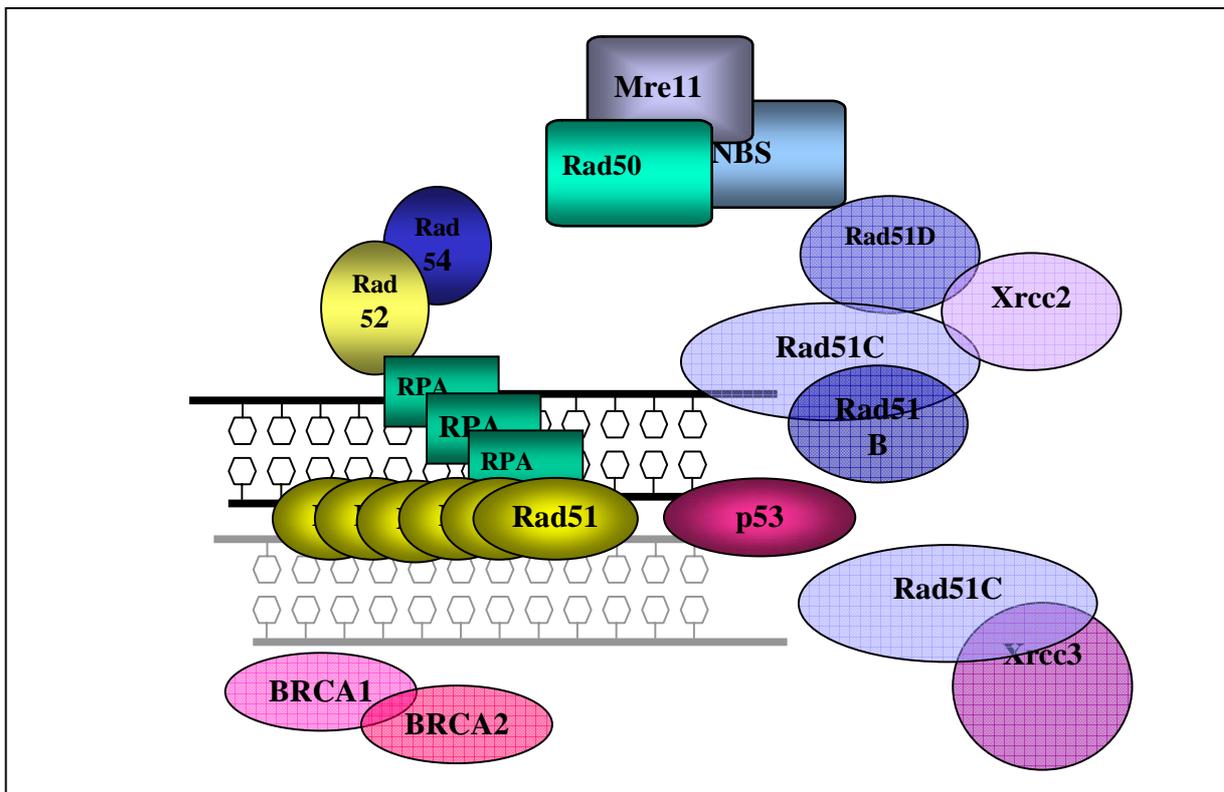


**Abbildung 4:** Modell des *template switching*, um Läsionen zu reparieren, die während der Replikation entstehen und zu einer Lücke zwischen den Okazaki-Fragmenten führen (entnommen aus Helleday et al., 2007).

Das Protein RAD51 spielt eine zentrale Rolle bei fast allen Homologie-vermittelten Reparaturereignissen. Mit Hilfe der assoziierten Proteine BRCA2, RAD52, RAD54, RAD54B sowie den RAD51 Paralogen RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 und XRCC3 bildet RAD51 ein Nukleoproteinfilament, welches das Auffinden von Homologien sowie die Stranginvasion ermöglicht.

#### 2.4. RAD51

RAD51 ist das Schlüsselprotein der homologen Rekombination und bildet durch Polymerisation auf der geschädigten, einzelsträngigen DNA ein Nukleoproteinfilament. Es vermittelt die homologe Paarung, die Stranginvasion sowie den Strangaustausch zwischen der geschädigten und der zur Reparatur notwendigen homologen, doppelsträngigen DNA. Darüber hinaus sind weitere Proteine der Rad52-Epistasisgruppe sowie die Tumormarker BRCA1, BRCA2 und p53 in den Prozess involviert (Abb. 5).



**Abbildung 5:** Proteine der homologen Rekombination: Rad51, Rad52-Epistasisgruppe (Rad50, Mre11, NBS, Rad51B, Rad51C, Rad51D, Rad52, Rad54, RPA, Xrcc2, Xrcc3), RPA und die Tumormarker BRCA1, BRCA2 und p53.

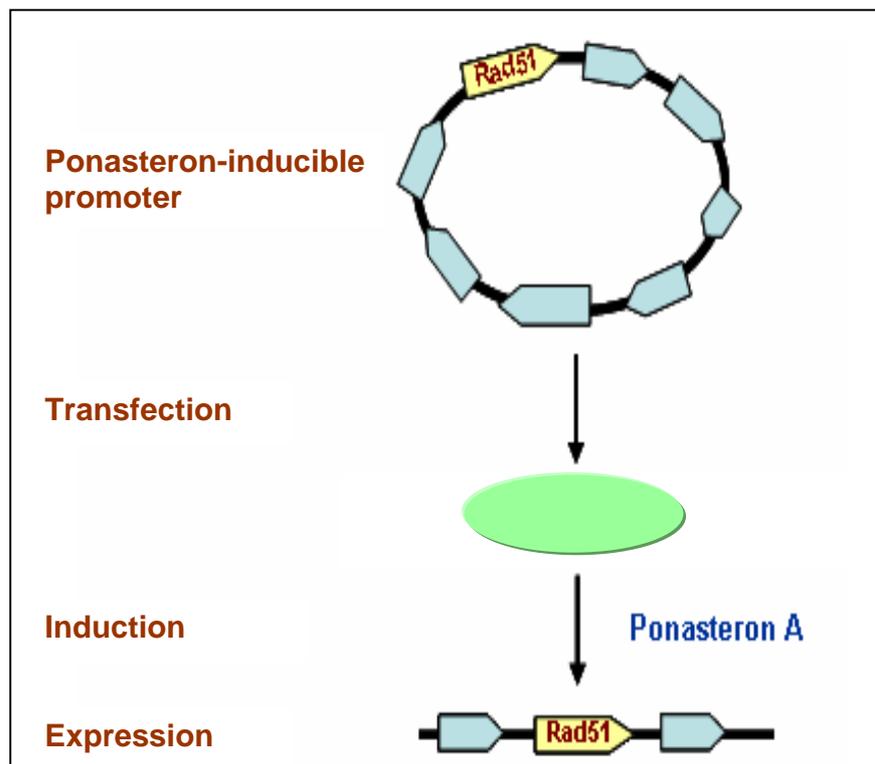
Die essentielle Rolle, die RAD51 und die homologe Rekombination beim Erhalt der genomischen Stabilität spielen, zeigt sich anhand der Folgen einer Dysregulation von RAD51. Die Suppression der RAD51-Expression bewirkt eine Akkumulation von Chromosomenaberrationen in Zellen von Vertebraten, die Zellteilung kommt zum Erliegen (Sonoda et al., 1998). Rad51-Nullmutationen führen bei Mäusen zum frühen embryonalen Tod (Lim et al., 1996).

Die Überexpression von RAD51 hatte in unterschiedlichen Studien eine gesteigerte Rate der Rekombination, eine erhöhte Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung (Vispe et al., 1998), eine erniedrigte Angehrate, einen G2-Arrest sowie eine vermehrte Apoptose (Flygare et al., 2001) zur Folge. Eine andere Studie fand neben einer reduzierten Anzahl an G2-Aberrationen und einer Wachstumsverzögerung eine Resistenz gegenüber DNA-Schäden-induzierter Apoptose (Raderschall et al., 2002). Zusammenfassend legen diese Ergebnisse nahe, dass eine Hochregulation des RAD51-Proteins mit einer erhöhten genomischen Instabilität einhergeht und damit einen Beitrag zur Tumorphagenese leisten könnte. Aufgrund der Widersprüchlichkeit der verfügbaren Daten wurde in der vorliegenden Arbeit mit zwei isogenetischen Tumorzelllinien gearbeitet. Es sollten die Auswirkungen einer RAD51-Überexpression vor allem auf chromosomaler Ebene untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die Zelllinien mit unterschiedlicher RAD51-Expression vor und nach Bestrahlung hinsichtlich Chromosomenaberrationen, Zellzyklusverteilung und Koloniebildungsfähigkeit miteinander verglichen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Zelllinien

Die Experimente wurden mit den Zelllinien UiRad51 und UiLacZ durchgeführt. Beide Linien wurden aus einem humanen Osteosarkom mit geringer endogener RAD51-Eypression generiert (Abb. 6, Maacke et al., 2000). In die UiRad51-Zellen wurde mittels eines Plasmids die Sequenz des humanen Rad51-Gens eingeführt, das unter die Kontrolle eines durch das Juvenilhormon Ponasteron induzierbaren Promoters gestellt wurde. Zur Überprüfung des Effektes der Transfektion wurde parallel eine isogenetische Linie, UiLacZ, hergestellt, die an Stelle des Rad51-Gens, das aus der Hefe stammende  $\beta$ -Galaktosidase-Gen enthielt. Die Expression des Rad51- bzw.  $\beta$ -Galaktosidase-Gens wurde durch Zugabe von Ponasteron ( $1\mu\text{mol}$ ) und einer Inkubationszeit von 24 h induziert. Zur Aufrechterhaltung der Transfektion wurde das Plasmid mit jeweils einem Resistenzgen gegen Zeocin und Neomycin ausgestattet.



**Abb.6:** Induktion der RAD51-Überexpression mittels eines Hormon-induzierbaren Systems. Nach Transfektion der Osteosarkomzellen mit dem humanen Rad51-Gen, das unter Kontrolle eines ponasteroninduzierbaren Promoters steht, kann eine RAD51-Expression durch Zugabe von Ponasteron in das Kulturmedium erzielt werden. Die Aufrechterhaltung der Transfektion wird durch Antibiotikaresistenzen gewährleistet.

### 3.2 Zellkulturhaltung

Die Zellkulturhaltung erfolgte durch Aussaat der Zellen in Gewebekulturflaschen (Falcon) unter Zugabe des Nährmediums DMEM, welches mit fetalem Kälberserum, Zeocin und G 418 versetzt wurde, bei 37°C in einem Inkubator mit 10 % CO<sub>2</sub>. Ein- bis zweimal wöchentlich wurde das Medium entfernt und die Zellen für 1-2 min mit 5 ml 0,25 % Trypsin versetzt um die Haftung der Zellen am Flaschenboden aufzuheben. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Kulturmedium resuspendiert und in geringerer Dichte neu ausgesät.

### 3.3 Western Blot

#### 3.3.1. Proteinisolierung

Die Extraktion von Proteinen wurde nach Finnie et al. (1995) durchgeführt. Bei dieser Methode wird das gesamte Protein der Zelle extrahiert.

Zunächst wurden die Zellen mit 5 ml 0,25% Trypsin abgelöst und sofort in Kulturmedium (DMEM) aufgenommen. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei 4°C und auf einer sterilen Werkbank (Heraeus), um eine Degradation oder Kontamination des Proteinextraktes zu verhindern. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und 8 min mit 328 g bei 4°C zentrifugiert (Labofuge 400R). Anschließend wurde der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe vorsichtig abgesaugt. Das Zellsediment wurde in 5 ml kaltem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand erneut mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das Zellsediment wurde in 1 ml kaltem PBS resuspendiert und in ein steriles 1,5 ml Transfektionsgefäß transferiert. Die Zellsuspension wurde erneut bei 4°C mit 151 g für 8 min zentrifugiert (Microfuge R). Parallel wurde ein 146 µl Aliquot des Puffers A auf Eis aufgetaut, mit 5 µl PMSF und 50 µl Glycerol versetzt und gemischt. Das Volumen des Zellsediments wurde abgeschätzt, und es wurde ein dem Sedimentvolumen gleiches Volumen an Extraktionspuffer zugegeben. Bei einem sehr kleinen Sediment wurden 20 µl Extraktionspuffer eingesetzt. Die Zellen wurden in dem Extraktionspuffer resuspendiert. Anschließend wurden die zellulären Strukturen durch plötzliches Gefrieren aufgebrochen. Hierfür wurde das Reaktionsgefäß abwechselnd 1 min in flüssigem Stickstoff und 1 min im 37 °C warmen Wasserbad inkubiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt viermal wiederholt. Anschließend wurden die Zellbestandteile für 10 min bei 10822 g und 4 °C (Microfuge R) sedimentiert. Der Proteinextrakt wurde abgenommen, in ein neues, steriles 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt und gemischt. Für die Proteinbestimmung wurden 2 µl des Extraktes

abgenommen. Der verbleibende Zellextrakt wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

### 3.3.2. Proteinbestimmung

Für die Quantifizierung der extrahierten Proteine wurde die BCA-Methode (Smith et al., 1985) mit dem Reagenz der Firma Pierce eingesetzt. Basierend auf der Biuret-Reaktion werden  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen durch das Protein zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert und bilden einen Komplex mit einem kolorimetrischen Reagenz, das Bicinchoninsäure (BCA) enthält. Der Komplex absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 562 nm. Die Absorption steigt im Messbereich zwischen 20 und 2.000  $\mu\text{g/ml}$  linear mit der Proteinkonzentration an.

2  $\mu\text{l}$  des Proteinextraktes wurden in 48  $\mu\text{l}$  sterilem  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. verdünnt. Als Blindprobe diente  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. Das Farbreagenz wurde durch Mischen von 50 Teilen Reagenz A mit einem Teil Reagenz B angesetzt. Zu den verdünnten Proteinextrakten und der Blindprobe wurden je 1 ml Farbreagenz gegeben. Die Proben wurden gemischt und 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Proben kurz bei Raumtemperatur abgekühlt, in Küvetten transferiert und die Extinktion bei 562 nm im Photometer gemessen. Jede Messung wurde innerhalb von 10 min vollendet.

Als Standard diente Rinderserumalbumin. Die Standardkurve wurde mit sechs Verdünnungen zwischen 25 und 1000  $\mu\text{g/ml}$  BSA aufgenommen und im Gerät gespeichert. Jeder Standardwert wurde dreimal bestimmt.

### 3.3.3. Nachweis der Proteine

20  $\mu\text{g}$  Proteinextrakt wurden mit 5x Probenpuffer und  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. versetzt, gemischt und für 8 min im kochenden Wasserbad denaturiert. Das Volumen der Probe durfte 25  $\mu\text{l}$  nicht überschreiten. Die gekochten Proben wurden auf Eis gekühlt und kurz zentrifugiert. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht erfolgte durch ein 12,5 %iges Tris-HCl Polyacrylamid-Gel für 5 min bei 100 V (Sammelphase) und 70 min bei 200 V (Trennphase). Die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte im Criterion Blotter (BioRad) für 25 min bei 100 V im Kühlschrank. Vor dem Transfer wurde die Membran 10 sec in Methanol aktiviert und 5 min in aqua bidest. gewaschen. Anschließend wurden sowohl das Gel als auch die Membran 5 min in Towbin-Transferpuffer äquilibriert. Nach dem Transfer wurde die Membran einmal kurz mit PBS abgespült und zur Blockade der freien Bindungsstellen für 1 h mit 5% MM-PBS blockiert. Anschließend wurde die

Membran einmal kurz mit PBST abgespült und dreimal 10 min mit PBST unter Schütteln gewaschen.

#### 3.3.4. Detektion der Proteine

Die Detektion des RAD51-Proteins erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen das RAD51-Protein über Nacht unter Schütteln bei 4°C. Zur Detektion des Proteins TP53 wurde ein monoklonaler Antikörper gegen das TP53-Protein verwendet, die Inkubation erfolgte über Nacht unter Schütteln bei 4°C. Die Detektion des p21-Proteins erfolgte mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen das p21-Protein über Nacht unter Schütteln bei 4°C.

Nach Detektion der Proteine wurde die Membran erneut einmal kurz mit PBST abgespült und dreimal 10 min mit PBST gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Antikörper für 1 h unter Schwenken. Die Membran wurde einmal kurz und dreimal 10 min mit PBST gewaschen. Zur Detektion wurde das *ECL Western Blotting Detection Reagent* eingesetzt. Je 1 ml der ECL-Lösungen 1 und 2 wurden gemischt, auf die Membran pipettiert und für 1 min inkubiert. Die Lösung wurde mit Filterpapier aufgesaugt und die Membran ohne Luftblasen eingeschweißt. Das Chemolumineszenz-Signal wurde zunächst mit einer ultrasensitiven CCD-Kamera (NightOwl) mit Hilfe der Software Winlight aufgezeichnet und quantitativ analysiert. Im Anschluss wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und durch 2-minütige Inkubation im Entwickler und 2-minütige Inkubation im Fixierer mit anschließendem Wässern entwickelt. Als quantitative Kontrolle wurde auf derselben Membran  $\beta$ -AKTIN nachgewiesen.

Die Auswertung der aufgenommenen Chemolumineszenz-Signale erfolgte mit Hilfe der Software Winlight. Die relative RAD51-Menge errechnete sich, indem von den jeweils spezifischen RAD51- bzw.  $\beta$ -AKTIN-Signalen der Hintergrund abgezogen und das so korrigierte RAD51-Signal auf das korrigierte  $\beta$ -AKTIN-Signal normiert wurde.

### 3.4 Detektion der RAD51-Foci mittels Immunfluoreszenz

Nach Aussaat der Zellen auf Objektträger (*Culture Slides*, Becton Dickinson) wurden die Zellen mit Ponasteron (1  $\mu$ l/ml Medium) für 24 h inkubiert, mit 12 Gy bestrahlt und für weitere 8 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion der RAD51-Foci. Die Objektträger wurden aus den Kammern gelöst, einmal kurz und danach für 10 min in PBS gespült. Die anschließende Fixierung der Zellen erfolgte in 2% Formaldehyd in PBS für 15 min bei RT. Zur Permeabilisierung der Zellen wurden die Objektträger einmal kurz und dreimal 10 min in 0,1% Triton X-100 gewaschen und über Nacht in 0,5% BSA in PBS bei 4°C blockiert. Am nächsten

Tag wurde die Blockierung für 30 min im 37°C Inkubator fortgesetzt. Als erster Antikörper wurde ein polyklonaler Antikörper gegen das RAD51-Protein aus dem Kaninchen eingesetzt. Jeder Objektträger wurde mit 50 µl Antikörper-Lösung versehen und mit einem Kunststoff-Deckglas (Plastic Coverslip, Appligene Oncor) gegen Austrocknung geschützt. Nach Inkubation für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer wurden die Objektträger erneut einmal kurz und dreimal 10 min in 0,1% Triton X-100 gewaschen. Bei dem zweiten Antikörper handelte es sich um einen mit Fluorescein markierten Antikörper aus dem Kaninchen. Alle folgenden Schritte wurden ohne direkte Lichteinstrahlung durchgeführt. Erneut wurde jeder Objektträger mit 50 µl Antikörper-Lösung versehen, mit einem Kunststoffdeckglas geschützt, für 1 h bei 37°C in einer feuchten, abgedunkelten Kammer inkubiert und im Anschluss einmal kurz und dreimal 10 min in 0,1% Triton X-100, sowie weitere 10 min in PBS gewaschen. Zur Färbung der Kerne wurde 20 µl eines mit dem DNA-Farbstoff DAPI versetzten Antibleichmittels verwendet. Die Objektträger wurden mit Nagellack in Glas versiegelt. Die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop erfolgte quantitativ und qualitativ anhand Anzahl, Größe und Form der Foci.

### **3.5 Chromosomenaberrationen**

#### **3.5.1. Metaphasentechnik**

Der Einsatz dieser Technik ermöglicht die Visualisierung kondensierter Chromosomen. Sie basiert darauf, dass die mitotische Zellteilung in der Metaphase unterbrochen wird. Zu diesem Zeitpunkt liegen die Chromosomen dicht kondensiert in der Äquatorialebene der sich teilenden Zelle vor und sind so bei entsprechender Färbung lichtmikroskopisch gut zu erkennen. Die Unterbrechung der Zellteilung erfolgte durch Zugabe von Colcemid, einem Derivat des Colchicins, einem Spindelfasergift, das die Ausbildung eines intakten Spindelfaserapparates in der mitotischen Zelle verhindert. Dadurch wird die Zelle in ihrer weiteren Teilung behindert und verharrt so am Ende der Metaphase.

Die mitotischen Zellen wurden von den Interphasezellen durch Abklopfen vom Boden der Kulturflaschen gelöst, in Spitzbodenröhrchen (Falcon) überführt und für 5 min bei 194 g und 20 °C zentrifugiert (Labofuge 400R, Heraeus), so dass sich die Zellen am Boden absetzten. Anschließend wurde der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Durch tropfenweise Zugabe von 10 ml 0,0075 M KCl auf dem Schüttler wurden die Zellen hypotonisch behandelt, wodurch es zu einer Volumenzunahme der Zellen kam. Erneut wurden die Zellen für 5 min bei 194 g und 20 °C zentrifugiert und der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe entfernt.

Anschließend wurden die Zellen mit 12 ml Methanol/Essigsäure im Verhältnis 3:1 (Carnoy's Fixativ) versehen. Die Zugabe erfolgte tropfenweise auf dem Schüttler, um einer Verklumpung der Zellen vorzubeugen. Die Zellen wurden bei 194 g und 20 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt, um wässrige Bestandteile möglichst zu entfernen. Dieser Fixierungsschritt wurde wiederholt, wobei der Überstand bis auf 1,5 ml entfernt wurde. Bei einer Lagerung bei -20 °C ist eine gleichbleibende Qualität der so präparierten Zellen für mehrere Monate gewährleistet.

Um ein mikroskopisch auswertbares Präparat herzustellen, wurde ein Objektträger mit einem homogenen Wasserfilm bedeckt. Anschließend wurden 25 µl der Zellsuspension aus einer Mikropipette auf den Objektträger gebracht, wobei der Alkohol der Suspension das Wasser verdrängte. Die Wechselwirkungen zwischen dem Alkohol und dem Wasser brachten die Zellen zum Platzen. Die Chromosomen wurden so auf dem Objektträger gespreizt. Nachdem das Präparat 20 min lang trocknete wurde es für 7 min in 2 ml Giemsa (Endkonzentration 2%) und 68 ml PBS gefärbt und der überschüssige Farbstoff anschließend in drei Waschschrritten mit H<sub>2</sub>O dest. entfernt. Der Giemsa-Farbstoff bindet spezifisch, sequenz-unabhängig an die DNA und lässt die Chromosomen im Lichtmikroskop rot/violett erscheinen. Das Präparat wurde getrocknet, in Entellan (Merck) eingebettet und mikroskopisch ausgewertet.

### 3.5.2. G<sub>0</sub>-Assay

Zur Untersuchung der Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung in der G<sub>0</sub>-Phase wurden die Zellen zunächst in der G<sub>0</sub>-Phase synchronisiert. Durch das Wachstum der Zellen entsteht nach einigen Tagen ein dichter Zellrasen. Bei entsprechender Dichte der Zellen kommt es zur Kontaktinhibition, die zu einer Einstellung der Teilungsaktivität führt. Die Zellen verlassen den Zellzyklus und verharren in der G<sub>0</sub>-Phase (auch Plateau-Phase genannt). Durch erneute Aussaat in geringerer Zellzahl werden die Zellen dann relativ synchron zur Proliferation stimuliert. Pro Zelllinie wurden vier Gewebekulturflaschen (0, 2, 4 und 6 Gy) in Anwesenheit von Ponasteron und vier (0, 2, 4 und 6 Gy) ohne Ponasteron mit gleicher Zellzahl angesetzt. Nach Erreichen der Plateau-Phase wurden vier der acht Kulturen mit jeweils 1 µg Ponasteron pro ml Medium für 24 h bei 37°C inkubiert und anschließend bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen in größere Gewebekulturflaschen ausgesät, um sie zur Teilung zu stimulieren.

Anschließend wurden die Zellkulturflaschen für 44 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert, nach Ablauf dieser Zeit mit 0,2 µg/ml Colcemid versehen und für weitere vier Stunden in den Brutschrank gestellt. Die akkumulierten, mitotischen Zellen wurden durch Abklopfen gewonnen. Hierbei wurde das Phänomen ausgenutzt, dass sich mitotische Zellen abrunden und

so ihre Haftung am Boden im Vergleich zu Interphasezellen reduzieren. Die Präparation der Chromosomen erfolgte mit der Metaphasentechnik.

### 3.5.3. G2-Assay

Pro Zelllinie wurden vier Gewebekulturflaschen mit gleicher Zellzahl angesetzt. Zwei Zellkulturflaschen (0 und 0.5 Gy) der exponentiell wachsenden Zellen wurden mit Ponasteron (1 µg/ml Medium) für 24 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde eine unbehandelte und eine mit Ponasteron behandelte Kulturflasche mit 0,5 Gy bestrahlt und jeweils eine Kulturflasche mit und eine ohne Ponasteronbehandlung als unbestrahlte Kontrolle mitgeführt. Im Anschluss an die Bestrahlung wurden die Zellen für 30 min bei 37°C inkubiert, danach für weitere 60 min in Anwesenheit von 0,2 µg/ml Colcemid bei 37°C inkubiert. Die akkumulierten mitotischen Zellen wurden durch Abklopfen gewonnen. Die Inkubationsperiode von 30 min nach Bestrahlung ohne Colcemid gewährleistete, dass Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der Metaphase befunden haben, weiterwanderten und nicht in die Auswertung eingingen; die darauf folgende kurze Colcemid-Inkubation von 60 min stellte sicher, dass nur Zellen, die zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der G2-Phase waren, analysiert wurden. Die Präparation der Chromosomen erfolgte mit der Metaphasentechnik.

## 3.6 Mikroskopie und Auswertung

Die Analyse der mit Giemsa gefärbten Chromosomen-Präparate erfolgte lichtmikroskopisch. Für jeden Dosiswert wurden 50 Metaphasen kodiert ausgewertet.

Im G0-Assay wurde jeweils die Zahl der Chromosomenfragmente, der dizentrischen Chromosomen und Ringchromosomen erhoben (Borgmann, 1999). Die strahleninduzierten zusätzlichen azentrischen Fragmente wurden ermittelt, indem die Zahl der Chromosomenfragmente unbestrahlter Zellen von denen der bestrahlten Zellen abgezogen wurde. Für die Zahl der letalen Chromosomenaberrationen wurden die Zahlen der strahleninduzierten zusätzlichen azentrischen Fragmente, der dizentrischen sowie der ringförmigen Chromosomen pro Zelle addiert.

Im G2-Assay wurden *gaps* (Lücken), Chromatid- und Isochromatidfragmente sowie Austauschaberrationen, wie Translokationen, Triradiale, Quadriale und Fusionen einzelner Chromatidarme gezählt. Ein *gap* wurde nur berücksichtigt, wenn er länger war als die Breite des Chromatids (Sanford et al., 1989). Die Werte unbestrahlter Zellen wurden von denen bestrahlter abgezogen, um nur die strahleninduzierten Chromatidtyp-Aberrationen zu ermitteln (Scott et al., 1999). Die Zahl der Brüche wurde wie folgt berechnet (Borgmann): Für einen *gap* und ein

Isochromatidfragment wurden zwei Brüche berechnet, für ein Chromatidfragment ein Bruch. Für eine Translokation und ein Quadriales wurden vier Brüche kalkuliert, für ein triradiales Chromosom drei Brüche und für ein an einem Arm fusioniertes Chromosom zwei Brüche.

### 3.7 Zellzyklusanalyse

Die Verteilung der Zellen im Zellzyklus wurde mittels der Durchflusszytometrie untersucht und an einem FACScan Durchflusszytometer durchgeführt. Die Zellen wurden mit Propidiumjodid als Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Das nach Anregung durch den geräteinternen Argonlaser von Propidiumjodid emittierte Licht kann hauptsächlich im Bereich FL-2 gemessen werden. Die Auswertung der Messdaten erfolgte computergestützt mit Hilfe der Software ModFit 3.0.

#### 3.7.1. Messung von Zellzyklusverteilung und DNA-Gehalt

Bei der Bestimmung der anteilmäßigen Verteilung der Zellen einer Zelllinie in einer gegebenen Probe auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus macht man sich die physiologischen Veränderungen im DNA-Gehalt der Zellkerne während des Durchlaufens des Zellzyklus zunutze. Geht man für eine einzelne Zelle in der G1-Phase (bzw. G0-Phase) von einem einfachen DNA-Gehalt aus, der als  $2n$  bezeichnet wird, so kann man für die G2/M-Phase einen genau verdoppelten DNA-Gehalt von  $4n$  erwarten. In der zeitlich zwischen G1/G0 und G2/M liegenden S-Phase sollte der DNA-Gehalt von  $2n$  auf  $4n$  stetig zunehmen. In der Tat kommen diese theoretisch zu erwartenden Werte des DNA-Gehalts proliferierender Zellen den in der Realität messbaren sehr nahe (Gray, 1974).

Die Zellen der zu untersuchenden Probe wurden in Ethanol fixiert und RNA-Moleküle durch Zugabe von RNase degradiert. Vor der Messung im Durchflusszytometer wurden dann die DNA-Moleküle mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid markiert. Die im Fluoreszenzbereich FL-2 bestimmte Emissionen pro Zelle korrelierte dann direkt mit deren DNA-Gehalt (Crissman *et al.*, 1976).

Der normale  $2n$ -DNA-Gehalt von menschlichen Zellen in der G1/G0-Phase verteilt sich auf 46 Chromosomen (22 Autosomempaaire und 2 Gonosomen). Die Zellen besitzen damit einen sogenannten diploiden Chromosomensatz. Die Tumorzelllinien UiRad51 und UiLacZ besitzen mit einer durchschnittlichen Chromosomenzahl von 71-76 einen hypertriploiden Chromosomensatz und damit einen erhöhten DNA-Gehalt ( $> 3n$ ). Misst man nun in der Durchflusszytometrie eine Mischung aus Zellen mit bekanntem DNA-Gehalt gemeinsam mit einer Probe der Tumorzellen, so lässt sich aus der Proportion der durchschnittlichen

Fluoreszenz der jeweiligen G1/G0-Phase-Zellen direkt auf den DNA-Gehalt der Tumorzellen schließen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zelllinien UiRad51 und UiLacZ jeweils mit und ohne Ponasteronzugabe bezüglich der Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus sowie bezüglich ihres DNA-Gehaltes durchflusszytometrisch untersucht.

### 3.7.2. Zellfixierung und Messung am FACScan

Zur Messung wurden je  $1 \times 10^6$  Zellen der Zelllinien UiRad51 und UiLacZ verwendet. Die Zellen wuchsen bis zur Konfluenz (ca. 70% in der G1-Phase), wurden dann durch Umsetzen zur Proliferation stimuliert und hernach mit  $1 \mu\text{mol}$  Ponasteron versetzt, bzw. ohne Ponasteron inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten nach Restimulierung wurden die Zellen geerntet und wie folgt behandelt. Die Zellen wurden im Falcon-Röhrchen zentrifugiert (5 min mit 249 g) und anschließend zweimal in PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation der Zell-PBS-Lösung wurde das resultierende Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Unter vorsichtigem Durchmischen wurden dann nacheinander 1 ml 70 %ige und 4,5 ml 96 %ige Ethanollösung ( $4^\circ\text{C}$ ) tropfenweise hinzu gegeben. Die nach dieser Prozedur fixierten Zellen konnten über mehrere Wochen bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert werden.

Unmittelbar vor der Messung am FACScan wurden die fixierten Zellen zentrifugiert, einmal in PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und das resultierende Pellet in 500  $\mu\text{l}$  einer RNase-Propidiumjodid-PBS-Lösung aufgenommen und für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben direkt im FACScan analysiert. Für die DNA-Gehaltsmessung wurde die Probe danach noch im Volumenverhältnis 4:1 mit einem Leukozytenstandard gemischt (siehe 3.7.3.) und erneut analysiert. In die Analyse gingen stets mindestens 50.000 Zellen ein. Die Auswertung, Interpretation und graphische Darstellung der Messwerte erfolgte softwaregestützt (ModFit LT 3.0).

### 3.7.3. Herstellung des Leukozytenstandards für die DNA-Gehaltsbestimmung

Die kernhaltigen Zellen des peripheren Blutes, die Leukozyten, verfügen über einen diploiden Chromosomensatz und befinden sich in der G0-Phase des Zellzyklus, d.h. sie proliferieren aktuell nicht und haben einen konstanten DNA-Gehalt von  $2n$ . Eine Lösung dieser Zellen eignet sich daher als Standard bei der durchflusszytometrischen Analyse von Zellen unbekanntem DNA-Gehaltes. Der bei den Messungen der vorliegenden Arbeit verwendete Standard wurde in folgender Weise hergestellt: 5 ml EDTA-antikoaguliertes humanes Vollblut wurde zusammen mit 40 ml Erythrozytenlyse-Puffer in einem Falcon-Röhrchen bei Raumtemperatur für 30 min

inkubiert. Danach wurde für 10 min mit 1559 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 15 ml des Erythrozytenlyse-Puffers wieder aufgenommen. Nach erneutem Zentrifugieren für 10 min mit 1750g und Abschütten des Überstandes verblieb nun ein nur noch aus Leukozyten bestehendes Zellsediment. Diese wurde in PBS resuspendiert und anschließend Aliquots von je  $1 \times 10^6$  Zellen in der unter 3.7.2. erläuterten Weise in Ethanol fixiert. Die Färbung der DNA erfolgte unmittelbar vor der FACScan-Analyse mit Propidiumjodid in der ebenfalls unter 3.7.2. erläuterten Weise.

### **3.8 Koloniebildungstest**

Zur Darstellung der Überlebensrate wurden die Zellen 24 h nach Ponasteronzugabe (1µl/ml Medium) trypsiniert, mit 0, 2, 4, und 6 Gy bestrahlt und in so geringer Konzentration in Petrischalen ausgesät, dass sich jede Zelle einzeln absetzt und klonal vermehrt. Nach Ablauf von 14 Tagen wurde das Medium verworfen, die Zellen mit Isoton II gespült und 5 min mit 70 % Ethanol fixiert. Das Ethanol wurde verworfen, die Zellen wurden mit 0,1 % Kristallviolett für 2 min gefärbt und die Kolonien mit mehr als 50 Zellen mit einem Zählgerät ausgezählt. Die Überlebensrate wurde durch das Verhältnis gebildeter Kolonien zur Anzahl eingegebener Zellen bestimmt. Zur Kalkulation der Koloniebildungsfähigkeit wurde die Überlebensrate auf die Angehrate (*plating efficiency*) der jeweiligen Zelle normiert. Die Angehrate wurde mit unbestrahlten Zellen ermittelt.

### **3.9 Bestrahlung und Dosimetrie**

Die Bestrahlung erfolgte mit einer technischen Röntgenröhre (RT 200, C.H.F. Müller) bei 20 mA und 200 kV. Zur Aufhärtung der Strahlen wurde ein 0,5 mm starker Kupferfilter angebracht. Die Röntgenröhre wurde mit Hilfe eines Duplexdosimeters (PTW) geeicht, welches mit einer Strontium-Radium-Quelle kalibriert worden war. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte je nach Größe der Kulturflasche und benötigter Gesamtdosis bei 1 Gy/min bzw. 2 Gy/min.

### 3.10 Puffer und Lösungen

#### 3.10.1. Reagenzien und Medien für die Zellkultur

<i>Name</i>	<i>Zusammensetzung/Hersteller</i>
Kulturmedium	DMEM + 10% FCS, Zeocin 1250 µl, G418 5ml Stocklösung auf 500 ml steril filtrieren
Foetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe #10270-106 Gold, PAA, Cölbe #A15-649
Neomycin	5% Neomycin (Sigma)
Zeocin	Zeocin 100mg/ml solution, Invitrogen, #R250-01
DMEM	Gibco
Trypsin	Difco
1x Trypsin-EDTA	0,05 % (w/v) Trypsin, 0,02 % (w/v) EDTA, Invitrogen, #25300-054

#### 3.10.2. Induktion der Genexpression

Ponasteron A	1mM Stocklösung: Ponasteron A 250µg(~0.5µmol) / Ethanol 100% 500µl, Invitrogen, # H101-01
--------------	---

#### 3.10.3. Reagenzien zur Detektion von Proteinen

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>
BCA Protein Assay	Fa. Pierce
ECL-Lösung (Enhanced Chemolumineszenz)	Amersham Bioscience
Standard Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich

## 3.10.4. DNA-Farbstoff

DAPI/Antifade	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) 0,1 µg/ml in Antifade, bei -20°C, Qbiogene
---------------	---

## 3.10.5. Allgemeine Puffer, Lösungen und Chemikalien

<i>Name</i>	<i>Zusammensetzung/ Hersteller</i>	<i>Lagerung</i>
Agarose	3 % (w/v) in 1x TBE, Bio-Rad	RT
Carnoy`s Fixativ	75 % (v/v) Methanol 25 % (v/v) Essigsäure, Merck	RT
Colcemid	0,02 % Demecolcine in PBS Steril filtrieren	4 °C
Coomassie-Färbelösung	0,2 % (w/v) Coomassie Brillant Blue R250 0,05 % (w/v) coomassie brillant blue G250 44,7 % (v/v) Ethanol abs. 10,5 % (v/v) Eisessig über Nacht unter Rühren lösen	RT
Coomassie-Entfärber	13 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Eisessig	RT
Entwickler für Röntgenfilme	1:10 Eukobrom, Tetenal	RT
Fixierer für Röntgenfilme	1 : 5 Superfix, Tetenal	RT
2 % Formaldehyd	5,4 % (v/v) Formaldehyd in 1x PBS (Stamm 37 % w/v, End 2 % w/v)	frisch angesetzt
Giemsa-Färbelösung	4 % (v/v) Giemsa, Sigma (Stamm 0,4 % w/v, End 0,016 % w/v) in 1xPBS	frisch angesetzt
Kristallviolett-Färbelösung	0,1 % (w/v) in H <sub>2</sub> O bidest.	RT
1x Laufpuffer	10 % (v/v) 10x TG-Puffer 1 % (v/v) SDS (Stamm 10 % w/v, End 0,1 % w/v)	frisch angesetzt
PMSF	200 mM in Isopropanol	Aliquots bei 20°C

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	Aliquots bei -20 °C
5-15 % MM-PBS	5-15%(w/w)Magermilchpulver (Naturaflo), Toepfer, in 1xPBS	frisch angesetzt
1x PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O Autoklaviert	RT
PBST	0,05 % (v/v) Tween 20 in 1x PBS	RT
PBS+	0,15 % Glycin 0,5 % BSA in 1x PBS	
5x Probenpuffer nach Laemmli	50 mM tris-HCl, ph 6,8 100 mM DTT 2 % (w/v) SDS 0,1 % Bromphenolblau 10 % Glycerol	in Aliquots bei -20°C
Propidiumjodid (PI)	MP Biomedicals	
RNAse (Ribonuclease A From Bovine Pancreas)	Sigma-Aldrich	
10 % SDS	10 % (w/v) SDS in H <sub>2</sub> O bidest.	RT
1x Transferpuffer nach Towbin	10 % (v/v) 10x TG-Puffer 20 % (v/v) Methanol kühlen bei 4 °C im Eis 0,5 % (v/v) SDS (Stamm 10 % w/v, End 0,05 % w/v)	frisch angesetzt

10x Tris-Glycin (TG)-Puffer	1,92 M Glycin 250 mM Tris Base Ph = 8,3 , nicht korrigieren Autoklavieren	RT
0,1 % Triton X-100	0,1 % (v/v) Triton X-100 in 1x PBS	RT
5x TBE	0,445 M Tris Borat 0,002 M EDTA Ph = 8,3	RT

### 3.10.6. Antikörper gegen das RAD51, TP53, und p21-Protein

#### Western Blot

<i>Antikörper</i>	<i>Hersteller/Nummer</i>	<i>Inkubationsbedingungen</i>
RAD51 (Ab-2) clone 51RAD01 mouse monoclonal IgG <sub>1</sub>	Oncogene, NA71	1 µg/ml in 5 % MM-PBS über Nacht bei 4 °C
Anti-β-Aktin clone AC-15 mouse monoclonal IgG <sub>1</sub>	Sigma, A5441	1:10.000 bis 1:60.000 in 5 % MM- PBS (abhängig von der Charge und dem Alter der Charge) 0,5 h bis 1 h RT
Antibody to Mouse IgG, HRP-Linked F(ab') <sub>2</sub> Fragment	Amersham Biosciences, NA9310	1:1.000 in 5 % MM-PBS 1 h RT
TP53 (DO7), mouse monoclonal IgG	Nova Castra, NCL-p53-DO7	1:1500 in 5% MM-PBS ü.N. bei 4°C
p21 (waf1(Ab1), mouse monoclonal IgG	Oncogene,OP64	1:200 in 5% MM-PBS ü.N. bei 4°C

#### Immunfluoreszenz

<i>Antikörper</i>	<i>Hersteller/Nummer</i>	<i>Inkubationsbedingungen</i>
RAD51 (Ab-1) rabbit polyclonal IgG	Oncogene, PC130	1:100 in PBS+ 1 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer
Anti-Rabbit Ig, Fluorescein-Linked Antibody	Amersham Biosciences N1034	1:50 in PBS+ 1 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer

### 3.10.7. Größenstandards

Folgende Größenstandards wurden verwendet, um das Molekulargewicht von RAD51 und  $\beta$ -AKTIN in Polyacrylamidgelen zu überprüfen:

---

MagicMark Western Standard, Invitrogen	Standardbanden werden nach Detektion mit dem Sekundärantikörper auf der Membran sichtbar.
Kaleidoscope Prestained Standards, Bio-Rad	Standardbanden sind bereits im Gel und direkt nach dem Transfer auf der Membran sichtbar.

---

## 4. Ergebnisse

Ein häufig beobachtetes Phänomen bei der Therapie maligner Tumoren ist ihr unterschiedliches Ansprechen auf eine Behandlungsstrategie. Für dieses unterschiedliche Ansprechen kann einerseits eine Resistenzentwicklung beispielsweise aufgrund einer verbesserten Reparaturfähigkeit der Tumorzellen oder andererseits eine erhöhte Akzeptanz der Zellen für eine erhöhte genomische Instabilität verantwortlich sein. Für einige Tumorzelllinien konnte beobachtet werden, dass die Überexpression von Proteinen bestimmter Reparaturwege als Ursache einer Resistenzentwicklung in Betracht kommt. Mit dieser Arbeit sollte die These überprüft werden, ob sich die Überexpression des RAD51-Proteins, eines für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels homologer Rekombination bedeutsamen Reparaturproteins, auf die Resistenzbildung oder die genomische Instabilität der Zellen auswirkt. Diese These sollte an einem isogenetischen Tumorzellpaar untersucht werden, das induzierbar RAD51 überexprimiert. Dabei war von besonderem Interesse, ob sich eine Überexpression von RAD51 auf die Bildung von Chromosomenaberrationen der G1- und G2-Phase, die Zellzyklusverteilung und die Koloniebildungsfähigkeit nach Bestrahlung auswirkt.

### 4.1 Methodische Vorarbeiten

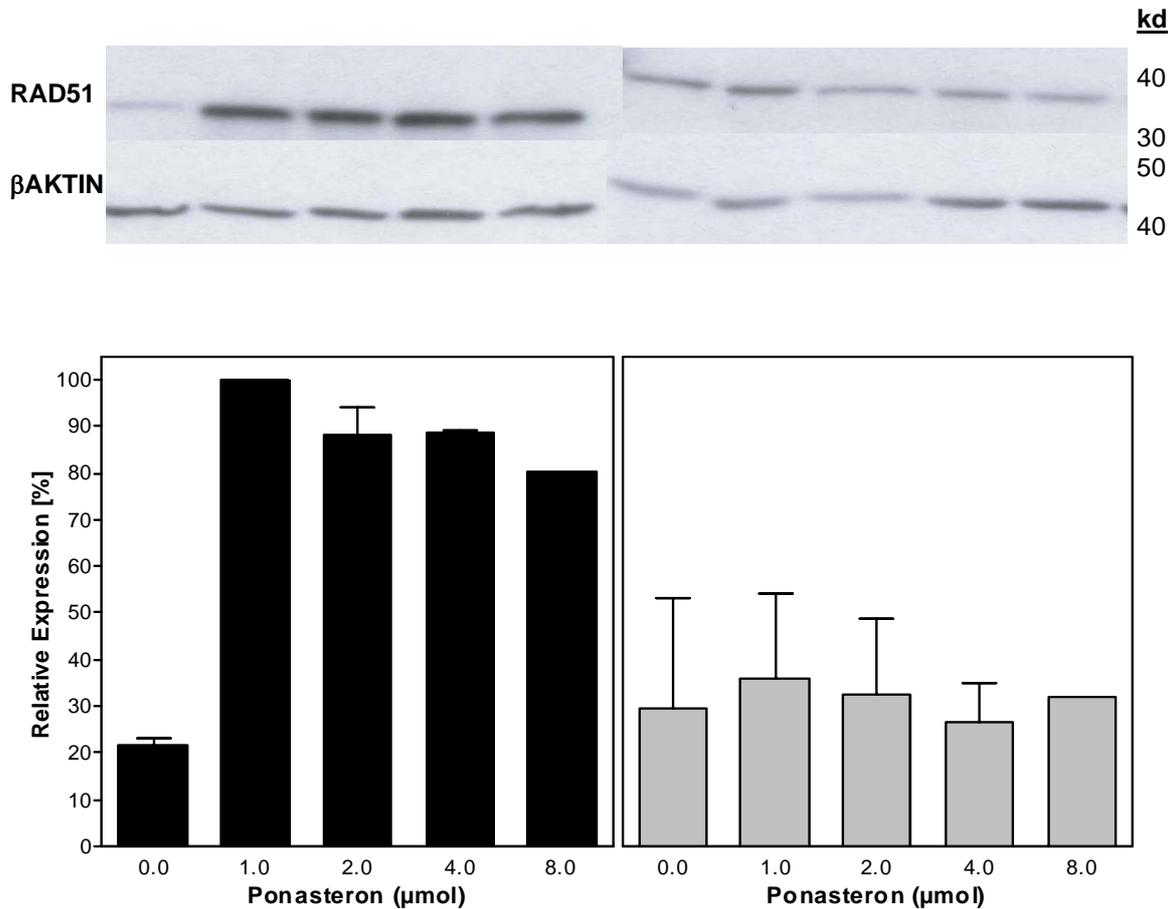
In den methodischen Vorarbeiten sollte zunächst das Zellsystem hinsichtlich der Expression von RAD51 und seinen Auswirkungen auf das zelluläre Wachstum überprüft werden.

#### 4.1.1. Induktion der Rad51-Überexpression

Die RAD51 überexprimierende Zelllinie UiRad51 wurde durch Maacke et al., 2000 nach Transfektion der Osteosarkomzelllinie U2-OS generiert. Zur Herstellung der RAD51-Überexpression wurde ein Hormon-induzierbares System verwendet, das den Vorteil bietet, die RAD51-Überexpression zu einem individuell bestimmten Zeitpunkt zu induzieren. Als induzierende Substanz wurde ein Analog des Insektenhormons Ecdyson, das Ponasteron, verwendet. Als Kontrollzelllinie wurde die  $\beta$ -GALAKTOSIDASE exprimierende Zelllinie UiLacZ etabliert. Exponentiell wachsenden UiRad51- und UiLacZ-Zellen wurden unterschiedliche Ponasteronkonzentrationen (1-4  $\mu$ M) zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 24h wurden die Proteine isoliert und im Western Blot analysiert.

Abb.7 zeigt die Menge an RAD51-Protein in Abhängigkeit von der Ponasteronkonzentration in UiRad51- und UiLacZ-Zellen. Unbehandelte UiRad51-Zellen zeigten nur eine sehr geringe Menge an endogenem Protein. Durch Zugabe von 1  $\mu$ mol Ponasteron konnte die RAD51-Menge

um den Faktor 4 gesteigert werden und blieb bei weiterer Konzentrationssteigerung gleich bleibend hoch. Die UiLacZ-Zellen zeigten keine Erhöhung der RAD51-Expression, sondern eine der Nullkontrolle entsprechende RAD51-Konzentration. Für alle weiteren Versuche wurde eine Ponasteron-Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  eingesetzt.

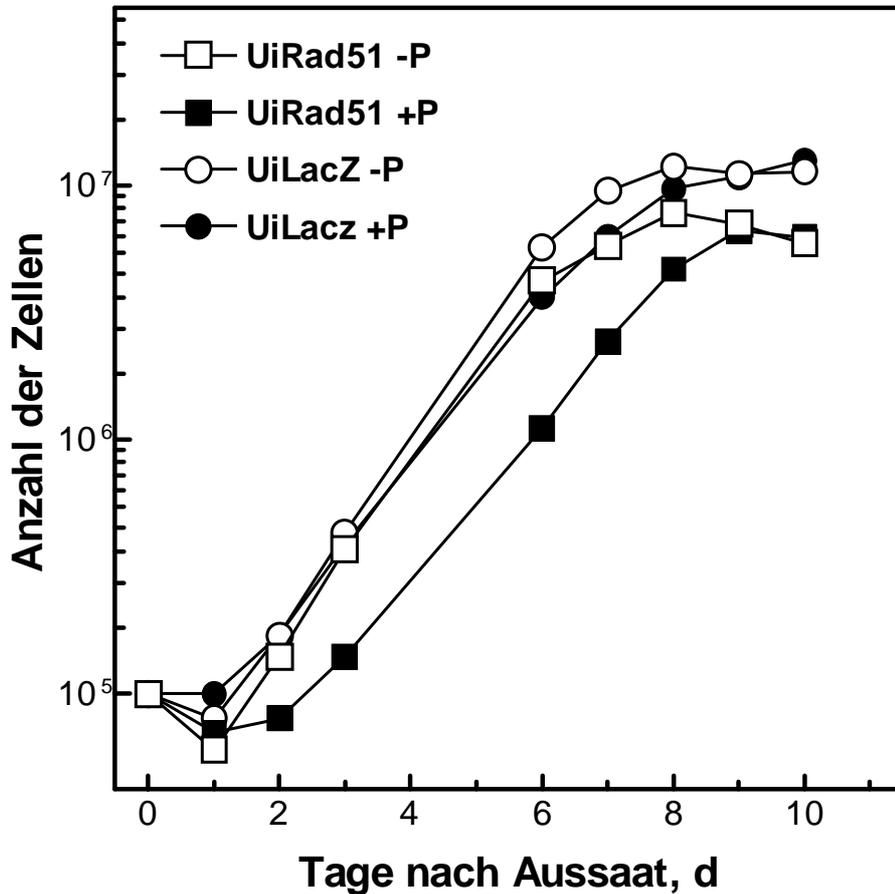


**Abb. 7.** Expression des RAD51-Proteins nach Ponasteron-Induktion im Western Blot. UiRad51- bzw. UilacZ-Zellen wurden mit ansteigender Ponasteronkonzentration für 24 h inkubiert, die Proteine isoliert und mittels Anti-RAD51-Antikörper im Western Blot detektiert. Als Ladungskontrolle diente die Detektion von  $\beta$ -AKTIN. Die Fehlerbalken stellen die Abweichungen des Mittelwerts aus drei unabhängigen Experimenten dar.

#### 4.1.2. Zelluläres Wachstum

Der Einfluss der RAD51-Überexpression auf das Wachstum der Zellen wurde durch das Erstellen einer Wachstumskurve untersucht. UiRad51- und UiLacZ-Zellen wurden mit Ponasteron inkubiert. Zur Kontrolle wurden UiRad51- und UiLacZ-Zellen ohne Ponasteron angesetzt. Nach 24h wurden die Zellen trypsiniert, in Zellkulturflaschen mit einer Dichte von 100.000 neu ausgesät und entsprechend mit bzw. ohne Ponasteron weiterkultiviert. Die Anzahl der Zellen wurde täglich über einen Zeitraum von 10 Tagen bestimmt. Abb.8 zeigt die Anzahl

der Zellen in Abhängigkeit von der Zeit nach Aussaat.



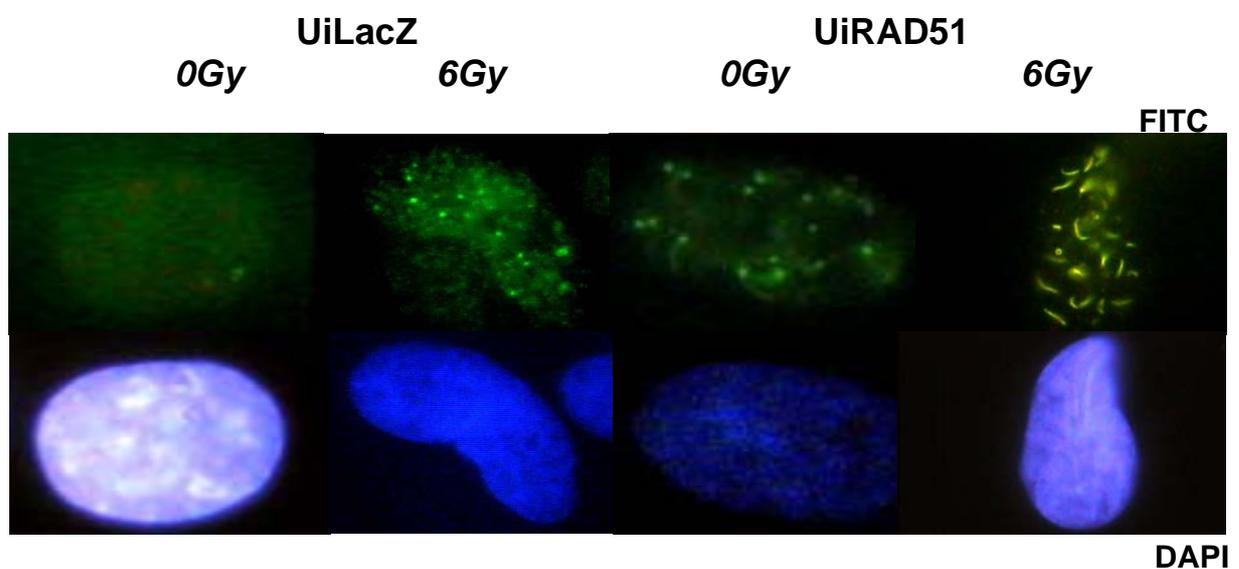
**Abb. 8:** Einfluss der RAD51-Überexpression auf das Wachstum der Zellen. UiRad51- und UiLacZ-Zellen mit und ohne Ponasteron wurden für 24h inkubiert, trypsiniert und mit einer Dichte von 10<sup>5</sup> Zellen ausgesät und die Zellzahl in regelmäßigen Abständen über 10 Tage bestimmt.

Es zeigte sich kein Wachstum am ersten Tag nach Aussaat der Zellen in allen Zelllinien. Ab dem zweiten Tag zeigten die UiLacZ-Zellen mit und ohne Ponasteron sowie die UiRad51-Zellen ohne Ponasteron ein exponentielles Wachstum. Ab dem sechsten Tag verlangsamte sich das Wachstum in diesen Zellen und erreichte am achten Tag ein Plateau. UiRad51-Zellen mit Ponasteron zeigten dagegen einen deutlichen Unterschied im Wachstumsverhalten, mit einer deutlich längeren Phase des Stillstandes bis Tag zwei, einem schwächeren, aber ebenfalls exponentiellen Wachstum und einem späteren Erreichen des Plateaus an Tag 10. Berechnet man aus den Steigungen des exponentiellen Teils die Verdopplungszeit der Zellen, so zeigte sich für die UiRad51-Zellen mit Ponasteron ein deutlich verlangsamtes Wachstum gegenüber den Zellen ohne Ponasteron bzw. den UiLacZ-Zellen mit 28h zu 24h. Folglich bewirkt die

Rad51-Überexpression eine Verzögerung der Verdoppelungszeit um 4h.

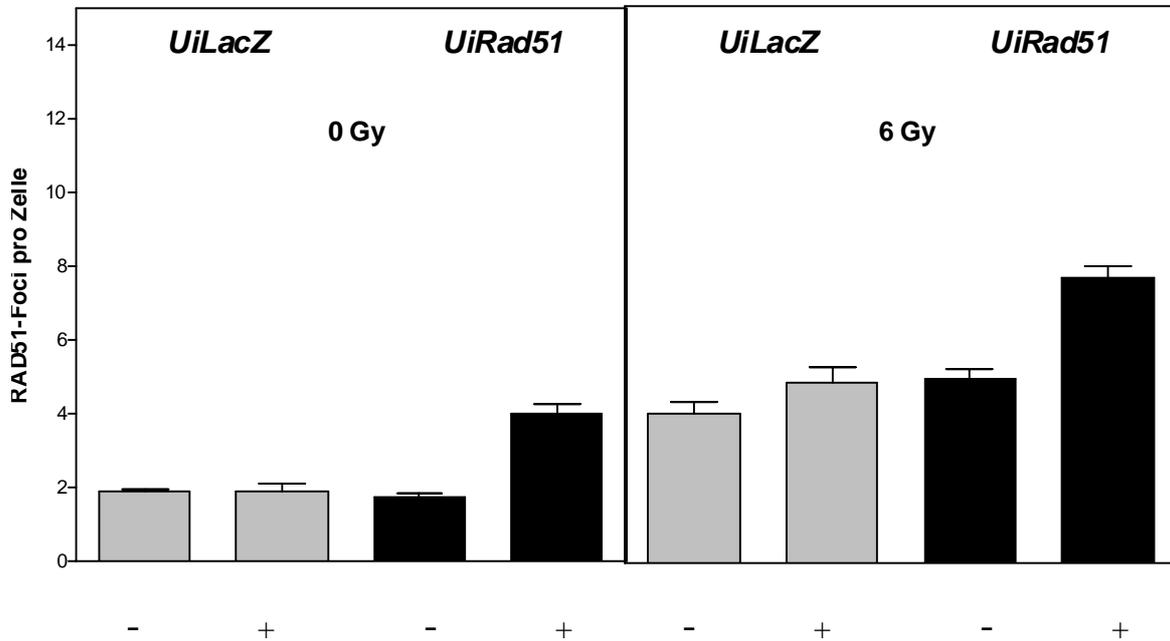
#### 4.1.3. Rad51-Foci

Nach einer Schädigung der DNA akkumuliert das RAD51-Protein in Form von Nukleoproteinfilamenten vermutlich an den Stellen der DNA, an denen ein DNA-Doppelstrangbruch stattgefunden hat. Solche so genannten RAD51-Foci lassen sich immunzytometrisch nachweisen (Haaf et al., 1995; Raderschall et al., 1999) und gelten als funktioneller Nachweis von Reparaturkomplexen der HR in Säugetierzellen.



**Abb.9:** RAD51-Foci in unbestrahlten oder bestrahlten Uirad51- und UilacZ-Zellen. Die Zellen wurden auf Objektträgern ausgesät und 24h vor Bestrahlung mit Ponasteron inkubiert und mit 6 Gy bestrahlt. 8h nach Bestrahlung wurden die Zellen fixiert und der Antikörpernachweis mittels FITC-markiertem Antikörpers durchgeführt. Die Gegenfärbung des Zellkerns erfolgte mit DAPI.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich die Überexpression des RAD51-Proteins auf die Bildung von RAD51-Foci auswirkt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen für 24h mit Ponasteron inkubiert, mit einer Dosis von 6 Gy bestrahlt, 8h bei 37°C für die Ausbildung der RAD51-Foci inkubiert, immunzytometrisch sichtbar gemacht und quantifiziert. Abb. 9 zeigt Beispiele für RAD51-Foci in unbestrahlten Uirad51- und UilacZ-Zellen, die mit Ponasteron behandelt wurden. Es zeigte sich eine deutlich erhöhte Anzahl an RAD51-Foci in unbestrahlten, RAD51-überexprimierenden Zellen im Gegensatz zu den Kontrollzellen. Auch nach Bestrahlung zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Zellen mit einer RAD51-Überexpression und den Kontrollzellen, mit stark vergrößerten, filamentartigen RAD51-Foci in den RAD51-überexprimierenden Zellen.

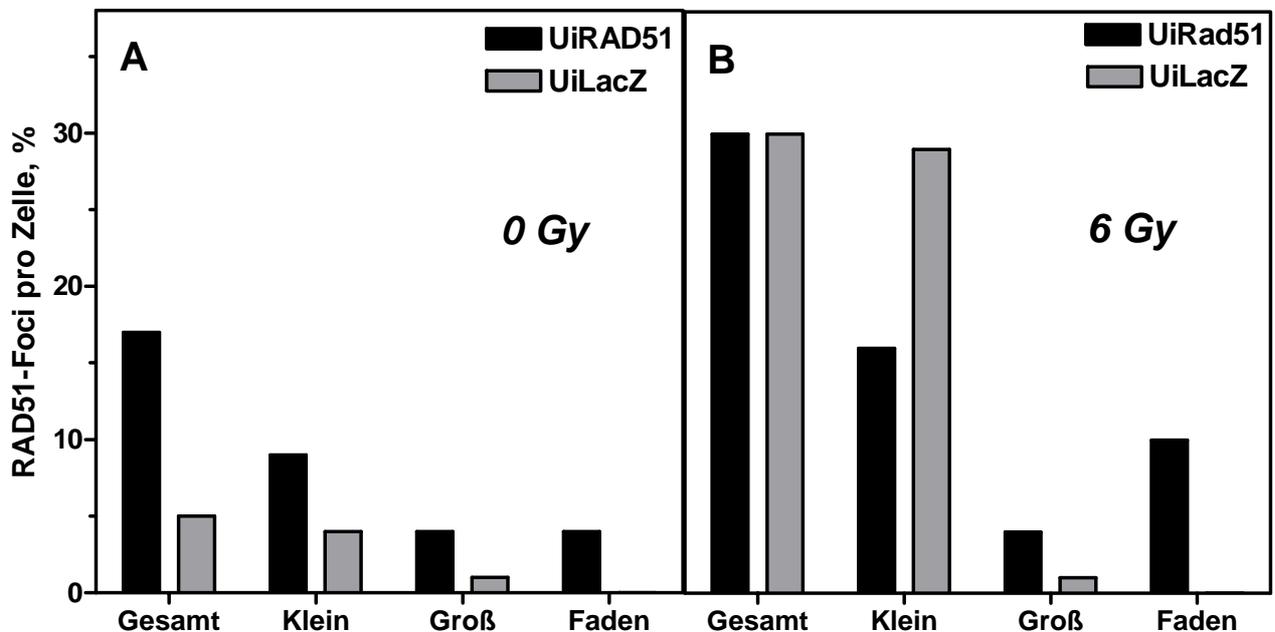


**Abb. 10:** Quantitative Auswertung der RAD51-Fokusbildung in unbestrahlten und mit 6 Gy bestrahlten, mit und ohne Ponasteron behandelten UiRad51- und UiLacZ-Zellen. Die Zellen wurden für 24h mit Ponasteron kultiviert, bestrahlt, für die Fokusbildung 8h bei 37°C inkubiert und immunzytometrisch sichtbar gemacht. Es wurden jeweils 50 Zellen ausgewertet, 3 Experimente durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Die Fehlerbalken stellen den Fehler des Mittelwertes dar.

Abb. 10. zeigt die Quantifizierung der RAD51-Foci für unbestrahlte und bestrahlte, mit und ohne Ponasteron behandelte UiLacZ- und UiRad51-Zellen. RAD51 überexprimierende Zellen zeigten bereits ohne Bestrahlung eine deutlich erhöhte Anzahl an RAD51-Foci im Vergleich zu den Kontrollzellen, mit  $3,9 \pm 0,3$  Foci pro Zelle im Vergleich zu  $1,88 \pm 0,08$ ,  $1,92 \pm 0,2$  und  $1,74 \pm 0,1$ . Nach Bestrahlung mit 6 Gy zeigte sich für alle Zelllinien eine Erhöhung der Rad51-Foci, mit  $4,04 \pm 0,29$ ,  $4,88 \pm 0,38$  für die UiLacZ-Zellen ohne und mit Ponasteron,  $4,97 \pm 0,26$  und  $7,69 \pm 0,33$  für die UiRad51-Zellen ohne und mit Ponasteron. Es zeigte sich somit kein Unterschied zwischen RAD51-überexprimierenden und den Kontrollzellen, denn in allen Zelllinien konnte eine Steigerung der RAD51-Foci um den Faktor zwei nach Bestrahlung beobachtet werden.

Hinsichtlich der Struktur der RAD51-Foci zeigte sich eine Besonderheit für die RAD51-überexprimierenden Zellen. Normalerweise zeigten die RAD51-Foci eine kleine, kugelförmige Struktur. In den RAD51-überexprimierenden Zellen zeigten sich neben diesen kleinen

kugelförmigen auch größere bis hin zu expandierten, fadenförmigen RAD51-Foci. Abb.11 zeigt den prozentualen Anteil dieser expandierten RAD51-Foci an der Gesamtzahl der Foci/Zelle in unbestrahlten und mit 6 Gy bestrahlten Zellen. Die Bildung großer und fadenförmiger Foci trat ohne vorangegangene Bestrahlung mit jeweils 4% in mit Ponasteron behandelten UiRad51-Zellen auf, dagegen zeigten die UiLacZ- Zellen keine fadenförmigen und nur 1% große RAD51-Foci. Nach einer Bestrahlung von 6 Gy zeigte sich dieser Unterschied noch deutlicher mit 4% großen und 10% fadenförmigen RAD51-Foci in den RAD51-überexprimierenden Zellen und nur 1% großer und keinen fadenförmigen Foci in den Kontrollzellen. Diese Daten weisen darauf hin, dass es bei einem RAD51-Überangebot zu einer Aggregatbildung kommt, die entweder DNA-unabhängig ist oder sich an während der Replikation einzelsträngig vorliegender DNA ausbildet.



**Abb.11:** Prozentualer Anteil an kleinen, großen und fadenförmigen RAD51-Foci in RAD51-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (A) und nach in vitro Bestrahlung mit 6 Gy (B). Die Zellen wurden für 24h mit Ponasteron kultiviert, bestrahlt, für die Fokusbildung 8h bei 37°C inkubiert und immunzytometrisch sichtbar gemacht. Es wurden jeweils 50 Zellen ausgewertet.

#### 4.2 Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung

Nach Bestrahlung können aus nicht reparierten DNA-Doppelstrangbrüchen Chromosomenaberrationen entstehen. Man unterscheidet dabei Chromosomenaberrationen die in der G1-Phase entstanden sind von Chromosomenaberrationen aus der G2-Phase. Wichtigstes Unterscheidungsmerkmal ist hier, dass Aberrationen der G1-Phase den

entstandenen Schaden auf beiden Chromatiden zeigen und deshalb auch als Chromosomentypaberrationen bezeichnet werden, während Aberrationen der G2-Phase meistens nur ein Chromatid betreffen und als Chromatidtypaberrationen bezeichnet werden. Die Ursache für diesen Unterschied liegt in der Replikation, die von in der G1-Phase bestrahlten Zellen durchlaufen wird und den Schaden mitrepliziert, so dass der Schaden in beiden Schwesterchromatiden auftritt. Chromosomentypaberrationen werden in stabile, d.h. von der Zelle tolerierbare, und instabile, von der Zelle nicht tolerierbare Aberrationen unterschieden. Instabile Chromosomenaberrationen führen zum Absterben der Zellen in den nächsten weiteren Teilungen und werden häufig als letale Chromosomenaberrationen bezeichnet. Demgegenüber stehen die Chromatidtypaberrationen, welche nicht automatisch zum Absterben der Zelle führen müssen, sondern auch potentiell von der Zelle toleriert werden können. Deshalb werden Chromatidtypaberrationen häufig mit genomischer Instabilität assoziiert.

Im Folgenden sollte der Effekt einer RAD51-Überexpression auf die Reparatur von Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung in der G1- oder in der G2-Phase untersucht werden.

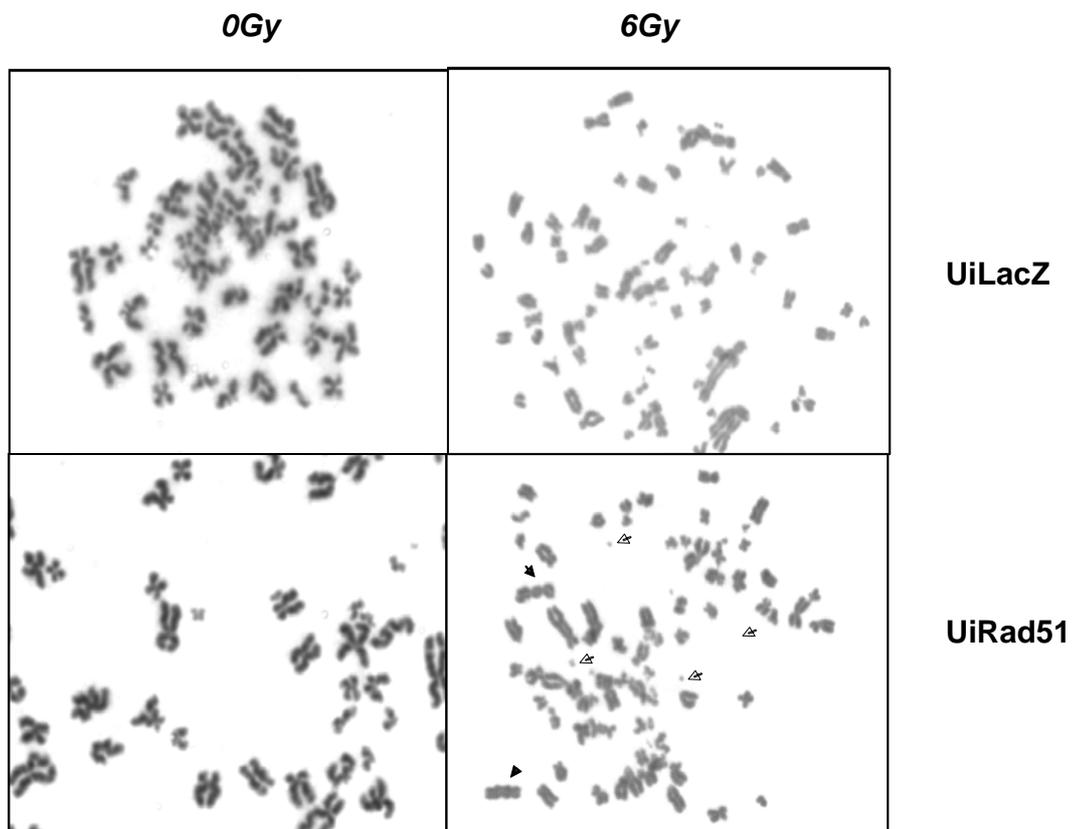
#### 4.2.1. Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung in der G1-Phase

Zur Überprüfung des Effektes der RAD51-Überexpression auf die Reparatur von Chromosomen-Schäden nach Bestrahlung wurden die Zellen zunächst auf Chromosomenaberrationen der G1-Phase untersucht. Zu diesem Zweck wurden UiRad51- und UiLacZ-Zellen mit und ohne Ponasteron inkubiert, mit Röntgendosen von 0-6 Gy bestrahlt und für 48h inkubiert. In den letzten 4h der Inkubation wurde den Zellen Colcemid, ein Analog des Spindelfasergiftes Colchicin, zugesetzt, so dass proliferierende Zellen in der Metaphase der Mitose akkumulierten. Durch die Wahl des Zeitfensters gingen hauptsächlich Zellen in die Untersuchung ein, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der G1-Phase befanden. Die Bestimmung der letalen Chromosomenaberrationen erfolgte dann lichtmikroskopisch an mit Giemsa gefärbten Präparaten.

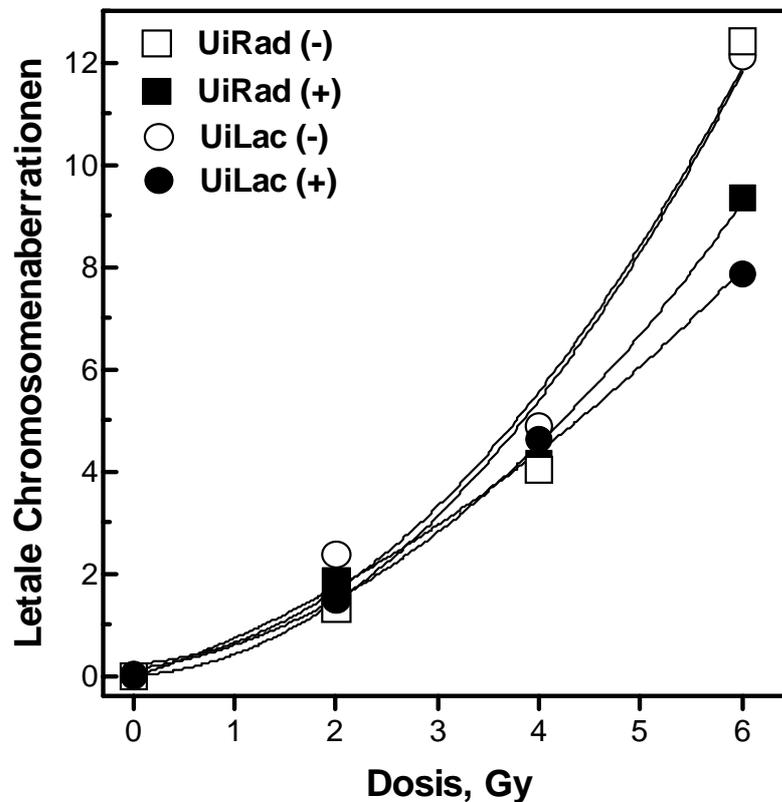
Abb.12 zeigt beispielhaft Karyogramme von unbestrahlten und mit 6 Gy bestrahlten Zellen mit RAD51-Überexpression im Vergleich zu den Kontrollzellen. Unbestrahlte UiRad51-Zellen zeigten im Mittel  $74,23 \pm 0,56$ , nach Induktion mit Ponasteron  $75,22 \pm 0,45$  Chromosomenfragmente. Im Vergleich dazu lag die Zahl der Chromosomenfragmente bei UiLacZ-Zellen ohne Ponasteron bei  $73,34 \pm 0,32$ , mit Ponasteronbehandlung bei  $75,36 \pm 0,5$ . Nach Bestrahlung zeigten beide Zelllinien das für Bestrahlung in der G1-Phase typische Muster mit azentrischen Fragmenten (offenen Pfeile) aus terminalen und interstitiellen Deletionen, sowie

dizentrischen Chromosomen (schwarze Pfeile).

In Abb. 13 ist die Anzahl der letalen Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung für UiRad51- und UiLacZ-Zellen mit und ohne Ponasteronbehandlung abzüglich der unbestrahlten Kontrolle dargestellt. Es zeigte sich ein linear-quadratischer Anstieg mit der Dosis für die Anzahl der letalen Chromosomenaberrationen in allen untersuchten Zelllinien.



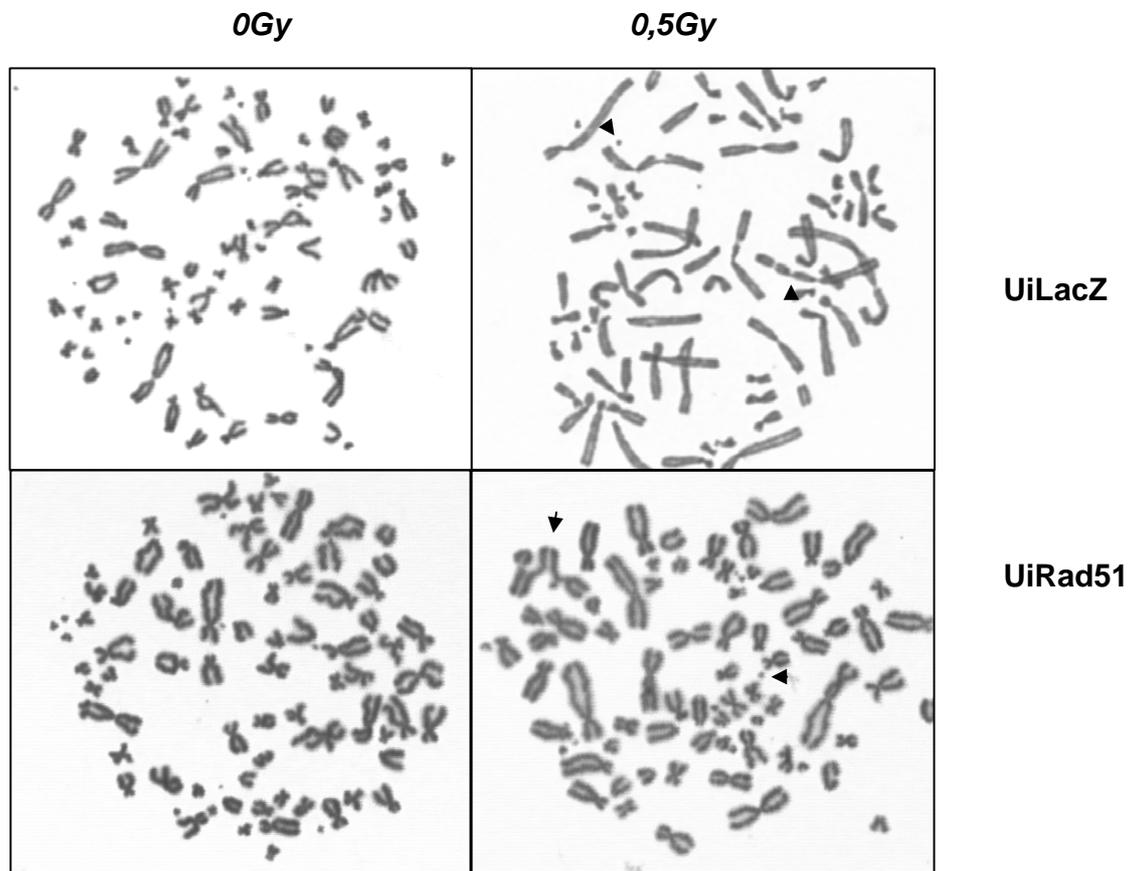
**Abb.12:** Chromosomenaberrationen der G1-Phase nach Bestrahlung in Zellen mit RAD51-Überexpression im Vergleich zu den Kontrollzellen. UiLacZ- (A,C) und UiRad51- (B, D) Zellen wurden in der Plateau-Phase mit Ponasteron inkubiert, 24h später bestrahlt (C, D) und im Anschluss zur Teilung stimuliert. 48h nach der Bestrahlung wurden die Zellen in der Metaphase fixiert und gefärbt. Die Pfeile zeigen Beispiele von azentrischen Fragmenten und dizentrischen Chromosomen.



**Abb.13:** Anzahl der letalen Chromosomenaberrationen in humanen Tumorzellen mit Überexpression von RAD51 im Vergleich zu Kontrollzellen in Abhängigkeit von der Dosis. Die Zellen wurden in der Plateau-Phase mit Ponasteron inkubiert, 24h später bestrahlt und im Anschluss zur Teilung stimuliert. 48h nach der Bestrahlung wurde die Anzahl der G0-Aberrationen bestimmt. Anzahl zusätzlicher azentrischer Fragmente in unbehandelten und mit Ponasteron behandelten UiRad51- und UiLacZ-Zellen in Abhängigkeit von der Strahlendosis.

Unbehandelte UiRad51-Zellen zeigten  $1,33 \pm 0,28$  letale Chromosomenaberrationen bei einer Dosis von 2 Gy,  $4,03 \pm 0,35$  bei 4 Gy und  $12,42 \pm 0,47$  bei 6 Gy. Bei Überexpression von RAD51 zeigten die Zellen  $1,86 \pm 0,78$  bei 2 Gy,  $4,16 \pm 0,7$  bei 4 Gy und  $9,36 \pm 0,8$  bei 6 Gy und damit etwas weniger als die unbehandelten UiRad51-Zellen. In den Kontrollzellen UiLacZ wurden ohne Ponasteronbehandlung  $2,36 \pm 0,4$  bei einer Dosis von 2 Gy,  $4,87 \pm 0,4$  bei 4 Gy und  $12,12 \pm 0,58$  bei 6 Gy bestimmt und nach Behandlung mit Ponasteron zeigten sich ebenfalls etwas weniger letale Chromosomenaberrationen als in den unbehandelten Zellen mit  $1,49 \pm 0,38$  bei 2 Gy,  $4,62 \pm 0,48$  bei 4 Gy und  $7,86 \pm 0,4$  bei 6 Gy. Es konnte kein Effekt der Überexpression auf die Anzahl der letalen Chromosomenaberrationen beobachtet werden. Es zeigte sich zwar eine reduzierte Anzahl an letalen Chromosomenaberrationen bei einer Dosis von 6 Gy nach Überexpression von RAD51 im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Dieser Effekt zeigte sich allerdings auch in den Kontrollzellen und kann somit nur auf die Ponasteronbehandlung

zurückgeführt werden.



**Abb. 14:** Chromosomenaberrationen der G2-Phase nach Bestrahlung in Zellen mit Rad51-Überexpression im Vergleich zu den Kontrollzellen. UiLacZ- und UiRad51- Zellen wurden für 24h mit Ponasteron inkubiert, mit 0,5Gy bestrahlt und bei 37°C inkubiert. 30 min nach Bestrahlung wurde den Zellen für 60 min Colcemid hinzu gegeben und im Anschluss wurden Metaphasezellen fixiert und gefärbt. Die Pfeile zeigen auf typische Chromatidtypaberrationen wie Lücken (*gap*), Chromatidfragmente und Translokationen.

#### 4.2.2. Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung in der G2-Phase

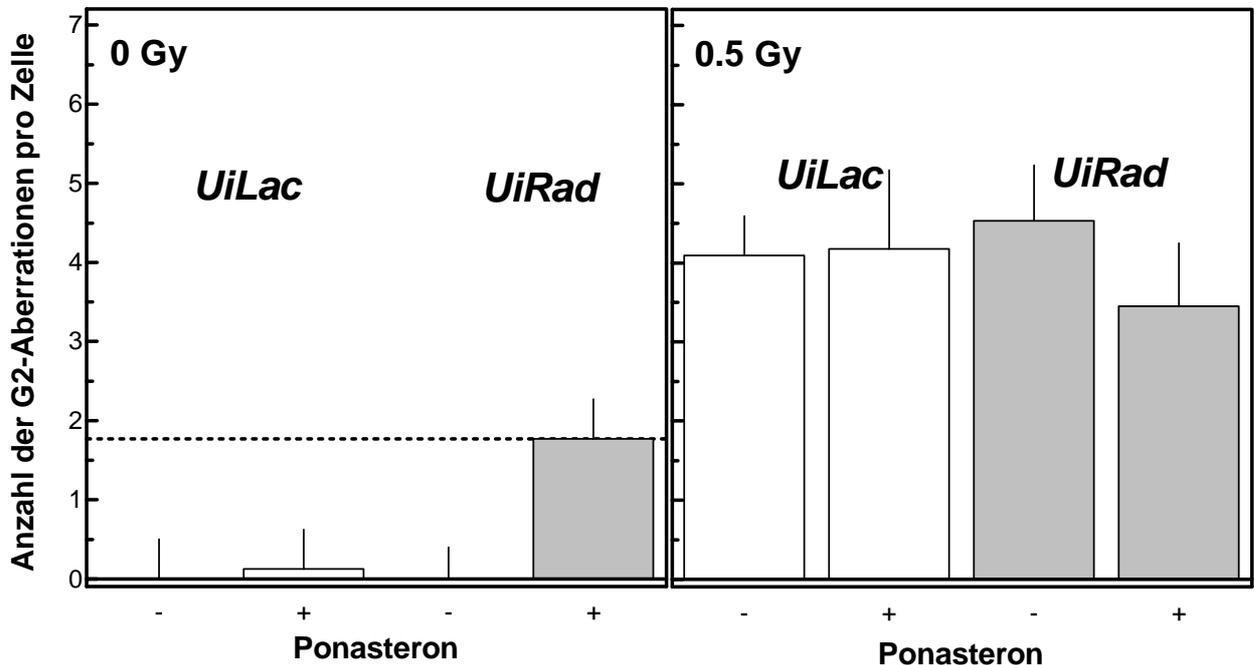
Zur weiteren Überprüfung des Effektes der RAD51-Überexpression auf die Reparatur von Schäden nach Bestrahlung wurden die Zellen auf Chromosomenaberrationen der G2-Phase untersucht. Dies war von besonderem Interesse, da die durch homologe Rekombination vermittelte DNA-Reparatur hauptsächlich in der S/G2-Phase aktiv ist, welches sich auch in der Expression von endogenem RAD51 widerspiegelt. So erfolgt die Expression normalerweise zellzyklusspezifisch, mit einer sehr geringen Expression in der G1-Phase, einem Anstieg in der S-Phase und einem Maximum in der G2-Phase, gefolgt von einem Abfall der Expression in der

Mitose (Chen et. al., 1997).

UiRad51- und UiLacZ-Zellen wurden mit und ohne Ponasteron inkubiert und mit einer Röntgendosis von 0,5 Gy bestrahlt. Zur Kontrolle wurden unbestrahlte Zellen mitgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C wurde den Zellen für 1h Colcemid hinzugesetzt, um proliferierende Zellen in der Metaphase der Mitose anzureichern. Durch diese Wahl des Zeitfensters gingen ausschließlich Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der G2-Phase befanden, in die Untersuchung ein. Die Bestimmung der Chromatidtypaberrationen erfolgte lichtmikroskopisch an mit Giemsa gefärbten Präparaten. Unter dem Begriff Chromatidtypaberrationen wurden Diskontinuitäten der Chromatiden wie Lücken (*gaps*) und Chromatid- (Bruch der ein Chromatid betraf) bzw. Isochromatidbrüche (Bruch der beide Chromatiden betraf), sowie komplexe Aberrationen, wie Translokationen und triradiale Chromosomen, zusammengefasst und im Folgenden als G2-Aberrationen bezeichnet.

Abb.14 zeigt beispielhaft G2-Aberrationen in mit 0,5 Gy bestrahlten sowie mit Ponasteron behandelten UiRad51- und UiLacZ-Zellen im Vergleich mit unbehandelten Zellen. Abb. 15 zeigt die Anzahl der G2-Aberrationen in unbestrahlten und mit 0,5 Gy bestrahlten UiRad51- und UiLacZ-Zellen mit und ohne Ponasteronbehandlung. Es konnte eine deutlich erhöhte Anzahl der G2-Aberrationen in unbestrahlten, RAD51-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen bestimmt werden, mit  $1,77 \pm 0,5$  in den UiRad51-Zellen mit Ponasteron im Vergleich zu unbehandelten UiRad51-Zellen mit  $0,0 \pm 0,4$ . Die Kontrollzelllinie UiLacZ zeigten dagegen nur eine sehr geringe Anzahl von spontan auftretenden G2-Aberrationen mit  $0,125 \pm 0,5$  in mit Ponasteron behandelten und  $0,0 \pm 0,5$  in unbehandelten Zellen. Nach Bestrahlung zeigte sich dagegen kein deutlicher Effekt der RAD51-Überexpression auf die Anzahl der G2-Aberrationen, mit  $5,2 \pm 0,8$  unter Ponasteron im Vergleich zu  $4,53 \pm 0,7$  ohne Ponasteron in den UiRad51-Zellen und  $4,09 \pm 0,5$  und  $4,3 \pm 1,0$  in den UiLacZ-Zellen ohne und mit Ponasteron.

Diese Daten zeigen sehr deutlich, dass ein Überangebot von RAD51 sich weder auf die Reparatur von strahleninduzierten Chromosomenaberrationen in der G1- noch der G2-Phase auswirkte, wohl aber zu einem 14fachen Anstieg der spontanen G2-Aberrationen führte.



**Abb.15:** Chromosomenaberrationen der G2-Phase nach Bestrahlung in mit und ohne Ponasteron behandelten UiRad51- und UiLacZ-Zellen. Exponentiell wachsende Zellen wurden 24h vor Bestrahlung mit 0,5 Gy mit Ponasteron inkubiert. 90 min. nach Bestrahlung wurden die Zellen in der Metaphase fixiert und gefärbt. Es wurden die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten aufgetragen und die Werte der unbestrahlten Kontrollen von den mit 0,5 Gy bestrahlten subtrahiert.

### 4.3 Zellzyklus

Die Länge des Zyklus einer Zelle kann von äußeren und inneren Faktoren abhängen. So können beispielsweise äußere Faktoren, wie Zellgröße und das zur Verfügung stehende Nährstoffangebot, aber auch innere Faktoren wie beispielsweise Wachstumshormone oder das Angebot an Nukleotiden einen Einfluss auf die Länge des Zellzyklus nehmen. Die Dauer und Abfolge der Phasen werden von Steuerungsmechanismen, so genannten Kontrollpunkten (Checkpoints) überwacht, die dafür sorgen, dass erst dann der nächste Schritt des Zellzyklus erfolgt, wenn der vorhergehende abgeschlossen ist. An solchen Checkpoints besteht dann die Möglichkeit zur Unterbrechung (Arretierung) des Zellzyklus oder auch zur Einleitung der Apoptose, des programmierten Zelltodes.

Für die Regulation des Zellzyklus existieren spezielle Proteine wie die Cycline und die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs, Cycline dependent Kinases). Zu bestimmten Zeitpunkten im Zyklus werden diese Proteine verstärkt exprimiert, bis die Konzentration ein Maximum erreicht. Von

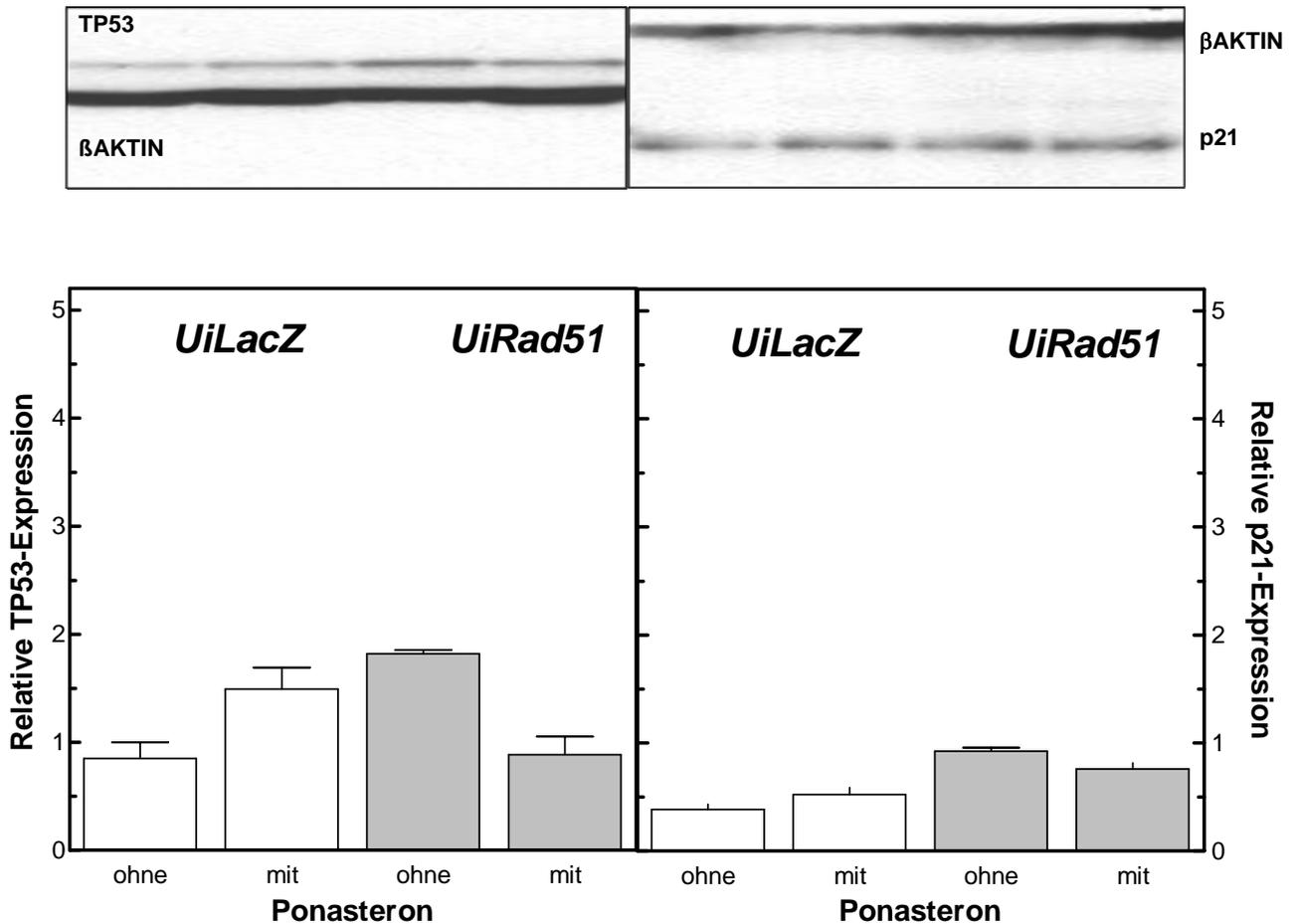
diesem Maximum nimmt man an, dass es den Kontrollpunkt darstellt. Danach werden die Cycline schnell abgebaut. CDKs und die zugehörigen Cycline bilden Komplexe, deren Aktivierung beziehungsweise Deaktivierung unter anderem durch Wachstumsfaktoren und Protoonkogene gesteuert wird. Im Folgenden sollte der Einfluss der RAD51-Überexpression auf die Zellzyklusregulation in Tumorzellen überprüft werden. Dabei sollten einerseits der Effekt auf den G1-Arrest mittels Expression von p53 und p21 überprüft werden, und andererseits der Effekt auf den G2-Arrest mittels Messung der Zellzyklusverteilung.

#### 4.3.1. Expression von TP53 und p21

Nach Schadensinduktion kommt es zu einem Anstieg in der Expression des Tumorsuppressorproteins p53, welches auch als Hüter des Genoms bezeichnet wird und in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor dazu führt, dass sich die Expression einer Vielzahl von Genen verändert. Unter diesen Genen konnte auch die Aktivierung des p21-Proteins (CDKN1), eines Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors ermittelt werden, welches wiederum nach Aktivierung eine Inhibition der Aktivität des CyclinE/CDK2-Kinase-Komplexes bewirkt. Dies führt dann zu einer Arretierung der Zellen in der G1-Phase. Die Expression des p21-Proteins nach Induktion von p53 kann somit als ein Maß der Aktivierung des so genannten G1-Arrest angesehen und soll im Folgenden genauer untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurde exponentiell wachsenden UiRad51- und UiLacZ-Zellen Ponasteron zugesetzt und nachfolgend für 24h inkubiert. Im Anschluss wurden Proteinextrakte der Zellen hergestellt und die Proteine TP53 und p21 mittels Western Blot nachgewiesen.

In Abb. 16 sind jeweils Beispiele der Western Blots für die Proteine TP53 bzw. p21, sowie die relative Menge der beiden Proteine dargestellt. Dabei zeigte sich in den Kontrollzellen ein leichter Anstieg insbesondere für das TP53, aber auch für das p21 Protein nach Zugabe von Ponasteron. Für die UiRad51-Zellen wurde dagegen eine deutliche Abnahme des TP53 und eine geringe Abnahme des p21 Proteins beobachtet. Allerdings zeigten diese Unterschiede keine Signifikanz.

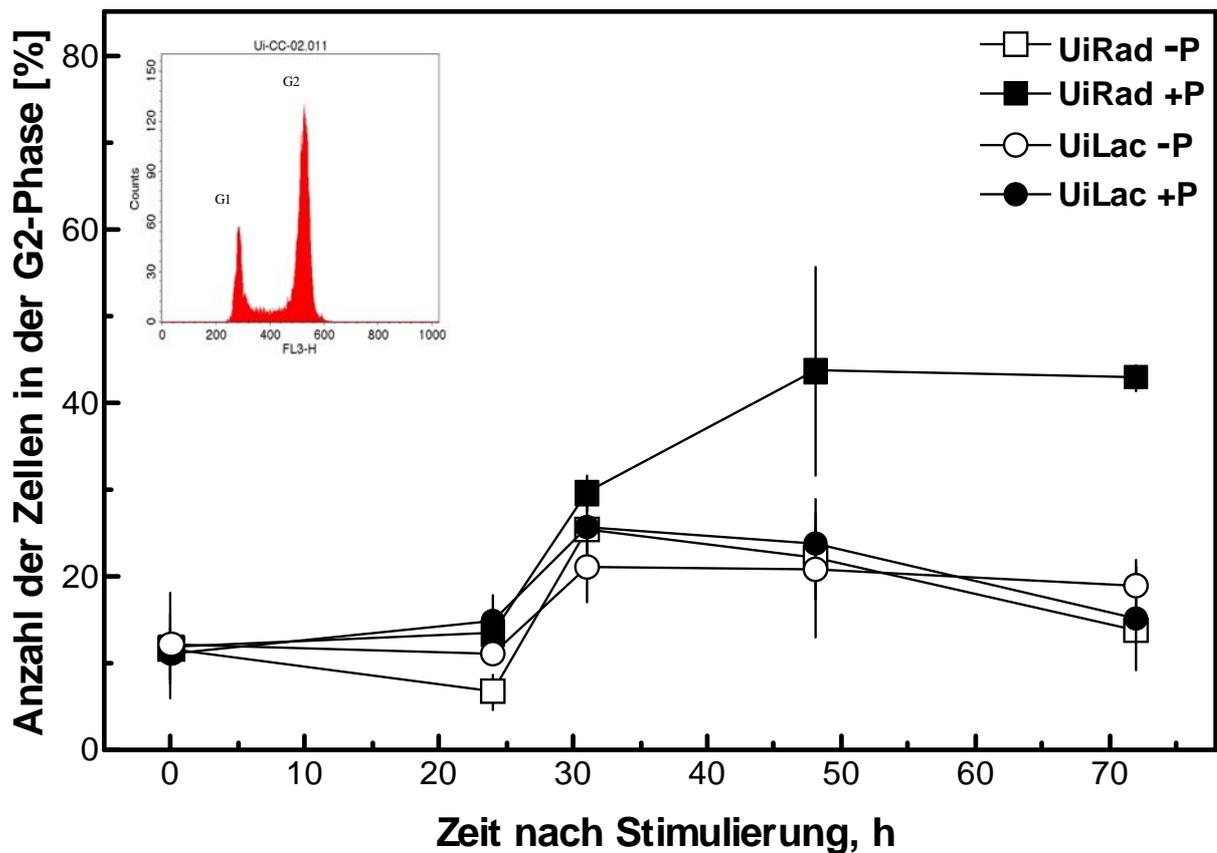


**Abb.16:** Effekt der RAD51-Überexpression auf die Expression der Proteine TP53 und p21. Nach Restimulation nahezu konfluenter Zellen wurde 1  $\mu$ mol Ponasteron hinzugegeben und nach 24h wurden Gesamtzellextrakte hergestellt und mittels Anti-p21 bzw. p53-Antikörpern im Western Blot detektiert. Als Ladungskontrolle diente die Detektion von  $\beta$ -AKTIN. Die Fehlerbalken stellen die Abweichungen des Mittelwerts aus drei unabhängigen Experimenten dar.

#### 4.3.2. Zellzyklusverteilung

Es sollte überprüft werden, ob sich die Induktion der RAD51-Expression auf die Anzahl der Zellen in der G2-Phase auswirkt. Zu diesem Zweck wurden nahezu konfluente Zellkulturen hergestellt, durch verdünnte Aussaat restimuliert und Ponasteron hinzu gegeben. Anschließend wurden Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert. Abb.17 zeigt den Anteil an Zellen in der G2-Phase in zeitlicher Abhängigkeit. Unter konfluenten Bedingungen befanden sich etwa 12% der unbehandelten sowie der mit Ponasteron behandelten Zellen in der G2-Phase. Dieser Anteil veränderte sich bis 24h nach Restimulation nicht, zeigte dann aber einen Anstieg auf 20-30% nach 32h. Für die Zellen mit Überexpression von RAD51 stieg der Anteil der Zellen auf 42% nach einer Inkubation von 48h an und verblieb auf diesem hohen Niveau bis 72h nach

Restimulation. Dagegen zeigten die Kontrollzellen ihre Maxima von 20, 22 bzw. 30% bei 32h, dann aber einen deutlichen Abfall mit 20, 21 bzw. 22% nach 48h und 17, 18 bzw. 20% nach 72h. Ein Überangebot an RAD51 führt folglich zu einem Arrest von 42% der Zellen in der G2-Phase, der in den Kontrollzellen nicht beobachtet werden konnte. Ein entsprechender Anstieg der Zellen in der G1-Phase konnte nicht beobachtet werden.



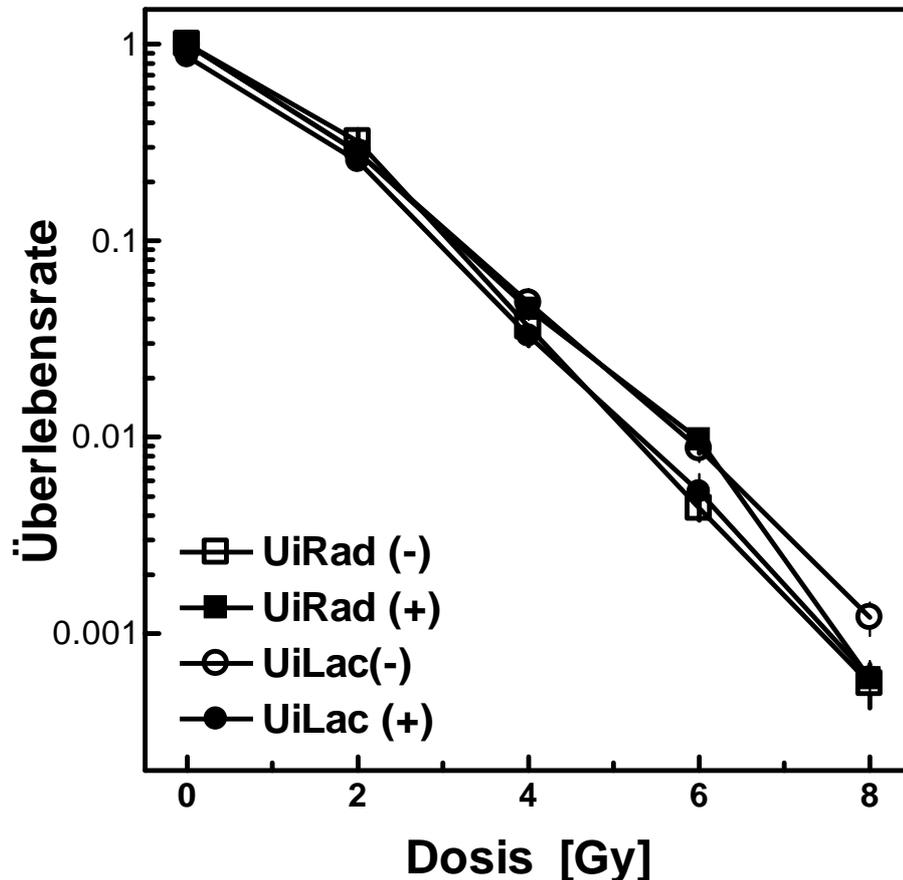
**Abb.17:** Anteil an Zellen in der G2-Phase in Zellen mit RAD51 Überexpression um Vergleich zu Kontrollzellen. Nahezu konfluente UiRad51- und UiLacZ-Zellen wurden nach Inkubation mit Ponasteron für 24h durch verdünnte Aussaat restimuliert (Zeitpunkt  $t = 0h$ ). Zu den Zeitpunkten 0h, 24h, 32h, 48h und 72h wurden die Zellen fixiert und der DNA-Gehalt im Durchflusszytometer (BD FACScan) nach Färbung mit PI bestimmt. Die Zellzyklusverteilung wurde mit der Software ModFit LT ermittelt. Aufgetragen wurde nur der Anteil der in der G2-Phase befindlichen Zellen

#### 4.4 Zelluläre Strahlenempfindlichkeit

Es sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Überexpression von RAD51 auf das zelluläre Überleben nach Bestrahlung hat. Exponentiell wachsende Zellen wurden 24 h vor der Bestrahlung mit Ponasteron behandelt, dann mit den Dosen 0, 2, 4, 6 und 8 Gy bestrahlt und für

den Koloniebildungstest plattiert. 14 Tage nach Bestrahlung wurden die Zellen fixiert, gefärbt und die Kolonien wurden ausgezählt.

Abb.18 zeigt die Überlebensrate von unbehandelten und mit Ponasteron behandelten UiRad51- und UiLacZ-Zellen in Abhängigkeit von der Strahlendosis. Es zeigte sich, dass die RAD51-Überexpression keinen Einfluss auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit hat, da sich mit Ponasteron behandelte UiLacZ- und UiRad51-Zellen hinsichtlich ihrer Überlebensrate nicht unterscheiden. Allerdings wurde eine deutliche Reduktion der Angehrate in Zellen mit Überexpression von RAD51 im Vergleich zu den Kontrollzellen festgestellt, mit nur 6% gegenüber 31% in den UiRad51-Zellen ohne Ponasteron und 33 bzw. 32% in den UiLacZ-Zellen mit und ohne Ponasteron.



**Abb.18:** Bedeutung der RAD51-Überexpression für das Überleben der Zellen nach Bestrahlung. Exponentiell wachsenden Zellen wurden 24h vor der Bestrahlung mit Ponasteron inkubiert, bestrahlt und plattiert. 14 Tage nach Bestrahlung wurden die Zellen fixiert, gefärbt und die Kolonien ausgezählt. Die Daten wurden mittels nicht linearer Regression angepasst und die Fehlerbalken repräsentieren die Abweichungen aus 3 unabhängigen Experimenten.

## 5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war, zu überprüfen, welchen Einfluss die Überexpression von RAD51, einem an der homologen Rekombination beteiligten Protein, auf die chromosomale Instabilität hat. Zu diesem Zweck wurden zwei isogenetische, mit einem Plasmid transfizierte Tumorzelllinien ionisierender Strahlung ausgesetzt und anschließend hinsichtlich der auftretenden Chromosomenaberrationen verglichen. Eine Zelllinie exprimiert das RAD51-Protein durch Ponasteron induziert im Übermaß, die Kontrollzelllinie hingegen  $\beta$ -GALAKTOSIDASE.

### 5.1. Methodische Vorarbeiten

#### 5.1.1. Induktion der RAD51-Überexpression

Im Rahmen der methodischen Vorarbeiten wurde die Induktion der RAD51-Überexpression mittels Western Blot überprüft. Unbehandelte UiRad51-Zellen zeigten nur eine sehr geringe Menge an endogenem Protein. Durch Zugabe von 1  $\mu\text{mol/ml}$  konnte die RAD51-Menge um den Faktor vier (Abb. 7) gesteigert werden und blieb bei weiterer Konzentrationssteigerung gleichermaßen hoch. Der Grad der Überexpression dieses Zellsystems ist vergleichbar mit dem in anderen Studien verwendeter Systeme, in denen die Überexpression um das zwei- bis zehnfache gesteigert werden konnte (Arnaudeau et al., 2000, Flygare et al., 2001, Jarutat, 2004, Raderschall et al., 2002a, Richardson et al., 2004, Yanez and Porter, 1999).

#### 5.1.2. Zelluläres Wachstum

Der Einfluss der RAD51-Überexpression auf das Wachstum der Zellen wurde durch das Erstellen einer Wachstumskurve untersucht. Es zeigte sich kein Wachstum am ersten Tag nach Aussaat der Zellen in allen Zelllinien. Ab dem zweiten Tag zeigten alle Zelllinien mit normaler RAD51-Expression ein exponentielles Wachstum, welches sich ab dem sechsten Tag verlangsamte und am achten Tag ein Plateau erreichte. RAD51-überexprimierende Zellen zeigten dagegen einen deutlichen Unterschied im Wachstumsverhalten, mit einer deutlich längeren Phase des Stillstandes, einem schwächeren, aber ebenfalls exponentiellem Wachstum und einem späteren Erreichen des Plateaus an Tag 10 (Abb.8). Nach Errechnung der Verdoppelungszeit zeigte sich für die RAD51-überexprimierenden Zellen ein deutlich verlangsamtes Wachstum gegenüber den Kontrollzelllinien mit 28h zu 24h. Folglich bewirkt die RAD51-Überexpression eine Verlangsamung des zellulären Wachstums bzw. eine Verzögerung

der Verdoppelungszeit um 4h. Dieses Ergebnis stimmt mit denen anderer Publikationen überein, in welchen eine verminderte Wachstumsrate für RAD51-überexprimierende Zellen nachgewiesen wurde (Flygare et al., 2001, Paffet et al., 2005, Raderschall et al., 2001).

## 5.2. RAD51-Foci

Werden Zellen ionisierender Strahlung oder anderen genotoxischen Substanzen ausgesetzt, akkumuliert das RAD51-Protein in Form von Nukleoproteinfilamenten im Zellkern. Solche so genannten RAD51-Foci lassen sich immunzytochemisch nachweisen (Haaf et al., 1995, Raderschall et al., 1999). Sie treten in Regionen mit einzelsträngig vorliegender DNA auf (Raderschall et al., 1999) und kolokalisieren nach DNA-Schädigung mit an der homologen Rekombination beteiligten Proteinen, wie RAD52 (Liu und Maizels, 2000), RAD54 (Tan et al., 1999) und RPA (Golub et al., 1998; Raderschall et al., 1999). Haaf et al. (1999) postulierten, dass RAD51-Foci tragende Zellen die Reparatur nach DNA-Schädigung eingeleitet haben. RAD51-Foci könnten demnach das *repairosom* darstellen, an dem die RAD51-vermittelte Rekombinationsreparatur von Doppelstrangbrüchen im Zusammenspiel mit zahlreichen anderen Proteinen stattfindet. Heute gelten RAD51-Foci als funktioneller Nachweis von Reparaturkomplexen der homologen Rekombination in Säugetierzellen, und sind daher gut geeignet, den Effekt einer RAD51-Überexpression auf die Reparaturleistung der Zelle mittels homologer Rekombination zu überprüfen.

In unbehandelten Kontrollzelllinien mit niedriger RAD51-Expression zeigten sich RAD51-Foci, mit  $1,88 \pm 0,08$ ,  $1,92 \pm 0,2$  und  $1,74 \pm 0,1$  Foci/Zelle. Diese Werte waren deutlich höher als in nicht malignen Säugetierzellen ohne vorangegangene DNA-Schädigung, die in der Regel keine, bzw. nur sehr vereinzelt RAD51-Foci zeigen. Es wird allgemein angenommen, dass es sich bei diesen spontan auftretenden RAD51-Foci um Foci handelt, die während der S-Phase gebildet werden (Tashiro et al., 1996). Das in der vorliegenden Arbeit regelmäßige Auftreten von Foci in unbehandelten Zellen erklärt sich durch die Verwendung von Tumorzelllinien, deren Zellen stärker proliferieren, häufiger replizieren und somit einen erhöhten Anteil an S-Phase-Zellen haben. Nach Bestrahlung mit 6 Gy trat in diesen Zelllinien eine um das Zweifache gesteigerte Anzahl von RAD51-Foci auf. Dies stimmt überein mit den Ergebnissen von van Veelen et al. (2005), die sowohl für HeLa- als auch CHO-Zellen einen Vierfachen Anstieg der RAD51-Foci nach einer Dosis von 12 Gy zeigten.

In RAD51-überexprimierenden Zellen zeigte sich bereits ohne Bestrahlung eine im Vergleich zu den Kontroll-Zelllinien deutlich erhöhte Anzahl an RAD51-Foci ( $3,9 \pm 0,3$ ), deren Anzahl sich durch Bestrahlung mit 6 Gy auf  $9,77 \pm 0,87$  Foci/Zelle steigerte (Abb.10). Das bedeutet, dass

sich die Überexpression von RAD51 nicht auf die Reparaturleistung der Zellen auswirkt, beispielsweise zu einer Verbesserung und damit einer deutlichen Reduktion der RAD51-Foci führt, da hier eine den Kontrollzellen vergleichbare Steigerung um den Faktor 2,5 erfolgte. Von besonderer Bedeutung ist allerdings die erhöhte Anzahl der spontan auftretenden RAD51-Foci im Vergleich zu den Kontrollzellen, die auch für andere Tumorzelllinien mit einer Überexpression an RAD51 beobachtet werden konnte (Raderschall et al., 2002b).

Weiterhin fanden sich große und fadenförmig strukturierte Foci, die ohne vorangegangene Bestrahlung mit etwa 8% ausschließlich in RAD51-überexprimierenden Zellen auftraten und deren Bildung durch Bestrahlung sich um mehr als das Doppelte erhöhte (Abb.11). Eine derart veränderte Focistruktur bei RAD51-Überexpression wurde ebenfalls von Raderschall et al. (2002a) beschrieben. Hier zeigten sich in stabil transfizierten RAD51-überexprimierenden humanen PPL-Fibroblasten und TGR-Fibroblasten der Ratte bereits ohne vorangegangene DNA-Schädigung sowohl eine erhöhte Anzahl an RAD51-Foci als auch Foci mit einer linearen Struktur. Folglich kann ein erhöhter Proteinlevel allein eine dramatische RAD51-Umverteilung im Zellkern zur Folge haben. Diese Daten weisen darauf hin, dass es bei einem RAD51-Überangebot zu einer Aggregatbildung kommt, die entweder DNA-unabhängig ist oder sich an während der Replikation einzelsträngig vorliegender DNA als Folge von angehaltenen Replikationsgabeln ausbildet. Weitere Untersuchungen wären von Interesse, die eine Kolo-kalisation dieser RAD51-Aggregate mit Proteinen der Doppelstrangbruchreparatur bzw. der Replikation zeigen könnten.

### **5.3. Chromosomenaberrationen der G1-Phase**

Es sollte der Einfluss der RAD51-Überexpression auf Chromosomenaberrationen der G1-Phase überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden die Zellen in der G0-Phase bestrahlt und anschließend stimuliert. Verglichen wurde die Anzahl letaler Chromosomenaberrationen (Chromosomenfragmente, dizentrische Chromosomen) unbehandelter und mit Ponasteron behandelter Zellen nach Bestrahlung mit der jeweils unbestrahlten Kontrollgruppe.

Alle untersuchten Zelllinien zeigten einen dosisabhängigen Anstieg letaler Chromosomenaberrationen, mit Ponasteron behandelte Zellen zeigten geringfügig weniger Fragmente und azentrische Fragmente (Abb.12, 13). Da dieser Effekt sowohl in UiRad51- als auch UiLacZ-Zellen auftrat, ist er nicht auf eine Rad51-Überexpression, sondern allenfalls auf die Ponasteronbehandlung zurückzuführen. Dieses Ergebnis stimmt überein mit den Resultaten von Raderschall et al. (2002a), die in stabil transfizierten, RAD51-überexprimierenden Fibroblasten der Ratte nach Bestrahlung in der G0-Phase annähernd die gleiche Anzahl

chromosomaler Schäden wie in der Kontrollzelllinie fanden. Grandy et al. (2002) untersuchten embryonale Fibroblasten des Huhns nach Bestrahlung in Hinblick auf aufgetretene Translokationen mittels FISH. Für die Anzahl der Translokationen zeigte sich hier ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Reparaturleistung zwischen RAD51-überexprimierenden Zellen und den Kontrolllinien. Eine RAD51-Überexpression hat folglich an diesem Punkt des Zellzyklus keinen Einfluss auf die Reparaturleistung der Zelle.

#### **5.4. Chromatidtyp-Aberrationen der G2-Phase**

Es ist beschrieben, dass RAD51 zellzyklusspezifisch reguliert und hauptsächlich in der S/G2-Phase exprimiert wird. Deshalb sollte untersucht werden, wie sich eine RAD51-Überexpression auf Chromatidtypaberrationen in der G2-Phase auswirkt. Zu diesem Zweck wurden Zellen mit 0,5 Gy bestrahlt und eine halbe Stunde im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde für eine Stunde Colcemid zugegeben und die Metaphasen wurden geerntet. Dieser enge Zeitplan stellt sicher, dass die gewonnenen Metaphasen nur von Zellen stammen, die zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der G2-Phase waren. Es zeigte sich eine im Vergleich zu den Kontrollzelllinien 14-fache Erhöhung spontaner G2-Aberrationen (Abb.14, 15).

Nach Bestrahlung zeigte sich dagegen kein deutlicher Effekt der RAD51-Expression auf die Anzahl der G2-Aberrationen im Vergleich zu den Kontrollzelllinien. Somit wirkte sich ein Überangebot von RAD51 weder in der G1- noch in der G2-Phase auf die Reparatur von strahleninduzierten Chromosomenaberrationen aus. Raderschall et al. (2002a) beschrieben dagegen eine signifikante Reduktion von Chromatidtypaberrationen und Austauschaberrationen in RAD51-überexprimierenden Zellen nach Bestrahlung, allerdings erfolgte die Analyse der Chromatidtypaberrationen nach Bestrahlung in der G1-Phase, so dass die vorliegenden G2-Aberrationen aufgrund der Prozessierung in der S-Phase entstanden sein könnten. Die Verwendung unterschiedlicher Zellsysteme könnte ebenfalls eine Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse sein. Im Hinblick auf die Frage nach einem Einfluss der RAD51-Überexpression auf die Tumorentstehung scheint ein Zellsystem mit induzierbarer Überexpression geeigneter als stabil transfizierte Zellen mit dauerhafter Überexpression, die sich im Verlauf einer Langzeitkultivierung und klonaler Selektion an den dauerhaft erhöhten Proteinlevel angepasst haben.

#### **5.5. Zelluläre Strahlenempfindlichkeit**

Es sollte der Einfluss einer RAD51-Überexpression auf die Koloniebildungsfähigkeit nach Bestrahlung untersucht werden. Dabei zeigte sich, dass die Angehrate der RAD51-

überexprimierenden Zellen deutlich geringer war als die unbehandelter Zellen bzw. der Kontrollzelllinie. Dies stimmt überein mit den Ergebnissen von Flygare et al. (2001), die für humane Fibrosarkomzellen nach Induktion der RAD51-Überexpression eine Reduktion der Angehrate von 40% auf 6% zeigten.

Allerdings zeigte sich in der vorliegenden Arbeit kein Einfluss der RAD51-Überexpression auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit, da sich mit Ponasteron behandelte UiLacZ- und UiRad51-Zellen hinsichtlich ihrer Überlebensrate nicht unterschieden (Abb.18). Wurde das Zellüberleben auf die Angehrate unbehandelter Zellen bezogen, fand sich ebenfalls kein Unterschied hinsichtlich der Strahlenempfindlichkeit. Auch Lambert et al. (2000) zeigten für verschiedene Formen von RAD51, dass eine Überexpression lediglich die Rekombinationsrate, nicht jedoch die Strahlenempfindlichkeit beeinflusst. Im Gegensatz dazu beschreiben Yanez et al. (1999) eine Reduktion der Strahlenempfindlichkeit in RAD51-überexprimierenden Zellen, die allerdings erst bei sehr hohen Strahlendosen auftritt. Vispe et al. (1998) fanden ebenfalls nur eine geringe Reduktion der Strahlenempfindlichkeit bei hohen Dosen. Erst nach Synchronisation der Zellen und Bestrahlung in der G2-Phase konnte eine deutliche Reduktion der Strahlenempfindlichkeit erreicht werden. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Reparatur von Doppelstrangbrüchen über den Weg der RAD51-abhängigen homologen Rekombination überwiegend in der G2-Phase stattfindet. Zusammenfassend weisen die vorliegenden Daten darauf hin, dass sich eine RAD51-Überexpression nicht auf die allgemeine Strahlenempfindlichkeit, aber auf die Proliferation auswirkt.

## 5.6. Zellzyklus

Es sollte überprüft werden, ob die Überexpression von RAD51 einen Effekt auf die Zellzyklusregulation hat. Zur Bestimmung eines möglichen Effektes auf den G1-Arrest wurden die Proteinexpression für TP53 und p21 bestimmt. Der Effekt auf den G2-Arrest wurde mittels Zellzyklusverteilung analysiert.

### 5.6.1. G1-Arrest

Für die Bestimmung des G1-Arrests wurde die Expression der Proteine TP53 und p21 untersucht. TP53 wird auch als Wächter des Genoms bezeichnet (Levine 1997). Durch Bestrahlung oder andere zytotoxische Substanzen erzeugte DNA-Schäden führen zu einer TP53-abhängigen vermehrten Expression des p21-Proteins, welches über die Hemmung von CyclinD/Cdk4 und CyclinE/Cdk2 die Phosphorylierung des Rb-Proteins, die Freisetzung von E2F und damit die Transaktivierung von Genen verhindert, die für den Eintritt in die S-Phase

nötig sind. Dadurch kommt es zum Zellzyklusarrest vor der S-Phase, d.h. zum G1-Arrest. Ein ausgeprägter TP53-abhängiger G1-Arrest findet sich jedoch bei Tumorzellen, selbst solchen mit normalem TP53-Status, nicht (Nagasawa et al., 1998).

Raderschall et al. (2002a) konnten für exponentielle humane Fibroblasten einen TP53-unabhängigen Effekt der RAD51-Überexpression auf die Expression des p21 Protein feststellen. Es zeigte sich eine um das zweifache vermehrte p21-Expression bei einer RAD51-Überexpression auf Transkriptionsebene. In den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tumorzellen konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden (Abb. 16). Sowohl die TP53-abhängige als auch unabhängige p21-Expression zeigte keinen signifikanten Unterschied in Abhängigkeit von der RAD51-Expression. Jarutat (2004) beschrieb für exponentiell wachsende UiRad51-Zellen einen deutlichen TP53-unabhängigen p21 Anstieg 24h nach Induktion der Überexpression von RAD51 mit einem leichten Anstieg der Zellen in der G1-Phase, allerdings auch mit einem noch deutlicheren Anstieg der Zellen in der G2-Phase. Möglicherweise liegt an dieser Stelle der entscheidende Unterschied zu den hier gefundenen Ergebnissen, da in diesem experimentellen Ansatz konfluente Zellen zur Stimulation angeregt wurden, dann die Überexpression durch Zugabe von Ponasteron für 24h induziert wurde und nachfolgend die Bestimmung der Proteinexpression erfolgte. Dieser Versuchsaufbau führte möglicherweise zu einer Akkumulation der Zellen in der G2-Phase (siehe Abschnitt 5.6.2), sodass eine Induktion von p21 nicht zu erwarten war. Dies deckt sich auch mit dem Befund von Havre et al. (1998), die für konfluente CHO-Zellen nur eine vorübergehende Akkumulation in der G1-Phase bei RAD51-Überexpression beobachteten, gefolgt von einer Normalisierung der Zellzyklusverteilung nach 6h, mit einer nachfolgenden Akkumulation der Zellen in der G2-Phase.

#### 5.6.2. G2-Arrest

Es sollte überprüft werden, ob sich die Induktion der RAD51-Expression auf die Zellzyklusverteilung auswirkt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen in der G1-Phase synchronisiert, durch verdünnte Aussaat wieder zur Proliferation angeregt und zu mehreren Zeitpunkten nach Stimulation die Zellzyklusverteilung bestimmt. Während die Kontrollzellen nach einer anfänglichen Anhäufung von ca. 20-22% bei 30h die G2-Phase wieder verließen, zeigten die RAD51-überexprimierenden Zellen eine deutliche Akkumulation mit über 40% bis 70h nach Stimulation (Abb.17). Dies stimmt überein mit den Ergebnissen von Flygare et al. (2001), welche bei RAD51-überexprimierenden humanen Fibrosarkomzellen eine Akkumulation in der G2-Phase zeigten. Jarutat (2004) beschrieb ebenfalls für exponentiell wachsende Zellen nach einer anfänglichen Akkumulation in der G1-Phase eine wesentlich deutlichere

Akkumulation der Zellen in der G2-Phase. Übereinstimmend mit der Literatur zeigen diese Daten, dass ein Überangebot an RAD51 zu einem Arrest der Zellen in der G2-Phase führt.

### 5.7. Genomische Stabilität

Fasst man die wichtigsten Befunde dieser Arbeit zusammen, so zeigte sich, dass ein Überangebot von RAD51 ohne exogene Schädigung zu einer erhöhten Anzahl an RAD51-Foci (2fach, Abb. 10) einer erhöhten Anzahl an G2-Aberrationen (14fach, Abb. 15) und der Akkumulation der Zellen in der G2-Phase (mehr als 25% im Vergleich zu den Kontrollzellen, Abb. 17) führte. Das bedeutet, dass die Prozessierung endogen erzeugter DNA-Schäden bei einem Überangebot von RAD51 deutlich schlechter ist, mit dem Resultat, dass vermehrt DNA-Doppelstrangbrüche entstehen.

Die Ursache der vermehrten Anzahl von DNA-Doppelstrangbrüchen könnte auf eine verminderte Reparatur von durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) erzeugten DNA-Schäden zurückzuführen sein, die beispielsweise durch Lipidperoxidation oder in der mitochondrialen Atmungskette entstehen können. Zu den ROS gehören Superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ), Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Alkoxy-Radikale ( $RO\cdot$ ) und die reaktivste Spezies, das Hydroxylradikal ( $HO\cdot$ ). Reaktive Sauerstoffspezies können zu chemischen Modifikationen der DNA führen. In zellulärer DNA konnten oxidierte Basen neben Einzelstrangbrüchen und DNA-Protein-Quervernetzungen nachgewiesen werden (Blazek und Hariharan, 1984, Ben-Hur et al., 1987, Ugglä und Sundell-Bergman, 1990). Die wichtigste und am häufigsten entstehende Purinmodifikation ist 8-Hydroxyguanin (7,8-Dihydro-8-oxoguanin, 8-oxoG). 8-Hydroxyguanin entsteht durch Reaktion von Guanin-Basen mit Hydroxylradikalen, Singulett-Sauerstoff oder angeregten Photosensibilisatoren endogener (z.B. Riboflavin) oder exogener Herkunft. Aus oxidativen DNA-Schäden entstehen vorwiegend Punktmutationen. Das Auftreten von Deletions- und Insertionsmutationen ist hingegen gering. Zu den oxidativen Modifikationen der Pyrimidine gehören 5,6-Dihydropyrimidin-Derivate wie Thyminglykole und Cytosinhydrate und Fragmentierungsprodukte (z.B. 5-Hydroxy-5-methylhydantoin) (Breimer und Lindahl, 1985). Thyminglykole blockieren wie Formamidopyrimidine die DNA-Replikation und haben daher einen stark cytotoxischen Effekt (Laval et al., 1998). Während reguläre AP-Läsionen, also basenfreie Stellen durch Hydrolyse der *N*-glykosidischen Bindung entstehen, werden oxidierte AP-Läsionen durch oxidativen Angriff an die Kohlenstoffatome C1', C2' oder C4' des Zuckers gebildet. Die so entstandenen AP-Läsionen blockieren die DNA-Replikation, besitzen somit ein prämutagenes Potential. Das Auftreten von Deletionen ist ebenso durch spontane oder enzymatische Umwandlung der basenfreien Stellen in Strangbrüche möglich.

Fasst man diese sicherlich nicht vollständige Auflistung der möglicherweise endogen durch Sauerstoffradikale entstehenden DNA-Schäden zusammen, so ist es gut vorstellbar, dass einige dieser Schäden beispielsweise in Form von Einzelstrangbrüchen in die Replikation gelangen und dort durch Behinderung der Replikation zu Doppelstrangbrüchen umgewandelt werden könnten. Die Reparatur dieser so genannten Replikations-assoziierten DNA-Doppelstrangbrüche wird durch die homologe Rekombination vermittelt, mit ihrem wichtigsten Protein, dem RAD51. Dies würde bedeuten, dass bei einer Überexpression von RAD51 weniger dieser DNA-Schäden auftreten, doch das Gegenteil ist der Fall. Folglich könnte möglicherweise die Überexpression des RAD51-Proteins zu einer Störung seiner Funktion führen, beispielsweise durch eine verstärkte Akkumulation in Form filamentartiger Strukturen, wie sie auch im Rahmen dieser Arbeit beobachtet wurde (Abb.9), und dies zu einer verminderten Reparaturleistung führt. Möglicherweise könnte aber auch durch die Überexpression von RAD51 sekundär die Regulation anderer Proteine betroffen sein, beispielsweise durch Repression anderer an der HR beteiligter Proteine, um eine übermäßige Beladung der DNA mit RAD51 zu verhindern. Tatsächlich wurde parallel zu den hier dargestellten Ergebnissen für die Zelllinie UiRad51 im Vergleich zu UiLacZ die Genexpression nach Induktion von Ponasteron bestimmt (Wrona et al., 2007). Dabei zeigte sich eine um den Faktor 3 reduzierte Expression des Fanconi-A Proteins (FANCA), bei einer 25fachen Steigerung von RAD51.

FANCA gehört zu einer Gruppe von Genen, die in mutierter Form bei Patienten mit Fanconi-Anämie (FA, Fanconi 1927) entschlüsselt wurden. Bei dieser Erkrankung handelt es sich um ein autosomal-rezessiv erbliches Syndrom mit erhöhter Krebsanfälligkeit, angeborenen Fehlbildungen und progressivem Knochenmarkversagen. Der Beginn des Knochenmarkversagens liegt im Mittel bei 7-8 Jahren, die Patienten sterben häufig an den Folgen einer aplastischen Anämie.

Jedes der bislang entschlüsselten FA-Gene scheint mit seinem Produkt an der Zellantwort auf DNA-Schädigung beteiligt zu sein. So bilden nach aktuellen Modellen die FA-Proteine zwei Hauptkomplexe (Lyakhovich et al., 2007). Der FA-Kernkomplex wird durch die Proteine FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCM, FAAP1000 und FAAP24 gebildet und leitet die Ubiquitinierung und damit Aktivierung von FANCD2 ein. Zuvor findet, signalisiert durch einen vorliegenden DNA-Schaden, eine Phosphorylierung von FANCD2 durch ATR statt, ein Prozess, der als Auslöser für die nachfolgende Ubiquitinierung dient. Unter Vermittlung von BRCA1 wird ubiquitiniertes FANCD2 ins Chromatin gelenkt, wo es BRCA2 rekrutiert, den FA-Chromatinkomplex bildet und die Homologie vermittelte DNA-Reparatur startet, indem BRCA2 RAD51 auf den Chromatinstrang lädt. Dabei scheint das im Nukleosom lokalisierte Histon

H2AX, nachdem es einem DNA-Schaden folgend durch ATR phosphoryliert wurde, ebenfalls eine Rolle als „Marker“ in der Retention oder Akkumulation von Reparaturfaktoren zu spielen.

Eine häufig beschriebene, quasi die typische Eigenschaft von FA-Zellen ist ihre Übersensibilität gegenüber Agenzien die zu DNA-Vernetzung führen, insbesondere Diepoxybutane, Mitomycin C und Cisplatin (Gurtan und D´Andrea, 2006). Neuere Daten weisen allerdings darauf hin, dass möglicherweise die Sensibilität der FA-Zellen nicht auf die durch Mitomycin C erzeugten DNA-Vernetzungen zurückzuführen ist, sondern auf die während des Abbaus von beispielsweise MMC in Semiquinon-Derivate erzeugten OH-Radikale, die ihrerseits zu Basenschäden oder Einzelstrangbrüchen führen können (Pagano und Youssoufian, 2003). Hinweise auf eine erhöhte ROS Empfindlichkeit von FA-Zellen wurden erstmals von Joenje et al. (1995) beobachtet, die eine Reduktion der chromosomalen Instabilität durch Reduktion des Sauerstoffgehaltes im Medium bei der Kultivierung primärer Fanconi-Zellen erzielten. Saadatzaeh et al. (2004) zeigten ebenfalls eine Hypersensitivität gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in FANCC-defizienten Zellen. Weitere auf diese Hypersensitivität hinweisende Arbeiten sind von Pagano und Youssoufian (2003) zusammengestellt.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass die Überexpression von RAD51 nicht zu einer erhöhten Resistenz gegenüber genotoxischen Agenzien führte, sondern eher zu einer erhöhten genomischen Instabilität. Diese erhöhte genomische Instabilität ist auf eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber DNA-Schäden zurückzuführen, welche durch endogen erzeugte OH-Radikale verursacht wurden und deren Ausdruck sich in einer erhöhten Anzahl an endogenen Doppelstrangbrüchen zeigt, als Folge einer reduzierten FANCA-Proteinexpression.

## 6. Zusammenfassung

Mit dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob sich die Überexpression des Rad51 Proteins, welches für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels homologer Rekombination von Bedeutung ist, auf die Resistenzbildung oder die genomische Instabilität von Tumorzellen auswirkt. Diese These sollte an einem isogenetischen Tumorzellpaar mittels induzierbarer RAD51-Überexpression untersucht werden. Dabei war von besonderem Interesse, ob sich eine Erhöhung der RAD51-Expression auf die Bildung von Chromosomenaberrationen, die Zellzyklusverteilung und die Koloniebildungsfähigkeit nach Bestrahlung auswirkt.

Die Induktion der Überexpression bewirkte eine 4-fache Steigerung der RAD51-Konzentration im Vergleich zu den Kontrollzellen. Hinsichtlich der Proliferation bewirkte dies eine Verlängerung der Verdopplungszeit um 4h.

Für die RAD51-überexprimierenden Zellen wurde im Vergleich zu den Kontrollzellen kein Unterschied in der Resistenz gegenüber Bestrahlung gemessen. Dies konnte über den Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels RAD51-Foci, der Bildung von Chromosomenaberrationen in der G1-Phase sowie der Chromosomenaberrationen der G2-Phase, als auch mittels des Koloniebildungstestes gezeigt werden.

Dagegen wurden für die endogen erzeugten DNA-Doppelstrangbrüche deutliche Unterschiede gefunden. So zeigten die RAD51-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen eine um den Faktor 2 höhere Anzahl an RAD51-Foci und sogar um den Faktor 14 erhöhte Anzahl an G2-Aberrationen. Es wurde ebenfalls beobachtet, dass sich die Struktur der RAD51-Foci bei Überexpression zu deutlich größeren, filamentartigen Aggregaten veränderte.

Die Überexpression von RAD51 führte auch zu einem ausgeprägten Arrest der Zellen in der G2-Phase mit einer Zunahme um 42%. Ein Arrest in der G1-Phase wurde nicht beobachtet, was übereinstimmte mit einer unveränderten Expression von TP53 und p21, welche beide Marker des TP53-abhängigen bzw. TP53-unabhängigen G1-Arrestes sind.

Die Arbeit zeigt damit insgesamt erstmalig, dass eine Überexpression des RAD51-Proteins nicht zu einer verbesserten Reparaturleistung der Zellen gegenüber Röntgenstrahlen führt, sondern durch fehlerhafte Prozessierung endogener Schäden zu einer erhöhten genomischen Instabilität mit einem möglicherweise daraus resultierenden maligneren Phänotyp.

Es wird vermutet, dass die erhöhte Anzahl an endogenen Doppelstrangbrüchen und der daraus resultierenden genomischen Instabilität auf eine fehlerhafte Prozessierung Replikations-assoziiierter Schäden zurückzuführen ist, welche durch die gesteigerte Aggregatbildung des

RAD51-Proteins verursacht wird. Die fehlerhafte Prozessierung ist möglicherweise aber auch die Folge einer durch die RAD51-Überexpression bewirkten reduzierten Synthese von Proteinen, die für die Beladung des Chromatins mit RAD51 verantwortlich sind. Dies könnte für die Proteine des Fanconi-Komplexes oder das BRCA2-Protein gelten, die bei Reduktion ebenfalls zu einer erhöhten genomischen Instabilität führen.

## 7. Literaturverzeichnis

- Alberts B (2003) DNA replication and recombination. *Nature* 421/6921:431-5
- Arnaudeau C, Rozier L, Cazaux C, Defais M, Jenssen D, Helleday T (2001) RAD51 supports spontaneous non-homologous recombination in mammalian cells, but not the corresponding process induced by topoisomerase inhibitors. *Nucleic Acids Res* 29/3:662-7
- Ben-Hur E, Fujihara T, Suzuki F, Elkind MM (1987) Genetic toxicology of the photosensitization of Chinese hamster cells by phthalocyanines. *Photochem Photobiol* 45:227-30
- Blasco MA (2005) Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 6/8:611-22
- Blazek ER, Hariharan PV (1984) Alkaline elution studies of hematoporphyrin-derivative photosensitized DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Photochem Photobiol* 40:5-13
- Borgmann K (1999) Untersuchung strahleninduzierter Chromosomenschäden in Säugetierzellen, PhD dissertation, Universität Hamburg
- Breimer LH, Lindahl T (1985) Thymine lesions produced by ionizing radiation in double-stranded DNA. *Biochemistry* 24:4018-22
- Chen F, Nastasi A, Shen Z, Brenneman M, Crissman H, Chen DJ (1997) Cell cycle-dependent protein expression of mammalian homologs of yeast DNA double-strand break repair genes Rad51 and Rad52. *Mutat Res* 384/3:205-11
- Chen F, Nastasi A, Shen Z, Brenneman M, Crissman H, Chen DJ. (1997) Cell cycle-dependent protein expression of mammalian homologs of yeast DNA double-strand break repair genes Rad51 and Rad52. *Mutat Res.* 384/3:205-11
- Chen TY, Chen JS, Su WC, Wu MS, Tsao CJ. Expression of DNA repair gene Ku80 in lymphoid neoplasm. *Eur J Haematol.* 2005 Jun;74/6:481-8
- Connell PP, Jayathilaka K, Haraf DJ, Weichselbaum RR, Vokes EE, Lingen MW (2006) Pilot study examining tumor expression of Rad51 and clinical outcomes in human head cancers. *Int J Oncol* 28/5:1113-9
- Crissman HA, Oka MS, Steinkamp JA (1976) Rapid staining methods for analysis of deoxyribonucleic acid and protein in mammalian cells. *J Histochem Cytochem* 24/1:64-71
- Dikomey E, Dahm-Daphi J, Kasten U (2001) DNA-Schäden und ihre Reparatur. In: Freyschmidt J (Hrsg) *Handbuch Diagnostische Radiologie*. Springer-Verlag, Berlin
- Finnie NJ, Gottlieb TM, Blunt T, Jeggo PA, Jackson SP (1995) DNA-dependent protein kinase activity is absent in xrs-6 cells: implications for site-specific recombination and DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 92/1:320-4
- Flygare J, Fält S, Ottervald J, Castro J, Dackland AL, Hellgren D, Wennborg A (2001) Effects of HsRad51 overexpression on cell proliferation, cell cycle progression, and apoptosis. *Exp Cell Res* 268/1:61-9
- Friesland S, Kanter-Lewensohn L, Tell R, Munck-Wikland E, Lewensohn R, Nilsson A (2003) Expression of Ku86 confers favorable outcome of tonsillar carcinoma treated with radiotherapy. *Head Neck* 25/4:313-21
- Golub EI, Gupta RC, Haaf T, Wold M, Radding C (1998) Interaction of human Rad51 recombination protein with single-stranded DNA binding protein, RPA. *Nucleic Acids Res* 26/23:5388-93

- Grabsch H, Dattani M, Barker L, Maughan N, Maude K, Hansen O, Gabbert HE, Quirke P, Mueller W (2006) Expression of DNA double-strand break repair proteins ATM and BRCA1 predicts survival in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 12/5:1494-500
- Grandy I, Hardt T, Schmid M, Haaf T (2002) Effects of higher-order nuclear structure and Rad51 overexpression on radiation-induced chromosome rearrangements. *Cytogenet Genome Res* 98/4:265-69
- Gray JW (1974) Cell cycle analysis from computer synthesis of deoxyribonucleic acid histograms. *J Histochem Cytochem* 22/7:642-50
- Gurtan AM, D'Andrea AD (2006) Dedicated to the core: understanding the Fanconi anemia complex. *DNA Repair* 5:1119-25
- Haaf T, Golub EI, Reddy G, Radding C, Ward DC (1995) Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 92/6:2298-302
- Haaf T, Raderschall E, Reddy G, Ward DC, Radding CM, Golub EI (1999) Sequestration of mammalian Rad51-recombination protein into micronuclei. *J Cell Biol* 144/1:11-20
- Havre PA, Rice MC, Noe M, Kmiec EB (1998) The human REC2/RAD51B gene acts as a DNA damage sensor by inducing G1 delay and hypersensitivity to ultraviolet irradiation. *Cancer Res* 58/20:4733-39
- Helleday T, Lo J, van Gent D, Engelward BP (2007) DNA double-strand break repair: From mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst.)* 6/7:923-35
- Jarutat T (2004) Untersuchungen zu Mechanismen induzierter Veränderungen der Rad51-Expression bei Exposition mit DNA-schädigenden und Apoptose-auslösenden Agenzien. Med. Dissertation. Universität Lübeck
- Joenje H, Yousoufian H, Kruyt FA, dos Santos CC, Wevrick R, Buchwald M (1995) Expression of the Fanconi anemia gene FAC in human cell lines: lack of effect of oxygen tension. *Blood Cells Mol Dis* 21/3:182-91
- Keeney S (2001) Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Curr Top Dev Biol* 52:1-53
- Khanna KK, Jackson SP (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 27/3:247-54
- Komuro Y, Watanabe T, Hosoi Y, Matsumoto Y, Nakagawa K, Tsuno N, Kazama S, Kitayama J, Suzuki N, Nagawa H (2005) The expression pattern of Ku correlates with tumor radiosensitivity and disease free survival in patients with rectal carcinoma. *Cancer* 95/6:1199-205
- Kops GJPL, Weaver BAA, Cleveland DW (2005) On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* 5/10:773-85
- Lambert S, Lopez BS (2000) Characterization of mammalian RAD51 double strand break repair using non-lethal dominant-negative forms. *EMBO J* 19/12:3090-99
- Laval J, Jurando J, Saporbaev M, Sidorkina O (1998) Antimutagenic role of base-excision repair enzymes upon free radical-induced DNA damage. *Mutat Res* 402/1-2:93-102
- Lee SW, Cho KJ, Park JH, Kim SY, Nam SY, Lee BJ, Kim SB, Choi SH, Kim JH, Ahn SD, Shin SS, Choi EK, Yu E (2005) Expressions of Ku70 and DNA-PKcs as prognostic indicators of local control in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 62/5:1451-7
- Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88/3:323-331

- Lim DS, Hasty P (1996) A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. *Mol Cell Biol* 16/12:7133-43
- Liu Y, Maizels N (2000) Coordinated response of mammalian Rad51 and Rad52 to DNA damage. *EMBO Rep* 1/1:85-90
- Lyakhovich A, Surrallés J (2007) New Roads to FA/BRCA Pathway: H2AX. *Cell Cycle* 6/9:1019-23
- Maacke H, Hundertmark C, Miska S, Voss M, Kalthoff H, Stürzbecher HW (2002) Autoantibodies in sera of pancreatic cancer patients identify recombination factor Rad51 as a tumor-associated antigen. *J Cancer Res Clin Oncol* 128/4:219-22
- Maacke H, Jost K, Opitz S, Miska S, Yuan Y, Hasselbach L, Lüttges J, Kalthoff H, Stürzbecher HW (2000a) DNA repair and recombination factor Rad51 is over-expressed in human pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene* 19/23:2791-5
- Maacke H, Opitz S, Jost K, Hamdorf W, Henning W, Krüger S, Feller A Ch, Lopens A, Diedrich K, Schwinger E, Stürzbecher HW (2000b) Over-expression of wild-type Rad51 correlates with histological grading of invasive ductal breast cancer. *Int J Cancer* 88/6:907-13
- Nagasawa H, Keng P, Maki C, Yu Y, Little JB (1998) Absence of a radiation-induced first-cycle G1-S arrest in p53+ human tumor cells synchronized by mitotic selection. *Cancer Res* 58/9:2036-41
- Neumann AA, Reddel RR (2002) Telomere maintenance and cancer - look, no telomerase. *Nat Rev Cancer* 2/11:879-84
- Paffet KS, Clikeman JA, Palmer S, Nickoloff JA (2005) Overexpression of Rad51 inhibits double-strand break-induced homologous recombination but does not affect gene conversion tract lengths. *DNA Repair (Amst.)* 4/6:687-98
- Pagano G, Youssoufian H (2003) Fanconi anaemia proteins: major roles in cell protection against oxidative damage. *Bioessays* 25/6:589-595
- Paques F, Haber JE (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 63/2:349-404
- Pfeiffer P (1998) The mutagenic potential of DNA double-strand break repair. *Toxicol Lett* 96-97:119-29
- Pfeiffer P, Goedecke W, Kuhfittig-Kulle S, Obe G (2004) Pathways of DNA double-strand break repair and their impact on the prevention and formation of chromosomal aberrations. *Cytogenet Genome Res* 104/1-4:7-13
- Pfeiffer P, Goedecke W, Obe G (2000) Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* 15/4:289-302
- Prochownik EV (2005) Functional and physical communication between oncoproteins and tumor suppressors. *Cell Mol Life Sci* 62/21:2438-2459
- Qiao GB, Wu YL, Yang XN, Zhong WZ, Xie D, Guan XY, Fischer D, Kolberg HC, Krüger S, Stürzbecher HW (2005) High-level expression of Rad51 is an independent prognostic marker of survival in non-small-cell lung cancer patients. *Br J Cancer* 93/1:137-43
- Raderschall E, Bazarov A, Cao J, Lurz R, Smith A, Mann W, Ropers HH, Sedivy JM, Golub EI, Fritz E, Haaf T (2002a) Formation of higher-order nuclear Rad51 structures is functionally linked to p21 expression and protection from DNA damage-induced apoptosis. *J Cell Sci* 115/Pt 1:153-64

- Raderschall E, Golub EI, Haaf T (1999) Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions formed after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 96/5:1921-26
- Raderschall E, Stout K, Freier S, Suckow V, Schweiger S, Haaf T (2002b) Elevated levels of Rad51 recombination protein in tumor cells. *Cancer Res* 62/1:219-25
- Richardson C, Moynahan ME, Jasin M (1998) Double-strand break repair by interchromosomal recombination: suppression of chromosomal translocations. *Genes Dev* 12/24:3831-42
- Richardson C, Stark JM, Ommundsen M, Jasin M (2004) Rad51 overexpression promotes alternative double-strand break repair pathways and genome instability. *Oncogene* 23/2:546-53
- Rothkamm K, Kruger I, Thompson LH, Lobrich M (2003) Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* 23/16:5706-15
- Saadatzadeh MR, Bijangi-Vishehsaraei K, Hong P, Bergman H, Haneline LS (2004) Oxidant hypersensitivity of Fanconi anemia type C-deficient cells is dependent on a redox-regulated apoptotic pathway. *J Biol Chem* 279/16:16805-12
- Sanford KK, Parshad R, Gantt R, Tarone RE, Jones GM, Price FM (1989) Factors affecting and significance of G2 chromatin radiosensitivity in predisposition to cancer. *Int J Radiat Biol* 55/6:963-81
- Schild D, Lio YC, Collins DW, Tsomondo T, Chen DJ (2000) Evidence for simultaneous protein interactions between human Rad51 paralogs. *J Biol Chem* 275/22:16443-9
- Scott D, Barber JB, Spreadborough AR, Burill W, Roberts SA (1999) Increased chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a comparison of two assays. *Int J Radiat Biol* 75/1:1-10
- Scott D, Barber JB, Spreadborough AR, Burill W, Roberts SA (1999) Increased chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a comparison of two assays. *Int J Radiat Biol* 75/1:1-10
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goecke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150/1:76-85
- Söderlund K, Stal O, Skoog L, Rutqvist LE, Nordenskjöld B, Stenmark Askmalm M (2007) Intact Mre11/Rad50/Nbs1 complex predicts good response to radiotherapy in early breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 68/1:50-8
- Sonoda E, Sasaki MS, Buerstedde JM, Bezzubova O, Shinohara A, Ogawa H, Takata M, Yamaguchi-Iwai Y, Takeda S (1998) Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *EMBO J* 17/2:598-608
- Stark JM, Jasin M (2003) Extensive loss of heterozygosity is suppressed during homologous repair of chromosomal breaks. *Mol Cell Biol* 23/2:733-43
- Tan TL, Essers J, Citterio E, Swagemakers SM, de Wit J, Benson FE, Hoeijmakers JH, Kanaar R (1999) Mouse Rad54 affects DNA conformation and DNA-damage-induced Rad51 foci formation. *Curr Biol* 9/6:325-8
- Tashiro S, Kotomura N, Shinohara A, Tanaka K, Ueda K, Kamada N (1996) S phase specific formation of the human Rad51 protein nuclear foci in lymphocytes. *Oncogene* 12/10:2165-70
- Thompson LH, Schild D (2002) Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat Res* 509/1-2:49-78

- Uggla, A.H. and Sundell-Bergmann, S. (1990) The induction and repair of DNA damage detected by the DNA precipitation assay in Chinese hamster ovary cells treated with acridine orange + visible light, *Mutation Res.*, 236, 119-127.
- van Gent DC, Hoeijmakers JHJ, Kanaar R (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* 2/3:196-206
- van Veelen LR, Cervelli T, van de Rakt MWMM, Theil AF, Essers J, Kanaar R (2005) Analysis of ionizing radiation-induced foci of DNA damage repair proteins. *Mutat Res* 574/1-2:22-23
- Vispe S, Casaux C, Lesca C, Defais M (1998) Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation. *Nucleic Acids Res* 26/12:2859-64
- Wagener C (1999) *Molekulare Onkologie*. Thieme-Verlag, Stuttgart
- Wrona A, Jend C, Streichert T, Stürzbecher HW, Zschenker O, Borgmann K, Dikomey E (2006) Overexpression of RAD51 causes genomic instability in the G2 phase. 9<sup>th</sup> Biennial Meeting of the DGDR, Hamburg
- Yanez RJ, Porter ACG (1999) Gene targeting is enhanced in human cells overexpressing hRad51. *Gene Ther* 6/7:1282-90

## 8. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Camilla Jend  
Geburt: 07.02.1972 in Berlin  
Familienstand: verheiratet, ein Kind (2 Jahre)

### Schulbildung

1978-1991 Schulausbildung in Berlin und Hamburg, Abschluss Abitur

### Hochschulbildung

1991-1998 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg  
1. Staatsexamen 08/1995  
2. Staatsexamen 09/1997  
3. Staatsexamen 12/1998  
Praktisches Jahr im UKE, Hamburg 10/1997-09/1998, Wahlfach:  
Gynäkologie und Geburtshilfe  
2001-2006 Studium der Zahnmedizin an der Universität Hamburg  
Staatsexamen 12/2006

### Beruflicher Werdegang

06/1999-08/1999 Ärztin im Praktikum, Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe, ev.  
Krankenhaus Bethesda, Hamburg  
08/1999-11/2000 Ärztin im Praktikum, Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe, Klinikum  
Nord, Betriebsteil Heidberg, Hamburg  
11/2000-11/2003 Assistenzärztin, Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe, Klinikum  
Nord, Betriebsteil Heidberg, Hamburg  
seit 12/2006 Assistenzärztin für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie, Praxis Prof.  
Jend-Rossmann, Hamburg

## 9. Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Frau Dr. Kerstin Borgmann für die ausgezeichnete Betreuung. Ihr allzeit offenes Ohr, ihre Geduld und ihre motivierende Zusprache waren eine große Hilfe.

Herrn Prof. Jung, Herrn Prof. Alberti und Herrn Prof. Dikomey danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit im Institut für Strahlentherapie und Radioonkologie anfertigen zu können.

Ebenso danke ich der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dikomey für die freundliche Aufnahme und die zahlreichen Hilfestellungen. Insbesondere Frau Dr. Kerstin Büttner, Frau Agnieszka Wrona, Frau Jutta Schäfer, Frau Britta Riepen und Frau Alexandra Zielinski ein Dankeschön für die Einweisung in Versuchstechniken und viel praktische Unterstützung.

Meinen Eltern danke ich ganz besonders; sie ermöglichten meine Ausbildung und unterstützten mich stets in praktischen wie auch theoretischen Belangen. Tobi danke ich für Verständnis, Geduld und nicht zuletzt für die Ermöglichung meines Zweitstudiums.

**10. Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift.....