

Aus dem
Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie
Leitung: Prof. Dr. E. Dikomey
der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
des Onkologischen Zentrums
Leitung: PD. Dr. A. Krüll (komm.)
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

**Einfluss von Topoisomerase II Inhibitoren auf die Reparatur
von Doppelstrangbrüchen durch
Homologe Rekombination und Nichthomologes Endjoining**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

Rahel Steiner
aus Hamburg

Hamburg
2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 15.01.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: PD Dr. J. Dahm-Daphi

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. E. Dikomey

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. J. Lorenzen

.....

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitshypothese	3
2. Einleitung	4
3. Material und Methoden	15
3.1. Zelllinien und Kultivierung	15
3.1.1. 10.1. MEFs	15
3.1.2. 10.1. pGFSP6 und 10.1. pGFSP3	15
3.1.3. Einfrieren	16
3.1.4. Wachstumstest	16
3.1.5. Koloniebildungstest	16
3.2. Messung der Toxizität von Etoposid	17
3.2.1. Etoposid	17
3.2.2. Koloniebildungstests mit Etoposid	17
3.3. Transfektion von Plasmid-DNA	17
3.3.1. Bestimmung optimaler Transfektionsbedingungen	18
3.4. Durchflusszytometrie	19
3.5. Zellsynchronisation	20
3.6. Zellzyklusmessung am Durchflusszytometer	20
3.7. Western Blot	21
3.8. Messung der Doppelstrangbruchinduktion durch Etoposid mittels γ H2AX-Foci	23
4. Resultate	25
4.1. Zellwachstum	25
4.2. Koloniebildungstest mit 10.1.pGFSP6	27
4.3. Toxizität von Etoposid	27
4.4. Zelltransfektion und Expression des „Grünfluoreszierenden Proteins“	29
4.5. Induktion von Doppelstrangbrüchen	30
4.5.1. Zusammenhang von Spannung und Transfektionsrate	31
4.5.2. Expressionskinetik des GFP und der I-SceI Endonuklease nach Elektroporation	31
4.6. Reparatur von Doppelstrangbrüchen	34
4.6.1. Reparaturkinetik der Homologen Rekombination	34

4.6.2. Reparaturkinetik des Nichthomologen Endjoinings	35
4.7. Einfluss des Topoisomerase II-Inhibitors Etoposid auf die Reparatur von Doppelstrangbrüchen	37
4.7.1. Etoposid vermindert die Reparatur durch Homologe Rekombination	37
4.7.2. Etoposid hat keinen Einfluss auf das Nichthomologe Endjoining	37
4.8. Topoisomerase II-Nachweis	38
4.8.1. Synchronisation der Zellen und Messung der Zellzyklusverteilung im Durchflusszytometer	40
4.8.2. Proteinnachweis durch Western Blot	42
4.9. Etoposid induziert Doppelstrangbrüche	43
5. Diskussion	45
5.1. Konstrukte für zwei Reparaturwege mit unterschiedlicher Effizienz und Geschwindigkeit	45
5.2. Die Bedeutung der Topoisomerase II bei der DSB-Reparatur	48
5.3. Expression der Topoisomerase II ist zellzyklusabhängig	51
5.4. Etoposid verursacht DSB	51
5.5. Topoisomerase I	52
5.6. Etoposid in der Therapie: Strahlensensibilisierung durch Hemmung der Homologen Rekombination	54
6. Zusammenfassung	56
7. Literaturverzeichnis	57
8. Danksagung	65
9. Lebenslauf	66
10. Erklärung	67

1. Arbeitshypothese

Etoposid, ein Topoisomerase II-Inhibitor, wird erfolgreich in der Behandlung von verschiedenen Karzinomen sowohl als Mono-Chemotherapeutikum als auch in der kombinierten Radiochemotherapie eingesetzt. In der Radiochemotherapie ruft Etoposid eine Strahlensensibilisierung hervor, so dass eine höhere Effektivität der Bestrahlung erreicht werden kann.

Die vorliegende Arbeit geht von der Hypothese aus, dass diese Strahlensensibilisierung auf eine Inhibition der Reparatur von strahleninduzierten Doppelstrangbrüchen durch Hemmung der Topoisomerase II mit Etoposid zurückzuführen ist.

Diese Annahme wird anhand der Untersuchung des Einflusses von Etoposid auf die beiden wichtigsten Reparaturwege von DSB, die Homologe Rekombination und das Nichthomologe Endjoining, überprüft.

2. Einleitung

Karzinom – ein Begriff, der schon auf den griechischen Arzt Hippokrates (Corpus Hippocraticum, 4. Jhd. v. Chr.) und auch auf Philosophen wie Aristoteles oder Galeus zurückzuführen ist. Mit dem Begriff Karzinom wurden damals Knoten und Geschwüre beschrieben, die nicht zu heilen waren. Sie waren von einem Netz von Blutgefäßen umgeben, so dass ihr Aussehen an Krebstiere mit ihren Beinen und Scheren erinnerte. Deshalb nannte Hippokrates eine solche Neubildung „*karkínos*“ [griech. karkínos Krebs].

Bis zum heutigen Zeitpunkt im Jahre 2008 hat die Forschung auf dem Gebiet der Krebserkrankungen neue Erkenntnisse gewonnen. Es gibt eine umfassende Klassifizierung verschiedener Krebserkrankungen und auch in dem Wissen um die Krebsentstehung sind seit Hippokrates Zeiten bis in die Gegenwart entscheidende Fortschritte gemacht worden.

Ein Karzinom entsteht maßgeblich durch genetische Veränderungen – durch irreparable Schäden des Genoms. Eine Zelle entwickelt sich dadurch zu einer unkontrolliert wachsenden Tumorzelle. Oft betroffene Gene sind sogenannte Protoonkogene, Tumorsuppressorgene oder auch Reparaturgene (Vogt et al., 2004). Die Protoonkogene und Tumorsuppressorgene sind in allen gesunden Körperzellen zu finden. Sie regulieren Proliferation (Zellwachstum) und Differenzierung der Zelle. Dabei fördern Onkogene prinzipiell die Proliferation, während Tumorsuppressorgene das Wachstum der Zelle unterdrücken. Die beiden Proteine halten das Wachstum einer gesunden Zelle im Gleichgewicht. Fallen Gene, die diese Proteine kodieren, z.B. durch Mutation aus, verliert das Kontrollsystem die Balance. Dies führt zu unkontrolliertem Wachstum. Daneben kann auch eine Mutation in Reparaturproteinen eine Karzinombildung auslösen. Reparaturproteine sind für die Reparatur von DNA-Schäden im Genom zuständig. DNA-Schäden können unrepariert zu Genominstabilität führen.

Die Ursachen der Entstehung von DNA-Schäden sind vielfältig. Exogene Ursachen werden häufig als Karzinogene bezeichnet. Neben chemischen Karzinogenen gibt es solche wie Viren oder ionisierende und UV-Strahlung (u.a. radioaktive Strahlung, Sonnenlicht). Sowohl hierdurch als auch aufgrund des oxidativen Stoffwechsels entstehen spontan Basenschäden, Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA. Können diese Schäden nicht repariert werden, so stirbt die Zelle entweder ab (z.B. über den

mitotischen Zelltod oder Apoptose) oder es kommt zu genomischer Instabilität. Dann kann eine solche Zelle den Ausgangspunkt eines Karzinoms darstellen.

Heute sind aufgrund intensiver Forschung eine Vielzahl von Möglichkeiten in der Therapie von Krebs gegeben. Wurden früher die Geschwüre vor allem äußerlich mit Pulver, Pflanzenextrakten und Tinkturen behandelt, so setzt man heute auf eine multimodale Therapie. Dazu gehört die operative Entfernung des Karzinoms, adjuvante oder neoadjuvante Strahlentherapie und Medikamentenbehandlung (Zytostatika, Hormon-, Immuntherapie) sowie palliative Behandlung und Förderung der Lebensqualität der Erkrankten. Das bedeutet, die Diagnose Krebs ist nicht mehr gleichbedeutend mit einem „Todesurteil“ für den Patienten, sondern die Krankheit kann, abhängig von Faktoren, wie z.B. Karzinomart, Zeitpunkt der Diagnose, Alter und Lebenswandel, einen ganz unterschiedlichen Verlauf nehmen; dem Patienten kann oft eine günstige Prognose gestellt werden.

Krebs ist trotz dieser Fortschritte immer noch nach Herzinfarkt und Schlaganfall (ca. 45%) mit 26% die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Bei Männern lagen am häufigsten bösartige Neubildungen der Atmungsorgane (7,5%), der Prostata (2,9%) und des Dickdarms (2,4%) vor. Bei Frauen waren neben den bösartigen Neubildungen der Brustdrüse (4,0%) die der Atmungsorgane (2,5%) am häufigsten (Statistisches Bundesamt Deutschland 2006). Es bedarf folglich weiterer therapeutischer Bemühungen, um die Zahl der Todesfälle noch mehr senken zu können. Ein wesentlicher Ansatz in der Therapie besteht seit einigen Jahren darin, verschiedene Modalitäten gemeinsam anzuwenden. Kombinierte Radiochemotherapie ist für viele Tumorentitäten inzwischen zum Behandlungsstandard geworden (Tannock, 1996; Bartelink et al., 2002; Bhutani et al., 2006; Ciombor et al., 2006). Für einige Therapien nutzt man die Wirkungen beider Agenzien unabhängig voneinander (additiver Effekt), in anderen Fällen konnte die Chemotherapie die Strahlenwirkung verstärken (synergistischer Effekt) (Hennequin et al., 2001; Wilson et al., 2006). Eine mögliche Wirkungsweise hierbei ist die Hemmung der DNA-Reparatur durch das Chemotherapeutikum, wie es bereits für Cis-Platin gezeigt wurde (Begg, 1990; Wilson et al., 2006).

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob Inhibitoren der Topoisomerase II (Topo-II) die Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB) beeinflussen. DSB stellen nach ionisierender Bestrahlung die entscheidenden letalen DNA-Schäden dar (Dikomey et al., 1998; Willers et al., 2004). Eine Inhibition der Reparatur dieser DSB könnte ein Weg sein, über den die Strahlenwirkung insgesamt verstärkt wird. Zur Reparatur von

Doppelstrangbrüchen werden zwei Wege von der Zelle genutzt, das *Nicht-homologe Endjoining* (NHEJ) und die *Homologe Rekombination* (HR oder HDR =homology directed repair) (Lin et al., 1999; Pfeiffer et al., 2000; Khanna et al., 2001; Jackson, 2002; Willers et al., 2004). In Säugetierzellen werden etwa 2/3 aller DSB über den Weg des NHEJ und 1/3 über HR repariert (Sargent et al., 1997; Johnson et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit konnten diese Reparaturwege einzeln untersucht werden, da in einer früheren Doktorarbeit hierfür spezielle Plasmidkonstrukte entwickelt wurden (Schmidt-Petersen, Med. Doktorarbeit. 2003).

Als Einstieg in das Thema sollen zunächst die Reparaturmechanismen für einen DSB erläutert werden. Ein DSB zerstört an einer Position im Genom die Kontinuität beider komplementärer DNA-Stränge. Die Reparatur muss deshalb ohne Matrize des zweiten Stranges erfolgen, wie es etwa bei einem Einzelstrangbruch oder einem Basenschaden möglich ist. Dies birgt die Gefahr, dass der Schaden nicht korrekt repariert wird mit der Konsequenz der Genomischen Instabilität oder des Zelltodes (Pfeiffer et al., 2000; Khanna et al., 2001; Dixon et al., 2004).

Homologe Rekombination:

Die Homologe Rekombination (Abb. 1A) stellt eine konservative Reparatur dar. Dazu ist eine zum geschädigten Strang homologe intakte Sequenz von mindestens 400 Basenpaaren erforderlich. Diese stammt optimalerweise vom Schwesterchromatid nach DNA-Replikation (Johnson et al., 2001) oder in selteneren Fällen vom homologen Chromosom. So ist die HR vermehrt in der S/G2-Phase des Zellzyklus zu finden (Hendrickson et al., 1998; Rothkamm et al., 2003; Saleh-Gohari et al., 2004). Auch repetitive Sequenzen auf dem Genom können unter Umständen als homologe Kopie dienen. An der HR sind eine Vielzahl von Proteinen, wie die des MR11 Komplexes, bestehend aus Mre11, Rad50 und Nbs1, sowie RPA (Replication protein A) Rad52, Rad51, Rad51B, C, D, Rad54, Xrcc2 und 3, Brca1, Brca2, c-Abl und ATM beteiligt (Symington, 2005; Mazin Alexeev et Kowalczykowski, 2003; Sugawara et al., 2003; Khanna et Jackson, 2001; Petukhova et al., 1998). Am Anfang der Reparatur durch HR entstehen in der Umgebung des DSB durch exonukleotischen Abbau durch die Exonuklease 1 in 5'-3'-Richtung 3'-Einzelstrangenden (Abb.1A I.). Es wird nun die komplementäre Sequenz in einem zweiten DNA-Doppelstrang („Donorstrang“) aufgesucht. Dieser Donorstrang wird entwunden und die Doppelstränge werden getrennt, so dass sich die 3'-Enden des defekten Stranges der komplementären Sequenz anlegen können (Abb.1A II.+III.). Die verlorengegangenen Sequenzen können nun vom „Donorstrang“, der als Matrize dient,

durch DNA-Polymeraseaktivität abgelesen und resynthetisiert werden. Die entstandenen Enden werden ligiert, so dass sich überkreuzende Stränge entstehen (sogenannte Holiday-Junction). Es gibt zwei Wege, diese Überkreuzung zu lösen: Entweder wird vor und hinter dem DSB in gleicher Weise geschnitten oder beide Kreuzungsstellen werden in unterschiedlicher Richtung getrennt. Im ersten Fall entsteht ein begrenzter Austausch von genetischer Information (Gen-Konversion), im zweiten Fall ein vollständiger Austausch der Schwesterchromatiden (Cross over) (Abb.1A IV.). Da bei der HR eine homologe Sequenz als Matritze dient, ist dieser Reparaturweg im Prinzip fehlerfrei.

Nichthomologes Endjoining:

Das Nichthomologe Endjoining (NHEJ) (Abb1B) zählt zu der nichtkonservativen Reparatur. NHEJ benötigt keine homologe Sequenz und ist somit Zellzyklus unabhängig (Rothkamm et al., 2003). Beim NHEJ werden die Enden des DSB zunächst exonukleotisch bereinigt, damit ligierbare Enden entstehen (Abb.1B II). Hierbei spielen Proteine, wie der Ku70/80-DNA-PKcs-Komplex und Artemis eine Rolle. Die Ligase IV zusammen mit den Ko-Faktoren XRCC4 und XLF verbindet die entstandenen Enden und schließt so die Doppelstrangunterbrechung (Khanna et al., 2001). Da bei der Bereinigung der DNA-Enden einige Nukleotide verloren gehen können, ist dieser Reparaturweg mit einer hohen Fehlerrate behaftet. Dennoch wird NHEJ häufiger genutzt als HR (Sargent et al., 1997; Liang et al. 1998; Johnson et al., 2001 Allen et al. 2003), weil die Reparatur über NHEJ schneller, weniger komplex und energiesparender ist. Da nur ca. 5% des Genoms für Proteine kodiert, ist eine fehlerhafte Reparatur im nicht-kodierten Bereich von der Zelle tolerierbar.

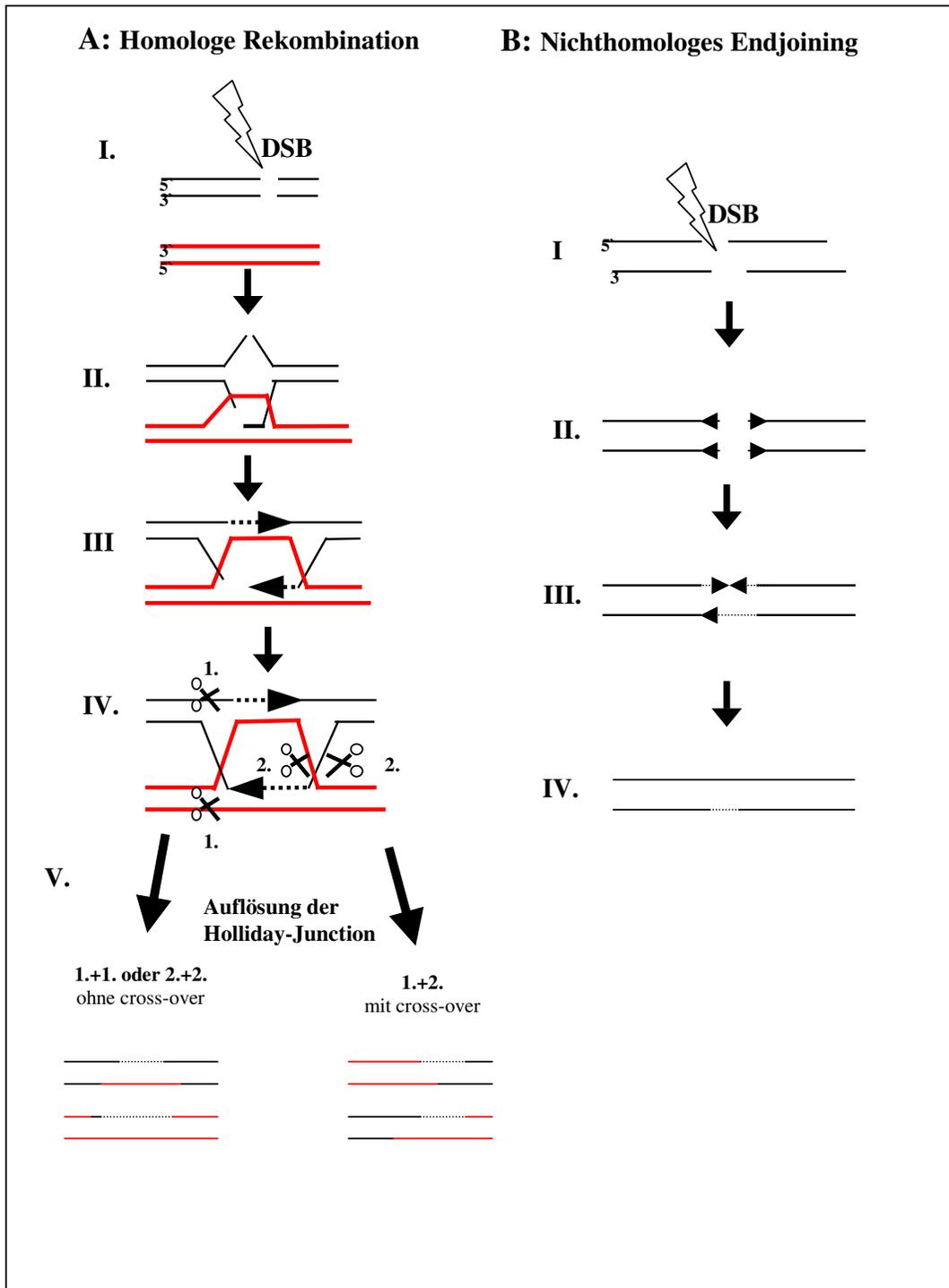


Abb.1

A: DSB-Reparatur über HR. Eine homologe Sequenz im Donorstrang dient als Matritze. Die fehlende Sequenz wird resynthetisiert und die Überkeuzungstellen (Holliday-Junctions) mit oder ohne cross-over aufgelöst.

B: DSB-Reparatur über NHEJ. Die durch Exonuklease-Aktivität entstandenen Einzelstrangenden werden ligiert. Es wird keine homologe Sequenz benötigt.

Reparatur-Reporterkonstrukte:

Um in der vorliegenden Arbeit diese beiden Reparaturwege getrennt voneinander untersuchen zu können, wurden zwei Reporterkonstrukte verwendet (Schmidt-Petersen, Med. Doktorarbeit 2003), zum einen das Konstrukt für die HR, bezeichnet als pGFSP3 (Abb.2A), und zum anderen das Konstrukt für das NHEJ, bezeichnet als pGFSP6 (Abb.2B). Beide Konstrukte sind auf der Basis weitgehend identischer genetischer Elemente und Struktur aufgebaut. Somit sind die Voraussetzungen für eine Vergleichbarkeit der beiden Reparaturwege gegeben. Wichtige genetische Elemente derartiger plasmidbasierter Konstrukte sind:

- der Replikationsstartpunkt ColE ori (Origin of Replikation) zur Replikation des Plasmids im Bakterium
- das Antibiotikaresistenzgen Amp^R, welches in Bakterien die Resistenz gegen Ampicillin vermittelt
- das Puromycin¹-Resistenzgen zur Selektion von plasmidtragenden Säugetierzellen
- das GFP- Reportergen (Green- Fluorescent- Protein- Gen) mit CMV-Promotor und Polyadenylierungssignal (pA)

Ausgangsplasmid für beide Konstrukte war pBlueskript II KS². Auf diesem Plasmid liegt der Replikationsstartpunkt ColE ori und das Ampicillin-Resistenzgen. In einer Vorarbeit wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) das Puromycin-Resistenzgen und ein Polyadenylierungssignal aus dem pPHW1-Plasmid (Dahm-Daphi et al. 2005) gewonnen und in das pBlueskriptII KS integriert, welches dann als pBlueskriptpuropoly bezeichnet wurde. Aus dem pEGFP N1-Plasmid³ wurden alle GFP-Derivate mittels PCR gewonnen (Schmidt-Petersen, Med. Doktorarbeit 2003).

In früheren Arbeiten wurde, um die Reparatur messbar zu machen, oft mit der Expression von Resistenzproteinen gegen spezielle Antibiotika gearbeitet. Es dauerte oft Wochen, bis dann aus der Anzahl resistenter Klone auf die Reparatur geschlossen werden konnte. In dieser Arbeit wird bei den Konstrukten pGFSP3 und pGFSP6 nicht mit einem Antibiotikaresistenzgen gearbeitet, sondern mit dem Green-Fluorescent-Protein-Gen (GFP-Gen). Dieses Gen entstammt der Tiefseequalle *Aequoria victoria*. Wird eine Zelle, die dieses Gen trägt, mit UV- oder blauem Licht angeregt, so fluoresziert das GFP sichtbar grün (Prasher et al., 1992; Cody et al., 1993; Chalfie, 1995). Diese Fluoreszenz lässt sich mit Hilfe eines Flusszytometers quantifizieren.

¹ Sigma

² Startogene

³ Clontech

Es wurden jeweils Derivate des GFP-Gens in die Konstrukte eingebaut, so dass ein korrektes Reparaturereignis durch die Grünfluoreszenz der Zelle im Flusszytometer gemessen werden konnte.

Das Konstrukt der Homologen Rekombination (pGFSP3) besteht aus 6621 Basenpaaren. Auf ihm liegt, neben den bereits erwähnten Grundelementen, ein GFP-Gen, in welches eine Erkennungssequenz für die Endonuklease I-SceI inkloniert wurde (Abb.2A). Durch diese Insertion ist das GFP-Gen inaktiviert und kann erst durch die Reparaturvorgänge „reaktiviert“ werden. Die I-SceI-Endonuklease wird aus Hefen gewonnen und dient der Erzeugung eines einzelnen Doppelstrangbruches. Die Erkennungssequenz ist 18 Basenpaare lang und hat die Basenfolge: TAGGGATAACAGGGTAAT (Rouet et al., 1994). Wegen der Länge der spezifischen Sequenz kann davon ausgegangen werden, dass diese nicht zufällig im Genom von Säugetierzellen vorkommt. Durch Transfektion mit einem Plasmid (pCMV-I-SceI), auf dem die I-SceI-Endonuklease kodiert ist, kann an der spezifischen Erkennungssequenz im GFP-Gen ein DSB verursacht werden. Auf dem Konstrukt pGFSP3 befindet sich außerdem ein am 3'-Ende deletiertes GFP-Gen (GFP- Δ 3'). Durch die Deletion ist das GFP-Gen ebenfalls inaktiv. Wird nun über die I-SceI-Endonuklease ein DSB in der Erkennungssequenz innerhalb des GFP-Gens erzeugt, löst dies Reparaturvorgänge aus. Dazu stehen der Zelle grundsätzlich mehrere Möglichkeiten offen. Jedoch nur, wenn die Zelle den DSB über HR repariert, wird der Schaden fehlerlos behoben, was zu einem intakten GFP-Gen und somit zu einer Grünfluoreszenz der Zelle führt. Für die HR benötigt die Zelle, wie zuvor beschrieben, eine homologe Sequenz im Genom. Diese ist durch das GFP- Δ 3' vorhanden. Bei der Reparatur in der S/G2-Phase kann sich das Schwesterchromatid mit dem Bereich der homologen Sequenz an die Schadensstelle anlagern. Es ist aber auch möglich, dass sich die homologe Sequenz auf dem gleichen Chromatid durch Bildung einer „Schleife“ an den DSB anlegt und damit eine Reparatur in der G1 Phase erlaubt. Die Zelle kann somit den DSB im GFP-Gen über HR reparieren und die Zelle fluoresziert grün. Somit markiert jede Grünfluoreszenz der Zelle, die das pGFSP3 integriert hat, jeweils eine stattgefundene Reparatur durch HR.

Das Konstrukt des Nichthomologen Endjoinings (pGFSP6) ist 6129 Basenpaare groß. Neben den Grundelementen befindet sich auf diesem Konstrukt ein vollständiges GFP-Gen (Abb.2B). Jedoch wurde zwischen Promoter und offenem Leserahmen (ORF) die Sequenz für ein zusätzliches Startkodon (ATG) inkloniert. Dieses befindet sich nicht im gleichen Leserahmen wie das originale Startkodon und verhindert, dass das GFP

translatiert werden kann. Das neu eingebaute, „künstliche“ ATG wird von zwei Erkennungssequenzen für die I-SceI-Endonuklease flankiert. Werden nun durch die I-SceI-Endonuklease an den beiden Erkennungssequenzen DSB verursacht, fällt das künstliche Startcodon heraus. Erfolgt die Schließung der Lücke über NHEJ, kann das GFP-Gen abgelesen werden und die Zelle fluoresziert grün. Eine Grünfluoreszenz der Zelle würde in diesem Falle ein Reparaturereignis durch NHEJ anzeigen. Da es keine homologe Sequenz zu diesem Reparaturabschnitt auf dem Konstrukt gibt, kann nicht über HR repariert werden.

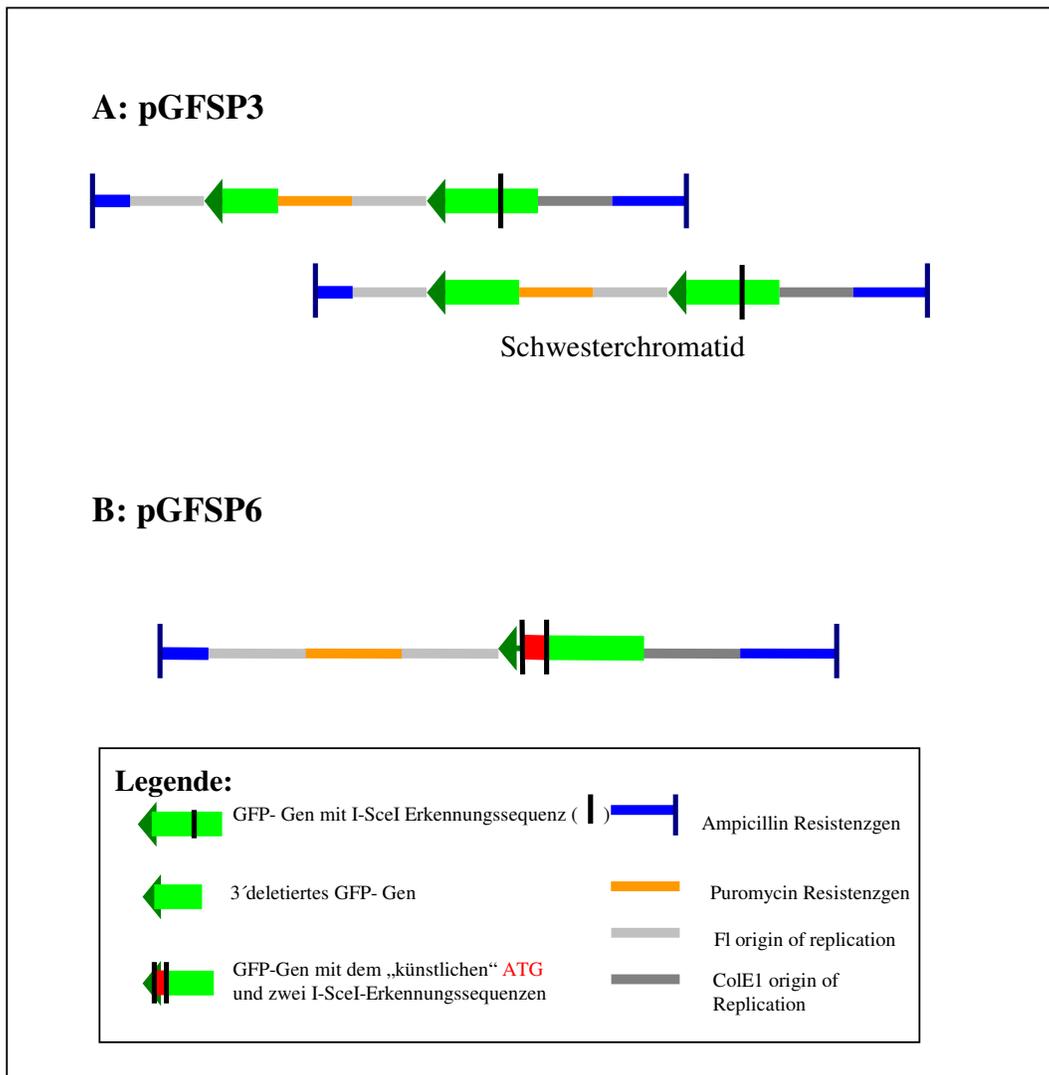


Abb. 2

A: pGFSP3, das Plasmid der HR, in linearisierter Darstellung
 B: pGFSP6, das Plasmid des NHEJ, in linearisierter Darstellung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht die Reparatur von DSB durch HR und NHEJ. An der Reparatur sind, wie oben beschrieben, eine Vielzahl von Proteinen beteiligt. Es werden fortlaufend neue Proteine entdeckt, die mehr oder minder direkt in beide Prozesse involviert sind. Neuerdings lassen sich auch Verbindungen und Überlappungen zwischen beiden Reparaturwegen aufzeigen.

Es soll in dieser Arbeit geklärt werden, ob die Topoisomerase II (Topo-II) an den o.g. Reparaturmechanismen beteiligt ist. Die Topo-II ist ein Enzym, welches den topologischen Zustand der DNA in der Zelle regeln und verändern kann. Topo-II katalysiert den ATP-abhängigen Transport von einer intakten Doppelhelix durch eine zweite, bei der zuvor durch das Enzym ein DSB verursacht wurde (Abb.3). Die DNA liegt als gewundene Doppelhelix im Zellkern vor. Diese ist fortlaufend alle 400 Basenpaare um Komplexe aus Histonproteinen gewunden, was zu einer „Verdichtung“ der DNA zu sogenannten Nukleosomen führt. Nicht-Histonproteine kondensieren die DNA weiter zu Strukturen höherer Ordnung („higher order chromatin structure“) (Wang, 1985; Osheroff et al., 1991; Chen et al., 1994; Burden et al., 1998; Fortune et al., 2000; Champoux, 2001; Wang, 2002; Baldwin et al., 2005). Für einige Vorgänge in der Zelle, wie Replikation und Rekombination, muss die DNA jedoch entwunden werden. Während der Öffnung des kondensierten Chromatins über mehrere Nukleosomenwindungen hinweg kommt es zu Verschlingungen und Überkreuzungen der DNA, die durch die Topo-II gelöst werden müssen. Auch zur Reparatur muss die DNA am Ort des Schadens frei entwunden vorliegen, damit die zahlreichen Reparaturproteine direkt an die DNA binden können. Auch hierbei ist eine Beteiligung der Topo-II wahrscheinlich. Es gibt zwei Isoenzyme von Topo-II: Topo-II α und Topo-II β , wobei in dieser Arbeit nur Topo-II α beachtet wird (Chung et al., 1989; Jenkins et al., 1992). Anders als Topo-II β wird Topo-II α in exponentiell wachsenden Zellen stärker exprimiert als in ruhenden Zellen, was auf eine zellzyklusabhängige Expression hindeutet. Topo-II α ist ein Homodimer mit zwei 170-kDa Polypeptiden. Das Gen für Topo-II ist auf Chromosom 17q21-22 lokalisiert. Es gibt drei getrennte Domänen-Regionen pro Untereinheit: eine ATPase oder N-terminale Domäne und eine Trennungs-/Verbindungsdomäne, welche sich aus dem sog. DNA-Gate und der C-terminalen Domäne zusammensetzt (Roca, 2004; Berger et al., 1996). Bevor Topo-II mit der DNA interagiert, hat es die Form einer offenen Klammer (Abb.3; 1), in der die N-terminale Domäne an den oben gelegenen Spitzen, das DNA-Gate in der Mitte am „Gelenk“ und das C-Gate am unteren Ende lokalisiert sind. In einer Doppelhelix wird in der „Trennungs-/Verbindungsdomäne“ ein DSB in der DNA

(sog. G(ated)-Segment) verursacht (Abb.3; 2-3). Hierbei sind die 5`DNA-Enden über Phosphotyrosinbindungen mit dem Enzym verbunden (cleavage-complex). Durch ATP-Bindung verändern sich die N-terminalen Domänen, so dass sich die Klammer um einen weiteren Doppelstrang (sog. T(ransported)-Segment) schließt (Abb.3; 2-3). Durch Konformationsänderung des Enzyms wird das T-Segment nun durch den Doppelstrangbruch des G-Segments geschoben (Abb.3; 3-4). Der DSB wird wieder geschlossen und beide Stränge werden aus dem Enzym entlassen (Abb.3; 5-6). Die Topo-II kann somit topologische Verwindungen lösen, die im Zuge der DNA-Prozessierung auftreten.

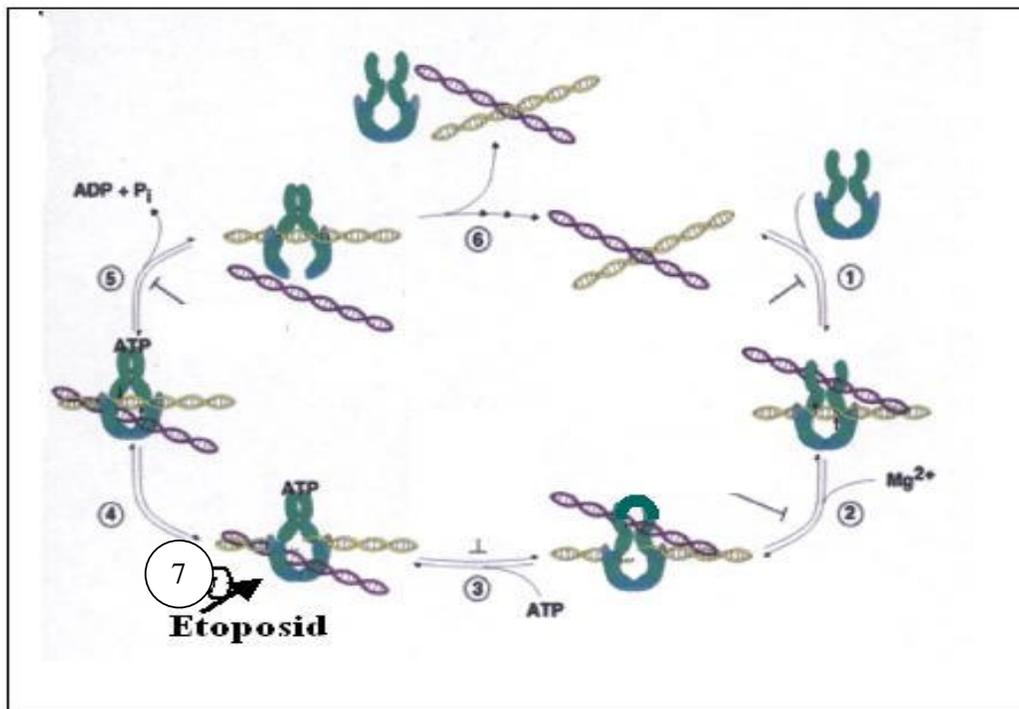


Abb.3

Funktionszyklus der Topoisomerase II : Es wird ein DSB in einem DNA-Doppelstrang induziert. Das Enzym liegt nun mit dem DSB in einem sog. cleavage-complex vor. Durch den DSB wird eine zweite DNA hindurchgeschoben. Anschließend wird der DSB wieder ligiert.

7 Angriffspunkt des Topoisomerase II-Inhibitors Etoposid. Etoposid stabilisiert den cleavage-complex und hemmt somit die Religation des DSB.
(Bild verändert nach: Bruce A. Chabner: chemotherapy and biological response modifiers)

Als Inhibitor der Topo-II wurde das Etoposid gewählt (Hande et al., 1998; Kaufmann, 1998; Li et al., 2001; Larsen et al., 2003; Baldwin et al., 2005). Etoposid gehört zusammen mit Teniposid in die Substanzgruppe der Podophyllotoxine (PPT). Es wird aus der Alraune (*Podophyllum peltatum*) gewonnen (Vincent et al., 2000). PPT ist ein Mitosehemmstoff, welcher als Spindelgift wirkt und somit die Zellteilung in der Metaphase hemmt. Etoposid ist ein teilsynthetisches PPT-Derivat. 1973 wurde es erstmals in klinische Versuche einbezogen und ab 1983 wurde es als Kombinationstherapeutikum mit anderen Zytostatika in der Behandlung von Krebs eingesetzt, heute z.B. noch bei Lymphomen (Hodgkin und Non-Hodgkin)(Greco, 1999; Hertzberg et al., 2006; Mamed et al., 2006) oder Keimzelltumoren (Saxman, 1999; Kondagunta et al., 2005). Aktuell ist das Einsetzen von Etoposid beim kleinzelligen Bronchialkarzinom in Kombination mit Cisplatin und Bestrahlung Therapie der Wahl (Rosti et al., 2006; Ciombor et al., 2006; Bhutani et al., 2006; Juergens et al., 2006).

Die Wirkung des Etoposid beruht auf der Beeinflussung der Topo-II, wobei nicht die gesamte katalytische Aktivität des Enzyms gehemmt wird. Vielmehr wird ein Schritt in dem zuvor beschriebenen Reaktionszyklus des Enzyms stabilisiert (Abb.3:7). Hierbei handelt es sich um den Komplex, in dem ein Doppelstrangbruch in dem G-Segment, verbunden mit dem Enzym, vorliegt (cleavage complex). Durch diese Stabilisierung des cleavage complex' wird eine Religation der offenen Enden verhindert und Doppelstrangbrüche entstehen. Die Topo-II ist nicht in der Lage, ihren Funktionszyklus zu beenden. Etoposid wird somit richtigerweise als Topo-II-„Gift“ und nicht als Topo-II-Inhibitor bezeichnet.

In der vorliegenden Arbeit soll geklärt werden, ob die Inhibition der Topo-II durch Etoposid einen Einfluss auf die Reparatur von DSB durch HR oder NHEJ hat. Zeigt sich ein Einfluss, so würde dies die in anderen Arbeiten nachgewiesenen synergistischen Effekte von Etoposid und Bestrahlung *in vitro* (Minehan et al., 1993; Shigematsu et al., 2001; Haddock et al., 1995) und *vivo* (Beauchesne et al., 2003; Liu et al., 2005; Bhutani et al., 2006; Ciombor et al., 2006; Juergens et al., 2006; Rosti et al., 2006) erklären können und, darauf basierend, neue Möglichkeiten für die Kombination von Strahlen- und Chemotherapie in der Behandlung von Krebs aufzeigen.

3. Material und Methoden

3.1. Zelllinien und Kultivierung

3.1.1.

10.1. MEFs

In den Versuchen wurden embryonale Mausfibroblasten (MEFs; Stamm 10.1; Harvey et al., 1991) verwendet. Dieser Stamm hat im Verlauf der Immortalisierung beide p53 Allele verloren.

Die MEFs wurden in Dulbecco's Minimal Essential Medium⁴, dem 10% fötales Kälberserum⁵, 10ml Penicillin/Streptomycin⁶ und 10ml 1M HEPES⁷ zugesetzt wurden, kultiviert. Die Zellen wuchsen im Brutschrank⁸ in Dunkelheit bei 37°C und einer Atmosphäre von 5%CO₂. Bedeckten die Zellen den gesamten Boden der Kulturflasche⁹ (Subkonfluenz), wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1xPBS¹⁰ gewaschen und mit Trypsin¹¹ 2min bei 37°C inkubiert. Die Zellen lösten sich dadurch vom Flaschenboden ab und konnten in einer geringeren Konzentration (1:10) wieder ausgesät werden.

3.1.2.

10.1. pGFSP6 und 10.1. pGFSP3

In dem für diese Arbeit zuständigen Labor wurden im Rahmen einer vorherigen Arbeit in die 10.1. MEFs zwei unterschiedliche Plasmide stabil integriert (Schmidt-Petersen F, Doktorarbeit 2003). Sie ermöglichen es, entweder die Homologe Rekombination (pGFSP3) oder das Nichthomologe Endjoining (pGFSP6) spezifisch zu untersuchen. Um biologisch möglichst gut vergleichbar zu sein, sind beide Plasmide auf der gleichen

⁴ DMEM; Invitrogen

⁵ FKS; Invitrogen

⁶ Gibco

⁷ Sigma

⁸ Heraeus instruments

⁹ Sarstedt

¹⁰ Phosphate buffered saline; 10xPBS: 24g KH₂PO₄+27,2g Na₂HPO₄·x7H₂O+2gKCl+80gNaCl

¹¹ Gibco

Grundstruktur aufgebaut und tragen identische Elemente. Das Prinzip der Plasmide wurde in der Einleitung beschrieben.

3.1.3. Einfrieren

Von allen Zelllinien wurden Stammkulturen in Flüssigstickstoff gehalten. Es wurden dazu 10^6 Zellen trypsiniert und zentrifugiert (1000rpm; 5min.; Raumtemperatur (RT)). In 10% DMSO¹² resuspendiert wurden die Zellen in Cryogenic-tubes überführt. Es erfolgte dann das Einfrieren in drei Temperaturschritten. Zuerst wurden die Zellen drei Stunden lang bei -20°C abgekühlt. Es folgte eine Abkühlung über 24 Stunden bei -80°C . Zum Schluss wurden die Zellen bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.1.4. Wachstumstest

Die Zellzahl wurde an einem automatischen Zellzähler, dem Casy Zellcounter¹³, gemessen. Dazu wurden die Zellen trypsiniert und ihre Anzahl in einer 1:50 Verdünnung (200 μl der Zellsuspension plus 9,8ml 0,9% NaCl) am Zellzähler gemessen. Um die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen zu ermitteln, wurden in 8 T25-Kulturflaschen jeweils 1×10^5 Zellen ausgesät. An den darauffolgenden Tagen wurde die Zellzahl jeweils einer Kulturflasche bestimmt.

3.1.5. Koloniebildungstest

Bei diesem Versuch wurde eine unterschiedliche Anzahl von Zellen (von 100 bis zu 2000) in mehrere T25-Kulturflaschen ausgesät und für etwa zwei Wochen inkubiert. Die gebildeten Zellkolonien wurden mit 70% Ethanol fixiert und danach mit 0,5% Kristallviolett angefärbt.

Es wurden nur Kolonien mit mehr als 50 Zellen gezählt. Die Plattierungseffizienz ergab sich aus dem Quotienten aus der Anzahl gebildeter Kolonien und ausgesäter Zellen.

¹² Dimethyl Sulfoxide; Invitrogen

¹³ Casy^R1; Schärfe System

3.2. Messung der Toxizität von Etoposid

3.2.1. Etoposid

Etoposid¹⁴ (VP 16) ist ein Topoisomerase II-Inhibitor. Der Handelsname ist Vepesid^R oder Etopophos^R. Es handelt sich um ein Derivat des Podophylotoxins mit einem Molekulargewicht von 588,6. Eine gute Löslichkeit besteht in DMSO, Methanol sowie in Chloroform. Es ist bei -20°C als Aliquot aufzubewahren und vor Licht zu schützen. Die Strukturformel lautet $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{O}_{13}$.

Für die Versuche wurden 25mg Etoposid in 8,5ml DMSO gelöst und in 1ml aliquots in Eppendorf-Tubes gelagert. Die Stammlösung (2.94mg Etoposid pro 1ml) entsprach einer $5000\mu\text{M}$ Lösung.

3.2.2 Koloniebildungstest mit Etoposid

Es wurde ein Koloniebildungstest durchgeführt. 4 Stunden nach der Aussaat wurden verschiedene Konzentrationen von Etoposid dem Medium hinzugefügt. Nach 24h und nach 48h erfolgte ein Mediumwechsel mit zytostatikafreiem Medium. Der weitere Test wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

3.3. Transfektion von Plasmid-DNA

Sämtliche verwendete Plasmide¹⁵ wurden in die Säugerzellen mit Hilfe der Elektroporation transfiziert. Dabei öffnet ein elektrischer Impuls im Bruchteil einer Sekunde Poren in der Zellmembran und macht sie somit für das linearisierte Plasmid durchgängig. Das Plasmid gelangt in den Zellkern und liegt dort extrachromosomal vor. So können die Plasmidgene exprimiert werden; eine Plasmidreplikation erfolgt jedoch nicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich mit transienten Transfektionen

¹⁴ Calbiochem

¹⁵ Als Plasmide wurden verwendet:

pEGFPN1

pCMV-I-SceI-Plasmid

gearbeitet. Die hier eingesetzten Reparaturkonstrukte wurden in vorherigen Versuchen stabil ins Genom integriert.

Es wurden pro Transfektion durch Elektroporation 3×10^6 Zellen verwendet. Diese wurden zentrifugiert (3min.; 1000rpm; RT), danach mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 750µl PBS resuspendiert und zusammen mit 50µl der Plasmidsuspension in eine Elektroporationsküvette gegeben. Nach einem am Elektroporator¹⁶ ausgelösten Impuls von 250V und 950 µF wurde die Zellsuspension sofort in eine Kulturflasche mit DMEM pipetiert und gut vermischt. Hierbei war rasches Vorgehen erforderlich, da beobachtet wurde, dass sich die Transfektionseffizienz unkalkulierbar verändert, sobald die Plasmid-Zell-Suspension länger als einige Sekunden in der Küvette stehen gelassen wird. Je nach Versuchsaufbau wurde nach unterschiedlichen Zeiten der Anteil an grünfluoreszierenden Zellen am Durchflusszytometer¹⁷ (FACScan) gemessen.

3.3.1. Bestimmung optimaler Transfektionsbedingungen

Die Transfektionseffizienz und das Zellüberleben ist unter anderem abhängig von der Höhe der Spannung des elektrischen Impulses, mit der die Elektroporation durchgeführt wird. Übersteigt die Spannung einen Grenzwert, so sterben die Zellen ab. Um den Wert zu ermitteln, bei dem eine hohe Transfektionsrate erreicht wird und gleichzeitig viele Zellen überleben, wurden Transfektionen mit dem pEGFPN1 Plasmid als Substrat vorgenommen. Das pEGFPN1 Plasmid trägt ein intaktes GFP-Gen. Zur Ermittlung der optimalen Spannung wurden jeweils 3×10^6 Zellen mit 200V-350V getestet. Es konnte nach der Transfektion das Zellüberleben über die Zellzahlbestimmung ermittelt werden. Am Durchflusszytometer konnte der Anteil an grünfluoreszierenden Zellen als Maß für die Transfektionseffizienz bestimmt werden.

¹⁶ Biorad Gene Pulser II

¹⁷ FACScan; BD Biosciences

3.4. Durchflusszytometrie

Mithilfe eines Durchflusszytometers können verschiedene optische Eigenschaften von Zellen, wie etwa Lichtstreuung an der Membranoberfläche oder die Fluoreszenz, bestimmt werden.

Ein Zytometer besteht aus drei Komponenten:

1. dem Flüssigkeitssystem: Es regelt die Zufuhr und Fokussierung der Zellen im Messpunkt.
2. der Optik: Sie ist zuständig für die Anregung der Zellen über Licht verschiedener Wellenlängen.
3. der Detektion und weiteren elektronischen Datenverarbeitung: Die optischen Signale werden detektiert und für die Computeranalyse digitalisiert.

Zur Messung gelangen die Zellen aus dem Probenröhrchen über eine Kapillare in die Messküvette. Diese wird mit einem Laser, der eine Wellenlänge von 488nm hat, ausgeleuchtet. Es wird das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) mit 10% Beugung zur Achse des einfallenden Lichtes gesammelt und von einem Fotodetektor erfasst. Das FSC ist proportional zur Zelloberfläche und somit ein Maß für die Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (SSC), das in einem 90°Winkel zum einfallenden Licht gemessen wird, ist proportional zur Zellkomplexizität, Membranfaltung und Zellgranularität. Das SSC besitzt dann eine Wellenlänge von 488nm. Über diesen Strahlengang kann auch die jeweilige Fluoreszenz der Zelle gemessen werden. Bei einer emittierten Wellenlänge von ~530nm (FL1) wird eine Grünfluoreszenz, von ~585nm (FL2) eine Gelb- und von >650nm (FL3) eine Rotfluoreszenz gemessen.

Vor der Messung am Flusszytometer wurden die Zellen trypsiniert und gewaschen. Die in 1ml PBS aufgenommene Zellsuspension wurde mit Hilfe eines Gasefilters von Zellverklumpungen befreit, damit die Zellen zur Messung ausschließlich einzeln vorliegen.

3.5. Zellsynchronisation

Es wurden mehrere Methoden zur Zellsynchronisation angewandt. Um die Zellen in der G₂-Phase zu synchronisieren, wurde die natürliche Kontaktinhibition der Zellen genutzt, welche einen Proliferationsstopp bedeutet, sobald eine Zelle die Nachbarzelle berührt. Dafür wurden Zellen 48 Stunden lang in Konfluenz belassen, so dass sich die meisten Zellen in der G₂-Phase des Zellzyklus befanden. Die Zellen wurden trypsinisiert, gewaschen und pelletiert. Die Fixierung erfolgte durch Zugabe von zuerst 1ml 70% Ethanol und dann von 4,5ml 96% Ethanol (tropfenweise).

Um Zellen in der S-Phase zu synchronisieren, wurden Zellen, die sich 48 Stunden in Konfluenz befanden, in einer geringeren Konzentration wieder ausgesät, welche dann mit der Proliferation begannen und in die S-Phase des Zellzyklus gingen. Bei diesen Zellen erfolgte die Fixierung nach 16 Stunden.

Außerdem wurden Zellen mit Aphidicolin¹⁸ behandelt. Aphidicolin ist ein Inhibitor der DNA-Polymerasen α , δ und ϵ und arretiert die Zellen in der frühen S-Phase. Die Zellen wurden nach 16 Stunden Aphidicolinbehandlung (1 μ M) fixiert. Sie befanden sich in der frühen S-Phase.

Andere Zellen wurden nach Aphidicolinbehandlung für 4 oder 8 h in aphidicolinfreiem Medium inkubiert und danach fixiert. Diese Zellen befanden sich in der späten S-Phase oder waren teilweise in die G₂-Phase oder die Mitose übergegangen.

3.6. Zellzyklusmessung am Durchflusszytometer

Der DNA Gehalt jeder einzelnen Zelle wird durch Markierung mit Propidium-Jodid, einem DNA-spezifischen Farbstoff, der an die DNA in einem genauen (stöchiometrischen) Verhältnis bindet, durchflußzytometrisch anhand der Fluoreszenzintensität messbar. Über den DNA Gehalt kann die Position der Zelle im Zellzyklus bestimmt werden. Aus der Messung einer Vielzahl von Zellen entsteht ein DNA-Histogramm.

¹⁸ Sigma

Vor der Messung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und pelletiert. Das Pellet wurde mit 450µl Propidium-Jodid-Arbeitslösung¹⁹ +50µl RNase²⁰ 20min lang in Dunkelheit inkubiert. Danach konnte die Zellzyklusverteilung am Flusszytometer gemessen und in einem DNA-Histogramm ausgewertet werden.

3.7. Western Blot

Western Blot bezeichnet die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe und deren Transfer auf eine Trägermembran. Die einzelnen Proteine können anschließend über Antikörperreaktionen nachgewiesen werden.

Zuerst erfolgte die Isolierung der Proteine aus den Zellen. Dazu wurden die Zellen in PBS gewaschen, pelletiert und langsam abgekühlt. In Eppendorf-Tubes transferiert wurden die Zellen erneut pelletiert (Zentrifuge²¹, 5min, 1500/min und 4°C). Das Zellpellet wurde 1:1 in einem Lysispuffer²² resuspendiert, wobei die Zellmembranen aufgelöst wurden. Nach einem dreimaligen Einfrieren in Flüssigstickstoff und Wiederauftauen in einem Heizblock²³ konnten die Proteine von unlöslichen Zellbestandteilen durch Zentrifugieren (10min, 4°C, 11000rpm) im Überstand isoliert werden. Anschließend musste der Proteingehalt der einzelnen Proben am Photometer²⁴ nach der Bradford-Methode (nach BioRad: Mikroassay Procedure) bestimmt werden.

Dem Proteinextrakt der jeweiligen Zellen wurde nun für den Western Blot jeweils H₂O ad 10 µl hinzupipettiert. Damit hatte jede Probe denselben Proteinanteil. Außerdem wurden 10µl Auftragspuffer hinzupipettiert, so dass jede Probe insgesamt ein Volumen von 20µl aufwies. Das für den Western Blot verwendete Gel²⁵ wurde 5 min in Laufpuffer²⁶ equilibriert. Es erfolgte dann das Auftragen der einzelnen Proben á 20µl und eines spezifischen Markers²⁷ auf das Gel. Anhand des typischen Bandenmusters dieses Markers lassen sich später die einzelnen Proteinbanden der Proben aufgrund ihrer

¹⁹ Invitrogen

²⁰ Sigma

²¹ Microfuge[®]R; Beckmann

²² Inhibitor Cocktail (Sigma) 1:5 mit 1xPBS verdünnt

²³ Thermomixer comfort; Eppendorf

²⁴ Uvikon Spektrophotometer (Kontron instruments)

²⁵ Ready Gels; 12% Tris-HCL, 12 wells á 30µl; Bio Rad

²⁶ *Laufpuffer*: 100ml Tris-Glycin (TG)-Puffer +900ml aqua dest. >4°C ; vor Gebrauch +10ml 10% SDS

10xTris-Glycin-Puffer: 144g Glycin+30,3g Trisaminomethane (Trizma[®]Base), ad 1l aqua dest.

10% SDS: (Natriumdodecylsulfat); Sigma

²⁷ 10µl Bench Marker (Invitrogen)+5µl Magic Marker (Invitrogen)

spezifischen Größe identifizieren. Das Gel mit den aufgetragenen Proben wurde nun in die innere Kammer eines Tanks gespannt, der mit Laufpuffer gefüllt wurde. Dann wurde beim sog. Gellauf ein entlang des Gels laufendes elektrisches Feld angelegt. Die negativ geladenen Proteine wandern entlang des elektrischen Feldes durch das Gel, wobei die Laufgeschwindigkeit der Proteine von ihrer relativen Molekülmasse abhängt (Elektrophorese). Bei der Sammlungsphase wurde für 7min eine Spannung von 100V angelegt. Nach weiteren 55min Laufzeit, bei einer Spannung von 200V, sind die Proteine abhängig von ihrer Größe aufgetrennt. Kleinere Proteine, die weniger Widerstand haben, sind schneller, also weiter durch die Gelmatrix gewandert als größere.

Es folgte das eigentliche Blotten. Dabei wird ein elektrisches Feld senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung angelegt, wodurch die Proteine aus der Gelmatrix auf eine Trägermembran²⁸ laufen und dort gebunden werden. Hierfür wurden Gel und Membran sandwichartig zwischen Filterpapier und Schwämme geklemmt. Dieses „Sandwich“ wurde in die mit Transferpuffer²⁹ gefüllte Kammer gesetzt. Der Blot erfolgte 60min mit einer Spannung von 100V. Danach sind die Proteine an die Trägermembran gebunden. Für die nun folgende Immunreaktion wurde die Membran zuerst mit Blocking-Puffer³⁰ 2h lang auf einem Wipptisch inkubiert. Dadurch wurden alle Möglichkeiten unspezifischer Bindungen an der Membran blockiert, damit im Folgenden die Antikörper sich nur noch spezifisch an ihr Zielprotein binden konnten.

In der nun folgenden 1. Antikörperreaktion wurde die Membran über Nacht bei +4°C mit dem 1. Antikörper³¹ inkubiert. Dieser Antikörper bindet spezifisch an das C-terminale Ende der Topo-II α . Am nächsten Tag wurde die Membran gewaschen³² und somit von nicht gebundenen Antikörpern befreit. Es erfolgte dann die 2. Antikörperreaktion, bei der die Membran 1h bei Raumtemperatur mit dem 2. Antikörper³³ inkubiert und danach erneut gewaschen wurde. Dieser Antikörper bindet spezifisch an den ersten. Es wurde dann eine ECL- Lösung³⁴ als Substrat zur Detektion auf der Membran verteilt. Dadurch wird eine chemische Reaktion ausgelöst, die die

²⁸ Immun-Blot VDF Membran (BioRad)

²⁹ *Transferpuffer*: 150ml TG-Puffer +850ml a.dest.; vor Gebrauch: +300ml Methanol +10ml 10%SDS +ad 1,5l a.dest

³⁰ *Blocking-Puffer*: 4g Milchpulver (Töpfer) +40ml PBS+120 μ l Tween; Sigma

³¹ *Santa Cruz; TopoII- α goat-Antikörper*: 1g Milchpulver+19ml PBS+ 60 μ l Tween +200 μ l TopoII- α Antikörper (Verdünnung 1:100)

³² 1xPBS+ 0,3% Tween

³³ *Sigma; Anti-goat*: 1g Milchpulver+19ml PBS+60 μ l Tween+20 μ l goat-Antikörper

³⁴ Western Blotting detection reagents and analysis system (Amersham BioScience S)

Substratmoleküle zum Fluoreszieren bringt (Chemolumineszenz). Für 1min wurde dann die Membran auf einen Film³⁵ exponiert und entwickelt. An den Stellen, an denen die Reaktion abläuft, wurde der Film geschwärzt. So entstanden an den Stellen, an denen Protein (hier Topo-II) nachgewiesen wurde, Banden spezifischer Größe. Diese Größen konnten anhand der Markerbanden identifiziert werden.

3.8. Messung der Doppelstrangbruchinduktion durch Etoposid mittels γ H2AX-Foci

Das Prinzip der γ H2AX-Foci beruht auf der Fluoreszenz-Markierung von Doppelstrangbrüchen durch eine Antikörperreaktion. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Doppelstrangbruchinduktion durch Etoposid bei MEFs untersucht.

Entsteht in der Zelle ein Doppelstrangbruch, so wird das Histonprotein H2AX in der Umgebung des Bruches phosphoryliert. Dieses wird dann als γ H2AX bezeichnet. Diese phosphorylierte H2AX Variante kann mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Der erste Antikörper bindet an das γ H2AX, der zweite, der fluoreszenzmarkiert ist, an den ersten Antikörper. Unter dem Fluoreszenzmikroskop³⁶ wird diese Markierung als Fokus sichtbar. Ein Fokus entspricht Hunderten von γ H2AX-Molekülen, aber nur einem Doppelstrangbruch.

Versuchsablauf:

Es wurden 3×10^5 Zellen auf sterilen Glasobjektträgern ausgesät, die in Petrischalen ausgelegt waren. Nach 24h wurde Etoposid in verschiedenen Konzentrationen in das Medium gegeben. Nach weiteren 16h wurden die Objektträger gewaschen und für 15min bei Raumtemperatur (RT) fixiert³⁷. Danach erfolgte dreimal ein zehnminütiges Waschen unter leichtem Umschwenken in PBS. Die Objektträger wurden 5min auf Eis in eine Permeabilisierungslösung³⁸ gegeben. Danach wurden sie mit PBS +1% BSA³⁹ kurz gewaschen. Bevor der erste Antikörper dazugegeben werden konnte, wurden die

³⁵ HyperfilmTM ECL(Amersham Biosciences)

³⁶ Zeiss

³⁷ Fixierungslösung: 189,2ml PBS+10,8ml 37%iges Formaldehyd

³⁸ Permeabilisierungslösung (auf Eis): 200ml PBS+2g BSA(=PBS+1%BSA)+0,4ml Triton X 100

³⁹ Bovine serum albumin; Sigma

Objektträger für 1h bei RT in eine Blockierungslösung I⁴⁰ gegeben. Es konnten dann je 50µl des 1. Antikörpers⁴¹ auf die gut abgetropften Objektträger gegeben werden und diese für eine Stunde in einer Feuchtkammer inkubiert und anschließend 3mal für 10min gewaschen⁴² werden. Mit dem 2. Antikörper⁴³ wurde genauso verfahren. Es erfolgte die Gegenfärbung mit 15µl Dapi- Antifade⁴⁴ pro Objektträger.

Die Auswertung der γ H2AX-Foci wurde am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Das Fluoreszenzmikroskop ermöglicht es, die fluoreszenzmarkierten γ H2AX sichtbar zu machen. Das Mikroskop ist so aufgebaut, dass aus dem weißen Licht der Mikroskoplampe durch den Anregungsfilter die für die Anregung des Fluorochroms geeignete Wellenlänge (hier 510-560nm) herausgefiltert wird. Im Innern des Mikroskops wird dieses Licht nun von einem dichromatischen Spiegel auf das Präparat reflektiert. Dichromatische Spiegel reflektieren nur Licht mit kleineren Wellenlängen, Licht mit größeren Wellenlängen wird durchgelassen. Der Spiegel wird so gewählt, dass die Wellenlänge zwischen Anregungs- und Emissionsmaximum des Fluorochroms liegt. Da die Wellenlänge des Anregungslichtes immer kleiner ist als die des Fluoreszenzlichtes, wird das Anregungslicht durch das Objektiv zum Präparat gelenkt, während das vom Präparat emittierte langwelligere Fluoreszenzlicht (590nm) den Spiegel passiert und durch das Okular zum Auge gelangt.

⁴⁰ Blockierungslösung: 200ml PBS+6g BSA

⁴¹ 1. Antikörper: 197µl PBS+1% BSA+1µl Tween+2µl γ H2AX-Antikörper

⁴² Waschlösung I: 600ml PBS+1% BSA+3ml Tween

⁴³ 2. Antikörper: 599µl PBS+1% BSA+3µl Tween+1µl „Alexa“-Antikörper

⁴⁴ molecular Cytogenetics, Q-Biogene

4. Resultate

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss von Topoisomerase II-Inhibitoren auf die Reparatur von Doppelstrangbrüchen zu untersuchen. Dazu wurde die Reparatur durch Homologe Rekombination und Nichthomologes Endjoining getrennt voneinander betrachtet. Dieses war mithilfe zweier speziell entwickelter Plasmidkonstrukte, (pGFSP6 und pGFSP3), die jeweils als Substrat für einen dieser Reparaturwege dienen, möglich.

Ein Doppelstrangbruch wurde mit einem Plasmid erzeugt, welches die Restriktionsendonuklease I-SceI exprimiert. Wird dieser Doppelstrangbruch über den Reparaturweg des jeweiligen Konstruktes repariert, konnte dies anhand der Grünfluoreszenz der Zelle im Durchflusszytometer gemessen werden (Abb.4). Ein Einfluss auf die Reparatur durch die Inhibition der Topo-II mit Etoposid würde über eine Änderung der Anzahl von grünfluoreszierenden Zellen zu erkennen sein.

4.1. Zellwachstum

Es wurden Wachstumstests mit der Stammkultur der embryonalen Mausfibroblasten (10.1.MEFs) durchgeführt. Auch die Stämme, die die beiden Konstrukte tragen (10.1.pGFSP6; 10.1.pGFSP3), wurden auf ihr Wachstumsverhalten hin untersucht.

Alle Zelllinien zeigten ein nahezu gleiches Wachstumsverhalten. Abb.5 zeigt eine exponentielle Zunahme der Zellzahlen bis Tag 5(-7). Dann folgt eine langsame aber stetige Abnahme, welche einem zunehmenden Absterben der Zellen in der Kulturschale entspricht. Eine Phase, in der die Zellzahlen konstant bleiben (Plateauphase), die für viele Zellen typisch ist, zeigt sich hier nicht. Die Wachstumsgeschwindigkeit ist in den beiden Klonen, die das Reparaturkonstrukt integriert haben (pGFSP3 und 6), geringfügig höher als im Parentalklon (10.1), so dass durch das Transgen an sich keine Beeinträchtigung des Wachstums zu erkennen ist. Damit kann festgehalten werden, dass die erfolgten Reparatur- und Koloniebildungsversuche nicht durch eine primär unterschiedliche Proliferationsrate beeinflusst wurden.

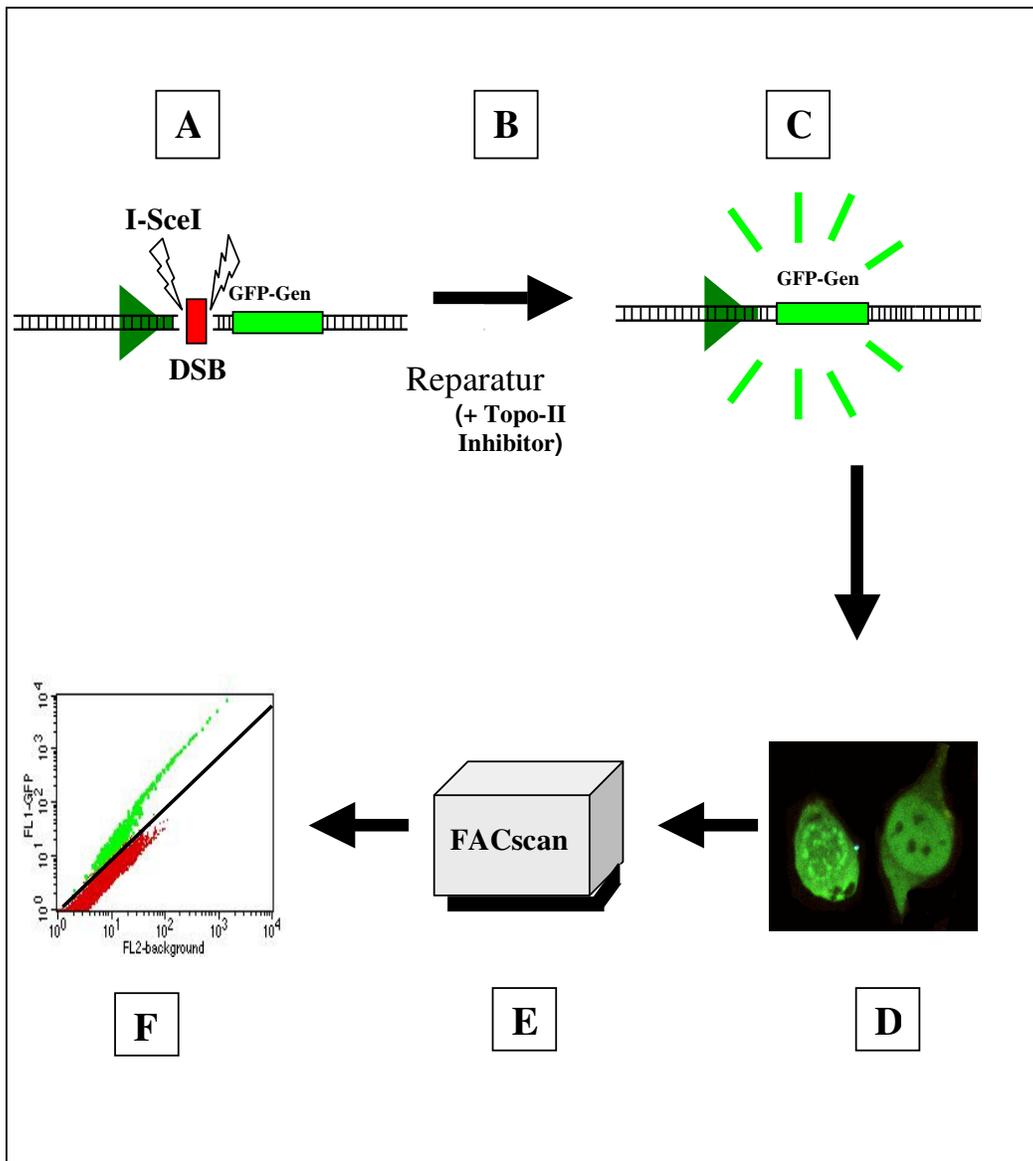


Abb.4

Skizzierung des Versuchsaufbaus

A Transfektion des I-SceI-Plasmids pCMV-I-SceI durch Elektroporation; dadurch Induktion von DSB

B Reparatur der DSB je nach Konstrukt durch HR oder NHEJ, Zugabe des Topo-II-Inhibitors in das Medium

C Expression des intakten GFP-Gens nach erfolgreicher Reparatur

D Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der grünfluoreszierenden Zellen

E Messung der Anzahl grünfluoreszierender Zellen im Durchflusszytometer (FACScan)

F Graphische Darstellung der Messung und Auswertung; hier 10% grünfluoreszierende Zellen (grün) und 90% Normalpopulation (rot)

4.2. Koloniebildungstest mit 10.1.pGFSP6

Abb.6 zeigt für die Zellen, die das pGFSP6 Konstrukt enthalten, einen linearen Anstieg der Koloniebildung in Abhängigkeit von der Anzahl ausgesäter Zellen. Es ergibt sich daraus eine Plattierungseffizienz (plating efficiency) von $PE=0,12$, welche als Quotient aus der Anzahl gebildeter Kolonien und der Anzahl ausgesäter Zellen definiert ist.

Die Koloniebildung wurde als Grundlage für die Toxizitätsuntersuchung von Etoposid an diesen Zellen verwendet.

4.3. Toxizität von Etoposid

Es wurden Koloniebildungstests nach Inkubation mit Etoposid durchgeführt, um die Toxizität des Topoisomerase II-Inhibitors zu bestimmen. Ziel war es, Konzentrationen zu finden, bei denen von einer ausreichenden Inhibition der Topo-II ausgegangen werden kann. Die Konzentration von Etoposid in den Versuchen durfte nicht so gering sein, dass Etoposid keine Wirkung zeigt, aber auch nicht so hoch, dass alle Zellen absterben würden. Es wurden Konzentrationen zwischen $0,1$ und $5\mu\text{M}$ untersucht. Abb.7 zeigt bei Konzentrationen über $0,1\mu\text{M}$ eine kontinuierliche Abnahme der Überlebensfraktion. Bei einer Konzentration von $0,7\mu\text{M}$ Etoposid ist diese um den Faktor 10 gegenüber unbehandelten Zellen vermindert, bei $5\mu\text{M}$ um den Faktor 1000. Höhere Etoposidkonzentrationen zeigen kein Überleben mehr.

Anhand dieser Daten wurden 6 Konzentrationen zwischen $0,01\mu\text{M}$ und $3\mu\text{M}$ als optimal für die folgenden Reparaturversuche festgelegt.

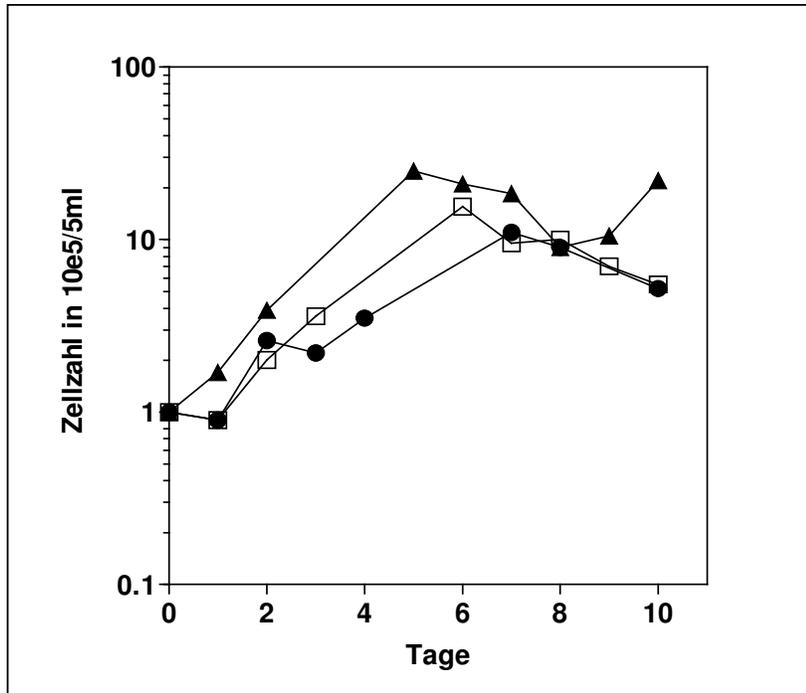


Abb.5

Es wurden Wachstumstests mit ● 10.1.; □ 10.1.pGFSP3 und ▲ 10.1.pGFSP6 durchgeführt. Alle drei Zellgruppen zeigen einen vergleichbaren Wachstumsverlauf.

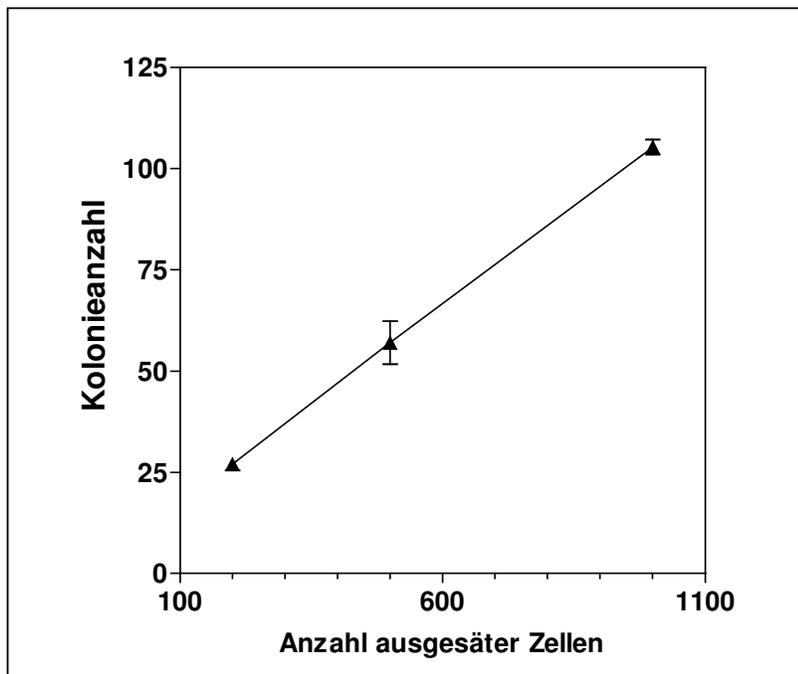


Abb.6

Koloniebildungstest mit 10.1.pGFSP6; Es wurden 200, 500 und 1000 Zellen ausgesät. Nach zwei Wochen Wachstum wurden Kolonien mit über 50 Zellen gezählt. Es ist ein linearer Anstieg der Koloniebildung zu sehen.

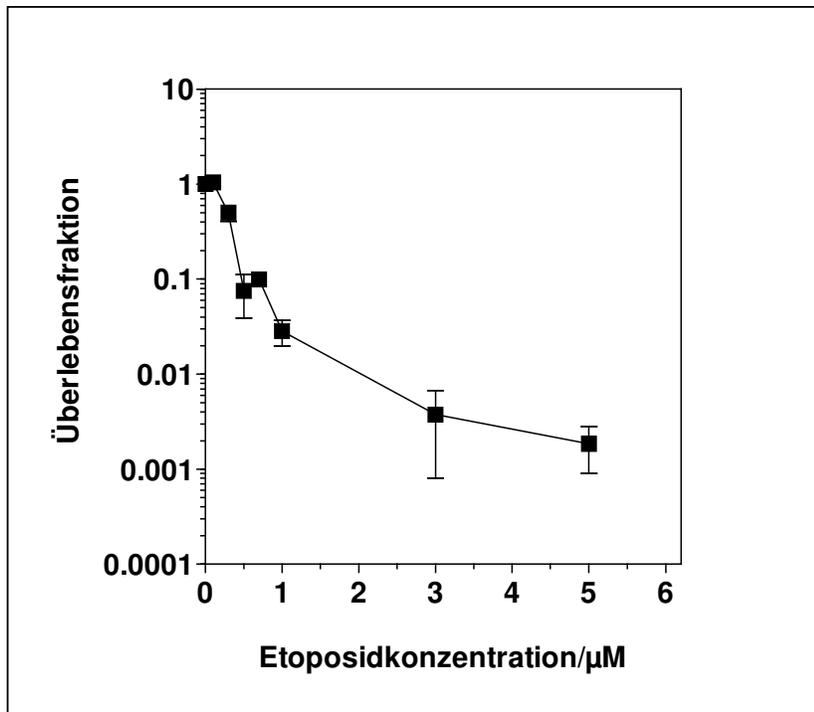


Abb.7

Koloniebildungstest mit 10.1.pGFSP6, wobei Konzentrationen von 0,1 μM , 0,3 μM , 0,5 μM , 0,7 μM , 1 μM , 3 μM und 5 μM Etoposid 4h nach Aussaat hinzugefügt wurden. Ab einer Konzentration von 0,1 μM ist eine kontinuierliche Abnahme der Überlebensfraktion zu sehen

4.4. Zelltransfektion und Expression des „Grünfluoreszierenden Proteins“

Die Grünfluoreszenz der Zelle wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Expression des „Green Fluorescent Protein“ (GFP) im Durchflusszytometer gemessen. Dort werden die zu messenden Zellen einzeln in eine Kapillare gesogen und im Strahlengang eines Lasers durch eine bestimmte Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt. Jede Zelle wird einzeln mit ihrer Fluoreszenz sowie ihren Lichtstreuungseigenschaften erfasst. Zur Auswertung wurde eine logarithmische Darstellung der Fluoreszenz 1 (Grünfluoreszenz) gegen Fluoreszenz 2 (Orangefluoreszenz) gewählt (Abb.9A).

Abb.9Aa) zeigt Versuche mit den 10.1 Zellen. Die Graphik lässt eine schmale, exponentiell ansteigende Punktwolke erkennen. Jeder Punkt kennzeichnet eine Zelle. Trotz unterschiedlicher Intensität zeigen die Zellen ein konstantes Verhältnis von Grün- zu Rot-Hintergrundfluoreszenz. Nach Transfektion der Zellen mit dem pEGFP N1-

Plasmid wird nun darüber hinaus Grünfluoreszenz durch Expression des GFP-Gens induziert. Diese gesteigerte Grünfluoreszenz kann man in der Graphik (Abb.9Ab)) an der nach oben verschobenen und steiler ansteigenden Punktwolke erkennen. Die Population von grünfluoreszierenden Zellen kann durch ein Fenster (Gate: gekennzeichnet durch die Diagonale in Abb.9Aa) und b)) rechnerisch von der nicht-grünfluoreszierenden Population getrennt werden. Aus dem Verhältnis beider Werte ergibt sich der Anteil an grünfluoreszierenden Zellen. Mit der durchflusszytometrischen Bestimmung der GFP Expression konnte in den folgenden Versuchen jede Änderung des Anteils an grünfluoreszierenden Zellen ermittelt werden.

Um die Grünfluoreszenz der Zellen zu visualisieren, wurde zusätzlich eine Darstellung durch das Fluoreszenzmikroskop gewählt (Abb.8).

4.5. Induktion von Doppelstrangbrüchen

Durch Elektroporation wurde das Plasmid pCMV-I-SceI, welches die Endonuklease I-SceI kodiert, in die Zellen transfiziert. Das Enzym wird dann von der Zelle synthetisiert und verursacht innerhalb des Konstruktes an der I-SceI Erkennungssequenz einen Doppelstrangbruch. Für die Reparaturversuche war es wichtig, dass möglichst viele Zellen mit einem Plasmid transfiziert werden, also möglichst viele Doppelstrangbrüche erzeugt werden und diese dann repariert werden können. Für derartige Versuche mussten die Bedingungen der Transfektion optimiert werden (4.5.1). Auch musste zusätzlich der Zeitpunkt gefunden werden, an dem die Zelle beginnt, die Proteine des transfizierten Plasmides zu synthetisieren (4.5.2).

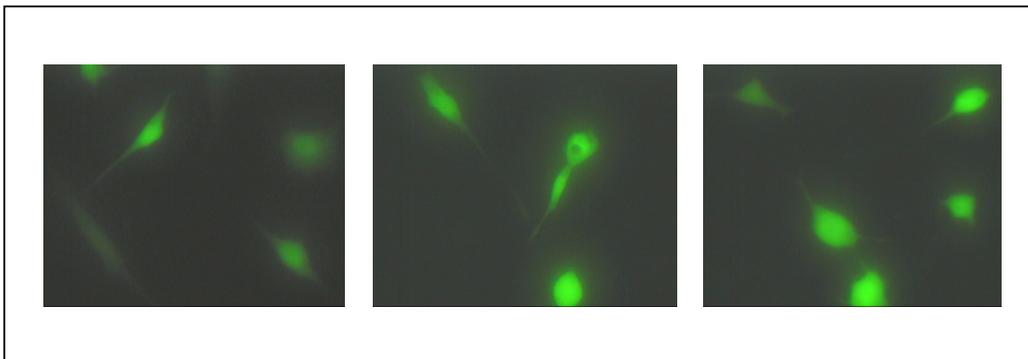


Abb.8

Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Grünfluoreszenz bei MEFs mit intaktem GFP-Gen

4.5.1. Zusammenhang von Spannung und Transfektionsrate

Die Transfektionsrate ist abhängig von der Spannung, mit der der elektrische Impuls bei der Elektroporation appliziert wird. Außerdem hängt die Effizienz von der Ionenkonzentration des Elektroporationspuffers und der Zeitdauer des Impulses ab. Um die Bedingungen zu optimieren, wurden die letzten beiden Parameter konstant gehalten, die Spannung jedoch verändert. Für diesen Versuch wurde das pEGFP-N1 Plasmid, welches ein intaktes GFP-Gen trägt, in die Zellen transfiziert. Die erfolgreiche Transfektion kann am Folgetag anhand der Anzahl an grünfluoreszierenden Zellen im Flusszytometer gemessen werden. Das pEGFP-N1 wurde mit verschiedenen Spannungen im Bereich zwischen 200V und 350V elektroporiert (Abb 9B). Bei einer Spannung von 250V war die Anzahl grünfluoreszierender Zellen, gemessen im Durchflusszytometer, am höchsten (Abb.9B). Bei diesem Wert konnte daher von einer optimalen Transfektion ausgegangen werden, so dass alle folgenden Transfektionen mit einer Spannung von 250V durchgeführt wurden.

4.5.2. Expressionskinetik des GFP und der I-SceI-Endonuklease nach Elektroporation

Werden die Zellen, die das pGFSP6 oder das pGFSP3 Konstrukt integriert haben, mit dem pCMV-I-SceI Plasmid transfiziert, entstehen an den zuvor beschriebenen Erkennungssequenzen im Konstrukt Doppelstrangbrüche. Der Entstehungszeitpunkt dieser Doppelstrangbrüche nach Transfektion ist aber noch nicht bekannt. Im ersten Schritt sollte deshalb untersucht werden, mit welcher Kinetik ein Protein nach Transfektion episomal exprimiert wird, damit auch der auf den Doppelstrangbruch folgende Reparaturbeginn definiert werden kann. Dazu wurden die Zellen mit dem Plasmid pEGFP-N1 (s.o.) transfiziert, mit dem der Proteinsynthesebeginn anhand der Grünfluoreszenz verfolgt werden kann (Abb.10). Es zeigte sich, dass das GFP bereits 2 Stunden nach Transfektion von der Zelle synthetisiert wurde (Abb10Ab) und 10B). Der Anteil an grünfluoreszierenden Zellen stieg bis 48 Stunden nach Transfektion weiter an (Abb.10B). Es ist davon auszugehen, dass analog dazu auch die I-SceI-Endonuklease in diesem Zeitraum exprimiert wird, da die I-SceI Expression von demselben CMV-Promotor erfolgt wie das GFP im pEGFP-N1. Ist die I-SceI-Endonuklease einmal

synthetisiert, beginnt sie Doppelstrangbrüche zu induzieren und damit auch Reparaturereignisse auszulösen.

Will man einen Einfluss der Topoisomerase II-Inhibitoren auf die Reparatur nachweisen, sollten diese also bereits 2h nach Transfektion in der Zelle anwesend sein, um auch die frühesten Reparaturvorgänge beeinflussen zu können.

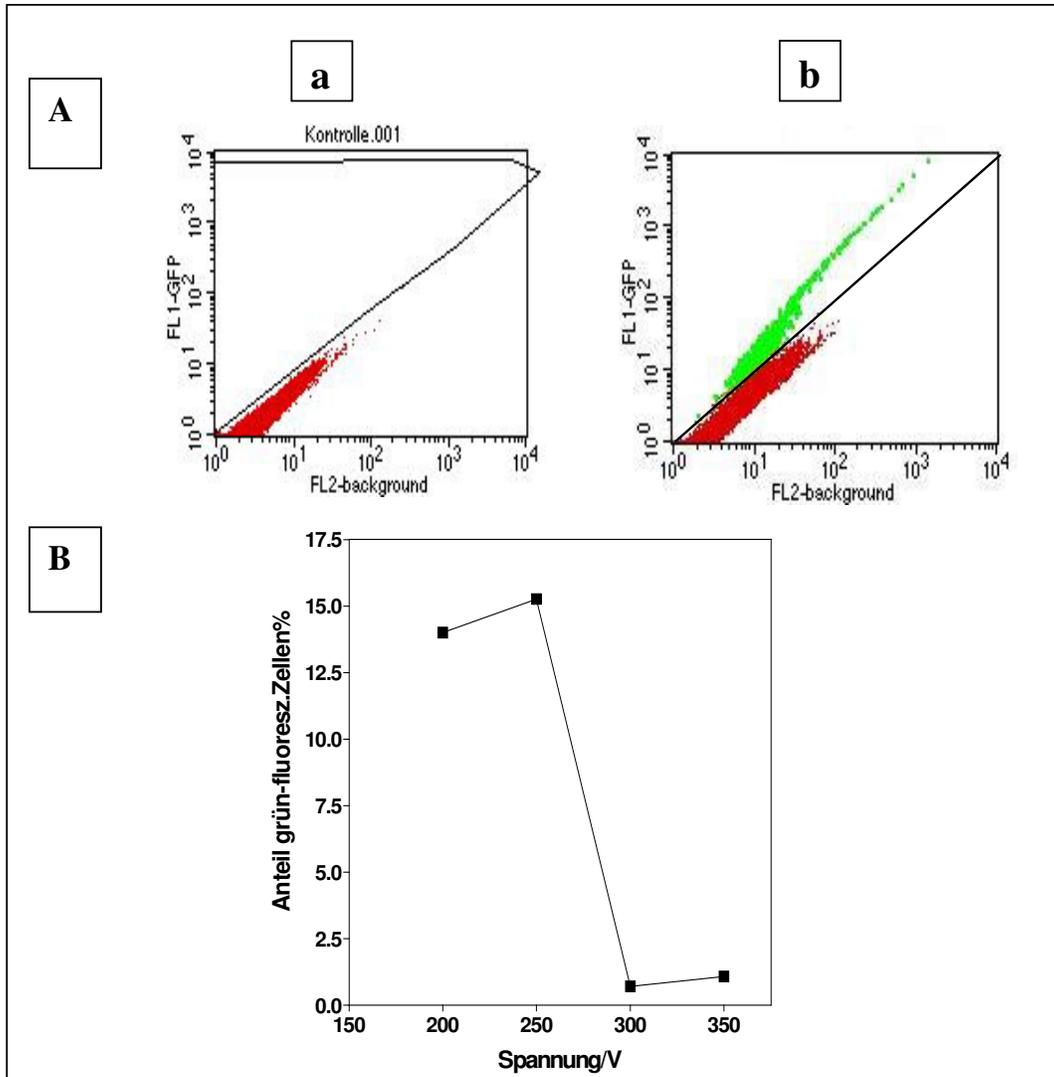


Abb.9

A: Messung der Grünfluoreszenz am Durchflusszytometer

a) Zellen ohne intaktes GFP Gen zeigen keine Grünfluoreszenz

b) Mit pEGFP N1 transfizierte Zellen zeigen hier 2,5 % Anteil grünfluoreszierender Zellen, sichtbar in der steil ansteigenden grünen Punktwolke

B: Transfektion des pEGFP N1 Plasmids mit verschiedenen Voltstärken (200V, 250V, 300V, 350V). Bei 250V ist die Transfektion am effektivsten.

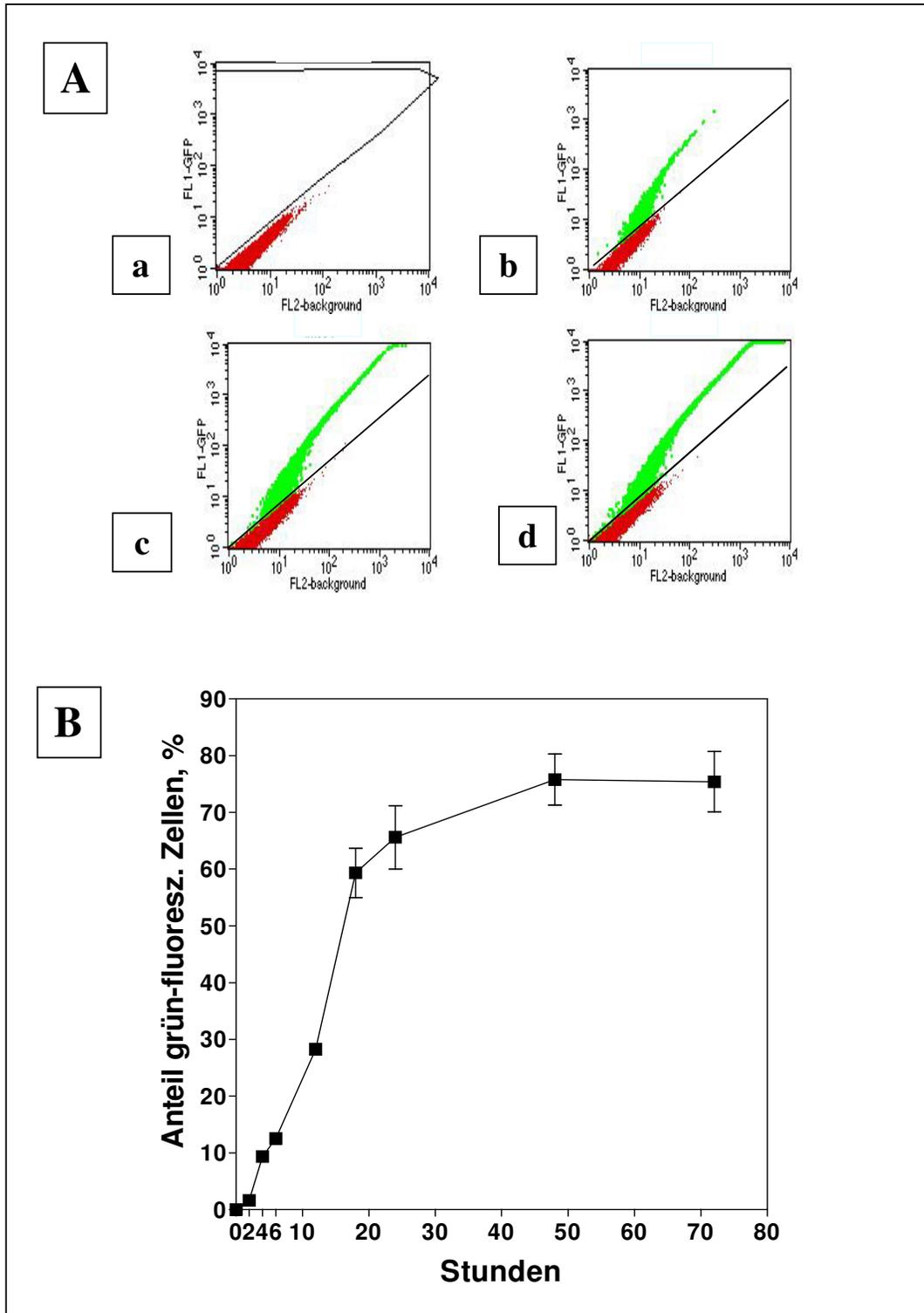


Abb.10

A: Darstellung der Messung der GFP-Expression am Durchflusszytometer

- a) Nicht transfizierte Zellen zeigen keine Grünfluoreszenz
- b) 2h nach Transfektion (p.T.) sind 1,6% grünfluor. Zellen
- c) 4h p.T. zeigen 9,3% der Zellen eine Grünfluoreszenz
- d) 6h p.T. zeigen 12,5% eine Grünfluoreszenz

B: Expressionskinetik des GFP-Gens nach Transfektion des pEGFP N1-Plasmid in 10.1 MEFs durch Messung der Grünfluoreszenz.

4.6. Reparatur von Doppelstrangbrüchen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten mithilfe zweier transgener Reporterkonstrukte die Homologe Rekombination und das Nichthomologe Endjoining untersucht werden. Dafür wurden in den Zellen mit den unterschiedlichen Konstrukten Doppelstrangbrüche durch Transfektion des pCMV-I-SceI-Plasmids induziert. Diese konnten dann von der Zelle auf dem jeweils spezifischen Weg repariert werden.

4.6.1. Reparaturkinetik der Homologen Rekombination

Es wurde überprüft, zu welchem Zeitpunkt nach Transfektion Reparaturereignisse nachweisbar sind. Dazu wurden die 10.1.pGFSP3-Zellen, die das Konstrukt der Homologen Rekombination tragen, mit dem pCMV-I-SceI-Plasmid transfiziert. In einem Zeitrahmen zwischen 0 und 96 Stunden (h) wurde der Anteil an grünfluoreszierenden Zellen zu unterschiedlichen Zeiten am Durchflusszytometer gemessen. Dieser Zeitraum diente den Zellen als Reparaturzeit.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

1. Wann beginnt die Reparatur?
2. Wo liegt der Zeitpunkt, zu dem ein Großteil der Zellen die DSB repariert hat?

Abb.12A zeigt, dass bei den Zellen, die die DSB durch Homologe Rekombination reparieren, nach 8 Stunden die ersten grünfluoreszierenden Zellen im Flusszytometer messbar sind. Während dieser 8 Stunden wird, wie bereits nachgewiesen, etwa 2 Stunden nach Transfektion die I-SceI-Endonuklease von der Zelle exprimiert. Es entstehen DSB und die Zelle beginnt mit der Reparatur durch Homologe Rekombination. Nach erfolgreicher Reparatur benötigt die Zelle weitere 2 Stunden, um das nun intakte GFP zu synthetisieren und grün zu fluoreszieren. Somit ergibt sich eine effektive Reparaturzeit durch Homologe Rekombination von etwa 4 Stunden.

Mit fortschreitender Zeit ist ein Anstieg der GFP synthetisierenden Zellen messbar (Abb.11A; 12A), der nach 48h bereits den halbmaximalen Wert erreicht hat. Nach 54h ist das Maximum an grünfluoreszierenden Zellen erreicht, das danach auf einem Plateau stabil bleibt. Da jenseits von 48h die gesamte Anzahl lebender Zellen abnimmt, wurde ein konstantes Zeitintervall von 2 Tagen für die Messung der Homologen Rekombination ausgewählt.

4.6.2. Reparaturkinetik des Nichthomologes Endjoining

Durch Transfektion der 10.1.pGFSP6-Zellen mit dem pCMV-I-SceI-Plasmid wurden auch in diesem Genom an den spezifischen Sequenzen DSB verursacht. Die Reparatur durch NHEJ wurde wie bei den Versuchen mit HR in einem Zeitrahmen von 0 bis 96 Stunden verfolgt.

Bei diesem Reparaturweg zeigte sich eine deutlich andere Zeitkinetik als bei der HR. Abb.12B zeigt, dass die ersten grünfluoreszierenden Zellen 4 Stunden früher zu messen waren als bei den Versuchen mit HR (Abb.11B; 12B) Es wird außerdem wesentlich schneller, nämlich schon nach 12-24 Stunden, der maximale Anteil an grünfluoreszierenden Zellen erreicht. Dies spricht für eine schnellere Reparatur der DSB und bedeutet, dass das NHEJ viel weniger Zeit benötigt, als die Reparatur über HR. Nach 24h nimmt der Anteil an grünfluoreszierenden Zellen wieder ab, so dass für das NHEJ ein Messintervall von 24 Stunden für die Versuche mit Etoposid gewählt wurde.

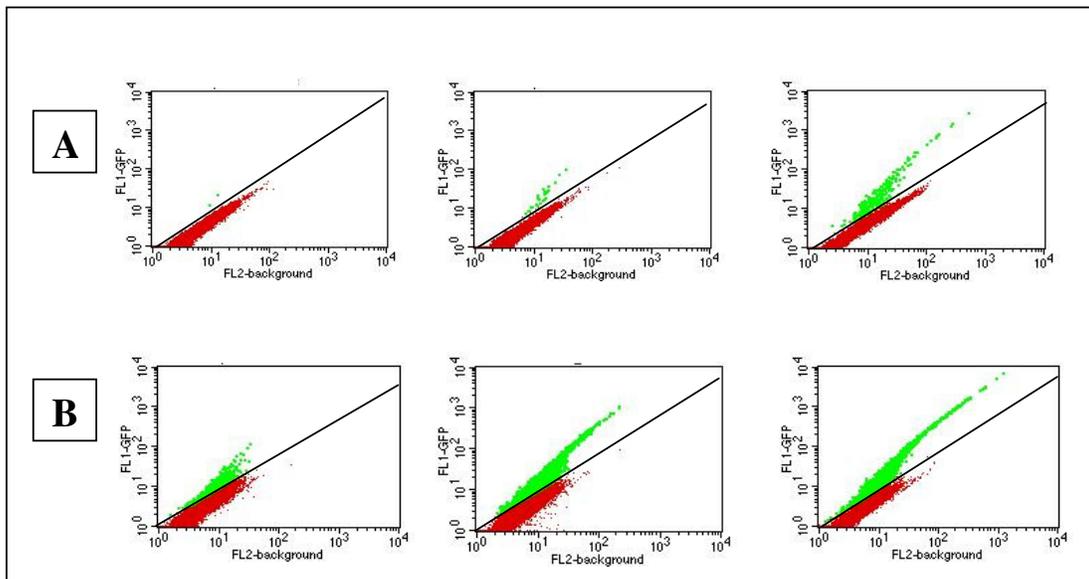


Abb.11

Messung der grünfluoreszierenden Zellen am Durchflusszytometer nach DSB Induktion

A : Messung des Anteils an grünfluoresz. Zellen nach HR; 8h, 12h, 48h nach Transfektion

B : Messung des Anteils an grünfluoresz. Zellen nach NHEJ; 8h, 12h, 24h nach Transfektion

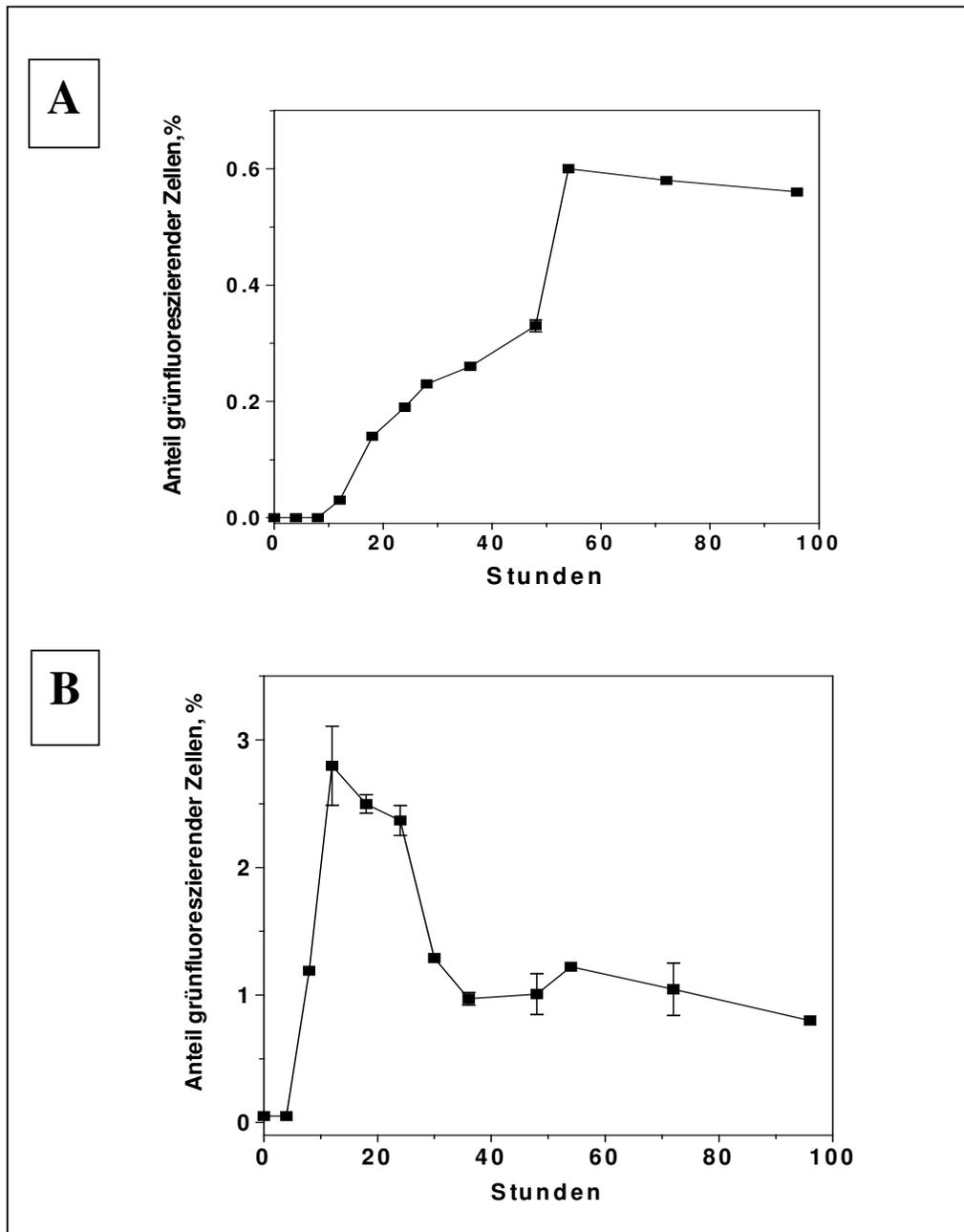


Abb.12

Zeitkinetik der Reparatur nach DSB Induktion durch die I-SceI-Endonuklease in einem Zeitraum von 0- 96h

- A : Messung der Reparatur durch Homologe Rekombination in den 10.1.pGFSP3 nach I-SceI-Transfektion
- B : Messung der Reparatur durch Nichthomologes Endjoining in den 10.1.pGFSP6

4.7. Einfluss des Topoisomerase II-Inhibitors Etoposid auf die Reparatur von Doppelstrangbrüchen

Auf der Grundlage der zuvor beschriebenen Versuchsergebnisse konnte der Einfluss von Etoposid auf HR und NHEJ untersucht werden (Abb.4). Unmittelbar nach der Transfektion mit pCMV-I-SceI wurden verschiedene Konzentrationen von Etoposid in das Medium der Zellen gegeben und über die gesamte Reparaturzeit im Medium gelassen. So kann davon ausgegangen werden, dass die Topoisomerase II über den gesamten Zeitraum hinweg gehemmt wird. In dem Fall, dass Etoposid, und somit die Hemmung der Topo-II, einen Einfluss auf HR oder NHEJ hat, kann dies anhand einer Änderung des Anteils an grünfluoreszierenden Zellen im Durchflusszytometer gemessen werden.

4.7.1. Etoposid vermindert die Reparatur durch Homologe Rekombination

Es wurden in 4 unabhängigen Versuchen jeweils Etoposidkonzentrationen zwischen 0,01 μ M und 3 μ M in ihrer Wirkung auf die HR untersucht (Abb.13A). Nach 48 Stunden wurde der Anteil grünfluoreszierender Zellen im Flusszytometer bestimmt. Es zeigte sich, dass mit ansteigender Konzentration von Etoposid der Anteil an grünfluoreszierenden Zellen kontinuierlich abnahm. Konzentrationen von weniger als 0,1 μ M zeigten noch keinen Effekt auf die Reparatur der DSB. Doch schon bei einer Etoposidkonzentration von 0,5 μ M nahm der Anteil an grünfluoreszierenden Zellen deutlich ab. Bei 3 μ M Etoposid wurde die Reparaturfrequenz der HR etwa um den Faktor 10 vermindert. Dies bedeutet, dass Etoposid in steigenden Konzentrationen die DSB-Reparatur über Homologe Rekombination zunehmend hemmt.

4.7.2. Etoposid hat keinen Einfluss auf das Nichthomologe Endjoining

Es wurde auch der Einfluss von Etoposid auf das NHEJ untersucht (Abb.13B). Hierbei wurden wiederum Konzentrationen zwischen 0,01 μ M und 3 μ M verwendet. Die Reparaturrate wurde wegen der unterschiedlichen Kinetik von NHEJ und HR schon nach 24 Stunden anhand der grünfluoreszierenden Zellen gemessen. Dabei zeigte sich in

drei unabhängigen Versuchen, dass der Anteil an grünfluoreszierenden Zellen unter dem Einfluss von Etoposid nahezu konstant blieb. Es zeigten sich keine signifikanten Änderungen. Die Hemmung der Topo-II durch Etoposid hat im Gegensatz zur HR auf das NHEJ keinen Einfluss.

4.8. Topoisomerase II-Nachweis

Die Ergebnisse dieser Arbeit werfen die Frage auf, warum nur die HR, nicht aber das NHEJ gehemmt wird. Dies könnte daran liegen, dass der Effekt der Hemmung der Topoisomerase II durch Etoposid ausgeprägter ist, wenn das Enzym in der Zelle auch vermehrt benötigt wird. Zeichen für einen erhöhten Enzymbedarfs könnte indirekt das Expressionsniveau sein. Eine hohe Expression von Topo-II kann in diesem Sinne eine bedeutende, eine niedrige Expression dagegen eine weniger wichtige Funktion anzeigen.

Dieser Vorstellung zufolge sollte die Expression der Topo-II zu Zeiten hoch sein, in denen sie für die HR benötigt wird. Deshalb wurde untersucht, ob die Topo-II im Verlauf des Zellzyklus unterschiedlich stark exprimiert wird.

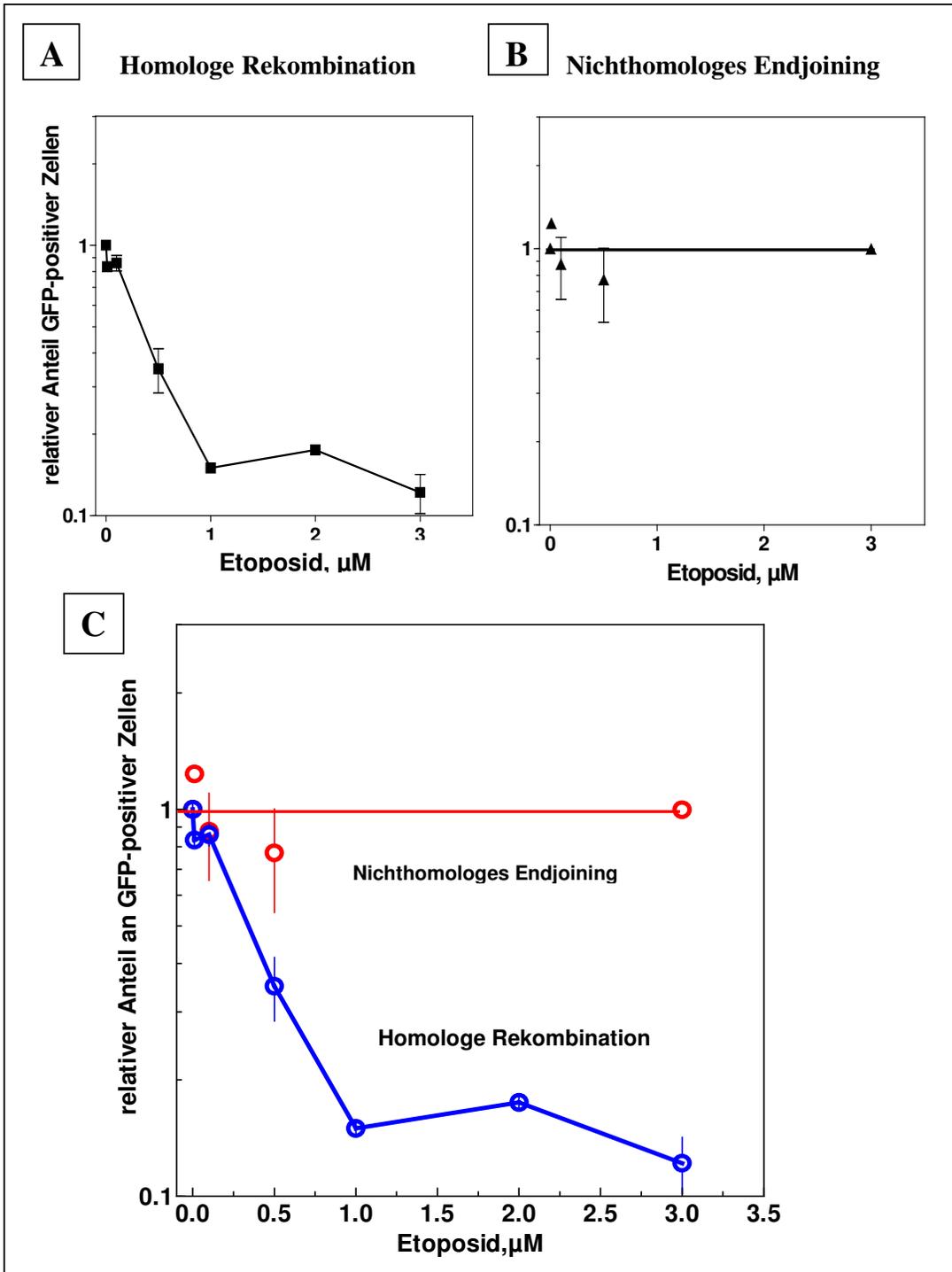


Abb.13

Es wurde nach DSB-Induktion durch pCMV-I-SceI die Wirkung von Etoposid auf die Reparatur durch Veränderung des Anteils an grünfluoreszierenden Zellen untersucht. Darstellung der normierten Werte, um die absolut gesehenen Änderungen deutlicher zu machen.

A: Einfluss von Etoposid auf die HR: Zugabe von 0,01 μM ; 0,1 μM ; 0,5 μM ; 1 μM ; 2 μM ; 3 μM Etoposid und Messung des Anteils an grünfluoreszierenden Zellen nach 48h. Der Anteil nimmt mit höherer Konzentration von Etoposid ab.

B: Einfluss von Etoposid auf das NHEJ: Zugabe von 0,01 μM ; 0,1 μM ; 0,5 μM ; 3 μM Etoposid und Messung nach 24h. Der Anteil an grünfluoreszierenden Zellen ändert sich nicht wesentlich.

C: Beide Ergebnisse im Vergleich zueinander in einer Graphik dargestellt

4.8.1. Synchronisation der Zellen und Messung der Zellzyklusverteilung im Durchflusszytometer

Um Topoisomerase II in verschiedenen Phasen des Zellzyklus nachzuweisen, mussten die Zellen vorher synchronisiert werden. Der Nachweis der Zellzyklusverteilung erfolgte nach Färbung mit Propidium-Jodid am Durchflusszytometer (Abb.14). Zur Analyse des Zellzyklus wird der DNA-Gehalt der Zellen über die Interkalation von Propidiumjodid in die DNA und die daraus resultierende Fluoreszenzstärke im FACS-Gerät bestimmt. In der G1-Phase beträgt der DNA Gehalt 1N, in der G2/M Phase 2N, in der S-Phase liegt der Gehalt der DNA dazwischen. Die FACS-Analyse (Abb.14), bei der die Anzahl der Zellen gegen die DNA-Fluoreszenz aufgetragen wird, erlaubt die Berechnung des Anteils der Zellen in verschiedenen Zellzyklusphasen.

Zur Synchronisation der Zellen in der G0/G1 Phase des Zellzyklus wurden die Zellen für 48 Stunden in Konfluenz gehalten. Danach befanden sich 83% in der G0/G1-Phase (Abb.14A), 7% in der S-Phase und 10% der Zellen in der G2-Phase. Ein Teil dieser Zellen wurde verdünnt neu ausgesät, so dass diese aus der G0-Phase in die S-Phase übergingen (Abb.14B). Nach 16 Stunden wurden 61% der Zellen in der S-Phase gemessen. Dagegen waren in der G1-Phase nur noch 15%, in der G2-Phase 24%.

Um die Zellen in der frühen S-Phase zu synchronisieren, wurden Zellen für 16 Stunden mit Aphidicolin behandelt. Aphidicolin ist ein Inhibitor der DNA-Polymerasen α , δ , ϵ . Dadurch wird vor allem die Initiation aber auch in geringerem Maße die Elongation der Replikation verhindert. Die Zellen akkumulieren deshalb in der frühen S-Phase unmittelbar zu Beginn der DNA-Duplikation (Abb.14C). Im Histogramm sind sie daher noch im Bereich der G0/G1-Zellen (79%) zu finden. Daneben befanden sich 14% der Zellen im Verlauf der S-Phase und 7% in der G2-Phase. Wenn die Zellen nach dieser Behandlung in aphidicolinfreies Medium gegeben wurden, setzten sie unmittelbar die Synthese fort. 4 Stunden nach Aphidicolinbehandlung sind 66% in die S-Phase übergegangen (Abb.14D). Nur noch 12% befinden sich in der G1-Phase, in der G2-Phase sind es 22%. Nach weiteren 4 Stunden befinden sich 58% der Zellen in der S-Phase, 12% wurden in der G1-Phase gemessen und in der G2-Phase befanden sich 30% (Abb.14E).

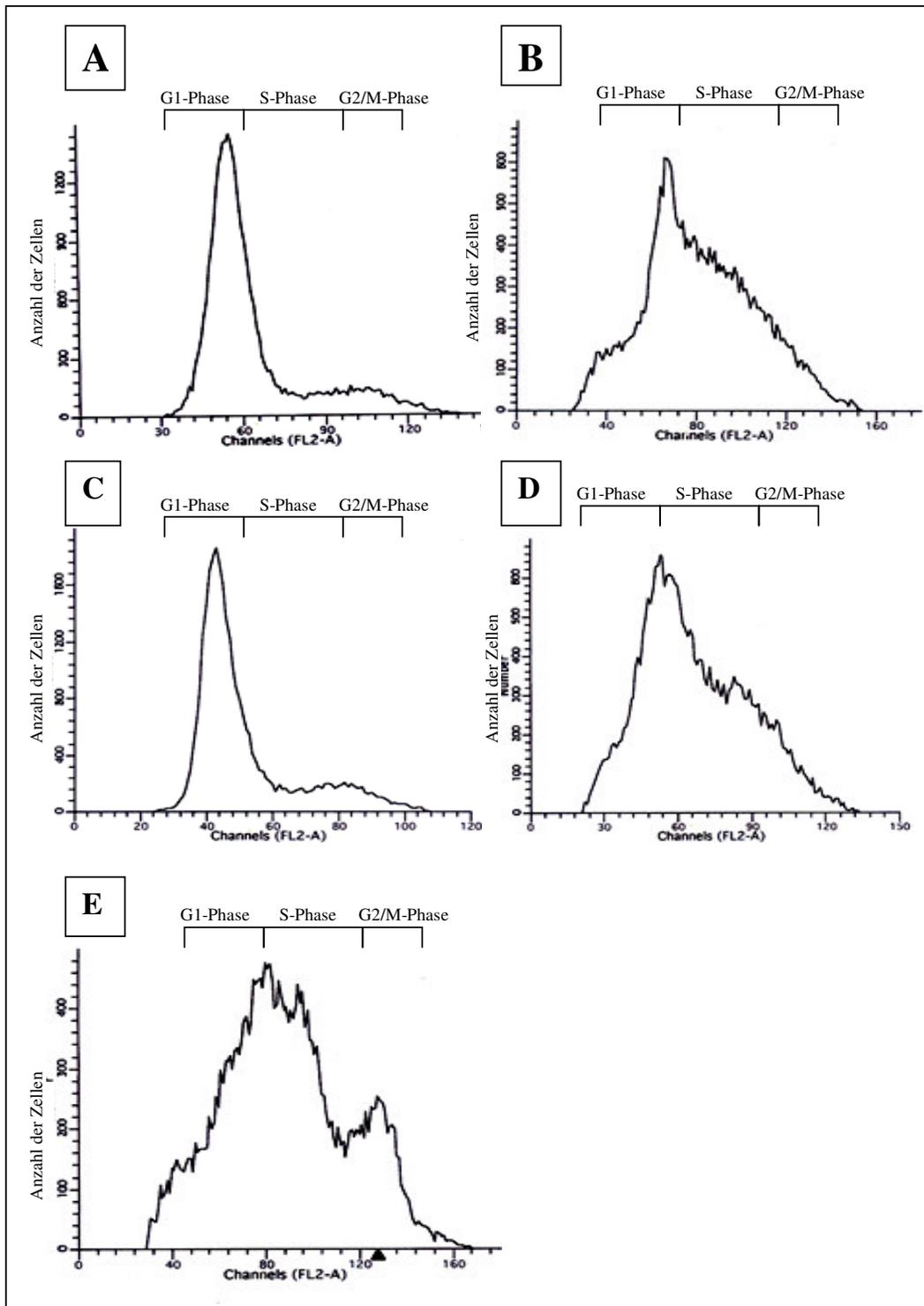


Abb.14

DNA-Histogramme nach durchflusszytometrischer Messung. Aufgetragen wurde die Anzahl der Zellen gegen den relativen DNA-Gehalt. Daraus wurde der Anteil der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen ermittelt.

A: Zellen sind 48h im Plateau/konfluent; 83% sind in der G0/G1-Phase

B: Zellen nach Plateau 16h wachsend; 61% sind in der S-Phase

C: Zellen wurden 16h mit Aphidicolin behandelt; 79% sind in der frühen S-Phase arretiert; da sie noch nicht den doppelten DNA Gehalt haben, sind sie im Diagramm unter der G1-Phase

D: Zellen 4h nach Aphidicolinbehandlung; 58% sind in der S-Phase

E: Zellen 8h nach Aphidicolinbehandlung; 66% befinden sich in der S-Phase

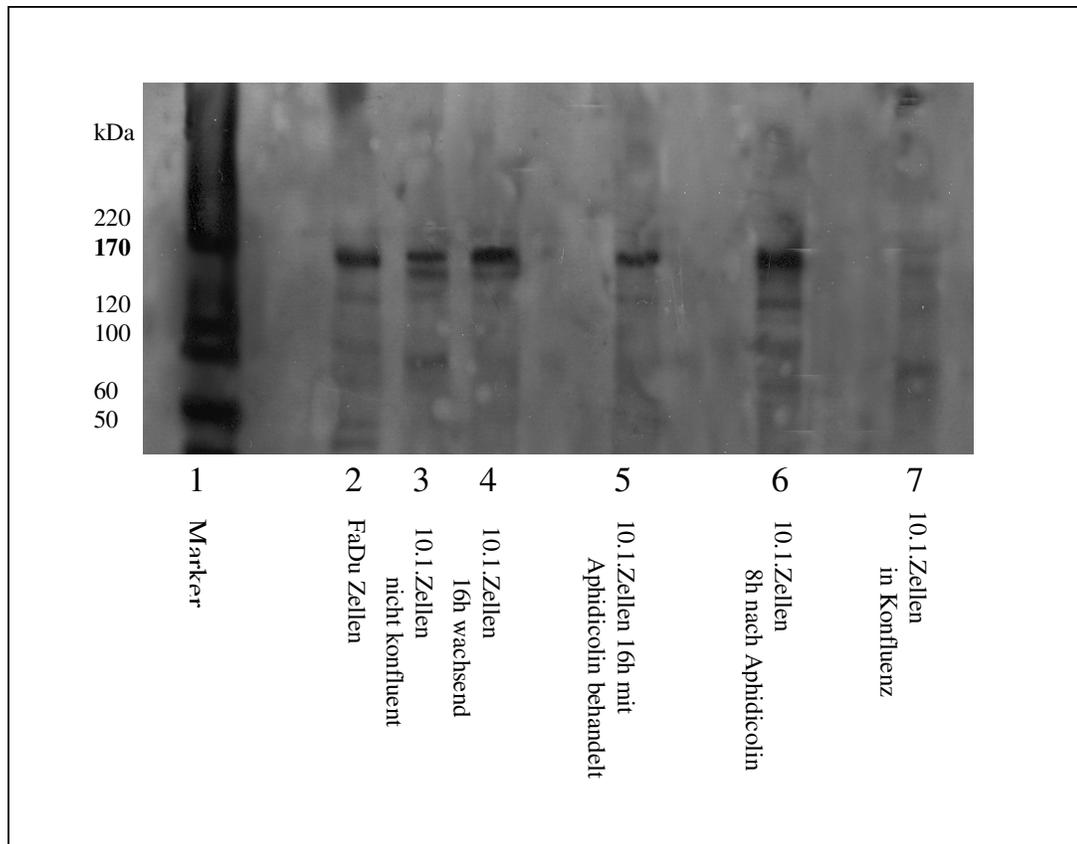


Abb.15

*Western Blot zum Nachweis der Topo-II in verschiedenen Zellzyklusphasen
 In den Kontrollzellen (Bahn 2), den proliferierenden Zellen (Bahn 3, 4, 6), sowie in den in der frühen S-Phase
 sistierenden (Bahn 5) Zellen konnte anhand der Bande bei 170 kDa Topo-II nachgewiesen werden. Bei den
 konfluenten Zellen (Bahn 7) ist keine Bande zu erkennen, also keine Topo-II nachweisbar*

4.8.2. Proteinnachweis durch Western Blot

Das Western-Blotting ist ein Verfahren zum differentiellen Nachweis von Proteinen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung im Polyacrylamidgel erfolgt der Transfer der Proteine auf eine Membran. Dort können sie über eine spezifische Antigen-Antikörperbindung sichtbar gemacht werden.

Zur Verifikation der Maus-Topo-II wurden humane FaDu-Zellen als Kontrolle verwendet. Bei diesen (Bahn 2) zeigte sich eine spezifische Bande bei 170kDa, die der Topo-II entspricht.

Die 10.1. Zellen wurden in verschiedenen Phasen des Zellzyklus` synchronisiert (4.8.1.) und ihre Proteine für den Western Blot isoliert. In Bahn 3, 4 und 6 wurden Zellen

untersucht, die sich in der Proliferation befanden. Bahn 5 zeigt Zellen, die durch Aphidicolinbehandlung in der frühen S-Phase des Zellzyklus arretierten. Die Zellen, die in Bahn 7 untersucht wurden, befanden sich im Proliferationsstopp.

Im Western Blot zeigte sich bei den Zellen (Bahn 3-6), die sich in der S/G2-Phase des Zellzyklus befanden, deutliche Banden bei 170kDa. Diese entsprechen der Maus-Topo-II. Bei den nichtproliferierenden Zellen (Bahn 7) zeigte sich diese spezifische Bande nicht. Topo-II wird folglich vermehrt in proliferierende Zellen exprimiert.

4.9. Etoposid induziert Doppelstrangbrüche

Die durch Etoposid induzierten DSB können über γ H2AX-Foci in den Zellen nachgewiesen werden (Rogakou et al., 1998). Am Fluoreszenzmikroskop werden die γ H2AX-Foci sichtbar und können ausgezählt werden (Abb.16). Die Zellen mit Foci wurden in Klassen zusammengefasst (0-10, 10-30, 30-50, 50-100, ≥ 100 Foci/Zelle), wobei maximal 100 Foci/Zelle gezählt wurden. Es zeigte sich, dass auch die Mausfibroblasten, die nicht mit Etoposid behandelt wurden, Foci aufwiesen (Abb.16B; schwarzer Balken), d.h., dass bereits ohne Einfluss von Etoposid auf die Zelle das Genom Doppelstrangbrüche aufweist.

Bei den behandelten Zellen zeigte sich mit zunehmender Etoposidkonzentration (0,1 μ M; 0,7 μ M; 5 μ M) eine Steigerung der Foci/Zelle. Diese Dosis-Effekt-Beziehung lässt sich in der dosisabhängigen Abnahme der Zellen mit < 30 Foci/Zelle und der dazu fast spiegelbildlichen Zunahme der Zellen mit ≥ 100 Foci/Zelle erkennen.

Somit konnte ähnlich wie in vorherigen Arbeiten (Lin et Liu, 2001; Kaufmann, 1998; Jeggo et al., 1989; Liu, 1989; Chen et al., 1984; Ross et al., 1984) nachgewiesen werden, dass Etoposid in den untersuchten Konzentrationen Doppelstrangbrüche induziert. Dies zeigt die doppelte Wirksamkeit von Etoposid als Zytostatikum. Einerseits wird die Topo-II gehemmt, andererseits verursacht Etoposid dabei DNA-Schäden, die von der Zelle repariert werden müssen, unrepariert letztendlich zur Apoptose der Zelle führen.

Für die Ergebnisse dieser Arbeit ist festzuhalten, dass die starke Doppelstrangbruchinduktion von Etoposid auch ihrerseits Reparaturmechanismen in der Zelle aktiviert und beeinflusst.

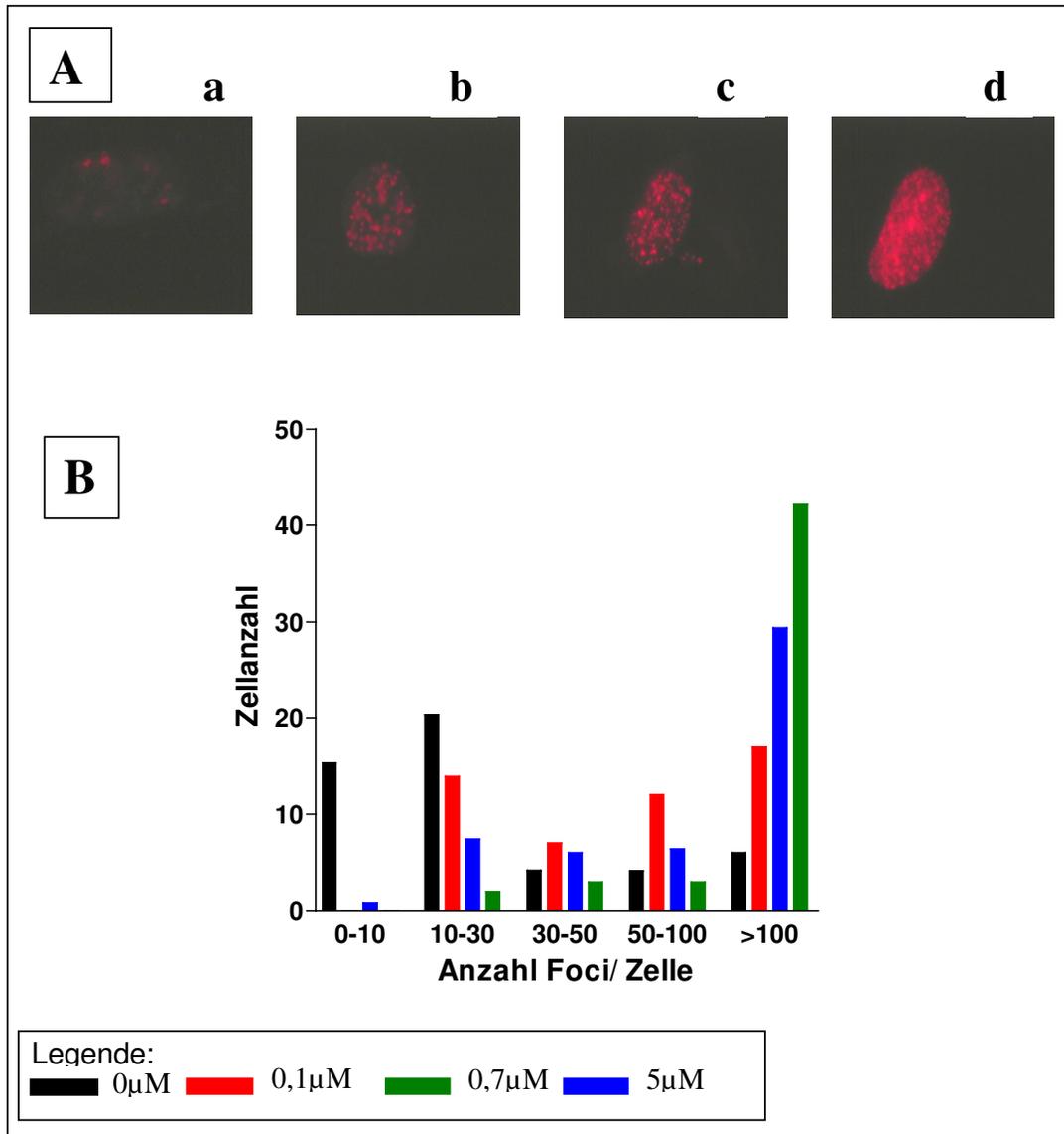


Abb.16

A: Zellen mit Foci unter dem Fluoreszenzmikroskop: a) Zelle mit 3Foci; b) Zelle mit 30-50 Foci; c) Zelle mit 50-100 Foci; d) Zelle mit >100Foci

B: Diagramm zur Auswertung der γ H2AX- Foci pro Zelle nach einer 24h Behandlung mit 0 μM; 0,1 μM; 0,7 μM; 5 μM Etoposid

5. Diskussion

Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob eine Inhibition des Enzyms Topoisomerase II durch Etoposid die Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB) beeinflusst. DSB stellen nach ionisierender Bestrahlung die entscheidenden letalen DNA-Schäden dar (Dikomey et al., 1998; Willers et al., 2004). Im Einzelnen sollte untersucht werden, welcher Reparaturmechanismus durch Etoposid beeinflusst wird, die Homologe Rekombination oder das Nichthomologe Endjoining. Eine Hemmung der DNA-Reparatur durch das Chemotherapeutikum könnte in einer kombinierten Radiochemotherapie Grund für eine Verstärkung der Strahlenwirkung sein (synergistischer Effekt) (Hennequin et Favaudon, 2001; Wilson et al., 2006).

5.1. Konstrukte für zwei Reparaturwege mit unterschiedlicher Effizienz und Geschwindigkeit

Es gibt prinzipiell zwei Wege, mit denen DSB repariert werden können: die HR und das NHEJ (Lin, Lukacsovich, Waldman, 1999; Pfeiffer, Goedecke, Obe, 2000; Khanna, Jackson 2001; Jackson, 2002; Willers et al., 2004). Mit Hilfe von zwei bereits entwickelten Plasmidkonstrukten (Schmidt-Petersen, med. Doktorarbeit 2003) konnten in dieser Arbeit beide Reparaturwege getrennt voneinander untersucht werden. Die Konstrukte zeigten wesentliche Verbesserungen zu vorher genutzten Systemen. Die von anderen Arbeitsgruppen bereits entwickelten Plasmidassays haben eine Vielfalt nicht vergleichbarer Resultate ergeben. Um eine Reparatur durch HR nachweisen zu können, gab es extrachromosomal vorliegende (Akyüz et al., 2002; Willers et al., 2002; Willers et al., 2001; Powell et al., 1994) und auch chromosomal integrierte Substrate (Akyüz et al., 2002, Willers et al., 2000; Lin et al., 1999; Moynahan et al., 1999; Phillips et al., 1999; Saintigny et al., 1999; Elliott et al., 1998; Mekeel et al., 1997; Liang et Jasin, 1995; Rouet et al., 1994). Um das NHEJ zu messen, wurden zumeist episomal vorliegende Substrate verwendet oder die Reparatur an isolierten Zellextrakten (Okorokov et al., 2002) untersucht. Häufig wurde auch eine einfache Ligation eines Plasmids, welches zur Wiederherstellung eines Reportergens führte (Thacker et al., 1992; Tang et al., 1999) oder auch eine zufällige Integration eines Plasmids in das Genom einer Zelle als ein NHEJ-Ereignis angesehen und quantifiziert (Lee et al., 1999). Heutzutage nutzt man in den Untersuchungen von Reparaturvorgängen

v.a. chromosomal integrierte Plasmide. Diese kommen den natürlichen Vorgängen in der Zelle am nächsten. Insgesamt ergab sich aufgrund der Vielzahl unterschiedlicher Methoden und Konstrukte keine Vergleichbarkeit beider Reparaturwege untereinander und der Ergebnisse verschiedener Arbeiten miteinander. Beispielsweise sieht man unterschiedliche Ergebnisse in Arbeiten, die einen quantitativen Vergleich von NHEJ und HR in der DSB-Reparatur in Säugetierzellen vornehmen: Es wurde untersucht, in welchem Maß ein I-SceI induzierter DSB durch NHEJ oder HR repariert wird. Allen et al. schreiben von einer 85%igen Reparatur des DSB durch NHEJ in Säugetierzellen. Nur 15% der DSB werde über HR repariert. Dagegen ist in der Arbeit von Liang et al. eine NHEJ Beteiligung von nur 50-70% beschrieben; über HR werde in 30-50% der Fälle repariert. Diese unterschiedlichen Ergebnisse zeigen die Auswirkungen unterschiedlicher genutzter Methoden. Allen et al. beschreiben ein Assay, dass eine Coexpression von der Endonuklease I-SceI und dem GFP-Gen nutzt und eine Sortierung jeder Zelle durch ein MoFlo-Flusszytometer ermöglicht (Allen et al. 2003). Anschließend werden durch PCR die Reparaturereignisse ausgewertet. Dagegen beschreibt Liang et al. einen nicht-selektiven, PCR-basierten Assay (Liang et al. 1998).

Die strukturelle Ähnlichkeit der in der vorliegenden Arbeit genutzten Konstrukte sowie der identische Versuchsablauf haben es ermöglicht, die Reparatur eines DSB durch HR oder NHEJ direkt miteinander zu vergleichen. Mit dem in das Genom von MEFs integrierten Konstrukt pGFSP3 konnte die Reparatur über HR nachgewiesen werden. Mit dem pGFSP6 Konstrukt wurde die Reparatur über den NHEJ-Weg untersucht. Eine erfolgreiche Reparatur wurde durch die Grünfluoreszenz der Zelle nachgewiesen. Durch die Nutzung des GFP-Gens als Reportergen war somit eine schnelle Messung der Reparaturraten über die Grünfluoreszenz möglich. Auch Beginn und Verlauf der Reparatur durch HR und NHEJ konnte mithilfe der Substrate verglichen werden.

Wie die Versuche gezeigt haben, ist der Beginn der Reparatur durch HR im Vergleich zum NHEJ verzögert, d.h. die erste erfolgreiche Reparatur durch HR zeigte sich erst 4 Stunden später als die durch NHEJ (Abb.12A/B). Dies lässt darauf schließen, dass der Ablauf der HR komplexer ist und länger dauert als der des NHEJ. Um diesen unterschiedlichen Zeitverlauf der Reparaturwege HR und NHEJ zu verstehen, ist es notwendig, den detaillierten Ablauf der beiden Reparaturwege genau zu vergleichen (siehe auch Einleitung). Schon bei der Anzahl der Proteine, die an beiden Reparaturwegen beteiligt sind, fällt auf, dass bei dem komplexen Verlauf der HR mehr Proteine benötigt werden als beim NHEJ. Bei der konservativen Reparatur durch HR

wird unter Zuhilfenahme einer homologen Sequenz als Matrize eine fehlerfreie Reparatur des DSB gewährleistet (Abb.1A). Die daran beteiligten Proteine sind der Mre11 Komplex, bestehend aus Mre11, Rad50 und Nbs1, das RPA (Replication protein A) Rad52, Rad51, Rad51B, C, D, Rad54, Xrcc2 und 3, Brca1, Brca2, c-Abl und ATM (Symington, 2005; Mazin Alexeev et Kowalczykowski, 2003; Sugawara et al., 2003; Khanna et Jackson, 2001; Petukhova et al., 1998). Das NHEJ dagegen ist auf eine schnelle sowie energiesparende Reparatur ausgelegt, die allerdings nicht fehlerfrei ist. Es wird keine homologe Sequenz benötigt. Beim NHEJ spielen Proteine, wie der Ku70/80-DNA-PKcs-Komplex, Artemis, Xrcc4, LigaseIV und XLF eine Rolle (Khanna et al., 2001). Die Anzahl an Proteinen beim NHEJ ist kleiner und der Ablauf der Reparatur weniger komplex als bei der HR (Abb.1B). Insbesondere benötigt die HR Helikaseaktivität und DNA Strang-Synthese. Beides ist für das NHEJ in nur geringem Maße notwendig. Die Zelle braucht für das NHEJ folglich weniger Energie als für die HR. Außerdem können DNA-Schäden schneller repariert werden. Eine Fehlreparatur, vor allem der Verlust einiger weniger Basenpaare, ist in den meisten Regionen des Chromatins tolerierbar, da nur ca. 5% des Genoms kodierender Bereich ist. Es kann somit erklärt werden, warum die Zelle die Reparatur durch NHEJ häufiger und auch schneller nutzt als durch HR (Sargent et al., 1996; Johnson et Jasin 2001).

Einen weiteren Unterschied in der Reparaturkinetik zeigen Abb.12A/B: nach Erreichen eines Maximalwertes nach 12h nimmt die Anzahl der durch NHEJ reparierten, grünfluoreszierenden Zellen ab, wogegen die der HR reparierten Zellen im Vergleich konstant bleibt. Als Erklärung kann angeführt werden, dass das NHEJ mit einer hohen Fehlerrate versehen ist, das Reparaturprodukt somit einer gewissen Instabilität unterliegen kann und erneut repariert wird. Bereits grünfluoreszierende Zellen können durch eine erneute Reparatur ihre Grünfluoreszenz wieder verlieren.

Tatsächlich zeigten chromosomale Untersuchungen mit der FISH-Technik, dass bei dem NHEJ häufig erst mehrere nacheinander geschaltete Reparaturvorgänge zum endgültigen Ergebnis führten (Savage et al., 1993; Cornforth, 2001). Nur durch wiederholtes Aufschneiden und Neureparatur des Schadens sind gezeigte komplexe Austauschaberrationen zu erklären.

Es ist außerdem bekannt, dass die GFP-Expression mit der Zeit variieren kann (transkriptionale Oszillation von >20%) (Feng et al. 2001). Dieser Mechanismus müsste jedoch in der vorliegenden Arbeit unabhängig davon sein, über welchen Weg die Zellen repariert haben. Es dürfte nicht nur in der Reparatur durch NHEJ zu sehen sein.

Insgesamt sollte sich außerdem bei der großen Anzahl von gemessenen Zellen im Mittel ein konstanter Wert oder allenfalls eine geringfügige Varianz desselben ergeben. Deshalb kann die transkriptionale Oszillation nicht als Grund für den gezeigten Unterschied in der Reparaturkinetik angesehen werden.

5.2. Die Bedeutung der Topoisomerase II bei der DSB Reparatur

Die Topoisomerase II ist ein Enzym, welches den topologischen Zustand der DNA kontrolliert. Für einige Vorgänge in der Zelle wie Replikation, Transkription und Rekombination muss die DNA entwunden werden (Baldwin et Osheroff, 2005; Osheroff, 2003; Wang, 2002; Champoux, 2001; Fortune et Osheroff, 2000; Burden et Osheroff, 1998; Nitiss, 1998; Wang, 2002; Osheroff et al., 1991; Wang, 1985). Die dabei auftretenden Torsionsspannungen werden durch Topoisomerasen gelöst. Möglicherweise hilft die Topo-II auch komplexere DNA-Strukturen wie Überkreuzungen temporär zu „entwirren“ (Baldwin et Osheroff, 2005; Wang, 2002; Champoux, 2001; Burden, 1998).

Durch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Reparaturkonstrukte konnte der Einfluss von Topo-II-Inhibitoren auf die Reparatur von DSB untersucht werden. Durch eine Hemmung der Topo-II mit Etoposid wurde die Reparatur durch die Homologe Rekombination gehemmt. Damit konnte gezeigt werden, dass Topo-II tatsächlich für die Reparatur durch HR benötigt wird. Das Nichthomologe Endjoining wurde dagegen nicht durch eine Hemmung der Topo-II beeinflusst.

Es steht also die Frage im Raum, warum allein die HR gehemmt wurde, nicht aber das NHEJ. Um diese Frage beantworten zu können, musste zunächst gezeigt werden, dass sich Erkennungssequenzen für Topo-II auf beiden Reparaturkonstrukten (pGFSP3 und pGFSP6) in der Nähe des induzierten DSB befanden. Wenn das nicht der Fall gewesen wäre, hätte die Hemmung der Topo-II gar keinen Einfluss zeigen können, da diese nicht im Bereich der Reparatur aktiv werden konnte. Capranico et al. (1998) haben die verschiedenen Möglichkeiten der Erkennungssequenzen der Topo-II beschrieben (Quellen darin: Sander et al., 1985; Cornarotti et al., 1996; Capranico et al., 1990; Pommier et al., 1991). Daraus geht hervor, dass Topo-II eine Reihe möglicher Sequenzen von bis zu 15 Nukleotiden (Capranico et al., 1990) zur Bindung preferiert. Es wurden die Topo-II Bindungsstellen in den Konstrukten pGFSP6 und pGFSP3 im Bereich von 220 Nukleotiden stromaufwärts und -abwärts der I-SceI-Sequenz aufgesucht. Es befinden

sich in diesem Abschnitt des pGFSP6-Konstruktes 2 und auf dem pGFSP3-Konstrukt 4 Erkennungssequenzen für die Topo-II (Abb.19). Somit kann der ausbleibende Einfluss von Topo-II auf das NHEJ nicht auf ein Fehlen von Topo-II Erkennungssequenzen auf dem pGFSP6 Konstrukt zurückgeführt werden.

A: pGFSP6

```

.....GTTTAGTGAACCGTCAGATCGCTAGCGCTACTACCGGACTCGA
GTCCACCCGAGACATCACTTGATCAAATCGAAATCGAACACCTGCGG
AATTCTAGGGATAACAGGGTTAATTAAGCTTCTGCAGACCATGGAG
ATTACCCTGTTATCCCTACCCGGGGATACTGACGGTACCTCAATAAT
CCGATCGAAGTCTACTACTGATCGCGGATCCACCGGTCGCCGCCATGG
TGAGCAAGGGCGA.....

```

B: pGFSP3

```

.....CAGGGTCAGCTTATTACCCTGTTACCCTACACACGCTGAACTT
GTGGCCGTTTACGTCGCCGTCAGCTCGACCAGGATGGGCACCACC
CCGGTGAACAGCTCCTGCCCTTGCTACCATGGTGGCGACCGGTG
GATCCCGGGCCCGCGGTACCGTCGACTGCCAGAATCGAAGCTTG
AGCTCGAGATCTGAGTCCGGTA.....

```

Abb.19

A: Ausschnitt aus der Basensequenz des pGFSP6-Konstruktes, in dem 2 Topo-II-Bindungsstellen stromaufwärts der I-SceI-Erkennungssequenz liegen. Rot markiert sind die Erkennungssequenzen der Topo-II, grün markiert ist das künstliche Startcodon, blau das natürliche Startcodon. Die I-SceI-Erkennungssequenzen sind schwarz hervorgehoben. Insgesamt wurde jeweils ein Abschnitt von 220 Nukleotiden stromauf- und -abwärts untersucht.

B: Ausschnitt aus der Basensequenz des pGFSP3-Konstruktes, in dem 4 Topo-II-Bindungsstellen stromabwärts der I-SceI-Erkennungssequenz liegen.

Eine Erklärung für die ausschließliche Hemmung der HR ist in der Unterschiedlichkeit der beiden Reparaturwege zu finden. Für die HR ist eine intakte zum geschädigten Strang homologe Sequenz erforderlich. Diese stammt normalerweise vom Schwesterchromatid nach der DNA-Replikation (Johnson et Jasin, 2001). Damit die komplementäre Sequenz vom „Donorstrang“ abgelesen werden kann, muss dieser in jedem Fall zu einem sogenannten D-Loop geöffnet werden. Dabei entsteht beidseits des Loops im Bereich der noch nicht entwundenen DNA ein Torsionsstress (Abb.20). Das negative bzw. positive „supercoiling“ würde nach kurzem die Helikase, das Protein das für die Öffnung der DNA-Helix zuständig ist, hemmen. Erst wenn die Topoisomerase II diesen Stress löst, kann die Sequenz langstreckig geöffnet, durch DNA-Polymeraseaktivität abgelesen und resynthetisiert werden. Um nach Abschluss der Reparatur den ursprünglichen Konfigurationszustand wieder herzustellen (Chromatinremodelling), ist erneut Topoisomeraseaktivität nötig. Im Gegensatz zu diesem Reparaturweg werden beim NHEJ die Enden des DSB zunächst exonukleotisch bereinigt, damit ligierbare Enden entstehen. Wesentlich ist, dass es in diesem Fall nur freie DNA-Enden gibt, die ohne Torsionsspannung prozessiert und wieder verbunden werden können. Es ist kein Öffnen eines „Donorstranges“ und somit keine Topoisomeraseaktivität erforderlich.

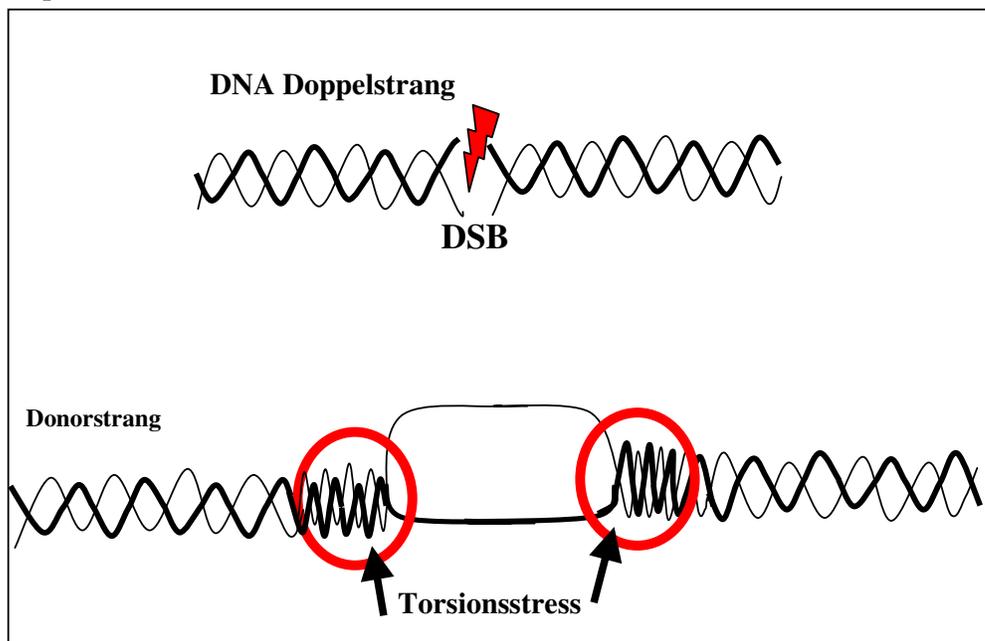


Abb.20

*Zustand bei der Reparatur eines DSB durch homologe Rekombination:
Bei der HR muss der Donorstrang geöffnet werden, damit die homologe Sequenz abgelesen werden kann. Dabei entsteht in dem Donorstrang ein Torsionsstress. Beim Lösen dieses Torsionsstresses ist die Topoisomerase II beteiligt.*

5.3. Expression der Topoisomerase II ist zellzyklusabhängig

Ein weiterer Indikator dafür, dass Topo-II eine Rolle in der HR aber nicht beim NHEJ spielt, lässt sich in der Expression von Topo-II im Verlauf des Zellzyklus erkennen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der Topo-II in den verschiedenen Zellzyklusphasen mittels Western-Blot untersucht (Abb.15). In ruhenden Zellen zeigt sich kaum Topo-II Expression, in Zellen der frühen S-Phase (mit Aphidicolin gehemmt) eine Steigerung und in Phasen der Proliferation eine wesentlich stärkere Expression. Dies wurde in ähnlicher Weise auch in anderen Arbeiten beobachtet (Tolner et al., 2000; Tolner et al., 2001; Isaacs et Harris, 1996; Woessner et al., 1991; Hsiang et al., 1988). Das bedeutet, dass Topo-II besonders in der S-/G2-Phase für die HR, die in dieser Phase vermehrt genutzt wird, zur Verfügung steht.

5.4. Etoposid verursacht DSB

Es konnte gezeigt werden, dass Etoposid nicht nur Topo-II hemmt, sondern dabei auch DSB induziert (Abb.16). Auch diese DSB müssen von der Zelle repariert werden. Dies geschieht in Säugerzellen vorwiegend über NHEJ, kaum durch HR. Dargestellt wurde dies in verschiedenen Arbeiten, in denen eine hohe Sensitivität von Zellen mit Mutationen in Reparaturgenen des NHEJ gegenüber Etoposid nachgewiesen wurde (Adachi et al.,2004; Adachi et al.,2003; Jin et al., 1998). Hefen hingegen bevorzugen zur Reparatur die HR (Sabourin et al., 2003; Malik et Nitiss, 2003). Der Einfluss von Etoposid auf HR und NHEJ bei der Reparatur von DSB ist in den Arbeiten nicht untersucht worden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Homologe Rekombination durch Etoposid gehemmt wird. Daraus ergibt sich für die o.g. Arbeiten ein zusätzlicher Aspekt: Neben der fehlenden Reparaturmöglichkeit eines Etoposid-induzierten DSB über NHEJ, können die Zellen mit dem NHEJ-Defekt auch nur unzureichend auf die Reparatur durch HR ausweichen, da diese durch Etoposid selbst gehemmt wird. Beides zusammen kann Grund für eine stark erhöhte Sensitivität der NHEJ defekten Zellen gegenüber Etoposid sein.

In der Arbeit von Akyüz et al. (2003) wurde ein neues Testverfahren zur Detektion von Genotoxizität von Etoposid und Bestrahlung geprüft. Das genutzte Versuchssystem ist dem in der vorliegenden Arbeit genutzten System zur Untersuchung der HR mit Hilfe des GFP als Reporter gen ähnlich. Akyüz et al. fanden die Homologe Rekombination durch Etoposid und Bestrahlung gesteigert. Dies scheint im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zu stehen. Es wurde jedoch nicht, wie in der vorliegenden Arbeit, der Einfluss von Etoposid auf die Reparatur eines einzelnen induzierten DSB untersucht. Vielmehr verursachten sowohl Etoposid wie auch Bestrahlung im gesamten Genom der Zelle, also auch zufällig im GFP Gen, unspezifisch DSB. Somit kann die gesteigerte Grünfluoreszenz durch HR bei Akyüz et al. allein einer unspezifisch erhöhten spontanen Rekombinationsrate entsprechen, die durch die hohe Zahl von DSB ausgelöst wurde.

5.5. Topoisomerase I

Die Beobachtung, dass die Hemmung der Topo-II keinen Einfluss auf das NHEJ hat, könnte auch darauf zurückzuführen sein, dass die möglicherweise notwendige Topoisomerase-Funktion durch die Topoisomerase I (Topo-I) übernommen wird. Topo-I ist wie die Topo-II ein Enzym der Zelle, welches den topologischen Zustand der DNA regeln und verändern kann. Topo-I verursacht Einzelstrangbrüche, ermöglicht somit kontrolliertes Rotieren des DNA-Stranges um die eigene Achse und schließt den Einzelstrangbruch danach wieder. Dies ist v.a. in der Replikation beim Fortschreiten der Replikationsgabel notwendig, damit, analog zu der Funktion der Topo-II, entstandene Spannungen in der Helix gelöst werden können (Osheroff, 2003; Wang, 2002; Champoux, 2001; Wang, 1985; Vosberg, 1985). Es kann sein, dass für das NHEJ die Topo-I Funktion ausreichend ist, während für die komplexere Reparatur durch HR die Topo-II notwendig ist und deren Hemmung nicht durch Topo-I kompensiert werden kann.

Mit diesem Gedanken wurde in dem für diese Arbeit zuständigen Labor auch der Einfluss des Topoisomerase I-Inhibitors Topotecan auf die HR und das NHEJ untersucht. Der Versuchsaufbau glich dem Aufbau der Versuche mit Etoposid. Es zeigte sich bei diesen Versuchen, dass Topotecan weder die HR noch das NHEJ beeinflusst (Abb.21). Topo-I scheint für die Reparatur von exogenen Doppelstrangbrüchen entbehrlich zu sein, zumindest unter Bedingungen, in der die Topo-II funktional ist.

In diesem Sinne ist es allerdings auch nicht auszuschließen, dass umgekehrt die Topo-I in den vorliegenden Experimenten Reparaturfunktion übernommen hat und dadurch das NHEJ durch Etoposid nicht entscheidend eingeschränkt wurde. Den supprimierenden Effekt auf die HR konnte die funktionale Topo-I jedoch nicht kompensieren.

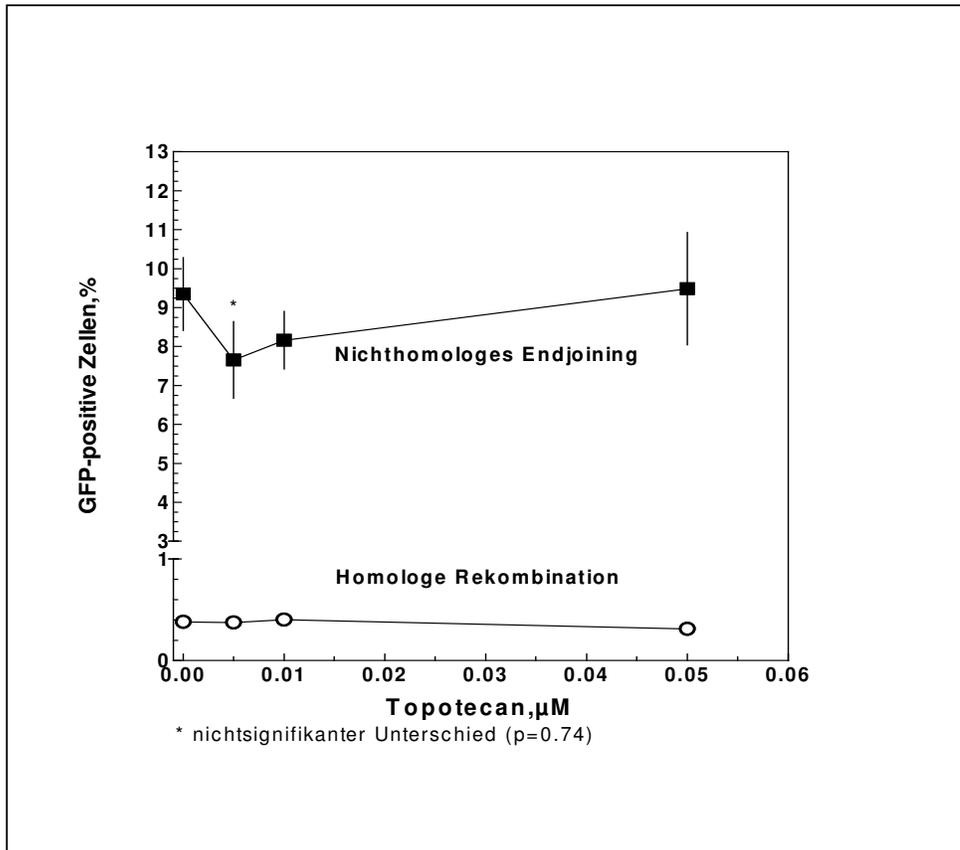


Abb.21:

Einfluss von Topotecan auf HR und NHEJ: Messung der Anzahl grünfluoresz. Zellen am FACS nach I-SceI-Plasmid Transfektion und Topotecanbehandlung mit Konzentrationen von 0,001 μM , 0,005 μM , 0,1 μM und 0,5 μM

5.6. Etoposid in der Therapie:

Strahlensensibilisierung durch Hemmung der Homologen Rekombination

Etoposid wird bereits seit den 80er Jahren in der Tumorthherapie eingesetzt. Es findet als Einzeltherapeutikum oder in der Kombinationstherapie mit anderen Zytostatika Anwendung. Erfolge wurden durch den Einsatz beim kleinzelligen Bronchialkarzinom (Tucker et al., 1978; Johnson et al., 1990), Ovarialkarzinom (Takeda et al., 1990) Lymphomen (Greco, 1999; Hertzberg et al., 2006; Mabeid et Al-Kgodary, 2006) und Keimzelltumoren (Saxman, 1999; Kondagunta et al., 2005) erreicht.

In verschiedenen Arbeiten wird außerdem beschrieben, dass Etoposid in vitro eine Sensibilisierung von Zellen gegenüber Bestrahlung bewirkt (Shigematsu et al., 2001; Minehan et Bonner, 1993; Haddock et al., 1995). Shigematsu et al. haben in ihrer Studie mit 4 unterschiedlichen Zelllinien anhand von Überlebenskurven gezeigt, dass Etoposid vor allem auf sich schnell teilende Zellen strahlensensibilisierend wirkt und somit am ehesten für schnell wachsende Tumoren von Nutzen ist.

In einer Studie von Liu et al. wurde der Effekt von Etoposid in Kombination mit Bestrahlung an, in BALB/c Mäuse implantierten, CT26 colorektalen Adenokarzinomen getestet. Bei den Mäusen, die eine kombinierte Therapie von Etoposid und Bestrahlung erhielten, war die Tumorreduktion am größten. Der Tumor hatte nur 54% der Tumorgroße der Mäuse, die nur eine Bestrahlung erhalten hatten. Es zeigte sich, dass Etoposid in niedrigen Dosen nur eine geringe Toxizität, aber eine hohe Strahlensensibilisierung bewirkte.

Auch in der klinisch angewandten Radiochemotherapie wird Etoposid eingesetzt (Bhutani et al., 2006; Ciombor et al., 2006; Juergens et Brahmer, 2006; Rosti et al., 2006; Liu et al., 2005; Beauchesne et al., 2003). In der Therapie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms ist eine Kombination von Etoposid (und Cisplatin) und Bestrahlung Mittel der Wahl (Rosti et al., 2006; Ciombor et al., 2006; Bhutani et al., 2006; Juergens et Brahmer, 2006). Laut der AWMF Leitlinien werden bei einer sofortigen kombinierten Radiochemotherapie im Stadium I-III, dem „limited disease“, Remissionsraten von 80-90% mit 50-60% Komplettremissionen erreicht. Die mediane Überlebenszeit der Patienten wird bei 14 - 18 Monaten gesehen. 10-20% der Patienten haben eine Dreijahresüberlebensrate und wiederum 10-20% der Patienten sind Langzeitüberlebende ohne Rezidiv. In diesem Stadium gibt es eine klare kurative Zielsetzung. Dagegen wird im „extensive disease“

(Stadium IV) eine palliative Chemotherapie mit Etoposid und Cisplatin sowie eine lokale Bestrahlung empfohlen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welcher Mechanismus für die Strahlensensibilisierung durch Etoposid verantwortlich ist. Da die induzierten DSB die relevanten Schäden bei einer Bestrahlung darstellen, stellte sich die Frage, inwieweit Etoposid, und somit die Hemmung der Topo-II, einen Einfluss auf die Reparaturmechanismen dieser DSB hat. Es wurden die beiden relevanten Reparaturwege, das HR und das NHEJ, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Etoposid die Reparatur durch Homologe Rekombination hemmt. Es können somit die DSB, die nach Bestrahlung entstehen, nicht über HR repariert werden. Dadurch kann eine Strahlensensibilisierung durch Etoposid hervorgerufen werden.

Der Therapieansatz, durch die Hemmung von Reparaturmechanismen die Reparatur induzierter DNA-Schäden zu verhindern, wird jüngst diskutiert. Farmer et al. (2005) sowie Bryant et al. (2005) arbeiteten mit Brustkrebszellen, die BRCA1 defizient sind. Durch eine Hemmung des Enzyms PARP1, das für die Reparatur von Basenschäden verantwortlich ist, können die BRCA1 defizienten Brustkrebszellen, bei denen die Homologe Rekombination defekt ist, erfolgreich sensibilisiert werden.

Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse ist für die Zukunft zu erwarten, dass verschiedenartige Interferenz mit dem zellulären Reparatursystem eine erfolgversprechende Strategie in der Therapie von Krebs darstellen wird, um die klinische Wirksamkeit bisheriger Behandlungen zu verstärken.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine Inhibition der Topoisomerase II durch Etoposid die Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB), die nach Bestrahlung die entscheidenden letalen DNA-Schäden darstellen, beeinflusst. Eine Hemmung der Reparatur der DSB kann als Ursache für eine Strahlensensibilisierung der Zelle gesehen werden. Die möglichen Reparaturwege sind das NHEJ und die HR: Die HR nutzt als konservativer Reparaturweg eine zum DSB homologe Sequenz für eine fehlerfreie Reparatur. Das NHEJ ligiert ohne eine Matrize die vorher bereinigten Bruchenden der DSB. Um beide Reparaturwege getrennt voneinander – aber vergleichbar – untersuchen zu können, wurden bereits zuvor entwickelte Konstrukte genutzt. Diese tragen das Gen für das „Grünfluoreszenz Protein“. Durch Transfektion eines Plasmids, welches die I-SceI-Endonuklease kodiert, wurden an spezifischen Erkennungssequenzen im Konstrukt DSB induziert. Die Zelle repariert die DSB, je nach Konstrukt, und zeigt eine erfolgreiche Reparatur mit einer Grünfluoreszenz an.

Es wurde in der vorliegenden Arbeit auch der Zeitverlauf der einzelnen Reparaturwege untersucht. Die Reparatur durch NHEJ begann schon 12 Stunden nach DSB-Induktion, wogegen die ersten Reparaturereignisse durch HR wegen deren Komplexizität erst 4 Stunden später gemessen werden konnten. In einem weiteren Schritt wurde die Wirkung des Topo-II-Inhibitors Etoposid auf die beiden o.g. Reparaturwege untersucht. Die Topo-II ist ein Enzym, welches den topologischen Zustand der DNA verändern kann. Sie katalysiert den ATP-abhängigen Transport von einer intakten Doppelhelix durch eine zweite, bei der zuvor ein DSB verursacht wurde. Somit wird eine Entwindung der DNA bei wichtigen Vorgängen in der Zelle wie Replikation, Transkription und Reparatur möglich. Etoposid hemmt Topo-II, indem es einen Komplex stabilisiert, in dem die Topo-II mit dem erzeugten DSB der DNA verbunden vorliegt. Eine Religation des DSB kann nicht mehr erfolgen. Etoposid wird als Mono-Chemotherapeutikum und wegen der strahlensensibilisierenden Wirkung in Kombination mit einer Strahlentherapie erfolgreich in der Tumorthherapie eingesetzt.

Die Versuche der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Homologe Rekombination durch Etoposid gehemmt wird. Das Nichthomologe Endjoining dagegen weist keine signifikante Beeinflussung auf. Diese Erkenntnisse könnten den synergistischen therapeutischen Effekt von Etoposid in Kombination mit Strahlentherapie erklären und somit zu einer Verbesserung der Therapie von Krebserkrankungen beitragen.

7. Literaturverzeichnis

- Adachi N, Iizumi S, So S, Koyama H (2004) Genetic involvement of two distinct nonhomologous end-joining pathways in repair of topoisomerase II-mediated DNA damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 318:856-861
- Adachi N, Suzuki H, Iizumi S, Koyama H (2003) Hypersensitivity of nonhomologous DNA end-joining mutants to VP-16 and ICRF-193. *The Journal of Biological Chemistry* 278:35897-35902
- Akyüs N, Wiesmüller L (2003) Proof of principle: Detection of genotoxicity by a fluorescence-based recombination test in mammalian cells. *ALTEX* 77-84
- Akyüz N, Boehden GS, Süsse S, Rimek A, Preuss U, Scheidtmann KH, Wiesmüller L (2002) DNA substrate dependence of p53-mediated regulation of double-strand break repair. *Molecular and Cellular Biology* 22:6306-6317
- Allen C, Miller CA, Nickoloff JA (2003) The mutagenic potential of a single DNA double-strand break in a mammalian chromosome is not influenced by transcription. *DNA Repair* 2:1147-1156
- AWMF: Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.; www.awmf.org
- Baldwin EL, Osheroff N (2005) Etoposide, topoisomerase II and cancer. *Current Medicinal Chemistry. Anticancer Agents* 5(4):363-372
- Bartelink H, Schellens JHM, Verheij M (2002) The combined use of radiotherapy and chemotherapy in treatment of solid tumours. *European Journal of Cancer* 38:216-222
- Beauchesne PMD, Soler CMD, Boniol MMS, Schmitt TMD (2003) Response to a phase II study of concomitant-to-sequential use of etoposide and radiation therapy in newly diagnosed malignant gliomas. *American Journal of Clinical Oncology* 26(3):22-27
- Begg AC (1990) Cisplatin and radiation: interaction probabilities and therapeutics possibilities. *International Journal of Radiation Oncology, Biology and Physics* 19(5):1183-1189
- Berger JM, Gamblin SJ, Harrison SC, Wang JC (1996) Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature* 379(6562):225-232
- Bhutani M, Pathak AK, Mohan A, Guleria R, Kochupillai V (2006) Small cell lung cancer: an update on therapeutics aspects. *The Indian Journal of Chest Diseases and Allied Sciences* 48(1):49-57

Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, Kyle S, Meuth M, Curtin NJ, Helleday T (2005) Specific killing of BRCA2-deficient tumors with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 434(7035):913-917

Burden DA, Osheroff N (1998) Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta* 1400(1-3):139-154

Capranico G, Binaschi M (1998) DNA sequence selectivity of topoisomerases and topoisomerase poisons. *Biochimica et Biophysica Acta* 1400:185-194

Capranico G, Kohn KW, Pommier Y (1990) Local sequence requirements for DNA cleavage by mammalian topoisomerase II in the presence of doxorubicin. *Nucleic Acid Research* 18(22):6611-6619

Chabner BA, Longo DL, Pinedo HM (1995) DNA Topoisomerase II poisons and inhibitors. *Chemotherapy and biological response modifiers*

Chalfie M (1995) Green fluorescent protein. *Photochemistry and Photobiology* 62(4):651-656

Champoux JJ (2001) DNA topoisomerases: structure, function and mechanism. *Annual Review of Biochemistry* 70:369-413

Chen AY, Liu LF (1994) DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 34:191-218

Chen GL, Yang L, Rowe TC, Halligan BD, Tewey KM, Liu LF (1984) Nonintercalative antitumor drugs interfere with breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. *The Journal of Biological Chemistry* 259:13560-13566

Chung TD, Drake FH, Tan KB, Per SR, Crooke ST, Mirabelli CK (1989) Characterization and immunological identification of cDNA clones encoding two human DNA topoisomerase II isozymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9431-9435

Ciombor KK, Rocha Lima CM (2006) Management of small cell lung cancer. *Current Treatment Options in Oncology* 7(1):59-68

Cody CW, Prasher DC, Westler WM, Prendergast FG, Ward WW (1993) Chemical structure of the hexapeptide chromophore of *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry* 32(5):1212-1218

Cornforth MN (2001) Analyzing radiation-induced complex chromosome rearrangements by combinatorial painting. *Radiation Research* 155:643-659

Cornarotti M, Tinelli S, Willmore E, Zunino F, Fisher LM, Austin CA, Capranico G (1996) Drug sensitivity and sequence specificity of human recombinant DNA topoisomerases II alpha (p170) and II beta (p180). *Molecular Pharmacology* 50(6):1463-1471

- Dikomey E, Dahm-Daphi J, Brammer I, Martensen R, Kaina B (1998) Correlation between radiosensitivity and nonrepaired double-strand breaks studied in nine mammalian cell lines. *International Journal of Radiation Biology* 73(3):269-278
- Dikomey E, Dahm-Daphi J, Kasten U (2002) DNA-Schäden und ihre Reparatur In: *Biologische Strahlenwirkungen*:203-212
- Dixon K, Kopras E (2004) Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology* 14(6):441-448
- Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt ANJ, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NMB, Jackson SP, Smith GCM, Ashworth A (2005) Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a Therapeutic strategy. *Nature* 434: 917-921
- Feng Y-Q, Lorincz MC, Fiering S, Grealley JM, Bouhassira EE (2001) Position effects are influenced by the orientation of a transgene with respect to flanking chromatin. *Molecular and Cellular Biology* 21(1):298-309
- Fortune JM, Osheroff N (2000) Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 64:221-253
- Greco FA(1999) Oral etoposide in lymphoma. *Drugs* 58(3):35-41
- Haddock MG, Ames MM, Bonner JA (1995) Assessing the interaction of irradiation with etoposide or idarubicin. *Mayo Clinic Proceedings* 70(11):1053-1060
- Hande KR (1998) Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *European Journal of Cancer*34(10):1514-1521
- Harvey and Levine (1991) P53 alteration is a common event in spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts. *Gene Development* 5:2375-2385
- Hendrickson EA (1997) Cell-cycle regulation of mammalian DNA double-strand break-repair. *American Journal of Human Genetics* 61:795-800
- Hennequin C, Favaudon V (2002) Biological basics for chemo-radiotherapy interactions. *European Journal of Cancer* 38:223-230
- Hertzberg MS, Crombie C, Benson W, Taper J, Gottlieb D, Bradstock KF (2006) Outpatient fractionated ifosfamide, carboplatin and etoposide as salvage therapy in relapsed and refractory non-Hodgkin's and Hodgkin's lymphoma. *Annals of Oncology: official Journal of the European Society for Medical Oncology/ESMO* 17(4):25-30
- Hsiang YH, Wu HY, Liu LF (1988) Proliferation-dependent regulation of DNA topoisomerase II in cultured human cells. *Cancer Research* 48(11):3230-3235
- Isaacs RJ, Harris AL, Hickson ID (1996) Regulation of the human topoisomerase II alpha gene promoter in confluence-arrested cells. *The Journal of Biological Chemistry* 271(28):16741-16747

- Jackson SP (2002) Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23(5):687-696
- Jenkins JR, Ayton P, Jones T, avies SL, Simmons DL, Harris AL, Sheer D, Hickson ID (1992) Isolation of cDNA clones encoding the beta isozymes of human DNA topoisomerase II and localisation of the gene to chromosome 3p24. *Nucleic Acid Research* 20:5587-5592
- Jin S, Inoue S, Weaver DT (1998) Differential etoposide sensitivity of cells deficient in the Ku and DNA-PKcs components of the DNA-dependent protein kinase. *Carcinogenesis* 19:965-971
- Johnson RD, Jasin M (2001) Double-strand-break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Biochemical Society Transaction* 29(2):196-201
- Juergens RA, Brahmer JR (2006) Adjuvant treatment in non-small cell lung cancer: Where are we now? *Journal of the National Comprehensive Cancer Network:JNCCN* 4(6):595-600
- Kaufmann SH (1998) Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs: more questions than answers. *Biochimica and Biophysica Acta* 1400:195-211
- Khanna KK, Jackson SP (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics* 27: 247-254
- Kondagunta GV, Bacik J, Bajorin D, Dobrzynski D, Sheinfeld J, Motzer RJ, Bosl GJ (2005) Etoposide and cisplatin chemotherapy for metastatic good-risk germ cell tumours. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 23(36):9290-9294
- Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A (2003);. Catalytic topoisomerase II Inhibitors in cancer therapy. *Pharmacology and Therapeutics* 99:167-181
- Lee MP, Sander M, Hsieh T-S (1989) Nuclease protection by Drosophila DNA topoisomerase II. *The Journal of Biological Chemistry* 264(36):21779-21787
- Lee H, Sun D, Larner JM, Wu FS (1999) The tumor suppressor p53 can reduce stable transfection in the presence of irradiation. *Journal of Biomedical Science* 6:285-292
- Li T-K, Liu LF (2001) Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 41:53-77
- Liang F, Jasin M (1995) Studies on the influence of cytosine methylation on DNA recombination and end-joining in mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry* 270:23838-23844
- Liang F, Han M, Romanienko PJ, Jasin M (1998) Homology-directed repairs a major double strand break repair pathway in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Science* 95:5172-5177

- Lin Y, Lukacsovich T, Waldman AS (1999) Multiple pathways of DNA double-strand breaks in mammalian chromosomes. *Molecular and Cellular Biology* 19(12):8353-8360
- Lin Y, Waldman BC, Waldman AS (2003) Suppression of high-fidelity double-strand break repair in mammalian chromosomes by pifithrin- α , a chemical inhibitor of p53. *DNA Repair* 2:1-11
- Liu C-Y, Liao H-F, Wang T-E, Lin S-C, Shi S-C, Chang W-H, Yang Y-C, Lin C-C, Chen Y-J (2005) Etoposide sensitizes CT26 colorectal adenocarcinoma to radiation therapy in BALB/c mice. *World Journal of Gastroenterology* 11(31):4895-4898
- Liu LF, Rowe TC, Yang L, Tewey M, Chen GL (1983) Cleavage of DNA by mammalian DNA Topoisomerase II. *The Journal of Biological Chemistry* 258(24):15365-15370
- Mabed M, Al-Kgodary T (2006) Cyclophosphamide, etoposide and carboplatin plus non-cryopreserved autologous peripheral blood stem cell transplantation rescue for patients with refractory or relapsed non-Hodgkin's lymphomas. *Bone Marrow Transplantation* 37(8):739-743
- Malik M, Nitiss JL (2003) DNA repair functions that control sensitivity to topoisomerase-targeting drugs. *Eukaryotic cell* 3:82-90
- Mazin AV, Alexeev AA, Kowalczykowski SC (2003) A novel function of Rad54 Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 278(16):14029-14036
- Minehan KJ, Bonner JA (1993) The interaction of etoposide with radiation: variation in cytotoxicity with the sequence of treatment. *Life Science* 53(15):237-242
- Moynahan ME, Chiu JW, Koller BH, Jasin M (2001) BRCA1 controls homology-directed DNA repair. *Molecular Cell* 7:263-272
- Nitiss JL (1998) Investigating the biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1400(1-3):63-81
- Okorokov AL, Warnock L, Milner J (2002) Effect of wild-type, S15D and R175H proteins on DNA end joining in vitro: potential mechanism of DNA double-strand break repair modulation. *Carcinogenesis* 23:549-557
- Osheroff N, Zechiedrich EL, Gale KC (1991) Catalytic function of DNA topoisomerase II. *Bioessays* 13(6):269-273
- Osheroff N (2003) DNA topology, topoisomerases and chemotherapy. *Allied Health Biochemistry* 501:1ff
- Pfeiffer P, Goedecke W, Obe G (2000) Mechanism of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* 15(4):289-302
- Phillips JE, Thyagarajan B, Calos MP (1999) Epstein-Barr virus plasmid model system for analyzing recombination in human cells. *Plasmid* 41:198-206

- Pierce AJ, Johnson RD, Thompson LH, Jasin M (1999) XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes & Development* 13:2633-2638
- Pommier Y, Capranico G, Orr A, Kohn KW (1991) Local base sequence preferences for DNA cleavage by mammalian topoisomerase II in the presence of amsacrine or teniposide. *Nucleic Acid Research* 19(21):5973-5980
- Powell SN, McMillan TJ (1994) The repair fidelity of restriction enzyme-induced double strand breaks in plasmid DNA correlates with radioresistance in human tumor cell lines. *I.J. Radiation Oncology* 29:1035-1040
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ (1992) Primary structure of *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111(2):229-233
- Roca J (2004) The path of the DNA along the dimer interface of topoisomerase II. *The Journal of Biological Chemistry* 279(11):25783-25788
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of Biological Chemistry* 273(10):5858-5868
- Rothkamm K, Kruger I, Thompson LH, Lobrich M (2003) Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Molecular and Cellular Biology* 23(16):5706-5715
- Rosti G, Carminati O, Monti M, Tamberi S, Marangolo M (2006) Chemotherapy advances in small cell lung cancer. *Annals of Oncology: official Journal of the European Society for Medical Oncology/ESMO* 17(5):99-102
- Rouet P, Smih F, Jasin M (1994) Expression of a site specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Biochemistry* 91:6064-6068
- Saburin M, Nitiss JL, Nitiss KC, Tatebayashi K, Ikeda H, Osheroff N (2003) Yeast recombination pathways triggered by topoisomerase II-mediated DNA breaks. *Nucleic Acid Research* 31:4373-4384
- Saleh-Gohari N, Helleday T (2004) Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S-phase of the cell cycle in human cells. *Nucleic Acids Research* 36:3683-3688
- Sander M, Hsieh TS (1985) *Drosophila* topoisomerase II double-strand DNA cleavage: analysis of DNA sequence homology at the cleavage site. *Nucleic Acid Research* 13(4):1057-1072
- Sargent RG, Brennemann MA, Wilson JH (1997) Repair of site-specific double-strand breaks in mammalian chromosome by homologous and illegitimate recombination. *Molecular and Cellular Biology* 17(1):267-277
- Savage JRK, Simpson PJ (1994) FISH painting patterns resulting from complex exchanges. *Mutation Research* 312:51-60

- Saxman S (1999) Oral etoposide in germ cell tumours. *Drugs* 58(3):31-34
- Schmidt-Petersen F (2003) Verwendung des Grün-Fluoreszenz-Protein Gens zur Messung von homologer und nicht homologer Rekombination in chromosomal integrierten Pasmiden. Med. Doktorarbeit Hamburg
- Shigematsu N, Kawata T, Ihara N, Kawaguchi O, Kutsuki S, Ishibashi R, Kubo A, Ito H (2001) Effect of combined treatment with radiation and low dose etoposide on cell survival. *Anticancer Research* 21(1A):325-328
- Statistisches Bundesamt Deutschland 2006. Todesursachen in Deutschland 2003. www.destatis.de
- Sugawara N, Wang X, Haber JE (2003) In vivo roles of Rad52, Rad54 and Rad55 proteins in Rad51-mediated recombination. *Molecular Cell* 12(1):209-219
- Symington L. Focus on recombination DNA repair (2005) *European Molecular Biology Organization Reports* 6(6):512-517
- Tang (1999) P53 directly enhances rejoining of DNA double-strand breaks with cohesive ends in γ -irradiated mouse fibroblasts. *Cancer Research* 59:2562-2565
- Tannock IF (1996) Treatment of cancer with radiation and drugs. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 14(12):3156-3174
- Thacker (1992) A mechanism for deletion formation in DNA by human cell extracts: the involvement of short sequence repeats. *Nucleic Acid Research* 20:6183-6188
- Tolner B, Hartley JA, Hochhauser D (2001) Transcriptional regulation of topoisomerase II alpha at confluence and pharmacological modulation of expression by bis-benzimidazole drugs. *Molecular Pharmacology* 59(4):699-706
- Tucker RD, Ferguson A, Van WC, Sealy R, Hewitson R, Levin W (1978) Chemotherapy of small cell carcinoma of the lung with VP. *Cancer* 41:1710-1714
- Vincent T, DeVita JR, Hellmann S, Rosenberg SA (2000) Pharmacology of Cancer Chemotherapy. In: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Lippincott Williams and Wilkins, Bd 6
- Vogt PK (1992) Cancer genes. *Western Journal of Medicine* 158: 273-278
- Wang JC (1985) DNA topoisomerases. *Annual Review of Biochemistry*. 54:665-697
- Wang JC (2002) Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature* 3:430-441
- Willers H, McCarthy E, Alberti W, Dahm-Daphi J, Powell SN (2000). Loss of wild-type p53 function is responsible for up-regulated homologous recombination rates in

immortalized rodent fibroblasts. *International Journal of Radiation Biology* 76:1055-1062

Willers H, McCarthy E, Hubbe P, Dahm-Daphi J, Powell SN (2001) Homologous recombination in extrachromosomal plasmid substrates is not suppressed by p53. *Carcinogenesis*

Willers H, Dahm-Daphi J, Powell SN (2004) Repair of radiation damage to DNA. *British Journal of Cancer* 90:1297-1301

Wilson GD, Bentzen SM, Harari PM (2006) Biologic basis for combining drugs with radiation. *Seminars in Radiation Oncology* 16(1):2-9

Woessner RD, Mattern MR, Mirabelli CK, Johnson RK, Drake FH (1991) Proliferation- and cell cycle-dependent differences in expression of the 170kDa and 180kDa forms of topoisomerase II in NIH-3T3 cells. *Cell Growth and Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research* 2(4):209-214

8. Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Als erstes denke ich dabei an meinen Doktorvater PD Dr. Jochen Dahm-Daphi, der mir die Chance gegeben und das Vertrauen in mich gesetzt hat, eine solche Arbeit anzufangen und – viel wichtiger – auch zu beenden. Danke für die ausgezeichnete Betreuung.

Lena Schliecker hat mich mit viel Geduld in die Laborarbeiten eingearbeitet und war auch während der gesamten Zeit immer eine große Hilfe für mich. Mein Dank dafür an Lena, aber auch an Fruszina Gatzemeier und Rafaat El-Awady, die sich bei Fragen immer sofort Zeit nahmen.

Herrn Prof. Dr. W. Alberti und Herrn Prof. Dr. E. Dikomey danke ich dafür, dass ich diese Doktorarbeit im Labor für Strahlenbiologie und experimentelle Radioonkologie durchführen konnte.

Besonderer Dank gilt meiner langjährigen Freundin und „Laborplatzkollegin“ Anika Seniuk. Mit ihr konnte ich Freud und Leid teilen und durch ihren Fleiß und ihre Disziplin als Vorbild wurde ich immer wieder angespornt weiterzumachen.

Danken möchte ich aber vor allem meinen Eltern und der gesamten Familie, die mich während der langen Zeit sehr viel unterstützt haben. Sie haben mir den Rückhalt gegeben, den man für das Gelingen einer solchen Arbeit braucht.

9. Lebenslauf

10. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel 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: Rahel Steiner