

Aus dem
Labor für Strahlenbiologie und experimentelle Radioonkologie
Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Ekkehard Dikomey
der
Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
Leitung: Privat Dozent Dr. Andreas Krüll
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Die Rolle von XRCC2 in der Homologen Rekombination und Zellzyklusregulation

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von
Maren Elisabeth Jantke
geboren am 30.08.1982 in Hamburg

Hamburg, 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 28.05.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

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

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

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. K. Pantel

Inhaltsverzeichnis

1. Ziel der Dissertation	5
2. Einleitung	6
3. Materialien und Methoden.....	18
3.1. Zelllinien und Zellkultur	18
3.2. Wachstumskurven.....	19
3.3. Topotecan.....	19
3.4. Kolonietest	19
3.5. Zellzyklusmessung.....	20
3.6. BrdU-Einbau	22
3.7. γ H2AX- Foci.....	23
3.8. Western Blot	24
3.8.1. Proteinextraktion und -quantifizierung	24
3.8.2. Proteinauftrennung durch Gelelektrophorese.....	25
3.8.3. Blot.....	26
3.8.4. Detektion	26
4. Resultate	28
4.1. Zellwachstum.....	28
4.2. Sensitivität gegenüber Topotecan	29
4.2.1. Überlebensfraktion unbehandelter Zellen	29
4.2.2. Sensitivität gegenüber Topotecan	29
4.3. Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	31
4.4. Zellzykluseffekte der Topotecaninkubation	34
4.4.1. Kinetik der Zellzyklusprogression	34
4.4.2. Einfluss der Topotecankonzentrationen auf den Zellzyklus	35
4.5. Einfluss von Topotecan auf die Replikationsaktivität	38
4.6. Aktivierung von Zellzykluscheckpoints	41
5. Diskussion	43

Inhaltsverzeichnis

5.1. XRCC2-defiziente Zellen zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Topotecan	43
5.2. XRCC2 ist an der Reparatur topotecaninduzierter Doppelstranbrüche beteiligt. 43	
5.3. XRCC2 beeinflusst die Replikationsaktivität topotecangeschädigter Zellen	45
5.5. Es existieren XRCC2-abhängige Checkpoints	47
5.6. Krebstherapie und DNA-Reparatur	47
6. Zusammenfassung	49
7. Literaturverzeichnis	51
8. Danksagung	58
9. Eidesstattliche Versicherung	59

1. Ziel der Dissertation

In dieser Dissertation soll die Rolle des Reparaturgens XRCC2 für die Homologe Rekombination und für die Zellzyklusregulation untersucht werden. Insbesondere soll die gegenseitige Beeinflussung von Reparatur und Zellzykluscheckpoints nach DNA-Schädigung durch das Chemotherapeutikum Topotecan studiert werden.

Es sind SNP's (Single Nucleotide Polymorphisms) im XRCC2-Gen bekannt, die das individuelle Krebsrisiko einer Person steigern. Gleichzeitig geht der Verlust von XRCC2 mit großer Sensitivität gegenüber verschiedenen DNA-schädigenden Substanzen wie ionisierender Strahlung und Mitomycin C einher. Es ist deshalb sowohl von grundsätzlicher wie von klinischer Bedeutung zu klären, ob diese Sensitivität allein durch den Reparaturdefekt oder auch durch die Veränderungen im Zellzyklus bedingt ist.

Die Idee, die hinter dieser Arbeit steht, ist, mit Hilfe des Topotecans in XRCC2-defizienten und normalen Zelllinien Doppelstrangbrüche zu erzeugen. Nach der Inkubation mit Topotecan erhalten die Zellen Zeit zur Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche. Nach unterschiedlich langen Reparaturzeiten sollen die Doppelstrangbrüche mit Hilfe von γ H2AX-Foci visualisiert und deren Anzahl pro Zellkern ermittelt werden. Auf diese Weise ist es möglich, die Fähigkeit DNA-Doppelstrangbrüche zu reparieren zwischen der XRCC2-defizienten und der intakten Zelllinie direkt zu vergleichen. Dadurch kann man Rückschlüsse auf die Bedeutung von XRCC2 für die Homologe Rekombination schließen.

Um den Mechanismus der Homologen Rekombination und die Funktion der daran beteiligten Proteine zu verstehen, ist es notwendig, den Zellzyklus und seine Regulationsmechanismen mit einzubeziehen. Ob ein von XRCC2 abhängiger „cross-talk“ zwischen Homologer Rekombination und Zellzyklusregulation besteht, soll mit Hilfe von Zellzyklusuntersuchungen mittels Durchflusszytometrie, BrdU-Einbau sowie Western Blots untersucht werden.

2. Einleitung

Die wesentliche Voraussetzung für das Überleben von Zellen, Geweben und Organismen ist, dass sie die Integrität ihrer DNA erhalten können und sie damit unverändert an die Tochterzellen weitergeben können. In jeder Zelle werden durch verschiedene Einflüsse jedoch ununterbrochen DNA-Schäden verursacht, die diese Integrität gefährden. Denn DNA-Schäden können zu Mutationen führen, die das Absterben einer Zelle oder deren Entartung bewirken können. Um dieser Gefahr zu begegnen verfügen Zellen über verschiedenste Mechanismen zur Erhaltung ihrer genetischen Stabilität.

DNA-Schäden werden durch äußere Einflüsse wie UV-Licht, ionisierende Strahlung und mutagene Substanzen wie zum Beispiel Chemotherapeutika verursacht. Sie können aber auch spontan oder während der Replikation entstehen (Haber 1999, Kowalczykowski 2000). In seltenen Fällen treten DNA-Schäden physiologischerweise auf. Dies ist zum Beispiel während des Crossing-Over zu Steigerung der genetischen Variabilität in der Meiose (Sun et al. 1989) und während der V(D)J-Rekombination (Roth und Craig 1998) der Fall. Pro Tag entstehen in jeder lebenden Zelle bis zu 20.000 DNA-Schäden (Pfeiffer et al. 2000). Dennoch kommt es in gesunden Säugetierzellen spontan nur zu etwa einem Nucleotid-Austausch pro 10^9 Basenpaaren pro Zellgeneration (Janning und Knust 2004). Stellt man diese Zahlen einander gegenüber, so wird klar, dass Zellen über sehr effektive Reparaturmechanismen verfügen müssen.

Abhängig vom Typ des DNA-Schadens (Basenschaden, Zuckerschaden, Strangvernetzung etc.) existieren verschiedene spezifische Reparaturmechanismen. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche untersucht.

DNA-Doppelstrangbrüche machen weniger als 1% aller DNA-Schäden aus. Dennoch kommt ihnen eine besondere Bedeutung zu. Durch einen Doppelstrangbruch kann es zum Verlust von genetischer Information kommen, da beide Stränge beschädigt sind und so kein komplementärer Strang zur Reparatur zur Verfügung steht. Dies wiederum kann Chromosomenaberrationen, Zelltod oder maligne Entartung bewirken. Umso wichtiger ist es, dass effektive Reparaturmechanismen zur Beseitigung der DNA-Doppelstrangbrüche existieren.

Einleitung

Eukaryotischen Zellen stehen verschiedene Mechanismen zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen zur Verfügung. Dabei verfügen Zellen über homologe und nicht-homologe Verfahren (Pfeiffer et al. 2000).

Der größte Teil an Doppelstrangbrüchen, die in einer Zellen anfallen wird durch das Nicht-homologe Endjoining (NHEJ) repariert. Dafür sind keine homologen DNA-Sequenzen notwendig. Es werden lediglich die freien Enden eines Doppelstrangbruches ligiert. Im Zuge dieses Prozesses können kleinere oder größere Deletionen und Insertionen auftreten, was diesen Reparaturmechanismus ungenau macht. Da das Genom aber zu über 90% aus Sequenzen besteht, die nicht für Proteine kodieren, sind kleine Veränderungen meistens zu tolerieren. Oder es können Gene betroffen sein, die für das Überleben der Zelle nicht essentiell sind (Pfeiffer et al. 2000, Pfeiffer 1998).

In der vorliegenden Arbeit wird ausschließlich die Doppelstrangbruchreparatur über die Homologe Rekombination (HR) untersucht. Man kann konservative und nicht-konservative Unterformen der Homologen Rekombination unterscheiden. Die konservativen Formen können sicherstellen, dass die geschädigte DNA-Sequenz vollständig und präzise wieder hergestellt wird (Pfeiffer et al. 2000).

Die nicht-konservative Homologe Rekombination wird auch als „single-strand annealing“ (SSA) bezeichnet. Diese Form der homologen Rekombination kommt zum Einsatz, wenn ein Doppelstrangbruch zwischen zwei repetitiven Sequenzen (Repeats) liegt. Die freien 5'-Enden des Doppelstrangbruchs werden abgebaut, so dass lange freie 3'-einzelsträngige Überhänge entstehen. Im nächsten Schritt lagern sich die homologen Sequenzen beider Repeats aneinander an. Die nicht-homologen Abschnitte werden endonukleolytisch entfernt und entstandene Lücken durch DNA-Synthese aufgefüllt. Bei dem SSA geht sowohl eine der repetitiven Sequenzen sowie der gesamte DNA-Abschnitt zwischen zwei Repeats verloren. Sie führt also regelhaft zu ausgedehnten Deletionen und wird möglicherweise von Säugern nur selten benutzt (Lin et al. 1984), (Abb. 2.1).

Einleitung

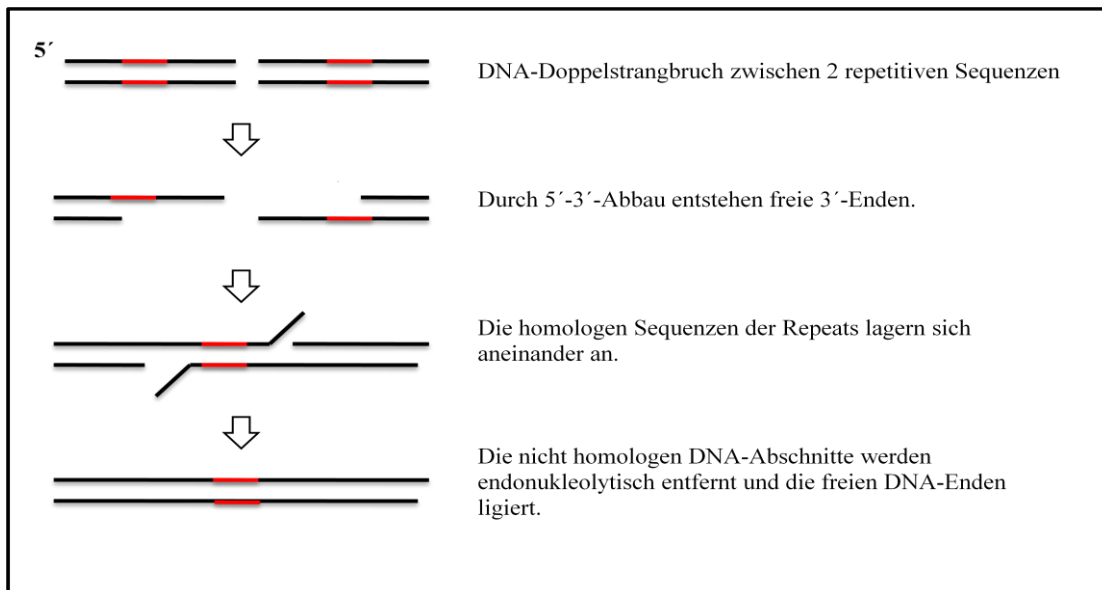


Abb. 2.1: SSA-Modell nach Lin et al. (1984)

Für die konservative Homologe Rekombination wird eine zweite DNA-Sequenz benötigt, die in der Basenabfolge vollständig dem DNA-Abschnitt um den Doppelstrangbruch herum entspricht (homolog). In der Regel sind diese homologen Abschnitte 400 Basenpaare und länger. Derartige Homologien finden sich nach abgelaufener Replikation auf dem Schwesterchromatid (Johnson und Jasin 2000), oder auf dem homologen Chromosom (dem zweiten Allel). Es gibt drei Modelle, die den Ablauf der konservativen Homologen Rekombination beschreiben. Die Homologe Rekombination über Genkonversion nach Szostak, das „synthesis-dependent strand annealing“ (SDSA) und die „break-induced replication“ (BIR) (Pfeiffer et al. 2000).

Bei der Homologen Rekombination durch Genkonversion (bei der Erstbeschreibung durch Szostak et al. 1983 auch DSBR-Modell genannt, Abb. 2.2) werden im ersten Schritt zunächst die freien Enden des Doppelstrangbruches bearbeitet. Dabei wird jeweils ein Strang von 5' nach 3' abgebaut, so dass freie 3'-Enden entstehen. Der homologe Donorstrang wird entwunden. Durch diese Auftrennung der komplementären Einzelstränge entsteht ein sogenannter „D-Loop“. Die Stränge mit freiem 3'-Ende werden dann in diesen D-Loop herangeführt und den homologen Sequenzen angelagert. Die fehlenden Basen werden komplementär zum Donorstrang neu synthetisiert und ligiert. Durch das Aneinanderlagern von den insgesamt 4 Einzelsträngen entsteht eine sogenannte Heteroduplex, die von den kreuzenden DNA-Einzelsträngen begrenzt ist. Die kreuzenden DNA-Einzelstränge werden als „Holliday Junctions“ bezeichnet. Damit

Einleitung

sich die beiden DNA-Doppelstränge nach der Neusynthese der fehlenden Nukleotide wieder voneinander trennen könne, müssen die Holliday Junctions mit Hilfe einer Endonuklease aufgelöst werden. Je nachdem zwischen welchen freien DNA-Enden nach der Auflösung der Holliday Junctions die Religation statt findet, kann es zu einem „Crossing-Over“ kommen. In der Entwicklungsgenetik ist das „Crossing-Over“, das ebenfalls in der Meiose statt-findet, für die Pluralität des Erbgutes sehr wichtig, während es für eine effektive Doppelstrangbruch-Reparatur kaum von Bedeutung ist.

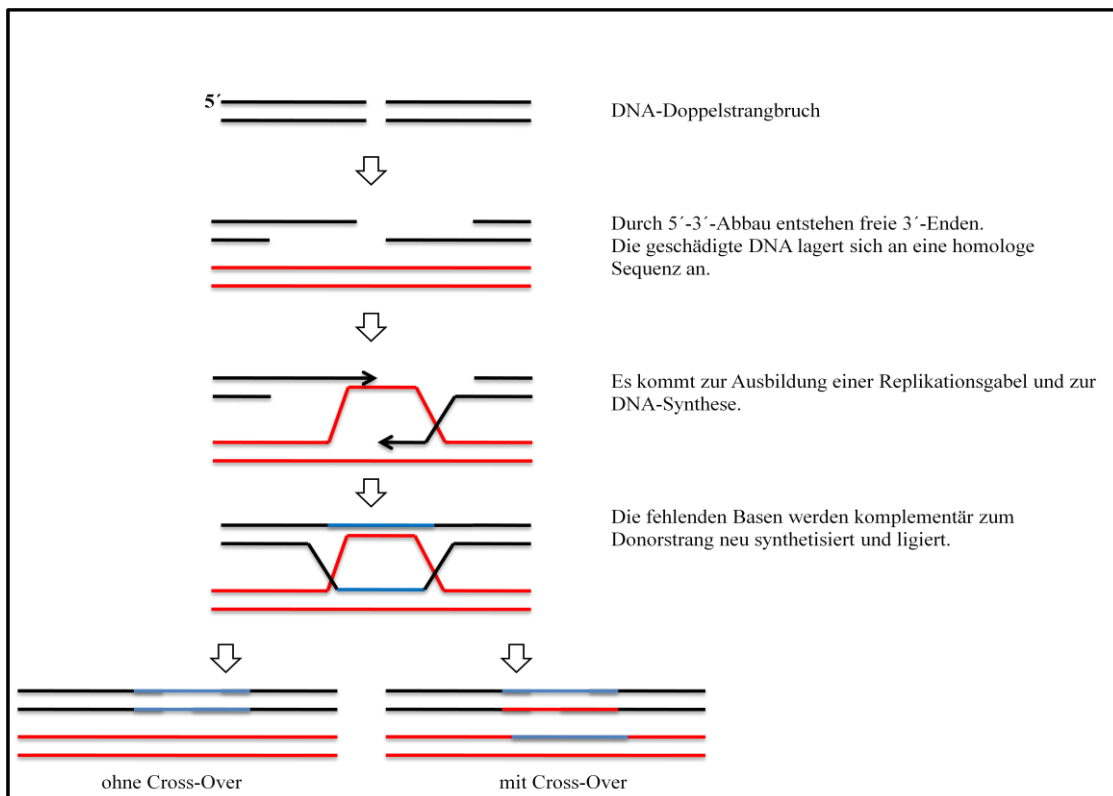


Abb. 2.2: DSB-Reparaturmodell nach Szostak et al. (1983)

Auch bei dem SDSA-Modell (Abb. 2.3) erfolgt zunächst die Stranginvasion der freien 3'-Enden und die Anlagerung an die homologe Sequenz des Donorstranges. Die anschließende Reparatursynthese erfolgt allerdings nur soweit, bis die Neusynthese an den freien 3'-Enden zu einer Überbrückung der Lücke geführt hat, die nun durch erneute Strangpaarung wieder geschlossen werden kann. Als entscheidender Unterschied zum zuvor beschriebenen Szostak-Modell kommt es in diesem Fall zur Auflösung der Heteroduplices ohne dass diese eingeschnitten werden. Die neusynthetisierten Enden lösen sich vom Donorstrang ab, paaren erneut miteinander und hinterlassen den Donorstrang völlig unverändert. Die noch bestehende Lücke kann

Einleitung

dann mit dem komplementären DNA-Strang als Matrize geschlossen und die Bruchenden durch die DNA-Ligase miteinander verknüpft werden (Pâques und Haber 1999).

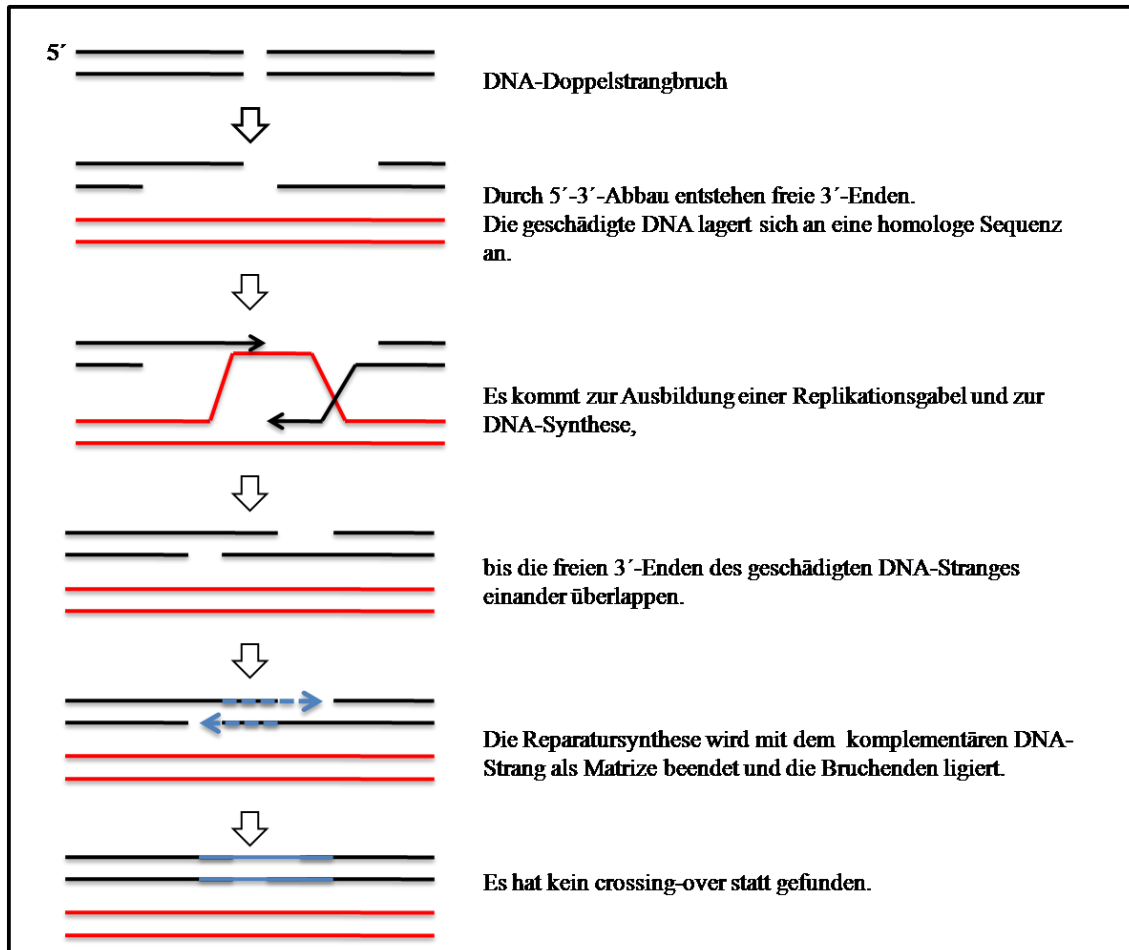


Abb. 2.3: SDSA-Modell nach Pâques und Haber (1999)

Die break-induced Replikation (BIR) ist dem SDSA verwandt. Hier paart sich jedoch nur ein Bruchende mit dem Donorstrang. Das andere Ende kann vollständig durch Exonukleasen abgedaut werden, so dass sich die DNA-Synthese bis zum Ende des Chromosoms erstrecken kann (long patch). Dieser Mechanismus kommt in Hefezellen bei dem Erhalt von Telomeren sowie bei der Reparatur von gebrochenen Replikationsgabeln zum Einsatz (Kraus et al. 2001, Pâques und Haber 1999), (Abb. 2.4).

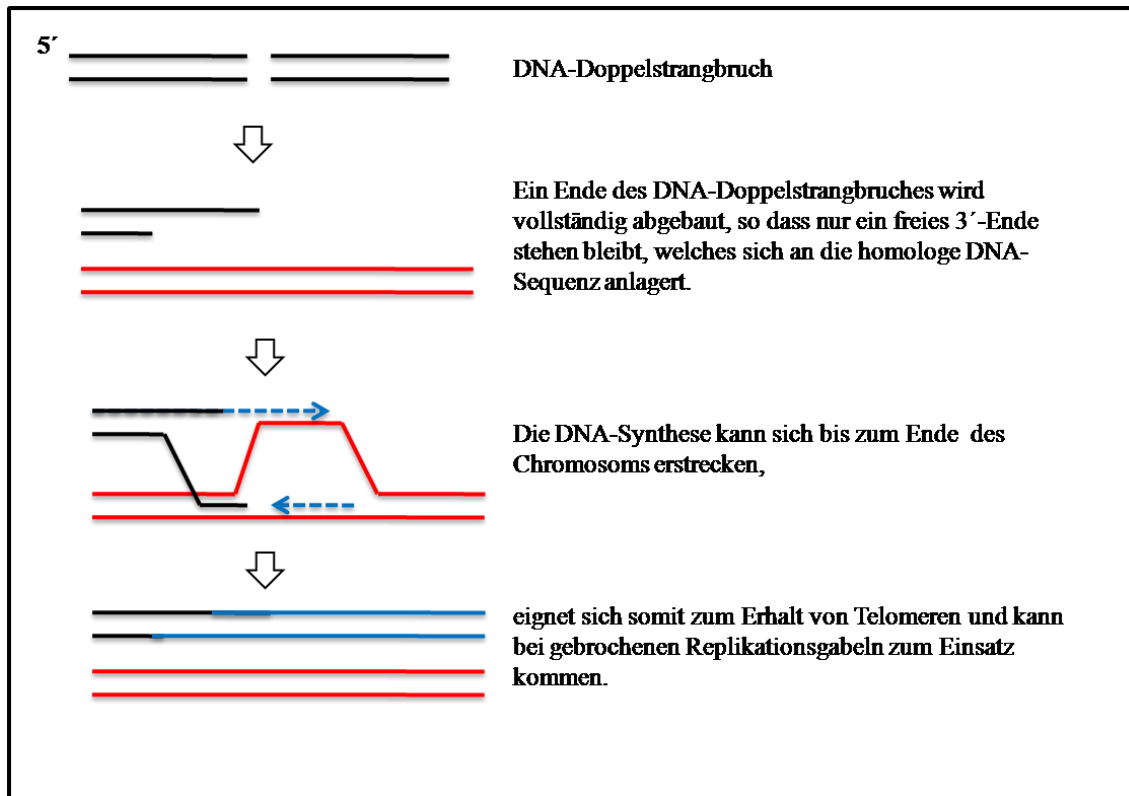


Abb. 2.4: BIR-Modell nach Pâques und Haber (1999) und Kraus et al. (2001)

An der homologen Rekombination sind zahlreiche Proteine beteiligt. In erster Linie gehören sie der RAD52-Familie an (Symington 2002).

Der Abbau der freien Enden des Doppelstrangbruchs von 5' nach 3' wird durch den Mre11/Rad50/Nbs1-Komplex vermittelt. Der genaue Ablauf ist jedoch noch unklar, denn Mre11 besitzt in vitro lediglich eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität die somit gegenläufig arbeitet (Paull und Gellert 1998, Trujillo et al. 1998). An die freien 3'-Enden des Doppelstrangbruchs bindet dann zunächst schützend das Protein RAD52. Es ist an der Rekrutierung von RPA (Replication Protein A) und RAD51 an den Doppelstrangbruch beteiligt. RAD51 ist in der Lage an der DNA zu polymerisieren und Nukleoproteinfilamente auszubilden. Die Bildung der RAD51-Nukleoproteinfilamente mit Verdrängung von RPA aus der ss-DNA-Bindung ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Homologen Rekombination und ermöglicht unter ATP-Verbrauch die folgende Stranginvasion und homologe Paarung (Benson et al. 1994, Ogawa et al. 1993, Sung und Roberson 1995, Baumann und West, 1998). Durch die Stranginvasion in den intakten Donorstrang überkreuzen sich die DNA-Stränge zu Holliday Junctions. Anschließend erfolgte die Paarung der komplementären Basen zwischen gebrochenem und Donorstrang. An den freien 3'-Enden des

Einleitung

gebrochenen Doppelstranges können dann DNA-Polymerasen mit der DNA-Synthese beginnen und die fehlende DNA-Sequenz synthetisieren. Dabei wandern die Überkreuzungsstellen der beiden DNA-Moleküle mit der Replikationsgabel mit (branch migration). Die Trennung der DNA-Stränge ist abhängig vom jeweiligen Modell (s.o.).

RAD51 ist ein hochkonserviertes Protein, das von Hefen bis zum Menschen in allen Zellen vor kommt. Das bakterielle RecA und das in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* vorkommende Rad51p weisen zu 59% eine nahezu identische Aminosäuresequenz auf. Zwischen Rad51p und dem humanen RAD51 sind es sogar 83% (Baumann und West 1998, Shinohara et al. 1993). Mutationen in RecA und RAD51 verursachen Defekte in der Fähigkeit einer Zelle zur Rekombination und eine extrem hohe Sensitivität gegenüber zahlreichen DNA-schädigenden Substanzen.

In höheren Organismen existieren fünf dem RAD51 in der Aminosäuresequenz sehr ähnliche Proteine: XRCC2, XRCC3, RAD51B, RAD51C, RAD51D, die sogenannten RAD51-Paraloge (Albala et al. 1997, Cartwright et al. 1998, Dosanjh et al. 1998, Liu et al. 1998, Pittman et al. 1998, Tambini et al. 1997, Tebbs et al. 1995). In humanen Zellen haben die 5 Paraloge zu 20 bis 30% eine identische Aminosäuresequenz mit humanem RAD51. Untereinander gleicht sich ihre Aminosäuresequenz zu etwa 30% (Thacker 1999).

In dieser Arbeit soll die Funktion des RAD51-paralogen Proteins XRCC2 (X-Ray cross-complementing) untersucht werden. Seinen Namen trägt das Protein auf Grund seiner Fähigkeit, die Sensitivität von *irs1*-Hamsterzellen gegenüber ionisierender Strahlung zu komplementieren (Tambini et al. 1997, Cartwright et al. 1998, Liu et al. 1998). *Irs1*-Zellen zeigen nicht nur eine erhöhte Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Substanzen sondern auch eine gesteigerte spontane genetische Instabilität mit einer erhöhten Mutationsrate (Thacker et al. 1994), Chromosomenaberrationen (Tucker et al. 1991) und chromosomaler Non-Disjunction (Griffin et al. 2000). Komplementiert man die *irs1*-Zelle mit dem XRCC2-Gen, so verringert sich die Sensitivität der Zelllinie gegenüber DNA-schädigenden Substanzen. Sie entspricht dann annähernd der Sensitivität von der parentalen V79-Zelllinie. Auf Grund dieser Beobachtung und der Tatsache, dass das XRCC2-Protein im Nukleus lokalisiert ist (O'Regan et al., 2001), steht fest, dass es in erster Linie DNA-protective Funktionen in der Zelle wahr nimmt.

Einleitung

Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von XRCC2 für die Bildung von RAD51-Foci nach Bestrahlung notwendig ist (O'Regan et al., 2001). Die Basis für die Bildung von RAD51-Foci ist die Bildung von Nukleoproteinfilamenten aus RAD51-Polymeren, die sich an einen DNA-Doppelstrangbruch anlagern. Ein Rad51-Focus repräsentiert also einen Doppelstrangbruch, der durch Homologe Rekombination repariert wird (Haaf et al. 1995, Raderschall et al. 1999). XRCC2 spielt eine entscheidende Rolle für die Bildung der Rad51-Nukleoproteinfilamente und ist somit in die Homologe Rekombination involviert.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass das zu RAD51 paraloge Protein XRCC3 essentiell für die Reparatur Camptothecin-induzierter Doppelstrangbrüche an blockierten Replikationsgabeln ist (Arnaudeau et al. 2001). In dieser Arbeit wurden Doppelstrangbrüche mit Hilfe des Camptothecin-Derivates Topotecan induziert und untersucht, ob XRCC2 an der Reparatur dieser Doppelstrangbrüche beteiligt ist.

Topotecan wirkt als Inhibitor der Topoisomerase I. Bei Topoisomerasen handelt es sich um nukleäre Enzyme, die die räumliche suprahelikale Struktur der DNA kontrollieren. Dies ist für die zellulären Prozesse der Replikation und der Transkription wichtig, bei denen es zu Torsionsstress in der Doppelhelix kommt. Dabei induziert die Topoisomerase I einen Einzelstrangbruch, der dann eine Rotation des DNA-Stranges um die eigene Achse erlaubt und zur Relaxation der DNA führt. Die Topoisomerase I ist in der Lage, diesen Einzelstrangbruch auch wieder zu verschließen. Die Topoisomerase I verfügt also sowohl über Nuclease- als auch Ligaseaktivität. Sie arbeitet im Gegensatz zu der Topoisomerase II unabhängig von ATP.

Bindet Topotecan nun kovalent den Komplex aus Topoisomerase I und DNA („cleavable complex“), wird dadurch der Wiederverschluss des DNA-Einzelstrangbruchs verhindert. Trifft die fortschreitende Replikationsgabel auf das 5'-Ende dieses cleavable complex, wird der Einzelstrangbruch in einen ein-endigen DNA-Doppelstrangbruch (DSB) umgewandelt (Strumberg et al. 2000). Dieser kann, sofern er von der Zelle nicht repariert wird, zum Zelltod führen. Aufgrund dieses Mechanismus ist die Wirkung von Topotecan überwiegend auf Zellen in der S-Phase beschränkt (Pommier, 2006). Diese topotecaninduzierten Doppelstrangbrüche werden durch Homologe Rekombination repariert. Daher erweist sich Topotecan als besonders geeignet um diesen Mechanismus isoliert zu untersuchen (Abb. 2.5).

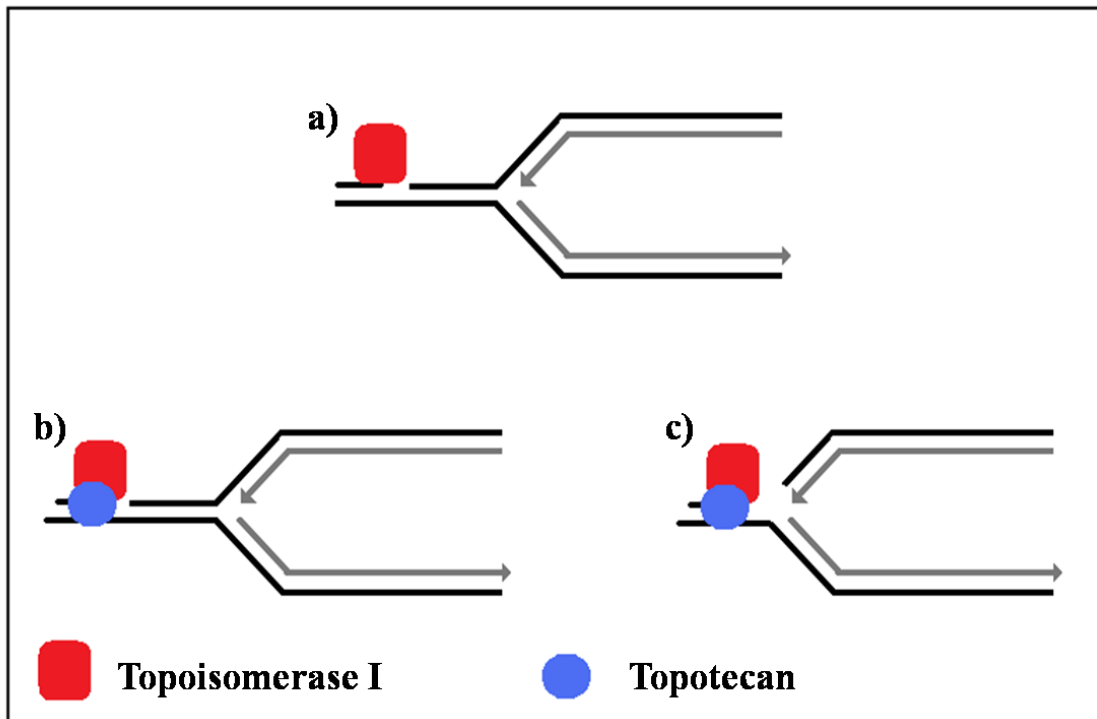


Abb. 2.5: a) Während der Replikation setzt die Topoisomerase I Einzelstrangbrüche, um entstehenden Scherungsstress abzubauen. b) Topotecan bildet zusammen mit der Topoisomerase I und dem Einzelstrangbruch einen stabilen Komplex, so dass dieser nicht wieder verschlossen werden kann. c) Trifft nun die Replikationsgabel auf den fixierten Einzelstrangbruch, so entsteht ein ein-endiger Doppelstrangbruch.

Zur Beurteilung von DNA-Doppelstrangbrüchen wurde das Histon H2AX mittels fluoreszierender Antikörper als sogenannter Focus visualisiert und damit quantifizierbar gemacht. Im umgebenden Chromatin des Doppelstrangbruchs wird innerhalb von Sekunden das Histon H2AX zu γ H2AX phosphoryliert, das dann mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers sichtbar gemacht werden kann. Damit ist es ein hochsensitiver Marker für DNA-Doppelstrangbrüche (Rogakou et al. 2000). Da γ H2AX-Foci unabhängig von der Homologen Rekombination noch vor Einsetzen des Reparaturprozesses an den Doppelstrangbrüchen entstehen, sind sie eine zuverlässige Methode zur Darstellung von Doppelstrangbrüchen unabhängig von Defekten im nachfolgenden Reparaturprozess.

Um sicherzustellen, dass eine korrekte Kopie des Genoms an die Tochterzelle weitergegeben wird, existieren eine Reihe von Mechanismen, die den Zellzyklus überwachen: die Zellzykluscheckpoints (Iliakis et al. 2003). Sie sind in der Lage, geschädigte DNA zu entdecken und aktiv eine Zellzyklusverzögerung oder einen

Einleitung

vollständigen Arrest des Zellzyklus auszulösen. Dies gibt geschädigten Zellen genügend Zeit, DNA-Reparaturmechanismen zu aktivieren, um Schäden des Genoms zu korrigieren, bevor diese an die Tochterzelle weitergegeben werden (Abraham, 2001). Eine effektive Homologe Rekombination ist von zuverlässig funktionierenden Zellzykluscheckpoints abhängig.

Ein Zellzyklusarrest kann in Form von G1- S- und G2-Phase-Blocks in allen Zellzyklusphasen auftreten. Es existieren verschiedene Typen von S-Phase-Checkpoints, abhängig von dem vorliegenden DNA-Schaden (Bartek et al. 2004). Trifft während der S-Phase eine Replikationsgabel auf einen DNA-Schaden, wird diese dadurch blockiert oder verlangsamt. Bei den Schäden kann es sich um einen Doppelstrangbruch handeln. Viel häufiger liegt allerdings ein Einzelstrangbruch vor (wie hier durch Topotecan). Die Replikation kann auf dem zweiten Strang kurzstreckig weiterlaufen. Dadurch entsteht ein verlängerter Abschnitt (400-300 Nts) einzelsträngiger DNA. Dieser einzelsträngige DNA-Bereich ist ein geeignetes Signal zur Checkpointaktivierung in der S-Phase. Das Signal wird durch spezifische Proteine erkannt (Sensors), die es über Transduktionsproteine (Transducers) fortleiten, was schließlich die Aktivierung von ausführenden Protein (Effectors) bewirkt. Diese Effektorproteine hemmen den Zellzyklusablauf und leiten die Reparatur des DNA-Schadens ein (Iliakis et al. 2003).

Ein wichtiges Protein zur Erkennung von langen einzelsträngigen DNA-Abschnitten und sonstigen DNA-Schäden an Replikationsgabeln in der S-Phase ist die Proteinkinase ATR (ATM- RAD3-like kinase). Sie phosphoryliert H2AX und leitet als Sensorprotein die Aktivierung des S-Phase-Checkpoints und die Doppelstrangbruchreparatur zum Beispiel durch die Induktion von Nbs1 (Zhao et al. 2000) ein. Auch die Kinase ATM (Ataxia Teleangiectasia Mutated) kann den S-Phase-Checkpoint aktivieren. Allerdings wird sie eher von DNA-Schäden aktiviert, die zunächst unabhängig von den Replikationsgabeln entstehen. Das zentrale Regulatorprotein des S- und G2-Phase-Checkpoints ist Chk1 (Checkpoint Kinase 1) (Abraham 2001, Bartek und Lukas 2003, Liu et al. 2000, Takai et al. 2000). Es wird durch die Proteinkinase ATR zu Phospho-Chk1 phosphoryliert und damit aktiviert (Liu et al. 2000, Zhao et al. 2001). Die Induktion von Chk1 bewirkt in der Zelle eine Phosphorylierung der Phosphatase Cdc25a an Ser123 und dessen raschen Abbau (Iliakis et al. 2003). Diese ist jedoch

Einleitung

notwendig für die Aktivierung des Zyklin A-Cdk2-Komplexes, der die Aktivität der Origins aufrecht erhält und somit die Initiation und den Fortschritt der Replikation in der S-Phase (Donaldson und Blow 1999, Takisawa et al. 2000). Somit führt die Cdc25a-Degradierung zu einem Stopp der Replikation und zu einer Arretierung der Zelle in der S-Phase. Eine alternative Signaltransduktion führt vom Doppelstrangbruch über die Aktivierung von ATM und Chk2 (Checkpoint Kinase 2) ebenfalls zur Degradierung von Cdc25a und hat somit den gleichen Effekt auf den S-Phase-Checkpoint (Falck et al. 2001, Kastan 2001), (Abb. 2.6).

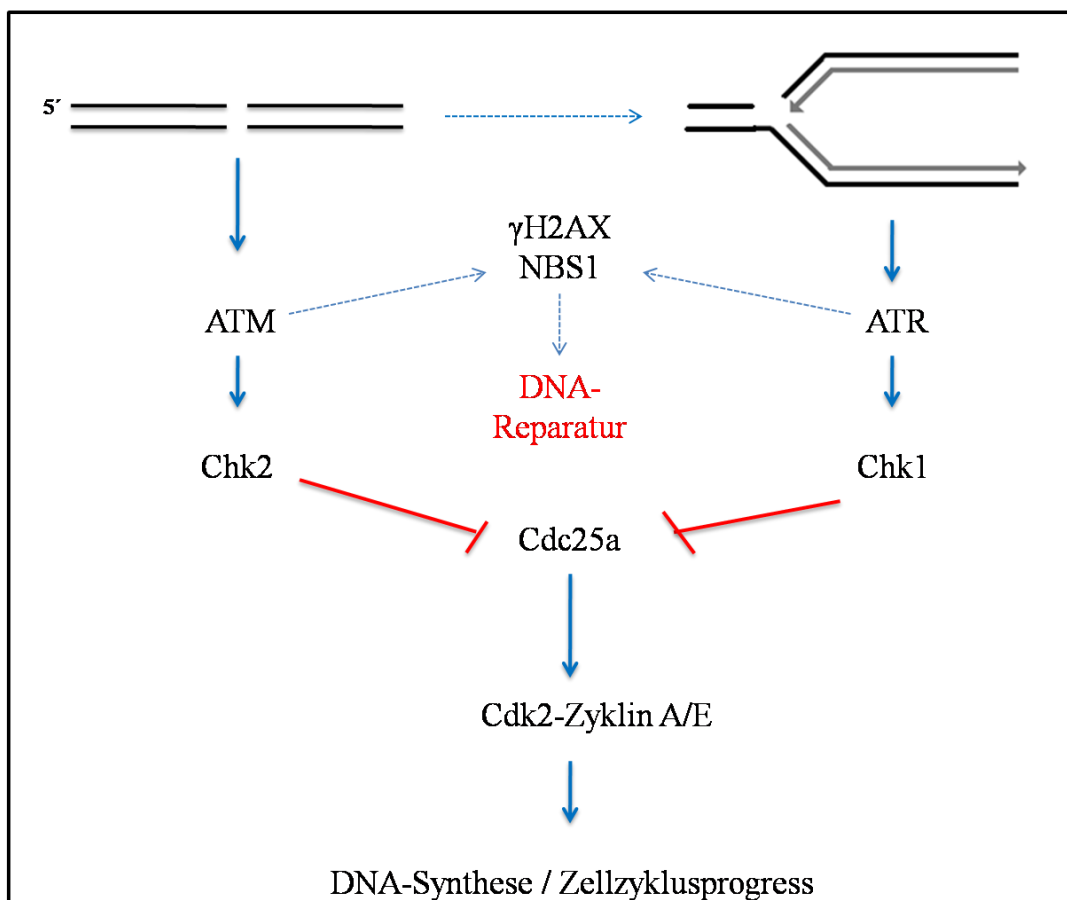


Abb. 2.6: Signaltransduktion des S-Phase-Checkpoints

Es konnte gezeigt werden, dass Chk1 mit Rad51 direkt interagiert und dieses an der Aminosäure Thr309 phosphoryliert wird. Chk1-defiziente Zellen sind nämlich nicht in der Lage, nach Inkubation mit Hydroxyurea einem Inhibitor der Ribonukleotidreduktase Rad51-Foci zu bilden. Chk1 ist also nicht nur ein Schlüsselprotein der Zellzykluscheckpoints sondern auch ein essentieller Aktivator der Homologen Rekombination (Sørensen, 2005). Dies zeigt, wie eng die beiden Prozesse miteinander

Einleitung

verzahnt sind. Es ist jedoch anzunehmen, dass nicht allein Chk1 das Zusammenspiel von Reparatur und Replikation steuert. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit untersucht, ob XRCC2 neben seiner Rolle in der Homologen Rekombination auch eine Funktion in der Zellzyklusregulation besitzt.

Das Wissen um die genaue Funktion von DNA-Reparaturproteinen kann eine klinische Relevanz haben. Ein Defekt von DNA-Reparaturmechanismen führt zur Anreicherung von DNA-Schäden und somit zu Mutationen, die zu Krebserkrankungen beim Menschen führen können. Ein bekanntes klinisches Beispiel dafür ist das Mammakarzinom, die häufigste maligne Erkrankung der Frau. In der Altersgruppe der 35- bis 55-jährigen Frauen ist das Mammakarzinom weltweit die häufigste Todesursache. Eine Ursache für ein erhöhtes Erkrankungsrisiko sind Mutationen in den Tumorsuppressorgenen BRCA1 und BRCA2. So werden in bis zu 80% der Fälle des familiär vererbten Mammakarzinoms Mutationen im BRCA1- und 2-Gen gefunden (Stauber und Weyerstahl 2005). Sie sind beide an DNA-Reparaturprozessen beteiligt. Insbesondere interagieren sie wie auch XRCC2 mit DNA-Reparaturproteinen, die an der homologen Rekombination beteiligt sind. Das Wissen um den Zusammenhang von Mutationen im BRCA1- und -2-Gen wird heutzutage zur individuellen Risikoabschätzung von Patientinnen genutzt und ermöglicht in solchen Fällen eine besonders intensive Vorsorge oder gar den Einsatz von elektiven Mammaablationen zur Krebsprävention.

Auch bei XRCC2 scheint es sich auf Grund Beteiligung an der Homologen Rekombination um ein Tumorsuppressorgen zu handeln. Es sind SNP's im XRCC2-Gen bekannt, die das individuelle Krebsrisiko einer Person steigern (Benhamou et al. 2004, Han et al. 2004). Das Wissen um solche Mutationen kann wie auch bei BRCA1- und 2 die Möglichkeit einer individuellen Risikoabschätzung und somit eine Optimierung von Vorsorge- und Screeningverfahren bei verschiedensten Krebserkrankungen beinhalten. Die Kenntnis der genauen Funktion der Proteine in der DNA-Reparatur kann die Möglichkeit einer spezifischen, individuell abgestimmten Therapie beinhalten. In dem Fall kann die Therapie an den Reparaturmechanismen angreifen, die in der Tumorzelle defekt sind.

3. Materialien und Methoden

3.1. Zelllinien und Zellkultur

Die Versuche wurden mit zwei Zelllinien durchgeführt. Die V79-Zelllinie sind Lungenfibroblasten vom Hamster. Es handelt sich bei ihnen um die parentale Zelllinie der irs1-Zelllinie. Sie ist eine von vier strahlensensiblen Mutanten der V79-Zelllinie (irs1-4, „ionizing radiation sensitive“), die mit Hilfe des Mutagens ENU (ethyl nitrosurea) erzeugt wurden (Jones et al. 1987). Der Unterschied besteht darin, dass den irs1-Zellen im Gegensatz zu den V79-Zellen das zu Rad51 paraloge Protein XRCC2 fehlt (Tambini et al. 1997, Cartwright et al. 1998, Liu et al. 1998). irs1-Zellen haben eine erhöhte Sensibilität gegenüber ionisierender Strahlung, UV-Licht, alkylierenden und interkalierenden Substanzen wie z.B. Mitomycin C, die komplementäre DNA-Stränge kovalent miteinander verbinden.

Die Zelllinien wurden in T75er Zellkulturflaschen¹ kultiviert. Sowohl für die V79- als auch für die irs1-Zelllinie wurde als Kulturmedium RPMI² verwendet. Zu diesem wurde 10% fetales Kälberserum (FCS)³ sowie 1% Penicillin/Streptomycin⁴ gegeben.

Die Zellkulturen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert.

Die Passagierung der Zellen erfolgte alle zwei bis drei Tage vor Erreichen der Konfluenz. Dazu wurden die Zellen einmal in 10ml PBS⁵ gewaschen und anschließend mit Hilfe von 3ml 0,25% EDTA-Trypsin⁶ gelöst. Schließlich wurden sie in geringerer Dichte erneut ausgesät.

Die Zelldichtebestimmung wurde an einem automatischen Zellzähler⁷ durchgeführt. Die trypsinierten und in Medium resuspendierten Zellen wurden hierfür in 0,9% NaCl 1:50 verdünnt und in den Zellzähler gegeben. Dabei wird die Zellsuspension in eine Kapillare angesaugt. Dort entsteht eine Widerstandsänderung, wenn die Zellen an einer Elektrode vorbeiströmen. Die Anzahl dieser Ereignisse entspricht der gemessenen Zellzahl.

¹ Sarstedt – Tissue Culture Flask 75cm²

² Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland

³ FBS Superior, Biochrom AG

⁴ Penicillin Streptomycin, Gibco

⁵ 137 mM NaCl + 2,7 mM KCl + 2 mM KH₂PO₄ + 10 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, autoklaviert

⁶ 5% Trypsin-EDTA, Gibco

⁷ CASYII Zellcounter, Schärfe Systems

Materialien und Methoden

Die Stammkulturen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Dafür wurden 1×10^6 Zellen bei 1200 rpm für 3 Minuten zentrifugiert⁸. Das Zellpellet wurde in 1,5ml Medium mit 10% DMSO⁹ resuspendiert und in ein 2ml Cryotube¹⁰ überführt. Das Einfrieren erfolgte in drei Temperaturschritten. Zunächst wurden die Cryotubes für drei Stunden bei -20°C eingefroren. Es folgte eine Abkühlung auf -80°C über Nacht und schließlich die Überführung in flüssigen Stickstoff bei -196°C .

3.2. Wachstumskurven

Um das Wachstumsverhalten der Zellen kennen zu lernen, wurden so genannte Wachstumskurven ermittelt. Hierzu wurden in 16 T25er Flaschen jeweils 1×10^5 Zellen ausgesät, täglich zwei Flaschen trypsinisiert und deren Zellzahl am Zellzähler bestimmt. Aus den Ergebnissen eines Tages wurde ein Mittelwert gebildet und so eine Wachstumskurve erstellt.

3.3. Topotecan

Die Zellen wurden bei den Versuchen mit dem Chemotherapeutikum Topotecan¹¹ behandelt, das in replizierenden Zellen DNA-Doppelstrangbrüche bewirkt. Es handelt sich dabei um ein semi-synthetisches Derivat des Alkaloids Camptothecin, welches aus der Rinde, den Wurzeln und den Früchten der Pflanze *Camptotheca acuminata* gewonnen wird. Es wurde bereits in der traditionellen chinesischen Medizin zur Behandlung maligner Tumore eingesetzt. Von der Schulmedizin wurde es 1966 zu therapeutischen Zwecken wieder eingesetzt. Heutzutage werden zwei Camptothecinderivate klinisch genutzt, Topotecan und Irinotecan. Topotecan ist als Zytostatikum für therapierefraktäre und metastasierte Ovarialkarzinome sowie therapierefraktäre kleinzellige Bronchialkarzinome (SCLC) in Deutschland zugelassen. Topotecanhydrochlorid¹¹ wird in Pulverform geliefert und als 1mMol Stock-Lösung bei -20°C eingefroren.

3.4. Kolonietest

Zur Ermittlung der Sensibilität der Zellen gegenüber Topotecan wurde ein Kolonietest durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen in T25er Flaschen ausgesät. 6

⁸ Laborfuge 400R, Heraeus Instruments

⁹ Dimethyl sulphoxide, Sigma

¹⁰ Cryogenic vial, Corning Incorporated

¹¹ Calbiochem

Stunden später erfolgte ein Mediumwechsel unter Zugabe von Topotecan in unterschiedlicher Konzentration. Innerhalb einer Woche wuchsen die Zellen zu Kolonien, welche mit 0,9%NaCl gewaschen und daraufhin für fünf Minuten mit 75% Ethanol fixiert und mit Kristallviolett angefärbt wurden. Die Anzahl gewachsener Kolonien im Verhältnis zur Zahl ausgesäter Zellen ergibt die Plattierungseffizienz (PE). Das Verhältnis der PE von topotecan-behandelten Zellen zu der von unbehandelten Kontrollzellen ergibt die konzentrationsabhängige Überlebensfraktion (SF).

3.5. Zellzyklusmessung

Die Zellzyklusverteilung wurde am Durchflusszytometer¹² anhand des DNA-Gehalts der einzelnen Zellen einer Zellsuspension gemessen. Die DNA der Zellen wird, wie im Verlauf beschrieben, mit dem fluoreszierenden Farbstoff Propidium-Jodid angefärbt. Somit geht von jeder Zelle ein mittels Durchflusszytometrie messbares Fluoreszenzsignal aus, welches proportional zum DNA-Gehalt der Zelle ist. Der DNA-Gehalt einer Zelle wiederum ist von der Zellzyklusphase, in der sie sich befindet, abhängig. In der G1-Phase liegt ein einfacher DNA-Gehalt vor. Während der S-Phase nimmt dieser aufgrund von Replikation zu, bis in der G2-Phase schließlich ein doppelter DNA-Gehalt vorliegt. Somit kann man vom DNA-Gehalt der Zelle indirekt auf die Zellzyklusphase schließen, in der sie sich befindet. Summiert man die Fluoreszenzsignale jeder Zelle einer Messpopulation, erhält man eine Häufigkeitsverteilung der Zellen, die sich in einem DNA-Histogramm darstellen lässt (Abb. 3.1).

¹² FACScan, Becton-Dickinson

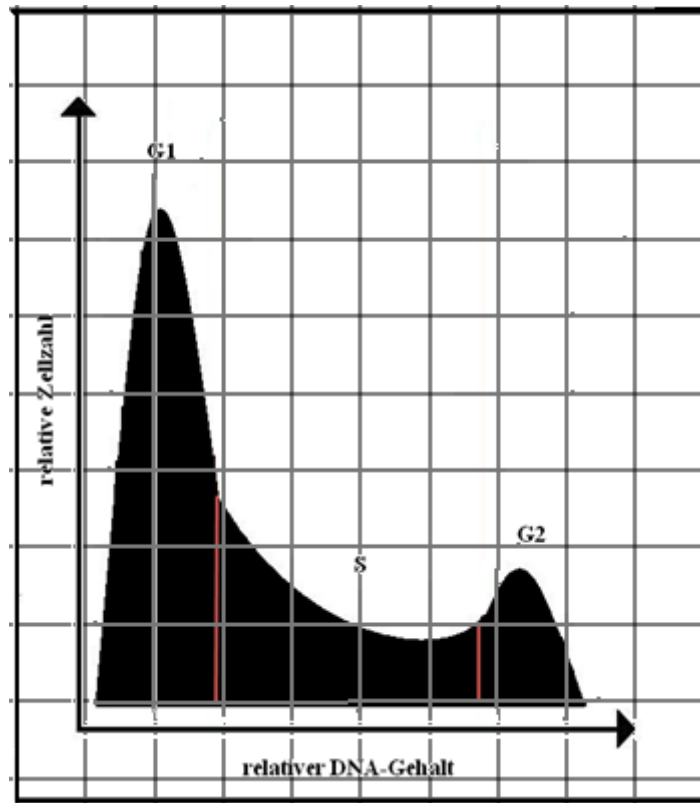


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Diagramms einer Zellzyklusmessung.

Es wurden 5×10^5 Zellen in T75er Zellkulturflaschen ausgesät und 24 Stunden später ein Mediumwechsel mit verschiedenen Topotecankonzentrationen durchgeführt. Danach wurden zu unterschiedlichen Zeiten die Zellen mit Ethanol fixiert. Dazu wurden die Zellen trypsiniert und in PBS gewaschen und erneut in 1ml PBS resuspendiert. Danach wurde nacheinander zunächst 1ml 70% Ethanol dann 4,5ml 96% Ethanol langsam eingetroppt. Die nun 80%ige Ethanol-Zellsuspension konnte bei -20°C gelagert werden. Zur Vorbereitung der Messung am Durchflusszytometer wurden die Zellen zweimal zentrifugiert und zwischendurch in PBS gewaschen. Danach wurde zur Färbung der DNA auf das Zellpellett $500\mu\text{l}$ einer RNase¹³-Propidium-Jodid¹⁴-Lösung im Mischungsverhältnis 1:10 gegeben. Die Zellen in der RNase-PI-Lösung wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Dann erfolgte die Messung am Durchflusszytometer.

Die Auswertung der Zellzyklusmessungen erfolgte vor allem manuell über die Aufrasterung der DNA-Histogramme. Dabei maß eine Einheit des Rasters $0,5\text{cm} \times$

¹³ 1xPBS + 10 mg/ml Ribonuclease A aus Rinderpankreas, Serva

¹⁴ 1xPBS + 10 $\mu\text{g/ml}$ Propidium-Jodid, Sigma

0,5cm. Ziel war es, den prozentualen Anteil der Zellen einer Kolonie an den verschiedenen Zellzyklusphasen zu bestimmen. Da die Topotecanbehandlung das normale Zellzyklusprofil erheblich veränderte, konnten die Histogramme nicht mit kommerziell erhältlichen Algorithmen und den zugrunde liegenden Zellzyklusmodellen (ModFIT) analysiert werden.

3.6. BrdU-Einbau

Die Fähigkeit von Zellen zu replizieren, also Einzelnukleotide zu DNA-Strängen zusammenzufügen, kann man dadurch messbar machen, dass man ihnen zum Einbau mit Brom markiertes Uridin (BrdU¹⁵) als Ersatz zum Nukleotid Thymidin anbietet. Das eingebaute BrdU wird mit einem spezifischen Antikörper¹⁶ markiert, an den wiederum ein fluoreszierender Antikörper¹⁷ binden kann. Dieser Komplex aus BrdU und Antikörpern kann im Durchflusszytometer sichtbar gemacht werden. Die Menge des BrdU in der DNA spiegelt die Replikationsaktivität der Zellen wieder.

Zur Ermittlung des BrdU-Einbaus in die V79- und irs1-Zellen wurden zunächst je 5×10^5 Zellen ausgesät und für 24 Stunden im Brutschrank gelagert. Daraufhin erfolgte ein Mediumwechsel. Dabei variierte bei einer Inkubationszeit von acht Stunden jeweils die Topotecankonzentration. Vor dem Fixieren wurden die Zellen für 30 Minuten im Brutschrank mit BrdU inkubiert. Dafür wurden 100µl BrdU pro 100ml Medium in die Zellkulturflaschen gegeben.

Nach ihrer Fixierung (siehe 3.5.) wurden die Zellen bei 1200rpm für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Danach erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit 2ml HCl-Triton¹⁸ für 30 Minuten bei 37°C im Dunkeln. Nach der Permeabilisierung wurden die Zellen einmal mit drei Milliliter PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (s.o.), bevor sie für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln mit 1ml PBT-Ziegenserum¹⁹ inkubiert wurden. Nach dem Zentrifugieren erfolgte die Inkubation mit 100µl BrdU-Antikörper²⁰ für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper²¹ für 30 Minuten bei Raumtemperatur im

¹⁵ Sigma

¹⁶ Anti-Bromodeoxyuridine, Klon Bu 20a, Dako Cytomation, #MO744, 1:50-Verdünnung in PBT-Ziegenserum

¹⁷ Anti-Mouse Immunglobulins/FITC Goat F (ab²), Dako #F0479, 1:40-Verdünnung in PBT-Ziegenserum

¹⁸ 2N HCl + 0,1% Triton-X-100, Sigma

¹⁹ 250µl Ziegenserum auf 50ml PBT (1xPBS + 0,5% TWEEN20)

²⁰ monoklonaler Maus-Anti-BrdU-Ak, 1:50-Verdünnung in PBT Ziegenserum

²¹ 100µl FITC-konjugierter monoklonaler Anti.Maus-Ak in PBT-Ziegenserum, 1:40-Verdünnung

Dunkeln. Es erfolgten wieder zwei Waschungen mit 3ml PBS und schließlich die Färbung mit 0,5ml Propidiumjodid für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Messung des BrdU-Einbaus erfolgte am Durchflusszytometer.

3.7. γ H2AX- Foci

Es wurden von der V79- und der irs1-Zelllinie 5×10^5 Zellen auf einen sterilen Objektträger in einer 10 ml Petrischale ausgesät. Nach zwölf Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. Dem frischen Medium wurde Topotecan zugegeben, so dass eine Konzentration von $0,02 \mu\text{M}$ Topotecan entstand. Nach 16 Stunden erfolgte ein erneuter Mediumwechsel gegen topotecanfreies Medium. Die auf den Objektträgern angewachsenen Zellen wurden daraufhin nach 0, 2, 4, 6 und 24 Stunden Reparaturzeit fixiert. Die Fixierung der Objektträger erfolgte im Dunkeln.

Zur Fixierung wurden die Objektträger in PBS gewaschen und daraufhin für 15 Minuten in 2%igem Formaldehyd fixiert. Danach wurden sie dreimal für je 10 Minuten in PBS gewaschen. Die weitere Präparierung der Objektträger erfolgte ebenfalls im Dunkeln. Die Zellen wurden für fünf Minuten auf Eis permeabilisiert²² und danach gewaschen²³. Die anschließende Blockierung erfolgte für eine Stunde²⁴. Die Inkubation mit dem ersten γ H2AX- Antikörper²⁵ erfolgte in einer feuchten Dunkelkammer. Es wurde daraufhin dreimal für je zehn Minuten gewaschen²⁶. Bei dem zweiten Antikörper handelte es sich um einen fluoreszierenden Anti-Maus-Antikörper²⁷, mit dem die Zellen auf den Objektträgern für eine Stunde in einer dunklen Feuchtkammer inkubiert wurden. Danach wurden die Objektträger viermal für zehn Minuten gewaschen²⁸. Die Gegenfärbung erfolgte mit DAPI/Antifade²⁹. Die eingedeckelten Objektträger wurden mit Nagellack versiegelt und in einer lichtundurchlässigen Box bei 4°C aufbewahrt.

Auf jedem Objektträger wurden die Foci in den Zellkernen von 50 Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop³⁰ ausgezählt (Abb. 3.2).

²² 1xPBS + 1%BSA + 0,2% Triton-X 100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol, Sigma)

²³ 1xPBS + 1%BSA

²⁴ 1xPBS + 3%BSA

²⁵ Anti-Phospho-Histon H2AX-Ak, monoclonal, Anti-Maus, Upstate, in 1xPBS + 1%BSA + 0,5% TWEEN 20, 1:100-Verdünnung, 50 μ l/OT

²⁶ 1xPBS + 1%BSA + 0,5% TWEEN 20

²⁷ Alexa Flour 594 goat anti-mouse, Molecular Probes in 1xPBS + 1%BSA + 0,5 % TWEEN 20, 1:600-Verdünnung, 50 μ l/OT

²⁸ 1xPBS + 0,5% TWEEN 20

²⁹ 4,6-Diamidin-2-PhenylIndolhydrochlorid, Qbiogen

³⁰ Axioplan, Zeiss

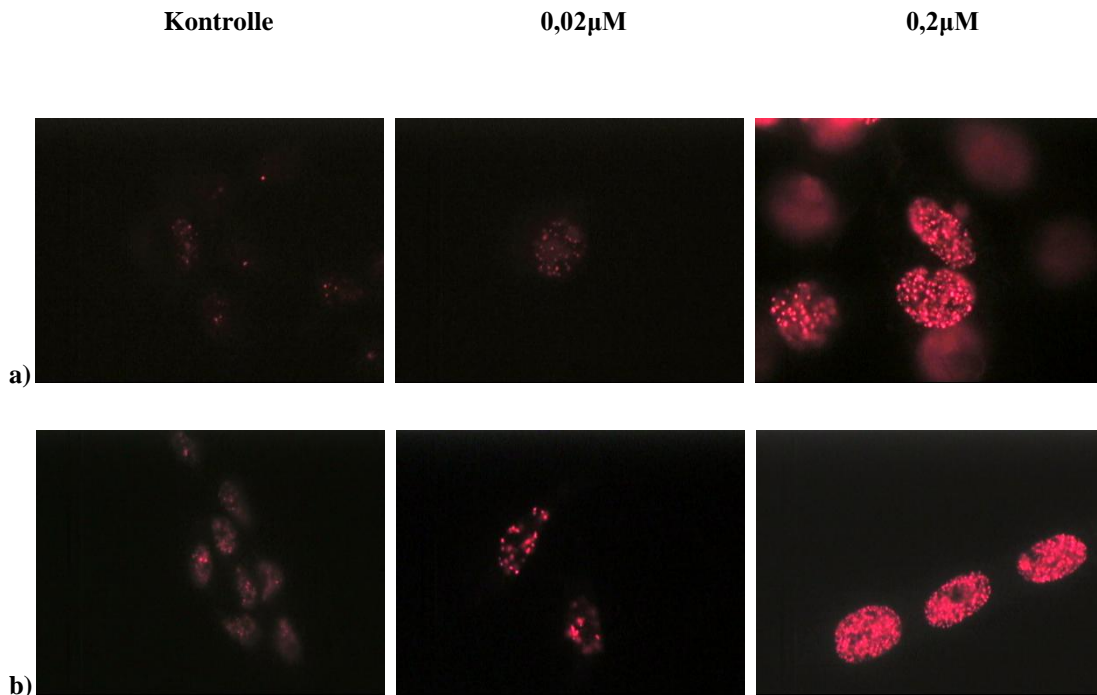


Abb. 3.2: γ H2AX-Foci in den Zellkernen von V79-(a) und irs1-Zelllinien (b) nach sechzehnstündiger Inkubation mit 0,02 μ M und 0,2 μ M Topotecan unter dem Fluoreszenzmikroskop.

3.8. Western Blot

Bei dem Western Blot handelt es sich um eine Methode zum semiquantitativen Nachweis von Proteinen in einer Zelllinie. Dabei werden die extrahierten Proteine durch Gelelektrophorese getrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Anschließend können sie mit Hilfe eines spezifischen primären Antikörpers markiert und durch einen zweiten Antikörper mittels eines Lichtsignals sichtbar gemacht werden. Um den Einfluss von XRCC2 auf die Checkpointaktivierung nach Induktion von Doppelstrangbrüchen zu untersuchen, wurden nach Topotecaninkubation Proteine isoliert und die am Checkpoint beteiligten Proteine im Western Blot dargestellt.

3.8.1. Proteinextraktion und -quantifizierung

In einer T175er Flasche wurden je 5×10^5 Zellen ausgesät und für 48 Stunden im Brutschrank gelagert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel gegen ein Medium mit einer Konzentration von 1 μ M Topotecan. Die Proteinextraktion erfolgte nach einer Inkubationszeit von 0, 4, 8, 16 und 24 Stunden. Die Zellen wurden trypsinisiert, in 8ml

1xPBS aufgenommen und für 3 Minuten bei 1000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 10ml 1xPBS resuspendiert, erneut zentrifugiert (s.o.) und der Überstand wieder verworfen. Das gewonnene Zellpellet wurde in 1ml PBS resuspendiert und in einen Eppendorftube³¹ überführt. Nach erneuter Zentrifugation bei 1500 rpm und 4°C für 5 Minuten³² wurde das Zellpellet 1:1 in Lysispuffer³³ aufgenommen. Diese Lösung wurde danach sofort fünfmal für einige Sekunden in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem Heizblock³⁴ bei 30°C wieder aufgetaut. Danach wurde die Suspension für 10 Minuten bei 11.000 rpm bei 4°C zentrifugiert³⁵. Im Überstand befand sich nun das Proteinextrakt, welches in einen neuen Eppendorftube transferiert wurde.

Die Proteinquantifizierung erfolgte nach Bradford. Dazu wurde zunächst eine Verdünnungsreihe des Proteinextraktes erstellt: 1:500, 1:1000 und 1:2000. Von jeder Verdünnung wurden 800µl in eine Photometerküvette gegeben und mit 200µl BioRad-Reagenz³⁶ gemischt. Nach zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die optische Dichte des Gemisches am Photometer³⁷ bei 595nm bestimmt. Diese Messwerte wurden mit einer Eichreihe aus bekannten BSA-Konzentrationen verglichen, wodurch die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt werden konnten.

3.8.2. Proteinauftrennung durch Gelelektrophorese

Die Proteinauftrennung nach Molekulargewicht erfolgte nach Laemmli (1970) mittels denaturierender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

In den einzelnen Proben wurden 30µg des extrahierten Proteins und 10µl Auftragspuffer³⁸ zusammengegeben. Diese wurden mit destilliertem Wasser auf insgesamt 20µl aufgefüllt. Daraufhin wurden die Proben für acht Minuten in kochendes Wasser gegeben und danach auf Eis für acht Minuten gekühlt. Währenddessen wurde das Elektrophoresegel³⁹ für fünf Minuten in Tris-Glycin-Puffer⁴⁰ equilibriert und danach in eine mit Tris-Glycin-Puffer aufgefüllte Gelelektrophoresekammer⁴¹ gespannt.

³¹ Eppendorf Tubes, Sarstedt

³² Microfuge® R, Beckman

³³ Protease Inhibitor Cocktail, Sigma

³⁴ Thermomixer comfort, Eppendorf

³⁵ Microfuge, Beckmann

³⁶ BioRad

³⁷ Uvicon Spectro Photometer, Kontron Instruments

³⁸ Ref. Solutions

³⁹ Pager® Gold Precast Gels, Lonza 12,5%

⁴⁰ 14,4g Glycin, Roth 3,03g Trizma base, Sigma ad 1 L ddH₂O + 10ml 10% sodium dodecyl sulfate, Sigma

⁴¹ Ready Gel Cell, Bio-Rad

Anschließend wurden die präparierten Proteine in die mit Tris-Glycin-Puffer gespülten Taschen pipettiert. Von dem direkt auf dem Gel sichtbaren Benchmark Marker⁴² wurden 10µl in eine freie Geltasche gegeben, um den Gellauf und Blot zu überprüfen. Als Größenstandard dient der erst nach Detektion mit ECL sichtbare MagicMarker⁴³, von dem 5µl in die-selbe Geltasche zum BenchMarker hinzu pipettiert werden.

Die Gelelektrophorese begann mit einer siebenminütigen Sammlungsphase bei 100V. Danach folgte die Trennungsphase für 90 Minuten bei 200V.

3.8.3. Blot

Eine 7 cm x 9 cm große PVDF-Transfermembran⁴⁴ wurde für 30 Sekunden in Methanol⁴⁵ aktiviert, danach für 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen und schließlich für 10 Minuten in Transferpuffer⁴⁶ equilibriert. Auch 2 Schwämme, 4 Whatmanpapiere⁴⁷ und das Gel wurden für fünf Minuten in den Transferpuffer⁴⁶ gegeben. Ein Schwamm, zwei Whatmanpapiere, das Elektrophoresegel, die PVDF-Membran, zwei Whatmen-Papiere und ein weiterer Schwamm wurden in angegebener Reihenfolge zwischen zwei Gittern zusammengedrückt und in eine Blottingkammer⁴⁸ eingespannt. Die Kammer wurde mit Transferpuffer⁴⁶ gefüllt. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte für 60 Minuten bei 100V auf Eis.

3.8.4. Detektion

Die Darstellung der gesuchten Proteine erfolgte über eine Immunodetektion d.h. mit Hilfe spezifischer Antikörper. Dabei wurde die Membran zunächst mit dem ersten proteinspezifischen Antikörper und danach mit einem zweiten gegen das Fc-Fragment des ersten Antikörpers gerichteten Antikörper inkubiert. Am Fc-Fragment des zweiten Antikörpers war eine Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP) gekoppelt. Dieses Enzym ist in der Lage, unter Lichtemission die Oxidation von Lunimol zu katalysieren (Enhanced Chemiluminescence, ECL), wodurch ein Film belichtet werden kann.

Nach dem Blot wurde die Membran für 5 Minuten in PBS gewaschen. Danach erfolgte die Blockierung in 20ml PBS mit 10% Magermilch⁴⁹ und 120µl TWEEN⁵⁰. Im

⁴² BenchmarkTM prestained Protein Ladder, Invitrogen

⁴³ MagicMarkTM XP Western Standard, Invitrogen

⁴⁴ Immun-Blot PVDF Membrane, Bio-Rad

⁴⁵ Methanol, J.T. Baker

⁴⁶ 28,8g Glycin, 6,06g Trizma base, 300ml Methanol ad 1,5l ddH₂O

⁴⁷ Gel-Blotting-Papier, Schleicher und Schuell

⁴⁸ Mini Trans-Blot[®] Cell, Bio-Rad

⁴⁹ Naturaflo Magermilchpulver, Töpfer

Materialien und Methoden

Anschluss daran erfolgte die Inkubation der Membran mit einem spezifischen Antikörper, der gegen das gesuchte Protein gerichtet war, in 10ml PBS mit 5% Magermilch und 60µl TWEEN über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Membran in PBS + 0,3% TWEEN gewaschen. Dabei wurde die Waschlösung zunächst nach 15 Minuten und noch weitere dreimal nach 5 Minuten ausgewechselt. Danach erfolgte die Inkubation der Membran mit dem zweiten Antikörper in 10ml PBS mit 5% Magermilch und 60µl TWEEN für eine Stunde. Danach wurde die Membran erneut wie beschrieben gewaschen. Unmittelbar danach wurde die Membran für 1 Minute mit 3 ml ECL-Lösung⁵¹ inkubiert und für 3 bis 5 Minuten ein Röntgenfilm⁵² unter Ausschluss anderer Lichtquellen aufgelegt. Die Entwicklung des Röntgen-Films erfolgte durch zweiminütige Inkubation im Entwickler⁵³ und 2-minütige Inkubation im Fixierer⁵⁴.

Nach der Detektion des gesuchten spezifischen Proteinsignals erfolgte auf derselben Membran als Kontrolle die Detektion des ubiquitär vorkommenden Proteins β -Actin. Die Membran wurde kurz in PBS + 0,3% TWEEN gewaschen, erneut für eine Stunde nach bekanntem Schema blockiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem β -Actin-Antikörper⁵⁵ in einer 1:10000-Verdünnung in 20ml PBS mit 5% Magermilchpulver und 120µl TWEEN inkubiert. Anschließend wurde die Membran nach bekanntem Schema gewaschen und mit dem 2. Antikörper inkubiert und entwickelt. Verwendete Antikörper: Chk1, Cell Signaling Technology #2345; Chk2, BD Biosciences #611571; cdc25a, Novus Biologicals NB 100-269; β -Actin, Sigma A 5441; Anti-Rabbit, BD Biosciences NA934; Anti-Mouse, BD Biosciences NA9310.

⁵⁰ TWEEN®, Sigma

⁵¹ ECL™ Western Blotting Detections Reagents, Ameram Bioscience

⁵² CL-Xposure Film. Pierce

⁵³ Eukobrom B/W paper developer, Tetenal, 40ml ad 400ml H₂O

⁵⁴ Superfix Plus, Tetenal 200ml ad 600ml H₂O

⁵⁵ Monoclonal anti- β -actin clona ac-15, Sigma

4. Resultate

4.1. Zellwachstum

Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens der V79- und irs1-Zelllinie wurden Wachstumskurven erstellt (Abb. 4.1). Es zeigte sich für beide Zelllinien zu Beginn eine exponentielle Zunahme der Zellzahl. Das Wachstum der V79-Zellen erreichte bereits am zweiten Tag ein Plateau, das bis zum siebten Tag des Wachstums aufrecht erhalten wurde und danach wieder abfiel. Im exponentiellen Wachstum haben die Zellen eine Verdoppelungszeit von etwa 12,2 Stunden. Die irs1-Zellen erreichten das Plateau der Wachstumskurve am dritten Tag. In diesem Fall nahm die Zellzahl erst am neunten Tag wieder ab. Im exponentiellen Wachstum haben die irs1-Zellen eine Verdoppelungszeit von etwa 15,8 Stunden.

Die Mutante irs1 zeigte also einerseits ein langsamerer Wachstum, wuchs andererseits aber auch nicht so dicht wie die Wildtypzelle V79. Für die Planung folgender Versuche wurden die unterschiedlichen Verdoppelungszeiten der beiden Zelllinien mitberücksichtigt.

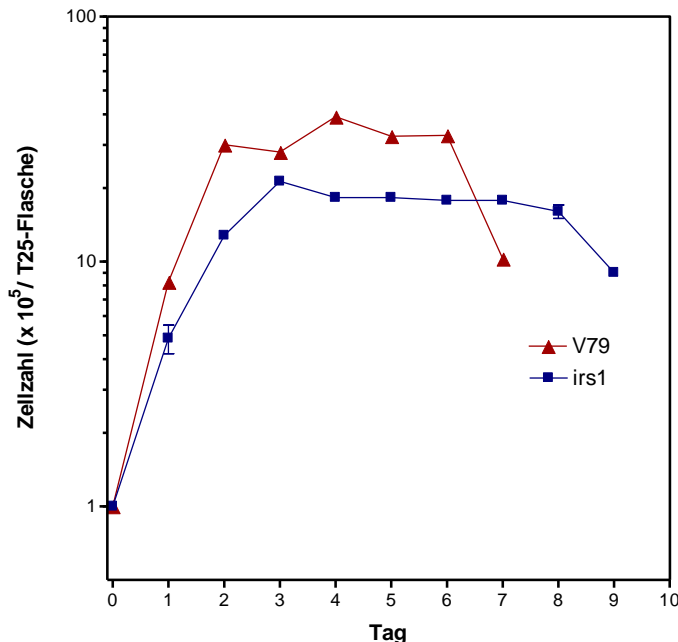


Abb. 4.1: Wachstumskurven von V79- und irs1-Zellen: Es wurden 1×10^5 Zellen in T25-Flaschen ausgesät. Alle 24 Stunden wurde die Zellzahl in jeweils zwei Flaschen ausgezählt und der Mittelwert aufgetragen.

4.2. Sensitivität gegenüber Topotecan

4.2.1. Überlebensfraktion unbehandelter Zellen

Zunächst wurde überprüft, ob die Zelllinien ein vergleichbares Koloniebildungsvermögen haben. *irs1*-Zellen zeigten eine geringfügig verminderte Koloniebildung (PE) gegenüber der Parentalzelle (Abb. 4.2). Die Effizienz, Kolonien zu bilden, war in beiden Fällen über einen Bereich von 0-500 ausplattierten Zellen konstant. Dieses Resultat erlaubte es, für Sensitivitätstestungen Zellen in unterschiedlicher Dichte auszusäen, ohne dass die Zellzahl per se das Ergebnis beeinflussen würde.

4.2.2. Sensitivität gegenüber Topotecan

Nachdem kein signifikanter Unterschied in der Plattierungseffizienz beider Zelllinien festgestellt werden konnte, wurde ihre Sensibilität gegenüber Topotecan mit Hilfe des Koloniebildungstests untersucht. Abbildung 4.3 stellt das Überleben der Zellen abhängig von der Topotecankonzentration im Medium dar.

In beiden Zelllinien nahm die Überlebensfraktion mit steigender Topotecankonzentration kontinuierlich ab. Im Gegensatz zu V79- zeigten *irs1*-Zellen allerdings auch schon bei sehr geringen Konzentrationen eine starke Abnahme der Überlebensfraktion. Sie sind bezogen auf eine Überlebensrate von 10%, etwa 10-fach empfindlicher als die V79-Zellen. Es zeigt sich somit, dass der Verlust von XRCC2 die Sensibilität von Zellen gegenüber Topotecan steigert.

Resultate

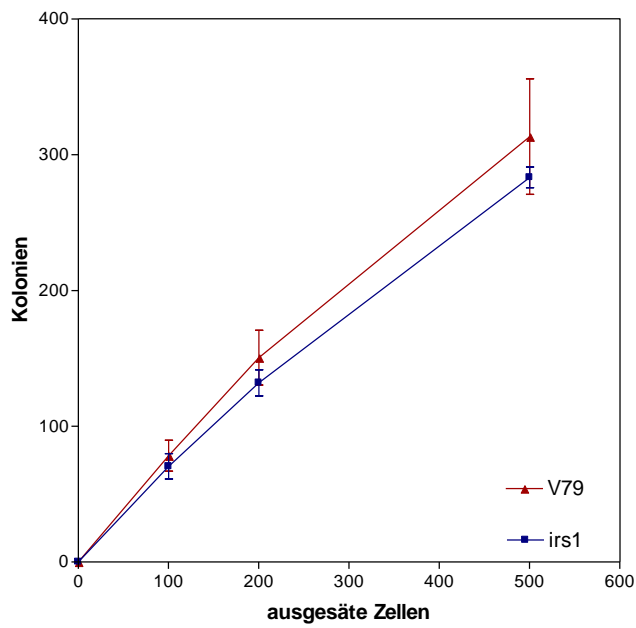


Abb. 4.2: Koloniebildungstest von V79 und irs1: Die Zellen wurden in verschiedenen Konzentrationen in T25er-Flaschen ausgesät und für sieben Tage inkubiert. Danach erfolgte die Fixierung, Färbung und Auszählung der Kolonien.

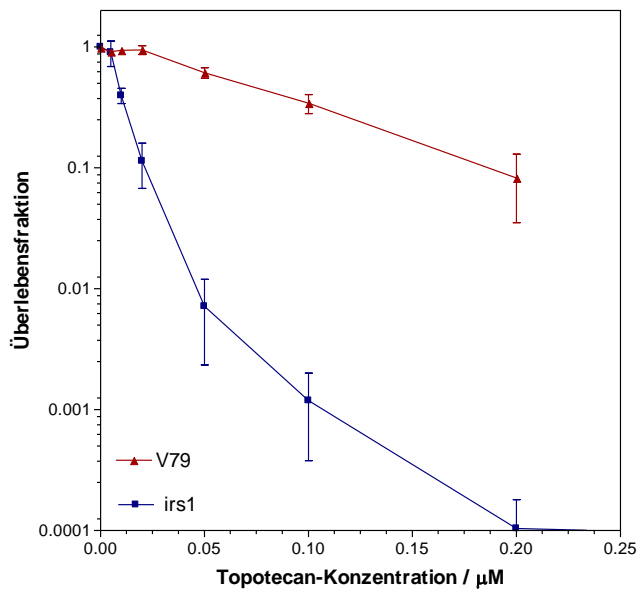


Abb. 4.3: Überlebensfraktion nach Inkubation mit unterschiedlichen Topotecankonzentrationen: Die Zellen wurden mit unterschiedlicher Zellzahl in normales RPMI-Medium ausgesät, das nach sechs Stunden gegen topotecanhaltiges Medium ausgetauscht wurde. Die Kolonien wurden sieben Tage später gefärbt und ausgezählt.

4.3. Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Topotecan induziert in exponentiell wachsenden Zellen Doppelstrangbrüche. XRCC2-defiziente Zellen sind gegenüber Topotecan sensitiv. Das XRCC2-Protein ist an der Homologen Rekombination beteiligt. Es wurde nun untersucht, ob XRCC2 einen Einfluss auf die Reparatur von topotecaninduzierten Doppelstrangbrüchen hat und ob das möglicherweise die Ursache für die erhöhte Sensitivität von XRCC2-defizienten Zellen gegenüber Topotecan ist.

Um dies zu untersuchen, wurde die Anzahl von γ -H2AX-Foci nach sechzehnständiger Inkubation mit Topotecan ermittelt. Abbildung 4.4 zeigt den Anteil der Zellkerne ohne Foci und mit zehn oder mehr Foci. Der Anteil der Zellkerne, der zwischen einem und neun Foci aufwies, variierte ebenfalls, war aber nicht geeignet, um einen Dosis- oder Zeiteffekt zu quantifizieren (siehe Dissertation A. Seniuk, Hamburg 2007).

In unbehandelten V79-Zellen wiesen deutlich über die Hälfte der Zellkerne keine Foci auf. Es fanden sich keine Zellkerne mit mehr als zehn Foci. Mit zunehmender Topotecankonzentration nahm der Anteil der Zellkerne ohne Foci kontinuierlich ab und der mit mehr als zehn Foci kontinuierlich zu. Bei einer Topotecankonzentration von 0,5 μ M wiesen schließlich alle Zellkerne zehn oder mehr Foci auf.

Die Hälfte der unbehandelten irs1-Zellen wies keine Foci auf. In 10% der Zellkerne zeigten sich bereits über 10 Foci. Wie auch schon bei den V79-Zellen nahm bei den irs1-Zellen mit zunehmender Topotecankonzentration der Anteil der Zellkerne ohne Foci kontinuierlich ab und der Anteil der Zellen mit mehr als 10 Foci kontinuierlich zu. In Abbildung 4.4 erkennt man, dass bei einer intermediären Topotecankonzentration von 0,1 μ M noch ein Drittel der V79-Zellen keine Foci zeigt, während der Anteil der irs1-Zellen ohne Foci bei der gleichen Topotecankonzentration bereits unter 5% lag.

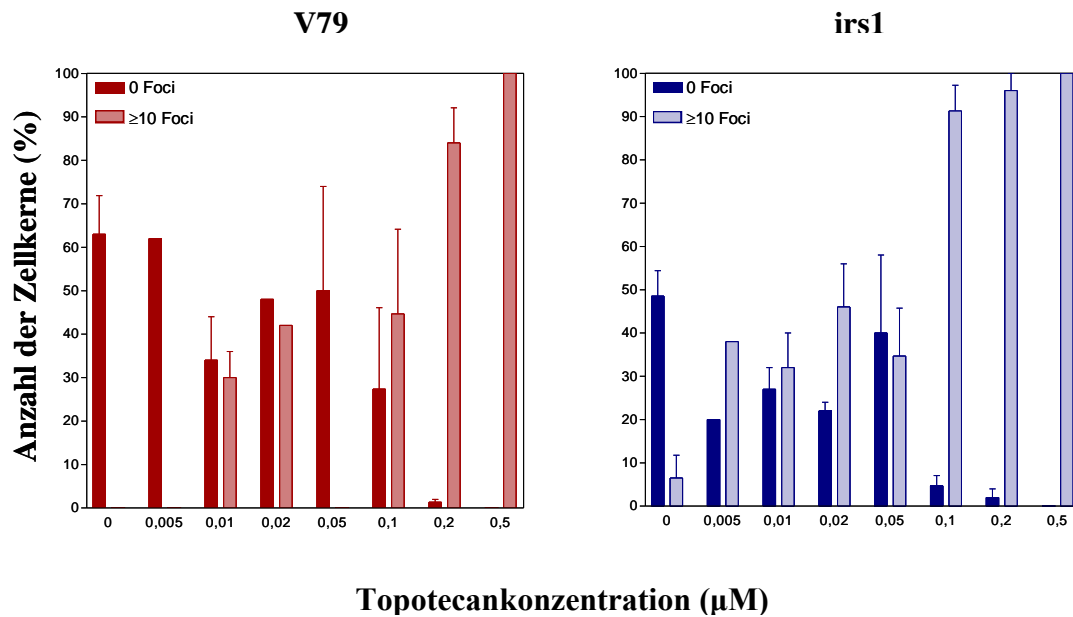


Abb. 4.4: γ H2AX-Foci in den Zellkernen von V79 und irs1 nach sechzehnstündiger Inkubation mit aufsteigender Topotecankonzentration: Es wurden Zellkerne ohne oder mit 10 und mehr Foci ausgezählt.

In den irs1-Zellen entstanden also schon bei sehr geringen Topotecankonzentrationen deutlich mehr γ -H2AX-Foci und damit topotecaninduzierte Doppelstrangbrüche, als bei den parentalen Zellen. Dieses Ergebnis muss nicht nur auf einer erhöhten Sensitivität der XRCC2-defizienten Zellen gegenüber Topotecan beruhen. Während der sechzehnstündigen Inkubationszeit findet in den Zellen bereits DNA-Reparatur statt. Deshalb kann die erhöhte Anzahl von γ -H2AX-Foci auch auf einer eingeschränkten Reparaturfähigkeit beruhen. Es entstehen also nicht zwingend mehr Doppelstrangbrüche in den irs1-Zellen, es werden von den entstandenen Doppelstrangbrüchen möglicherweise nur weniger repariert. Um dies zu überprüfen, wurden γ -H2AX-Reparaturversuche durchgeführt.

Dazu wurden die Zellen für 16 Stunden mit 0,02 μ M Topotecan behandelt und anschließend zur Reparatur bis zu 24h in Normalmedium weiterinkubiert.

Aus Abbildung 4.5 ist zu entnehmen, dass unbehandelte V79-Zellen zu 60 bis 70% keine Foci aufweisen. Nur 2% der Zellkerne hatten mehr als 10 Foci. Nach sechzehnstündiger Inkubation mit 0,02 μ M Topotecan nahm die Anzahl der Zellkerne mit mehr als 10 nukleären Foci deutlich zu. Bereits zwei Stunden nach dem Mediumwechsel war ein Reparatureffekt erkennbar, da der Anteil der Zellkerne ohne Foci wieder zunahm. Der Anteil der Zellkerne mit mehr als 10 Foci nahm entsprechend

Resultate

deutlich ab. Nach 24 Stunden entsprach die Anzahl an Foci wieder annähernd der von unbehandelten Zellen. Bei identischer Versuchsdurchführung zeigten die unbehandelten *irs1*-Zellen eine höhere Anzahl von Foci als die V79-Zellen. Die sechzehnstündige Inkubation mit identischen Topotecankonzentrationen führte in *irs1*-Zellen zu einer stärkeren Zunahme der Anzahl der Foci, als in den V79-Zellen. Über 80% der *irs1*-Zellkerne zeigten mehr als 10 Foci, und kaum noch ein Zellkern wies keinen Focus auf. Man erkennt über die Zeit nach dem Mediumwechsel eine kontinuierliche Reduktion der Anzahl der Foci. Allerdings wird nach 24 Stunden nicht annähernd wieder das Niveau der unbehandelten Kontrollzellen erreicht. Auch in den *irs1*-Zellen nimmt die Anzahl der nukleären Foci also ab. Sie sind ebenfalls in der Lage Doppelstrangbrüche zu reparieren, allerdings weniger effizient als die V79-Zellen.

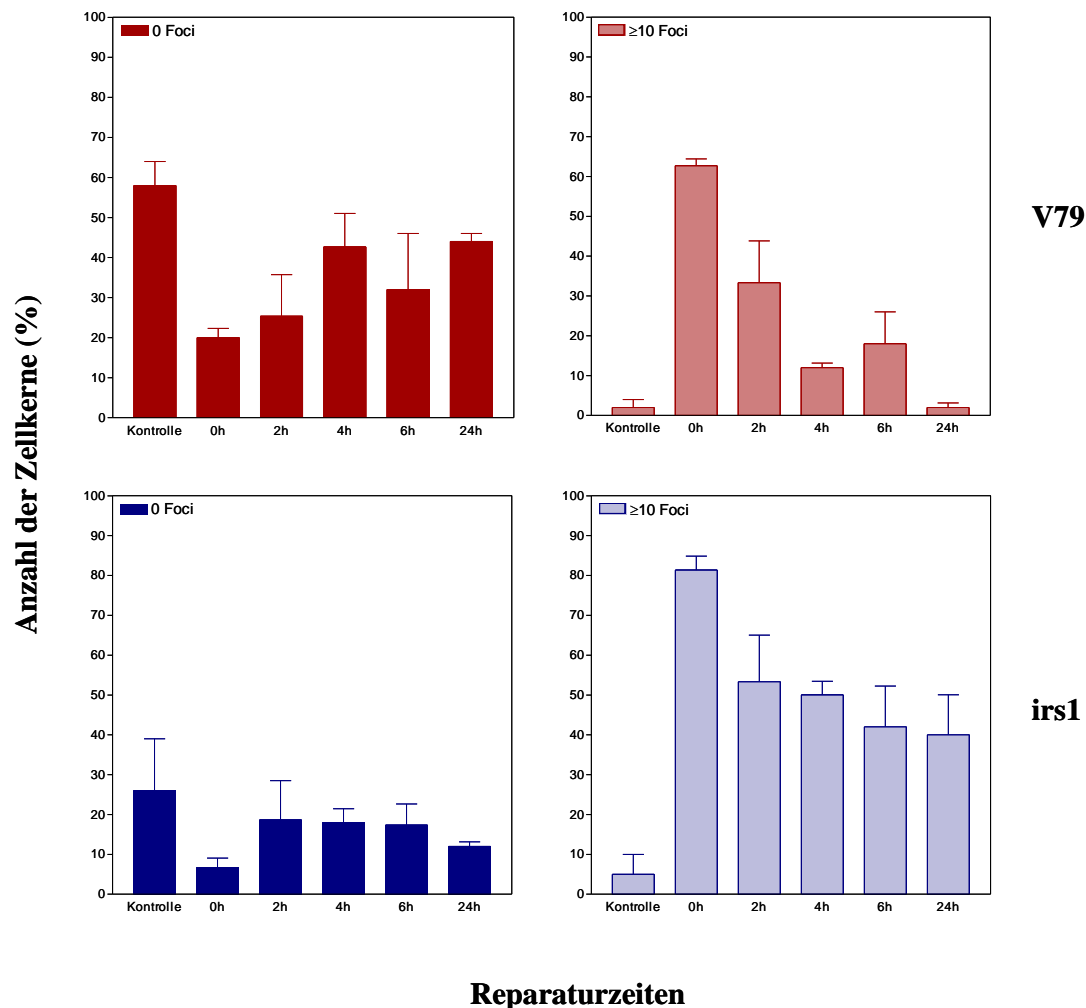


Abb. 4.5.: γ H2AX-Foci in den Zellkernen der V79- und *irs1*-Zelllinien nach sechzehn stündiger Inkubation mit 0,02 μ M Topotecan. Danach wurden die Zellen für die angegebenen Reparaturzeiten im Normalmedium weiter inkubiert.

4.4. Zellzykluseffekte der Topotecaninkubation

Kommt es während der Replikationsphase zu Doppelstrangbrüchen kann die DNA-Synthese über dieses Hindernis hinweg nicht fortgesetzt werden. Es sollte deshalb hier untersucht werden, welchen Effekt Topotecan auf die Zellzyklusprogression hat und ob die unterschiedliche Reparaturfähigkeit der Zelllinien dieses beeinflusst. Dazu wurde die Zellzyklusverteilung der wildtyp- und der XRCC2-defizienten Zellen nach verschiedenen Topotecankonzentrationen und Inkubationszeiten im Durchflusszytometer untersucht.

4.4.1. Kinetik der Zellzyklusprogression

Exponentiell wachsende Zellen wurden für 4, 8, 16 und 24 Stunden mit 0,05µM Topotecan inkubiert und deren Verteilung im Zellzyklus gemessen (Abb. 4.6). Der prozentuale Anteil der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen ist in Tabelle 4.1 aufgelistet.

Unbehandelte V79-Zellen zeigten eine Verteilung von 37,5% G1- 46,6% S- und 15,9%-G2-Phase Zellen. Nach achtstündiger Inkubation mit Topotecan zeigte sich eine Abnahme von G1-Zellen, ein nahezu unveränderter S-Phase Anteil sowie eine deutliche Zunahme der G2-Phase Zellen, was einer Akkumulation in dieser Phase entspricht (Abb. 4.6, obere Zeile). Nach sechzehnständiger Topotecaninkubation war eine Akkumulation der Zellen in der gesamten S-Phase erkennbar. Nach 24 Stunden sammelten sich vor allem Zellen am G1/S Übergang bzw. in der frühen S-Phase. Dagegen nahm der Anteil der späten S-Phase Zellen deutlich ab (Abb. 4.6). Das bedeutet, dass nach der langen Topotecaninkubation vermehrt Zellen in der frühen S-Phase akkumulieren und die mittlere S-Phase nicht mehr erreichen.

Die *irs1*-Zellen zeigten schon frühzeitig Unterschiede gegenüber den V79-Zellen. Bereits nach vier Stunden Topotecaninkubation wurde eine erhebliche Akkumulation der Zellen in der späten S- und G2-Phase sichtbar (Abb. 4.6, untere Zeile). Mit zunehmender Inkubationsdauer wurde der Anteil der G2-Phase-Zellen immer größer, bis schließlich nach vierundzwanzigständiger Inkubationsdauer fast alle eingesetzten Zellen in der G2-Phase arretiert waren. Das bedeutet, dass in *irs1*-Zellen die S-Phase

Resultate

ohne wesentliche Verzögerung durchlaufen konnten, dann aber alle Zellen in G2 blockiert waren.

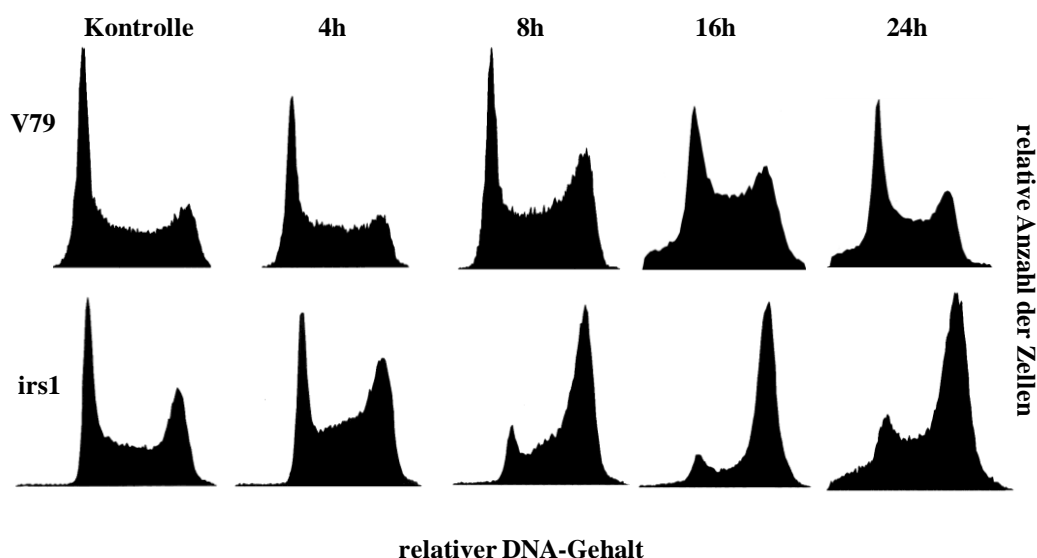


Abb. 4.6: Zellzyklus-Effekte der Topotecaninkubation in V79- und irs1-Zellen: Exponentiell wachsende Zellen wurden mit 0,05 μ M Topotecan inkubiert. Nach unterschiedlicher Zeitdauer wurden die Zellen fixiert und anschließend ihre DNA mit Propidium-Iodid angefärbt. Die Histogramme zeigen die Verteilung des zellulären DNA-Gehaltes, der eine Zuordnung zu den einzelnen Zellzyklusphasen erlaubt (vergl. Abb. 3.2). Die quantitative Auswertung ist in Tab. 4.1 dargestellt.

(%)	V79			irs1		
Zellzyklusphase	G1	S	G2	G1	S	G2
Kontrolle	37,5	46,6	15,9	36,8	31,4	31,8
4h	41,5	39,6	18,9	26,2	35,8	38
8h	29,8	40,4	29,8	10,9	24,4	64,7
16h	25,7	47,9	26,3	9,2	10,5	80,3
24h	30,2	50,6	19,2	16,8	17,8	65,4

Tab. 4.1: Zellzyklusverteilung (%) der V79- und irs1-Zellen nach Inkubation mit 0,05 μ M Topotecan für 0, 4, 8, 16 und 24 Stunden, zu Abbildung 4.6.

4.4.2. Einfluss der Topotecankonzentrationen auf den Zellzyklus

In Abbildung 4.7 ist die Zellzyklusverteilung nach vierstündiger Inkubation mit aufsteigenden Topotecankonzentrationen und in Tabelle 4.2 der entsprechende Anteil der Zellen in den einzelnen Phasen dargestellt.

Resultate

Die niedrigeren Topotecankonzentrationen haben keinen Einfluss auf die Verteilung der V79-Zellen. Lediglich bei einer Konzentration von $0,2\mu\text{M}$ Topotecan reicherten sich Zellen am G1-S-Phase-Übergang an (Abb. 4.7, obere Zeile). Irs1-Zellen dagegen akkumulierten, wie auch schon zuvor nach $0,05\mu\text{M}$ sichtbar (vergl. Abb. 4.7), in der S-Phase. Bei niedrigen Konzentrationen akkumulierten die Zellen in der späten S-Phase, mit steigender Schadenslast verschob sich der Schwerpunkt kontinuierlich in die frühe S-Phase. Nach den hohen Topotecankonzentrationen wurde folglich in beiden Zelllinien in ähnlicher Weise die S-Phase bereits zu frühen Zeitpunkten blockiert.

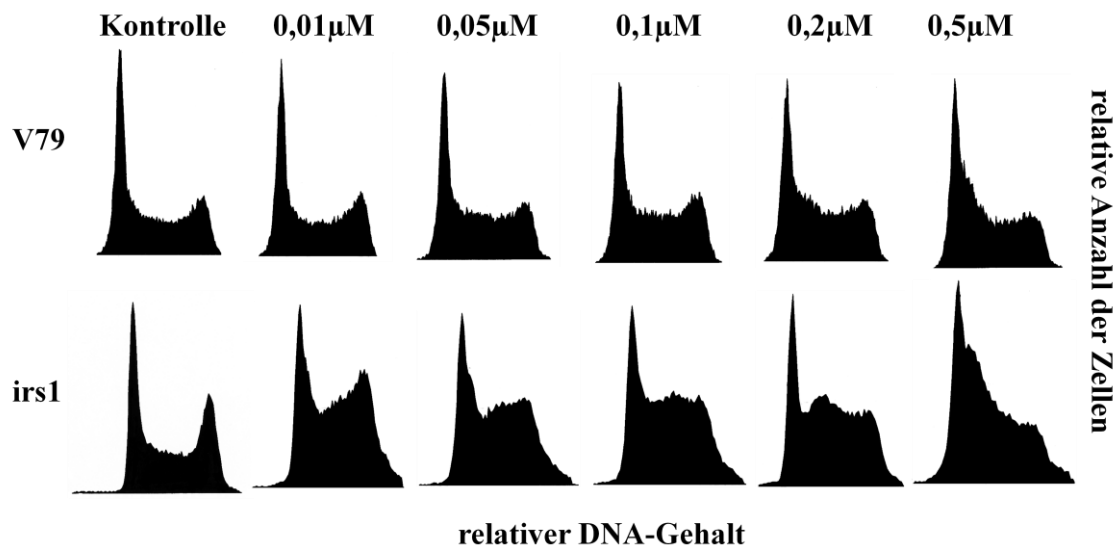


Abb.4.7: Zellzykluseffekte der Topotecaninkubation in V79- und irs1-Zellen: Exponentiell wachsende Zellen wurden für jeweils Vier Stunden mit $0,01\mu\text{M}$, $0,05\mu\text{M}$, $0,1\mu\text{M}$, $0,2\mu\text{M}$ und $0,5\mu\text{M}$ Topotecan inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert und ihre DNA mit Propidium-Iodid angefärbt. Mittels Flusszytometrie konnten die Zellen über ihren DNA-Gehalt einer Zellzyklus-Phase zugeordnet werden. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen im exponentiellen Wachstum verwendet.

Resultate

(%)	V79			irs1		
Zellzyklusphase	G1	S	G2	G1	S	G2
Kontrolle	37,5	46,6	15,9	36,8	31,4	31,8
0,01 μ M	45,3	33,6	21,1	26,5	46,2	27,3
0,05 μ M	41,5	39,6	18,9	34,3	60,9	4,9
0,1 μ M	40,9	38,5	20,6	29,9	65,3	4,8
0,2 μ M	41,7	40,5	17,8	25,8	74,2	10
0,5 μ M	38,4	47,2	14,4	32	60	8

Tab. 4.2: Zellzyklusverteilung (%) der V79- und irs1-Zellen nach Inkubation mit 0,01 μ M, 0,05 μ M, 0,1 μ M, 0,2 μ M und 0,5 μ M Topotecan für jeweils 4 Stunden, zu Abbildung 4.7.

Beiden Zellen ist jedoch gemeinsam, dass die Akkumulation innerhalb der S-Phase auftritt. In allen Histogrammen zeigt sich ein signifikanter Anteil der Zellen in G1. Das Beobachtungsintervall von vier Stunden war nicht ausreichend um den Übertritt in die S-Phase vollständig erfassen zu können

Um zu überprüfen, ob Topotecan nicht nur den Progress innerhalb der S-Phase, sondern auch den Beginn der Synthese-Phase blockiert, wurden die Messungen deshalb nach 8 Stunden wiederholt (Abb. 4.8, Tab. 4.3). Wiederum zeigte sich die konzentrationsabhängige S-Phasen-Akkumulation in V79-Zellen (Abb. 4.8) deutlicher, mit einer ähnlichen Verschiebung von später zu früher Blockierung wie zuvor (vergl. Abb. 4.7, obere Zeile). Selbst nach den höchsten Konzentrationen waren alle Zellen in die S-Phase eingetreten und hatten mit der DNA-Synthese begonnen, was bedeutet, dass Topotecan nicht die Initiation der Replikation inhibiert. Prinzipiell zeigt sich ein ähnliches Bild für die irs1-Zellen (Abb. 4.8, untere Zeile). Auch diese Zellen hatten alle nach acht Stunden die G1-Phase verlassen und waren in der S-Phase akkumuliert, konnten aber wiederum viel besser die S-Phase durchschreiten und erreichten in größerer Anzahl die späte S- und G2-Phase als die V79-Zellen. In beiden Zelllinien nach der Inkubation mit niedrigen Topotekankonzentrationen noch G1-Phase-Zellen vorhanden. Dies beruht darauf, dass bei geringer DNA-Schädigung Zellen noch aus der G2-Phase in die G1-Phase übertreten können, was nach schwerer DNA-Schädigung und bei ausgeprägtem G2-Block nicht mehr möglich ist.

Resultate

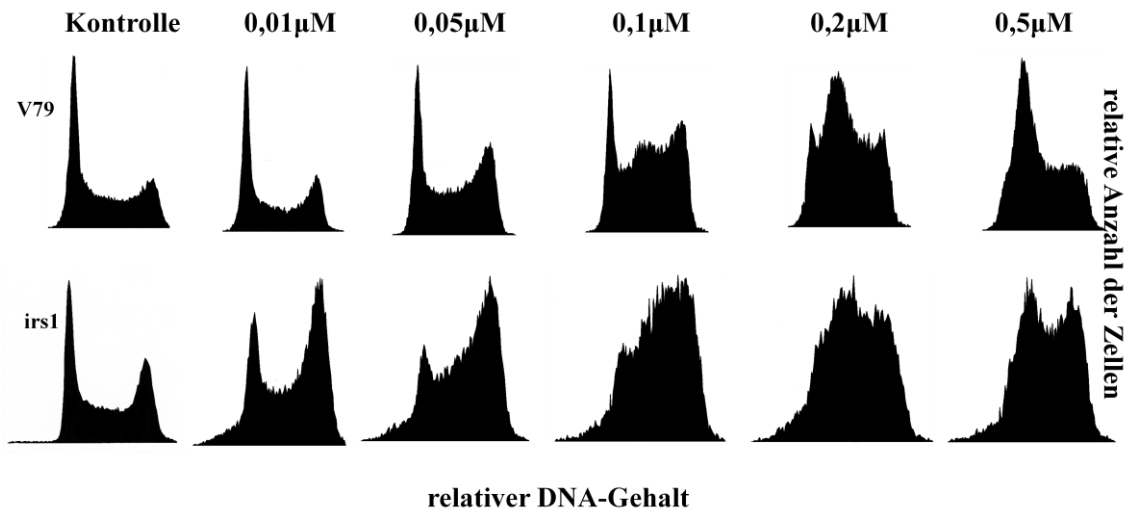


Abb. 4.8: Zellzykluseffekte der Topotecaninkubation in V79- und irs1-Zellen. Exponentiell wachsende Zellen wurden für jeweils acht Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Topotecan inkubiert. Danach wurden die Zellen fixiert und ihre DNA mit Propidium-Iodid angefärbt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen im exponentiellen Wachstum verwendet.

(%)	V79			irs1		
Zellzyklusphase	G1	S	G2	G1	S	G2
Kontrolle	37,5	46,6	15,9	36,8	31,4	31,8
0,01µM	42,3	33,6	24,1	25	31,5	43,5
0,05µM	29,8	40,4	29,8	17,4	34,4	48,2
0,1µM	20,5	55,1	24,4	0	72,1	27,9
0,2µM	12,2	72,5	15,3	0	81,8	18,2
0,5µM	12,6	77,8	9,6	0	100	0

Tab. 4.3: Zellzyklusverteilung (%) der V79- und irs1-Zellen nach Inkubation mit 0,01µM, 0,05µM, 0,1µM, 0,2µM und 0,5µM Topotecan für jeweils 8 Stunden, zu Abbildung 4.8.

4.5. Einfluss von Topotecan auf die Replikationsaktivität

Die durchgeführten Zellzyklusmessungen sind Momentaufnahmen von Zellen. Man kann daher nie sagen, ob Zellen im S-Phase Kompartiment dort arretiert sind oder noch replizieren. Die Messung des BrdU-Einbaus in die DNA der Zellen sollte Aufschluss

Resultate

darüber geben, ob Zellen ihre DNA-Synthese vollständig eingestellt hatten oder weiterhin ein Progress im Zellzyklus stattfand.

Die Zelllinien wurden für acht Stunden mit Topotecan inkubiert. Eine halbe Stunde vor der Fixierung wurde BrdU zu den Zellen gegeben, welches in diesem Zeitraum von den Zellen in die DNA integriert werden konnte.

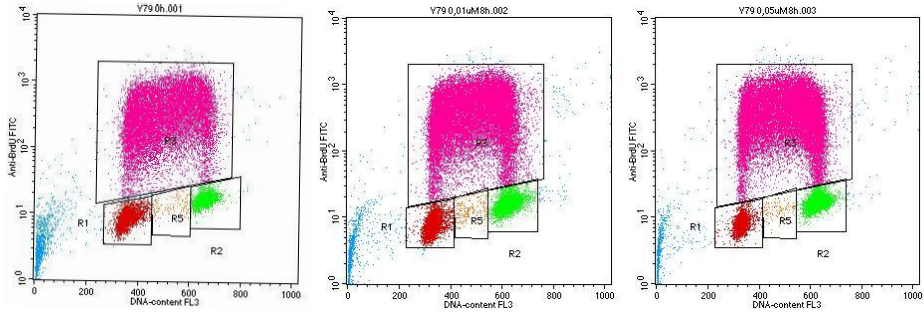
Die V79-Zellen zeigten mit zunehmender Topotecankonzentration eine Reduktion des BrdU-Einbaus in der frühen S-Phase und damit eine Reduktion der Replikationsaktivität. Zu einer vollständigen Einstellung der Replikation kam es allerdings nicht. Ab einer Topotecankonzentration von 0,1 μM wurde die Elongation in den V79-Zellen messbar gestört indem sich die Menge des eingebauten BrdU pro Zelle vor allem in der späten S-Phase mit zunehmender Topotecankonzentration um fast eine Zehnerpotenz verringerte. Obwohl die Mehrheit der Zellen aktiv replizieren, fehlt nach den hohen Topotecankonzentrationen der kleine Anteil von Zellen die direkt am G1/S Übergang die Replikation beginnen (Aufsteigender Schenkel des „BrdU-Hufeisens“), so dass eine partielle Störung der Initiation zu vermuten ist.

Bei den *irs1*-Zellen war keine Beeinträchtigung der Replikationsinitiation erkennbar. Unabhängig von der eingesetzten Topotecankonzentration blieb der BrdU-Einbau in der frühen S-Phase immer gleich. Eine zunehmende Reduktion des BrdU-Einbaus mit steigender Topotecankonzentration vor allem in der späten S-Phase lässt aber auf eine starke Hemmung der Replikationselongation durch Topotecan schließen.

Es konnte also beobachtet werden, dass die Zelllinien eine signifikant unterschiedliche Replikationsaktivität unter Topotecaneinfluss haben. Das kann entweder bedeuten, dass die XRCC2-abhängige Reparatur Einfluss auf den Fortgang der Replikation hat oder dass, XRCC2 direkt an der Regulation der S-Phase beteiligt ist.

Resultate

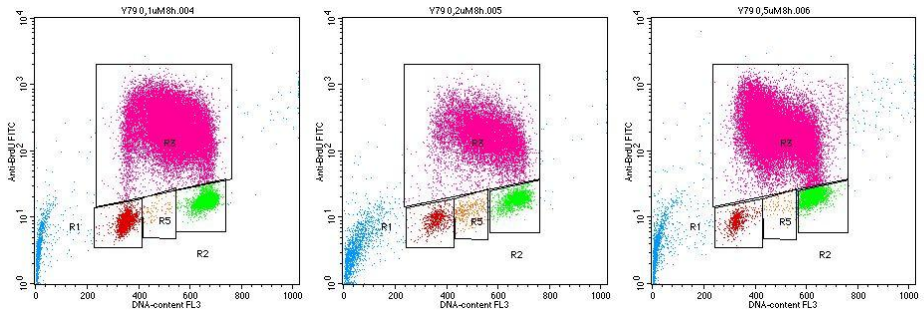
V79



Kontrolle

0,01µM

0,05µM

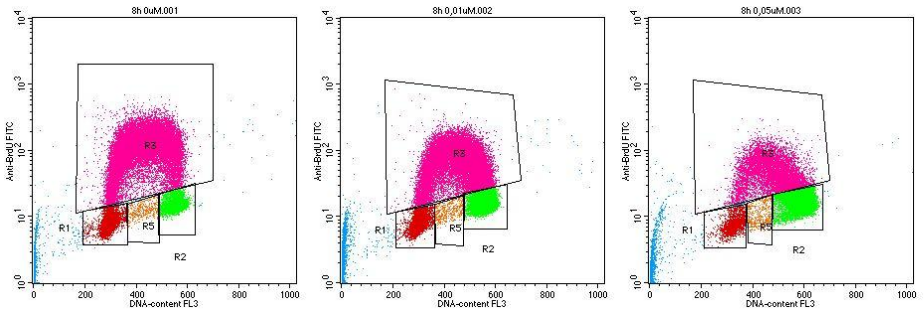


0,1µM

0,2µM

0,5µM

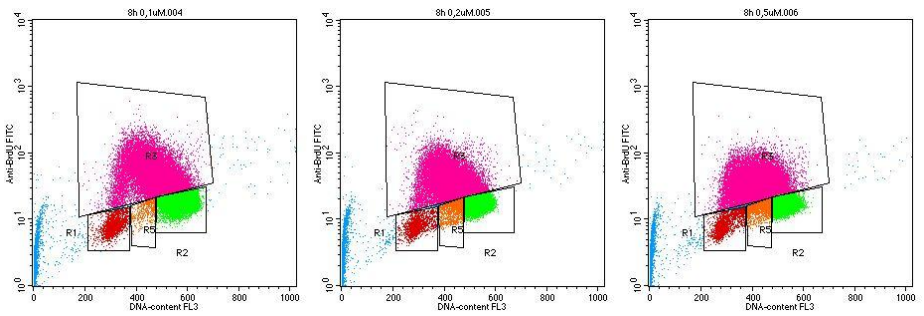
irs1



Kontrolle

0,01µM

0,05µM



0,1µM

0,2µM

0,5µM

Abb 4.9: BrdU-Einbau in die DNA exponentiell wachsender Zelllinien bei achtstündiger Inkubation mit steigenden Topotecankonzentrationen.

4.6. Aktivierung von Zellzykluscheckpoints

Es sollte deshalb untersucht werden, ob XRCC2 eine Bedeutung für die Intra-S-Checkpoint-Aktivierung hat. Topotecaninduzierte Doppelstrangbrüche entstehen durch die Kollision einer Replikationsgabel mit einem durch Topotecan fixierten cleavable complex. Die Zellzyklusmessungen haben gezeigt, dass irs1-Zellen zu einem vollständigen G2-Arrest fähig sind, aber vorher die frühe S-Phase scheinbar ungehindert passieren. Es wurde mit Hilfe von Immunoblots untersucht, ob Topotecan zu einer Aktivierung von Chk1 und Degradation von Cdc25A führt, den maßgeblichen Signalen für den S-Phase-Checkpoint. Die Zellen wurden für 0, 4, 8, 16 und 24 Stunden mit 1µM Topotecan inkubiert, die Proteine isoliert und semiquantitativ im Western Blot nachgewiesen.

Wie in Abb. 4.10 zu erkennen ist, konnte trotz hoher Topotecankonzentration und langer Inkubationszeit in beiden Zelllinien keine Phosphorylierung von Chk1 in Form einer Doppelbande nachgewiesen werden. Die typische ATR-abhängige Phosphorylierung von Chk1 war somit in beiden Zelllinien nicht nachweisbar. Trotzdem erfolgte in beiden Zelllinien eine Phosphorylierung von Cdc25a, zu erkennen einerseits an der verstärkten Doppelbande und der Abnahme des Signals des nativen Proteins, was einer zusätzlichen Degradation entsprechen könnte. Allerdings treten diese Reaktionen nicht parallel zur S-Phase Inhibition auf sondern erst nach 16 bis 24 Stunden. Es ist deshalb möglich, dass Cdc25A über Chk2 im Rahmen des G2-Arrestes reguliert wurde. Diese Annahme wird gestützt durch die Chk2 Doppelbande als Zeichen der Phosphorylierung, die ebenfalls ihr Maximum nach 16- bis 24-stündiger Inkubation zeigt. Sowohl die Chk1 wie auch die Chk2 Reaktion war in beiden Zelllinien weitgehend gleich, so dass kein Effekt von XRCC2 auf die Checkpoint-Aktivierung nachgewiesen werden konnte.

Resultate

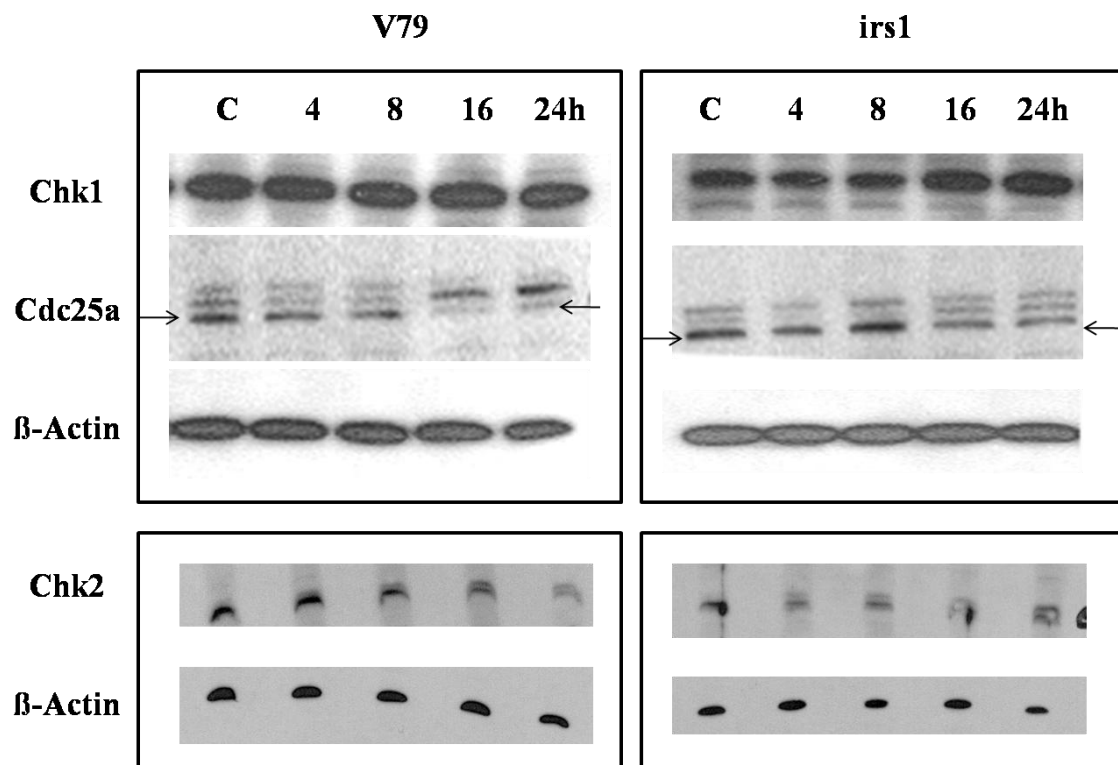


Abb. 4.10: Western Blot von Chk1, Chk2, cdc25a und β -Actin nach Inkubation der Zelllinien mit $1\mu\text{M}$ Topotecan.

5. Diskussion

5.1. XRCC2-defiziente Zellen zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Topotecan

In dieser Arbeit konnte an einem Paar isogenetischer Hamsterzelllinien, die sich ausschließlich in der Expression des Proteins XRCC2 unterscheiden, gezeigt werden, dass die XRCC2-defizienten Zellen gegenüber Topotecan eine zehnfach erhöhte Sensitivität haben. Die Sensitivität dieser Zellen gegenüber ionisierender Strahlung ist dagegen nur zweifach erhöht (Jones et al. 1987). Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte in der Struktur der jeweils generierten Doppelstrangbrüche liegen. Während ionisierende Strahlung den Doppelstrang durchtrennt verursacht Topotecan nur replikationsabhängig DNA-Doppelstrangbrüche. Die ersteren haben regelmäßig zwei Bruchenden und können wie beschrieben in jedem Fall über Nicht-homologes Endjoining miteinander verknüpft werden. Die Kollision der Replikationsgabel mit dem Topotecan-Schaden hinterlässt jedoch ein einzelnes doppelsträngiges Ende (Abb. 3.1), dass zwingend über Homologe Rekombination repariert werden muss. Deshalb wirkt sich der XRCC2-Defekt in diesem Fall viel stärker aus.

In vorangegangenen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass das Protein XRCC2 an der homologen Rekombination von enzymatisch erzeugten Doppelstrangbrüchen beteiligt ist (Johnson et al. 1999). Daneben zeigten bestrahlte XRCC2-defiziente Zellen eine verminderte RAD51-Foci-Bildung, was immer als Hinweis auf mangelhafte oder fehlende Homologe Rekombination gewertet wird (O'Regan et al. 2001, Liu 2002, Liu und Lim 2005). Zusammen zeigen diese Resultate, dass die Sensitivität von XRCC2-defizienten Zellen auf einem Defekt in der Homologen Rekombination von Doppelstrangbrüchen beruhen.

5.2. XRCC2 ist an der Reparatur topotecaninduzierter Doppelstranbrüche beteiligt

Die hier vorgelegten Ergebnisse belegen nun erstmalig, dass XRCC2 auch an der Homologen Rekombinationsreparatur von topotecaninduzierten Doppelstrangbrüchen ist.

V79-Zellen sind in der Lage topotecaninduzierte Doppelstrangbrüche innerhalb von 24 Stunden vollständig zu reparieren. Im Gegensatz dazu reparierten die XRCC2-defizienten irs1-Zellen im selben Zeitraum nur etwa 50% der topotecaninduzierten

Diskussion

Doppelstrangbrüche. Damit können wir jedoch auch erstmalig zeigen, dass die Hälfte der Doppelstrangbrüche nicht auf XRCC2 zu ihrer Reparatur angewiesen ist.

Diese neuartige Beobachtung könnte auf verschiedene Weise erklärt werden: 1) Es gibt Subtypen der Homologen Rekombination, die unabhängig von XRCC2 funktionieren. Darüber gibt es bisher keine Erkenntnisse. 2) Die Funktion von XRCC2 kann zumindest teilweise durch andere Reparaturproteine ersetzt werden. Es erscheint möglich, dass die Vielzahl der Rad51-Paraloge eine gewisse Redundanz darstellen und sich wechselseitig ersetzen können (Yonetani et al. 2005). 3) Es existieren andere Reparaturwege, die den „cleavable complex“ entfernen, bevor Doppelstrangbrüche entstehen können. Topotecan und die damit kovalent gebundene Topoisomerase I kann über das Enzym Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase I (TdpI) aus der DNA entfernt werden. Es ist also vorstellbar, dass eine blockierte Replikationsgabel sich ein Stück weit „zurückzieht“ (fork regression) unter Ausbildung einer sogenannten *chicken-foot* Struktur (Abb. 5.1). Der Topotecanschaden wird entfernt, die Einzelstranglücke geschlossen und im Anschluss die Replikation an derselben Stelle fortgesetzt (Pommier et al. 2006).

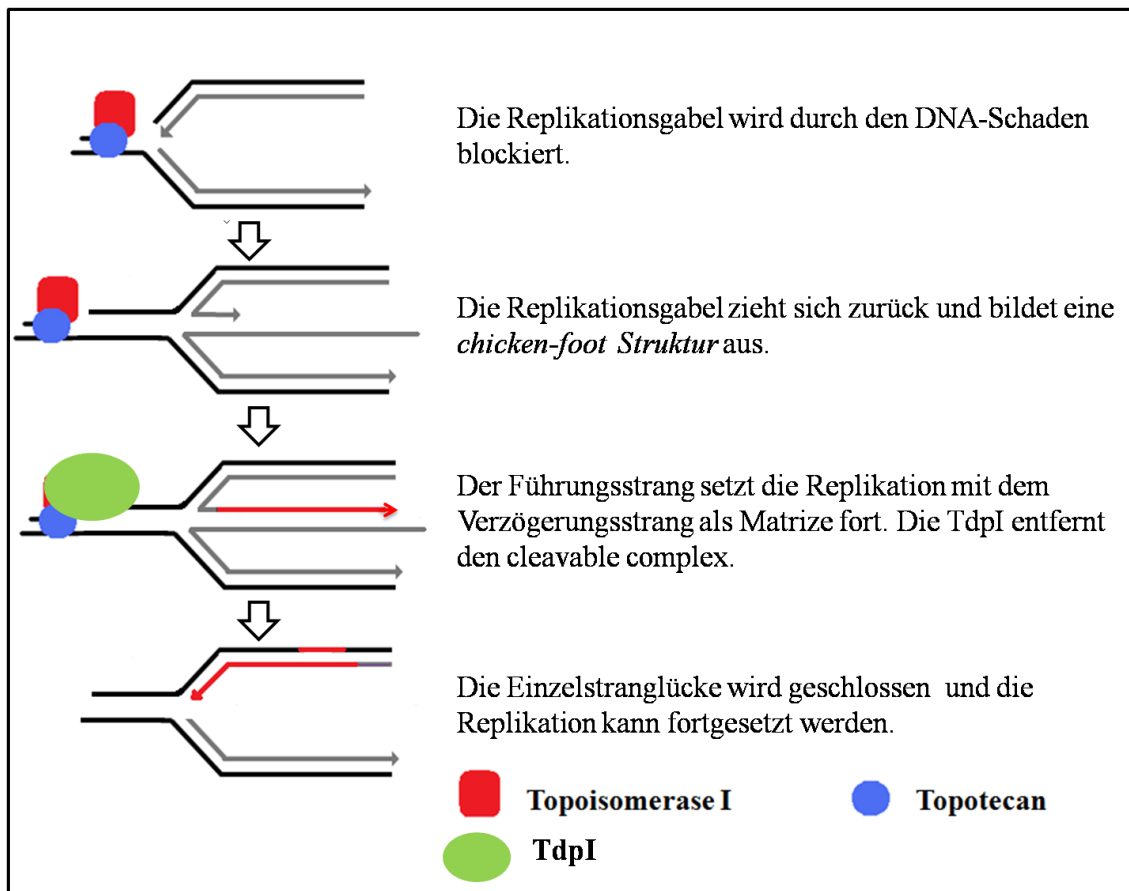


Abb. 5.1: Reparatur des Topotecanschadens mittels Tyrosyl-DNA-Phosphodiesterase I

4) Ohne XRCC2 wird die Homologe Rekombination nur verzögert aber nicht vollständig unterdrückt. Es wird diskutiert, ob XRCC2 am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der homologen Rekombination beteiligt ist, der Bildung der Rad51-Nucleoproteinfilamente (Liu N. 2002, O'Regan et al., 2001). Dabei führt der Verlust von XRCC2 in einer Zelle zur Verzögerung der Initiation der Homologen Rekombination, da sich die Bindung von Rad51 an den Doppelstrangbruch ohne das Mitwirken von XRCC2 langsamer ausbildet. Ist diese aber einmal erfolgt, kann die Reparatur auch ohne XRCC2 normal ablaufen. So ist es theoretisch denkbar, dass längere Beobachtungszeiten über 24 Stunden hinaus sogar in *irs1*-Zellen eine vollständige Reparatur gezeigt hätten. Die geringe Abnahme der Doppelstrangbrüche zwischen 6 und 24 Stunden (Abb. 4.5) macht allerdings eine effiziente Reparatur in der Folgezeit in den *irs1*-Zellen sehr unwahrscheinlich.

5.3. XRCC2 beeinflusst die Replikationsaktivität topotecangeschädigter Zellen

Die Untersuchung des BrdU-Einbaus der Zellen hat gezeigt, dass sich der Verlust von XRCC2 auf das Replikationsverhalten von Zellen nach Topotecaninkubation auswirkt.

Wir konnten zeigen, dass beide Zelllinien in die S-Phase eintreten und dort akkumulieren. Es erfolgte also eine Verzögerung der Replikationselongation. Eine vollständige Arretierung der Zellen während der S-Phase erfolgte allerdings nicht, da weiterhin BrdU eingebaut wurde und viele Zellen die G2-Phase erreichten. Bei dieser S-Phase-Verzögerung kann es sich um einen rein mechanisch-strukturellen Effekt handeln, der die Replikation hindert, zeitgerecht abzulaufen. Dabei wird kein Checkpoint aktiviert. Vielmehr führen die zahlreichen Topotecan-Topoisomerase I – Komplexe zu einer sterischen Blockierung der Replikationsgabeln und somit zu einem Abbruch der Elongation. Mit Steigerung der Topotecankonzentration werden immer mehr Replikationsgabeln frühzeitig blockiert und die Arretierung verschiebt sich in Richtung der frühen S-Phase. Dieser Effekt ist in beiden Zelllinien zu beobachten.

In den V79-Zellen wird zusätzlich die Replikationsinitiation in der frühen S-Phase gehemmt, was bei den *irs1*-Zellen überhaupt nicht zu beobachten ist. Möglicherweise ist bei den V79-Zellen an dieser Stelle ein Checkpoint aktiv, der ohne XRCC2 nicht wirksam werden kann. Der genaue Mechanismus, der zur Auslösung dieses Checkpoints führt ist letztendlich unklar.

Diskussion

Obwohl mehr DNA-Schäden entstehen durchlaufen die *irs1*-Zellen die S-Phase schneller als die V79-Zellen. Ein Erklärungsmodell ist folgendes: Neben aktiven „origins of replication“ existieren dazwischen eine Reihe potentieller origins, die normalerweise nicht „feuern“, da die Replikationsmaschienerie über sie hinweg läuft („dormant origins“). Normalerweise sind diese zu blockierten Replikationsgabeln benachbarte Origins nicht aktiv (Santocanale et al. 1999). Es ist möglich, dass XRCC2 an der Hemmung dieser „schlafenden“ Origins beteiligt ist und deshalb die Replikation verzögert. In XRCC2-defizienten Zellen fällt diese Hemmung weg, die „dormant origins“ feuern und führen trotz bereits vorhandener DNA-Schäden zur Vollständigen Replikation des Genoms, (Abb. 5.2).

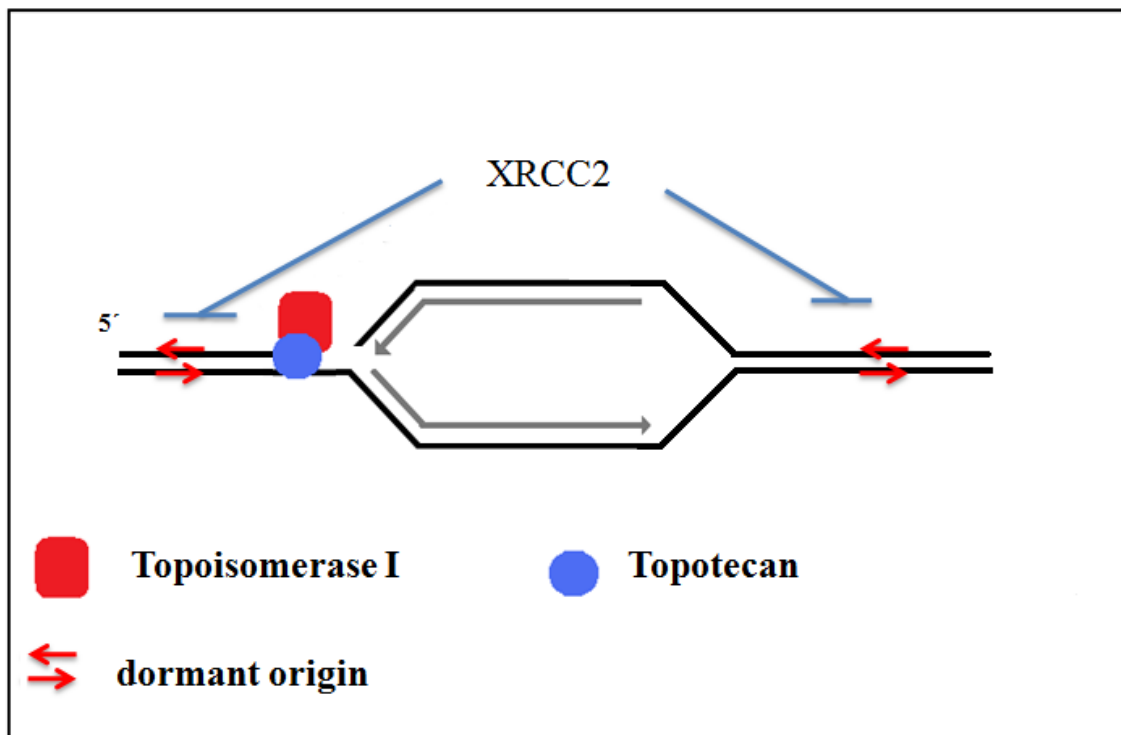


Abb. 5.2: Die Hemmung „schlafender“ Origins durch blockierte Replikationsgabeln ist vermutlich XRCC2-vermittelt.

Es kann also zusammengefasst werden, dass XRCC2-abhängige Mechanismen existieren, die beim Auftreten von topotecaninduzierten Doppelstrangbrüchen, die Replikationsinitiation hemmen, um eine fehlerhafte DNA-Replikation zu verhindern. Gleichzeitig gibt es auch eine XRCC2-unabhängige Blockierung der Elongation, vermutlich ausschließlich durch mechanische Blockierung der Replikationsgabeln.

5.5. Es existieren XRCC2-abhängige Checkpoints

Es konnte mit Hilfe der Messung des BrdU-Einbaus festgestellt werden, dass es in den V79-Zellen nicht aber in den *irs1*-Zellen nach Topotecaninkubation zu einer Zellzyklusverzögerung in der frühen S-Phase kommt. Die Frage, ob es sich dabei um eine rein passive sterische Blockierung anstelle eines aktiven Checkpoints handelt kann durch die Messung der DNA-Doppelstrangbrüche beantwortet werden. Die γ H2AX-Versuche haben uns gezeigt, dass in XRCC2-defizienten Zellen zu allen Zeiten wesentlich mehr DNA-Doppelstrangbrüche vorhanden waren als in V79-Zellen; diese aber den deutlicheren Replikationsblock aufwiesen. Das bedeutet, dass die frühe S-Phase-Zellzyklusverzögerung in den V79-Zellen kein passiver Effekt ist sondern auf einer aktiven Checkpointaktivierung beruht. Wie oben beschrieben, kommt dagegen die Elongationshemmung die in beiden Zellen gefunden wurde auf Grund der großen Zahl nicht reparierter Doppelstrangbrüche zustande.

Die intra-S Checkpointaktivierung erfolgt typischerweise über Chk1 (Bartek et al. 2004), die hier trotz des Einsatzes hoher Topotecankonzentrationen nicht in *irs1* aber auch nicht in V79-Zellen gefunden wurde. Passend dazu lies sich auch keine frühe Degradierung von Cdc25A nachweisen. Allerdings lässt ein Zeitvergleich der späten Cdc25A-Degradierung (nach 16 Stunden) mit der Chk2-Phosphorylierung vermuten, dass die Chk2-Aktivierung im Zuge des G2-Arrestes für den Cdc25A-Abbau verantwortlich ist.

Das Ausbleiben der Phosphorylierung von Chk1 in der frühen S-Phase muss also auf einem bisher unbekanntem Defekt zurück zu führen sein, der in den beiden Zelllinien gleichermaßen vorliegt. Aufgrund dieses Defektes ist es derzeit nicht möglich, sicher zu beurteilen, ob XRCC2 einen Einfluss auf den intra-S-Phase-Checkpoint hat. Zur Klärung dieses Punktes sind nicht zuletzt Antikörper nötig, die zuverlässig phosphoryliertes Hamster-Chk1, Chk2 und Cdc25A detektieren. Derartige Antikörper sind kommerziell nicht erhältlich.

5.6. Krebstherapie und DNA-Reparatur

Viele Krebszellen weisen Defekte in der Reparatur von DNA-Schäden oder der damit verbundenen Signaltransduktion auf. Diese Defekte stehen häufig mit dem onkogenen Potential in direktem Zusammenhang (Bartkova et al. 2005 und 2006). Gleichzeitig sind

Diskussion

diese Defekte auch die Schwachstelle der Zelle. Abhängig von der Art des Defektes in der DNA-Reparatur sind sie gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika oder Bestrahlung besonders empfindlich. Ein besonders klares Beispiel findet sich in Tumoren mit einem Defekt in der Homologen Rekombination, vor allem im Rahmen einer Mutation in BRCA1 oder BRCA2, die in höchstem Maße besonders sensibel gegenüber PARP-Inhibitoren sind (Bryant und Helleday, Martin et al. 2008). In dem Fall wird die Homologe Rekombination benötigt, um Basenschäden, die mit der Replikationsgabel kollidieren über Homologe Rekombination zu reparieren. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie ist es analog zu erwarten, dass alle Krebszellen mit einem Defekt in der Homologen Rekombination auch sensitiv gegenüber Topotecan sind und damit Topotecan ein gut wirksames, selektives Therapeutikum für diese ausgewählte Gruppe von Tumoren ist. Topotecan könnte in dem Fall aus der Reihe der second-line Therapeutika in die Primärindikation befördert werden.

6. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Dissertation war es die Rolle des Reparaturgens XRCC2 für die homologe Rekombination und für die Zellzyklusregulation nach Behandlung mit Topotecan zu untersuchen.

Bei Topotecan handelt es sich um ein Chemotherapeutikum, das replikationsabhängig DNA-Doppelstrangbrüche verursacht. Da diese DNA-Doppelstrangbrüche in erster Linie mittels Homologer Rekombination repariert werden, ist Topotecan zur Untersuchung dieses Reparaturweges besonders geeignet.

XRCC2 ist eines von 5 Paralogen des zentralen Reparaturproteins Rad51 und an der Homologen Rekombination beteiligt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die XRCC2-defizienten *irs1*-Zellen etwa 10-fach sensibler gegenüber Topotecan sind als die parentalen V79 Zellen. Es wurde mittels γ H2AX-Foci gezeigt, dass die erhöhte Empfindlichkeit der XRCC2-defizienten Zellen gegenüber Topotecan auf einer mangelhaften Homologen Rekombination beruht. Während bei den V79-Zellen innerhalb von 24 Stunden eine vollständige Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche statt fand. Im gleichen Zeitraum wurden von den XRCC2-defizienten Zellen nur etwa 60% der DNA-Doppelstrangbrüche repariert. Es kann also gefolgert werden, dass ein Defekt im XRCC2-Gen einen Defekt in der Reparatur von topotecaninduzierten Doppelstrangbrüchen zur Folge hat. Die stark erhöhte Sensibilität kann zusätzlich auch darauf beruhen, dass Topotecan in beiden Zelllinien unterschiedlich mit dem Zellzyklus interferiert. Deshalb wurde die Zellzyklusprogression der Zellen untersucht.

Bei geringen Topotecankonzentrationen blieb die Zellzyklusverteilung von V79 relativ unbeeinflusst während *irs1* früh eine Zunahme von G2-Phase-Zellen zeigte, was einerseits auf einen abgeschwächten intra-S-Phase-Block andererseits auf eine hohe Schadensdichte in den XRCC2-defizienten Zellen hinweist. Um zu testen, ob die Zellzyklusprogression in *irs1*-Zellen unabhängig von XRCC2 grundsätzlich hemmbar ist, wurden höhere Konzentrationen von Topotecan eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass ab Konzentrationen von 0.05 μ M Topotecan die Progression in die G2 Phase gehemmt ist, die Zahl der S-Phase Zellen kontinuierlich zunimmt. Mit steigender Konzentration erfolgte die Arretierung immer früher in der S-Phase wobei die G1-Phase Zellen in jedem Fall abnahmen. Das bedeutet, dass alle Zellen die Replikation initiieren können und lediglich die Elongation nach hoher Schadensdichte inhibiert wird. In den

Zusammenfassung

XRCC2-profizienten V79 Zellen dagegen blieb konstant ein Anteil von Zellen in G1- oder früher S-Phase erhalten. Allerdings zeigten Zellen die die Replikation initiieren konnten nach höheren Topotecankonzentrationen ähnlich wie die *irs1* Zellen einen Block der Elongation. Zusammenfassend ergibt sich bezogen auf die Zellzyklusregulation nach Topotecan ein bimodales Modell, demzufolge, abhängig von XRCC2, die Initiation der Replikation gehemmt wird. Zusätzlich wird nach hoher Schadensdichte, unabhängig von XRCC2, die Elongation unterbrochen. Der Vergleich von Reparaturkapazität und Zellzyklusregulation zeigt, dass vermutlich nicht nur die Reparaturfähigkeit sondern auch die Fähigkeit, einen stringenten S-Phase-Block auszulösen die Resistenz gegenüber Topotecan bestimmt. Beide Parameter könnten einen differenziellen Effekt von Topotecan auf Tumor- und Normalzellen begründen.

7. Literaturverzeichnis

- Abraham R.T. (2001),
Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases, *Genes and Development* 15: 2177-2196
- Albala J.S., Thelen M.P., Prange C., Fan W., Christensen M., Thompson L.H., Lennon G.G. (1997),
Identification of a novel human RAD51 homolog, RAD51B, *Genomics* 46: 476-479
- Arnaudeau C., Lundin C., Helleday T. (2001),
DNA Double-strand Breaks Associated with Replication Forks are Predominantly Repaired by Homologous Recombination Involving an Exchange Mechanism in Mammalian Cells, *Journal of Molecular Biology* 307: 1235-1245
- Bartek J., Lukas J. (2003),
Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer, *Cancer Cell* 3: 421-429
- Bartek J., Lukas C., Lukas J. (2004),
Checking on DNA Damage in S-Phase, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5: 792-803
- Bartkova J., Hořejši Z., Koed K., Krämer A., Tort F., Zieger K., Guldborg P., Sehested M., Nesland J.M., Lukas C., Ørntoft T., Lukas J., Bartek J. (2005).
DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis, *Nature* 434: 864-870
- Bartkova J., Rezaei N., Liontos M., Karakaidos P., Kletsas D., Issaeva N., Vassiliou L.-V.F., Kolettas E., Niforou K., Zoumpourlis V.C., Takaoka M., Nakagawa H., Tort F., Fugger K., Johansson F., Sehested M., Andersen C.L., Dyrskjot L., Ørntoft T., Lukas J., Kittas C., Helleday T., Halazonetis T.D., Bartek J., Gorgoulis V.G. (2006),
Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA-damage checkpoints, *Nature* 444: 633-637
- Baumann P., West S.C. (1998),
Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair, *Trends in Biochemical Sciences* 23: 247-251
- Benhamou S., Tuimala J., Bouchardy C, Dayer P., Sarasin A., Hirvonen A. (2004),
DNA repair gene XRCC2 and XRCC3 polymorphisms and susceptibility to cancers of the upper aerodigestive tract, *International Journal of Cancer* 112: 901-904
- Benson F.E., Stasiak A., West S.C. (1994),
Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of E. coli RecA, *The EMBO Journal* 13(23): 5764-5771

Literaturverzeichnis

- Bryant H.E., Helleday T. (2006),
Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase activat ATM which is required for subsequent homologous recombination repair, *Nucleic Acids Research* 34(6): 1685-1691
- Cartwright R., Tambini C.E., Simpson P.J., Thacker J. (1998),
The XRCC2 DNA repair gene from human and mouse encodes a novel member of the recA/RAD51 family, *Nucleic Acids Research* 26(13): 3084-3089
- Donaldson A.D., Blow J.J. (1999),
The regulation of replication origin activation, *Current Opinion in Genetics & Development* 9: 62-68
- Dosanjh M.K., Collins D.W., Fan W., Lennon G.G., Albala J.S., Shen Z., Schild D. (1998),
Isolation and characterization of RAD51C, a new human member of the RAD51 family of related genes, *Nucleic Acids Research* 26(5): 1179-1184
- Falck J., Mailand N., Syljuasen R.G., Bartek J., Lukas J. (2001),
The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis, *Nature* 410: 842-847
- Griffin C.S., Simpson P.J., Wilson C.R., Thacker J. (2000),
Mammalian recombination-repair genes XRCC2 and XRCC3 promote correct chromosome segregation, *Nature Cell Biology* 2, 757-761
- Haaf T., Golub E.I., Reddy G., Radding C.M., Ward D.C. (1995),
Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92: 2298-2302
- Haber J.E. (1999),
DNA recombination: the replication connection, *Trends in Biochemical Sciences* 24: 271-275
- Han J., Colditz G.A., Samson L.D., Hunter D.J. (2004),
Polymorphisms in DNA Double-Strand Break Repair Genes and Skin Cancer Risk, *Cancer Research* 64: 3009-3013
- Iliakis G., Wang Y., Guan J., Wang H. (2003),
DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation, *Oncogene* 22: 5834-5847
- Janning W., Knust E. (2004),
Genetik: Allgemeine Genetik, Molekulare Genetik, Entwicklungsgenetik, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Literaturverzeichnis

- Johnson R.D., Liu N., Jasin M. (1999),
Mammalian XRCC2 promotes the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination, *Nature* 401: 397 – 399
- Johnson R.D., Jasin M. (2000),
Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells, *EMBO Journal* 19: 3398-3407
- Jones N.J., Cox R., Thacker J. (1987),
Isolation and cross-sensitivity of X-ray-sensitive mutants of V79-4 hamster cell, *Mutation Research* 183: 279-286
- Kastan M.B. (2001),
Cell cycle. Checking two steps, *Nature* 410: 766-767
- Kowalczykowski S.C. (2000),
Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication, *Trends in Biochemical Sciences* 25: 156-165
- Kraus E., Leung W.-Y., Haber J.E. (2001),
Break-induced replication: a review and an example in budding yeast, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(15): 8255-8262
- Lin F.-L., Sperle K., Sternberg N. (1984),
Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process, *Molecular and Cellular Biology* 4(6): 1020-1034
- Liu N., Lamerdin J.E., Tebbs R.S., Schild D., Tucker J.D., Shen M.R., Brookman K.W., Siciliano M.J., Walter C.A., Fan W., Narayana L.S., Zhou Z.Q., Adamson A.W., Sorensen K.J., Chen D.J., Jones N.J., Thompson L.H. (1998),
XRCC2 and XRCC3, new human Rad51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages, *Molecular Cell* 1: 783-793
- Liu N. (2002)
XRCC2 is Required for the Formation of Rad51 Foci Induced by Ionizing Radiation and DNA Cross-Linking Agent Mitomycin C, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2: 106-113
- Liu N., Lim C.-S. (2005),
Differential Roles of XRCC2 in Homologous Recombinational Repair of Stalled Replication Forks, *Journal of Cellular Biochemistry* 95: 942-954

Literaturverzeichnis

- Liu Q., Guntuku S., Cui X.-S., Matsuoka S., Cortez D., Tamai K., Luo G., Carattini-Rivera S., DeMayo F., Bradley A., Donehower L.A., Elledge S.J. (2000),
Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G₂/M damage checkpoint, *Genes & Development* 14: 1448-1459
- Martin S.A., Lord C.J., Ashworth A. (2008),
DNA repair deficiency as a therapeutic target in cancer, *Current opinion in genetics and development* 18: 80-86
- Ogawa T., Yu X., Shinohara A., Egelman E.H. (1993),
Similarity of the yeast RAD51 filament to the bacterial RecA filament, *Science* 259(5103): 1896-1899
- O'Regan P., Wilson C, Townsend S., Thacker J. (2001),
XRCC2 is a nuclear RAD51-like protein required for damage-dependent RAD51 focus formation without the need for ATP binding, *The Journal of Biological Chemistry* 276(25): 22148-22153
- Pâques F., Haber J.E. (1999),
Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63(2): 349-404
- Paul T., Gellert M. (1998),
The 3' to 5' Exonuclease Activity of Mre11 Facilitates Repair of DNA Double-Strand Breaks, *Molecular Cell* 1: 969 - 979
- Pfeiffer P. (1998),
The mutagenic potential of DNA double-strand break repair, *Toxicology Letters* 96-97: 119-129
- Pfeiffer P., Goedecke W., Obe G. (2000),
Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations, *Mutagenesis* 15: 289-302
- Pittman D.L., Weinberg L.R., Schimenti J.C. (1998),
Identification, characterization, and genetic mapping of Rad51d, a new mouse and human RAD51/RecA-related gene, *Genomics* 49: 103-111
- Pommier Y. (2006),
Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond, *Nature Reviews Cancer* 6: 789-802
- Pommier Y., Barcelo J.M., Rao V.A., Sordet O., Jobson AG, Thibaut L., Miao Z.H., Seiler J.A., Zhang H., Marchand C., Agama K., Nitiss J.L., Redon C (2006),
Repair of topoisomerase I-mediated DNA damage, *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 81: 179-229

Literaturverzeichnis

- Raderschall E., Golub E.I., Haaf T. (1999),
Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions formed after DNA damage, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 1921-1926
- Rogakou E.P., Nieves-Neira W., Boon C., Pommier Y., Bonner W.M. (2000),
Initiation of DNA Fragmentation during Apoptosis Induces Phosphorylation of H2AX Histone at Serine 139, *The Journal of Biological Chemistry* 275(13): 9390-9395
- Roth D.B., Craig N.L. (1998),
VDJ recombination: a transposase goes to work, *Cell* 94: 411-414
- Santocanale C., Sharma K., Diffley J.F.X. (1999),
Activation of dormant origins of DNA replication in budding yeast, *Genes and Development* 13: 2360-2364
- Seniuk A. (2008),
Repair of DNA-double-strand breaks induced by the chemotherapeutic drug Topotecan in mamma carcinoma cells with genetic defects in the BRCA1 or BRCA2 genes, *Medizinischen Dissertation, Universität Hamburg*
- Shinohara A., Ogawa H., Matsuda Y., Ushio N., Ikeo K., Ogawa T. (1993),
Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to RAD51 and recA, *Nature Genetics* 4: 239-243
- Sørensen C.S., Hansen L.T., Dziegielewski J., Syljuåsen R.G., Lundin C., Bartek J., Helleday T. (2005),
The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair, *Nature Cell Biology* 7(2): 195-201
- Stauber M., Weyerstahl T. (2005),
Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Strumberg D., Pilon A. A., Smith M., Hickey R., Malkas L., Pommier Y. (2000),
Conversion of topoisomerase I cleavage complexes on the leading strand of ribosomal DNA into 5'-phosphorylated DNA double-strand breaks by replication runoff, *Molecular and Cellular Biology* 20: 3977-1978
- Sun H., Treco D., Schultes N.P., Szostak J.W. (1989),
Double-strand breaks at an initiation site for meiotic gene conversion, *Nature* 338: 87-90
- Sung P., Robberson D.L. (1995),
DNA strand exchange mediated by a RAD51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA, *Cell* 82: 453-461

Literaturverzeichnis

- Symington L.S. (2002),
Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair, *Microbiology and molecular biology reviews* 66(4): 630-70
- Szostak J.W., Orr-Weaver T.-L., Rothstein R., Stahl F.W. (1983),
The double-strand-break repair model for recombination, *Cell* 33: 25-35
- Takai H., Tominaga K., Motoyama N., Minamishima Y.A., Nagahama H., Tsukiyama T., Ikeda K., Nakayama K., Nakanishi M., Nakayama K. (2000),
Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in *Chk1*^{-/-} mice, *Genes & Development* 14: 1439-1447
- Takisawa H., Mimura S., Kubota Y. (2000),
Eukaryotic DNA replication: from pre-replication complex to initiation complex, *Current Opinion in Cell Biology* 12: 690-696
- Tambini C.E., George A.M., Rommens J.M., Tsui L.C., Scherer S.W., Thacker J. (1997),
The XRCC2 DNA repair gene: identification of a positional candidate, *Genomics* 41: 84-92
- Tebbs R.S., Zhao Y., Tucker J.D., Scheerer J.B., Siciliano M.J., Hwang M., Liu N., Legerski R.J., Thompson L.H. (1995),
Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the XRCC3 DNA repair gene, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92: 6354-6358
- Thacker J., Ganesh A.N., Stretch A., Benjamin D.M., Zahalsky A.J., Hendrickson E.A. (1994),
Gene mutation and V(D)J recombination in the radiosensitive *irs* lines, *Mutagenesis* 9(2):163-168
- Thacker J. (1999),
A surfeit of RAD51-like genes?, *Trends in genetics* 15(5): 166-168
- Trujillo K.M., Yuan S.-S.F., Eva Y.H., Lee P., Sung P. (1998),
Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11m and p95, *Journal of Biological Chemistry* 273: 21447-21450
- Tucker J.D., Jones N.J., Allen N.A., Minkler J.L., Thompson L.H., Carrano A.V. (1991),
Cytogenetic characterization of the ionizing radiation-sensitive Chinese hamster mutant *irs1*, *Mutation Research* 254, 143-152

Literaturverzeichnis

Yonetani Y., Hohegger H., Sonoda E., Shinya S., Yoshikawa H., Takeda S., Yamazoe M. (2005),

Differential and collaborative actions of Rad51 paralog proteins in cellular response to DNA damage, *Nucleic Acids Research* 33(14): 4544-4552

Zhao S., Weng Y.C., Yuan S.S., Lin Y.T., Hsu H.C., Lin S.C., Gerbino E., Song M.H., Zdzienicka M.Z., Gatti R.A., Shay J.W., Ziv Y., Shiloh Y., Lee E.Y (2000),

Functional link between ataxia-telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome gene products, *Nature* 405: 473-47

Zhao H., Piwnicka-Worms H. (2001),

ATR-Mediated Checkpoint Pathways Regulate Phosphorylation and Activation of Human Chk1, *Molecular and Cellular Biology* 21(13): 4129-

8. Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ekkehard Dikomey für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation im Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie erstellen zu können.

Bei Frau Lena Nitsch und Frau Fruzsina Gatzemeier möchte ich mich herzlich für die ausgezeichnete Einarbeitung und die engagierte Unterstützung im Labor bedanken.

Ganz besonders möchte ich Herrn PD Dr. med. Jochen Dahm-Daphi, dem Leiter der Arbeitsgruppe „DNA Reparatur“, für die ausgezeichnete Betreuung dieser Arbeit, interessante Diskussionen, Anregungen und die engagierte Hilfe bei Schwierigkeiten im Zusammenhang mit dieser Arbeit danken.

Danken möchte dem gesamten Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie für die freundliche Aufnahme in Ihre Gemeinschaft.

9. Eidesstattliche Versicherung

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 übernommenen 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.

Maren Jantke

Hamburg, den 18.02.09