

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie  
Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie

Leitung Prof. Dr. rer. nat. E. Dikomey

## **REGULATION DER REPARATUR VON DNA- DOPPELSTRANGBRÜCHEN IN CV1 PRIMATENZELLEN - BEITRAG VON NICHT-HOMOLOGEM ENDJOINING UND SINGLE-STRAND ANNEALING**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Cristina Elena Belmar Campos  
aus Hamburg

Hamburg 2010

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 21.06.2010**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

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

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Kerstin Borgmann**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. J. Fiehler**

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	3
1.1	DNA-Doppelstrangbrüche .....	3
1.2	Reparaturmechanismen .....	4
1.2.1	NHEJ.....	4
1.2.2	Homologe Rekombination .....	6
1.3	Methoden zum Nachweis einzelner Reparaturwege .....	9
1.4	Zellzyklus .....	12
1.5	Zielsetzung.....	13
2	Material und Methoden.....	15
2.1	Zellkultur und Zelltypisierung.....	15
2.1.1	Zelllinie.....	15
2.1.2	Zellkultivierung .....	15
2.1.3	Zellzahlbestimmung .....	16
2.1.4	Koloniebildungstest nach Bestrahlung .....	16
2.2	Transfektion.....	16
2.2.1	Stabile Integration von Plasmid-DNA in das Genom.....	16
2.2.2	Transfektion zur stabilen Integration von pEJSSA und transiente Transfektion des pCMV3xNLS-Scel .....	17
2.2.3	Transiente Transfektion des DsRed-Scel-GR-Fusionsproteins.....	18
2.2.4	Aufzucht und „Picken“ der Klone.....	19
2.3	Methoden zur Analyse der DSB- Reparatur .....	20
2.3.1	FACS-Messung.....	20
2.3.2	Zellsortieren .....	21
2.3.3	Topo-Cloning.....	21
2.3.4	Sequenzierung .....	26
2.4	Methoden zur Zellzyklusanalyse .....	27
2.4.1	Propidiumiodid-Färbung.....	27
2.4.2	BrdU-Färbung .....	27
2.4.3	Synchronisation durch Isoleucinenzug .....	29
3	Ergebnisse .....	30
3.1	Strahlensensibilität der Zellen .....	30
3.2	Reparatureffizienz .....	31
3.3	Reparaturergebnisse .....	32
3.4	NHEJ.....	34
3.5	Zellzyklus .....	37
3.6	DSB Induktion mittels des DsRed-Scel-GR-Fusionsprotein.....	39
4	Diskussion .....	42
4.1	Reparaturwege/Mechanismen.....	42
4.2	Reparaturgenauigkeit .....	44
4.3	Mechanismen des Endjoining-Prozesses.....	44
4.4	Klon 128 .....	50
4.5	Zellzyklus .....	51
5	Zusammenfassung .....	54
6	Literaturverzeichnis .....	56
7	Danksagung .....	63
8	Eidesstaatliche Erklärung.....	64

# 1 Einleitung

Der Träger unserer Erbinformation, die DNA, ist täglich einer Vielzahl schädigender Einflüsse ausgesetzt. Durch externe Einflüsse wie UV-Strahlen, ionisierende Strahlen und Chemikalien, aber auch intern durch Sauerstoffradikale oder während der Replikation können Basenschäden, Einzelstrang- oder Doppelstrangbrüche in der DNA entstehen.

Ist ein solcher Schaden aufgetreten, hört die betroffene Zelle auf zu proliferieren und geht in einen Zellzyklusarrest über, um die geschädigte DNA zu reparieren.

Es ist von übergeordneter Bedeutung, dass die genetische Information jeder Zelle weitgehend unverändert erhalten bleibt und fehlerfrei auf die Tochterzellen weitergegeben wird.

Basenschäden oder Einzelstrangbrüche sind relativ leicht zu reparieren, da die Kontinuität des DNA-Stranges nicht unterbrochen ist und der zweite, nicht geschädigte Strang als Matrize für die Reparatur zur Verfügung steht. Bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen hingegen müssen zwei offene Enden wieder zusammengeführt werden, ohne dass dafür unmittelbar eine Matrize zur Verfügung steht.

## 1.1 DNA-Doppelstrangbrüche

Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB) ist für die Zelle besonders wichtig, da das Ausbleiben der Reparatur oder eine fehlerhafte Reparatur zum Zelltod in der Mitose, zur Apoptose (programmierter Zelltod) oder aber zu Mutationen wie Deletionen, Insertionen oder Translokationen des Genoms führen können. Da unser Genom zu über 90% aus nicht-kodierenden Sequenzen besteht, haben zahlreiche Mutationen keine unmittelbare Folge. Ist jedoch ein Genabschnitt betroffen, der etwa für die Kontrolle des Zellwachstums zuständig ist (Protoonkogen oder Tumorsuppressorgen) kann eine Mutation zu Krebsentstehung führen (1,2).

DSB können durch exogene Einflüsse wie ionisierende Strahlung oder durch chemische Noxen wie beispielsweise Zytostatika, die in der Krebstherapie eingesetzt werden, entstehen (3). Aber auch physiologisch kommt es zur Entstehung von DSB, so z.B. im Rahmen der V(D)J-Rekombination während der B-

und T-Zellreifung (4), beim Antikörperklassenwechsel (5) und während der Meiose (6).

Um die genomische Integrität zu sichern und sich vor drohenden Mutationen und dem Verlust von Erbinformation zu schützen, besitzen die Zellen komplexe Reparaturmechanismen, mit deren Hilfe Schäden erkannt und behoben werden können.

In dieser Arbeit geht es um Mechanismen zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen.

## **1.2 Reparaturmechanismen**

Für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen stehen eukaryontischen Zellen zwei Hauptwege zur Verfügung: Die nicht homologe Endverknüpfung (non homologous end joining = NHEJ) und die homologe Rekombination. Die homologe Rekombination kann wiederum unterteilt werden in die Genkonversion (gene conversion = GC) und das single-strand annealing (SSA).

### **1.2.1 NHEJ**

Das NHEJ ist der in Säugetierzellen bevorzugte Reparaturmechanismus. Er kann während aller Zellzyklusphasen erfolgen (7).

Es werden hierbei in einfacher Weise die gebrochenen Enden wieder zusammengefügt. Dabei kommt es in der Regel zu kleineren Deletionen von einigen wenigen Basenpaaren. Da aber, wie ausgeführt, über 90% unseres Genoms aus nicht kodierenden Sequenzen besteht, bleiben diese Mutationen zumeist ohne Folgen.

Für die Reparatur mittels NHEJ werden mehrere Reparaturproteine benötigt. Eine wesentliche Rolle spielen dabei die Proteine Ku70 und Ku80. Diese leiten die Reparatur ein, indem sie ein Heterodimer bilden und an den entstandenen Bruchenden des Doppelstrangbruches binden. Dadurch wird ein weiteres Protein rekrutiert, die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (PKcs). Gemeinsam bilden diese Faktoren den funktionellen DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK) Komplex, welcher die Aufgabe hat, die DNA-Enden zusammenzuhalten und zu prozessieren. Die aktivierte DNA-PKcs ermöglicht dabei

durch Autophosphorylierung und dadurch hervorgerufener Konformationsänderung die Zugänglichkeit der DNA-Enden für weitere Prozessierungsschritte (8).

Unter Mithilfe der Artemis-Nuklease werden dabei nicht passende Basen an den Enden entfernt und die Lücken dann über die Polymerasen  $\lambda$  und  $\mu$  aufgefüllt (fill-in synthesis). Artemis ist ein Protein, welches von der DNA-PKcs phosphoryliert wird. Während es alleine eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität zeigt, wirkt es phosphoryliert und im Komplex mit der DNA-PKcs als Endonuklease an überhängenden 5'- und 3'-Enden (9,10).

Im nächsten Schritt wird der DNA Ligase IV Komplex rekrutiert, bestehend aus den Faktoren Ligase IV, XRCC4 und XLF, welcher in der Lage ist, den DSB wieder zu schließen (11).

Grundsätzlich können die DSB-Enden beim NHEJ an jeder beliebigen Stelle neu verknüpft werden. Bevorzugt geschieht dies jedoch an solchen Stellen, an denen beide Enden eine Mikrohomologie von einigen Nukleotiden aufweisen, wodurch eine Basenpaarung der komplementären Einzelstränge möglich ist (12).

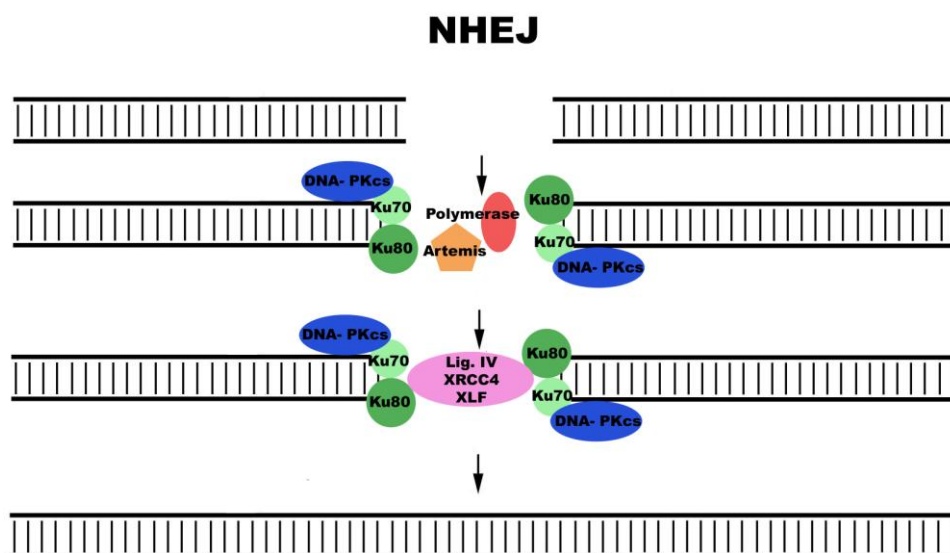


Abbildung 1: NHEJ. Zunächst werden die DNA-Enden durch das Ku70/80 Heterodimer gebunden und die DNA-PKcs rekrutiert. In manchen Fällen müssen die DNA-Enden mittels Artemis und die Polymerasen  $\lambda$  und  $\mu$  prozessiert, um dann schließlich im letzten Schritt mit Hilfe des Ligase IV, XRCC4 und XLF-Komplexes ligiert zu werden.

## 1.2.2 Homologe Rekombination

Bei der homologen Rekombination dient ein homologer DNA-Abschnitt als Matrize für die Reparatur.

Dieser Reparaturmechanismus spielt eine wesentliche Rolle bei Bakterien und Hefen (13), scheint dagegen aber in höheren Säugetieren von untergeordneter Bedeutung zu sein. Spricht man von homologer Rekombination, so ist damit meist der Reparaturweg der klassischen Genkonversion (GC) gemeint. Daneben gibt es weitere Spielarten der HR, an erster Stelle das single-strand annealing (SSA).

### 1.2.2.1 Genkonversion

Die Reparatur mittels Genkonversion gilt im Allgemeinen als fehlerfreier Reparaturmechanismus (14). Dieser Reparaturmechanismus wird vor allem während der S- und G2-Phase des Zellzyklus verwendet.

Es wird hierbei eine homologe Sequenz im Genom als Matrize für den zu reparierenden Abschnitt benutzt. Diese Sequenz kann vom Schwesterchromatid, dem homologen Chromosom, aber auch von einem anderen homologen Abschnitt auf demselben oder einem anderen Chromosom stammen. Ausgenommen des Schwesterchromatids sind die verwendeten Matrizen jedoch häufig nicht zu hundert Prozent homolog, so dass die Reparatur mittels Genkonversion mit dem homologen Chromosom zu einem Verlust eines der beiden Allele (loss of heterozygosity, LOH) und somit auch zu einem Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen führen kann (15,16,17). Ist beispielsweise ein Allel eines Tumorsuppressorgens defekt, so kann im Zuge der homologen Rekombination das zweite gesunde Allel verloren gehen (LOH) und damit zum gesamten Funktionsausfall des Tumorsuppressorgens führen, da das defekte Gen jetzt hemizygot vorliegt. Beispiele hierfür sind BRCA1 und BRCA2 beim familiären Mammakarzinom oder das TP53-Gen.

Zu Beginn der Reparatur muss sichergestellt werden, dass die Bruchenden zusammenbleiben. Anschließend werden die Bruchenden von 5' nach 3' exonukleolytisch abgebaut. Diese Schritte werden durch den Mre11/Rad50/Nbs1-Komplex gesteuert (18,19). Die entstandenen überhängenden 3'-Enden werden von dem heterotrimeren Proteinkomplex RPA (replication protein A) gebunden, welcher diese stabilisiert. In Hefen interagiert RPA mit Rad52 (20,21), welches

wiederum die Bindung von Rad51 an die Einzelstrang-DNA durch den Austausch von RPA vereinfacht (22).

In Säugetierzellen hingegen wird die Aktivität der Rekombinase Rad51 durch BRCA2 kontrolliert (23,24).

RAD51 bewirkt die Anlagerung des homologen Abschnittes und den Strangaustausch zwischen den freien 3`-Enden und dem komplementären Einzelstrang des intakten DNA-Moleküls (25,26). Dabei entsteht eine heteroduplex-DNA (D-Loop), dessen Stabilität von Rad54 vermittelt wird (11).

Anschließend folgt die DNA-Neusynthese mit dem komplementären Strang als Matrize ausgehend von dem 3`-Ende, wobei die Heteroduplex in eine Homoduplex übergeht. Dieser Prozess führt zur Formation einer als „Holliday junction“ bezeichneten Struktur. Nachdem diese Struktur endonukleolytisch aufgelöst ist, erfolgen im letzten Schritt die Prozession und Ligation der Bruchenden (27). Hierbei spielen verschiedene Proteine, wie die Polymerasen  $\eta$  und  $\epsilon$ , PCNA, und die DNA Ligase I eine Rolle (28).



## GC

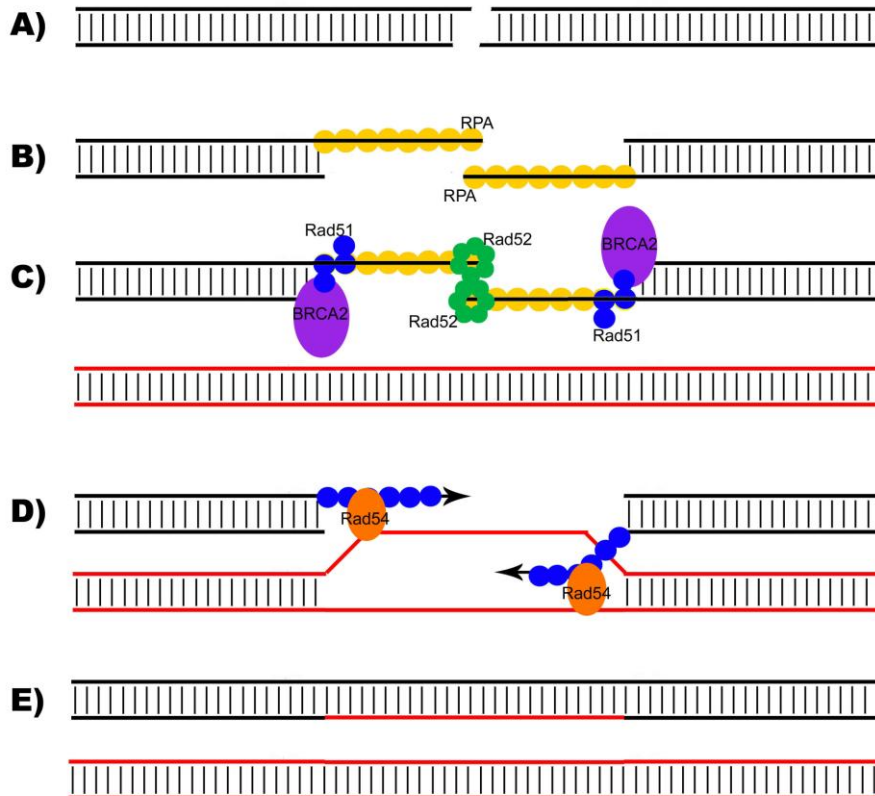


Abbildung 2: Genkonversion. A) Nachdem ein DSB entstanden ist, werden gesteuert durch den Mre11/Rad50/Nbs1-Komplex die Bruchenden von 5' nach 3' exonukleolytisch abgebaut. B) Die dabei entstandenen 3'-Überhänge werden von dem Proteinkomplex RPA gebunden und stabilisiert. C) RAD51 bewirkt unter Kontrolle von BRCA2 die Anlagerung des homologen Abschnitts und D) den Strangaustausch zwischen den freien 3'-Enden und dem komplementären Einzelstrang des intakten DNA-Moleküls. Rad54 vermittelt der dabei entstehenden heteroduplex-DNA Stabilität. E) Nach Prozession und Ligation der Bruchenden liegt ein der Matrize homologer Strang vor.

### 1.2.2.2 SSA

Die Reparatur durch SSA ist bisher vor allem in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* untersucht worden (29,30). Über die Rolle dieses Reparaturweges in Säugetieren ist bis jetzt relativ wenig bekannt.

SSA kann erfolgen, wenn ein Doppelstrangbruch zwischen zwei repetitiven, in die gleiche Richtung orientierten Sequenzen auftritt. Unser humanes Genom besteht zu über 30% aus repetitiven Sequenzen (31), die zumindest teilweise für das SSA verwendet werden könnten.

Es werden wie auch bei der Reparatur mittels Genkonversion zunächst die Enden der Bruchstellen entfernt, so dass lange 3'-Einzelstränge verbleiben. Möglicherweise spielen hier die gleichen Proteine eine Rolle wie bei der GC (32).

Anschließend folgt die Suche nach Homologien. Ist die Suche erfolgreich, lagern sich die beiden homologen Sequenzen zusammen und hybridisieren. Das Schlüsselprotein hierbei ist das Rad52 (33-35).

Die nach dem Anlagern der homologen Sequenzen überstehenden Enden werden durch den XFP/ERCC1-Komplex reseziert (36) und die entstandenen Lücken aufgefüllt. Schließlich folgt die Ligation, wobei das hierfür benötigte Protein bisher noch nicht bekannt ist. Am Ende ist die repetitive Sequenz nur noch einmal vorhanden und die Sequenz zwischen den beiden homologen Sequenzen ist verloren gegangen.

Die Reparatur mit diesem Mechanismus ist deshalb immer fehlerbehaftet und geht mit einem großen Basenverlust einher.

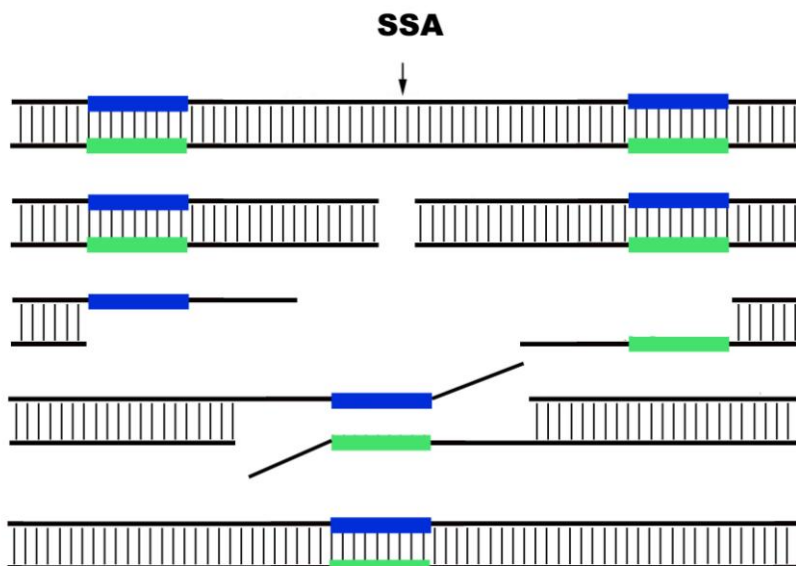


Abbildung 3: SSA. Im ersten Schritt werden die Enden der Bruchstellen entfernt, so dass lange 3'-Einzelstränge verbleiben. Dann lagern sich die beiden homologen Sequenzen zusammen und hybridisieren, die überstehenden Enden werden entfernt und die entstandenen Lücken aufgefüllt. Am Ende sind eine Kopie der repetitiven und die verbindende Sequenz verloren gegangen.

### **1.3 Methoden zum Nachweis einzelner Reparaturwege**

Mit geläufigen DNA-Reparaturassays wie der Gelelektrophorese oder dem immunzytochemischen Nachweis von  $\gamma$ H2AX-foci im Zellkern lässt sich zwar die gesamte Reparaturkapazität ermitteln, es ist aber nicht möglich zu sagen, über welchen Weg repariert wurde. Um NHEJ und SSA zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit das in diesem Labor entwickelte Reporterkonstrukt pEJSSA verwendet (37).

Es handelt sich hierbei um ein Modellsystem, welches in der Lage ist, in vivo die Reparatur eines einzelnen DSB durch die Expression eines Reportergens anzuzeigen. Das pEJSSA ist so gebaut, dass es spezifisch die DSB-Reparatur mittels NHEJ und SSA detektieren kann.

Dieses Konstrukt enthält als Reportergen zum Nachweis von DSB eine modifizierte Variante des Gens für das grünfluoreszierende Protein (GFP). Das GFP-Gen stammt aus der Tiefseequalle „*Aequoria victoria*“ und kodiert mit drei Exons für ein 238 Aminosäuren großes Protein (38,39). Das Chromophor des GFP wird durch Licht im blauen oder ultravioletten Spektrum angeregt und fluoresziert dann grün. Dadurch ist es möglich, Zellen, die dieses Protein exprimieren, im Flusszytometer nachzuweisen. Kommerziell ist ein Plasmid, das GFP unter der Kontrolle eines starken viralen Promotors (CMV) exprimiert, als pEGFP-N1 erhältlich.

Zur Generierung des pEJSSA wurde das Plasmid pEGFP-N1 modifiziert und enthält zwei I-SceI Schnittstellen (in direkter Nachbarschaft aber in gegensätzlicher Orientierung) in der 5` untranslatierten Region des GFP-Gens. Da diese Erkennungssequenz nicht symmetrisch („pallindromisch“) ist, kann sie in zwei unterschiedlichen Richtungen eingebaut werden, so dass nach dem Schnitt zwei nicht zueinander passende Enden entstehen. Diese Schnittstellen flankieren ein künstliches Startkodon (ATG), welches nicht im Leserahmen des nachfolgenden GFP-Gens liegt. Somit verhindert dieses vorgeschaltete ATG die Translation dieses Gens. Zusätzlich befinden sich 3` und 5`-wärts des künstlichen Startkodons zwei 50bp lange homologe Abschnitte, die repetitiven Sequenzen SSA1 und SSA2 für das single-strand annealing (37). Das pEJSSA wurde stabil in das Genom von CV1-Zellen integriert.

Zur Induktion von DSB wurde ein weiteres Plasmid in die Zellen transfiziert, welches die I-SceI-Restriktionsendonuklease exprimiert (Expressionsvektor). Restriktionsenzyme schneiden DNA an einer definierten Basensequenz. Die I-SceI-Endonuklease, die ursprünglich aus der Hefe „*Saccharomyces cerevisiae*“ stammt, hat eine extrem lange Erkennungssequenz von 18 Basenpaaren und tritt deshalb mit einer statistischen Häufigkeit von nur  $1/4^{18}$  Basen ( $7 \times 10^{-10}$ ) auf. Diese Sequenz kommt im Genom von Säugetierzellen somit praktisch nicht vor. Dadurch ist gewährleistet, dass die DNA gezielt ausschließlich in dem integrierten DNA-Abschnitt geschnitten wird.

Wird nun mittels der Restriktionsendonuklease I-SceI ein DSB induziert, so wird das künstliche Startkodon herausgeschnitten. Nach erfolgreicher Reparatur beginnt die Translation am eigentlichen Startkodon des GFP-Gens und dieses kann wieder exprimiert werden. Die Zelle beginnt grün zu leuchten, was fluorezenzmikroskopisch oder im Durchflusszytometer gemessen werden kann. Darüber hinaus können die grünfluoreszierenden Zellen im Durchflusszytometer aussortiert werden und anschließend die DNA aus diesen Zellen isoliert werden.

Um zu unterscheiden welchen Reparaturweg die einzelne Zelle benutzt hat, wurde die DNA isoliert und der Reparaturabschnitt über PCR amplifiziert. Wurde NHEJ benutzt, dann ist das PCR Fragment ca. 550bp groß, je nachdem ob und in welchem Ausmaß es bei der Reparatur zu Deletionen gekommen ist. Wurde hingegen mittels SSA repariert, so sind die Fragmente wegen des großen Basenverlustes mit 415bp sichtbar kleiner. Die SSA-Sequenz ist in diesem Fall nur noch einfach vorhanden.

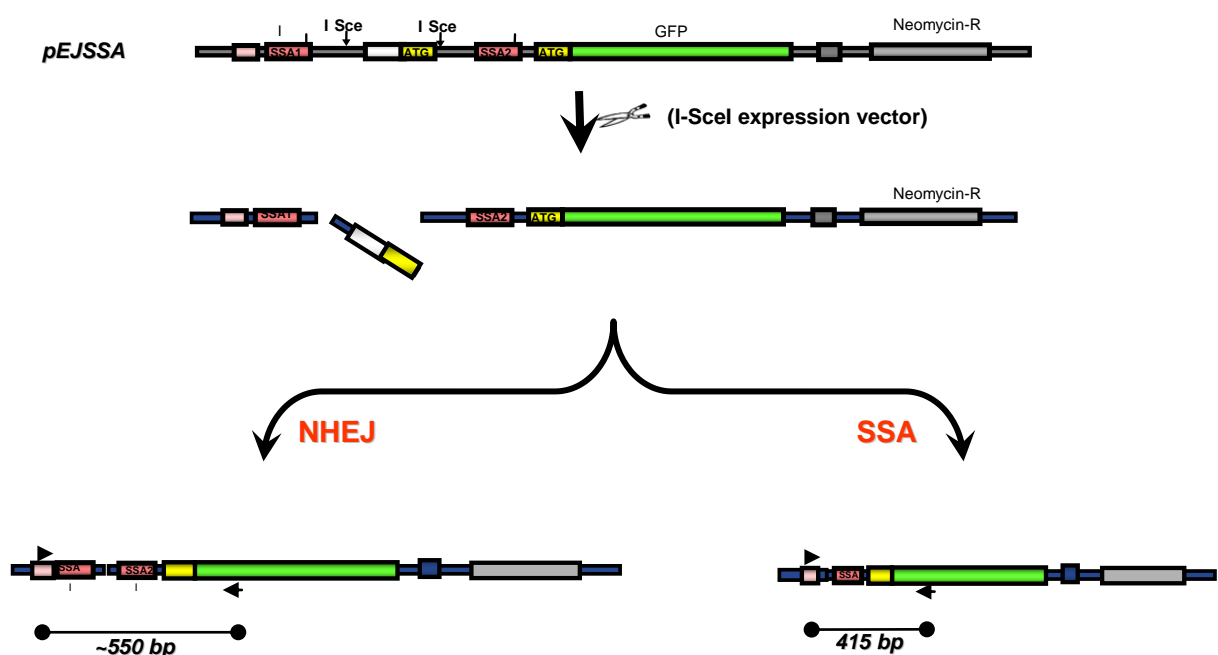


Abbildung 4: pEJSSA. Das chromosomal integrierte Konstrukt enthält als Reportergen für die Reparatur das GFP-Gen. Dieses ist aufgrund eines vorgeschalteten künstlichen Startkodons (ATG) inaktiv. Das ATG wird von zwei I-SceI-Schnittstellen flankiert. Außerdem enthält das Konstrukt 3' und 5'-wärts des ATGs zwei 50bp große repetitive Sequenzen (SSA1 und SSA2). Wird mittels des I-SceI ein Doppelstrangbruch induziert, so wird das künstliche Startkodon herausgeschnitten und nach erfolgreicher Reparatur beginnt die Translation am eigentlichen Startkodon. Das GFP kann wieder exprimiert werden und die Zelle leuchtet im Flusszytometer grün. Nach der Reparatur kann eine PCR-Amplifikation des Reparaturabschnittes Auskunft geben, ob über NHEJ oder SSA repariert wurde. Im Fall von NHEJ ist das Fragment ca. 550bp nach SSA etwa 415bp groß.

## 1.4 Zellzyklus

Der Zellzyklus kann in vier Phasen gegliedert werden: Die Mitose (M-Phase) und die drei dazwischen liegenden Phasen G1- (gap1, Vorbereitung auf die Synthesephase), S- (Synthesephase, Replikation) und G2-Phase (gap2, Vorbereitung auf die Mitose), die zusammen die Interphase ausmachen. Nicht-proliferierende Zellen gehen in eine als G0 (Ruhephase) bezeichnete Sonderform der G1-Phase über.

Für die erfolgreiche Reparatur von DSB ist der Zellzyklusarrest eine wichtige Voraussetzung. Durch ihn gewinnt die Zelle Zeit, um den Schaden rechtzeitig zu beheben, bevor er an die Tochterzelle weitergegeben werden kann. Die Erkennung eines DSB erfolgt über die Aktivierung der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase ATM (ataxia telangiectasia mutated) (40-42). Die Aktivierung von ATM führt wiederum zur Aktivierung zahlreicher anderer Proteine, welche bei der DSB-Reparatur und der Zellzykluskontrolle eine Rolle spielen. Für die Zellzyklusregulation sind das im Besonderen CHK2 (checkpoint kinase 2) und das p53-Protein, welches einerseits über p21 einen G1-Phase-Arrest und andererseits die Apoptose induzieren kann (43,44). ATM ist an der Aktivierung aller Zellzyklus Checkpoints (G1/S, intra-S, G2 und G2/M) beteiligt.

ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3 related), ein weiteres durch DSB aktiviertes Protein, kann über die Proteinkinase CHK1 (checkpoint kinase 1), einen intra-S Checkpoint auslösen sowie den Übertritt von der G2- in die M-Phase blockieren.

Wie oben beschrieben entstehen DSB als Folge spontaner Stoffwechselprozesse aber auch im Zuge verschiedener Krebstherapien. Dort werden sie etwa durch ionisierende Strahlung oder durch Chemotherapeutika wie Etoposid gezielt induziert, um über die toxischen Wirkungen der DSB die Tumorzellen abzutöten.

Die Reparatur in Tumorzellen erfolgt im Prinzip mit den gleichen Methoden wie bei Normalzellen. Wurde der DSB nicht oder unvollständig repariert, kommt es entweder zum terminalen Zellzyklusarrest, so dass sich die Zellen nicht weiter teilen, oder es kommt zum mitotischen oder apoptotischen Zelltod.

Im Hinblick auf die Therapie von Krebserkrankungen ist es von außerordentlichem Interesse, zu wissen, ob Unterschiede zwischen Tumor- und Normalzellen in der Auswahl von DSB-Reparaturwegen bestehen. Dabei ist auch von Bedeutung, in

wieweit eine Zellzyklusabhängigkeit der verschiedenen Reparaturwege besteht, da Tumorzellen im Vergleich zu den meisten Normalzellen stetig proliferieren.

Bisherige Untersuchungen über die Wahl der Reparaturwege wurden entweder an immortalisierten Nagerzellen (Maus und Hamster) oder an Tumorzellen durchgeführt (45-50). Über die Verhältnisse in Normalzellen von höheren Säugern ist bisher jedoch wenig bekannt.

Würden sich Unterschiede in der Wahl des Reparaturweges zwischen humanen Normal- und Tumorzellen zeigen, könnte man sich dies in der Entwicklung neuer Therapien zunutze machen. Es ist zum Beispiel vorstellbar, Tumorzellen gegenüber einer Strahlentherapie zu sensibilisieren, indem man den durch die Tumorzellen vermehrt genutzten Reparaturweg inhibiert. So könnte man den Anteil der nicht reparierten Doppelstrangbrüche in den Tumorzellen erhöhen und diese darüber bevorzugt abtöten.

## **1.5 Zielsetzung**

Da bisherige Untersuchungen bezüglich der Reparaturwege vor allem an Nagetierzellen oder Tumorzellen erfolgten, war es Ziel dieser Arbeit DNA-Doppelstrangbruchreparatur mittels NHEJ und SSA an humanähnlichen Primatenzellen zu untersuchen. Es sollte herausgefunden werden, welcher Reparaturweg in proliferierenden Zellen bevorzugt und in welchem Ausmaß verwendet wird und wie präzise die Reparatur durchgeführt wird.

Hierfür wurden CV1-Zellen, Nierenepithelzellen der grünen afrikanischen Meerkatze gewählt. Diese Zellen haben eine große Ähnlichkeit zu humanen Zellen und besitzen darüber hinaus eine gut erhaltene Zellzyklusregulation und p53 Funktion im Gegensatz zu den meisten Tumor- und Nagerzelllinien. Des Weiteren besteht der Vorteil der Immortalität im Gegensatz etwa zu primären humanen Fibroblasten. Diese Eigenschaften sind für diese Arbeit essenziell, da eine hohe Passagierung der Zellen im Rahmen der verwendeten Methoden nötig war.

Außerdem sollte im Rahmen dieser Studie die Möglichkeit zur Untersuchung der gewählten DSB-Reparaturwege in verschiedenen Zellzyklusphasen (G1- bzw. G0- vs. S- und G2-Phase) erarbeitet werden. Hierfür war es das Ziel, herauszufinden, wie die Zellen im Zellzyklus arretiert und synchronisiert werden können, so dass

eine DSB-Induktion und Reparaturdetektion mittels des Reporterkonstruktes innerhalb der engen Zeitfenster einzelner Zellzyklusphasen möglich wird.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur und Zelltypisierung

#### 2.1.1 Zelllinie

Es wurden für diese Arbeit CV1-Nierenepithelzellen der grünen afrikanischen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) verwendet. Die Zellen bilden in der Kultur einschichtige fibroblastenartige Zellrasen (Monolayer).

#### 2.1.2 Zellkultivierung

Die Zellen wurden in T-75er Gewebekulturflaschen<sup>1</sup> in DMEM-Medium<sup>2</sup> mit einem Zusatz von 5% fötalem Kälberserum<sup>3</sup> und 2% L-Glutamin<sup>4</sup> gehalten.

Die Zellkulturen wurden bei 37°C und 100% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. Zur pH-Stabilisierung der Zellen wurde der Brutschrank mit CO<sub>2</sub> (10%) begast.

Alle zwei bis drei Tage erreichten die Zellen Konfluenz und wurden dann mit 10ml 1xPBS<sup>5</sup> gewaschen und mit 2ml 0,25% EDTA-Trypsin<sup>6</sup> abgelöst und in geringer Dichte neu ausgesät.

Zur längeren Verwahrung wurden die Stammkulturen sowie Kulturen ausgewählter Klone in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Einfrieren erfolgte in drei Temperaturschritten. Nach dem Pelletieren der Zellen wurden diese in Medium mit 10% DMSO<sup>7</sup> resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. In dieser Form wurden sie zunächst für zwei Stunden bei -20°C, über Nacht bei -80°C und schließlich bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

---

<sup>1</sup> Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland

<sup>2</sup> Gibco, Paisley, UK

<sup>3</sup> FCS Gibco, Paisley, UK

<sup>4</sup> Gibco, Paisley, UK

<sup>5</sup> 0,24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 1,44g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0,2g KCl + 8g NaCl in 800ml a.dest., pH auf 7,2 mit HCl, auf 1L mit H<sub>2</sub>O

<sup>6</sup> Gibco, Paisley, UK

<sup>7</sup> Sigma, St. Louis, USA



### **2.1.3 Zellzahlbestimmung**

Die Zellzahlbestimmung wurde an einem automatischen Zellzähler<sup>8</sup> durchgeführt. Der Zellzähler erfasst die Widerstandsveränderungen durch die vorbeiströmenden Zellen in der angesaugten Flüssigkeit und kann so die Zellzahl bestimmen.

Die abtrypsinisierten und in Medium resuspendierten Zellen wurden mit einem Puffer<sup>9</sup> 1:50 verdünnt und in das Gerät gegeben.

### **2.1.4 Koloniebildungstest nach Bestrahlung**

Mittels Kolonietest wurde die zelluläre Strahlenempfindlichkeit bestimmt. Es wurden verschiedene Zellzahlen in mehrere T25er Flaschen ausgesät. Nach vierstündiger Inkubation im Brutschrank erfolgte die Bestrahlung an der Röntgenröhre<sup>10</sup> mit einer Röhrenspannung von 200kV, einem Röhrenstrom von 15mA und Verwendung eines Filters von 5mm Cu. Die Zellen wurden mit jeweils verschiedenen Dosen von 2-8Gy bei einer mittleren Dosisrate von 2Gy pro Minute bestrahlt.

Nach zwei Wochen wurden die Kulturflaschen mit 5ml 0,9% NaCl gewaschen und für fünf Minuten mit 70%igem Ethanol fixiert. Anschließend ließ man sie über Nacht trocknen. Dann erfolgte die Färbung der Kolonien mit 5ml Kristallviolett<sup>11</sup>. Nach fünf Minuten konnte der Farbstoff mit Wasser gründlich ausgespült werden. Mit Hilfe eines Keimzählgerätes wurden die Kolonien gezählt. Dabei wurden nur diejenigen Kolonien als lebend gewertet, die mehr als 50 Zellen enthielten.

## **2.2 Transfektion**

### **2.2.1 Stabile Integration von Plasmid-DNA in das Genom**

Zur stabilen Integration von Plasmid-DNA in das Genom der Zelllinie wurde in dieser Arbeit die Methode der Lipofektion benutzt. Bei diesem Verfahren bildet die DNA Komplexe mit kationischen Lipidpartikeln und kann so durch die Zellmembran in die Zelle eingeschleust werden.

---

<sup>8</sup> CASY1 Zellcounter, Schärfe System, Freiburg, Deutschland

<sup>9</sup> Casyton®, Schärfe System, Freiburg, Deutschland

<sup>10</sup> Gulmay RS225, Surrey, UK

<sup>11</sup> 1g/l Kristallviolett

In den meisten Zellen werden die transfizierten Plasmide nicht in das Chromosom integriert sondern werden innerhalb einiger Tage abgebaut. In diesem Fall spricht man von einer transienten Transfektion. In einigen wenigen Fällen jedoch wird die DNA in das Chromosom der Zelle aufgenommen und ist dann „stabil“ in ihr Genom integriert.

Um die Zellen zu isolieren, in denen eine solche stabile Integration erfolgt ist, enthält das integrierte Plasmid ein Antibiotikaresistenzgen. In diesem Fall handelt es sich um eine Resistenz gegenüber Geniticin, einen Inhibitor der ribosomalen Proteinsynthese. Gibt man dem normalen Zellmedium nun dieses Antibiotikum in ausreichender Konzentration hinzu, so überleben nur die Zellen, die das Plasmid mit dem Resistenzgen stabil in ihr Genom integriert haben. Die anderen Zellen sterben innerhalb von zwei Wochen unter dem toxischen Antibiotikum.

### **2.2.2 Transfektion zur stabilen Integration von pEJSSA und transiente Transfektion des pCMV3xNLS-Scel**

Für die stabile Integration des pEJSSA in die Zellen wurden diese zwei Tage vor der Transfektion in T25er Flaschen in einer Dichte von jeweils  $1-2 \times 10^5$  ausgesät, so dass sie sich am Tag der Transfektion in exponentiellem Wachstum befanden. Es wurden insgesamt mehrere voneinander unabhängige Versuchsansätze zu verschiedenen Zeitpunkten gemacht, wobei pro Ansatz 0,1-0,5 $\mu$ g linearisiertes pEJSSA-Plasmid und jeweils die 2,5fache Menge an Lipofectamine<sup>12</sup> verwendet wurden. Der Ansatz des DNA-Lipofektionsgemisches erfolgte nach dem Protokoll von Invitrogen.

Hierfür wurden zunächst getrennt voneinander zum einen das Plasmid und zum anderen das Lipofectamine in ein Volumen von jeweils 500 $\mu$ l Opti-MEM<sup>13</sup> Medium verdünnt. Die beiden Gemische wurden dann für fünf Minuten im Dunkeln und bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend zusammengegeben und erneut im Dunkeln und bei Raumtemperatur 20 Minuten inkubiert.

---

<sup>12</sup> Lipofectamine™ 2000, Invitrogen, Paisley, UK  
<sup>13</sup> Opti-MEM, Invitrogen, Paisley, UK

Das Lipofektionsgemisch wurde dann in die T25er Flasche mit 5ml normalem Medium gegeben und dann für sechs Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel hin zu frischem DMEM-Medium.

Für die transiente Transfektion des pCMV3xNLS-Scel wurden für jeden Ansatz zwei Tage vor der Transfektion  $1 \times 10^5$  bis  $2,5 \times 10^5$  Zellen ausgesät. Nach dem bereits beschriebenen Verfahren der Lipofektion und unter konstanten Bedingungen wurde pro T25er Flasche 5µg DNA transfiziert.

Nach 48 Stunden Reparaturzeit erfolgte die Messung der zellulären Grünfluoreszenz am Flusszytometer.

### **2.2.3 Transiente Transfektion des DsRed-Scel-GR-Fusionsproteins**

Die zuvor beschriebene Transfektion des I-Scel-Plasmides funktioniert ausschließlich an sich teilenden Zellen. Zellen, die durch 36stündigen Isoleucinentzug (siehe unten) in der G0-Phase des Zellzyklus angehalten wurden, zeigten eine Transfektionseffizienz von lediglich 0,68% (bei exponentiell wachsenden Zellen hingegen um die 50%).

Um auch DSB an nicht-proliferierenden Zellen induzieren zu können, die im Zellzyklus angehalten wurden, wurde ein I-Scel-Gen transfiziert, welches mit einem Glukokortikoid-Rezeptor (GR) fusioniert ist. Die Expression dieses I-Scel-GR-RFP (Red fluorescent protein) Fusionskonstruktes generiert ein zytoplasmatisches Protein, das nach Zugabe des GR-Liganden Triamcinolon Acetonid<sup>14</sup> (TA) in den Kern transloziert wird. Der DSB kann dadurch zeitlich nah induziert werden (51).

Dieses experimentelle System erlaubt es proliferierende Zellen effektiv zu transfizieren, dann die Zellen im Zellzyklus zu arretieren und anschließend erst durch Zugabe des TA-Liganden den DSB zu induzieren. So ist es möglich, die Reparatur nur in einer bestimmten Zellzyklusphase zu untersuchen.

Die Zellen wurden wie oben beschrieben für die Transfektion vorbereitet und das Protein lipofiziert. Nach 48 Stunden erfolgte die Zugabe des Liganden (100µl TA (100nM/ml) pro 2ml DMEM-Medium), nach weiteren 48 Stunden dann die FACS-Analyse.

---

<sup>14</sup> Sigma, St. Louis, USA,

## 2.2.4 Aufzucht und „Picken“ der Klone

24 Stunden nach der Transfektion zur stabilen Integration des pEJSSA wurden die Zellen abtrypsiniert und in einer Dichte von  $2 \times 10^4$  bis  $2 \times 10^5$  in mehrere T75er Flaschen neu ausgesät. Nach weiteren 24 Stunden dann erfolgte ein Mediumwechsel hin zum Selektionsmedium mit 1,5mg/ml Geneticin<sup>15</sup>. Dieses wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt um abgestorbene Zellen zu entfernen und die notwendige Konzentration des licht- und wärmesensiblen Antibiotikums beizubehalten und so den Selektionsdruck aufrechtzuerhalten.

Um möglichen Infektionen vorzubeugen wurde dem Selektionsmedium zusätzlich 100µg/ml Streptomycin und 100iU Penicillin<sup>16</sup> hinzugefügt.

Nach zwei Wochen hatten die einzelnen Zellklone ausreichend große Kolonien von einigen hundert Zellen gebildet und konnten „gepickt“ werden. Es wurden ausschließlich einzeln stehende Kolonien für die weitere Aufzucht ausgewählt. Das Medium wurde abgesaugt und die Kulturflasche einmal mit 10ml 1xPBS gewaschen. Anschließend wurde mit einem LötKolben ein Loch in die Kulturflasche direkt über der jeweiligen Kolonie gebrannt, auf jede ausgewählte Kolonie 10µl Trypsin gegeben und die Flasche für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (52).

Daraufhin konnten die Zellen per Mikropipette in 20µl Medium resuspendiert und in 48-Loch „Multiwellplatten“ überführt werden. Dabei wurden jeweils die Zellen einer Kolonie in ein eigenes Well übertragen. Sobald die Zellen im Well konfluent gewachsen waren, wurden die Zellen abtrypsiniert und auf die nächst größere Platte überführt. Verwendung fanden 48- und 12-Well Platten, sowie Zellkulturflaschen mit 25cm<sup>2</sup> und 75cm<sup>2</sup>.

Es wurden insgesamt in verschiedenen Ansätzen 143 Klone „gepickt“, von denen 59 so weiterkultiviert werden konnten, dass sie im Flusszytometer auf die Reparaturrate hin untersucht werden konnten. Von diesen waren 27 Klone „positiv“, d.h. durch I-SceI induzierte Reparatur ergab grün fluoreszierende Zellen, vielfach jedoch weniger als 0,1%. (Siehe Abbildung 5)

---

<sup>15</sup> 50mg active G418/ml, Gibco BRL, Paisley, UK

<sup>16</sup> 100U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, Invitrogen, St. Louis, USA

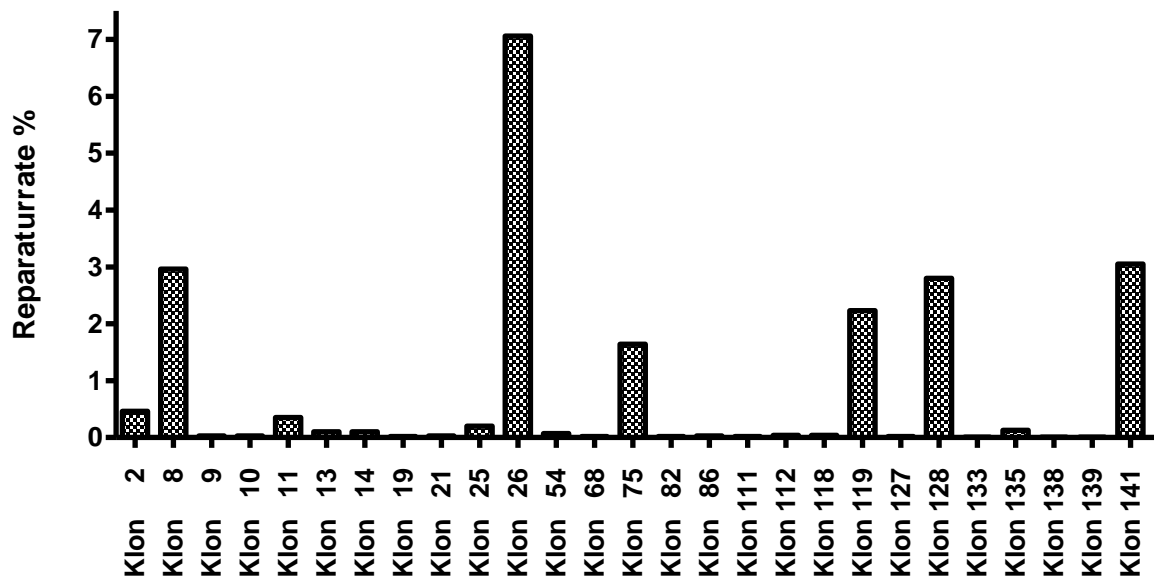


Abbildung 5: Reparaturraten aller „positiven“ pEJSSA-Klone.

## 2.3 Methoden zur Analyse der DSB- Reparatur

### 2.3.1 FACS-Messung

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS = „fluorescence activated cell sorter“) ist ein Verfahren, mit dessen Hilfe sowohl Oberflächenmoleküle als auch intrazelluläre Proteine quantitativ detektiert werden können. Es beruht auf der Lichtemission, die entsteht, wenn die Zellen an einem Laserstrahl mit einer geeigneten Wellenlänge vorbeigeleitet werden. Hierfür werden die sich in Lösung befindlichen Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren einzeln den Laserstrahl.

Mittels Detektoren kann Fluoreszenzlicht unterschiedlicher Wellenlänge erfasst werden. Das Fluoreszenzlicht entsteht, wenn der Laserstrahl bestimmte Fluorochrome anregt und deren Elektronen dadurch auf ein höheres Energieniveau hebt. Danach fallen die Elektronen unter Abgabe energiereicher Photonen auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück, wobei sie Lichtenergie emittieren, die als Fluoreszenz sichtbar wird. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten FACS-Gerät<sup>17</sup>,

<sup>17</sup> FACScan, BD Bioscience, San Jose, USA

wurde eine sich im blauen Spektrum befindliche Wellenlänge von 488nm verwendet.

Neben der Erfassung von Fluoreszenzlicht, kann das von der Zelle gestreute Licht nachgewiesen werden und so Rückschlüsse auf Größe und Struktur der Zelle gezogen werden.

Zur quantitativen Bestimmung der Reparaturereignisse in dieser Arbeit wurde das GFP (Green-Fluorescent-Protein) verwendet.

Die zu untersuchenden Zellen wurden abtrypsinisiert und 1x in 1xPBS gewaschen, dann je nach Größe des Zellpellets in 1-3ml 1xPBS resuspendiert und durch eine feinmaschige Gaze filtriert, um Zellaggregate abzutrennen. Die gefilterte Zellsuspension wurde direkt in das Flusszytometer gegeben.

### **2.3.2 Zellsortieren**

Mit jenen Klonen, die zu einem ausreichend hohem Prozentsatz ( $\geq 2\%$ ) repariert hatten (Klon 8, 119, 128 und 141), wurde im Folgenden weitergearbeitet.

Es erfolgte mit diesen Klonen abermals, wie zuvor beschrieben, eine transiente Transfektion des I-SceI-Plasmides, diesmal jedoch in jeweils einer T75er Flasche mit der dreifachen Menge an Zellen und DNA. Nach der 48stündigen Reparaturzeit wurden die Zellen an einem speziellen FACS-Gerät<sup>18</sup> gemessen. Das verwendete FACS-Gerät ist in der Lage parallel zur quantitativen Reparaturanalyse die „positiven“ grünfluoreszierenden Zellen auszusortieren und in einem Falconröhrchen mit PBS- und BSA-Puffer aufzufangen. Pro Sortiervorgang wurden so pro Klon zwischen 600 und 18000 Zellen in jeweils drei 50ml-Falconröhrchen sortiert. Diese wurden anschließend pelletiert, in DMEM-Medium resuspendiert und dann in einer T25er-Flasche weiterkultiviert.

### **2.3.3 Topo-Cloning**

Mittels der zuvor beschriebenen FACS-Messung können nur quantitative Angaben zu den Reparaturvorgängen gemacht werden. Um die Reparatur auch qualitativ beurteilen zu können, wurde die DNA der aussortierten grünfluoreszierenden Zellen

---

<sup>18</sup> Calibur, BD Bioscience, San Jose, USA

isoliert und die reparierten Genabschnitte über die Methode des Topo-Cloning<sup>19</sup> sequenziert.

Das zentrale Enzym dieser Klonierungsmethode ist die Topoisomerase I und kann sowohl als Restriktionsenzym als auch als Ligase fungieren. Das Enzym ist kovalent an die Enden des linearisierten Klonierungsvektors gebunden.

Dieser TOPO-Cloning-Vektor enthält einen 3'-T-Überhang. Das PCR-Produkt wurde mit der Taq-Polymerase prozessiert, welche an die 3'-Enden der PCR-Produkte zusätzliche Adenosine anhängen kann. Dieser entstandene 3'-A-Überhang kann nun über den komplementären Thymin-Überhang des Vektors durch die Topoisomerase I direkt an den TOPO-Vektor ligiert werden.

Etwa eine Woche nach dem Zellsortieren am FACS-Gerät, wenn genügend Zellen in der Kulturflasche gewachsen waren, wurde die DNA aus den Zellen isoliert. Es wurde hierfür das Dneasy Blood&Tissue Kit<sup>20</sup> mit leicht variiertem Protokoll verwendet. Nach Abtrypsinieren, Waschen und Zentrifugation der Zellen wurde das Pellet in 200µl PBS resuspendiert und 20µl Proteinase K sowie 200µl Puffer (AL) dazugemischt. Danach wurde für etwa zehn Minuten bei 56°C inkubiert. Anschließend wurden 200µl 99%iges Ethanol dazu gegeben und das Gemisch in eine Säule (DNeasy Mini Spin Column) in ein Tube pipettiert und zentrifugiert, das Eluat verworfen. Nach Zugabe von je einem Waschpuffer folgten zwei weitere Zentrifugationsschritte und zuletzt eine weitere Zentrifugation, um die Reste zu entfernen. Schließlich wurde die Säule in ein neues Tube gestellt und 25µl AE Puffer auf die Membran gegeben. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde ein letztes Mal zentrifugiert. Das Eluat entsprach der isolierten DNA, welche bei -20°C aufbewahrt wurde.

Das Topo-Cloning erfolgte in mehreren Schritten:

#### **1. PCR (1)**

#### **2. Gelelektrophorese**

#### **3. Gelaufreinigung**

#### **4. TOPO-Reaktion**

---

<sup>19</sup> TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing, Invitrogen, Paisley, UK  
<sup>20</sup> Qiagen, Germantown, USA

## 5. Transformation in Bakterien

## 6. PCR (2)

## 7. Gelelektrophorese

## 8. Gelaufreinigung

### **PCR**

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode mit der kleinste DNA Mengen in vitro vervielfältigt werden können.

Voraussetzung ist, dass die Sequenz des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes bekannt ist. Dann kann mit Hilfe von zwei entsprechenden Primern (20-30bp große Oligonukleotide), welche komplementär zu den Basen am Anfang und am Ende dieses Abschnittes sind, die PCR durchgeführt werden. Außer der zu amplifizierenden DNA und den Primern benötigt man für die Reaktion eine DNA-Polymerase (Taq-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermophilus aquaticus*, welches bei hohen Temperaturen funktionsfähig ist), Desoxynukleosidtriphosphate als Bausteine für die neusynthetisierten DNA-Stränge, geeignete Pufferlösungen und  $Mg^{2+}$ -Ionen.

Die PCR wird in einem Thermocycler durchgeführt. Dieses Gerät ist in der Lage, die Reaktionsgefäße auf die für den jeweiligen Schritt benötigte Temperaturen präzise zu erhitzen bzw. wieder abzukühlen.

Die PCR erfolgt in drei Schritten:

**1) Denaturierung** - Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA auf 94-96°C erhitzt um die Wasserstoffbrückenbindungen zu spalten und die DNA in Einzelstränge aufzutrennen.

**2) Primerhybridisierung** - Im zweiten Schritt wird die Temperatur für ca. 30 Sekunden auf 50-65°C gesenkt, damit die Primer mit den Einzelsträngen hybridisieren können („Annealing“).

**3) Elongation** - Anschließend kommt es in Gegenwart der Taq-Polymerase zur Auffüllung des Einzelstranges mit den komplementären freien Nukleotiden der vier Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin. Die geeignete Temperatur hängt von der jeweiligen Basenfolge ab, liegt aber in der Regel zwischen 65 und 72°C. Die Dauer des Schrittes hängt von der Prozessionsgeschwindigkeit der Polymerase und der Länge des zu amplifizierenden Fragments ab.



Die Abfolge der beschriebenen drei Schritte wird als Zyklus bezeichnet und lässt sich mehrmals, meist 25-35 Mal, wiederholen. Dabei kommt es zu einem exponentiellen Anstieg der Menge des amplifizierten DNA-Abschnittes.

### **1. PCR**

Die isolierte DNA wurde mittels PCR im Thermocycler<sup>21</sup> amplifiziert. Pro Probe (Klon) wurden je nach Größe des bei der DNA-Extraktion sichtbaren Pellets 4-8µl DNA, 2µl NHEJ G1-Primer<sup>22</sup> (10pmol), 2µl NHEJ G2-Primer<sup>23</sup> (10pmol), 12,5µl PCR-Mastermix<sup>24</sup> verwendet und mit a.dest. auf 25µl aufgefüllt. Folgendes PCR-Programm wurde benutzt: 96°C -2min; **35x**: 96°C -30sek, 68°C -20sek, 72°C -1min 20sek; 72°C -5min.

### **Gelelektrophorese**

Bei der Agarose-Gelelektrophorese handelt es sich um eine Methode, mit der Nukleinsäure-Stränge nach ihrer Größe aufgetrennt werden können. Das Gel besteht aus vernetzten Fäden von Agarose. Je höher die Konzentration des Gels, desto kleiner sind die Poren im Gel, was dann die Auftrennung kleiner Fragmente begünstigt. In höher konzentrierten Gelen lässt sich daher die Auftrennung verstärken. Ein elektrisches Feld wird angelegt, so dass die negativ polarisierte DNA zur Anode wandert. Dabei wandern kleinere Moleküle schneller durch das Gel als größere. Zum Vergleich dient jeweils ein DNA-Standard<sup>25</sup> mit definierten Fragmentlängen.

Der Agarose-Matrix wird zudem Ethidiumbromid zugesetzt, ein Farbstoff, der in die DNA interkaliert und unter Einfluss von UV-Strahlung fluoresziert. Auf diese Weise lassen sich die DNA-Banden nach dem Gellauf auf dem UV-Lichttisch sichtbar machen. Der Probe muss zusätzlich noch ein Auftragspuffer hinzugefügt werden, der die DNA bindet und dafür sorgt, dass diese am Grund der Auftrags tasche des Gels bleibt und nicht frei in den Elektrophoresepuffer diffundiert.

---

<sup>21</sup> Robo Cycler, Stratagene, La Jolla, USA  
<sup>22</sup> NHEJ-1 (for.) 5`3` : -gca aat ggg cgg tag gcg tgt a-, 5pmol/µl  
<sup>23</sup> NHEJ-2 (rev.) 5`3` : -tcg ggc atg gcg gac ttg aa-, 5pmol/µl  
<sup>24</sup> PCR Master-Mix Y, peQ Lab, #01-1320, Erlangen, Deutschland  
<sup>25</sup> 1kb DNA Ladder, Invitrogen, 10µl+ 90µl a.dest.+ 20µl DNA-Auftragspuffer

Vor dem Gellauf wurde das Agarosegel in der Elektrophoresekammer<sup>26</sup> mit 0,5x TBE<sup>27</sup> überschichtet. Die 25µl PCR-Produkt + 5µl Auftragspuffer<sup>28</sup> wurden auf das 1%iges Ethidiumbromid<sup>29</sup>-Gel<sup>30</sup> aufgetragen. Nach 45-60 Minuten Laufzeit in einem elektrischen Feld von 5V/cm erfolgte die Beurteilung auf dem UV-Lichttisch<sup>31</sup> und die Banden wurden ausgeschnitten.

### **DNA-Aufreinigung**

Die ausgeschnittenen Banden wurden entweder im Kühlschrank bei 4°C verwahrt oder sofort weiter bearbeitet.

Zur Isolation von elektrophoretisch aufgetrennten DNA Banden wurde das Gelextraktionskit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System<sup>32</sup> verwendet.

Das Agarosestück mit der DNA-Bande wurde gewogen, 10µl Membrane Binding Solution pro 10mg Gel hinzu gegeben und bei 65°C inkubiert, bis sich das Gel komplett aufgelöst hatte. Das gelöste Gel wurde auf eine Säule (SV Minicolumn) in einem Tube pipettiert und nach Inkubation von einer Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert (1min, 13000rpm). Anschließend wurde in zwei Schritten eine ethanolhaltige Waschlösung (Membrane Wash Solution) auf die Säule gegeben und zentrifugiert (eine Minute und fünf Minuten bei 13000rpm). Das Eluat wurde nach jedem Zentrifugationsschritt verworfen. Dann wurde die Säule in ein sauberes Tube gesetzt und etwa 25µl Nuklease-freies Wasser in die Säule gegeben, für eine Minute bei Raumtemperatur stehen gelassen und schließlich ein letztes Mal zentrifugiert (1min, 13000rpm). Im Tube befand sich danach die aufgereinigte DNA, welche bei -20°C verwahrt wurde.

### **TOPO-Reaktion**

5µl PCR-Produkt + 1µl dil. Salt Solution<sup>33</sup> + 1µl TOPO-Vektor wurden zusammengegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

---

<sup>26</sup> Biorad, Hercules, USA

<sup>27</sup> 5,4g Tris-Base; 2,75g Borsäure; 2ml 0,5 M EDTA pH 8,0 mit Wasser auf 1 l aufgefüllt

<sup>28</sup> 0,5% SDS; 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol; 31% Glycerol (w/v) und 25mM EDTA in a.dest.

<sup>29</sup> Ethidiumbromid 10mg/ml, ICN Biomedicals Inc. #802511, Solon, USA

<sup>30</sup> 1g Agarose (Agarose Invitrogen, Paisley, Scotland) in 100 ml 0,5x TBE und 3µl 1% Ethidiumbromid

<sup>31</sup> Biorad, Hercules, USA

<sup>32</sup> Promega, Madison, USA

## **Transformation in Bakterien**

In ein E.coli-Tube<sup>34</sup> wurden 2µl des TOPO-Reaktionsgemisches dazugegeben und mittels Elektroporation im Elektroporator<sup>35</sup> bei einem Puls von 1,8kV und 950 Mikrofarad die DNA in die Bakterien eingeschleust. Die Suspension wurde in 250µl S.O.C.-Medium<sup>36</sup> überführt und eine Stunde lang bei 37°C und 225rpm in einem Schüttler inkubiert. Daraufhin wurde die Suspension mittels eines 4-Ösen-Ausstriches auf je drei bis vier Agarplatten mit Ampicillin<sup>37</sup> aufgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert.

## **2.PCR**

Die über Nacht gewachsenen Bakterienklone wurden einzeln mittels einer Pipettenspitze „gepickt“ und je ein Klon in ein PCR-Ansatz (1,5µl NHEJ G1, 1,5µl NHEJ G2, 12,5µl PCR-Master-Mix und 9,5µl a.dest.) gegeben. Es wurde das gleiche PCR-Programm wie für die erste PCR verwendet.

### **2.3.4 Sequenzierung**

Die aufgereinigten DNA-Banden nach der 2. PCR des TOPO-Cloning-Verfahrens wurden nach dem Big-Dye-Termination Protokoll sequenziert.

Hierfür wurde folgender PCR-Ansatz verwendet: 4µl Big Dye-Puffer, 6µl Half-Term-Puffer, 3µl NHEJ G1 (15pmol), 3µl DNA und 4µl a.dest..

Verwendet wurde das folgende PCR-Programm: 35x: 96°C -50sek, 55°C -55sek, 60°C -4min.

Anschließend erfolgte die Fällung des PCR-Produktes. Dem 20µl PCR-Produkt wurden 3µl Natriumacetat<sup>38</sup> und 50µl 99%iges Ethanol zugegeben, vermischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 20 Minuten bei 13000rpm und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand abgenommen und 250µl 70%iges Ethanol in jede Probe pipettiert. Es erfolgte erneut eine 20minütige

---

<sup>33</sup> Salt Solution (1,2M NaCl, 0,06M MgCl<sub>2</sub>) 4-fold diluterd with a.dest.

<sup>34</sup> One Shot® TOP10 Electrocompetent E.coli, Topo TA Cloning® Kit, Invitrogen, Paisley, UK

<sup>35</sup> E.coli-Pulser, Biorad, Hercules, USA

<sup>36</sup> Topo TA Cloning® Kit, Invitrogen, Paisley, UK

<sup>37</sup> 50mg/ml Ampicillin, 800µl in 400ml LB (100µg/ml), Sigma, St.Louis, USA

<sup>38</sup> 3M Sodium Acetate Buffer, pH 4,6, Perkin Elmer, Waltham, USA

Zentrifugation bei 13000rpm und Raumtemperatur. Nach vorsichtiger Abnahme des Überstandes wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet.

Der Gellauf und die Analyse der Basenfolgen wurde im Service-Sequenzierlabor des Institutes für Pathologie an einem automatischen Sequenzierer<sup>39</sup> durchgeführt.

## **2.4 Methoden zur Zellzyklusanalyse**

### **2.4.1 Propidiumiodid-Färbung**

Propidiumiodid (PI) ist ein Farbstoff, der in DNA interkaliert. Dies macht man sich zu Nutze um den DNA-Gehalt von Zellen zu bestimmen. Anhand des DNA-Gehaltes einer Zelle kann man beurteilen, in welcher Zellzyklusphase sich diese befindet. In der G2-Phase des Zellzyklus ist der DNA-Gehalt der Zelle im Vergleich zur G1-Phase verdoppelt.

Da PI allerdings nur die Membran von toten Zellen perforiert, müssen die Zellen vor der Behandlung fixiert werden.

Für die Färbung der DNA mit PI wurden die Zellen abtrypsiniert, in Medium resuspendiert, für drei Minuten bei 1200rpm und Raumtemperatur zentrifugiert, in 10ml 1xPBS aufgenommen und abermals zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 1ml 1xPBS resuspendiert und zur Fixierung langsam, um Verklumpungen zu verhindern, in 6ml 80%igem Ethanol eingetropt. Nach 24 Stunden bei -20°C wurden die Zellen pelletiert, einmal mit 1xPBS gewaschen und mit RNase-PI-Lösung<sup>40</sup> gefärbt (20 Minuten, Raumtemperatur, im Dunkeln). Danach erfolgte die Messung am FACS-Gerät.

### **2.4.2 BrdU-Färbung**

Um zu detektieren, welcher Anteil der Zellen aktiv proliferiert, wurde in dieser Arbeit neben der Färbung mit Propidiumiodid zur Zellzyklusanalyse zusätzlich die Methode der Bromdesoxyuridin (BrdU)-Färbung angewendet.

Das BrdU wird während der Replikation anstelle von Thymidin in die neusynthetisierte DNA eingebaut. Es werden nur diejenigen Zellen mit dem BrdU

---

<sup>39</sup> Automatischer Sequenzer ABI-377, Applied Biosystems, Foster City, USA  
<sup>40</sup> 50µl RNase-Stammlösung (10mg RNaseA #34390.02, Serva /ml 1xPBS) + 450µl PI-Arbeitslösung (0,5 ml PI-Stammlösung (1mg Propidiumiodid/ml 1xPBS) + 49,5ml 1xPBS

markiert, die sich während der Inkubationszeit mit dem BrdU in der S-Phase des Zellzyklus befinden. Zusätzlich kann festgestellt werden, ob die Zellen aktiv replizieren und zu welchem Zeitpunkt der Eintritt in die S-Phase erfolgt. Es erleichtert die Beurteilung, ob eine Zellpopulation im Zellzyklus arretiert werden konnte. So können noch genauere Angaben über die Zellzyklusverteilung gemacht werden, als wenn nur mit Propidiumiodid gefärbt wird.

Den Zellen wurde für 30 Minuten 100µl BrdU<sup>41</sup> pro 5ml Medium zugesetzt.

Nach der 30minütigen Inkubationszeit wurden die Zellen wie oben bei der PI-Färbung beschrieben in 80%igem Alkohol fixiert und anschließend bei -20°C für mindestens 24 Stunden gelagert. Anschließend konnte die BrdU-Markierung mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung und FACS-Messung qualifiziert werden. Hierfür wurden die fixierten Zellen zunächst für fünf Minuten bei 1200rpm und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Permeabilisation der Zellmembran erfolgte die Zugabe von 2ml HCL-Triton-Lösung<sup>42</sup> für 30 Minuten bei 37°C im Dunkeln. Anschließend erfolgten weitere Zentrifugations- (jeweils fünf Minuten, 1200rpm, RT) und Wasch-Schritte mit Borat-Lösung<sup>43</sup> und PBS<sup>44</sup>.

Um unspezifische Antigenstrukturen zu blockieren, wurden die Zellen mit 1ml PBT<sup>45</sup>-Ziegen Serum<sup>46</sup> für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert.

Nach Zentrifugation und Absaugen des Überstandes erfolgte die Zugabe eines BrdU-Antikörpers<sup>47</sup>. Dieser wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit 1xPBS und Zentrifugation wurde der zweite Antikörper für ebenfalls 30 Minuten, Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Dieser Anti-Maus Antikörper ist fluoreszenzmarkiert (FITC-AK<sup>48</sup>). Danach

---

<sup>41</sup> 40mg 5'-Brom-2'-desoxyuridin + 32mg Cytidin ad 100ml 1xPBS, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

<sup>42</sup> 2N HCl+0,1% Triton-X-100

<sup>43</sup> 0,1M Borat, 2x3ml

<sup>44</sup> 1x3ml 1xPBS

<sup>45</sup> 1xPBS+0,5% TWEEN20, Sigma, St. Louis, USA

<sup>46</sup> 250µl Ziegen Serum (Gibco, Paisley, UK) ad 50ml PBT

<sup>47</sup> Monoklonaler Maus-Anti-BrdU AK, 10mg/l in PBT-Ziegen Serum, 100µl, Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark

<sup>48</sup> FITC-konjugierter monoklonaler Anti-Maus-AK, 25µg/l in PBT Ziegen Serum, 100µl, Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark

wurde erneut zwei Mal mit 1xPBS gewaschen und zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Färbung der DNA mit 0,5ml Propidiumiodid<sup>49</sup> wie zuvor beschrieben.

### **2.4.3 Synchronisation durch Isoleucinentzug**

Um eine Zellpopulation im Zellzyklus anzuhalten, wurde die Methode des Isoleucinentzuges benutzt. Ohne diese Aminosäure hören die Zellen auf sich zu teilen und treten in die G0-Phase ein.

Dazu wurde Normalmedium durch isoleucinfreies Medium<sup>50</sup> ersetzt, dem 5% dialysiertes fötales Kälberserum und 2% L-Glutamin zugegeben wurde. Die Dialyse ist notwendig, um auch aus dem Kälberserum Isoleucin zu entfernen. Zur Dialyse wurde FCS in ca. 15cm lange Dialyseschläuche gegeben und diese unter ständigem Rühren fünf Tage gegen 5L PBS-Puffer dialysiert. Täglich wurde der Dialysepuffer ausgetauscht und schließlich nach den fünf Tagen steril filtriert, aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -20°C weggefroren.

Um die Zellen zu synchronisieren wurde das normale Medium abgenommen, die Zellkulturflasche einmal gründlich mit 10ml 1xPBS gewaschen und für 36 Stunden das vorbereitete Isoleucinfreie Medium auf die Zellen gegeben.

---

<sup>49</sup> 10mg Propidiumiodid ad 1l PBS

<sup>50</sup> DMEM w/o L-Isoleucine, w/o L-Glutamine, w/o Na- Pyruvate, Sonderanfertigung

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Strahlensensibilität der Zellen

Zur Bestimmung der Strahlenempfindlichkeit von CV1-Zellen wurde die Koloniebildungsfähigkeit nach Röntgenbestrahlung untersucht. Zwischen 100 und 50.000 Zellen wurden ausgesät und mit Dosen von 0-8Gy bestrahlt. Nach 14 Tagen wurden die Kolonien fixiert, gefärbt und ausgezählt. Aus dem Verhältnis der Anzahl gewachsener Kolonien zu der Anzahl an ausgesäten Zellen, ergab sich die Plattierungseffizienz. Die Plattierungseffizienz von unbestrahlten Zellen betrug im Mittel 0,74. Die Überlebenskurve (Abb. 6) beginnt mit einem flach verlaufenden Anteil, auch „Schulter“ genannt, und geht dann über in eine nahezu exponentielle Abnahme der Überlebensfraktion. Mit Hilfe des linearquadratischen Modells (53)  $S=e^{-\alpha D-\beta D^2}$  wurde der Kurvenverlauf mathematisch beschrieben. S (survival) ist das Überleben nach einer Dosis (D),  $\alpha$  und  $\beta$  sind die Koeffizienten des linearen und des quadratischen Terms. Nicht-lineare Regressionsanalyse ergibt ein  $\alpha=0.25$  ( $\pm 0.04$ ) und ein  $\beta=0.056$  ( $\pm 0.005$ ), die Überlebensfraktion nach 2Gy (SF2) beträgt 0.54 ( $\pm 0.04$ ). Für die CV1-Zellen zeigte sich damit eine normale Strahlensensibilität, die im Bereich anderer Normalzellen und auch vieler humaner Tumorzellen liegt (54-56), so dass ein wesentlicher Reparaturdefekt ausgeschlossen werden kann.

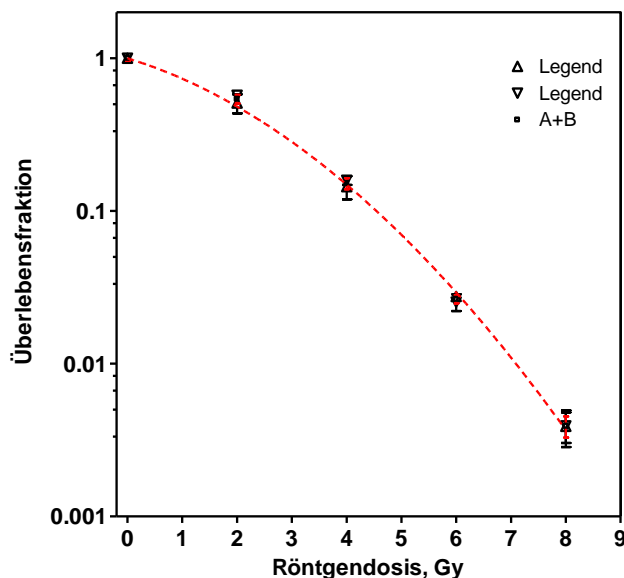


Abbildung 6: Koloniebildung von CV1-Zellen nach Bestrahlung. Die Abbildung zeigt das Überleben der Zellen nach Röntgenbestrahlung mit 0, 2, 4, 6 oder 8 Gray. Der Versuch wurde zweifach durchgeführt und die Ergebnisse normiert.

### 3.2 **Reparatureffizienz**

Ziel weiterer Versuche war es, die Effizienz der Reparatur über die Wege des NHEJ und SSA in den CV1-Zellen zu untersuchen.

Hierfür wurde zunächst die Gesamteffizienz der Reparatur gemessen.

Die verschiedenen pEJSSA-Klone wurden nach der klonalen Aufzucht auf ihre Reparatur hin untersucht. Hierfür wurden die exponentiell wachsenden Zellen mit dem I-SceI-Expressionsplasmid transfiziert und so Doppelstrangbrüche erzeugt. Nach 48 Stunden Reparaturzeit wurde der Anteil grünfluoreszierender Zellen im Flusszytometer bestimmt. Dieser entspricht dem Anteil der Zellen, die erfolgreich repariert haben und somit das GFP exprimieren. Diese Reparaturrate wurde jeweils auf die zuvor ermittelte Transfektionseffizienz (vergleiche Material und Methoden) von 50% normiert und damit die Reparatureffizienz ausschließlich der transfizierten Zellen ermittelt. Die vier untersuchten Klone zeigten eine Reparatureffizienz zwischen 4 und 6% (Abb. 7). Diese liegt damit in einer ähnlichen Größenordnung wie bei CHO-Zellen (37).

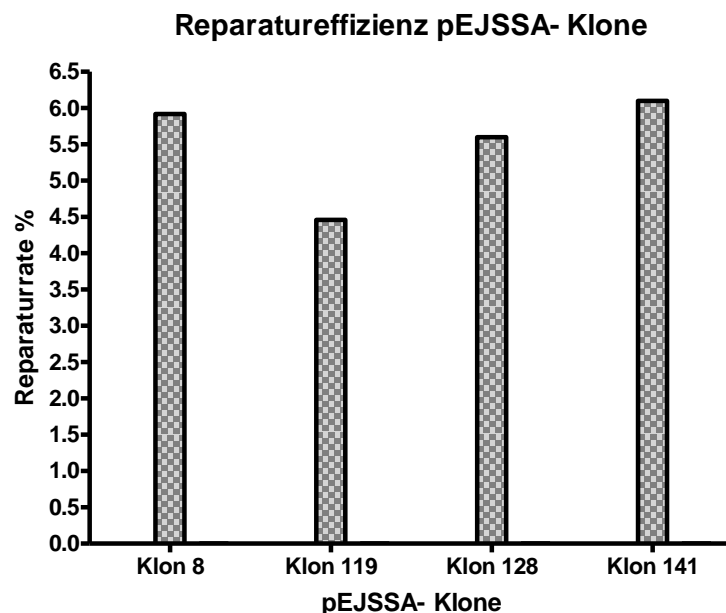


Abbildung 7 zeigt die Reparatureffizienz der pEJSSA-Klone 8, 119, 128 und 141 normiert auf eine Transfektionseffizienz von 50%.

Diese Ergebnisse zeigen Werte für die Gesamtreparatur, erlauben aber keine Rückschlüsse auf die Art der Reparatur.



### 3.3 Reparaturergebnisse

Zur Unterscheidung des Mechanismus (NHEJ oder SSA), der zur Reparatur der einzelnen Doppelstrangbrüche in den CV1-Zellen führte, wurde eine große Anzahl von Reparaturereignissen mit der Methode des Topo-Clonings sequenziert.

Nach 48 Stunden Reparaturzeit wurden von den einzelnen Klonen (Nr. 8, 119, 128 und 141) die grünfluoreszierenden Zellen im Flusszytometer aussortiert und deren DNA isoliert. Der Reparaturbereich wurde mit flankierenden Primern mittels PCR amplifiziert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend aus dem Gel aufgereinigt. Das Fragmentgemisch entspricht der Gesamtheit der Reparaturereignisse. Diese PCR-Fragmente wurden in die Topo-Cloning-Vektoren hinein ligiert. Durch Elektrotransformation wurde unter den gewählten Bedingungen im Mittel je ein Vektor mit einem Reparaturereignis pro Bakterium aufgenommen, sodass jeweils ein Reparaturereignis in einer Bakterienkolonie amplifiziert wurde. Am folgenden Tag wurden die Bakterienkolonien einzeln „gepickt“ und mittels einer zweiten PCR der Reparaturabschnitt erneut amplifiziert. Nun konnte anhand der DNA-Bandengröße bereits beurteilt werden, ob für die Reparatur NHEJ oder SSA verwendet worden war. Die Mehrzahl der Fragmente zeigte eine Größe um die 550bp, was NHEJ entspricht (Abb. 9). Wurde hingegen SSA als Reparaturmechanismus verwendet, so zeigte sich eine deutlich kleinere Bande von genau 415bp. Allerdings ist es möglich, dass auch ausgedehnte Deletionen im Rahmen des Endjoinings zu Fragmenten um 415bp führen können.

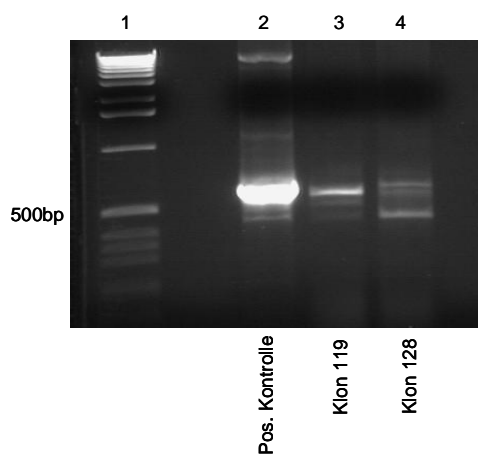


Abbildung 8. DNA-Banden der Gelelektrophorese nach der ersten PCR des Topo-Clonings der pEJSSA-Klone 119 und 128. Die Gesamtheit der Reparaturereignisse des einzelnen Klons ist jeweils aufgetragen. In Spalte 1 wurde der DNA-Standard zum Ablesen der Größe der Banden aufgetragen. Als Positivkontrolle diente linearisiertes pEJSSA.

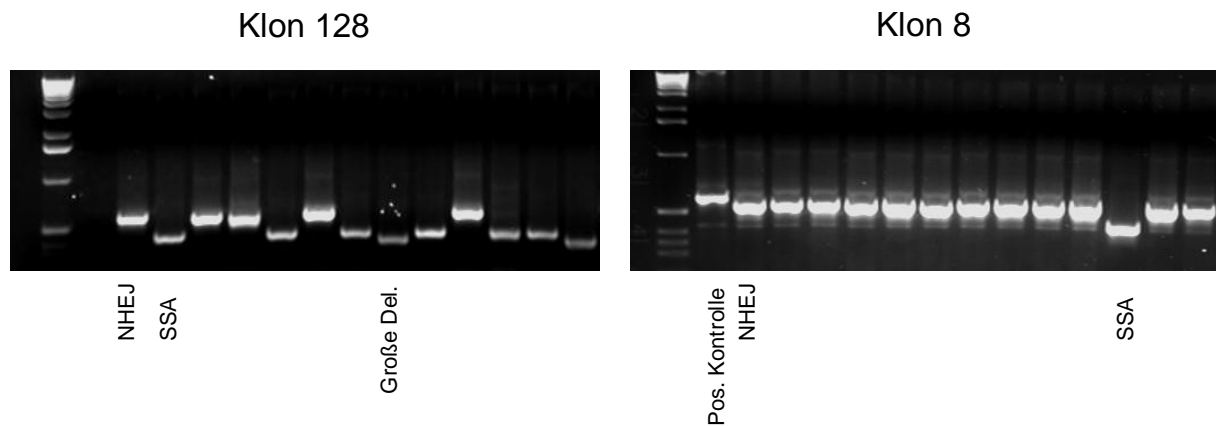


Abbildung 9: DNA-Banden der Gelelektrophorese nach der zweiten PCR des Topo-Clonings der pEJSSA-Klone 128 und 8. Jede Bande enthält die DNA aus einem Bakterienklon und entspricht einem Reparaturereignis. Ganz links ist jeweils der DNA-Standard aufgetragen, an ihm lässt sich die Bandengröße ablesen.

Somit war es erst nach der folgenden Sequenzierung aller PCR Produkte möglich, mit Sicherheit zu sagen, welcher Mechanismus für die Reparatur verwendet worden war.

Es zeigten sich hierbei Unterschiede zwischen den vier untersuchten pEJSSA-Klonen. Klon 141 reparierte ausschließlich mittels NHEJ (100 %) und niemals über SSA (0%). Bei dem pEJSSA-Klon 8 fanden sich bei vier von 23 Ereignissen SSA (17%). Die übrigen hatten mittels NHEJ (83%) repariert. Der pEJSSA-Klon 119 reparierte in zwei von 52 Fällen mittels SSA (4%).

Ganz anders verhielt es sich bei dem pEJSSA-Klon 128. Es fand sich in 38 von 53 Klonen eine Reparatur mittels SSA (72%). Nur 15 von 53 Klonen (38%) hatten NHEJ für die Reparatur benutzt.

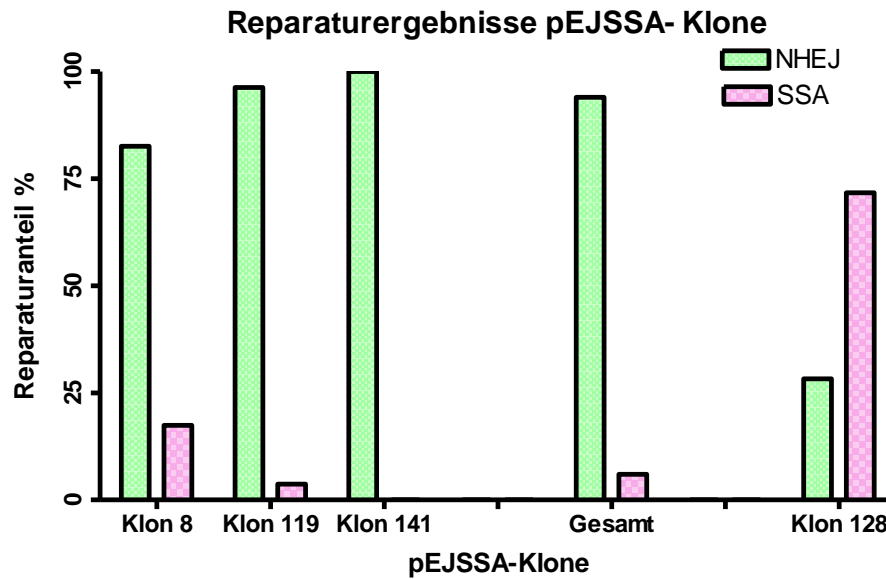


Abbildung 10 zeigt die Reparaturergebnisse der pEJSSA-Klone 8, 119, 128 und 141. Es wird der Anteil von NHEJ und SSA an allen Reparaturereignissen des jeweiligen Klons, bzw. der Klone 8, 119 und 141 zusammengefasst, dargestellt.

Aufgrund dieser großen Abweichung von den anderen Klonen wurde Klon 128 gesondert betrachtet und aus der Gesamtberechnung ausgeschlossen (Siehe Diskussion).

Zusammenfassend wurde gefunden, dass für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen in CV1-Zellen vornehmlich NHEJ verwendet wird. Dies geschah, im Mittel der Klone 8, 119 und 141, in 94% der 100 ausgewerteten Reparaturereignisse. Nur in 6% der Fälle wurde mittels SSA repariert.

### 3.4 NHEJ

Während der Reparatur über NHEJ wird bei jedem Reparaturvorgang eine unterschiedliche Anzahl von Basen entfernt oder eingefügt, so dass insgesamt eine große Vielfalt von Sequenzen gefunden wurde. Von jedem Reparaturereignis mittels NHEJ wurde das Produkt der Gelelektrophorese sequenziert.

Abbildung 11 zeigt alle NHEJ-Sequenzen.

**PEJSSA REPARATURSEQUENZEN**

CTGCGGAATTCTAGGGATAA CAGGGTAATTAAGCTTCTGCAGACCATGGAGATTACCTGTAT CCCTACCCGGGGATACTGAC



CTGCGGAATTCTAGGGATAA-----CCCTACCCGGGGATACTGAC

SEQUENZ	DEL	µH	8	141	119	128	GES.
CTGCGGAATTCTAGGGAT -----TAT CCCTACCCGGGGATACTGAC	0	1	9	12	16	2	39
CTGCGGAATTCTAGGGATAA.-----T CCCTACCCGGGGATACTGAC	0	1	4	5	10	2	21
CTGCGGAATTCTAGGGATAA ----- CCCTACCCGGGGATACTGAC	0	0	1	0	6	1	8
CTGCGGAATTCTAGGGAT-- ----- CCCTACCCGGGGATACTGAC	2	2	0	3	4	1	8
CTGCGGAATTCTAGGGATA- -----T CCCTACCCGGGGATACTGAC	0	2	0	1	7	1	9
CTGCGGAATTCTAGGGATA- ----- CCCTACCCGGGGATACTGAC	1	0	0	0	3	0	3
CTGCGGAATTCTAGGGATAA -----TTAT CCCTACCCGGGGATACTGAC	0	0	0	0	1	0	1
CTGCGGAATTCTAGGG-----TTAT CCCTACCCGGGGATACTGAC	0	0	1	0	2	0	3
CTGCGGAATTCT-----TAT CCCTACCCGGGGATACTGAC	5	1	0	0	0	1	1
CTGCGGAATTCTAGGGATA- -----CCCGGGATACTGAC	6	2	1	0	0	0	1
CTGCGGAATT-----TAT CCCTACCCGGGGATACTGAC	7	1	0	0	3	0	3
CTGCGGAATTCT----- CCCTACCCGGGGATACTGAC	8	0	0	1	0	0	1
CTGCGGAATTCTAGG-----TACCCGGGGATACTGAC	8	0	1	0	0	0	1
CTGCGGAATT----- CCCTACCCGGGGATACTGAC	10	1	1	0	0	0	1
CTGCGGAATTCTA-----CGGGATACTGAC	14	0	0	0	0	1	1
CTGCG-----A -----ACCCGGGGATACTGAC	18	1	1	0	0	0	1

Abbildung 11: Sequenzen der Reparaturprodukte nach NHEJ und deren Anzahl bei den einzelnen Klonen (8, 141, 119 und 128) sowie insgesamt (=Ges.). Del.= Anzahl der deletierten Basenpaare; µH= Anzahl der Mikrohomologien. In der obersten Zeile ist die parenterale Sequenz, in der zweiten Zeile die Sequenz nach Schnitt der I-SceI-Resriktionsendonuklease gezeigt.

Die Analyse der Sequenzen ergab, dass jedes der Reparaturereignisse Folge von Einschnitten an beiden I-SceI-Sequenzen war. In anderen Zellsystemen konnte zuvor gezeigt werden, dass positive Reparaturereignisse auch auf einem einzelnen I-SceI-Bruch beruhen können (57, 58).

Eine Deletion ist der Verlust eines oder mehrerer Nukleotide. In den meisten Fällen entstanden bei der Reparatur mittels NHEJ keine oder nur kleine Deletionen von wenigen Basenpaaren. Veränderungen an den Überhängen dürfen dabei nicht als Deletion gewertet werden. Klon 8, 119, 141 zusammen zeigten in 80,5% der Reparaturereignisse keine Deletionen.

Gelegentlich kamen jedoch auch größere Deletionen vor. Dies war insbesondere bei Klon 128 der Fall. Es fand sich in sechs von den 15 erfolgten NHEJ-Reparaturen eine Deletion von 171bp. Nur in 40% der Fälle fand sich hier eine Reparatur ohne Deletionen. Auch dieses Resultat bestätigt das ungewöhnliche Reparaturverhalten des Klons 128.

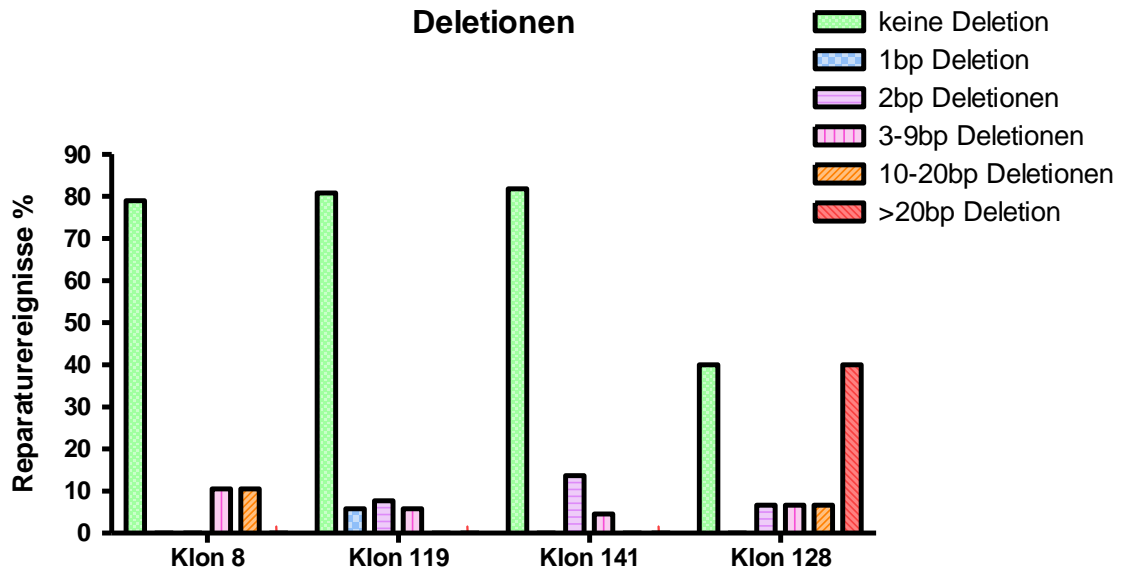


Abbildung 12 zeigt den Anteil von Reparaturereignissen mit einer bestimmten Anzahl an Deletionen der verschiedenen pEJSSA-Klone.

Für die Reparatur von DSB mittels NHEJ werden oft so genannte Mikrohomologien verwendet. Hierbei werden für das Zusammenfügen der DNA-Fragmente kurze Homologien von 1-6 Basen benutzt, die durch die Prozessierung der DSB-Enden frei exponiert werden und dann miteinander paaren können. Die pEJSSA-Klone benutzen ausschließlich Mikrohomologien von maximal zwei Basenpaaren. In 15,3% der Fälle (alle vier Klone zusammen betrachtet) wurden keine Mikrohomologien für die Reparatur verwendet, wobei es bei Klon 141 kein Reparaturereignis ohne die Verwendung einer Mikrohomologie gab.

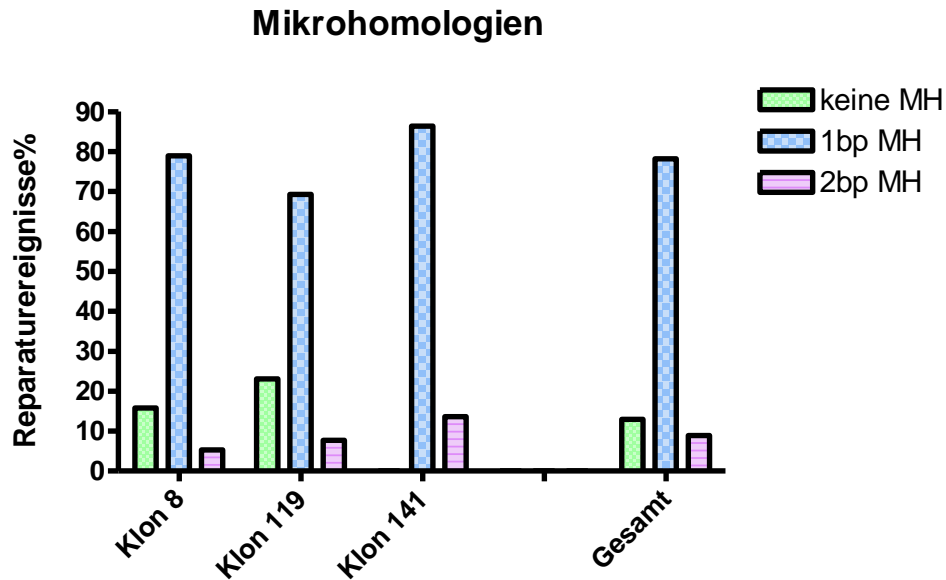


Abbildung 13 stellt den Anteil von Reparaturereignissen mit einer bestimmten Anzahl an Mikrohomologien der verschiedenen pEJSSA-Klone dar.

### 3.5 Zellzyklus

Es sollte geprüft werden, ob CV1-Zellen geeignet sind, um DSB-Reparatur in verschiedenen Zellzyklusphasen getrennt zu untersuchen. Mittels Isoleucinenzug wurden die Zellen synchronisiert. Hierfür wurden die Zellen in mehrere Kulturflaschen ausgesät und für 36 Stunden in isoleucinfreiem Medium gehalten. Durch diese Behandlung gingen die Zellen in die G<sub>0</sub>-Phase und wurden so im Zellzyklus arretiert. Danach konnten die Zellen durch den Wechsel des isoleucinfreien Mediums gegen normales Nährmedium wieder aus dem Arrest entlassen werden und sie traten gemeinsam in die S-Phase ein. Um die Kinetik und das Ausmaß dieser Rückführung in den Zellzyklus zu untersuchen wurde den Zellen direkt nach den 36 Stunden Isoleucinenzug und zu verschiedenen Zeitpunkten danach für 30 Minuten BrdU zugegeben und dann die Zellen fixiert. Anschließend erfolgten die indirekte Immunfluoreszenzfärbung des BrdUs und die Auswertung am Flusszytometer.

Direkt nach dem 36stündigen Isoleucinenzug zeigte sich im Flusszytometer ein Zellanteil von 87,5% in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase der bereits acht Stunden später auf 61% abgesunken war. Der BrdU-Einbau zeigt den Anteil an Zellen, die sich jeweils in der Replikation befanden. Dieser S-Phase Anteil stieg parallel an, erreichte zwischen 12 und 14 Stunden ein Maximum von 62% und fiel danach wieder ab.

Zeitgleich nahm dann der Anteil an G2-Zellen zu. Zusätzlich konnte auch beobachtet werden, dass eine kleine (1-2%) aber konstante Fraktion der S-Phase Zellen kein BrdU einbaute und somit nicht aktiv replizierte.

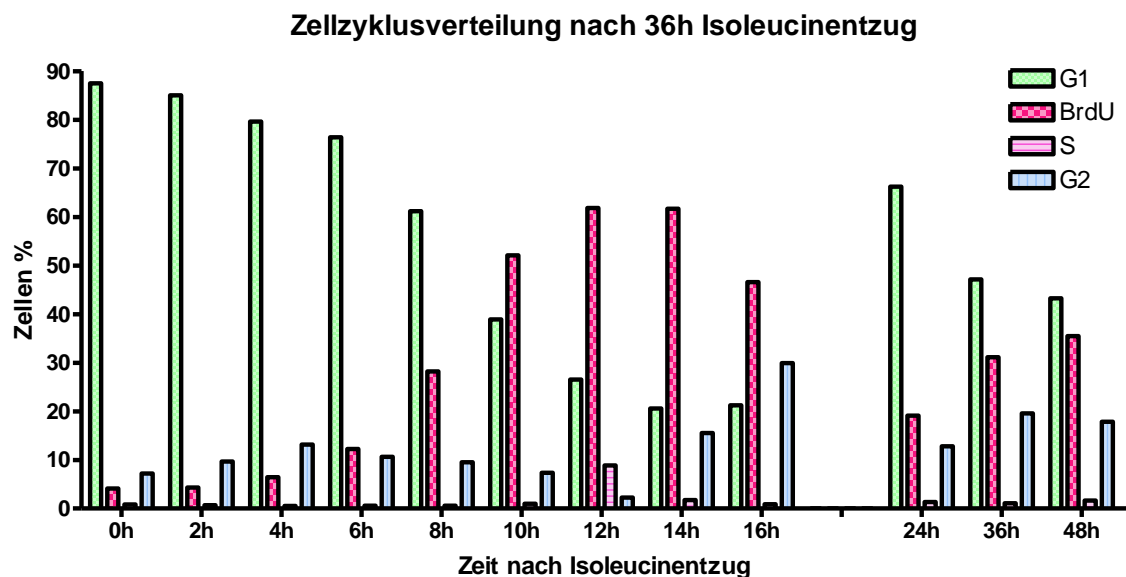


Abbildung 14 zeigt die Zellzyklusverteilung des CV1-pEJSSA-Klons 8 36 Stunden nach dem Isoleucinentzug und nach dem Release in den Zellzyklus. Die x-Achse zeigt die Zeit nach dem Isoleucinentzug in nicht linearer Darstellung.

Um Reparatur messen zu können, müssen die Zellen transient mit dem I-SceI-Plasmid transfiziert werden. Deshalb sollte im nächsten Schritt überprüft werden, inwieweit die Lipofektion den Durchlauf durch den Zellzyklus beeinflusst. Hierfür wurden in einem parallelem Versuchsansatz einige Zellkulturflaschen zwei Stunden nach Aufhebung des Arrests mit dem I-SceI-Plasmid durch Lipofektion transfiziert und dann, wie oben beschrieben, alle zwei Stunden mit BrdU markiert und am Flusszytometer untersucht. Hierbei zeigte sich, dass durch die Lipofektion der Zellzyklus deutlich verändert war. Es erreichten wesentlich weniger Zellen die frühe S-Phase, maximal 39,4%, und mehr Zellen verblieben in der G1-Phase. Gleichzeitig verzögerte sich auch der Eintritt in die S-Phase und begann, wenn die Zellen lipifiziert wurden erst zehn Stunden nach dem Ende des Isoleucinentzugs. Damit konnte sowohl eine Zellzyklusverzögerung um etwa zwei Stunden beobachtet werden wie auch ein Arrest von etwa 20-30% der lipifizierten Zellen in der G1-Phase. Ob dieser Arrest transient ist und später wieder aufgehoben wird, konnte mit diesen Messungen nicht bestimmt werden.

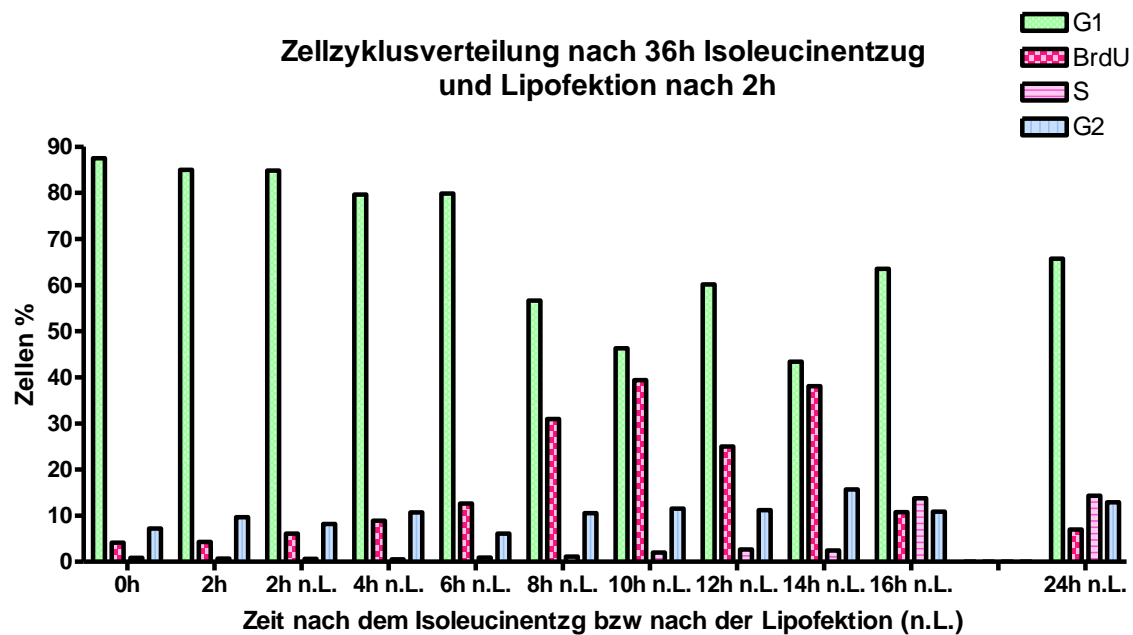


Abbildung 15 zeigt die Zellzyklusverteilung des CV1-pEJSSA- Klons 8 36 Stunden nach dem Isoleucinentzug und nach dem Release in den Zellzyklus. Zwei Stunden nach dem Release erfolgte die Transfektion des Scel-Plasmids mittels Lipofektion. Das heißt, zwei Stunden nach der Lipofektion (2h n.L.) entspricht vier Stunden nach dem Isoleucinentzug.

### 3.6 DSB Induktion mittels des *DsRed-Scel-GR-Fusionsprotein*

Die in der G0-Phase arretierten Zellen zeigten eine Transfektionseffizienz von lediglich 0,68%. Bei exponentiell wachsenden Zellen hingegen betrug die Transfektionseffizienz um die 50%. Um auch DSB an solchen Zellen induzieren zu können, die sich durch Isoleucinentzug in der G0-Phase des Zellzyklus befinden, wurde ein I-Scel-Gen transfiziert, welches mit einem Glukokortikoid-Rezeptor fusioniert ist. Die Expression dieses I-Scel-GR-RFP-Fusionskonstruktes generiert ein zytoplasmatisches Protein, das nach Zugabe des GR-Liganden Triamcinolon Acetonid (TA) in den Kern transloziert wird. Dadurch ist es möglich den DSB zeitlich gezielt zu induzieren (51). Das RFP dient zur Kontrolle der Translokation in den Zellkern.

Mit Hilfe dieses experimentellen Systems war es möglich proliferierende Zellen effektiv zu transfizieren, dann die Zellen im Zellzyklus zu arretieren und anschließend erst durch Zugabe des TA-Liganden den DSB zu induzieren.

Dies ist eine wichtige Voraussetzung um in Zukunft die Reparatur gezielt in nur einer bestimmten Zellzyklusphase zu untersuchen.



Für die Versuche wurde ein pEJSSA-Zellklon (Klon 119) verwendet. Das I-SceI-GR-RFP wurde in die Zellen mittels Lipofektion transfiziert, die Zellen in zwei verschiedenen Konzentrationen neu ausgesät. Zum einen in geringerer Dichte, damit sie sich (bei der TA-Zugabe) im exponentiellen Wachstum befanden, und zum anderen in höherer Dichte, so dass die Zellen konfluent wuchsen, eine weitere Methode um einen G0-Arrest herbeizuführen. 48 Stunden später erfolgte die Zugabe des TA und wieder 48 Stunden danach wurde am FACS die Reparatur gemessen.

Parallel wurden auch Zellen mit dem normalen I-SceI transfiziert und ebenfalls nach 48 Stunden Reparaturzeit am FACS gemessen. Es zeigte sich eine Reparatureffizienz von 2,5% bei den exponentiell wachsenden Zellen. Die konfluenten Zellen zeigten ebenfalls eine gute Reparatureffizienz, welche jedoch mit 1,2% nur halb so hoch war (siehe Abb. 16). Die konventionell mit dem I-SceI transfizierten Zellen zeigten eine geringere Reparatureffizienz von 0,4% (nicht abgebildet).

Eventuell ist die Reparatur in exponentiell wachsenden Zellen effektiver als in Zellen, die sich in der G0-Phase befinden.

Leider war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, die Versuche (auch mit dem Zellzyklusarrest durch Isoleucinentzug) weiter fortzuführen.

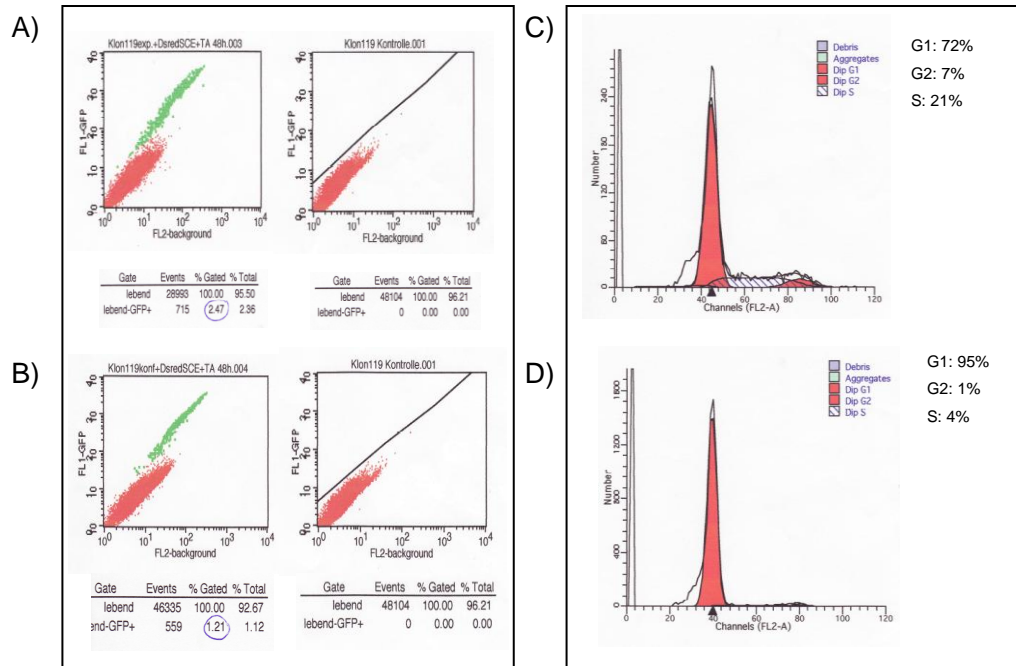


Abbildung 16: Unter A) und B) sind die Reparaturergebnisse der FACS-Analyse abgebildet. A) exponentiell wachsenden Zellen; B) konfluente Zellen. Rechts ist jeweils die untransfizierte Kontrolle abgebildet, welche keine grünfluoreszierende Zellen enthält.

Unter C) und D) sind Zellzyklusmessungen von exponentiell wachsenden Zellen (C) und konfluenten Zellen (D) abgebildet- die Proben entsprechen allerdings nicht demselben Versuch wie unter A und B. Man sieht, dass sich 95% der konfluenten Zellen in der G1/ G0-Phase des Zellzyklus befinden.

## 4 Diskussion

Die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen ist essentiell für die genetische Integrität aller Zellen. Das Ausbleiben der Reparatur oder eine fehlerhafte Reparatur kann zum Zelltod oder zu Mutationen des Genoms und so zu Krebsentstehung führen. Für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen stehen eukaryontischen Zellen zwei Hauptwege zur Verfügung: Die nicht homologe Endverknüpfung (NHEJ) und die homologe Rekombination, welche unterteilt werden kann in die Genkonversion und das SSA. In dieser Arbeit wurden die beiden Reparaturwege NHEJ und SSA erstmalig in human-nahen Primatenzellen untersucht.

### 4.1 Reparaturwege/Mechanismen

Die Untersuchungen der DSB-Reparatur an CV1-Zellen mit Hilfe des pEJSSA-Konstruktes haben gezeigt, dass das NHEJ den vorrangig benutzten Reparaturmechanismus darstellt. In 94% der Fälle erfolgte die Reparatur mittels NHEJ. SSA machte dagegen nur 6% der Reparaturereignisse aus.

Diese Ergebnisse stimmen mit zuvor durchgeführten Untersuchungen mit Hilfe des pEJSSA-Konstruktes in anderen Säugetierzelllinien überein. So zeigten Untersuchungen an Hamsterzellen (CHOK1) eine SSA-Rate von 4% bei 96% NHEJ (37). Dies lässt darauf schließen, dass die DSB-Reparatur in Nagetierzellen und in Primatenzellen ähnlich reguliert wird. Obwohl Primaten einen wesentlich höheren Gehalt an NHEJ-Proteinen (59) aufweisen, wird der Reparaturweg nicht effektiver genutzt als in Nagerzellen.

In vivo ist nicht jeder DSB wie in unserem Modellsystem durch repetitive Sequenzen flankiert, die ein erfolgreiches SSA ermöglichen. Es ist deshalb zum einen anzunehmen, dass die DSB-Reparatur natürlicherweise über das SSA seltener erfolgt als im experimentellen System und zum anderen ist es möglich, dass die Reparatur über SSA bei nicht Vorhandensein von repetitiven Sequenzen nicht erfolgreich ist und in unreparierten DSB endet, die zum Zelltod führen.

Die Reparaturwege von NHEJ und Varianten der Homologen Rekombination (Genkonversion und SSA) wurde auch in verschiedenen Arbeiten zuvor verglichen. Jedoch wurden zumeist Reporterkonstrukte verwendet, die unabhängig von

einander und getrennt nur jeweils einen der Wege detektierten (45-50). Der Vergleich dieser Werte lässt nicht in gleicher Weise wie diese Untersuchung den Schluss über die relative Häufigkeit der Reparaturwege zu. Es ist deshalb kaum möglich, die jeweiligen Ergebnisse direkt zu vergleichen. Untersuchungen in unserem wie auch in anderen Labors haben gezeigt, dass das Verhältnis zwischen NHEJ und SSA veränderbar ist. So können z.B. Defekte in Reparaturproteinen zu einer Verschiebung des Verhältnisses in die eine oder andere Richtung führen. Eine Verschiebung des Verhältnisses von NHEJ zu SSA zeigte sich so bei Untersuchungen (unter Verwendung des pEJSSA) an Zellen mit Defekten in den Reparaturproteinen Rad51 und Ku80. Hier nahm der Anteil an Reparatur mittels SSA gegenüber NHEJ deutlich zu (um 11-26% gegenüber dem Wildtyp) (37). Es ist bekannt, dass Rad51, welches eine zentrale Rolle bei der klassischen Homologen Rekombination, der Genkonversion, spielt, den Reparaturweg über das SSA inhibiert (49,50).

Humane Tumorzellen zeigten ähnliche Verschiebungen der Reparaturanteile. So ergaben in vitro Messungen an der Plattenepithelkarzinomzelllinie FaDu mit 12% eine doppelt so hohe SSA-Rate gegenüber den Untersuchungen an CV1-Zellen. Bei der ebenfalls aus einem Plattenepithelkarzinom isolierten Zelllinie SKX fand sich sogar eine SSA-Rate von 43% (60). Interessanterweise sind die SKX-Zellen wesentlich strahlensensibler im Vergleich zu den FaDu-Zellen. Neben dem bekannten Defekt im NHEJ (Kasten-Pisula) könnte die gezeigte Bereitschaft, in hohem Maße SSA auszuführen, einen zusätzlichen Nachteil bedeuten. SSA-„Reparaturversuche“ bei denen den Zellen die geeigneten Homologien für das SSA fehlen, enden in nicht reparierbaren DSB, die zum Zelltod führen können.

In jedem Fall stellt SSA einen potenziell mutagenen Reparaturweg dar, der auch zu Krebsentstehung führen kann. So zeigten Arbeiten zur Entstehungsweise von chromosomalen Translokationen nach Doppelstrangbrüchen, dass SSA hier eventuell eine Rolle spielt (61). Es wurde in dieser Arbeit ein Modell verwendet, welches es ermöglichte, Translokationen zwischen zwei Alu-Elementen auf verschiedenen Chromosomen, nach Induktion eines DSB, zu detektieren. Anschließend wurde die Häufigkeit der zu Translokationen führenden Reparaturwege betrachtet. Alu-Elemente sind die häufigsten repetitiven Elemente im humanen Genom und mutagene Rekombinationsereignisse wurden an

verschiedenen Krebsarten und auch der AML (akute myeloische Leukämie) gefunden (62-65). Waren diese Alu-Elemente auf den beiden Chromosomen in ihrer Sequenz identisch, so fand man in 85% der entstandenen Translokationen SSA als verwendeten Reparaturweg. Die restlichen 15% waren durch NHEJ entstanden. Waren jedoch die Sequenzen, wie es in vivo zumeist der Fall ist, abweichend voneinander (Alu-Elemente im humanen Genom sind meist zwischen 2% und 30% abweichend) so wurden Translokationen vor allem über NHEJ erzeugt. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Translokationen in vivo in erster Linie über NHEJ erfolgen, dennoch stellt auch SSA einen relevanten Reparaturweg für die Kanzerogenese dar, sowie es in der Nachbarschaft des DNA-Schadens exakt homologe Sequenzen gibt (66).

#### **4.2 Reparaturgenauigkeit**

Die Sequenzanalysen der NHEJ-Reparaturereignisse ergaben eine sehr fehlerarme Reparatur mit wenigen Deletionen. Im Mittel wurde pro Reparaturereignis eine Base entfernt ( $0,95 \pm 0,28$ ), wobei in 80% der Fälle überhaupt keine Deletion entstanden war (den Klon 128 nicht mit einbezogen- s. unten). Dies zeigt, dass NHEJ in Primatenzellen hochgradig präzise und konservativ verläuft.

Dass die klassische NHEJ-Reparatur in Säugetierzellen mit nur wenigen Deletionen einhergeht, zeigte sich in vorherigen Arbeiten mit ähnlichen Ergebnissen (46, 58, 67, 68). Bei CHO-K1 Zellen mit dem pEJSSA-Konstrukt war die durchschnittliche Deletionslänge mit  $0,9 \pm 0,3\text{bp}$  fast identisch zu der in den CV1-Zellen (37).

#### **4.3 Mechanismen des Endjoining-Prozesses**

Für die Reparatur mittels NHEJ wurden häufig Mikrohomologien verwendet. Das heißt, dass wenige homologe Basen an den freien Enden miteinander paarten. Dadurch ist garantiert, dass die Enden zusammen gehalten werden. Im Gegensatz dazu können die Enden auch ohne Paarung von homologen Basen direkt miteinander ligiert werden (blunt ends), wobei die Stabilität der Verbindung geringer ist.

Bei der Reparatur in den CV1-Zellen wurden Mikrohomologien von ein oder zwei Basenpaaren Länge verwendet. Auch in anderen Arbeiten bestätigte sich, dass für die Reparatur mittels NHEJ überwiegend kleine Mikrohomologien von bis zu zwei Basenpaaren verwendet werden. So ergaben Untersuchungen zum NHEJ an CHO-K1 Hamsterzellen nach einem durch die Restriktionsenzyme Sal I und Bam HI induziertem DSB in 84% der sequenzierten Reparaturereignisse die Verwendung von 0-2bp Mikrohomologien (69). In anderen Arbeiten, unter Verwendung eines Vorgängerkonstruktes (pEJ) zu dem hier verwendeten pEJSSA fanden sich in Maus- und Hamsterzelllinien ebenfalls fast ausschließlich Reparaturprodukte, die durch den Gebrauch von bis zu zwei Mikrohomologien entstanden waren (37,67). Mikrohomologien von mehreren Basenpaaren Länge fanden sich dagegen bei fehlerhaften Reparaturereignissen, zum Beispiel bei Zelllinien, welche defizient in einem Reparaturprotein des NHEJ waren (XRCC4 oder Ku80). Diese Reparaturereignisse gingen stets mit größeren Deletionen einher (37,58,67,70). Man geht von einem zweiten NHEJ-Weg, einem „alternativen-NHEJ“, neben dem klassischen NHEJ aus. Dieses alternative NHEJ ist unabhängig von den Reparaturproteinen Ku, DNA-PKcs und XRCC4/LigIV und zeichnet sich durch größere Deletionen und die Verwendung von längeren Mikrohomologien im Vergleich zum klassischen NHEJ aus (69,71,72). Die geringere Stabilität der DNA-Verbindung, welche aus dem Fehlen der zusammenhaltenden Endjoining-Proteine resultiert, wird in dem Falle durch die langen Mikrohomologien mit mehr Basenpaaren ausgeglichen.

Abbildung 11 zeigt die genauen Sequenzen der Reparaturprodukte des NHEJ in den CV1-Zellen (alle vier Klone) und deren Entstehungsmechanismus.

Reparaturprodukt und Mechanismus	Reparaturschritte	Anzahl (n=108)	Del.	μH
<b>A)</b> <pre> GGG<b>ATAA</b>          CCC CCC              <b>AATAGGG</b>  1.      ↓         ↓ GGG<b>ATA</b>  CCC CCC←<b>ATA</b>GGG </pre>	1. Entfernung der terminalen A's auf dem sense- und antisense-Strang und Paarung von TA und AT	9 (8,3%)	0	2

<p>2.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">GGG<b>ATAT</b>CCC CCC<b>TATA</b>GGG</p>	<p>2. Synthese von je einem T auf dem sense- und antisense-Strang</p>			
<p><b>B-1)</b></p> <p>GGG<b>A</b>TAA CCC CCC           <b>AAT</b>AGGG</p> <p>1.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>GGG<b>A</b>TAA CCC CCC           <b>T</b>GGG</p> <p>2.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>GGG<b>A</b>TAA<b>CCC</b> CCC ← <b>T</b>GGG</p> <p>3.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>GGG<b>A</b>TAA<b>CCC</b> CCC<b>TAT</b>TGGG</p> <p style="text-align: center;">oder</p>	<p>1. Entfernung der vier terminalen Basen auf dem antisense-Strang und „freie“, ungepaarte Synthese eines T's</p> <p>2. A:T Paarung</p> <p>3. Synthese von TAT auf dem antisense-Strang</p>	<p>8 (7,4%)</p>	<p>0</p>	<p>0</p>
<p><b>B-2)</b></p> <p>GGG<b>A</b>TAA CCC CCC           <b>AAT</b>AGGG</p> <p>1.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>GGG<b>A</b>T<b>A</b>CCC CCC<b>A</b>A<b>T</b>AGGG</p> <p>2.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>GGG<b>A</b>T<b>A</b>CCC CCC ← <b>A</b>T- GGG</p> <p>3.</p> <p style="text-align: center;">↓</p>	<p>1. Paarung von TA und AT</p> <p>2. Entfernung der nicht kompatiblen A's auf dem antisense-Strang (mismatches)</p> <p>3. Synthese von zwei T's auf dem antisense-Strang</p>		<p>0</p>	<p>2</p>

<p>GGG<b>ATA</b>ACC CCC<b>TAT</b>GGG</p>				
<p><b>C-1)</b></p> <p>GGG<b>ATA</b>                    CCC CCC                    <b>AAT</b>AGGG</p> <p>1.                    ↓</p> <p>GGG<b>T</b>                    CCC CCC                    <b>AAT</b>AGGG</p> <p>2.                    ↓</p> <p>GGG<b>T</b> →                    CCC CCC<b>AAT</b>AGGG</p> <p>3.                    ↓</p> <p>GGG<b>TTAT</b>CCC CCC<b>AAT</b>AGGG</p> <p>oder</p> <p><b>C-2)</b></p> <p>GGG<b>ATA</b>                    CCC CCC                    <b>AAT</b>AGGG</p> <p>1.                    ↓</p> <p>GGG<b>ATA</b>ACC CCC<b>AAT</b>AGGG</p> <p>2.                    ↓</p> <p>GGG → <b>TA</b> →                    CCC CCC<b>AAT</b>AGGG</p> <p>3.                    ↓</p> <p>GGG<b>TTAT</b>CCC CCC<b>AAT</b>AGGG</p>	<p>1. Entfernung der vier Basen auf dem sense-Strang und „freie“, ungepaarte Synthese eines T`s</p> <p>2. T:A Paarung</p> <p>3. Synthese von TAT auf dem sense- Strang</p> <p>1. Paarung von TA und AT</p> <p>2. Entfernung der nicht kompatiblen A`s auf dem sense-Strang (mismatches)</p> <p>3. Synthese von zwei T`s auf dem sense- Strang</p>	<p>3 (2,8%)</p>	<p>0</p>	<p>0</p> <p>0</p> <p>2</p>



<p><b>D)</b></p> <p>GGG<b>A</b>TAA                    CCC  CCC                    <b>A</b>ATAGGG</p> <p>1. ↓</p> <p>GGG<b>A</b>T →    CCC  CCC ← <b>A</b>ATAGGG</p> <p>2. ↓</p> <p>GGG<b>A</b>T<b>T</b>A<b>T</b>CCC  CCC<b>T</b>A<b>A</b>TAGGG</p>	<p>1. Entfernung von zwei Basen (AA) auf dem sense-Strang und T:A Paarung</p> <p>2. Synthese von TAT auf dem sense-Strang und T auf dem antisense-Strang</p>	<p>39 (36,1%)</p>	<p>0</p>	<p>1</p>
<p><b>E)</b></p> <p>GGG<b>A</b>TAA                    CCC  CCC                    <b>A</b>ATAGGG</p> <p>1. ↓</p> <p>GGG<b>A</b>T<b>A</b>A → CCC  CCC ← <b>T</b>AGGG</p> <p>2. ↓</p> <p>GGG<b>A</b>T<b>A</b>A<b>T</b>CCC  CC<b>T</b>A<b>T</b>TAGGG</p>	<p>1. Entfernung von zwei Basen auf dem antisense-Strang und A:T Paarung</p> <p>2. Synthese von T auf dem sense-Strang und TAT auf dem sense-Strang</p>	<p>21 (19,4%)</p>	<p>0</p>	<p>1</p>
<p><b>F)</b></p> <p>GGG<b>A</b>TAA                    CCC  CCC                    <b>A</b>ATAGGG</p> <p>1. ↓</p> <p>GGG<b>A</b>T<b>A</b>A<b>T</b> → CCC  CCC ← <b>A</b>ATAGGG</p> <p>2. ↓</p> <p>GGG<b>A</b>T<b>A</b>A<b>T</b><b>T</b>A<b>T</b>CCC  CCC<b>T</b>A<b>T</b><b>T</b>A<b>A</b>TAGGG</p>	<p>1. „Freie“, ungepaarte Synthese eines T's auf dem sense-Strang und Paarung mit einem A</p> <p>2. Synthese von TAT auf dem sense-Strang und TTAT auf dem antisense-Strang</p>	<p>1 (0,9%)</p>	<p>0</p>	<p>0</p>
<p>Summe der akkuraten Reparatur</p>	<p>74,9%</p>			

<p><b>G)</b></p> <pre> GGG<b>A</b>TAA      CCC CCC           <b>A</b>A<b>T</b>AGGG 1.   ↓ GGG<b>A</b>TAA      CCC CCC           <b>T</b>A<b>A</b>TAGGG 2.   ↓ GGG<b>A</b>T<b>A</b>CCC CCC           <b>T</b>GGG 3.   ↓ GGG<b>A</b>T<b>A</b>CCC CCC<b>T</b>A<b>T</b>GGG </pre>	<p>1. Entfernung eines A's auf dem sense-Strang und der vier Basen auf dem antisense-Strang sowie „freie“, ungepaarte Synthese eines T's</p> <p>2. Paarung des T's mit einem A</p> <p>3. Synthese von AT auf dem antisense-Strang</p>	<p>1 (0,9%)</p>	<p>1</p>	<p>0</p>
<p><b>H)</b></p> <pre> GGG<b>A</b>TAA      CCC CCC           <b>A</b>A<b>T</b>AGGG 1.   ↓ GGG<b>A</b>T      CCC CCC           <b>T</b>A<b>T</b>AGGG 2.   ↓ GGG<b>A</b>TCCC CCC<b>T</b>A<b>T</b>AGGG </pre>	<p>1. Entfernung von je zwei A's auf dem sense- und dem antisense-Strang</p> <p>2. Paarung von AT und TA</p>	<p>8 (7,4%)</p>	<p>2</p>	<p>2</p>
<p>Reparatur mit längeren Deletionen (hier nicht gezeigt)</p>		<p>16,8%</p>		

Abbildung 15: Reparaturprodukte des NHEJ, deren Entstehungsweise und Häufigkeit. Die 4-Basen Überhänge sind **fett** dargestellt, nicht kompatible Basen sind **rot** und neu synthetisierte Basen **grün** dargestellt.

I-SceI-induzierte DSB besitzen vier Basen lange 3'-Überhänge. Diese sind im pEJSSA-Konstrukt nicht kompatibel, so dass sie zunächst modifiziert werden müssen, ehe sie ligiert werden können. Die Reparatur wird als „akkurat“ bezeichnet, wenn die Modifikation nicht zu einem Verlust von Basen im Bereich der Überhänge kommt. Fehlerfrei ist der Prozess nicht, da einzelne Basenaustausche und damit begrenzte Sequenzänderungen möglich sind.

Diese akkurate Reparatur wurde in 75% der Fälle durchgeführt (den Klon 128 ausgeschlossen 80%) (Abb.15 A- F).

Bei den Reparaturwegen D bis F kam es ebenfalls zu keinen Deletionen, jedoch jeweils zu einer Insertion von einer Base.

Die Reparaturprodukte B und C können jeweils auf zwei verschiedene Arten und Weisen entstanden sein (1 und 2). Entweder durch das Entfernen der überhängenden 3` bzw. 5`-randständigen Basen und anschließendem Auffüllen oder durch die Verwendung von jeweils zwei Mikrohomologien zwischen den zentralen TA und AT-Basen, dann Entfernen der nicht kompatiblen A`s und Synthese von zwei T`s (Mismatch-Korrektur). Bei der qualitativen Analyse der Anzahl der Mikrohomologien (s. Abbildung 13) wurde diese Möglichkeit nicht berücksichtigt, da es sich nicht um endständige Mikrohomologien handelt.

Die Reparaturmechanismen, die unter B-1, C-1, F und G beschrieben sind und ohne Verwendung von Mikrohomologien repariert wurden, gebrauchten die so genannte „unprimed synthesis“. Dabei wird an das freie 3`-Ende eine zusätzliche Base ohne gegenüberliegende Matrix durch die Polymerase  $\mu$  oder  $\lambda$  angehängt. Diese eine Base, häufig ein T, kann dann eine neu geschaffene Brücke darstellen, mit dem ersten A des zweiten Bruchendes paaren und dann die weitere Auffüllsynthese nach sich ziehen (73,74). Bei den Reparaturwegen G und H entsteht eine Deletion von einmal einer (G) und einmal zwei (H) Basen. Die Reparatur ist damit bereits „inakkurat“.

Alle weiteren Reparaturprodukte tragen größere Deletionen und sind hier nicht einzeln abgebildet. Sie sind in Abb. 11 zu sehen.

Die Verteilung und relative Häufigkeit der verschiedenen Reparaturprodukte stimmt mit der in den CHO-K1 Zellen gefundenen weitgehend überein (37).

#### **4.4 Klon 128**

Der pEJSSA-Klon 128 zeigte signifikant abweichende Reparaturmuster gegenüber den anderen untersuchten Zellklonen. Auffällig war zunächst die abnorm hohe Rate an Reparaturereignissen die mittels SSA repariert worden waren. Insgesamt wurde in 38 von 53 untersuchten Reparaturereignissen eine Reparatur durch SSA gefunden. Dies entspricht einer SSA-Rate von 72% (Abb.10). NHEJ wurde nur in

15 Fällen verwendet (28%). Die Analyse dieser Sequenzen zeigte zudem häufige und ausgedehnte Deletionen (Abb.12). In nur sechs Fällen war die Reparatur akkurat (40% gegenüber 80% in den anderen Klonen). Die Deletionen erreichten in den anderen Fällen außergewöhnliche Längen von bis zu 177bp. In keinem der anderen CV1-pEJSSA-Klone wurde eine annähernd so große Deletion gefunden.

Große Fehler beim NHEJ und relativ häufige Verwendung von SSA sprechen dafür, dass es in dem Klon 128 im Zuge der vielen Passagen unter der lang andauernden klonalen Zellkultur zu einer Defektmutation im Bereich des NHEJ-Reparaturapparates gekommen ist. Die genaue Natur dieses reparaturdefektes konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden.

#### **4.5 Zellzyklus**

Ziel der Versuche zum Zellzyklus an den CV1-Zellen war es, den Weg zu bahnen, um in Zukunft die Häufigkeit der verschiedenen Reparaturwege in den einzelnen Zellzyklusphasen zu untersuchen.

Man weiß bisher über die Genkonversion, dass diese besonders in der späten S- und G2-Phase des Zellzyklus verwendet wird, da hier das Schwesterchromatid als homologe Sequenz zur Verfügung steht (75). Das Schwesterchromatid ist die bevorzugt benutzte Homologie für die Reparatur mittels Genkonversion, sie wird 100 mal häufiger verwendet als das homologe Chromosom (76). Versuche haben gezeigt, dass die Reparatur mittels GC nach einem I-SceI-induzierten DSB in humanen SW480SN Zellen, in S-Phase-Zellen 39 mal höher als in der M-Phase und 24 mal höher im Vergleich zu Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus war (77).

Andere Versuche an humanen HSF-55-Fibroblasten und CHO-Hamsterzellen haben gezeigt, dass die Expression des Reparaturproteins Rad51, das Schlüsselenzym der GC, in der S/G2-Phase erhöht ist. Auch das Protein Rad52, welches eine zentrale Rolle beim SSA spielt fand sich in der S/G2-Phase erhöht (78). Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass SSA ebenfalls vermehrt in der S/G2-Phase des Zellzyklus verwendet wird. Man weiß jedoch bisher nicht, in welcher Phase SSA vorrangig verwendet wird.

Bezüglich des NHEJ deuten bisherige Ergebnisse darauf hin, dass es in allen Zellzyklusphasen eine wichtige Rolle spielt (79).

Für die Synchronisation der Zellen wurden die Zellen mit isoleucinfreiem Medium behandelt. Dies erwies sich als geeignetes Mittel um die Zellen in den G0-Arrest zu bringen. Es fand sich nach dem Isoleucinentzug ein Zellanteil von etwa 88% in der G0-Phase. Ferner konnte die Kinetik des Durchwanderns der verschiedenen Zellzyklusphasen nach dem Wiedereintritt in den Zyklus durch Isoleucingabe genau dargestellt werden. Zum einen an normalen, nicht weiter behandelten, und zum anderen an zusätzlich nach dem Release mit dem I-SceI transfizierten Zellen (s. Abb.14 und 15).

Darüber hinaus wurde mit dem I-SceI-GR-RFP-Fusionskonstrukt ein neues experimentelles System erprobt, welches eine zeitlich gezielte Induktion eines DSB ermöglichte. Dies ist im Besonderen deshalb von großer Bedeutung, da sich die in der G0-Phase arretierten Zellen mit einer Transfektionseffizienz von 0,68% (im Vergleich zu 50% bei exponentiell wachsenden Zellen) so gut wie gar nicht transfizieren ließen. Durch das I-SceI-GR-RFP-Fusionskonstrukt war es möglich die Zellen während des exponentiellen Wachstums zu transfizieren, anschließend erst im Zellzyklus zu arretieren und dann durch Zugabe des GR-Liganden Triamcinolon-Acetonid die nukleäre Translokation der Endonuklease zeitlich präzise zu induzieren.

Es war im Zeitrahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich die Reparatur in den verschiedenen Zellzyklusphasen zu untersuchen. Die Versuche werden in unserem Labor jedoch fortgesetzt.

In dieser Arbeit wurden erstmalig die DSB- Reparaturmechanismen NHEJ und SSA in Primatenzellen in vivo untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass NHEJ in Primatenzellen hochgradig präzise und konservativ verläuft und den bevorzugt genutzten Mechanismus für die Reparatur von DSB darstellt. Das fehlerbehaftete SSA wurde weitaus seltener für die Reparatur eines DSB verwendet. Die Auswertung der Reparaturereignisse erbrachte sowohl bezogen auf die Häufigkeit der Verwendung der Reparaturmechanismen, wie auch die Qualität der Reparatur, ähnliche Ergebnisse

wie zuvor an Nagetierzellen gewonnen wurden. Damit zeigt sich, dass die gesamte Doppelstrangbruchreparatur in ihren wesentlichen Merkmalen in höheren Säugern identisch abläuft.

Darüber hinaus konnte durch die Ergebnisse der Zellzyklusversuche die Voraussetzungen geschaffen werden, um in Zukunft die Häufigkeit der verschiedenen Reparaturwege in den einzelnen Zellzyklusphasen untersuchen zu können.

## 5 Zusammenfassung

Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen ist essentiell für die Integrität des Genoms. Ausbleiben der Reparatur oder eine fehlerhafte Reparatur können zum Zelltod oder zu Mutationen des Genoms und so zu Krebsentstehung führen.

Für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen stehen eukaryontischen Zellen zwei Hauptwege zur Verfügung: Die nicht-homologe Endverknüpfung (non homologous end joining = NHEJ), bei der in einfacher Weise die gebrochenen Enden wieder zusammengefügt werden, und die homologe Rekombination. Bei diesem Reparaturweg dient ein homologer DNA-Abschnitt als Matrize für die Reparatur. Homologe Rekombination kann wiederum unterteilt werden in die Genkonversion (gene conversion = GC) und das single-strand annealing (SSA).

Da bisherige Untersuchungen bezüglich dieser Reparaturwege vor allem an Nagetierzellen oder Tumorzellen erfolgten, war es Ziel dieser Arbeit DNA-Doppelstrangbruchreparatur mittels NHEJ und SSA an humanähnlichen Primatenzellen (CV1-Nierenepithelzellen) zu untersuchen. Um die Doppelstrangbruchreparatur mittels NHEJ und SSA zu untersuchen, wurde ein plasmidbasiertes Reporterkonstrukt (pEJSSA) stabil in die Zellen integriert. Erfolgreiche Reparatur nach Erzeugung eines einzelnen chromosomalen DSB durch die I-SceI-Endonuklease führte dann zur Expression des grün-fluoreszierenden Proteins, das im Flusszytometer detektiert werden konnte.

Für die Reparaturuntersuchungen wurden vier Zellklone ausgewählt, welche am Flusszytometer nach 48stündiger Reparaturzeit eine ausreichend hohe Reparatureffizienz zwischen 4 und 6% zeigten.

Es zeigte sich, dass das NHEJ der vorrangig für die Reparatur von DSB verwendete Reparaturweg war. In 94% der Fälle erfolgte die Reparatur mittels NHEJ. In 6% der Fälle war das SSA für die Reparatur gebraucht worden.

Die Sequenzanalysen der NHEJ-Reparaturereignisse, ergaben eine sehr fehlerarme Reparatur mit wenigen Deletionen. Durchschnittlich wurde pro Reparaturereignis nur eine Base entfernt, wobei in 80% der Fälle keine Deletion entstanden war.

Die Ergebnisse stimmen mit zuvor durchgeführten Untersuchungen mit Hilfe des pEJSSA-Konstruktes in anderen Zelllinien überein.

In diesen Versuchen wurde erstmalig gezeigt, dass DSB Reparatur in Primatenzellen, ähnlich wie in Nagerzellen, hochgradig präzise und konservativ verläuft und NHEJ der bevorzugt benutzte Mechanismus für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen ist, während das fehlerbehaftete SSA sehr viel seltener verwendet wird.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Khanna, K.K. and Jackson, S.P. (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature genetics*, 27, 247-254.
2. Dasika, G.K., Lin, S.C., Zhao, S., Sung, P., Tomkinson, A. and Lee, E.Y. (1999) DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene*, 18, 7883-7899.
3. Karran, P. (2000) DNA double strand break repair in mammalian cells. *Current opinion in genetics & development*, 10, 144-150.
4. Grawunder, U., Zimmer, D., Fugmann, S., Schwarz, K. and Lieber, M.R. (1998) DNA ligase IV is essential for V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in human precursor lymphocytes. *Molecular cell*, 2, 477-484.
5. Chaudhuri, J., Basu, U., Zarrin, A., Yan, C., Franco, S., Perlot, T., Vuong, B., Wang, J., Phan, R.T., Datta, A. *et al.* (2007) Evolution of the immunoglobulin heavy chain class switch recombination mechanism. *Advances in immunology*, 94, 157-214.
6. Keeney, S. and Neale, M.J. (2006) Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double-strand breaks: mechanism and regulation. *Biochemical Society transactions*, 34, 523-525.
7. Takata, M., Sasaki, M.S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A. and Takeda, S. (1998) Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO journal*, 17, 5497-5508.
8. Shrivastav, M., De Haro, L.P. and Nickoloff, J.A. (2008) Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell research*, 18, 134-147.
9. Lieber, M.R., Ma, Y., Pannicke, U. and Schwarz, K. (2003) Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nature reviews*, 4, 712-720.
10. Jeggo, P. and O'Neill, P. (2002) The Greek Goddess, Artemis, reveals the secrets of her cleavage. *DNA repair*, 1, 771-777.
11. Helleday, T., Lo, J., van Gent, D.C. and Engelward, B.P. (2007) DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA repair*, 6, 923-935.
12. Pastwa, E. and Blasiak, J. (2003) Non-homologous DNA end joining. *Acta biochimica Polonica*, 50, 891-908.
13. Haber, J.E. (1995) In vivo biochemistry: physical monitoring of recombination induced by site-specific endonucleases. *Bioessays*, 17, 609-620.
14. West, S.C. (2003) Molecular views of recombination proteins and their control. *Nature reviews*, 4, 435-445.

15. Allen, C., Kurimasa, A., Brenneman, M.A., Chen, D.J. and Nickoloff, J.A. (2002) DNA-dependent protein kinase suppresses double-strand break-induced and spontaneous homologous recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 3758-3763.
16. Johnson, R.D. and Jasin, M. (2000) Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *The EMBO journal*, 19, 3398-3407.
17. van den Bosch, M., Lohman, P.H. and Pastink, A. (2002) DNA double-strand break repair by homologous recombination. *Biological chemistry*, 383, 873-892.
18. Paull, T.T. and Gellert, M. (1998) The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Molecular cell*, 1, 969-979.
19. Wyman, C. and Kanaar, R. (2006) DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annual review of genetics*, 40, 363-383.
20. Hays, S.L., Firmenich, A.A., Massey, P., Banerjee, R. and Berg, P. (1998) Studies of the interaction between Rad52 protein and the yeast single-stranded DNA binding protein RPA. *Molecular and cellular biology*, 18, 4400-4406.
21. Lisby, M., Mortensen, U.H. and Rothstein, R. (2003) Colocalization of multiple DNA double-strand breaks at a single Rad52 repair centre. *Nature cell biology*, 5, 572-577.
22. Song, B. and Sung, P. (2000) Functional interactions among yeast Rad51 recombinase, Rad52 mediator, and replication protein A in DNA strand exchange. *The Journal of biological chemistry*, 275, 15895-15904.
23. Galkin, V.E., Esashi, F., Yu, X., Yang, S., West, S.C. and Egelman, E.H. (2005) BRCA2 BRC motifs bind RAD51-DNA filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 8537-8542.
24. Shivji, M.K. and Venkitaraman, A.R. (2004) DNA recombination, chromosomal stability and carcinogenesis: insights into the role of BRCA2. *DNA repair*, 3, 835-843.
25. Baumann, P. and West, S.C. (1998) Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. *Trends in biochemical sciences*, 23, 247-251.
26. Helleday, T. (2003) Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mutation research*, 532, 103-115.
27. van Gent, D.C., Hoeijmakers, J.H. and Kanaar, R. (2001) Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet*, 2, 196-206.
28. Batty, D.P. and Wood, R.D. (2000) Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. *Gene*, 241, 193-204.

29. Haber, J.E. and Leung, W.Y. (1996) Lack of chromosome territoriality in yeast: promiscuous rejoining of broken chromosome ends. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 13949-13954.
30. Sugawara, N., Ira, G. and Haber, J.E. (2000) DNA length dependence of the single-strand annealing pathway and the role of *Saccharomyces cerevisiae* RAD59 in double-strand break repair. *Molecular and cellular biology*, 20, 5300-5309.
31. Schmid, C.W. (1996) Alu: structure, origin, evolution, significance and function of one-tenth of human DNA. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 53, 283-319.
32. Tauchi, H., Kobayashi, J., Morishima, K., van Gent, D.C., Shiraishi, T., Verkaik, N.S., vanHeems, D., Ito, E., Nakamura, A., Sonoda, E. *et al.* (2002) Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells. *Nature*, 420, 93-98.
33. Mortensen, U.H., Bendixen, C., Sunjevaric, I. and Rothstein, R. (1996) DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 10729-10734.
34. Shinohara, A. and Ogawa, T. (1998) Stimulation by Rad52 of yeast Rad51-mediated recombination. *Nature*, 391, 404-407.
35. Sugiyama, T., New, J.H. and Kowalczykowski, S.C. (1998) DNA annealing by RAD52 protein is stimulated by specific interaction with the complex of replication protein A and single-stranded DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 6049-6054.
36. Sargent, R.G., Meservy, J.L., Perkins, B.D., Kilburn, A.E., Intody, Z., Adair, G.M., Nairn, R.S. and Wilson, J.H. (2000) Role of the nucleotide excision repair gene ERCC1 in formation of recombination-dependent rearrangements in mammalian cells. *Nucleic acids research*, 28, 3771-3778.
37. Mansour, W.Y., Schumacher, S., Roskopf, R., Rhein, T., Schmidt-Petersen, F., Gatzemeier, F., Haag, F., Borgmann, K., Willers, H. and Dahm-Daphi, J. (2008) Hierarchy of nonhomologous end-joining, single-strand annealing and gene conversion at site-directed DNA double-strand breaks. *Nucleic acids research*, 36, 4088-4098.
38. Shimomura, O., Johnson, F.H. and Saiga, Y. (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of cellular and comparative physiology*, 59, 223-239.
39. Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. and Cormier, M.J. (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111, 229-233.
40. Bradbury, J.M. and Jackson, S.P. (2003) ATM and ATR. *Curr Biol*, 13, R468.

41. Lee, J.H. and Paull, T.T. (2005) ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science (New York, N.Y)*, 308, 551-554.
42. Bakkenist, C.J. and Kastan, M.B. (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421, 499-506.
43. Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, N.I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y. *et al.* (1998) Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science (New York, N.Y)*, 281, 1674-1677.
44. Chao, C., Saito, S., Kang, J., Anderson, C.W., Appella, E. and Xu, Y. (2000) p53 transcriptional activity is essential for p53-dependent apoptosis following DNA damage. *The EMBO journal*, 19, 4967-4975.
45. Lukacsovich, T., Yang, D. and Waldman, A.S. (1994) Repair of a specific double-strand break generated within a mammalian chromosome by yeast endonuclease I-SceI. *Nucleic acids research*, 22, 5649-5657.
46. Lin, Y., Lukacsovich, T. and Waldman, A.S. (1999) Multiple pathways for repair of DNA double-strand breaks in mammalian chromosomes. *Molecular and cellular biology*, 19, 8353-8360.
47. Dronkert, M.L., Beverloo, H.B., Johnson, R.D., Hoeijmakers, J.H., Jasin, M. and Kanaar, R. (2000) Mouse RAD54 affects DNA double-strand break repair and sister chromatid exchange. *Molecular and cellular biology*, 20, 3147-3156.
48. Allen, C., Halbrook, J. and Nickoloff, J.A. (2003) Interactive competition between homologous recombination and non-homologous end joining. *Mol Cancer Res*, 1, 913-920.
49. Stark, J.M., Pierce, A.J., Oh, J., Pastink, A. and Jasin, M. (2004) Genetic steps of mammalian homologous repair with distinct mutagenic consequences. *Molecular and cellular biology*, 24, 9305-9316.
50. Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N. and Stark, J.M. (2008) Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS genetics*, 4, e1000110.
51. Soutoglou, E., Dorn, J.F., Sengupta, K., Jasin, M., Nussenzweig, A., Ried, T., Danuser, G. and Misteli, T. (2007) Positional stability of single double-strand breaks in mammalian cells. *Nature cell biology*, 9, 675-682.
52. Dahm-Daphi, J.u.Schulte-Uetrop. (2009) Melting the way to your cell colonies. *Lab-Times* 1-2009 46.
53. Kellerer, A.M. and Rossi, H.H. (1973) The biophysical properties of 3.9-GeV nitrogen ions. VI. Interpretation of results. *Radiation research*, 55, 447-456.
54. Dikomey, E., Dahm-Daphi, J., Brammer, I., Martensen, R. and Kaina, B. (1998) Correlation between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand

breaks studied in nine mammalian cell lines. *International journal of radiation biology*, 73, 269-278.

55. Dikomey, E., Borgmann, K., Brammer, I. and Kasten-Pisula, U. (2003) Molecular mechanisms of individual radiosensitivity studied in normal diploid human fibroblasts. *Toxicology*, 193, 125-135.

56. Bohnke, A., Westphal, F., Schmidt, A., El-Awady, R.A. and Dahm-Daphi, J. (2004) Role of p53 mutations, protein function and DNA damage for the radiosensitivity of human tumour cells. *International journal of radiation biology*, 80, 53-63.

57. Dahm-Daphi, J., Hubbe, P., Horvath, F., El-Awady, R.A., Bouffard, K.E., Powell, S.N. and Willers, H. (2005) Nonhomologous end-joining of site-specific but not of radiation-induced DNA double-strand breaks is reduced in the presence of wild-type p53. *Oncogene*, 24, 1663-1672.

58. Willers, H., Husson, J., Lee, L.W., Hubbe, P., Gazemeier, F., Powell, S.N. and Dahm-Daphi, J. (2006) Distinct mechanisms of nonhomologous end joining in the repair of site-directed chromosomal breaks with noncomplementary and complementary ends. *Radiation research*, 166, 567-574.

59. Finnie, N.J., Gottlieb, T.M., Blunt, T., Jeggo, P.A. and Jackson, S.P. (1995) DNA-dependent protein kinase activity is absent in xrs-6 cells: implications for site-specific recombination and DNA double-strand break repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 320-324.

60. Kasten-Pisula, U., Menegakis, A., Brammer, I., Borgmann, K., Mansour, W.Y., Degenhardt, S., Krause, M., Schreiber, A., Dahm-Daphi, J., Petersen, C. *et al.* (2009) The extreme radiosensitivity of the squamous cell carcinoma SKX is due to a defect in double-strand break repair. *Radiother Oncol*, 90, 257-264.

61. Elliott, B., Richardson, C. and Jasin, M. (2005) Chromosomal translocation mechanisms at intronic alu elements in mammalian cells. *Molecular cell*, 17, 885-894.

62. Deininger, P.L. and Batzer, M.A. (1999) Alu repeats and human disease. *Molecular genetics and metabolism*, 67, 183-193.

63. Kolomietz, E., Meyn, M.S., Pandita, A. and Squire, J.A. (2002) The role of Alu repeat clusters as mediators of recurrent chromosomal aberrations in tumors. *Genes, chromosomes & cancer*, 35, 97-112.

64. Hess, J.L. (2004) MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. *Trends in molecular medicine*, 10, 500-507.

65. Dorrance, A.M., Liu, S., Yuan, W., Becknell, B., Arnoczky, K.J., Guimond, M., Strout, M.P., Feng, L., Nakamura, T., Yu, L. *et al.* (2006) Mll partial tandem duplication induces aberrant Hox expression in vivo via specific epigenetic alterations. *The Journal of clinical investigation*, 116, 2707-2716.

66. Weinstock, D.M., Richardson, C.A., Elliott, B. and Jasin, M. (2006) Modeling oncogenic translocations: distinct roles for double-strand break repair pathways in translocation formation in mammalian cells. *DNA repair*, 5, 1065-1074.
67. Schulte-Uentrop, L., El-Awady, R.A., Schliecker, L., Willers, H. and Dahm-Daphi, J. (2008) Distinct roles of XRCC4 and Ku80 in non-homologous end-joining of endonuclease- and ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks. *Nucleic acids research*, 36, 2561-2569.
68. Lin, Y. and Waldman, A.S. (2001) Capture of DNA sequences at double-strand breaks in mammalian chromosomes. *Genetics*, 158, 1665-1674.
69. Kabotyanski, E.B., Gomelsky, L., Han, J.O., Stamato, T.D. and Roth, D.B. (1998) Double-strand break repair in Ku86- and XRCC4-deficient cells. *Nucleic acids research*, 26, 5333-5342.
70. Guirouilh-Barbat, J., Rass, E., Plo, I., Bertrand, P. and Lopez, B.S. (2007) Defects in XRCC4 and KU80 differentially affect the joining of distal nonhomologous ends. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 20902-20907.
71. Gottlich, B., Reichenberger, S., Feldmann, E. and Pfeiffer, P. (1998) Rejoining of DNA double-strand breaks in vitro by single-strand annealing. *European journal of biochemistry / FEBS*, 258, 387-395.
72. Kuhfittig-Kulle, S., Feldmann, E., Odersky, A., Kuliczowska, A., Goedecke, W., Eggert, A. and Pfeiffer, P. (2007) The mutagenic potential of non-homologous end joining in the absence of the NHEJ core factors Ku70/80, DNA-PKcs and XRCC4-LigIV. *Mutagenesis*, 22, 217-233.
73. Thode, S., Schafer, A., Pfeiffer, P. and Vielmetter, W. (1990) A novel pathway of DNA end-to-end joining. *Cell*, 60, 921-928.
74. Nick McElhinny, S.A., Havener, J.M., Garcia-Diaz, M., Juarez, R., Bebenek, K., Kee, B.L., Blanco, L., Kunkel, T.A. and Ramsden, D.A. (2005) A gradient of template dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining. *Molecular cell*, 19, 357-366.
75. Hendrickson, E.A. (1997) Cell-cycle regulation of mammalian DNA double-strand-break repair. *American journal of human genetics*, 61, 795-800.
76. Johnson, R.D. and Jasin, M. (2001) Double-strand-break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Biochemical Society transactions*, 29, 196-201.
77. Saleh-Gohari, N. and Helleday, T. (2004) Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. *Nucleic acids research*, 32, 3683-3688.
78. Chen, F., Nastasi, A., Shen, Z., Brenneman, M., Crissman, H. and Chen, D.J. (1997) Cell cycle-dependent protein expression of mammalian homologs of yeast DNA double-strand break repair genes Rad51 and Rad52. *Mutation research*, 384, 205-211.

79. Rothkamm, K., Kruger, I., Thompson, L.H. and Lobrich, M. (2003) Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Molecular and cellular biology*, 23, 5706-5715.

## **7 Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde im Labor für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. Ekkehard Dikomey danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J. Dahm- Daphi, der mich bei der Durchführung dieser Arbeit hervorragend betreut hat. Nicht nur beim wissenschaftlichen Teil, sondern auch bei allen anderen Herausforderungen hat er mir zur Seite gestanden und mich mit Rat und Tat unterstützt.

Ebenso möchte ich mich bei der Medizinisch- technischen Assistentin Frau Lena Nitsch bedanken, die mich hervorragend in den Laboralltag eingeführt und während meiner praktischen Arbeit im Labor betreut hat.

Des Weiteren danke ich allen weiteren Mitarbeitern des Labors für ihre ständige Hilfsbereitschaft und die nette Zusammenarbeit.

.



## **8 Eidesstaatliche Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift.....

Hamburg, den.....