

***In vitro* DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur in humanen  
Kopf-/Hals-Tumorzelllinien**

**Zellfreie Extrakte zur Prädiktion der Strahlenempfindlichkeit**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

des Fachbereichs Biologie,

der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,

der Universität Hamburg

vorgelegt von

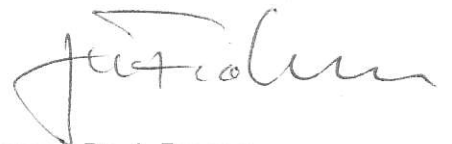
**Sarah Degenhardt**

aus Geldern

Hamburg 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Professor Dr. J. DAHM-DAPHI  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Professor Dr. T. DOBNER  
Tag der Disputation: 19.10.2012

Hamburg, den 04.10.2012



Professor Dr. J. Fromm

Vorsitzender des Promotionsausschusses  
Biologie

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. DNA-Schäden und ihre Verbindung zu Karzinogenese .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. <i>In vitro</i> DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur .....</b>	<b>1</b>
<b>1.3. Hauptwege der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur .....</b>	<b>3</b>
1.3.1. Nicht-Homologes End-Joining .....	3
1.3.2. Alternatives End-Joining .....	5
1.3.3. Homologe Rekombination .....	6
1.3.4. Single-Strand Annealing .....	7
<b>1.4. Zellfreie Doppelstrangbruch-Reparatur .....</b>	<b>8</b>
<b>1.5. Einführung in zellfreie Extrakte .....</b>	<b>9</b>
<b>1.6. DNA-Substrate und Doppelstrangbrüche .....</b>	<b>11</b>
<b>1.7. Der DSB und seine Reparatur im CFE .....</b>	<b>12</b>
<b>1.8. DNA-DSB-Reparatur in Extrakten aus humanen Tumoren .....</b>	<b>15</b>
<b>1.9. Zielsetzung .....</b>	<b>17</b>
<b>2. Materialien und Methoden .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1. Materialien .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2. Methoden .....</b>	<b>18</b>
2.2.1. Zellkultur .....	18
2.2.2. Zellfreie Extrakte .....	19
2.2.3. End-Joining-Substrat .....	20
2.2.4. <i>In vitro</i> End-Joining-Reaktion .....	20
2.2.5. Transformationsassay .....	23
2.2.6. Kolonie-PCR .....	23
2.2.7. Subklonierung .....	24
2.2.8. Southern-Blot .....	25
2.2.9. Southern-Blot: Markierung und Detektion .....	26
2.2.10. Zellüberleben .....	27
2.2.11. Doppelstrangbrüche .....	27

<b>3. Resultate .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1. Etablierung des <i>in vitro</i> Reparatur-Systems .....</b>	<b>29</b>
3.1.1. Reaktionsbedingungen: Temperatur und Zeit .....	29
3.1.2. Reaktionsbedingungen: Verhältnis von DNA- zu Protein-Menge .....	32
3.1.3. Einfluss der Struktur der Doppelstrangbruch-Enden auf den NHEJ-Reparaturprozess	34
3.1.4. Quantifizierung zirkulärer End-Joining-Produkte .....	39
<b>3.2. Quantitative und qualitative Validierung des <i>in vitro</i> End-Joinings mithilfe von Reparaturmutanten .....</b>	<b>42</b>
3.2.1. Einfluss eines NHEJ-Defektes auf die Effizienz der Reparatur.....	43
3.2.2. Die Rolle eines alternativen Reparaturweges im <i>in vitro</i> End-Joining .....	47
3.2.3. Die Genauigkeit der Reparatur.....	48
<b>3.3. <i>In vitro</i> Doppelstrangbruch-Reparatur in humanen Tumorzellen .....</b>	<b>53</b>
3.3.1. Kopf-/Hals-Tumorzellen: Gesamt-Effizienz des <i>in vitro</i> End-Joinings.....	53
3.3.2. Single-Strand Annealing als Reparaturmöglichkeit .....	57
3.3.3. Kopf-/Hals-Tumorzellen im Transformationsassay: Bildungskapazität zirkulärer Reparaturprodukte.....	58
3.3.4. Reparaturgenauigkeit humaner Kopf-/Hals-Tumorzellen <i>in vitro</i> .....	61
3.3.5. Die Wahl des Reparaturweges (Pathway-Choice).....	63
<b>3.4. Strahlenempfindlichkeit humaner Kopf-/Hals-Tumorzellen <i>in vivo</i> .....</b>	<b>64</b>
<b>3.5. Korrelation von zellulärer Strahlenantwort und <i>in vitro</i> Reparaturkapazität .....</b>	<b>67</b>
<b>3.6. Korrelation zwischen der Wahl des Reparaturweges und der Anzahl residueller Foci.....</b>	<b>70</b>
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>72</b>
<b>4.1. Zirkuläre Produkte sind spezifisch für klassisches NHEJ .....</b>	<b>72</b>
4.1.1. Alternatives End-Joining wird durch Ku70/80 behindert .....	75
4.1.2. Das Fehlen klassischer End-Joining-Komponenten beeinträchtigt die Reparaturgenauigkeit.....	79
4.1.3. Transformationsassay zur Effizienzbestimmung des klassischen NHEJ .....	80
<b>4.2. Das Verhältnis von <i>in vitro</i> End-Joining-Kapazität und zellulärer Strahlenempfindlichkeit</b>	<b>81</b>
4.2.1. <i>In vivo</i> - Die zelluläre Strahlenempfindlichkeit der Hals-/Kopf-Tumorzellen hängt von der Anzahl der residuellen $\gamma$ H2AX-Foci ab .....	81
4.2.2. <i>In vitro</i> - Zirkuläre Produkte als Indikator für effizientes NHEJ .....	83

4.2.3.	Humane Kopf-/Hals-Tumorzelllinien zeigen überwiegend hochgradig korrekte Reparatur.....	85
4.2.4.	Korrelation von Strahlenempfindlichkeit und <i>in vitro</i> End-Joining-Effizienz.....	87
<b>4.3.</b>	<b>Methodische Grenzen des <i>in vitro</i> End-Joinings .....</b>	<b>90</b>
<b>4.4.</b>	<b><i>In vitro</i> End-Joining als Instrument zur Prädiktion der Strahlenempfindlichkeit.....</b>	<b>91</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>93</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>95</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>103</b>
<b>7.1.</b>	<b>Materialien .....</b>	<b>103</b>
7.1.1.	Laboraausstattung.....	103
7.1.2.	Kits, Reagenzien, Chemikalien.....	104
7.1.3.	Reagenzien und Medien für Zellkultur .....	107
7.1.4.	Bakterienkultur.....	107
7.1.5.	Antikörper.....	107
7.1.6.	Plasmide .....	108
7.1.7.	Oligonukleotid-Sequenzen .....	108
7.1.8.	Software .....	108
7.1.9.	Puffer und Lösungen .....	108
<b>7.2.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>112</b>
<b>7.3.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>114</b>
<b>7.4.</b>	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>114</b>
7.4.1.	Publikationen.....	116
7.4.2.	Präsentationen / Konferenzteilnahmen.....	116
<b>7.5.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>118</b>

## 1. Einleitung

### 1.1. DNA-Schäden und ihre Verbindung zu Karzinogenese

Die DNA in unseren Zellen ist kontinuierlich endo- und exogenen Substanzen und Prozessen ausgesetzt, die die funktionale Integrität des Genoms beeinträchtigen können. Es wird angenommen, dass eine humane Zelle über 10.000 DNA-Läsionen pro Tag reparieren muss, um alleine den endogenen Quellen von DNA-Schäden entgegenzuwirken (Lindahl, 1993). Dazu kommen genotoxische Substanzen wie reaktive Sauerstoffspezies, interkalierende Agenzien, UV-Licht und ionisierende Strahlung (Lodisch H, 2004). Dabei kann die DNA auf verschiedene Weise geschädigt werden. Ihre Basen (Adenin (A), Guanin (G), Thymin (T) und Cytosin (C)) können direkt modifiziert werden, z. B. durch Oxidation oder Hydrolyse, und während der Replikation kann es zu Basen-Fehlpaarungen kommen. Es können kovalente Quervernetzungen (*Crosslinks*) zwischen Basen desselben DNA-Stranges oder zwischen beiden Strängen entstehen. Außerdem kann das DNA-Rückgrat aus Desoxyribosen und Phosphaten brechen, was zu Einzelstrangbrüchen und den besonders schwerwiegenden Doppelstrangbrüchen (DSBs) führt. Die Zelle benötigt wirksame Reparaturmechanismen, um diesen schädlichen Ereignissen entgegenzuwirken und um die genomische Integrität aufrecht zu erhalten. Sollte es nicht gelingen, die genetische Information wiederherzustellen und den Bruch zu schließen, so führt dies zu einem Chromosomenfragment, welches in den folgenden Mitosen durch die gestörte Segregation verloren geht und mit ihm essentielle Genloci. Somit stirbt die Zelle (mitotische Katastrophe) oder es wird durch den unreparierten DSB das Programm der Apoptose (programmierter Zelltod) aktiviert. Durch Insertionen, Deletionen oder Translokationen kann aber auch eine permanente Veränderung der DNA-Sequenz, eine Mutation, verursacht werden, die irreversibel ist. Liegt diese in Genen, die verantwortlich sind für DNA-Reparatur und Zellzyklus-Regulation, kann dies den ersten Schritt in Richtung Krebsentstehung bedeuten (Khanna et al., 2001). Die Evolution hat eine Vielzahl an Reparaturmöglichkeiten hervorgebracht. Diese Mechanismen funktionieren jedoch nicht immer ausreichend oder korrekt. Die fehlerhafte Reparatur kann z. B. zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung führen. Das Ziel der Forschung ist es, diese Reparaturmechanismen aufzudecken und zu verstehen.

### 1.2. *In vitro* DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur

Zur Untersuchung der DNA-DSB-Reparatur wurden bislang Parameter *in vivo* betrachtet wie das Zellüberleben nach Bestrahlung oder nach DNA-schädigenden Agenzien. Dabei handelt

es sich um einen indirekten Nachweis, wie effizient die Zelle DSBs reparieren kann, da sie durch bestehende DSB in die Apoptose geleitet oder nach wenigen Teilungen durch die mitotische Katastrophe inaktiviert werden würde. Ein weiterer Parameter ist die Kapazität und Geschwindigkeit, mit der DSBs in der Zelle beseitigt werden und wieviele unrepariert bleiben. Innerhalb weniger Minuten nach Erkennung des DSBs in der Zelle wird in dessen Umgebung das Histon H2AX über eine Region von einigen Megabasen phosphoryliert (Burma et al., 2001; Rogakou et al., 1998). Das sogenannte  $\gamma$ H2AX kann mit Hilfe von Antikörpern immunocytochemisch angefärbt werden und macht so die Quantifizierung von DSBs möglich. Diese Untersuchungen lassen Schlüsse auf die Reparatureffizienz der Zelle zu, ermöglichen aber keine Aussage über Qualität der Reparatur oder Wahl des Reparaturweges. Es gibt zwar speziell entwickelte Plasmidkonstrukte, mit denen verschiedene Reparaturwege quantifiziert werden können, diese müssen jedoch zunächst in die Zelle transfiziert und/oder stabil integriert werden, was einen großen Zeitaufwand bedeutet und nicht mit jeder Zelle ohne Probleme durchführbar ist. Wie sich Transfektionsbedingungen, Zellzyklus und genetische Disposition der Zelle auf die komplexe DSB-Reparatur auswirken, ist ungeklärt. Trotzdem haben *in vivo* DSB-Reparaturassays schon viele Komponenten und Zusammenhänge des komplexen Reparatursystems humaner Zellen aufgedeckt. Jedoch sind *in vitro* Reparatursysteme insofern flexibler und breiter in der Anwendung, als dass sie weniger störenden Nebeneffekten unterliegen. *In vivo* wirkt sich die Herunterregulierung oder Inhibition bestimmter Reparatur-Proteine letal auf den Zellorganismus aus, z. B. im Falle der DNA-Ligase IV (Barnes et al., 1998; Frank et al., 2000). *In vitro* sind nicht Zellzyklus, Transfektionseffizienzen oder Zell-Toxizitäten vordergründig, sondern die *in vitro* Reaktion lässt direkt auf die verschiedenen DSB-Reparaturwege blicken. Verschiedenste Arten von DSBs können untersucht und die reparierten Sequenzen genau analysiert werden. Die Gesamtheit der Proteine einer Zelle ausgenommen ihrer Organellen, Membranen, DNA oder sonstigen Bestandteile bildet dabei das zellfreie System. Diese Zusammenstellung der Proteine ohne den Rahmen des lebenden Zellorganismus ist frei von oben genannten Nebeneffekten. Daher bieten zellfreie Systeme eine gute Möglichkeit, die grundlegenden biochemischen Zusammenhänge zwischen den einzelnen Reparaturproteinen und -wegen und deren Regulation untereinander, deren Effizienz und Genauigkeit zu erforschen.

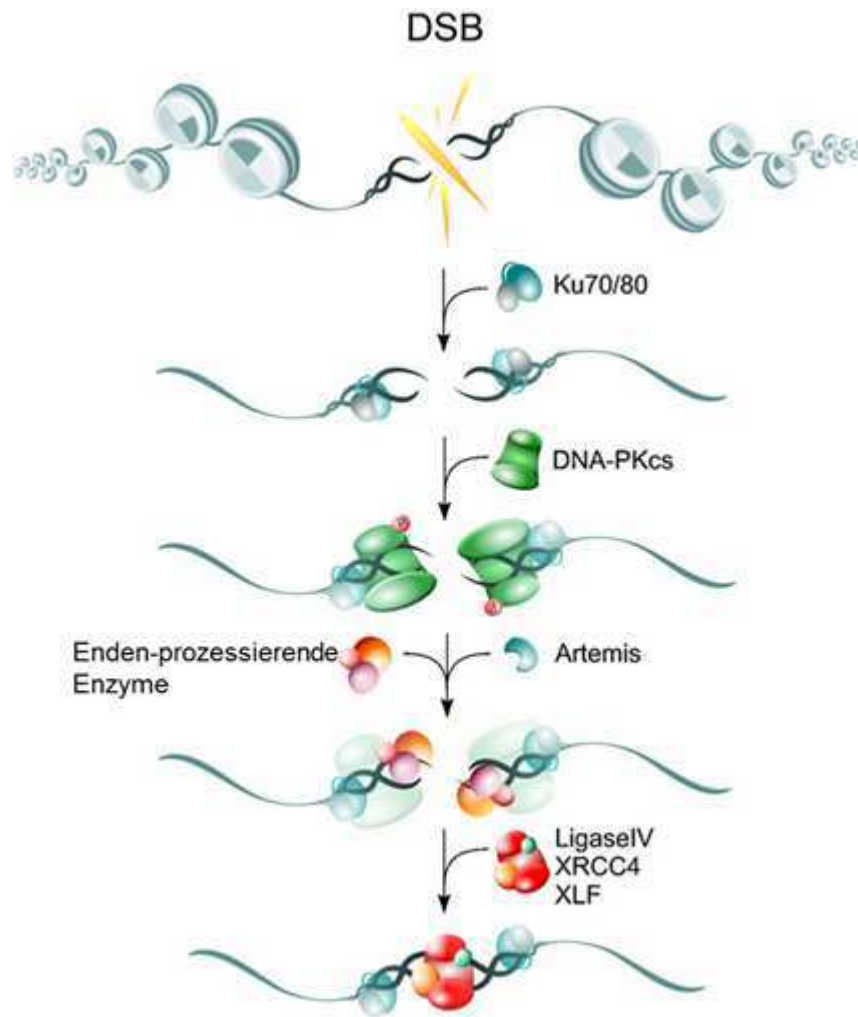
## 1.3. Hauptwege der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur

### 1.3.1. Nicht-Homologes End-Joining

In humanen Zellen werden DSBs in der DNA, hervorgerufen z. B. durch ionisierende Strahlung oder Genrearrangements während des Zellzyklus, vorwiegend über nicht-homologe Endverknüpfung (*Non-Homologous End-Joining* = NHEJ) repariert. Dabei werden die beiden Enden des DSBs direkt verbunden, wobei Fehler wie Deletionen oder Insertionen auftreten können, was diesen Reparaturweg als prinzipiell ungenau deklariert (Lieber, 2008). Das einfachste Beispiel ist die Ligation von „sauberen“, komplementär überhängenden Enden sowie die von glatten (*blunt*) Enden ohne Überhang, zu der im Regelfall eine DNA-Ligase ausreicht. Der vollständige Mechanismus des NHEJ basiert jedoch außerdem mindestens auf den folgenden, notwendigen Proteinen: Ku70, Ku80, DNA-PKcs, Artemis, Ligase IV, XRCC4 und XLF (Abbildung 1).

In einem ersten Schritt nach Erkennung des DNA-DSBs binden Ku70 und Ku80 als Heterodimer (Ku) in einer Ringstruktur an die freiliegenden DNA-Enden (Smider et al., 1994; Taccioli et al., 1994) und schützen sie vor einem unkontrollierten Abbau durch Nukleasen (Walker et al., 2001). Die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Protein-Kinase (DNA-PKcs) wird durch Ku zu den Enden rekrutiert (Hammarsten et al., 1998) und ist dort dafür zuständig, diese in direkter Nachbarschaft zu halten, um sofort wieder verbunden werden zu können (DeFazio et al., 2002; Spagnolo et al., 2006). Bindet DNA-PKcs an das Ku70/80 Heterodimer, rutscht dieses ca. einen Helix-Turn weiter nach innen, weg vom DSB (Yoo et al., 1999), um dort das DSB-Ende für weitere Reparaturproteine zugänglich zu machen. Der letzte Schritt der Endverknüpfung wird von DNA-Ligase IV (LigIV) durchgeführt (Lees-Miller et al., 2003). Diese Ligase ist mit seinem Kofaktor XRCC4 zu einem multimeren Filament verbunden (Modesti et al., 2003), welches die Adenylierung der Ligase und ihre Aktivität stimuliert und für ihre Stabilität *in vivo* benötigt wird (Bryans et al., 1999; Grawunder et al., 1997). XLF und XRCC4 interagieren miteinander (Ahnesorg et al., 2006) und führen durch Filamentformierung zu einer Brückenbildung, so dass die DSB-Enden in nächster Nähe zusammengehalten werden (Andres et al., 2012; Roy et al., 2012). Außerdem steigert XLF die Effizienz der Ligation vom XRCC4/LigIV-Komplex *in vitro* (Gu et al., 2007). XLF stimuliert als Kofaktor das End-Joining (EJ) von nicht-kohäsiven Enden und *blunt*-Enden, hat aber wenig Einfluss auf die Ligation von kohäsiven Enden (Tsai et al., 2007).



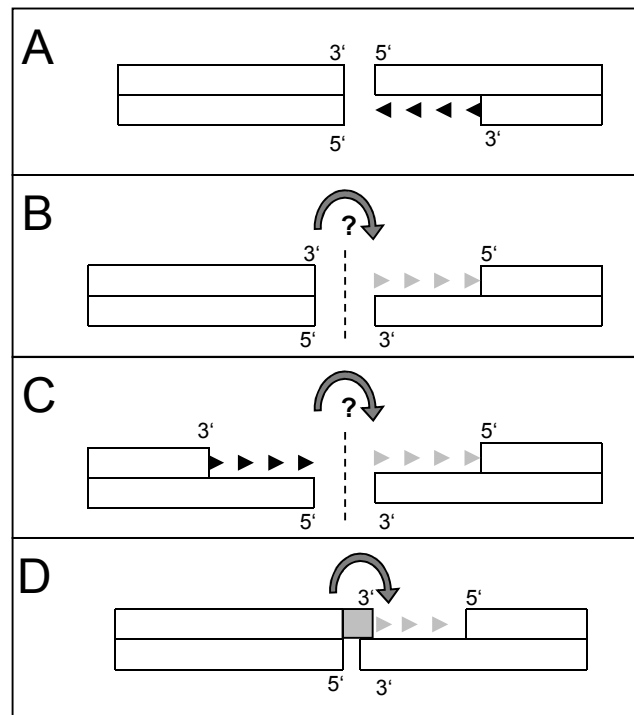


**Abbildung 1: Der Mechanismus des nicht-homologen End-Joinings (NHEJ).**

Sehr schnell nach Entstehen des DSB bindet das Heterodimer aus Ku70 und Ku80 beide Enden des Bruchs. Ku rekrutiert DNA-PKcs, um zusammen den Synapsenkomplex zu bilden, der die Enden in direkter Nähe zueinander hält. Artemis und andere Nukleasen prozessieren die DNA-Enden zu ligierbaren Strukturen. In einem finalen Schritt wird der Bruch durch einen Komplex aus LigIV, XRCC4 und XLF verschlossen (verändert nach Mladenov et al., 2011).

Für die einfachste Form der Ligation von kohäsiven DNA-Enden müssen allerdings DSBs mit 3'-Hydroxyl- (OH) oder 5'-Phosphat-Gruppen (P) vorliegen. Die durch ionisierende Strahlung hervorgerufenen DSBs können häufig nicht direkt ligiert werden, weil zusätzlich zu Unterbrechungen des Zucker-Phosphat-Gerüsts auch Basenmodifikationen und Zuckerschäden auftreten (3'-Phosphate oder -Phosphoglykolate). Diese DNA-Enden müssen zuerst prozessiert werden, indem Reste geschädigter Basen oder nicht kompatible Einzelstrang-Überhänge entfernt werden. Eine der Endonukleasen, die in diese Prozesse involviert sind, heißt Artemis. Sie hat die Fähigkeit, DNA-Strukturen wie 3'- oder 5'-Überhänge, Haarnadelstrukturen (*hairpins*) oder an DNA-Lücken (*ss-gaps*) zu schneiden (Ma et al., 2002; Ma et al., 2005). Fehlende DNA-Abschnitte werden durch verschiedene DNA-Polymerasen neu synthetisiert. Kommt es bei der Ligation zweier teilweise

komplementären Einzelstrang-Enden zur Lückenbildung, wird diese Einzelstrang-Lücke durch Polymerase  $\mu$  (My) oder Polymerase  $\lambda$  (Lambda) aufgefüllt (Ma et al., 2005). Diese Polymerasen der Familie DNA-pol-X können über einen bestehenden DNA-Schaden hinweg ohne Template synthetisieren und stellen so eine minimale Brücke her, mittels derer, sofern passende Nukleotide angehängt wurden, die beiden Enden kovalent verbunden werden können (Abb. 2).



**Abbildung 2: Schema der Verknüpfung nicht-homologer DNA-Enden durch Auffüllen fehlender Basen und Ligation.**

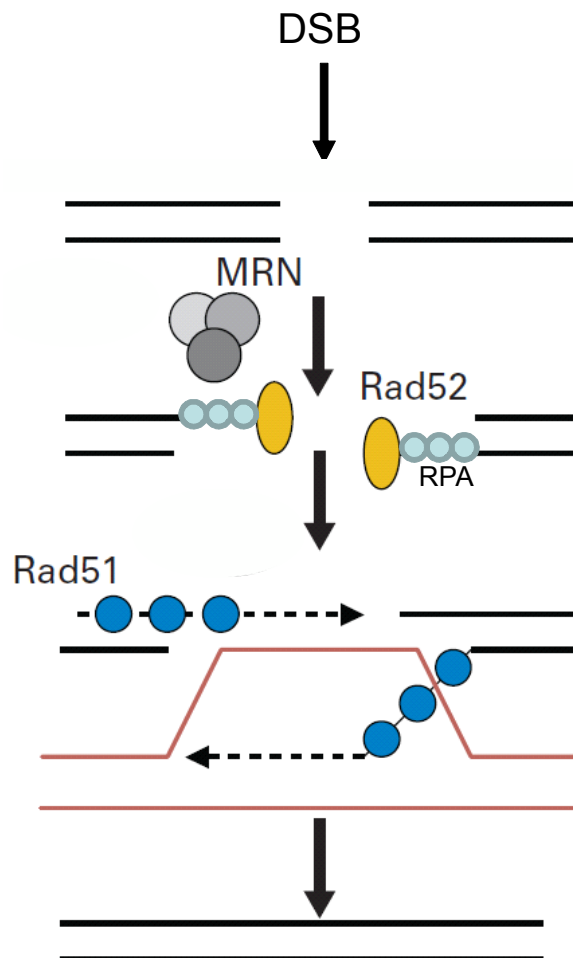
Polymerasen benötigen ein 3'-Hydroxyl-Ende (3'-OH), um mit der DNA-Synthese in 5'-3'-Richtung beginnen zu können. (A) Auffüllen des 5'-Überhangs und anschließende „blunt-end“-Ligation. (B + C) Nur das 3'-OH-Ende des gegenüberliegenden DNA-Stranges kann als Primer für die Polymerase dienen. (D) Reparaturschema für B und C: An das gegenüberliegende DSB-Ende wird ohne vorliegendes Template eine Base angehängt („unprimed synthesis“), so dass es zum Überhang kommt und die DNA-Synthese fortgesetzt werden kann.

► konventionelles Auffüllen des Überhangs durch DNA-Polymerase; ► unkonventionelles Auffüllen des Überhangs vorbereitet durch den ungebundenen gegenüberliegenden DNA-Strang; ■ „frei“ synthetisiertes, komplementäres Nukleotid.

### 1.3.2. Alternatives End-Joining

Neben dem klassischen NHEJ gibt es einen alternativen Reparaturweg, der unter bestimmten Bedingungen einsetzt. Er ist langsamer als das klassische NHEJ und wird unter Wildtyp-Bedingungen durch die schnelle Bindung von Ku70/80 und DNA-PKcs an die DSBs verhindert. Fällt das klassische NHEJ aus, hat dieser „Backup“-Reparaturweg die

Möglichkeit, den Defekt aufzufangen. Allerdings zeichnet sich das *Backup*-NHEJ durch einen hohen Grad an unkorrekter Reparatur aus (Adachi et al., 2001; Feldmann et al., 2000; Kuhfittig-Kulle et al., 2007). Es wird wahrscheinlich durch die Komponenten PARP1, DNA-Ligase III und XRCC1 ausgeführt (Audebert et al., 2004; Iliakis, 2009; Mansour et al., 2008; Wang et al., 2005). Ligase III arbeitet im Komplex zusammen mit XRCC1 und wird durch PARP1 reguliert.



**Abbildung 3: Überblick über die Hauptfaktoren der Homologen Rekombination (HR).**

Nach der Resektion der 5'-DNA-Enden durch Nukleasen wie den MRN-Komplex (Mre11/Rad50/Nbs1), werden die entstehenden 3'-überhängenden Enden durch RPA und Rad52 gebunden, die die Bindung von Rad51 vermitteln, so dass ein Nukleoprotein-Filament entsteht, welches nach Auffinden der homologen Sequenz in den Strang des Schwester-Chromatids einwandert. Es folgt die DNA-Synthese komplementär zur Homologie (verändert nach Weberpals et al., 2008).

### 1.3.3. Homologe Rekombination

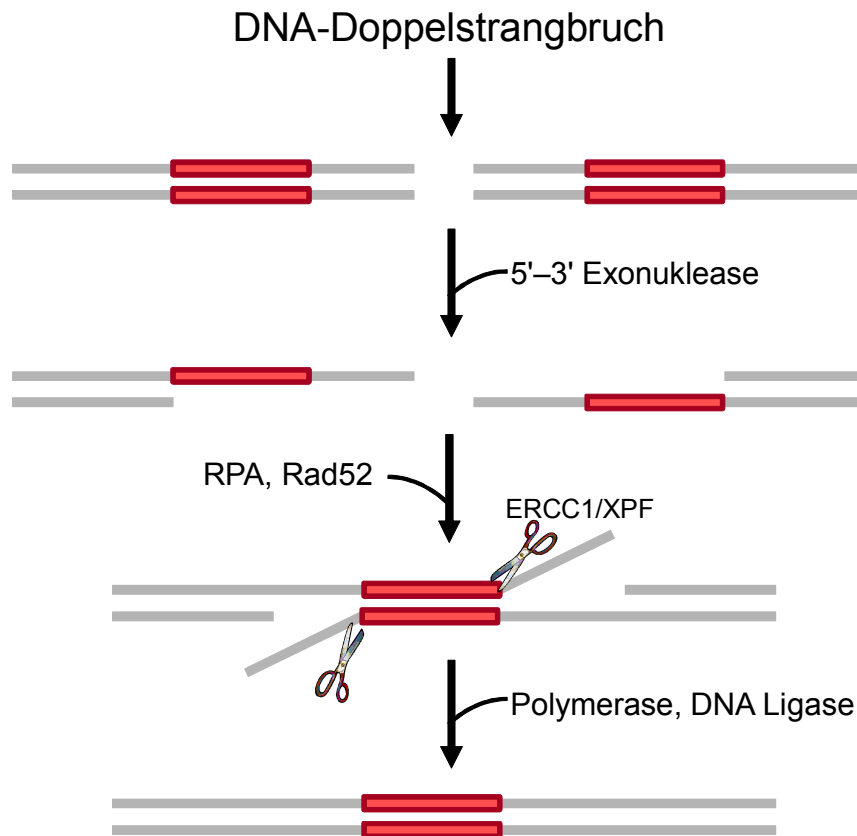
Die Homologe Rekombination (HR) gilt im Gegensatz zum NHEJ als eine stets fehlerfreie Reparatur von DSBs. Jedoch steht dieser Reparaturweg nicht wie das NHEJ während des

gesamten Zellzyklus zur Verfügung. HR ist nur möglich in der S- bzw. G2-Phase, da nur hier das Schwester-Chromatid als Reparaturvorlage dienen kann.

Bei der HR werden zunächst die DNA-Enden in 5'-3'-Richtung durch Nukleasen wie den MRN-Komplex (bestehend aus Mre11, Rad50 und Nbs1) reseziert, so dass 3'-überhängende Einzelstränge entstehen, die sofort durch das Einzelstrang-bindende Replikationsprotein A (RPA) besetzt werden (Wold, 1997) (Abb. 3). Das gebundene RPA führt wiederum zur Anlagerung von Rad52, welches in Interaktion Rad51 den Zugang zum Einzelstrang-DNA/RPA-Komplex ermöglicht. Rad51 legt sich in einem Filament um die einzelsträngigen DNA-Enden. Diese Ketten wandern in homologe, unbeschädigte Bereiche des Schwester-Chromatids ein. Dort werden sie durch DNA-Polymerasen komplementär zum Template verlängert und damit die Sequenzlücke des DSBs überbrückt.

#### 1.3.4. **Single-Strand Annealing**

Ein dritter, alternativer Weg zum NHEJ und zur HR ist das *Single-Strand Annealing* (SSA). Dieser Reparaturweg ist immer fehlerbehaftet und kann nur verwendet werden, wenn der DSB im Bereich repetitiver DNA-Sequenzen auftritt. Nach dem Bruch des Doppelstranges werden die DNA-Enden in der Weise reseziert, dass lange, einzelsträngige Überhänge entstehen. Die Einzelstränge werden zuerst mit RPA besetzt. Anschließend wird Rad52 zum DSB rekrutiert. Ist die Resektion soweit fortgeschritten, dass komplementäre Regionen frei liegen, können diese paaren und verbunden werden (Abb. 4). Die überhängenden Enden werden durch die ERCC1/XPF-Endonuklease entfernt, die am Übergang von einzel- und doppelsträngiger DNA schneidet (de Laat et al., 1998). Eine der repetitiven Sequenzen geht dabei verloren und mit ihr die gesamte Sequenz, die zwischen den beiden sich wiederholenden Bereichen liegt. Daher gilt dieser Reparaturweg als ausgesprochen mutagen (Haber, 2000; Sung et al., 2006).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des *Single-Strand Annealing* (SSA).**

Dieser Reparaturweg beginnt ähnlich der HR mit der 5'-3'-Resektion der DNA-Enden durch eine Exonuklease. Es entstehen 3'-Einzelstrang-Überhänge. Diese werden durch RPA gebunden und stabilisiert, wonach Rad52 bindet und die Suche nach Homologien stimuliert. Nachdem sich die homologen Sequenzen aneinandergelagert haben, folgt ein erneuter Resektionsschritt der inkompatiblen, abstehenden Einzelstränge, die zwischen den Homologien vorlagen, durch die endonukleolytische Aktivität des ERCC1/XPF-Komplexes. Die entstandenen Sequenz-Lücken werden durch Fill-in-Synthese aufgefüllt und durch DNA-Ligasen ligiert.

#### 1.4. Zellfreie Doppelstrangbruch-Reparatur

Um die nur teilweise bekannten biochemischen Zusammenhänge der verschiedenen Reparaturwege und der beteiligten Proteine aufzudecken, haben sich „*in vitro* Reparaturassays“ bewährt. Es gibt verschiedene Arten von zellfreien Reparatursystemen. Am häufigsten genutzt werden Systeme, die darauf basieren, dass Plasmid-DNA mit Extrakt-Proteinen oder teilweise gereinigten, fraktionierten Extrakten inkubiert wird, welche Reparaturaktivität besitzen. Die Plasmide werden durch ein oder zwei verschiedene Restriktionsenzyme linearisiert und stellen auf diese Weise die DSBs dar - das Reparatursubstrat. Während der Inkubation mit dem Extrakt bilden sich zirkuläre monomerische und lineare multimerische Produkte, die durch verschiedene

Analysemethoden (Agarose-Gelelektrophorese, Southern-Blot, PCR) untersucht werden können.

Alternativ kann *in vitro* DNA-Reparatur auch in einem weitgehend artifizialen System untersucht werden, in dem DNA-Enden mit ausgewählten, aufgereinigten Proteinen interagieren. Diese Methode liefert wichtige Einsichten in biochemische Zusammenhänge und Strukturen. Sie ist aber dadurch begrenzt, dass alle notwendigen Komponenten der Reparatur vorher bereits bekannt sein müssen. Außerdem ist es in der Vorbereitung schwierig, große Proteine in nativer Form und in ausreichender Menge zu präparieren. Gerade das komplexe Zusammenspiel von Signalwegen nach der DNA-Schädigung und der verschiedenen Reparaturwege ist ein Gebiet mit vielen noch unbekanntem Abläufen. Um die genaue Funktionsweise der Reparatur aufzudecken, werden Extrakte aus gesamten Zellen hergestellt, die damit eine physiologische Zusammensetzung der für die DNA-Reparatur wichtigen Proteine aufweisen.

## 1.5. Einführung in zellfreie Extrakte

Zellfreie Reparaturextrakte (*cell-free extract* = CFE), wie sie in der Literatur beschrieben werden, basieren auf einer ähnlichen Herstellungsweise. Die zu extrahierenden Zellen bzw. Gewebe werden zunächst gewaschen bzw. die Gewebeprobe zerschnitten und von Blutresten befreit. Je nachdem, ob ein zytoplasmatisches, nukleäres oder Gesamtzell-Extrakt gewonnen werden soll, erfolgt der Aufschluss der Zellen. Die gewaschenen, pelletierten Zellen werden in einem hypotonischen Extraktionspuffer aufgenommen, also in einem Puffer mit niedrigerer Salzkonzentration als innerhalb der Zelle. Dieser Puffer enthält Protease-Inhibitoren zur Verhinderung der Proteindegradation und Dithiothreitol (DTT) als Antioxidationsmittel. DTT konserviert Proteine in ihrer funktionellen Form, indem es die Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen zu Disulfidbrücken durch Luftsauerstoff verhindert. In diesem Puffer quellen die Zellen durch den osmotischen Wassereinstrom auf. Mit Hilfe von mechanischen Homogenisatoren lassen sich die Zellmembranen aufscheren. Schonender ist die Zellyse nur durch alleinige Einwirkung des hypotonischen Puffers. Die Zellkerne bleiben hierbei intakt und können durch Zentrifugation separiert werden. Der entstehende Überstand stellt den zytoplasmatischen Extrakt dar, welcher keine Reparaturkapazität besitzt (Cheong et al., 1998), da sich die Haupt-Faktoren der DNA-Reparatur gelöst im Nukleus befinden. Das Pellet aus Zellkernen kann mit hypotonischem Lysispuffer unter Einsatz von Ultraschall zum nukleären Extrakt weiterverarbeitet werden (North et al., 1990). Ohne diese Trennung von Zytoplasma und Kernen wird ein Gesamtzellextrakt gewonnen, welcher ähnlich gute Reparaturkapazität besitzt wie ein rein nukleärer Extrakt. Nach dem Aufschluss der Zellen

wird ein Hochsalzpuffer zugesetzt, der die Proteinextraktion aus den Kernen ermöglicht. Die hochmolekularen Bestandteile (Membranen und Zytoskelett) werden durch einen Ultrazentrifugationsschritt entfernt. Genomische DNA wird ebenfalls durch diesen Schritt entfernt. Sie würde in der späteren Reparaturreaktion mit dem DSB-Substrat konkurrieren und die Analyse der Reparaturprodukte verfälschen oder unmöglich machen. Der Überstand aus der Ultrazentrifugation wird anschließend entweder direkt der Dialyse zugeführt oder erst einer Ammoniumsulfatfällung unterzogen. Nach Zentrifugation wird das präzipitierte Proteinpellet in Dialysepuffer aufgenommen und mehrere Stunden dialysiert. Der Dialysepuffer enthält neben Proteaseinhibitoren auch Glycerol, welches der Stabilisierung der Proteinstruktur während der Lagerung im gefrorenen Zustand dient. Nachdem die Proteine „umgepuffert“ und überschüssige Salzreste durch die Dialyse entfernt wurden, wird der Extrakt in flüssigem Stickstoff gelagert. Es gibt Studien, in denen die zellfreien Extrakte weitere Aufreinigungsschritte durchlaufen. Dabei wird der Extrakt chromatographisch in diverse Fraktionen getrennt, die sich je nach Salzgradient ergeben (Baumann et al., 1998). Hierbei besteht allerdings die Gefahr, dass die für die Reparaturreaktion verwendete Fraktion bestimmte Reparaturfaktoren nicht mehr enthält, da sie durch ihre biochemischen Eigenschaften aus diesen Fraktionen ausgeschlossen wurden.

Das erste zellfreie *in vitro* Reparatursystem, das speziell für die Analyse des NHEJ entwickelt wurde, stammt von Pfeiffer und Vielmetter. Dabei wurden Extrakte aus künstlich befruchteten Eiern von *Xenopus laevis*, einer südafrikanischen Krallenfroschart, vor der ersten Teilung gewonnen. Am häufigsten werden die *Xenopus*-Extrakte auf die Weise gewonnen, dass die Eier zunächst gewaschen und dann in einem Extraktionspuffer durch Zentrifugation aufgeschlossen werden (Pfeiffer et al., 1988). Gleichzeitig wird dadurch eine Dichtentrennung erreicht, so dass der Gesamt-Zellextrakt frei von Fetten, Zelldebris und DNA entnommen werden kann. Der zellfreie Extrakt aus Froscheiern hat durch das embryonale Stadium den Vorteil, dass eine hohe Konzentration an wichtigen Proteinen des DNA-Metabolismus vorliegt. Das Gesamt-Zellextrakt aus *X. laevis* kann eine breite Palette an biologischen Vorgängen nachstellen wie DNA-Replikation, Aufbau eines Spindelapparates, Chromosomen-Kondensation oder die verschiedenen Arten der DNA-Reparatur.

Das erste zellfreie Extrakt für NHEJ *in vitro* aus Säugetierzellen wurde 1990 von North et al. erstellt (North et al., 1990). Die Extrakterstellung aus Säugetierzellen ist schwieriger als die aus *Xenopus*-Eiern, da die zu extrahierenden Zellen ca. 100-mal kleiner sind und einen viel geringeren Proteingehalt aufweisen.

Die ersten zellfreien Extrakte aus Gewebe wurden 2003 von Diggle et al. aus Hirn- und Blasen-Tumor-Biopsien erzeugt (Diggle et al., 2003). Bei Geweben kommt als erschwerender Faktor hinzu, dass (Tumor-)Gewebe meist aus einer Vielzahl verschiedener Zelltypen

besteht. Außerdem müssen vor der Extraktion Blutreste so gut wie möglich entfernt werden. Dies geschieht durch feine Zerkleinerung der Gewebestücke und ausgiebiges Waschen. Im Anschluss kann mit diesem zerkleinerten Gewebe weiter wie mit Einzelzellen verfahren werden.

## 1.6. DNA-Substrate und Doppelstrangbrüche

Neben dem zellfreien Extrakt wird für das DSB-Reparatur-System ein Substrat benötigt, das den DSB darstellt, der *in vitro* wieder verbunden werden soll. Er kann in genomischer DNA (Cheong et al., 1998; Iliakis et al., 2006a) oder in Plasmid-DNA (Budman et al., 2006; Iliakis et al., 2006b; Pfeiffer et al., 2005) erzeugt und zum Extrakt hinzugegeben werden. Des Weiteren können auch DNA-Fragmente als Reparatursubstrat eingesetzt werden (Datta et al., 2006).

Genomische DNA als Reparatursubstrat kommt der *in vivo* Situation sehr nahe. Hier liegt die DNA partiell organisiert in Chromatin vor. Die Größe von genomischer DNA stellt jedoch für *in vitro* Experimente insofern ein Hindernis dar, als dass durch die Handhabung das Molekül schnell geschert wird. So treten unwillkürlich DSBs auf. Eine Möglichkeit, diesem Problem zu begegnen, ist, bereits die Zellen, aus denen die DNA isoliert werden soll, in Agarose einzubetten (Ganguly et al., 1995; Iliakis et al., 2006a). Sowohl „nackte“ genomische DNA als auch Chromatin-gebundene genomische DNA können so ohne die Einwirkung von Scherkräften für *in vitro* Reparaturversuche gewonnen werden. Die in Agaroseblöcken eingelagerten Zellen werden mit Lysispuffern, die Detergenzien, RNase und Proteinase enthalten, extensiv gewaschen, um schließlich nur noch genomische, von Proteinen freie DNA zu erhalten. Um DNA in chromatinassoziiierter Form zu gewinnen, werden die eingebetteten Zellen nicht mit Proteinasen behandelt, sondern nur mit Detergenz- und Antioxidanz-haltigem Lysispuffer unter Zugabe von Protease-Inhibitoren gewaschen, so dass die Zellen aufquellen, die Membranen zerplatzen und die Kerne frei von Zytoplasma vorliegen. Auch die Kernmembran wird auf diese Weise aufgebrochen, so dass Großteile des Nukleoplasmas weggewaschen werden. Diese vorbehandelte DNA kann anschließend durch Bestrahlung oder Behandlung mit DSB-induzierenden Agenzien geschädigt werden. Solch eine Präparation von genomischer DNA ist sehr zeitintensiv und lässt sich in Agarose nur schwer biochemisch rein und vollständig zugänglich herstellen. Daher hat sich Plasmid-DNA als Reparatursubstrat in vielen zellfreien Systemen durchgesetzt. Sie lässt sich schnell und in größeren Mengen herstellen. Die Behandlung mit ionisierender Strahlung als auch mit DSB-induzierenden Agenzien ist möglich. Linearisierte Plasmide können einfach über Agarose-Gelelektrophorese von zirkulären Plasmidformen getrennt und anschließend



aufgereinigt werden, so dass ein rein lineares DSB-Substrat zur *in vitro* Reparatur eingesetzt werden kann.

## 1.7. Der DSB und seine Reparatur im CFE

Die einfachste Möglichkeit einen DSB zu erhalten ist, DNA mit Restriktionsenzymen (RE) zu schneiden. Bei Verwendung eines einzelnen REs entstehen typischerweise entweder ein glattes (*blunt*) Ende ohne einzelsträngige Überhänge oder kohäsive Enden mit 3'- oder 5'-überhängenden Einzelsträngen. Unter Verwendung zweier verschiedener RE können nicht-kohäsive DSB-Enden erzeugt werden, die entweder überlappend sind oder 5'-3', 3'-5' einzelsträngig oder *blunt*-3' oder *blunt*-5' aneinanderstoßen. Diese DNA-Enden stellen sogenannte saubere Brüche dar, da sie im Gegensatz zu "schmutzigen", strahlungsinduzierten oder durch Sauerstoffradikale (reaktive Sauerstoffspezies; ROS) induzierten DSBs mit geringem Prozessieraufwand durch Polymerasen und Ligasen wieder verknüpft werden können. Wichtig ist nur die Herstellung einer ligierbaren Endenstruktur (3'-OH und 5'-P) durch das exonukleolytische Entfernen inkompatibler Basen oder/und durch „*Fill-in*“-DNA-Synthese.

Es wurde gezeigt, dass sich die Effizienz und Genauigkeit der Reparatur von verschiedenen enzymatisch hervorgerufenen DSBs durchaus unterscheidet. So wurden 3'-komplementäre DSB-Enden mit einer höheren Effizienz verbunden als 5'- oder *blunt*-Enden (Baumann et al., 1998; Feldmann et al., 2000). Das ist bemerkenswert, da eine DNA-Polymerase für die Synthese neuer Basen ein 3'-Hydroxyl-Ende (3'-OH) für die Verbindung benötigt. Ein DSB mit 5'-Überhang kann sowohl durch *Fill-in* der fehlenden Basen als auch durch exonukleolytische Degradation in 5'-3'-Richtung geglättet werden, um dann ligiert werden zu können. 3'-Überhänge haben aber keine freie Struktur, an der Polymerasen direkt anknüpfen können (siehe Abb. 2 B und C) und können daher nur über 3'-5'-Degradation durch eine Exonuklease geglättet werden. Dazu passend zeigten die 3'-überhängenden Enden auch eine geringe Reparaturgenauigkeit, da bei vielen Reparaturverknüpfungen die überhängenden Enden degradiert und anschließend die *blunt*-Enden ligiert wurden. Aber da trotzdem auch akkurate Reparatur stattgefunden hat, muss es einen Mechanismus geben, der in der Lage ist, DSB-Enden in direkter Nachbarschaft zusammenzuhalten und so nah aneinander zu bringen, dass z. B. ein *blunt*-Ende eines DSBs als Ansatzpunkt für eine DNA-Polymerase dienen kann (siehe Abb. 2 D), die über die bestehende Lücke hinweg, ohne dass es ein Template gibt, mindestens eine passende Base synthetisieren kann. Diese Base kann mit dem zweiten Bruchende paaren und dann Auffüllsynthese und Ligation erlauben (Thode et al., 1990).

Um zu untersuchen, ob diese Reparaturereignisse über NHEJ zustande kommen, wurden Kern-Faktoren des NHEJ über entsprechende Antikörper entfernt und die Reparatureffizienz dieser depletierten Extrakte analysiert. Die Reparatur konnte durch Depletion von XRCC4, Ku70, Ku80 und DNA-PKcs inhibiert werden (Baumann et al., 1998). Damit wurde bestätigt, dass die DSBs in diesem zellfreien System durch NHEJ repariert wurden. Lange war unbekannt, welche Ligase oder Ligasen an der Reparatur solcher DSBs beteiligt sind. Baumann und West depletierten die DNA-Ligasen I, III und IV durch die Behandlung der CFEs mit entsprechenden Antikörpern. Sie konnten zeigen, dass für die Reparatur komplementärer DNA-Enden in ihrem zellfreien System nur die DNA-Ligase IV eine Rolle spielt, nicht aber die Ligasen I und III. Die Entstehung von Produkten konnte dort durch die Depletion von LigIV vollständig unterbunden werden. Das bedeutet, dass außer dem klassischen NHEJ keine andere Möglichkeit zur Reparatur der DSB bestand. Diese Erkenntnis steht im Gegensatz zu späteren Arbeiten anderer Arbeitsgruppen. Dort wurde eine unterschiedlich hohe Reparatureffizienz auch ohne die Anwesenheit von Kernfaktoren des NHEJ wie z. B. DNA-PKcs, Ku80 oder LigIV in zellfreien Extrakten aus defizienten Zellen festgestellt (Kuhfittig-Kulle et al., 2007; Wang et al., 2001). Zwar war die Effizienz deutlich geringer als die im Wildtyp-Extrakt, jedoch fand Reparatur auf einem niedrigen Level statt. Folglich besteht eine Reparaturmöglichkeit über einen Weg, der eintritt und nachweisbar ist, wenn klassisches NHEJ nicht arbeiten kann. Werden diese späteren *in vitro* Systeme mit dem von Baumann und West verglichen, kann festgestellt werden, dass sich die Reaktionsbedingungen der *in vitro* Reparatur in einem Detail unterscheiden. Baumann und West arbeiten mit einer Magnesium-Konzentration von 0,5 mM während der Reparatur, die anderen Systeme mit höheren Konzentrationen von 10 mM Magnesium. Dabei wurde festgestellt, dass durch Reduktion der Magnesium-Konzentration von 10 mM auf 0,5 mM in der Reaktion von Extrakten aus LigIV-defizienten Zellen genau der Effekt wie bei Baumann und West beobachtet werden konnte, nämlich dass die Effizienz der Reparatur verringert bzw. die Reaktion inhibiert werden konnte (Wang et al., 2001). Diese Resultate deuten darauf hin, dass ein Reparaturweg unabhängig vom klassischen NHEJ besteht, der je nach Magnesium-Konzentration unterdrückt oder hervorgehoben wird. Dieser Reparaturweg, der in LigIV-defizienten Extrakten bei hohen Magnesium-Konzentrationen beobachtet werden konnte, wurde vollständig unterbunden, indem vor dem LigIV- und damit NHEJ-defizienten Hintergrund zusätzlich DNA-Ligase III depletiert wurde (Wang et al., 2005). Da im Gegensatz zu DNA-Ligase III die DNA-Ligase IV in der Zelle bereits in einem pre-adenylierten Zustand vorliegt (Robins et al., 1996; Tomkinson et al., 1997), kann sie auch unter Bedingungen niedriger Magnesium-Konzentrationen aktiv bleiben. Die Magnesium-Konzentration *in vivo* liegt im Zellkern bei ca. 2 – 4 mM in der Interphase und bei ca. 4 – 17 mM in der M-Phase (Strick et al., 2001). Daher arbeiten viele zellfreie Systeme mit höheren Magnesium-

Konzentrationen, um *in vivo*-ähnliche Bedingungen zu simulieren und sowohl Ligase IV- als auch Ligase III-abhängige Reparatur bzw. deren Konkurrenz um den DSB möglich zu machen. Vor diesem Hintergrund sind Zellzyklus-spezifische Beobachtungen zu LigIII-abhängiger Reparatur von großer Bedeutung. Es wurde beschrieben, dass der alternative Reparaturweg über Ligase III verstärkt in der G2-Phase auftritt (Iliakis, 2009; Wu et al., 2008a; Wu et al., 2008b). Dies lässt vermuten, dass Ligase III durch den erhöhten Magnesium-Gehalt in der zweiten Hälfte des Zellzyklus bessere Bedingungen für ihre Aktivität vorfindet und somit verstärkt in die DSB-Reparatur eingreifen kann.

Jedoch ist nicht nur die Konzentration an Magnesium bestimmend für den Reparaturweg. Auch die Interaktion der verschiedenen Reparaturfaktoren oder das Fehlen einzelner Faktoren bestimmt den Reparaturweg. Es wurde beschrieben, dass eine geringe Reparaturaktivität besteht, auch wenn XRCC4, Ku80 oder DNA-PKcs nicht vorliegen. Jedoch hat die Behandlung der Extrakte mit Wortmannin, einem Inhibitor der DNA-PKcs, nur einen weiteren inhibitorischen Effekt auf Extrakte des Wildtyps oder von XRCC4-defizienten Zellen (Kuhfittig-Kulle et al., 2007). Die Aktivität von Ku80- oder DNA-PKcs-defizienten Extrakten blieb unverändert. Durch diese Resultate wird das Modell bestätigt, dass es an einem DSB sehr schnell zur Bildung eines Ku70/Ku80/DNA-PKcs-Komplexes (DNA-PK) kommt, der die Reparatur in Richtung von LigIV-abhängigem NHEJ leitet. Wird DNA-PKcs inhibiert, löst sich der Komplex nicht vom DSB ab, sondern blockiert ihn. Auf diese Weise haben Proteine anderer Reparaturwege keinen Zugang zum DSB. Fehlt jedoch einer der Partner (Ku70/80 oder DNA-PKcs), so dass der Protein-Komplex nicht gebildet werden kann, wird durch Wortmannin zwar DNA-PKcs inhibiert, aber durch den fehlenden Komplex am DSB bleibt dieser frei zugänglich für andere Reparaturwege und der DSB kann verschlossen werden. Daher wird durch Wortmannin nur in Wildtyp-Extrakten oder in XRCC4-defizienten Extrakten die Reparatur inhibiert, weil beide Komplexpartner Ku70/80 und DNA-PKcs vorhanden sind. In Ku80- oder DNA-PKcs-defizienten Extrakten ist der Weg zu den DSBs frei für die DNA-PK-unabhängige Reparatur, das sogenannte *Backup-NHEJ* über Ligase III (Iliakis et al., 2004; Wang et al., 2003).

Auch Homologe Rekombination kann *in vitro* gemessen werden. Jedoch ist dieser Reparaturweg nicht sehr detailliert in zellfreien Systemen untersucht worden. Es gibt nur wenige Arbeiten, die jeweils unterschiedliche Reparatursubstrate für die *in vitro* HR verwenden. Sie sind alle Plasmid-basiert und detektieren eine erfolgte Rekombination dadurch, dass ein vorher defektes Markergen, z. B. eine Antibiotika-Resistenz, nach der Reparaturreaktion wieder Funktion erlangt (*plasmid reactivation assay*) (Kucherlapati et al., 1985; Oppliger et al., 1993; Song et al., 1985; Srivastava et al., 2007). Voraussetzung für die HR im zellfreien System ist einerseits das Vorhandensein zweier verschiedener Plasmide, die dasselbe Markergen mit jeweils unterschiedlichem Defekt tragen. Dies wird meist

dadurch erreicht, dass das Zielgen auf dem einen Plasmid eine große Deletion im 5'-Teil der Sequenz und das zweite Plasmid eine große Deletion im 3'-Teil des Gens enthält. Auf diese Weise liegt die fehlende Sequenz zu einem funktionellen Markergen auf dem jeweils anderen Plasmid. Nur die das Gen betreffende, Homologie-basierte Reparatur führt zu Plasmiden mit der korrekten Sequenz. Werden die entstehenden Plasmidprodukte in Bakterien transformiert, so können im Falle der Antibiotika-Resistenz nur diese mit korrektem Markergen in der Anwesenheit des Antibiotikums Kolonien bilden. Ein zweiter wichtiger Faktor, damit Homologe Rekombination *in vitro* stattfinden kann, ist die Lage des DSBs. Liegt der DSB außerhalb der zu rekombinierenden Region, ob in einem oder in beiden Plasmiden, so findet so gut wie keine HR statt. Liegt der DSB jedoch innerhalb des Markergens, so kann HR gemessen werden. Durch Erzeugung von DSBs in beiden Rekombinationspartnern wird die Rate an HR erhöht (Song et al., 1985).

Ein Konstrukt für die Messung von SSA in zellfreien Systemen ist ebenfalls Plasmid-basiert und wurde auch in unserem Labor entwickelt (Mansour et al., 2008). Hierbei wird die homologe Sequenz nicht über ein zweites Plasmid bereitgestellt, sondern über zwei homologe Bereiche von 47 bp auf demselben Plasmid, die ca. 150 bp voneinander entfernt liegen. Wird das Plasmid mittig zwischen beiden Homologien linearisiert, kann es im zellfreien Extrakt sowohl über NHEJ als auch über SSA wieder verbunden werden (Kasten-Pisula et al., 2009). Auf diese Weise ist nicht nur die Effizienz der Reparatur selbst, sondern auch die Präferenz zwischen den beiden Reparaturwegen analysierbar. Welche Faktoren die Wahl des Reparaturweges bestimmen ist allerdings noch unklar und daher Thema der aktuellen Forschung.

## 1.8. DNA-DSB-Reparatur in Extrakten aus humanen Tumoren

Durch die Untersuchung der DNA-DSB-Reparatur in zellfreien Systemen verschiedener Zelllinien konnte gut beschrieben werden, dass die Kapazität und Genauigkeit der Reparatur entscheidend mit der genomischen Stabilität *in vivo* zusammenhängt und damit einen Hinweis auf das Zellüberleben nach ionisierender Strahlung oder DNA-schädigenden Substanzen wie Chemotherapeutika geben kann. Jedoch ist der Schritt von der Erfassung der Reparatur in gut charakterisierten Zelllinien zu bisher unbekanntem, nicht charakterisierten humanen Tumoren noch nicht getan. Es ist wenig bekannt über die genauen Abläufe der DSB-Reparatur in Tumoren. Es konnte beobachtet werden, dass die Reparatur in Tumoren abweichend von der in normalen Zellen abläuft (Bentley et al., 2004; Diggle et al., 2003; Shin et al., 2006). Bisher konnten die zu Grunde liegenden Mechanismen

jedoch nicht aufgeklärt werden, weil funktionelle Studien unmöglich an Tumoren im Menschen durchgeführt werden können. Mit der Reparaturanalyse in zellfreien Systemen ist es nun erstmalig möglich, die Reparatureffizienz, -Qualität und die Wahl des Reparaturweges auch an Tumorbiopsien beschreiben zu können und so eventuell die verschiedenen Tumorentitäten zu charakterisieren.

Dass die Erstellung zellfreier Extrakte aus Tumorgewebe sich für funktionelle Analysen eignet, wurde 2003 von Diggle et al. beschrieben. In dieser Arbeit wurden Extrakte aus Gewebebiopsien von Hirn- und Blasen-Tumoren erstellt. Die DSB-Reparatur der Tumore konnte zu diesem Zeitpunkt insofern charakterisiert werden, dass sie nicht ausschließlich über NHEJ abläuft. Denn durch Zugabe eines XRCC4-Antikörpers wurde nur in Extrakten aus Normalzellen die Reparatur vollständig inhibiert. Die Tumor-Extrakte zeigten nur eine leichte Reduktion der Reparatureffizienz (Diggle et al., 2003). Dieses Ergebnis lieferte einen ersten Hinweis darauf, dass die Reparatur in Tumorgeweben differiert von der in Normalgeweben über klassisches XRCC4-abhängiges EJ. Diese abweichende Reparatur in Blasen-Tumoren wurde in einer späteren Arbeit genauer betrachtet. Dort konnte beschrieben werden, dass ein nicht-komplementärer DSB durch die Tumorextrakte nicht korrekt wieder verschlossen werden konnte. Diese regelhafte Fehlreparatur war nicht abhängig von den Proteinen des klassischen NHEJ Ku70, DNA-PK oder XRCC4. Und obwohl mit niedrigen Magnesium-Konzentrationen gearbeitet wurde, die eine Reparatur über das LigIII-abhängige *Backup*-NHEJ verhindern, wurde trotz zusätzlicher Inhibition der DNA-PK weiterhin Reparatur gemessen (Bentley et al., 2004). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Extrakte der Tumore noch weitere Reparaturmöglichkeiten neben dem klassischen und *Backup*-NHEJ zur Reparatur nutzen.

Wenn die Wahl des Reparaturweges, die Effizienz der Reparatur und ihre Genauigkeit bekannt sind, könnte die Wirksamkeit der Tumorthherapie etwa durch Strahlen- oder Chemotherapie auf der Basis dieser Kenntnis gesteigert werden. Das Ziel ist es, den Tumor so selektiv wie möglich abzutöten und gleichzeitig das gesunde Gewebe zu schonen. Im Gegensatz zum gesunden Normalgewebe nutzen Tumore häufig einen fehlerhaften, von der klassischen DSB-Reparatur abweichenden Reparaturweg. Steht also kein klassisches NHEJ oder die homologe Rekombination zur Verfügung, kann dem Tumor systematisch auch die letzte Möglichkeit zur Reparatur seiner DSBs genommen werden, indem spezifisch die für den verbleibenden Reparaturweg notwendigen Proteine inhibiert werden. Auf diese Weise würden sich die durch die Strahlentherapie hervorgerufenen DSBs hauptsächlich auf den Tumor letal auswirken, während das Normalgewebe weiterhin die klassischen Reparaturwege nutzen könnte. Darüber hinaus könnten die therapeutischen Strahlendosen individuell angepasst werden, wenn bereits vorher bekannt ist, ob es sich um einen Tumor

handelt, der eher effizient oder nur schlecht DSBs reparieren kann. Die verschiedenen Reparaturwege in zellfreien Systemen von humanen Tumoren aufzuklären, bietet also eine große Chance für die zukünftige Tumor-Therapie.

## **1.9. Zielsetzung**

Das Ziel dieser Arbeit war es, einen funktionellen *in vitro* Assay zu entwickeln, mit dem wichtige Parameter der DNA-DSB-Reparatur in humanen Zellen gemessen werden können. Dabei sollten sowohl die Quantität, die Qualität als auch die Wahl des Reparaturweges in humanen Tumor-Zellen des Kopf-/Hals-Bereiches untersucht werden. Außerdem sollte geklärt werden, ob diese Tumorzellen inadäquate Reparaturwege wie alternatives EJ und SSA häufiger als normale Zellen gebrauchen. Die erlangten Daten sollten mit den Strahlenantworten, die *in vivo* gemessen wurden, verglichen werden, um die Frage zu beantworten, ob die *in vitro* DSB-Reparatur in der Lage ist, die zelluläre Strahlenantwort wiederzugeben.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Materialien

Alle verwendeten Materialien sind im Anhang aufgelistet und beschrieben.

### 2.2. Methoden

#### 2.2.1. Zellkultur

In dieser Arbeit wurden verschiedene humane Tumorzelllinien verwendet. MO59J und MO59K sind Glioblastom-Zelllinien, bei denen MO59J einen Defekt im DNA-PKcs-Gen besitzt. 180BR ist eine Fibroblasten-Zelllinie aus einem Patienten mit lymphoblastischer Leukämie, die einen Defekt in LigIV-Gen aufweist. HeLa stammt aus einem Zervix-Karzinom, A549 ist eine Epithelzelllinie aus einem Lungenkarzinom und MCF7 ist eine Adenokarzinom-Zelllinie aus der Brust. Bei den Zelllinien SAS, Cal33, UTSCC8, UTSCC14, UTSCC5, XF354, SKX und FaDu handelt es sich um Plattenepithelkarzinom-Zelllinien aus dem Kopf-/Halsbereich (Abb. 5). Außerdem wurden die Hamster-Zelllinien CHO-K1 und xrs5 (Ku80-defizient) verwendet. Alle Zellkulturarbeiten wurden in einer sterilen Sicherheitswerkbank der Klasse 2 durchgeführt. Das Zellwachstum wurde unter einem inversen Phasenkontrast-Mikroskop kontrolliert.

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien wurden in DMEM-Medium mit einem Zusatz von 10 % FCS bei 10 % CO<sub>2</sub> und 37 °C kultiviert. Nager-Zelllinien wurden in *alpha*-Medium unter Zusatz von 10 % FCS bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C kultiviert. Zum Passagieren oder Ernten der Zellen wurde zunächst das Medium abgesaugt und die adhärent wachsenden Zellen mit vorgewärmtem PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurden die Zellen unter Zugabe von 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA bei 37 °C solange inkubiert, bis sie sich von der Wachstumsfläche der Zellkulturflasche abgelöst hatten. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden die abgelösten Zellen mit FCS-haltigem Medium aufgenommen. Zur Weiterkultivierung der Zellen wurde die Zellzahl mit Hilfe eines automatischen Zellzählers bestimmt und eine definierte Menge an Zellen in frischem Medium ausgesät. Zur Ernte der Zellen wurde die Zellsuspension bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert und die Zellen pelletiert. Die geernteten Zellen wurden entweder sofort weiterverwendet oder in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurde das Zellpellet in 1 ml FCS/10 % DMSO aufgenommen, in ein Kryogefäß überführt und über Nacht in einer Einfrierbox mit Isopropanol bei -80 °C eingefroren, um es am nächsten Tag in flüssigem Stickstoff zu lagern.

Bezeichnung	Ursprung	Präparat
SAS	Zunge	Primärtumor
Cal33	Zunge	Primärtumor
UTSCC8	Larynx	Metastase
UTSCC14	Zunge	Primärtumor
UTSCC5	Zunge	Metastase
XF354	Mundboden	LK-Metastase
SKX	Mundboden	Primärtumor
FaDu	Hypopharynx	Primärtumor

**Abbildung 5: Ursprung der verwendeten Kopf-/Hals-Tumorzellen.**

Die Zelllinien wurden aus Plattenepithelkarzinomzellen menschlicher Primärtumoren oder Metastasen des Kopf- und Halsbereiches gewonnen. Sie wurden über eine Explantatkultur der Biopsien generiert (Göckschu, 2010).

### 2.2.2. Zellfreie Extrakte

Für die *in vitro* EJ-Experimente wurden Gesamtzellextrakte, sogenannte zellfreie Extrakte (*cell-free extract*, CFE), auf der Grundlage von früheren Arbeiten (Diggle et al., 2003; Pfeiffer et al., 2005; Pfeiffer et al., 1988) hergestellt, weiterentwickelt und optimiert.

Dazu wurden von den verwendeten Zelllinien jeweils  $\sim 1 \times 10^8$  Zellen in T125er Kulturflaschen herangezogen. In einem exponentiell wachsenden Stadium wurden die Zellen zunächst mit PBS gespült, dann mit Trypsin abgelöst und in FCS-haltigem Medium aufgenommen. Nach Zentrifugieren der Zellen bei 900 rpm wurden sie zweimal in eiskaltem PBS gewaschen. Abschließend wurden sie bei 900 rpm zentrifugiert, um das gepackte Zellvolumen (*packed cell volume* = PCV) zu bestimmen. Es lag abhängig vom Zelltyp bei 0,5 – 1,0 ml. Die Zellen wurden auf Eis in 4 x PCV hypotonischem Puffer resuspendiert und solange auf Eis inkubiert, bis sie begannen aufzuquellen und zu platzen (Abb. 6). Alle 10 min wurde der Verlauf des Aufquellens der Zellen unter einem Phasenkontrast-Mikroskop kontrolliert. Die Extraktion wurde fortgesetzt, sobald ca. 80 - 90 % der Zellkerne vom Zytoplasma befreit und intakt vorlagen. Nach Zugabe von 4 x PCV Hochsalz-Puffer und 80 % des PCV gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung wurde das Lysat (an dieser Stelle zw. 4,9 und 10 ml) für 30 min bei



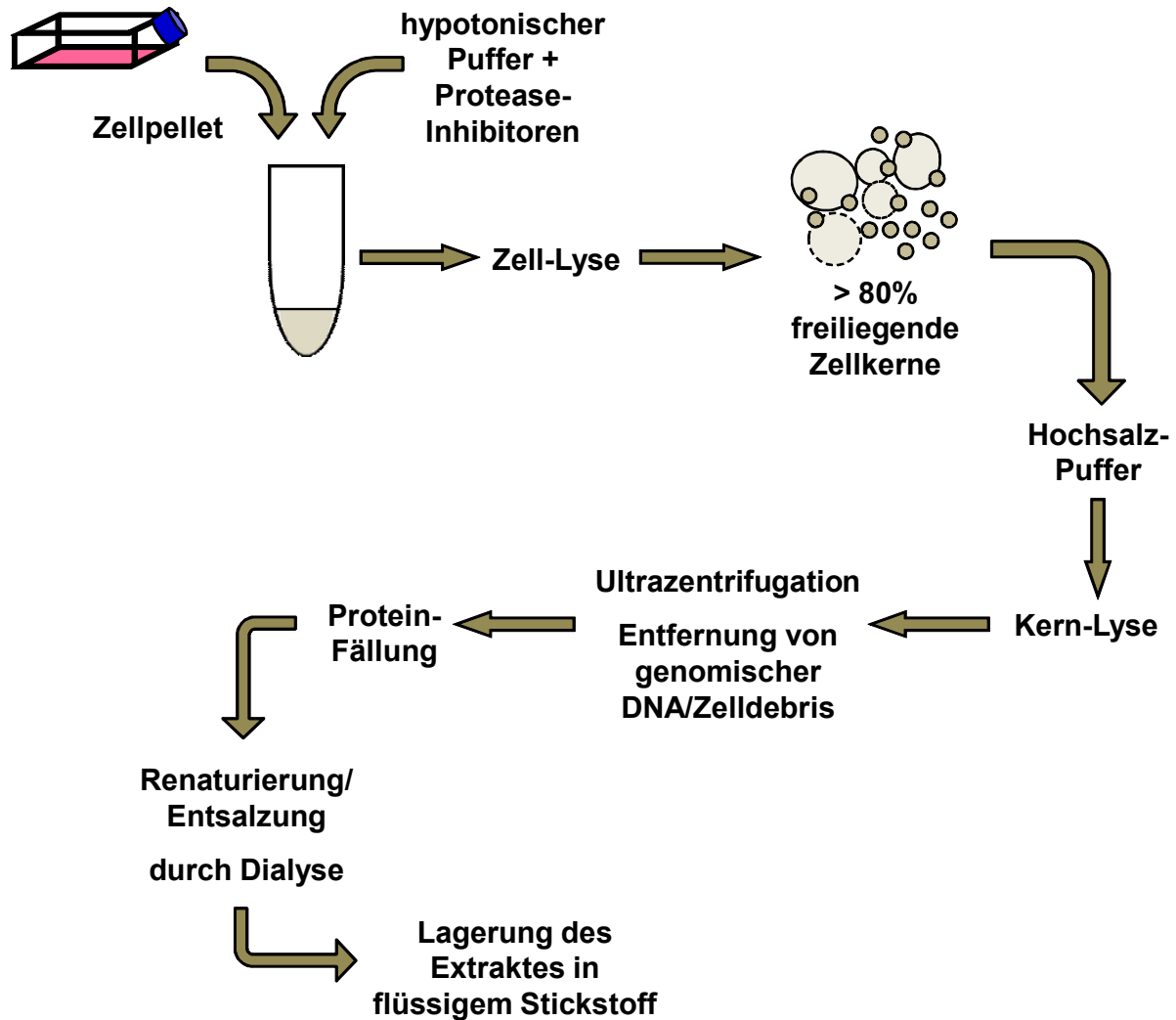
4 °C langsam gerührt. Zur Entfernung von unlöslichem Material und genomischer DNA wurde das nun sehr viskose Lysat für eine Stunde bei 40.000 rpm (ca. 21.000 x g) bei 2 °C ultrazentrifugiert. Der geklärte Überstand wurde abgenommen und die Proteine darin durch eine Ammoniumsulfat-Fällung präzipitiert. Dazu wurden pro 1 ml Überstand 0,33 g fein gemahlenes Ammoniumsulfat langsam unter Rühren in den Überstand gegeben und für mehr als 1 h bei 4 °C gerührt. Die durch den hohen Salzeintrag präzipitierten Proteine wurden durch Zentrifugation bei 13.500 rpm pelletiert und ohne Schaumbildung in 250 – 450 µl Dialysepuffer aufgenommen. Es folgte eine Dialyse im Dialyseschlauch gegen 1 l Dialysepuffer über Nacht bei 4 °C mit einmaligem Pufferwechsel nach 1 h. Am nächsten Tag wurde die Proteinkonzentration der Extrakte mit Hilfe des BCA-Assays photometrisch bestimmt. Sie lag typischerweise zwischen 4 und 8 µg/µl. Die Extrakte wurden in 50 µl Aliquots aufgeteilt und bis zum Gebrauch in flüssigem Stickstoff gelagert.

### 2.2.3. End-Joining-Substrat

Als Substrat für das *in vitro* EJ dienten die Plasmide pEJ und pEJSSA. Sie lieferten den DSB, indem sie mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und PstI linearisiert wurden (Abb. 7). Für die präparativen Restriktionsansätze wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl zu 1 µg Plasmid-DNA je 1 µl Restriktionsenzym, 2 µl Puffer gegeben und mit didest. H<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37 °C wurden die Ansätze über Agarosegelelektrophorese in die linearisierte und die ungeschnittene Plasmid-Form aufgetrennt. Die linearisierten Plasmide wurden aus dem Gel ausgeschnitten und über ein Gel-Extraktions-Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Auf diese Weise wurden durch den doppelten Verdau vollständig linearisierte Plasmide gewonnen, die nicht-kohäsive Enden mit 5'- und 3'-Überhängen aufweisen.

### 2.2.4. *In vitro* End-Joining-Reaktion

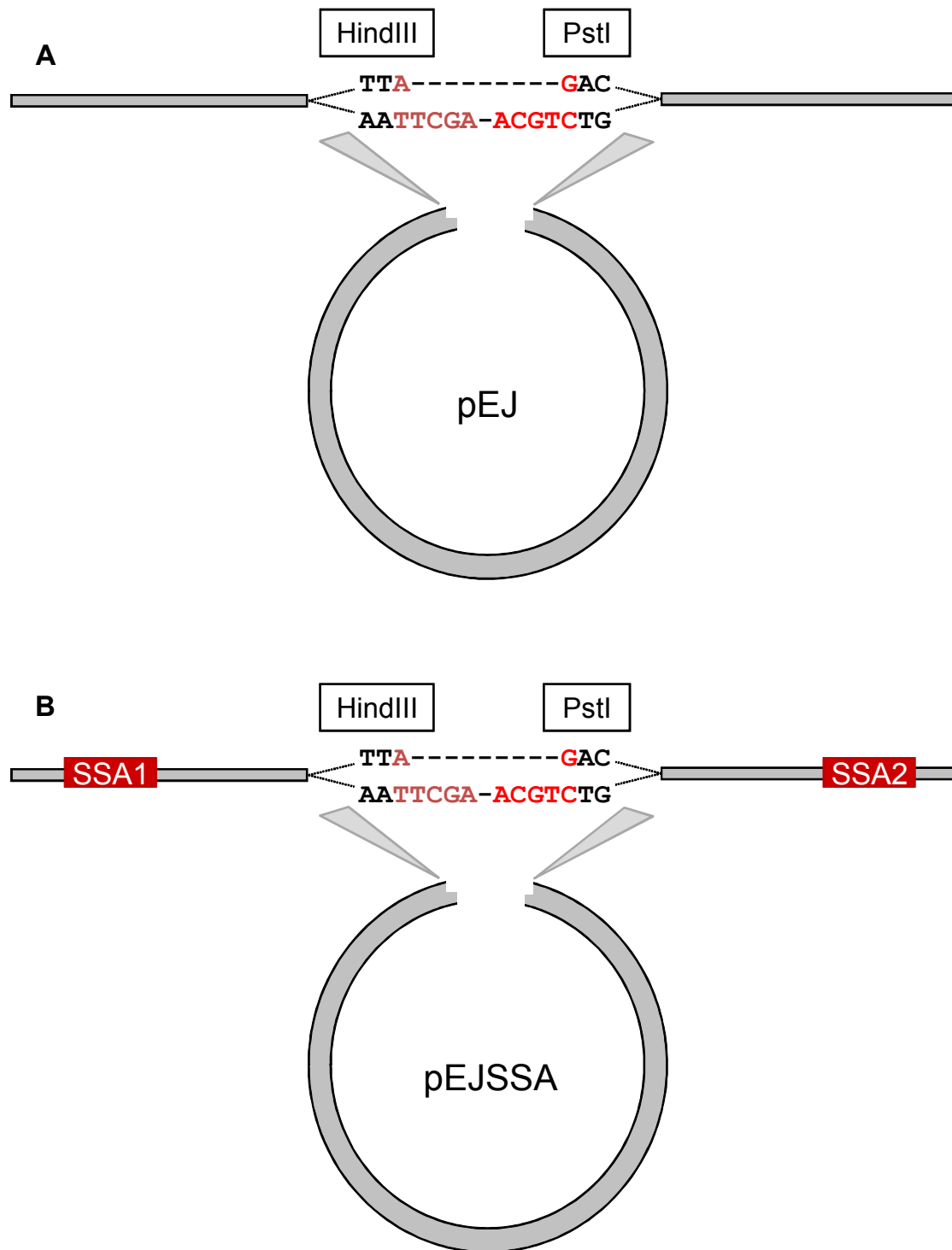
Für eine *in vitro* EJ-Reaktion wurde das benötigte Volumen (ein Aliquot = 50 µl) an zellfreiem Extrakt auf Eis aufgetaut. Der stets frisch angesetzte MOPSO-Puffer wurde im Kühlraum in eine Petrischale gegeben und auf dessen Oberfläche eine Microdialysefilter-Scheibe aufgelegt. Auf diesen schwimmenden Filter wurden die 50 µl aufgetautes CFE in einem Tropfen aufpipettiert und 30 min bei 4 °C dialysiert, um das Extrakt für die Reaktion umzupuffern. Nach der Dialyse wurde die Proteinkonzentration der Extrakte erneut mit Hilfe des BCA-Assays photometrisch gemessen, um Konzentrationsänderungen durch die Dialyse



**Abbildung 6: Herstellung zellfreier Extrakte in der Übersicht.**

Ca.  $1 \times 10^8$  Zellen wurden in T125er Kulturflaschen herangezogen, in exponentiell wachsendem Stadium geerntet und unter Zugabe von hypotonischem Puffer solange lysiert, bis ca. 80 - 90 % der Zellkerne vom Zytoplasma befreit und intakt vorlagen. Erst dann folgte durch die Zugabe von Hochsalz-Puffer die Kern-Lyse. Zur Entfernung von unlöslichem Material und genomischer DNA wurde das Lysat ultrazentrifugiert. Aus dem geklärten Überstand wurden die Proteine durch Ammoniumsulfat-Fällung präzipitiert und abzentrifugiert. Die ausgefällten Proteine wurden in Dialysepuffer aufgenommen und zur Renaturierung und Entsalzung gegen Dialysepuffer über Nacht bei 4 °C dialysiert. Die fertigen zellfreien Extrakte wurden auf ihren Proteingehalt geprüft und bis zum weiteren Gebrauch in flüssigem Stickstoff gelagert.

zu bestimmen. 50 ng des linearisierten Plasmid-Substrats wurden für 6 h bei 25 °C in einem Gesamtvolumen von 20 µl zusammen mit 65 µg des extrahierten Proteins und 2 µl LNB-Puffer inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µl TE-Stopp/SDS-Lösung und Inkubation für 10 min bei 65 °C gestoppt. Bis zur weiteren Analyse wurde die Probe bei -20 °C gelagert.



**Abbildung 7: Plasmid-Substrate für das *in vitro* End-Joining.**

Die Plasmide mit einer Größe von 4900 bp wurden mit den Restriktionsenzymen HindIII und PstI linearisiert. Auf diese Weise wurden nicht-kohäsive DNA-Enden mit aneinander anstoßenden, einzelsträngigen 5'-/3'-Überhängen erzeugt. (A) Plasmid „pEJ“ zur Analyse von NHEJ. (B) Plasmid „pEJSSA“ mit zwei homologen Sequenzen SSA1 und SSA2 von 50 bp, die die Restriktionsschnittstellen flankieren. Mit diesem Plasmid ist die Analyse von NHEJ und SSA möglich.

### 2.2.5. Transformationsassay

In der vorliegenden Arbeit wurde herausgefunden, dass vor allem die Reparatur zu zirkulären Plasmid-Monomeren von Bedeutung ist und weniger die zu linearisierten Multimeren. Es wurde deshalb eine Methode entwickelt, um spezifisch diese zirkulären Produkte der EJ-Reaktion quantifizieren zu können. Dazu wurde die Reparatur-Reaktion wie beschrieben durchgeführt. Anschließend wurden 4 µl der Reaktion, die 5 ng des Plasmid-Substrats enthalten, auf eine auf destilliertem Wasser schwimmende Microdialyse-Membran pipettiert und 30 min dialysiert. Dieser Schritt diente der Entfernung von Substanzen wie Salzen und SDS aus der Lösung, die die anschließende Elektroporation stören würden. Durch die Dialyse nahm das Volumen des Ansatzes um etwa das 6fache zu, da Wasser durch den Dialyse-Filter einströmte und den Ansatz verdünnte. Das gesamte Volumen (ca. 25 µl) wurde mittels Elektroporation bei 1,8 kV in *E. coli* transformiert. Der dialysierte Reaktionsansatz enthielt 5 ng DNA-Substrat, welches in verschiedenen Anteilen durch Einwirkung des CFE zu Monomeren und Multimeren verknüpft wurde. Zwar wurden alle diese Produkte in die Elektroporation einbezogen, jedoch resultieren lineare Plasmide im Bakterium nicht in Koloniebildung. Die Bakterien an sich sind nicht in der Lage DNA-DSB zu verbinden, da sie keine Rekombinase-Aktivität besitzen (*recA1<sup>-/-</sup>*). Das bedeutet, dass nur zuvor von den Extrakten zirkularisierte Plasmid-DNA [*closed circle* (cc) oder *open circle* (oc)] im Bakterium repliziert werden kann und durch Expression der Selektionsmarker auf Selektionsmedium zur Bildung von Kolonien führen kann. Nach einer Inkubationszeit von 1 h in LB-Medium ohne Antibiotikum unter Schütteln bei 37 °C wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit dem Antibiotikum Kanamycin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurde die Anzahl der Bakterienkolonien automatisch mittels Koloniezähler bestimmt.

### 2.2.6. Kolonie-PCR

Um neben der Gesamteffizienz der Reparatur auch eine Aussage über die Qualität der Reparatur und die Wahl des Reparaturweges treffen zu können, wurden PCRs zur Charakterisierung der Reparaturstellen direkt von bakteriellen Einzelkolonien mit den Primern P1 und P2 durchgeführt. Der PCR-Ansatz setzte sich zusammen aus 12,5 µl 2x PeqGold Master-MixY, 1 µl Primer P1, 1 µl Primer P2 und 10,5 µl dest. Wasser. Mit Hilfe einer Pipettenspitze wurde jeweils eine einzelne Bakterienkolonie „gepickt“ und im PCR-Puffer mit dem Gesamtvolumen von 25 µl suspendiert. Die PCR-Bedingungen umfassten einen Denaturierungsschritt bei 96 °C für 2 min und eine Amplifikation über 35 Zyklen mit

Denaturierung bei 96 °C für 20 s, Annealing bei 68 °C für 20 s und Elongation bei 72 °C für 80 s. Beendet wurde die PCR von einer Abschluss-Elongation bei 72 °C für 7 min. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte über Agarosegelelektrophorese. Zu 5 µl PCR-Produkt wurde 1 µl DNA-Auftragspuffer gegeben und die Mischung in einem 1 %igen Agarosegel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid bei 120 V für 45 min getrennt. Die Signale der Produktbanden wurden mit Hilfe des „BioDoc II“-Gel-Dokumentationssystems (Biometra) aufgenommen. Zur genaueren Analyse der Reparaturstellen wurden die PCR-Produkte aufgereinigt und sequenziert. Dazu wurde zu 2,5 µl PCR-Produkt 1 µl ExoSAP-It gegeben, für 15 min bei 37 °C und für 15 min bei 80 °C inkubiert. Die auf diese Weise gereinigten PCR-Proben wurden zur externen Sequenzierung an die Firma GATC Biotech geschickt.

### **2.2.7. Subklonierung**

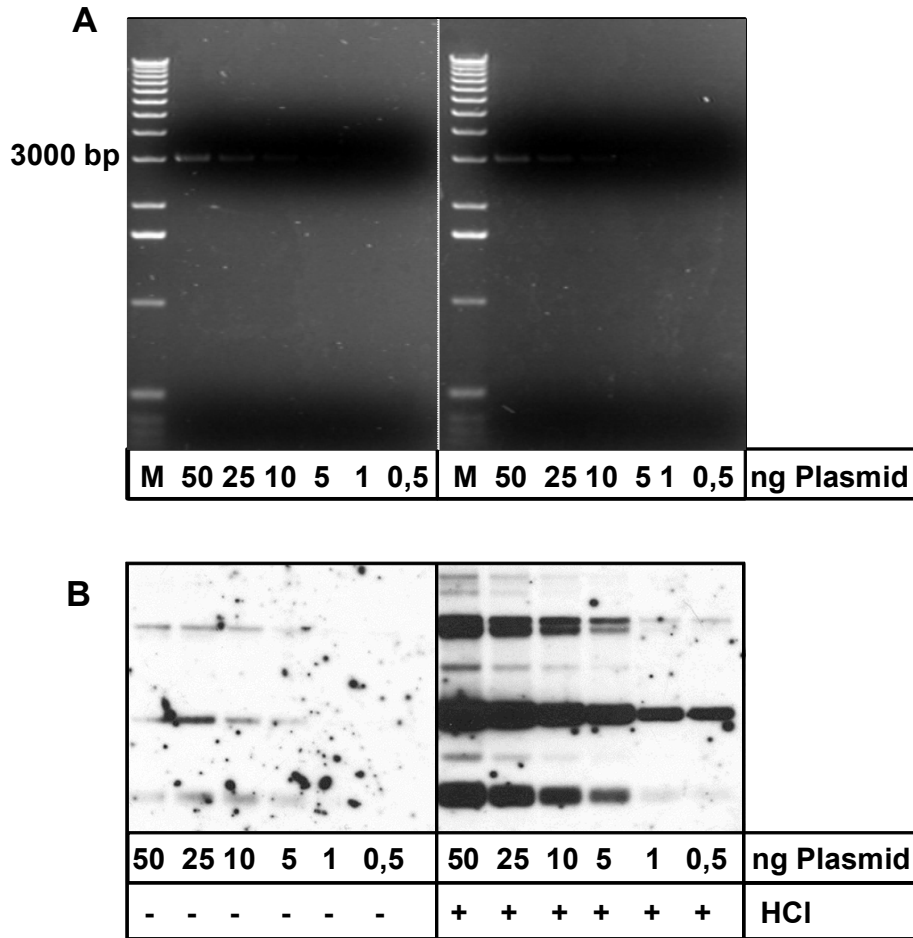
Bei CFE, die eine sehr schlechte Reparatureffizienz aufwiesen, führte die Transformation der Reparaturprodukte zu keinen oder zu wenigen Bakterienkolonien. Um in diesen Fällen trotzdem eine Aussage über die Reparaturqualität treffen zu können, wurden die Produkte (in dem Fall vornehmlich lineare Di- und Multimere) subkloniert. Dazu wurde zunächst die DNA aus den EJ-Reaktionen unter Verwendung des „DNeasy Blood & Tissue Extraction“-Kits extrahiert. Die extrahierte DNA wurde in einer PCR wie oben beschrieben eingesetzt und die PCR-Produkte gereinigt. Diese wurden mit Hilfe des „Topo-TA-Cloning“-Kits nach Herstellerangaben in den Klonierungsvektor eingefügt. Das Prinzip dieses Klonierungsverfahrens beruht darauf, dass sich an den Phosphat-Enden eines linearisierten Topo-TA-Vektors ein überhängendes 3'-Desoxythymidine befindet, das jeweils ein Topoisomerasel-Molekül gebunden trägt (durch den Hersteller synthetisiert). Mit diesem Thymidin paart ein Adenin-Rest, der durch die TAQ-Polymerase zusätzlich ungepaart an das 3'-Ende der PCR-Produkte angehängt wurde (eine wohlbekannte biochemische Eigenschaft der TAQ, aber nicht anderer Polymerasen). Die gebundene Topoisomerase I ist nun in der Lage, den noch offenen Einzelstrangbruch zu ligieren und anschließend von der DNA zu dissoziieren. Nun liegt das anfängliche Gemisch aus PCR-Produkten, die alle einzelne Reparaturereignisse darstellen, einligiert in einem äquivalenten Gemisch aus zirkulären Vektoren vor, das wiederum in elektrokompente Bakterien transformiert und dort als Einzelkolonien amplifiziert wurde. Die anschließende Analyse erfolgte durch die Kolonie-PCR wie oben beschrieben.

### 2.2.8. Southern-Blot

Die Visualisierung der Produkte der EJ-Reaktionen war allein über Anfärbung des Gels mit Ethidiumbromid oder einem anderen DNA-Farbstoff nicht möglich (Sybr-Gold, GelRed und GelStar wurden getestet). Da es sich um DNA-Mengen von 5 ng handelt, die über das Agarosegel aufgetrennt werden, ist nur die Analyse über das Southern-Blotting sensitiv genug, um die einzelnen Reparaturprodukte sichtbar zu machen. Die Detektion erfolgte nicht-radioaktiv durch Hybridisierung der Produkte mit DNA-Proben, die zuvor mit thermostabiler alkalischer Phosphatase markiert wurden.

4 µl der EJ-Reaktionen wurden mit 4 µl Proteinase-Laufpuffer (50 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 112,5 µl Ladepuffer auf 200 µl mit didest. H<sub>2</sub>O aufgefüllt) vermischt, 30 min bei 37 °C und 15 min bei 65 °C inkubiert, um vorhandene Proteine zu degradieren und anschließend die Proteinase zu inaktivieren. Die Proben wurden auf ein 0,7 %iges Agarose-Gel mit 1 µg/ml Ethidiumbromid aufgetragen und in TAE-Puffer mit 1 µg/ml Ethidiumbromid bei 120 V über 3 h aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 15 min bei Raumtemperatur in 0,2 M HCl geschwenkt, um durch die Säurebehandlung eine Depurinierung der DNA zu erzielen. Es folgte eine 30 min Inkubation des Gels in alkalischem TS-Puffer. Durch diese Behandlung bricht die DNA an den zuvor depurinierten Stellen. Im Folgenden denaturiert die DNA im alkalischen Transferpuffer und kann als kleine einzelsträngige Fragmente wesentlich effizienter auf die Nylon-Membran transferiert werden als die hochmolekularen Plasmide voller Länge (Abb. 8).

Für den Southern-Blot wurde auf der mit TS-Puffer getränkten, porösen Platte des Vakuum-Blotters der Transfer-Aufbau luftblasenfrei zusammengesetzt. Als Erstes wurde die „Hybond-N<sup>+</sup>“-Nylon-Membran aufgelegt, darauf eine abdichtende Kunststoff-Folie und darauf das Agarosegel. Der Blot wurde mit TS-Puffer überschichtet und auf Dichtigkeit überprüft. Der Vakuumtransfer wurde bei 5 bis 7 inch Hg (entspricht 0,17 – 0,24 bar Unterdruck) für 30 min durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran 15 min in TN-Puffer geschwenkt und dann für wenigstens eine Stunde zwischen Filterpapier bei 37 °C getrocknet, um die DNA auf der Membran zu fixieren.



**Abbildung 8: Effekt der HCl-Behandlung des Agarosegels auf die Transferqualität im Southern-Blot.**

(A) Auftrennung von unbehandeltem Plasmid im Agarosegel. Das Plasmid pEJSSA wurde aus *E. coli* isoliert und ohne weitere Behandlung in einem 1 %igen Agarosegel je nach der unterschiedlichen Plasmidkonformation - linear, zirkulär oder supercoiled - aufgetrennt. Die rechte Hälfte des Gels wurde nach der Gelelektrophorese für 15 min in 0,2 M HCl geschwenkt, die linke Hälfte blieb unbehandelt. (B) Die HCl-Behandlung des Agarosegels bewirkt einen besseren Transfer während des Vakuum-Blottings und dadurch eine bessere Detektion der Plasmidformen im Gegensatz zum unbehandelten Agarosegel. Es wurden Plasmidmengen von 0,5 ng bis 50 ng aufgetragen. Die Banden stellen unterschiedliche Plasmidformen dar, wie sie nach einer Präparation aus Bakterien natürlich vorkommen.

### 2.2.9. Southern-Blot: Markierung und Detektion

Zur Markierung der DNA auf der Membran wurde das „Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System“ von GE Healthcare verwendet. Es dient der Markierung von DNA-Proben mit thermostabiler alkalischer Phosphatase.

Die Membran wurde in Prähybridisierungspuffer 1 h bei 55 °C in einem Hybridisierungssofen unter Schwenken blockiert. In dieser Zeit wurde das Labelling vorbereitet. Dazu wurden 500 ng zirkuläres Plasmid im Reaktionsgefäß für 5 min in kochendem Wasser denaturiert

und sofort 5 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 50 µl Reaktionspuffer, 10 µl Labelling-Reagenz und 50 µl Vernetzer-Lösung wurde die Probe 30 min im Wärmeblock bei 37 °C gehalten. Die nun markierte DNA wurde sofort zur Membran in den Prähybridisierungspuffer gegeben und über Nacht bei 55 °C hybridisiert.

Am folgenden Tag wurde Waschpuffer 1 frisch angesetzt und auf 55 °C vorgewärmt. In diesem wurde die Membran für 2 x 15 min bei 55 °C gewaschen. Ein weiterer Waschschrift folgte in Waschpuffer 2 bei Raumtemperatur für 2 x 5 min.

Für die Entwicklung des Chemilumineszenz-Signals wurde die Blot-Membran auf einen ebenen Untergrund gelegt, ohne sie austrocknen zu lassen. Das Substrat für die alkalische Phosphatase, Dioxetan, wurde in Form der Detektions-Reagenzlösung auf die Blot-Membran gegeben und nach 3 min wieder abgenommen. Die Membran wurde in Kunststoffolie eingelegt, überschüssiges Substrat ausgestrichen, eingeschweißt und in eine Blot-Entwicklungskassette eingelegt. In der Dunkelkammer wurde ein Film aufgelegt, für 20 – 60 min belichtet und entwickelt. Die Quantifizierung der Produktbanden erfolgte mit dem Programm Un-Scan-ItGel.

#### 2.2.10. Zellüberleben

Zur Bestimmung der Empfindlichkeit der Zellen gegenüber ionisierender Strahlung wurden Kolonietests durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in einem Zustand von ca. 90 % Konfluenz mit 0, 3 und 6 Gy in einer Röntgenanlage bestrahlt. Nach 14 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen trypsiniert und in definierten Zellzahlen in frischem Medium ausgelegt. Nach 14 Tagen Inkubation bei 37 °C wurden die Kulturen mit Ethanol fixiert und mit Kristallviolett angefärbt. Kolonien, die mehr als 50 Zellen aufwiesen, wurden als überlebende Kolonien ausgewertet. Der Anteil überlebender Zellen (*Surviving Fraction*, SF) von bestrahlten Zellen wurde auf die Anwachsrate (*Plating Efficiency*, PE) der unbestrahlten Kontrollen normiert.

#### 2.2.11. Doppelstrangbrüche

Zur Untersuchung von DNA-Doppelstrangbrüchen *in vivo* wurde die Bildung von  $\gamma$ H2AX-Foci untersucht. In der Nachbarschaft von DNA-Doppelstrangbrüchen wird die Histon-Variante H2AX, die je nach Zelllinie einen Anteil von 5 – 25 % am H2A ausmacht, phosphoryliert. Diese Phosphorylierungen erstrecken sich flankierend über einen Bereich von bis zu einem Megabasenpaar und führen so nach Anfärbung mit einem fluoreszierenden Antikörper zu lichtmikroskopisch sichtbaren Foci. Jeder Fokus entspricht exakt einem DSB.



Konfluente Zellkulturen wurden bestrahlt und für 24 h bei 37 °C inkubiert, um den Zellen die Möglichkeit zu geben, die erzeugten DSBs zu reparieren. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen trypsiniert und durch Zytospin (75.000 Zellen pro Spot; 200 rpm, 2 min) auf Objektträger zentrifugiert. Die Zellen wurden mit Formaldehyd für 15 min fixiert. Nach der Permeabilisierung der Zellmembranen mit Triton-X-100 (0,01 % in PBS v/v) wurde mit BSA (1 % in PBS) für 30 min inkubiert, um unspezifische Reaktionen zu blockieren. Der Primäantikörper (Upstate; Anti-phospho-Histone H2AX, clone JBW301; 1:1000 in 1 % BSA/PBS) wurde für 1 h bei RT gegeben. Nach 3 x 10 min Waschen mit Waschpuffer folgte der sekundäre Fluoreszenz-Antikörper ALEXA 594 für 30 min (Molecular Probes; 1:400). Die Zellkerne wurden zusätzlich mit DAPI (Böhringer; 25 µg/ml) für 10 min angefärbt. Die  $\gamma$ H2AX-Foci wurden mit Hilfe eines Zeiss Fluoreszenz-Mikroskops mit rotem Fluoreszenz-Signal (Filter 15, Anregung 546 nm, Emission 590 nm) und 630facher Vergrößerung ausgezählt. Es wurden nur Zellen ausgewertet, die den morphologischen Kriterien intakter Kerne entsprachen (geprüft mit DAPI-Färbung unter Filter 2, Anregung 365 nm, Emission 420 nm). Für die Auswertung wurden 200 Kerne von jeder Bestrahlungsdosis zufällig ausgewählt und die Anzahl der Foci pro Kern erfasst. Koloniebildung und  $\gamma$ H2AX-Foci wurden in enger Kooperation mit Dr. U. Kasten-Pisula und Mitarbeitern durchgeführt.

### 3. Resultate

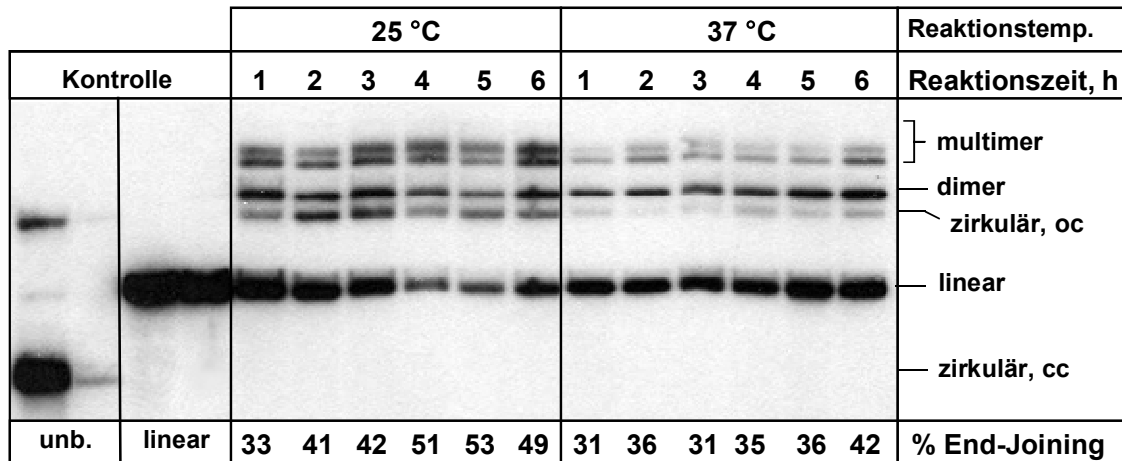
#### 3.1. Etablierung des *in vitro* Reparatur-Systems

In dieser Arbeit wurde die Methode der *in vitro* DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur angewendet und weiterentwickelt in Anlehnung an Arbeiten von P. Pfeiffer (Pfeiffer et al., 2005; Pfeiffer et al., 1988). Um Unterschiede in End-Joining-Kapazitäten messen zu können, muss die Methode soweit wie möglich optimiert sein. Es müssen durchführungs-bedingte Schwankungen bei dieser anspruchsvollen Methode weitestgehend ausgeschlossen werden. Bereits bei der Herstellung der CFEs wurde auf größte Sorgfalt geachtet. Da die CFEs in einem funktionellen Assay verwendet werden, müssen die Proteine im Extrakt aktiv bleiben und deswegen während des gesamten Prozesses gekühlt und schonend behandelt werden.

##### 3.1.1. Reaktionsbedingungen: Temperatur und Zeit

Wichtige Optimierungen betreffen die Reaktionsbedingungen. Wie in anderen Arbeiten beschrieben (North et al., 1990; Pastwa et al., 2001), hängt die Effizienz des *in vitro* End-Joinings (EJ) stark von der Reaktionstemperatur ab. Um den Unterschied der EJ-Effizienz zwischen physiologischer Temperatur von Säugetieren und niedrigeren Reaktionstemperaturen zu testen, wurde die Reaktion bei 37 °C und 25 °C durchgeführt (Abb. 9). Dazu wurde das linearisierte Plasmid-Substrat zusammen mit ATP und dNTPs in den CFE gegeben und für Zeitintervalle von 1 h bis 6 h bei 25 °C und bei 37 °C inkubiert. Die Reparaturprodukte der einzelnen Proben wurden anschließend im Agarosegel ihrer Größe nach aufgetrennt. Zur Kontrolle wurde unverdautes und linearisiertes Plasmid-Substrat auf das Gel aufgetragen, um die Positionen des „*closed circle*“-Plasmides (cc), des „*open circle*“-Plasmides (oc) und des linearisierten Substrat-Inputs zu markieren. Zur Detektion der verschiedenen Produkte wurde ein Southern-Blot von dem Agarosegel erstellt. Die Produkte wurden mit Sonden markiert, die mit alkalischer Phosphatase konjugiert waren. Die Chemilumineszenzsignale der Produkte wurden durch Belichtung eines Röntgenfilms detektiert und die Intensität der Banden mit Hilfe des Programms „Un-Scan-It Gel“ quantifiziert. Die relative gesamte EJ-Effizienz in Prozent wurde durch den Quotienten aus den Produkt-Signalen und dem Gesamtsignal (Produkte + Substrat-Input) jeder einzelnen Spur errechnet. Es wurden die Signale aller EJ-Produkte quantifiziert und als relative EJ-Effizienz ausgedrückt (Abb. 9 und 10). Die Reaktion verlief bei 25 °C deutlich effizienter (53 %) gegenüber 37 °C (42 %), dafür insgesamt aber auch langsamer, was den generellen Regeln der Enzymaktivität entspricht. Bei dem CFE handelt es sich um ein Gesamtzellextrakt, in dem nicht nur Proteine enthalten sind, die für eine DSB-Verknüpfung

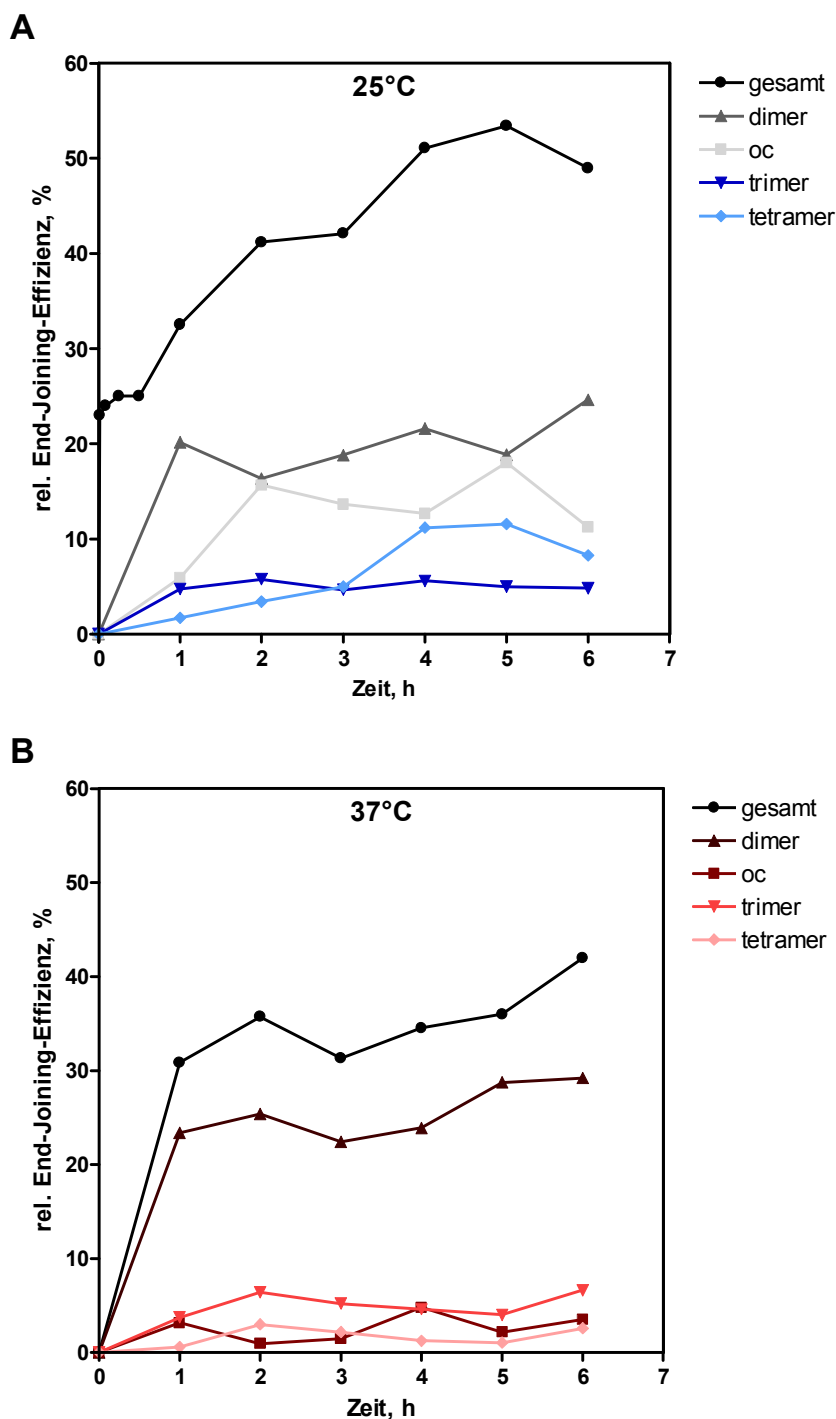
notwendig sind, sondern prinzipiell alle Bestandteile des Zellproteoms, darunter auch Enzyme wie Nukleasen. Bei 37 °C übersteigt die nukleolytische Aktivität die der Endverknüpfung und DNA wird schneller degradiert als repariert (Pastwa et al., 2001).



**Abbildung 9: Die End-Joining-Effizienz ist bei 25 °C höher als bei 37 °C.**

Der Southern-Blot zeigt die Zeitkinetik einer End-Joining-Reaktion von 1 – 6 h im CFE aus HeLa bei 25 °C und 37 °C. Zur Kontrolle wurde unverdautes und linearisiertes Plasmid-Substrat aufgetragen, um die Position des „closed circle“-Plasmides (cc), des „open circle“-Plasmides (oc) und des linearisierten Substrates zu markieren. Die relative End-Joining-Effizienz in Prozent ergibt sich aus dem Quotienten des Produkt-Signals und dem Gesamtsignal (Produkte + Input) einer Spur.

Der Unterschied zwischen den Reaktionstemperaturen zeigt sich neben der Gesamteffizienz in der Art der gebildeten Produkte. Bei 37 °C sind lineare Dimere das Hauptprodukt (max. 29,2 %). Die zirkuläre Plasmid-Form bildet nur einen geringen Anteil der Produkte mit max. 4,8 % (Abb. 10 B). Im Gegensatz dazu werden bei 25 °C weniger Dimere (max. 24,6 %) aber mehr zirkuläre Produkte mit max. 18,0 % gebildet (Abb. 10 A). Zudem wird deutlich, dass Dimere unter beiden Bedingungen bereits in der ersten Stunde, zirkuläre und multimere Produkte dagegen deutlich langsamer gebildet werden. Da zirkuläre Produkte charakteristisch für hocheffizientes und genaues NHEJ im Wildtyp sind (Kuhfittig-Kulle et al., 2007), ist die bessere Produktqualität bei einer Reaktionstemperatur von 25 °C zu erzielen, die fortan für die Reparatur-Reaktionen verwendet wird.

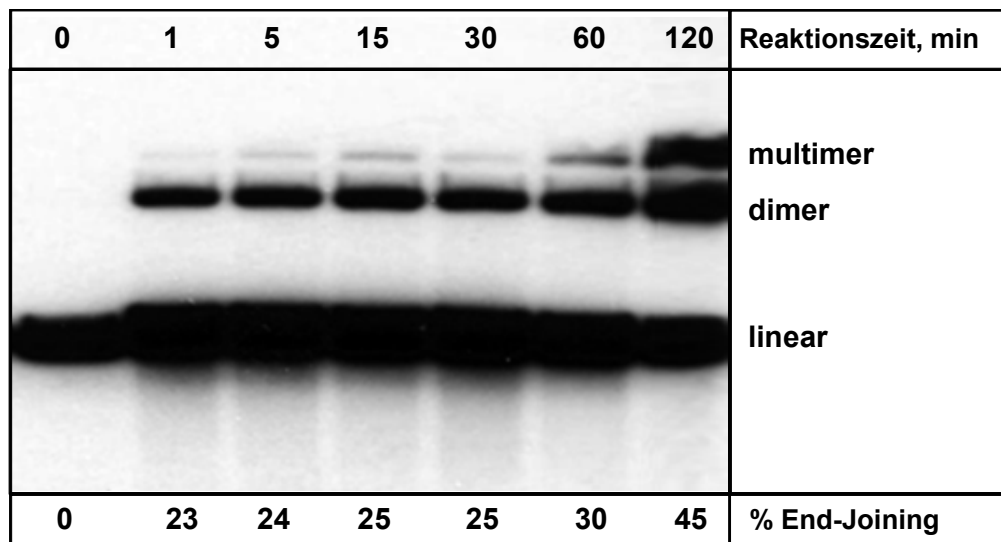


**Abbildung 10: Die Bildung zirkulärer Produkte ist effizienter bei 25 °C.**

Quantifizierung der End-Joining-Produkte nach 1 – 6 h bei 25 °C (A) und 37 °C (B) im CFE aus HeLa. Dargestellt ist der Verlauf der gesamten Produktmenge und der Menge an Dimeren, zirkulären Plasmiden (oc), Trimeren und Tetrameren.

An der Kinetik der Reaktionen ist zu erkennen, dass nach einer Inkubationszeit von 4 h bei 25 °C keine wesentliche Steigerung der Produktmenge mehr erreicht wurde, dass also unter den Versuchsbedingungen kein weiteres EJ mehr stattfinden konnte. Nach der Beobachtung, dass die *in vitro* Reparatur bereits nach wenigen Stunden ihr Maximum erreicht hat, wurde geprüft, wie schnell erste Produkte gebildet werden. Dazu wurden

kürzere Reaktionszeiten ab 1 min ausgewählt. Wie in Abb. 11 zu sehen ist, erschienen erste Produkte bereits nach einer Minute, was zeigt, dass die Verknüpfung von DNA-Enden eine extrem schnelle Reaktion ist. Wiederum werden so rasch ausschließlich Dimere gebildet, während alle anderen Produkte erst im Verlauf von Stunden auftreten.



**Abbildung 11: Die Verknüpfung von DNA-Enden *in vitro* ist eine sehr schnelle Reaktion und findet bereits nach wenigen Minuten statt.**

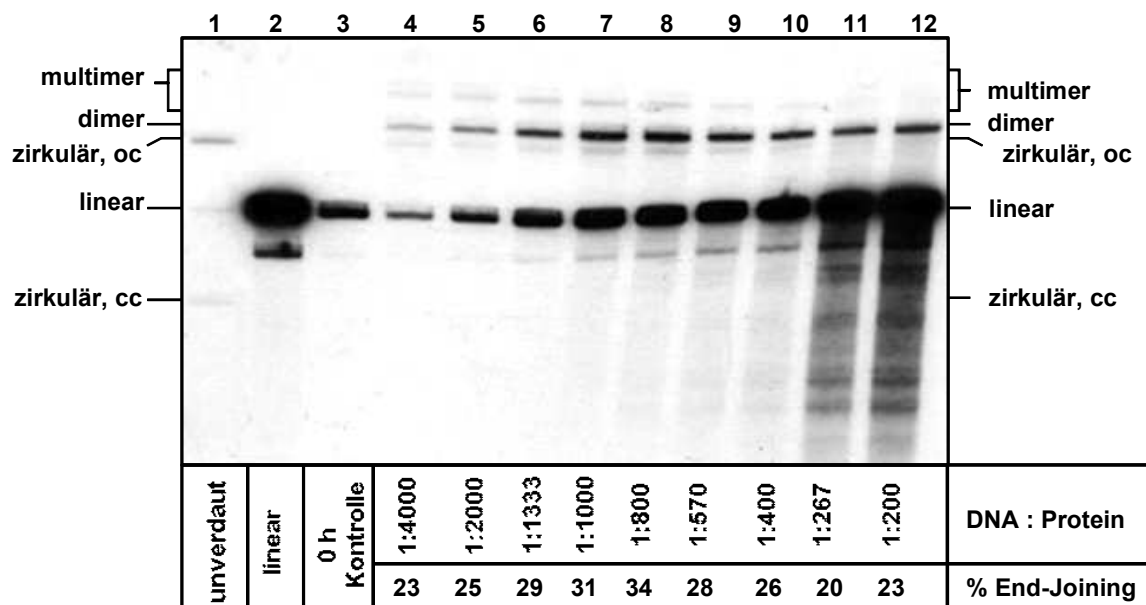
Der Southern-Blot zeigt die End-Joining-Effizienz eines CFE aus MCF7 nach kurzen Reaktionszeiten bei 25 °C. Die relative End-Joining-Effizienz in Prozent ergibt sich aus dem Quotienten des Produkt-Signals und dem Gesamtsignal einer Spur.

In dieser Arbeit soll überprüft werden, ob mithilfe von zellfreien Extrakten Unterschiede in Reparaturkapazitäten verschiedener Zellen ermittelt werden können. Dabei sollen zunächst alle möglichen Reparaturwege erfasst werden und nicht durch die Reaktionsbedingungen eine Selektion auf einzelne Reparaturwege erfolgen. Das klassische NHEJ ist eine sehr schnelle Reaktion, wie hier bereits gezeigt wurde. Dagegen sind alternative Reparaturwege wie das *Backup*-NHEJ *in vivo* eher langsame Mechanismen (Mansour et al., 2008), die aber insbesondere bei 25 °C für die späte Zunahme von Reaktionsprodukten verantwortlich sein könnten. Um auch diese Wege zu erfassen, wurde für die Standard-EJ-Reaktion eine Reaktionszeit von 6 h ausgewählt. Damit ist es möglich, eine Aussage über die gesamte Reparaturkapazität zu treffen. Außerdem kann so durch eine anschließende Analyse der Produkte die ganze Bandbreite der Reparaturgenauigkeit erfasst werden.

### 3.1.2. Reaktionsbedingungen: Verhältnis von DNA- zu Protein-Menge

Für die Qualität der Reparatur ist das Verhältnis von Proteinmenge zu eingegebener DNA-Substrat-Menge ausschlaggebend. Bei einem Verhältnis, in dem die Menge des Proteins

ausreichend oder überwiegend ist, sind die freien DNA-Enden unverzüglich mit den im CFE vorhandenen Reparaturfaktoren besetzt. Die Verknüpfung der Enden findet nahezu ohne Einwirkung von Nukleasen statt. Sind in der Reaktion DSBs im Überschuss, so kann es zu einer mangelhaften Abdeckung der DNA-Enden mit Reparatur-Faktoren kommen, so dass die Enden länger offen stehen, ungeschützt sind und frei für Nukleasen sind, die beginnen, die DNA zu degradieren. Dieses Phänomen konnte bereits beschrieben werden (Blanco et al., 2004) und wurde auch in der aktuellen Arbeit bestätigt. Um das optimale Verhältnis von Extrakt-Protein zu DNA-Substrat im vorliegenden zellfreien System zu finden, wurden verschiedene Verhältnisse im EJ getestet. In Abb. 12 ist das Ergebnis der Veränderung des Verhältnisses von DNA-Substrat zu Protein-Menge dargestellt. Es ist zu erkennen, dass bei einem bestimmten Verhältnis von 1:1000 – 1:800 ein sehr effizientes EJ stattfindet (Abb. 12, Spur 7 - 8). Wird weniger Protein eingesetzt, kehrt sich die Effizienz der Reparatur um, die Produktmenge nimmt ab und die Degradation (Schmier) nimmt zu. Das DNA-Substrat wird an seinen Enden verstärkt von DNasen angegriffen.



**Abbildung 12: Die Änderung des Verhältnisses von DNA zu Protein hat Auswirkung auf Produktbildung bzw. Degradation.**

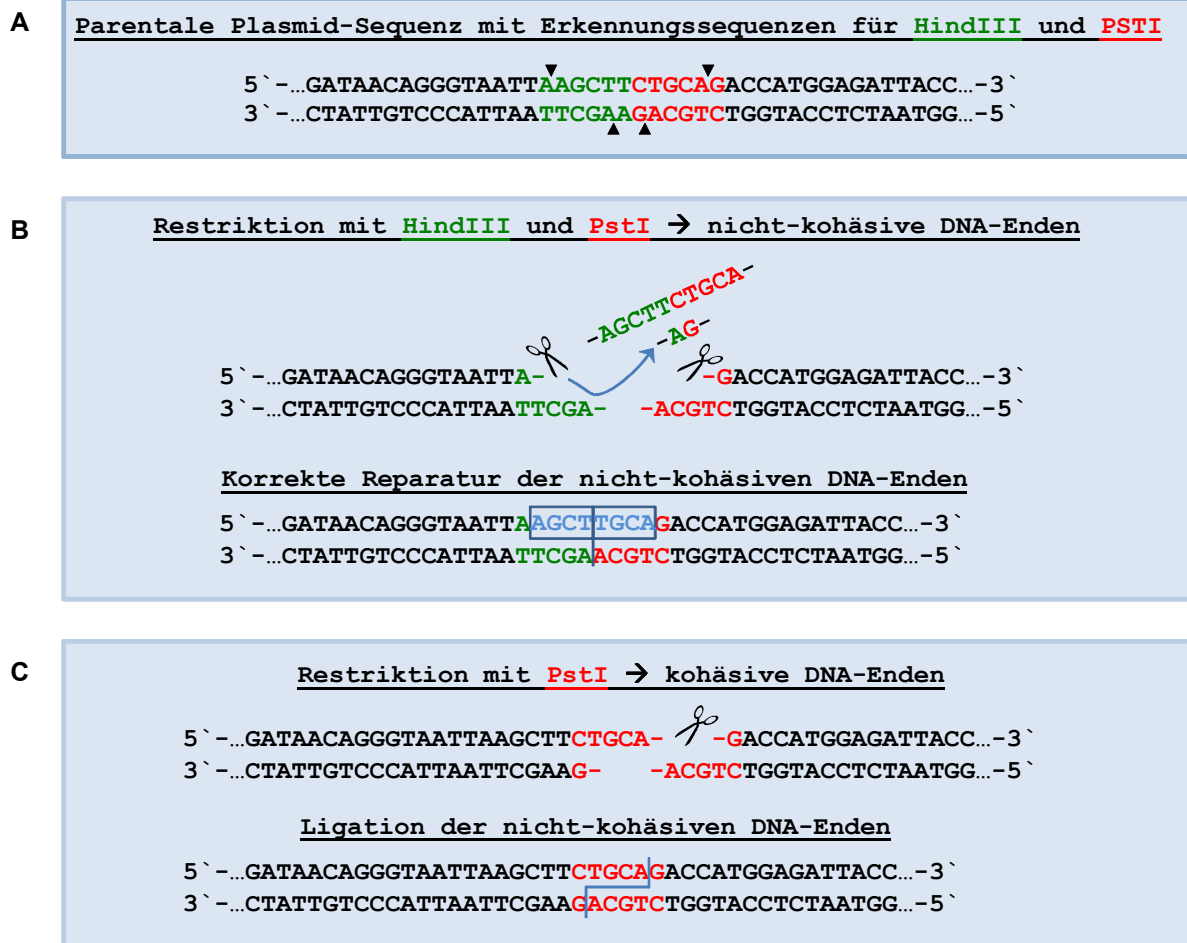
Der Southern-Blot zeigt die im CFE aus FaDu über 6 h entstandenen Produkte der End-Joining-Reaktion mit den angezeigten Verhältnissen von Extrakt-Protein zu DNA-Substrat. Die verschiedenen Produkt-Typen sind gekennzeichnet. Die relative End-Joining-Effizienz in Prozent ergibt sich aus dem Quotienten des Produkt-Signals und dem Gesamtsignal einer Spur.

Es muss beachtet werden, dass das optimale Verhältnis zwischen Extrakt-Protein und Substrat-DNA von Zelle zu Zelle variieren kann. Soll das *in vitro* EJ in einer unbekanntem Zelllinie getestet werden, muss zuerst das optimale DNA-zu-Protein-Verhältnis ermittelt werden.

### 3.1.3. Einfluss der Struktur der Doppelstrangbruch-Enden auf den NHEJ-Reparaturprozess

Neben dem Verhältnis von DNA zu Protein in der Reaktion hat auch die Beschaffenheit der DNA-Enden einen Einfluss auf ihre Verknüpfung oder Degradation. Um das zu untersuchen, wurde das Substrat-Plasmid entweder nur mit einem einzelnen (PstI) oder mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen (HindIII/PstI) linearisiert. Auf diese Weise wurden kohäsive und nicht-kohäsive DNA-Enden erzeugt.

Die kohäsiven Enden verfügen an ihren 3'-Enden über 4 überhängende, komplementäre Basen. Diese können wieder verknüpft werden, indem sie sich komplementär aneinanderlagern und ligiert werden. Hierbei handelt es sich um eine fehlerfreie Reparatur. Für diese Verknüpfung würde eine einfache Ligase-Aktivität ausreichen, da keine Bearbeitung der Enden notwendig ist. Die nicht-kohäsiven Enden verfügen über einen 5'-Überhang aus 4 Basen und einen 3'-Überhang aus 4 Basen. Diese einzelsträngigen Überhänge stoßen aneinander und können nicht durch einfache Ligation verknüpft werden. Es sind Prozessierungsschritte notwendig. Einerseits können die Überhänge nukleolytisch abgebaut werden, damit glatte DNA-Enden entstehen, die durch „Blunt-End“-Ligation verbunden werden. Andererseits kann eine „Fill-in“-Synthese, also ein Auffüllen der fehlenden Basen auf der Seite des 5'-Überhangs der Ligation vorausgehen. Der 3'-Überhang kann nicht ohne weiteres aufgefüllt werden, da die DNA-Polymerase die Synthese neuer Basen stets von einem 3'-OH-Ende aus komplementär zum Partner-Strang in 5'-3'-Richtung durchführt. Zum einzelsträngigen 3'-Ende existiert jedoch keine Vorlage des Partnerstrangs, nach der synthetisiert werden könnte. Zu einer fehlerfreien Reparatur kann es nur kommen, wenn der Fall eintritt, dass an das 3'-OH-Ende des aufgefüllten 5'-Überhangs auf der einen Seite über den Bruch hinweg eine zum zweiten einzelsträngigen Überhang „zufällig“ komplementäre Base synthetisiert wird (siehe Abb. 2). Diese so genannte „*unprimed synthesis*“ einer überhängenden Base kann dann eine Brücke bilden, um die Ligation und die „Fill-in“-Synthese der verbleibenden Lücke zu ermöglichen. Die reparierten Doppelstränge können mittels PCR und Primern, die beidseits (193 bp vor und 405 bp nach dem DSB) des ursprünglichen DSB anlagern, sequenziert werden. Die Ergebnisse der dargestellten DNA-Resektionen und -Synthesen zur Verknüpfung der Enden können an der Sequenzabfolge Base für Base nachvollzogen werden (Abb. 13), da die parentale Plasmid-Sequenz bekannt ist. Auf diese Weise können Resektionen, die vor der Verknüpfung stattgefunden haben, bis auf etwa 550 bp nachgewiesen werden.

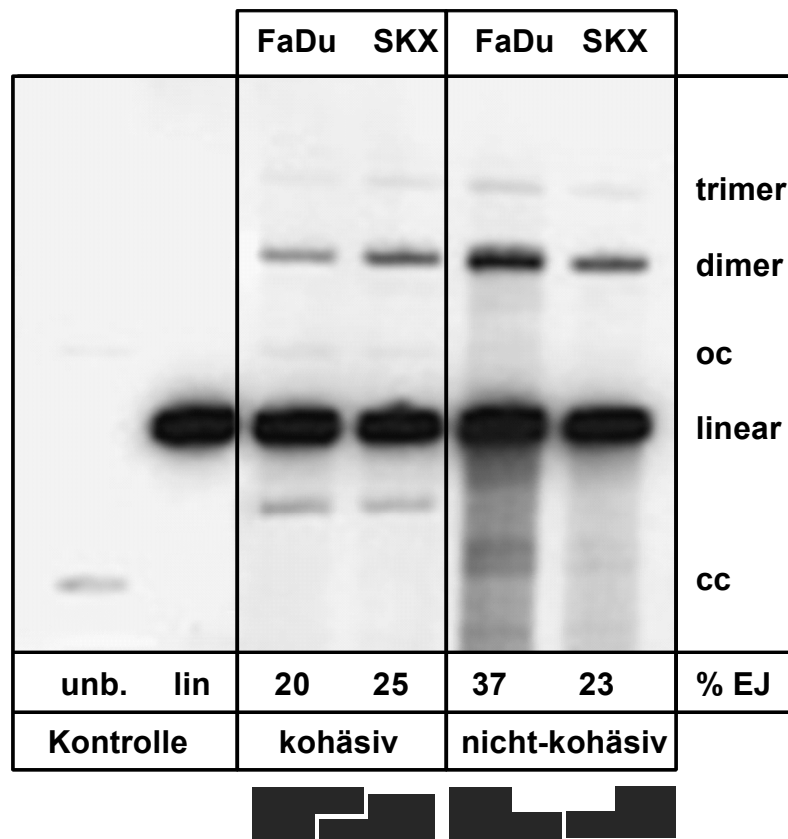


**Abbildung 13: Sequenz des parentalen Substrat-Plasmids im Bereich des induzierten Doppelstrangbruches.**

(A) Die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme HindIII (grün) und PstI (rot) sind mit ihren Schnittstellen (schwarze Dreiecke) dargestellt. (B) Die Restriktion mit HindIII und PstI führt zum Verlust eines kurzen Sequenzabschnitts und es entstehen aneinander anstoßende, einzelsträngige 5'- und 3'-Überhänge von 4 Basen Länge. Die korrekte Reparatur erfolgt durch Auffüllen der fehlenden Basen (blau) zum 5'-Überhang, „unprimed synthesis“, Ligation und Auffüllen des 3'-Überhangs. (C) Die Restriktion mit PstI führt zur Durchtrennung des DNA-Doppelstranges mit komplementären 3'- und 5'-Überhängen.

Zum Vergleich der Reparatur beider Enden-Typen wurde das eine Substrat-Plasmid nur mit PstI und das andere Substrat sowohl mit PstI als auch mit HindIII verdaut. Die Substrate wurden unter den Standard-Reaktionsbedingungen in Extrakten der zwei Zelllinien FaDu und SKX inkubiert. Die Reparaturprodukte wurden über ein Agarosegel aufgetrennt und über einen Southern-Blot detektiert. In Abb. 14 ist ein repräsentativer Southern-Blot für den Vergleich der Reparatur kohäsiver und nicht-kohäsiver DNA-Enden gezeigt.

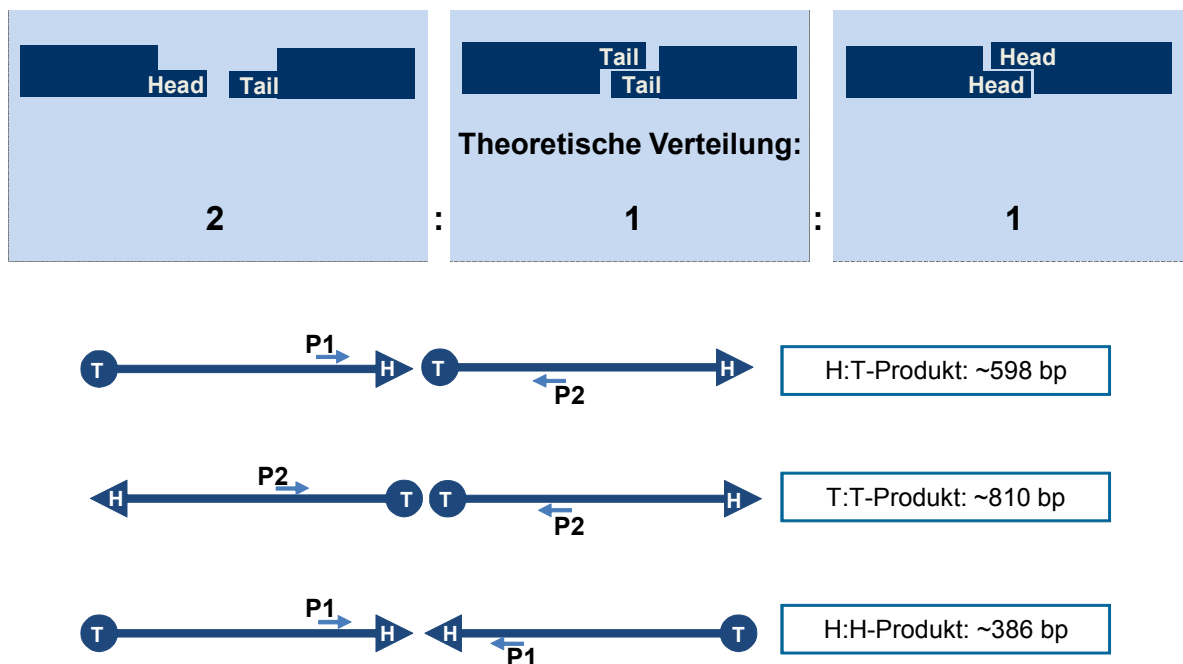




**Abbildung 14: Kohäsive DNA-Enden unterliegen geringeren Degradationseffekten und resultieren in einem höheren Anteil zirkulärer Produktformen.**

Der Southern-Blot zeigt die Produkte der End-Joining-Reaktionen in CFE aus FaDu und SKX. Das DNA-Substrat wurde mit PstI (kohäsive DNA-Enden) oder mit HindIII/PstI (nicht-kohäsive DNA-Enden) linearisiert. Die Struktur der DNA-Enden ist schematisch dargestellt. Zur Kontrolle wurde unverdautes (unb.) und linearisiertes (lin) Plasmid aufgetragen. Die relative End-Joining-Effizienz in Prozent (% EJ) ergibt sich aus dem Quotienten des Produkt-Signals und dem Gesamtsignal einer Spur.

Es ist zu sehen, dass die Ausbeute an Dimeren für nicht-kohäsive Enden sich stärker zwischen beiden Zellen unterschied als die von kohäsiven Enden. Die Quantifizierung der Banden ergab für nicht-kohäsive Enden 37 % (FaDu) gegen 23 % (SKX) EJ-Effizienz. Bei kohäsiven Enden betrug der Unterschied nur 5 % (FaDu 20 % EJ; SKX 25 % EJ). Dies ist ein Hinweis darauf, dass sich die CFEs verschiedener Zelllinien weniger in ihrer reinen Ligationsfähigkeit als vielmehr in ihrer EJ-Fähigkeit unterscheiden, was die komplexere Endenprozessierung mit einschließt. Der Blot zeigt zudem, dass bei der Reparatur der kohäsiven DNA-Enden ein geringerer Anteil an degradierter DNA auftritt. Dadurch, dass die Enden komplementäre Überhänge besitzen, können diese schnell aneinanderlagern, sind geschützt und können direkt ligiert werden. Im Gegensatz dazu können die nicht-kohäsiven Enden erst nach Prozessierung der Enden verbunden werden. Dies bedeutet, dass die Überhänge möglicherweise länger dem Einfluss von Exonukleasen ausgesetzt sind.

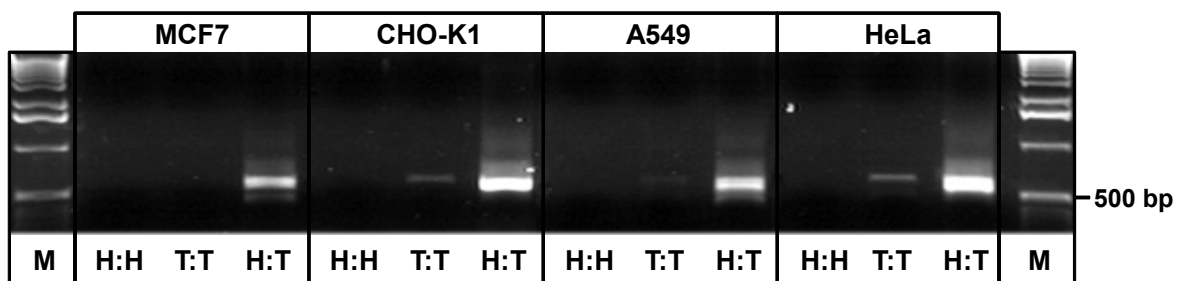


**Abbildung 15: Zusammenstellung und theoretische Verteilung der möglichen Enden-Verknüpfungen bei Substrat-Plasmiden mit nicht-kohäsiven DNA Enden.**

Oberer Teil: Schematische Darstellung der Head- und Tail-Enden-Struktur und ihre theoretische Verteilung 2:1:1. Unterer Teil: Dargestellt sind die Möglichkeiten der Multimer-Verknüpfungen mit Lage der verwendeten Primer P1 und P2 und die Größe der durch die Primer zu erwartenden PCR-Produkte.

Bei der Unterscheidung von kohäsiven und nicht-kohäsiven Enden sind im *in vitro* EJ-System Einschränkungen zu beachten. Sobald die linearen Plasmid-Monomere in den Zellextrakt zur Reparatur gegeben werden, ist die Orientierung der Monomere und damit der DNA-Enden (in der Folge als „head“- oder „tail“-Ende bezeichnet) zueinander willkürlich. Für zirkuläre Plasmid-Monomere ist nur die „Head to Tail“-Verknüpfung (H:T; HindIII/PstI) möglich. Beide Enden desselben Plasmids werden hierbei miteinander verbunden. Für lineare Multimer-Produkte bedeutet dies aber, dass sich genauso komplementäre Enden (nur PstI/PstI, T:T; oder HindIII/HindIII, H:H) wie nicht-komplementäre Enden (H:T) aneinanderlagern können (Abb. 15). Es ist bekannt, dass diese Verknüpfungen auftreten (Labhart, 1999b) und dass H:T-Verknüpfungen den Großteil der linearen Multimere ausmachen (Kuhfittig-Kulle et al., 2007). Die theoretische Verteilung von H:T, T:T und H:H liegt bei 2:1:1. Um die tatsächliche Verteilung der Verbindungsverhältnisse zu untersuchen, wurden PCRs mit den in der EJ-Reaktion entstandenen Produkten durchgeführt. Durch die unterschiedliche Kombination der Primer P1 und P2 im PCR-Ansatz können spezifisch H:H- (P1+P1), T:T- (P2+P2) und H:T-Verknüpfungen (P1+P2) amplifiziert werden. Diese wurden durch eine Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und anhand ihrer Größe unterschieden. H:T-Produkte resultieren in Banden von ca. 598 bp, H:H-Produkte in ca. 386 bp und T:T-

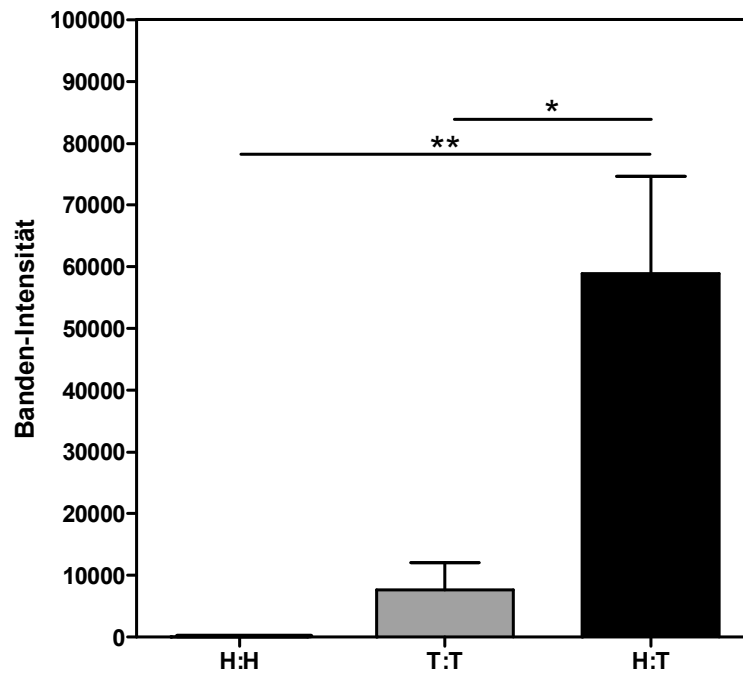
Produkte in ca. 810 bp (Abb. 15 und 16). Wie in Abb. 17 zu sehen ist, überwiegen die H:T-Verknüpfungen die T:T-Verknüpfungen deutlich um durchschnittlich das 8-fache (Abb. 17). H:H-Verbindungen wurden nicht amplifiziert. Das bedeutet, dass diese Kombination der DNA-Enden in den durchgeführten EJ-Reaktionen nicht oder allenfalls minimal auftritt (unterhalb der Detektionsgrenze im Agarosegel). Das Fehlen der H:H Verbindung könnte auf den Umstand zurückzuführen sein, dass generell komplementäre 5'-Überhänge (in unserem Fall H:H) nicht so effizient verschlossen werden können wie komplementäre 3'-Überhänge (in unserem Fall T:T) (Baumann et al., 1998). Außerdem ist damit gezeigt, dass im vorliegenden System nicht einfache Ligationen sondern echte EJ-Prozesse analysiert werden.



**Abbildung 16: In CFE sind Head-to-Tail-Produkte vorherrschend.**

Agarosegel der PCR-Produkte, die entstanden sind durch Amplifikation mit den Primern P1 + P1 (H:H; 386 bp), P2 + P2 (T:T; 810 bp) und P1 + P2 (H:T; 598bp). Die PCR wurde mit Produkten aus End-Joining-Reaktionen mit CFE von MCF7, CHO-K1, A549 und HeLa durchgeführt (M = 1 kb-Leiter; Höhe der 500 bp-Bande ist markiert).

In Arbeiten anderer Arbeitsgruppen werden die hier gemachten Beobachtungen bestätigt. Dort wird darauf hingewiesen, dass H:H- oder T:T-Verbindungen besonders in CFEs gebildet werden, in denen der klassische NHEJ-Apparat defekt ist, so z. B. in Ku80-defizienten CFEs. In diesen Systemen ist die alleinige Ligationsfähigkeit nicht eingeschränkt, so dass zueinander komplementäre DNA-Enden durchaus verschlossen werden können, nicht aber nicht-komplementäre Enden. Dies bedeutet, dass trotz defektem NHEJ noch immer die Fähigkeit erhalten ist, Dimere oder höhere lineare Multimere durch Hybridisierung der komplementären Überhänge zu ligieren (Labhart, 1999b). Daher spiegeln multimere Verknüpfungen komplementärer Enden nicht ausschließlich die Aktivität des NHEJ wider, da die Enden nicht prozessiert sondern nur ligiert werden müssen. Werden nicht-kohäsive Enden eingesetzt, lässt die Bildung von zirkulären Produkten aber eine Aussage über Qualität und Quantität des eigentlichen, vollständigen EJ-Prozesses zu.

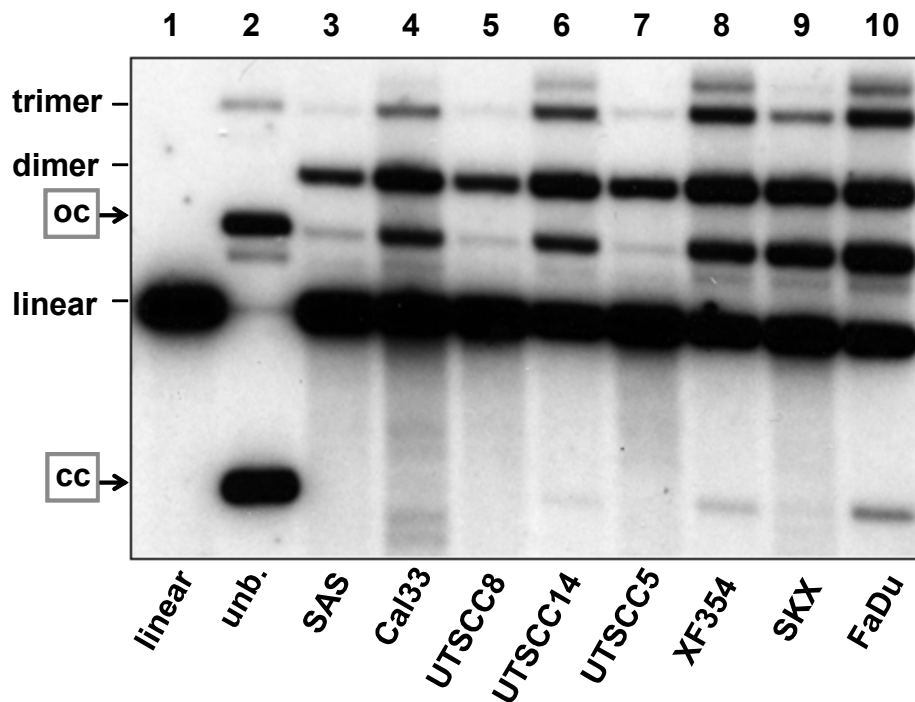


**Abbildung 17: Quantifizierung der PCR-Produkte zur Ermittlung der Verteilung auf H:H-, T:T- und H:T-Verknüpfungen.**

Nach Durchführung der PCR mit Produkten aus End-Joining-Reaktionen mit CFE aus MCF7, CHO-K1, A549 und HeLa, wurden die Intensitäten der Produktbänder nach ihrer Auftrennung im Agarosegel ausgewertet (Mann-Whitney, \*p = 0,0203, \*\*p = 0,0097).

### 3.1.4. Quantifizierung zirkulärer End-Joining-Produkte

Der Vergleich von linearen und zirkulären Produkten legt nahe, dass nur zirkuläre Produkte einer kompletten EJ-Reaktion entsprechen, da lineare Multimere zu einem gewissen Teil aus reiner Ligationsaktivität entstehen. Die Quantifizierung der Reparaturprodukte erfolgte über die Analyse im Southern-Blot. Wie in Abb.18 zu sehen ist, ist diese Methode sehr gut geeignet, um die Gesamteffizienz des EJs zu ermitteln und Unterschiede zwischen verschiedenen Zellen anhand der Bandenintensität darzustellen. Das Hauptaugenmerk wurde auf die zirkulären Produkt-Formen gelegt. *Open circles* (oc-Produkte) entsprechen den zirkularisierten Plasmiden mit noch einem Einzelstrangbruch („nick“). Sie sind sehr gut im Southern-Blot darzustellen und zu quantifizieren. Im Gegensatz dazu sind kovalent geschlossene Plasmide (*closed circles*, cc) extrem seltene Ereignisse, die in den meisten untersuchten Blots nicht dargestellt werden konnten (eine der Ausnahmen ist Abb. 18). Da die zirkulären Formen die qualitativ wichtigste Produktgruppe darstellen, wurde die Methode des quantitativen Transformationsassays entwickelt, die die Darstellung der *closed circles* ermöglicht.

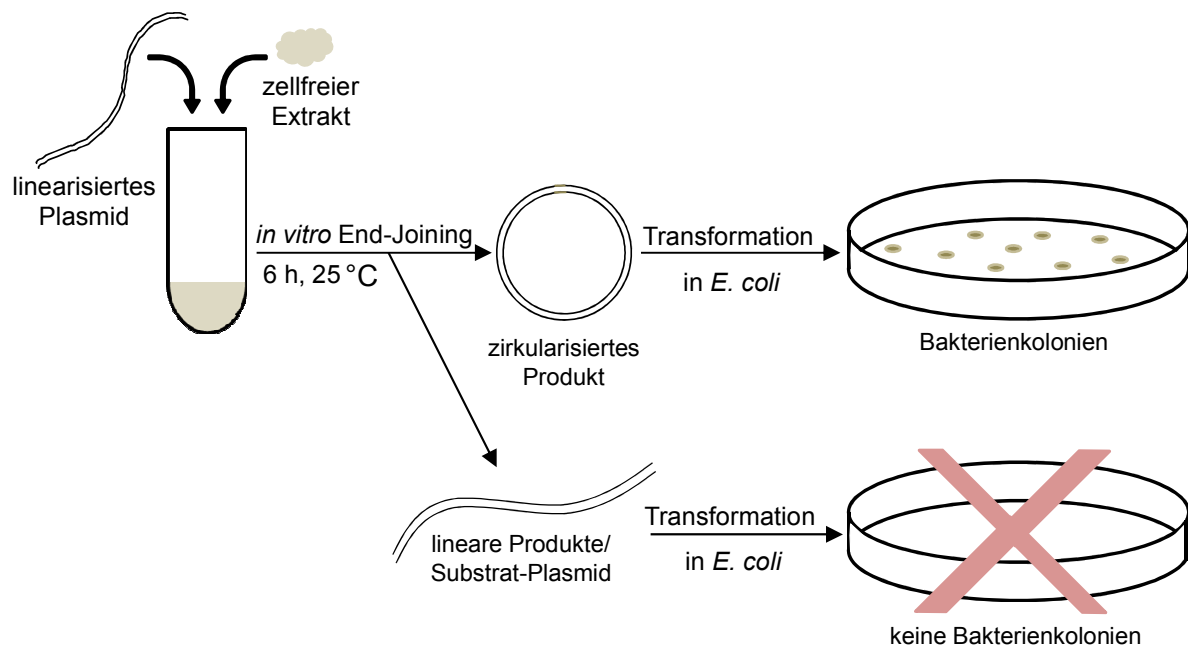


**Abbildung 18: Tumor-Zelllinien unterscheiden sich in der Bildungskapazität zirkulärer Produkte.** Die Bildung von oc-Plasmiden ist gut nachweisbar. Die Detektion von cc-Plasmiden ist ein seltenes Ereignis. Der Southern-Blot zeigt die Produkte der End-Joining-Reaktionen in CFEs aus den angezeigten Tumorzelllinien. Die Reaktionen wurden unter Standard-Bedingungen durchgeführt unter Verwendung des HindIII/PstI-linearisierten Substrates pEJ. Zur Kontrolle wurde linearisiertes und unverdautes (unb.) Plasmid aufgetragen. Derselbe Blot ist mit geringerer Belichtung unter Abb. 27 A abgebildet.

Nach Ende der EJ-Reaktion wurde eine bestimmte Menge des Produktgemisches mittels Elektroporation nach Entsalzung durch Dialyse in elektro-kompetente *E. coli* transformiert und diese dann ausplattiert. Auf dem Substrat-Plasmid ist als Selektionsmarker das Kanamycin-Resistenzgen vorhanden, welches in Bakterien nur dann exprimiert wird, wenn das Plasmid in seiner zirkulären Form vorliegt. Lineare Plasmid-Formen werden in Bakterien degradiert und führen nicht zu einer Kanamycin-Resistenz bzw. zu Bakterienwachstum. Die Anzahl der resultierenden Bakterienkolonien spiegelt die Effizienz der Reparaturreaktion plus der nachfolgenden Transformation wider (Abb. 19).

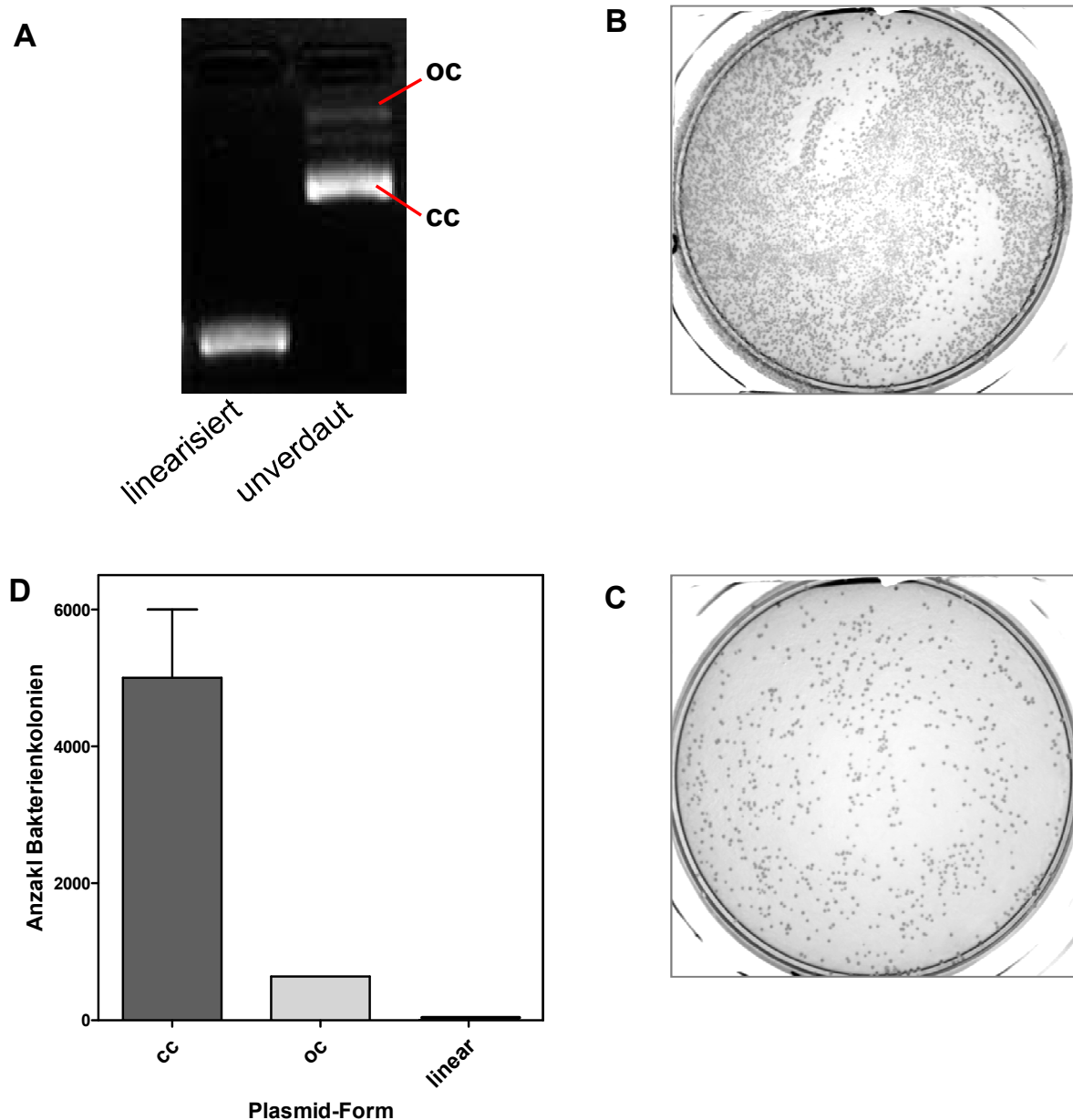
Um zu testen, wie hoch die Transformationseffizienz von oc-Produkten und cc-Produkten ist, wurde unbehandeltes Plasmid über ein Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die oc- und die cc-Form des Plasmids sowie die linearisierte Form wurde aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt (Abb. 20 A). Gleiche Mengen der linearen, genickten und geschlossenen Plasmid-Form (je 4 pg) wurden transformiert. Anhand der Zahl der entstandenen Kolonien ist abzuleiten, dass die kovalent geschlossene (cc) Plasmid-Form ca. 7,8-mal effizienter zu Kolonien führt als die genickte oc-Form (Abb. 20 B-D). Wie erwartet, führte die rein linearisierte Form nicht zu vitalen Bakterien, da diese Plasmide nicht repliziert

werden und somit keine Antibiotikaresistenz aufgebaut werden kann. Durch die Auszählung der Kolonien, die pro ng Substrat-DNA entstehen, lässt sich also eine Aussage über die Effizienz treffen, mit der zirkuläre Produkte gebildet werden, ohne dass im Einzelfall auf die jeweiligen Anteile von oc gegen cc im Reparaturgemisch geschlossen werden kann. Es handelt sich um eine geeignete Methode, um spezifisch die EJ-Kapazität individueller Zelltypen zu betrachten und dabei reine Ligationseffekte auszuschließen.



**Abbildung 19: Schematische Darstellung von *in vitro* End-Joining und Transformationsassay.**

HindIII/PstI-linearisiertes Plasmid (pEJSSA bzw. pEJ) wird für 6 h bei 25 °C im zellfreien Extrakt inkubiert. Die Reparatur-Produkte (sowohl zirkularisierte als auch lineare Plasmide) werden nach kurzer Dialyse direkt in *E. coli* transformiert. Nur Bakterien mit zirkulärem Produkt können die Resistenz gegen das Selektionsantibiotikum exprimieren. Resultierende Kolonien werden gezählt, einzeln geerntet und der Kolonie-PCR zugeführt.



**Abbildung 20: Sowohl die kovalent geschlossene cc-Plasmid-Form als auch die genickte oc-Form führt transformiert in *E. coli* zu Koloniebildung.**

(A) Agarosegelelektrophorese des linearisierten und des unbehandelten Plasmids zur Isolation der linearen, oc- und cc-Plasmidform. (B) Bakterienkolonien nach Transformation mit cc-Plasmid. (C) Bakterienkolonien nach Transformation mit oc-Plasmid (linearisiertes Plasmid führt nicht zu Koloniebildung). (D) Quantitative Auswertung der Koloniezahlen nach Transformation gleicher Mengen an cc-, oc- und linearisiertem Plasmid.

### 3.2. Quantitative und qualitative Validierung des *in vitro* End-Joinings mithilfe von Reparaturmutanten

Die wichtigste Frage für das biologische Überleben ist, ob das NHEJ effizient und weitgehend korrekt ausgeführt wird. Um diese Frage zu untersuchen, wurden Mutanten

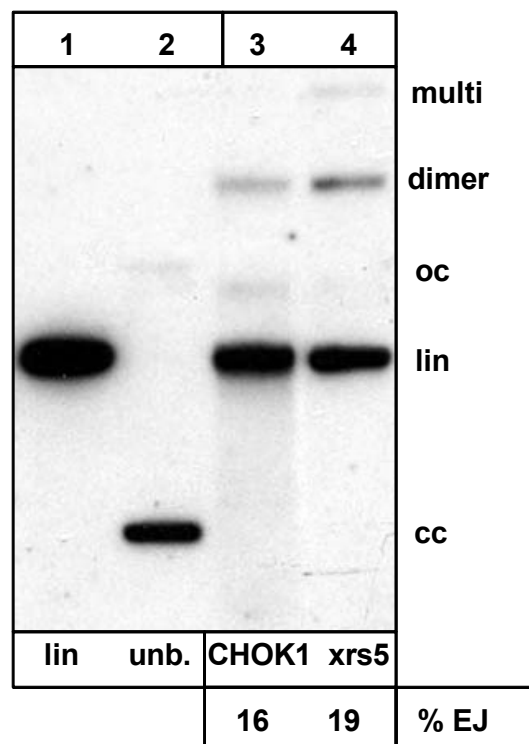
verwendet, mit denen der Effekt eines beeinträchtigten NHEJ auf die Quantität und Qualität der Reparatur beobachtet werden kann. Neben diesen beiden wichtigen Endpunkten sollte untersucht werden, ob alternative Reparaturwege bei defektem NHEJ auch *in vitro* zum Einsatz kommen.

### 3.2.1. Einfluss eines NHEJ-Defektes auf die Effizienz der Reparatur

Die bisher in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse legen nahe, dass nur ein intaktes NHEJ in der Lage ist, zirkuläre Produkte hervorzubringen. Um dies zu überprüfen, wurden DNA-Reparaturmutanten verwendet, die in genau diesen Schritten einen möglichen Defekt aufweisen. Die verwendeten Mutanten sind zum einen humane 180BR-Zellen, die einen Defekt in LigIV aufweisen. MO59J sind defizient in DNA-PKcs und xrs5-Hamsterzellen sind defizient in Ku80. Als Kontrollen wurden entsprechende Zellen ohne NHEJ-Defekt verwendet.

Das Protein, welches als eines der ersten am DSB bindet, ist Ku80, das zusammen mit Ku70 eine heterodimere Ringstruktur um die DSB-Enden bildet und diese vor unkontrollierter Degradation schützt (Walker et al., 2001). In CFEs aus xrs5-Zellen fehlt Ku80. Beim EJ in diesen CFEs wurde festgestellt, dass sich die Gesamteffizienz der Reparatur im Vergleich zum Wildtyp (CHO-K1) nicht stark unterscheidet. Wie in Abb. 21 zu sehen ist, liegt die EJ-Effizienz von CHO-K1 mit 16 % (Abb. 21, Spur 3) sogar geringfügig unter dem Niveau von xrs5 mit 19 % (Abb. 21, Spur 4). Der wichtigste Unterschied liegt nicht in der Gesamteffizienz, sondern in der Zusammensetzung der Reparatur-Produkte. Die zirkulären Produkte, die im Wildtyp mit 3,5 % vorhanden sind und für eine effiziente Reparatur über NHEJ stehen, fehlen im Ku80-defizienten CFE vollständig. Hier bestehen die Produkte ausschließlich aus linearen Di- und Multimeren, wobei Dimere mit 17,9 % den größten Anteil ausmachen. Dieses Ergebnis liefert einen Hinweis darauf, dass zirkuläre Produkte ein intaktes NHEJ voraussetzen. Da aber die Gesamteffizienz in xrs5 sogar leicht erhöht ist, scheint die Reparatur über Ku-unabhängige, alternative Mechanismen zwar zu qualitativ minderwertigen Verknüpfungen, dafür aber zu einer erhöhten Produktmenge zu führen. Weil Ku80 fehlt, können nachfolgende NHEJ-Komponenten wie DNA-PKcs nicht oder nur schlecht zur Bruchstelle rekrutiert werden. Die DNA-Enden werden nicht durch Ku80 blockiert und könnten für alternative Reparaturwege zugänglich sein. Hierbei kann der alternative Reparaturweg sogar effizienter sein als das klassische NHEJ, was bereits in anderen Arbeiten beobachtet wurde (Mansour et al., 2008; Wang et al., 2003).

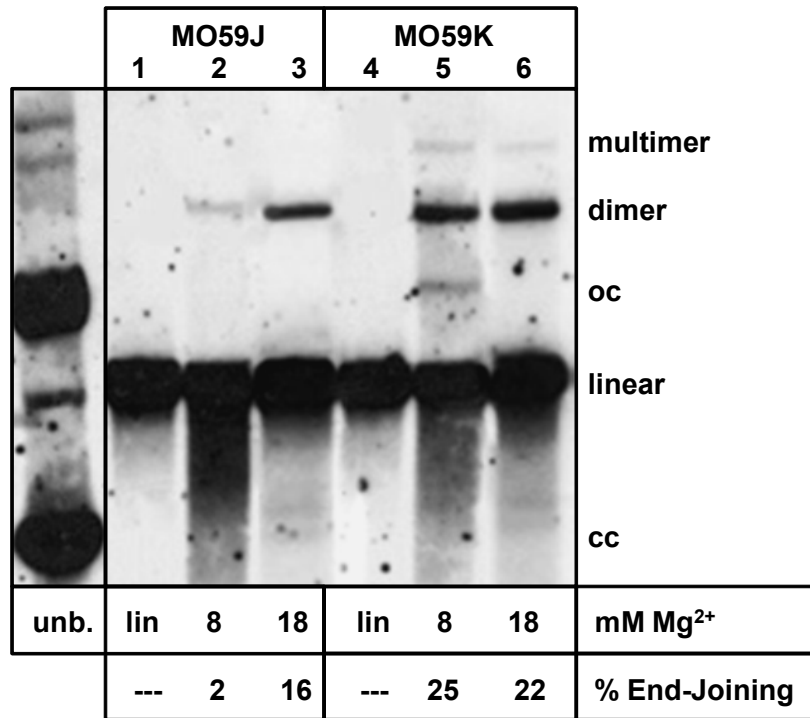




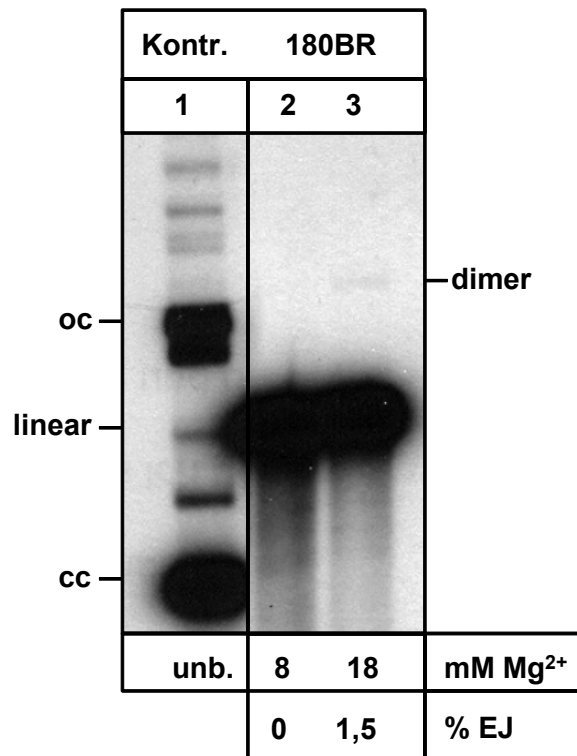
**Abbildung 21: Auswirkung der Ku80-Defizienz auf die Produktbildung im CFE.**

Der Southern-Blot zeigt, dass eine Defizienz in Ku80 (*xrs5*, Spur 4) im *in vitro* End-Joining nicht zu einem vollständigen Reparaturdefekt führt, sondern zur Bildung von ausschließlich Di- und Multimeren (Spur 4). Zirkuläre Produkte (*oc*) werden nur im Wildtyp (CHO-K1) produziert (Spur 3).

In CFEs aus MO59J-Zellen liegt im Gegensatz zu den MO59K-Wildtypzellen keine DNA-PKcs vor. Hier führte das EJ zu einer Gesamteffizienz von nur 2 %, wobei die Produkte ausschließlich aus Dimeren bestanden (Abb. 22, Spur 2). Zirkuläre Monomere oder höhere Multimere wurden nicht detektiert. Damit hat die Defizienz von DNA-PKcs einen stärkeren Effekt auf die Gesamteffizienz als Ku80. In den MO59K-Extrakten führte das EJ zu einer Effizienz von 25 % (Abb. 22, Spur 5). Nur das intakte NHEJ in den Wildtyp-Zellen resultierte in zirkulären Produkten (5,3 %), die in MO59J vollständig fehlten.



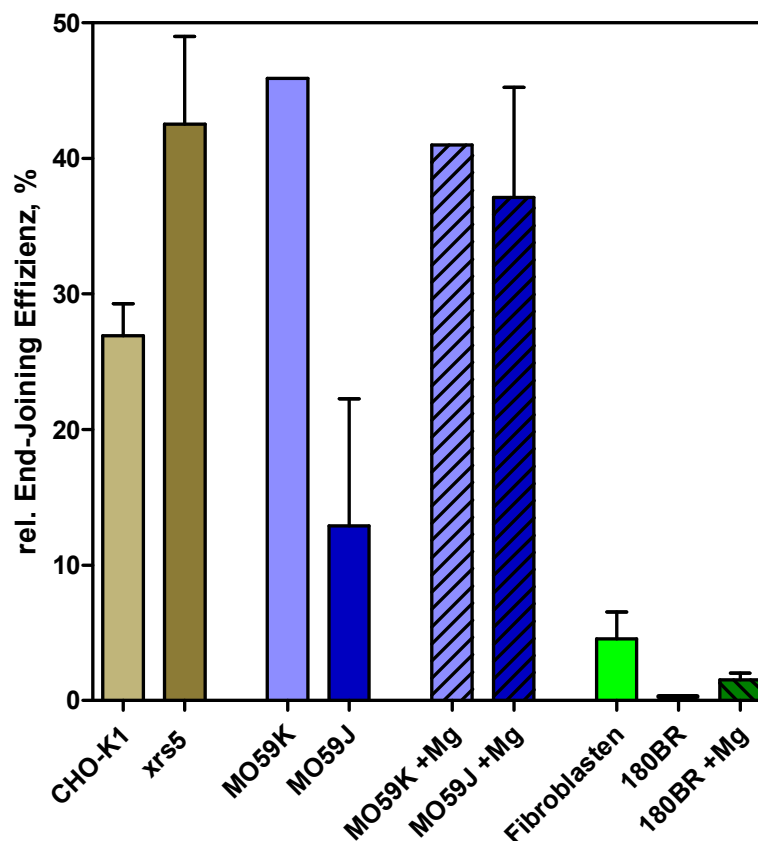
**Abbildung 22: Die Defizienz in DNA-PKcs führt zu stark verringerter *in vitro* End-Joining-Effizienz.** Der Southern-Blot zeigt die Produkte der End-Joining-Reaktionen in CFEs aus MO59J (Spur 1 – 3) und MO59K (Spur 4 – 6). Die Reaktionen wurden unter Standard-Bedingungen (8 mM Mg<sup>2+</sup>, Spur 2 und 5) bzw. erhöhtem Mg<sup>2+</sup>-Gehalt (18 mM Mg<sup>2+</sup>, Spur 3 und 6) durchgeführt. Zur Kontrolle wurde linearisiertes (lin) und unverdautes (unb.) Plasmid aufgetragen.



**Abbildung 23: Die Defizienz in LigIV verhindert End-Joining.**

Der Southern-Blot zeigt die Produkte der End-Joining-Reaktionen im CFE aus 180BR. Die Reaktionen wurden unter Standard-Bedingungen (8 mM Mg<sup>2+</sup>, Spur 2) bzw. erhöhtem Mg<sup>2+</sup>-Gehalt (18 mM Mg<sup>2+</sup>, Spur 3) durchgeführt. Zur Kontrolle wurde unverdautes Plasmid (unb.) aufgetragen.

Die abschließende Verknüpfung der DNA-Enden wird im NHEJ durch LigIV im Komplex mit XRCC4 und XLF durchgeführt (Lees-Miller et al., 2003). Der Effekt der Defizienz in LigIV wurde in CFEs aus der Fibroblasten-Zelllinie 180BR untersucht (Abb. 23). Obwohl im Allgemeinen CFEs aus Fibroblasten generell eine eher geringe Effizienz im EJ aufwiesen (ohne Abbildung und Abb. 24), konnte in 180BR unter Standardbedingungen gar keine Reparatur im Southern-Blot detektiert werden (Abb. 23, Spur 2). Ein Grund dafür kann sein, dass in diesen CFEs sowohl Ku70/80 als auch DNA-PKcs vorhanden sind, die zusammen einen Komplex am DSB bilden und die DNA-Enden zusammenhalten. Die Reparatur wird in Richtung des klassischen NHEJ geleitet. Diese kann nicht fortgesetzt werden, da LigIV fehlt. Die DNA-Enden bleiben durch den DNA-PK-Komplex besetzt und sind somit auch für den Zugriff anderer Proteine, die potentiell die Ligation ausführen könnten, blockiert (Perrault et al., 2004).



**Abbildung 24: Einfluss eines NHEJ-Defektes auf die End-Joining-Effizienz.**

Die relativen Gesamt-Effizienzen der Kontroll- und Mutanten-Reaktionen wurden über die Southern-Blot-Analyse quantifiziert (Mittelwerte mit Standardfehler). CHO-K1: Wildtyp, xrs5: Ku80-def., MO59K: Wildtyp, MO59J: DNA-PKcs-def., Fibroblasten: Wildtyp, 180BR: LigIV-def., +Mg: End-Joining-Reaktion wurde unter erhöhtem Magnesiumgehalt (18 mM) durchgeführt, die übrigen Reaktionen unter Standardkonzentration von 8mM Mg<sup>2+</sup>.

Es konnte gezeigt werden, dass sich der Defekt des NHEJ *in vitro* auf die Quantität der Produkte auswirkt. Unabhängig davon, welcher Faktor des NHEJ fehlt, fällt das effiziente EJ in Form von zirkulären Produkten vollständig aus, lineare Produkte sind jedoch in unterschiedlicher Menge nachweisbar. Dieses Ergebnis liefert einen weiteren Hinweis darauf, dass es sich bei linearen Multimeren nicht um die Produkte eines intakten, effizienten NHEJ handelt.

### 3.2.2. Die Rolle eines alternativen Reparaturweges im *in vitro* End-Joining

In den vorherigen Ergebnissen wurde gezeigt, dass außer 180BR die Mutanten-Zelllinien trotz nicht funktionsfähigem NHEJ einen nicht unerheblichen Anteil an Reparatureffizienz aufwiesen.

Lag eine Defizienz in Ku80 vor, so zeigte sich der Ausfall des klassischen NHEJ im Fehlen der zirkulären Produkte (Abb. 21, Spur 4). Allerdings bedeutete der Wegfall von Ku80 nicht zwangsläufig eine Abnahme in der Effizienz des EJs. Während CHO-K1 eine EJ-Effizienz von 16 % aufwies, lag die Kapazität bei xrs5 bei 19 %. Ein Grund für diese Beobachtung kann sein, dass der alternative Reparaturweg durch Ku80 unterdrückt wird. Ku80 bindet sehr schnell nach Schadenserkennung an die DNA-Enden und bildet mit DNA-PKcs einen Komplex, der den Zugriff alternativer Reparaturfaktoren verhindert. Ist Ku80 nicht vorhanden, so sind die DNA-Enden frei für alternatives EJ (Adachi et al., 2001).

Bei einem nicht funktionsfähigen NHEJ muss die Reparatur also über einen alternativen Weg abgelaufen sein. Um speziell diesen Einfluss eines alternativen Reparaturweges zu untersuchen, wurde die Magnesiumkonzentration von 8 mM (Standard-Bedingungen) auf 18 mM erhöht, was die Aktivität von LigIII als alternatives Verknüpfungsenzym steigert.

MO59J wies unter Standard-Bedingungen durch die Defizienz in DNA-PKcs eine um 23 % geringere Effizienz als der Wildtyp MO59K auf (2 %; Abb. 22, Spur 2). Durch Erhöhung des Magnesium-Gehaltes in der Reaktion konnte die Effizienz von MO59J von 2 % auf 16 % gesteigert werden. Diese Steigerung bewirkte jedoch keine Änderung in der Art der Produkte, d. h. dass weiterhin ausschließlich Dimere gebildet wurden (Abb. 22, Spur 3). Im Wildtyp wirkte sich die Magnesium-Erhöhung so aus, dass die Effizienz nur leicht um 3 % verringert war (22 %; Abb. 22, Spur 6). Hier wurde jedoch ein Einfluss auf die Art der Produkte festgestellt. Es konnten nun keine zirkulären Produkte mehr detektiert werden. Es wurden nur Di- und Multimere gebildet. Dieses Ergebnis zeigt, dass durch die Erhöhung des Magnesium-Gehaltes die Reparatur durch das klassische NHEJ unterdrückt wird und stattdessen ein alternativer Reparaturweg bevorzugt abläuft.

Die Bedingungen von 8 mM Magnesium in der Standard-Reaktion lassen es also zu, dass sowohl DNA-PK-abhängiges (Abb. 22, Spur 5) als auch DNA-PK-unabhängiges NHEJ (Abb. 22, Spur 2), das sogenannte alternative oder „Backup“-NHEJ auftritt (Kuhfittig-Kulle et al., 2007; Wang et al., 2001). Durch die Anhebung des Magnesium-Gehalts auf 18 mM wird das DNA-PK-unabhängige NHEJ über LigIII unterstützt (Robins et al., 1996; Tomkinson et al., 1997).

Dieser Effekt wurde auch in den LigIV-defizienten Extrakten beobachtet. Dort konnten wie vorher beschrieben unter Standard-Bedingungen keine Produkte detektiert werden (Abb. 23, Spur 2). Unter erhöhter Magnesium-Konzentration konnte eine sehr geringe Produktbildung von ca. 1,5 % gemessen werden (Abb. 23, Spur 3). Im Gegensatz zu LigIII (alternativer Reparaturweg) liegt LigIV (NHEJ) im pre-adenylierten Zustand vor und bleibt bei niedrigen Magnesium-Konzentrationen aktiv (Robins et al., 1996; Tomkinson et al., 1997). Bei LigIII ist das ohne vorliegendes Magnesium nicht der Fall. Sie benötigt Magnesium als Kofaktor, und je höher der Magnesiumgehalt ist, desto höher ist ihre Aktivität. Die Bedingungen für eine alternative Reparatur sind zwar verbessert worden, jedoch sind die DNA-Enden weiterhin durch den DNA-PK-Komplex besetzt und erschweren den Zugriff anderer Proteine (Perrault et al., 2004). Es findet kompetitiv nur sehr wenig alternative Reparatur statt.

Es wurde also gezeigt, dass neben dem klassischen NHEJ ein weiterer Reparaturweg zur Verknüpfung von DSBs möglich ist, wenn eine Defizienz in einem der NHEJ-Faktoren besteht. Diese alternative Reparatur wird durch eine Erhöhung des Magnesium-Gehaltes in der Reparaturreaktion begünstigt. Diese Begünstigung des alternativen EJs geht wahrscheinlich auf eine erhöhte Aktivität der LigIII zurück.

Charakteristisch für das klassische NHEJ sind zirkuläre Reparaturprodukte. Durch alternatives EJ werden ausschließlich lineare Multimere gebildet. Diese Ergebnisse werden durch Arbeiten von Kuhfittig-Kulle et al. (2007) bestätigt, die gezeigt haben, dass nur in Wildtyp-CFEs aus Hamster-Zellen zirkuläre Produkte gebildet werden. Die Defekt-Mutanten für Ku80-, XRCC4- und DNA-PKcs konnten aber jeweils über alternative Wege lineare Multimere formieren.

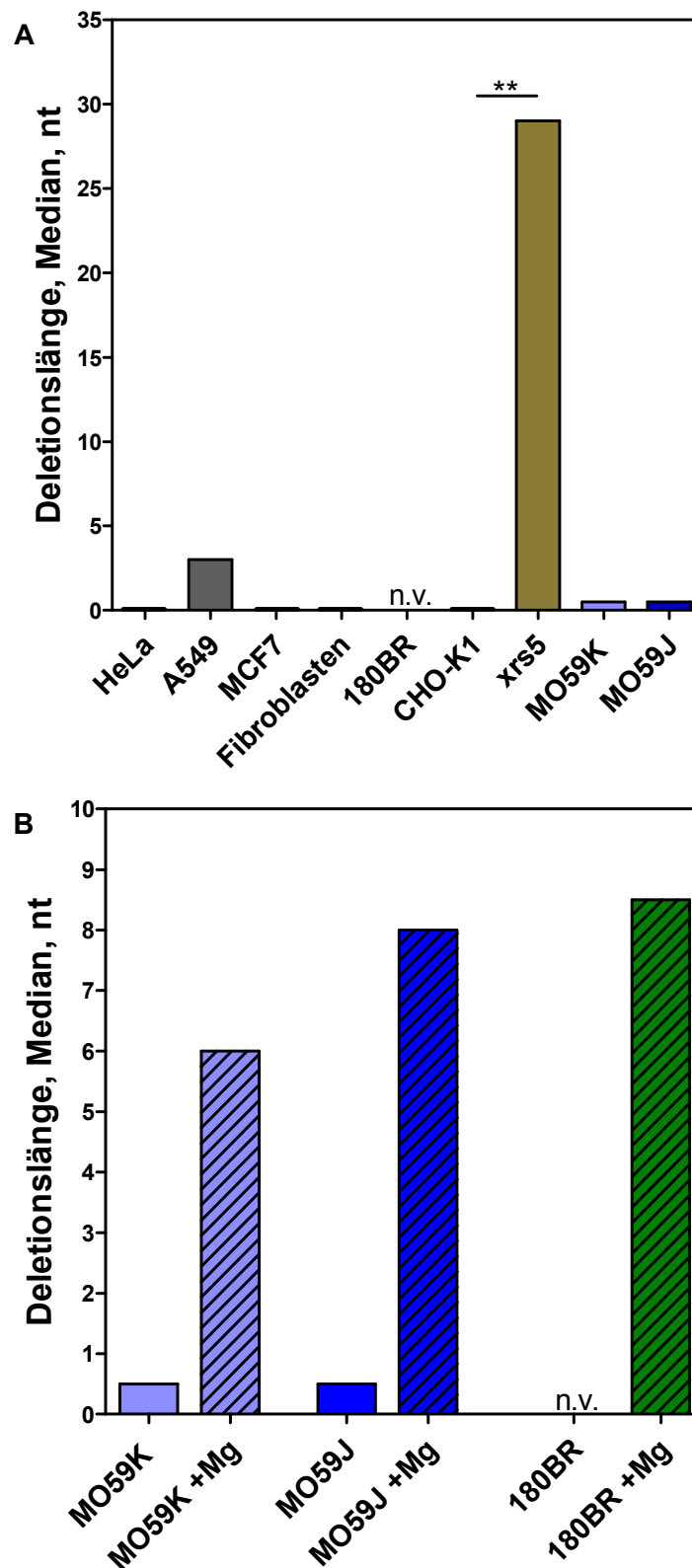
### 3.2.3. Die Genauigkeit der Reparatur

Für das biologische Überleben ist nicht nur die Effizienz der Reparatur von Bedeutung, sondern auch wie genau diese abläuft. Um eine korrekte Reparatur handelt es sich nur dann, wenn die DNA-Sequenz so wiederhergestellt wurde, wie sie vor dem DSB war. Um zu untersuchen, wie sich ein NHEJ-Defekt auf die Genauigkeit der Reparatur auswirkt, wurden

zirkuläre Produkte der EJ-Reaktion aus NHEJ-intakten CFEs nach Transformation in Bakterien direkt durch Kolonie-PCR amplifiziert. Für NHEJ-defekte Zellen wurde die Gesamtheit der Reparaturprodukte (ausschließlich lineare Multimere) zunächst über PCR amplifiziert. Die Amplifikate wurden über Topo-TA-Klonierung in Vektoren subkloniert und diese in Bakterien transformiert. Einzelklone (mit nun individuellen Reparaturprodukten) wurden dann erneut über PCR mit den Primern P1 und P2 über die Reparaturregion hinweg amplifiziert, anschließend sequenziert und mit der Original-Sequenz verglichen.

Die Analyse der Reparatur-Sequenzen zeigte, dass in den CHO-K1 Extrakten 53 % der DSBs korrekt ohne jeglichen Verlust von Basen zusammengefügt wurden. Die einzelsträngigen Überhänge wurden im Rahmen des EJs vollständig aufgefüllt und die Enden verknüpft. Bei 47 % der DSBs kam es zu Deletionen einzelner Basen, jedoch beschränkten sich diese ausschließlich auf den Bereich der einzelsträngigen Überhänge (Median 0,0 bp) (Abb. 25 A und 26). Fehlte Ku80 (wie in *xrs5*-Zellen), so wurde kein einziger Bruch ohne Deletion verbunden. Hier lag der Median der Deletionslänge bei 29,0 bp. Diese Steigerung der Deletionsrate und -länge kann ein Hinweis darauf sein, dass Ku80 im Verbund mit Ku70 als Schutzfaktor für offenstehende DNA-Enden wirken könnte. Dies steht in Übereinstimmung mit Beobachtungen, die Ku80 als eines der Reparaturproteine kennzeichnen, die als erste am DSB binden und im Komplex mit DNA-PKcs eine brückenbildende Funktion zwischen zwei benachbarten DNA-Enden einnehmen (DeFazio et al., 2002). Ist Ku80 nicht vorhanden, kann sich das Heterodimer nicht bilden, DNA-PKcs wird nicht rekrutiert und das klassische NHEJ kann nicht vollendet werden. Das bedeutet, dass längere Zeit nukleolytische Degradation erfolgt, bevor es zur definitiven Endverknüpfung kommt.

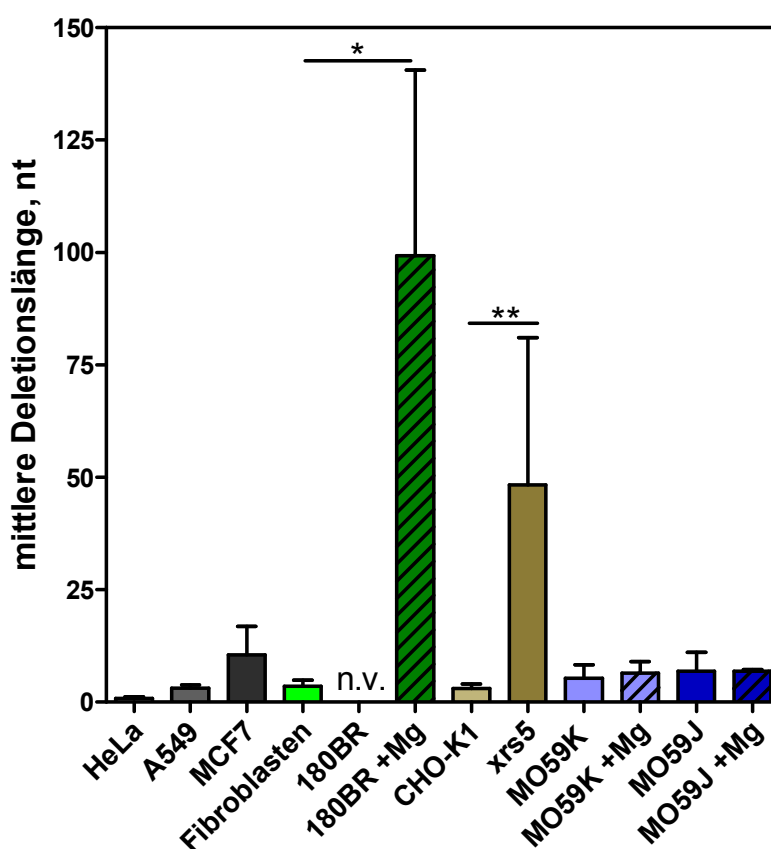
Normale humane Fibroblasten zeigten ähnlich wie CHO-K1-Zellen eine sehr genaue Reparatur mit einer Deletionslänge von 0,0 bp im Median und 63 % korrekt reparierten DSBs. Im Vergleich dazu wirkte sich der Defekt von LigIV sehr stark aus. Da die Produktbildung unter Standard-Bedingungen ausblieb, konnte keine Analyse der Reparaturereignisse auf ihre Reparaturgenauigkeit in 180BR erfolgen. Es wurden nur Reparaturprodukte unter erhöhtem Magnesium-Gehalt gebildet, die untersucht werden konnten. Keine einzige dieser Verknüpfungen erfolgte korrekt, und in 25 % der Fälle traten Deletionen über 200 bp auf. Die mittlere Deletionslänge in 180BR-Extrakten lag bei 99,3 bp (5 – 436 bp; Median 8,5 bp; Abb. 25 B und 26).



**Abbildung 25: Einfluss eines Defektes von Kernfaktoren des NHEJ auf die Reparaturgenauigkeit.**

(A) Getestet wurden CFEs aus DNA-PKcs-, LigIV-, und Ku80-defizienten Zellen. Außerdem wurden NHEJ profiziente CFEs aus humanen Fibroblasten, CHO-K1, MO59K, HeLa, MCF7 und A549 verwendet. Aufgrund zu geringer Produktbildung in 180BR konnten keine Deletionslängen ermittelt werden (n.v. = nicht verfügbar). (B) Vergleich der Deletionslängen in CFEs aus MO59K, MO59J und 180BR unter Reaktionsbedingungen mit Standard- (8 mM) oder hohem Magnesium-Gehalt (18 mM). Die Reparaturstellen wurden entweder direkt mittels Kolonie-PCR oder durch vorangehende Subklonierung/PCR amplifiziert und sequenziert (Mann-Whitney, \*\* p = 0,0055).

Um den Einfluss der DNA-PKcs auf die Genauigkeit des EJs zu untersuchen, wurden zellfreie Extrakte aus MO59K (NHEJ profizient) und MO59J (DNA-PKcs-defizient) hergestellt und das *in vitro* End-Joining durchgeführt. Die Extrakte aus MO59K zeigten nach Sequenzanalyse der Reparaturstellen zu 50 % korrektes EJ mit einer Deletionslänge von 0,5 bp Median (Mittelwert 5,3 bp). Das Fehlen von DNA-PKcs bewirkte in MO59J unter Standardbedingungen (8 mM Mg<sup>2+</sup>) keine Erhöhung der Deletionslänge. Sie lag ebenfalls bei einem Median von 0,5 bp. Genau wie in MO59K waren die Verknüpfungen ohne DNA-PKcs zu 50 % korrekt. Diese Beobachtung kann dadurch zustande kommen, dass im Extrakt Ku80 vorhanden war, welches die Enden vor Degradation schützt.



**Abbildung 26: Einfluss eines Defektes von Kernfaktoren des NHEJ auf die Reparaturgenauigkeit.**

In dieser Abbildung sind die Deletionslängen aus Abb. 25 A als Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt (Beschreibung siehe Abb. 25) (n.v. = nicht verfügbar) (Mann-Whitney, \* p = 0,0275; \*\* p = 0,0055).

Wie bereits weiter oben beschrieben, führt eine Erhöhung des Magnesium-Gehaltes in LigIV- und DNA-PKcs-defizienten Extrakten zu einer leichten Steigerung der EJ-Effizienz. Da davon ausgegangen wird, dass diese Steigerung in der Effizienz auf eine Begünstigung des *Backup*-NHEJ zurückzuführen ist, wurde untersucht, ob die Erhöhung des Magnesium-Gehaltes in der *in vitro* Reaktion zu einer Verringerung der Reparaturgenauigkeit führt. In MO59J stieg die Deletionslänge durch den erhöhten Magnesium-Gehalt von Median 0,5 bp



auf 8,0 bp (Abb. 25 B), und nur 3 % (statt 50 % unter Standardbedingungen) der Verknüpfungen wurden ohne Deletionen repariert. In MO59K zeigte sich, dass auch hier die Deletionslänge vom Median 0,5 bp auf 6,0 bp anstieg und nur noch 38 % der Verknüpfungen korrekt repariert wurden (im Vergleich zu 50 % unter Standard-Bedingungen).

Neben den NHEJ-defizienten Extrakten wurden auch Extrakte aus 3 verschiedenen humanen Tumorzelllinien auf ihre Reparaturgenauigkeit untersucht. Dabei handelte es sich um eine Zelllinie aus einem Cervix-Karzinom (HeLa), einem Lungen-Karzinom (A549) und einem Brust-Adenokarzinom (MCF7). Diese Zellen tragen keinen bekannten Defekt im klassischen NHEJ. Die Extrakte aus HeLa zeigten die höchste Reparaturgenauigkeit mit 76 % korrekten Verknüpfungen und einer Deletionslänge 0 bp im Median. A549-Extrakte wiesen eine Rate von 41 % korrekten Reparaturstellen und eine Deletionslänge von 3,0 bp im Median auf. MCF7-Extrakte reparierten zu 70 % korrekt und hatten eine Deletionslänge von ebenfalls 0 bp im Median.

Anhand dieser Ergebnisse ist zu erkennen, dass Reparaturstellen in NHEJ-profizienten Extrakten nur geringe Deletionen innerhalb der einzelsträngigen Überhänge und eine hohe Rate an korrekter Reparatur aufweisen. Liegt ein Defekt im klassischen NHEJ vor, so ist dieser im Falle von Ku80- oder LigIV-Defizienz anhand von hohen Deletionslängen zu erkennen. Es findet keine korrekte Reparatur statt. In DNA-PKcs-defizienten Extrakten ist nur ein leichter Effekt im Vergleich zu profizienten Extrakten erkennbar. Durch die hier verwendeten Reaktionsbedingungen liegt im *in vitro* EJ ein Milieu vor, in dem sowohl klassisches, DNA-PK-abhängiges NHEJ als auch *Backup*-NHEJ möglich sind. Beide Reparaturwege konkurrieren um die DNA-Enden. Aus diesem Grund werden vermutlich Verknüpfungen in Normalzellen sowohl zu einem geringen Teil vom alternativen als auch hauptsächlich vom klassischen NHEJ durchgeführt. Die Verwendung des alternativen EJs könnte sich negativ auf die Deletionslängen in Normalzellen auswirken.

Der Test der Tumorzellextrakte hat gezeigt, dass auch bei intaktem NHEJ die Deletionslängen an den DNA-Enden im Median zwischen 0 bp und 3 bp schwanken können (im Mittel zwischen 0,8 bp (HeLa) und 10,5 bp (MCF7); Abb. 26). Dies schließt jedoch korrekte Reparatur nicht aus. So wurde in MCF7-Extrakten die zweithöchste Genauigkeitsrate mit 70 % korrekt reparierten Brüchen trotz mittlerer Deletionslänge von 10 bp ermittelt. Diese Beobachtung zeigt, dass Tumorzellen ähnlich wie Normalzellen ein gewisses Spektrum an Deletionen aufweisen. Sie reparieren überwiegend korrekt, jedoch gibt es auch einige Ausnahmen.

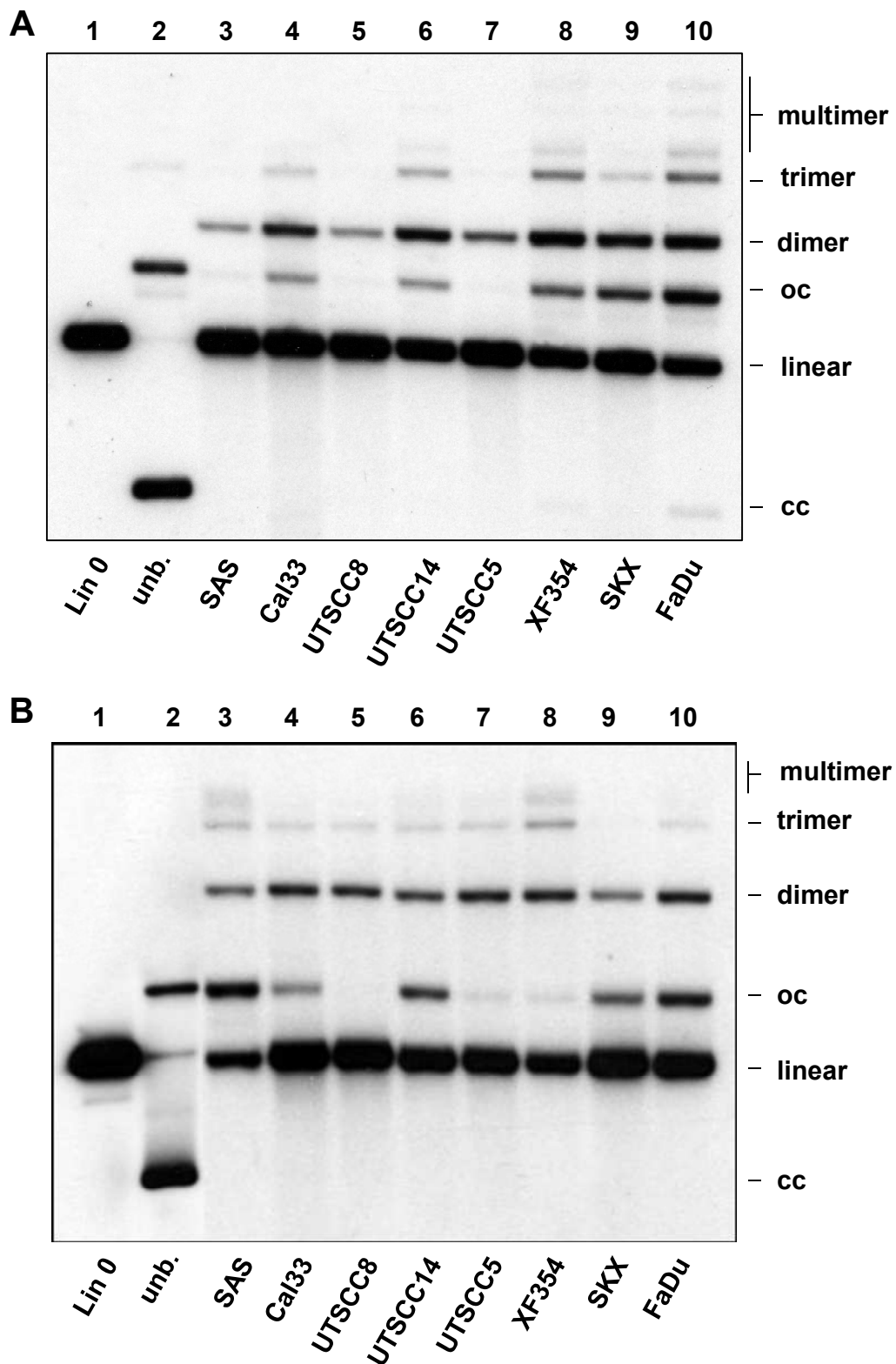
### 3.3. *In vitro* Doppelstrangbruch-Reparatur in humanen Tumorzellen

Das in dieser Arbeit etablierte *in vitro* EJ-System ermöglicht es, signifikante Unterschiede im DSB-Reparaturverhalten zwischen einzelnen Zelllinien zu erkennen. Um zu testen, ob damit auch relevante Unterschiede in der Reparatur individueller Tumorzelllinien entdeckt werden können, wurden CFEs aus 8 verschiedenen Plattenepithelkarzinom-Zelllinien des Hals-/Kopf-Bereiches hergestellt und untersucht. Als Substrate für die Untersuchung des klassischen End-Joinings wurden die linearisierten Plasmide pEJ und pEJSSA eingesetzt. Das Substrat pEJSSA wurde außerdem dazu verwendet, um festzustellen, ob die Zellen SSA als alternativen Reparaturweg verwenden. Dies könnte etwa in Fällen auftreten, in denen das klassische NHEJ nicht zur Verfügung steht und die relative Effizienz der Reparatur durch Ausweichen auf den zusätzlich möglichen Reparaturweg gesteigert oder ausgeglichen werden kann.

#### 3.3.1. Kopf-/Hals-Tumorzellen: Gesamt-Effizienz des *in vitro* End-Joinings

Um die Gesamt-Effizienz der Reparatur der acht Kopf-/Hals-Tumorzellen zu ermitteln, wurde die Reparaturreaktion nach Standardbedingungen durchgeführt und die Produkte über Southern-Blots analysiert. In Abb. 27 sind repräsentative Blots von EJ-Produkten der zwei Plasmid-Substrate pEJ (Abb. 27 A) und pEJSSA (Abb. 27 B) dargestellt. Um sicherzustellen, dass die Produkte ausschließlich durch Einwirkung des CFE entstanden sind, wurde zur Kontrolle das linearisierte Substrat nach 0 h Reparaturzeit aufgetragen (Abb. 27; Spur1, lin 0, Reaktion wurde direkt nach Zugabe des CFE gestoppt). Als Marker für die Positionen der zirkulären Plasmid-Formen wurden jeweils unbehandelte Plasmide aufgetragen (Abb. 27, Spur 2, unb.).

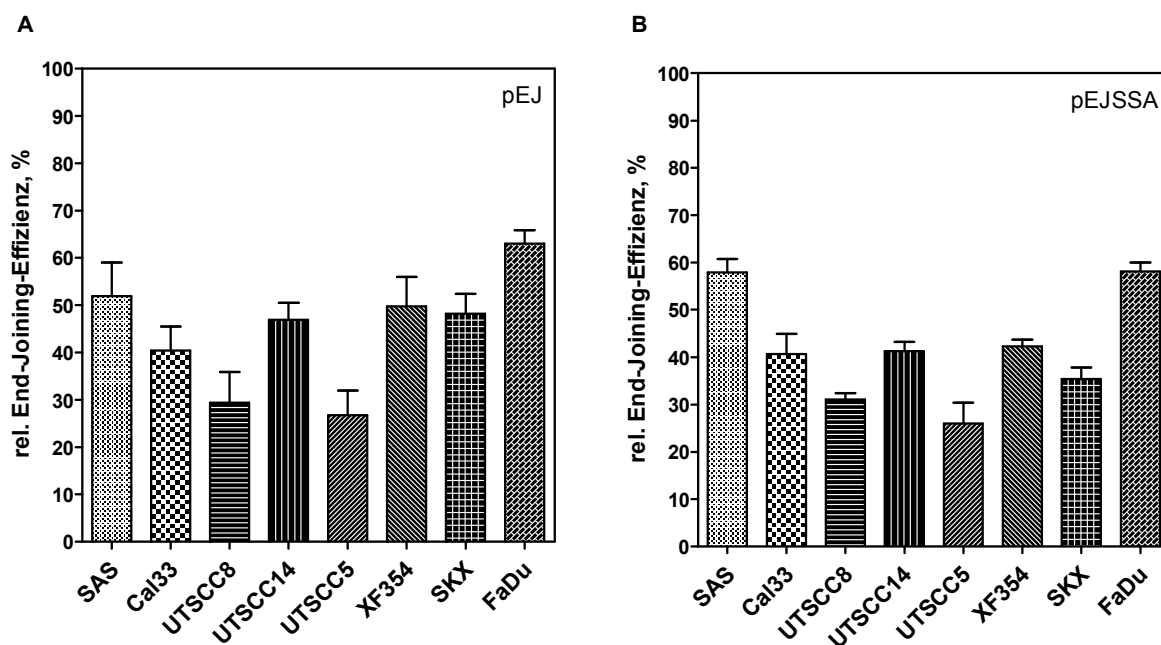
Anhand der Bandenintensitäten in Abb. 27 ist zu erkennen, dass sich die Zelllinien in ihren Produktbildungseffizienzen im Southern-Blot unterscheiden. Die einzigen Produkte, welche in allen Extrakten gebildet wurden, sind Dimere. Sie bildeten das häufigste Produkt in den EJ-Reaktionen. In den Effizienzen der Bildung dieser Dimere gab es leichte Schwankungen zwischen den Zelllinien. Tri-, Tetra- und höhere Multimere wurden weniger häufig gebildet. Der größte Unterschied war an der Bildungseffizienz der zirkulären Produktformen auszumachen (Abb. 27, oc). Hier gab es Zelllinien, die sehr wenig zirkuläre Produkte hervorbrachten (UTSCC8; UTSCC5). Diese Zellen waren allgemein schlecht in ihrer Reparaturreffizienz. Andere Zellen bildeten dagegen sehr effizient zirkuläre Produkte (FaDu, SKX, UTSCC14, Cal33). Je effizienter deren Bildung desto wahrscheinlicher war auch das Vorhandensein von höheren Multimeren.



**Abbildung 27: Tumorzelllinien unterscheiden sich in ihrer *in vitro* End-Joining-Kapazität.**

Die Southern-Blots zeigen die Produkte der End-Joining-Reaktionen in CFEs aus den angezeigten Hals-/Kopf-Tumorzelllinien. Die Reaktionen wurden unter Standard-Bedingungen durchgeführt unter Verwendung des HindIII/PstI-linearisierten Plasmids pEJ (A) und pEJSSA (B). Zur Kontrolle wurde linearisiertes (lin 0) und unverdautes (unb.) Plasmid aufgetragen. A zeigt den gleichen Blot wie in Abb. 18 mit weniger Belichtung.

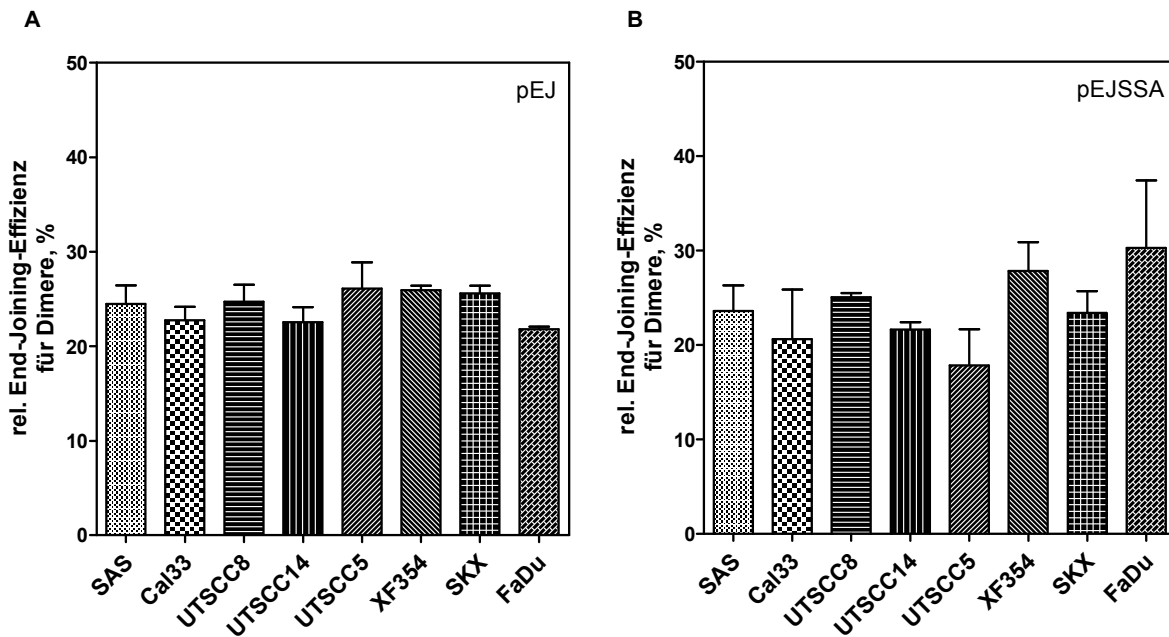
Im Vergleich der beiden Plasmid-Substrate pEJ und pEJSSA lieferten die Zellen mit beiden Substraten im Grunde ähnliche Gesamteffizienzen. Aus diesem Grund wird im Folgenden auf das Plasmid pEJSSA nur in Bezug auf die Wahl des Reparaturwegs eingegangen.



**Abbildung 28: Unterschiede in der Gesamteffizienz des End-Joinings in CFE aus Hals-/Kopf-Tumorzelllinien.**

Es wurden *in vitro* End-Joinings mit 8 verschiedenen Hals-/Kopf-Tumorzelllinien unter Verwendung der Plasmid-Substrate pEJ (A) und pEJSSA (B) durchgeführt. Die relative Gesamteffizienz des End-Joinings wurde ermittelt aus dem Quotienten des Produkt-Signals im Southern-Blot und dem Gesamtsignal (Produkte + Input). Bei diesen Daten handelt es sich um normierte Mittelwerte aus je 5 Southern-Blot-Analysen pro Plasmid.

In Abb. 28 ist die Quantifizierung (Mittelwerte aus jeweils 5 Versuchen) der relativen Gesamteffizienzen des EJs mit pEJ gezeigt. Die Extrakte variieren mit einer Bandbreite von der niedrigsten Reparatureffizienz bei UTSCC5 von 27 % bis zur höchsten Effizienz von 63 % gemessen bei FaDu. Im Gegensatz zur Gesamtreparatur unterscheiden sich die Zelllinien auffällig wenig in der Effizienz, mit der Dimere verknüpft werden (Abb. 29). Sie liegt bei allen Zellen bei ca. 24 %.

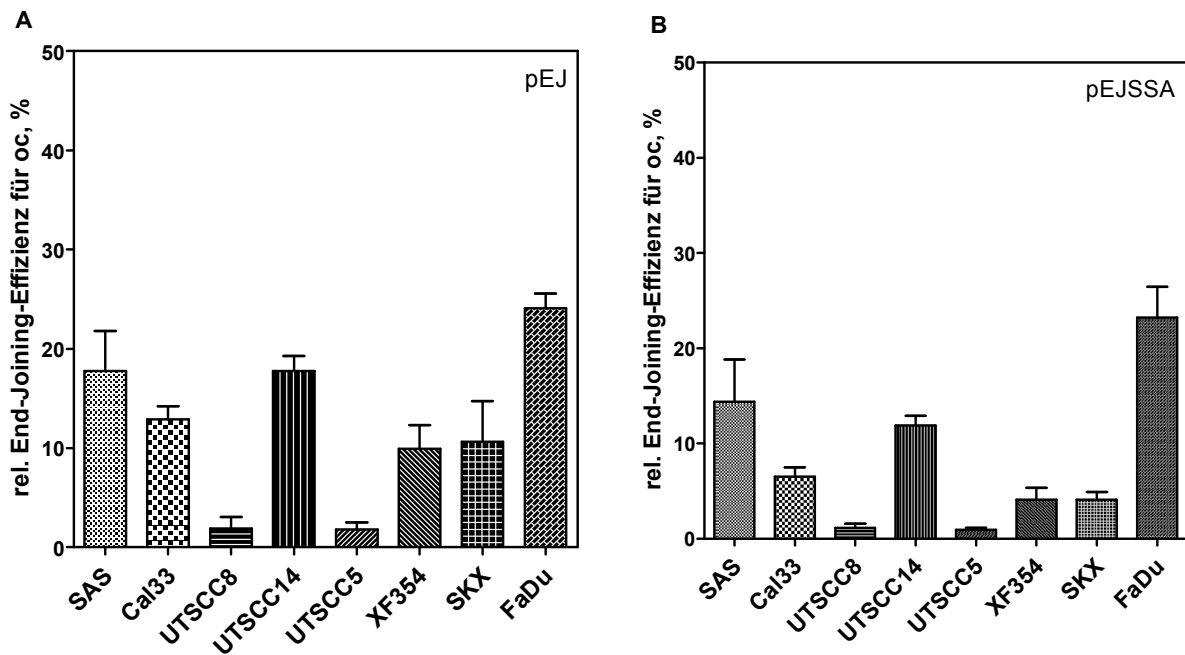


**Abbildung 29: Quantifizierung der Dimere, welche als häufigste Produkte des End-Joinings in CFE aus Hals-/Kopf-Tumorzelllinien auftreten.**

Es wurden *in vitro* End-Joinings mit 8 verschiedenen Kopf/Hals-Tumorzelllinien unter Verwendung der Plasmid-Substrate pEJ (A) und pEJSSA (B) durchgeführt. Die relative Dimer-Bildungseffizienz wurde ermittelt aus dem Quotienten des Southern-Blot Produkt-Signals (Dimere) und dem Gesamtsignal (Produkte + Input).

Obwohl die zirkulären Produkte nicht den Hauptteil des EJs ausmachen, sind besonders an ihrer Bildungskapazität die großen Unterschiede zwischen den Zellen zu erkennen. Wie vorher bereits in dieser Arbeit erläutert wurde, sind die zirkulären Produkte ausschlaggebend, da nur sie den komplexen Mechanismus des EJs und nicht nur reine Ligase-Aktivität darstellen. Die Quantifizierung dazu (Abb. 30) deckt deutliche Kapazitätsunterschiede auf. Die niedrigste Effizienz weisen UTSCC8 (1,9 %) und UTSCC5 (1,8 %) auf. Eine mittlere Effizienz ist bei XF354 (9,9 %), SKX (10,6 %) und Cal33 (12,9 %) zu finden. SAS und UTSCC14 bilden im Mittel zu 17,8 % zirkuläre Produkte, und FaDu ist mit 24,1 % am effizientesten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Tumorzelllinien deutlich in ihren Effizienzen unterscheiden, mit denen sie zirkuläre Produkte bilden. Wenig oder keine Unterschiede sind bei der Bildung von Dimeren zu erkennen. Daraus lässt sich folgern, dass sich Reparaturkapazitäten verschiedener Zellen nur anhand von zirkulären Monomeren messen lassen.



**Abbildung 30: Die Unterschiede in den End-Joining-Kapazitäten der Tumorzelllinien zeigen sich in der Bildungseffizienz für zirkuläre Produkte.**

Die Abbildung zeigt die Quantifizierung nur der zirkulären Produktsignale im Southern-Blot aus 5 *in vitro* End-Joining-Reaktionen mit den Substraten pEJ (A) und pEJSSA (B).

### 3.3.2. Single-Strand Annealing als Reparaturmöglichkeit

Die Effizienzen für zirkuläre Produkte sind bei der Verwendung von pEJSSA im Southern-Blot insgesamt niedriger als bei pEJ (Abb. 30 A und B). Bei SAS, UTSCC8 und FaDu ist diese Verringerung nur minimal. Bei den übrigen Extrakten fällt die Abnahme der zirkulären Produkte stärker aus. Bei Cal33, UTSCC5, XF354 und SKX werden sogar nur noch halb so viele Zirkel gebildet. Was der Grund für die unterschiedlichen Bildungseffizienzen zwischen pEJ und pEJSSA sein kann, ist zurzeit nicht geklärt. Allerdings ist der einzige Unterschied zwischen den beiden Plasmiden, dass pEJSSA homologe Sequenzen beidseitig des DSBs besitzt. Es könnte sein, dass diese Einfluss auf die Reparatur haben, etwa indem sie die Regulation der Reparaturwege beeinflussen, denn nur mit diesen homologen Abschnitten kommt SSA als zusätzliche Reparaturmöglichkeit in Frage.

Die Verwendung von pEJSSA als Substrat bewirkte nur bei XF354 und FaDu eine Steigerung der Dimer-Bildung (XF354: + 1,9 %; FaDu: + 8,5 %). Bei allen anderen kam es zu einer Verringerung der Dimer-Bildung (Abb. 29). Sie war am stärksten bei UTSCC5 ausgeprägt (- 8,3 %). Die größte Wirkung der Verwendung von pEJSSA war auf die zirkulären Produkte zu erkennen. Ihre Bildungskapazität verringerte sich bei Cal33,

UTSCC5, XF354 und SKX um die Hälfte oder mehr. Auch die Kapazitäten aller anderen Zellen verringerten sich (Abb. 30 B).

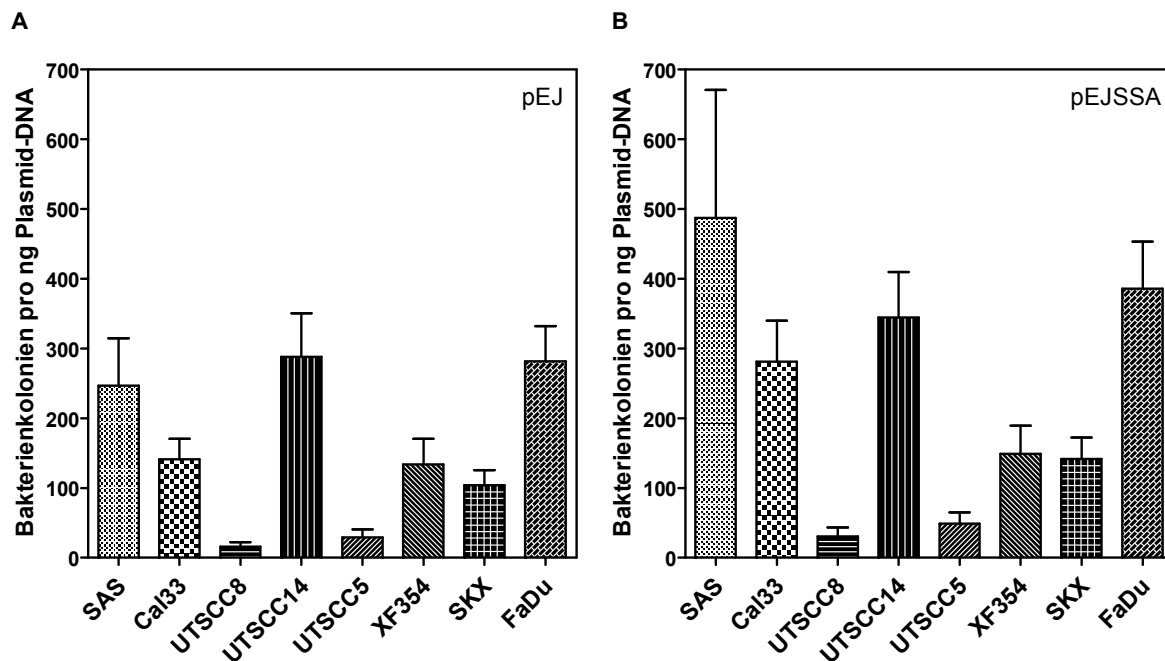
Es lässt sich also festhalten, dass diese zusätzliche Option des SSA insgesamt nicht zu einer Steigerung in der EJ-Effizienz der Tumorzell-Extrakte führt. Es ist sogar eher umgekehrt, dass es gerade bei den wichtigen zirkulären Produkten zu einer Verringerung der Effizienz kommt.

### 3.3.3. Kopf-/Hals-Tumorzellen im Transformationsassay: Bildungskapazität zirkulärer Reparaturprodukte

Wie in dieser Arbeit bereits beschrieben wurde, führen die zirkulären Produkte aus der *in vitro* EJ-Reaktion zur Koloniebildung im Transformationsassay. Es sollte überprüft werden, ob die quantitativen Unterschiede, die sich im Southern-Blot so klar darstellen, auch im Transformationsassay zu bestätigen sind. Der in dieser Arbeit entwickelte Transformationsassay ist eine hervorragende Methode, um sehr spezifisch zirkuläre Produkte aus dem *in vitro* EJ zu messen. Diese direkte Transformation der Reparaturprodukte in Bakterien wurde mit den 8 Tumorzelllinien durchgeführt. Dabei entspricht eine hohe Anzahl an Bakterienkolonien einer hohen Bildungskapazität für high-fidelity Produkte. In Abb. 31 sind die Koloniezahlen aufgetragen, die aus 1 ng eingesetztem, linearem Substrat hervorgegangen sind.

Es zeigt sich deutlich, wie unterschiedlich effizient die einzelnen Zelllinien high-fidelity Produkte bilden können. SAS (247 Kolonien), UTSCC14 (288 K.) und FaDu (282 Kolonien) weisen eine sehr hohe Koloniebildungskapazität auf. Eine mittlere Effizienz zeigt sich bei Cal33 (141 K.), XF354 (134 K.) und SKX (104 K.). Am schlechtesten können UTSCC5 (29 K.) und UTSCC8 (16 K.) zirkuläre Produkte bilden. Aufgrund der Ähnlichkeit der Ergebnisse aus Southern-Blot (Abb. 28) und Transformationsassay (Abb. 31) wurden beide Methoden direkt quantitativ verglichen. Abb. 32 zeigt, dass beide signifikant miteinander korrelieren ( $p = 0,0087$ ). Das bedeutet, dass die individuelle EJ-Gesamteffizienz, die sich in der Bildung zirkulärer Reparaturprodukte spiegelt, sowohl über die Southern-Blot-Analyse als auch über den Transformationsassay bestimmt werden kann. Die linearen Produkte sind allerdings nicht für diese Korrelation verantwortlich, da zwischen ihnen und der Transformationseffizienz kein signifikanter Zusammenhang besteht ( $p = 0,3212$ , Abb. 32 B). Werden sie in die Korrelation mit einbezogen, schwächen sie also den Zusammenhang. Tatsächlich sind die zirkulären Produktformen ausschlaggebend. Im direkten Vergleich der Effizienz für Zirkel aus dem Southern-Blot mit der Transformationseffizienz zeigt sich eine

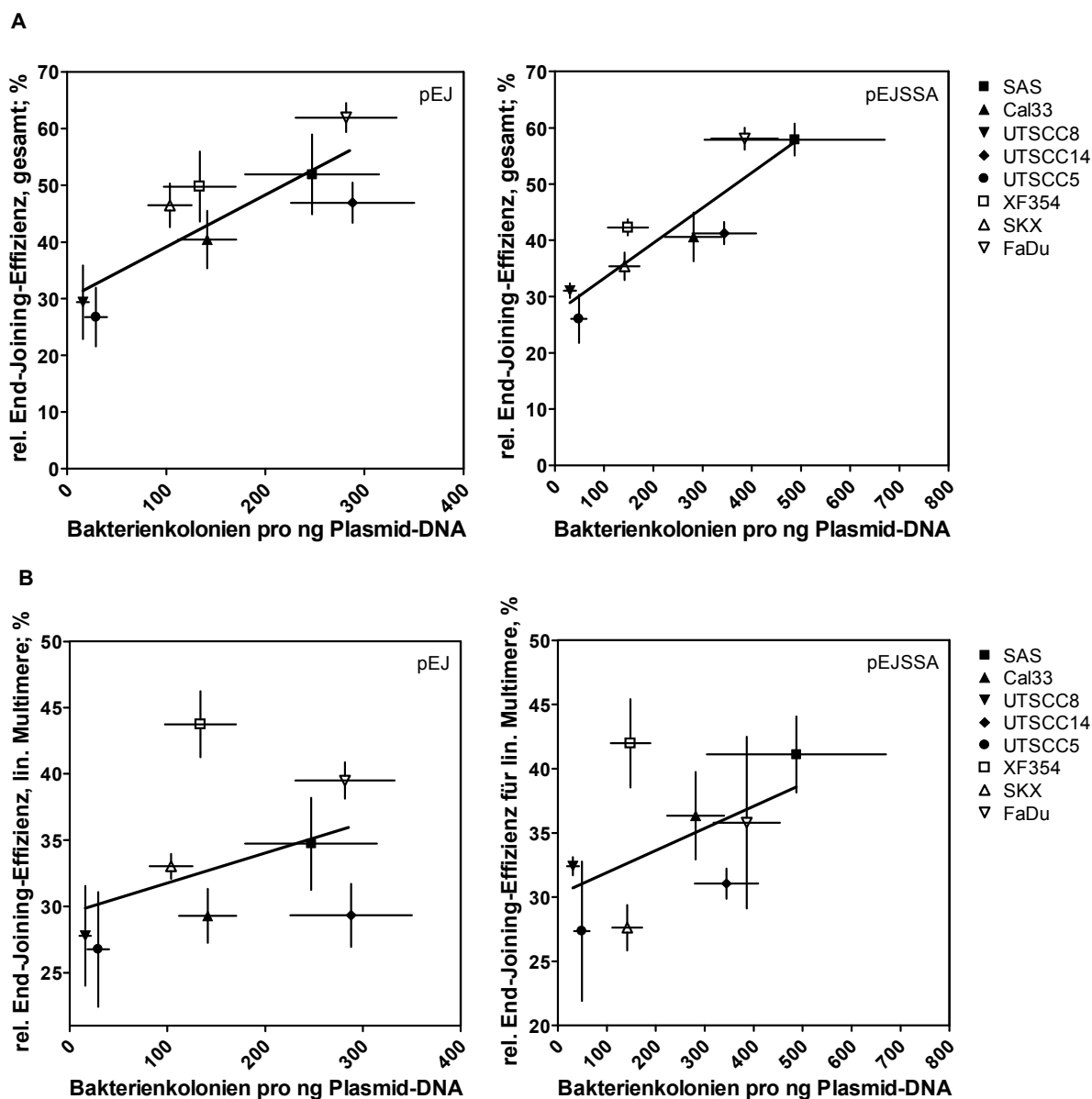
erhöhte Signifikanz von  $p = 0,0006$  (Abb. 33) im Gegensatz zur Gesamteffizient mit  $p = 0,0087$ .



**Abbildung 31: Mit Hilfe des Transformationsassays lassen sich klassische NHEJ-Kapazitäten quantitativ messen.**

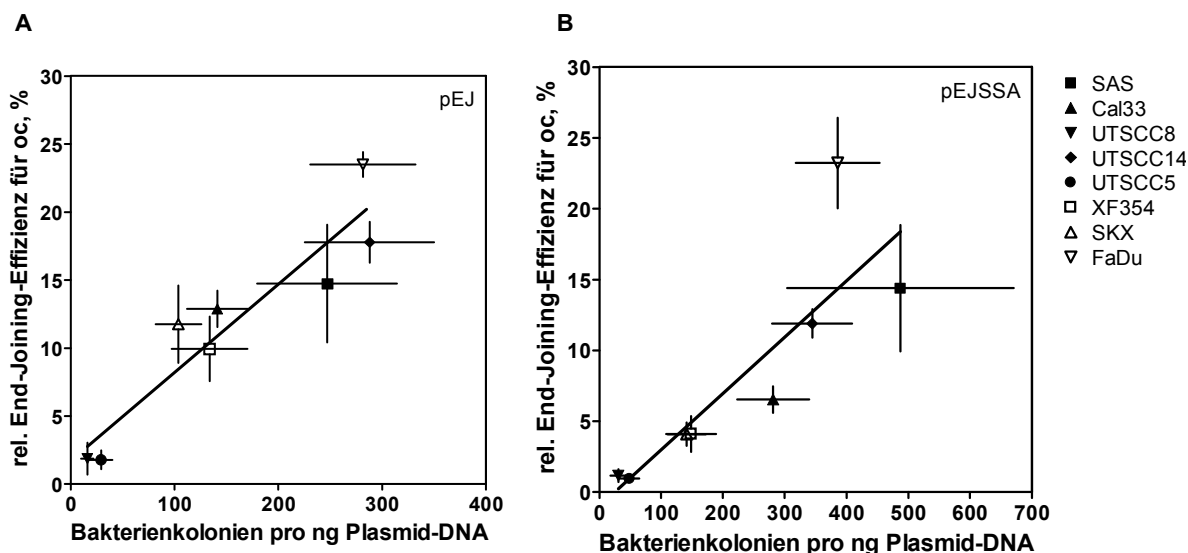
Nach dem *in vitro* End-Joining mit den Plasmid-Substraten pEJ (A) und pEJSSA (B) wurden die Reparaturprodukte dem Transformationsassay unterzogen. Dargestellt ist die Anzahl an Bakterienkolonien, die 1 ng Substrat entsprechen. Für jedes CFE und Plasmid-Substrat wurden jeweils 3 End-Joining-Reaktionen durchgeführt und für jede Reaktion mindestens zwei Transformationsassays.





**Abbildung 32: Korrelationen der End-Joining-Effizienzen ermittelt durch Southern-Blot und Transformationsassay.**

(A) Die End-Joining-Effizienzen für die Gesamtheit der Produkte aus den Southern-Blot-Analysen sind aufgetragen gegen die Koloniebildung im Transformationsassay (pEJ:  $p = 0,0087$ ,  $r^2 = 0,7093$ ; pEJSSA:  $p = 0,0022$ ,  $r^2 = 0,8125$ ). (B) Die End-Joining-Effizienzen für die linearen Multimere aus den Southern-Blot-Analysen sind aufgetragen gegen die Koloniebildung im Transformationsassay (pEJ:  $p = 0,3212$ ,  $r^2 = 0,1630$ ; pEJSSA:  $p = 0,1955$ ,  $r^2 = 0,2612$ ).



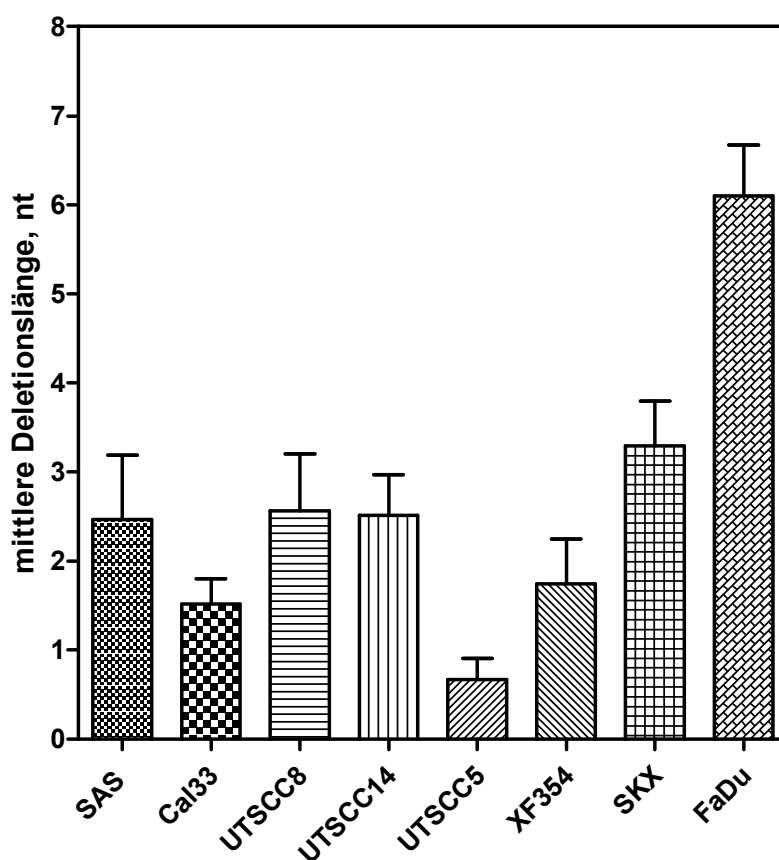
**Abbildung 33: Korrelation der End-Joining-Effizienzen aus Southern-Blot und Transformationsassay.**

Die End-Joining-Effizienzen für zirkuläre Produkte aus Southern-Blot-Analysen sind aufgetragen gegen die Koloniebildung im Transformationsassay. Für beide Plasmidsubstrate pEJ (A) und pEJSSA (B) zeigt sich ein signifikanter Zusammenhang (pEJ:  $p = 0,0006$ ,  $r^2 = 0,8764$ ; pEJSSA:  $p = 0,0066$ ,  $r^2 = 0,7338$ ).

### 3.3.4. Reparaturgenauigkeit humaner Kopf-/Hals-Tumorzellen *in vitro*

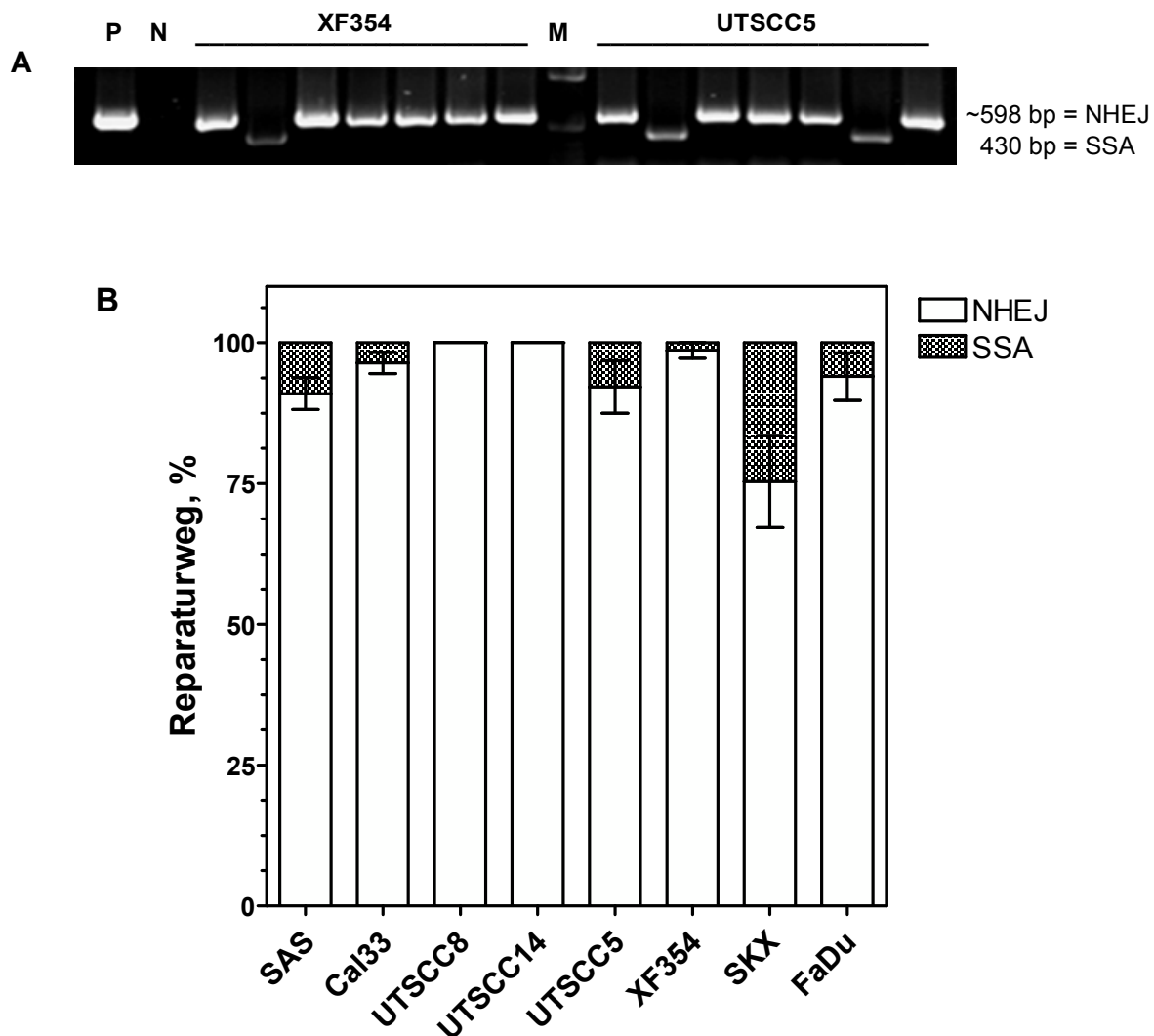
Wie schon in Abschnitt 3.1.4 beschrieben wurde, ist die Bildung von Bakterienkolonien im Transformationsassay ein Hinweis darauf, dass im CFE nicht nur Ligation sondern der Reparaturprozess des NHEJ mit all seinen Komponenten stattfindet. Die CFEs aller getesteten Tumorzellen zeigten Koloniebildung. Allerdings gab es Unterschiede in der Effizienz der Bildung zirkulärer Produkte. Es sollte überprüft werden, ob sich diese Effizienz-Unterschiede auch in der Genauigkeit der Reparatur widerspiegeln. Dazu wurden Kolonie-PCRs direkt aus den Kolonien nach dem Transformationsassay durchgeführt. Es wurden insgesamt 421 Amplifikate sequenziert und im Vergleich zur Original-Sequenz an der Bruchstelle ausgewertet. Die mittleren Deletionslängen der Tumorzellen lagen zwischen 0,67 bp (UTSCC5) und 6,1 bp (FaDu) (Abb. 34). Das bedeutet, dass Enddegradation nur selten über den Bereich der 4 Basen der einzelsträngigen Überhänge am DSB hinausgeht. Sie stellt zumeist die Prozessierung der DNA-Enden im Rahmen des klassischen NHEJ dar, um die Enden ligierbar zu machen. Eine hohe Genauigkeit weisen UTSCC5 mit 74 % und XF354 mit 72 % korrekter Reparatur ohne jeglichen Basenverlust auf. Bei SAS und Cal33 zeigen 51 % der Enden-Verknüpfungen keine Deletionen, bei UTSCC8 sind dies 53 %, bei UTSCC14 41 % und bei SKX 37 %. Das höchste Maß an unkorrekter Reparatur zeigt sich in FaDu-Zellen mit einer mittleren Deletionslänge von 6,1 bp. Nur 7% der Junctionen zeigen keinen Basenverlust. Allerdings liegen auch in FaDu-Zellen 88 % der Deletionen ausschließlich im Bereich der einzelsträngigen Überhänge.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die DNA-Enden in den Tumorzellen generell stabil sind. Eine Korrelation zwischen der EJ-Effizienz und der Reparaturgenauigkeit besteht nicht (ohne Abbildung). Das bedeutet, dass trotz teilweise niedriger Effizienz die Reparatur immer sehr genau ist. Vorherige Beobachtungen, dass Tumorzellen generell ungenau reparieren (Bentley et al., 2004; Bentley et al., 2009; Shin et al., 2006), kann hier nicht bestätigt werden. Die Genauigkeit der Reparatur betrifft in diesem Fall speziell die des NHEJ. Die Verwendung anderer Reparaturmechanismen soll im folgenden Kapitel betrachtet werden.



**Abbildung 34:** Die Deletionslängen an reparierten DSBs aus *in vitro* End-Joinings in Hals-/Kopf-Tumorzelllinien sind gering und beschränken sich auf die Überhänge an den DSBs.

Die mittleren Deletionslängen wurden ermittelt durch Kolonie-PCR der Reparaturstelle nach Transformationsassay und anschließender Sequenzierung.



**Abbildung 35: Wahl des Reparaturweges.**

(A) Unter Verwendung des Plasmids pEJSSA in der End-Joining-Reaktion wurde durch Kolonie-PCR und Agarosegel-Analyse die Verteilung der Reparaturwege ermittelt. Ein über NHEJ verknüpfter DSB führt im *in vitro* End-Joining zu einem ca. 598 bp großen PCR-Produkt. Wurde SSA als Reparaturweg verwendet, entsteht ein exakt 430 bp großes PCR-Produkt. Repräsentativ sind je 7 Kolonie-PCRs von XF354 und UTSCC5 dargestellt (SAS n=67, Cal33 n=66, UTSCC8 n=46, UTSCC14 n=50, UTSCC5 n=58, XF354 n=56, SKX n=84, FaDu n=84). P = Positivkontrolle, N = Negativkontrolle, M = Marker, 1 kb-Leiter. (B) Prozentuale Auswertung der Verwendung von NHEJ oder SSA im *in vitro* End-Joining.

### 3.3.5. Die Wahl des Reparaturweges (Pathway-Choice)

Tumorzellen weisen häufig eine erhöhte Anzahl an chromosomalen Aberrationen auf. Der Mechanismus, der zu diesen chromosomalen Veränderungen führt, ist jedoch nicht bekannt. Weil durch das EJ (umfasst klassisches und alternatives NHEJ) *in vitro* keine großen Reparaturfehler beobachtet werden konnten, sollte überprüft werden, ob stattdessen die Verwendung von SSA der Grund für das Auftreten von Fehlern ist. SSA geht immer mit großen Deletionen einher, die häufig in klinischen Tumoren gefunden werden (Bentley et al., 2004). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit getestet, ob in den Tumorzellen häufig das

fehlerhafte SSA eingesetzt wird. Dazu wurde in den Reparatur-Reaktionen wie beschrieben das Plasmid pEJSSA verwendet, welches sowohl über NHEJ als auch über SSA repariert werden kann. Dieses Plasmid wurde in unserem Labor konstruiert (Mansour et al., 2008). In dem Plasmid liegen beidseitig der Restriktionsschnittstelle homologe Sequenzen von 50 bp Länge vor. Kommt es zum SSA, so werden die 5'-Enden des DSBs reseziert. Die langen, überhängenden 3'-Einzelstränge paaren im Bereich der Homologie. Die überstehenden Einzelstränge (flap ends) werden entfernt und die bestehenden Lücken aufgefüllt. Es wird so eine Deletion von definierter Größe (168 bp) generiert. Wird die Reparaturstelle mittels PCR amplifiziert, ist der Unterschied zwischen einem NHEJ-Ereignis und einem SSA im Agarosegel optisch anhand der Bandengröße klar auszumachen (Abb. 35 A). Zur Bestätigung des SSA wurden diese Banden zusätzlich aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA aufgereinigt und sequenziert. Alle Extrakte zeigen SSA mit einer Häufigkeit zwischen 0 und 9 % (Abb. 35 B). Die SKX-Zelle weist einen außergewöhnlich hohen SSA-Anteil von 25 % auf (siehe auch Kasten-Pisula et al., 2009).

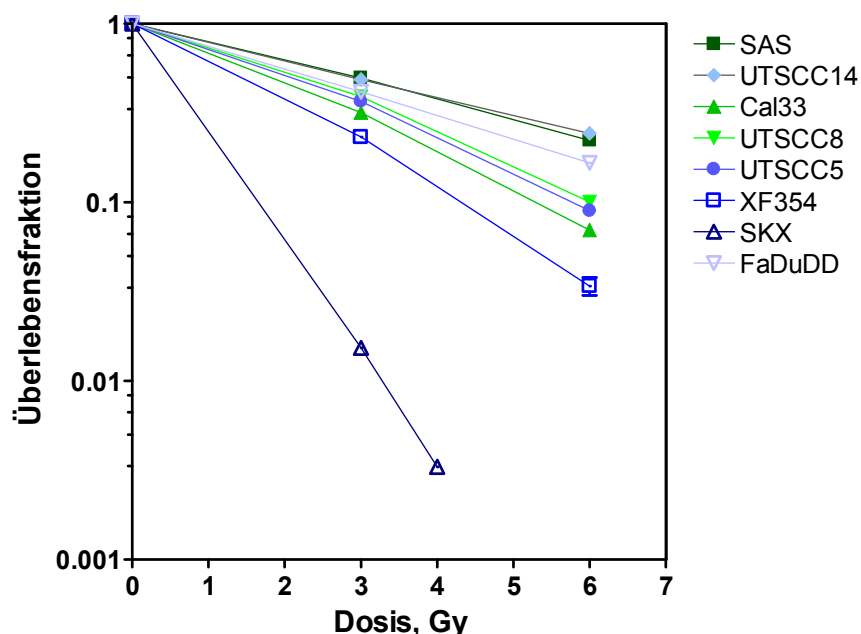
### **3.4. Strahlenempfindlichkeit humaner Kopf-/Hals-Tumorzellen *in vivo***

Der in dieser Arbeit vorgestellte *in vitro* EJ-Assay stellt einen funktionellen Ansatz dar, um zu erkennen, wie stark und warum Tumorzellen in ihrer Antwort auf ionisierende Strahlung variieren. Damit können genomische und proteomische Analysen relevant ergänzt werden. Als Methode, um die gesamte zelluläre Strahlenantwort zusammenfassend zu beurteilen, wurde der Koloniebildungstest gewählt.

Dazu wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. U. Kasten-Pisula das Zellüberleben der acht Tumorzelllinien nach Bestrahlung mit 3 und 6 Gy Röntgen im Kolonie-Test bestimmt. Die Zellen wurden kultiviert bis sie konfluent waren und wurden anschließend mit 0, 3 und 6 Gy bestrahlt. Nach Bestrahlung wurden sie für 14 h weiterkultiviert und erst danach in definierten Zellzahlen neu ausgesät. Nach einer weiteren Inkubation von ca. 14 Tagen wurden Kolonien, mehr als 50 Zellen aufwies, als überlebende Kolonien ausgezählt. Abb. 36 zeigt, dass die Strahlenempfindlichkeit der Tumorzellen stark variiert. SKX ist extrem strahlensensibel und zeigte bei 6 Gy Bestrahlung bereits keine Koloniebildung mehr. XF354 ist ebenfalls strahlensensitiv. UTSCC5, UTSCC8 und Cal33 zeigen eine mittlere Strahlenempfindlichkeit und SAS, UTSCC14 und FaDu sind relativ resistent.

Zur Untersuchung der DSB-Reparatur *in vivo* eignet sich der indirekte Nachweis eines DSBs über die immunologische Anfärbung von  $\gamma$ H2AX. Die Isoform H2AX macht ca. 10 % des

Histons H2A aus, eines der fünf Haupt-Histon-Proteine, und ist im Chromatin gleichmäßig verteilt (van Attikum et al., 2005). Nachdem ein DSB entstanden ist, werden einige Tausend H2AX-Proteine innerhalb von Minuten am Ser139 über einen Bereich von mehreren Megabasen phosphoryliert (Rogakou et al., 1998). Das phosphorylierte Histon wird  $\gamma$ H2AX genannt. Es kann mit spezifischen Antikörpern angefärbt und fluoreszenzmikroskopisch als Fokus sichtbar gemacht und ausgewertet werden. Bei der Auswertung ist der DNA-Gehalt zu beachten, der je nach Zelllinie variieren kann. Eine Zelle mit höherem DNA-Gehalt kann aufgrund ihrer Größe durch die Bestrahlung mehr Schäden erlitten haben, als eine kleinere Zelle mit geringerem DNA-Gehalt. Aus diesem Grund wird auf gleichen DNA-Gehalt normiert. Mit Hilfe dieser  $\gamma$ H2AX-Foci-Technik wurde untersucht, wie hoch die Kapazität der Zellen *in vivo* ist, DNA-DSBs zu reparieren.

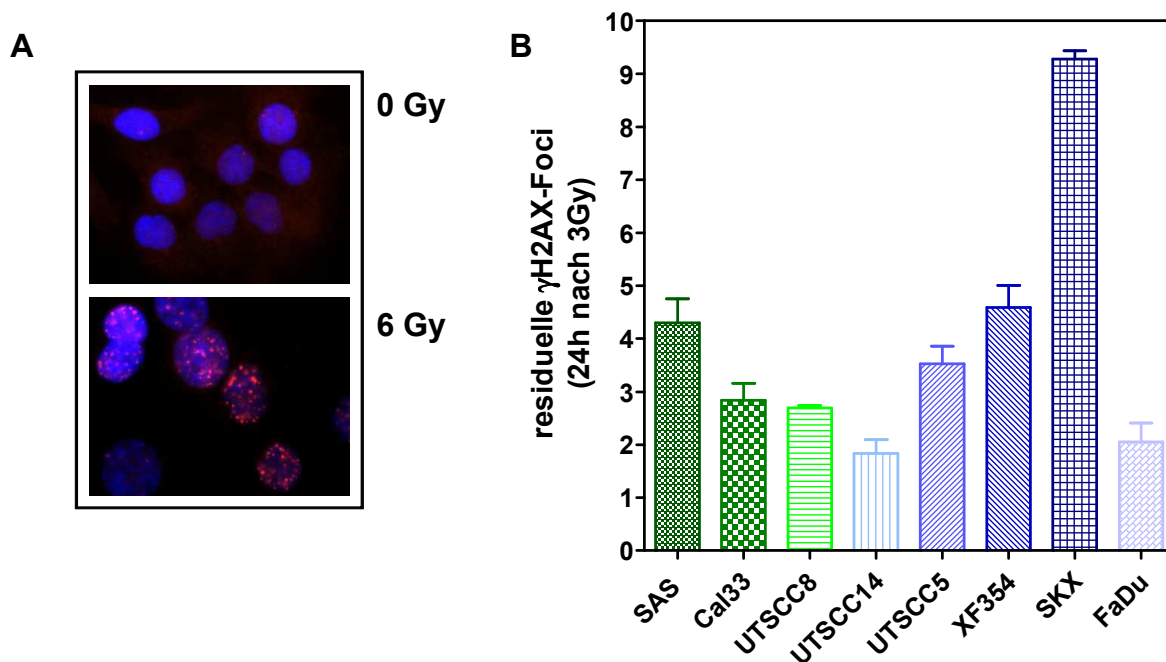


**Abbildung 36: Zellüberleben von Hals-/Kopf-Tumorzelllinien nach Bestrahlung.**

Die Überlebensfraktionen wurden anhand des Koloniebildungstests ermittelt. Die Zellen wurden im konfluenten Zustand mit den angezeigten Dosen bestrahlt, nach 14 h in definierter Zellzahl neu ausgesät und nach 14 Tagen ausgewertet (Daten in Zusammenarbeit mit Kasten-Pisula et al.).

Die Zellen wurden mit 3 Gy bestrahlt und nach 24 h Reparaturzeit fixiert. Durch Immunfluoreszenz-Färbung wurden die residuellen  $\gamma$ H2AX-Foci in rot angefärbt und die DNA des Kerns mit DNA-Farbstoff in blau gegengefärbt, so dass die einzelnen Foci ausgezählt werden konnten (Abb. 37 A). Abb. 37 B zeigt die durchschnittliche Anzahl von residuellen  $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle 24 h nach Bestrahlung mit 3 Gy. Obwohl den Tumor-Zellen durch die gleiche Dosis ionisierender Strahlung die gleiche Anzahl von Schäden zugefügt wurde, ist zu

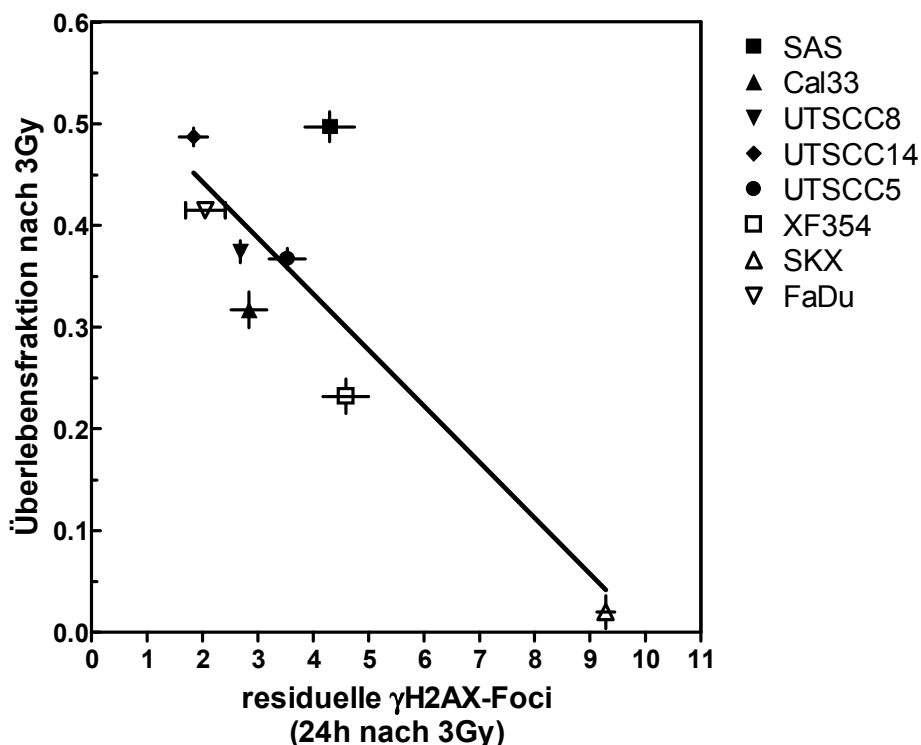
erkennen, dass nicht alle Zellen in der Lage waren, sämtliche Schäden zu beheben. Am effektivsten haben UTSCC14 mit 1,8 und FaDu mit 2,1 residuellen Foci repariert. Es folgen UTSCC8 (2,7 Foci), Cal33 (2,8 Foci), UTSCC5 (3,5 Foci), SAS (4,3 Foci) und XF354 (4,6 Foci). Die meisten unreparierten Schäden liegen nach 24 h bei SKX vor (9,3 Foci).



**Abbildung 37: Zelluläre Strahlenantwort von Hals-/Kopf-Tumorzelllinien.**

(A) Repräsentative Abbildung von  $\gamma$ H2AX-Foci in der Immunfluoreszenz. Das obere Bild zeigt die unbestrahlte Kontrolle. Auf dem unteren Bild sind residuelle Foci nach 6 Gy zu sehen. Rot:  $\gamma$ H2AX-Foci; blau: Gegenfärbung des Kerns mit DAPI. (B) Reparatur von DSBs *in vivo*. Residuelle DSBs wurden durch die  $\gamma$ H2AX-Foci-Technik 24 h nach Bestrahlung ermittelt. (Daten in Zusammenarbeit mit Kasten-Pisula et al.).

Der Vergleich von DSB-Reparatur und Zellüberleben zeigt in Abb. 38 den signifikanten Zusammenhang ( $p = 0,0077$ ) zwischen der Überlebensfraktion (3 Gy) und den residuellen  $\gamma$ H2AX-Foci (3 Gy). Diese Korrelation wird maßgeblich durch die Zelllinie SKX bewirkt, da diese eine besonders hohe Strahlenempfindlichkeit und hohe Anzahl von residuellen Foci aufweist.



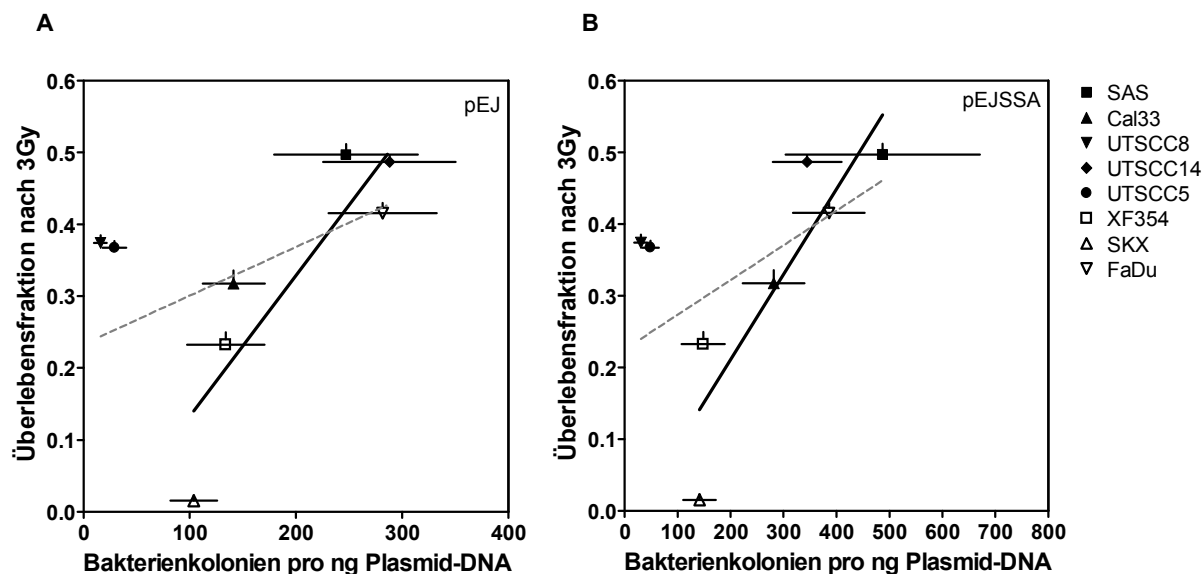
**Abbildung 38: Korrelation von Zellüberleben und residuellen  $\gamma$ H2AX-Foci nach 3 Gy Bestrahlung.**

Es wurde die Überlebensfraktion der Zellen nach Bestrahlung mit 3 Gy (ermittelt durch den Koloniebildungstest) gegen die Anzahl der residuellen  $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle aufgetragen ( $p = 0,0077$ ,  $r^2 = 0,7205$ ).

### 3.5. Korrelation von zellulärer Strahlenantwort und *in vitro* Reparaturkapazität

Nachdem das Zellüberleben und die residuellen  $\gamma$ H2AX-Foci nach Bestrahlung als Endpunkte für die *in vivo* Strahlenantwort vorlagen, haben wir gefragt, ob die DSB-Reparatur im zellfreien System der zellulären Strahlenantwort entspricht. Dazu wurde die Bakterien-Transformationseffizienz mit dem Zellüberleben verglichen (Abb. 39). Es ist ein Trend zu erkennen, der zeigt, dass je höher die Reparatur-Kapazität im Transformationsassay ist, umso höher ist auch das Zellüberleben nach Bestrahlung. Dieser Trend ist nicht signifikant (Abb. 39, grau gestrichelte Gerade). Die zwei Zelllinien UTSCC5 und UTSCC8 zeigen eine auffällig hohe Überlebensrate nach Bestrahlung. Ohne diese Zelllinien ist der Zusammenhang zwischen beiden Endpunkten signifikant ( $p = 0,0216$  für pEJ;  $p = 0,0196$  für pEJSSA; Abb. 39 schwarze Gerade).

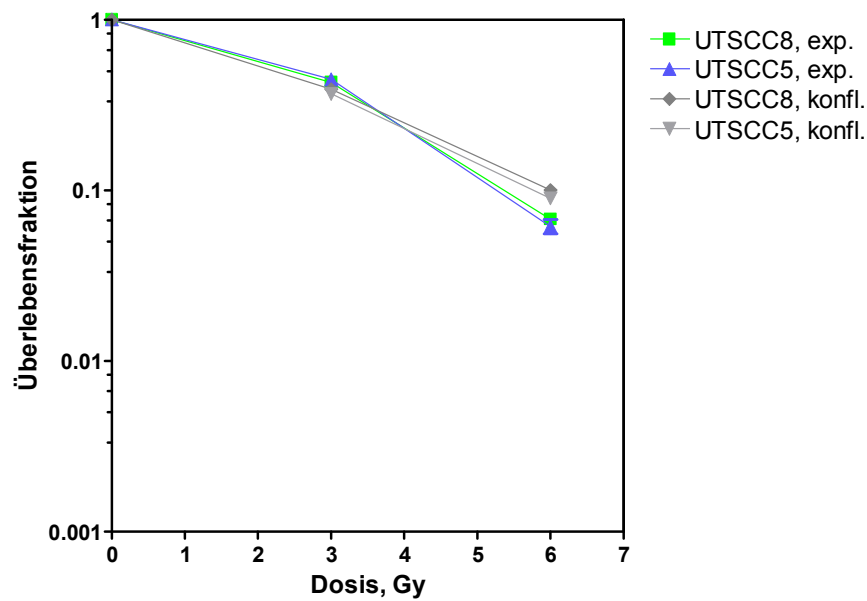




**Abbildung 39: Korrelation der Überlebensfraktion nach 3 Gy mit der Bakterien-Transformationseffizienz aus dem *in vitro* End-Joining-Assay.**

Die graue Gerade zeigt die lineare Regression aller acht Zelllinien (grau gestrichelte Gerade; pEJ:  $p = 0,2464$ ,  $r^2 = 0,2156$ ; pEJSSA:  $p = 0,1921$ ,  $r^2 = 0,2646$ ). Werden die Zellen UTSCC5 und UTSCC8 aus der linearen Regression ausgeschlossen, besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Überlebensfraktion nach Bestrahlung und der Transformationseffizienz des *in vitro* End-Joining-Assays (schwarze Gerade, pEJ:  $p = 0,0216$ ,  $r^2 = 0,7699$ ; pEJSSA:  $p = 0,0196$ ,  $r^2 = 0,7802$ ).

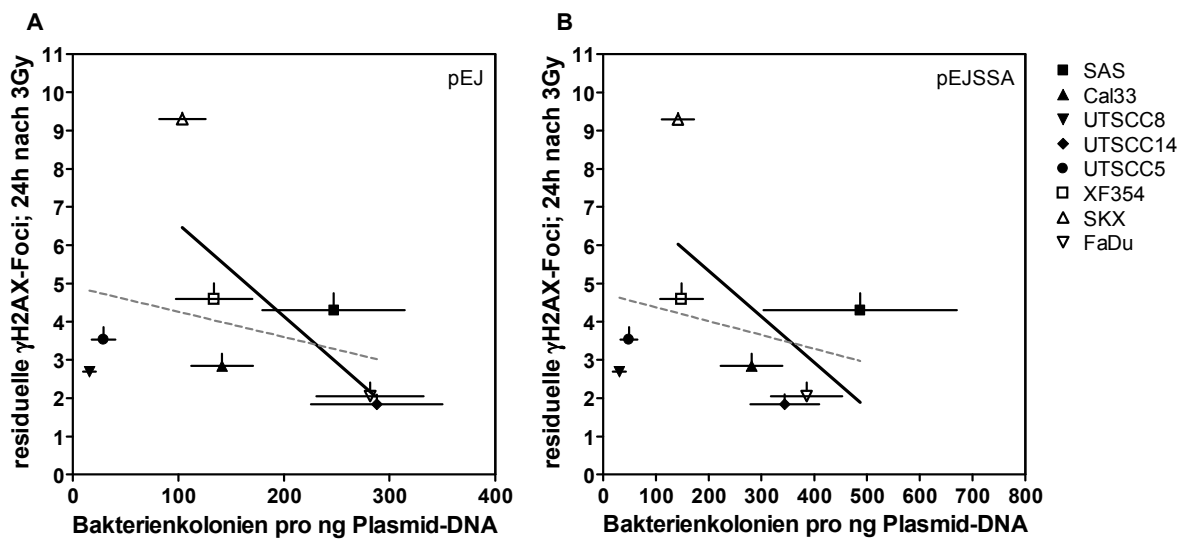
Der Grund für die hohe Strahlenresistenz könnte sein, dass diese Zellen ein besonders hohes Erholungsvermögen in der Ruhephase haben (sogenanntes „potentially lethal damage repair“, PLDR in der Konfluenz), während in der exponentiellen Wachstumsphase, in der die Proteinextrakte gewonnen wurden, das Erholungsvermögen nur gering ausgeprägt ist. Um das zu testen, wurde ein Koloniebildungstest durchgeführt, bei dem die beiden Zelllinien im konfluenten oder im exponentiellen Zustand bestrahlt wurden (Abb. 40). Der Unterschied der Überlebensfraktionen von konfluenten und exponentiell wachsenden Zellen ist nur gering. Nach 6 Gy Bestrahlung zeigen die konfluent bestrahlten Zellen eine minimal höhere Strahlenresistenz. Offenbar existieren Mechanismen, die Einfluss auf Zellüberleben und Reparaturkapazität ausüben, die aber in diesen Systemen noch nicht erfasst werden können.



**Abbildung 40: Vergleich des Zellüberlebens von konfluent und exponentiell wachsenden UTSCC8 und UTSCC5 nach Bestrahlung mit 3 und 6 Gy.**

Die Überlebensfraktionen wurden anhand des Koloniebildungstests ermittelt. Die Zellen wurden im exponentiellen und konfluenten Zustand mit den angezeigten Dosen bestrahlt und nach 14 h in definierter Zellzahl neu ausgesät. Nach 14 Tagen wurden die Kolonietests ausgewertet.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die *in vivo* Reparaturkapazität der Zelle der *in vitro* Reparaturreffizienz entspricht. Dazu wurden die residuellen  $\gamma$ H2AX-Foci gegen die Anzahl der Bakterienkolonien aus dem Transformationsassay aufgetragen (Abb. 41). Die lineare Regression der Daten ist mit  $p = 0,4762$  (pEJ) und  $p = 0,5478$  (pEJSSA) nicht signifikant. Auch in diesem Fall sind die Zelllinien UTSCC5 und UTSCC8 auffällig, da sie trotz niedriger Anzahl an residuellen Foci eine extrem schwache Bakterien-Transformationseffizienz aufweisen.



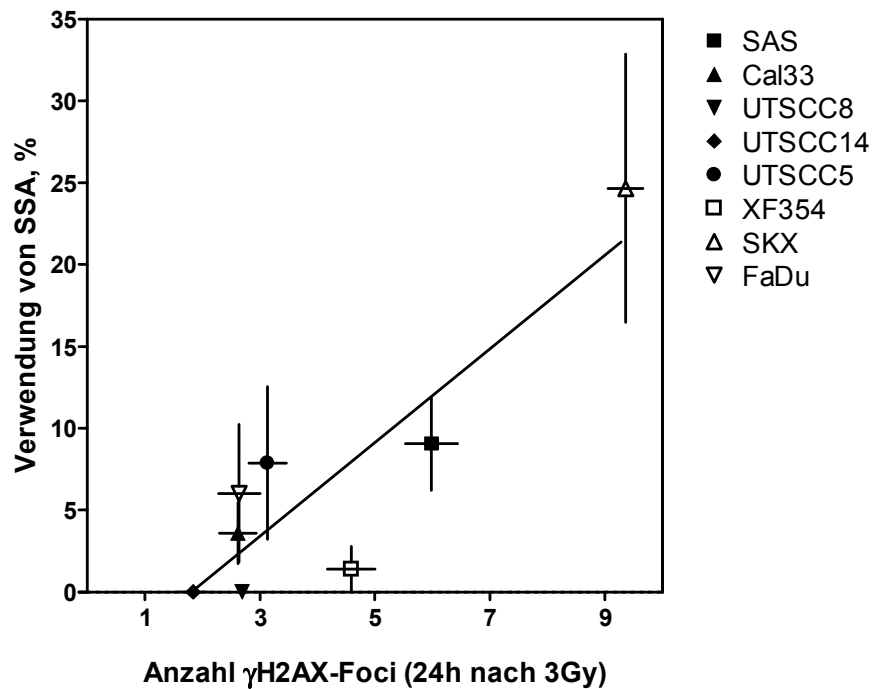
**Abbildung 41: Korrelation von residuellen  $\gamma$ H2AX-Foci 24 h nach 3 Gy mit der Bakterien-Transformationseffizienz aus dem *in vitro* End-Joining-Assay.**

Die graue Gerade zeigt die lineare Regression aller acht Tumor-Zelllinien (grau gestrichelte Gerade, pEJ:  $p = 0,4762$ ,  $r^2 = 0,08774$ ; pEJSSA:  $p = 0,5478$ ,  $r^2 = 0,06330$ ). Auch nach Ausschluss von UTSCC5 und UTSCC8 aus der linearen Regression besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen residuellen  $\gamma$ H2AX-Foci und der Transformationseffizienz des *in vitro* End-Joining-Assays (schwarze, durchgezogene Gerade, pEJ:  $p = 0,1077$ ,  $r^2 = 0,5163$ ; pEJSSA:  $p = 0,2166$ ,  $r^2 = 0,3494$ ).

### 3.6. Korrelation zwischen der Wahl des Reparaturweges und der Anzahl residueller Foci

Eine hohe Anzahl an nicht reparierten DSBs in der Zelle bedeutet, dass die Reparatur nicht stattfinden konnte. Die Gründe für die unterschiedlich hohen Zahlen an residuellen Foci sind nicht ausreichend bekannt. Da die Reparatur über das klassische NHEJ eigentlich sehr schnell abläuft, war es im Falle der residuellen Foci offenbar nicht erfolgreich. Eine hohe Rate an Enddegradation kann ein klassisches End-Joining verhindern, da lange Einzelstränge kein adäquates Substrat für NHEJ darstellen. *In vivo* kann diese anfängliche Resektion der DNA-Enden zu unreparierten DSBs führen, wenn keine geeigneten homologen Sequenzen für die Reparatur über SSA vorliegen. Durch die homologen Sequenzen in pEJSSA kann *in vitro* SSA als Reparaturmöglichkeit genutzt werden. Ob das fehlgeschlagene NHEJ oder eine erhöhte Enddegradation Auslöser für eine vermehrte Nutzung des SSA sind, ist nicht bekannt.

Es sollte also untersucht werden, ob ein Zusammenhang besteht zwischen der Anzahl an nicht reparierten DSBs und der Häufigkeit der Verwendung des SSA. Dazu wurden die Häufigkeiten des SSA gegen die Anzahl der residuellen Foci aufgetragen (Abb. 42). Der Zusammenhang, der sich daraus ergibt, ist signifikant mit  $p = 0,0034$ .



**Abbildung 42: Korrelation der Verwendungshäufigkeit von SSA *in vitro* mit der Anzahl an residuellen  $\gamma$ H2AX-Foci 24 h nach 3 Gy.**

Die Verwendungshäufigkeit von SSA wurde durch Sequenzierung der Reparaturstellen im Plasmid pEJSSA ermittelt. Es besteht ein signifikanter Zusammenhang mit  $p = 0,0034$ ,  $r^2 = 0,7840$ .

## 4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Hypothese verfolgt, dass humane Tumore sowohl in ihrer Gesamtreparaturkapazität variieren als auch im Grad der Reparaturgenauigkeit z. B. durch häufigen Gebrauch von „ungeeigneten“ Reparaturwegen, die in der Folge sowohl die genomische Instabilität als auch die Tumorempfindlichkeit (Sensitivität) bestimmen können. Das Ziel dieser Arbeit war es, einen *ex vivo/in vitro* DSB-Reparatur-Assay aufzustellen und zu validieren, mit dem die Reparatur-Quantität, Qualität und Wahl des Reparatur-Pfades in einer Reihe von humanen Kopf-/Hals-Tumor-Zelllinien untersucht werden kann. Mithilfe dieses Werkzeugs sollte getestet werden, ob Tumorzellen häufig Reparatur-Wege einsetzen, die zu fehlerhafter Reparatur führen wie alternative End-Joining-Mechanismen oder SSA. Außerdem sollte verglichen werden, ob die Effizienz und die Genauigkeit der *in vitro* Reparatur mit der zellulären Strahlenempfindlichkeit *in vivo* zu korrelieren ist.

### 4.1. Zirkuläre Produkte sind spezifisch für klassisches NHEJ

Mit Hilfe der Methode des *in vitro* End-Joining-Assays konnten viele Einblicke in den Ablauf des NHEJ und das Zusammenspiel seiner Kernfaktoren gewonnen werden. Die ersten funktionellen Reparaturuntersuchungen wurden *in vitro* mit Extrakten aus *Xenopus laevis*-Eiern vorgenommen. Es folgten Extrakte aus etablierten Säugerzelllinien. Diesen ersten *in vitro* End-Joining-Methoden ist gemeinsam, dass die Extrakte eine große Masse an Zellen als Ausgangsmaterial benötigten. So mussten Kulturen von mehr als  $8 \times 10^9$  Zellen herangezogen werden, um daraus Extrakte herstellen zu können (Baumann et al., 1998). Die sogenannte „micro-scale“ Präparation ermöglichte es, die benötigte Zellzahl auf ca.  $1 \times 10^8$  Zellen zu verringern (Diggle et al., 2003). Allerdings erbrachten Extrakte, die nach dieser Methode gewonnen wurden, meist nur mäßige Reparatureffizienzen. Die Produkte aus diesen Reaktionen bestanden aus linearen, hauptsächlich dimeren Verknüpfungen der Substrate. Es konnten keine rezirkularisierten Substrate festgestellt werden (Bentley et al., 2009; Diggle et al., 2003; Iliakis et al., 2004; Liang et al., 2008; Pastwa et al., 2005; Wang et al., 2003). In seltenen Fällen wurden Zirkel zwar beobachtet, aber weder separat quantifiziert noch auf ihre Verknüpfungsgenauigkeit untersucht (Baumann et al., 1998; Cheong et al., 1998; Perrault et al., 2004; Wang et al., 2001). Es wurde nicht und konnte nicht unterschieden werden zwischen linearen Multimerprodukten und zirkulären, monomeren Produkten. Mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten zellfreien Extrakten konnte neben linearen Produkten eine effiziente Bildung zirkulärer Produkte nachgewiesen werden. In der Southern Blot-Analyse der Reparaturreaktion konnte die Kapazität der EJ-Reaktion

insgesamt beurteilt werden. Außerdem war es möglich, die Effizienz zu quantifizieren, mit der die einzelnen Produkttypen (zirkuläre Produktformen, Dimere, Multimere) gebildet wurden.

Um festzustellen, welche dieser verschiedenen Produkte tatsächlich von funktioneller Relevanz für das klassische NHEJ sind, wurden Reaktionen mit Extrakten durchgeführt, die in Kernfaktoren des NHEJ defekt waren. Es konnte gezeigt werden, dass die Defizienz in Ku80, DNA-PKcs und LigIV dazu führte, dass keine zirkulären Produktformen mehr gebildet werden konnten. Die Verknüpfung zu linearen Dimeren und Multimeren wurde weiterhin detektiert. Lineare Multimere können also nicht verlässlich für die Effizienzbestimmung des klassischen NHEJ herangezogen werden, da sie auf alternative Reparaturwege zurückgehen müssen. Dieses Resultat wird bestätigt durch die Arbeit an Hamster-Zelllinien von Kuhfittig-Kulle et al., in der gezeigt wurde, dass lineare Multimere sowohl in NHEJ-defizienten als auch in NHEJ-profizienten Extrakten gebildet werden können. Zirkuläre Produkte konnten auch dort ausschließlich in Extrakten mit voll funktionsfähigem, klassischem NHEJ detektiert werden (Kuhfittig-Kulle et al., 2007). Das bedeutet, dass Dimere und höhergradige Multimere, die in Defektmutanten zu finden sind, auf alternative EJ-Wege zurückzuführen sind. Der Grund, warum über diese alternative Reparatur keine Zirkel gebildet werden, ist bisher nicht geklärt. Wenn die freien DNA-Enden desselben Plasmids durch Diffusion in direkte Nähe zueinander gelangen, ist es möglich, dass sie nur gegen eine gewisse Torsionsspannung, die durch die zirkuläre „Verkrümmung“ des Plasmids entsteht, von den Reparaturproteinen zusammengehalten werden können. Vermutlich ist dies nur durch die Bindung klassischer NHEJ-Komplexe möglich, während die Bindung durch alternative EJ-Proteine nicht in der Lage ist, die Enden unter dieser Strukturspannung zusammen zu halten, so dass sie vor der Ligation zu instabil ist. Zirkuläre Produkte entstehen unter den hier verwendeten Bedingungen nur durch klassisches NHEJ. Außerdem wurde durch Auswahl von DSB-Enden, die nicht einfach ligierbar waren, sondern nur durch komplizierte vorhergehende Prozessierung wieder verknüpft werden konnten, sichergestellt, dass es sich um klassisches End-Joining handeln musste, wenn es zu zirkulären Reparaturprodukten kam. Durch reine Ligation konnte es nicht zu zirkulären Produkten kommen. Dies wird bestätigt durch Arbeiten, in denen inkompatible DNA-Substrate nur mit T4-Ligase behandelt wurden. Diese nicht-komplementären Enden konnten dort nur zu linearen Produkten verschlossen werden (Thode et al., 1990).

Diese Bruchreparatur wurde *in vitro* hier erstmalig sowohl quantitativ als auch qualitativ erfasst und analysiert. Da nur zirkuläre Produkte klassisches NHEJ widerspiegeln, wurde für deren Quantifizierung und qualitative Analyse ein Transformationsassay entwickelt. Ohne

weitere Auftrennung oder Reinigung wurden alle Reaktionsprodukte – sowohl lineare als auch zirkuläre – nach kurzer Dialyse in Bakterien transformiert. Diese haben die Eigenschaft, dass sie zirkuläre Plasmide replizieren bzw. deren Gene exprimieren können. Lineare DNA wird degradiert. Der in dieser Arbeit verwendete Bakterienstamm ist defizient in RekombinaseA1 (recA1), so dass lineare Plasmide im Bakterium nicht durch Rekombination homologer Sequenzen verknüpft werden konnten. Nur die Aufnahme zirkulärer Produkte führte dazu, dass die Bakterien die Resistenz gegen das Selektionsantibiotikum ausbilden konnten. Lineare Produkte führten nicht zur Resistenzbildung. Mit Hilfe dieses Transformationsassays konnte also die Effizienz des klassischen NHEJ gemessen werden, da nur zirkuläre Produkte spezifisch für klassisches NHEJ sind und zu quantifizierbaren Kolonien führten. Über Sequenzierung nur dieser zirkulären Verknüpfungen aus den entstandenen Bakterienkolonien konnte eine präzise Aussage über die Genauigkeit des NHEJ gemacht werden.

Die Reparatur über alternative Wege in den NHEJ-defekten Zellextrakten konnte in der vorliegenden Arbeit durch Erhöhung des Magnesium-Gehaltes von 8 mM auf 18 mM in der EJ-Reaktion gesteigert werden. In LigIV-defizienten 180BR-Extrakten, die unter Standardbedingungen keine Reparatur zeigten, konnte unter erhöhtem Magnesiumgehalt eine schwache Bildung von Dimeren detektiert werden. Auch in Extrakten von MO59J, die DNA-PKcs-defizient sind, führte die Erhöhung der Magnesium-Konzentration zu einer Steigerung der EJ-Effizienz von 2 % auf 16 %. Die Produkte bestanden ausschließlich aus linearen Di- und Multimeren. In Wildtyp-Extrakten mit funktionsfähigem, klassischem NHEJ führte die Magnesium-Erhöhung dazu, dass sich zwar die Effizienz nicht wesentlich veränderte (Verringerung um 3 %), jedoch zirkuläre Produkte vollständig ausblieben. Das bedeutet, dass ein erhöhter Magnesium-Gehalt hemmend auf die Bildung zirkulärer Produkte wirkt und/oder induzierend auf alternatives EJ. Wie genau Magnesium in diesem Zusammenhang wirkt, ist bisher nicht vollständig geklärt. Als Faktoren, die am alternativen EJ beteiligt sind, konnten bisher LigIII, XRCC1 und PARP1 identifiziert werden (Audebert 2004; Wang, 2005 #1867, Wang 2006), die in der Basen-Exzisions-Reparatur (BER) involviert sind (Kubota et al., 1996; Lindahl et al., 1999; Wilson et al., 1997; Wilson, 1998). LigIII benötigt im Gegensatz zu LigIV, die bereits in pre-adenyliertem Zustand vorliegt (Robins et al., 1996), Magnesium als Kofaktor für ihre Aktivität. Bei niedrigen oder fehlenden Magnesium-Konzentrationen liegt sie offenbar in unzureichend oder nicht aktiver Form vor. Die gesteigerte Aktivität des alternativen NHEJ unter Anwesenheit von Magnesium ist jedoch keine Erklärung dafür, dass das klassische NHEJ regelrecht zurückgedrängt wird bzw. dass keine zirkulären Produkte mehr gebildet werden, wie es in MO59K-Extrakten zu beobachten war. Während des Zellzyklus schwankt die Magnesium-Konzentration im Nukleus. Strick et

al. haben beobachtet, dass die Magnesium-Konzentration in der Mitose-Phase des Zellzyklus, in der die DSB-Reparatur neben NHEJ über homologe Rekombination stattfindet, erhöht ist (Strick et al., 2001). In Zellen mit beeinträchtigten Kernfaktoren des NHEJ konnte durch Wu et al. in dieser Zellzyklusphase eine erhöhte Rate an alternativer Reparatur beobachtet werden (Wu et al., 2008b). Dies bestätigt die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung, dass das alternative EJ unter erhöhter Magnesium-Konzentration aktiver ist. Dazu ist die Arbeit von Hochegger et al. interessant, die PARP1 als Schutzfaktor der Homologen Rekombination vor der Interferenz durch Ku und LigIV beschreibt (Hochegger et al., 2006), indem Ku durch PARP1 poly-ADP-ribosyliert wird. Diese Modifikation soll die Bindung von Ku an die DNA behindern und damit die Affinität dieses Proteins zu DSBs senken. Es stellt sich die Frage, ob diese PARP1-Aktivität Magnesium-abhängig ist, was bisher nicht ausdrücklich untersucht worden ist und genauer Klärung bedarf. Zusammengenommen könnte dies ein Grund für den Rückgang zirkulärer Produkte in NHEJ-profizienten Zellen unter erhöhter Magnesium-Konzentration sein. Um zu überprüfen, ob PARP1 die Zirkelbildung unter erhöhten Magnesium-Konzentrationen hemmt, müssten die EJ-Reaktionen unter Einfluss eines PARP-Inhibitors wiederholt werden.

#### 4.1.1. Alternatives End-Joining wird durch Ku70/80 behindert

In dieser Arbeit wurden sowohl NHEJ-profiziente als auch –defiziente CFEs auf ihre EJ-Effizienz und -Genauigkeit getestet. Es sollte untersucht werden, ob mit der Methode des *in vitro* EJ-Assays verlässlich die Reparatur über klassisches NHEJ dargestellt und die Verwendung alternativer EJ-Varianten nachgewiesen werden kann. Außerdem sollte die Auswahl des Reparaturweges zwischen NHEJ und SSA analysiert werden.

Die quantitative und qualitative Bestimmung des EJs in verschiedenen CFEs konnte über Southern-Blot-Analyse den Einfluss des Fehlens von Kernfaktoren des NHEJs auf die Gesamt-Effizienz des EJs darstellen. So führte die Abwesenheit des Faktors DNA-PKcs zu einer Reduktion der Gesamt-Effizienz um 33 % (von 46 % im MO59K-CFE (Wildtyp) auf 13 % im MO59J-CFE (DNA-PKcs-def.)). Diese Beobachtungen werden bestätigt durch Arbeiten, in denen mit DNA-PKcs-defizienten CFEs oder mit Inhibitoren gegen DNA-PKcs gearbeitet wurde (Baumann et al., 1998; Kuhfittig-Kulle et al., 2007). Jedoch zeigt die 13%ige Reparatureffizienz in den MO59J-CFEs, dass ein DNA-PKcs-unabhängiger Reparaturweg existiert, der auch dann EJ zulässt, wenn klassisches NHEJ nicht arbeiten kann. In der Literatur wird diese Art der Reparatur als „alternatives End-Joining“ bezeichnet (back-up, B-NHEJ) (Iliakis et al., 2004; Wang et al., 2003).



Die Wichtigkeit der DNA-Enden für die *in vitro* Reparatur bzw. für die Aussage, die über deren Produkte getroffen werden kann, wird häufig nicht ausreichend beachtet. In einigen Arbeiten anderer Arbeitsgruppen wurde beschrieben, dass entgegen der hier gewonnenen Erkenntnis trotz NHEJ-Defektes nicht immer eine Reduktion der EJ-Effizienz beobachtet werden konnte (Iliakis et al., 2004; Perrault et al., 2004; Wang et al., 2003; Wang et al., 2001). Dort wurde mit Extrakten aus 180BR und MO59J gearbeitet, welche auch in dieser Arbeit verwendet wurden. Jedoch wurde das Plasmid-Substrat mit nur einem Restriktionsenzym linearisiert, so dass kompatible, überhängende DSB-Enden entstanden. Für die Verknüpfung dieser Enden sind nicht alle NHEJ-Faktoren erforderlich, sondern im Prinzip nur Ligase-Aktivität, die effizient zu Produktbildung führt. Belegt wird dies dadurch, dass die Verknüpfung solcher Enden allein durch T4-Ligase-Aktivität möglich ist (Thode et al., 1990). Dies ist eine Bestätigung dafür, dass es sich bei einem Großteil der linearen Produkte in diesen Arbeiten mit kohäsiven DNA-Enden nicht ausschließlich um NHEJ-Ereignisse handeln kann sondern um Produkte, die durch Ligase-Aktivität entstanden sind. Um diese rein auf Ligation beruhende Reparatur in der vorliegenden Arbeit ausschließen zu können, wurden im Hauptteil der Experimente 5'- und 3'-Überhänge an den Bruchenden kombiniert, so dass diese einzelsträngig aneinanderstießen, also nicht überhängend und nicht komplementär waren.

In vielen Arbeiten mit zellfreien Systemen wird in Zellen mit Defekten des klassischen NHEJ immer noch EJ beobachtet. Diese Verknüpfungen führen (bei inkompatiblen DSB-Enden) ausschließlich zu linearen Produkten (Feldmann et al., 2000; Iliakis et al., 2004; Kuhfittig-Kulle et al., 2007; Liang et al., 2008). So ist der Unterschied zwischen einem Ku80-defizienten (*xrs5*) und Wildtyp-CFE (CHO-K1) in der vorliegenden Arbeit nicht allein anhand der EJ-Effizienz erkennbar, sondern vor allem an der Art der entstandenen Produkte. Tatsächlich war die Effizienz im Ku80-defizienten CFE gegenüber der im Wildtyp-CFE nicht zwangsläufig reduziert wie in DNA-PKcs-defizienten CFEs, sondern sogar leicht erhöht (Abb. 24), was auch in Arbeiten anderer Arbeitsgruppen beobachtet werden konnte (Kuhfittig-Kulle et al., 2007; Labhart, 1999a, Labhart, 1999b; Mansour et al., 2008; Wang et al., 2003). Zirkuläre Produkte blieben jedoch aus. Das bedeutet, dass die Effizienz in diesen CFEs auf einen alternativen, Ku-unabhängigen Reparaturweg zurückgeht. Allein die Fähigkeit zur Bildung zirkulärer Produkte fehlt.

Der Unterschied zwischen den Effizienzen von DNA-PKcs- (MO59J) und Ku80-defizienten (*xrs5*) Extrakten zeigt, dass bei Anwesenheit von Ku80 (MO59J) alternative Reparaturwege offenbar schlechter ablaufen und behindert werden. Ist Ku nicht vorhanden ist die EJ-Effizienz in NHEJ-defekten Extrakten erhöht. Diese Beobachtung wird bestätigt durch Plasmid-basierte *in vivo* EJ-Analysen in Ku-pro- und -defizienten Zellen sowie in DNA-PKcs-

defizienten Zellen, in denen mit PARP1-Inhibitoren gearbeitet wurde (Wang et al., 2006). Diese Inhibitoren hatten in Ku-profizienten Zellen keinen Einfluss auf die EJ-Effizienz, da die Zellen die enzymatischen DSBs über klassisches NHEJ reparierten. Ku-defiziente Zellen waren in ihrer Gesamteffizienz verringert, was auf die geringere Effizienz des alternativen EJs zurückgeführt werden kann. Diese verringerte Effizienz konnte durch PARP1-Inhibitoren um weitere 60 % reduziert werden, was die Beteiligung von PARP1 an dieser Reparatur impliziert. In Zellen mit einem Defekt in DNA-PKcs, in denen aber Ku vorhanden ist, konnte keine weitere Reduktion des EJs durch die Inhibitoren erreicht werden. Dies spricht für einen spezifischen inhibitorischen Effekt von Ku auf PARP1 vermitteltes EJ. Dies geht darauf zurück, dass Ku eine ca. 10fach höhere Affinität zu DSB-Enden aufweist als PARP1 (Ariumi et al., 1999; Wang et al., 2006) und so die Rekrutierung von PARP1 für alternative Reparaturwege limitiert wird.

Mit LigIV-defizienten CFEs (180BR) konnte in der vorliegenden Arbeit so gut wie keine EJ-Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 23 und 24). Erst nach Erhöhung des Magnesium-Gehaltes in der EJ-Reaktion konnte eine minimale Effizienz von 1,5 % erreicht werden. Da LigIV in diesem Extrakt nicht vorliegt, müssen andere Ligasen für die minimale EJ-Aktivität verantwortlich sein. Neben LigIV existieren in Säugetieren die DNA-Ligasen LigI und LigIII. LigI ist hauptsächlich beteiligt an der finalen Verknüpfung der diskontinuierlichen Stränge, die während der DNA-Replikation entstehen (Okazaki-Fragmente) und an der Ligation des neu synthetisierten Bereichs während der Basen-Exzisions-Reparatur (Prigent et al., 1994; Timson et al., 2000). LigIII wurde in Zusammenhang mit XRCC1 beschrieben (Caldecott et al., 1994) und versiegelt Einzelstrangbrüche während der Basen-Exzisions-Reparatur (Timson et al., 2000). Daneben ist sie wie oben bereits beschrieben ein Faktor des alternativen EJs (Wang et al., 2005). Wang et al. konnten zeigen, dass die EJ-Effizienz in LigIV<sup>-/-</sup>-Zellen um 70 % reduziert wird, wenn zusätzlich LigIII herunterreguliert wird. Dies weist darauf hin, dass nicht LigI sondern LigIII die fehlende NHEJ-Aktivität ersetzt.

Die niedrige EJ-Effizienz in 180BR-Extrakten steht im Gegensatz zu Beobachtungen einer anderen Arbeitsgruppe mit LigIV-defizienten Extrakten (Wang et al., 2001). Dort konnte eine ähnliche Effizienz wie in Wildtyp-Extrakten bei Reaktionsbedingungen von 10 mM Magnesium erzielt werden. Allerdings handelte es sich beim dort verwendeten Substrat um ein mit dem Restriktionsenzym Sall linearisiertes Plasmid. Die komplementären DNA-Enden konnten ohne weitere Prozessierung auch ohne LigIV ligiert werden. Durch die Reduktion des Magnesium-Gehalts auf 0,5 mM konnte dort die Beteiligung anderer Ligasen ausgeschlossen werden, da kaum noch EJ-Aktivität detektierbar war. Für die in dieser Arbeit erzielte niedrige EJ-Aktivität in 180BR-CFEs ist nicht die Magnesium-Konzentration sondern die Struktur der DNA-Enden ausschlaggebend. Durch die Anwesenheit von Ku und DNA-

PKcs am DSB-Ende wurde die Reparatur bereits in Richtung NHEJ geleitet. DNA-PK rekrutiert Nukleasen zu den Bruchenden, die ligierbare Strukturen schaffen sollen. Nach Prozessierung der Enden sollte LigIV diese verknüpfen (Budman et al., 2007). Die Rekrutierung von LigIV bleibt jedoch erfolglos, so dass die DNA-Enden offen bleiben, durch Ku, DNA-PKcs und andere prozessive Enzyme besetzt sind und somit nur schlecht zugänglich für Komponenten des alternativen Reparaturwegs sind. Adachi et al. konnten *in vivo* zeigen, dass sich eine Defizienz in LigIV dramatischer auf das Zellüberleben nach Bestrahlung auswirkt als eine Defizienz in Ku70 (Adachi et al., 2001). Interessanterweise konnte die Reparatur von LigIV-defizienten Zellen sogar verbessert werden, wenn gleichzeitig Ku70 fehlte. Das kann so interpretiert werden, dass Ku im Komplex zusammen mit DNA-PKcs in LigIV<sup>-/-</sup> Zellen die DNA-Enden durch seine höhere Bindungsaffinität blockiert und keine Reparatur möglich ist. Erst wenn Ku depletiert oder herunterreguliert wird, steht der Weg in alternatives EJ offen (Wang et al., 2006). Im *in vitro* EJ-Assay wirkt sich dieser Effekt als niedrige bzw. fehlende Effizienz aus (Abb. 23, Spur 2). Adachi folgerte in seiner Arbeit, dass Ku-abhängiges NHEJ spezifisch LigIV benötigt, die bei Vorhandensein von Ku nicht durch andere Ligasen (I und III) ersetzt werden kann. Dies bestätigt die Beobachtungen im vorliegenden *in vitro* EJ-Assay, dass auch die Anhebung des Magnesium-Gehaltes in 180BR-CFEs nur zu einer geringfügigen Steigerung der Effizienz führt. Dieses Resultat zeigt neben dem Umstand, dass in Anwesenheit von Ku kein effektives alternatives EJ möglich ist (s.o.), auch dass im klassischen Weg LigIV nicht durch andere Ligasen ersetzbar ist (Folie 18 Spur 3). Die Funktion von LigIV ist also essentiell für klassisches NHEJ.

Trotz funktionierendem NHEJ in normalen humanen Fibroblasten bleibt deren EJ-Effizienz weit unter der der Nagetier-Fibroblasten CHO-K1 (Abb. 24; 4,5 % im Vergleich zu 27 % in CHO-K1-CFEs). In einigen Arbeiten wurde beschrieben, dass humane Zellen typischerweise höhere Raten an DNA-Reparatur aufweisen als Nager-Zellen (Anderson et al., 1996; Ayene et al., 2005; Daza et al., 1996; Lieber et al., 2004; Ludwig et al., 1997). Auch die DNA-PK-Aktivität wird in menschlichen Zellen als 50-mal höher beschrieben als in Hamster- und anderen Nager-Zellen (Anderson et al., 1992; Finnie et al., 1995; Labhart, 1999b; Walker et al., 1985). Man hätte also erwartet, dass humane Fibroblasten zumindest eine ähnlich hohe EJ-Effizienz aufweisen würden wie CHO-K1. Es gibt zurzeit keine Erklärung für diese Beobachtung. Möglicherweise herrscht in den CHO-K1-Extrakten ein besseres stöchiometrisches Verhältnis zwischen den einzelnen EJ-Faktoren, das das NHEJ besser balanciert und somit effektiver ablaufen lässt als in humanen Fibroblasten.

#### 4.1.2. Das Fehlen klassischer End-Joining-Komponenten beeinträchtigt die Reparaturgenauigkeit

Für die Effizienz der DSB-Reparatur ist nicht nur der quantitative Aspekt, wieviele Brüche repariert werden, von Bedeutung, sondern auch der qualitative Aspekt mit welcher Genauigkeit/Sequenztreue sie wieder verschlossen werden. Im zellfreien System entspricht eine korrekte Reparatur der Wiederherstellung der Basensequenz des Substrates wie sie vor dem DSB war. In dieser Arbeit konnte durch den Vergleich von verschiedenen Reparatur-profizienten und -defizienten CFEs gezeigt werden, in welchem Umfang sich die Defizienz des NHEJ im *in vitro* EJ-Assay auf die Reparaturgenauigkeit auswirkt.

Die Abwesenheit von Ku begünstigt offenbar den Zugang alternativer Reparaturwege zu den DNA-Enden, da die Reparatureffizienz nicht wesentlich vermindert war (Abb. 24). Diese alternative Reparatur zeigte jedoch eine hohe Fehleranfälligkeit. Die Deletionslänge lag im Median bei 29 bp im Vergleich zu 0 bp im Wildtyp. Dieses Ergebnis wird bestätigt durch Arbeiten *in vivo*. Schulte-Uentrop et al. konnten in Ku80<sup>-/-</sup>-MEFs eine mittlere Deletionslänge von 30 bp ermitteln (Schulte-Uentrop et al., 2008). Die ungenaue Reparatur wurde auch *in vitro* beobachtet. So wurde in Extrakten aus xrs6-Zellen (Ku70<sup>-/-</sup>) kein einziger Bruch korrekt verknüpft im Vergleich zu 17 bis 45 % korrekten Verknüpfungen im Wildtyp (Kuhfittig-Kulle et al., 2007).

Das Fehlen einer funktionellen DNA-PKcs hatte einen milderen Effekt. Trotz Reduktion in der EJ-Effizienz zeigte sich kaum ein Unterschied in der Reparaturgenauigkeit im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 25 A und B). Dieses Ergebnis wird bestätigt durch Untersuchungen in DNA-PKcs<sup>-/-</sup> XR-C1-Extrakten, die im Vergleich zum Wildtyp-Extrakt aus CHO-K1 nur eine leicht verringerte Genauigkeit aufwiesen (Kuhfittig-Kulle et al., 2007). Dort wird angenommen, dass DNA-PKcs nur einen geringen Einfluss auf die Genauigkeit des EJs hat. Ein weiterer Grund für die geringfügige Degradation der Enden kann sein, dass das vorhandene Ku die Enden in gewissem Rahmen vor Nukleasen schützen kann, bis (weitere) Reparatur einsetzt, etwa indem Ku auch ohne die Anwesenheit von DNA-PKcs den XRCC4/LigIV-Komplex an die DNA-Enden rekrutieren und so die Verknüpfung stattfinden kann (Nick McElhinny et al., 2000). Somit ist DNA-PKcs nicht essentiell ausschlaggebend für die Reparaturgenauigkeit.

Die Anhebung des Magnesium-Gehalts führte sowohl in den DNA-PKcs-profizienten als auch -defizienten Extrakten zu einer Erhöhung der medianen Deletionslänge von 0,5 bp auf 6 bp (MO59K) bzw. 8 bp. (MO59J). Das bedeutet, dass trotz Ku-Anwesenheit in beiden Fällen die Reparatur weniger korrekt ablief. Das zeigt, dass die günstigeren Bedingungen für LigIII-abhängige Reparatur in den DNA-PKcs<sup>-/-</sup>-CFEs zu einer Erhöhung der Degradation geführt haben und die alternative Reparatur fehleranfällig ist. Die Zunahme der Deletionen in den DNA-PKcs-profizienten CFEs ist dagegen unerwartet. Obwohl das klassische NHEJ als

eine sehr schnelle und akkurate Reaktion gilt, wird sie durch den erhöhten Magnesium-Gehalt offenbar in der Weise beeinflusst, dass alternative Reparaturwege verstärkt Zugriff auf die DNA-Enden erlangen können (Baumann et al., 1998; Wang et al., 2003; Zhong et al., 2002). Wie beschrieben, könnte unter diesen Bedingungen die Affinität von Ku70/80 zur DNA herabgesetzt sein, weil dieser Komplex von PARP1 poly-ADP-ribosyliert wird (Hochegger et al., 2006; Li et al., 2004).

Die Defizienz in LigIV zeigte die größten Auswirkungen auf die Effizienz des *in vitro* EJs. Es wurden so gut wie keine Enden verknüpft (Abb. 23 und 24), so dass unter Standardbedingungen keine Reparaturereignisse auf ihre Genauigkeit untersucht werden konnten. In DT40-Zellen konnte gezeigt werden, dass die LigIV-Defizienz eine hohe Strahlenempfindlichkeit bewirkt. Die geringe Überlebensrate nach Bestrahlung könnte durch die hohe Anzahl an unreparierten DSBs oder ein hohes Maß an fehlerhafter Reparatur bedingt sein. Die hohe Anzahl unreparierter DSBs konnte im zellfreien Extrakt als nicht vorhandene EJ-Reaktion bestätigt werden. Die wenigen Verknüpfungereignisse, die unter erhöhtem Magnesium-Gehalt erzielt wurden, wiesen eine hohe Degradation der DNA-Enden auf (Abb. 25 B und 26). Es ist also davon auszugehen, dass in diesem Fall Ku keine Enden-stabilisierende Funktion hat, die zu genauer Reparatur führt. Die Bindung von Ku und die erfolglose Rekrutierung von LigIV zu den DNA-Enden führen zu dauerhaft unverschlossenen Enden. Weder die überstehenden einzelsträngigen Enden können durch fill-in durch Polymerase  $\lambda$  aufgefüllt werden, noch kann es zur finalen Ligation kommen (Lee et al., 2004; Lee et al., 2003). Nur ein Bruchteil von unbesetzten Enden steht der Prozessierung durch alternative Reparaturwege offen. Dies ist in guter Übereinstimmung mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die zeigten, dass in LigIV<sup>-/-</sup>-Extrakten nur minimales EJ stattfand (Kuhfittig-Kulle et al., 2007), welches unterbunden werden konnte, indem LigIII depletiert wurde (Wang et al., 2005).

#### **4.1.3. Transformationsassay zur Effizienzbestimmung des klassischen NHEJ**

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden vorgestellt, um die Reparaturkapazitäten von CFEs zu untersuchen. Der Southern-Blot hat die Eigenschaft, die Gesamtkapazität der Reparatur widerzuspiegeln. An ihm lassen sich sowohl die Effizienz der Reaktion wie auch die Qualität in Bezug auf die verwendeten Reparaturwege ablesen. Ausschlaggebend für eine korrekte Reparatur sind nur die zirkulären Produkte, die spezifisch mit dem Transformationsassay nachgewiesen konnten. Es wurde gezeigt, dass eine

Korrelation zwischen der Gesamteffizienz der Southern-Blot-Ergebnisse und dem Transformationsassay besteht, diese sich aber hauptsächlich durch die exzellente Übereinstimmung zwischen der open circle (oc) Produktform und der Anzahl an Bakterienkolonien im Transformationsassay ergibt. Im Southern-Blot hat sich gezeigt, dass es schwierig ist, die kovalent geschlossenen (cc) Produktformen deutlich darzustellen. Im Gegensatz dazu zeigt sich die oc-Form klar sichtbar. Die Testung der Transformationseffizienzen der kovalent geschlossenen und der offenen Zirkel zeigte für beide Plasmid-Formen gute Ergebnisse (Abb. 20 B - D). Dabei lag die Effizienz der cc-Form deutlich über der der oc-Form. Obwohl im Southern-Blot nur selten die cc-Produktbande zu detektieren war, zeigte sich im Transformationsassay trotzdem immer eine gute Transformationseffizienz. Es ist deshalb davon auszugehen, dass die überwiegende Anzahl der Bakterienkolonien auf die oc-Produkte zurückzuführen ist.

## **4.2. Das Verhältnis von *in vitro* End-Joining-Kapazität und zellulärer Strahlenempfindlichkeit**

Neben chirurgischen Maßnahmen stellt die Strahlentherapie für viele Tumorentitäten die entscheidende therapeutische Option dar, um eine lokale Tumorkontrolle zu erreichen. Bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches, die aufgrund ihrer Lokalisation oder wegen des Zieles „Organerhalt“ inoperabel sind, ist die Strahlenbehandlung die bevorzugte Therapie. Diese Tumorentität ist im Allgemeinen durch eine moderate Strahlenempfindlichkeit gekennzeichnet. Jedoch zeigt sich trotz gleicher Entität und gleichem Behandlungsprotokoll eine sehr heterogene Strahlenantwort der Tumoren. Unter den Faktoren, die die Strahlenantwort bestimmen, wird die zelluläre Strahlenempfindlichkeit generell als einer der wichtigsten Parameter erachtet (Deacon et al., 1984; West et al., 1997). Bisher konnte die zelluläre Strahlenempfindlichkeit über den sehr zeitintensiven Koloniebildungstest in Zellkultur bestimmt werden. Es sollte an Kopf-/Hals-Tumorzellen untersucht werden, ob die Methode des zellfreien *in vitro* EJ-Assays die zelluläre Strahlenantwort widerspiegeln kann.

### **4.2.1. *In vivo* - Die zelluläre Strahlenempfindlichkeit der Hals-/Kopf-Tumorzellen hängt von der Anzahl der residuellen $\gamma$ H2AX-Foci ab**

Nach Bestrahlung in Zellkultur zeigten die getesteten Tumorzellen sehr unterschiedliche Überlebensraten. So bewegte sich die Überlebensfraktion nach 3 Gy zwischen 1,5 % (SKX)

und 49,7 % (SAS; Abb. 36). Vergleichbare Unterschiede fanden sich für die DSB-Reparaturkapazität, gemessen als residuelle  $\gamma$ H2AX-Foci 24h nach Bestrahlung (1,8  $\gamma$ H2AX-Foci in UTSCC14 bis 9,3 Foci in SKX). Beide Faktoren als Parameter für die Strahlenantwort zeigten zueinander eine signifikante, negative Korrelation ( $p = 0,0077$ , Abb. 38). Das Zellüberleben sank mit steigender Anzahl an residuellen DSBs. Das deutet also wie in vielen Voruntersuchungen darauf hin, dass die Effizienz, DSBs zu reparieren, ein ausschlaggebender Faktor für die Strahlenempfindlichkeit ist.

Dieser Zusammenhang zwischen der Anzahl residueller DSBs und der zellulären Strahlenempfindlichkeit wurde bestätigt durch Untersuchungen an konfluent wachsenden Fibroblasten (Dikomey et al., 2000a). Dort wurden verschiedene experimentelle Bedingungen beschrieben, die die Empfindlichkeit auf Strahlung stark beeinflussen, wie Aussaatbedingungen während der Tests und nach der Bestrahlung sowie Zellzyklusverteilung. Der Zusammenhang zwischen Überlebensfraktion und residuellen DSBs erreichte nur dann Signifikanz, wenn für den Koloniebildungstest wie in der vorliegenden Arbeit die Methode des „delayed Platings“ anstatt des „immediate Platings“ verwendet wurde. Das bedeutet, dass die Zellen nach Bestrahlung nicht sofort, sondern erst nach 14 h Kulturzeit neu ausgesät wurden. Die experimentellen Bedingungen haben also einen bedeutsamen Einfluss auf die Ergebnisse der Strahlenempfindlichkeit. Analog wurde festgestellt, dass ein deutlicher Unterschied zwischen den Überlebensfraktionen exponentiell oder konfluent wachsender Zellen bestand. So wurde durch Dikomey et al. beschrieben, dass die Überlebensfraktionen von Fibroblasten im exponentiellen Wachstum und im konfluenten Zustand nicht korrelierten (Dikomey et al., 2000b; Johansen et al., 1994). Zellen, die in der exponentiellen Phase bestrahlt wurden, waren empfindlicher als Zellen, die durch die Kontaktinhibition in der G1-Phase bestrahlt wurden. Der Grund für die erhöhte Sensitivität exponentiell wachsender Zellen liegt darin, dass unreparierte DSBs während der Mitose dazu führen können, dass die Segregation der beschädigten Chromosomen gestört abläuft und es zur mitotischen Katastrophe kommt, so dass die Zellen inaktiviert werden (Castedo et al., 2004; Vakifahmetoglu et al., 2008). Dieser Aspekt ist für die vorliegende Arbeit von Bedeutung, da das Wachstum von Tumorzellen im Gegensatz zu dem von Fibroblasten nicht der Kontaktinhibition unterliegt (Abercrombie, 1979) und Tumorzellen deswegen nicht zwangsläufig durch Konfluenz in der G1-Phase des Zellzyklus so wie Normalzellen synchronisiert werden können. Es wurde für die hier durchgeführten Arbeiten davon ausgegangen, dass durch die Konfluenz sich lediglich der überwiegende Teil der Tumorzellen in der G1-Phase befindet.

In der Literatur scheint es jedoch nicht eindeutig geklärt zu sein, ob in jedem Fall ein signifikanter Zusammenhang zwischen Zellüberleben und residuellen DSBs besteht. Es gibt Arbeiten, die die Korrelation von Strahlenempfindlichkeit und residuellen DSBs bestätigen

(Kasten-Pisula et al., 2005; Kelland et al., 1988; Klovov et al., 2006; Schwartz et al., 1988) und wiederum andere, die dem widersprechen (Olive et al., 1994; Yoshikawa et al., 2009). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit der Anzahl residueller DSBs ein Maß für die zelluläre Strahlenempfindlichkeit besteht.

#### 4.2.2. *In vitro* - Zirkuläre Produkte als Indikator für effizientes NHEJ

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die zellfreien Extrakte der Tumorzellen unterschiedliche Gesamt-Effizienzen des EJs von 26 % (UTSCC5) bis 63 % (FaDu) aufwiesen (Abb. 28) und sich dabei vor allem in der Menge bestimmter Reparaturprodukte unterschieden. Im Southern-Blot konnten neben linearen Dimeren, die in allen Extrakten das Hauptprodukt darstellten, auch lineare Multimere quantifiziert werden. Als die entscheidenden Produkte, die ein effizientes EJ darstellen, konnten allerdings die zirkulären Monomere identifiziert werden. Nur diese Produktform ist charakteristisch für klassisches NHEJ da EJ-Mutanten etwa über einen alternativen Ku-unabhängigen Reparaturweg keine zirkulären Produkte bilden können. Separate Quantifizierung von zirkulären Produkten und linearen Multimeren im Southern-Blot zeigte, dass sich die Unterschiede zwischen den Tumor-Zelllinien genau in der Fähigkeit, zirkuläre Produkte zu bilden, manifestieren (Abb. 30) und nicht in der Bildung von Dimeren. Zwar stellten Dimere mit 24 % das Hauptprodukt der EJ-Reaktion dar, die Unterschiede zwischen den Zelllinien waren jedoch extrem klein (Abb. 29). Dagegen zeigten sich bei der Zirkel-Bildung größere Differenzen. Die effizienteste Bildung von Zirkeln fand in FaDu mit bis zu 24 % statt. Eine sehr geringe Kapazität für klassisches NHEJ zeigten UTSCC5 und UTSCC8, die Effizienzen zwischen 0,95 und 1,87 % aufwiesen, was einer gewissen Defizienz des klassischen NHEJ entspricht. Das bedeutet, dass sich die Tumorzellen nicht in ihrer Fähigkeit für alternatives EJ, sondern in ihrer Kapazität für klassisches NHEJ unterscheiden. Da in allen Tumorzellen zirkuläre Produkte gebildet wurden, liegt jedoch kein absoluter Defekt im klassischen End-Joining vor, wie er in Ku-defizienten Zellen zu finden ist.

Es existieren keine vergleichbaren Arbeiten, in denen Kopf-/Hals-Tumorzellen mit der hier verwendeten zellfreien Methode untersucht wurden. Allerdings gibt es Arbeiten, in denen Tumorzellen oder –Gewebe anderer Entitäten mit zellfreien Systemen untersucht wurden. Dort bezieht sich häufig die Quantifizierung der Produkte nur auf lineare Multimere, da zirkuläre Produkte so gut wie nicht gebildet bzw. nachgewiesen werden konnten (Bentley et al., 2004; Diggle et al., 2003; Pastwa et al., 2005; Shin et al., 2006). Es wird dort nicht zwischen beiden Produkttypen unterschieden. Außerdem kann nicht ausgeschlossen



werden, dass die Reparaturprodukte nur durch Ligation gebildet wurden. Es werden Plasmide mit komplementären oder *blunt*-Enden verwendet, die nicht eindeutig ein klassisches NHEJ widerspiegeln. Eine Ausnahme ist die Arbeit von Bentley et al. (Bentley et al., 2004). Dort wurden neben kompatiblen, 3'-überhängenden Enden auch nicht-kompatible Enden verwendet. Die Quantifizierung erfolgte dort jedoch nur indirekt über PCR, da die Effizienzen sehr gering waren und unterhalb der Sensitivität der Detektion mit Sybr Green im Agarosegel lagen. Auch mit dieser Methode konnte nicht zwischen zirkulären und linearen Produkten unterschieden werden.

Um spezifisch das klassische NHEJ ohne Beeinflussung durch alternative Reparaturwege sowohl quantitativ als auch qualitativ erfassen und beurteilen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit die Methode des Transformationsassays entwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Assay vergleichbare Ergebnisse für die EJ-Effizienzen liefern konnte wie die Detektion über einen Southern-Blot. Beide Methoden zeigten eine signifikante Korrelation (Abb. 32 A). Diese Korrelation wurde nicht durch lineare Multimer-Produkte bestimmt (Abb. 32 B), sondern durch die zirkuläre Produktform (Abb. 33). Der Transformationsassay stellt also eine gute Alternative zum Southern-Blot dar, um die Effizienz des NHEJ im zellfreien Extrakt zu bestimmen.

Ein Transformationsschritt während der Aufarbeitung der EJ-Produkte wurde auch in früheren Arbeiten durchgeführt (Kuhfittig-Kulle et al., 2007; North et al., 1990). Jedoch diente die Transformation bei Kuhfittig-Kulle et al. nur der Vorbereitung der Reparaturprodukte auf die anschließende Restriktionsanalyse und Sequenzierung, um qualitativ eine Aussage über die Reparaturgenauigkeit treffen zu können. Es wurde keine Quantifizierung der zirkulären Produkte vorgenommen. Bei North et al. fand eine Quantifizierung der zirkulären Produkte durch Transformation der EJ-Produkte und Auszählen der Bakterienkolonien statt. Vor der Transformation wurden dort die Reparaturprodukte über Phenol/Chloroform aufgereinigt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dabei größere Multimerkomplexe vollständig präzipitieren, kleinere zirkuläre Monomere im geringeren Maße und sich damit das Verhältnis zwischen den Reparaturprodukten zu Ungunsten der „korrekten“ Reparatur verschieben kann. Da für die Reparatur in diesem Fall ausschließlich komplementäre Enden erzeugt wurden, könnte die Endverknüpfung allein auf Ligation beruhen und damit ebenfalls kein klassisches NHEJ widerspiegeln.

#### 4.2.3. Humane Kopf-/Hals-Tumorzelllinien zeigen überwiegend hochgradig korrekte Reparatur

Durch die Untersuchung der Hals-/Kopf-Tumorzellen auf ihre Reparaturgenauigkeit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich die Deletionslängen an den DNA-Enden während der DSB-Reparatur maximal auf die Länge der überhängenden einzelsträngigen Enden beschränken. Sie lagen im Mittel zwischen 0,67 bp bei UTSCC5 und 6,1 bp bei FaDu. Damit zeigten die Tumorzellen keine Auffälligkeiten ihrer DSB-Reparatur dahingehend, dass sie etwa ungenauer als in Normalzellen abläuft. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu der Auffassung, dass Tumorzellen im Allgemeinen eine fehleranfälligeren Reparatur aufweisen.

So zeigte eine frühere Arbeit, dass Tumorzellen im Vergleich zu Normalzellen einen hohen Grad an Deletionen aufwiesen (Shin et al., 2006). Normalzellen zeigten dort keine anormale Produktbildung. Die dort untersuchten Hals-/Kopf-Plattenepithelkarzinom-Zellen (HNSCC) zeigten mit 2 - 72,8 % eine geringere Rate an korrektem NHEJ im Vergleich zu normalen humanen oralen Keratinozyten. Die verwendeten Substrate enthielten enzymatisch erzeugte DSBs mit kohäsiven oder *blunt*-Enden. Anders als in der vorliegenden Arbeit konnten also Verknüpfungen nur durch Ligation nicht ausgeschlossen werden. Die Quantifizierung der Produkte wurde mittels PCR-Amplifikation und Quantifizierung der Produktbanden im Agarosegel durchgeführt. Dadurch konnte keine Unterscheidung zwischen zirkulären und linearen Produkttypen getroffen werden. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, sind die am häufigsten gebildeten Produkte in einer *in vitro* EJ-Reaktion Dimere. So wurden in der Shin-Arbeit wahrscheinlich hauptsächlich diese Dimer-Verknüpfungen amplifiziert und ausgewertet. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass Dimere nicht eindeutig dem NHEJ zugeordnet werden können und eher alternativen Reparaturwegen entsprechen, die als fehleranfällig gelten. Nur die zirkulären Produkte sind relevant für die Aussage über ein effizientes und korrektes NHEJ. In der Shin-Arbeit wurde gezeigt, dass ein Mikrohomologie-vermitteltes End-Joining (MEJ) ausschließlich in den Tumorzellen in 3 – 65 % der Reparaturereignisse, nicht aber in normalen Zellen stattfand. Diese Beobachtung ungenauer Reparatur würde zu der Annahme passen, dass dort hauptsächlich Dimere, also alternative Reparatur und nicht klassisches NHEJ untersucht wurde. Daraus kann man schließen, dass die untersuchten Tumorzellen in höherem Maße alternative Reparaturwege verwenden als Normalzellen. Eine Aussage über die Genauigkeit des klassischen NHEJ konnte dort nicht eindeutig getroffen werden. Die Genauigkeit und Effizienz dieses Reparaturwegs ist jedoch entscheidend für das Überleben der Zelle, da er für die Reparatur des Großteils der in der Zelle auftretenden DSBs verantwortlich ist.

In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass die Reparatur von kohäsiven und glatten DNA-Enden in Hirn- und Blasen-Tumor-Zellen fehleranfälliger als in normalem Gewebe abläuft

(Diggle et al., 2003). Auch hier konnten trotz kohäsiver DNA-Enden keine zirkulären Produkte nachgewiesen werden. Die Untersuchung der Reparaturgenauigkeit erfolgte durch Verdau der Produkte mit genau dem Restriktionsenzym, mit welchem auch das Reparatursubstrat zuvor linearisiert worden war. In vielen Fällen konnte das Reparaturprodukt nicht vollständig geschnitten werden, was auf einen Fehler bei der Ligation, etwa durch Deletion von ein oder mehr Basen hinweist. Eine Aussage über die Deletionslängen wurde nicht getroffen.

Ein ähnliches Resultat wurde in der Arbeit von Bentley et al. beschrieben. Dort wurde die Reparatur in humanen Blasen-Tumorzellen untersucht. Es wurde festgestellt, dass diese fehlerhafter reparierten und MEJ nutzten (Bentley et al., 2004). Auch dort konnten keine zirkulären Produkte erfasst werden. Die ausschließlich linearen Produkte der Blasen-Tumor-Extrakte zeigten keine einzige, korrekte Verknüpfung inkompatibler DNA-Enden. Auch bei dieser Reparatur handelte es sich möglicherweise nicht um klassisches NHEJ, da die Effizienz sich nicht durch Einsatz von Wortmannin oder durch Depletion von Ku80 oder XRCC4-Protein reduzieren ließ. Die Reparatur war also DNA-PKcs-, Ku- und XRCC4-unabhängig.

Diese Arbeiten konnten zeigen, dass in Tumorzellen ein gewisses Maß an fehlerhafter Reparatur stattfindet. Bei den dort untersuchten Reparaturwegen, handelte es sich vermutlich nicht um klassisches NHEJ, sondern eher um alternative Reparaturwege. Für das Zellüberleben ist jedoch vor allem ein effizientes und korrektes klassisches NHEJ ausschlaggebend, da hierüber der Großteil der DSBs repariert wird. NHEJ zeigt sich nur durch die Bildung zirkulärer Produkte, die bisher in keiner der vorherigen Arbeiten untersucht und quantifiziert wurden.

Neben der Reparatur über End-Joining spielen Homologie-vermittelte Reparaturwege wie die homologe Rekombination bei der Beseitigung von DSBs eine große Rolle. Diese läuft immer fehlerfrei ab. Dagegen ist das *Single-Strand Annealing* (SSA) ein mutagener Prozess, der zu großen Deletionen und Translokationen führen kann, die vielfach mit humanen Krebserkrankungen in Zusammenhang stehen (Elliott et al., 2005; Strout et al., 1998; Weinstock et al., 2006). Um zu prüfen, ob neben dem klassischen NHEJ das fehlerhafte SSA in Hals-/Kopf-Tumorzellen von Bedeutung ist, wurde in der vorliegenden Arbeit das *in vitro* EJ mit pEJSSA durchgeführt. Mit Ausnahme einer Zelllinie lag die Rate an SSA zwischen 0 und 9,1 %, während über 90% der Reparatur über EJ ablief. Damit spielte SSA eine eher untergeordnete Rolle in den Tumorzellen, vergleichbar mit der Rate von 2 - 6 % in anderen Normalzellen (Belmar-Campos, 2010; Mansour et al., 2008). Klassisches NHEJ blieb der Haupt-Reparaturweg zur Entfernung der DSBs. SKX zeigte eine erhöhte SSA-Rate mit 24,7 %. Solche Werte wurden in anderen Arbeiten *in vivo* bisher nur dann gemessen, wenn

Beeinträchtigungen der Reparaturmechanismen vorliegen. In *xrs5*-Zellen, die defizient in Ku80 sind, wurde von Mansour et al. eine Verwendung von SSA von 20,1 % gemessen. Dieser Wert war um das 8-fache höher als in den Wildtyp-Zellen CHO-K1 mit 2,4 % (Mansour et al., 2008). Diese Daten lassen vermuten, dass in SKX ein Defekt eines Reparaturweges vorliegen könnte. Tatsächlich konnte die Defizienz in einem wichtigen Faktor der DNA-Schadenserkennung, der Serin-Proteinkinase ATM, in dieser Zelllinie nachgewiesen werden, die auf die Überexpression der gegen ATM-gerichteten microRNA miR421 zurückgeht (Mansour et al., unveröffentlichte Daten). Obwohl SKX *in vivo* eine extrem hohe Strahlenempfindlichkeit aufweist, scheint die ATM-Defizienz quantitativ wenig Auswirkungen auf das klassische NHEJ *in vitro* zu haben. SKX-Zellen zeigen eine normale Expression der NHEJ-Kernfaktoren und *in vitro* ein effizientes EJ. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass das Fehlen von ATM *in vivo* dazu führt, dass Brüche im Heterochromatin nicht repariert werden können. Die notwendige Chromatin-Relaxation bleibt durch die fehlende ATM-vermittelte Phosphorylierung von KRAB assoziiertem Protein 1 (Kap1) aus (Ziv et al., 2006). Dies führt zur Steigerung der Strahlenempfindlichkeit *in vivo*. Im zellfreien System liegt die Substrat-DNA jedoch „nackt“, also nicht Chromatin-assoziiert vor. Es besteht keine Notwendigkeit der Relaxation, da der DSB auch ohne ATM frei zugänglich für die Reparaturproteine vorliegt. Somit kann diese Komponente des ATM-defektes *in vitro* nicht erfasst werden. Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass ATM zusammen mit XRCC4 und dem „XRCC4-like Factor“ (XLF oder „Cernunnos“) die Genauigkeit des klassischen EJ reguliert (Bennardo et al., 2010; Zha et al., 2011). Ohne ATM wird die Rate der End-Degradation erhöht, was der vermehrten Nutzung des SSA-Weges *in vitro* durch SKX-Zellextrakte entsprechen würde und dieses Resultat gut erklären könnte.

Zusammenfassend bedeuten die hier erzielten Resultate, dass die in dieser Arbeit getesteten Tumorzellen sich zwar in ihrer Effizienz des klassischen NHEJ unterscheiden, dass aber auch eine geringe Effizienz nicht dazu führt, dass ein fehlerhafter alternativer Reparaturweg benutzt wird. Anderenfalls müssten in diesen Zellen mehr Dimere/Multimere sowie längere Deletionen auftreten. Dies ist bis auf die Ausnahme SKX, die vermehrt SSA benutzt (s. o.), nicht der Fall.

#### 4.2.4. Korrelation von Strahlenempfindlichkeit und *in vitro* End-Joining-Effizienz

Basierend auf den Resultaten dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es mit Hilfe des *in vitro* EJ-Assays möglich ist, die Qualität und Quantität des klassischen NHEJ zu bestimmen. Dabei sind nur zirkuläre Produkte von Bedeutung, da nur sie die relevanten Produkte des

NHEJ widerspiegeln. Es wurde nachfolgend die Hypothese geprüft, dass die Effizienz zur Bildung zirkulärer Produkte mit der DNA-Reparatur und dem Zellüberleben *in vivo* nach Bestrahlung vergleichbar ist. Daher wurden die Überlebensfraktionen der Zellen *in vivo* mit den Transformationseffizienzen aus dem *in vitro* Assay gegenübergestellt. Es ergab sich ein nicht-signifikanter Trend (Abb. 39). Dieser wurde negativ beeinflusst durch zwei Zelllinien, UTSCC5 und UTSCC8, die bei mittlerer Strahlenempfindlichkeit eine sehr geringe Effizienz zur Bildung zirkulärer Produkte im EJ-Assay aufwiesen. Werden diese beiden Zellen aus der Berechnung der Korrelation ausgeschlossen, so ist der Zusammenhang zwischen dem *in vivo* Zellüberleben nach Bestrahlung und der Bildung zirkulärer EJ-Produkte *in vitro* signifikant.

Es wurde vermutet, dass in diesen Zellen die Reparaturreffizienz eventuell von der Zellzyklusphase abhängig sein könnte und G1-Phase-Zellen deutlich effizienter reparieren als S-/G2-Phase-Zellen. Die *in vivo* Strahlenempfindlichkeit wurde in dieser Arbeit in konfluent wachsenden Zellen ermittelt. Die CFEs wurden dagegen aus exponentiell wachsenden Kulturen hergestellt. Um also zu untersuchen, warum die beiden Zelllinien ein so schlechtes EJ im Verhältnis zu ihrem Zellüberleben aufwiesen, wurden UTSCC5 und UTSCC 8 auch im exponentiell wachsenden Zustand dem Koloniebildungstest zur Ermittlung der Überlebensfraktionen unterzogen. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied im Zellüberleben konfluent oder exponentiell wachsender Zellen, so dass das relativ gute Überleben der beiden Zellen nicht allein auf den konfluenten Wachstumszustand zurückzuführen ist (Abb. 40).

Eine Eigenschaft, die die Strahlenempfindlichkeit beeinflusst und mit Hals-/Kopf-Tumoren in Zusammenhang steht, ist ihr HPV-Status (humanes Papillomavirus). Für die beiden Zelllinien UTSCC5 und UTSCC8 kann eine mögliche HPV-Infektion aber nicht die erhöhte Resistenz erklären, da HPV-positive Karzinome gewöhnlich strahlenempfindlicher sind als HPV-negative. Der einzige Unterschied dieser beiden Zelllinien gegenüber den anderen Tumorzellen ist, dass es sich bei UTSCC5 und UTSCC8 nicht um Zelllinien aus Primärtumorgewebe sondern aus Fernmetastasen handelt. Ob dies die offensichtlich relativ hohe Strahlenresistenz der beiden Zelllinien gegenüber der schlechten EJ-Effizienz erklären kann, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden.

Neben dem Zellüberleben wurde auch die Anzahl residueller DSBs nach Bestrahlung mit den Ergebnissen aus dem *in vitro* EJ-Assay verglichen. Hier zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang. Die *in vitro* EJ-Effizienz konnte also nicht dazu verwendet werden, um die DSB-Reparatur-Effizienz *in vivo* vorherzusagen. Dies kann verschiedene Gründe haben. Die enzymatisch erzeugten DSBs *in vitro* sind nicht mit denen zu vergleichen, die durch ionisierende Strahlung in der DNA im chromosomalen Verbund verursacht werden. Sie sind in den seltensten Fällen so einfach aufgebaut wie enzymatische Brüche. Vielmehr beinhalten

sie chemisch modifizierte DNA-Enden (3'-Phosphoglykolate und 5'-hydroxylierte Termini) und bestehen zum Teil aus hochkomplexen Mehrfachschäden („bulky lesions“), die schwieriger zu reparieren sind, länger unverknüpft bleiben oder gar nicht verschlossen werden können. Außerdem ist bisher nicht bekannt, in wie weit der Anteil der S-Phase-Proteine im Extrakt die Gesamtreparatur beeinflusst. Solche Proteine können etwa durch cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) oder Checkpointkinasen in ihrem Reparaturvermögen modifiziert sein, was die Korrelation mit G0/G1-Phase-Zellen stören würde. Residuelle DSBs in der Zelle stammen möglicherweise auch daher, dass sie aufgrund ihrer Konformation kein geeignetes Substrat für klassisches NHEJ dargestellt haben. Anderenfalls wären sie schnell verschlossen worden. Werden durch erhöhte Enddegradation der 5'-DSB-Enden durch Nukleasen lange 3'-Einzelstrang-Enden hervorgebracht, so könnten auch diese Strukturen nicht erfolgreich durch klassisches NHEJ verknüpft werden. Die Einleitung einer Homologie-vermittelten Reparatur könnte eine letzte Möglichkeit zum Verschluss des DSBs bedeuten. Liegt jedoch keine Homologie in Bruchnähe vor, so können die DNA-Enden nicht verschlossen werden. Im zellfreien System finden diese Vorgänge unter anderen Bedingungen statt. Hier wird eine Vielzahl gleicher Plasmide als DSB-Substrat zur Reaktion gegeben. Werden die DNA-Enden in Vorbereitung auf die HR degradiert, bleiben dann aber unverschlossen, so gehen sie nicht messbar im linearen Substrat-Pool unter. Zwar könnte theoretisch HR stattfinden, indem mit der identischen Sequenz eines zweiten, bereits reparierten Plasmids im Extrakt homolog rekombiniert wird, jedoch ist das entstehende Produkt nicht als solches zu erkennen und nicht von einem EJ-Produkt zu unterscheiden. Wird durch Verwendung des Substrat-Plasmids pEJSSA die Homologie bereitgestellt, so könnte über SSA Reparatur stattfinden. Aber auch hier könnte über die Homologien zweier Plasmide homolog rekombiniert werden, was wiederum nicht von einem SSA oder EJ zu unterscheiden wäre.

Die in dieser Arbeit untersuchten Hals-/Kopf-Tumorzelllinien zeigten unterschiedliche Raten an SSA. Diese wurden verglichen mit der Anzahl an residuellen DSBs, um zu untersuchen, ob diese mit der Verwendung mutagener Reparaturwege in Verbindung stehen. Es zeigte sich, dass ein signifikanter Zusammenhang besteht. Das könnte bedeuten, dass über längere Zeit unreparierte DSBs offen stehen, an denen unspezifische oder auch gezielte Enddegradation stattfinden kann, was letztlich zu einer alternativen Reparatur (alternatives EJ oder hier SSA) führen kann. Jedoch besagt die *in vitro* beobachtete Reparatur über SSA nicht automatisch, dass es auch *in vivo* tatsächlich zu erfolgreichem SSA kommen würde, da nicht in jedem Fall geeignete repetitive Sequenzen in Bruchnähe verfügbar wären. Um diese Beziehung aufzuklären sind zukünftige Arbeiten nötig.

### 4.3. Methodische Grenzen des *in vitro* End-Joinings

Die Schwierigkeit der Fragestellung in der vorliegenden Arbeit war einzuschätzen, ob und in wie weit die DNA-Reparatur in zellfreien Extrakten mit der *in vivo* Reparatur gleichzusetzen ist. Für die Aufklärung biochemischer Zusammenhänge und Wechselwirkungen zwischen Proteinen und DNA waren *in vitro* EJ-Assays in den vergangenen Jahrzehnten sehr hilfreich. Jedoch kann nicht die gesamte Komplexität des Zusammenspiels von Zellzyklus, Chromatinmodulation und Schadenssignal-Weitergabe *in vitro* widergespiegelt werden.

Zu allererst hängt die Qualität des Extraktes vom Zustand der Zellpopulation und der Erfahrung des Experimentators ab. Die in dieser Arbeit erzeugten CFEs wiesen durchweg gute EJ-Effizienzen auf, sofern sie nicht aus einer NHEJ-defizienten Zelllinie gewonnen wurden und deshalb in dieser Hinsicht grundsätzlich in ihrer Effizienz beeinträchtigt waren. Der Fortschritt des Zellzyklus, sein Effekt auf die DNA-Reparatur und die Beteiligung unterschiedlicher Reparaturwege kann in humanen Extrakten nicht so, wie es in denen von *Xenopus laevis* möglich ist, simuliert werden. Es ist nur möglich, spezifisch einzelne Zeitpunkte des Zellzyklus zu betrachten, indem Extrakte aus entsprechend synchronisierten Populationen gewonnen werden. Dazu kommt die Bereitstellung eines geeigneten Substrates. Wie in dieser Arbeit beschrieben wurde, kann nicht nur die Struktur des DSB-Substrates entscheidend für den Ablauf oder die Effizienz der Reparatur sein. Es ist zwar möglich spezielle Substrate zu generieren, die es ermöglichen, NHEJ, SSA, beide Reparaturwege simultan wie in dieser Arbeit oder auch die Verwendung von HR zu messen (Kucherlapati et al., 1985; Oppliger et al., 1993; Srivastava et al., 2007). Es müsste versucht werden, die Komplexität der *in vivo* Chromatin-gebundenen DNA zu imitieren. Gerade für die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der geschwindigkeitsbestimmenden Chromatinmodulation für die Rekrutierung der Reparaturproteine und der Regulation der Reparaturwege sind zellfreie Reparatursysteme nur begrenzt aussagefähig. Zukünftig könnten jedoch bestimmte DNA-Substrate, welche mit Histon-Proteinen assoziiert sind, solche Bedingungen besser imitieren. Eine andere vielversprechende Alternative könnte der Einsatz von genomischer DNA sein (Cheong et al., 1998), in die zuvor gezielt Substrate für einzelne Reparaturwege, etwa pEJ, pEJSSA oder pGC für die homologe Rekombination integriert wurden.

Auch die Unterscheidung zwischen klassischem und alternativem EJ ist nicht einfach zu bewerkstelligen. Da in der vorliegenden Arbeit die NHEJ-defizienten Extrakte ausschließlich lineare Produkte hervorbrachten, wurde daraus geschlossen, dass diese Produkte einem alternativen EJ entstammen. Zur Prüfung, ob diese Annahme den Tatsachen entspricht, könnten die CFEs vor der EJ-Reaktion mit Inhibitoren behandelt werden. So sollte die

Inhibition z. B. von PARP1, einem Protein, welches sowohl in der Einzelstrangbruch-Reparatur wie auch im alternativen EJ beteiligt ist, dazu führen, dass in NHEJ-defizienten Zelllinien keine Reparatur mehr stattfindet.

Nicht vollständig aufgeklärt ist die Wirkung von Magnesium im CFE. Unbestritten ist der auch in der vorliegenden Arbeit beobachtete Effekt, dass die Bildung von linearen Produkten unter erhöhtem Magnesium-Gehalt sowohl in NHEJ-profizienten als auch –defizienten Extrakten effizienter abläuft. Vermutet wird, dass dies an einer durch Magnesium erhöhten Aktivität der LigIII liegt. Nicht ausgeschlossen ist aber die Möglichkeit, dass auch andere Enzyme wie etwa die Nukleasen CtIP, MRN oder Exo1 durch Magnesium eine Aktivitätssteigerung erfahren könnten und dadurch die DNA-Enden stärker degradiert werden. Sollten dadurch lange einzelsträngige Überhänge entstehen, so sind diese Strukturen keine geeigneten Substrate, um über klassisches NHEJ verschlossen zu werden. Es wurde beschrieben, dass Mre11 allein oder im Komplex mit Rad50 als Exonuklease *in vitro* nur in Mangan- und nicht in Magnesium-haltigen Puffern aktiv ist (Paull et al., 1998; Sartori et al., 2007). Ihre Endonuklease-Aktivität wird durch Magnesium teilweise inhibiert (Sun et al., 2012). CtIP allein zeigte *in vitro* weder unter Magnesium noch unter Mangan Aktivität. Nur zusammen mit Mre11 und Rad50 konnte unter Magnesium Endonuklease-Aktivität beobachtet werden (Sartori et al., 2007). Exo1 zeigte Exonuklease-Aktivität unter Magnesium und wurde teilweise durch Mangan inhibiert (Sun et al., 2012). Die in diesen Arbeiten verwendeten Magnesium-Konzentrationen lagen bei maximal 5 mM und damit unter den in dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen. Es wurde dort nicht getestet, ob die Aktivität der Nukleasen unter erhöhten  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen gesteigert oder inhibiert wird. Daher ist die Beteiligung von CtIP, Mre11, Rad50 und Exo1 an der Degradation der DNA-Enden nicht auszuschließen und bedarf weiterer Untersuchungen.

#### **4.4. *In vitro* End-Joining als Instrument zur Prädiktion der Strahlenempfindlichkeit**

Plattenepithelkarzinome aus dem Hals-/Kopf-Bereich gelten als Tumorentität mit intermediärer Strahlenempfindlichkeit. Die primäre Behandlung lokal fortgeschrittener Tumore beinhaltet eine Kombination aus Radiotherapie und Chirurgie oder Chemo-Radio-Therapie. Im klinischen Alltag wäre die akkurate Vorhersage der Tumorantwort auf die Strahlentherapie und eventuell nachfolgende Chemotherapie ein wichtiger Parameter, der den behandelnden Arzt darin unterstützen könnte, die individuell am besten geeignete Therapie für den Patienten zu planen und Nebenwirkungen zu reduzieren. Aus diesem



Grund wird permanent nach neuen Methoden gesucht, um zuverlässig den Effekt einer Strahlentherapie auf den Tumor vorhersagen zu können. Die meisten solcher Methoden basieren auf molekularbiologischen, zytogenetischen oder zellulären Techniken. Dabei werden im Zellsystem Endpunkte betrachtet wie das Überleben nach Bestrahlung, Apoptose, Chromosomenabberationen, Genexpression oder die Reparaturkinetik von DSBs.

In dieser Arbeit stellen wir einen funktionellen Assay zur Einschätzung der Strahlenempfindlichkeit von Kopf-/Hals-Tumorzellen vor, der in der Lage ist, sowohl die Effizienz des EJs zu messen als auch die Qualität der Reparatur und die Wahl des Reparaturweges. Es konnte gezeigt werden, dass mit dem *in vitro* EJ-Assay und dem Transformationsassay spezifisch die Effizienz des klassischen NHEJ in den acht Hals-/Kopf-Tumorzelllinien gemessen werden konnte. Die Tumorzellen zeigten keine Anzeichen eines Defektes im NHEJ und wiesen keine großen Deletionen an den Reparaturstellen auf. Die EJ-Effizienz zeigte unter Ausschluss von zwei Zelllinien eine signifikante Korrelation mit den *in vivo* gemessenen Überlebensraten nach Bestrahlung. Es stellt sich also für die hier gemessenen Zelllinien dar, dass allein durch die Analyse der Effizienz des klassischen NHEJ *in vitro* die Strahlenantwort *in vivo* vorhergesagt werden kann. Um zu bestätigen, dass die beiden Zelllinien UTSCC5 und UTSCC8 eine Ausnahme darstellen, sollte die Untersuchung an weiteren Hals-/Kopf-Tumorzelllinien durchgeführt werden. Sollte dieser Assay in der Klinik Anwendung finden, so ist dabei zu beachten, dass gerade solche Ausnahmen zu Fehleinschätzungen führen können. Die beiden Zelllinien UTSCC5 und UTSCC8 zeigten eine geringe EJ-Effizienz. Ihre Strahlenresistenz war jedoch vergleichsweise hoch. Die therapeutische Ausrichtung am EJ-Ergebnis würde in diesem Fall zu einer niedrigen Dosisverschreibung führen und damit das Risiko beinhalten, keine Tumorkontrolle zu erreichen. Unter Umständen würde eine solche Konstellation dazu führen, dass ein Patient mit zu niedriger Dosis bestrahlt würde und es nicht zu einer Tumorkontrolle käme. Es sind also noch einige Untersuchungen nötig, um die Aussagekraft des *in vitro* EJ-Assays auch z. B. für Extrakte aus Tumor-Gewebe zu sichern. Zukünftig könnten Patienten Tumorproben entnommen und daraus direkt CFEs hergestellt werden, mit denen das individuelle Reparaturvermögen funktionell getestet werden könnte. Als Schwierigkeit ist zu beachten, dass Tumorgewebe nicht homogen aus Tumorzellen besteht, sondern zu veränderlichen Teilen Normalzellen und Bindegewebe enthält. Um die Auswirkungen des Verhältnisses von Tumor- zu Normalzellen auf die Reparaturkapazität einschätzen zu können, sind jedoch extensive Untersuchungen notwendig. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass dieser Assay ein großes Potential für die klinische Anwendung und die individuelle Charakterisierung von Tumoren bietet.

## 5. Zusammenfassung

Die Antwort individueller, humaner Tumore auf Chemo- und Strahlentherapie variiert erheblich trotz gleicher Behandlungsprotokolle. Der Grund dafür ist derzeit nicht vollständig aufgeklärt. Ein Konzept, diese Heterogenität zwischen den Tumoren zu erklären, ist die unterschiedliche Kapazität, mit der DNA-Schäden repariert werden. Unter diesen sind DNA-Doppelstrangbrüche (DSBs) die schwerwiegendsten. Es wird vermutet, dass humane Tumore neben den beiden Hauptreparaturmechanismen Nicht-Homologes End-Joining (NHEJ) und Homologe Rekombination (HR) auch vermehrt fehlerhafte Reparaturwege nutzen, die vermutlich ausschlaggebend für Strahlenempfindlichkeit und genomische Instabilität sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein *in vitro* End-Joining-Assay etabliert, der eine wichtige Lücke zwischen multiparametrischer Testung von Genom und Proteom eines Tumors und der funktionellen Analyse in etablierten Zelllinien schließen kann. Es wurden drei zentrale Fragen behandelt: (1) Wie genau und effizient werden DNA-DSBs von humanen Tumorzellen repariert? (2) Zeichnen sich humane Tumorzellen durch eine häufige Nutzung fehlerhafter Reparaturwege aus? (3) Ist die *in vitro* DSB-Reparatur in der Lage, die zelluläre Strahlenantwort wiederzugeben?

Der *in vitro* End-Joining-Assay wurde anhand von zellfreien Extrakten (CFE) aus verschiedenen NHEJ-Defektmutanten und Wildtypzellen etabliert und validiert. Der DSB wurde dem CFE in Form von enzymatisch linearisierten Plasmiden hinzugefügt, wobei mit dem Plasmid pEJ NHEJ und mit dem Plasmid pEJSSA neben NHEJ auch *Single-Strand Annealing* (SSA) gemessen werden konnte. Der zentrale Unterschied der Reparatur in Defektmutanten zu der in Wildtyp-Zellen zeigte sich im Ausbleiben zirkulärer End-Joining-Produkte, die spezifisch effizientes, klassisches NHEJ anzeigen. Um die Effizienz des klassischen NHEJ gezielt messbar zu machen, wurde der Transformationsassay entwickelt. Die durch diesen Assay gemessenen End-Joining-Effizienzen korrelierten signifikant mit den „*open circle*“-Produktformen, die anhand der Southern-Blot-Analyse aus dem Pool der Gesamtprodukte sichtbar gemacht werden konnten.

Der Defekt in DNA-PKcs und LigIV bewirkte einen starken Rückgang der Gesamtreparatureffizienz. Der Defekt in Ku80 führte nicht zu einem Rückgang der End-Joining-Effizienz, was auf den Gebrauch anderer, alternativer Reparaturwege als dem klassischen NHEJ hinweist. Diese sind vordergründig fehleranfällig und führen beim Ku80- und LigIV-Defekt zu 100 % unkorrekter Reparatur sowie großen Deletionen an den Verknüpfungsstellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen, in denen Deletionen maximal im Rahmen der einzelsträngigen Überhänge des Substrat-Plasmids lagen. Die Deletionslängen an Reparaturstellen, die in CFEs mit DNA-PKcs-Defekt gebildet wurden, entsprachen denen

des Wildtyps. Dies weist darauf hin, dass das vorhandene Ku-Protein einen schützenden Effekt auf DNA-Enden ausübt. Unter Standardbedingungen, bei denen 8 mM Magnesium vorliegt, findet im *in vitro* End-Joining-Assay sowohl Reparatur über klassisches NHEJ als auch über alternative Reparaturwege statt. Durch Anhebung des Magnesium-Gehalts in der End-Joining-Reaktion auf 18 mM konnte die Reparatur in Richtung des alternativen End-Joinings verschoben werden. Dies zeigte sich zum einen durch Anstieg der End-Joining-Effizienz in DNA-PKcs- und LigIV-defekten CFEs, zum anderen führte dies zum Ausbleiben zirkulärer Produkte auch im Wildtyp. In der Reparaturgenauigkeit wirkte sich die Magnesiumerhöhung negativ auf die Deletionslänge aus, sodass sowohl in DNA-PKcs-defekten Zellen als auch in Wildtyp-Zellen die Länge der Deletionen zunahm, was ein Beweis für die Fehlerhaftigkeit alternativer Reparaturwege ist.

Die untersuchten humanen Tumorzelllinien stammen aus Plattenepithelkarzinomen des Kopf-/Hals-Bereiches. Im *in vitro* End-Joining-Assay zeigte sich, dass diese Zellen in ihrer Reparatur-Effizienz variieren und sich besonders in der Bildungskapazität zirkulärer Produkte unterscheiden. Jedoch zeichnete sich ihre Reparatur auch bei niedriger End-Joining-Effizienz als hochgradig präzise aus und bewegte sich stets innerhalb der Überhänge der DSB-Enden. Über SSA reparierten die Tumorzellen in unterschiedlicher, aber geringer Häufigkeit, sodass NHEJ der Hauptreparaturweg blieb.

*In vivo* wurde die Strahlenempfindlichkeit der Tumorzellen anhand ihrer Überlebensrate nach Bestrahlung und ihre Reparaturkapazität anhand der Zählung residueller  $\gamma$ H2AX-Foci nach Bestrahlung gemessen. Es zeigte sich eine breite Varianz der Strahlenempfindlichkeit und der Reparaturkapazität. Beim Vergleich der *in vitro* End-Joining-Effizienz mit der *in vivo* Überlebensrate der Tumorzellen zeichnete sich ein Trend ab, der Signifikanz erreichte, nachdem zwei Zelllinien ausgeschlossen wurden, die sich durch eine außerordentlich niedrige *in vitro* Reparatur auszeichneten. Zwischen der SSA-Rate und der Anzahl residueller Foci ließ sich ein signifikanter Zusammenhang nachweisen, der DSBs, die *in vivo* über längere Zeit unrepariert bleiben, mit der Verwendung alternativer Reparaturwege in Verbindung bringt.

Insgesamt lassen diese Daten die Folgerung zu, dass die untersuchten Kopf-/Hals-Tumorzelllinien zwar in unterschiedlicher Effizienz DSBs reparieren, dass sie aber auch bei verminderter Effizienz dennoch eine hohe Präzision der Verknüpfungen beibehalten und nicht auf alternative Reparaturwege ausweichen. Der *in vitro* End-Joining-Assay ist in der Lage, die *in vivo* Strahlenempfindlichkeit wiederzugeben und beinhaltet das Potential der klinischen Anwendung in der Tumorthherapie. Für die Zukunft ist es von besonderem Interesse, den Assay auf humane Tumorproben auszuweiten, um so die Möglichkeit zu haben, die Strahlenempfindlichkeit individueller Tumoren besser charakterisieren und einschätzen zu können.

## 6. Literatur

- Abercrombie, M. (1979). Contact inhibition and malignancy. *Nature*, 281, 259–262.
- Adachi, N., Ishino, T., Ishii, Y., Takeda, S., & Koyama, H. (2001). DNA ligase IV-deficient cells are more resistant to ionizing radiation in the absence of Ku70: Implications for DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 12109–12113.
- Ahnesorg, P., Smith, P., & Jackson, S. P. (2006). XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell*, 124, 301–313.
- Anderson, C. W., & Carter, T. H. (1996). The DNA-activated protein kinase -- DNA-PK. *Curr Top Microbiol Immunol*, 217, 91–111.
- Anderson, C. W., & Lees-Miller, S. P. (1992). The nuclear serine/threonine protein kinase DNA-PK. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2, 283–314.
- Andres, S. N., Vergnes, A., Ristic, D., Wyman, C., Modesti, M., & Junop, M. (2012). A human XRCC4-XLF complex bridges DNA. *Nucleic Acids Res*, 40, 1868–1878.
- Ariumi, Y., Masutani, M., Copeland, T. D., Mimori, T., Sugimura, T., Shimotohno, K., Ueda, K., Hatanaka, M., & Noda, M. (1999). Suppression of the poly(ADP-ribose) polymerase activity by DNA-dependent protein kinase *in vitro*. *Oncogene*, 18, 4616–4625.
- Audebert, M., Salles, B., & Calsou, P. (2004). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem*, 279, 55117–55126.
- Ayene, I. S., Ford, L. P., & Koch, C. J. (2005). Ku protein targeting by Ku70 small interfering RNA enhances human cancer cell response to topoisomerase II inhibitor and gamma radiation. *Mol Cancer Ther*, 4, 529–536.
- Barnes, D. E., Stamp, G., Rosewell, I., Denzel, A., & Lindahl, T. (1998). Targeted disruption of the gene encoding DNA ligase IV leads to lethality in embryonic mice. *Current biology CB*, 8, 1395–1398.
- Baumann, P., & West, S. C. (1998). DNA end-joining catalyzed by human cell-free extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 14066–14070.
- Belmar-Campos (2010). Regulation der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in CV1-Primatenzellen: Beitrag von Nicht-Homologem Endjoining und Single-Strand Annealing. Hamburg.
- Bennardo, N., & Stark, J. M. (2010). ATM limits incorrect end utilization during non-homologous end joining of multiple chromosome breaks. *PLoS Genet*, 6, e1001194.
- Bentley, J., Diggle, C. P., Harnden, P., Knowles, M. A., & Kiltie, A. E. (2004). DNA double strand break repair in human bladder cancer is error prone and involves microhomology-associated end-joining. *Nucleic Acids Res*, 32, 5249–5259.
- Bentley, J., L'Hote, C., Platt, F., Hurst, C. D., Lowery, J., Taylor, C., Sak, S. C., Harnden, P., Knowles, M. A., & Kiltie, A. E. (2009). Papillary and muscle invasive bladder tumors with distinct genomic stability profiles have different DNA repair fidelity and KU DNA-binding activities. *Genes Chromosomes Cancer*, 48, 310–321.
- Blanco, M. G., Boan, F., & Gomez-Marquez, J. (2004). A paradox in the *in vitro* end-joining assays. *J Biol Chem*, 279, 26797–26801.
- Bryans, M., Valenzano, M. C., & Stamato, T. D. (1999). Absence of DNA ligase IV protein in XR-1 cells: evidence for stabilization by XRCC4. *Mutat Res*, 433, 53–58.
- Budman, J., & Chu, G. (2006). Assays for nonhomologous end joining in extracts. *Methods Enzymol*, 408, 430–444.
- Budman, J., Kim, S. A., & Chu, G. (2007). Processing of DNA for nonhomologous end-joining is controlled by kinase activity and XRCC4/ligase IV. *J Biol Chem*, 282, 11950–11959.

- Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A., & Chen, D. J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem*, 276, 42462–42467.
- Caldecott, K. W., McKeown, C. K., Tucker, J. D., Ljungquist, S., & Thompson, L. H. (1994). An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA ligase III. *Mol Cell Biol*, 14, 68–76.
- Castedo, M., Perfettini, J. L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R., & Kroemer, G. (2004). Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*, 23, 2825–2837.
- Cheong, N., Perrault, A. R., & Iliakis, G. (1998). *In vitro* rejoining of DNA double strand breaks: a comparison of genomic-DNA with plasmid-DNA-based assays. *Int J Radiat Biol*, 73, 481–493.
- Datta, K., Neumann, R. D., & Winters, T. A. (2006). An *in vitro* nonhomologous end-joining assay using linear duplex oligonucleotides. *Analytical biochemistry*, 358, 155–157.
- Daza, P., Reichenberger, S., Gottlich, B., Hagmann, M., Feldmann, E., & Pfeiffer, P. (1996). Mechanisms of nonhomologous DNA end-joining in frogs, mice and men. *Biol Chem*, 377, 775–786.
- Deacon, J., Peckham, M. J., & Steel, G. G. (1984). The radioresponsiveness of human tumours and the initial slope of the cell survival curve. *Radiother Oncol*, 2, 317–323.
- DeFazio, L. G., Stansel, R. M., Griffith, J. D., & Chu, G. (2002). Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *Embo J*, 21, 3192–3200.
- Diggle, C. P., Bentley, J., & Kiltie, A. E. (2003). Development of a rapid, small-scale DNA repair assay for use on clinical samples. *Nucleic Acids Res*, 31, e83.
- Dikomey, E., & Brammer, I. (2000a). Relationship between cellular radiosensitivity and non-repaired double-strand breaks studied for different growth states, dose rates and plating conditions in a normal human fibroblast line. *Int J Radiat Biol*, 76, 773–781.
- Dikomey, E., Brammer, I., Johansen, J., Bentzen, S. M., & Overgaard, J. (2000b). Relationship between DNA double-strand breaks, cell killing, and fibrosis studied in confluent skin fibroblasts derived from breast cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 46, 481–490.
- Elliott, B., Richardson, C., & Jasin, M. (2005). Chromosomal translocation mechanisms at intronic alu elements in mammalian cells. *Mol Cell*, 17, 885–894.
- Feldmann, E., Schmiemann, V., Goedecke, W., Reichenberger, S., & Pfeiffer, P. (2000). DNA double-strand break repair in cell-free extracts from Ku80-deficient cells: implications for Ku serving as an alignment factor in non-homologous DNA end joining. *Nucleic Acids Res*, 28, 2585–2596.
- Finnie, N. J., Gottlieb, T. M., Blunt, T., Jeggo, P. A., & 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 320–324.
- Frank, K. M., Sharpless, N. E., Gao, Y., Sekiguchi, J. M., Ferguson, D. O., Zhu, C., Manis, J. P., Horner, J., DePinho, R. A., & Alt, F. W. (2000). DNA ligase IV deficiency in mice leads to defective neurogenesis and embryonic lethality via the p53 pathway. *Molecular cell*, 5, 993–1002.
- Ganguly, T., & Iliakis, G. (1995). A cell-free assay using cytoplasmic cell extracts to study rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in human cell nuclei. *Int J Radiat Biol*, 68, 447–457.

- Göckschu, J. (2010). Die Expression von DNA-Reparatur-Proteinen unter hypoxischen Bedingungen in zehn Plattenepithelkarzinomlinien aus Kopf- und Halstumoren. Dissertation. Hamburg.
- Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T. E., Mann, M., & Lieber, M. R. (1997). Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature*, 388, 492–495.
- Gu, J., Lu, H., Tsai, A. G., Schwarz, K., & Lieber, M. R. (2007). Single-stranded DNA ligation and XLF-stimulated incompatible DNA end ligation by the XRCC4-DNA ligase IV complex: influence of terminal DNA sequence. *Nucleic acids research*, 35, 5755–5762.
- Haber, J. E. (2000). Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet*, 16, 259–264.
- Hammarsten, O., & Chu, G. (1998). DNA-dependent protein kinase: DNA binding and activation in the absence of Ku. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 525–530.
- Hochegger, H., Dejsuphong, D., Fukushima, T., Morrison, C., Sonoda, E., Schreiber, V., Zhao, G. Y., Saberi, A., Masutani, M., Adachi, N., Koyama, H., Murcia, G. de, & Takeda, S. (2006). PARP-1 protects homologous recombination from interference by Ku and Ligase IV in vertebrate cells. *Embo J*, 25, 1305–1314.
- Iliakis, G. (2009). Backup pathways of NHEJ in cells of higher eukaryotes: cell cycle dependence. *Radiotherapy and oncology journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 92, 310–315.
- Iliakis, G., & Cheong, N. (2006a). *In vitro* rejoining of double-strand breaks in genomic DNA. *Methods Mol Biol*, 314, 95–108.
- Iliakis, G., Rosidi, B., Wang, M., & Wang, H. (2006b). Plasmid-based assays for DNA end-joining *in vitro*. *Methods Mol Biol*, 314, 123–131.
- Iliakis, G., Wang, H., Perrault, A. R., Boecker, W., Rosidi, B., Windhofer, F., Wu, W., Guan, J., Terzoudi, G., & Pantelias, G. (2004). Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet Genome Res*, 104, 14–20.
- Johansen, J., Bentzen, S. M., Overgaard, J., & Overgaard, M. (1994). Evidence for a positive correlation between *in vitro* radiosensitivity of normal human skin fibroblasts and the occurrence of subcutaneous fibrosis after radiotherapy. *Int J Radiat Biol*, 66, 407–412.
- Kasten-Pisula, U., Menegakis, A., Brammer, I., Borgmann, K., Mansour, W. Y., Degenhardt, S., Krause, M., Schreiber, A., Dahm-Daphi, J., Petersen, C., Dikomey, E., & Baumann, M. (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.
- Kasten-Pisula, U., Tastan, H., & Dikomey, E. (2005). Huge differences in cellular radiosensitivity due to only very small variations in double-strand break repair capacity. *Int J Radiat Biol*, 81, 409–419.
- Kelland, L. R., Edwards, S. M., & Steel, G. G. (1988). Induction and rejoining of DNA double-strand breaks in human cervix carcinoma cell lines of differing radiosensitivity. *Radiat Res*, 116, 526–538.
- Khanna, K. K., & Jackson, S. P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet*, 27, 247–254.
- Klokov, D., MacPhail, S. M., Banath, J. P., Byrne, J. P., & Olive, P. L. (2006). Phosphorylated histone H2AX in relation to cell survival in tumor cells and xenografts exposed to single and fractionated doses of X-rays. *Radiother Oncol*, 80, 223–229.
- Kubota, Y., Nash, R. A., Klungland, A., Schar, P., Barnes, D. E., & Lindahl, T. (1996). Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. *Embo J*, 15, 6662–6670.

- Kucherlapati, R. S., Spencer, J., & Moore, P. D. (1985). Homologous recombination catalyzed by human cell extracts. *Mol Cell Biol*, 5, 714–720.
- Kuhfittig-Kulle, S., Feldmann, E., Odersky, A., Kuliczowska, A., Goedecke, W., Eggert, A., & 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.
- Laat, W. L. de, Appeldoorn, E., Jaspers, N. G., & Hoeijmakers, J. H. (1998). DNA structural elements required for ERCC1-XPF endonuclease activity. *J Biol Chem*, 273, 7835–7842.
- Labhart, P. (1999a). Ku-dependent nonhomologous DNA end joining in *Xenopus* egg extracts. *Mol Cell Biol*, 19, 2585–2593.
- Labhart, P. (1999b). Nonhomologous DNA end joining in cell-free systems. *Eur J Biochem*, 265, 849–861.
- Lee, J. W., Blanco, L., Zhou, T., Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Kunkel, T. A., Wang, Z., & Povirk, L. F. (2004). Implication of DNA polymerase lambda in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in human nuclear extracts. *J Biol Chem*, 279, 805–811.
- Lee, J. W., Yannone, S. M., Chen, D. J., & Povirk, L. F. (2003). Requirement for XRCC4 and DNA ligase IV in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining *in vitro*. *Cancer Res*, 63, 22–24.
- Lees-Miller, S. P., & Meek, K. (2003). Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie*, 85, 1161–1173.
- Li, B., Navarro, S., Kasahara, N., & Comai, L. (2004). Identification and biochemical characterization of a Werner's syndrome protein complex with Ku70/80 and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J Biol Chem*, 279, 13659–13667.
- Liang, L., Deng, L., Nguyen, S. C., Zhao, X., Maulion, C. D., Shao, C., & Tischfield, J. A. (2008). Human DNA ligases I and III, but not ligase IV, are required for microhomology-mediated end joining of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res*, 36, 3297–3310.
- Lieber, M. R. (2008). The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem*, 283, 1–5.
- Lieber, M. R., Ma, Y., Pannicke, U., & Schwarz, K. (2004). The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. *DNA Repair (Amst)*, 3, 817–826.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362, 709–715.
- Lindahl, T., & Wood, R. D. (1999). Quality control by DNA repair. *Science*, 286, 1897–1905.
- Lodisch H, B. A. M. P. K. C. K. M. S. M. Z. S. D. J. (2004). *Molecular Biology of the Cell*. (Keine Angabe).
- Ludwig, D. L., Chen, F., Peterson, S. R., Nussenzweig, A., Li, G. C., & Chen, D. J. (1997). Ku80 gene expression is Sp1-dependent and sensitive to CpG methylation within a novel cis element. *Gene*, 199, 181–194.
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., & Lieber, M. R. (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell*, 108, 781–794.
- Ma, Y., Schwarz, K., & Lieber, M. R. (2005). The Artemis: DNA-PKcs endonuclease cleaves DNA loops, flaps, and gaps. *DNA Repair (Amst)*, 4, 845–851.
- Mansour, W. Y., Schumacher, S., Roskopf, R., Rhein, T., Schmidt-Petersen, F., Gatzemeier, F., Haag, F., Borgmann, K., Willers, H., & Dahm-Daphi, J. (2008).

- Hierarchy of nonhomologous end-joining, single-strand annealing and gene conversion at site-directed DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res*, 36, 4088–4098.
- Mladenov, E., & Iliakis, G. (2011). Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutat Res*, 711, 61–72.
- Modesti, M., Junop, M. S., Ghirlando, R., van de Rakt, M., Gellert, M., Yang, W., & Kanaar, R. (2003). Tetramerization and DNA ligase IV interaction of the DNA double-strand break repair protein XRCC4 are mutually exclusive. *Journal of molecular biology*, 334, 215–228.
- Nick McElhinny, S. A., Snowden, C. M., McCarville, J., & Ramsden, D. A. (2000). Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends. *Mol Cell Biol*, 20, 2996–3003.
- North, P., Ganesh, A., & Thacker, J. (1990). The rejoining of double-strand breaks in DNA by human cell extracts. *Nucleic Acids Res*, 18, 6205–6210.
- Olive, P. L., Banath, J. P., & MacPhail, H. S. (1994). Lack of a correlation between radiosensitivity and DNA double-strand break induction or rejoining in six human tumor cell lines. *Cancer Res*, 54, 3939–3946.
- Oppliger, T., Wurgler, F. E., & Sengstag, C. (1993). A plasmid system to monitor gene conversion and reciprocal recombination *in vitro*. *Mutat Res*, 291, 181–192.
- Pastwa, E., Neumann, R. D., & Winters, T. A. (2001). *In vitro* repair of complex unligatable oxidatively induced DNA double-strand breaks by human cell extracts. *Nucleic Acids Res*, 29, E78.
- Pastwa, E., Poplawski, T., Czechowska, A., Malinowski, M., & Blasiak, J. (2005). Non-homologous DNA end joining repair in normal and leukemic cells depends on the substrate ends. *Z Naturforsch C*, 60, 493–500.
- Paull, T. T., & Gellert, M. (1998). The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell*, 1, 969–979.
- Perrault, R., Wang, H., Wang, M., Rosidi, B., & Iliakis, G. (2004). Backup pathways of NHEJ are suppressed by DNA-PK. *J Cell Biochem*, 92, 781–794.
- Pfeiffer, P., & Vielmetter, W. (1988). Joining of nonhomologous DNA double strand breaks *in vitro*. *Nucleic Acids Res*, 16, 907–924.
- Pfeiffer, P., Feldmann, E., Odersky, A., Kuhfittig-Kulle, S., & Goedecke, W. (2005). Analysis of DNA double-strand break repair by nonhomologous end joining in cell-free extracts from mammalian cells. *Methods Mol Biol*, 291, 351–371.
- Prigent, C., Satoh, M. S., Daly, G., Barnes, D. E., & Lindahl, T. (1994). Aberrant DNA repair and DNA replication due to an inherited enzymatic defect in human DNA ligase I. *Mol Cell Biol*, 14, 310–317.
- Robins, P., & Lindahl, T. (1996). DNA ligase IV from HeLa cell nuclei. *J Biol Chem*, 271, 24257–24261.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., & Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, 273, 5858–5868.
- Roy, S., Andres, S. N., Vergnes, A., Neal, J. A., Xu, Y., Yu, Y., Lees-Miller, S. P., Junop, M., Modesti, M., & Meek, K. (2012). XRCC4's interaction with XLF is required for coding (but not signal) end joining. *Nucleic Acids Res*, 40, 1684–1694.
- Sartori, A. A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., & Jackson, S. P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*, 450, 509–514.
- Schulte-Uentrop, L., El-Awady, R. A., Schliecker, L., Willers, H., & 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 Res*, 36, 2561–2569.
- Schwartz, J. L., Rotmensch, J., Giovanazzi, S., Cohen, M. B., & Weichselbaum, R. R. (1988). Faster repair of DNA double-strand breaks in radioresistant human tumor cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 15, 907–912.
- Shin, K. H., Kang, M. K., Kim, R. H., Kameta, A., Baluda, M. A., & Park, N. H. (2006). Abnormal DNA end-joining activity in human head and neck cancer. *Int J Mol Med*, 17, 917–924.
- Smider, V., Rathmell, W. K., Lieber, M. R., & Chu, G. (1994). Restoration of X-ray resistance and V(D)J recombination in mutant cells by Ku cDNA. *Science*, 266, 288–291.
- Song, K. Y., Chekuri, L., Rauth, S., Ehrlich, S., & Kucherlapati, R. (1985). Effect of double-strand breaks on homologous recombination in mammalian cells and extracts. *Mol Cell Biol*, 5, 3331–3336.
- Spagnolo, L., Rivera-Calzada, A., Pearl, L. H., & Llorca, O. (2006). Three-dimensional structure of the human DNA-PKcs/Ku70/Ku80 complex assembled on DNA and its implications for DNA DSB repair. *Mol Cell*, 22, 511–519.
- Srivastava, N., & Raman, M. J. (2007). Homologous recombination-mediated double-strand break repair in mouse testicular extracts and comparison with different germ cell stages. *Cell Biochem Funct*, 25, 75–86.
- Strick, R., Strissel, P. L., Gavrillov, K., & Levi-Setti, R. (2001). Cation-chromatin binding as shown by ion microscopy is essential for the structural integrity of chromosomes. *J Cell Biol*, 155, 899–910.
- Strout, M. P., Marcucci, G., Bloomfield, C. D., & Caligiuri, M. A. (1998). The partial tandem duplication of ALL1 (MLL) is consistently generated by Alu-mediated homologous recombination in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 2390–2395.
- Sun, J., Lee, K. J., Davis, A. J., & Chen, D. J. (2012). Human Ku70/80 protein blocks exonuclease 1-mediated DNA resection in the presence of human Mre11 or Mre11/Rad50 protein complex. *J Biol Chem*, 287, 4936–4945.
- Sung, P., & Klein, H. (2006). Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 739–750.
- Taccioli, G. E., Gottlieb, T. M., Blunt, T., Priestley, A., Demengeot, J., Mizuta, R., Lehmann, A. R., Alt, F. W., Jackson, S. P., & Jeggo, P. A. (1994). Ku80: product of the XRCC5 gene and its role in DNA repair and V(D)J recombination. *Science*, 265, 1442–1445.
- Thode, S., Schafer, A., Pfeiffer, P., & Vielmetter, W. (1990). A novel pathway of DNA end-to-end joining. *Cell*, 60, 921–928.
- Timson, D. J., Singleton, M. R., & Wigley, D. B. (2000). DNA ligases in the repair and replication of DNA. *Mutat Res*, 460, 301–318.
- Tomkinson, A. E., & Levin, D. S. (1997). Mammalian DNA ligases. *Bioessays*, 19, 893–901.
- Tsai, C. J., Kim, S. A., & Chu, G. (2007). Cernunnos/XLF promotes the ligation of mismatched and noncohesive DNA ends. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 7851–7856.
- Vakifahmetoglu, H., Olsson, M., & Zhivotovsky, B. (2008). Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ*, 15, 1153–1162.
- van Attikum, H., & Gasser, S. M. (2005). The histone code at DNA breaks: a guide to repair? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 757–765.
- Walker, A. I., Hunt, T., Jackson, R. J., & Anderson, C. W. (1985). Double-stranded DNA induces the phosphorylation of several proteins including the 90 000 mol. wt. heat-shock protein in animal cell extracts. *Embo J*, 4, 139–145.

- Walker, J. R., Corpina, R. A., & Goldberg, J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, 412, 607–614.
- Wang, H., Perrault, A. R., Takeda, Y., Qin, W., & Iliakis, G. (2003). Biochemical evidence for Ku-independent backup pathways of NHEJ. *Nucleic Acids Res*, 31, 5377–5388.
- Wang, H., Rosidi, B., Perrault, R., Wang, M., Zhang, L., Windhofer, F., & Iliakis, G. (2005). DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. *Cancer Res*, 65, 4020–4030.
- Wang, H., Zeng, Z. C., Perrault, A. R., Cheng, X., Qin, W., & Iliakis, G. (2001). Genetic evidence for the involvement of DNA ligase IV in the DNA-PK-dependent pathway of non-homologous end joining in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 29, 1653–1660.
- Wang, M., Wu, W., Rosidi, B., Zhang, L., Wang, H., & Iliakis, G. (2006). PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res*, 34, 6170–6182.
- Weberpals, J. I., Clark-Knowles, K. V., & Vanderhyden, B. C. (2008). Sporadic epithelial ovarian cancer: clinical relevance of BRCA1 inhibition in the DNA damage and repair pathway. *J Clin Oncol*, 26, 3259–3267.
- Weinstock, D. M., Elliott, B., & Jasin, M. (2006). A model of oncogenic rearrangements: differences between chromosomal translocation mechanisms and simple double-strand break repair. *Blood*, 107, 777–780.
- West, C. M., Davidson, S. E., Roberts, S. A., & Hunter, R. D. (1997). The independence of intrinsic radiosensitivity as a prognostic factor for patient response to radiotherapy of carcinoma of the cervix. *Br J Cancer*, 76, 1184–1190.
- Wilson, D. M. 3., & Thompson, L. H. (1997). Life without DNA repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 12754–12757.
- Wilson, S. H. (1998). Mammalian base excision repair and DNA polymerase beta. *Mutat Res*, 407, 203–215.
- Wold, M. S. (1997). Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem*, 66, 61–92.
- Wu, W., Wang, M., Mussfeldt, T., & Iliakis, G. (2008a). Enhanced use of backup pathways of NHEJ in G2 in Chinese hamster mutant cells with defects in the classical pathway of NHEJ. *Radiat Res*, 170, 512–520.
- Wu, W., Wang, M., Singh, S. K., Mussfeldt, T., & Iliakis, G. (2008b). Repair of radiation induced DNA double strand breaks by backup NHEJ is enhanced in G2. *DNA Repair (Amst)*, 7, 329–338.
- Yoo, S., & Dynan, W. S. (1999). Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein. *Nucleic Acids Res*, 27, 4679–4686.
- Yoshikawa, T., Kashino, G., Ono, K., & Watanabe, M. (2009). Phosphorylated H2AX foci in tumor cells have no correlation with their radiation sensitivities. *J Radiat Res*, 50, 151–160.
- Zha, S., Guo, C., Boboila, C., Oksenysh, V., Cheng, H. L., Zhang, Y., Wesemann, D. R., Yuen, G., Patel, H., Goff, P. H., Dubois, R. L., & Alt, F. W. (2011). ATM damage response and XLF repair factor are functionally redundant in joining DNA breaks. *Nature*, 469, 250–254.
- Zhong, Q., Boyer, T. G., Chen, P. L., & Lee, W. H. (2002). Deficient nonhomologous end-joining activity in cell-free extracts from Brca1-null fibroblasts. *Cancer Res*, 62, 3966–3970.

Ziv, Y., Bielopolski, D., Galanty, Y., Lukas, C., Taya, Y., Schultz, D. C., Lukas, J., Bekker-Jensen, S., Bartek, J., & Shiloh, Y. (2006). Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nat Cell Biol*, 8, 870–876.

## 7. Anhang

### 7.1. Materialien

#### 7.1.1. Laborausstattung

Hersteller	Gerät
Beckman Instruments GmbH, München Deutschland	Kühlzentrifuge Microfuge R pH-Meter 300
Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland	Coulter Counter Model Z1 Ultrazentrifuge Optima LE-80K SW 60 Ti Rotor, Swinging Bucket
Binder, Tuttlingen, Deutschland	Heraeus B50/60EK/CO <sub>2</sub> Brutschrank Inkubator B
Biometra, Deutschland	BioDoc II, Geldokumentation Duo-Therm-Hybridisierungssofen OV5
Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA	<i>E. coli</i> Pulser Vacuum Pump 206BR Vacuum Blotter Model 785
Carl Zeiss Werk, Göttingen, Deutschland	Axioplan 2 Imaging Fluoreszenz- Mikroskop
Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Bio-Photometer Eppendorf Zentrifuge 5415 D Zentrifuge 5810R Thermo-Block Thermostat 5320
Gulmay Medical LTD, Oxford, UK	X-Strahl Generator Typ RS225 Research System
Johanna Otto GmbH, Hechingen, Deutschland	Edmund Bühler Schüttler KM-2

	Edmund Bühler Schüttler TH30 SM-30 Control
Kendro, Hanau, Deutschland	Hera Cell 240 CO <sub>2</sub> Brutschrank Heraeus Typ B15 Brutschrank Thermo Herasafe HS12 Sterile Werkbank
Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland	Analytical balance P1200 Waage Analytical balance AE160 Waage
MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland	Primus 25 Thermal Cycler
Olympus Optical Co., Japan	Invers-Mikroskop (Olympus CK2)
Oxford Optronix, Oxford, UK	ColCount Kolonie-Zähler
Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	Zellkultur-Flaschen 25 bis 175 cm <sup>2</sup> Petrischalen
Stratagene, Amsterdam, Niederlande	Robocycler Gradient 40
Thermo Scientific, Rockford, IL, USA	BCA Protein Assay CL-XPosure Röntgen-Film

### 7.1.2. Kits, Reagenzien, Chemikalien

Amersham, GE Healthcare	Hybond-N Membran AlkPhos Direct Labeling and Detection System
Biotium, Hayward, CA, USA	GelRed Nucleic Acid Gel Stain
Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf Deutschland	Elektroporationsküvetten
Fermentas, Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland	Fast Digest Restriktionsenzyme

---

GE Healthcare, München, Deutschland	Exo-SAP-IT DNA-Aufreinigungskit
Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland	Topo-TA Cloning Kit für Sequenzierung destilliertes Wasser 1 kb DNA-Leiter Dialyseschlauch SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain Molecular Probes Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG
Lonza, Rockland, ME, USA	GelStar Nucleic Acid Gel Stain
Millipore, Billerica, MA, USA	VSWP 0,025 µm Microdialyse-Filter
Nalgene Labware, Thermo Fisher Scientific Rochester, NY, USA	Mr. Frosty
New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland	Restriktionsenzyme
PeQ Lab Biotechnology GmbH, Erlangen Deutschland	PeQLab PCR Master-Mix Y
Promega Corporation, Madison, WI, USA	Wizard SV Gel und PCR Clean-up System
Qbiogene	4',6-Diamidino-2- phenylindoldihydrochlorid (DAPI)
Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland	Plasmid Mini Kit Plasmid Maxi Kit DNeasy Blood and Tissue Extraction Kit
Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	Leupeptin PepstatinA Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen,  
Deutschland

Agarose  
Ammoniumsulfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)  
Aprotinin  
Borsäure  
Bovine serum albumin (BSA)  
Bromphenol Blau  
Bromphenol Blau (BPB)  
Calciumchlorid CaCl<sub>2</sub>  
CDP-STAR Chemiluminescent Substrate  
Soution  
Dimethylsulfoxid (DMSO)  
Di-Natriumhydrogenphospat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)  
Dithiothreitol (DTT)  
Ethanol absolut  
Ethidiumbromid  
Ethylene-diamin-tetracetic-acid (EDTA)  
Ethylene-glycol-tetraacetic-acid (EGTA)  
Glucose  
Glycerol  
Kaliumchlorid (KCl)  
Kaliumdihydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)  
Kanamycinsulfat  
Kristallviolett  
Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>)  
β-Mercaptoethanol  
Methanol  
Natriumchlorid (NaCl)  
Natriumdihydrogenphosphat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)  
β-Natrium-Glycerophosphat  
Natriumhydroxid (NaOH)  
2-Propanol  
Proteinase K  
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)  
Sucrose  
Trizma-base  
Urea  
Xylene Cyanol (XC)

### 7.1.3. Reagenzien und Medien für Zellkultur

Gibco Cell Culture, Invitrogen GmbH, Karlsruhe Deutschland	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Antibiotika: Penicillin, Streptomycin Trypsin-EDTA
Biochrom AG, Berlin, Deutschland	FCS Superior
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland auf 1 l mit didest.H <sub>2</sub> O)	α-Medium (MEM-α-Pulver, 0,22 % (w/v) NaHCO <sub>3</sub> 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin

### 7.1.4. Bakterienkultur

Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland Bakterien	One Shot TOP10 Electrocompetente
Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA	TransforMax EC100 Electrocompetent <i>E. coli</i>
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland	LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) Agar

### 7.1.5. Antikörper

#### Primärantikörper

Anti-Phospho-Histon H2AX-Antikörper, monoclonal, anti-mouse, Upstate, 1:100-Verdünnung in 1 % BSA/1 x PBS

#### Sekundärantikörper

Alexa Flour 594 goat anti-mouse, Molecular Probes/Invitrogen, 1:400-Verdünnung in 1 % BSA/1 x PBS



### 7.1.6. Plasmide

pEJ

pEJSSA

### 7.1.7. Oligonukleotid-Sequenzen

(Primer von MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland)

P1: 5`-GGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG-3`

P2: 5`-GTC GGG CAT GGC GGA CTT GAA-3`

### 7.1.8. Software

Graphpad Software	Prism 4.03
DNA Star	Lasergene
Silk Scientific	Un-Scan-It Gel 6.1

### 7.1.9. Puffer und Lösungen

#### Hypotonischer Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 8,0

1 mM EDTA

5 mM Dithiothreitol (DTT)

#### Protease-Inhibitoren

100 mM (200x) Phenyl-methyl-sulfonyl-fluorid (PMSF) in Isopropanol

1 mM (1000x) Leupeptin in didest. H<sub>2</sub>O

1 mM (1000x) Pepstatin A in Methanol

#### Hochsalz-Puffer

50% Glycerol

25% Sucrose

50 mM Tris-HCl, pH 8,0

10 mM MgCl<sub>2</sub>

2 mM DTT

#### gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung

10,3 g Ammoniumsulfat in 20 ml didest. H<sub>2</sub>O, pH 7,0

Dialyse-Puffer

20 % Glycerol  
30 mM Tris-HCl pH 8,0  
90 mM KCl  
10 mM  $\beta$ -Natrium-Glycerophosphat, pH 7,0,  
2 mM EGTA, pH 8,5  
1 mM EDTA pH 8,0  
1 mM DTT  
2 mM  $MgCl_2$

MOPSO-Puffer

50 mM MOPSO-NaOH, pH 7,5  
40 mM KCl  
10 mM  $MgCl_2$   
5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

10 x LNB-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 8,0  
1,2 mM  $MgCl_2$   
10 mM KCl  
1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol  
10 mM ATP, pH 7,0  
2 mM dNTPs (je 0,5 mM)  
0,5 mg/ml BSA

2 x TE-Stop/SDS-Lösung

40 mM Tris-HCl, pH 7,5  
2 mM EDTA  
2 % Natriumdodecylsulfat (SDS)

Ladepuffer (End-Joining-Gel)

2,5 mM Tris-HCl, pH 8,0  
50 mM EDTA, pH 8,0  
77 % Glycerol  
0,01 % BPB  
0,01 % XC

Agarose-Gel

1 g Agarose in 100 ml 1 x TBE-Puffer (1 %iges Standard-Gel)

0,7 g Agarose in 100 ml 1 x TAE-Puffer (0,7 %iges End-Joining Gel)

Proteinase K

20 mg/ml in didest. H<sub>2</sub>O

Transfer-Puffer (TS)

0,6 M NaCl

0,4 M NaOH

Neutralisierungs-Puffer (TN)

1 M NaCl

0,5 M Tris-HCl, pH 7,2

DNA Lade-Puffer

30 % Glycerol

0,25 % Bromophenol Blau

0,25 % Xylen-Cyanol

PBS (phosphate buffered saline)

140 mM NaCl

3 mM KCl

8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

10 x TBE-Puffer (Elektrophorese-Puffer)

1,8 M Tris-base

1,8 M Borsäure

20 mM EDTA

50 x TAE-Puffer (Elektrophorese-Puffer)

2 M Tris-base

100 mM EDTA

pH 8,5

Waschpuffer 1

120 g Urea

1 g SDS

100 ml 0,5 M Na-Phosphat pH 7,0 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ )

8,7 g NaCl

1.0 M  $\text{MgCl}_2$  1 ml

2 g Blocking Reagenz

auf 1 l mit didest.  $\text{H}_2\text{O}$

20 x Waschpuffer 2

121 g Tris base

112 g NaCl

pH 10,0

auf 1 l mit didest.  $\text{H}_2\text{O}$

## 7.2. Abkürzungsverzeichnis

$\lambda$	Lambda
$\mu$	Mikro ( $10^{-6}$ )
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BER	Basen-Exzisions-Reparatur
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
CDK	cyclin-abhängige Kinase
CFE	Cell-free Extract/Zellfreier Extrakt
CHO	Chinese Hamster Ovary
CtIP	C-terminal binding protein interacting protein
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
didest.	didestilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PKcs	DNA-abhängige Protein Kinase
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EJ	End-Joining
ERCC1	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1
Exo1	Exonuklease 1
FCS	Fötale Kälberserum
G	Guanin
Gy	Gray
h	Stunden
Hg	Quecksilber
HNSCC	Hals-/Kopf-Plattenepithelkarzinom
HPV	Humanes Papillom-Virus
HR	Homologe Rekombination
Ig	Immunglobulin
Kap1	KRAB assoziiertes Protein 1
kb	Kilobasen
kV	Kilovolt
l	Liter
LigIII	DNA-Ligase 3

---

LigIV	DNA-Ligase 4
LNB	Lade-NTP-BSA
M	Molar (mol/l)
MEM	Minimum Essential Medium
min	Minuten
miR	Mikro-RNA
MOPSO	2-Hydroxy-4-morpholinpropansulfonsäure
Mre11	Meiotic recombination 11 (3'-5' exonuclease)
MRN	Mre11/Rad50/Nbs1
n	Nano ( $10^{-9}$ )
Nbs1	Nijmegen-Breakage-Syndrom 1/Nibrin
NHEJ	Nicht-homologes End-Joining
nt	Nukleotide
p	Piko ( $10^{-12}$ )
PARP1	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Plattierungseffizienz
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Re	Restriktionsenzym
RecA	Rekominase A
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPA	Replikationsprotein
rpm	Rotationen pro Minute
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SF	Überlebensfraktion
ss	Einzelstrang/einzelsträngig
SSA	Single-Strand Annealing
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TN	Neutralisierungspuffer
TS	Transferpuffer
UV	Ultraviolett
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
wt	Wildtyp
XC	Xylen Cyanol
XLF	XRCC4-like Factor
XRCC4	X-ray repair cross-complementing protein 4
xrs	X-ray-sensitive

### 7.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Mechanismus des nicht-homologen End-Joinings (NHEJ). .....	4
Abbildung 2: Schema der Verknüpfung nicht-homologer DNA-Enden durch Auffüllen fehlender Basen und Ligation.....	5
Abbildung 3: Überblick über die Hauptfaktoren der Homologen Rekombination (HR). .....	6
Abbildung 4: Schematische Darstellung des <i>Single-Strand Annealing</i> (SSA).....	8
Abbildung 5: Ursprung der verwendeten Kopf-/Hals-Tumorzellen. ....	19
Abbildung 6: Herstellung zellfreier Extrakte in der Übersicht. ....	21
Abbildung 7: Plasmid-Substrate für das <i>in vitro</i> End-Joining. ....	22
Abbildung 8: Effekt der HCl-Behandlung des Agarosegels auf die Transferqualität im Southern-Blot. ....	26
Abbildung 9: Die End-Joining-Effizienz ist bei 25 °C höher als bei 37 °C. ....	30
Abbildung 10: Die Bildung zirkulärer Produkte ist effizienter bei 25 °C.....	31
Abbildung 11: Die Verknüpfung von DNA-Enden <i>in vitro</i> ist eine sehr schnelle Reaktion und findet bereits nach wenigen Minuten statt.....	32
Abbildung 12: Die Änderung des Verhältnisses von DNA zu Protein hat Auswirkung auf Produktbildung bzw. Degradation.....	33
Abbildung 13: Sequenz des parentalen Substrat-Plasmids im Bereich des induzierten Doppelstrangbruches. ....	35
Abbildung 14: Kohäsive DNA-Enden unterliegen geringeren Degradationseffekten und resultieren in einem höheren Anteil zirkulärer Produktformen.....	36
Abbildung 15: Zusammenstellung und theoretische Verteilung der möglichen Enden- Verknüpfungen bei Substrat-Plasmiden mit nicht-kohäsiven DNA Enden.....	37
Abbildung 16: In CFE sind Head-to-Tail-Produkte vorherrschend.....	38
Abbildung 17: Quantifizierung der PCR-Produkte zur Ermittlung der Verteilung auf H:H-, T:T- und H:T-Verknüpfungen.....	39
Abbildung 18: Tumor-Zelllinien unterscheiden sich in der Bildungskapazität zirkulärer Produkte.....	40
Abbildung 19: Schematische Darstellung von <i>in vitro</i> End-Joining und Transformationsassay. ....	41
Abbildung 20: Sowohl die kovalent geschlossene cc-Plasmid-Form als auch die genickte oc-Form führt transformiert in <i>E. coli</i> zu Koloniebildung.....	42
Abbildung 21: Auswirkung der Ku80-Defizienz auf die Produktbildung im CFE. ....	44
Abbildung 22: Die Defizienz in DNA-PKcs führt zu stark verringerter <i>in vitro</i> End-Joining-Effizienz.....	45
Abbildung 23: Die Defizienz in LigIV verhindert End-Joining.....	45

---

Abbildung 24: Einfluss eines NHEJ-Defektes auf die End-Joining-Effizienz.....	46
Abbildung 25: Einfluss eines Defektes von Kernfaktoren des NHEJ auf die Reparaturgenauigkeit. ....	50
Abbildung 26: Einfluss eines Defektes von Kernfaktoren des NHEJ auf die Reparaturgenauigkeit. ....	51
Abbildung 27: Tumorzelllinien unterscheiden sich in ihrer <i>in vitro</i> End-Joining-Kapazität.....	54
Abbildung 28: Unterschiede in der Gesamteffizienz des End-Joinings in CFE aus Hals-/Kopf-Tumorzelllinien. ....	55
Abbildung 29: Quantifizierung der Dimere, welche als häufigste Produkte des End-Joinings in CFE aus Hals-/Kopf-Tumorzelllinien auftreten. ....	56
Abbildung 30: Die Unterschiede in den End-Joining-Kapazitäten der Tumorzelllinien zeigen sich in der Bildungseffizienz für zirkuläre Produkte.....	57
Abbildung 31: Mit Hilfe des Transformationsassays lassen sich klassische NHEJ-Kapazitäten quantitativ messen. ....	59
Abbildung 32: Korrelationen der End-Joining-Effizienzen ermittelt durch Southern-Blot und Transformationsassay. ....	60
Abbildung 33: Korrelation der End-Joining-Effizienzen aus Southern-Blot und Transformationsassay. ....	61
Abbildung 34: Die Deletionslängen an reparierten DSBs aus <i>in vitro</i> End-Joinings in Hals- /Kopf-Tumorzelllinien sind gering und beschränken sich auf die Überhänge an den DSBs.....	62
Abbildung 35: Wahl des Reparaturweges.....	63
Abbildung 36: Zellüberleben von Hals-/Kopf-Tumorzelllinien nach Bestrahlung.....	65
Abbildung 37: Zelluläre Strahlenantwort von Hals-/Kopf-Tumorzelllinien. ....	66
Abbildung 38: Korrelation von Zellüberleben und residuellen $\gamma$ H2AX-Foci nach 3 Gy Bestrahlung.....	67
Abbildung 39: Korrelation der Überlebensfraktion nach 3 Gy mit der Bakterien- Transformationseffizienz aus dem <i>in vitro</i> End-Joining-Assay. ....	68
Abbildung 40: Vergleich des Zellüberlebens von konfluent und exponentiell wachsenden UTSCC8 und UTSCC5 nach Bestrahlung mit 3 und 6 Gy. ....	69
Abbildung 41: Korrelation von residuellen $\gamma$ H2AX-Foci 24 h nach 3 Gy mit der Bakterien-Transformationseffizienz aus dem <i>in vitro</i> End-Joining-Assay. ....	70
Abbildung 42: Korrelation der Verwendungshäufigkeit von SSA <i>in vitro</i> mit der Anzahl an residuellen $\gamma$ H2AX-Foci 24 h nach 3 Gy. ....	71



## 7.4. Veröffentlichungen

### 7.4.1. Publikationen

Kasten-Pisula U., Menegakis A., Brammer I., Borgmann K., Mansour W. Y., Degenhardt S., Krause M., Schreiber A., Dahm-Daphi J., Petersen C., Dikomey E., Baumann M.

“The extreme radiosensitivity of the squamous cell carcinoma SKX is due to a defect in double-strand break repair”, *Radiother Oncol* 2009; 90: 257-264

Belmar Campos C., Degenhardt S., Mansour W. Y., Dahm-Daphi J.

„DNA-Doppelstrangbruchreparatur in CV1-Zellen“, *Exp Strahlenther Klin Strahlenbiol* 2009; 18: 82-85

Degenhardt S., Dreffke K., Dahm-Daphi J., Mansour W. Y.

“Cell free extracts to assess non-homologous endjoining and single-strand annealing in mammalian cell systems.” Paper in preparation

### 7.4.2. Präsentationen / Konferenzteilnahmen

09/2010 S. Degenhardt (Germany), W. Mansour, U. Kasten-Pisula, J. Dahm-Daphi  
“Tumour cells and their switch to error-prone DSB repair pathways”, ESTRO 29, Barcelona, Spanien (Vortrag)

09/2010 S. Degenhardt, W. Y. Mansour, U. Kasten-Pisula, E. Dikomey, J. Dahm-Daphi  
“*In vitro* end-joining efficiency of human tumour cells correlates with residual  $\gamma$ H2AX foci *in vivo*”, GBS, Hamburg (Poster)

09/2009 S. Degenhardt, T. Rieckmann, U. Kasten-Pisula, W. Y. Mansour, E. Becker, K. Borgmann, E. Dikomey, J. Dahm-Daphi  
“Characterisation of the radiosensitive human tumour cell line SKX”, zweites deutsch-französisches DNA Repair-Meeting, Konstanz (Poster)

09/2009 S. Degenhardt, T. Rieckmann, U. Kasten-Pisula, W. Y. Mansour, E. Becker, E. Dikomey, J. Dahm-Daphi  
“Characterisation of the radiosensitive human tumour cell line SKX”, GBS, Essen (Poster)

- 09/2008 Rieckmann T., Kocken S., Köcher S., Rhein T., Dahm-Daphi J., Mansour W.Y.  
“Ku-dependent and -independent end-joining of I-SceI-induced DSB differ in their velocity and fidelity but are equally efficient”, zehntes Biennales Meeting der DGDR, Berlin (Poster)

## 7.5. Danksagung

Ich möchte mich zu allererst bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Jochen Dahm-Daphi bedanken für die interessante Fragestellung meiner Arbeit, für die Freiheiten während ihrer Umsetzung, für die selbst im Urlaub bestehende Erreichbarkeit und für die immer positive Bestärkung, die mich auch in einer schwierigen Phase der Arbeit motiviert hat. Danke für die fröhliche und lockere Stimmung innerhalb der Arbeitsgruppe, zu der die vielen kleinen Espresso und Franzbrötchen sicher ihren Beitrag geleistet haben.

Herrn Prof. Ekkehard Dikomey danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit im Labor für Strahlenbiologie und experimentelle Radioonkologie anfertigen zu dürfen, und für die Übernahme des Disputationsgutachtens.

Bei Herrn Prof. Thomas Dobner möchte ich mich für die Bereitschaft bedanken, das zweite Dissertationsgutachten zu übernehmen, und Herrn Prof. Wilhelm Schäfer danke ich für die Übernahme des Disputationsgutachtens. Ich möchte auch Herrn Prof. Hartwig Lüthen für den Vorsitz des Prüfungsausschusses sowie allen Fragestellern für ihre Mitwirkung an meiner Disputation danken.

Ich danke allen Mitarbeitern des Labors und besonders der Arbeitsgruppe Dahm-Daphi für die tolle Zusammenarbeit und die gute Arbeitsatmosphäre. Ich hatte eine wirklich tolle, erfolgreiche Zeit bei euch, und es war mir eine Freude mit euch zusammenzuarbeiten. Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Wael Yassin Mansour für seine unendliche Diskussionsbereitschaft bei meist einer Tasse Kaffee, für seine ansteckende Begeisterung sowohl für seine als auch meine Arbeit, und für die vielen Tricks und Ideen im Laboralltag.

Frau Alexandra Zielinski möchte ich besonders für ihre immer freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Labor sowie für die vielen lustigen Stunden während und nach der Arbeit danken.

Bei meiner Familie, bei meinen Freunden und Bekannten möchte ich mich für die vielen lieben Aufmunterungen sowie die Unterstützung und Motivation in jeglicher Form herzlich bedanken. Darüber hinaus danke ich Natalie fürs ungeliebte Korrekturlesen. Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann für seine unendliche Geduld und Unterstützung.