

**Effekt des Knockdowns von *Rad51* mittels RNA-Interferenz
auf die Homologie-vermittelte DNA-Reparatur**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Kerstin Büttner

Hamburg, März 2004

Datum der Disputation: 04.06.2004

Gutachter: Prof. Dr. E. Dikomey

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Mechanismen zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	3
1.1.1	Nicht Homologie-vermittelte Mechanismen (NHEJ)	3
1.1.2	Homologie-vermittelte Mechanismen (HR)	4
1.1.2.1	Konservative HR	4
1.1.2.2	Nicht-konservative HR	6
1.2	Die Proteine der <i>RAD52</i> -Epistasisgruppe	7
1.2.1	Das RAD51-Protein	7
1.2.2	Modell der homologen Paarung durch Rad51p	8
1.2.3	Die Bedeutung von RAD51 in höheren Organismen	9
1.2.3.1	Interaktion von RAD51 mit anderen Proteinen	10
1.2.3.2	Bedeutung von RAD51 für die Tumorigenese	11
1.2.4	RAD51-Paraloge in höheren Organismen	12
1.2.5	Die Bedeutung der <i>RAD52</i> -Epistasisgruppe für die Viabilität	13
1.3	Die Bedeutung der HR verglichen mit dem NHEJ	14
1.4	Ziel der Arbeit	16
1.5	RNA-Interferenz (RNAi)	16
2	MATERIALIEN UND METHODEN	19
2.1	Materialien	19
2.1.1	Chemikalien	19
2.1.2	Antikörper	19
2.1.3	DNA-Farbstoffe	20
2.1.4	Transfektionsagenzien	20
2.1.5	siRNAs	21
2.1.6	Puffer und Lösungen	22
2.1.7	Größenstandards	24
2.1.8	Zelllinien	24
2.1.9	Reagenzien und Medien für die Zellkultur	25
2.1.10	Verbrauchsmaterialien	25

2.1.11	Geräte	26
2.1.12	Software und Datenbanken	27
2.2	Methoden	28
2.2.1	Zellkulturtechniken	28
2.2.1.1	Zellkultivation	28
2.2.1.2	Kryokonservierung	29
2.2.2	Genetische Nomenklatur	29
2.2.3	Bestrahlung und Dosimetrie	29
2.2.4	RNAi gegen <i>Rad51</i> in Hamsterzellen	30
2.2.4.1	Wahl geeigneter siRNA-Sequenzen	30
2.2.4.2	RNAi gegen <i>Rad51</i>	30
2.2.5	Methodische Vorarbeiten	33
2.2.5.1	Optimierung der Transfektionseffizienz	33
2.2.5.2	Mikroskopischer Nachweis der Aufnahme von siRNA	33
2.2.5.3	Optimierung der Inhibition der RAD51-Expression	34
2.2.6	Western-Blot	34
2.2.6.1	Proteinisolierung	34
2.2.6.2	Proteinbestimmung	35
2.2.6.3	Western-Blot	35
2.2.7	Detektion von RAD51-Foci	38
2.2.8	Zellzyklusmessung	39
2.2.9	Chromosomenaberrationen	39
2.2.9.1	Mitotischer Index	39
2.2.9.2	G ₁ -Assay	40
2.2.9.3	G ₂ -Assay	40
2.2.9.4	Präparation der Metaphasen	41
2.2.10	Koloniebildungstest	42
2.2.10.1	Strahlenempfindlichkeit in der G ₁ -Phase	42
2.2.10.2	Strahlenempfindlichkeit in der frühen S-Phase	42
2.2.10.3	Strahlenempfindlichkeit in der späten S/G ₂ -Phase	43
2.2.10.4	Empfindlichkeit gegenüber MMC	43
2.2.10.5	Färbung und Analyse der Kolonien	43
3	ERGEBNISSE	44
3.1	Methodische Vorarbeiten zur RNAi	44
3.1.1	Optimierung der Transfektionseffizienz	44

3.1.1.1	Konzentration des Transfektionsagens	44
3.1.1.2	Konzentration der siRNA	50
3.1.1.3	Kontrolle der Aufnahme von siRNA im Mikroskop	52
3.1.2	Optimierung der Inhibition der RAD51-Expression	53
3.1.2.1	Wahl geeigneter siRNA-Sequenzen gegen <i>Rad51</i>	53
3.1.2.2	Effekt der eingesetzten Menge siRNA und TransIT-TKO	55
3.2	Inhibition der RAD51-Expression	57
3.3	Effekt der <i>Rad51</i> -Interferenz auf die Focibildung	58
3.4	Inhibition der RAD51-Expression in Abhängigkeit des Zellzyklus	61
3.5	Effekt der <i>Rad51</i> -Interferenz auf die Zellzyklusverteilung	64
3.6	Einfluss der <i>Rad51</i> -RNAi auf Chromosomenaberrationen	66
3.6.1	Effekt auf Chromosomentyp-Aberrationen aus der G ₁ -Phase (<i>G₁-Assay</i>)	66
3.6.2	Effekt auf Chromatidtyp-Aberrationen der G ₂ -Phase (<i>G₂-Assay</i>)	69
3.7	Strahlenempfindlichkeit nach Inhibition der RAD51-Expression	72
3.7.1	Strahlenempfindlichkeit nach Bestrahlung in der G ₁ -Phase	72
3.7.2	Strahlenempfindlichkeit nach Bestrahlung in der S/G ₂ -Phase	74
3.8	RNAi gegen <i>Rad51</i> in <i>xrs5</i> -Zellen	75
3.8.1	Strahlenempfindlichkeit von <i>xrs5</i> -Zellen nach <i>Rad51</i> -RNAi	76
3.9	Effekt der <i>Rad51</i> -Interferenz auf die MMC-Empfindlichkeit	77
4	DISKUSSION	79
4.1	Etablierung der RNAi	79
4.1.1	Optimierung der Transfektionseffizienz	80
4.1.1.1	Konzentration des Transfektionsagens	80
4.1.1.2	Konzentration der siRNA	82
4.1.1.3	Lokalisation der siRNA in der Zelle	83
4.1.2	Optimierung der Inhibition der RAD51-Expression	84
4.1.2.1	Wahl geeigneter siRNA-Sequenzen	84
4.1.2.2	Optimierung der <i>Rad51</i> -RNAi	85
4.1.3	Effizienz der <i>Rad51</i> -Interferenz	86
4.2	Phänotyp des <i>Rad51</i> -Knockdowns	89
4.2.1	Inhibition der RAD51-Focibildung	89
4.2.2	Inhibition der RAD51-Expression während des Zellzyklus	90

4.2.3	Einfluss der <i>Rad51</i> -Interferenz auf den Zellzyklus	92
4.2.4	Einfluss von RAD51 auf spontane chromosomale Aberrationen	92
4.2.5	Einfluss von RAD51 auf strahleninduzierte chromosomale Aberrationen	94
4.2.5.1	Effekt von RAD51 auf Chromosomentyp-Aberrationen aus der G ₁ -Phase	94
4.2.5.2	Effekt von RAD51 auf Chromatidtyp-Aberrationen aus der G ₂ -Phase	95
4.2.6	Effekt der <i>Rad51</i> -RNAi auf die Strahlenempfindlichkeit	96
4.2.6.1	Einfluss von RAD51 auf die Strahlenempfindlichkeit in der G ₁ -Phase	96
4.2.6.2	Einfluss von RAD51 auf die Strahlenempfindlichkeit in der S/G ₂ -Phase	97
4.2.6.3	Bedeutung von RAD51 für die Strahlenempfindlichkeit in CHO-K1-Zellen	98
4.2.6.4	Effekt der RAD51-Inhibition auf die Strahlenempfindlichkeit in xrs5-Zellen	100
4.2.7	Effekt der <i>Rad51</i> -Interferenz auf die MMC-Empfindlichkeit	101
4.2.8	Die Bedeutung von RAD51 für die DNA-Reparatur	103
4.2.8.1	Das Modell von Lambert und Lopez (2000)	103
4.2.8.2	Die RAD51-vermittelte HR im Vergleich zum NHEJ	106
4.2.8.3	Die Bedeutung von RAD51 verglichen mit seinen Paralogen	107
4.3	Zusammenfassung des Phänotyps der <i>Rad51</i> -RNAi und Ausblick	109
5	ZUSAMMENFASSUNG	110
6	LITERATUR	112
6.1	Quellen aus dem Internet	130
7	ANHANG	131
7.1	Allgemeine Abkürzungen	131
7.2	Sequenz der mRNA für <i>Rad51</i>	134
	DANKSAGUNG	136
	BERUFLICHER WERDEGANG	138

1 Einleitung

Für alle lebenden Organismen ist die korrekte Weitergabe des genetischen Materials von grundlegender Bedeutung. Die Integrität des Genoms wird durch Schäden an der DNA jedoch kontinuierlich gefährdet. DNA-Schäden können Mutationen auslösen, die wiederum zum Absterben der Zelle oder zur Entartung führen können. Die Fähigkeit, solche Schäden rechtzeitig zu erkennen und zu beseitigen, ist essentiell. Die genetische Stabilität zu erhalten zählt zu den wichtigsten zellulären Aufgaben.

Für die Erzeugung von DNA-Schäden sind exogene Prozesse ebenso verantwortlich wie endogene. Zu den exogenen genotoxischen Agenzien gehören z. B. Umweltchemikalien und Strahlung. Neben UV-Strahlung schädigt vor allem ionisierende Strahlung die DNA. Die durch ionisierende Strahlung bedingte effektive Belastung der deutschen Bevölkerung lag 2002 bei 4,1 mSv (BMU, 2004). Die eine Hälfte ist auf natürliche Quellen zurückzuführen, insbesondere auf die Inhalation von Radon und seinen Zerfallsprodukten. Die andere Hälfte resultiert aus künstlichen Quellen, vor allem aus der medizinischen Röntgendiagnostik. Zu den endogenen genotoxischen Agenzien zählen z. B. Sauerstoffradikale, die im Zellstoffwechsel in großer Zahl entstehen. In der DNA einer jeden Zelle werden auf diese Weise täglich 20.000 oxidative Läsionen induziert (Pfeiffer et al., 2000).

Alle Organismen haben Reparaturmechanismen entwickelt, so dass die Wahrscheinlichkeit für eine spontane Mutation in einem Gen unter 10^{-9} pro Zellgeneration liegt (Knippers, 1995). Nach Röntgenbestrahlung können 99 % aller Schäden repariert werden (Dikomey et al., 2001). Das genetische Material wird folglich selbst nach einem genotoxischen Insult gut konserviert. Das liegt vor allem an der Struktur der DNA: Mit Hilfe des komplementären Stranges kann ein Schaden beseitigt werden, ohne dass Information verloren geht.

Es gibt verschiedene Reparaturwege für die einzelnen Schadenstypen. Basenschäden und Einzelstrangbrüche werden durch die Basenexzisions-, Nukleotidexzisions- (NER) oder Mismatchreparatur beseitigt, Doppelstrangbrüche über nicht-homologes Endjoining oder homologe Rekombination (Dikomey et al., 2001; Pfeiffer et al., 2000). Vernetzungen zwischen beiden DNA-Strängen bzw. zwischen DNA und Protein werden vermutlich durch die Kopplung verschiedener Mechanismen repariert.

Vor allem in Hinblick auf die Tumorigenese spielt die Reparaturgenauigkeit eine bedeutende Rolle. Ein Defekt in der Reparatur von DNA-Schäden erhöht die Mutationsrate. Das wird am Beispiel des hereditären nonpolyposen kolorektalen Karzinoms (HNPCC) deutlich. Das HNPCC

zählt zu den autosomal-dominant vererbten Tumorerkrankungen mit hoher Penetranz. Bei den betroffenen Patienten ist die Mismatch-Reparatur beeinträchtigt, so dass Replikationsfehler nicht adäquat beseitigt werden können (Wagener, 1999). Dadurch akkumulieren Mutationen. Aus einer einzelnen Zelle, deren DNA schrittweise durch verschiedene solche Mutationen geschädigt wird, kann in der Folge ein Karzinom entstehen (Fearon und Vogelstein, 1990). Neben dem HNPCC gibt es zahlreiche weitere Erkrankungen, die zu einer vermehrten Tumorentstehung führen und mit einer fehlerhaften DNA-Reparatur assoziiert sind: z. B. *Xeroderma pigmentosum*, *Ataxia teleangiectasia*, das *Nijmegen breakage syndrome*, das Werner Syndrom, das Bloom Syndrom oder die Fanconi Anämie (Pfeiffer et al., 2000; Thompson und Schild, 2002; van Gent et al., 2001).

Ionisierende Strahlung kann durch Induktion von DNA-Schäden zur Kanzerogenese beitragen. Dies limitiert z. B. den Einsatz von Strahlung in der medizinischen Diagnostik. Ein Gray Röntgenstrahlung erzeugt 3.000 bis 4.000 Basenschäden pro Zelle, 1.000 Einzelstrangbrüche und 40 Doppelstrangbrüche (*double strand breaks*, DSBs) (Dikomey et al., 2001). Darüber hinaus treten gehäufte Läsionen (200 bis 400/Zelle/Gy) und Vernetzungen (*crosslinks*) zwischen Proteinen und DNA und den DNA-Strängen (150 bis 200/Zelle/Gy) auf (Dikomey et al., 2001). Selbst kleine Strahlendosen können Mutationen und in der Folge Krebs erzeugen. Es wurde berechnet, dass durch die natürliche Strahlenbelastung jährlich knapp 10.000 Menschen an Krebs sterben, durch die medizinische knapp 3.000 (Sauer, 2001).

Zur bedrohlichsten Läsion für die Zelle zählt der Doppelstrangbruch (DSB), da in diesem Fall beide Stränge der DNA beschädigt sind (Khanna und Jackson, 2001; van Gent et al., 2001). Die Information zur Reparatur kann folglich nicht vom komplementären Strang abgelesen werden. DSBs entstehen spontan vor allem während der Replikation. Wird ein DSB nicht oder falsch repariert, so kann es zu chromosomalen Aberrationen kommen, die Translokationen und den Verlust oder die Amplifikation von genetischem Material zur Folge haben (Dikomey et al., 2003; Khanna und Jackson, 2001; van Gent et al., 2001). Diese strukturellen chromosomalen Aberrationen gefährden die Integrität des Genoms in besonderem Maße. Aufgrund dieser Zusammenhänge ist es von großem Interesse, die Grundlagen der DSB-Reparatur im Detail zu verstehen.

Besondere Bedeutung hat die Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden in Hinblick auf die Strahlentherapie. Hier spielt sie einerseits für das Ansprechen eines Tumors auf die Therapie als auch für die Normalgewebsreaktion eine Rolle. Das Verständnis von Reparaturprozessen hat in der Vergangenheit die Therapie verbessert und wird sie auch künftig weiter optimieren. Mehrere

mit der DNA-Reparatur assoziierte Proteine wurden als molekulares Ziel für *radiosensitizer* diskutiert (Ortiz et al., 2004; Russell et al., 2003; Sarkaria und Eshleman, 2001; Veuger et al., 2003; Wachters et al., 2003).

1.1 Mechanismen zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Die Mechanismen zur Reparatur von DSBs lassen sich prinzipiell in zwei Kategorien einteilen: in nicht Homologie-vermittelte und Homologie-vermittelte (Pâques und Haber, 1999; Pfeiffer et al., 2000). Bei den erstgenannten rekombinieren DNA-Sequenzen, deren Basen komplementär zueinander sind und die daher eine Homologie aufweisen, bei den letztgenannten ist keine Übereinstimmung der DNA-Sequenz notwendig. In Hefe übernehmen allein Homologie-vermittelte Mechanismen die DSB-Reparatur (Christmann et al., 2003). Es wird angenommen, dass die meisten DSBs in Säugerzellen hingegen über nicht-homologe Mechanismen repariert werden. Erst in den vergangenen Jahren wurde eine Rolle für Homologie-vermittelte Mechanismen auch in Säugern etabliert (Liang et al., 1998; Lin et al., 1999).

1.1.1 Nicht Homologie-vermittelte Mechanismen (NHEJ)

Die nicht Homologie-vermittelten Mechanismen werden auch illegitime Rekombination oder nicht-homologes Endjoining (NHEJ) genannt.

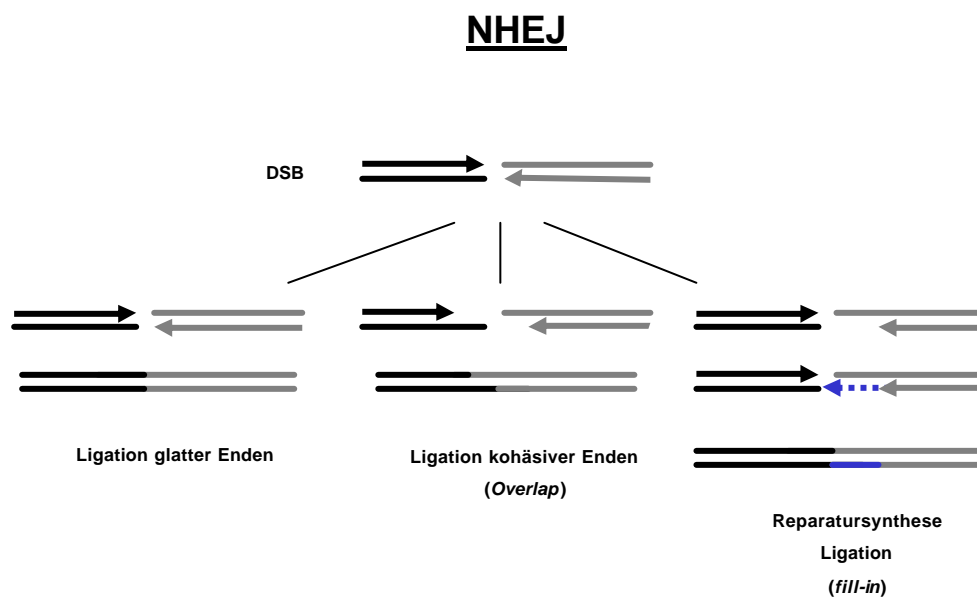


Abbildung 1: Mechanismen des KU70/80-abhängigen NHEJ nach Pfeiffer et al. (2000).

Beim NHEJ sind keine Homologien für die Verknüpfung der beiden DNA-Enden vonnöten, wenn auch oftmals Mikrohomologien genutzt werden. Es gibt mindestens zwei verschiedene Mechanismen des NHEJ. Der vorherrschende ist abhängig von den DNA-bindenden Proteinen KU80 und KU70, der DNA-Proteinkinase und der Ligase XRCC4 (*x-ray cross complementing*). Der zweite ist nur nachweisbar, wenn das KU70/80-Heterodimer nicht funktional ist. Mittels NHEJ werden zwei DNA-Enden unabhängig von ihrer Sequenz miteinander ligiert. Der Prozess ist in der Regel ungenau, da der DSB zunächst in eine ligierbare Form überführt wird und dabei Insertionen oder Deletionen auftreten (Pfeiffer, 1998).

1.1.2 Homologie-vermittelte Mechanismen (HR)

Die Homologie-vermittelten Mechanismen sind mit der homologen Rekombination verwandt und werden daher auch homologe Rekombinationsreparatur (HR) genannt. Für die HR ist eine Homologie zwischen den rekombinierenden Sequenzen erforderlich, diese kann über mehrere hundert Basen reichen.

Die Einteilung der Mechanismen zur HR wurde im Wesentlichen von Pfeiffer et al. (2000) und Pâques und Haber (1999) übernommen. Demnach lassen sich konservative und nicht-konservative Mechanismen unterscheiden. Bei den erstgenannten ist es prinzipiell möglich, die DNA-Sequenz zu erhalten, bei den letztgenannten kommt es ähnlich wie beim NHEJ zum Verlust von DNA-Sequenzen. Die hier beschriebenen Mechanismen wurden in erster Linie in *S. cerevisiae* untersucht. Es ist davon auszugehen, dass diese auch in höheren Säugern existieren. Als Modell für höhere Organismen hat sich die B-Zelllinie DT40 aus dem Huhn etabliert, da diese eine ungewöhnlich hohe Rate an gezielter DNA-Integration aufweist und daher Knockout-(k.o.)-Linien vergleichsweise einfach zu erzeugen sind (Winding und Berchtold, 2001).

1.1.2.1 Konservative HR

Bei den konservativen Mechanismen wird zur Reparatur des DSB das Schwesterchromatid oder das homologe Chromosom kopiert. Drei Modelle beschreiben diesen Prozess: DSB-Reparatur (DSBR), *synthesis-dependent strand annealing* (SDSA) und *break-induced replication* (BIR) (Abbildung 2). Allen gemein ist die Möglichkeit zur akkuraten Reparatur des DSB.

Nach dem DSBR-Modell von Szostak et al. (1983) werden die beiden Enden des DSB von 5' nach 3' exonukleolytisch abgebaut. Die entstehenden 3'-Enden dringen in die homologe Matrize ein und initiieren als Primer die DNA-Synthese. Der Prozess führt zur Formation einer

Heteroduplex, die von verzweigten Strukturen begrenzt wird, den *Holliday junctions*, die endonukleolytisch aufgelöst werden müssen. Je nachdem, wie die *Holliday junctions* aufgelöst werden, kommt es zu einem *crossing-over* oder nicht. Die DNA-Synthese ist semikonservativ, d. h. die neu synthetisierte DNA befindet sich in beiden Doppelsträngen.

Neben diesem einfachen Modell existieren mehrere weitere, die unter dem Begriff SDSA zusammengefasst werden (Pâques und Haber, 1999). Sie wurden entwickelt, da in mitotischen Zellen nur selten ein *crossing-over* zu beobachten ist. Die neu synthetisierten DNA-Stränge werden in diesem Fall von der Matrize gelöst und hybridisieren. Die DNA-Synthese ist konservativ, d. h. die neu synthetisierte DNA befindet sich im selben Doppelstrang.

Konservative HR

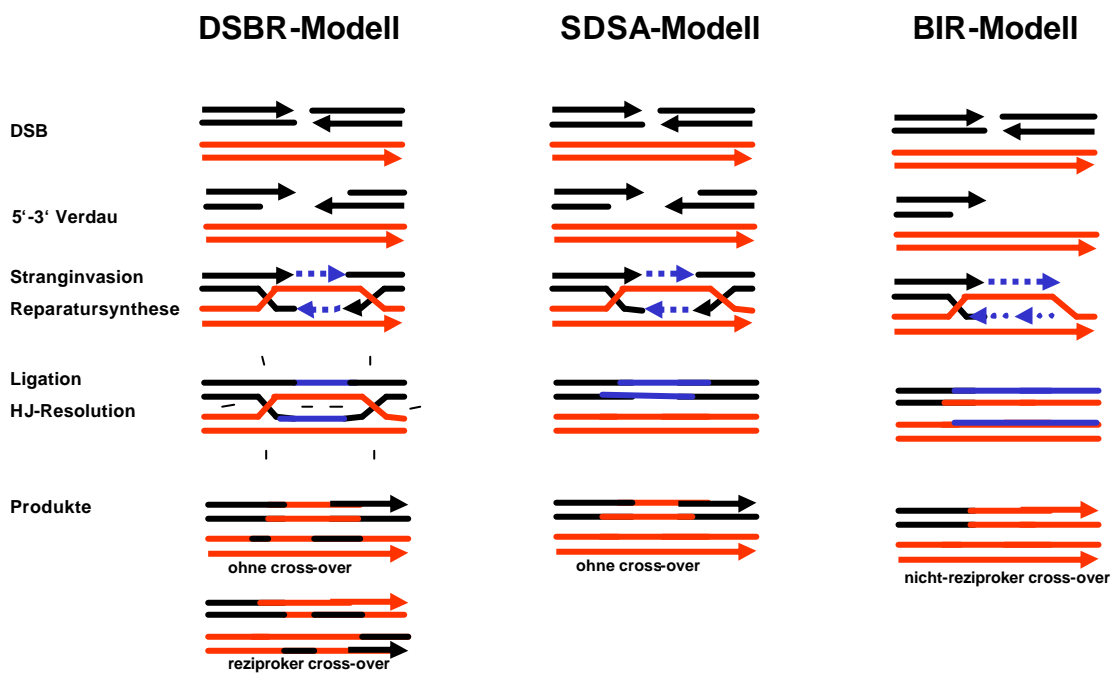


Abbildung 2: Mechanismen der konservativen HR nach Pfeiffer et al. (2000).

DSBR und SDSA erstrecken sich über relativ kurze Bereiche (*short patch*). Beide Mechanismen werden auch als Genkonversion klassifiziert. Das BIR-Modell umfasst im Vergleich dazu längere Bereiche (*long patch*). Nach der Stranginvasion eines 3'-Endes paart der verdrängte Strang nicht mit dem zweiten 3'-Ende. Es kommt zur Neusynthese von DNA, die sich bis zum Ende des Chromosoms erstrecken kann. BIR könnte daher insbesondere bei der

Erhaltung von Telomeren und der Reparatur gebrochener Replikationsgabeln eine wichtige Rolle spielen (Kraus et al., 2001; Pâques und Haber, 1999).

1.1.2.2 Nicht-konservative HR

Wenn ein DSB zwischen zwei *Repeats* auftritt, so kann er über das *single strand annealing* (SSA) repariert werden (Lin et al., 1984). Die Enden des DSB werden ebenfalls resektiert, so dass lange einzelsträngige Enden entstehen. Die beiden komplementären Stränge der homologen Sequenz hybridisieren, die überstehenden nicht-homologen Enden werden abgebaut und die verbleibende Lücke durch DNA-Synthese gefüllt. Dabei geht die repetierte Sequenz einmal verloren (Abbildung 3).

Nicht-konservative HR

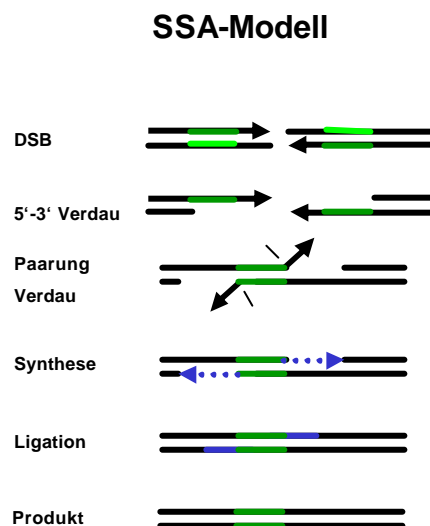


Abbildung 3: Modell der nicht-konservativen HR nach Pfeiffer et al. (2000) und Pâques und Haber (1999).

Die HR ist potentiell mutagen, wenn das homologe (*loss of heterozygosity*) oder heterologe Chromosom als Reparaturmatrize verwendet wird. Heterologe Chromosomen können aufgrund der zahlreichen *repeats* im Genom höherer Organismen anstelle homologer Sequenzen verwendet werden. Üblicherweise findet die HR jedoch zwischen Schwesterchromatiden statt, zwischen homologen bzw. heterologen Chromosomen tritt sie um zwei bis drei Größenordnungen seltener auf (Johnson und Jasin, 2000; Liang et al., 1998; Moynahan und Jasin, 1997; Richardson et al., 1998).

Die verschiedenen Mechanismen zur HR stehen in Konkurrenz zueinander. Johnson und Jasin (2000) analysierten die Reparatur Enzym-induzierter DSBs und zeigten, dass die konservative HR für 3/4 und die nicht-konservative HR für 1/4 der Homologie-vermittelten Ereignisse verantwortlich ist. Die konservative HR war nicht mit *crossing-over* assoziiert und umfasste zu 76 % *short tracts* und zu 22 % *long tracts*. Es ist jedoch zu bedenken, dass die Ergebnisse solcher Untersuchungen sehr stark von der Art des verwendeten Rekombinationssubstrates abhängen, so dass eine Aussage über den Anteil der verschiedenen Mechanismen an der DSB-Reparatur nicht möglich ist.

1.2 Die Proteine der RAD52-Epistasisgruppe

Die Reparatur über homologe Rekombination wird durch die Mitglieder der RAD52-Epistasisgruppe vermittelt. In *S. cerevisiae* zählen neben RAD51 unter anderem RAD52, RAD54, das RAD54-Homolog RDH54/TID1, RAD55 und RAD57 dazu (Symington, 2002). Die durch diese Gene kodierten Hefeproteine werden im Folgenden mit kleinem „p“ gekennzeichnet. Die sonst in der Arbeit verwendete genetische Nomenklatur wird im Detail in 2.2.2 erläutert. Rad55p und Rad57p weisen Homologie zu Rad51p auf und werden daher als Paraloge von Rad51p betrachtet. In Vertebraten wurden Orthologe für RAD51, RAD52, RAD54 sowie RDH54 (RAD54B) identifiziert (Bendixen et al., 1994; Kanaar et al., 1996; Shen et al., 1995; Shinohara et al., 1993; Tanaka et al., 2002). Darüber hinaus gibt es im Gegensatz zur Hefe fünf RAD51-Paraloge in höheren Organismen: XRCC2, XRCC3, RAD51B, RAD51C, RAD51D (Albala et al., 1997; Cartwright et al., 1998a/b; Dosanjh et al., 1998; Jones et al., 1995; Liu et al., 1998; Pittman et al., 1998; Tambini et al., 1997; Tebbs et al., 1995).

1.2.1 Das RAD51-Protein

Die frühen Schritte der Rekombination, die homologe Paarung und die Stranginvasion, werden in allen Organismen durch Proteine der RAD51-Familie ausgeführt (West, 2003). RAD51 ist von *E. coli* über Hefe bis zum Menschen hoch konserviert: Das bakterielle RecA und Rad51p aus *S. cerevisiae* weisen 59 % identische bzw. ähnliche Aminosäuren auf, Rad51p und das humane RAD51 83 % (Baumann und West, 1998; Shinohara et al., 1993).

Die strukturelle Homologie ist noch stärker ausgeprägt. In allen Organismen polymerisiert RAD51 auf einzelsträngiger DNA und bildet ein charakteristisches Nukleoproteinfilament aus, in dem mehrere Hundert Monomere enthalten sein können (Benson et al., 1994; Ogawa et al.,

1993; Sung und Robberson, 1995). Dabei ist eine Stöchiometrie von einem Molekül pro drei Nukleotiden ideal. RAD51 weist darüber hinaus eine konservierte ATPase-Aktivität auf, wobei das bakterielle RecA ATP sehr viel schneller hydrolysiert als seine Orthologen in Hefe und Mensch (Baumann und West, 1998; Gupta et al., 1997). Der Prozess der homologen Paarung und des Strangaustausches ist vermutlich hoch konserviert. Biochemische Analysen zeigten ähnliche Funktionen für das humane RAD51 wie für Rad51p aus *S. cerevisiae* (Baumann et al., 1996; Baumann und West, 1997, 1999; Benson et al., 1998; Ristic et al., 2001; Sigurdsson et al., 2001a; Swagemakers et al., 1998).

1.2.2 Modell der homologen Paarung durch Rad51p

Die Funktion von Rad51p im Zusammenspiel mit den anderen Proteinen der *RAD52*-Epistasisgruppe wurde vor allem durch Sung et al. (2003) in *S. cerevisiae* detailliert untersucht. Die Autoren postulierten ein Modell für die homologe Paarung. Zentraler Bestandteil ist die Bildung eines präsynaptischen Filamentes zwischen Rad51p und einzelsträngiger DNA (ssDNA), mit dessen Hilfe die Invasion in einen homologen Doppelstrang ermöglicht wird (Sung, 1994; Sung und Robberson, 1995). Das Produkt dieser Invasion ist eine Heteroduplex, die durch die bereits erwähnten Mechanismen (1.1.2.1) aufgelöst werden kann.

Das präsynaptische Filament enthält eine Bindungsstelle für doppelsträngige DNA (dsDNA) (Sung et al., 2003). Die Rekombinationsreaktion wird durch Rad51p jedoch nur sehr ineffizient katalysiert (Baumann und West, 1998). Weitere Proteine sind erforderlich, um die Effizienz der Reaktion zu erhöhen. Das Replikationsprotein A (RPA) stimuliert die Strangaustauschreaktion, indem es an ssDNA bindet und die Sekundärstruktur auflöst (Sung et al., 2003; Sugiyama et al., 1997). Gleichzeitig konkurriert RPA jedoch mit RAD51 um die Bindung an ssDNA (Sung, 1997a). Um diesen inhibitorischen Effekt zu überwinden, sind Rad52p, Rad54p und der Rad55p-Rad57p Komplex notwendig (New, 1998; Petukhova et al., 1998; Shinohara und Ogawa, 1998; Sung et al., 2003). Das ringförmig vorliegende Rad52p bildet einen Komplex mit Rad51p, dieser bindet an ssDNA und rekrutiert weitere Rad51p-Moleküle an die DNA (Shinohara et al., 1998; Song und Sung, 2000; Sugiyama und Kowalczykowski, 2002). Rad55p und Rad57p bilden einen stabilen Komplex, der die Ablösung von RPA von der ssDNA unterstützt (Sung et al., 2003, 1997b).

Rad54p und Rad51p interagieren ebenfalls (Clever et al., 1997; Jiang et al., 1996). Die Rolle von Rad54p ist jedoch unklar, es könnte sowohl beim Aufbau des Filamentes oder bei der späteren Strangaustauschreaktion wichtig sein (Tan et al., 2003; West, 2003). Rad54p weist eine

DNA-abhängige ATPase-Aktivität auf und ist Mitglied der Swi2/Snf2-Proteinfamilie. In der präsynaptischen Phase vermittelt und stabilisiert Rad54p den Aufbau des Nukleoproteinfilamentes zwischen Rad51p und ssDNA (Mazin et al., 2003; Wolner et al., 2003). Während der synaptischen Phase stimuliert Rad54p die Paarung zwischen homologer ssDNA und dsDNA und stabilisiert die gebildete Heteroduplex (Mazin et al., 2003; Petukhova et al., 1998, 1999; Solinger et al., 2001). Sobald eine Basenpaarung zwischen ssDNA und dem homologen Strang einer dsDNA erfolgt, beginnt der Strangaustausch. In diesem Stadium wirkt Rad54p ebenfalls stimulatorisch und beschleunigt die Geschwindigkeit und die Ausdehnung des Strangaustauschs (Solinger und Heyer, 2001). Rad54p induziert negative *supercoils* in der dsDNA, die zu einer transienten Öffnung des Doppelstranges führen und so die DNA zugänglich machen für die Suche nach Homologien (Petukhova et al., 1999; Sung et al., 2003; van Komen et al., 2000). Darüber hinaus ist Rad54p am Chromatin *remodeling* beteiligt, diese Funktion könnte den Strangaustausch Nukleosomen-verpackter DNA ermöglichen (Alexeev et al., 2003; Tan et al., 2003).

1.2.3 Die Bedeutung von RAD51 in höheren Organismen

In höheren Organismen ist die Bedeutung von RAD51 unklar. RAD51 ist an der Meiose (Plug et al., 1996) und beim Wechsel der Immunglobulinklasse in B-Zellen beteiligt (Li et al., 1996). Es wurde eine Rolle für die Zellproliferation und DNA-Reparatur postuliert (Lim und Hasty, 1996; Sonoda et al., 1998; Tsuzuki et al., 1996).

Humanes RAD51 ist ein Protein von 339 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 37 kd (Benson et al., 1994; Shinohara et al., 1993; Yoshimura et al. 1993). *Rad51* wird in lymphoiden Geweben und den Keimzell-Organen am stärksten exprimiert (Bezzubova et al., 1993; Morita et al., 1993; Shinohara et al., 1993). Die Expression des RAD51-Proteins in Geweben korreliert im Allgemeinen mit dem Anteil proliferierender Zellen (Yamamoto et al., 1996).

RAD51 ist ein Zellzyklus-reguliertes Protein (Chen et al., 1997; Flygare et al., 1996; Tashiro et al., 1996; Yamamoto et al., 1996). Die Expression von RAD51 steigt von der G₀-Phase zur G₁-Phase um das fünf- bis zehnfache an, von der G₁-Phase bis zur G₂-Phase um das zwei- bis dreifache und bleibt dann auf einem hohem Niveau während der G₂/M-Phase (Chen et al., 1997; Yamamoto et al., 1996).

Nach DNA-Schädigung wird RAD51 durch c-ABL phosphoryliert, möglicherweise durch Formation eines Komplexes zwischen ATM, c-ABL und RAD51 (Chen et al., 1999; Yuan et al.,

1998). Die Bedeutung dieser posttranslationalen Modifikation ist noch unklar (Daboussi et al., 2002). Die Phosphorylierung an Tyr 54 inhibiert die Bindung von RAD51 an ssDNA und den Strangaustausch durch Rad51p (Yuan et al., 1998). Die Phosphorylierung an Tyr 315 stimuliert hingegen die Interaktion zwischen RAD52 und RAD51 und fördert auf diese Weise vermutlich die Genkonversion (Chen et al., 1999).

RAD51 ist vorwiegend im Kern lokalisiert und liegt dort während der S-Phase fokal konzentriert vor (Haaf et al., 1995; Tashiro et al., 1996). Die Bedeutung der S-Phase-Foci ist nicht klar. Sie könnten Stellen der Reparatur endogener DNA-Schäden repräsentieren oder Depots für RAD51 darstellen. Nach Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien wie Strahlung oder *crosslinkern* ändert sich die nukleäre Verteilung von RAD51 und die Zahl der Kerne mit RAD51-Foci nimmt in Abhängigkeit der Dosis stark zu. Die Expression von RAD51 bleibt demgegenüber nach DNA-Schädigung unverändert, einzig die Verteilung ändert sich (Haaf et al., 1995). RAD51 akkumuliert sehr schnell im geschädigten Areal und ist dort bereits nach zehn Minuten nachweisbar (Tashiro et al., 2000). Nach sechs bis acht Stunden wird ein Maximum an Foci-positiven Zellen erreicht (Bishop et al., 1998; Godthelp et al., 2002a). Es wird angenommen, dass die Foci lokale Reparaturdomänen repräsentieren (Haaf et al., 1995). Die Foci, die noch Stunden nach Bestrahlung sichtbar sind, könnten ungewöhnlich lange Filamente repräsentieren, die keinen Partner gefunden haben und irreparabel sind. Ein bis zwei Tage nach Bestrahlung werden die verbliebenen RAD51-Foci in Mikronuklei ausgeschleust (Haaf et al., 1999).

1.2.3.1 Interaktion von RAD51 mit anderen Proteinen

RAD51 interagiert bzw. kolokalisiert mit zahlreichen anderen zellulären Proteinen. Aus diesen Wechselwirkungen lassen sich Hinweise auf die Funktion von RAD51 ableiten. Essers et al. (2002) zeigten, dass RAD52 und RAD54 reversibel und schnell mit den RAD51-Foci interagieren. RAD51-Foci stellen demnach dynamische Multiprotein-Komplexe dar. Darüber hinaus kolokalisieren weitere Proteine mit RAD51 in den Foci: BRCA1, BLM und RPA (Golub et al., 1998; Raderschall et al., 1999; Scully et al., 1997a/b; Wu et al., 2001).

RAD51 interagiert darüber hinaus mit den Tumorsuppressoren P53, BRCA1 und BRCA2 (Buchhop et al., 1997; Linke et al., 2003; Marmorstein et al., 1998; Scully et al., 1997a/b; Sharan et al., 1997; Stürzbecher et al., 1996). P53 kontrolliert möglicherweise die korrekte Paarung in der durch Strangaustausch gebildeten Heteroduplex und nähme somit direkt Einfluss auf die Rekombination (Dudenhöffer et al., 1998, 1999; Süße et al., 2000). Mutiertes P53 ist mit

erhöhten Raten an homologer Rekombination assoziiert (Saintigny und Lopez, 2002; Willers et al., 2000), wt-P53 inhibiert hingegen die Replikations-assoziierte Rekombination (Janz und Wiesmüller, 2002). BRCA2 bindet über so genannte BRC-Domänen an RAD51 und spielt eine entscheidende Rolle bei der DNA-Reparatur (Chen et al., 1998; Patel et al., 1998; Wong et al., 1997). Es wurde angenommen, dass BRCA2 als Mediator der Rekombination fungiert, indem es die Verfügbarkeit und Aktivität von RAD51 reguliert (Venkitaraman, 2002). Des Weiteren könnte BRCA2 am Aufbau des RAD51-Nukleoproteinfilamentes beteiligt sein (Lo et al., 2003). Mittels Immunpräzipitation wurde eine Interaktion zwischen RAD51 und BRCA1 nachgewiesen, es wird jedoch heute davon ausgegangen, dass diese über BRCA2 vermittelt wurde und keine direkte Bindung zwischen BRCA1 und RAD51 existiert (West, 2003). BRCA1 spielt vermutlich bei der Erkennung von DNA-Schäden und der darauf folgenden Signaltransduktion eine Rolle und koordiniert die Erhaltung der genomischen Integrität (Venkitaraman, 2002; Wang et al., 2000).

1.2.3.2 Bedeutung von RAD51 für die Tumorigenese

Die Interaktion von RAD51 mit Tumorsuppressoren einerseits und die Beziehung zwischen DNA-Reparatur und genetischer Stabilität andererseits wirft die Frage nach einer möglichen Rolle von RAD51 bei der Tumorigenese auf. Es ist ein Polymorphismus im *RAD51*-Gen bekannt, der das Brustkrebsrisiko von *BRCA2*-Trägerinnen erhöht (Levy-Lahad et al., 2001). Darüber hinaus sind die Resultate widersprüchlich:

In einigen Tumoren bzw. Tumorlinien wird RAD51 überexprimiert (Henning und Stürzbecher, 2003; Maacke et al., 2000a/b; Raderschall et al., 2002). Die RAD51-Expression korreliert mit dem Tumorgrad in nicht-invasiven papillären Blasenkarzinomen und ist ein unabhängiger Marker für das Wiederauftreten und die Progression (Henning und Stürzbecher, 2003). Die Überexpression von RAD51 ist mit erhöhten Raten an homologer Rekombination und einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika assoziiert (Christodoulopoulos et al., 1999; Slupianek et al., 2002; Vispé et al., 1998; Wang et al., 2001; Xia et al., 1997). Im Tiermodell stimuliert die Überexpression von RAD51 jedoch nicht die Tumorigenese. Daher wurde spekuliert, dass der erhöhte Gehalt an RAD51 z. B. den proliferativen Status des Tumors widerspiegeln könnte (Bertrand et al., 2003).

In anderen Tumoren wurde eine reduzierte RAD51-Expression beobachtet (Yoshikawa et al., 2000). Die Inhibition von RAD51 stimuliert die Tumorigenese und ist mit Zentrosomeninstabilität und Aneuploidie assoziiert (Bertrand et al., 2003). Zusammenfassend

lässt sich sagen, dass vermutlich eine exakte Regulation der RAD51-Expression notwendig ist, um die genomische Integrität zu gewährleisten.

Die Inhibition von RAD51 mittels Antisense-Technologien führt zu einer Strahlensensibilisierung von Tumorzellen (Collis et al., 2001; Ohnishi et al., 1998). Es wurde daher vorgeschlagen, dass die Inhibition von RAD51 therapeutisch zur Strahlensensibilisierung von Tumoren eingesetzt werden könnte (Ohnishi et al., 1998).

1.2.4 RAD51-Paraloge in höheren Organismen

Es wurden fünf RAD51-Paraloge in Vertebraten identifiziert: XRCC2, XRCC3, RAD51B (RAD51L1), RAD51C (RAD51L2) und RAD51D (RAD51L3) (Albala et al., 1997; Cartwright et al., 1998a/b; Dosanjh et al., 1998; Jones et al., 1995; Liu et al., 1998; Pittman et al., 1998; Tambini et al., 1997, Tebbs et al., 1995). Sie weisen eine bis zu 30 %ige Sequenzidentität mit RAD51 auf der Ebene der Aminosäuren auf.

Tabelle 1: Übersicht über die RAD51-Paraloge, Namen der Hamsterlinien mit defektem RAD51-Paralog und die erzeugten k.o.-Mäuse († = letal, -- = nicht bekannt).

Protein	Synonym	Hamster	k.o.-Maus
RAD51B	RAD51L1 RAD51H2	--	†
RAD51C	RAD51L2	CL-V4B	--
		irs3	--
RAD51D	RAD51L3 RAD51H3	--	†
XRCC2		irs1	†
XRCC3		irs1SF	--

Es wurden mehrere Hamsterzelllinien mit Mutationen der RAD51-Paraloge isoliert. Darüber hinaus wurde jedes einzelne Paralog in DT40-Zellen ausgeschaltet. Der Phänotyp dieser verschiedenen Mutanten ist ähnlich: Sie sind bis zu dreifach empfindlicher gegenüber ionisierender Strahlung und bis zu 100fach empfindlicher gegenüber DNA-*crosslinkern* im Vergleich zu den jeweiligen Wildtypen (Caldecott und Jeggo, 1991; Jones et al., 1987; Liu et al., 1998; O'Regan et al., 2001; Takata et al., 2000, 2001; Tebbs et al., 1995). Die DT40-Mutanten

zeigen verminderte Wachstumsraten und chromosomale Instabilität, sie akkumulieren spontane Chromosomenbrüche, da sie zerstörte Replikationsgabeln wahrscheinlich nicht reparieren können (Takata et al., 2000, 2001).

Die XRCC2-defiziente Linie *irs1* (*ionizing radiation-sensitive*) und die XRCC3-defiziente Linie *irs1SF* zeigen genetische Instabilität und einen Defekt in der Homologie-vermittelten Reparatur von DSBs (Brenneman et al., 2000; Cui et al., 1999; Griffin et al., 2000; Johnson et al., 1999; Liu et al., 1998; Pierce et al., 1999; Thacker et al., 1994; Tucker et al., 1991). Die RAD51-Focibildung ist deutlich reduziert, wenn eines der Paralogen mutiert ist (Bishop et al., 1998; Godthelp et al., 2002a; Liu, 2002; O'Regan et al., 2001).

Die RAD51-Paraloge liegen in humanen Zellen in verschiedenen Komplexen vor, die dynamisch miteinander interagieren (Braybrooke et al., 2000; Liu et al., 2002; Masson et al., 2001a/b; Miller et al., 2002; Schild et al., 2000; Wiese et al., 2002). Liu et al. (2002) haben ein Modell vorgeschlagen, nach dem ein Dimer aus RAD51D-XRCC2 (DX2) sich mit einem Dimer aus RAD51B-Rad51C zu einem großen Komplex (BCDX2) formiert. XRCC3 könnte die Dissoziation von RAD51C aus dem Komplex bewirken, der neu formierte RAD51C-XRCC3-Komplex (CX3) dann an RAD51 binden. Es ist anzunehmen, dass die Komplexe eine analoge Funktion zum Rad55p-Rad57p-Komplex in Hefe wahrnehmen. Vermutlich rekrutieren oder stabilisieren sie das RAD51-Nukleoproteinfilament, ähnlich wie dies für Rad55p und Rad57p beschrieben wurde (Takata et al., 2001; Sigurdsson et al., 2001b; Symington, 2002). Dies würde auch das Fehlen von RAD51-Foci in den entsprechenden Mutanten erklären. Der BCDX2-Komplex bindet spezifisch an ssDNA und an eingeschnittene (*nicked*) dsDNA. Der CX3-Komplex und der DX2-Komplex können beide an ssDNA binden und ähnlich wie RAD51 ein Nukleoproteinfilament ausbilden und die homologe Paarung katalysieren (Kurumizaka et al., 2001, 2002).

Die potentielle Interaktion zwischen RAD51 und seinen Paralogen ist nicht abschließend geklärt: Es gibt Hinweise für eine Interaktion von XRCC3 bzw. RAD51C mit RAD51, die in anderen Studien nicht bestätigt werden konnten (Liu et al., 1998, 2002; Wiese et al., 2002).

1.2.5 Die Bedeutung der *RAD52*-Epistasisgruppe für die Viabilität

Alle Homologie-vermittelten Reparaturmechanismen in Hefe sind abhängig von Rad52p (Pâques und Haber, 1999). Rad52p stimuliert einerseits die Rad51p-abhängige Stranginvasion (New et al., 1998; Shinohara und Ogawa, 1998), andererseits ist Rad52p unabhängig von Rad51p für das SSA verantwortlich (Mortensen et al., 1996). Neben *RAD51* sind *RAD52* und *RAD54* in Hefe die

wichtigsten Gene für das Überleben nach Bestrahlung (Thompson, 1996). Die entsprechenden Mutanten sind lebensfähig, aber strahlenempfindlich. Der Verlust von *RAD55* und *RAD57* ist hingegen mit einem schwächeren Phänotyp assoziiert (Shinohara und Ogawa, 1995).

In Mäusen führt der Verlust von *Rad51* zum Tod in der frühen embryonalen Entwicklung (Lim und Hasty, 1996; Tsuzuki et al., 1996). *Rad51*^{-/-}-Trophoblasten sind strahlenempfindlich und weisen Chromosomenverlust auf (Lim und Hasty, 1996). Die Deletion von *RAD51* ist in DT40-Zellen nur möglich, wenn ein konditionell regulierbares humanes Transgen eingeführt wird. Wird das Transgen ausgeschaltet, so akkumulieren die Zellen innerhalb von zwölf Stunden in der G₂/M-Phase und es kommt zum massiven Zelltod (Sonoda et al., 1998). Daher wurde angenommen, dass RAD51 für die Zellproliferation essentiell ist. K.o.-Mäuse von *Rad51B*, *Rad51D* oder *Xrcc2* sind ebenfalls nicht lebensfähig (Deans et al., 2000; Pittman und Schimenti, 2000; Shu et al., 1999). *Rad54*^{-/-}-Zellen weisen eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit im Embryonalstadium und eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber DNA-*crosslinkern* auf (Bezzubova et al., 1997; Essers et al., 1997). *Rad52*^{-/-}-Zellen sind hingegen nicht empfindlich gegenüber DNA-schädigenden Agenzien, es ist lediglich eine reduzierte Rekombinationsfrequenz nachweisbar (Rijkers et al., 1998; Yamaguchi-Iwai et al., 1998). Es wird daher angenommen, dass es in höheren Eukaryonten weitere, bislang noch nicht bekannte *Rad52*-Homologe gibt, die einen Verlust ausgleichen. Ein Kandidat hierfür könnte der Tumorsuppressor BRCA2 sein (Lo et al., 2003).

1.3 Die Bedeutung der HR verglichen mit dem NHEJ

Es wird angenommen, dass das NHEJ der hauptsächliche Mechanismus zur Reparatur von DSBs in Säugerzellen ist. Wenn das NHEJ defekt ist, so werden DSBs vermehrt mittels Homologie-vermittelter Mechanismen repariert (Delacôte et al., 2002; Pierce et al., 2001). Die Bedeutung der HR in Konkurrenz zum NHEJ ist jedoch nicht letztendlich geklärt.

Fest steht, dass die Mechanismen der HR und die beteiligten Proteine von Hefe bis zu höheren Organismen wie Maus und Mensch konserviert sind. Der Phänotyp von Mutanten der *Rad52*-Epistasisgruppe zeigt, dass die Proteine eine Rolle bei der DNA-Reparatur in Säugern spielen. Die Reparatur von Enzym-induzierten DSBs ist abhängig von XRCC2, XRCC3 und RAD54 (Brennemann et al., 2000; Dronkert et al., 2000; Johnson et al., 1999; Pierce et al., 1999). Ein chromosomaler DSB induziert die HR, die für 30 – 40 % der Reparaturereignisse in Rekombinationssubstraten verantwortlich ist (Johnson und Jasin, 2000; Liang et al., 1998).

Dabei wird bevorzugt das Schwesterchromatid als Matrize verwendet (Johnson und Jasin, 2000). Es ist daher davon auszugehen, dass die HR vor allem in der S/G₂-Phase stattfindet, wenn das Schwesterchromatid vorliegt.

Es existieren zahlreiche Belege dafür, dass die HR in Abhängigkeit des Zellzyklus reguliert wird. In DT40-Zellen werden strahleninduzierte DSBs in der G₁- und frühen S-Phase vor allem durch NHEJ, in der späten S/G₂-Phase durch HR repariert (Takata et al., 1998). Rothkamm et al. (2003) zeigten, dass *Xrcc3*-mutierte *irs1SF*-Zellen nur einen kleinen Reparaturdefekt in der G₁-Phase aufweisen, der in der S-Phase deutlicher wird und in der späten S/G₂-Phase voll zum Tragen kommt. Dementsprechend nimmt auch die Strahlenempfindlichkeit der *irs1SF*-Zellen im Zellzyklus zu. Demgegenüber weist die NHEJ-defiziente Linie V3 während des gesamten Zellzyklus einen Reparaturdefekt und eine ausgeprägte Strahlenempfindlichkeit auf. In der späten S/G₂-Phase ist die Linie V3 etwas resistenter als in G₁. Die Autoren postulierten, dass das NHEJ in allen Zellzyklusphasen von Bedeutung ist, die HR speziell in der späten S/G₂-Phase. Beide Mechanismen könnten demnach in der späten S/G₂-Phase zur Reparatur und Strahlenresistenz beitragen.

Es bleibt unklar, welche weiteren Faktoren über die Zellzyklusphase hinaus die Wahl zwischen den Reparaturmechanismen beeinflussen. Möglicherweise spielt der Ursprung der DSBs eine Rolle. Es gibt mehrere Hinweise, dass während der Replikation auftretende DSBs vorwiegend durch HR repariert werden (Arnaudeau et al., 2001; Rothkamm et al., 2003). Saintigny et al. (2001) zeigten, dass DSBs, die durch die Inhibition der Replikation erzeugt werden, zunächst durch das NHEJ prozessiert werden. Wenn die Inhibition der Replikation über Stunden anhält und DSBs akkumulieren, dann wird die RAD51-abhängige Rekombination aktiv.

Pierce et al. (2001) postulierten, dass die Struktur des DSB mit über den Reparaturmechanismus entscheidet. Klassische DSBs mit zwei DNA-Enden könnten vom KU70/80-Komplex besetzt werden. So könnten die KU-Proteine den Eintritt von HR-Proteinen verhindern bzw. mit diesen konkurrieren. DSBs mit nur einem DNA-Ende, wie sie beim Kollaps einer Replikationsgabel auftreten, würden nicht von KU70/80 besetzt und ständen daher für die HR-Maschinerie zur Verfügung.

Darüber hinaus gibt es weitere Hinweise für eine Inhibition der HR durch Faktoren des NHEJ bzw. für eine Konkurrenz zwischen beiden Mechanismen (Allen et al., 2002; Fukushima et al., 2001). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass NHEJ und HR alternative Mechanismen darstellen, die insbesondere in der S/G₂-Phase des Zellzyklus vermutlich um die Reparatur von DSBs konkurrieren.

1.4 Ziel der Arbeit

Die Ausführungen zeigen, dass die Bedeutung der Homologie-vermittelten Mechanismen für die Reparatur von DSBs in Säugerzellen bis heute nicht geklärt ist. Von besonderem Interesse ist die konservative HR, mit deren Hilfe DSBs akkurat repariert werden können. Sie dürfte an der Erhaltung der genetischen Stabilität maßgeblich beteiligt sein.

Das zentrale Protein der konservativen HR ist das RAD51. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Expression von RAD51 zu reprimieren und die Bedeutung dieses Proteins für die Reparatur von DSBs zu analysieren. Bisher war es nicht möglich, vitale *Rad51*-k.o.-Zellen zu erzeugen. Daher wurde die Methode der RNA-Interferenz (RNAi) gewählt, um die Expression von RAD51 transient zu inhibieren. Die Technologie wurde bereits für die Untersuchung von DNA-Reparaturwegen eingesetzt und hat sich als besonders effizient erwiesen (Collis et al., 2003; Miller und Grollmann, 2003; Peng et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde RNAi erstmals in Säugerzellen gegen *Rad51* eingesetzt.

Anschließend wurde der RAD51-defiziente Phänotyp insbesondere in Hinblick auf die Bedeutung von RAD51 für die DNA-Reparatur in Säugerzellen analysiert. Es wurden die Focibildung, die strahleninduzierten Chromosomenaberrationen, die Strahlenempfindlichkeit und die Empfindlichkeit gegenüber dem Chemotherapeutikum Mitomycin C (MMC) untersucht.

1.5 RNA-Interferenz (RNAi)

RNAi wurde erstmals in *C. elegans* benannt (Fire et al., 1998) und nachfolgend in zahlreichen Organismen wie Insekten, Protozoen und Pflanzen beschrieben (Kennerdell und Carthew, 1998; Misquitta und Paterson, 1999; Ngo et al., 1998; Waterhouse et al., 1998). Es handelt sich dabei um einen Mechanismus, der zur posttranskriptionalen Gensuppression führt – ähnlich der seit langem bekannten Co-Suppression in Pflanzen und dem *quelling* in *N. crassa* (Hammond et al., 2001; Napoli et al., 1990; Romano und Macino, 1992; van der Krol et al., 1990).

RNAi wird durch Transfektion einer doppelsträngigen RNA (dsRNA) ausgelöst und führt zu einer starken Inhibition der Expression des Zielproteins. In kultivierten Säugerzellen löst die Transfektion von dsRNA über 30 bp jedoch eine sequenzunabhängige Interferon-Antwort aus, die zu einer unspezifischen Hemmung der Translation und zur Apoptose führt (Gil und Esteban, 2000; Hunter et al., 1975; Kumar und Carmichael, 1998; McManus und Sharp, 2002; Stark et al., 1998). Diese Interferon-Antwort maskiert vermutlich die spezifische RNAi, so dass die

Technologie in Säugerzellen bis vor wenigen Jahren nicht zur spezifischen Hemmung der Proteinexpression einsetzbar war (Elbashir et al., 2001b; Yang et al., 2001).

Der Weg zur RNAi in Säugerzellen wurde durch die Entdeckung geebnet, dass die langen dsRNAs in der Zelle durch die Ribonuklease Dicer in kleine dsRNAs von 21 bis 25 Nukleotiden Länge prozessiert werden (Bernstein et al., 2001; Billy et al., 2001; Elbashir et al., 2001a; Hamilton und Baulcombe, 1999; Hammond et al., 2000; Nykänen et al., 2001; Tuschl et al., 1999; Yang et al., 2000/2001; Zamore et al., 2000). Elbashir et al. (2001b) zeigten erstmals, dass die Expression endogener sowie heterologer Gene mit Hilfe kleiner interferierender dsRNA (*small interfering RNA*, siRNA) in kultivierten Säugerlinien spezifisch supprimiert werden kann.

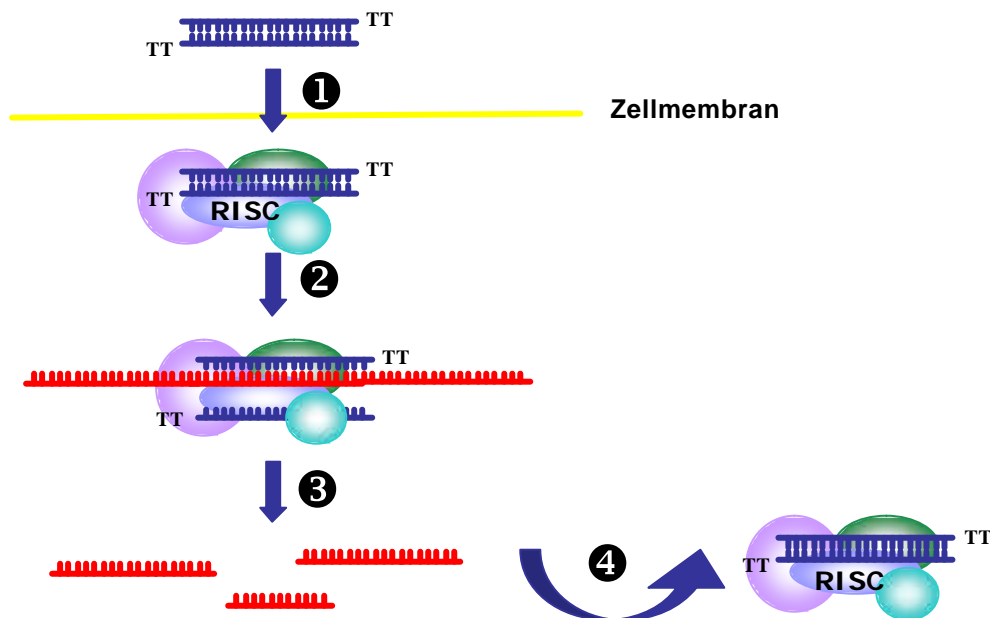


Abbildung 4: Wirkung von siRNA in der Zelle. 1: Transfektion und Bildung des RISC, 2: Homologiesuche, 3: Degradation der mRNA, 4: Recycling des RISC. Quelle: Eurogentec.

Es wird davon ausgegangen, dass die siRNA in der Zelle mit einer Reihe weiterer Proteine den *RNA-induced silencing complex* (RISC) bildet (Abbildung 4). RISC wurde aus *Drosophila*-Zellen isoliert (Hammond et al., 2000). Der Komplex enthält unter anderem eine Endonuklease-Aktivität. Vermutlich wird RISC durch die Entwindung der siRNA in seine aktive Form überführt (Nykänen et al., 2001). Seine Spezifität erhält der Komplex durch die gebundene siRNA, die RISC zur gewünschten mRNA lenkt, indem der Antisense-Strang der siRNA eine Basenpaarung mit der mRNA eingeht (Hammond et al., 2001). Die mRNA wird

endonukleolytisch abgebaut. Es wird vermutet, dass RISC weitere Aktivitäten enthält, z. B. wurde eine Exonuklease-Aktivität postuliert (Hannon, 2002). Neben der Degradation der mRNA könnte RISC auch eine Funktion für die translationale Inhibition oder die transkriptionelle Inhibition über Chromatin *remodeling* wahrnehmen (Hannon, 2002).

Es zeigte sich, dass die mittels RNAi gewonnenen Resultate denjenigen vergleichbar sind, die durch andere k.o.-Strategien erzeugt wurden (Harborth et al., 2001). Der Einsatz von siRNA gilt heute als sehr viel effizienter und spezifischer als die bislang zur Studie von *loss-of-function* Phänotypen verfügbaren Technologien wie Antisense-Oligonukleotide, dsRNA und Ribozyme (Bass, 2001; Caplen et al., 2001; Elbashir et al. 2001b; Grünweller et al., 2003; Hammond et al., 2001; Scherr et al., 2003). Demnach wird die Expression durch siRNAs stärker reduziert, die benötigten Mengen sind geringer und gleichzeitig ist die Erfolgsquote höher. Die RNAi vermittelt durch siRNA ist auch für stark exprimierte Proteine anwendbar (Harborth et al., 2001). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die RNAi als Methode für einen transienten Knockdown der *Rad51*-mRNA ausgewählt.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in *p. A.* Qualität von folgenden Firmen bezogen: Fluka (Buchs, CH), J. T. Baker (Deventer, NL), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (St. Louis, USA), Serva (Heidelberg). Zur Proteinbestimmung wurde das *BCA Protein Assay Reagent* der Firma Pierce (Rockford, USA) verwendet.

2.1.2 Antikörper

ECL-Lösung (*Enhanced Chemoluminescence*) zur Detektion des gebundenen Sekundärantikörpers im Western-Blot wurde von Amersham Biosciences (Freiburg) bezogen.

Tabelle 2: Antikörper für den Western-Blot.

Antikörper	Hersteller/Nummer	Inkubationsbedingungen
RAD51 (Ab-2) <i>clone 51RAD01</i> <i>mouse monoclonal IgG₁</i>	oncogene (San Diego, USA) NA71	1 µg/ml in 5 % MM-PBS über Nacht bei 4 °C
Anti-RAD51 <i>clone 3c10</i> <i>mouse monoclonal IgG₁</i>	upstate biotechnology (Lake Placid, USA) 05-530	1 µg/ml in 5 % MM-PBS über Nacht bei 4 °C
RAD51 (Ab-1) <i>rabbit polyclonal IgG</i>	oncogene (San Diego, USA) PC130	1:3000 in 15 % MM-PBS 1h Raumtemperatur (RT) oder über Nacht bei 4 °C
Anti-β-Aktin <i>clone AC-15</i> <i>mouse monoclonal IgG₁</i>	Sigma (St. Louis, USA) A5441	1:10.000 bis 1:60.000 in 5 % MM- PBS (abhängig von der Charge und dem Alter der Charge) 0,5 h bis 1 h RT
<i>Antibody to Mouse IgG, HRP-Linked F(ab')₂ Fragment</i>	Amersham Biosciences (Freiburg) NA9310	1/1.000 in 5 % MM-PBS 1 h RT
<i>Antibody to Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Antibody</i>	Amersham Biosciences (Freiburg) NA934	1:500 in 5 % MM-PBS 1 h RT

Tabelle 3: Antikörper für die Detektion von RAD51-Foci.

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

2.1.3 DNA-Farbstoffe

Es wurden verschiedene DNA-Farbstoffe eingesetzt: 7-Amino-Aktinomycin D (7-AAD), um im Durchflusszytometer tote von lebendigen Zellen zu unterscheiden; Propidiumiodid (PI), um im Durchflusszytometer den DNA-Gehalt und damit die Zellzyklusverteilung der Zellen zu messen, und 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI), um bei der mikroskopischen Analyse fixierter Zellen den Kern zu färben.

Tabelle 4: Fluoreszenzfarbstoffe zur Färbung von DNA.

Name	Zusammensetzung	Lagerung
7-AAD (Sigma, St. Louis, USA)	1 mg/ml in H ₂ O bidest.	4 °C
DAPI/Antifade (Qbiogene, Heidelberg)	0,1 µg/ml in Antifade	-20 °C
PI (Merck Biosciences, Bad Soden)	1 mg/ml in PBS/0,1 % NaN ₃	4 °C

2.1.4 Transfektionsagenzien

Folgende kationischen Lipide wurden verwendet, um siRNA in CHO-K1-Zellen zu transfizieren:

Lipofectamine 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Oligofectamine Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
TransIT-TKO	Mirus, Madison, USA

2.1.5 siRNAs

Es wurden chemisch synthetisierte siRNAs der Firmen Dharmacon (Lafayette, USA) und Qiagen-Xeragon (Köln) verwendet. Die siRNAs wurden lyophilisiert geliefert und in dem jeweils empfohlenen mitgelieferten Puffer bzw. H₂O bidest. rehydratisiert, so dass die Endkonzentration bei 20 µM lag. Von Qiagen-Xeragon gelieferte siRNA wurde entsprechend den Herstellerangaben für 1 min im Heizblock auf 96 °C erhitzt und bei 37 °C für 1 h inkubiert, um höhere Aggregate zu zerstören. Die gelöste siRNA wurde in Aliquots bei -20 °C gelagert. Die siRNAs beider Hersteller hatten sich in Vorversuchen als äquivalent erwiesen.

Tabelle 5: Sequenzen der verwendeten siRNAs.

Name	Sequenz	GC-Gehalt	Nukleotide im Target
siRNA1	GCUGGUUCCAUACGGUGG TT TT CGACCAAAGGUAUGCCACC	52,4 %	A: 2 U: 6 G: 7 C: 4
siRNA2	GUGGAUGGAGCAGCCAUGU TT TT CACCUACCUCGUCGGUACA	52,4 %	A: 4 U: 4 G: 8 C: 3
scrRNA1	UGUGCGAGAGUUGCACGAG TT TT ACACGCUCUCAACGUGCUC	52,4 %	A: 4 U: 4 G: 8 C: 3
scrRNA2	UAGGCAUUGCGCGUGUGUC TT TT AUCCGUAACGCGCACACAG	52,4 %	A: 2 U: 6 G: 7 C: 4
Fluorescein-siRNA	Fl CGUACGCGGAAUACUUCGA TT TT GCAUGCGCCUUAUGAAGCU	47,6 %	A: 4 U: 5 G: 5 C: 5
Cy3-siRNA	Cy3 CGUACGCGGAAUACUUCGA TT TT GCAUGCGCCUUAUGAAGCU	47,6 %	A: 4 U: 5 G: 5 C: 5

2.1.6 Puffer und Lösungen

Das verwendete Wasser wurde, soweit nicht anders angegeben, mit einer Millipore-Anlage (Milli-Q académic, Millipore, Molsheim, F) aufbereitet. Es wird im Folgenden als H₂O bidest. bezeichnet. Wenn angegeben, wurden Lösungen für 20 min bei 121 °C und 100 K autoklaviert (2540 EL, Tuttnauer, GD Breda, NL) bzw. steril filtriert (Schleicher & Schuell, Riviera Beach, USA; Qualilab, Merck Labor und Chemie Vertrieb, Bruchsal). Elektrolytlösung für den Coulter Counter (Isoton II) wurde von Beckman Coulter (Krefeld) bezogen, *FACSRinse* und *FACSClean* zum Reinigen des Durchflusszytometers sowie *FACSFlow* als Trägerflüssigkeit von Becton Dickinson (Heidelberg).

Tabelle 6: Puffer und Medien.

Name	Zusammensetzung	Lagerung
Agarose (Bio-Rad, München)	3 % (w/v) in 1x TBE	RT
Carnoy's Fixativ	75 % (v/v) Methanol 25 % (v/v) Eisessig	RT
Colcemid	0,02 % Demecolcine in PBS steril filtrieren	4 °C
Coomassie-Färbelösung	0,2 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250 44,7 % (v/v) Ethanol abs. 10,5 % (v/v) Eisessig über Nacht unter Rühren lösen	RT
Coomassie-Entfärber	13 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Eisessig	RT
Entwickler für Röntgenfilme	1 : 10 Eukobrom (Tetenal, Norderstedt)	RT
Fixierer für Röntgenfilme	1 : 5 Superfix (Tetenal, Norderstedt)	RT
2 % Formaldehyd	5,4 % (v/v) Formaldehyd in 1x PBS (Stamm 37 % w/v, End 2 % w/v)	frisch ansetzen
Giensa-Färbelösung	4 % (v/v) Giensa (Stamm 0,4 % w/v, End 0,016 % w/v) in 1x PBS	frisch ansetzen
Kristallviolett-Färbelösung	0,1 % (w/v) in H ₂ O bidest.	RT
MMC	0,01 % (w/v) in H ₂ O bidest. [0,1 mg/ml]	4 °C dunkel
1x Laufpuffer	10 % (v/v) 10x TG-Puffer 1 % (v/v) SDS (Stamm 10 % w/v, End 0,1 % w/v)	frisch ansetzen
PMSF	200 mM in Isopropanol	Aliquots bei -20 °C

Puffer A	20 mM Hepes 450 mM NaCl 50 mM NaF 0,2 mM EDTA 0,5 mM DTT 0,5 µg/ml Leupeptin 0,5 µg/ml Pepstatin A 1,0 µg/ml Trypsin Inhibitor 0,5 µg/ml Aprotinin 40 µg/ml Bestatin	Aliquots bei -20 °C
5-15 % MM-PBS	5-15 % (w/w) Magermilchpulver (Naturaflo, Toepfer, Dietmannsried) in 1x PBS	frisch ansetzen
1x PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 2 mM KH ₂ PO ₄ 10 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O autoklaviert	RT
PBST	0,05 % (v/v) Tween 20 in 1x PBS	RT
PBS+	0,15 % Glycin 0,5 % BSA in 1x PBS	
5x Probenpuffer nach Laemmli	50 mM Tris-HCL, pH 6,8 100 mM DTT 2 % (w/v) SDS 0,1 % Bromphenolblau 10 % Glycerol	in Aliquots bei -20 °C
RNase A (Serva, Heidelberg)	100 Kunitz Units/ml in 1x PBS 15 min kochen	in Aliquots bei -20 °C
10 % SDS	10 % (w/v) SDS in H ₂ O bidest.	RT
1x Transferpuffer nach Towbin	10 % (v/v) 10x TG-Puffer 20 % (v/v) Methanol Kühlen bei 4 °C im Eis 0,5 % (v/v) SDS (Stamm 10 % w/v, End 0,05 % w/v)	frisch ansetzen
10x Tris-Glycin (TG)-Puffer	1,92 M Glycin 250 mM Tris Base pH = 8,3 , nicht korrigieren autoklavieren	RT
0,1 % Triton X-100	0,1 % (v/v) Triton X-100 in 1x PBS	RT
5x TBE	0,445 M Tris Borat 0,002 M EDTA pH = 8,3	RT

2.1.7 Größenstandards

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

<i>MagicMark Western Standard</i> (Invitrogen, Karlsruhe)	Standardbanden werden nach Detektion mit dem Sekundärantikörper auf der Membran sichtbar.
<i>Kaleidoscope Prestained Standards</i> (Bio-Rad, München)	Standardbanden sind bereits im Gel und direkt nach dem Transfer auf der Membran sichtbar.

2.1.8 Zelllinien

Die vorliegende Arbeit basiert auf Untersuchungen an der seit vielen Jahren kultivierten Zelllinie CHO-K1 (*Chinese Hamster Ovary*). Die Linie CHO wurde ursprünglich aus dem Ovar eines adulten chinesischen Hamsters etabliert, bei CHO-K1 handelt es sich um einen Subklon (Puck et al., 1958; Kao und Puck, 1968). Des Weiteren wurde die Linie *xrs5* (*x-ray-sensitive*) eingesetzt, die durch Ethyl-Methansulfonat-(EMS)-Mutagenese aus CHO-K1-Zellen erzeugt wurde (Jeggo et al., 1982; Jeggo und Kemp, 1983). Die hier verwendeten *xrs5*-Zellen wurden freundlicherweise von Beate Volkmer zur Verfügung gestellt. *xrs5*-Zellen weisen einen Defekt im nicht-homologen Endjoining auf, der durch eine humane *KU80*-cDNA komplementiert werden kann. Molekularbiologische Analysen zeigen, dass in *xrs5*-Zellen nur sehr wenig *Ku80*-Transkript nachzuweisen ist (Singleton et al., 1997). Es wird angenommen, dass CHO-K1-Zellen zwei Kopien des *Xrcc5*-Gens enthalten, von denen eine in einer inaktiven, hypermethylierten Form vorliegt (Jeggo und Holliday, 1986; Singleton et al., 1997). *Xrcc5* kodiert das *KU80*-Protein. Singleton et al. (1997) postulierten, dass durch die EMS-Mutagenese die zweite, aktive Kopie des Gens in *xrs5*-Zellen mutiert wurde und dass der Phänotyp durch die geringe Expression des *Ku80*-Transkripts verursacht wird.

Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen auf Mykoplasmen überprüft (*Mycoplasma PCR Elisa Kit*, Roche, Mannheim).

2.1.9 Reagenzien und Medien für die Zellkultur

Tabelle 7: Reagenzien für die Zellkultur.

Name	Zusammensetzung/Hersteller
α -Medium	MEM- α -Pulver, Invitrogen, Karlsruhe, #12000-014 0,22 % (w/v) NaHCO ₃ 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin ad 1 l mit H ₂ O bidest. steril filtrieren, 5 % (v/v) FCS
Einfriermedium	α -Medium ohne Zusätze 10 % (v/v) DMSO steril filtrieren, 20 % (v/v) FCS
Foetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe #10270-106 Gold, PAA, Cölbe #A15-649
OA-Medium	MEM- α -Pulver, Invitrogen, Karlsruhe #12000-014 0,22 % (w/v) NaHCO ₃ ad 1 l mit RNase-freiem H ₂ O, Invitrogen, Karlsruhe steril filtrieren
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, #15140-122 10.000 U/ml Penicillin, 10.000 μ g/ml Streptomycin
Transfektionsmedium	MEM- α -Pulver, Invitrogen, Karlsruhe #12000-014 0,22 % (w/v) NaHCO ₃ ad 1 l mit RNase-freiem H ₂ O, Invitrogen, Karlsruhe steril filtrieren, 5 % (v/v) FCS
1x Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe, #25300-054 0,05 % (w/v) Trypsin, 0,02 % (w/v) EDTA

2.1.10 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien wurden im Allgemeinen über die Firmen Becton Dickinson (Heidelberg), Brand (Melsungen), Corning (Corning, NY), eppendorf (Hamburg) und Sarstedt (Nürnbrecht) bezogen. Gewebekulturflaschen und -schalen (Cellstar) wurden bei greiner bio-one, (Frickhausen) bestellt, 6-Well-Gewebekulturplatten und *Culture Slides* bei Becton Dickinson. Criterion Tris-HCl-Polyacrylamidgele wurden bei Bio-Rad Laboratories (München) erworben, Deckgläser und Objektträger bei Marienfeld (Lauda-Königshofen), *Plastic Coverslips* bei Appligene Oncor (Illkirch Graffenstaden, F). Die RNase-freien Reaktionsgefäße stammten von Bio-Cert (Brand, Wertheim). Röntgenfilme (Hyperfilm) wurden bei Amersham Biosciences (Freiburg) bestellt. Proben für das Durchflusszytometer wurden durch feines Nylongewebe (Sefar Nitex, Sefar, Heiden, CH) filtriert.

2.1.11 Geräte

Tabelle 8: Fabrikate der verwendeten Geräte.

Name	Fabrikat
Autoklav	2540 EL, Tuttnauer, GD Breda, NL
Blotkammer	Criterion Blotter, Bio-Rad, München
Brutschrank	Heracell, Heraeus, Hanau
Coulter Counter	Modell Z1, Beckman Coulter, Krefeld
Duplexdosimeter	PTW, Freiburg
Elektrophoresekammer	Criterion Cell, Bio-Rad, München
Durchflusszytometer	BD FACScan, Becton Dickinson, Heidelberg
Heizblock	Thermostat 5320, eppendorf, Hamburg
Kamerasysteme	CF 15/4 MCC, Kappa, Gleichen Night Owl, EG & G Berthold, Bad Wildbad
Keimzählgerät	BZG 28, WTW, Weilheim
Magnetrührer	Ikamag Ret, Ika, Staufen
Mikroskope	Axioplan 2 imaging, Zeiss, Göttingen <u>FITC-Filter</u> : Anregungsfilter BP 450 bis 490 nm, Emissionsfilter LP 515 nm <u>DAPI/FITC-Filter</u> : Anregungsfilter TBP 400 nm + 495 nm + 570 nm, Emissionsfilter TBP 460 nm + 530 nm + 625 nm) Diavert, Leitz, Wetzlar Photomikroskop III, Zeiss, Göttingen <u>FITC-Filter</u> : Anregungsfilter BP 450 bis 490 nm, Emissionsfilter LP 520 nm <u>DAPI-Filter</u> : Anregungsfilter BP 365 nm, Emissionsfilter LP 367 nm
Netzgeräte	Consort E455, Fröbel Laborgeräte, Lindau Consort E802, Fröbel Laborgeräte, Lindau
pH-Meter	φ 300, Beckman Coulter, Krefeld
Photometer	Bio-Photometer, eppendorf, Hamburg
Schüttler	Edmund Bühler, Johanna Otto GmbH, Hechingen Mini-Shaker, Modell Kühner, Braun, Melsungen Polymax 1040, Heidolph, Schwabach
Röntgenröhre	Seifert, Ahrensburg
Sterile Werkbank	Herasafe, Heraeus, Hanau
Vakuumpumpe	KNF Neuberger, Balterswil, CH
Waagen	P1200, Mettler Toledo, Giessen AE160, Mettler Toledo, Giessen
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Wasserbäder	Haake W19/D3, Karlsruhe Lauda, Lauda-Königshofen
Zentrifugen	Biofuge 15R, Heraeus, Hanau Labofuge 400 R, Heraeus, Hanau Microfuge R, Beckman Coulter, Krefeld Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau

2.1.12 Software und Datenbanken

Folgende Programme wurden zur Aufnahme und Analyse von Daten genutzt: CellQuest Pro 4.0.2, ModFit LT 3.0, WinLight 1.0, Optimas 6.51.199. Für Sequenzabgleiche wurden die Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) der USA verwendet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturtechniken

2.2.1.1 Zellkultivation

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank mit vertikalem Luftstrom durchgeführt. Das Zellwachstum wurde im inversen Mikroskop überprüft. Die Stammhaltung der Zellen erfolgte in 25 cm²-Gewebekulturflaschen in Brutschränken in einer Wasserdampf gesättigten, 5 % CO₂ enthaltenden Atmosphäre. Als Nährmedium wurde α -Medium mit 1 % Penicillin/Streptomycin und 5 % FCS eingesetzt. Die Zellen wurden alle zwei bis vier Tage passagiert. Das Nährmedium wurde verworfen und der Zellrasen mit 5 ml 37 °C warmen Trypsin kurz inkubiert. Das Trypsin wurde bis auf 1 ml abgesaugt und die Kulturflasche wenige Minuten im Brutschrank inkubiert, bis die Zellen sich abgelöst hatten. Die Zellen wurden durch Klopfen vereinzelt und das Trypsin durch Zugabe von 37 °C warmem Nährmedium inaktiviert. Die Zelldichte wurde im Coulter Counter ermittelt und die Zellen in einer neuen Kulturflasche subkultiviert.

Es ist bekannt, dass die Passagennummer die Transfektionseffizienz beeinflussen kann (Tuschl, *siRNA user guide*, 8.5.2003). Es wird empfohlen, die Zellen nach Optimierung der Transfektionseffizienz nicht über 30 Passagen hinaus zu kultivieren (Elbashir et al., 2002). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit zu Beginn eine große Menge der jeweiligen Zellen eingefroren (2.2.1.2), in regelmäßigen Abständen wurden aus dieser Charge neue Zellen aufgetaut. CHO-K1-Zellen wurden bis zu 30mal passagiert, xrs5-Zellen bis zu 20mal. Die Zahl der Passagen wurde für xrs5-Zellen noch weiter begrenzt, da diese relativ schnell revertieren können.

Vor der Transfektion mit siRNA (2.2.4) wurden die Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus synchronisiert, um Untersuchungen von strahleninduzierten Chromosomenaberrationen und der Strahlenempfindlichkeit in definierten Zellzyklusphasen zu ermöglichen. Dies wurde durch eine hohe Eingabe von Zellen und Wachstum über drei Tage ohne Mediumwechsel bis zur Konfluenz erreicht.

2.2.1.2 Kryokonservierung

Subkonfluent gewachsene Zellen wurden mit Trypsin abgelöst und mit Nährmedium versetzt. Die Zellzahl wurde auf 1 bis 3×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit Einfriermedium versetzt und zügig in Kryoröhrchen verteilt. Die Kryoröhrchen waren bereits vorab auf Eis gekühlt worden. Die Zellen wurden 1 h auf Eis inkubiert, über Nacht bei -80 °C und schließlich langfristig bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Wiederanzucht wurden die gefrorenen Zellsuspensionen im 37 °C -Wasserbad leicht angetaut und dann noch teilweise gefroren in eine mit Nährmedium versetzte Kulturflasche überführt. Nach einem Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.2.2 Genetische Nomenklatur

In Anlehnung an das *International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice* wurden Hamstergene und mRNA mit großem Anfangsbuchstaben und kursiv (*Rad51*), Hamsterproteine in großen Buchstaben (RAD51) geschrieben. Gene aus *H. sapiens* und *G. gallus* wurden in kursiven Großbuchstaben (*RAD51*), Proteine in Großbuchstaben (RAD51) geschrieben (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/guidelines.html>; <http://www.chicken-genome.org/resources/nomenclature.html>). In Übereinstimmung mit dem *Committee for Genetic Nomenclature* wurden Gene aus *S. cerevisiae* groß und kursiv geschrieben (*RAD51*), die entsprechenden Proteine mit großem Anfangsbuchstaben und dem Appendix „p“ (Rad51p) (http://www.mblogic.net/auspoint_of_view/1/). Für bakterielle Gene und Proteine wurde die Nomenklatur nach Demerec (1966, 1968) übernommen, d. h. Gene wurden klein und kursiv mit einem Großbuchstaben am Ende (*recA*), Proteine mit großem Anfangsbuchstaben (RecA) geschrieben (<http://www.life.uiuc.edu/micro/316/topics/mutations/nomenclature.html>).

2.2.3 Bestrahlung und Dosimetrie

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

2.2.4 RNAi gegen *Rad51* in Hamsterzellen

Die RNAi wurde von Tuschl (*siRNA user guide*, 3.4.2002) adaptiert. Zu den methodischen Vorarbeiten zählte die Wahl des geeigneten Transfektionsagens und der siRNA-Sequenz, die Bestimmung der optimalen Konzentration des Agens und der siRNA sowie die Anpassung des Transfektionsprotokolls im Detail.

2.2.4.1 Wahl geeigneter siRNA-Sequenzen

Bei der Wahl geeigneter siRNA-Sequenzen für die Inhibition von RAD51 wurden die generellen Richtlinien von Tuschl (*siRNA user guide*, 3.4.2002) beachtet. Es wurde die in der NCBI-Datenbank hinterlegte mRNA-Sequenz von RAD51 (gi1552257) verwendet (7.2). Die Suche nach geeigneten Sequenzen begann 100 Nukleotide hinter dem Startcodon und es wurde nach Sequenzen mit dem Muster AA(N19) gesucht, deren GC-Gehalt bei etwa 50 % liegt. Auf diese Weise wurde eine Sequenz im vorderen Teil der mRNA und eine weitere Sequenz im hinteren Teil ausgewählt. Die Sequenzen wurden mit dem BLAST-Programm *Search for short nearly exact matches* (E: 1.000, Word Size: 7, Description/Alignments: 500) gegen die NCBI-Datenbank mit murinen und anderen *Expressed Sequence Tags* (ESTs) abgeglichen, da das Hamstergenom nicht vollständig sequenziert vorliegt. Als vernichtender Treffer wurde eine Übereinstimmung von 18 Nukleotiden definiert. Als Kontrolle wurde eine unspezifische *scrambled* RNA eingesetzt (scrRNA). Die Sequenzen für diese scrRNA wurden so gewählt, dass der Anteil der jeweiligen Nukleotide in der siRNA mit dem in der zugehörigen scrRNA übereinstimmt. In diesem Sinne passt scrRNA2 als Kontrolle zu siRNA1 und scrRNA1 zu siRNA2. Auch die scrRNAs wurden mit der NCBI-Datenbank abgeglichen und zur Sicherheit auch gegen die Sequenz der *Rad51*-mRNA selbst, um keine unerwünschten Treffer zu erzeugen. Letztendlich sind solche Treffer bei einem Organismus wie dem Hamster jedoch nicht auszuschließen. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit zwei siRNAs und zwei scrRNAs eingesetzt, um mögliche unspezifische Effekte zu erkennen.

2.2.4.2 RNAi gegen *Rad51*

Alle RNAi-Versuche wurden mit konfluenten, in der G₁-Phase synchronisierten Zellen durchgeführt, die durch verdünnte Aussaat restimuliert und anschließend transfiziert wurden. Während der G₁-Phase ist der RAD51-Gehalt am geringsten, so dass zu diesem Zeitpunkt optimale Bedingungen für die Interferenz gewährleistet sind. Das Protokoll wurde in Anlehnung

an die Vorschrift von Invitrogen (Karlsruhe) für Lipofectamine 2000 entwickelt. Die Zellzahl wurde auf 625.000/ml eingestellt und es wurden 100 μl Zellen/ cm^2 Kulturfläche ausgesät. Die Größe der verwendeten Kulturgefäße wurden dem Zellbedarf für die nachfolgenden Experimente angepasst (Tabelle 9). Die Zellzahl wurde so gewählt, dass die Zellen bis zum Zeitpunkt der Ernte am folgenden Tag keine Konfluenz erreichen konnten. Als Medium wurde Transfektionsmedium verwendet, welches keine Antibiotika enthielt. Die Zellen wurden 1 h im Brutschrank inkubiert, bevor die Transfektion erfolgte. Diese Regenerationszeit hatte sich als sinnvoll im Hinblick auf die RAD51-Inhibition erwiesen. Währenddessen wurde die siRNA so in OA-Medium verdünnt, dass nach Zugabe zu den Zellen eine Konzentration von 200 nM erreicht wurde. Erste Versuche zur Optimierung der Transfektionseffizienz wurden mit 100 nM siRNA durchgeführt, es zeigte sich jedoch im weiteren Verlauf, dass eine siRNA-Konzentration von 200 nM zu einer effizienteren Inhibition von RAD51 führt (2.2.5). Die verdünnte siRNA wurde durch Vortexen gemischt.

Tabelle 9: Bedarf an siRNA/TransIT-TKO für verschieden große Kulturflaschen.

	<i>Culture Slide</i>	6-Well-Kulturschale	25 cm²-Kulturflasche	75 cm²-Kulturflasche
eingesetzte Zellzahl	562.500	625.000	1.560.000	4.680.000
Volumen	0,9 ml	1 ml	2,5 ml	7,5 ml
TransIT-TKO + OA-Medium	7,9 μl + 91,1 μl	8,8 μl + 101,2 μl	22 μl + 253 μl	66 μl + 759 μl
siRNA + OA-Medium	13 μl + 95 μl	14,4 μl + 105,6 μl	36 μl + 264 μl	108 μl + 792 μl
Zugabe siRNA zu TransIT-TKO	99 μl	110 μl	275 μl	825 μl
Zugabe Komplexe zu Zellen	180 μl	200 μl	500 μl	1.500 μl
Endkonzentration TransIT-TKO auf den Zellen	6,7 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Medium	6,7 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Medium	6,7 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Medium	6,7 $\mu\text{l}/\text{ml}$ Medium
Endkonzentration siRNA auf den Zellen	200 nM	200 nM	200 nM	200 nM
Zugabe Medium nach 4 h	0,9 ml	1 ml	2,5 ml	7,5 ml

Parallel wurde das Transfektionsagens ebenfalls in OA-Medium verdünnt. Die methodischen Vorarbeiten hatten gezeigt, dass TransIT-TKO in einer Konzentration von 6,7 $\mu\text{l}/\text{ml}$ für die Transfektion von siRNA in CHO-K1-Zellen am besten geeignet ist (2.2.5). Das verdünnte TransIT-TKO wurde durch Invertieren gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die verdünnte siRNA zum verdünnten TransIT-TKO gegeben, die Lösungen wurden durch Invertieren gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Während dieser Zeit werden die Komplexe zwischen TransIT-TKO und siRNA gebildet. Anschließend wurden die Komplexe zu den Zellen gegeben. In jedem Versuch wurden unbehandelte Zellen mitgeführt, diese Zellen

erhielten statt der Komplexe nur OA-Medium. Außerdem wurden zur Kontrolle scrRNAs eingesetzt.

Tabelle 10: Zeitschema für den Ablauf der einzelnen Experimente nach RAD51-Inhibition. Die Zahlen stehen für Stunden vor/nach Restimulation der CHO-K1-Zellen, kursive Zahlen für xrs5-Zellen.

	Analyse der RAD51-Expression im Western-Blot	Analyse der RAD51-Focibildung	Analyse der Zellzyklus-Verteilung nach RAD51-Inhibition	Analyse des Mitotischen Index	Analyse von Chromosomen-aberration im G ₁ -Assay	Analyse von Chromosomen-aberration im G ₂ -Assay	Koloniebildungsfähigkeit nach Bestrahlung in der G ₁ -Phase	Koloniebildungsfähigkeit nach Bestrahlung in der frühen S-Phase	Koloniebildungsfähigkeit nach Bestrahlung in der späten S/G ₂ -Phase	Koloniebildungsfähigkeit nach Behandlung mit MMC
Bestrahlung konfluenter Zellen	-6	--	-6	-6	-6	--	-6	--	--	--
Aussaat der Zellen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Transfektion	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Mediumzugabe	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Bestrahlung exponentieller Zellen	--	18	--	--	--	20	--	12	16/20	--
Proteinisolierung	20/24	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Fixierung		26	12/12 16/16 20/20 24 28	--	--	--	--	--	--	--
Zugabe Colcemid				12 16 20 24 28	18	20,5	--	--	--	--
Metaphasenpräparation				16 20 24 28 32	24	21,5	--	--	--	--
Plattieren für Koloniebildung							16	16	16/20	20

Nach 4 h ist die Aufnahme der siRNA weitestgehend abgeschlossen. Es erfolgte die Zugabe von 100 µl Transfektionsmedium/cm² Kulturfläche, um die toxischen Nebeneffekte der Transfektion zu minimieren. Die transfizierten Zellen wurden je nach anschließendem Versuchsaufbau (Tabelle 10) weiter im Brutschrank inkubiert.

Die Versuche wurden mit RNase-freien Reaktionsgefäßen und Pipettenspitzen durchgeführt, alle eingesetzten Medien und Puffer wurden mit RNase-freiem Wasser angesetzt. Die verwendeten Glasgeräte wurden vorab bei 180 °C für mindestens 4 h gebacken.

2.2.5 Methodische Vorarbeiten

2.2.5.1 Optimierung der Transfektionseffizienz

Zur Optimierung der Transfektionseffizienz wurde die Aufnahme einer Fluorescein-markierten siRNA (Fl-siRNA) im Durchflusszytometer gemessen. Es wurden Konzentrationsreihen von drei Transfektionsagenzien aufgezeichnet: Trans IT TKO, Lipofectamine 2000 und Oligofectamine. In einem weiteren Experiment wurde die Konzentration der eingesetzten Fl-siRNA variiert. Das Protokoll wurde bereits beschrieben (2.2.4.2).

Für die flusszytometrische Analyse wurden die Zellen trypsiniert, in Medium aufgenommen, die Zellzahl wurde am Coulter Counter ermittelt und die verbleibenden Zellen 5 min bei 1.500 U zentrifugiert (Labofuge 400R). Das Zellsediment wurde in 5 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellsediment in 500 µl PBS aufgenommen, in FACS-Röhrchen filtriert und es wurden 2,5 µl 7-AAD zugegeben. Die Membran absterbender Zellen ist für 7-AAD durchlässig, so dass eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen möglich wird. Nach 20 min Inkubation erfolgte die Messung am Durchflusszytometer (BD FACScan) mit Hilfe der Software CellQuest Pro.

2.2.5.2 Mikroskopischer Nachweis der Aufnahme von siRNA

Um sicherzustellen, dass sich die siRNA im Inneren der Zelle befand und nicht nur von außen an der Membran heftete, wurde die Aufnahme einer Fl-siRNA und einer Cy3-markierten siRNA mikroskopisch überprüft. Es wurden zwei verschieden markierte siRNAs getestet, weil Cy3 intensiver fluoresziert und weniger schnell verblasst als Fluorescein. Die Zellen wurden auf *Culture Sides* ausgesät und wie beschrieben mit siRNA transfiziert. Nach 4 h wurde das Medium abgesaugt, die Kammer vom Objektträger gelöst und dieser dreimal 5 min in PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit PBS überschichtet und lebend eingedeckelt. Das Deckglas

wurde mit Agarose fixiert. Die mikroskopische Analyse erfolgte direkt im Anschluss mit den entsprechenden Filtern (Axioplan 2 imaging).

2.2.5.3 Optimierung der Inhibition der RAD51-Expression

Die Inhibition der RAD51-Expression wurde mit Hilfe des Western-Blots (2.2.6) optimiert. Die Transfektion erfolgte mit RAD51-spezifischen siRNAs und den entsprechenden scrRNAs als Kontrolle. 19 h später wurden die Proteine aus den transfizierten Zellen extrahiert und im Western-Blot analysiert. Die Konzentration von siRNA und TransIT-TKO wurde variiert.

2.2.6 Western-Blot

Die Inhibition der RAD51-Expression durch RNAi wurde im Western-Blot nachgewiesen. Hierfür wurden die Proteine aus den siRNA-transfizierten Zellen isoliert und gelelektrophoretisch separiert. Das RAD51-Protein wurde nach Transfer auf eine PVDF-Membran immunologisch nachgewiesen. Als Referenz diente das *Housekeeping*-Protein β -AKTIN.

2.2.6.1 Proteinisolierung

Die Extraktion von Proteinen aus Zellen wurde nach Finnie et al. (1995) durchgeführt. Bei dieser Methode wird ein Extrakt der ganzen Zelle gewonnen. Zunächst wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und sofort in α -Medium mit 5 % FCS aufgenommen. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis und unter einer sterilen Werkbank, um eine Degradation oder Kontamination des Proteins zu verhindern. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt und die Kulturflasche einmal mit kaltem PBS gewaschen, um die verbliebenen Zellen zu gewinnen. Die Zellen wurden 8 min mit 1.300 U bei 4 °C zentrifugiert (Labofuge 400R). Anschließend wurde der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe vorsichtig abgesaugt. Das Zellsediment wurde in 5 ml kaltem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand erneut abgesaugt. Das Zellsediment wurde in 1 ml kaltem PBS resuspendiert und in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß transferiert. Die Zellsuspension wurde erneut bei 4 °C mit 1.300 rpm für 8 min zentrifugiert (Microfuge R). Parallel wurde ein 146 μ l-Aliquot des Puffers A auf Eis aufgetaut, mit 5 μ l PMSF und 50 μ l Glycerol versetzt und anschließend durch Vortexen gemischt.

Das Volumen des Zellsediments wurde abgeschätzt, und es wurde das doppelte Volumen an Extraktionspuffer zugegeben. War kein Pellet sichtbar, so wurden 20 μ l Extraktionspuffer

eingesetzt. Die Zellen wurden durch Vortexen resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen durch Schockgefrieren aufgebrochen. Hierfür wurde das Reaktionsgefäß abwechselnd 1 min in flüssigem Stickstoff und 1 min im 37 °C warmen Wasserbad inkubiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt viermal wiederholt. Anschließend wurden die Zelltrümmer 10 min bei 11.000 U und 4 °C (Microfuge R) sedimentiert. Der Extrakt wurde abgenommen, in ein steriles 0,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und gevortext. Für die Proteinbestimmung wurden 2 µl des Extraktes abgenommen. Der verbleibende Zellextrakt wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.6.2 Proteinbestimmung

Zur Quantifizierung des extrahierten Proteins wurde die sogenannte BCA-Methode eingesetzt (Smith et al., 1985). Sie basiert auf der Biuret-Reaktion, bei der Cu^{2+} -Ionen durch das Protein zu Cu^+ -Ionen reduziert werden. Die Cu^+ -Ionen bilden einen Komplex mit einem kolorimetrischen Reagenz, das Bicinchoninsäure (BCA) enthält. Der Komplex absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 562 nm. Die Absorption steigt im Messbereich zwischen 20 und 2.000 µg/ml linear mit der Proteinkonzentration an.

Es wurde das *BCA Protein Assay Reagent* der Firma Pierce benutzt. 2 µl des Proteinextraktes wurden in 48 µl autoklaviertem H_2O bidest. verdünnt. Als Blindprobe diente H_2O bidest. ohne Zugabe von Extrakt. Das Farbreagenz wurde durch Mischen von 50 Teilen Reagenz A mit einem Teil Reagenz B angesetzt. Zu den verdünnten Proteinextrakten und der Blindprobe wurden je 1 ml Farbreagenz gegeben. Die Proben wurden durch Vortexen gemischt und 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Proben kurz bei RT abgekühlt, in Küvetten transferiert und die Extinktion bei 562 nm im Photometer gemessen. Jede Messung wurde innerhalb von 10 min vollendet.

Als Standard diente bovines Serumalbumin (BSA, Sigma). Die Standardkurve wurde mit sechs Verdünnungen zwischen 25 und 1.000 µg/ml BSA aufgenommen und im Gerät gespeichert. Jeder Standardwert wurde dreifach bestimmt.

2.2.6.3 Western-Blot

Die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Es wurde das Criterion-System (Bio-Rad Laboratories) verwendet. Beim Transfer vom Gel auf die Membran

wurde das Towbin-Puffersystem eingesetzt (Towbin et al., 1979). Die Bedingungen des Western-Blots wurden von Kasten-Pisula (pers. Mitteilung) adaptiert.

Für die Gelelektrophorese wurden 20 µg Proteinextrakt mit 5x Probenpuffer und H₂O bidest. versetzt, gemischt und für 8 min im kochenden Wasserbad denaturiert. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis ausgeführt. Das Volumen der Proben durfte 25 µl nicht übersteigen. Die gekochten Proben wurden auf Eis gekühlt und kurz anzentrifugiert (Microfuge R). Erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung nicht direkt im Anschluss, so wurden die vorbereiteten Proben bei -80 °C gelagert.

Die elektrophoretische Auftrennung wurde auf 12,5%igen Tris-HCl Polyacrylamid-Gelen (Bio-Rad Laboratories) durchgeführt. Das Gel wurde vor dem Einsetzen in die Elektrophoresekammer in H₂O bidest. und Laufpuffer gespült. Die Pufferreservoirs wurden mit Laufpuffer gefüllt, der Kamm gezogen und die Taschen gespült. Luftblasen am unteren Gelrand wurden entfernt. Die Proben wurden vor dem Beladen des Gels durch Vortexen gemischt und das gesamte Volumen einer jeden Probe in die jeweilige Tasche pipettiert. In mindestens eine Spur wurde ein Größenstandard pipettiert. Dabei handelte es sich um 8 µl *MagicMark Western Standard* (Invitrogen) und 12 µl *Kaleidoscope Prestained Standard* (Bio-Rad), die vorab gemischt worden waren. Während der *Kaleidoscope Prestained Standard* bereits im Gel sichtbar wird, erscheint der *MagicMark Western Standard* erst durch die Detektion auf der Membran. Verbleibende leere Taschen wurden mit 1x Probenpuffer beladen. Die Elektrophorese erfolgte für 5 min bei 100 V (Sammelphase) und für 70 min bei 200 V (Trennphase).

Anschließend wurden die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine im Criterion Blotter auf eine PVDF-Membran übertragen. Vor dem Transfer wurde die Membran 10 s in Methanol aktiviert und 5 min in H₂O bidest. gewaschen. Anschließend wurden sowohl das Gel als auch die Membran 5 min in Towbin-Transferpuffer äquilibriert. Die Apparatur wurde gemäß den Herstellerangaben zusammengesetzt. Der Transfer erfolgte für 25 min bei 100 V im Kühlschrank. Der Towbin-Transferpuffer wurde während der gesamten Zeit durch Rühren umgewälzt. Die Effektivität des Transfers wurde anhand des *Kaleidoscope Prestained Standard* überprüft. Das Gel wurde zum selben Zweck in Coomassie-Lösung für 30 min unter Schwenken gefärbt und mehrmals mit Entfärber entfärbt.

Nach dem Transfer wurde die Membran einmal kurz mit PBS abgespült und anschließend für 1 h in 5 % MM-PBS unter Schwenken inkubiert. Bei nachfolgender Detektion mit dem polyklonalen RAD51-Antikörper wurde in 15 % MM-PBS inkubiert. Durch diesen Schritt werden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran blockiert. Anschließend wurde die

Membran einmal kurz in PBST abgespült und dreimal 10 min mit PBST unter Schütteln gewaschen. Die Inkubation mit dem Anti-RAD51-Antikörper erfolgte über Nacht unter Schütteln im Kühlschrank. Die Bedingungen für die RAD51-Antikörper waren zuvor optimiert worden. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden monoklonale und polyklonale Antikörper verschiedener Hersteller (Tabelle 2) eingesetzt, die jedoch vergleichbare Ergebnisse lieferten. Die Membran wurde erneut einmal kurz in PBST abgespült und dreimal 10 min mit PBST unter Schütteln gewaschen, um überschüssige Antikörper zu entfernen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Antikörper unter Schwenken. Die Membran wurde einmal kurz in PBST abgespült und dreimal 10 min mit PBST unter Schütteln gewaschen. Zur Detektion wurde das *ECL Western Blotting Detection Reagent* von Amersham Biosciences eingesetzt. Je 1 ml der ECL-Lösungen 1 und 2 wurden gemischt, auf die Membran pipettiert und für 1 min inkubiert. Die Lösung wurde mit Filterpapier aufgesaugt und die Membran ohne Luftblasen eingeschweißt. Das Chemolumineszenz-Signal wurde zunächst mit einer ultrasensitiven CCD-Kamera (NightOwl) mit Hilfe der Software Winlight aufgezeichnet und quantitativ analysiert. Anschließend wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und durch 2-minütige Inkubation im Entwickler und 2-minütige Inkubation im Fixierer mit anschließendem Wässern entwickelt.

Nach Detektion des RAD51-Signals wurde auf derselben Membran als Kontrolle β -AKTIN nachgewiesen. Die Membran wurde kurz mit PBS abgespült und über Nacht in 10 % MM-PBS blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit primären und sekundären Antikörpern nach dem gleichen Schema wie zuvor für RAD51.

Die Auswertung der aufgenommenen Chemolumineszenz-Signale erfolgte mit Hilfe der Software Winlight. Die relative RAD51-Menge errechnete sich wie folgt: Von den jeweiligen spezifischen RAD51- bzw. β -AKTIN-Signalen wurde der Hintergrund abgezogen, anschließend wurde das korrigierte RAD51-Signal auf das korrigierte β -AKTIN-Signal normiert. Das hieraus ermittelte normierte RAD51-Signal der siRNA-behandelten Proben wurde auf den Mittelwert aus den Signalen der scrRNA-behandelten Proben bezogen.

$$\frac{[(\text{RAD51 Signal} - \text{Hintergrund})/(\beta\text{-AKTIN Signal} - \text{Hintergrund})]_{\text{siRNA}}}{[(\text{RAD51 Signal} - \text{Hintergrund})/(\beta\text{-AKTIN Signal} - \text{Hintergrund})]_{\text{scrRNA1+2}}} \times 100 = \text{relative RAD51-Menge [\%]}$$

2.2.7 Detektion von RAD51-Foci

Der Nachweis von RAD51-Foci in CHO-K1-Zellen erfolgte immunzytometrisch (modifiziert nach Wiegant, pers. Mitteilung; Kraakmann-van der Zwet et al., 2002). Zuvor wurden verschiedene Protokolle und Antikörper getestet sowie die eingesetzte Konzentration der Antikörper optimiert.

Die Zellen wurden auf Objektträgern (*CultureSlides*) ausgesät und wie in 2.2.4.2 beschrieben mit siRNA transfiziert. Die Zellen wurden 18 Stunden nach der Transfektion mit 12 Gy bestrahlt und weitere 8 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion der RAD51-Foci. Die Kammern wurden von den Objektträgern gelöst. Die Objektträger wurden einmal kurz und einmal 10 min in PBS gespült. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen in 2 % Formaldehyd in PBS für 15 min bei RT. Die Objektträger wurden einmal kurz und dreimal 10 min in 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert und über Nacht in PBS+ im Kühlschrank blockiert. Am nächsten Tag wurde die Blockierung für 30 min im 37 °C-Wärmeschrank fortgesetzt. Als erster Antikörper wurde ein polyklonaler RAD51-Antikörper aus dem Kaninchen eingesetzt (Tabelle 3). Der Antikörper wurde 1:100 in PBS+ verdünnt. Jeder Objektträger wurde mit 50 µl Antikörper-Lösung versehen und mit einem Kunststoff-Deckglas (*Plastic Coverslip*) geschützt. Die Inkubation erfolgte 1 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Objektträger erneut einmal kurz und dreimal 10 min in 0,1 % Triton X-100 gewaschen und 15 min in PBS+ bei RT blockiert. Bei dem zweiten Antikörper handelte es sich um einen Fluorescein-markierten *Donkey-Anti-Rabbit*-Antikörper (Tabelle 3). Der zweite Antikörper wurde 1:50 in PBS+ verdünnt. Alle folgenden Schritte wurden ohne direkte Lichteinstrahlung durchgeführt. Erneut wurde jeder Objektträger mit 50 µl Antikörper-Lösung versehen und mit einem Kunststoff-Deckglas geschützt. Die Inkubation erfolgte 1 h bei 37 °C in einer feuchten, abgedunkelten Kammer. Anschließend wurden die Objektträger erneut einmal kurz und dreimal 10 min in 0,1 % Triton X-100 und anschließend 10 min in PBS gewaschen. Zur Färbung der Kerne wurden 20 µl eines mit dem DNA-Farbstoff DAPI versetzten Antifades verwendet (Tabelle 4). Die Objektträger wurden mit Nagellack in Glas eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte verschlüsselt am Fluoreszenzmikroskop im FITC-Filter. Der kombinierte DAPI-FITC-Filter wurde lediglich zur Kontrolle der richtigen Lage der Foci genutzt. Zellen mit fünf und mehr Foci wurden als positiv gewertet. Als Negativkontrolle dienten nicht transfizierte unbestrahlte Zellen, als Positivkontrolle nicht transfizierte bestrahlte Zellen. Pro Objektträger wurden 100 Zellen ausgewertet.

2.2.8 Zellzyklusmessung

Zur Analyse des Zellzyklus wurde der DNA-Gehalt am Durchflusszytometer gemessen. Konfluente, in der G₁-Phase synchronisierte CHO-K1-Zellen wurden bestrahlt. Nach 6 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen durch verdünnte Aussaat restimuliert. Eine Stunde später wurden die Zellen mit siRNA transfiziert (2.2.4.2). Zu verschiedenen Zeitpunkten (Tabelle 10) nach Restimulation wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in Medium aufgenommen und in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde 5 min mit 1.500 U bei RT zentrifugiert (Labofuge 400R). Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellsediment in 5 ml PBS aufgenommen und aufgeschüttelt. Es folgte eine erneute Zentrifugation. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine Spritze aufgezogen und langsam unter Schütteln in 6 ml -20 °C kalten, 80 %igen Ethanol eingetropft. Die fixierten Zellen wurden bei -20 °C mindestens über Nacht gelagert.

Anschließend wurden die Zellen 5 min mit 1.500 U bei RT sedimentiert. Der Überstand wurde abgossen und die Zellen in 5 ml PBS resuspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 500 µl RNase resuspendiert und für 30 min im 37 °C-Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt und in FACS-Röhrchen filtriert. Zur Färbung der DNA wurden 25 µl PI zugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Aufnahme am BD FACScan mit Hilfe der Software CellQuest Pro. Zur quantitativen Auswertung der Zellzyklusverteilung wurde das Programm ModFitLT verwendet.

2.2.9 Chromosomenaberrationen

2.2.9.1 Mitotischer Index

Der mitotische Index wurde bestimmt, um im G₁-Assay das richtige Zeitfenster für die Gabe von Colcemid nach Transfektion der Zellen mit siRNA zu finden. Wie unter 2.2.9.2 beschrieben, wurden konfluente, in der G₁-Phase synchronisierte CHO-K1-Zellen bestrahlt. Nach 6 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen durch verdünnte Aussaat restimuliert. Eine Stunde später wurden die Zellen mit siRNA transfiziert (2.2.4.2). Zu den Zeitpunkten 12 h, 16 h, 20 h, 24 h und 28 h nach Restimulation wurde Colcemid zugegeben. Colcemid enthält Colchicin, ein Alkaloid der Herbstzeitlosen, das die Ausbildung der Kernspindel inhibiert. Die Zellen können

keine intakten Spindelfasern ausbilden und werden daher in der Metaphase arretiert. Während der Mitose adhären die Zellen nicht mehr fest am Boden der Kulturflasche. Die akkumulierten mitotischen Zellen konnten daher jeweils 4 h nach Colcemid-Gabe durch Abklopfen gewonnen werden. Der Zellrasen wurde trypsiniert, in Medium aufgenommen und beide Fraktionen – Zellrasen und mitotische Zellen – wurden vereinigt. Anschließend erfolgte die Präparation der Metaphasen (2.2.9.4).

2.2.9.2 G₁-Assay

Strahleninduzierte Chromosomentyp-Aberrationen der G₁-Phase wurden mit der Metaphasentechnik nachgewiesen (Borgmann, 1999). Konfluente, in der G₁-Phase synchronisierte CHO-K1-Zellen wurden bestrahlt. Nach 6 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen durch verdünnte Aussaat restimuliert. Während dieser Zeit wird die DNA-Reparatur in der G₁-Phase abgeschlossen, verbleibende Schäden können erst nach erneutem Eintritt in den Zellzyklus weiter beseitigt werden (Borgmann, 1999). Eine Stunde nach Restimulation wurden die Zellen mit siRNA transfiziert (2.2.4.2). Nach weiteren 17 h Inkubation im Brutschrank wurde das Medium gewechselt und 1 µl Colcemid pro ml Medium zugegeben. Die akkumulierten mitotischen Zellen wurden 6 h nach Colcemid-Gabe durch Abklopfen gewonnen. Anschließend erfolgte die Präparation der Metaphasen (2.2.9.4).

2.2.9.3 G₂-Assay

In der G₂-Phase des Zellzyklus erzeugte Chromatidtyp-Aberrationen wurden im G₂-Assay analysiert (Bryant et al., 2002; Scott et al., 1999). Konfluente, in der G₁-Phase synchronisierte CHO-K1-Zellen wurden durch verdünnte Aussaat restimuliert. Eine Stunde später wurden die Zellen mit siRNA transfiziert (2.2.4.2). Nach weiteren 19 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen bestrahlt. Zu diesem Zeitpunkt war ein größtmöglicher Anteil der Zellen in der G₂-Phase. Eine halbe Stunde nach Bestrahlung wurde das Medium gewechselt und 1 µl Colcemid pro ml Medium zugegeben. Die akkumulierten mitotischen Zellen wurden 1 h nach Colcemid-Gabe durch Abklopfen gewonnen. Die kurze Colcemid-Inkubation stellt sicher, dass nur Zellen, die zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der G₂-Phase waren, analysiert werden. Anschließend erfolgte die Präparation der Metaphasen (2.2.9.4).

2.2.9.4 Präparation der Metaphasen

Die mitotischen Zellen wurden in ein 15 ml-Falconröhrchen überführt und 5 min bei 1200 U zentrifugiert (Megafuge 1.0). Der Überstand wurde mit der Vakuumpumpe abgesaugt und das Zellsediment in 10 ml PBS resuspendiert. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation. Zu dem Zellsediment wurde tröpfchenweise 10 ml 0,075 M KCl unter Rütteln zugegeben. Durch diese hypotone Behandlung quellen die Zellen. Es wurde zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, und die Zellen wurden durch tröpfchenweise Zugabe von 10 ml Carnoys Fixativ unter Rütteln fixiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde die Fixierung wiederholt, um verbliebene wässrige Anteile zu entfernen und die Zellen vollständig zu konservieren. Der Überstand wurde bis auf 1 ml abgesaugt. Die fixierten mitotischen Zellen konnten so bei -20 °C für mehrere Monate gelagert werden.

Zur mikroskopischen Auswertung wurden die mitotischen Zellen auf Objektträger getropft. Dabei spreiten sich die kondensierten Chromosomen. Vor dem Auftropfen wurden die fixierten Zellen mindestens eine Nacht bei 4 °C gelagert. Der Objektträger wurde mit einem homogenen Wasserfilm bedeckt und 25 µl der Zellsuspension wurden aufgetropft. Der Alkohol verdrängt das Wasser, die dabei entstehende Energie erleichtert das Spreiten der Chromosomen. Die Objektträger wurden mindestens 20 min getrocknet. Anschließend wurden die Metaphasen-Präparate für 8 min in 4 % Giemsa in einem Hellendahl-Färbekasten gefärbt. Der überschüssige Farbstoff wurde durch dreimaliges Waschen in H₂O bidest. entfernt. Die Objektträger wurden erneut getrocknet und mit Entellan eingedeckelt. Die Präparate wurden lichtmikroskopisch analysiert, pro Probe wurden 25 Metaphasen detailliert ausgewertet.

Im G₁-Assay wurde die Zahl der Chromosomenfragmente und die Zahl der dizentrischen Chromosomen erhoben (Borgmann, 1999). An den Enden fusionierte, ringförmige Chromosomen wurden den dizentrischen zugerechnet. Die strahleninduzierten zusätzlichen azentrischen Fragmente wurden ermittelt, indem die Zahl der Chromosomenfragmente unbestrahlter Zellen von der bestrahlter Zellen abgezogen wurde. Für die Zahl der letalen Chromosomenaberrationen wurde die Zahl der strahleninduzierten zusätzlichen azentrischen Fragmente und die der dizentrischen Chromosomen pro Zelle addiert.

Im G₂-Assay wurden *Gaps*, Chromatid- und Isochromatidfragmente sowie Austauschaberrationen gezählt. Ein *Gap* wurde nur berücksichtigt, wenn er länger war als die Breite des Chromatids (Sanford et al., 1989). Die Werte unbestrahlter Zellen wurden von denen bestrahlter abgezogen, um die strahleninduzierten Chromatidtyp-Aberrationen zu ermitteln

(Scott et al., 1999). Die Zahl der Brüche wurde wie folgt berechnet (Borgmann, pers. Mitteilung): Für einen *Gap* und ein Isochromatidfragment wurden zwei Brüche berechnet, für ein Chromatidfragment ein Bruch. Für eine Translokation wurden vier Brüche kalkuliert, für ein triradiales Chromosom drei Brüche und für ein an einem Arm fusioniertes Chromosom zwei Brüche.

2.2.10 Koloniebildungstest

Die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber MMC oder ionisierender Strahlung nach Inhibition der RAD51-Expression wurde mit Hilfe des Koloniebildungstests bestimmt. Dabei werden die Zellen in so geringer Konzentration ausgesät, dass jede Zelle sich einzeln absetzt und sich klonal vermehrt. Innerhalb von sieben Tagen bilden sich aus überlebenden Einzelzellen sichtbare Kolonien, die gezählt werden können.

2.2.10.1 Strahlenempfindlichkeit in der G₁-Phase

Konfluente, in der G₁-Phase synchronisierte CHO-K1-Zellen wurden bestrahlt. Nach 6 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen durch verdünnte Aussaat restimuliert. Eine Stunde später wurden die Zellen mit siRNA transfiziert (2.2.4.2). Nach weiteren 15 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen in Ø 10 cm-Gewebezuchtschalen für den Koloniebildungstest ausgesät. Pro Probe wurden die Zellen in mindestens zwei verschiedenen Konzentrationen jeweils doppelt angesetzt. Die Färbung der Kolonien erfolgte nach sieben Tagen (2.2.10.5).

2.2.10.2 Strahlenempfindlichkeit in der frühen S-Phase

Konfluente, in der G₁-Phase synchronisierte CHO-K1-Zellen wurden durch verdünnte Aussaat restimuliert. Eine Stunde später wurden die Zellen mit siRNA transfiziert (2.2.4.2). Nach weiteren 11 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen bestrahlt. Die Zellen wurden anschließend 4 h im Brutschrank inkubiert und dann in Ø 10 cm-Gewebezuchtschalen für den Koloniebildungstest ausgesät. Pro Probe wurden die Zellen in mindestens zwei verschiedenen Konzentrationen jeweils doppelt angesetzt. Die Färbung der Kolonien erfolgte nach sieben Tagen (2.2.10.5).

2.2.10.3 Strahlenempfindlichkeit in der späten S/G₂-Phase

Konfluente, in der G₁-Phase synchronisierte CHO-K1- bzw. xrs5-Zellen wurden durch verdünnte Aussaat restimuliert. Eine Stunde später wurden die Zellen mit siRNA transfiziert (2.2.4.2). Nach weiteren 15 h (CHO-K1-Zellen) bzw. 19 h (xrs5-Zellen) Inkubation im Brutschrank erfolgte die Bestrahlung. Die Zellen wurden direkt im Anschluss in Ø 10 cm-Gewebezuchtschalen für den Koloniebildungstest ausgesät. Pro Probe wurden die Zellen in mindestens zwei verschiedenen Konzentrationen jeweils doppelt angesetzt. Die Färbung der Kolonien erfolgte nach sieben Tagen (2.2.10.5).

2.2.10.4 Empfindlichkeit gegenüber MMC

MMC führt Vernetzungen zwischen beiden Strängen der DNA ein, für deren Reparatur offenbar Homologie-vermittelte Mechanismen unverzichtbar sind (Takata et al., 2000, 2001; Godthelp et al., 2002a). Um die Empfindlichkeit gegenüber MMC zu bestimmen, wurden CHO-K1-Zellen 19 h nach Transfektion mit siRNA (2.2.4.2) in Ø 10 cm-Gewebezuchtschalen für den Koloniebildungstest ausgesät. Pro Probe wurden die Zellen in mindestens zwei verschiedenen Konzentrationen jeweils doppelt angesetzt. Zeitgleich wurde MMC zugegeben. Die Inkubation mit MMC erfolgte kontinuierlich über sieben Tage. Anschließend wurden die Kolonien gefärbt und analysiert (2.2.10.5).

2.2.10.5 Färbung und Analyse der Kolonien

Die Kolonien wurden durch Färbung mit Kristallviolett sichtbar gemacht. Das Medium wurde verworfen, die Zellen einmal mit Isoton II gespült und 5 min mit 70 % Ethanol fixiert. Der Ethanol wurde verworfen und die Zellen wurden mit 0,1 % Kristallviolett für 2 min gefärbt. Das Kristallviolett wurde abgekippt und überschüssige Farbe mit Leitungswasser entfernt. Die Platten wurden getrocknet. Bei der anschließenden Analyse wurden die Petrischalen mit einem Keimzählgerät ausgewertet, nur Kolonien mit mehr als 50 Zellen wurden gezählt. Die Überlebensrate wurde durch das Verhältnis gebildeter Kolonien zur Anzahl eingegebener Zellen bestimmt. Zur Kalkulation der Koloniebildungsfähigkeit wurde die Überlebensrate auf die Angehrate (*plating efficiency*) der jeweiligen Zellen normiert. Die Angehrate wurde mit unbestrahlten Zellen ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Methodische Vorarbeiten zur RNAi

RNAi ist eine Technik zur posttranskriptionalen Inhibition der Genexpression. Die Interferenz wird durch siRNAs vermittelt, dsRNAs von 21 Nukleotiden Länge. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, chemisch synthetisierte siRNA transient in Zellen zu transfizieren, um die Expression des RAD51-Proteins zu unterdrücken. Dieser Ansatz bietet sich immer dann an, wenn das Zielprotein für das Zellwachstum essentiell ist und ein Knockout nicht in Frage kommt.

Die Stärke der Inhibition hängt von verschiedenen Faktoren ab. Entscheidend ist zunächst die Effizienz der Transfektion, also der Anteil transfizierter Zellen und die Menge eingebrachter siRNA. Beide Parameter mussten optimiert werden. Hierfür wurde die Konzentration des Transfektionsagens und die Konzentration der siRNA variiert.

Nachdem die idealen Bedingungen für die Transfektion ermittelt waren, wurde die Inhibition der RAD51-Expression optimiert. Es wurden zwei verschiedene siRNA-Sequenzen getestet sowie die Konzentration der siRNA und die Konzentration des Transfektionsagens angepasst.

3.1.1 Optimierung der Transfektionseffizienz

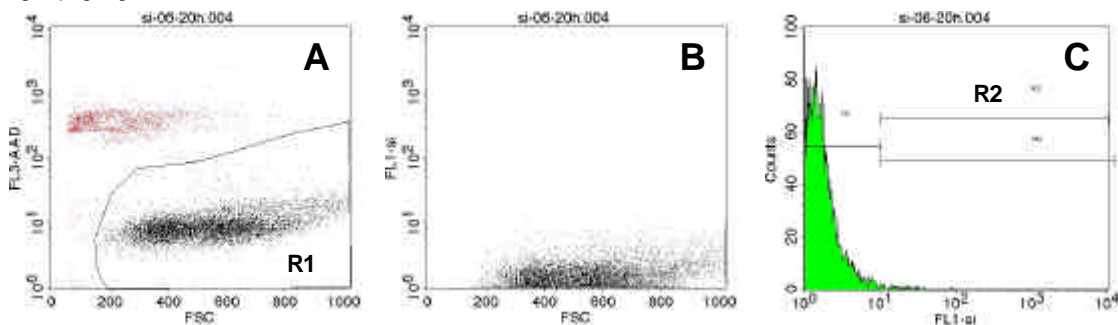
3.1.1.1 Konzentration des Transfektionsagens

Zur Transfektion von siRNA in CHO-K1-Zellen wurden drei verschiedene kationische Lipide getestet: TransIT-TKO (Mirus), Lipofectamine 2000 und Oligofectamine (Invitrogen). Eine Elektroporation kam aufgrund starker toxischer Nebeneffekte in CHO-K1-Zellen nicht in Frage (Daten nicht gezeigt).

Die Transfektionseffizienz wurde im Durchflusszytometer analysiert. Konfluente Zellen wurden durch verdünnte Aussaat restimuliert und eine Stunde später mit einer Fluoresceinmarkierten siRNA (F-siRNA) transfiziert. Die Aufnahme der siRNA sollte vier Stunden nach der Transfektion abgeschlossen sein. Daher wurden die Zellen nach vier Stunden geerntet und untersucht. Aussagen über die Toxizität der Behandlung lassen sich jedoch erst nach längerer Zeit treffen, so dass die Aufnahme parallel auch nach weiteren 16 Stunden Inkubation im Brutschrank analysiert wurde.

Die Auswertung der entsprechenden Versuchsreihen ist in Abbildung 5 exemplarisch gezeigt. Bei der Analyse sollten nur lebende Zellen betrachtet werden. Um lebende von toten Zellen zu unterscheiden, wurde der rote DNA-Farbstoff 7-AAD eingesetzt. Nur sterbende oder tote Zellen mit durchlässigen Membranen können 7-AAD aufnehmen. In Abbildung 5A ist die im Detektor 3 gemessene Rotfluoreszenz schein-behandelter Zellen gegen das Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*, FSC) aufgetragen. Die Vorwärtsstreuung ist ein Maß für die Zellgröße. Es sind zwei Populationen zu erkennen. Bei der schwarz dargestellten Population handelt es sich um intakte Zellen, bei der rot dargestellten um tote Zellen bzw. um Zelltrümmer. Die Region R1 legt die Grenze zwischen beiden Populationen fest und grenzt durch 7-AAD gefärbte stark fluoreszierende Zellen aus. In Abbildung 5D ist die Rotfluoreszenz siRNA-transfizierter Zellen gegen das Vorwärtsstreulicht aufgetragen. Die Region R1 wurde von der Kontrolle übernommen. Die leicht erhöhte Rotfluoreszenz der lebenden siRNA-transfizierten Zellen verglichen mit den lebenden schein-behandelten Zellen ist auf veränderte Membraneigenschaften nach der Transfektion zurückzuführen.

Kontrolle



siRNA-transfizierte Zellen

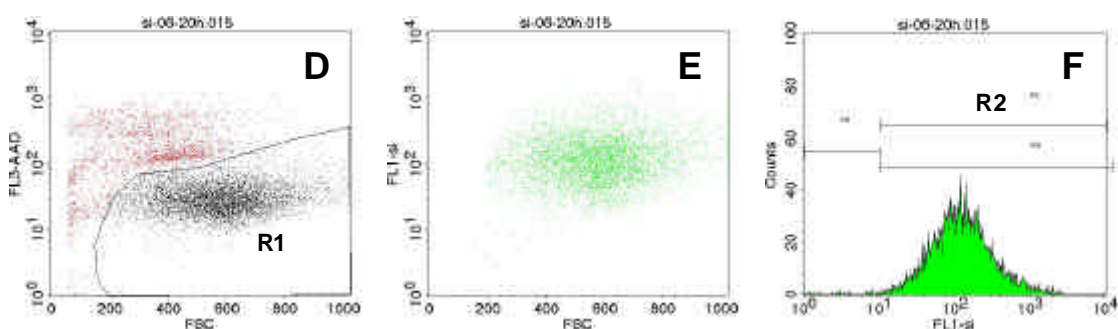


Abbildung 5: Analyse der Aufnahme von F1-siRNA in CHO-K1-Zellen mittels Durchflusszytometrie. Die Zellen wurden entweder mit 100 nM F1-siRNA inkubiert (oben) oder mit 100 nM F1-siRNA und 6,7 µl/ml TransIT-TKO transfiziert (unten). FSC: *Forward Scatter*, Vorwärtsstreulicht. Rote Punkte repräsentieren tote Zellen oder Zelltrümmer, schwarze Punkte lebende Zellen und grüne Punkte lebende, siRNA-positive Zellen.

Abbildung 5B, C und E, F zeigen die Aufnahme der F1-siRNA in lebenden Zellen nach Abzug der toten aus Region 1. In Abbildung 5B ist die in Detektor 1 gemessene Grünfluoreszenz schein-behandelter Zellen gegen das Vorwärtsstreulicht aufgetragen, in Abbildung 5C die Grünfluoreszenz als Histogramm. In Abbildung 5E und F ist die in Detektor 1 gemessene Grünfluoreszenz siRNA-transfizierter Zellen entsprechend dargestellt. Nach Transfektion mit F1-siRNA wurde in fast allen Zellen eine starke Grünfluoreszenz detektiert. Schein-behandelte Zellen, die nur mit F1-siRNA inkubiert wurden, wiesen hingegen lediglich eine schwache Autofluoreszenz im Detektor 1 auf. Die Region R2 legt die Grenze zwischen stark grün fluoreszierenden, d. h. siRNA-positiven Zellen, und negativen Zellen fest. Sie wurde so gewählt, dass nicht mehr als 1 % der Zellen in der schein-behandelten Probe als falsch positiv klassifiziert wurden (Abbildung 5C). In schein-transfizierten Zellen, die nur mit TransIT-TKO inkubiert wurden, war ebenfalls keine erhöhte Grünfluoreszenz zu detektieren (nicht gezeigt).

Abbildung 6 zeigt die Aufnahme der siRNA in Abhängigkeit der Konzentration der drei getesteten kationischen Lipide. Der Anteil siRNA-positiver Zellen nahm mit der eingesetzten Konzentration Transfektionsagens zu.

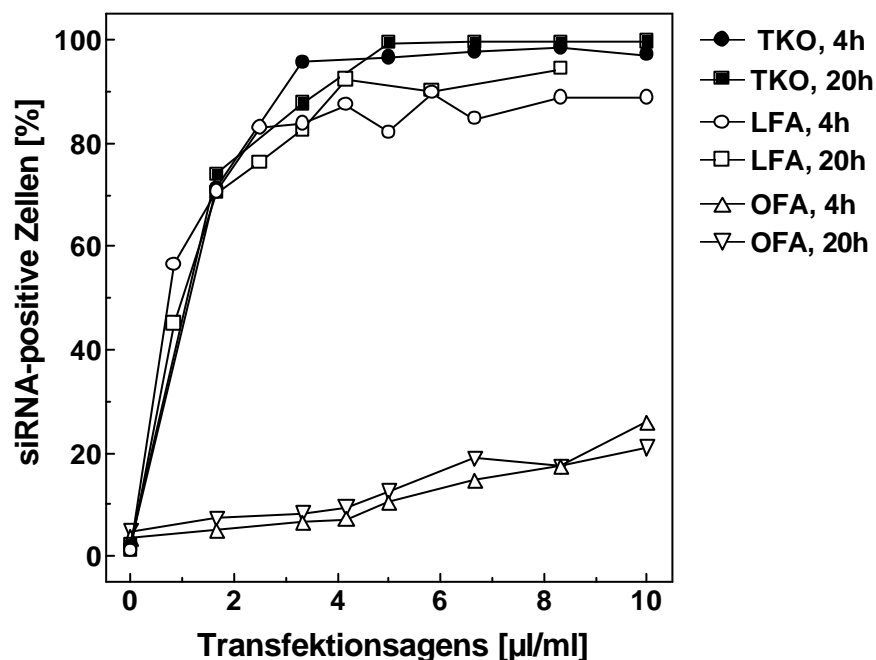


Abbildung 6: Aufnahme von F1-siRNA in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration des jeweiligen Transfektionsagens in CHO-K1-Zellen. Die Transfektion wurde mit 100 nM siRNA und Oligofectamine (OFA), Lipofectamine 2000 (LFA) oder TransIT-TKO (TKO) durchgeführt. Dargestellt ist der Anteil lebender siRNA-positiver Zellen. Die Analyse erfolgte vier bzw. 20 Stunden nach Transfektion im Durchflusszytometer.

Bei Transfektion mit 1,7 $\mu\text{l/ml}$ TransIT-TKO und Lipofectamine 2000 wurden bereits 72,7 % bzw. 70,5 % siRNA-positive Zellen detektiert, bei Transfektion mit 1,7 $\mu\text{l/ml}$ Oligofectamine hingegen nur 6,2 %. Bei Transfektion mit 3,3 $\mu\text{l/ml}$ TransIT-TKO waren 91,6 %, mit 3,3 $\mu\text{l/ml}$ Lipofectamine 2000 83,1 % und mit 3,3 $\mu\text{l/ml}$ Oligofectamine 7,4 % siRNA-positive Zellen nachweisbar.

Bei 5 $\mu\text{l/ml}$ TransIT-TKO bzw. 4,2 $\mu\text{l/ml}$ Lipofectamine 2000 wurde eine Sättigung siRNA-positiver Zellen erreicht, der Anteil siRNA-positiver Zellen konnte durch den Einsatz höherer Konzentrationen Transfektionsagens nicht weiter gesteigert werden. Mit TransIT-TKO wurde der höchste Anteil siRNA-positiver Zellen detektiert (98 %). Mit Lipofectamine wurden im Mittel 87 % transfiziert. Dagegen zeigte Oligofectamine mit maximal 23 % siRNA-positiven Zellen eine schlechte Transfektionseffizienz, eine Sättigung wurde nicht erreicht. Damit kam Oligofectamine als Transfektionsagens für die vorliegende Arbeit nicht in Frage und wurde im Folgenden nicht weiter berücksichtigt.

Die Inkubationsdauer der Komplexe aus siRNA und Transfektionsagens hatte keinen Einfluss auf den Anteil siRNA-positiver Zellen. So wurden keine Unterschiede nach vier und nach 20 Stunden im Anteil siRNA-positiver Zellen gemessen. Dies deutet darauf hin, dass das Fluorescein über diesen Zeitraum in den Zellen stabil bleibt und die Aufnahme von siRNA nach vier Stunden weitestgehend abgeschlossen ist.

Für eine erfolgreiche RNAi ist nicht nur der Anteil siRNA-positiver Zellen von Bedeutung, sondern auch die Menge aufgenommener siRNA pro Zelle. Diese wurde durch die mittlere Fluoreszenz, den Median, der als lebend positiv qualifizierten Zellen bestimmt. Abbildung 7 zeigt die aufgenommene Menge siRNA pro Zelle in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration TransIT-TKO und Lipofectamine 2000. Bis zu einer Konzentration von 4,2 $\mu\text{l/ml}$ Lipofectamine 2000 und 5 $\mu\text{l/ml}$ TransIT-TKO war ein starker Anstieg zu beobachten, bei höheren Konzentrationen wurde die Menge aufgenommener siRNA pro Zelle nur noch minimal gesteigert.

Bei Transfektion mit Lipofectamine 2000 wurde nach vier Stunden in den Zellen deutlich mehr siRNA detektiert als nach 20 Stunden. Die relative Fluoreszenzintensität lag bei Einsatz von 4,2 $\mu\text{l/ml}$ Lipofectamine 2000 nach vier Stunden bei 235, nach 20 Stunden bei 83. Bei Transfektion mit TransIT-TKO zeigte sich dagegen kein Unterschied nach vier bzw. 20 Stunden, die relative Fluoreszenzintensität bei Einsatz von 5 $\mu\text{l/ml}$ lag zu beiden Zeitpunkten bei etwa 95. Die größte Menge aufgenommener siRNA pro Zelle wurde mit 5,8 $\mu\text{l/ml}$ Lipofectamine 2000 nach vier Stunden erreicht, mit einer relativen Fluoreszenzintensität von 281. Demgegenüber

wurde mit TransIT-TKO deutlich weniger siRNA in die Zelle transportiert. Die maximale Fluoreszenzintensität wurde mit TransIT-TKO bei einer Konzentration von 10 $\mu\text{l/ml}$ nach 20 Stunden erreicht und lag bei 130. Mit 8,3 $\mu\text{l/ml}$ Lipofectamine wurde eine vergleichbare Menge siRNA pro Zelle nach 20 Stunden detektiert. Nach vier Stunden war Lipofectamine 2000 gegenüber TransIT-TKO hinsichtlich der Menge aufgenommener siRNA deutlich überlegen. Nach 20 Stunden war kein Unterschied zwischen den beiden Agenzien festzustellen.

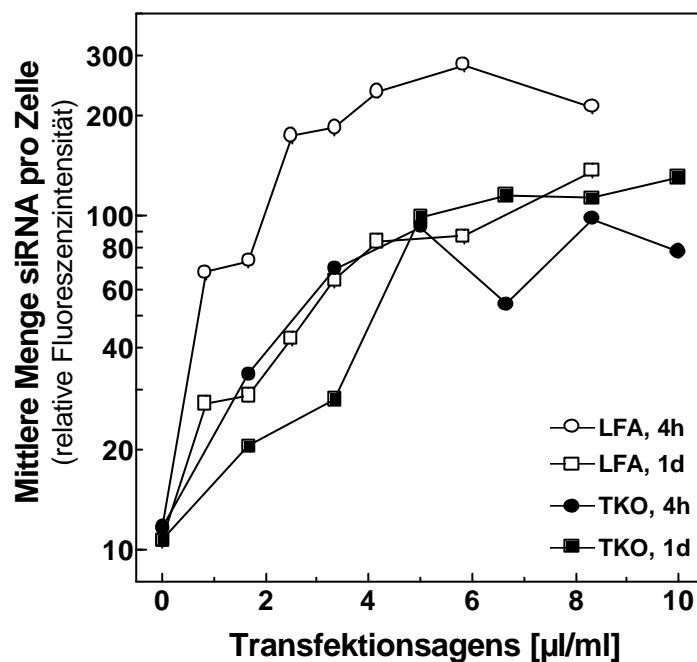


Abbildung 7: Aufnahme von Fl-siRNA in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration des jeweiligen Transfektionsagens in CHO-K1-Zellen. Dargestellt ist die relative Fluoreszenz (Median) lebender, siRNA-positiver Zellen nach Transfektion mit Lipofectamine 2000 (LFA) oder TransIT-TKO (TKO). Die Analyse erfolgte vier bzw. 20 Stunden nach Transfektion im Durchflusszytometer.

Die Transfektion mit kationischen Lipiden kann toxische Nebenwirkungen haben, die von der Zusammensetzung des Agens abhängen. Die Toxizität von TransIT-TKO und Lipofectamine 2000 wurde verglichen, indem die Zahl überlebender Zellen 20 Stunden nach der Transfektion bestimmt wurde. Hierfür wurde einerseits die Zahl der Zellen im Coulter Counter bestimmt, andererseits der Anteil lebender Zellen im Durchflusszytometer mit Hilfe des Farbstoffs 7-AAD ermittelt. Aus der Zellzahl und dem Anteil der lebenden Zellen wurde die absolute Zahl lebender Zellen berechnet, die wiederum in Relation gesetzt wurde zu der absoluten Zahl lebender Zellen nach Behandlung mit Fl-siRNA allein, ohne Transfektionsagens. Es zeigte sich (Abbildung 8),

dass die Zahl überlebender Zellen mit steigender Konzentration Transfektionsagens exponentiell abnimmt. Die $D_{0,5}$, bei der 50 % der Zellen überleben, lag für TransIT-TKO bei 5,6 $\mu\text{l/ml}$ und für Lipofectamine 2000 bei 4,2 $\mu\text{l/ml}$. Die Toxizität von TransIT-TKO war somit etwas geringer als die von Lipofectamine 2000.

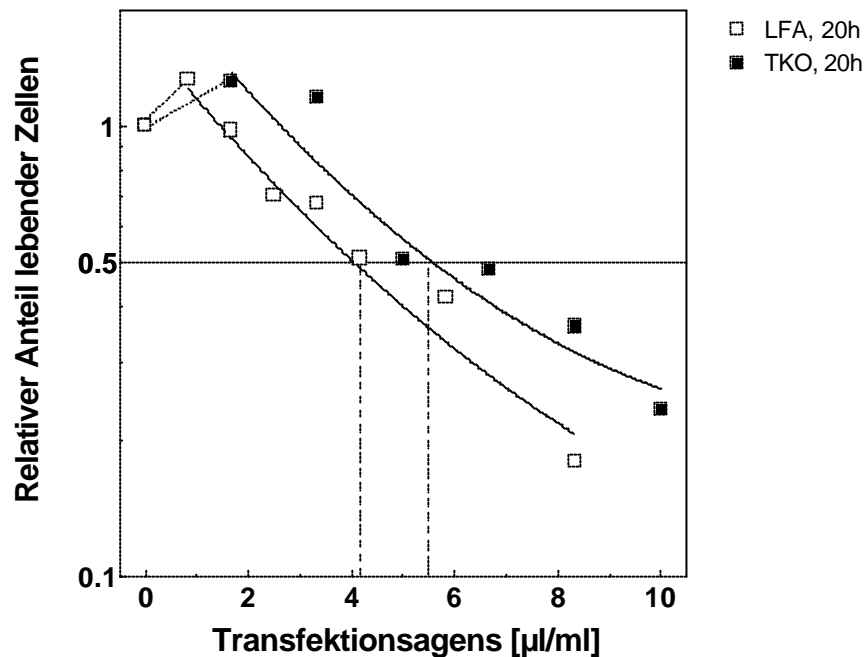


Abbildung 8: Vergleich der Toxizität von Lipofectamine 2000 (LFA) und TransIT-TKO (TKO) in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration. CHO-K1-Zellen wurden mit 100 nM Fl-siRNA transfiziert und 20 Stunden später nach Inkubation mit dem Vitalfarbstoff 7-AAD im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist der relative Anteil lebender Zellen. Dieser errechnet sich aus dem durchflusszytometrisch ermittelten Anteil lebender Zellen und der zuvor am Coulter Counter ermittelten Zellzahl. Die Kurve wurde den Daten mittels nicht-linearer Regression angepasst.

Für die folgenden RNAi-Experimente wurde TransIT-TKO als Transfektionsagens gewählt. Mit TransIT-TKO wurden 98 % der Zellen mit siRNA transfiziert. Die Menge an transfizierter siRNA pro Zelle war nach vier Stunden zwar geringer als bei Transfektion mit Lipofectamine 2000. Für die nachfolgenden Untersuchungen war jedoch entscheidender, dass möglichst alle Zellen mit siRNA transfiziert wurden. Darüber hinaus war TransIT-TKO weniger toxisch als Lipofectamine 2000.

Im Folgenden wurde mit einer Konzentration von 5 $\mu\text{l/ml}$ TransIT-TKO gearbeitet. Bei dieser Menge wurde die maximale Effizienz in Hinblick auf den Anteil siRNA-positiver Zellen erreicht mit 56 % überlebenden Zellen (Abbildung 9).

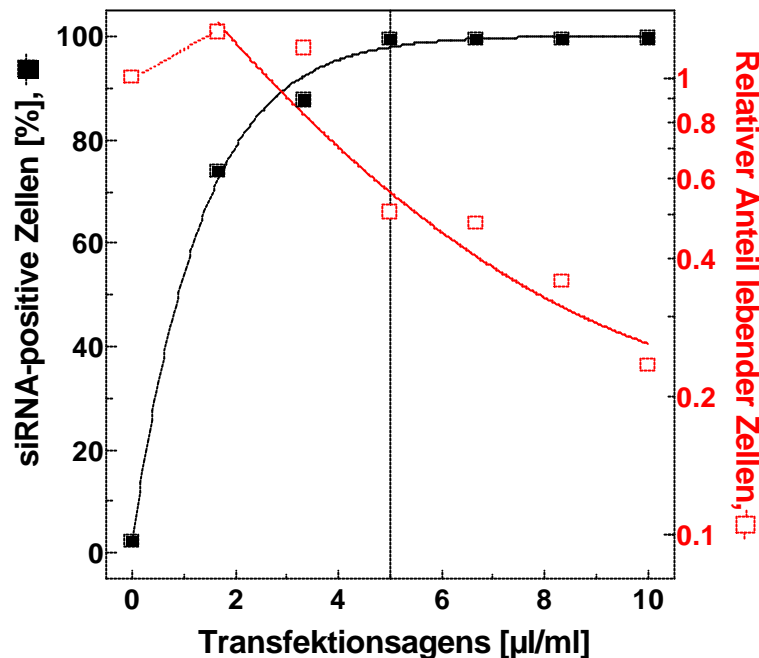


Abbildung 9: Transfektionseffizienz und Toxizität in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration TransIT-TKO. Der Anteil lebender, siRNA-positiver Zellen ist auf der linken Ordinate dargestellt (■, aus Abbildung 6), der relative Anteil lebender Zellen auf der rechten Ordinate (□, aus Abbildung 8). Die Analyse erfolgte 20 Stunden nach Transfektion im Durchflusszytometer. Die Kurve wurde den Daten mittels nicht-linearer Regression angepasst.

3.1.1.2 Konzentration der siRNA

Es sollte festgestellt werden, welche Konzentration an siRNA mindestens notwendig ist, um alle Zellen zu erreichen. Die Transfektionseffizienz wurde wie bereits gezeigt im Durchflusszytometer quantifiziert (Abbildung 5). Konfluente Zellen wurden durch verdünnte Aussaat restimuliert und eine Stunde später mit verschiedenen Konzentrationen F1-siRNA und 5 $\mu\text{l/ml}$ TransIT-TKO transfiziert. Die Zellen wurden nach vier Stunden und nach 20 Stunden analysiert.

Es zeigte sich, dass der Anteil siRNA-positiver Zellen mit der eingesetzten Menge siRNA ansteigt (Abbildung 10A). Nach vier Stunden waren bei Einsatz von 40 nM F1-siRNA 80 % siRNA-positive Zellen nachweisbar, bei Einsatz von 100 nM F1-siRNA waren es 95 % siRNA-

positive Zellen. Nach 20 Stunden wurde bei 40 nM F1-siRNA bereits die Sättigung erreicht, es wurden mehr als 98 % siRNA-positive Zellen detektiert.

Die mittlere Fluoreszenz pro Zelle nahm ebenfalls mit der eingesetzte Menge siRNA zu (Abbildung 10B), es wurde jedoch keine Sättigung erreicht. Nach 20 Stunden wurde deutlich mehr Fluoreszenz pro Zelle detektiert als nach vier Stunden. Die relative Fluoreszenzintensität lag bei Einsatz von 40 nM F1-siRNA nach vier Stunden bei 24, nach 20 Stunden bei 87. Sie stieg bei Einsatz von 100 nM F1-siRNA nach vier Stunden auf 35 und nach 20 Stunden auf 156. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch über vier Stunden hinaus siRNA aufgenommen wurde. Für die folgenden Experimente wurden 100 nM siRNA eingesetzt.

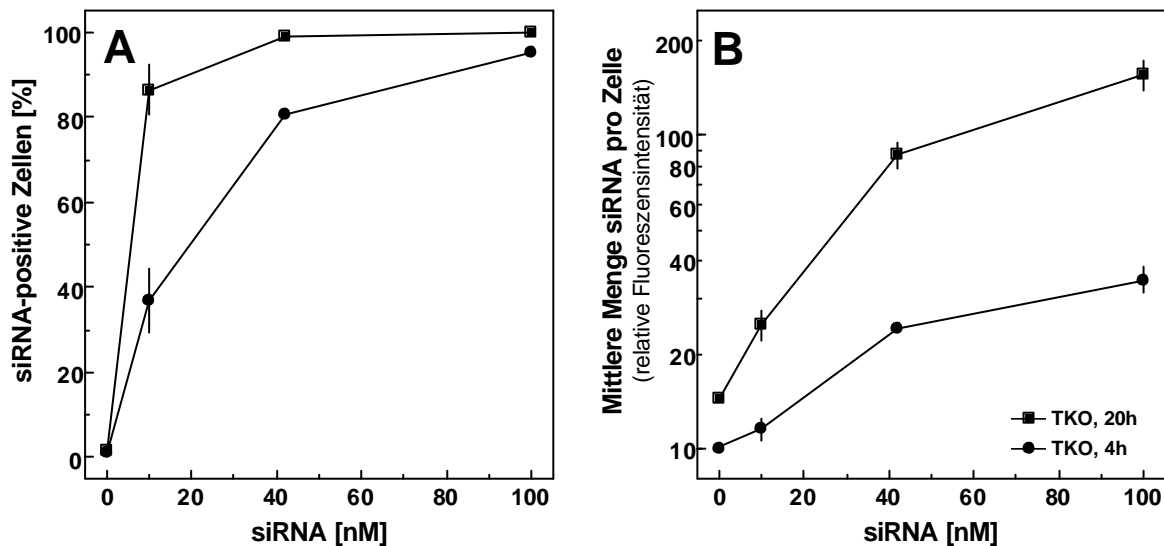


Abbildung 10: Aufnahme von F1-siRNA in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration siRNA in CHO-K1-Zellen. Die Transfektion wurde mit 5 μ l/ml TransIT-TKO (TKO) durchgeführt. Dargestellt ist der Anteil lebender siRNA-positiver Zellen (A) und die relative Fluoreszenz (Median) dieser Zellen (B). Die Analyse erfolgte vier bzw. 20 Stunden nach Transfektion im Durchflusszytometer.

3.1.1.3 Kontrolle der Aufnahme von siRNA im Mikroskop

Die Aufnahme der siRNA wurde mikroskopisch überprüft, um sicherzustellen, dass positiv detektierte Zellen die siRNA auch tatsächlich internalisiert hatten und die Komplexe nicht nur von außen an den Zellen hafteten. Die Untersuchungen wurden in lebenden Zellen vier Stunden nach Transfektion durchgeführt. Neben der F1-siRNA wurde eine Cy3-markierte siRNA eingesetzt, da Cy3 weniger schnell ausbleicht. Abbildung 11 zeigt, dass die siRNA in das Innere der Zelle aufgenommen wurde. Der Kern fluoreszierte am stärksten, das Zytoplasma etwas schwächer. Dies deutet auf eine präferentielle Lokalisation der siRNA im Kern bzw. an der Kernmembran hin.

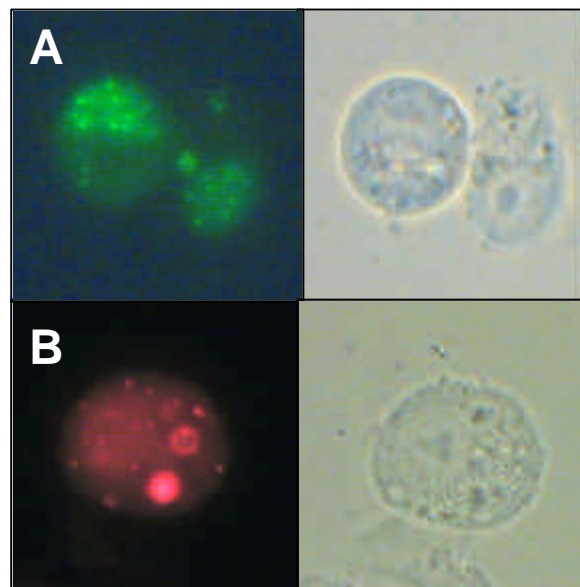


Abbildung 11: Aufnahme Fluoreszenz-markierter siRNA in nativen CHO-K1-Zellen. Die Analyse erfolgte vier Stunden nach Transfektion im Fluoreszenzmikroskop mit einer 1.000fachen Vergrößerung. A: F1-siRNA, B: Cy3-markierte siRNA; rechts jeweils die dazugehörigen Aufnahmen im Phasenkontrast.

3.1.2 Optimierung der Inhibition der RAD51-Expression

Der Effekt spezifischer siRNA auf die RAD51-Expression wurde im Western-Blot untersucht und weiter optimiert. Konfluente Zellen wurden durch verdünnte Aussaat restimuliert und eine Stunde später mit spezifischer siRNA oder unspezifischer scrRNA transfiziert. Nach vier Stunden Inkubation im Brutschrank wurde frisches Medium zugegeben, und nach weiteren 15 Stunden wurden Proteine isoliert und im Western-Blot analysiert.

3.1.2.1 Wahl geeigneter siRNA-Sequenzen gegen *Rad51*

Zunächst mussten geeignete Sequenzen für die Inhibition der RAD51-Expression mittels RNAi identifiziert werden. Die Auswahl der siRNA-Sequenzen wurde nach den von Tuschl (*siRNA user guide*, 3.4.2002) definierten Regeln durchgeführt. Demnach sollten die Sequenzen mindestens 100 Nukleotide hinter dem Startcodon liegen, nach dem Muster AA(N₁₉) ausgewählt werden und einen GC-Gehalt nahe 50 % haben. Die verwendete mRNA-Sequenz für *C. griseus-Rad51* wurde von Vispé (1996, 1998) beim NCBI unter der Zugangsnummer Y0902 hinterlegt (7.2). Es wurden zwei siRNA-Sequenzen getestet, da nicht davon ausgegangen werden kann, dass alle Regionen einer mRNA gleich gut zugänglich für eine Interferenz sind. Eine siRNA-Sequenz wurde im 5'-Bereich der mRNA und eine weitere im 3'-Bereich angesiedelt. Als Kontrolle wurden zwei Sequenzen mit gleichem GC-Gehalt (52,4 %) gewählt, die keine mRNA in der Zelle erkennen und als scrRNAs bezeichnet wurden.

Abbildung 12 zeigt eine deutliche Reduktion der RAD51-Expression durch siRNA1 und siRNA2 im Vergleich zu den Kontrollen. Die Transfektion wurde wie in 2.2.4.2 beschrieben durchgeführt. Das RAD51-Signal wurde in siRNA1-transfizierten Zellen um 65 % reduziert, in siRNA2-transfizierten Zellen um 59 %, bezogen auf das RAD51-Signal unbehandelter Zellen. Die beiden siRNAs erwiesen sich somit als gleichwertig. Im Mittel wurde das RAD51-Signal um 62 % vermindert. Nach Transfektion von scrRNA war ein den unbehandelten Zellen vergleichbares RAD51-Signal zu detektieren. Nach Einsatz von scrRNA1 lag das RAD51-Signal bei 103 %, mit scrRNA2 bei 89 %, bezogen auf Extrakte unbehandelter Zellen. Die geringfügige Reduktion durch scrRNA2 ist auf die Behandlung zurückzuführen. Sie wurde in weiteren Versuchen mit beiden scrRNAs beobachtet. Aus diesem Grund wurde die relative RAD51-Menge der siRNA-transfizierten Zellen künftig auf scrRNA-behandelte Zellen bezogen und

nicht auf unbehandelte Zellen. Das RAD51-Signal wurde im Mittel um ca. 60 % reduziert durch die Behandlung mit siRNA, bezogen auf die scrRNA-transfizierten Zellen.

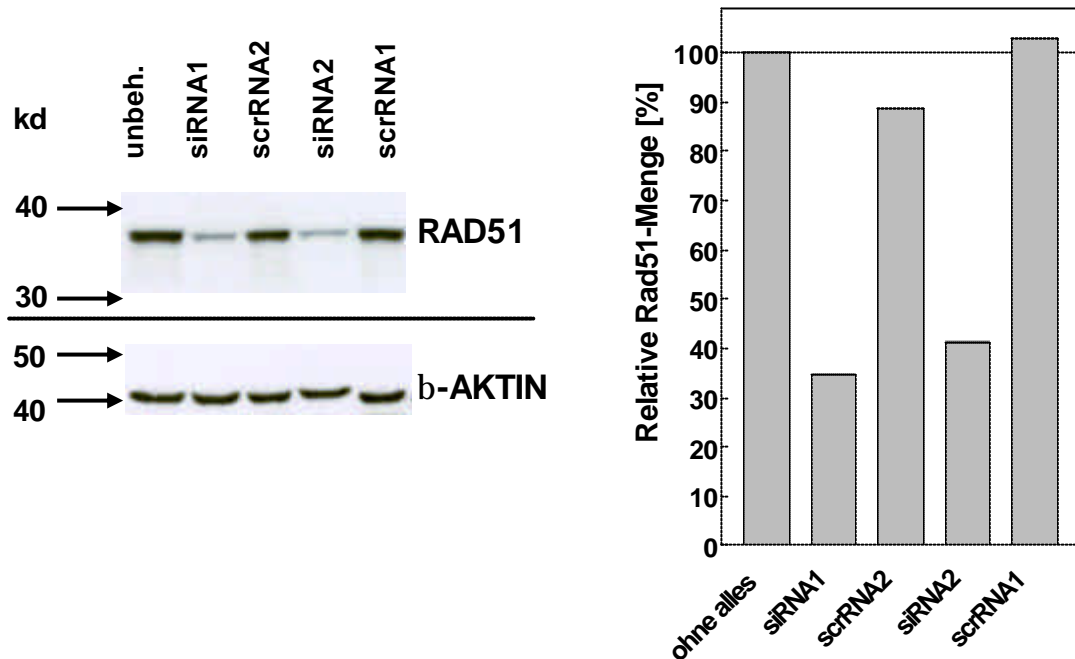


Abbildung 12: Nachweis von RAD51 im Western-Blot (links). Konfluente CHO-K1-Zellen wurden durch verdünnte Aussaat restimuliert, mit siRNA transfiziert und 19 Stunden später extrahiert. Spur 1: Extrakt unbehandelter Zellen, Spuren 2 und 4: Extrakte siRNA-behandelter Zellen, Spuren 3 und 5: Extrakte scrRNA-behandelter Zellen. Die Detektion erfolgte mit Anti-RAD51-Antikörpern aus Maus, sekundärem HRP-konjugierten Anti-Maus-IgG aus Ziege und dem ECL-System. Die Quantifizierung (rechts) erfolgte mit einer ultrasensitiven CCD-Kamera. Dargestellt ist die relative RAD51-Menge, bezogen auf die unbehandelte Probe.

Für die folgenden Experimente wurden immer beide siRNAs parallel eingesetzt. Das Hamstergenom ist nicht vollständig sequenziert, so dass unspezifische Treffer nicht auszuschließen sind. Der Einsatz von zwei verschiedenen, gleichwertigen siRNAs war daher notwendig, um sicherzustellen, dass beobachtete biologische Effekte tatsächlich auf die spezifische Inhibition von RAD51 zurückzuführen sind. Aus demselben Grund wurde bei der Analyse biologischer Effekte (ab 3.2) mit beiden scrRNAs als Kontrolle gearbeitet.

3.1.2.2 Effekt der eingesetzten Menge siRNA und TransIT-TKO

Es wurde untersucht, ob sich die Inhibition der RAD51-Expression durch den Einsatz höherer siRNA-Konzentrationen weiter steigern lässt. Abbildung 13 zeigt die relative Menge an RAD51 in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration siRNA bezogen auf scrRNA1-transfizierte Zellen. Die relative RAD51-Menge nahm konzentrationsabhängig ab. Bei Einsatz von 10 nM siRNA lag sie im Mittel bei 78 %, bei Einsatz von 50 nM bei 53 %, bei Einsatz von 100 nM siRNA bei 40 % und bei Einsatz von 200 nM bei 34 %. Damit war die maximal mögliche Inhibition erreicht. Eine weitere Steigerung der siRNA-Konzentration hatte keinen Effekt auf die Expression von RAD51. In den weiteren Experimenten wurde daher mit 200 nM siRNA transfiziert.

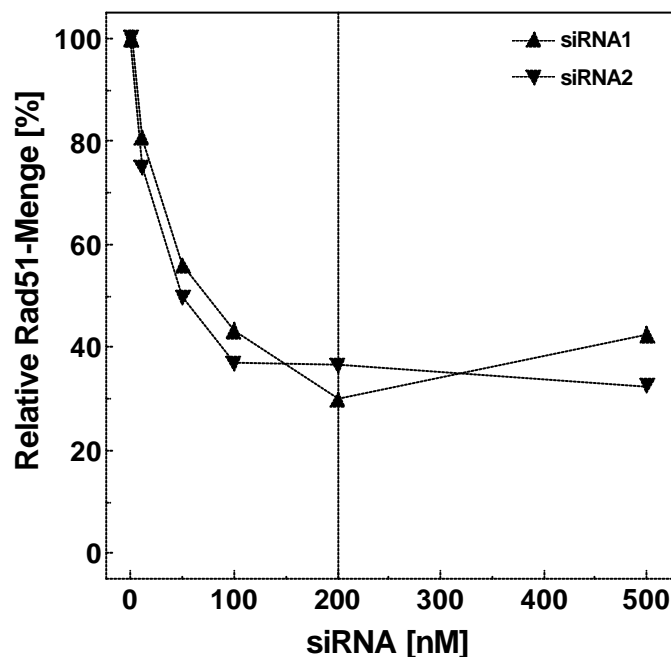


Abbildung 13: RAD51-Expression in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration siRNA. Konfluente CHO-K1-Zellen wurden durch verdünnte Aussaat restimuliert. Eine Stunde später erfolgte die Transfektion mit ansteigenden Konzentrationen an siRNA und 5 μ l/ml TransIT-TKO. Dargestellt ist die relative RAD51-Menge siRNA-transfizierter Zellen, die im Western-Blot ermittelt wurde, bezogen auf scrRNA1-transfizierte Zellen.

Der Einsatz einer höheren Konzentration an siRNA ist vermutlich noch effektiver, wenn gleichzeitig eine höhere Konzentration an TransIT-TKO zur Komplexbildung angeboten wird. Daher wurde der Einsatz von 5 μ l/ml TransIT-TKO mit 6,7 μ l/ml verglichen. Höhere

Konzentrationen an TransIT-TKO wurden nicht verwendet, da die Toxizität zu sehr zunehmen würde (Abbildung 9).

Abbildung 14 zeigt, dass der Einsatz von 6,7 $\mu\text{l/ml}$ TransIT-TKO zu einer Inhibition der Expression von RAD51 um 79 % führt, bezogen auf scrRNA1-transfizierte Zellen. Demgegenüber wurde das RAD51-Signal mit 5 $\mu\text{l/ml}$ Trans IT-TKO nur um 62 % reduziert. Die Transfektion von siRNA wurde in allen nachfolgenden Experimenten mit 200 nM siRNA und 6,7 $\mu\text{l/ml}$ TransIT-TKO durchgeführt.

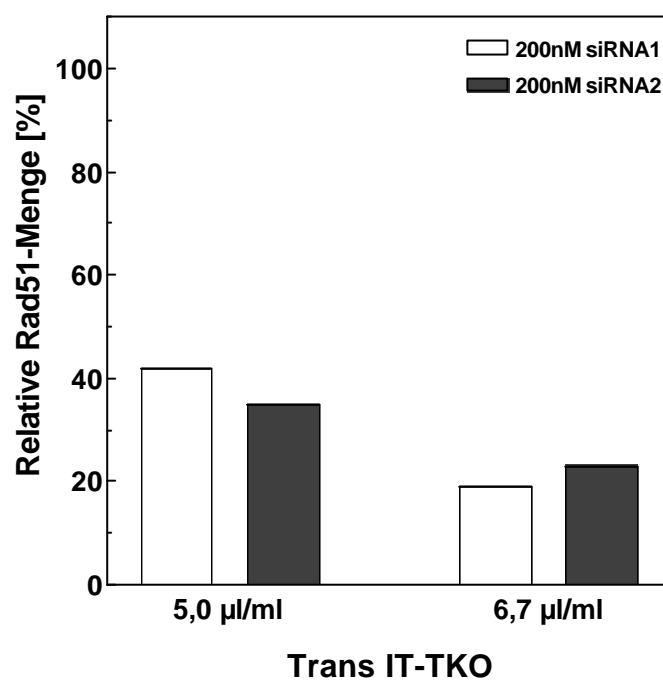


Abbildung 14: RAD51-Expression in Abhängigkeit der eingesetzten Menge TransIT-TKO. Konfluente CHO-K1-Zellen wurden durch verdünnte Aussaat restimuliert. Eine Stunde später erfolgte die Transfektion mit verschiedenen Konzentrationen TransIT-TKO und 200 nM siRNA. Dargestellt ist die relative RAD51-Menge siRNA-transfizierter Zellen, die im Western-Blot ermittelt wurde, bezogen auf scrRNA1-transfizierte Zellen.

3.2 Inhibition der RAD51-Expression

Die Inhibition der RAD51-Expression wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit in zeitlichen Abständen kontinuierlich überprüft. Konfluent gewachsene CHO-K1-Zellen wurden durch verdünnte Aussaat restimuliert und eine Stunde später mit 6,7 μ l/ml TransIT-TKO und 200 nM siRNA transfiziert. Nach vier Stunden wurde frisches Medium zugegeben und nach weiteren 15 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Proteine isoliert und im Western-Blot analysiert. Abbildung 15 zeigt, dass nach Transfektion mit siRNA1 die RAD51-Expression im Mittel um 60,3 % reduziert wurde, bezogen auf die Expression von RAD51 nach Behandlung mit scrRNA. Die Werte der beiden scrRNAs wurden für diese Analyse gemittelt. Nach Transfektion mit siRNA2 wurde die Expression im Schnitt um 63,7 % gesenkt. Es bestätigte sich hiermit, dass beide siRNAs die RAD51-Expression gleichermaßen inhibieren. Im Mittel wurde eine Reduktion von RAD51 um 62 % auf ein Niveau von 38 % erreicht.

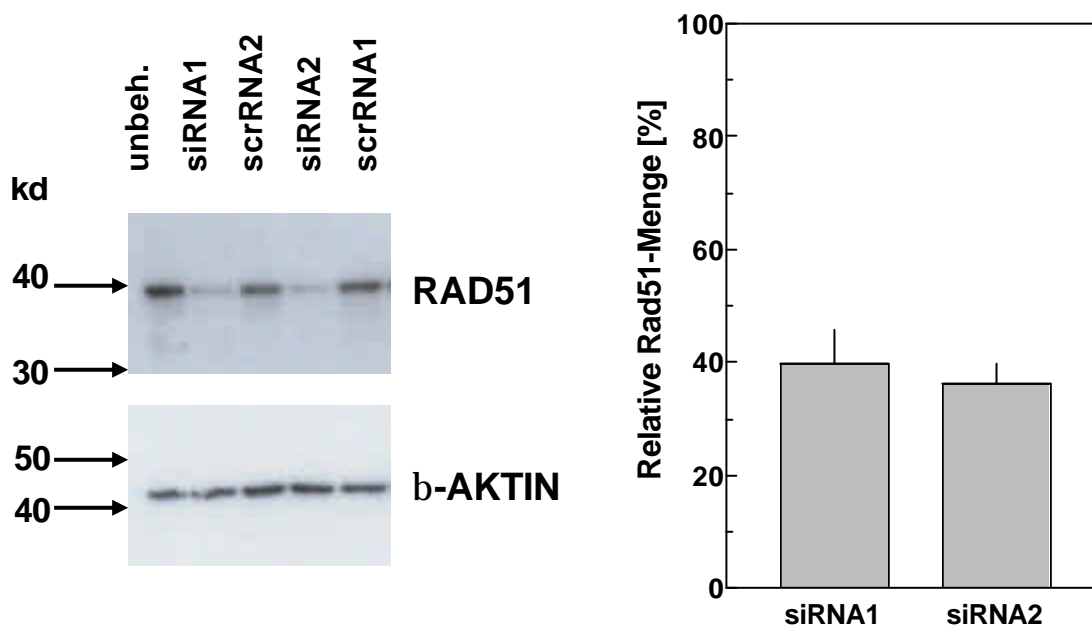


Abbildung 15: Analyse der RAD51-Expression nach Transfektion mit siRNA im Western-Blot. Beispielhaft ist eine Autoradiographie auf der linken Seite dargestellt. Konfluente CHO-K1-Zellen wurden durch verdünnte Aussaat restimuliert und mit siRNA transfiziert. Die Extraktion der Proteine erfolgte 20 Stunden nach der Restimulation. Spur 1: Extrakt unbehandelter Zellen, Spuren 2 und 4: Extrakte siRNA-behandelter Zellen, Spuren 3 und 5: Extrakte scrRNA-behandelter Zellen. Die Quantifizierung erfolgte mit einer ultrasensitiven CCD-Kamera (rechts). Dargestellt ist die relative RAD51-Menge nach Behandlung mit siRNA1 bzw. siRNA2, bezogen auf die gemittelten Werte nach Transfektion von scrRNA. Dargestellt sind die Mittelwerte aus acht unabhängigen Experimenten.

3.3 Effekt der *Rad51*-Interferenz auf die Focibildung

Nach DNA-Schädigung akkumuliert RAD51 in immunzytochemisch nachweisbaren Foci im Zellkern (Haaf et al., 1995; Raderschall et al., 1999). Die Focibildung wird als Nachweis für die Funktion von RAD51 und der HR angesehen. Es sollte untersucht werden, wie sich die Inhibition der RAD51-Expression auf die Bildung von Foci auswirkt.

Konfluente CHO-K1-Zellen wurden restimuliert, transfiziert und 17 Stunden später mit 12 Gy bestrahlt. Nach weiteren acht Stunden wurden die RAD51-Foci immunzytometrisch sichtbar gemacht (Abbildung 16) und quantifiziert (Abbildung 17). Abbildung 16 zeigt für unbestrahlte CHO-K1-Zellen nahezu keine RAD51-Foci (Abbildung 16A) und einen deutlichen Anstieg an Zellen mit Foci nach Bestrahlung mit 12 Gy (Abbildung 16B). In scrRNA-behandelten Zellen war die Focibildung nach Bestrahlung ähnlich ausgeprägt wie in unbehandelten Zellen (Abbildung 16 C/D). Dagegen war nur eine geringe Induktion von Foci nach Bestrahlung in siRNA-behandelten Zellen zu beobachten (Abbildung 16 E/F).

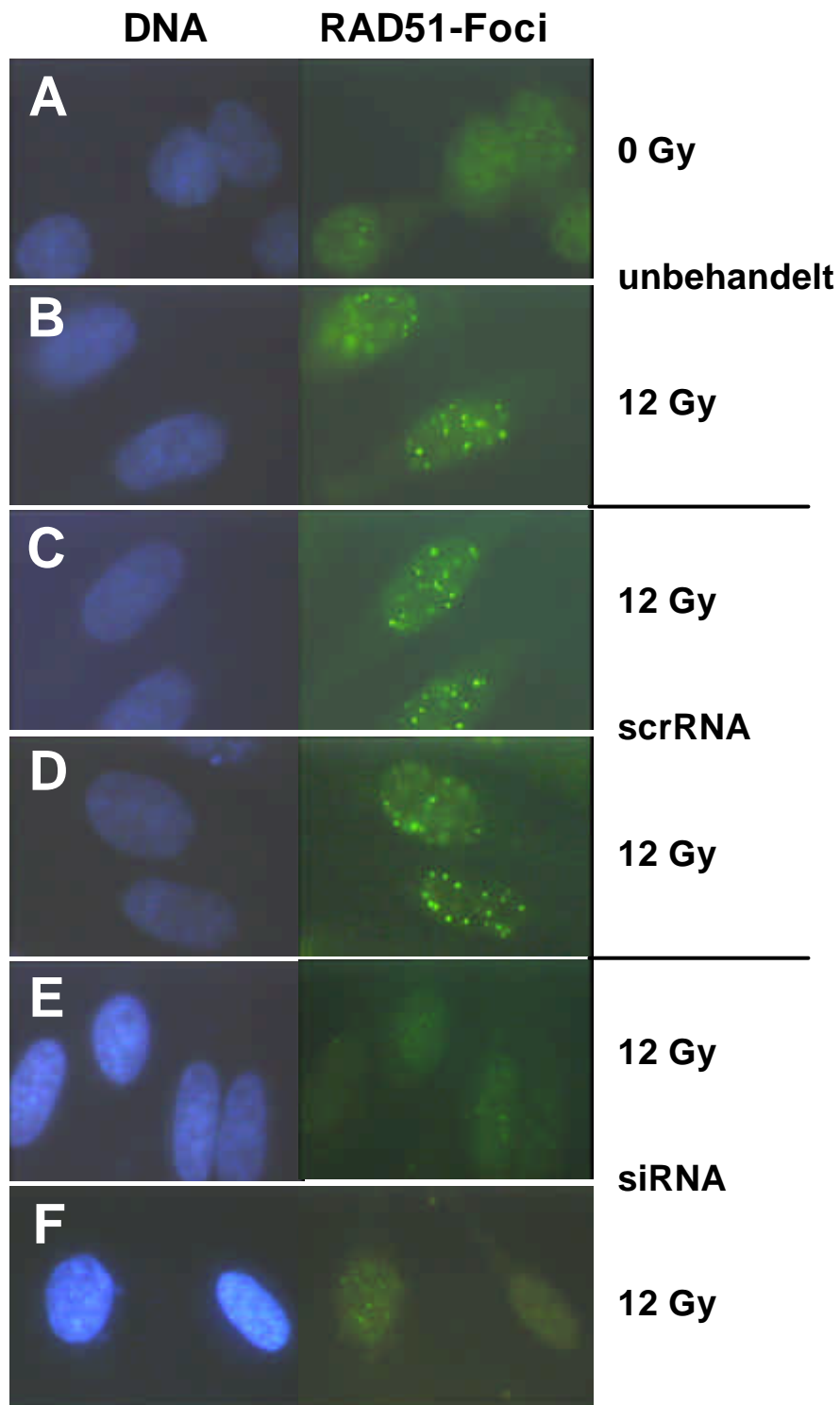


Abbildung 16: RAD51-Foci in unbestrahlten und mit 12 Gy bestrahlten, unbehandelten bzw. siRNA- oder scrRNA-transfizierten Zellen. Konfluente CHO-K1-Zellen wurden durch verdünnte Aussaat restimuliert, mit siRNA transfiziert und 17 Stunden später mit 12 Gy bestrahlt. Nach weiteren acht Stunden wurden die Foci immunzytometrisch sichtbar gemacht. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die Analyse erfolgte im Fluoreszenzmikroskop mit einer 1.000fachen Vergrößerung.

Abbildung 17 zeigt die Quantifizierung der Foci. Zellen mit mehr als fünf Foci wurden als positiv bewertet (Godthelp et al., 2002a). Ohne Bestrahlung waren nur in 6 % der unbehandelten CHO-K1-Zellen Foci zu beobachten. Der Anteil Foci-positiver Zellen stieg auf 83 % nach Bestrahlung mit 12 Gy an. Nach Transfektion mit scrRNA wiesen im Mittel 69 % der Zellen Foci nach Bestrahlung mit 12 Gy auf. Demgegenüber waren im Mittel nur 26 % der siRNA-behandelten Zellen Foci-positiv nach Bestrahlung mit 12 Gy. Der Einsatz von siRNA1 führte zu einer etwas stärkeren Reduktion der Focibildung mit nur noch 16 % Foci-positiven Zellen im Vergleich zu 36 % nach Transfektion mit siRNA2. Die Inhibition der RAD51-Expression mittels RNAi führte folglich zu einer dramatischen Reduktion der Foci nach Bestrahlung.

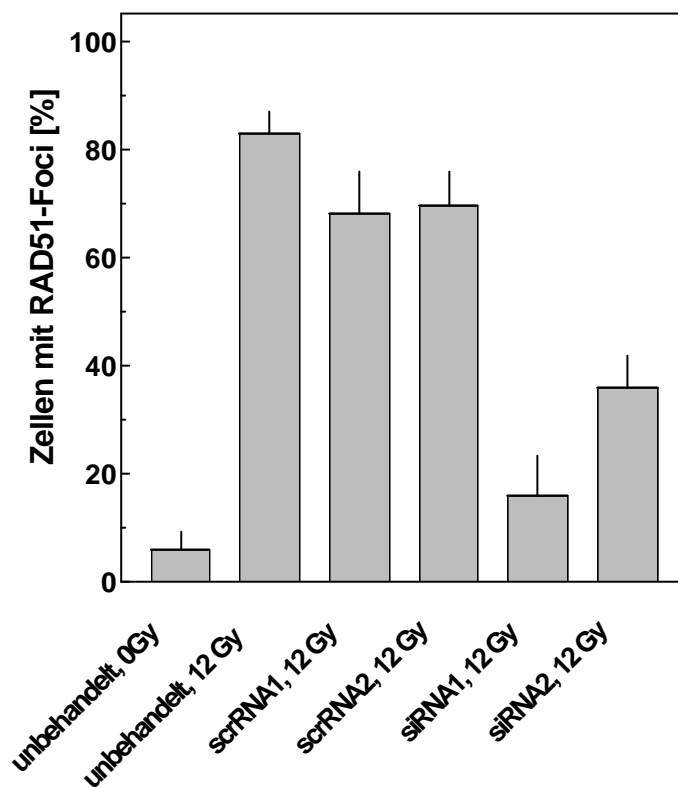


Abbildung 17: Quantitative Analyse der RAD51-Focibildung nach Bestrahlung mit 12 Gy in unbehandelten, siRNA- bzw. scrRNA-behandelten CHO-K1-Zellen. Die RAD51-Foci wurden immunzytometrisch sichtbar gemacht (Abbildung 16) und mikroskopisch analysiert. Zellen mit mehr als fünf nukleären Foci wurden als positiv bewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten.

3.4 Inhibition der RAD51-Expression in Abhängigkeit des Zellzyklus

RAD51 wird in Säugerzellen in Abhängigkeit des Zellzyklus reguliert (Chen et al., 1997; Flygare et al., 1996; Tashiro et al., 1996; Yamamoto et al., 1996). Während RAD51 in der G₀-Phase kaum nachweisbar ist, steigt die Expression von der G₀- zur G₁-Phase dramatisch an und nimmt bis zur G₂-Phase weiter kontinuierlich zu, wo sie ein Maximum erreicht (Chen et al., 1997).

Es wurde untersucht, ob mittels RNAi die zunehmende Expression von RAD51 im Verlauf des Zellzyklus inhibiert werden kann. Konfluent gewachsene CHO-K1-Zellen wurden durch verdünnte Aussaat restimuliert, mit siRNA transfiziert und in regelmäßigen Abständen wurde Protein isoliert und die RAD51-Expression im Western-Blot analysiert. Abbildung 18A zeigt die absolute Menge des RAD51-Proteins in Abhängigkeit des Zellzyklus in unbehandelten CHO-K1-Zellen, Abbildung 19 die relative Menge an RAD51. In proliferierenden Zellen wurde die Expression von RAD51 nach 20 Stunden um den Faktor 3,1 gesteigert, bezogen auf konfluent gewachsene Zellen. Die Expression nahm nach Eintritt in den Zellzyklus kontinuierlich zu, zeigte nach acht Stunden eine Verdoppelung und erreichte nach 20 Stunden ein Maximum. Anschließend nahm die RAD51-Expression wieder etwas ab. Nach 32 Stunden wurde eine um den Faktor 2 gesteigerte Proteinmenge nachgewiesen. Nach 48 Stunden stieg die RAD51-Expression erneut an auf ein Niveau von 2,4.

In scrRNA-behandelten Zellen wurde die RAD51-Expression um den Faktor 2,7 nach 20 Stunden gesteigert (Abbildung 18 B und C, Abbildung 19). Sie nahm nach Eintritt in den Zellzyklus ebenfalls kontinuierlich zu. Nach zwölf Stunden war die Proteinmenge um den Faktor 1,7 vermehrt, nach 20 Stunden wurde das Maximum erreicht. Die Expression blieb auf einem hohen Niveau bis 32 Stunden nach der Restimulation. Nach 24 Stunden wurde die 2,1fache Proteinmenge registriert, nach 32 Stunden die 2,6 fache Proteinmenge. Anschließend nahm die Menge an RAD51 kontinuierlich ab bis auf ein Niveau von 1,3 nach 48 Stunden.

Demgegenüber zeigte sich keine Zunahme der RAD51-Expression in siRNA-behandelten Zellen im Verlauf des Zellzyklus (Abbildung 18 B und C). Abbildung 19 zeigt, dass die relative RAD51-Menge im Mittel bei 0,93 lag. Die RAD51-Expression blieb kontinuierlich auf dem Niveau der konfluenten Zellen, bis zum Endpunkt 48 Stunden.

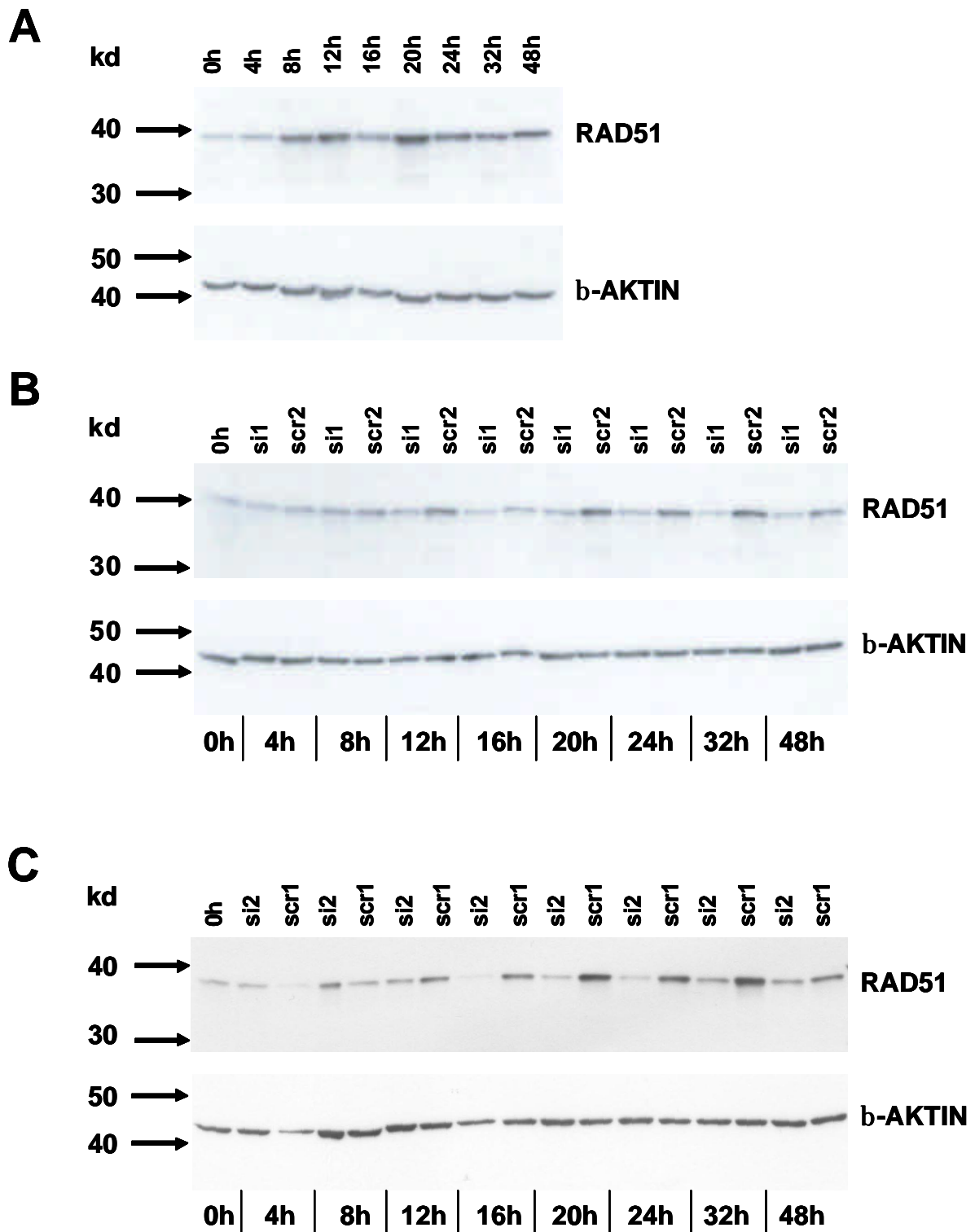


Abbildung 18: RAD51-Expression im Verlauf des Zellzyklus. Konfluente CHO-K1-Zellen wurden durch verdünnte Aussaat restimuliert (Zeitpunkt $t = 0$ h), mit siRNA transfiziert und zu den bezeichneten Zeitpunkten extrahiert. Die Analyse erfolgte im Western-Blot. A: Extrakte unbehandelter Zellen. B: Extrakte siRNA1/scrRNA2-behandelter Zellen. C: Extrakte siRNA2/scrRNA1-behandelter Zellen.

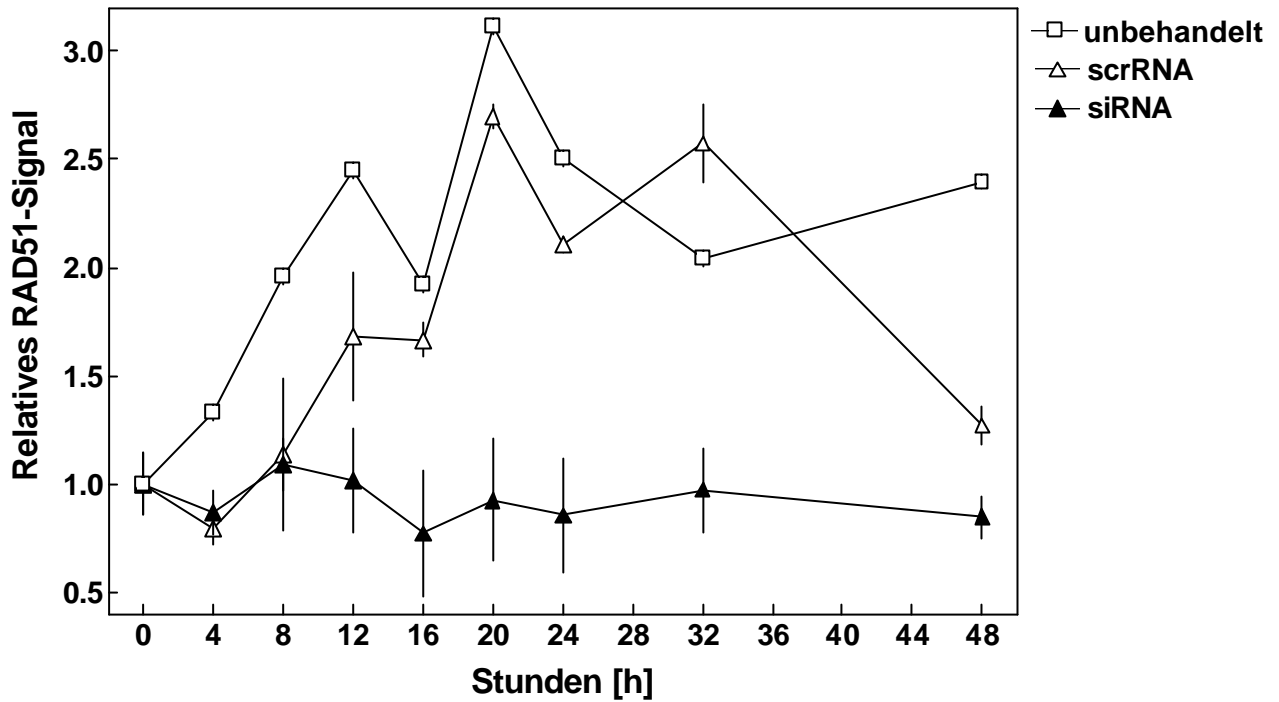


Abbildung 19: Relative Menge an RAD51-Protein in Abhängigkeit des Zellzyklus (Western-Blots siehe Abbildung 18). Die um Beladungsunterschiede korrigierten RAD51-Signale wurden im ersten Schritt auf das stärkste Signal der jeweiligen Membran und im zweiten Schritt untereinander normiert. Die Werte für die siRNA- und scrRNA-behandelten Proben wurden gemittelt. Die Quantifizierung erfolgte mit einer ultrasensitiven CCD-Kamera.

3.5 Effekt der *Rad51*-Interferenz auf die Zellzyklusverteilung

Es sollte überprüft werden, ob sich die Inhibition der RAD51-Expression auf die Zellzyklusverteilung auswirkt. Konfluente CHO-K1-Zellen wurden durch verdünnte Aussaat restimuliert und mit siRNA transfiziert. Anschließend wurden Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert. Abbildung 20 zeigt den Anteil an Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen in Abhängigkeit der Zeit. Unter konfluenten Bedingungen waren knapp 70 % der Zellen in der G₁-Phase. In unbehandelten Zellen nahm dieser Anteil zwölf Stunden nach Restimulation auf 11 % ab. Der Anteil an S-Phase-Zellen stieg von knapp 20 % in Konfluenz auf knapp 60 % zwölf Stunden nach Stimulation. Bis 16 Stunden nahm der Anteil an S-Phase-Zellen wieder auf 20 % ab, der Anteil an G₂-Phase-Zellen stieg zeitgleich auf knapp 30 %, der Anteil an G₁-Phase-Zellen auf 46 %. Nach 20 Stunden war ein erneuter Anstieg an Zellen in der S-Phase zu verzeichnen, der Anteil an G₁- und G₂-Phase-Zellen nahm hingegen ab. Der erste Zyklus nach Restimulation wurde folglich in 16 bis 20 Stunden durchlaufen.

Zwischen scrRNA- und siRNA-behandelten Zellen war kein Unterschied zu beobachten. Der Anteil an G₁-Zellen nahm zwölf Stunden nach Restimulation auf durchschnittlich 38 % ab, 16 Stunden nach Restimulation auf 31 %. Nach zwölf Stunden waren 42 % der transfizierten Zellen in der S-Phase, nach 16 Stunden knapp 40 % und nach 20 Stunden 36 %. Nach 16 Stunden war eine Zunahme an G₂-Phase-Zellen auf 29 % zu beobachten, der Anteil blieb auch nach 20 Stunden noch erhöht bei 26 %.

Es zeigte sich, dass nach Transfektion mit siRNA oder scrRNA die Zellen langsamer und weniger synchron in den Zellzyklus eintreten. Ohne Behandlung waren nach 12 Stunden knapp 60 % der Zellen in die S-Phase eingetreten, nach Transfektion im Mittel 42 %. Zum selben Zeitpunkt befanden sich 11 % der unbehandelten Zellen, jedoch 38 % der transfizierten Zellen noch in der G₁-Phase. Während in der unbehandelten Kontrolle nach 16 Stunden nur noch 20 % der Zellen in der S-Phase detektiert wurden und bereits nach 20 Stunden die zweite Welle an Zellen eintraf, wurden nach Transfektion auch nach 16 und 20 Stunden noch 40 % bzw. 37 % der Zellen in der S-Phase nachgewiesen. Die Verzögerung war auch in der G₂-Phase offensichtlich: Die erste Welle unbehandelter Zellen erreichte die G₂-Phase nach 12 bis 16 Stunden, bis 20 Stunden nahm der Anteil an G₂-Phase-Zellen hingegen deutlich ab. In transfizierten Proben nahm der Anteil an G₂-Phase-Zellen erst nach 16 Stunden deutlich zu und blieb bis 20 Stunden erhöht. Die Inhibition der RAD51-Expression hatte folglich keinen spezifischen Effekt auf den Zellzyklus, siRNA-transfizierte Zellen verhielten sich ähnlich wie scrRNA-behandelte.

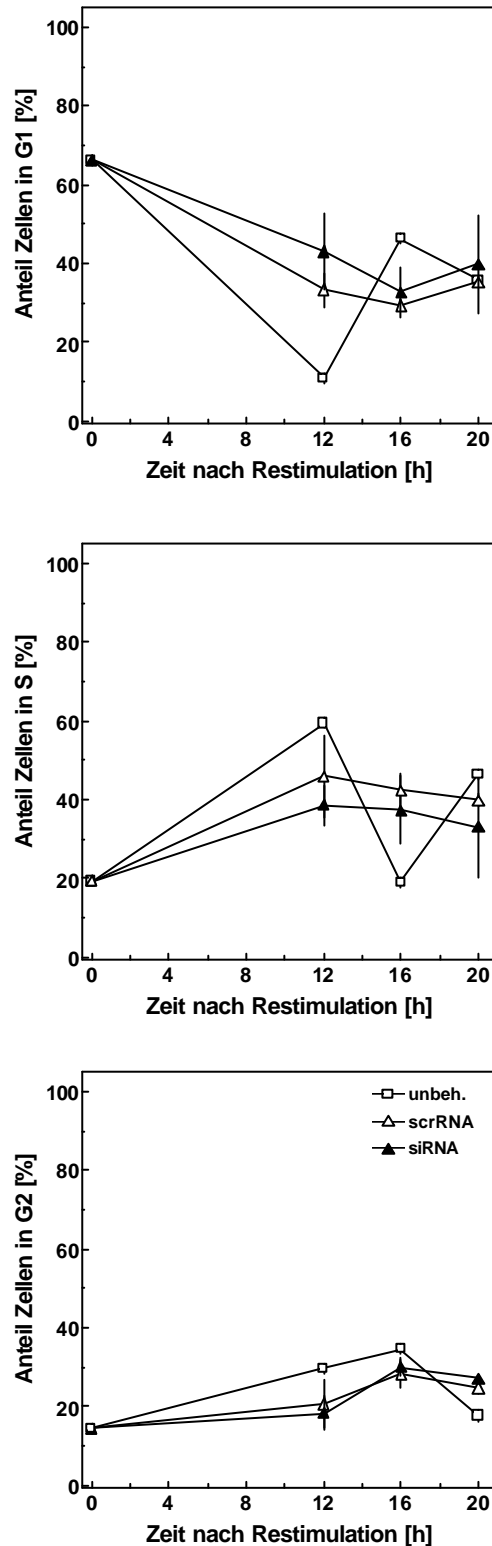


Abbildung 20: Zellzyklusverteilung nach Inhibition der RAD51-Expression. Konfluente CHO-K1-Zellen wurden durch verdünnte Aussaat restimuliert (Zeitpunkt $t = 0$ h) und mit siRNA oder scrRNA transfiziert. Zu den Zeitpunkten 0 h, 12 h, 16 h und 20 h wurden die Zellen fixiert. Die Analyse des DNA-Gehaltes erfolgte im Durchflusszytometer (BD FACScan) nach Färbung mit PI. Die Zellzyklusverteilung wurde mit der Software ModFit LT ermittelt.

3.6 Einfluss der *Rad51*-RNAi auf Chromosomenaberrationen

Ein Ziel der Arbeit war es, zu überprüfen, ob sich die Inhibition der RAD51-Expression mittels RNAi auf die Reparatur von Chromosomenaberrationen der G₁- und G₂-Phase auswirkt.

Nach Bestrahlung von Zellen in der G₁-Phase werden Chromosomentyp-Aberrationen erzeugt. Diese werden von der Zelle innerhalb von sechs Stunden nach Bestrahlung repariert. Nach Abschluss der Reparatur in der G₁-Phase verbleiben 38 % nicht- bzw. falsch-reparierte Fragmente, die im Verlauf des Zellzyklus größtenteils entfernt werden (Borgmann, 1999). Es sollte untersucht werden, ob diese Abnahme nicht-reparierter strahleninduzierter Fragmente während des Zellzyklus von RAD51 abhängt. Zu diesem Zweck wurden in der G₁-Phase bestrahlte CHO-K1-Zellen, bei denen RAD51 zeitgleich mit Eintritt in den Zellzyklus inhibiert wurde, mit der Metaphasentechnik untersucht (*G₁-Assay*).

Darüber hinaus sollte überprüft werden, welchen Einfluss die Inhibition der RAD51-Expression auf in der G₂-Phase erzeugte Chromatidtyp-Aberrationen hat. Hierfür wurden CHO-K1-Zellen, bei denen RAD51 mittels RNAi unterdrückt wurde, in der G₂-Phase bestrahlt und 1,5 Stunden später analysiert (*G₂-Assay*).

3.6.1 Effekt auf Chromosomentyp-Aberrationen aus der G₁-Phase (*G₁-Assay*)

Zunächst wurde das optimale Zeitfenster für die Sammlung der Metaphasen bestimmt, da sich gezeigt hatte, dass transfizierte Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen verzögert und weniger synchron in den Zellzyklus eintreten (3.5). Konfluente CHO-K1-Zellen wurden durch verdünnte Aussaat restimuliert und eine Stunde später mit siRNA1 oder scrRNA2 transfiziert. Anschließend wurde zu verschiedenen Zeitpunkten Colcemid zugegeben, Metaphasen wurden über vier Stunden gesammelt und der mitotische Index bestimmt. Die meisten Metaphasen wurden zwischen 18 und 24 Stunden nach der Restimulation gewonnen (Daten nicht gezeigt). Der Zeitpunkt der Colcemid-Zugabe wurde daher für die folgenden Experimente auf 18 Stunden festgelegt, die Inkubationsdauer auf sechs Stunden.

Für den *G₁-Assay* wurden konfluente Zellen bestrahlt und sechs Stunden im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit wird die in der G₁-Phase mögliche Reparatur abgeschlossen. Anschließend wurden die Zellen durch verdünnte Aussaat restimuliert und mit siRNA oder scrRNA transfiziert. So wurde eine gezielte Reduktion von RAD51 während des Zellzyklus

erreicht. Die Zellen wurden in der ersten Metaphase nach Bestrahlung mit Hilfe von Colcemid arretiert und die Chromosomen wurden präpariert.

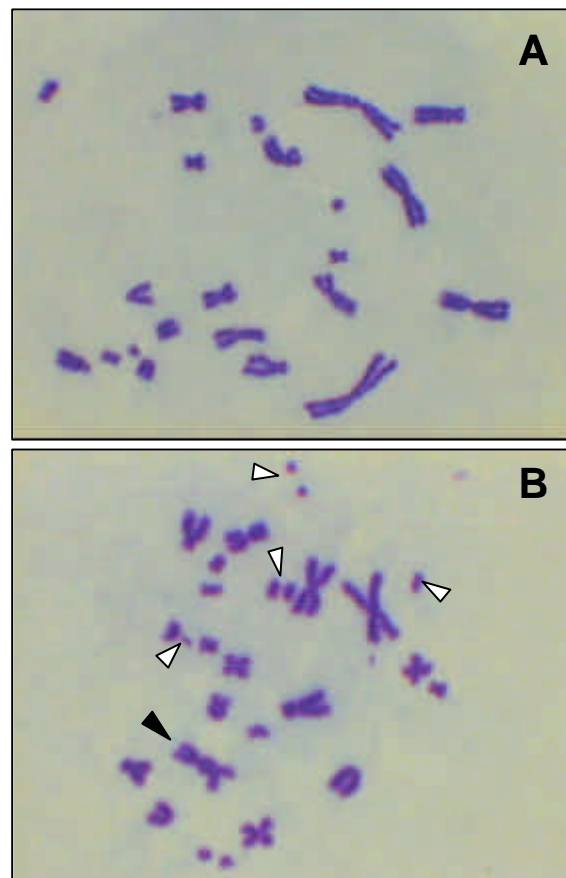


Abbildung 21: Strahleninduzierte letale Chromosomenaberrationen in CHO-K1-Zellen. Die präparierten Metaphasen wurden mit Giemsa gefärbt und mikroskopisch mit einer 1.000fachen Vergrößerung analysiert. Die Aufnahme der Bilder erfolgte über eine Digitalkamera, die Bearbeitung mit Adobe PhotoDeluxe. Dargestellt sind unbestrahlte Zellen (A) und mit 6 Gy in der G₁-Phase des Zellzyklus bestrahlte Zellen (B). Die weißen Pfeile markieren ein azentrische Fragmente, der schwarze Pfeil ein dizentrisches Chromosom.

Abbildung 21 zeigt beispielhaft eine gespreizte Metaphase einer unbestrahlten, unbehandelten Zelle (A) sowie eine zweite nach Bestrahlung mit 6 Gy (B). Unbestrahlte Zellen zeigten 22 Chromosomen, bestrahlte Zellen neben intakten auch dizentrische und ringförmige Chromosomen sowie zusätzliche azentrische Fragmente. Diese bilden zusammen die letalen Chromosomenaberrationen (Pfeile).

Abbildung 22 zeigt die mittlere Anzahl letaler Chromosomenaberrationen pro Zelle in Abhängigkeit der Dosis. Die Zahl der letalen Chromosomenaberrationen wurde ermittelt, indem die strahleninduzierten zusätzlichen Fragmente, die dizentrischen Chromosomen und die

Ringchromosomen addiert wurden. In unbehandelten, scrRNA- und siRNA-behandelten Zellen nahm die Zahl der letalen Chromosomenaberrationen linear-quadratisch mit der Dosis zu.

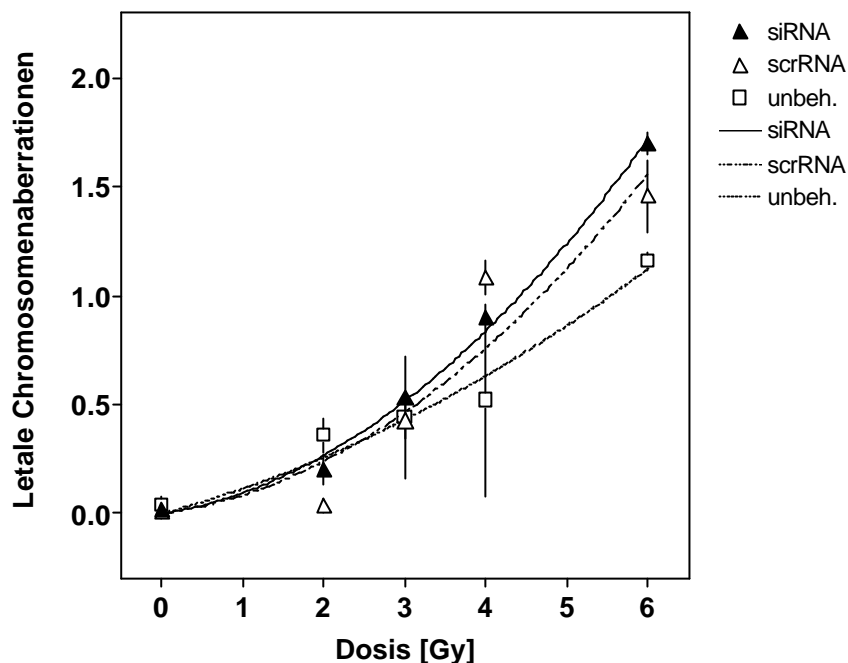


Abbildung 22: Effekt der Inhibition der RAD51-Expression auf strahleninduzierte letale Chromosomenaberrationen in CHO-K1-Zellen. Konfluente Zellen wurden bestrahlt, 6 Stunden später durch verdünnte Aussaat restimuliert und mit siRNA oder scrRNA transfiziert. 18 Stunden nach der Restimulation wurde Colcemid zugegeben, die Präparation der Metaphasen erfolgte nach 24 Stunden. Pro Objektträger wurden 25 Zellen kodiert im Mikroskop ausgewertet. Die Werte für siRNA1 und 2 bzw. scrRNA1 und 2 wurden jeweils gemittelt. Die Anzahl der letalen Chromosomenaberrationen wurde durch Addition der strahleninduzierten Fragmente, der dizentrischen und Ringchromosomen pro Zelle berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Kurve wurde den Daten mittels nicht-linearer Regression angepasst.

In unbehandelten Zellen wurden 0,4 letale Chromosomenaberrationen pro Zelle nach einer Bestrahlung mit 3 Gy nachgewiesen, in scrRNA-behandelten Zellen 0,5 und in siRNA-behandelten Zellen ebenfalls 0,5. Nach Bestrahlung mit 6 Gy stieg die Zahl letaler Chromosomenaberrationen pro Zelle in unbehandelten Zellen auf 1,1, in scrRNA-behandelten Zellen auf 1,6 und in siRNA-behandelten Zellen auf 1,7. Die Inhibition der RAD51-Expression hatte folglich keinen Einfluss auf die letalen Chromosomenaberrationen aus der G₁-Phase. Die Inhibition der RAD51-Expression hatte auch keinen Effekt auf die Zahl spontan erzeugter Fragmente in unbestrahlten Zellen (Daten nicht gezeigt).

3.6.2 Effekt auf Chromatidtyp-Aberrationen der G₂-Phase (G₂-Assay)

Für den G₂-Assay wurden konfluente CHO-K1-Zellen durch verdünnte Aussaat restimuliert, eine Stunde später transfiziert und nach weiteren 19 Stunden Inkubation im Brutschrank mit 0,5 Gy bestrahlt. Wie in Abbildung 20 gezeigt, war zu diesem Zeitpunkt ein größtmöglicher Anteil der Zellen in der G₂-Phase. Eine halbe Stunde nach Bestrahlung wurde Colcemid für eine Stunde zugegeben und im Anschluss wurden die Metaphasen präpariert.

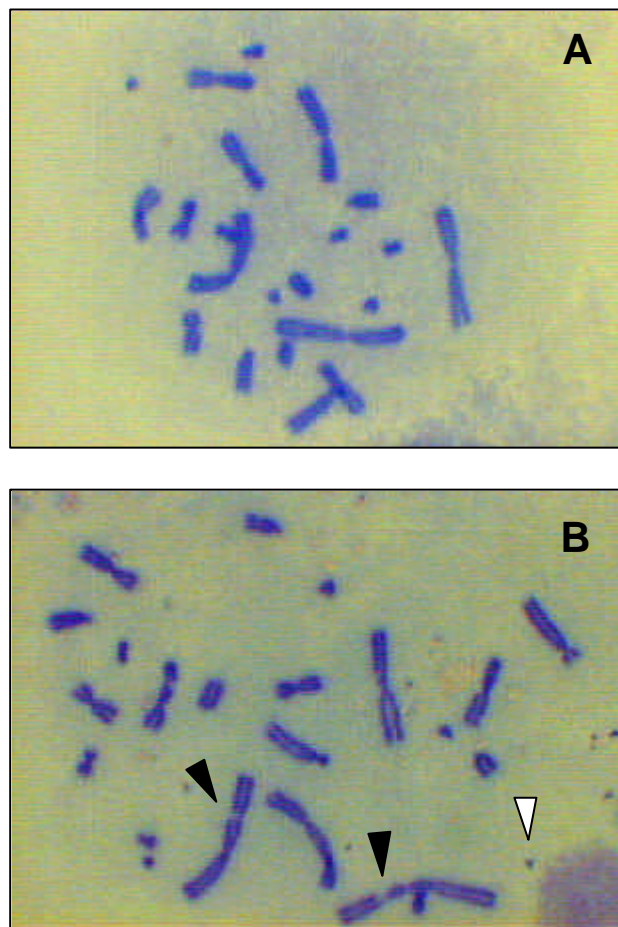


Abbildung 23: Strahleninduzierte G₂-Aberrationen in CHO-K1-Zellen. Die präparierten Metaphasen wurden mit Giemsa gefärbt und mikroskopisch mit einer 1.000fachen Vergrößerung analysiert. Die Aufnahme der Bilder erfolgte über eine Digitalkamera. Dargestellt sind unbestrahlte Zellen (A) und mit 0,5 Gy in der G₂-Phase des Zellzyklus bestrahlte Zellen (B). Schwarze Pfeile markieren *Gaps*, der weiße Pfeil ein Fragment.

Abbildung 23 zeigt beispielhaft Chromatidtyp-Aberrationen nach einer Bestrahlung mit 0,5 Gy. Es wurden hauptsächlich *Gaps*, weniger Chromatidfragmente und Isochromatidfragmente und nur selten Austauschaberrationen beobachtet. Als *Gaps* wurden Lücken auf einem

Schwesterchromatid gewertet, wenn die nicht-gefärbte Region länger war als das Chromatid breit (Sanford et al., 1989).

Die Inhibition der RAD51-Expression führte zu einer Verdopplung der mit dem G_2 -Assay detektierten Aberrationen (Abbildung 24A).

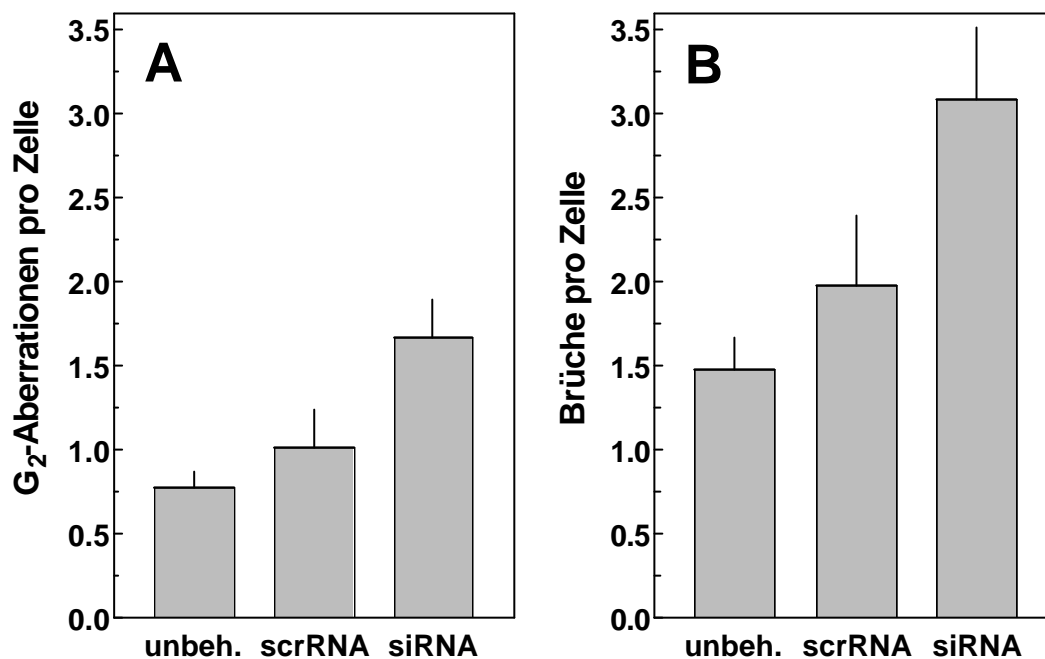


Abbildung 24: Strahleninduzierte Chromatidtyp-Aberrationen in siRNA-behandelten, scr-RNA-behandelten und unbehandelten CHO-K1-Zellen. In A ist die Zahl der G_2 -Aberrationen pro Zelle gezeigt, in B die Zahl der berechneten Brüche pro Zelle nach einer Bestrahlung mit 0,5 Gy. Die Werte bestrahlter Zellen wurden um die unbestrahlter korrigiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

In siRNA-behandelten CHO-K1-Zellen wurden 1,7 G_2 -Aberrationen pro Zelle nachgewiesen, in scrRNA-behandelten Zellen hingegen nur 1,0 und in unbehandelten Zellen 0,8. Zur Berechnung der erzeugten DSBs wurde die Zahl der Brüche wie folgt addiert (Borgmann, pers. Kommunikation): Für einen *Gap* wurden zwei Brüche berechnet, für ein Chromatidfragment ein Bruch, für ein Isochromatidfragment zwei Brüche. Für eine Translokation wurden vier Brüche kalkuliert, für ein triradiales Chromosom drei Brüche und für ein an einem Arm fusioniertes Chromosom zwei Brüche. Die Zahl der so berechneten Brüche war ebenfalls deutlich erhöht nach Inhibition der RAD51-Expression (Abbildung 24B). In siRNA-behandelten Zellen traten 3,1 Brüche pro Zelle auf, in scrRNA-behandelten 2,0 und in unbehandelten Zellen 1,5. Die Inhibition der RAD51-Expression führte folglich zu einem 1,7fachen Anstieg der

G₂-Aberrationen nach Bestrahlung, entsprechend 1,6mal mehr Brüchen, verglichen mit scrRNA-behandelten Zellen.

Die Aufschlüsselung der einzelnen G₂-Aberrationen in Tabelle 11 zeigt, dass insbesondere mehr Chromatidfragmente nach Inhibition der RAD51-Expression zu beobachten waren. Chromatidfragmente nahmen um den Faktor 2,5 zu, *Gaps* und Austauschaberrationen um den Faktor 1,6 bzw. 1,7. Bei den Isochromatidfragmenten war kein Unterschied zwischen siRNA-behandelten und scrRNA-behandelten Zellen zu beobachten.

Tabelle 11: Übersicht über G₂-Aberrationen pro Zelle ± SEM nach Bestrahlung mit 0,5 Gy.

	<i>Gaps</i>	Chromatid- fragmente	Isochromatid- fragmente	Austausch- aberrationen	Summe
unbehandelt	0,63 ± 0,05	0,07 ± 0,04	0,07 ± 0,04	0,01 ± 0,01	0,78
scrRNA	0,72 ± 0,13	0,11 ± 0,05	0,14 ± 0,08	0,06 ± 0,02	1,03
siRNA	1,17 ± 0,17	0,27 ± 0,06	0,14 ± 0,10	0,10 ± 0,04	1,68

In unbestrahlten Zellen wurde keine erhöhte Zahl an G₂-Aberrationen nach Behandlung mit siRNA gefunden (Daten nicht gezeigt).

3.7 Strahlenempfindlichkeit nach Inhibition der RAD51-Expression

Es sollte untersucht werden, welchen Einfluss die RNAi gegen *Rad51* auf das zelluläre Überleben nach Bestrahlung hat. Synchronisierte CHO-K1-Zellen wurden hierfür in definierten Zellzyklus-Phasen bestrahlt und die Koloniebildungsfähigkeit wurde analysiert.

3.7.1 Strahlenempfindlichkeit nach Bestrahlung in der G₁-Phase

Die Bestrahlung in der G₁-Phase erfolgte in konfluent gewachsenen Zellen, die anschließend sechs Stunden im Brutschrank inkubiert wurden, um analog zum G₁-Assay (3.6.1) die in der G₁-Phase mögliche Reparatur abzuschließen. Anschließend wurden die Zellen restimuliert und transfiziert. Die Zellen wurden 16 Stunden nach der Restimulation für den Kolonietest plattiert, kurz bevor sie den ersten Zyklus nach Bestrahlung vollendet hatten.

Abbildung 25A zeigt die Überlebensrate von CHO-K1-Zellen nach Bestrahlung in der G₁-Phase. Auf der rechten Seite ist exemplarisch ein DNA-Histogramm von Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung dargestellt. In konfluenten Zellen waren 68 % in der G₁-Phase des Zellzyklus. Die Plattierungseffizienz lag für unbehandelte Zellen bei 71 %, für siRNA-transfizierte Zellen im Mittel bei 8 % und für scrRNA-behandelte Zellen im Mittel bei 11 %. In unbehandelten und in siRNA- bzw. scrRNA-transfizierten Zellen nahm die Überlebensrate in Form einer Schulterkurve ab. Bis zu 3 Gy wurde nur eine geringe Abnahme beobachtet, bei höheren Dosen eine nahezu exponentielle. Es war kein Unterschied zwischen siRNA- und scrRNA-behandelten Zellen zu beobachten. Unbehandelte Zellen zeigten jedoch ein besseres Überleben als mit siRNA- oder scrRNA-transfizierte. Die D_{0,1}, bei der 10 % der Zellen überleben, lag für unbehandelte Zellen bei 7,4 Gy und für transfizierte Zellen bei 6,0 Gy.

Folglich hatte die Inhibition der RAD51-Expression keinen Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit von CHO-K1-Zellen in der G₁-Phase.

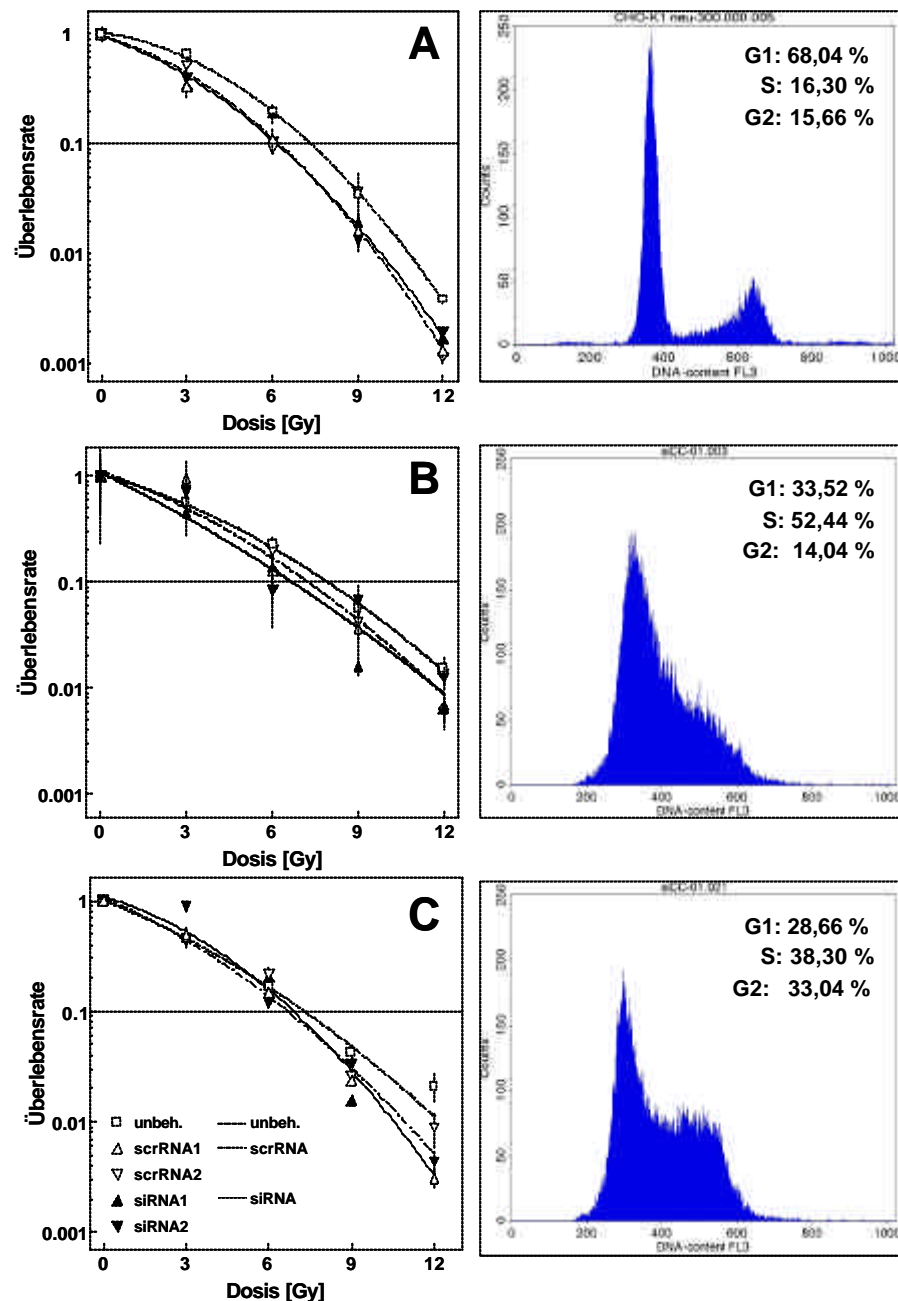


Abbildung 25: Überlebensrate nach Bestrahlung zu verschiedenen Zeitpunkten während des Zellzyklus. Dargestellt ist exemplarisch die Zellzyklusverteilung zum Zeitpunkt der Bestrahlung (rechts) und die Überlebensrate der Zellen in Abhängigkeit der Strahlendosis (links)

A: Konfluente CHO-K1-Zellen wurden bestrahlt, sechs Stunden später durch verdünnte Aussaat restimuliert und mit siRNA oder scrRNA transfiziert. Die Zellen wurden 16 Stunden nach der Restimulation für den Kolonietest ausgesät. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. **B:** Konfluente CHO-K1-Zellen wurden durch verdünnte Aussaat restimuliert und mit siRNA oder scrRNA transfiziert. Die Zellen wurden zwölf Stunden nach der Restimulation bestrahlt und nach weiteren vier Stunden Inkubation im Brutschrank für den Kolonietest ausgesät. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. **C:** Konfluente CHO-K1-Zellen wurden durch verdünnte Aussaat restimuliert und mit siRNA transfiziert. Die Zellen wurden 16 Stunden nach der Restimulation bestrahlt und für den Kolonietest ausgesät. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Kurve wurde den Daten mittels nicht-linearer Regression angepasst.

3.7.2 Strahlenempfindlichkeit nach Bestrahlung in der S/G₂-Phase

Es sollte überprüft werden, wie sich die *Rad51*-RNAi auf die Strahlenempfindlichkeit in der S-Phase auswirkt. Für die Bestrahlung wurden die Zeitpunkte zwölf und 16 Stunden gewählt. Nach zwölf Stunden befanden sich die Zellen in der frühen S-Phase, nach 16 Stunden waren die Zellen in der späten S-Phase bzw. waren bereits in die G₂-Phase eingetreten (Abbildung 20). Die Zellen wurden nach Bestrahlung in der frühen S-Phase vier weitere Stunden im Brutschrank inkubiert und vor der nächsten Teilung für den Kolonietest ausgesät. Nach Bestrahlung in der späten S/G₂-Phase wurden die Zellen direkt für den Kolonietest plattiert.

Abbildung 25B zeigt die Überlebensrate nach Bestrahlung in der frühen S-Phase in Abhängigkeit von der Dosis. Auf der rechten Seite ist beispielhaft ein DNA-Histogramm unbehandelter Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung dargestellt. Der Anteil an S-Phase-Zellen lag bei 52 % und an G₂-Phase-Zellen bei 14 %. Die Plattierungseffizienz lag für unbehandelte Zellen bei 100 %, für siRNA-transfizierte Zellen im Mittel bei 19 % und für scrRNA-behandelte Zellen bei 17 %. Die Überlebensrate nahm in Form einer Schulterkurve ab, wobei die Schulter nicht so stark ausgeprägt war wie nach Bestrahlung in der G₁-Phase (Abbildung 25A). Es war kein bedeutender Unterschied im Kurvenverlauf zwischen unbehandelten, scrRNA- und siRNA-behandelten Zellen zu beobachten. Transfizierte Zellen waren geringfügig strahlenempfindlicher als unbehandelte Zellen. Zwischen den Dosispunkten 3 Gy und 9 Gy zeigte sich eine leichte Sensibilisierung nach Inhibition der RAD51-Expression. Die D_{0,1} lag für siRNA-transfizierte Zellen bei 6,7 Gy, für die scrRNA-transfizierten Kontrollen bei 7,3 Gy und für unbehandelte Zellen bei 8,0 Gy. Die Zellen sind folglich in der frühen S-Phase resistenter gegenüber Strahlung als in der G₁-Phase.

Abbildung 25C zeigt die Überlebensrate nach Bestrahlung in der späten S/G₂-Phase in Abhängigkeit von der Dosis. Die Plattierungseffizienz lag für unbehandelte Zellen bei 100 %, für siRNA-transfizierte Zellen im Mittel bei 29 % und für scrRNA-behandelte Zellen bei 11 %. Auf der rechten Seite ist erneut ein DNA-Histogramm unbehandelter Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung dargestellt. Der Anteil an Zellen in der S- und G₂-Phase lag bei 38 % bzw. 33 %. Die Überlebensraten nahmen in Form von Schulterkurven ab. Der Schulterbereich war weniger ausgeprägt als nach Bestrahlung in der G₁-Phase (Abbildung 25). Es war kein bedeutender Unterschied zwischen unbehandelten, scrRNA- und siRNA-behandelten Zellen zu beobachten. Transfizierte Zellen waren im Dosisbereich ab 6 Gy strahlenempfindlicher als unbehandelte Zellen, es war jedoch kein spezifischer Effekt der siRNA im Vergleich zur scrRNA zu

beobachten. Die $D_{0,1}$ lag für siRNA- und scrRNA-transfizierte Zellen bei 7,1 Gy, für unbehandelte Zellen bei 7,5 Gy. Im Vergleich zur frühen S-Phase waren die Zellen in der späten S-Phase somit etwas strahlenempfindlicher. Die Strahlenempfindlichkeit nahm folglich im Verlauf des Zellzyklus zunächst von der G_1 -Phase zur frühen S-Phase ab und bis zur späten S/ G_2 -Phase wieder zu.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Inhibition der RAD51-Expression keinen Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit von CHO-K1-Zellen hatte.

3.8 RNAi gegen *Rad51* in *xrs5*-Zellen

In CHO-K1-Zellen wurde die Strahlenempfindlichkeit durch einen *Rad51*-Knockdown nicht beeinflusst. Offensichtlich können andere Reparaturmechanismen den Verlust der HR kompensieren. Es gibt Hinweise, dass ein Defekt der HR erst zum Tragen kommt, wenn auch das NHEJ ausfällt (Essers et al., 2000; Pluth et al., 2001). Daher wurde die Expression von RAD51 in *xrs5*-Zellen unterdrückt und der Effekt auf die Strahlenempfindlichkeit untersucht. *xrs5*-Zellen sind durch EMS-Mutagenese aus CHO-K1-Zellen entstanden und weisen einen Defekt in *Ku80* auf (Jeggo und Holliday, 1986; Singleton et al., 1997).

Zunächst wurde überprüft, ob die für CHO-K1-Zellen optimierten Transfektionsbedingungen auch für *xrs5*-Zellen geeignet sind. Konfluente *xrs5*-Zellen wurden durch verdünnte Aussaat restimuliert und eine Stunde später mit einer Fl-siRNA und ansteigenden Konzentrationen TransIT-TKO transfiziert. Die Zellen wurden 20 Stunden nach Transfektion am Durchflusszytometer analysiert (Daten nicht gezeigt). Es zeigte sich ein ähnliches Bild wie nach Transfektion von CHO-K1-Zellen. Bei Einsatz von 3,3 $\mu\text{l/ml}$ TransIT-TKO wurden 85 % siRNA-positive Zellen detektiert, bei Einsatz von 5 $\mu\text{l/ml}$ waren es 97 %. Bei Einsatz der Standardkonzentration von 6,7 $\mu\text{l/ml}$ TransIT-TKO wurden 98,7 % der *xrs5*-Zellen transfiziert, die relative Fluoreszenzintensität lag bei 167.

Darüber hinaus wurde überprüft, ob der Einsatz von 6,7 $\mu\text{l/ml}$ TransIT-TKO und 200 nM siRNA in *xrs5*-Zellen zu einer ähnlichen Inhibition der RAD51-Expression wie in CHO-K1-Zellen führt. Konfluente *xrs5*-Zellen wurden durch verdünnte Aussaat restimuliert, eine Stunde später mit siRNA oder scrRNA transfiziert und nach weiteren 23 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde Protein isoliert und im Western-Blot analysiert. Nach Transfektion mit siRNA1 wurde die RAD51-Expression in *xrs5*-Zellen im Mittel um 73 % reduziert, bezogen auf die Expression von RAD51 nach Behandlung mit scrRNA. Nach Transfektion mit siRNA2

wurde die Expression im Schnitt um 71 % gesenkt. Die Werte für beide scrRNAs wurden für diese Analyse gemittelt. Im Mittel wurde eine Reduktion von RAD51 um 72 % auf ein Niveau von 28 % erreicht (Daten nicht gezeigt). Der Zeitpunkt der Ernte für den Western-Blot und auch der Bestrahlung für den Kolonietest wurde im Vergleich zu CHO-K1-Zellen später gewählt, weil xrs5-Zellen langsamer proliferieren (Daten nicht gezeigt).

3.8.1 Strahlenempfindlichkeit von xrs5-Zellen nach *Rad51*-RNAi

Es wurde untersucht, wie sich die Inhibition der RAD51-Expression auf die Strahlenempfindlichkeit von xrs5-Zellen auswirkt. Konfluent gewachsene xrs5-Zellen wurden durch verdünnte Aussaat restimuliert und mit siRNA transfiziert. 20 Stunden nach der Restimulation erfolgte die Bestrahlung. Zu diesem Zeitpunkt sind die Zellen in der späten S/G₂-Phase des Zellzyklus, vergleichbar den CHO-K1-Zellen nach 16 Stunden. Direkt im Anschluss wurden die Zellen für den Kolonietest plattiert. Die Plattierungseffizienz lag für unbehandelte Zellen bei 41 %, für siRNA-transfizierte Zellen im Mittel bei 9 % und für scrRNA-behandelte Zellen im Mittel bei 11 %.

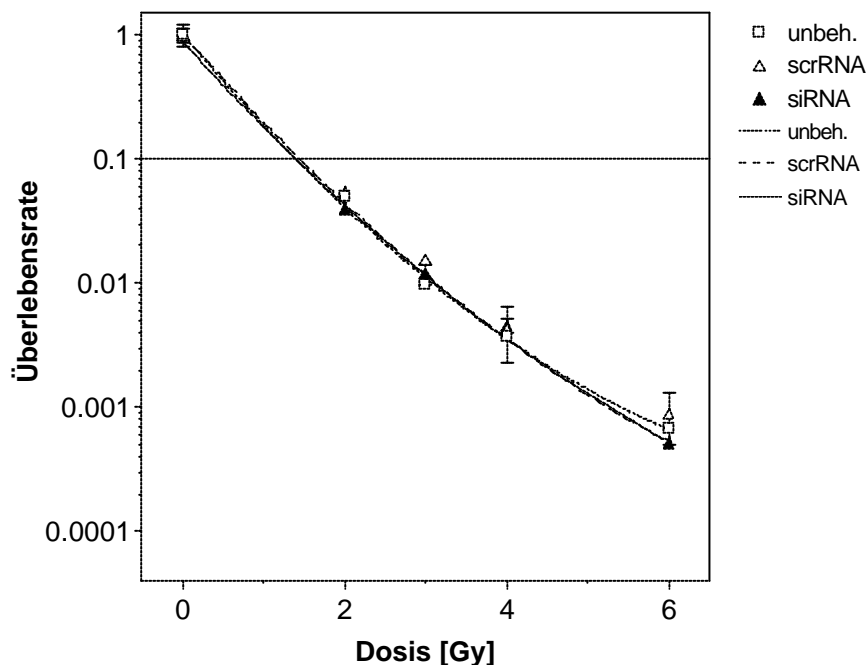


Abbildung 26: Überlebensrate nach Bestrahlung in der späten S/G₂-Phase des Zellzyklus in xrs5-Zellen. Konfluente xrs5-Zellen wurden durch verdünnte Aussaat restimuliert und mit siRNA oder scrRNA transfiziert. Die Zellen wurden 20 Stunden nach der Restimulation bestrahlt und für den Kolonietest ausgesät. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten. Die Kurve wurde den Daten mittels nicht-linearer Regression angepasst.

Abbildung 26 zeigt das Überleben von *xrs5*-Zellen nach *Rad51*-RNAi in Abhängigkeit der Dosis. Die Überlebenskurven nahmen einen exponentiellen Verlauf. Es war kein Unterschied zwischen siRNA-, scrRNA- und unbehandelten Zellen zu beobachten. Die $D_{0,1}$, bei der 10 % der Zellen überleben, lag bei 1,4 Gy. Die Inhibition der RAD51-Expression hatte folglich keinen Einfluss auf das Überleben von *xrs5*-Zellen nach ionisierender Strahlung.

3.9 Effekt der *Rad51*-Interferenz auf die MMC-Empfindlichkeit

In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, dass Zelllinien mit einem Defekt in der HR empfindlich auf die Behandlung mit Agenzien wie MMC reagieren, die zur Vernetzung der DNA-Stränge führen (Takata et al., 2000, 2001; Godthelp et al., 2002a). Es sollte untersucht werden, wie sich die Inhibition der RAD51-Expression mittels RNAi auf die Empfindlichkeit von CHO-K1-Zellen gegenüber MMC auswirkt.

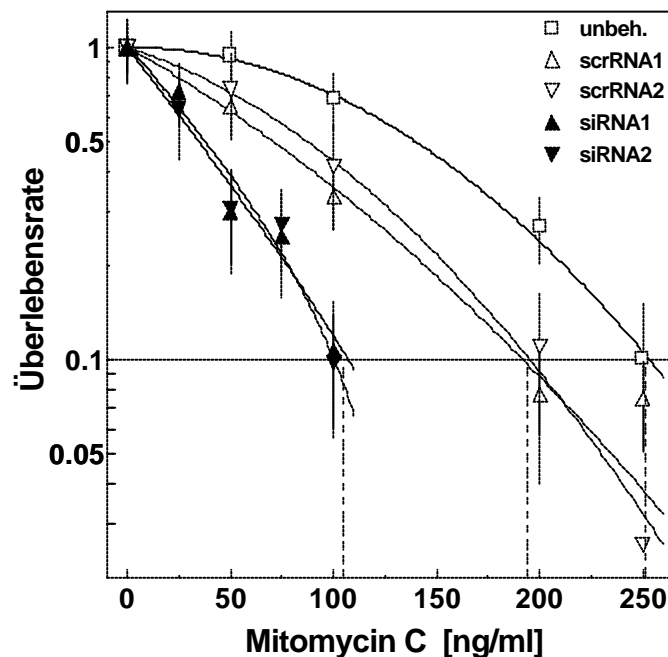


Abbildung 27: Überlebensrate nach Behandlung mit MMC. Konfluente CHO-K1-Zellen wurden durch verdünnte Aussaat restimuliert und mit siRNA bzw. scrRNA transfiziert. 19 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für den Kolonietest ausgesät. Zeitgleich wurde MMC zugegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Kurve wurde den Daten mittels nicht-linearer Regression angepasst.

Konfluente Zellen wurden durch verdünnte Aussaat restimuliert, eine Stunde später mit siRNA transfiziert und nach 19 Stunden für den Kolonietest plattiert. Zeitgleich wurde MMC zugegeben. Nach sieben Tagen Inkubation im Brutschrank wurden die Kolonien gefärbt und ausgezählt.

Abbildung 27 zeigt die Überlebensrate in Abhängigkeit der MMC-Konzentration. Die Plattierungseffizienz lag für unbehandelte Zellen bei 91 %, für siRNA-transfizierte Zellen im Mittel bei 6 % und für scrRNA-behandelte Zellen im Mittel bei 5 %. In unbehandelten CHO-K1-Zellen nahm das Überleben in Form einer Schulterkurve mit zunehmender MMC-Konzentration ab. Die $D_{0,1}$, bei der 10 % der Zellen überleben, lag bei 250 ng/ml MMC. In scrRNA-behandelten Zellen nahm das Überleben ebenfalls dosisabhängig ab mit einer leicht erhöhten Empfindlichkeit gegenüber unbehandelten Zellen. Die $D_{0,1}$ lag bei 195 ng/ml. siRNA-behandelte Zellen waren dagegen deutlich empfindlicher gegenüber MMC als scrRNA-behandelte Zellen. Die Überlebenskurve zeigte einen exponentiellen Verlauf mit einer $D_{0,1}$ von nur 105 ng/ml. Die Inhibition der RAD51-Expression führt folglich zu einer 1,9fachen Sensibilisierung von CHO-K1-Zellen gegenüber dem *crosslinker* MMC.

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung von RAD51 bei der Homologie-vermittelten DNA-Reparatur in Säugerzellen zu untersuchen. Insbesondere sollte überprüft werden, ob sich die Inhibition der RAD51-Expression auf Chromosomentyp-Aberrationen der G₁- und G₂-Phase, auf die Strahlenempfindlichkeit und das Überleben nach Behandlung mit dem *crosslinker* MMC auswirkt. Des Weiteren sollte untersucht werden, welchen Effekt der Knockdown von *Rad51* auf die Strahlenempfindlichkeit hat, wenn gleichzeitig das NHEJ ausfällt. Hierfür wurde die Expression von RAD51 mittels RNAi in CHO-K1- und xrs5-Zellen unterdrückt. Die Methode der RNAi musste zunächst neu etabliert werden. Die Transfektionseffizienz wurde durch flusszytometrische Untersuchungen optimiert und die Reduktion von RAD51 im Western-Blot überprüft. Anschließend wurde der Phänotyp des *Rad51*-Knockdowns analysiert.

4.1 Etablierung der RNAi

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von RAD51 in CHO-K1- und xrs5-Zellen mittels RNAi inhibiert. Es wurde mit zwei siRNAs von 21 Nukleotiden Länge und TT-Überhängen gearbeitet, in Anlehnung an Elbashir et al. (2001b). Die siRNA wurde transient transfiziert. Die stabile Integration von siRNA-kodierenden Sequenzen in das Genom kam zunächst nicht in Frage, da RAD51 als essentielles Protein beschrieben wurde. Ein Knockout des Gens ist nicht möglich (Lim und Hasty, 1996; Tsuzuki et al., 1996); *loss-of-function* Mutanten von *Rad51* konnten bislang nur durch konditionellen Knockout, durch den Einsatz dominant-negativer Formen, durch Antisense-Oligonukleotide, Ribozyme oder Inhibitoren der Signaltransduktion erzeugt werden (Collis et al., 2001; Ohnishi et al., 1998; Russell et al., 2003; Stark et al., 2002; Taki et al., 1996). RNAi ist jedoch gegenüber diesen Methoden überlegen, der Einsatz von siRNA gilt als sehr viel effizienter und spezifischer (Bass, 2001; Caplen et al., 2001; Elbashir et al., 2001b; Grünweller et al., 2003; Hammond et al., 2001; Scherr et al., 2003).

Die Inhibition der Expression durch siRNA ist von mehreren Faktoren abhängig. Zelltyp, Stärke der Genexpression, Rate des RNAi vermittelten mRNA-Abbaus, Halbwertszeit des Proteins und die Sekundärstruktur der mRNA spielen dabei eine wichtige Rolle (Bass, 2001; Elbashir et al., 2001b, 2002; Scherr et al., 2003). Ähnlich wie bei Antisense-Studien müssen die Bedingungen angepasst werden, bevor funktionelle Untersuchungen möglich sind. Als

limitierend gilt zunächst die Transfizierbarkeit der Zellen (McManus und Sharp, 2002). Daher wurde die Transfektionseffizienz optimiert.

4.1.1 Optimierung der Transfektionseffizienz

In Säugerzellen wird siRNA nicht spontan aufgenommen, sondern muss transfiziert werden (Holen et al., 2002). Für die Transfektion wurden kationische Lipide eingesetzt, die einen Komplex mit der siRNA bilden, der endozytotisch aufgenommen wird. Eine Elektroporation schied aus, da Voruntersuchungen zeigten, dass die Überlebensrate der CHO-K1-Zellen zu gering ist.

Es wurden drei verschiedene kationische Lipide getestet: Lipofectamine 2000 (Invitrogen), dessen Vorgänger Lipofectin von Caplen et al. (2001) erfolgreich zur Transfektion von siRNA eingesetzt wurde, Oligofectamine (Invitrogen), das von Elbashir et al. (2001b) verwendet wurde, und das alternativ empfohlene TransIT-TKO (Mirus) (Tuschl, *siRNA user guide*, 3.4.2002). Es wurde eine unspezifische Fl-siRNA eingesetzt, die gegen Luciferase aus *P. pyralis* gerichtet ist und deren Sequenz in Säugerzellen natürlicherweise nicht vorkommt. Die Transfektionseffizienz wurde sowohl nach vier Stunden als auch nach 20 Stunden im Durchflusszytometer analysiert. Es ist bekannt, dass die Aufnahme von siRNAs ihr Maximum nach zwei bis vier Stunden erreicht (Holen et al., 2002). Nach 20 Stunden sind toxische Effekte auf die Zellproliferation jedoch besser zu beurteilen. Es könnte sein, dass zu diesem Zeitpunkt die Fluorescein-Markierung bereits abgebaut ist und die Aufnahme unterschätzt wird, so dass zur Sicherheit die Aufnahme von siRNA zu beiden Zeitpunkten betrachtet wurde.

4.1.1.1 Konzentration des Transfektionsagens

Im Hinblick auf den **Anteil transfizierter Zellen** war TransIT-TKO beiden anderen Transfektionsagenzien deutlich überlegen. Die Effizienz stieg dosisabhängig an und erreichte bei 5 µl/ml TransIT-TKO und 4,2 µl/ml Lipofectamine 2000 die Sättigung. Mit TransIT-TKO wurden mindestens 98 % der Zellen transfiziert, mit Lipofectamine 2000 im Mittel 87 % (Abbildung 6). Mit Oligofectamine wurde im getesteten Konzentrationsbereich, der weit über die Herstellerangaben hinausging, keine Sättigung erreicht. Es wurden maximal 23 % der Zellen transfiziert. In Abwesenheit des Transfektionsagens war keine Aufnahme von siRNA zu beobachten, entsprechend den Befunden von Holen et al. (2002).

Die schlechte Performance von Oligofectamine ist unerwartet, da Harborth et al. (2001) und Elbashir et al. (2002) mit Oligofectamine Transfektionseffizienzen nahe 90 % in verschiedenen Säugerlinien erreichten. Oligofectamine ist prinzipiell für CHO-K1-Zellen geeignet (Hemmings-Mieszczyk et al., 2003). Vermutlich ist die schlechte Effizienz mit Oligofectamine auf das in dieser Arbeit verwendete Protokoll zurückzuführen, das von den Herstellerempfehlungen und den publizierten Protokollen deutlich abweicht (Elbashir et al., 2001b; Hemmings-Mieszczyk et al., 2003). Es wurden konfluent gewachsene, frisch passagierte Zellen und nicht exponentiell wachsende, adhärenente Zellen transfiziert. Außerdem wurde in Anwesenheit von Serum transfiziert, da die Zellen in ihrer Proliferation so wenig wie möglich beeinflusst werden sollten. Nur die Komplexbildung zwischen siRNA und Transfektionsagens fand in Medium ohne Serum statt. Lipofectamine 2000 und TransIT-TKO gelten als besonders effektiv in Präsenz von Serum, mit Oligofectamine wurden hingegen niedrigere Transfektionsraten beobachtet (Herstellerangaben).

Neben dem Anteil der transfizierten Zellen wurde die relative **Menge aufgenommener siRNA** pro Zelle im Durchflusszytometer bestimmt. Hinsichtlich dieses Parameters wurden nur Lipofectamine 2000 und TransIT-TKO verglichen. Wie erwartet, wurde auch hier eine dosisabhängige Zunahme an siRNA pro Zelle beobachtet. Es wurde jedoch keine Sättigung erreicht, die Menge an siRNA pro Zelle nahm weiter zu, je mehr Transfektionsagens eingesetzt wurde (Abbildung 7). Mit Lipofectamine 2000 wurde vier Stunden nach der Transfektion etwa doppelt so viel siRNA pro Zelle detektiert als mit TransIT-TKO.

Als letzter Parameter wurde die **Toxizität** von TransIT-TKO und Lipofectamine 2000 verglichen (Abbildung 8). Für TransIT-TKO wurden bereits toxische Nebeneffekte, vor allem morphologische Veränderungen, durch Tuschl beschrieben (*siRNA user guide*, 8.5.2003). Es war zu beobachten, dass die Zellen nach Behandlung mit TransIT-TKO stärker am Boden der Kulturflasche adhärenieren. Um die Toxizität beider Agenzien zu vergleichen, wurde der relative Anteil lebender Zellen 20 Stunden nach Transfektion bestimmt. Dieser berechnet sich aus der Zahl verbleibender Zellen, die durch Zellzahlbestimmung am Coulter Counter erhoben wurde, und dem Anteil lebender Zellen, der im Durchflusszytometer bestimmt wurde. Es zeigte sich, dass eine geringe Dosis Transfektionsagens offenbar das Wachstum stimuliert. Der Anteil lebender Zellen stieg nach Transfektion mit 1,7 µl TransIT-TKO bzw. 0,8 µl Lipofectamine 2000 geringfügig an. Mit wachsender Dosis nahm der Anteil lebender Zellen jedoch immer weiter ab. Nach Transfektion mit TransIT-TKO zeigte sich ein geringfügig besseres Überleben als nach Transfektion mit Lipofectamine 2000. Die $D_{0,5}$, bei der der Anteil lebender Zellen um

die Hälfte reduziert ist, lag mit Lipofectamine 2000 bei 4,2 $\mu\text{l/ml}$ und mit TransIT-TKO bei 5,6 $\mu\text{l/ml}$.

Die Differenz zwischen den einzelnen Transfektionsagenzien ist möglicherweise durch die unterschiedliche Lipidzusammensetzung der einzelnen Agenzien zu erklären (Scherr et al., 2003). Ein detaillierter Vergleich ist jedoch nicht möglich, da die Firmen die Zusammensetzung ihrer Agenzien nicht bekannt geben. Im Prinzip unterscheiden sich die Agenzien jedoch voneinander: TransIT-TKO ist im Gegensatz zu Lipofectamine 2000 nicht liposomal, es handelt sich um ein kationisches Polymer/Lipid Gemisch, das die Aufnahme von siRNA in die Zelle vermutlich über Endozytose vermittelt. Lipofectamine 2000 ist wie Oligofectamine ein kationisches Lipid, das Liposomen bildet und ebenfalls endozytotisch aufgenommen wird.

Die Komplexe aus siRNA und Transfektionsagens müssen aus den Endosomen freigesetzt werden, um ihre Wirkung vermitteln zu können. Offensichtlich wird die Anheftung an die Zellmembran durch TransIT-TKO besser vermittelt, so dass ein höherer Anteil siRNA-positiver Zellen resultiert. Mit Lipofectamine 2000 ist hingegen der Anteil transfizierter siRNA pro Zelle deutlich höher, d. h. wenn eine Zelle empfänglich ist, können sich mehr Komplexe anheften oder die Komplexe werden aus den Endosomen im Zellinneren besser freigesetzt.

Für die Transfektion von siRNA wurde im Folgenden TransIT-TKO verwendet, mit dem mehr als 98 % der Zellen transfiziert wurden, so dass in allen Zellen RNAi prinzipiell möglich war. Mit Lipofectamine 2000 wurde zwar im Mittel mehr siRNA in die Zelle transportiert, jedoch wurde ein geringerer Anteil an Zellen erreicht. Die verbleibenden 13 % Zellen mit normaler RAD51-Expression könnten den *loss-of-function* Phänotyp maskieren. Eine quantitative Transfektion zu erreichen hatte daher oberste Priorität, die Menge an eingebrachter siRNA spielte hingegen eine untergeordnete Rolle. Schließlich sind bereits geringe Konzentrationen an siRNA ausreichend, um gute Effekte zu erzielen (Elbashir et al., 2001b)

4.1.1.2 Konzentration der siRNA

Die bereits geschilderten Untersuchungen wurden mit 100 nM siRNA durchgeführt, entsprechend den Empfehlungen von Tuschl (*siRNA user guide*, 8.5.2003). Da siRNA offensichtlich bis zu einer Konzentration von 1,5 nM wirksam ist (Elbashir et al., 2001b), wurde untersucht, wie sich der Einsatz von weniger siRNA auf die Transfektionseffizienz auswirkt.

Es zeigte sich, dass mit steigender Dosis siRNA der **Anteil transfizierter Zellen** und die **Menge siRNA pro Zelle** anstieg (Abbildung 10). Nach 20 Stunden wurde mit 42 nM siRNA eine Sättigung erreicht, mindestens 98 % der Zellen wurden transfiziert. Nach vier Stunden ist

selbst mit 100 nM siRNA noch keine Sättigung zu beobachten, es wurden knapp 95 % der Zellen transfiziert. Auch in Hinblick auf die Menge eingeschleuster siRNA pro Zelle wurde keine Sättigung erreicht. Es müssen folglich mindestens 100 nM siRNA eingesetzt werden, um im ersten Zellzyklus nach Transfektion eine größtmögliche Anzahl an Zellen zu erreichen.

Bei der Variation der eingesetzten Konzentration Transfektionsagens wurden kaum Unterschiede im Anteil positiver Zellen nach vier bzw. 20 Stunden gefunden. Demnach war die Aufnahme nach vier Stunden abgeschlossen. Alle entsprechenden Experimente wurden mit 100 nM siRNA ausgeführt. Wurde die Menge an siRNA jedoch weiter reduziert, so war der Anteil siRNA-positiver Zellen nach 20 Stunden höher als nach vier Stunden. War siRNA im Überschuss vorhanden, so wurde offensichtlich eine längere Zeit benötigt, bis die Transfektion abgeschlossen war.

4.1.1.3 Lokalisation der siRNA in der Zelle

Die Untersuchungen zur Transfektionseffizienz wurden im Durchflusszytometer durchgeführt. Um sicherzustellen, dass die siRNA nicht nur von außen an den CHO-K1-Zellen haftete, wurden die transfizierten Zellen im Fluoreszenzmikroskop betrachtet (Abbildung 11). Die Analysen wurden mit lebenden Zellen ausgeführt, da eigene Studien mit Fluoreszenz-markierten DNA-Oligonukleotiden gezeigt hatten, dass die Fixierung einen starken Einfluss auf die Lokalisation haben kann. Die Fluoreszenz war in der ganzen Zelle zu beobachten, wobei der Kern oft dichter erschien. Zusätzlich waren punktförmige Anhäufungen von Fluoreszenz zu sehen. Dabei könnte es sich um Fluoreszenz-markierte siRNA handeln, die nach der Endozytose noch nicht in das Zytoplasma entlassen wurde (Holen et al., 2002).

Untersuchungen in HeLa-Zellen zeigten, dass sich die siRNA 48 Stunden nach Transfektion auf der zytoplasmatischen Seite der Kernmembran befindet (Byrom et al., 2003). Bereits nach vier Stunden war ein kleiner Anteil freier siRNA in der Zelle zu detektieren, während der Großteil an siRNA mit dem Trägerlipid des Transfektionsagens in Foci verblieb. Der Anteil an freier siRNA stieg bis zu 48 Stunden nach Transfektion kontinuierlich an und war nahe der Kernmembran zu detektieren. Als mögliche Erklärung hierfür wird diskutiert, dass siRNA rund um Kernporen konzentriert auftritt, wo die mRNA während ihres Exports in das Zytoplasma nach komplementären Sequenzen abgetastet wird (Byrom et al., 2003). Es wurde gezeigt, dass RNAi auf das Zytoplasma bzw. den Prozess des Kernexports begrenzt ist (Zeng und Cullen, 2002). Das Enzym Dicer, das dsRNA in kleine Duplex-RNA prozessiert, ist im Zytoplasma lokalisiert (Billy et al., 2001). Die gefundene Verteilung von siRNA in der ganzen Zelle ist mit

diesem Konzept vereinbar. Möglicherweise erscheinen die Kerne dichter, weil sich die siRNA an der äußeren Seite der Kernmembran anreichert.

4.1.2 Optimierung der Inhibition der RAD51-Expression

Die Optimierung der Transfektionseffizienz hatte zum Ziel, in einem möglichst großen Anteil an Zellen RNAi zu ermöglichen. Im nächsten Schritt wurde der Effekt spezifischer siRNAs auf die Expression von RAD51 untersucht. Die RAD51-Expression wurde im Western-Blot nachgewiesen. Western-Blot oder Immunfluoreszenz-Analysen sind die geeigneten Methoden, um den Knockdown nachzuweisen – wenn Antikörper für das Zielprotein zur Verfügung stehen (Elbashir et al., 2002; Tuschl, *siRNA user guide*, 8.5.2003).

4.1.2.1 Wahl geeigneter siRNA-Sequenzen

Es gibt zahlreiche Berichte über positionale Effekte beim Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden und Ribozymen (Amarzguioui et al., 2000; Bennett et al., 1994; Kurreck et al., 2003; Vickers et al., 2003). Es wurde daher angenommen, dass auch die Effektivität einer siRNA von der Sekundärstruktur der Ziel-mRNA abhängen kann. Daher wurden zwei verschiedene siRNAs getestet. Beim Design der siRNA wurden die von Tuschl (*siRNA user guide*, 8.5.2003) publizierten Regeln befolgt. Es wurde eine siRNA im 5'-Bereich und eine zweite im 3'-Bereich der mRNA positioniert. Gleichzeitig wurde durch die Wahl zweier verschiedener siRNAs die Gefahr unspezifischer Effekte minimiert. Da das Hamstergenom nicht vollständig sequenziert vorliegt, ist kein zuverlässiger Abgleich nach anderen unspezifischen Treffern möglich.

Es zeigte sich, dass beide siRNAs die RAD51-Expression in etwa gleichem Ausmaß inhibieren (Abbildung 12). Die RAD51-Expression wurde in CHO-K1-Zellen im Mittel um 62 % reduziert, bezogen auf die RAD51-Expression unbehandelter Zellen. In Relation zu scrRNA-behandelten Zellen wurde die Expression um ca. 60 % reduziert. Beide gewählte Positionen der mRNA waren folglich gleich gut zugänglich. Offenbar spielt bei RNAi die Sekundärstruktur der mRNA generell keine so große Rolle wie ursprünglich angenommen. Neuere Studien bestätigen, dass etwa 80 bis 90 % der siRNAs erfolgreich sind (Harborth et al., 2001). Die Sekundärstruktur der mRNA scheint demnach nur einen geringen Einfluss auf die Suppression zu haben (Elbashir et al., 2002). Die Autoren, die starke positionale Effekte von siRNAs beobachteten, haben meist die von Tuschl empfohlenen Regeln nicht beachtet (Holen et al., 2002; Vickers et al., 2003). Außerdem wurde die Expression teilweise nur mit Real Time-

PCR quantifiziert und die Reduktion des Proteins möglicherweise unterschätzt (Vickers et al., 2003).

Die beiden scrRNAs wurden im GC-Gehalt den beiden siRNAs angepasst. Während die Expression von RAD51 nach Transfektion mit scrRNA1 im Bereich der unbehandelten Zellen lag, war sie nach Transfektion mit scrRNA2 leicht reduziert (Abbildung 12). Im Lauf der vorliegenden Arbeit wurde die RAD51-Inhibition mehrfach im Western-Blot überprüft, und es zeigte sich üblicherweise ein leichter unspezifischer Effekt der scrRNAs, wobei dieser bei scrRNA2 etwas stärker ausgeprägt war als bei scrRNA1. Diese unspezifischen Effekte sind vermutlich auf die Transfektion zurückzuführen. RAD51 ist ein Zellzyklus-abhängig reguliertes Protein (Chen et al., 1997; Flygare et al., 1996; Tashiro et al., 1996; Yamamoto et al., 1996). Sollten die Zellen durch die Transfektion in ihrer Proliferation verlangsamt werden, würde auch RAD51 weniger stark induziert. Tatsächlich wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass transfizierte CHO-K1-Zellen verzögert in den Zellzyklus eintreten (Abbildung 20). Daher haben unbehandelte Zellen im Vergleich zu scrRNA-transfizierten Zellen nach 20 Stunden eine stärkere RAD51-Expression.

Der Wert von scrRNA als Kontrolle wird kontrovers diskutiert (Editorial, Nature Cell Biology, 2003). Bei einem Zellzyklus-abhängig regulierten Protein wie RAD51 ist es jedoch unbedingt erforderlich, den Effekt der spezifischen siRNA um unspezifische Effekte, die z. B. durch eine verzögerte Proliferation zustande kommen, zu korrigieren. Daher wurde im Folgenden die relative Menge an RAD51 nach Behandlung mit siRNA bestimmt. Das RAD51-Signal nach Transfektion mit der jeweiligen siRNA wurde immer auf das RAD51-Signal nach Transfektion mit scrRNA bezogen. Die Werte für scrRNA1 und scrRNA2 wurden gemittelt.

4.1.2.2 Optimierung der *Rad51*-RNAi

Bei der Optimierung der Transfektionseffizienz wurde unter den gewählten Bedingungen keine Sättigung in Hinblick auf die Menge siRNA pro Zelle beobachtet. Es wurde daher untersucht, ob durch den Einsatz höherer Konzentrationen siRNA und TransIT-TKO die Inhibition von RAD51 weiter verstärkt werden kann. Die Dosis siRNA wurde bis auf 500 nM gesteigert. Es zeigte sich, dass bereits bei 100 nM siRNA die relative RAD51-Menge um 60 % absank. Nach Transfektion mit 200 nM siRNA nahm die relative RAD51-Menge um deutlich mehr als 60 % ab, eine weitere Erhöhung der Dosis brachte keinen weiteren Effekt. Es ist davon auszugehen, dass die RNAi-Maschinerie, insbesondere der RISC-Komplex, zu sättigen ist (Editorial, Nature Cell Biology, 2003; McManus und Sharp, 2002). Daher musste ab einer bestimmten Konzentration siRNA ein

solches Plateau erreicht werden. In den folgenden Versuchen wurde die siRNA-Konzentration auf 200 nM angehoben, um eine stabile Inhibition der RAD51-Expression zu erreichen.

Die maximale Suppression wird durch sehr aktive siRNAs bereits mit 0,1 bis 0,2 nM siRNA erreicht (Grünweller et al., 2003). Sie liegt damit um mindestens zwei Größenordnungen unterhalb derjenigen von konventionellen Antisense-Oligonukleotiden. Elbashir et al. (2001b) beobachteten, dass eine Reduktion der siRNA auf 1,2 nM noch zu einer Inhibition führt. Im Vergleich dazu ist die Menge eingesetzter siRNA in den eigenen Untersuchungen mit 200 nM hoch angesiedelt. Dies wird im Folgenden detailliert diskutiert (4.1.3).

Nachdem die Menge transfizierter siRNA erhöht wurde, wurde analysiert, wie sich der Einsatz von mehr TransIT-TKO auf die Expression von RAD51 auswirkt. Es wurden 5 µl/ml TransIT-TKO mit 6,7 µl/ml verglichen, da bei diesen Konzentrationen die Toxizität vertretbar ist. Bei noch höheren Konzentrationen von TransIT-TKO nahm der Anteil lebender Zellen zu stark ab (Abbildung 9). Es zeigte sich, dass die RAD51-Expression stärker inhibiert wurde, wenn mehr TransIT-TKO eingesetzt wurde. Es wurde daher im Weiteren mit 6,7 µl/ml TransIT-TKO transfiziert.

4.1.3 Effizienz der *Rad51*-Interferenz

Es wurde gezeigt, dass mit den optimierten Bedingungen – 6,7 µl/ml TransIT-TKO und 200 nM siRNA – die RAD51-Expression um mehr als 60 % reduziert wird, in einzelnen Versuchen um bis zu 80 % (Abbildung 15). Nach Transfektion mit siRNA1 nahm das RAD51-Signal im Mittel um 60,3 % ab, mit siRNA2 im Schnitt um 63,7 %, bezogen auf die Expression von RAD51 nach Behandlung mit scrRNA. Im Mittel konnte die RAD51-Expression folglich um 62 % inhibiert werden.

Es wird davon ausgegangen, dass die Expression eines Zielgens mit chemisch synthetisierter siRNA fast vollständig unterdrückt werden kann. Mc Manus und Sharp (2002) fassten in ihrer Übersicht zahlreiche Publikationen zusammen, die alle eine siRNA-vermittelte Reduktion der Proteinexpression um 85 % dokumentieren. Der Erfolg von RNAi ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Zunächst ist entscheidend, den Anteil transfizierter Zellen möglichst hoch zu halten. Wie bereits dargestellt, war dies in der vorliegenden Arbeit gewährleistet. Mit zunehmender Transfektionseffizienz wurde auch eine bessere Reduktion der Expression von RAD51 beobachtet. Die Freisetzung der siRNA aus den Endosomen im Zytoplasma wurde jedoch nicht überprüft. Es ist denkbar, dass dadurch die Effizienz der RNAi beeinflusst werden kann. Auch der Schutz gegen Degradation, der durch Transfektionsagenzien vermittelt wird,

könnte eine Rolle spielen (Grünweller et al., 2003). Darüber hinaus sind folgende Parameter entscheidend für den RNAi-Effekt:

Zelltyp: Abhängig vom Zelltyp wurden unter gleichen Bedingungen unterschiedlich starke RNAi-Effekte beobachtet (Elbashir et al., 2001b). Die für CHO-K1-Zellen publizierten Daten deuten darauf hin, dass die für eine RNAi benötigte Menge siRNA oder dsRNA höher ist als in anderen Organismen (Berezovska et al., 2003; Ui-Tei et al., 2000; Vaca und Sampierei, 2002; Yang et al., 2001). Elbashir et al. (2002) transfizierten CHO-K1-Zellen mit 100 nM siRNA, HeLa-Zellen hingegen nur mit 25 nM, um eine Suppression von Reportergenen zu erreichen. In anderen Arbeiten mit CHO-K1-Zellen wurde ähnlich viel siRNA eingesetzt wie in den eigenen Untersuchungen (Hemmings-Mieszczyk et al., 2003; Katome et al., 2003). Zusammenfassend ist anzunehmen, dass die RNAi-Maschinerie bei CHO-K1-Zellen nicht so effektiv ist wie in anderen Säugerlinien. Dies könnte erklären, warum in der vorliegenden Arbeit 200 nM siRNA für eine maximale Inhibition der RAD51-Expression eingesetzt werden musste und warum keine stärkere Inhibition möglich war.

Menge des Transkripts: Die RAD51-Expression wird Zellzyklus-abhängig reguliert (Chen et al., 1997; Flygare et al., 1996; Tashiro et al., 1996; Yamamoto et al., 1996). In der G₀/G₁-Phase ist die Expression am niedrigsten. Die RNAi wurde in Zellen initiiert, die durch Wachstum in die Konfluenz in der G₁-Phase synchronisiert worden waren. Die siRNA wurde direkt nach Restimulation der Zellen transfiziert. Zum Zeitpunkt der Transfektion war die Menge an RAD51 in den Zellen folglich gering. Während des Zellzyklus kommt es zu einem dreifachen Anstieg der Proteinmenge. Flygare et al. (1996) zeigten, dass diese Induktion zumindest in humanen Lymphozyten transkriptionell reguliert wird. Es ist folglich davon auszugehen, dass in CHO-K1-Zellen auch die Menge an *Rad51*-mRNA im Zuge des Zellzyklus zunimmt. Diese starke Hochregulation des Gens in den proliferierenden Zellen könnte dazu beitragen, dass relativ große Mengen siRNA benötigt werden, um mit der Proteinexpression zu interferieren und dass die Inhibition nicht unter 62 % reduziert werden kann.

Halbwertszeit des Proteins: Die Halbwertszeit von Proteinen scheint eine bedeutendere Rolle für den RNAi-Effekt zu spielen als die Menge des vorhandenen Proteins (Harborth et al., 2001). Die bisherigen Erkenntnisse zur Halbwertszeit von RAD51 sind nicht eindeutig (Flygare et al., 1996; Raderschall et al., 2002; Yamamoto et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde einem möglichen negativen Effekt der Halbwertszeit vorgebeugt, indem die RNAi in konfluent gewachsenen Zellen initiiert wurde, die kaum RAD51 exprimieren.

Es bleibt festzuhalten, dass wahrscheinlich der Zelltyp und die starke Induktion der RAD51-Expression dafür verantwortlich sind, dass eine relativ hohe Konzentration an siRNA benötigt wurde, um die maximal mögliche Inhibition zu erreichen. Es bleibt unklar, warum keine stärkere Inhibition erreicht werden konnte. Folgende Erklärungen sind denkbar:

- Es ist bekannt, dass die mRNA durch siRNA nicht komplett abgebaut wird. Möglicherweise liegt eine Fraktion der mRNA in geschützten Kompartimenten, z. B. Spleissosomen, vor (Holen et al., 2002). Auf diese Weise kann es zu einer unvollständigen RNAi kommen.
- Vermutlich besteht ein kinetisches Gleichgewicht zwischen Transkription neuer mRNA und Degradation durch RISC, wobei letzteres mehr Zeit in Anspruch nimmt (Holen et al., 2002). Wenn in CHO-K1-Zellen die RNAi-Maschinerie nicht so effektiv ist wie in anderen Linien und gleichzeitig die RAD51-Expression im Zellzyklus stark induziert wird, so könnte dies erklären, warum trotz Sättigung des RISC-Komplexes keine stärkere Inhibition der RAD51-Expression zu beobachten war.
- Es ist denkbar, dass ein bestimmter Anteil des Proteins in der Zelle stabilisiert wird, um essentielle biologische Funktionen wahrzunehmen. Andere Autoren, die versuchten, RAD51 mit der Antisense-Technologie herunter zu regulieren, haben ebenfalls keine komplette Inhibition der Expression erreichen können. Collis et al. (2001) reduzierten RAD51 in LNCaP-Zellen mit einem Ribozym-Vektor um 50 bis 80 %, Ohnishi et al. (1998) in murinen 203G-Gliomzellen um 70 bis 90 %. Diese Theorie wird außerdem unterstützt durch das Fehlen von k.o.-Mutanten.

4.2 Phänotyp des *Rad51*-Knockdowns

Der durch RNAi induzierte biologische Effekt hängt davon ab, ob die Proteinmenge unter einen Schwellenwert fällt, der für den *loss-of-function* Phänotyp notwendig ist (Scherr et al., 2003). Es wurde daher zunächst überprüft, ob RAD51 durch die Reduktion der Proteinmenge auch funktionell inhibiert wird. Hierfür wurde die RAD51-Focibildung nach Transfektion mit siRNA und Bestrahlung mit 12 Gy analysiert. Anschließend wurde der Phänotyp des *Rad51*-Knockdowns näher charakterisiert. Es wurde der Effekt der RNAi auf die Zellzyklus-abhängige RAD51-Expression, auf den Zellzyklus, auf strahleninduzierte Chromosomentyp- und Chromatidtyp-Aberrationen sowie auf die Strahlenempfindlichkeit und das Überleben nach Behandlung mit dem Chemotherapeutikum MMC untersucht.

4.2.1 Inhibition der RAD51-Focibildung

Nach ionisierender Strahlung oder Behandlung mit anderen genotoxischen Substanzen akkumuliert RAD51 in immunzytochemisch nachweisbaren Foci im Kern (Haaf et al., 1995; Raderschall et al., 1999). Vieles spricht dafür, dass diese Foci nach DNA-Schädigung funktionelle Bedeutung haben: Sie werden in Zellen beobachtet, die außerhalb der S-Phase DNA synthetisieren (Haaf et al., 1995). Sie sind in Regionen mit einzelsträngiger DNA lokalisiert (Raderschall et al., 1999). Proteine, die in die Reparatur involviert sind, kolokalisieren mit RAD51-Foci nach DNA-Schädigung: z. B. RPA (Golub et al., 1998, Raderschall et al., 1999), RAD52 und RAD54 (Essers et al., 2002; Liu und Maizels, 2000; Tan et al., 1999). Haaf et al. (1999) postulierten, dass RAD51-Foci tragende Zellen die Reparatur nach DNA-Schädigung eingeleitet haben. RAD51-Foci könnten demnach das *repaïrosom* darstellen, an dem die RAD51-vermittelte Rekombinationsreparatur von DSBs im Zusammenspiel mit zahlreichen anderen Proteinen stattfindet.

Ein Defekt in der RAD51-Focibildung geht mit einer verminderten homologen Rekombination, mit chromosomaler Instabilität und erhöhter Empfindlichkeit gegenüber genotoxischen Agenzien einher (Bishop et al., 1998; Godthelp et al., 2002a; O'Regan et al., 2001; Takata et al., 2000, 2001). Daher ist die RAD51-Focibildung gut geeignet, um zu überprüfen, ob der Knockdown von *Rad51* mittels RNAi ausreicht, einen HR-defizienten Phänotyp zu erzeugen.

In unbestrahlten, unbehandelten Zellen traten Foci nur in einem kleinen Anteil (5,9 %) auf. Diese repräsentieren wahrscheinlich Foci, die während der S-Phase spezifische Funktionen wahrnehmen (Tashiro et al., 1996). Nach Bestrahlung mit 12 Gy waren in 83 % der unbehandelten Zellen und 69 % der scrRNA-transfizierten Zellen mehr als fünf Foci zu detektieren. In siRNA-behandelten Zellen wurde die RAD51-Focibildung nach Bestrahlung hingegen stark beeinträchtigt. Im Mittel waren 26 % der siRNA-behandelten Zellen Foci-positiv (Abbildung 17). Die Inhibition der Expression von RAD51 um im Mittel 62 % resultierte folglich in einer stark beeinträchtigten RAD51-Focibildung, unterband diese jedoch nicht vollständig. In 62 % der für die Focibildung empfänglichen Zellen wurde dieselbige unterdrückt. Die RNAi gegen *Rad51* führte folglich in der Mehrzahl der Zellen zum Funktionsverlust.

Der Anteil Foci-positiver, unbehandelter bzw. scrRNA-transfizierter Zellen stimmt mit den in der Literatur publizierten Daten für wt-Hamsterlinien überein (Bishop et al., 1998; Godthelp et al., 2002a; Liu, 2002; Wachters et al., 2003). Die reduzierte Focibildung in siRNA-transfizierten Zellen steht in Einklang mit den Ergebnissen für andere HR-defiziente Zelllinien. So wurde die Focibildung um 67 bis 93 % vermindert in Hamsterlinien mit einem Defekt in *Xrcc2*, *Xrcc3* oder *Rad51C* (*irs1*, *irs1SF*, *CL-4B*), bezogen auf für die Focibildung empfängliche Zellen (Bishop et al., 1998; Godthelp et al., 2002a; Liu, 2002). Die Focibildung war um 76 bis 89 % reduziert in DT40-Linien, in denen die Gene der einzelnen RAD51-Paraloge ausgeknockt waren (Takata et al., 2000, 2001). Die Focibildung wurde in der vorliegenden Arbeit durch den Knockdown von *Rad51* mittels RNAi ähnlich stark gehemmt wie bei diesen Mutanten. Folglich reicht diese Suppression aus, um einen HR-defizienten Phänotyp zu erzeugen.

Die geringere Focibildung in scrRNA-behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten lässt sich durch den verlangsamten Eintritt in den Zellzyklus erklären: Der Anteil an S/G₂-Phase-Zellen war in transfizierten Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung geringer als in unbehandelten (Abbildung 20). Es wurde gezeigt, dass Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der G₁-Phase befinden, keine RAD51-Foci bilden können (Ear et al., zitiert in Bishop et al., 1998; Gasior et al., 2001).

4.2.2 Inhibition der RAD51-Expression während des Zellzyklus

Nach Transfektion mit siRNA wurde die Expression von RAD51 nach 20 Stunden um 62 % reduziert, bezogen auf die scrRNA-behandelten Kontrollzellen. Die verbleibende Menge RAD51 entspricht dem Niveau konfluent gewachsener CHO-K1-Zellen. Es wurde daher untersucht, ob

die Induktion von RAD51 während des Zellzyklus durch RNAi vollständig unterbunden werden kann.

Es zeigte sich, dass die relative RAD51-Menge über den untersuchten Zeitraum von 48 Stunden konstant auf dem Niveau von konfluent gewachsenen Zellen blieb (Abbildung 19). In unbehandelten Zellen stieg die relative RAD51-Menge hingegen um das 3,1fache an, in scrRNA-transfizierten Zellen um das 2,7fache. Diese Werte stimmen gut mit den für humane Lymphozyten und Fibroblasten, murine m5S-Zellen sowie V3- und AA8-Zellen publizierten Daten überein (Chen et al., 1997; Flygare et al., 1996; Tashiro et al., 1996; Yamamoto et al., 1996). In humanen Fibroblasten war der größte Anstieg (Faktor 5-10) von der G₀-Phase zur G₁-Phase zu beobachten, von der G₁-Phase bis zur G₂-Phase stieg die Expression noch einmal um das 2 bis 3fache an. Ähnlich waren die Ergebnisse in den Hamsterlinien V3 und AA8. In murinen m5S-Zellen embryonalen Ursprungs wurde gezeigt, dass RAD51 in der späten G₁-Phase erscheint, während der S-Phase stark ansteigt und in der G₂/M-Phase konstant bleibt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen über drei Tage ohne Mediumwechsel bis zur Konfluenz kultiviert und dadurch synchronisiert. Es ist davon auszugehen, dass die synchronisierten Zellen eine Mischpopulation aus G₀/G₁-Phase-Zellen darstellen, so dass der von Chen et al. (1997) beschriebene starke Anstieg von der G₀-Phase zur G₁-Phase in der eigenen Arbeit nicht beobachtet werden konnte. Der etwas verminderte Anstieg der RAD51-Expression in scrRNA-transfizierten CHO-K1-Zellen ist auf einen verzögerten Eintritt in den Zellzyklus nach Transfektion zurückzuführen (Abbildung 20) und wird im Folgenden detailliert diskutiert.

Es war folglich möglich, die Induktion von RAD51 während des Zellzyklus durch RNAi komplett zu inhibieren. Dies deutet auf eine transkriptionelle Regulation hin, ebenso wie Flygare et al. (1996) für humane Lymphozyten beschrieben haben. Eine darüber hinaus gehende Reduktion der Expression war bis 48 Stunden nach Transfektion nicht möglich. Möglicherweise ist eine Reduktion unter das Basisniveau, das in G₀/G₁-Phase-Zellen vorliegt, nicht erreichbar. Diese limitierte Inhibition der Expression von RAD51 könnte funktionell begründet sein (4.1.3). Das würde implizieren, dass in jeder Zelle eine ähnlich große Menge an Protein verbleibt. Die Analyse der Foci nach Bestrahlung belegt jedoch, dass RAD51 in der Mehrzahl der Zellen so stark reduziert wurde, dass keine Focibildung mehr nachweisbar war. Vermutlich gibt es zwei Populationen an Zellen: Eine, in der eine starke Reduktion des Proteins erreicht wurde, und eine zweite, in der genug Protein für die Focibildung vorhanden war. Es kann daher nicht davon ausgegangen werden, dass das Protein in allen Zellen gleichermaßen reduziert wurde.

4.2.3 Einfluss der *Rad51*-Interferenz auf den Zellzyklus

RAD51 ist ein Zellzyklus-abhängig reguliertes Protein. Es ist denkbar, dass die beobachtete Reduktion des Proteins in siRNA-behandelten Zellen auf einen frühen Arrest der Zellen und nicht auf RNAi zurückzuführen ist. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde der Effekt der *Rad51*-RNAi auf den Zellzyklus untersucht.

Es zeigte sich, dass die Inhibition der RAD51-Expression mittels RNAi keinen Einfluss auf den ersten Zellzyklus nach Transfektion hat. Durch die Behandlung mit kationischem Lipid und siRNA bzw. scrRNA traten die Zellen lediglich später in den Zellzyklus ein. Die erste G₂/M-Phase nach Restimulation und Transfektion wurde mit einer Verzögerung von ca. vier Stunden nach 16 Stunden erreicht. Dies ist jedoch nicht auf die Inhibition von RAD51 zurückzuführen, sondern trat in scrRNA-behandelten Zellen gleichermaßen auf. Die Bestrahlung in der frühen S-Phase wurde auf zwölf Stunden, die in der späten S/G₂-Phase auf 16 Stunden festgelegt.

4.2.4 Einfluss von RAD51 auf spontane chromosomale Aberrationen

Die Zahl spontan auftretender Chromosomenschäden war nach Inhibition der RAD51-Expression mittels RNAi nicht erhöht. Dieses Ergebnis steht in Einklang zu Untersuchungen von Lambert und Lopez (2000) mit einem dominant-negativen RAD51. Dagegen zeigten andere Studien eine erhöhte spontane genetische Instabilität in HR-defizienten Zellen (Brennemann et al., 2002; Cui et al., 1999; Deans et al., 2000, 2003; French et al., 2002; Fujimori et al., 2001; Liu et al., 1998; Sonoda et al., 1998; Takata et al., 2000, 2001; Tebbs et al., 1995; Thacker et al., 1994; Tucker et al., 1991). Es wurden beispielsweise sechsfach mehr spontane Chromosomenaberrationen in RAD51C-defizienten Zellen (CL-V4B) als im Wildtyp V79 gefunden. Hauptsächlich handelte es sich dabei um Chromatidtyp-Aberrationen (Godthelp et al., 2002a). Diese chromosomale Instabilität ging nicht mit einer Reduktion der Viabilität der Mutante einher. In einer anderen RAD51C-defizienten Linie (*irs3*) wurden 16mal mehr spontane Aberrationen nachgewiesen, in erster Linie traten vermehrt Isochromatidbrüche auf (French et al., 2002). Es wird vermutet, dass in diesen Mutanten die Replikations-gekoppelte HR defekt ist, Replikations-induzierte DSBs akkumulieren und zu Chromosomenaberrationen führen (Brennemann et al., 2000; Cui et al., 1999). Außerdem wird möglicherweise die spontane Rekombinationsfrequenz unkontrolliert hoch reguliert, ähnlich wie es für BRCA2-defiziente Hamsterlinien beschrieben wurde (Larminat et al., 2002).

Ein Defekt von RAD51 inhibiert zwar die Genkonversion, die globale DSB-Reparatur ist davon jedoch nicht betroffen (Lambert und Lopez, 2000; Stark et al., 2002). Die Zelle kann folglich bei einem RAD51-Defekt auf andere Mechanismen zur Reparatur von DSBs umschalten. DSBs entstehen spontan in erster Linie während der Replikation, es wird von zehn DSBs pro Teilung ausgegangen (Haber, 1999). Diese könnten in RAD51-defizienten Zellen z. B. durch das NHEJ repariert werden. Die geringere Genauigkeit dieses alternativen Reparaturwegs kommt möglicherweise erst zum Tragen, wenn eine große Zahl an DSBs mittels genotoxischer Agenzien induziert wird. Saintigny et al. (2001) haben die Induktion von DSBs durch Inhibition der Replikation untersucht und postulierten, dass diese zunächst durch das NHEJ prozessiert werden. Erst wenn DSBs akkumulieren, wird die RAD51-vermittelte Rekombination aktiv. Rothkamm et al. (2003) zeigten hingegen, dass die HR für die Reparatur Replikations-assoziiierter DSBs verantwortlich ist und dass das NHEJ einen Verlust der HR nicht kompensieren kann. Das spricht für einen anderen Homologie-vermittelten Mechanismus wie z. B. das SSA oder die BIR, der den Verlust an RAD51 kompensiert. Dieser Mechanismus wäre abhängig von XRCC3, da XRCC3-defiziente Zellen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber dem Replikationsinhibitor Aphidicolin aufweisen (Rothkamm et al., 2003).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass RAD51 für die Reparatur spontan auftretender Schäden in adulten Zellen nicht dieselbe Bedeutung haben kann wie in embryonalen Zellen. Der Knockout von *Rad51* führte in Mausembryonen zu spontanem Chromosomenverlust (Lim und Hasty, 1996).

Zusammenfassend lässt sich schließen, dass RAD51 offenbar eine geringere Bedeutung für die Integrität des adulten Genoms hat als seine Paralogen. Die Rolle von RAD51 im Vergleich zu seinen Paralogen wird im Folgenden im Detail diskutiert (4.2.8.3).

4.2.5 Einfluss von RAD51 auf strahleninduzierte chromosomale Aberrationen

Ein Ziel dieser Arbeit war es, zu überprüfen, ob RAD51 in proliferierenden Zellen an der Reparatur von DNA-Schäden beteiligt ist, die zu chromosomalen Aberrationen führen. Einerseits wurden aus der G₁-Phase stammende letale Chromosomenaberrationen, andererseits in der G₂-Phase erzeugte Chromatidtyp-Aberrationen analysiert.

4.2.5.1 Effekt von RAD51 auf Chromosomentyp-Aberrationen aus der G₁-Phase

Es zeigte sich, dass die Inhibition der RAD51-Expression keinen Einfluss auf die aus der G₁-Phase verbliebenen letalen Chromosomenaberrationen hat (Abbildung 22). In siRNA-behandelten Zellen waren 1,7 letale Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung mit 6 Gy nachweisbar, in scrRNA-behandelten Zellen 1,6 und in unbehandelten Zellen 1,1. Letale chromosomale Aberrationen setzen sich aus zusätzlichen azentrischen Fragmenten, dizentrischen und Ringchromosomen zusammen. Wie Borgmann (1999) zeigte, verbleiben nach Abschluss der Reparatur in der G₁-Phase nicht-reparierte zusätzliche azentrische Fragmente, die nach Eintritt in den Zellzyklus deutlich reduziert werden. Diese Abnahme während des Zellzyklus ist Borgmann (1999) zufolge weder auf einen selektiven Arrest noch auf die Apoptose stark geschädigter Zellen oder die Reparatur durch NHEJ zurückzuführen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen darüber hinaus, dass auch die RAD51-vermittelte Reparatur nicht an der Abnahme letaler Chromosomenaberrationen im Verlauf des Zellzyklus beteiligt ist. Folgende Erklärungen sind denkbar:

- RAD51 spielt nur eine untergeordnete Rolle bei der Beseitigung von aus der G₁-Phase verbliebenen DNA-Schäden bis zur Metaphase. Andere, RAD51-unabhängige Mechanismen sind für die Abnahme der letalen Chromosomenaberrationen verantwortlich bzw. können den Verlust von RAD51 kompensieren. Die Ergebnisse von Borgmann (1999) zeigen, dass es sich dabei nicht um das NHEJ handeln kann. Es muss weitere Mechanismen geben, die während des Zellzyklus aktiv sind, z. B. BIR oder SSA. Dieser Aspekt wird im Folgenden im Detail diskutiert (4.2.8.1).
- Es ist nicht auszuschließen, dass die trotz RNAi in den Zellen verbleibende Menge an RAD51 ausreicht, um Funktionen wie die Reparatur von Fragmenten während des Zellzyklus zu

übernehmen. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da die Focibildung durch den *Rad51*-Knockdown in ähnlichem Maß inhibiert wurde wie in Zellen, die mutierte HR-Gene tragen (4.2.1). Mehr als 62 % der siRNA-behandelten Zellen waren nicht mehr zur RAD51-Focibildung nach Bestrahlung fähig. Der Anteil nicht-reparierter Fragmente, der trotz der Inhibition der RAD51-Expression beseitigt wird, ist jedoch so hoch, dass kaum die verbliebenen Zellen mit funktionalem RAD51 hierfür verantwortlich sein können.

4.2.5.2 Effekt von RAD51 auf Chromatidtyp-Aberrationen aus der G₂-Phase

Die HR ist vor allem in der S/G₂-Phase des Zellzyklus aktiv, wenn das Schwesterchromatid als homologes Substrat vorliegt (Rothkamm et al., 2003; Takata et al., 1998). Es wurde daher untersucht, ob RAD51 bei der Reparatur von Schäden eine Rolle spielt, die in der G₂-Phase erzeugt wurden. Die Zellen wurden mit 0,5 Gy bestrahlt und eine halbe Stunde im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde für eine Stunde Colcemid zugegeben und die Metaphasen wurden geerntet. Dieser enge Zeitplan stellt sicher, dass die gewonnenen Metaphasen nur von Zellen stammen, die zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der G₂-Phase waren.

Es zeigte sich, dass die Zahl der G₂-Aberrationen durch die Inhibition der RAD51-Expression um den Faktor 1,7 anstieg, die der Chromatidbrüche um den Faktor 1,6 (Abbildung 24). In siRNA-behandelten Zellen traten 1,7 G₂-Aberrationen pro Zelle auf, entsprechend 3,1 Brüchen. In scrRNA-behandelten Zellen waren es hingegen nur 1,0 G₂-Aberrationen pro Zelle, entsprechend 2,0 Brüchen. In unbehandelten Zellen wurden 0,8 G₂-Aberrationen pro Zelle beobachtet, entsprechend 1,5 Brüchen. Es wurden 2,5mal mehr Chromatidfragmente, 1,7mal mehr Austauschaberrationen und 1,6mal mehr *Gaps* nach Inhibition der RAD51-Expression beobachtet. Demgegenüber blieb die Zahl der Isochromatidfragmente unverändert.

Der Effekt von RAD51 auf die strahleninduzierten G₂-Aberrationen ist besonders in Hinblick auf die Daten von Scott et al. (1999, 2000) interessant. Die Autoren zeigten, dass mehr als 40 % der Brustkrebspatientinnen im G₂-Assay eine erhöhte Empfindlichkeit aufweisen, im Vergleich zu 6 % der gesunden Kontrollpersonen. Sie postulierten, dass diese erhöhte Empfindlichkeit durch Brustkrebs-prädisponierende Gene mit geringer Penetranz verursacht wird. *Rad51* könnte ein solches Gen sein. Ergebnisse von Bertrand et al. (2003) deuten auf eine Rolle von RAD51 während der Tumorprogression hin. Die Autoren nahmen an, dass ein Defekt der RAD51-vermittelten Rekombination die Reparaturgenauigkeit verändert und auf diese Weise zu Mutationen, genomischen Rearrangements und Aneuploidie führt. Die Daten der vorliegenden

Arbeit bestätigen diese Theorie dahingehend, dass ein Reparaturdefekt in der G₂-Phase für RAD51-defiziente Zellen nach Bestrahlung nachgewiesen wurde. Die beobachteten G₂-Aberrationen sind potentiell mutagen.

Zusammenfassend belegen die Daten, dass RAD51 nur in proliferierenden CHO-K1-Zellen einen Einfluss auf die Reparatur von DNA-Schäden nach Bestrahlung hat. Andere Untersuchungen mit exponentiell wachsenden Zellen, in denen RAD51 oder eines seiner Paralogen defizient ist, fanden ebenfalls eine erhöhte Zahl an Chromosomenaberrationen nach DNA-Schädigung durch genotoxische Agenzien wie Strahlung oder MMC (Fujimori et al., 2001; Fuller und Painter, 1988; Godthelp et al., 2002a; Liu et al., 1998; Mozdarani et al., 2001; Takata et al., 2000; Tucker et al., 1991). Ein Vergleich der Anzahl erzeugter Schäden ist nicht möglich, da andere Autoren üblicherweise nicht nur G₂-Phase-Zellen untersucht oder die Aberrationen nach einem anderen Schema klassifiziert haben.

4.2.6 Effekt der *Rad51*-RNAi auf die Strahlenempfindlichkeit

Es wurde untersucht, wie sich die Inhibition der RAD51-Expression in CHO-K1-Zellen auf die Strahlenempfindlichkeit auswirkt. Es ist davon auszugehen, dass die Bedeutung der HR für das Überleben der Zellen in Abhängigkeit des Zellzyklus variiert (Rothkamm et al., 2003). Um diese Effekte nachzuweisen, wurden die Zellen durch Wachstum in die Konfluenz in der G₁-Phase synchronisiert. Die Bestrahlung erfolgte entweder in der Konfluenz oder zu definierten Zeiten nach Restimulation.

4.2.6.1 Einfluss von RAD51 auf die Strahlenempfindlichkeit in der G₁-Phase

Es wurde untersucht, wie die Inhibition der RAD51-Expression während des Zellzyklus das Überleben nach Bestrahlung in der G₁-Phase beeinflusst. Die Zellen wurden in der G₁-Phase bestrahlt und weitere sechs Stunden inkubiert, um die in der G₁-Phase mögliche Reparatur abzuschließen. Die Inhibition der RAD51-Expression erfolgte zeitgleich mit dem Eintritt in den Zellzyklus.

Es zeigte sich, dass die RNAi gegen *Rad51* keinen Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit hat (Abbildung 25). Das Überleben nahm mit zunehmender Dosis in Form einer Schulterkurve ab. Die D_{0,1} lag für scrRNA- und siRNA-behandelte CHO-K1-Zellen bei 6 Gy, für unbehandelte

Zellen bei 7,4 Gy. Die reduzierte Überlebensrate transfizierter Zellen ist vermutlich auf die Transfektion mit kationischem Lipid zurückzuführen.

Zusammenfassend lässt sich schließen, dass die Inhibition der RAD51-Expression keinen Einfluss auf das Überleben von CHO-K1-Zellen hat, die in Konfluenz bestrahlt wurden und die in der G₁-Phase mögliche DNA-Reparatur abschließen konnten. Dies steht in Einklang mit den Untersuchungen der aus der G₁-Phase verbliebenen letalen Chromosomenaberrationen, die ebenfalls unverändert blieben. Möglicherweise dominiert das NHEJ in der G₁-Phase so stark, dass ein Defekt in RAD51 ohne Folgen bleibt. Dieser Aspekt wird im Weiteren im Detail diskutiert (4.2.6.3).

4.2.6.2 Einfluss von RAD51 auf die Strahlenempfindlichkeit in der S/G₂-Phase

Es wird angenommen, dass die HR vorwiegend in der S/G₂-Phase des Zellzyklus aktiv ist (Rothkamm et al., 2003; Takata et al., 1998). Daher wurde untersucht, welchen Effekt die Inhibition der RAD51-Expression auf die Strahlenempfindlichkeit in proliferierenden Zellen hat. Die Zellen wurden erneut in der G₁-Phase synchronisiert, durch verdünnte Aussaat restimuliert und entweder in der frühen S-Phase oder in der späten S/G₂-Phase bestrahlt.

Die Überlebensraten nahmen in Form von Schulterkurven mit zunehmender Dosis ab (Abbildung 25). In der frühen S-Phase zeichnete sich zwischen den Dosispunkten 3 Gy und 9 Gy eine leichte Sensibilisierung nach Inhibition der RAD51-Expression ab. Die D_{0,1} lag für siRNA-behandelte Zellen bei 6,7 Gy, für scrRNA-behandelte Zellen bei 7,3 Gy und für unbehandelte Zellen bei 8,0 Gy. Nach RNAi gegen *Rad51* wurde folglich eine geringfügige Sensibilisierung von CHO-K1-Zellen in der frühen S-Phase um den Faktor 1,1 beobachtet. In der späten S/G₂-Phase war hingegen kein spezifischer Effekt auf die Strahlenempfindlichkeit nachzuweisen. Die D_{0,1} lag für siRNA- wie für scrRNA-behandelte Zellen bei 7,1 Gy, für unbehandelte Zellen bei 7,5 Gy. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass kein ausgeprägter Effekt auf die Strahlenempfindlichkeit proliferierender CHO-K1-Zellen nach Inhibition der RAD51-Expression mittels RNAi zu beobachten war.

Im G₂-Assay wurde eine erhöhte Zahl an Chromatidtyp-Aberrationen nach Bestrahlung der Zellen in der G₂-Phase gemessen (4.2.5.2). Das Überleben nach Bestrahlung in der S/G₂-Phase, wie es hier analysiert wurde, muss davon jedoch nicht betroffen sein:

- Während der Mitose führen Isochromatidbrüche in beiden Tochterzellen zum Verlust genetischen Materials, es handelt sich daher um letale Aberrationen (Bauchinger et al., 1986;

Braselmann et al., 1986; Grote et al., 1981; Joshi et al., 1982; Schmid und Bauchinger, 1980). Es gibt keine Arbeiten, die den Zusammenhang zwischen G_2 -Aberrationen und dem Überleben untersuchen. Chromatidbrüche, *Gaps* und Austauschaberrationen sind nur potentiell letale Aberrationen, da sie nur eines der beiden Schwesterchromatiden betreffen bzw. nicht zwangsläufig zu Verlust von genetischem Material führen. Theoretisch kann eine Tochterzelle überleben und eine Kolonie bilden. In siRNA-behandelten Zellen waren lediglich vermehrte Chromatidbrüche, *Gaps* und Austauschaberrationen zu beobachten, es konnte jedoch kein Einfluß auf die Zahl der Isochromatidfragmente festgestellt werden. Ein Effekt auf das Überleben war daher nicht zu erwarten.

- Der G_2 -Assay betrachtet nur den Ausschnitt an Zellen, die zwischen 30 und 90 Minuten nach Bestrahlung in die Metaphase eintreten. Dies ist nur ein sehr kleiner Anteil derjenigen Zellen, die zum Überleben nach Bestrahlung in der S/ G_2 -Phase beitragen können. Der Großteil der untersuchten CHO-K1-Zellen befand sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung für den Kolonietest in der S-Phase. Diese Zellen hatten bis zum Eintritt in die Metaphase nicht nur mehr Zeit, vermutlich standen ihnen auch mehr Mechanismen für die Reparatur von Schäden zur Verfügung als den Zellen, die sehr kurz vor Eintritt in die Metaphase für den G_2 -Assay bestrahlt wurden.

4.2.6.3 Bedeutung von RAD51 für die Strahlenempfindlichkeit in CHO-K1-Zellen

Es konnte kein Einfluss von RAD51 auf die Strahlenempfindlichkeit in CHO-K1-Zellen festgestellt werden. Die Ergebnisse stehen in Einklang mit den Befunden von Lambert und Lopez (2000), die zeigten, dass die Strahlenresistenz in adulten, asynchron proliferierenden Säugerzellen von RAD51 unabhängig ist. Demgegenüber gibt es mehrere Studien in humanen und murinen embryonalen Zellen und Tumorzellen, die eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit nach RAD51-Inhibition mittels Antisense-Oligonukleotiden oder Ribozymen (Collis et al., 2001; Ohnishi et al., 1998; Taki et al., 1996), Knockout (Lim und Hasty, 1996), dominant-negativer Formen (Stark et al., 2002) oder Gleevec (Russell et al., 2003), einem spezifischen Inhibitor von c-ABL, fanden. Die Zellen wurden in diesen Studien um den Faktor 1,3 bis 2,5 sensibilisiert.

In adulten Zellen wie den in der vorliegenden Arbeit untersuchten CHO-K1-Zellen hat RAD51 offenbar weniger Bedeutung für das Überleben nach Bestrahlung als in embryonalen oder Tumorzellen. Ein Grund hierfür könnte die unterschiedliche Regulation von RAD51 sein. Russell et al. (2003) zeigten, dass RAD51 in nicht-immortalisierten humanen Fibroblasten nach

Bestrahlung unverändert bleibt, in humanen Gliomzellen jedoch induziert wird. Raderschall et al. (2002) fanden in unbestrahlten humanen Tumorklinen eine bis zu siebenfach gesteigerte Proteinexpression.

Die Bedeutung von RAD51 für die Strahlenempfindlichkeit in adulten Säugern könnte ähnlich wie die von RAD54 sein. Essers et al. (2000) zeigten, dass *Rad54*^{-/-}-Mäuse im adulten Stadium nicht empfindlich auf ionisierende Strahlen reagieren, sondern nur im embryonalen. Darüber hinaus postulierten Essers et al., dass die Bedeutung der RAD54-vermittelten homologen Rekombination in adulten Tieren durch das NHEJ maskiert wird. Sie beobachteten, dass adulte *Rad54*^{-/-}/*scid*-Mäuse extrem strahlenempfindlich sind. Der Defekt in der HR kam in adulten Geweben folglich erst zum Tragen, wenn auch das NHEJ defekt war. Die Bedeutung von HR und NHEJ für die Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden verändert sich demnach im Verlauf der Entwicklung. Mehrere Gründe könnten Essers zufolge hierfür verantwortlich sein: Die HR könnte in schnell proliferierenden Zellen wirksamer sein oder in der frühen Entwicklung könnte die Genauigkeit der Reparatur und damit die HR bedeutsamer sein.

Ähnliche Ergebnisse wurden von Pluth et al. (2001) für murine Zelllinien berichtet. Der Phänotyp der adulten *Rad54*-mutierten Mauslinien glich dem der CHO-K1-Zellen nach Behandlung mit siRNA gegen *Rad51*, es wurde keine erhöhte Strahlenempfindlichkeit beobachtet. Zusammenfassend lässt sich postulieren, dass RAD51 ähnlich wie RAD54 in adulten Zellen nur dann eine Rolle für das Überleben nach ionisierender Strahlung spielt, wenn das NHEJ defizient ist. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Expression von RAD51 in *xrs5*-Zellen mit RNAi inhibiert (4.2.6.4).

Im Gegensatz zu RAD51 und RAD54 scheinen die RAD51-Paraloga eine größere Rolle für das Überleben adulter Zellen nach ionisierender Strahlung zu spielen. XRCC2- oder XRCC3-defiziente Hamsterlinien sind um den Faktor 2 bzw. 2,4 empfindlicher als die entsprechenden wt-Zellen, RAD51C-defiziente Linien um den Faktor 1,3 bis 2 (French et al., 2002; Godthelp et al., 2002a; Jones et al., 1987; Fuller und Painter, 1988). Die Bedeutung von RAD51 im Vergleich zu seinen Paralogen für das Überleben nach genotoxischem Insult wird im Folgenden separat diskutiert (4.2.8.3).

Es ist nicht letztendlich auszuschließen, dass die Methode der RNAi beim Kolonietest an ihre Grenzen kommt. Möglicherweise überlagert die unspezifische Toxizität der Transfektion den Effekt der *Rad51*-RNAi auf das Überleben. Die Plattierungseffizienz lag in unbehandelten Zellen im Mittel bei 90 %, in scrRNA-behandelten und siRNA-behandelten bei 13 % bzw. 19 %.

Es ist denkbar, dass ein kleiner Effekt auf das Überleben nach Strahlung nicht mehr aufgelöst werden kann.

4.2.6.4 Effekt der RAD51-Inhibition auf die Strahlenempfindlichkeit in xrs5-Zellen

Es wurde postuliert, dass die Bedeutung von RAD51 für die Strahlenempfindlichkeit durch das NHEJ maskiert wird, ähnlich wie es für RAD54 von Pluth et al. (2001) und Essers et al. (2000) beschrieben wurde. Diese Hypothese wurde überprüft, indem die *Rad51*-RNAi in *xrs5*-Zellen etabliert wurde, die einen Defekt in *Ku80* aufweisen.

In *xrs5*-Zellen war eine dem Wildtyp CHO-K1 vergleichbare Transfektionseffizienz zu beobachten. Es wurde eine Reduktion von RAD51 um 72 % erreicht. Da *xrs5*-Zellen etwas langsamer proliferieren als CHO-K1-Zellen, wurden die Zeitpunkte der Bestrahlung und der Ernte der Zellen für die Proteinisolierung bzw. den Kolonietest entsprechend angepasst (Tabelle 10).

Die Strahlenempfindlichkeit wurde in der späten S/G₂-Phase untersucht, da NHEJ-defiziente Zellen in dieser Phase am resistantesten sind (Rothkamm et al., 2003; Whitmore et al., 1989). Es war kein Einfluss der *Rad51*-RNAi auf das Überleben von *xrs5*-Zellen nach ionisierender Strahlung zu beobachten. Die Hypothese, dass möglicherweise das NHEJ den Effekt von RAD51 maskiert, ließ sich folglich nicht bestätigen. Der Phänotyp RAD51- und RAD54-defizienter Zellen ist in dieser Hinsicht folglich nicht identisch. RAD54 ist offensichtlich im Gegensatz zur RAD51 nicht ersetzbar bzw. wird auch in RAD51-unabhängigen Mechanismen zur Reparatur benötigt.

Es wird davon ausgegangen, dass die HR vor allem in der S/G₂-Phase von Bedeutung ist (Rothkamm et al., 2003; Takata et al., 1998) und dass daher NHEJ-defiziente Linien in der späten S/G₂-Phase etwas resistenter sind als in anderen Phasen des Zellzyklus (Rothkamm et al., 2003). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen schließen, dass ein RAD51-unabhängiger Mechanismus für die relative Strahlenresistenz von NHEJ-Mutanten verantwortlich ist oder den RAD51-Verlust kompensiert. Dabei kommen erneut andere Homologie-vermittelte Mechanismen wie BIR und SSA in Frage (4.2.8.1).

4.2.7 Effekt der *Rad51*-Interferenz auf die MMC-Empfindlichkeit

Zur Chemotherapie von Tumoren werden oftmals *crosslinker* eingesetzt, die Vernetzungen zwischen den beiden DNA-Strängen einführen. Zu den am weitest verbreiteten Agenzien zählen unter anderem Mustargene wie Melphalan und Chlorambucil, Cisplatin und MMC (McHugh et al., 2001). Es ist bekannt, dass die konservative HR an der Reparatur dieser *interstrand crosslinks* (ICLs) beteiligt ist (deSilva et al., 2000; McHugh et al., 2001). In *S. cerevisiae* und *E. coli* werden ICLs durch Verknüpfung von NER und HR repariert (Cheng et al., 1991; Cole, 1973; Cole und Sinden, 1975; Jachymczyk et al., 1981; Sladek et al., 1989; van Houten et al., 1986). Der genaue Mechanismus der ICL-Reparatur in Säugern ist jedoch unklar. XRCC2- und XRCC3-defiziente Linien sind extrem empfindlich gegenüber Agenzien wie MMC und Cisplatin (Caldecott und Jeggo, 1991; Jones et al., 1987; Liu et al., 1998). Auch XPF (ERCC4)- und ERCC1-defiziente CHO-Linien (*excision repair cross complementing*) sind extrem empfindlich gegenüber *crosslinkern* (Andersson et al., 1996; Damia et al., 1996). XPF und ERCC1 sind in die NER involviert. De Silva et al. (2000) postulierten folgendes Modell für die ICL-Reparatur in Säugerzellen: Zunächst kommt es zu einem Stopp der Replikationsgabel an *crosslinks*. Ein DSB entsteht, vermutlich durch enzymatische Aktivitäten an der Replikationsgabel. Der DSB initiiert die Stranginvasion durch XRCC2 und XRCC3. Der *crosslink* wird exonukleolytisch ausgehakt durch XPF, ERCC1 und RPA. Die entstandene Lücke wird durch Reparatursynthese aufgefüllt, das XPF-ERCC1-Heterodimer schneidet ein zweites Mal, entfernt das *crosslink*-Addukt und es erfolgt die abschliessende Reparatursynthese.

Es wird folglich vermutet, dass auch in Säugern Komponenten der HR und der NER an der ICL-Reparatur beteiligt sind. Daher wurde untersucht, wie sich die Inhibition der RAD51-Expression auf die Reparatur von ICLs auswirkt. Es wurde das Chemotherapeutikum MMC zur Induktion der *crosslinks* verwendet. Es zeigte sich, dass siRNA-behandelte Zellen 1,9mal empfindlicher gegenüber MMC sind als scrRNA-behandelte Zellen. scrRNA-behandelte Zellen wiesen ein 1,3fach schlechteres Überleben auf als unbehandelte Zellen. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Transfektion mit kationischen Lipiden die Zellmembran und damit die Aufnahme von MMC verändert.

RAD51 ist folglich an der Reparatur von ICLs beteiligt. Zahlreiche weitere Studien untermauern dieses Ergebnis:

- RAD51 interagiert mit dem NER-Protein XPD, und diese Assoziation wird durch Behandlung mit Cisplatin gesteigert (Aloyz et al., 2002).

- Die MMC-Behandlung induziert in Säugerzellen RAD51-Foci (Godthelp et al., 2002a/b; Liu, 2002).
- Es wird angenommen, dass die RAD51-vermittelte HR mit verantwortlich ist für die Resistenz von Tumorzellen gegenüber *crosslinkern* (Bello et al., 2002; Slupianek et al., 2001, 2002; Wang et al., 2001). Die Resistenz gegen das Mustargen Melphalan korreliert z. B. mit der Dichte der RAD51-Foci in epithelialen Tumorlinien. Je resistenter die Tumorlinie, umso intensiver die RAD51-Foci (Wang et al., 2001).
- Mustargen-resistente B-CLL-Lymphozyten sind um den Faktor 5,6 resistenter gegenüber Chlorambucil und um den Faktor 4,1 resistenter gegenüber Melphalan (Bramson et al., 1995). Die Größenordnung des Effektes ist folglich mit der hier gemessenen Sensibilisierung vergleichbar, wenn bedacht wird, dass RAD51 nur einer von mehreren Mechanismen ist, die zu dieser Resistenz beitragen (Panasci et al., 2001).
- Die Resistenz gegenüber Cisplatin und MMC in Leukämien und Lymphomen geht mit der Expression fusionierter Tyrosinkinasen wie BCR-ABL einher. Slupianek et al. (2001, 2002) zeigten, dass fusionierte Tyrosinkinasen zu einer Überexpression von RAD51 führen. Es wird angenommen, dass eine gesteigerte RAD51-vermittelte Reparatur von DSBs zur beobachteten Resistenz beiträgt.

Stark et al. (2002) fanden nach Expression eines dominant negativen RAD51 eine etwa vierfach erhöhte Empfindlichkeit gegenüber MMC in murinen embryonalen Stammzellen. Demnach hat RAD51 in embryonalen und adulten Zellen eine ähnliche Funktion für die Empfindlichkeit gegenüber MMC und ist mit RAD54 vergleichbar. RAD54-defiziente adulte Zellen weisen eine den siRNA-behandelten Zellen vergleichbare Sensibilisierung gegenüber MMC um den Faktor 1,7 auf (Pluth et al., 2001). In embryonalen Stammzellen hat der *Rad54*-Knockout ebenfalls nur eine geringfügig erhöhte MMC-Empfindlichkeit um den Faktor zwei bis drei zur Folge (Essers et al., 1997). Die Empfindlichkeit gegenüber MMC bleibt offenbar in allen Entwicklungsstadien bestehen, im Gegensatz zur Strahlenempfindlichkeit, die in RAD54- sowie RAD51-defizienten Zellen nur im embryonalen Stadium ausgeprägt zu sein scheint.

Im Vergleich zu seinen Paralogen hat RAD51 offenbar eine geringere Bedeutung für das Überleben nach Behandlung mit MMC. Für Zelllinien mit einem Defekt in den RAD51-Paralogen wurde eine bis zu 100fach erhöhte MMC-Empfindlichkeit beschrieben (Godthelp et al., 2002a; Takata et al., 2000, 2001). Diese extreme Empfindlichkeit wurde von Masson et al. (2001b) auf Defekte in der Prozessierung von eingeschnittenen *crosslinks* zurückgeführt. Die Autoren beobachteten, dass ein Komplex aus RAD51B, RAD51C, RAD51D und XRCC2 an

nicks in dsDNA bindet. Es ist möglich, dass die RAD51-Paraloge damit einen essentiellen Schritt in der Reparatur von ICLs ausführen, RAD51 selbst von geringerer Bedeutung ist.

Es ist nicht vollkommen auszuschließen, dass der Einfluss von RAD51 auf die ICL-Reparatur in der vorliegenden Arbeit leicht unterschätzt wird. Schließlich handelt es sich um einen Knockdown der mRNA, der nicht in allen Zellen RAD51 funktionell inhibieren kann. Die Focibildung wurde in über 60 % der empfänglichen Zellen unterdrückt. Es ist folglich davon auszugehen, dass weniger als 40 % der Zellen funktionelles RAD51 aufweisen, das zum Überleben beitragen kann. Der Effekt auf das Überleben nach MMC könnte vermutlich um den Faktor 1,4 größer sein, wenn RAD51 in allen Zellen funktionell inhibiert wäre. Das kann jedoch nicht erklären, warum die Mutanten der RAD51-Paralogen um ein vielfaches empfindlicher gegenüber MMC sind. Die biologischen Gründe für diese Diskrepanz werden im Folgenden detailliert diskutiert (4.2.8.3).

4.2.8 Die Bedeutung von RAD51 für die DNA-Reparatur

Es zeigte sich, dass der Knockdown von *Rad51* zu vermehrten Chromatidtyp-Aberrationen nach Bestrahlung in der G₂-Phase und einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber MMC führt. Die vorliegende Arbeit belegt damit erstmalig eine Rolle von RAD51 für die Reparatur bestimmter DNA-Schäden in adulten Säugern, nämlich in der G₂-Phase erzeugter DSBs und Vernetzungen zwischen beiden DNA-Strängen. Interessanterweise ist RAD51 offenbar nur an der Reparatur von DSBs beteiligt, die eines der beiden Schwesterchromatiden betreffen, nicht jedoch an Isochromatidbrüchen. Übereinstimmend damit wurde auch keine Beteiligung von RAD51 an der Reparatur von aus der G₁-Phase verbliebenen nicht-reparierten Fragmenten gefunden. Des Weiteren hatte die Inhibition der RAD51-Expression keinen Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit von CHO-K1- und xrs5-Zellen. Diese Ergebnisse lassen sich mit dem von Lambert und Lopez (2000) postulierten Modell interpretieren.

4.2.8.1 Das Modell von Lambert und Lopez (2000)

Lambert und Lopez (2000) haben ein Modell vorgeschlagen, nach dem RAD52 die Reparatur in Richtung der HR kanalisiert (Abbildung 28). Ist RAD51 vorhanden, so bindet es demnach an RAD52 und Genkonversion findet statt. Ist RAD51 nicht anwesend, so wird stattdessen SSA ausgeführt. RAD51 hätte demzufolge keinen Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit und die spontanen Chromosomenaberrationen in CHO-K1-Zellen bzw. xrs5-Zellen, weil ein anderer

Mechanismus den Verlust kompensieren kann. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass es sich bei diesem anderen Mechanismus nicht um das NHEJ handeln kann.

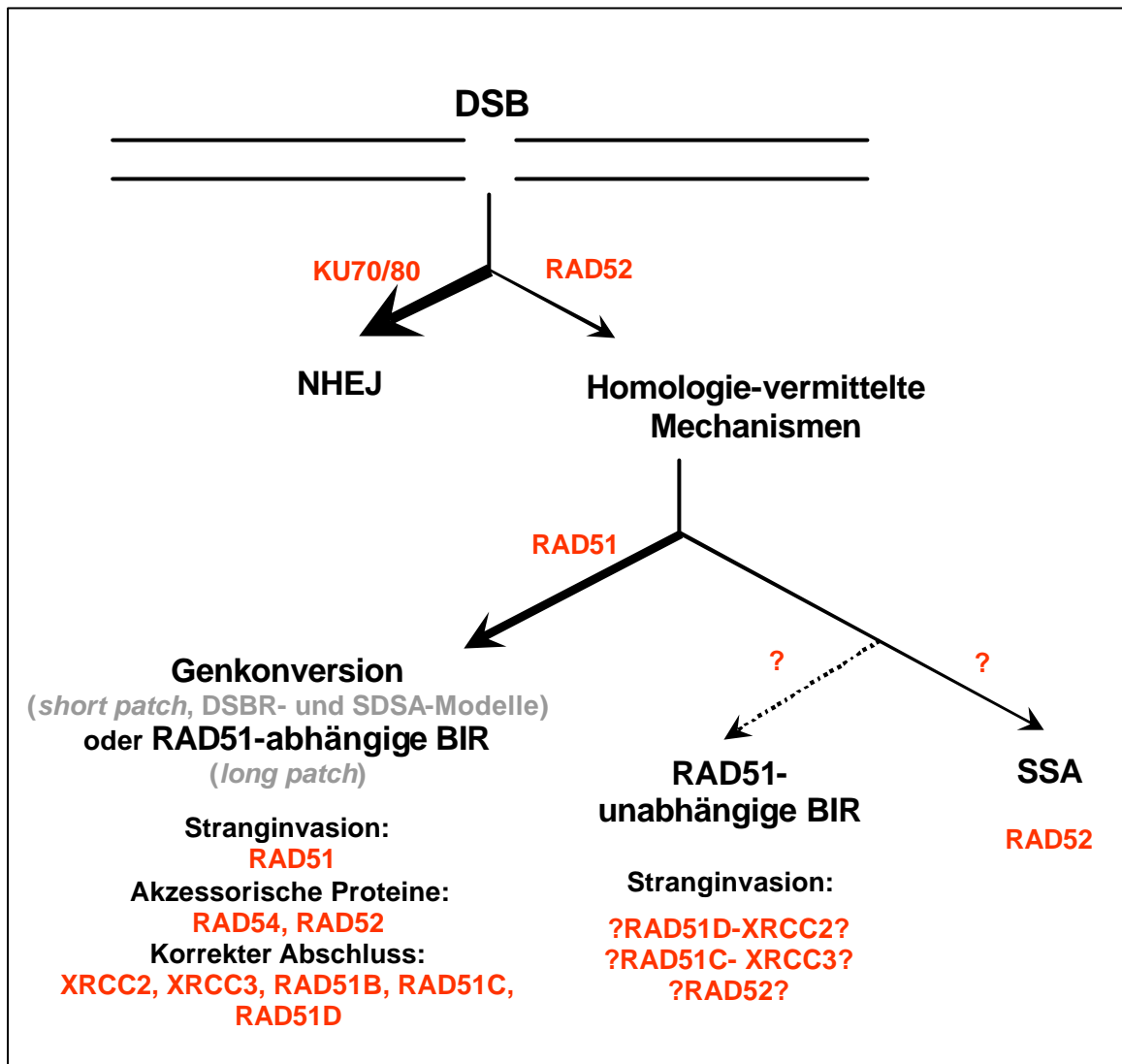


Abbildung 28: Das Modell von Lambert und Lopez (2000) in erweiterter Form. RAD52 und KU70/80 konkurrieren um die Reparatur von DSBs. Bindet RAD52 an die DNA, so wird die Reparatur in Richtung Homologie-vermittelter Mechanismen kanalisiert. Ist RAD51 anwesend, so findet präferentiell Genkonversion statt, die RAD51-Paralogue sind am korrekten Abschluss dieses Prozesses beteiligt. Die RAD51-abhängige BIR hat vermutlich eine untergeordnete Bedeutung. Ist RAD51 nicht anwesend, so können andere Homologie-vermittelte Mechanismen die Reparatur übernehmen. Hierfür kommt in erster Linie das SSA in Frage. Eine mögliche weitere Option ist die RAD51-unabhängige BIR.

Lambert und Lopez (2000) schlugen das SSA als alternativen Mechanismus vor, basierend auf ihren Messungen mit Rekombinationssubstraten. Sie schleusten ein dominant-negatives RAD51 in CHO-Zellen ein und untersuchten die Rekombinationsfrequenz nach Induktion eines DSBs. Sie zeigten, dass die Zahl der nicht-konservativen, durch SSA-vermittelten

Reparaturereignisse stark zunahm, die der konservativen, durch Genkonversion vermittelten Ereignisse entsprechend ab. Diese Befunde belegen, dass SSA die Homologie-vermittelte Reparatur von DSBs übernehmen kann, wenn die konservative HR ausfällt. Das SSA ist fehlerbehaftet und kann mit genomischer Instabilität assoziiert sein (Larminat et al., 2002), so können z. B. chromosomale Rearrangements durch das SSA verursacht werden (Richardson und Jasin, 2000). Die Übernahme der Reparatur durch das SSA könnte erklären, warum vermehrt G₂-Aberrationen nach Inhibition der RAD51-Expression beobachtet wurden.

In siRNA-behandelten CHO-K1-Zellen wäre nach dem Modell von Lambert und Lopez auch eine Reparatur über das NHEJ möglich, wenn KU70/80 die Reparatur entsprechend kanalisiert. Das gilt insbesondere für die G₁-Phase, wenn RAD52 kaum exprimiert wird (Chen et al., 1997). In siRNA-behandelten *xrs5*-Zellen müsste das SSA hingegen die Reparatur aller DSBs übernehmen. Es stellt sich die Frage, ob die mit dem SSA assoziierte fehlerhafte Reparatur nicht einen Effekt auf das Überleben der *xrs5*-Zellen im Kolonietest hätte haben müssen. Daher wird postuliert, dass es einen weiteren Mechanismus geben muss, der den Verlust von RAD51 kompensiert.

Dabei könnte es sich um die RAD51-unabhängige BIR handeln, die möglicherweise einen Teil der entstehenden DSBs reparieren kann. Die RAD51-unabhängige BIR wurde im Modell von Lambert und Lopez nicht berücksichtigt, wird jedoch insbesondere für die Reparatur von DSBs infolge von Vernetzungen zwischen den DNA-Strängen als RAD51-unabhängiger Mechanismus diskutiert:

- Li et al. (1999) zeigten, dass die Reparatur eines einzelnen definierten ICLs *in vitro* durch Extrakte aus Säugerzellen nicht von RAD51 abhängt. Die Autoren postulierten, dass die BIR den Rekombinationsschritt bei der ICL-Reparatur übernimmt.
- In Hefe kann BIR unabhängig von RAD51 und RAD54 ablaufen (Malkova et al., 1996; Signon et al., 2001), auch die ICL-Reparatur kann in Hefe zumindest teilweise RAD51-unabhängig stattfinden (McHugh et al., 2000). Möglicherweise spielt die Struktur der DSBs hierbei eine entscheidende Rolle.

Mittels BIR könnte der Verlust von RAD51 bei der ICL-Reparatur teilweise ausgeglichen werden, so dass es nur zu der beobachteten moderat erhöhten MMC-Empfindlichkeit kommt. Dabei müsste in der G₁-Phase das homologe Chromosom als Matrize für die Reparatur dienen, in der G₂-Phase das Schwesterchromatid. Malkova et al. (1996) zeigten, dass BIR in Hefe in Konkurrenz zur *short patch*-Genkonversion selten auftritt. Ist jedoch *RAD51* defekt, so können

DSBs zumindest teilweise über BIR repariert werden, wenn dieser Weg auch nicht so effizient ist wie die RAD51-abhängige Reparatur. Es wird angenommen, dass die BIR unter anderem bei der Reparatur gebrochener Replikationsgabeln eine Rolle spielt (Kraus et al., 2001). Die BIR könnte den Ausfall der RAD51-abhängigen Genkonversion insbesondere während der S-Phase kompensieren. Während der Replikation auftretende DSBs könnten in CHO-K1-Zellen durch die BIR beseitigt werden, so dass der *Rad51*-Knockdown nicht zu erhöhten spontanen Chromosomenaberrationen führt.

Die Reparatur von in der G₂-Phase erzeugten Schäden auf einem Schwesterchromatid können offensichtlich weder die BIR noch das SSA leisten bzw. nur fehlerhaft leisten, so dass es zu vermehrten Chromatidtyp-Aberrationen kommt. Gleiches gilt für einen Teil der Schäden, die durch MMC eingeführt werden. Einerseits könnte die Art des Schadens hierfür verantwortlich sein. Andererseits könnte die Empfindlichkeit gegenüber MMC auch dadurch bedingt sein, dass alle Zellen während der kontinuierlichen MMC-Exposition in der G₂-Phase geschädigt wurden. Demnach wäre die RAD51-vermittelte Rekombination entscheidend für die DNA-Reparatur in der G₂-Phase adulter Säugerzellen.

Das Modell von Lambert und Lopez bietet keine schlüssige Erklärung, warum in embryonalen Zellen RAD51 mehr Bedeutung für die Reparatur hat. Möglicherweise sind die diskutierten RAD51-unabhängigen Mechanismen wie die BIR oder das SSA in embryonalen Zellen nicht aktiv. Oder es kommt durch die schnelle Teilungsrate zu einer Akkumulation spontaner G₂-Aberrationen, die dann zur genetischen Instabilität führen können. Andererseits ist denkbar, dass die für die Zellproliferation essentielle Funktion von RAD51 durch die geringen verbleibenden Mengen an Protein in der Zelle ausgeführt werden können (Lambert und Lopez, 2000).

4.2.8.2 Die RAD51-vermittelte HR im Vergleich zum NHEJ

Die Rolle der verschiedenen Reparaturmechanismen in Konkurrenz zueinander ist nicht klar. Rothkamm et al. (2003) zeigten, dass die Bedeutung der HR von der G₁- über die S- bis zur späten S/G₂-Phase in Hamsterzellen deutlich zunimmt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen damit überein und definieren die erforderlichen Proteine näher. RAD51 ist demnach nur für die Reparatur strahleninduzierter Schäden erforderlich, die in der G₂-Phase auf einem Schwesterchromatid auftreten. Kein anderer Mechanismus – weder NHEJ, SSA oder BIR – kann offenbar einen Defekt der RAD51-vermittelten HR in diesem Stadium kompensieren.

Delacôte et al. (2002) zeigten, dass ein Defekt im NHEJ zur Stimulation Homologie-vermittelter Mechanismen führt. Die Autoren schlugen ein Modell vor, nach dem NHEJ und HR nicht einfach um die DSB-Reparatur konkurrieren, sondern dass sie aufeinander folgend agieren können. Ein DSB, der durch NHEJ nicht zu reparieren ist, würde demnach vom RAD51-Komplex übernommen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergänzen dieses Modell dahingehend, dass auch der gleichzeitige Ausfall von NHEJ und RAD51-vermittelter HR kompensiert werden kann. Folglich gibt es in adulten Säugerzellen ein kompliziertes Netzwerk aus DNA-Reparaturprozessen, die sich gegenseitig ersetzen können. Es wurde postuliert, dass BIR ein entscheidender Mechanismus zur DSB-Reparatur in höheren Säugern ist, der bevorzugt in der S-Phase wirkt.

Im Gegensatz zu anderen Arbeiten wurde kein Effekt auf die Strahlenempfindlichkeit gefunden, wenn RAD51 mittels RNAi inhibiert wurde. Rothkamm et al. (2003) beobachteten selbst in der G₁-Phase eine Strahlensensibilisierung von XRCC3-defizienten Zellen. Diese Diskrepanz zeigt, dass die Bedeutung der einzelnen an der HR beteiligten Proteine separat betrachtet werden muss. Dieser Aspekt wird im nächsten Abschnitt näher diskutiert.

4.2.8.3 Die Bedeutung von RAD51 verglichen mit seinen Paralogen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass RAD51 für die Reparatur von DNA-Schäden und das Überleben nach genotoxischem Insult eine geringere Bedeutung hat als seine Paralogen. Die Inhibition der RAD51-Expression hatte keine erhöhte Strahlenempfindlichkeit und eine lediglich moderat erhöhte Empfindlichkeit gegenüber MMC in CHO-K1-Zellen zur Folge. Demgegenüber sind die Mutanten der RAD51-Paraloge moderat strahlenempfindlich und äußerst empfindlich gegenüber MMC (Godthelp et al., 2002a; Takata et al., 2000, 2001).

Nach der Hypothese von Lambert und Lopez (2000) könnte RAD51 den Rekombinationsprozess initiieren, der dann durch die Paraloge XRCC2, XRCC3 und RAD51C korrekt abgeschlossen wird. In Zellen, die einen Defekt in diesen RAD51-Paralogen aufweisen, würden nach DNA-Schädigung nicht-prozessierte Rekombinationsintermediate akkumulieren, die zum Absterben der Zellen und zu einer erhöhten Strahlen- und MMC-Empfindlichkeit führen. Das setzt voraus, dass einige der Paralogen in spätere Stadien der Genkonversion involviert sind, in Übereinstimmung mit einigen neueren Arbeiten (Brenneman et al., 2002; French et al., 2002; Lambert und Lopez, 2000). Ohne RAD51 würde die DNA-Reparatur vor Initiation der Stranginvasion in Richtung anderer Mechanismen kanalisiert.

Es stellt sich die Frage, wie die Stranginvasion bei der postulierten RAD51-unabhängigen BIR vonstatten geht. In diesem Fall könnten die Komplexe der RAD51-Paralogen den Verlust von RAD51 kompensieren: Es wurde gezeigt, dass der CX3-Komplex und der DX2-Komplex ähnlich wie RAD51 die Paarung zwischen homologen DNA-Strängen katalysieren können und ebenfalls ein Nukleoproteinfilament ausbilden (Kurumizaka et al., 2001, 2002). Möglicherweise sind die beiden Komplexe an der Stranginvasion bei der RAD51-unabhängigen BIR beteiligt (Abbildung 28). Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass als weiterer Kandidat hierfür RAD52 infrage käme, da es ebenfalls ein Nukleoproteinfilament bilden kann und homologe Paarungsaktivität aufweist (Kagawa et al., 2001). Bei der Genkonversion nach dem DSBR- und SDSA-Modell ist RAD51 für die Stranginvasion hingegen offensichtlich unersetzlich, da Lambert und Lopez (2000) bei Verlust von RAD51 einen Wechsel zum SSA beobachteten.

Zusammenfassend ist zu schließen, dass die Rolle von RAD51 im Vergleich zu seinen Paralogen insbesondere bei der Reparatur von ICLs, aber auch von strahleninduzierten DSBs, nicht abschließend geklärt ist. Einerseits hat RAD51 in CHO-K1-Zellen im Vergleich zu seinen Paralogen offenbar weit weniger Bedeutung, andererseits können die Paralogen einen Verlust von RAD51 nicht vollständig kompensieren.

4.3 Zusammenfassung des Phänotyps der *Rad51*-RNAi und Ausblick

Die *Rad51*-RNAi führte dazu, dass mehr als 60 % der Zellen keine Foci mehr ausbilden konnten. Der starke Anstieg der RAD51-Expression während des Zellzyklus wurde komplett unterbunden. Dies führte zu vermehrten Chromatidtyp-Aberrationen nach Bestrahlung in der G₂-Phase und zu einer 1,9fach erhöhten MMC-Empfindlichkeit. Es war kein Effekt von RAD51 auf den Zellzyklus, auf die spontanen Chromosomenaberrationen und die nach Bestrahlung in der G₁-Phase induzierten letalen Chromosomenaberrationen zu beobachten.

Es wurde postuliert, dass

1. RAD51 für die Reparatur von in der G₂-Phase erzeugten DNA-Schäden und vernetzten DNA-Strängen essentiell ist.
2. die BIR und/oder das SSA den Verlust von RAD51 bei der Reparatur von DSBs in den anderen Zellzyklusphasen kompensieren können.
3. RAD51 in adulten Säugerzellen weniger Bedeutung für die Reparatur von DSBs, Strahlen- und MMC-Empfindlichkeit hat als seine Paralogen.
4. RAD51 in adulten Säugerzellen für die Strahlenempfindlichkeit nicht dieselbe Bedeutung hat wie in embryonalen Zellen oder Tumorzellen.

Daraus ist zu schließen, dass die Rolle jedes an der HR beteiligten Proteins der *Rad52*-Epistasisgruppe separat betrachtet werden muss. Weitere Untersuchungen sollten die aufgestellten Hypothesen überprüfen und so das Zusammenspiel der einzelnen Proteine näher charakterisieren. Es erscheint sinnvoll, RNAi gegen sämtliche Proteine der *Rad52*-Epistasisgruppe zu etablieren. Der Knockdown mehrerer Proteine gleichzeitig ist hierbei besonders viel versprechend, um die verschiedenen Homologie-vermittelten Reparaturwege im Detail aufzuklären.

Darüber hinaus sollte die siRNA gegen *Rad51* stabil exprimiert werden, um methodische Limitationen bedingt durch die transiente Transfektion von siRNA zu überwinden. Dabei ist unter anderem zu klären, welche Bedeutung RAD51 für die Viabilität von adulten Zellen hat und für die chromosomale Instabilität, die aus spontan in der G₂-Phase auftretenden DNA-Schäden resultieren könnte.

5 Zusammenfassung

Die Stabilität des Genoms wird durch Schäden an der DNA gefährdet. Besonders bedrohlich sind Doppelstrangbrüche (DSBs), die zu chromosomalen Aberrationen führen, wenn sie nicht oder falsch repariert werden. Es gibt verschiedene Mechanismen zur Reparatur von DSBs. Es wird angenommen, dass der Großteil der DSBs durch das nicht-homologe Endjoining (NHEJ) repariert wird. Daneben existieren Homologie-vermittelte Reparaturmechanismen (HR), die vermutlich vorwiegend in der S/G₂-Phase des Zellzyklus aktiv sind. Die Bedeutung der HR in Konkurrenz zum NHEJ ist nicht klar. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der HR bei der Reparatur von DNA-Schäden in Säugerzellen näher definiert. Hierfür wurde die Expression des zentralen HR-Proteins RAD51 mittels RNA-Interferenz (RNAi) inhibiert.

Zunächst wurde die Methode der RNAi etabliert. Es wurde gezeigt, dass das kationische Lipid TransIT-TKO am besten geeignet ist für die Transfektion von siRNA in CHO-K1-Zellen. Es wurden zwei verschiedene siRNAs gegen die *Rad51*-mRNA getestet, als Kontrolle wurden scrRNAs eingesetzt. Die RAD51-Expression wurde mit 200 nM siRNA maximal inhibiert, im Mittel wurde das Signal um 62 % reduziert. Es war kein Unterschied zwischen beiden spezifischen siRNAs festzustellen.

Nach DNA-Schädigung akkumuliert RAD51 in immunzytochemisch nachweisbaren Foci im Zellkern. Diese Focibildung wird als funktioneller Nachweis der RAD51-abhängigen Reparatur angesehen. Die RNAi gegen *Rad51* führte zu einer deutlichen Reduktion der Foci nach Bestrahlung mit 12 Gy. Nur 26 % der siRNA-behandelten Zellen waren Foci-positiv, gegenüber 69 % der scrRNA-behandelten Zellen und 83 % der unbehandelten Zellen.

RAD51 wird in Abhängigkeit des Zellzyklus reguliert, die Expression steigt von der G₀- zur G₁-Phase deutlich an und nimmt bis zur G₂-Phase weiter kontinuierlich zu, wo sie ein Maximum erreicht. Dieser Anstieg wurde mittels *Rad51*-RNAi vollständig unterbunden. Nach Behandlung mit siRNA blieb die RAD51-Expression über 48 Stunden kontinuierlich auf dem Niveau konfluent gewachsener Zellen. Dieser Effekt war nicht auf eine veränderte Zellzyklus-Verteilung zurückzuführen. Die Behandlung mit siRNA hatte keinen spezifischen Effekt auf den Zellzyklus, die Zellen traten nach Transfektion mit siRNA oder scrRNA lediglich etwas langsamer und weniger synchron in den Zellzyklus ein.

Es wurde gezeigt, dass RAD51 einen Einfluss auf die DNA-Reparatur in der G₂-Phase, nicht jedoch in der G₁-Phase, hat. Nach Inhibition der RAD51-Expression war die Zahl der Chromatidtyp-Aberrationen im G₂-Assay um den Faktor 1,7 erhöht, die Zahl der Brüche um den

Faktor 1,6. Chromatidfragmente nahmen um den Faktor 2,5 zu, *Gaps* und Austauschaberrationen um den Faktor 1,6 bzw. 1,7. Bei den Isochromatidfragmenten war kein Anstieg zu beobachten. Die Inhibition der RAD51-Expression hatte hingegen keinen Einfluss auf die letalen Chromosomenaberrationen nach Bestrahlung in der G₁-Phase. Es war auch kein Effekt auf spontan erzeugte Aberrationen nachzuweisen.

Die Strahlenempfindlichkeit von CHO-K1-Zellen in der G₁-, der frühen S- und der späten S/G₂-Phase wurde durch die RNAi gegen *Rad51* nicht verändert. Es wurde angenommen, dass das NHEJ möglicherweise den Verlust der HR kompensiert. Daher wurde die Strahlenempfindlichkeit in der NHEJ-defizienten Linie *xrs5* untersucht. Die Inhibition der RAD51-Expression hatte jedoch auch in *xrs5*-Zellen keinen Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit.

Abschließend wurde die Beteiligung von RAD51 an der Reparatur von *crosslinks* untersucht. Die *crosslinks* wurden mit dem Chemotherapeutikum Mitomycin C (MMC) erzeugt. Die Inhibition der RAD51-Expression führte zu einer 1,9fach erhöhten MMC-Empfindlichkeit, verglichen mit scrRNA-behandelten Zellen.

Es wurde postuliert, dass RAD51 nur für die Reparatur bestimmter DNA-Schäden essentiell ist. RAD51 spielt demnach eine wichtige Rolle bei der Reparatur von Schäden, die in der G₂-Phase durch ionisierende Strahlung erzeugt werden. Darüber hinaus kommt RAD51 eine besondere Bedeutung bei der Reparatur von *crosslinks* zu. Nach dem Modell von Lambert und Lopez (2000) wurde angenommen, dass der Verlust von RAD51 durch andere Reparaturmechanismen kompensiert werden kann. Es wurde diskutiert, dass das *single strand annealing* (SSA) und – insbesondere in der S-Phase – die *break-induced replication* (BIR) solche alternativen Wege zur Homologie-vermittelten Reparatur sein könnten.

Es bleibt festzuhalten, dass RAD51 in adulten Säugerzellen weniger Bedeutung für die Reparatur von DNA-Schäden und für die Empfindlichkeit gegenüber genotoxischen Agenzien als seine Paralogen hat. RAD51 hat darüber hinaus in adulten Säugerzellen für die Strahlenempfindlichkeit nicht dieselbe Bedeutung wie in embryonalen Zellen oder Tumorzellen.

Künftige Untersuchungen müssen das Zusammenspiel der an der HR beteiligten Proteine näher charakterisieren. Der Knockdown mehrerer Proteine der *Rad52*-Epistasisgruppe gleichzeitig erscheint viel versprechend, um die verschiedenen Homologie-vermittelten Reparaturwege im Detail aufzuklären.

6 Literatur

- ALBALA JS, THELEN MP, PRANGE C, FAN W, CHRISTENSEN M, THOMPSON LH, LENNON GG. Identification of a novel human RAD51 homolog, RAD51B. *Genomics*. **1997** Dec 15; 46(3): 476-9.
- ALEXEEV A, MAZIN A, KOWALCZYKOWSKI SC. Rad54 protein possesses chromatin-remodeling activity stimulated by the Rad51-ssDNA nucleoprotein filament. *Nat Struct Biol*. **2003** Mar; 10(3): 182-6.
- ALLEN C, KURIMASA A, BRENNEMAN MA, CHEN DJ, NICKOLOFF JA. DNA-dependent protein kinase suppresses double-strand break-induced and spontaneous homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2002** Mar 19; 99(6): 3758-63.
- ALOYZ R, XU ZY, BELLO V, BERGERON J, HAN FY, YAN Y, MALAPETSA A, ALAOUI-JAMALI MA, DUNCAN AM, PANASCI L. Regulation of cisplatin resistance and homologous recombinational repair by the TFIIH subunit XPD. *Cancer Res*. **2002** Oct 1; 62(19): 5457-62.
- AMARZGUIOUI M, BREDE G, BABAIE E, GROTLI M, SPROAT B, PRYDZ H. Secondary structure prediction and in vitro accessibility of mRNA as tools in the selection of target sites for ribozymes. *Nucleic Acids Res*. **2000** Nov 1; 28(21): 4113-24.
- ANDERSSON BS, SADEGHI T, SICILIANO MJ, LEGERSKI R, MURRAY D. Nucleotide excision repair genes as determinants of cellular sensitivity to cyclophosphamide analogs. *Cancer Chemother Pharmacol*. **1996**; 38(5): 406-16.
- ARNAUDEAU C, LUNDIN C, HELLEDAY T. DNA double-strand breaks associated with replication forks are predominantly repaired by homologous recombination involving an exchange mechanism in mammalian cells. *J Mol Biol*. **2001** Apr 13; 307(5): 1235-45.
- BASS BL. RNA interference. The short answer. *Nature*. **2001** May 24; 411(6836): 428-9.
- BAUCHINGER M, SCHMID E, BRASELMANN H. Cell survival and radiation induced chromosome aberrations. II. Experimental findings in human lymphocytes analysed in first and second post-irradiation metaphases. *Radiat Environ Biophys*. **1986** 25(4): 253-60.
- BAUMANN P, BENSON FE, WEST SC. Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell*. **1996** Nov 15; 87(4): 757-66.
- BAUMANN P, WEST SC. The human Rad51 protein: polarity of strand transfer and stimulation by hRP-A. *EMBO J*. **1997** Sep 1; 16(17): 5198-206.
- BAUMANN P, WEST SC. Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. *Trends Biochem Sci*. **1998** Jul; 23(7): 247-51.
- BAUMANN P, WEST SC. Heteroduplex formation by human Rad51 protein: effects of DNA end-structure, hRP-A and hRad52. *J Mol Biol*. **1999** Aug 13; 291(2): 363-74.
- BELLO VE, ALOYZ RS, CHRISTODOULOPOULOS G, PANASCI LC. Homologous recombinational repair vis-a-vis chlorambucil resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Biochem Pharmacol*. **2002** May 1; 63(9): 1585-8.
- BENDIXEN C, SUNJEVARIC I, BAUCHWITZ R, ROTHSTEIN R. Identification of a mouse homologue of the *Saccharomyces cerevisiae* recombination and repair gene, RAD52. *Genomics*. **1994** Sep 1; 23(1): 300-3.

- BENNETT CF, CONDON TP, GRIMM S, CHAN H, CHIANG MY. Inhibition of endothelial cell adhesion molecule expression with antisense oligonucleotides. *J Immunol.* **1994** Apr 1; 152(7): 3530-40.
- BENSON FE, STASIAK A, WEST SC. Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of E. coli RecA. *EMBO J.* **1994** Dec 1; 13(23): 5764-71.
- BENSON FE, BAUMANN P, WEST SC. Synergistic actions of Rad51 and Rad52 in recombination and DNA repair. *Nature.* **1998** Jan 22; 391(6665): 401-4.
- BEREZOVSKA O, RAMDYA P, SKOCH J, WOLFE MS, BACSKAI BJ, HYMAN BT. Amyloid precursor protein associates with a nicastrin-dependent docking site on the presenilin 1-gamma-secretase complex in cells demonstrated by fluorescence lifetime imaging. *J Neurosci.* **2003** Jun 1; 23(11): 4560-6.
- BERNSTEIN E, CAUDY AA, HAMMOND SM, HANNON GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* **2001** Jan 18; 409(6818): 363-6.
- BERTRAND P, LAMBERT S, JOUBERT C, LOPEZ BS. Overexpression of mammalian Rad51 does not stimulate tumorigenesis while a dominant-negative Rad51 affects centrosome fragmentation, ploidy and stimulates tumorigenesis, in p53-defective CHO cells. *Oncogene.* **2003** Oct 23; 22(48): 7587-92.
- BEZZUBOVA O, SHINOHARA A, MUELLER RG, OGAWA H, BUERSTEDDE JM. A chicken RAD51 homologue is expressed at high levels in lymphoid and reproductive organs. *Nucleic Acids Res.* **1993** Apr 11; 21(7): 1577-80.
- BEZZUBOVA O, SILBERGLEIT A, YAMAGUCHI-IWAI Y, TAKEDA S, BUERSTEDDE JM. Reduced X-ray resistance and homologous recombination frequencies in a RAD54^{-/-} mutant of the chicken DT40 cell line. *Cell.* **1997** Apr 18; 89(2): 185-93.
- BILLY E, BRONDANI V, ZHANG H, MÜLLER U, FILIPOWICZ W. Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2001** Dec 4; 98(25): 14428-33.
- BISHOP DK, EAR U, BHATTACHARYYA A, CALDERONE C, BECKETT M, WEICHSELBAUM RR, SHINOHARA A. Xrcc3 is required for assembly of Rad51 complexes in vivo. *J Biol Chem.* **1998** Aug 21; 273(34): 21482-8.
- BMU. http://www.bmu.de/de/800/nj/sachthemen/strahlen/info_strahlen/main.htm. **2004**.
- BORGMANN, K. Untersuchung strahleninduzierter Chromosomenschäden in Säugertierzellen. *Dissertation des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg.* **1999**.
- BRAMSON J, MCQUILLAN A, AUBIN R, ALAOUJ-JAMALI M, BATIST G, CHRISTODOULOPOULOS G, PANASCI LC. Nitrogen mustard drug resistant B-cell chronic lymphocytic leukemia as an in vivo model for crosslinking agent resistance. *Mutat Res.* **1995** May; 336(3): 269-78.
- BRASELMANN H, BAUCHINGER M, SCHMID E. Cell survival and radiation induced chromosome aberrations. I. Derivation of formulae for the determination of transmission and survival parameters of aberrations. *Radiat Environ Biophys.* **1986**; 25(4): 243-51.
- BRAYBROOKE JP, SPINK KG, THACKER J, HICKSON ID. The RAD51 family member, RAD51L3, is a DNA-stimulated ATPase that forms a complex with XRCC2. *J Biol Chem.* **2000** Sep 15; 275(37): 29100-6.
- BRENNEMAN MA, WEISS AE, NICKOLOFF JA, CHEN DJ. XRCC3 is required for efficient repair of chromosome breaks by homologous recombination. *Mutat Res.* **2000** Mar 20; 459(2): 89-97.

- BRENNEMAN MA, WAGENER BM, MILLER CA, ALLEN C, NICKOLOFF JA. XRCC3 controls the fidelity of homologous recombination: roles for XRCC3 in late stages of recombination. *Mol Cell*. **2002** Aug; 10(2): 387-95.
- BRYANT PE, GRAY L, RICHES AC, STEEL CM, FINNON P, HOWE O, KESTERTON I, VRAL A, CURWEN GB, SMART V, TAWN EJ, WHITEHOUSE CA. The G₂ chromosomal radiosensitivity assay. *Int J Radiat Biol*. **2002** Sep; 78(9): 863-6.
- BUCHHOP S, GIBSON MK, WANG XW, WAGNER P, STURZBECHER HW, HARRIS CC. Interaction of p53 with the human Rad51 protein. *Nucleic Acids Res*. **1997** Oct 1; 25(19): 3868-74.
- BYROM M, PALLOTTA V, BROWN D, FORD L. Visualizing siRNA in Mammalian Cells: Fluorescence Analysis of the RNAi Effect. *Ambion TechNotes*. **2003** 9(3).
- CALDECOTT K, JEGGO P. Cross-sensitivity of gamma-ray-sensitive hamster mutants to cross-linking agents. *Mutat Res*. **1991** Sep; 255(2): 111-21.
- CAPLEN NJ, PARRISH S, IMANI F, FIRE A, MORGAN RA. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2001** Aug 14; 98(17): 9742-7.
- CARTWRIGHT R, DUNN AM, SIMPSON PJ, TAMBINI CE, THACKER J. Isolation of novel human and mouse genes of the recA/RAD51 recombination-repair gene family. *Nucleic Acids Res*. **1998a** Apr 1; 26(7): 1653-9.
- CARTWRIGHT R, TAMBINI CE, SIMPSON PJ, THACKER J. The XRCC2 DNA repair gene from human and mouse encodes a novel member of the recA/RAD51 family. *Nucleic Acids Res*. **1998b** Jul 1; 26(13): 3084-9.
- CHEN F, NASTASI A, SHEN Z, BRENNEMAN M, CRISSMAN H, CHEN DJ. Cell cycle-dependent protein expression of mammalian homologs of yeast DNA double-strand break repair genes Rad51 and Rad52. *Mutat Res*. **1997** Sep; 384(3): 205-11.
- CHEN PL, CHEN CF, CHEN Y, XIAO J, SHARP ZD, LEE WH. The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1998** Apr 28; 95(9): 5287-92.
- CHEN G, YUAN SS, LIU W, XU Y, TRUJILLO K, SONG B, CONG F, GOFF SP, WU Y, ARLINGHAUS R, BALTIMORE D, GASSER PJ, PARK MS, SUNG P, LEE EY. Radiation-induced assembly of Rad51 and Rad52 recombination complex requires ATM and cAbl. *J Biol Chem*. **1999** Apr 30; 274(18): 12748-52.
- CHENG S, SANCAR A, HEARST JE. RecA-dependent incision of psoralen-crosslinked DNA by (A)BC excinuclease. *Nucleic Acids Res*. **1991** Feb 11; 19(3): 657-63.
- CHRISTMANN M, TOMICIC MT, ROOS WP, KAINA B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*. **2003** Nov 15; 193(1-2): 3-34.
- CHRISTODOULOPOULOS G, MALAPETSA A, SCHIPPER H, GOLUB E, RADDING C, PANASCI LC. Chlorambucil induction of HsRad51 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res*. **1999** Aug; 5(8): 2178-84.
- CLEVER B, INTERTHAL H, SCHMUCKLI-MAURER J, KING J, SIGRIST M, HEYER WD. Recombinational repair in yeast: functional interactions between Rad51 and Rad54 proteins. *EMBO J*. **1997** May 1; 16(9): 2535-44.
- COLE RS. Repair of DNA containing interstrand crosslinks in *Escherichia coli*: sequential excision and recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1973** Apr; 70(4): 1064-8.

- COLE RS, SINDEN RR. Repair of cross-linked DNA in *Escherichia coli*. *Basic Life Sci.* **1975**; 5B: 487-95.
- COLLIS SJ, TIGHE A, SCOTT SD, ROBERTS SA, HENDRY JH, MARGISON GP. Ribozyme minigene-mediated RAD51 down-regulation increases radiosensitivity of human prostate cancer cells. *Nucleic Acids Res.* **2001** Apr 1; 29(7): 1534-8.
- COLLIS SJ, SWARTZ MJ, NELSON WG, DEWEESE TL. Enhanced radiation and chemotherapy-mediated cell killing of human cancer cells by small inhibitory RNA silencing of DNA repair factors. *Cancer Res.* **2003** Apr 1; 63(7): 1550-4.
- CUI X, BRENNEMAN M, MEYNE J, OSHIMURA M, GOODWIN EH, 1 DJ. The XRCC2 and XRCC3 repair genes are required for chromosome stability in mammalian cells. *Mutat Res.* **1999** Jun 23; 434(2): 75-88.
- DABOUSSI F, DUMAY A, DELACOTE F, LOPEZ BS. DNA double-strand break repair signalling: the case of RAD51 post-translational regulation. *Cell Signal.* **2002** Dec;14(12):969-75.
- DAMIA G, IMPERATORI L, STEFANINI M, D'INCALCI M. Sensitivity of CHO mutant cell lines with specific defects in nucleotide excision repair to different anti-cancer agents. *Int J Cancer.* **1996** Jun 11; 66(6): 779-83.
- DE SILVA IU, MCHUGH PJ, CLINGEN PH, HARTLEY JA. Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* **2000** Nov; 20(21): 7980-90.
- DEANS B, GRIFFIN CS, MACONOCHE M, THACKER J. Xrcc2 is required for genetic stability, embryonic neurogenesis and viability in mice. *EMBO J.* **2000** Dec 15; 19(24): 6675-85.
- DEANS B, GRIFFIN CS, O'REGAN P, JASIN M, THACKER J. Homologous recombination deficiency leads to profound genetic instability in cells derived from Xrcc2-knockout mice. *Cancer Res.* **2003** Dec 1; 63(23): 8181-7.
- DELACÔTE F, HAN M, STAMATO TD, JASIN M, LOPEZ BS. An xccc4 defect or Wortmannin stimulates homologous recombination specifically induced by double-strand breaks in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **2002** Aug 1; 30(15): 3454-63.
- DEMEREK M, ADELBERG EA, CLARK AJ, HARTMAN PE. A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics.* **1966** Jul; 54(1): 61-76.
- DEMEREK M, ADELBERG EA, CLARK AJ, HARTMAN PE. A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *J Gen Microbiol.* **1968** Jan; 50(1): 1-14.
- DIKOMEY E, DAHM-DAPHI J, KASTEN U. DNA-Schäden und ihre Reparatur. in: FREYSCHMIDT J (HRSG). Handbuch diagnostische Radiologie. *Springer-Verlag, Berlin.* **2001**.
- DIKOMEY E, BORGMANN K, BRAMMER I, KASTEN-PISULA U. Molecular mechanisms of individual radiosensitivity studied in normal diploid human fibroblasts. *Toxicology.* **2003** Nov 15; 193(1-2): 125-35.
- DOSANJH MK, COLLINS DW, FAN W, LENNON GG, ALBALA JS, SHEN Z, SCHILD D. Isolation and characterization of RAD51C, a new human member of the RAD51 family of related genes. *Nucleic Acids Res.* **1998** Mar 1; 26(5): 1179-84.
- DRONKERT ML, BEVERLOO HB, JOHNSON RD, HOEIJMAKERS JH, JASIN M, KANAAR R. Mouse RAD54 affects DNA double-strand break repair and sister chromatid exchange. *Mol Cell Biol.* **2000** May; 20(9): 3147-56.

- DUDENHÖFFER C, ROHALY G, WILL K, DEPERT W, WIESMÜLLER L. Specific mismatch recognition in heteroduplex intermediates by p53 suggests a role in fidelity control of homologous recombination. *Mol Cell Biol.* **1998** Sep; 18(9): 5332-42.
- DUDENHÖFFER C, KURTH M, JANUS F, DEPERT W, WIESMÜLLER L. Dissociation of the recombination control and the sequence-specific transactivation function of P53. *Oncogene.* **1999** Oct 14; 18(42): 5773-84.
- EDITORIAL. Whither RNAi? *Nat Cell Biol.* **2003** Jun; 5(6): 489-90.
- ELBASHIR SM, LENDECKEL W, TUSCHL T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* **2001a** Jan 15; 15(2): 188-200.
- ELBASHIR SM, HARBORTH J, LENDECKEL W, YALCIN A, WEBER K, TUSCHL T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* **2001b** May 24; 411(6836): 494-8.
- ELBASHIR SM, HARBORTH J, WEBER K, TUSCHL T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods.* **2002** Feb; 26(2): 199-213.
- ESSERS J, HENDRIKS RW, SWAGEMAKERS SM, TROELSTRA C, DE WIT J, BOOTSMA D, HOEIJMAKERS JH, KANAAR R. Disruption of mouse RAD54 reduces ionizing radiation resistance and homologous recombination. *Cell.* **1997** Apr 18; 89(2): 195-204.
- ESSERS J, VAN STEEG H, DE WIT J, SWAGEMAKERS SM, VERMEIJ M, HOEIJMAKERS JH, KANAAR R. Homologous and non-homologous recombination differentially affect DNA damage repair in mice. *EMBO J.* **2000** Apr 3; 19(7): 1703-10.
- ESSERS J, HOUTSMULLER AB, VAN VEELEN L, PAULUSMA C, NIGG AL, PASTINK A, VERMEULEN W, HOEIJMAKERS JH, KANAAR R. Nuclear dynamics of RAD52 group homologous recombination proteins in response to DNA damage. *EMBO J.* **2002** Apr 15; 21(8): 2030-7.
- FEARON ER, VOGELSTEIN B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* **1990** Jun 1; 61(5): 759-67.
- FINNIE NJ, GOTTLIEB TM, BLUNT T, JEGGO PA, JACKSON SP. 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.* **1995** Jan 3; 92(1): 320-4.
- FIRE A, XU S, MONTGOMERY MK, KOSTAS SA, DRIVER SE, MELLO CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* **1998** Feb 19; 391(6669): 806-11.
- FLYGARE J, BENSON F, HELLGREN D. Expression of the human RAD51 gene during the cell cycle in primary human peripheral blood lymphocytes. *Biochim Biophys Acta.* **1996** Jul 24; 1312(3): 231-6.
- FRENCH CA, MASSON JY, GRIFFIN CS, O'REGAN P, WEST SC, THACKER J. Role of mammalian RAD51L2 (RAD51C) in recombination and genetic stability. *J Biol Chem.* **2002** May 31; 277(22): 19322-30.
- FUJIMORI A, TACHIIRI S, SONODA E, THOMPSON LH, DHAR PK, HIRAOKA M, TAKEDA S, ZHANG Y, RETH M, TAKATA M. Rad52 partially substitutes for the Rad51 paralog XRCC3 in maintaining chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.* **2001** Oct 1; 20(19): 5513-20.
- FUKUSHIMA T, TAKATA M, MORRISON C, ARAKI R, FUJIMORI A, ABE M, TATSUMI K, JASIN M, DHAR PK, SONODA E, CHIBA T, TAKEDA S. Genetic analysis of the DNA-dependent protein

- kinase reveals an inhibitory role of Ku in late S-G₂ phase DNA double-strand break repair. *J Biol Chem.* **2001** Nov 30; 276(48): 44413-8.
- FULLER LF, PAINTER RB. A Chinese hamster ovary cell line hypersensitive to ionizing radiation and deficient in repair replication. *Mutat Res.* **1988** Mar; 193(2): 109-21.
- GASIOR SL, OLIVARES H, EAR U, HARI DM, WEICHSELBAUM R, BISHOP DK. Assembly of RecA-like recombinases: distinct roles for mediator proteins in mitosis and meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2001** Jul 17; 98(15): 8411-8.
- GIL J, ESTEBAN M. Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis.* **2000** Apr; 5(2): 107-14.
- GODTHELP BC, WIEGANT WW, VAN DUJIN-GOEDHART A, SCHARER OD, VAN BUUL PP, KANAAR R, ZDZIENICKA MZ. Mammalian Rad51C contributes to DNA cross-link resistance, sister chromatid cohesion and genomic stability. *Nucleic Acids Res.* **2002a** May 15; 30(10):2172-82.
- GODTHELP BC, ARTWERT F, JOENJE H, ZDZIENICKA MZ. Impaired DNA damage-induced nuclear Rad51 foci formation uniquely characterizes Fanconi anemia group D1. *Oncogene.* **2002b** Jul 25; 21(32): 5002-5.
- GOLUB EI, GUPTA RC, HAAF T, WOLD MS, RADDING CM. Interaction of human Rad51 recombination protein with single-stranded DNA binding protein, RPA. *Nucleic Acids Res.* **1998** Dec 1; 26(23): 5388-93.
- GRIFFIN CS, SIMPSON PJ, WILSON CR, THACKER J. Mammalian recombination-repair genes XRCC2 and XRCC3 promote correct chromosome segregation. *Nat Cell Biol.* **2000** Oct; 2(10): 757-61.
- GROTE SJ, JOSHI GP, REVELL SH, SHAW CA. Observations of radiation-induced chromosome fragment loss in live mammalian cells in culture, and its effect on colony-forming ability. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* **1981** Apr; 39(4): 395-408.
- GRÜNWELLER A, WYSZKO E, BIEBER B, JAHNEL R, ERDMANN VA, KURRECK J. Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA. *Nucleic Acids Res.* **2003** Jun 15; 31(12): 3185-93.
- GUPTA RC, BAZEMORE LR, GOLUB EI, RADDING CM. Activities of human recombination protein Rad51. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1997** Jan 21; 94(2): 463-8.
- HAAF T, GOLUB EI, REDDY G, RADDING CM, WARD DC. Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1995** Mar 14; 92(6): 2298-302.
- HAAF T, RADERSCHALL E, REDDY G, WARD DC, RADDING CM, GOLUB EI. Sequestration of mammalian Rad51-recombination protein into micronuclei. *J Cell Biol.* **1999** Jan 11; 144(1): 11-20.
- HABER JE. DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem Sci.* **1999** Jul; 24(7): 271-5.
- HAMILTON AJ, BAULCOMBE DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science.* **1999** Oct 29; 286(5441): 950-2.
- HAMMOND SM, BERNSTEIN E, BEACH D, HANNON GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature.* **2000** Mar 16; 404(6775): 293-6.

- HAMMOND SM, CAUDY AA, HANNON GJ. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet.* **2001** Feb; 2(2): 110-9.
- HANNON GJ. RNA interference. *Nature.* **2002** Jul 11; 418(6894): 244-51.
- HARBORTH J, ELBASHIR SM, BECHERT K, TUSCHL T, WEBER K. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci.* **2001** Dec; 114(Pt 24): 4557-65.
- HEMMINGS-MIESZCZAK M, DORN G, NATT FJ, HALL J, WISHART WL. Independent combinatorial effect of antisense oligonucleotides and RNAi-mediated specific inhibition of the recombinant rat P2X₃ receptor. *Nucleic Acids Res.* **2003** Apr 15; 31(8): 2117-26.
- HENNING W, STÜRZBECHER HW. Homologous recombination and cell cycle checkpoints: Rad51 in tumour progression and therapy resistance. *Toxicology.* **2003** Nov 15; 193(1-2): 91-109.
- HOLEN T, AMARZGUIOUI M, WIIGER MT, BABAIE E, PRYDZ H. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. *Nucleic Acids Res.* **2002** Apr 15; 30(8): 1757-66.
- HUNTER T, HUNT T, JACKSON RJ, ROBERTSON HD. The characteristics of inhibition of protein synthesis by double-stranded ribonucleic acid in reticulocyte lysates. *J Biol Chem.* **1975** Jan 25; 250(2): 409-17.
- JACHYMCZYK WJ, VON BORSTEL RC, MOWAT MR, HASTINGS PJ. Repair of interstrand cross-links in DNA of *Saccharomyces cerevisiae* requires two systems for DNA repair: the RAD3 system and the RAD51 system. *Mol Gen Genet.* **1981**; 182(2): 196-205.
- JANZ C, WIESMÜLLER L. Wild-type p53 inhibits replication-associated homologous recombination. *Oncogene.* **2002** Aug 29; 21(38): 5929-33.
- JEGGO PA, KEMPLM, HOLLIDAY R. The application of the microbial "tooth-pick" technique to somatic cell genetics, and its use in the isolation of X-ray sensitive mutants of Chinese hamster ovary cells. *Biochimie.* **1982** Aug-Sep; 64(8-9): 713-5.
- JEGGO PA, KEMP LM. X-ray-sensitive mutants of Chinese hamster ovary cell line. Isolation and cross-sensitivity to other DNA-damaging agents. *Mutat Res.* **1983** Dec; 112(6): 313-27.
- JEGGO PA, HOLLIDAY R. Azacytidine-induced reactivation of a DNA repair gene in Chinese hamster ovary cells. *Mol Cell Biol.* **1986** Aug; 6(8): 2944-9.
- JIANG H, XIE Y, HOUSTON P, STEMKE-HALE K, MORTENSEN UH, ROTHSTEIN R, KODADEK T. Direct association between the yeast Rad51 and Rad54 recombination proteins. *J Biol Chem.* **1996** Dec 27; 271(52): 33181-6.
- JOHNSON RD, LIU N, JASIN M. Mammalian XRCC2 promotes the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination. *Nature.* **1999** Sep 23; 401(6751): 397-9.
- JOHNSON RD, JASIN M. Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *EMBO J.* **2000** Jul 3; 19(13): 3398-407.
- JONES NJ, COX R, THACKER J. Isolation and cross-sensitivity of X-ray-sensitive mutants of V79-4 hamster cells. *Mutat Res.* **1987** May; 183(3): 279-86.
- JONES NJ, ZHAO Y, SICILIANO MJ, THOMPSON LH. Assignment of the XRCC2 human DNA repair gene to chromosome 7q36 by complementation analysis. *Genomics.* **1995** Apr 10; 26(3): 619-22.

- JOSHI GP, NELSON WJ, REVELL SH, SHAW CA. Discrimination of slow growth from non-survival among small colonies of diploid Syrian hamster cells after chromosome damage induced by a range of x-ray doses. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* **1982** Sep; 42(3): 283-96.
- KAGAWA W, KURUMIZAKA H, IKAWA S, YOKOYAMA S, SHIBATA T. Homologous pairing promoted by the human Rad52 protein. *J Biol Chem.* **2001** Sep 14; 276(37): 35201-8.
- KANAAR R, TROELSTRA C, SWAGEMAKERS SM, ESSERS J, SMIT B, FRANSSSEN JH, PASTINK A, BEZZUBOVA OY, BUERSTEDDE JM, CLEVER B, HEYER WD, HOEIJMAKERS JH. Human and mouse homologs of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD54 DNA repair gene: evidence for functional conservation. *Curr Biol.* **1996** Jul 1; 6(7): 828-38.
- KAO FT, PUCK TT. Genetics of somatic mammalian cells, VII. Induction and isolation of nutritional mutants in Chinese hamster cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1968** Aug; 60(4): 1275-81.
- KATOME T, OBATA T, MATSUSHIMA R, MASUYAMA N, CANTLEY LC, GOTOH Y, KISHI K, SHIOTA H, EBINA Y. Use of RNA interference-mediated gene silencing and adenoviral overexpression to elucidate the roles of AKT/protein kinase B isoforms in insulin actions. *J Biol Chem.* **2003** Jul 25; 278(30): 28312-23.
- KENNERDELL JR, CARTHEW RW. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell.* **1998** Dec 23; 95(7): 1017-26.
- KHANNA KK, JACKSON SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet.* **2001** Mar; 27(3): 247-54.
- KNIPPERS R. Molekulare Genetik. *Thieme-Verlag, Stuttgart.* **1995.**
- KRAAKMAN-VAN DER ZWET M, OVERKAMP WJ, VAN LANGE RE, ESSERS J, VAN DUIJN-GOEDHART A, WIGGERS I, SWAMINATHAN S, VAN BUUL PP, ERRAMI A, TAN RT, JASPERS NG, SHARAN SK, KANAAR R, ZDZIENICKA MZ. Brca2 (XRCC11) deficiency results in radioresistant DNA synthesis and a higher frequency of spontaneous deletions. *Mol Cell Biol.* **2002** Jan; 22(2): 669-79.
- KRAUS E, LEUNG WY, HABER JE. Break-induced replication: a review and an example in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2001** Jul 17; 98(15): 8255-62.
- KUMAR M, CARMICHAEL GG. Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev.* **1998** Dec; 62(4): 1415-34.
- KURRECK J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem.* **2003** Apr; 270(8): 1628-44.
- KURUMIZAKA H, IKAWA S, NAKADA M, EDA K, KAGAWA W, TAKATA M, TAKEDA S, YOKOYAMA S, SHIBATA T. homologous-pairing activity of the human DNA-repair proteins Xrcc3•Rad51C. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2001** May 8; 98(10): 5538-43.
- KURUMIZAKA H, IKAWA S, NAKADA M, ENOMOTO R, KAGAWA W, KINEBUCHI T, YAMAZOE M, YOKOYAMA S, SHIBATA T. Homologous pairing and ring and filament structure formation activities of the human Xrcc2*Rad51D complex. *J Biol Chem.* **2002** Apr 19; 277(16): 14315-20.
- LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **1970** Aug 15; 227(259): 680-5.
- LAMBERT S, LOPEZ BS. Characterization of mammalian RAD51 double strand break repair using non-lethal dominant-negative forms. *EMBO J.* **2000** Jun 15; 19(12): 3090-9.

- LARMINAT F, GERMANIER M, PAPOULI E, DEFAIS M. Deficiency in BRCA2 leads to increase in non-conservative homologous recombination. *Oncogene*. **2002** Aug 1; 21(33): 5188-92.
- LEVY-LAHAD E, LAHAD A, EISENBERG S, DAGAN E, PAPERNA T, KASINETZ L, CATANE R, KAUFMAN B, BELLER U, RENBAUM P, GERSHONI-BARUCH R. A single nucleotide polymorphism in the RAD51 gene modifies cancer risk in BRCA2 but not BRCA1 carriers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2001** Mar 13; 98(6): 3232-6.
- LI MJ, PEAKMAN MC, GOLUB EI, REDDY G, WARD DC, RADDING CM, MAIZELS N. Rad51 expression and localization in B cells carrying out class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1996** Sep 17; 93(19): 10222-7.
- LI L, PETERSON CA, LU X, WEI P, LEGERSKI RJ. Interstrand cross-links induce DNA synthesis in damaged and undamaged plasmids in mammalian cell extracts. *Mol Cell Biol*. **1999** Aug; 19(8): 5619-30.
- LIANG F, HAN M, ROMANIENKO PJ, JASIN M. Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1998** Apr 28; 95(9): 5172-7.
- LIM DS, HASTY P. A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. *Mol Cell Biol*. **1996** Dec; 16(12): 7133-43.
- LIN FL, SPERLE K, STERNBERG N. Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process. *Mol Cell Biol*. **1984** Jun; 4(6): 1020-34.
- LIN Y, LUKACSOVICH T, WALDMAN AS. Multiple pathways for repair of DNA double-strand breaks in mammalian chromosomes. *Mol Cell Biol*. **1999** Dec; 19(12): 8353-60.
- LINKE SP, SENGUPTA S, KHABIE N, JEFFRIES BA, BUCHHOP S, MISKA S, HENNING W, PEDEUX R, WANG XW, HOFSETH LJ, YANG Q, GARFIELD SH, STÜRZBECHER HW, HARRIS CC. p53 interacts with hRAD51 and hRAD54, and directly modulates homologous recombination. *Cancer Res*. **2003** May 15; 63(10): 2596-605.
- LIU N, LAMERDIN JE, TEBBS RS, SCHILD D, TUCKER JD, SHEN MR, BROOKMAN KW, SICILIANO MJ, WALTER CA, FAN W, NARAYANA LS, ZHOU ZQ, ADAMSON AW, SORENSEN KJ, CHEN DJ, JONES NJ, THOMPSON LH. XRCC2 and XRCC3, new human Rad51-family members, promote chromosome stability and protect against DNA cross-links and other damages. *Mol Cell*. **1998** May; 1(6): 783-93.
- LIU Y, MAIZELS N. Coordinated response of mammalian Rad51 and Rad52 to DNA damage. *EMBO Rep*. **2000** Jul; 1(1): 85-90.
- LIU N, SCHILD D, THELEN MP, THOMPSON LH. Involvement of Rad51C in two distinct protein complexes of Rad51 paralogs in human cells. *Nucleic Acids Res*. **2002** Feb 15; 30(4): 1009-15.
- LIU N. XRCC2 is Required for the Formation of Rad51 Foci Induced by Ionizing Radiation and DNA Cross-Linking Agent Mitomycin C. *J Biomed Biotechnol*. **2002** 2(2): 106-113.
- LO T, PELLEGRINI L, VENKITARAMAN AR, BLUNDELL TL. Sequence fingerprints in BRCA2 and RAD51: implications for DNA repair and cancer. *DNA Repair (Amst)*. **2003** Sep 18; 2(9): 1015-28.
- MAACKER H, JOST K, OPITZ S, MISKA S, YUAN Y, HASSELBACH L, LUTTGES J, KALTHOFF H, STURZBECHER HW. DNA repair and recombination factor Rad51 is over-expressed in human pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene*. **2000a** May 25; 19(23): 2791-5.

- MAACKE H, OPITZ S, JOST K, HAMDORF W, HENNING W, KRUGER S, FELLER AC, LOPENS A, DIEDRICH K, SCHWINGER E, STURZBECHER HW. Over-expression of wild-type Rad51 correlates with histological grading of invasive ductal breast cancer. *Int J Cancer*. **2000b** Dec 15; 88(6): 907-13.
- MALKOVA A, IVANOV EL, HABER JE. Double-strand break repair in the absence of RAD51 in yeast: a possible role for break-induced DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1996** Jul 9; 93(14): 7131-6.
- MASSON JY, STASIAK AZ, STASIAK A, BENSON FE, WEST SC. Complex formation by the human RAD51C and XRCC3 recombination repair proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2001a** Jul 17; 98(15): 8440-6.
- MASSON JY, TARSOUNAS MC, STASIAK AZ, STASIAK A, SHAH R, MCILWRAITH MJ, BENSON FE, WEST SC. Identification and purification of two distinct complexes containing the five RAD51 paralogs. *Genes Dev*. **2001b** Dec 15; 15(24): 3296-307.
- MAZIN AV, ALEXEEV AA, KOWALCZYKOWSKI SC. A novel function of Rad54 protein. Stabilization of the Rad51 nucleoprotein filament. *J Biol Chem*. **2003** Apr 18; 278(16): 14029-36.
- MCHUGH PJ, SONES WR, HARTLEY JA. Repair of intermediate structures produced at DNA interstrand cross-links in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. **2000** May; 20(10): 3425-33.
- MCHUGH PJ, SPANSWICK VJ, HARTLEY JA. Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance. *Lancet Oncol*. **2001** Aug; 2(8): 483-90.
- MCMANUS MT, SHARP PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet*. **2002** Oct; 3(10): 737-47.
- MILLER KA, YOSHIKAWA DM, MCCONNELL IR, CLARK R, SCHILD D, ALBALA JS. RAD51C interacts with RAD51B and is central to a larger protein complex in vivo exclusive of RAD51. *J Biol Chem*. **2002** Mar 8; 277(10): 8406-11.
- MILLER H, GROLLMAN AP. DNA repair investigations using siRNA. *DNA Repair (Amst)*. **2003** Jun 11; 2(6): 759-63.
- MISQUITTA L, PATERSON BM. Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1999** Feb 16; 96(4): 1451-6.
- MORITA T, YOSHIMURA Y, YAMAMOTO A, MURATA K, MORI M, YAMAMOTO H, MATSUSHIRO A. A mouse homolog of the *Escherichia coli* recA and *Saccharomyces cerevisiae* RAD51 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1993** Jul 15; 90(14): 6577-80.
- MORTENSEN UH, BENDIXEN C, SUNJEVARIC I, ROTHSTEIN R. DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1996** Oct 1; 93(20): 10729-34.
- MOYNAHAN ME, JASIN M. Loss of heterozygosity induced by a chromosomal double-strand break. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1997** Aug 19; 94(17): 8988-93.
- MOZDARANI H, LIU N, JONES NJ, BRYANT PE. The XRCC2 human repair gene influences recombinational rearrangements leading to chromatid breaks. *Int J Radiat Biol*. **2001** Aug; 77(8): 859-65.
- NAPOLI C, LEMIEUX C, JORGENSEN R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*. **1990** Apr; 2(4): 279-289.

- NEW JH, SUGIYAMA T, ZAITSEVA E, KOWALCZYKOWSKI SC. Rad52 protein stimulates DNA strand exchange by Rad51 and replication protein A. *Nature*. **1998** Jan 22; 391(6665): 407-10.
- NGO H, TSCHUDI C, GULL K, ULLU E. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1998** Dec 8; 95(25): 14687-92.
- NYKÄNEN A, HALEY B, ZAMORE PD. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*. **2001** Nov 2; 107(3): 309-21.
- OGAWA T, YU X, SHINOHARA A, EGELMAN EH. Similarity of the yeast RAD51 filament to the bacterial RecA filament. *Science*. **1993** Mar 26; 259(5103): 1896-9.
- OHNISHI T, TAKI T, HIRAGA S, ARITA N, MORITA T. In vitro and in vivo potentiation of radiosensitivity of malignant gliomas by antisense inhibition of the RAD51 gene. *Biochem Biophys Res Commun*. **1998** Apr 17; 245(2): 319-24.
- O'REGAN P, WILSON C, TOWNSEND S, THACKER J. XRCC2 is a nuclear RAD51-like protein required for damage-dependent RAD51 focus formation without the need for ATP binding. *J Biol Chem*. **2001** Jun 22; 276(25): 22148-53.
- ORTIZ T, LOPEZ S, BURGUILLOS MA, EDREIRA A, PINERO J. Radiosensitizer effect of wortmannin in radioresistant bladder tumoral cell lines. *Int J Oncol*. **2004** Jan; 24(1): 169-75.
- PANASCI L, PAIEMENT JP, CHRISTODOULOPOULOS G, BELENKOV A, MALAPETSA A, ALOYZ R. Chlorambucil drug resistance in chronic lymphocytic leukemia: the emerging role of DNA repair. *Clin Cancer Res*. **2001** Mar; 7(3): 454-61.
- PÂQUES F, HABER JE. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*. **1999** Jun; 63(2): 349-404.
- PATEL KJ, YU VP, LEE H, CORCORAN A, THISTLETHWAITE FC, EVANS MJ, COLLEDGE WH, FRIEDMAN LS, PONDER BA, VENKITARAMAN AR. Involvement of Brca2 in DNA repair. *Mol Cell*. **1998** Feb; 1(3): 347-57.
- PENG Y, ZHANG Q, NAGASAWA H, OKAYASU R, LIBER HL, BEDFORD JS. Silencing expression of the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase by small interfering RNA sensitizes human cells for radiation-induced chromosome damage, cell killing, and mutation. *Cancer Res*. **2002** Nov 15; 62(22): 6400-4.
- PETUKHOVA G, STRATTON S, SUNG P. Catalysis of homologous DNA pairing by yeast Rad51 and Rad54 proteins. *Nature*. **1998** May 7; 393(6680): 91-4.
- PETUKHOVA G, VAN KOMEN S, VERGANO S, KLEIN H, SUNG P. Yeast Rad54 promotes Rad51-dependent homologous DNA pairing via ATP hydrolysis-driven change in DNA double helix conformation. *J Biol Chem*. **1999** Oct 8; 274(41): 29453-62.
- PFEIFFER P. The mutagenic potential of DNA double-strand break repair. *Toxicol Lett*. **1998** Aug; 96-97: 119-29.
- PFEIFFER P, GOEDECKE W, OBE G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis*. **2000** Jul; 15(4): 289-302.
- PIERCE AJ, JOHNSON RD, THOMPSON LH, JASIN M. XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells. *Genes Dev*. **1999** Oct 15; 13(20): 2633-8.
- PIERCE AJ, HU P, HAN M, ELLIS N, JASIN M. Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells. *Genes Dev*. **2001** Dec 15; 15(24): 3237-42.

- PITTMAN DL, WEINBERG LR, SCHIMENTI JC. Identification, characterization, and genetic mapping of Rad51d, a new mouse and human RAD51/RecA-related gene. *Genomics*. **1998** Apr 1; 49(1): 103-11.
- PITTMAN DL, SCHIMENTI JC. Midgestation lethality in mice deficient for the RecA-related gene, Rad51d/Rad5113. *Genesis*. **2000** Mar; 26(3): 167-73.
- PLUG AW, XU J, REDDY G, GOLUB EI, ASHLEY T. Presynaptic association of Rad51 protein with selected sites in meiotic chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1996** Jun 11; 93(12): 5920-4.
- PLUTH JM, FRIED LM, KIRCHGESSNER CU. Severe combined immunodeficient cells expressing mutant hRAD54 exhibit a marked DNA double-strand break repair and error-prone chromosome repair defect. *Cancer Res*. **2001** Mar 15; 61(6): 2649-55.
- PUCK TT, CIECIURA SJ, ROBINSON A. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med*. **1958** Dec 1; 108(6): 945-56.
- RADERSCHALL E, GOLUB EI, HAAF T. Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions formed after DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1999** Mar 2; 96(5): 1921-6.
- RADERSCHALL E, STOUT K, FREIER S, SUCKOW V, SCHWEIGER S, HAAF T. Elevated levels of Rad51 recombination protein in tumor cells. *Cancer Res*. **2002** Jan 1; 62(1): 219-25.
- RICHARDSON C, MOYNAHAN ME, JASIN M. Double-strand break repair by interchromosomal recombination: suppression of chromosomal translocations. *Genes Dev*. **1998** Dec 15; 12(24): 3831-42.
- RICHARDSON C, JASIN M. Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. *Nature*. **2000** Jun 8; 405(6787): 697-700.
- RIJKERS T, VAN DEN OUWELAND J, MOROLLI B, ROLINK AG, BAARENDS WM, VAN SLOUN PP, LOHMAN PH, PASTINK A. Targeted inactivation of mouse RAD52 reduces homologous recombination but not resistance to ionizing radiation. *Mol Cell Biol*. **1998** Nov; 18(11): 6423-9.
- RISTIC D, WYMAN C, PAULUSMA C, KANAAR R. The architecture of the human Rad54-DNA complex provides evidence for protein translocation along DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2001** Jul 17; 98(15): 8454-60.
- ROMANO N, MACINO G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol*. **1992** Nov; 6(22): 3343-53.
- ROTHKAMM K, KRUGER I, THOMPSON LH, LOBRICH M. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol*. **2003** Aug; 23(16): 5706-15.
- RUSSELL JS, BRADY K, BURGAN WE, CERRA MA, OSWALD KA, CAMPHAUSEN K, TOFILON PJ. Gleevec-mediated inhibition of Rad51 expression and enhancement of tumor cell radiosensitivity. *Cancer Res*. **2003** Nov 1; 63(21): 7377-83.
- SAINTIGNY Y, DELACOTE F, VARES G, PETITOT F, LAMBERT S, AVERBECK D, LOPEZ BS. Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells. *EMBO J*. **2001** Jul 16; 20(14): 3861-70.
- SAINTIGNY Y, LOPEZ BS. Homologous recombination induced by replication inhibition, is stimulated by expression of mutant p53. *Oncogene*. **2002** Jan 17; 21(3): 488-92.

- SANFORD KK, PARSHAD R, GANTT R, TARONE RE, JONES GM, PRICE FM. Factors affecting and significance of G₂ chromatin radiosensitivity in predisposition to cancer. *Int J Radiat Biol.* **1989** Jun; 55(6):963-81.
- SAUER, R. Strahlenpathologie. in: KAUFFMANN GW, MOSER E, SAUER R. Radiologie. *Urban & Fischer, München.* **2001.**
- SARKARIA JN, ESHLEMAN JS. ATM as a target for novel radiosensitizers. *Semin Radiat Oncol.* **2001** Oct; 11(4): 316-27.
- SCHERR M, MORGAN MA, EDER M. Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells. *Curr Med Chem.* **2003** Feb; 10(3): 245-56.
- SCHILD D, LIO YC, COLLINS DW, TSOMONDO T, CHEN DJ. Evidence for simultaneous protein interactions between human Rad51 paralogs. *J Biol Chem.* **2000** Jun 2; 275(22): 16443-9.
- SCHMID E, BAUCHINGER M. Analysis of primary processes in the formation of acentric fragments. *Radiat Environ Biophys.* **1980** Feb; 17(2): 143-9.
- SCOTT D, BARBER JB, SPREADBOROUGH AR, BURRILL W, ROBERTS SA. Increased chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a comparison of two assays. *Int J Radiat Biol.* **1999** Jan; 75(1): 1-10.
- SCOTT D. Chromosomal radiosensitivity, cancer predisposition and response to radiotherapy. *Strahlenther Onkol.* **2000** May; 176(5): 229-34.
- SCULLY R, CHEN J, PLUG A, XIAO Y, WEAVER D, FEUNTEUN J, ASHLEY T, LIVINGSTON DM. Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell.* **1997a** Jan 24; 88(2): 265-75.
- SCULLY R, CHEN J, OCHS RL, KEEGAN K, HOEKSTRA M, FEUNTEUN J, LIVINGSTON DM. Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell.* **1997b** Aug 8; 90(3): 425-35.
- SHARAN SK, MORIMATSU M, ALBRECHT U, LIM DS, REGEL E, DINH C, SANDS A, EICHELE G, HASTY P, BRADLEY A. Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature.* **1997** Apr 24; 386(6627): 804-10.
- SHEN Z, DENISON K, LOBB R, GATEWOOD JM, CHEN DJ. The human and mouse homologs of the yeast RAD52 gene: cDNA cloning, sequence analysis, assignment to human chromosome 12p12.2-p13, and mRNA expression in mouse tissues. *Genomics.* **1995** Jan 1; 25(1): 199-206.
- SHINOHARA A, OGAWA H, MATSUDA Y, USHIO N, IKEO K, OGAWA T. Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to RAD51 and recA. *Nat Genet.* **1993** Jul; 4(3): 239-43.
- SHINOHARA A, OGAWA T. Homologous recombination and the roles of double-strand breaks. *Trends Biochem Sci.* **1995** Oct; 20(10): 387-91.
- SHINOHARA A, OGAWA T. Stimulation by Rad52 of yeast Rad51-mediated recombination. *Nature.* **1998** Jan 22; 391(6665): 404-7.
- SHINOHARA A, SHINOHARA M, OHTA T, MATSUDA S, OGAWA T. Rad52 forms ring structures and co-operates with RPA in single-strand DNA annealing. *Genes Cells.* **1998** Mar; 3(3): 145-56.
- SHU Z, SMITH S, WANG L, RICE MC, KMEIC EB. Disruption of muREC2/RAD51L1 in mice results in early embryonic lethality which can be partially rescued in a p53(-/-) background. *Mol Cell Biol.* **1999** Dec; 19(12): 8686-93.

- SIGNON L, MALKOVA A, NAYLOR ML, KLEIN H, HABER JE. Genetic requirements for RAD51- and RAD54-independent break-induced replication repair of a chromosomal double-strand break. *Mol Cell Biol.* **2001** Mar; 21(6): 2048-56.
- SIGURDSSON S, TRUJILLO K, SONG B, STRATTON S, SUNG P. Basis for avid homologous DNA strand exchange by human Rad51 and RPA. *J Biol Chem.* **2001a** Mar 23; 276(12): 8798-806.
- SIGURDSSON S, VAN KOMEN S, BUSSEN W, SCHILD D, ALBALA JS, SUNG P. Mediator function of the human Rad51B-Rad51C complex in Rad51/RPA-catalyzed DNA strand exchange. *Genes Dev.* **2001b** Dec 15; 15(24): 3308-18.
- SINGLETON BK, PRIESTLEY A, STEINGRIMSDOTTIR H, GELL D, BLUNT T, JACKSON SP, LEHMANN AR, JEGGO PA. Molecular and biochemical characterization of xrs mutants defective in Ku80. *Mol Cell Biol.* **1997** Mar; 17(3): 1264-73.
- SLADEK FM, MUNN MM, RUPP WD, HOWARD-FLANDERS P. In vitro repair of psoralen-DNA cross-links by RecA, UvrABC, and the 5'-exonuclease of DNA polymerase I. *J Biol Chem.* **1989** Apr 25; 264(12): 6755-65.
- SLUPIANEK A, SCHMUTTE C, TOMBLINE G, NIEBOROWSKA-SKORSKA M, HOSER G, NOWICKI MO, PIERCE AJ, FISHEL R, SKORSKI T. BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs, resulting in drug resistance. *Mol Cell.* **2001** Oct; 8(4): 795-806.
- SLUPIANEK A, HOSER G, MAJSTEREK I, BRONISZ A, MALECKI M, BLASIAK J, FISHEL R, SKORSKI T. Fusion tyrosine kinases induce drug resistance by stimulation of homology-dependent recombination repair, prolongation of G(2)/M phase, and protection from apoptosis. *Mol Cell Biol.* **2002** Jun; 22(12): 4189-201.
- SMITH PK, KROHN RI, HERMANSON GT, MALLIA AK, GARTNER FH, PROVENZANO MD, FUJIMOTO EK, GOEKE NM, OLSON BJ, KLENK DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* **1985** Oct; 150(1):7 6-85.
- SOLINGER JA, LUTZ G, SUGIYAMA T, KOWALCZYKOWSKI SC, HEYER WD. Rad54 protein stimulates heteroduplex DNA formation in the synaptic phase of DNA strand exchange via specific interactions with the presynaptic Rad51 nucleoprotein filament. *J Mol Biol.* **2001** Apr 13; 307(5): 1207-21.
- SOLINGER JA, HEYER WD. Rad54 protein stimulates the postsynaptic phase of Rad51 protein-mediated DNA strand exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2001** Jul 17; 98(15): 8447-53.
- SONG B, SUNG P. Functional interactions among yeast Rad51 recombinase, Rad52 mediator, and replication protein A in DNA strand exchange. *J Biol Chem.* **2000** May 26; 275(21): 15895-904.
- SONODA E, SASAKI MS, BUERSTEDDE JM, BEZZUBOVA O, SHINOHARA A, OGAWA H, TAKATA M, YAMAGUCHI-IWAI Y, TAKEDA S. Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *EMBO J.* **1998** Jan 15; 17(2): 598-608.
- STARK GR, KERR IM, WILLIAMS BR, SILVERMAN RH, SCHREIBER RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem.* **1998**; 67: 227-64.
- STARK JM, HU P, PIERCE AJ, MOYNAHAN ME, ELLIS N, JASIN M. ATP hydrolysis by mammalian RAD51 has a key role during homology-directed DNA repair. *J Biol Chem.* **2002** Jun 7; 277(23): 20185-94.
- STÜRZBECHER HW, DONZELMANN B, HENNING W, KNIPPSCHILD U, BUCHHOP S. p53 is linked directly to homologous recombination processes via RAD51/RecA protein interaction. *EMBO J.* **1996** Apr 15; 15(8): 1992-2002.

- SUGIYAMA T, ZAITSEVA EM, KOWALCZYKOWSKI SC. A single-stranded DNA-binding protein is needed for efficient presynaptic complex formation by the *Saccharomyces cerevisiae* Rad51 protein. *J Biol Chem.* **1997** Mar 21; 272(12): 7940-5.
- SUGIYAMA T, KOWALCZYKOWSKI SC. Rad52 protein associates with replication protein A (RPA)-single-stranded DNA to accelerate Rad51-mediated displacement of RPA and presynaptic complex formation. *J Biol Chem.* **2002** Aug 30; 277(35): 31663-72.
- SUNG P. Catalysis of ATP-dependent homologous DNA pairing and strand exchange by yeast RAD51 protein. *Science.* **1994** Aug 26; 265(5176): 1241-3.
- SUNG P, ROBBERSON DL. DNA strand exchange mediated by a RAD51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA. *Cell.* **1995** Aug 11; 82(3): 453-61.
- SUNG P. Yeast Rad55 and Rad57 proteins form a heterodimer that functions with replication protein A to promote DNA strand exchange by Rad51 recombinase. *Genes Dev.* **1997a** May 1; 11(9): 1111-21.
- SUNG P. Function of yeast Rad52 protein as a mediator between replication protein A and the Rad51 recombinase. *J Biol Chem.* **1997b** Nov 7; 272(45): 28194-7.
- SUNG P, KREJCI L, VAN KOMEN S, SEHORN MG. Rad51 recombinase and recombination mediators. *J Biol Chem.* **2003** Oct 31; 278(44): 42729-32.
- SÜBE S, JANZ C, JANUS F, DEPERT W, WIESMÜLLER L. Role of heteroduplex joints in the functional interactions between human Rad51 and wild-type p53. *Oncogene.* **2000** Sep 14; 19(39): 4500-12.
- SWAGEMAKERS SM, ESSERS J, DE WIT J, HOEIJMAKERS JH, KANAAR R. The human RAD54 recombinational DNA repair protein is a double-stranded DNA-dependent ATPase. *J Biol Chem.* **1998** Oct 23; 273(43): 28292-7.
- SYMINGTON LS. Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev.* **2002** Dec; 66(4): 630-70
- SZOSTAK JW, ORR-WEAVER TL, ROTHSTEIN RJ, STAHL FW. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell.* **1983** May; 33(1): 25-35.
- TAKATA M, SASAKI MS, SONODA E, MORRISON C, HASHIMOTO M, UTSUMI H, YAMAGUCHI-IWAI Y, SHINOHARA A, TAKEDA S. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.* **1998** Sep 15; 17(18): 5497-508.
- TAKATA M, SASAKI MS, SONODA E, FUKUSHIMA T, MORRISON C, ALBALA JS, SWAGEMAKERS SM, KANAAR R, THOMPSON LH, TAKEDA S. The Rad51 paralog Rad51B promotes homologous recombinational repair. *Mol Cell Biol.* **2000** Sep; 20(17): 6476-82.
- TAKATA M, SASAKI MS, TACHIIRI S, FUKUSHIMA T, SONODA E, SCHILD D, THOMPSON LH, TAKEDA S. Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five Rad51 paralogs. *Mol Cell Biol.* **2001** Apr; 21(8): 2858-66.
- TAKI T, OHNISHI T, YAMAMOTO A, HIRAGA S, ARITA N, IZUMOTO S, HAYAKAWA T, MORITA T. Antisense inhibition of the RAD51 enhances radiosensitivity. *Biochem Biophys Res Commun.* **1996** Jun 14; 223(2): 434-8.
- TAMBINI CE, GEORGE AM, ROMMENS JM, TSUI LC, SCHERER SW, THACKER J. The XRCC2 DNA repair gene: identification of a positional candidate. *Genomics.* **1997** Apr 1; 41(1): 84-92.

- TAN TL, ESSERS J, CITTERIO E, SWAGEMAKERS SM, DE WIT J, BENSON FE, HOEIJMAKERS JH, KANAAR R. Mouse Rad54 affects DNA conformation and DNA-damage-induced Rad51 foci formation. *Curr Biol*. **1999** Mar 25; 9(6): 325-8.
- TAN TL, KANAAR R, WYMAN C. Rad54, a Jack of all trades in homologous recombination. *DNA Repair (Amst)*. **2003** Jul 16; 2(7): 787-94.
- TANAKA K, KAGAWA W, KINEBUCHI T, KURUMIZAKA H, MIYAGAWA K. Human Rad54B is a double-stranded DNA-dependent ATPase and has biochemical properties different from its structural homolog in yeast, Tid1/Rdh54. *Nucleic Acids Res*. **2002** Mar 15; 30(6): 1346-53.
- TASHIRO S, KOTOMURA N, SHINOHARA A, TANAKA K, UEDA K, KAMADA N. S phase specific formation of the human Rad51 protein nuclear foci in lymphocytes. *Oncogene*. **1996** May 16; 12(10): 2165-70.
- TASHIRO S, WALTER J, SHINOHARA A, KAMADA N, CREMER T. Rad51 accumulation at sites of DNA damage and in postreplicative chromatin. *J Cell Biol*. **2000** Jul 24; 150(2): 283-91.
- TEBBS RS, ZHAO Y, TUCKER JD, SCHEERER JB, SICILIANO MJ, HWANG M, LIU N, LEGERSKI RJ, THOMPSON LH. Correction of chromosomal instability and sensitivity to diverse mutagens by a cloned cDNA of the XRCC3 DNA repair gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1995** Jul 3; 92(14): 6354-8.
- THACKER J, GANESH AN, STRETCH A, BENJAMIN DM, ZAHALSKY AJ, HENDRICKSON EA. Gene mutation and V(D)J recombination in the radiosensitive *irs* lines. *Mutagenesis*. **1994** Mar; 9(2): 163-8.
- THOMPSON LH, SCHILD D. Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat Res*. **2002** Nov 30; 509(1-2): 49-78.
- THOMPSON LH. Evidence that mammalian cells possess homologous recombinational repair pathways. *Mutat Res*. **1996** Jun 12; 363(2): 77-88.
- TOWBIN H, STAEGELIN T, GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1979** Sep; 76(9): 4350-4.
- TSUZUKI T, FUJII Y, SAKUMI K, TOMINAGA Y, NAKAO K, SEKIGUCHI M, MATSUSHIRO A, YOSHIMURA Y, MORITAT. Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1996** Jun 25; 93(13): 6236-40.
- TUCKER JD, JONES NJ, ALLEN NA, MINKLER JL, THOMPSON LH, CARRANO AV. Cytogenetic characterization of the ionizing radiation-sensitive Chinese hamster mutant *irs1*. *Mutat Res*. **1991** Mar; 254(2): 143-52.
- TUSCHL T, ZAMORE PD, LEHMANN R, BARTEL DP, SHARP PA. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev*. **1999** Dec 15; 13(24): 3191-7.
- TUSCHL T, siRNA user guide, www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html
- UI-TEI K, ZENNO S, MIYATA Y, SAIGO K. Sensitive assay of RNA interference in *Drosophila* and Chinese hamster cultured cells using firefly luciferase gene as target. *FEBS Lett*. **2000** Aug 18; 479(3): 79-82.
- VACA L, SAMPIERI A. Calmodulin modulates the delay period between release of calcium from internal stores and activation of calcium influx via endogenous TRP1 channels. *J Biol Chem*. **2002** Nov 1; 277(44): 42178-87.

- VAN DER KROL AR, MUR LA, BELD M, MOL JN, STUITJE AR. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell*. **1990** Apr; 2(4): 291-9.
- VAN GENT DC, HOEIJMAKERS JH, KANAAR R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet*. **2001** Mar; 2(3): 196-206.
- VAN HOUTEN B, GAMPER H, HOLBROOK SR, HEARST JE, SANCAR A. Action mechanism of ABC excision nuclease on a DNA substrate containing a psoralen crosslink at a defined position. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1986** Nov; 83(21): 8077-81.
- VAN KOMEN S, PETUKHOVA G, SIGURDSSON S, STRATTON S, SUNG P. Superhelicity-driven homologous DNA pairing by yeast recombination factors Rad51 and Rad54. *Mol Cell*. **2000** Sep; 6(3): 563-72.
- VENKITARAMAN AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*. **2002** Jan 25; 108(2): 171-82.
- VEUGER SJ, CURTIN NJ, RICHARDSON CJ, SMITH GC, DURKACZ BW. Radiosensitization and DNA repair inhibition by the combined use of novel inhibitors of DNA-dependent protein kinase and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Cancer Res*. **2003** Sep 15; 63(18): 6008-15.
- VICKERS TA, KOO S, BENNETT CF, CROOKE ST, DEAN NM, BAKER BF. Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. A comparative analysis. *J Biol Chem*. **2003** Feb 28; 278(9): 7108-18.
- VISPÉ S, CAZAUX C, LESCA C, DEFAIS M. Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation. *Nucleic Acids Res*. **1998** Jun 15; 26(12): 2859-64.
- WACHTERS FM, VAN PUTTEN JW, MARING JG, ZDZIENICKA MZ, GROEN HJ, KAMPINGA HH. Selective targeting of homologous DNA recombination repair by gemcitabine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. **2003** Oct 1; 57(2): 553-62.
- WAGENER C. Molekulare Onkologie. *Thieme-Verlag, Stuttgart*. **1999**.
- WANG Y, CORTEZ D, YAZDI P, NEFF N, ELLEDGE SJ, QIN J. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev*. **2000** Apr 15; 14(8): 927-39.
- WANG ZM, CHEN ZP, XU ZY, CHRISTODOULOPOULOS G, BELLO V, MOHR G, ALOYZ R, PANASCI LC. In vitro evidence for homologous recombinational repair in resistance to melphalan. *J Natl Cancer Inst*. **2001** Oct 3; 93(19): 1473-8.
- WATERHOUSE PM, GRAHAM MW, WANG MB. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1998** Nov 10; 95(23): 13959-64.
- WEST SC. Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2003** Jun; 4(6): 435-45.
- WHITMORE GF, VARGHESE AJ, GULYAS S. Cell cycle responses of two X-ray sensitive mutants defective in DNA repair. *Int J Radiat Biol*. **1989** Nov; 56(5): 657-65.
- WIESE C, COLLINS DW, ALBALA JS, THOMPSON LH, KRONENBERG A, SCHILD D. Interactions involving the Rad51 paralogs Rad51C and XRCC3 in human cells. *Nucleic Acids Res*. **2002** Feb 15; 30(4): 1001-8.

- WILLERS H, MCCARTHY EE, ALBERTI W, DAHM-DAPHI J, POWELL SN. Loss of wild-type p53 function is responsible for upregulated homologous recombination in immortal rodent fibroblasts. *Int J Radiat Biol.* **2000** Aug; 76(8): 1055-62.
- WINDING P, BERCHTOLD MW. The chicken B cell line DT40: a novel tool for gene disruption experiments. *J Immunol Methods.* **2001** Mar 1; 249(1-2): 1-16.
- WOLNER B, VAN KOMEN S, SUNG P, PETERSON CL. Recruitment of the recombinational repair machinery to a DNA double-strand break in yeast. *Mol Cell.* **2003** Jul; 12(1): 221-32.
- WONG AK, PERO R, ORMONDE PA, TAVTIGIAN SV, BARTEL PL. RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene *brca2*. *J Biol Chem.* **1997** Dec 19; 272(51): 31941-4.
- WU L, DAVIES SL, LEVITT NC, HICKSON ID. Potential role for the BLM helicase in recombinational repair via a conserved interaction with RAD51. *J Biol Chem.* **2001** Jun 1; 276(22): 19375-81.
- XIA SJ, SHAMMAS MA, SHMOOKLER REIS RJ. Elevated recombination in immortal human cells is mediated by HsRAD51 recombinase. *Mol Cell Biol.* **1997** Dec; 17(12): 7151-8.
- YAMAGUCHI-IWAI Y, SONODA E, BUERSTEDDE JM, BEZZUBOVA O, MORRISON C, TAKATA M, SHINOHARA A, TAKEDA S. Homologous recombination, but not DNA repair, is reduced in vertebrate cells deficient in RAD52. *Mol Cell Biol.* **1998** Nov; 18(11): 6430-5.
- YAMAMOTO A, TAKI T, YAGI H, HABU T, YOSHIDA K, YOSHIMURA Y, YAMAMOTO K, MATSUSHIRO A, NISHIMUNE Y, MORITA T. Cell cycle-dependent expression of the mouse Rad51 gene in proliferating cells. *Mol Gen Genet.* **1996** Apr 24; 251(1): 1-12.
- YANG D, LU H, ERICKSON JW. Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos. *Curr Biol.* **2000** Oct 5; 10(19): 1191-200.
- YANG S, TUTTON S, PIERCE E, YOON K. Specific double-stranded RNA interference in undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* **2001** Nov; 21(22): 7807-16.
- YOSHIKAWA K, OGAWA T, BAER R, HEMMI H, HONDA K, YAMAUCHI A, INAMOTO T, KO K, YAZUMI S, MOTODA H, KODAMA H, NOGUCHI S, GAZDAR AF, YAMAOKA Y, TAKAHASHI R. Abnormal expression of BRCA1 and BRCA1-interactive DNA-repair proteins in breast carcinomas. *Int J Cancer.* **2000** Oct 1; 88(1): 28-36.
- YOSHIMURA Y, MORITA T, YAMAMOTO A, MATSUSHIRO A. Cloning and sequence of the human RecA-like gene cDNA. *Nucleic Acids Res.* **1993** Apr 11; 21(7): 1665.
- YUAN ZM, HUANG Y, ISHIKO T, NAKADA S, UTSUGISAWA T, KHARBANDA S, WANG R, SUNG P, SHINOHARA A, WEICHELBAUM R, KUFE D. Regulation of Rad51 function by c-Abl in response to DNA damage. *J Biol Chem.* **1998** Feb 13; 273(7): 3799-802.
- ZAMORE PD, TUSCHL T, SHARP PA, BARTEL DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell.* **2000** Mar 31; 101(1): 25-33.
- ZENG Y, CULLEN BR. RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *RNA.* **2002** Jul; 8(7): 855-60.

6.1 Quellen aus dem Internet

BMU: http://www.bmu.de/de/800/nj/sachthemen/strahlen/info_strahlen/main.htm.

Genetische Nomenklatur:

http://www.mblogic.net/point_of_view/1/

<http://www.chicken-genome.org/resources/nomenclature.html>

<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/guidelines.html>

<http://www.life.uiuc.edu/micro/316/topics/mutations/nomenclature.html>

National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

siRNA user guide: <http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html>

7 Anhang

7.1 Allgemeine Abkürzungen

7-AAD	7-Amino-Aktinomycin D
Ab	<i>Antibody</i> /Antikörper
ATM	<i>Ataxia teleangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BCA	Bicinchoninsäure
BCDX2	RAD51B-RAD51C-RAD51D-XRCC2
bidest.	bidestilliert
BIR	<i>break-induced replication</i>
BLM	Bloom Syndrom Protein
BMU	Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit
BRCA	<i>breast cancer</i>
BSA	bovines Serumalbumin
c-ABL	<i>Abelson murine leukemia viral (v-abl) oncogene homolog 1</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>C. griseus</i>	<i>Cricetulus griseus</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CX3	RAD51C-XRCC3-Komplex
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure/ <i>deoxyribonucleic acid</i>
DSB(s)	<i>double strand break(s)</i> /Doppelstrangbruch(brüche)
DSBR	DSB-Reparatur
dsDNA	doppelsträngige DNA
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	1,4-Dithiothreit
DX2	RAD51D-XRCC2-Komplex
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMS	Ethyl-Methansulfonat
<i>Ercc/ERCC</i>	<i>Excision repair cross complementing</i>
ESTs	<i>Expressed Sequence Tags</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FACScan	<i>fluorescence activated cell scanner</i>
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
Fl-siRNA	Fluorescein-markierte siRNA
Hepes	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HNPCC	hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom
HR	homologe Rekombinationsreparatur
HRP	Meerrettich-Peroxidase/ <i>Horseradish-Peroxidase</i>
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>

Ig	Immunglobulin
irs	<i>ionizing radiation-sensitive</i>
kd	Kilo-Dalton
k.o.	Knockout
LFA	Lipofectamine 2000
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MM	Magermilch
MMC	Mitomycin C
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NHEJ	nicht-homologes Endjoining
OA-Medium	„ohne alles“-Medium
OFA	Oligofectamine
<i>p. A.</i>	zur Analyse
<i>P. pyralis</i>	<i>Photinus pyralis</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PBST	PBS mit 0,05 % (v/v) Tween 20
PBS+	PBS mit 0,15 % Glycin und 0,5 % BSA
PI	Propidiumiodid
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rad	Strahlung/ <i>radiation</i>
<i>Rad51</i>	Gen aus Nagern
RAD51	Protein aus Nagern, Menschen, Hühnern
<i>RAD51</i>	Gen aus Hefe, Menschen, Hühnern
RAD51H	RAD51-Homolog
RAD51L	<i>RAD51-like</i>
Rad51p	Protein aus Hefe
RecA	bakterielles Protein
recA	bakterielles Gen
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA(s)	Ribonukleinsäure/ <i>ribonucleic acid(s)</i>
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RPA	Replikationsprotein A
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
scrRNA	<i>scrambled RNA</i>
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat</i> /Dodecylsulfat Natriumsalz
SDSA	<i>synthesis-dependent strand annealing</i>
siRNA(s)	<i>small interfering RNA(s)</i>
ssDNA	einzelsträngige DNA
SSA	<i>single strand annealing</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TG	Tris-Glycin-Puffer
TKO	TransIT-TKO
Tyr	Tyrosin

wt	Wildtyp
Xrcc/XRCC	<i>x-ray cross complementing</i>
xrs	<i>x-ray-sensitive</i>

7.2 Sequenz der mRNA für *Rad51*

[Y08202](#). *C. griseus* mRNA fo...[gi:1552257]
 LOCUS CGRAD51 1020 bp mRNA linear ROD 05-JUN-1999
 DEFINITION *C. griseus* mRNA for RAD51 protein.
 ACCESSION Y08202
 VERSION Y08202.1 GI:1552257
 KEYWORDS DNA repair; RAD51 gene.
 SOURCE *Cricetulus griseus* (Chinese hamster)
 ORGANISM [Cricetulus griseus](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Cricetinae;
 Cricetulus.
 REFERENCE 1
 AUTHORS Vispe, S., Cazaux, C., Lesca, C. and Defais, M.
 TITLE Overexpression of RAD51 protein stimulates homologous
 recombination
 and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation
 JOURNAL *Nucleic Acids Res.* 26 (12), 2859-2864 (1999)
 MEDLINE [98278898](#)
 PUBMED [9611228](#)
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1020)
 AUTHORS Vispe, S.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (11-SEP-1996) S. Vispe, CNRS, IPBS, 205 route de
 Narbonne, F- 31400 Toulouse, FRANCE
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1020
 /organism="Cricetulus griseus"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:10029"
 /cell_line="AA8"
 /cell_type="fibroblast"
 /tissue_type="ovary"
[gene](#) 1..1020
 /gene="rad51"
[CDS](#) 1..1020
 /gene="rad51"
 /function="DNA repair"
 /codon_start=1
 /protein_id="[CAA69384.1](#)"
 /db_xref="GI:1552258"
 /db_xref="GOA:P70099"
 /db_xref="SWISS-PROT:P70099"
 /translation="MAMQMQLLEANADTSVEEESFGPQPISRLEQCGISANDVKKLEEA
 GFHTVEAVAYAPKKELINIKGISEAKADKILAEAAKLVPMGFTTATEFHQRSEIIQI
 TTGSKELDKLLQGGIETGSITEMFGEFRTGKTQICHTLAVTCQLPIDRGGGEGKAMYI
 DTEGTFRPERLLAVAERYGLSGSDVLDNVAYARGFNTDHQTQLLYQASAMMVESRYAL
 LIVDSATALYRTDYSGRGELSARQMHLARFLRMLLRLLADEFGVAVVITNQVVAQVDGA
 AMFTADPKKPIGGNIIAHASTTRLYLKGRGETRICKVYDSPCLPEAEAMFAINADGV
 GDAKD"
 BASE COUNT 306 a 216 c 262 g 236 t
 ORIGIN
 1 atggctatgc agatgcagct tgaagcaaat gcagatactt cagtggaaga agaaagcttt
 61 ggtccacaac ctatttcacg gttagagcaa tgtggcataa gtgccaatga tgtgaagaaa
 121 ttagaag[aag ctggtttcca tacggtgg](#)gag gctggtgctt atgcaccaa gaaggaactc
 181 ataaatatta agggaattag tgaagccaaa gcagacaaaa ttctggctga ggccgctaaa

241 ttagttccaa tgggtttcac cactgcaact gaatttcacc aaaggcgttc agaaatcata
301 cagattacta ctggctccaa agagcttgac aaactgcttc aagggtggaat tgagactgga
361 tctatcacag agatgtttgg agaattccga actgggaaga cacagatctg tcatacattg
421 gctgtaacat gccagcttcc cattgatcgt ggtggagggtg aaggaaaggc catgtacatt
481 gacaccgagg gtacgtttag gccagaacgg ctgctagcag tggctgagag gtatggtctg
541 tctggcagcg atgtcctaga taatgtagca tatgctcgag ggttcaacac agaccaccaa
601 acccagctcc tttatcaagc atcagccatg atggtagaat ccagatatgc actgcttatt
661 gtagacagtg ctactgcoct ctacagaaca gactactcag gtcgaggaga gctttcagcc
721 aggcaaatgc atttggccag atttctgagg atgctgctgc gacttgctga tgagtttggg
781 gtagcagtgg taatcaccaa ccaggtagta gcccaagtgg atggagcagc catgttact
841 gcagatcca aaaaacccat tggaggaaac atcattgcc atgcatcaac aaccaggctg
901 tacctgagga aaggaagagg ggagaccaga atctgcaaag tctatgactc tcctgtctc
961 cctgaagctg aagccatggt tgccattaat gcagatggag taggagatgc caaggactga

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich diese Dissertation noch an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen.

Hamburg, den

.....

Kerstin Büttner

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Dr. Kerstin Borgmann bedanken, die diese Arbeit initiiert und betreut hat. Ich danke Kerstin ganz besonders für ihr großes Engagement in meiner Sache, für ihr offenes Ohr zu jeder Zeit, für ihren Optimismus in allen Lebenslagen, für die Motivation, nie aufzugeben und für den Spaß dabei. Nicht zu vergessen für die Zeit auf dem RRS-Kongreß 2002 – und den anschließenden Trip durch die kalifornischen Redwoods.

Ebenso großer Dank geht an Prof. Dr. Ekkehard Dikomey, der gemeinsam mit Kerstin meine Arbeit begleitet hat. Ich danke Ekkehard für die große Unterstützung, die ich bei diesem Projekt erfahren habe, für das Vertrauen in mich, für die Möglichkeit, eigene Ideen umzusetzen, für die vielen fruchtbaren Diskussionen und seinen Rat, wann immer ich ihn brauchte. Insbesondere aber möchte ich mich dafür bedanken, dass ich mit meinen Daten auf Reisen gehen durfte und an mehreren Tagungen teilnehmen konnte.

Prof. Dr. H. Jung danke ich für die Aufnahme am Institut für Biophysik und Strahlenbiologie.

Bei Prof. Dr. W. Schäfer möchte ich mich für die Betreuung seitens des Fachbereiches Biologie und für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Dr. G. Zahner (Medizinische Klinik, UKE) danke ich für die Anregungen zur Antisense-Technologie und die Synthese von DNA-Oligonukleotiden.

Bei Prof. Dr. H. Baisch bedanke ich mich für die Einarbeitung in die Durchflusszytometrie, für viele anregende Diskussionen und sein Interesse an meinem Projekt.

Ganz besonders möchte ich mich bei Sylvia Bornkessel und Jutta Schäfer bedanken, die zu dieser Arbeit tatkräftig beigetragen haben. Ich danke Sylvia für ihre Bereitschaft, mit mir noch einmal in ganz neue Welten einzutauchen, für die vielen Ideen und Tipps, für ihr kritisches Urteil, für die gelungene und konstruktive gemeinsame Arbeit. Ich danke Jutta für ihr Engagement insbesondere bei den Metaphase-Analysen, dafür, dass sie immer für mich da und häufig Retter in der Not war, für ihre Motivationsarbeit und ihr positives, aufbauendes Wesen.

Dr. Ulla Kasten und Dr. Ingo Brammer danke ich für viele gute Diskussionen und Anregungen und für ihr großes Interesse an meiner Arbeit. Ulla möchte ich besonders danken für die

Einweisung in den Western-Blot, Ingo speziell für das Computermanagement und den Nachschub an extra Kalorien an harten Tagen (Hanuta...).

Ich bedanke mich bei Britta Riepen, für ihre Pionierarbeit bei den Kolonietests für diese Arbeit, für die gute Laune, mit der sie den Laboralltag im Keller bedeutend aufgehellt hat und – nicht zu vergessen – für viele, viele, viele bestellte Eppis und Co ...; bei Maria Omniczynski ebenfalls für die Unterstützung in Sachen Zellüberleben; bei Agnieszka Wrona für die Hilfe bei den Chromosomen-Analysen und die internationale Abwechslung, die sie zu uns brachte; bei Hannelore Bollmann und Alexandra Zielinski und allen weiteren (ehemaligen und jetzigen) Mitarbeitern des Labors für die freundliche, kollegiale Atmosphäre, die schöne Zeit am Institut und die gute Zusammenarbeit; bei den Praktikantinnen, die den Laboralltag bereichert und aufgefrischt haben (insbesondere Anneke Schütt und Katharina Wustrau).

Dr. Oliver Zschenker (Doc Z) und Martin Purschke (Puschi, Empuu) danke ich vor allem für den Spaß nebenbei, die aufbauenden Kaffee/Eisorgien in guten wie in schlechten Zeiten, Männeransichten (ich habe viel gelernt ☺), die Trainingsrunden um die Alster, Martin insbesondere für die gute Zeit im Doktorandenzimmer und die Naturalienversorgung am späten Nachmittag.

Dem Team aus Pavillon 11 – insbesondere PD Dr. Jochen Dahm-Daphi, Petra Hubbe und Fruszina Horvath – danke ich für Rat und Tat, mit denen sie mir zur Seite standen und für die besondere Atmosphäre beim Experimentieren in ihrem Labor. Bei Jochen möchte ich mich bedanken für die guten Diskussionen und Ideen, für seine Leidenschaft für die homologe Rekombination und die Möglichkeit, in seinem Labor neue Wege zu probieren. Petra Hubbe danke ich für ihre Hilfe dabei, für ihre Geduld und ihre Tipps. Rafaat A. El-Awady danke ich für viele gute Anregungen und Gespräche.

Mein Dank gilt meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben, mir nicht nur das Studium ermöglichten, sondern auch darüber hinaus an meinem Leben teilhaben und sich sogar freiwillig durch naturwissenschaftliches Kauderwelsch quälen. Last but not least danke ich meinem Christoph für seine Liebe, seine Geduld, seine Unterstützung, insbesondere für den pronto-Bibliotheksdienst der vergangenen Wochen und ganz speziell für den Tag, an dem er mich zu einem Vortrag von T. Tuschl mitschleppte.

Beruflicher Werdegang

- 1991** Beginn mit dem Studium der Chemie
- 1992 bis 1996** Studium der Biochemie/Molekularbiologie an der Universität Hamburg
- **Nebenfach:** Immunologie, Schwerpunkt: Molekulare Medizin
 - **Thema der Diplomarbeit:** „Repetitive Sequenzen auf instabilen DNA-Fragmenten im Genom von humanen Tumorzellen“, angefertigt unter Betreuung von Prof. Dr. F. Hölzel, Institut für Physiologische Chemie, Abteilung Molekularbiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
- 1996 bis 1998** Ergänzungsstudium Journalistik mit der Fachrichtung „Naturwissenschaften, Medizin, Technik“ am Institut für Journalistik und Kommunikationsforschung an der Hochschule für Musik und Theater, Hannover
- **Thema der Diplomarbeit:** „Medizin und Medien – unvereinbare Welten? Zur Kommunikation zwischen Ärzten und Journalisten“
- 1999 bis 2000** Presse- und Öffentlichkeitsarbeit bei der Strathmann AG
- seit April 2000** Promotion in der Sektion für Strahlenbiologie und Experimentelle Radioonkologie/Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie im Radiologischen Zentrum (vormals Institut für Biophysik und Strahlenbiologie) des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter Betreuung von Dr. K. Borgmann/Prof. Dr. E. Dikomey
- Juni 2004** voraussichtlicher Abschluß der Promotion

Praktika und Projekte

- Nov./Dez. 1994** Projektstudie am Institut für Physiologische Chemie unter Betreuung von Prof. Dr. H. J. Seitz und PD Dr. T. Patschinsky, Abteilung Biochemische Endokrinologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
- **Thema:** „Untersuchung der Funktionalität pro- und eukaryotisch exprimierter Schilddrüsenhormonrezeptoren“
- Feb./Mrz./Sep. 1997** Praktikum im Ressort „Wissenschaft & Technik“ bei der Zeitung „Die Woche“
- Feb.-Apr. 1998** Praktikum in der Wissenschaftsredaktion des Hamburger Abendblattes
- Mai 1998** Praktikum beim NDR Fernsehen, Sendung „Visite“, Redaktion Medizin
- Dez. 1998/Jan.1999** Praktikum beim Magazin GEO

Publikationen

K. BÜTTNER, E. DIKOMEY, K. BORGMANN. Die Inhibition von RAD51 via RNA-Interferenz bewirkt eine MMC- aber keine Strahlensensibilisierung in CHO-Zellen. Proceedings des 13. Symposiums Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie Dresden. (13) **2004**.

K. BÜTTNER, E. DIKOMEY, K. BORGMANN. Keine Zunahme in der Strahlen, aber der MMC-Empfindlichkeit bei Inhibition von Rad51 mittels RNAinterferenz in CHO-Zellen. *Proceedings of the 7th Wolfsberg Meeting on Molecular Radiation Biology/Oncology, Molecular Radiation Biology/Oncology*, (4), **2003**.

K. BÜTTNER, E. DIKOMEY, K. BORGMANN. Molekulare Mechanismen der Reparatur von zusätzlichen azentrischen Fragmenten in G₀- und S/G₂-Phase. *Proceedings of the 5th Wolfsberg Meeting on Molecular Radiation Biology/Oncology, Molecular Radiation Biology/Oncology*, (2), **2001**.

Präsentationen

K. BÜTTNER, E. DIKOMEY, K. BORGMANN. Molecular mechanisms underlying cellular radiosensitivity: cell cycle dependent reduction of excess acentric fragments. *Poster presentation at the International 6th Wolfsberg Meeting on Molecular Radiation Biology/Oncology, Ermatingen, Schweiz*, **2002**.

K. BÜTTNER, E. DIKOMEY, K. BORGMANN. Molecular mechanisms underlying cellular radiosensitivity: cell cycle dependent reduction of excess acentric fragments. *Poster presentation and talk at the 49th Radiation Research Society Annual Scientific Meeting, Reno, NV, USA*, **2002**.

„I wanted to live deep and suck out all the marrow of life ...
and not, when I came to die, discover that I had not lived“
(nach Thoreau)



Ananas Pieces