

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 Säugierzellen 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

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

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.