

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Labor für Strahlenbiologie und experimentelle Radioonkologie

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Kai Rothkamm

Auswirkung der RAD51 Überexpression auf die Aktivität des Fanconi-Komplexes nach DNA-Schädigung

Dissertation

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

vorgelegt von:

Cora Waldstein
aus Göttingen

Hamburg 2016

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 19.09.2016**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Kerstin Borgmann

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Cordula Petersen

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	DNA Schäden	6
1.2	DNA Reparatur.....	7
1.3	Doppelstrangbruch-Reparatur.....	8
1.3.1	Nicht-Homologes Endjoining	9
1.3.2	Homologe Rekombination	9
1.4	Bedeutung von RAD51 für die Doppelstrangbruch-Reparatur.....	15
1.5	Bedeutung der Expression von RAD51 für die Prognose bei Tumorpatienten	17
1.6	Fanconi-Anämie	19
1.6.1	Bedeutung der Fanconi-Proteine für die Reparatur von DNA-Schäden.....	19
1.7	Ziel der Arbeit.....	20
2	Material und Methoden	22
2.1	Material	22
2.1.1	Chemikalien (Allgemein)	22
2.1.2	Reagenzien und Medien für die Zellkulturen und für den Koloniebildungstest	22
2.1.3	Chemikalien für die Schadensinduktion.....	22
2.1.4	Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.5	Puffer und Lösungen	23
2.1.6	Antikörper für den Western Blot	25
2.1.7	Größenstandards	26
2.1.8	Geräte	27
2.1.9	Software.....	27
2.2	Methoden	28
2.2.1	Zelllinien.....	28
2.2.2	Zellkulturhaltung.....	29
2.2.3	Bestrahlung und Dosimetrie	30
2.2.4	Herstellung der Mitomycin C Lösung	30
2.2.5	Schadensinduktion durch Mitomycin C	30
2.2.6	Schadensinduktion durch H ₂ O ₂	31
2.2.7	Proteinisolierung.....	32
2.2.8	Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem BCA Assay	32
2.2.9	Western Blot (Prinzip).....	33
2.2.10	Nachweisbedingungen der DNA-Reparaturproteine	37
2.2.11	Koloniebildungstest	38
2.2.12	Statistik	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Methodische Vorarbeiten	39
3.1.1	Titration von Proteinmenge und Antikörperkonzentration zum optimalen Nachweis der Proteine ATM, ATR und FANCD2 und ihrer phosphorylierten Form	40
3.1.2	Bestimmung des optimalen Zeitpunktes zur Detektion des aktivierten Proteins nach DNA-Schädigung.....	41
3.1.3	Aktivierung von ATM nach Bestrahlung.....	41
3.1.4	Aktivierung von ATR nach Bestrahlung.....	43
3.1.5	Aktivierung von FANCD2 nach Bestrahlung	44
3.1.6	Aktivierung von ATM nach Schadensinduktion durch Mitomycin C	46
3.1.7	Aktivierung von ATR nach Schadensinduktion durch Mitomycin C	47
3.1.8	Aktivierung von FANCD2 nach Schadensinduktion durch Mitomycin C	49

3.1.9	Aktivierung von ATM nach Schadensinduktion durch H ₂ O ₂	50
3.1.10	Aktivierung von ATR nach Schadensinduktion durch H ₂ O ₂	52
3.1.11	Aktivierung von FANCD2 nach Schadensinduktion durch H ₂ O ₂	53
3.2	Bedeutung der RAD51 Überexpression für DNA-Repartaturproteine bei DNA-Schäden 56	
3.2.1	Expression von RAD51 in Zellen mit RAD51 Überexpression nach Schadensinduktion...	56
3.2.2	Expression von ATM in Zellen mit RAD51 Überexpression nach Schadensinduktion	57
3.2.3	Aktivierung von ATM nach Schadensinduktion.....	58
3.2.4	Expression von ATR nach Schadensinduktion	60
3.2.5	Aktivierung von ATR nach Schadensinduktion.....	62
3.2.6	Expression von FANCD2 nach Schadensinduktion	63
3.2.7	Aktivierung von FANCD2 nach Schadensinduktion	64
3.3	Zelluläre Strahlenempfindlichkeit	66
3.4	Zelluläre Empfindlichkeit gegenüber Mitomycin C	66
3.5	Zelluläre Empfindlichkeit gegenüber Wasserstoffperoxid	68
4	Diskussion	70
4.1	Methodische Vorarbeiten	70
4.1.1	Aktivierung von ATM nach Schadensinduktion.....	70
4.1.2	Aktivierung von ATR nach Schadensinduktion.....	72
4.1.3	Aktivierung von FANCD2 nach Schadensinduktion	73
4.2	Bedeutung der RAD51 Überexpression für weitere Reparaturproteine nach DNA- Schäden	75
4.2.1	Expression von RAD51 in Zellen mit RAD51 Überexpression nach Schadensinduktion...	75
4.2.2	Expression von ATM und pATM in Zellen mit RAD51 Überexpression nach Schadensinduktion	77
4.2.3	Expression von ATR und pATR in Zellen mit RAD51 Überexpression nach Schadensinduktion	78
4.2.4	Expression von FANCD2 und pFANCD2 in Zellen mit RAD51 Überexpression nach Schadensinduktion	79
4.3	Zelluläre Strahlenempfindlichkeit	80
4.4	Zelluläre Empfindlichkeit gegenüber Mitomycin C	81
4.5	Zelluläre Empfindlichkeit gegenüber Wasserstoffperoxid	81
5	Zusammenfassung / Abstract.....	82
6	Abkürzungsverzeichnis	85
7	Literaturverzeichnis	88
8	Danksagung.....	95
9	Lebenslauf	96
10	Eidesstattliche Erklärung	98

1 Einleitung

Die drei Hauptsäulen der Therapie von malignen Tumoren bestehen aus Chirurgie, Chemo- und Strahlentherapie. In den letzten Jahren gab es in diesem Feld neue Fortschritte und Entwicklungen, insbesondere in der Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern, die eine weitere Behandlungssäule darstellt. In diesen Therapieansätzen wird die Strategie verfolgt, möglichst effizient Tumorgewebe zu zerstören und ein erneutes Wachstum von Tumorzellen zu verhindern.

Bei der Chirurgie erfolgt dies über eine Operation und somit Entfernung des Tumorgewebes möglichst im Gesunden. Diese Therapieoption kann jedoch nur bei lokalen und nicht metastasierten Tumoren als alleinige Therapie angewendet werden. Die Chemotherapie zielt auf eine effektive Schädigung der Tumorzellen des Primärtumors und möglicher Metastasen und wird systemisch über den Blutkreislauf appliziert. Die Strahlentherapie schädigt die Tumorzellen im Gegensatz zur Chemotherapie nur lokal im Bestrahlungsfeld mit nachfolgendem Absterben der Zellen. Bei vielen Tumorentitäten wird nicht nur eine Therapie, sondern eine Kombination aus den verschiedenen Therapieoptionen angewandt. Dabei wird eine möglichst hohe Tumorkontrolle und eine bestmögliche Schonung von gesundem Gewebe angestrebt.

Tumoren entstehen häufig durch Mutationen von Genen des Zellwachstums, der Zellteilung und Zelldifferenzierung und gehen mit einer unkontrollierten Proliferation der entarteten Zelle einher. Viele Behandlungsansätze einer Tumorthherapie machen sich den erhöhten Anteil an proliferierenden Zellen in Tumoren zu Nutze, greifen die replikative S-Phase der Zellen an und schonen somit das gesunde Gewebe aufgrund dessen geringen Anteils proliferierender Zellen (Helleday et al., 2008).

Die Fähigkeit verursachte DNA (desoxyribonucleic acid) Schäden zu reparieren und die Empfindlichkeit gegenüber den eingesetzten Agenzien der einzelnen Tumoren und innerhalb von Tumorentitäten unterscheidet sich deutlich. So zeigen Tumoren wie z.B. das Zervix- und das Prostatakarzinom eine höhere Strahlenempfindlichkeit als z.B. Sarkome oder Glioblastome. Die Ursachen unterschiedlicher Sensibilität gegenüber ionisierender Strahlen oder Chemotherapeutika sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Wesentliche Faktoren spielen dabei die Oxygenierung und die unterschiedliche Reparaturkapazität der Tumorzellen. In der folgenden Arbeit wird besonders auf die Reparaturmechanismen von DNA-Schäden geschaut, um mehr Einblicke in eine erfolgreiche Tumorthherapie zu erhalten.

1.1 DNA Schäden

Durch ionisierende Strahlung wird die DNA der Zellen direkt oder indirekt geschädigt. Bei einer direkten Schädigung werden Atome der DNA ionisiert, bei einer indirekten Schädigung entstehen hoch reaktive freie Radikale, die die DNA angreifen. Bei beiden Prozessen kann eine veränderte Funktion der Zelle oder Zelltod resultieren. Eine Röntgenbestrahlung mit 1 Gy verursacht pro Zelle ca. 100 000 Ionisationen, ungefähr 3000 Basenschäden, 1000 Einzelstrangbrüche und etwa 20-40 Doppelstrangbrüche (DSB).

Mitomycin C (MMC) schädigt die DNA, indem kovalente Verbindungen (engl. interstrand cross-links) durch Interkalation zweier Stränge entstehen. Durch diese sogenannten interstrand cross-links fehlt dem DNA-Strang die Fähigkeit zu dissoziieren um die Replikation bzw. Transkription erfolgreich durchzuführen.

H₂O₂ gehört zu den ROS (reactive oxygen species) und schädigt die DNA über oxidativen Stress durch die Entstehung von freien Radikalen. Diese greifen die DNA an, sodass in weiterer Folge ebenfalls Einzelstrang- und Doppelstrangbrüche sowie chromosomale Aberrationen entstehen.

Die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität ist das fundamentale Ziel der Zelle. Die Vererbung einer korrekten DNA an jede Tochterzelle ist dabei von großer Bedeutung. Die Zelle hat verschiedene Möglichkeiten von molekularen Mechanismen entwickelt, um DNA-Schäden zu erkennen und sie fehlerfrei zu reparieren. Zur Detektion und Reparatur von Basenschäden gehört die Basenexzisionsreparatur (BER, engl. Base excision repair), von Einzelstrangbrüchen die Einzelstrangreparatur (SSBR, engl. Single strand break repair) und von Doppelstrangbrüchen das nicht homologe Endjoining (NHEJ, engl. Non-homologous end joining) und die homologe Rekombination (HR, engl. Homologous recombination).

Die Zelle durchläuft während des Zellzyklus mehrere Phasen, in denen die Erkennung von DNA-Schäden spezifisch erfolgt und je nach Art des DNA Schadens zu einer Signalkaskade führt, die entweder einen Reparaturprozess aktiviert oder den Zelltod einleitet. Der Zellzyklus besteht aus der G1-, S-, G2- und M-Phase. Die S-Phase und die M-Phase sind dabei die funktionell bedeutsamen Zellzyklusphasen, die durch die Ruhephasen G1 und G2 voneinander getrennt sind. In der Synthese- oder S-Phase wird die gesamte DNA verdoppelt und in der Mitose oder M-Phase, auf zwei Tochterzellen verteilt.

Trifft die Replikationsmaschinerie während der S-Phase auf geschädigte DNA kann dies ein Anhalten oder Kollabieren des Replikationsapparates bedeuten. In weiterer Folge können DNA-Doppelstrangbrüche entstehen, die ein letales Ereignis für die Zelle bedeuten, falls sie nicht repariert werden (Branzei and Foiani, 2008). Die oben genannten Reparaturmechanismen sind für eine fehlerfreie Replikation zuständig (Hoeijmakers, 2001). Welcher Reparaturweg eingeschlagen wird, hängt von der Form des DNA Schaden ab.

1.2 DNA Reparatur

Nach der Schädigung der DNA leitet die Zelle über eine schadensspezifische Signalkaskade die Reparatur ein. Diese Schadensantwort wird unter dem Begriff DNA Damage Response (DDR) zusammengefasst und erfolgt über eine Signalkaskade, bei der Zellzyklusübergänge, Replikation, DNA Reparatur und Apoptose koordiniert werden (Ciccio and Elledge, 2010).

Schlüsselproteine der DDR in Eukaryoten sind die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K-Kinase), Ataxia-Telangiectasia and Rad3 related (ATR), Ataxia-Telangiectasia Mutated (ATM) und DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit (DNAPKcs).

Diese Schlüsselproteine werden vermutlich durch Veränderungen der lokalen Chromatinstruktur aktiviert. Hier geht man davon aus, dass das Signal über ATR durch einen langen einzelsträngigen Abschnitt und das Signal über ATM eher über einen Doppelstrangbruch ausgelöst wird (Colton et al., 2006, Kastan and Lim, 2000, Sancar et al., 2004, McGowan and Russell, 2004, Shechter et al., 2004).

Das ATM-Gen ist besonders im Zusammenhang mit der Ataxia teleangiectatica (AT), das auch als Louis-Bar-Syndrom benannt wird, bekannt, einem autosomalen rezessiven Syndrom mit einem vielfältigen klinischen Erscheinungsbild. Es wird hauptsächlich durch eine zerebelläre Ataxie mit Kleinhirnatrophie und erweiterten kleinen Arterien (Teleangiectasien) in den Konjunktiven der Augen gekennzeichnet. Die Krebsrate soll um den Faktor 100 höher liegen als in der Normalbevölkerung. Auf zellulärer Ebene kommen eine erhöhte chromosomale Instabilität mit gehäuften Translokationen sowie eine extreme Überempfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlen hinzu (Iliakis, 1997, Iliakis et al., 2003), die die AT zum ersten und prominentesten Beispiel eines Strahlenempfindlichkeitssyndrom machen. Die ATM-Kinase spielt eine zentrale Rolle bei der Checkpoint-Aktivierung und steht ebenso an

der Spitze der Signalkette, die die Doppelstrang-Reparatur steuert. Man nimmt auch an, dass ATM direkt an der Reparatur beteiligt ist (Jeggo and Lobrich, 2005). ATR ist sowohl an der Auslösung des S-Phase-Checkpoints als auch an der Reparatur über die Homologe Rekombination beteiligt. Zellen mit ATR-Mutationen, wie beim seltenen Seckel-Syndrom, zeigen zwar eine chromosomale Instabilität, aber nur eine geringe Strahlenempfindlichkeit. Dagegen sind Zellen mit ATR-Mutation hoch empfindlich gegenüber Einzelstrangbrüchen, wie beispielsweise durch Mitomycin C induziert.

1.3 Doppelstrangbruch-Reparatur

Die Reparatur von DNA - Doppelstrangsbrüchen (DSB) spielt eine sehr bedeutende Rolle im Überleben einer Zelle. Da beide Stränge der DNA geschädigt wurden, kann die Information zur Reparatur nicht vom komplementären Strang abgelesen werden. Somit kann fehlerhafte oder fehlende Reparatur von DSB zur Kanzerogenese oder zum Zelltod führen. In Säugetierzellen haben sich zwei Reparaturwege - die Homologe Rekombination (HR) und das Nicht-homologe Endjoining (NHEJ) - entwickelt. Welche der beiden Reparaturwege eingeschlagen werden, hängt von verschiedenen Faktoren ab (Helleday et al., 2007a). Das NHEJ ligiert die beiden DNA-Enden unabhängig von ihrer Sequenz und wird in allen Zellzyklusphasen verwendet. Die HR benötigt zur Reparatur der DNA die homologen Sequenzen des Schwesterchromatids und findet deshalb hauptsächlich in der S/G2 Phase statt (San Filippo et al., 2008).

Die Wahl des jeweiligen Reparaturweges hängt von der Struktur der freiliegenden DNA-Enden ab. DNA-Doppelstrangbrüche können mit einem offenen oder mit zwei offenen Enden auftreten. Wenn die Replikationsgabel auf nicht reparierte DNA-Schäden stößt, können einseitige Doppelstrangbrüche entstehen. Wenn ein doppelsträngiges DNA-Molekül in zwei Teile bricht, können zweiseitige Doppelstrangbrüche entstehen. Zweiseitige DSB können im Gegensatz zu einseitigen DSB in allen Zellzyklusphasen auftreten und somit über das NHEJ repariert werden. Einseitige DSB treten hauptsächlich in der S-Phase auf und werden auch als sekundäre DSB bezeichnet. Sie können aus Basenschäden, Einzelstrangbrüchen und DNA-Kreuzvernetzungen entstanden sein und zu DSB werden, wenn sie auf eine Replikationsgabel treffen und diese zum Zusammenbruch

führen. An Replikationsgabeln entstandene Doppelstrangbrüche werden wahrscheinlich ausschließlich durch die Homologe Rekombination repariert (Helleday et al., 2007b, Helleday et al., 2007a).

1.3.1 Nicht-Homologes Endjoining

In Eukaryoten ist das Nicht-homologe Endjoining ein effizienter und zentraler Reparaturweg, der zwei DNA-Enden direkt und sequenzunabhängig verknüpft. Das NHEJ verwendet für die Verknüpfung der beiden DNA-Enden kurze Basenpaare langer Homologien und ist insgesamt anfällig für Fehler wie Insertionen und Deletionen (Lieber, 2008).

Es gibt mindestens zwei verschiedene Wege des NHEJ. Der vorrangige Weg wird durch Bildung eines Heterodimeres der Proteine Ku70 und Ku80 an den freien DNA-Enden vermittelt und verhindert somit eine räumliche Trennung der Bruchenden. Nach Rekrutierung von DNA-PKcs entsteht ein heterotrimerer Komplex, der insgesamt die DNA-abhängige Protein-Kinase (DNA-PK) bildet. Die DNA-PKCS rekrutiert und aktiviert weitere Enzyme wie Artemis und Pol μ , während die Ku-Proteine den Ligationskomplex aus XRCC4, Ligase IV und XLF rekrutieren (Weterings and van Gent, 2004).

Wenn das KU70/80-Heterodimer defekt ist, leitet die Zelle einen alternativen Endjoiningmechanismus ein, um Doppelstrangbrüche zu reparieren. Die Hauptfaktoren dieses Reparaturweges sind PARP1, XRCC1 und Ligase III (Audebert et al., 2004, Wang et al., 2003). Die Reparaturkinetik ist beim alternativen nicht-homologen Endjoining deutlich verlangsamt und Deletionen und Insertionen können entstehen. Außerdem induziert die Wahl dieses Reparaturweges die Entstehung von chromosomalen Translokationen und könnte daher eine bedeutsame Quelle für onkogene Mutationen darstellen.

1.3.2 Homologe Rekombination

Die Homologe Rekombination (HR) verwendet im Gegensatz zum NHEJ homologe Sequenzen des Schwesterchromatids für die DSB-Reparatur. Dies benötigt wesentlich mehr Zeit, stellt jedoch einen sehr akkuraten Mechanismus dar.

Die Homologe Rekombination wird nach Pfeiffer et al. (2004) (Pfeiffer et al., 2004) und Pâques und Haber (1999) (Pâques and Haber, 1999) in die nicht konservative

HR (single-strand annealing –SSA) und in die konservative HR (Genkonversion) unterteilt. Bei der konservativen HR handelt es sich um eine fehlerfreie DSB-Reparatur, indem homologe Sequenzen des Schwesterchromatids kopiert werden. Dagegen stellt das single-strand annealing eine fehlerbehaftete Reparatur dar, bei der es zum Verlust von DNA-Sequenzen kommen kann. Bei beiden Reparaturwegen werden am DSB Nukleotide in 5'-3'-Richtung abgebaut, um ein freies 3'Ende zu schaffen.

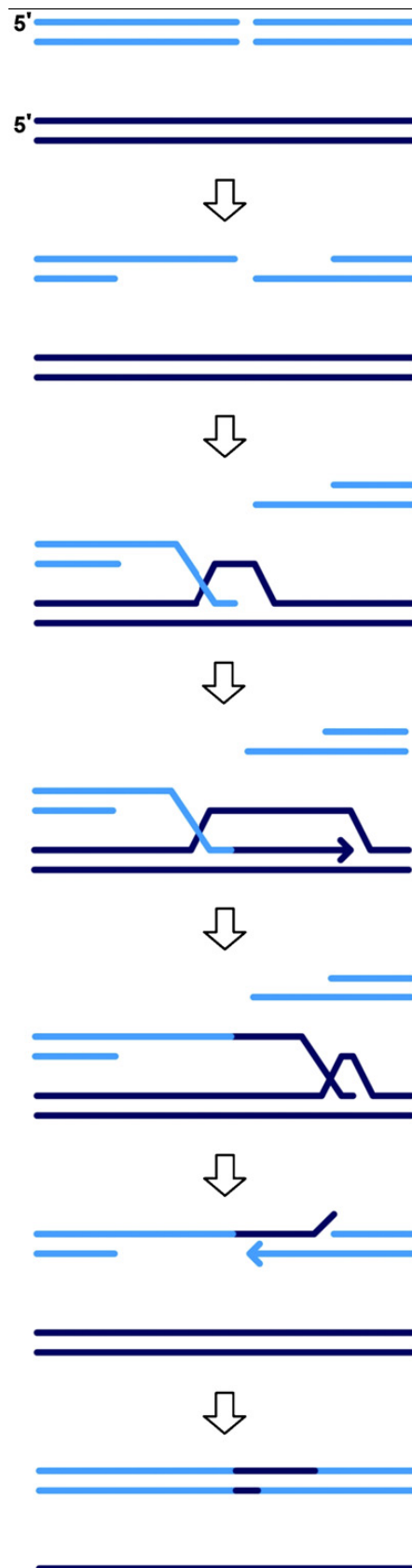
1.3.2.1 Konservative Homologe Rekombination

Bei der konservativen HR wird in zwei untergeordneten Wege, dem synthesis dependent strand annealing (SDSA), klassisches Holliday-Modell mit einer einseitigen oder einer zweiseitigen Holliday-Struktur und breakage induced replication (BIR) unterschieden.

Das *synthesis dependent strand annealing* gilt als bevorzugter Homologie-vermitteltender Mechanismus, um zweiseitige Doppelstrangbrüche zu reparieren. Wie in der Abbildung 1 graphisch dargestellt, ist der Beginn des SDSA die Erkennung des DSB durch den MRN-Komplex und die Einleitung der Prozessierung der DSB-Enden. Der initiale Schritt ist dabei die Resektion des 5'DNA-Endes des DSB, welche einen langen, einzelsträngigen 3'-Überhang hinterlässt. ATM spielt bei diesem Prozess eine weitere Rolle als Kinase, die den Doppelstrangbruch erkennt und weitere Reparaturproteine aktiviert, um die Reparatur zu initiieren.

Die generierte einzelsträngige DNA wird durch RAD52 geschützt und vom Replikationsprotein A (RPA) gebunden, stabilisiert und anschließend durch das Nukleoproteinfilament RAD51 ersetzt. Die RAD51-Beladung auf die ssDNA wird durch BRCA2 und die Bildung des RAD51-Filaments durch weitere Proteine reguliert. Dazu gehören die RAD51 Paraloge RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRcc3 und XRCC3. Dieses Nukleoproteinfilament leitet die Invasion des geschädigten Stranges in das Schwesterchromatid ein, wodurch eine Heteroduplex-DNA entsteht. RAD51 sucht dabei das Schwesterchromatid nach homologen Sequenzen ab und RAD54 stimuliert die Stranginvasion durch Formung von negativen Supercoils. Nach der Invasion kommt es zur Synthese des DNA-Stranges über die DSB-Sequenz hinweg zur Wiederherstellung der fehlenden Sequenzen im Bereich der Bruchstellen. Dieser Prozess, der auch als *branch migration* bezeichnet wird, ermöglicht die Freigabe des

neusynthetisierten DNA-Stranges und dessen Bindung an das andere Ende des Doppelstrangbruches, wo er nun als Matrize für die Reparatursynthese des zweiten DNA-Stranges dient. Auf diese Weise kommt es zu einem Transfer von Sequenzinformationen, der auch als Genkonversion bezeichnet wird. Im Bereich der invasierten Stelle wird eine Holliday Junction (HJ) gebildet, die sich von dort in beide Richtungen bewegt. In Folge dessen wird die Holliday Junction aufgelöst und es entsteht entweder ein Cross-over-Ereignis oder ein nicht Cross-over-Ereignis (Helleday, 2003).



Doppelstrangbruch

Resektion des 5'-DNA-Endes

Invasion des geschädigten Stranges
in das Schwesterchromatid

DNA-Synthese

Branch migration

Freigabe des neusynthetisierten
DNA-Stranges

Abbildung 1: Modell des synthesis dependent strand annealing (SSDA) modifiziert nach Helleday et al., 2007

Das klassische Holliday junction Modell (Abb. 2) unterscheidet sich vom SDSA nur durch die Ausbildung zweier anstatt einer Holliday-Struktur mit einem D-Loop. Es entspricht dem klassischen Modell der Homologen Rekombination und dient der Erklärung von Genkonversionen und *crossover*-Ereignissen, die simultan nach einem Doppelstrangbruch während der Meiose auftreten können. Bei diesem Modell dringen beide resezierten einzelsträngigen Enden des DNA-Doppelstrangbruches in den intakten homologen DNA-Strang ein und bilden eine doppelte Holliday-Struktur aus, die endonukleolytisch aufgelöst werden muss. Je nachdem, wie die Holliday-Strukturen aufgelöst werden, kommt es zu einem *crossing-over* oder einer Genkonversion.

Der Unterschied zwischen breakage induced replication (BIR) und der klassischen Homologen Rekombination liegt darin, dass nur ein DNA-Ende zur Invasion zur Verfügung steht. Dabei handelt es sich um den Leitstrang der Replikationsgabel, der auf den erzeugten Einzelstrangbruch trifft und so zu einem Doppelstrangbruch führt. Das 5'-Ende der Template-DNA wird entfernt und das daraus entstehende einzelsträngig vorliegende 3'-Ende des neusynthetisierten DNA-Stranges dient zur Stranginvasion (Llorente et al., 2008). Nach Sequenz-Synthese über den Einzelstrangbruch, wandert das freie DNA-Ende in das intakte DNA-Molekül ein und die Replikation wird wieder aufgenommen. Aus diesem Reparaturereignis resultiert ein Schwesterchromatidaustausch ohne Genkonversion (Strumberg et al., 2000). Bislang konnte die Reparatur über BIR ausschließlich für den Leitstrang, aber nicht für den Folgestrang beobachtet werden.

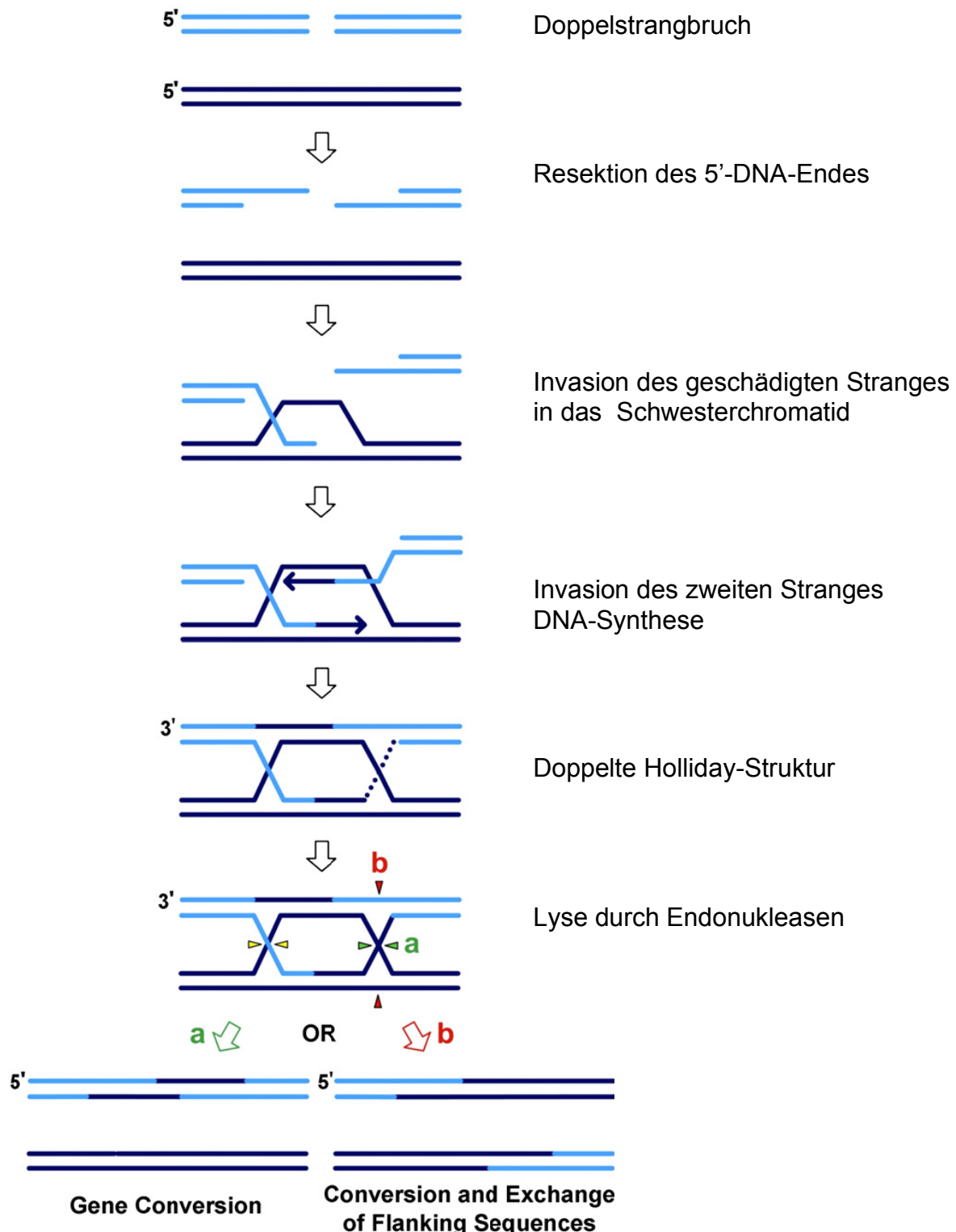


Abbildung 2: Klassisches Holliday-Modell für die Homologie-vermittelte Reparatur von zweiseitigen DSB modifiziert nach Helleday et al., 2007

1.3.2.2 Nicht-Konservative Homologe Rekombination

Wenn sich ein Doppelstrangbruch zwischen zwei sich wiederholenden Sequenzen von 20-50 Basenpaaren (engl. repeats) auf demselben DNA-Strang befindet, kann er über das single strand annealing repariert werden. Die DNA-Enden werden reseziert, sodass überhängende einzelsträngige DNA-Sequenzen entstehen. Die komplementären Stränge der homologen Sequenzen hybridisieren, wobei die restliche überhängende DNA durch Endonukleasen reseziert wird (Abb. 3). Dieser Reparaturweg ist RAD51 unabhängig und benutzt RAD52 als Schlüsselprotein. Im Vergleich zur HR ist das SSA mutagen, da sowohl die repeats als auch die Sequenzen zwischen den repeats verloren gehen.

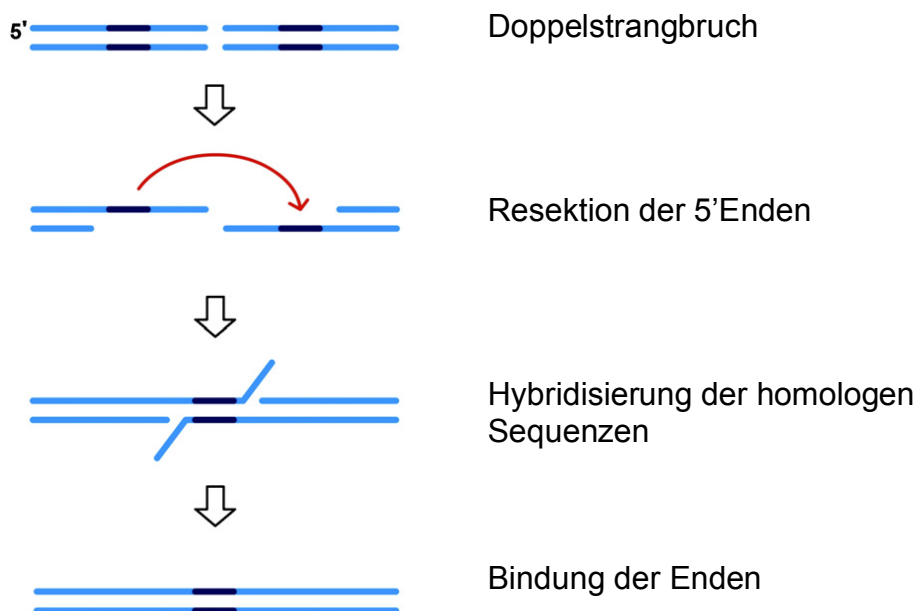


Abbildung 3: Modell des single strand annealing (SSA) modifiziert nach Helleday et al., 2007. Die dunkelblauen Stellen stellen homologe Sequenzen dar.

1.4 Bedeutung von RAD51 für die Doppelstrangbruch-Reparatur

RAD51 ist das Schlüsselprotein der homologen Rekombination und wird für die Homologiesuche und -paarung, den Strangtransfer, die Stranginvasion und den Strangaustausch benötigt. Mit Hilfe der assoziierten Proteinen BRCA2, RAD52, RAD54, RAD54B sowie den RAD51 Paralogen RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 und XRCC3 polymerisiert RAD51 auf der ssDNA und bildet ein Nukleoproteinfilament aus (Benson et al., 1994, Ogawa et al., 1993, Sung and Robberson, 1995).

Die Forschung an den Proteinen der HR ist komplex, da das Knockout von Rad51 bei Mäusen schon embryonal letal ist (Lim and Hasty, 1996, Tsuzuki et al., 1996). Rad51^{-/-} Zellen zeigten eine Akkumulation von Chromosomenaberrationen in Wirbeltieren und eine Einleitung in den Zelltod (Sonoda et al., 1998). Dies ist ein weiterer Hinweis, dass RAD51 eine essentielle Rolle bei der homologen Rekombination und beim Erhalt der genomischen Stabilität spielt. Eine weitere Arbeit konnte zeigen, dass Rad51-defiziente Zellen eine Akkumulation von DSB nach induziertem Stress aufwiesen (Game et al., 2003).

Das menschliche Rad51- Gen kodiert ein 339 Aminosäuren Protein mit einem relativen Molekulargewicht von 37 kDa (Benson et al., 1994). Die Expression des RAD51 Proteins ist in der G0/G1 Phase am niedrigsten, stärker in der S-Phase und am stärksten in der G2/M-Phase (Chen et al., 1997, Flygare et al., 1996, Yamamoto et al., 1996).

RAD51 wird von CHK1 an Thr-309 phosphoryliert. Zudem ist CHK1 für die Rekrutierung von RAD51 an das Chromatin, für eine effizientere DNA-Reparatur und für das zelluläre Überleben nach Replikationsstress notwendig (Sorensen et al., 2005). Die ATM und c-Abl abhängige Phosphorylierung von RAD51 an Thr-54 hemmt die DNA-Bindung von RAD51 und den DNA Strangaustausch durch RAD51 (Yuan et al., 1998), wobei die Aktivierung über Thr-315 die Komplexbildung zwischen RAD51 und RAD52 stimuliert und die Genkonversion erleichtert (Chen et al., 1999a). Nach Schadensinduktion wie Bestrahlung konnte gezeigt werden, dass RAD51 vom Zytoplasma in den Zellkern transportiert wird (Gildemeister et al., 2009). Die Aktivität von RAD51 in der S-Phase ist durch die Bildung von Komplexen charakterisiert, von denen man glaubt, dass sie Stellen identifizieren, an denen angehaltene oder geschädigte Replikationsgabeln repariert werden (Daboussi et al., 2008, Haaf et al., 1995, Raderschall et al., 1999). Dabei bleibt die Menge an mRNA und Protein unverändert (Flygare et al., 1996, Haaf et al., 1995, Mladenov et al., 2006). Die Akkumulation von RAD51 ist dosisabhängig, beginnt zehn Minuten nach Schadensinduktion und erreicht ihr Maximum nach sechs bis acht Stunden (Godthelp et al., 2002, Tashiro et al., 2000). Die Beladung der DNA und die Bindung an die DNA durch RAD51 wird durch BRCA2 gefördert (Davies et al., 2001, Godthelp et al., 2002, Pellegrini et al., 2002). Andere Studien zeigten eine verminderte Bildung von RAD51 Foci bei FA (Fanconi) mutierten Zellen (Digweed et al., 2002, Pichierri et al.,

2002, Willers et al., 2008). Diese Ergebnisse weisen auf eine Abhängigkeit des RAD51 Komplexes mit den Fanconi Proteinen hin.

Bei Überexpression von RAD51 wurde in verschiedenen Studien eine erhöhte Rate der Rekombination, eine gesteigerte Resistenz gegenüber ionisierender Bestrahlung (Vispè et al., 1998), eine erniedrigte Angehrate, ein G2-Arrest und eine gesteigerte Apoptose gezeigt (Flygare et al., 2001). Raderschall et al. (Raderschall et al., 2002) beobachtete neben einer reduzierten Anzahl an G2-Aberrationen und einer Wachstumsverzögerung eine Resistenz gegenüber DNA-Schäden –induzierter Apoptose.

1.5 Bedeutung der Expression von RAD51 für die Prognose bei Tumorpatienten

Im folgenden Abschnitt wird die Rolle von RAD51 bei verschiedenen malignen Tumoren im klinischen Zusammenhang dargestellt.

Die Mehrheit der Patientinnen mit Brustkrebs erhalten nach der Operation eine Radiotherapie, um das Risiko eines Lokalrezidives zu verringern (Clarke et al., 2005). Wie oben beschrieben interagiert RAD51 mit den Brustkrebsgenen BRCA1 und BRCA2 (Chen et al., 1999b, Scully et al., 1997, Wong et al., 1997).

Bei der Untersuchung der Expression von Proteinen der Homologen Rekombination bei betroffenen prämenopausalen Patientinnen zeigte eine hohe Expression von RAD51 eine verringerte Wahrscheinlichkeit ein Lokalrezidiv zu entwickeln (Soderlund et al., 2007), wie es in der Abbildung 4 graphisch dargestellt ist.

In der Arbeit von Welsh et al. (Welsh et al., 2009) konnte ebenfalls bei erhöhter RAD51 Expression ein besseres Überleben für Patienten mit Glioblastomen gezeigt werden. Dagegen wurde bei Patienten mit NSCLC (non-small-cell lung cancer) jedoch beobachtet, dass die Expression von RAD51 in den Tumorzellen ein negativer prognostischer Faktor in Bezug auf das Gesamtüberleben besonders im klinischen Stadium 1 ist (Qiao et al., 2005) (Abb. 5).

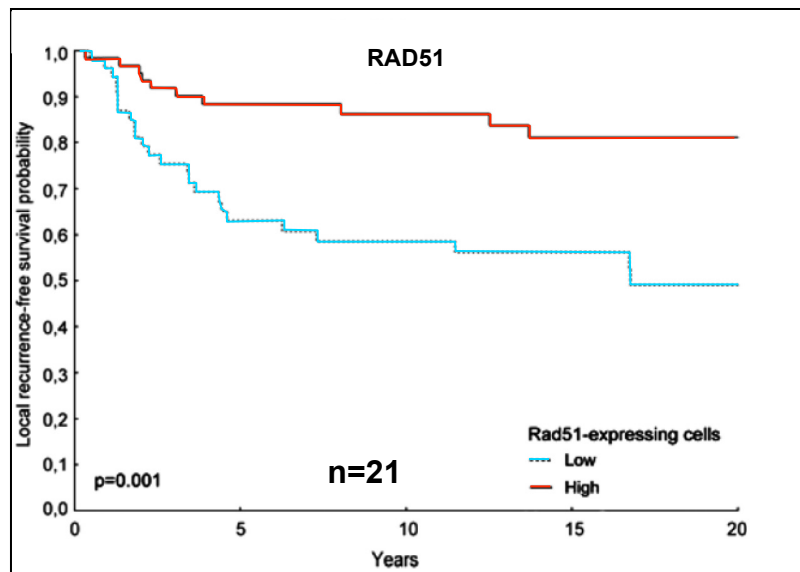


Abbildung 4: Kaplan–Meier–Überlebenskurve in Bezug auf die RAD51 Expression bei Patientinnen mit Brustkrebs (Grafik entnommen aus Söderlund et al., 2007)

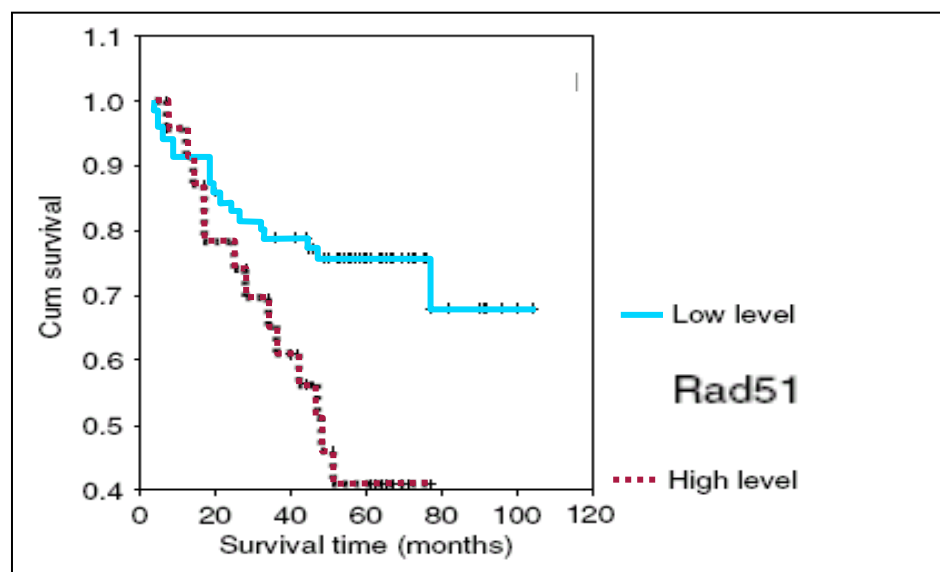


Abbildung 5: Kaplan–Meier–Überlebenskurve in Bezug auf die RAD51 Expression bei Patienten mit NSCLC in dem klinischen Stadium I (Grafik entnommen aus Qiao et al., 2005)

Ebenfalls wurde RAD51 als unabhängiger negativer prognostischer Faktor in colorektalen Karzinomen (Tennstedt et al., 2012) und gegensätzlich zu den oben beschriebenen Ergebnissen bei Patientinnen mit Brustkrebs (Le Scodan et al., 2010) beobachtet. Ähnliche Ergebnisse wurden für Pankreas- und Ösophagus Karzinome untersucht (Maacke et al., 2002, Li et al., 2011).

Insgesamt weisen diese Ergebnisse auf einen negativen Effekt der RAD51 Überexpression für Tumorpatienten hin. Dieser negative Effekt kann sich als Lokalrezidiv oder einer Metastasierung bemerkbar machen.

1.6 Fanconi-Anämie

Die Fanconi-Anämie (FA) ist eine autosomal rezessive Erbkrankheit, die nach dem Schweizer Kinderarzt Guido Fanconi benannt ist. Die klinischen Merkmale der Erkrankung sind angeborene Fehlbildungen an den Extremitäten, an den Nieren, an der Speiseröhre, an den Ohren oder am Herzen. Zusätzlich kann sich eine kleine Statur, ein kleiner Kopfumfang, Pigmentanomalien der Haut und besonders eine Rückbildung des Knochenmarks (schwere aplastische Anämie), sowie ein extrem erhöhtes Risiko für Leukämien und solide Tumore (insbesondere Schleimhautkarzinome) zeigen. Das durchschnittliche Alter, eine Insuffizienz des Knochenmarks zu entwickeln, liegt zwischen 7 und 8 Jahren. Oft versterben FA-Patienten an den Komplikationen einer aplastischen Anämie. In diesen Fällen ist die einzige mögliche Therapie eine autologe Knochenmarkstransplantation.

Patienten mit FA zeigen auf Lebenszeit ein stark erhöhtes Krebsrisiko, besonders für akute myeloblastische Leukämie (AML) und für Plattenepithelkarzinome im Kopf- und Halsbereich. Zurzeit sind dreizehn verschiedene Fanconi-Anämie-Untergruppen, die nach Buchstaben des Alphabets benannt werden, bekannt: Fanconi-Anämie A, B, C, D1, D2, E, F, G, I, J, L, M und N. Den Untergruppen liegen unterschiedliche Gendefekte auf den Chromosomen zugrunde und unterscheiden sich klinisch aber kaum.

1.6.1 Bedeutung der Fanconi-Proteine für die Reparatur von DNA-Schäden

Auf zellulärer Ebene zeigen FA Zellen eine Überempfindlichkeit gegenüber DNA-Kreuzvernetzenden Chemotherapeutika wie MMC (Mitomycin C), Cisplatin oder DEB (Diepoxybutan) (Wang and D'Andrea, 2004, D'Andrea and Grompe, 2003, Joenje et al., 1997, Levitus et al., 2004, Garcia-Higuera et al., 2001). Dem aktuellen Stand der Wissenschaft zufolge sind zurzeit 16 FA Proteine bekannt, wobei acht Proteine (A, B, C, E, F, G, L, M) nach DNA-Schaden einen Enzymkomplex (Core-Komplex) bilden

(D'Andrea and Grompe, 2003, Joenje et al., 1997, Levitus et al., 2004, Wang and D'Andrea, 2004).

Der Fanconi Komplex ist besonders für die Reparatur von DNA-Kreuzvernetzungen in der homologen Rekombination wichtig. Als Antwort auf einen DNA-Schaden oder während der S-Phase wird der FA Enzymkomplex aktiviert und FANCL funktioniert als Ubiquitin Ligase, die FANCD2 monoubiquitiniert (Garcia-Higuera et al., 2001) und somit aktiviert.

In Folge dessen vermittelt FANCD2 die Beladung des Chromatins mit RAD51 und weiteren Proteinen der homologen Rekombination wie BRCA2, um den Reparaturprozess in Gang zu setzen (Wang et al., 2004b) (Abb. 6).

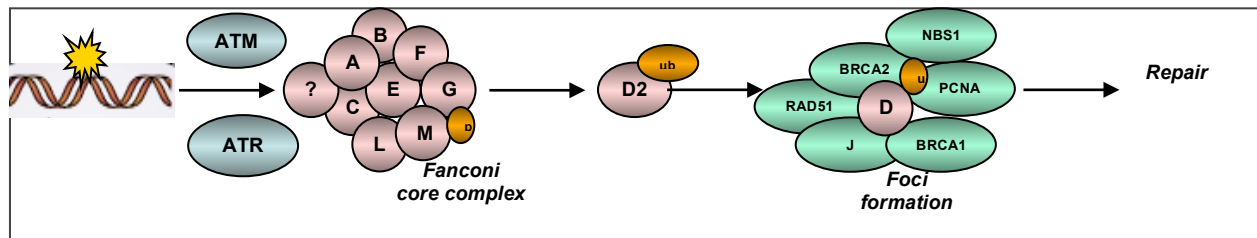


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Fanconi-Anämie DNA-Reparaturweges. DNA Schädigung aktiviert den Komplex der Fanconi Anämie-assoziierten Proteine FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL und FANCM. FANCL stellt die Ubiquitin-Ligase dar welche zur Mono-Ubiquitinierung und damit Aktivierung von FANCD2 führt. FANCD2 vermittelt zusammen mit BRCA2 die Beladung des Chromatins mit RAD51.

1.7 Ziel der Arbeit

RAD51 ist das Schlüsselprotein der Homologen Rekombination und daher für die Reparatur von DSB essentiell. Die Überexpression von RAD51 kann sich in einer verbesserten Homologen Rekombination oder einer erhöhten Resistenz gegenüber DNA-Schäden (und beispielsweise erniedrigter Strahlensensitivität von malignen Tumoren) auswirken. Andererseits zeigen Zellen mit RAD51 Überexpression auch eine erhöhte genomische Instabilität und erhöhte Tumorgenese (Klein, 2008). In einer vorangegangenen Arbeit des Labors für Strahlenbiologie & Experimentelle Radioonkologie wurde gezeigt, dass eine Überexpression von RAD51, nicht - wie erwartet- zu einer Resistenzbildung nach vergleichbarer Schadensinduktion führte. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die veränderte Synthese bzw. Aktivierung von Sensoren der DNA-Reparatur (z.B. ATM, ATR oder FANCD2) bei RAD51

Überexpression oder eine fehlerhafte Beladung des Chromatins mit RAD51 (wofür neben BRCA2 auch die Proteine der Fanconi Anämie verantwortlich sind) darstellen. Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss der Überexpression von RAD51 – dem zentralen Protein der homologen Rekombination – auf die funktionelle Aktivierung der nachfolgenden Signalkaskade der DNA-Reparatur und ihrer Konsequenz für das zelluläre Überleben zu überprüfen. Hierzu wurde die Phosphorylierung von ATM/ATR und FANCD2 nach Schadensinduktion mittels Bestrahlung beziehungsweise Behandlung mit MMC und Wasserstoffperoxid mittels Western Blot und zelluläres Überleben anhand des Koloniebildungstests untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien (Allgemein)

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).

2.1.2 Reagenzien und Medien für die Zellkulturen und für den Koloniebildungstest

Name	Zusammensetzung/Hersteller	Lagerung
Kulturmedium	750 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), (Gibco) 75 ml 10% Foetales Kälberserum (FKS), (Gibco) 1250 µl Zeocin, (Invitrogen,) 25 ml Neomycin, (Invitrogen) 10 ml L-Glutamin, (Gibco)	Bei 4°C
Trypsin-EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Gibco	Bei 4°C
Kristallviolett-Färbelösung	0,1 % (w/v) in H ₂ O bidest.	Raumtemperatur

Tabelle 1: Reagenzien für die Zellkultur und für den Koloniebildungstest.

2.1.3 Chemikalien für die Schadensinduktion

Name	Hersteller
Ponasteron A	Invitrogen, Darmstadt
Mitomycin C (MMC)	Medac, Hamburg
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Calbiochem, Darmstadt

Tabelle 2: Chemikalien für die Schadensinduktion.

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien wurden im Allgemeinen über die Firmen Becton Dickinson (Heidelberg), Brand (Melsungen), Corning (Corning, NY), eppendorf (Hamburg) und Sarstedt (Nürmbrecht) bezogen. Gewebekulturflaschen und -schalen (Cellstar) wurden bei Greiner Bio-One, (Frickenhausen) bestellt, 6-Well-Gewebekulturplatten und *Culture Slides* bei Becton Dickinson. Criterion Tris-HCl-Polyacrylamidgele wurden bei Bio-Rad Laboratories (München) erworben.

2.1.5 Puffer und Lösungen

Das verwendete Wasser wurde, soweit nicht anders angegeben, mit einer Millipore-Anlage (Milli-Q academic, Millipore, Molsheim, F) aufbereitet. Es wird im Folgenden als H₂O bidest. bezeichnet. Wenn nicht 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.

2.1.5.1 Puffer und Lösungen für die Proteinisolierung

Name	Zusammensetzung	Lagerung
PMSF	200 mM in Isopropanol	Aliquots bei -20°C
Puffer A	20 mM Hepes 450 mM NaCl 50 mM NaF 0,2 mM Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA) 0,5 mM Dithiothreitol (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

PBS (Phosphate buffered saline)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 2 mM KH ₂ PO ₄ 10 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O Autoklaviert	Raumtemperatur
Probenpuffer nach Laemmli	50 mM tris-HCl, pH 6,8 100 mM Dithiothreitol DTT 2 % SDS 0,1 % Bromphenolblau 10 % Glycerol	Aliquots bei -20°C
10 % SDS (Sodiumdodecylsulfat)	10 % SDS in H ₂ O bidest.	Raumtemperatur

Tabelle 3: Puffer und Lösungen für die Proteinisolierung.

2.1.5.2 BCA-Assay

Name	Hersteller
Reagenz A	Sigma, Seelze
Reagenz B	Sigma, Seelze

Tabelle 4: Reagenzien für den BCA-Assay.

2.1.5.3 Puffer und Lösungen für den Western-Blot

Name	Zusammensetzung / Hersteller	Lagerung
Electrochemiluminescence (ECL)	Reagenz 1, (Amersham Bioscience) Reagenz 2, (Amersham Bioscience)	Bei 4°C
Film-Entwickler	10 % Eukobrom (Tetenal)	Bei 4°C
Film-Fixierer	20 % Superfix plus (Tetenal)	Bei 4°C
1x Laufpuffer	10 % 10x TG-Puffer 1 % Sodiumdodecylsulfat (SDS), (Carl Roth GmbH)	frisch angesetzt
5% Magermilch	5% Magermilchpulver, (Naturaflor, Töpfer)	frisch angesetzt

	in TBS-Tween20	
10 % Sodiumdodecylsulfat (SDS)	10 % SDS (Carl Roth GmbH)	Raumtemperatur
10× Tris-Buffered Saline (TBS)-Puffer	10 mM Tris-HCL, (Sigma) 100 mM NaCl, (J.T. Baker) pH Einstellen auf 7,5	Raumtemperatur
Tris-Buffered Saline (TBS)-Tween20	0,1 % Tween20, (Sigma) in 1× Tris-Buffered Saline (TBS)	Raumtemperatur
1x Transferpuffer nach Towbin	10 % 10x Tris-Glycin (TG)-Puffer 20 % Methanol, (Merck)	Bei 4°C
10x Tris-Glycin (TG)-Puffer	1,92 M Glycin, (Carl Roth GmbH) 250 mM Tris Base, (Sigma) Ph = 8,3 , nicht korrigieren Autoklavieren	Raumtemperatur

Tabelle 5: Puffer und Lösungen für den Western-Blot.

2.1.6 Antikörper für den Western Blot

Für die Detektion von Western-Blot-Extrakten wurde das Licor System verwendet. Die primären Antikörper wurden von Cell Signaling und Santa Cruz Biotechnology (USA) und die sekundär-Antikörper wurden von Licor (Nebraska, USA) bezogen.

Antikörper	Herkunft	Firma/Nummer
Phosho-ATM	Mouse mAb	Cell Signaling (Ser1981)(10H11.E12) # 4526
ATM	Rabbit mAb	Cell Signaling (D2E2) # 2873
Phosho-FANCD2	Rabbit mAb	Cell Signaling Phosho-FANCD2 (Ser222) # 4945
FANCD2	Mouse mAb	Santa Cruz Biotechnology,

		INC FANCD2 (FI17): sc20022
Phospho-ATR	Rabbit mAb	Cell Signaling (Ser 428) #2853
ATR	Rabbit mAb	Abcam, Cambridge, ENG ab10312
RAD51	Rabbit mAb	Calbiochem, Darmstadt Ab-1 / PC130
β Actin	Mouse mAb	Sigma, St.Louis, USA A5441
Antibody to Mouse IgG		Amersham Biosciences, Freiburg NA931
Antibody to Rabbit IgG		Amersham Biosciences, Freiburg NA934

Tabelle 6: Antikörper für den Western-Blot.

2.1.7 Größenstandards

Folgende Größenstandards wurden verwendet, um das Molekulargewicht von pATM, ATM, pFANCD2, FANCD2, pATR, ATR, RAD51 und β -AKTIN in Polyacrylamidgelen zu überprüfen:

Name	Hersteller	Beschreibung
MagicMark Western Standards	Invitrogen, Darmstadt	Standardbanden werden nach Detektion mit dem Sekundärantikörper auf der

		Membran sichtbar.
Kaleidoscope Prestained Standards	Bio-Rad, München	Standardbanden sind bereits im Gel und direkt nach dem Transfer auf der Membran sichtbar.

Tabelle 7: Größenstandards für Western-Blot-Analysen

2.1.8 Geräte

Name	Hersteller
Blotkammer	Criterion Blotter Bio-Rad
Brutschrank	ICN Flow (Automatik CO ₂ Incubator Model)
Coulter Counter	Modell Z1, Beckmann Coulter, Krefeld
Elektrophoresekammer	Criterion Cell, Bio-Rad, München
Entwicklermaschine	Hyperprocessor, Amersham pharmacia biotech
Kamerasystem	Night Owl Molecular Light Imager, EG & G Berthold, Bad Wildbad
Keimzählgerät	BZG 28, WTW, Weilheim
Photometer	Bio-Photometer, eppendorf, Hamburg
Schüttler	Edmund Bühler, Johanna Otto GmbH, Hechingen
Sterile Werkbank	HeraSafe, Heraeus, Hanau
Röntgenröhre	Gulmay Medical RS 225
Waage	Mettler P 1200

Tabelle 8: Fabrikate der verwendeten Geräte.

2.1.9 Software

Folgende Programme wurden zur Aufnahme und Analyse von Daten genutzt:

WinLight 3.2. (Media Cybernetics); Prism 5 (GraphPad).

2.2 Methoden

2.2.1 Zelllinien

Die Experimente der vorliegenden Arbeit basieren auf den Zelllinien UiRAD51 und UiLacZ, die beide ursprünglich aus einem humanen Osteosarkom mit geringer endogener RAD51-Expression generiert (Maacke et al., 2000) wurden. In die UiRAD51-Zellen wurde mittels eines Plasmids die Sequenz des humanen Rad51-Gens eingeführt, das unter die Kontrolle eines durch das Juvenilhormon Ponasteron induzierbaren Promoters gestellt wurde (Abb. 7). Zur Überprüfung des Effektes der Transfektion wurde parallel eine isogenetische Linie, UiLacZ, hergestellt, die an Stelle des Rad51-Gens, das aus der Hefe stammende β -Galaktosidase-Gen enthielt. Die Expression des Rad51- bzw. β -Galaktosidase-Gens wurde durch Zugabe von Ponasteron (1 μ mol) und einer Inkubationszeit von 24 h induziert. Zur Aufrechterhaltung der Transfektion wurde das Plasmid mit jeweils einem Resistenzgen gegen Zeocin und Geneticin ausgestattet (Helleday et al., 2007b).

Vor Beginn dieser Arbeit wurde eine große Menge der jeweiligen Zellen eingefroren und in regelmäßigen Abständen wieder aufgetaut, um die Zellen wie empfohlen nicht über 30 Passagen hinaus zu kultivieren (Elbashir et al., 2002). Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen auf Mykoplasmen überprüft.

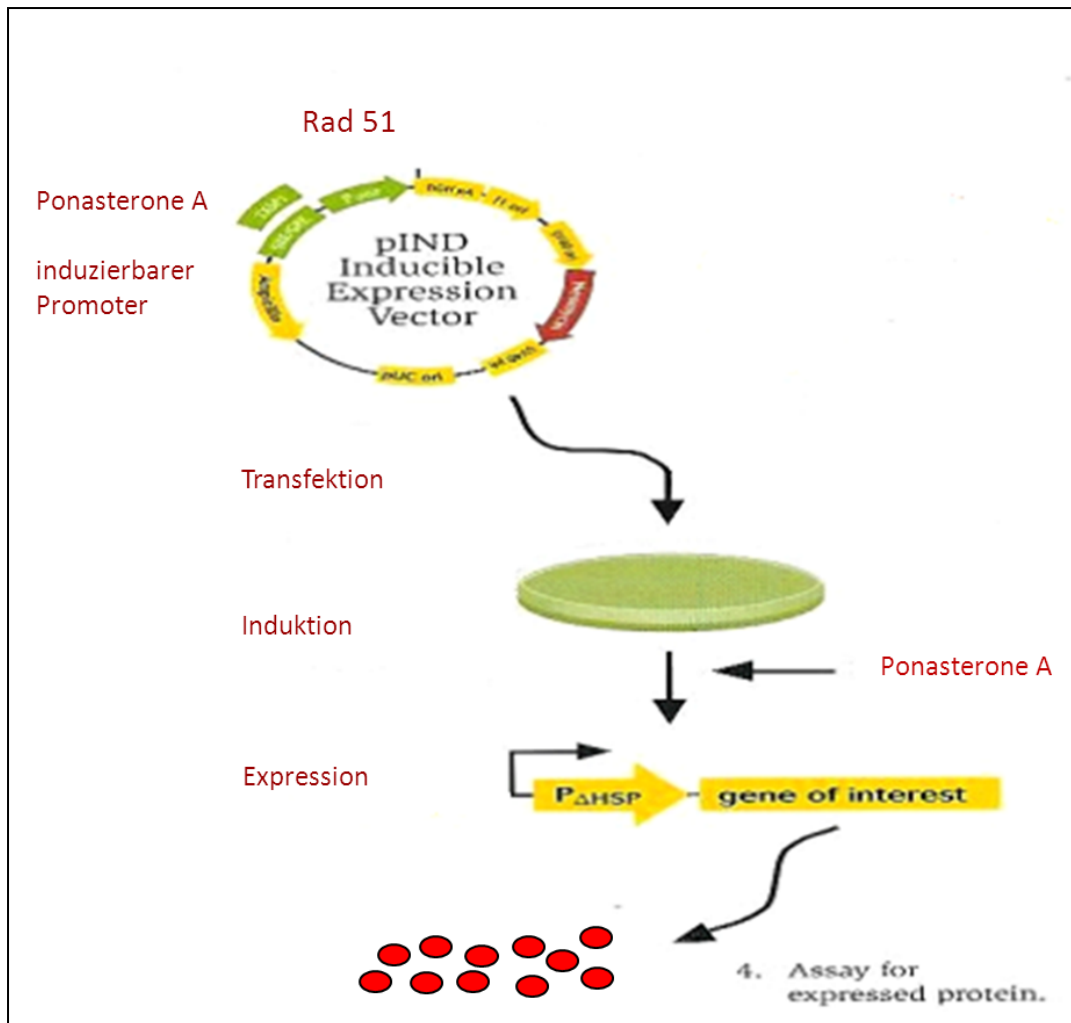


Abbildung 7: Modell-System für die RAD51-Überexpression.

2.2.2 Zellkulturhaltung

Die Zellkulturhaltung erfolgte durch Aussaat der Zellen in 75 cm² Zellkulturflaschen (Falcon) bei 37°C in einem Inkubator mit 10% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit. Als Wachstumsmedium für die UiRAD51- und UiLacZ-Zellen diente DMEM unter Zusatz von 5% hitzeinaktiviertem FCS, 2% L-Glutamin, 100 µg/ml Zeocin und 0,05 % Neomycin.

Ein- bis zweimal wöchentlich wurde das Medium entfernt und die Zellen für 1-2 min mit 5 ml 0,25 % Trypsin versetzt um die Haftung der Zellen am Flaschenboden aufzuheben. Die Zelldichte wurde im Coulter Counter ermittelt. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Kulturmedium resuspendiert und in geringerer Dichte neu ausgesät.

2.2.3 Bestrahlung und Dosimetrie

Die Bestrahlung erfolgte mit einer technischen Gulmay-Röntgenröhre bei einem Röhrenstrom von 15 mA und einer Röhrenspannung von 200 kV. Zur Aufhärtung der Strahlen 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 mit einer Dosisleistung von 1,2 Gy/min bei Raumtemperatur bis zu der benötigten Gesamtdosis von 6 Gy.

24 Stunden vor der Bestrahlung wurde die Expression des Rad51- bzw. des β -Galaktosidase-Gens durch Zugabe von Ponasteron (15 μ mol/15 ml Medium) induziert.

Sowohl nach einer ½, 1, 2, 4, 6, 8 als auch 24 Stunden nach der Bestrahlung wurden die Proteine nach der Methode nach Finnie et al. (Finnie et al., 1995) extrahiert.

2.2.4 Herstellung der Mitomycin C Lösung

Bei der Herstellung der Mitomycin C Lösung und bei der Behandlung der Zellen mit Mitomycin C wurden alle Arbeitsschritte unter einer sterilen Werkbank durchgeführt, um eine Degradation oder Kontamination der Zellen zu verhindern. Weiterhin wurde bei der Herstellung der Mitomycin C Lösung unter abgedunkelten Bedingungen gearbeitet, um eine Deaktivierung von Mitomycin C zu verhindern.

Zunächst wurde das pulverförmige Mitomycin C in 20 ml H₂O bidest. unter Schütteln bei 37°C über 30 Minuten in einem Falcon-Röhrchen gelöst. Aus dieser Lösung wurde nach einer Abkühlungszeit von 5 Minuten 1 ml entnommen und erneut mit 9 ml H₂O bidest. verdünnt. Anschließend wurde die Lösung steril filtriert.

2.2.5 Schadensinduktion durch Mitomycin C

Pro Versuch wurden 8 Zellkulturflaschen (75 cm²) mit gleicher Zellzahl angesetzt. Vier Zellkulturflaschen der exponentiell wachsenden Zellen wurden mit Ponasteron (15 μ g/15ml Medium) für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden zwei unbehandelte und zwei mit Ponasteron behandelten Zellkulturflaschen mit 240 μ l (160ng/ml) Mitomycin C Lösung angesetzt. Als unbehandelte Kontrolle wurden jeweils zwei Zellkulturflaschen mit und zwei ohne Ponasteronbehandlung mitgeführt. Für die später Versuchsreihe mit

unterschiedlichen Zeitwerten wurden die Zellen bei jedem Versuch entweder nach einer ½, 1, 2, 4, 6, 8 oder nach 24 Stunden nach der Behandlung nach der Methode nach Finnie et al. (Finnie et al., 1995) extrahiert.

2.2.6 Schadensinduktion durch H₂O₂

Um eine Degradation oder Kontamination der Zellen zu verhindern, wurden alle folgenden Arbeitsschritte unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

Bevor die Zellen mit Wasserstoffperoxid behandelt werden konnten, musste die H₂O₂-Stammlösung (1M/8,8M) zuerst mit Wasser durch eine Verdünnungsreihe auf 50 µM verdünnt werden, wie es folgende Tabelle darstellt.

Gewünschte Konzentration	Menge der neuen Lösung	Menge an Wasser
1M	113,6 µl Stammlösung	886,4 µl H ₂ O
100 mM	100 µl 1M-Lösung	900 µl H ₂ O
1 mM	100 µl 100 mM-Lösung	900 µl H ₂ O
100 µM	100 µl 1mM-Lösung	900 µl H ₂ O
50 µM	500 µl 100µM-Lösung	500 µl H ₂ O

Tabelle 9: Verdünnungsreihe von H₂O₂.

Nachdem die verdünnte Lösung mit Kulturmedium vermischt wurde, konnten die Zellen der Schadensinduktion durch Wasserstoffperoxid ausgesetzt werden. Hierfür wurde der Versuch wie bei der Schadensinduktion durch Mitomycin C durchgeführt. Dabei erhielt man sowohl jeweils Zellen mit und ohne Ponasteronbehandlung als auch jeweils Zellen mit und ohne Schadensinduktion. 24 Stunden vor der Behandlung mit Wasserstoffperoxid wurde die Expression des RAD51-Proteins durch Zugabe von Ponasteron (15µmol/15 ml Medium) induziert. Sowohl nach einer ½, 1, 2, 4, 6, 8 als auch 24 Stunden nach der Schadensinduktion wurden die Proteine nach der Methode nach Finnie et al. (Finnie et al., 1995) extrahiert.

2.2.7 Proteinisolierung

Die Extraktion von Proteinen wurde nach Finnie et al. (Finnie et al., 1995) durchgeführt. Bei dieser Methode wird das gesamte Protein der Zelle mechanisch und mittels Detergenz extrahiert. Exponentiell wachsende Zellen wurden mit 8 ml PBS gespült und mit 2 ml 0,25% Trypsin abgelöst. Daraufhin wurden die Zellen sofort in 10ml PBS / 10 % FKS aufgenommen und resuspendiert. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei 4°C und unter einer sterilen Werkbank (Heraeus), um eine Degradation oder Kontamination des Proteinextraktes zu verhindern. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und 8 min mit 1200 rpm bei 4°C zentrifugiert (Labofuge 400R). Anschließend wurde der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe vorsichtig abgesaugt. Das Zellsediment wurde in 10 ml kaltem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand erneut mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das Zellsediment wurde in 1 ml kaltem PBS resuspendiert und in ein steriles 1,5 ml Transfektionsgefäß transferiert. Die Zellsuspension wurde erneut bei 4°C mit 1200 rpm für 8 min zentrifugiert (Labofuge 400R). Parallel wurde ein 146 µl Aliquot des Puffers A auf Eis aufgetaut, mit 5 µl PMSF und 50 µl Glycerol versetzt und gemischt. Das Volumen des Zellsediments wurde abgeschätzt, und es wurde ein dem Sedimentvolumen gleiches Volumen an Extraktionspuffer zugegeben. Bei einem sehr kleinen Sediment wurden 20 µl Extraktionspuffer eingesetzt. Die Zellen wurden in dem Extraktionspuffer resuspendiert. Anschließend wurden die zellulären Strukturen durch plötzliches Gefrieren 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 Zellbestandteile für 10 min bei 11000 rpm und 4 °C (Microfuge R) sedimentiert. Der Proteinextrakt wurde abgenommen, in ein neues, steriles 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt und gemischt. Für die Proteinbestimmung wurden 2 µl des Extraktes abgenommen. Der verbleibende Zellextrakt wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.8 Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem BCA Assay

Für die Quantifizierung der extrahierten Proteine wurde die BCA (Bicinchoninsäure)-Methode (Smith et al., 1985) mit dem Reagenz der Firma Sigma eingesetzt. Basierend auf der Biuret-Reaktion werden Cu^{2+} -Ionen durch das Protein zu Cu^{+} -

Ionen reduziert und bilden einen Komplex mit einem kolorimetrischen Reagenz, das Bicinchoninsäure 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.

2 µl des Proteinextraktes wurden in 48 µl sterilem H₂O bidest. verdünnt. Als Blindprobe diente 2 µl Extraktionspuffer und 48 µl steriles H₂O bidest. 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 gemischt und 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Proben kurz bei Raumtemperatur abgekühlt, in Küvetten transferiert und die Extinktion bei 562 nm im Photometer gemessen. Jede Messung wurde innerhalb von 10 min vollendet.

Als Standard diente Rinderserumalbumin. Die Standardkurve wurde mit sechs Verdünnungen zwischen 25 und 1000 µg/ml BSA aufgenommen und im Gerät gespeichert. Jeder Standardwert wurde dreimal bestimmt.

2.2.9 Western Blot (Prinzip)

Das Western Blot Prinzip bezeichnet die Übertragung (engl. Blotting) von Proteinen auf eine Trägermembran durch Diffusion, Kapillarwirkung oder Elektrophorese. In den folgenden Versuchen wurde die Methode der Elektrophorese angewendet. Anschließend können die übertragenden Proteine unterschiedlich wie zum Beispiel durch fluoreszierende Antikörper nachgewiesen werden.

1979 wurde das Western Blot Prinzip im Labor von George Stark an der Universität Stanford entwickelt (Renart et al., 1979). Die Bezeichnung des Western Blot stammt von den englischen Wörtern blot (d. Fleck, Klecks) und blotting paper (d. Löschpapier) ab, die das Verfahren als einen identischen Abdruck eines Originals beschreiben und vergleichen sollen.

Die Entwicklung der Blotting Technik wurde 1975 von Edwin Southern erfunden, bei der er DNA-Fragmente auftrennte und anschließend hybridisierte. Diese Technik wurde nach dem Erfinder als Southern Blot benannt. Als Anlehnung wurde die Auftrennung von RNA-Fragmenten als Northern Blot bezeichnet und anschließend die Bezeichnung des Western Blot entsprechend für die Proteinauftrennung eingeführt.

Der Ausdruck des Eastern Blot wird für verschiedene Methoden in Anspruch genommen, zum Beispiel für das Blotten von Lipiden auf Membranen, den Transfer nativer Proteine aus nichtdenaturierenden Gelen oder das Blotten von (sehr) kleinen Molekülen (Tanaka et al., 2007).

2.2.9.1 Spezifischer Proteinnachweis mittels SDS-PAGE und Western Blot

Die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels der denaturierten Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Es wurde das Criterion-System (Bio-Rad Laboratories) verwendet. Um die Proteineigenladung zu kompensieren, wurden die Proben mit SDS versetzt. SDS ist ein negativ geladenes Detergenz, das die Proteine mit einer negativen Ladung umhüllt. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung an das Gel wandern die Proteine in Richtung Anode und werden ihrer Größe nach aufgetrennt, wobei die kleinen Proteine schneller durch das Gel wandern als die großen. Mittels Western Blot werden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulose Membran überführt und dort fixiert. Für den immunologischen Nachweis des Zielproteins wird ein spezifischer Antikörper eingesetzt, der gegen genau dieses Protein gerichtet ist und an dieses bindet. Im nächsten Schritt wird ein zweiter Antikörper eingesetzt, der an das Fc-Fragment des ersten Antikörpers bindet. An dem zweiten Antikörper ist die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt, welche bei Zugabe eines entsprechenden Substrates eine Lichtreaktion auslöst, die dann durch eine Kamera oder über lichtempfindliche Filme sichtbar gemacht werden kann. Ein während der Gelelektrophorese mitgeführter Molekulargewichtsmarker ermöglicht eine Größenordnung der Proteine.

2.2.9.2 SDS-PAGE

Für die Gelelektrophorese wurden 50 µg Proteinextrakt mit 10 µl 5x Bio-Rad-Lämmli versetzt und mit sterilem H₂O bidest. auf 25 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Proben wurden durchmischt, kurz bei 4°C zentrifugiert und dann für 5 Minuten in ein kochendes Wasserbad gestellt, um eine Denaturierung der Proteine zu erreichen. Nach dem Aufkochen wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und nochmals kurz

bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung nicht direkt im Anschluss, so wurden die vorbereiteten Proben bei -80 °C gelagert. Die elektrophoretische Auftrennung wurde auf 7,5 %igen Tris-HCl Polyacrylamid-Gelen (Bio-Rad Laboratories) durchgeführt. Nach dem Auspacken wurde der Kamm aus den Gelen gezogen, die Gele in destilliertem Wasser gespült und in die Gelkammer eingesetzt. Die Pufferreservoirs wurden mit Laufpuffer gefüllt, die Taschen dreimal gespült und die Luftblasen am unteren Gelrand entfernt. Im Anschluss daran wurde das gesamte Volumen einer Probe in die jeweilige Tasche pipettiert. Dabei wurde je eine Geltasche mit einem Farb-Molekulargewichtsmarker (Kaleidoskop) und einem ECL-Molekulargewichtsmarker (Magic Mark) beladen. Der sichtbare Farbmarker zeigte die Proteinauftrennung im Gel und anschließend die Effizienz des Blots an. Der andere Marker wurde erst unter der Reaktion mit ECL sichtbar und diente dazu das Molekulargewicht der einzelnen Proteinbanden bestimmen zu können. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in einem Eisbad für 5 Minuten bei 100 V (Sammelphase) und für 60 Minuten bei 200 V (Trennphase).

2.2.9.3 Western Blot (Proteintransfer)

Der Transfer der im Gel aufgetrennten Proteine erfolgte auf eine PVDF-Trägermembran. Hierfür wurde die PVDF-Membran zunächst auf Gelgröße zurechtgeschnitten, kurz in Methanol aktiviert, dann 5 Minuten in destilliertem Wasser geschwenkt und 15 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Zwei Blotschwämme und zwei auf Gelgröße zurechtgeschnittene Filterpapiere wurden ebenfalls 15 Minuten in Transferpuffer gelegt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel aus der Gelkammer herausgenommen, der Gelplastikrahmen aufgebrochen und die Sammeltaschen und die Ränder des Gels entfernt. Das Gel wurde in Transferpuffer äquilibriert und anschließend mit Hilfe eines Filterpapiers in die Blothalterung überführt. Die Blotschichtung bestand aus Schwamm, Filterpapier, Gel, Membran, Filterpapier und Schwamm. Diese wurde dann zwischen die Elektroden der Blotkammer gesteckt und mit eisgekühltem Transferpuffer gefüllt. Der Western Blot erfolgte über Nacht bei einer Spannung von 10 V und einer Temperatur von 4°C. Der Transferpuffer wurde während der gesamten Zeit durch Rühren umgewälzt. Am darauffolgenden Tag wurde noch einmal für 0,5 h bei 100 V transferiert. Die Effektivität des Transfers wurde anhand des Two Color Molekulargewichtsmarkers überprüft.

2.2.9.4 Detektion und Auswertung der Proteinsignale

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran kurz mit TBS-Tween20 gespült und für 10 Minuten unter Schütteln gewaschen und danach für mindestens 8 Stunden bei 4°C blockiert. Die Blockierung erfolgte mit 5 % Magermilch und/oder BSA und diente dazu alle unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran zu sättigen. Nach der Blockierung wurde die Membran kurz in TBS-Tween20 gespült und 10 Minuten gewaschen und anschließend mit dem ersten Antikörper über Nacht unter leichtem Schwenken bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in TBS-Tween20 gewaschen bevor die Inkubation mit dem zweiten Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur folgte. Nach einem erneuten Waschschrift von dreimal 10 Minuten wurde die Membran für eine Minute mit dem ECL-Reagenz benetzt, welches zu gleichen Teilen aus ECL-Reagenz 1 und 2 besteht. Dann wurde die Membran zwischen zwei durchsichtigen Plastikfolien gelegt und das überschüssige ECL-Reagenz entfernt. Die Detektion der Proteinsignale erfolgte über die Belichtung von lichtempfindlichen Röntgenfilmen und mit einer lichtsensitiven Kamera (Night Owl). Die Kamera ermöglicht die Quantifizierung und die Auswertung der Proteinsignale durch Aufnahme der Chemolumineszenz, die durch die Meerrettichperoxidase-vermittelte (gekoppelt an den zweiten Antikörper) Umwandlung des Substrats erzeugt wird. Die Zuordnung der Proteinsignale zu den jeweiligen Proteinen konnte anhand des Molekulargewichtsmarkers bestimmt werden.

Im Anschluss wurde ein Röntgenfilm für ein bis vier Minuten aufgelegt und in der Entwicklungsmaschine entwickelt. Für die Auswertung mit der Software Winlight wurden gleich große Rahmen um die einzelnen Proteinsignale und deren Hintergrund gelegt, in denen die abgegebene Lichtemission pro Fläche bestimmt wurde. Anschließend wurden die Proteinsignale um das Hintergrundsignal korrigiert. Um Messfehler durch unterschiedliche Gelbeladungen auszuschließen, wurden die korrigierten Proteinsignale durch die entsprechenden β -Actinsignale dividiert. Actin ist ein Protein, welches unter allen Bedingungen konstant in der Zelle exprimiert wird. Um die Aktivierung der Proteine ATM, ATR, FANCD2, RAD51 und dessen Signalproteine zu bestimmen wurden die korrigierten phosphorylierten Proteinsignale durch die korrigierten Proteinsignale im Basallevel dividiert. Für die Detektion mehrerer Proteine auf der gleichen Membran wurde das beschriebene Vorgehen mit dem jeweils spezifischen Antikörper wiederholt.

2.2.10 Nachweisbedingungen der DNA-Reparaturproteine

Zielprotein	1. Antikörper	2. Antikörper	Molekulargewicht
pATM	1:500 (5%MM)	1:000 Anti-Maus (5%MM)	350 kDa
ATM	1:1000 (5%MM)	1:1000 Anti- Kaninchen Amersham: NA934 (5%MM)	350 kDa
pFANCD2	1:1000 (5%MM)	1:1000 Anti- Kaninchen (5%MM)	155 kDa FANCD2-S 230 kDa FANCD2-L
FANCD2	1:500 (5%MM)	1:1000 Anti-Maus (5%MM)	150 kDa
pATR	1:1000 (5%MM)	1:1000 Anti- Kaninchen (5%MM)	300 kDa
ATR	1:25000 (5%MM)	1:5000 Anti- Kaninchen (5%MM)	317 kDa
RAD51	1:3000 (5%MM)	1:1500 Anti- Kaninchen (5%MM)	~ 43 kDa
β-Aktin	1:10000 (5%MM)	1:1000 Anti-Maus (5%MM)	~ 42 kDa

Tabelle 10: Nachweisbedingungen der DNA-Reparaturproteine.

2.2.11 Koloniebildungstest

Zur Untersuchung der Empfindlichkeit der exponentiell wachsenden Zellen gegenüber ionisierender Bestrahlung, MMC und H₂O₂ mit und ohne Überexpression von RAD51 wurde der Koloniebildungstest verwendet. Dabei wurden die Zellen 24 Stunden nach Ponasteronzugabe (1µl/1ml Medium) trypsinisiert, bestrahlt bzw. Mitomycin C für 4 Stunden oder H₂O₂ für 20 min ausgesetzt und in geringer Konzentration in 6-Well-Plates ausgesät, sodass sich die Zellen einzeln absetzen und Kolonien bilden konnten. Sichtbare Kolonien bilden sich nach 7 Tagen, woraufhin das Medium verworfen wird und die Zellen mit Isoton II gespült und mit 70 % Ethanol für 5 min fixiert werden. Anschließend werden die Zellen mit 0,1% Kristallviolett für 2 min gefärbt und die Kolonien mit mehr als 50 Zellen in einem Zählgerät ausgezählt.

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 unbehandelten Zellen ermittelt.

2.2.12 Statistik

Pro Experiment wurden mindestens drei Experimente durchgeführt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler (SEM).

3 Ergebnisse

Ein häufig beobachtetes Phänomen bei der Therapie maligner Tumoren ist die große Variation ihres Ansprechens auf eine Behandlungsstrategie selbst bei identischen Behandlungen. Für diese Variation können neben einer Reihe anderer Faktoren u. a. auch Unterschiede in der Reparaturkapazität der Tumorzellen verantwortlich sein, mit daraus folgenden deutlichen Unterschieden in der genomischen Stabilität. So konnte für einige Tumorentitäten beobachtet werden, dass die Überexpression von Proteinen bestimmter Reparaturwege in einigen Studien als Ursache einer deutlich besseren, in anderen dagegen deutlich schlechteren Prognose in Betracht kommt.

In einer vorangegangenen Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Überangebot des RAD51-Proteins, welches das zentrale Protein der homologen Rekombination ist, nicht - wie erwartet - zu einer Resistenzbildung nach ionisierender Bestrahlung oder Behandlung mit Mitomycin C führte. Eine Ursache hierfür könnte die veränderte Synthese bzw. Aktivierung von Sensoren der DNA-Reparatur, wie beispielsweise ATM oder ATR sein oder eine fehlerhafte Beladung des Chromatins mit RAD51, wofür neben BRCA2 auch die Proteine der Fanconi Anämie verantwortlich sind. Tatsächlich zeigten Zellen mit einem Überangebot an RAD51 eine verminderte Genexpression von Fanconi A und eine erhöhte von ATM. Unklar ist jedoch, wie sich die veränderte Genexpression auf die funktionelle Aktivierung, beispielsweise Phosphorylierung des ATM/ATR- oder Mono-Ubiquitinierung des FANCD2-Proteins nach Schadensinduktion auswirkt.

3.1 Methodische Vorarbeiten

In den methodischen Vorarbeiten sollten zunächst die Bedingungen für einen optimalen Nachweis der entsprechenden Proteine und ihre aktivierte Form etabliert werden. Hierzu wurden sowohl die Menge an eingesetzten Proteinextrakten als auch die entsprechenden Verdünnungen der primären und sekundären Antikörper für die jeweiligen Proteine und deren aktivierte Form etabliert, um das aussagekräftigste Signal zu erhalten.

3.1.1 Titration von Proteinmenge und Antikörperkonzentration zum optimalen Nachweis der Proteine ATM, ATR und FANCD2 und ihrer phosphorylierten Form

Zunächst musste die optimale Konzentration an eingesetztem Proteinextrakt für den gleichzeitigen Nachweis mehrerer Proteine auf einer PDVF-Membran etabliert werden.

Dazu wurde isoliertes Protein aus Gesamtzellextrakten mehrfach mit ansteigender Konzentration (15, 30 und 60 µg) mittels Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt und durch Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde zerschnitten um mehrere Verdünnungskonzentrationen des primären Antikörpers, bei gleichbleibender Konzentration des sekundären Antikörpers, zu überprüfen.

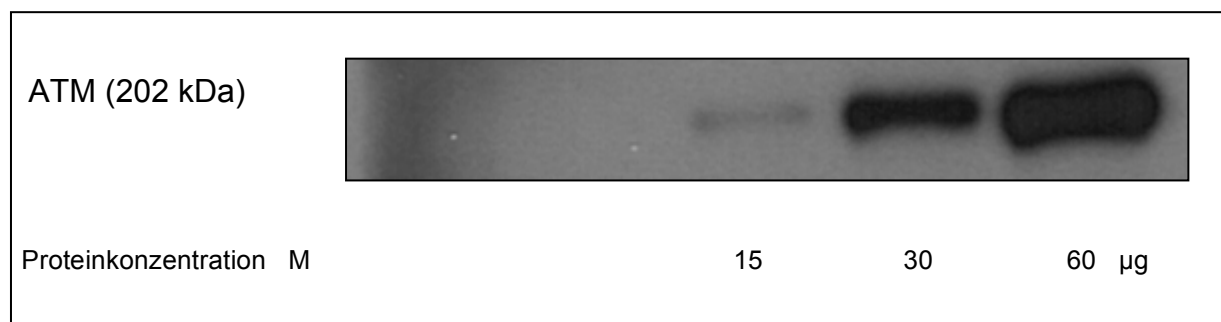


Abbildung 8: Detektion des ATM Proteins bei ansteigender Proteinkonzentration im Western-Blot. Aus exponentiell wachsenden Zellen wurde Gesamtprotein extrahiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PDVF-Membran transferiert. ATM wurde mittels primärem rabbit anti-ATM-Antikörper und sekundärem mouse-IgG-Antikörper detektiert. Die Detektion erfolgte mittels Chemolumineszenz über eine lichtempfindliche Kamera.

Abbildung 8 zeigt exemplarisch für alle Antikörper anhand des ATM Proteins, dass die Menge an detektiertem Protein mit der Menge an eingesetztem Gesamtprotein ansteigt. So zeigte sich bei einer Konzentration von 15 µg eingesetztem Gesamtproteins nur ein sehr schwaches Signal für ATM, welches deutlich stärker bei 30 µg Gesamtprotein wurde und bei einer Konzentration von 60 µg so stark wurde, dass eine Überstrahlung des Signals in benachbarte Banden zu befürchten war. Deshalb wurde für alle folgenden Experimente 30 µg Protein aus Gesamtzellextrakten eingesetzt.

Die Titration der Antikörperkonzentrationen ergab für die einzelnen Proteine und ihre phosphorylierte Form folgenden Konzentrationen:

ATM: 1:1000 für den primären, 1:1000 für den sekundären Antikörper

ATR: 1:25 000 für den primären, 1:5000 für den sekundären Antikörper

FANCD2: 1:500 für den primären, 1:1000 für den sekundären Antikörper

pATM: 1:500 für den primären, 1:1000 für den sekundären Antikörper

pATR: 1:1000 für den primären, 1:1000 für den sekundären Antikörper

pFANCD2: 1:1000 für den primären, 1:1000 für den sekundären Antikörper

RAD51: 1:3000 für den primären, 1:1500 für den sekundären Antikörper

b-Aktin: 1:10 000 für den primären, 1:1000 für den sekundären Antikörper

3.1.2 Bestimmung des optimalen Zeitpunktes zur Detektion des aktivierten Proteins nach DNA-Schädigung

Im Folgenden wurde der optimale Zeitpunkt zur Detektion des aktivierten Proteins von ATM, ATR und FANCD2 nach DNA-Schädigung mittels ionisierender Bestrahlung, Schädigung durch Mitomycin C oder Wasserstoffperoxid bestimmt. Zu diesem Zweck wurden exponentiell wachsende Zellen mit den entsprechenden Agenzien geschädigt, zu verschiedenen Zeitpunkten nach Schädigung wurden Proteinextrakte des gesamten Proteins hergestellt und pATM, pATR bzw. pFANCD2 mittels Antikörperreaktion detektiert.

3.1.3 Aktivierung von ATM nach Bestrahlung

Es wurde der optimale Zeitpunkt für die Aktivierung von ATM nach Bestrahlung überprüft. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit 6 Gy bestrahlt und die Aktivierung von ATM durch die Bestimmung der phosphorylierten Form (pATM) an Serin (Ser) 1981 detektiert und als Beladungskontrolle wurde β -Aktin eingesetzt. Die Auswertung erfolgte durch eine lichtempfindliche Kamera, welche die Lichtemission pro Fläche detektierte. Abbildung 9 zeigt sowohl die Phosphorylierung von ATM qualitativ als auch eine quantitative Auswertung des Phosphorylierungssignals. Die ermittelten Werte wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt, wobei der Wert der unbehandelten Kontrolle gleich 1 gesetzt wurde. Jedes Experiment wurde dreimal durchgeführt und die quantitative Auswertung zeigt die Mittelwerte der analysierten Experimente.

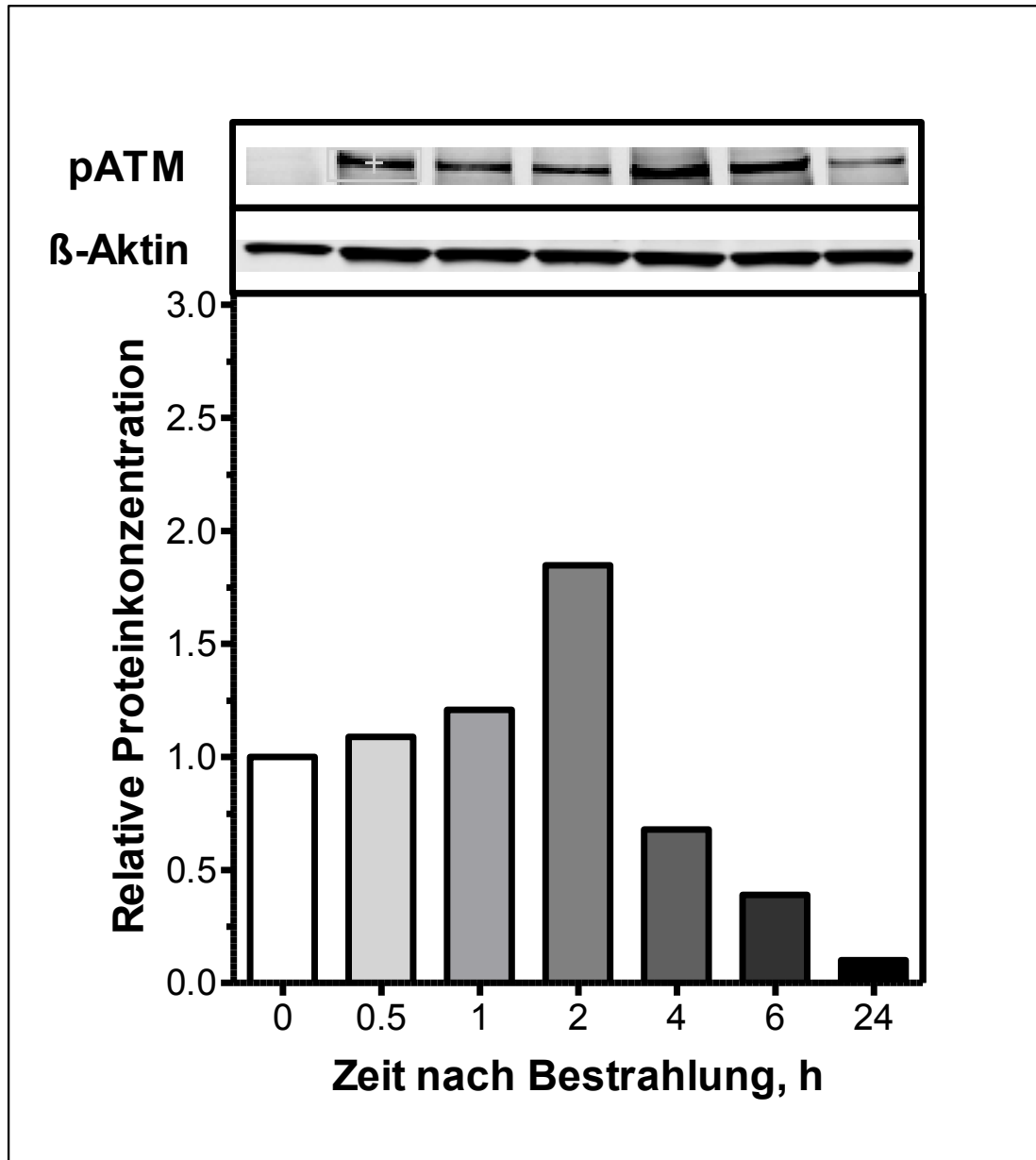


Abbildung 9: Phosphorylierung von ATM nach Bestrahlung in U2OS-Zellen. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung (0.5-24h) wurden Proteinextrakte erstellt. Im Western-Blot wurde pATM detektiert und mit einer lichtempfindlichen Kamera ausgewertet. β-Aktin diente als Beladungskontrolle.

Es zeigte sich eine deutliche Aktivierung des ATM Proteins mit zunehmender Zeit nach Bestrahlung. Direkt nach Bestrahlung zeigte sich eine schwache Phosphorylierung des ATM Proteins. Nach 30 min wurde ein Anstieg der Phosphorylierung um 8% beobachtet. Diese Aktivierung wurde noch stärker nach 1h mit einer Zunahme um 20% und zeigte sein Maximum mit 84 % nach 2h. Danach nahm das Aktivierungssignal sukzessive ab, mit einem um 32 % schwächeren Signal als der Ausgangswert nach 4h, 60% nach 6h, um dann fast vollständig zu

verschwinden, mit einer Reduktion um 90% nach 24h bezogen auf den Ausgangswert. Somit konnte eine sehr deutliche und schnelle Aktivierung von ATM nach Bestrahlung mit einem Maximum nach 2h beobachtet werden.

3.1.4 Aktivierung von ATR nach Bestrahlung

Es wurde der optimale Zeitpunkt für die Aktivierung von ATR nach Bestrahlung überprüft. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit 6 Gy bestrahlt und die Aktivierung von ATR durch die Bestimmung der phosphorylierten Form (pATR) an Position Ser 428 detektiert und als Beladungskontrolle wurde β -Aktin eingesetzt. Die Auswertung erfolgte durch eine lichtempfindliche Kamera, welche die Lichtemission pro Fläche detektierte. Abbildung 10 zeigt sowohl die Phosphorylierung von ATR qualitativ als auch die quantitative Auswertung des Phosphorylierungssignals. Die ermittelten Werte wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt, wobei der Wert der unbehandelten Kontrolle gleich 1 gesetzt wurde. Jedes Experiment wurde dreimal durchgeführt und die quantitative Auswertung zeigt die Mittelwerte der analysierten Experimente.

Es wurde eine deutliche Phosphorylierung von ATR durch Bestrahlung im zeitlichen Verlauf beobachtet. Zwar zeigte sich ein leichter Anstieg der Phosphorylierung nach 30 min um 14 %, jedoch sank das Aktivierungssignal nach 1h und nach 2h um 7 % bezogen auf den Ausgangswert. Die Aktivierung wurde nach 4h mit 20 % und nach 6h mit 72 % deutlich stärker und erreichte ihr Maximum nach 24h mit 82 %. Es trat eine deutliche, jedoch späte und länger anhaltende Aktivierung von ATR nach Bestrahlung auf, die über 24 h auf einem hohen Niveau blieb.

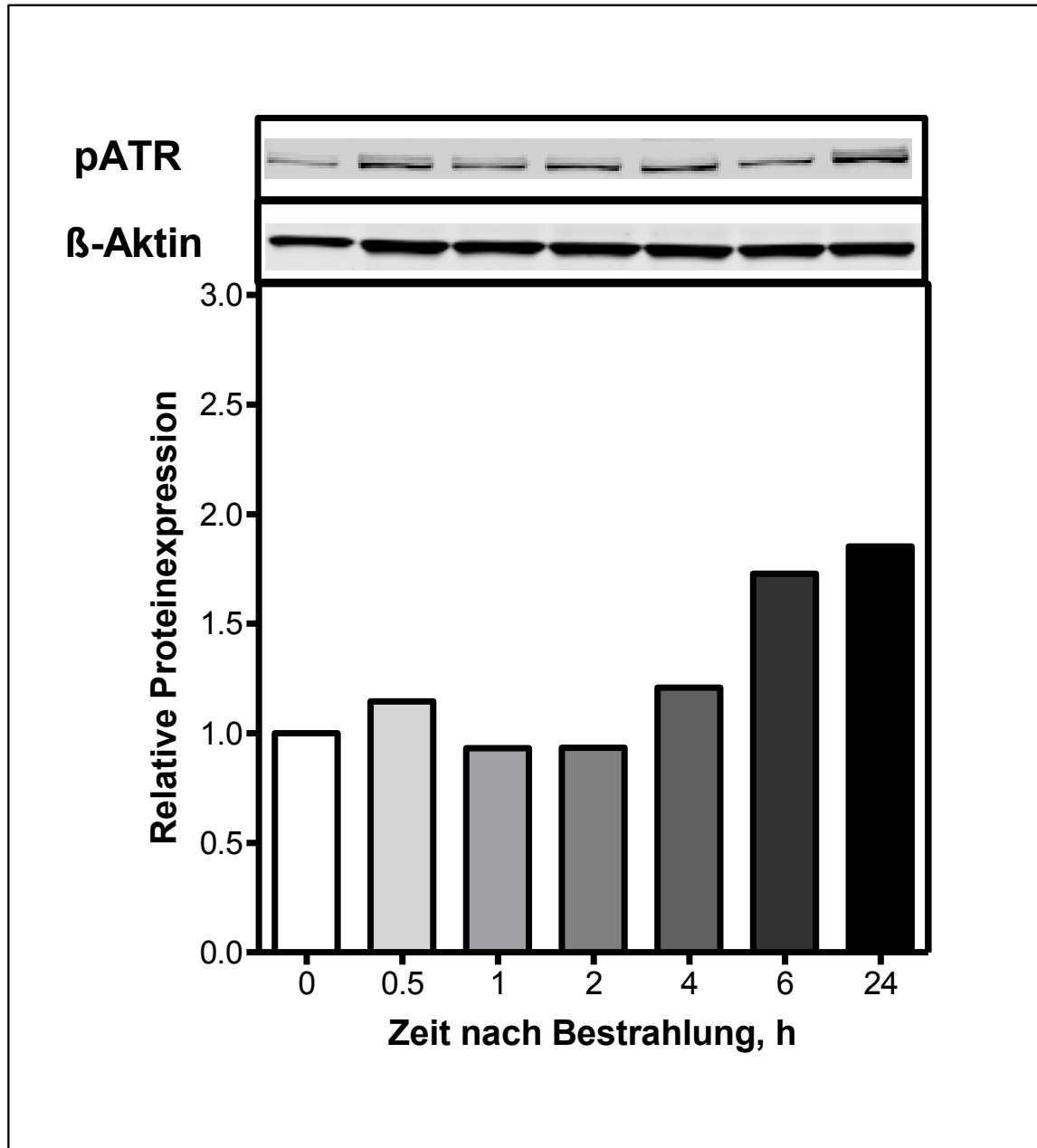


Abbildung 10: Phosphorylierung von ATR nach Bestrahlung in U2OS-Zellen. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung (0.5-24h) wurden Proteinextrakte erstellt. Im Western-Blot wurde pATR detektiert und mit einer lichtempfindlichen Kamera ausgewertet. β-Aktin diente als Beladungskontrolle.

3.1.5 Aktivierung von FANCD2 nach Bestrahlung

Es wurde der optimale Zeitpunkt für die Aktivierung von FANCD2 nach Bestrahlung überprüft. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit 6 Gy bestrahlt und die Aktivierung von FANCD2 durch die Bestimmung der phosphorylierten Form (pFANCD2) an Ser

222 detektiert und als Beladungskontrolle wurde β -Aktin eingesetzt. Die Auswertung erfolgte durch eine lichtempfindliche Kamera, welche die Lichtemission pro Fläche detektierte. Abbildung 11 zeigt die Phosphorylierung von FANCD2 quantitativ. Die ermittelten Werte wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt, wobei der Wert der unbehandelten Kontrolle gleich 1 gesetzt wurde. Jedes Experiment wurde dreimal durchgeführt und die quantitative Auswertung zeigt die Mittelwerte der analysierten Experimente.

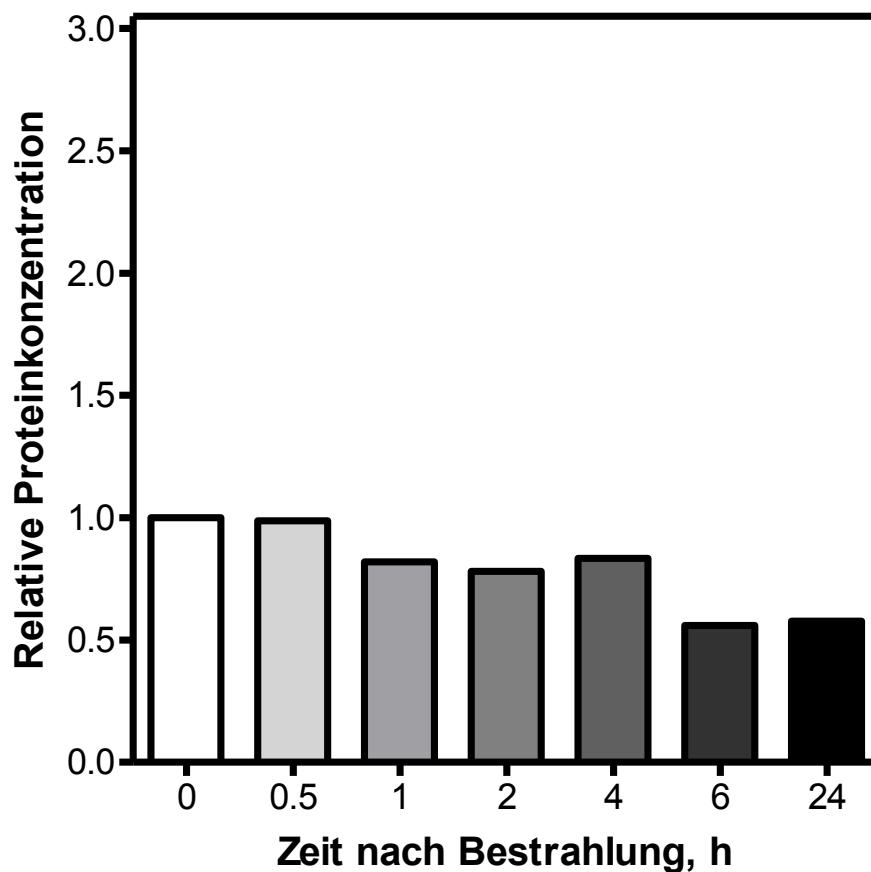


Abbildung 11: Phosphorylierung von FANCD2 nach Bestrahlung in U2OS-Zellen. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung (0.5-24h) wurden Proteinextrakte erstellt. Im Western-Blot wurde pFAND2 detektiert und mit einer lichtempfindlichen Kamera ausgewertet. β -Aktin diente als Beladungskontrolle.

Es wurde keine Phosphorylierung von FANCD2 nach Bestrahlung im zeitlichen Verlauf beobachtet. Das Aktivierungssignal zeigte eine leichte Reduktion nach 30 min um 1 %, nach 1h um 18 % und nach 2h um 22 % ab. Dieser Trend setzte sich im weiteren Verlauf mit einem Abfall von 17 % nach 4h fort. Danach erreichte sie ihr Minimum mit einem um 45% schwächeren Signal als der Ausgangswert nach 6h und um 42 % nach 24h.

Es zeigte sich somit keine durch Phosphorylierung an Serin 222 bedingte Aktivierung des FANCD2 Proteins nach Bestrahlung in U2OS-Zellen.

3.1.6 Aktivierung von ATM nach Schadensinduktion durch Mitomycin C

Im Weiteren wurde überprüft, ob eine Aktivierung von ATM mittels Phosphorylierung an Ser 1981 durch Behandlung mit dem DNA-kreuzvernetzenden Chemotherapeutikum Mitomycin C erfolgt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit einer Mitomycin C-Lösung (160 ng/ml) behandelt und die Aktivierung von ATM mittels Detektion von pATM untersucht, als Beladungskontrolle wurde β -Aktin eingesetzt. Die Auswertung der Proteinsignale erfolgte durch eine lichtempfindliche Kamera, welche die Lichtemission pro Fläche detektiert. In Abbildung 12 ist die Aktivierung von ATM quantitativ dargestellt. Für die quantitative Auswertung wurde der Wert der unbehandelten Kontrolle gleich 1 gesetzt und die Veränderung der Werte nach Behandlung zueinander ins Verhältnis gesetzt. Die ermittelten Werte sind das Resultat dreier unabhängiger Experimente.

Es zeigte sich keine eindeutige Phosphorylierung des ATM Proteins nach Behandlung mit Mitomycin C im zeitlichen Verlauf. Zwar zeigte sich eine leichte Zunahme des Signals, um 20% direkt nach Behandlung mit MMC, welches etwas schwächer mit 6% nach 1h zu beobachten war, um nach 2h wieder im Bereich des Ausgangswertes abzufallen. Nach 4h zeigte sich dann wieder ein leichter Anstieg des Aktivierungssignals auf 15%, welches sich nach 6h auf 13% und nach 24h auf 9% verminderte. Somit konnte für ATM keine eindeutig sichtbare Aktivierung nach Behandlung mit MMC beobachtet werden.

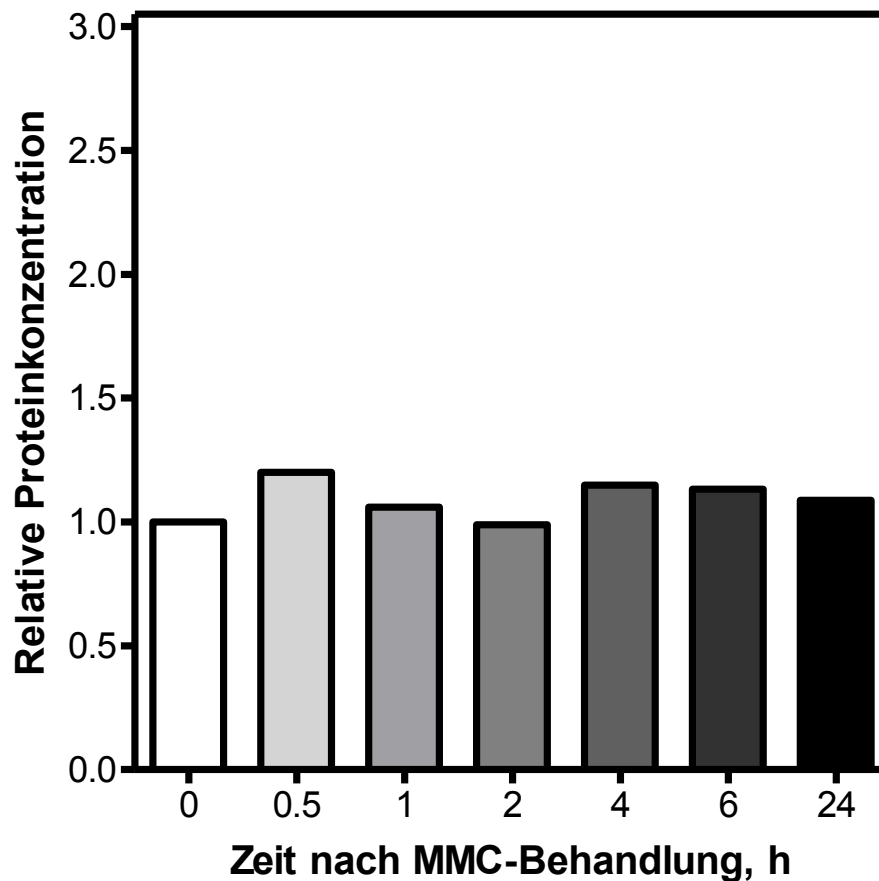


Abbildung 12: Phosphorylierung von ATM nach Behandlung mit MMC in U2OS-Zellen. Die Zellen wurden mit einer MMC-Lösung (160 ng/ml) angesetzt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung (0.5-24h) wurden Proteinextrakte erstellt. Im Western-Blot wurde pATM detektiert und mit einer lichtempfindlichen Kamera ausgewertet. β -Aktin diente als Beladungskontrolle.

3.1.7 Aktivierung von ATR nach Schadensinduktion durch Mitomycin C

Ebenfalls wurde überprüft, ob eine Aktivierung von ATR mittels Phosphorylierung an Ser 428 durch Behandlung mit dem DNA-kreuzvernetzenden Chemotherapeutikum Mitomycin C erfolgt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit einer Mitomycin C-Lösung (160 ng/ml) behandelt und die Aktivierung von ATR mittels Detektion von

pATR untersucht, als Beladungskontrolle wurde β -Aktin eingesetzt.. Die Auswertung der Proteinsignale erfolgte durch eine lichtempfindliche Kamera, welche die Lichtemission pro Fläche detektiert. In Abbildung 13 ist die Aktivierung von ATR quantitativ dargestellt. Für die quantitative Auswertung wurde der Wert der unbehandelten Kontrolle gleich 1 gesetzt und die Veränderung der Werte nach Behandlung zueinander ins Verhältnis gesetzt. Die ermittelten Werte sind das Resultat dreier unabhängiger Experimente.

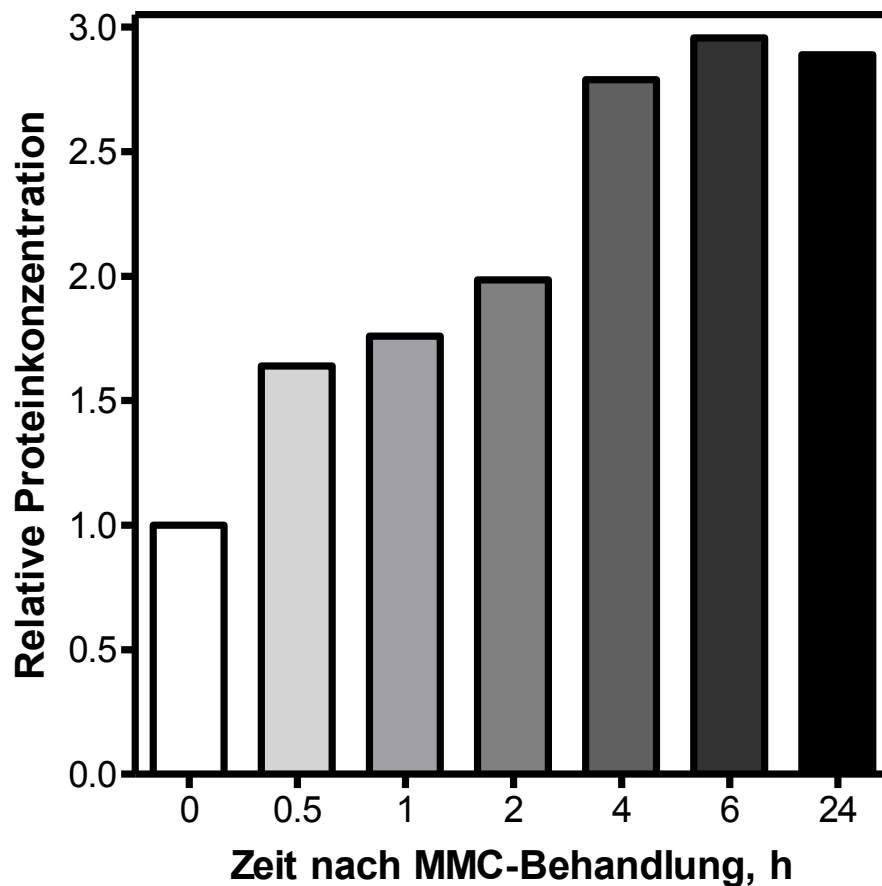


Abbildung 13: Phosphorylierung von ATR nach Behandlung mit MMC in U2OS-Zellen. Die Zellen wurden mit einer MMC-Lösung (160 ng/ml) angesetzt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung (0.5-24h) wurden Proteinextrakte erstellt. Im Western-Blot wurde pATR detektiert und mit einer lichtempfindlichen Kamera ausgewertet. β -Aktin diente als Beladungskontrolle.

Es wurde eine deutliche und massive Phosphorylierung des ATR Proteins mit zunehmender Zeit nach Behandlung mit Mitomycin C beobachtet. Es erfolgte ein sukzessiver Anstieg mit 63 % schon nach 30 min, 76 % nach 1h und 98 % nach 2h. Diese Aktivierung wurde noch stärker mit einer Verdreifachung nach 4h mit 270 % und zeigte sein Maximum mit 295 % nach 6h und 288 % nach 24h. So konnte eine sehr strake und lang andauernde Aktivierung von ATR mit einem Maximum zwischen 4 und 24 h nach Mitomycin C Gabe beobachtet werden.

3.1.8 Aktivierung von FANCD2 nach Schadensinduktion durch Mitomycin C

Weiterhin wurde überprüft, ob eine Aktivierung von FANCD2 mittels Phosphorylierung an Ser 222 durch Behandlung mit dem DNA-kreuzvernetzenden Chemotherapeutikum Mitomycin C erfolgt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit einer Mitomycin C-Lösung (160 ng/ml) behandelt und die Aktivierung von FANCD2 mittels Detektion von pFANCD2 untersucht, als Beladungskontrolle wurde β -Aktin eingesetzt.. Die Auswertung der Proteinsignale erfolgte durch eine lichtempfindliche Kamera, welche die Lichtemission pro Fläche detektiert. In Abbildung 14 ist die Aktivierung von FANCD2 quantitativ dargestellt. Für die quantitative Auswertung wurde der Wert der unbehandelten Kontrolle gleich 1 gesetzt und die Veränderung der Werte nach Behandlung zueinander ins Verhältnis gesetzt. Die ermittelten Werte sind das Resultat dreier unabhängiger Experimente.

Die Aktivierung von FANCD2 nach Mitomycin C Gabe wies deutliche Unterschiede im zeitlichen Verlauf auf. Zunächst wurde ein Abfall des Aktivierungssignals von 67 % nach 30 min beobachtet, das sehr schnell auf 68 % nach 1h bezogen auf den Ausgangswert anstieg, damit sein Maximum erreichte und mit 46 % nach 2h auf einem hohen Niveau blieb. Danach fiel die Phosphorylierung von FANCD2 stufenweise ab mit 28 % nach 4h und 51 % nach 6h. Zuletzt wurde erneut ein Anstieg von 59 % nach 24h beobachtet. Somit konnte ein sehr unterschiedliches Aktivierungsmuster nach Gabe von Mitomycin C gezeigt werden.

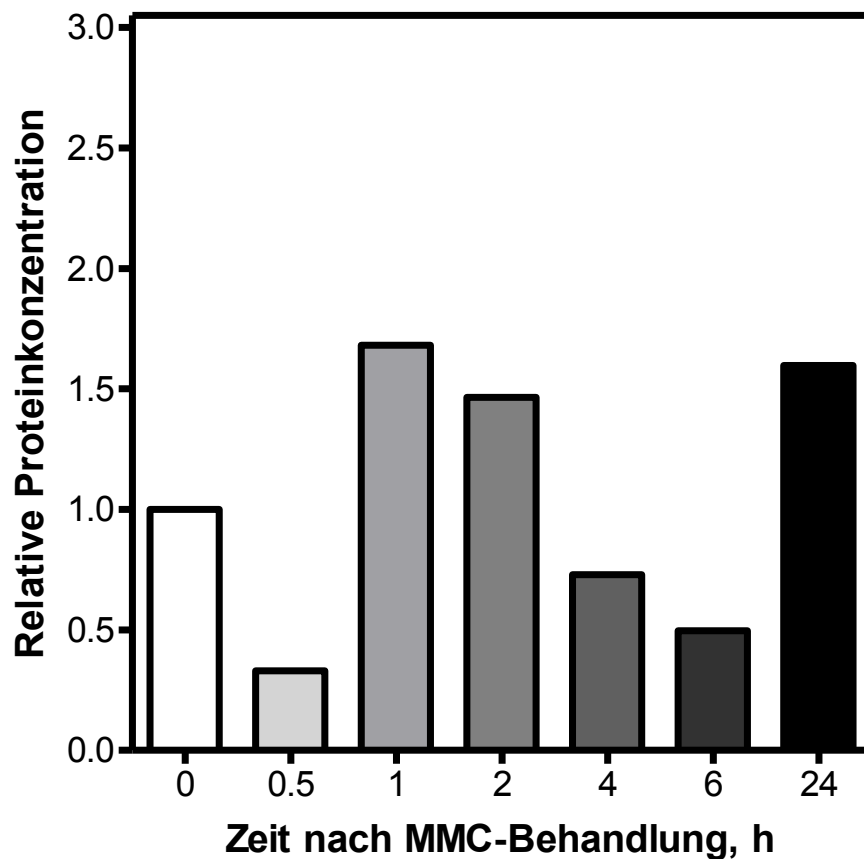


Abbildung 14: Phosphorylierung von FANCD2 nach Behandlung mit MMC in U2OS-Zellen. Die Zellen wurden mit einer MMC-Lösung (160 ng/ml) angesetzt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung (0.5-24h) wurden Proteinextrakte erstellt. Im Western-Blot wurde pFANCD2 detektiert und mit einer lichtempfindlichen Kamera ausgewertet. β -Aktin diente als Beladungskontrolle.

3.1.9 Aktivierung von ATM nach Schadensinduktion durch H₂O₂

Es wurde überprüft, ob eine Aktivierung von ATM mittels Phosphorylierung an Ser 1981 durch Behandlung mit H₂O₂ erfolgt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit einer H₂O₂-Lösung (50 μ M) angesetzt und die Aktivierung von ATM mittels Detektion von pATM untersucht, als Beladungskontrolle wurde β -Aktin eingesetzt. Die Auswertung der Proteinsignale erfolgte durch eine lichtempfindliche Kamera, welche

die Lichtemission pro Fläche detektiert. In Abbildung 15 ist die Aktivierung von ATM quantitativ dargestellt. Für die quantitative Auswertung wurde der Wert der unbehandelten Kontrolle gleich 1 gesetzt und die Veränderung der Werte nach Behandlung zueinander ins Verhältnis gesetzt. Die ermittelten Werte sind das Resultat dreier unabhängiger Experimente.

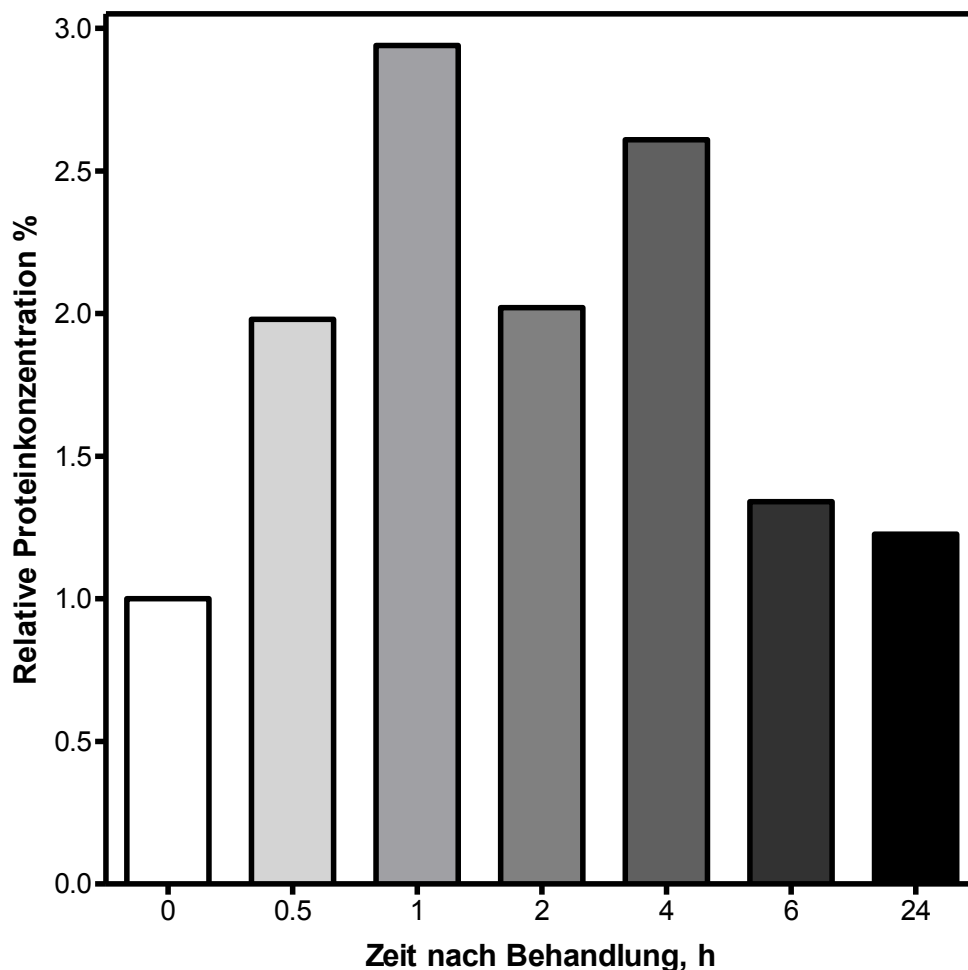


Abbildung 15: Phosphorylierung von ATM nach Behandlung mit H_2O_2 in U2OS-Zellen. Die Zellen wurden mit einer H_2O_2 -Lösung ($50 \mu\text{M}$) angesetzt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung (0.5-24h) wurden Proteinextrakte erstellt. Im Western-Blot wurde pATM detektiert und mit einer lichtempfindlichen Kamera ausgewertet. β -Aktin diente als Beladungskontrolle.

Es zeigte sich eine sehr schnelle und deutliche Aktivierung des ATM-Proteins nach der Schadensinduktion durch H_2O_2 im zeitlichen Verlauf.

Zunächst wurde eine leichte Phosphorylierung des ATM-Proteins beobachtet, die sich nach 30 min mit 97 % verdoppelte und nach 1 h das maximale Aktivierungssignal mit einer Verdreifachung um 298 % des Anfangswertes erreichte.

Das Niveau der Phosphorylierung blieb nach 2 h mit 202 % und nach 4 h mit 260 % hoch, um nach 6 h mit 34 % und nach 24 h mit 22 % wieder abzusinken.

Es konnte somit eine starke und sehr schnelle Phosphorylierung von ATM mit einem Maximum nach 1 h nach der Schadensinduktion durch H_2O_2 beobachtet werden.

3.1.10 Aktivierung von ATR nach Schadensinduktion durch H_2O_2

Es wurde überprüft, ob eine Aktivierung von ATR mittels Phosphorylierung an Ser 428 durch Behandlung mit H_2O_2 erfolgt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit einer H_2O_2 -Lösung (50 μM) angesetzt und die Aktivierung von ATR mittels Detektion von pATR untersucht, als Beladungskontrolle wurde β -Aktin eingesetzt. Die Auswertung der Proteinsignale erfolgte durch eine lichtempfindliche Kamera, welche die Lichtemission pro Fläche detektiert. In Abbildung 16 ist die Aktivierung von ATR quantitativ dargestellt. Für die quantitative Auswertung wurde der Wert der unbehandelten Kontrolle gleich 1 gesetzt und die Veränderung der Werte nach Behandlung zueinander ins Verhältnis gesetzt. Die ermittelten Werte sind das Resultat dreier unabhängiger Experimente.

Es zeigte sich keine deutliche Aktivierung von ATR nach Schadensinduktion durch H_2O_2 im zeitlichen Verlauf. Die Phosphorylierung reduzierte sich zunächst um 14 % nach 30 min und blieb kontinuierlich mit 9 % nach 1 h, 4 % nach 2 h und 5 % nach 4 h auf einem niedrigen Niveau bezogen auf den Ausgangswert. Es wurde ein leichter Anstieg der Aktivierung mit 20 % nach 6 h beobachtet, jedoch zeigte sich nach 24 h eine Reduktion von 12 %. Somit wurde keine Phosphorylierung von ATR nach Schadensinduktion durch H_2O_2 im zeitlichen Verlauf beobachtet.

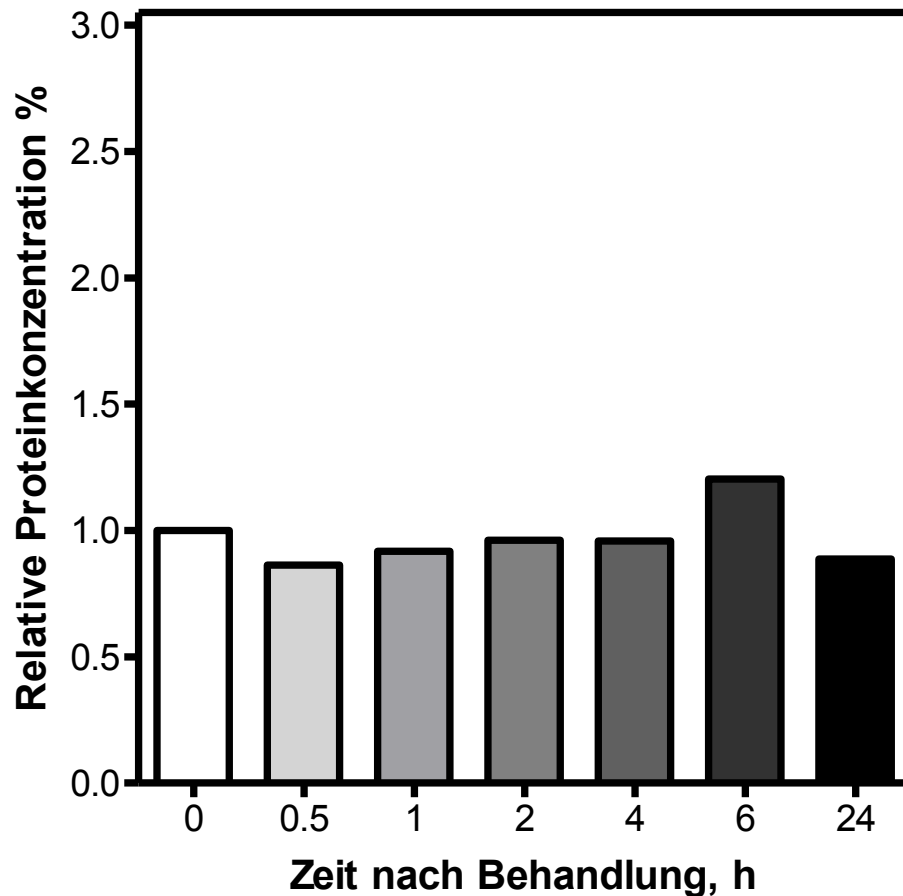


Abbildung 16: Phosphorylierung von ATR nach Behandlung mit H_2O_2 in U2OS-Zellen. Die Zellen wurden mit einer H_2O_2 -Lösung ($50 \mu M$) angesetzt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung (0.5-24h) wurden Proteinextrakte erstellt. Im Western-Blot wurde pATR detektiert und mit einer lichtempfindlichen Kamera ausgewertet. β -Aktin diente als Beladungskontrolle.

3.1.11 Aktivierung von FANCD2 nach Schadensinduktion durch H_2O_2

Zum Schluss der methodischen Vorarbeiten wurde überprüft, ob eine Aktivierung von FANCD2 mittels Phosphorylierung an Ser 222 durch Behandlung mit H_2O_2 erfolgt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit einer H_2O_2 -Lösung ($50 \mu M$) angesetzt und die Aktivierung von FANCD2 mittels Detektion von pFANCD2 untersucht, als Beladungskontrolle wurde β -Aktin eingesetzt. Die Auswertung der Proteinsignale

erfolgte durch eine lichtempfindliche Kamera, welche die Lichtemission pro Fläche detektiert. In Abbildung 17 ist die Aktivierung von FANCD2 quantitativ dargestellt. Für die quantitative Auswertung wurde der Wert der unbehandelten Kontrolle gleich 1 gesetzt und die Veränderung der Werte nach Behandlung zueinander ins Verhältnis gesetzt. Die ermittelten Werte sind das Resultat dreier unabhängiger Experimente.

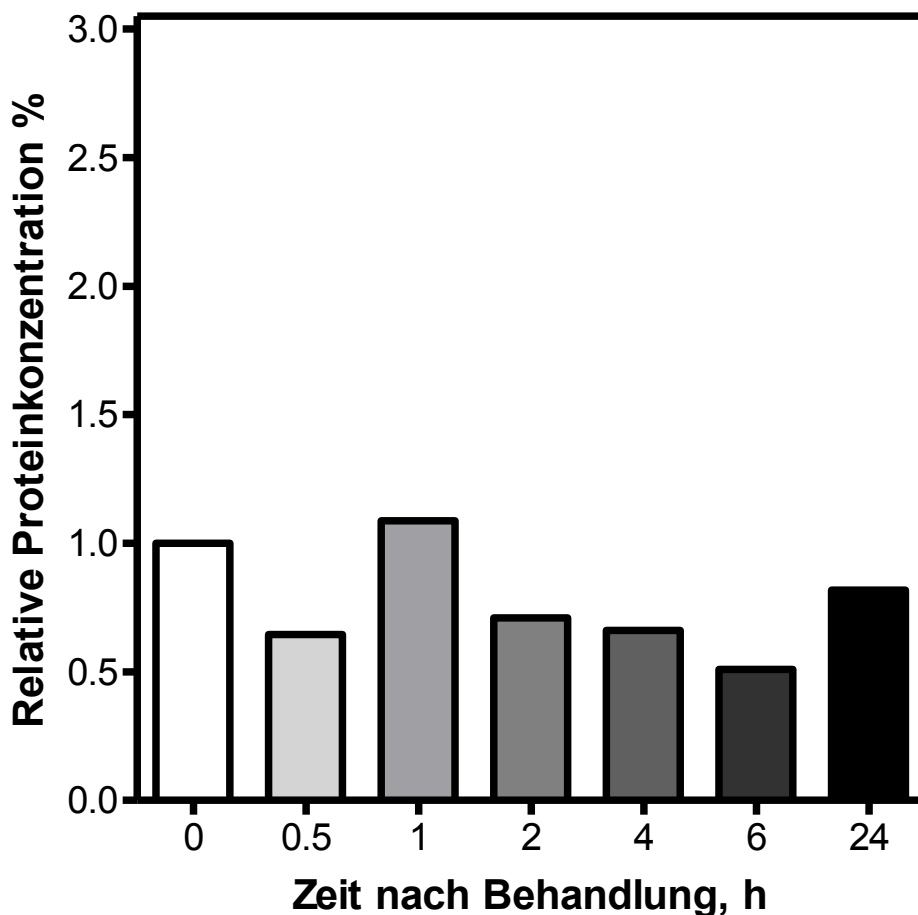


Abbildung 17: Phosphorylierung von FANCD2 nach Behandlung mit H_2O_2 in U2OS-Zellen. Die Zellen wurden mit einer H_2O_2 -Lösung ($50 \mu\text{M}$) angesetzt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung (0.5-24h) wurden Proteinextrakte erstellt. Im Western-Blot wurde pFANCD2 detektiert und mit einer lichtempfindlichen Kamera ausgewertet. β -Aktin diente als Beladungskontrolle.

Es wurde keine Aktivierung von FANCD2 nach Schadensinduktion durch H_2O_2 mit zunehmender Zeit beobachtet.

Es zeigte sich zunächst eine schwache Phosphorylierung, die sich nach 30 min um 36 % reduzierte und nach 1 h mit 8 % bezogen auf den Ausgangswert anstieg. Im weiteren Verlauf nahm das Aktivierungssignal sukzessiv ab mit einer Reduktion von 30 % nach 2 h, 34 % nach 4 h und mit einem Minimum von 50 % nach 6 h und 19 % nach 24 h.

Somit kam es zu keiner Phosphorylierung von FANCD2 nach Schadensinduktion durch H_2O_2 im zeitlichen Verlauf.

Damit konnte zu den methodischen Vorarbeiten ein Antikörperset etabliert werden, welches speziell für den Schadens- und Reparaturweg deutlich unterschiedliche Muster zeigte.

Nach Bestrahlung wurde ATM früh und vorübergehend über 1 bis 4 Stunden aktiviert, während die Phosphorylierung von ATR deutlich später und länger über 24 Stunden erfolgte. Es zeigte sich zudem keine Phosphorylierung von FANCD2 nach Bestrahlung.

Nach Schadensinduktion durch MMC zeigte sich dagegen ein unterschiedliches Bild. Es wurde keine Aktivierung von ATM beobachtet, während sich eine massive Aktivierung von ATR mit einem Maximum zwischen 4 und 24 Stunden zeigte. Die Phosphorylierung von FANCD2 zeichnete sich im zeitlichen Verlauf sehr heterogen ab.

Nach Schadensinduktion durch H_2O_2 wurde ATM sehr schnell und nur vorübergehend mit einem Maximum bei 1 Stunde phosphoryliert. Es zeigte sich dagegen keine Aktivierung von ATR und FANCD2 nach Schadensinduktion durch H_2O_2 .

Nach Bestrahlung erfolgte die Extraktion der Proteine nach 8 Stunden, nach Schadensinduktion mit MMC nach 24 Stunden und nach Schadensinduktion durch H_2O_2 nach vier Stunden.

3.2 Bedeutung der RAD51 Überexpression für DNA-Reparaturproteine bei DNA-Schäden

3.2.1 Expression von RAD51 in Zellen mit RAD51 Überexpression nach Schadensinduktion

RAD51 ist ein bedeutsames Reparaturprotein, das bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen mittels homologer Rekombination eine wichtige Rolle spielt. Der Einfluss der RAD51-Expression nach Schadensinduktion durch Bestrahlung, durch Mitomycin C oder durch H₂O₂ wurde mittels Western Blot bestimmt. Die Zellen wurden acht Stunden nach Bestrahlung, vierundzwanzig Stunden nach MMC-Zugabe und vier Stunden nach H₂O₂-Zugabe extrahiert.

Abbildung 18 zeigt die Expression von RAD51 in Zellen mit und ohne RAD51 Überexpression durch die Induktion von Ponasteron (1 µmol) 24 Stunden vor Behandlung, die entweder mit 6 Gy bestrahlt, mit MMC (160 ng/ml) oder mit H₂O₂ (50 µM) behandelt wurden. Die Auswertung der Proteinsignale erfolgte durch eine lichtempfindliche Kamera, die die Lichtemission pro Fläche detektiert. Die ermittelten Werte wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt und als Graphen mit einer Skala der relativen Proteinkonzentration zwischen 0 und 1 dargestellt. Für jedes Ergebnis wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt.

In unbehandelten Zellen zeigte sich ein etwas 3facher Anstieg der RAD51 Expression nach Ponasterongabe.

Nach Bestrahlung zeigte sich dagegen eine geringere Expression von RAD51 nach Ponasteroninduktion.

Nach Schadensinduktion durch MMC zeigte sich ein den unbehandelten Zellen vergleichbarer Anstieg der RAD51 Expression nach Gabe von Ponasteron.

Nach Schadensinduktion durch H₂O₂ wurde ebenfalls ein Anstieg der RAD51 Expression nach Ponasteroninduktion, mit einer Zunahme um das 1.5 fache in Bezug auf die Kontrollzellen. Somit konnte nach allen Behandlungen ein verminderter Anstieg der RAD51 Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach Zugabe von Ponasteron beobachtet werden.

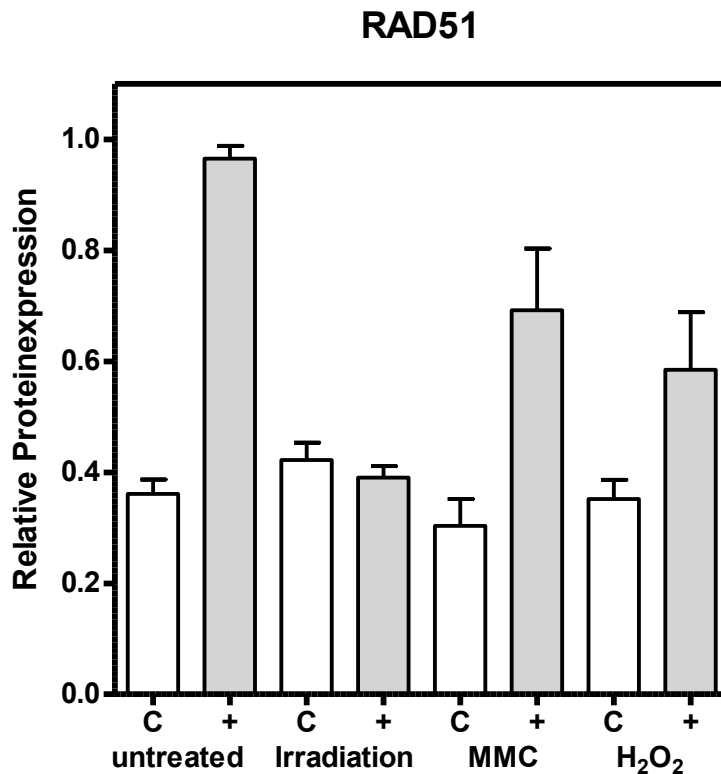


Abbildung 18: Expression von RAD51 in U2OS-Zellen mit (+) und ohne (C) Überexpression von RAD51 nach Schadensinduktion. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt, mit Mitomycin C (160 ng/ml) oder H₂O₂ (50 µM) behandelt. Die Extraktion erfolgte 8h nach Bestrahlung, 24h nach MMC- und 4h nach H₂O₂-Gabe. Die Proteinexpression von RAD51 wurde mittels Western Blot detektiert und mit einer lichtempfindlichen Kamera ausgewertet. β-Aktin diente als Beladungskontrolle.

3.2.2 Expression von ATM in Zellen mit RAD51 Überexpression nach Schadensinduktion

Der Einfluss der RAD51 Expression auf die Expression von ATM wurde nach Schadensinduktion durch Bestrahlung, durch Mitomycin C oder durch H₂O₂ mittels Western Blot bestimmt. Die Zellen wurden acht Stunden nach Bestrahlung, vierundzwanzig Stunden nach MMC-Zugabe und vier Stunden nach H₂O₂-Zugabe extrahiert.

Abbildung 19 zeigt die Expression von ATM in Zellen mit und ohne RAD51 Überexpression durch die Induktion von Ponasteron (1 µmol) 24 Stunden vor Behandlung, die entweder mit 6 Gy bestrahlt, mit MMC (160 ng/ml) oder mit H₂O₂ (50 µM) behandelt wurden. Die Auswertung der Proteinsignale erfolgte durch eine lichtempfindliche Kamera, die die Lichtemission pro Fläche detektiert. Die ermittelten Werte wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt und als Graphen mit einer Skala der

relativen Proteinkonzentration zwischen 0 und 1 dargestellt. Für jedes Ergebnis wurden mindestens 3 Experimente durchgeführt.

Es wurde keine Veränderung in der Menge an ATM Protein nach Bestrahlung und Schadensinduktion durch MMC sowie H₂O₂ beobachtet. Die Schwankungen des Gesamtproteins variierten im Fehlerbereich.

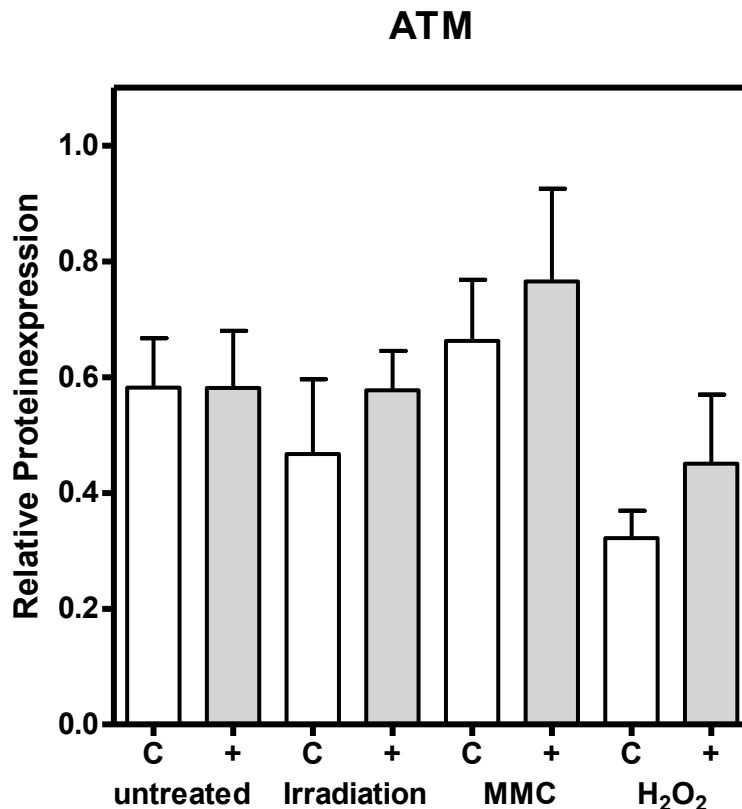


Abbildung 19: Expression von ATM in Zellen mit Überexpression von RAD51 nach Schadensinduktion im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt, mit Mitomycin C (MMC) oder H₂O₂ behandelt. Die Extraktion erfolgte 8h nach Bestrahlung, 24h nach MMC-Gabe und 4h nach H₂O₂-Gabe. Die Proteinexpression von RAD51 wurde mittels Western Blot detektiert und mit einer lichtempfindlichen Kamera ausgewertet. β -Aktin diente als Beladungskontrolle.

3.2.3 Aktivierung von ATM nach Schadensinduktion

Der Einfluss der RAD51 Überexpression auf die Aktivierung von ATM nach Schadensinduktion durch Bestrahlung, durch Mitomycin C oder durch H₂O₂ wurde mittels Western Blot bestimmt. Die Zellen wurden acht Stunden nach Bestrahlung, vierundzwanzig Stunden nach MMC-Zugabe und vier Stunden nach H₂O₂-Zugabe extrahiert.

Abbildung 20 zeigt die Phosphorylierung von ATM (pATM) in Zellen mit und ohne RAD51 Überexpression durch die Induktion von Ponasteron (1 μ mol) 24 Stunden vor Behandlung, die entweder mit 6 Gy bestrahlt, mit MMC (160 ng/ml) oder mit H₂O₂ (50 μ M) behandelt wurden. Die Auswertung der Proteinsignale erfolgte durch eine lichtempfindliche Kamera, die die Lichtemission pro Fläche detektiert. Die ermittelten Werte wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt und als Graphen mit einer Skala der relativen Proteinkonzentration zwischen 0 und 1 dargestellt. Für jedes Ergebnis wurden mindestens 3 Experimente durchgeführt.

Die Überexpression von RAD51 ohne Schadensinduktion zeigte keinen Einfluss auf die Aktivierung von ATM.

Nach Bestrahlung zeigte sich eine starke Aktivierung in den Kontrollzellen, dagegen eine deutlich schwächere in Zellen mit RAD51 Überexpression, mit einer Verminderung um etwa 50%.

Nach Schadensinduktion durch MMC zeigte sich kein Effekt auf die Aktivierung von ATM bei normaler RAD51 Expression, allerdings ein leichter Anstieg bei RAD51 Überexpression. Ein ähnlicher Effekt auf die Aktivierung zeigte sich auch nach Behandlung mit H₂O₂.

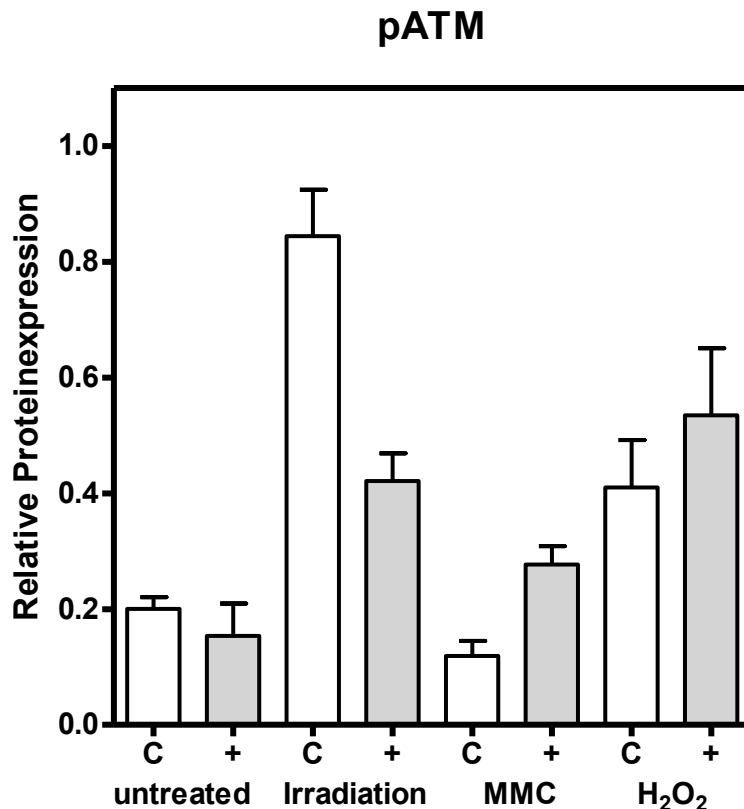


Abbildung 20: Expression von pATM in Zellen mit Überexpression von RAD51 nach Schadensinduktion im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt, mit Mitomycin C (MMC) oder H₂O₂ behandelt. Die Extraktion erfolgte 8h nach Bestrahlung, 24h nach MMC-Gabe und 4h nach H₂O₂-Gabe. Die Proteinexpression von RAD51 wurde mittels Western Blot detektiert und mit einer lichtempfindlichen Kamera ausgewertet. β -Aktin diente als Beladungskontrolle.

3.2.4 Expression von ATR nach Schadensinduktion

Der Einfluss der RAD51 Überexpression auf die Expression von ATR nach Schadensinduktion durch Bestrahlung, durch Mitomycin C oder durch H₂O₂ wurde mittels Western Blot bestimmt. Die Zellen wurden acht Stunden nach Bestrahlung, vierundzwanzig Stunden nach MMC-Zugabe und vier Stunden nach H₂O₂-Zugabe extrahiert.

Abbildung 21 zeigt die Expression von ATR in Zellen mit und ohne RAD51 Überexpression durch die Induktion von Ponasteron (1 μ mol) 24 Stunden vor Behandlung, die entweder mit 6 Gy bestrahlt, mit MMC (160 ng/ml) oder mit H₂O₂ (50 μ M) behandelt wurden. Die Auswertung der Proteinsignale erfolgte durch eine lichtempfindliche Kamera, die die Lichtemission pro Fläche detektiert. Die ermittelten Werte wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt und als Graphen mit einer Skala der

relativen Proteinkonzentration zwischen 0 und 1 dargestellt. Für jedes Ergebnis wurden mindestens 3 Experimente durchgeführt.

Bei der Expression von ATR zeigt sich sowohl bei der Überexpression von RAD51 als auch bei den Kontrollzellen keine signifikanten Veränderungen nach Bestrahlung und Schadensinduktion durch MMC sowie durch H_2O_2 . Allerdings zeigte sich eine deutliche Reduktion im unbehandelten Zustand im Vergleich zu den Kontrollzellen.

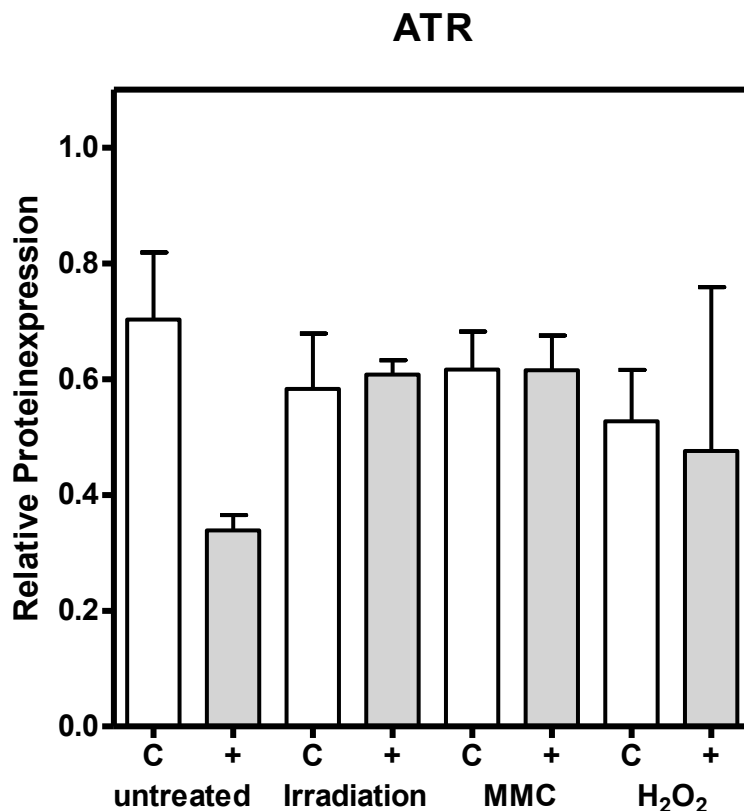


Abbildung 21: Expression von ATR in Zellen mit Überexpression von RAD51 nach Schadensinduktion im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt, mit Mitomycin C (MMC) oder H_2O_2 behandelt. Die Extraktion erfolgte 8h nach Bestrahlung, 24h nach MMC-Gabe und 4h nach H_2O_2 -Gabe. Die Proteinexpression von RAD51 wurde mittels Western Blot detektiert und mit einer lichtempfindlichen Kamera ausgewertet. β -Aktin diente als Beladungskontrolle.

In unbehandelten Zellen wurde eine Reduktion von 50% der Expression von ATR bei RAD51 Überexpression im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet.

Sowohl nach Bestrahlung als auch nach Behandlung mit MMC und H_2O_2 wies die Proteinexpression von ATR keinen Unterschied zwischen den Kontrollzellen und den Zellen nach Ponasteroninduktion auf.

3.2.5 Aktivierung von ATR nach Schadensinduktion

Der Einfluss der RAD51 Überexpression auf die Aktivierung von ATR wurde nach Schadensinduktion durch Bestrahlung, durch Mitomycin C oder durch H₂O₂ mittels Western Blot bestimmt. Die Zellen wurden acht Stunden nach Bestrahlung, vierundzwanzig Stunden nach MMC-Zugabe und vier Stunden nach H₂O₂ –Zugabe extrahiert.

Abbildung 22 zeigt die Aktivierung von ATR in Zellen mit und ohne RAD51 Überexpression durch die Induktion von Ponasteron (1 µmol) 24 Stunden vor Behandlung, die entweder mit 6 Gy bestrahlt, mit MMC (160 ng/ml) oder mit H₂O₂ (50 µM) behandelt wurden. Die Auswertung der Proteinsignale erfolgte durch eine lichtempfindliche Kamera, die die Lichtemission pro Fläche detektiert. Die ermittelten Werte wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt und als Graphen mit einer Skala der relativen Proteinkonzentration zwischen 0 und 1 dargestellt. Für jedes Ergebnis wurden mindestens 3 Experimente durchgeführt.

Es zeigte sich keine deutlichen Unterschiede in der Aktivierung von ATR nach Bestrahlung und Schadensinduktion durch MMC und H₂O₂ sowohl bei Überexpression von RAD51 als auch bei den Kontrollzellen.

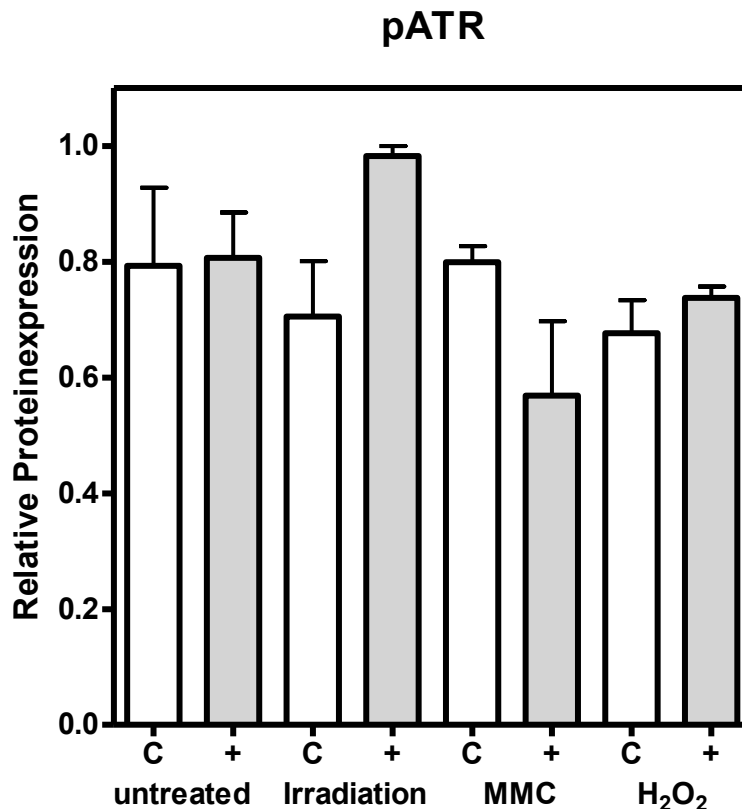


Abbildung 22: Expression von pATR in Zellen mit Überexpression von RAD51 nach Schadensinduktion im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt, mit Mitomycin C (MMC) oder H₂O₂ behandelt. Die Extraktion erfolgte 8h nach Bestrahlung, 24h nach MMC-Gabe und 4h nach H₂O₂-Gabe. Die Proteinexpression von RAD51 wurde mittels Western Blot detektiert und mit einer lichtempfindlichen Kamera ausgewertet. β -Aktin diente als Beladungskontrolle.

3.2.6 Expression von FANCD2 nach Schadensinduktion

Der Einfluss der RAD51 Überexpression auf die Expression von FANCD2 nach Schadensinduktion durch Bestrahlung, durch Mitomycin C oder durch H₂O₂ wurde mittels Western Blot bestimmt. Die Zellen wurden acht Stunden nach Bestrahlung, vierundzwanzig Stunden nach MMC-Zugabe und vier Stunden nach H₂O₂-Zugabe extrahiert.

Abbildung 23 zeigt die Expression von FANCD2 in Zellen mit und ohne RAD51 Überexpression durch die Induktion von Ponasteron (1 μ mol) 24 Stunden vor Behandlung, die entweder mit 6 Gy bestrahlt, mit MMC (160 ng/ml) oder mit H₂O₂ (50 μ M) behandelt wurden. Die Auswertung der Proteinsignale erfolgte durch eine lichtempfindliche Kamera, die die Lichtemission pro Fläche detektiert. Die ermittelten Werte wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt und als Graphen mit einer Skala der

relativen Proteinkonzentration zwischen 0 und 1 dargestellt. Für jedes Ergebnis wurden mindestens 3 Experimente durchgeführt.

Es wurde keine gesteigerte Proteinexpression von FANCD2 durch RAD51 Überexpression nach Bestrahlung und Schadensinduktion durch MMC sowie H_2O_2 beobachtet.

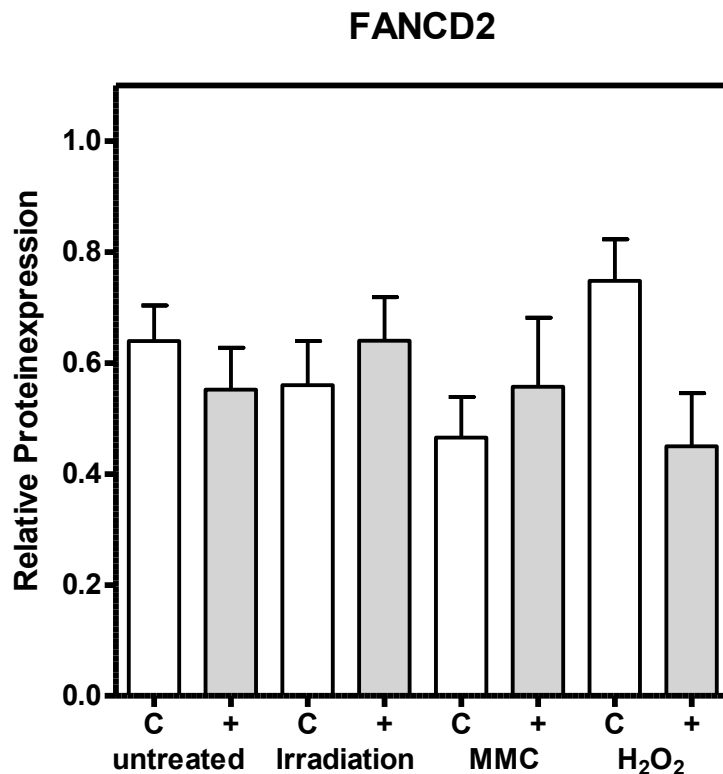


Abbildung 23: Expression von FANCD2 in Zellen mit Überexpression von RAD51 nach Schadensinduktion im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt, mit Mitomycin C (MMC) oder H_2O_2 behandelt. Die Extraktion erfolgte 8h nach Bestrahlung, 24h nach MMC-Gabe und 4h nach H_2O_2 -Gabe. Die Proteinexpression von RAD51 wurde mittels Western Blot detektiert und mit einer lichtempfindlichen Kamera ausgewertet. β -Aktin diente als Beladungskontrolle.

3.2.7 Aktivierung von FANCD2 nach Schadensinduktion

Der Einfluss der RAD51 Überexpression auf die Aktivierung von FANCD2 wurde nach Schadensinduktion durch Bestrahlung, durch Mitomycin C oder durch H_2O_2 wurde mittels Western Blot bestimmt. Die Zellen wurden acht Stunden nach Bestrahlung, vierundzwanzig Stunden nach MMC-Zugabe und vier Stunden nach H_2O_2 -Zugabe extrahiert.

Abbildung 24 zeigt die Aktivierung von FANCD2 in Zellen mit und ohne RAD51 Überexpression durch die Induktion von Ponasteron (1 μ mol) 24 Stunden vor Behandlung, die entweder mit 6 Gy bestrahlt, mit MMC (160 ng/ml) oder mit H₂O₂ (50 μ M) behandelt wurden. Die Auswertung der Proteinsignale erfolgte durch eine lichtempfindliche Kamera, die die Lichtemission pro Fläche detektiert. Die ermittelten Werte wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt und als Graphen mit einer Skala der relativen Proteinkonzentration zwischen 0 und 1 dargestellt. Für jedes Ergebnis wurden mindestens 3 Experimente durchgeführt.

Es zeigte sich eine leichte Abnahme der Phosphorylierung von FANCD2 nach Bestrahlung und Schadensinduktion durch MMC. Nach der Schadensinduktion durch H₂O₂ wurde ein Anstieg der Phosphorylierung von FANCD2 bei RAD51 Überexpression beobachtet.

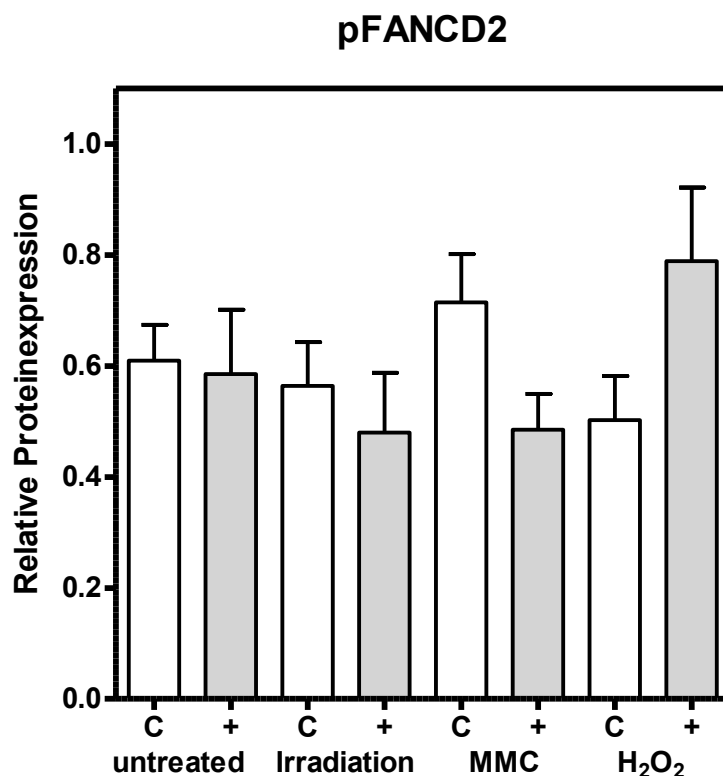


Abbildung 24: Expression von pFANCD2 in Zellen mit Überexpression von RAD51 nach Schadensinduktion im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Zellen wurden mit 6 Gy bestrahlt, mit Mitomycin C (MMC) oder H₂O₂ behandelt und die Proteinexpression von pFANCD2 wurde mittels Western Blot bestimmt.

3.3 Zelluläre Strahlenempfindlichkeit

Es sollte überprüft werden, ob sich die Überexpression von RAD51 auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit auswirkt.

Exponentiell wachsende Zellen wurden mit den Dosen 0, 2, 4, 6, und 8 Gy bestrahlt und anschließend für den Koloniebildungstest ausgelegt. Nach 14 Tagen wurden die Kolonien gefärbt und ausgezählt.

Abbildung 25 zeigt das relative zelluläre Überleben von Zellen mit normaler und RAD51 Überexpression in Abhängigkeit von der Strahlendosis. Die ermittelten Werte sind das Resultat dreier unabhängiger Experimente.

Es zeigte sich für beide Zelllinien eine vergleichbare, deutliche Reduktion des zellulären Überlebens mit steigender Strahlendosis.

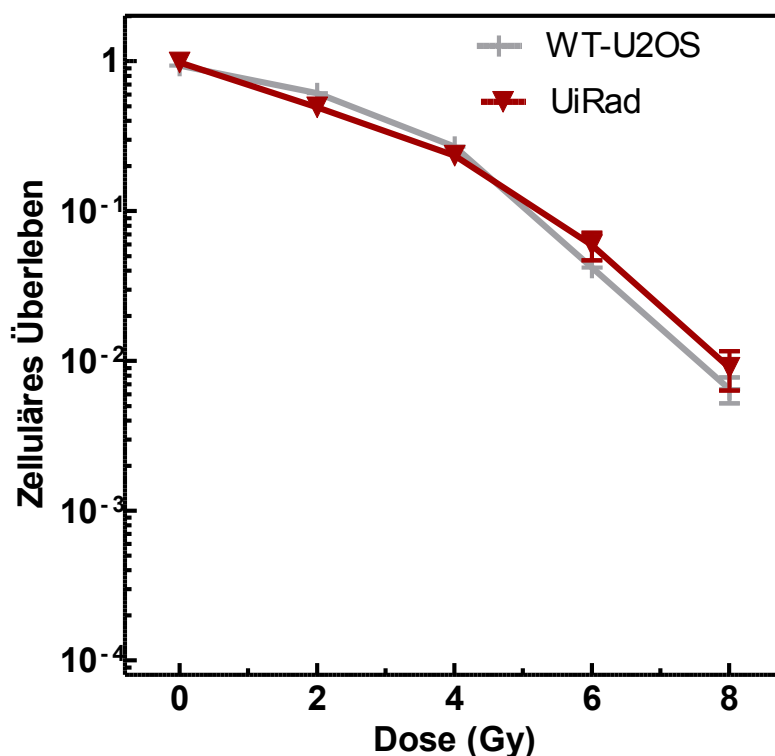


Abbildung 25: Bedeutung der RAD51-Überexpression für das zelluläre Überleben der Zelllinien UiRAD und WT-U2OS in Abhängigkeit der Strahlendosis. Die Fehlerbalken repräsentieren die Abweichungen aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

3.4 Zelluläre Empfindlichkeit gegenüber Mitomycin C

Es sollte untersucht werden, ob sich die Überexpression von RAD51 auf das zelluläre Überleben nach Behandlung mit MMC auswirkt.

Exponentiell wachsenden Zellen wurden mit den Konzentrationen 0, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 nM über 24 Stunden behandelt und anschließend im Koloniebildungstest ausgesät. Die Färbung und Auszählung der Zellen erfolgte nach 14 Tagen.

Abbildung 26 zeigt das zelluläre Überleben für Zellen mit normaler und RAD51 Überexpression in Abhängigkeit von der Konzentration von MMC. Die ermittelten Werte sind das Resultat dreier unabhängiger Experimente.

Es wurde eine deutliche Reduktion der Überlebensrate bei steigender Dosierung von MMC bei RAD51 Überexpression im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet. Es zeigte sich ein leichter sukzessiver Abfall des zellulären Überlebens bei den Kontrollzellen von 10 % bei 6 nM, 45 % bei 33 nM, 65 % bei 48 nM und von 70 % bei einer Dosierung von 60 nM.

Jedoch zeigte sich bei RAD51 Überexpression eine sehr viel stärkere Reduktion der zellulären Überlebensrate bei Dosissteigerung von MMC. So wies das zelluläre Überleben eine Reduktion von 67 % bei 33 nM, 83 % bei 48 nM und von 90,6 % bei einer Dosierung von 60 nM MMC auf.

Somit zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Zellen mit RAD51 Überexpression und den Kontrollzellen. Es kam zu einem starken Abfall von 90,6% nach 60 nM bei RAD51 Überexpression im Gegensatz zu 70 % bei den Kontrollzellen.

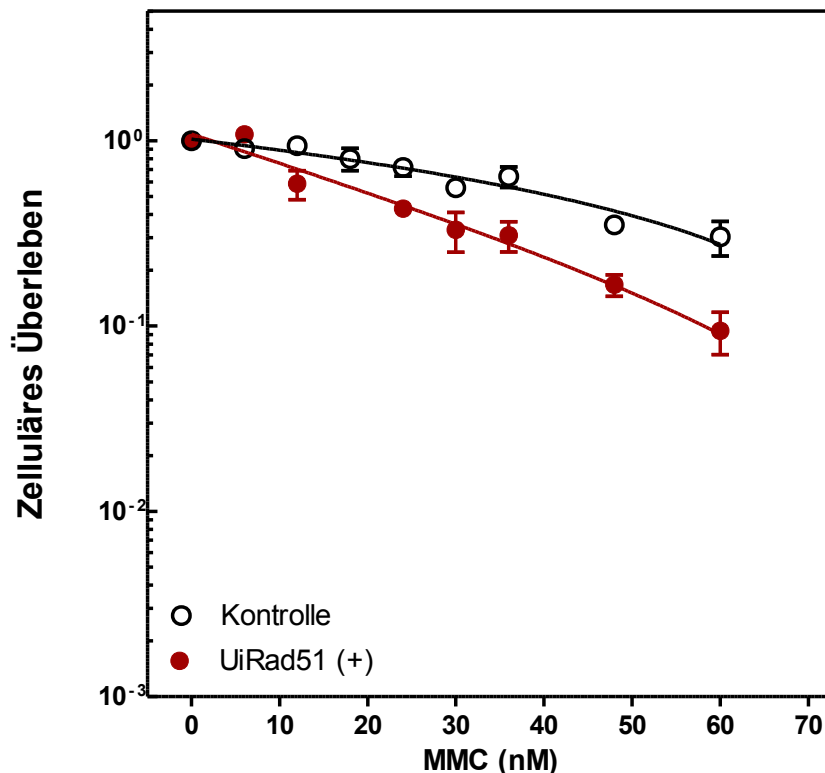


Abbildung 26: Bedeutung der RAD51-Überexpression für das zelluläre Überleben der Zelllinien UiRAD mit und ohne RAD51-Überexpression in Abhängigkeit von der Konzentration von MMC. Die Fehlerbalken repräsentieren die Abweichungen aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

3.5 Zelluläre Empfindlichkeit gegenüber Wasserstoffperoxid

Es sollte überprüft werden, wie sich die Überexpression von RAD51 auf die zelluläre Empfindlichkeit nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid auswirkt. Zu diesem Zweck wurden exponentiell wachsende Zellen Konzentrationen zwischen 0 und 200 μM H_2O_2 für 20 Minuten ausgesetzt und anhand des Koloniebildungstestes untersucht. Anschließend wurde die Kolonie nach 14 Tagen gefärbt und ausgezählt.

Abbildung 27 zeigt das relative zelluläre Überleben der Zelllinien mit normaler und RAD51 Überexpression in Abhängigkeit der Konzentration von H_2O_2 . Die ermittelten Werte sind das Resultat dreier unabhängiger Experimente.

Es zeigte sich ein sehr schneller und starker Abfall des zellulären Überlebens bei RAD51 Überexpression im Gegensatz zu den Kontrollzellen bei niedriger Dosierung von H_2O_2 . Bei den Kontrollzellen wurde ein deutlicher Abfall von 42 % bei 10 μM , 52 % bei 50 μM und 60 % bei 100 μM beobachtet. Danach zeigte sich ein leichter Anstieg von 54 % bei 200 μM .

Jedoch wies das zelluläre Überleben einen massiven Abfall bei RAD51 Überexpression auf mit 73 % bei 10 μM und 79 % bei 30 μM auf. Danach blieb das zelluläre Überleben bei RAD51 Überexpression mit 78% bei 50 μM und 77 % bei 100 μM auf einem konstanten Niveau. Zuletzt zeigte sich ein leichter Anstieg auf 70 % bei einer Dosierung von 200 μM H_2O_2 .

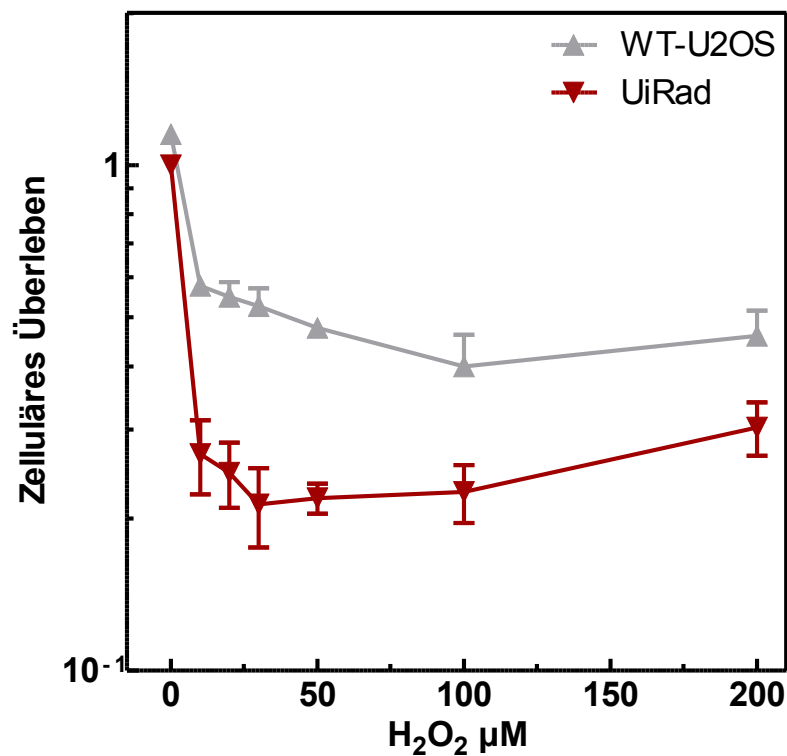


Abbildung 27: Bedeutung der RAD51-Überexpression für das zelluläre Überleben der Zelllinien UiRAD und WT-U2OS in Abhängigkeit von der Konzentration von H_2O_2 . Die Fehlerbalken repräsentieren die Abweichungen aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss der Überexpression von RAD51 – dem zentralen Protein der homologen Rekombination – auf die funktionelle Aktivierung der nachfolgenden Signalkaskade der DNA-Reparatur zu überprüfen. Hierzu wurde die Phosphorylierung von ATM/ATR und die Mono-Ubiquitinierung von FANCD2 nach Schadensinduktion mittels Bestrahlung beziehungsweise Behandlung mit Mitomycin C und Wasserstoffperoxid untersucht. In einer vorangegangenen Arbeit unseres Labors wurde gezeigt, dass eine Überexpression von RAD51, nicht - wie erwartet - zu einer Resistenzbildung nach vergleichbarer Schadensinduktion führte. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die veränderte Synthese bzw. Aktivierung von Sensoren der DNA-Reparatur (z.B. ATM, ATR oder FANCD2) oder eine fehlerhafte Beladung des Chromatins mit RAD51 (wofür neben BRCA2 auch die Proteine der Fanconi Anämie verantwortlich sind) darstellen. Die Überprüfung der ersten Hypothese war die zentrale Aufgabenstellung der vorliegenden Dissertation. In Zellen mit einem Überangebot an RAD51 konnte nach jeglicher Schadensinduktion eine erhöhte Aktivierung von ATM bei normaler Expression demonstriert werden. Im Gegensatz dazu konnte für ATR keinerlei Aktivierung oder vermehrte Expression nachgewiesen werden. Bei FANCD2 wurde ein von der Art der Schadensinduktion abhängiges Aktivierungs- und Expressionsmuster gezeigt.

4.1 Methodische Vorarbeiten

4.1.1 Aktivierung von ATM nach Schadensinduktion

Die Proteinkinase ATM wird durch DNA-Schäden aktiviert und phosphoryliert wichtige Schlüsselproteine für Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur und Apoptose. In der wissenschaftlichen Literatur wird ATM zudem als Reparaturprotein für DSB und als Sensor für oxidativen Stress beschrieben (Colton et al., 2006, Kastan and Lim, 2000, Sancar et al., 2004, Banin et al., 1998, Canman et al., 1998, Bakkenist, 2003). Zur Vorbereitung der weiteren Experimente wurde der Zeitverlauf für die Phosphorylierung von ATM an Position Ser 1981 nach Schadensinduktion durch DSB, DNA-Kreuzvernetzungen und oxidativen Stress überprüft.

Zur Evaluierung von DSB wurden Zellen bestrahlt und Gesamtzellextrakte über einen Zeitraum von 24h hergestellt. Es zeigte sich eine deutliche Aktivierung von ATM mit zunehmender Zeit, mit einem leichten Anstieg nach 30 min und einem Maximum mit 84 % nach 2h. Danach nahm das Aktivierungssignal sukzessive bis 6h ab, um nach 24h wieder den Ausgangswert zu erreichen. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen anderer überein, die ebenfalls eine schnelle Aktivierung von ATM (teilweise bereits 5 min nach Bestrahlung), mit einem Maximum nach 2h (Fang et al., 2001, Pandita et al., 2000, Yajima et al., 2009, Yan et al., 2008) und einer sukzessiven Abnahme bis 24h beobachteten. Canman et al. (Canman et al., 1998) und Banin et al. (Banin et al., 1998) zeigten zudem, dass in Folge der schnellen Aktivierung von ATM nach Bestrahlung das Tumorsuppressorprotein p53 an Serin 15 phosphoryliert wurde. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass ATM in der Signalkaskade nach Schadensinduktion durch Bestrahlung zu einem sehr frühen Zeitpunkt von Bedeutung ist (Bakkenist, 2003).

Zur Überprüfung von DNA-Kreuzvernetzungen wurde der Zeitverlauf der Phosphorylierung von ATM an Position Ser 1981 durch Behandlung mit dem DNA-kreuzvernetzenden Chemotherapeutikum Mitomycin C überprüft. Dafür wurden ebenfalls Gesamtzellextrakte in verschiedenen Zeitabständen über 24h extrahiert. Es konnte keine eindeutig sichtbare Aktivierung von ATM beobachtet werden. In der wissenschaftlichen Literatur ist kein vergleichbares Experiment mit MMC vorliegend. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit mit MMC beschreibt eine Studie unter Benutzung einer ähnlichen kreuzvernetzenden Substanz, Cisplatin, eine Aktivierung von ATM (Colton et al., 2006). Zur endgültigen Klärung der Aktivierung von ATM bei Schäden durch kreuzvernetzenden Substanzen werden weitere Studien nötig sein.

Zur Untersuchung des Zeitverlaufs der Aktivierung von ATM nach oxidativem Stress wurden ebenfalls Gesamtzellextrakte mit dem Radikalbildner H_2O_2 behandelt. Nach der Schadensinduktion durch H_2O_2 konnte eine starke und sehr schnelle Phosphorylierung von ATM mit einem Maximum nach 1 h beobachtet werden. Das Niveau der Phosphorylierung blieb auch nach 2 h und nach 4 h hoch, um später wieder abzusinken. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von Guo (Guo, 2010) überein, die eine Phosphorylierung von ATM nach Behandlung mit H_2O_2 zeigten. Zudem wurde eine Aktivierung von ATM unabhängig des MRN (Mre11-Rad50-Nbs1)-Komplexes, der im direkten Zusammenhang mit DNA

Doppelstrangbrüchen steht, beobachtet. Dies deutet auf eine mögliche Rolle von ATM als direkter Sensor von oxidativem Stress unabhängig von DNA-Schäden hin (Chen et al., 2011).

Zusammenfassend zeigen die methodischen Vorarbeiten eine schadensabhängige, schnelle Aktivierung von ATM, in Übereinstimmung mit der vorhandenen Literatur.

4.1.2 Aktivierung von ATR nach Schadensinduktion

Ähnlich wie ATM spielt auch die Proteinkinase ATR eine wichtige Rolle in der Phosphorylierung von Schlüsselproteinen der Zellreparatur. Im Gegensatz zu ATM wird ATR jedoch durch Replikationsstress aktiviert (Colton et al., 2006, Kastan and Lim, 2000, Sancar et al., 2004, McGowan and Russell, 2004, Shechter et al., 2004). Analog zu ATM wurde zur Methodenvvalidierung auch für ATR der charakteristische Zeitverlauf der Aktivierung nach Schadensinduktion durch DSB, DNA-Kreuzvernetzungen und oxidativen Stress überprüft.

Nach Bestrahlung wurde eine leichte Phosphorylierung von ATR im langsamen zeitlichen Verlauf beobachtet. Die Aktivierung erfolgte nach 4h und stieg weiter stetig an, um nach 24h das Maximum zu erreichen. Im Vergleich dazu zeigte Jazayeri et al. (Jazayeri et al., 2006) eine Aktivierung von ATR während der S- und G2-Phase, in Abhängigkeit von ATM und dem MRN Komplex. Diese Beobachtungen stimmen mit Yan et al. (Yan et al., 2007) überein, in deren Studie eine 12-fache Aktivierung von ATR eine Stunde nach Bestrahlung beobachtet wurde. Cortez et al. (Cortez et al., 2001) zeigte bei einer Deletion von ATR eine fehlende Aktivierung des G2-Checkpoints nach Bestrahlung. Zusammenfassend weisen unsere Ergebnisse in Zusammenschau mit der aktuellen Literatur darauf hin, dass ATR zwar durch Bestrahlung aktiviert wird, jedoch später als ATM, und vermutlich indirekt über ATM.

Zur Überprüfung von DNA-Kreuzvernetzungen wurde der Zeitverlauf der Phosphorylierung von ATR an Position Ser 428 durch Behandlung mit Mitomycin C überprüft. Dafür wurden ebenfalls Gesamtzellextrakte in verschiedenen Zeitabständen über 24h extrahiert. Es wurde eine massive Phosphorylierung von ATR mit zunehmender Zeit beobachtet. Nach einem kontinuierlichen Anstieg nach 30 min zeigte sich ein Maximum nach 6h, wobei das Aktivierungssignal bis 24 h nach Behandlung mit MMC auf einem hohen Niveau blieb. Verschiedene andere

vorliegende Studien zeigten, dass ATR für die zelluläre Antwort auf DNA-kreuzvernetzende Chemotherapeutika wie MMC und Cisplatin benötigt wird. So wurde eine Hypersensitivität gegenüber MMC und Cisplatin bei ATR-defizienten Zellen beobachtet (Zou and Elledge, 2003). Zusammenfassend ergibt sich ein deutlicher Hinweis, dass ATR und nicht ATM der relevante Sensor für Schäden durch DNA-kreuzvernetzende Chemotherapeutika ist (Wang and D'Andrea, 2004).

Nach Schadensinduktion durch H₂O₂ konnte in der vorliegenden Arbeit keine deutliche Aktivierung von ATR gezeigt werden. In einer ähnlichen Arbeit (Berdelle et al., 2011) wird nach Behandlung mit Artesunate, einem Malariamedikament welches ebenfalls oxidativen Stress hervorruft, eine Phosphorylierung von ATR beschrieben. Diese widersprüchliche Datenlage impliziert die Notwendigkeit weiterer Studien zur Rolle von ATR bei oxidativem Stress.

Zusammenfassend konnten die methodischen Vorarbeiten bestätigen, dass ATR nach kreuzvernetzenden DNA-Schäden ein schnelles, deutliches Aktivierungsmuster zeigt. Die langsame Aktivierung von ATR nach DSB Induktion deutet auf eine indirekte Aktivierung über ATM hin.

4.1.3 Aktivierung von FANCD2 nach Schadensinduktion

Der Fanconi Komplex ist wichtig für die Reparatur von DNA-Kreuzvernetzungen in der homologen Rekombination. FANCD2 ist eines von sechzehn bekannten FA Proteinen, wobei acht Proteine (A, B, C, E, F, G, L, M) nach DNA-Schaden einen Enzymkomplex (Core-Komplex) bilden, der FANCD2 monoubiquiniert und phosphoryliert. FA-defiziente Zellen weisen eine hohe Sensitivität gegenüber DNA-kreuzvernetzenden Substanzen wie Cisplatin oder MMC auf (D'Andrea and Grompe, 2003, Joenje et al., 1997, Levitus et al., 2004, Wang and D'Andrea, 2004, Garcia-Higuera et al., 2001). Über die Monoubiquinierung von FANCD2 wurde bereits sehr viel geforscht, weshalb wir uns in dieser Arbeit der Phosphorylierung von FANCD2 widmen. Zur Vorbereitung der weiteren Experimente wurde der typische Zeitverlauf der Phosphorylierung von FANCD2 an Position Ser 222 nach Schadensinduktion durch DSB, DNA-Kreuzvernetzungen und oxidativen Stress überprüft.

Zur Überprüfung der Phosphorylierung von FANCD2 bei DSB wurden Zellen bestrahlt und Gesamtzellextrakte über 24 h extrahiert. Es wurde keine Phosphorylierung von FANCD2 im zeitlichen Verlauf festgestellt. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen anderer Studien überein, die ebenfalls keine Aktivierung von FANCD2 nach Bestrahlung beobachteten (Collis et al., 2006). Im Gegensatz dazu beobachteten Garcia-Higuera et al. (Garcia-Higuera et al., 2001) eine Aktivierung von FANCD2 nach Bestrahlung allerdings bei einer höheren Dosis von 20 Gy. Ergänzend zeigte Taniguchi et al. (Taniguchi et al., 2002) nach Bestrahlung vermehrte Phosphorylierung von FANCD2 durch ATM in der S-Phase, jedoch ebenfalls nach einer viel stärkeren Strahlendosis von 30 Gy. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass FANCD2 nicht direkt durch DSB, sondern verzögert über ATM aktiviert wird.

Weiterhin wurde überprüft, ob eine Aktivierung von FANCD2 mittels Phosphorylierung an Serin 222 durch die Behandlung mit dem DNA-kreuzvernetzenden Chemotherapeutikum Mitomycin C erfolgt. Die Phosphorylierung von FANCD2 nach Mitomycin C zeichnete sich im zeitlichen Verlauf sehr heterogen ab. Das Aktivierungssignal stieg nach 1h leicht an, mit einem Maximum nach 2h. Danach fiel es stufenweise bis nach 6h ab, um einen erneuten Anstieg nach 24h zu zeigen. Collis et al. (Collis et al., 2006) und Kennedy et al. (Kennedy and D'Andrea, 2005) beobachteten ebenfalls eine Phosphorylierung von FANCD2 nach MMC-Behandlung. Andreassen et al. (Andreassen et al., 2004) zeigte eine Phosphorylierung von FANCD2 durch ATR nach Behandlung mit MMC. In einer weiteren Arbeit (O'Driscoll et al., 2003) wurde bei ATR-defizienten Seckel Zellen eine fehlende Aktivierung von FANCD2 nach MMC Behandlung beobachtet – was in weiterer Folge mit unserer Arbeit, die eine Aktivierung von ATR nach MMC-Behandlung zeigte, übereinstimmt. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse eine direkte, schnelle Phosphorylierung von FANCD2 durch DNA-Kreuzvernetzungen, sowie eine langsame Phosphorylierung über ATR.

Zum Abschluss der methodischen Vorarbeiten wurde zur Untersuchung des Zeitverlaufs der Phosphorylierung von FANCD2 nach oxidativem Stress Zellen mit H₂O₂ behandelt. Es wurde keine Phosphorylierung von FANCD2 mit zunehmender Zeit beobachtet. Vergleichbare Studien liegen in der Literatur nicht vor.

Basierend auf den methodischen Vorarbeiten wurde der typische Zeitverlauf der Aktivierung der verschiedenen Proteine ATM, ATR und FANCD2 nach Schadensinduktion etabliert, und der optimale Zeitpunkt für die Proteinextraktion in Einklang mit den Ergebnissen festgelegt. Nach Bestrahlung erfolgte die Extraktion der Proteine nach 8 Stunden, nach Schadensinduktion mit MMC nach 24 Stunden und nach Schadensinduktion durch H₂O₂ nach vier Stunden.

4.2 Bedeutung der RAD51 Überexpression für weitere Reparaturproteine nach DNA-Schäden

RAD51 ist das Schlüsselprotein der Homologen Rekombination und daher für die Reparatur von DSB essentiell. Die Überexpression von RAD51 kann sich in einer verbesserten Homologen Rekombination oder einer erhöhten Resistenz gegenüber DNA-Schäden (und beispielsweise erniedrigter Strahlensensitivität von malignen Tumoren) auswirken. Andererseits zeigen Zellen mit RAD51 Überexpression auch eine erhöhte genomische Instabilität und erhöhte Tumorgenese (Klein, 2008). Um dieser Widersprüchlichkeit weiter nachzugehen, wurden wichtige Reparaturproteine der Homologen Reparatur wie ATM, ATR und FANCD2 bei RAD51 Überexpression nach Schadensinduktion durch DSB, DNA-Kreuzvernetzungen und oxidativen Stress überprüft.

4.2.1 Expression von RAD51 in Zellen mit RAD51 Überexpression nach Schadensinduktion

Zunächst wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der RAD51-Expression nach Schadensinduktion durch Bestrahlung, durch Mitomycin C oder durch H₂O₂ mittels Western Blot bestimmt. Die Zellen wurden basierend auf den methodischen Vorarbeiten 8 Stunden nach Bestrahlung, 24 Stunden nach MMC-Zugabe und vier Stunden nach H₂O₂ –Zugabe extrahiert.

Ohne Schadensinduktion zeigte sich eine 3-fach erhöhte RAD51-Expression nach Ponasterongabe. Diese deutliche Überexpression ist vergleichbar mit anderen Studien, in denen die Überexpression um das zwei- bis zehnfache gesteigert werden konnte (Arnaudeau et al., 2001, Flygare et al., 2001, Raderschall et al., 2002, Richardson et al., 2004, Yáñez and Porter, 1999). Somit konnte gezeigt werden,

dass in den verwendeten humanen Osteosarkomzellen eine RAD51 Überexpression durch Induktion gewährleistet ist.

Nach Bestrahlung wurde keine gesteigerte Expression von RAD51 nach Ponasteroninduktion beobachtet. Eine Erklärung hierfür könnte eine verminderte Ponasteronwirkung auf den induzierbaren Promoter oder eine Hemmung der Genexpression durch Bestrahlung sein.

Nach Schadensinduktion durch MMC zeigte sich eine Verdoppelung der RAD51 Expression nach Gabe von Ponasteron. Dies ist jedoch auf eine relative Erhöhung des RAD51-Proteins zurückzuführen. Durch den verursachten Schaden durch MMC kommt es zu einem verschobenen Zellzyklus, der zu einer Anreicherung der Zellen im G2 Arrest und nicht zu einer erhöhten Genexpression führt (Yun et al., 2005).

In einer anderen Arbeit von Slupianek et al. (Slupianek et al., 2001) wurde eine Überexpression von RAD51 in Zellen beobachtet, die das Onkogen BCR/Abl exprimieren. Diese Zellen wiesen eine erhöhte Resistenz gegenüber Cisplatin und MMC auf. In weiteren Publikationen zeigte sich eine negative Aktivierung von RAD51 durch p53 (Arias-Lopez et al., 2006, Hannay et al., 2007). Allerdings sind in 50 % der Tumoren p53 mutiert und RAD51 überexprimiert, was eine erhöhte Resistenz gegenüber Chemotherapeutika hervorruft (Klein, 2008). Ergänzend zeigten Meng et al. (Meng et al., 2005) und Bindra et al. (Bindra et al., 2004), dass bei Hypoxie RAD51 vermindert exprimiert wird und daraus eine verminderte Reparatur resultieren kann. Zusammenfassend lassen die vorliegenden Ergebnisse im Einklang mit der wissenschaftlichen Literatur darauf schließen, dass eine vermehrte Menge an RAD51 bei Schäden durch DNA-Kreuzvernetzung zu einer verbesserten DNA Reparatur führen kann.

Nach Schadensinduktion durch H₂O₂ wurde ebenfalls eine sehr deutliche RAD51 Expression nach Ponasteroninduktion beobachtet. Leider ist die wissenschaftliche Datenlage auch hier schlecht, und es liegen keine vergleichbaren Studien vor.

Anhand dieser Ergebnisse für RAD51 kann noch keine genaue Aussage, ob RAD51 Überexpression eine erhöhte Resistenzbildung oder genomische Instabilität induziert, getroffen werden.

4.2.2 Expression von ATM und pATM in Zellen mit RAD51 Überexpression nach Schadensinduktion

Der Einfluss der RAD51 Überexpression auf die Expression von ATM und phosphoryliertem ATM nach Schadensinduktion durch Bestrahlung, Mitomycin C oder H_2O_2 wurde mittels Western Blot bestimmt. Die Zellen wurden 8 Stunden nach Bestrahlung, 24 Stunden nach MMC-Zugabe und vier Stunden nach H_2O_2 –Zugabe extrahiert. Es wurde keinerlei erhöhte Expression des ATM-Proteins sowohl bei RAD51 Überexpression als auch bei Kontrollzellen nach Bestrahlung und Schadensinduktion durch MMC sowie H_2O_2 beobachtet. Dies bedeutet vermutlich, dass die ATM Expression unabhängig von der Schadensinduktion und der RAD51 Überexpression ist.

Für die Aktivierung von ATM (pATM) zeigte sich jedoch ein anderes Bild. Es wurde eine starke Phosphorylierung von ATM in den Kontrollzellen nach Bestrahlung beobachtet. Dieses Ergebnis ist sehr gut mit unseren methodischen Vorarbeiten vereinbar. Bei RAD51 Überexpression zeigte sich eine Reduktion der Phosphorylierung von ATM um 50%. Diese stark verminderte Phosphorylierung von ATM bei RAD51 Überexpression deutet auf eine Reduktion der Schadenserkennung durch ATM hin, welche in erster Linie über Doppelstrangbrüche erfolgt.

Im Gegensatz dazu konnte nach Schadensinduktion durch MMC ein sehr deutlicher Anstieg mit einer Verdoppelung der Phosphorylierung von ATM bei RAD51 Überexpression gezeigt werden. Die RAD51 Überexpression scheint demnach zu einer verzögerten Aktivierung von ATM zu führen, da ATM bei der Reparatur von MMC-Schäden eher untergeordnete Rollen spielt. Durch den hervorgerufenen Stress durch die RAD51 Überexpression werden Schäden an der Replikationsgabel verzögert repariert, und es kommt sekundär zu Doppelstrangbrüchen. In Folge dessen wird der Schaden nicht klassisch über ATR, sondern sekundär über ATM repariert.

Nach Schadensinduktion durch H_2O_2 wurde ebenfalls eine deutliche Phosphorylierung von ATM bei RAD51 Überexpression beobachtet. Dieses Ergebnis ist schwierig zu interpretieren, da ATM durch oxidativen Stress auch ohne DNA-Schaden aktiviert wird (siehe methodische Vorarbeiten), und dadurch eine Aktivierung von ATM auch unabhängig von RAD51 erfolgen könnte. Alternativ könnte für das beobachtete Ergebnis ein ähnlicher Mechanismus wie bei der Schadensinduktion durch MMC verantwortlich sein.

4.2.3 Expression von ATR und pATR in Zellen mit RAD51 Überexpression nach Schadensinduktion

Der Einfluss der RAD51 Überexpression auf die ATR und pATR Expression nach Schadensinduktion durch Bestrahlung, durch Mitomycin C oder durch H₂O₂ wurde mittels Western Blot bestimmt. Die Zellen wurden 8 Stunden nach Bestrahlung, 24 Stunden nach MMC-Zugabe und vier Stunden nach H₂O₂ –Zugabe extrahiert.

Bei Vorliegen einer Überexpression von RAD51 zeigte sich eine deutliche Reduktion der Expression von ATR bei unbehandelten Zellen, was auf verminderte Reparaturfähigkeiten der Zellen nach Replikationsstress hindeuten könnte. Nach Schadensinduktion durch Bestrahlung, MMC und H₂O₂ wurde dagegen keine signifikanten Veränderungen der ATR Expression zwischen den Kontrollzellen und RAD51 Überexpression beobachtet. Es zeigte sich jedoch deutliche Unterschiede in der Phosphorylierung von ATR.

Nach Bestrahlung konnte in den Kontrollzellen im Gegensatz zu den methodischen Vorarbeiten keine Aktivierung von ATR festgestellt werden, allerdings zeigte sich ein minimaler Anstieg von pATR bei RAD51 Überexpression. Dies lässt vermuten, dass RAD51 Überexpression die Aktivierung von ATR nach Bestrahlung vermindert. Nach Schadensinduktion durch MMC zeigte sich ein leichter Abfall der Aktivierung von ATR bei RAD51 Überexpression. In den Vorarbeiten konnte nachgewiesen werden, dass ATR besonders für die Reparatur nach DNA-Kreuzvernetzungen benötigt wird. Im Fall der Überexpression von RAD51 wird die Aktivierung von ATR deutlich unterdrückt, da ein klarer Anstieg der Aktivierung zu erwarten gewesen wäre. Die Unterdrückung von ATR – und damit die für die Zelle verzögerte Reparatur von DNA-Kreuzvernetzungen – stimmen mit den Ergebnissen der verzögerten Aktivierung von ATM nach MMC-Gabe bei RAD51 Überexpression überein. ATM wird demnach sekundär bei Verzögerung der Reparatur durch ATR verwendet. Alternativ wäre denkbar, dass pATR keine zentrale Rolle spielen würde, und durch den down-stream von ATR andere Proteine wie CHK1 aktiviert werden würden.

Nach Schadensinduktion durch H₂O₂ wurde kein Unterschied der ATR Aktivierung zwischen Zellen mit RAD51 Überexpression und den Kontrollzellen beobachtet.

Verglichen mit den Vorarbeiten wird ATR nicht durch RAD51 Überexpression bei oxidativem Stress beeinflusst.

4.2.4 Expression von FANCD2 und pFANCD2 in Zellen mit RAD51 Überexpression nach Schadensinduktion

Der Einfluss der RAD51 Überexpression auf die FANCD2 und pFANCD2 Expression nach Schadensinduktion durch Bestrahlung, Mitomycin C oder H_2O_2 wurde mittels Western Blot bestimmt. Die Zellen wurden 8 Stunden nach Bestrahlung, 24 Stunden nach MMC-Zugabe und vier Stunden nach H_2O_2 –Zugabe extrahiert.

Es wurde keine gesteigerte Proteinexpression von FANCD2 durch RAD51 Überexpression nach Bestrahlung und Schadensinduktion durch MMC beobachtet. Nach Schadensinduktion durch H_2O_2 zeigte sich ein gegensätzliches Bild. Es wurde eine leichte Erhöhung der Proteinexpression von FANCD2 in den Kontrollzellen beobachtet, jedoch nicht bei RAD51 Überexpression. Somit führt RAD51 Überexpression zu einer Unterbindung der FANCD2 Expression.

Nach Bestrahlung zeigte sich keine Änderung der Phosphorylierung von FANCD2 sowohl bei den Kontrollzellen als auch bei RAD51 Überexpression. Im Vergleich zu den Vorarbeiten, in denen eine Aktivierung von FANCD2 nachgewiesen wurde, deuten diese Ergebnisse auf eine deutliche Unterdrückung von FANCD2 durch RAD51 Überexpression hin, in Kombination mit der Hemmung von ATM.

Nach Schadensinduktion durch MMC zeigten die Kontrollzellen eine leichte Aktivierung von FANCD2. Dies war bei Überexpression von RAD51 nicht zu beobachten. In Zusammenschau mit den Ergebnissen der Vorarbeiten (direkte Aktivierung von FANCD2 und indirekte Aktivierung über ATR) lässt dies auf eine verstärkte Hemmung sowohl von FANCD2 als auch von ATR durch die Überexpression von RAD51 schließen.

Nach der Schadensinduktion durch H_2O_2 wurde ein Anstieg der Phosphorylierung von FANCD2 bei RAD51 Überexpression beobachtet. Dies steht gegensätzlich zu den Vorarbeiten, bei denen sich keine Aktivierung zeigte. Möglicherweise führt

RAD51 Überexpression also zu einer „falschen“ Aktivierung von FANCD2 nach oxidativem Stress.

Zusammenfassend führt die Überexpression von RAD51 zu einer gestörten und gegensätzlichen Signaltransduktion in der DNA-Reparatur sowohl bei DSB, DNA-Kreuzvernetzungen und oxidativem Stress. Um zu überprüfen, wie sich dieser gestörte Reparaturmechanismus auf das Gesamtüberleben der Zellen auswirkt, wurden weiterführende Experimente durchgeführt.

4.3 Zelluläre Strahlenempfindlichkeit

Es sollte festgestellt werden, welchen Einfluss die unterschiedlichen Strahlendosierungen auf das zelluläre Überleben der Zelllinien UiRAD (RAD51 Überexpression) und WT-U2OS, die als Kontrollzellen dienten, haben.

Es zeigte sich für beide Zelllinien eine deutliche Reduktion des zellulären Überlebens mit steigender Strahlendosis. Jedoch konnte kein Unterschied in Zellen mit RAD51 Überexpression im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet werden.

Somit zeichnete sich ein sehr deutlicher Abfall des relativen Überlebens sowohl für die Kontrollzellen als auch für die Zellen mit RAD51 Überexpression mit einem Maximum von 99 % nach einer Dosis von 8 Gy ab. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Jend et al. (Jend, 2008) überein, die für das gleiche Zellsystem nach Induktion der RAD51 Überexpression nach Bestrahlung keine Einfluss auf die zelluläre Strahlenempfindlichkeit im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigten. Im Gegensatz dazu bestrahlte Vispe et al. (Vispè et al., 1998) Hamster-Zellen mit RAD51 Überexpression in der späten S/G2 Phase und beschrieb eine Strahlenresistenz der überexprimierenden Zellen.

Unsere Ergebnisse zeigen einen gestörten Reparaturmechanismus auf Proteinebene, der jedoch keine Auswirkung auf das Gesamtüberleben der Zellen bei RAD51 Überexpression nach Bestrahlung hat.

4.4 Zelluläre Empfindlichkeit gegenüber Mitomycin C

Es sollte untersucht werden, welchen Einfluss unterschiedliche Konzentrationen von MMC auf das zelluläre Überleben der Zelllinie UiRAD mit und ohne RAD51-Überexpression (WTU2OS Zellen) hat.

Es zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen Zellen mit RAD51 Überexpression und Kontrollzellen. Es wurde eine deutliche Reduktion der zellulären Überlebensrate bei steigender Dosierung von MMC bei RAD51 Überexpression im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet. Bei den Kontrollzellen zeigte sich ein leichter sukzessiver Abfall des zellulären Überlebens bis zu 70 % bei einer Dosierung von 60 μM . Bei RAD51 Überexpression zeigte sich eine stärkere Reduktion der zellulären Überlebensrate bis zu 91 % bei einer Dosierung von 60 μM MMC.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zur einschlägigen Literatur. Wie schon oben beschrieben zeigten Slupianek et al. (Slupianek et al., 2001) und Klein et al. (Klein, 2008) eine erhöhte Resistenz der Zellen gegenüber Chemotherapeutika wie Cisplatin und MMC bei RAD51 Überexpression.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse nicht nur einen gestörten Reparaturmechanismus auf Proteinebene, sondern auch eine deutliche Auswirkung auf das Gesamtüberleben der Zellen bei RAD51 Überexpression nach Schadensinduktion mit MMC.

4.5 Zelluläre Empfindlichkeit gegenüber Wasserstoffperoxid

Es sollte überprüft werden, wie sich ansteigende Konzentrationen von H_2O_2 auf das zelluläre Überleben der Zelllinien UiRAD und WT-U2OS auswirken.

Es zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen Zellen mit RAD51 Überexpression und Kontrollzellen, da ein sehr schneller und starker Abfall des zellulären Überlebens bei RAD51 Überexpression im Gegensatz zu den Kontrollzellen bei niedriger Dosierung von H_2O_2 beobachtet wurde. Danach blieb das zelluläre Überleben bei RAD51 Überexpression und bei den Kontrollzellen mit steigender Dosierung auf einem konstanten Niveau. Bei einer Konzentration von 200 μM änderte sich das Bild, und es zeigte sich wieder ein leichter Anstieg des Überlebens.

Somit zeigen unsere Ergebnisse insgesamt einen gestörten Reparaturmechanismus auf Proteinebene, der sich auf das Gesamtüberleben der Zelle bei RAD51 Überexpression nach Schadensinduktion mit H_2O_2 auswirkt.

5 Zusammenfassung / Abstract

Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss der Überexpression von RAD51 – dem zentralen Protein der homologen Rekombination – auf die funktionelle Aktivierung der nachfolgenden Signalkaskade der DNA-Reparatur zu überprüfen. Dies wurde anhand der Phosphorylierung von ATM, ATR und FANCD2 nach Schadensinduktion mittels Bestrahlung beziehungsweise Behandlung mit Mitomycin C und Wasserstoffperoxid untersucht. In einer vorangegangenen Arbeit wurde bereits gezeigt, dass eine Überexpression von RAD51, nicht – wie erwartet – zu einer Resistenzbildung nach vergleichbarer Schadensinduktion führte (Parplys et al., 2015). Eine mögliche Ursache hierfür könnte die veränderte Synthese bzw. Aktivierung von Sensoren der DNA-Reparatur, wie z.B. ATM, ATR oder FANCD2, oder eine fehlerhafte Beladung des Chromatins mit RAD51 sein. In der vorgelegten Arbeit wurde der Einfluss der RAD51 Überexpression auf die Aktivierung der intrazellulären Signalkaskaden, vermittelt durch ATM und ATR, untersucht.

In den methodischen Vorarbeiten wurde zunächst der optimale Zeitpunkt für die maximale Aktivierung der Proteine ATM, ATR und FANCD2 nach Schadensinduktion untersucht. Für ATM wurde eine sehr frühe Aktivierung, nach 2-8h nach Bestrahlung, analog dazu für H₂O₂ ebenfalls nach 1-4h, und keine Aktivierung durch MMC beobachtet. Für die Aktivierung von ATR zeigte sich dagegen ein vollständig anderes Bild, mit einer schnellen und persistierenden Aktivierung von 0.5 bis 24h nach MMC, 24h für Bestrahlung und keine auffällige Aktivierung nach H₂O₂. Für FANCD2 zeigte sich im Wesentlichen nur eine Aktivierung durch Behandlung mit MMC. Basierend auf diesen Ergebnissen erfolgte in den weiteren Experimenten zum Einfluss der RAD51 Überexpression auf die Aktivierung der Signalkaskade die Extraktion bei Bestrahlung nach 8h, bei MMC nach 24 h und bei H₂O₂ nach 4h.

Bezogen auf die Aktivierung von ATM zeigte sich eine verminderte Aktivierung nach Bestrahlung unter RAD51 Überexpression und eine leicht erhöhte Aktivierung nach MMC und Wasserstoffperoxid. Bezüglich ATR war auffällig, dass die Expression von ATR selbst anstieg, die Aktivierung allerdings vergleichbar oder eher geringer im Vergleich zu den Kontrollzellen ausfiel. Die Aktivierung von FANCD2 war nach Behandlung mit H₂O₂ deutlich erhöht in Zellen mit RAD51 Überexpression. Diese beobachteten Unterschiede zeigten sich ebenfalls im zellulären Überleben nach

Behandlung mit den verschiedenen Agenzien. So zeigte sich keine Veränderung in der zellulären Strahlenempfindlichkeit nach Bestrahlung bei Überexpression von RAD51, aber eine deutliche Sensitivierung nach Behandlung mit MMC und H₂O₂.

Die Arbeit zeigte damit erstmalig, dass die RAD51 Überexpression zu einer Störung der intrazellulären Signalkaskade auf der Ebene von ATR und FANCD2 führt, während die Aktivierung von ATM weitestgehend unverändert bleibt. Dies drückt sich auch auf der Ebene des zellulären Überlebens aus, mit einer Sensitivität gegenüber Agenzien, die insbesondere zur Schädigung in der S-Phase führen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die Überexpression von RAD51 insbesondere bei der Reparatur von Schäden, welche die aktive Replikation stören, auswirkt – entweder durch fehlerhafte Signalgebung, oder verminderte DNA Reparaturprozesse. Diese Beobachtungen sind insbesondere für Tumorentitäten von Bedeutung, für die bereits eine Überexpression von RAD51 beobachtet wurde. Möglich wäre, dass diese Tumore deutlich empfindlicher auf DNA-DNA vernetzende Agenzien, wie Cisplatin, sowie Topoisomerase I hemmende Agenzien wie Camptothecin, aber auch neue Inhibitoren wie PARP1 reagieren könnten und damit das Outcome dieser Patienten maßgeblich verbessert werden könnte.

English Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of RAD51 overexpression on the activation of DNA-repair proteins. RAD51 is the central protein in the homologous recombination pathway of the DNA repair mechanism. The effect of RAD51 overexpression was analysed by investigating the phosphorylation of ATM, ATR and FANCD2 after irradiation, treatment with MMC and H₂O₂.

In a previous study, no influence of RAD51 overexpression on cellular resistance after comparable DNA damage was observed (Parplys et al., 2015). The reason could be a modified synthesis or activation of the sensors of DNA repair, for example ATM, ATR or FANCD2, or an inaccurate loading of RAD51 onto DNA. In our study, the influence of RAD 51 overexpression on the activation of intracellular pathways mediated by ATM and ATR was investigated.

In ancillary methodological studies, the time point of the maximum activation of the

proteins ATM, ATR and FANCD2 after DNA damage was established. An early activation of ATM after irradiation (2-8h) and after treatment with H₂O₂ (1-4h), as well as no activation after treatment with MMC were detected. In contrast, the activation of ATR was fast and persistent after treatment with MMC (0,5-24h) and after irradiation (24h), and not detectable after treatment with H₂O₂. Only activation after treatment with MMC was observed for FANCD2, essentially. Based on these results, the protein extraction was performed 8h after irradiation, 24h after treatment with MMC and 4h after treatment with H₂O₂.

In RAD51 overexpression, we observed reduced activation of ATM after irradiation and slightly elevated activation of ATM after MMC and H₂O₂. With regard to ATR, an increased expression of the ATR protein was noticed, while its activation remained similar or slightly reduced in RAD51 overexpression compared to control cells. Furthermore, the activation of FANCD2 after exposure to H₂O₂ was substantially elevated in cells with RAD51 overexpression.

Similar findings were also observed in cellular survival after treatment with the various substances. In detail, no difference in cellular survival was noticed in RAD51 overexpression after irradiation, in contrast to a substantially reduced cellular survival after treatment with MMC and H₂O₂.

In conclusion, to the best of our knowledge, this work showed for the first time that RAD51 overexpression leads to dysfunction of the intracellular signalling cascade at the level of ATR and FANCD2, while the activation of ATM remains largely intact. This results in augmented sensitivity towards substances acting during the S-phase, which also impacts cellular survival. Our results indicate that RAD51 overexpression particularly impacts the repair of DNA damage disturbing active replication. This may be caused by dysfunctional signalling or disturbed response to DNA damage.

Our observations are of particular relevance for tumours with known overexpression of RAD51. Possibly such tumours would react much more sensitively towards DNA crosslinking agents such as Cisplatin, as well as towards topomerase-I-inhibitors (e.g., Camptothecin), and novel inhibitors such as PARP1. Thus, the outcomes of patients suffering from such neoplasms could potentially be improved significantly.

6 Abkürzungsverzeichnis

Ab	antibody/Antikörper
ADP	Adenosindiphosphat
AML	myeloblastische Leukämie
AT	Ataxia teleangiectatica
ATM	Ataxia teleangiectasia mutated
ATR	Ataxia teleangiectasia mutated related
BCA	Bicinchoninsäure
BER	Base excision repair/Basenexzisionsreparatur
bidest.	bidestilliert
BIR	break-induced replication
BRCA	breast cancer
BSA	bovines Serumalbumin
c-Abl	Abelson murine leukemia viral (v-abl) oncogene homolog 1
CHK1	checkpoint kinase 1
DDR	DNA Damage Response
DNA	Desoxyribonukleinsäure/desoxyribonucleic acid
DNA-PK	DNA-Protein-Kinase
DNAPKcs	DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DSB	double strand break/Doppelstrangbruch
DSBR	DSB-Reparatur
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol

ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FA	Fanconi-Anämie
FANCD2	Fanconi anemia group complementation D2 protein
FCS	fötales Kälberserum
HJ	Holliday Junction
HR	homologe Rekombination
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
MMC	Mitomycin C
mRNA	messenger RNA
MRN Komplex	Protein Komplex bestehend aus Mre11, Rad50 und Nbs1
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NHEJ	nicht-homologes Endjoining
NSCLC	non-small-cell lung cancer
<i>p. A.</i>	zur Analyse
PARP1	Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1
PBS	phosphate-buffered saline
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rad	Strahlung/radiation
Rad51	Gen aus Hefe, Menschen, Hühnern

RAD51	Protein aus Nagern, Menschen, Hühnern
RNA	Ribonukleinsäure/ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
RPA	Replikationsprotein A
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat/Dodecylsulfat Natriumsalz
SDSA	synthesis-dependent strand annealing
SSA	single strand annealing
SSBR	Single strand break repair/Einzelstrangreparatur
ssDNA	einzelsträngige DNA
TG	Tris-Glycin-Puffer
Thr	Threonin
wt	Wildtyp
XLF	XRCC4-like factor
XRcc/XRCC	x-ray cross complementing protein

7 Literaturverzeichnis

- Andreassen, P. R., D'andrea, A. D. & Taniguchi, T. 2004. ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response. *Genes & Development*, 18, 1958-1963.
- Arias-Lopez, C., Lazaro-Trueba, I., Kerr, P., Lord, C. J., Dexter, T., Iravani, M., Ashworth, A. & Silva, A. 2006. p53 modulates homologous recombination by transcriptional regulation of the RAD51 gene. *EMBO Rep*, 7, 219-224.
- Arnaudeau, C., Rozier, L. N., Cazaux, C., Defais, M., Jenssen, D. & Helleday, T. 2001. RAD51 supports spontaneous non-homologous recombination in mammalian cells, but not the corresponding process induced by topoisomerase inhibitors. *Nucleic Acids Research*, 29, 662-667.
- Audebert, M., Salles, B. & Calsou, P. 2004. Involvement of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 and XRCC1/DNA Ligase III in an Alternative Route for DNA Double-strand Breaks Rejoining. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 55117-55126.
- Bakkenist 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *nature*, 421, 499.
- Banin, S., Moyal, L., Shieh, S. Y., Taya, Y., Anderson, C. W., Chessa, L., Smorodinsky, N. I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y. & Ziv, Y. 1998. Enhanced Phosphorylation of p53 by ATM in Response to DNA Damage. *Science*, 281, 1674-1677.
- Benson, F. E., Stasiak, A. & West, S. C. 1994. Purification and characterization of the human Rad51 protein, an analogue of E. coli RecA. *The Embo Journal*, 13, 5764-577.
- Berdelle, N., Nikolova, T., Quiros, S., Efferth, T. & Kaina, B. 2011. Artesunate Induces Oxidative DNA Damage, Sustained DNA Double-Strand Breaks, and the ATM/ATR Damage Response in Cancer Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10, 2224-2233.
- Bindra, R. S., Schaffer, P. J., Meng, A., Woo, J., Måseide, K., Roth, M. E., Lizardi, P., Hedley, D. W., Bristow, R. G. & Glazer, P. M. 2004. Down-Regulation of Rad51 and Decreased Homologous Recombination in Hypoxic Cancer Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 24, 8504-8518.
- Branzei, D. & Foiani, M. 2008. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 297-308.
- Canman, C. E., Lim, D.-S., Cimprich, K. A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M. B. & Siliciano, J. D. 1998. Activation of the ATM Kinase by Ionizing Radiation and Phosphorylation of p53. *Science*, 281, 1677-1679.
- Chen, B. P. C., Li, M. & Asaithamby, A. 2011. New insights into the roles of ATM and DNA-PKcs in the cellular response to oxidative stress. *Cancer Letters*.
- Chen, F., Nastasi, A., Shen, Z., Brenneman, M., Crissman, H. & Chen, D. J. 1997. Cell cycle-dependent protein expression of mammalian homologs of yeast DNA double-strand break repair genes Rad51 and Rad52. *Mutation Research/DNA Repair*, 384, 205-211.
- Chen, G., Yuan, S.-S. F., Liu, W., Xu, Y., Trujillo, K., Song, B., Cong, F., Goff, S. P., Wu, Y., Arlinghaus, R., Baltimore, D., Gasser, P. J., Park, M. S., Sung, P. & Lee, E. Y. H. P. 1999a. Radiation-induced Assembly of Rad51 and Rad52

- Recombination Complex Requires ATM and c-Abl. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 12748-12752.
- Chen, J.-J., Silver, D., Cantor, S., Livingston, D. M. & Scully, R. 1999b. BRCA1, BRCA2, and Rad51 Operate in a Common DNA Damage Response Pathway. *Cancer Research*, 59, 1752s-1756s.
- Ciccio, A. & Elledge, S. J. 2010. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Molecular cell*, 40, 179-204.
- Clarke, M., Collins, R., Darby, S., Davies, C., Elphinstone, P., Evans, E., Godwin, J., Gray, R., Hicks, C., James, S., Mackinnon, E., McGale, P., Mchugh, T., Peto, R., Taylor, C. & Wang, Y. 2005. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *The Lancet*, 366, 2087-2106.
- Collis, S. J., Barber, L. J., Ward, J. D., Martin, J. S. & Boulton, S. J. 2006. C. elegans FANCD2 responds to replication stress and functions in interstrand cross-link repair. *DNA Repair*, 5, 1398-1406.
- Colton, S. L., Xu, X. S., Wang, Y. A. & Wang, G. 2006. The Involvement of Ataxia-telangiectasia Mutated Protein Activation in Nucleotide Excision Repair-facilitated Cell Survival with Cisplatin Treatment. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 27117-27125.
- Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J. & Elledge, S. J. 2001. ATR and ATRIP: Partners in Checkpoint Signaling. *Science*, 294, 1713-1716.
- D'andrea, A. D. & Grompe, M. 2003. The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer*, 3, 23-34.
- Daboussi, F., Courbet, S., Benhamou, S., Kannouche, P., Zdzienicka, M. Z., Debatisse, M. & Lopez, B. S. 2008. A homologous recombination defect affects replication-fork progression in mammalian cells. *Journal of Cell Science*, 121, 162-166.
- Davies, A. A., Masson, J.-Y., McIlwraith, M. J., Stasiak, A. Z., Stasiak, A., Venkitaraman, A. R. & West, S. C. 2001. Role of BRCA2 in Control of the RAD51 Recombination and DNA Repair Protein. *Molecular cell*, 7, 273-282.
- Digweed, M., Rothe, S., Demuth, I., Scholz, R., Schindler, D., Stumm, M., Grompe, M., Jordan, A. & Sperling, K. 2002. Attenuation of the formation of DNA-repair foci containing RAD51 in Fanconi anaemia. *Carcinogenesis*, 23, 1121-1126.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Weber, K. & Tuschl, T. 2002. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*, 26, 199-213.
- Fang, Z. M., Lee, S. C., Sarris, M., Kearsley, J. H., Murrell, D. D. E., Lavin, M. F., Keating, K. & Clarke, R. A. 2001. Rapid Radiation-Induction of Atm Protein Levels in Situ. *Pathology - Journal of the RCPA*, 33, 30-36
10.1080/00313020125667.
- Finnie, N. J., Gottlieb, T. M., Blunt, T., Jeggo, P. A. & Jackson, S. P. 1995. DNA-dependent protein kinase activity is absent in xrs-6 cells: implications for site-specific recombination and DNA double-strand break repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 320-324.
- Flygare, J., Benson, F. & Hellgren, D. 1996. Expression of the human RAD51 gene during the cell cycle in primary human peripheral blood lymphocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1312, 231-6.
- Flygare, J., Fält, S., Ottervald, J., Castro, J., Dackland, A.-L., Hellgren, D. & Wennborg, A. 2001. Effects of HsRad51 Overexpression on Cell Proliferation, Cell Cycle Progression, and Apoptosis. *Experimental Cell Research*, 268, 61-69.

- Game, J. C., Birrell, G. W., Brown, J. A., Shibata, T., Baccari, C., Chu, A. M., Williamson, M. S. & Brown, J. M. 2003. Use of a genome-wide approach to identify new genes that control resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to ionizing radiation. *Radiation Research*, 160, 14-24.
- Garcia-Higuera, I., Taniguchi, T., Ganesan, S., Meyn, M. S., Timmers, C., Hejna, J., Grompe, M. & D'andrea, A. D. 2001. Interaction of the Fanconi Anemia Proteins and BRCA1 in a Common Pathway. *Molecular Cell*, 7, 249-262.
- Gildemeister, O. S., Sage, J. M. & Knight, K. L. 2009. Cellular Redistribution of Rad51 in Response to DNA Damage: Novel role for Rad51C. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 31945-31952.
- Godthelp, B. C., Artwert, F., Joenje, H. & Zdzienicka, M. Z., 5002-5 2002. Impaired DNA damage-induced nuclear Rad51 foci formation uniquely characterizes Fanconi anemia group D1. *Oncogene*, 21, 5002-5005.
- Guo 2010. ATM Activation by Oxidative Stress. *Science*, 330, 517.
- Haaf, T., Golub, E. I., Reddy, G., Radding, C. M. & Ward, D. C. 1995. Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 2298-2302.
- Hannay, J. a. F., Liu, J., Zhu, Q.-S., Bolshakov, S. V., Li, L., Pisters, P. W. T., Lazar, A. J. F., Yu, D., Pollock, R. E. & Lev, D. 2007. Rad51 overexpression contributes to chemoresistance in human soft tissue sarcoma cells: a role for p53/activator protein 2 transcriptional regulation. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6, 1650-1660.
- Helleday, T. 2003. Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 532, 103-115.
- Helleday, T., Lo, J., Van Gent, D. C. & Engelward, B. P. 2007a. DNA double-strand break repair: From mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair*, 6, 923-935.
- Helleday, T., Lo, J., Van Gent, D. C. & Engelward, B. P. 2007b. DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair (Amst)*, 6, 923-35.
- Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B. & Sharma, R. A. 2008. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 8, 193-204.
- Hoeijmakers, J. H. J. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411, 366-374.
- Iliakis, G. 1997. Cell cycle regulation in irradiated and nonirradiated cells. *Semin Oncol*, 24, 602-15.
- Iliakis, G., Wang, Y., Guan, J. & Wang, H. 2003. DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene*, 22, 5834-47.
- Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G. C., Lukas, J. & Jackson, S. P. 2006. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol*, 8, 37-45.
- Jeggo, P. A. & Lobrich, M. 2005. Artemis links ATM to Double Strand Break Rejoining. *Cell Cycle*, 4, 359-362.
- Jend, C. 2008. *Einfluss der Überexpression von Rad51 auf die chromosomale Instabilität*. Staats- und Universitätsbibliothek Hamburg.
- Joenje, H., Oostra, A. B., Wijker, M., Di Summa, F. M., Van Berkel, C. G. M., Rooimans, M. A., Ebell, W., Van Weel, M., Pronk, J. C., Buchwald, M. & Arwert, F. 1997. Evidence for at Least Eight Fanconi Anemia Genes. *The American Journal of Human Genetics*, 61, 940-944.

- Kastan, M. B. & Lim, D.-S. 2000. The many substrates and functions of ATM. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1, 179-186.
- Kennedy, R. D. & D'andrea, A. D. 2005. The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. *Genes Dev*, 19, 2925-40.
- Klein, H. L. 2008. The consequences of Rad51 overexpression for normal and tumor cells. *DNA Repair*, 7, 686-693.
- Le Scodan, R., Cizeron-Clairac, G. R., Fourme, E., Meseure, D., Vacher, S., Spyrtos, F. D. R., De La Lande, B., Cvitkovic, F. D. R., Lidereau, R. & Bieche, I. 2010. DNA Repair Gene Expression and Risk of Locoregional Relapse in Breast Cancer Patients. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 78, 328-336.
- Levitus, M., Roimans, M. A., Steltenpool, J. R., Cool, N. F. C., Oostra, A. B., Mathew, C. G., Hoatlin, M. E., Waisfisz, Q., Arwert, F., De Winter, J. P. & Joenje, H. 2004. Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for 2 new genetic subtypes. *Blood*, 103, 2498-2503.
- Li, Y., Yu, H., Luo, R.-Z., Zhang, Y., Zhang, M.-F., Wang, X. & Jia, W.-H. 2011. Elevated expression of Rad51 is correlated with decreased survival in resectable esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Surgical Oncology*, 104, 617-622.
- Lieber, M. R. 2008. The Mechanism of Human Nonhomologous DNA End Joining. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 1-5.
- Lim, D. S. & Hasty, P. 1996. A mutation in mouse rad51 results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in p53. *Molecular and Cellular Biology*, 16, 7133-43.
- Maacke, H., Hundertmark, C., Miska, S., Voss, M., Kalthoff, H. & Sturzbecher, H. W. 2002. Autoantibodies in sera of pancreatic cancer patients identify recombination factor Rad51 as a tumour-associated antigen. *J Cancer Res Clin Oncol*, 128, 219-22.
- Maacke, H., Jost, K., Opitz, S., Miska, S., Yuan, Y., Hasselbach, L., Luttges, J., Kalthoff, H. & Sturzbecher, H. W. 2000. DNA repair and recombination factor Rad51 is over-expressed in human pancreatic adenocarcinoma. *Oncogene*, 19, 2791-5.
- Mcgowan, C. H. & Russell, P. 2004. The DNA damage response: sensing and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 16, 629-633.
- Meng, A. X., Jalali, F., Cuddihy, A., Chan, N., Bindra, R. S., Glazer, P. M. & Bristow, R. G. 2005. Hypoxia down-regulates DNA double strand break repair gene expression in prostate cancer cells. *Radiotherapy and Oncology*, 76, 168-176.
- Mladenov, E., Anachkova, B. & Tsaneva, I. 2006. Sub-nuclear localization of Rad51 in response to DNA damage. *Genes to Cells*, 11, 513-524.
- O'driscoll, M., Ruiz-Perez, V. L., Woods, C. G., Jeggo, P. A. & Goodship, J. A. 2003. A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nature Genetics*, 33, 497 - 501.
- Ogawa, T., Shinohara, A., Nabetani, A., Ikeya, T., Yu, X., Egelman, E. H. & Ogawa, H. 1993. RecA-like recombination proteins in eukaryotes: functions and structures of RAD51 genes. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 58, 567-576.
- Pandita, T. K., Lieberman, H. B., Lim, D.-S., Dhar, S., Zheng, W., Taya, Y. & Kastan, M. B. 2000. Ionizing radiation activates the ATM kinase throughout the cell cycle. *Oncogene*, 19, 1386-1391.

- Pâques, F. & Haber, J. E. 1999. Multiple Pathways of Recombination Induced by Double-Strand Breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 349-404.
- Parplys, A. C., Seelbach, J. I., Becker, S., Behr, M., Wrona, A., Jend, C., Mansour, W. Y., Joosse, S. A., Stuerzbecher, H.-W., Pospiech, H., Petersen, C., Dikomey, E. & Borgmann, K. 2015. High levels of RAD51 perturb DNA replication elongation and cause unscheduled origin firing due to impaired CHK1 activation. *Cell Cycle*, 14, 3190-3202.
- Pellegrini, L., Yu, D. S., Lo, T., Anand, S., Lee, M., Blundell, T. L. & Venkitaraman, A. R. 2002. Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature*, 420, 287-293.
- Pfeiffer, P., Goedecke, W., Kuhfittig-Kulle, S. & Obe, G. 2004. Pathways of DNA double-strand break repair and their impact on the prevention and formation of chromosomal aberrations. *Cytogenetic and Genome Research*, 104, 7-13.
- Pichierri, P., Auerbeck, D. & Rosselli, F. 2002. DNA cross-link-dependent RAD50/MRE11/NBS1 subnuclear assembly requires the Fanconi anemia C protein. *Human Molecular Genetics*, 11, 2531-2546.
- Qiao, G. B., Wu, Y. L., Yang, X. N., Zhong, W. Z., Xie, D., Guan, X. Y., Fischer, D., Kolberg, H. C., Kruger, S. & Stuerzbecher, H. W. 2005. High-level expression of Rad51 is an independent prognostic marker of survival in non-small-cell lung cancer patients. *Br J Cancer*, 93, 137-43.
- Raderschall, E., Bazarov, A., Cao, J., Lurz, R., Smith, A., Mann, W., Ropers, H.-H., Sedivy, J. M., Golub, E. I., Fritz, E. & Haaf, T. 2002. Formation of higher-order nuclear Rad51 structures is functionally linked to p21 expression and protection from DNA damage-induced apoptosis. *Journal of Cell Science*, 115, 153-164.
- Raderschall, E., Golub, E. I. & Haaf, T. 1999. Nuclear foci of mammalian recombination proteins are located at single-stranded DNA regions formed after DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 1921-1926.
- Renart, J., Reiser, J. & Stark, G. R. 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 3116-20.
- Richardson, C., Stark, J. M., Ommundsen, M. & Jasin, M. 2004. Rad51 overexpression promotes alternative double-strand break repair pathways and genome instability. *Oncogene*, 23, 546-553.
- San Filippo, J., Sung, P. & Klein, H. 2008. Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination. *Annual Review of Biochemistry*, 77, 229-257.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kaçmaz, K. & Linn, S. 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*, 73, 39-85.
- Scully, R., Chen, J., Plug, A., Xiao, Y., Weaver, D., Feunteun, J., Ashley, T. & Livingston, D. M. 1997. Association of BRCA1 with Rad51 in Mitotic and Meiotic Cells. *Cell*, 88, 265-275.
- Shechter, D., Costanzo, V. & Gautier, J. 2004. Regulation of DNA replication by ATR: signaling in response to DNA intermediates. *DNA Repair*, 3, 901-908.
- Slupianek, A., Schmutte, C., Tomblin, G., Nieborowska-Skorska, M., Hoser, G., Nowicki, M. O., Pierce, A. J., Fishel, R. & Skorski, T. 2001. BCR/ABL Regulates Mammalian RecA Homologs, Resulting in Drug Resistance. *Molecular cell*, 8, 795-806.

- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150, 76-85.
- Soderlund, K., Skoog, L., Fornander, T. & Askmalm, M. S. 2007. The BRCA1/BRCA2/Rad51 complex is a prognostic and predictive factor in early breast cancer. *Radiother Oncol*, 84, 242-51.
- Sonoda, E., Sasaki, M. S., Buerstedde, J.-M., Bezzubova, O., Shinohara, A., Ogawa, H., Takata, M., Yamaguchi-Iwai, Y. & Takeda, S. 1998. Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. *EMBO J*, 17, 598-608.
- Sorensen, C. S., Hansen, L. T., Dziegielewska, J., Syljuasen, R. G., Lundin, C., Bartek, J. & Helleday, T. 2005. The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nature Cell Biology* 7, 195-201.
- Strumberg, D., Pilon, A. A., Smith, M., Hickey, R., Malkas, L. & Pommier, Y. 2000. Conversion of Topoisomerase I Cleavage Complexes on the Leading Strand of Ribosomal DNA into 5'-phosphorylated DNA Double-Strand Breaks by Replication Runoff. *Molecular and Cellular Biology*, 20, 3977-3987.
- Sung, P. & Roberson, D. L. 1995. DNA strand exchange mediated by a RAD51-ssDNA nucleoprotein filament with polarity opposite to that of RecA. *Cell*, 82, 453-461.
- Tanaka, H., Fukuda, N. & Shoyama, Y. 2007. Eastern blotting and immunoaffinity concentration using monoclonal antibody for ginseng saponins in the field of traditional chinese medicines. *J Agric Food Chem*, 55, 3783-7.
- Taniguchi, T., Garcia-Higuera, I., Xu, B., Andreassen, P. R., Gregory, R. C., Kim, S.-T., Lane, W. S., Kastan, M. B. & D'andrea, A. D. 2002. Convergence of the Fanconi Anemia and Ataxia Telangiectasia Signaling Pathways. *Cell*, 109, 459-472.
- Tashiro, S., Walter, J., Shinohara, A., Kamada, N. & Cremer, T. 2000. Rad51 Accumulation at Sites of DNA Damage and in Postreplicative Chromatin. *The Journal of Cell Biology*, 150, 283-292.
- Tennstedt, P., Fresow, R., Simon, R., Marx, A., Terracciano, L., Petersen, C., Sauter, G., Dikomey, E. & Borgmann, K. 2012. RAD51 overexpression is a negative prognostic marker for colorectal adenocarcinoma. *International Journal of Cancer*, 132, 2118-2126.
- Tsuzuki, T., Fujii, Y., Sakumi, K., Tominaga, Y., Nakao, K., Sekiguchi, M., Matsushiro, A., Yoshimura, Y. & Moritat 1996. Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 6236-6240.
- Vispè, S., Cazaux, C., Lesca, C. & Defais, M. 1998. Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation. *Nucleic Acids Research*, 26, 2859-2864.
- Wang, H., Perrault, A. R., Takeda, Y., Qin, W., Wang, H. & Iliakis, G. 2003. Biochemical evidence for Ku-independent backup pathways of NHEJ. *Nucleic Acids Research*, 31, 5377-5388.
- Wang, X., Andreassen, P. R. & D'andrea, A. D. 2004b. Functional Interaction of Monoubiquitinated FANCD2 and BRCA2/FANCD1 in Chromatin. *Molecular and Cellular Biology*, 24, 5850-5862.
- Wang, X. & D'andrea, A. D. 2004. The interplay of Fanconi anemia proteins in the DNA damage response. *DNA Repair*, 3, 1063-1069.

- Welsh, J. W., Ellsworth, R. K., Kumar, R., Fjerstad, K., Martinez, J., Nagel, R. B., Eschbacher, J. & Stea, B. 2009. Rad51 Protein Expression and Survival in Patients with Glioblastoma Multiforme. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 74, 1251-1255.
- Weterings, E. & Van Gent, D. C. 2004. The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synopsis. *DNA Repair*, 3, 1425-1435.
- Willers, H., Kachnic, L. A., Luo, C. M., Li, L., Purschke, M., Borgmann, K., Held, K. D. & Powell, S. N. 2008. Biomarkers and Mechanisms of FANCD2 Function. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2008.
- Wong, A. K. C., Pero, R., Ormonde, P. A., Tavtigian, S. V. & Bartel, P. L. 1997. RAD51 Interacts with the Evolutionarily Conserved BRC Motifs in the Human Breast Cancer Susceptibility Gene *brca2*. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 31941-31944.
- Yajima, H., Lee, K.-J., Zhang, S., Kobayashi, J. & Chen, B. P. C. 2009. DNA Double-Strand Break Formation upon UV-Induced Replication Stress Activates ATM and DNA-PKcs Kinases. *Journal of Molecular Biology*, 385, 800-810.
- Yamamoto, A., Taki, T., Yagi, H., Habu, T., Yoshida, K., Yoshimura, Y., Yamamoto, K., Matsushiro, A., Nishimune, Y. & Morita, T. 1996. Cell cycle-dependent expression of the mouseRad51 gene in proliferating cells. *Molecular and General Genetics MGG*, 251, 1-12.
- Yan, Y., Black, C. & Cowan, K. 2007. Irradiation-induced G2/M checkpoint response requires ERK1/2 activation. *Oncogene*, 26, 4689-4698.
- Yan, Y., Black, C. P., Cao, P. T., Haferbier, J. L., Kolb, R. H., Spieker, R. S., Ristow, A. M. & Cowan, K. H. 2008. Irradiation-Induced DNA Damage Checkpoint Activation Involves Feedback Regulation between Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 and BRCA1. *Cancer Research*, 68, 5113-5121.
- Yáñez, R. & Porter, A. 1999. Gene targeting is enhanced in human cells overexpressing hRAD51. *Gene Therapy*, 6, 1282-1290.
- Yuan, Z.-M., Huang, Y., Ishiko, T., Nakada, S., Utsugisawa, T., Kharbanda, S., Wang, R., Sung, P., Shinohara, A., Weichselbaum, R. & Kufe, D. 1998. Regulation of Rad51 Function by c-Abl in Response to DNA Damage. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 3799-3802.
- Yun, J., Zhong, Q., Kwak, J.-Y. & Lee, W.-H. 2005. Hypersensitivity of Brca1-deficient MEF to the DNA interstrand crosslinking agent mitomycin C is associated with defect in homologous recombination repair and aberrant S-phase arrest. *Oncogene*, 24, 4009-4016.
- Zou, L. & Elledge, S. J. 2003. Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes. *Science*, 300, 1542-1548.

8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei PD Dr. Kerstin Borgmann bedanken, die meine Arbeit initiiert und betreut hat. Ich bedanke mich ganz besonders bei Kerstin für Ihr vorbildliches Engagement, Ihren Optimismus und ihre permanent guten Laune, die immer zu einer guten Atmosphäre im Labor beigetragen hat. Ihr Vorbild hat mich inspiriert, mir Mut gegeben und mich in meiner beruflichen Entwicklung stark geprägt.

Ein ebenso großer Dank ergeht an Prof. Dr. Ekkehard Dikomey, der gemeinsam mit Kerstin meine Arbeit begleitet hat. Ich danke Prof. Dikomey für die große Unterstützung, für sein Vertrauen und für die vielen fruchtbaren Diskussionen. Insbesondere möchte ich mich dafür bedanken, dass ich auf meinen ersten Kongress in Dresden fahren durfte, um meine Daten dort präsentieren zu können.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Ann Christin Parplys und Alexandra Zielinski bedanken, die zu dieser Arbeit tatkräftig beigetragen haben. Ich danke Ann für die konstruktive gemeinsame Arbeit, ihr großes Interesse an meiner Arbeit und der Unterstützung bei den Zellüberlebensexperimenten. Ich danke Alex für ihr Engagement, für ihre motivierende, freundliche und kollegiale Art, die immer zu einer guten und positiven Atmosphäre beigetragen hat. Insbesondere möchte ich mich bei ihr für das Einarbeiten und die große Hilfe beim Western Blot bedanken.

Dr. Ulla Kasten, Dr. Ingo Brammer und PD Dr. Jochen Dahm-Daphi danke ich für viele gute Diskussionen und Anregungen und für ihr großes Interesse an meiner Arbeit.

Bei Prof. Dr. Kai Rothkamm möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Ich bedanke mich bei Britta Riepen und allen weiteren (ehemaligen und jetzigen) Mitarbeitern des Labors für die freundliche, kollegiale Atmosphäre, die schöne Zeit am Institut und die gute Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben, an mich geglaubt und mir überhaupt das Studium ermöglicht haben. Außerdem danke ich meinem Ehemann Sebastian für seine Liebe, seine Ruhe und Geduld, seine große Unterstützung und für unsere beiden wunderbaren Kinder.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Cora Waldstein
Geburtsdatum	13.06.1984
Geburtsort	Göttingen
Familienstand	verheiratet (geb. Bartels), 2 Kinder (5 Monate / 2 Jahre)
Konfession	evangelisch

Schullaufbahn

1990-1994	Grundschule in Ulm
1994-2003	Gymnasium in Weinheim
06/2003	Allgemeine Hochschulreife

Medizinstudium

09/2004-06/2006	Studium an der Medizinischen Universität Szeged, Ungarn
06/2006	Physikum, Note: sehr gut
10/2006-10/2010	Studium an der Universität Hamburg-Eppendorf
11/2010	Staatsexamen, Note: gut
11/2010	Erteilung der ärztlichen Approbation

Praktisches Jahr

Anästhesie:	Israelitisches Krankenhaus Hamburg
Innere Medizin:	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Chirurgie:	Universitätsspital Zürich, Schweiz

Beruflicher Werdegang

05-06/2011	Assistenzärztin im Diagnosezentrum Urania (Wien)
Seit 07/2011	Ärztin in Facharztausbildung für Radioonkologie an der Medizinischen Universität Wien

Publikationen

Cora Bartels, Ekkehard Dikomey und Kerstin Borgmann, Auswirkung der Rad 51 Überexpression auf die Aktivität des Fanconi-Komplexes nach DNA-Schädigung, Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie 18 (2009) 70-73, ISSN 1432-864X

Präsentationen

Cora Bartels, Ekkehard Dikomey und Kerstin Borgmann, Auswirkung der Rad 51 Überexpression auf die Aktivität des Fanconi-Komplexes nach DNA-Schädigung 18. Symposium „Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie“ an der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden (2009)

C. Waldstein, W. Dörr, R. Pötter, G. Goldner, Postoperative radiotherapy for prostate cancer: Morbidity due to local vs. pelvic radiotherapy, Poster Präsentation bei der ESTRO in Wien, 2014

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: