

Aus dem Institut für Toxikologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen über γ -H2AX
Immunhistochemie nach Einwirkung gentoxischer Agenzien auf
Säugerzellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des

Doktorgrades der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von
Ori Staszewski
aus Berlin

Mainz, 2006

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 13.02.2007

Gewidmet meinen Eltern und Großeltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I Inhaltsverzeichnis	i
II Abkürzungsverzeichnis	iv
1 Ziel der Untersuchung	1
2 Einleitung	2
2.1 DNA unterliegt intra- und extrazellulären Einflüssen	2
2.2 Quellen von DNA-Schäden	2
2.2.1 Endogene Ursachen für DNA-Schäden	3
2.2.2 Exogene Ursachen für DNA-Schäden	7
2.2.2.1 DNA-Schäden durch Alkylantien	7
2.2.2.2 DNA-Schäden durch ultraviolette Strahlung (UV)	9
2.2.2.3 DNA-Schäden durch ionisierende Strahlung (IR)	11
2.3 DNA-Reparaturmechanismen	13
2.3.1 Direkte Umkehr von DNA-Schäden	14
2.3.1.1 Direkte Reparatur von UV-induzierten Läsionen	14
2.3.1.2 Direkte Reparatur von alkylierten Basen	16
2.3.2 Reparatur durch Exzision des Schadens	17
2.3.2.1 Fehlpaarungsreparatur (MMR)	17
2.3.2.2 Basen-Exzisionsreparatur (BER)	17
2.3.2.3 Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER)	19
2.3.2.4 Reparatur und Transkription	21
2.3.3 Reparatur von Strangbrüchen	21
2.3.3.1 Homologe Rekombination (HR)	22
2.3.3.2 Non-Homologous-End-Joining (NHEJ)	22
2.3.4 Schadenstoleranz	23
2.4 DNA-Schäden und Chromatinstruktur	24
2.5 Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen	27
3 Materialien	28
3.1 Feinchemikalien und Chemikalien	28
3.2 Antikörper und Enzyme	28
3.3 Zelllinien	29

3.4	Zellkulturmedien und Medienzusätze	29
3.5	Lösungen und Puffer	29
3.6	Mikroskopier- und Zellkulturverbrauchsmaterialien	30
3.7	Geräte	30
3.8	Wissenschaftliche Software	30
4	Methoden	31
4.1	Zellbiologische Methoden	31
4.1.1	Zellkultur	31
4.1.2	Aussaat von Zellen auf Deckgläsern	31
4.1.3	Bestrahlung von Zellen mit ionisierender Strahlung	32
4.1.4	Bestrahlung von Zellen mit ultravioletter Strahlung	32
4.1.5	Behandlung von Zellen mit alkylierenden Substanzen	32
4.1.6	Behandlung von Zellen mit Enzyminhibitoren	33
4.2	Immunfluoreszenz	33
4.2.1	Immunfluoreszenzfärbung für Fluoreszenzmikroskopie	33
4.2.2	Immunfluoreszenzfärbung für konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	34
4.3	Statistische Methoden und Auswertung	35
5	Ergebnisse	36
5.1	γ -H2AX-Focus Bildung nach Einwirken von ionisierender Strahlung auf CHO-Zellen	36
5.2	γ -H2AX-Focus-Bildung nach Einwirken von ultravioletter Strahlung auf CHO-Zellen	37
5.2.1	γ -H2AX-Focus-Bildung nach Einwirken von UVC-Strahlung auf exponentiell wachsende CHO-9-Zellen	37
5.2.2	γ -H2AX-Focus-Bildung nach Einwirken von UVC-Strahlung auf ruhende CHO-9-Zellen	41
5.2.3	γ -H2AX-Focus-Bildung nach Einwirken von UVC-Strahlung auf exponentiell wachsende CHO-43-3B-Zellen	43
5.2.4	γ -H2AX-Focus-Bildung nach Einwirken von UVC-Strahlung auf in serumfreiem Medium gehaltene CHO-43-3B-Zellen	47
5.2.5	γ -H2AX-Focus-Bildung nach Einwirken von UVC-Strahlung auf exponentiell wachsende Aphidicolin vorbehandelte CHO-9-Zellen	49
5.2.6	γ -H2AX-Focus-Bildung nach Einwirken von UVC-Strahlung auf exponentiell wachsende, mit Coffein vorbehandelte CHO-9-Zellen	49
5.2.7	γ -H2AX-Focus-Bildung nach Einwirkung von UVB-Strahlung auf exponentiell wachsende CHO-9-Zellen	51

5.3	γ -H2AX Focus-Bildung nach Einwirken von Methylmethansulfonat (MMS)	53
5.3.1	γ -H2AX-Focus-Bildung nach Einwirken von MMS auf exponentiell wachsende CHO-9-Zellen	53
5.3.2	γ -H2AX-Focus-Bildung nach Einwirken von MMS auf in serumfreiem Medium gehaltene CHO-9-Zellen	55
5.4	γ -H2AX-Focus-Bildung nach Einwirken von 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin (MNNG)	56
5.4.1	γ -H2AX-Focus-Bildung nach Einwirken von MNNG auf exponentiell wachsende CHO-9-Zellen	56
5.4.2	γ -H2AX-Focus-Bildung nach Einwirken von MNNG auf in serumfreiem Medium gehaltene CHO-9-Zellen	59
6	Diskussion	62
6.1	Quantifizierung von durch ionisierende Strahlung verursachten DNA-Doppelstrangbrüchen durch γ -H2AX-Foci	62
6.2	γ -H2AX-Foci nach Bestrahlung von CHO-Zellen mit ultraviolettem Licht	63
6.2.1	UV induziert deutlich mehr γ -H2AX-Foci als durch direkte Fragmentierung der DNA erklärbar ist	63
6.2.2	DNA-Doppelstrangbrüche können an blockierten Replikationsgabeln entstehen	64
6.2.3	γ -H2AX-Foci entstehen nach UV-Bestrahlung replikationsabhängig und sind an blockierten Replikationsgabeln nachweisbar	68
6.2.4	Eingeschränkte Reparatur führt zu höherer Induktion von γ -H2AX-Foci	69
6.2.5	Die späte Induktion von γ -H2AX-Foci nach UV-Bestrahlung ist durch Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen erklärbar	70
6.2.6	Zellzykluskontrolle und Reparaturkompetenz beeinflussen die Induktion von γ -H2AX-Foci	72
6.3	γ -H2AX-Foci nach Einwirken von Methylmethansulfonat auf CHO-Zellen	73
6.4	γ -H2AX-Foci nach Einwirken von 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin auf CHO-Zellen	76
6.5	Abschließende Bewertung	77
7	Zusammenfassung	79
8	Literaturverzeichnis	80
	Danksagungen	92

Abkürzungsverzeichnis

6-4-PP	Pyrimidin(6-4)-Pyrimidon-Photoprodukt
AP	Apurinisch/apyrimidinisch
BER	Basen-Exzisionsreparatur
BSA	Rinderserumalbumin
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CHO-43-3B	CHO-Zelllinie 43-3B mit mutiertem ERCC1-Gen (Defekt in Helicase-Funktion)
CHO-9	CHO-Zelllinie 9
CHO-Zellen	Ovarzellen des Chinesischen Hamsters
CO ₂	Kohlendioxid
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer
Da	Dalton
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octan
dH ₂ O	Deionisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fetales Rinderserum
Gy	Strahlendosis von ionisierenden Strahlen 1 Gy = 1 J/kg
H2AX	Variante X des Histons 2A
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure, 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HR	Homologe Rekombination
IR	Ionisierende Strahlung, $\lambda = 0,05 - 0,5 \text{ nm}$
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kalilauge
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase

MMR	Fehlpaarungsreparatur
MMS	Methylmethansulfonat
MNNG	N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitroso-Guanidin
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Kochsalz
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur
NHEJ	Non-homologous-end-joining
O ⁶ -Meg	O ⁶ -Methylguanin
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI	Propidiumjodid
RNAse A	Pankreatische Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
SCE	Schwesterchromatidaustausch
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SSB	Einzelstrangbruch
T	Thymin
UV	Ultraviolettes Licht
UVA	UV der Klasse A, $\lambda = 320 - 400$ nm
UVB	UV der Klasse B, $\lambda = 295 - 320$ nm
UVC	UV der Klasse C, $\lambda = 100 - 295$ nm
γ -H2AX	An Serin 139 phosphoryliertes H2AX
λ	Wellenlänge

1 Ziel der Untersuchung

Die Quantifizierung von umschriebenen Foci des an Serin 139 phosphorylierten Histons H2AX (γ -H2AX) mittels Immunfluoreszenzfärbung stellt eine neue Methode zur Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Einwirken von ionisierender Strahlung dar. Mit Hilfe dieser Methode konnte die Nachweisgrenze von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Einwirken von ionisierender Strahlung von einigen Gy auf einige mGy gesenkt werden (Jakob *et al.*, 2003; Rothkamm und Lobrich, 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit soll

1. die Immunfluoreszenzfärbung für γ -H2AX in unserem Labor etabliert werden,
2. untersucht werden, ob γ -H2AX-Foci auch durch UV-Strahlung und alkylierende Substanzen induziert werden und
3. evaluiert werden, ob sich diese Methode eignet, um DNA-Doppelstrangbrüche nach Exposition mit diesen Agenzien zu quantifizieren.

Zu diesem Zweck soll anhand von CHO-Zelllinien

1. die aus der Literatur bekannte Dosiswirkungsbeziehung von γ -H2AX-Foci nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung nachvollzogen werden,
2. die Induktion von γ -H2AX in CHO-Zellen nach Anwendung genotoxischer Substanzen in Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis und im zeitlichen Verlauf untersucht werden,
3. die gewonnenen Daten mit bekannten Daten anderer Methoden zur Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen verglichen werden.

2 Einleitung

Die DNA einer Zelle stellt den Bauplan für alle von der Zelle für ihren Stoffwechsel benötigten Proteine dar und ermöglicht die Aufrechterhaltung des zellulären Stoffwechsels. Gleichzeitig dient sie als Träger des Erbgutes zur Weitergabe dieses „Bauplans“ an folgende Generationen. Beide Funktionen erfordern die Sicherung der Stabilität der DNA und der von ihr kodierten Information.

2.1 DNA unterliegt intra- und extrazellulären Einflüssen

Die DNA einer Zelle liegt nicht isoliert vom übrigen Stoffwechselgeschehen vor: Sie ist innerhalb des Zellkerns ständig den direkten oder indirekten Einflüssen von Stoffwechselvorgängen ausgesetzt, die geeignet sind, ihre molekulare Struktur zu verändern (Friedberg *et al.*, 1995). Teilweise sind solche Veränderungen für die Aufrechterhaltung oder Erfüllung der Funktion der DNA notwendig, zum Beispiel bei der kurz nach der Replikation durchgeführten Methylierung einzelner Basen (Holliday und Ho, 2002), der Einfügung von (transienten) Strangbrüchen bei der Reifung von antikörper-produzierenden Zellen (Schrader *et al.*, 2005) oder durch Topoisomerasen bei der Replikation (Degrassi *et al.*, 2004). Die weit überwiegende Zahl solcher Veränderungen entstehen jedoch nicht als notwendige oder vorgesehene Ereignisse, sondern sind als Grundlage von Mutationen potentiell für die Zelle oder den Gesamtorganismus bedrohlich und stellen daher einen DNA-Schaden dar (Lindahl und Nyberg, 1974; Nakamura *et al.*, 1998; Rydberg und Lindahl, 1982).

2.2 Quellen von DNA-Schäden

DNA-Schäden können sowohl exogen, d.h. durch äußere Einflüsse auf die DNA, z.B. Strahlung oder mutagene Chemikalien, als auch endogen, z.B. durch Stoffwechselprodukte entstehen (Friedberg *et al.*, 2006). Dies wird im Weiteren näher betrachtet.

2.2.1 Endogene Ursachen für DNA-Schäden

Beispiele für endogen entstehende DNA-Schäden sind die Basenfehlpaarung im Rahmen der Replikation, spontane Desaminierung von Basen, der Verlust ganzer Basen durch spontane Hydrolyse oder durch Sauerstoff verursachte Schäden.

Die DNA-Replikation erfolgt durch Proteine, die neben der reinen DNA-Synthese auch Funktionen für die Denaturierung der DNA-Doppelhelix in Einzelstränge, sowie die direkt an die DNA-Synthese anschließende Korrektur fehlerhaft eingebauter Basen erfüllen (Friedberg *et al.*, 2006). Zwar erfolgt die Replikation relativ genau und wird durch die direkte Korrektur falsch eingebauter Basen noch genauer, aber bei mehreren Milliarden Basen pro Genom stellt bereits eine geringe Fehlerhäufigkeit bei der Replikation eine Quelle zahlreicher Fehlpaarungen und damit DNA-Schäden dar (Kunkel und Bebenek, 2000).

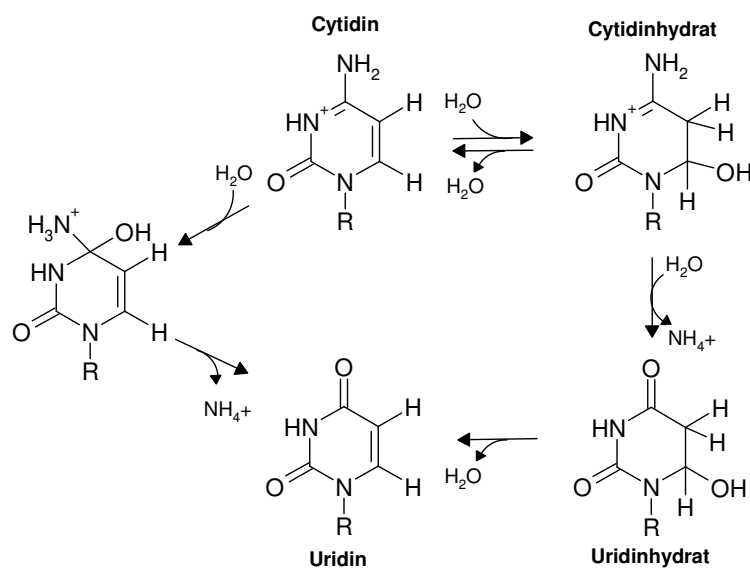


Abb. 2-1: Desaminierung von Cytidin zu Uridin (nach Friedberg *et al.*, 2006)

DNA liegt, wie alle Moleküle einer Zelle, in wässriger Umgebung vor und ist daher ständig der Möglichkeit spontaner Hydrolysen in Form von Desaminierungen oder Basenverlusten ausgesetzt. Dabei verdrängt bei der Desaminierung das angreifende Wassermolekül die Aminogruppe (siehe Abbildung 2-1) und verursacht damit ein geändertes Bindungsverhalten mit komplementären Basen (Poole *et al.*, 2001; Radany *et al.*, 2000, siehe Abbildung 2-2). So paart Cytosin bei Replikation und Transkription mit Guanin, während das Reaktionsprodukt der oben angegebenen Reaktion, Uracil, mit

Adenin paart. Spontane Desaminierungen entstehen bevorzugt an Cytosin-Basen, allerdings können auch Adenin und Guanin spontan desaminieren (siehe Abbildung 2-3), dies geschieht jedoch um einige Größenordnungen seltener als bei Cytosin (Lindahl, 1979).

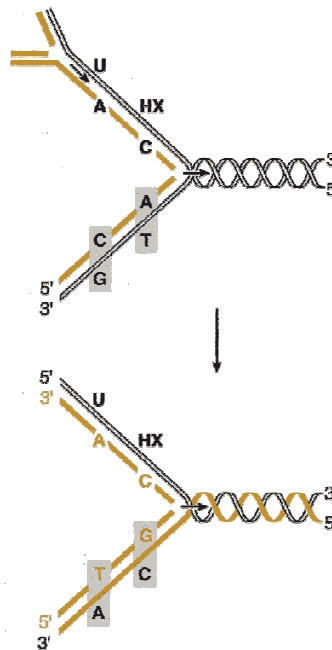


Abb. 2-2: Die Desaminierung von Cytosin (C) zu Uracil (U) und von Adenin (A) zu Hypoxanthin (HX) kann Ursache von Basenaustauschmutationen sein (aus Friedberg *et al.*, 2006)

Findet eine solche Hydrolyse an einer N-glykosylischen Bindung zwischen der Base und der Desoxyribose statt, so wird die entsprechende Base entfernt und es entsteht eine abasische Stelle in der DNA (in der Literatur auch als apurinische/apyrimidinische Stelle, AP-Stelle, bezeichnet). Von einer solchen Hydrolyse sind bevorzugt Purine betroffen, während Pyrimidine seltener durch spontane Hydrolyse aus der DNA entfernt werden (Loeb und Preston, 1986). An AP-Stellen liegt die Desoxyribose in einem Gleichgewicht zwischen ihrer geschlossenen Furanoseform und ihrer offenen Aldehydform. Die 3'-Phosphodiester-Bindung an der Aldehydform der Desoxyribose ist äußerst labil und kann im Rahmen einer β -Elimination hydrolysieren und dadurch DNA-Strangbrüche verursachen (Lindahl und Andersson, 1972, siehe Abbildung 2-4).

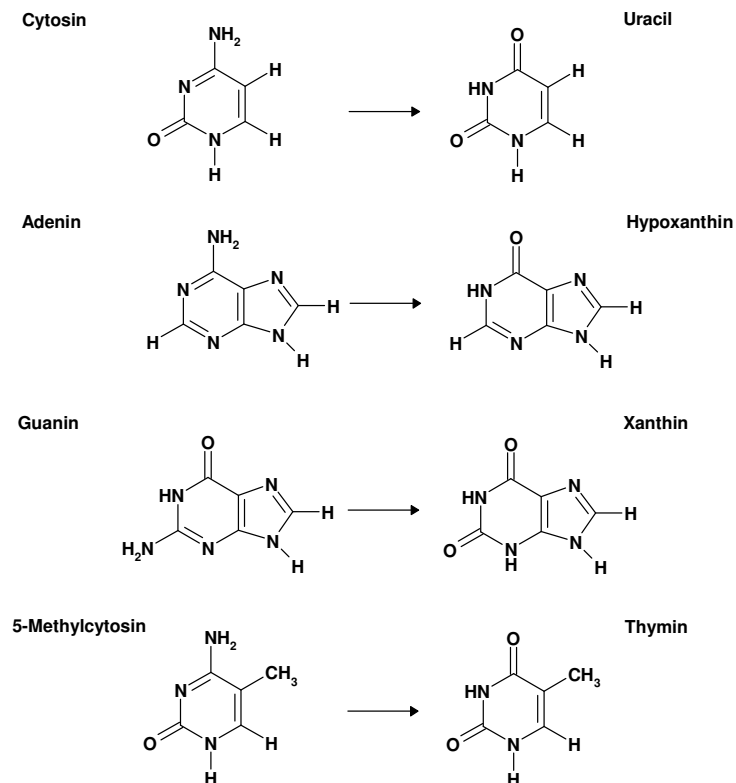


Abb. 2-3: Desaminierungsprodukte von DNA-Basen (nach Friedberg *et al.*, 2006)

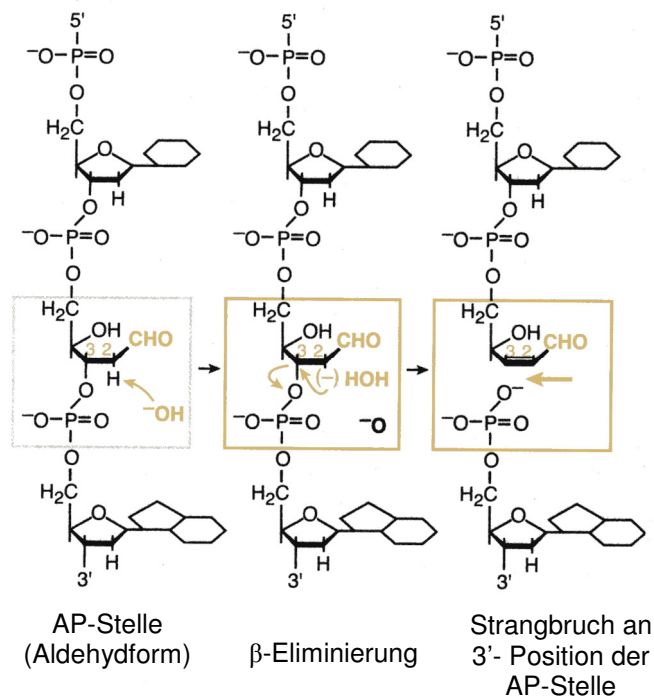


Abb. 2-4: Bildung eines Einzelstrangbruches an einer AP-Stelle (nach Friedberg *et al.*, 2006)

Für Zellen mit aerobem Stoffwechsel stellt Sauerstoff einen essentiellen Grundstoff für die Aufrechterhaltung des Stoffwechsels dar. Gleichzeitig werden als Nebenprodukte des aeroben Stoffwechsels und auch im Rahmen von ungerichteten Abwehrreaktionen so genannte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) - z. B. Superoxidradikale ($\bullet\text{O}_2^-$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikale ($\bullet\text{OH}$) - gebildet. Diese stellen aufgrund ihres starken Redoxpotentials (siehe Abbildung 2-5) eine Hauptquelle von endogenen Schäden an allen intrazellulären Makromolekülen dar (Ames und Gold, 1991; Imlay und Linn, 1988).

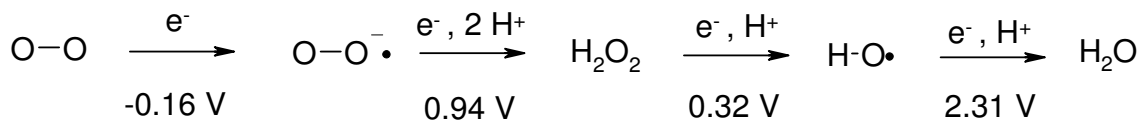


Abb. 2-5: Reaktive Sauerstoffspezies mit Angabe der Redoxpotentialen (nach Friedberg *et al.*, 2006)

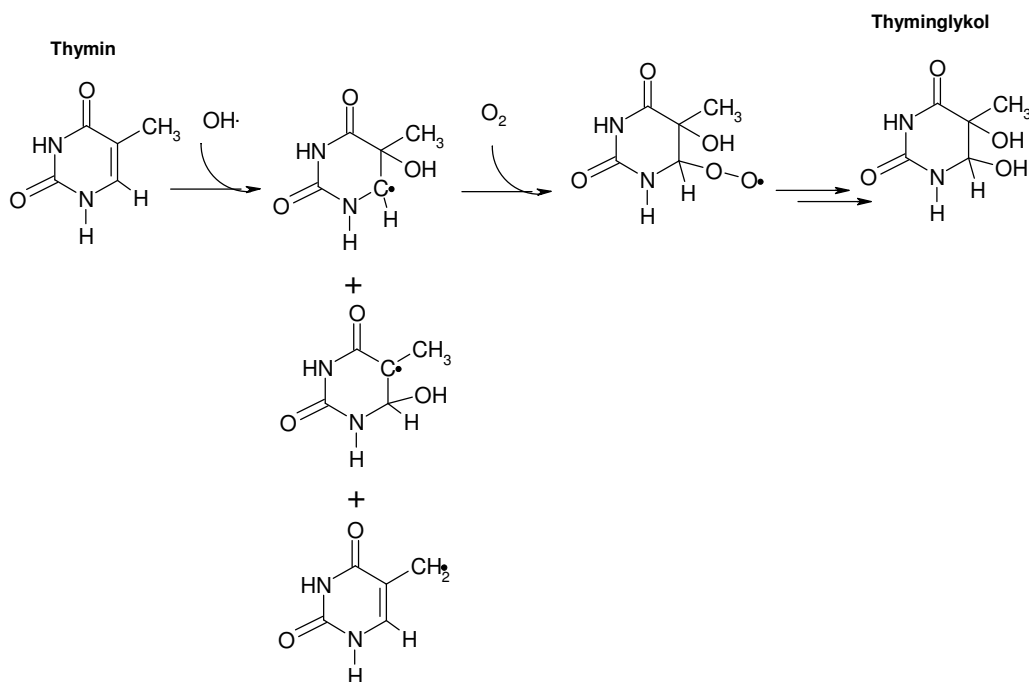


Abb. 2-6: Oxidation von Thymin zu Thyminglykol (nach Friedberg *et al.*, 2006)

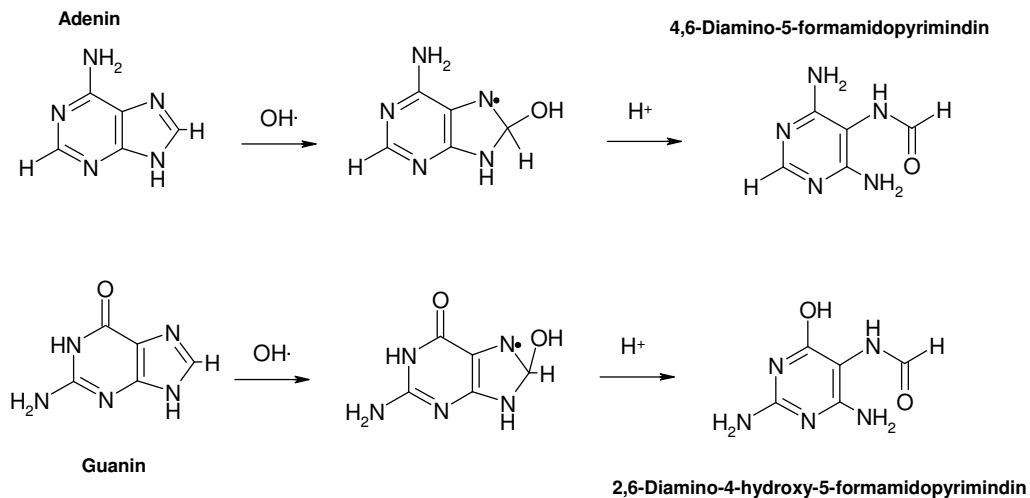


Abb. 2-7: Oxidationsprodukte von Adenin und Guanin (nach Friedberg *et al.*, 2006)

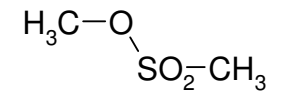
Greifen ROS an DNA an, so entstehen eine Vielzahl von möglichen Produkten (Bjelland und Seeberg, 2003). Typische Produkte von Reaktionen mit Basen sind in Abbildungen 2-6 und 2-7 dargestellt (Friedberg *et al.*, 2006). Bei Reaktionen von ROS mit der Desoxyribose kann es darüber hinaus zu DNA-Einzelstrangbrüchen kommen (Mello Filho *et al.*, 1984).

2.2.2 Exogene Ursachen für DNA-Schäden

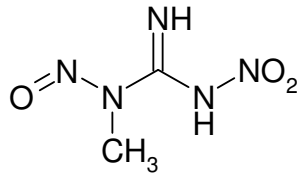
Neben den oben exemplarisch dargestellten endogenen Ursachen für DNA-Schäden kommen auch eine Vielzahl von Umweltfaktoren für die Verursachung von DNA-Schäden in Frage. Beispiele hierfür sind diverse Strahlenarten oder alkylierende Substanzen, was im Folgenden näher erläutert werden soll.

2.2.2.1 DNA-Schäden durch Alkylantien

Es gibt eine Vielzahl von alkylierenden Substanzen, die an verschiedenen Angriffspunkten an der DNA Alkylierungen verursachen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden beispielhaft N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitroso-Guanidin (MNNG) und Methylmethansulfonat (MMS) verwendet (siehe Abbildung 2-8). MNNG und MMS unterscheiden sich in ihrem vorwiegenden Angriffspunkt an der DNA. MNNG wirkt bevorzugt durch O-Alkylierung, während MMS vorwiegend durch N-Alkylierung zu DNA-Schäden führt (Richardson und Richardson, 1990, Friedberg *et al.*, 1995).



Methylmethansulfonat



N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitroso-Guanidin

Abb. 2-8: Strukturformeln von MMS und MNNG (nach Friedberg *et al.*, 2006)

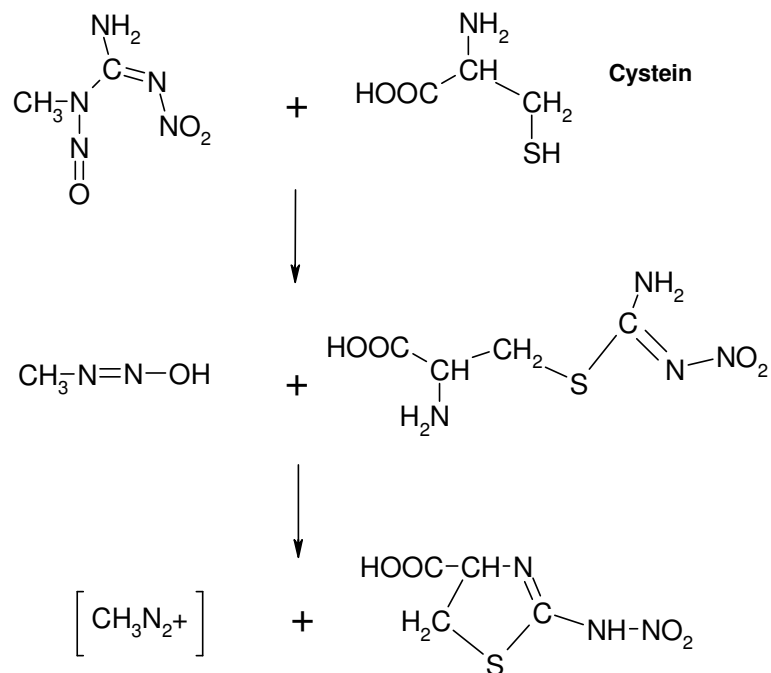


Abb. 2-9: Reaktion von MNNG mit einem Cysteinrest unter Bildung eines Methyldiazonium-Kations (nach Friedberg *et al.*, 2006)

MNNG wirkt nicht direkt alkylierend auf DNA. Wie in Abbildung 2-9 dargestellt, reagiert MNNG zunächst mit einem Thiol, in der Regel einem Cysteinrest, welcher zum Beispiel Bestandteil des ubiquitär in Zellen vorhandenen Glutathions ist. Das dabei entstehende Methyldiazonium-Kation stellt die tatsächlich alkylierende Struktur dar. (Niknahad und O'Brien, 1995). Die biologisch wichtigste durch MNNG verursachte

DNA-Läsion ist O⁶-Methylguanin (O⁶-MeG) (Beranek, 1990; Kaina, 1998). Verbleibt O⁶-MeG unrepariert in der DNA, so paart es bei der Replikation mit Thymin und kann im Rahmen der DNA-Replikation zu Mutationen führen. Derartige Fehlpaarungen unterliegen der Reparatur durch Fehlpaarungsreparatur-Mechanismen (MMR), wie weiter unten ausgeführt wird. Im Fall von O⁶-MeG-T-Paaren kann es zu fehlerhaften MMR-Zyklen kommen, bei denen wiederholt statt dem O⁶-MeG Thymin entfernt und wieder insertiert wird. Auf diesem Wege kann es zum Zelluntergang durch Nekrose oder Apoptose kommen (Kaina *et al.*, 1997). Außerdem kann es dabei zur Beeinträchtigung der chromosomalen Stabilität und zu DNA-Strangbrüchen kommen, welche wiederum zu chromosomalen Aberrationen führen. Diese Effekte sind bei Einwirken von MNNG in der zweiten auf die Exposition folgenden Replikation stärker ausgeprägt als in der ersten Replikationsrunde nach Behandlung (Kaina *et al.*, 1997).

Im Unterschied zu MNNG erzeugt MMS vorwiegend N-Alkylierungen (Beranek, 1990; Kaina, 1998; Natarajan *et al.*, 1984). Daher sind die wichtigsten durch MMS verursachten Läsionen N-alkylierte Basen wie N7-Methylguanin und N3-Methyladenin (Pegg, 1984). Diese Veränderungen blockieren die DNA-Replikation direkt, so dass die zu beobachtenden Effekte bereits bei der ersten auf die Schädigung folgenden Replikation maximal sind. Hierbei kommt es sowohl zur Behinderung der Initiation der Replikation, als auch - bei bereits begonnener Replikation - zur Blockade von Replikationsgabeln an den Läsionsstellen (Kaina, 1998). An solchen blockierten Replikationsgabeln können letztlich DNA-Doppelstrangbrüche entstehen, die möglicherweise zum Untergang der Zelle oder nach fehlerhafter Reparatur zu chromosomalen Veränderungen führen (Higgins *et al.*, 1976; Kuzminov, 2001; Michel *et al.*, 2004).

2.2.2.2 DNA-Schäden durch ultraviolette Strahlung (UV)

UV-Strahlung stellt eine der wichtigsten toxischen Umwelteinflüsse auf lebende Organismen dar. Durch sie können alle zellulären Makromoleküle verändert werden, wodurch es eine große Anzahl deletärer Effekte von UV-Strahlung gibt (Peak *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 1997). Während die langwelligen UV-Strahlen der UVA und UVB Bereiche (320-400 nm bzw. 295-320 nm Wellenlänge) in stärkerem Ausmaß Veränderungen an Proteinen verursachen, fallen deren Wirkungen auf die DNA quantitativ geringer aus als bei UVC (100-295 nm Wellenlänge) (Friedberg *et al.*, 1995, Mitchell *et al.*, 1991, Setlow, 1974). Die kurzwellige UV-Strahlung des UVC Bereichs

liegt dagegen sehr nahe am Absorptionsmaximum der DNA bei 254 nm, so dass diese Strahlung beinahe selektiv DNA-Veränderungen verursacht (Friedberg *et al.*, 2006). Die Hauptveränderungen an der DNA, die durch kurzwellige UV-Strahlung verursacht werden, sind Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) und Pyrimidin(6-4)-Pyrimidon-Photoproducte (6-4-PP) (Friedberg *et al.*, 2006, siehe Abbildung 2-10). Diese Veränderungen beeinträchtigen den zellulären Stoffwechsel durch Behinderung sowohl der DNA-Replikation als auch der Transkription, da sie zu einer Verzerrung der DNA-Doppelhelix und damit zu einem erschwerten Zugriff der für diese Vorgänge notwendigen Proteinkomplexe führen (Moore und Strauss, 1979; Setlow *et al.*, 1963; Swenson und Setlow, 1966). Zusätzlich können diese Veränderungen, wenn sie nicht repariert werden, Quelle von Basenfehlpaarungen und so die Ursache tumoröser Veränderungen sein (Otoshi *et al.*, 2000; Yagi *et al.*, 1991). Werden CPDs nicht entfernt, können sie während der Replikation dazu führen, dass Replikationsgabeln arretiert werden. Dies kann wie oben bereits erwähnt zur Entstehung von DNA-Strangbrüchen und letztlich zum Zelltod führen.

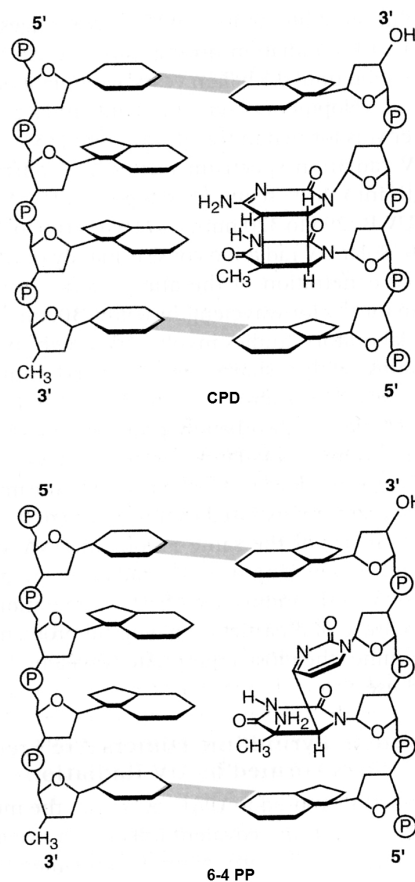
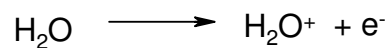


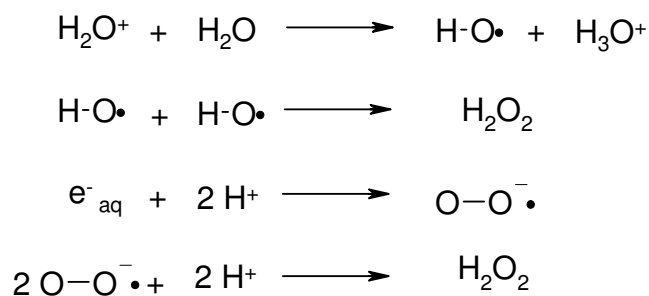
Abb. 2-10: Darstellung von CPD bzw. 6-4-PP (aus Friedberg *et al.*, 2006)

2.2.2.3 DNA-Schäden durch ionisierende Strahlung (IR)

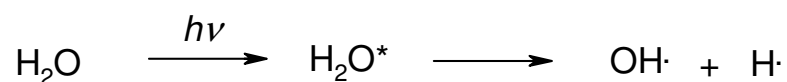
Die durch ionisierende Strahlung verursachten DNA-Schäden können in direkte und indirekte Schäden unterschieden werden (Friedberg *et al.*, 2006). Indirekte Schäden entstehen dadurch, dass die einfallende Strahlung von Wassermolekülen, oder in geringerem Maße durch andere Moleküle, z.B. Proteine, absorbiert wird. Da Wasser das in einer Zelle bei weitem häufigste Molekül darstellt, wird geschätzt, dass beinahe die gesamte absorbierte Energie von ionisierender Strahlung in der Radiolyse des Wassers verbraucht wird (Riley, 1994; Ward, 1988). Dabei laufen zwei Vorgänge ab: Ist die Energie der einfallenden Photonen hoch genug, um direkt ein Elektron aus dem Wassermolekül herauszuschlagen, so entsteht ein hochreaktives und kurzlebiges Wasser-Radikalkation:



Beinahe 80% der absorbierten Energie in einer Zelle entfällt auf diese Reaktion. Im Folgenden kommt es zur Bildung verschiedener reaktiver, aber relativ langlebiger Produkte wie $\text{OH}^\bullet$, $\text{O}_2^{\bullet -}$ oder $\text{H}_2\text{O}_2^\bullet$, die dann mit anderen Molekülen, z.B. mit DNA, reagieren können:



Die restlichen 20% der absorbierten Energie entfallen wiederum auf die Aktivierung von Wassermolekülen und den erst in einem zweiten Schritt erfolgenden Verfall in zwei Radikale:



Bei direkten Schäden wird die Strahlungsenergie direkt auf die DNA übertragen und führt zur Ionisierung von Basen oder Zuckern der DNA (Ward, 1988). Die entstehenden

Schäden können identisch mit denen sein, die auf indirektem Wege entstehen. Nur ein geringer Teil der in einer Zelle deponierten Energie führt zu direkten DNA-Schäden, während der größte Teil, wie oben beschrieben, auf die Radiolyse von Wasser entfällt. Die relative Verteilung der DNA-Schäden auf direkte und indirekte Mechanismen ist allerdings deutlich zur Seite der direkten DNA-Schäden verschoben, da der größte Teil der Radiolyseprodukte des Wassers nicht mit der DNA, sondern mit anderen zellulären Molekülen, etwa Proteinen oder Lipiden, weiterreagiert. Während annähernd 99% der Strahlenenergie auf die Radiolyse des Wassers entfallen, entstehen nur etwa zwei Drittel der DNA-Schäden auf diesem Weg. Das übrige Drittel der Schäden wird durch direkte Wirkung der ionisierenden Strahlung auf die DNA verursacht (Friedberg *et al.*, 2006). Ionisierende Strahlung verursacht Veränderungen an allen Bestandteilen der DNA. Beispiele für durch ionisierende Strahlung verursachte Basenveränderungen sind in Abbildung 2-11 dargestellt.

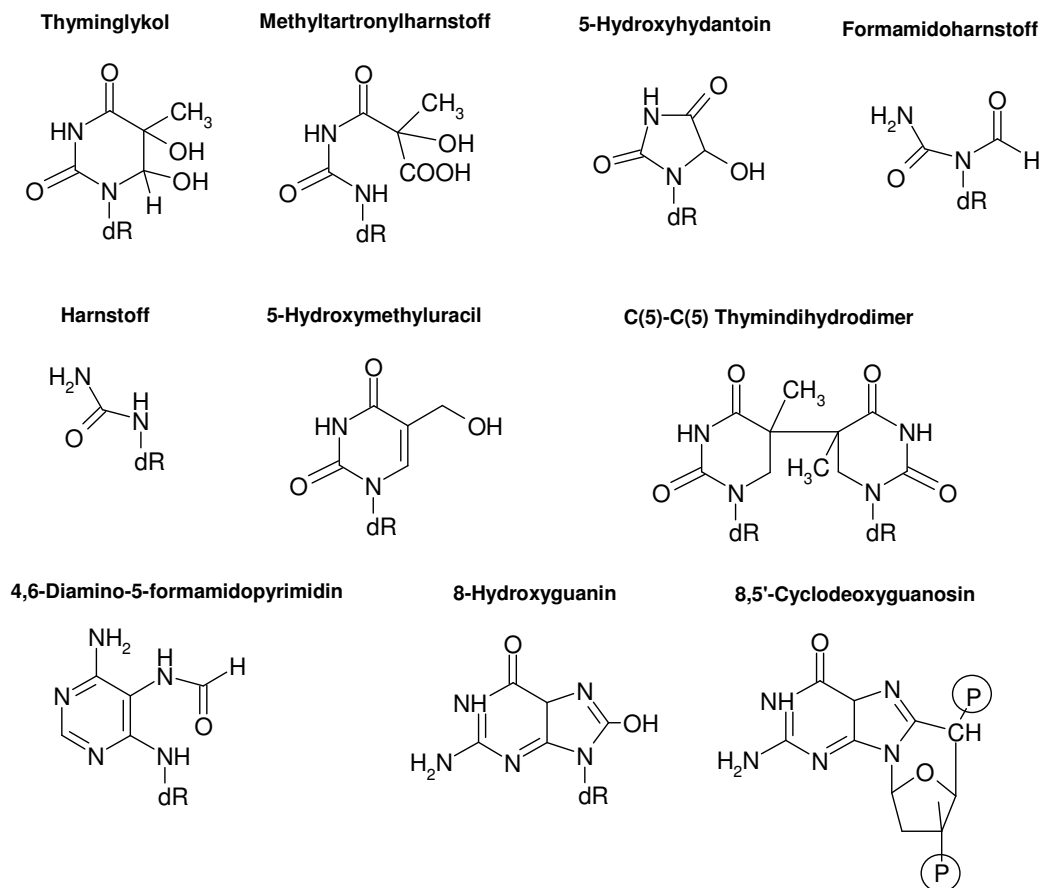


Abb. 2-11: Typische Reaktionsprodukte nach Einwirken von ionisierender Strahlung auf DNA-Basen (nach Friedberg *et al.*, 2006)

Neben der Veränderung einzelner Basen, die letztlich entweder die Transkription und Replikation behindern oder durch Basenfehlpaarungen zu Mutationen führen können, kann durch ionisierende Strahlung die Integrität des gesamten DNA-Moleküls beeinträchtigt werden. Ionisierende Strahlung kann direkt zu Einzel- oder Doppelstrangbrüchen führen (Lobrich *et al.*, 1996). Die durch ionisierende Strahlung verursachten Veränderungen treten in höchst unterschiedlichem Maße auf. So verursacht 1 Gy γ -Strahlung in einer Zelle etwa 250 Thyminveränderungen, ca. 600-1000 DNA-Einzelstrangbrüche und ca. 16-40 DNA-Doppelstrangbrüche (Ward, 1988).

2.3 DNA-Reparaturmechanismen

DNA-Reparaturmechanismen kann man grob in drei Bereiche unterteilen. Zunächst gibt es Mechanismen, die den entstandenen Schaden direkt rückgängig machen, wie dies beispielsweise durch DNA-Photolyasen oder die O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase geschieht. Einer weiteren Gruppe von Mechanismen - wie der Nukleotid-Exzisionsreparatur oder der Basen-Exzisionsreparatur - ist gemein, dass sie die schadhafte Stelle und teilweise ihre direkte Umgebung aus dem betroffenen Strang herausschneiden und ersetzen. Darüber hinaus gibt es eine Gruppe von Reparaturmechanismen, die Strangbrüche repariert. Eine weitere Methode von Zellen, mit DNA-Schäden zu verfahren, ist die so genannte Schadenstoleranz. Dies sind Mechanismen, die DNA-Schäden bei der Transkription und Replikation überspringen helfen und so unter Inkaufnahme von Basenfehlpaarungen einen etwaigen Block an der betreffenden Stelle übergehen (Friedberg *et al.*, 2006, siehe Abbildung 2-12).

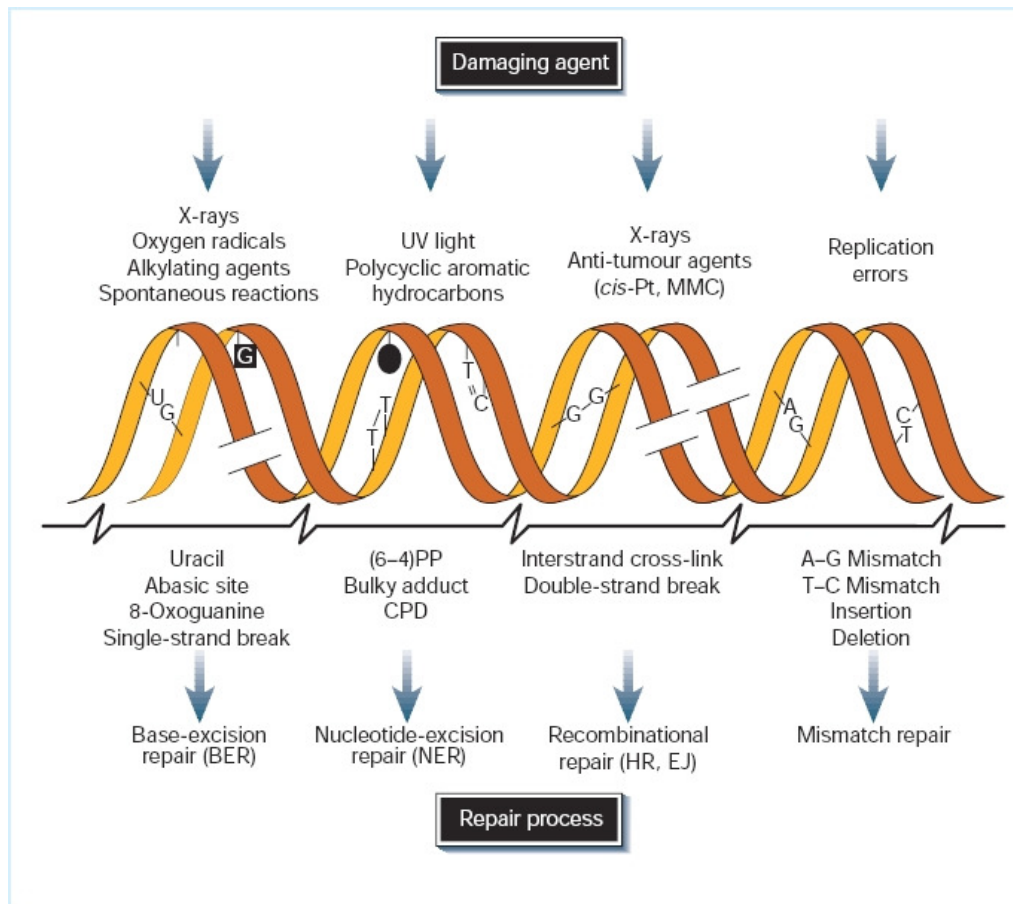


Abb. 2-12: DNA-Schädigung und Reparatur (aus Hoeijmakers, 2001)

2.3.1 Direkte Umkehr von DNA-Schäden

Direkte Umkehr von schädigenden Reaktionen gibt es beispielsweise bei UV-abhängigen Schäden und Alkylierungen, wie im Folgenden beschrieben wird.

2.3.1.1 Direkte Reparatur von UV-induzierten Läsionen

Sowohl 6-4-PPs als auch CPDs können nicht-enzymatisch oder enzymatisch durch Photolyasen entfernt werden. Dabei werden die durch UV-Licht dimerisierten Basen direkt monomerisiert.

Nicht-enzymatisch verläuft die Monomerisierung dadurch, dass bei kontinuierlicher Einstrahlung von UV-Licht Dimere und Monomere in einem wellenlängen-abhängigen Gleichgewicht zueinander vorliegen. Bei größeren Wellenlängen (größer 280 nm) liegt dabei bevorzugt das Dimer vor, während bei Wellenlängen kleiner als 235 nm bevorzugt das Monomer vorliegt (Setlow, 1968).

Enzymatisch werden diese Photoprodukte durch Photolyasen direkt monomerisiert. Photolyasen binden an DNA-Stellen, an denen die entsprechenden Photoprodukte vorliegen und katalysieren bei Einwirken von langwelligem Licht (Wellenlängen von größer als 300 nm) die Monomerisierung der vorliegenden Dimere (Friedberg *et al.*, 2006, siehe Abbildungen 2-13 und 2-14) Während Photolyasen in vielen Organismen nachgewiesen wurden (Todo, 1999), fehlen sie bei Säugetieren (Garinis *et al.*, 2006; Li *et al.*, 1993).

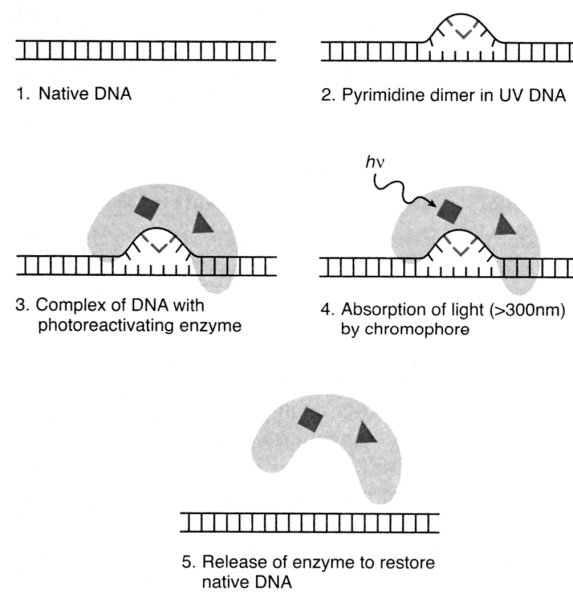


Abb. 2-13: Reparatur von CPD (aus Friedberg *et al.*, 2006)

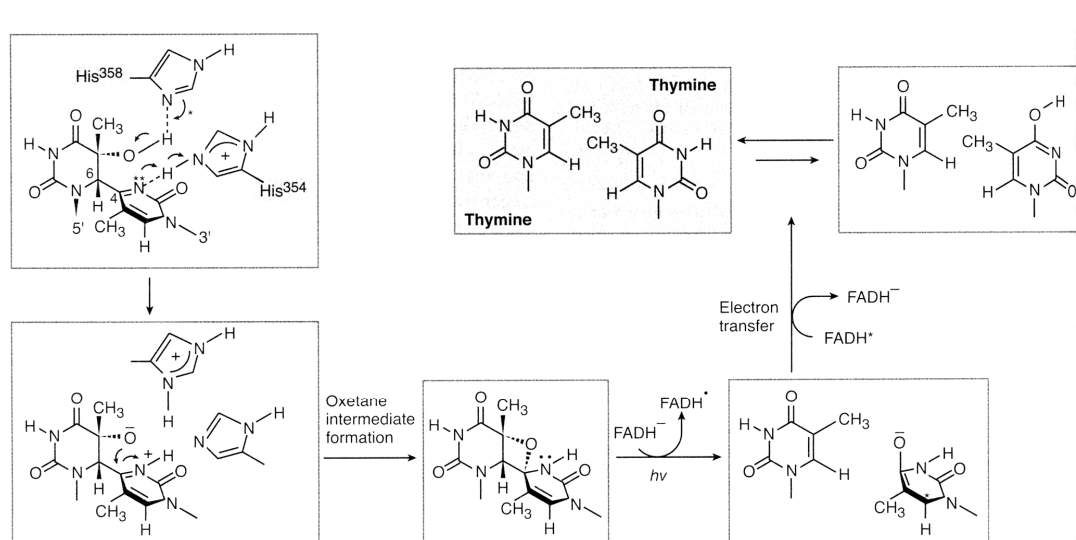


Abb. 2-14: Reparatur von 6-4-PP (aus Friedberg *et al.*, 2006)

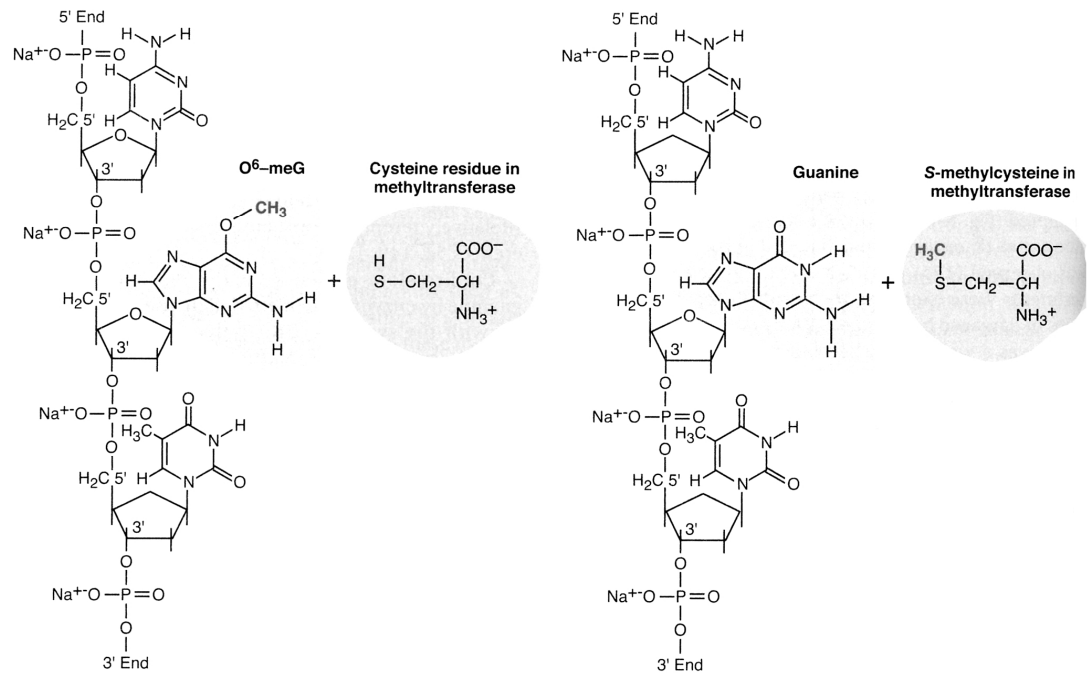


Abb. 2-15: Wirkungsmechanismus von MGMT (aus Friedberg *et al.*, 2006)

2.3.1.2 Direkte Reparatur von alkylierten Basen

O⁶-alkylierte - insbesondere O⁶-methylierte - Basen können durch das Protein O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT, auch als O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (O⁶-AGT) bezeichnet) repariert werden. Dieses Protein stellt dabei ein so genanntes „suicide enzyme“ dar, da es in der entsprechenden Reaktion inaktiviert wird. MGMT bewirkt dabei die Übertragung des Alkylrestes von der entsprechenden Base auf einen eigenen Cysteinrest. Da hierbei eine kovalente Bindung des Alkylrestes an das MGMT-Protein erfolgt und das Protein dadurch inaktiv wird, kann ein MGMT-Protein die Reparatur lediglich einer alkylierten Base durchführen (Demple *et al.*, 1982; Foote *et al.*, 1980; Margison *et al.*, 2003, siehe Abbildung 2-15).

2.3.2 Reparatur durch Exzision des Schadens

Durch Exzision des Schadens wirken Mechanismen wie die Mismatch-Reparatur (MMR), die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) oder die Basen-Exzisionsreparatur (BER). Dies wird im Weiteren erläutert.

2.3.2.1 Fehlpaarungsreparatur (MMR)

Die MMR ist Teil der während der DNA-Replikation ablaufenden Korrekturmechanismen, die für eine äußerst fehlerarme DNA-Replikation verantwortlich sind. Im Rahmen der MMR erkennt der Reparaturkomplex den neu synthetisierten Strang und ersetzt in diesem etwaige im Vergleich zu dem älteren Strang fehlgepaarte Basen. Dabei wird zunächst das fehlpaarende Nukleotid mittels einer Endonukleaseaktivität entfernt und direkt im Anschluss mittels einer DNA-Polymerase durch das korrekte Nukleotid ersetzt. Es werden sowohl fehlerhaft eingebaute Basen als auch eine Reihe von geschädigten Basen, wie beispielsweise einige Photoprodukte und alkylierte Basen, erkannt und entfernt (Friedberg *et al.*, 2006; Wagner und Meselson, 1976, siehe Abbildung 2-16). So kann es beispielsweise bei O⁶-alkylierten Basen zu erfolglosen Exzisionsversuchen kommen, die schließlich nach mehreren Zyklen zu DNA-Strangbrüchen führen können (Kaina, 1998; Rasmussen und Samson, 1996).

2.3.2.2 Basen-Exzisionsreparatur (BER)

Die BER kann einzelne veränderte - beispielsweise alkylierte oder desaminierte - Basen aus der DNA entfernen und durch die korrekte Base ersetzen. Dabei wird im ersten Schritt die Base durch eine DNA-Glycosylase entfernt und eine abasische Stelle (AP) erzeugt wie sie auch spontan entstehen kann (Lindahl, 1976). Nachfolgend wird durch eine DNA-Endonuklease oder eine DNA-Lyase zunächst ein Einzellstrangbruch auf der 5'-Seite der AP-Stelle erzeugt (Boiteux und Guillet, 2004). Der verbleibende Desoxyribosephosphat-Rest der AP-Stelle wird dann durch eine Exonuklease oder die DNA-Desoxyribophosphodiesterase-Aktivität einer Pol β -DNA-Polymerase entfernt (Friedberg *et al.*, 2006; Prasad *et al.*, 1998). Anschließend wird das fehlende Nukleotid durch die Pol β -DNA-Polymerase eingebaut und mittels einer DNA-Ligase die Integrität des entsprechenden Strangs wieder hergestellt (Friedberg *et al.*, 2006, siehe Abbildung 2-17).

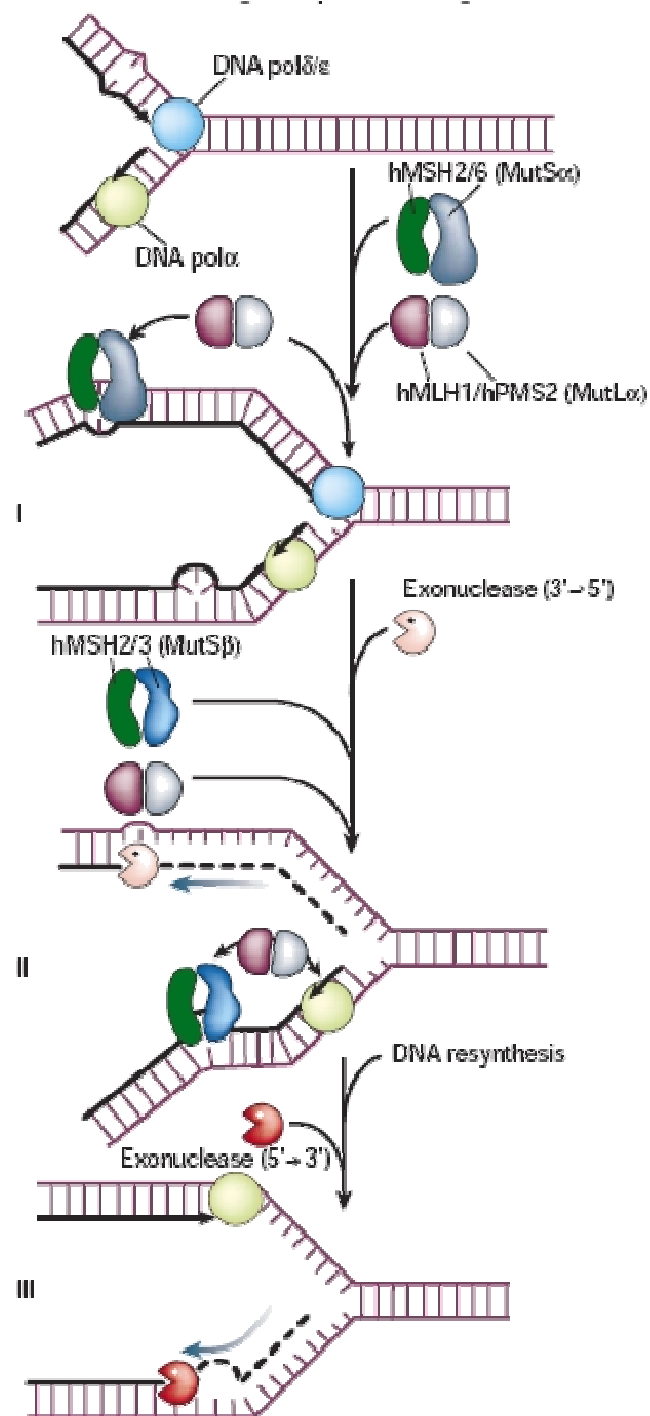


Abb. 2-16: Übersicht über MMR (aus Hoeijmakers, 2001); auf die Erkennung einer fehlpaairenden Base folgt die Entfernung eines die fehlerhafte Base einschließenden DNA-Abschnitts und darauf die Resynthese der fehlenden DNA

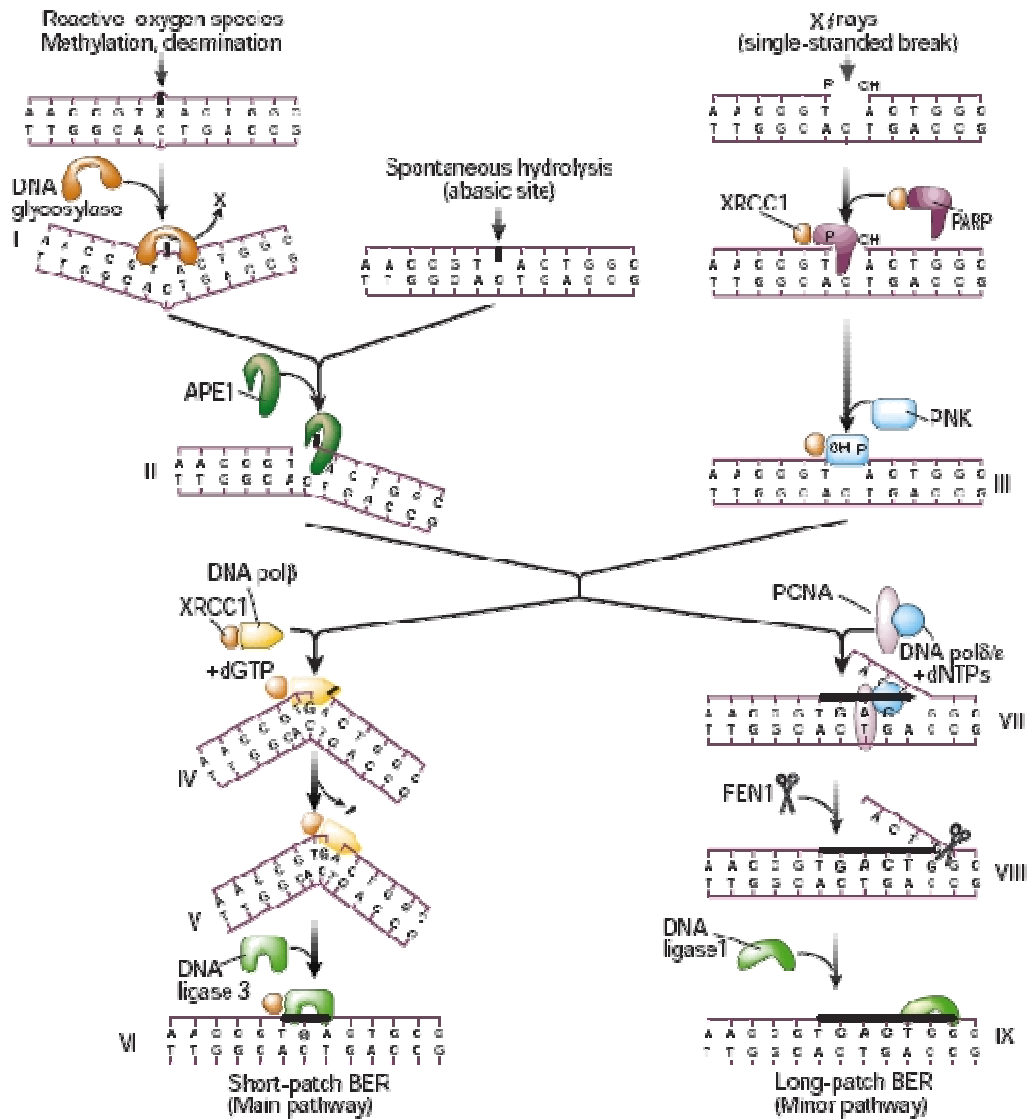


Abb. 2-17: Übersicht über BER (aus Hoeijmakers, 2001)

2.3.2.3 Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER)

Durch NER werden Schäden repariert, die die DNA in stärkerem Maße deformieren. Beispiele hierfür sind CPDs und 4-6-PPs (Grossman und Thiagalingam, 1993). Dabei wird nach erfolgter Erkennung der schadhaften Stelle innerhalb des DNA-Stranges zunächst ein Komplex aus mehreren Reparaturproteinen an diese Stelle gebunden. Anschließend erfolgt durch Endonukleaseaktivitäten einiger an dem Reparaturkomplex beteiligter Proteine eine Inzision sowohl auf der 3'- als auch der 5'-Seite der Schadstelle im Abstand von einigen Basen von der Läsion. In einem anschließenden Schritt wird ein Oligonukleotid von 12 bis 32 Basen Länge, welches die Läsion beinhaltet, herausgeschnitten und die entstandene Lücke mittels einer DNA-Polymerase aufgefüllt.

Der neu synthetisierte Oligonukleotidstrang wird mittels einer DNA-Ligase wieder in den DNA-Strang eingefügt (Friedberg *et al.*, 2006; Grossman und Thiagalingam, 1993; Sancar, 1996, siehe Abbildung 2-18).

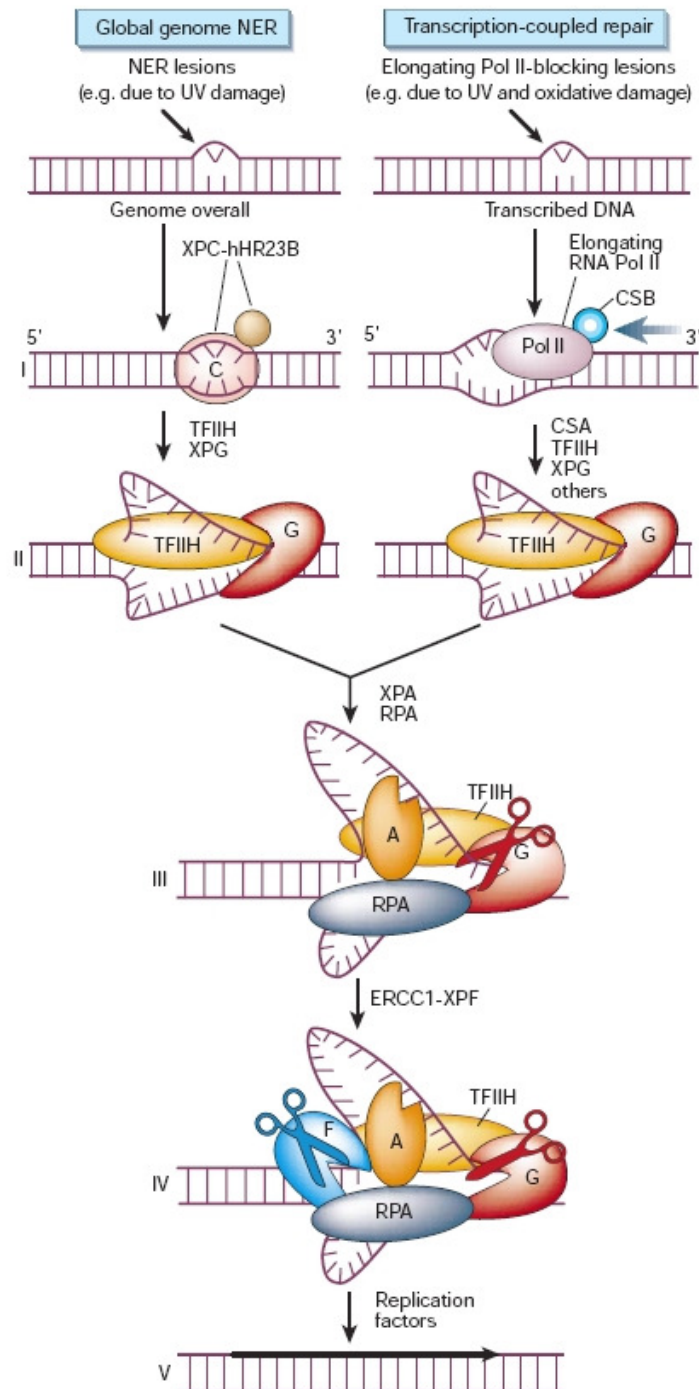


Abb. 2-18: Übersicht über NER (aus Hoeijmakers, 2001)

2.3.2.4 Reparatur und Transkription

BER und NER sind Mechanismen, von denen es in den meisten Organismen mehrere Varianten gibt. Einige davon sind transkriptionsabhängig, sind also nur an Stellen der DNA aktiv, die transkribiert werden. Andere sind transkriptionsunabhängig und im gesamten Genom aktiv. Diese transkriptionsabhängigen und transkriptionsunabhängigen Varianten unterscheiden sich teilweise erheblich in ihrer Effizienz bei der Entfernung von bestimmten DNA-Schäden. Dadurch kann es beispielsweise zu einer Persistenz von CPDs in nicht-transkribierten Bereichen der DNA kommen, während diese durch die transkriptionsabhängige NER effizient entfernt werden (Mellon *et al.*, 1987).

2.3.3 Reparatur von DNA-Strangbrüchen

Für die Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen (SSB für „single-strand break“) ist von Bedeutung, dass der nicht unterbrochene Strang zum einen den unterbrochenen Strang in Position hält und zum anderen gleichzeitig als Matrize für die Synthese etwaig fehlender Basen fungieren kann. Tritt ein SSB auf, so bindet nach erfolgter Erkennung der Läsion ein Reparaturkomplex, bestehend unter anderem aus PARP und XRCC1, an den Läsionsort. Im Folgenden werden weitere Proteine wie PNK und Pol β rekrutiert. Zunächst wird der SSB durch PNK so prozessiert, dass anschließend Pol β etwaige Lücken schließen kann und der SSB durch die DNA-Ligase 3 ligiert werden kann (Friedberg *et al.*, 2006, siehe Abbildung 2-19).

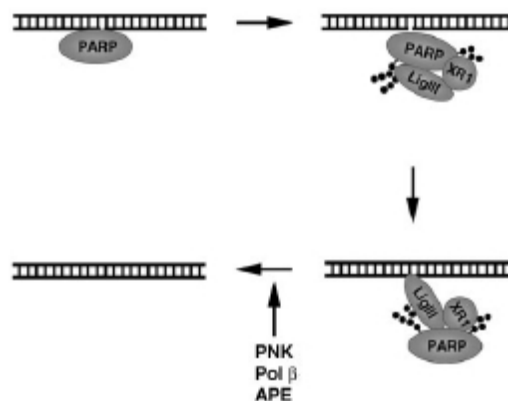


Abb. 2-19: Einzelstrangbruchreparatur (aus Leppard *et al.*, 2003)

Bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen besteht zunächst das Problem, dass beide Stränge durch die Durchtrennung auseinander diffundieren und so möglicherweise nicht korrekt zusammengefügt werden können. Mögliche Mechanismen, die dies verhindern sollen, sind weiter unten beschrieben. Für die Reparatur solcher Schäden existieren unterschiedliche Mechanismen. Zu diesen gehören die homologe Rekombination (HR) und die Verbindung nicht-homologer Bruchenden.

2.3.3.1 Homologe Rekombination (HR)

Wenn die jeweiligen Bruchenden genügend Homologien zu einem anderen DNA-Strang (in der Regel das jeweils entsprechende Schwesterchromatid) aufweisen, so kann ein Doppelstrangbruch durch homologe Rekombination repariert werden. Dabei wird (analog zu Vorgängen während der Meiose) die intakte Schwesterchromatide herangezogen, um die Bruchenden zu binden, etwaige fehlende Anteile zu resynthetisieren und die defekte Chromatide zu komplettieren (Friedberg *et al.*, 2006). Während dieses Vorganges kommt es zu einem Austausch von DNA-Strängen zwischen den beiden beteiligten Chromosomen, so dass dieser Vorgang als so genannter Schwesterchromatid-Austausch („sister chromatid exchange“ [SCE]) nachgewiesen und als Marker für stattgefundene homologe Rekombination genutzt werden kann. Gleichzeitig bedeutet dies in der Regel, dass keine genetische Information verloren geht, wenn tatsächlich die Schwesterchromatide als Matrize verwendet wird (Paques und Haber, 1999).

2.3.3.2 Non-Homologous-End-Joining (NHEJ)

Anders als bei der homologen Rekombination ist für das direkte Verbinden der Bruchstücke durch „Non-Homologous-End-Joining“ (NHEJ) nicht die Verwendung des Schwesterchromosoms notwendig, da hierbei die Enden direkt miteinander verbunden werden (Paques und Haber, 1999). Dies hat den Vorteil, dass eine Bindung von großen homologen Bereichen an ein anderes Chromosom nicht erforderlich ist. Gleichzeitig bedeutet dies aber, dass dieser Reparaturmechanismus gerade in einem Genom mit mehreren eng beieinander liegenden DNA-Doppelstrangbrüchen stärker zu Fehlverbindungen und damit zu chromosomalen Umlagerungen neigt, als dies bei der HR der Fall ist. Eine Übersicht über HR und NHEJ ist in Abbildung 2-20 zu sehen.

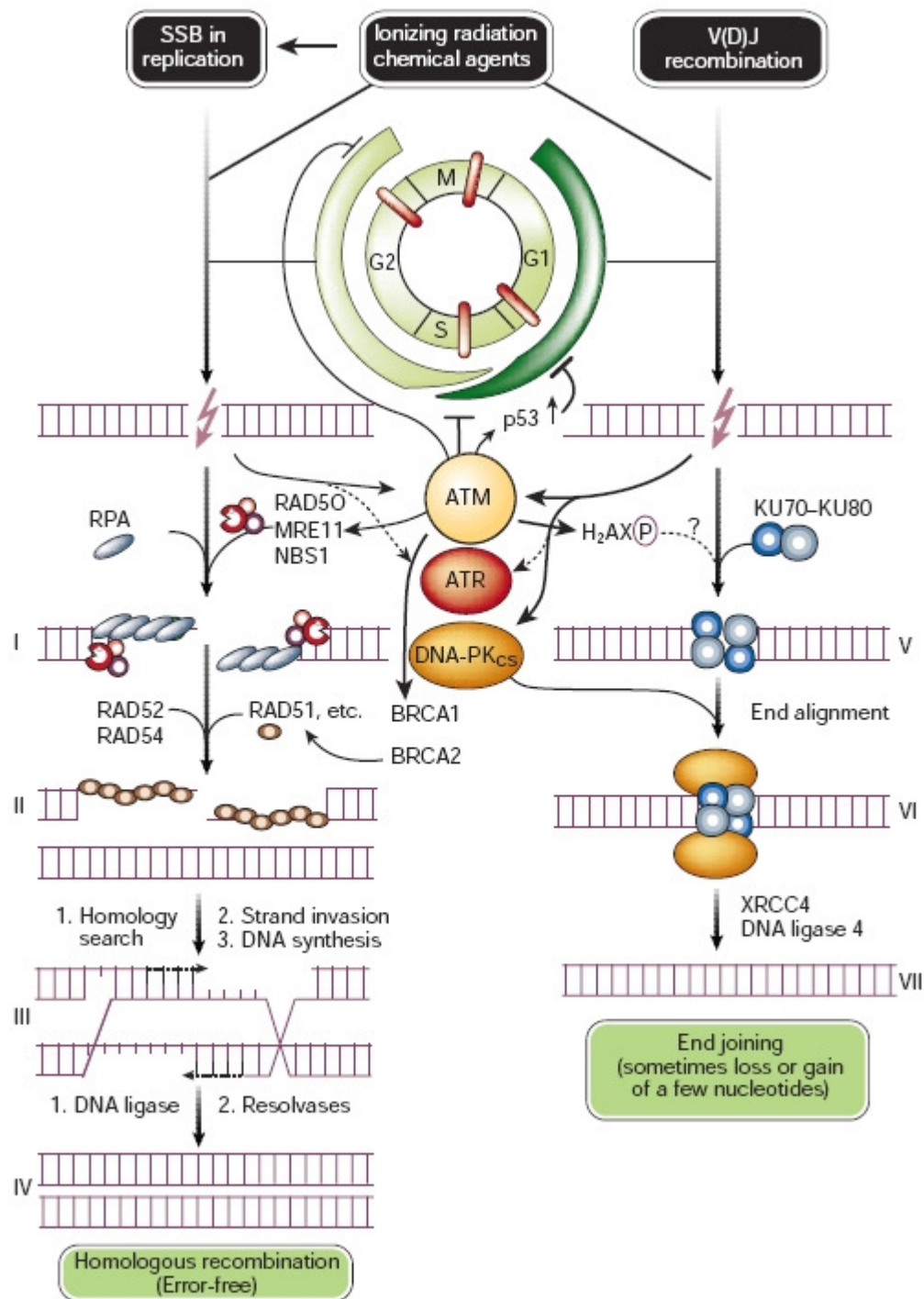


Abb. 2-20: Übersicht über HR (links) und NHEJ (rechts) (aus Hoeijmakers, 2001)

2.3.4 Schadenstoleranz

Wird ein DNA-Schaden, der die DNA-Replikation beeinträchtigt, nicht behoben, so kann die betroffene Zelle entweder durch Apoptose aus dem Organismus entfernt werden, durch Seneszenz die Fähigkeit zur weiteren Proliferation verlieren, oder den Schaden tolerieren und trotz dieses Schadens weiter proliferieren. Diese verschiedenen

Wege werden durch das Zusammenwirken verschiedener Checkpointproteine reguliert. Dabei hängt die Entscheidung für einen dieser Wege unter anderem von der Art des Schadens, der Art der Zelle, der Anzahl an Schäden im gesamten zellulären Genom und dem Zeitpunkt im Zellzyklus ab (Friedberg *et al.*, 2006; Hussain und Harris, 2006).

Neben der oben beschriebenen homologen Rekombination, die außer der Reparatur von DNA-Strangbrüchen auch für die Umgehung von unreparierten DNA-Schäden bedeutsam ist, ist die Transläsionssynthese („trans lesion synthesis“) ein weiterer Mechanismus der Schadenstoleranz (Friedberg *et al.*, 2006). Dabei fungieren besonders unselektive DNA-Polymerasen als „Rettungsproteine“, die es ermöglichen, an Läsionen vorbei zu synthetisieren, die die normale DNA-Replikation blockieren. Diese Polymerasen der Pol-Y Familie sind in der Lage, die DNA-Replikation über eine Läsion hinweg fortzuführen. Dies geschieht, indem sie durch ihre unselektive Bindung an die DNA auch stark deformierende Läsionen des Matrizenstranges binden und im Tochterstrang Basen einbauen können, die nicht unbedingt den komplementären Basen der geschädigten Basen des Matrizenstranges entsprechen. Gleichzeitig binden sie DNA nur schlecht und können daher nur einige Basen synthetisieren, bevor sie wieder von der DNA abfallen. Dies sichert, dass diese DNA-Polymerasen nicht mit der normalen DNA-Replikation interferieren und nur dort in größerem Maße aktiv werden, wo die normale, sehr viel fehlerärmere Replikation aufgehalten wird (Wang, 2001).

2.4 DNA-Schäden und Chromatinstruktur

Die Schädigung und Reparatur von DNA findet, wie der gesamte DNA-Stoffwechsel, im Kontext des Chromatins statt. Das Chromatin besteht neben der DNA auch aus einer großen Anzahl von Proteinen und stellt letztlich in seiner Gesamtheit die strukturelle Basis des Zellkerns dar. Die Chromatinstruktur wird durch die Nukleosomen bestimmt, die als kleinste Untereinheit der Chromatinstruktur betrachtet werden können (Takahashi und Ohnishi, 2005). Ein Nukleosom besteht aus einem etwa 100 kDa großen Proteinkomplex aus jeweils zwei Kopien von vier verschiedenen Histonproteinen, um die die DNA in zwei superhelikalen Schleifen von insgesamt 146 bp Länge gewickelt ist. Jedes Nukleosom wird durch einen kurzen Abschnitt von so genannter Verbindungs-DNA („linker DNA“, die mit einem Verbindungshiston [„linker-histone“] komplexiert ist), mit dem nächsten Nukleosom verknüpft (Hansen, 2002; Luger, 2003). Diese niedrige Stufe der DNA-Packung im Kern wurde von Foster und Downs, 2005 als

Perlenkette beschrieben. Von dieser Packungsstufe ausgehend wird die DNA dann noch dichter gepackt. Die Packung von DNA in Form von Nukleosomen erlaubt einerseits eine Verdichtung dieses anionischen Polyelektrolyten, andererseits behindert sie notwendige Stoffwechselvorgänge der DNA, wie die Replikation, Transkription und die DNA-Reparatur. Neben der reinen „Verpackungsfunktion“ spielen Histone daher auch eine Rolle bei der Modulation dieser Vorgänge. Die vier Histone, die in einem Nukleosom vorliegen sind die Histone H2A, H2B, H3 und H4, während das Verbindungshiston der Histonfamilie H1 angehört (Redon *et al.*, 2002, siehe Abbildung 2-21).

Um die Funktion von Replikations-, Transkriptions- und Reparaturproteinen zu erleichtern, gibt es mehrere Mechanismen, mit deren Hilfe lokal die Chromatinstruktur verändert werden kann. Dazu gehören kovalente Veränderungen von Histonen, z.B. Acetylierung, Deacetylierung, Phosphorylierung, ATP-abhängige Strukturveränderungen und der Austausch von Histonvarianten derselben Histonfamilie (Mersfelder und Parthun, 2006; West und Bonner, 1980).

Ein Beispiel für kovalente Veränderungen stellt die Phosphorylierung des Histons H2AX an Serin 139 in der Umgebung von DNA-Doppelstrangbrüchen dar. Die an Serin 139 phosphorylierte Form von H2AX wird in der Literatur als γ -H2AX, in einigen Veröffentlichungen auch als H2AXS139ph oder phopho-H2AX, bezeichnet (Foster und Downs, 2005; Pilch *et al.*, 2003; Rogakou *et al.*, 2000; Ward und Chen, 2001). Im Folgenden wird die üblichere Bezeichnung γ -H2AX verwendet.

H2AX macht etwa 10% der H2A Population innerhalb des Chromatins aus und scheint innerhalb des Chromatins gleichmäßig verbreitet zu sein (Mannironi *et al.*, 1989). Entsteht in einem DNA-Strang ein Doppelstrangbruch, so werden innerhalb einiger Minuten mehrere Tausend H2AX-Proteine zu γ -H2AX phosphoryliert (Pilch *et al.*, 2003; Rogakou *et al.*, 1998; Rothkamm und Lobrich, 2003). Dabei scheint die Phosphorylierung in der unmittelbaren Umgebung des Strangbruches initiiert zu werden und sich dann radial auszubreiten, so dass schließlich H2AX-Moleküle bis zu einigen Megabasen Entfernung von dem Strangbruch phosphoryliert werden (Rogakou *et al.*, 1999). γ -H2AX bildet zusammen mit Reparaturproteinen und Proteinen, die den Zellzyklus als Checkpointproteine regulieren, als nukleäre Foci nachweisbare Komplexe (siehe Abbildung 2-22).

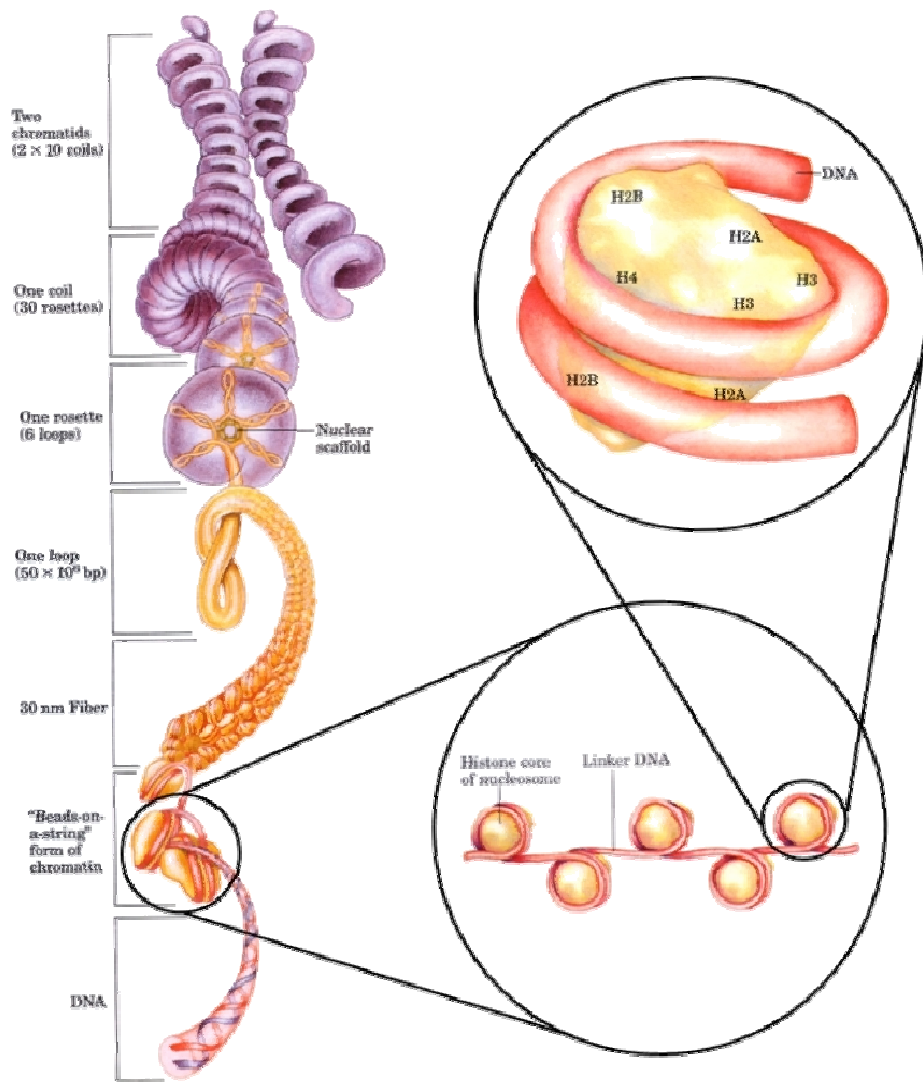


Abb. 2-21: Chromatinstruktur (nach Lehninger *et al.*, 1993)

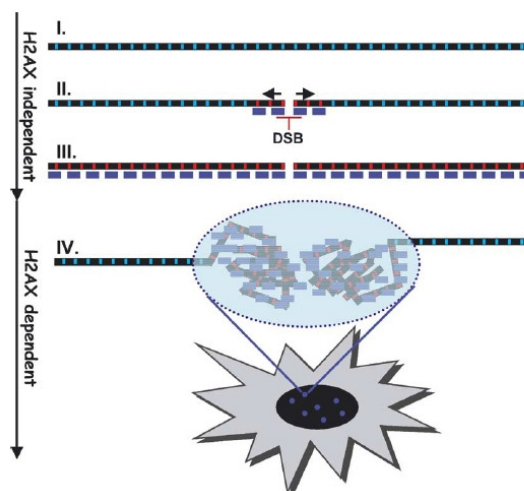


Abb. 2-22: Phosphorylierung von H2AX mehrere Megabasen um einen Doppelstrangbruch herum führt zur Bildung sichtbarer Foci (aus Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004)).

Zu den beteiligten Proteinen gehören 53BP1, der Mre11/Rad50/Nbs1-Komplex, Mdc1, Rad 51 und BRCA1 (Furuta *et al.*, 2003; Pilch *et al.*, 2003). Dabei scheint γ -H2AX einerseits die Funktion eines Ankers zu haben, der für die Rekrutierung und korrekte sterische Anordnung dieser Reparaturkomplexe in der Umgebung des DNA-Schadens notwendig ist, andererseits vermittelt γ -H2AX über die oben genannten Checkpointproteine auch das Signal, dass eine potentiell letale Läsion vorhanden ist. Als weitere Funktion wird die Fixierung der beiden Bruchenden und die Lenkung der Reparatur in Richtung der fehlerfreieren homologen Rekombination beschrieben (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004).

2.5 Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen

DNA-Doppelstrangbrüche können durch eine Reihe von Methoden quantifiziert werden. Zu diesen gehören der neutrale Comet Essay (Fairbairn *et al.*, 1995), die Pulsfeldgelelektrophorese (Whitaker *et al.*, 1991) oder die TUNEL Methode (Hewitson *et al.*, 2006). All diesen Methoden ist gemeinsam, dass sie nicht sehr sensitiv im Bereich von wenigen Doppelstrangbrüchen pro Zelle sind. So liegt die Grenze, ab der Doppelstrangbrüche sicher vom Hintergrund unterschieden werden können, beim neutralen Comet Essay, bei einer Strahlendosis von etwa 4 Gy (Kaina, unpublizierte Daten, Lobrich und Kiefer, 2006). Bei dieser Strahlendosis werden pro Zelle bereits etwa 160 DNA-Doppelstrangbrüche verursacht (Friedberg *et al.*, 2006). Durch die Arbeiten von Rothkamm und Lobrich, 2003 und anderen konnte gezeigt werden, dass eine Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen durch Darstellung von γ -H2AX Foci mittels Immunfluoreszenz möglich ist. Dabei stimmen die darstellbaren Foci nach Bestrahlung mit ionisierender Photonenstrahlung und nach Bestrahlung mit schweren Ionen sowohl mit der erwarteten Anzahl als auch mit dem erwarteten Ort der DNA-Doppelstrangbrüche überein (Jakob *et al.*, 2003; Lobrich und Kiefer, 2006; Rothkamm und Lobrich, 2003). Diese Methode zur Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen ist sensitiv genug, um bereits im mGy Bereich DNA-Doppelstrangbrüche zu detektieren. In diesem Bereich liegt die Zahl der zu erwartenden DNA-Doppelstrangbrüche bei etwa 0,05 pro bestrahltem Zellkern (Lobrich und Kiefer, 2006; Rothkamm und Lobrich, 2003; Ward, 1988). Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode verwendet, um DNA-Schäden nach Einwirkung gentoxischer Agenzien zu beurteilen.

3 Materialien

3.1 Feinchemikalien und Chemikalien

1,4-diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO)	Sigma-Aldrich, München
1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin (MNNG)	Sigma-Aldrich, München
4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure, 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
Aphidicolin	Sigma-Aldrich, München
Coffein	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Neu Ulm
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Hoechst 33258 Farbstoff	Invitrogen, Karlsruhe
Kalilauge (KOH)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth, Karlsruhe
Kalziumchlorid (CaCl_2)	Roth, Karlsruhe
Kochsalz (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Roth, Karlsruhe
Methylmethansulfonat (MMS)	Sigma-Aldrich, München
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
Propidiumjodid (PI)	Serva, Heidelberg
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Trypsin/ Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Konzentrat	Biochrom, Berlin
Vectashield H-1000 Eindeckmedium	Vectorlabs, vertrieben durch Axxora Deutschland, Grünberg

3.2 Antikörper und Enzyme

Anti-Histon 2A.X Antikörper (Upstate Polyclonal Rabbit anti-human H2A.X)	Upstate, vertrieben durch Biomol, Hamburg
Fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper (Alexa Fluor 488 Goat anti-Rabbit F(AB) ₂ -Fragment)	Invitrogen, Karlsruhe
Pankreatische Ribonuklease (RNase A), EC-Nummer: 2326466	Sigma-Aldrich, München

3.3 Zelllinien

CHO-43-3B	Im Institut für Toxikologie, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, vorhandene Zelllinie
CHO-9	Im Institut für Toxikologie, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, vorhandene Zelllinie

3.4 Zellkulturmedien und Medienzusätze

Dulbeccos/F12 Medium	Cambrex, Verviers
Fetales Rinderserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Glutamin	GibcoLifeTechnologies, Karlsruhe
Natriumpyruvat	GibcoLifeTechnologies, Karlsruhe

3.5 Lösungen und Puffer

Antikörperpuffer für Immunfluoreszenz	1 μ l Antikörperlösung in 200 μ l Blockierungspuffer
Blockierungspuffer	1 g BSA in 100 ml PBS
Eindeckmedium modifiziert nach Ono <i>et al.</i> , 2001	1 ml Glycerin 1 ml PBS 2.5 % DABCO mit HCL auf pH 8.6 eingestellt 1 μ M PI 100 μ g/ml RNase A
Einfriermedium	Dulbeccos/F12 Medium 10 % FCS 1 % Glutamin 1 % Natriumpyruvat 10 % DMSO
Fixierungspuffer	4 g Paraformaldehyd in 100 ml PBS
HEPES Puffer, modifiziert nach Jakob <i>et al.</i> , 2000	10 mM KCl 10 mM HEPES 1.5 mM MgCl ₂ 0.1 % Triton X-100 0.5 mM DTT mit KOH auf pH 7.9 eingestellt
Kulturmedium	Dulbeccos/F12 Medium 10 % FCS 1 % Glutamin 1 % Natriumpyruvat
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄

	0,7 mM CaCl ₂
	0,6 mM MgCl ₂
	pH 7,4
Serumfreies Kulturmedium	Dulbeccos/F12 Medium
	1 % Glutamin
	1 % Natriumpyruvat
Trypsin/EDTA-Medium	Dulbeccos/F12 Medium
	0.25 % Trypsin
	0,025 % EDTA

3.6 Mikroskopier- und Zellkulturverbrauchsmaterialien

Deckgläser (10x10 mm)	Roth, Karlsruhe
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Polypropylenröhrchen (50 ml, bzw. 15 ml)	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflaschen Easy Flask 25 V/C	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturflaschen TC Flask 80CM2 VE	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturschalen (Durchmesser 5 cm, bzw. 2,5 cm)	Greiner, Frickenhausen

3.7 Geräte

⁶⁰ Co- γ -Strahlungsquelle	Atomic Energy of Canada Ltd.
Brutschrank (B5060 EK/CO ₂)	Heraeus, München
Brutschrank NUAIRE (NU-4500E)	Zapf, Sarstedt
Feinwaage	Satorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop BX 50	Olympus, Hamburg
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	Leica, Bensheim
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Sterilbank CLASSII A/B3, NUAIR	Zapf, Sarstedt
Tischzentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
UVB-Lampe	Heraeus, München
UVC-Lampe	Heraeus, München
Zentrifuge Megafuge 1.0, Rotor 3360	Heraeus, München
Zentrifuge Sorvall RC513, Rotor GSA	Heraeus, München

3.8 Wissenschaftliche Software

Microsoft Office Excel 2003	Microsoft, Unterschleißheim
Data Master 2003	Dr. Alex Pronin, General Physics Institute, Russian Academy of Sciences, Moskau
MDL Isis/Draw 2.5	Elsevier MDL, Köln

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Zellkultur

CHO-Zellen wurden in Dulbeccos/F12 Medium mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS, 1 % Glutamin und 1 % Natriumpyruvat kultiviert. Die Kultivation erfolgte in Plastikkulturflaschen bzw. Plastikkulturschalen bei 37 °C in CO₂-Inkubatoren unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 7 % CO₂.

CHO-9 und CHO-43-3B-Zellen wurden ein- bis zweimal wöchentlich passagiert. Für alle Experimente wurden Zellen mit 5 bis 10 Passagen verwendet. Für die Passage wurde zunächst das Kulturmedium entfernt, die Kulturschale bzw. die Kulturflasche einmal mit 37°C warmem PBS gespült und anschließend mit Trypsin/EDTA-Medium für ca. 3 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die abgelösten Zellen in frischem, 37°C warmem Medium aufgenommen und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die gewünschte Zellzahl wurde dann in einer neuen Kulturschale bzw. Kulturflasche ausgesät.

Zum Einfrieren von Zellen wurden exponentiell wachsende Zellen wie oben beschrieben abgelöst und in frischem Medium aufgenommen. Anschließend wurden sie bei 1000 U/min für 4 min zentrifugiert, das Medium abgenommen und der Zellpellet in Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann in Kryoröhrchen überführt und in Zellstoff verpackt. Anschließend wurden sie in einer Styroporbox bei -80°C eingefroren.

Tiefgefrorene Zellen wurden bei 37°C in einem Wasserbad aufgetaut und in Kulturmedium aufgenommen. Anschließend wurden sie bei 1000 U/min für 4 min zentrifugiert, das noch DMSO-haltige Kulturmedium entfernt und der Zellpellet in frischem Kulturmedium aufgenommen. Daraufhin wurden die Zellen wie oben beschrieben ausgesät.

4.1.2 Aussaat von Zellen auf Deckgläsern

Für die Immunfluoreszenz-Experimente wurden die Zellen wie folgt auf Deckgläsern ausgesät. Die Deckgläser wurden für 1 bis 2 Stunden in 2 M HCl vorbehandelt, anschließend mit deionisiertem Wasser gewaschen und in 70 % Ethanol aufbewahrt. Vor der Aussaat von Zellen wurden jeweils zwei Deckgläser in eine Kulturschale mit

2,5 cm Durchmesser gegeben. In diese Kulturschale wurden 10^5 Zellen in 5 ml Kulturmedium ausgesät und für 48 Stunden bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 7 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das jeweilige Experiment wie unten beschrieben durchgeführt.

Für Experimente mit ruhenden Zellen wurden 10^6 Zellen in 5 ml Kulturmedium ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Kulturmedium entfernt und mit 37°C warmem PBS gespült. Daraufhin wurden 5 ml serumfreies Kulturmedium in die Kulturschale gegeben und die Zellen für weitere 48 Stunden inkubiert, anschließend wurde das jeweilige Experiment wie unten beschrieben durchgeführt.

4.1.3 Bestrahlung von Zellen mit ionisierender Strahlung

Für Experimente, bei denen eine Bestrahlung der Zellen mit ionisierender Strahlung (IR) vorgesehen war, wurde eine ⁶⁰Co-Quelle mit einer Dosisleistung von 4 Gy/min verwendet. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur bestrahlt und anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden sie wie unten beschrieben weiter behandelt.

4.1.4 Bestrahlung von Zellen mit ultravioletter Strahlung

Für Experimente, bei denen eine Bestrahlung der Zellen mit ultravioletter Strahlung (UV) vorgesehen war, wurde das Kulturmedium aus der Kulturschale entfernt und die Zellen mit 37°C warmem PBS gewaschen. Sofort anschließend wurden die Zellen mit einer UV-Lampe bestrahlt; es wurde sofort darauf neues Kulturmedium zugegeben. Anschließend wurden die Zellen für die jeweils angegebene Zeit bei 37°C inkubiert und wie unten beschrieben weiter behandelt.

4.1.5 Behandlung von Zellen mit alkylierenden Substanzen

Für Experimente, bei denen eine Behandlung der Zellen mit MMS oder MNNG vorgesehen war, wurde die jeweilige Substanz in der vorgesehenen Konzentration in Kulturmedium verdünnt. Das Kulturmedium aus der Kulturschale wurde entfernt und durch die vorbereitete MMS- oder MNNG-Lösung ersetzt. Anschließend wurden die Zellen für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit 37°C warmem PBS gespült und frisches Kulturmedium zugegeben. Im

Anschluss daran wurden die Zellen für die weiter vorgesehene Zeit bei 37°C inkubiert und daraufhin wie unten beschrieben weiter behandelt.

4.1.6 Behandlung von Zellen mit Enzyminhibitoren

Für Experimente, bei denen eine Vorbehandlung der Zellen mit Aphidicolin oder Coffein vor der Anwendung von UV-C vorgesehen war, wurde die jeweilige Substanz in Kulturmedium auf die vorgesehene Konzentration verdünnt. Das Kulturmedium aus der Kulturschale wurde entfernt und durch die vorbereitete Lösung ersetzt. Anschließend wurden die Zellen für 60 min (180 min für Aphidicolin) bei 37°C inkubiert, das Kulturmedium wurde entfernt und die Zellen wurden mit 37°C warmem PBS gewaschen. Direkt im Anschluss wurde die vorgesehene Behandlung wie oben beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde das Coffein- bzw. Aphidicolinhaltige Kulturmedium wieder zugefügt und die Zellen darin bis zum Ende der vorgesehenen Inkubationszeit gehalten.

4.2 Immunfluoreszenz

4.2.1 Immunfluoreszenzfärbung für Fluoreszenzmikroskopie

Die Quantifizierung von γ -H2AX-Foci erfolgte gemäß einer modifizierten Version des von Jakob *et al.*, 2000 publizierten Protokolls. Im Einzelnen wurden die behandelten Zellen nach Abschluss der jeweiligen Behandlung auf Eis gestellt und zunächst das Nährmedium entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit eisgekühlter PBS gewaschen und dann 20 Minuten mit eisgekühltem HEPES-Puffer auf Eis inkubiert. Nach Entfernung des HEPES-Puffers wurde einmal 5 Minuten mit eisgekühlter PBS auf Eis inkubiert und anschließend 20 Minuten mit eisgekühltem Fixierungspuffer auf Eis fixiert.

Im Anschluss an die Fixierung wurden die Präparate 3x für jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen und anschließend für mehrere Stunden mit Blockierungspuffer bei 4°C geblockt. Nach dem Blocken wurden die Präparate eine Stunde mit dem Primärantikörper (Upstate Polyclonal Rabbit anti-human-H2A.X) in dem entsprechenden Antikörperpuffer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (jeweils 5 Minuten) wurden die Präparate für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper

(Alexa Fluor 488 Goat anti-Rabbit F(AB)₂-Fragment) in dem entsprechenden Antikörperpuffer im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde erneut dreimal jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen und die Deckgläser mit den gefärbten Zellen auf Objektträger unter Verwendung des Eindeckmediums übertragen.

Die Präparate wurden im Anschluss innerhalb von höchstens 3 Tagen im Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung des 100x-Objektivs ausgewertet.

4.2.2 Immunfluoreszenzfärbung für konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Einzelne Kontrollexperimente zur Visualisierung von γ -H2AX-Foci wurden in Zusammenarbeit mit der Gesellschaft für Schwerionenforschung in Darmstadt durchgeführt. Hierzu wurde das von Jakob *et al.*, 2000 publizierte Protokoll verwendet.

Im Einzelnen wurden die behandelten Zellen nach Abschluss der jeweiligen Behandlung auf Eis gestellt und zunächst das Nährmedium entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit eisgekühlter PBS gewaschen und dann 20 Minuten mit eisgekühltem HEPES-Puffer auf Eis inkubiert. Nach Entfernung des HEPES-Puffers wurde einmal 5 Minuten mit eisgekühlter PBS auf Eis inkubiert und anschließend 20 Minuten mit eisgekühltem Fixierungspuffer auf Eis fixiert.

Im Anschluss an die Fixierung wurden die Präparate 3x jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen und anschließend für mehrere Stunden mit Blockierungspuffer bei 4°C geblockt. Nach dem Blocken wurden die Präparate für eine Stunde mit dem Primärantikörper (Upstate Polyclonal Rabbit anti-human-H2A.X) in dem entsprechenden Antikörperpuffer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (jeweils 5 Minuten) wurden die Präparate für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper (Alexa Fluor 488 Goat anti-Rabbit F(AB)₂-Fragment) in dem entsprechenden Antikörperpuffer im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde erneut zweimal jeweils 5 Minuten mit PBS gewaschen. Abschließend wurde eine Kernfärbung mit Hoechst 33258-Farbstoff durchgeführt. Hierzu wurde der Farbstoff zu einer Konzentration von 0,2 mg/ml in PBS verdünnt und die Präparate 5 min im Dunkeln damit inkubiert. Anschließend wurde die Lösung entfernt und die und die Deckgläser mit den gefärbten Zellen auf Objektträger unter Verwendung eines für die konfokale Laser-scanning-Mikroskopie geeigneten Eindeckmediums übertragen.

Die Präparate wurden unverzüglich unter Verwendung eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops ausgewertet und fotografiert. Die Routine-Auswertung der Präparate erfolgte mit einem Binokular-Mikroskop bei einer Vergrößerung von 100x, wie in Kapitel 4.2.1. beschrieben.

4.3 Statistische Methoden und Auswertung

In allen Experimenten wurden je Präparat 40 Zellkerne gezählt. Jedes Experiment wurde im Duplikat durchgeführt und zwei bis viermal unabhängig voneinander wiederholt.

Für die statistische Analyse der Ergebnisse wurden der statistische Mittelwert (Mean) und die Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) berechnet. Zur Untersuchung, ob zwischen den beobachteten Behandlungsgruppen oder Zelllinien statistisch signifikante Unterschiede bestehen, wurde der Student's t-Test als zweiseitiger Test auf die Daten angewendet. Als statistisch signifikant wurde ein $p < 0,01$ betrachtet. Alle statistischen Berechnungen wurden wie aus der Literatur bekannt (Bland, 1995; Papoulis, 1991) durchgeführt, für die Berechnungen wurde die Excel-Software verwendet.

Zur Bestimmung von Kurvenfunktionen aus den vorhandenen Daten wurde die Methode der kleinsten Quadrate (Bland, 1995; Papoulis, 1991), für nicht-lineare Funktionen in der Modifikation nach Levenberg-Marquardt (Marquardt, 1963), verwendet. Zur Durchführung der Analysen diente das Programm Data Master 2003.

5 Ergebnisse

5.1 γ -H2AX-Focus Bildung nach Einwirken von ionisierender Strahlung auf CHO-Zellen

Zur Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Darstellung von γ -H2AX-Foci mittels Immunfluoreszenz verwendet.

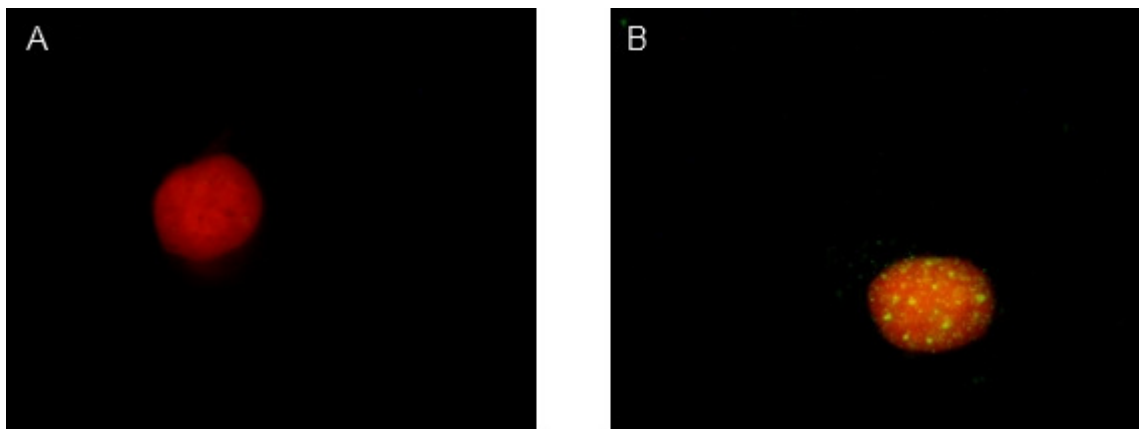


Abb. 5-1: γ -H2AX-Foci bei CHO-9 Zellen; A: Unbehandelte CHO-9 Zelle im Fluoreszenzmikroskop (rot: Kernfärbung); B: CHO-9 Zelle 30 min nach Bestrahlung mit 0,67 Gy im Fluoreszenzmikroskop (grün: γ -H2AX)

Im Rahmen der Etablierung dieser Methode in unserem Labor wurde zunächst die durchschnittliche Anzahl von γ -H2AX-Foci nach Einwirkung von 0 bis 1,67 Gy γ -Strahlung auf CHO-9- Zellen bestimmt (siehe Abbildung 5-1). Dazu wurde eine halbe Stunde nach Bestrahlung die Zahl der induzierten γ -H2AX-Foci ausgezählt. Hierbei ergab sich eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung, wie in Abbildung 5-2 dargestellt. Durchschnittlich wurden dabei pro 1 Gy applizierter γ -Strahlung $33,8 \pm 2,1$ (Mittelwert $\pm$ SEM) γ -H2AX-Foci induziert. Die lineare Dosiswirkungsbeziehung und die beobachtete Anzahl an γ -H2AX-Foci pro 1 Gy ionisierender Strahlung entspricht der erwarteten Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen in dem verwendeten Dosisbereich.

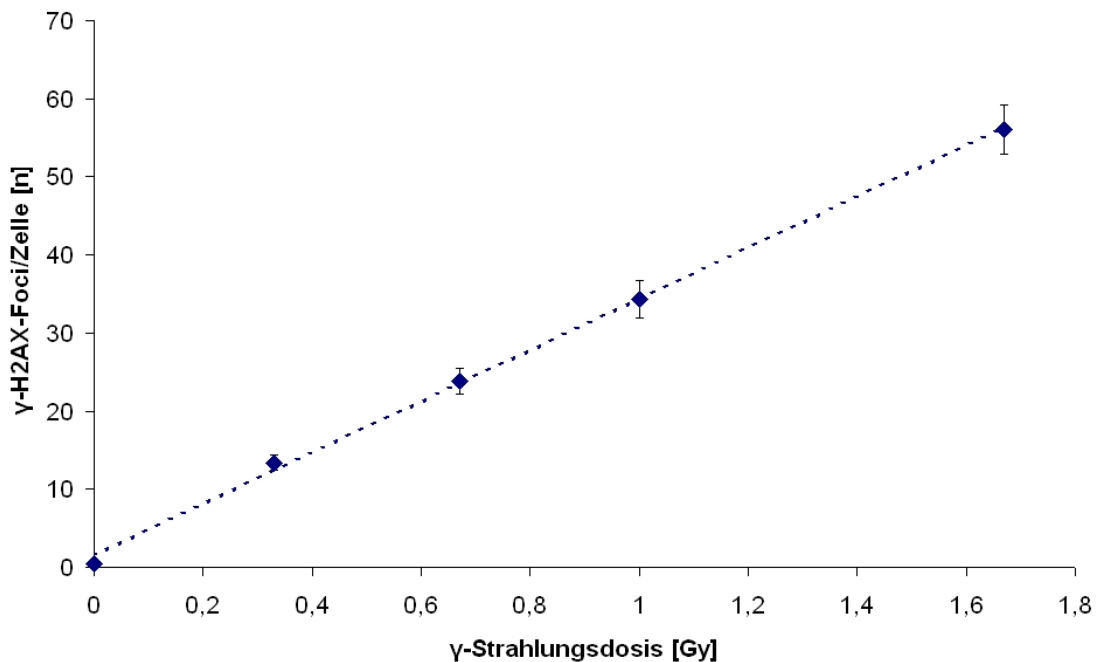


Abb. 5-2: Dosiswirkungskurve für CHO-9 Zellen 30 min nach Bestrahlung mit γ -Strahlung einer ^{60}Co -Quelle. Jeder Messpunkt ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten $\pm$ Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

5.2 γ -H2AX-Focus-Bildung nach Einwirken von ultravioletter Strahlung auf CHO-Zellen

5.2.1 γ -H2AX-Focus-Bildung nach Einwirken von UVC-Strahlung auf exponentiell wachsende CHO-9-Zellen

Um festzustellen, ob UVC-Strahlung die Bildung von γ -H2AX-Foci in CHO-Zellen induziert und um eine etwaige Zeitabhängigkeit einer solchen Induktion festzustellen, wurden CHO-9-Zellen mit 20 J/m^2 UVC bestrahlt und in festen Zeitintervallen bis zu vierundzwanzig Stunden nach der Bestrahlung mittels Immunfluoreszenz auf die Bildung von γ -H2AX Foci untersucht.

UV-Bestrahlung induziert in CHO-Zellen die Phosphorylierung von H2AX zu γ -H2AX und die Bildung diskreter nukleärer Foci (siehe Abbildung 5-3). Die entsprechende Zeit-Wirkungskurve ist in Abbildung 5-4 gezeigt. UVC induziert bereits eine Stunde nach Bestrahlung die Bildung von γ -H2AX-Foci, dabei liegt der Anteil der Zellen, die eine Stunde nach Bestrahlung γ -H2AX Foci aufweisen bei ca. 54% (siehe Abbildung 5-17). Die Anzahl dieser Foci nimmt im weiteren zeitlichen Verlauf zunächst auf

beinahe Kontrollniveau ab, um dann erneut auf ein Maximum zwölf Stunden nach Bestrahlung anzusteigen. Die Anzahl der nachweisbaren γ -H2AX-Foci nimmt nach diesem zweiten Anstieg innerhalb der nächsten sechzehn Stunden kontinuierlich ab, erreicht aber auch vierundzwanzig Stunden nach Bestrahlung nicht das Kontrollniveau.

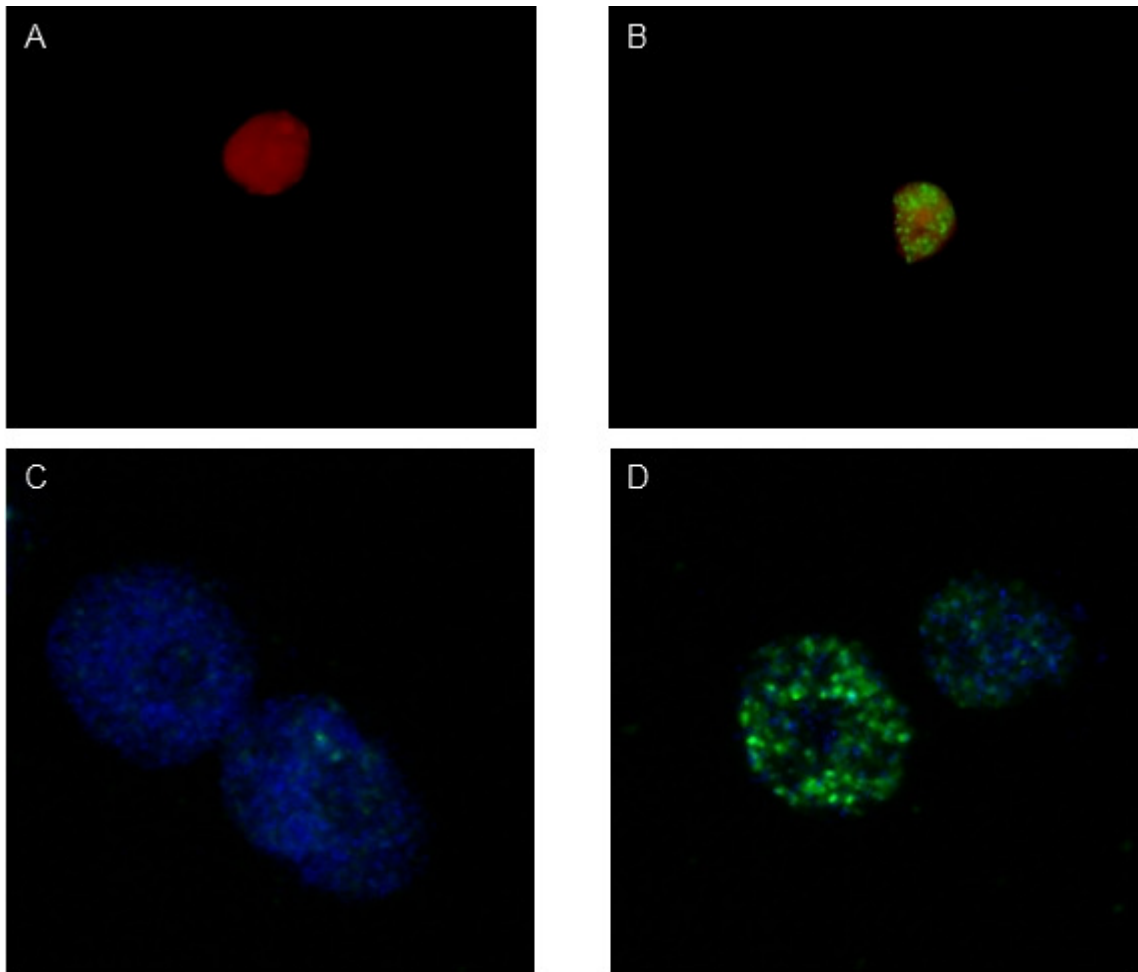


Abb. 5-3: γ -H2AX-Foci nach Bestrahlung mit UVC; A: Unbehandelte CHO-9 Zelle; B: CHO-9 Zelle 60 min nach Bestrahlung mit 20 J/m² UVC; C: Unbehandelte CHO-9 Zellen im konfokalen Laserscanning Mikroskop (blau: Kernfärbung); D: CHO-9 Zellen 60 min nach Bestrahlung mit 20 J/m² UVC im konfokalen Laserscanning Mikroskop (grün: γ -H2AX). Vergrößerung 1000x.

Im folgenden wurden Dosis-Wirkungsbeziehungen im zeitlichen Abstand von einer Stunde und acht Stunden nach Bestrahlung untersucht. In Abbildung 5-5 ist die Dosis-

Wirkungsbeziehung für UVC-Strahlung nach einer Stunde zusammengefasst. Bei höheren Dosen steigt die durchschnittliche Anzahl von γ -H2AX-Foci dosisabhängig an, bis ein Plateau bei ca. 40 J/m² erreicht wird. Die Dosiswirkungsbeziehung lässt sich hier durch die Funktion $F(X) = a + b(1 - e^{cx}) + d \cdot x$ darstellen. Dabei entspricht $F(x)$ der Anzahl der Foci und x der applizierten UVC-Dosis. Der exponentielle Anteil der Funktion $b(1 - e^{cx})$ überwiegt deutlich.

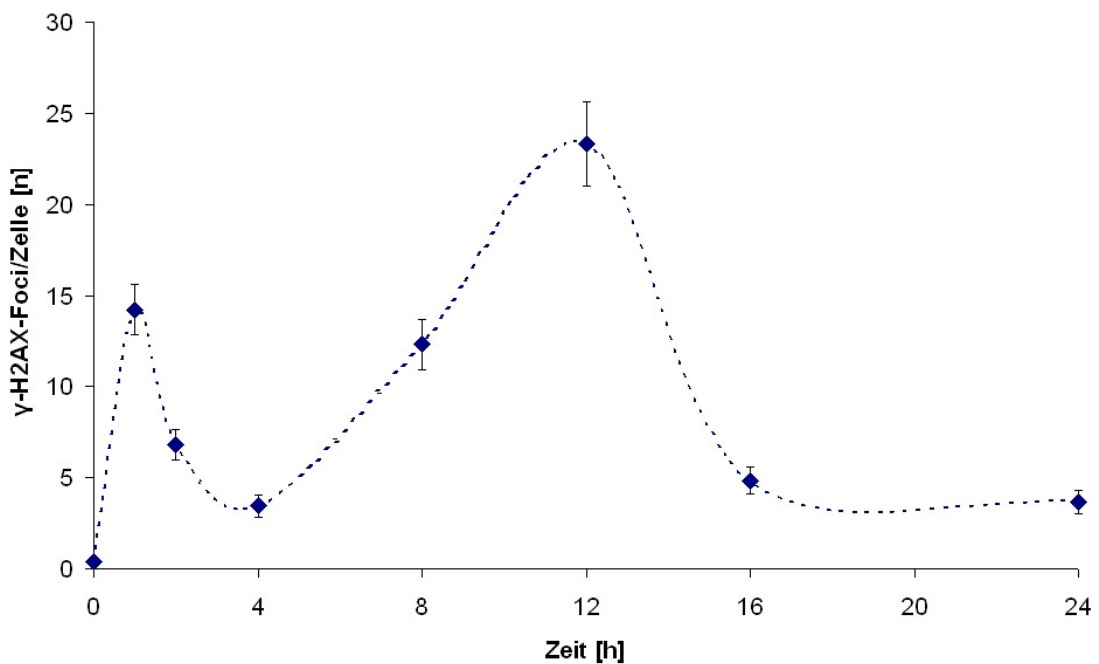


Abb. 5-4: Zeitwirkungskurve für mit 20 J/m² UVC bestrahlte exponentiell wachsende CHO-9 Zellen; die Zeitachse stellt die Inkubationszeit nach Bestrahlung dar, der Wert für 0 h ist der Wert für unbestrahlte CHO-9 Zellen. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus 3 bis 4 unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM dar.

Die Bildung von γ -H2AX acht Stunden nach Bestrahlung ist bei allen applizierten UVC- Dosen dosisabhängig. Ein Plateau, an dem eine erhöhte UVC-Dosis keine Steigerung der γ -H2AX-Foci-Anzahl bewirkte, wurde bis zu einer Dosis von 100 J/m² nicht beobachtet. Wie in Abbildung 5-6 gezeigt wird, verläuft der Anstieg zunächst linear und geht bei Dosen größer ca. 20 J/m² in ein Plateau über (Sättigung). Die Dosiswirkungsbeziehung lässt sich dabei ebenfalls durch die Funktion $F(X) = a + b(1 - e^{cx}) + d \cdot x$ darstellen. Die jeweiligen Konstanten sind in Tabelle 5-1 zusammengefasst.

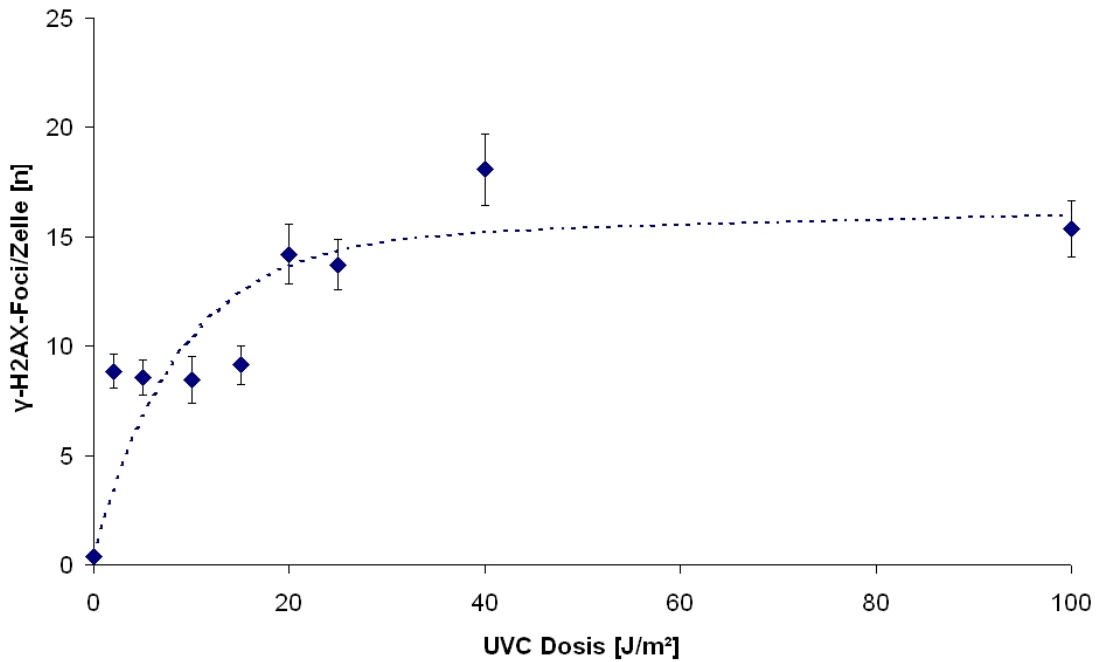


Abb. 5-5: Dosiswirkungskurve für CHO-9 Zellen 60 min nach Bestrahlung mit UVC. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus 3 bis 4 unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM dar.

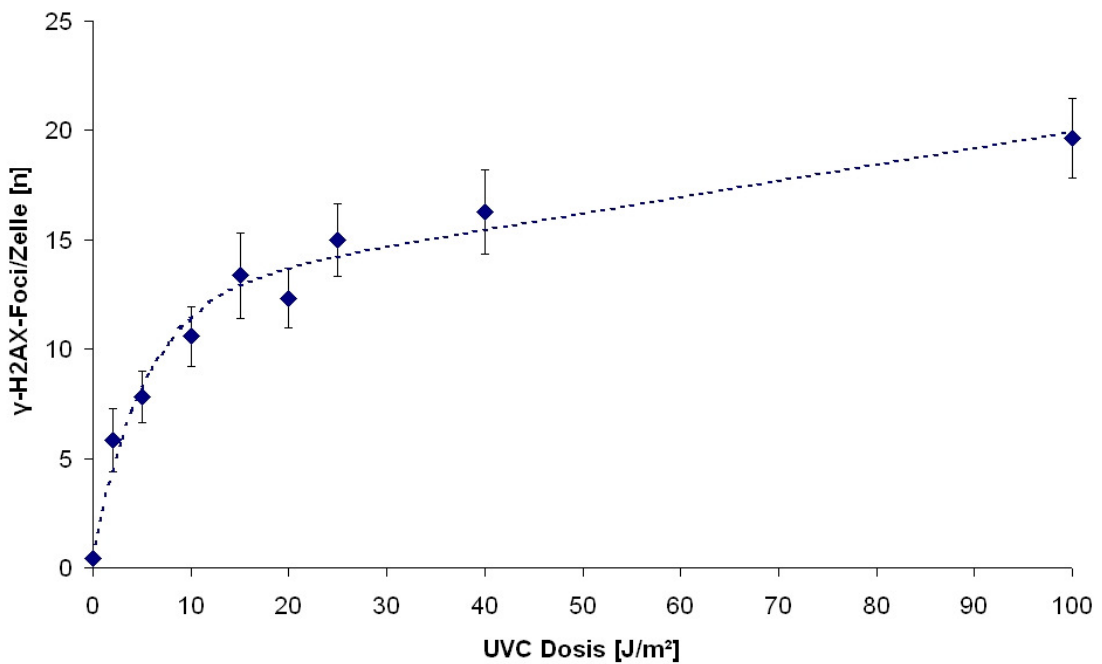


Abb. 5-6: Dosiswirkungsbeziehung für CHO-9 Zellen 8 h nach Bestrahlung mit UVC. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM dar.

Dosiswirkungsfunktion $F(X) = a + b(1 - e^{cx}) + d \cdot x$	a	b	c	d
Eine Stunde nach Bestrahlung von CHO-9 Zellen	0,39	14,50	-0,11	0,01
Acht Stunden nach Bestrahlung von CHO-9 Zellen	0,44	12,01	-0,19	0,07

Tab. 5-1: Dosiswirkungsfunktionen eine und acht Stunden nach UVC Bestrahlung von CHO-9 Zellen

5.2.2 γ -H2AX-Focus-Bildung nach Einwirken von UVC-Strahlung auf in serumfreiem Medium gehaltene CHO-9-Zellen

Um festzustellen, wie weit die beobachtete Bildung von γ -H2AX-Foci replikationsabhängig verläuft, wurden CHO-9-Zellen in serumfreiem Medium ausgesät und mit einer UVC-Dosis von 20 J/m² bestrahlt. Wie der Abbildung 5-7 zu entnehmen ist, fehlt hier das bei exponentiell wachsenden Zellen beobachtete Maximum eine Stunde nach Bestrahlung völlig. Nach zwei Stunden beginnt die Zahl der γ -H2AX-Foci anzusteigen, um nach acht Stunden ein Maximum zu erreichen. Anschließend nimmt die Zahl der γ -H2AX-Foci über mehrere Stunden hin wieder ab. Insgesamt findet man maximal 25% der γ -H2AX-Foci, die bei exponentiell wachsenden Zellen erreicht wurden.

Wie aus Abbildung 5-8 zu ersehen ist, gleicht sich die Zahl der induzierten γ -H2AX-Foci in beiden Behandlungsgruppen sowohl vier Stunden nach Behandlung, als auch vierundzwanzig Stunden nach Behandlung einander an. Die beiden bei exponentiell wachsenden CHO-9 Zellen beobachteten Maxima fehlen allerdings in Zellen, die in serumfreiem Medium gehalten wurden, oder sind nur schwach ausgeprägt.

Unabhängig von der applizierten Dosis werden innerhalb der ersten Stunde nach Exposition mit UVC keine γ -H2AX Foci induziert (siehe Abbildung 5-9). Der Unterschied zu exponentiell wachsenden CHO-9 Zellen ist hier bei allen applizierten Dosen mit $p < 0,01$ signifikant.

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Bildung von γ -H2AX-Foci nach Einwirken von UVC replikationsabhängig erfolgt. Dies ist mit der Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen an Stellen blockierter Replikation vereinbar

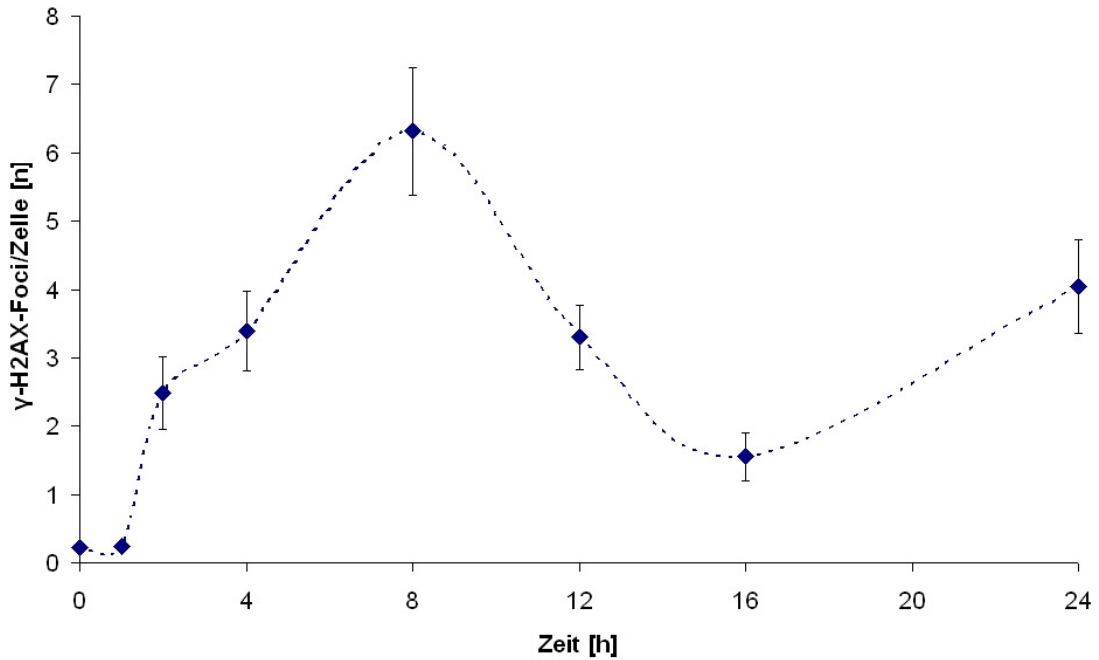


Abb. 5-7: Zeitwirkungskurve für CHO-9 Zellen, die in serumfreiem Medium gehalten wurden, nach Bestrahlung mit 20 J/m² UVC; der Wert für 0 h ist für unbestrahlte ruhende CHO-9 Zellen. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM dar.

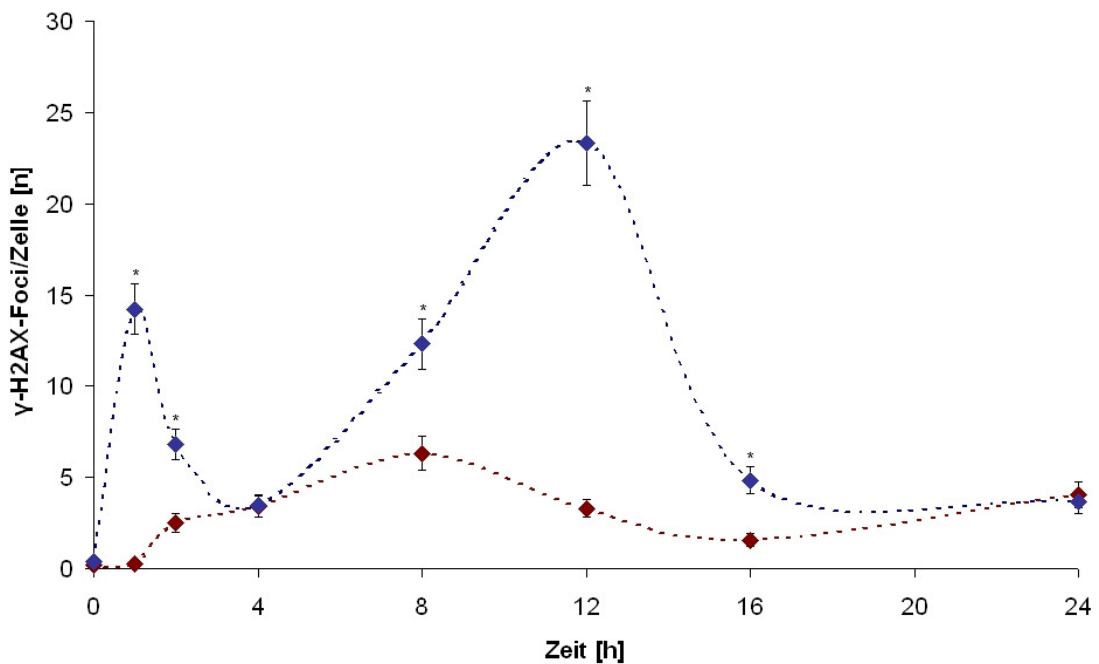


Abb. 5-8: Vergleich zwischen exponentiell wachsenden und in serumfreiem Medium gehaltenen CHO-9 Zellen; blau: exponentiell wachsende CHO-9 Zellen; rot: in serumfreiem Medium gehaltene CHO-9 Zellen; an mit * markierte Zeitpunkten ist der Unterschied mit $p < 0,01$ signifikant. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus 3 bis 4 unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM dar.

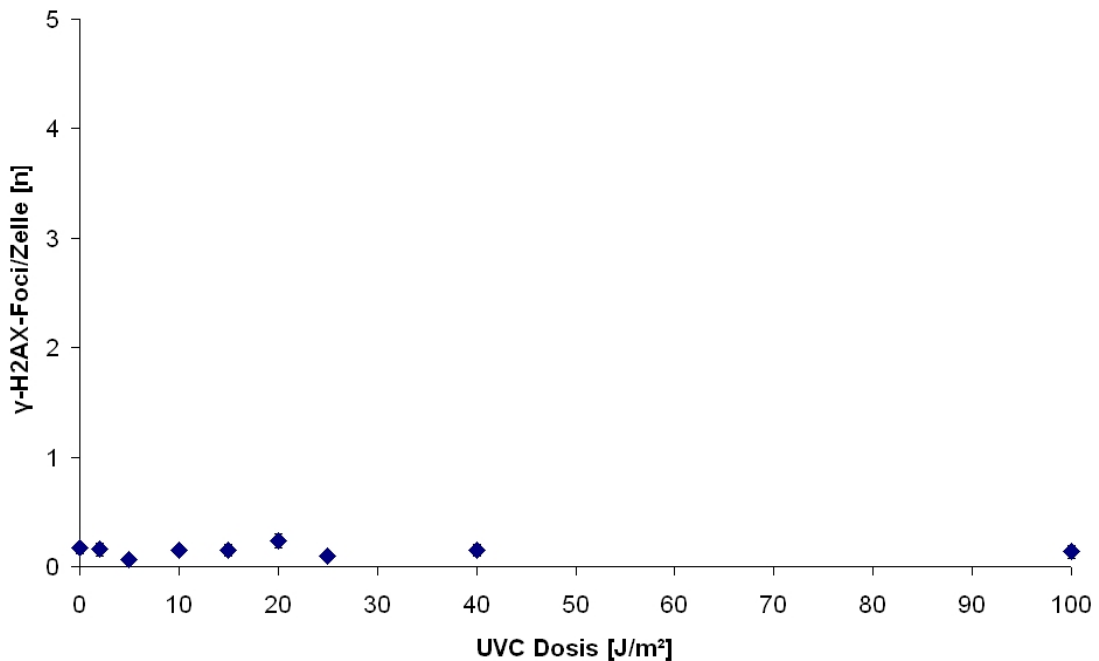


Abb. 5-9: Dosiswirkungskurve für CHO-9 Zellen, die in serumfreiem Medium gehalten wurden, 60 min nach Bestrahlung mit UVC. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM dar.

5.2.3 γ -H2AX-Focus-Bildung nach Einwirken von UVC-Strahlung auf exponentiell wachsende CHO-43-3B-Zellen

Um den Einfluss der Reparatur von UVC-induzierten Schäden auf die γ -H2AX-Bildung genauer zu untersuchen, wurden UVC-hypersensitive CHO-43-3B Zellen mit UVC bestrahlt und die daraus folgende Bildung von γ -H2AX-Foci beobachtet (siehe Abbildung 5-10).

Wie Abbildung 5-11 zu entnehmen ist, werden auch bei CHO-43-3B-Zellen bereits eine Stunde nach Bestrahlung γ -H2AX-Foci in ähnlichem Umfang wie bei CHO-9-Zellen gebildet. Anders als bei den nicht reparaturdefizienten CHO-9-Zellen erfolgt hier jedoch kein Abfall der γ -H2AX-Foci-Anzahl, sondern die Zahl der Foci nimmt kontinuierlich über vierundzwanzig Stunden zu.

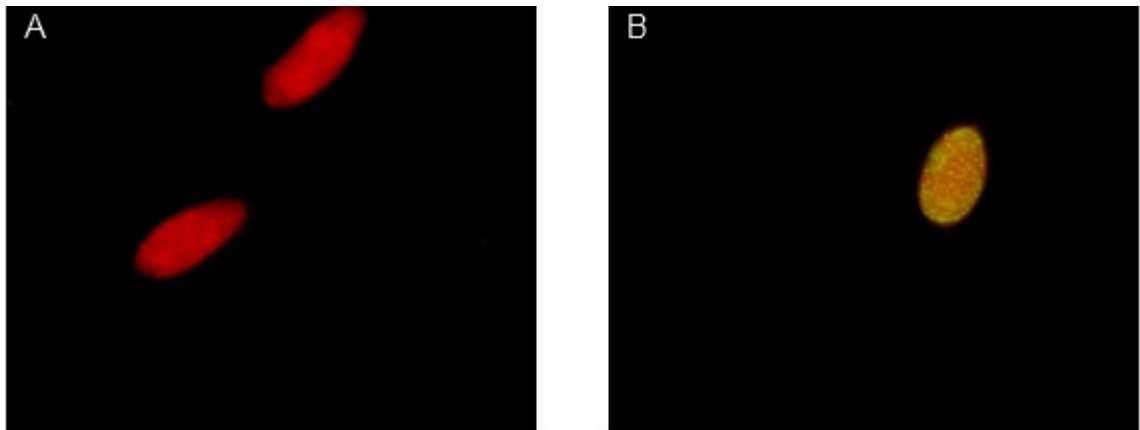


Abb. 5-10: γ -H2AX-Foci nach Bestrahlung mit UVC; A: Unbehandelte CHO-43-3B Zellen; B: CHO-43-3B Zelle 60 min nach Bestrahlung mit 20 J/m² UVC

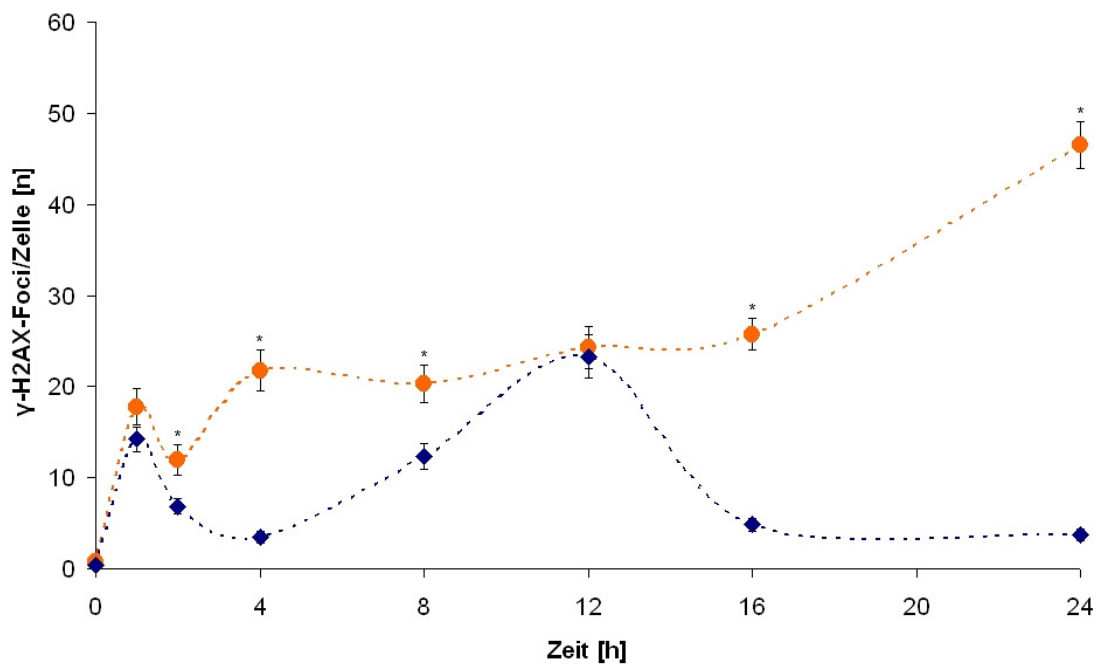


Abb. 5-11: Vergleich der Zeitwirkungskurven nach Bestrahlung mit 20 J/m² UVC; die Werte für 0 h sind für unbestrahlte Zellen; an mit * bezeichneten Zeitpunkten ist der Unterschied mit $p < 0,01$ signifikant; blau: CHO-9 Zellen; orange: CHO-43-3B Zellen. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus 3 bis 4 unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM dar.

Zunächst nimmt die Zahl der γ -H2AX-Foci, die eine Stunde nach Bestrahlung beobachtet werden können, ähnlich wie bei CHO-9 Zellen zu (siehe Abbildung 5-12). Der auch bei CHO-9-Zellen beobachtete starke Anstieg an induzierten γ -H2AX-Foci bei Dosen größer 20 J/m² ist bei CHO-43-3B Zellen jedoch deutlich ausgeprägter. Die Dosiswirkung lässt sich auch bei diesen Zellen mit einer Funktion der Form $F(X)=a+b(1-e^{cx})+d \cdot x$ darstellen (siehe Tabelle 5-2).

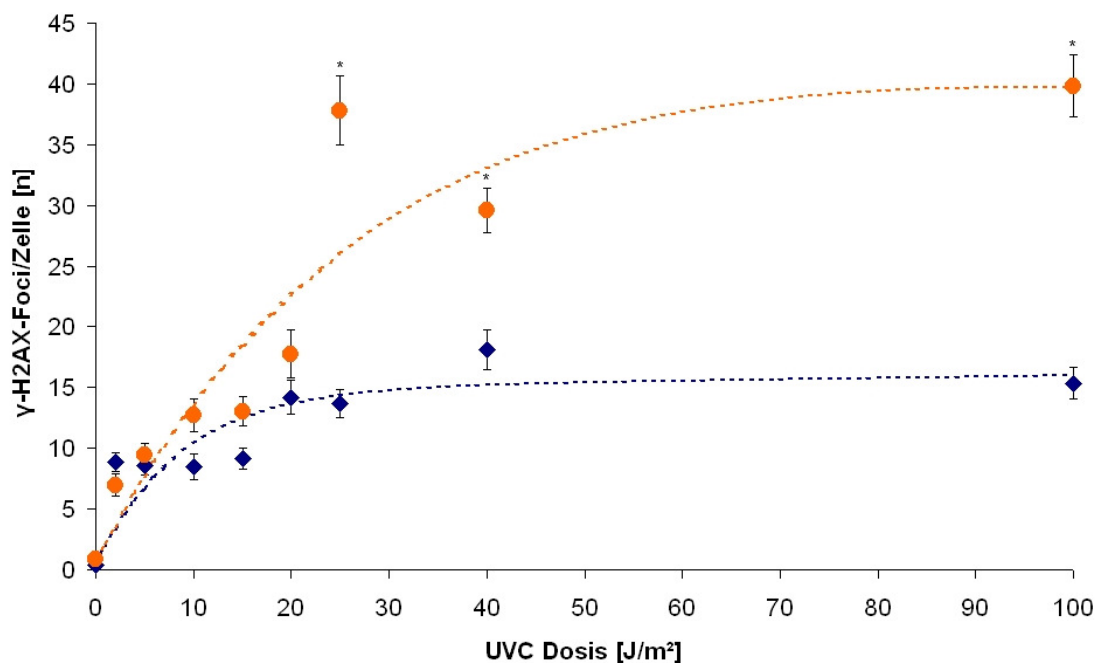


Abb. 5-12: Vergleich der Dosiswirkungskurven 60 min nach Bestrahlung mit UVC; an mit * markierten Dosen ist der Unterschied mit $p < 0,01$ signifikant; blau: CHO-9 Zellen; orange: CHO-43-3B Zellen. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus 3 bis 4 unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM dar.

Acht Stunden nach Bestrahlung zeigen die CHO-43-3B-Zellen einen nicht-dosisabhängigen Zuwachs an Foci. Dabei nimmt jedoch die Zahl der vollständig durchgefärbten und daher nicht quantitativ auswertbaren Zellen dosisabhängig auf bis zu 30 % zu (siehe Abbildung 5-13).

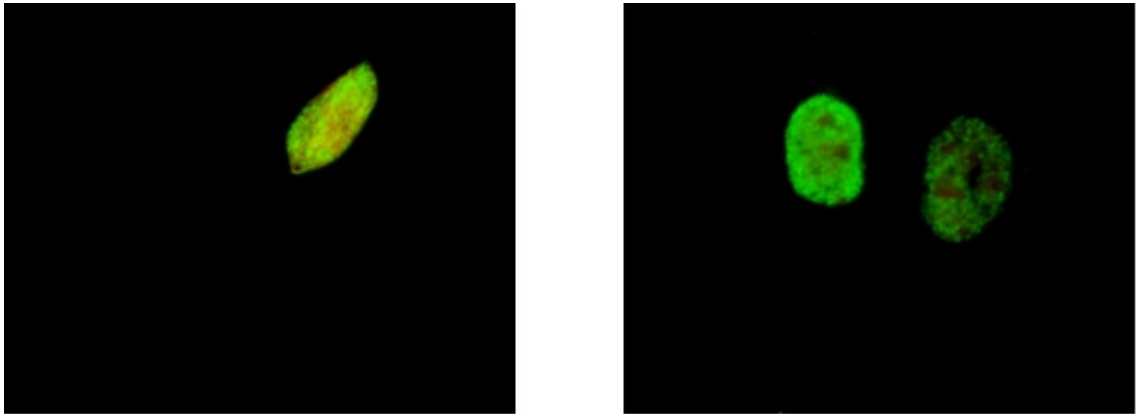


Abb. 5-13: Der Auswertung nicht zugängliche CHO-43-3B Zellen 8 h nach UVC Bestrahlung

Die in Abbildung 5-14 dargestellten Werte für hohe UVC-Dosen basieren daher nur auf den Zellen, die einer Auswertung zugänglich waren. Auch hier erscheint die Dosis-Wirkungsbeziehung mit einer der Form $F(X)=a+b(1-e^{cx})+d \cdot x$ darstellbar. Aufgrund der oben angegebenen Einschränkungen in der Auswertung lässt sich die genaue Form der Funktion allerdings nicht angeben.

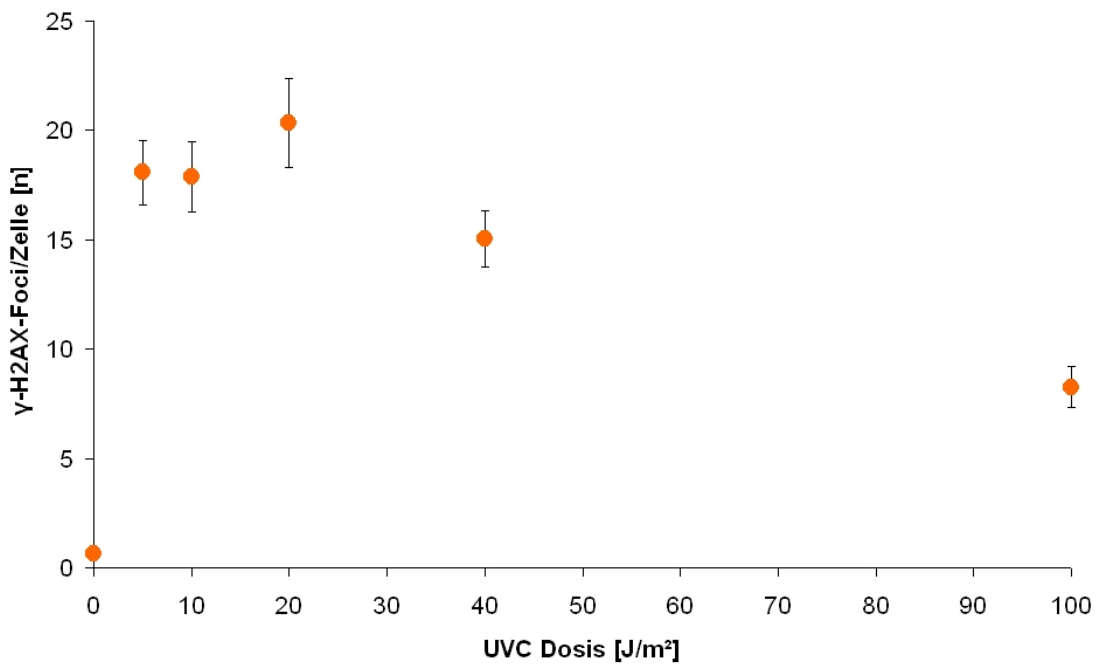


Abb. 5-14: Dosiswirkungskurve für CHO-43-3B Zellen 8 h nach Bestrahlung mit UVC. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM dar.

5.2.4 γ -H2AX-Focus-Bildung nach Einwirken von UVC-Strahlung auf in serumfreiem Medium gehaltene CHO-43-3B-Zellen

Um zu überprüfen, ob die Bildung von γ -H2AX-Foci bei CHO-43-3B-Zellen replikationsabhängig verläuft, wurden CHO-43-3B-Zellen in serumfreiem Medium gehalten und mit UVC bestrahlt. Auch bei in serumfreiem Medium gehaltenen CHO-43-3B-Zellen induziert eine UVC-Bestrahlung γ -H2AX Foci (Abbildung 5-15). Vier Stunden nach Einwirken von UVC ist die Zahl der induzierten Foci maximal. Anschließend nimmt die Zahl der Foci über ca. acht Stunden wieder auf Kontrollniveau ab. Die Anzahl der induzierten γ -H2AX-Foci ist zu jedem Zeitpunkt signifikant geringer als bei exponentiell wachsenden CHO-43-3B Zellen. Wie bei exponentiell wachsenden Zellen lässt sich hier die Dosis-Wirkungsbeziehung eine Stunde nach Exposition ebenfalls mit einer Funktion der Form $F(X)=a+b(1-e^{cx})+d \cdot x$ darstellen (siehe Abbildung 5-16 und Tabelle 5-2); dabei ist die Anzahl der induzierten γ -H2AX-Foci bei jeder verwendeten Dosis signifikant geringer als bei exponentiell wachsenden CHO-43-3B Zellen.

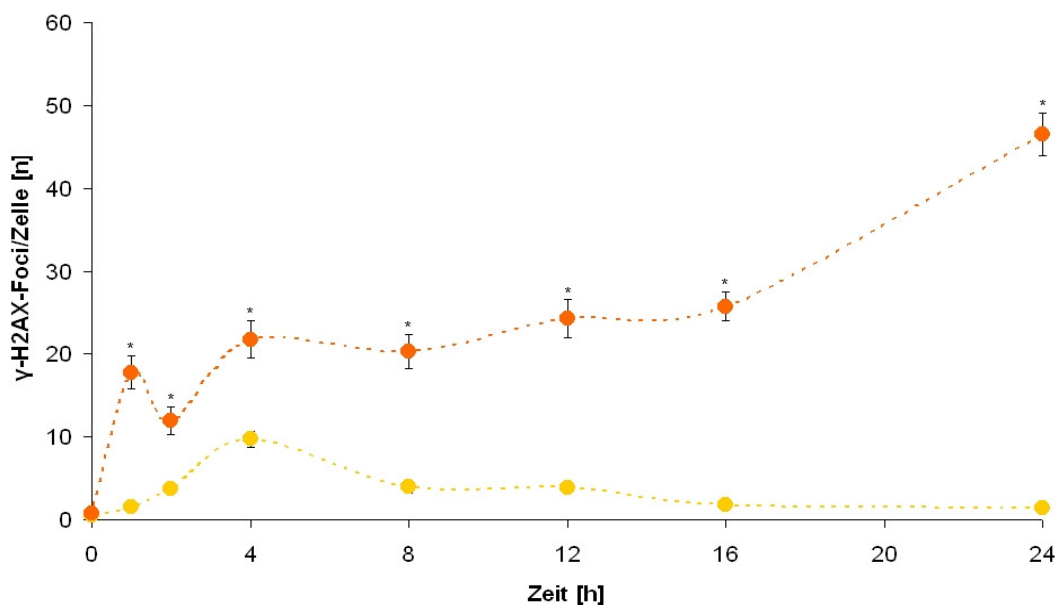


Abb. 5-15: Vergleich der Zeitwirkungskurven von exponentiell wachsenden und in serumfreiem Medium gehaltenen CHO-43-3B Zellen nach Bestrahlung mit 20 J/m² UVC; Werte für 0 h sind für unbestrahlte Zellen; an mit * markierten Zeitpunkten ist der Unterschied mit $p < 0,01$ signifikant; orange: exponentiell wachsende CHO-43-3B Zellen; gelb: in serumfreiem Medium gehaltene CHO-43-3B Zellen. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM dar.

Die Ergebnisse für CHO-43-3B-Zellen zeigen, dass die Bildung von γ -H2AX-Foci bei eingeschränkter Reparatur von UVC-induzierten Läsionen deutlich gesteigert ist. Dies ist mit der Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen an, die Replikation blockierenden, UVC-induzierten Läsionen vereinbar, da diese bei Zellen mit einem Reparaturdefekt vermehrt vorhanden sind.

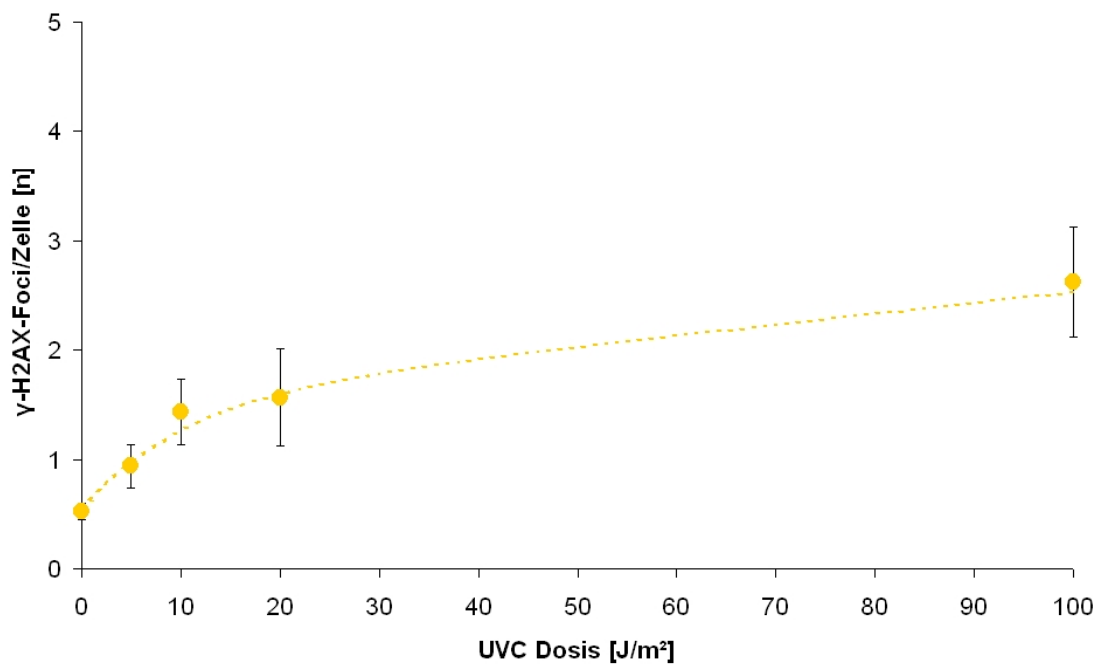


Abb. 5-16: Dosiswirkungskurve für in serumfreiem Medium gehaltene CHO-43-3B Zellen 60 min nach Bestrahlung mit UVC. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM dar.

Dosiswirkungsfunktion $F(X) = a + b(1 - e^{cx}) + d \cdot x$	a	b	c	d
Eine Stunde nach Bestrahlung von CHO-43-3B Zellen	0,60	46,29	-0,03	-0,06
Eine Stunde nach Bestrahlung von in serumfreiem Medium gehaltenen CHO-43-3B Zellen	0,53	1,00	-0,10	0,01

Tab. 5-2: Dosiswirkungsfunktionen eine Stunde nach UVC Bestrahlung von CHO-43-3B Zellen

5.2.5 γ -H2AX-Focus-Bildung nach Einwirken von UVC-Strahlung auf exponentiell wachsende mit Aphidicolin vorbehandelte CHO-Zellen

Um zu überprüfen, ob die Unterdrückung der DNA-Replikation einen Einfluss auf die Bildung von γ -H2AX-Foci hat, wurden exponentiell wachsende Zellen mit dem DNA-Polymerase- α -Inhibitor Aphidicolin vorbehandelt und anschließend mit UVC bestrahlt. Wie in Abbildung 5-18 dargestellt, erhöht Aphidicolin sowohl bei CHO-9 als auch bei CHO-43-3B Zellen die basal detektierbare Anzahl an γ -H2AX-Foci und reduziert gleichzeitig in CHO-43-3B Zellen die UVC-induzierbare Erhöhung an γ -H2AX-Foci signifikant. Dies bestätigt die Replikationsabhängigkeit der beobachteten γ -H2AX-Focusbildung.

5.2.6 γ -H2AX-Focus-Bildung nach Einwirken von UVC-Strahlung auf exponentiell wachsende, mit Coffein vorbehandelte CHO-9-Zellen

Um zu überprüfen, ob die beobachtete Bildung von γ -H2AX-Foci von den ATM/ATR Kinasen abhängig ist, wurden CHO-9-Zellen vor Bestrahlung mit UVC mit dem ATM/ATR-Inhibitor Coffein vorbehandelt. Dabei nimmt die Zahl der eine Stunde nach UVC-Einwirkung detektierbaren γ -H2AX-Foci je nach Coffein-Dosis ab, oder liegt auf Kontrollniveau (siehe Abbildung 5-19). Gleichzeitig nimmt die basal detektierbare Anzahl an γ -H2AX-Foci nach Zugabe von Coffein zunächst zu, wird jedoch bei Erhöhung der Coffein-Dosis wieder reduziert. Eine vollständige Aufhebung der Bildung von γ -H2AX-Foci ist auch nach Einwirkung von 5 mM Coffein nicht zu beobachten, allerdings sind nach Zugabe von 5 mM Coffein keine durch UVC induzierbaren γ -H2AX-Foci mehr nachzuweisen. Dies zeigt, dass die hier beobachtete Induktion von γ -H2AX-Foci ATM/ATR abhängig verläuft.

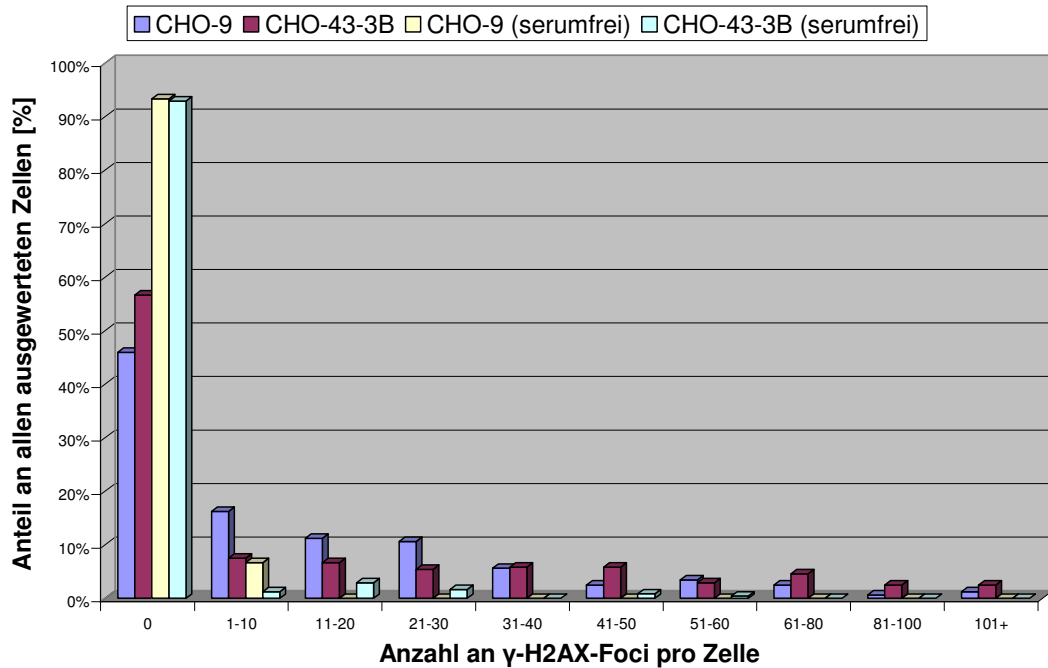


Abb. 5-17: Anteil an γ -H2AX-positiven Zellen eine Stunde nach Bestrahlung mit 20 J/m² UVC, jeweils Mittelwert aus 3-4 unabhängigen Experimenten.

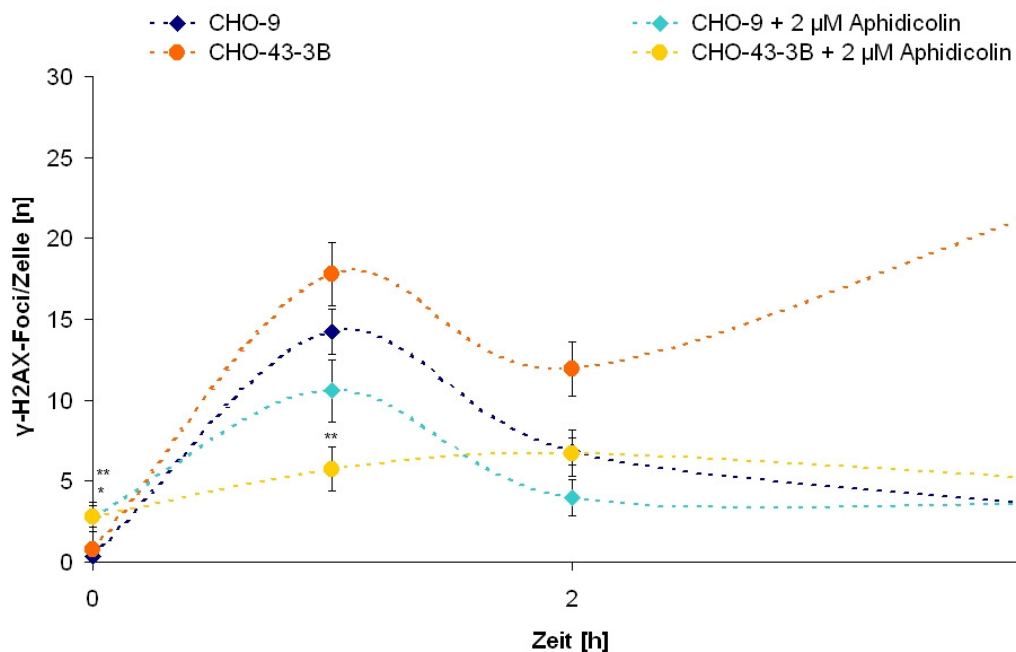


Abb. 5-18: Effekt von Aphidicolin Vorbehandlung bei Bestrahlung mit 20 J/m² UVC; Werte für 0 h sind für unbestrahlte Zellen; mit * markierte Werte sind für CHO-9 Zellen signifikant unterschiedlich; mit ** markierte Werte sind für CHO-43-3B Zellen signifikant unterschiedlich. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus 2 unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM dar

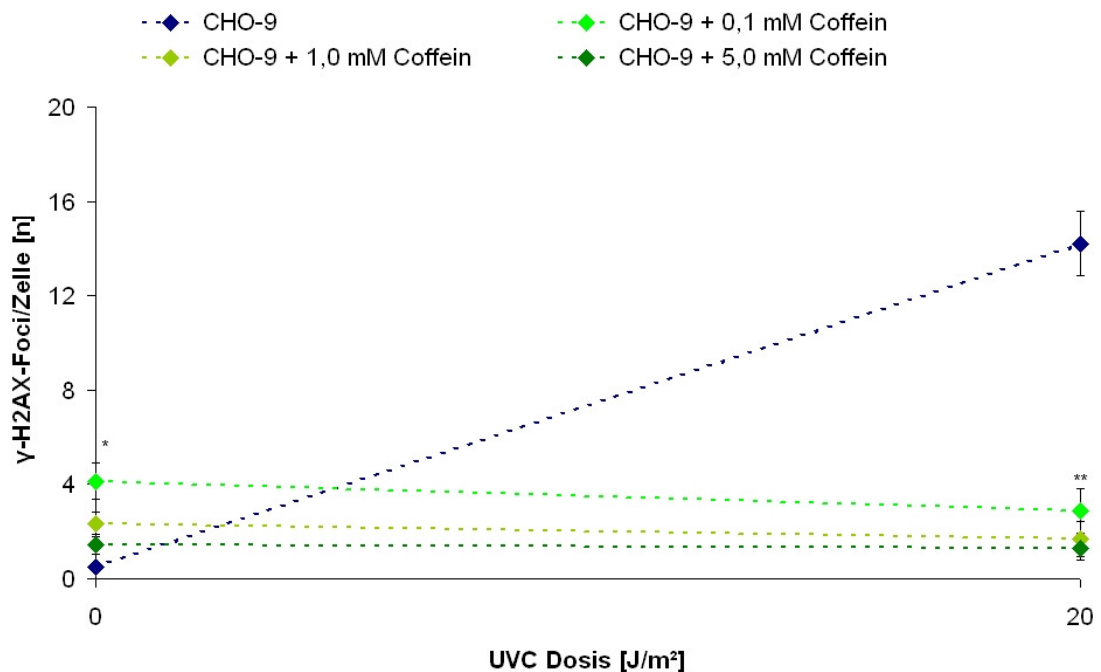


Abb. 5-19: Effekt von Coffein Vorbehandlung 60 min nach Bestrahlung mit UVC; *: der Wert für 0,1 mM Coffein ist signifikant unterschiedlich zu unbehandelten CHO-9 Zellen; **: die Werte für alle Coffein-Konzentrationen sind signifikant unterschiedlich zu unbehandelten CHO-9 Zellen. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM dar.

5.2.7 γ -H2AX-Focus-Bildung nach Einwirkung von UVB-Strahlung auf exponentiell wachsende CHO-9-Zellen

Um zu untersuchen, ob auch UVB geeignet ist, γ -H2AX-Foci zu induzieren, wurden CHO-9-Zellen mit UVB bestrahlt. UVB induziert γ -H2AX-Foci eine Stunde nach Bestrahlung (siehe Abbildungen 5-20 und 5-21). Die Anzahl dieser Foci nimmt über die folgenden 24 Stunden kontinuierlich ab. Die erforderliche Strahlendosis ist dabei um etwa eine Größenordnung höher als bei UVC. Dies zeigt, dass UVB ebenfalls in der Lage ist, γ -H2AX-Foci zu induzieren.

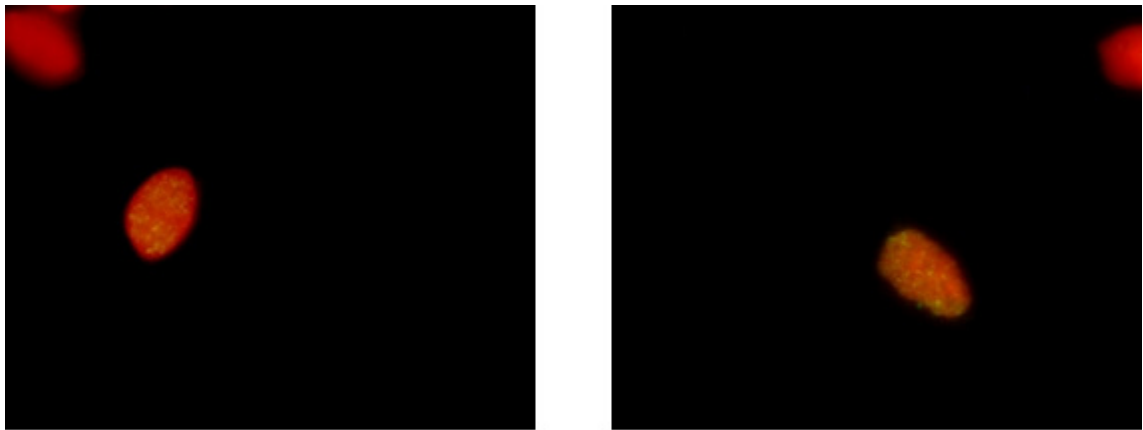


Abb. 5-20: γ -H2AX-Foci 60 min nach Bestrahlung mit 250 J/m² UVB

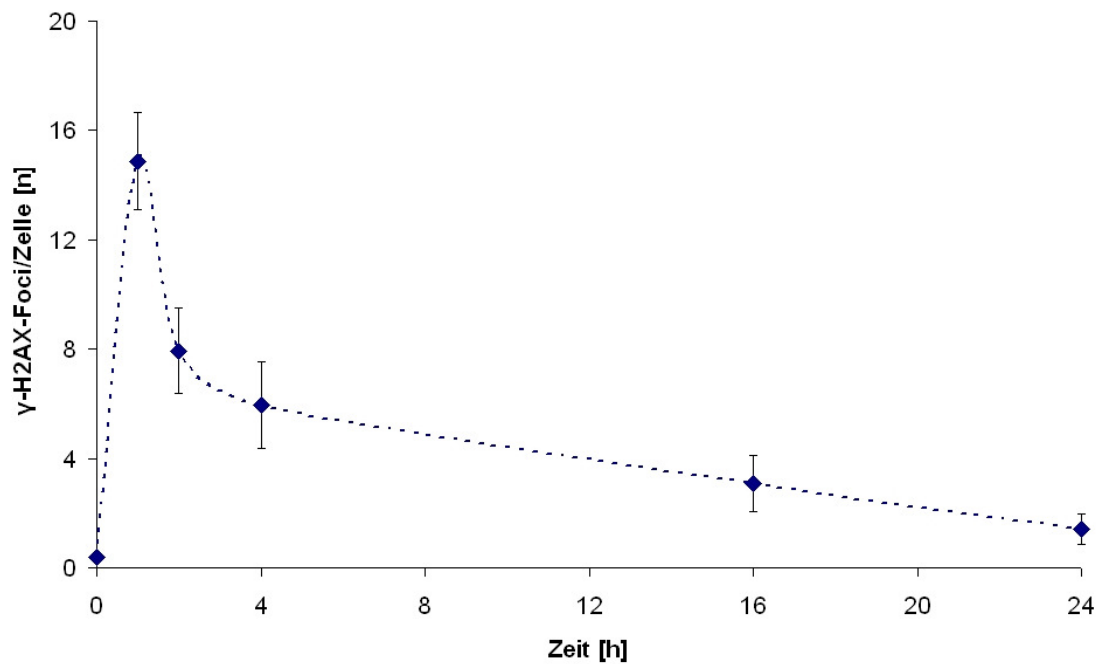


Abb. 5-21: Zeitwirkungskurve nach Bestrahlung von CHO-9 Zellen mit 250 J/m² UVB; der Wert für 0 h ist für unbestrahlte Zellen. Die Datenpunkte entsprechen X unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus 2 unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM dar.

5.3 γ -H2AX Focus-Bildung nach Einwirkung von Methylmethansulfonat (MMS)

5.3.1 γ -H2AX-Focus-Bildung nach Einwirken von MMS auf exponentiell wachsende CHO-9-Zellen

Um zu untersuchen, ob MMS zur Phosphorylierung von H2AX führen kann, wurden exponentiell wachsende CHO-9-Zellen mit MMS behandelt. MMS induziert γ -H2AX-Foci (siehe Abbildung 5-22). Werden exponentiell wachsende CHO-9-Zellen eine Stunde mit MMS behandelt, so sind bereits bei Ende der Einwirkzeit eine erhöhte Anzahl an γ -H2AX-Foci nachzuweisen. Die Zahl an Foci erreicht nach acht Stunden ein Maximum, um anschließend über zwölf Stunden wieder abzufallen. Das Kontrollniveau wird auch vierundzwanzig Stunden nach Ende der MMS-Behandlung nicht erreicht (siehe Abbildung 5-23).

Die Zahl der eine Stunde nach Ende der Exposition nachweisbaren γ -H2AX-Foci nimmt dosisabhängig wie in Abbildung 5-24 dargestellt zu. Die Dosis-Wirkungsabhängigkeit eine Stunde nach Ende der Exposition ist linear, wobei die Dosis von 1 mM MMS (60 min Exposition) durchschnittlich $3,7 \pm 0,5$ (Mittelwert $\pm$ SEM) γ -H2AX-Foci induziert. Dies zeigt dass MMS in der Lage ist γ -H2AX-Foci zu induzieren, dabei werden in dem beobachteten Dosisbereich weniger γ -H2AX-Foci gebildet als bei UVC beobachtet wurde.

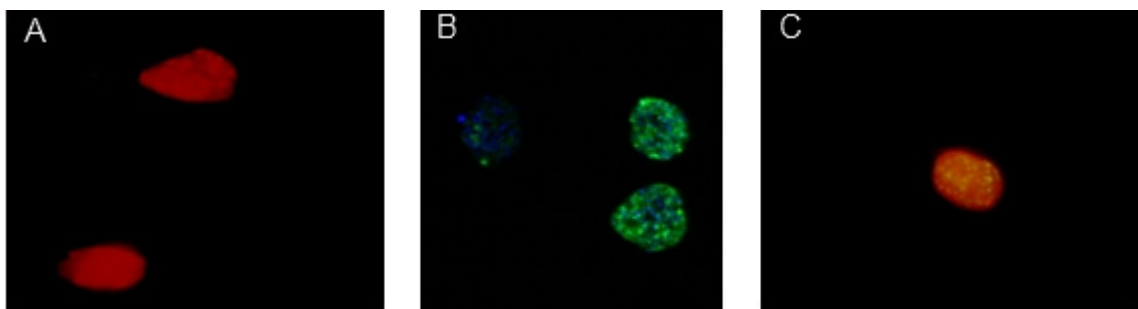


Abb. 5-22: γ -H2AX-Foci nach Behandlung mit MMS; A: unbehandelte CHO-9 Zellen; B und C: CHO-9 Zellen 60 min nach Ende der einstündigen Pulsbehandlung mit 1,5 mM MMS (B: Konfokales Laserscanning Mikroskop; C: Fluoreszenzmikroskop).

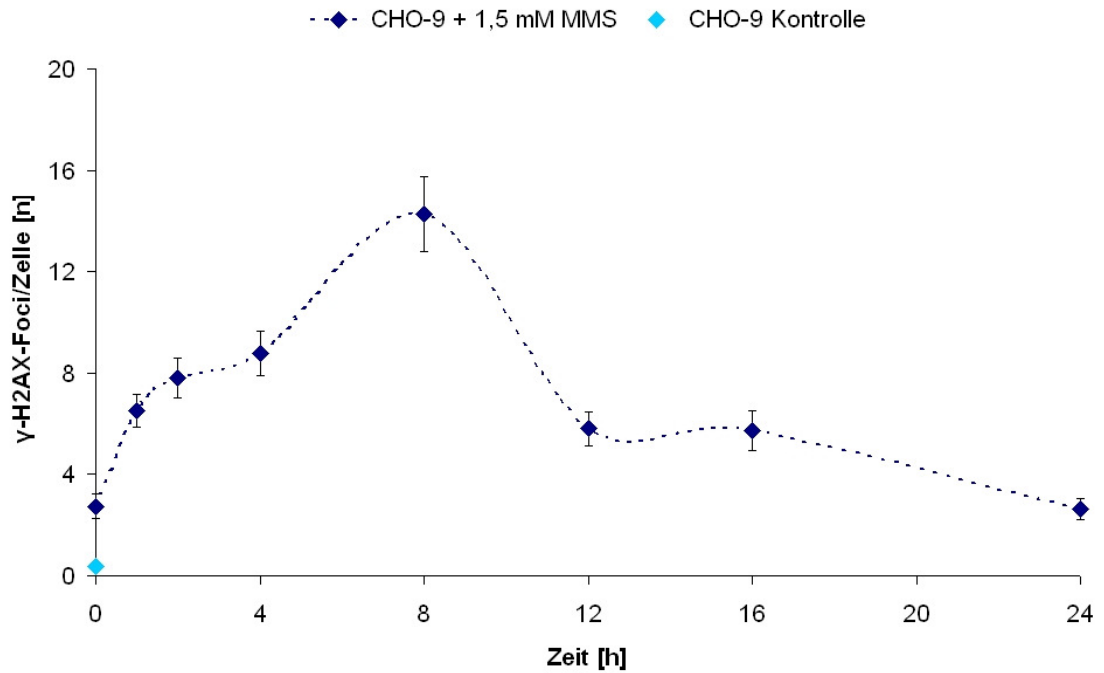


Abb. 5-23: Zeitwirkungskurve nach einstündiger Pulsbehandlung mit 1,5 mM MMS; der Kontrollwert ist für unbehandelte CHO-9 Zellen. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM dar.

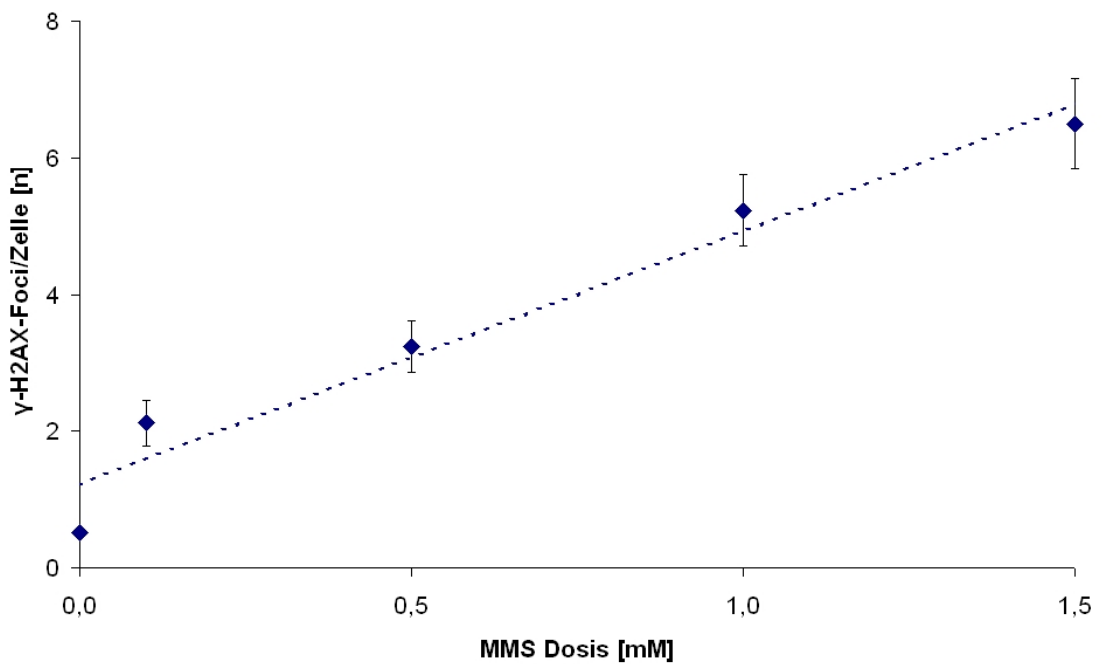


Abb. 5-24: Dosiswirkungskurve für CHO-9 Zellen 1 h nach Ende der einstündigen Pulsbehandlung mit MMS. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM dar.

5.3.2 γ -H2AX-Focus-Bildung nach Einwirken von MMS auf in serumfreiem Medium gehaltene CHO-9-Zellen

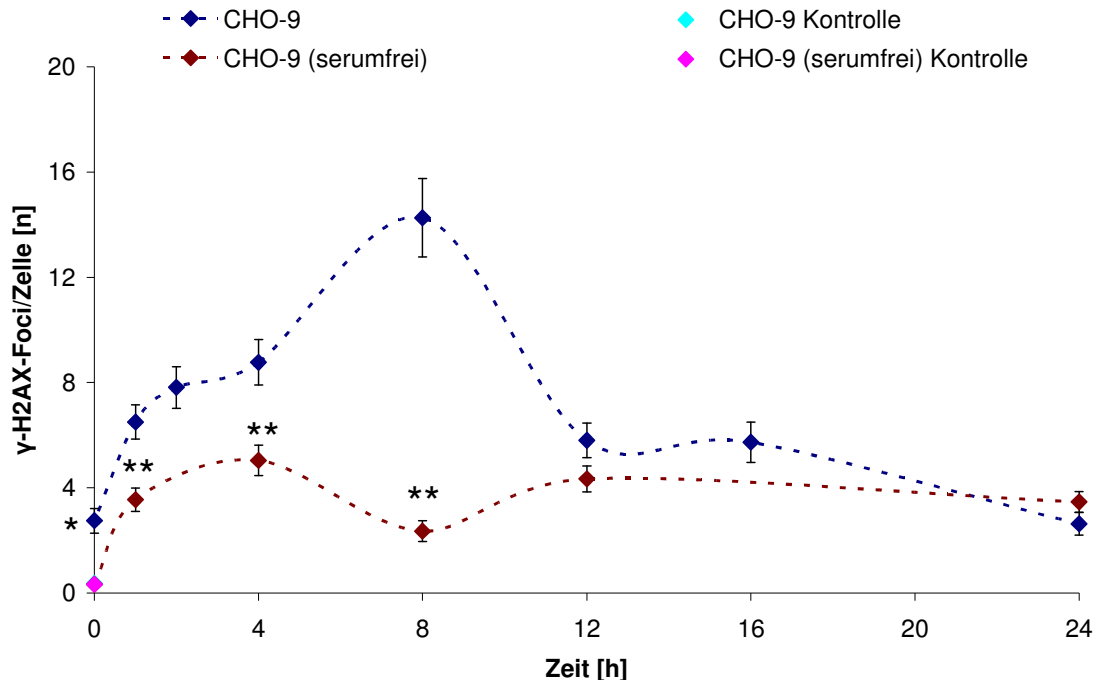


Abb. 5-25: Vergleich der Zeitwirkungskurven von in serumfreiem Medium gehaltenen und exponentiell wachsenden CHO-9 Zellen nach einstündiger Pulsbehandlung mit 1,5 mM MMS; *: der Wert für exponentiell wachsende CHO-9 Zellen sofort nach Beendigung der Pulsbehandlung ist signifikant unterschiedlich zu unbehandelten CHO-9; **: die markierten Werte für in serumfreiem Medium gehaltene CHO-9 Zellen sind signifikant unterschiedlich zu exponentiell wachsenden CHO-9 Zellen. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM dar.

Um zu überprüfen, inwieweit die Bildung von γ -H2AX-Foci nach Einwirken von MMS replikationsabhängig erfolgt, wurden in serumfreiem Medium gehaltene CHO-9-Zellen mit MMS behandelt. Bei diesen Zellen, lässt sich nach Behandlung mit MMS ebenfalls bereits unmittelbar nach Ende der Exposition eine Bildung von γ -H2AX-Foci nachweisen. Diese Anzahl ist jedoch deutlich niedriger als bei exponentiell wachsenden Zellen (siehe Abbildung 5-25). Die Dosis-Wirkungsbeziehung eine Stunde nach Ende der Exposition ist, wie bei exponentiell wachsenden Zellen, linear (siehe Abbildung

5-26), wobei 1 mM MMS (60 min Exposition) durchschnittlich 2,1 γ -H2AX-Foci induziert. Somit ist die Bildung von γ -H2AX-Foci nach Einwirken von MMS replikationsabhängig, diese Replikationsabhängigkeit ist nicht so strikt wie es bei UVC beobachtet wurde.

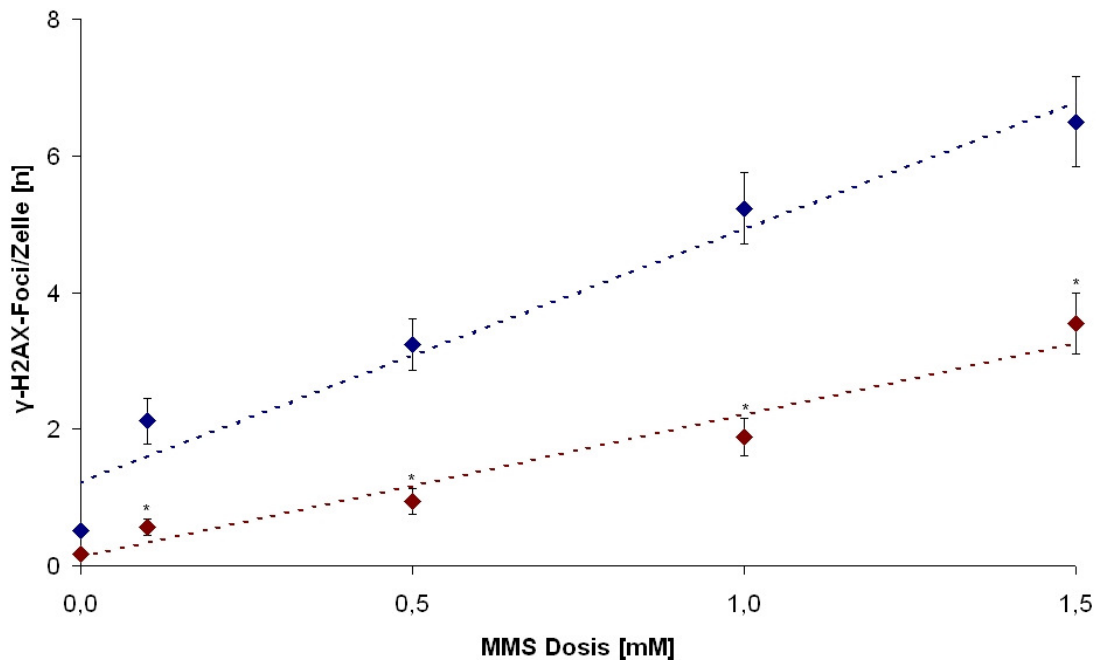


Abb. 5-26: Vergleich der Dosiswirkungskurven 1 h nach Ende der Pulsbehandlung mit MMS; mit * markierte Werte sind signifikant unterschiedlich; blau: exponentiell wachsende CHO-9 Zellen; rot: in serumfreiem Medium gehaltene CHO-9 Zellen. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM dar.

5.4 γ -H2AX-Focus-Bildung nach Einwirken von 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin (MNNG)

5.4.1 γ -H2AX-Focus-Bildung nach Einwirken von MNNG auf exponentiell wachsende CHO-9-Zellen

Für die Untersuchung ob MNNG in der Lage ist die Bildung von γ -H2AX zu induzieren, wurden exponentiell wachsende CHO-9-Zellen mit MNNG behandelt.

Diese zeigen bereits unmittelbar nach Beendigung einer einstündigen Behandlung mit 10 μ M MNNG γ -H2AX-Foci (siehe Abbildung 5-27).

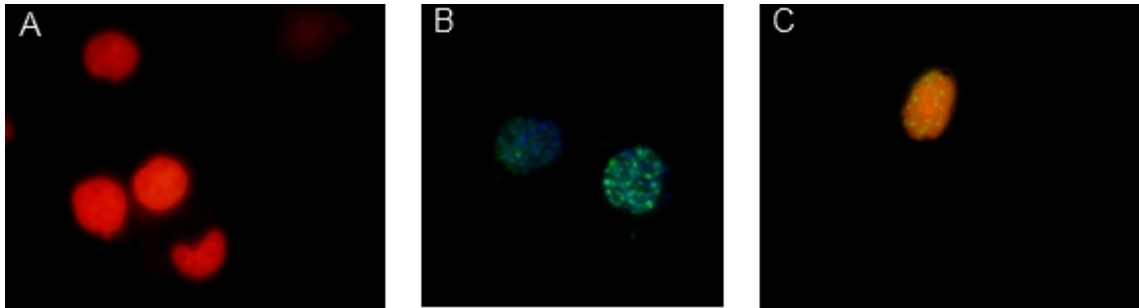


Abb. 5-27: γ -H2AX-Foci nach Behandlung mit MNNG; A: unbehandelte CHO-9 Zellen; B und C: CHO-9 Zellen 1 h nach Ende der Pulsbehandlung mit 10 μ M MNNG (B: Konfokales Laserscanningmikroskop; C: Fluoreszenzmikroskop).

Die Anzahl der Foci erreicht dabei eine Stunde nach Beendigung der Behandlung ein Plateauniveau, auf dem sie einige Stunden verbleibt. Anschließend steigt die Zahl der Foci an, um nach acht Stunden ein Maximum zu erreichen. Über die folgenden sechzehn Stunden sinkt die Zahl der Foci dann wieder ab, erreicht aber auch vierundzwanzig Stunden nach Beendigung der Behandlung nicht das Kontrollniveau (siehe Abbildung 5-28). Eine Stunde nach Beendigung der Behandlung mit MNNG zeigen die Zellen eine dosisabhängige Induktion von γ -H2AX-Foci. Diese Dosis-Wirkungsabhängigkeit ist ganz oder überwiegend durch ein exponentielles Verhältnis beschreibbar. Dabei wird ein Plateau nach Behandlung mit ca. 30 μ M MNNG erreicht, von dem aus die Zahl der Foci auch durch deutliche Erhöhung der Dosis nicht erhöht werden kann (siehe Abbildung 5-29). Die Dosis-Wirkungsbeziehung folgt einer Funktion der Form $F(X)=a+b(1-e^{cx})+d \cdot x$, wobei x hier für die applizierte MNNG-Dosis steht (siehe Tabelle 5-3).

MNNG ist somit in der Lage, γ -H2AX-Foci zu induzieren, wobei die Bildung sättigbar ist. Dies wäre mit der sekundären Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen im Rahmen von Reparatur und/oder Replikation vereinbar.

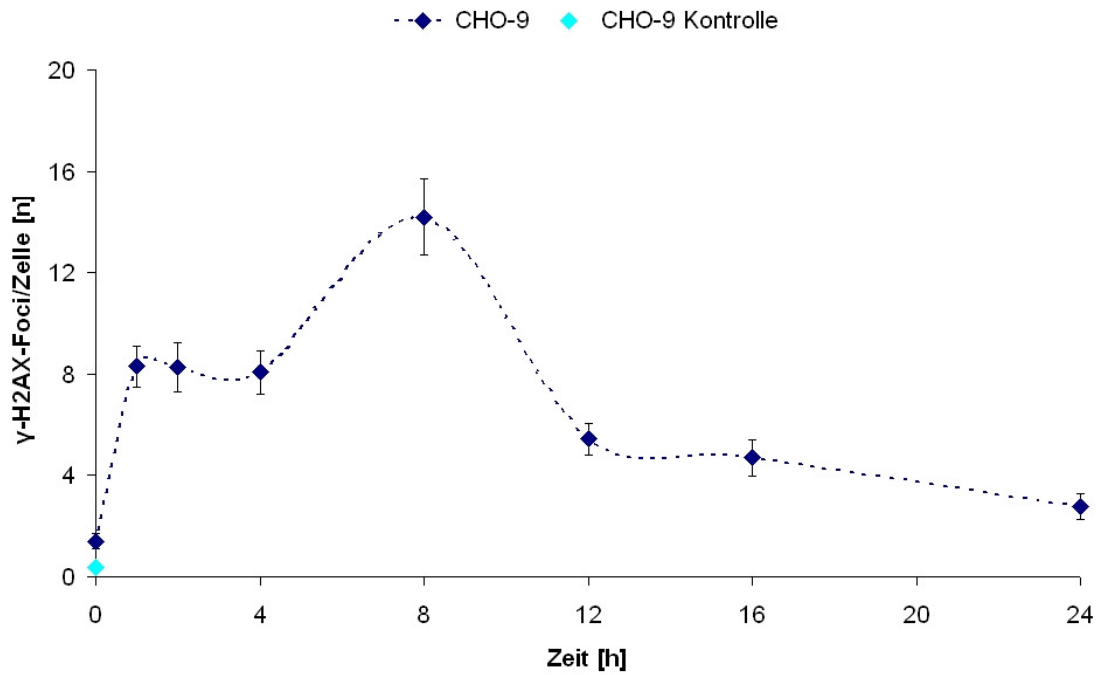


Abb. 5-28: Zeitwirkungskurve für CHO-9 Zellen nach Pulsbehandlung mit 10 μ M MNNG; der Kontrollwert ist für unbehandelte CHO-9 Zellen. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM dar.

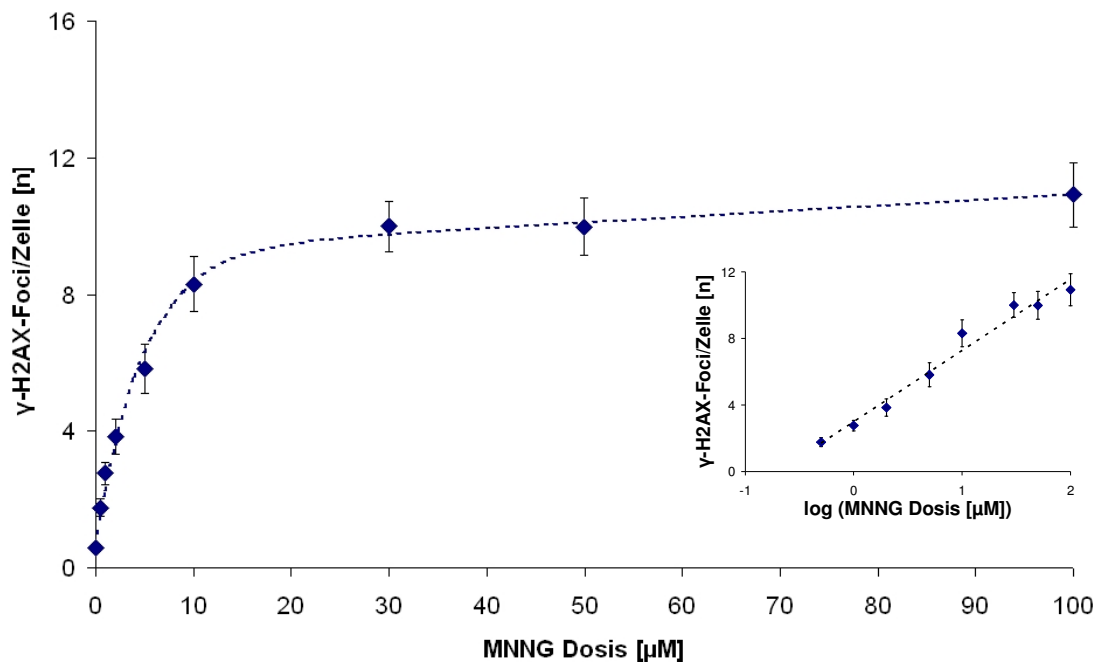


Abb. 5-29: Dosiswirkungskurve für CHO-9 Zellen 1 h nach Ende der Pulsbehandlung mit MNNG. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM dar. Wie im Inset gezeigt, ergibt sich durch halblogarithmische Auftragung (Anzahl der Foci vs. $\log$ [Dosis]) eine Gerade mit einem Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0.97.

5.4.2 γ -H2AX-Focus-Bildung nach Einwirken von MNNG auf in serumfreiem Medium gehaltene CHO-9-Zellen

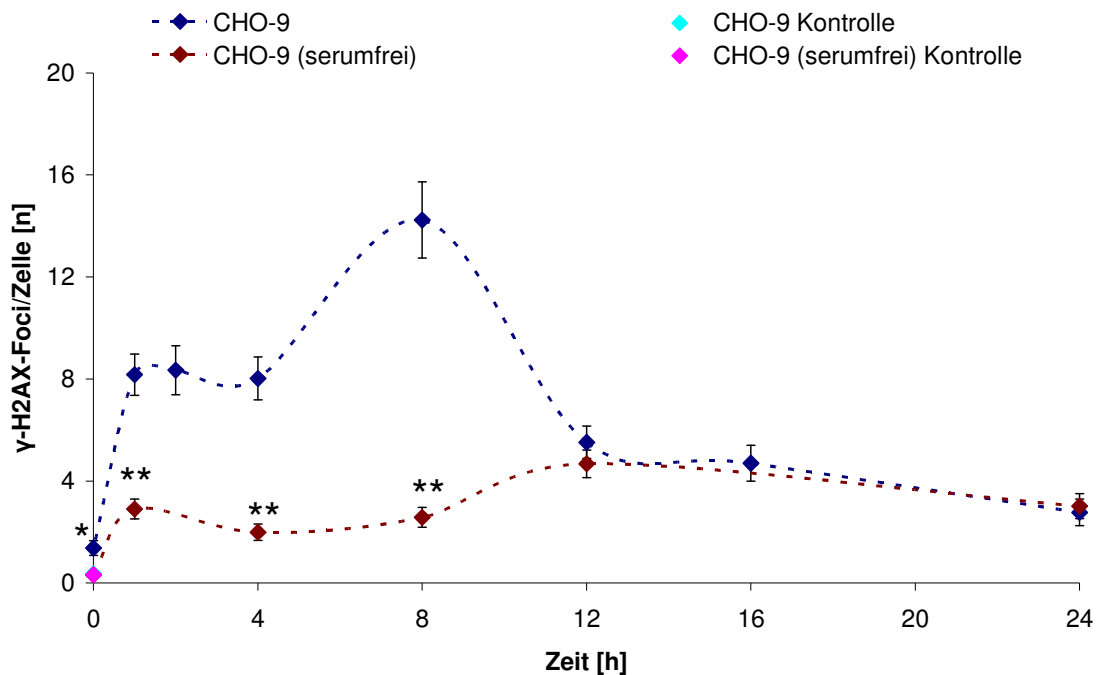


Abb. 5-30: Vergleich der Zeitwirkungskurven von in serumfreiem Medium gehaltenen und exponentiell wachsenden CHO-9 Zellen nach einstündiger Pulsbehandlung mit 10 μ M MNNG; *: der Wert für exponentiell wachsende CHO-9 Zellen sofort nach Beendigung der Pulsbehandlung ist signifikant unterschiedlich zu unbehandelten CHO-9; **: die markierten Werte für in serumfreiem Medium gehaltene CHO-9 Zellen sind signifikant unterschiedlich zu exponentiell wachsenden CHO-9 Zellen. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM dar.

Um den Einfluss von DNA-Replikation auf die Induktion von γ -H2AX-Foci nach Einwirken von MNNG zu untersuchen, wurden in serumfreiem Medium gehaltene CHO-9-Zellen mit MNNG behandelt. Bei CHO-9-Zellen, die in serumfreiem Medium gehalten wurden, induziert die Behandlung mit 10 μ M MNNG bereits eine Stunde nach Beendigung der Behandlung eine Anzahl von γ -H2AX-Foci, die über dem

Kontrollniveau liegt. Über die folgenden vierundzwanzig Stunden zeigt sich keine deutliche Änderung der Anzahl an γ -H2AX-Foci (siehe Abbildung 5-30). Eine Stunde nach Beendigung der Behandlung mit MNNG zeigt sich eine Dosis-Wirkungsabhängigkeit der γ -H2AX-Fociinduktion, die sich ebenfalls durch eine kombinierte exponentielle und lineare Funktion der Form $F(X)=a+b(1-e^{cx})+d \cdot x$ beschreiben lässt (siehe Abbildung 5-31 und Tabelle 5-3). γ -H2AX-Foci werden somit durch MNNG durch einen überwiegend replikationsabhängigen Mechanismus induziert.

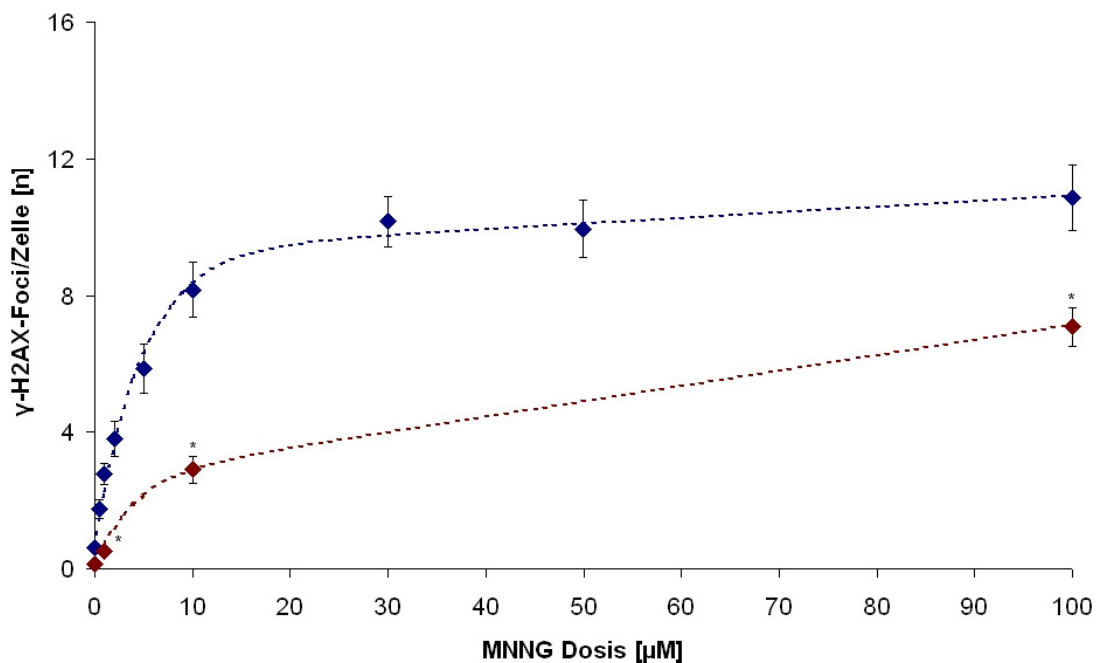


Abb. 5-31: Vergleich der Dosiswirkungskurven 1 h nach Ende der Pulsbehandlung mit MNNG; mit * markierte Werte sind signifikant unterschiedlich; blau: exponentiell wachsende CHO-9 Zellen; rot: in serumfreiem Medium gehaltene CHO-9 Zellen. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM dar.

Dosiswirkungsfunktion $F(X) = a + b(1 - e^{cx}) + d \cdot x$	a	b	c	d
Eine Stunde nach Beendigung der MNNG-Behandlung CHO-9 Zellen	0,60	8,67	-0,21	0,02
Eine Stunde nach Beendigung der MNNG-Behandlung in serumfreiem Mediumgehaltene CHO-9 Zellen	0,14	2,5	-0,25	0,045

Tab. 5-3: Dosiswirkungsfunktionen eine Stunde nach Beendigung der Behandlung von CHO-9 Zellen mit MNNG.

6 Diskussion

6.1 Quantifizierung von durch ionisierende Strahlung verursachten DNA-Doppelstrangbrüchen durch γ -H2AX-Foci

Im Rahmen der Etablierung der Methode zur Bestimmung von γ -H2AX-Foci mittels Immunfluoreszenz in unserem Labor konnte gezeigt werden, dass es eine lineare Abhängigkeit zwischen der Anzahl an γ -H2AX-Foci und der applizierten Dosis an γ -Strahlung gibt. Dabei werden pro 1 Gy Strahlung 33,8 γ -H2AX-Foci induziert. Dies entspricht den bereits zuvor (beispielsweise von Rothkamm und Lobrich, 2003) veröffentlichten Daten für Dosen zwischen 0,001 und 90 Gy ionisierender Strahlung (siehe Abbildung 6-1).

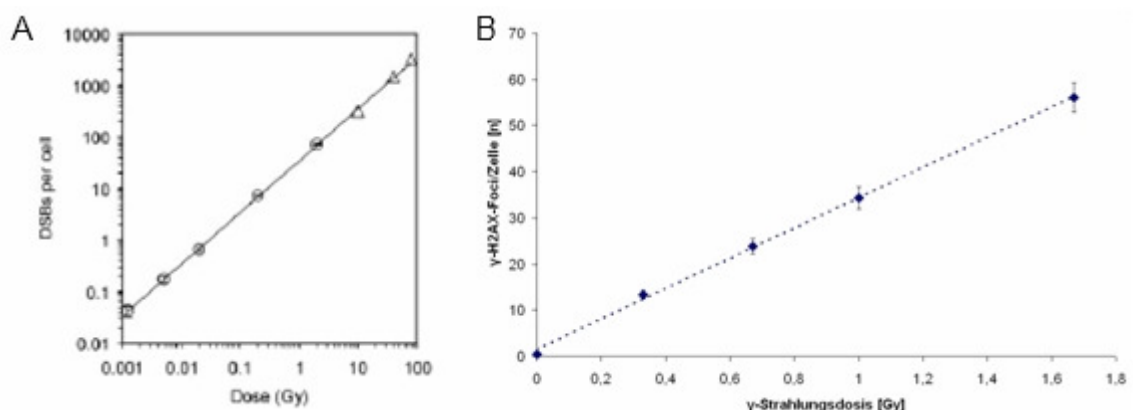


Abb. 6-1: γ -H2AX-Foci nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung; A: Ergebnisse für menschliche Fibroblasten (aus: Rothkamm und Lobrich, 2003); B: eigene Ergebnisse, erhalten nach Bestrahlung von Zellen des Chinesischen Hamsters (Zelllinie CHO-9)

Die Anzahl der induzierten γ -H2AX-Foci ist dabei im Bereich der bei Einwirken von ionisierender Strahlung zu erwartenden Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen (Friedberg *et al.*, 2006). Es ist bekannt, dass γ -H2AX nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung mit Proteinen kolokalisiert ist, die an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt sind (Paull *et al.*, 2000). Bei Versuchen, bei denen

gezielt DNA-Doppelstrangbrüche erzeugt wurden, konnte gezeigt werden, dass sich die γ -H2AX-Foci an diesen Doppelstrangbrüchen bilden [z.B. mit in zelluläre DNA eingebauten ^{125}I -Nukliden (Sedelnikova *et al.*, 2002), mit Bestrahlung durch schwere Ionen (Jakob *et al.*, 2003) und mit UV-A Lasern in Gegenwart von BrdU (Rogakou *et al.*, 1999)]. Daher ist allgemein akzeptiert, dass die Quantifizierung von γ -H2AX-Foci eine sehr sensitive Methode zur Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen nach Einwirken von ionisierender Strahlung darstellt (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004; Jakob *et al.*, 2003; Pilch *et al.*, 2003).

6.2 γ -H2AX-Foci nach Bestrahlung von CHO-Zellen mit ultraviolettem Licht

6.2.1 UVC-Strahlung induziert deutlich mehr γ -H2AX-Foci als durch direkte Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen erklärbar ist

Der zeitliche Verlauf der Induktion von γ -H2AX nach Bestrahlung von CHO-9 Zellen mit UVC (gemessen 8, 16 und 24 Stunden nach Bestrahlung) stimmt mit bereits publizierten Daten über DNA-Doppelstrangbrüche nach UVC-Bestrahlung (Dunkern und Kaina, 2002, siehe Abbildung 6-2) überein. Ähnliche Ergebnisse sind bereits früher für andere Zellsysteme publiziert worden (Kiefer und Feige, 1993; Peak und Peak, 1990). Für die früheren Zeitpunkte lassen sich in der Literatur keine Vergleichszahlen finden. Die frühe Bildung von γ -H2AX-Foci lässt sich nicht wie bei ionisierender Strahlung mit direkter Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen erklären. Zwar kann UV-Strahlung, insbesondere die kurzwellige UVC-Strahlung, DNA sowohl in vitro als auch in vivo fragmentieren, aber die Anzahl von direkt verursachten Strangbrüchen ist bei den hier verwendeten Strahlendosen nicht ausreichend hoch, um die beobachtete Zahl an γ -H2AX-Foci zu erklären (Friedberg *et al.*, 1995; Friedberg *et al.*, 2006). Zudem werden γ -H2AX-Foci auch durch UVB-Strahlung induziert, für welche eine direkte Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen nicht bekannt ist. Für UVB (und UVA) ist allerdings eine indirekte Bildung von DNA-Einzelstrangbrüchen nach UV-induzierter Bildung von Sauerstoffradikalen bekannt (Friedberg *et al.*, 2006). Die hier und in einigen veröffentlichten Studien (Limoli *et al.*, 2002a; Ward und Chen, 2001)

gezeigte Induktion von γ -H2AX nach Einwirken von UV-Strahlung auf Säugerzellen kann daher nicht durch direkte Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen erklärt werden. Wie im Folgenden erläutert wird lässt sich diese Induktion von γ -H2AX-Foci allerdings durch die Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen an arretierten Replikationsgabeln erklären.

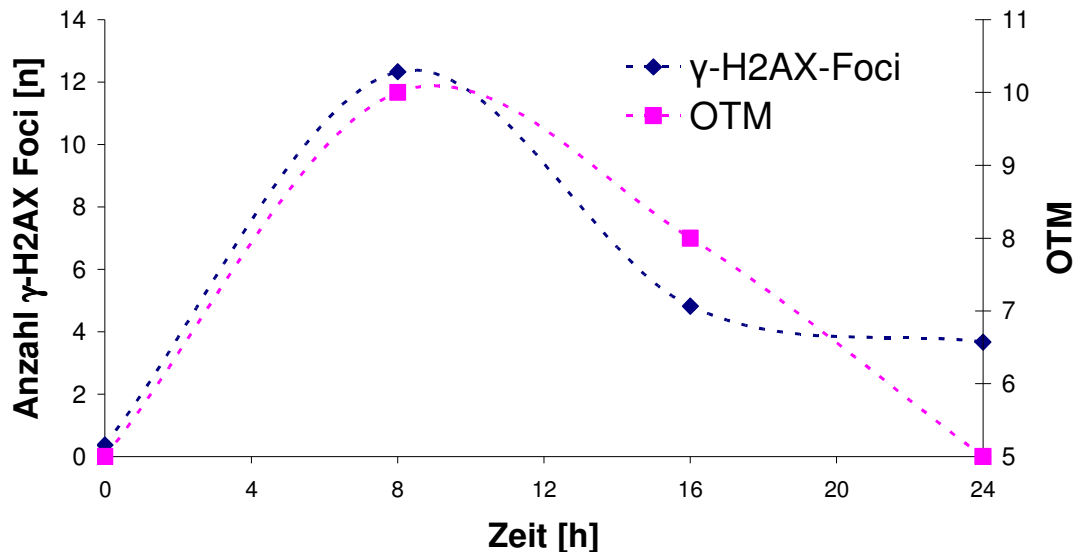


Abb. 6-2: Zeitlicher Verlauf von γ -H2AX-Foci und DNA-Doppelstrangbrüchen nach Einwirkung von UVC auf CHO-9-Zellen. blau: eigene Daten nach 20 J/m² UVC (siehe auch Abb. 5-4), pink: Daten für neutralen Comet-Assay nach 10 J/m² UVC (aus Dunkern und Kaina, 2002).

6.2.2 DNA-Doppelstrangbrüche können an blockierten Replikationsgabeln entstehen

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, können DNA-Doppelstrangbrüche entstehen, wenn eine aktive Replikationsgabel auf eine Läsion trifft, die die weitere DNA-Synthese verhindert. Dabei können die meisten derartiger Blockaden durch verschiedene Mechanismen umgangen werden, zu diesen Mechanismen (Friedberg *et al.*, 2006). Zu solchen Mechanismen gehören die Transläsionssynthese (Friedberg *et al.*, 2006) sowie sekundäre Umgehungsmechanismen („secondary bypass mechanisms“). In Zellen mit funktionslosem p53, wie den hier verwendeten CHO-Zelllinien (Dunkern und Kaina, 2002; Orren *et al.*, 1995), ist letzterer Vorgang eingeschränkt (Cleaver, 2002; McGregor, 1999). Gleichzeitig ist in p53-defizienten Zellen die Stabilität von

blockierten Replikationsgabeln reduziert. Dabei treten in Abwesenheit von p53 an arretierten Replikationsgabeln gehäuft DNA-Doppelstrangbrüche auf. Dieser Effekt ist deutlich verstärkt in Zellen mit eingeschränkter Kapazität für die Reparatur der blockierenden Läsionen (Squires *et al.*, 2004).

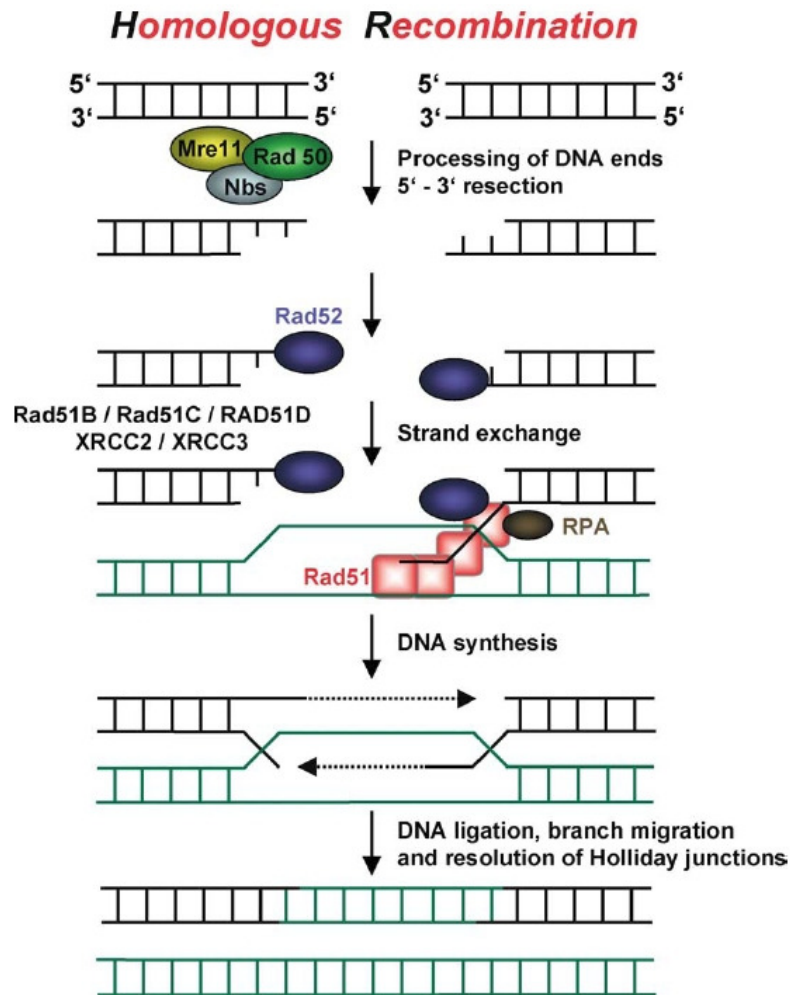


Abb. 6-3: Bildung und Auflösung einer Holliday-Struktur im Rahmen der homologen Rekombination (aus: Christmann *et al.*, 2003)

Trifft die Replikationsgabel auf eine Läsion, die die Form der DNA stark beeinträchtigt und dadurch die Replikation verhindert (beispielsweise durch UVC-induzierte CPDs und/oder 6-4 PPs), so wird die Replikationsgabel zunächst arretiert. Wird die entsprechende Läsion weder repariert noch durch Transläsionssynthese oder andere Umgehungsmechanismen umgangen, so kann es zur Bildung einer so genannten „chicken foot“ Struktur, einer Sonderform der als Zwischenschritt der homologen Rekombination entstehenden Holliday-Struktur kommen (Postow *et al.*, 2001; Robu *et*

al., 2004). Holliday-Strukturen entstehen während der homologen Rekombination, wenn es nach einer initialen Inzision in den beteiligten Strängen und einer folgenden Ligation zu einer Überkreuzung der homologen DNA-Stränge kommt (Lehninger *et al.*, 1993, siehe Abbildung 6-3). Im Falle der als „chicken foot“ beschriebenen Sonderform der Holliday-Struktur entsteht die Kreuzung nicht unter Beteiligung zweier DNA-Stränge, sondern durch Regression der Replikationsgabel und Ligation der beiden neusynthetisierten DNA-Stränge miteinander (Postow *et al.*, 2001, siehe Abbildung 6-4).

Eine solche „chicken-foot“-Struktur kann durch Reparatur der blockierenden Läsion aufgelöst werden und eine Wiederaufnahme der Replikation ermöglichen (Friedberg *et al.*, 2006). Geschieht dies nicht, so kann diese Struktur unter Erzeugung eines DNA-Doppelstrangbruches aufgelöst (McGlynn und Lloyd, 2002, siehe Abbildung 6-5) und nachfolgend die weitere DNA-Synthese durch homologe Rekombination mit dem komplementären Schwesterchromatid repariert werden (Rodriguez-Reyes und Morales-Ramirez, 2003; Sonoda *et al.*, 1999). Die dabei entstehenden DNA-Doppelstrangbrüche wiederum führen wahrscheinlich zu der beobachteten Phosphorylierung von H2AX zu γ -H2AX und zur nachfolgenden Rekrutierung des für die Doppelstrangbruchreparatur notwendigen RAD50/MRE11/NBS1 Komplexes (Furuta *et al.*, 2003).

Eine weitere in der Literatur diskutierte Möglichkeit für die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen verläuft ohne den oben beschriebenen Kollaps von „chicken-foot“-Strukturen. Je länger eine Replikationsgabel blockiert bleibt, desto eher ist sie Angriffen von Endo- und Exonukleasen ausgesetzt, die direkt zu Bildung eines DNA-Doppelstrangbruchs führen können, indem sie die an der Replikationsgabel vorliegenden DNA-Einzelstränge denaturieren (siehe Abb. 6-6). In *E. coli* wird dies u. a. durch den RuvABC Komplex verursacht, für Eukaryonten sind spezifische hierfür verantwortliche Nukleasen nicht identifiziert (Hyrien, 2000; Michel *et al.*, 1997; Scully *et al.*, 2000) .

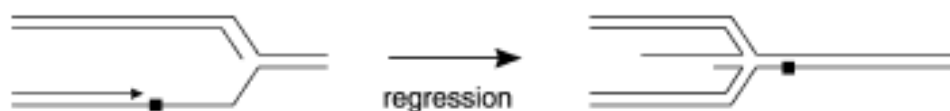


Abb. 6-4: Bildung einer „chicken foot“ Struktur an einer arretierten Replikationsgabel; rot: blockierende Läsion (aus: Cox, 2002)

In Anbetracht der oben zitierten Ergebnisse können die in dieser Arbeit erhaltenen Daten wie folgt interpretiert werden: Die beobachteten γ -H2AX-Foci nach Bestrahlung mit UV-Licht, vor allem die früh beobachteten Maxima, stimmen mit DNA-Doppelstrangbrüchen überein, die nach dem oben dargestellten Mechanismus durch Kollaps von arretierten Replikationsgabeln entstehen. Dies wird unterstützt durch die weiter unten ausgeführten Beobachtungen, dass die γ -H2AX-Induktion streng replikationsabhängig ist, dass Agenzien, die Replikationsgabeln arretieren ohne DNA-Schäden zu verursachen (beispielsweise Hydroxyharnstoff oder Aphidicolin), ebenfalls zur Bildung von γ -H2AX-Foci führen und dass Zellen, die arretierte Replikationsgabeln nicht oder nur eingeschränkt reparieren können mehr γ -H2AX-Foci aufweisen.

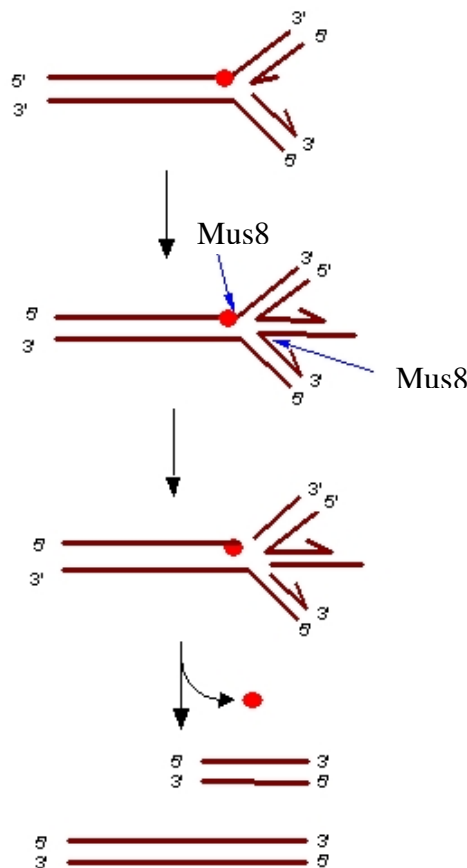


Abb. 6-5: Bildung eines DNA-Doppelstrangbruches an einer arretierten Replikationsgabel; die „chicken foot“ Struktur wird durch Wirkung einer Endonukleaseaktivität aufgelöst (in *E. coli* RecAB, in Eukaryonten Mus81); rot: blockierende Läsion (nach: Branzei und Foiani, 2005; Friedberg *et al.*, 2006)

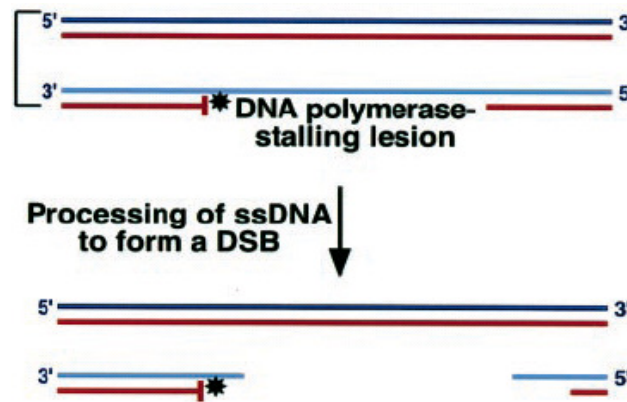


Abb. 6-6: Bildung eines DNA-Doppelstrangbruchs an einer die Replikation blockierenden Läsion; die an der Replikationsgabel vorliegenden DNA-Einzelstränge werden durch Nukleasen abgebaut (aus: Scully *et al.*, 2000).

6.2.3 γ -H2AX-Foci entstehen nach UV-Bestrahlung replikationsabhängig und sind an blockierten Replikationsgabeln nachweisbar

Exponentiell wachsende CHO-9 Zellen haben eine Generationszeit von 12-14 Stunden (Burki und Aebersold, 1978; Tomicic, 2001), wobei die S-Phase etwa 50% der Generationszeit einnimmt (Burki und Aebersold, 1978). Somit befinden sich in nicht synchronisierten, exponentiell wachsenden CHO-9-Zellkulturen zu jedem Zeitpunkt ca. 50% der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus. Dies entspricht auch dem Anteil der Zellen, die bei dem früh auftretenden Maximum γ -H2AX-Foci aufweisen (siehe Abbildung 5-17). Dies deutet bereits auf eine Replikationsabhängigkeit der Bildung von γ -H2AX-Foci hin. Auch weist die sättigbare Dosis-Wirkungsbeziehung (siehe Abbildungen 5-5 und 5-6) auf eine endliche Anzahl möglicher Schädigungsstellen hin, wie dies bei einer Beteiligung der aktiven Replikationsgabeln zu erwarten wäre. Wie bereits sowohl in unserem Labor (Dunkern und Kaina, 2002, siehe Abbildung 6-7) als auch von anderen Gruppen (Orren *et al.*, 1995) gezeigt wurde, lässt sich die Replikation von CHO-Zellen beinahe vollständig unterdrücken, indem diese Zellen für mehr als 48 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert werden. Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, induzieren selbst hohe Dosen an UVC eine Stunde nach Bestrahlung in solchen Zellen keine γ -H2AX-Foci (siehe Abbildungen 5-8 und 5-9), so

dass für diesen Zeitpunkt von einer strengen Replikationsabhängigkeit der γ -H2AX-Induktion ausgegangen werden kann.

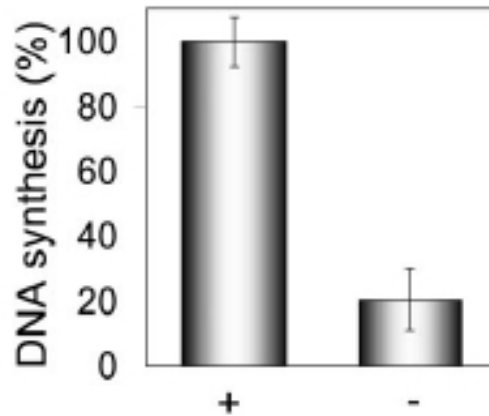


Abb. 6-7: DNA-Synthese in CHO-Zellen in unterschiedlichen Kulturmedien; +: mit 10 % Serum; - ohne Serum (aus: Dunkern und Kaina, 2002)

Wie bereits für die auf Replikationsgabeln inhibitorisch wirkenden Stoffe Hydroxyharnstoff und Aphidicolin publiziert wurde, erhöht die direkte Blockade von Replikationsgabeln die Anzahl an induzierten γ -H2AX-Foci (Kurose *et al.*, 2006a; Kurose *et al.*, 2006b; Liu *et al.*, 2003). Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit für Aphidicolin bestätigt werden. Gleichzeitig reduziert die Inhibition der DNA-Synthese durch Aphidicolin die Anzahl an durch UVC induzierbaren γ -H2AX-Foci (siehe Abbildung 5-18).

6.2.4 Eingeschränkte Reparatur führt zu höherer Induktion von γ -H2AX-Foci

Einer der Mechanismen, mit denen „chicken foot“-Strukturen an blockierenden Läsionen repariert werden können, verwendet das Heterodimer ERCC1/XPF. Dieser Enzymkomplex ist sowohl zur Entfernung von Läsionen, die der NER unterliegen (Araujo und Wood, 1999; Park und Choi, 2006), als auch zur Auflösung von Interstrangvernetzungen notwendig (Niedernhofer *et al.*, 2004). Dabei wird die Läsion wie in Abbildung 6-8 gezeigt unter Beteiligung von ERCC1/XPF exzidiert und eine Wiederaufnahme der DNA-Synthese ermöglicht (Friedberg *et al.*, 2006). Dadurch wird die Auflösung der „chicken-foot“-Struktur durch Einfügen von Doppelstrangbrüchen

vermieden. Wie gezeigt werden konnte, nimmt die Anzahl an nachweisbaren γ -H2AX-Foci bei ERCC1-defizienten CHO-43-3B-Zellen direkt nach UVC-Exposition ebenso rapide oder sogar stärker zu wie bei CHO-9-Zellen; einen Abfall der γ -H2AX-Foci-Anzahl kann man jedoch auch innerhalb von 24 Stunden nicht beobachten. Der gezeigte deutliche Anstieg nach 24 Stunden ist wahrscheinlich das Resultat der etwa 20 Stunden nach UVC Bestrahlung einsetzenden Apoptose (Dunkern und Kaina, 2002; Orren *et al.*, 1997) in den behandelten Zellen, die, wie bereits publiziert wurde, ebenfalls zur Bildung von γ -H2AX-Foci führt (Lu *et al.*, 2006; Rogakou *et al.*, 2000).

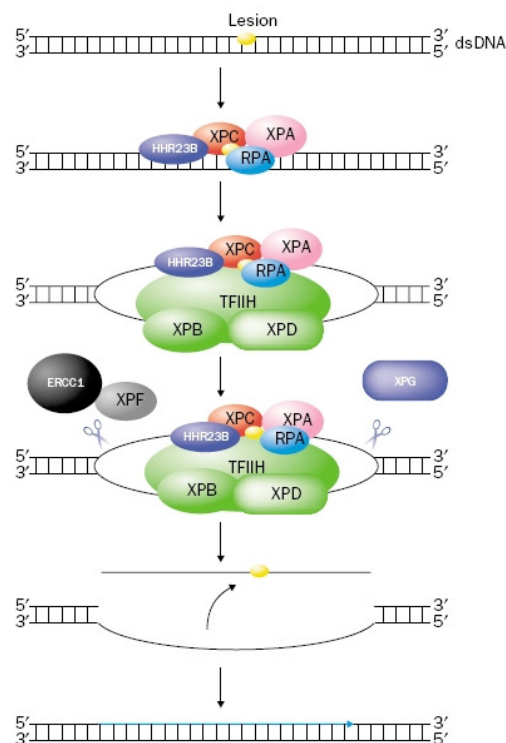


Abb. 6-8: Exzision einer Läsion unter Beteiligung des ERCC1/XPF Komplexes (aus: McHugh *et al.*, 2001)

6.2.5 Die späte Induktion von γ -H2AX-Foci nach UV-Bestrahlung ist durch Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen erklärbar

Auch der zeitlich gestreckte zweite Anstieg der Anzahl an γ -H2AX-Foci in CHO-9-Zellen lässt sich durch den in Kapitel 6.2.2 dargestellten Mechanismus erklären. Nach Exposition mit UVC erfahren CHO-Zellen für etwa 6-8 Stunden einen G₁-Arrest (Orren *et al.*, 1995); und auch in Zellen, die bereits in der S-Phase sind, wird die Initiation der Replikation für einige Stunden reduziert (Orren *et al.*, 1995; Orren *et al.*, 1997). Der in

Abbildung 5-4 dargestellte zeitliche Verlauf der γ -H2AX-Induktion lässt sich daher damit erklären, dass zunächst γ -H2AX-Foci nur in Zellen induziert werden, in denen zum Zeitpunkt der Exposition aktive Replikationsgabeln auf blockierende Läsionen treffen. Die danach folgende Pause von ca. 6 Stunden, während der durch Reparatur die entstandenen Läsionen des ersten Maximums teilweise repariert werden und keine neuen Läsionen hinzukommen, lässt sich durch den oben erwähnten Zellzyklusarrest erklären. Im Anschluss daran gehen auch Zellen mit noch nicht reparierten UVC-induzierten Läsionen in die S-Phase, bzw. nehmen die DNA-Replikation wieder auf (Orren *et al.*, 1995), wodurch es wahrscheinlich zu dem zweiten Maximum kommt. Gleichzeitig nehmen auch nicht replikationsabhängige γ -H2AX-Foci zu.

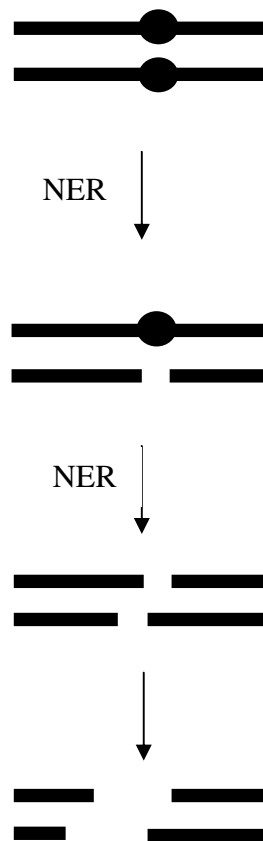


Abb. 6-9: Bildung eines DNA-Doppelstrangbruchs an überlappenden Einzelstrangbrüchen (nach: Friedberg *et al.*, 2006; Theron *et al.*, 2005).

Diese entstehen in einem geringeren Umfang als die replikationsabhängigen γ -H2AX-Foci. Als Erklärung hierfür können Doppelstrangbrüche, die ähnlich wie bei der Replikation durch blockierte Transkriptionsstellen entstehen, dienen (Theron *et al.*,

2005). Gleichzeitig kann auch die NER an Stellen, an denen auf den beiden Strängen der DNA eng benachbart Läsionen vorliegen, bei dem Versuch der Reparatur DNA-Doppelstrangbrüche einfügen (Friedberg *et al.*, 2006). Dies geschieht, wenn durch NER Einzelstrangbrüche in überlappenden Stellen auf den beiden DNA-Strängen eingefügt werden und somit die Stabilität der DNA-Doppelhelix zerstört wird (siehe Abbildung 6-9). Insbesondere letzterer Mechanismus führt umso häufiger zu Doppelstrangbrüchen, je mehr Läsionen in der DNA vorhanden sind, da dann die Wahrscheinlichkeit direkt benachbarter Läsionen auf beiden DNA-Strängen steigt. Dies führt dazu, dass neben der sättigbaren Dosis-Wirkungsbeziehung der replikationsabhängigen Komponente hier auch eine Komponente nachzuweisen ist, die nicht sättigbar ist (siehe Abbildung 5-6).

6.2.6 Zellzykluskontrolle und Reparaturkompetenz beeinflussen die Induktion von γ -H2AX-Foci

Die hier beschriebenen Ergebnisse spielen offensichtlich insbesondere in Zelllinien eine Rolle, in denen entweder die Zellzykluskontrolle, insbesondere durch Mutation von p53, eingeschränkt oder die NER beeinträchtigt ist. So gibt es Berichte über γ -H2AX-Foci nach Einwirken von UV-Strahlung insbesondere für diverse Xeroderma Pigmentosum Varianten (XP A-G), bei denen verschiedene Bestandteile des NER-Systems beeinträchtigt sind (Limoli *et al.*, 2002a; Limoli *et al.*, 2002b). Darüber hinaus gibt es entsprechende Untersuchungen aus Zellsystemen, in denen p53 entweder mutiert oder in seiner Funktion eingeschränkt ist (Cleaver, 2002; Liu und Chen, 2006; Rappold *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2006). In anderen Zellsystemen ist die Induktion von γ -H2AX-Foci nach Einwirken von UVC nicht so ausgeprägt, wird aber ebenfalls berichtet (Halicka *et al.*, 2005). Hier kommt stattdessen offensichtlich eine andere Funktion von γ -H2AX stärker zum Tragen.

Neben der Bildung von nukleären Foci nach Ausbildung von DNA-Doppelstrangbrüchen kann H2AX auch diffus im Nukleus phosphoryliert werden, wenn andere Läsionen vorliegen. In diesem Fall zeigen Immunfluoreszenzverfahren statt der diskreten Foci eine diffuse Anfärbung des Zellkerns, welche nicht ATM abhängig ist und vor allem in der G₁-Phase des Zellzyklus nachweisbar ist (Marti *et al.*, 2006). Durch die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Kernfärbung mit Propidiumiodid und die verwendete Wellenlänge im Fluoreszenzmikroskop war eine derartige diffuse

nukleäre Färbung hier nicht darstellbar. Anders als die oben beschriebene, ATM-unabhängige, diffuse nukleäre Induktion von γ -H2AX, ist die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene Induktion von γ -H2AX-Foci ATM-abhängig. Dies konnte dadurch gezeigt werden, dass die Induktion von γ -H2AX-Foci durch Zugabe des ATM/ATR-Inhibitors Coffein unterdrückt werden konnte (siehe Abbildungen 5-19 und 6-10).

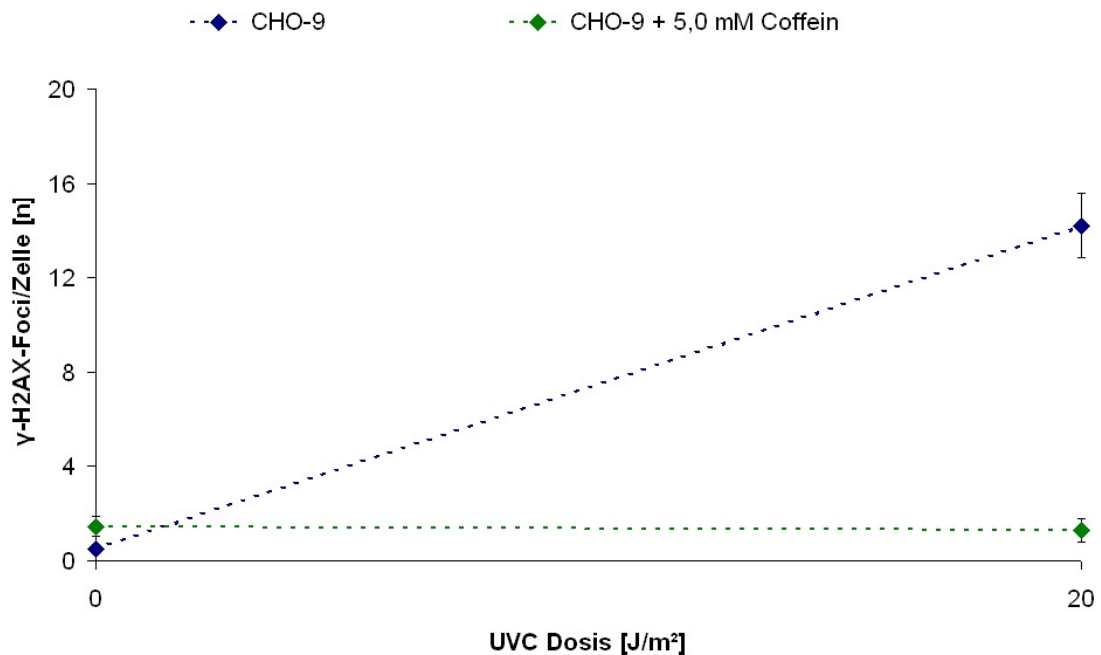


Abb. 6-10: Coffein unterdrückt die UV-abhängige Induktion von γ -H2AX-Foci in CHO-9 Zellen(eigen Daten, siehe auch Abb. 5-19)

6.3 γ -H2AX-Foci nach Einwirken von Methylmethansulfonat auf CHO-Zellen

Nach Behandlung von CHO-Zellen mit MMS werden γ -H2AX-Foci induziert. Die Anzahl dieser γ -H2AX-Foci ist proportional zu der verwendeten Dosis an MMS und ist teilweise replikationsabhängig (siehe Abbildung 5-26). MMS verursacht $3,7 \pm 0,5$ (Mittelwert $\pm$ SEM) γ -H2AX-Foci pro 1 mM. Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass MMS zu unterschiedlichen Arten von Läsionen führt, welche teilweise direkt, teilweise replikationsabhängig zu DNA-Doppelstrangbrüchen führen.

MMS verursacht, wie bereits in der Einleitung zu dieser Arbeit dargestellt, vor allem N-Alkylierungen an DNA-Basen (Friedberg *et al.*, 1995; Kaina *et al.*, 1993). Diese Läsionen können, wenn sie nicht zuvor repariert werden, die DNA-Replikation sterisch

behindern und zur Blockade von Replikationsgabeln führen (Friedberg *et al.*, 2006; Kaina *et al.*, 1997; Kaina, 2004). Analog zu den Vorgängen bei durch UV-induzierte Läsionen arretierten Replikationsgabeln (siehe oben) kann die sterische Blockade durch N-alkylierte Basen ebenfalls zu DNA-Doppelstrangbrüchen führen (Kaina, 2004). Da dieser Mechanismus nicht ohne Einwirken des Replikationsapparates zu Doppelstrangbrüchen führt, lässt sich damit die (teilweise) Replikationsabhängigkeit der beobachteten γ -H2AX-Foci erklären.

Die durch MMS verursachten Läsionen werden durch den BER-Mechanismus repariert (Christmann *et al.*, 2003; Friedberg *et al.*, 2006). Dabei wird, wie in der Einleitung zu dieser Arbeit beschrieben, die geschädigte Base entfernt und eine abasische Stelle in dem betreffenden DNA-Strang erzeugt, welche in weiteren Schritten repariert wird. Erfolgt diese Reparatur der abasischen Stelle nicht, so kann diese durch Ringöffnung der Desoxyribose zu einem DNA-Einzelstrangbruch führen (Friedberg *et al.*, 2006).

Trifft eine Replikationsgabel auf einen nicht reparierten DNA-Einzelstrangbruch (der als Intermediat während einer Exzisionsreparatur auftreten kann) oder eine andere blockierende Läsion, so kann diese Replikationsgabel, wie in Abbildung 6-11 dargestellt, kollabieren, was zu einem DNA-Doppelstrangbruch führt (Friedberg *et al.*, 2006; Kuzminov, 2001).

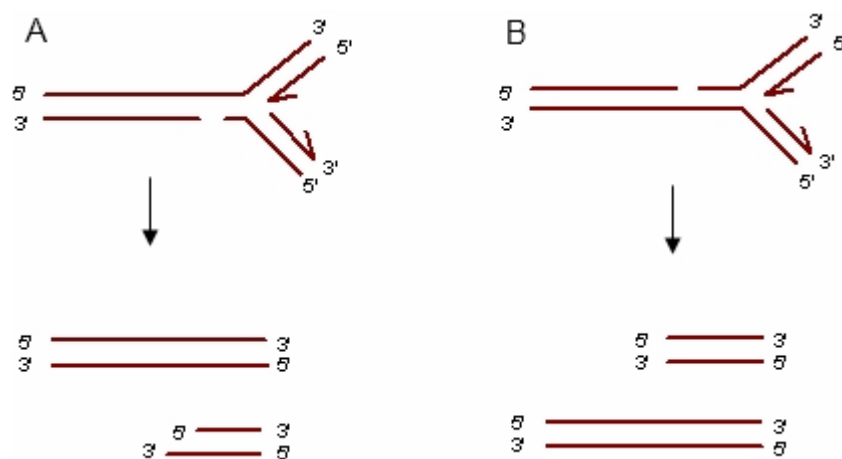


Abb. 6-11: Kollaps einer Replikationsgabel an einem DNA-Einzelstrangbruch (nach: Friedberg *et al.*, 2006); A: Einzelstrangbruch am Verzögerungsstrang; B: Einzelstrangbruch am Führungsstrang

Die Bildung von reparaturabhängigen Einzelstrangbrüchen ist in CHO-Zellen bereits unmittelbar nach Beendigung der MMS-Exposition nachweisbar. Sie ist 4 Stunden

danach stark ausgeprägt und kann auch in unmittelbarer räumlicher Beziehung zu Replikationsgabeln nachgewiesen werden (Nikiforov *et al.*, 2004). Wie von Pascucci *et al.*, 2005 beschrieben wurde, entstehen aus solchen reparaturabhängigen DNA-Einzelstrangbrüchen, wenn sie nicht zuvor repariert wurden, während der Replikation DNA-Doppelstrangbrüche. Der replikationsabhängige Anteil an den im Rahmen dieser Arbeit beobachteten γ -H2AX-Foci lässt sich durch DNA-Doppelstrangbrüche erklären, die auf dem hier beschriebenen Weg entstanden sind.

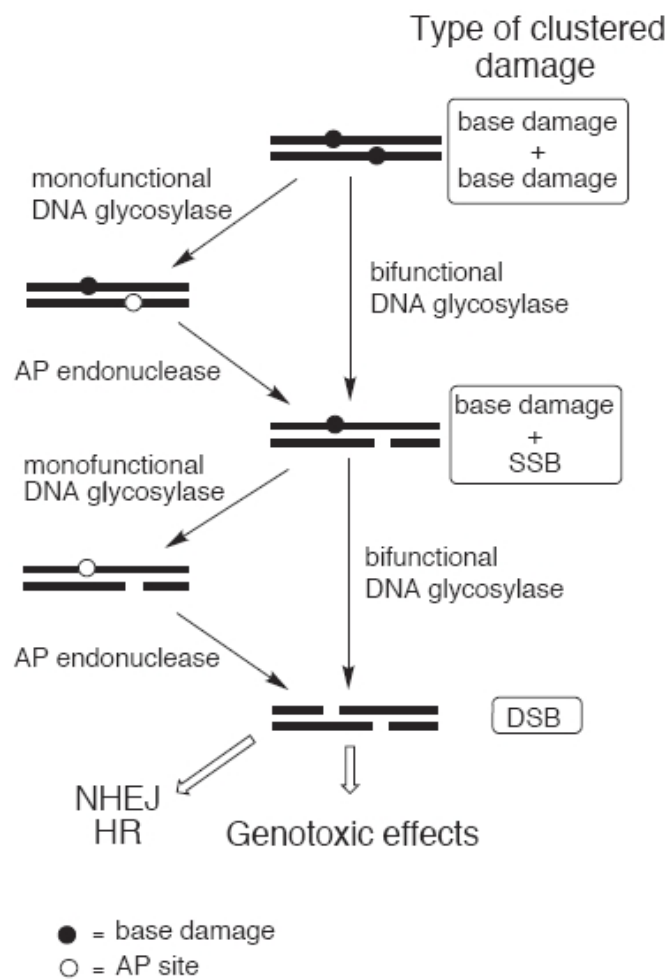


Abb. 6-12: Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen aus anderen einander benachbarten Läsionen (aus: Terato und Ide, 2004)

Neben den oben dargestellten replikationsabhängigen Mechanismen können MMS-induzierte Läsionen auch replikationsunabhängig DNA-Doppelstrangbrüche verursachen. Da wie oben erwähnt im Rahmen von Reparaturvorgängen intermediär DNA-Einzelstrangbrüche verursacht werden. Wenn mehrere Läsionen auf beiden DNA-

Strängen vorliegen, so können mehrere Exzisionsschritte zur Bildung von überlappenden DNA-Einzelstrangbrüchen führen, den Zusammenhalt des gesamten Strangs kompromittieren und zur Bildung eines DNA-Doppelstrangbruches führen kann (Coquerelle *et al.*, 1995; Friedberg *et al.*, 2006, siehe Abbildung 6-12). Auf diese Weise lassen sich auch die bei nichtproliferierenden Zellen nachweisbaren γ -H2AX-Foci erklären.

6.4 γ -H2AX-Foci nach Einwirken von N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine auf CHO-Zellen

Auch nach Exposition von CHO-Zellen mit MNNG lassen sich bereits kurz nach Beendigung der Exposition γ -H2AX-Foci nachweisen. Bei den hier verwendeten Konzentrationen von MNNG zeigt sich dabei eine dosisabhängige, sättigbare Dosiswirkungsbeziehung (siehe Abbildung 5-29). Dies ließe sich dadurch erklären, dass MNNG hauptsächlich nach Aktivierung durch zelluläre Thiole wirkt (Friedberg *et al.*, 2006), wie in der Einleitung zu dieser Arbeit beschrieben. Im zeitlichen Verlauf verhalten sich die MNNG-induzierten γ -H2AX-Foci ähnlich wie die durch MMS induzierten (siehe Abbildungen 5-25 und 5-28).

Die wichtigste mutagene Läsion, die durch MNNG induziert wird, stellt das O⁶-Methylguanin (O⁶-Meg) dar. Diese Läsion kann, wie in Kapitel 2 beschrieben, durch das Reparaturprotein MGMT zu Guanin demethyliert und damit repariert werden (Kaina und Christmann, 2002). Geschieht dies nicht, so kann O⁶-Meg im Rahmen der DNA-Replikation mit T fehlpaaren (siehe Abbildung 6-13). Diese Fehlpaarung unterliegt den Mechanismen der Fehlpaarungsreparatur (MMR). O⁶-Methylguanin verursacht dabei fehlerhafte MMR-Zyklen, bei denen statt des O⁶-Meg das fehlerhaft eingebaute T entfernt und wieder eingefügt wird (Drablos *et al.*, 2004; Kaina, 1998). Nach mehreren derartigen Zyklen kann es dann zur Bildung von Einzelstrangbrüchen kommen (Friedberg *et al.*, 2006; Kaina, 2004). Diese wiederum können wie oben beschrieben Ursache von DNA-Doppelstrangbrüchen sein, wobei diese sehr wahrscheinlich replikationsabhängig entstehen (Roos *et al.*, 2004).

Die mutagene und toxische Wirkung von MNNG ist im zweiten auf die Exposition folgenden Zellzyklus deutlich ausgeprägter als in dem Zyklus, in dem die Exposition erfolgt (Kaina und Aurich, 1985; Kaina *et al.*, 1993). Durch MNNG induzierte γ -H2AX-Foci lassen sich allerdings bereits kurz nach Beendigung der einstündigen

MNNG-Exposition nachweisen (siehe Abbildung 5-28, Stojic *et al.*, 2004). Diese γ -H2AX-Foci lassen sich mit durch oben dargestellte Mechanismen verursachten DNA-Doppelstrangbrüchen erklären.

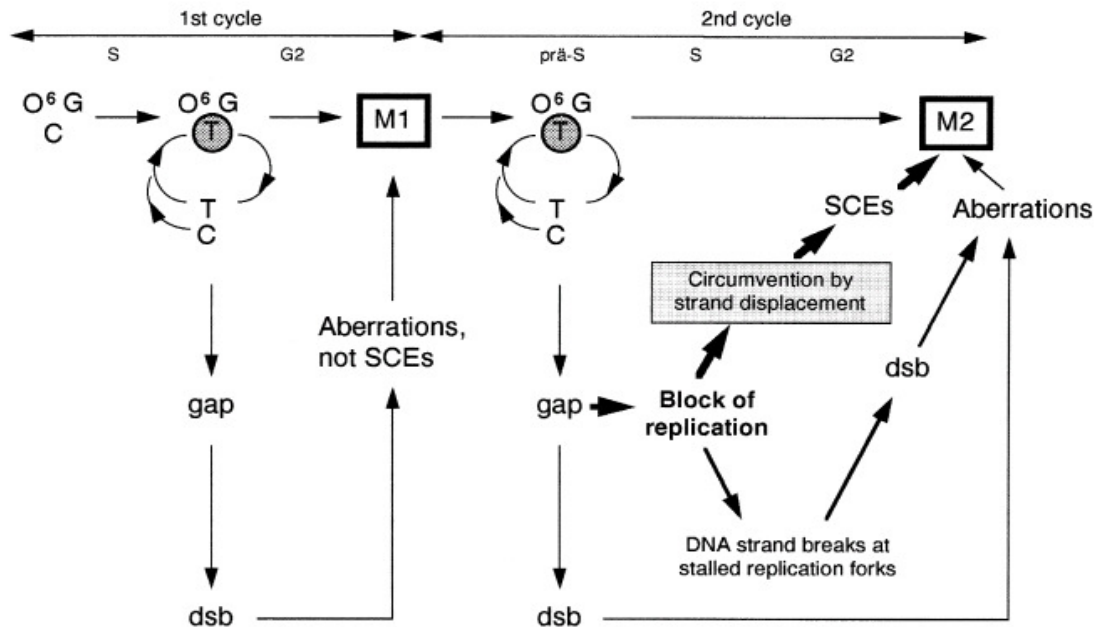


Abb. 6-13: Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen (dsb) als Folge von wiederholten MMR-Zyklen nach Bildung von O⁶-MeG durch MNNG. Dies geschieht replikationsabhängig und hauptsächlich im zweiten auf die Exposition folgenden Zellzyklus (aus: Kaina *et al.*, 1997)

6.5 Abschließende Bewertung

Die Darstellung von γ -H2AX-Foci eignet sich zur Darstellung von DNA-Schäden nach Einwirken verschiedener genotoxischer Agentien. Wie im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden konnte, induziert ionisierende Strahlung γ -H2AX-Foci in einem der applizierten Dosis proportionalen Umfang. Dabei entspricht die beobachtete Anzahl an γ -H2AX-Foci pro 1 Gy applizierter Strahlung der erwarteten Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen. Es ist in der Literatur allgemein akzeptiert, dass γ -H2AX-Foci nach Einwirken von ionisierender Strahlung in der Umgebung von DNA-Doppelstrangbrüchen entstehen (siehe Kapitel 6-1).

Andere genotoxische Agentien, wie UV-Strahlung, MMS und MNNG induzieren ebenfalls die Bildung von γ -H2AX-Foci. Wie oben diskutiert wurde, ist die Bildung

dieser γ -H2AX-Foci durch die Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen im Rahmen von Reparaturvorgängen und in größerem Maße an arretierten Replikationsgabeln erklärbar. Während diese Erklärung von einem großen Teil der vorliegenden Literatur unterstützt wird (beispielsweise in: Burma *et al.*, 2001; Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004; Foster und Downs, 2005; Furuta *et al.*, 2003; Halicka *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005; Paull *et al.*, 2000; Redon *et al.*, 2002; Stucki und Jackson, 2006; Takahashi und Ohnishi, 2005; Ward und Chen, 2001), gibt es einige Autoren, die bezweifeln, dass γ -H2AX ausschließlich durch DNA-Doppelstrangbrüche induziert wird. Marti *et al.*, 2006 konnten zeigen, dass UVC neben der replikationsabhängigen Induktion von abgrenzbaren nukleären Foci auch ein anderes Verteilungsmuster der Phosphorylierung von H2AX verursacht. Während replikationsabhängig die auch im Rahmen dieser Arbeit beobachteten nukleären Foci gebildet werden, konnten Marti *et al.*, 2006 während der G₁-Phase eine diffuse Phosphorylierung von γ -H2AX beobachten. Stojic *et al.*, 2004 diskutieren die von ihnen beobachtete Bildung von γ -H2AX-Foci nach MNNG-Exposition als durch nichtreparable Läsionen verursacht, die nicht als DNA-Doppelstrangbrüche gedeutet werden könnten.

Die Quantifizierung von γ -H2AX eignet sich daher zur Darstellung von durch ionisierende Strahlung, UV-Strahlung sowie Alkylantien erzeugten Effekten. Eine abschließende Klärung, ob durch die hier angewandte Methode selektiv DNA-Doppelstrangbrüche detektiert werden, steht aber weiterhin aus.

7 Zusammenfassung

Wie im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden konnte, eignet sich die Quantifizierung von γ -H2AX-Foci mittels Immunfluoreszenz zur Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen, welche durch ionisierende Strahlung erzeugt werden. Dabei erzeugt ein Gy Strahlung der verwendeten ^{60}Co -Quelle $33,8 \pm 2,1$ DNA-Doppelstrangbrüche.

Durch UV-Strahlung sowie alkylierende Substanzen wie MMS und MNNG werden in CHO-Zellen γ -H2AX-Foci induziert. Die Anzahl der induzierten γ -H2AX-Foci ist Dosis- und replikationsabhängig. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten sprechen für eine Phosphorylierung von H2AX an Läsionen, welche die DNA-Replikation beeinträchtigen und insbesondere aktive Replikationsgabeln blockieren. Diese Läsionen können zu DNA-Doppelstrangbrüchen an blockierten Replikationsgabeln führen.

H2AX wird in der unmittelbaren Umgebung von DNA-Doppelstrangbrüchen zu γ -H2AX phosphoryliert und eignet sich damit zur Quantifizierung dieser Läsionen. Ob γ -H2AX ausschließlich an DNA-Doppelstrangbrüchen phosphoryliert wird, oder auch an anderen Läsionen ist in der Literatur umstritten. Die bis dato publizierte Literatur geht mehrheitlich davon aus, dass γ -H2AX einen ausschließlichen Marker von DNA-Doppelstrangbrüchen darstellt (Burma *et al.*, 2001; Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004; Foster und Downs, 2005; Furuta *et al.*, 2003; Halicka *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2005; Paull *et al.*, 2000; Redon *et al.*, 2002; Stucki und Jackson, 2006; Takahashi und Ohnishi, 2005; Ward und Chen, 2001). Neuere Arbeiten postulieren jedoch, dass H2AX auch durch andere, bisher nicht genau klassifizierte, Störungen der Chromatinstruktur phosphoryliert wird (Marti *et al.*, 2006; Stojic *et al.*, 2004). Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse mit UV-Strahlung und den Alkylantien MMS und MNNG lassen sich gut durch die teils direkte, größtenteils jedoch replikationsabhängige Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen an blockierten Replikationsgabeln erklären. Ausschließen lässt sich die Hypothese, dass die beobachteten γ -H2AX-Foci auch aufgrund anderer Läsionen entstehen, auf Grundlage der erhaltenen Daten nicht.

Die Quantifizierung von γ -H2AX eignet sich zur Darstellung von durch ionisierende Strahlung, UV-Strahlung sowie Alkylantien erzeugten Effekten. Eine abschließende Klärung, ob durch die hier angewandte Methode selektiv DNA-Doppelstrangbrüche detektiert werden, steht aber weiterhin aus.

8 Literaturverzeichnis

- Ames, B. N. und Gold, L. S. (1991) *Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer*. Mutation Research **250**: 3-16.
- Araujo, S. J. und Wood, R. D. (1999) *Protein complexes in nucleotide excision repair*. Mutation Research **435**: 23-33.
- Beranek, D. T. (1990) *Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents*. Mutation Research **231**: 11-30.
- Bjelland, S. und Seeberg, E. (2003) *Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation*. Mutation Research **531**: 37-80.
- Bland, M. (1995) *An Introduction to Medical Statistics*. 2nd Edition. Oxford University Press, Oxford.
- Boiteux, S. und Guillet, M. (2004) *Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae**. DNA Repair **3**: 1-12.
- Branzei, D. und Foiani, M. (2005) *The DNA damage response during DNA replication*. Current opinion in cell biology **17**: 568-575.
- Burki, H. J. und Aebersold, P. M. (1978) *Bromodeoxyuridine-induced mutations in synchronous Chinese hamster cells: temporal induction of 6-thioguanine and ouabain resistance during DNA replication*. Genetics **90**: 311-321.
- Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A. und Chen, D. J. (2001) *ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks*. The Journal of biological chemistry **276**: 42462-42467.
- Christmann, M., Tomicic, M. T., Roos, W. P. und Kaina, B. (2003) *Mechanisms of human DNA repair: an update*. Toxicology **193**: 3-34.
- Cleaver, J. E. (2002) *Mechanisms by which human cells bypass damaged bases during DNA replication after ultraviolet irradiation*. TheScientificWorldJournal **2**: 1296-1305.
- Coquerelle, T., Dosch, J. und Kaina, B. (1995) *Overexpression of N-methylpurine-DNA glycosylase in Chinese hamster ovary cells renders them more sensitive to the production of chromosomal aberrations by methylating agents--a case of imbalanced DNA repair*. Mutation Research **336**: 9-17.
- Cox, M. M. (2002) *The nonmutagenic repair of broken replication forks via recombination*. Mutation Research **510**: 107-120.
- Degrassi, F., Fiore, M. und Palitti, F. (2004) *Chromosomal aberrations and genomic instability induced by topoisomerase-targeted antitumour drugs*. Current Medicinal Chemistry Anti-Cancer Agents **4**: 317-325.

- Demple, B., Jacobsson, A., Olsson, M., Robins, P. und Lindahl, T. (1982) *Repair of alkylated DNA in Escherichia coli. Physical properties of O6-methylguanine-DNA methyltransferase*. The Journal of biological chemistry **257**: 13776-13780.
- Drablos, F., Feyzi, E., Aas, P. A., Vaagbo, C. B., Kavli, B., Bratlie, M. S., Pena-Diaz, J., Otterlei, M., Slupphaug, G. und Krokan, H. E. (2004) *Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance*. DNA Repair **3**: 1389-1407.
- Dunkern, T. R. und Kaina, B. (2002) *Cell proliferation and DNA breaks are involved in ultraviolet light-induced apoptosis in nucleotide excision repair-deficient Chinese hamster cells*. Molecular Biology of the Cell **13**: 348-361.
- Fairbairn, D. W., Olive, P. L. und O'Neill, K. L. (1995) *The comet assay: a comprehensive review*. Mutation Research **339**: 37-59.
- Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M. und Nussenzweig, A. (2004) *H2AX: the histone guardian of the genome*. DNA Repair **3**: 959-967.
- Foote, R. S., Mitra, S. und Pal, B. C. (1980) *Demethylation of O6-methylguanine in a synthetic DNA polymer by an inducible activity in Escherichia coli*. Biochemical and biophysical research communications **97**: 654-659.
- Foster, E. R. und Downs, J. A. (2005) *Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair*. The FEBS journal **272**: 3231-3240.
- Friedberg, E. C., Walker, G. C. und Siede, W. (1995) *DNA Repair and Mutagenesis*. American Society for Microbiology Press, Washington, DC.
- Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W., Wood, R. D., Schultz, R. A. und Ellenberger, T. (2006) *DNA Repair and Mutagenesis*. Second Edition. American Society for Microbiology Press, Washington, DC.
- Furuta, T., Takemura, H., Liao, Z. Y., Aune, G. J., Redon, C., Sedelnikova, O. A., Pilch, D. R., Rogakou, E. P., Celeste, A., Chen, H. T., Nussenzweig, A., Aladjem, M. I., Bonner, W. M. und Pommier, Y. (2003) *Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes*. The Journal of biological chemistry **278**: 20303-20312.
- Garinis, G. A., Jans, J. und van der Horst, G. T. (2006) *Photolyases: capturing the light to battle skin cancer*. Future oncology (London, England) **2**: 191-199.
- Grossman, L. und Thiagalingam, S. (1993) *Nucleotide excision repair, a tracking mechanism in search of damage*. The Journal of biological chemistry **268**: 16871-16874.
- Halicka, H. D., Huang, X., Traganos, F., King, M. A., Dai, W. und Darzynkiewicz, Z. (2005) *Histone H2AX phosphorylation after cell irradiation with UV-B*:

- relationship to cell cycle phase and induction of apoptosis*. Cell cycle (Georgetown, Tex) **4**: 339-345.
- Hansen, J. C. (2002) *Conformational dynamics of the chromatin fiber in solution: determinants, mechanisms, and functions*. Annual review of biophysics and biomolecular structure **31**: 361-392.
- Hewitson, T. D., Bisucci, T. und Darby, I. A. (2006) *Histochemical localization of apoptosis with in situ labeling of fragmented DNA*. Methods in molecular biology (Clifton, NJ) **326**: 227-234.
- Higgins, N. P., Kato, K. und Strauss, B. (1976) *A model for replication repair in mammalian cells*. Journal of Molecular Biology **101**: 417-425.
- Hoeijmakers, J. H. (2001) *DNA repair mechanisms*. Maturitas **38**: 17-23.
- Holliday, R. und Ho, T. (2002) *DNA methylation and epigenetic inheritance*. Methods (San Diego, Calif) **27**: 179-183.
- Huang, X., Halicka, H. D., Traganos, F., Tanaka, T., Kurose, A. und Darzynkiewicz, Z. (2005) *Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis*. Cell proliferation **38**: 223-243.
- Hussain, S. P. und Harris, C. C. (2006) *p53 biological network: at the crossroads of the cellular-stress response pathway and molecular carcinogenesis*. Journal of Nippon Medical School = Nihon Ika Daigaku zasshi **73**: 54-64.
- Hyrien, O. (2000) *Mechanisms and consequences of replication fork arrest*. Biochimie **82**: 5-17.
- Imlay, J. A. und Linn, S. (1988) *DNA damage and oxygen radical toxicity*. Science **240**: 1302-1309.
- Jakob, B., Scholz, M. und Taucher-Scholz, G. (2000) *Immediate localized CDKN1A (p21) radiation response after damage produced by heavy-ion tracks*. Radiation Research **154**: 398-405.
- Jakob, B., Scholz, M. und Taucher-Scholz, G. (2003) *Biological imaging of heavy charged-particle tracks*. Radiation Research **159**: 676-684.
- Kaina, B. und Aurich, O. (1985) *Dependency of the yield of sister-chromatid exchanges induced by alkylating agents on fixation time. Possible involvement of secondary lesions in sister-chromatid exchange induction*. Mutation Research **149**: 451-461.
- Kaina, B., Fritz, G. und Coquerelle, T. (1993) *Contribution of O6-alkylguanine and N-alkylpurines to the formation of sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations, and gene mutations: new insights gained from studies of genetically engineered mammalian cell lines*. Environmental and Molecular Mutagenesis **22**: 283-292.

- Kaina, B., Ziouta, A., Ochs, K. und Coquerelle, T. (1997) *Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O6-methylguanine in Mex-, Mex+ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models*. Mutation Research **381**: 227-241.
- Kaina, B. (1998) *Critical steps in alkylation-induced aberration formation*. Mutation Research **404**: 119-124.
- Kaina, B. und Christmann, M. (2002) *DNA repair in resistance to alkylating anticancer drugs*. International journal of clinical pharmacology and therapeutics **40**: 354-367.
- Kaina, B. (2004) *Mechanisms and consequences of methylating agent-induced SCEs and chromosomal aberrations: a long road traveled and still a far way to go*. Cytogenetic and genome research **104**: 77-86.
- Kiefer, J. und Feige, M. (1993) *The significance of DNA double-strand breaks in the UV inactivation of yeast cells*. Mutation Research **299**: 219-224.
- Kunkel, T. A. und Bebenek, K. (2000) *DNA replication fidelity*. Annual Review of Biochemistry **69**: 497-529.
- Kurose, A., Tanaka, T., Huang, X., Traganos, F., Dai, W. und Darzynkiewicz, Z. (2006a) *Effects of hydroxyurea and aphidicolin on phosphorylation of ataxia telangiectasia mutated on Ser 1981 and histone H2AX on Ser 139 in relation to cell cycle phase and induction of apoptosis*. Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology **69**: 212-221.
- Kurose, A., Tanaka, T., Huang, X., Traganos, F. und Darzynkiewicz, Z. (2006b) *Synchronization in the cell cycle by inhibitors of DNA replication induces histone H2AX phosphorylation: an indication of DNA damage*. Cell proliferation **39**: 231-240.
- Kuzminov, A. (2001) *Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**: 8241-8246.
- Lehninger, A., Nelson, D. und Cox, M. (1993) *Principles of Biochemistry*. 2nd Edition. Worth Publishers, New York.
- Leppard, J. B., Dong, Z., Mackey, Z. B. und Tomkinson, A. E. (2003) *Physical and functional interaction between DNA ligase III α and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair*. Molecular and cellular biology **23**: 5919-5927.
- Li, Y. F., Kim, S. T. und Sancar, A. (1993) *Evidence for lack of DNA photoreactivating enzyme in humans*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**: 4389-4393.

- Limoli, C. L., Giedzinski, E., Bonner, W. M. und Cleaver, J. E. (2002a) *UV-induced replication arrest in the xeroderma pigmentosum variant leads to DNA double-strand breaks, gamma -H2AX formation, and Mre11 relocalization*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**: 233-238.
- Limoli, C. L., Laposa, R. und Cleaver, J. E. (2002b) *DNA replication arrest in XP variant cells after UV exposure is diverted into an Mre11-dependent recombination pathway by the kinase inhibitor wortmannin*. Mutation Research **510**: 121-129.
- Lindahl, T. und Andersson, A. (1972) *Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid*. Biochemistry **11**: 3618-3623.
- Lindahl, T. und Nyberg, B. (1974) *Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid*. Biochemistry **13**: 3405-3410.
- Lindahl, T. (1976) *New class of enzymes acting on damaged DNA*. Nature **259**: 64-66.
- Lindahl, T. (1979) *DNA glycosylases, endonucleases for apurinic/apyrimidinic sites, and base excision-repair*. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology **22**: 135-192.
- Liu, G. und Chen, X. (2006) *DNA polymerase eta, the product of the xeroderma pigmentosum variant gene and a target of p53, modulates the DNA damage checkpoint and p53 activation*. Molecular and cellular biology **26**: 1398-1413.
- Liu, J. S., Kuo, S. R. und Melendy, T. (2003) *Comparison of checkpoint responses triggered by DNA polymerase inhibition versus DNA damaging agents*. Mutation Research **532**: 215-226.
- Lobrich, M., Cooper, P. K. und Rydberg, B. (1996) *Non-random distribution of DNA double-strand breaks induced by particle irradiation*. International journal of radiation biology **70**: 493-503.
- Lobrich, M. und Kiefer, J. (2006) *Assessing the likelihood of severe side effects in radiotherapy*. International journal of cancer Journal international du cancer **118**: 2652-2656.
- Loeb, L. A. und Preston, B. D. (1986) *Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites*. Annual Review of Genetics **20**: 201-230.
- Lu, C., Zhu, F., Cho, Y. Y., Tang, F., Zykova, T., Ma, W. Y., Bode, A. M. und Dong, Z. (2006) *Cell apoptosis: requirement of H2AX in DNA ladder formation, but not for the activation of caspase-3*. Molecular cell **23**: 121-132.
- Luger, K. (2003) *Structure and dynamic behavior of nucleosomes*. Current Opinion in Genetics & Development **13**: 127-135.

- Mannironi, C., Bonner, W. M. und Hatch, C. L. (1989) *H2A.X. a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and polyA 3' processing signals*. Nucleic Acids Research **17**: 9113-9126.
- Margison, G. P., Povey, A. C., Kaina, B. und Santibanez Koref, M. F. (2003) *Variability and regulation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase*. Carcinogenesis **24**: 625-635.
- Marquardt, D. W. (1963) *An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters*. Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics **11**: 431-441.
- Marti, T. M., Hefner, E., Feeney, L., Natale, V. und Cleaver, J. E. (2006) *H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**: 9891-9896.
- McGlynn, P. und Lloyd, R. G. (2002) *Recombinational repair and restart of damaged replication forks*. Nature Reviews Molecular Cell Biology **3**: 859-870.
- McGregor, W. G. (1999) *DNA repair, DNA replication, and UV mutagenesis*. The journal of investigative dermatology Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc [and] European Society for Dermatological Research **4**: 1-5.
- McHugh, P. J., Spanswick, V. J. und Hartley, J. A. (2001) *Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance*. The lancet oncology **2**: 483-490.
- Mello Filho, A. C., Hoffmann, M. E. und Meneghini, R. (1984) *Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron*. The Biochemical journal **218**: 273-275.
- Mellon, I., Spivak, G. und Hanawalt, P. C. (1987) *Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene*. Cell **51**: 241-249.
- Mersfelder, E. L. und Parthun, M. R. (2006) *The tale beyond the tail: histone core domain modifications and the regulation of chromatin structure*. Nucleic Acids Research **34**: 2653-2662.
- Michel, B., Ehrlich, S. D. und Uzest, M. (1997) *DNA double-strand breaks caused by replication arrest*. The EMBO journal **16**: 430-438.
- Michel, B., Grompone, G., Flores, M. J. und Bidnenko, V. (2004) *Multiple pathways process stalled replication forks*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**: 12783-12788.

- Mitchell, D. L., Jen, J. und Cleaver, J. E. (1991) *Relative induction of cyclobutane dimers and cytosine photohydrates in DNA irradiated in vitro and in vivo with ultraviolet-C and ultraviolet-B light*. Photochemistry and Photobiology **54**: 741-746.
- Moore, P. und Strauss, B. S. (1979) *Sites of inhibition of in vitro DNA synthesis in carcinogen- and UV-treated phi X174 DNA*. Nature **278**: 664-666.
- Nakamura, J., Walker, V. E., Upton, P. B., Chiang, S. Y., Kow, Y. W. und Swenberg, J. A. (1998) *Highly sensitive apurinic/aprimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physiological conditions*. Cancer Research **58**: 222-225.
- Natarajan, A. T., Simons, J. W., Vogel, E. W. und van Zeeland, A. A. (1984) *Relationship between cell killing, chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges and point mutations induced by monofunctional alkylating agents in Chinese hamster cells. A correlation with different ethylation products in DNA*. Mutation Research **128**: 31-40.
- Niedernhofer, L. J., Odijk, H., Budzowska, M., van Drunen, E., Maas, A., Theil, A. F., de Wit, J., Jaspers, N. G., Beverloo, H. B., Hoeijmakers, J. H. und Kanaar, R. (2004) *The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks*. Molecular and cellular biology **24**: 5776-5787.
- Nikiforov, A., Svetlova, M., Solovjeva, L., Sasina, L., Siino, J., Nazarov, I., Bradbury, M. und Tomilin, N. (2004) *DNA damage-induced accumulation of Rad18 protein at stalled replication forks in mammalian cells involves upstream protein phosphorylation*. Biochemical and biophysical research communications **323**: 831-837.
- Niknahad, H. und O'Brien, P. J. (1995) *Cytotoxicity induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine may involve S-nitrosyl glutathione and nitric oxide*. Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems **25**: 91-101.
- Ono, M., Murakami, T., Kudo, A., Isshiki, M., Sawada, H. und Segawa, A. (2001) *Quantitative comparison of anti-fading mounting media for confocal laser scanning microscopy*. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society **49**: 305-312.
- Orren, D. K., Petersen, L. N. und Bohr, V. A. (1995) *A UV-responsive G2 checkpoint in rodent cells*. Molecular and cellular biology **15**: 3722-3730.
- Orren, D. K., Petersen, L. N. und Bohr, V. A. (1997) *Persistent DNA damage inhibits S-phase and G2 progression, and results in apoptosis*. Molecular Biology of the Cell **8**: 1129-1142.
- Otoshi, E., Yagi, T., Mori, T., Matsunaga, T., Nikaido, O., Kim, S. T., Hitomi, K., Ikenaga, M. und Todo, T. (2000) *Respective roles of cyclobutane pyrimidine dimers, (6-4)photoproducts, and minor photoproducts in*

- ultraviolet mutagenesis of repair-deficient xeroderma pigmentosum A cells*. Cancer Research **60**: 1729-1735.
- Papoulis, A. (1991) *Probability, Random Variables, and Stochastic Processes*. 3rd Edition. McGraw-Hill, Singapore.
- Paques, F. und Haber, J. E. (1999) *Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR **63**: 349-404.
- Park, C. J. und Choi, B. S. (2006) *The protein shuffle. Sequential interactions among components of the human nucleotide excision repair pathway*. The FEBS journal **273**: 1600-1608.
- Pascucci, B., Russo, M. T., Crescenzi, M., Bignami, M. und Dogliotti, E. (2005) *The accumulation of MMS-induced single strand breaks in G1 phase is recombinogenic in DNA polymerase beta defective mammalian cells*. Nucleic Acids Research **33**: 280-288.
- Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M. und Bonner, W. M. (2000) *A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage*. Current biology : CB **10**: 886-895.
- Peak, J. G. und Peak, M. J. (1990) *Ultraviolet light induces double-strand breaks in DNA of cultured human P3 cells as measured by neutral filter elution*. Photochemistry and photobiology **52**: 387-393.
- Peak, M. J., Peak, J. G. und Carnes, B. A. (1987) *Induction of direct and indirect single-strand breaks in human cell DNA by far- and near-ultraviolet radiations: action spectrum and mechanisms*. Photochemistry and Photobiology **45**: 381-387.
- Pegg, A. E. (1984) *Methylation of the O6 position of guanine in DNA is the most likely initiating event in carcinogenesis by methylating agents*. Cancer Investigation **2**: 223-231.
- Pilch, D. R., Sedelnikova, O. A., Redon, C., Celeste, A., Nussenzweig, A. und Bonner, W. M. (2003) *Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites*. Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire **81**: 123-129.
- Poole, A., Penny, D. und Sjöberg, B. M. (2001) *Confounded cytosine! Tinkering and the evolution of DNA*. Nature Reviews Molecular Cell Biology **2**: 147-151.
- Postow, L., Ullsperger, C., Keller, R. W., Bustamante, C., Vologodskii, A. V. und Cozzarelli, N. R. (2001) *Positive torsional strain causes the formation of a four-way junction at replication forks*. The Journal of biological chemistry **276**: 2790-2796.

- Prasad, R., Beard, W. A., Chyan, J. Y., Maciejewski, M. W., Mullen, G. P. und Wilson, S. H. (1998) *Functional analysis of the amino-terminal 8-kDa domain of DNA polymerase beta as revealed by site-directed mutagenesis. DNA binding and 5'-deoxyribose phosphate lyase activities*. The Journal of biological chemistry **273**: 11121-11126.
- Radany, E. H., Dornfeld, K. J., Sanderson, R. J., Savage, M. K., Majumdar, A., Seidman, M. M. und Mosbaugh, D. W. (2000) *Increased spontaneous mutation frequency in human cells expressing the phage PBS2-encoded inhibitor of uracil-DNA glycosylase*. Mutation Research **461**: 41-58.
- Rappold, I., Iwabuchi, K., Date, T. und Chen, J. (2001) *Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53BP1) is involved in DNA damage-signaling pathways*. The Journal of cell biology **153**: 613-620.
- Rasmussen, L. J. und Samson, L. (1996) *The Escherichia coli MutS DNA mismatch binding protein specifically binds O(6)-methylguanine DNA lesions*. Carcinogenesis **17**: 2085-2088.
- Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K. und Bonner, W. (2002) *Histone H2A variants H2AX and H2AZ*. Current Opinion in Genetics & Development **12**: 162-169.
- Richardson, F. C. und Richardson, K. K. (1990) *Sequence-dependent formation of alkyl DNA adducts: a review of methods, results, and biological correlates*. Mutation Research **233**: 127-138.
- Riley, P. A. (1994) *Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation*. International journal of radiation biology **65**: 27-33.
- Robu, M. E., Inman, R. B. und Cox, M. M. (2004) *Situational repair of replication forks: roles of RecG and RecA proteins*. The Journal of biological chemistry **279**: 10973-10981.
- Rodriguez-Reyes, R. und Morales-Ramirez, P. (2003) *Sister chromatid exchange induction and the course of DNA duplication, two mechanisms of sister chromatid exchange induction by ENU and the role of BrdU*. Mutagenesis **18**: 65-72.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S. und Bonner, W. M. (1998) *DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139*. The Journal of biological chemistry **273**: 5858-5868.
- Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C. und Bonner, W. M. (1999) *Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo*. The Journal of cell biology **146**: 905-916.
- Rogakou, E. P., Nieves-Neira, W., Boon, C., Pommier, Y. und Bonner, W. M. (2000) *Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139*. The Journal of biological chemistry **275**: 9390-9395.

- Roos, W., Baumgartner, M. und Kaina, B. (2004) *Apoptosis triggered by DNA damage O6-methylguanine in human lymphocytes requires DNA replication and is mediated by p53 and Fas/CD95/Apo-1*. *Oncogene* **23**: 359-367.
- Rothkamm, K. und Lobrich, M. (2003) *Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 5057-5062.
- Rydberg, B. und Lindahl, T. (1982) *Nonenzymatic methylation of DNA by the intracellular methyl group donor S-adenosyl-L-methionine is a potentially mutagenic reaction*. *The EMBO Journal* **1**: 211-216.
- Sancar, A. (1996) *DNA excision repair*. *Annual Review of Biochemistry* **65**: 43-81.
- Schrader, C. E., Linehan, E. K., Mochegova, S. N., Woodland, R. T. und Stavnezer, J. (2005) *Inducible DNA breaks in Ig S regions are dependent on AID and UNG*. *The Journal of Experimental Medicine* **202**: 561-568.
- Scully, R., Puget, N. und Vlasakova, K. (2000) *DNA polymerase stalling, sister chromatid recombination and the BRCA genes*. *Oncogene* **19**: 6176-6183.
- Sedelnikova, O. A., Rogakou, E. P., Panyutin, I. G. und Bonner, W. M. (2002) *Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody*. *Radiation Research* **158**: 486-492.
- Setlow, R. B., Swenson, P. A. und Carrier, W. L. (1963) *Thymine Dimers and Inhibition of DNA Synthesis by Ultraviolet Irradiation of Cells*. *Science* **142**: 1464-1466.
- Setlow, R. B. (1968) *The photochemistry, photobiology, and repair of polynucleotides*. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **8**: 257-295.
- Setlow, R. B. (1974) *The wavelengths in sunlight effective in producing skin cancer: a theoretical analysis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71**: 3363-3366.
- Sonoda, E., Sasaki, M. S., Morrison, C., Yamaguchi-Iwai, Y., Takata, M. und Takeda, S. (1999) *Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells*. *Molecular and cellular biology* **19**: 5166-5169.
- Squires, S., Coates, J. A., Goldberg, M., Toji, L. H., Jackson, S. P., Clarke, D. J. und Johnson, R. T. (2004) *p53 prevents the accumulation of double-strand DNA breaks at stalled-replication forks induced by UV in human cells*. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **3**: 1543-1557.
- Stojic, L., Mojas, N., Cejka, P., Di Pietro, M., Ferrari, S., Marra, G. und Jiricny, J. (2004) *Mismatch repair-dependent G2 checkpoint induced by low doses of SNI type methylating agents requires the ATR kinase*. *Genes & development* **18**: 1331-1344.

- Stucki, M. und Jackson, S. P. (2006) *gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes*. DNA Repair **5**: 534-543.
- Swenson, P. A. und Setlow, R. B. (1966) *Effects of ultraviolet radiation on macromolecular synthesis in Escherichia coli*. Journal of Molecular Biology **15**: 201-219.
- Takahashi, A. und Ohnishi, T. (2005) *Does gammaH2AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks?* Cancer Letters **229**: 171-179.
- Terato, H. und Ide, H. (2004) *Clustered DNA damage induced by heavy ion particles*. Biological sciences in space = Uchū seibutsu kagaku **18**: 206-215.
- Theron, T., Foustieri, M. I., Volker, M., Harries, L. W., Botta, E., Stefanini, M., Fujimoto, M., Andressoo, J. O., Mitchell, J., Jaspers, N. G., McDaniel, L. D., Mullenders, L. H. und Lehmann, A. R. (2005) *Transcription-associated breaks in xeroderma pigmentosum group D cells from patients with combined features of xeroderma pigmentosum and Cockayne syndrome*. Molecular and cellular biology **25**: 8368-8378.
- Todo, T. (1999) *Functional diversity of the DNA photolyase/blue light receptor family*. Mutation Research **434**: 89-97.
- Tomicic, M. (2001) *Mechanismus der Apoptose, Gentoxizität und DNA-Reparatur in Herpesvirus-Thymidinkinase-exprimierenden Säugerzellen nach Behandlung mit Antiherpes-Virustatika vom Typ der Nukleosidanaloga*. Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz Mainz.
- Wagner, R., Jr. und Meselson, M. (1976) *Repair tracts in mismatched DNA heteroduplexes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **73**: 4135-4139.
- Wang, Z. (2001) *DNA damage-induced mutagenesis : a novel target for cancer prevention*. Molecular interventions **1**: 269-281.
- Ward, I. M. und Chen, J. (2001) *Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress*. The Journal of biological chemistry **276**: 47759-47762.
- Ward, J. F. (1988) *DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability*. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology **35**: 95-125.
- West, M. H. und Bonner, W. M. (1980) *Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species*. Biochemistry **19**: 3238-3245.
- Whitaker, S. J., Powell, S. N. und McMillan, T. J. (1991) *Molecular assays of radiation-induced DNA damage*. European journal of cancer (Oxford, England : 1990) **27**: 922-928.

- Yagi, T., Tatsumi-Miyajima, J., Sato, M., Kraemer, K. H. und Takebe, H. (1991) *Analysis of point mutations in an ultraviolet-irradiated shuttle vector plasmid propagated in cells from Japanese xeroderma pigmentosum patients in complementation groups A and F*. Cancer Research **51**: 3177-3182.
- Yu, T., Macphail, S. H., Banath, J. P., Klovov, D. und Olive, P. L. (2006) *Endogenous expression of phosphorylated histone H2AX in tumors in relation to DNA double-strand breaks and genomic instability*. DNA Repair **5**: 935-946.
- Zhang, X., Rosenstein, B. S., Wang, Y., Lebwohl, M., Mitchell, D. M. und Wei, H. (1997) *Induction of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by ultraviolet radiation in calf thymus DNA and HeLa cells*. Photochemistry and Photobiology **65**: 119-124.