

**DNA-Reparatur und Chromatinstruktur –  
wechselseitige Beeinflussung nach DNA-Schädigung  
durch ionisierende Strahlung**

*Dissertation der Fakultät für Biologie der Ludwigs-Maximilians-Universität  
München*

*durchgeführt an der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und  
Radioonkologie in der Arbeitsgruppe Molekulare Strahlenbiologie*

*vorgelegt von  
**Belinda Maroschik***

*München, 2018*

Diese Dissertation wurde angefertigt  
unter der Leitung von PD Dr. A. Friedl  
im der Arbeitsgruppe Molekulare Strahlenbiologie, der Klinik und Poliklinik für  
Strahlentherapie und Radioonkologie

Erstgutachter: PD Dr. Anna A. Friedl

Zweitgutachter: Prof. Dr. Heinrich Leonhardt

Tag der Abgabe: 14.06.2017

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.2018

## **Erklärung**

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass meine Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt worden ist.

Die vorliegende Dissertation wurde weder ganz, noch teilweise bei einer anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Ich habe noch zu keinem früheren Zeitpunkt versucht, eine Dissertation einzureichen oder an einer Doktorprüfung teilzunehmen.

München, den 14.06.2017

Belinda Maroschik

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	6
1    Einleitung .....	9
1.1    DNA-Schadensantwort und -reparatur .....	9
1.1.1    Nicht-homologe Endenverknüpfung.....	9
1.1.2    Homologe Rekombination .....	10
1.1.3    Wahl des Reparaturweges.....	12
1.2    Chromatin .....	12
1.3    Bedeutung der Chromatinstruktur für die DNA-Reparatur .....	15
1.3.1.    Chromatin-Remodelling Komplexe.....	15
1.3.2.    Veränderungen im PTM-Muster .....	16
1.3.3.    Individuelle Strahlenempfindlichkeit und epigenetische Therapie .....	21
1.4    Spezifische Herausforderung: DDR und Reparatur in kondensiertem Chromatin .....	23
1.5    Zielsetzung dieser Arbeit.....	28
2.    Ergebnisse.....	30
2.1    Beeinflussung der Schadensantwort durch modifizierte Chromatinzugänglichkeit .....	30
2.1.1    Untersuchung der Verträglichkeit der Hypertonbehandlung .....	30
Apoptoseinduktion .....	30
Induktion von Strangbrüchen.....	34
Einfluss der veränderten Osmolarität auf die Zellkernmorphologie und -größe.....	38
2.1.2 $\gamma$ H2AX-Focibildung in osmotisch verändertem Chromatin .....	41
Focibildung und Morphologie .....	42
Zunahme des Focivolumens bei 750 mOsm.....	45
Focianzahl und Tracklänge .....	46
2.1.3    Akkumulation anderer DDR-Reparaturfaktoren.....	49

2.1.3.1	U2OS-Zellen .....	49
2.1.3.2	HeLa-Zellen .....	53
	Genauere Eingrenzung der kritischen Osmolarität.....	56
	53BP1-Kinetik bei 570 mOsm in HeLa-Zellen .....	58
	Hypertonbehandlung von HeLa-53BP1-EGFP-Zellen .....	59
	Ausschluss von chromatingebundenem 53BP1 bei Hyperkondensierung.....	61
2.1.3.3	BJ-1-hTERT-Zellen .....	62
2.1.4	Akkumulation verschiedener DDR-Faktoren unter hypotonen Bedingungen .....	64
2.2	Beeinflussung der Chromatinstruktur durch DNA-Schadensinduktion .....	67
2.2.3	Screening verschiedener Histonmodifikationen auf eine Veränderung nach Bestrahlung.....	68
	Zusammenfassung Screening LCL-HuKo.....	79
2.2.4	Abhängigkeit der Veränderung im PTM-Muster von der Strahlensensitivität der Zelllinie.....	80
2.2.5	Zusammenfassung.....	95
3	Diskussion.....	97
3.1	Einfluss der Chromatinstruktur auf die DNA-Reparatur .....	97
3.1.1	Einfluss von Hypertonie und Hypotonie auf verschiedene Zelllinien.....	97
3.1.2	Einfluss von artifizieller Chromatinhyperkondensierung auf die Akkumulierung von DNA-Reparaturfaktoren.....	99
3.1.3	DDR in artifiziell aufgelockertem Chromatin .....	105
3.2	Einfluss der DNA-Schadensantwort auf die Chromatinstruktur .....	106
3.2.1	Screening von PTMs nach Bestrahlung in LCL-HuKo.....	107
3.2.2	Veränderungen im PTM-Muster in Abhängigkeit der Strahlensensitivität .....	111
3.3	Zusammenfassung und Ausblick .....	114
4	Methoden .....	118
4.1	Zellkultur .....	118

4.1.1	Kultivierung der Zellen .....	118
4.1.2	Aussaat der Zellen für die Ionenmikrobestrahlung .....	118
4.1.3	Behandlung der Zellen mit verschiedenen Salzkonzentrationen .....	119
4.2	Bestrahlung der Zellen .....	120
4.2.1	Ionenmikrobestrahlung mit SNAKE .....	120
4.2.2	Röntgenbestrahlung .....	121
4.2.3	Gamma-Bestrahlung an der Cäsium-Quelle .....	122
4.3	Immunfluoreszenzfärbung .....	122
4.4	Epi-Fluoreszenzmikroskopie .....	123
4.5	Auswertung der Bilddaten .....	123
4.5.1	Zellkernflächenbestimmung mit ImageJ .....	123
4.5.2	Bestimmung des Focivolumens .....	124
4.5.3	Bestimmung der Tracklänge .....	125
4.5.4	Quantifizierung von Korrelation zwischen zwei Signalen .....	125
4.6	Proteinextraktion für Western-Blot-Experimente .....	125
4.6.1	Extraktion von Kern- und zytoplasmatischen Proteinen .....	125
4.6.2	Gesamtzellextraktion von adhärent wachsenden Zellen .....	126
4.6.3	Gesamtzellextraktion aus Suspensionszellen .....	126
4.7	Gelelektrophorese und Western-Blotting .....	127
4.7.1	Auftrennung der Proteine .....	127
4.7.2	Western-Blotting .....	127
4.7.3	Detektion und Quantifizierung des Chemilumineszenzsignals .....	128
4.7.4	Quantifizierung geringer Proteinkonzentrationsunterschiede .....	128
4.8	Peptid Competition Assay .....	130
4.9	Durchflusszytometrie zur Bestimmung apoptotischer Zellen .....	131
5	Material .....	132
5.1	Zelllinien und Medien .....	132

5.2	Lösungen und Reagenzien für die Zellkultur .....	132
5.3	Reagenzien und Puffer für die Immunfluoreszenz.....	133
5.4	Reagenzien und Puffer für Western-Blotting.....	133
5.5	Chemikalien .....	134
5.6	Antikörper und Peptide.....	135
5.6.1	Primäre Antikörper Western-Blotting.....	135
5.6.2	Primäre Antikörper Immunfluoreszenz.....	135
5.6.3	Sekundäre Antikörper .....	136
5.6.4	Peptide.....	136
5.7	Equipment .....	137
6	Anhang .....	138
	Western-Blots zur Zunahme von $\gamma$ H2AX nach Hochsalzbehandlung.....	138
	p-Werte HuKo-Screening .....	138
	p-Werte LUCY- und AT-Zelllinien.....	139
	Peptid-Kompetitions-Assay der Histonantikörper .....	141
7	Literaturverzeichnis.....	142

## Zusammenfassung

DNA-Doppelstrangbrüche sind biologisch von großer Bedeutung, da eine ineffiziente oder ungenaue Reparatur zum Zelltod oder genomischer Instabilität führen können, welche dann wiederum die Krebsentstehung bedingen kann. Deswegen stehen der Zelle verschiedene Mechanismen zur Verfügung, um mit einer DNA-Schädigung umzugehen. Einer davon ist die DNA-Reparatur. Für die Betrachtung der damit einhergehenden Prozesse muss beachtet werden, dass die DNA nicht nackt im Zellkern vorliegt, sondern in eine komplexe Chromatinstruktur eingebettet ist, mit welcher das gesamte Orchester der DNA-Schadensantwort wechselwirkt. Ziel dieser Arbeit war es, nähere Einblicke zu erhalten, wie die Chromatinstruktur die DNA-Schadensantwort beeinflusst und welche Auswirkungen im Umgekehrten eine DNA-Schädigung mit der anschließenden Schadensantwort auf das Chromatin hat.

Für die Betrachtung der ersten Fragestellung musste zunächst nachgewiesen werden, dass die gewählte Methode zur künstlichen Beeinflussung der Chromatinstruktur für die weiteren Analysen in der Immunfluoreszenz nach Ionenmikrobestrahlung geeignet ist. Ich konnte zeigen, dass die Behandlung der Zellen mit hypertonem Medium zu den von uns gewählten Bedingungen in den untersuchten Zelllinien zu keiner nennenswerten Apoptoseinduktion führt. Die im Western-Blot sichtbare Phosphorylierung von H2AX konnte in der Immunfluoreszenz nicht dargestellt werden. Nach Bestrahlung der Zellen waren sie jedoch in der Lage, effektiv  $\gamma$ H2AX-Foci entlang der Ionenspur auszubilden. Analysen zum Focivolumen und der Focianzahl zeigten in HeLa- und U2OS-Zellen eine deutliche Zunahme des Volumens bei einer Behandlung mit 750 mOsm. In U2OS-Zellen konnte zudem noch eine signifikante Volumenabnahme der Foci unter hypotonen Bedingungen beobachtet werden. Eine Veränderung in der Focianzahl zeigte sich in einer Zunahme bei 570 mOsm nach Normierung auf die Länge der Ionenspur nur in U2OS-Zellen. In der Gesamtheit der Ergebnisse konnte ich damit zeigen, dass die transiente Methode der Hyper-, bzw. Hypokondensierung der Zellen durch die Inkubation in

Medium verschiedener Osmolaritäten für HeLa-, U2OS- und BJ-1-hTERT-Zellen ein geeignetes Mittel ist, um die DNA-Schadensantwort in Abhängigkeit der Chromatinstruktur näher zu untersuchen.

Hierfür habe ich die Akkumulierungsfähigkeit verschiedener DNA-Reparaturfaktoren nach Ionenmikrobestrahlung innerhalb der artifiziell veränderten Chromatinstruktur betrachtet. Die untersuchten Proteine Brit1, Mre11, Mdc1, pATM, 53BP1, BRCA1 und Rad51 kolokalisieren unter isotonen Bedingungen mit dem Schadensmarker  $\gamma$ H2AX. Bei einer starken Hyperkondensierung durch 750 mOsm Medium kommt es trotz einer effektiven Phosphorylierung von H2AX, welche darauf hindeutet, dass die Schadensantwort nicht vollständig inhibiert ist, zu keiner Akkumulierung der untersuchten DNA-Reparaturfaktoren an den Schadensorten in allen drei gewählten Zellsystemen. Bei 570 mOsm konnten hingegen Unterschiede, sowohl im Verhalten der einzelnen Faktoren, als auch zwischen den Zelllinien beobachtet werden. Am auffälligsten zeigten sich hierbei die U2OS-Zellen, für die ich bei dem frühen Reparaturfaktor Mdc1 eine vollständige Kolokalisation mit  $\gamma$ H2AX nachweisen konnte, während alle anderen Proteine, insbesondere die späten DDR-Faktoren wie Rad51, 53BP1 und BRCA1, deutlich in ihrer Akkumulierungsfähigkeit eingeschränkt sind. HeLa-Zellen reagieren deutlich weniger sensibel auf die Hyperkondensierung mit 570 mOsm. Hier konnte ich nur leichte Einschränkungen bei der Kolokalisation von Mre11 und Rad51 mit  $\gamma$ H2AX beobachten, während alle anderen Reparaturfaktoren effektiv an den Schäden akkumulieren. Ich konnte anhand von Mdc1 und 53BP1 zeigen, dass es hier in den unterschiedlichen Zellsystemen eine individuelle kritische Osmolarität/Kondensierungsgrad des Chromatins zu geben scheint, bei der die untersuchten DDR-Faktoren in ihrer Akkumulierungsfähigkeit behindert oder vollständig inhibiert sind. Im Gegensatz zur Hyperkondensierung konnte ich bei einer künstlichen Chromatinauflockerung durch Hypotonie keine Einschränkungen in der Rekrutierung der DDR-Faktoren nach Bestrahlung feststellen.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Frage inwiefern es durch eine DNA-Schadensantwort nach ionisierender Strahlung zu einer Veränderung der

Chromatinstruktur kommt. Hierfür habe ich zunächst ein Screening für 17 verschiedene posttranslationale Histonmodifikationen in einer Lymphoblastenzelllinie eines gesunden Spenders durchgeführt. Es wurde hierbei sehr auf ein standardisiertes Protokoll für die Western-Blot-Analyse geachtet, um auch geringe Veränderungen nachweisen und reproduzieren zu können. Neben der Zunahme des  $\gamma$ H2AX-Levels, war es mir möglich, für vier der untersuchten Histonmodifikationen eine Veränderung nach Bestrahlung nachzuweisen. H3K4me3, H3K56ac, H4K5ac und H4K16ac zeigten jeweils eine stabile Abnahme.

Aufgrund der Screeningergebnisse und Daten aus der aktuellen Literatur habe ich im Folgenden das Screening mit einem ausgewählten Set an Histonmodifikationen auf acht weitere Zelllinien unterschiedlicher Spender ausgedehnt. Ziel war hierbei, nicht nur zu überprüfen, ob die Veränderungen auch in weiteren Zelllinien reproduzierbar sind, sondern auch, ob eine Korrelation mit der Strahlensensitivität der untersuchten Zellen besteht. Im Zuge dieser Analysen konnte ich zeigen, dass außer bei der global detektierbaren Zunahme von  $\gamma$ H2AX, die interindividuellen Unterschiede zwischen den Zelllinien so groß sind, dass keine einheitliche Veränderung für alle Zelllinien nachgewiesen werden konnte. Bis auf eine Abnahme von H4K16ac, welche nur in den strahlensensitiven Zelllinien auftritt, konnte auch keine Korrelation mit der Strahlensensitivität beobachtet werden.

# 1 Einleitung

DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) entstehen in der Zelle nicht nur durch ionisierende Strahlung, sondern auch durch freie Radikale, bestimmte Chemikalien oder bei biochemischen Prozessen in der Zelle, wie der Replikation und der DNA-Reparatur. DSB sind biologisch von großer Bedeutung, da sie die genomische Stabilität der Zelle stark gefährden. Eine ineffiziente oder ungenaue Reparatur kann zum Zelltod oder zu genomischer Instabilität führen, die dann wiederum Krebs verursachen kann. Deswegen kann die Zelle auf verschiedenen Wegen auf DSB reagieren, wie Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur und Apoptose. Dabei ist noch nicht vollständig geklärt, welche Umstände zu welchem dieser Mechanismen führen (Su, 2006). Hinzu kommt, dass die DNA und damit auch der mögliche DSB in eine komplexe Chromatinstruktur eingebettet sind, mit der das gesamte Orchester der DNA-Schadensantwort wechselwirkt. Auf die Fragen wie die Chromatinstruktur die DNA-Schadensantwort beeinflusst und welche Auswirkungen im Umgekehrten eine DNA-Schädigung und anschließende Reparatur auf das Chromatin hat, soll in der folgenden Arbeit eingegangen werden.

## 1.1 DNA-Schadensantwort und -reparatur

Die Reparatur der DSB erfolgt in den meisten Fällen über zwei Wege. Entweder werden sie über die Nicht-homologe Endenverknüpfung (*Non-homologous End-Joining, NHEJ*) oder über die Homologe Rekombinationsreparatur (HR) repariert.

### 1.1.1 Nicht-homologe Endenverknüpfung

Bei der NHEJ werden DNA-Enden ohne Nutzung von homologen Sequenzen verknüpft – eine fehleranfällige Methode des Reparaturprozesses, da nur korrekt ligiert werden kann, wenn es zu keinem Basenverlust gekommen ist. Dafür kann die NHEJ unabhängig vom Zellzyklus erfolgen und stellt im Gegensatz zur HR eine schnelle Reparaturmöglichkeit dar. In Säugerzellen ist die NHEJ der Hauptreparaturweg bei Schäden die durch ionisierende Strahlung (Ionizing Radiation = IR) verursacht wurden (Weterings und Chen, 2008). Im Falle eines DSB bindet hierfür zunächst das Ku70/80-Heterodimer an die Enden des

gebrochenen DNA-Moleküls. Es dient als Gerüst für die Rekrutierung und Bindung weiterer Proteine der NHEJ-Maschinerie, wie XRCC4, XLF, DNA Ligase IV und APLF. Die Ligation der freien Enden findet bei der NHEJ ohne Resektion statt, bei Bedarf stehen aber verschiedene Enzyme, wie beispielsweise Artemis und ATM (*Ataxia Teleangiectasia Mutated*), zur Verfügung, die – je nach Art des Schadens – eine entsprechende Endenprozessierung durchführen können. Der DNA-Ku-XRCC4-Komplex dient bei allen Schritten als Plattform für alle anderen an der NHEJ beteiligten Proteine. Zusammen mit XLF und DNA-PKcs überbrückt der Ku-XRCC4-Komplex den Schaden und hält die DNA-Enden zusammen, bis die endgültige Ligation durch die DNA-Ligase IV erfolgt (Davis und Chen, 2013).

### 1.1.2 Homologe Rekombination

Die Homologe Rekombination ist ein biochemisch wesentlich komplexerer Mechanismus, für den eine Sequenzhomologie von mehreren hundert Basenpaaren notwendig ist, die sich in der Regel entweder auf dem Schwesterchromatid oder auf einem homologen Chromosom findet. Die Homologe Rekombination mit dem Schwesterchromatid ist am häufigsten. Da hier die Sequenz normalerweise identisch ist, ist eine fehlerfreie Reparatur möglich. Allerdings stehen Schwesterchromatiden nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus zur Verfügung, nämlich nach der DNA-Replikation und vor der Mitose. Für die HR werden die durch den DSB entstandenen DNA-Enden so prozessiert, dass einzelsträngige Überhänge entstehen. Für den initialen Prozessierungsschritt bindet ein Komplex aus CtIP/Mre11-Rad50-NBS1 (MRN) an die DNA-Bruchstelle. Dies sorgt für die Rekrutierung und Aktivierung der Kinase ATM, welche durch Monomerisierung und Autophosphorylierung aktiviert wird und anschließend weitere Substrate phosphoryliert (Bakkenist und Kastan, 2003). Eines der wichtigsten ist hierbei H2AX, eine Variante des Histons H2A (Rogakou et al., 1998). An das phosphorylierte H2AX ( $\gamma$ H2AX) kann Mdc1 (*mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) binden (Stucki et al., 2005), welches durch ATM phosphoryliert wird und dann wiederum weiteres MRN und ATM rekrutiert, was zu einer positiven Feedback-Schleife der Signalamplifikation führt (Lou et al., 2006).

Zeitgleich finden aktive Veränderungen der DNA-Struktur statt, die die Bindung weiterer Mediator- und Reparaturproteine ermöglichen. Wichtig sind hierbei ATP-abhängige Chromatin-Remodelling-Komplexe wie SWI/SNF (Chai et al., 2005). Das in dieser Arbeit untersuchte Brit1 wirkt hierbei als Regulator. Durch die erhöhte Bindungsaffinität von Brit1 auf den SWI/SNF bei einer DNA-Schädigung kann der Komplex spezifisch zu den Läsionen rekrutiert werden und dort zur Auflockerung der Chromatinstruktur beitragen (Lin et al., 2010, Peng et al., 2009). Zudem wird die Ubiquitinligase RNF8 rekrutiert, welche an MDC1 bindet und das DNA-Schadenssignal durch Ubiquitylierung von benachbarten Histonen weiter verbreitet. Die Anwesenheit von RNF8 führt dann zur Rekrutierung einer weiteren Ubiquitinligase, RNF168. Das Umschalten von der auf die Phosphorylierung gestützten DNA-Schadens-Signaltransduktion hin zu einer von Ubiquitylierung geprägten ist wichtig für den weiteren Verlauf der DNA-Reparatur, da die Ubiquitinketten an den Histonen einerseits die Bindung des BRCA1-A (*Breast Cancer 1-A*) Komplexes vermitteln, andererseits auch die Bindung von 53BP1 (*p53 binding protein 1*) ermöglichen (Mok und Henderson, 2012). Zum einen führt die Ubiquitylierung zu einer Konformationsänderung der Chromatinstruktur, wodurch das konstitutiv vorkommende zweifach methylierte Lysin 20 des Histon 4 (H4K20me2) als 53BP1-Bindungsstelle freigelegt wird, zum anderen ubiquityliert RNF168 das Histon 2A an Lysin 15 (H2AK15ub), welche als zweite Bindungsstelle für 53BP1 gilt und erst eine stabile Akkumulation möglich macht (Botuyan et al., 2006; Mattioli et al., 2012; Fradet-Turcotte et al., 2013).

Bei ausreichender Länge an einzelsträngiger DNA (ssDNA) bindet das *Replication protein A* (RPA) an die ssDNA-Überhänge, um diese zu stabilisieren und die Bildung von Sekundärstrukturen zu verhindern. RPA wird im Weiteren über einen BRCA2-abhängigen Mechanismus durch Rad51 ersetzt, welches essentiell für die Bildung der Holliday-Junction und der Heteroduplexstruktur ist, also dem Eindringen der ssDNA in den komplementären DNA-Strang. Die eigentliche Reparatur erfolgt bei der HR dann dadurch, dass der unbeschädigte Strang als Vorlage verwendet wird, um die durch den DNA-Schaden und

darauf erfolgte Prozessierung verlorenen Basen zu ersetzen. Gefolgt wird dies durch einen Ligationsschritt (Kakaroukas und Jeggo, 2014).

### **1.1.3 Wahl des Reparaturweges**

NHEJ scheint nach aktuellen Erkenntnissen in den meisten Zellzyklusphasen der bevorzugte Reparaturweg zu sein. Es gibt allerdings zwei Faktoren, welche einen Wechsel hin zur HR begünstigen. Zum einen die Lage des Schadens in kondensierten Chromatinbereichen, zum anderen die Komplexität des Schadens (Shibata et al., 2011; Kakaroukas et al., 2013). Auch wenn die genauen molekularen Mechanismen zur Wahl des Reparaturweges noch nicht bekannt sind, scheint die Konkurrenz zwischen der DNA-Enden-Resektion und der DNA-Enden-Protektion die Wahl zu bestimmen (Symington und Gautier, 2011). Zwei Schlüsselkomponenten sind hierbei die schon lange bekannten DNA-Reparaturproteine 53BP1 und BRCA1, wobei 53BP1 die NHEJ und BRCA1 mit seiner Funktion bei der Enden-Resektion die HR fördert (Escribano-Diaz et al., 2013; Zimmermann und Lange, 2013; Kakaroukas und Jeggo, 2014, Kato et al., 2014).

## **1.2 Chromatin**

Bei der Betrachtung von Reparaturprozessen in der Zelle ist zu beachten, dass die DNA, der Träger der genetischen Information, in eukaryotischen Zellkernen nicht nackt vorliegt, sondern um Histonproteine gewickelt ist (Kornberg, 1977) und zusätzlich mit weiteren Komponenten assoziiert, die zu einer übergeordneten Chromatinstruktur führen (Probst et al. 2009; Li and Reinberg, 2011). Wie schon 1977 von Kornberg beschrieben, ist dabei die kleinste Einheit das Nukleosom, bestehend aus einem Oktamer welcher aus jeweils zwei Histonen H2A, H2B, H3 und H4 zusammengesetzt ist. Zusammen bilden diese den Nukleosomenkern, um welchen 147 Basenpaare der DNA gewickelt sind. Für einen höheren Kompaktierungsgrad sind die einzelnen Nukleosome durch das Linker-Histon H1 mit ihren benachbarten Nukleosomen verbunden. Wie genau die übergeordnete Sekundärstruktur aussieht, ist bis heute nicht geklärt. Lange Zeit wurde angenommen, dass die DNA in einer 30 nm Faser im Interphasezellkern vorliegt (Finch und Klug, 1976). Die

Untersuchungen, die zu dieser Erkenntnis führten, wurden allerdings nicht an intakten Zellkernen unter in vivo Bedingungen, sondern an isolierter DNA in vitro durchgeführt. Es gibt viele methodische Ansätze, um die DNA-Struktur in ihrer natürlichsten Form zu ergründen, viele führen allerdings unweigerlich zu Artefakten, so dass bis jetzt nicht endgültig geklärt werden konnte, ob die 30 nm Faser in situ in allen, keinen oder eventuell auch nur in ganz bestimmten Zellkernen existiert (Grigoryev und Woodcock, 2012). Studien der letzten Jahre gehen von einer irregulär gefalteten Nukleosomenfaser mit 10 nm Durchmesser aus (Maeshima et al., 2010, Nishino et al., 2012, Joti et al., 2012), welcher eine Zick-Zack- oder Solenoidstruktur der Nukleosomenkette zugrunde liegt (Woodcock und Ghosh 2010).

Betrachtet man das Chromatin in einer weiteren, übergeordneten Ebene, kann zwischen Euchromatin (EC) und Heterochromatin (HC) unterschieden werden. Die beiden Begriffe wurden schon sehr früh, im Jahre 1928 von Emil Heitz eingeführt, welcher bei lichtmikroskopischen Beobachtungen zeigen konnte, dass sich manche Teile des Chromatins durch ihre Kompaktierung und Färbereigenschaften von anderen Bereichen unterscheiden. Er definierte HC als Chromatinregionen, welche sich stark anfärben lassen und durch den ganzen Zellzyklus hindurch in einem hohen Kompaktierungsgrad vorliegen und EC als die Bereiche, die nur eine schwache Färbung aufweisen und die während der Telophase verschwinden. Diese zytologische Definition von HC und EC ist zwar sehr allgemein gehalten, hat aber bis heute noch ihre Gültigkeit.

Beeinflusst wird die DNA-Struktur durch viele Faktoren, wie beispielsweise die Länge des Linker-Histons H1, DNA-Methylierung, Chromatin-Remodelling-Faktoren, die Zusammensetzung des Nukleosomenkerns mit verschiedenen Histonvarianten und posttranslationale Histonmodifikationen (PTM) (Woodcock und Gosh, 2010). Über letzteres leitet sich auch die molekulare Definition von HC und EC ab. Bereits seit 1964 ist bekannt, dass Histone posttranslational modifiziert werden (Allfrey et al., 1964). Mittlerweile kennt man viele verschiedene Modifikationen, darunter Methylierungen, Phosphorylierungen, Ubiquitylierungen, Acetylierungen und Sumoylierungen – und die Suche nach neuen Modifikationen ist noch nicht abgeschlossen (Turner, 2012). Es wird von

einem sogenannten „Histone Code“ gesprochen, welcher viele Prozesse in der Zelle beeinflusst oder auch steuert, wie beispielsweise Transkription, Replikation, Rekombination oder auch DNA-Reparatur (Bannister und Kouzarides, 2011). Für die molekulare Definition von EC und HC spielen vor allem Histonmethylierungen und -acetylierungen eine große Rolle. EC ist reich an Acetylierungen, welche die positive Ladung der Lysinreste neutralisieren und so dazu führen, dass die Bindung zur negativ geladenen DNA geschwächt wird. Dies führt zu einer offenen, wenig kondensierten Chromatinstruktur, in welcher Transkription möglich ist (Jost et al., 2012). HC ist im Gegensatz dazu transkriptionell inaktiv. Es muss hier zwischen konstitutiven und fakultativen Heterochromatin unterschieden werden. Konstitutives HC beinhaltet Genomregionen die permanent stillgelegt sind, wie Centromere oder Telomere. Charakterisiert ist es durch das relativ hohe Vorhandensein von H3K9me<sub>3</sub>, also einem 3-fach methyliertem Histon 3 am Lysin 9. Fakultatives HC beinhaltet Regionen, welche im Laufe der Entwicklung und/oder Differenzierung unterschiedlich exprimiert und anschließend stillgelegt wurden. Ein klassisches Beispiel wäre hierfür das inaktive X-Chromosom bei weiblichen Säugetieren. Die vorherrschende PTM in fakultativem HC ist H3K27me<sub>3</sub> (Bannister und Kouzarides, 2011). In fakultativem HC ist noch eine Regulation der Genaktivität möglich. Je nach Bedarf kann hierbei EC in fakultatives HC umgewandelt werden, oder auch umgekehrt können lokal stillgelegte Gene wieder transkriptionell aktiviert werden. Anders als Acetylierungen oder Phosphorylierungen ändern Methylierungen die Ladung des Histonproteins jedoch nicht und führen somit nicht direkt zu einer Veränderung in der Struktur des Chromatins (Bannister und Kouzarides, 2011), sondern bilden eine Bindungsplattform für weitere Proteine, wie beispielsweise die Chromodomänen des HP1 Proteins, welches die Bildung von HC unterstützt und in Folge dessen zur Repression der Genexpression führt (Zeng et al., 2010).

HP1 ist dabei nur ein mögliches Effektorprotein, welches bestimmte Histonmodifikationsmuster als Bindungsstellen erkennt. Ein Beispiel aus den vielen Proteinen, die das PTM-Muster zur Rekrutierung und Bindung nutzen, sind die Chromatin-Remodelling-Komplexe, auch Remodeller genannt. Hier kann zwischen vier Familien

entschieden werden: SWI/SNF, ISWI, CHD und INO80. Es handelt sich hierbei um große Proteinkomplexe (> 1 MDa), welche alle über eine evolutionär stark konservierte ATPase Untereinheit verfügen. Durch ATP-Hydrolyse sind sie in der Lage, den DNA-Histon-Kontakt zu lösen. Dadurch sind eine ganze Reihe strukturelle Chromatinveränderungen möglich, wie das Verschieben oder die Lageveränderung von Nukleosomen, das komplette Entfernen von Histonoktameren, um die DNA freizulegen, oder der Austausch und das Einsetzen von Histonvarianten. Chromatin-Remodelling-Komplexe sorgen also auf der Grundlage der PTM für eine dynamische Chromatinumgebung, die entsprechend der unterschiedlichen DNA prozessierenden Aktivitäten angepasst werden kann (Liu et al., 2012).

### **1.3 Bedeutung der Chromatinstruktur für die DNA-Reparatur**

Die Chromatinumgebung spielt auch bei dem Prozess der DNA-Reparatur eine große Rolle. Da die geschädigte DNA nicht nackt im Zellkern vorliegt, sondern in eine komplexe Chromatinstruktur eingebettet ist, muss diese in den gesamten Reparaturprozess mit einbezogen werden. Auf der einen Seite muss die Struktur aufgelockert werden, um eine Zugänglichkeit und Mobilität zu gewährleisten, auf der anderen Seite müssen die losen Enden zusammengehalten, die gesamte Integrität geschützt, und die Genexpression an geschädigten Bereichen reprimiert werden. Dementsprechend sind an der DNA-Reparatur viele Proteine beteiligt, die das PTM-Muster verändern oder auf andere Weise die Chromatinstruktur direkt oder indirekt beeinflussen.

#### **1.3.1. Chromatin-Remodelling Komplexe**

Für alle Chromatin-Remodelling-Familien ist in verschiedenen Organismen eine Beteiligung in der DNA-Reparatur beschrieben, auch wenn die genauen Prozesse meist noch nicht im Detail bekannt sind. SWI/SNF wird beispielsweise in Hefe bei der HR an die Schadensorte rekrutiert und unterstützt hier die Paarung der homologen DNA-Stränge (Chai et al., 2005). Auch in Säugerzellen wird SWI/SNF zu den Schadensorten rekrutiert, interagiert dort mit acetyliertem H3 und H4, was durch die Phosphorylierung von H2AX

stimuliert wird (Lee et al., 2010; Ogiwara et al., 2011). CHD4 und seine regulatorische Einheit MTA2 fördern in der Ubiquitin-vermittelten Signaltransduktion die Rekrutierung der E3 Ligasen RNF168 und BRCA1 an die DSB (Smeenk et al., 2010; Larsen et al., 2010). Des Weiteren spielt CHD3 bei der Reparatur im Heterochromatin eine Rolle – worauf im Weiteren noch näher eingegangen wird. Der zur INO80-Familie gehörende TRRAP-Tip60 Komplex acetyliert nach DNA-Schädigung ATM sowie die Histone H2A/H2AX und H4 und ist für eine effiziente DNA-Reparatur notwendig (Bird et al., 2002; Sun et al., 2005; Murr et al., 2006). Und auch für die ISWI-Familie der Chromatin-Remodelling-Proteine konnte eine Beteiligung an der DNA-Reparatur nachgewiesen werden. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass SNF2H über eine RNF20 vermittelte Monoubiquitylierung von H2B und eine Methylierung von H3K4 an den Schaden rekrutiert wird. Eine Depletion von SNF2H in der Zelle führt dazu, dass DNA-Endenprozessierung nicht mehr stattfinden kann, Rad51 und BRCA1 nicht mehr an den Schadensort rekrutiert werden und somit keine DNA-Reparatur mittels HR mehr möglich ist (Nakamura et al., 2011). Für einen anderen Faktor aus der ISWI-Familie, ACF1, konnte von Sánchez-Molina et al., 2011 eine schnelle Rekrutierung an den Schadensort nachgewiesen werden. Die Depletierung von ACF1 führt zu erhöhten Apotoseraten und einem unvollständigen G2/M-Checkpoint bei strahleninduzierten DNA-Schäden. Auch wenn die genaue Rolle von ACF1 bei der DNA-Reparatur noch nicht genau geklärt ist, zeigen diese Ergebnisse, dass Proteine der ISWI-Familie essentiell für eine effektive Reparatur von DNA-Schäden sind.

### **1.3.2. Veränderungen im PTM-Muster**

Wie man an einigen Bindungsstellen der Chromatin-Remodelling-Komplexe schon sehen kann, spielen auch PTM eine wichtige Rolle bei der DNA-Reparatur. Dabei ist das PTM-Modifizierungsmuster fast beliebig komplex, da verschiedene PTM an unterschiedlichen Aminosäuren möglich sind. Im Falle der Methylierung können sogar mehrere Methylgruppen an eine Aminosäure gebunden werden. Ein Nukleosom ist in der Regel nicht nur mit einer, sondern mit mehreren PTM versehen, die dann wiederum miteinander wechselwirken und damit zu unterschiedlichen Wirkungen in der Chromatinregulation

führen (Bannister und Kouzarides, 2011). Ein zusätzlicher Grad an Komplexität entsteht durch neueste Erkenntnisse, die zeigen, dass die Histondimere in einem Nukleosom auch asymmetrisch modifiziert werden können (Voigt et al., 2012). Aufgrund der ständig wachsenden Neuentdeckungen und Erkenntnisse über PTM ist bis jetzt noch nicht endgültig geklärt, wie die genaue Regulation einzelner Prozesse in der Zelle stattfindet. Bis jetzt konnte nur für wenige PTM ein direkter kausaler Zusammenhang mit den Effekten im Chromatin hergestellt werden (Henikoff und Shilatifard, 2011).

Dass PTM in der DNA-Reparatur jedoch eine sehr wichtige Rolle spielen, ist spätestens seit der Entdeckung von H2AX, welches nach DNA-Schädigung an den Schadensorten phosphoryliert wird, bekannt (Rogakou et al., 1998). Die Phosphorylierung der Histonvariante H2AX erfolgt innerhalb der ersten Minuten nach der Entstehung eines Doppelstrangbruches und umfasst einen Bereich von 2-3 Mb (Rogakou et al., 1999).  $\gamma$ H2AX ist ein zentraler Baustein innerhalb der DNA-Reparatur und dient seit der Entdeckung in Zusammenhang mit DSB (Rogakou et al., 1998) in vielen Untersuchungen als Doppelstrangbruchmarker. In diversen Immunfluoreszenzstudien wurde gezeigt, dass  $\gamma$ H2AX nach ionisierender Strahlung mit vielen DNA-Reparaturfaktoren wie dem MRN-Komplex, 53BP1, MDC1, BRCA1 und RAD51 kolokalisiert. Verantwortlich für die Phosphorylierung sind die PI3-like Kinasen ATM, ATR und DNA-PK, wobei ATM und DNA-PK vor allem bei der Reaktion auf Schäden durch IR beteiligt sind, ATR hingegen bei Schäden, die durch die DNA-Replikation in der S-Phase entstehen. Eine strikte Trennung kann jedoch hier nicht gezogen werden. Alle drei Kinasen scheinen während der zellulären Reaktion auf IR und Replikationsstress zusammen zu wirken und auch ATR kann in der S- und G2-Phase in die Reparatur von IR Schäden involviert sein (Übersicht bei Firsanov et al., 2011). Seit der Entdeckung von  $\gamma$ H2AX im Zusammenhang mit der DNA-Reparatur wurden immer mehr Mechanismen entdeckt, wie PTM und DNA-Reparaturfaktoren zusammenwirken. Dabei spielt nicht nur das Setzen von neuen Modifikationen eine Rolle, es kommt ebenso zu einer Veränderung im Muster der bestehenden PTM. Es sind hierbei sowohl Prozesse entdeckt worden, die möglicherweise zu einer Auflockerung des Chromatins führen, als auch welche, die zu einer Kondensierung und Expressionsrepression

führen könnten. In Abbildung 4.1 bzw. Abbildung 4.2 sind diese Interaktionen und Zusammenhänge vereinfacht dargestellt. Die durchgezogenen Linien stellen dabei gut untersuchte Interaktionen und kausale Beziehungen dar, die unterbrochenen Linien Wege, für die es bis jetzt weniger starke Evidenzen gibt. Was sofort ins Auge sticht, ist die Tatsache, dass die wenigsten Wege bis jetzt gut untersucht sind (Friedl et al., 2012). Für vieles gibt es bisher nur Hinweise und auch oft widersprüchliche Daten, die auf viele Gründe, wie beispielsweise verschiedene Zelllinien, Schadensarten oder auch methodische Unterschiede zurückzuführen sind.

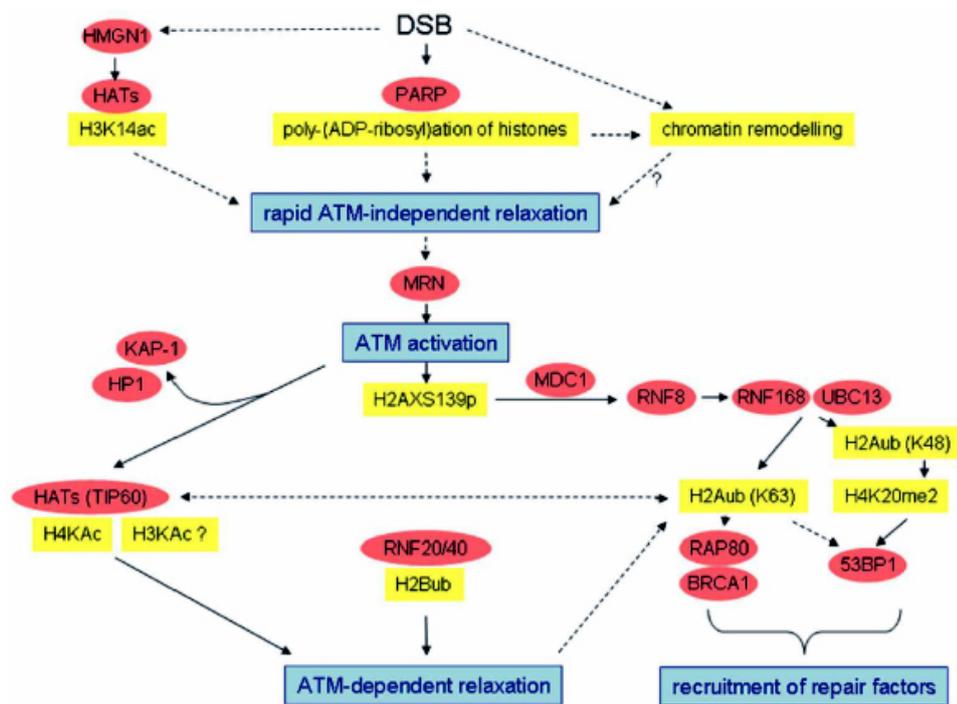


Abbildung 4.1. Vereinfachte Übersicht über die strahlungsinduzierten Veränderungen, die möglicherweise zu einer offeneren Chromatinstruktur und der Rekrutierung von DNA-Reparaturfaktoren führen. Die durchgezogenen Linien stellen gut untersuchte Interaktionen und kausale Beziehungen dar, die unterbrochenen Linien Wege, für die es bis jetzt weniger starke Evidenzen gibt (Friedl et al., 2012).

Eine wichtige PTM für die Auflockerung des Chromatins scheint die Acetylierung zu sein. Histonacetyltransferasen (HAT) katalysieren den Transfer der Acetylgruppe von CoA an die Lysinreste von H3 und H4. Dies führt zu einer Neutralisierung der positiven Ladung der Lysinreste, was die Interaktion zwischen Histon und DNA schwächen kann (Bannister und Kouzarides 2011). Die globale Acetylierung von H3K14 scheint dabei als einer der ersten

Schritte der DNA-Schadensantwort noch vor ATM-Aktivierung zu erfolgen (Lim et al., 2005; Kim et al., 2009). Die in der Literatur beschriebenen Beobachtungen an den Veränderungen des Acetylierungsmuster nach DNA-Schädigung stellen sich jedoch größtenteils als sehr widersprüchlich dar. Einige Gruppen sehen beispielsweise eine Zunahme von H3K14ac nach DNA-Schädigung (Murr et al., 2006; Kim et al., 2009), andere bestätigen dies aber nicht und beschreiben dafür eine Hyperacetylierung von H3K18 (Ogiwara et al., 2011). Für H3K56ac sind die Daten noch widersprüchlicher. Hier wurde sowohl eine Zunahme (Das et al., 2009; Vempati et al., 2010), als auch eine globale Abnahme der H3K56 Acetylierung beschrieben (Tjeertes et al., 2009; Yang et al., 2009; Miller et al., 2010). Die lokale Hyperacetylierung von H4 scheint gesicherter zu sein und wurde von verschiedenen Gruppen beschrieben (Murr et al., 2006; Falk et al., 2007; Ogiwara et al., 2011). Die schadensinduzierte Hyperacetylierung von H4 an den Lysinen 5, 8, 12 und 16 beeinflusst dabei vermutlich entweder direkt über die Schwächung der Verbindung zwischen H2A und H4 oder indirekt über den NuA4 Remodelling-Komplex, die Nukleosomstabilität (Xu und Price, 2011).

Interessanterweise geht die schadensabhängige lokale Chromatindekondensierung, wie sie beispielsweise Kruhlak et al. (2006) nach Bestrahlung mit einem UV-Laser beobachten konnten, nicht mit einem Verlust von heterochromatinspezifischen PTM wie H3K9me2 oder H3K9me3 einher (Ayoub et al., 2008; Luijsterburg et al., 2009, Sun et al., 2009; Noon et al., 2010; Seiler et al., 2011).

Es scheint neben der Auflockerung des Chromatins auch gleichzeitig zu einer Verdichtung und damit Repression der Genexpression zu kommen. Dies geht einher mit einem Verlust der Euchromatinmarker H3K4me3 und H3K9ac, wie auch in Abbildung 4.2 zu sehen ist (Seiler et al., 2011, Friedl et al., 2012).

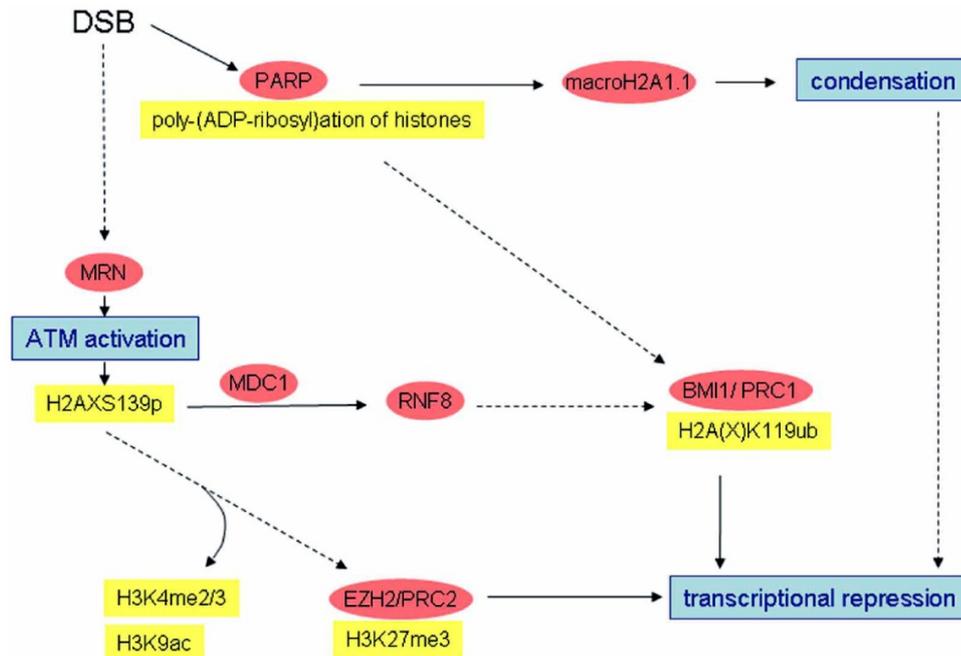


Abbildung 4.2. Vereinfachte Übersicht über die strahlungsinduzierten Veränderungen, die möglicherweise zu einer Chromatinkondensation und einer transkriptionellen Repression führen. Die durchgezogenen Linien stellen gut untersuchte Interaktionen und kausale Beziehungen dar, die unterbrochenen Linien die Wege, für die es bis jetzt weniger Evidenzen gibt (Friedl et al., 2012).

Bei den vielfältigen Veränderungen im PTM-Muster muss während und nach der eigentlichen DNA-Reparatur die stark veränderte Chromatinstruktur wiederhergestellt werden, um die genetische und epigenetische Stabilität zu gewährleisten. Hier kommen Histonchaperone zum Einsatz, die entfernte Histonoktamere wieder in das Chromatin einbauen oder modifizierte Histone austauschen, genauso wie diverse andere Enzyme, wie z.B. Histondeacetylasen, die Modifikationen entfernen oder auch wiederherstellen. Der aktuelle Wissenstand legt nahe, dass es zu keiner vollständigen Wiederherstellung der parental Struktur kommt, da ebenso neue Histone eingebaut werden, so dass man von einem möglichen „damage imprint“ spricht (Soria et al., 2012, Misteli und Soutoglou, 2009). Diese epigenetischen Veränderungen nach DNA-Reparatur, vor allem durch HR, können dabei sogar zur Stilllegung von Genen führen (O’Hagan et al., 2008).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass noch nicht im Detail bekannt ist, wie alles ineinandergreift, welche Histonmodifikationen während der DNA-Reparatur verändert werden, von welchen Faktoren dies abhängig ist und welche Auswirkungen dies sowohl auf die Strangbruchreparatur, als auch auf den weiteren Zellstoffwechsel hat. Es fehlt an

Screening-Untersuchungen bei denen Histonmodifikationen identifiziert werden, die sich nach einer DNA-Schädigung verändern. Tjeertes et al. haben 2009 ein entsprechendes Screening in U2OS und HeLa-Zellen nach Behandlung der Zellen mit DNA-schädigenden Agenzien publiziert. Im Zuge dieser Arbeit soll die Veränderung des PTM-Musters nach Bestrahlung in lymphoblastoiden Zelllinien untersucht werden.

### **1.3.3. Individuelle Strahlenempfindlichkeit und epigenetische Therapie**

Bereits seit über 100 Jahren ist bekannt, dass einzelne Individuen unterschiedlich auf Bestrahlung reagieren. Dies führt vor allem bei der Strahlentherapie von malignen Tumoren zu einer starken Einschränkung, da zwischen einem möglichst großen therapeutischen Effekt und möglichst geringen Nebenwirkungen in den bestrahlten und benachbarten Geweben eine Balance gefunden werden muss. Hierbei kann man in frühe und späte Nebenwirkungen unterscheiden. Bei den frühen handelt es sich beispielsweise um Hautirritationen, Schleimhautentzündungen, Übelkeit oder Diarrhö, die jedoch nach der Beendigung der Behandlung schnell wieder abklingen. Späte Nebenwirkungen begleiten den Patienten hingegen über Monate und Jahre hinweg nach der Radiotherapie und finden beispielsweise Ausprägung in Fibrosen, Atrophien, Schädigungen der Gefäße oder Neuronen und anderen Erkrankungen, u.a. auch strahleninduzierten Tumoren (Bentzen, 2006; Foray et al., 2012). Dabei sind nicht nur Patienten mit genetischen Syndromen wie beispielsweise Ataxia Telangiectasia betroffen, auch bei 5-15% der Krebspatienten ohne einer mit Strahlensensitivität assoziierten genetischen Erkrankung treten mittlere und schwere Komplikationen während oder nach der Strahlentherapie auf (Foray et al., 2012). In welchen interindividuellen Unterschieden diese Variation an Strahlensensitivität begründet liegt, ist noch nicht geklärt.

Interessante Kandidaten hierfür wären Proteine, die an der epigenetischen Regulation beteiligt sind. Genomanalysen von malignen Tumoren konnten Mutationen sowohl in Histon- und DNA-modifizierenden Proteinen, als auch in Nukleosom-Remodelling-Komplexen identifizieren (Jakopovic, 2013). Epigenetische Veränderungen treten in der frühen Karzinogenese vermutlich deutlich häufiger auf als Änderungen der DNA-Sequenz.

Eines der prominentesten Beispiele ist hierbei die Stilllegung von Tumorsuppressorgenen durch DNA-Hypermethylierung der Promoterregionen (Esteller et al., 1999; Schuebel et al., 2007; Geutjes et al., 2012). Deswegen ist die Epigenetik auch ein interessantes Ziel für die Tumorthherapie. Sowohl Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDAC-Inhibitoren), als auch DNA-Methyltransferase-Inhibitoren (DNMT-Inhibitoren) werden aktuell bereits in der Krebstherapie eingesetzt. Allerdings wirken diese sehr unspezifisch. HDAC-Inhibitoren können streng genommen nicht als spezifisch epigenetisches Medikament bezeichnet werden, da sie nicht nur einen Einfluss auf den Acetylierungsstatus von Histonen haben, sondern zu einer Hyperacetylierung von 1750 verschiedenen Proteinen in der Zelle führen können (Choudhary et al., 2009). Dies bietet zwar einerseits großes Potential für Nebenwirkungen, auf der anderen Seite könnte es aber auch einen großen Teil zu dem therapeutischen Effekt der HDAC-Inhibitoren beitragen. DNMT-Inhibitoren wirken zwar spezifisch auf DNA-Methylierung, allerdings kommt es nicht nur in den tumorrelevanten Genen, sondern genomweit zu einer Hypomethylierung. Es konnte zwar gezeigt werden, dass eine globale Reduktion der DNA-Methylierung im Mausmodell positive Effekte auf die Heilung von Intestinaltumoren hat (Laird et al., 1995), gleichzeitig ist Hypomethylierung aber auch mit genomischer Instabilität verknüpft und könnte eine epigenetische Veränderung darstellen, welche die Tumorbildung fördert (Rius und Lyko, 2012). Deswegen wird nach immer neuen Inhibitoren gesucht, welche in die epigenetische Regulation eingreifen, dabei aber nicht global, sondern tumorspezifisch wirken. Ein Beispiel wäre hierfür der Wirkstoff EPZ-6438, welcher im Mausmodell erfolgreich getestet wurde und vermutlich bald in die erste klinische Testphase gehen wird. Es handelt sich hierbei um einen EZH2-Inhibitor. EZH2 ist eine katalytische Untereinheit von PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*), einem Multiproteinkomplex, welcher für die Methylierung von H3 Lysin 27 (H3K27) verantwortlich ist und mit einer Reihe von hämatologischen und soliden menschlichen Tumoren in Verbindung gebracht wird, wie beispielsweise Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) (Deshpande et al., 2012; Lund et al., 2014). Der EZH2-Inhibitor ist in der Lage, selektiv NHL-Zellen zu töten, die eine Mutation im EZH2 haben, Zellen mit EZH2-Wildtyp werden dabei nur minimal in ihrer Proliferation eingeschränkt (Knutson et al., 2013; Wee et al., 2014).

Die Forschung befindet sich hier noch ganz am Anfang in den Bemühungen einen Bogen zu schlagen zwischen individueller Strahlenempfindlichkeit, Epigenetik und spezifischer und individualisierter Tumorthherapie. Da Histonmodifikationen als Marker und Bindungsstellen nicht nur in der DNA-Reparatur, sondern auch für andere Prozesse in der Zelle eine zentrale Rolle spielen und teilweise mit Krebs und Tumorthherapie assoziiert werden können, wird in dieser Arbeit untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen individueller Strahlenempfindlichkeit und der spezifischen Veränderung des Histonmodifikationsmusters nach Bestrahlung besteht.

#### **1.4 Spezifische Herausforderung: DDR und Reparatur in kondensiertem Chromatin**

DNA-Schäden innerhalb von hoch kondensiertem Chromatin stellen eine besondere Herausforderung an die Zelle dar. Durch den hohen Kompaktierungsgrad der DNA stellt sich nicht nur die Frage nach möglichen Einschränkungen in der Zugänglichkeit für Proteine der DNA-Schadensantwort (*DNA damage response*, DDR), aufgrund der darin enthaltenen hochrepetitiven Sequenzen bedarf es zudem einer strengeren Regulation der DNA-Reparatur als im Euchromatin. Besonders während der HR besteht ansonsten die Gefahr von Verlust oder Duplikation von Information (Peng und Karpen, 2008) oder bei der Rekombination zwischen identischen Wiederholungen nichthomologer Chromosomen die Entstehung von Austauschaberrationen.

Nicht nur während der Mitose liegen Chromosomen in einem hochkondensierten Zustand vor, sondern auch im Interphasekern sind etwa 15-25% der DNA in Heterochromatin gepackt, so dass sich hier ebenfalls die Frage nach der DNA-Schadensantwort stellt. Interessant sind hierzu Beobachtungen die zeigen, dass 10-25% der DSBs deutlich langsamer repariert werden als die restlichen DNA-Doppelstrangbrüche (Iliakis et al., 1991, Löbrich et al., 1995) und dass derselbe Prozentsatz spezifisch ATM und Artemis für die Reparatur benötigt (Riballo et al., 2004; Darroudi et al., 2007). Auch wenn die Komplexität der Läsion die Reparaturkinetik beeinflussen kann (Riballo et al., 2004), deuten neuere

Ergebnisse darauf hin, dass der Anteil an langsam reparierten DSBs denen entspricht, die sich innerhalb von HC-Bereichen befinden (Goodarzi et al., 2008).

Zu der Ausbildung von  $\gamma$ H2AX-Foci in Heterochromatinbereichen sind sehr unterschiedliche Aussagen in der Literatur zu finden. Cowell et al. haben 2007 beispielweise publiziert, dass  $\gamma$ H2AX-Foci nicht in Chromatinbereichen auftreten, die mit Heterochromatinmarkern wie HP1 $\alpha$  oder H3K9me3 (trimethyliertes Lysin 9 des Histons H3) dekoriert sind. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Rube et al. 2011, die Ergebnisse aus Analysen mit einem Transmissionselektronenmikroskop veröffentlicht haben. Sie beschreiben, dass  $\gamma$ H2AX, 53BP1 und MDC1 nur in dichten Chromatinbereichen auftreten und dort mit dem Heterochromatinmarker H3K9me3 kolokalisieren und nie mit acetyliertem H3, einem Marker für Euchromatinbereiche.

Bis jetzt ist wenig darüber bekannt, wie sich DNA-Reparaturfaktoren in hyperkondensiertem Chromatin verhalten. Es wird postuliert, dass in den Heterochromatinbereichen der Zelle unter normalen physiologischen Bedingungen nur die frühe Schadenserkennung und Prozessierung innerhalb des HC stattfindet und alle weiteren Schritte der Reparatur erst erfolgen, nachdem die geschädigte DNA an die Peripherie der HC-Bereiche gebracht wurde (Abbildung 4.3) (Soria et al., 2012).

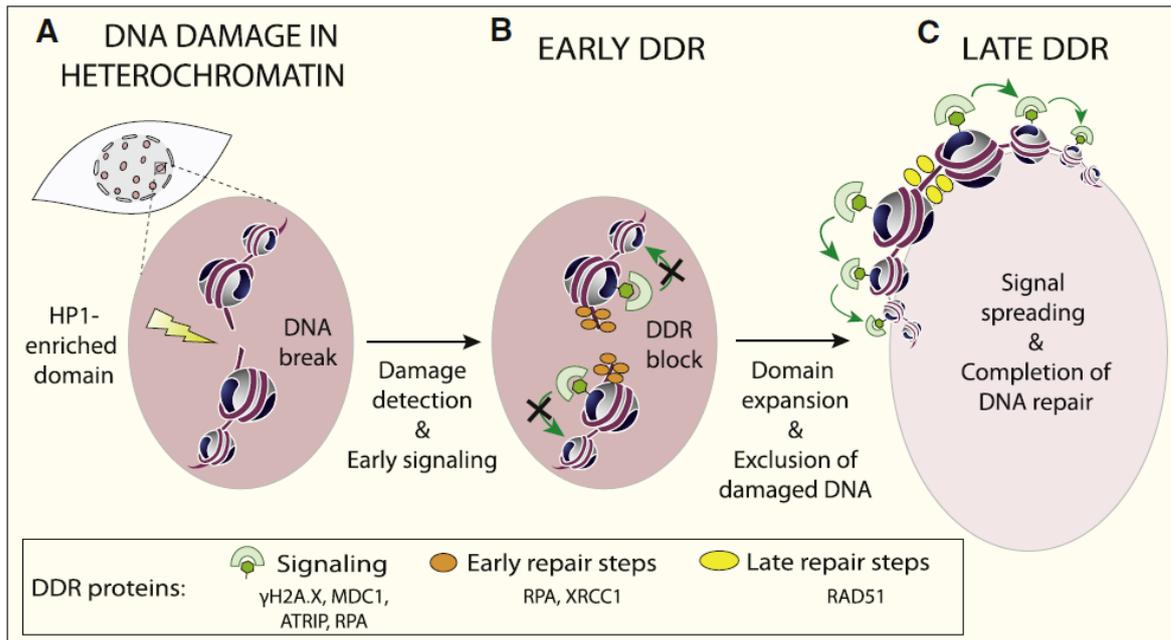


Abbildung 4.3. Model für die mögliche DSB-Antwort innerhalb von Heterochromatinbereichen in höheren Eukaryoten. In rosa dargestellt ist schematisch ein durch den Heterochromatinmarker beschriebenes Chromozentrum einer Mauszeile. Wenn es zu einem DNA-Schaden innerhalb dieses Heterochromatinbereichs kommt (A), finden die frühen Schritte der DDR, wie die Schadenserkenkung und die frühe Signaltransduktion innerhalb des Heterochromatins statt (B). Anschließend kommt es zu einer Volumenzunahme des Chromozentrums und zu einer Verlagerung der beschädigten DNA an die Peripherie des Heterochromatinbereichs. Erst dort findet die weitere Signalweitergabe und die vollständige Reparatur statt (C) (Soria et al., 2012).

Depletionsversuche an *Drosophila*-Zellen in denen entweder Proteine des NHEJ oder der HR ausgeschaltet wurden, haben gezeigt, dass – anders als im EC – in DAPI-intensiven HC-Bereichen alleine die homologe Rekombination für die Reparatur der Doppelstrangbrüche verantwortlich ist. Die frühen Schritte der DNA-Reparatur, wie Schadenserkenkung, H2AX-Phosphorylierung, Bildung von ATRIP und Mdc1-Foci, scheinen auch innerhalb des HC mit derselben Effektivität und Kinetik zu verlaufen wie im EC. Weitere Schritte, wie die Rekrutierung von Rad51, erfolgen allerdings zeitlich und räumlich versetzt (Chiolo et al., 2011). Hierfür müssen zunächst umfassende Veränderungen in der Chromatinstruktur erfolgen, die sich u.a. in einer Vergrößerung der HC-Domänen zeigt. Entgegen früherer Annahmen, scheint es bei den Veränderungen weniger um eine Auflockerung der Chromatinstruktur zu gehen, die DNA-Reparaturfaktoren eine bessere Zugänglichkeit ermöglicht, sondern vielmehr darum, den geschädigten DNA-Strängen die Mobilität zu verschaffen, die sie benötigen, um für die weitere Reparatur an die Peripherie des HC

gebracht zu werden. Hierbei scheinen vor allem zwei Heterochromatinproteine eine entscheidende Rolle zu spielen, HP1- $\beta$  (*Heterochromatin Protein 1- $\beta$* ) und KAP-1 (*Krüppel-associated protein-1*). HP1- $\beta$  bindet an den Heterochromatinmarker H3K9me3 (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001) und blockiert die Assemblierung von Rad51-Foci im HC (Chiolo et al., 2011). Nach einer DNA-Schadensinduktion wird es von CK2 (*Casein Kinase 2*) phosphoryliert, was eine Konformationsänderung und eine Freisetzung vom Heterochromatin bewirkt (Ayoub et al., 2008). KAP-1 wird durch ATM phosphoryliert. Dies verursacht eine Störung der Interaktion von KAP-1 und CHD3 (*chromodomain helicase DNA-binding protein 3*), so dass CHD3 von heterochromatischen DSBs entfernt wird (Goodarzi et al., 2011). Dies führt zu einer Chromatinrelaxierung (Goodarzi et al., 2011), wobei der genaue Mechanismus, wie die Freisetzung von CHD3 aus dem HC die Reparatur fördert, noch unklar ist (Soria et al., 2012).

Für die Expansion des HC und die Relokalisierung der Reparaturfoci an die Peripherie des HC-Kompartiments scheinen die Checkpoint Proteine ATM und besonders ATR, sowie Resektionsproteine notwendig zu sein (Chiolo et al., 2011).

Entgegen früherer Schlussfolgerungen (Cowell et al., 2007; Goodarzi et al., 2008; Kim et al., 2007) ist vermutlich die Struktur des Heterochromatins nicht grundsätzlich eine Behinderung für die DNA-Schadenserkennung und die weitere Reparatur darzustellen. Ebenso scheint die bei der Reparatur beobachtete Chromatinauflockerung nicht, wie von verschiedenen Autoren angenommen (Ayoub et al., 2008; Goodarzi et al., 2008), für die Zugänglichkeit von Reparaturfaktoren notwendig zu sein, da sonst eine effektive und schnelle Phosphorylierung von H2AX und die Focibildung von großen Proteinen wie Mu2 (*Drosophila*-Homolog von Mdc1) im HC nicht möglich wäre (Chiolo et al., 2011).

Auch für mitotische Zellen konnte gezeigt werden, dass die ersten Schritte der Schadenserkennung, wie die Rekrutierung des MRN-Komplexes, die Aktivierung von ATM und die Phosphorylierung von H2AX auch in den hyperkondensierten Mitosechromosomen noch möglich ist (Giunta et al., 2010; Gomez-Godinez et al., 2010; van Vugt et al., 2010).

Dennoch ist immer noch wenig darüber bekannt, ob und wie DNA-Reparatur in hyperkondensiertem Chromatin abläuft – besonders in humanen Zellen. Anders als die in vielen zu dem Thema verwendeten Mauszellen verfügen humane Zellen nicht über große, klar abgegrenzte Heterochromatinbereiche wie die murinen Chromozentren. Um quantitative Aussagen über die DNA-Reparatur in hyperkondensiertem, oder auch aufgelockertem, Chromatin treffen zu können, wurde in dieser Arbeit eine Möglichkeit zur artifiziellen Veränderungen der Chromatinstruktur verwendet. Bereits 1938 wurde von Otto Bank beschrieben, dass eine Erhöhung oder Erniedrigung der Ionenkonzentration in dem Umgebungsmedium der Zellen oder Geweben zu einer Veränderung der Strukturen im Zellkern führt. Diese Methode der künstlichen Hyper- bzw. Hypokondensierung von Chromatin wurde seither in zahlreichen Experimenten als eine schnelle und transiente Methode genutzt, um die Chromatinstruktur zu beeinflussen. Die Veränderung tritt dabei innerhalb von wenigen Minuten ein und ist in ähnlich kurzen Zeitspannen reversibel. Durch unterschiedliche Molaritäten sind Abstufungen des Kondensationsgrades möglich – von aufgelockertem Chromatin bis hin zu Stadien die, einen Vergleich mit Mitosechromatin zulassen (Albiez et al., 2006; Martin und Cardoso, 2010).

Eine Kombination aus artifiziell veränderter Chromatinstruktur und Bestrahlung bzw. der Reparatur von strahleninduzierten DNA-Schäden wurde bisher kaum untersucht. Erste Untersuchungen von Susanne Bretkopf im Zuge einer Diplomarbeit in unserer Arbeitsgruppe (Bretkopf, 2007) deuteten auf eine Reduktion bzw. Inhibierung der Rad51 und 53BP1-Akkumulierung an den Schadensort im hyperkondensierten Chromatin hin.

Im Zuge dieser Arbeit wurde eine systematische Untersuchung verschiedener DNA-Reparaturfaktoren innerhalb unterschiedlicher Chromatinqualitäten – von aufgelockert bis stark kondensiert – durchgeführt. Beurteilt wurde hierbei ihre Akkumulierungsfähigkeit und Kolokalisation mit  $\gamma$ H2AX am Schadensort, um detaillierter als bisher beschrieben die Abhängigkeit von Chromatinstruktur und DNA-Reparatur beurteilen zu können.

## 1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Da die DNA nicht nackt im Zellkern vorliegt, sondern in eine komplexe Chromatinstruktur eingebettet ist, welche nicht nur in Abhängigkeit der Zellzyklusphase in unterschiedlichen Kondensationsgraden in der Zelle vorliegt, sollte diese für eine umfassende Betrachtung zellulärer Prozesse wie die DNA-Schadensantwort und Reparatur miteinbezogen werden.

Ziel dieser Arbeit war die Betrachtung der wechselseitigen Beeinflussung von DNA-Schadensantwort und Chromatinstruktur.

Im ersten Teil sollte der Einfluss des Kompaktierungsgrades des Chromatins auf die Akkumulierung von DNA-Reparaturfaktoren untersucht werden. Hierfür musste zunächst geklärt werden, inwiefern die gewählte Methode der artifiziellen und transienten Hyper- bzw. Hypokondensierung des Chromatins durch hyper- oder hypotones Medium Einfluss auf die allgemeine Morphologie und Viabilität der gewählten Zellsysteme hat. Im Weiteren wurden dann folgende Fragen geklärt:

*Findet auch in der veränderten Chromatinstruktur eine effiziente Phosphorylierung von H2AX nach Ionenmikrobestrahlung statt und welchen Einfluss gibt es auf die Größe und die Anzahl der  $\gamma$ H2AX-Foci? Welche DNA-Reparaturfaktoren sind auch in hyperkondensiertem Chromatin noch in der Lage am Schadensort zu akkumulieren? Kann hierbei ein Unterschied zwischen Proteinen festgestellt werden, die früh oder spät an der DNA-Reparatur beteiligt sind? Gibt es eine kritische Osmolarität bei der keine Akkumulierung mehr stattfinden kann und ist diese in unterschiedlichen Zellsystemen gleich? Welche Bedeutung haben kinetische Effekte oder mögliche Antikörperartefakte auf die Beurteilung der Ergebnisse? Wie wirkt sich im Gegensatz zur Hyperkondensierung eine Auflockerung der Chromatinstruktur auf die Focibildung der untersuchten Reparaturfaktoren aus?*

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte dann die andere Seite näher betrachtet werden, wie die Bestrahlung mit IR und der darauffolgende DNA-Reparaturprozess die Chromatinstruktur verändert. Hierfür wurden verschiedene Histonmodifikationen nach IR quantitativ im

Western Blot analysiert. Die Versuche wurden zunächst an einer LCL-Zelllinie eines gesunden Spenders durchgeführt und unter den folgenden Gesichtspunkten betrachtet:

*Welche PTM zeigen eine Zu- oder Abnahme in ihrer global detektierbaren Menge und welchen Einfluss hat hierbei die applizierte Dosis und die Inkubationszeit nach Bestrahlung? Gibt es ein einheitliches Muster bei bestimmten PTMs wie Acetylierungen oder Methylierungen oder gibt es eine Korrelation, ob eine PTM mit transkriptionell aktivem oder inaktivem Chromatin assoziiert ist?*

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde dann im Anschluss an einem kleineren Set an PTM noch untersucht, ob es interindividuelle Unterschiede zwischen Zelllinien verschiedener Spender gibt und ob diese eventuell mit der Strahlensensitivität einer Zelllinie korrelieren, da dies einen wichtigen Hinweis auf die Frage nach einer individuellen Strahlentherapie und einer epigenetisch wirkenden Tumorthherapie liefern könnte.

## **2. Ergebnisse**

### **2.1 Beeinflussung der Schadensantwort durch modifizierte Chromatinzugänglichkeit**

Um die Beeinflussung der DNA-Schadensantwort von verschiedenen Reparaturfaktoren in Abhängigkeit der Chromatinzugänglichkeit beurteilen zu können, wurde eine schnelle und transiente Methode verwendet, welche auf rein physiologischen Effekten beruht. Durch Modulation der Osmolarität des Kulturmediums (isoton: 290 mOsm) kann sowohl eine Auflockerung der Chromatinstruktur (hypotonen Medium: hier 140 mOsm), als auch eine Hyperkondensation durch hypertones Medium (hier 525 bis 750 mOsm) erreicht werden.

Bevor jedoch der Einfluss auf die DNA-Reparaturfaktoren nach Schadensinduktion untersucht wurde, wurde zunächst abgeklärt, welchen Effekt die veränderte Osmolarität des Kulturmediums auf die Viabilität der Zellen hat. Da die Behandlung mit hypotonem Medium nach eigenen und auch fremdpublizierten Ergebnissen (Baure et al., 2008) deutlich weniger potentiell schädliche Einflüsse auf Zellen hat als hypertones Medium, erfolgte bei den Analysen eine Konzentration auf die Behandlung der Zellen mit Hypertonie.

#### **2.1.1 Untersuchung der Verträglichkeit der Hypertonbehandlung**

Als Kriterien für den Einfluss und die Verträglichkeit des hypertonen Mediums auf die Zellen wurde sowohl die Zellkerngröße und -morphologie untersucht, als auch Versuche zur Apoptoseinduktion und Induktion von Strangbrüchen durchgeführt.

##### **Apoptoseinduktion**

Die veröffentlichten Angaben zur Apoptoseinduktion durch hohe Salzkonzentrationen im umgebenden Medium der Zellen sind sehr widersprüchlich. Von diversen Autoren wird für verschiedene Zelllinien und nach unterschiedlichen Inkubationszeiten eine massive Apoptoseinduktion nach hypertoner Behandlung beschrieben (Galvez et al., 2001, Falk et al., 2008, Dmitrieva et al., 2008). Im Gegensatz zu anderen Schädigungen der Zelle, wie beispielsweise Bestrahlung, die erst zwischen 24 und 48 h zu einem deutlichen Anstieg in

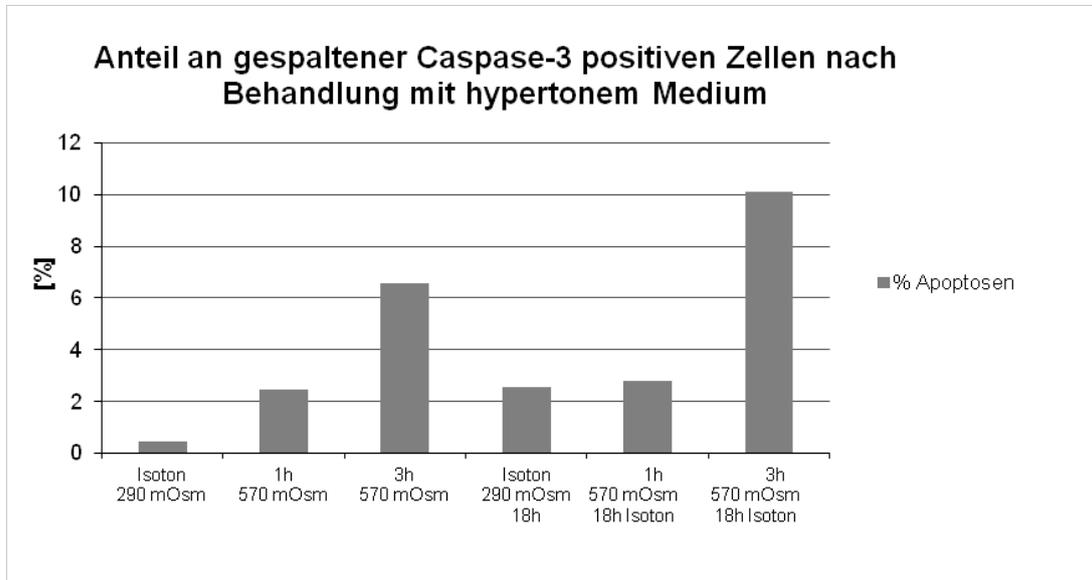
der Apoptoserate der Zellen führen (z.B. Auer et al., 2011), wurde unter Hypertonbehandlung schon nach relativ kurzen Zeitwerten Apoptoseinduktion beschrieben. Galvez et al., 2001, sehen nach 6 h osmotischem Stress in Herz-Myozyten eine deutlich erhöhte Apoptoserate, Dmitrieva et al., 2008, beschreiben dies für HeLa-Zellen nach 4 h bei 500 und auch 600 mOsm. Die Experimente von Falk et al., 2008, zeigen einen noch deutlicheren und schnelleren Anstieg der Apoptoserate in BJ-Fibroblasten. Nach 20 min Hypertonie sind 10% der Zellen apoptotisch, nach 60 min steigt dieser Wert sogar auf 80% an. In anderen Arbeitsgruppen wurde dieser Effekt jedoch nicht beobachtet, in Maus-Nierenzellen kommt es selbst nach 24h osmotischem Stress (550 mOsm) zu keiner erhöhten Apoptoserate (Pihakaski-Maunsbach et al., 2010). Die Apoptoseinduktion und deren Beurteilung scheinen stark sowohl von den behandelten Zellen, als auch von der Osmolarität, der Behandlungsdauer und der genutzten Nachweismethode abzuhängen (Burg et al., 2007), so dass eine jeweilige Beurteilung in dem zu untersuchenden Zellsystem unter den gewählten Versuchsbedingungen nötig ist.

Da die Frage der möglichen Apoptoseinduktion durch die Hypertonbehandlung eine sehr zentrale Rolle bei der Beurteilung der im Weiteren erzielten Ergebnisse darstellt, wurde sie für unsere Zellsysteme und Behandlungsmodalitäten über den Nachweis der gespaltenen Caspase-3 in der Immunfluoreszenz und der fragmentierten Zellen (sub-G1-Fraktion) in der Durchflusszytometrie untersucht.

Bei der Untersuchung in der Immunfluoreszenz wurden HeLa-Zellen für eine oder drei Stunden mit einem hypertonem Medium mit 570 mOsm inkubiert und anschließend entweder direkt fixiert oder über Nacht auf isotones Medium gesetzt, um die Reversibilität der Behandlung zu untersuchen. Vor der Fixierung wurde hier auf den Waschschrift verzichtet, um keine Zellen von der Oberfläche abzuschwemmen.

Die anschließende Auszählung der für gespaltenen Caspase-3 positiven Zellen lieferte das in Abbildung 2.1 dargestellte Ergebnis. Bei einer einstündigen Inkubation kommt es im Vergleich zur isotonen Kontrolle zu einem minimalen Anstieg der positiven Zellen. Dieser Unterschied ist jedoch bei einer darauffolgenden Inkubation unter isotonen Bedingungen für 18 h nicht mehr zu beobachten. Der deutlichere Anstieg nach drei Stunden in 570

mOsm Medium ist hingegen nicht reversibel, steigt jedoch bei der Inkubation über Nacht kaum mehr an und bleibt mit 7 % in einem für die weitere Beurteilung der Reaktion der Zellen akzeptablen Rahmen.

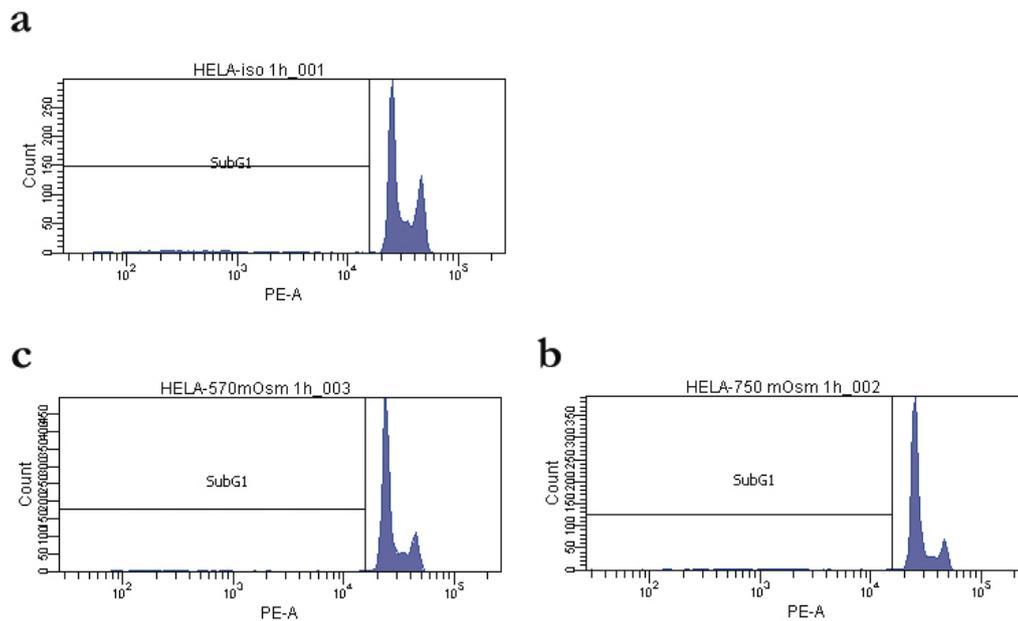


*Abbildung 2.1. Anteil der Zellen mit einem positiven Immunfluoreszenzsignal für gespaltene Caspase-3 nach Behandlung mit 570 mOsm Medium. Die Zellen wurden für 1 h oder 3 h mit hypertonem Medium inkubiert und anschließend entweder direkt fixiert oder weitere 18 h in isotonem Medium inkubiert bevor sie fixiert wurden. Pro Datenpunkt wurden ca. 250 Zellen aus einem Experiment ausgezählt. Bei direkter Fixierung sieht man einen leichten Anstieg bei beiden Inkubationszeiten, für eine Stunde Behandlung ist dieser Effekt nach 18 h in isotonem Medium allerdings nicht mehr zu beobachten.*

Aufgrund der besonders drastischen Ergebnisse von Falk et al., 2008 mit BJ-Fibroblasten, wurde derselbe Versuch auch mit BJ-1-hTERT-Zellen wiederholt, hier konnten jedoch zu keinem gewählten Zeitpunkt bzw. unter keiner Medienbedingung Zellen mit einem positiven Signal für gespaltene Caspase-3 gezählt werden (Daten nicht gezeigt).

Als unabhängige Bestätigung der Ergebnisse aus der Immunfluoreszenz wurde die Durchflusszytometrie gewählt, um ausschließen zu können, dass sich bei der Immunfluoreszenz die apoptotischen Zellen schon komplett abgelöst haben und somit nicht mehr nachzuweisen waren. Es wurde hierbei dem Behandlungsprotokoll für alle weiteren Versuche zur DNA-Schadensantwort gefolgt und eine Stunde mit 570 oder 750

mOsm Medium behandelt. Die anschließende Fixierung, Kernextraktion und Propidiumiodidfärbung erfolgte mittels Nicoletti-Puffer.



*Abbildung 2.2. SubG1-Anteil von HeLa-Zellen nach der Behandlung der Zellen mit hyperosmolarem Medium für 1 h. Die Zellen wurden mit 570 mOsm (b) bzw. 750 mOsm (c) Medium inkubiert und anschließend mit dem Nicoletti-Puffer geerntet, fixiert und gefärbt. Die Proben wurden in einem Durchflusszytometer analysiert und das Gate für die SubG1-Fraktion wurde anhand der isotonen Kontrolle (a) festgelegt. Weder bei einer Behandlung mit 570 mOsm (b), noch mit 750 mOsm (c) kommt es nach einer Stunde zu einem Anstieg der SubG1-Fraktion.*

Die SubG1-Fraktion entspricht fragmentierten, apoptotischen Zellen. Im Gegensatz zu langen Inkubationszeiten, wie unter Abbildung 2.3 für 24 h zu sehen, führt eine einstündige Behandlung der HeLa-Zellen (Abbildung 2.2) weder bei 570 mOsm, noch bei 750 mOsm Medium zu einem Anstieg in der SubG1-Fraktion. Was allerdings auch schon nach einer Stunde Behandlung zu sehen ist, ist eine leichte Verschiebung der Zellzyklusverteilung hin zu G1, die allerdings nicht näher quantifiziert wurde. Der gewählte Experimentaufbau

führt also in HeLa-Zellen zu keiner drastischen Apoptoseinduktion und stellt somit kein Problem für alle weiteren Beobachtungen dar.

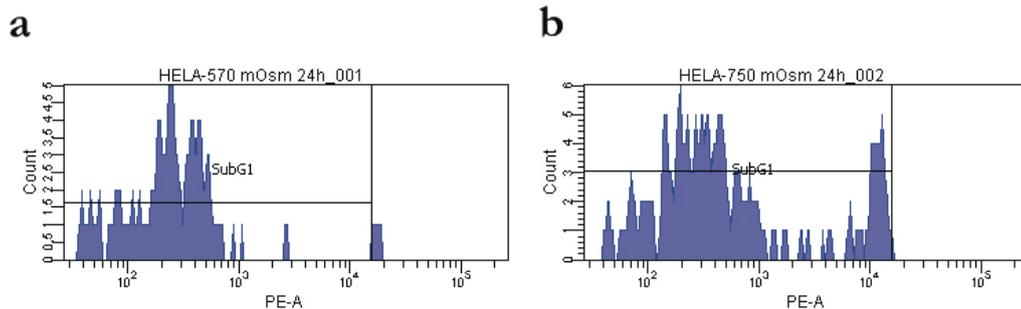


Abbildung 2.3. SubG1-Anteil von HeLa-Zellen nach der Behandlung der Zellen mit hyperosmolarem Medium für 24 h. Die Zellen wurden mit 570 mOsm (a) bzw. 750 mOsm (b) Medium inkubiert und anschließend mit dem Nicoletti-Puffer geerntet, fixiert und gefärbt. Die Proben wurden in einem Durchflusszytometer analysiert und das Gate für die SubG1-Fraktion wurde anhand der isotonen Kontrolle festgelegt. Bei einer Inkubationszeit von 24 h, kommt es bei beiden Osmolaritäten zu einer starken Apoptoseinduktion, fast alle Zellen liegen fragmentiert vor.

## Induktion von Strangbrüchen

Wie bei der Frage nach der Apoptoseinduktion durch Hypertonbehandlung finden sich auch zur Induktion von Strangbrüchen sehr unterschiedliche Angaben in der Literatur. Reitsema et al., 2004 beschreiben beispielsweise eine deutliche Zunahme an  $\gamma$ H2AX-Foci nach Behandlung von SiHa-Zervixkarzinomzellen mit hyperosmolarem Medium. Diese Zunahme sieht auch eine andere Arbeitsgruppe in mIMCD3- (Maus-Nierenzellen) und MEF-Zellen (embryonale Mausfibroblasten), allerdings erst, nachdem die Zellen nach hypertone Stress wieder in isotonem Medium kultiviert wurden (Dmitrieva et al., 2003). In Dmitrieva et al. aus dem Jahr 2008 ist hingegen für HeLa-Zellen publiziert, dass es zwar in allen Zellen zu einer Induktion von Strangbrüchen kommt, aber nur in den Zellen, die anschließend in Apoptose gehen, ein Anstieg von  $\gamma$ H2AX zu beobachten ist. Andere Autoren (Zhou et al., 2006) bestätigen die Ausbildung von  $\gamma$ H2AX-Foci in menschlichen FL-Amnion-Zellen die mit Hypertonie behandelt wurden hingegen nicht.

Da im Folgenden die  $\gamma$ H2AX-Focibildung unter hypertonen Bedingungen untersucht werden soll, ist es wichtig, eine starke Induktion rein durch die hohe Salzkonzentration im

Medium auszuschließen. Dies wurde sowohl auf Proteinebene, als auch in der Immunfluoreszenz untersucht.

Für die Proteinanalyse wurden HeLa- und U2OS-Zellen für 1 h mit 750 mOsm Medium inkubiert, der höchsten in dieser Arbeit für die Analysen der DNA-Reparatur verwendeten Salzkonzentration. Für HeLa-Zellen konnte unter diesen Bedingungen im Western-Blot eine Zunahme der  $\gamma$ H2AX-Menge um 150 % beobachtet werden (Abbildung 2.4). Für die U2OS-Zellen (Abbildung 2.5) war die Zunahme im Durchschnitt etwas geringer, allerdings mit großen Schwankungen zwischen den einzelnen Experimenten.

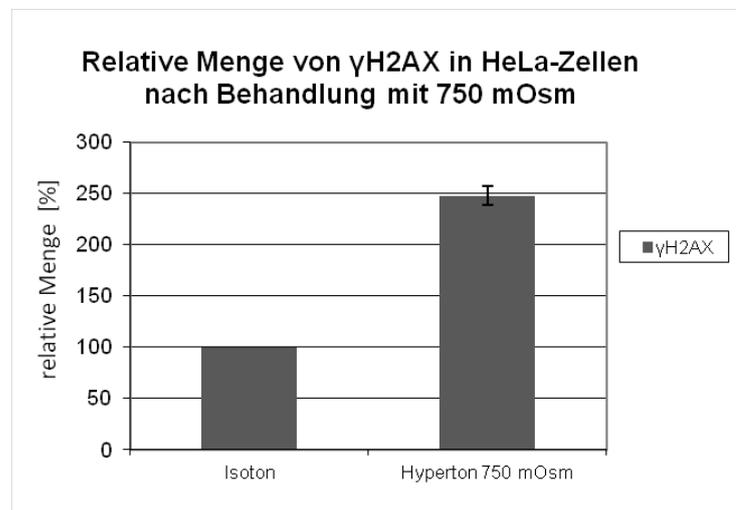


Abbildung 2.4. Quantifizierung der  $\gamma$ H2AX-Menge im Western-Blot nach einer Behandlung der HeLa-Zellen für 1 h in 750 mOsm hypertonem Medium. Die Proteinmenge wurde normalisiert auf die Ladekontrolle H2A und die isotone Kontrolle. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von zwei Experimenten.

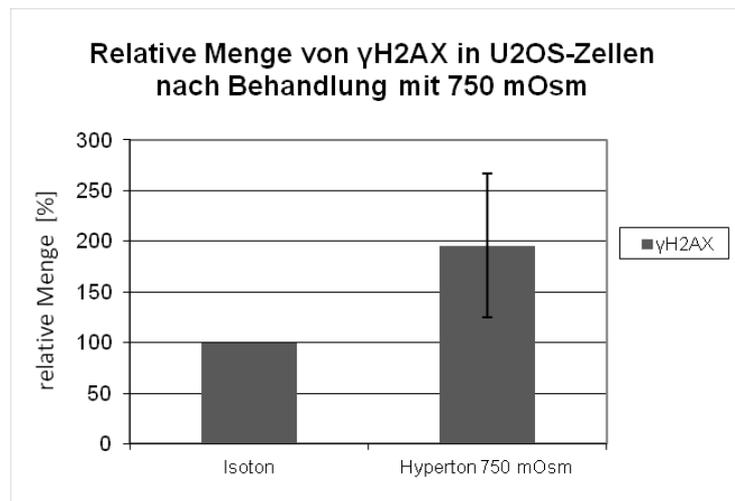


Abbildung 2.5. Quantifizierung der  $\gamma$ H2AX-Menge im Western-Blot nach einer Behandlung der U2OS-Zellen für 1 h in 750 mOsm hypertonem Medium. Die Proteinmenge wurde normalisiert auf die Ladekontrolle H2A und die isotone Kontrolle. Gezeigt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung von zwei Experimenten.

Im Western-Blot lässt sich für beide Zelllinien eine deutliche Zunahme an  $\gamma$ H2AX nach Behandlung mit hypertonem Medium erkennen (Blot-Bilder siehe 0). Da alle weiteren Experimente zur DDR in artifiziiell verändertem Chromatin in der Immunfluoreszenz durchgeführt wurden, wurde zusätzlich untersucht, ob diese Zunahme auch durch eine erhöhte Anzahl an  $\gamma$ H2AX-Foci oder einem stärkeren Hintergrundsignal in der Immunfluoreszenz nachzuweisen ist (Abbildung 2.6) und damit die weiteren Analysen stören könnte.

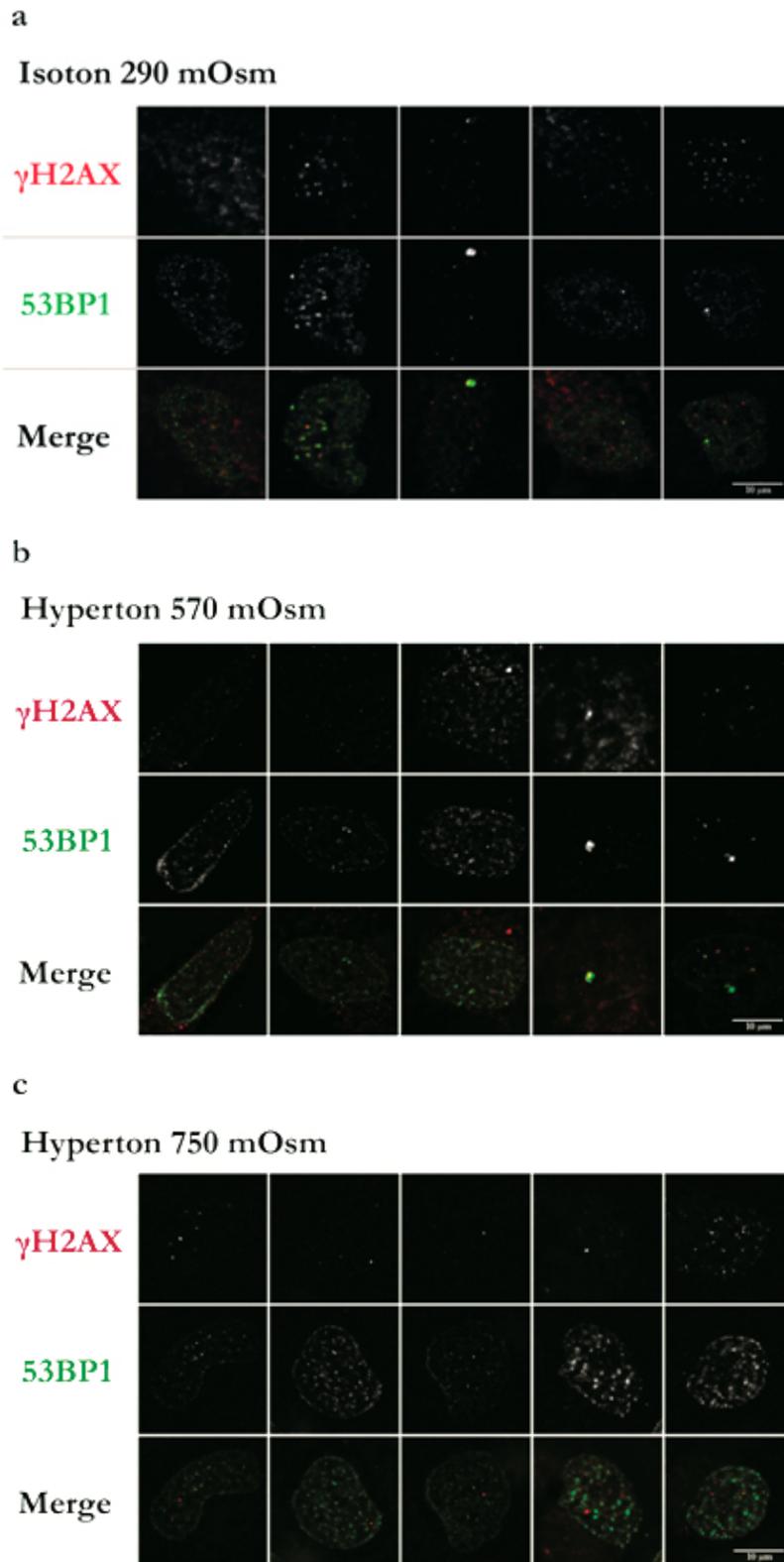


Abbildung 2.6. Keine  $\gamma$ H2AX- und 53BP1-Focibildung in HeLa-Zellen durch Hypertonbehandlung. Die Zellen wurden für 1 h in hyperosmolarem Medium mit 570 mOsm (b) oder 750 mOsm (c) inkubiert, anschließend fixiert und mit indirekter Immunfluoreszenz  $\gamma$ H2AX und 53BP1 als DNA-Schadensmarker nachgewiesen. Die Z-Projektionen repräsentativer Zellkerne wurden auf 8-bit normalisiert und in Galerien dargestellt. Es kommt zu keiner Zunahme der  $\gamma$ H2AX- oder der 53BP1-

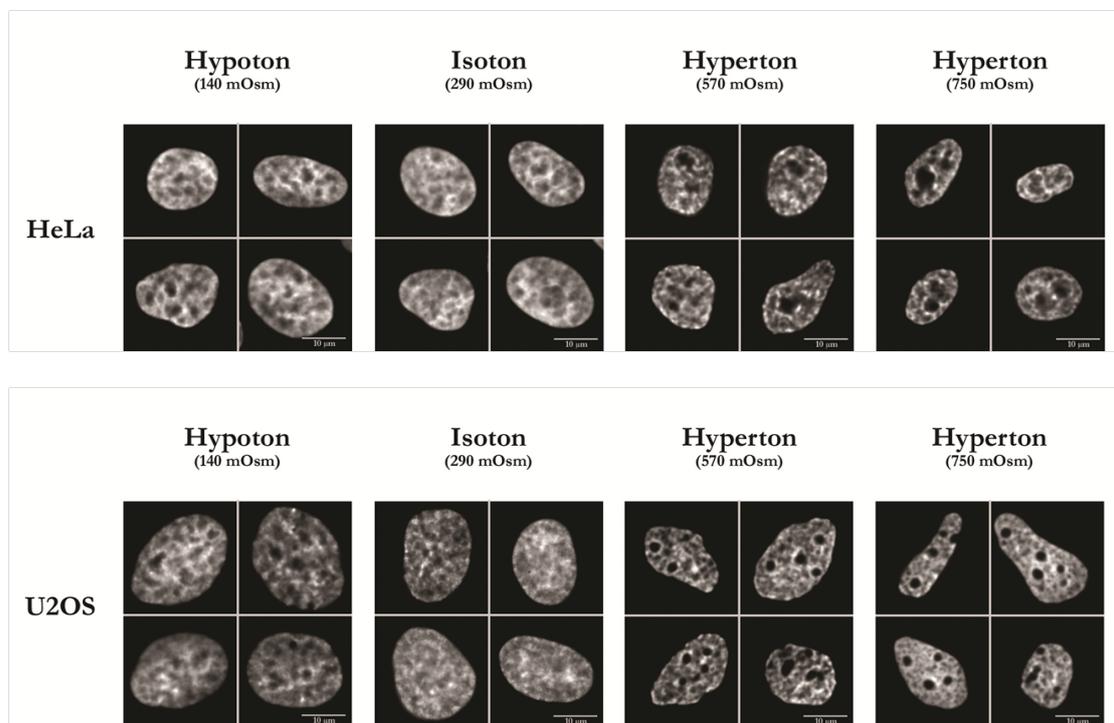
*Foci nach Behandlung mit 570 mOsm (b) oder mit 750 mOsm (c) Medium im Vergleich zur isotonen Kontrolle (a).*

Nach Behandlung der HeLa-Zellen für eine Stunde mit hypertonem Medium mit 570 oder 750 mOsm wurden die Zellen fixiert und mit indirekter Immunfluoreszenz  $\gamma$ H2AX und 53BP1 als DNA-Schadensmarker nachgewiesen. Dargestellt sind Z-Projektionen von 3D Mikroskopieaufnahmen, die anschließend auf 8-bit normalisiert wurden. Durch die Normalisierung wird das 8-bit Spektrum der Grauwerte optimal ausgenutzt, der dunkelste Punkt des Bildes bekommt den Wert „0 = schwarz“ zugeordnet, der hellste Punkt den Wert „255 = weiß“. Bei Mikroskopiedaten mit sehr schwachen Signalen kommt es hierbei zu einer Verstärkung des Hintergrundsignals, welches auf allen in Abbildung 2.6 gezeigten Bildern zu sehen ist. Es handelt sich dabei nicht um die Darstellung von schadensinduzierten Foci. Gerade im direkten Vergleich mit den Bildern der isotonen Kontrolle sieht man, dass es in der Immunfluoreszenz nach der Behandlung mit hypertonem Medium zu keiner erkennbaren  $\gamma$ H2AX-Fociinduktion kommt. Vergleichbare optimale Belichtungszeiten für alle Bedingungen zeigen auch keinen Anstieg in der allgemeinen Fluoreszenzintensität nach Behandlung mit Hypertonie. Die hier gezeigten Beobachtungen für HeLa-Zellen decken sich auch mit denen von U2OS- und BJ-1-hTERT-Zellen (Daten nicht gezeigt). Der deutlich erkennbare Anstieg der  $\gamma$ H2AX-Menge im Western-Blot schlägt sich nicht in einem Anstieg der Foci in der Immunfluoreszenz nieder, so dass weitere Analysen zur Focibildung von DDR-Proteinen in ihrer Auswertung dadurch nicht gestört werden.

### **Einfluss der veränderten Osmolarität auf die Zellkernmorphologie und -größe**

Der Einfluss der Hypo- und Hypertonbehandlung auf die Zellkernmorphologie ist in Abbildung 2.7 dargestellt. Die Zellen wurden eine Stunde mit dem angegebenen Medium inkubiert, anschließend fixiert und die DNA mit DAPI gefärbt. Die beobachteten Veränderungen decken sich für HeLa- und U2OS-Zellen. Das hypotone Medium hat mit dieser Methode keine sichtbaren Veränderungen in der Chromatinstruktur zur Folge; die

DNA ist, wie in der isotonen Kontrolle, relativ gleichmäßig, diffus im Zellkern verteilt; Nucleoli treten in der Z-Projektion durch darüber und darunterliegende DNA nur schwach im Bild hervor. Nach Hypertonbehandlung, sowohl mit 570 mOsm als auch 750 mOsm, sind die Veränderungen sehr viel deutlicher. Die Zellkerne bekommen eine unregelmäßigere Struktur, scheinen kleiner zu sein als die Zellkerne in der isotonen Kontrolle und die Nucleoli heben sich deutlich schwarz von der Fluoreszenz des DAPI ab. Das Chromatin ist in heller hervortretenden, kondensierten Bereichen sichtbar und die dazwischenliegenden Interkompartiment Hohlräume sind vergrößert (Albiez et al., 2006).



*Abbildung 2.7. Veränderung der Zellkernmorphologie bei unterschiedlichen Osmolaritäten in HeLa- und U2OS-Zellen. Dargestellt sind Z-Projektionen nach 3D-Mikroskopie von jeweils vier exemplarischen, unbestrahlten Zellkernen, welche 1 h mit entsprechendem Medium inkubiert und anschließend fixiert und mit DAPI eingefärbt wurden. Von links nach rechts aufsteigende Osmolaritäten: Hypoton (140 mOsm), Isoton (290 mOsm), Hyperton (570 mOsm) und Hyperton (750 mOsm). Eine hypoosmolare Behandlung führt zu keiner hier sichtbaren Veränderung in der Zellkernmorphologie. Mit hypertonem Medium inkubierte Zellen zeigen in beiden Zelllinien eine deutliche Veränderung, die Zellkerne werden kleiner, die Form unregelmäßiger und die Nucleoli treten deutlich sichtbar aus dem Chromatin hervor.*

Für die Quantifizierung dieses Effekts des hypertonen Mediums auf die Zellkerngröße wurde die Zellkernfläche anhand von Z-Projektionen aus 3D-Mikroskopiebildern

ermittelt. Aufgrund der Lichtstreuung in andere Fokusebenen bei der Weitfeld-Epifluoreszenzmikroskopie wurde von einer Messung des Zellkernvolumens abgesehen, da in Z-Ebene die jeweilige Begrenzung des Zellkerns nicht klar erkennbar ist. Für die Zellkernflächenmessung wurde das ImageJ-Plugin „syncMeasure3D“ verwendet.

Die aus dieser Auswertung gewonnenen Daten sind in Abbildung 2.8 für HeLa- und in Abbildung 2.9 für U2OS-Zellen dargestellt.

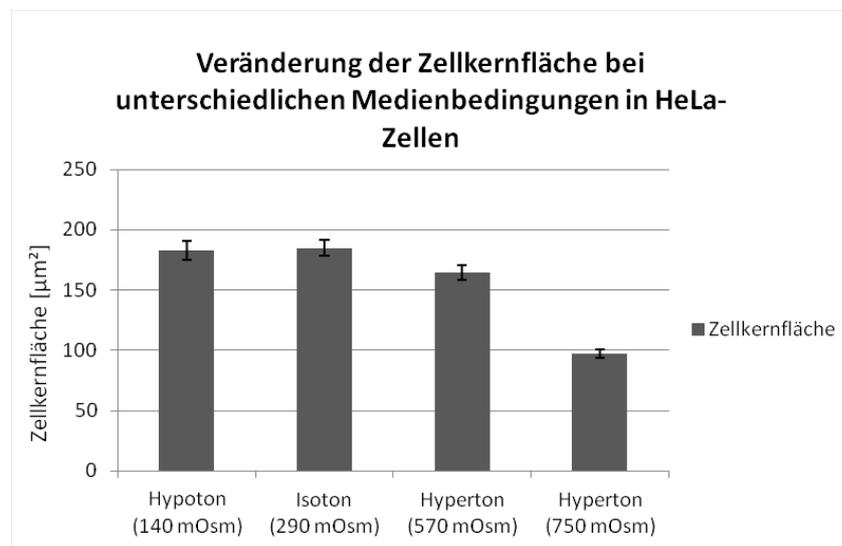
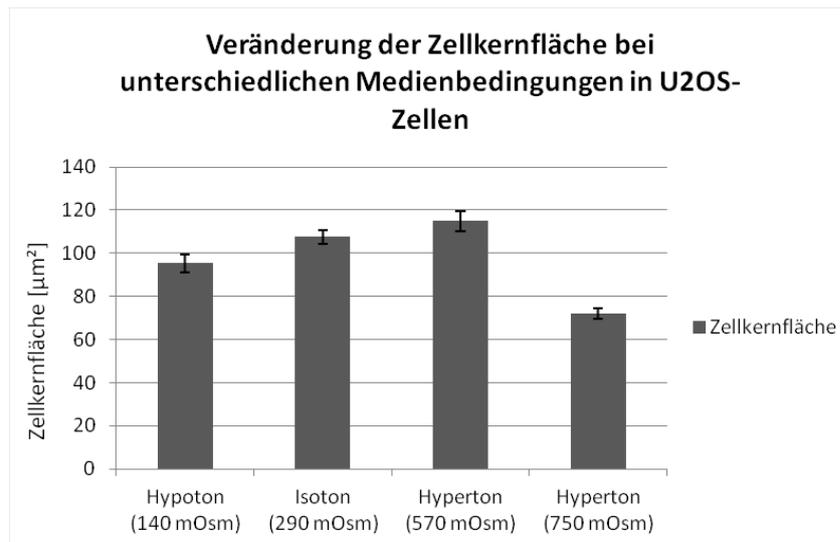


Abbildung 2.8. Quantifizierung der Zellkernfläche von HeLa-Zellen in Immunfluoreszenzbildern. Die Zellen wurden für 1 h mit verschiedenen osmolaren Medienbedingungen behandelt. Die Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung erfolgte nach 1 h. Die Quantifizierung erfolgte an Z-Projektionen von 3D-Mikroskopieaufnahmen mit „sync measure 3D“ in ImageJ. Dargestellt sind die Mittelwerte und der Fehler des Mittelwertes von durchschnittlich 50 ausgewerteten Zellkernen pro Datenpunkt aus einem Experiment. Bei Hypotonie kommt es zu keiner Veränderung der Zellkernflächen, bei Hypertonie zu einer statistisch signifikanten (570 mOsm p-Wert = 0,0248; 750 mOsm p-Wert < 0,001) Abnahme der Zellkernfläche.

In HeLa-Zellen lässt sich die in den Immunfluoreszenzbildern sichtbare Schrumpfung der Zellkerne nach Behandlung mit hypertonem Medium quantifizieren. Sowohl für 570 mOsm (p-Wert = 0,0248), als auch für 750 mOsm (p-Wert < 0,001) ist die Abnahme statistisch signifikant.



*Abbildung 2.9. Quantifizierung der Zellkernfläche von U2OS-Zellen in Immunfluoreszenzbildern. Die Zellen wurden für 1h mit verschiedenen osmolaren Medienbedingungen behandelt. Die Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung erfolgte nach 1 h. Die Quantifizierung erfolgte an Z-Projektionen von 3D-Mikroskopieaufnahmen mit „sync measure 3D“ in ImageJ. Dargestellt sind die Mittelwerte und der Fehler des Mittelwertes von durchschnittlich 50 ausgewerteten Zellkernen pro Datenpunkt aus einem Experiment. Sowohl bei 140 mOsm ( $p$ -Wert = 0,0228), als auch bei 750 mOsm ( $p$ -Wert < 0,001) kommt es zu einer statistisch signifikanten Abnahme. Die Zunahme bei 570 mOsm ist nicht signifikant.*

U2OS-Zellen zeigen ebenfalls bei 750 mOsm eine statistisch hoch signifikante ( $p$ -Wert < 0,001) Abnahme der Zellkernfläche. Im Gegensatz zu den HeLa-Zellen kommt es allerdings auch bei der Behandlung mit hypotonem Medium zu einer leichten Schrumpfung, dafür bei 570 mOsm jedoch zu keiner signifikanten Veränderung.

### 2.1.2 $\gamma$ H2AX-Focibildung in osmotisch verändertem Chromatin

$\gamma$ H2AX, die phosphorylierte Form der Histonvariante H2AX, ist ein zentraler Baustein innerhalb der DNA-Reparatur und dient seit der Entdeckung in Zusammenhang mit DSB (Rogakou et al., 1998) in vielen Untersuchungen als Doppelstrangbruchmarker.  $\gamma$ H2AX sollte auch in den hier in den im Folgenden vorgestellten Experimenten als Schadensmarker verwendet werden. Da jedoch in der Literatur so widersprüchliche Angaben zu der Ausbildung von  $\gamma$ H2AX-Foci in Heterochromatinbereichen /hochkondensiertem Chromatin zu finden sind, wurde zunächst untersucht, inwiefern sich die durch unterschiedliche Osmolaritäten im Kulturmedium erreichten Kompaktierungsgrade des

Chromatins auf die Bildung, Morphologie und Größe der  $\gamma$ H2AX-Foci auswirken. Zur Induktion von Doppelstrangbrüchen wurden die Zellen mit Schwerionen (55 MeV Kohlenstoff) bestrahlt. Hierfür wurde ein Winkel von  $10^\circ$  von Austrittsnase zu Zellrasen angesetzt, so dass es sich bei den Focispuren um Ionendurchgänge einzelner Ionen handelt (Abbildung 2.10).

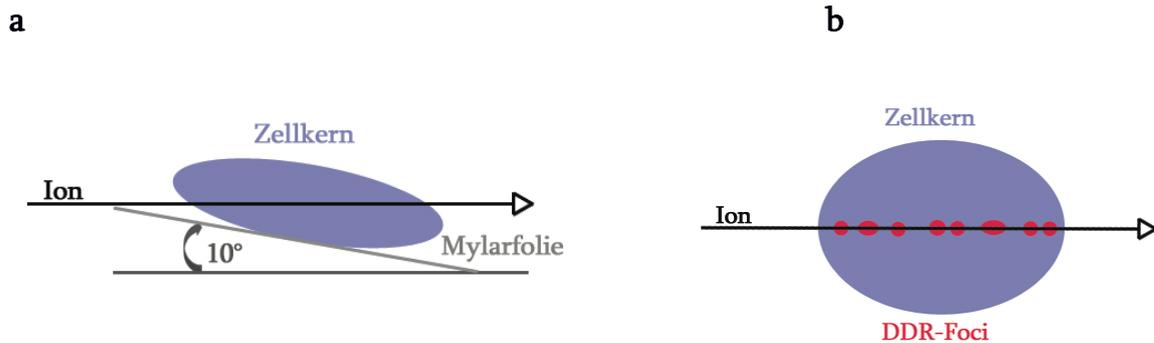


Abbildung 2.10. Schematische Darstellung der Bestrahlungsmodalität. (a) Aufbau während der Bestrahlung, die auf einer Mylarfolie wachsenden Zellen werden in einem  $10^\circ$ -Winkel zum Strahl positioniert, so dass die einzeln applizierten Ionen den Zellkern (lila) schräg durchdringen. Dies führt zu einem in (b) dargestellten Bild bei der Mikroskopie. Die Ionendurchgänge werden als Focispuren (rot) sichtbar.

Für alle Untersuchungen der DDR nach künstlicher Hyperkondensierung wurden die Zellen 10 min vor der Bestrahlung dem Medium mit der veränderten Osmolarität ausgesetzt. Dies führt zu einer effektiven Hyperkondensierung, wobei der Effekt sehr schnell einsetzt und innerhalb von einer Minute in allen Zellzyklusphasen zu beobachten ist (Albiez et al., 2006, Breitkopf, 2007). Nach der Bestrahlung erfolgte ein weiterer Medienwechsel, die Osmolarität wurde aber bis zur Fixierung beibehalten.

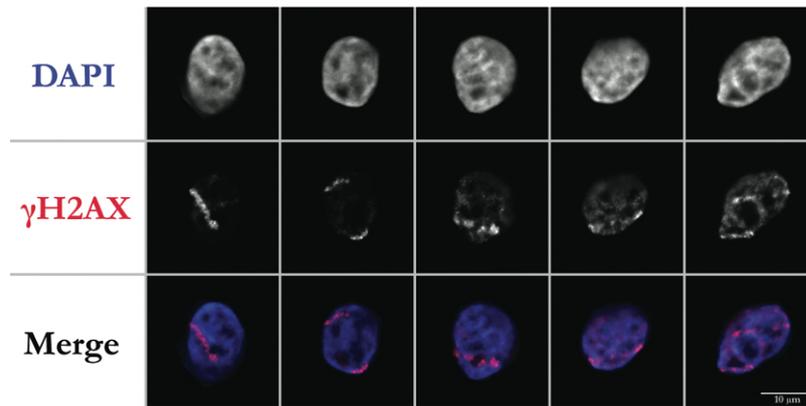
### Focibildung und Morphologie

Die in Abbildung 2.11 dargestellten HeLa-Zellen wurden wie beschrieben mit dem Medium der entsprechenden Osmolarität behandelt und in einem kleinen Winkel bestrahlt. Die  $\gamma$ H2AX-Signale, die sich linienförmig durch den Zellkern ziehen, spiegeln dabei die einzelnen Ionendurchgänge wider. Die Zellen wurden mit einem Epifluoreszenzmikroskop 3D mikroskopiert, wobei hier allerdings einzelne Schichtaufnahmen aus einer mittleren

Zellkernebene in Galerien zusammengefasst sind. Die Bilder wurden mit vergleichbaren Belichtungszeiten aufgenommen und die ausgeschnittenen Bilder zur besseren Darstellung auf 8-bit normalisiert.

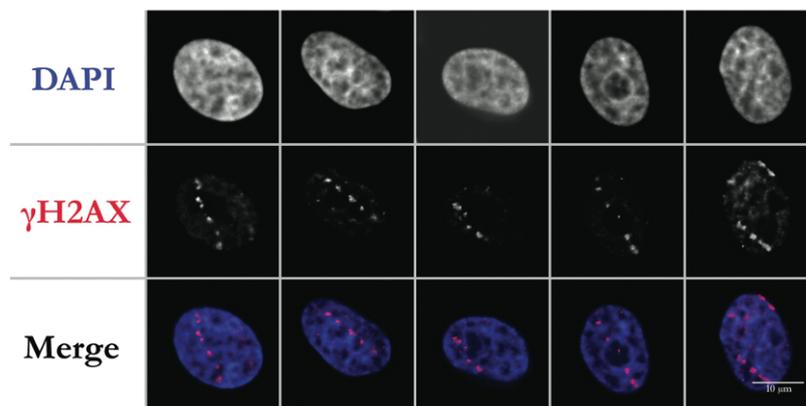
a

Hypoton 140 mOsm



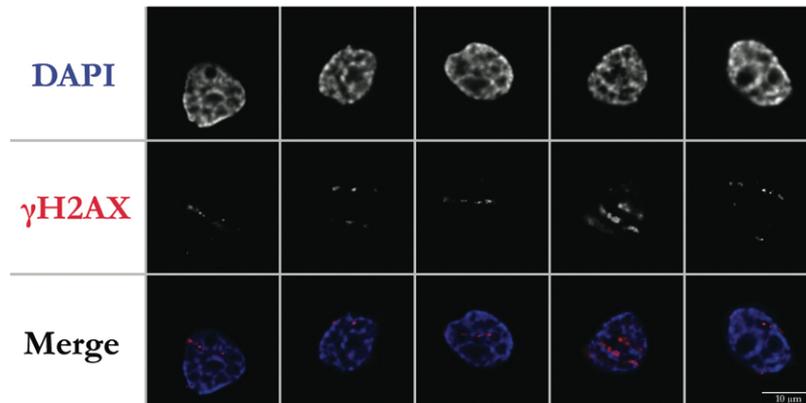
b

Isoton 290 mOsm



c

Hyperton 570 mOsm



d

Hyperton 750 mOsm

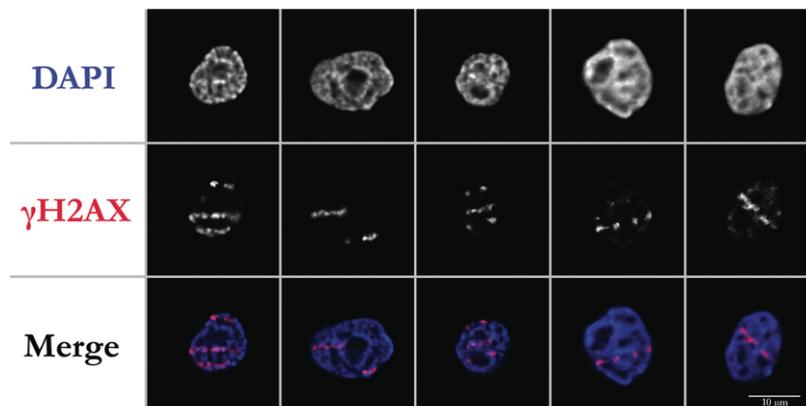


Abbildung 2.11.  $\gamma$ H2AX-Focibildung und -morphologie in HeLa-Zellen nach Schrägbestrahlung mit Kohlenstoffionen und Behandlung mit unterschiedlichen Osmolaritäten. Die Zellen wurden 10 min vor der Bestrahlung an SNAKE dem Medium entsprechender Osmolarität ausgesetzt und 1 h nach der Bestrahlung fixiert. Anschließend wurde mit indirekter Immunfluoreszenz  $\gamma$ H2AX nachgewiesen und die DNA mit DAPI gefärbt. Dargestellt ist eine mittlere Zellkernebene von jeweils fünf exemplarischen Zellkernen nach 3D-Mikroskopie.  $\gamma$ H2AX-Foci werden unter allen Medienbedingungen ausgebildet. Die Morphologie der Foci verändert sich nur leicht mit ansteigender Osmolarität.

Wie in Abbildung 2.11 gezeigt, findet die Phosphorylierung des H2AX unter allen Medienbedingungen statt – sowohl im aufgelockerten, als auch im hyperkondensierten Chromatin. Auch die Morphologie der Foci verändert sich nur geringfügig. Unter hypotonen Bedingungen (Abbildung 2.11a) erscheinen die einzelnen Foci kaum voneinander getrennt, der Ionendurchgang wirkt diffus und ist nur an wenigen Stellen optisch unterbrochen. Bei Isotonie (Abbildung 2.11b) sind die Foci klein und wie bei einer

Perlenkette aufgereiht, aber meist klar voneinander getrennt. Mit weiter steigender Osmolarität (Abbildung 2.11c und d) scheinen die Foci etwas größer zu werden, teilweise werden auch die Abstände größer, andere Ionendurchgänge erscheinen hingegen wieder eher durchgehend. Das hier exemplarisch für HeLa-Zellen gezeigte, lässt sich auch auf U2OS-Zellen übertragen, wie auch in Abbildung 2.18 zu erkennen ist.

### Zunahme des Focivolumens bei 750 mOsm

Um zu überprüfen, ob sich der visuelle Eindruck der Zunahme des Focivolumens nach Hypertonbehandlung quantifizieren lässt, wurden die Foci mittels des Programmes FociPicker3D (Du et al., 2011) analysiert. Dieses ImageJ-Plugin ist in der Lage, sowohl nah beieinanderliegende Foci, als auch Foci mit unterschiedlichen Intensitäten zu erkennen und zu unterscheiden. Die Auswertung erfolgte in 3D an Z-Stacks einzelner Zellkerne, sowohl für HeLa- als auch für U2OS-Zellen. Die Zellen wurden wie oben gezeigt mit Schwerionen in einem 10°-Winkel schräg bestrahlt.

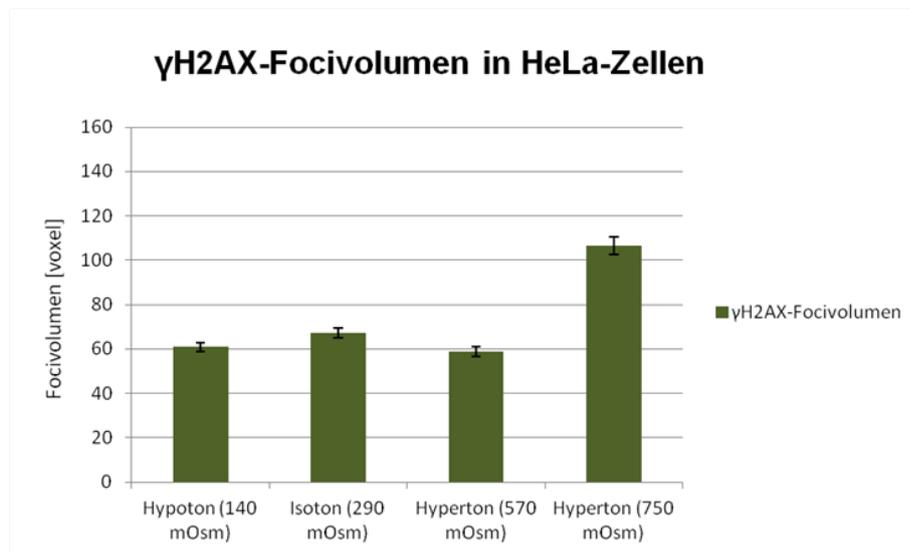


Abbildung 2.12. Mittelwert und Fehler des Mittelwertes des  $\gamma$ H2AX-Focivolumens (in Voxeln) nach Behandlung von HeLa-Zellen mit verschiedenen osmolaren Bedingungen und Bestrahlung mit Kohlenstoffionen. Die Zellen wurden 10 min vor der Bestrahlung an SNAKE dem Medium entsprechender Osmolarität ausgesetzt und 1 h nach der Bestrahlung fixiert. Anschließend wurde mit indirekter Immunfluoreszenz  $\gamma$ H2AX nachgewiesen. Die Auswertung von ca. 40 Zellkernen (ca. 500-800 Foci) pro Medienbedingung erfolgte mit dem FociPicker3D (ImageJ). Osmolaritäten zwischen 140 und 570 mOsm führen zu keiner Beeinflussung des  $\gamma$ H2AX-Focivolumens, hyperosmolares Medium mit 750 mOsm führt zu einer deutlichen Zunahme ( $p$ -Wert < 0,0001).

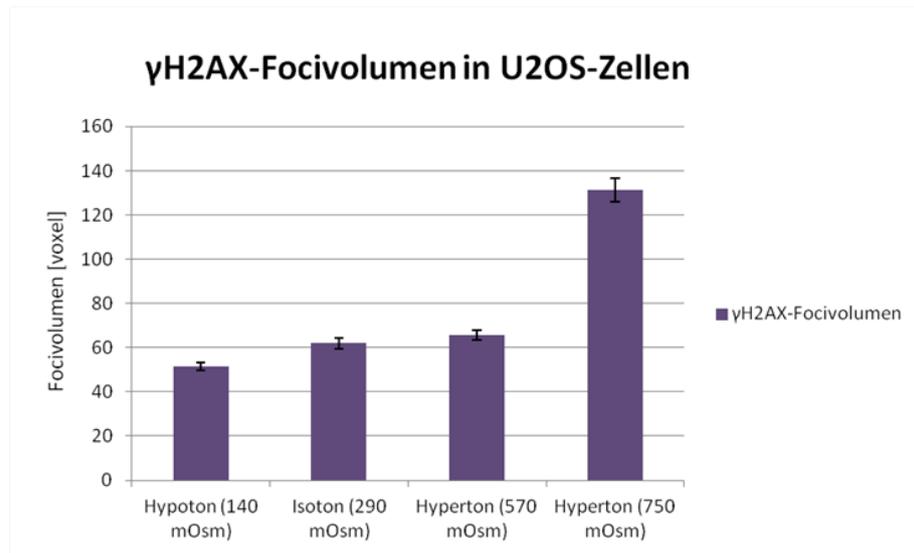


Abbildung 2.13. Mittelwert und Fehler des Mittelwertes des  $\gamma$ H2AX-Focivolumens (in Voxeln) nach Behandlung von U2OS-Zellen unter verschiedenen osmolaren Bedingungen und Bestrahlung mit Kohlenstoffionen. Die Zellen wurden 10 min vor der Bestrahlung an SNAKE dem Medium entsprechender Osmolarität ausgesetzt und 1 h nach der Bestrahlung fixiert und mit indirekter Immunfluoreszenz  $\gamma$ H2AX nachgewiesen. Die Auswertung von ca. 40 Zellkernen (ca. 500-800 Foci) pro Medienbedingung erfolgte mit dem FociPicker3D (ImageJ). In U2OS-Zellen kommt es zu einer signifikanten Abnahme des Focivolumens bei 140 mOsm ( $p$ -Wert = 0,0014) und einer Zunahme bei 750 mOsm ( $p$ -Wert < 0,001).

Wie in Abbildung 2.12 für die HeLa- und in Abbildung 2.13 für die U2OS-Zellen gezeigt, bleiben die Focigrößen in dem Osmolaritätsbereich von 140 bis 570 mOsm relativ konstant. In Medium mit 750 mOsm ist die Zunahme des Focivolumens jedoch deutlich, bei den HeLa-Zellen sind die Foci 75% größer als in der Kontrolle, bei den U2OS-Zellen nehmen die einzelnen Foci sogar mehr als das Doppelte des Volumens ein.

### Focianzahl und Tracklänge

Nicht nur im Focivolumen, auch in der Focianzahl kann eine Veränderung in Abhängigkeit der Medienbedingungen festgestellt werden (Abbildung 2.14 und Abbildung 2.15).

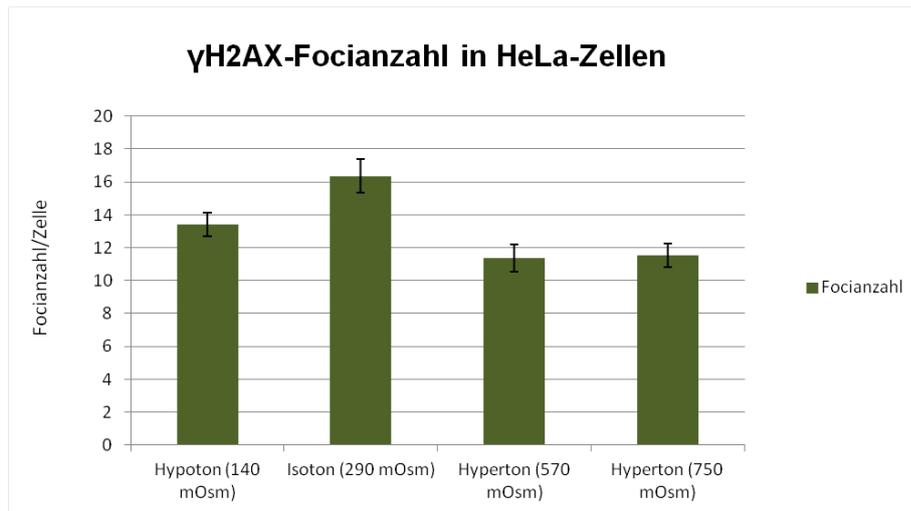


Abbildung 2.14. Mittelwert und Fehler des Mittelwertes des  $\gamma$ H2AX-Focianzahl nach Behandlung von HeLa-Zellen mit verschiedenen osmolaren Bedingungen und Bestrahlung mit Kohlenstoffionen. Die Zellen wurden 10 min vor der Bestrahlung an SNAKE dem Medium entsprechender Osmolarität ausgesetzt und 1 h nach der Bestrahlung fixiert. Anschließend wurde mit indirekter Immunfluoreszenz  $\gamma$ H2AX nachgewiesen. Die Zählung der Foci aus ca. 40 Zellkernen pro Medienbedingung erfolgte mit dem FociPicker3D (ImageJ). Hypertonie führt in HeLa-Zellen zu einer deutlichen Reduktion der Focianzahl pro Zelle.

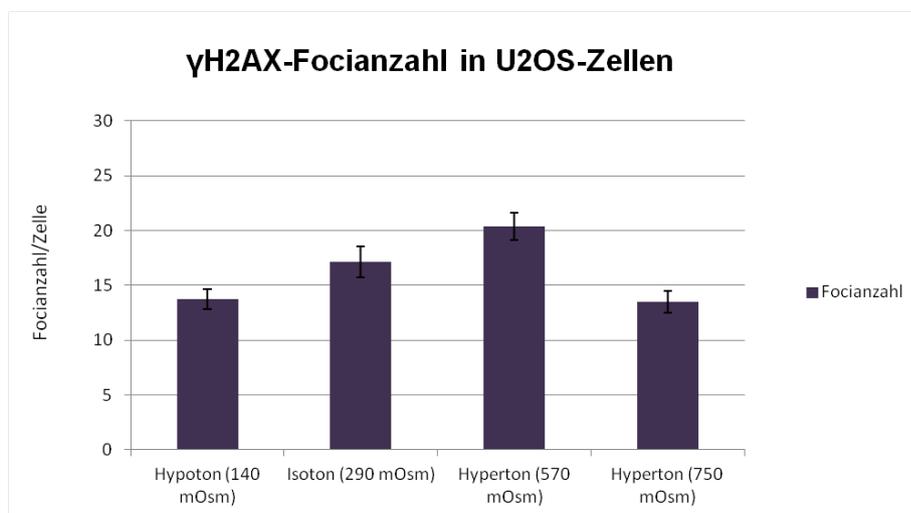


Abbildung 2.15. Mittelwert und Fehler des Mittelwertes des  $\gamma$ H2AX-Focianzahl nach Behandlung von U2OS-Zellen unter verschiedenen osmolaren Bedingungen und Bestrahlung mit Kohlenstoffionen. Die Zellen wurden 10 min vor der Bestrahlung an SNAKE dem Medium entsprechender Osmolarität ausgesetzt und 1 h nach der Bestrahlung fixiert. Anschließend wurde mit indirekter Immunfluoreszenz  $\gamma$ H2AX nachgewiesen. Die Zählung der Foci aus ca. 40 Zellkernen pro Medienbedingung erfolgte mit dem FociPicker3D (ImageJ). Bei U2OS-Zellen führt die Zunahme der Osmolarität bis 570 mOsm zu einer Zunahme der Focianzahl, bei 750 mOsm finden sich genauso viele Foci in der Zelle wie bei Hypotonie.

Bei HeLa ist eine deutliche Reduktion der Focianzahl unter hypertonen Bedingungen im Vergleich zu isotonem und hypotonem Medium zu erkennen. Hier muss jedoch die Länge der Ionenspur mit einbezogen werden, um mögliche Artefakte, wie eine deutlich verkürzte Tracklänge unter hypotonen Bedingungen auszuschließen. Deswegen ist in Abbildung 2.16 die Normierung der Focianzahl in HeLa-Zellen auf 10  $\mu\text{m}$  Tracklänge dargestellt.

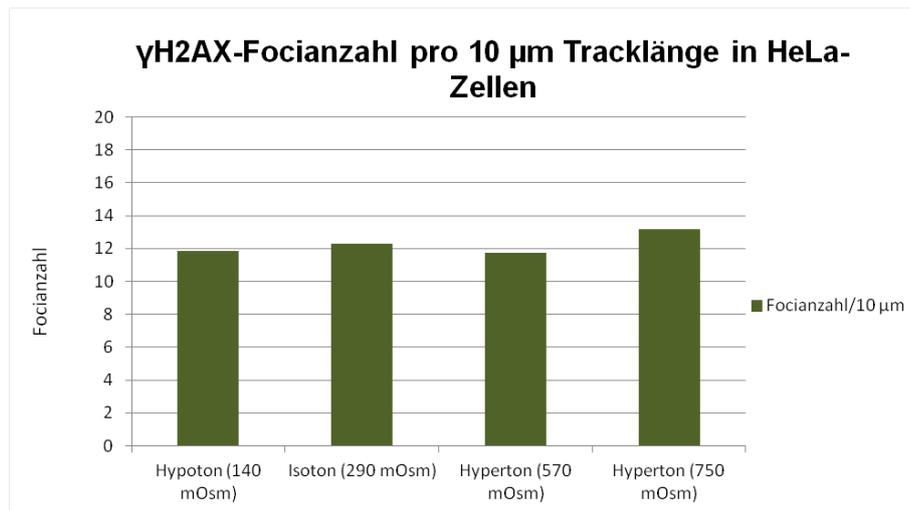


Abbildung 2.16.  $\gamma\text{H2AX}$ -Focianzahl pro 10  $\mu\text{m}$  Tracklänge bezogen auf die Mittelwerte der Focianzahl nach Behandlung von HeLa-Zellen mit verschiedenen osmolaren Bedingungen und Bestrahlung mit Kohlenstoffionen. Die durchschnittliche Tracklänge wurde mit Hilfe des FociPicker3D (ImageJ) bestimmt. Bei einer Normierung auf die Tracklänge sind in HeLa-Zellen keine Unterschiede in der Focianzahl bei unterschiedlichen Medienbedingungen zu erkennen.

Bezieht man die durchschnittliche Focianzahl einer HeLa-Zelle auf die durchschnittliche Tracklänge derselben Medienbedingung ist die beobachtete Abnahme der Focianzahl unter hypertonen Bedingungen nivelliert. Die beobachtete Veränderung in der Zellkernfläche spiegelt sich in einer Verkürzung der Tracklänge unter Hypertonie wider und damit auch in der Focianzahl.

Bei U2OS-Zellen ist der Effekt der Osmolarität des Mediums, auch nach der Normierung auf die Tracklänge noch zu erkennen (Abbildung 2.17). Wird die durchschnittliche Anzahl der Focianzahl auf 10  $\mu\text{m}$  Tracklänge normiert, ist vor allem die Zunahme der Focianzahl bei 570 mOsm immer noch deutlich sichtbar.

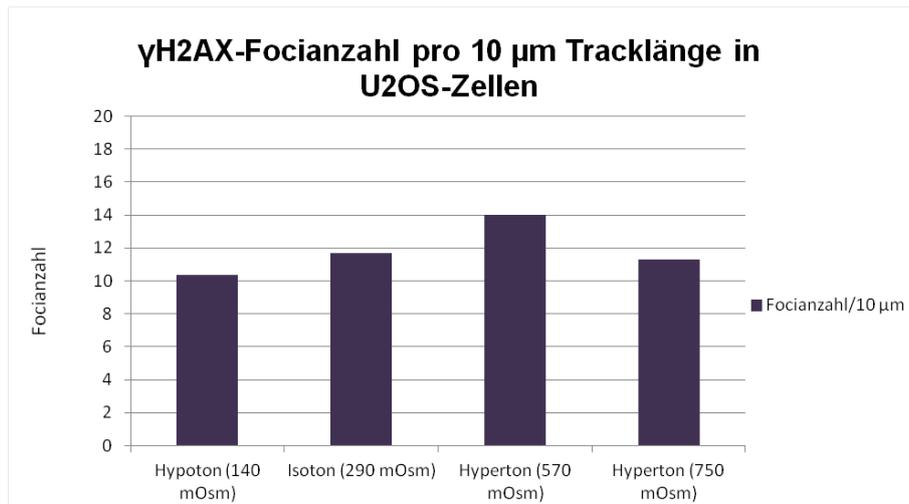


Abbildung 2.17.  $\gamma$ H2AX-Focianzahl pro 10  $\mu$ m Tracklänge bezogen auf die Mittelwerte der Focianzahl nach Behandlung von U2OS-Zellen unter verschiedenen osmolaren Bedingungen und Bestrahlung mit Kohlenstoffionen. Die durchschnittliche Tracklänge wurde mit Hilfe des FociPicker3D (ImageJ) bestimmt. Bei einer Normierung auf die Tracklänge, ist in HeLa-Zellen eine Zunahme der Focianzahl bei der Behandlung der Zellen mit 570 mOsm Medium zu erkennen.

## 2.1.3 Akkumulation anderer DDR-Reparaturfaktoren

### 2.1.3.1 U2OS-Zellen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass  $\gamma$ H2AX in jeder verwendeten Osmolarität, auch bei sehr starker Kompaktierung des Chromatins, als DNA-Schadensmarker verwendet werden kann, kann die weiterführende Frage gestellt werden, wie andere an der Schadensantwort beteiligte Proteine auf eine starke Chromatinkondensierung reagieren. Hierfür wurde ein Set von sieben Proteinen gewählt, die zu unterschiedlichen Zeiten an den Schadensort rekrutiert werden und dort unterschiedliche Funktionen erfüllen. Mre11 ist ein Teil des MRN-Komplexes, der sich sehr früh in der DDR am Schaden einfindet und dort im Komplex für die Rekrutierung und Aktivierung von ATM sorgt. Brit1 dient als Regulator für einen Chromatinremodellingkomplex, welcher auch schon sehr früh in der Schadensprozessierung für eine lokale Auflockerung der Chromatinstruktur sorgen soll. Mdc1 bindet an  $\gamma$ H2AX, wird durch ATM phosphoryliert und sorgt dann durch weitere Rekrutierung von MRN und ATM für eine Signalamplifikation. Die Akkumulierung von BRCA1 und des Mediatorproteins 53BP1 erfolgt im weiteren Verlauf der DNA-Reparatur. Rad51 ist zum Schluss ein eher später Faktor der homologen Rekombination.

In Abbildung 2.18 sind zunächst exemplarisch U2OS-Zellen nach Schrägbestrahlung mit Kohlenstoffionen dargestellt. Die Zellen wurden neben der isotonen Kontrolle je 10 min vor Bestrahlung dem hypertonem Medium mit 570 und 750 mOsm ausgesetzt. Die Fixierung der Zellen erfolgte 1 h nach Bestrahlung. In der oberen Reihe der Blöcke sind jeweils die  $\gamma$ H2AX-Signale gezeigt, in der unteren die entsprechenden Signale eines weiteren DDR-Faktors. Um eine Einheitlichkeit der Bildbearbeitung zu gewährleisten, wurden alle Bilder auf 8-bit normalisiert. Bei den Signalen in den Zellen ohne klar im DDR-Signal widerspiegelten Ionendurchtritt, handelt es sich um das Hintergrundsignal, welches durch die Normalisierung auf 8-bit hervorgehoben wird.

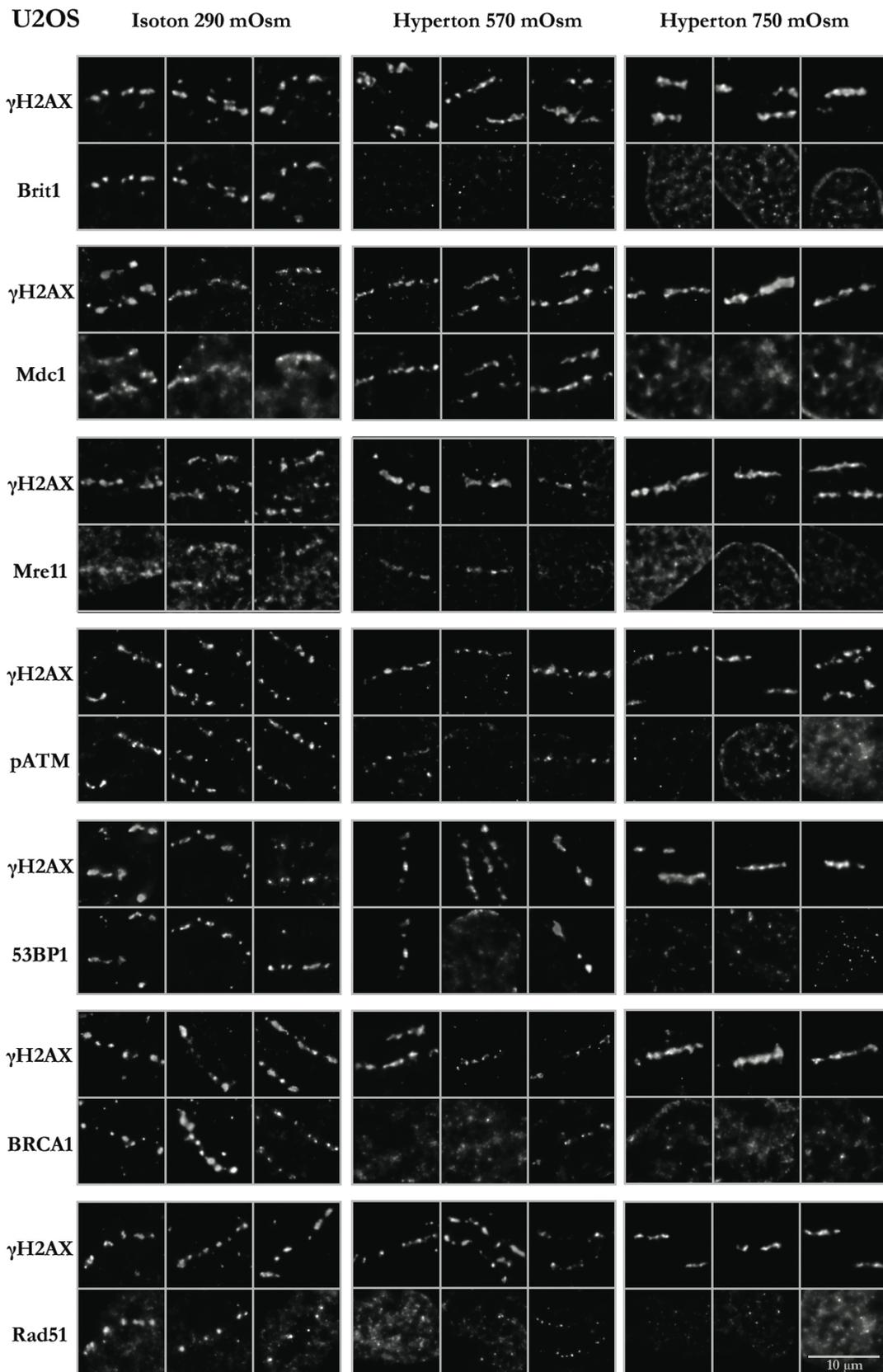


Abbildung 2.18. Focibildung der DDR-Faktoren *Brit1*, *Mre11*, *Mdc1*, *pATM*, *53BP1*, *BRCA1* und *Rad51* in U2OS-Zellen nach Schrägbestrahlung mit Kohlenstoffionen an SNAKE. Die Zellen wurden 10 min vor der Bestrahlung mit hypertonem Medium (570 oder 750 mOsm) behandelt und 1 h nach der Bestrahlung bis zur Fixierung darin inkubiert. Dargestellt sind auf 8-bit normalisierte Z-Projektionen von je 3 exemplarischen Zellen.

Wie man in der Galerie schon sehen kann, führt eine Behandlung mit 570 mOsm Medium bei allen untersuchten Proteinen, bis auf *Mdc1*, zu einer Behinderung der Focibildung. Bei 750 mOsm akkumuliert keiner der untersuchten DDR-Faktoren mehr am durch  $\gamma$ H2AX dekorierten Schadensort. Für eine bessere Übersicht und eine quantitative Aussage wurden jeweils ca. 100 bis 300 Zellkerne für jede Medienbedingung auf die Kolokalisation zwischen  $\gamma$ H2AX und einem anderen Reparaturfaktor geprüft. Hierfür wurden, separat in beiden Kanälen, zum einen die Zellen gezählt, die klar durch die Ionendurchgänge verursachte  $\gamma$ H2AX-Schäden haben und zum anderen die Zellen, die ein korrespondierendes Signal auch in dem jeweiligen DDR-Faktor zeigen. Die Ergebnisse finden sich in der untenstehenden Tabelle (Tabelle 2.1).

U2OS	Isoton	Hyperton	Hyperton
		570 mOsm	750 mOsm
Brit1	100%	40±4,2%	0%
Mdc1	100%	100%	0%
Mre11	85,6%	73,4%	0%
pATM	100%	71±2,8%	0%
53BP1	100%	63±12,7%	0%
BRCA1	100%	24±2,8%	0%
Rad51	61±21,2%	15±7,1%	0%

Tabelle 2.1. Prozentualer Anteil von U2OS-Zellen, die nach einer Schrägbestrahlung und Behandlung mit hypertonem Medium sowohl ein  $\gamma$ H2AX, als auch ein untersuchtes anderes Protein des DNA-Reparaturwegs akkumuliert an der Ionenspur aufweisen. Dargestellt sind die

*Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten von jeweils ca. 100-300 Zellkernen, mit Ausnahme der Daten für Mre11, für die nur ein Experiment zur Verfügung stand. Bei einer Behandlung mit 570 mOsm sind Mre11, pATM, und 53BP1 leicht in ihrer Akkumulation am Schadensort beeinträchtigt; bei Brit1, BRCA1 und Rad51 fällt dieser Effekt deutlicher aus. Bei 750 mOsm kommt es bei keinem der untersuchten Proteine zu einer Kolokalisation mit  $\gamma$ H2AX.*

Bis auf Mre11 und Rad51, ist bei allen Proteinen bei 290 mOsm eine hundertprozentige Kolokalisation mit  $\gamma$ H2AX zu beobachten. Das Immunfluoreszenzsignal des Mre11-Antikörpers war sehr schwach mit einem hohen Hintergrundrauschen, so dass die verminderte Korrelation unter isotonen Bedingungen wahrscheinlich an der Qualität des Antikörpers liegt, und keinen physiologischen Effekt widerspiegelt. Homologe Rekombination mit Rad51 Nukleofilamentbildung ist auf S- und G2-Phasezellen beschränkt, was die verminderte Kolokalisation mit  $\gamma$ H2AX erklärt. Bei 750 mOsm ist keines der untersuchten Proteine mehr in der Lage mit  $\gamma$ H2AX zu kolokalisieren – ein Ergebnis, das im weiteren Verlauf diskutiert werden soll.

Interessant ist bei den U2OS-Zellen vor allem die mittlere Osmolarität mit 570 mOsm. Hier kommt es bei fast allen Proteinen zu einer Beeinträchtigung in der Akkumulierung am Schadensort – bei allen Proteinen bis auf Mdc1. Dies ist ein besonders interessantes Ergebnis, da es nicht nur, zusammen mit der nur leichten Beeinträchtigung von Mre11, zu der Theorie passt, dass die frühen Schritte der DNA-Schadensreparatur in Heterochromatinbereichen stattfinden können (Chiolo et al., 2011), sondern auch, weil es hier Parallelen zu den publizierten Daten zur DNA-Reparatur während der Mitose gibt.

### **2.1.3.2 HeLa-Zellen**

In Abbildung 2.19 und Tabelle 2.2 ist die gleiche Untersuchung für HeLa-Zellen dargestellt.

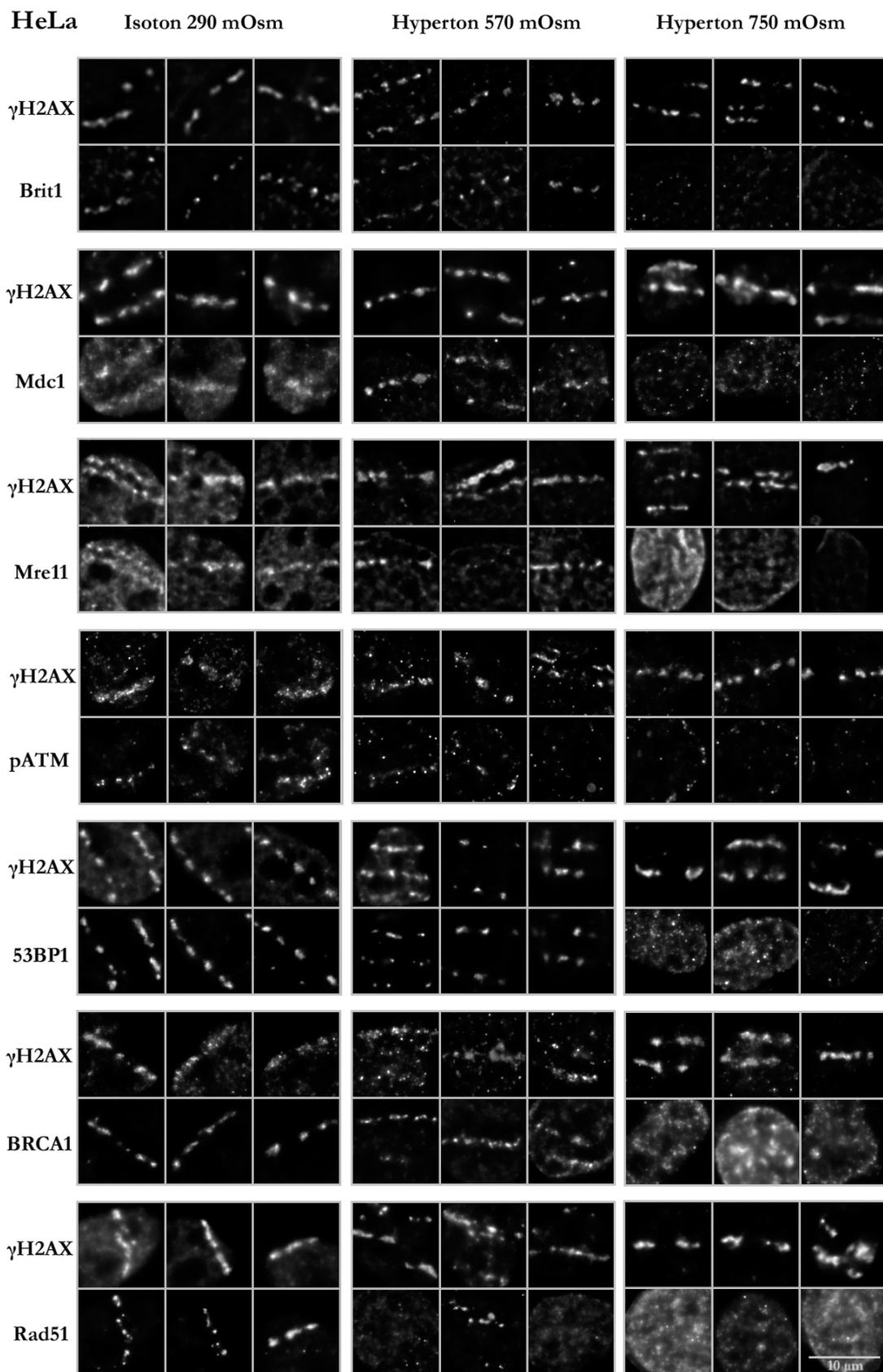


Abbildung 2.19. Focibildung der DDR-Faktoren Mre11, Brit1, Mdc1, pATM, 53BP1, BRCA1 und Rad51 in HeLa-Zellen nach Schrägbestrahlung mit Kohlenstoffionen an SNAKE. Die Zellen wurden 10 min vor der Bestrahlung mit hypertonem Medium (570 oder 750 mOsm) behandelt und 1 h nach der Bestrahlung bis zur Fixierung darin inkubiert. Dargestellt sind auf 8-bit normalisierte Z-Projektionen von jeweils drei exemplarischen Zellkernen. Eine Behandlung mit 570 mOsm Medium führt nur bei Mre11, Brit1 und Rad51 zu einer Behinderung der Focibildung, bei 750 mOsm akkumuliert keines der untersuchten DNA-Reparaturfaktoren mehr am durch  $\gamma$ H2AX dekoriertem Schadensort.

HeLa	Isoton	Hyperton	Hyperton
		570 mOsm	750 mOsm
Brit1	100%	100%	0%
Mdc1	100%	100%	0%
Mre11	100%	81%	0%
pATM	100%	100%	0%
53BP1	100%	100%	0%
BRCA1	100%	100%	0%
Rad51	81±7,1%	9±1,4%	0%

Tabelle 2.2. Prozentualer Anteil von HeLa-Zellen, die nach einer Schrägbestrahlung und Behandlung mit hypertonem Medium sowohl ein  $\gamma$ H2AX, als auch ein untersuchtes anderes Protein des DNA-Reparaturwegs akkumuliert an der Ionenspur aufweisen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 100-300 Zellkernen aus mindestens zwei unabhängigen Strahlzeiten. Bei einer Behandlung mit 570 mOsm ist Mre11 leicht in seiner Akkumulation am Schadensort beeinträchtigt, bei Rad51 fällt dieser Effekt deutlicher aus. Bei 750 mOsm kommt es bei keinem der untersuchten Proteine zu einer Kollokalisierung mit  $\gamma$ H2AX.

Wie man an den Ergebnissen deutlich sehen kann, bestehen zwischen U2OS- und HeLa-Zellen bei der Akkumulation von DNA-Reparaturfaktoren in hyperkondensiertem Chromatin große Unterschiede. Während es bei den U2OS-Zellen bei 570 mOsm zu einer starken Veränderung der Akkumulation verschiedener Schadensfaktoren kommt, reagieren die HeLa-Zellen deutlich weniger sensibel auf die artifizielle Hyperkondensierung. Bei 570 mOsm kommt es nur bei Rad51 zu einer starken Behinderung in der Focibildung und einem schwachen Effekt

bei Mre11, alle anderen untersuchten Proteine sind von der Hyperkondensierung unbeeinflusst und zeigen eine normale Focibildung und eine klare Kollokalisierung mit  $\gamma$ H2AX.

### Genauere Eingrenzung der kritischen Osmolarität

Da die Reaktion der Zellen auf IR bei 570 und 750 mOsm so unterschiedlich ist und um zu überprüfen, ob die HeLa-Zellen bei modulierter Hyperkondensierung ein ähnliches Verhalten zeigen wie die U2OS-Zellen, wurden Versuche mit weiteren Osmolaritäten durchgeführt. Es wurde ein Bereich von 525 und 660 mOsm ausgewählt und dieser in insgesamt vier verschiedenen Osmolaritäten abgedeckt. Da aufgrund der durch Strahlzeiten begrenzten experimentellen Kapazitäten nicht alle sonst beobachteten Faktoren untersucht werden konnten, wurden zwei aussagekräftige ausgewählt und diese mit beiden Zelllinien getestet. Zum einen Mdc1, welches bei 570 mOsm bei beiden Zelllinien noch eine vollständige Korrelation mit  $\gamma$ H2AX gezeigt hat und 53BP1, welches in HeLa-Zellen bei dieser Osmolarität nicht eingeschränkt war, in den U2OS-Zellen jedoch deutlich.

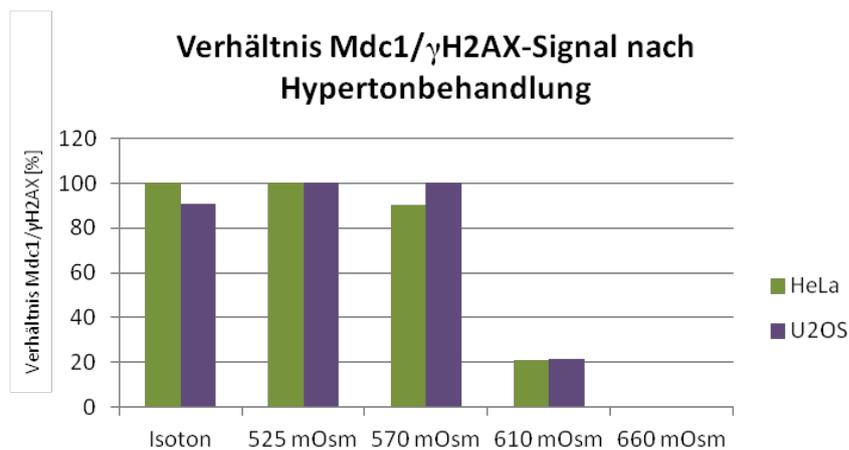
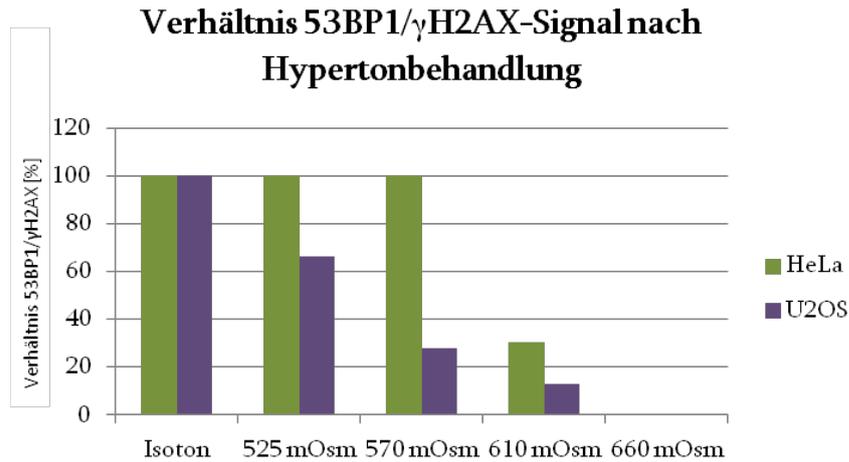


Abbildung 2.20. Verhältnis von Mdc1- zu  $\gamma$ H2AX-Signalen in HeLa- und U2OS-Zellen nach Schrägbestrahlung der Zellen und aufsteigenden Osmolaritäten. Sowohl in HeLa- als auch in U2OS-Zellen führt eine erhöhte Osmolarität von bis zu 570 mOsm zu keiner Beeinträchtigung der Akkumulation von Mdc1 an den mit  $\gamma$ H2AX dekorierten DNA-Schadensorten. Bei 610 mOsm lokalisieren nur noch 20% der  $\gamma$ H2AX-Signale mit Mdc1. Ab einer Osmolarität von 660 mOsm kommt es zu keiner Akkumulation von Mdc1 mehr an die Schadensorte.

Wie in Abbildung 2.20 zu sehen ist, verhält sich Mdc1, was seine Focibildung am Schadensort angeht, bei allen Osmolaritäten in den beiden Zelllinien gleich. Bei 525 und

570 mOsm findet noch eine normale Akkumulierung statt, bei 610 mOsm scheint bereits eine kritische Grenze überschritten zu sein. Hier kommt es zu einem starken Einbruch, nur noch 20% der ausgewerteten Zellen zeigen noch eine Kollokalisierung von  $\gamma$ H2AX und Mdc1 – sowohl in HeLa- als auch in U2OS-Zellen.



*Abbildung 2.21. Verhältnis von 53BP1- zu  $\gamma$ H2AX-Signalen in HeLa- und U2OS-Zellen nach Schrägbestrahlung der Zellen und aufsteigenden Osmolaritäten. In HeLa-Zellen kommt es wie bei Mdc1 auch bei 53BP1 bis zu einer Osmolarität von 570 mOsm zu keiner Beeinträchtigung in der Akkumulierung am Schadensort. In U2OS-Zellen kommt es hingegen zu einer sukzessiven Abnahme der mit  $\gamma$ H2AX kollokalisierenden 53BP1-Signale bei steigender Osmolarität. Bei 610 mOsm kommt es auch bei den HeLa-Zellen zu einer starken Reduktion, ab 660 mOsm findet in beiden Zelllinien keine 53BP1 Akkumulierung mehr am DNA-Schadensort statt.*

Wie bei den vorherigen Auswertungen schon beschrieben, verhält sich 53BP1 in U2OS- und HeLa-Zellen unterschiedlich. Die U2OS-Zellen reagieren deutlich sensibler auf eine erhöhte Osmolarität und damit auf eine Hyperkondensierung des Chromatins. Man sieht eine sukzessive Abnahme der Kollokalisierung mit  $\gamma$ H2AX bei steigender Osmolarität. Auch hier ist, wie für Mdc1 beobachtet, bei 660 mOsm die kritische Grenze überschritten, 53BP1 ist weder in HeLa, noch in U2OS-Zellen in der Lage am Schadensort zu akkumulieren. Bei den HeLa-Zellen ist auch für 53BP1 bei 610 mOsm wieder der Einbruch zu beobachten, bei dem nur noch gut 20% der Zellen eine Kollokalisierung zeigen. Bis 570 mOsm kommt es zu keiner Einschränkung.

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die 570 mOsm gut gewählt waren, da sich hier sowohl Unterschiede in verschiedenen Zelllinien, als auch unterschiedlichen DDR-Faktoren zeigen. Bei 610 mOsm scheint eine Grenze erreicht zu sein, bei der nur noch wenige Zellen in der Lage sind, normal auf IR-Schäden zu reagieren und bei 660 mOsm sind nur noch  $\gamma$ H2AX-Foci detektierbar.

### 53BP1-Kinetik bei 570 mOsm in HeLa-Zellen

Da die HeLa-Zellen scheinbar so unempfindlich auf eine Hypertonbehandlung bis 570 mOsm reagieren, wurde eine weitere Charakterisierung vorgenommen.

Zunächst wurde untersucht, ob eine Hyperkondensierung des Chromatins einen Einfluss auf die Rekrutierungskinetik von 53BP1 hat. Alle vorangegangenen Daten wurden eine Stunde nach Bestrahlung angefertigt. Mit der in Abbildung 2.22 dargestellten Kinetik wurde das Zeitfenster von 5 bis 40 min nach Bestrahlung abgedeckt, der Medienwechsel erfolgte weiterhin jeweils 10 min vor der Bestrahlung. Kürzere Zeitwerte nach Bestrahlung sind aufgrund des technischen Setups nicht möglich.

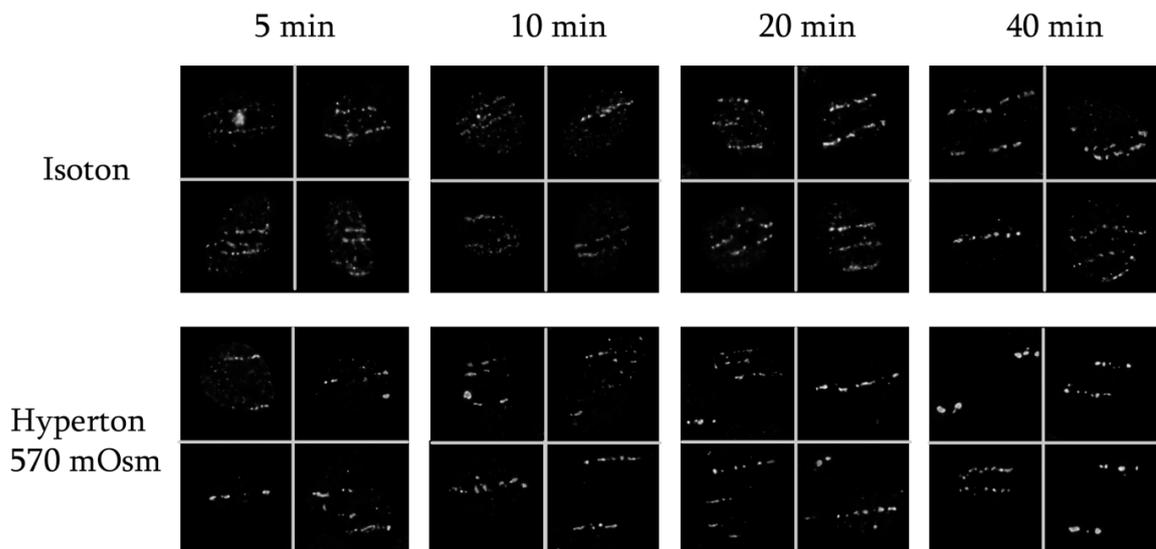


Abbildung 2.22. Nachweis von 53BP1 jeweils 5, 10, 20 und 40 min nach Schrägbestrahlung an SNAKE in jeweils vier exemplarischen HeLa-Zellen. Die Behandlung mit 570 mOsm Medium erfolgte 10 min vor Bestrahlung und jeweils bis zur Fixierung. Es kommt durch die Hypertonbehandlung zu keiner in diesem Zeitfenster sichtbaren Verzögerung der 53BP1-Akkumulation am Schadensort.

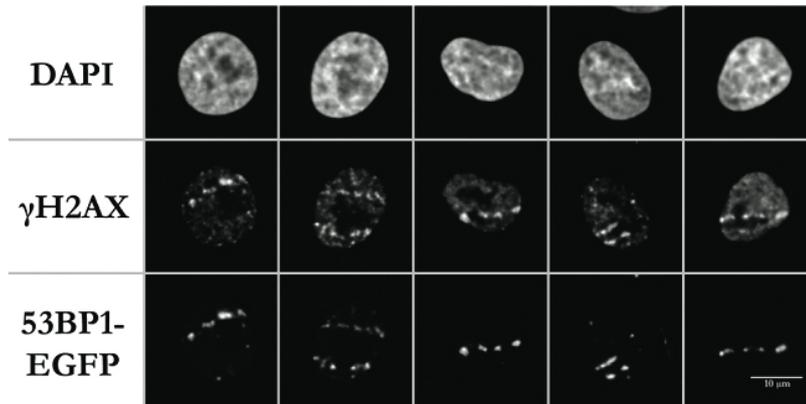
Schon nach 5 min kommt es unter beiden untersuchten Bedingungen zu einer effektiven Akkumulierung von 53BP1 am Schadensort. Es ist also in HeLa-Zellen, auch in der Kinetik von 53BP1 kein Einfluss von 570 mOsm Medium auf die DNA-Schadensantwort zu beobachten.

### **Hypertonbehandlung von HeLa-53BP1-EGFP-Zellen**

Um einen Antikörperartefakt aufgrund des hypertonen Mediums und der Hyperkondensierung auszuschließen, wurde ein Experiment mit HeLa-pMC16-53BP1-EGFP-Zellen durchgeführt, welche stabil ein mit EGFP markiertes 53BP1 exprimieren (Hable et al., 2012). Die Zellen wurden – wie in den anderen Experimenten zum Verhalten der Zellen auf IR nach Hochsalzbehandlung – 10 min vor der Bestrahlung mit dem entsprechend osmolarem Medium überschichtet und eine Stunde nach Bestrahlung fixiert. In der Immunfluoreszenz wurde nur  $\gamma$ H2AX nachgewiesen; das mikroskopisch aufgenommene 53BP1-Signal stammt vom 53BP1-EGFP.

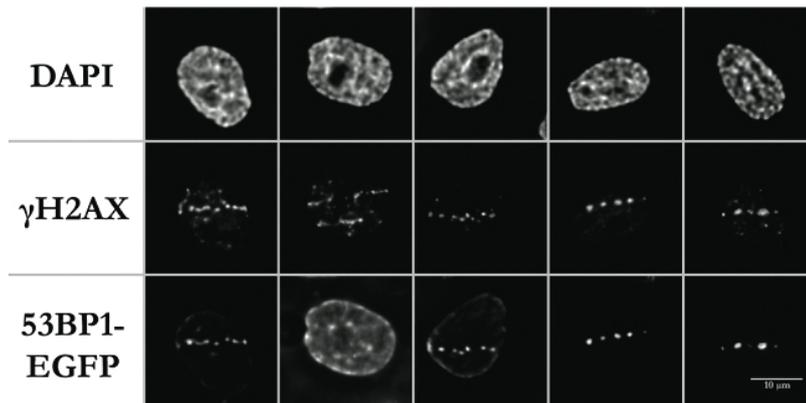
**a**

Isoton 290 mOsm



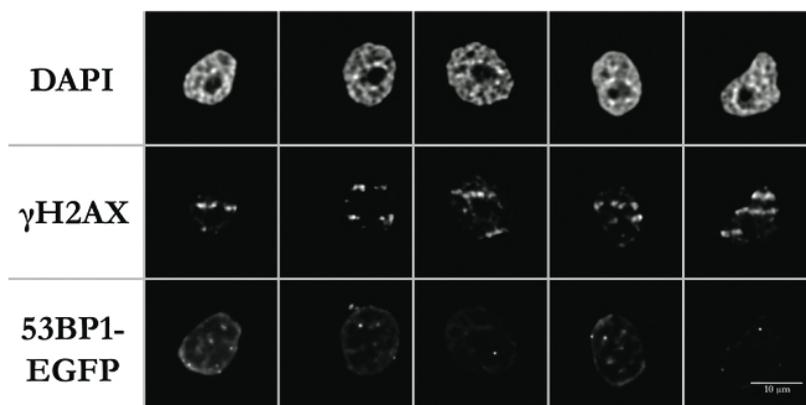
**b**

Hyperton 570 mOsm



**c**

Hyperton 750 mOsm



*Abbildung 2.23. 53BP1-EGFP-Signal nach Bestrahlung von HeLa-53BP1-EGFP-Zellen. Die Zellen wurden 10 min vor der Bestrahlung mit hypertonem Medium (570 oder 750 mOsm) behandelt und 1 h nach der Bestrahlung bis zur Fixierung darin inkubiert. Dargestellt sind auf 8-bit normalisierte Z-Projektionen. In der isotonen Kontrolle (a) sieht man eine klare Korrelation des 53BP1-EGFP und den  $\gamma$ H2AX-Signals. Hypertones Medium mit 570 mOsm (b) hat einen kleinen Effekt auf die Focibildung, bei 750 mOsm (c) ist keine Akkumulation von 53BP1-EGFP am Schadenort mehr erkennbar.*

Eine quantitative Auswertung ergibt, dass in isotonem Medium 97% der 53BP1-Signale mit einem  $\gamma$ H2AX-Signal klar korrespondieren, bei hypertonem Medium mit 570 mOsm sind es 91% und bei 750 mOsm ist keine Kolo-kalisation mehr zu beobachten. Da dieses Ergebnis vergleichbar ist mit den oben beschriebenen Daten, die mittels sekundärer Immunfluoreszenz gewonnen wurden, ist auszuschließen, dass es sich bei der Inhibierung der Akkumulation der DDR-Faktoren bei hohen Osmolaritäten um ein Antikörperartefakt handelt.

### **Ausschluss von chromatingebundenem 53BP1 bei Hyperkondensierung**

Während der Erstellung dieser Arbeit wurde von van Vugt et al. (2010) von einem Ausschluss von 53BP1 aus dem Chromatin während der Mitose berichtet. Um mögliche Parallelen zwischen der Reparatur während der Mitose und der DNA-Reparatur in artifiziell hyperkondensiertem Chromatin weiter zu charakterisieren, wurden HeLa-53BP1-EGFP-Zellen in kleinem Winkel unter isotonen Bedingungen bestrahlt und für 30 min bei 37°C inkubiert, um eine Akkumulierung von 53BP1 am Schadensort zu ermöglichen. Anschließend wurde die Osmolarität des Mediums auf 750 mOsm erhöht. Die Fixierung der Zellen erfolgte eine Stunde nach dem Medienwechsel.

### Osmolaritätenwechsel Isoton - Hyperton 750 mOsm

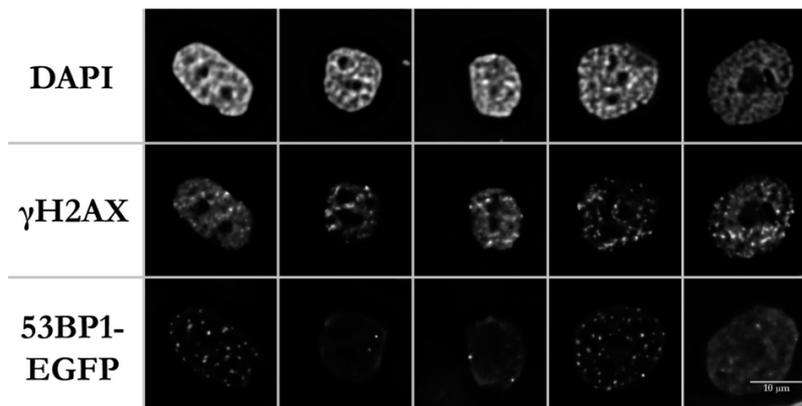


Abbildung 2.24. 53BP1-EGFP-Signal nach Osmolaritätenwechsel von Isoton auf 750 mOsm Hyperton 30 min nach der Schrägbestrahlung der Zellen mit Schwerionen. Die Zellen wurden 1 h nach dem Medienwechsel fixiert. Dargestellt sind auf 8-bit normalisierte Z-Projektionen.

Bei einem Osmolaritätenwechsel nach der Bestrahlung scheint der Stress für die Zellen noch größer zu sein als bei einer DNA-Schädigung unter hyperosmolaren Bedingungen. Sowohl im  $\gamma$ H2AX- als auch 53BP1-Signal sind Foci zu erkennen, die nicht durch die Bestrahlung bedingt sind.  $\gamma$ H2AX zeichnet immer noch die Ionenspur nach, 53BP1 zeigt hier keine Korrelation. Es scheint also durchaus, wie bei der Mitose, bei artifizierlicher Hyperkondensierung zu einem Ausschluss von am Schaden gebundenen 53BP1 zu kommen, jedoch zu keinem vollständigen, da 53BP1-Foci erkennbar sind. Allerdings handelt es sich bei diesen Foci um 53BP1-Akkumulationen, die keine Kollokalisierung mit  $\gamma$ H2AX aufweisen.

#### 2.1.3.3 BJ-1-hTERT-Zellen

Zusätzlich zu HeLa- und U2OS-Zellen, die beide tumorös entartet sind, wurden einige der Analysen mit BJ-1-hTERT-Zellen durchgeführt. Es handelt sich hierbei um eine hTERT-immortalisierte Fibroblastenzelllinie eines gesunden Spenders.

Exemplarisch wurde das Verhalten von Mdc1 und 53BP1 unter hypertonen Bedingungen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.25 und Tabelle 2.3 zusammengefasst.

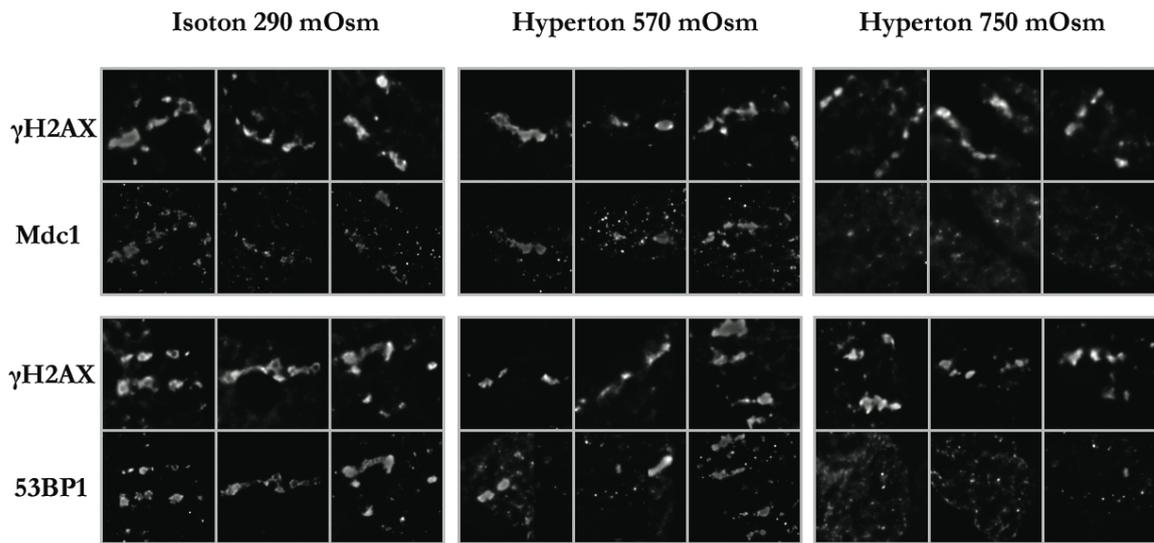


Abbildung 2.25. Focibildung der DDR-Reparaturfaktoren Mdc1 und 53BP1 in BJ1-hTERT-Zellen nach Schrägbestrahlung mit Kohlenstoffionen an SNAKE. Die Zellen wurden 10 min vor der Bestrahlung mit hypertonem Medium (570 oder 750 mOsm) behandelt und 1 h nach der Bestrahlung bis zur Fixierung darin inkubiert. Dargestellt sind auf 8-bit normalisierte Z-Projektionen. Eine Behandlung mit 570 mOsm Medium führt zu keiner signifikanten Behinderung der Foci-Bildung, 750 mOsm Medium inhibiert die Akkumulation von 53BP1 und Mdc1 am Schadensort.

Wie in den exemplarisch dargestellten Mikroskopiebildern zu erkennen, ist das Mdc1-Signal sehr schwach und das Hintergrundsignal im Verhältnis dazu sehr hoch, was die Auswertung zusätzlich erschwert. Aufgrund dieser Schwierigkeiten mit dem Antikörper konnten keine ganz exakten Zahlen für die Zellen mit korrespondierendem Mdc1 und  $\gamma$ H2AX-Signal ermittelt werden, was bei der Betrachtung der nachfolgenden Tabelle berücksichtigt werden muss.

<b>BJ1-hTERT</b>	Isoton	Hyperton 570 mOsm	Hyperton 750 mOsm
Mdc1	89,9±1,6%	79,1±11,7%	0%
53BP1	100%	90,7±5,4%	0%

*Tabelle 2.3. Prozentualer Anteil von BJ1-hTERT-Zellen die nach eine Schrägbestrahlung und Behandlung mit hypertonem Medium sowohl ein  $\gamma$ H2AX, als auch ein Mdc1 bzw. 53BP1-Signal akkumuliert an der Ionenspur aufweisen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils ca. 100 Zellkernen aus zwei unabhängigen Experimenten. Bei einer Behandlung mit 570 mOsm sind sowohl Mdc1 als auch 53BP1 leicht in ihrer Akkumulation am Schadensort beeinträchtigt. Bei 750 mOsm kommt es bei keinem der beiden Proteine zu einer Kolokalisation mit  $\gamma$ H2AX.*

Dass Mdc1 unter isotonen Bedingungen nicht zu 100% mit  $\gamma$ H2AX kolokalisiert, ist vermutlich auf die oben angesprochene schlechte Qualität des Antikörpers zurückzuführen. Unter den gleichen Einschränkungen muss man auch das Ergebnis bei 570 mOsm betrachten. Es scheinen bei 570 mOsm sowohl Mdc1, als auch 53BP1, leicht in ihrer Akkumulation am Schadensort beeinträchtigt zu sein. Dieser Effekt ist allerdings nur sehr schwach ausgeprägt. Nach 750 mOsm ist das Ergebnis wieder deutlicher. Vergleichbar mit HeLa- als auch U2OS-Zellen sind Mdc1 und 53BP1 bei BJ1-hTERT-Zellen nicht mehr in der Lage am Schadensort zu akkumulieren.

#### **2.1.4 Akkumulation verschiedener DDR-Faktoren unter hypotonen Bedingungen**

Neben der artifiziellen Hyperkondensation durch hypertones Medium wurde auch noch der gegenteilige Effekt untersucht: eine Auflockerung der Chromatinstruktur durch Hypotonie. Es wurden sowohl in HeLa- als auch in U2OS-Zellen verschiedene DDR-Faktoren auf ihr Akkumulationsverhalten nach Schadensinduktion durch IR untersucht. Die untersuchten Proteine entsprechen denen, die auch nach Hypertonie beobachtet wurden. Exemplarisch dargestellte Zellen, die unter hypotonen Medienbedingungen mit

Schwerionen im kleinen Winkel bestrahlt wurden, sind in Abbildung 2.26 zusammengefasst.

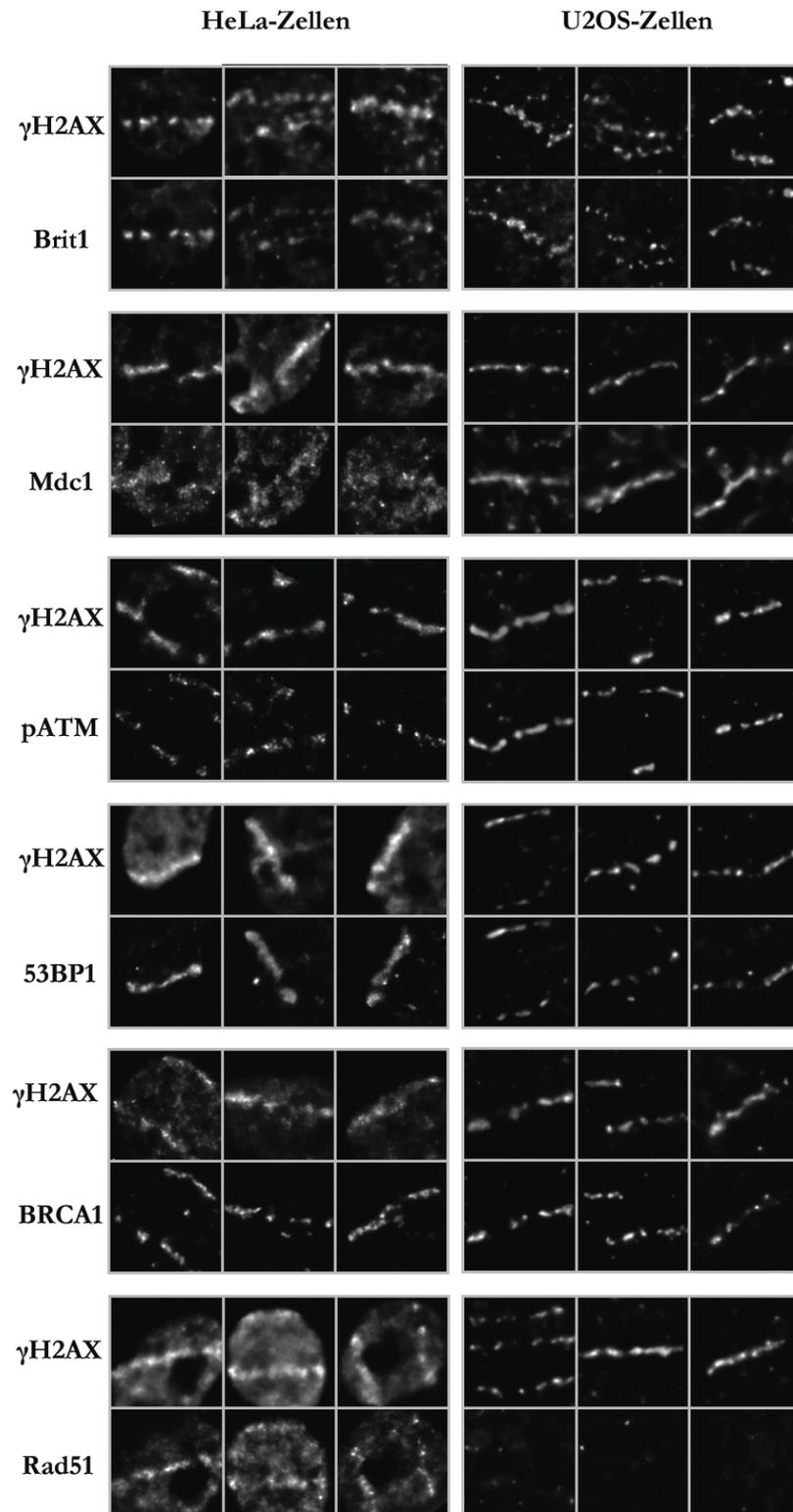


Abbildung 2.26. Focibildung der DDR-Faktoren Brit1, Mdc1, pATM, 53BP1, BRCA1 und Rad51 in HeLa- und U2OS-Zellen nach Schrägbestrahlung mit Kohlenstoffionen an SNAKE. Die Zellen wurden 10 min vor der Bestrahlung mit hypotonem Medium (140 mOsm) behandelt und 1 h nach der Bestrahlung bis zur Fixierung darin inkubiert. Dargestellt sind auf 8-bit normalisierte Z-Projektionen. Die Behandlung mit hypotonem Medium führt nur bei Rad51 zu einer Beeinträchtigung der Focibildung am Schadensort.

In den Bildern deutlich sichtbar ist, dass es nur bei Rad51 zu einer Beeinträchtigung der Focibildung kommt. Bei Mdc1 in HeLa-Zellen ist das Signal sehr schwach, was auf die schlechte Qualität des in dieser Strahlzeit verwendeten Antikörpers zurückzuführen ist, wie auch schon in den Auswertungen zu den BJ1-hTERT-Zellen thematisiert. Die in Tabelle 2.4 dargestellte quantitative Auswertung zeigt jedoch, dass es bei Mdc1 zu keinen Einschränkungen in der Korrelation mit dem  $\gamma$ H2AX-Signal kommt.

	HeLa		U2OS	
	Isoton	Hypoton	Isoton	Hypoton
Brit1	100%	100%	100%	100%
Mdc1	100%	100%	100%	100%
pATM	100%	100%	100%	100%
53BP1	100%	100%	100%	100%
BRCA1	100%	100%	100%	100%
Rad51	81±7,1%	51±1,4%	61±21,2%	0%

Tabelle 2.4. Prozentualer Anteil von HeLa- und U2OS-Zellen, die nach einer Schrägbestrahlung und Behandlung mit hypotonem Medium sowohl ein  $\gamma$ H2AX, als auch ein untersuchtes anderes Protein des DNA-Reparaturwegs akkumuliert an der Ionenspur aufweisen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 100-300 Zellkernen aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Rad51 zeigt in beiden Zelllinien eine Beeinträchtigung der Focibildung unter Hypotonie.

Die Behandlung der Zellen mit hypotonem Medium führt nur bei Rad51 zu einer Veränderung im Akkumulierungsverhalten am Schadensort. Wie auch bei den Untersuchungen unter hyperkondensierten Bedingungen reagieren auch bei Hypotonie die U2OS-Zellen sensibler als die HeLa-Zellen, was sich allerdings nur bei Rad51 zeigt. Ansonsten gibt es keinerlei Einschränkungen in der Focibildung der DDR-Faktoren am Schadensort.

## **2.2 Beeinflussung der Chromatinstruktur durch DNA-Schadensinduktion**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Chromatinstruktur einen deutlichen Einfluss auf die DNA-Schadensantwort nach Bestrahlung hat, soll im zweiten Teil untersucht werden, welchen Einfluss eine DNA-Schädigung durch Bestrahlung und eine darauffolgende Schadensreparatur, auf die Chromatinstruktur hat.

Dass der DNA-Reparaturprozess einen Einfluss auf die Chromatinstruktur hat, wurde von vielen verschiedenen Gruppen und für viele chromatinmodellierende Faktoren und PTM beschrieben (z.B. Farrell et al., 2011; Lukas et al., 2011; Xu und Price et al., 2011; Friedl et al., 2012; Miller und Jackson, 2012). Allerdings gab es bis jetzt kaum Screening-Experimente, in denen verschiedene PTM untersucht worden wären. Die Publikation von Tjeertes et al. aus dem Jahr 2009 fasst diesen Gedanken auf, allerdings verwenden sie nur eine einzige Zelllinie und die DNA-Schadensinduktion erfolgt nicht durch Bestrahlung. Nachdem vorangegangene Untersuchungen gezeigt haben, wie unterschiedlich die Reaktion auf einen Stimulus in verschiedenen Zelllinien ausfallen kann, war es für diese Arbeit wichtig, nicht nur anhand einer Zelllinie ein Screening auf die Veränderung von verschiedenen PTM nach unterschiedlichen Bestrahlungsdosen und Zeitwerten durchzuführen, sondern das dann auch mit einem kleineren Set an zu untersuchenden PTM auf mehrere Zelllinien auszudehnen.

Um bei Unterschieden zwischen den Zelllinien einer zusätzlichen Fragestellung nachgehen zu können, wurden für das Screening auf Veränderungen in den PTM nach Bestrahlung Zelllinien aus dem LUCY-Kollektiv verwendet. Hierbei handelt es sich um Epstein-Barr-

Virus (EBV)-immortalisierte Lymphoblasten-Zelllinien, generiert aus Zellen von jungen Lungenkrebspatienten (LUng Cancer of the Young), welche in einem Alter von 50 Jahren oder jünger den Krebs entwickelt haben (Sauter et al., 2008). Für Lungenkrebspatienten wurde eine reduzierte DNA-Reparaturkapazität beobachtet und gerade bei den jungen Lungenkrebspatienten scheint dies durch genetische Faktoren begünstigt zu sein (Rajae- Behbahani et al., 2001; Kreuzer et al., 1998). Aus diesem Grund wurden 120 dieser Zelllinien ausgewählt, um ein Screening auf die individuelle Strahlenempfindlichkeit durchzuführen (Guertler et al., 2011). Beruhend auf diesen Ergebnissen wurden für die Untersuchungen der Veränderungen in den PTM nach Bestrahlung Zelllinien gewählt, die als besonders strahlenempfindlich bzw. strahlenunempfindlich identifiziert wurden. Dies führt zu der Möglichkeit, die gewonnenen Ergebnisse mit der individuellen Strahlenempfindlichkeit zu korrelieren.

### **2.2.3 Screening verschiedener Histonmodifikationen auf eine Veränderung nach Bestrahlung**

Zunächst wurde jedoch ein Screening mit einer Zelllinie durchgeführt, um optimale Strahlungsdosen und Inkubationszeiten zu ermitteln und eine Vorauswahl an PTM zu treffen, die sich nach Bestrahlung in ihrer globalen Menge verändern. Hierfür wurde eine humane Kontrollzelllinie (HuKo) von einem gesunden männlichen Spender verwendet. Wie bei den Zelllinien aus dem LUCY-Kollektiv handelt es sich hierbei um eine EBV-immortalisierte lymphoblastoide Zelllinie (LCL).

Die Zelllinie wurde mit 0 Gy, 0,5 Gy, 2 Gy und 10 Gy bestrahlt und nach 15 min, 1 h oder 24 h wurden Gesamtzellextrakte gewonnen. Im Anschluss wurden sie mittels Western-Blot auf die in Tabelle 2.5 aufgeführten posttranslationalen Histonmodifikationen getestet. Hierbei handelt es sich sowohl um transkriptionell repressive, als auch aktivierende PTM, da für beide eine Beteiligung in der DNA-Reparatur beschrieben ist. Zudem wurde, abhängig von der Verfügbarkeit geeigneter Antikörper, darauf geachtet, ein breites Spektrum an Methylierungen, Phosphorylierungen und Acetylierungen abzudecken.

Um auch geringe Veränderungen in den PTM mittels Western-Blot quantitativ reproduzierbar nachweisen zu können, wurde besonderes Augenmerk auf ein standardisiertes Protokoll und eine gleichmäßige Beladung gelegt. Nur Western-Blots mit einer Variation von maximal 20% in der Signalintensität der Tubulin-Kontrollen sind in die Auswertung eingegangen. Die gezeigten und auch zur quantitativen Auswertung herangezogenen Tubulin-Kontrollen stammen immer von demselben Blot auf dem auch die PTM nachgewiesen wurden.

<b>PTM</b>	<b>Beschriebene Funktion</b>
γH2AX	DNA-Reparatur (Rogakou et al., 1998)
H3S10p	Aktivierung, Mitose (van Hooser et al., 1998)
H3K4me0	unmodifiziertes Lysin 4 an Histon 3
H3K4me1	Aktivierung (Noma et al., 2001)
H3K4me2	Aktivierung (Liang et al., 2004)
H3K4me3	Aktivierung (Barski et al., 2007)
H3K9me1	Aktivierung (Barski et al., 2007)
H3K9me2	Repression (Bannister et al., 2001)
H3K9me3	Repression (Bannister et al., 2001)
H3K27me3	Repression (Boyer et al., 2006)
H4K20me1	Aktivierung (Talasz et al., 2005)
H4K20me2	DNA-Reparatur (Sanders et al., 2004)
H4K20me3	Repression (Schotta et al., 2004)
H3K9ac	Aktivierung, DNA-Reparatur (Nishida et al., 2006)
H3K56ac	Aktivierung, DNA-Reparatur (Vempati et al., 2010)
H4K5ac	Aktivierung, DNA-Reparatur (Wang et al., 2008)
H4K16ac	Aktivierung, DNA-Reparatur (Wang et al., 2008)

*Tabelle 2.5. Für das Screening mit LCL-HuKo verwendete PTM und ihr Einfluss auf die Transkription, als auch weitere bekannte Funktionen.*

Im Folgenden sind in Form der Western-Blot Chemilumineszenzbilder, Tabellen oder Graphen, gruppiert nach Art der Modifikation, die Ergebnisse dieses Screenings dargestellt. Da sich gezeigt hat, dass die Dosis von 0,5 Gy zu gering ist, um in unserem System eine Veränderung zu sehen, werden nur die Ergebnisse für 0 Gy, 2 Gy und 10 Gy, 15 min, 1 h und 24 h nach Bestrahlung dargestellt.

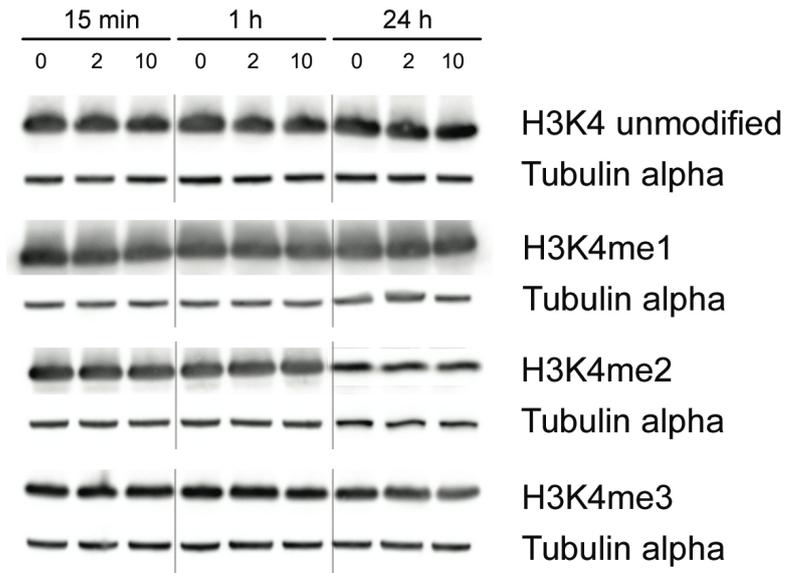


Abbildung 2.27. Abnahme der H3K4me3-Menge nach Bestrahlung, kein Effekt bei den anderen Methylierungsstatus von H3K4. Western-Blots von Gesamtzellextrakten aus EBV-immortalisierten menschlichen Fibroblasten (LCL-HuKo). Die Zellen wurden mit 2 Gy oder 10 Gy bestrahlt und nach Inkubationszeiten von 15 min, 1 h oder 24 h nach Bestrahlung geerntet. Tubulin alpha wurde verwendet, um die Gleichmäßigkeit der Beladung nachzuweisen.

	H3K4 unmodified		H3K4me		H3K4me2		H3K4me3	
	MW+SEM	n	MW+SEM	n	MW+SEM	n	MW+SEM	n
0 Gy 15 min	100	2	100	4	100	6	100	7
2 Gy 15 min	95,8 ± 9,2	2	105,2 ± 7,2	4	96,1 ± 2,5	6	100,9 ± 15,8	7
10 Gy 15 min	86,8 ± 0,7**	2	104,9 ± 12,8	3	96,6 ± 7,6	4	84,7 ± 7,1	5
0 Gy 1 h	100	2	100	6	100	8	100	9

2 Gy 1 h	96,3 ± 2,7	2	95,7 ± 1,3	4	109,7 ± 5,6	6	87,2 ± 3,5**	7
10 Gy 1 h	102,1 ± 0,5	2	106,4 ± 8,7	4	105,2 ± 12,6	6	82,7 ± 2,2***	5
0 Gy 24 h	100	2	100	5	100	6	100	5
2 Gy 24 h	107,5 ± 5,5	2	97,1 ± 5,4	5	93,0 ± 7,8	6	95,8 ± 4,8	5
10 Gy 24 h	117,8 ± 2,7*	2	118,9 ± 10,8	5	103,8 ± 10,2	6	82,0 ± 7,5*	5

*Tabelle 2.6. Quantifizierung der Histonmethylierungslevel von H3K4 im Western-Blot. Die Proteinmenge der untersuchten Histonmodifikation wurde auf die Ladekontrolle (Tubulin alpha) und die unbestrahlte Kontrolle normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte (MW) und der Mittelwertfehler (SEM) von zwei bis drei unabhängigen Experimenten und der angegebenen Anzahl an Blots (n). Sternchen markieren nach dem t-Test statistisch signifikante Veränderungen gegenüber der unbestrahlten Kontrolle. Die trimethylierte Form von H3K4 zeigt eine Abnahme nach Bestrahlung, insbesondere nach einer Dosis von 10 Gy an jedem untersuchten Zeitpunkt. Beim unmodifiziertem H3K4 kommt es nach 15 min zu einer Abnahme und nach 24 h zu einer Zunahme, jeweils nach einer Dosis von 10 Gy.*

Es wurden alle Methylierungsstufen von Lysin 4 an Histon 3 untersucht, von unmethyliertem H3K4 bis dreifach methyliertem H3K4me3. Wie in Abbildung 2.27 und Tabelle 2.6 zu sehen ist, kommt es bei der trimethylierten Form zu einer stabilen Abnahme nach Bestrahlung. Die p-Werte für alle statistisch signifikanten Veränderungen des LCL-HuKo-Screenings finden sich in Anhang 2. In Abbildung 2.28 ist wie in der Tabelle zu sehen, dass bei einer Dosis von 10 Gy nicht nur nach 24 h, sondern auch schon nach 1 h und 15 min eine reproduzierbare Reduktion der H3K4me3 Menge in der Zelle zu messen ist. Dies konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits für HeLa-Zellen, sowohl global, als auch lokal, gezeigt werden (Seiler et al., 2011). Die Auswertung des unmethylierten H3K4 führt zu uneinheitlichen Ergebnissen. Hier kommt es nach einer Bestrahlung mit 10 Gy zunächst zu einer transienten Abnahme 15 Minuten nach Bestrahlung, gefolgt von einer Zunahme nach 24 h.

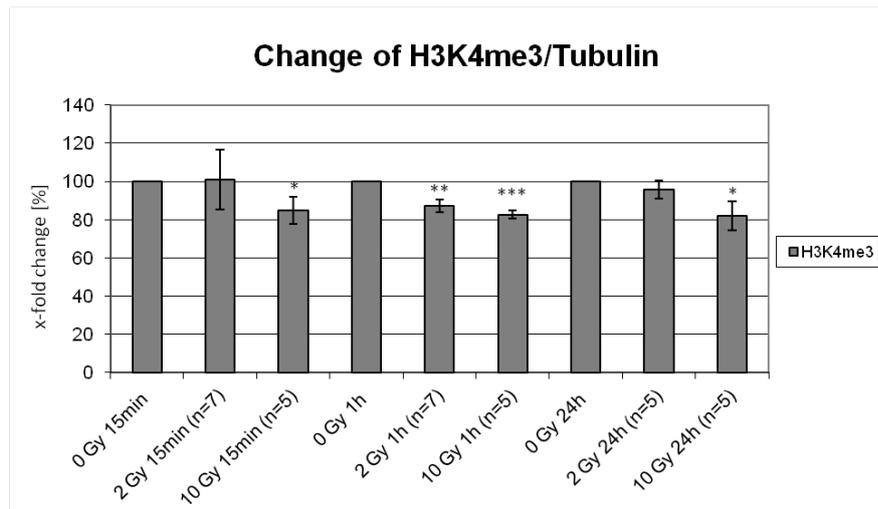


Abbildung 2.28. Quantifizierung von H3K4me3 im Western-Blot. Die Proteinmenge der untersuchten Histonmodifikation wurde auf die Ladekontrolle (Tubulin alpha) und die unbestrahlte Kontrolle normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte (MW) und der Mittelwertfehler (SEM) von zwei bis drei unabhängigen Experimenten und der angegebenen Anzahl an Blots (n). Sternchen markieren nach dem t-Test statistisch signifikante Veränderungen gegenüber der unbestrahlten Kontrolle. H3K4me3 nimmt nach Bestrahlung um 10% bis 20% bei allen untersuchten Zeitwerten und nahezu allen Dosen ab.

Bei H3K9 kommt es, wie in Abbildung 2.29 und Tabelle 2.7 zu sehen, nur bei H3K9me3 zu einer transienten Reduktion, wobei eine statistische Signifikanz nur eine Stunde nach Bestrahlung mit 2 Gy nachgewiesen werden konnte. H3K9me1 und H3K9me2 zeigen keine Veränderung nach Bestrahlung.

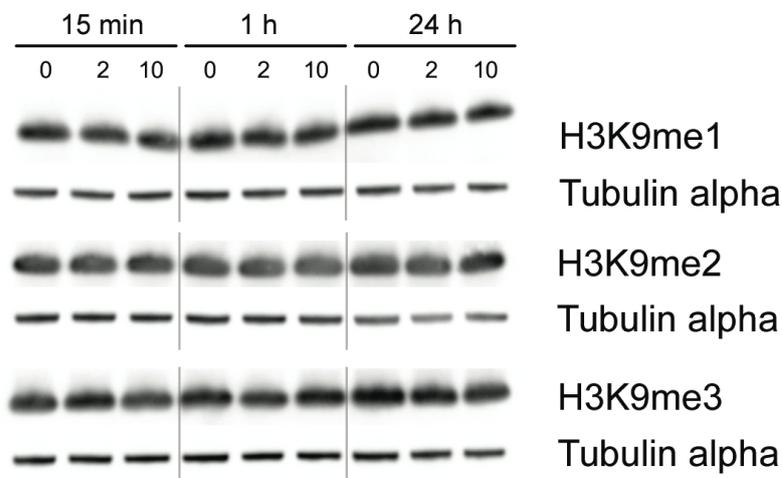


Abbildung 2.29. Keine Veränderung im Methylierungsstatus von H3K9 nach Bestrahlung. Western-Blots von Gesamtzellextrakten aus EBV-immortalisierten menschlichen Fibroblasten (LCL-HuKo). Die Zellen wurden mit 2 Gy oder 10 Gy bestrahlt und nach Inkubationszeiten von 15 min, 1 h oder 24 h nach Bestrahlung geerntet. Tubulin alpha wurde verwendet, um die Gleichmäßigkeit der Beladung nachzuweisen.

	H3K9me		H3K9me2		H3K9me3	
	MW+SEM	n	MW+SEM	n	MW+SEM	n
0 Gy 15 min	100	2	100	4	100	7
2 Gy 15 min	96,1 ± 6,6	2	111,2 ± 10,0	4	92,7 ± 7,1	7
10 Gy 15 min	93,3 ± 17,9	2	115,7 ± 8,1	2	85,9 ± 11,5	5
0 Gy 1 h	100	2	100	4	100	7
2 Gy 1 h	107,1 ± 3,9	2	85,7 ± 8,5	4	83,2 ± 5,3**	7
10 Gy 1 h	106,1 ± 7,3	2	100,3 ± 5,7	2	98,2 ± 6,1	4
0 Gy 24 h	100	2	100	2	100	5
2 Gy 24 h	90,9 ± 10,0	2	102,1 ± 18,3	2	91,9 ± 5,1	5
10 Gy 24 h	80,2 ± 11,7	2	100,2 ± 9,2	2	93,8 ± 4,2	5

Tabelle 2.7. Quantifizierung der Histonmethylierungslevel von H3K9 im Western-Blot. Die Proteinmenge der untersuchten Histonmodifikation wurde auf die Ladekontrolle (Tubulin alpha) und die unbestrahlte Kontrolle normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte (MW) und der Mittelwertfehler (SEM) von zwei bis drei unabhängigen Experimenten und der angegebenen Anzahl an Blots (n). Die Level von methyliertem H3K9me1 und H3K9me2 verändern sich nach Bestrahlung nicht. Bei H3K9me3 kann eine transiente Abnahme beobachtet werden, welche nur nach 1 h und einer Dosis von 2 Gy Signifikanz erreicht.

Sehr ähnlich ist dies beim Lysin 20 des Histons 4. Ebenso wie bei H3K9 ist hier die Monomethylierung mit aktiv transkribiertem Chromatin assoziiert und die Trimethylierung mit inaktivem. Es lässt sich bei keiner untersuchten Dosis und bei keinem Zeitwert eine Veränderung im Methylierungsmuster feststellen (Abbildung 2.30, Tabelle 2.8).

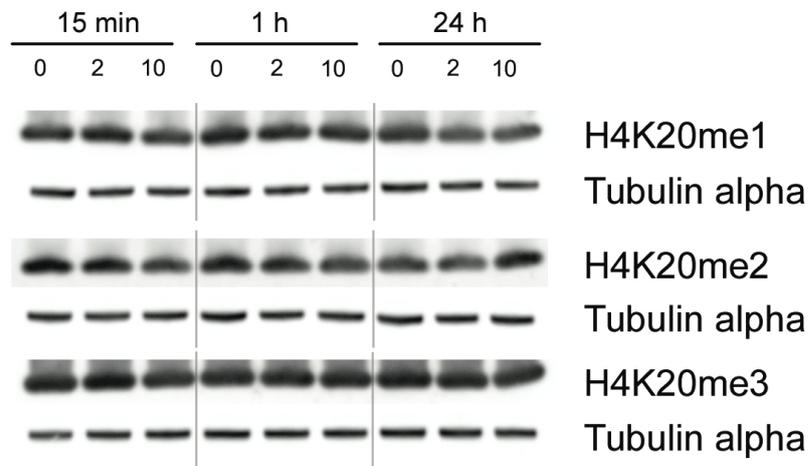


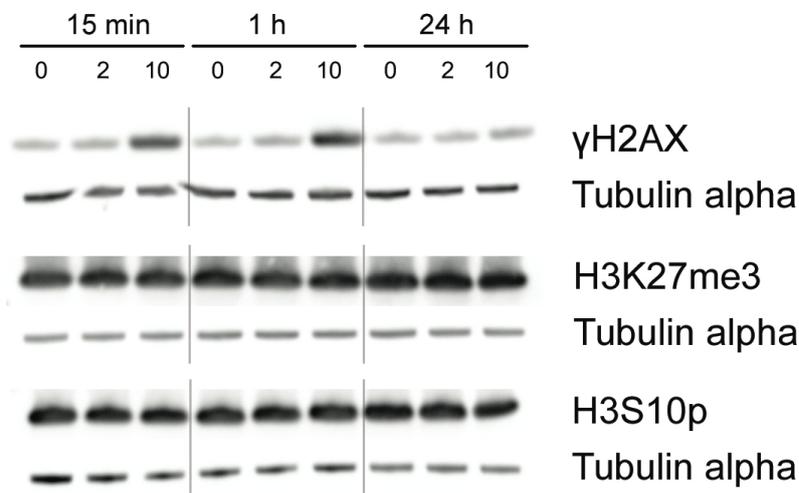
Abbildung 2.30. Keine Veränderung im Methylierungsstatus von H4K20 nach Bestrahlung. Western-Blots von Gesamtzell-extrakten aus EBV-immortalisierten menschlichen Fibroblasten (LCL-HuKo). Die Zellen wurden mit 2 Gy oder 10 Gy bestrahlt und nach Inkubationszeiten von 15 min, 1 h oder 24 h nach Bestrahlung geerntet. Tubulin alpha wurde verwendet, um die Gleichmäßigkeit der Beladung nachzuweisen.

	H4K20me		H4K20me2		H4K20me3	
	MW+SEM	n	MW+SEM	n	MW+SEM	n
0 Gy 15min	100	2	100	2	100	5
2 Gy 15min	97,8 ± 14,2	2	95,7 ± 3,7	2	95,2 ± 6,9	5
10 Gy 15min	98,9 ± 9,4	2	89,8 ± 7,3	2	85,3 ± 12,8	4
0 Gy 1h	100	2	100	2	100	5
2 Gy 1h	106,7 ± 6,7	2	100,5 ± 5,0	2	101,3 ± 4,7	5
10 Gy 1h	108,7 ± 8,8	2	98,8 ± 4,7	2	99,9 ± 6,0	4
0 Gy 24h	100	2	100	2	100	2
2 Gy 24h	98,0 ± 10,7	2	98,2 ± 12,1	2	99,1 ± 2,6	2
10 Gy 24h	90,6 ± 6,8	2	79,5 ± 15,2	2	100,8 ± 6,3	2

*Tabelle 2.8. Quantifizierung der Histonmethylierungslevel von H4K20 im Western-Blot. Die Proteinmenge der untersuchten Histonmodifikation wurde auf die Ladekontrolle (Tubulin alpha) und die unbestrahlte Kontrolle normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte (MW) und der Mittelwertfehler (SEM) von zwei bis drei unabhängigen Experimenten und der angegebenen Anzahl an Blots (n). Die Level von methyliertem H4K20 verändern sich nach Bestrahlung nicht.*

Wie in Abbildung 2.31 zu sehen ist, kommt es anders als bei Tjeertes et al., 2009 beschrieben, in LCL-HuKo auch nach 24 h zu keiner Abnahme von phosphoryliertem H3S10. H3S10 wird vor allem während der Mitose stark phosphoryliert und trägt zur Kompaktierung des Chromatins bei (van Hooser et al., 1998). Eine Verschiebung im Phosphorylierungsmuster von H3S10 nach Bestrahlung ist mehr auf einen Zellzyklusarrest zurückzuführen, als auf eine direkte Beteiligung an der DNA-Reparatur (Tjeertes et al., 2009).

Auch die von O'Hagan et al., 2008 publizierte Zunahme des mit stillgelegtem Chromatin assoziiertem H3K27me3 konnte in diesen Experimenten in den LCL-HuKo auf globaler Ebene nicht bestätigt werden.



*Abbildung 2.31. Keine Veränderung von H3K27me3 und H3S10p nach Bestrahlung, deutliche Zunahme von  $\gamma$ H2AX. Western-Blots von Gesamtzellextrakten aus EBV-immortalisierten menschlichen Fibroblasten (LCL-HuKo). Die Zellen wurden mit 2 Gy oder 10 Gy bestrahlt und nach Inkubationszeiten von 15 min, 1 h oder 24 h nach Bestrahlung geerntet. Tubulin alpha wurde verwendet, um die Gleichmäßigkeit der Beladung nachzuweisen. Bei  $\gamma$ H2AX zeigt sich eine dosis- und zeitabhängige Zunahme nach Bestrahlung.*

In Tabelle 2.9 sind sowohl die Werte der Quantifizierung von H3K27me3 und H3S10p, als auch die Zunahme von  $\gamma$ H2AX nach Bestrahlung angegeben. Man sieht zu allen Fixierungszeitwerten eine dosisabhängige Zunahme von  $\gamma$ H2AX nach Bestrahlung.

	$\gamma$ H2AX		H3K27me3		H3S10p	
	MW	n	MW+SEM	n	MW+SEM	n
0 Gy 15 min	100,0		100	2	100	6
2 Gy 15 min	148,7		96,4 $\pm$ 2,9	2	104,5 $\pm$ 5,5	6
10 Gy 15 min	462,2		92,0 $\pm$ 2,9	2	108,4 $\pm$ 14,1	4
0 Gy 1 h	100,0		100	4	100	6
2 Gy 1 h	151,1		98,0 $\pm$ 1,7	2	98,9 $\pm$ 8,1	6
10 Gy 1 h	409,3		101,4 $\pm$ 5,9	4	101,7 $\pm$ 8,9	4
0 Gy 24 h	100,0		100	6	100	2
2 Gy 24 h	115,2		98,7 $\pm$ 6,5	6	96,6 $\pm$ 4,2	2
10 Gy 24 h	136,2		104,8 $\pm$ 7,3	6	110,4 $\pm$ 18,2	2

Tabelle 2.9. Quantifizierung der  $\gamma$ H2AX-, H3K27me3- und H3S10p-Level im Western-Blot. Die Proteinmenge der untersuchten Histonmodifikation wurde auf die Ladekontrolle (Tubulin alpha) und die unbestrahlte Kontrolle normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte (MW) und der Mittelwertfehler (SEM) von zwei bis drei unabhängigen Experimenten und der angegebenen Anzahl an Blots (n).  $\gamma$ H2AX zeigt eine dosisabhängige Zunahme nach Bestrahlung. 24 h nach Bestrahlung ist nur noch ein leichter Anstieg im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle zu beobachten. Die Trimethylierung von H3K27 und die Phosphorylierung von H3S10 verändern sich in ihrer globalen Menge nach Bestrahlung nicht.

Wie in Abbildung 2.32 und vor allem Tabelle 2.10 zu sehen ist, konnte bei allen untersuchten Acetylierungen eine globale Deacetylierung nach Bestrahlung nachgewiesen werden. Die Sternchen markieren dabei nach dem t-Test statistisch signifikante Veränderungen (Anhang 2).

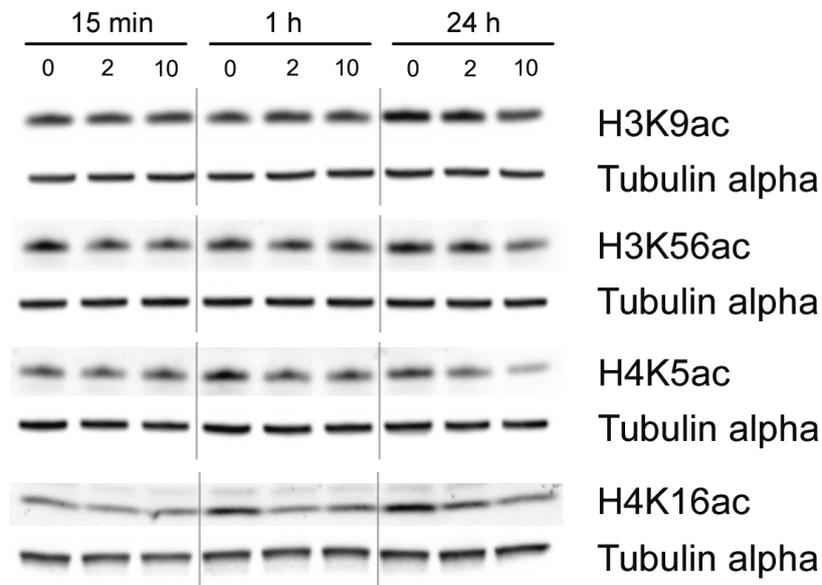


Abbildung 2.32. Abnahme des globalen Acetylierungslevels von H3K9ac, H3K56ac, H4K5ac und H4K16ac. Western-Blots von Gesamtzellextrakten aus EBV-immortalisierten menschlichen Fibroblasten (LCL-HuKo). Die Zellen wurden mit 2 Gy oder 10 Gy bestrahlt und nach Inkubationszeiten von 15 min, 1 h oder 24 h nach Bestrahlung geerntet. Tubulin alpha wurde verwendet, um die Gleichmäßigkeit der Beladung nachzuweisen.

	H3K9ac		H3K56ac		H4K5ac		H4K16ac	
	MW+SEM	n	MW+SEM	n	MW+SEM	n	MW+SEM	n
0 Gy 15min	100		100		100		100	
2 Gy 15min	102,6 ± 4,7	6	102,7 ± 5,9	6	105,3 ± 13,0	6	86,5 ± 5,0*	4
10 Gy 15min	89,4 ± 2,9**	4	80,8 ± 9,8	4	88,0 ± 21,4	4	90,1 ± 7,6	3
0 Gy 1h	100		100		100		100	
2 Gy 1h	94,6 ± 5,8	6	75,7 ± 6,5**	6	72,9 ± 2,9***	6	83,2 ± 10,2	4
10 Gy 1h	87,7 ± 5,0*	5	79,1 ± 5,3**	6	95,1 ± 5,9	5	84,1 ± 10,6	4
0 Gy 24h	100		100		100		100	
2 Gy 24h	95,9 ± 5,9	5	82,3 ± 5,8*	5	81,3 ± 5,0**	5	81,0 ± 3,4**	4
10 Gy 24h	94,5 ± 5,3	5	68,6 ± 4,8***	5	76,3 ± 12,0	5	87,8 ± 6,5	4

Tabelle 2.10. Quantifizierung der Histonacetylierungslevel im Western-Blot. Die Proteinmenge der untersuchten Histonmodifikation wurde auf die Ladekontrolle (Tubulin alpha) und die unbestrahlte Kontrolle normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte (MW) und der Mittelwertfehler (SEM) von zwei bis drei unabhängigen Experimenten und der angegebenen Anzahl an Blots (n). Sternchen markieren nach dem t-Test statistisch signifikante Veränderungen gegenüber der unbestrahlten Kontrolle. Die Level von H3K56ac, H4K5ac und H4K16ac zeigen nach Bestrahlung eine globale Abnahme von 15%-30% nach allen untersuchten Zeitpunkten und nahezu allen Dosen. Bei H3K9ac kommt es nur zu einer sehr schwachen, nicht signifikanten Abnahme.

Die Veränderungen für H3K9ac fallen geringer aus, als die der anderen untersuchten Acetylierungen, sind aber für die kürzeren Zeiträume von 15 min und 1 h nach einer Bestrahlung mit 10 Gy signifikant. Für H3K56ac konnte eine deutliche Deacetylierung nach 1 h und 24 h und beiden Dosen nachgewiesen werden. Ähnlich ist das Ergebnis für H4K5ac, allerdings konnte nur für 2 Gy nach 1 h und 24 h eine Signifikanz gezeigt werden. Bei H4K16ac sieht man in den Zahlenwerten eine Deacetylierung als Antwort auf Bestrahlung für alle Zeitwerte und Dosen, allerdings sind nur die Werte nach 2 Gy und 15 min und 2 Gy und 24 h signifikant.

Die größten Veränderungen im PTM-Muster nach Bestrahlung sind in den Acetylierungen zu beobachten. Die Ergebnisse in der Literatur sind dabei sehr widersprüchlich. Für H4 werden vor allem Hyperacetylierungen beschrieben, für H4K5ac jedoch auch eine globale Deacetylierung, allerdings abhängig vom schadensinduzierendem Agens (Xu and Price, 2011; Tjeertes et al., 2009). Bei H4K16ac wurde lokal sogar erst eine Abnahme und zwei Stunden nach Bestrahlung eine Zunahme der Acetylierung beobachtet (Miller et al., 2010). Das gilt ebenso für die Acetylierungen am Histon 3. Für H3K56ac wurde sowohl eine Zunahme (Das et al., 2009; Vempati et al., 2010), als auch eine Abnahme (Tjeertes et al., 2009; Yang et al., 2009; Miller et al., 2010) publiziert. Tjeertes et al. haben 2009 in ihrem Screening ebenfalls eine Abnahme bei H3K9ac beobachten können. Diese Ergebnisse wurden allerdings durch neueste Ergebnisse von Drogaris et al., 2012 in Frage gestellt, da sie eine Kreuzreaktion von diversen kommerziell erhältlichen Antikörpern gegen H3K56ac mit H3K9ac gefunden haben, was die Beobachtung eines ähnlichen Verhaltens dieser beiden PTM in anderen Studien ebenso erklären könnte wie tatsächliche Effekte der DNA-Schädigung bzw. der Reparatur. Andere Autoren (Egelhofer et al., 2011) und auch eigene Ergebnisse (siehe Kapitel 4.8 und Anhang 4), konnten eine allgemeine Kreuzreaktion der kommerziell erhältlichen H3K56ac-Antikörper jedoch nicht bestätigen. Auch für die anderen verwendeten Histon-Acetyl-Antikörper konnte keine Kreuzreaktivität mit den anderen Acetylierungen festgestellt werden (Anhang 4).

## Zusammenfassung Screening LCL-HuKo

Aus den gezeigten Ergebnissen ergibt sich die in Tabelle 2.11 dargestellte Zusammenfassung der strahleninduzierten Veränderungen in den PTM in LCL-HuKo.

Protein	15 min	15 min	1 h	1 h	24 h	24 h
	2 Gy	10 Gy	2 Gy	10 Gy	2 Gy	10 Gy
$\gamma$ H2AX						
H3K4 unm.						
H3K4me1						
H3K4me2						
H3K4me3						
H3K9me						
H3K9me2						
H3K9me3						
H4K20me						
H4K20me2						
H4K20me3						
H3K27me3						
H3S10p						
H3K9ac						
H3K56ac						
H4K5ac						
H4K16ac						

Tabelle 2.11. Strahleninduzierte globale Effekte in verschiedenen PTM in LCL-HuKo.

Bis auf  $\gamma$ H2AX, welches nach Bestrahlung eine klare Zunahme zeigt, kommt es bei den anderen untersuchten PTM fast ausschließlich zu einer Abnahme. Die einzige Ausnahme stellt hierbei das unmethylierte H3K4 24 h nach einer Bestrahlung mit 10 Gy dar. Zusätzlich kann man feststellen, dass es sich bei den meisten Veränderungen um PTM handelt, die mit aktiv transkribierten Chromatinregionen assoziiert sind.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde ein Set von PTM ausgewählt, welche für die weiteren Analysen mit den Zelllinien aus dem LUCY-Kollektiv verwendet wurden. Neben den fünf posttranslationalen Histonmodifikationen  $\gamma$ H2AX, H3K4me3, H3K56ac, H4K5ac und H4K16ac, welche in diesem Screening eine Veränderung nach Bestrahlung gezeigt haben, wurden auch H3K27me3 und H3K4me2 in die weiterführenden Untersuchungen mit einbezogen. H3K27me3 wurde gewählt, da von verschiedenen Autoren (O'Hagan et al., 2008; Chou et al., 2010) eine Zunahme des repressiven Markers nach Bestrahlung beschrieben wurde. H3K4me2 ist aus mechanistischer Sicht, aufgrund des Verlustes von H3K4me3, interessant. Falls es sich hierbei um eine schrittweise Demethylierung handelt, könnte sich dies auch in einer Veränderung der H3K4me2-Menge in der Zelle bemerkbar machen.

## **2.2.4 Abhängigkeit der Veränderung im PTM-Muster von der Strahlensensitivität der Zelllinie**

In den weiteren Untersuchungen wurde zum einen der Frage nachgegangen, ob die bei den LCL-HuKo beobachteten strahleninduzierten Veränderungen in den PTM auch in anderen Zelllinien desselben Zelltyps auftreten, als auch zum anderen der Frage, ob es eine Korrelation zwischen den Veränderungen im PTM-Muster nach Bestrahlung und der Strahlensensitivität einer Zelllinie gibt.

Hierfür wurden Zellen des LUCY-Kollektivs verwendet, welche zuvor hinsichtlich ihrer Strahlensensitivität auf Ebene der Koloniebildefähigkeit kategorisiert wurden (Guertler et al., 2011). Für die Beurteilung der Strahlensensitivität wurde als besonders strahlenempfindliche Kontrolle eine Zelllinie eines AT-Patienten verwendet, als

strahlenunempfindlich galt sein gesunder Bruder. Diese beiden Zelllinien wurden auch in die Analysen der PTM mit einbezogen.

Zunächst sind in Abbildung 2.33 die Ergebnisse des Screenings für  $\gamma$ H2AX dargestellt. Auf der linken Seite sind die strahlensensitiven Zelllinien aufgeführt, auf der rechten die strahlenresistenten. Deutlich zu beobachten, ist die schwächere Phosphorylierung des H2AX nach Bestrahlung in der Zelllinie des AT-Patienten. Wie man in Tabelle 2.12 sehen kann, ist der Grad der Phosphorylierung von Zelllinie zu Zelllinie unterschiedlich und wie prominent  $\gamma$ H2AX nach 24 h noch in der Zelle ist.

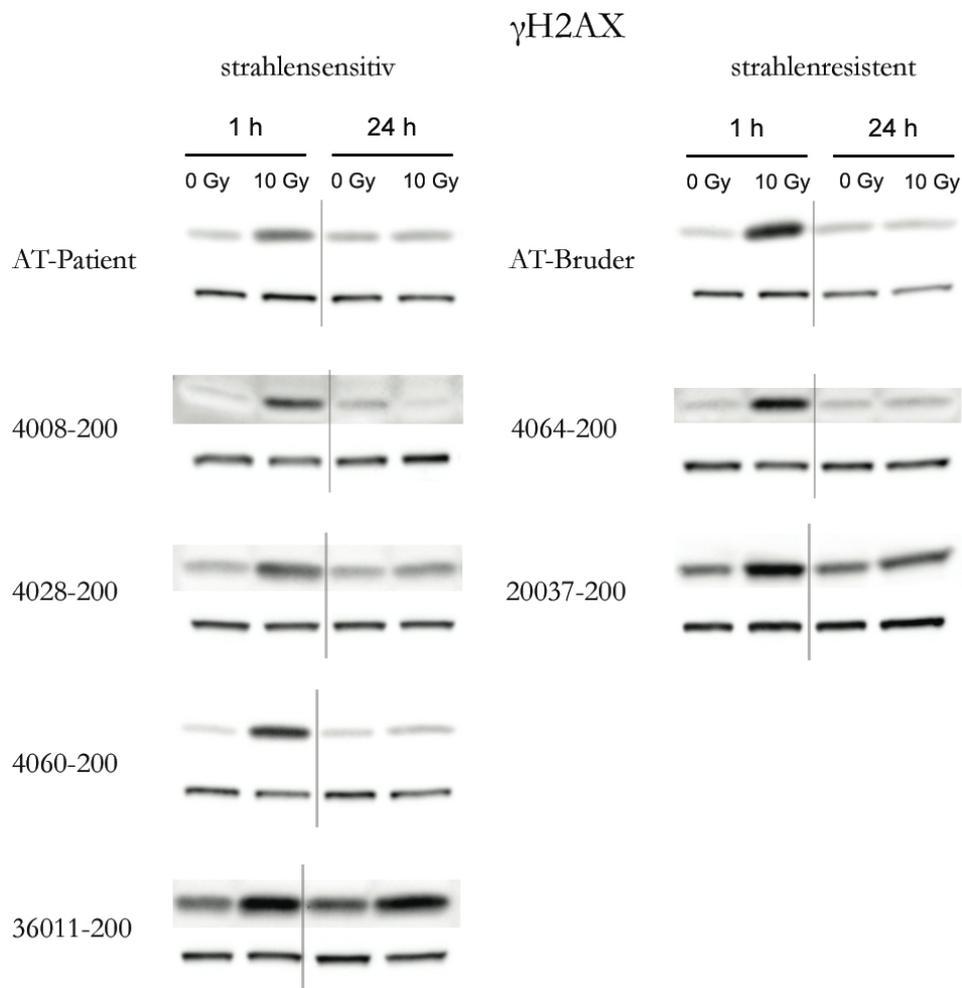


Abbildung 2.33. Zunahme der globalen  $\gamma$ H2AX-Menge nach Bestrahlung in strahlensensitiven und strahlenresistenten Zelllinien. Western-Blots von Gesamtzellextrakten. Die Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt und nach Inkubationszeiten von 1 h oder 24 h geerntet. In der jeweils oberen Zeile ist  $\gamma$ H2AX nachgewiesen, in der darunterliegenden Tubulin alpha, um die Gleichmäßigkeit der Beladung nachzuweisen.

$\gamma$ H2AX	1 h		24 h	
	10 Gy		10 Gy	
	MW+SEM	n	MW+SEM	n
AT-Patient	193,5 ± 34,1	4	117,3 ± 6,6	4
4008-200	193,0 ± 9,7	2	120,4 ± 48,3	2
4028-200	504,1	1	114,4	1
4060-200	424,3 ± 88,3	3	149,4 ± 22,6	3
36011-200	281,6	1	152,2	1
AT-Bruder	369,7 ± 77,1	4	145,0 ± 21,2	4
4064-200	374,0 ± 109,2	2	232,8 ± 101,3	2
20037-200	266,0 ± 66,3	3	135,4 ± 14,8	3

*Tabelle 2.12. Quantifizierung der relativen  $\gamma$ H2AX-Menge im Western-Blot. Die Proteinmenge der untersuchten Histonmodifikation wurde auf die Ladekontrolle (Tubulin alpha) und die unbestrahlte Kontrolle normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte (MW) und der Fehler des Mittelwertes (SEM) von zwei unabhängigen Experimenten und der angegebenen Anzahl an Blots (n).  $\gamma$ H2AX nimmt in allen untersuchten Zelllinien zu, nach 1 h ist der Effekt noch deutlich ausgeprägter als nach 24 h. Es ist weder bei 1 h, noch bei 24 h in der Stärke der Zunahme eine Korrelation mit der Strahlensensitivität erkennbar.*

Es ist keine klare Korrelation zwischen der Strahlenempfindlichkeit und der Stärke des H2AX Phosphorylierung oder der Persistenz des Signals nach 24 h zu erkennen. Fast alle Zelllinien zeigen 24 h nach Bestrahlung eine ähnliche Menge an  $\gamma$ H2AX, ungeachtet der Stärke der Phosphorylierung, die nach 1 h zu messen war.

Bei den beiden untersuchten Methylierungsstufen von H3K4 zeigt sich ein stärkerer Zusammenhang mit der Strahlensensitivität der Zelllinien. Wie in Abbildung 2.34 und Tabelle 2.13 für H3K4me2 und in Abbildung 2.35 und Tabelle 2.14 für H3K4me3 dargestellt, zeigen die strahlensensitiven Zelllinien aus dem LUCY-Kollektiv (blau) deutlich mehr epigenetische Reaktionen auf Bestrahlung als die als strahlenresistent kategorisierten.

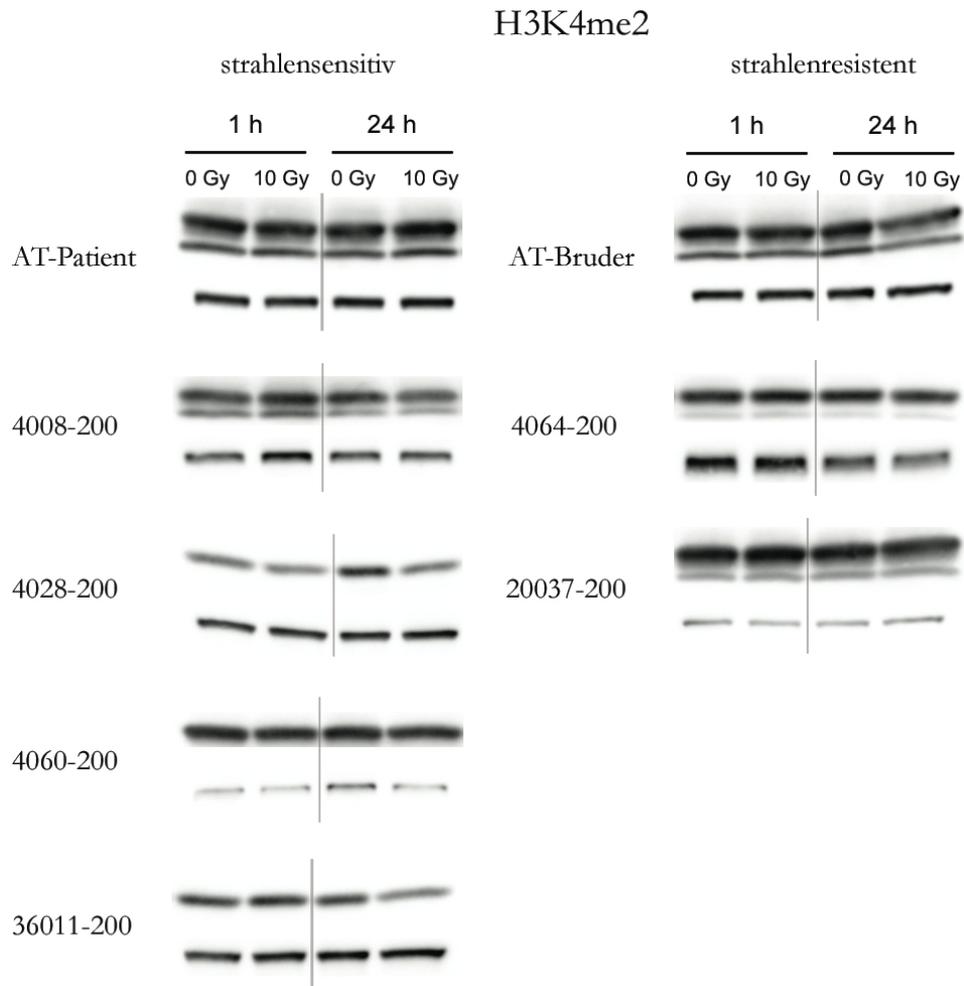


Abbildung 2.34. Veränderung der globalen H3K4me2-Menge nach Bestrahlung in strahlensensitiven und strahlenresistenten Zelllinien. Western-Blots von Gesamtzellextrakten. Die Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt und nach Inkubationszeiten von 1 h oder 24 h geerntet. In der jeweils oberen Zeile ist H3K4me2 nachgewiesen, in der darunterliegenden Tubulin alpha, um die Gleichmäßigkeit der Beladung nachzuweisen.

H3K4me2	1 h		24 h	
	10 Gy		10 Gy	
	MW+SEM	n	MW+SEM	n
AT-Patient	101,7 ± 3,3	6	92,6 ± 5,7	6
4008-200	104,3 ± 7,0	4	80,0 ± 6,2 *	4
4028-200	88,9 ± 5,1	5	75,3 ± 9,1 *	5
4060-200	105,0 ± 7,4	6	135,1 ± 13,1 *	5
36011-200	102,0 ± 6,8	4	86,0 ± 7,1	5
AT-Bruder	96,2 ± 4,2	6	101,9 ± 11,3	6
4064-200	102,8 ± 11,3	4	101,6 ± 4,8	5
20037-200	87,2 ± 10,9	6	104,6 ± 12,0	6

*Tabelle 2.13. Quantifizierung der relativen H3K4me2-Menge im Western-Blot. Die Proteinmenge der untersuchten Histonmodifikation wurde auf die Ladekontrolle (Tubulin alpha) und eine unbestrahlte Kontrolle normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte (MW) und der Fehler des Mittelwertes (SEM) von zwei unabhängigen Experimenten und der angegebenen Anzahl an Blots (n). Sternchen markieren nach dem t-Test statistisch signifikante Veränderungen. H3K4me2 zeigt nach einer Stunde Inkubationszeit noch keine Veränderung. Nach 24 h kommt es zu einer Abnahme in zwei der strahlensensitiven Zelllinien, hingegen in einer Zelllinie auch zu einer Zunahme. In den strahlenresistenten Linien verändert sich die H3K4me2-Menge in der Zelle nicht.*

Wie man in Tabelle 2.13 sieht, ist die Art der Veränderung im H3K4me2-Muster jedoch nicht einheitlich. In zwei der LUCY-Zelllinien kommt es zu einer statistisch signifikanten Abnahme von H3K4me2 nach Bestrahlung, in einer weiteren untersuchten Linie zu einer Zunahme. Die Zellen des AT-Patienten zeigen hingegen keinen Effekt. Die p-Werte aller statistisch signifikanten Veränderungen der PTM in den AT- und den LUCY-Zelllinien finden sich in Anhang 3.

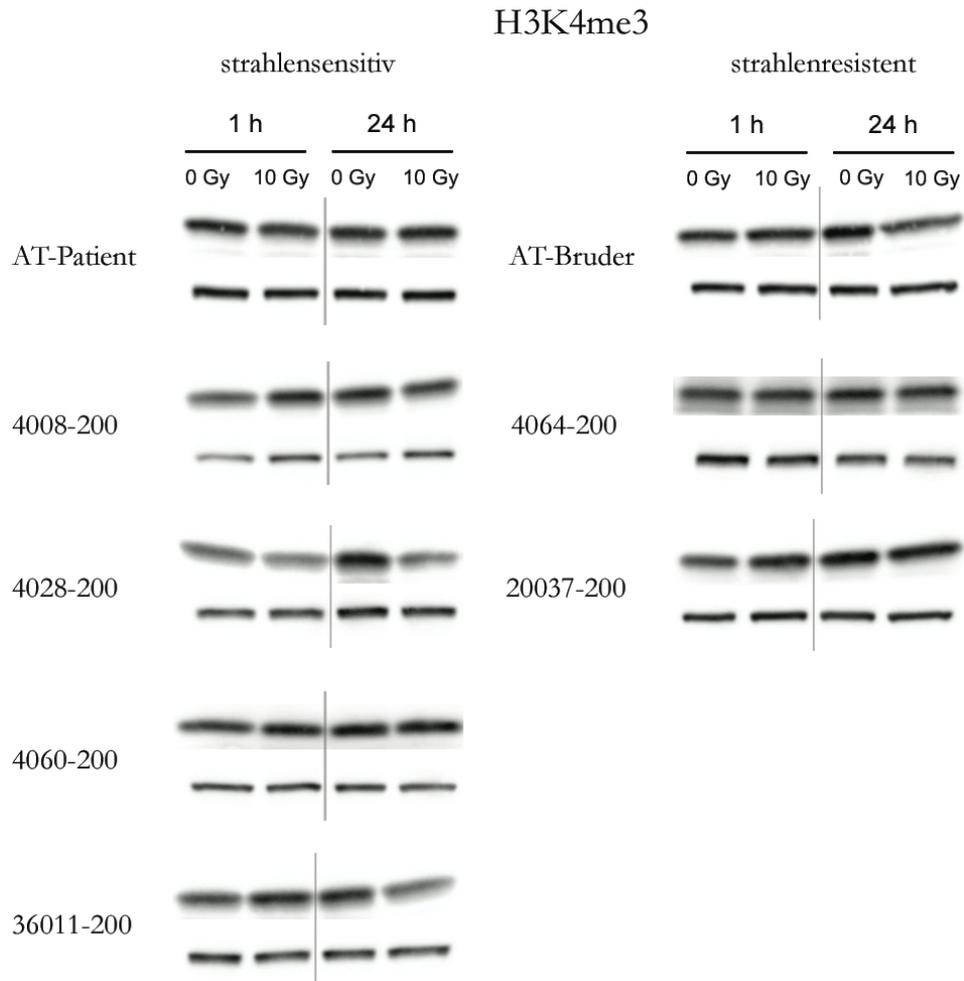


Abbildung 2.35. Veränderung der globalen H3K4me3-Menge nach Bestrahlung in strahlensensitiven und strahlenresistenten Zelllinien. Western-Blots von Gesamtzelextrakten. Die Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt und nach Inkubationszeiten von 1 h oder 24 h geerntet. In der jeweils oberen Zeile ist H3K4me3 nachgewiesen, in der darunterliegenden Tubulin alpha, um die Gleichmäßigkeit der Beladung nachzuweisen.

H3K4me3	1 h		24 h	
	10 Gy		10 Gy	
	MW+SEM	n	MW+SEM	n
AT-Patient	101,2 ± 8,0	6	95,2 ± 5,7	6
4008-200	102,3 ± 9,9	4	81,2 ± 9,0	4
4028-200	87,2 ± 4,0 *	5	78,2 ± 9,9	5
4060-200	103,7 ± 2,8	7	109,1 ± 13,1	7
36011-200	117,0 ± 4,3 *	5	86,9 ± 8,1	5
AT-Bruder	98,7 ± 5,2	6	94,1 ± 8,5	5
4064-200	92,2 ± 9,8	4	93,5 ± 11,4	4
20037-200	98,0 ± 8,4	6	109,4 ± 10,0	6

*Tabelle 2.14. Quantifizierung der relativen H3K4me3-Menge im Western-Blot. Die Proteinmenge der untersuchten Histonmodifikation wurde auf die Ladekontrolle (Tubulin alpha) und eine unbestrahlte Kontrolle normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte (MW) und der Fehler des Mittelwertes (SEM) von zwei unabhängigen Experimenten und der angegebenen Anzahl an Blots (n). Sternchen markieren nach dem t-Test statistisch signifikante Veränderungen. H3K4me3 zeigt nach einer Stunde Inkubationszeit in der 36011-200 Linie eine leichte Zunahme, in der 4028-200 eine Abnahme. Nach 24 h kommt es zu keinen statistisch signifikanten Veränderungen.*

Auch bei H3K4me3 kommt es nur bei den strahlenempfindlichen Linien zu einem global messbaren Effekt nach Bestrahlung, wie in Abbildung 2.35 und Tabelle 2.14 zu sehen ist. Im Gegensatz zu H3K4me2 lässt sich diese jedoch nur eine Stunde nach Bestrahlung nachweisen und nach 24 h nicht mehr. Hat die LCL-HuKo-Zelllinie eine klare Abnahme nach Bestrahlung gezeigt, kommt es hier in einer Zelllinie zu einer Abnahme und in einer anderen zu einer kleinen, aber reproduzierbaren und statistisch signifikanten Zunahme. Auch hier gibt es keine Übereinstimmung mit der Zelllinie des AT-Patienten, welche keine Reaktion zeigt.

Für H3K27me3 (Abbildung 2.36, Tabelle 2.15) kann zwar nicht bei allen Zelllinien eine Veränderung nach Bestrahlung festgestellt werden und es existiert auch keine Korrelation mit der Strahlensensitivität der Linien, allerdings kann, wenn es zu einer Reaktion kommt, einheitlich eine Zunahme beobachtet werden, wie sie auch in der Literatur beschrieben ist (O'Hagan et al., 2008; Chou et al., 2010). Diese lässt sich vor allem nach 24 h nachweisen und fällt mit bis zu 40% verhältnismäßig deutlich aus.

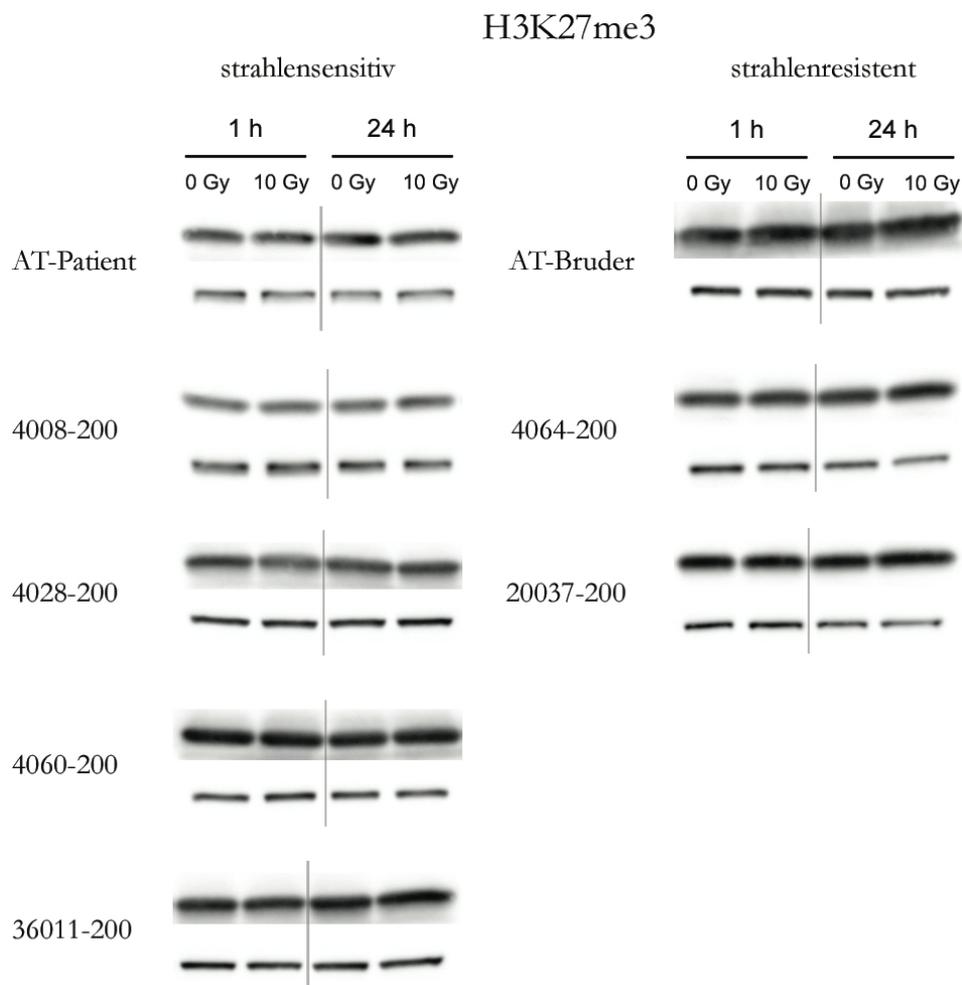


Abbildung 2.36. Veränderung der globalen H3K27me3-Menge nach Bestrahlung in strahlensensitiven und strahlenresistenten Zelllinien. Western-Blots von Gesamtzellextrakten. Die Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt und nach Inkubationszeiten von 1 h oder 24 h geerntet. In der jeweils oberen Zeile ist H3K27me3 nachgewiesen, in der darunterliegenden Tubulin alpha, um die Gleichmäßigkeit der Beladung nachzuweisen.

H3K27me3	1 h		24 h	
	10 Gy		10 Gy	
	MW+SEM	n	MW+SEM	n
AT-Patient	108,5 ± 4,3	6	95,7 ± 23,2	6
4008-200	99,7 ± 3,5	4	100,6 ± 11,7	5
4028-200	96,6 ± 7,6	5	91,5 ± 8,1	5
4060-200	107,3 ± 6,0	7	117,8 ± 4,2 *	7
36011-200	116,6 ± 7,4	5	132,1 ± 10,6 *	5
AT-Bruder	104,5 ± 9,6	6	100,6 ± 21,3	4
4064-200	104,2 ± 7,5	6	141,3 ± 7,5 *	6
20037-200	94,8 ± 9,5	6	126,2 ± 5,8 *	6

Tabelle 2.15. Quantifizierung der relativen H3K27me3-Menge im Western-Blot. Die Proteinmenge der untersuchten Histonmodifikation wurde auf die Ladekontrolle (Tubulin alpha) und eine unbestrahlte Kontrolle normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte (MW) und der Mittelwertfehler (SEM) von zwei unabhängigen Experimenten und der angegebenen Anzahl an Blots (n). Sternchen markieren nach dem t-Test statistisch signifikante Veränderungen. Nach 24 h zeigen zwei strahlensensitive und zwei -resistente Zelllinien eine Zunahme von H3K27me3.

Als weitere PTM wurde außerdem noch der Fokus auf die Acetylierungen von H3 und H4 gelegt. Es wird angenommen, dass die Acetylierung von Histonen zu einer Auflockerung der Chromatinstruktur beiträgt (Bannister und Kouzarides 2011). In den LCL-HuKo-Zellen fanden sich hier die meisten und deutlichsten Veränderungen. Im Nachfolgenden finden sich die Analysen von H3K56ac, H4K5ac und H4K16ac.

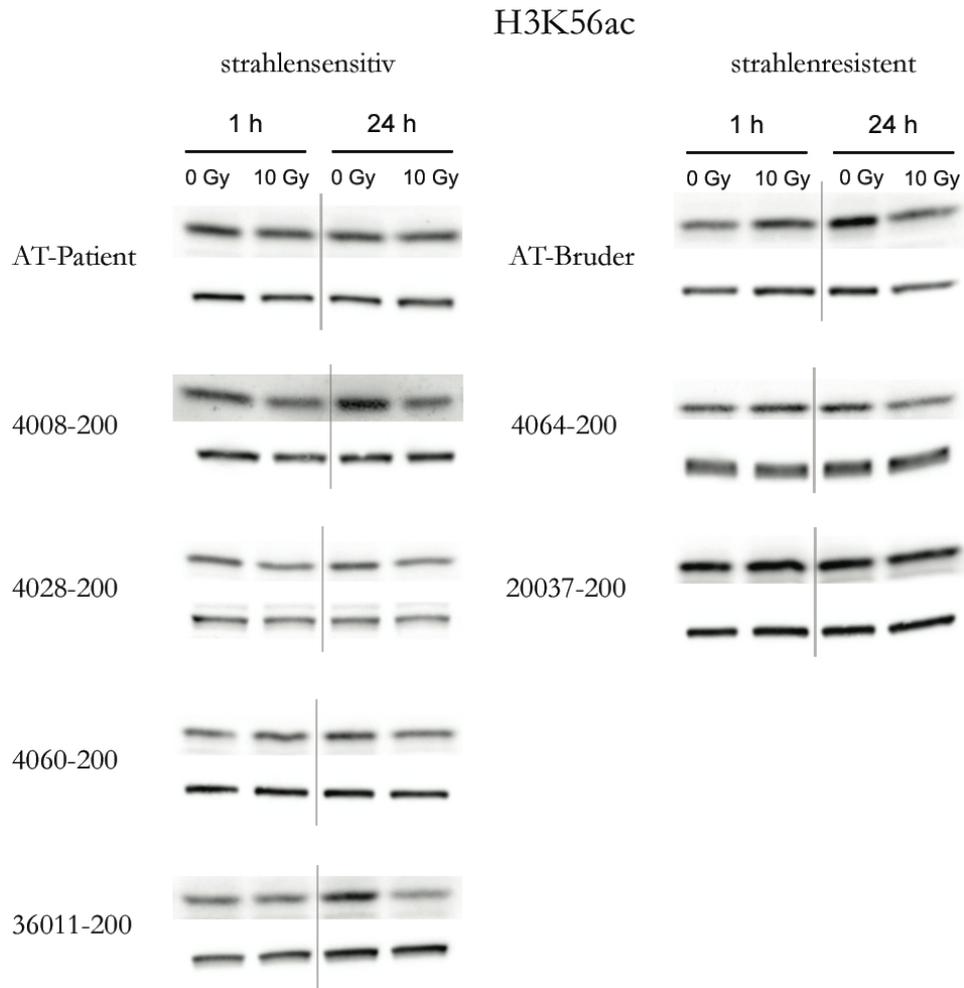


Abbildung 2.37. Veränderung der globalen H3K56ac-Menge nach Bestrahlung in strahlensensitiven und strahlenresistenten Zelllinien. Western-Blots von Gesamtzellextrakten. Die Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt und nach Inkubationszeiten von 1 h oder 24 h geerntet. In der jeweils oberen Zeile ist H3K56ac nachgewiesen, in der darunterliegenden Tubulin alpha, um die Gleichmäßigkeit der Beladung nachzuweisen.

H3K56ac	1 h		24 h	
	10 Gy		10 Gy	
	MW+SEM	n	MW+SEM	n
AT-Patient	107,6 ± 11,3	6	90,8 ± 7,0	6
4008-200	107,3 ± 7,7	4	82,6 ± 6,9 *	4
4028-200	109,4 ± 14,0	5	92,8 ± 7,01	5
4060-200	103,9 ± 3,2	7	102,1 ± 7,7	7
36011-200	98,7 ± 7,7	5	78,9 ± 5,1 *	5
AT-Bruder	126,6 ± 5,0 *	5	73,6 ± 10,3 *	4
4064-200	106,3 ± 4,9	4	89,0 ± 10,1	4
20037-200	90,9 ± 11,3	7	94,1 ± 9,2	6

Tabelle 2.16. Quantifizierung der relativen H3K56ac-Menge im Western-Blot. Die Proteinmenge der untersuchten Histonmodifikation wurde auf die Ladekontrolle (Tubulin alpha) und eine unbestrahlte Kontrolle normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte (MW) und der Mittelwertfehler (SEM) von zwei unabhängigen Experimenten und der angegebenen Anzahl an Blots (n). Sternchen markieren nach dem t-Test statistisch signifikante Veränderungen. Nach einer Stunde Inkubation kommt es bei dem strahlenresistenten AT-Bruder zu einer leichten Zunahme. Nach 24 h ist in dieser Zelllinie eine Abnahme nachzuweisen, ebenso wie in einer weiteren strahlenresistenten und einer strahlensensitiven Zelllinie.

In den LUCY- und AT-Kontrollzelllinien zeigt sich vor allem nach 24 h eine Abnahme im H3K56ac-Level. Dies betrifft zwei als strahlensensitiv kategorisierte Zelllinien und die Zelllinie des AT-Bruders. Interessanterweise zeigt eben dieser AT-Bruder nach 1 h eine reproduzierbare und statistisch signifikante Zunahme von H3K56ac.

Es sind dieselben Zelllinien die auch bei H4K5ac 24 h nach Bestrahlung eine Abnahme zeigen.

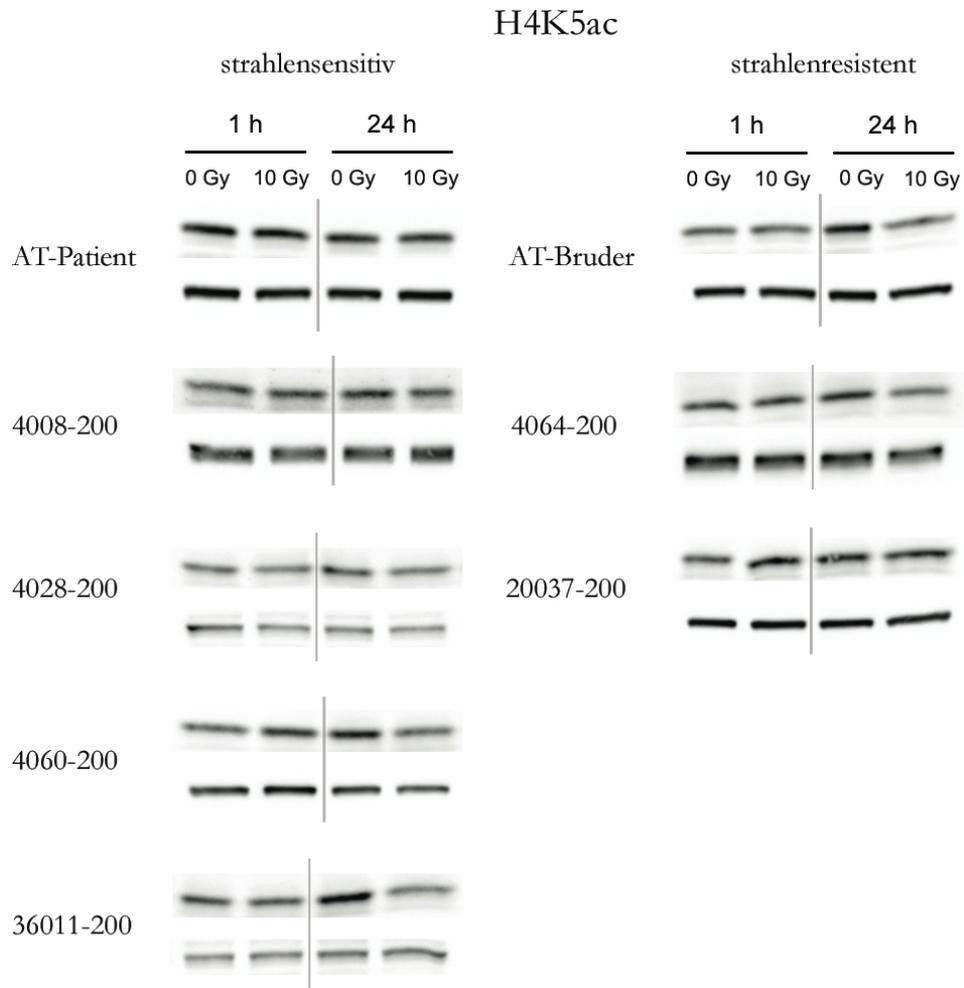


Abbildung 2.38. Veränderung der globalen H4K5ac-Menge nach Bestrahlung in strahlensensitiven und strahlenresistenten Zelllinien. Western-Blots von Gesamtzellextrakten. Die Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt und nach Inkubationszeiten von 1 h oder 24 h geerntet. In der jeweils oberen Zeile ist H4K5ac nachgewiesen, in der darunterliegenden Tubulin alpha, um die Gleichmäßigkeit der Beladung nachzuweisen.

H4K5ac	1 h		24 h	
	10 Gy		10 Gy	
	MW+SEM	n	MW+SEM	n
AT-Patient	103,9 ± 16,2	4	91,1 ± 10,7	4
4008-200	101,2 ± 10,1	3	70,8 ± 2,9 *	4
4028-200	113,9 ± 10,4	5	87,3 ± 8,3	5
4060-200	97,1 ± 8,6	7	89,5 ± 5,3	8
36011-200	91,8 ± 4,3	5	74,5 ± 4,6 *	5
AT-Bruder	113,6 ± 8,7	4	72,7 ± 5,1 *	4
4064-200	99,1 ± 9,0	4	90,0 ± 5,5	4
20037-200	100,1 ± 6,2	8	94,5 ± 7,1	7

*Tabelle 2.17. Quantifizierung der relativen H4K5ac-Menge im Western-Blot. Die Proteinmenge der untersuchten Histonmodifikation wurde auf die Ladekontrolle (Tubulin alpha) und eine unbestrahlte Kontrolle normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte (MW) und der Mittelwertfehler (SEM) von zwei unabhängigen Experimenten und der angegebenen Anzahl an Blots (n). Sternchen markieren nach dem t-Test statistisch signifikante Veränderungen. Es kommt nur nach 24 h zu signifikanten Abnahmen und zwar in zwei strahlensensitiven LUCY-Zelllinien und bei dem strahlenresistenten AT-Bruder.*

Die Veränderungen im H4K5 Acetylierungsmuster fallen mit 25-30% im Vergleich sehr deutlich aus. Die Zunahme nach 1 h in den Zellen des AT-Bruders zeigt H4K5ac jedoch nicht.

Als dritte Acetylierung wurde H4K16ac untersucht. Hier kommt es in allen strahlensensitiven Zelllinien, bis auf den AT-Patienten, zu einer deutlichen Abnahme 24 h nach Bestrahlung. In zwei dieser Zelllinien ist diese Veränderung auch schon nach einer Stunde zu beobachten.

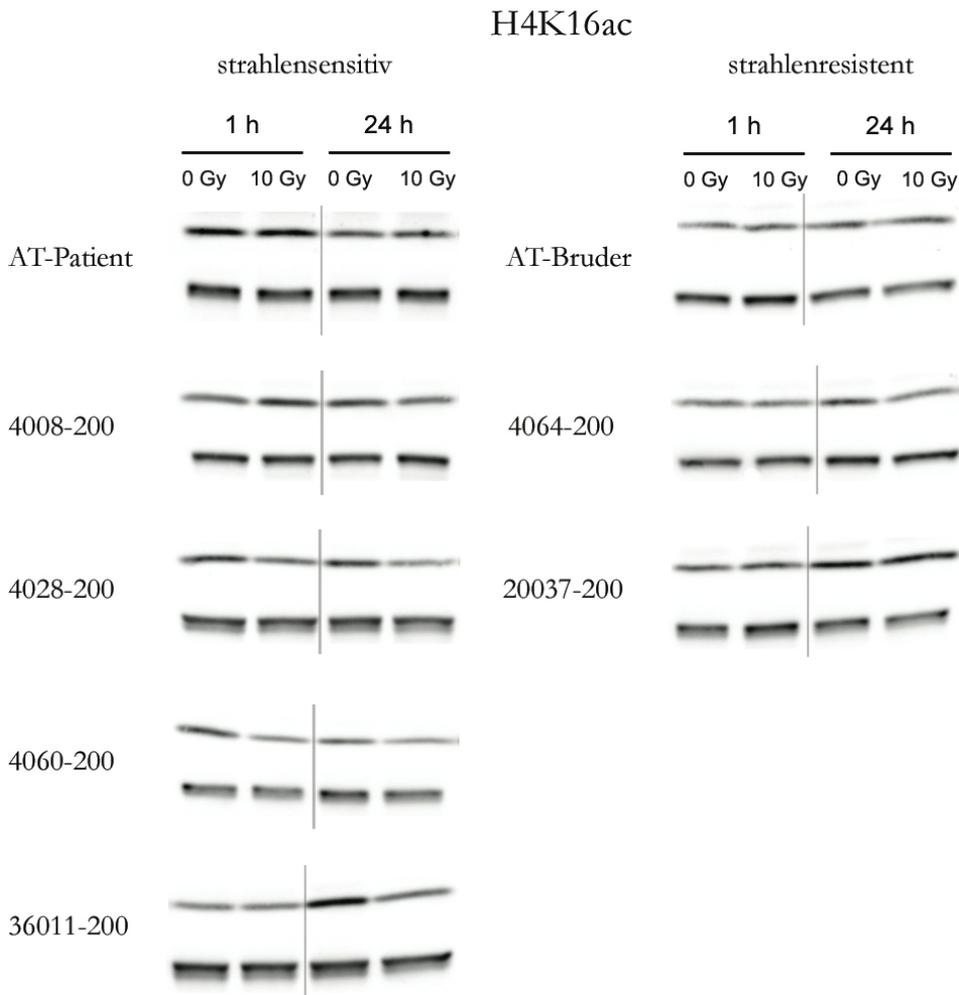


Abbildung 2.39. Veränderung der globalen H4K16ac-Menge nach Bestrahlung in strahlensensitiven und strahlenresistenten Zelllinien. Western-Blots von Gesamtzellextrakten. Die Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt und nach Inkubationszeiten von 1 h oder 24 h geerntet. In der jeweils oberen Zeile ist H4K16ac nachgewiesen, in der darunterliegenden Tubulin alpha, um die Gleichmäßigkeit der Beladung nachzuweisen.

H4K16ac	1 h		24 h	
	10 Gy		10 Gy	
	MW+SEM	n	MW+SEM	n
AT-Patient	101,3 ± 7,6	4	97,0 ± 10,5	4
4008-200	93,9 ± 11,9	4	68,1 ± 2,6 *	4
4028-200	80,6 ± 2,3 *	4	68,4 ± 3,9 *	3
4060-200	64,4 ± 5,0 *	4	82,5 ± 4,8 *	3
36011-200	101,2 ± 7,0	3	72,8 ± 2,7 *	4
AT-Bruder	86,4 ± 9,0	4	106,7 ± 17,6	4
4064-200	91,8 ± 13,0	4	98,4 ± 4,7	4
20037-200	96,3 ± 4,3	4	99,6 ± 10,0	4

*Tabelle 2.18. Quantifizierung der relativen H4K16ac-Menge im Western-Blot. Die Proteinmenge der untersuchten Histonmodifikation wurde auf die Ladekontrolle (Tubulin alpha) und eine unbestrahlte Kontrolle normalisiert. Gezeigt sind die Mittelwerte (MW) und der Mittelwertfehler (SEM) von zwei unabhängigen Experimenten und der angegebenen Anzahl an Blots (n). Sternchen markieren nach dem t-Test statistisch signifikante Veränderungen. Bei H4K16ac kommt es nur bei den strahlensensitiven Linien zu einer strahleninduzierten Veränderung im H4K16-Acetylierungsmuster. Hierbei kommt es zu einer Abnahme, mit Ausnahme des AT-Patienten, welcher keinen Effekt zeigt.*

## 2.2.5 Zusammenfassung

In Tabelle 2.19 sind alle statistisch signifikanten Veränderungen der PTM der LCL-HuKo-, AT-Kontrollzelllinien und der untersuchten Zelllinien aus dem LUCY-Kollektiv dargestellt. Die roten Pfeile bezeichnen Zunahmen, die grünen Pfeile eine Abnahme und die grauen Balken entsprechen keiner im Western-Blot detektierbaren signifikanten Mengenveränderung nach Bestrahlung.

Protein	Zeit	LCL- HuKo	AT- Bruder	20037- 200	4064- 200	AT- Patient	4060- 200	4008- 200	4028- 200	36011- 200
γH2AX	1 h	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
	24h	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
H3K4me2	1 h	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	24h	—	—	—	—	—	↑	↓	↓	—
H3K4me3	1 h	↓	—	—	—	—	—	—	↓	↑
	24h	↓	—	—	—	—	—	—	—	—
H3K27me3	1 h	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	24h	—	—	↑	↑	—	↑	—	—	↑
H4K5 ac	1 h	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	24h	↓	↓	—	—	—	—	↓	—	↓
H3K56ac	1 h	↓	↑	—	—	—	—	—	—	—
	24h	↓	↓	—	—	—	—	↓	—	↓
H4K16ac	1 h	—	—	—	—	—	↓	—	↓	—
	24h	—	—	—	—	—	↓	↓	↓	↓

Tabelle 2.19. Zusammenfassung des Screenings von verschiedenen EBV-immortalisierten lymphoblastoiden Zelllinien. Die in schwarzer Schrift benannten Linien entsprechen den

*strahlenresistenten Zelllinien, die in blauer Schrift die strahlensensitiven. Die p-Werte für alle Veränderungen finden sich in Anhang 2 und Anhang 3.*

In der Übersicht ist gut zu sehen, dass es bis auf die Zunahme an  $\gamma$ H2AX keine Veränderungen in den untersuchten PTM gibt, die in allen Zelllinien nach Bestrahlung auftreten würde. Bei den beiden untersuchten Methylierungen von H3K4 kommt es sowohl zu einer Zu-, als auch zu einer Abnahme, wobei diese Veränderungen hauptsächlich in den strahlensensitiven Zelllinien auftreten. Die PTM neben  $\gamma$ H2AX bei der die Bestrahlung zu einer Zunahme führt, ist die einzige untersuchte PTM, die mit transkriptioneller Reprimierung assoziiert ist: H3K27me3. Ein Zusammenhang mit der Strahlensensitivität der Zelllinien ist hierbei jedoch nicht zu beobachten. Bei den untersuchten Acetylierungen von H3 und H4 führt eine Bestrahlung fast ausschließlich zu einer Hypoacetylierung. Die Abnahme von H4K16ac ist dabei klar mit der Strahlensensitivität assoziiert und tritt in keiner der als strahlenresistent definierten Zelllinien auf.

Allgemein kann man sagen, dass Veränderungen vor allem in den strahlensensitiven LUCY-Zelllinien auftreten. LCL-HuKo spielt unter den strahlenresistenten Linien eine Sonderrolle, da sie verhältnismäßig viele Veränderungen zeigt, im AT-Bruder und den strahlenresistenten Linien des LUCY-Kollektivs kommt es zu kaum Reaktionen auf eine Bestrahlung.

Den stärksten Hinweis, dass eine Veränderung des PTM-Musters nach Bestrahlung mit der DNA-Reparatur in Zusammenhang steht, liefert jedoch der AT-Patient. Durch seine Mutation von ATM zeigt er drastische Defizite in der DNA-Reparatureffizienz. Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Zelllinien kann man, bis auf die Zunahme von  $\gamma$ H2AX, keine Veränderung in dem PTM-Muster nach Bestrahlung beobachten.

Es konnte gezeigt werden, dass eine DNA-Schädigung einen globalen Einfluss auf die PTM und damit die Chromatinstruktur hat. Ein direkter Zusammenhang mit Prozessen der DNA-Schadensantwort wird aufgrund der Ergebnisse des AT-Patienten angenommen, allerdings konnte keine Korrelation zwischen Stärke und Art der Veränderungen im PTM-Muster und der Strahlensensitivität einer Zelllinie hergestellt werden.

## **3 Diskussion**

### **3.1 Einfluss der Chromatinstruktur auf die DNA-Reparatur**

#### **3.1.1 Einfluss von Hypertonie und Hypotonie auf verschiedene Zelllinien**

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die artifizielle Chromatinmodulation durch die Änderung der Osmolarität bei den gewählten Bedingungen sowohl in HeLa- als auch U2OS-Zellen zu kaum dauerhaften Schäden führt. Sowohl in der Immunfluoreszenz, als auch in der Durchflusszytometrie konnte erst nach deutlich längeren Inkubationszeiten mit hypertonem Medium, als der für die Versuche gewählten 1 h, eine erhöhte Apoptoserate beobachtet werden.

Eine Induktion von  $\gamma$ H2AX durch die Behandlung mit hypertonem Medium lässt sich zwar im Western-Blot sowohl für HeLa- als auch für U2OS-Zellen nachweisen, in der Immunfluoreszenz zeigt sich dies aber weder durch die Ausprägung von  $\gamma$ H2AX-Foci, noch durch eine allgemeine Erhöhung der Fluoreszenzintensität des Zellkerns, sodass weitere Analysen in der Immunfluoreszenz nicht beeinträchtigt waren.

Einen klaren Einfluss auf die Zellkernmorphologie und deren Größe sieht man vor allem bei der Behandlung der Zellen mit hohen Salzkonzentrationen. Sowohl bei HeLa-, als auch bei U2OS-Zellen führte 750 mOsm Medium zu einer statistisch signifikanten Verkleinerung der Zellkernfläche. Martin und Cardoso haben 2010 publiziert, dass die Behandlung von HeLa-Zellen mit Medium, welches über Zugabe von PBS auf 500 mM (entspricht in etwa 970 mOsm) gebracht wurde, zu einem der Mitose vergleichbaren Kondensationsgrad des Chromatins führt. Es wurden in dieser Studie keine niedrigeren Salzkonzentrationen getestet, sodass nicht gesagt werden kann, ob bereits schon bei einer geringeren Hyperosmolarität, wie den von uns verwendeten 750 mOsm, ein vergleichbarer Kondensationsgrad erreicht wird.

Einen gegenteiligen Effekt hat die hohe Osmolarität auf die Größe der  $\gamma$ H2AX-Foci nach Bestrahlung. Hier kommt es bei 750 mOsm zu einer deutlichen Zunahme des Volumens. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens, ist in den DAPI-Immunfluoreszenzaufnahmen der behandelten Zellkerne zu sehen. Durch die Behandlung der Zellkerne mit 750 mOsm Medium wird den Zellen Wasser entzogen, die Interkompartiment Hohlräume werden größer und das Chromatin dichter, wie auch deutlich an den viel helleren Strukturen auf den Mikroskopiebildern zu sehen ist. Durch die artifizielle Hyperkondensierung befindet sich mehr DNA auf kleinerem Raum, was sich auch in einem kleineren Zellkern widerspiegelt. Die Schäden die ein Ionendurchtritt an der DNA verursacht, befinden sich damit ebenfalls auf einem sehr kleinen Raum. Durch die begrenzte Auflösung der Epifluoreszenzmikroskopie können die einzelnen Schäden nicht mehr aufgelöst werden und erscheinen als ein großer Focus. Hierfür würde auch die Reduktion der Focianzahl pro Ionendurchgang nach Hypertonbehandlung sprechen, welche sich allerdings nach einer Normierung auf die Tracklänge nur noch in den U2OS-Zellen nachweisen lässt. Eine andere mögliche Ursache der Vergrößerung der  $\gamma$ H2AX-Foci bei Hypertonbehandlung wird von Reitsema et al., 2005 diskutiert, die in ihrer Publikation ebenfalls diese Beobachtung gemacht haben. Sie konnten durch DNA-PK defiziente und substituierte Zelllinien eine Beteiligung von DNA-PK an der Zunahme des Focivolumens nach Hypertonbehandlung (1000 mOsm NaCl) nachweisen. Sie postulieren, dass die Hochsalzumgebung die Ligation der Doppelstrangbrüche verhindert, was im Weiteren dazu führt, dass DNA-PK in seiner aktiven Form am Schaden gebunden bleibt und H2AX über die Zeit in einem größeren Bereich phosphoryliert.

Für die in dieser Arbeit weiteren Untersuchungen war essentiell, dass unter allen gewählten osmotischen Bedingungen eine effiziente Schadenserkennung und Phosphorylierung von H2AX stattfindet, wie es früh auch schon für mitotische Zellen nachgewiesen werden konnte (Rogakou et al., 1999). In embryonalen Mauszellen und Mäusenierenzellen konnte von Dmitrieva et al., 2003 gezeigt werden, dass eine Osmolarität von 600 mOsm NaCl zu einer Inhibierung der Schadensantwort nach IR führt und dabei auch die Phosphorylierung von H2AX erst nach Senkung der Osmolarität auf ein isotones Level erfolgen kann. Ein

Ergebnis, dem unsere Daten in HeLa-, U2OS- und BJ-1-hTERT-Zellen widersprechen. Für die Phosphorylierung verantwortlich sind die PI3K-like Kinasen ATM, DNA-PK und teilweise ATR. ATR ist hauptsächlich bei Schäden aktiv, die während der DNA-Replikation entstehen. Es kann aber auch während der S- und G2-Phase in der Reparatur von IR-Schäden involviert sein (Firsanov et al., 2011). Um näher einzugrenzen, welche der Kinasen in unserem Experimentaufbau für die  $\gamma$ H2AX-Focibildung verantwortlich ist, wurde in einem Versuch zusätzlich zu der Behandlung mit hypertonem Medium der ATM-Inhibitor (ATMi) KU60019 in unterschiedlichen Konzentrationen 30 min vor der Bestrahlung zugegeben (Daten nicht gezeigt). Trotz des Inhibitors kam es sowohl unter isotonen, als auch unter hypertonen Bedingungen (570 und 750 mOsm) zu einer Phosphorylierung von H2AX. Demnach scheinen hier auch andere Kinasen, DNA-PK und/oder ATR beteiligt zu sein. Es wäre interessant, dieser Frage mit Inhibitoren für die anderen H2AX phosphorylierenden Kinasen weiter nachzugehen, was aus technischen Gründen im Zuge dieser Arbeit nicht mehr möglich war.

### **3.1.2 Einfluss von artifizieller Chromatinhyperkondensierung auf die Akkumulierung von DNA-Reparaturfaktoren**

Nachdem wir eine starke Schädigung der Zellen durch eine Behandlung mit Medium unterschiedlicher Osmolaritäten ausschließen und außerdem nachweisen konnten, dass  $\gamma$ H2AX als Schadensmarker unter allen gewählten Bedingungen ausgeprägt wird, haben wir im weiteren Verlauf dieser Arbeit den Einfluss der künstlichen Chromatinveränderung durch Osmolaritätsänderung auf die Akkumulierungsfähigkeit verschiedener DNA-Reparaturfaktoren an den Schadensort untersucht.

Besonders die Hyperkondensierung von Chromatin, wie sie sowohl in Mitosechromosomen, als auch in Heterochromatinbereichen im Interphasekern vorkommt, stellt hierbei für die DNA-Reparatur eine besondere Herausforderung für die Zelle dar. Zudem wird nicht nur durch die Komplexität des Schadens, sondern auch durch den Kompaktierungsgrad des Chromatins die Wahl des Reparaturwegs beeinflusst. Zu Beginn dieser Arbeit war noch wenig darüber bekannt, wie sich DNA-Reparaturfaktoren

in hyperkondensiertem Chromatin verhalten. Aus diesem Grund haben wir sowohl frühe, als auch späte DDR-Faktoren auf ihre Focibildung nach Bestrahlung mit Schwerionen unter zwei verschiedenen hyperosmolaren Bedingungen untersucht.

Unter isotonen Bedingungen kolokalisieren sowohl Brit1, als auch Mre11, Mdc1, pATM, 53BP1, BRCA1 und Rad51 mit dem Schadensmarker  $\gamma$ H2AX. Rad51 jedoch nur mit einem Prozentsatz von  $61 \pm 21,2\%$  in U2OS-Zellen und  $81 \pm 7,1\%$  in HeLa-Zellen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Rad51 nur in der S- und G2-Phase im Zellzyklus exprimiert wird (Flyfare et al., 1996). Dass auch Mre11 in U2OS-Zellen unter isotonen Bedingungen keine 100%ige Kolokalisation mit  $\gamma$ H2AX aufweist, ist vermutlich auf die Qualität des Antikörpers zurückzuführen, welcher nur ein schwaches Signal zeigte und ein starkes Hintergrundrauschen hervorbrachte. Zudem konnte für Mre11 im Gegensatz zu den anderen untersuchten Proteinen nur ein Versuch durchgeführt werden, sodass es sich auch um ein Problem bei der Aufarbeitung der Proben handeln könnte.

Eine Beobachtung, die in allen drei verwendeten Zelllinien, HeLa-, U2OS- und BJ-1-hTERT-Zellen, gemacht wurde ist, dass bei einer Hypersomolarität von 750 mOsm keiner der untersuchten DNA-Reparaturfaktoren in der Immunfluoreszenzanalyse mehr mit  $\gamma$ H2AX kolokalisiert. Dadurch wird die Tatsache, dass H2AX dennoch effektiv phosphoryliert wird in ein bemerkenswertes Licht gerückt, da auch pATM bei einer Hyperkondensierung mit 750 mOsm Medium nicht mehr am Schaden akkumuliert. Dies wirft die oben schon diskutierte Frage wieder auf, welche anderen Kinasen hier für die Phosphorylierung verantwortlich sind. Aufgrund der zeitlichen und kapazitären Einschränkungen durch die Strahlzeiten für die Bestrahlung der Zellen mit dem Ionenmikrostrahl, konnten wir dieser Fragestellung nicht weiter nachgehen.

Als besonders interessant, hat sich die Hyperkondensierung mit 570 mOsm Medium gezeigt, welche sich aber zwischen den verschiedenen Zelllinien deutlich unterscheidet und erst für U2OS-Zellen diskutiert werden soll. Hier kommt es bei allen untersuchten DNA-Reparaturfaktoren zu einer signifikanten Abnahme in der Akkumulierungsfähigkeit am Schadensort von 25-75%. Ein Antikörperartefakt aufgrund des hypertonen Mediums und der dadurch erreichten künstlichen Hyperkondensierung konnte durch einen

Parallelversuch mit HeLa-pMC16-53BP1-EGFP-Zellen ausgeschlossen werden. Bemerkenswerterweise gibt es neben  $\gamma$ H2AX eine Ausnahme, die von der Hyperkondensierung bei 570 mOsm nicht beeinträchtigt ist: Mdc1 ist auch unter diesen Bedingungen in der Lage zu 100% mit dem Schadensmarker zu korrelieren. Dies deutet auf Parallelen zwischen unserem experimentellen Aufbau und der DNA-Reparatur in der Mitose hin. Hierzu wurde 2010 von Giunta et al. und van Vugt et al. beschrieben, dass es während der Mitose zwar noch zur Kolokalisation von Mdc1 mit  $\gamma$ H2AX kommt, aber keine Focibildung von späteren DDR-Faktoren wie 53BP1, RNF8, RNF168 oder BRCA1 beobachtet werden kann. Van Vugt et al. (2010) beschreiben nicht nur, dass es während der Mitose zu keiner 53BP1-Focibildung mehr kommt, sondern auch, dass bestehende 53BP1-Foci während der Mitose aus dem Chromatin verdrängt werden. Um zu testen, ob es hier in unserem Modell ebenfalls Parallelen zur Reparatur in der Mitose gibt, haben wir HeLa-Zellen, welche stabil ein EGFP-gekoppeltes 53BP1 exprimieren (Hable et al., 2012), unter isotonen Bedingungen in kleinem Winkel mit Kohlenstoffionen bestrahlt. Nach 30 min, ein Zeitpunkt zu dem in Kontrollproben eine klare Kolokalisation von  $\gamma$ H2AX und 53BP1-EGFP zu erkennen war, wurde die Osmolarität des Mediums auf 750 mOsm angehoben. Die Fixierung erfolgte wie in den anderen Experimenten nach 1 h. Wie von van Vugt beschrieben, konnten auch wir keine 53BP1-Foci mehr an den von  $\gamma$ H2AX-dekorierten Schadensorten nachweisen, was auf eine Exklusion von 53BP1 aus hyperkondensiertem Chromatin hindeutet. Allerdings erfolgte diese bei uns nicht vollständig. Die sekundäre Hypertonie nach der Ionenmikrobestrahlung zeigte sowohl in der Morphologie der Zellkerne, als auch im  $\gamma$ H2AX-Signal einen starken Stress der Zellen an, welche zu den Bestrahlungsschäden auch zu vielen spontanen Brüchen zu führen schien. So ist auch bei den HeLa-53BP1-EGFP-Zellen eine Focibildung zu beobachten. Diese Foci kolokalisieren allerdings nicht mit  $\gamma$ H2AX, sodass nicht nachgewiesen werden konnte, ob es sich hierbei wirklich um Akkumulierungen an DSBs handelt.

Auch wenn es noch nicht endgültig geklärt ist, deuten Indizienbeweise darauf hin, dass die NHEJ während der Mitose nicht schwerwiegend beeinträchtigt ist. Für Ku konnte sowohl in *Xenopus* (Peterson et al., 2011; Gomez-Godinez et al., 2012), als auch für Ku80 in

menschlichen Zellen (Mari et al., 2006) gezeigt werden, dass es während der Mitose an die DNA-Schäden rekrutiert wird. Auch wenn noch nicht für alle essentiellen NHEJ-Komponenten, wie z.B. die Ligase IV, gezeigt werden konnte, dass sie während der Mitose normal funktionieren, kann vermutet werden, dass auch während der Mitose Schäden mittels NHEJ repariert werden können (Heijink et al., 2013). Anders verhält es sich bei der DSB-Reparatur mittels HR. Nach neueren Erkenntnissen wird der MRN Komplex, von welchem angenommen wird, dass er der erste Detektor eines DNA-Bruchs ist, normal zu den Schäden rekrutiert (Peterson et al., 2011). Des Weiteren kommt es zu einer normalen Akkumulierung und Aktivierung von ATM am Schadensort, welches H2AX phosphoryliert und einer anschließenden Rekrutierung von Mdc1 (van Vugt et al., 2010, Giunta et al., 2010; Nelson et al., 2009; Stucki et al., 2005). In unserem gewählten Modell kommt es im Vergleich hierzu zu leichten Abweichungen, da bei 570 mOsm in U2OS-Zellen auch Mre11 und pATM bereits leicht in ihrer Kolokalisation mit  $\gamma$ H2AX eingeschränkt sind. Bei Mre11 könnte dies aber auch durch die Methode der Hypertonie ausgelöst sein und nicht durch die Hyperkondensierung. Dmitrieva et al. beschreiben 2003, dass eine Behandlung der Zellen mit einer erhöhten Salzkonzentration sowohl in mIMCD3-Zellen (murine Nierenzellen), als auch MEF-Zellen (murine embryonale Fibroblasten) zu einer reversiblen Translokation von Mre11 aus dem Zellkern ins Zytoplasma führt. Zu der Akkumulierung und Aktivierung von ATM kann man sagen, dass in unserem Zellmodell und Versuchsaufbau ATM nicht die alleinige verantwortliche Kinase zu sein scheint, um H2AX zu phosphorylieren, da es wie oben schon erwähnt bei 750 mOsm zu keiner pATM Akkumulierung mehr kommt, eine effektive Phosphorylierung von H2AX aber weiterhin stattfindet.

In den U2OS-Zellen konnten wir bei 570 mOsm vor allem bei den späteren DDR-Faktoren 53BP1, BRCA1 und Rad51 stärkere Einschränkungen bei der Focibildung am Schadensort beobachten. Dies deckt sich mit neuesten Publikationen wie beispielsweise von Orthwein et al., 2014, welche aufgrund der Ergebnisse von van Vugt et al., 2010, Giunta et al., 2010, Zhang et al., 2011 und Nelson et al., 2009 vermuten, dass die Inaktivierung der DDR während der Mitose auf die fehlende Rekrutierung von BRCA1 und 53BP1 zurückzuführen

ist. Es war bereits bekannt, dass in der Mitose der Signalweg oberhalb der Rekrutierung von RNF8 an den DSB blockiert ist. RNF8 und RNF168 werden in Interphasezellen durch Mdc1 an den Schaden rekrutiert, wo RNF168 H2A ubiquitinyliert, was dann zur Rekrutierung von 53BP1 und BRCA1 führt (Panier und Durocher, 2013; Mattioli et al., 2012; Gatti et al., 2012; Fradet-Turcotte et al., 2013; Jackson und Durocher, 2013). In Mitosezellen führt eine CDK1-abhängige Phosphorylierung von RNF8 dazu, dass RNF8 nicht mehr in der Lage ist an MDC1 zu binden. Dies führt dann im Folgenden dazu, dass auch BRCA1 nicht an den Schaden rekrutiert wird. Bei 53BP1 ist neben der Phosphorylierung von RNF8 noch ein weiterer Mechanismus dafür verantwortlich, dass es während der Mitose nicht mehr an den DSB binden kann. Es konnte gezeigt werden, dass zusätzlich das UDR-Motiv von 53BP1 phosphoryliert wird, welches 53BP1 ermöglicht an phosphoryliertes H2A zu binden. Erst die Verhinderung von beiden Phosphorylierungen, von RNF8 und 53BP1 führt zu einer Rekrutierung von BRCA1 und 53BP1 an die Schadensorte und damit zu einer Wiederherstellung der DNA-Reparatur während der Mitose (Orthwein et al., 2014). Auch dass Rad51 in mitotischen Zellen nicht mehr an den Schaden rekrutiert wird, ist auf einen CDK-abhängigen Mechanismus zurückzuführen. Von Esashi et al. konnte 2005 gezeigt werden, dass sich die Phosphorylierung von BRCA2 negativ auf die Bindung von Rad51 auswirkt. Zudem wurde beschrieben, dass Rad51-BRCA2-Foci verschwinden, wenn die Zellen in die Mitose eintreten, auch wenn noch DNA-Brüche existieren (Esashi et al., 2005, Ayoub et al., 2009).

Ob die Einschränkung oder Inhibierung der Akkumulierungsfähigkeit der untersuchten DDR-Faktoren bei der artifiziellen Chromatinhyperkondensierung auf ähnlichen Mechanismen beruht wie bei mitotischen Zellen kann ohne weitere Untersuchungen nicht gesagt werden. Unsere Daten deuten jedoch darauf hin, dass alleine die Kondensation schon einen deutlichen Effekt auf die DNA-Schadensantwort hat, unabhängig von den während der Mitose auftretenden Chromatinveränderungen wie beispielsweise der Hyperphosphorylierung. Durch die Ähnlichkeiten im Akkumulierungsverhalten der DDR-Faktoren mit den Beobachtungen während der Mitose, kann die Hyperkondensierung mittels Hypertonie in U2OS-Zellen möglicherweise als Modell verwendet werden, um die

DNA-Reparatur in Heterochromatin und mitotischen Chromosomen weiter zu untersuchen.

Diese Beobachtungen scheinen aber sehr vom verwendeten Zellsystem abzuhängen. HeLa-Zellen zeigen bei 750 mOsm zwar dasselbe Verhalten wie U2OS-Zellen, auf 570 mOsm reagieren sie aber deutlich weniger sensibel. Hier kommt es nur bei Mre11 zu leichten und bei Rad51 zu stärkeren Einschränkungen bei der Akkumulierung an die mit  $\gamma$ H2AX dekorierten Schadensorte. Naheliegend ist die Vermutung, dass die kritische Osmolarität für HeLa-Zellen etwas höher liegt. Dies wurde in Versuchen mit weiteren Abstufungen an Hyperosmolarität, von 525 mOsm über 570 mOsm, 610 mOsm und 660 mOsm näher untersucht. Da es aufgrund der begrenzten Strahlzeiten nicht möglich war, dies mit einem großen Set an DDR-Faktoren zu testen, wurden zwei aussagekräftige, nämlich Mdc1 und 53BP1, gewählt und diese in den beiden Zelllinien verglichen. Mdc1 zeigte bei den Versuchen mit 570 mOsm sowohl in U2OS-, also auch in HeLa-Zellen keine Beeinträchtigung in der Focibildung; 53BP1, war in U2OS-Zellen stark in seiner Akkumulierung am Schadensort eingeschränkt. Es konnte gezeigt werden, dass nicht erst bei 750 mOsm, sondern bereits bei 660 mOsm keines der beiden Proteine mehr mit  $\gamma$ H2AX kolokalisiert und dass bei 610 mOsm in beiden Zelllinien für Mdc1 und bei den HeLa-Zellen auch für 53BP1 die kritische Osmolarität erreicht ist, bei der es zu einer starken Behinderung der Focibildung kommt. Dies zeigt, dass die 570 mOsm für die Versuche gut gewählt waren, da hier sowohl Unterschiede in verschiedenen DDR-Faktoren, als auch in unterschiedlichen Zelllinien sichtbar wurden. Es konnte auf diese Weise aber für die HeLa-Zellen keine Medienbedingung und damit künstliche Hyperkondensierung des Chromatins gefunden werden bei der die Ergebnisse in ähnlicher Weise mit der DNA-Reparatur in der Mitose vergleichbar wäre wie bei den U2OS-Zellen. Auch in der Kinetik zeigte sich für HeLa-Zellen kein Einfluss von 570 mOsm Medium im Vergleich zur isotonen Kontrolle.

Die Reaktion auf die Hyperkondensierung durch Hypertonie scheint also sehr stark vom Zellsystem abzuhängen, wie auch ein Versuch mit BJ-hTERT-Zellen, einer hTERT-immortalisierten Fibroblastenzelllinie eines gesunden Spenders gezeigt hat. Hier wurde exemplarisch Mdc1 und 53BP1 untersucht und es konnte bei 570 mOsm bei beiden

Proteinen eine geringe Einschränkung in der Kolo­kalisierung mit  $\gamma$ H2AX beobachtet werden. Ein Ergebnis, das weder mit den gewonnenen Daten für HeLa- noch für U2OS-Zellen übereinstimmt.

### **3.1.3 DDR in artifiz­iell aufgelockertem Chromatin**

Nachdem im Zuge dieser Arbeit allgemein das Wechselspiel zwischen Chromatin und DNA-Reparatur untersucht werden sollte, wurde neben den Experimenten zu artifiz­ieller Hyperkondensation auch untersucht, inwiefern sich das Akkumulierungsverhalten von DNA-Reparaturfaktoren in künstlich aufgelockertem Chromatin verändert. Zu der DNA-Reparatur unter hypotonen Medienbedingungen, wie wir sie zur Auflockerung der Chromatinstruktur verwendet haben, gibt es wenige Daten in der Literatur. Dass eine Auflockerung des Chromatins aber notwendig für eine effiziente Reparatur ist, zeigt sich jedoch an der Beteiligung der zahlreichen chromatinremodellierenden Faktoren, welche für eine erfolgreiche DNA-Reparatur nötig sind, sowie an den Daten zur Reparatur in Heterochromatin (Price und Andrea, 2013). Die Behandlung der Zellen mit hypert­onem Medium kann durch seine chromatinauflockernde Wirkung die Notwendigkeit von chromatinremodellierenden Faktoren umgehen, wie von Murr et al., 2006 anhand von Trrap-defizienten Zellen gezeigt werden konnte. Trrap ist eine Komponente vieler Histon-Acetyl-Transferase-Komplexe, welche an der DNA-Reparatur beteiligt sind (Peterson und Cote, 2004). Die Depletion von Trrap in Zellen führt zu einer defizienten HR-Reparatur, da verschiedene DNA-Reparaturfaktoren wie 53BP1, BRCA1 oder Rad51 nicht mehr an den DSB akkumulieren. Dieser Effekt kann durch Behandlung der Zellen mit hypotonem Medium aufgehoben werden (Murr et al., 2006).

Unsere Experimente mit hypotonem Medium wurden an demselben Set an DNA-Reparaturfaktoren und unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie die Experimente mit Hypertonie, sowohl in HeLa- als auch in U2OS-Zellen. Die Foci entlang der Ionenspur zeigen bei allen Proteinen in beiden Zelllinien eine leicht veränderte Morphologie im Vergleich zu isotonem oder hypert­onem Medium. Die einzelnen Foci scheinen optisch kaum voneinander getrennt, die Ionenspur wirkt fast durchgehend, diffus, mehr wie eine

durchgehende Linie, als wie eine Perlenkette, so wie es unter den anderen Medienbedingungen der Fall ist.

Bei der Akkumulierungsfähigkeit an den Schadensorten und der Kolo-kalisation mit  $\gamma$ H2AX konnte jedoch kein Unterschied im Vergleich zur isotonen Kontrolle festgestellt werden. Die einzige Ausnahme stellt hierbei Rad51 dar, welches in HeLa-Zellen nur noch eingeschränkt und in U2OS-Zellen unter hypotonen Bedingungen keine Foci an den DSBs mehr bildet. Dieser Effekt ist vermutlich nicht auf den aufgelockerten Chromatinstatus zurückzuführen, da mittlerweile von einigen Arbeitsgruppen publiziert wurde, dass in HC-Bereichen ohne vorherige Chromatinauflockerung keine Rad51-Beladung und DNA-Reparatur stattfinden kann (Soria et al., 2012; Kakarougkas und Jeggo, 2014). Es wäre möglich, dass die Beeinträchtigung entweder auf ein Antikörperartefakt zurückzuführen ist oder darauf, dass gerade die erfolgreiche Rad51-Rekrutierung und Bindung als ein später Schritt in der HR stark von den vorangegangenen Veränderungen der Chromatinstruktur abhängig ist. Bei einem künstlichen Eingreifen, wie der Chromatinkondensierung oder -auflockerung durch hypertones oder hypotones Medium könnte es zu einer Störung des natürlichen Wechselspiels zwischen chromatinverändernden Faktoren und den DNA-Reparaturfaktoren kommen. Es wäre für weiterführende Versuche interessant, die Bestrahlung unter hypotonen oder hypertonen Bedingungen mit einer Zelllinie durchzuführen, welche ein fluoreszenzmarkiertes Rad51 trägt, um einen Antikörperartefakt ausschließen zu können.

### **3.2 Einfluss der DNA-Schadensantwort auf die Chromatinstruktur**

Im Zuge dieser Arbeit wurde nicht nur beleuchtet, wie die Chromatinstruktur die DNA-Reparatur beeinflusst, auch der Einfluss der DNA-Schadensantwort auf die Chromatinstruktur wurde untersucht. Dafür, dass DNA-Schäden Einfluss auf post-translationale Histonmodifikationen haben, gibt es immer mehr Hinweise, das bekannteste Beispiel ist hierbei die Phosphorylierung von H2AX an Serin 139, eine PTM die wir bereits in den Versuchen zur artifiziellen Chromatinmodulation als DNA-Schadensmarker verwendet haben. Die Detektion von PTMs mittels Immunfluoreszenz in den  $\gamma$ H2AX-

dekorierten Bereichen nach Schadensinduktion zeigte, dass sie eng mit der Regulation von Chromatinzugänglichkeit, Rekrutierung von DNA-Reparaturfaktoren und der Regulation von DNA-Metabolismus und Transkription verknüpft sind (Friedl et al., 2012). Wie Tjeertes et al., 2009 nach Induktion von Doppelstrangbrüchen durch Hydroxyurea oder Phleomycin gezeigt haben, können diese Veränderungen im PTM-Muster teilweise auch mit globaleren Methoden wie Western-Blot-Analysen nachgewiesen werden. Allerdings wurde bei diesem Screening nur eine Zelllinie untersucht, sodass keine Aussage über die Allgemeingültigkeit der beobachteten Veränderungen getroffen werden konnte.

Ziel dieser Arbeit war zunächst PTMs zu identifizieren, die speziell im Zuge der Schadensantwort nach Bestrahlung eine Veränderung zeigen und die Untersuchungen anschließend auf weitere Zelllinien auszudehnen. Hierfür haben wir zunächst ein Screening mit einer normalen, humanen, EBV-immortalisierten Lymphoblastenzelllinie (LCL-HuKo) durchgeführt und mittels quantitativem Western-Blot Veränderungen nach verschiedenen Dosen und Zeitwerten analysiert.

Um im Western-Blot Veränderungen im PTM-Muster reproduktiv nachweisen zu können, müssen sie eine gewisse Stärke und Signifikanz aufweisen. Geht man davon aus, dass eine Bestrahlung mit  $\gamma$ -Strahlen bei einer Dosis von 10 Gy um die 400 DSBs verursacht, würde der komplette Verlust eines bestimmten PTM innerhalb des 2 Mbp großen  $\gamma$ H2AX-positiven Bereichs zu einer Reduktion des globalen Levels der PTM von etwa 13% führen, bei einer gleichmäßigen Verteilung im Kern. Dementsprechend könnten beobachtete Veränderungen nach einer Dosis von 10 Gy auf lokale Verluste oder Zunahmen im PTM-Muster hindeuten, wobei eine Veränderung bei 2 Gy als globale Reaktionen auf die Bestrahlung und/oder die DNA-Reparatur zu werten sind.

### **3.2.1 Screening von PTMs nach Bestrahlung in LCL-HuKo**

Untersucht wurden 17 verschiedene PTMs, welche sich sowohl in transkriptionell repressive als auch aktivierende einteilen lassen, da für beide eine Beteiligung an der DNA-Schadensantwort beschrieben ist. Im Rahmen der Verfügbarkeit an geeigneten,

spezifischen Antikörpern wurden sowohl Histonmethylierungen, als auch -phosphorylierungen und -acetylierungen nachgewiesen.

Die Methylierung von H3K4 ist mit transkriptionell aktiven Chromatinregionen verknüpft. In vorangegangenen Experimenten konnte in unserer Arbeitsgruppe sowohl in der Immunfluoreszenz ein lokaler Verlust von H3K4me<sub>2</sub> und H3K4me<sub>3</sub> in Regionen mit  $\gamma$ H2AX-Signal, als auch im Western-Blot eine globale Abnahme des H3K4me<sub>3</sub>-Levels in HeLa-Zellen nachgewiesen werden (Seiler et al., 2011). Diese Abnahme konnten wir auch in LCL-HuKo-Zellen bei 10 Gy-Bestrahlung nach 15 min, 1 h und 24 h nachweisen (1h und 24h statistisch signifikant). Nach 1h war die Abnahme sogar nach einer Dosis von nur 2 Gy bereits deutlich. H3K4me<sub>1</sub> und H3K4me<sub>2</sub> zeigten keine statistisch signifikanten Veränderungen im Western-Blot. Die Analyse von unmethyliertem H3K4 führte bei einer Dosis von 10 Gy zu einer signifikanten Abnahme nach 15 min und einer darauffolgenden Zunahme nach 24 h. Inwiefern dieser Effekt kausal mit dem Verlust von H3K4me<sub>3</sub> nach 24 h in Verbindung gebracht werden kann wäre eine interessante Fragestellung für weiterführende Analysen.

Im Gegensatz zu der Methylierung von H3K4 ist die Methylierung von H3K9 in transkriptionelle Stilllegungsprozesse involviert. Des Weiteren wurde H3K9me<sub>3</sub> während der DNA-Reparatur als Bindungsstelle für die Histonacetyltransferase TIP60 identifiziert (Sun et al., 2009). Zu der Frage, ob es nach DNA-Schädigung zu einer Veränderung des H3K9-Methylierungsmusters kommt, gibt es sehr uneinheitliche Aussagen in der Literatur. In den meisten Studien konnten weder lokal, noch global Veränderungen im H3K9me<sub>2</sub>- oder H3K9me<sub>3</sub>-Level nachgewiesen werden (Goodarzi et al., 2011; Sun et al., 2009; Ayoub et al., 2008; Luijsterburg et al., 2009; Noon et al., 2010). Andere konnten eine transiente Reduktion der nukleären H3K9me<sub>2</sub> und H3K9me<sub>3</sub>-Immunfluoreszenzsignale innerhalb der ersten 45 min und einer Bestrahlungsdosis von 2 Gy beobachten (Young et al., 2013). Wir haben für unsere Analysen von H3K9me<sub>3</sub> denselben Antikörper verwendet wie in der Studie von Young et al. und konnten ebenfalls eine statistisch signifikante Abnahme nach einer Bestrahlung mit 2 Gy und 1 h Inkubationsdauer nachweisen. Andere Zeitwerte und

Dosen, sowie die Untersuchung von H3K9me2 und H3K9me1 zeigten jedoch keine signifikanten Veränderungen.

Die Methylierung von H4K20 spielt in der Zelle eine vielfältige Rolle bei der Chromatinkompaktierung und der DNA-Reparatur (Jørgensen et al., 2013). Besonders H4K20me1 und H4K20me2 spielen bei der DNA-Reparatur eine wichtige Rolle. Sie sind im Kern großflächig verbreitet und dienen als Bindungsstelle für 53BP1 (Botuyan et al., 2006; Hertlerode et al., 2012; Schotta et al., 2008; Yang et al., 2008). In unserem Screening konnten wir keine signifikanten Veränderungen in den globalen H4K20-Methylierungsleveln nach Bestrahlung feststellen, was sich mit den meisten publizierten Daten deckt (Botuyan et al., 2006; Houston et al., 2008; Goodarzi et al., 2011; Hsao und Mizzen, 2013).

Des Weiteren haben wir uns die Trimethylierung von H3K27 angesehen. H3K27me3 ist in der Zelle mit der Stilllegung von Genen mittels des Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) (Simon und Kingston, 2013) assoziiert. Die Rekrutierung von Mitgliedern der PRC2-Familie und die Akkumulierung von H3K27me3 an DNA-Schadensorten konnte sowohl nach Laser-, also auch nach Schwerionenbestrahlung gezeigt werden (Seiler et al., 2011; Chou et al., 2010). Im Western-Blot konnte dies von uns auf globaler Ebene nicht bestätigt werden.

An Phosphorylierungen haben wir die Level von  $\gamma$ H2AX und H3S10p untersucht.  $\gamma$ H2AX zeigt als Schadensmarker eine dosisabhängige Zunahme in allen Zeitwerten, aber auch eine reparaturbedingte Abnahme 24 h nach Bestrahlung. H3S10p trägt zur Kompaktierung des Chromatins während der Mitose bei und es konnte von Tjeertes et al., 2009 eine schadensinduzierte Reduktion nachgewiesen werden, wobei sie diesen eher auf den durch die Schädigung bedingten Zellzyklusarrest zurückführen, als auf einen direkten Effekt der Reparaturprozesse. Wir konnten diese Beobachtungen nicht bestätigen und zu keinem Zeitwert eine signifikante Veränderung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle nachweisen.

Die deutlichsten Veränderungen im PTM-Muster konnten wir während unseres Screenings bei den Acetylierungen beobachten. Histonacetylierung wird allgemein mit einem offenen Chromatin in Verbindung gebracht. Die Sicht auf die DNA-Schadensantwort zu Beginn

dieser Arbeit hat angenommen, dass eine erhöhte Zugänglichkeit des Chromatins an den Schadensorten notwendig für die Rekrutierung der DNA-Reparaturfaktoren und damit einer effektiven Reparatur ist. Für die Steigerung der Zugänglichkeit spielen vor allem Histonacetylierungen, insbesondere an H4, eine entscheidende Rolle (reviewed durch Xu und Price, 2011). Mittlerweile hat man allerdings eine detailliertere Sicht auf die Veränderung des Histon-Acetylierungsmusters nach Schadensinduktion, welche verdeutlicht hat, dass die Prozesse deutlich komplexer sind als ursprünglich angenommen. Eine PTM die wir untersucht haben, ist H4K16ac. Dies ist eine gut charakterisierte Modifikation, für die experimentell gezeigt werden konnte, dass sie in vitro die Chromatinkompaktierung auflöst (Robinson et al., 2008; Shogren-Knaak und Peterson, 2006). Nach DNA-Schädigung konnte von mehreren Arbeitsgruppen beobachtet werden, dass es zunächst zu einem schnellen Verlust der Acetylierung kommt, worauf später ein Anstieg von H4K16ac folgt (Hsiao und Mizzen, 2013; Miller et al., 2010; Tang et al., 2013). Da H4K16ac die Bindung von 53BP1 an H4K20me3 verringert, fördert der schnelle Verlust dieser PTM an den DSBs die Akkumulierung von 53BP1 (Hsiao und Mizzen, 2013; Tang et al., 2013). Es gibt aber ebenfalls Beobachtungen, dass das Level von H4K16ac schon kurz nach Bestrahlung ansteigt, ohne dass es zuvor zu einer Verminderung gekommen wäre (Gupta et al., 2005; Li et al., 2010). In unserem Zellsystem konnten wir vergleichbare globale Reduktionen von H4K16ac zu allen untersuchten Zeitwerten, sowohl bei 2 Gy, als auch bei 10 Gy nachweisen.

Die Ergebnisse von Hsiao und Mizzen, 2013 deuten darauf hin, dass die schnelle Deacetylierung auch noch an diversen anderen N-terminalen Lysinen erfolgen kann. Wir haben als weitere H4-Acetylierung H4K5ac in unser Screening aufgenommen und konnten sowohl nach 1 h und 2 Gy, als auch nach 24 h und beiden Dosen eine deutliche Reduzierung feststellen. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen wir für H3K56ac. Hier konnten wir sowohl nach 1 h, als auch nach 24 h bei jeweils 2 Gy und 10 Gy eine deutliche Abnahme im globalen Level nachweisen. Die biologische Funktion von H3K56ac ist in Säugerzellen noch weitgehend unklar und zu der Reaktion auf DNA-Schädigung gibt es sehr widersprüchliche Angaben in der Literatur. So wurde sowohl eine Zunahme (Das et al.,

2009, Vempati et al., 2010), eine Abnahme (Tjeertes et al., 2009; Yang et al., 2009; Miller et al., 2010) als auch ein Modell ähnlich zu den Beobachtungen bezüglich H4K16ac publiziert mit einem raschen Verlust von H3K56ac und einem anschließenden Anstieg im H3K56ac Level (Miller et al., 2010). H3K9ac, eine PTM für welche sowohl lokal, als auch global reduzierte Level nach DNA-Schädigung publiziert werden konnten (Seiler, 2012; Shimada et al., 2008; Tjeertes et al., 2009), zeigte auch in unserem Screening eine schnelle und transiente Abnahme nach Bestrahlung, welche allerdings deutlich schwächer ausfällt wie bei den anderen untersuchten Acetylierungen und nur nach 10 Gy nach 15 min und 1 h eine Signifikanz erreicht.

Unsere Ergebnisse von H4K16ac, H4K5ac und H3K56ac deuten jedoch eher auf eine stabile Reduktion dieser PTM nach Bestrahlung hin, welche mehr als 24 h anhält. Die globale Abnahme beträgt hierbei sowohl nach 2 Gy, als auch 10 Gy 20-30% im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle, was darauf schließen lässt, dass es sich dabei wahrscheinlich nicht nur um einen lokalen Effekt handelt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es bei den meisten untersuchten PTM zu keinen im Western-Blot messbaren Veränderungen nach Bestrahlung kommt. Ausnahmen stellen hierbei  $\gamma$ H2AX, H3K4me3 und die Acetylierungen von H4K5, H4K16 und H3K56 dar. Gemeinsam haben diese PTMs, dass es sich, bis auf den Schadensmarker  $\gamma$ H2AX, um Marker für aktiv transkribierte Chromatinregionen handelt.

### **3.2.2 Veränderungen im PTM-Muster in Abhängigkeit der Strahlensensitivität**

Die Angaben in der Literatur zur Reaktion der PTM auf eine DNA-Schädigung sind sehr unterschiedlich und decken sich auch nur teilweise mit den Ergebnissen des in dieser Arbeit vorgestellten Screenings. Eine mögliche Erklärung wäre die Verwendung von unterschiedlichen Zelllinien. Aus diesem Grund haben wir unsere Untersuchungen auf weitere Zelllinien desselben Zelltyps, aber von verschiedenen Spendern ausgeweitet. Um dabei noch einen weiteren interessanten Aspekt zu betrachten, wurden EBV-immortalisierte Lymphoblastenzelllinien verwendet, die im Vorfeld auf Ebene ihrer

Koloniebildungsfähigkeit auf ihre Strahlensensitivität getestet wurden (Gürtler et al., 2010). Es handelt sich dabei um LCL-Zelllinien aus dem LUCY-Kollektiv junger Lungenkrebspatienten (Schneider et al., 2008). Die Zelllinien 20037 und 4064 wurden als relativ strahlenunempfindlich charakterisiert, vergleichbar mit der Zelllinie des gesunden AT-Bruders. Die strahlensensitiven Zelllinien 4008, 4028, 36011 und 4060 erreichten im Gegensatz dazu Überlebenszahlen vergleichbar zu der ATM-defizienten Zelllinie des AT-Patienten.

Für das Screening dieser Zelllinien haben wir sieben verschiedene PTM ausgewählt, welche entweder beim Screening in LCL-HuKo auffällig waren oder aus mechanistischer Sicht bzw. auch durch aktuelle Publikationen, welche im Laufe dieser Arbeit von anderen Arbeitsgruppen veröffentlicht wurden, interessant waren.

H2AX zeigt in allen untersuchten Zelllinien nach einer Stunde einen deutlichen Anstieg der phosphorylierten Form, wobei deutlich zu erkennen ist, dass das Level von  $\gamma$ H2AX im AT-Patienten deutlich unter dem der strahlenunempfindlichen Zelllinien liegt. Insgesamt kann man jedoch sagen, dass es keine Korrelation mit der Strahlenempfindlichkeit einer Zelllinie gibt, weder bei der Höhe des  $\gamma$ H2AX-Levels, noch bei der Persistenz des Signals nach 24 h.

Bei der zwei- und dreifachen Methylierung von H3K4 ist ein mit der Strahlensensitivität korrelierender Effekt zu erkennen, welcher hauptsächlich erst nach 24 h in Erscheinung tritt. Bei H3K4me<sub>2</sub> ist die Veränderung jedoch nicht einheitlich, denn drei der untersuchten Zelllinien zeigen nach 10 Gy und 24 h eine Abnahme, die vierte Zelllinie eine Zunahme des H3K4me<sub>2</sub>-Levels. Bei H3K4me<sub>3</sub> kommt es bei den strahlensensitiven Zelllinien nach 1 h in der Zelllinie 4028 zu einer statistisch signifikanten Abnahme und bei 36011 zu einer Zunahme. Einheitlich bei beiden Methylierungen ist, dass weder die drei strahlenunempfindlichen Zelllinien, noch die Zelllinie des strahlensensitiven AT-Patienten eine Reaktion auf Bestrahlung zeigen. Falls es wirklich eine Korrelation mit der Strahlenempfindlichkeit und der Di- und Trimethylierung von H3K4 nach DNA-Schädigung gibt, scheint diese demnach auf anderen Mechanismen zu beruhen als der Strahlenempfindlichkeit der Zellen des AT-Patienten. Die Stichprobe an unterschiedlichen

Zelllinien ist allerdings zu gering, um statistisch belastbare Aussagen zu treffen. Durch das uneinheitliche Muster sowohl an Zu-, als auch Abnahmen, lassen sich bei dem Ergebnis auch keine mechanistischen Rückschlüsse bezüglich der Demethylierung/Methylierung von H3K4 ziehen.

H3K27me3 zeigt in insgesamt 4 Zelllinien nach 24 h eine Zunahme nach Bestrahlung, allerdings ist diese nicht mit der Strahlenempfindlichkeit korreliert.

Aufgrund der deutlichen Abnahmen in den untersuchten Acetylierungen wurde auch in den LUCY-Zelllinien ein Screening auf die H4K5ac-, H4K16ac- und H3K56ac-Level durchgeführt. Wie in der LCL-HuKo-Zelllinie kommt es auch hier hauptsächlich zu einer Abnahme der globalen Menge. Eine Ausnahme stellt H3K56ac in der Zelllinie des AT-Bruders dar, welches nach 1 h eine Zunahme um ca. 25% und nach 24 h eine Abnahme zeigt. Ein besonders interessantes Ergebnis liefert die Analyse von H4K16ac, welches als einzige untersuchte Zelllinie in unserem Set eine klare Korrelation mit der Strahlensensitivität zeigt. Hier kommt es nach 24 h in allen strahlensensitiven LUCY-Zelllinien zu einer deutlichen und signifikanten Abnahme, während keine der als strahlenunempfindlich charakterisierten Linien einen Effekt zeigt. Mit Abnahmen von 20-30% ist es möglich, dass diese Hypoacetylierung nicht nur die  $\gamma$ H2AX-Domänen involviert, sondern auch genomische Regionen. Um diese Frage zu überprüfen, wären allerdings weitere Versuche notwendig, genau wie für eine statistisch relevante Aussage, ob die H4K16ac in jungen Lungenkrebspatienten wirklich mit der Strahlensensitivität korreliert oder ob dies nur aufgrund der geringen Stichprobe der Fall ist. Für eine belastbare Aussage müssten deutlich mehr Zelllinien analysiert werden.

Würden sich die Ergebnisse bestätigen, wäre das eine faszinierende Erkenntnis. Es ist möglich, dass eine verminderte Reparaturfähigkeit wie sie in den strahlensensitiven Zelllinien auftritt, die Wiederherstellung der Chromatinstruktur behindert und damit zu einer längerfristigen Hypoacetylierung führt. Auf der anderen Seite wäre es aber auch möglich, dass die nach einem Schaden lang andauernde Hypoacetylierung von H4K16ac zu einer reduzierten DNA-Reparatur führt, wie sie von einigen postuliert wird (Krishnan et al., 2011; Peng et al., 2012; Sharma et al., 2010). Des Weiteren könnte die Hypoacetylierung

von H4K16 zu einer transkriptionellen Deregulierung und damit zu einer Radiosensitivität führen (Füllgrabe et al., 2013; Horikoshi et al., 2013). Publikationen der letzten Jahre konnten zeigen, dass eine Hypoacetylierung von H4K16 zu einer verstärkten Bindung von 53BP1 und damit einer reduzierten Bindung von BRCA1 an den Schadensstellen führt. Am Schaden gebundenes 53BP1 verhindert eine Resektion und fördert damit die Reparatur via NHEJ, während BRCA1 die Resektion fördert und damit die Reparatur mittels HR (Hsiao und Mizzen, 2013; Miller et al., 2010; Tang et al., 2013).

Für statistisch belastbare Ergebnisse zur Reaktion von verschiedenen Zelllinien des gleichen Typs, bzw. auch von unterschiedlichen Zelltypen, müssten noch mehr Zelllinien in das Screening mit einbezogen werden. Zusammenfassend kann man aufgrund der im Zuge dieser Arbeit generierten Daten aber sagen, dass für die meisten PTM die interindividuellen Unterschiede größer zu sein scheinen wie der Effekt, der durch eine DNA-Schädigung und -Reparatur ausgelöst wird.

### **3.3 Zusammenfassung und Ausblick**

Im Zuge dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Chromatinstruktur und DNA-Reparatur einen klaren wechselseitigen Einfluss aufeinander haben.

So konnte gezeigt werden, dass auch eine künstliche Hyperkondensierung des Chromatins zu Einschränkungen in der Akkumulierung der DNA-Reparaturfaktoren und damit der Verhinderung einer effizienten DNA-Reparatur führt. Diese Beobachtungen decken sich mit Publikationen zur DNA-Reparatur in Heterochromatinbereichen oder auch während der Mitose. Sie beschreiben einheitlich, dass kondensiertes Chromatin eine Barriere für die DNA-Reparatur darstellt. Ohne weitreichende Mechanismen wie einer Auflockerung des Chromatins und einer Relokalisierung des Schadens an die Peripherie, wäre eine vollständige DNA-Reparatur in HC-Bereichen nicht möglich (Chiolo et al., 2011). Während der Mitose wird die vollständige DNA-Reparatur sogar komplett unterdrückt und erst vollendet, wenn die Zelle in die G1-Phase eingetreten ist (Orthwein et al., 2014). Diese Daten beziehen sich hauptsächlich auf die DNA-Reparatur von DSBs mittels HR, da hier die Gefahr von Verlust oder Duplikationen durch Paarung innerhalb hochrepetitiver

Sequenzen (HC) oder von Telomerfusionen (Mitose) besteht (Peng und Karpen, 2008; Orthwein et al., 2014).

Dennoch wäre es aufgrund der von uns generierten Daten interessant, in weiterführenden Versuchen spezifische Proteine aus anderen Reparaturwegen wie dem NHEJ oder der Basenexzisionsreparatur (Einzelstrangbruchreparatur) auf ihre Akkumulierungsfähigkeit zu untersuchen. Durch die stabile und effiziente Phosphorylierung von H2AX auch in stark hyperkondensiertem Chromatin, in dem keines der anderen untersuchten Proteine noch in der Lage war am Schadensort zu binden, konnten wir zeigen, dass auch hier noch DNA-Reparaturmechanismen greifen. Es wird vermutet, dass das NHEJ auch in hochkondensiertem Chromatin wie mitotischen Chromosomen wenig bis nicht beeinträchtigt ist (Heijink et al., 2013). Die Methode der künstlichen Hyperkondensierung über hypertones Medium wäre eine Möglichkeit, um dies näher zu untersuchen.

Bei dem Screening von einer Reihe an PTM auf ihre globalen Veränderungen nach strahleninduzierten DNA-Schäden konnten wir zwar in normalen menschlichen Lymphoblasten einen Einfluss auf das globale PTM-Muster nachweisen, die Reaktion bei den Methylierungen war hier jedoch eher gering. Nur in bei H3K4 kam es zu statistisch signifikanten Abnahmen nach der Bestrahlung. Im Gegensatz dazu zeigten alle untersuchten Acetylierungen, sowohl von H3 als auch H4, eine deutliche und langanhaltende Hypoacetylierung nach Bestrahlung. Ähnliche Ergebnisse konnten auch bei dem weiterführenden Screening mit einem Set an LCL-Zelllinien aus jungen Lungenkrebspatienten gewonnen werden. Bei allen untersuchten PTM waren die interindividuellen Unterschiede zwischen den Zelllinien so groß, dass davon auszugehen ist, dass es keine bis wenige PTM gibt, die in verschiedenen Zelllinien auf globaler Ebene eine gleiche, reproduzierbare Reaktion auf Bestrahlung zeigen. Dies ist eine sehr interessante Erkenntnis, da fast alle bisher publizierten Ergebnisse zu den Veränderungen im PTM-Muster nach einer DNA-Schädigung nur in jeweils einer Zelllinie nachgewiesen wurden. Unsere Daten zeigen, dass für belastbare Aussagen hier jeweils darauf geachtet werden sollte, Zelllinien verschiedener Zelltypen, bzw. auch gleicher Zelltypen aber verschiedener Spender zu untersuchen. Eine interessante Ausnahme bei unserem Screening

stellt H4K16ac dar. Hier konnte zwar keine einheitliche Reaktion in allen untersuchten Zelllinien gezeigt werden, aber eine klare Korrelation mit der Strahlensensitivität der Zellen. Eine langanhaltende Hypoacetylierung trat in den Zelllinien auf, welche eine erhöhte Strahlensensitivität zeigten. Hypoacetylierung von H4K16 wurde bereits mit Tumoren in Verbindung gebracht (Fraga et al., 2005). Sowohl Klasse I als auch III Histon Deacetylasen (HDACs) sind in der Lage H4K16ac zu deacetylieren (Gong und Miller, 2013). HDAC-Inhibitoren nehmen immer mehr an Bedeutung zu als Tumormedikamente und haben das Potential die Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen zu erhöhen (Groselj et al., 2013). In Verbindung mit unseren Ergebnissen lässt dies den Schluss zu, dass in manchen Situationen die Verhinderung der Hyperacetylierung von H4K16 zu einer erhöhten Strahlensensitivität der Zellen führen könnte, was wiederum eine interessante Erkenntnis für die epigenetische Tumorthherapie sein kann.

Für eine klare Aussage diesbezüglich bedürfte es aber noch deutlich mehr Untersuchungen, um eine mögliche Beziehung zwischen Strahlenantwort und Hypoacetylierung herzustellen. Dasselbe gilt für allgemeingültige Aussagen bezüglich der Veränderungen vom globalen Level verschiedener PTMs nach Schadensinduktion. Nachdem die Analyse mittels Antikörper zwar immer noch die gängigste ist, aber aufgrund von hoher qualitativer Variabilität einzelner Produktionsreihen und wiederholt dokumentierter Kreuzreaktivität bei nahe verwandten PTMs immer öfter in der Kritik steht, sollte man für weitere Untersuchungen in Erwägung ziehen, auf antikörperfreie Analysen umzusteigen (Minaker et al., 2012). Ein groß angelegtes Screening von Egelhofer et al., 2011, welches über 200 verschiedene, kommerziell erhältliche Antikörper gegen 57 verschiedene PTM getestet haben, hat gezeigt, dass 25% der von ihnen getesteten Antikörper Probleme bei der Spezifität oder der Einsetzbarkeit in verschiedenen Methoden hatten. Dementsprechend müsste jeder Antikörper im jeweiligen Labor vor der Anwendung in jeder Methode auf seine Spezifität getestet werden. Dies kostet nicht nur viel Zeit und Ressourcen, sondern ist auch oft gar nicht möglich, weil kommerziell keine geeigneten Peptide zum Testen erhältlich sind, wie wir selbst im Zuge dieser Arbeit mehrfach feststellen mussten.

Der wechselseitige Einfluss von Chromatin und DNA-Reparatur ist und bleibt, nicht nur mit Hinblick auf den immer stärker wachsenden Markt der epigenetischen Tumorthherapie, ein spannendes Forschungsfeld bei dem noch lange nicht alle mechanistischen Zusammenhänge geklärt sein werden.

## **4 Methoden**

### **4.1 Zellkultur**

#### **4.1.1 Kultivierung der Zellen**

Die adhärent wachsenden HeLa- und U2OS-Zellen wurden in RPMI-Medium mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 50 µg Streptomycin und L-Glutamin kultiviert. Zur Aufrechterhaltung der Kultur wurden die Zellen, entsprechend ihrer Wachstumsgeschwindigkeit, vor Erreichen der Konfluenz, gesplittet. Die Zellkultur der EBV-transformierten lymphoblastoiden Zelllinien aus dem LUCY-Kollektiv und die entsprechenden verwendeten Kontrollen wurden im S2-Labor des Bundesamtes für Strahlenschutz (Oberschleißheim) durchgeführt. Die Zelllinien wurden mit  $0,5 \times 10^6$  Zellen pro ml ausgesät und die Zellzahl alle zwei bis drei Tage bestimmt. In der logarithmischen Phase wurden sie zweimal pro Woche im Verhältnis 1:3 passagiert. Hierfür wurde die Zellsuspension gut resuspendiert und die Zellen 10 min bei  $200 \times g$  zentrifugiert. Das Sediment wurde in frischem RPMI 1640 mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

Sämtliche verwendete Zelllinien wurden im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  kultiviert.

#### **4.1.2 Aussaat der Zellen für die Ionenmikrobestrahlung**

Es ist nicht möglich, die Zellen in gängigen Zellkulturgefäßen zu bestrahlen, da die beschleunigten Ionen Plastik oder Glas nicht durchdringen können. Deswegen müssen die Zellen für die Versuche in geeigneten Behältern ausgesät werden. Hierfür wurden spezielle Edelstahlringe, siehe Abbildung 4.1, verwendet, die mit einer 6 µm dicken Mylarfolie bespannt wurden, auf der die Zellen ausgesät wurden und adhärent wachsen.

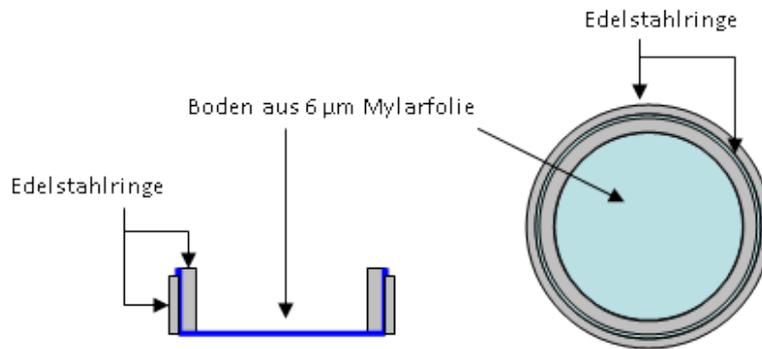


Abbildung 4.1. Zeichnung eines Edelstahlzellbehälters in Ringform zur Bestrahlung der Zellen mit  $\alpha$ -Partikeln oder Ionen und anschließender Immunfluoreszenzfärbung. Links: Seitenansicht; rechts: Aufsicht (S. Auer, Dissertation 2012). Die Zellen wurden direkt auf der 6  $\mu\text{m}$  Mylarfolie ausgesät und mit 2 ml Medium bedeckt. Nach der Immunfluoreszenz wurde ein rundes Deckgläschen aufgelegt und der darunter liegende Teil der Folie ausgeschnitten und für die Mikroskopie auf einen Objektträger transferiert.

Um eine optimale Anheftung der Zellen zu gewährleisten, wurde die Mylarfolie vor der Aussaat der Zellen mit 1  $\mu\text{g}$  Cell-TAK™ (BD Biosciences) pro  $\text{cm}^2$  beschichtet. Hierfür wurde das Cell-TAK™ in 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung verdünnt und ganzflächig auf der Folienoberfläche verteilt. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit erfolgten zwei Waschschriffe mit sterilem, deionisiertem Wasser und eine Trocknungsphase.

Je nach Generationszeit der Zellen wurde am Tag vor der geplanten Bestrahlung eine definierte Zellzahl in 2 ml Medium ausgesät, um zur Bestrahlung einen zu ca. 80% konfluenten Zellrasen vorliegen zu haben. Bei HeLa-, HeLa-53BP1-GFP- und U2OS-Zellen wurden jeweils 250.000 Zellen pro Zellbehälter ausgesät, bei BJ1-hTERT-Zellen waren es 300.000. Um Sterilität zu gewährleisten, wurden die Edelstahlringe in 5 cm Petrischalen aufbewahrt und so auch bis zur Immunfluoreszenzfärbung inkubiert.

#### 4.1.3 Behandlung der Zellen mit verschiedenen Salzkonzentrationen

Wenn nicht anders beschrieben, wurde zehn Minuten vor der Bestrahlung das isotone Medium durch das entsprechende, in der Osmolarität variierte Medium, ausgetauscht. Die Osmolarität bezeichnet dabei die Teilchenzahl einer osmotisch aktiven Substanz pro Liter Lösungsmittel. Direkt nach der Bestrahlung erfolgte ein erneuter Medienwechsel, bevor die Zellen eine Stunde in dem entsprechend osmolarem Medium bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  bis zur

Fixierung inkubiert wurden. Dieses Protokoll wurde sowohl für Immunfluoreszenzversuche, als auch bei Proteinextraktionen für eine Western-Blot Analyse verwendet. Wurden die Zellen nicht bestrahlt, erfolgte eine 60-minütige Inkubation in dem entsprechenden Medium, ohne erneuten Wechsel, bis zur Fixierung.

Herstellung des hypotonen und der hypertonen Medien:

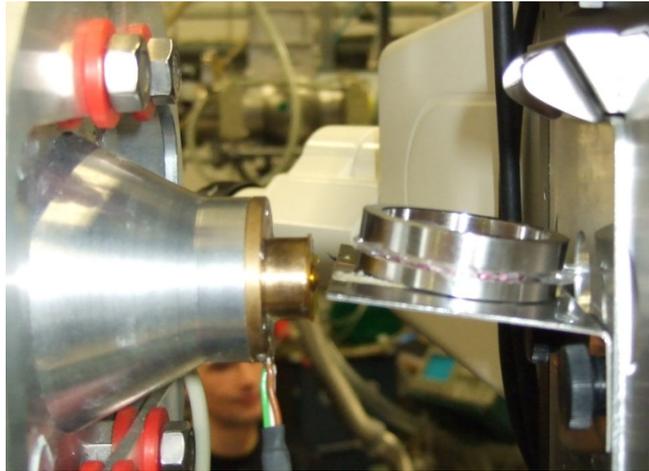
Hypoton 140 mOsm	1 Teil Medium + 1 Teil deionisiertes Wasser
Hyperton 570 mOsm	1 Teil 20 x PBS + 19 Teile Medium
Hyperton 660 mOsm	1,5 Teile 20 x PBS + 18,5 Teile Medium
Hyperton 750 mOsm	2 Teile 20 x PBS + 18 Teile Medium

*Tabelle 4.1. Mischungsverhältnis von Medium mit deionisiertem Wasser bzw. 20 x konzentriertem PBS zur Herstellung von Medien mit unterschiedlichen Osmolaritäten (Albiez et al., 2006; Breitkopf, 2007).*

## 4.2 Bestrahlung der Zellen

### 4.2.1 Ionenmikrobestrahlung mit SNAKE

Mit dem Supraleitenden Nanoskop für Angewandte Kernphysikalische Experimente (SNAKE) ist es möglich, gezielt zu bestrahlen. Hierfür wird der Ionenstrahl des Garching 14 MV Tandembeschleunigers mit Mikroschlitz so beschnitten, dass er mit Hilfe einer supraleitenden Multipollinse verkleinert und als Mikrostrahl in der Fokalebene abgebildet werden kann.



*Abbildung 4.2. Strahlplatz SNAKE für die Bestrahlung von Zellen mit Schwerionen in kleinem Winkel. Links im Bild die Ionen-Austrittsnase, die für die Bestrahlung nah an die Halterung gebracht wird, welche sich in  $10^\circ$ -Winkel zu dem Ionenstrahl befindet. Auf diese Halterung wird der Edelstahlzellbehälter (ringförmig, rechts im Bild) gesetzt, in welchem auf einer ionendurchlässigen Mylarfolie die zu bestrahlenden Zellen wachsen.*

Erst am Strahlplatz (Abbildung 4.2), an dem die lebenden Zellen mit den Ionen beschossen werden, tritt der Strahl durch eine Austrittsöffnung mit 1 mm Durchmesser, über die eine  $7,5 \mu\text{m}$  dicke Kaptonfolie gespannt ist, aus dem Vakuum aus. Diese Austrittsnase wird für die Schrägbestrahlung in einem  $10^\circ$ -Winkel an die Mylarfolie der Edelstahlringe angesetzt. Der Bestrahlungsmodus ist so gewählt, dass im bestrahlten Bereich pro Zelle im Durchschnitt 1 bis 3 Ionen appliziert werden.

#### **4.2.2 Röntgenbestrahlung**

Die Röntgenbestrahlung erfolgte mit einer Philips MCN-Röntgenröhre mit 300 kV bei 10 mA. Hierbei wurden 2,5 + 4,0 mm Aluminium- und 1.0 mm Kupferfilter verwendet, bei einer Dosisleistung von 2 Gy pro Minute. Für eine nachfolgende Proteinextraktion wurden die Zellen in Zellkulturschalen oder -flaschen bestrahlt. Bei einer anschließenden Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung wuchsen die Zellen auf einer Mylarfolie in den Edelstrahlringen, welche auch für die Bestrahlung an SNAKE verwendet werden.

### 4.2.3 Gamma-Bestrahlung an der Cäsium-Quelle

Alle EBV-immortalisierten lymphoblastoiden Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen, an einer  $\text{Cs-}^{137}$ -Quelle (HWM-D 2000, Waelischmüller) am Helmholtz-Zentrum (Oberschleißheim) mit einer Dosisleistung von 0,54 Gy/min, bestrahlt. Dies wurde von Frau Anne Gürtler (Bundesamt für Strahlenschutz, Oberschleißheim) durchgeführt. Die unbestrahlten Kontrollen wurden ebenfalls dem Weg zur Quelle und der Zeit bei Raumtemperatur ausgesetzt, um dieselben Bedingungen für alle Proben zu schaffen.

### 4.3 Immunfluoreszenzfärbung

Vor der Fixierung wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden schnell mit PBS gewaschen. Bei einer vorangegangenen Behandlung mit hypo- oder hypertonem Medium wurde hierbei PBS entsprechender Osmolarität verwendet. Für die Fixierung und Färbung in den Edelstahlringen wurde bei allen Schritten ein Flüssigkeitsvolumen von 2 ml verwendet. Die Fixierung der Zellen erfolgte über 15 min mit einer 2% Paraformaldehyd-Lösung. Es folgte ein kurzer Waschschrift in PBS und anschließend eine Permeabilisierung über drei mal 5 min Inkubationen mit einer 0,1% PBS-Triton-X-100-Lösung. Unspezifische Bindestellen wurden mit einer 1% BSA und 0,15% Glycin enthaltenden PBS-Lösung abgesättigt. Dies erfolgte in drei, jeweils 10 min andauernden Waschsritten. Anschließend wurde die Flüssigkeit vollständig entfernt. Die primären Antikörper wurden in 75  $\mu\text{l}$  Blocklösung verdünnt und auf die Zellen aufgetropft. Die Antikörperinkubation erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten, geschlossenen Kammer.

Am nächsten Tag wurden die Zellen 5 min mit PBS gewaschen, um dann erneut 10 min mit PBS + Triton permeabilisiert zu werden. Es folgte ein weiterer Waschschrift von 5 min Länge mit PBS, bevor 7 min geblockt wurde. Die fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper wurden ebenfalls in 75  $\mu\text{l}$  Blockreagenz verdünnt und nach sorgfältiger Flüssigkeitsabnahme auf die Zellen aufgebracht. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 45 min. Anschließend folgten mehrere Waschsritte (2 x 5 min mit PBS + Triton, 1 x 10 min mit PBS und nochmals 2 x 7 min mit PBS), bevor die DNA mit DAPI gefärbt wurde. Die DAPI-Stammlösung wurde hierfür 1:10000 in PBS verdünnt und

für 90 s auf dem Zellrasen belassen. Nach zwei 2 min Waschschrritten mit PBS wurde die Flüssigkeit vollständig entfernt und die Zellen wurden unter einem 20 oder 22 mm Durchmesser Deckgläschen mit Vectashield® eingebettet. Für die Mikroskopie wurde das Deckgläschen, mit den aus der Mylarfolie angehefteten Zellen, auf einen Objektträger übertragen. Hierfür wurde eine feine, erhitzte Stahlspitze verwendet, mit der die Mylarfolie durchtrennt werden konnte. Anschließend wurden Folie und Deckgläschen mit Nagellack auf dem Objektträger fixiert.

## 4.4 Epi-Fluoreszenzmikroskopie

Für die Bildakquise wurde ein inverses Epifluoreszenzmikroskop von Zeiss (AxioObserver Z1) mit der AcioCamMr3 (Zeiss) Kamera und einem Zeiss Plan-Neofluar 63x/1.3 Glycerinobjektiv verwendet. Die Steuerung erfolgte über die AxioVision 4.6 Software von Zeiss. Es wurden folgende Filter verwendet: 01 (BP 365/12) für DAPI, 38HE (BP470/40 (HE)) für GFP bzw. Alexa488 und Filter 20 (BP 546/12) für Cy3. Bei Z-Bilderstapeln betrug der Abstand zwischen den optischen Schnitten 250 nm. Die Aufnahmen wurden sequenziell für alle Kanäle bei jedem Schnitt aufgenommen.

## 4.5 Auswertung der Bilddaten

### 4.5.1 Zellkernflächenbestimmung mit ImageJ

Die Bestimmung der Zellkernfläche erfolgte mit dem ImageJ-Plugin „*Sync Measure 3D*“. Es wurden Z-Projektionen des DAPI-Kanals für die Bestimmung der Zellkernfläche verwendet. Mit der Schaltfläche *Start Measurements* wird die Messung begonnen und für jeden Zellkern wurde eine *Region of Interest* (ROI) definiert. Mit der Scrollleiste kann individuell für jede ROI ein Schwellenwert angegeben werden, der die Größe des Zellkerns nachempfendet und den Hintergrund ausschließt. Durch Doppelklick in die jeweilige ROI werden die Daten ausgelesen und eine Angabe über die von dem Schwellenwert eingeschlossene Fläche kann gespeichert und weiter ausgewertet werden.

## 4.5.2 Bestimmung des Focivolumens

Für die Bestimmung des Focivolumens wurde der FociPicker3D (Du et al., 2011), ein Plugin für ImageJ verwendet. Wie in Abbildung 4.3 dargestellt, berechnet der Algorithmus für jeden Fokus einen eigenen Schwellenwert. Im Gegensatz zu Programmen, die einen Schwellenwert für den gesamten auszuwertenden Bereich festlegen, bietet diese Herangehensweise entscheidende Vorteile. Nachdem die einzelnen Foci auch innerhalb nur einer Zelle stark in ihrer Intensität variieren können, führt ein allgemeiner Schwellenwert, der für eine ganze Zelle oder einen Bildausschnitt festgelegt wird, immer zu einem Kompromiss. Je nach Wahl des Schwellenwertes können entweder schwache Foci nicht mehr detektiert werden, oder stärkere werden als ein Fokus gezählt, die bei einem anderen Schwellenwert als dicht beieinanderliegende Einzelfoci erkannt worden wären. Sowohl die schwachen, als auch die dicht beieinanderliegenden Foci können mit dem Algorithmus des FociPicker3D aufgelöst werden.

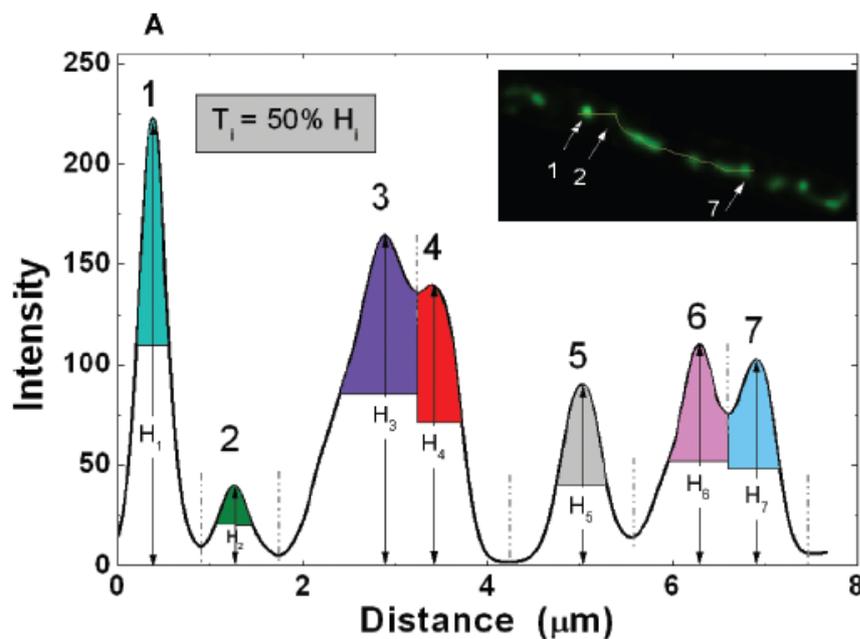


Abbildung 4.3. Prinzip des FociPicker3D Algorithmus am Beispiel eines Plotprofils einer mit DNA-Reparaturfaktoren dekorierten Ionenspur in einem Zellkern. Wie in dem Immunfluoreszenzbild und dem Plotprofil zu sehen, variiert sowohl die Intensität der Foci, als auch ihr Abstand zueinander. Durch die lokalen Schwellenwerte (in bunt dargestellt) ist es möglich, beides aufzulösen (Du et al., 2011).

Für die Auswertung wurden Zellkerne ausgewählt und einzeln mit dem Foci-Picker analysiert. Das Hintergrundlevel wurde auf „uniform“ gesetzt und entsprechend der Qualität des Mikroskopiebildes und des Antikörpers angepasst. Die Toleranz wurde aufgrund einer Empfehlung von Dr. Guanghua Du auf 200 gesetzt.

### **4.5.3 Bestimmung der Tracklänge**

Die Tracklängen wurden mit Hilfe der Daten des Foci-Pickers errechnet. Dieser ermittelt nicht nur das Focivolumen, sondern auch die Lage der Mittelpunkte der einzelnen Foci im dreidimensionalen Raum. Für die Tracklängenbestimmung wurde der Fokus mit dem kleinsten X-Wert als Referenz gesetzt und die anderen Werte entsprechend hierzu in Referenz genommen, um den Abstand der beiden am weitesten voneinander entfernten Foci in jeder Zelle zu ermitteln.

### **4.5.4 Quantifizierung von Korrelation zwischen zwei Signalen**

Zur Beurteilung und Quantifizierung der Focibildung verschiedener DDR-Faktoren nach Behandlung der Zellen mit verschiedenen Osmolaritäten, wurden die Zellkerne zunächst in 3D mikroskopiert. Für die Auszählung wurden Z-Projektionen verwendet und die Helligkeit und der Kontrast so verändert, dass ein optimales Ergebnis erzielt werden konnte. Es wurden jeweils die Zellen gezählt, die Focibildung an Schäden aufweisen, die eindeutig durch die Bestrahlung mit Schwerionen entstanden sind. Es wurden hier separat die  $\gamma$ H2AX-Signale und die Signale des weiteren DDR-Faktors gezählt. Anschließend wurden die Zahlen mit den  $\gamma$ H2AX positiven Zellen als Referenz ins Verhältnis gesetzt.

## **4.6 Proteinextraktion für Western-Blot-Experimente**

### **4.6.1 Extraktion von Kern- und zytoplasmatischen Proteinen**

Für die Isolation und Auftrennung der Proteine in eine Kern- und zytoplasmatische Fraktion wurde der ProteoJET™ Cytoplasmatic and Nuclear Protein Extraction Kit von

Fermentas verwendet. Es wurden  $1 \times 10^7$  Zellen und folgende Proteaseinhibitoren eingesetzt:

Leupeptin: 20  $\mu\text{g/ml}$

Pepstatin A: 10  $\mu\text{g/ml}$

Aprotinin: 20  $\mu\text{g/ml}$

NOV: 10 mM

PMSF: 10 mM

Die Proteinextraktion erfolgte nach Angaben des Herstellers.

#### **4.6.2 Gesamtzellextraktion von adhären wachsenden Zellen**

Die Zellkulturflaschen wurden auf Eis gestellt, das Medium entfernt und anschließend zwei Mal schnell mit eiskaltem PBS gewaschen. Ca. 100  $\mu\text{l}$  RIPA-Puffer (150 mM NaCl, 1 % NP-40, 10 mM MDOC, 0,1 % SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8,0) pro 12.000 Zellen wurde mit Protease-, Phosphatase- und Histondeacetylaseinhibitoren versetzt (Roche: Complete mini, PhosStop; Natriumbutyrat: 5 mM) und gleichmäßig auf dem Zellrasen verteilt. Nach 3-5 min Inkubationszeit auf Eis wurden die lysierten Zellen mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst und in ein gekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben für 10 min auf 104°C erhitzt und anschließend bei -20°C gelagert.

#### **4.6.3 Gesamtzellextraktion aus Suspensionszellen**

5 - 10 x  $10^6$ - Zellen wurden der Zellkultur entnommen und bei 500 x g und 4°C für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zellpellet in eiskaltem PBS resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Ca. 100  $\mu\text{l}$  RIPA-Puffer, mit zugesetzten Protease-, Phosphatase- und Histondeacetylaseinhibitoren wurde pro 12.000 Zellen zugegeben und während einer Inkubationszeit von 4-5 min auf Eis mehrfach gut gemischt. Anschließend wurde das Lysat in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 10 min auf 99°C erhitzt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

## **4.7 Gelelektrophorese und Western-Blotting**

### **4.7.1 Auftrennung der Proteine**

Um die DNA aus dem Gesamtzellproteinextrakt zu entfernen, wurden die Proben bei -20°C eingefroren und anschließend unter ständigem Schütteln so weit aufgetaut, dass nur noch der Kern der Probe gefroren war. Ein anschließendes Zentrifugieren bei 12000 x g für 1,5 min bewirkt ein Pelletieren der DNA, da diese einen niedrigeren Gefrierpunkt wie die Proteinlösung besitzt. Der Überstand konnte nun in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für die weitere Analyse verwendet werden.

Die Proteinextrakte wurden mit 4 x Laemmli-puffer gemischt, für 8 min auf 95°C erhitzt und anschließend auf 10% Bis-Tris Gele von Invitrogen oder 12% TGX-precast Gele von BioRad aufgetragen. Die Separation erfolgte bei 100V bis die Lauffront das untere Ende der Gelkammer erreicht hatte. Als Proteingrößenstandard wurde der Precision Plus Dual Color Protein Standard von BioRad verwendet.

### **4.7.2 Western-Blotting**

Für den Elektrotransfer wurde das Gel aus der Plastikkassette gelöst und auf drei in Transferpuffer (NuPAGE Invitrogen) equilibrierte Blotpapiere und einer Nitrozellulosemembran platziert und mit weiteren drei Blotpapieren bedeckt. Luftbläschen zwischen den Schichten wurden entfernt und Gel und Membran wurden für den Transfer in eine mit NuPAGE-Transferpuffer gefüllte Wet-Blot Kammer (PeqLab) überführt. Das Blotting erfolgte bei 4°C über Nacht bei 30 Volt. Nach dem Blotting wurde die Membran mit Ponceau Rot in 10% Trichloressigsäure gefärbt, um den Erfolg des Transfers nachzuweisen. Um die Vollständigkeit des Transfers der Proteine aus dem Gel auf die Membran nachzuweisen, wurde das Gel für 1 h in der Coomassiefärbelösung inkubiert und anschließend für 2 h wieder entfärbt. Währenddessen wurde die Membran für eine Stunde in dem Blockreagenz geschüttelt. Dieses wurde entsprechend dem Antikörper und den Herstellerangaben gewählt (siehe Tabelle 5.6.1). Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte anschließend entweder für 1-2 h bei Raumtemperatur, oder bei 4°C

über Nacht, in 50 ml Rörchen auf einem Rotationsschüttler. Nach drei Waschschritten von je 5 min mit PBS-Tween 0,3% wurde die Membran für 45 min in 20 ml Blocklösung mit einem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper (Santa Cruz) inkubiert. Nach anschließenden drei Waschschritten mit PBS-Tween 0,3% und einem mit PBS, um das Tween zu entfernen, erfolgte die Detektion mittels Chemilumineszenz.

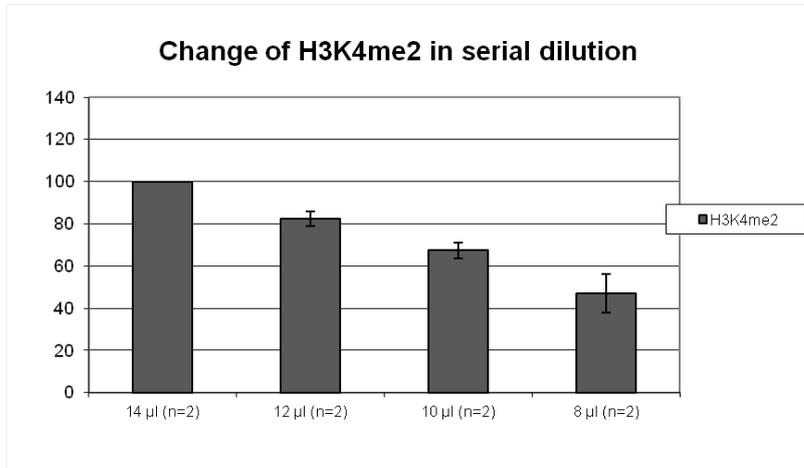
### **4.7.3 Detektion und Quantifizierung des Chemilumineszenzsignals**

Die Immunodetektion des Antikörpers erfolgte mit dem Amersham™ ECL™ Advance developer (GE Healthcare). Die Lösungen A und B wurden in einem 1:1 Verhältnis gemischt und die Membran anschließend darin für 4-5 min inkubiert. Die Aufnahme des Chemilumineszenzsignals erfolgte mit einem CHEMISMART documentation system (peqlab, Vilber Lourmat) und der Chemi-Capt 5000 software. Es wurden 16-bit Bilder mit der höchsten Auflösung aufgenommen. Die anschließende relative Quantifizierung erfolgte mit der Bio-1D Software (Vilber Lourmat). Hierbei erfolgte anhand der Fläche und der Lichtintensität der Banden eine relative Quantifizierung auf eine unbestrahlte/unbehandelte Kontrolle. Diese Werte wurden anschließend auf eine interne Ladekontrolle (Tubulin alpha, SMC-1) normiert.

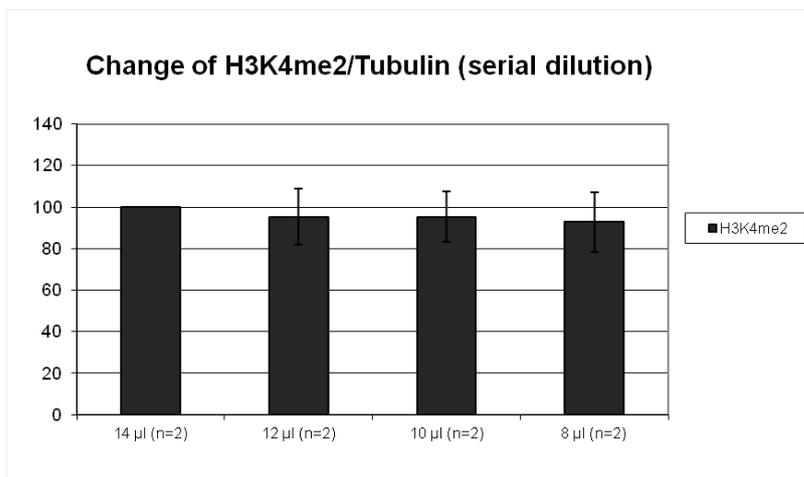
### **4.7.4 Quantifizierung geringer Proteinkonzentrationsunterschiede**

Da in dieser Arbeit sehr geringe Unterschiede und Veränderungen in den Proteinmengen untersucht wurden, war es wichtig sicherzustellen, dass die verwendete Methode geeignet ist, um exakte und reproduzierbare Ergebnisse auch bei nur kleinen Veränderungen nachzuweisen. Hierfür wurde besonderes Augenmerk auf ein standardisiertes Protokoll und ebensolche Materialien gelegt sowie auf eine exakt gleichmäßige Beladung. Zum Nachweis, dass es möglich ist, kleine Unterschiede zu detektieren, wurden Western-Blot Analysen mit Verdünnungsreihen von ein und derselben Probe durchgeführt.

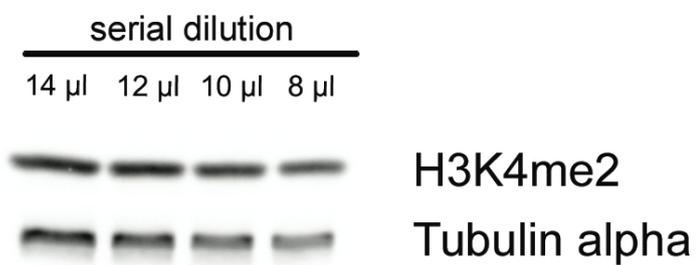
**a**



**b**



**c**



*Abbildung 4.4. Verdünnungsreihe mit unterschiedlichen Volumina eines Gesamtzellextraktes mit Unterschieden von 15% bis 45%, bezogen auf die erste Spur. a + b: Quantifizierung von Western-Blots, dargestellt sind zwei Blots aus unabhängigen Experimenten. (a) Veränderung von H3K4me2, normalisiert auf die erste Spur. (b) Quantifizierung normalisiert auf die erste Spur und auf Tubulin*

*alpha. (c) Western-Blot von H3K4me2 und Tubulin alpha. Die Größe und die Intensität der Spuren reflektiert die geladene Proteinmenge.*

Wie in Abbildung 4.4 zu sehen, ist eine Quantifizierung auch bei geringen Proteinmengenunterschieden von weniger als 20% möglich und auch reproduzierbar. Die unterschiedlich aufgetragenen Volumina wurden sowohl im Signal von Tubulin alpha, als auch von H3K4me2 reflektiert. Bezogen auf die interne Ladekontrolle sieht man dementsprechend keine Veränderungen in der Menge von H3K4me2.

## **4.8 Peptid Competition Assay**

Für die weiterführenden Analysen an den LUCY-Zelllinien im Anschluss an das LCL-HuKo-Screening wurden, soweit dies möglich war, die kommerziell erworbenen Antikörper auf ihre Spezifität und mögliche Kreuzreaktionen mit anderen Histonmodifikationen untersucht. Hierfür wurden spezifische Peptide verwendet, die in ihren Epitopen spezifisch von dem jeweiligen Antikörper erkannt werden sollten. Für den Test beim Western-Blotting wurde 1 µg Peptide mit dem Antikörper in seiner gewohnten Verdünnung im entsprechenden Blocking-Reagenz für 1 h bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde die Blotting-Membran zu dem vorinkubierten Antikörper gegeben und die Membran wie unter Punkt 4.7.2 beschrieben weiter behandelt.

Für die Acetyl-Antikörper konnte keine Kreuzreaktion mit den jeweils anderen Acetylierungen nachgewiesen werden (Anhang 4). Für H3K9ac, H4K5ac und H4K16ac konnte zudem gezeigt werden, dass sie ihr Epitop spezifisch erkennen. Für H3K56ac war kein korrespondierendes Peptid gewerblich erhältlich, sodass nur Wechselwirkungen mit den anderen Epitopen ausgeschlossen werden konnten. Die Methyl-Antikörper, welche auch von dieser Arbeit verwendet wurden, wurden zeitgleich von Frau Seiler für ihre Dissertation (Seiler, 2011) getestet. Für die H3K4- und H3K9-Methylierungen konnten nur keine, bis sehr schwache Wechselwirkungen mit anderen Epitopen nachgewiesen werden. Die Antikörper für die H4K20-Methylierung zeigten starke Kreuzreaktionen mit anderen Methylierungen und wurden auch in dieser Arbeit nach dem Screening der HuKo-Zelllinie für keine weiteren Analysen verwendet. Zusätzlich getestet wurde noch der H3K27me3-

Antikörper. Es konnte klar gezeigt werden, dass dieser spezifisch sein Epitop erkennt (Anhang 5).

#### **4.9 Durchflusszytometrie zur Bestimmung apoptotischer Zellen**

Für die Analyse der Apoptoserate nach Hypertonbehandlung wurden  $5 \times 10^3$ -Zellen in 96-well Platten ausgesät. Die Behandlung mit hypertonem Medium erfolgte am nächsten Tag für 1 h oder 24 h. Anschließend wurden die Zellkerne mit Nicoletti-Puffer, einem hypotonem Propidiumiodid (PI)-Färbepuffer (50 µg/ml Propidiumiodid, 0,1% (w/v) Tri-Natriumcitratdihydrat, 0,1% (v/v) Triton X-100 in deionisiertem Wasser) (Riccardi and Nicoletti, 2006), gefärbt und aus den Zellen gelöst. Hierfür wurde das Medium entfernt und die Zellen 5 min bei 37°C mit 200 µl Nicoletti-Puffer pro 10.000 Zellen inkubiert. Die Suspension aus Puffer und Zellkernen wurde bis zur Durchflusszytometrie bei 4°C aufbewahrt.

Die Durchflusszytometrie wurde an einem BD LSR II Durchflusszytometer durchgeführt. Die Analyse der Daten erfolgte mit der FACSDiva software (BD Biosciences). Die Zellkerne wurden sowohl über das Vorwärts- und das Seitwärtsstreulicht, als auch über die PI Fluoreszenz analysiert. Alle Zellen mit weniger als einem diploiden DNA-Gehalt wurden als apoptotisch definiert.

## 5 Material

### 5.1 Zelllinien und Medien

Zelllinie	Ursprung	Medium
HeLa	Humanes Zervixkarzinom	RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH), 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin
HeLa pMC16-53BP1-EGFP Klon #2	stabil transfizierte HeLa-Zellen mit 53BP1-EGFP Dr. G. Drexler (Hable et al., 2012)	RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH), 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 0,4 µg/ml Puromycin
U2OS	Humanes Osteosarkom	RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH), 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin
LCL-HuKo	EBV-immortalisierte humane Fibroblasten	RPMI 1640 (Biochrom AG), 10% FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin
AT-Patient (ATM (-) LCL, Coriell Institute, NJ, USA: GM03189) und AT-Bruder (ATM (+) LCL, Coriell Institute: GM03323)	EBV-immortalisierte humane Fibroblasten	RPMI 1640 (Biochrom AG), 10% FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin
Zelllinien aus dem LUCY-Kollektiv ( <a href="http://www.helmholtz-muenchen.de/epi1/index.html">www.helmholtz-muenchen.de/epi1/index.html</a> ): 4008-200, 4028-200, 4060-200, 36011-200, 4064-200, 20037-200	EBV-immortalisierte humane Fibroblasten	RPMI 1640 (Biochrom AG), 10% FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin

### 5.2 Lösungen und Reagenzien für die Zellkultur

Produkt	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Fetal calf serum (FCS)	PAA Laboratories GmbH
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Phosphate buffered saline (PBS)	Dulbecco
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trypsin/EDTA	Biochrom AG

### 5.3 Reagenzien und Puffer für die Immunfluoreszenz

Reagenz	Zusammensetzung
Fixierlösung	2 % Paraformaldehyd gelöst in PBS bei 72°C
Permeabilisierungslösung	0,15 % Triton-X-100 in PBS
Blocking Puffer	1 % BSA, 0,15 % Glycerin in PBS
DAPI-Lösung	DAPI 1:10000 in PBS

### 5.4 Reagenzien und Puffer für Western-Blotting

Reagenz	Zusammensetzung
Laemmli-Puffer	9,6 ml Tris (1M, pH 8,6), 3,2 g SDS, 16 ml Glycerin, 4 ml $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,14 g Bromphenolblau, 11,2 ml Aqua dest.
Waschpuffer	0,3 % Tween 20 in PBS
Blocklösung I	Roti-Block (Pierce) 1:10 in Aqua dest.
Blocklösung II	5 % Milchpulver in PBS-Tween 20 0,1 %
Ponceau-Rot	5 % Trichloressigsäure, 0,2 % Ponceau-S in Aqua dest.
Coomassie Färbelösung	10 % Essigsäure, 30 % Methanol, 0,1 % Coomassie brilliant blue in Aqua dest.
Coomassie Entfärber	10 % Essigsäure, 30 % Methanol in Aqua dest.
ECL advanced developer (Amersham Bioscience)	Solution A and B mixed 1:1
RIPA-Puffer	150 mM NaCl, 1% NP-40, 10 mM Desoxycholic acid (mMDOC), 0,1 % SDS, 50 mM Tris pH 8,0 in

	Aqua dest, ergänzt durch Protease und Phosphatase Inhibitoren (10x Stocklösung Roche Applied Science) und 5 mM Natriumbutyrat
Laufpuffer I	20 x NuPAGE SDS Running buffer (Invitrogen) 1:20 in Aqua dest.
Laufpuffer II	10 x Tris/Glycine/SDS Running buffer (BioRad) 1:10 in Aqua dest.
Transferpuffer	20 x NuPAGE Transfer buffer (Invitrogen), 1:20 in Aqua dest. mit 15 % Methanol

## 5.5 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Adrich GmbH
Cell-TAK Tissue Adhesive	BD Bioscience
DAPI	Sigma-Adrich GmbH
DMSO	Merck
Ethanol p.a.	Merck
Ethanol 80 %	Merck
Glycin	Sigma-Adrich GmbH
Methanol 100 %	Merck
NaCl	Merck
Nonident® P40 Substitute	Fluka
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Adrich GmbH
Paraformaldehyd	Sigma-Adrich GmbH
Ponceau S	Sigma-Adrich GmbH
Triton-X-100	Merck
Trypsin/EDTA	Biochrom AG
Tween 20	Merck
Vectashield w/o DAPI	Vector Laboratories

## 5.6 Antikörper und Peptide

### 5.6.1 Primäre Antikörper Western-Blotting

Antikörper	Quelle	Bestellnr.	Verdünnung	Blocklösung
53BP1	Novus	NB100-305	1:5000	Roti-®Block
γH2AX	millipore	05-636	1:1000	Roti-®Block
H3K4 unmodified	millipore	05-1341	1:1000	Roti-®Block
H3K4me	abcam	ab3825	1:1000	Roti-®Block
H3K4me2	abcam	ab32356	1:1000	Roti-®Block
H3K4me3	abcam	ab12209	1:1000	Roti-®Block
H3K9me	millipore	07-450	1:1000	Roti-®Block
H3K9me2	millipore	04-768	1:1000	Roti-®Block
H3K9me3	millipore	07-442	1:1000	Roti-®Block
H3K27me3	millipore	07-449	1:4000	Roti-®Block
H3K56ac	millipore	07-677	1:1000	Roti-®Block
H3S10p	upstate	05-598	1:1000	Roti-®Block
H4K5ac I	upstate	06-759-MN	1:1000	Roti-®Block
H4K5ac II	abcam	ab51997	1:20000	Roti-®Block
H4K16ac	millipore	07-329	1:4000	5% milk
H4K20me	millipore	07-1570	1:1000	Roti-®Block
H4K20me2	millipore	07-367	1:1000	Roti-®Block
H4K20me3	abcam	ab9053	1:1000	Roti-®Block
Tubulin alpha	abcam	ab7291	1:4000	Roti-®Block

### 5.6.2 Primäre Antikörper Immunfluoreszenz

Antikörper	Tier	Quelle	Bestellnr.	Verdünnung
53BP1	rabbit	Novus	NB100-305	1:500
BRCA1	mouse	Calbiochem	OP92T	1:100
Brit1	rabbit	Proteintech	11962-1-AP	1:50

Mdc1	rabbit	bethyl	A300-015A	1:45
Mdc1	mouse	sigma	M2444	1:500
Mre11	mouse	abcam	ab214	1:500
phospho-ATM (Ser1981)	mouse	millipore	05-740	1:250
phospho-H2AX	rabbit	abcam	ab81299	1:200
phospho-H2AX	mouse	millipore	05-636	1:350
phospho-NBS1 (Ser343)	rabbit	cell signaling	3001	1:200
Rad51	rabbit	Calbiochem	PC130	1:100

### 5.6.3 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Spezifikation	Quelle	Bestellnr.	Verdünnung
goat anti rabbit IgG	Alexa Fluor 488	Molecular Probes	A-11034	1:200
goat anti mouse F(ab)2	Cyanin 3	Jackson Immunoresearch	115-165-072	1:200
sheep anti mouse IgG	Cyanin 3	Dianova	515-165-062	1:500
goat anti mouse	Peroxidase	Santa Cruz	sc2005	0,35 µl/20 ml
goat anti rabbit	Peroxidase	Santa Cruz	sc2004	0,25 µl/20 ml

### 5.6.4 Peptide

Peptid	Quelle	Bestellnr.
H3K4me1	abcam	ab1340
H3K4me2	abcam	ab7768
H3K4me3	abcam	ab1342
H3K9me1	abcam	ab1771
H3K9me2	abcam	ab1772
H3K9me3	abcam	ab1773
H3K27me3	abcam	ab1782
H3 unmodified	abcam	ab2903

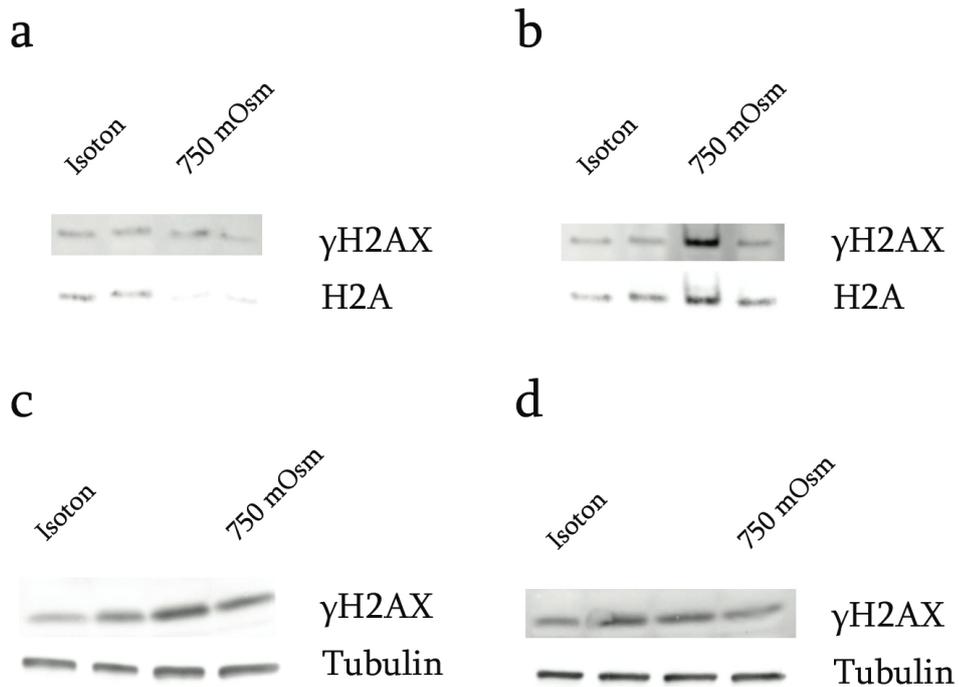
H4K20me1	abcam	ab17043
H4K20me2	abcam	ab14964
H4K20me3	abcam	ab17567
H3K9ac	abcam	ab16635
H4K5ac	millipore	12-343
H4K16ac	millipore	12-346

## 5.7 Equipment

Gerät	Hersteller
MCN X-ray tube	Philips, USA
<sup>137</sup> Cs-γ-Zelle, HWM-D 2000	Waelischmüller, Deutschland
Axiovert Z1	Zeiss, Deutschland
Camera AxioCam Mrm	Zeiss, Deutschland
Chemismart documentation system	PeqLab, Deutschland

## 6 Anhang

### Western-Blots zur Zunahme von $\gamma$ H2AX nach Hochsalzbehandlung



Anhang 1. Zunahme von  $\gamma$ H2AX im Western-Blot nach Behandlung der Zellen für 1 h mit hypertonem Medium mit 750 mOsm. (a + b), Zunahme in HeLa-Zellen, (c + d), U2OS-Zellen. Es wurden jeweils noch andere Proben aufgetragen, deren Ergebnisse nicht weiter verwendet wurden.

### p-Werte HuKo-Screening

	H3K4 unmod.	H3K9me3	H3K4me3	H3K9ac	H3K56ac	H4K5ac	H4K16ac
2 Gy, 15 min							0,0368*
10 Gy, 15 min	0,0028**			0,0099**			

2 Gy, 1 h		0,0082**	0,0033**		0,0039**	0,0001***	
10 Gy, 1 h			0,0001***	0,0395*	0,0028**		
2 Gy, 24 h					0,0158*	0,0057**	0,0014**
10 Gy, 24 h	0,0217*		0,0432*		0,0002***		

Anhang 2. p-Werte des t-Tests für statistisch signifikante Veränderungen der PTM nach Bestrahlung von LCL-HuKo-Zellen. Die Berechnung der p-Werte erfolgte mit der GraphPad Software ([www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/](http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/)). Ein p-Wert  $\leq 0,05$  gilt als signifikant und wurde mit einem Sternchen (\*) markiert. Ein p-Wert  $\leq 0,01$  gilt als sehr signifikant und wurde mit zwei Sternchen (\*\*) markiert. Ein p-Wert  $\leq 0,001$  wird als hoch signifikant bewertet und mit drei Sternchen (\*\*\*) markiert.

### p-Werte LUCY- und AT-Zelllinien

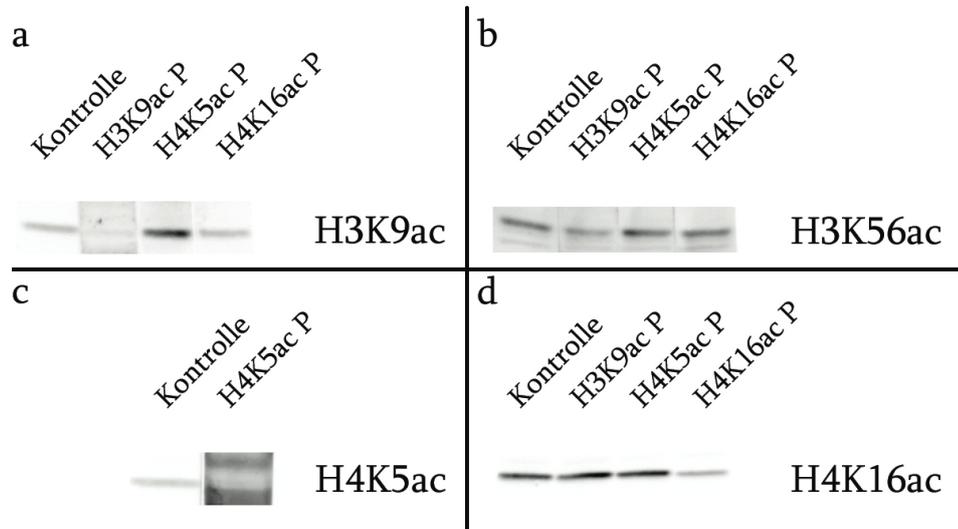
	H3K4me2		H3K4me3		H3K27me3	
	1 h	24 h	1 h	24 h	1 h	24 h
AT-Patient						
4008-200		0,0180				
4028-200		0,0265	0,0126			
4060-200		0,0280				0,0012
36011-200			0,0042			0,0164
AT-Bruder						

4064-200						0,0003
20037-200						0,0011

	H3K56ac		H4K5ac		H4K16ac	
	1 h	24 h	1 h	24 h	1 h	24 h
AT-Patient						
4008-200		0,0452		0,0001		0,0001
4028-200					0,0002	0,0013
4060-200					0,0001	0,0219
36011-200		0,0033		0,0005		0,0001
AT-Bruder	0,0007	0,0427		0,0017		
4064-200						
20037-200						

*Anhang 3. p-Werte des t-Tests für statistisch signifikante Veränderungen der PTM nach Bestrahlung von Zelllinien des LUCY-Kollektivs und der AT-Linien. Die Berechnung der p-Werte erfolgte mit der GraphPad Software. [www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/](http://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/)*

## Peptid-Kompetitions-Assay der Histonantikörper



Anhang 4. Test der Acetyl-Histonantikörper über Peptid-Kompetitions-Assays auf ihre Spezifität, bzw. Kreuzreaktivität mit anderen Acetylierungen. Die Beschriftung neben der Abbildung des Western-Blots bezeichnet den getesteten Antikörper. Die Beschriftung der Banden entspricht den Peptiden mit denen die Antikörper vorinkubiert wurden. (a) H3K9ac erkennt klar sein Epitop und weist keine Kreuzreaktivität mit den anderen Peptiden auf. (b) H3K56ac wechselwirkt ebenfalls nicht mit den anderen Acetylierungen. Dieses Ergebnis wurde unabhängig bestätigt. (c) H4K5ac wird von seinem Epitop bei Vorinkubation des Antikörpers blockiert. (d) H4K16ac erkennt nur sein Epitop und wechselwirkt nicht mit H3K9ac oder H4K5ac.



Anhang 5. Peptid-Kompetitions-Assay mit dem H3K27me3- Antikörper. Der Antikörper wird klar durch sein Epitop blockiert.

## 7 Literaturverzeichnis

Albiez, Heiner; Cremer, Marion; Tiberi, Cinzia; Vecchio, Lorella; Schermelleh, Lothar; Dittrich, Sandra et al. (2006): Chromatin domains and the interchromatin compartment form structurally defined and functionally interacting nuclear networks. In: *Chromosome Res.* 14 (7), S. 707–733. Online verfügbar unter doi:10.1007/s10577-006-1086-x.

ALLFREY, V. G.; FAULKNER, R.; MIRSKY, A. E. (1964): ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 51, S. 786–794.

Auer, Susanne; Hable, Volker; Greubel, Christoph; Drexler, Guido A.; Schmid, Thomas E.; Belka, Claus et al. (2011): Survival of tumor cells after proton irradiation with ultra-high dose rates. In: *Radiat Oncol* 6, S. 139.

Ayoub, Nabieh; Jeyasekharan, Anand D.; Bernal, Juan A.; Venkitaraman, Ashok R. (2008): HP1-beta mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response. In: *Nature* 453 (7195), S. 682–686.

Ayoub, Nabieh; Rajendra, Eeson; Su, Xinyi; Jeyasekharan, Anand D.; Mahen, Robert; Venkitaraman, Ashok R. (2009): The carboxyl terminus of Brca2 links the disassembly of Rad51 complexes to mitotic entry. In: *Curr. Biol.* 19 (13), S. 1075–1085.

Bakkenist, Christopher J.; Kastan, Michael B. (2003): DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. In: *Nature* 421 (6922), S. 499–506.

Bank, Otto (1938): Abhängigkeit der Kernstruktur von der Ionen-Konzentration. Online verfügbar unter <http://www.springerlink.com/content/jv15h638177nm5j2/fulltext.pdf>.

Bannister, A. J.; Zegerman, P.; Partridge, J. F.; Miska, E. A.; Thomas, J. O.; Allshire, R. C.; Kouzarides, T. (2001): Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. In: *Nature* 410 (6824), S. 120–124.

Bannister, Andrew J.; Kouzarides, Tony (2011): Regulation of chromatin by histone modifications. In: *Cell Res.* 21 (3), S. 381–395. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3193420/pdf/cr201122a.pdf>.

Barski, Artem; Cuddapah, Suresh; Cui, Kairong; Roh, Tae-Young; Schones, Dustin E.; Wang, Zhibin et al. (2007): High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. In: *Cell* 129 (4), S. 823–837.

Baure, Jennifer; Izadi, Atefeh; Suarez, Vannina; Giedzinski, Erich; Cleaver, James E.; Fike, John R.; Limoli, Charles L. (2008): Histone H2AX phosphorylation in response to changes in chromatin structure induced by altered osmolarity. In: *Mutagenesis*. Online verfügbar unter doi:10.1093/mutage/gen064.

Bentzen, Søren M. (2006): Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. In: *Nat. Rev. Cancer* 6 (9), S. 702–713.

- Bernstein, Bradley E.; Meissner, Alexander; Lander, Eric S. (2007): The mammalian epigenome. In: *Cell* 128 (4), S. 669–681.
- Bird, Alexander W.; Yu, David Y.; Pray-Grant, Marilyn G.; Qiu, Qifeng; Harmon, Kirsty E.; Megee, Paul C. et al. (2002): Acetylation of histone H4 by Esa1 is required for DNA double-strand break repair. In: *Nature* 419 (6905), S. 411–415.
- Bolderson, Emma; Savage, Kienan I.; Mahen, Robert; Pisupati, Venkat; Graham, Mark E.; Richard, Derek J. et al. (2012): KRAB-Associated Co-repressor (KAP-1) Ser-473 phosphorylation regulates Heterochromatin Protein 1 $\beta$  (HP1- $\beta$ ) mobilization and DNA repair in heterochromatin. In: *The Journal of biological chemistry*.
- Botuyan, Maria Victoria; Lee, Joseph; Ward, Irene M.; Kim, Ja-Eun; Thompson, James R.; Chen, Junjie; Mer, Georges (2006): Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. In: *Cell* 127 (7), S. 1361–1373.
- Boyer, Laurie A.; Plath, Kathrin; Zeitlinger, Julia; Brambrink, Tobias; Medeiros, Lea A.; Lee, Tong Ihn et al. (2006): Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. In: *Nature* 441 (7091), S. 349–353. Online verfügbar unter [http://www.biology.csail.mit.edu/pubs/Boyer\\_Nature2006.pdf](http://www.biology.csail.mit.edu/pubs/Boyer_Nature2006.pdf).
- Breitkopf, Susanne (2007): Zellantwort und Lokalisation der Reparaturprozesse nach Hypertonie und Ionenbestrahlung. Diplomarbeit. Ludwig-Maximilians-Universität, München. Strahlenbiologisches Institut.
- Burg, Maurice B.; Ferraris, Joan D.; Dmitrieva, Natalia I. (2007): Cellular response to hyperosmotic stresses. In: *Physiol. Rev.* 87 (4), S. 1441–1474.
- Burma, Sandeep; Chen, Benjamin P. C.; Chen, David J. (2006): Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. In: *DNA Repair (Amst.)* 5 (9-10), S. 1042–1048.
- Caterino T.L., Hayes J.H (2007): Chromatin structure depends on what's in the nucleosome's pocket. Online verfügbar unter <http://www.nature.com/nsmb/journal/v14/n11/pdf/nsmb1107-1056.pdf>.
- Chai, Bob; Huang, Jian; Cairns, Bradley R.; Laurent, Brehon C. (2005): Distinct roles for the RSC and Swi/Snf ATP-dependent chromatin remodelers in DNA double-strand break repair. In: *Genes Dev.* 19 (14), S. 1656–1661.
- Chiolo, Irene; Minoda, Aki; Colmenares, Serafin U.; Polyzos, Aris; Costes, Sylvain V.; Karpen, Gary H. (2011): Double-Strand Breaks in Heterochromatin Move Outside of a Dynamic HP1a Domain to Complete Recombinational Repair. In: *Cell* 144 (5), S. 732–744.
- Chou, Danny M.; Adamson, Britt; Dephoure, Noah E.; Tan, Xu; Nottke, Amanda C.; Hurov, Kristen E. et al. (2010): A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (43), S. 18475–18480.

- Choudhary, Chunaram; Kumar, Chanchal; Gnad, Florian; Nielsen, Michael L.; Rehman, Michael; Walther, Tobias C. et al. (2009): Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. In: *Science* 325 (5942), S. 834–840.
- Cowell, Ian G.; Sunter, Nicola J.; Singh, Prim B.; Austin, Caroline A.; Durkacz, Barbara W.; Tilby, Michael J. (2007): gammaH2AX foci form preferentially in euchromatin after ionising-radiation. In: *PLoS ONE* 2 (10), S. e1057. Online verfügbar unter doi:10.1371/journal.pone.0001057.
- Darroudi, Firouz; Wiegant, Wouter; Meijers, Matty; Friedl, Anna A.; van der Burg, Mirjam; Fomina, Janna et al. (2007): Role of Artemis in DSB repair and guarding chromosomal stability following exposure to ionizing radiation at different stages of cell cycle. In: *Mutat. Res.* 615 (1-2), S. 111–124.
- Das, Chandrima; Lucia, M. Scott; Hansen, Kirk C.; Tyler, Jessica K. (2009): CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 on lysine 56. In: *Nature* 459 (7243), S. 113–117.
- Davis, Anthony J.; Chen, David J. (2013): DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. In: *Transl Cancer Res* 2 (3), S. 130–143.
- Deshpande, Aniruddha J.; Bradner, James; Armstrong, Scott A. (2012): Chromatin modifications as therapeutic targets in MLL-rearranged leukemia. In: *Trends Immunol.* 33 (11), S. 563–570.
- Dmitrieva, Natalia I.; Bulavin, Dmitry V.; Burg, Maurice B. (2003): High NaCl causes Mre11 to leave the nucleus, disrupting DNA damage signaling and repair. In: *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 285 (2), S. F266–74. Online verfügbar unter doi:10.1152/ajprenal.00060.2003.
- Dmitrieva, Natalia I.; Burg, Maurice B. (2008): Analysis of DNA breaks, DNA damage response, and apoptosis produced by high NaCl. In: *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 295 (6), S. F1678–88. Online verfügbar unter doi:10.1152/ajprenal.90424.2008.
- Drogaris, Paul; Villeneuve, Valérie; Pomiès, Christelle; Lee, Eun-Hye; Bourdeau, Véronique; Bonneil, Eric et al. (2012): Histone deacetylase inhibitors globally enhance h3/h4 tail acetylation without affecting h3 lysine 56 acetylation. In: *Sci Rep* 2, S. 220.
- Du, Guanghua; Drexler, Guido A.; Friedland, Werner; Greubel, Christoph; Hable, Volker; Krücken, Reiner et al. (2011): Spatial Dynamics of DNA Damage Response Protein Foci along the Ion Trajectory of High-LET Particles. In: *Radiation Research* 176 (6), S. 706–715, zuletzt geprüft am 31.08.2012.
- Egelhofer, Thea A.; Minoda, Aki; Klugman, Sarit; Lee, Kyungjoon; Kolasinska-Zwierz, Paulina; Alekseyenko, Artyom A. et al. (2011): An assessment of histone-modification antibody quality. In: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18 (1), S. 91–93. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3017233/pdf/nihms251600.pdf>.
- Esashi, Fumiko; Christ, Nicole; Gannon, Julian; Liu, Yilun; Hunt, Tim; Jasin, Maria; West, Stephen C. (2005): CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. In: *Nature* 434 (7033), S. 598–604.

- Escibano-Díaz, Cristina; Orthwein, Alexandre; Fradet-Turcotte, Amélie; Xing, Mengtan; Young, Jordan T. F.; Tkáč, Ján et al. (2013): A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. In: *Mol. Cell* 49 (5), S. 872–883.
- Esteller, M.; Catusus, L.; Matias-Guiu, X.; Mutter, G. L.; Prat, J.; Baylin, S. B.; Herman, J. G. (1999): hMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis. In: *Am. J. Pathol.* 155 (5), S. 1767–1772.
- Falk; Lukášová; Kozubek (2008): Chromatin structure influences the sensitivity of DNA to gamma-radiation. In: *Biochim. Biophys. Acta*. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.bbamcr.2008.07.010.
- Falk, Martin; Lukasova, Emilie; Gabrielova, Barbora; Ondrej, Vladan; Kozubek, Stanislav (2007): Chromatin dynamics during DSB repair. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1773 (10), S. 1534–1545.
- Farrell, Andrew W.; Halliday, Gary M.; Lyons, James Guy (2011): Chromatin Structure Following UV-Induced DNA Damage-Repair or Death? In: *Int J Mol Sci* 12 (11), S. 8063–8085.
- Finch, J. T.; Klug, A. (1976): Solenoidal model for superstructure in chromatin. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73 (6), S. 1897–1901.
- Firsanov, Denis V.; Solovjeva, Liudmila V.; Svetlova, Maria P. (2011): H2AX phosphorylation at the sites of DNA double-strand breaks in cultivated mammalian cells and tissues. In: *Clin Epigenetics* 2 (2), S. 283–297.
- Flygare, J.; Benson, F.; Hellgren, D. (1996): Expression of the human RAD51 gene during the cell cycle in primary human peripheral blood lymphocytes. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1312 (3), S. 231–236.
- Foray, Nicolas; Colin, Catherine; Bourguignon, Michel (2012): 100 years of individual radiosensitivity: how we have forgotten the evidence. In: *Radiology* 264 (3), S. 627–631.
- Fradet-Turcotte, Amélie; Canny, Marella D.; Escibano-Díaz, Cristina; Orthwein, Alexandre; Leung, Charles C. Y.; Huang, Hao et al. (2013): 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. In: *Nature* 499 (7456), S. 50–54.
- Fraga, Mario F.; Ballestar, Esteban; Villar-Garea, Ana; Boix-Chornet, Manuel; Espada, Jesus; Schotta, Gunnar et al. (2005): Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. In: *Nat. Genet.* 37 (4), S. 391–400.
- Friedl, Anna A.; Mazurek, Belinda; Seiler, Doris M. (2012): Radiation-induced alterations in histone modification patterns and their potential impact on short-term radiation effects.
- Füllgrabe, Jens; Lynch-Day, Melinda A.; Heldring, Nina; Li, Wenbo; Struijk, Robert B.; Ma, Qi et al. (2013): The histone H4 lysine 16 acetyltransferase hMOF regulates the outcome of autophagy. In: *Nature* 500 (7463), S. 468–471.

- Galvez, A.; Morales, M. P.; Eltit, J. M.; Ocaranza, P.; Carrasco, L.; Campos, X. et al. (2001): A rapid and strong apoptotic process is triggered by hyperosmotic stress in cultured rat cardiac myocytes. In: *Cell Tissue Res.* 304 (2), S. 279–285.
- Gatti, Marco; Pinato, Sabrina; Maspero, Elena; Soffientini, Paolo; Polo, Simona; Penengo, Lorenza (2012): A novel ubiquitin mark at the N-terminal tail of histone H2As targeted by RNF168 ubiquitin ligase. In: *Cell Cycle* 11 (13), S. 2538–2544.
- Geutjes, E-J; Bajpe, P. K.; Bernards, R. (2012): Targeting the epigenome for treatment of cancer. In: *Oncogene* 31 (34), S. 3827–3844.
- Giunta, Simona; Belotserkovskaya, Rimma; Jackson, Stephen P. (2010): DNA damage signaling in response to double-strand breaks during mitosis. In: *J. Cell Biol.* 190 (2), S. 197–207. Online verfügbar unter doi:10.1083/jcb.200911156.
- Gomez-Godinez, Veronica; Wu, Tao; Sherman, Adria J.; Lee, Christopher S.; Liaw, Lih-Huei; Zhongsheng, You et al. (2010): Analysis of DNA double-strand break response and chromatin structure in mitosis using laser microirradiation. In: *Nucleic Acids Res.* 38 (22), S. e202.
- Gong, Fade; Miller, Kyle M. (2013): Mammalian DNA repair: HATs and HDACs make their mark through histone acetylation (1-2), zuletzt geprüft am 19.12.2014.
- Goodarzi, Aaron A.; Kurka, Thomas; Jeggo, Penelope A. (2011): KAP-1 phosphorylation regulates CHD3 nucleosome remodeling during the DNA double-strand break response. In: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18 (7), S. 831–839. Online verfügbar unter <http://www.nature.com/nsmb/journal/v18/n7/pdf/nsmb.2077.pdf>.
- Goodarzi, Aaron A.; Noon, Angela T.; Deckbar, Dorothee; Ziv, Yael; Shiloh, Yosef; Löbrich, Markus; Jeggo, Penny A. (2008): ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. In: *Mol. Cell* 31 (2), S. 167–177. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.molcel.2008.05.017.
- Green, Catherine M.; Almouzni, Geneviève (2002): When repair meets chromatin. First in series on chromatin dynamics. In: *EMBO Rep.* 3 (1), S. 28–33. Online verfügbar unter <http://www.nature.com/embor/journal/v3/n1/pdf/embor254.pdf>.
- Grigoryev, Sergei A.; Woodcock, Christopher L. (2012): Chromatin organization - the 30 nm fiber. In: *Exp. Cell Res.* 318 (12), S. 1448–1455.
- Groselj, B.; Sharma, N. L.; Hamdy, F. C.; Kerr, M.; Kiltie, A. E. (2013): Histone deacetylase inhibitors as radiosensitisers: effects on DNA damage signalling and repair. In: *Br. J. Cancer* 108 (4), S. 748–754.
- Guertler, A.; Kraemer, A.; Roessler, U.; Hornhardt, S.; Kulka, U.; Moertl, S. et al. (2011): The WST survival assay: an easy and reliable method to screen radiation-sensitive individuals. In: *Radiation Protection Dosimetry* 143 (2-4), S. 487–490.
- Guo, Ruifeng; Chen, Jie; Mitchell, David L.; Johnson, David G. (2011): GCN5 and E2F1 stimulate nucleotide excision repair by promoting H3K9 acetylation at sites of damage. In:

- Nucleic Acids Res.* 39 (4), S. 1390–1397. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3045616/pdf/gkq983.pdf>.
- Gupta, Arun; Sharma, Girdhar G.; Young, Charles S. H.; Agarwal, Manjula; Smith, Edwin R.; Paull, Tanya T. et al. (2005): Involvement of human MOF in ATM function. In: *Mol. Cell. Biol.* 25 (12), S. 5292–5305.
- Hable, Volker; Drexler, Guido A.; Brüning, Tino; Burgdorf, Christian; Greubel, Christoph; Derer, Anja et al. (2012): Recruitment Kinetics of DNA Repair Proteins Mdc1 and Rad52 but Not 53BP1 Depend on Damage Complexity (7).
- Hartlerode, Andrea J.; Guan, Yinghua; Rajendran, Anbazhagan; Ura, Kiyoe; Schotta, Gunnar; Xie, Anyong et al. (2012): Impact of histone H4 lysine 20 methylation on 53BP1 responses to chromosomal double strand breaks. In: *PLoS ONE* 7 (11), S. e49211.
- Hefferin, Melissa L.; Tomkinson, Alan E. (2005): Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. In: *DNA Repair (Amst.)* 4 (6), S. 639–648.
- Heijink, Anne Margriet; Krajewska, Małgorzata; van Vugt, Marcel A. T. M. (2013): The DNA damage response during mitosis. In: *Mutat. Res.* 750 (1-2), S. 45–55.
- Heitz, Emil: Das Heterochromatin der Moose In I Jahrb Wiss Botanik, Vol. 69 (1928), 762 - 818 by E. Heitz 1928 (Vol. 69), S. 762–818.
- Henikoff, Steven; Shilatifard, Ali (2011): Histone modification: cause or cog? In: *Trends Genet.* 27 (10), S. 389–396.
- Horikoshi, Nobuo; Kumar, Pankaj; Sharma, Girdhar G.; Chen, Min; Hunt, Clayton R.; Westover, Kenneth et al. (2013): Genome-wide distribution of histone H4 Lysine 16 acetylation sites and their relationship to gene expression. In: *Genome Integr* 4 (1), S. 3.
- Houston, Sabrina I.; McManus, Kirk J.; Adams, Melissa M.; Sims, Jennifer K.; Carpenter, Phillip B.; Hendzel, Michael J.; Rice, Judd C. (2008): Catalytic function of the PR-Set7 histone H4 lysine 20 monomethyltransferase is essential for mitotic entry and genomic stability. In: *J. Biol. Chem.* 283 (28), S. 19478–19488.
- Hsiao, Kuei-Yang; Mizzen, Craig A. (2013): Histone H4 deacetylation facilitates 53BP1 DNA damage signaling and double-strand break repair. In: *J Mol Cell Biol* 5 (3), S. 157–165.
- Iliakis, G. E.; Cicilioni, O.; Metzger, L. (1991): Measurement of DNA double-strand breaks in CHO cells at various stages of the cell cycle using pulsed field gel electrophoresis: calibration by means of <sup>125</sup>I decay. In: *Int. J. Radiat. Biol.* 59 (2), S. 343–357.
- Jackson, Stephen P.; Durocher, Daniel (2013): Regulation of DNA damage responses by ubiquitin and SUMO. In: *Mol. Cell* 49 (5), S. 795–807.
- Jakopovic, Marko; Thomas, Anish; Balasubramaniam, Sanjeeve; Schrupp, David; Giaccone, Giuseppe; Bates, Susan E. (2013): Targeting the Epigenome in Lung Cancer: Expanding Approaches to Epigenetic Therapy. In: *Front Oncol* 3, S. 261.

- Jørgensen, Stine; Schotta, Gunnar; Sørensen, Claus Storgaard (2013): Histone H4 lysine 20 methylation: key player in epigenetic regulation of genomic integrity. In: *Nucleic Acids Res.* 41 (5), S. 2797–2806.
- Jost, K. Laurence; Bertulat, Bianca; Cardoso, M. Cristina (2012): Heterochromatin and gene positioning: inside, outside, any side? In: *Chromosoma* 121 (6), S. 555–563.
- Joti, Yasumasa; Hikima, Takaaki; Nishino, Yoshinori; Kamada, Fukumi; Hihara, Saera; Takata, Hideaki et al. (2012): Chromosomes without a 30-nm chromatin fiber. In: *Nucleus* 3 (5), S. 404–410.
- Kakarougkas, A.; Jeggo, P. A. (2014): DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism. In: *Br J Radiol.*
- Kakarougkas, Andreas; Ismail, Amani; Klement, Karolin; Goodarzi, Aaron A.; Conrad, Sandro; Freire, Raimundo et al. (2013): Opposing roles for 53BP1 during homologous recombination. In: *Nucleic Acids Res.* 41 (21), S. 9719–9731.
- Kato, Kiyoko; Nakajima, Kazuhiro; Ui, Ayako; Muto-Terao, Yuri; Ogiwara, Hideaki; Nakada, Shinichiro (2014): Fine-tuning of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB2 supports the DNA repair pathway choice. In: *Mol. Cell* 53 (4), S. 617–630.
- Kim, Jung-Ae; Kruhlak, Michael; Dotiwala, Farokh; Nussenzweig, André; Haber, James E. (2007): Heterochromatin is refractory to gamma-H2AX modification in yeast and mammals. In: *J. Cell Biol.* 178 (2), S. 209–218. Online verfügbar unter doi:10.1083/jcb.200612031.
- Kim, Yong-Chul; Gerlitz, Gabi; Furusawa, Takashi; Catez, Frédéric; Nussenzweig, Andre; Oh, Kyu-Seon et al. (2009): Activation of ATM depends on chromatin interactions occurring before induction of DNA damage. In: *Nat. Cell Biol.* 11 (1), S. 92–96.
- Knutson, Sarah K.; Warholic, Natalie M.; Wigle, Tim J.; Klaus, Christine R.; Allain, Christina J.; Raimondi, Alejandra et al. (2013): Durable tumor regression in genetically altered malignant rhabdoid tumors by inhibition of methyltransferase EZH2. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 (19), S. 7922–7927.
- Kornberg, Roger D. (1977): Structure of Chromatin. Online verfügbar unter <http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.bi.46.070177.004435>.
- Kreuzer, M.; Kreienbrock, L.; Gerken, M.; Heinrich, J.; Bruske-Hohlfeld, I.; Muller, K. M.; Wichmann, H. E. (1998): Risk factors for lung cancer in young adults. In: *Am. J. Epidemiol.* 147 (11), S. 1028–1037.
- Krishnan, Vaidehi; Chow, Maggie Zi Ying; Wang, Zimei; Le Zhang; Liu, Baohua; Liu, Xinguang; Zhou, Zhongjun (2011): Histone H4 lysine 16 hypoacetylation is associated with defective DNA repair and premature senescence in Zmpste24-deficient mice. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108 (30), S. 12325–12330.
- Kruhlak, Michael J.; Celeste, Arkady; Nussenzweig, André (2006): Spatio-temporal dynamics of chromatin containing DNA breaks. In: *Cell Cycle* 5 (17), S. 1910–1912.

- Lachner, M.; O'Carroll, D.; Rea, S.; Mechtler, K.; Jenuwein, T. (2001): Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. In: *Nature* 410 (6824), S. 116–120.
- Laird, P. W.; Jackson-Grusby, L.; Fazeli, A.; Dickinson, S. L.; Jung, W. E.; Li, E. et al. (1995): Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. In: *Cell* 81 (2), S. 197–205.
- Lans, Hannes; Marteiijn, Jurgen A.; Vermeulen, Wim (2012): ATP-dependent chromatin remodeling in the DNA-damage response. In: *Epigenetics & Chromatin* 5 (1), S. 4.
- Larsen, Dorthe Helena; Poinsignon, Catherine; Gudjonsson, Thorkell; Dinant, Christoffel; Payne, Mark R.; Hari, Flurina J. et al. (2010): The chromatin-remodeling factor CHD4 coordinates signaling and repair after DNA damage. In: *J. Cell Biol.* 190 (5), S. 731–740.
- Lee, Han-Sae; Park, Ji-Hye; Kim, So-Jung; Kwon, Su-Jung; Kwon, Jongbum (2010): A cooperative activation loop among SWI/SNF, gamma-H2AX and H3 acetylation for DNA double-strand break repair. In: *EMBO J.* 29 (8), S. 1434–1445.
- Li, Guohong; Reinberg, Danny (2011): Chromatin higher-order structures and gene regulation. In: *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21 (2), S. 175–186.
- Li, Xiangzhi; Corsa, Callie Ann Sprunger; Pan, Patricia W.; Wu, Lipeng; Ferguson, David; Yu, Xiaochun et al. (2010): MOF and H4 K16 acetylation play important roles in DNA damage repair by modulating recruitment of DNA damage repair protein Mdc1. In: *Mol. Cell. Biol.* 30 (22), S. 5335–5347.
- Liang, Gangning; Lin, Joy C. Y.; Wei, Vivian; Yoo, Christine; Cheng, Jonathan C.; Nguyen, Carvell T. et al. (2004): Distinct localization of histone H3 acetylation and H3-K4 methylation to the transcription start sites in the human genome. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (19), S. 7357–7362. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC409923/pdf/1017357.pdf>.
- Lim, Jae-Hwan; West, Katherine L.; Rubinstein, Yaffa; Bergel, Michael; Postnikov, Yuri V.; Bustin, Michael (2005): Chromosomal protein HMG1 enhances the acetylation of lysine 14 in histone H3. In: *EMBO J.* 24 (17), S. 3038–3048.
- Lin, Shiao-Yih; Liang, Yulong; Li, Kaiyi (2010): Multiple Roles of BRIT1/MCPH1 in DNA Damage Response, DNA Repair, and Cancer Suppression. In: *Yonsei Med J* 51 (3), S. 295. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2852782/pdf/ymj-51-295.pdf>.
- Liu, Baohua; Yip, Raymond Kh; Zhou, Zhongjun (2012): Chromatin remodeling, DNA damage repair and aging. In: *Curr. Genomics* 13 (7), S. 533–547.
- Löbrich, M.; Rydberg, B.; Cooper, P. K. (1995): Repair of x-ray-induced DNA double-strand breaks in specific Not I restriction fragments in human fibroblasts: joining of correct and incorrect ends. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (26), S. 12050–12054.
- Lou, Zhenkun; Minter-Dykhouse, Katherine; Franco, Sonia; Gostissa, Monica; Rivera, Melissa A.; Celeste, Arkady et al. (2006): MDC1 Maintains Genomic Stability by

- Participating in the Amplification of ATM-Dependent DNA Damage Signals. In: *Molecular Cell* (21), S. 187–200. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.molcel.2005.11.025.
- Luijsterburg, Martijn S.; Dinant, Christoffel; Lans, Hannes; Stap, Jan; Wiernasz, Elzbieta; Lagerwerf, Saskia et al. (2009): Heterochromatin protein 1 is recruited to various types of DNA damage. In: *J. Cell Biol.* 185 (4), S. 577–586.
- Lukas, Jiri; Lukas, Claudia; Bartek, Jiri (2011): More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. In: *Nat. Cell Biol.* 13 (10), S. 1161–1169. Online verfügbar unter <http://www.nature.com/ncb/journal/v13/n10/pdf/ncb2344.pdf>.
- Lund, K.; Adams, P. D.; Copland, M. (2014): EZH2 in normal and malignant hematopoiesis. In: *Leukemia* 28 (1), S. 44–49.
- Maeshima, Kazuhiro; Hihara, Saera; Eltsov, Mikhail (2010): Chromatin structure: does the 30-nm fibre exist in vivo? In: *Current Opinion in Cell Biology* 22 (3), S. 291–297.
- Martin, Robert M.; Cardoso, M. Cristina (2010): Chromatin condensation modulates access and binding of nuclear proteins. In: *FASEB J.* 24 (4), S. 1066–1072. Online verfügbar unter doi:10.1096/fj.08-128959.
- Mattiroli, Francesca; Vissers, Joseph H. A.; van Dijk, Willem J.; Ikpa, Pauline; Citterio, Elisabetta; Vermeulen, Wim et al. (2012): RNF168 ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to drive DNA damage signaling. In: *Cell* 150 (6), S. 1182–1195.
- Miller, Kyle M.; Jackson, Stephen P. (2012): Histone marks: repairing DNA breaks within the context of chromatin. In: *Biochem. Soc. Trans.* 40 (2), S. 370–376. Online verfügbar unter <http://www.biochemsoctrans.org/bst/040/0370/0400370.pdf>.
- Miller, Kyle M.; Tjeertes, Jorrit V.; Coates, Julia; Legube, Gaëlle; Polo, Sophie E.; Britton, Sébastien; Jackson, Stephen P. (2010): Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining. In: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17 (9), S. 1144–1151. Online verfügbar unter <http://www.nature.com/nsmb/journal/v17/n9/pdf/nsmb.1899.pdf>.
- Minaker, Samuel A.; Daze, Kevin D.; Ma, Manuel C. F.; Hof, Fraser (2012): Antibody-free reading of the histone code using a simple chemical sensor array. In: *J. Am. Chem. Soc.* 134 (28), S. 11674–11680.
- Misteli, Tom (2007): Beyond the sequence: cellular organization of genome function. In: *Cell* 128 (4), S. 787–800.
- Misteli, Tom; Soutoglou, Evi (2009): The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10 (4), S. 243–254. Online verfügbar unter <http://www.nature.com/nrm/journal/v10/n4/pdf/nrm2651.pdf>.
- Mochan, Tamara A.; Venere, Monica; DiTullio, Richard A., JR; Halazonetis, Thomas D. (2003): 53BP1 and NFB1/MDC1-Nbs1 Function in Parallel Interacting Pathways Activating Ataxia-Telangiectasia Mutated (ATM) in Response to DNA Damage. In: *CANCER RESEARCH* (63), S. 8586–8591.

- Mok, Myth T. S.; Henderson, Beric R. (2012): Three-dimensional imaging reveals the spatial separation of  $\gamma$ H2AX-MDC1-53BP1 and RNF8-RNF168-BRCA1-A complexes at ionizing radiation-induced foci. In: *Radiother Oncol* 103 (3), S. 415–420.
- Murr, Rabih; Loizou, Joanna I.; Yang, Yun-Gui; Cuenin, Cyrille; Li, Hai; Wang, Zhao-Qi; Herceg, Zdenko (2006): Histone acetylation by Trapp-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks. In: *Nat. Cell Biol.* 8 (1), S. 91–99.
- Nakamura, Kyosuke; Kato, Akihiro; Kobayashi, Junya; Yanagihara, Hiromi; Sakamoto, Shuichi; Oliveira, Douglas V. N. P. et al. (2011): Regulation of homologous recombination by RNF20-dependent H2B ubiquitination. In: *Mol. Cell* 41 (5), S. 515–528.
- Nelson, Glyn; Buhmann, Matthias; Zglinicki, Thomas von (2009): DNA damage foci in mitosis are devoid of 53BP1. In: *Cell Cycle* 8 (20), S. 3379–3383.
- Nishida, Hiromi; Suzuki, Takahiro; Kondo, Shinji; Miura, Hisashi; Fujimura, Yu-ichi; Hayashizaki, Yoshihide (2006): Histone H3 acetylated at lysine 9 in promoter is associated with low nucleosome density in the vicinity of transcription start site in human cell. In: *Chromosome Res.* 14 (2), S. 203–211.
- Nishino, Yoshinori; Eltsov, Mikhail; Joti, Yasumasa; Ito, Kazuki; Takata, Hideaki; Takahashi, Yukio et al. (2012): Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure. In: *EMBO J.* 31 (7), S. 1644–1653.
- Noma K; Allis, C. D.; Grewal, S. I. (2001): Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. In: *Science* 293 (5532), S. 1150–1155. Online verfügbar unter <http://www.sciencemag.org/content/293/5532/1150.full.pdf>.
- Noon, Angela T.; Goodarzi, Aaron A. (2011): 53BP1-mediated DNA double strand break repair: insert bad pun here. In: *DNA Repair (Amst.)* 10 (10), S. 1071–1076.
- Noon, Angela T.; Shibata, Atsushi; Rief, Nicole; Löbrich, Markus; Stewart, Grant S.; Jeggo, Penelope A.; Goodarzi, Aaron A. (2010): 53BP1-dependent robust localized KAP-1 phosphorylation is essential for heterochromatic DNA double-strand break repair. In: *Nat. Cell Biol.* 12 (2), S. 177–184.
- Ogiwara, H.; Ui, A.; Otsuka, A.; Satoh, H.; Yokomi, I.; Nakajima, S. et al. (2011): Histone acetylation by CBP and p300 at double-strand break sites facilitates SWI/SNF chromatin remodeling and the recruitment of non-homologous end joining factors. In: *Oncogene* 30 (18), S. 2135–2146. Online verfügbar unter <http://www.nature.com/onc/journal/v30/n18/pdf/onc2010592a.pdf>.
- O'Hagan, Heather M.; Mohammad, Helai P.; Baylin, Stephen B. (2008): Double strand breaks can initiate gene silencing and SIRT1-dependent onset of DNA methylation in an exogenous promoter CpG island. In: *PLoS Genet.* 4 (8), S. e1000155.
- Orthwein, Alexandre; Fradet-Turcotte, Amélie; Noordermeer, Sylvie M.; Canny, Marella D.; Brun, Catherine M.; Strecker, Jonathan et al. (2014): Mitosis inhibits DNA double-strand break repair to guard against telomere fusions. In: *Science* 344 (6180), S. 189–193.

Panier, Stephanie; Durocher, Daniel (2013): Push back to respond better: regulatory inhibition of the DNA double-strand break response. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14 (10), S. 661–672.

Pearson, Christopher E.; Nichol Edamura, Kerrie; Cleary, John D. (2005): Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. In: *Nat. Rev. Genet.* 6 (10), S. 729–742.

Peng, Guang; Yim, Eun-Kyoung; Dai, Hui; Jackson, Andrew P.; van der Burgt, Ineke; Pan, Mei-Ren et al. (2009): BRIT1/MCPH1 links chromatin remodelling to DNA damage response. In: *Nat. Cell Biol.* 11 (7), S. 865–872. Online verfügbar unter <http://www.nature.com/ncb/journal/v11/n7/pdf/ncb1895.pdf>.

Peng, Jamy C.; Karpen, Gary H. (2008): Epigenetic regulation of heterochromatic DNA stability. In: *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18 (2), S. 204–211.

Peng, Lirong; Ling, Hongbo; Yuan, Zhigang; Fang, Bin; Bloom, Gregory; Fukasawa, Kenji et al. (2012): SIRT1 negatively regulates the activities, functions, and protein levels of hMOF and TIP60. In: *Mol. Cell. Biol.* 32 (14), S. 2823–2836.

Peterson, Craig L.; Côté, Jacques (2004): Cellular machineries for chromosomal DNA repair. In: *Genes Dev.* 18 (6), S. 602–616.

Peterson, Shaun E.; Li, Yinyin; Chait, Brian T.; Gottesman, Max E.; Baer, Richard; Gautier, Jean (2011): Cdk1 uncouples CtIP-dependent resection and Rad51 filament formation during M-phase double-strand break repair. In: *J. Cell Biol.* 194 (5), S. 705–720.

Pihakaski-Maunsbach, Kaarina; Nonaka, Shoichi; Vorum, Henrik; Maunsbach, Arvid B. (2010): Response of IMCD3 cells to hypertonic challenges as analyzed by electron microscopy. In: *J Electron Microscop (Tokyo)* 59 (6), S. 481–494. Online verfügbar unter <http://jmicro.oxfordjournals.org/content/59/6/481.full.pdf#page=1&view=FitH>.

Price, Brendan D.; D'Andrea, Alan D. (2013): Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks. In: *Cell* 152 (6), S. 1344–1354.

Probst, Aline V.; Dunleavy, Elaine; Almouzni, Geneviève (2009): Epigenetic inheritance during the cell cycle. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 10 (3), S. 192–206.

Rajae-Bebahani, N.; Schmezer, P.; Risch, A.; Rittgen, W.; Kayser, K. W.; Dienemann, H. et al. (2001): Altered DNA repair capacity and bleomycin sensitivity as risk markers for non-small cell lung cancer. In: *Int. J. Cancer* 95 (2), S. 86–91.

Reitsema, Tarren J.; Banáth, Judit P.; MacPhail, Susan H.; Olive, Peggy L. (2004): Hypertonic saline enhances expression of phosphorylated histone H2AX after irradiation. In: *Radiat. Res.* 161 (4), S. 402–408.

Riballo, Enriqueta; Kühne, Martin; Rief, Nicole; Doherty, Aidan; Smith, Graeme C. M.; Recio, María-José et al. (2004): A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. In: *Mol. Cell* 16 (5), S. 715–724.

Riccardi, Carlo; Nicoletti, Ildo (2006): Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry (3). Online verfügbar unter

<http://www.nature.com/nprot/journal/v1/n3/pdf/nprot.2006.238.pdf>, zuletzt geprüft am 20.02.2013.

Rius, M.; Lyko, F. (2012): Epigenetic cancer therapy: rationales, targets and drugs. In: *Oncogene* 31 (39), S. 4257–4265.

Robinson, Philip J.J.; An, Woojin; Routh, Andrew; Martino, Fabrizio; Chapman, Lynda; Roeder, Robert G.; Rhodes, Daniela (2008): 30 nm Chromatin Fibre Decompaction Requires both H4-K16 Acetylation and Linker Histone Eviction (4), zuletzt geprüft am 05.12.2014.

Rogakou, E. P.; Boon, C.; Redon, C.; Bonner, W. M. (1999): Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. In: *J. Cell Biol.* 146 (5), S. 905–916. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2169482/pdf/9906008.pdf>.

Rogakou, E. P.; Pilch, D. R.; Orr, A. H.; Ivanova, V. S.; Bonner, W. M. (1998): DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. In: *J. Biol. Chem.* 273 (10), S. 5858–5868. Online verfügbar unter <http://www.jbc.org/content/273/10/5858.full.pdf#page=1&view=FitH>.

Rübe, Claudia E.; Lorat, Yvonne; Schuler, Nadine; Schanz, Stefanie; Wennemuth, Gunther; Rübe, Christian (2011): DNA repair in the context of chromatin: New molecular insights by the nanoscale detection of DNA repair complexes using transmission electron microscopy. In: *DNA repair*.

Sánchez-Molina, Sara; Mortusewicz, Oliver; Bieber, Béatrice; Auer, Susanne; Eckey, Maren; Leonhardt, Heinrich et al. (2011): Role for hACF1 in the G2/M damage checkpoint. In: *Nucleic Acids Res.* 39 (19), S. 8445–8456.

Sanders, Steven L.; Portoso, Manuela; Mata, Juan; Bähler, Jürg; Allshire, Robin C.; Kouzarides, Tony (2004): Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. In: *Cell* 119 (5), S. 603–614.

Sauter, Wiebke; Rosenberger, Albert; Beckmann, Lars; Kropp, Silke; Mittelstrass, Kirstin; Timofeeva, Maria et al. (2008): Matrix metalloproteinase 1 (MMP1) is associated with early-onset lung cancer. In: *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17 (5), S. 1127–1135. Online verfügbar unter <http://cebp.aacrjournals.org/content/17/5/1127.full.pdf#page=1&view=FitH>.

Schneider, Joachim; Illig, Thomas; Rosenberger, Albert; Bickeböller, Heike; Wichmann, Hans-Erich (2008): Detection of ATM gene mutations in young lung cancer patients: a population-based control study. In: *Arch. Med. Res.* 39 (2), S. 226–231.

Schotta, Gunnar; Lachner, Monika; Sarma, Kavitha; Ebert, Anja; Sengupta, Roopsha; Reuter, Gunter et al. (2004): A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. In: *Genes Dev.* 18 (11), S. 1251–1262. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC420351/pdf/0181251.pdf>.

Schotta, Gunnar; Sengupta, Roopsha; Kubicek, Stefan; Malin, Stephen; Kauer, Monika; Callén, Elsa et al. (2008): A chromatin-wide transition to H4K20 monomethylation impairs genome integrity and programmed DNA rearrangements in the mouse. In: *Genes Dev.* 22 (15), S. 2048–2061.

Schuebel, Kornel E.; Chen, Wei; Cope, Leslie; Glöckner, Sabine C.; Suzuki, Hiromu; Yi, Joo-Mi et al. (2007): Comparing the DNA hypermethylome with gene mutations in human colorectal cancer. In: *PLoS Genet.* 3 (9), S. 1709–1723.

Seiler, Doris M. (2012): Epigenetic alterations at gamma-H2AX-decorated chromatin regions after ionizing radiation. PhD thesis. Ludwig-Maximilians-Universität.

Seiler, Doris M.; Rouquette, Jacques; Schmid, Volker J.; Strickfaden, Hilmar; Ottmann, Christian; Drexler, Guido A. et al. (2011): Double-strand break-induced transcriptional silencing is associated with loss of tri-methylation at H3K4. In: *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology.*

Sharma, Girdhar G.; So, Sairei; Gupta, Arun; Kumar, Rakesh; Cayrou, Christelle; Avvakumov, Nikita et al. (2010): MOF and histone H4 acetylation at lysine 16 are critical for DNA damage response and double-strand break repair. In: *Mol. Cell. Biol.* 30 (14), S. 3582–3595.

Shibata, Atsushi; Conrad, Sandro; Birraux, Julie; Geuting, Verena; Barton, Olivia; Ismail, Amani et al. (2011): Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. In: *EMBO J.* 30 (6), S. 1079–1092.

Shimada, Midori; Niida, Hiroyuki; Zineldeen, Doaa H.; Tagami, Hideaki; Tanaka, Masafumi; Saito, Hiroyuki; Nakanishi, Makoto (2008): Chk1 is a histone H3 threonine 11 kinase that regulates DNA damage-induced transcriptional repression. In: *Cell* 132 (2), S. 221–232.

Shogren-Knaak, Michael; Peterson, Craig L. (2006): Switching on chromatin: mechanistic role of histone H4-K16 acetylation. In: *Cell Cycle* 5 (13), S. 1361–1365.

Simon, Jeffrey A.; Kingston, Robert E. (2013): Occupying chromatin: Polycomb mechanisms for getting to genomic targets, stopping transcriptional traffic, and staying put. In: *Mol. Cell* 49 (5), S. 808–824.

Smeenk, Godelieve; Wiegant, Wouter W.; Vrolijk, Hans; Solari, Aldo P.; Pastink, Albert; van Attikum, Haico (2010): The NuRD chromatin-remodeling complex regulates signaling and repair of DNA damage. In: *J. Cell Biol.* 190 (5), S. 741–749.

Smerdon, M. J. (1991): DNA repair and the role of chromatin structure. In: *Curr. Opin. Cell Biol.* 3 (3), S. 422–428.

Soria, Gaston; Polo, Sophie E.; Almouzni, Geneviève (2012): Prime, Repair, Restore: The Active Role of Chromatin in the DNA Damage Response. In: *Molecular Cell* 46 (6), S. 722–734.

- Stucki, Manuel; Clapperton, Julie A.; Mohammad, Duaa Yaffe Michael B.; Smerdon, Stephen J.; Jackson, Stephen P. (2005): MDC1 Directly Binds Phosphorylated Histone H2AX to Regular Cellular Responses to DNA Double-Strand Breaks. In: *Cell* (123), S. 1213–1226. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.cell.2005.09.038.
- Su, Tin Tin (2006): Cellular Responses to DNA Damage: One Signal, Multiple Choices. In: *Annual Review of Genetics* (40), S. 187–208. Online verfügbar unter doi:10.1145/annurev.genet.40.110405.090428.
- Sun, Yingli; Jiang, Xiaofeng; Chen, Shujuan; Fernandes, Norvin; Price, Brendan D. (2005): A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (37), S. 13182–13187.
- Sun, Yingli; Jiang, Xiaofeng; Xu, Ye; Ayrapetov, Marina K.; Moreau, Lisa A.; Whetstone, Johnathan R.; Price, Brendan D. (2009): Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60. In: *Nat. Cell Biol.* 11 (11), S. 1376–1382. Online verfügbar unter doi:10.1038/ncb1982.
- Sung, Patrick; Klein, Hannah (2006): Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (10), S. 739–750.
- Symington, Lorraine S.; Gautier, Jean (2011): Double-strand break end resection and repair pathway choice. In: *Annu. Rev. Genet.* 45, S. 247–271.
- Talasz, Heribert; Lindner, Herbert H.; Sarg, Bettina; Helliger, Wilfried (2005): Histone H4-lysine 20 monomethylation is increased in promoter and coding regions of active genes and correlates with hyperacetylation. In: *J. Biol. Chem.* 280 (46), S. 38814–38822. Online verfügbar unter <http://www.jbc.org/content/280/46/38814.full.pdf#page=1&view=FitH>.
- Tang, Jiangbo; Cho, Nam Woo; Cui, Gaofeng; Manion, Erica M.; Shanbhag, Niraj M.; Botuyan, Maria Victoria et al. (2013): Acetylation limits 53BP1 association with damaged chromatin to promote homologous recombination. In: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20 (3), S. 317–325.
- Tjeertes, Jorrit V.; Miller, Kyle M.; Jackson, Stephen P. (2009): Screen for DNA-damage-responsive histone modifications identifies H3K9Ac and H3K56Ac in human cells. In: *EMBO J.* 28 (13), S. 1878–1889. Online verfügbar unter doi:10.1038/emboj.2009.119.
- Turner, Bryan M. (2012): The adjustable nucleosome: an epigenetic signaling module. In: *Trends Genet.* 28 (9), S. 436–444.
- van Hooser, A.; Goodrich, D. W.; Allis, C. D.; Brinkley, B. R.; Mancini, M. A. (1998): Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation. In: *J. Cell. Sci.* 111 (Pt 23), S. 3497–3506. Online verfügbar unter <http://jcs.biologists.org/content/111/23/3497.full.pdf#page=1&view=FitH>.
- van Vugt, Marcel A. T. M.; Gardino, Alexandra K.; Linding, Rune; Ostheimer, Gerard J.; Reinhardt, H. Christian; Ong, Shao-En et al. (2010): A mitotic phosphorylation feedback network connects Cdk1, Plk1, 53BP1, and Chk2 to inactivate the G(2)/M DNA damage

checkpoint. In: *PLoS Biol.* 8 (1), S. e1000287. Online verfügbar unter doi:10.1371/journal.pbio.1000287.

Vempati, Rahul K.; Jayani, Ranveer S.; Notani, Dimple; Sengupta, Amrita; Galande, Sanjeev; Halder, Devyani (2010): p300-mediated acetylation of histone H3 lysine 56 functions in DNA damage response in mammals. In: *J. Biol. Chem* 285 (37), S. 28553–28564.

Voigt, Philipp; LeRoy, Gary; Drury, William J.; Zee, Barry M.; Son, Jinsook; Beck, David B. et al. (2012): Asymmetrically modified nucleosomes. In: *Cell* 151 (1), S. 181–193.

Wang, Zhibin; Zang, Chongzhi; Rosenfeld, Jeffrey A.; Schones, Dustin E.; Barski, Artem; Cuddapah, Suresh et al. (2008): Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. In: *Nat. Genet.* 40 (7), S. 897–903. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2769248/pdf/nihms76359.pdf>.

Wee, Susan; Dhanak, Dash; Li, Haitao; Armstrong, Scott A.; Copeland, Robert A.; Sims, Robert et al. (2014): Targeting epigenetic regulators for cancer therapy. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1309 (1), S. 30–36.

Weterings, Eric; Chen, David J. (2008): The endless tale of non-homologous end-joining. In: *Cell Res.* 18 (1), S. 114–124.

Woodcock, Christopher L.; Ghosh, Rajarshi P. (2010): Chromatin higher-order structure and dynamics. In: *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2 (5), S. a000596.

Xu, Ye; Price, Brendan D. (2011): Chromatin dynamics and the repair of DNA double strand breaks. In: *Cell Cycle* 10 (2), S. 261–267.

Yang, Bo; Zwaans, Bernadette M. M.; Eckersdorff, Mark; Lombard, David B. (2009): The sirtuin SIRT6 deacetylates H3 K56Ac in vivo to promote genomic stability. In: *Cell Cycle* 8 (16), S. 2662–2663.

Yang, Hongbo; Pesavento, James J.; Starnes, Taylor W.; Cryderman, Diane E.; Wallrath, Lori L.; Kelleher, Neil L.; Mizzen, Craig A. (2008): Preferential dimethylation of histone H4 lysine 20 by Suv4-20. In: *J. Biol. Chem.* 283 (18), S. 12085–12092.

Yang, Jun; Yu, Yingnian; Hamrick, Hope E.; Duerksen-Hughes, Penelope J. (2003): ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. In: *Carcinogenesis* 24 (10), S. 1571–1580. Online verfügbar unter <http://carcin.oxfordjournals.org/content/24/10/1571.full.pdf#page=1&view=FitH>.

Young, Leah C.; McDonald, Darin W.; Hendzel, Michael J. (2013): Kdm4b histone demethylase is a DNA damage response protein and confers a survival advantage following  $\gamma$ -irradiation. In: *J. Biol. Chem.* 288 (29), S. 21376–21388.

Yuan, Jian; Pu, Mintie; Zhang, Zhiguo; Lou, Zhenkun (2009): Histone H3-K56 acetylation is important for genomic stability in mammals. In: *Cell Cycle* 8 (11), S. 1747–1753.

Zeng, Weihua; Ball, Alexander R.; Yokomori, Kyoko (2010): HP1: heterochromatin binding proteins working the genome. In: *Epigenetics* 5 (4), S. 287–292.

Zhang, Wei; Peng, Guang; Lin, Shiaw-Yih; Zhang, Pumin (2011): DNA damage response is suppressed by the high cyclin-dependent kinase 1 activity in mitotic mammalian cells. In: *J. Biol. Chem.* 286 (41), S. 35899–35905.

Zhou, Chunxian; Li, Zhongxiang; Diao, Huiling; Yu, Yanke; Zhu, Wen; Dai, Yayun et al. (2006): DNA damage evaluated by  $\gamma$ H2AX foci formation by a selective group of chemical/physical stressors. In: *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 604 (1-2), S. 8–18.

Zimmermann, Michal; Lange, Titia de (2014): 53BP1: pro choice in DNA repair. In: *Trends Cell Biol.* 24 (2), S. 108–117.



## Danksagung

Zu danken habe ich von Herzen vielen Personen ohne diese die Arbeit nie zustande gekommen wäre.

Allen voran möchte ich meiner Arbeitsgruppe unter Leitung von Frau Dr. PD Anna Friedl für die vielen Jahre Unterstützung und das angenehme Arbeitsumfeld danken. Ich habe die Zeit in Labor und Büro immer sehr genossen. Dies lag sicher auch an meinen tollen Doktorschwestern, Doris Maugg, Susanne Huber, Sophie Drexler, Linda Kinzel, Corina Penterling, Anne Dietz und natürlich unserem immer hilfsbereiten Post-Doc Guido Drexler. Vielen, vielen Dank Dir Anna für die Chance diese ganzen Jahre Teil dieser tollen Arbeitsgruppe gewesen zu sein und vielen Dank an euch alle, dass ihr diese Zeit so besonders produktiv, aber vor allem auch so schön gemacht habt. Unsere sommerlichen Eis-Sessions werde ich nie vergessen!

Bei dieser Gelegenheit möchte ich natürlich auch unseren netten Kollegen aus der Physik, allen voran Dr. Christoph Greubel, Dr. Volker Hable und Prof. Dr. Günther Dollinger für den konstruktiven Austausch zwischen Physik und Biologie und der tatkräftigen Unterstützung am Teilchenbeschleuniger danken!

Des Weiteren hat meine Familie einen nicht unerheblichen Anteil geleistet. Vielen Dank Oma und Opa sowie Mama und Papa für eure jahrelange mentale sowie finanzielle Unterstützung. Danke, dass ich diesen Weg gehen durfte und ihr mir immer geholfen habt wo Hilfe nötig war! Vielen Dank Robert für Deine Liebe, Deine Geduld und auch Dein Antreiben und Aufbauen wenn ich das Gefühl hatte nicht weiter zu kommen oder nie fertig zu werden. Danke auch für unseren wunderbaren Sohn Nero und unsere Tochter Julia. Sie haben zwar mein Leben gehörig auf den Kopf gestellt und auch die Abgabe dieser Dissertation um zwei Jahre verzögert, aber jeder Tag mit ihnen zeigt mir, dass es die richtige Entscheidung war.

Last but not Least möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Heinrich Leonhardt bedanken, dass Sie sich bereit erklärt haben als Zweitgutachter zu fungieren!

