

Schlussbericht (gemäß Nr. 5.a.2 A/BNBest-P/BMU)

Zuwendungsempfänger: Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg	Förderkennzeichen: SR/StSch/INT 3610S30015
Vorhabenbezeichnung: 3D/4D Architektur von chromosomalen Bruchpunktregionen in Zellkernen nach Bestrahlung von Krebs- und nicht-Krebszellen	
Laufzeit des Vorhabens: 01.10.2010 – 30.09.2013	verlängert bis 31.03.2014
Berichtszeitraum: 01.01.2010 – 31.03.2014	

Der nachfolgende Schlussbericht ist der kumulative Bericht der fünf beteiligten Projektpartner:

- Ruprecht-Karls-Universität, Kirchhoff-Institut für Physik, Heidelberg
- Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität, Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, München
- Universität der Bundeswehr, Angewandte Physik und Messtechnik, München
- Technische Universität, Fachbereich Zoologie, Strahlenbiologie und DNA Reparatur, Darmstadt
- Helmholtz Zentrum München, Institut für Strahlenschutz, Neuherberg

Einzelne Kapitel werden zusammenfassend dargestellt; hinsichtlich der Ergebnisse werden die Kapitel nach Partner aufgeteilt.

I. Kurze Darstellung zu

1. Aufgabenstellung

Eine Herausforderung in der medizinischen Strahlenbiologie stellt die Entwicklung von effektiven Analysemethoden zur korrekten Beschreibung der Entstehung onkogener, chromosomaler Aberrationen (z.B. Translokationen) dar, um somit präventive Behandlungsmethoden zu entwickeln. Die ersten Ereignisse in der Bildung verschiedener strahleninduzierter Aberrationen treten im Zusammenhang mit charakteristischen Veränderungen der räumlichen Chromosomenorganisation und deren 3D-Struktur in Kernen somatischer Zellen auf. Daher ist es das Ziel des Projektes, die strukturellen und biologischen Mechanismen, die hinter diesen charakteristischen Veränderungen liegen, besser zu verstehen und zusätzliche diagnostische Verfahren für Strahlensensitivität und Strahlentherapiekontrolle zu entwickeln, die darauf beruhen, Parameter der chromosomalen Organisation und Struktur zu berücksichtigen.

Anordnung, Position und Morphologie von Chromosomenterritorien (CT) sind in der Interphase nicht zufällig und von prinzipieller Bedeutung für das Ergebnis chromosomaler Instabilitäten. Die Genomarchitektur liefert einen übergeordneten strukturellen Kontext zum Verständnis molekularer Krankheitsursachen. Obwohl verschiedene Ergebnisse die räumliche Nähe kanonischer Translokationspartner auf der Ebene ganzer Chromosomen bestätigen, war es aufgrund der beschränkten optischen Auflösung mit 3D Fluoreszenz-Mikroskopieverfahren nicht möglich, Substrukturen zu analysieren. In diesem Verbundprojekt sollen daher neue Verfahren der hochauflösenden optischen Mikroskopie, insbesondere Lokalisationsmikroskopie, angewendet werden, womit die 3D Detektion einzelner Moleküle und Molekülkomplexe möglich wird, so dass Konformationsänderungen von Chromatin im Auflösungsbereich von wenigen 10 nm sichtbar gemacht werden sollen.

Dekondensation von Chromatin tritt nach Exposition von Zellen mit ionisierender Strahlung und resultierenden Chromatinbrüchen auf, was nahelegt, dass Dekondensation und erneute Kondensation ein allgemein notwendiger Mechanismus im Rahmen der DNA Reparatur ist. Die neuen biologischen und mikroskopischen Techniken, die hier zusammen mit Computersimulationen angewendet werden sollen, bieten erstmals einen direkten mikroskopischen Zugang zur Erforschung der Doppelstrangschäden. Beispielsweise könnte die Markierung der Histone in Nukleosomen zusammen mit molekularer Lokalisationsmikroskopie eine direkte Antwort auf Fragen der lokalen Kondensation und Dekondensation geben. Darüber hinaus kann mittels hochauflösender Mikroskopieverfahren die innere Struktur von Reparaturfoci und ihre Dynamik während der Reparatur analysiert werden.

Die hier vorgesehenen Untersuchungen sollen neue lichtmikroskopische Einblicke in intakte Zellkerne geben, um räumliche Interaktionen auf einer molekularen Größenskala besser zu verstehen.

Für eine mechanistische Einschätzung des primären Strahlenschadens, seiner möglichen Reparatur und der Weiterentwicklung verbleibender Veränderungen in somatischen Zellen als potentielle Beiträge zu Tumorerkrankungen werden detailliert die zeitliche und räumliche Entwicklung kritischer Läsionen und Reparaturkomplexe aus direkter und indirekter Wechselwirkung ionisierender Strahlung mit Säugerzellen analysiert und simuliert.

In den einzelnen Arbeitspaketen werden verschiedene Schritte zur Erforschung und zu einem besseren Verständnis des Verhaltens von Bruchpunktregionen in Abhängigkeit des Genomlokus, der Chromatinfaltung, der beteiligten Reparaturproteine, der Strahlenqualität und der räumlichen und zeitlichen Reparatureffizienz bearbeitet und im Hinblick auf eine Verbesserung einer effizienten Prognose gesundheitlicher Konsequenzen aufgrund von entsprechender Strahlenexposition systematisch analysiert und in prognostische Modelle implementiert.

2. Voraussetzungen unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Der Projektantrag wurde 2008 vorgelegt und dann in aktualisierter Form zum 1.10.2010 bewilligt. Die beteiligten Arbeitsgruppen sind seit vielen Jahren etabliert und verfügen über umfangreiche Expertisen auf dem Gebiet der biologischen Strahlenforschung.

Zu Beginn des Projektes standen neben der üblichen für Laborarbeiten notwendigen Infrastruktur und Bestrahlungseinheiten (Röntgen-, γ -Strahlung) insbesondere die SNAKE Mikrobestrahlungsanlage (Ionenbestrahlung) mit angeschlossener Lebendzellmikroskopieeinheit an der Universität der Bundeswehr, verschiedene Ausführungsformen der SPDM-Lokalisationsmikroskope am Kirchhoff-Institut der Universität Heidelberg und das biophysikalische Simulationsmodell PARTRAC am Helmholtz-Zentrum München zur Verfügung. Im Laufe des Projektes konnte die hochauflösende Mikroskopie noch durch die Beschaffung eines STED-Mikroskops an der Universität der Bundeswehr verstärkt werden.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Vorhaben wurde in enger Zusammenarbeit der beteiligten Arbeitsgruppen durchgeführt. Die Aufgabenteilung erfolgte gemäß Antrag:

Ruprecht-Karls-Universität, Kirchhoff-Institut für Physik, Heidelberg:

Simulationen: Das 1Mbp-SCD Modell wird durch ein bandenabhängiges Volumenmaß erweitert, welches die unterschiedliche Packungsdichte der DNA in Hetero- und Euchromatin repräsentiert. Dabei werden die Volumina der 1-Mbp Domänen anhand der H4K40me1 Häufigkeit variiert. Da sich verschiedene Sequenzierungsläufe nicht absolut mit einander vergleichen lassen, werden relative Häufigkeitsunterschiede verglichen.

Experimente:

Im Hochdosisbereich (> 10 Gy) werden Dynamiken von Chromosomenterritorien während der Reparatur untersucht. Homologe und nicht-homologe Assoziationen sollen im Hinblick auf die Bildung von Translokationen und komplexen Reparatur Ergebnissen analysiert werden.

Zur Untersuchung auf der nanoskaligen Strukturebene soll die hochauflösende Lokalisationsmikroskopie weiter entwickelt und eingesetzt werden, um die Veränderungen von Nukleosomenverteilungen in Zellkernen und die räumliche Struktur von Bruchpunkregionen vor und nach Strahlenexposition zu untersuchen. Die Arbeiten konzentrieren sich auf Analysen von strukturellen Veränderungen im Gesamt-, Eu- und Heterochromatin vor und nach γ -Bestrahlung. Verpackungsänderungen in Abhängigkeit von der Reparaturzeit werden statistisch analysiert und systematisch verglichen.

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität, Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, München

Zur Herstellung von Zelllinien wurden Expressionsvektoren mittels Standardmethoden generiert und durch Transfektion in Ziel-Zelllinien eingebracht. Nach mehrwöchiger Antibiotikaselektion wurden Einzelzellklone stabil transfizierter Linien isoliert und hinsichtlich Expression und Wachstumsverhalten charakterisiert. Für Herunterregulation von Kandidatengenen wurden kommerziell erhältliche siRNAs bzw. siRNA-Kombinationen benutzt. Im Allgemeinen wurden Experimente 72 h nach Transfektion der siRNA durchgeführt. Scrambled Kontroll-siRNA wurde in Kontrollzellen transfiziert. Analysen von Focicharakteristika an fixierten Zellen wurden gewöhnlich nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen (55 MeV) an SNAKE in 8° Winkel durchgeführt, so dass die Foci entlang des Tracks bei der nachfolgenden Mikroskopie in xy-Richtung sichtbar sind. Dafür wurden die Zellen auf Deckgläsern oder auf Mylar- bzw. Polypropylenfolie gezogen. Immunfluoreszenzreaktionen für Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie erfolgten mittels Standardmethoden mit kommerziell erhältlichen Antikörpern.

Immunfluoreszenzreaktionen für hochauflösende Mikroskopie erfolgten mit spezifischen geeigneten Antikörpern. Für Lebendzellbeobachtungen wurden die Zellen in speziellen Behältern auf Szintillatorfolien kultiviert. Die Bestrahlung an SNAKE erfolgte mit Kohlenstoffionen im rechten Winkel zur Zellschicht, in vorgegebenen Mustern. Für die Beobachtung wurden Zeitserien mit der Fragestellung angepassten Intervallen durchgeführt.

Universität der Bundeswehr, Angewandte Physik und Messtechnik, München

Bestrahlung von Zellen mit 20 MeV Protonen (LET: 2,6 keV/μm) und 55 MeV Kohlenstoffionen (LET: 304 keV/μm) am Rasterionenmikroskop SNAKE. Die Bestrahlungen fanden entweder mit der Strahlrichtung senkrecht zur Zellebene statt, so dass die Ionenspuren entlang der optischen Achse bei der nachfolgenden Fluoreszenzmikroskopie ausgerichtet waren, oder die Zellkulturen wurden unter flachem Winkel zur Oberfläche bestrahlt („Schrägbestrahlung“). Die Bestrahlungsgeometrie senkrecht zur Bestrahlungsrichtung wird verwendet, um gezielt Zellbereiche zu bestrahlen, bestimmte Bestrahlungsmuster zu erzielen, oder die Möglichkeit einer in situ optischen Fluoreszenzmikroskopie vor, während und nach der Bestrahlung zu ermöglichen. Unter dieser Bestrahlungsgeometrie wurden die Arbeiten zur Rekrutierungskinetik unterschiedlicher Reparaturfaktoren und zur Dynamik von strahlungsinduzierten Foci verwendet. Die Schrägbestrahlungen wurden verwendet, um höchstauflösende Mikroskopie an ionenstrahlinduzierten Foci durchzuführen, sodass insbesondere die Spuren von Kohlenstoffionen nahezu komplett in der Fokalebene beobachtet werden können. In Zusammenarbeit mit der Ludwigs Maximilians Universität München und der Universität Heidelberg wurden Protokolle zur Zellkultivierung, Ionenbestrahlung an SNAKE und höchstauflösender Mikroskopie mit Lokalisationsmikroskopie-Methoden entwickelt und durchgeführt. Außerdem wurde im Projektzeitraum ein STED-Mikroskop an der Universität der Bundeswehr beschafft, mit dem Zweifarben-Mikroskopie mit sub-100 nm Auflösung möglich ist.

Technische Universität, Fachbereich Zoologie, Strahlenbiologie und DNA Reparatur, Darmstadt

CtIP ist in der G2-Phase für die Anresection von DSBs, die mit einer langsamen Kinetik repariert werden, verantwortlich. In vorläufigen Studien konnte gezeigt werden, dass CtIP auch in der langsamen Reparatur in der G1-Phase essentiell ist. Die langsame Komponente soll daher anhand von DSB-Reparaturkinetiken in siRNA-behandelten Zellen mit immunfluoreszenz-mikroskopischer Analyse genauer untersucht werden. Um den Einfluss der Regulation der Resektionsaktivität von CtIP zu untersuchen, sollen zunächst Mutantenkonstrukte von CtIP, in denen verschiedene Phosphorylierungsstellen in eine Phosphomutante bzw. Phosphomimikmutanten umgewandelt werden, hergestellt werden. Anschließend sollen diese Konstrukte in CtIP-depletierte Zellen transfiziert werden und die DSB-Reparatur anhand von immunfluoreszenz-mikroskopischer Analyse untersucht werden.

Ein Einfluss von CtIP bei der langsamen Reparaturkomponente in der G1-Phase, lässt vermuten, dass diese DSBs in der G1-Phase anresectiert werden und über einen End-Joining-Weg (vermutlich Microhomology-mediated end-joining, MMEJ) repariert werden. Dieser Reparaturweg ist häufig mit Fehlreparatur verbunden, daher soll in der G1-Phase auf chromosomaler Ebene die Fehlreparatur anhand von Translokationen in Abhängigkeit von CtIP untersucht werden. Dazu soll zunächst eine Kombination aus vorzeitiger Chromosomenkondensation (PCC) und „Fluorescence in situ hybridization“ (FISH) etabliert werden. Anschließend soll mit dieser Methode der Einfluss von CtIP auf die fehlerhafte Reparatur untersucht werden, in dem in Fibroblasten CtIP mit siRNA ausgeschaltet wird und nach Bestrahlung die Translokationen in diesen Zellen im Vergleich zum Wildtyp analysiert werden.

Helmholtz Zentrum München, Institut für Strahlenschutz, München

Die Aufgaben am Helmholtz Zentrum München betrafen die Weiterentwicklung und den Einsatz des Programmpakets PARTRAC für Simulationsrechnungen von Strahlenwirkungen an der DNA im Zellkern. Konkret ging es darum, das DNA- und Chromatinmodell in PARTRAC um eine Strukturebene für hetero- und euchromatische Bereiche im Zellkern zu erweitern, das DNA-

Reparaturmodell zu einem Modell für Chromosomenaberrationen fortzuentwickeln, ein Modell für γ -H2AX-Foci auf dieser Basis zu entwerfen und biologische Wirkungen für unterschiedliche Strahlenqualitäten anhand dieser verbesserten Modelle zu berechnen.

Während des Vorhabens wurde in ca. halbjährigen Abständen jeweils ein ganztätiges Arbeitstreffen durchgeführt, um die bis dahin erzielten Ergebnisse zu diskutieren und das weitere Vorgehen zu koordinieren.

4. Wissenschaftlichem und technischem Stand, an den angeknüpft wurde, insbesondere

a. Angaben bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens genutzt wurden.

Bei den oben genannten Techniken der SNAKE-Mikrobestrahlungsapparatur und SPDM handelt es sich um Eigenentwicklungen der jeweiligen Institutionen. Die Patente hierzu wurden beantragt bzw. erteilt. Im Rahmen des Projektes musste auf keine weiteren Schutzrechte zurückgegriffen werden.

b. Angabe von verwendeter Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste

Über die Bibliotheken der beteiligten Institutionen konnte auf alle relevante Fachliteratur zurückgegriffen werden. Nicht direkt zugängliche Artikel konnten über die jeweiligen Einrichtungen zur Fernleihe beschafft werden. Wichtige Literaturzitate werden in Abschnitt II im Zusammenhang mit den erzielten Ergebnissen aufgelistet.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Im Laufe des Projektes konnten bestehende Kooperationen außerhalb des Verbundes weiter vertieft werden bzw. neue Kooperationen etabliert werden. Im Einzelnen handelt es sich dabei um:

- Prof. Dr. Harry Scherthan, Institut für Radiobiologie der Bundeswehr, München, an der Universität Ulm (Untersuchungen zur Dynamik von Chromosomenterritorien)
- Prof. Dr. Udo Keschull, Forschungsgruppe Infrastruktur und Rechnersysteme in der Informationsverarbeitung, Universität Frankfurt (Beschleunigung der SPDM Datenverarbeitung)
- Prof. Dr. Dieter W. Heermann, Institut für Theoretische Physik, Universität Heidelberg (Simulationsgestützte SPDM Bildverarbeitung)
- Dr. Jekatarina Erenpreisa, Biomedical Research and Study Center, Riga, Latvia (Untersuchungen zur Dynamik von Chromosomenterritorien)
- Prof. Dr. Frederik Wenz, Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Universitätsmedizin Mannheim (Klinische Anwendung der Ergebnisse)
- Prof. Dr. Marlon Velkvijk, Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Universitätsmedizin Mannheim (Bestrahlung und Etablierung von Nanogoldinkorporation)
- Dr. Martin Falk, Institute for Biophysics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno (Untersuchungen zur Genomarchitektur)
- Dr. Rainer Stotzka, Karlsruhe Institute of Technology, Karlsruhe (Large Scale Data Processing)
- Dr. Thomas Schmid, Klinikum rechts der Isar der TU München (Optimierte Durchführung von Experimenten an SNAKE)

II. Eingehende Darstellung

1. Des erzielten Ergebnisses

Ruprecht-Karls-Universität, Kirchhoff-Institut für Physik, Heidelberg

a) Simulationen zu Zellkernen und Hetero-/Euchromatin:

In diesem Arbeitspaket wurden Einflüsse von Heterochromatin und Euchromatin in Zellkernen von Krebszellen und normalen Zellen mittels Computersimulationen beschrieben. Dazu wurde das 1-Mbp Spherical Chromatin Domain (SCD) Modell um die Möglichkeit erweitert, jeder Domäne ein individuelles Volumen zuzuordnen. Abbildung 1.1 zeigt eine Zeitserie, über sechs Sekunden, eines mit Brownscher Dynamik simulierten menschlichen Zellkerns (männlich; 46, XY). Der Radius der Domänen ist dabei zufällig zwischen 235 und 265 nm um einen Mittelwert von 250 nm verteilt.

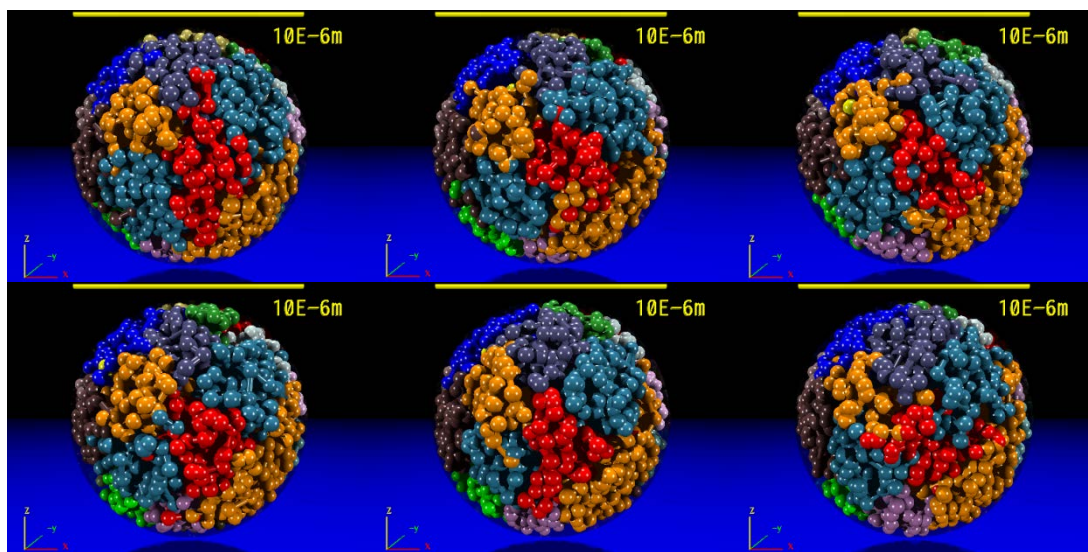


Abb. 1.1: Zeitserie eines mit brownischer Dynamik simulierten menschlichen Zellkerns. Es sind die Zeitschritte 0; 1,2; 2,4; 3,6; 4,8 und 6 Sekunden dargestellt. Jedes Chromosom ist mit einer anderen Farbe eingefärbt, die Größe der Domänen ist zufällig +/- 15 nm um den mittleren Radius von 250 nm verteilt.

Zunächst wurden zum Vergleich mit anderen Verteilungen Simulationen von Zellkernen mit zufällig verteilten und ohne Volumenvariationen in den Domänengrößen durchgeführt. Diese wurden zur Bestimmung des Einflusses des Bandenmusters auf die Dynamik im Zellkern benötigt. Diese und alle weiteren Ergebnisse der Simulationen wurden an W. Friedland (Helmholtz-Zentrum München) weitergegeben um dort in PATRAC weiter verwendet zu werden.

Die Struktur innerhalb der 1-MBp Domänen hat einen großen Einfluss auf die Wechselwirkung zwischen Domänen. Um ein besseres Verständnis der Strukturen zu bekommen, wurden Monte Carlo Simulationen auf Nukleosomen-Ebene durchgeführt, die den möglichen Konfigurationsraum sampeln. Die Basiselemente dieser Simulation sind das Nukleosom und die zwischen den Nukleosomen vorhandene Linker-DNA. In der Simulation werden Torsions-, Biege- und Streckpotentiale berücksichtigt, die elektrostatische Abstoßung der DNA und Wechselwirkungen zwischen Nukleosomen sind integriert (Kepper et al., 2008; Stehr et al., 2008). Abbildung 1.2 zeigt eine Beispielkonfiguration von 1000 Nukleosomen mit jeweils einer Nucleosome Repeat Length (NRL) von 189 bp. Diese Arbeiten konnten im Rahmen dieses Projektes nicht abgeschlossen werden, da die Rechenzeiten zu lang wurden, jedoch sind wichtige Teilergebnisse wie Dichteverteilungen in die geplanten 1-MBp SCD Simulationen mit eingeflossen.

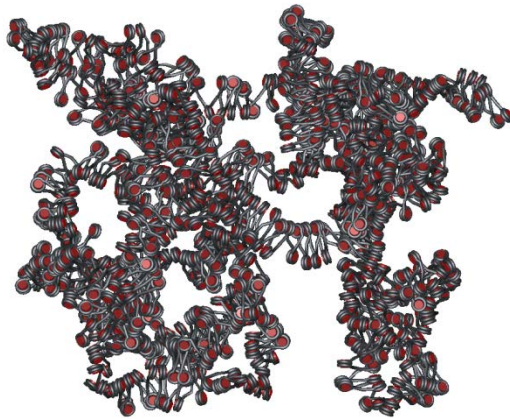


Abb. 1.2: Relaxierte Beispielkonfiguration von 1000 Nucleosomen mit regelmäßigem Abstand von 189 bp. Die Nucleosomen sind in einer Zick-Zack Geometrie angeordnet, die von der Tetranucleosom Kristallstruktur (Schalch et al., 2005) abgeleitet wurde.

Zum Vergleich zwischen einer Tumorzelllinie und einer gesunden Zelllinie wurden die Datensätze von Lungenfibroblasten (NHLF), die keine Tumorzellen darstellen, mit der Krebszelllinie A549, einer Linie von Epithelzellen von Lungenkrebsgewebe, für das SCD Modell aufbereitet. Dazu wurden für jede Domäne des 1-Mbp SCD Modells eines menschlichen Zellkerns der Gehalt von Hetero- und Euchromatin auf Basis des H4K20me1 Markers festgelegt. Die H4K20 Einfach-Methylierung dient hier als Marker für Heterochromatin.

Ein ungefähres Verhältnis der Konzentration von ca. 1 zu 2 für Eu- zu Heterochromatin konnte aus den Monte Carlo Simulationen abgeschätzt werden. Diese Ergebnisse stimmen mit Abschätzungen aus Nucleosomen-Dichteverteilungen überein. Aus diesem Grund wurde das Volumen der 1-Mbp Domänen an Hand der H4K40me1 Häufigkeit variiert. Da sich die Absolutwerte verschiedener Sequenzierungsläufe nur schwer vergleichen lassen, wurden nur relative Häufigkeitsunterschiede betrachtet.

Neben den Verteilungen von A549 und NHLF wurde noch eine zufällige Größenverteilung der Domänen zum Vergleich erzeugt. Alle Zellkerne weisen sehr ähnliche Anfangspositionen der Domänen auf, um alleine den Effekt der unterschiedlichen Verteilung von Eu- und Heterochromatin durch Variation der Domänengröße zu erhalten. Abbildung 1.1 zeigt einen Zellkern mit einer NHLF Verteilung über den simulierten Zeitraum von 6 Sekunden.

Alle getestete Parameter weisen keinen signifikanten Unterschied zwischen der Krebszellkonfiguration, der nicht Krebszellkonfiguration und der zufälligen Verteilung auf. Wir vermuten, dass die räumliche Anordnung der Chromosomen sich zwischen Krebszellen und nicht Krebszellen unterscheidet und einen stärkeren Einfluss hat. Leider sind uns bis jetzt noch keine Datensätze, z.B. aus **3C** Experimenten oder der höchstaflösenden Mikroskopie, für diese Zelllinien bekannt, die eine ausreichend hohe räumliche Auflösung besitzen, als dass wir diesen Parameter in unser Modell mit einfließen lassen könnten. Außerdem wurde bislang nur die Heterochromatinverteilung berücksichtigt, die Verteilung des Euchromatin könnte weiteren verstärkenden Einfluss auf mögliche Effekte in der Dynamik der Domänen und Chromosomenterritorien haben.

b) Experimente Hochdosis: Induktion von Endopolyploidisierung, Analyse der Chromosomenterritorien über 7 Tage Reparaturverlauf (Schwarz-Finsterle et al., 2013)

Nach Exposition mit hohen Dosen ionisierender Strahlung (typisch 10 Gy) können Tumorzellen über den Umweg der Endopolyploidie der Apoptose entgehen. Diese Strategie führt im allgemeinen jedoch zur mitotischen Katastrophe während der ersten paar Tage nach der Bestrahlung. Allerdings besteht prinzipiell die Möglichkeit, dass einige Zellen der mitotischen Katastrophe entkommen, indem sie durch Polyploidie und Depolyploidie neue, lebensfähige para-diploide Tumorzellen entwickeln. Dieser Vorgang muss jedoch mit chromosomalen Umlagerungen und einer Neuordnung der Architektur des Genoms korrelierten.

Zum besseren Verständnis dieser Konsequenzen einer durch ionisierende Strahlung induzierten Endopolyploidie wurde das Genom und die chromosomale Architektur in Kernen polyplorder p53-defizienter HeLa-Zellen und Sub-Kernen nach der Teilung von bi- oder multikernhaltigen Zellen über einen mehrere Tage dauernden Reparaturvorgang nach der Bestrahlung mit 10 Gy untersucht. Die Chromosomenterritorien (CT) # 1, # 4, # 12 wurden durch FISH markiert und hinsichtlich der Anzahl der Chromosomen, Volumina und räumlichen Verteilung während 7 Tage nach der Bestrahlung analysiert. Die CT wurden zur Auswertung in ein peripheres und ein zentral liegendes Territorium unterteilt. Beide Territorienpositionen, die die potentiell äußerste und innerste Lage aller homologen CT darstellen, und die Volumina der CT wurden mit nicht bestrahlten Kontrollen über den Zeitverlauf verglichen. Vor Beginn der Experimente wurde der Karyotyp der verwendeten HeLa-S3-Zellen bestimmt, um seine hypotriploide Natur zu bestimmen. In Studien > 100 DAPI gefärbten Zellen konnte eine modale Anzahl von 65 Chromosomen pro Zelle beobachtet werden. Die Metaphasenanalyse von 126 Zellen zeigt das Auftreten von zwei Chromosomen 1, zwei Chromosomenarme 1q, zwei Chromosomen 4 und drei Chromosomen 12 pro Metaphase. Ergebnisse aus FISH-Experimenten in Interphasekernen bestätigten die Metaphasenanalysen für Chromosom 1 und 4, jedoch nicht Chromosom 12, in dem nur zwei markierte Chromosomenterritorien beobachtet wurden.

Der Unterschied in den Chromosomenzahlen von Chromosom 12 im Vergleich Meta- und Interphase konnte ggf. auf die enge Nachbarschaft zweier homologer Chromosomen zurückgeführt werden. Für nicht-bestrahlte Zellen bzw. direkt nach Bestrahlung an Tag 2 konnten meist zwei Cluster für Chromosom 12 in der Interphase beobachtet werden. Vergleicht man die Volumenterritorien, zeigt sich, dass in einigen Fällen drei Kopien des Chromosoms 12 vorhanden sind, von denen zwei Homologe eng verbunden sind. Mit der beobachteten Vergrößerung der Kernvolumen an Tag 5 verschiebt sich die mittlere Anzahl von Chromosom 12 auf drei, was wiederum die Ergebnisse der Metaphase-chromosomen-Analyse verifizieren (Abbildung 1.3).

Ein weiteres Kriterium für die Neuorganisation des Genoms nach Exposition von Strahlung und während Reparatur ist die Bestimmung der Absolutpositionen der CT in Abhängigkeit der Verlaufszeit. Statistische Analysen von Aliquots der bestrahlten Kultur nach verschiedenen Tagen nach der Bestrahlung bestätigen, dass alle getesteten CT ihre absolute radiale Position im Zellkern ändern.

Von Tag 2 bis Tag 5 nach der Bestrahlung haben sich die peripheren (PCT) und die zentralen (CCT) CT (# 1, # 4, # 12) in Richtung der Kernperipherie teilweise hoch signifikant im Vergleich zu den nicht behandelten

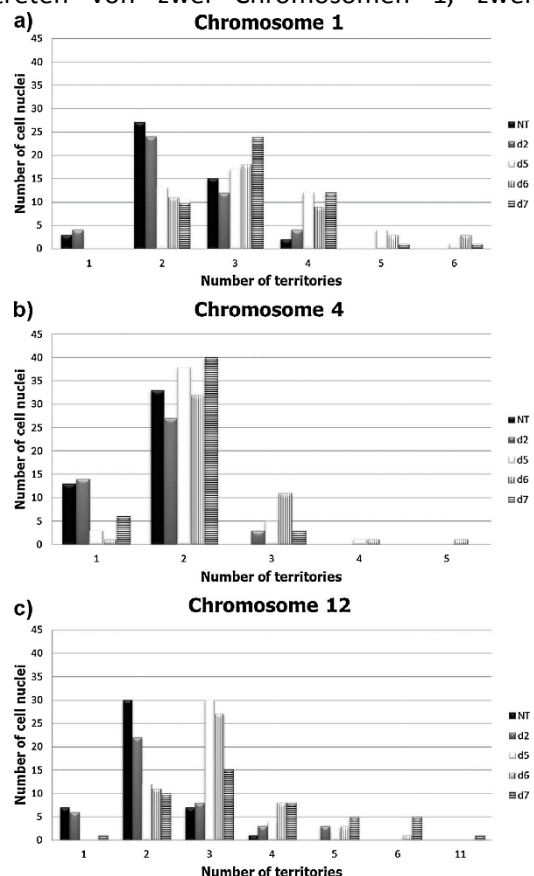


Abb. 1.3: Häufigkeit der Zellkerne gegen Anzahl der automatisch segmentierten markierten Chromosomenterritorien #1 (a), #4 (b), und #12 (c). Die unterschiedlichen Säulen geben die Daten nach den entsprechenden Tagen (2-7) nach der Bestrahlung wieder.

Kontrollen verschoben. Im weiteren Verlauf der Inkubation orientieren sich die CT bezüglich ihrer Lage wieder in Richtung Ausgangsposition (Abbildung 1.4).

Ebenso haben sich von Tag 2 bis Tag 5 nach der Bestrahlung die Volumina der CT # 1, # 4, # 12 um 16 - bis 25-fache erhöht (Abbildung 1.5). Das mittlere Zellkernvolumen von unbehandelten HeLa S3 Zellkerne betrug etwa $500 \mu\text{m}^3$. Nach der Bestrahlung stieg das mittlere Volumen der Zellkerne mit der Zeit an und erreichte am Tag 7 einen achtfachen Volumenanstieg von etwa $4200 \mu\text{m}^3$ (Abbildung 1.6). Die Form der Riesenzellkerne änderte sich im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen erheblich. Die laterale Größe wurde stark reduziert, während die axiale Größe vergrößert war.

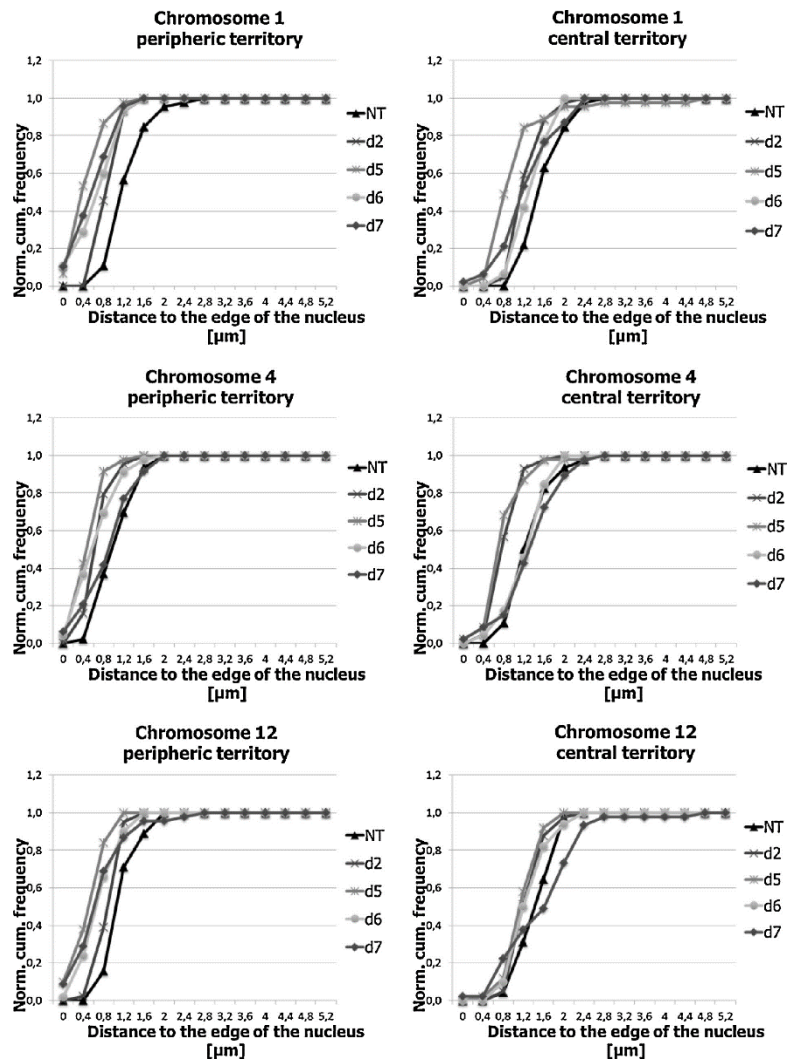


Abb. 1.4: Normalisierte kumulative Häufigkeiten der gemessenen Distanzen (μm) des Schwerpunktes der CT zum Zellkernrand. Dargestellt wird die Position fixierter FISH-markierter CT #1, #4, und #12 in HeLa S3 Zellen vor und nach 10 Gy-Bestrahlung. Zur Auswertung wurden die CT in ein peripheres (pCT) und ein zentral liegendes (cCT) Territorium unterteilt und über die Zeit verglichen. Linke Seite: Verteilung der pCT #1, #4, und #12. Rechte Seite: Verteilung der cCT #1, #4, und #12.

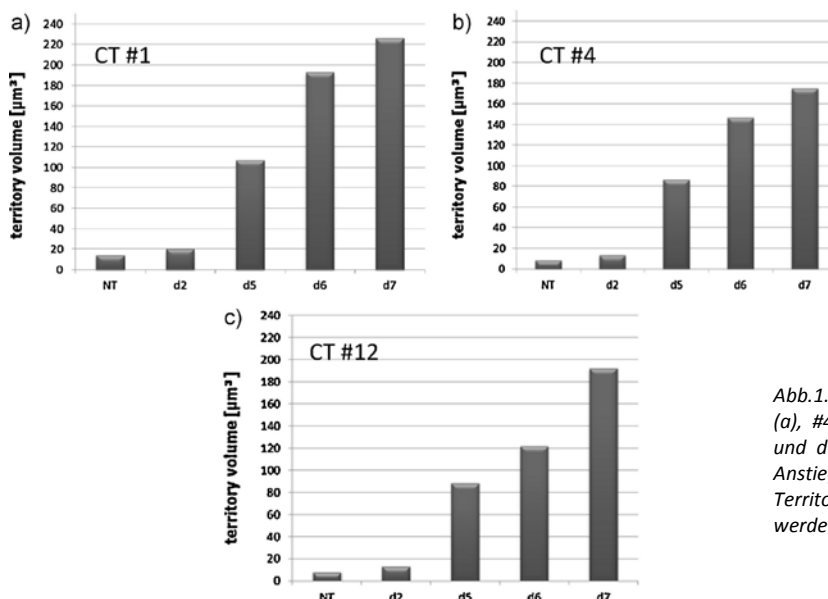


Abb.1.5: Mittleres Volumen der CTs #1 (a), #4 (b), und #12 (c) für NT, d2, d5, d6, und d7 (d-Tag). An Tag 5 konnte ein Anstieg (12- bis 25-fach) des mittleren Territoriumvolumens beobachtet werden.

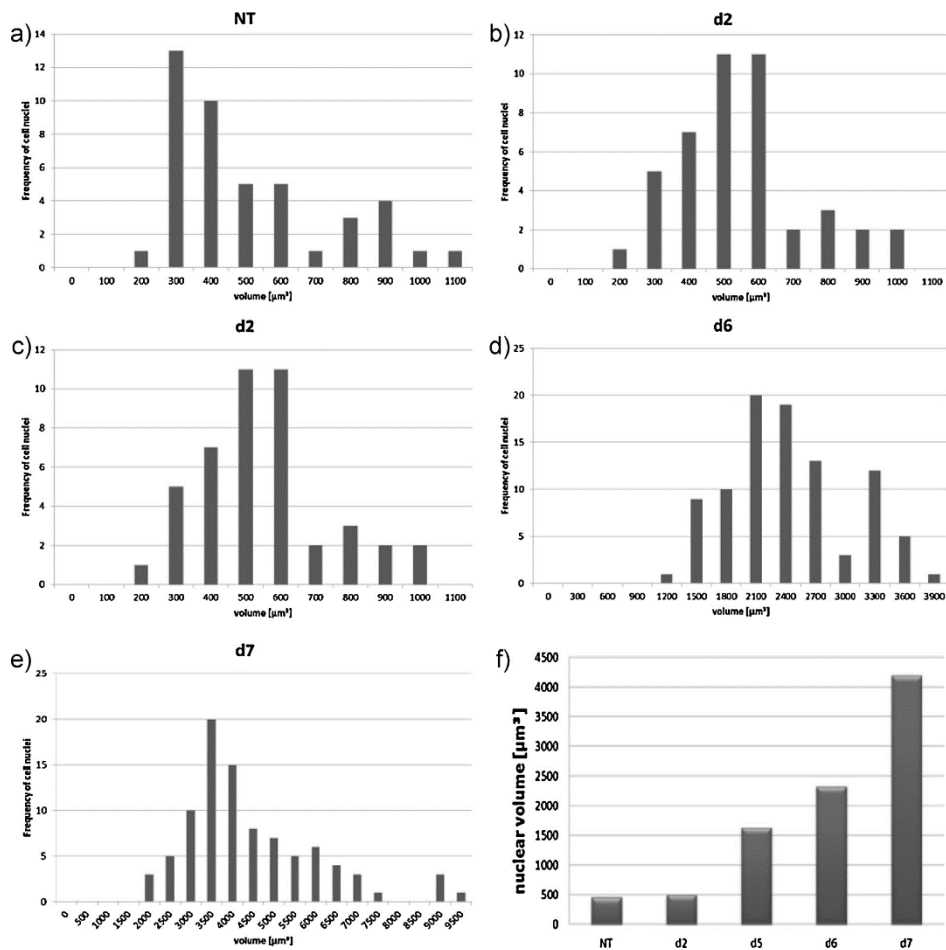


Abb.1.6:
Häufigkeitshistogramme von Kernvolumina für NT (a), d2 (b), d5 (c), d6 (d), d7 (e) {d=Tag}. Die Spalten stellen Volumenwerte in Schritten von $100 \mu\text{m}^3$ (a und b), $300 \mu\text{m}^3$ (c und d), und $500 \mu\text{m}^3$ (e) dar. (f) Durchschnittsvolumen der Zellkerne aus den Werten von a-e. Hinweis: Die Kernvolumina aus d7 beziehen sich nur auf die großen Kerne. Die Modalwerte der Kernvolumina erhöhen sich 3- bis 5-fach am Tag 5.

Neben den Riesenzellen konnten ausschließlich am Tag 7 auch kleinere Zellen mit einem durchschnittlichen Volumen von $255 \mu\text{m}^3$ beobachtet werden. Abbildung 1.7 zeigt ein Beispiel einer asymmetrischen Zellteilung von HeLa-Zellen 7 Tage nach der Bestrahlung. Diese Teilung der Zellen in unterschiedlicher Größe deutet daraufhin, dass durch ionisierende Strahlung in Zellen eine asymmetrische Zellteilung induziert werden kann.

Die Daten der Experimente mit hohen Dosen ionisierender Strahlung zusammen mit 3D-Bildanalyse von Chromosomenpositionen und Architektur in HeLa-Zellen deuten auf eine neue strahleninduzierte Generation von großen intranuklearen Chromosomenterritorien und ihre Neupositionierung hin. Weitere Untersuchungen sollten die Beziehung zwischen den beobachteten Chromosomenbewegungen sowie Volumenänderungen und Depolyploidie und der Produktion von lebensfähigen paraploiden Tochterzellen aufklären.

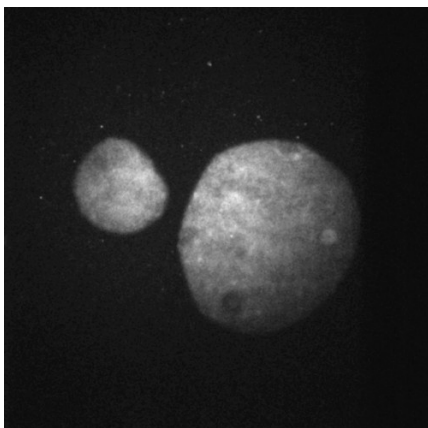


Abb. 1.7: Beispiel einer asymmetrischen Zellteilung an Tag 7 nach Bestrahlung.

c) Instrumentierung für hochauflösende Mikroskopie (Spectral Position Determination Microscopy (SPDM), Structured Illumination Microscopy (SIM))

Für hochauflösende Mikroskopie wurden verschiedene Ausführungsformen der SPDM (Baddeley et al. 2009; Cremer et al. 2011; Gunkel et al. 2009; Lemmer et al. 2008) eingesetzt und an die Anforderungen des Projektes adaptiert. Die Geräte standen auch den übrigen Verbundpartnern zur Verfügung.

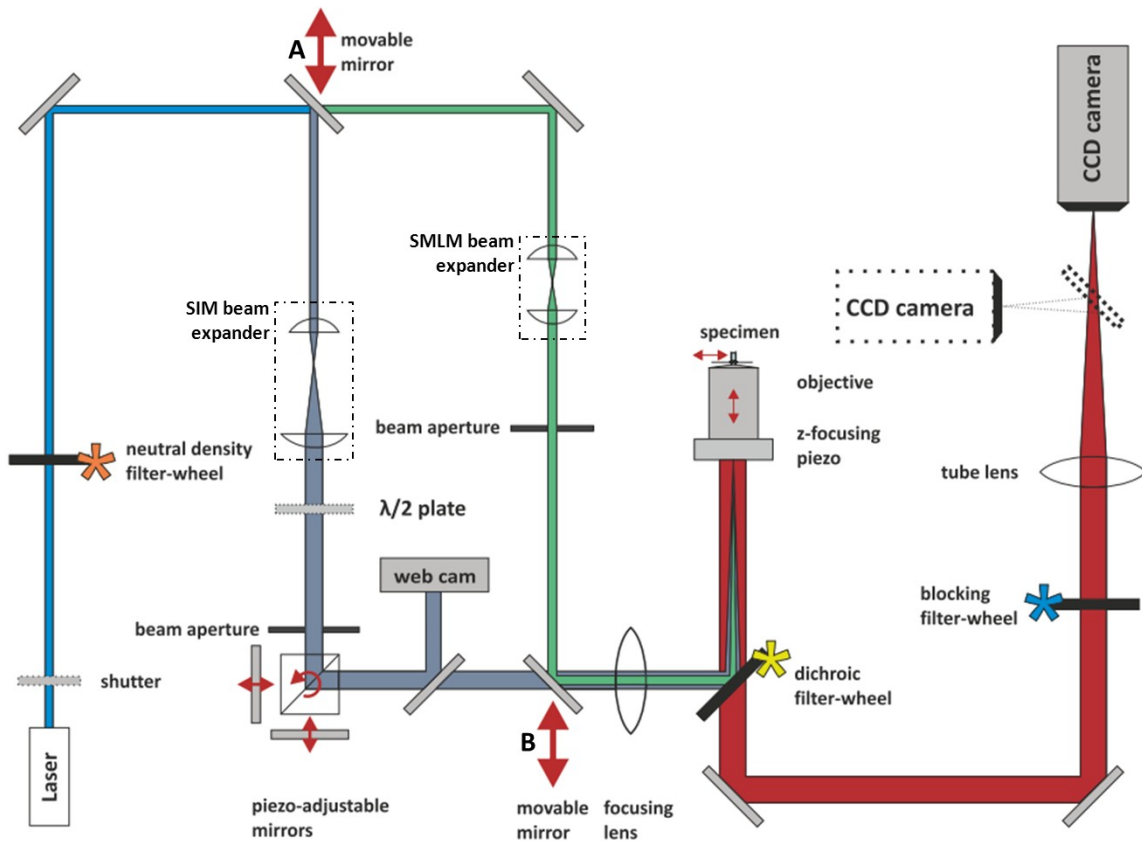


Abb. 1.8: Schemabild des Kombi-Mikroskopenaufbaus. Gegenwärtig kann das Mikroskop mit bis zu fünf Laseranregungswellenlängen gleichzeitig benutzt werden. Diese können einzeln durch ein selbstentwickeltes Shutter-System angesteuert werden. Ein Filterrad mit kontinuierlichem Graufiltergradienten wird benutzt, um die Laserintensität zu regeln. Ein automatisiertes Spiegelsystem (A,B) erlaubt das Umschalten zwischen den beiden Mikroskop-Aufnahmemodi (SPDM, grüner Strahlverlauf; SIM, dunkelblauer Strahlverlauf), abhängig von der jeweiligen Spiegelstellung. Ein vollautomatisiertes Filterrad mit verschiedenen dichroitischen Strahlteilern (gelber Stern) sowie ein automatisiertes Emissionsfilterrad (blauer Stern) zur Unterdrückung von Laserstreulicht auf der Kamera wurden implementiert. Die Tubuslinse sorgt dafür, dass das Fluoreszenzlicht auf die CCD-Kamera mit hoher Quanteneffizienz fokussiert wird. Publiziert in (Rossberger et al. 2013)

Bei dem Verfahren SPDM_{phymod} bedient man sich des reversiblen Fluoreszenzbleichens von herkömmlichen Fluorophoren in Standard-Probenvorbereitungsbedingungen. Hohe Laserintensitäten (Fokus-Intensität von etwa 10 kW/cm²) werden auf die Probe aufgebracht, wodurch ein Transfer der meisten Fluorophore in einen "dunklen" Zustand (d.h. im registrierten Emissionswellenlängenbereich nicht-fluoreszierenden Zustand) erreicht wird. Aus diesem Dunkelzustand kehren stochastisch Fluoreszenzmolekülen in ihren fluoreszierenden Zustand zurück. Ein weiterer, zweiter Laser zum Photoschalten der Fluorophore ist hierbei nicht erforderlich. Die wichtigste Voraussetzung für SPDM ist, dass in jedem aufgenommenen 2D Bild (*frame*) nur eine geringe Anzahl von Fluorophoren in einem "hellen" Zustand ist. Auf diese Art kann die Beugungsgrenze überwunden werden, da die detektierten Signale der einzelnen Fluorophore idealerweise auf dem Detektor nicht überlappen, d.h. sie sind optisch isoliert. Folglich stellt jedes dieser beugungsbegrenzten Signale im Wesentlichen die gemessene Punktspreizfunktion (PSF, identisch zur Impulsantwort) des Mikroskops dar, und die Position der Moleküle lässt sich sehr genau anhand der Mitte / dem Maximum der jeweiligen gemessenen PSF wiedergeben. Die Genauigkeit der Positionsbestimmung ist dabei abhängig von der

Signalstärke, dem Hintergrund- und dem Rauschanteil, sowie Hardwareparametern wie Pixelgröße, Wellenlänge und Numerischer Apertur des Detektionsobjektivs. Theoretisch lässt sich die Position jedes Fluorophors mit 'unbegrenzter Genauigkeit' bestimmen, wenn lediglich die detektierte Photonenzahl hoch genug ist. Dieses Verfahren der Positionsbestimmung wird für mehrere tausend aufgenommene *frames* wiederholt. In jedem *frame* werden unterschiedliche sich im Hell-Zustand befindliche, optisch isolierte Fluorophore erkannt, und deren Positionen extrahiert. Anschließend werden die gesammelten Positionsinformationen zu einem Gesamtbild verrechnet, welches den genauen Positionsangaben Rechnung trägt. Hiermit lässt sich theoretisch eine „unendlich gute“ Auflösung erreichen (Bates et al. 2007; Hess et al. 2006; Rust et al. 2006). In der Praxis hat sich vor allem aufgrund der limitierten Anzahl detektierbarer Photonen eine Auflösung im 10-nm-Bereich als realistisch erwiesen. Handelsübliche Standard-Fluorophore die in diesen Experimenten zum Einsatz kommen können, sind in der Lage, sich mehrmals aus dem reversibel ausgebleichten Zustand in den Fluoreszenzzustand zu erholen, bevor sie irreversibel gebleicht werden.

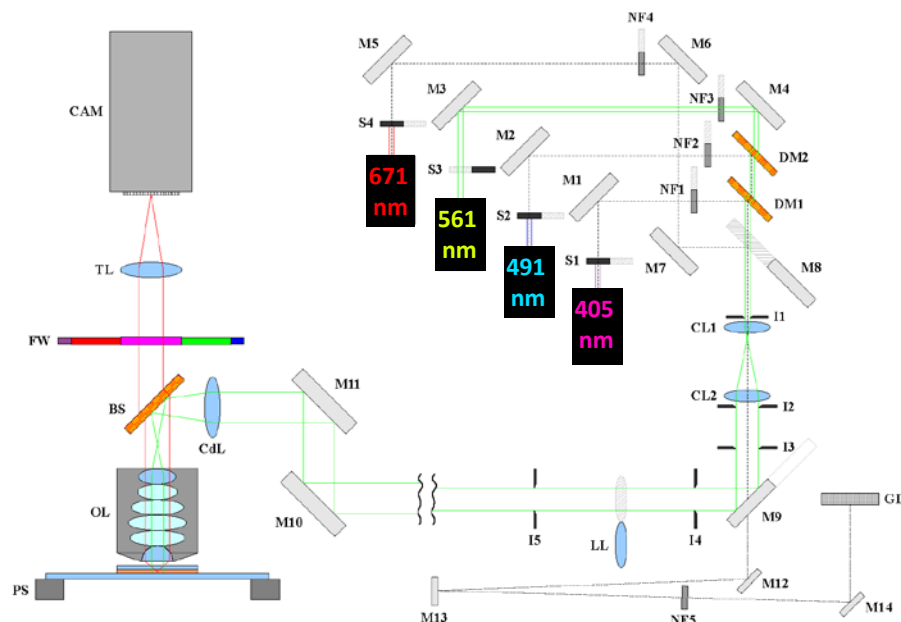


Abb. 1.9: Aufbau des Vertico-SPDM Mikroskops. Es stehen vier unterschiedliche Wellenlängen (405nm, 491nm, 561nm, und 671nm) zur Verfügung. Die Laserstrahlen werden durch einen Kollimator (bestehend aus zwei achromatischen Linsen CL1 mit $f = 30$ mm, CL2 mit $f = 200$ mm) fünfmal aufgeweitet, und treten nach Reflexion an den Spiegeln M1 - M6 in das eigentliche Mikroskop (links) ein. Zuvor werden die Laserstrahlen unter Verwendung von dichroitischen Spiegeln (DM1, DM2) kombiniert. Fünf Irisblenden (I1 - I5) werden während der Strahljustage verwendet. Nach Eintritt ins Mikroskop wird der Strahl durch eine achromatische Linse (CDL, $f = 60$ mm) über den Fluoreszenzstrahlteiler (BS, Quad-Band dichroitischen Spiegel, Chroma) in die hintere Fokusebene eines Objektivs (63x, NA 1.4) fokussiert.

Das aus der Probe emittierte Fluoreszenzlicht passiert zuerst den Fluoreszenzstrahlteiler und dann die auf ein Filterrad (FW) montierten Emissionsfilter. Anschließend wird das Licht durch eine Tubulinse (TL, $f = 200$ mm) auf den CCD-Chip einer hochempfindlichen 12-Bit-Schwarz-Weiß-Kamera (CAM) fokussiert. Im Lokalisierungsmodus wird zum Erreichen hoher Laserbeleuchtungsintensität eine Lokalisationslinse (LL, $f = 500$ mm) in den optischen Pfad eingebracht.

In einem Mikroskopaufbau werden die Vorteile von SPDM mit SIM kombiniert und die beiden Aufnahmemodi einem einzigen Gerät bereitgestellt (Abbildung 1.8). Dies erlaubt die Aufnahme der gleichen Region der Probe an einem Instrument in zwei der derzeit gängigsten supraauflösenden Mikroskopieverfahren. Wesentlicher Bestandteil der Entwicklungen an diesem Kombi-Mikroskop ist unter anderem eine benutzerfreundliche Ansteuerung. In die Steuersoftware können zuvor benutzerdefinierte Einstellungen eingelesen werden, und mehrere zusätzliche vollautomatische und Software-gesteuerte Funktionen ausgeführt werden, die zur Beschleunigung und Vereinfachung des Mikroskopieprozesses entwickelt wurden. Die Details wurden publiziert in (Rossberger et al. 2013).

Der grundlegende optischen Aufbau eines weiteren Systems (Vertico-SPDM Mikroskop) ist in Abbildung 1.9 gezeigt und wurde bereits an anderer Stelle detailliert beschrieben (Reymann et al. 2008). Hier stehen nunmehr vier Laserwellenlängen (405nm, 491nm, 561nm und 671nm) zur Anregung praktisch sämtlicher gängiger Fluorophore bereit.

d) SPDM Messungen zur Konformation von Nukleosomen nach Bestrahlung und während der Reparatur

Wie die Forschungsergebnisse der letzten Jahre gezeigt haben, ist die Anordnung des Genoms im Zellkern nicht willkürlich, sondern folgt festen Regeln, die der Funktionalität des Genoms dienen. Die heterochromatischen Bereiche, insbesondere konstitutives Heterochromatin, enthalten (nicht-kodierendes), inaktives Genmaterial und sind stark kondensiert, d.h. dicht verpackt. Die euchromatischen Bereiche müssen weniger dicht gepackt sein, um transkriptionelle Prozesse zu ermöglichen. Die Dichteveränderungen werden durch die Histone und bestimmte Modifikationen der Histonproteine erreicht. Mit Hilfe von Antikörpern wurden diese speziellen Histonmodifikationen in HeLa-Zellen, bei denen die Nukleosomen durch GFP bzw. YFP nach stabiler Transfektion markiert wurden, sichtbar gemacht.

Aus der Literatur ist bekannt, dass ein Doppelstrangbruch im heterochromatischen Bereich nur am Rand eines solchen Bereichs repariert werden kann. Es finden demnach Konformationsänderungen des Chromatins während der Reparatur statt; allerdings waren keine Aussagen über diese Konformationsänderungen möglich, da die Abstände der Histone kleiner sind als die maximale Auflösung klassischer Lichtmikroskopiemethoden. Dies wird durch die hochauflösende Lokalisationsmikroskopie (SPDM) nun möglich, womit die Bestimmung einzelner Histonpositionen und somit die Analyse der Histonstruktur und ihrer Veränderungen nach Bestrahlung und während der Reparatur von DNA Schäden an dem verwendeten Zellsystem durchgeführt wurde.

Die verwendete Lokalisationsmikroskopie SPDM erreicht die optische Isolation einzelner dicht beieinander liegender Histone durch reversibles Photobleichen, das bei einer ganzen Reihe von Farbstoffen (z.B. Alexa-Farbstoffe) und Fluoreszenzproteinen (z.B. GFP oder YFP) auftritt. Daher mussten die verwendeten Standard-Präparationsmethoden für diese Art der Lokalisationsmikroskopie nicht geändert werden. Bei SPDM werden die Fluorophore zunächst durch hohe Laserintensität reversibel ausgebleicht. Einzelne gebleichte Fluorophore kehren dann in einem stochastisch verteilten Prozess wieder in den fluoreszenten Zustand zurück. Wenn nun über einen gewissen Zeitraum ein Bilderstapel von ca. 1000 bis 3000 Bildern desselben Bildausschnitts aufgenommen wird, so finden sich auf jedem Bild des Stapels einige fluoreszente Fluorophore. Ein Computeralgorithmus fügt diese Bilder zum Lokalisationsbild zusammen und so kann die gewünschte optische Trennung der einzelnen Fluorophore erreicht werden. Die Auflösung betrug wenige 10nm.

Da die bloße Anzahl von Messpunkten bei Zellen von wechselnder Größe und Form nur ein schlechtes Mittel der Quantifizierung ist, wurde ein Auswertalgorithmus, der ursprünglich zur Bestimmung der Clusterbildung von Membranproteinen entwickelt wurde, für diese neue Anwendung abgeändert. Als Referenz wurden Messungen an unbestrahlten Zellen verwendet. Die Versuche zeigten, dass dieser Cluster-Algorithmus ein geeignetes Mittel ist, um Strahlenschäden am Chromatin zu quantifizieren. Der Algorithmus analysiert die Punktmatrizen, die bei der Lokalisationsmikroskopie gewonnen wurden, und sucht entsprechend bestimmter Parameter nach Clustern. Z.B. kann eine Gruppe aus Punkten als Cluster definiert werden, wenn sich um einen Punkt mindestens drei andere in einem Radius von 40nm befinden. Die Messdaten werden außerdem mit einer Zufallsverteilung gleicher Punktdichte verglichen, um auszuschließen, dass die Clusterbildung zufällig ist. Die angegebenen „Random“-Messpunkte können außerdem als eine erste grobe Abschätzung der Ungenauigkeit der Messdaten interpretiert werden.

Erste Versuche wurden zur Histon-H2A-Verteilung und der Verteilung des konstitutiven Heterochromatins nach einer H4K20me3-Antikörper-Markierung durchgeführt. Die Entwicklung des Clusterverhaltens nach Bestrahlung wurde an Aliquots zu verschiedenen Reparaturzeiten untersucht und erzielte die unter Abbildung 1.10 aufgeführten Ergebnisse. Die Ergebnisse konnten später teilweise bestätigt werden. So zeigte sich zunächst, dass Chromatin, d.h. die Nukleosomen, zu 25% in

die Formation von Clustern involviert ist. 30 min nach Bestrahlung konnte ein signifikanter Rückgang festgestellt werden, der nach 48h bei 0,5 Gy Bestrahlungsdosis wieder den Ausgangszustand erreichte. Dagegen konnte bei Euchromatin nur ein geringfügiger Rückgang der Clusterhäufigkeit festgestellt werden, der nach 48 h wieder den Ausgangswert erreichte (Abbildung 1.11).

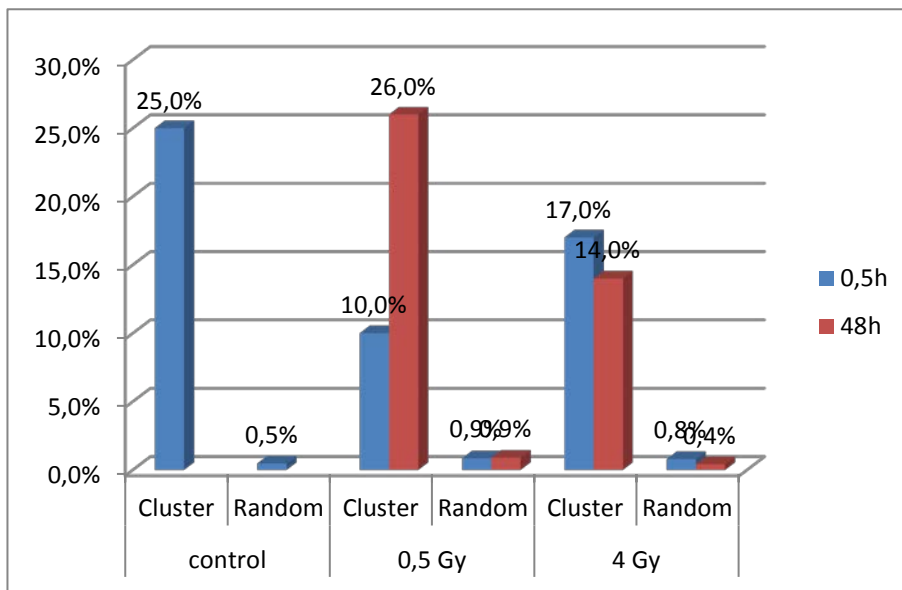


Abb. 2.10: Heterochromatinclusterverhalten (H4K20me3-Färbung). Der Messpunkt bei 0,5Gy entspricht den Erwartungen und wurde durch spätere Messungen bestätigt. Der Messpunkt bei 4Gy basiert auf einer unzureichenden Statistik und konnte nicht hinreichend gut reproduziert werden.

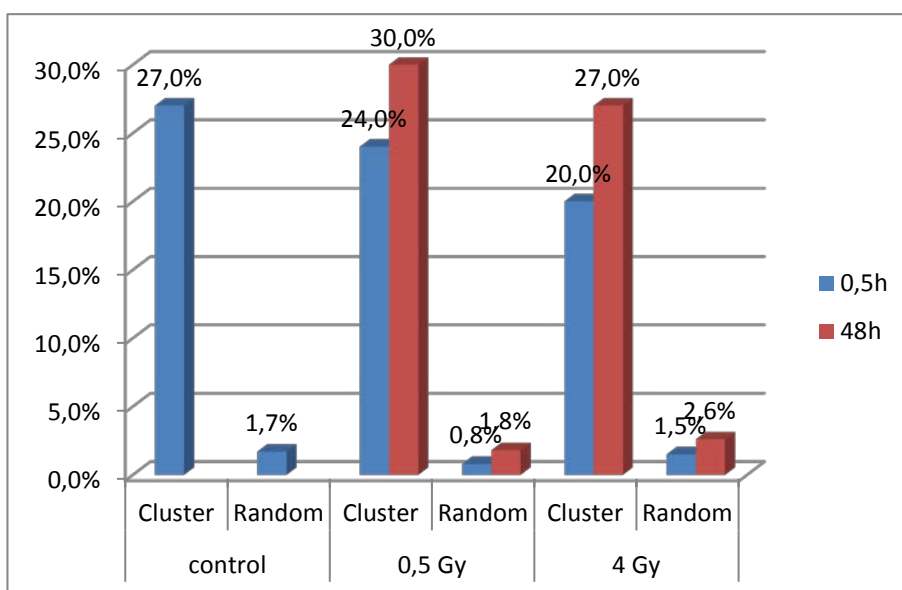


Abb. 1.11: Euchromatinclusterverhalten (H3K4me3-Färbung). Die nur kleineren Veränderungen der Cluster beim Euchromatin wurden durch weitere Daten bestätigt.

Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass sie sich dahingehend interpretieren lassen, dass Heterochromatin zur Reparatur von DNA-Schäden entpackt wird. Arbeiten aus der Gruppe Prof. D.W. Heermann (Institut für Theoretische Physik der Universität Heidelberg) haben gezeigt, dass unter Annahme eines Polymermodells für Chromatin Doppelstrangbrüche bei dicht gepacktem Heterochromatin allein durch entropische Kräfte an den Rand der Heterochromatinbereichs bewegt werden und daher erst dort repariert werden. In Zusammenarbeit mit der Gruppe Heermann wurden daher die SPDM Daten nochmals mittels Algorithmen der statistischen Physik und Graphentheorie ausgewertet. Es wurden Paarkorrelationsfunktionen sowie Längenverteilungen und mittlere Koordinatenzahlen für Graphen nach Triangulation der Markerpositionen bestimmt.

Die Bestimmung der Paarkorrelationsfunktion (siehe auch Bohn et al., 2010) sagt aus, wie stark sich die gemessene Verteilung von einer Verteilung von gleichvielen Punkten unterscheidet, die zufällig in einem gleichgroßen Volumen angeordnet sind. Abbildung 1.12 zeigt das Ergebnis für Heterochromatin und Euchromatin. Die Abweichung von Wert 1 bedeutet, dass bei diesen

Dimensionen Strukturen nicht zufälliger Art vorhanden sind. Je stärker der Wert von 1 abweicht, desto dichter sind die gemessenen Punkte verpackt. Daher können die Ergebnisse dahingehend interpretiert werden, dass Nukleosomen im Chromatin generell bei Dimensionen unter 100 nm nicht mehr zufällig angeordnet sind. Heterochromatin zeigt sowohl bei 0,5 Gy als auch bei 4 Gy Bestrahlung nach 15 min Reparatur einen deutlichen Rückgang der Verpackungsdichte, die nach 48 h wieder zurück in den stärker verpackten Zustand übergeht. Euchromatin zeigt bei 0,5 Gy eher einen umgekehrten Vorgang, d.h. die Entpackung von Heterochromatinbereichen in Euchromatinbereichen könnte dieses Verhalten erklären. Die 4 Gy Daten zeigen durch die höhere Schadenshäufigkeit vermutlich eine Äquilibration des Verhaltens, was in einem scheinbar geringeren Entpacken von Heterochromatin und einem nahezu kaum veränderten Euchromatin resultiert.

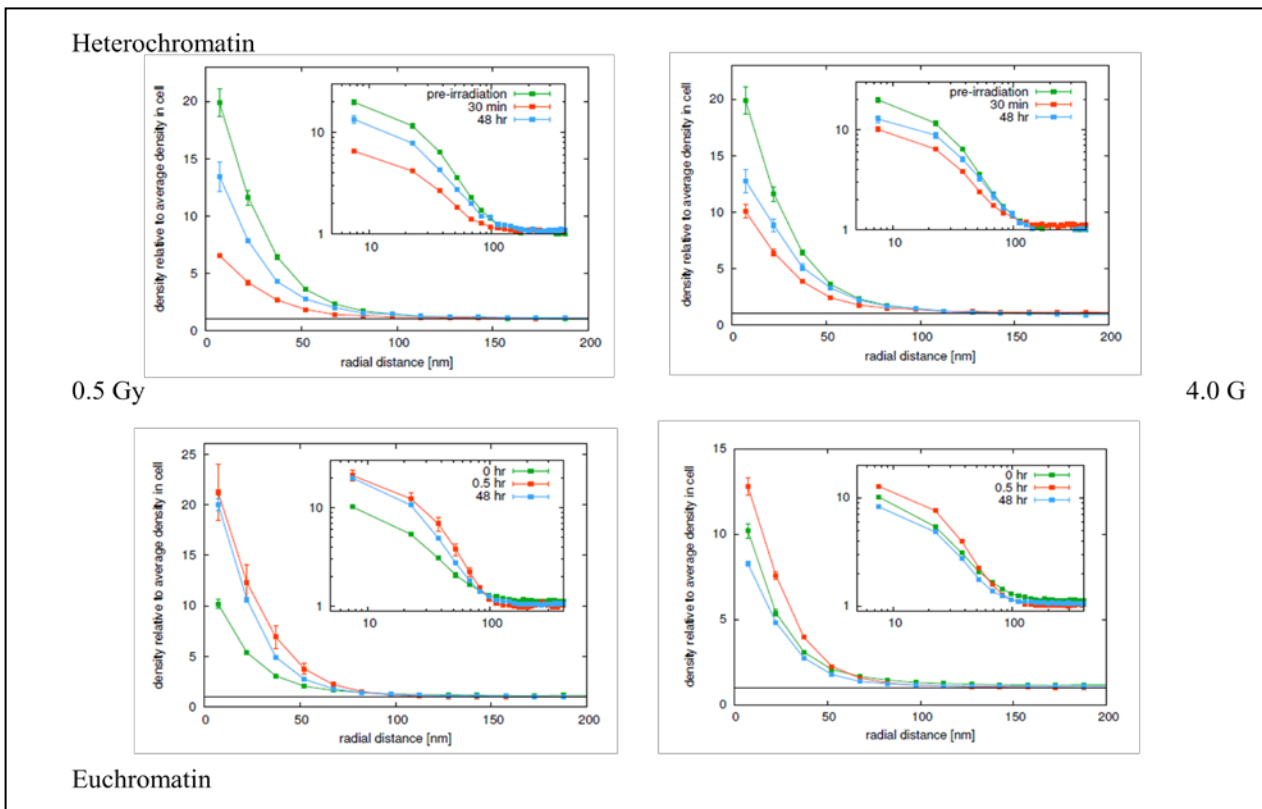


Abb. 1.12: Paarkorrelationsfunktionen für Heterochromatin (oben) und Euchromatin (unten) zu Reparaturzeiten von 30 min (rote Kurven) und 48 h (blaue Kurven) im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle (grüne Kurven) nach Bestrahlung mit Dosen von 0,5 Gy (links) und 4 Gy (rechts). Die Daten zeigen eine signifikante Abweichung von einer zufällig verteilten Punkteschar bei Dimensionen unter 100 nm. Der Ordinatenwert kann als ein Maß für die Verpackungsdichte herangezogen werden.

Unter Berücksichtigung der bereits gewonnen Messdaten und Informationen wurden für weitere systematische Experimente folgende Bestrahlungsintensitäten und Fixierzeitpunkte ausgewählt: 0,5h, 6h und 24h jeweils bei Bestrahlungsintensitäten von 0,5Gy und 3,5Gy

Für die Immunfärbungen wurden Antikörper eingesetzt, die möglichst spezifisch an hetero- und euchromatische Bereiche binden. (Heterochromatin: H3K9me3, Euchromatin H3K36me3)

Diese Ergebnisse weisen ein sehr ähnliches Verhalten, wie die früher gewonnen Daten, auf und zeigen, dass die Daten zumindest hinsichtlich des qualitativen Verhaltens reproduzierbar sind. Die gewonnen Daten sind außerdem der erste Versuch systematisch Hetero- und Euchromatindaten aufzunehmen und dabei den Einfluss aller äußeren Faktoren (Alter der Zellen, Präparationsmethode, zeitliche Dauer zwischen den Messungen usw.) soweit möglich zu minimieren.

Abbildung 1.13 zeigt die relativen Häufigkeiten von gemessenen Punkten für Hetero- und Euchromatin, die zur Formation von Clustern beitragen. Zum Vergleich wird jeweils das Ergebnis einer Zufallsverteilung gezeigt, die aus gleichvielen Punkten in einem gleichgroßen Bildvolumen besteht. Man kann zeigen, dass die Clusterformation von Heterochromatin bei 6 h Reparaturzeit am

geringsten ist und anschließend wieder ansteigt, ebenfalls ein Indiz für Entpackung in der ersten Reparaturphase und erneuter Verpackung nach Abschluss der Reparatur. Euchromatin zeigt bei 6 h ein entgegen gesetztes Verhalten. Die Tendenz von registrierten Punkten (markierten Nukleosomen), Cluster zu bilden, steigt bei 6h Reparatur an, d.h. durch die Verschiebung von Heterochromatin sollten die Euchromatinbereiche enger zusammengeschoben werden.

Zwar sind schon zahlreiche Optimierungen bei der Präparation und den Messungen durchgeführt worden, aber die dennoch vorhandenen Schwankungen bei der Anzahl der Punkte pro Zelle zeigen deutlich, dass ein Computeralgorithmus gefunden werden muss, der diese Schwankungen ausgleicht. Unterschiedliche Größen der Zellen sind keine ausreichende Erklärung für diese Schwankungen. Diese Optimierungen und die damit einhergehende Verkleinerung der Fehlertoleranzbereiche sind eine große Herausforderung für die Zukunft und versprechen faszinierende neue Einblicke in die Chromatinstruktur und ihre Dynamik des Zellkerns.

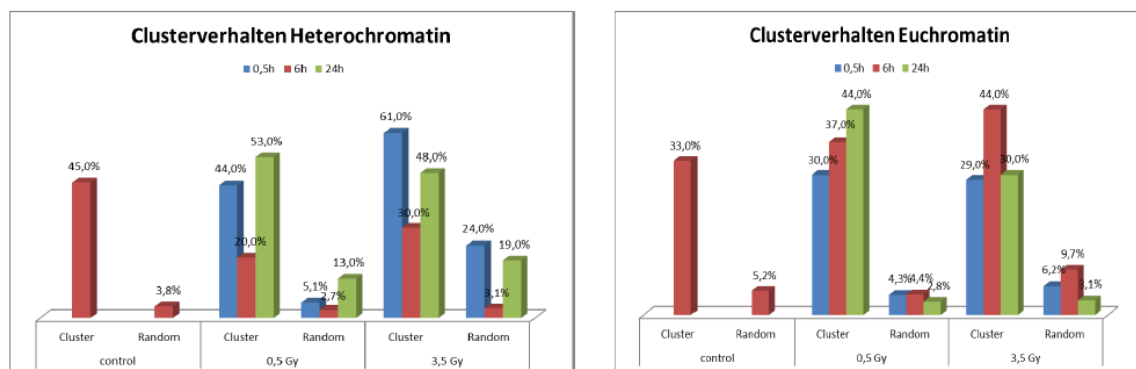


Abb. 1.13: Relative Häufigkeit von Hetero- und Euchromatin-Markierungspunkte, die an der Bildung von Clustern beteiligt sind. Es werden Bestrahlungsexperimente bei 0,5 Gy und 3,5 Gy im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen für verschiedene Reparaturzeiten dargestellt.

e) Experimente zur klinischen Anwendung: Clusterformation von Nukleosomenverteilungen in Abhängigkeit der Strahlenqualität (50kV und 6MV)

Die Analyse von Chromatinstruktur mit Hilfe von Lokalisationsmikroskopie erlaubt eine detaillierte Analyse der Strahlungswirkung und könnte so Auskunft über die Überlebensfähigkeit von Zellen nach Bestrahlung geben.

Erste für medizinische Anwendungen geeignete Daten wurden erbracht, da gezeigt werden konnte, dass unterschiedliche Strahlungsenergien Zellen unterschiedlich stark beeinflussen und deutlich unterschiedliche Strukturveränderungen bewirken. Dies könnte im Rahmen der Strahlentherapie zu Behandlungsoptimierungen und somit zu Verringerungen von Nebenwirkungen führen.

Eine neue Technik in der Strahlentherapie (Intra-Operative Strahlentherapie mittels INTRABEAM™ Vorrichtung (engl. intraoperative radiotherapy - IORT)), die an der Universitätsmedizin Mannheim etabliert wurde, erlaubt eine punktuelle Bestrahlung nahezu ohne Schädigung angrenzender Organe und Strukturen. Hierbei besteht die Möglichkeit direkt nach der Operation des Tumors das verbleibende Tumorbett mit hoher Strahlendosis zu behandeln. Dabei kann 20% bis 30% der Gesamtdosis einer strahlentherapeutischen Behandlung auf einmal verabreicht werden. IORT nutzt niederenergetische Photonen (Spektrum bis 50kV Beschleunigungsspannung). Im Gegensatz dazu erfolgt die externe Strahlentherapie (engl. external beam radiotherapy - EBR) durch einen Linearbeschleuniger (LINAC, Elekta Synergy™-System mit Agility® beam shaping), was ebenfalls in der Universitätsmedizin Mannheim zur Verfügung stand und einen hochenergetischen Photonenstrahl besitzt (Spektrum bis 6MV Beschleunigungsspannung). Obwohl Studien durchgeführt werden, die die Auswirkungen von niederenergetischen Photonen (IORT) mit hochenergetischen Photonen (ERB) vergleichen, sind bisher die Unterschiede in der biologischen Wirkung dieser beiden klinischen Behandlungen nur unzureichend erforscht. Die folgende Tabelle zeigt den experimentellen

Ansatz für in vitro Kulturen von GFP-markierten HeLa-Zellen für beide Bestrahlungstechniken. Zusätzlich wurden noch unbestrahlte Zellen analysiert.

Strahlentherapie	Strahlungsenergie	Dosisrate	Totale Dosis	unterschiedliche Fixierzeitpunkte
EBR	6 MV	300 mGy/min	3,5 Gy	15 Min, 30 Min 12 Std, 48 Std
IORT	50 kV	300 mGy/min	3,5 Gy	15 Min, 30 Min 12 Std, 48 Std

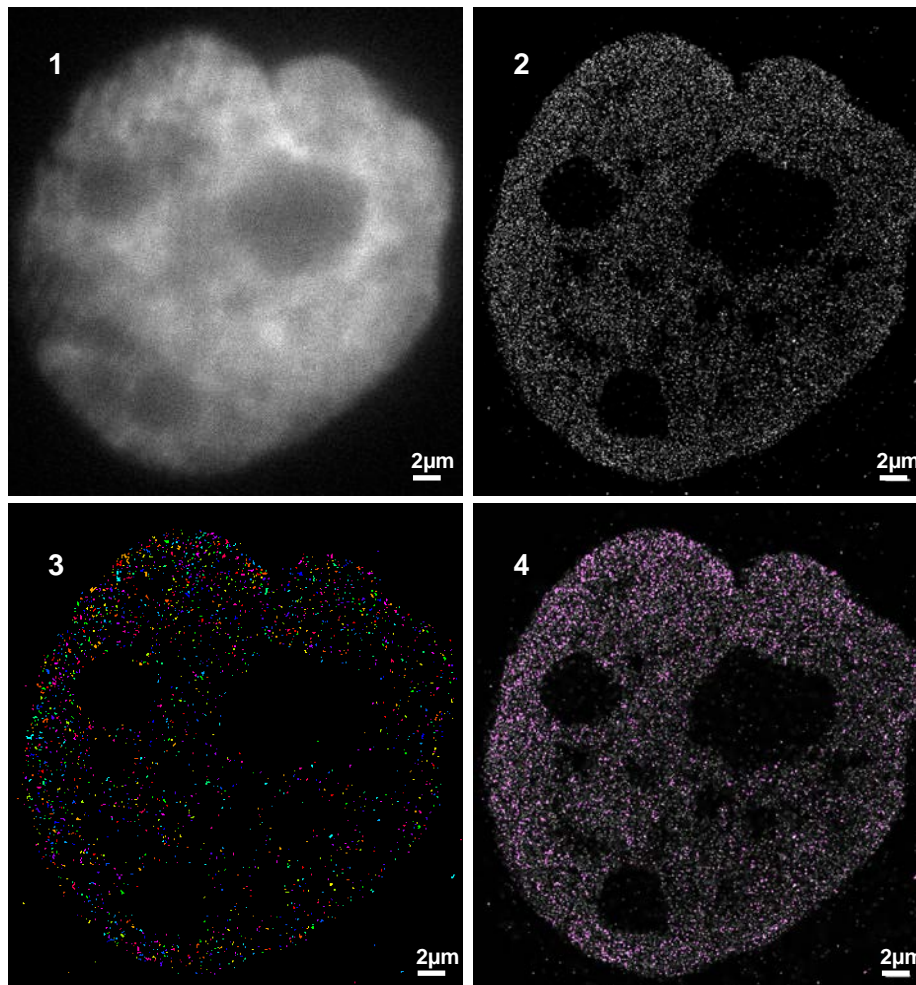


Abb. 4.14:
 (1) Weitfeldbild,
 (2) Lokalisationsbild,
 (3) Clusterauswertung
 mit Punkten, die zur
 Clusterbildung
 beitragen
 (4) Überlagerungsbild
 von 2 und 3
 eines Zellkerns einer
 Histon 2B-GFP exprimie-
 renden HeLa-Zelle. Für
 weitere Details siehe
 Text.

Abbildung 1.14 zeigt exemplarisch eine Zusammenstellung von einem Weitfeldbild, einem Lokalisationsbild, einem Bild der Clusteranalyse sowie ein Überlagerungsbild eines Zellkerns einer Histon 2B-GFP exprimierenden HeLa-Zelle. Das Weitfeldbild erlaubt keine Separation einzelner Fluoreszenzproteine. Der Zellkern erscheint relativ homogen gefärbt. Es können lediglich die Nukleoli als dunklere Flecken ausgemacht werden. Das pointillistische Lokalisationsbild dagegen ermöglicht eine präzise Visualisierung der Anordnung der detektierten fluoreszenten Histonproteine. Aufgrund der präzisen Positionsinformation aller Punkte können Distanz- und Clusteranalysen durchgeführt werden. In diesem Zellkern wurden 55217 Signale detektiert. Man kann hier die Nukleoli (= Orte ohne Histonproteine) ganz klar von der Umgebung diskriminieren. Die bunten Punkte zeigen die identifizierten Cluster der detektierten Fluorophoren. Dabei spiegelt die Variation der Farbe den Unterschied in der Clustergröße und Clusterdichte der detektierten Signale wider. Die Parameter für eine erfolgreiche Cluster-Detektion wurden so gewählt, dass jedes detektierte Signal eine minimale Anzahl von drei Nachbarn in einem Umkreis von 40nm besitzen muss, um zu einem Cluster zu

gehören. Anschließend wird ein morphologisches Schließen dieser evaluierten Punkte durchgeführt und somit die Cluster Grenzen festgelegt. Die maximale Anzahl der detektierten Punkte, die ein Cluster bilden können, wurde auf 100 gesetzt. Zusätzlich wurde der maximale Abstand zwischen zwei Punkten in einem Cluster auf 200 nm festgelegt. Mit der gleichen Anzahl der detektierten Fluorophore der Clusteranalyse wird anschließend noch eine zufällige Verteilung simuliert, um Aufschluss über das zufällige Clusterauftreten der Proteine zu erhalten. Der Vergleich des gemessenen Bildes mit der simulierten Zufallsverteilung spiegelt die statistische Signifikanz der erfassten Nukleosomen-Clusteranordnung wider. Dieses Ergebnis aus den Untersuchungen durch eine radiale Paarkorrelationsfunktion (siehe Abschnitt d) führte zu den oben genannten Cluster-Kriterien. Abbildung 1.14 zeigt schließlich eine Überlagerung des Lokalisationsbildes mit dem auftretenden und detektierten Clustern.

Im Fall der unbestrahlten HeLa-Zellen zeigte die Nukleosomenverteilung von H2B eine Verteilung mit nur geringer Clusterbildung (13% der detektierten Fluorophore befinden sich in Clustern). Dabei sind 4% zufällig auftretende Clusterformationen. Dies ist in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen [Müller et al. 2012].

Als nächster Schritt wurden die oben beschriebenen Strahlentherapie-relevanten Bestrahlungsarten hinsichtlich ihres Einfluss auf die Histonverteilung (H2B) untersucht (hochenergetische Photonen [6MV] via Linearbeschleuniger LINAC und niedrigenergetische Photonen via INTRABEAM™ für Intra-Operative Radiotherapie [50kV]). Um bei beiden Bestrahlungen eine gleichverteilte und gleich starke Dosis zu gewährleisten, wurden zuerst dosimetrische Messungen unter biologisch experimentellen Bedingungen vollzogen (Daten nicht gezeigt). Nach diesem Test zur Homogenität, Symmetrie und Stärke der Dosisverteilung wurde den Zellen eine Gesamtdosis von 3,5 Gy mit den unterschiedlich energetischen Photonen verabreicht. Aliquots wurden nach verschiedenen Inkubations-/ Reparaturzeiten [siehe Tabelle oben] mit Formaldehyd fixiert. Anschließend wurde zu jedem Experiment ein mikroskopischer Datensatz erstellt und alle auf ihr Clusterverhalten überprüft. Die resultierenden Werte sind in Abbildung 1.15 dargestellt. In bestrahlten HeLa-Zellkernen konnte ein Clustern von Histonproteinen beobachtet werden.

Hochenergetische Photonen [6MV] LINAC, Elekta™:

Nach Bestrahlung der HeLa H2B-GFP Zellen mit hochenergetischen Photonen und 15-minütiger Inkubations-/ Reparaturzeit zeigte die Histonverteilung noch keine Veränderung im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen. Mit erhöhter Inkubations-/Reparaturzeit nach der Bestrahlung ist eine deutliche Steigerung des Histonprotein-Clusterung zu erkennen. Es ist ein annähernd linearer Anstieg (18% → 21% → 25%) über die Zeit (30 Min. → 12 Std. → 48Std.) zu erkennen. Der maximale Prozentsatz (25%) der Histonprotein-Clusterung ist nach 48 Stunden zu beobachten. In allen Experimentansätzen tritt das zufällige Clustern von Histonproteinen in einer viel geringeren Häufigkeit im Vergleich zu den Ausgangsdaten auf (zwischen 4% - 9%).

Niederenergetische Photonen [50kV] INTRABEAM™:

Bei den Zellen, die mit niederenergetischen Photonen (50kV) bestrahlt wurden, lässt sich eine deutlich unterschiedliche Entwicklung der Clusterbildung beobachtet. Bereits nach 0,25 Stunden ist im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollzellen eine Zunahme an H2B-Clusterbildung (20%) zu erkennen. Die zufällige Clusterformation liegt bei 4%. Daraufhin folgt nach 0,5 Stunden eine Abnahme (17%) hinsichtlich der H2B-Clusterbildung. Die maximale Clusterbildung der H2B-Proteine und somit die größte Umordnung/Veränderung chromatischer Struktur wurde 12 Stunden nach der Bestrahlung (24%) beobachtet. 48 Stunden nach der Bestrahlung nehmen die Zellen hinsichtlich der H2B-Clusterbildung wieder annähernd den Ausgangszustand unbestrahlter Zellen an (14 %).

Vergleicht man die H2B-Clusterbildung (Anteil der markierten Nukleosomen, die an einer Clusterbildung beteiligt sind) induziert durch die verschieden energetischen Photonen, scheint es, dass beide nicht im gleichen Maß strukturelle Veränderung im Chromatin bewirken. Man kann feststellen, dass Schäden, hervorgerufen durch niederenergetische Photonen, schneller vom Zellsystem erkannt und repariert werden können. Die vollkommen abgeschlossene Reparaturzeit bei dieser Art von Bestrahlung liegt bei ungefähr 48 Stunden. Im Gegensatz dazu zeigen Zellen, bestrahlt

mit hochenergetischen Photonen, in ihrem H2B-Clusterverhalten immer noch keine Tendenz zur vollständigen Reorganisation (Biswas et al., Manuskript in Vorbereitung).

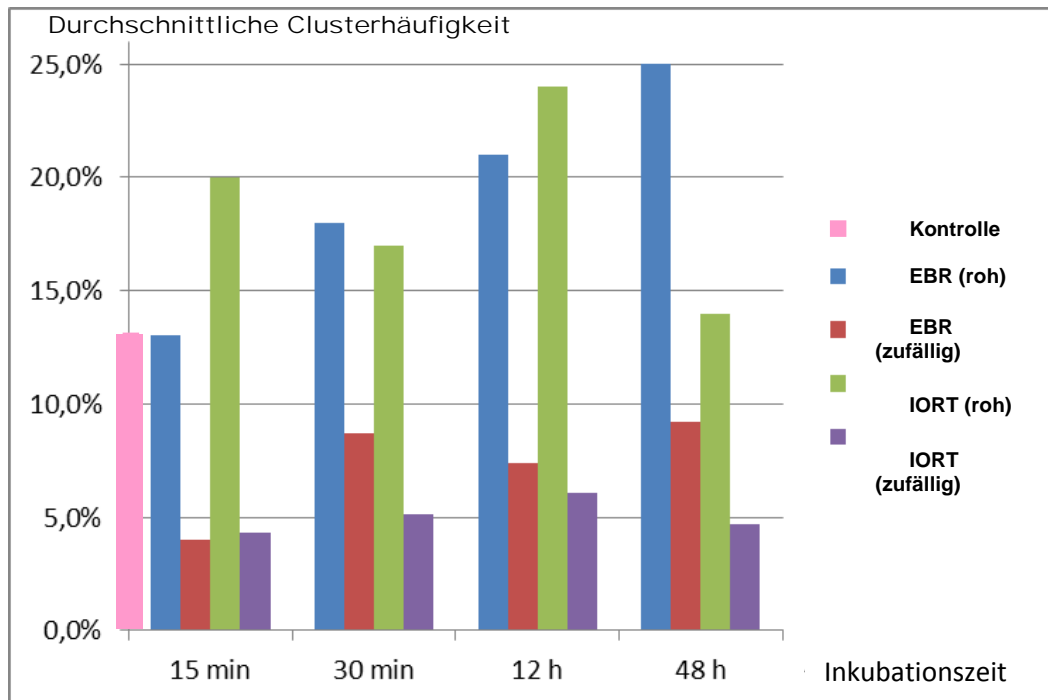


Abb. 1.15: Mittlere relative Häufigkeit von markierten Nukleosomen, die in eine Clusterbildung involviert sind, in Abhängigkeit von der Reparatur-/ Inkubationszeit nach der Bestrahlung. Für weitere Details sei auf den Text verwiesen.

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität, Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, München

a) Herstellung von stabil transfizierten Zelllinien zur Expression fluoreszenzmarkierter Proteine

Für Bestrahlungen unter Strahlzeitbedingungen an SNAKE sind stabil transfizierte Zellen transient transfizierten Zellen vorzuziehen, da sich oft unvorhersehbare Verschiebungen im Experimentablauf ergeben. Nach Etablierung des Lebendzell-Beobachtungssystems an SNAKE (Hable et al., 2009) wurden erste Zelllinien unter Verwendung der gebräuchlichen pEGFP-Vektoren (Clontech) hergestellt, darunter die Linie U2OS pEGFP-Mdc1 clone F1, die das Transgen sehr stabil exprimiert. In anderen Linien wurde hingegen häufig ein Verlust der Expression des Transgens beobachtet, der vermutlich auf eine epigenetische Stilllegung des CMV-Promoters zurückzuführen ist (Bultmann und Leonhardt, 2013). Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Vektoren zur Expression von Proteinen der DNA-Schadensantwort (*DNA damage response* DDR-Proteine) unter Verwendung sogenannter bi-cistronischer Vektoren hergestellt und/oder verwendet (siehe exemplarisch Abbildung 2.1). In diesen Vektoren reguliert derselbe Promoter die Expression des fluoreszenzmarkierten Transgens und des Selektionsgens, so dass bei Stilllegung des Promoters die Zellen aus der Population verschwinden, sofern Antibiotika-Selektion durchgeführt wird (Dirks et al., 1993, Mielke et al., 2000). Sie wurden auch von anderen erfolgreich für Rekrutierungsstudien von DDR-Proteinen verwendet (Berg et al., 2011, Roesner et al., 2013). Folgende Plasmide sind verfügbar: pMC16 -Mdc1-GFP (von W. Dirks erhalten), pMC16-53BP1-GFP, pMC16-GFP-Rad52, pMCC-Rad52-GFP (Abbildung 2.1) und pMC16-Brit1-GFP. Durch Transfektion und nachfolgende Antibiotika-Selektion wurden Zellen angereichert, die die Transgene exprimieren. Nach mehr-wöchiger Selektion wurden dann Einzelzellklone generiert, expandiert und funktionell getestet. Von allen Vektoren sind stabile Transfektanten in den Tumorzelllinien HeLa und U2OS verfügbar. Teilweise wurden auch Transfektanten in Maus- und Hamsterzelllinien (L929, NIH3T3, V79) verfügbar. Versuche, primäre Zellen oder die immortalisierten Linien BJ-hTert und RPE-hTert zu transfizieren schlugen jedoch fehl. Zur Expression von fluoreszenzmarkierten Faktoren des NHEJ (*non-homologous end joining*)-Reparaturweges wurden die Linien HT1080 pMCC-KU80-IRES-KU70-GFP und U2OS pEGFP-Xrcc4 genutzt, die von C. Mielke zur Verfügung gestellt wurden. Da sich in Vorversuchen ergab, dass Rekrutierungen von NHEJ-Faktoren unter normalen Bestrahlungsbedingungen wegen zu geringer Schadensdichte nicht detektierbar sind, wurde von einer Klonierung der cDNA für die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs) abgesehen. Diese wäre wegen der Größe dieses Proteins außerordentlich aufwändig geworden.

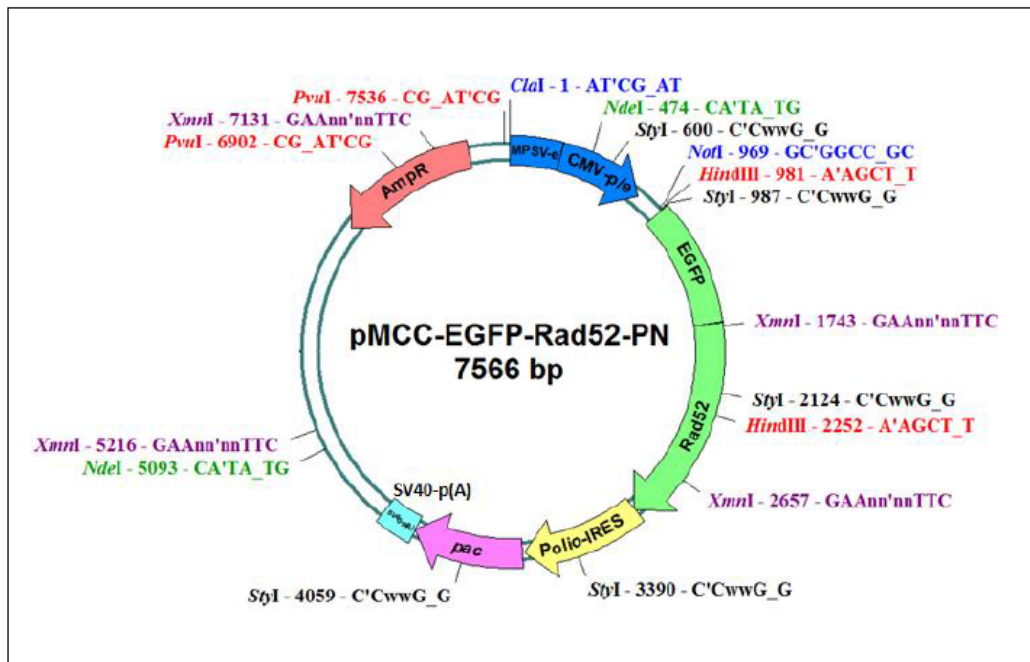


Abb. 2.1: Abgebildet ist die Plasmidkarte des Vektors pMCC-EGFP-Rad52-PN mit den enthaltenen regulatorischen Elementen, den prokaryotischen und eukaryotischen Selektionsmarkern, dem Fluoreszenz-Fusionsprotein EGFP-Rad52 und den Schnittstellen der Restriktionsenzyme ClaI, NdeI, StyI, NotI, HindIII, XmnI und PvuI. MPSV-e = LTR-Enhancer-Element des myeloproliferativen Sarkom-Virus; CMV-p/e = Cytomegalovirus-IE(immediate-early)-Promoter mit enthaltener Enhancer-Sequenz; Polio-IRES = Interne ribosomale Eintrittsstelle aus dem Poliovirus; pac = Eukaryotischer Selektionsmarker für Puromycin-Resistenz (Puromycin-N-Acetyltransferase); SV40-p(A) = Polyadenylierungs-Signal des Simian-Virus 40; AmpR = Prokaryotischer Selektionsmarker für Ampicillin-Resistenz (Beta-Lactamase).

b) Optimierung der Herunterregulation von Kandidatenproteinen mit vermutetem Einfluss auf Focistruktur

Durch Verwendung von *smart pool on target plus* siRNAs (Dharmacon) ließen sich optimierte Bedingungen zur Herunterregulation von 53BP1 und Mdc1 (Abbildung 2.2), sowie Wstf-1 und Rad50 (Abb. 3) finden. Die residualen Proteinmengen dieser Kandidatenproteine lagen jeweils bei oder unter ca. 20%. Auch Mre11 konnte effizient herunterreguliert werden (Abbildung 2.4); dies führte zu einer gleichzeitigen Abnahme von Rad50, vermutlich infolge von Destabilisierung durch Fehlen des Interaktionspartners (Abbildung 2.5). Im Gegensatz dazu war die Restmenge von Ku80 auch 96 h nach Transfektion mit Ku80 siRNA relativ hoch (Abbildung 2.6).

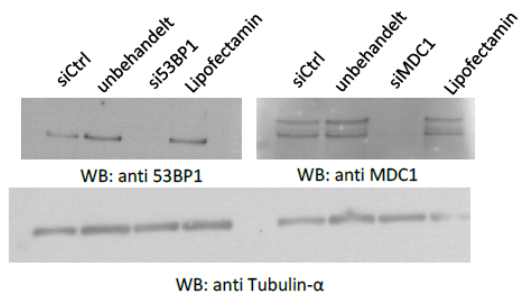


Abb. 2.2: Western Blot-Nachweis der residualen Proteinmenge von 53BP1 (links) und MDC1 (rechts) 72 h nach Transfektion mit entsprechenden siRNAs. Zum Vergleich wurden Proteinextrakte von gänzlich unbehandelten Zellen, mit Transfektionsreagenz (Lipofectamin) behandelten Zellen und mit Kontroll-siRNA (ctrl siRNA) transfizierten Zellen mit aufgetragen. Als Ladekontrolle diente Tubulin alpha.

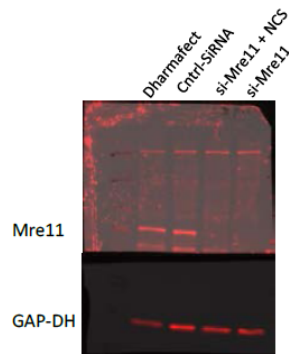


Abb. 2.4: Western Blot-Nachweis der residualen Proteinmenge von Mre11 72 h nach Transfektion mit entsprechender siRNA. Zum Vergleich wurden Proteinextrakte von gänzlich unbehandelten Zellen, mit Transfektionsreagenz (Dharmafect) behandelten Zellen und mit Kontroll-siRNA (ctrl siRNA) transfizierten Zellen mit aufgetragen. Als Ladekontrolle diente GAP-DH.

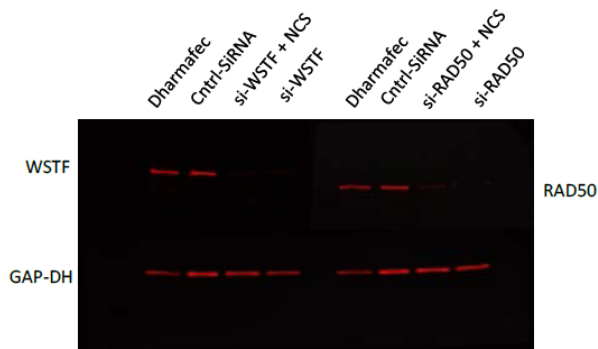


Abb. 2.3: Western Blot-Nachweis der residualen Proteinmenge von WSTF (links) und RAD50 (rechts) 72 h nach Transfektion mit entsprechenden siRNAs. Zum Vergleich wurden Proteinextrakte von mit Transfektionsreagenz (Dharmafect) behandelten Zellen und mit Kontroll-siRNA (ctrl siRNA) transfizierten Zellen mit aufgetragen. Um zu überprüfen, ob die Herunterregulation auch nach DSB-Induktion ausreicht, wurden Zellen auch mit Neocarcinostatin (NCS) behandelt. Als Ladekontrolle diente GAP-DH.

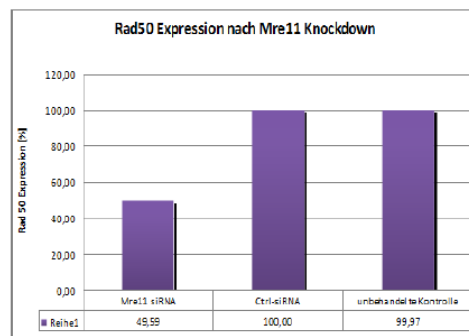


Abb. 2.5: Western Blot-Nachweis der residualen Proteinmenge von Mre11 72 h nach Transfektion mit entsprechender siRNA. Zum Vergleich wurden Proteinextrakte von gänzlich unbehandelten Zellen, mit Transfektionsreagenz (Dharmafect) behandelten Zellen und mit Kontroll-siRNA (ctrl siRNA) transfizierten Zellen mit aufgetragen. Als Ladekontrolle diente GAP-DH.

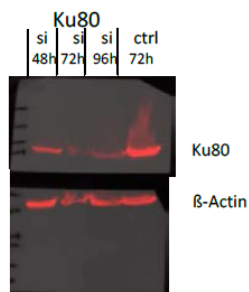


Abb. 2.6: Western Blot-Nachweis der residualen Proteinmenge von Ku80 zu den Zeitpunkten 48 h, 72 h und 96 h nach Transfektion mit entsprechender siRNA. Zum Vergleich wurden Proteinextrakte von mit Kontroll-siRNA (ctrl siRNA) transfizierten Zellen mit aufgetragen. Als Ladekontrolle diente beta-Actin.

c) Analyse von Focistruktur und –mobilität nach Herunterregulation von Kandidatenproteinen an fixierten Proben

Der Mre11-Rad50-Nbs1(MRN)-Komplex und Mdc1 spielen wichtige Rollen für die Signalamplifikation nach DSB-Detektion, so dass ihre Inaktivierung einen negativen Einfluss auf die Größe von IRIF haben könnte. Auch für WSTF Herunterregulation wurde eine Reduktion von γ -H2AX-Focibildung beschrieben (Xiao et al., 2009). In unseren Händen hatte Herunterregulation von WSTF oder RAD50 (als Vertreter der MRN-Komplexproteine) jedoch keinen Einfluss auf die Anzahl oder Größe von γ -H2AX Foci nach Röntgenbestrahlung mit 1 Gy und 1 h Post-Bestrahlungsinubation (Abbildung 2.7 und 2.8). Auch für 53BP1 und Phospho-RPA(Ser33)-Foci wurde kein Einfluss festgestellt (Daten nicht gezeigt).

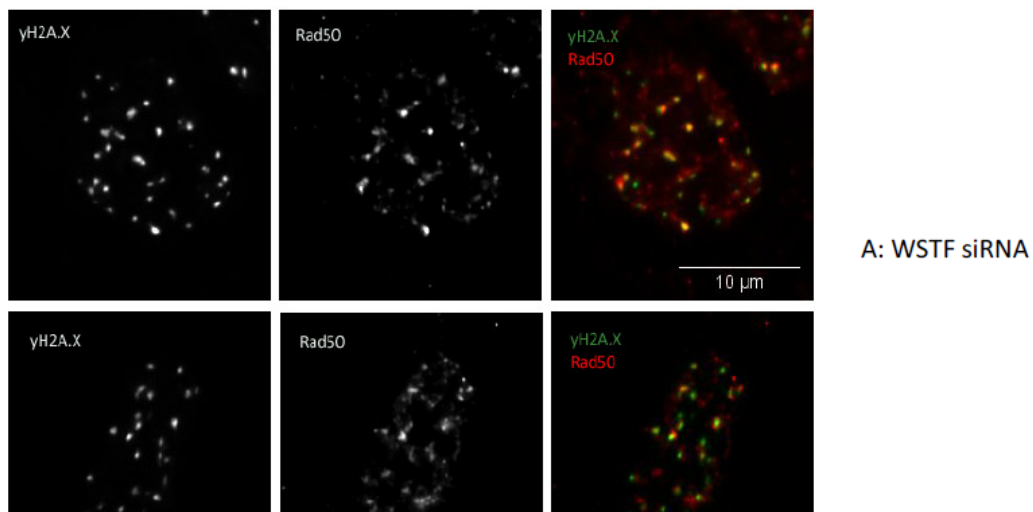


Abb. 2.7: Immunfluoreszenznachweis von γ -H2AX und Rad50-Foci nach Transfektion mit WSTF siRNA (oben) und Kontroll-siRNA und Bestrahlung mit 1 Gy Röntgenstrahlung. Gezeigt ist jeweils eine exemplarische Zelle.

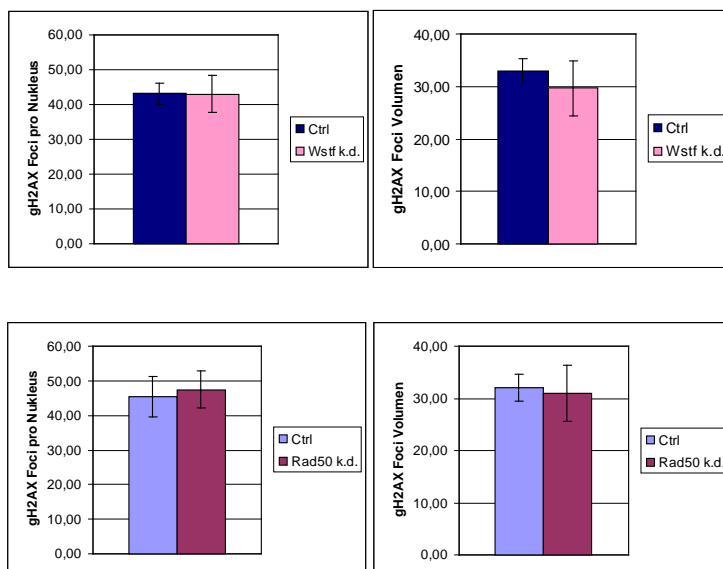


Abb. 2.8: Mittlere Anzahl von γ -H2AX-Foci und deren Volumen nach Knockdown von WSTF (oben) und RAD50 (unten) in HeLa-Zellen und Röntgenbestrahlung mit 1 Gy und 1 h Inkubation nach Bestrahlung. Die Auswertung erfolgte mittels FociPicker (Du et al. 2011) an 3D-Mikroskopieaufnahmen.

Um den Einfluss der Kandidatenproteine auf Focibildung nach Ionenbestrahlung zu untersuchen, wurden die Zellen 72 h nach siRNA-Transfektion an der Ionenmikrobestrahlungseinrichtung SNAKE

mit 55 MeV Kohlenstoffionen bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte im 10° Winkel zur Wachstumsfläche, so dass bei der späteren Mikroskopie die Foci entlang dem Ionentrack sichtbar gemacht werden können. Abbildung 2.9 zeigt Galerien von Tracks nach Transfektion mit Kontroll-siRNA und WSTF siRNA; die Zellen wurden jeweils 1 h nach Bestrahlung für den Immunfluoreszenznachweis fixiert.

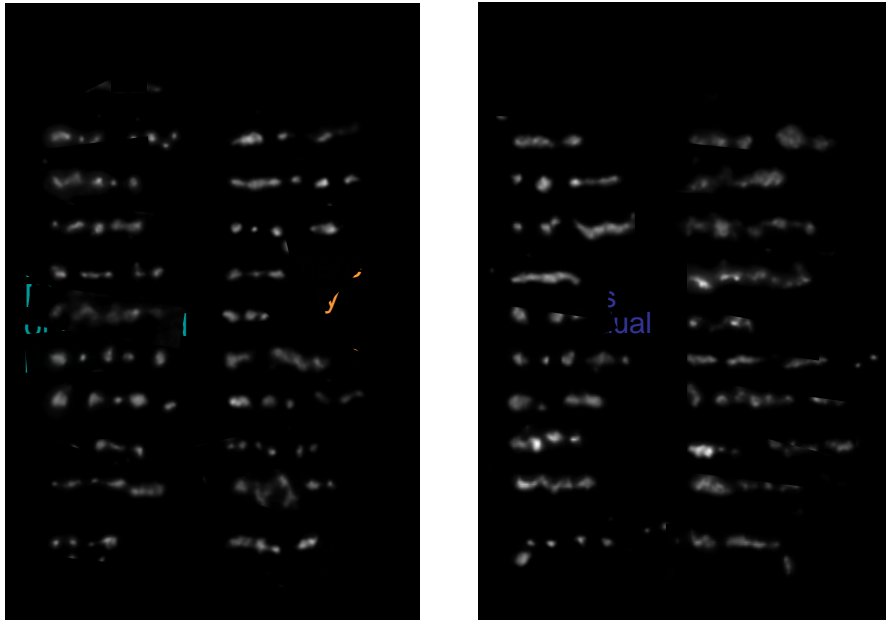


Abb. 2.9: 53BP1 Tracks nach Bestrahlung mit 55 MeV C Ionen in HeLa-Zellen nach Transfektion mit Kontroll-siRNA und WSTF-siRNA.

Focigrößen und –abstände innerhalb der Tracks zeigen eine gewisse Heterogenität. Diese spiegelt vermutlich zum einen wider, dass aufgrund der Bestrahlungsgeometrie (unterschiedliche Dicken durchdrungenen Materials, wie z.B. Medienschiicht und Trägerfolie) Variationen in der Energie der Ionen (und somit im LET) beim Durchgang der Zellen auftreten können. Zum anderen deuten unveröffentlichte Ergebnisse der AG Friedl auf einen Einfluss der Zellzyklusphase hin. Es ist hier kein systematischer Unterscheid in Focigrößen und –abständen zwischen Kontrollzellen und Zellen nach Herunterregulation von WSTF zu beobachten. Auch im Grad der Distortion der Tracks (also der Abweichung von eine geraden Linie) ist kein Unterschied zu beobachten. Daraus lässt sich schließen, dass WSTF keinen Einfluss auf Focigrößen, Fociclustering oder Focimobilität hat. Als repräsentatives Mitglied des MRN-Komplexes wurde auch der Einfluss einer Herunterregulation von Mre11 untersucht. Wie in Abbildung 2.10 ersichtlich, gibt es auch hier keinen detektierbaren Einfluss auf Focigröße, -clustering oder –mobilität.

Schließlich wurden auch Tracks von γ -H2AX-Foci nach Herunterregulation von 53BP1 oder Mdc1 untersucht. Mdc1 spielt eine wichtige Rolle bei der initialen Signalamplifikation, so dass nach Herunterregulation reduzierte Focigrößen erwartet wurden, wohingegen 53BP1 erst später in der Signalweitergabe involviert ist. Wie Abbildung 2.11 zeigt, hat die Herunterregulation beider Proteine keinen Einfluss und Focigrößen, -clustering oder –mobilität.

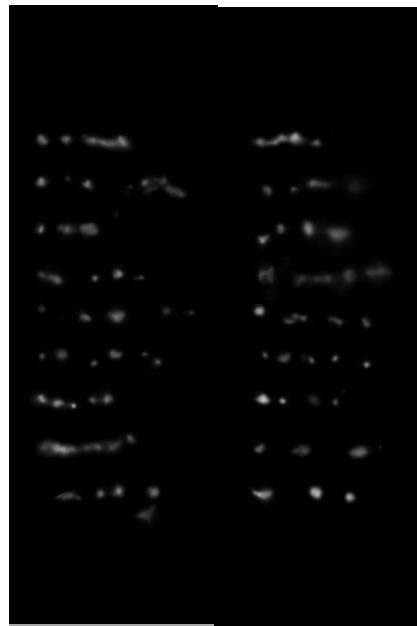
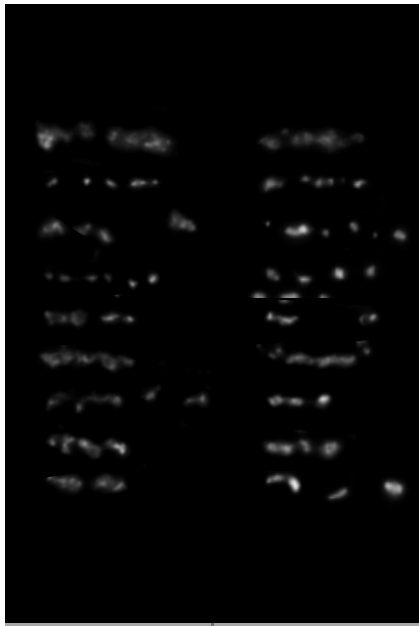
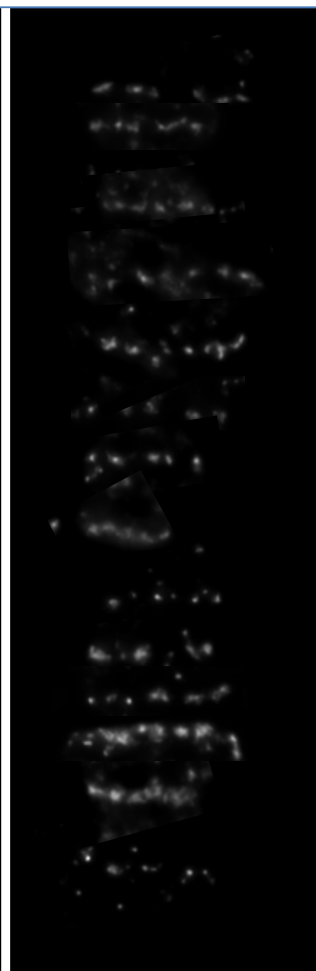
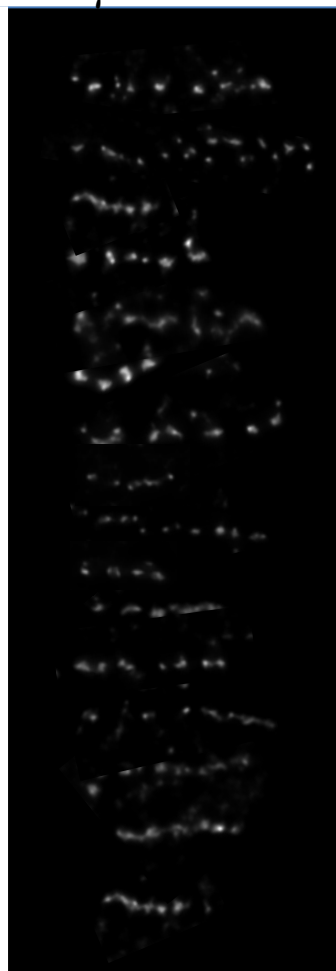
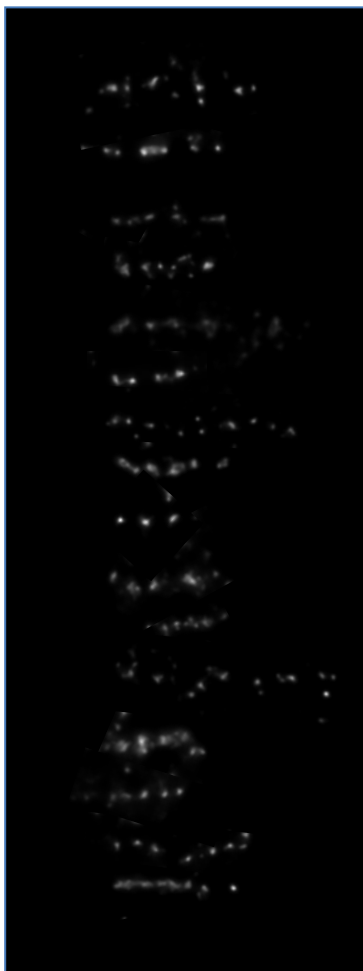


Abb. 2.10: 53BP1 Tracks nach Bestrahlung mit 55 MeV C Ionen in HeLa-Zellen nach Transfektion mit Kontroll-siRNA und Mre11-siRNA.

Mre11

γ -H2AX



Ctrl

53BP1

Mdc1

Abb. 2.11: γ -H2AX Tracks nach Bestrahlung mit 55 MeV C Ionen in U2OS-Zellen nach Transfektion mit Kontroll-siRNA (links), 53BP1 siRNA (Mitte) und Mdc1-siRNA (rechts).

d) Analyse von Fociclustering und Mobilität durch *Live Cell Imaging*

Fixierte Proben erlauben immer nur Momentaufnahmen. Daher ist die Lebendzellbeobachtung (*Live Cell Imaging, LCI*) prinzipiell für die Analyse zeitlicher Veränderungen von Focieigenschaften und –lagen besser geeignet. Nachteil beim LCI ist, dass die zu untersuchenden Faktoren fluoreszenzmarkiert sein müssen. In unserem experimentellen System wird das durch stabile Transfektion mit den in Abschnitt 1 beschriebenen Vektoren erreicht. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dollinger wurde zuerst die Rekrutierungskinetik der Faktoren Mdc1, 53BP1 und Rad52 in Abhängigkeit vom LET untersucht. Dazu wurden die Zellen mit 55 MeV Kohlenstoffionen (43 MeV am Ort der Zellen, entsprechend $LET = 370 \text{ KeV}(\mu\text{m})$) oder 20 MeV Protonen ($LET = 2.6 \text{ kEV}/\mu\text{m}$) im rechten Winkel zur Wachstumsfläche bestrahlt. Einzelne Ionen und Protonen wurden dabei in Linienform (Abstand $1 \mu\text{m}$ lateral, $5 \mu\text{m}$ Abstand zwischen den Linien) appliziert. Die Rekrutierung aller drei Proteine zeigte eine lag-Phase, T_0 , nach Bestrahlung, während der keine Focibildung zu beobachten war, gefolgt von Akkumulierungsphasen mit spezifischen Rekrutierungszeiten, τ_1 . Mdc1 akkumuliert nach Hoch-LET-Bestrahlung schneller als 53BP1. Nach Nieder-LET-Bestrahlung ist die Rekrutierung von Mdc1 deutlich verlangsamt. Rad52 akkumuliert deutlich langsamer als Mdc1, zeigt aber eine ähnliche Abhängigkeit vom LET. Im Gegensatz dazu ist die mittlere Rekrutierungszeit von 53BP1 fast konstant bei unterschiedlichem LET. Diese Arbeiten wurden veröffentlicht (Hable et al., 2012).

Damit die Bruchenden von 2 Doppelstrangbrüchen so verknüpft werden können, dass strukturelle Chromosomenaberrationen entstehen, müssen sie sich nahe kommen. Neben dem initialen Abstand der betroffenen Regionen zum Zeitpunkt der Bruchentstehung spielt die Mobilität der gebrochenen Region eine Rolle, da bei hoher Mobilität die betroffenen Regionen zwischen Bruchinduktion und Reparatur in räumliche Nähe zueinander gelangen können. Schätzungen über Interaktionsdistanzen mittels biophysikalischer Modellierung reichen von ca. 100 nm bis mehrere μm (Savage 1996, 2002, Sachs et al., 1997). In Simulationsrechnungen zur DNA-Endenverknüpfung, die auf der Annahme normaler Diffusion der DNA-Enden beruhen, wird der Anteil nicht-reparierter DSB nach langen Reparaturzeiten gewöhnlich überschätzt (Friedland et al. 2010). Bisherige Messungen der Mobilität von DSB-Orten, die über Foci-bildende Faktoren markiert wurden, ergaben kein schlüssiges Bild. Studien an Zellen, die zu unterschiedlichen Zeiten nach DSB-Induktion fixiert und dann mittels Immunfluoreszenz untersucht wurden sind in der Anzahl analysierter Zeitwerte naturgemäß sehr beschränkt, so dass es schwierig ist, Mobilitätsfaktoren durch Anpassen einer Funktion an die beobachteten Werte abzuschätzen. Bei Lebendzellbeobachtung ist die Anzahl der Messpunkte sehr viel höher, so dass diese Methodik trotz des großen apparativen und experimentellen Aufwandes zunehmend für die Mobilitätsmessung eingesetzt wird (Kruhlak et al. 2006, Jacob et al. 2009). Allerdings ist die gebräuchliche *Single Particle Tracking*-Methode sehr anfällig für deutliche Überschätzungen der Mobilität, wenn keine ausreichenden Korrekturen für translationale und rotatorische Bewegungen des gesamten Zellkerns vorgenommen werden. Zusammen mit der AG von Prof. Dollinger haben wir daher in einem neuen Ansatz die Mobilität von Mdc1-Foci nach Bestrahlung an SNAKE mit Kohlenstoff-Ionen (43 MeV) bzw. Protonen (20 MeV) durch Messungen der Abstände zwischen zwei Foci in Abhängigkeit von der Beobachtungsdauer ermittelt. Die Experimente ergaben, dass die Foci über Beobachtungsspannen zwischen 5 s und 10^4 s eine sub-diffusive Mobilität aufweisen, mit ähnlichen Zeitkonstanten, wie sie für ungeschädigte Chromatindomänen wiederholt veröffentlicht wurden. Durch das sub-diffusive Verhalten erhöht sich, im Vergleich zur normalen Diffusion, die Wahrscheinlichkeit für zwei zusammengehörige (i.e. initial nah benachbarte) Enden, zueinander zu finden, während sich die Interaktionswahrscheinlichkeit für weiter voneinander entfernt liegende Enden verringert. Wir konnten keine LET-Abhängigkeit der Mobilitätsfaktoren beobachten. Diese Arbeiten wurden veröffentlicht (Girst et al., 2013).

Die Messung der durchschnittlichen Focimobilität, wie im letzten Absatz beschrieben, könnte zu einer Unterschätzung des Einflusses von gelegentlichen sprunghaften Fociverlagerungen führen, wie sie teilweise als Folge von Reparaturprozessen postuliert wurden. Innerhalb von Linienmustern könnten sprunghafte Fociverlagerungen übersehen werden. Wir haben daher in Zusammenarbeit mit AG Dollinger Zellen in einem 5-Punktmuster (Abbildung 2.12) mit 1-1000 Protonen pro Punkt bestrahlt und die Focibildung mittels LCI verfolgt. In insgesamt 899 so beschossenen Zellkernen

konnten zweimal (0.2%) größere, sprunghafte Fociverlagerungen beobachtet werden. Für ein Beispiel siehe Abbildung 2.13. Daraus kann geschlossen werden, dass diese Ereignisse selten sind.

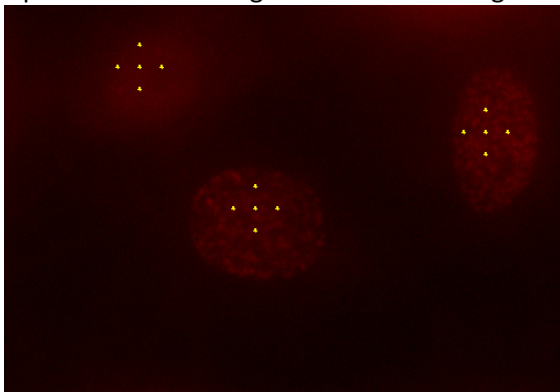


Abb. 2.12: Bestrahlungsmuster für 5-Punktbestrahlungen in LCI-Experimenten. Zielorte werden dabei vor der Bestrahlung für alle zu bestrahlenden Zellen Interaktiv markiert.

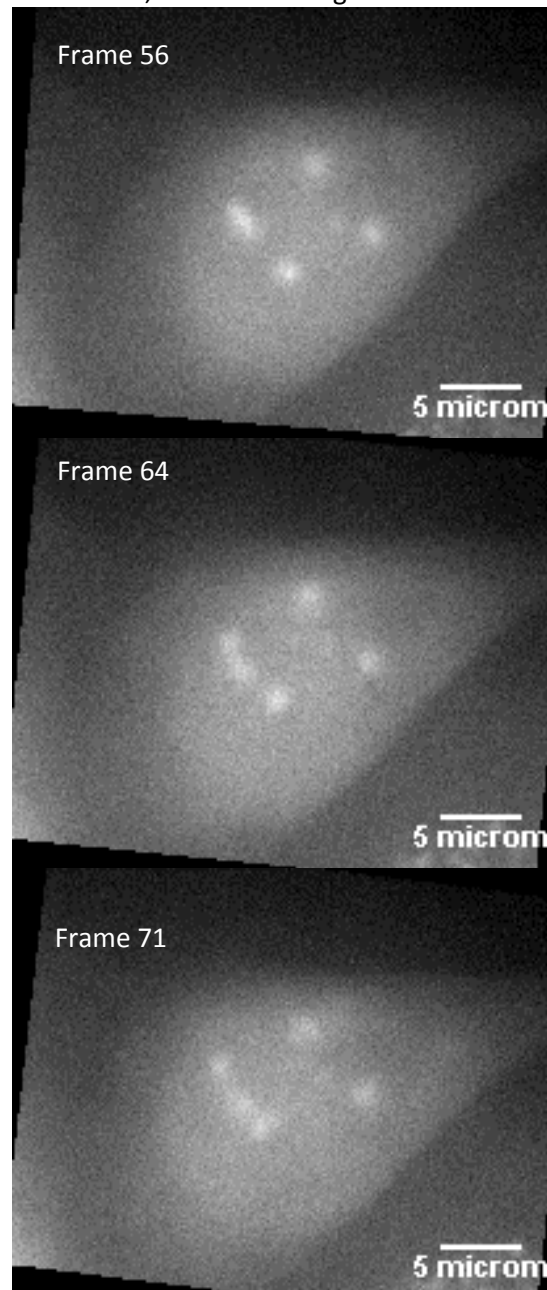


Abb. 2.13: Einzelbilder einer Zeitserie zur Focibildung von PCNA nach Bestrahlung mit 30 Protonen pro Punkt.

e) Analyse von Focifeinstruktur durch hochauflösende Mikroskopie

Da wegen Problemen mit der Verfügbarkeit des Lokalisationsmikroskops in Heidelberg (Laborumzug 2012) keine ausreichende Optimierung der Färbemethodik für dieses Mikroskop möglich war, werden im Weiteren nur die Experimente für die STED (*Stimulated Emission Depletion*)-Mikroskopie beschrieben. Für die Optimierung der Antikörper-Verdünnungen wurden Vorexperimente mit den primären Antikörpern Maus-anti- γ -H2AX und Kaninchen-anti-53BP1 durchgeführt. Sekundäre Antikörper waren mit Chromeo505 oder AbberiorStar440SX markiert. Als optimale Verdünnungen wurde für beide sekundären Antikörper 1:1500 ermittelt. Weitere Vorexperimente mit anderen primären Antikörpern ergaben, dass die optimale Konzentration der Sekundärantikörper für jede Kombination von Primärantikörpern separat ermittelt werden muss.

Nach dem Durchgang von Kohlenstoffionen durch einen Zellkern ist die Zahl der detektierbaren Foci viel geringer als die Zahl der erwarteten DSB (Du et al. 2011), so dass anzunehmen ist, dass in einem Focus mehrere DSB zusammen kommen. Bislang ist die relative biologische Wirksamkeit (RBE)

von Ionenstrahlung für die Induktion von DSB nicht genau bekannt, da die genaue und robuste Quantifizierung von DSB nach Ionenbestrahlung mit bisherigen Methoden nicht möglich ist. Bei der DSB-Quantifizierung mittels Fociquantifizierung liegt das Problem in der relativ großen Ausdehnung der Foci. Könnte man die Proteinansammlung auf den Chromatinbereich in der unmittelbaren Nachbarschaft der DSB begrenzen, sollte sich die Zahl der DSB innerhalb einer normalerweise als Focus markierten Region bestimmen lassen können. Wie bereits gezeigt (Abschnitt 1), führt eine Herunterregulation von Mdc1, Mre11, Rad50, 53BP1 oder WSTF nicht zur Ausbildung von lokal begrenzten γ -H2AX- oder 53BP1-Mikrofoci. Behandlung mit dem ATM-Inhibitor KU-60019 führt zwar tendenziell zu einer Verkleinerung von γ -H2AX-Foci nach Schrägbestrahlung mit Kohlenstoffionen (Abbildung 2.14), aber nicht zu einer verbesserten Visualisierung von Substrukturen (Einzel-DSB) innerhalb der markierten Regionen.

Das einzelstrangbindende Protein RPA (replication protein A) besetzt in der Vorbereitung der homologen Rekombination enden-resezierte Stränge und wird im weiteren Verlauf durch Rad51 ersetzt. Wie erwartet, bilden beide Proteine Mikrofoci aus, die ein Teilvolumen der γ -H2AX-markierten Domänen einnehmen (Abbildung 2.15). Obwohl angenommen wird, dass pro γ -H2AX-„Makrofokus“ mehrere DSB vorliegen, ist meistens nur 1 Mikrofokus vorhanden. Ob dies bedeutet, dass mehrere DSB eng benachbart prozessiert werden (Repair Factory-Modell), bleibt offen, da nicht bekannt ist, wieviele der DSB über homologe Rekombination prozessiert werden.

Wegen der höheren Verlässlichkeit der Rad51-Antikörper wurde in weiteren Analysen mittels Super-Resolution-Mikroskopie die Lokalisierung von Rad51 weiter untersucht (sh. Bericht der Bundeswehr-Universität).

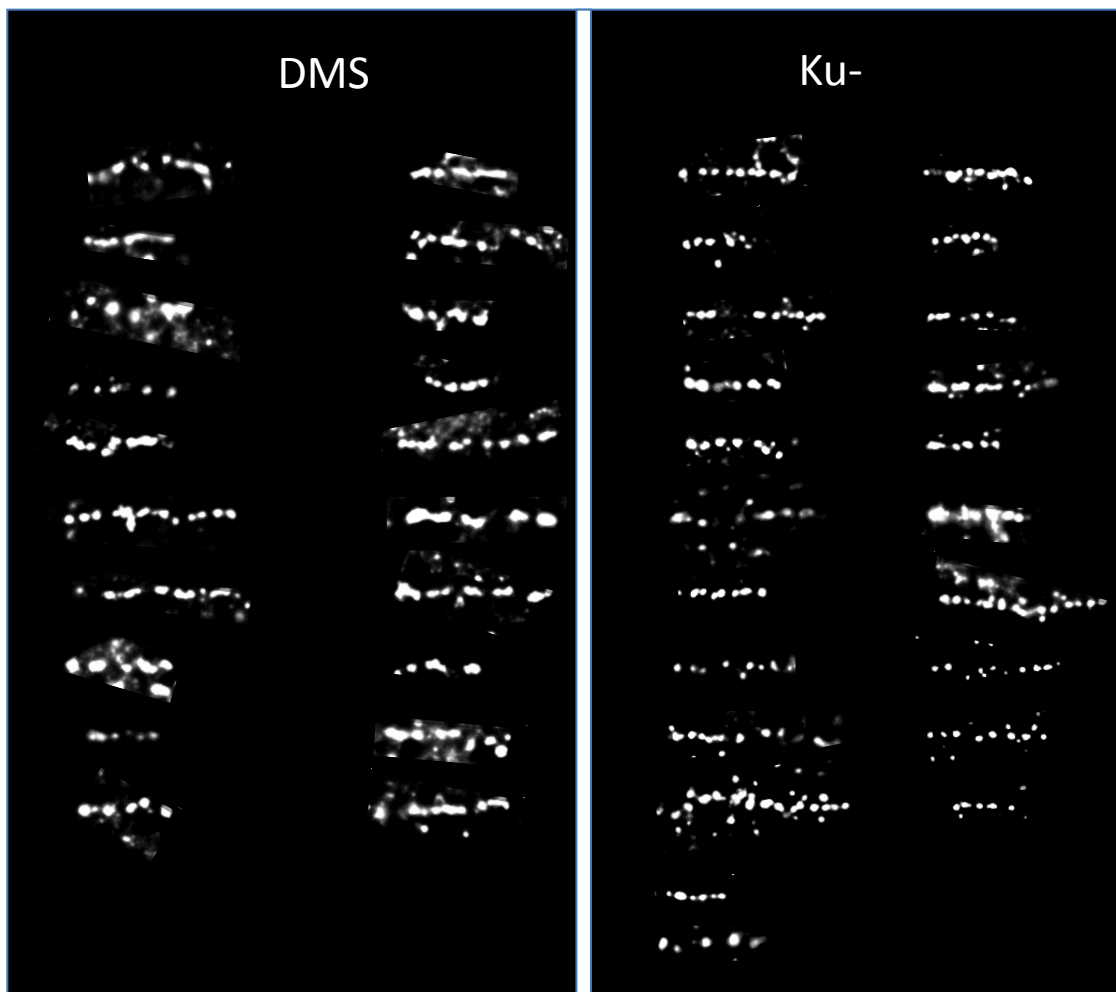


Abb. 2.14: γ -H2AX Tracks nach Schrägbestrahlung mit 55 MeV Kohlenstoffionen. 20 min vor Bestrahlung wurden die Zellen mit 10 mM ATM-Inhibitor Ku-60019 behandelt; Kontrollen erhielten das Lösungsmittel DMSO. Zellen wurden 1 h nach Bestrahlung fixiert und γ -H2AX wurde mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen.

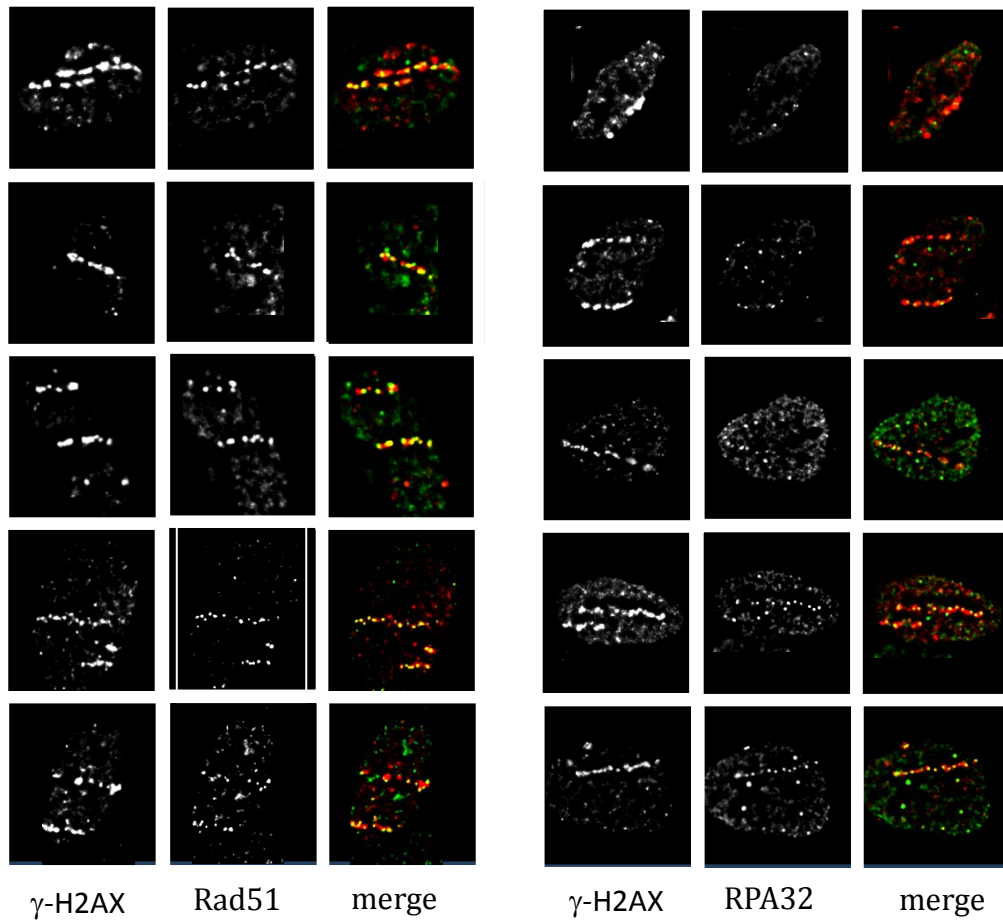


Abb. 2.15: γ -H2AX-Tracks und Rad51-Tracks (links) bzw. RPA32-Tracks (rechts) nach Schrägbestrahlung mit 55 MeV Kohlenstoffionen. Zellen wurden 1 h nach Bestrahlung fixiert und die Reparaturfaktoren wurden mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen.

a) Entwicklung von Bestrahlungsprotokollen zur Bestrahlung in geometrischen Mustern mit 20 MeV Protonen und 55 MeV Kohlenstoffionen für Kinetikstudien

Für die Untersuchungen der Rekrutierungskinetiken und die Untersuchungen der Focimobilität, beides in Abhängigkeit des linearen Energietransfers (LET) wurde am Rasterionenmikroskop SNAKE ein Bestrahlungsaufbau realisiert, mit dem lebende Zellen mit hochenergetischen Ionen gezielt oder auch in geometrischen Mustern bestrahlt werden können, und sowohl vor, während und auch nach der Bestrahlung mit state of the Art optischer Phasenkontrast und Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden können. Das Herzstück des Bestrahlungsaufbaus stellt die kompakte Realisierung eines Zellbehälters mit dünnen Eintrittsfolien dar, so dass die Ionen aus dem Vakuum durch ein dünnes Austrittsfenster an Atmosphärenbedingungen transportiert werden können und dann durch die dünne Eintrittsfolie in den Zellbehälter und durch eine nur 20 – 30 µm dicke Mediumschicht auf die Zellen treffen (Abbildung 3.1). Hinter dem Zellcontainer (Abbildung 3.2) befindet sich ein optisches Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskop, mit dem die Zellen in der Fokusebene des Rasterionenmikroskops beobachtet werden können. Die Zellen wachsen dabei auf einem Plastik-Szintillatormaterial, dessen Szintillationslicht für jedes Ion durch das Mikroskop hindurch nachgewiesen wird und so zur Steuerung der Ionenapplikation verwendet werden kann. Durch diese Anordnung ist es möglich, die Zellen mit Submikrometer Auflösung sowohl mit einzelnen oder abgezählt vielen Ionen zu bestrahlen. Dabei ist eine Bestrahlung mit hoch-LET Ionen (z.B. 55 MeV Kohlenstoff) oder auch mit niedrig-LET Ionen (z.B. 20 MeV Protonen) möglich. Die Realisierung des Aufbaus ist in Abbildung 3.3 gezeigt.

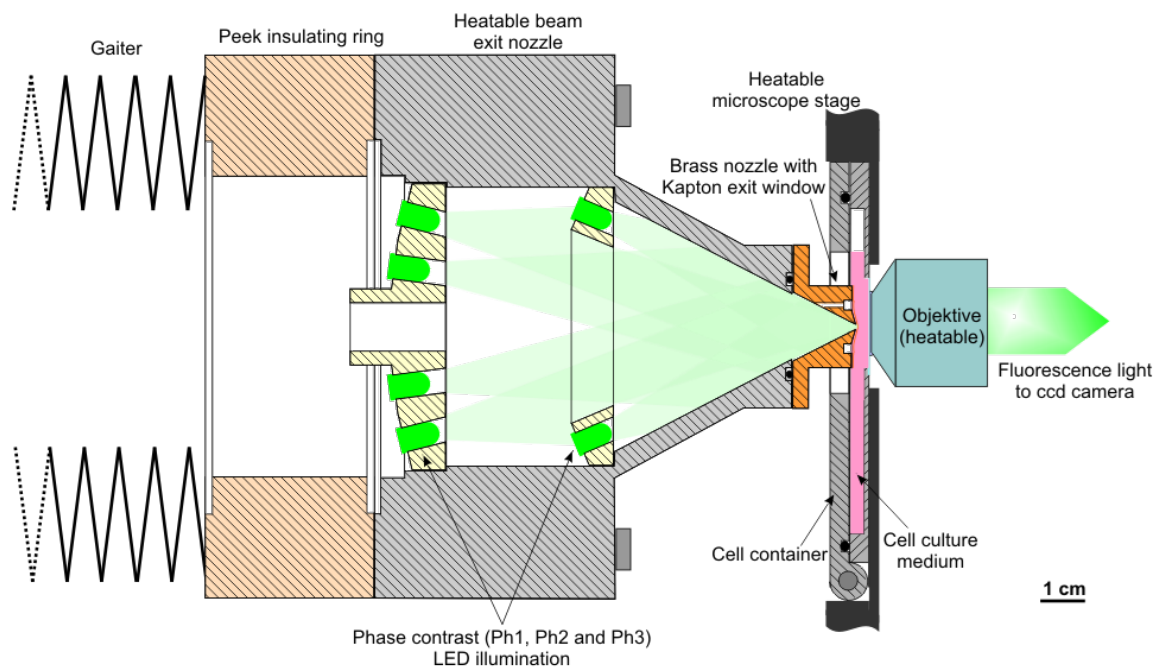


Abb. 3.1: Bestrahlungs- und Mikroskopieraufbau an SNAKE

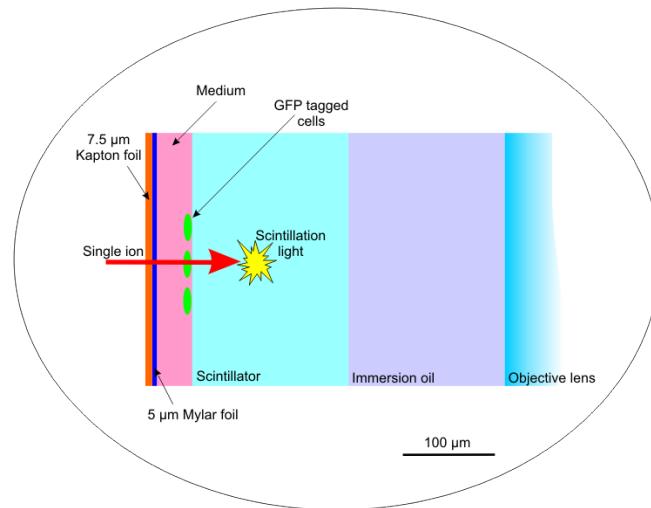


Abb. 3.2: Detail des Zellbehälters mit (von links) Vakuumaustrittsfolie, Zellbehälter-Eintrittsfolie, Medium, Zellen, die auf einem Plastiksintillator dick angewachsen sind, Immersionsöl und Objektiv mit hoher numerischer Apertur.

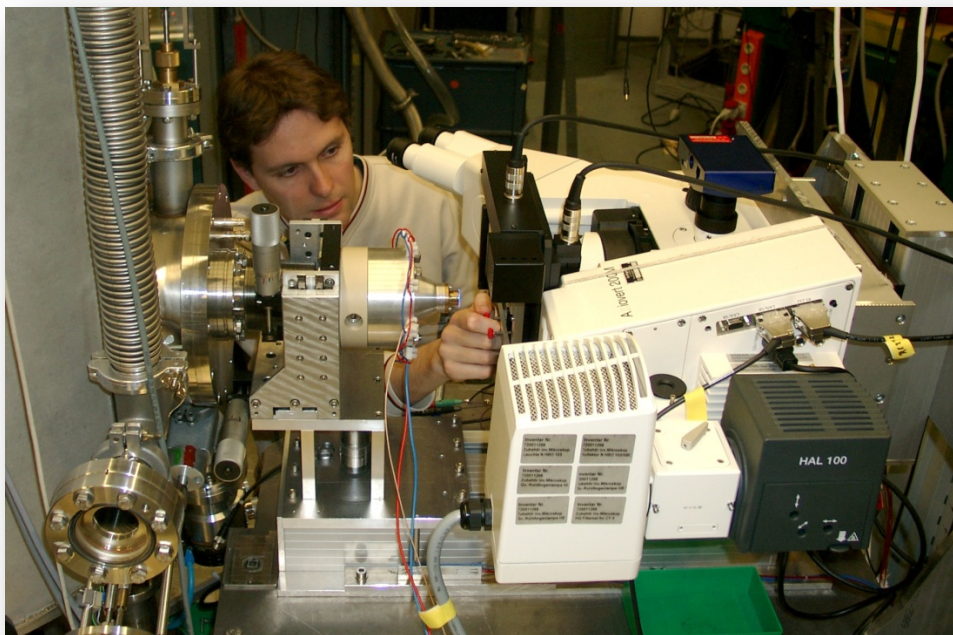


Abb. 3.3: Photo des Bestrahlungsaufbaus an SNAKE

b) Entwicklung von online-Fluoreszenzmikroskopie zur Untersuchung der Rekrutierungskinetik unterschiedlicher Reparaturfaktoren (in Zusammenarbeit mit LMU)

In intensiven Tests wurde nachgewiesen, dass mit GFP-getaggte Zellen unter normalen Wachstumsbedingungen (die Zellbehälter und die Umgebung werden auf 37°C geheizt) ohne Probleme über 12 Stunden am Bestrahlungsort beobachtet werden können. Die Herstellung von GFP-getaggtten Zellen erfolgte dabei an der LMU, Bestrahlungen und optische Mikroskopie erfolgte in enger Zusammenarbeit. Entscheidend für eine möglichst nebenwirkungsfreie Lebendzellmikroskopie am Bestrahlungsplatz von SNAKE war die Installation einer LED-Beleuchtungseinheit (Colibri von Zeiss), mit der mehrere hundert Aufnahmen mit erträglichem Bleichen des GFP-Farbstoffes über Stunden hinweg ermöglicht wurde.

c) Entwicklung geeigneter Auswertalgorithmen zur Analyse der Rekrutierungskinetiken

Das erste Hauptziel des Verbundes war die Analyse von Anlagerungskinetiken von MDC1, 53BP1 und Rad52 bei 20 MeV Proton (niedrig-LET) und 55 MeV Kohlenstoffionen (hoch-LET). Dazu wurden Zellen in dezidierten Mustern mit diesen Ionen bestrahlt. Zur quantitativen Auswertung der Kinetiken wurde die Intensitätsverteilung der GFP-getaggtten Proteine in Serienaufnahmen bewertet. Die geometrischen Bestrahlungsmuster erlaubten, nach einer Korrektur der Zellbewegungen eine quantitative Analyse der Intensitätsänderungen mit einer speziellen, im Hause erstellten Auswertesoftware. Ein Zeitverlauf für MDC 1 ist für MDC1 in Abbildung 3.4 gezeigt. Die Daten wurden mit einer Modellfunktion angefüttet und die Zeitverzögerung für den Anstieg und die Steigung des Anstiegs für die unterschiedlichen Proteine und Bestrahlungsarten ausgewertet. Die Ergebnisse der Experimente sind in Abbildung 3.5 zusammengefasst und wurden in (Hable et al., 2012) veröffentlicht. Es zeigt sich, dass die Steigung und damit die Rekrutierungsgeschwindigkeit für 53BP 1 unabhängig ist vom LET, allerdings ist die Wartezeit, bis die Rekrutierung beginnt, bei hoch-LET-Strahlung etwas kürzer. Im Gegensatz dazu unterscheidet sich die Rekrutierungskinetik für MDC 1 sehr stark zwischen hoch- und niedrig-LET-Strahlung. So ist die Rekrutierungsgeschwindigkeit nahezu zehnmal höher bei Kohlenstoffbestrahlung wie bei Protonenbestrahlung und die Rekrutierung startet auch um Faktoren schneller.

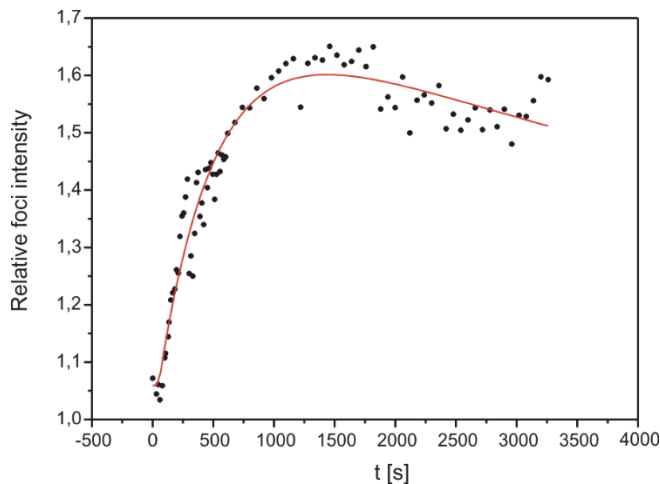


Abb. 3.4: Gemessene, relative Focihelligkeit für MDC1 nach Kohlenstoffbestrahlung

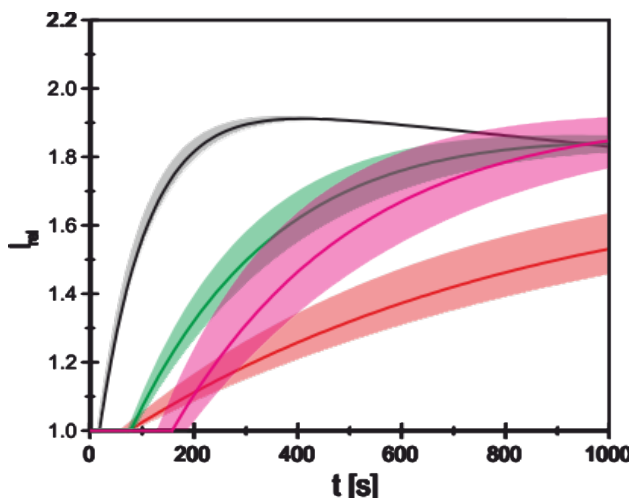


Abb. 3.5: Aus den Messungen modellierte Rekrutierungskinetiken für 53BP1, Kohlenstoffbestrahlt (grün), Protonenbestrahlt (violett), und für MDC 1, Kohlenstoffbestrahlt (schwarz) und Protonenbestrahlt (orange). Die helleren Bereiche um jede Kurve stellen das 1σ -Fehlerintervall der Kurve dar.

d) Entwicklung von Bestrahlungsmodalitäten für Protonen- und Kohlenstoffbestrahlung zur Analyse der Dynamik von DSB-Reparaturfoci (zusammen mit LMU):

Zum Studium der Focibeweglichkeit wurde eine Matrixbestrahlung entwickelt, bei der der Abstand einzelner Foci durch den Abstand der Ionenbestrahlung fest vorgegeben ist und somit ebenfalls unter Lebendzellbedingungen mit stroboskopischen Aufnahmen die Relativabstände zwischen den Foci vermessen werden konnten. Dieses Verfahren erlaubte die Vermessung der relativen Focibewegung im Zellkern mit deutlich geringeren systematischen Fehlern als beim Nachverfolgen von einzelnen Foci. Damit wurde gezeigt, dass sich die Bewegung zu größeren Abständen vom Ursprungsabstand immer mehr verlangsamt. Dieses Verhalten kann sehr gut durch eine Subdiffusion beschreiben werden (siehe Abbildung 3.6) (Girst et al., 2013). Die Daten zeigen vor allem bei langen Zeitintervallen eine deutlich langsamere Bewegung als vorhergehende Analysen mit Einzelteilchenverfolgung. Außerdem sind die Daten in sehr guter Übereinstimmung mit der Untersuchung der Dynamik von ungeschädigtem Chromatin.

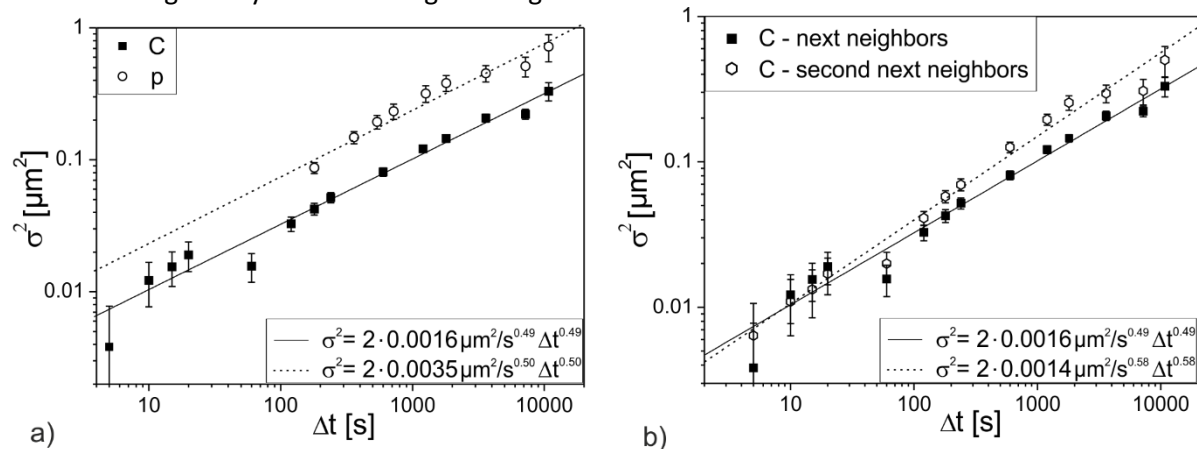


Abb. 3.6: Änderung des mittleren quadratischen Abstandes benachbarter Foci (anfangsabstand ca. 4 μm) nach Kohlenstoff und Protonenbestrahlung (a). Werden zur Ermittlung des Abstandes die übernächsten Nachbarn herangezogen, so erscheint die Bewegung etwas schneller, ist aber auf eine Konformationsänderung der Zellen zurückzuführen (b).

e) Entwicklung von Schrägbestrahlungsprotokollen für 20 MeV Protonen und 55 MeV Kohlenstoffionen (zusammen mit LMU)

Zur Untersuchung der inneren Feinstruktur von strahleninduzierten Foci (siehe auch Bericht LMU) wurden Bestrahlungsprotokolle entwickelt, mit denen insbesondere auch für hoch-LET Bestrahlungen (z.B. mit 55 MeV Kohlenstoffionen) die Bestrahlungsrichtung nahezu parallel zur optischen Fokalebene im Fluoreszenzmikroskop erfolgt. Diese Bestrahlungen erfolgen unter 9° zur Substratoberfläche. Damit ist allerdings keine echte Mikrobestrahlung möglich. Die Ionenspuren sind nahezu stochastisch in den Zellproben verteilt. Damit wird es aber bei der Fluoreszenzmikroskopie möglich, die Ionenspuren mit höchster Auflösung in der optischen Fokalebene zu studieren.

f) Durchführung von ultrahochoflösender Lokalisations-Mikroskopie (in Zusammenarbeit mit der LMU und der Universität Heidelberg)

Schon mit konventioneller optischer Fluoreszenzmikroskopie ist erkennbar, dass die meisten strahleninduzierten Foci sowohl nach niedrig-LET, wie noch ausgeprägter nach hoch-LET Bestrahlung, deutlich größer sind als die Auflösung des Mikroskops eine Punktverteilung abbilden würde. Außerdem deuten sich Anzeichen einer Substruktur. Eines der Hauptziele des Verbundes war daher die Aufklärung der Substruktur von Reparaturfoci, einerseits, um zu ergründen, ob es auch bei hoch LET-Strahlung möglich ist, die Anzahl der induzierten Doppelstrangbrüche (DSB) durch das Zählen von Reparaturfoci zu ermöglichen und andererseits die Ursachen und die Funktion eventueller Focisubstrukturen aufzuklären. Die ersten Experimente mit Lokalisationsmikroskopie waren vielversprechend, da es gelang optische Signale mit einer Auflösung besser als 100 nm von strahleninduzierten Foci zu erlangen. Allerdings war die Anzahl individueller optischer Signale so

gering, dass eine genauere Beurteilung der Fokusstrukturen nicht möglich war. Auch nach intensiver Präparationsarbeit ist es nicht gelungen, die Ausbeute an optischen Signalen signifikant zu steigern und damit z.B. eine Korrelationsanalyse zweier unterschiedlicher Reparaturproteine zu bewerkstelligen.

g) STED Mikroskopie an strahleninduzierten Foci (in Zusammenarbeit mit LMU)

Auch die STED-Mikroskopie (STED: STimulated Emission Depletion) ist eine Methode, um Fluoreszenzmikroskopie unterhalb dem klassischen Beugungslimit durchzuführen, und somit ultrahochauflösende optische Mikroskopie zu betreiben. Erste Experimente an einem kommerziellen STED (LEICA) zeigten, dass die Informationsdichte bei von uns präparierten Focistrukturen besser war als bei der Lokalisationsmikroskopie. Wir haben daher, mit Mitteln der Universität der Bundeswehr München ein kommerzielles STED-Mikroskop (LEICA) beschafft und noch etwa ein Jahr lang im Berichtszeitraum zur Analyse der Foci-Feinstruktur von Reparaturproteinen benutzt. Nach der Optimierung der Färbemethoden konnten erstmalig Korrelationsanalysen von γ -H2AX, 53BP1 und Rad 52 durchgeführt werden

Abbildung 3.7 zeigt ultrahochauflösende STED Aufnahmen von 53BP1 und γ -H2AX und Abbildung 3.8 von Rad51 und 53BP1, die durch Bestrahlung mit 36 MeV Kohlenstoff und 21 MeV Protonen in HeLa Zellen induziert wurden. Für die Kohlenstoffionen ergibt sich dadurch eine Verteilung der Schäden auf Spuren entlang der Ionenspurs in der Beobachtungsebene. Dies ist für eine optimale Ausnutzung der sehr guten lateralen Auflösung des STED Mikroskops vorteilhaft. Für Protonen ändert sich an der Schadensverteilung nichts, allerdings wurden so die gleichen Bestrahlungsbedingungen erzielt. Für 53BP1 und γ H2AX ergibt sich sowohl für Protonenbestrahlung als auch für die Bestrahlung mit Kohlenstoffionen eine innere Substruktur der Reparaturfoci. Für Rad51 kann keine Substruktur dargestellt werden. Es kann eine teilweise Antikorrelation von 53BP1 und γ H2AX gezeigt werden. Außerdem ist eine fast vollständige Antikorrelation von Rad51 und 53BP1 sichtbar (J. Reindl et al, Publikation in Vorbereitung). Dies bedeutet, dass sich die Anlagerungsstellen von 53BP1 und Rad51 gegenseitig ausschließen.

Die Bedeutung der Beobachtungen im Hinblick auf die stattfindenden Reparaturprozesse, insbesondere der homologen Reparatur (HR) und der nicht-homologen Endenverknüpfung (NHEJ) werden gerade erarbeitet. Die Arbeiten zeigen erstmalig die Feinstruktur der Foci von Reparaturproteinen mit einer Auflösung besser als 100 nm und der Korrelation und Antikorrelation dieser Foci mit dieser Präzision.

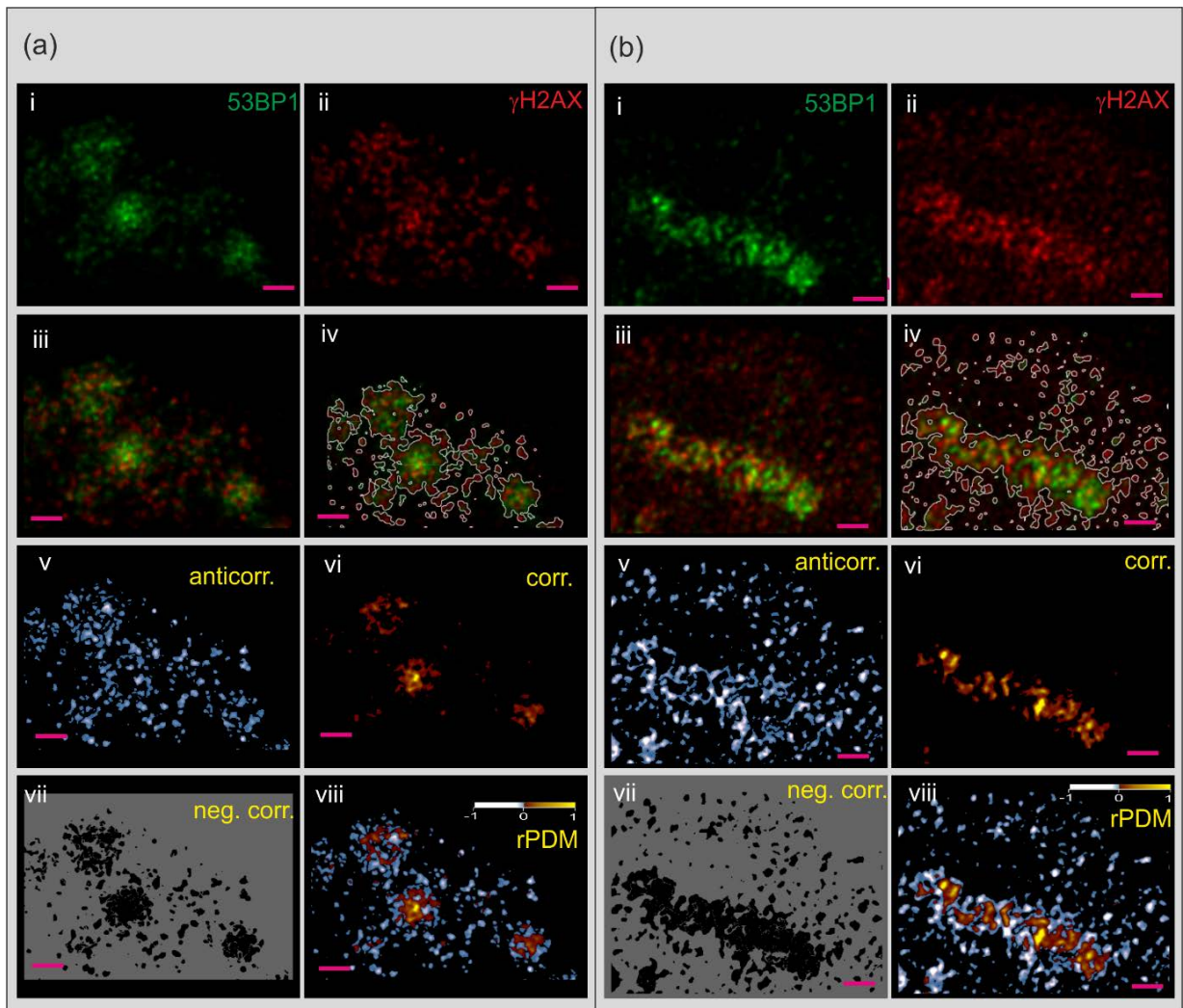


Abb. 3.7: Ausschnitt zweier HeLa Zellen, die mit 21 MeV Protonen (a) und 36 MeV Kohlenstoffionen (b) bestrahlt wurden. (i-iii) zeigen den Ausschnitt mit 53BP1 in grün (i) und γ H2AX in rot (ii) und das zweifarbige Bild (iii). In (iv) ist die zur Auswertung verwendete ROI (region of interest) dargestellt. (v) zeigt die antikorrelierten und (vi) die korrelierten Pixel. (vii) zeigt die Pixel, die in der rPDM Analyse vernachlässigten Pixel in grau. In (viii) ist die komplette rPDM Pixelverteilung dargestellt. corr.= korrelierte Pixel, anticorr.=antikorrelierte Pixel, neg.corr.= von der Analyse ausgeschlossene Pixel, rPDM=reduced PDM

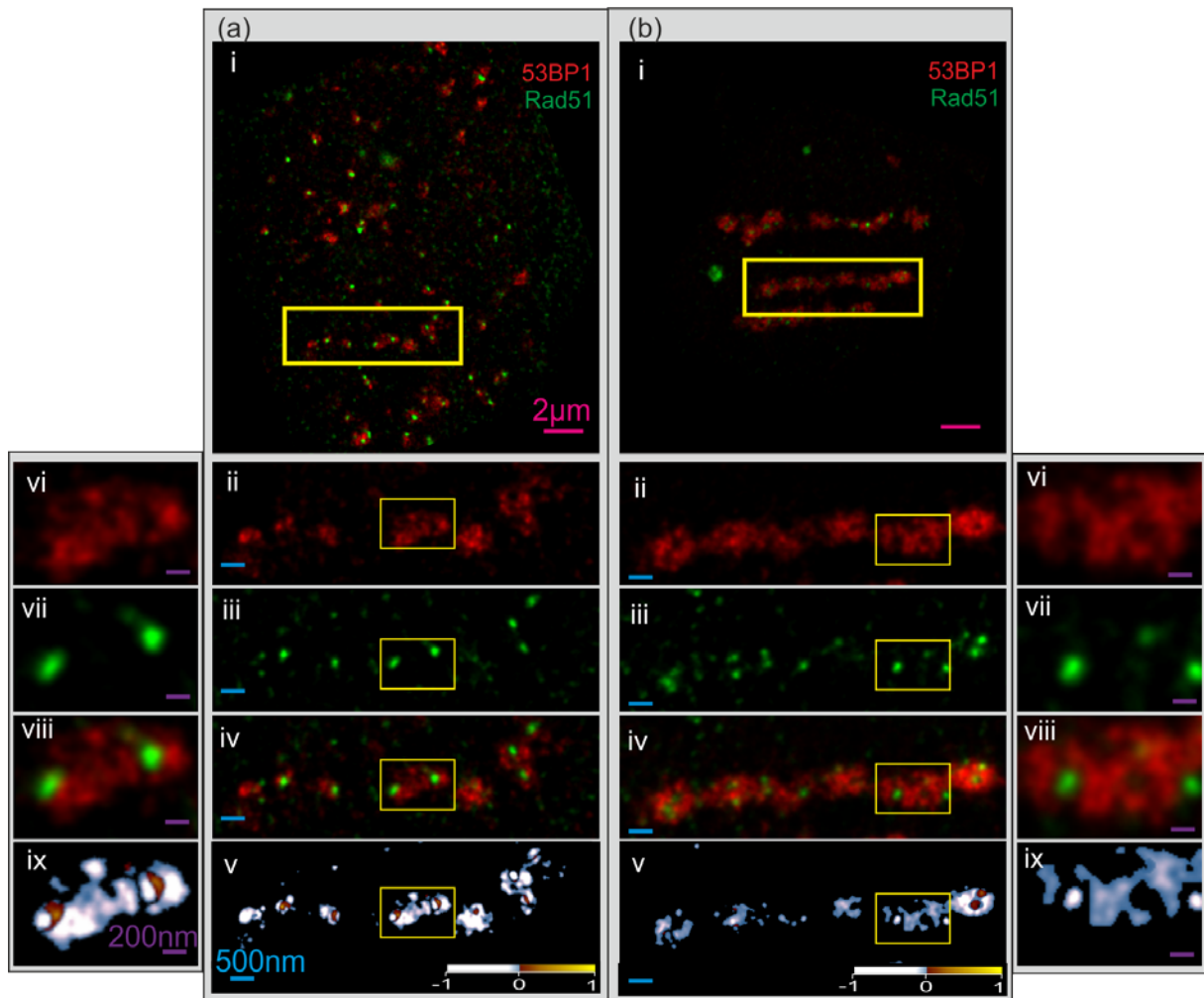


Abb. 3.8: Rad51 (grün) und 53BP1 (rot) Verteilung in einem HeLa Zellkern 1h nach Bestrahlung mit 21 MeV Protonen (a) und 36 MeV Kohlenstoffionen. (i) zeigt den ganzen Zellkern, mit einer Vergrößerung des gelb umrandeten $25 \mu\text{m}^2$ Rechtecks (ROI im roten Kanal (ii), im grünen Kanal (iii) und im zweifarbigen Bild (iv)). (v) zeigt die dazugehörige rPDM Pixelverteilung. Die Bilder (vi) bis (viii) zeigen eine weitere Vergrößerung der kleinen ROI und (ix) die dazugehörige rPDM Pixelverteilung.

Technische Universität, Fachbereich Zoologie, Strahlenbiologie und DNA Reparatur, Darmstadt

a) Experimente zur Charakterisierung der Reparatur von heterochromatischen DSBs in der G1-Phase in Abhängigkeit von CtIP: Etablierung von siRNA Technologie und Quantifizierung der DSB-Reparaturkinetiken in verschiedenen Zelllinien mittels immunfluoreszenz-mikroskopischer Analyse in der G1-Phase nach Bestrahlung

Die Reparatur strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) weist sowohl in der G1- als auch der G2-Phase eine biphasische Kinetik auf, wobei etwa 80 % der Brüche eine schnelle Reparatur zeigen und im Euchromatin liegen, während die restlichen 20 % mit langsamer Kinetik repariert werden und im Heterochromatin lokalisiert sind (Riballo et al. 2004., Goodarzi et al. 2008). Diese heterochromatischen DSBs werden in der G2-Phase mittels Homologer Rekombination (HR) und in der G1-Phase über den Prozess der Nicht-homologen Endverknüpfung (NHEJ) repariert, wohingegen die Reparatur der euchromatischen DSBs in beiden Zellzyklusphasen über den NHEJ-Weg erfolgt. Eine Voraussetzung für die Reparatur heterochromatischer DSBs in der G2-Phase mittels HR ist eine Anresekion der DSB-Enden durch das Protein CtIP (Sartori et al. 2007). Untersuchungen von Hühnerlymphozyten (DT40-Zellen) deuteten darauf hin, dass es auch in der G1-Phase zu einer CtIP-vermittelten Anresekion von DSBs kommt (Yun and Hiom 2009).

Im Rahmen dieses Projekts sollte nun überprüft werden, ob CtIP tatsächlich eine Funktion bei der DSB-Reparatur in der G1-Phase besitzt. Dazu sollte das Reparaturverhalten CtIP-defizienter Zellen nach Röntgenbestrahlung in der G1-Phase genau charakterisiert werden. Da in früheren Studien ein Zusammenhang zwischen der CtIP-Aktivität und der Ausbildung chromosomaler Translokationen

beschrieben wurde (Zhang and Jasin 2011), sollte zudem untersucht werden, ob ein solcher Zusammenhang auch in der G1-Phase besteht und auf CtIP zurückzuführen ist.

Zur Untersuchung des DSB-Reparaturverhaltens CtIP-depletierter Zellen wurde die Methode der γ H2AX-Immunfluoreszenz angewandt. Nach Auftreten eines DSBs wird die Histonvariante H2AX in einem Bereich von mehreren Megabasenpaaren um den Schaden herum phosphoryliert (Rogakou et al. 1998). Diese als γ H2AX bezeichnete Phosphorylierung kann mit Hilfe von phosphospezifischen Antikörpern in Form von sogenannten Foci sichtbar gemacht werden. Die Analyse dieser γ H2AX-Foci ermöglicht eine exakte Quantifizierung von DSBs und eine genaue Untersuchung des DSB-Reparaturverhaltens (Löbrich et al. 2010). Da die DSB-Reparatur in G1-Phase-Zellen untersucht werden sollte, wurde ein zellzykluspezifischer Ansatz der γ H2AX-Analyse gewählt. Dabei wurden die Zellen vor der Bestrahlung für 30 min mit dem Thymidin-Analogen EdU inkubiert, welches von replizierenden Zellen in die DNA eingebaut wird und somit eine Identifizierung von S-Phase-Zellen ermöglicht. Mit Hilfe der Mikroskop-Software Metafer (Metasystems) wurde neben der EdU-Intensität auch der DNA-Gehalt der Zellen anhand des DAPI-Signals bestimmt. In einer zweidimensionalen Auftragung konnten dann G1-, S- und G2-Zellen als getrennte Population dargestellt werden, die auch getrennt voneinander analysiert werden konnten (Abbildung 4.1A). Durch Zugabe des Spindelgifts Nocodazol wurde weiterhin verhindert, dass in der G2-Phase bestrahlte Zellen während des Untersuchungszeitraums in die G1-Phase progressieren und als G1-bestrahlte Zellen ausgewertet wurden. So war eine hochspezifische Analyse G1-bestrahlter Zellen möglich.

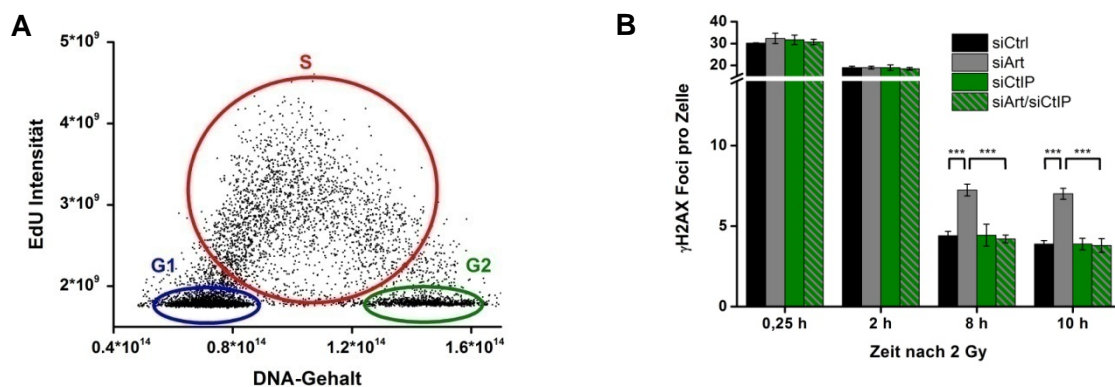


Abb. 4.1: DNA-Reparatur in CtIP- und/oder Artemis-depletierten 82-6 hTert-Fibroblasten nach strahleninduzierten Schäden in der G1-Phase

48 h nach siRNA-Transfektion (Art-siRNA, CtIP-siRNA, Ctrl-siRNA) wurden 82-6hTert-Zellen bestrahlt (2 Gy + Nocodazol). Nach Ablauf der Reparaturzeit (0,25 h, 2 h, 8 h, 10 h) wurden die Zellen fixiert. Unbestrahlte Zellen wurden identisch behandelt. Die Zellen wurden 30 min vor der Bestrahlung und während der Reparaturzeit mit dem Spindelfasergift Nocodazol und dem Thymidin-Analog EdU inkubiert.

(A) Identifizierung der Zellzyklusphasen in exponentiell wachsenden humanen Fibroblasten. Nach der Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen am Mikroskop eingescannt und die EdU-Intensität (Y-Achse, dimensionslos) gegen den anhand der DAPI-Intensität (X-Achse, dimensionslos) ermittelten DNA-Gehalt aufgetragen. Die G1-Phase-Zellen können von G2-Phase-Zellen anhand des DNA-Gehaltes und von S-Phase-Zellen durch das EdU-Signal unterschieden werden.

(B) γ H2AX-Foci in der G1-Phase von 82-6hTert. Die Kontrollwerte der unbestrahlten Proben wurden abgezogen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus 3 Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler der Mittelwerte. (***: $p < 0,001$)

Mit diesem Ansatz wurde zunächst das Reparaturverhalten von Zellen untersucht, in denen CtIP oder die Nuklease Artemis (Art) mittels siRNA depletiert wurden. Aus früheren Studien war bekannt, dass Artemis-defiziente Zellen einen Defekt in der langsamen Reparaturkomponente der G1- und G2-Phase aufweisen (Riballo et al. 2004, Beucher et al. 2009). Artemis ist somit bei der Reparatur heterochromatischer DSBs von Bedeutung. Die genaue Funktion von Artemis ist dabei zwar noch nicht geklärt, es wurde aber postuliert, dass Artemis wichtig sein könnte, um Sekundärstrukturen aufzulösen, die infolge der Resektion entstehen (Beucher et al. 2009). Ein Defekt in der langsamen Reparaturkomponente wurde auch in Artemis-depletierter Zellen beobachtet (Abbildung 4.1B). Eine

Depletion von CtIP hatte allein keinen Effekt, führte im Artemis-defizienten Hintergrund allerdings zum Aufheben des Artemis-abhängigen Reparaturdefekts. Diese Beobachtung verdeutlicht, dass CtIP auch an der Reparatur heterochromatischer DSBs in der G1-Phase beteiligt ist. Geht man davon aus, dass Artemis erst dann von Bedeutung ist, wenn DSB-Enden resektiert vorliegen (Beucher et al. 2009), so stellt dieses Ergebnis einen ersten Hinweis darauf, dass heterochromatische DSBs auch in der G1-Phase von CtIP anresektiert werden.

b) Experimente zur Untersuchung der Regulation von CtIP bei der DSB-Reparatur in G1:

1. Herstellung verschiedener CtIP-Mutanten (Mutation der ATM- und CDK-abhängigen Phosphorylierungsstellen in Phosphomutanten)

Die Bedeutung von CtIP wurde bisher nur für die DSB-Reparaturprozesse in der S- und G2-Phase untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass CtIP nach ionisierender Strahlung in der Zelle in einer hyperphosphorylierten Form vorliegt (Li et al. 2000, Baer und Baer 2001). Zunächst wurden dabei 4 Phosphorylierungsstellen für CtIP beschrieben, wobei die beiden Stellen S664 und S745 von der Kinase ATM phosphoryliert werden (Li et al. 2000). Die Phosphorylierung der beiden Stellen S327 und T847 erfolgt dagegen CDK-abhängig (Huertas et al. 2008). Im Rahmen dieses Projektes sollte nun untersucht werden, ob diese 4 Phosphorylierungsstellen auch für die Funktion von CtIP in der G1-Phase von Bedeutung sind. Dafür wurden zunächst unterschiedliche Phosphomutanten von CtIP generiert, indem die zuvor beschriebenen Serin- oder Threonin-Reste mittels zielgerichteter Mutagenese durch einen nicht phosphorylierbaren Alanin-Rest ersetzt wurden. Durch einen Austausch von T847 gegen Glutaminsäure wurde zudem eine Phospho-Mimik-Mutante hergestellt, in der eine dauerhaft phosphorylierte Form von CtIP simuliert wird. Schematische Darstellungen der generierten CtIP-Mutanten sind in Abbildung 4.2 aufgeführt. Alle Konstrukte besitzen eine EGFP-Sequenz, so dass Zellen, die erfolgreich mit diesen Konstrukten transfiziert wurden, anhand der EGFP-Expression identifiziert werden konnten.

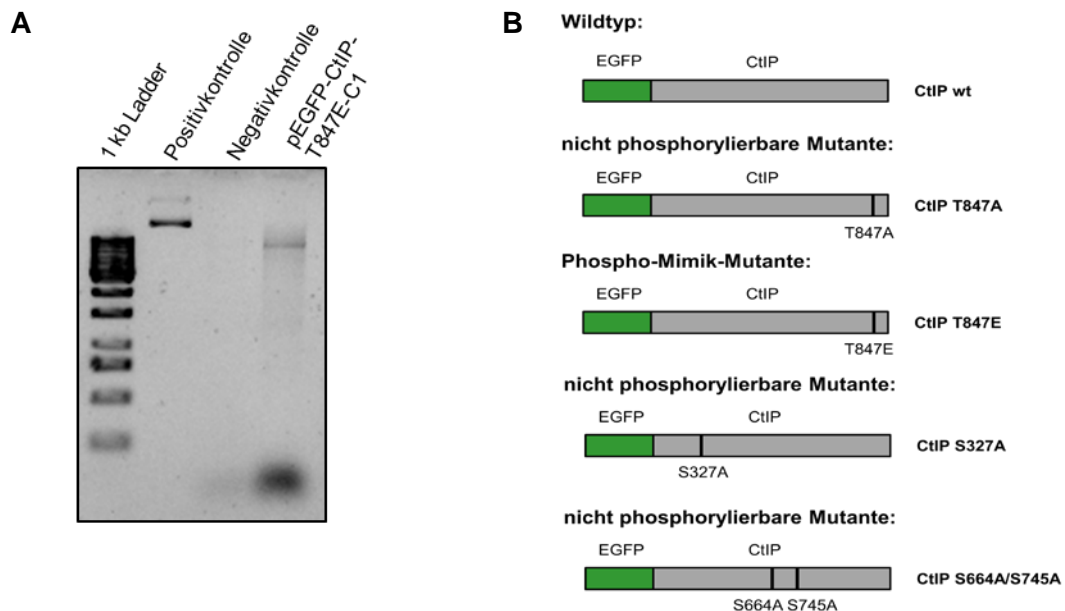


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der hergestellten CtIP-Konstrukte

(A) Dargestellt ist beispielhaft ein 1 %iges Agarosegel des Mutageneseansatzes pEGFP_CtIP-T847E_C1. Aufgetragen wurden 5 µl 1 kb Ladder, 100 ng Ausgangsplasmid (Positivkontrolle), eine Negativkontrolle (ohne Primer) und 10 µl Mutageneseansatz nach Inkubation mit DpnI.

(B) Schematische Darstellung der CtIP-Konstrukte. Gezeigt ist der Wildtyp, die nicht phosphorylierbaren Mutanten, bei der das Threonin an Position 847, das Serin an Position 327 oder die Serine an den Positionen 664 und 745 durch ein Alanin ausgetauscht wurden, sowie die Phospho-Mimik-Mutante, bei der das Threonin an Position 847 durch Glutaminsäure ersetzt wurde. Alle Konstrukte besaßen eine EGFP-Sequenz als Transfektions-Marker.

2. Analyse der DSB-Reparaturkinetiken der verschiedenen CtIP-Phosphorylierungskonstrukte im Vergleich zum Wildtyp nach Bestrahlung

Für die unterschiedlichen CtIP-Mutanten konnte nun das DSB-Reparaturverhalten nach Bestrahlung in der G1-Phase untersucht werden. Dazu wurde der zuvor beschriebene Ansatz der G1-spezifischen γ H2AX-Analyse gewählt. Um spezifisch die Wirkung der erzeugten CtIP-Mutationen zu bestimmen, wurde das endogene CtIP mittels siRNA depletiert. Eine Depletion der modifizierten CtIP-Varianten wurde durch Einbringen von 3 stillen Punktmutationen in die Erkennungssequenz der CtIP-siRNA verhindert. Da eine Defizienz von CtIP alleine keinen Einfluss auf das DSB-Reparaturverhalten in der G1-Phase zeigte, wurde in den Ansätzen auch die Nuklease Artemis depletiert und untersucht, welche CtIP-Variante in der Lage ist, den Artemis-abhängigen Reparaturdefekt aufzuheben. Der Artemis-abhängige Reparaturdefekt tritt nur dann auf, wenn CtIP aktiv ist, durch das Aufheben des Artemis-abhängigen Reparaturdefekts konnte so bestimmt werden, welche Phosphorylierungsstellen von CtIP in der G1-Phase relevant sind.

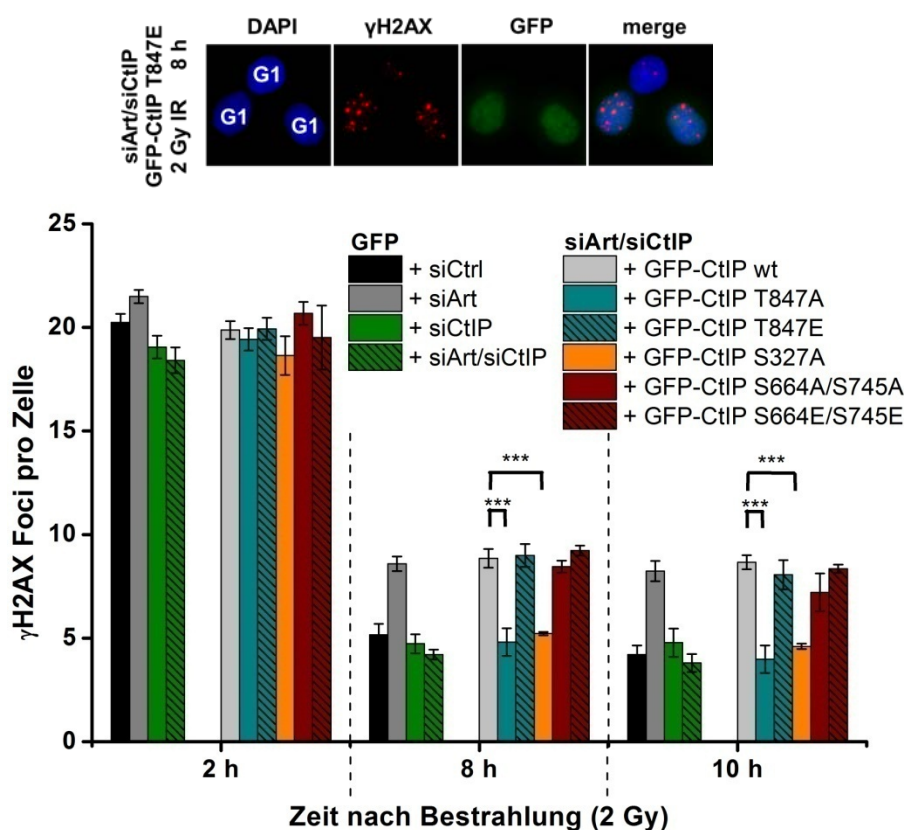


Abb. 4.3: DNA-Reparatur in CtIP-komplementierten Artemis-depletierten 82-6hTertFibroblasten nach strahleninduzierten Schäden in der G1-Phase

In 82-6hTert-Fibroblasten wurden das endogene CtIP und/oder Artemis durch siRNA depletiert und die Zellen 24 h später mit verschiedenen CtIP-Konstrukten transfiziert (GFP-CtIP wt, GFP-CtIP S327A, GFP-CtIP T847A, GFP-CtIP T847E, GFP-CtIP S664A-S745A, GFP-CtIP S664E-S745E). 24 h nach der Plasmidtransfektion wurden die Zellen mit 2 Gy bestrahlt und zu verschiedenen Reparaturzeiten fixiert. γ H2AX-Foci wurden in GFP-positiven G1-Phase-Zellen ausgewertet. Als Kontrolle wurden unbestrahlte Proben mitgeführt. Die Kontrollwerte der unbestrahlten Proben wurden abgezogen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus 3 Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler der Mittelwerte. (***) : $p < 0.001$

Zellen, in denen Artemis und CtIP depletiert wurden und die mit einer Wildtyp-Variante von CtIP komplementiert wurden, zeigten den erwarteten γ H2AX-Reparaturdefekt, wie er in Artemis-depletierten Zellen auftrat (Abbildung 4.3). Zellen mit einer CtIP-Variante, die am Threonin an Position 847 nicht phosphoryliert werden kann (T847A), zeigten dagegen keinen Artemis-

Reparaturdefekt. Dies verdeutlicht, dass in Zellen mit dieser CtIP-Variante keine Anresection der DSB-Enden stattgefunden hat, so dass sich die Artemis-Defizienz nicht in Form eines Reparaturdefekts manifestieren konnte. Die Phosphorylierung von CtIP am Threonin 847 scheint somit für die CtIP-Aktivität in der G1-Phase essentiell zu sein. Konsistent mit dieser Annahme zeigte eine Phospho-Mimic-Mutante dieses Threonin-Rests (T847E), die eine ständig phosphorylierte Form von CtIP imitiert, den erwarteten Artemis-Reparaturdefekt. Ein vergleichbares Verhalten wie die T847A-Variante zeigten auch Zellen, die mit dem S347A-Konstrukt komplementiert wurden, also mit einer CtIP-Variante, bei der das Serin an Position 347 nicht phosphoryliert werden kann. Auch hier wurde kein Artemis-Reparaturdefekt beobachtet, eine Phosphorylierung von Serin 347 scheint für die CtIP-Aktivität in G1 also ebenfalls essentiell zu sein. Neben den beiden CDK-abhängigen Phosphorylierungsstellen von CtIP wurden auch die beiden ATM-abhängigen Phosphorylierungsstellen S664 und S745 untersucht. Hier zeigten sowohl Zellen, in denen beiden Stellen nicht phosphoryliert werden konnten (S664A/S745A), als auch Zellen, in denen eine Phosphorylierung beider Stellen imitiert wurde (S664E/S745E), den Artemis-abhängigen Reparaturdefekt. Dies verdeutlicht, dass eine Aktivierung von CtIP durch ATM, wie sie in der G2-Phase essentiell ist, in der G1-Phase nicht relevant ist.

c) Experimente zu den zytogenetischen Techniken:

1. Entwicklung und Etablierung der PCC- und FISH-Analyse in G1-Phase bestrahlten Fibroblasten

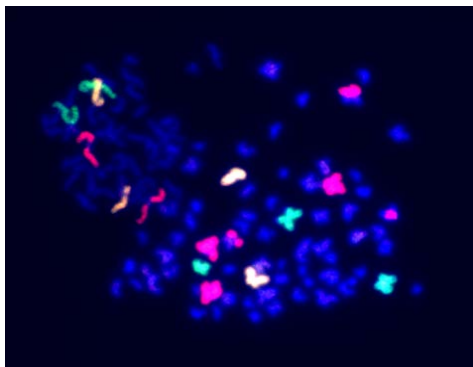


Abb. 4.4: **PCC-Analyse von 82-6hTert-Fibroblasten in der G1-Phase, fusioniert mit einer mitotischen HeLa-Zelle.**

Exemplarisches Beispiel von 82-6hTert-Fibroblasten, die mit mitotischen HeLa-Zellen fusioniert wurden, um eine Kondensation von Chromosomen der G1-Phase zu erreichen. Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) wurden mit Sonden gegen das Chromosom 1 (rot), 2 (grün) und 4 (gelb) durchgeführt.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass eine Depletion von CtIP zu einer Reduktion der Zahl an chromosomalen Translokationen führt (Zhang and Jasin 2011). Nachdem wir mit Hilfe der γH2AX-Analyse eine Funktion von CtIP bei der Reparatur heterochromatischer DSBs in der G1-Phase beschreiben konnten, stellte sich die Frage, ob sich eine CtIP-Depletion auch nach Bestrahlung in der G1-Phase in einer verminderten Zahl an Translokationen manifestiert. Zur Klärung dieser Frage wurde zunächst die Methode der vorzeitigen Chromosomenkondensation (PCC, *premature chromosome condensation*) in der G1-Phase etabliert. Um zu erreichen, dass Chromosomen in der G1-Phase kondensieren, wurden bestrahlte G1-Phase-Zellen von 82-6hTert-Fibroblasten mit mitotischen HeLa-Zellen fusioniert (Mosesso et al. 1999). Anschließend wurde eine Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) durchgeführt, bei der die Chromosomen 1, 2 und 4 mit spezifischen Sonden angefärbt wurden (Abbildung 4.4). Für die so angefärbten Chromosomen konnte dann die Zahl an Chromosomenbrüchen (Abbildung 4.5A) und Translokationen (sichtbar als Farbwechsel auf einem Chromosom, Abbildung 4.5B) bestimmt werden.

2. Analyse von Translokationen in Abhängigkeit von CtIP in G1-Phase bestrahlten Fibroblasten und Korrelation dieser Ergebnisse mit den Reparaturkinetiken in der G1-Phase

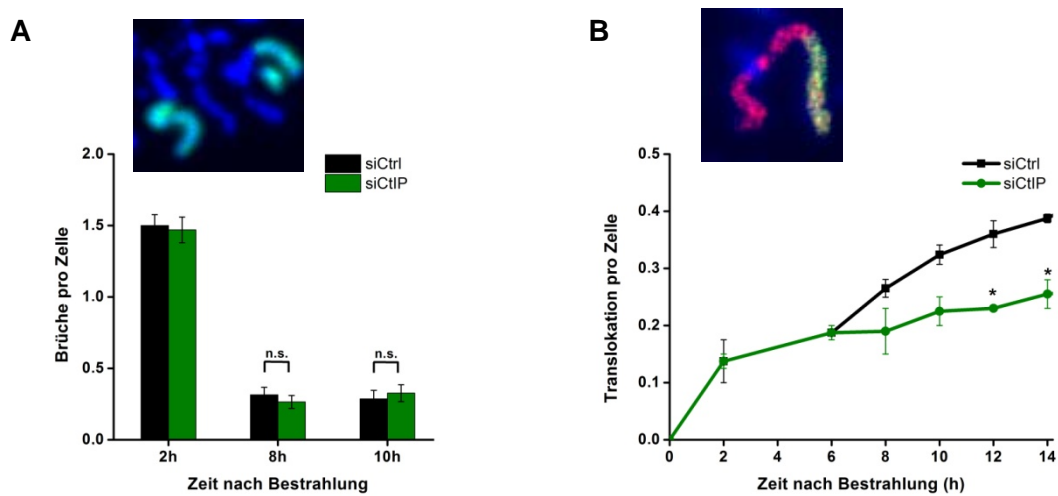


Abb. 4.5: **Chromosomale Studien in CtIP-depletierten 82-6hTert-Fibroblasten nach strahleninduzierten Schäden in der G1-Phase**

(A-B) 82-6hTert-Fibroblasten wurden 48 h nach siRNA-Transfektion mit 7 Gy Röntgenstrahlung geschädigt. Die Fibroblasten wurden nach den Reparaturzeiten mit mitotischen HeLa-Zellen fusioniert. Nach FISH-Färbung der Chromosomen 1, 2 und 4 wurden die Chromosomenbrüche (A) und Translokationen (B) ausgewertet. Als Kontrolle wurden unbestrahlte Proben mitgeführt. Die Kontrollwerte der unbestrahlten Probe wurden abgezogen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus 3 Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler der Mittelwerte. (*: $p < 0.05$)

Zur Untersuchung der Rolle von CtIP bei der Entstehung strahleninduzierter chromosomaler Aberrationen wurde die Zahl an Chromosomenbrüchen und Translokationen in CtIP-depletierten Zellen nach Röntgenbestrahlung bestimmt. Wie zuvor bei der Analyse strahleninduzierter γ H2AX-Foci wurde dabei kein Unterschied in der Zahl an Chromosomenbrüchen im Vergleich zu CtIP-profizienten Zellen festgestellt (Abbildung 4.5A). Bei der Zahl strahleninduzierter Translokationen wurde dagegen ein Unterschied zwischen CtIP-depletierten und Wildtyp-Zellen beobachtet. Die Entstehungskinetik der Translokationen zeigte einen biphasischen Verlauf mit einer schnellen Komponente in den ersten Stunden nach Bestrahlung und einer anschließenden langsamen Komponente (Abbildung 4.5B). Dabei zeigte die schnelle Komponente der Translokationsentstehung ein CtIP-unabhängiges Verhalten, wohingegen die langsame Komponente CtIP-abhängig war. So wurden zu späten Reparaturzeiten signifikant weniger Translokationen in CtIP-depletierten Zellen detektiert als in CtIP-profizienten Zellen. Dies verdeutlicht, dass zumindest ein Teil der strahleninduzierten Translokationen in der G1-Phase durch CtIP-abhängige Mechanismen erzeugt werden.

Es konnte in einer früheren Studie gezeigt werden, dass CtIP eine Funktion im Mechanismus des alternativen NHEJ (alt-NHEJ) besitzt (Lee-Theilen et al. 2011). Dieser alternative Weg kann unter bestimmten Umständen ablaufen und den dominierenden Weg des canonischen NHEJ (c-NHEJ) ersetzen. Abschließend sollte daher untersucht werden, ob die langsame Komponente der DSB-Reparatur in der G1-Phase, welche mit der Ausbildung von Translokationen einhergeht, über den Weg des alt-NHEJ erfolgt. Dazu wurde die Zahl an Chromosomenbrüchen und Translokationen in Zellen untersucht, in denen wichtige Faktoren des alt-NHEJ mittels siRNA depletiert waren (Ligase I und Ligase III) oder mit Hilfe eines chemischen Inhibitors gehemmt wurden (PARP1). Sowohl bei den Chromosomenbrüchen als auch bei den Translokationen konnte kein Unterschied zu den Wildtyp-Zellen beobachtet (Abb. 6A+B) werden. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Ausbildung von Translokationen nach strahleninduzierten Schäden in der G1-Phase nicht über den Weg des alt-NHEJ erfolgt. Daher wurde zum Abschluss dieser Studie überprüft, ob diese Translokationen auf Prozesse des c-NHEJ zurückzuführen sind, indem mit der Kinase DNA-PK ein wichtiger Faktor des c-NHEJ inhibiert wurde. Der Inhibitor (DNA-PKi) wurde dabei erst 6 h nach der Bestrahlung zugegeben,

um spezifisch den Einfluss auf die langsame Reparaturkomponente zu untersuchen, ohne dass dabei die schnelle Komponente beeinflusst wird. Die DNA-PK-inhibierten Zellen zeigten nach langen Reparaturzeiten eine deutliche Zunahme an Chromosomenbrüchen, was auf den induzierten DSB-Reparaturdefekt zurückzuführen ist (Abbildung 4.6C). Die Zahl an Translokationen nahm dagegen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen signifikant ab. Die Ausbildung der Translokation in DNA-PK inhibierten Zellen ist mit der von CtIP-depletierte Zellen vergleichbar (siehe Abbildung 4.5B). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die CtIP-abhängig erzeugten, strahleninduzierten Translokationen in der G1-Phase durch einen c-NHEJ-Weg erzeugt werden.

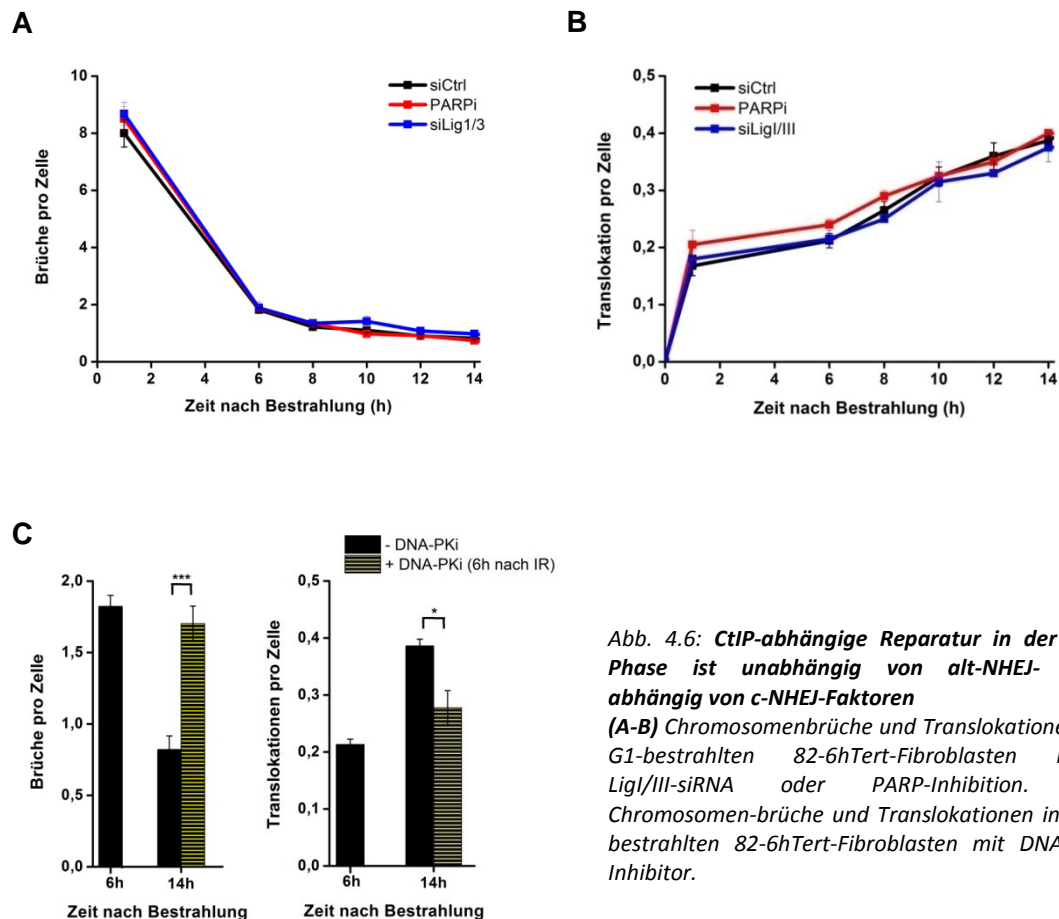


Abb. 4.6: **CtIP-abhängige Reparatur in der G1-Phase ist unabhängig von alt-NHEJ- und abhängig von c-NHEJ-Faktoren** (A-B) Chromosomenbrüche und Translokationen in G1-bestrahlten 82-6hTert-Fibroblasten nach Lig1/III-siRNA oder PARP-Inhibition. (C) Chromosomen-brüche und Translokationen in G1-bestrahlten 82-6hTert-Fibroblasten mit DNA-PK-Inhibitor.

Zusammenfassend zeigen die im Rahmen dieser Studie gewonnen Ergebnisse, dass CtIP auch in der G1-Phase an der Reparatur heterochromatischer DSBs beteiligt ist und dass diese Brüchen von CtIP anresektiert werden. Die Reparatur dieser DSBs erfolgt über den Weg des c-NHEJ und ist assoziiert mit der Ausbildung chromosomaler Translokationen.

Helmholtz Zentrum München, Institut für Strahlenschutz, München

a) Beschreibung von hetero- und euchromatischen Zellkernregionen im DNA-Modell von PARTRAC

Ein Chromatinstrukturmodell eines menschlichen Fibroblasten wurde unter Berücksichtigung von hetero- und euchromatischen Regionen im Zellkern erstellt. Zur Beschreibung der DNA in atomarer Auflösung wurden ein Basissatz für Heterochromatin und ein Satz für Euchromatin aus jeweils 5 kubischen Chromatinfaserelementen mit 40 nm Kantenlänge konstruiert. Die Elemente für Heterochromatin besitzen eine um den Faktor 2,5 bis 3 höhere Packungsdichte als für Euchromatin. Bei euchromatischen Basiselementen ist auch der höhere Anteil von CG-Nukleotidpaaren im

Euchromatin berücksichtigt. Alle 10 Basiselemente haben eine einheitliche Schnittstelle, so dass euchromatische und heterochromatische Elemente in einem Chromosom nahtlos miteinander verknüpft werden können (Abbildung 5.1).

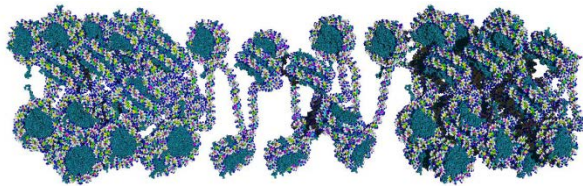


Abb. 5.1: Chromatinfaserstück aus zwei linearen heterochromatischen Basiselementen mit einem euchromatischen Basiselement dazwischen.

Neben der lokalen atomaren Struktur von hetero- und euchromatischen Bereichen musste auch deren Verteilung entlang der Chromosomen und damit im Zellkern modelliert werden. Im ersten Modellansatz wurden diese Bereiche anhand von Isochorendaten aus der Literatur [Costantini 2006] abgeleitet. Mit einem modifizierten Ansatz wurde ein verringerter Anteil von Heterochromatin erreicht (Abbildung 5.2), so dass - in Übereinstimmung mit Literaturdaten [Falk 2014] - der größere Anteil von strahleninduzierten Strangbrüchen in euchromatischen Zellkernbereichen auftrat.

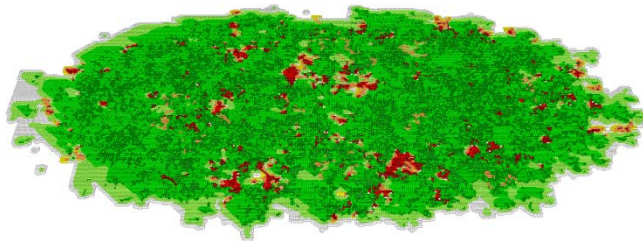


Abb. 5.2: Euchromatische (grün) und heterochromatische (rot) Bereiche im Schnitt durch das Modell des Fibroblastenkerns.

b) Modellierung von Chromosomenaberrationen auf der Basis des DNA-Reparaturmodells in PARTRAC

Im DSB-Reparaturmodell in PARTRAC wird die zeitlich-räumliche Entwicklung der Bruchenden im Verlauf des nicht-homologen End-Joining (NHEJ-) Reparaturpfads beschrieben und unter anderem auch das Auftreten von Fehlverbindungen der DNA-Enden aus unterschiedlichen Chromosomen in Rechnung gestellt. Für die Weiterentwicklung zu einem Modell für Chromosomenaberrationen (CA) genügte es daher, Daten zur Position der Zentromere einfließen zu lassen sowie die komplette Historie von DNA-Fehlverbindungen mit Strangbruchenden aus unterschiedlichen Chromosomen festzuhalten. Damit wurde es möglich, die nach langer Reparaturzeit verbleibenden Chromosomen bzw. entstandenen DNA-Fragmente entsprechend experimentellen zytogenetischen Endpunkten (z.B. azentrische Fragmente, dizentrische Chromosomen) zu klassifizieren. Bei Vergleichen mit experimentellen Daten ist es wichtig, die limitierte Erkennbarkeit kurzer DNA-Fragmente im Mikroskop zu berücksichtigen.

c) Modellierung der Dynamik von γ -H2AX Foci in PARTRAC

Aus dem DSB-Reparatur- und Chromosomenaberrationsmodell wurde ein γ -H2AX-Foci-Modell konzipiert, welches die Entstehung, die Persistenz und das Verschwinden von γ -H2AX-Foci an die räumlich-zeitliche Dynamik des DSB-Reparaturmodells ankoppelte. Pilot-Rechnungen zur Kinetik von γ -H2AX-Foci im Vergleich zu unreparierten DSB lieferten für 20 MeV Protonen eine im Maximum nach 30 Minuten um den Faktor 2 niedrigere Foci-Anzahl im Vergleich zu den initialen DSB. (Abbildung 5.3).

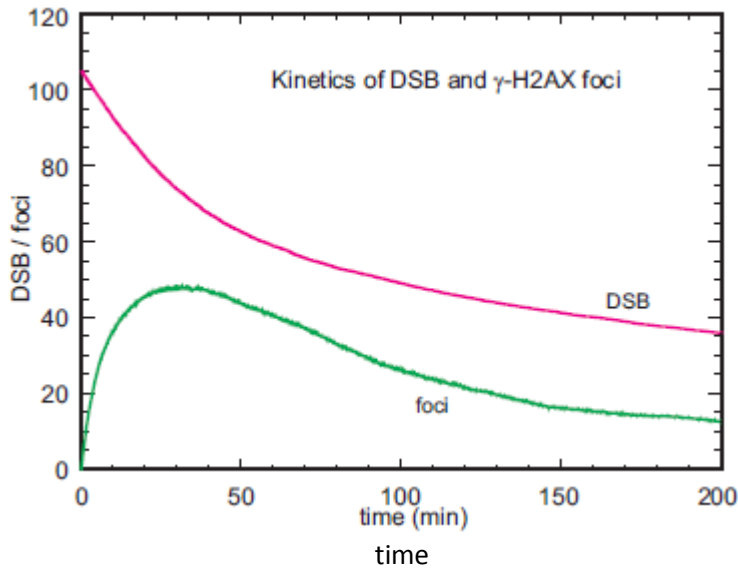


Abb. 5.3: Berechnete Kinetik der DSB-Reparatur und für γ -H2AX-Foci nach 1,7 Gy Bestrahlung mit 20 MeV Protonen

d) Modellrechnungen für initiale DNA Schäden unter Berücksichtigung hetero- und euchromatischer Zellkernregionen

Bei der Berechnung initialer Schäden an der DNA zeigte sich eine im Heterochromatin stärker ausgeprägte Abhängigkeit der DNA-Doppelstrangbrüche von der Ionisationsdichte oder dem linearen Energietransfer (LET) als im Euchromatin. Dies betraf insbesondere die Strangbrüche durch sogenannte direkte Effekte, d.h. aufgrund von Energiedepositionen innerhalb der Zucker-Phosphatstränge. Insgesamt gesehen nahm die Ausbeute an DSB mit steigendem LET bis zu den höchsten berechneten Werten von etwa 1 MeV/ μ m zu; sie war für langsame leichte Ionen (Protonen) höher als für schwere schnelle Ionen mit den gleichen LET (Abbildung 5.4).

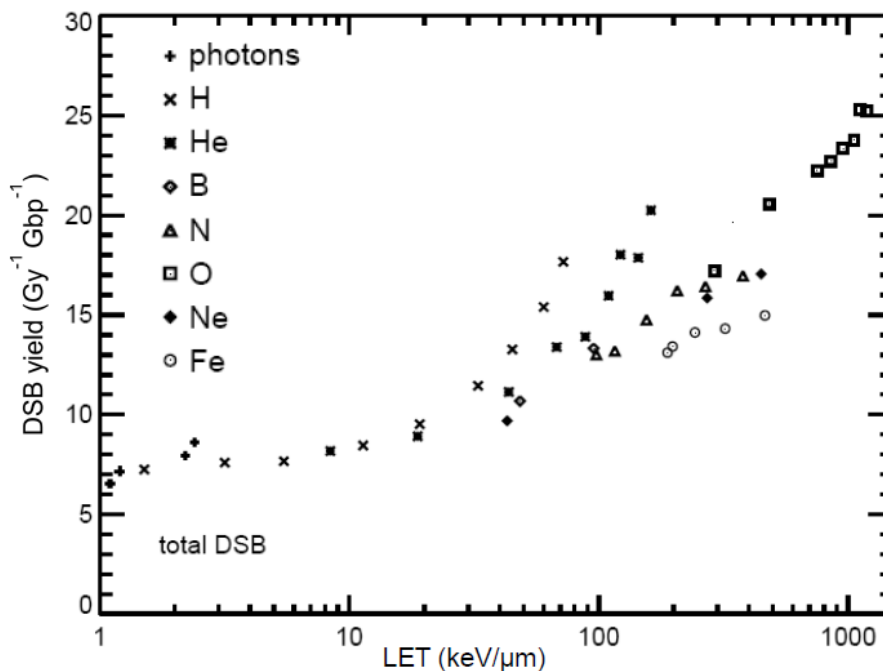


Abb. 5.4: Berechnete DSB-Ausbeute für Photonen und verschiedene Ionen als Funktion des LET.

e) Berechnung von Chromosomenaberrationen mit PARTRAC und Vergleich mit experimentellen Daten

Das Chromosomenaberrationsmodell in PARTRAC wurde für die Berechnung der Bildung von CA nach ^{137}Cs γ -Bestrahlung und nach 3.5 MeV α -Bestrahlung in Abhängigkeit von der Dosis entsprechend früheren Experimenten [Cornforth 2002] eingesetzt. Dabei wurden Modellparameter verwendet, die eine gute Beschreibung der Reparaturkinetik sowohl für Niedrig-LET- wie auch für Ionenstrahlung im Vergleich zu Literaturdaten ergeben hatten. Für die Bildung von CA spielten neben den Parametern, die die Kinetik von Reparaturenzymen bestimmen, auch die Modellansätze eine entscheidende Rolle, die die Mobilität freier DNA-Enden charakterisierten. Dabei waren neben den Diffusionskonstanten auch Beschränkungen der Beweglichkeit durch die Bindung längerer DNA-Fragmente an die Kernmatrix und das Ausmaß an Zerklüftung an den Rändern der Chromosomen im Interphasekern von großer Bedeutung. Im Ergebnis (Abbildung 5.5) lieferte das Modell für die Bewegung einzelner Bruchenden (dicke durchgezogene Linie) wie auch für die Abstände von Paaren von Bruchenden (gestrichelte Linie) ein sub-diffusives Verhalten, das im dargestellten Zeitfenster (wenige Minuten bis einige Stunden) den für Telomere gemessenen Daten (dünne durchgezogene Linie mit Fehlerbereich) nahe kam und mit Messungen an Foci [Girst 2013] im Rahmen dieses Projekts in Einklang war.

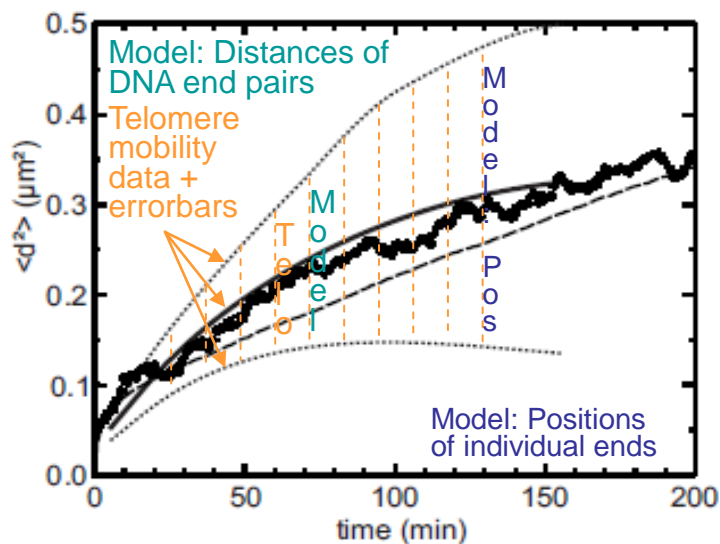


Abb. 5.5: Mittlere Bewegung eines DSB-Endes und mittlere Abstände von unverbundenen DSB-Enden in zweidimensionaler Projektion nach Modellrechnung [Friedland 2013] und für Telomere aus Literaturdaten [Jegou 2009].

Die Verteilung der ursprünglichen Abstände von fehlverbundenen DSB nach Bestrahlung mit Alphateilchen zeigte, dass im Modell auch DSB-Enden mit größeren Abständen als $1\ \mu\text{m}$ verbunden wurden und stärker zu interchromosomalen Fehlverbindungen beitrugen als zu Fehlreparaturen innerhalb eines Chromosoms (Abbildung 5.6). Insgesamt bleibt der Anteil dieser Verbindungen von DSB-Enden mit mehr als $1\ \mu\text{m}$ Abstand unter 5% aller CA.

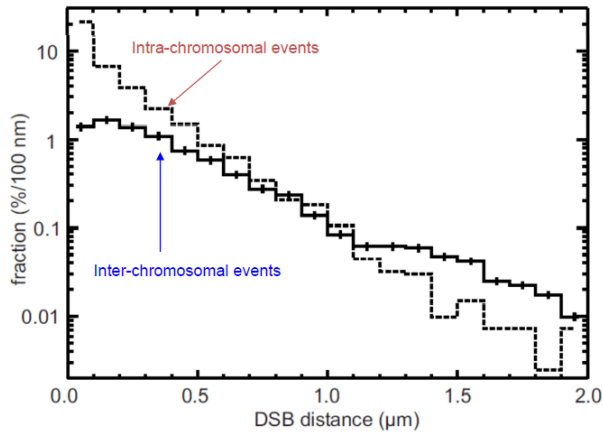


Abb. 5.6: Differenzierung von intra- und interchromosomalen Fehlverbindungen von DSB-Enden nach ihrem ursprünglichen Abstand nach 2.4 Gy Bestrahlung mit Alphateilchen.

Der Vergleich von berechneten und gemessenen dizentrischen Chromosomen (Abbildung 5.7) zeigte gute Übereinstimmung hinsichtlich der recht unterschiedlichen Dosisabhängigkeit für beide Strahlenqualitäten, wenngleich die absoluten Ausbeuten um den Faktor 2 bei α -Strahlung und um den Faktor 5 bei γ -Strahlung höher waren als in den Experimenten [Friedland 2013]. Bei diesem Ergebnis ist zu berücksichtigen, dass keinerlei Parameteranpassung vorgenommen wurde, d.h. es handelt sich um eine Modellvorhersage basierend auf standardisierten Ansätzen zur Ausbeute initialer DSB, ihrer Reparaturkinetik und der Mobilität der Bruchenden. Die Ergebnisse lassen erkennen, dass die Modellierung der zellulären Antwort auf DNA-Strahlenschäden mit PARTRAC ein enormes Potential hat.

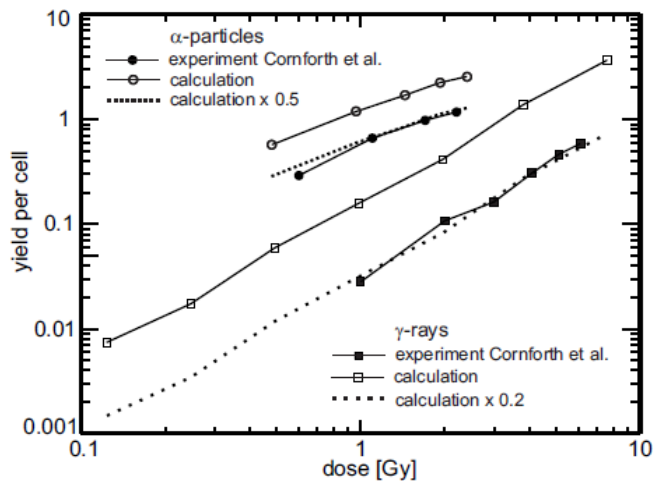


Abb. 5.7: Experimentelle [Cornforth 2002] und berechnete Ausbeute dizentrischer Chromosomen in Abhängigkeit von der Dosis nach α - und γ -Bestrahlung [Friedland 2013]

In II.1. zitierte Literatur (Fremdzitate, die zum Verständnis relevant sind; Eigenzitate, die außerhalb und innerhalb [siehe hierzu auch II.6.] des Projektes entstanden sind)

- Baddeley D, Jayasinghe ID, Cremer C, Cannell MB, Soeller C (2009) Light-induced dark states of organic fluochromes enable 30 nm resolution imaging in standard media. *Biophys J* 96:L22–24. doi: 10.1016/j.bpj.2008.11.002
- Baer, F.W. & Baer, R. 2001. Tumour suppressors - Effect of DNA damage on a BRCA1 complex. *Nature* 414, 36
- Bates M, Huang B, Dempsey GT, Zhuang X (2007) Multicolor Super-Resolution Imaging with Photo-Switchable Fluorescent Probes. *Science* 317:1749–1753. doi: 10.1126/science.1146598
- Best G, Amberger R, Baddeley D, Ach T, Dithmar S, Heintzmann R, Cremer C (2010) Structured illumination microscopy of autofluorescent aggregations in human tissue. *Micron Oxf Engl* 1993. doi: 10.1016/j.micron.2010.06.016

- Beucher A, Birraux J, Tchouandong L, Barton O, Shibata A, Conrad S, Goodarzi AA, Krempler A, Jeggo PA, Löbrich M (2009) ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *EMBO J.* 28: 3413-3427
- Bohn M, Diesinger P, Kaufmann R, Weiland Y, Müller P, Gunkel M, von Ketteler A, Lemmer P, Hausmann M, Heermann DW, Cremer C (2010) Localization microscopy reveals expression-dependent parameters of chromatin nanostructure. *Biophys. J.* 99: 1358-1367
- Cornforth MN, Bailey SM, Goodwin EH (2002) Dose Responses for Chromosome Aberrations Produced in Noncycling Primary Human Fibroblasts by Alpha Particles, and by Gamma Rays Delivered at Sublimiting Low Dose Rates. *Radiat Res* 158:43-53
- Costantini M, Clay O, Auletta F, Bernardi G (2006) An isochore map of human chromosomes. *Genome Res* 16:536-541
- Cremer C, Kaufmann R, Gunkel M, Pres S, Weiland Y, Müller P, Ruckelshausen T, Lemmer P, Geiger F, Degenhard S, Wege C, Lemmermann NAW, Holtappels R, Strickfaden H, Hausmann M (2011) Superresolution imaging of biological nanostructures by spectral precision distance microscopy. *Biotechnol J* 6:1037–1051. doi: 10.1002/biot.201100031
- Falk M, Lukasova E, Stefancikova L, Baranova E, Falkova I, Jezkova L, Davidkova M, Bacikova A, Vacekova J, Micahelidesova A, Kozubek S (2014) Heterochromatinization associated with cell differentiation as a model to study DNA double strand break induction and repair in the context of higher-order chromatin structure. *Applied Radiation and Isotopes* 83:177-185
- Friedland W, Kundrát P (2013) Track structure based modelling of chromosome aberrations after photon and alpha-particle irradiation. *Mutat Res* 756:213-223.
- Girst S, Hable V, Drexler GA, Greubel C, Siebenwirth C, Haum M, Friedl AA, Dollinger G (2013) Subdiffusion supports joining of correct ends during repair of DNA double-strand breaks. *Sci Rep (Nature Publ. Group)* 3:2511
- Goodarzi AA, Noon AT, Deckbar D, Ziv Y, Shiloh Y, Löbrich M, Jeggo PA (2008) ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol Cell.* 31: 167-177
- Gunkel M, Erdel F, Rippe K, Lemmer P, Kaufmann R, Hörmann C, Amberger R, Cremer C (2009) Dual color localization microscopy of cellular nanostructures. *Biotechnol J* 4:927–938. doi: 10.1002/biot.200900005
- Gustafsson MG (2000) Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J Microsc* 198:82–87.
- Hable V, Drexler GA, Brüning T, Burgdorf C, Greubel C, Derer A, Seel J, Strickfaden H, Cremer T, Friedl AA, Dollinger G (2012) Recruitment kinetics of DNA repair proteins MDC1 and RAD52 but not 53BP1 depend on damage complexity. *PLoS One* 7: 1-7.
- Heintzmann R, Benedetti PA (2006) High-resolution image reconstruction in fluorescence microscopy with patterned excitation. *Appl Opt* 45:5037–5045.
- Heintzmann R, Cremer CG (1999) Laterally modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating. *SPIE BIOS Eur.* pp 185–196
- Heintzmann R, Ficz G (2006) Breaking the resolution limit in light microscopy. *Brief Funct Genomic Proteomic* 5:289–301. doi: 10.1093/bfpg/ell036
- Hess ST, Girirajan TP, Mason MD (2006) Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys J* 91:4258–4272.
- Huertas P, Cortes-Ledesma F, Sartori AA, Aguilera A & Jackson SP (2008) CDK targets Sae2 to control DNA-end resection and homologous recombination. *Nature* 455, 689-U86.
- Jegou T, Chung I, Heuvelman G, Wachsmuth M, Görisch SM, Greulich-Bode KM, Boukamp P, Lichter P, Rippe K (2009) Dynamics of telomeres and promyelocytic leukemia nuclear bodies in a telomerase-negative human cell line. *Mol Cell Biol* 20:2070-2082
- Kepper N, Foethke D, Stehr R, Wedemann G, Rippe K (2008) Nucleosome Geometry and Internucleosomal Interactions Control the Chromatin Fiber Conformation. *Biophys J* 95: 3692–3705
- Lee-Theilen M, Matthews AJ, Kelly D, Zheng S, Chaudhuri J, (2011) CtIP promotes microhomology-mediated alternative end joining during class-switch recombination. *Nat Struct Mol Biol.* 18(1):75-9
- Lemmer P, Gunkel M, Baddeley D, Kaufmann R, Urich A, Weiland Y, Reymann J, Müller P, Hausmann M, Cremer C (2008) SPDM: light microscopy with single-molecule resolution at the nanoscale. *Appl Phys B* 93:1–12.
- Li S, Ting NSY, Zheng L, Chen PL, Ziv Y, Shiloh Y, Lee EYHP & Lee WH (2000) Functional link of BRCA1 and ataxia telangiectasia gene product in DNA damage response. *Nature* 406, 210-215.
- Löbrich M, Shibata A, Beucher A, Fisher A, Ensminger M, Goodarzi AA, Barton O, Jeggo PA (2010) gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle.* 9: 662-669
- Mosesso P, Fonti E, Bassi L, Lorenti GC, and Palitti F (1999) The involvement of chromatin condensation in camptothecin-induced chromosome breaks in G0 human lymphocytes. *Mutagenesis* 14:103-105.
- Müller P, Weiland Y, Kaufmann R, Gunkel M, Hillebrandt S, Cremer C, Hausmann M (2012) Analysis of fluorescent nanostructures in biological systems by means of spectral position determination microscopy (SPDM). In: Méndez-Vilas A (ed), *Current microscopy contributions to advances in science and technology*, Vol 1. Formatex Research Center Badajoz, Spain, pp 3–12
- Reymann J, Baddeley D, Gunkel M, Lemmer P, Stadter W, Jegou T, Rippe K, Cremer C, Birk U (2008) High-precision structural analysis of subnuclear complexes in fixed and live cells via spatially modulated illumination (SMI) microscopy. *Chromosome Res* 16:367–382. doi: 10.1007/s10577-008-1238-2

- Riballo E, Kühne M, Rief N, Doherty A, Smith GC, Recio MJ, Reis C, Dahm K, Fricke A, Krempler A, Parker AR, Jackson SP, Gennery A, Jeggo PA, Löbrich M (2004) A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol. Cell.* 16: 715-724
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 273: 5858-5868
- Rossberger S, Best G, Baddeley D, Heintzmann R, Birk U, Dithmar S, Cremer C (2013) Combination of structured illumination and single molecule localization microscopy in one setup. *J. Opt.* 15 094003 (13pp) doi: 10.1088/2040-8978/15/9/094003
- Rust MJ, Bates M, Zhuang X (2006) Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods* 3:793–796.
- Sartori AA, Lukas C, Coates J, Mistrik M, Fu S, Bartek J, Baer R, Lukas J, Jackson SP (2007) Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature.* 450: 509-514
- Schalch T, Duda S, Sargent DF, Richmond TJ (2005) X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature* 436: 138-141
- Schwarz-Finsterle J, Scherthan H, Huna A, González P, Müller P, Schmitt E, Erenpreisa J, Hausmann M (2013) Volume increase and spatial shifts of chromosome territories in nuclei of radiation-induced polyploidizing tumour cells. *Mutat. Res.: Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 756: 56-65
- Stehr R, Kepper N, Rippe K, Wedemann G (2008) The Effect of Internucleosomal Interaction on Folding of the Chromatin Fiber. *Biophys J* 95: 3677–3691
- Wicker K, Mandula O, Best G, Fiolka R, Heintzmann R (2013) Phase optimisation for structured illumination microscopy. *Opt Express* 21:2032–2049. doi: 10.1364/OE.21.002032
- Yun MH, Hiom K (2009) CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature* 459: 460-463
- Zhang Y and Jasin M (2011) An essential role for CtIP in chromosomal translocation formation through an alternative end-joining pathway. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18:80-84.

2. Der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die durchgeführten Arbeiten waren notwendig zum Erreichen der Ziele des Projektes. Es wurde stets angemessen mit den vorhandenen Mitteln und Ressourcen umgegangen.

3. Der Verwendung der Zuwendung hinsichtlich der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Ruprecht-Karls-Universität, Kirchhoff-Institut für Physik, Heidelberg

Personal: Dr. N. Kepper (Vollzeit, erste Projekthälfte, Simulationen), Dr. P. Müller (Vollzeit über Projektdauer, Experimente), Dr. J. Schwarz-Finsterle (Teilzeit, Projektdauer, Experimente), M. Bach (Teilzeit, 3. Jahr, SPDM Messungen)

Verbrauchsmittel

Reisemittel zu Konferenzen und Verbundtreffen

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität, Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, München

Personal: M. Lautenbacher (Teilzeit, 26 Monate, experimentelle Arbeiten), K. Straub (Teilzeit, 4 Monate, Bildauswertung), E. Glas (Teilzeit, 2 Monate, experimentelle Arbeiten), D. Seiler (Teilzeit, 1 Monat, experimentelle Arbeiten, Wissenstransfer)

Universität der Bundeswehr, Angewandte Physik und Messtechnik, München

Personal: C. Siebenwirth (33 Monate, ¾-Stelle, experimentelle Arbeiten an SNAKE und Mikroskopie)

Technische Universität, Fachbereich Zoologie, Strahlenbiologie und DNA Reparatur, Darmstadt

Personal: Dr. Olivia Barton (Vollzeit über gesamte Projektdauer)

Verbrauchsmittel

Helmholtz Zentrum München, Institut für Strahlenschutz, München

Personal: Dr. P. Kundrát (Vollzeit über Projektdauer)

Verbrauchsmittel: Dienstreisen zu Projektnehmertreffen und zu wichtigen nationalen und internationalen Meetings

4. Des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Die wissenschaftlichen Ergebnisse dieses Forschungsvorhabens wurden/werden auf Fachkonferenzen und in der Fachliteratur publiziert. Die Ergebnisse werden bei Bedarf für weitere Forschung und für die Lehre in Deutschland den jeweiligen Einrichtungen zur Verfügung gestellt.

Die Arbeiten tragen zur Verbesserung des Verständnisses der Reparaturprozesse bei Doppelstrangbrüchen in verschiedenen Genomregionen bei. Dies beinhaltet die Einflussgrößen und Genauigkeit des Prozesses, was neue Einsichten in den Mechanismus der Bildung von Chromosomenaberrationen und damit über das karzinogene Risiko von ionisierender Strahlung liefert. Auf der Basis dieser Daten können neue Parameter für die Strahlensensitivität bestimmt werden, die im Zusammenhang mit Strahlenschutz bzw. Diagnose und Therapiekontrolle bei medizinischer Bestrahlung genutzt und ggf. in entsprechende Bestimmungen nachhaltig umgesetzt werden können.

Das Projekt verfügt über ein hohes wissenschaftliches Anwendungspotential durch die eingesetzten Technologien im Bereich der Mikrobestrahlung und Lokalisationsmikroskopie sowie der Simulationsmodelle. Dies lässt erwarten, dass neue Fragestellungen mit den gesamten Werkzeugen bearbeitet werden können. Somit hat das vorgelegte Teilvorhaben eine hohe wissenschaftliche, technologiegetriebene Anschlussfähigkeit.

Desweiteren entstanden Programme und neue Algorithmen sowohl für die Simulationsmodelle als auch für die Auswertung der mikroskopischen Daten z.B. für die Bildauswertung und Statistik, die für weitere Forschungsprojekte genutzt und dann erweitert werden können. Die Ergebnisse aus den Simulationen können ebenfalls auf weitere spezifische Fragen des Strahlenschutzes ergänzt und vervollständigt werden. Für medizinische Anwendungen ergibt sich die Möglichkeit, auf Basis der erreichten Ergebnisse neue Projekte der Diagnostik und ihrer Umsetzung in der Therapie zu bearbeiten.

5. Des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Keine

6. Der erfolgten und geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses

Ruprecht-Karls-Universität, Kirchhoff-Institut für Physik, Heidelberg

Artikel:

- a) Müller P, Weiland Y, Kaufmann R, Gunkel M, Hillebrandt S, Cremer C, Hausmann M (2012) Analysis of fluorescent nanostructures in biological systems by means of Spectral Position Determination Microscopy (SPDM). In: "Current microscopy contributions to advances in science and technology" (Méndez-Vilas A, ed.), Vol. 1: 3-12
- b) Hausmann M, Müller P, Kaufmann R, Cremer C (2013) Entering the nano-cosmos of the cell by means of spatial position determination microscopy (SPDM): Implications for medical diagnostics and radiation research. IFMBE Proc. 38: 93-95

- c) Schwarz-Finsterle J, Scherthan H, Huna A, González P, Müller P, Schmitt E, Erenpreisa J, Hausmann M (2013) Volume increase and spatial shifts of chromosome territories in nuclei of radiation-induced polyploidizing tumour cells. *Mutat. Res.: Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 756: 56-65
- d) Burger N, Biswas A, Barzan D, Kirchner A, Hosser H, Hausmann M, Hildenbrand G, Herskind C, Wenz F, Veldvijk MA (2014) A method for the efficient cellular uptake and retention of small modified gold nanoparticles for the radiosensitization of cells. *Nanomedicine*: doi: 10.1016/j.nano.2014.03.011
- e) Falk M, Lukášová E, Hausmann M, Biswas A, Hildenbrand G, Davidková M, Krasavin E, Kleibl Z, Falková I, Ježková L, Štefančíková L, Ševčík J, Hofer M, Bačíková A, Matula P, Boreyko A, Vachelová J, Michaelidisová A, Kozubek S (2014) Giving OMICS spatiotemporal dimensions by challenging microscopy: From functional networks to structural organization of cell nuclei elucidating mechanisms of complex radiation damage response and chromatin repair – PART A (Radiomics). *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Express.* 24: 205-223
- f) Falk M, Hausmann M, Lukášová E, Biswas A, Hildenbrand G, Davidková M, Krasavin E, Kleibl Z, Falková I, Ježková L, Štefančíková L, Ševčík J, Hofer M, Bačíková A, Matula P, Boreyko A, Vachelová J, Michaelidisová A, Kozubek S (2014) Giving OMICS spatiotemporal dimensions by challenging microscopy: From functional networks to structural organization of cell nuclei elucidating mechanisms of complex radiation damage response and chromatin repair – PART B (Structuromics) . *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Express.* 24: 225-247
- g) Biswas A, Müller P, Veldvijk M, Al Saroori A, Moser F, Krufczik M, Bach M, Thölking J, Felix M, Cremer C, Wenz F, Hausmann M, Hildenbrand G (2014) Genome density analyses based on structural changes in the histone distribution induced by different irradiation energies (in Vorbereitung)
- h) Máté G, Zhang Y, Müller P, Hillebrandt S, Bach M, Kaufmann R, Hausmann M, Heermann DW (2014) Radiation induced chromatin conformation changes analyzed by fluorescent localization microscopy, statistical physics, and graph theory. *Rad. Res.* (in Vorbereitung)

Abstracts:

- a) Schwarz-Finsterle J, Erenpreisa J, Schmitt E, Kepper N, Scherthan H, Hausmann M (2011) Quantitative analysis of chromosomal re-arrangements in radiation induced endopolyploid cells. 14th International Congress of Radiation Research, Warschau, 28. 8. – 1. 9. 2011, Book of Abstracts: 154
- b) Müller P, Weiland Y, Kaufmann R, Hillebrandt S, Cremer C, Hausmann M (2012) Radiation induced changes in nucleosome patterns analysed with nanometre resolution. GBS2012, Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung, München, 17. 9. – 20. 9. 2012, Book of Abstracts: A54
- c) Schwarz-Finsterle J, Erenpreisa J, Schmitt E, Kepper N, Scherthan H, Hausmann M (2012) Quantitative analysis of chromosomal re-arrangements in radiation induced endopolyploid cells. The 10th International Symposium on Chromosomal Aberrations, Amalfi, 19.- 21. 10. 2012, Book of Abstracts
- d) Müller P, Hillebrandt S, Kaufmann R, Weiland Y, Bohn M, Diesinger P, Heermann D, Cremer C, Hausmann M (2012) What can we learn from localization microscopy? New insights into radiation induced changes of the chromatin nanostructure. 39th Annual Meeting of the European Radiation Research Society, Vietri sul Mare, 15. – 19. 10. 2012, Book of Abstracts: 53
- e) Hausmann M, Hildenbrand G, Müller P, Biswas A, Bach M, Al Saroori A, Moser F, Krufczik M, Felix M, Thölking J, Kretz D, Birk U, Cremer C, Wenz F (2013) Radiation induced changes of the chromatin nanostructure. 40th Annual Meeting of the European Radiation Research Society, Dublin, 1. – 5. 9. 2013, Book of Abstracts M-12

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität, Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, München, und Universität der Bundeswehr, Angewandte Physik und Messtechnik, München

- a) Hable V, Drexler GA, Brüning T, Burgdorf C, Greubel C, Derer A, Seel J, Strickfaden H, Cremer T, Friedl AA, Dollinger G. Recruitment Kinetics of DNA Repair Proteins Mdc1 and Rad52 but Not 53BP1 Depend on Damage Complexity. *PLoS One.* 7(7):e41943. (2012)
- b) Girst S, Hable V, Drexler GA, Greubel C, Siebenwirth C, Haum M, Friedl AA, Dollinger G. Subdiffusion supports joining of correct ends during repair of DNA double-strand breaks. *Sci Rep.* 3:2511. doi: 10.1038/srep02511. (2013)

- c) Reindl J, Drexler GA, Girst S, Greubel C, Siebenwirth C, Drexler S, Friedl AA, Dollinger G. Revealing Rad51 and 53BP1 distribution in HeLa cell nuclei after low and high LET irradiation (in Vorbereitung)
- d) Drexler GA, Drexler S, Böhlend C, Buchfellner A, Glas E, Frey S, Posselt L, Reindl J, Siebenwirth C, Dollinger G, Friedl AA. Simultaneous live-cell imaging of three different proteins. Technical Note. (in Vorbereitung)

Technische Universität, Fachbereich Zoologie, Strahlenbiologie und DNA Reparatur, Darmstadt
 Artikel

- a) Olivia Barton, Julia Künzel, Steffen C. Naumann, Ronja Biehs, Monika Steinlage, Bernard S. Lopez, Nodar Makharashvili, Tanya T. Paull and Markus Löbrich. Plk3 phosphorylates CtIP to enhance translocation formation in G1. under revision/Journal of Cell Biology
- b) Olivia Barton, Julia Künzel, Atsushi Shibata, Penny A. Jeggo and Markus Löbrich. A canonical non-homologous end-joining pathway involving CtIP-dependent resection in G1 in preparation

Abstracts

- a) Olivia Barton, Dorothee Deckbar, Markus Löbrich. The influence of end resection by CtIP on the Artemis dependent DNA double-strand break repair pathway in G1 and G2 phase. GBS 2011, Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung, Rheinbach, 13. 9. – 15. 9. 2011
- b) Julia Künzel, Sandro Conrad, Olivia Barton, Penny Jeggo und Markus Löbrich (2012). A canonical non-homologous end-joining pathway involving CtIP-dependent end-resection promotes chromosome translocation formation. 39th Annual Meeting of the European Radiation Research Society, Vietri sul Mare, Italy, October 15-19, 2012
- c) Julia Künzel, Sandro Conrad, Olivia Barton, Penny Jeggo und Markus Löbrich (2012). A canonical non-homologous end-joining pathway involving CtIP-dependent end-resection promotes chromosome translocation formation. The 10th International Symposium on Chromosomal Aberrations ISCA10, Amalfi, Italy, October 19-21, 2012
- d) Olivia Barton, Steffen C. Naumann, Atsushi Shibata, Nodar Makharashvili, Tanya T. Paull, Penny A. Jeggo and Markus Löbrich (2013). Plk3 regulates a CtIP-dependent non-homologous end-joining process in G1. GBS 2013, Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung, Darmstadt, 25. – 27. 9. 2013, Book of Abstracts: 59
- e) Olivia Barton, Steffen C. Naumann, Atsushi Shibata, Nodar Makharashvili, Tanya T. Paull, Penny A. Jeggo and Markus Löbrich (2013). Plk3 regulates a CtIP-dependent non-homologous end-joining process in G1. German-French DNA Repair meeting 2013, Strasbourg, 07.-10.10.2013, Book of Abstracts: 51

Helmholtz Zentrum München, Institut für Strahlenschutz, München

- a) Friedland W, Kunderát P (2012) Stochastic modelling of DSB repair after photon and ion irradiation. Int. J. Radiat. Biol. 88, 129-136.
- b) Friedland W, Kunderát P (2013) Track structure based modelling of chromosome aberrations after photon and alpha-particle irradiation. Mutat. Res. 756, 213-223.
- c) Kunderát P, Friedland W (2014) Chromosome aberration model combining radiation tracks, chromatin structure, DSB repair and chromatin mobility. Radiat. Prot. Dosim. (submitted)

Abstracts:

- a) Friedland W, Kunderát P, Jacob P (2011) Track structure simulations for radiation physics, chemistry and biology. 14th International Congress of Radiation Research, Warschau, 28. 8. – 1. 9. 2011, Book of Abstracts: p. 47.
- b) Friedland W, Kunderát P (2013) Chromosome aberration model combining radiation tracks, chromatin structure, DSB repair and chromatin mobility. MICROS 2013 – 16th International Symposium on Microdosimetry, Treviso, 20-25 October 2013, Book of Abstracts: p. 19.
- c) Friedland W, Kunderát P (2012) Systems radiation biology modelling with PARTRAC. 12th International Workshop on Radiation Damage to DNA, Prague, 2-7 June 2012, Book of Abstracts
- d) Kunderát P, Friedland W (2012) Biophysical Monte Carlo simulations with PARTRAC: From radiation track structures over DNA damage and its repair to chromosome aberrations. 5th International Systems Radiation Biology Workshop, Oxford, 3 - 5 September 2012, Book of Abstracts

III. Anlage I: Erfolgskontrollbericht (kurz gefasst)

1. Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen des Förderprogramms

Der Antrag bezog sich auf Strahlenforschung zur Unterstützung von BMU-Fachaufgaben: Im einzelnen ging es um die Erforschung der Grundlagen zur Entwicklung effizienterer neuer Diagnostikverfahren für mögliche Erkrankungen durch Strahlenexposition. Auf der Basis neuerer Erkenntnisse zur unterschiedlichen Empfindlichkeit von Tumor- und Normalgeweben und zu Reparaturprozessen strahleninduzierter Zellschäden sollten die durchgeführten Untersuchungen zu einem besseren Verständnis strahlenbiologischer struktureller Mechanismen in Zellkernen beitragen und so Erkenntnisse liefern, die einen Beitrag zum Strahlenschutz, der Strahlentherapie und ggf. der damit verbundenen gesetzgeberischen Tätigkeit erwarten lassen.

Die Teilprojekte sollten als experimentelle und theoretische Zusammenarbeit strahlenbiologischer Forschung dazu dienen, zusätzlichen Beratungs- und Forschungsbedarf des BMU zu decken, indem sie moderne physikalische und biologische Techniken (Computersimulationen, spezifische Markierungsverfahren, PCC, Ionen-Mikrobestrahlung, neue Verfahren der molekularen Lokalisationsmikroskopie und hochauflösenden STED-Mikroskopie) anwendeten und mit modernen Methoden der biophysikalischen Modellierung kombinierten, um Strahlenschäden und ihre Reparatur unter verschiedenen Bestrahlungsbedingungen zu erforschen.

2. Wissenschaftlich-technisches Ergebnis des Vorhabens, die erreichten Nebenergebnisse, und die gesammelten wesentlichen Erfahrungen

Das Vorhaben brachte wichtige wissenschaftliche Ergebnisse: So konnte gezeigt werden, dass nach Strahleninduktion die Reparatur mit systematischen strukturellen Veränderungen des Chromatins einhergeht. Die Dynamik wurde durch nano- und mikroskalige Verschiebungen von Chromatin und Reparaturfoci erfasst. Es konnte gezeigt werden, dass auf der Mikroskalenebene bei hoher Dosisapplikation durch eine Umordnung und Separation des Genoms eine Umgehung der Apoptose und Endomitose über Polyploidisierung und Depolyploidisierung zu einer erneuten Bildung diploider Zellen führen kann. Auf der Nanoskalenebene konnte gezeigt werden, dass es zu einer Entpackung und Rückverpackung von Heterochromatin während der Reparatur kommt. Neben der Nanostruktur von Foci konnte deren Dynamik erfasst werden. Es zeigte sich nach Mikrobestrahlung eine unterschiedlich schnelle Rekrutierung der Reparaturproteine und anschließend ein eindeutig subdiffusives Verhalten der Foci. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Translokationsbildung in der G1-Phase von CtIP vermittelter Resektion abhängt und eine Reparatur dieser DSB über c-NHEJ mit erhöhter Translokationsbildung erfolgt. Die erzielten experimentellen Ergebnisse erlaubten neben zusätzlichen Erkenntnissen aus der Fachliteratur eine systematische Verbesserung der Computermodelle und der daraus resultierenden Vorhersagen zu chromosomalen Aberrationen. Die erhaltenen Ergebnisse sind im beigefügten wissenschaftlichen Abschlussbericht im Detail erläutert.

Als Nebenergebnis sei erwähnt, dass die verwendeten Methoden der Nanostrukturanalyse bereits in die klinische Forschung aufgenommen wurden, insbesondere um Wirkungsweisen von Nanogoldpartikeln zur lokalen Verstärkung therapeutischer Strahlenquellen quantitativ zu erfassen. Die gesammelten Erfahrungen haben gezeigt, dass die Anwendung neuer Methoden zwar Einblicke in bisher nicht bekannte Konformationen des Chromatins und der Reparaturkomplexe liefern, allerdings im Hinblick auf die Interpretation auch neue Wege begangen werden mussten, da häufig äquivalente, gut etablierte Validierungsmethoden fehlten.

3. Die Fortschreibung des Verwertungsplans

- a. Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte, die vom Zuwendungsempfänger oder von am Vorhaben beteiligten gemacht oder in Anspruch genommen wurden, sowie deren Standort bezogene Verwertung und erkennbare Verwertungsmöglichkeiten**

Es wurden keine Schutzrechte angemeldet oder verwertet.

- b. Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende, Vorteile gegenüber Konkurrenzlösungen, Nutzen für verschiedene Anwendergruppen, Umsetzungs- und Transferstrategien**

Es handelte sich um ein Projekt der Grundlagenforschung, das nicht in der Absicht wirtschaftlicher Verwertungen durchgeführt wurde. Allerdings zeigt das Projekt bereits erste Ansätze des Transfers in die klinische Forschung. So besteht im Hinblick auf die Anwendung bei der Wirkung therapeutischer Strahlendosen großes Interesse an möglichen Quantifizierungspotentialen durch hochauflösende Strukturmessungen.

- c. Wissenschaftliche und technische Erfolgsaussichten nach Projektende (mit Zeithorizont), Nutzung der Ergebnisse in andere Weise (Datenbanken, Transfer, Zusammenarbeit mit anderen Einrichtungen...)**

Die wissenschaftlichen und technischen Erfolgsaussichten sind nach Projektende als äußerst gut einzustufen. So hat das Projekt bestätigt, dass die eingesetzten Methoden und Techniken, insbesondere die, die auf hochauflösendender Mikroskopie beruhen, zu stabilen neuen Erkenntnissen und Anwendungen führen. Die etablierten Methoden lassen sich mit den erzielten Ergebnissen auch in weiteren Projekten einsetzen. Das prädiktive Potential der Computersimulationen wurde deutlich verbessert.

Insgesamt werden noch im Laufe des Jahres 2014 weitere Ergebnisse aus dem Projekt publiziert bzw. zur Publikation eingereicht.

Neben den innerhalb der Verbundes bestehenden Zusammenarbeiten konnten weitere Zusammenarbeiten etabliert werden, so z.B. zum Institut für Theoretische Physik, Heidelberg (Prof. D.W. Heermann) und zur Klinik für Strahlentherapie an der Universitätsmedizin Mannheim (Prof. F. Wenz).

- d. Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit für eine mögliche notwendige nächste Phase, innovatorische Schritte zur erfolgreichen Umsetzung der FE-Ergebnisse**

Das Projekt hat die wissenschaftliche Basis für Folgeprojekte gelegt. Bei der Umsetzungsstrategie werden insbesondere klinische Aspekte berücksichtigt („from bench to bedside“)

4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Es gab keine Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer

Die Ergebnisse wurden/werden auf verschiedenen wissenschaftlichen, nationalen und internationalen Tagungen (z.B. GBS-Jahrestagung, ERR-Congress, ICRR) einem breiten Spektrum wissenschaftlicher Anwender präsentiert. Für Detailinformationen kann auf verschiedene bereits erschienenen oder noch erscheinenden Publikationen hingewiesen werden.

6. Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung

Aus mehreren Ursachen kamen die Arbeitspakete in einigen Teilprojekten gegen Ende des Jahres 2012 aus dem Zeitplan, so dass eine kostenneutrale Verlängerung um 6 Monate beantragt wurde:

Dies betraf zum einen die Münchner Teilprojekte am Klinikum der LMU und der Universität der Bundeswehr. Wegen technischer Probleme an der Mikrostrahlanlage konnten weniger Bestrahlungsversuche erfolgreich durchgeführt werden als geplant. Zudem konnten wegen der unvorhergesehenen limitierten Zugänglichkeit der hochauflösenden Mikroskope in Heidelberg (bzw. teilweise wegen Umzug in Mainz) weniger Analysen zur Focifeinstruktur durchgeführt werden als geplant. Durch eine kostenneutrale Verlängerung und die Möglichkeit, weitere Bestrahlungsexperimente durchzuführen, konnten die Experimente zu Bestimmung der Focifeinstruktur erfolgreich zum Abschluss gebracht werden.

Ebenso kam es im Heidelberger Teilprojekt sowohl instrumentell als auch personell bedingt zu Engpässen. Wie bereits oben erwähnt, mussten die Instrumente teilweise umgezogen werden, was nicht immer so reibungsfrei zu einem Neuanlauf führte. Daneben fiel aufgrund von Schwangerschaft und dem damit verbundenen Mutterschutz eine Mitarbeiterin ab dem 2. Halbjahr 2012 vollständig hinsichtlich Laborarbeiten aus. Hinzu kamen mehrere längerfristige Krankheitsphasen des hauptamtlich im Projekt tätigen Postdocs, die dazu führten, dass insbesondere in der zweiten Jahreshälfte 2012 und Januar 2013 die Arbeitspakete nicht mehr im vollen Umfang wie geplant abgearbeitet werden konnten. Innerhalb der Zeit der kostenneutralen Verlängerung konnten die Arbeitspakete inhaltlich wie geplant zu Ende geführt werden.

Die übrigen Partner lagen Ende 2012 zwar in ihrem Zeitplan, waren jedoch mit der Verlängerung einverstanden, um noch ausstehende Arbeiten in größerer Tiefe zu erledigen bzw. Zeit zu Publikationen der Ergebnisse zu haben.

Die Finanzierungspläne wurden jeweils den geänderten Verlaufsbedingungen angepasst und dem BfS zur Genehmigung vorgelegt. Die Projektpartner konnten die so angepassten Finanzierungspläne einhalten und die ihnen zugeteilten Teilsommen verausgaben.

IV. Anlage II: „Kurzfassung“ (Berichtsblatt)

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart Schlussbericht
3a. Titel des Berichts 3D/4D Architektur von chromosomalen Bruchpunktregionen in Zellkernen nach Bestrahlung von Krebs- und nicht-Krebszellen	
3b. Titel der Publikation Es wurden/werden mehrere Fachpublikationen veröffentlicht (siehe hierzu Bericht II.6.)	
4a. Autoren des Berichts (Name, Vorname(n)) Hausmann, Michael; Cremer, Christoph; Friedl, Anna; Dollinger, Günther; Löbrich, Markus; Friedland, Werner	5. Abschlussdatum des Vorhabens 31. März 2014
4b. Autoren der Publikation (Name, Vorname(n)) siehe Autorenlisten der Einzelpublikationen (Bericht II. 6.)	6. Veröffentlichungsdatum Siehe Bericht II.6.
	7. Form der Publikation Fachzeitschriften, Bücher
Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) <ul style="list-style-type: none"> Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Kirchoff-Institut für Physik, Im Neuenheimer Feld 227, 69120 Heidelberg Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität, Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Schillerstr 42, 80336 München Universität der Bundeswehr München, Angewandte Physik und Messtechnik, Werner-Heisenberg-Weg 39, 85577 Neubiberg Technische Universität Darmstadt, Fachbereich Zoologie, Strahlenbiologie und DNA Reparatur, Schnittspahnstraße 10, 64287Darmstadt Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH), Institut für Strahlenschutz, Ingolstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg 	9. Ber. Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen SR/StSch/INT 3610S30015
	11a. Seitenzahl Bericht 54
	11b. Seitenzahl Publikation Siehe Bericht II.6.
13. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit, 11055 Berlin	12. Literaturangaben
	14. Tabellen 1
	15. Abbildungen 51
16. Zusätzliche Angaben	
17. Vorgelegt bei Bundesamt für Strahlenschutz, München, 30. Juni 2014	
18. Kurzfassung <p>1. <i>Stand der Wissenschaft:</i> Die dreidimensional Architektur des Zellkerns ist nicht zufällig sondern unterliegt vielmehr Ordnungsprinzipien, die eine direkte wenn nicht gar kausale Korrelation zur jeweiligen Funktion besitzen. Mechanismen, die für die Wechselwirkung ionisierender Strahlung von Bedeutung sind, sind nur unzureichend erforscht. Insbesondere Nanostrukturen in Dimensionen unter 500 nm sowie Dynamiken von Foci waren bisher aufgrund begrenzter technischer Möglichkeiten kaum zugänglich.</p> <p>2. <i>Begründung/Zielsetzung:</i> Ziel ist es, zu einem mechanistischen Modell der Strahlenwechselwirkung beizutragen. Es sollen hierzu insbesondere Mechanismen der Induktion und Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB) auf der Ebene struktureller Veränderungen von Chromatinregionen experimentell und theoretisch erforscht werden. Für die Charakterisierung der Zeitkonstanten (4D) bei der Reparatur von DNA-DSB wird besonderes Gewicht auf die Prozessdynamik sowie auf die Abhängigkeit von der Lokalisation im Genom gelegt. Es soll untersucht werden, ob die Wahl des benutzten Reparaturwegs vom Genomort des Bruchs abhängt und welche zellulären Reparaturfaktoren abhängig vom Bruchort beim Reparaturvorgang eine Rolle spielen und wie sie sich dynamisch verändern.</p> <p>3. <i>Methoden:</i> Ionen-Mikrobestrahlung, therapeutische Strahlenquellen, 3D-Fluoreszenzmikroskopie, Lokalisationsmikroskopie (SPDM), STED-Mikroskopie, Computersimulationsmodelle, PCC, klassische strahlenbiologische und molekularbiologische Verfahren.</p> <p>4. <i>Ergebnis:</i> Es konnte gezeigt werden, dass nach Strahleninduktion die Reparatur mit systematischen strukturellen Veränderungen des Chromatins sowohl auf der Mikroskala bei hohen Dosen als auch auf der Nanoskala bei niedrigen Dosen einhergeht. Die Dynamik wurde durch nano- und mikroskalige Verschiebungen von Chromatin (Heterochromatin und Euchromatin) und der Dynamik bei der Rekrutierung von Reparaturproteinen zu Reparaturfoci erfasst. Es konnte gezeigt werden, dass die Translokationsbildung in der G1-Phase von CtIP vermittelter Resektion abhängt und in diesem Fall eine Reparatur über c-NHEJ erfolgt. Die erzielten experimentellen Ergebnisse erlaubten eine systematische Verbesserung der Computermodelle und der daraus resultierenden Vorhersagen zu chromosomalen Aberrationen und der Änderung der Verpackung von Hetero- und Euchromatin.</p> <p>5. <i>Schlussfolgerungen/Anwendungsmöglichkeiten:</i> Das Projekt konnte zeigen, dass die Erforschung nanoskaliger Genomveränderungen nicht nur von großer Erkenntnisrelevanz für die Grundlagenforschung ist, sondern auch im Hinblick auf diagnostische Untersuchungen in der Strahlentherapie wie auch für Fragen des Strahlenschutzes ein großes Anwendungspotential besitzt.</p>	
19. Schlagwörter Genom mikro-/nanoarchitektur, Doppelstrangbrüche, Translokationsbildung, hochauflösende Mikroskopie, Mikrobestrahlung, Reparaturkinetik, Chromatinorganisation, Rekrutierung von Reparaturproteinen, Computersimulationen, Hetero-/ Euchromatin	
20. Verlag	21. Preis

