

Aus dem  
José Carreras Zentrum für Immun- und Genterapie  
Innere Medizin I  
der Universität des Saarlandes, Homburg (Saar)

# Radiosensibilisierung durch epigenetisch modifizierende Substanzen in humanen Normalgewebszellen

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2010

vorgelegt von: Jan Christoph Purrucker  
geboren am: 04. Mai 1982 in Göttingen

Diese Arbeit entstand als

Kooperationsprojekt

zwischen

**Prof. Dr. U. Mahlknecht, PhD**

Leiter des José Carreras Zentrums für Immun- und Gentherapie

und

**Privatdozentin Dr. C. Rübe**

Leiterin des Labors für molekulare Strahlenonkologie  
Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie  
(Direktor Prof. Dr. C. Rübe)

*Meiner Familie  
gewidmet*

## Inhaltsverzeichnis

<b>I</b>	<b>Abkürzungen</b> .....	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>Abbildungen</b> .....	<b>3</b>
<b>III</b>	<b>Tabellen</b> .....	<b>4</b>
<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>5</b>
1.1	Summary .....	7
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>9</b>
2.1	Grundlegendes zum Aufbau des Genoms .....	9
2.2	Epigenetik.....	10
2.2.1	Epigenetische Modifikationen.....	10
2.2.1.1	DNA-Methylierung .....	11
2.2.1.2	Histonmodifikationen.....	12
2.2.1.2.1	Acetylierung/Deacetylierung .....	12
2.2.1.2.2	Histondeacetylasen.....	13
2.2.2	Epigenetisch modifizierende Substanzen.....	15
2.2.2.1	DNA-Methyltransferase-Inhibitoren.....	15
2.2.2.2	Histondeacetylase-Inhibitoren.....	17
2.3	Strahlenbiologische Grundlagen .....	18
2.3.1	Ionisierende Strahlung.....	18
2.3.2	Röntgenstrahlung und Röntgenquelle .....	19
2.3.3	Schadensinduktion und Wechselwirkungen ionisierender Strahlung .....	19
2.3.4	DNA-Doppelstrangbruchreparatur.....	21
2.3.4.1	DSB-Reparatur über non-homologous-end-joining.....	22
2.3.4.1.1	Von der Histon-Variante H2AX zu $\gamma$ H2AX .....	22
2.3.4.1.2	Ataxia telangiectasia mutated.....	25
2.3.4.1.3	Ku70/80, DNA-PKcs, Artemis.....	26
2.3.4.2	DSB-Reparatur über Homologe Rekombination .....	27
2.4	Ziele der Arbeit .....	29
<b>3</b>	<b>Material und Methodik</b> .....	<b>30</b>
3.1	Materialien und Geräte.....	30
3.1.1	Geräte .....	30
3.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	31
3.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	32
3.1.4	Testsubstanzen .....	34
3.1.4.1	Chemische Struktur der Testsubstanzen .....	34
3.1.5	Zusammensetzung verschiedener Lösungen.....	35
3.2	Arbeit mit Zellen .....	37
3.2.1	Zelllinien .....	37
3.2.2	Zellpassagierung.....	37
3.2.3	Einfrieren von eukaryotischen Zellen .....	38
3.2.3.1	Auftauen von Zellen.....	39
3.2.4	Synchronisation.....	39
3.3	Propidium-Iodid-Färbung.....	40
3.3.1	Prinzip der FACS®-Messung .....	41
3.4	Bestimmung der kumulativen Populationsverdopplungen .....	41
3.5	Aussäen auf Deckgläschen.....	42
3.6	Bestrahlungen.....	43
3.7	Immunfluoreszenzfärbungen.....	43
3.7.1	Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung.....	43

3.7.2 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung .....	44
3.8 Optisches System .....	46
3.9 $\gamma$ H2AX-Focusanalyse – Auswertung .....	47
3.9.1 Statistik .....	47
3.9.2 Foci-Größenbestimmung .....	48
3.10 Analyse des Acetylierungsstatus .....	48
3.10.1 Histonisolierung (Säureextraktionsmethode) .....	48
3.10.2 SDS-PAGE .....	49
3.10.3 Western-blot (Immunoblot) .....	50
3.10.4 Ponceau-Färbung .....	51
3.10.5 Proteindetektion mittels Immunfärbung .....	51
3.11 Colony Assay .....	52
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>55</b>
4.1 Zellzykluskontrolle .....	55
4.2 DNA-Doppelstrangbruchreparatur nach 5-Azacytidine-Behandlung .....	56
4.2.1 Experimente mit kurzer Inkubationszeit .....	56
4.2.2 Experimente mit langer Inkubationszeit .....	57
4.3 Histondeacetylase-Inhibitoren .....	59
4.3.1 Histon-Acetylierungsanalysen .....	59
4.3.2 Suberoylanilidhydroxamsäure (SAHA) .....	61
4.3.3 Trichostatin A (TSA) .....	63
4.3.4 MS275 .....	65
4.3.4.1 Doppelfärbungen $\gamma$ H2AX und 53BP1 .....	67
4.3.5 Valproinsäure (VA) .....	70
4.3.6 Natrium-Butyrat (NaB) .....	72
4.3.7 Vergleichende Darstellung der Kontrollen .....	75
4.3.8 Vergleichende Darstellung der quantitativen Reparatureffizienz .....	76
4.3.9 Vergleich der Foci-Größen .....	78
4.3.10 Koloniebildungstest .....	80
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>82</b>
5.1 Kritische Bewertung der Methoden .....	83
5.2 Hypomethylierende Substanzen und genomische Stabilität – die Ergebnisse im Kontext weiterer Studien .....	86
5.3 Histondeacetylase-Inhibitoren und DSB-Reparatur - die Ergebnisse im Vergleich zur Literatur .....	87
5.4 Histondeacetylase-Inhibierung und 53BP1 .....	93
5.5 Bedeutung der Ergebnisse für die Klinik .....	94
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>96</b>
<b>7 Publikationen .....</b>	<b>108</b>
<b>8 Danksagung .....</b>	<b>109</b>
<b>9 Lebenslauf .....</b>	<b>111</b>

## I Abkürzungen

53BP1	p53-binding protein 1
5-AzaC	5-Azacytidine
AML	Akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ASTRO	American Society for Therapeutic Radiology and Oncology
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
BMSC	Bone marrow stromal cell
bp	Basenpaare
BRCA	Breast cancer (gene)
CBF	Core binding factor
CBHA	m-Carboxycinnamsäure-bis-Hydroxamid
Da	Dalton
DDR	DNA damage response
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
DTT	Dithiothreitol
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FDA	Food and Drug Administration
FSC	Forward scatter
HAT	Histon-Acetylase
HDA1	Histondeacetylase 1
HDAC	Histondeacetylase
HDACi	HDAC-Inhibitor
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hMOF	Humanes „male absent on the first“ Protein
HMT	Histon-Methyltransferase
HP1	Heterochromatin Protein 1
HWZ	Halbwertszeit
inv	Inversion
KAP1	Krüppel-associated box (KRAB)-associated protein (=transcription intermediary factor 1 $\beta$ TIF1 $\beta$ )
$\lambda$	Wellenlänge
M	Molar (mol/l)
MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint 1
me(2/3)	(Di-/Tri-)Methylierung
MG <sup>1</sup>	Molekulargewicht <sup>1</sup>
mSin3A	mammalian-Switch-independent-3A
NaB	Natrium-Butyrat
NAD	Nicotinamiddinukleotid
N-CoR	Nuclear receptor corepressor
NF- $\kappa$ B	Nukleärer Faktor $\kappa$ B
NHL	Non-Hodgkin-Lymphome
NSCLC	Non-Small-Cell-Lung-Carcinoma
NuA4	Nucleosome acetyltransferase of histone H4
p	kurzer Arm eines Chromsoms

PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate-buffered saline
PI	Propidium-Iodid
PIKK	Phosphatidylinositol-3-OH-kinase-like family
q	Langer Arm eines Chromosoms
ROS	Reactive oxygen species
RPD3	Reduced Potassium Dependency
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAHA	Suberoylanilidhydrxamsäure
SDS	Sodium dodecyl Sulfat
SIR2	Silent Information Regulator 2
SIRT	Silent mating type information regulation
SNP	Single-nucleotide-polymorphism
SSC	Sideward scatter
Swi/Snf	Switching/sucrose non-fermenting
t	Translokation
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TSA	Trichostatin A
u	Unified atomic mass unit
ü. N.	über Nacht
VA	Valproat
XRCC4	X-ray-complementing Chinese hamster gene 4

<sup>1)</sup>: In der vorliegenden Arbeit wird die allgemein übliche Verwendung des Begriffs Molekulargewicht in Kombination mit der Einheit Dalton beibehalten, obwohl es sich streng genommen um eine Masseinheit handelt und somit der Begriff Molekülmasse präziser wäre. Es gilt: 1 Dalton = 1 u.

## II Abbildungen

Abb. 1 - Katalytische Domäne von HDAC4.....	15
Abb. 2 - Schematische Darstellung der DNA-Methylierung durch DNMT. ....	16
Abb. 3- Prinzip der Homologen Rekombination. Modifiziert nach (PANDITA et al., 2009). 28	
Abb. 4 – Schematische Darstellung der Röntgenanlage .....	43
Abb. 5 – Schematische Darstellung des Koloniebildungstests .....	53
Abb. 6 - PI-Färbung .....	55
Abb. 7 – $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle nach Behandlung mit 5-Azacytidine für 16 h .....	56
Abb. 8 - Behandlungsschema.....	57
Abb. 9 – $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle nach Behandlung mit 5-Azacytidine für 72 h .....	58
Abb. 10 – Acetylierungsstatus des Histon H4.....	59
Abb. 11 – Acetylierungsstatus des Histon H4 nach Behandlung mit TSA.....	60
Abb. 12 - $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle nach Behandlung mit SAHA .....	61
Abb. 13 – Statistischer Vergleich der Anzahl der $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle nach Behandlung mit SAHA .....	62
Abb. 14 - $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle nach Behandlung mit TSA.....	63
Abb. 15 - Statistischer Vergleich der Anzahl der $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle nach Behandlung mit TSA. ....	64
Abb. 16 - $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle nach Behandlung mit MS275 .....	65
Abb. 17 - Statistischer Vergleich der Anzahl der $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle nach Behandlung mit MS275. ....	66
Abb. 18 – 53BP1-Immunfluoreszenz gefärbte HSF1 <sup>2</sup> -Zellen 24 h post IR mit 0,5 Gy .....	67
Abb. 19 - $\gamma$ H2AX o. 53BP1-Foci pro Zelle nach Behandlung mit MS275 .....	68
Abb. 20 - $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle nach Behandlung mit VA. ....	70
Abb. 21 - Statistischer Vergleich der Anzahl der $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle nach Behandlung mit VA. ....	71
Abb. 22 - $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle nach Behandlung mit NaB.....	72
Abb. 23 - Statistischer Vergleich der Anzahl der $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle nach Behandlung mit NaB.....	73
Abb. 24 – $\gamma$ H2AX-Foci in immunfluoreszenz gefärbten Fibroblasten 5 h post IR.....	74
Abb. 25 - $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle in unbestrahlten Kontrollen. ....	75
Abb. 26 - Vergleichende Darstellung der quantitativen Reparaturreffizienz.....	77
Abb. 27 – Exemplarische Darstellung der unterschiedlichen Foci-Größen.....	78
Abb. 28 – $\gamma$ H2AX- und 53BP1-Foci-Größen ( $\mu\text{m}^2$ ) nach Behandlung mit MS275 oder VA ..	79
Abb. 29 – $\gamma$ H2AX-Foci in HSF1 <sup>2</sup> -Zellen 48.....	80
Abb. 30 – Ergebnisse des Koloniebildungstests .....	81



### III Tabellen

Tab. 1 – <i>MG-Angaben für die wichtigsten Histone. Die Größe symbolisiert das MG. Angaben: <a href="http://www.uniprot.org">http://www.uniprot.org</a></i> .....	9
Tab. 2 – <i>Überblick über die Klassenzugehörigkeit der 18 bekannten Histondeacetylasen</i> .....	13
Tab. 3 – <i>Inhibitionsprofil der Histon Deacetylase-Inhibitoren, modifiziert nach (WITT et al., 2008)</i> .....	18
Tab. 4 – <i>Bekannte Histonmodifikationen in der Antwort auf eine DSB-Induktion. Modifiziert nach (PANDITA et al., 2009)</i> .....	24
Tab. 5 – <i>Strukturformeln der verwendeten Testsubstanzen</i> .....	35
Tab. 6 – <i>Übersicht Fluoreszenzfarbstoffe – (PANCHUK-VOLOSHINA et al., 1999)</i> .....	44
Tab. 7 – <i>Primärantikörper Immunfluoreszenz</i> .....	45
Tab. 8 – <i>Sekundärantikörper Immunfluoreszenz</i> .....	45
Tab. 9 – <i>Zusammensetzung der Trenn- u. Sammelgele für die SDS-Gelelektrophorese</i> .....	50
Tab. 10 – <i>Primär u. Sekundärantikörper Immunoblot</i> .....	51
Tab. 11 – <i>Literaturübersicht über thematisch relevante Studien, die Normalzellen im Zusammenhang mit HDAC-Inhibitoren untersucht haben</i> .....	91

# 1 Zusammenfassung

Das Epigenom ist ein dem eigentlichen Genom überlagerter und mit ihm interagierender Regulationscode der Genexpression. Posttranslational erworbene Änderungen der Genexpression können auf der Ebene des Epigenoms ohne Änderungen an der primären DNA-Sequenz vererbt werden. Epigenetisch modifizierende Substanzen sind in den letzten Jahren Gegenstand intensiver Forschungen geworden. Zunehmend erhalten epigenetisch modifizierende Medikamente Einzug in neue Therapiekonzepte, ohne jedoch die Risiken bisher ausreichend zu kennen. Die Gruppe der derzeit am intensivsten erforschten epigenetischen Modifikatoren umfasst zum einen hypomethylierende Substanzen, die als Inhibitoren der DNA-Methyltransferasen fungieren. Zum anderen wirken Inhibitoren der Histondeacetylasen ebenfalls an Schlüsselpositionen des Epigenoms. Bisher haben die hypomethylierenden Substanzen 5-Azacytidine und 5-Aza-2'-Deoxycytidine eine Zulassung der US Food and Drug Administration (FDA) für die Behandlung des Myelodysplastischen Syndroms (MDS) erhalten. Aus der Gruppe der Histondeacetylaseinhibitoren hat die Substanz Suberoylanilidhydroxamsäure (SAHA) zudem eine Zulassung für die Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms bekommen. Ein Einsatz bei der Therapie nicht-onkologischer Erkrankungen wie z.B. der rheumatoiden Arthritis ist für die nächsten Jahre zu erwarten. Vor dem Hintergrund eines zu erwartenden zunehmenden Einsatzes in der Klinik ist auch die Erforschung möglicher Risiken ein entscheidender Punkt.

Epigenetische Regulationsvorgänge sind sehr eng mit der DNA-Doppelstrangbruchreparatur verknüpft. Zum einen haben durch epigenetische Modifikationen ausgelöste Änderungen an der Chromatinstruktur eine unmittelbare Konsequenz für die Reparaturvorgänge. Zum anderen führen Änderungen an der Genexpression ebenfalls zu einer Modifikation der Reparatur. Ziel dieser Arbeit war es daher, eine mögliche Beeinflussung der Doppelstrangbruchreparatur durch epigenetisch modifizierende Substanzen in humanen Normalzellen zu objektivieren und die biologische Konsequenz im Sinne einer Änderung der klonogenen Überlebensrate zu quantifizieren.

Es ist bekannt, dass das Entstehen eines Doppelstrangbruchs zur unmittelbaren Markierung der angrenzenden Genomabschnitte durch Phosphorylierung der Histonvariante H2AX ( $H2AX \rightarrow \gamma H2AX$ ) kommt (ROGAKOU *et al.*, 1998). Durch Antikörpermarkierung kann man dies nutzen und Doppelstrangbrüche indirekt sichtbar machen, um die Anzahl zu quantifizieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden in menschlichen Fibroblasten, mit und ohne vorhergehender Testsubstanz-Inkubation, durch Röntgenbestrahlung künstlich Doppelstrangbrüche erzeugt. Mittels der immunfluoreszenzbasierten  $\gamma$ H2AX-Focusanalyse konnte für die hypomethylierende Substanz 5-Azacytidine keine Beeinflussung der Induktion oder der Doppelstrangbruchreparatur in humanen Fibroblasten nachgewiesen werden. Jedoch zeigte sich bei Untersuchung der Histondeacetylase-Inhibitoren SAHA, Natrium-Butyrat und MS275 eine statistisch signifikante Verschlechterung der Reparatur. Für diese Substanzen konnten ebenfalls mittels des Koloniebildungs-Assays eine Abnahme der Überlebensfraktion im Vergleich zu scheinbehandelten Zellen nachgewiesen werden. Die beiden ebenfalls untersuchten Substanzen Valproinsäure und Trichostatin-A zeigten nach kurzer Inkubationszeit keine statistisch signifikante Verschlechterung der Reparatur in der  $\gamma$ H2AX-Focusanalyse, jedoch konnte nach längerer Inkubationszeit eine Beeinflussung der Überlebensfraktion im Koloniebildungs-Assay nachgewiesen werden.

Ferner konnte erstmals in menschlichen Normalzellen unter der Inkubation mit dem Histondeacetylase-Inhibitor MS275 eine verminderte Bildung von 53BP1-Foci nachgewiesen werden. Bei Analyse der unbestrahlten Kontrollen wurde ebenfalls für MS275 eine statistisch signifikante Zunahme der  $\gamma$ H2AX-Foci-Anzahl beobachtet, welche sich durch eine negative Beeinflussung der Clearance von reaktiven Sauerstoffspezies erklären könnte.

Eine verschlechterte Doppelstrangbruchreparatur führt zu einem erhöhten (Zweit-) Malignomrisiko. Daher sollten Patienten in Zukunft insbesondere vor einer geplanten Langzeittherapie über dieses Risiko aufgeklärt werden. Ebenso sollten Ärzte versuchen, eine Strahlenbelastung so gering wie möglich zu halten.

## 1.1 Summary

### **Radiosensitization of human normal tissue cells by epigenetic modifying substances**

The epigenome is a gene-expression regulating code interfering and interacting with the genome. On the level of the epigenome, post-translational acquired modifications of gene-expression can be inherited without changes in the primary DNA-sequence. In the last several years, epigenetic modifying substances have been subject to intensive research. More and more, epigenetic modifying drugs gain access into new therapy concepts without having sufficient knowledge to evaluate potential risks. At the moment most intensive scientific research is done on hypomethylating substances, which act as inhibitors of the DNA-methyltransferases. Inhibitors of histone-deacetylases are acting on key positions of the epigenome as well. Until today, 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine, both hypomethylating agents, achieved US Food and Drug Administration (FDA) approval for the therapy of the myelodysplastic syndrome (MDS). Out of the group of histone-deacetylase-inhibitors the FDA approved suberoylanilidhydroxamicacid (SAHA) for the therapy of cutaneous T-cell-lymphomas. A use in non-oncologic diseases such as rheumatoid arthritis is expected for the next years. Against a background of increasing clinical use investigation of potential risks becomes an important factor.

Epigenetic regulation is closely related to DNA double-strand break repair. Direct modification on the level of chromatin structure on the one hand and modification in gene-expression due to epigenetic modification on the other leads to changes in repair. Therefore the aim of this study was to assess the potential influence of epigenetic modifying substances on double-strand break repair in human normal cells and to quantify biological consequence in terms of changes in clonogenic survival.

It is known that in the presence of a DNA double-strand break adjacent genomic regions are marked immediately through phosphorylation of the histone variant H2AX ( $H2AX \rightarrow \gamma H2AX$ ) (ROGAKOU *et al.*, 1998). By using antibodies this phenomenon can be used to indirectly uncover double-strand breaks and to quantify them.

In the present study double-strand breaks have been generated by x-rays in human fibroblasts which previously had been incubated with or without test-substances. By using the immunofluorescence based  $\gamma H2AX$ -focus analysis no influence on induction or repair due to the hypomethylating agent 5-azacytidine could be detected in human normal fibroblasts. But a

statistical significant decrease in repair could be detected by analyzing the histone deacetylase inhibitors SAHA, sodium-butyrate and MS275. Using the clonogenic survival-assay, a decrease in clonogenic survival compared to mock-treated cells was detected for these substances as well. Two more substances, valproate and Trichostatin-A did not show statistically significant decrease in repair by using relatively short incubation periods, but did show an influence on clonogenic-survival after longer incubation.

Furthermore, an interaction between the histone-deacetylase inhibitor MS275 and reduced formation of 53BP1-foci could be described for the first time for human normal cells. By analyzing unirradiated controls a statistical significant increase in the number of  $\gamma$ H2AX-Foci due to incubation with MS275 was observed, which may be explained by a negative change in clearance of reactive-oxygen-species.






A deteriorated double-strand break repair increases the risk of development of a (secondary) malignoma. Therefore, patients should be extensively educated about the genotoxic risks, especially in long-time therapies. Additionally, physicians should intent to reduce exposure to radiations as maximum possible.

## 2 Einleitung

Trotz steter Optimierung und Weiterentwicklung bestehender Therapiekonzepte sterben in Deutschland jährlich mehr als 224000 Menschen an malignen Neubildungen, der zweithäufigsten Todesursache, und bis 2030 prognostiziert die WHO einen weiteren Anstieg (MATHERS *et al.*, 2006). Direkt aus der epigenetischen Grundlagenforschung abgeleitete Therapieansätze gehören zu den neuesten, viel versprechenden Therapiekonzepten, ohne jedoch bisher mögliche Nebeneffekte epigenetisch modifizierender Substanzen ausreichend einschätzen zu können.

### 2.1 Grundlegendes zum Aufbau des Genoms

In eukaryotischen Zellen ist die vererbare zellspezifische Information für die qualitative und quantitative Proteinherstellung, sowie für regulatorische RNA Moleküle, in Form von Genen durch die spezifische Aneinanderkettung der Nukleinbasen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin kodiert. Allerneueste Forschungsergebnisse zeigen zudem die Existenz einer fünften Nukleinbase in menschlichen Zellen: 5-Hydroxymethylcytosin (KRIAUCIONIS *et al.*, 2009). Diese Base scheint insbesondere für epigenetische Regulationsvorgänge in Nervengewebe eine wichtige Rolle zu spielen. Eine Nukleinbase zusammen mit Deoxyribose und Phosphatgruppen formt ein Nukleotid; die Verkettung von Nukleotiden formt Polynukleotidketten, zwei dieser Ketten bilden die DNA-Doppelhelix. (WATSON *et al.*, 1953; SAENGER, 1984). Die 3,2 Milliarden Nukleotide des humanen Genoms sind auf 22 autosomale und 2 gonosomale Chromosomen verteilt, wobei die DNA jeweils an kleine basische Proteine (MG s. Tab. 1), die sog. Histone, gebunden ist. Der Komplex aus DNA und Protein wird als *Chromatin* bezeichnet. Die vier Histone H2A, H2B, H3 und H4 lagern sich zu einem Histonoktamer zusammen, das fünfte Histon H1 bildet ein sog. Verbindungs- o. Linker-Histon. Um das Histonoktamer windet sich ein 145-147 bp (BERG *et al.*, 2007; ALBERTS *et al.*, 2008) langer DNA-Abschnitt, einen sog. *Nucleosome-Core-Particle* bildend. Erst das zusätzliche Einbeziehen eines kurzen DNA-

Histon	MG (kDa)
 H1	20,9
 H2A	14
 H2B	13,8
 H3	15,3
 H4	11,3

**Tab. 1** – MG-Angaben für die wichtigsten Histone. Die Größe symbolisiert das MG. Angaben: <http://www.uniprot.org>

Verbindungsstückes (bis 80 bp), an das teilweise das Histon H1 bindet, liefert die korrekte Definition eines sog. *Nucleosoms* (KORNBERG, 1974; KORNBERG *et al.*, 1999).

Das Histonoktamer, um dessen Außenseite sich die DNA zu einer linksgängigen Superhelix windet, wird aus der Zusammenlagerung der Histone H3 und H4 zu einem Tetramer  $(H3)_2(H4)_2$  und zweier Dimere von H2A-H2B geformt (KLUG *et al.*, 1980; LUGER *et al.*, 1997). Zahlreiche Wechselwirkungen (wie z.B. Wasserstoffbrücken) stellen die enge Verbindung zwischen DNA und Histonen her, wobei für epigenetische Regulationsmechanismen die Ladungsunterschiede zwischen den positiv geladenen Histonen (hoher Anteil an den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin) und der negativ geladenen DNA wichtig sind.

Bereits lichtmikroskopisch ist in den Interphasekernen eukaryotischer Zellen das dicht gepackte *Heterochromatin* vom offeneren, lockeren *Euchromatin* abgrenzbar. Gene, die auf Abschnitten im Heterochromatin liegen, werden praktisch nicht exprimiert (MAHLKNECHT *et al.*, 2003). Andersherum verhält es sich im transkriptionell aktiveren Euchromatin. Änderungen der Chromatinstruktur stellen folglich einen Mechanismus zur Regulierung der Genexpression dar, mit dessen Besonderheiten sich die sog. „*Epigenetik*“ beschäftigt.

## 2.2 Epigenetik

Jede gesunde eukaryotische Zelle besitzt ein für sie spezifisches und von den Notwendigkeiten der räumlichen und zeitlichen Aktion und Interaktion geprägtes Genexpressionsmuster. Veränderungen an der Chromatinstruktur, natürlich oder artifiziell induziert, stellen wichtige Mechanismen für die Kontrolle der Genexpression dar. Da Zellen in der Lage sind, Teile dieser Genexpressionsmuster ohne Veränderung an der eigentlichen DNA-Sequenz zu vererben, bezeichnet man dies auch als „epigenetisches Erbe“ – um durch das griechische Präfix „*epi*“ (auf) zu verdeutlichen, dass es sich um einen der eigentlichen DNA-Sequenz auf- o. überlagerten Code handelt. Es handelt sich also um postmitotisch vererbare Änderungen der Genexpression, die nicht auf einer Änderung der primären DNA-Sequenz beruhen (ESTELLER, 2008).

### 2.2.1 Epigenetische Modifikationen

Um die durch die unterschiedliche Packungsdichte des Chromatins hervorgerufene Regulation der Genexpression zu nutzen, müssen die Wechselwirkungen zwischen den

Histonen und der DNA-Doppelhelix, sowie regulatorischen Proteinen verändert werden. Hierbei spielen Acetylierung (HEBBES *et al.*, 1988), Methylierung (ALLFREY *et al.*, 1964) sowie Phosphorylierung und Ubiquitylierung von Histonen (ALBERTS *et al.*, 2008) die wichtigste Rolle, über zahlreiche weitere mögliche posttranslationale Modifikationsvorgänge ist weniger bekannt (vgl. (KOUZARIDES, 2007)).

Da Methylierungen sowohl an den Histonen als auch an der DNA selber stattfinden können, bietet sich für epigenetische Modifikationen die grobe Unterteilung in „Histon-Modifikationen“ und „DNA-Methylierung“ an (BERNSTEIN *et al.*, 2007).

Die verschiedenen Histon-Modifikationen und die DNA-Methylierung beeinflussen sich gegenseitig und stehen z.B. über Gen-regulatorische-Proteine, die an modifizierte Histone oder methylierte Cytosine binden, in Kontakt. Die korrekte Funktion der an der DNA-Methylierung, wie auch an Histon-Modifikationen, beteiligten Komponenten ist für den Organismus von entscheidender Bedeutung, da sie an Schlüsselregulationsstellen für gewebsspezifische Genexpression, Zelldifferenzierung, x-chromosomaler Inaktivierung und Alterungsprozesse maßgeblich beteiligt sind und eine Fehlfunktion zur Karzinogenese führen kann.

### **2.2.1.1 DNA-Methylierung**

Die DNA-Methylierung findet vornehmlich durch das Anfügen eines Methylrestes an der C-5 Position des Pyrimidinringes von Cytosin statt und wird im Beisein des Methylgruppendonors S-Adenosyl-Methionin über DNA-Methyltransferasen enzymatisch vermittelt. Die Modifizierung hat keinen Einfluss auf die Basen-Paarung (ALBERTS *et al.*, 2008). In humanen Zellen geschieht die DNA-Methylierung vornehmlich an Cytosinen, die einem Guanin vorangestellt sind, sog. CpG-Dinukleotide. Die Verteilung der CpG-Dinukleotide erfolgt nicht zufällig über das Genom verteilt, vielmehr finden sich Anhäufungen, sog. CpG-Inseln, die ungefähr 0.7 % des menschlichen Genoms ausmachen, jedoch 7 % der CpG Dinukleotide enthalten (FAZZARI *et al.*, 2004). Die Mehrheit der menschlichen Genpromotorregionen sind am 5'-Ende mit CpG Inseln assoziiert (BERNSTEIN *et al.*, 2007; ESTELLER, 2008) und in undifferenzierten Zellen unmethyliert, d.h. das zugehörige Gen wird exprimiert. Methylierte Cytosinbasen können regulatorische Proteine sowohl rekrutieren als auch ausschließen (BIRD, 2002).

Auch wenn der Großteil der aktuellen Literatur sich ausschließlich auf Methylierungen von CpG beschränkt, unterstreichen einige Forschungsergebnisse auch die Bedeutung von „Nicht-CpG“-Methylierungen in humanen Zelllinien (RAMSAHOYE *et al.*, 2000).



Die Weitergabe eines spezifischen Methylierungsmusters an eine Tochterzelle erfolgt über die DNA-Methyltransferase DNMT1 mit einer Spezifität für hemi-methylierte CpG-Dinukleotide, welche den elterlichen DNA-Strang als Vorlage für die Methylierungen am neu synthetisierten Tochterstrang benutzt. (SMITH *et al.*, 2007).

Die DNA-Methyltransferasen DNMT3a und DNMT3b hingegen methylieren „de novo“ vorher unmethylierte Sequenzen (OKANO *et al.*, 1999).

### **2.2.1.2 Histonmodifikationen**

Modifiziert werden die Aminosäuren-Seitenketten der acht Histone im Nukleosomenkern, wobei die größte Anzahl an kovalenten Modifikationen an den aus den Histonen herausragenden N-terminalen „Histon-Schwänzen“ erfolgt. Acetylierung findet vornehmlich an Lysin statt, wobei ein H-Atom durch eine Acetylgruppe ersetzt wird, und sich hierdurch die positive Ladung des Lysins aufhebt. Methylierung im Rahmen der posttranslationalen Histonmodifikationen findet sowohl an Lysin, wie auch an Arginin statt, wobei durch die Wahl von Mono-, Di- oder Trimethylierung eine weitere Stufe der Komplexität der Regulationsvorgänge ermöglicht wird. Während der Methylierung von Lysin funktionell Bedeutung bei Transkription und Reparatur zukommt, ist sie bei Arginin auf die Transkription beschränkt (KOUZARIDES, 2007).

Für Phosphorylierungen sind die Aminosäuren Serin oder Threonin das Substrat. Alle diese drei Modifikationen fügen lediglich relativ kleine Moleküle in die Histonschwänze ein. Ausnahme bildet nur die Ubiquitinylierung, da Ubiquitin selbst ein 76 AS großes Protein ist (SANTOS-ROSA *et al.*, 2005; ALBERTS *et al.*, 2008).

#### **2.2.1.2.1 Acetylierung/Deacetylierung**

Die Histonacetylierung wird durch Histon-Acetyl-Transferasen (HAT) katalysiert, die an enzymspezifische Lysin-Positionen des N-terminalen Histonendes mit Hilfe des Co-Faktors Acetyl-CoA negativ geladene Acetylgruppen transferieren. Acetyliert werden vor allem die Histone H3 und H4, jedoch nicht ausnahmslos, da z.B. die HAT CBP/P300 auch die Histone H2A und H2B acetyliert (KOUZARIDES, 2007).

Durch die Ladungsänderung des ursprünglich basischen, d.h. positiv geladenen Histonendes, wird die Affinität zwischen Histon und DNA abgeschwächt, so dass die Chromatinstruktur gelockert wird, und die nun im euchromatischen Abschnitt liegenden Gene

exprimiert werden können. An die acetylierten Lysine können zudem Bromodomänen, d.h. spezifische Acetyl-Lysin-Bindungsdomänen, wie sie in für die Transkription essentiellen Komplexen vorkommen, binden (BERG *et al.*, 2007; BERNSTEIN *et al.*, 2007). HATs können aber auch durch direkte Modifikation von Transkriptionsfaktoren agieren (ROTH *et al.*, 2001; LÜBBERT *et al.*, 2007). Mutationen werden bei zahlreichen Krebserkrankungen gefunden, sowohl bei soliden Tumoren, wie auch bei hämatologischen Erkrankungen (SANTOS-ROSA *et al.*, 2005).

### 2.2.1.2.2 Histondeacetylasen

Die Silent-Information-Regulator 2 (SIR2)-Familie (SIRT1-7) von Nikotin-Amid-Dinukleotid (NAD<sup>+</sup>)-abhängigen HDACs bildet die Klasse III der HDACs und wird aufgrund der großen Sequenzunterschiede von der Familie der klassischen HDACs unterschieden (VOELTER-MAHLKNECHT *et al.*, 2006). Die klassische HDAC-Familie kann man noch in zwei Klassen unterteilen: Klasse I umfasst die Reduced-Potassium-Dependency (RPD3)-ähnlichen HDACs (HDAC 1, 2, 3 u. 8), Klasse II die Histondeacetylase 1 (HDA1)-ähnlichen HDACs 4, 5, 6, 7, 9 u. 10 (GROZINGER *et al.*, 1999).

HDAC-Klasse	Protein im Menschen	Protein in Hefe
Klasse I	HDAC 1, 2, 3, u. 8	RPD3
Klasse II	HDAC 4, 5, 6, 7, 9 u. 10	HDA1
Klasse III	SIRT 1-7	SIR2
Klasse IV	HDAC 11	

**Tab. 2** - Überblick über die Klassenzugehörigkeit der 18 bekannten Histondeacetylasen

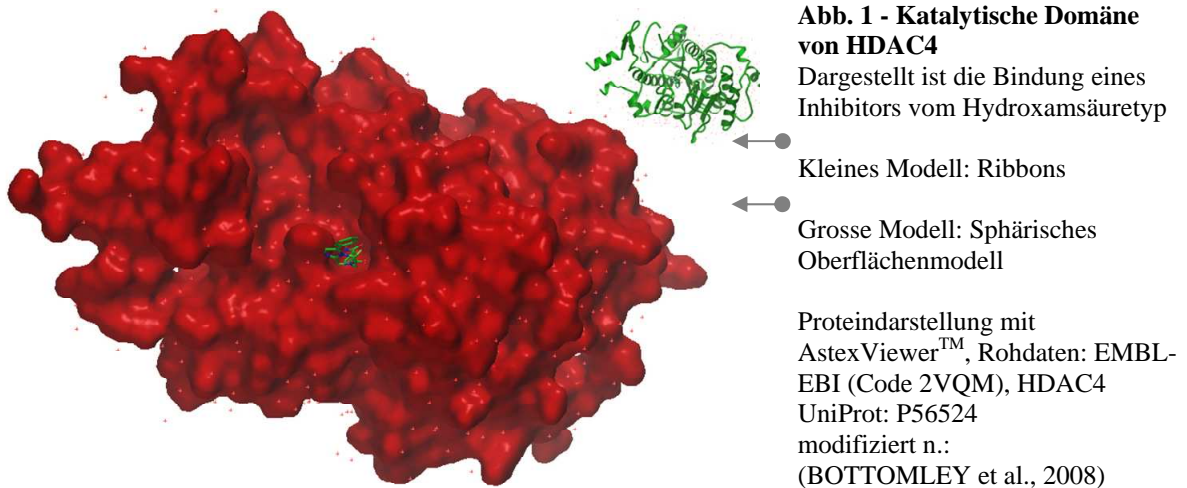
RPD3 ist ein Transkriptionsregulator der Hefe *Saccaromyces cerevisiae*; HDA1 ist ein ebenfalls in der Hefe vorkommendes Protein mit Deacetylaseaktivität; SIR2 das Protein in der Hefe, welches zum humanen SIRT1 die größte Homologie zeigt (DE RUIJTER *et al.*, 2003; ZSCHOERNIG *et al.*, 2008). Die erst 2002 identifizierte Histondeacetylase 11 (HDAC 11) zeigt zu den o.g. Klassen nur geringe Sequenz-Übereinstimmungen, so dass für sie eine eigene Klasse (IV) verwendet wird (GAO *et al.*, 2002; GREGORETTI *et al.*, 2004; VOELTER-MAHLKNECHT *et al.*, 2005).

Die HDACs der Klasse I finden sich fast ausschließlich im Zellkern, wobei HDAC1 und 2 diesen aufgrund des Fehlens eines Kern-Export-Signals (*nuclear export signal*, *NES*) nicht verlassen können, wohingegen z.B. HDAC3 sowohl ein Import- als auch Export Signal trägt, theoretisch also auch im Zytoplasma lokalisiert sein kann (JOHNSTONE, 2002). Die Histon-

Deacetylase 6 (HDAC6, Klasse II) ist an Mikrotubuli gebunden (HUBBERT *et al.*, 2002) und ist, wie auch HDAC9 (ZHOU *et al.*, 2001) und HDAC10 (FISCHER *et al.*, 2002; KAO *et al.*, 2002) im Zytoplasma lokalisiert, wobei letztere ebenfalls im Zellkern vorkommen (BERTOS *et al.*, 2001). Die Klasse II HDACs zeigen also eine größere Mobilität in Antwort auf zelluläre Signale. Noch besser untersucht wurden die Lokalisationsänderungen für die HDACs 4, 5 und 7 im Rahmen von Muskelzellendifferenzierung (vgl. (DE RUIJTER *et al.*, 2003), wobei das komplexe Zusammenspiel untereinander und mit weiteren Regulationsfaktoren in anderen Zelltypen deutlich weniger verstanden ist, und folglich auch hier die Verwendung epigenetisch modifizierender Substanzen noch ungeahnte Folgen hat.

Inzwischen kristallisieren sich jedoch für einzelne Tumorentitäten Unterschiede in der Expression der einzelnen HDACs heraus, und das Spektrum an bekannten Funktionen innerhalb der Tumorzellen wächst beachtlich, obwohl noch immer erhebliche Lücken bestehen (WITT *et al.*, 2008).

Den klassischen HDACs gemeinsam ist eine ca. 390 AS umfassende katalytische Domäne, wobei HDAC6 und 10 mit zwei katalytischen Domänen hier die Ausnahmen bilden (GUARDIOLA *et al.*, 2002). Die eigentliche aktive Region besteht aus einer röhrenförmigen Tasche mit breiterer Basis (Kolbenform) (FINNIN *et al.*, 1999). Zwei benachbarte Histidine, Aspartat und Tyrosin, sind die Grundlage dafür, dass über ein *charge-relay-system* die Acetylgruppe im Rahmen des Deacetylierungsprozesses entfernt werden kann. Neben einem  $Zn^{2+}$ -Ion an der Zink-Bindungsstelle am Boden der Tasche, werden weitere Kofaktoren für die HDAC-Aktivität benötigt. Da sie zusammen mit den HDACs die Genaktivität unterdrücken, werden sie in diesem Zusammenhang auch als Ko-Repressoren bezeichnet, dies sind z.B. BRCA, NF- $\kappa$ B oder N-CoR (für eine Übersicht vgl. (DE RUIJTER *et al.*, 2003)). Brisanz besitzen die zunehmenden Kenntnisse, dass auch so bedeutende Proteine wie p53, NF- $\kappa$ B,  $\alpha$ -Tubulin oder nukleäre Hormonrezeptoren von HDACs deacetyliert werden (DOKMANOVIC *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2007). Einige Autoren schlagen daher bereits vor, statt von Histon-Deacetylasen besser von „Lysin-Deacetylasen“ (YANG *et al.*, 2008) oder noch präziser ihre Spezifität implizierend von „N- $\epsilon$ -Lysin-Deacetylasen“ zu sprechen (XU *et al.*, 2007).



## 2.2.2 Epigenetisch modifizierende Substanzen

Die Erkenntnis, welche Bedeutung dem durch die HATs und HDACs vermittelten Gleichgewicht zwischen Genexpression u. –repression für die Entstehung von (malignen) Erkrankungen zukommt, machte die Entwicklung pharmakologisch wirksamer Substanzen attraktiv, die diese Schlüsselenzyme regulieren (MAHLKNECHT *et al.*, 2000).

### 2.2.2.1 DNA-Methyltransferase-Inhibitoren

In Tumorgewebe findet sich häufig ein genomweiter Methylierungsverlust, während es gleichzeitig zu aberranten lokalen Methylierungsanhäufungen kommt. Promotoren von Tumor-Suppressor-Genen sind dabei häufig Ziel von Hypermethylierungen und folglichem gene-silencing (JONES *et al.*, 2002).

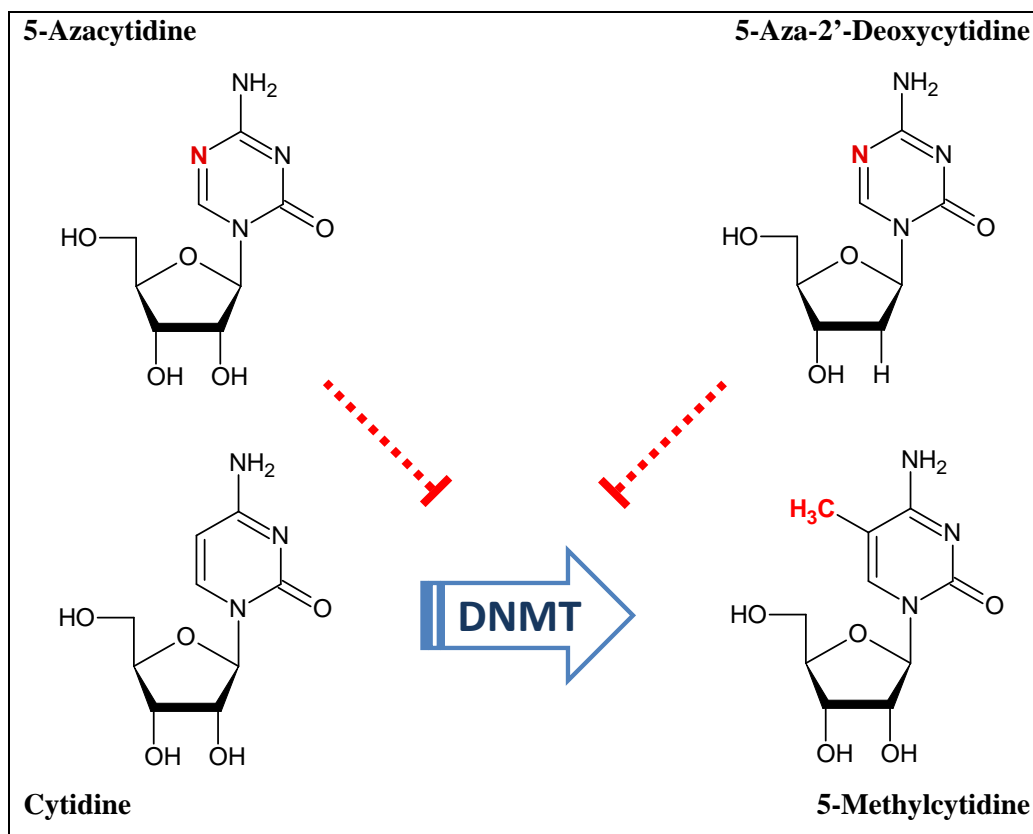
Ein Therapieansatz besteht darin, durch Hemmung der DNA-Methyltransferasen (DNMT) die Transkriptions-Suppression aufzuheben. Zwei DNA-Methyltransferase-Inhibitoren besitzen inzwischen eine FDA-Zulassung für die Behandlung von Patienten mit Myelodysplastischen Syndrom (MDS): 5-Azacytidine (Vidaza®; FDA-Zulassung 2004) und 5-Aza-2'-Deoxycytidine (Dacogen®, Decitabine; FDA-Zulassung 2006), rund 40 Jahre nach ihrer ersten Verwendung in *in vitro* Studien (SORM *et al.*, 1964; CIHÁK, 1974; JONES *et al.*, 1980).

Anwendung in neuen Therapieansätzen bei malignen Erkrankungen finden DNMT-Inhibitoren sowohl in Monotherapien, als auch in Kombination z.B. mit HDAC-Inhibitoren. Insbesondere in der Behandlung von MDS und Leukämien zeigen sich vereinzelt Erfolge, hingegen fehlen Beweise der Wirksamkeit für solide Tumore (ESTELLER, 2008). Auch

fehlen nach wie vor exakte Erklärungen für das uneinheitliche Therapieansprechen (STRESEMANN *et al.*, 2008).

Bei der Synthese von DNA-Strängen kann 5-Aza-2'-Deoxycytidine anstatt des natürlich vorkommenden Deoxycytidine (ein Desoxyribonukleosid) eingebaut werden. 5-Azacytidine hingegen wird als Ribonukleosid in RNA eingebaut, etwa 10 % jedoch können durch Konversion mittels Ribonukleotidreduktase in 5-Aza-2'-Deoxycytidine umgewandelt werden.

Von den natürlicherweise vorkommenden Cytidine und Deoxycytidine unterscheiden sich beide Substanzen lediglich durch das Vorhandensein eines Stickstoff-Atoms an Position 5 des Pyrimidinring, so dass DNMT beide Komponenten als normale Substrate betrachten. Hierdurch kann ein kovalent bindendes intermediäres Reaktionsprodukt der Methylierungsreaktion nicht freigesetzt werden, so dass die DNMT „eingefangen“ und in der Folge degradiert werden (SANTI *et al.*, 1984; STRESEMANN *et al.*, 2008).



**Abb. 2** - Schematische Darstellung der DNA-Methylierung durch DNMT, sowie Inhibition der DNMT durch die nukleosidischen DNA-Methyltransferaseinhibitoren 5-Azacytidine und 5-Aza-2'-Deoxycytidine. Strukturformeln erstellt mit ACD/ChemSketch. Validiert unter <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Modifiziert u. korrigiert nach (LÜBBERT *et al.*, 2007)

### 2.2.2.2 Histondeacetylase-Inhibitoren

Bereits 1971 beobachteten Sato und Friend, dass unter Exposition mit DMSO erythroleukämische Zellen ausdifferenzierten (SATO *et al.*, 1971). Sechs Jahre später wurden in *Nature* histon-modifizierende Effekte durch Natrium-Butyrat in HeLa und Friend-erythroleukämischen Zellen publiziert (RIGGS *et al.*, 1977), der Nachweis der Deacetylierungs-Inhibition erfolgte umgehend (BOFFA *et al.*, 1978). In einer japanischen Arbeitsgruppe konnte 1990 gezeigt werden, dass durch das aus *Streptomyces hygroscopicus* gewonnene Fermentationsprodukt TSA HDACs inhibiert und die Differenzierung von Friend-Zellen induziert wird (YOSHIDA *et al.*, 1990).

Weitere Substanzen wurden gesucht und synthetisiert, u.a. Suberoylanilide hydroxamic acid, kurz SAHA (RICHON *et al.*, 1996), deren Fähigkeit, HDACs zu inhibieren, zwei Jahre später publiziert wurde (RICHON *et al.*, 1998).

Inzwischen ist eine Vielzahl biochemisch sehr heterogener natürlich vorkommender oder synthetisierter Substanzen bekannt, die man nach chemischen Aspekten gruppieren kann. So reicht das Spektrum von den simpel strukturierten kurzkettigen Fettsäuren über Hydroxamsäuren und Benzamide bis zu komplexen zyklischen Tetrapeptiden. Bereits heute würde eine vollständige Liste aller bekannten HDAC-Inhibitoren den Umfang dieser Einleitung sprengen, erst jüngst sind weitere HDAC-Inhibitoren entwickelt worden, z.B. KD5170 oder Sulfamide (HASSIG *et al.*, 2008; WAHHAB *et al.*, 2009). Übersichten finden sich u.a. in (DE RUIJTER *et al.*, 2003; VILLAR-GAREA *et al.*, 2004; LÜBBERT *et al.*, 2007).

Auch wenn die genaue Funktion auf molekularer Ebene noch nicht für alle HDAC-Inhibitoren ergründet werden konnte, so stellt die Bildung eines Chelatkomplexes von einem Teil des Inhibitors mit dem am Boden der katalytischen Tasche der HDAC sitzenden  $Zn^{2+}$ -Ion ein mögliches Wirkprinzip dar (VILLAR-GAREA *et al.*, 2004), während zudem z.B. bei den Hydroxamsäuren der ringförmige Anteil wie ein Deckel für die Tasche gesehen werden kann. Neben einer optimalen Reaktion mit dem Metallion versucht man daher bei der Entwicklung neuer potenter HDAC-Inhibitoren möglichst viele Interaktionspunkte mit der kolbenförmigen „Tasche“ in der katalytischen Domäne zu kreieren (MASSA *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2003; SUZUKI *et al.*, 2003; WU *et al.*, 2004; MAI *et al.*, 2009).

Aus den Mechanismen auf molekularer Ebene ergibt sich eine gewisse Diversität hinsichtlich der HDAC-Spezifität der verschiedenen HDAC-Inhibitoren. So gibt es neben den bereits erwähnten Substanzen wie TSA und SAHA, die unspezifisch HDACs inhibieren und

daher im Englischen auch als „pan-inhibitors“ bezeichnet werden, auch solche, die z.B. nur HDACs der Klasse I oder II inhibieren (WITT *et al.*, 2008). Keine Einigkeit existiert über die Fragestellung, ob „pan-Inhibitoren“ wie SAHA oder klassen-spezifische Inhibitoren wie Valproat oder MS275 besser für die Krebstherapie geeignet sind. Aufgrund der bezüglich anderer Proteine nicht vorhandenen Redundanz der HDACs könnten die „pan-Inhibitoren“ auf breiterer Basis Tumore schädigen (XU *et al.*, 2007), während wenn man sich das größere Nebenwirkungsspektrum anschaut vieles für die Verwendung spezifischerer Inhibitoren spricht (WITT *et al.*, 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde aus der Gruppe der kurzkettigen Fettsäuren Valproat und Natrium-Butyrat, die Hydroxamsäuren SAHA und Trichostatin A, sowie das Benzamid MS275 verwendet. Eine Übersicht über die HDAC-Spezifität der Substanzen findet sich in Tab. 3, Strukturformeln im Abschnitt 3.1.4.1. Alle Substanzen waren oder sind gegenwärtig Bestandteil klinischer Studien, auch wenn bis zum jetzigen Zeitpunkt lediglich SAHA (unter dem Handelsnamen Vorinostat<sup>®</sup>) eine Zulassung für die Behandlung des primären kutanen T-Zell-Lymphoms erhalten hat (bei Patienten mit progressivem, persistierenden oder rückläufigem Erkrankungsbild, nach einer oder zwei vorangegangenen systemischen Therapien; FDA-Zulassung Okt. 2006).

HDACi	Klasse I				Klasse II						Klasse IV
	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC8	HDAC4	HDAC5	HDAC6	HDAC7	HDAC9	HDAC10	HDAC11
NaB											
VA	+++	+++	+++	+++			-	-	-		
SAHA	+++	+++	+++	+	+++		+++	+++	+++		
TSA	+++	+++	+++	+	+++		+++	+++	+++		
MS275	+++	+	+	-	-		-	-	+++	+++	

**Tab. 3** - Inhibitionsprofil der Histon Deacetylase-Inhibitoren, modifiziert nach (WITT *et al.*, 2008)  
 leer = keine Daten, +++ = starke Inhibition, + = schwache Inhibition, - = keine Inhibition

## 2.3 Strahlenbiologische Grundlagen

### 2.3.1 Ionisierende Strahlung

Für die künstliche Induktion von DNA-Schäden wurde in der vorliegenden Arbeit ionisierende Strahlung (IR) verwendet. Als ionisierend bezeichnet man Strahlung, deren kinetische Energie ausreicht, Elektronen aus einem Atom zu lösen, also ein positiv geladenes Ion (Kation) zu erzeugen. Man muss ionisierende Strahlung begrifflich von Ionenstrahlung

trennen, bei der es sich um Teilchenstrahlung handelt. Neben der Teilchen- oder Korpuskularstrahlung existiert die Photonen- oder Quantenstrahlung. Beim radioaktiven Zerfall entsteht z.B. Alphastrahlung ( ${}^4_2\text{He}^{2+}$ , Ionenstrahlung), die zugleich ionisierende Eigenschaften besitzt. Ebenfalls entstehen Beta- ( $\beta^-$ -Strahlung, Elektronen (= Teilchenstrahlung) und Gammastrahlung ( $\gamma$ -Strahlung, Photonen), die die höchste Energie und damit Eindringtiefe in den Organismus besitzt.

### 2.3.2 Röntgenstrahlung und Röntgenquelle

Röntgenstrahlung ist wie Gammastrahlung Photonen-Strahlung, nach dem Welle-Teilchendualismus ebenfalls betrachtbar als elektromagnetische Welle. Während Gammastrahlung bei Kernzerfallsprozessen entsteht und die höchste Energie besitzt, werden Röntgenstrahlen meist künstlich erzeugt und besitzen im Allgemeinen eine etwas geringere Energie, entsprechend einer etwas größeren Wellenlänge ( $\lambda_\gamma \leq 10^{-12}\text{m}$ ;  $\lambda_{\text{Röntgen.}} = 10^{-12}-10^{-9}\text{m}$ ).

Die Erzeugung der Röntgenstrahlen findet in einer Röntgenquelle (hier: Röntgenröhre) statt, in der Elektronen zunächst durch ein elektrisches Feld hohe (kinetische) Energie zugeführt wird, und anschließend ein abrupter Aufprall auf die Anode stattfindet. Hierbei wird 99 % der eingestrahnten Energie in Wärme umgewandelt (Notwendigkeit der Kühlung) und nur 1 % der Energie wird als Röntgenstrahlung freigesetzt, die sich aus zwei Komponenten zusammensetzt: Durch die starke Verzögerung der Elektronen entsteht zum einen kontinuierliche Bremsstrahlung, zum anderen werden Elektronen der Anoden-Atome angeregt, die bei Rückkehr auf das ursprüngliche Energieniveau Strahlung mit einem materialabhängigen charakteristischen Linienspektrum emittieren (charakteristische Röntgenstrahlung).

### 2.3.3 Schadensinduktion und Wechselwirkungen ionisierender Strahlung

Trifft ein Photon mit ausreichender Energie auf eine zelluläre Struktur, so finden prinzipiell drei Wechselwirkungsprozesse statt: Comptoneffekt, Photoeffekt (photoelektrischer Effekt) und Paarbildungseffekt. Der Comptoneffekt (Compton-Streuung) beschreibt, dass ein hochenergetisches Photon beim Zusammenstoß mit einem Hüllenelektron eines Atoms einen Teil dieser Energie abgibt, so dass ein Elektron freigesetzt werden kann. Ein Photon wird mit der Restenergie in eine geänderte Richtung emittiert und kann selber bei noch ausreichender Energie weitere Elektronen anregen. Hochenergetische Photonen können aber auch direkt mit



dem elektrischen Feld des Atomkerns wechselwirken, wobei zwei neue Teilchen entstehen (Paarbildungseffekt). Die Energie des Photons wird dabei in Ruheenergie und kinetische Energie der erzeugten Teilchen umgewandelt. Nötig ist hierfür, dass das Photon mindestens die Ruheenergie der erzeugten Teilchen besitzt, bei  $\gamma$ -Strahlung sind dies Elektron und Positron. Auch hierbei werden Teilchen frei, die ihrerseits ionisieren können. Niederenergetische Photonen geben hingegen ihre Energie bei der Kollision mit einem Hüllenelektron komplett ab, so dass das Elektron freigesetzt wird und ein ionisiertes Atom zurückbleibt (Photoeffekt).

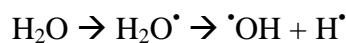
Die stärksten Strahlenschäden werden durch freie Radikale erzeugt, die eine hohe chemische Reaktivität besitzen. Als Radikal bezeichnet man ein Atom o. Molekül, das mindestens ein ungepaartes Elektron besitzt. Bei Bestrahlung mit Gamma- oder Röntgenstrahlung kommt es zur sog. Wasserradiolyse, die vereinfacht wie folgt abläuft:

Heterolytische Spaltung (Ionisation)  $\rightarrow$  Wasser-Ion (Radikal)

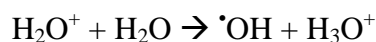


oder

homolytische Spaltung  $\rightarrow$  Hydroxylradikal u. Wasserstoffatom



Die primären Wasser-Ionen reagieren unmittelbar mit Wasser, wobei weitere Hydroxylradikale entstehen:



Aufgrund der kurzen Halbwertszeit der Radikale haben ihre Effekte nur eine begrenzte räumliche Auswirkung. Dennoch ergaben Untersuchungen, u.a. mit Radikalfängern, dass mehr als die Hälfte der DNA-Schäden durch Radikale erzeugt werden (REUVERS *et al.*, 1973). Es entstehen an der DNA neben Basen- u. Zuckerschäden, Vernetzungen (DNA-DNA und DNA-Protein-Crosslinks) Einzel- und Doppelstrangbrüche (KÜHNE, 2003; WANNENMACHER *et al.*, 2006; FRICKE, 2008).

### 2.3.4 DNA-Doppelstrangbruchreparatur

DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) gehören zu den schwersten DNA-Schäden. Jeder DSB stellt ein unmittelbares Risiko für die Chromatin-Stabilität und damit auch für chromosomale Translokationen dar. DSB können zu Gen-Rearrangements führen, zu Apoptose oder schlimmstenfalls zur malignen Transformation einer Zelle. Dennoch treten DSB auch natürlicherweise im Rahmen der Immunsystem-Reifung auf oder generieren während der Meiose genetische Diversität (SCHATZ *et al.*, 2005; WHITBY, 2005). Neben diesen normalen zellulären Mechanismen können DSB auch artifiziell durch eine Vielzahl von Ereignissen induziert werden. Pharmakologisch u.a. durch Topoisomerase-Inhibitoren (z.B. dem Zytostatikum Etoposid) oder radiomimetischen Substanzen wie Bleomycin (MAHANEY *et al.*, 2009). Ebenso können reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) zu DSB führen (vgl. S. 92). Für die vorliegende Arbeit wurden DSB durch die ionisierende Strahlung (IR) einer Röntgenröhre erzeugt. Lebewesen sind aber auch kontinuierlich natürlich vorkommender IR in niedrigen Dosen ausgesetzt. Insbesondere jedoch im Kontext medizinischer Diagnostik (z.B. Computertomographie) und Therapie wird IR verwendet und führt zu DNA-Schäden (LÖBRICH *et al.*, 2005; BRENNER *et al.*, 2007; ROTHKAMM *et al.*, 2007).

Ionisierende Strahlung führt indirekt über die Bildung von Hydroxyl-Radikalen ( $\bullet\text{OH}$ ) zu DNA-Schäden, sowie direkt über die Abgabe von Energie. Schäden entstehen an Nucleinsäure-Basen und am Phosphodiester-Rückgrat, resultierend in Einzelstrangbrüchen (single-strand-breaks SSBs). Entstehen zwei SSBs max. 20bp entfernt an gegenüberliegenden DNA-Einzelsträngen, so bilden sich die für IR typischen DSBs, die unsaubere Enden aufweisen (überhängende 3' u. 5'-Enden oder 3'-Phosphatgruppen) (WYMAN *et al.*, 2006; WYMAN *et al.*, 2008; MAHANEY *et al.*, 2009).

Für eine fehlerfreie Restauration der zerstörten Information ist es erforderlich, dass die verlorene Sequenzinformation von einem anderen DNA-Abschnitt auf demselben oder einem anderen DNA-Molekül abgelesen werden kann. Evolutionär hat es sich jedoch von Vorteil erwiesen, dass DSB auch dann repariert werden, wenn keine homologe Sequenzinformation verfügbar ist: So entstehen zwar Informationslücken, aber durch die Rekonstruktion des Phosphodiester-Rückgrats kann die strukturelle Integrität eines Chromosoms gewahrt werden, ohne welche der Verlust ganzer Chromosom-Segmente mit hunderten Genen drohen würde (LIEBER, 2008).

Dieses Prinzip der fehleranfälligen DSB-Reparatur wird als *non-homologous-end-joining*, kurz NHEJ, bezeichnet und von der fehlervermeidenden *homologen Rekombination* (HR) abgegrenzt. Die homologe Rekombination ist auf die S- und frühe G2-Phase beschränkt, da

für den korrekten Ablauf die Nähe eines Schwester-Chromatids notwendig ist (JEGGO *et al.*, 2006). Aus der experimentellen Notwendigkeit heraus, Zellen mit gleichem DNA-Gehalt zu untersuchen, konnten jedoch nur Zellen in der G0/G1-Zellzyklusphase untersucht werden. Im Folgenden soll daher im Detail das für diese Arbeit maßgebliche NHEJ unter besonderer Berücksichtigung epigenetischer Modifikationen und den ableitbaren wichtigsten Erkrankungen beschrieben werden.

#### **2.3.4.1 DSB-Reparatur über non-homologous-end-joining**

Inzwischen ist bekannt, dass die Koordination der in der Antwort auf DSB beteiligten Nucleasen (Entfernen von geschädigter DNA), Polymerasen (Synthetisierung neuer DNA-Stränge) und DNA-Ligasen (Verknüpfung von DNA-Strängen) unmittelbar mit Chromatin-Modifizierung verbunden ist, ein Beispiel für die Komplexität (epigenetischer) Regulationsvorgänge (PANDITA *et al.*, 2009).

##### **2.3.4.1.1 Von der Histon-Variante H2AX zu $\gamma$ H2AX**

Im Jahre 1998 wurde publiziert, dass in Reaktion auf das Auftreten von DSB die Histon-Variante H2AX phosphoryliert wird ( $H2AX \rightarrow \gamma H2AX$ ). Die nachfolgende Entwicklung kommerziell erwerblicher Antikörper gegen die Phosphorylierungsstelle am Serin 139 hat zu einer Revolution in der Erforschung der DSB-Reparatur geführt (ROGAKOU *et al.*, 1998; ROGAKOU *et al.*, 1999; BONNER *et al.*, 2008). Dennoch ist auch mehr als zehn Jahre nach der Entdeckung die exakte physiologische Bedeutung der H2AX-Phosphorylierung nicht eindeutig geklärt.

Aus Mausexperimenten weiß man, dass H2AX auch als Zellzyklus-Kontrollpunkt-Marker benötigt wird und zudem eine Rolle beim Immunglobulin-Klassenwechsel (*Ig class switch*) spielt. Homozygot H2AX negative Mäuse weisen eine hohe chromosomale Instabilität auf, resultierend in einem pleiotropen Phänotyp (Kleinwuchs, Immundefekte), männliche Mäuse sind zudem steril (CELESTE *et al.*, 2002). Überraschenderweise führt jedoch ein Verlust an  $\gamma$ H2AX trotz seiner zentralen Relevanz für die DNA-Schadensantwort (*DNA damage response, DDR*) nur zu einer mäßigen Verschlechterung der Reparatur. Die Arbeitsgruppe um Celeste vermutet, dass  $\gamma$ H2AX zwar zum Reparaturprozess beiträgt, jedoch nicht an der primären Erkennung beteiligt ist und folglich auch nicht an der Distribution der Reparatur-Komplexe (CELESTE *et al.*, 2003). Andere Arbeiten, die nicht im Widerspruch hierzu stehen,

zeigen potentielle Interaktionen von  $\gamma$ H2AX u.a. mit MDC1 (STEWART *et al.*, 2003), 53BP1 (WARD *et al.*, 2003) und Nbs1 (KOBAYASHI *et al.*, 2002). Interaktionen mit der HAT NuA4, sowie den an der Chromatin-Umformung beteiligten Proteinen Ino80 und Swi/Snf konnten in Hefeorganismen gezeigt werden (MORRISON *et al.*, 2004; VAN ATTIKUM *et al.*, 2004). Für MDC1 (Mediator / Regulator) konnte eine Interaktion auch auf struktureller Ebene nachgewiesen werden, seit bekannt wurde, dass MDC1 zwei BRCT-Domänen (*BRCA1 C-terminal domain*) besitzt, die optimal erscheinen, um  $\gamma$ H2AX zu erkennen (RODRIGUEZ *et al.*, 2003; STUCKI *et al.*, 2005; KINNER *et al.*, 2008).

Weitere Evidenz für eine Schlüsselrolle von H2AX liefern jüngste Studien, die Mutationen im H2AX-Gen (H2AFX) untersucht haben. H2AFX liegt auf Position 23 des langen Arms von Chromosom 11 (11q23), einer häufig Mutationen ausgesetzten Stelle in vielen hämatoonkologischen Erkrankungen (AML, ALL). Inzwischen konnten z.B. für einige SNPs (single-nucleotide-polymorphisms) im H2AFX-Gen eine starke Korrelation mit Follikulären Lymphomen und Mantelzell-Lymphomen (Non-Hodgkin-Lymphome) gefunden werden (NOVIK *et al.*, 2007).

Neben der Phosphorylierung scheint auch Ubiquitylierung an der Signaltransduktion beteiligt zu sein. So könnte eine Verbindung zwischen den am Anfang der Signalkaskade stehenden Faktoren ATM, MDC1 und Nbs1 und den später hinzukommenden Proteinen 53BP1 und BRCA1 über RNF8 geregelt werden, welches in der Lage ist, H2AX zu (poly)ubiquitylieren und so weitere Mediatoren zu rekrutieren (COHN *et al.*, 2008). 53BP1 interagiert zudem spezifisch mit dimethyliertem Lysin 20 des Histon H4 (H4K20me2). (BOTUYAN *et al.*, 2006).

Eine Übersicht über die beschriebenen und weitere, im Zuge der DSB-Reparatur stattfindenden, Histon-Modifikationen gibt Tab. 4.

Während über die der Phosphorylierung von H2AX nachgeschalteten Interaktionen bereits einiges bekannt ist, ist die zentrale Frage nach dem Mechanismus der initialen Phosphorylierung von H2AX ungeklärt. Beteiligt an der Phosphorylierung scheinen drei Mitglieder der PIKK-Familie zu sein, ATM, ATR und DNA-PKcs, wobei ATM die größte Bedeutung zukommt. Durch seine molekulare Struktur ist ATM in der Lage gleich mehrere H2AX-Moleküle zu phosphorylieren (BAKKENIST *et al.*, 2003). In vollständiger Abwesenheit von ATM, wobei eine spezifische Inhibition nicht genügt, ist auch die DNA-PKcs in der Lage, H2AX zu phosphorylieren (HICKSON *et al.*, 2004).

Histon	Aktion	Position
H1	Phosphorylierung durch DNA-PK	
H2A	Acetylierung durch TIP60	
H2AX	Phosphorylierung durch ATM	S139
	Ubiquitinylierung durch RNF8	S139
H3	Acetylierung durch TIP60	
	Methylierung durch DOT1L	K79
	Assoziation von 53BP1 an	K79me
	Assoziation von RAG2 an	K4me3
H4	Phosphorylierung durch ck2	S1
	Acetylierung durch NuA4/TIP60-TRAPP	
	Acetylierung durch hMOF	K16
	Assoziation von HP1 $\beta$ an	K20me3
	Assoziation von 53BP1 an	K20me2

**Tab. 4 - Bekannte Histonmodifikationen in der Antwort auf eine DSB-Induktion.**  
Modifiziert nach (PANDITA *et al.*, 2009)

Fest steht, dass nach einem Bruch des DNA-Doppelstrangs das Histon H2AX nicht, wie sonst üblich bei Histonmodifikationen, am N-terminalen, sondern am carboxyterminalen Ende (Ser139) phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung breitet sich bis zu einer 2 Mbp großen Region des Chromatins aus (ROGAKOU *et al.*, 1999), wobei neuere Untersuchungen eine Ausbreitung sogar bis zu 30 Mbp dadurch erklären, dass nicht nur unmittelbar aufeinander folgende H2AX-Moleküle phosphoryliert werden (PILCH *et al.*, 2003).

Charakteristisch führt diese lokale Phosphorylierung und die nachfolgende Rekrutierung einiger DDR-Proteine zur Bildung von (immunfluoreszenz-)mikroskopisch nachweisbaren Protein-Komplexen, sog. Foci (hier: „*IR-induced foci*“ *IRIF*). Die maximale Anzahl erreichen die  $\gamma$ H2AX-Foci in humanen Fibroblasten etwa 30 min nach dem Schadensereignis (BONNER *et al.*, 2008).

Unbekannt ist der genaue Mechanismus der Dephosphorylierung von  $\gamma$ H2AX. Theoretisch könnte dieser Prozess durch eine simple Dephosphorylierungsreaktion erfolgen oder komplizierter durch den Austausch von  $\gamma$ H2AX durch H2AX. Für eine *in situ* Dephosphorylierung spricht eine teilweise beobachtete Kolo-kalisierung der Phosphatase PP2A mit  $\gamma$ H2AX. Dagegen spricht, dass in Hefen  $\gamma$ H2AX-Foci auch in Phosphatase-defizienten Stämmen verschwinden und es Beweise gibt, dass das  $\gamma$ H2AX-Homolog zunächst

aus der Chromatin-Struktur entfernt wird, bevor es dephosphoryliert wird (KINNER *et al.*, 2008).

#### 2.3.4.1.2 Ataxia telangiectasia mutated

Für die These, dass ATM als Sensor für DSB fungiert, sprechen vor allem aus Strukturanalysen gewonnene Daten die u. a. belegen, dass ATM in der Lage ist, DNA-Enden zu binden (SMITH *et al.*, 1999; LLORCA *et al.*, 2003). Stärkere Evidenz erhält jedoch die Hypothese, dass der eigentliche primäre Sensor für DSB im Mre11-Komplex (Mre11/Rad50/Nbs1) zusehen ist, welcher ATM aktivieren kann (LAVIN *et al.*, 2007). Für den Komplex wird aufgrund seiner Nuklease-Aktivität vermutet, dass er zudem für die Prozessierung der DNA-Enden nach DSB-Induktion durch IR benötigt wird. Daten aus *in vivo* Experimenten an hypomorphen Rad50-Mäusen zeigen, dass bereits kleine Defekte insbesondere in proliferierenden Zellen, z.B. hämatopoetischen Stammzellen, zu schwerer chromosomaler Instabilität führen (BENDER *et al.*, 2002).

Eine Vielzahl von verschiedenen Mutationen im ATM-Gen, einem der größten des menschlichen Genoms, führt zum Krankheitsbild der *Ataxia telangiectasia*, welche u.a. durch eine hohe Strahlensensibilität gekennzeichnet ist (SANDOVAL *et al.*, 1999). Die hohe Empfindlichkeit der betroffenen Patienten für strahleninduzierte Schäden könnte damit zusammen hängen, dass möglicherweise DSB, die im Heterochromatin entstehen, ATM-abhängig repariert werden (BONNER *et al.*, 2008). So beeinflusst ATM den Transkriptions-Korepressor KAP1 (*Krüppel-associated box (KRAB)-associated protein*) direkt und führt zur Lockerung des zuvor durch KAP1, HP1- $\beta$  (Heterochromatin Protein 1) u./o. HDAC 1 u. 2 erzeugten heterochromatischen Chromatinabschnitts (RIBALLO *et al.*, 2004; ZIV *et al.*, 2006; GOODARZI *et al.*, 2008). Für HP1- $\beta$  konnte bereits auf molekularer Ebene ein Mechanismus aufgezeigt werden, über den HP1- $\beta$  nach DNA-Schädigung mobilisiert wird, so dass es konsekutiv zu einer Relaxation der heterochromatischen Struktur kommen kann (AYOUB *et al.*, 2008). Es ist wahrscheinlich, dass die gestörte Chromatin-Relaxation einen wesentlichen Anteil an der schlechteren DSB-Reparatur in AT-Patienten besitzt (PANDITA *et al.*, 2009). Ob eine durch epigenetische Modifikatoren ausgelöste Relaxation die fehlgesteuerte Relaxation im Gewebe von AT-Patienten umgehen mag, bleibt noch zu zeigen.

Auch an der Regulation von ATM sind epigenetische Modifikationen unmittelbar beteiligt. Jüngst konnte gezeigt werden, dass der Verlust des Nukleosom-bindenden Proteins HMGN1 Chromosomen zu binden, die durch IR ausgelöste ATM-Autophosphorylierung negativ beeinflusst. Abhängig von HMGN1 führt IR zu einem Anstieg der globalen Acetylierung von

Lysin 14 des Histon H3 (H3K14), jedoch sind HDAC-Inhibitoren in der Lage, die Abhängigkeit zwischen ATM und HMGN1 aufzuheben, so dass die Notwendigkeit von HMGN1 für eine effiziente Aktivierung von ATM umgangen werden kann (KIM *et al.*, 2009).

Nach seiner Aktivierung führt ATM seinerseits zur Phosphorylierung einer so großen Anzahl von Proteinen, dass inzwischen eine Plattform für *in silico* Netzwerk-Analysen besteht (Showcase of ATM related pathways: <http://www.cs.tau.ac.il/~spike/>). Grob lassen sich die Proteine gemäß ihrer Funktion in DNA-Schadens-Sensoren (z.B. DNA-PKcs, Nbs1), Vermittler (z.B. H2AX, MDC1, BRCA1, 53BP1), Übersetzer (z.B. Chk1, Chk2) und Effektoren (z.B. p53, Mdm2, Artemis, KAP1) unterteilen (LAVIN *et al.*, 2007).

#### 2.3.4.1.3 Ku70/80, DNA-PKcs, Artemis

In *in vitro* Experimenten konnte für zwei weitere Proteine, Ku70 u. Ku80, die Fähigkeit zur Erkennung von DSB binnen Sekunden nach der Induktion nachgewiesen werden. Inwieweit sie unabhängig oder in die Aktivierung z.B. von ATM, MDC1 oder  $\gamma$ H2AX involviert sind, ist derzeit noch unklar. So formen die als Heterodimer vorliegenden Ku70/Ku80 unter anderem eine Schleife, die DNA unabhängig von der Sequenz umschließen kann (WALKER *et al.*, 2001). DNA-PKcs können an die DNA-Enden des Bruches mit hoher Affinität binden, nachdem Ku durch eine kurze Einwärts-Drehung die Enden freigelegt hat. Der sich bildende Komplex (DSB-Ku-DNA-PKcs) könnte zum Zusammenhalten der DNA-Enden und zum Schutz vor Nukleasen dienen, zudem findet eine Autophosphorylierung an DNA-PKcs und Aktivierung der Nuklease Artemis statt. Verlust an DNA-PKcs führt u.a. durch Defekte in der V(D)J-Rekombination zum sog. SCID-Syndrom (severe combined immunodeficiency) in Pferden, Hunden und Mäusen (LIEBER, 2008; MAHANEY *et al.*, 2009). Artemis fungiert als 5'-3'-Endonuklease, Defekte führen in menschlichen Zellen zum RS-SCID (radiation-sensitive SCID). Etwa 10 % der DSB in humanen (Fibroblasten-)Zelllinien werden Artemis abhängig repariert (RIBALLO *et al.*, 2004).

Nach der Prozessierung der Enden synthetisieren DNA-abhängige-DNA-Polymerasen die ggf. zur Verknüpfung der geschädigten DNA nötigen DNA-Bausteine *de novo*. Unterschieden werden drei Polymerasen (Pol): TdT (Terminal deoxynucleotide Transferase), Pol  $\mu$  und Pol  $\lambda$ . TdT ist lediglich in der Lage, Nukleotide ohne Vorlage an die DNA-Enden zu fügen (v.a. während der V(D)J-Rekombination). Pol  $\mu$  kann sowohl nach Vorlage arbeiten, als auch zufällig Nukleotide anfügen. Pol  $\lambda$  arbeitet ausschließlich nach Vorlage. Als Vorlage kann

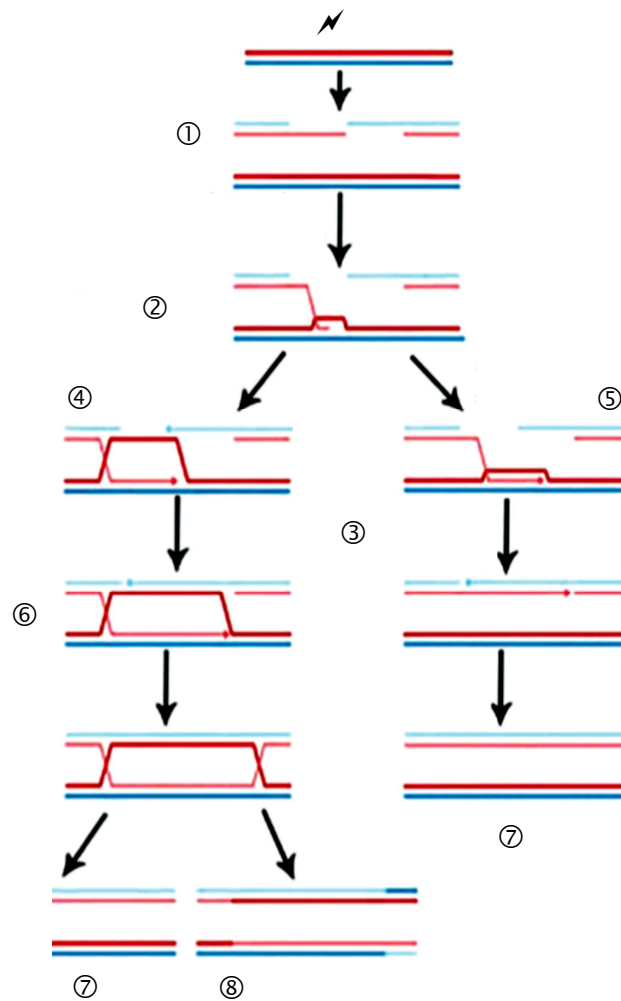
z.B. ein Teil des komplementären Stranges dienen (wenn sich z.B. die Enden überlappen), resultierend in einer inversen Wiederholung der Sequenz. Ebenso kann ein Stück des der Lücke gegenüberliegenden Stranges dienen, um die noch vorhandene eigentliche Läsion zu überbrücken (WYMAN *et al.*, 2006; LIEBER, 2008).

Die Verknüpfung der Nukleotide erfolgt abschließend über die DNA-Ligase IV, unabhängig vom parallelen Strang, zudem über Lücken von einigen Nukleotiden hinweg. Als Kofaktoren für die DNA-Ligase IV fungieren XRCC4 und XLF (XRCC4-like factor / Cerunnos) (GU *et al.*, 2007).

#### **2.3.4.2 DSB-Reparatur über Homologe Rekombination**

Das Prinzip der homologen Rekombination (HR) ist ebenfalls ein essentieller Bestandteil der DSB-Reparatursysteme in eukaryotischen Zellen. So veränderten sich die an der HR beteiligten Schlüsselenzyme wie Rad51 im Laufe der Evolution nur wenig. Störungen in der HR sind zudem mit einigen Krankheiten assoziiert worden, so z.B. das Nijmegen breakage syndrome oder die Fanconi Anämie (THOMPSON *et al.*, 2002). Die HR setzt homologe, also möglichst strukturähnliche oder gleiche DNA-Abschnitte voraus, z.B. Schwestern-Chromatide im Rahmen der Zellteilung. Für die vorliegende Arbeit waren jedoch kontaktinhibierte Zellen maßgeblich, so dass die HR im Gegensatz zum NHEJ hier nur vom Prinzip her beschrieben wird. Eine Rolle spielte sie aber bei der Reparatur von DSB im Rahmen des Koloniebildungstests, da dort sich teilende Zellen zum Einsatz kamen.





**Abb. 3-** Prinzip der Homologen Rekombination. Modifiziert nach (PANDITA et al., 2009)

Nach Registrierung des DSB durch u.a. den MRN-Komplex werden zunächst die Enden der Bruchstelle so prozessiert, dass die Überhänge 3'-Polarität aufweisen ①. Ein Teil eines Einzelstrangs dringt nun mit Hilfe der Proteine Rad51 (Meiose: Dmc1) in ein homologes Chromosom ein ②, meist ein Schwester-Chromatid. Die DNA-Polymerase I kann den Einzelstrang nun verlängern ③. Neben diesem sog. „synthesis-dependent strand annealing“ ⑤ kann es auch zur Ausbildung von sog. „Double-Holliday-Junctions (④,⑥) kommen, bei denen sich die Einzelstränge überkreuzen, so dass es während der Reparatur mitunter zu sog. „Crossovers“ kommt, also dem Austausch zweier DNA-Abschnitte. ⑦ = non-crossover recombinants, ⑧=crossover recombinants.

## 2.4 Ziele der Arbeit

In der klinischen Praxis zeigte sich, dass ein Teil der mit hypomethylierenden Substanzen behandelten Patienten nicht von einer Behandlung profitiert (ISSA *et al.*, 2009). Bei einzelnen Patienten kommt es im Gegenteil sogar zu einer deutlichen Verschlechterung des klinischen Bildes. Aus dieser Beobachtung heraus erwuchs die Motivation, mögliche Auswirkungen epigenetisch modifizierender Substanzen auf die chromosomale Stabilität zu untersuchen. Während sich der Großteil der Arbeiten auf die Untersuchung von epigenetisch aktiven Substanzen in Krebszellen konzentriert, war es Ziel der vorliegenden Arbeit, mögliche Auswirkungen auf die Reparatur von Doppelstrangbrüchen der DNA in nicht mutierten humanen Zellen zu untersuchen. Speziell sollte der Einfluss der hypomethylierenden Substanz 5-Azacytidine und der fünf HDAC-Inhibitoren SAHA, MS275, TSA, VA und NaB auf humane Fibroblasten mit Hilfe der  $\gamma$ H2AX-Focusanalyse und des Koloniebildungsassays untersucht werden. Mit diesen Versuchen sollten die biologische Relevanz und mögliche therapeutische Risiken ermittelt werden, um Konsequenzen für die klinische Praxis abzuleiten

## 3 Material und Methodik

### 3.1 Materialien und Geräte

#### 3.1.1 Geräte

Gerätetyp	Name	Hersteller, Ort <sup>1</sup>
Autoklav	Systec 3870 ELV	Systec GmbH, Wettenberg
Brutschränke	Heraeus, HeraCell	Kendo Laboratory Products, Fellbach
Durchflusszytometer (FACS)	BD FACS Canto	BD Biosciences, NJ USA
Elektronische Pipettierhilfe	„Pipettboy“ pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte
Elektrophorese	Mini Protean III Vertikal Elektrophorese System	Biorad, München
Fluoreszenz-Mikroskop	Nikon Eclipse E600	Nikon, Düsseldorf
Invers-(Zellkultur)-Mikroskop	Nikon Eclipse TS100	Nikon, Düsseldorf
Kamerasystem	Nikon DS 2MBWc (s/w) Nikon DS Fi1 (Farbe)	Nikon, Düsseldorf
Photometer	Ultrospec 3100	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Sterilwerkbanken	Heraeus Hera safe	Kendo Laboratory Products, Fellbach
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, NY USA
Wärmebad		GFL, Burgwedel
Westernblot	Mini Trans Blot Cell Biorad Power Pac 200 Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Zählkammer	Neubauer improved	Marienfeld Superior, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Zentrifugen	Biofuge 13 Heraeus	Kendo Laboratory Products, Fellbach

1) Sofern nicht anders angegeben, Deutschland.

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Gerätetyp	Name	Hersteller, Ort <sup>1</sup>
Deckgläschen	Deckgläser rund 12mm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Desinfektionsmittel	Freka-NOL AF	Dr. Schumacher GmbH, Melsungen
FACS-Röhrchen		Beckton & Dickinson, Heidelberg
Filme	Kodak BioMax Light Film u. XAR	Carestream Health Inc., NY USA
Kanülen	BD Microlance	BD Biosciences, NJ USA
Kryoröhrchen	Cryotube Vials	Nunc, Roskilde, Dänemark
Nitrocellulosemembran	Trans-Blot Transfer Medium 0,2µ	BioRad, München
Objektträger	SuperFrost	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Parafilm	Laboratory Film	Pechiney, Plastic Packaging, Chicago, USA
Pipettenspitzen	2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Präzisionswischtücher	Kimtech	Kimberly-Clark Professional, Roswell, USA
Rundbodenröhrchen	15 ml und 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Wasserbadstabilisator	BadStabil (#1-6095)	Neolab, Heidelberg
Zellkulturflaschen	T75 & T25 (75 & 25 cm <sup>2</sup> )	Thermo Fisher Scientific (Nunc GmbH & Co. KG ), Langenselbold
Zellkulturplatten	6-Well-Platten (= 6-Loch-Platten)	Thermo Fisher Scientific (Nunc GmbH & Co. KG ), Langenselbold
Zellkulturschalen	Ø 60	Thermo Fisher Scientific (Nunc GmbH & Co. KG ), Langenselbold
	Ø 94 mm, Ø 150 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen

1) Sofern nicht anders angegeben, Deutschland.

### 3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Typ	Name	Bezeichnung	Hersteller, Ort <sup>1</sup>
<b>Kulturmedien</b>			
	DMEM	#E15-843	PAA, Pasching, Österreich
		#FG 0435	Biochrome AG, Berlin
	MEM	#FG 0325	Biochrome AG, Berlin
	RPMI 1640	#F 1215	Biochrome AG, Berlin
<b>Supplemente</b>			
	FBS Superior	#S 0615	Biochrome AG, Berlin
	NEAA	#K 0293	Biochrome AG, Berlin
	Penicillin/Streptomycin	#A 2213	Biochrome AG, Berlin
	Sodium-pyruvate	#L 0473	Biochrome AG, Berlin
<b>Reagenzien und Lösungen für die Zellkultur</b>			
	DMSO	#A 994.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
	PBS		Klinikapotheke
	Trypsin / EDTA (0.05 %/0.02 %)	#L 2143	Biochrome AG, Berlin
<b>Immunzytochemische Färbung</b>			
	Methanol (Rotipuran)	#4627.5	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
	Mounting Medium (Vectashield)	mit DAPI #H1200 ohne DAPI #H1000	Vector Laboratories, CA USA
	Normalserum NS goat	#B15-035	PAA, Pasching, Österreich
	Triton X 100	#3051.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<b>Histonisierung und Westernblot</b>			
	Aceton		Hedinger, Stuttgart
	Acrylamid-Lösung	Rotipuran Gel (30 %) #3029.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
	Agarose		Sigma-Aldrich, Taufkirchen

APS	#10316	Grüssing GmbH, Filsum
DTT		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Entwickler		Adefo Chemie, Dietzenbach
Ethanol		SAV Liquid Productions, Flintsbach a. Inn
Fixierer		Adefo Chemie, Dietzenbach
Glycin		Merck KGgA, Darmstadt
Hepes	#H3375-25G	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
KCl		Riedel-de Haën, Seelze
Luminol		Flukka (Sigma- Aldrich), Taufkirchen
Magermilchpulver		Lasana, Herford
MgCl <sub>2</sub>	#63072	Flukka (Sigma- Aldrich), Taufkirchen
NaCl		Klinikapothek
PMSF		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Propidiumiodid		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protein- Molekulargewichtsmarker	#SM0671	Fermentas, St. Leon-Rot
RNaseA		Magery-Nagel, Düren
Salzsäure / HCl		Merck, Darmstadt
SDS	#428023	Callbiochem- Novobiochem Corp, CA USA
Temed		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trichloressigsäure		AppliChem, Darmstadt
Tris	#4855.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tween 20	#9127.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	(30 %)	Fischar, Saarbrücken

1) Sofern nicht anders angegeben, Deutschland.

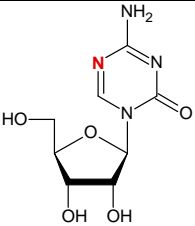
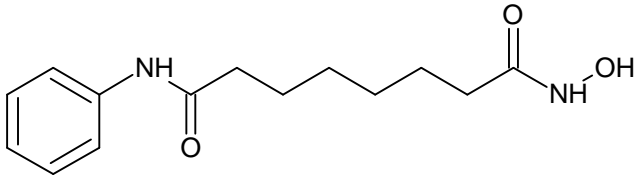
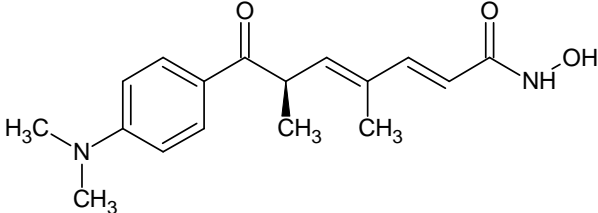
### 3.1.4 Testsubstanzen

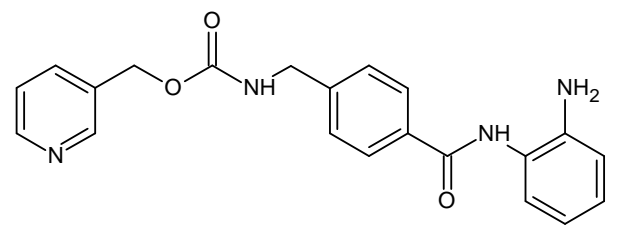
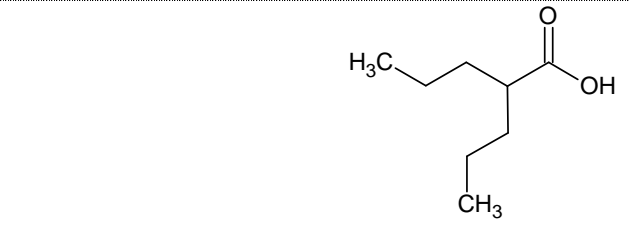
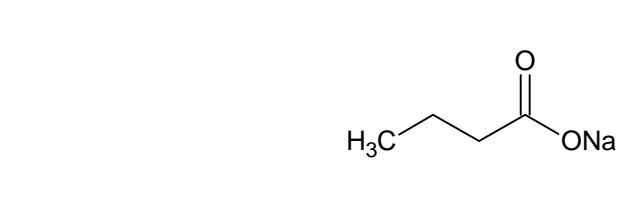
Name	Abk. <sup>1</sup>	Synonyme/Handelsnamen <sup>2</sup>	Hersteller/Bezugsquelle
<b>5-Azacytidine</b>	5-AzaC	Vidaza <sup>®</sup>	
<b>Suberoylanilid-hydroxamsäure</b>	SAHA	Vorinostat, Zolinza <sup>®</sup>	
<b>Trichostatin A</b>	TSA		
<b>MS275</b>		Etinostat <sup>®</sup> , SNDX-275	
<b>Valproat</b>	VA		
<b>Natrium-Butyrat</b>	NaB		

1) Angegeben sind die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen.

2) Auswahl der gängigsten Synonyme und Handelsnamen. Einige der Begriffe sind geschützte Marken.

#### 3.1.4.1 Chemische Struktur der Testsubstanzen

Testsubstanz	MW (g/mol)	<i>in vitro</i> Potenzial (IC <sub>50</sub> -Wertebereich)
<b>DNA-Methyltransferaseinhibitor</b>		
<b>5-Azacytidine</b>		
<b>HDAC-Inhibitoren</b>		
<b>SAHA</b> Hydroxamsäure	MW: 264.3 μM	
<b>Trichostatin A</b> Hydroxamsäure	MW: 302.4 nM	

<b>MS275</b> Benzamid	MW: 376.4 nM - $\mu$ M	
<b>Valproat</b> Kurzketttige Fettsäure	MW: 144.2 mM	
<b>Natrium-Butyrat</b> Kurzketttige Fettsäure	MW: 110.1 mM	

**Tab. 5** - Strukturformeln der verwendeten Testsubstanzen. Die Formeln wurden mit ACD/ChemSketch erstellt. Validierung und ausführliche chemische Informationen unter <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.

### 3.1.5 Zusammensetzung verschiedener Lösungen

Lysepuffer A	10 mM Hepes pH 7,9 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM KCl (kurz vor Benutzung dazugeben:) 0,5 mM DTT 1 mM PMSF
TBST-Puffer	150 mM NaCl 100 mM Tris pH 7,4 0,1 % Tween 20 ad 8 l dH <sub>2</sub> O
10x Transferpuffer	250 mM Tris 1,92 M Glycin
1x Transferpuffer	25 mM Tris-HCl pH 7,5 192 mM Glycin 20 % Ethanol (v/v)



---

10x Laufpuffer	30 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS oder 50 ml einer 20 %igen Lösung ad 1000 ml dH <sub>2</sub> O
1x Laufpuffer	125 mM Tris-HCl pH 7,5 190 mM Glycin 1 % SDS (w/v)
ECL 1	1 ml Luminol-Stammlösung 440 µl Coumaric Acid Stammlösung 10 ml 1 M Tris-HCl pH 8,5 ad 100 ml dH <sub>2</sub> O
ECL 2	64 µl Wasserstoffperoxid (30 %) 10 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,5) ad 100 ml dH <sub>2</sub> O
2 M Schwefelsäure	11,17 ml 96 %ige Schwefelsäure ad 100 ml dH <sub>2</sub> O
0,1 % HCl-Aceton-Lösung	27 µl 37 %ige HCl ad 10 ml Aceton
Ponceau-S-Lösung	0,1 % Ponceau(w/v), 20 % Eisessig (v/v) ad dH <sub>2</sub> O
Blockingsolution	3 % Magermilchpulver in TBST

---

## 3.2 Arbeit mit Zellen

### 3.2.1 Zelllinien

Für sämtliche Experimente wurde die humane Hautfibroblasten-Zelllinie (Zell-Stamm: HSF1<sup>2</sup>), bestehend aus kultivierten humanen Leistenbruchfibroblasten verwendet. Die Zellen wurden freundlicherweise von H.P. Rodemann und K. Dittmann, Universität Tübingen, bereitgestellt.

Die adhärent wachsenden HSF1-Zelllinien hatten sich wiederholt in der Vergangenheit als stabile Experimentalsysteme zur Untersuchung der DNA DSB-Reparatur in menschlichem Normalgewebe erwiesen. (LÖBRICH *et al.*, 2005; KEGEL *et al.*, 2007)

### 3.2.2 Zellpassagierung

Die Fibroblasten wurden standardmäßig bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % rel. Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in speziellen Zellkulturflaschen, die eine optimale Adhärenz und den Austausch von Gasen über ein Filtersystem im Deckel ermöglichten. Je nach Größe der Kulturflaschen wurden unterschiedliche Volumina an Nährmedium verwendet: T75 (75 cm<sup>2</sup>): 20 ml, T25 (25 cm<sup>2</sup>): 5 ml.

Als Kulturmedium kam in einer frühen Phase der Arbeit, insbesondere für den HSF1-Zellstamm, zunächst MEM-Medium mit 10 % FCS, 1 % NEAA, 1 % Penicillin/Streptomycin zum Einsatz. Der HSF1<sup>2</sup>-Zellstamm wurde anschließend in DMEM-Medium (high-glucose, mit Natrium-Pyruvat) mit 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert.

Alle im Folgenden verwendeten Lösungen wurden zuvor im Wasserbad auf physiologische 37 °C erwärmt.

Zur (Sub-)kultivierung der HSF1<sup>2</sup> Zellen in einer T75-Kulturflasche wurde zunächst das gebrauchte Medium abpipettiert und die noch adhärennten Zellen wurden zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen, um verbleibende Mediumsreste und Detritus zu entfernen. Das Ablösen der Fibroblasten erfolgte mit 2 ml Trypsin/EDTA und Inkubation für min. 5 Minuten im Brutschrank (37 °C, 5 %CO<sub>2</sub>). Die Kontrolle der Zellablösung erfolgte visuell mit dem inversen Zellkulturmikroskop: Gelöste Zellen schwimmen abgerundet in der Trypsin/EDTA-

Lösung. Bei schwierigem Detachment lösten sich noch adhärente Fibroblasten nach leichtem Beklopfen der Zellkulturflasche. Die Inhibierung der Trypsin-Wirkung erfolgte durch Zugabe von frischem, serumhaltigem Medium.

Nun wurden 10 µl Suspension zur nachfolgenden Zellzählung entnommen. Anschließend erfolgte die eigentliche Subkultivierung durch aufteilen der Suspension im Verhältnis von 1:2 oder 1:3 auf neue, frisches Nährmedium enthaltende Zellkulturflaschen.

Eine Passagierung im wöchentlichen Rhythmus hat sich für die langsam wachsenden Fibroblasten als optimal erwiesen.

### 3.2.3 Einfrieren von eukaryotischen Zellen

Die Langzeitkonservierung (ggf. über Jahre) der Zellen erfolgte durch Lagerung in flüssigem Stickstoff bei  $-196\text{ °C}$ . Durch Rekristallisationsprozesse können bei höheren Temperaturen von  $-130\text{ °C}$  bis ca.  $-20\text{ °C}$  Eiskristalle so stark wachsen, dass es zu einer strukturellen Schädigung der Zellen kommt. Ziel des Einfrierens war es, auch in späteren Phasen der Arbeit, sowie ggf. in Zukunft auf biologisch verhältnismäßig junge Zellen zurückgreifen zu können und diese erneut zu subkultivieren. Hierzu wurden Fibroblasten in der exponentiellen Wachstumsphase zunächst gewaschen, trypsiniert und in Suspension mit frischem Medium gebracht, um die Trypsinwirkung zu inhibieren. (Analog zur Passagierung, s. Abschnitt 3.2.2). Nach Zählung der Zellzahl und Bestimmung der CPD wurden die Zellen zunächst abzentrifugiert (300 g, 10 min, RT), der Überstand verworfen und das Pellet in gekühltem Einfriermedium (DMEM +20 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin + 10 % DMSO,  $4\text{ °C}$ ) resuspendiert und bis zur maximalen empfohlenen Füllung in 2 ml Kryoröhrchen überführt.

Für ein erfolgreiches Einfrieren (Erhalt der Zellviabilität) ist die Kühlungsrate von entscheidender Bedeutung. Um ein optimales Verhältnis von Dehydrierung, möglicher Eiskristallbildung und Konzentrationsanstieg gelöster Stoffe zu erzielen, hat sich das Absinken der Temperatur um  $1\text{ °C}$  pro Minute bewährt (SCHMITZ, 2007). Hierzu wurden die Kryoröhrchen in einer mit 100 % Isopropylalkohol gefüllten Einfrierbox („5100 Cryo  $1\text{ °C}$  Freezing Container Mr. Frosty“, Nalgene® Labware) zunächst für 1 h bei  $-20\text{ °C}$  gelagert, gefolgt von 24h bei  $-80\text{ °C}$  und anschließender Überführung in Kryoboxen, die in der Flüssigstickstoffphase bei  $-196\text{ °C}$  gelagert wurden.

### 3.2.3.1 Auftauen von Zellen

Da dem Einfriermedium das zelltoxische DMSO als Gefrierschutzmittel zugesetzt ist, muss das Auftauen von Zellen rasch geschehen. Hierzu wurden die Kryoröhrchen zunächst im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, bis sich praktisch alle Eiskristalle aufgelöst hatten und unmittelbar danach in ein mit 10 ml frischem, vorgewärmten Kulturmedium gefülltes Reaktionsgefäß überführt. Durch Zentrifugation bei 300 g für 10 min wurden die Zellen pelletiert, so dass der das toxische DMSO enthaltene Überstand entfernt werden konnte. Das Pellet wurde nun in 3 ml frischem Medium resuspendiert und in eine T75 Kulturflasche überführt und die Zellen unter Standardkulturbedingungen (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % rel. Luftfeuchtigkeit) kultiviert.

Nach ca. 12 Stunden konnte über das Verhältnis zwischen adhären zu nicht-adhären Zellen auf die Viabilität der Zellen geschlossen werden. Nach 24h erfolgte ein Mediumswechsel bzw. bei ausreichender Konfluenz ein Split im Verhältnis von 1:2 oder 1:3, um noch enthaltene toxische Komponenten zu entfernen.

### 3.2.4 Synchronisation

Zur reproduzierbaren und vergleichbaren Untersuchung der Induktion und Reparatur von DSB ist es erforderlich, dass die Zellen einen möglichst homogenen Gehalt an DNA besitzen. Der DNA-Gehalt variiert jedoch während der Zellzyklusphasen. Einen einfachen DNA-Gehalt besitzen die Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Zellzyklusphase, so dass für sämtliche Experimente in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-synchronisierte Zellen verwendet wurden. Eine Eigenschaft der Fibroblasten ist die durch Kontaktinhibition erreichte Einstellung der Teilungsaktivität nach Bildung eines Monolayers. Die Fibroblasten treten in die G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus ein und können so teils über Wochen bei ausreichender Nährstoffversorgung und optimalen Kulturbedingungen gehalten werden. Im Zuge der Zellpassagierung wird die Kontaktinhibition gelöst und die Zellen treten meist synchron wieder in den Zellzyklus ein (BECKER, 2006).

Da die Synchronität der Fibroblasten in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase ein Schlüsselfaktor zum Erreichen vergleichbarer Ergebnisse ist, wurde dies mittels durchflusszytometrischer Messung nach Färbung der Zellen mit Propidium-Iodid kontrolliert.

### 3.3 Propidium-Iodid-Färbung

Zur Unterscheidung der unterschiedlichen Zellzyklusphasen mittels durchflusszytometrischer Messung muss man die Zellen zunächst mit Propidiumiodid (PI) fluoreszenzfärben. PI ist ein mit DNA interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, der durch Licht der Wellenlänge  $\lambda=480\text{nm}$  angeregt wird.

Die Quantität der Interkalierung ist vom Gehalt der DNA abhängig, so dass eine Differenzierung der unterschiedlichen Zellzyklusphasen mit entsprechender Variation des DNA-Gehalts möglich ist.

Zur Färbung der DNA wurde mit den Fibroblasten zunächst analog zur Zellpassagierung (s.3.2.2) verfahren.

Vor der Überführung in frische Zellkulturflaschen wurde die Zellsuspension in 15 ml Falcons pipettiert, und danach bei 300 g für 10 min zentrifugiert. Nach vorsichtigem Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde bei 5000 rpm für 5 min in einer Tischzentrifuge erneut zentrifugiert und der Überstand wieder vorsichtig entfernt. Die vorsichtige, aber vollständige Resuspension des Zellpellets erfolgte nun in 200  $\mu\text{l}$  NaCl (0,9 %). In ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 1,8 ml auf  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühltes Methanol vorgelegt (Fixierung). Durch Pipettieren mittels einer 200  $\mu\text{l}$  Spitze wurden die Zellen erneut weiter vereinzelt und in das Methanol gespritzt. Bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  kann eine Lagerung bis zur weiteren Färbung erfolgen, jedoch sollte eine Mindestlagerzeit von 1 h bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  nicht unterschritten werden.

PI-Färbung: Hierzu wurden die methanolfixierten Zellen im Eppendorf-Reaktionsgefäß zunächst 1 min bei 12000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde einmal mit 500  $\mu\text{l}$  PBS gewaschen und bei 12000 rpm, 2 min erneut abzentrifugiert. Da sich das Pellet nun sehr leicht löst, ist auf besondere Vorsicht beim Abnehmen des Überstandes zu achten. Um eine reine DNA-Färbung zu erhalten, musste die RNA zunächst durch RNaseA hydrolysiert werden. Hierzu wurde das Pellet in 250  $\mu\text{l}$  PBS + RNaseA (Ansatz 1:400 aus einer Stammlösung 10 mg/ml) resuspendiert und für 60 min bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben in FACS-Röhrchen überführt und durch Zugabe von PI (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) plus anschließendem kurzen Vortexen gefärbt. Um eine optimale Interkalierung zu erreichen wurden die Proben für 30 min bei RT im dunklen inkubiert. Die Proben konnten nur für die FACS-Messung verwendet werden.

### 3.3.1 Prinzip der FACS®-Messung

Das von Göhde (GÖHDE, 1968) patentierte Prinzip der Durchflusszytometrie (engl. auch FACS®: „fluorescence activated cell sorting“) beruht auf Messung der Lichtemissionen von, durch zuvor einen Laser emittierten Lichtstrahl einer definierten Wellenlänge, angeregten Zellstrukturen oder fluoreszenzgefärbten Antigenen. Um Einzelzellen zu untersuchen, werden Zellen einer Suspension zunächst durch hydrodynamische Fokussierung, d.h. die starke Beschleunigung mittels Druckluft vor dem Eintritt in die Messkammer, vereinzelt. Die eigentliche Analyse erfolgt durch Messung zweier Streukomponenten des eingestrahnten Lichtes: Dem Vorwärtsstreulicht (engl.: FSC, forward scatter) und dem im rechten Winkel gestreuten Seitwärtsstreulicht (engl.: SSC, sideways scatter). Das FSC gibt einen Hinweis auf die Größe der Zelle, das SSC hingegen ist ein Maß für die Granularität.

In einer normalen eukaryotischen Zelle liegt in der  $G_0/G_1$ -Zellzyklusphase ein diploider Chromosomensatz ( $2n$ ) vor. In der  $G_2$  und M-Phase, vor erfolgter Zellteilung, besitzt die Zelle einen vierfachen Chromosomensatz ( $4n$ ). Mittels eines Histogramms (Auftragung Zellzahl gegen DNA-Gehalt(Lichtintensität)) kann die quantitative Verteilung der Zellen in die Zellzyklusphasen  $G_0/G_1$  ( $2n$ ), S ( $2n$  bis  $4n$ ) und  $G_2/M$  ( $4n$ ) unterschieden werden. (HEYNE, 2007). Die Analyse wurde mit der BD FACS Diva Software durchgeführt.

## 3.4 Bestimmung der kumulativen Populationsverdopplungen

Fibroblasten als Typ einer normalen, nicht immortalisierten humanen Zellart unterliegen Differenzierungs und Alterungsprozessen. (BAYREUTHER *et al.*, 1988) Zur Altersabschätzung einer Zellpopulation wird in den meisten Fällen auf die sog. Passage-Zahl zurückgegriffen. Sie wird pro Subkultivierung um Eins erhöht und ist nur zur groben, raschen Bestimmung des Alters bei konstanten Kulturbedingungen geeignet. Wenn man jedoch als Alter einer Zellpopulation von nicht immortalisierten Zellen, die Anzahl der einzelnen Zellteilungen bzw. Verdopplungen der Population betrachtet, so nähert man sich deutlich genauer dem tatsächlich biologischen Alter an. Für die folgende Arbeit wurden daher bei jeder Passage die sog. kumulativen Populationsverdopplungen (engl. CPD, cumulative population doublings) berechnet.

Als Basis diente die Bestimmung der Zellzahl ( $=N$ ) vor dem Splitting mit Hilfe einer *Neubauer improved*-Zählkammer. Da die Adhärenzeffizienz und Apoptoserate der Fibroblasten bei Passagierung im Rahmen der Meßgenauigkeit für die Zellzahlbestimmung liegt, konnten diese Faktoren für die Berechnung der CPD vernachlässigt werden.

Für

$N$  = Anzahl der geernteten Zellen

$N_0$  = Anzahl der zuvor ausgesäten Zellen

$CPD_{alt}$  = CPD der vorherigen Passage

$$\text{gilt: } CPD_{neu} = CPD_{alt} + \frac{\ln \frac{N_0}{N}}{\ln 2}$$

### 3.5 Aussäen auf Deckgläschen

Für die Bestrahlungsexperimente und anschließende Immunfluoreszenzfärbungen hat es sich als optimal erwiesen, die Fibroblasten direkt auf Deckgläsern wachsen zu lassen. Dies ermöglicht neben einer optimalen Konfluenz und somit der Synchronisation in  $G_0/G_1$ -Phase bei Bestrahlung zudem eine schnelle, zellschonende Fixierung und Färbung, ohne wie alternativ möglich, die Zellen nach Abtrypsinierung mittels einer Zytospin-Zentrifuge auf einen Objektträger zu zentrifugieren.

Um eine möglichst homogene Verteilung der auszusäenden Zellen auf die Deckgläser zu erhalten, wurden zunächst 12 autoklavierte Deckgläser unter sterilen Bedingungen in eine Petrischale ( $\varnothing$  5,5 cm) gelegt und durch sanftes Andrücken am späteren Aufschwimmen gehindert. In jede Petrischale wurden 10 ml frisches, vorgewärmtes Kulturmedium vorgelegt. Mit den Fibroblasten einer zuvor konfluenten Kultur in einer T75-Kulturflasche konnten nach erfolgtem Lösen und Suspendieren (vgl. 3.2.2, S. 37) durch Pipettieren gleicher Volumina unter ständigem Schwenken der Petrischale drei Petrischalen gleichmäßig besät werden. Nach einer Inkubation unter Standard-Kulturbedingungen (37 °C, 5 %  $CO_2$ , 95 % rel. Luftfeuchtigkeit) für min. 24, besser 48 Stunden konnten die Deckgläschen mit nun adhärenen Fibroblasten in entsprechend den Erfordernissen eines Experiments präparierte 6-Loch-Platten überführt werden. Hier wuchsen die Zellen zur endgültigen Konfluenz heran. Ein Well einer 6-Loch-Platte entsprach einem definierten Testpunkt, wobei je Loch stets 2 Deckgläschen verwendet wurden, die in 5 ml Kulturmedium/Loch lagen. Die doppelte Anzahl an Deckgläsern diente zum einen der internen Genauigkeitskontrolle, zum anderen konnte der Verlust eines Deckgläschens z.B. durch Glasbruch trotz sorgfältigster Arbeit nicht völlig ausgeschlossen werden.

## 3.6 Bestrahlungen

Zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen wurde in der vorliegenden Arbeit Röntgenstrahlung verwendet (vgl. 2.3.2, S. 19). Als Röntgenquelle diente eine Röntgenröhre vom Typ Philips PW2184/00, deren Anode aus Wolfram besteht. Das Austrittsfenster besteht aus Beryllium (Dicke  $< 0.02$  mm). Um eine Dosisleistung von  $1,22$  Gy/min zu erreichen, wurde eine Beschleunigungsspannung von  $90$  kV, sowie ein Heizstrom von  $25$  mA benötigt. Als Filter wurde eine  $2$  mm Aluminiumplatte verwendet, die sich in einem Abstand von  $40$  cm zum Austrittsfenster befand (KEGEL *et al.*, 2007; FRICKE, 2008). Bestrahlt wurden die Zellen in ihren entsprechenden Kulturgefäßen, in denen sich warmes Kulturmedium ( $37$  °C) befand.

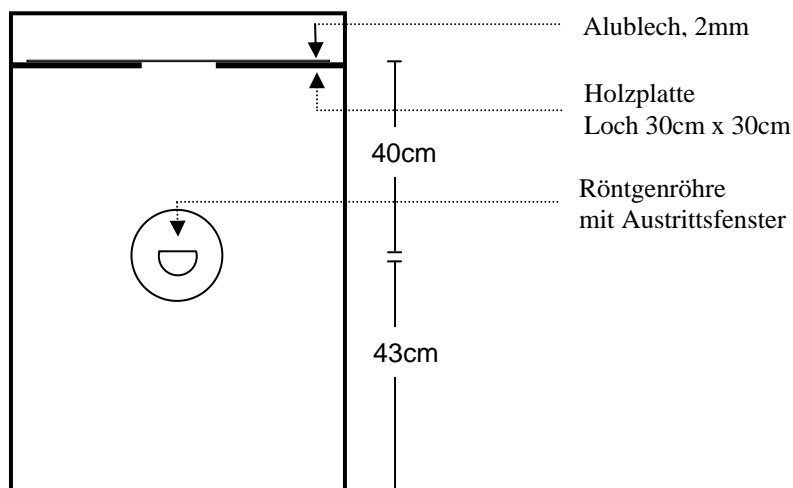


Abb. 4 – Schematische Darstellung der Röntgenanlage

## 3.7 Immunfluoreszenzfärbungen

### 3.7.1 Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung

Elektronen eines fluoreszierenden Stoffes (Fluorochrom) können durch Energie in Form von Licht einer definierten Wellenlänge auf ein höheres Energieniveau angehoben werden. Bei dem Rückfall auf das ursprüngliche Energieniveau emittieren die Elektronen ein spezifisches, im Verhältnis zur Anregungswellenlänge energieärmeres, längerwelliges Licht (STOKES, 1880-1905).



Das Prinzip der indirekten Immunfluoreszenzfärbung beruht auf der Permeabilisierung der Zellmembran, nachfolgender Bindung eines Primärantikörpers an das gewünschte Antigen und Bindung eines mit einem Fluorochrom markierten Sekundärantikörpers an den Primärantikörper. Hingegen ist bei der direkten Immunfluoreszenz der Primärantikörper direkt fluoreszenzmarkiert. Die indirekte Fluoreszenzfärbung ist zum einen flexibler, da ein Sekundärantikörper mit verschiedenen Primärantikörpern verwendet werden kann, zudem ergibt sich durch die mögliche Bindung des Sekundärantikörpers an mehrere Epitope eines einzelnen Primärantikörpers eine Signalverstärkung.

Fluoreszenzfarbstoff	Excitationsmaximum	Emissionsmaximum
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	$\lambda = 495 \text{ nm}$	$\lambda = 519 \text{ nm}$
Alexa Fluor <sup>®</sup> 568	$\lambda = 578 \text{ nm}$	$\lambda = 603 \text{ nm}$
DAPI (4',6-diamidino-2- phenylindole)	$\lambda = 358 \text{ nm}$	$\lambda = 461 \text{ nm}$

**Tab. 6 - Übersicht Fluoreszenzfarbstoffe – (PANCHUK-VOLOSHINA et al., 1999)**

### 3.7.2 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: Nach Ablauf der Reparaturzeit wurden die auf Deckgläschen gewachsenen Fibroblasten durch Überführen in  $-20 \text{ °C}$  kaltes Methanol für 30 min fixiert. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte durch Eintauchen mittels einer Färbekammer für 1 min in ebenfalls auf  $-20 \text{ °C}$  gekühltes Aceton. Anschließend wurde zweimal für je 10 min in PBS/1 % NSgoat (PBS plus Ziegen-Normalserum) auf einem Wipptisch gewaschen und für mindestens 30 min bei RT oder über mehrere Stunden bei  $4 \text{ °C}$  mit PBS/NSgoat geblockt, um unspezifische Bindungsstellen zu besetzen.

Es erfolgte hiernach die Überführung der Deckgläschen in zuvor präparierte Feuchtkammern:

Hierzu wurde in Petrischalen zunächst eine Schicht angefeuchtete Handfalttücher und darüber Parafilm<sup>®</sup> gelegt, wobei auf eine möglichst exakt plane Oberfläche zu achten war. Die Deckgläschen konnten nun mit dem gewünschten Primärantikörper inkubiert werden, wobei pro Deckgläschen  $40 \mu\text{l}$  der Antikörperlösung gleichmäßig über die Fläche verteilt wurden.

<b>Epitop</b>	<b>Name/Herkunft/Bezugsquelle</b>	<b>Verdünnung / Inkubationszeit</b>
$\gamma$ H2AX (Serin 139)	Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139), clone JBW301, mouse monoclonal IgG <sub>1</sub> / Upstate/Millipore, Billerica, MA USA)	Einzelfärbung: 1:800 (in PBS/NSgoat) (ü. N. bei 4 °C) 1:200 (in PBS/NSgoat), (1 h bei RT) Doppelfärbung: 1:1000 (in PBS/NSgoat) (ü. N. bei 4 °C)
53BP1	53BP1 IHC-00001 Ab, rabbit polyclonal, Bethyl Lab.Inc., Monthomery, TX USA	Einzel-/Doppelfärbung: 1:800 (in PBS/NSgoat) (ü. N. bei 4 °C)

**Tab. 7 – Primärantikörper Immunfluoreszenz**

Der  $\gamma$ H2AX-Antikörper (Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139), clone JBW301, mouse monoclonal) wurde in einem Verhältnis von 1:800 mit PBS/NSgoat verdünnt. Für Doppelfärbungen erfolgte eine Verdünnung im Verhältnis 1:1000, ebenso 1:1000 wurde der 53BP1-Antikörper (Anti-53BP1 IHC-00001, rabbit-polyclonal) verdünnt.

Die Inkubation erfolgte in der Feuchtkammer bei 4 °C ü. N., wobei bei Testfärbungen auch eine schnellere Inkubation bei RT, jedoch höherer Antikörper-Konzentration (Verdünnung 1:200) möglich war.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden, wenn erforderlich, die Proben zunächst für einige Minuten auf RT gebracht, und wiederum viermal für je 10 min. in 6-Loch-Platten mit PBS/NSgoat gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen.

Erneut erfolgte die Überführung der Deckgläschen in zuvor präparierte Feuchtkammern und die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper für 1 h bei RT im Dunklen. Sofern nicht anders angegeben wurden der Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 goat anti-mouse IgG, sowie ggf. der Alex Fluor<sup>®</sup> 568 – goat anti-rabbit in einer Verdünnung von 1:500 in PBS/NSgoat verwendet.

<b>Epitop</b>	<b>Name/Herkunft/Bezugsquelle</b>	<b>Verdünnung / Inkubationszeit</b>
Mouse IgG	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 goat anti-mouse IgG (H+L) #A11001/ Invitrogen (Molecular Probes), Karlsruhe	1:500 (in PBS/NSgoat), 1 h bei RT
Rabbit IgG	Alexa Fluor <sup>®</sup> 568 goat anti-rabbit IgG (H+L) #A11011/ Invitrogen (Molecular Probes), Karlsruhe	1:500 (in PBS/NSgoat), 1 h bei RT

**Tab. 8 – Sekundärantikörper Immunfluoreszenz**

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde viermal für je 10 min bei RT mit PBS gewaschen und die Deckgläschen wurden nach kurzem Abtropfen auf Filterpapier mit dem Zelllayer nach unten in einem Tropfen (3  $\mu$ l) Mountingmedium auf einem präparierten Objektträger eingebettet. Als Mountingmedium wurde DAPI-haltiges Mountingmedium (DNA/Zellkern-Färbung) der Firma VectaShield (H1200) in einem Verhältnis von 1:6 mit dem nicht-aushärtenden Mountingmedium (H1000) von Vectashield verdünnt.

Nach mehrstündigem Trocknen wurden die Deckgläser mit handelsüblichem Nagellack versiegelt. Die Lagerung der Proben erfolgte in vor Licht schützenden Sammelmappen bei 4 °C im Kühlschrank.

### 3.8 Optisches System

Zur Auswertung der Fluoreszenzfärbungen wurde ein Nikon Eclipse E600 Fluoreszenzmikroskop verwendet. Dieses war wie folgt bestückt:

<b>Okular:</b>	L-W 10x / 22		
<b>Objektive:</b>			
4x	Plan 4x / 0.10 $\infty$ / - WD 30		
10x	Plan Apo 10x / 0.45 DIC L $\infty$ / 0.17 WD 4.0		
20x	Plan Apo 20x / 0.75 DIC M $\infty$ / 0.17 WD 1.0		
60x	Plan Apo 60x / 1.40 Oil DIC H $\infty$ / 0.17 WD 0.21		
100x	Plan Apo 100x / 1.40 Oil DIC H $\infty$ / 0.17 WD 0.13		
<b>Filter:</b>			
<b>Bezeichnung</b>	<b>Ex (<math>\lambda</math> nm)</b>	<b>DM (<math>\lambda</math> nm)</b>	<b>BA (<math>\lambda</math> nm)</b>
DAPI	340 – 380	400	435 – 485
FITC	465 – 495	505	515 – 555
TxRed	540 – 580	595	600 - 660

EX: Excitation, DM: Dichromatic Mirror, BA: barrier filter emission

Aufnahmen in Graustufen wurden mittels einer Nikon DS 2MBWc Kamera durchgeführt und den einzelnen Kanälen wurde ggf. digital eine Farbe zugewiesen. Für direkte

Farbaufnahmen stand eine Nikon DS Fi1 Kamera zur Verfügung. Zur primären Kamerasteuerung und Bildbearbeitung wurde die Nikon NIS Elements BR Software verwendet.

### **3.9 $\gamma$ H2AX-Focusanalyse – Auswertung**

Die Auswertung der  $\gamma$ H2AX-Focusanalyse, ebenso wie die Zählung von 53BP1-Foci, wurde an einem Nikon E600- Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Hierzu wurden je Datenpunkt mindestens 50 Zellkerne ausgezählt und die Anzahl an Foci pro Zellkern manuell notiert. Die Zählung erfolgte direkt am Mikroskop, es wurden also keine zuvor gespeicherten Aufnahmen ausgewertet. Des Weiteren waren alle Datenpunkte verblindet, so dass der Auswerter keine Zuordnung zu behandelten- respektive scheinbehandelten Proben machen konnte.

#### **3.9.1 Statistik**

Die statistische Auswertung der Unterschiede der Anzahl der Foci für Behandlung vs. Scheinbehandlung pro definiertem Reparaturzeitpunkt erfolgte mittels des nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Tests. Um die Genauigkeit der statistischen Auswertung zu erhöhen, erfolgte zum einen die Auswertung basierend auf den aus drei Einzelerperimenten stammenden zusammengefassten Einzeldaten. Ebenso wurden jedoch auch alle Einzelerperimente für sich ausgewertet. Als statistisch signifikant wurden nur die Datenpunkte betrachtet, die in allen Einzelerperimenten, ebenso wie in der Auswertung der zusammengefassten Ergebnisse, eine statistische Signifikanz ergaben.

Das Signifikanzniveau wurde gemäß der Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests als zweiseitiger Test auf  $p \leq 0,05$  festgelegt.

Zur statistischen Auswertung wurde die Software „SPSS Statistics“ in der 15. Version verwendet (SPSS Inc., Chicago, USA). Die Berechnung der Daten, excl. der statistischen Auswertung, erfolgte mit Microsoft Excel 2003. Diagramme wurden mittels OriginPro 8 erstellt (OriginLab Corporation, MA USA). Zur Auswertung der FACS-Analysen wurde das Programm WinMDI in der Version 2.9 verwendet.

### 3.9.2 Foci-Größenbestimmung

Zur Bestimmung der Foci-Größen wurden einzelne Zellkerne des Reparaturpunktes 2,5 h mit der Kamera Nikon DS 2MBWc des Nikon Eclipse E600 Fluoreszenzmikroskops aufgenommen, welches zuvor exakt kalibriert worden war. Die anschließende Analyse der Fläche der einzelnen Foci erfolgte im Programm NIS-Elements BR mit der 4-Punkt-Ellipsen Funktion. Ausgewertet wurden zwischen 74 und 113 Foci je Substanz (MS275 oder VA bzw. Kontrollen) und Färbung ( $\gamma$ H2AX oder 53BP1).

## 3.10 Analyse des Acetylierungsstatus

### 3.10.1 Histonisolierung (Säureextraktionsmethode)

Für den Nachweis des Acetylierungsstatus mittels Western-blot ist zunächst die Isolierung der Histone erforderlich gewesen. Die Aufreinigung erfolgte mittels Säureextraktion, basierend auf einer modifizierten Methode nach Jansen (JANSEN *et al.*, 2004).

Hierzu wurden die Fibroblasten nach Entfernen des Mediums zunächst in der Kulturflasche zweimal mit PBS gewaschen, das Detachment per Trypsin/EDTA durchgeführt (vgl. Passagierung) und die Trypsin/EDTA/Medium-Zellsuspension in ein 15 ml-Falcon überführt. Nach Zentrifugation (300 g, 10 min, RT) wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (5000 rpm, 5 min, RT). Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Unmittelbar vor der Zugabe wurde dem Lysepuffer A 0,5 mM DTT und 1mM PMSF zugesetzt. Für die Lyse von  $1 \times 10^6$  Zellen wurden 100  $\mu$ l des Lysepuffer A (mit DDT / PMSF) benötigt. Alle folgenden Volumenangaben beziehen sich auf diese Zellzahl. Da pro Testsubstanz eine T75 Kulturflasche mit konfluentem Fibroblastenmonolayer untersucht wurde, mussten die Volumina entsprechend der höheren Zellzahl angepasst werden (ca.  $2 \times 10^6$  Zellen/Ansatz). Zur Optimierung der Lyserate wurden die Zellen für min. 15 min. bei  $-80^\circ\text{C}$  tiefgefroren und unter mehrmaligem kräftigen Vortexen aufgetaut. Eine weitere Verbesserung der Lyseeffizienz konnte durch mehrmaliges kurzes Eintauchen in flüssigen Stickstoff und Auftauen unter kräftigem Vortexen erreicht werden. Dem Lysat wurden tropfenweise unter vorsichtigem Vortexen 50  $\mu$ l einer 2 M Schwefelsäure zugegeben und anschließend wurde das Lysat für 1 h auf Eis inkubiert. Kräftiges Vortexen alle 10 min erhöhte die Lyseeffizienz weiter. Zentrifugation (10 min, 13000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ ), führte zur Abtrennung unerwünschter

Zellfragmente (Pellet). Der Überstand wurde in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Präzipitation der Histone erfolgte durch Zugabe des dreifachen Volumens 20 %iger Trichloressigsäure und anschließend erneuter Inkubation für 1 h auf Eis mit kräftigem Vortexen alle 10 min.

Durch Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4 °C) wurden die gefällten Histone/Proteine in einem Pellet konzentriert, welches einmal mit angesäuertem Aceton (0,1 % HCL) und einmal mit reinem Aceton gewaschen wurde (10 min, 13000 rpm, 4 °C). Nach Entfernen des Überstandes und kurzem Lufttrocknen wurde das Pellet anschließend in 25 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. An dieser Stelle konnte die Probe bei -20 °C tiefgefroren werden.

Um in der Gelelektrophorese möglichst gleiche Proteinkonzentrationen aufzutragen muss zunächst die Proteinkonzentration bestimmt werden. Hierzu wurden 2 µl der Proteinlösung zu 198 µl NaOH gegeben und die Absorption bei  $\lambda = 230$  nm am Photometer (Quarzküvette) gemessen. Unter Beachtung der Verdünnung ergab sich vereinfacht (CHUNG *et al.*, 1978):

$$1 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \triangleq \frac{(\text{Absorption}_{\lambda_{230\text{nm}}} \cdot 100)}{4,2}$$

### 3.10.2 SDS-PAGE

Zur spezifischen Analyse der Histone war zunächst die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht (MG) mittels Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nötig. Das negativ geladene SDS maskiert die Eigenladungen der Proteine, so dass die SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld zum Pluspol wandern und in der Polyacrylamidmatrix nach ihrem MG aufgetrennt werden. Um die Proteine zunächst aufzukonzentrieren wird das eigentliche Trenngel (10-15 % Polyacrylamid, Tris-Glycin-Puffer pH 8,8) nach Auspolymerisation mit einem Sammelgel (4 % Polyacrylamid, Tris-Glycin-Puffer pH 6,8) überschichtet (modifizierte Methode n. (LAEMMLI, 1970)). Die 0.75mm dünnen Gele, deren genaue Zusammensetzung der Tab. 9 zu entnehmen ist, wurden in einem Mini Protean III Vertikal Elektrophorese System, Biorad, verwendet.

Um möglichst gleiche Proteinmengen aufzutragen erfolgte zunächst eine Normierung auf die gewünschte Auftragsmenge (10/15/20µg), die Zugabe von SDS-Puffer (x µl einer 2x oder 5x SDS-Puffer-Stock-Lösung um eine 1x SDS-Puffer-Konz. im Endvolumen zu erhalten) und die Angleichung der Volumina auf ein gewünschtes Gesamtvolumen von 15-

25 µl/Probenansatz mittels dH<sub>2</sub>O. Die Proben wurden dann zwecks Vermischung zentrifugiert (5s, 5000 rpm) und die Proteine für 3 min. bei 90 °C denaturiert, sowie erneut zentrifugiert (10s, 10000 rpm).

Als Größenstandard wurden 3,5 µl des PageRuler (prestained) von Fermentas verwendet.

Die Beladung der Geltaschen erfolgte mittels Hamilton-Pipette; der Gellauf zunächst mit 100 V für ca. 10 bis 15 min, bis eine sichtbare Aufkonzentration erfolgt war und die Trennung der Banden im Trenngel erfolgte, welche für ca. 1 h bei einer Spannung von 160 V fortgeführt wurde.

	Trenngele			Sammelgele	
	10 %	12 %	15 %		
<b>30 %-Acrylamid</b>	2,50 ml	3,00 ml	3,75 ml	<b>30 %-Acrylamid</b>	0,4 ml
<b>1,5 M Tris-HCl/SDS pH 8,8</b>	1,90 ml	1,90 ml	1,90 ml	<b>0,5 M Tris-HCl/SDS pH 6,8</b>	0,6 ml
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	3,00 ml	2,50 ml	2,00 ml	<b>dH<sub>2</sub>O</b>	1,5 ml
<b>TEMED</b>	10 µl	10 µl	10 µl	<b>TEMED</b>	5 µl
<b>10 %-APS</b>	50 µl	50 µl	50 µl	<b>10 %-APS</b>	25 µl

**Tab. 9** – Zusammensetzung der Trenn- u. Sammelgele für die SDS-Gelelektrophorese.

### 3.10.3 Western-blot (Immunoblot)

Um die aufgetrennten Proteine weitergehenden Analysen unterziehen zu können, z.B. der Detektion mittels spezifischer Antikörper, mussten diese zunächst vom Gel auf eine sog. Nitrocellulose-Membran transferiert werden.

Dieser als Western-blot bekannte Transfer erfolgte als Wet-blot in der entsprechenden Kammer von PeqLab auf Eis. Hierzu wurde die Nitrocellulosemembran zunächst für mindestens 10 min zusammen mit 4 Lagen Whatman-Filterpapier in 1x Transfer-Puffer äquilibriert. Ebenso wurde das zuvor vorsichtig von den Glasplatten der Gelelektrophorese gelöste Gel kurze Zeit in 1x Transferpuffer gelegt. Auf die schwarze Seite der sog. Sandwich-Blothalterung wurde nun zunächst ein Fiberpad, darauf zwei Lagen Whatman-Filterpapier und hierauf das Gel luftblasenfrei aufgelegt. Auf das Gel wurde nun die feuchte Membran ebenfalls so aufgebracht, dass sich keine Luftblasen mehr zwischen Membran und Gel befanden. Zwei weitere Lagen Filterpapier, sowie ein Fiberpad und die weiße Seite der Kunststoffkammer schlossen das System. Dieses wurde nun mit der schwarzen Seite in Richtung Kathode in die mit 1x Transferpuffer gefüllte Blotting-Kammer eingesetzt. Nach

Anlegung einer konstanten Spannung von 100 V für 1 h erfolgte der Transfer der negativ geladenen Proteine auf die Membran (in Richtung der Anode).

Hiernach wurde die Membran für ca. 1 min in ddH<sub>2</sub>O von Transferpufferresten gewaschen und eine Ponceau-Färbung durchgeführt. Nach erneutem kurzen Waschen in dH<sub>2</sub>O wurde die Membran in 5 ml Blocking-Solution (5 % Milchpulver in TBST) überführt und ü. N. bei 4 °C zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen geblockt.

### 3.10.4 Ponceau-Färbung

Um die Gesamtproteinverteilung auf der Membran sichtbar zu machen, wurde die Membran für 5 bis 10 min bei RT in Ponceau-S-Lösung (0,5 % w/v Ponceau S, 3 % v/v Trichloressigsäure, 3 % v/v Sulfosalicylsäure) gefärbt. Die Ponceaurot-Färbung ist eine reversible Färbung, zudem werden die Proteine durch die enthaltene Trichloressigsäure fixiert (REHM, 2006).

### 3.10.5 Proteindetektion mittels Immunfärbung

Analog zur im Kapitel beschriebenen indirekten Immunfluoreszenzmethode wurde auch für die Detektion der transferierten Proteine im Immunoblot ein indirektes Nachweisverfahren gewählt.

<b>Epitop</b>	<b>Name/Herkunft/Bezugsquelle</b>	<b>Verdünnung / Inkubationszeit</b>
Ac H4 gesamt	Anti-acetyl Histone H4 ,rabbit polyclonal IgG / #06-598 / Upstate/Millipore, Billerica, MA USA	1:2000 in TBST, 4 °C ü. N.
Actin (20-33)	Anti-actin (20-33), rabbit IgG / #A 5060 / Sigma-Aldrich, München	1:5000 in TBST, 4 °C ü. N.
Rabbit IgG	Anti-rabbit IgG, HRP-gekoppelt / Dianova, Hamburg	1:5000 in TBST, 1 h RT

**Tab. 10** – Primär u. Sekundärantikörper Immunoblot.

Hierzu wurde zunächst die geblockte Membran dreimal für 10 min in TBST-Puffer gewaschen. Sofern der Nachweis verschiedener Proteine unterschiedlichen Molekulargewichts gleichzeitig erwünscht war (z.B. Aktin zur Mengenkontrolle, sowie der Histone), wurde die Membran zunächst durchtrennt und anschließend mit dem jeweiligen Primärantikörper ü. N. unter ständiger Rotation bei 4 °C inkubiert. Nach Ablauf der



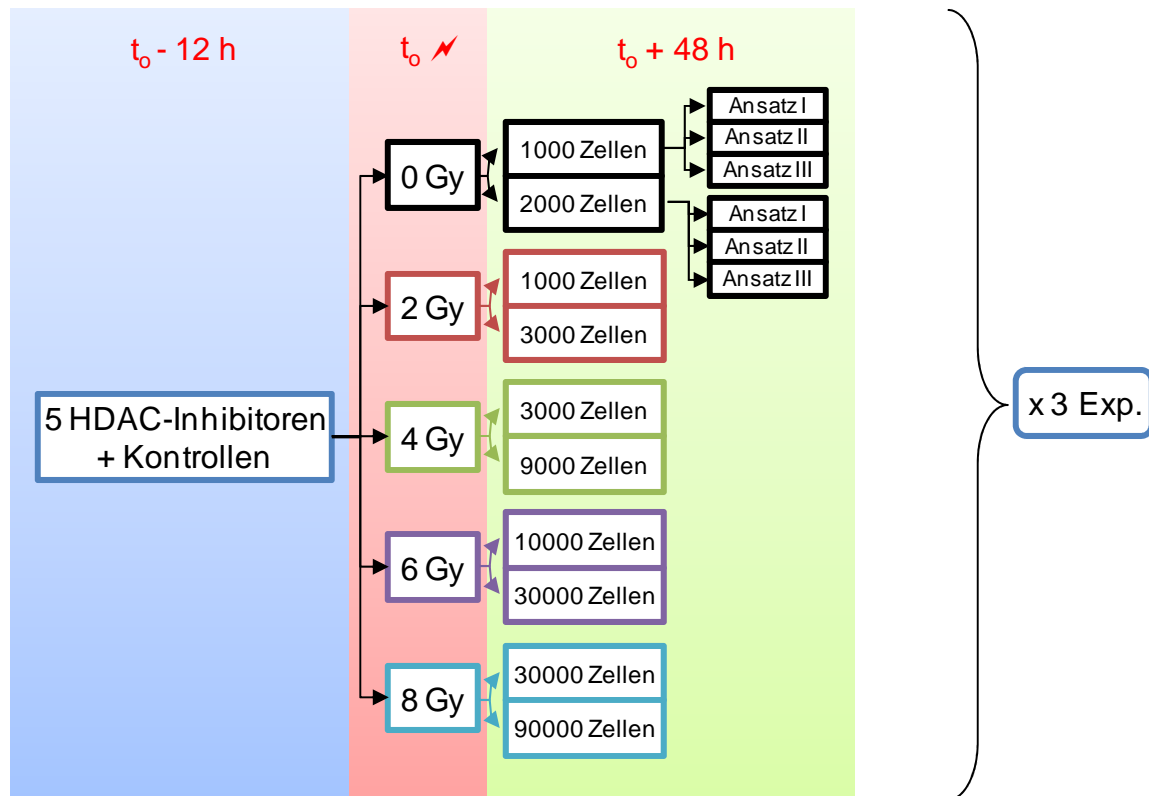
Inkubationszeit wurde die Membran für einmal 5 min und zweimal 10 min in TBST gewaschen, um nichtgebundene Antikörper zu entfernen. Nun erfolgte die Inkubation mit dem entsprechend spezie-spezifischen Sekundäantikörper (Meerrettichperoxidase (engl. horseradishperoxidase HRP) gekoppelt) für 1 h unter Rotation bei RT. Hiernach wurde die Membran einmal für 5 min und dreimal für 10 min gewaschen, wobei längeres Waschen den evtl. unspezifischen Hintergrund weiter reduzieren konnte.

Die Banden konnten nun mittels der sog. ECL (enhanced chemoluminescence)-Methode detektiert und dokumentiert werden: Bei der durch die Peroxidase katalysierten Oxidation von Luminol im Beisein von Wasserstoffperoxid entstehen Photonen, die einen Autoradiographiefilm belichten können.

Hierzu wurden zunächst je 1 ml ECL I und ECL II - Lösung gemischt und in der Dunkelkammer auf die Membran gegeben. Nach einer Inkubationszeit von ca. 1 min wurde der Autoradiographiefilm in einer Röntgenkassette auf die durch eine transparente Folie getrennte Membran gelegt. Unmittelbar nach Ablauf der gewünschten Expositionszeit wurde der Film in das Entwicklerbad gelegt, bis zum gewünschten Schwärzungsgrad geschwenkt und im Wasserbad gewaschen, danach fixiert und erneut gewaschen, sowie anschließend luftgetrocknet.

### **3.11 Colony Assay**

Hierzu wurde zunächst ein eigenes Design für das Experiment entworfen: Zum einen besitzen HDAC-Inhibitoren einen unkalkulierbaren Einfluss auf Proliferation und Zellmetabolismus, zum anderen aber war eine möglichst lange kontinuierliche Inkubation während der Reparaturphase erwünscht, um sich den *in vivo* gegebenen Bedingungen anzunähern. Wie in Abb. 5 dargestellt wurden HSF1-Zellen 12 h vor Bestrahlung mit der jeweiligen Testsubstanz bzw. dem Lösungsmittel inkubiert.



**Abb. 5** - Schematische Darstellung des Koloniebildungstests. Die Inkubation beginnt 12 h vor der Bestrahlung ( $t_0$ , hier durch einen Blitz symbolisiert). Nach weiteren 48 h Inkubation erfolgte das sog. „delayed plating“. Die Anzahl der ausplattierten Zellen ist exemplarisch dargestellt.

Die Bestrahlung erfolgte mit 2, 4, 6 und 8 Gy, als Kontrolle dienten unbestrahlte Zellen (0 Gy). Nach Bestrahlung wurden die Zellen weiter unter Kulturbedingungen und dem Einfluss von HDAC-Inhibitoren inkubiert und erst nach 48 h („delayed plating“) in substanzfreies, frisches, 37 °C warmes Medium überführt. Hierzu wurden sie zweimal mit vorgewärmten PBS gewaschen und anschließend „trypsiniert“. Nach manueller Zählung der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer wurden zwei verschiedene Konzentrationen an Zellen pro Dosis und Substanz in einem Dreifach-Ansatz in Petrischalen mit dem Kulturmedium überführt. Die Fibroblasten wurden anschließend für 21 Tage inkubiert. Danach wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 % Kristall-Violett (gelöst in: 95 % dH<sub>2</sub>O + 5 % Methanol zur Fixierung) gefärbt. Die Überlebensfraktionen wurden nach den in (HALL *et al.*, 2006) beschriebenen Formeln berechnet:

**Plating Efficiency (PE):**

$$PE = \frac{\text{number\_of\_colonies\_counted}}{\text{number\_of\_cells\_seeded}} \times 100$$

**Survival Fraction (SF):**

$$SF = \frac{\text{number\_of\_colonies\_counted}}{\text{number\_of\_cells\_seeded} \times (PE/100)}$$

Der Anteil der überlebenden Zellen wurde also auf den Anteil der Zellen, die in den unbestrahlten Kontrollen in der Lage waren, Kolonien zu bilden, normiert. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und der Mittelwert, sowie der Standardfehler berechnet.

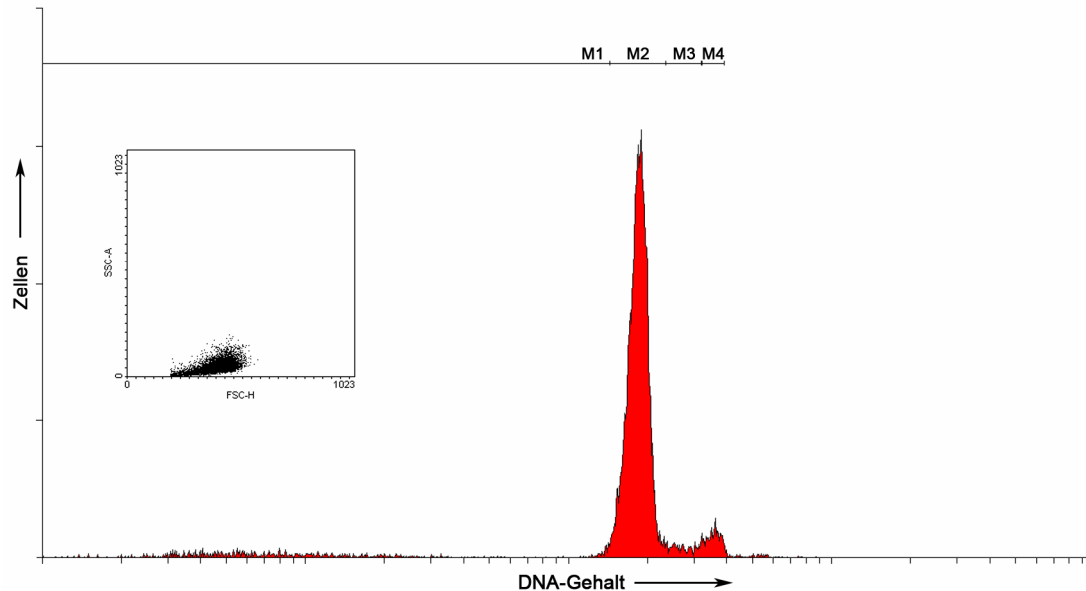
Um die Vergleichbarkeit mit anderen Studien zu erhöhen, wurde zusätzlich der sog. Dose-Enhancement-Factor (DEF) berechnet. Er beschreibt das Verhältnis zwischen der Strahlungsdosis in Beisein oder Fehlen einer Testsubstanz um eine Überlebensfraktion von 10 % zu erreichen ( $D_{10}$ ). Er kann auch wie folgt berechnet werden (HALL *et al.*, 2006):

Für  $D_0$  = Dosis die für eine Überlebensfraktion von 37 % benötigt wird gilt:

$$D_{10} = 2,3 \times D_0$$

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Zellzykluskontrolle



**Abb. 6 - PI-Färbung.** Histogramm: Verteilung des DNA-Gehalts. M1 = sub G1, M2 = G0/G1, M3 = S, M4 = G2/M. Dotplot: Eine homogene Größen- und Granulierungsverteilung der Zellen im FSC/SSC-Dotplot deutet auf eine gute Zellintegrität nach der Färbung hin.

Um sicherzustellen, dass sich ein ausreichend großer Anteil konfluent gewachsener Fibroblasten in der für die Versuche benötigten G0/G1-Zellzyklusphase befindet, wurde auf die Zellzyklusphasen-Bestimmung mittels Propidium-Iodid-Färbung zurückgegriffen (Abb. 6). Für die Messungen wurden HSF1 - Fibroblasten eines mittleren Alters (Passage 18) verwendet.

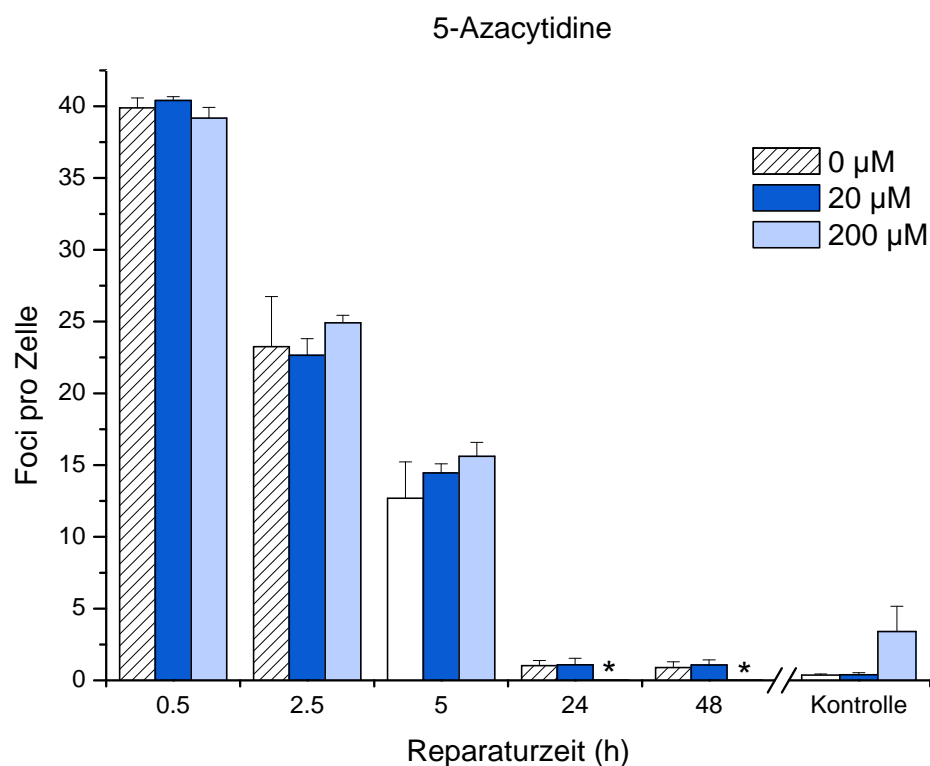
In der FACS-Messung ergab sich ein Anteil von 92 % lebenden Zellen. Der Anteil von Zellen in der sub G1 – Klasse (apoptotisch) konnte als 8 % bestimmt werden. Apoptotische Zellen wurden in den folgenden Immunzytochemischen Färbungen jedoch nicht mit ausgewertet, da sie durch den Zerfall der DNA eine unnatürlich hohe Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen aufwiesen. Die auf die Population lebender Zellen bezogene Verteilung der Zellzyklusphasen ergab 91 % Zellen in G0/G1, 4 % in S und 5 % in der G2/M Phase.

## 4.2 DNA-Doppelstrangbruchreparatur nach 5-Azacytidine-Behandlung

### 4.2.1 Experimente mit kurzer Inkubationszeit

Aus Mikrokerntest-Untersuchungen ist ein negativer Einfluss hypomethylierender Substanzen auf die Chromosomenstabilität seit längerem bekannt (GUTTENBACH *et al.*, 1994; FAUTH *et al.*, 1998). In einem ersten Schritt dieser Arbeit sollte daher mit der deutlich sensitiveren  $\gamma$ H2AX-Focusanalyse der Einfluss der hypomethylierenden Substanz 5-Azacytidine (Vidaza<sup>®</sup>) auf die DSB-Reparatur in humanen Normalgewebszellen untersucht werden.

Hierzu wurde zunächst der Einfluss relativ hoher Konzentrationen bei kurzer Inkubationszeit auf humane Fibroblasten untersucht. Hierzu wurden kontaktinhibierte, konfluente HSF1-Zellen 16 h vor Bestrahlung mit 5-Azacytidine inkubiert. Die Bestrahlung erfolgte mit 1 Gy. Die Ergebnisse der anschließend durchgeführten  $\gamma$ H2AX-Focusanalyse stellen sich wie folgt dar (Abb. 7):



**Abb. 7** –  $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle nach Behandlung mit 5-Azacytidine für 16 h. Die Bestrahlung erfolgte mit 1 Gy. Dargestellt sind die Mittelwerte nach Abzug der jeweiligen unbestrahlten (0 Gy) Kontrolle, die gesondert aufgeführt ist. Fehlerbalken entspricht Standardfehler. \* Erklärung im Text

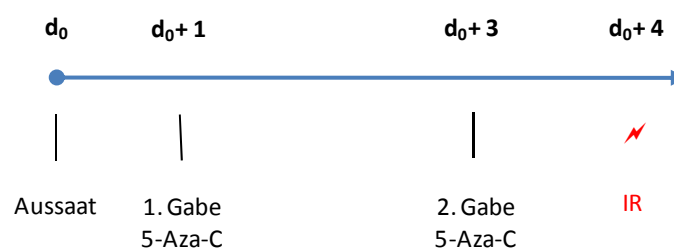
In der unbestrahlten Kontrolle ist nach Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$  5-Azacytidine (5-Aza-C) ein im Vergleich zu 0  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$  hohes Niveau an vorhandenen  $\gamma\text{H2AX}$ -Foci / Zelle mit einer relativ hohen interexperimentellen Schwankungsbreite ( $3.4 \pm 1.76$ ). Nach Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$  5-Aza-C kann nach 5 h und 8 h eine erhöhte Rate an  $\gamma\text{H2AX}$ -Foci nachgewiesen werden. Die scheinbar fehlenden Werte (vgl. Abb. 7, \*) nach Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$  5-Aza-C für die Reparaturzeitpunkte 24 h und 48 h ergeben sich durch den Abzug der hohen Kontrolle, da negative Werte biologisch unplausibel wären. Für 20  $\mu\text{M}$  5-Aza-C kann lediglich für den 5 h Wert eine Erhöhung gegenüber der unbehandelten Kontrolle festgestellt werden.

Zusammenfassend muss aufgrund der inkongruenten Werte (2,5 und 5 h im Vergleich zu 24 und 48 h) angenommen werden, dass eine Behandlung mit 5-Azacytidine nach einer kurzen Inkubationszeit von 16 h auch in hohen Dosen keinen oder nur einen geringen Effekt auf die DSB-Reparatur in humanen Normalgewebszellen zeigt.

#### 4.2.2 Experimente mit langer Inkubationszeit

In einem weiteren Schritt der Arbeit sollten nun der Einfluss geringerer 5-Azacytidine-Konzentrationen bei längerer Inkubationszeit auf die DSB-Reparatur in Fibroblasten untersucht werden.

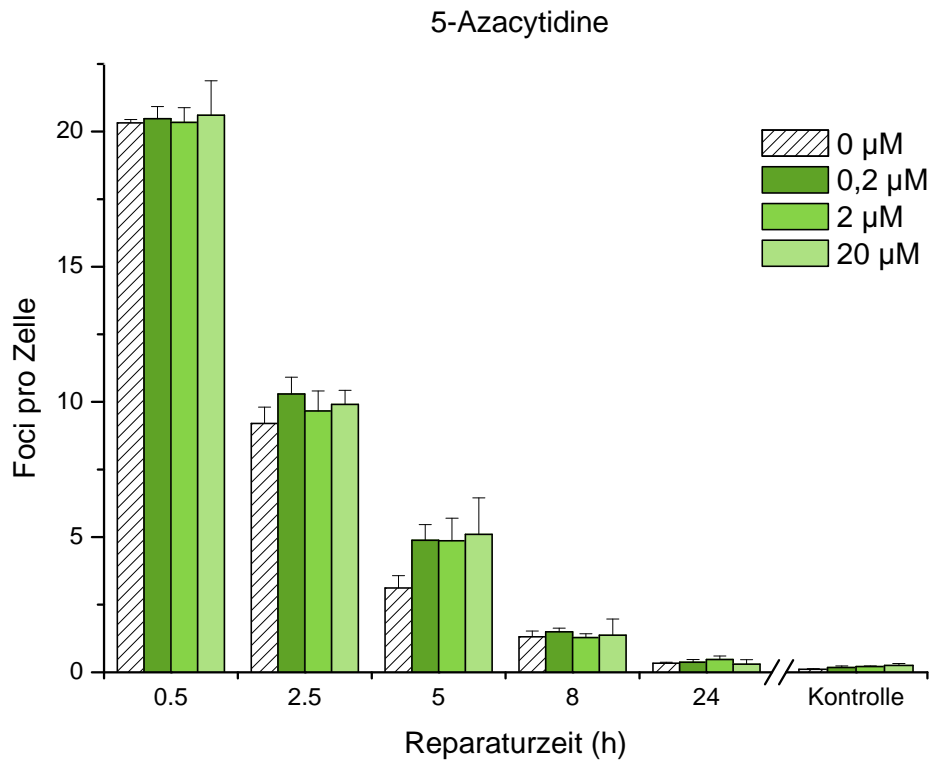
Das Ribonukleosidanalogen 5-Azacytidin muss zunächst in das Desoxyribonukleosid 5-Aza-2'-Deoxycytidine umgewandelt werden, ehe es in DNA eingebaut werden kann. Hieraus und aus der Notwendigkeit des „Einbaus“ in DNA ergibt sich für langsam proliferierende Zelllinien eine entsprechend lange Inkubationszeit (Durchlaufen der S-Phase). Zudem ist 5-Azacytidine unter Zellkulturbedingungen nicht lange stabil (NOTARI *et al.*, 1975). Um diesen Gegebenheiten Rechnung zu tragen, wurde für die Experimente folgendes Behandlungsschema erstellt (Abb. 8):



**Abb. 8** - Behandlungsschema:  $d_0 = 1.$  Tag,  $d_0 + 4 =$  Bestrahlung mit 0,5 Gy

Desweiteren wurde die Bestrahlungsenergie von 1 auf 0,5 Gy gesenkt, um optimalere Auszählbedingungen zu erhalten.

Die Auswertung der  $\gamma$ H2AX-Focusanalyse ergibt folgende Resultate (Abb. 9):



**Abb. 9** –  $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle nach Behandlung mit 5-Azacytidine für 72 h. Die Bestrahlung erfolgte mit 0,5 Gy. Dargestellt sind die Mittelwerte nach Abzug der jeweiligen unbestrahlten (0 Gy) Kontrolle, die gesondert aufgeführt ist. Fehlerbalken entspricht Standardfehler.

Trotz deutlich längerer Inkubationszeit kann in der unbestrahlten Kontrolle keine Zunahme des basalen Schädigungsniveaus beobachtet werden. Ebenso kann keine erhöhte Anzahl an  $\gamma$ H2AX-Foci zum Induktionszeitpunkt (hier 0,5 h post IR) nachgewiesen werden. Eine geringgradig erhöhte Rate an  $\gamma$ H2AX-Foci kann nach 2,5 h Reparaturzeit beobachtet werden, während nach 5 h die Anzahl an  $\gamma$ H2AX-Foci konzentrationsunabhängig deutlich erhöht ist (vgl. Abb. 9). Dieser Effekt zeigt sich jedoch nicht nach 8 und 24 h Reparatur.

Die erhöhte Rate an  $\gamma$ H2AX-Foci nach 2,5 und insbesondere 5 h nach Bestrahlung bei fehlender Persistenz in der Analyse der 8 und 24 h Reparaturpunkte lässt die Schlussfolgerung einer Hemmung der DSB-Reparatur durch 5-Azacytidine nicht sicher zu.

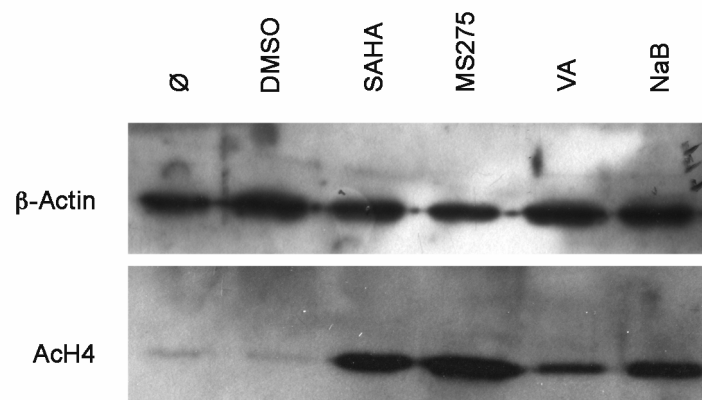
## 4.3 Histondeacetylase-Inhibitoren

Neben den vorgestellten Experimenten mit DNA-DNMT-Inhibitoren bildeten Untersuchungen mit HDAC-Inhibitoren den thematischen Schwerpunkt dieser Arbeit.

Die eingangs beschriebene enge Verknüpfung epigenetisch modulierender Faktoren mit der DNA-Reparatur ließ einen Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die DSB-Reparatur vermuten. Es galt demnach zunächst zu zeigen, inwieweit HDAC-Inhibitoren einen Einfluss auf die Induktion und Reparatur von DSB in humanen Normalgewebszellen ausüben. In einer späteren Phase der Arbeit sollte dann überprüft werden, ob die eventuelle Einschränkung der DSB-Reparatur unmittelbare biologische Konsequenz besäße.

### 4.3.1 Histon-Acetylierungsanalysen

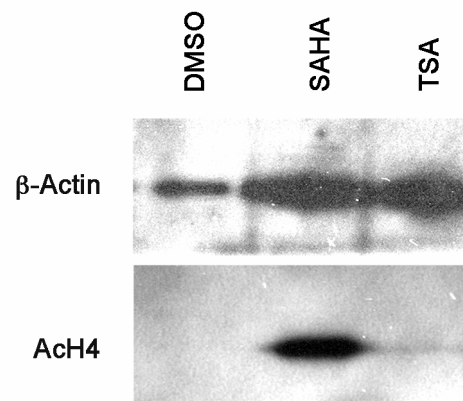
Um festzustellen, ob eine 12-stündige Inkubationszeit ausreichend ist, um eine Histone-Hyperacetylierung zu induzieren, wurde der Acetylierungsgrad von H4 bestimmt. Wie Abb. 10 zeigt, ist das Histon H4 in unbehandelten Fibroblasten nur gering acetyliert. Obwohl die Substanzen SAHA und MS275 in DMSO gelöst wurden, für das bekannt ist, dass es eine schwache hyperacetylierende Wirkung zeigt, konnte keine Zunahme des Acetylierungsgrades nach Behandlung mit DMSO festgestellt werden. Die Inkubation mit SAHA (10  $\mu$ M), MS275 (8  $\mu$ M), VA (2 mM) oder NaB (5 mM) zeigte jedoch eine deutliche Zunahme des Acetylierungsniveaus von H4. Die stärkste Zunahme wurde bei MS275 beobachtet, hingegen zeigte VA nach 12 h Inkubation eine im Vergleich zu den anderen Substanzen nur mäßige Zunahme des Acetylierungsniveaus.



**Abb. 10** – Acetylierungsstatus des Histon H4 nach Behandlung von humanen Fibroblasten mit Kulturmedium ( $\emptyset$ ), DMSO, SAHA, MS275, VA oder NaB.  $\beta$ -Actin diente als Mengenkontrolle.



Um möglichst mit Konzentrationen zu arbeiten, die mit anderen Arbeiten vergleichbar sind, wurde TSA in der Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  getestet (FLATMARK *et al.*, 2006). Bei der Histon-Acetylierungsanalyse zeigte sich erst nach vergleichsweise langer Entwicklungszeit ein schwaches Signal, während SAHA in ebenso literaturüblicher Konzentration (10  $\mu\text{M}$ ) im Vergleich ein deutlich stärkeres Signal lieferte (SONNEMANN *et al.*, 2006).

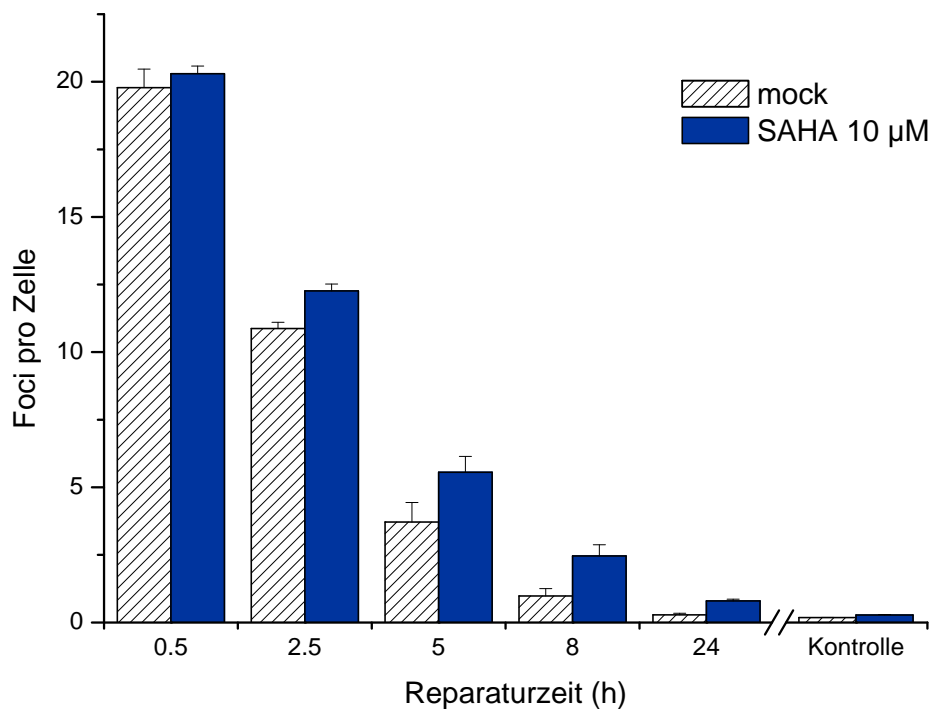


**Abb. 11** – Acetylierungsstatus des Histon H4 nach Behandlung mit TSA. Zum Vergleich: das Lösungsmittel DMSO, sowie die chemisch ähnliche Substanz SAHA.  $\beta$ -Actin diente der Mengenkontrolle.

Die Ergebnisse der Histon-Hyperacetylierungsanalyse ermöglichen zudem die Überprüfung, ob ggf. beobachtete Einflüsse auf die DSB-Reparatur tatsächlich von dem Histonacetylierungsgrad abhängig sind.

### 4.3.2 Suberoylanilidhydroxamsäure (SAHA)

Konfluent gewachsene, kontaktinhibierte HSF1<sup>2</sup>-Zellen wurden für 12 h mit 10  $\mu$ M SAHA inkubiert und anschließend mit 0,5 Gy bestrahlt. Als Kontrolle dienten nur mit dem Lösungsmittel DMSO, ansonsten jedoch identisch behandelte Zellen, hier als *mock* bezeichnet. Zudem wurde die Rate an basal vorhandenen DSB in nicht bestrahlten Zellen anhand der Rate an  $\gamma$ H2AX-Foci / Zelle bestimmt. Aller Versuche wurden „verblindet“ ausgewertet, so dass zum Zeitpunkt der Auszählung unklar war, ob es sich um eine Substanz- oder scheinbehandelte Probe handelte.

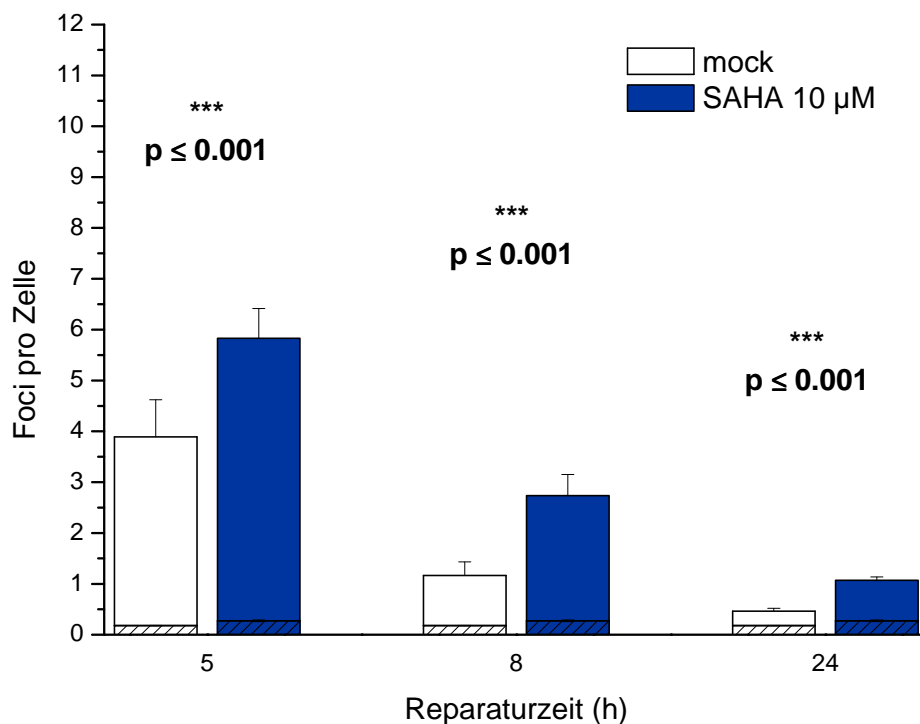


**Abb. 12** -  $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle nach Behandlung mit SAHA für 12 h. Die Bestrahlung erfolgte mit 0,5 Gy. Dargestellt sind die Mittelwerte nach Abzug der jeweiligen unbestrahlten (0 Gy) Kontrolle, die gesondert aufgeführt ist. Fehlerbalken entspricht Standardfehler. Die Standardfehler der Kontrolle sind als Fehlerbalken nicht darstellbar, da sie unter der Auflösungsgrenze liegen.

Eine Behandlung allein mit SAHA führt nicht zu einer signifikanten Induktion von DSB in humanen Fibroblasten, jedoch lag das basale Schädigungsniveau geringfügig höher (SAHA  $0,27 \pm 0,02$  vs. mock  $0,18 \pm 0,01$   $\gamma$ H2AX-Foci / Zelle). Unmittelbar nach Bestrahlung mit 0,5 Gy ist die DSB-Induktionsrate in mit SAHA behandelten Zellen im Vergleich zu scheinbehandelten Zellen fast identisch (SAHA  $20,3 \pm 0,28$  vs. mock  $19,8 \pm 0,68$   $\gamma$ H2AX-Foci / Zelle). Für alle Reparaturpunkte kann jedoch gegenüber der scheinbehandelten

Kontrolle eine erhöhte Rate an  $\gamma$ H2AX-Foci beobachtet werden. Auch nach 24 h ist unter SAHA-Behandlung ein Rückgang der  $\gamma$ H2AX-Foci / Zelle auf das Kontrollniveau nicht nachweisbar (vgl. Abb. 12). Hingegen ist in den scheinbehandelten Zellen eine Reparatur auf annähernd das Hintergrundniveau beobachtbar ( $\text{mock}_{24\text{ h}} 0,28 \pm 0,06$  vs.  $\text{mock}_{\text{Kontrolle}} 0,18 \pm 0,01$  Foci / Zelle).

Ferner ergab die statistische Auswertung der Unterschiede in der Anzahl der ermittelten  $\gamma$ H2AX-Foci / Zelle mittels Mann-Whitney-U-Test (vgl. S. 47) für die Reparaturpunkte 5, 8 und 24 h eine deutliche Signifikanz auf dem Niveau  $p \leq 0,001$ .

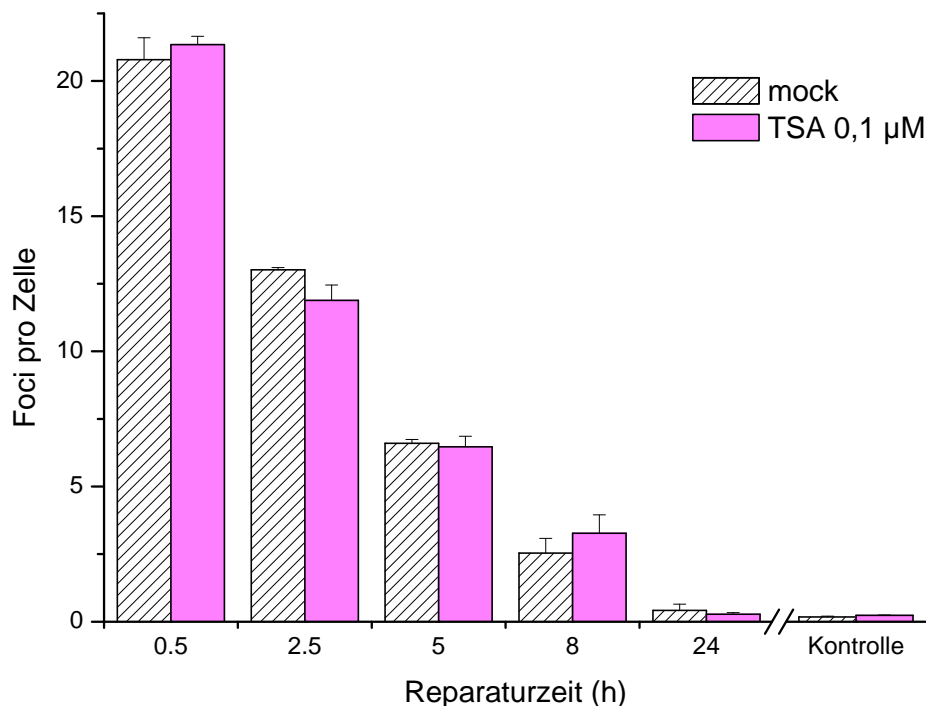


**Abb. 13** – Statistischer Vergleich der Anzahl der  $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle nach Behandlung mit SAHA für 12 h. Die Bestrahlung erfolgte mit 0,5 Gy. Der schraffierte Anteil der Säulen entspricht dem jeweiligen Hintergrundlevel der unbestrahlten Kontrolle. Die statistische Auswertung basiert auf dem Mann-Whitney-U-Test. Das jeweils ermittelte Signifikanzniveau ist als  $p \leq$  angegeben. Fehlerbalken entspricht Standardfehler.

Zusammenfassend lässt sich für den HDAC-Inhibitor SAHA daher ein deutlicher Einfluss auf die DSB-Reparaturfähigkeit annehmen. Insbesondere die statistische Signifikanz, sowie die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unterstreichen diese Annahme. Hingegen lassen die Daten nicht vermuten, dass SAHA in der untersuchten Konzentration auch einen DSB induzierenden Effekt in humanen Normalgewebszellen besitzt.

### 4.3.3 Trichostatin A (TSA)

Analog zu den Versuchen mit SAHA sollte der Einfluss der strukturähnlichen Substanz TSA auf die DSB-Reparaturfähigkeit von gesunden humanen Fibroblasten untersucht werden. Da TSA als einer der potentesten HDAC-Inhibitoren beschrieben wird, wurde eine vergleichsweise geringe Konzentration von nur 100 nM gewählt (MARKS *et al.*, 2007). In drei unabhängigen Experimenten wurden konfluent gewachsene, kontaktinhibierte HSF1<sup>2</sup>-Zellen für 12 h mit 0,1  $\mu$ M TSA inkubiert und anschließend mit 0,5 Gy bestrahlt. Als Kontrolle dienten nur mit dem Lösungsmittel DMSO behandelte Zellen. Die Auswertung unter „verblindeten“ Bedingungen ergab folgende Resultate (Abb. 14):

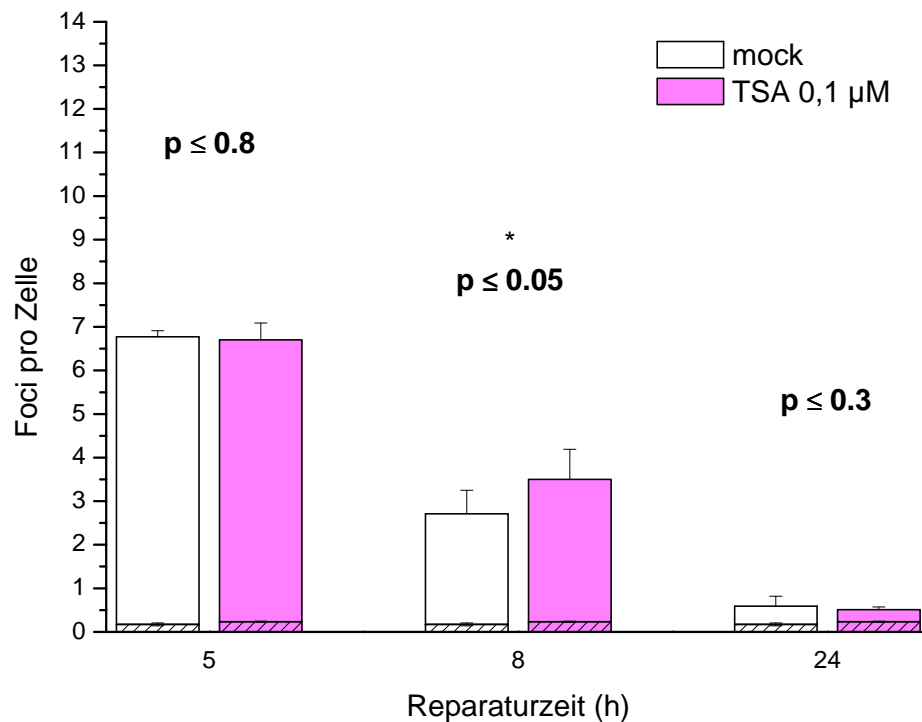


**Abb. 14** -  $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle nach Behandlung mit TSA für 12 h. Die Bestrahlung erfolgte mit 0,5 Gy. Dargestellt sind die Mittelwerte nach Abzug der jeweiligen unbestrahlten (0 Gy) Kontrolle, die gesondert aufgeführt ist. Fehlerbalken entspricht Standardfehler.

Vergleichbar mit den Beobachtungen nach der Behandlung mit SAHA führt auch TSA zu keiner relevanten Erhöhung der basalen  $\gamma$ H2AX-Focus Expression (TSA  $0,24 \pm 0,01$  vs. mock  $0,17 \pm 0,03$ ). Ebenso zeigt sich keine bedeutende Erhöhung der Anzahl an  $\gamma$ H2AX-Foci / Zelle 30 min. nach Bestrahlung (Induktion; TSA  $21,35 \pm 0,31$  vs. mock  $20,79 \pm 0,81$  Foci / Zelle). Bei Betrachtung des 2,5 h Reparaturpunktes fällt auf, dass

der für TSA ermittelte Wert sogar unterhalb des der scheinbehandelten Zellen lag (TSA  $11,89 \pm 0,57$  vs. mock  $13,02 \pm 0,08$   $\gamma$ H2AX-Foci / Zelle). Beim 5 h Zeitpunkt sind beide Werte erneut fast identisch, während nach 8 h die Anzahl an  $\gamma$ H2AX-Foci in TSA behandelten Zellen die Anzahl in scheinbehandelten Zellen übersteigt. Nach 24 h jedoch liegt der für TSA ermittelte Wert erneut geringfügig unter dem der scheinbehandelten Zellen (TSA  $0,28 \pm 0,06$  vs. mock  $0,42 \pm 0,23$ ).

Die statistische Auswertung ergab übereinstimmend keine Signifikanz nach 5 und 24 h Reparatur ( $p \leq 0,8$  bzw.  $p \leq 0,3$ ). Nach 8 h zeigt sich isoliert eine Signifikanz auf dem Niveau von 0,05.



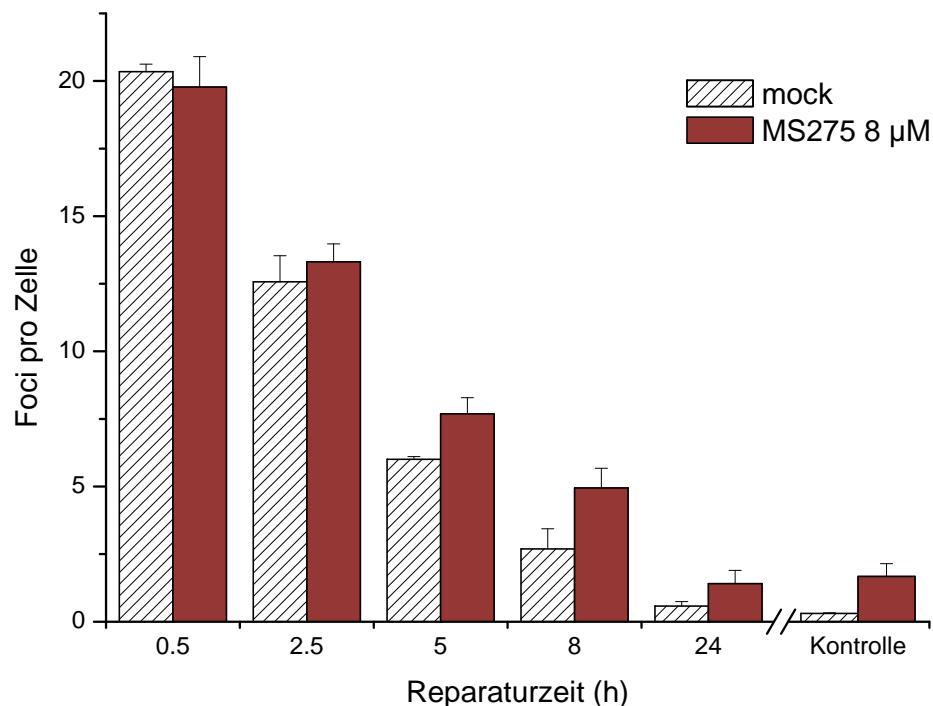
**Abb. 15** - Statistischer Vergleich der Anzahl der  $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle nach Behandlung mit TSA für 12 h. Die Bestrahlung erfolgte mit 0,5 Gy. Der schraffierte Anteil der Säulen entspricht dem jeweiligen Hintergrundlevel der unbestrahlten Kontrolle. Die statistische Auswertung basiert auf dem Mann-Whitney-U-Test. Das jeweils ermittelte Signifikanzniveau ist als  $p \leq$  angegeben. Fehlerbalken entspricht Standardfehler.

Basierend auf den Ergebnissen der  $\gamma$ H2AX-Focus-Analyse, sowie der statistischen Auswertung mit einem isoliert signifikanten Reparaturpunkt muss ein Einfluss von TSA in der Konzentration von 0,1  $\mu$ M auf das DSB-Reparaturverhalten von humanen Fibroblasten verneint werden.

#### 4.3.4 MS275

Aus der Gruppe der Benzamide fiel die Entscheidung auf die synthetische Substanz MS275, da sie bereits in mehreren klinischen Studien getestet wird. In drei unabhängigen Experimenten wurden stationäre HSF1<sup>2</sup>-Zellen für 12 h mit 8  $\mu$ M MS275 inkubiert und anschließend mit 0,5 Gy bestrahlt. Als Kontrolle dienten nur mit dem Lösungsmittel DMSO, ansonsten jedoch identisch behandelte Zellen, hier als *mock* bezeichnet. Analog zu den vorherigen Experimenten wurden unbestrahlte Kontrollen ebenfalls  $\gamma$ H2AX-Immunfluoreszenz gefärbt.

Die Auswertung erfolgte unter „verblindeten“ Bedingungen und ergab zunächst folgende Resultate (Abb. 16):

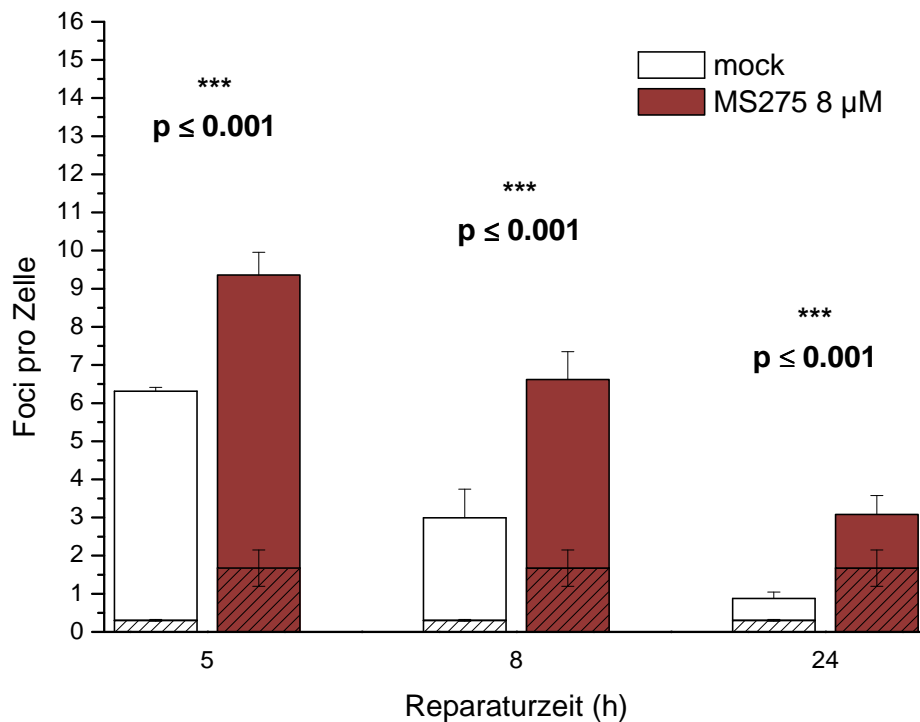


**Abb. 16** -  $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle nach Behandlung mit MS275 für 12 h. Die Bestrahlung erfolgte mit 0,5 Gy. Dargestellt sind die Mittelwerte nach Abzug der jeweiligen unbestrahlten (0 Gy) Kontrolle, die gesondert aufgeführt ist. Fehlerbalken entspricht Standardfehler.

Bei Betrachtung der Abb. 16 fällt die im Vergleich zu scheinbehandelten Zellen erhöhte Anzahl an  $\gamma$ H2AX-Foci in unbestrahlten Zellen (Kontrolle) nach Behandlung mit MS275 auf. Diese bisher in den vorangegangenen Experimenten unbeobachtete basale Schädigungsrate bedarf einer genaueren Betrachtung – hierzu darf auf Kapitel 4.3.7, S. 75 verwiesen werden.

Nach Bestrahlung mit 0,5 Gy kann zunächst keine erhöhte Induktion nachgewiesen werden, der für MS275 behandelte Zellen ermittelte Wert scheint sogar unter dem für scheinbehandelte Zellen zu liegen, wobei sich die Standardfehler überschneiden (MS275  $19,77 \pm 1,13$  vs. mock  $20,34 \pm 0,28$   $\gamma$ H2AX-Foci / Zelle). Nach Abzug der Kontrolle ist bei allen folgenden Reparaturpunkten die Anzahl an  $\gamma$ H2AX-Foci / Zelle unter MS275 Behandlung erhöht. Nach 2,5 h ergibt sich zunächst eine leichte Erhöhung (MS275  $13,31 \pm 0,66$  vs. mock  $12,57 \pm 0,97$  Foci / Zelle), die sich nach 8 h deutlich prominenter darstellt (MS275  $4,95 \pm 0,73$  vs. mock  $2,69 \pm 0,75$  Foci / Zelle).

Übereinstimmend mit diesen Resultaten stellt sich auch das Ergebnis der statistischen Auswertung dar:

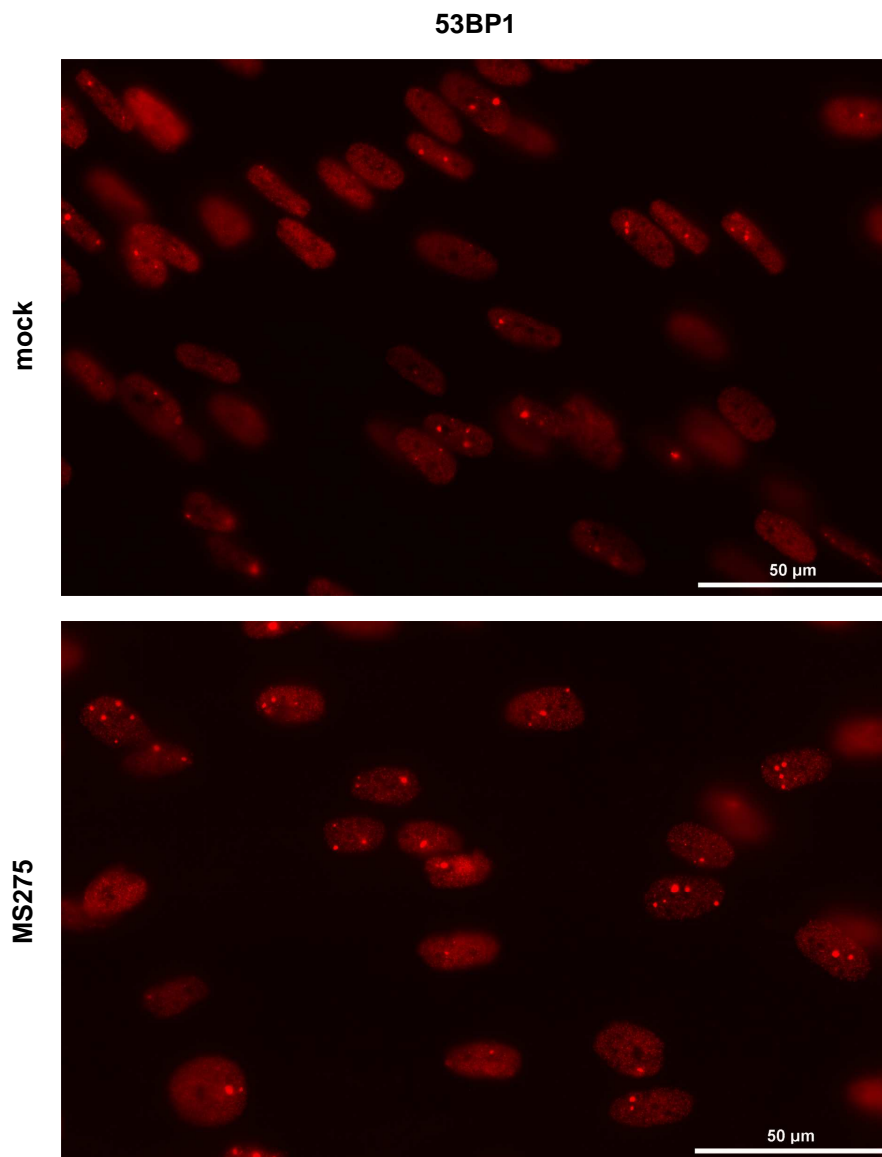


**Abb. 17** - Statistischer Vergleich der Anzahl der  $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle nach Behandlung mit MS275 für 12 h. Die Bestrahlung erfolgte mit 0,5 Gy. Der schraffierte Anteil der Säulen entspricht dem jeweiligen Hintergrundlevel der unbestrahlten Kontrolle. Die statistische Auswertung basiert auf dem Mann-Whitney-U-Test. Das jeweils ermittelte Signifikanzniveau ist als  $p \leq$  angegeben. Fehlerbalken entspricht Standardfehler.

Für die späten Reparaturzeitpunkte konnte in allen Experimenten eine statistische Signifikanz auf dem Niveau von  $p \leq 0,001$  ermittelt werden (Abb. 17). Auf die statistische Signifikanz der erhöhten  $\gamma$ H2AX-Foci-Anzahl in der unbestrahlten Kontrolle wird in Kapitel 4.3.7, S. 75 eingegangen.

#### 4.3.4.1 Doppelfärbungen $\gamma$ H2AX und 53BP1

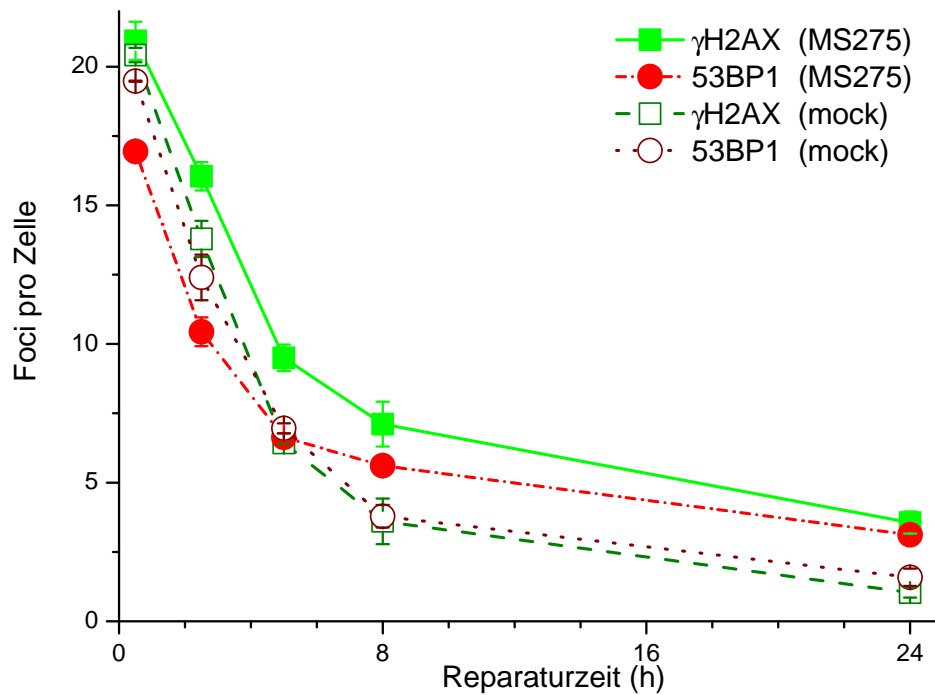
Neben  $\gamma$ H2AX gilt auch 53BP1 als verlässlicher Marker für DSB (SCHULTZ *et al.*, 2000). Um zu überprüfen, inwieweit die beobachteten Unterschiede in der Kinetik von  $\gamma$ H2AX mit denen von 53BP1 korrelieren, wurden HSF1<sup>2</sup>-Zellen für 12 h mit 8  $\mu$ M MS275 inkubiert, anschließend mit 0,5 Gy bestrahlt, gefolgt von einer Doppelfärbung mit  $\gamma$ H2AX und 53BP1. Um mögliche Effekte durch die Doppelfärbung auszuschließen, wurden ebenfalls  $\gamma$ H2AX und 53BP1 Einzelfärbungen untersucht (Abb. 18).



**Abb. 18** – 53BP1-Immunfluoreszenz gefärbte HSF1<sup>2</sup>-Zellen 24 h post IR mit 0,5 Gy. Es zeigt sich eine höhere Anzahl an 53BP1-Foci in der mit MS275 behandelten Probe als in der scheinbehandelten Probe zum gleichen Reparaturzeitpunkt. Um möglichst viele Zellen abzubilden, wurden überlappende Aufnahmen mittels der „large image stitch“ Technik der Software NIS Elements BR, Nikon, kombiniert.



Bei der Auswertung der Foci-Expression ergab sich, dass es keinen Unterschied auf die Foci-Anzahl machte, ob die Zellen einer Einzel- oder Doppelfärbung unterzogen worden waren. Jedoch zeigten sich große Unterschiede in der Kinetik zwischen  $\gamma$ H2AX und 53BP1 in Abhängigkeit von der Inkubation mit einem HDAC-Inhibitor (Abb. 19):



**Abb. 19** -  $\gamma$ H2AX o. 53BP1-Foci pro Zelle nach Behandlung mit MS275 für 12 h. Die Bestrahlung erfolgte mit 0,5 Gy. mock = scheinbehandelte Zellen (DMSO). Dargestellt sind die Mittelwerte zu den Zeitpunkten 0,5 h, 2,5 h, 5 h, 8 h und 24 h. Fehlerbalken entspricht Standardfehler.

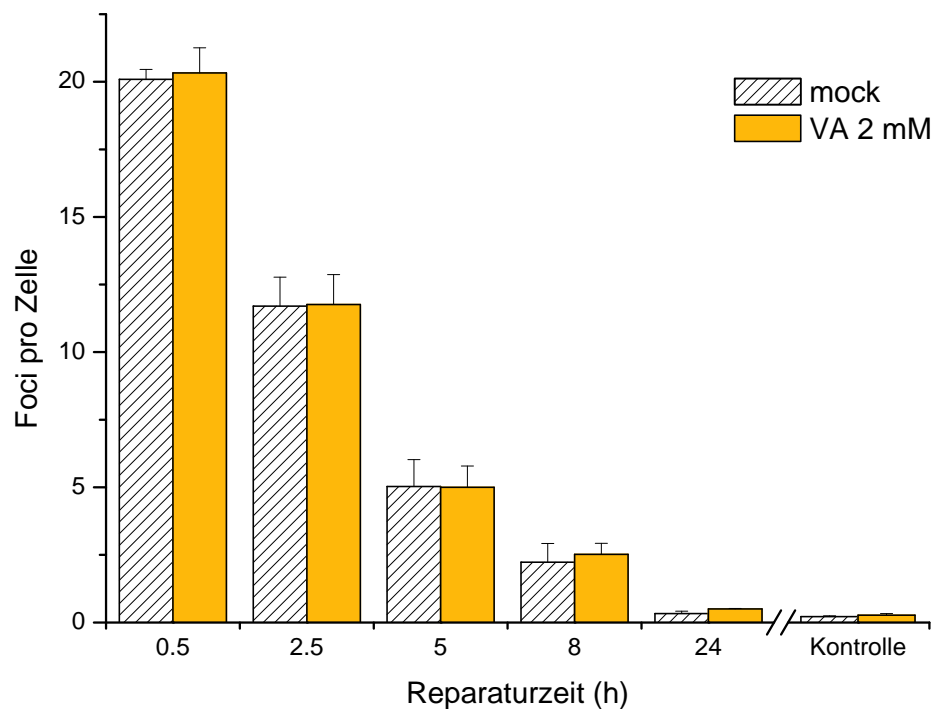
Betrachtet man zunächst isoliert die Kinetik in scheinbehandelten Zellen (*mock*), so fällt auf, dass die Anzahl der  $\gamma$ H2AX-Foci gut mit der beobachteten Zahl an 53BP1-Foci korreliert. Fünf Stunden nach Bestrahlung mit 0,5 Gy sind in den scheinbehandelten Zellen beispielsweise noch  $6,43 \pm 0,05$   $\gamma$ H2AX-Foci oder  $6,96 \pm 0,18$  53BP1-Foci / Zelle zählbar, nach 24 h ist dieser Wert auf  $1,04 \pm 0,19$   $\gamma$ H2AX-Foci bzw.  $1,59 \pm 0,31$  53BP1-Foci / Zelle abgesunken.

Bei Analyse der Induktion (hier 0,5 h) in mit MS275 behandelten Zellen fällt bereits eine erhebliche Diskrepanz zwischen der Anzahl an  $\gamma$ H2AX und 53BP1-Foci / Zelle auf. So liegt der für 53BP1 ermittelte Wert sogar deutlich unter dem Niveau des entsprechenden Wertes für scheinbehandelte Zellen ( $53BP1_{MS275}$   $16,95 \pm 0,31$  vs.  $53BP1_{mock}$   $19,48 \pm 0,02$  Foci / Zelle; zum Vergleich  $\gamma$ H2AX<sub>MS275</sub>  $20,93 \pm 0,69$  vs.  $\gamma$ H2AX<sub>mock</sub>  $20,42 \pm 0,26$  Foci / Zelle).

Nach 2,5 h vergrößert sich der Unterschied zwischen 53BP1 und  $\gamma$ H2AX sogar noch etwas ( $53BP1_{MS275} 10,44 \pm 0,52$  vs.  $\gamma H2AX_{MS275} 16,05 \pm 0,51$  Foci / Zelle). Nach 8 h Reparatur ist der Unterschied zwischen  $\gamma$ H2AX und 53BP1 in MS275 behandelten Zellen jedoch auf 1,5 Foci zurückgegangen ( $\gamma H2AX_{MS275} 7,11 \pm 0,81$  vs.  $53BP1_{MS275} 5,61 \pm 0,29$  Foci / Zelle). Wie aus Abb. 19 ersichtlich setzt sich der Rückgang weiter fort, nach 24 h lag der Unterschied zwischen der Anzahl an  $\gamma$ H2AX und 53BP1-Foci nur noch bei durchschnittlich 0,44 Foci / Zelle.

### 4.3.5 Valproinsäure (VA)

VA ist der HDAC-Inhibitor, der am breitesten klinisch getestet wurde. Als Antiepileptikum kommt VA seit Jahrzehnten zum Einsatz, die klinischen Tests und Erfahrungen richten sich allerdings erst seit kurzem auf die epigenetische Komponente VAs und ihre Auswirkungen. Ob auch unter Inkubation mit dem vergleichsweise schwächer potenten HDAC-Inhibitor VA ein Einfluss auf die DSB-Reparatur beobachtet werden kann, sollten drei unabhängige Experimente klären. In jedem Experiment wurden humane Fibroblasten mit 2 mM Valproat behandelt, sowie scheinbehandelte Zellen als Kontrolle mitgeführt.

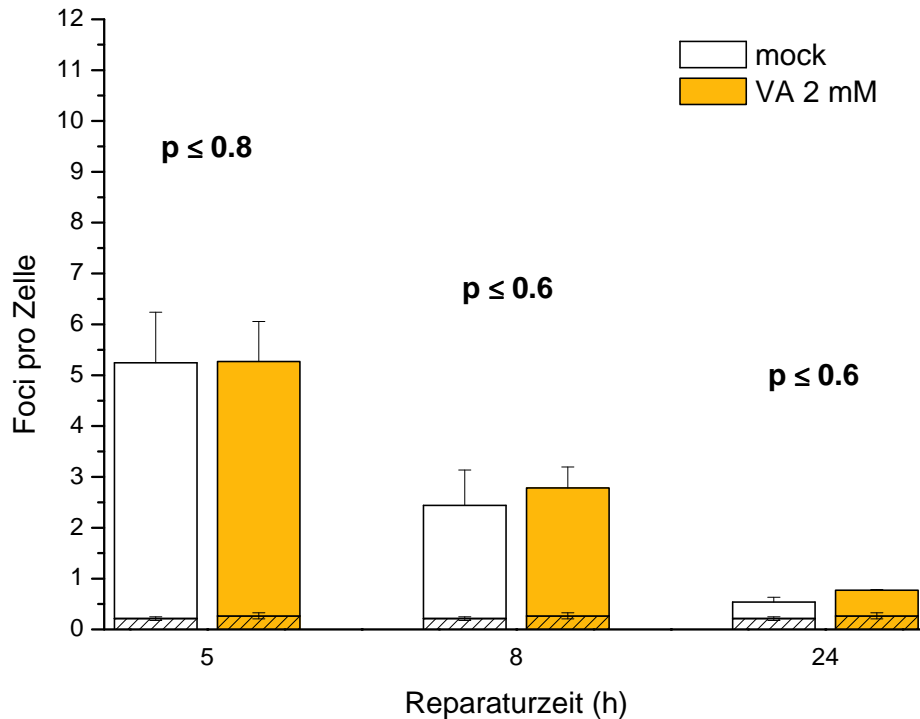


**Abb. 20** -  $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle nach Behandlung mit VA für 12 h. Die Bestrahlung erfolgte mit 0,5 Gy. Dargestellt sind die Mittelwerte nach Abzug der jeweiligen unbestrahlten (0 Gy) Kontrolle, die gesondert aufgeführt ist. Fehlerbalken entspricht Standardfehler.

In der unbestrahlten Kontrolle kann keine Zunahme an  $\gamma$ H2AX-Foci durch zwölfstündige Behandlung mit 2 mM Valproat festgestellt werden (VA  $0,27 \pm 0,06$  vs. mock  $0,21 \pm 0,04$ ). Nach Bestrahlung mit 0,5 Gy liegt die Rate an gezählten  $\gamma$ H2AX-Foci nur minimal höher nach VA-Behandlung (VA  $20,33 \pm 0,93$  vs. mock  $20,09 \pm 0,37$  Foci / Zelle). Auch in der Analyse der folgenden Reparaturpunkte kann keine Zunahme der Anzahl an  $\gamma$ H2AX-Foci unter Behandlung mit VA im Vergleich zu scheinbehandelten Zellen festgestellt werden (5 h

post irradiationem ergaben sich folgende, fast identische Werte: VA  $5,00 \pm 0,79$  vs. mock  $5,03 \pm 0,99$  Foci / Zelle).

Diese Resultate spiegelt auch die statistische Auswertung wieder, die für keinen der späten Reparaturzeitpunkte eine Signifikanz auf einem Niveau  $p \leq 0,05$  ergeben hat (Abb. 21)

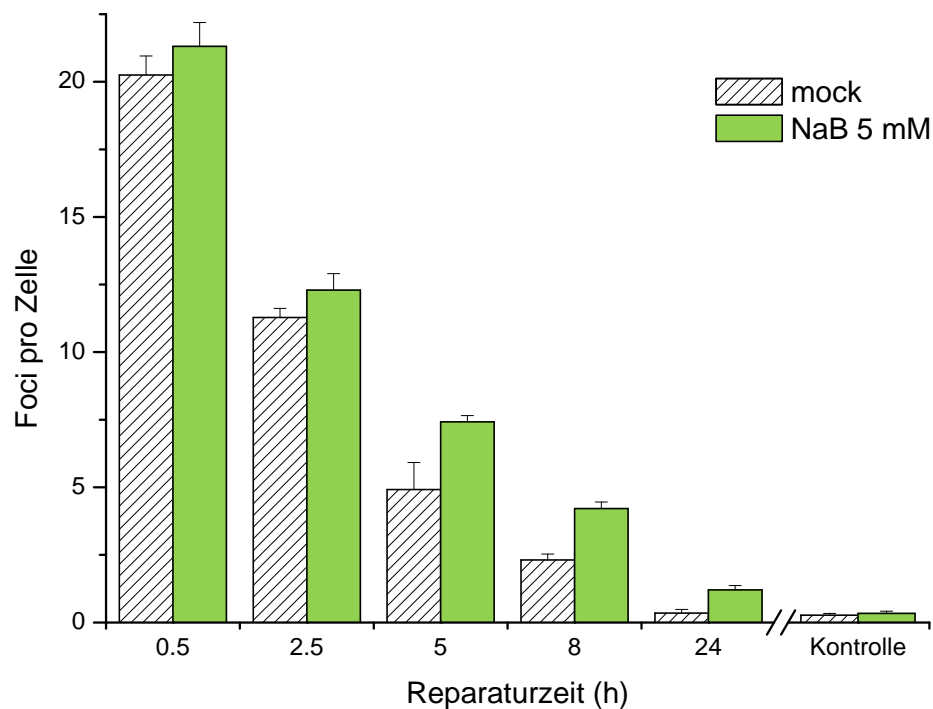


**Abb. 21** - Statistischer Vergleich der Anzahl der  $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle nach Behandlung mit VA für 12 h. Die Bestrahlung erfolgte mit 0,5 Gy. Der schraffierte Anteil der Säulen entspricht dem jeweiligen Hintergrundlevel der unbestrahlten Kontrolle. Die statistische Auswertung basiert auf dem Mann-Whitney-U-Test. Das jeweils ermittelte Signifikanzniveau ist als  $p \leq$  angegeben. Fehlerbalken entspricht Standardfehler.

Es muss zusammenfassend also festgehalten werden, dass eine zwölfstündige Inkubation mit 2 mM VA zu keiner (signifikanten) Zunahme an residuellen  $\gamma$ H2AX-Foci nach Bestrahlung von humanen Fibroblasten führt.

### 4.3.6 Natrium-Butyrat (NaB)

Vergleichbar mit VA besitzt auch NaB, die fünfte Testsubstanz, die vergleichsweise einfache chemische Struktur einer kurzkettigen Fettsäure. Nach den negativen Ergebnissen mit VA interessierte nun, ob es sich bei dem nicht sichtbaren Einfluss auf die Kinetik des  $\gamma$ H2AX-Focus-Abbaus in Normalgewebezellen um eine Eigenschaft kurzkettiger Fettsäuren im Allgemeinen handelt. Hierzu wurden humane Fibroblasten für 12 h mit der ebenfalls in mehreren klinischen Studien getesteten Substanz NaB in einer Konzentration von 5 mM inkubiert. Analog zu den vorherigen Experimenten war der Endpunkt die Anzahl der residuellen  $\gamma$ H2AX-Foci nach Bestrahlung mit 0,5 Gy.

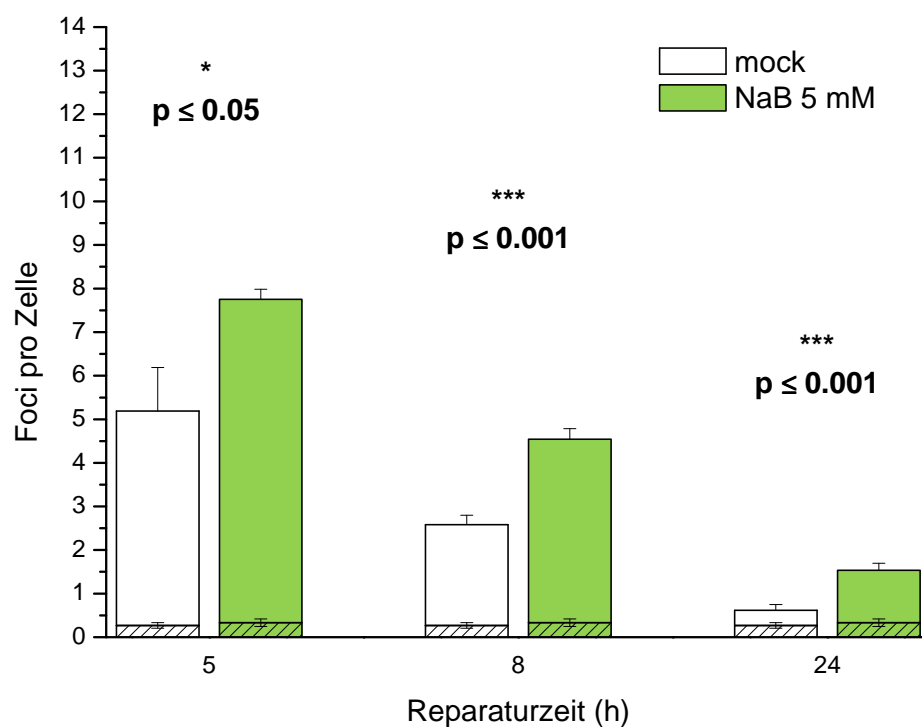


**Abb. 22** -  $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle nach Behandlung mit NaB für 12 h. Die Bestrahlung erfolgte mit 0,5 Gy. Dargestellt sind die Mittelwerte nach Abzug der jeweiligen unbestrahlten (0 Gy) Kontrolle, die gesondert aufgeführt ist. Fehlerbalken entspricht Standardfehler.

In der unbestrahlten Kontrolle findet sich kein Unterschied zwischen den mit 5 mM NaB behandelten und den scheinbehandelten Zellen (NaB  $0,33 \pm 0,09$  vs. mock  $0,27 \pm 0,06$ ). Nach Bestrahlung mit 0,5 Gy finden sich zudem bei Analyse der Induktion mehr Foci in NaB behandelten Zellen, als in der Vergleichsgruppe – wobei sich die Fehler überschneiden (NaB  $21,31 \pm 0,88$  vs. mock  $20,25 \pm 0,71$   $\gamma$ H2AX-Foci / Zelle). Deutlicher wird die Differenz zwischen NaB und scheinbehandelten Zellen bei Analyse der folgenden Reparaturpunkte. So

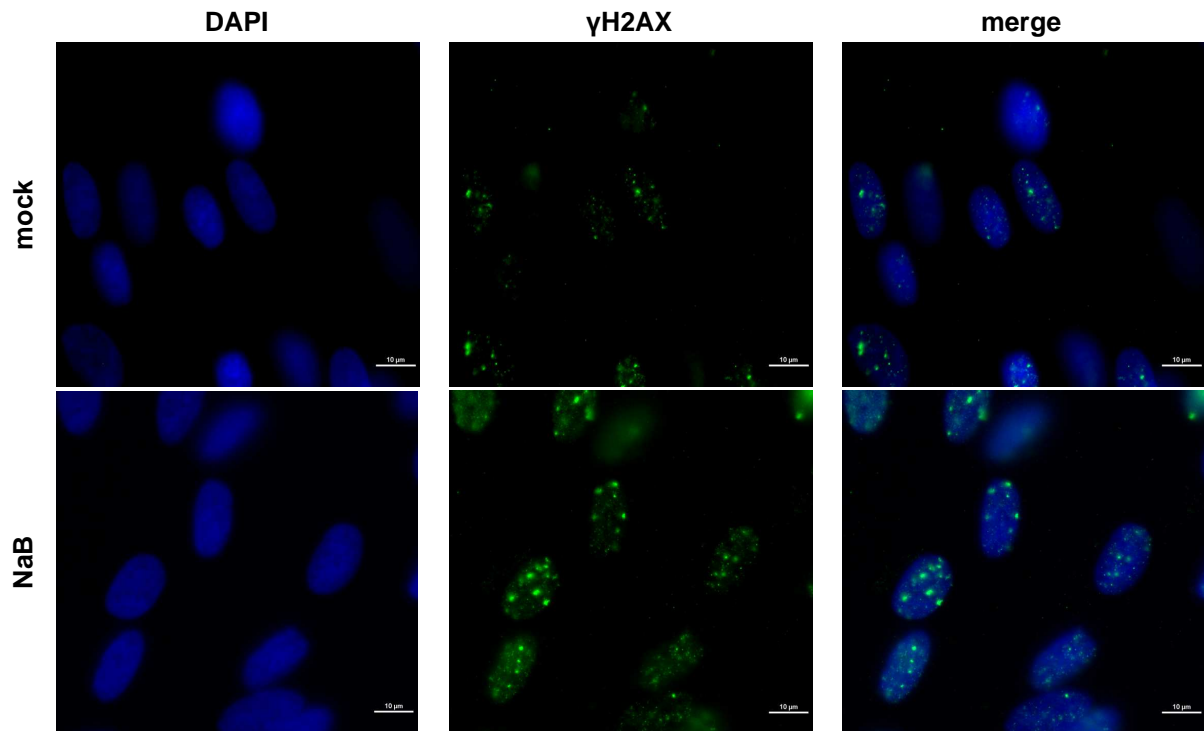
liegt die Anzahl noch vorhandener  $\gamma$ H2AX-Foci in NaB behandelten Zellen 2,5 h nach Bestrahlung bei  $12,3 \pm 0,61$ , während in der unbestrahlten Gruppe nur  $11,28 \pm 0,34$  Foci / Zelle gezählt werden konnten. Nach 8 h liegt die Differenz bei 1,9 Foci (NaB  $4,21 \pm 0,24$  vs. mock  $2,31 \pm 0,22$ ); nach 24 h liegt die Zahl noch vorhandener  $\gamma$ H2AX-Foci in NaB behandelten Zellen noch deutlich über der der Vergleichskontrolle unbestrahlter Zellen. Nach Abzug der Kontrolle ergeben sich für NaB nach 24 h noch  $1,2 \pm 0,16$  verbliebene Foci im Vergleich zu  $0,35 \pm 0,13$  Foci / Zelle in der Vergleichsgruppe

Die mittels des Mann-Whitney-U-Tests berechnete Signifikanz für den 5 h Reparaturzeitpunkt lag bei  $p \leq 0,05$ . Für die späten Reparaturzeitpunkte 8 und 24 h konnte sogar eine hohe Signifikanz mit  $p \leq 0,001$  ermittelt werden, die sich so auch in allen Teilexperimenten zeigte (Abb. 23).



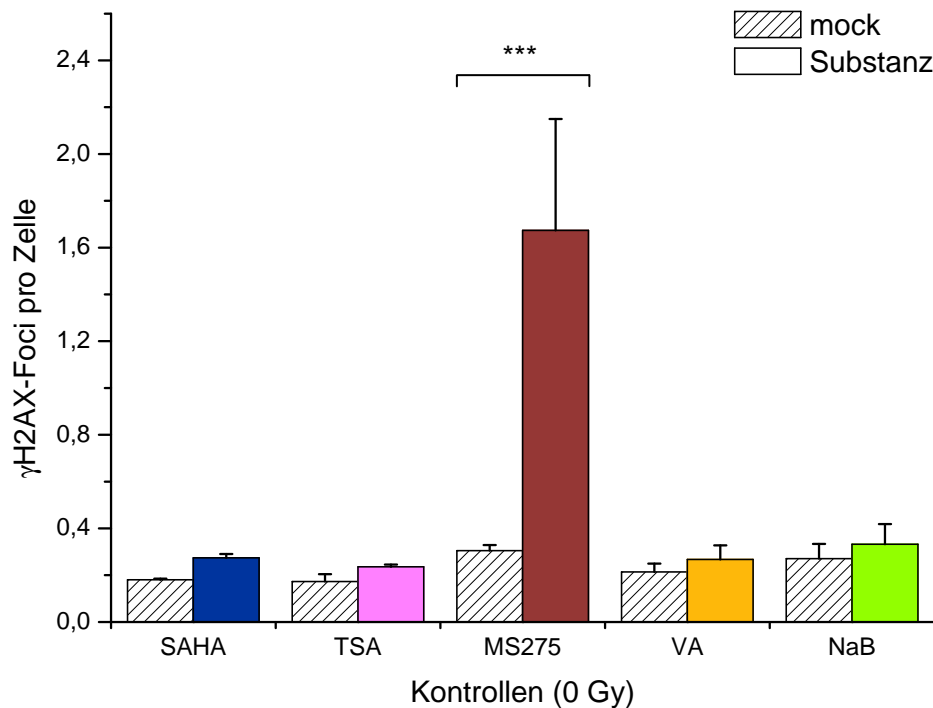
**Abb. 23** - Statistischer Vergleich der Anzahl der  $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle nach Behandlung mit NaB für 12 h. Die Bestrahlung erfolgte mit 0,5 Gy. Der schraffierte Anteil der Säulen entspricht dem jeweiligen Hintergrundlevel der unbestrahlten Kontrolle. Die statistische Auswertung basiert auf dem Mann-Whitney-U-Test. Das jeweils ermittelte Signifikanzniveau ist als  $p \leq$  angegeben. Fehlerbalken entspricht Standardfehler.

In der folgende Abb. 24 erkennt man eine deutliche Häufung von  $\gamma$ H2AX-Foci in mit NaB behandelten Fibroblasten. Durch die Größenunterschiede erscheinen die Foci zudem intensiver (vgl. 4.3.9., S. 78).



**Abb. 24** –  $\gamma$ H2AX-Foci (grün) in immunfluoreszenz gefärbten Fibroblasten 5 h post IR mit 0,5 Gy. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. mock = Scheinbehandlung. Größenangabe = 10  $\mu$ M.

### 4.3.7 Vergleichende Darstellung der Kontrollen



**Abb. 25** -  $\gamma$ H2AX-Foci pro Zelle in unbestrahlten Kontrollen unter Inkubation mit HDAC-Inhibitoren bzw. nach Scheinbehandlung (mock). Fehlerbalken entspricht Standardfehler. \*\*\* entspricht Signifikanz auf dem Niveau von  $p \leq 0,001$ .

Im direkten Vergleich der unbestrahlten Kontrollen fällt auf, dass sich die Anzahl der  $\gamma$ H2AX-Foci in behandelten und scheinbehandelten Zellen bei den Substanzen SAHA, TSA, VA und NaB stets im Bereich von ca. 0,02 bis 0,04 Foci / Zelle bewegt. Es findet sich bei diesen vier Substanzen also ein homogenes Niveau basaler  $\gamma$ H2AX-Foci. Auch bei der Substanz MS275 zeigen die scheinbehandelten Proben ein vergleichbares Niveau an  $\gamma$ H2AX-Foci vor Bestrahlung. Unter Substanzeinfluss jedoch zeigt sich eine deutliche Zunahme der  $\gamma$ H2AX-Foci auf  $1,67 \pm 0,48$  Foci / Zelle ohne Bestrahlung. Dies bedeutet nach Abzug der Kontrolle (scheinbehandelte Zellen), dass im Schnitt ca. 1,4  $\gamma$ H2AX-Foci / Zelle unter durch MS275 induziert werden. Dieser Anstieg ist signifikant auf dem Niveau von  $p \leq 0,001$ .



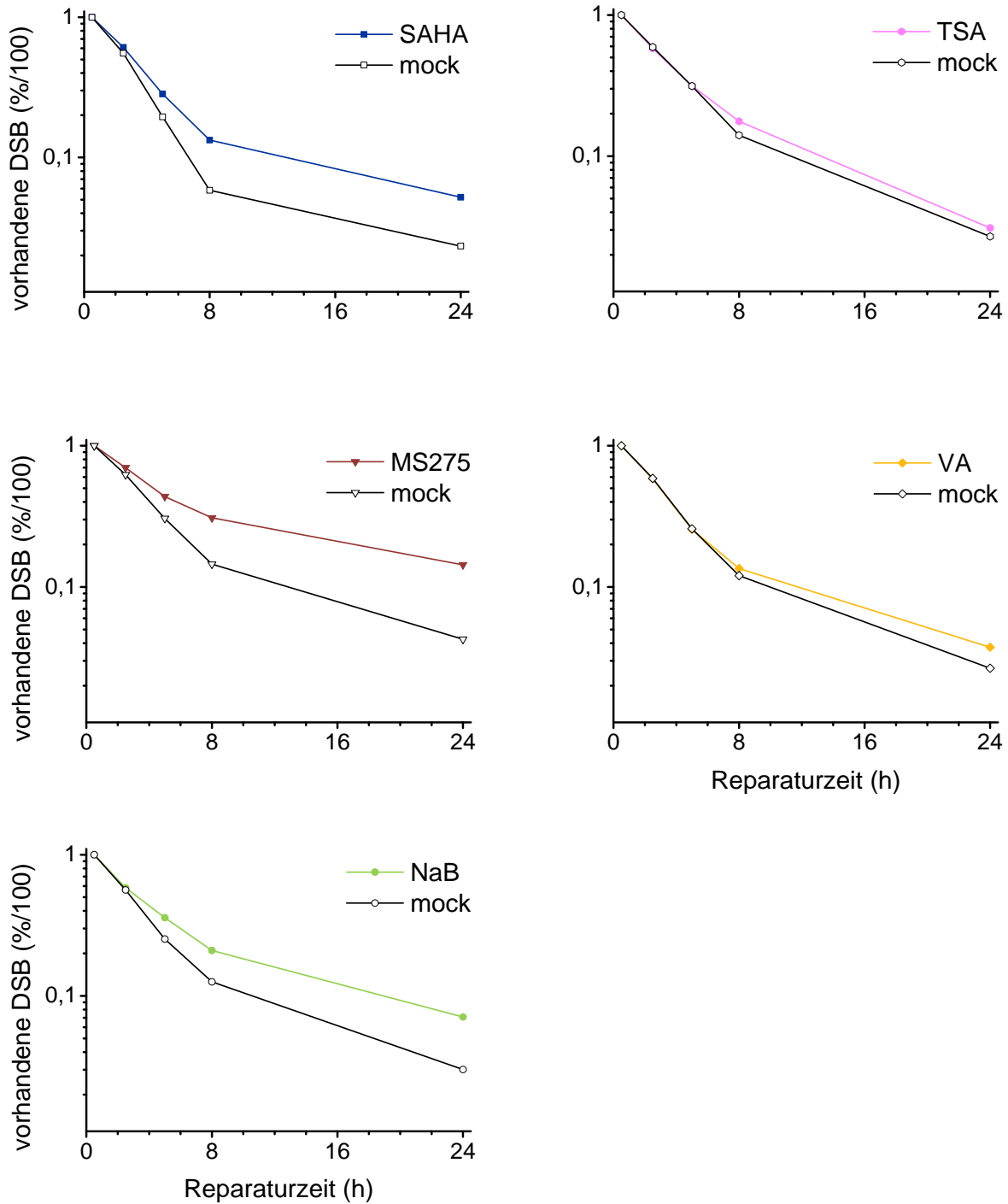
### 4.3.8 Vergleichende Darstellung der quantitativen Reparatureffizienz

Wie aus Abb. 29 ersichtlich, zeigt sich bei mit 2 bis 8 Gy bestrahlten Fibroblasten, dass die Anzahl der zu einem Reparaturzeitpunkt  $y$  noch vorhandenen ( $\gamma$ H2AX)-Foci von der Dosis der initialen Bestrahlung abhängt. Man kann annehmen, dass das Verhältnis zwischen einer Anzahl  $n$  zu einem Zeitpunkt  $x$  (z.B. Induktion) vorhandenen ( $\gamma$ H2AX)-Foci und der Anzahl der zu einem späteren Zeitpunkt  $y$  noch zu beobachtenden Foci unabhängig von der initialen Schädigungsmenge ist, da es keinen Anhalt für eine „Sättigung“ der an der Reparatur beteiligten Komponenten gibt, insbesondere nicht bei niedrigen und mittleren Bestrahlungsdosen. Die hier aufbereitete Auswertung der Experimente normiert die beobachteten Foci-Zahlen auf die zum Zeitpunkt der Induktion vorhandenen Foci und eignet sich daher besonders, die Unterschiede im Reparaturverhalten zu verdeutlichen.

Bei Betrachtung der Diagramme (Abb. 26) für die Substanzen SAHA, MS275 und NaB fällt ein divergierender Kurvenverlauf auf, mit zunehmender Divergenz in späten Reparaturpunkten. Bei VA und TSA findet sich ein weitgehend paralleler Linienverlauf, mit minimaler Divergenz bei VA.

Unter Behandlung mit SAHA sind nach 24 h 5,2 % der zum Zeitpunkt „0,5 h nach Bestrahlung“ gezählten  $\gamma$ H2AX-Foci noch vorhanden, während zum gleichen Zeitpunkt in der scheinbehandelten Vergleichsgruppe nur noch 2,3 % der Foci persistieren. Bei MS275 wird der Unterschied noch größer: Einen Tag nach Bestrahlung sind unter Scheinbehandlung noch 4,3 % der initial vorhandenen  $\gamma$ H2AX-Foci zählbar, während in den MS275-behandelten Zellen 14,4 % der Foci noch nicht verschwunden sind. Vergleichbar mit den Ergebnissen unter SAHA-Behandlung sind 24 h nach Bestrahlung unter Behandlung mit NaB noch 7,1 % der zum Induktionszeitpunkt vorhandenen Foci zählbar, in der scheinbehandelten Vergleichsgruppe sind es 4,1 % weniger (3 %).

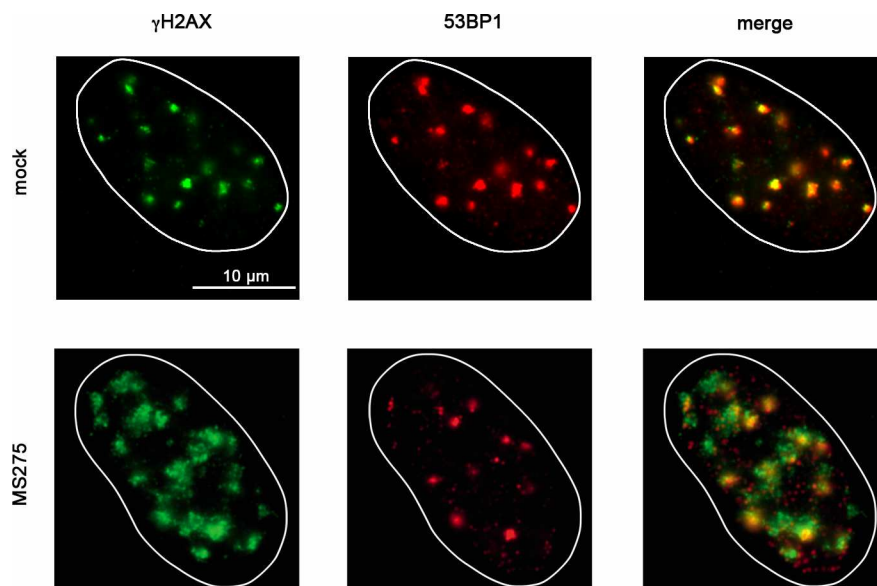
Wie die zuvor vorgestellten Daten zu TSA vermuten lassen, so zeigt sich, dass sowohl in TSA als auch in scheinbehandelten Zellen nach 24 h annähernd identisch viele Foci verschwunden sind. Unter TSA-Behandlung sind nach einem Tag noch 3,1 % der initial vorhandenen Foci vorhanden, unter Scheinbehandlung sind es 2,7 %. Ähnlich sieht der Kurvenverlauf bei VA aus, hier sind im Schnitt ca. 1 % weniger  $\gamma$ H2AX-Foci verschwunden als in der Vergleichsgruppe (VA: 3,7 % vs. mock 2,7 %).



**Abb. 26** - Vergleichende Darstellung der quantitativen Reparaturreffizienz: Verbleibende  $\gamma$ H2AX-Foci in Relation zur in der Induktion beobachteten Anzahl (= 1) nach Bestrahlung mit 0,5 Gy. Reparaturzeiten: 2,5 h, 5 h, 8 h und 24 h post IR..

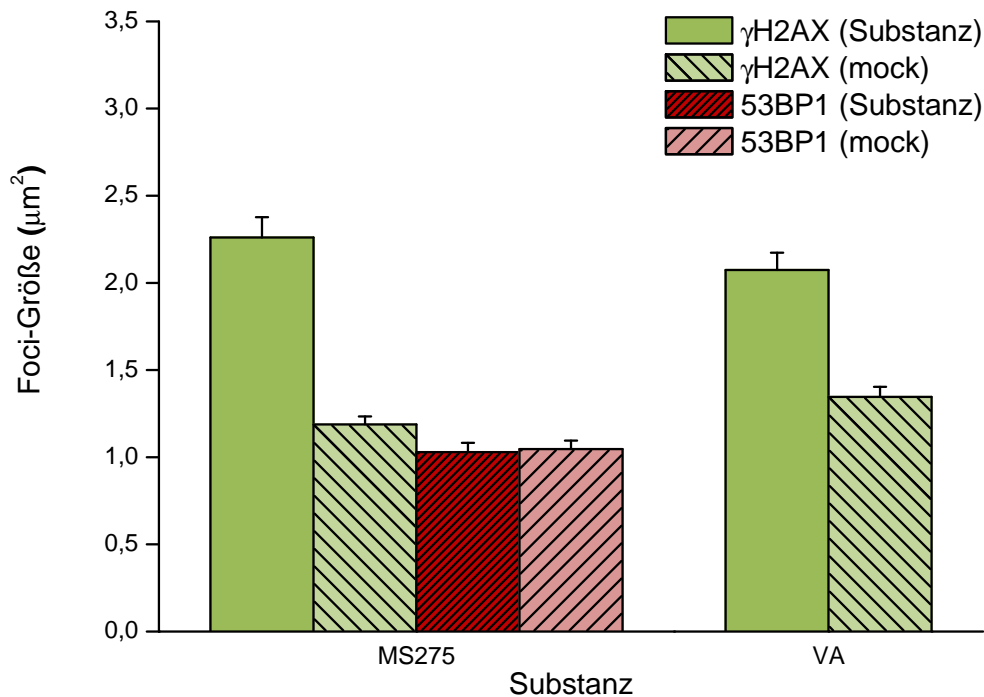
### 4.3.9 Vergleich der Foci-Größen

Bei der Auszählung der Foci fiel ein Größenunterschied zwischen  $\gamma$ H2AX-Foci in mit HDAC-Inhibitoren und scheinbehandelten Zellen auf. Bei 53BP1 war kein Unterschied wahrnehmbar. Um mögliche Unterschiede in der Morphologie weiter abzuklären, wurden die Foci-Größen sowohl  $\gamma$ H2AX als auch 53BP1 gefärbter, zuvor mit 8  $\mu$ M MS275 behandelter Zellen, ausgewertet. Um auszuschließen, dass Größenunterschiede die Zählergebnisse beeinflussen, wurden zudem  $\gamma$ H2AX-gefärbte, zuvor mit 2 mM VA behandelte Zellen, sowie entsprechende Kontrollen, ebenfalls einer Größenanalyse unterzogen. Für VA konnten zuvor keine signifikanten Unterschiede bei der  $\gamma$ H2AX-Focusanalyse festgestellt werden.



**Abb. 27** – Exemplarische Darstellung der unterschiedlichen Foci-Größen ohne (mock) und nach Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor MS275 in HSF1<sup>2</sup>-Zellen.  $\gamma$ H2AX (grün), 53BP1 (rot), merge = Überlagerung. Zur besseren Darstellung wurde auf eine DAPI-Gegenfärbung verzichtet, die Zellkerne sind weiß umrandet. Aufnahmen 2,5 h nach Bestrahlung mit 0,5 Gy.

Sowohl in MS275 als auch in VA behandelten Zellen konnte eine Zunahme der Focigröße gegenüber scheinbehandelten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 28).

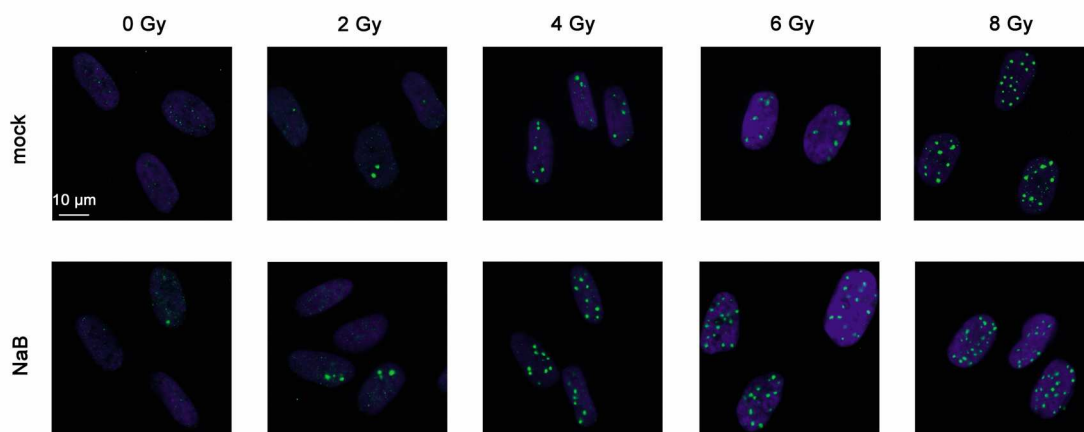


**Abb. 28**  $\gamma$ H2AX- und 53BP1-Foci-Größen ( $\mu\text{m}^2$ ) nach Behandlung mit MS275 oder VA, sowie Scheinbehandlung (mock, grobe Schraffierung). Zeitpunkt der Auswertung war 2,5 h post IR (0,5 Gy).

Die durchschnittliche  $\gamma$ H2AX-Foci-Größe unter MS275-Behandlung liegt bei  $2,26 \pm 0,12 \mu\text{m}^2$ , in der Vergleichsgruppe liegt die Größe nur bei  $1,19 \pm 0,05 \mu\text{m}^2$ . Vergleichbar sind die Ergebnisse unter VA-Inkubation: Hier liegt die Größe bei  $2,07 \pm 0,1 \mu\text{m}^2$ , im Gegensatz zu  $1,35 \pm 0,06 \mu\text{m}^2$  in scheinbehandelten Zellen. Wie die Analyse von 53BP1 und  $\gamma$ H2AX doppel-gefärbten MS275 behandelten Fibroblasten zeigt, ändert sich die Morphologie von 53BP1-Foci unter dem Einfluss eines HDAC-Inhibitors nicht. Unter Testsubstanz-Inkubation ist ein 53BP1-Foci im Durchschnitt  $1,03 \pm 0,05 \mu\text{m}^2$  klein, in den scheinbehandelten Zellen zeigt sich ein fast identischer Wert von  $1,05 \pm 0,05 \mu\text{m}^2$ . In den Kontrollzellen ist die  $\gamma$ H2AX und 53BP1-Größe fast identisch, während HDAC-Inhibitoren einen deutlich sichtbaren und messbaren Einfluss auf die Ausdehnung von  $\gamma$ H2AX-Foci haben.

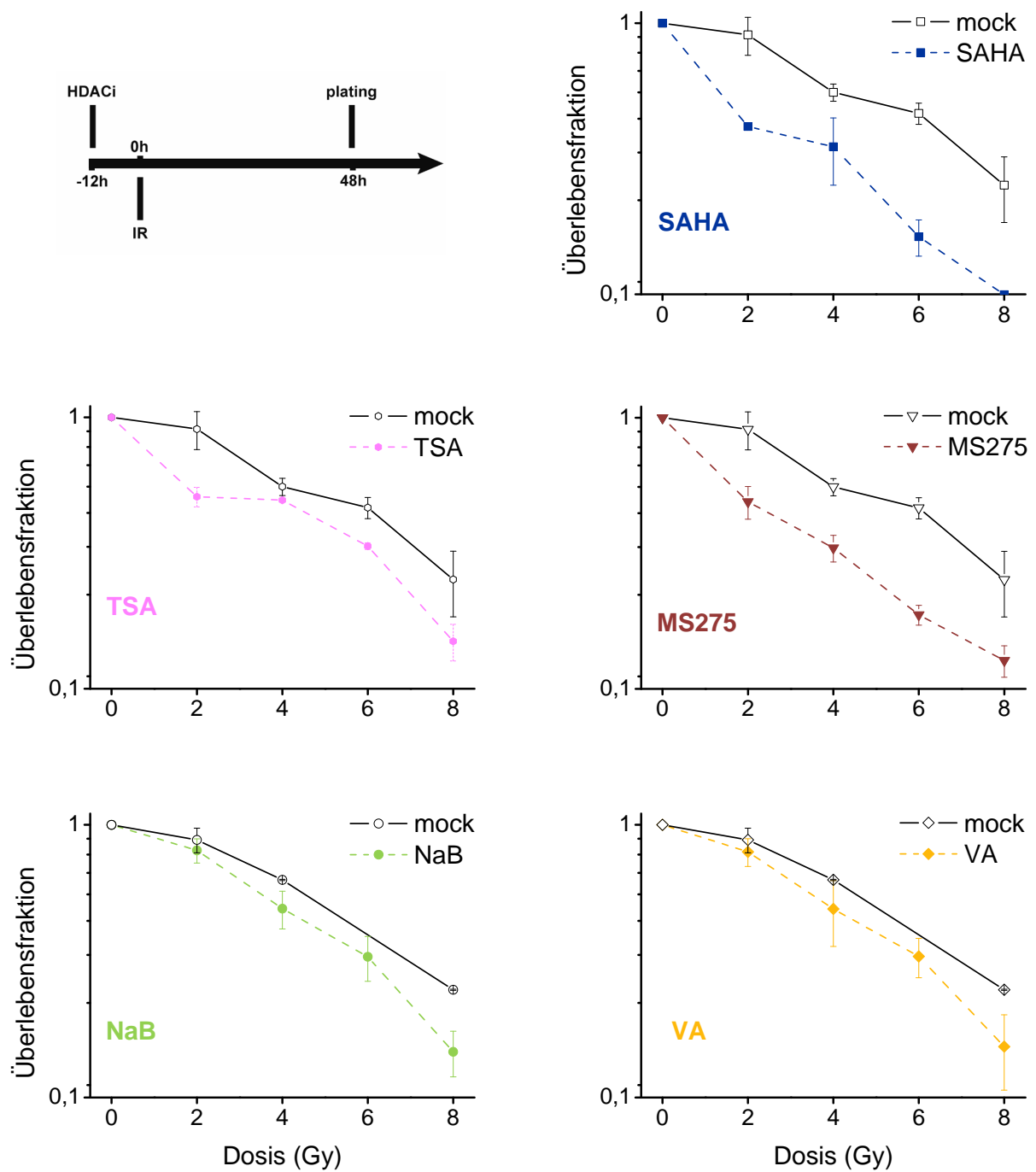
### 4.3.10 Koloniebildungstest

Nachdem die  $\gamma$ H2AX-Focus-Analyse für die Substanzen SAHA, MS275 und NaB einen Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die DSB-Reparatur in Normalzellen gezeigt hat, sollte mit Koloniebildungstests die biologische Relevanz dieser Beobachtung geklärt werden. Da durch kurze Inkubationszeiten oder niedrige Dosen möglicherweise maskierte Einflüsse ebenfalls interessierten, wurden alle Substanzen, inkl. TSA und VA getestet. Exemplarisch seien Aufnahmen von mit NaB behandelten Fibroblasten zum Zeitpunkt des Ausplattierens (48 h nach Bestrahlung), präsentiert – sie zeigen die erhöhte  $\gamma$ H2AX-Foci-Zahl nach Zugabe von NaB (Abb. 29).



**Abb. 29** –  $\gamma$ H2AX-Foci (grün) in HSF1<sup>2</sup>-Zellen, deren Kerne mittels DAPI (blau) Immunfluoreszenz gefärbt wurden. Dargestellt ist die Anzahl der residuellen Foci zum Zeitpunkt des Ausplattierens (48 h post IR). Es ist sichtbar, dass unter Einfluss von NaB die Anzahl an residuellen Foci zunimmt. mock = Scheinbehandlung.

Alle fünf getesteten Substanzen führen zu einer verminderten Koloniebildung. Die Kurven von SAHA und MS275 zeigen einen Abfall der Überlebensfraktion bereits bei niedrigeren Dosen, während bei NaB und VA die Kurven erst bei hohen Dosen divergieren. Sowohl bei SAHA wie auch bei TSA ergab sich ein sprunghafter Abfall bereits nach 2 Gy, der rein biologisch nicht erklärt werden kann. Unter Behandlung mit der Hydroxamsäure SAHA, sowie dem Benzamid MS275 zeigt sich die höchste Abnahme der Überlebensfraktion. Rechnerisch ergibt sich ein DEF (*Dose-Enhancement-Factor* vgl. 3.11) von 1,97 für SAHA bzw. 2,03 für MS275. Die beiden chemisch sehr ähnlichen Substanzen VA und NaB zeigen auch in den Überlebenskurven einen ähnlichen Verlauf. Es ergibt sich rechnerisch ein DEF von 1,22 für beide Substanzen. Für TSA liegt der DEF ebenfalls in derselben Größenordnung wie für VA und NaB, der berechnete Wert liegt bei 1,24. Es ergibt sich so ein Mittelwert für alle HDAC-Inhibitoren von 1,54 (Literaturvergleich s. Tab. 11).



**Abb. 30** – Ergebnisse des Koloniebildungstests. Links oben: Zeitlicher Ablauf der Experimente. Dargestellt sind die Überlebenskurven für die fünf getesteten HDAC-Inhibitoren. Durchgezogene Linien: mock / Scheinbehandlung. Gestrichelte Linien: Substanz. Fehlerbalken entspricht Standardfehler. Alle Substanzen führen zu einem im Vergleich zur Kontrolle eingeschränkten Überleben.

## 5 Diskussion

Epigenetische Therapieverfahren werden zunehmend in konkrete Therapieempfehlungen integriert, z.B. bei der Therapie von kutanen T-Zell-Lymphomen und dem MDS. Epigenetische Therapieansätze spielen zudem eine bedeutende Rolle im Umfeld der aus der biologischen Grundlagenforschung abgeleiteten neuesten Therapieansätze, die erst in den kommenden Jahren Einzug in die tägliche klinische Praxis gewinnen werden (MA *et al.*, 2009). Derzeit befinden sich die meisten Studien noch in Phase I und II, nur wenige Studien der Phase III sind bereits publiziert. Angesichts fehlender erfolgsversprechender alternativer Behandlungsmethoden werden jedoch, wie in der Onkologie üblich, auch geringe Verbesserungen der Klinik und des Verlaufs eines Patienten als Erfolge gefeiert. Eine kritische Betrachtung der publizierten Ergebnisse macht deutlich, dass man weit davon entfernt ist, von einem Durchbruch sprechen zu können. Epigenetische Therapieansätze wurden zunächst insbesondere beim MDS verfolgt, so dass hier eine Reihe klinischer Studien abgeschlossen sind. Selbst wenn komplette und partielle Remissionen (CR, PR) zusammen betrachtet werden, so liegt die ORR (overall response rate) in den meisten Studien bei  $\leq 50\%$  (KUENDGEN *et al.*, 2008). D.h. weniger als die Hälfte der Patienten profitiert zu einem Teil, aber rund die Hälfte spricht überhaupt nicht wie gewünscht auf die Therapie an. Zudem verschlechtert sich die Klinik einiger Patienten sogar durch die Therapie. Ungeachtet dessen: Epigenetischen Mechanismen als zentralen Regulationsinstanzen kommen in einer Vielzahl von Erkrankungen entscheidende Bedeutung zu. So verwundert es nicht, dass zunehmend auch andere Erkrankungen Ziel epigenetischer Therapieansätze werden, wie z.B. die Rheumatoide Arthritis (CHOO *et al.*, 2008). Selbst der Einsatz epigenetischer Medikation in den Bereichen der Nachsorge und Krebsprävention wird diskutiert (GRØNBAEK *et al.*, 2008).

Vor diesem Hintergrund war es Ziel dieser Arbeit, den Einfluss epigenetisch modifizierender Substanzen auf die DSB-Reparaturkapazität in menschlichen Normalgewebszellen zu analysieren, um somit einen Beitrag zur Klärung möglicher Risiken einer Langzeitbehandlung zu liefern.

## 5.1 Kritische Bewertung der Methoden

Grundlage der Analyse der Doppelstrangbruch (DSB)-Reparaturkapazität bildet die  $\gamma$ H2AX-Focusanalyse. Wie eingangs beschrieben, bildet sich nach DSB-Induktion ein  $\gamma$ H2AX-Focus, der über Immunfluoreszenzfärbungen sichtbar gemacht werden kann. Ein wichtiges Auswahlkriterium für die Methode ist die hohe Sensibilität für geringe Reparaturunterschiede, hier hat sich die  $\gamma$ H2AX-Focusanalyse bereits im Vorfeld als verlässliche Methode erwiesen (LÖBRICH *et al.*, 2005; RÜBE *et al.*, 2008). Doch wie alle auf komplexen Mechanismen basierenden Methoden weist auch die  $\gamma$ H2AX-Focusanalyse einige Besonderheiten auf, die in Hinblick auf die spätere Interpretation der Ergebnisse diskutiert werden sollten. Für eine allgemein kritische Wertung müssen zunächst drei zentrale Fragen beantwortet werden:

- Führt jeder DSB zu einem  $\gamma$ H2AX-Focus?
- Entspricht jeder  $\gamma$ H2AX-Focus einem DSB?
- Entspricht das Verschwinden eines  $\gamma$ H2AX-Focus auch der Reparatur eines DSB?

Die erste Frage kann klar beantwortet werden: Es besteht Konsens darüber, dass ein einzelner DSB zur Bildung eines  $\gamma$ H2AX-Focus führt: Dies bildet die rationale Grundlage für die Anwendung der Focusanalyse für die Quantifizierung von DSB. DSB kommen jedoch nicht nur durch Bestrahlung induziert vor, sondern werden auch im Rahmen der Immunsystemreifung (V(D)J-Rekombinationen) oder während der Spermatogenese beobachtet. Diese Phänomene spielen jedoch für die verwendeten humanen Fibroblasten keine Rolle.

Die umgekehrte zweite Frage, ob auch jeder  $\gamma$ H2AX-Focus einem DSB entspricht, muss mit einem Nein beantwortet werden. So kommt es z.B. bei Schädigung eines DNA-Einzelstrangs z.B. durch UV-Strahlung ebenfalls zu einer Phosphorylierung von H2AX (MATSUMOTO *et al.*, 2007). Zudem können sich hinter jedem  $\gamma$ H2AX-Focus mehrere eng benachbarte DSB verbergen. Eine unabhängige Methode zur Analyse eines einzelnen Focus fehlt jedoch bislang. Die  $\gamma$ H2AX-Focusanalyse hat sich binnen kurzer Zeit zum Standardinstrument für die Erforschung von DNA-Reparaturverhalten entwickelt: Sie ist um Größenordnungen sensibler als bisherige Methoden (Cometassay; Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)). Dies leitet unmittelbar über zur dritten Frage, ob das Verschwinden eines Focus gleichzusetzen mit dem Verschwinden eines DSB ist.



Die physikalischen Methoden zur Quantifizierung von DSB weisen allesamt eigene Unzulänglichkeiten auf, die die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erheblich erschweren bzw. unmöglich machen. So bedarf es z.B. bei der PFGE erheblich höherer Energiedosen ( $> 5$  Gy), des Weiteren wird die DNA lysierenden Substanzen oder hohen Temperaturen ausgesetzt, um sie von assoziierten Proteinen (z.B. Histonen) zu befreien. Die methodischen Unterschiede sind nicht die einzigen, auch die beobachteten Reparaturkinetiken unterscheiden sich zwischen PFGE und  $\gamma$ H2AX-Focusanalyse teils erheblich. So erreicht die  $\gamma$ H2AX-Foci-Anzahl erst nach ca. 30 min. eine Plateauphase, die bis zu 30 min anhalten kann, ehe ein deutlicher Abfall mit einer Halbwertszeit (HWZ) von ca. 100 min. zu beobachten ist. Diese Ergebnisse einer Studie von (KINNER *et al.*, 2008) decken sich sehr gut mit den eigenen beobachteten Kinetiken dieser Arbeit. Die PFGE lässt jedoch bereits innerhalb der ersten 30 min. einen deutlichen Abfall der DSB vermuten, hier liegt die HWZ bei nur 20 min. Auch die langsamere Kinetik trotz niedrigerem Schadenslevel im Vergleich PFGE zu  $\gamma$ H2AX-Focusanalyse ist bisher nicht geklärt. Da in der vorliegenden Arbeit jedoch insbesondere die verbleibenden Foci nach längerer Reparaturzeit und nur nach geringen Bestrahlungsdosen eine Rolle spielen, haben die oben beschriebenen Einschränkungen keine direkten Auswirkungen auf die Interpretation der Ergebnisse (BOUQUET *et al.*, 2006; KINNER *et al.*, 2008). Einzelne Arbeiten lassen vermuten, dass unter Umständen  $\gamma$ H2AX-Foci persistieren, auch wenn der zugrunde liegende Schaden repariert ist (FORAND *et al.*, 2004). Auch wenn es schwierig ist, diese Resultate zu übertragen, so sollte dennoch stets ein vermuteter Zusammenhang zwischen beobachteten verbliebenen Foci und dem Überleben experimentell überprüft werden.

Bei der Verwendung der  $\gamma$ H2AX-Focusanalyse im Zusammenhang mit epigenetisch modifizierenden Substanzen müssen zudem einige spezielle Punkte beachtet werden.  $\gamma$ H2AX unterliegt als phosphorylierte Version der Histonvariante H2AX einem direkten Einfluss epigenetischer Modifizierungen. So konnte eine Hyperacetylierung unter Einfluss von Valproat (VA) auch für das nach Bestrahlung gebildete  $\gamma$ H2AX nachgewiesen werden, allerdings ohne eine konkrete biologische Konsequenz ableiten zu können (CHINNAIYAN *et al.*, 2008). Größere Konsequenz für die Interpretation der Resultate der vorliegenden Arbeit besitzen jedoch kontroverse Resultate jüngerer Studien, die zeigen, dass  $\gamma$ H2AX vornehmlich in euchromatischen Regionen gebildet wird. Im dichter gepackten Heterochromatin hingegen sind weniger  $\gamma$ H2AX-Foci zu beobachten, obwohl man durch die erhöhte Packungsdichte eine vermehrte Anzahl an DSB vermuten könnte (COWELL *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2007; KINNER *et al.*, 2008). Doch könnte nicht nur die absolute Anzahl an Foci unterschiedlich

sein, insbesondere scheinen DSB im Heterochromatin auch langsamer repariert zu werden (KARAGIANNIS *et al.*, 2007). Erst vor kurzem wurde publiziert, dass ATM wahrscheinlich die heterochromatine Struktur auflockert, um schlecht zugängliche DNA-Regionen für die DSB-Reparatur zugänglich zu machen (GOODARZI *et al.*, 2008). Insbesondere die verwendeten HDAC-Inhibitoren agieren zu einem wichtigen Teil über die Konformationsänderung von genexpressions-inaktiven heterochromatischen Regionen hin zu Euchromatin, mit aktivierter Genexpression. Vor dem Hintergrund der erwähnten Literatur würde man eine Zunahme an  $\gamma$ H2AX-Foci nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren erwarten, diese jedoch bereits in der Induktion und nicht wie beobachtet, erst im Verlauf der Reparatur. Zudem könnte man eine Zunahme der Reparaturgeschwindigkeit vermuten, die im Verlaufe der Reparatur die initial vermehrt auftretenden Foci wieder kaschieren würde. Die eigenen Beobachtungen zeigen jedoch weder eine relevante Zunahme der Induktion noch einen positiven Einfluss auf die Geschwindigkeit der Reparatur. Im Gegenteil: Die Abnahme der  $\gamma$ H2AX-Foci geschieht unter Behandlung mit HDAC-Inhibitoren langsamer. Hier stehen die beobachteten Resultate im Einklang mit zahlreichen weiteren Studien, die an Tumorzellen unter Einfluss von HDAC-Inhibitoren eine verlangsamtete Reparatur beobachtet haben.

Diese widersprüchlichen Ergebnisse unterstreichen die Komplexität des Netzwerkes aus epigenetischer Regulation und DSB-Reparatur und ermahnen dazu, die Resultate stets auch an Überlebensexperimenten zu überprüfen, um konkrete biologische Konsequenzen ableiten zu können.

Mehrere Arbeiten haben einen Zusammenhang zwischen verbleibenden  $\gamma$ H2AX- wie auch 53BP1-Foci - und dem Überleben gezeigt und unterstreichen die eigenen beobachteten Ergebnisse (MACPHAIL *et al.*, 2003; ROTHKAMM *et al.*, 2003; OLIVE *et al.*, 2004; WYKES *et al.*, 2006; MARKOVÁ *et al.*, 2007). Für die Analyse des Überlebens wurde die etablierte Methode des Koloniebildungstests (Colony-Assay) verwendet (BURDAK-ROTHKAMM *et al.*, 2005; LÖBRICH *et al.*, 2005). Mit ihr testet man das Überleben im Sinne von erhaltener reproduktiver Integrität. Für ausdifferenzierte Zellen kann man den Tod als Verlust spezifischer Funktionen definieren. Sich jedoch prinzipiell noch teilende und sogar zu weiterer Differenzierung befähigte Zellen - wie es die verwendeten Fibroblasten sind - können nach einer Schädigung noch in der Lage sein, normale Zellfunktionen aufrecht zu erhalten, sich jedoch gar nicht mehr oder nach wenigen Mitosen nicht mehr weiter teilen. Es kommt also zum Verlust der reproduktiven Integrität, d.h. es kann kein Zellklon mehr entstehen und die Zelle hat *per definitionem* nicht überlebt (HALL *et al.*, 2006). In Tumoren

bildet die sich nicht mehr teilende Tumorzelle den gewünschten Endpunkt. Bei gesunden Fibroblasten hingegen können Unterschiede in der Überlebensfraktion als Indiz für das Maß der biologisch relevanten Schädigung betrachtet werden. Ein vermindertes klonogenes Überleben in Kombination mit einer verminderten Abnahme von  $\gamma$ H2AX-Foci in der Focusanalyse lässt den Schluss auf eine biologisch relevante schlechtere DSB-Reparatur zu.

## **5.2 Hypomethylierende Substanzen und genomische Stabilität – die Ergebnisse im Kontext weiterer Studien**

Zytotoxische Effekte wie die Induktion chromosomaler Instabilitäten durch Inhibitoren der DNA-Methyltransferase (DNMT) sind seit langem bekannt und nicht auf Krebszellen begrenzt, wie z.B. Mikrokernuntersuchungen an Lymphozyten zeigten (GUTTENBACH *et al.*, 1994; FAUTH *et al.*, 1998). Durch die Integration von 5-Azacytidine in RNA besteht zudem eine direkte Beeinflussung der Translation.

Für 5-Aza-2'-Deoxycytidine konnte zuvor die Induktion von DNA-Brüchen in Krebszellen durch Interaktion mit der DNMT1 nachgewiesen werden (PALII *et al.*, 2008). Für die DNMT1 war gezeigt worden, dass sie in den DNA-Reparaturprozess involviert zu sein scheint (MORTUSEWICZ *et al.*, 2005). Für 5-Aza-2'-Deoxycytidine konnte im Koloniebildungstest mit humanen Medulloblastomzelllinien jedoch keine signifikante Radiosensibilisierung festgestellt werden, jedoch eine strahlungsunabhängige Zytotoxizität (PATTIES *et al.*, 2009).

Für das in dieser Arbeit getestete 5-Azacytidine konnte zumindest für Plasmozytom-Zelllinien eine ATR-abhängige Aktivierung von DNA-Reparaturwegen beobachtet werden, wengleich die Arbeit keinen zytotoxischen Effekt auf PBMCs und BMSCs gesunder Spender zeigen konnte (KIZILTEPE *et al.*, 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls kein Einfluss auf die DSB-Reparatur im Sinne einer Änderung der  $\gamma$ H2AX-Focuskinetik beobachtet werden. Nach kurzer Inkubationszeit und Verwendung vergleichsweise hoher Dosen von 5-Azacytidine konnte nur für die höchste Dosis eine Zunahme des basalen Schädigungsniveaus beobachtet werden. Dieses Ergebnis würde die oben zitierten Arbeiten bestätigen. Gegen einen solchen Effekt in den beobachteten Fibroblasten spricht jedoch zum einen die hohe interexperimentelle Schwankung. Zum anderen wurde der Effekt nur in der höchsten Konzentration beobachtet, das Ergebnis steht also im Vergleich zu den niedrigeren Konzentrationen isoliert da. Ein

konzentrationsabhängiger Anstieg zeigt sich nicht. Eine extreme Schädigung einiger Zellen, wie z.B. durch die Substanz verursachte Apoptoseinduktion kann nicht ausgeschlossen werden, da apoptotische Zellen nicht im besondere erfasst wurden, prinzipiell jedoch nicht in die Auswertung der  $\gamma$ H2AX-Focusanalyse einfließen.

5-Azacytidine muss als Ribonukleosidanalogon wie beschrieben zunächst in ein Desoxyribuncleosid umgewandelt werden, ehe es in DNA eingebaut werden kann (LÜBBERT *et al.*, 2007). Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit proliferierender Zellen, damit die S-Phase durchlaufen wird. Jedoch müssen die Zellen zum Zeitpunkt der Bestrahlung konfluent und stationär sein. Unter Beachtung diesen Bedingungen wurde das zweite Experiment mit 5-Azacytidine durchgeführt. Da auch unter diesem Versuchsdesign lediglich bei einem Reparaturpunkt eine verminderte Abnahme der  $\gamma$ H2AX-Foci beobachtet wurde, ist davon auszugehen, dass 5-Azacytidine zu keiner Beeinflussung des DSB-Reparaturverhaltens in humanen Fibroblasten führt. Zudem konnte nur eine minimale Zunahme des basalen Schädigungsniveaus beobachtet werden. Diese Resultate bestätigen daher zum ersten Mal auch für humane Fibroblasten, dass 5-Azacytidine zu keiner signifikanten beobachtbaren DSB-Induktion oder Einschränkung der Reparaturkinetik führt.

### **5.3 Histondeacetylase-Inhibitoren und DSB-Reparatur - die Ergebnisse im Vergleich zur Literatur**

Nimmt man die Hypothese an, Histondeacetylasen würden in Tumor-Zellen im Vergleich zu Normalzellen eine ungleich stärkere Aktivität zeigen, so blieben die zytotoxischen Effekte von HDAC-Inhibitoren auf Tumorzellen begrenzt (CAMPHAUSEN *et al.*, 2007). Inzwischen konnte für eine Reihe von HDAC-Inhibitoren Effekte in Tumorzellen im Sinne einer Verschlechterung der DSB-Reparatur beobachtet werden. Toxische Effekte auf Normalzellen wurden jedoch in den seltensten Fällen untersucht bzw. führten zu negativen Ergebnissen. Eine Arbeit aus dem Jahre 2000 berichtet über eine eingeschränkte DSB-Reparatur, bei identischer Induktion, nach Behandlung von Lymphozyten mit Natrium-Butyrat (NaB, 5mM). Genutzt wurde unter anderem die heute nur noch selten verwendete Methode der „premature chromosome condensation“, die DSB indirekt über Chromsomenaberrationen (Chromsomen-Brüche) nachweist (STOILOV *et al.*, 2000). Eine etwas jüngere Studie untersuchte parallel zu humanen Melanomzellen auch menschliche Lungenfibroblasten, konnte jedoch in letzteren keine Abnahme der DNA-Reparaturkapazität oder eine Änderung der Expression von DNA-Reparaturproteinen feststellen (MUNSHI *et al.*,

2005). In einer Studie über die Radiosensibilisierung von Zervix- u. Colon-Ca-Zelllinien durch den HDAC-Inhibitor „PCI-24781“ wurden parallel auch Fibroblasten untersucht und aus den Ergebnissen eine nur geringere Strahlenempfindlichkeit nach Substanzinkubation postuliert. In der Studie wurden Tumor- und Normalzellen unterschiedlichen Behandlungsschemata unterzogen, so wurden z.B. die Normalzellen bei den Koloniebildungstests nur mit einer Dosis bestrahlt (BANUELOS *et al.*, 2007). Eine amerikanische Arbeitsgruppe fand eine verringerte „Letalität“ (in der Studie definiert als  $\geq 20\%$  Gewichtsverlust) bei *in vivo* Ganzkörper-Bestrahlungen von Mäusen unter Behandlung mit den HDAC-Inhibitoren VA und TSA vor oder sogar nach Bestrahlung (BROWN *et al.*, 2008).

Starke Evidenz in der Literatur gibt es jedoch für eine erhöhte Strahlensensibilität von Krebszellen unter Behandlung mit HDAC-Inhibitoren. Praktisch alle veröffentlichten Arbeiten mit Krebszellen zeigen eine Beeinträchtigung der DSB-Reparatur durch HDAC-Inhibitoren. Es bleibt zu spekulieren, ob das starke Ungleichgewicht in der Anzahl der Publikationen mit einer Vielzahl an Studien zu Krebszellen und nur wenigen, hier dargestellten Arbeiten, mit zudem kontroversen Resultaten zu Normalzellen die tatsächlich durchgeführten Studien widerspiegelt oder ob es sich nicht viel mehr um ein gutes Beispiel des vielkritisierten „publication-bias“ handelt.

Eine Übersicht über die bisher veröffentlichten Studien, die auch Normalzellen im Zusammenhang mit HDAC-Inhibitoren untersucht haben, findet sich in Tab. 11.

Berichte über eine Zunahme der Malignomhäufigkeit unter Therapie mit epigenetisch wirksamen Substanzen gibt es aufgrund der kurzen Beobachtungszeit noch nicht. Lediglich Valproat als gängiges Antiepileptikum findet bereits seit langem eine breite Anwendung unter anderem zur Prophylaxe von Krampfanfällen bei Hirntumoren, so dass man retrospektiv Daten zur kombinierten Radio- und Valproattherapie erheben kann. Ergebnisse einer solchen Untersuchung wurden anlässlich der 50. Jahrestagung der *American Society for Therapeutic Radiology and Oncology* (ASTRO) als Abstract veröffentlicht und sprechen für ein leicht besseres Therapieansprechen unter Valproat-Kombitherapie (BARKER *et al.*, 2008). Derzeit läuft eine prospektive klinische Studie, bei der Patienten mit Glioblastoma multiforme eine Kombinationstherapie von Valproat mit dem alkylierenden Zytostatikum Temozolomid erhalten, sowie eine fraktionierte Bestrahlung mit 60 Gy. Parallel wird zum ersten Mal der

Acetylierungsstatus in PBMCs protokolliert (NCI-06-C-0112, [www.cancer.org](http://www.cancer.org), (CAMPHAUSEN *et al.*, 2007)).

Bislang konnte man bei mit Valproat behandelten Epilepsie-Patienten keine Zunahme der Krebshäufigkeit feststellen (SINGH *et al.*, 2005), wobei man natürlich erst seit der Entdeckung der epigenetischen Komponente (GÖTTLICHER *et al.*, 2001) auch die spezifischen Auswirkungen *in vivo* untersuchen kann. Ob das bekannte und immer wieder bestätigte teratogene Potential von Valproat im Zusammenhang mit epigenetischen Modifikationen steht, bleibt noch zu zeigen (MEADOR *et al.*, 2009; ORNOY, 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal fünf HDAC-Inhibitoren unter vergleichbaren Bedingungen an menschlichen Normalzellen getestet. Zunächst interessierte, ob bereits die Substanzen selbst zu einer Zunahme der  $\gamma$ H2AX-Foci-Zahl führen würden, entsprechend einer Substanz-induzierten direkten oder indirekten DNA-Schädigung.

Die geringe Schwankung in der Anzahl der  $\gamma$ H2AX-Foci vor Bestrahlung, die sich für alle Substanzen bis auf eine Ausnahme zeigte, deutet auf eine gute Vergleichbarkeit des basalen Schädigungsniveaus und damit der einzelnen Experimente hin. Lediglich für MS275 zeigte sich unter Substanzbehandlung ein hochsignifikanter ( $p \leq 0,001$ ) Anstieg an  $\gamma$ H2AX-Foci im Vergleich zur scheinbehandelten Kontrolle. Dieser Anstieg könnte als Ausdruck einer durch MS275 induzierten genomischen Schädigung gewertet werden. Für MS275 hat man in Tumorzellen eine Induktion reaktiver Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) nachgewiesen (ROSATO *et al.*, 2003). Die eigenen Resultate deuten auf einen ebensolchen Effekt in menschlichen Hautfibroblasten hin. In teilweisem Widerspruch hierzu stehen die Resultate einer schwedisch/amerikanischen Arbeitsgruppe, die zwar nicht für MS275, jedoch für SAHA eine Akkumulation von ROS in Tumorzellen nachweisen konnte (UNGERSTEDT *et al.*, 2005). Dieselbe Arbeitsgruppe konnte jedoch für SAHA keine Zunahme der Schädigung (ROS-Akkumulation / Caspase-Aktivitätssteigerung) für Normalzellen feststellen. Obwohl für SAHA auch in anderen Quellen eine ROS-Induktion in Tumorzellen beschrieben wurde (RUEFLI *et al.*, 2001), zeigt die Auswertung der eigenen  $\gamma$ H2AX-Focusanalyse kein signifikant erhöhtes Schädigungspotential vor Bestrahlung und deckt sich damit mit den Ergebnissen von Ungerstedt *et al.*. Da aber eine minimale Zunahme der Schädigung beobachtet wurde, schließen die eigenen Ergebnisse eine nicht-signifikante Induktion von DSB durch SAHA nicht aus.

Reaktive Sauerstoffspezies stellen eine große Gefahr endogener DNA-Schädigung dar. In Zellen, bei denen die natürlicherweise vorkommenden Schutzmechanismen (enzymatische

und nichtenzymatische Radikalfänger) gestört sind, erreicht die Schädigung oft ein Niveau, das zur Apoptose führt. Oxidierte Basen werden normalerweise durch Glykolasen entfernt, so dass abasische Stellen in der DNA entstehen. Apurinische/Apyrimidinische (AP) - Endonukleasen schneiden an diesen Stellen und erzeugen Einzelstrangbrüche. Nicht oder falsch reparierte Einzelstrangbrüche können zu DSB führen, die in  $\gamma$ H2AX-Foci-Bildung resultieren. Durch Beeinflussung des intrazellulären Redox-Gleichgewichts und deregulierte DNA-Reparaturmechanismen können HDAC-Inhibitoren zu erheblichen oxidativen DNA-Schäden führen (EOT-HOULLIER *et al.*, 2008). Während in Tumorzellen diese Effekte erwünscht sind, so gehören sie zu den gefürchteten Nebenwirkungen in Normalzellen. Die Zunahme des basalen Schädigungsniveaus bei MS275, einer für die Induktion von ROS bekannten Substanz, sollte also zu großer Vorsicht insbesondere bei längerfristiger Anwendung mahnen. Weitere *in vivo* Studien müssen zeigen, inwieweit die Effekte für bestimmte Zell- und Gewebetypen spezifisch sind. Die Tatsache, dass die Ergebnisse in der hier vorliegenden Arbeit für SAHA keine solche Zunahme der basalen  $\gamma$ H2AX-Fociexpression zeigen, sollte vor dem Hintergrund prinzipiell ähnlicher Mechanismen und einer gezeigten Beeinflussung der ROS in Tumorzellen ebenfalls zunächst in weiteren *in vitro* und *in vivo*-Studien untersucht werden, ehe man eine Schädigung menschlicher Normalzellen ausschließen und von einer selektiven Schädigung von Tumorzellen sprechen könnte.

Substanz (Konzentration)	Zelllinie <sup>1</sup>	Methoden/ Endpunkte <sup>1</sup>	Resultate	Referenz
<b>Natrium-Butyrat</b> (5 mM)	PBMC	“premature-chromosome- condensation”	Zunahme an chromosomalen Aberrationen	(STOILOV <i>et al.</i> , 2000)
<b>Natrium-Butyrat</b> (3 mM)	MRC-9 (Primäre Lungenfibrobla- sten)	Klonogenes Überleben  mRNA-Level von DNA- Reparatur-Proteinen	Keine Änderung der DNA- Reparaturkapazität oder der Expression von DNA- Reparaturproteinen	(MUNSHI <i>et al.</i> , 2005)
<b>Natrium-Butyrat</b> (0 – 3mM)  <b>TSA</b> (0 – 1 µM)	Humane epidermale Keratinocyten (HEKs)	Wachstum  Differenzierung	NaB: Reversibler, TSA: irreversibler Wachstums- Arrest. Abfall des mRNA- Levels für cdk1, Anstieg für transglutaminase type I gene (TG1)	(SAUNDERS <i>et al.</i> , 1999)
<b>SAHA</b> (1,25-20 µM)  <b>MS275</b> (1,25-20 µM)	WI38, Hs578Bst (Humane Lungen- bzw. Brust- fibroblasten)	Zell-Viabilität; Caspase- Aktivität; Akkumulation ROS	Keine Akkumulation von ROS, keine Caspase- Aktivität in den Normalzellen	(UNGERSTED T <i>et al.</i> , 2005)
<b>AN-1 / AN-9</b> (100 µM, 200 µM)  AN-1: butyroyloxy-methyl butyrate  AN-9: pivaloylmethyl butyrate	Primäre humane Astrozyten	MTS Zell-Vitalitätstest  Apoptose Assay	Primäre Astrozyten zeigten wenig Apoptose (20 % Zelltod bei 200 µM AN-9 für 48 h).  Zellwachstum konzentrations- abhängig inhibiert.	(ENTIN-MEER <i>et al.</i> , 2005)
<b>PCI-24781</b> (0,3 µM, 3 µM)	Primäre humane Haut- fibroblasten (Passage 31)	Klonogenes Überleben  γH2AX Focusanalyse	Geringe Abnahme des Überlebens (mit einem dose- modifying factor (hier DEF) von 1,1 bei dem Maximum von 3 µM PCI-24781)  Weniger γH2AX-Foci im vergleich zur unbehandelten Kontrolle	(BANUELOS <i>et al.</i> , 2007)
<b>SAHA</b> (10 µM) <b>TSA</b> (0,1 µM) <b>MS275</b> (8 µM) <b>VA</b> (2 mM) <b>NaB</b> (5 mM)	Primäre humane Hautfibro- blasten (Passage 11- max. 20)	γH2AX Focusanalyse  Klonogenes Überleben	Signifikante Zunahme an γH2AX Foci/Zellkern für SAHA, MS275, NaB  Abnahme des klonogenen Überlebens mit einem DEF von 1.22 – 2.03	<u>Diese Arbeit</u>

**Tab. 11** – Literaturübersicht über thematisch relevante Studien, die Normalzellen im Zusammenhang mit HDAC-Inhibitoren untersucht haben. <sup>1)</sup> Nur die verwendeten menschliche Normalzelllinien der Studien sind angegeben und mit ihnen verknüpfte Methoden.



Die Analyse der DSB-Reparaturvorgänge mittels der  $\gamma$ H2AX-Focusanalyse ergab für die Substanzen SAHA, MS275 und NaB teils hochsignifikante Unterschiede in der Anzahl der verbliebenen  $\gamma$ H2AX-Foci. Nach Subtraktion der in den unbestrahlten Kontrollen gezählten Foci ergab sich bei keiner Substanz eine signifikante Zunahme der Anzahl der  $\gamma$ H2AX-Foci zum Zeitpunkt der Induktion, hier als 30 min post IR gewertet. HDAC-Inhibitoren führen unter den eingangs beschriebenen Mechanismen zur „Auflockerung“ des Chromatins. Prinzipiell gibt es zwei Hypothesen, wie sich das verstärkte Vorhandensein von euchromatischen Regionen auf die DSB-Induktion auswirken könnte. Betrachtet man das Chromatin bildlich dargestellt als normalerweise eng gepacktes „Garnknäuel“, so könnte man annehmen, dass bei einer Auflockerung sich auch die Zielstrukturen vergrößern und so mehr DSB induziert werden könnten. Die eigenen Beobachtungen der Anzahl der bestrahlungs-induzierten Foci können jedoch auch biologisch-mechanistisch wie folgt interpretiert werden: Die zur Schädigung führenden Sekundärpartikel sind im Größenvergleich zum Chromatin viel kleiner, ebenfalls lassen auftretende Streueffekte und Diffusionsprozesse der räumlichen Struktur keine Bedeutung für die Anzahl der induzierten DSB zukommen, dass von keiner Zunahme der bestrahlungs-induzierten Foci auszugehen ist.

Die Substanzen SAHA, MS275 und NaB führten zu signifikant mehr  $\gamma$ H2AX-Foci in den analysierten späten Reparaturzeitpunkten (5, 8 und 24 h). Zwei weitere getestete HDAC-Inhibitoren, TSA und VA zeigten keine signifikante Erhöhung der Foci-Anzahl (TSA nur nach fünf Stunden). Betrachtete man zusätzlich die Histon-Acetylierungsanalysen im Western-Blot, so fällt auf zum einen auf, dass VA ein schwächeres Signal lieferte, als die parallel getesteten Substanzen SAHA, MS275 und NaB. Zum anderen, obwohl TSA in einer literatur-üblichen Konzentration getestet wurde (PAPELEU *et al.*, 2003), ergab sich auch nach vielfältiger Wiederholung der Western-Blots nur eine minimalste Hyperacetylierung, die deutlich geringer war, als die im Vergleich durch SAHA ausgelöste. Für ein Erklärungsmodell bedarf es einer Zusammensicht der Ergebnisse mit denen der Koloniebildungstests.

In der Analyse des klonogenen Überlebens zeigte sich für alle getesteten Substanzen eine Abnahme der Überlebensfraktion im Vergleich zu scheinbehandelten Kontrollzellen. Die Tatsache, dass auch TSA und VA trotz nicht signifikanter Erhöhung der  $\gamma$ H2AX-Foci-Anzahl zu einem verminderten Überleben führen, lässt sich gut durch die unterschiedlich langen Inkubationszeiten erklären. So waren die Zellen im Koloniebildungstest insgesamt 48 h länger den HDAC-Inhibitoren ausgesetzt, als in der Focusanalyse. Marchion *et al.* schreibt, dass

Valproat eine vergleichsweise relativ lange Inkubationszeit benötigt, bevor Effekte nachweisbar sind (MARCHION *et al.*, 2005), zumal VA in anderen Studien in höheren Konzentrationen verwendet wurde (2 mM in dieser Arbeit, 5 – 10 mM in (DEFOORT *et al.*, 2006)).

Unterschiede in den ermittelten Überlebensfraktionen können sich durch die chemischen und pharmakologischen Spezifitäten der HDAC-Inhibitoren erklären. So zeigten die chemisch sehr ähnlich aufgebauten Substanzen VA und NaB auch sehr ähnliche Überlebenskurven.

Es zeigte sich also, dass die Beeinflussung der DSB-Reparaturfunktion ein generelles Phänomen der untersuchten HDAC inhibierender Substanzen ist.

## 5.4 Histondeacetylase-Inhibierung und 53BP1

Das Protein 53BP1 ist wie beschrieben ein häufig verwendeter zusätzlicher Marker von DSB und kolokalisiert gut mit  $\gamma$ H2AX, bis auf einige wenige seltene, hier nicht relevante Ausnahmen. So wäre bei der kombinierten 53BP1 und  $\gamma$ H2AX-Focusanalyse eigentlich ein ähnlicher Verlauf der Reparaturkinetik zu erwarten gewesen. Die in Abb. 19 dargestellten Ergebnisse zeigen jedoch, dass unter dem Einfluss von MS275 zunächst weniger 53BP1 als  $\gamma$ H2AX-Foci gebildet werden, sogar weniger, als in scheinbehandelten Zellen. Erst im Verlauf der weiteren Reparatur erreicht die Anzahl der 53BP1-Foci das Niveau der  $\gamma$ H2AX-Foci. Im Gegensatz hierzu verläuft die Kinetik in den scheinbehandelten Vergleichszellen wie erwartet fast identisch. Diese zunächst merkwürdig erscheinende Beobachtung lässt sich jedoch gut mit Ergebnissen einer amerikanischen Arbeitsgruppe um G. Kao in Übereinstimmung bringen. Sie konnte zeigen, dass 53BP1 und HDAC4 interagieren. So führte die RNAi vermittelte Inhibition von HDAC 4 zu einer drastischen Abnahme der 53BP1-Foci (KAO *et al.*, 2003).

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit lassen daher vermuten, dass die Inhibition von HDACs auch partiell die Formation von 53BP1 verzögert. Interessanterweise jedoch inhibiert MS275 HDAC 4 nur schwach (WITT *et al.*, 2008). Eventuell spielt daher die HDAC 5 hier die entscheidende Rolle: Sie weist eine hohe Strukturhomologie zu HDAC 4 auf, jedoch fehlen Daten zum Inhibitionsprofil von MS275 in Hinblick auf HDAC 5 (vgl. Tab. 3). In der Arbeit von Kao wurden neben HDAC 4 jedoch nur HDAC 2 u. 6 zusätzlich untersucht. Die Beschreibung der noch hypothetischen Interaktion zwischen HDAC 5 und 53BP1 wäre daher ein interessanter Ansatz für über diese Arbeit hinausgehende Experimente. Die Interaktion

zwischen der Inhibition der HDACs und 53BP1 könnte ein wichtiger mechanistischer Baustein für die beobachtete Radiosensitivierung sein.

## 5.5 Bedeutung der Ergebnisse für die Klinik

Als zentrales Ergebnis dieser Arbeit muss festgehalten werden, dass die epigenetische Modifikation durch HDAC-Inhibitoren auch in humanen Normalgewebszellen die DSB-Reparatur biologisch relevant einschränkt. Die zumindest partielle Inhibition der DSB-Reparatur ist nicht auf epigenetisch vorgeschädigte, entartete Zellen beschränkt, wie häufig irreführend behauptet wird, sondern kann auch in normalen Zellen ohne epigenetische Defekte beobachtet werden.

Eine eingeschränkte DSB-Reparatur jedoch führt zur Akkumulation von DNA-Schäden, so dass eine Zelle in Abhängigkeit der Schädigungen bestenfalls proliferationsinaktiv wird oder in die Apoptose geht oder im schlimmsten Fall ein Stadium der unkontrollierten Proliferation erreicht: Die Entwicklung von Krebs.

Auf den Erkenntnissen epigenetischer Regulation basierende Therapieverfahren gehören ganz sicher zu den spannendsten und vielversprechendsten Therapieansätzen. Insbesondere bei Krebserkrankungen, wenn andere Therapien versagen, kann die induzierte epigenetische Modifikation für bisher einige wenige Patienten ein letzter Hoffnungsschimmer sein.

Aber man sollte nie vergessen, dass es sich um ein noch sehr experimentelles Verfahren handelt, bei dem große Teile der zugrunde liegenden Mechanismen noch unverstanden sind. Angesichts eines ständig wachsenden Interesses und vorweggenommener Akzeptanz in der Klinik sollten die vorliegenden Ergebnisse jedoch zur Vorsicht mahnen.

Eine nicht nur auf Krebszellen beschränkte Einschränkung der DSB-Reparatur bedeutet ein generell erhöhtes Risiko für das Auftreten von (Zweit-)malignomen unter der Therapie mit HDAC-Inhibitoren. Wie bei Chemo- oder Strahlentherapien üblich, so müssen Patienten in Zukunft beim Einsatz epigenetisch modifizierender Substanzen, insbesondere bei HDAC-Inhibitoren, über das genotoxische Potential aufgeklärt werden. Unter Therapie mit HDAC-Inhibitoren sollte eine Strahlenexposition z.B. im Rahmen der klinischen Diagnostik so weit wie möglich vermieden werden.

Die Entwicklung neuer, spezifischer HDAC-Inhibitoren und die weitere Entschlüsselung des epigenetischen Codes werden dazu beitragen, die Risiken besser zu verstehen und Nebenwirkungen zu vermeiden. Langzeitstudien an Tieren und Menschen werden

ermöglichen, das tatsächliche Risiko besser einzuschätzen. Bis dahin müssen Ärzte eine besonders gründliche Risiko/Nutzen-Abwägung insbesondere bei Langzeitapplikation z.B. im Rahmen chronischer Erkrankungen wie Rheumatoider Arthritis (CHOO *et al.*, 2008) oder in der pädiatrischen Onkologie (FRÜHWALD *et al.*, 2008) vornehmen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2008) *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York.
2. Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE (1964) Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 51:786-794
3. Ayoub N, Jeyasekharan AD, Bernal JA, Venkitaraman AR (2008) HP1-beta mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response. *Nature* 453:682-686
4. Bakkenist CJ, Kastan MB (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421:499-506
5. Banuelos CA, Banáth JP, MacPhail SH, Zhao J, Reitsema T, Olive PL (2007) Radiosensitization by the histone deacetylase inhibitor PCI-24781. *Clin Cancer Res* 13:6816-6826
6. Barker C, Camphausen K, Tofilon P, Chan T (2008) Outcome of Patients Undergoing Radiotherapy for High Grade Glioma While Taking the Histone Deacetylase Inhibitor, Valproic Acid. *International Journal of Radiation Oncology\*Biography\*Physics* 72:S214-S214
7. Bayreuther K, Rodemann HP, Francz PI, Maier K (1988) Differentiation of fibroblast stem cells. *J Cell Sci Suppl* 10:115-130
8. Becker D (2006) Untersuchungen zum strahleninduzierten Bystandereffekt in normalen humanen Fibroblasten, Diplomarbeit, FH Darmstadt, Darmstadt.
9. Bender CF, Sikes ML, Sullivan R, Huye LE, Le Beau MM, Roth DB, Mirzoeva OK, Oltz EM, Petrini JH (2002) Cancer predisposition and hematopoietic failure in Rad50(S/S) mice. *Genes Dev* 16:2237-2251
10. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2007) *Biochemistry*. 6th edn W.H.Freeman and Company, New York.
11. Bernstein BE, Meissner A, Lander ES (2007) The mammalian epigenome. *Cell* 128:669-681
12. Bertos NR, Wang AH, Yang XJ (2001) Class II histone deacetylases: structure, function, and regulation. *Biochem Cell Biol* 79:243-252
13. Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16:6-21
14. Boffa LC, Vidali G, Mann RS, ALLFREY VG (1978) Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate. *J Biol Chem* 253:3364-3366
15. Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, Pommier Y (2008) gammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer*
16. Bottomley MJ, Lo Surdo P, Di Giovine P, Cirillo A, Scarpelli R, Ferrigno F, Jones P, Neddermann P, De Francesco R, Steinkühler C, Gallinari P, Carfi A (2008) Structural and functional analysis of the human HDAC4 catalytic domain reveals a regulatory structural zinc-binding domain. *J Biol Chem* 283:26694-26704

17. Botuyan MV, Lee J, Ward IM, Kim JE, Thompson JR, Chen J, Mer G (2006) Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell* 127:1361-1373
18. Bouquet F, Muller C, Salles B (2006) The loss of gammaH2AX signal is a marker of DNA double strand breaks repair only at low levels of DNA damage. *Cell Cycle* 5:1116-1122
19. Brenner DJ, Hall EJ (2007) Computed tomography--an increasing source of radiation exposure. *N Engl J Med* 357:2277-2284
20. Brown SL, Kolozsvary A, Liu J, Ryu S, Kim JH (2008) Histone deacetylase inhibitors protect against and mitigate the lethality of total-body irradiation in mice. *Radiat Res* 169:474-478
21. Burdak-Rothkamm S, Rube CE, Nguyen TP, Ludwig D, Feldmann K, Wiegel T, Rube C (2005) Radiosensitivity of tumor cell lines after pretreatment with the EGFR tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa). *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Röntgengesellschaft [et al]* 181:197-204
22. Camphausen K, Tofilon P (2007) Inhibition of histone deacetylation: a strategy for tumor radiosensitization. *Journal of Clinical Oncology* 25:4051-4056
23. Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Kruhlak MJ, Pilch DR, Staudt DW, Lee A, Bonner RF, Bonner WM, Nussenzweig A (2003) Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol* 5:675-679
24. Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio MJ, Redon C, Pilch DR, Orlaru A, Eckhaus M, Camerini-Otero RD, Tessarollo L, Livak F, Manova K, Bonner WM, Nussenzweig MC, Nussenzweig A (2002) Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* 296:922-927
25. Chinnaiyan P, Cerna D, Burgan W, Beam K, Williams ES, Camphausen K, Tofilon P (2008) Postradiation sensitization of the histone deacetylase inhibitor valproic acid. *Clin Cancer Res* 14:5410-5415
26. Choo QY, Ho PC, Lin HS (2008) Histone deacetylase inhibitors: new hope for rheumatoid arthritis? *Curr Pharm Des* 14:803-820
27. Chung SY, Hill WE, Doty P (1978) Characterization of the histone core complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:1680-1684
28. Cihák A (1974) Biological effects of 5-azacytidine in eukaryotes. *Oncology* 30:405-422
29. Cohn MA, D'Andrea AD (2008) Chromatin recruitment of DNA repair proteins: lessons from the fanconi anemia and double-strand break repair pathways. *Molecular Cell* 32:306-312
30. Cowell I, Sunter N, Singh P, Austin C, Durkacz B, Tilby M (2007) gammaH2AX foci form preferentially in euchromatin after ionising-radiation. *PLoS ONE* 2:e1057
31. de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 370:737-749

32. Defoort EN, Kim PM, Winn LM (2006) Valproic acid increases conservative homologous recombination frequency and reactive oxygen species formation: a potential mechanism for valproic acid-induced neural tube defects. *Mol Pharmacol* 69:1304-1310
33. Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA (2007) Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol Cancer Res* 5:981-989
34. Entin-Meer M, Rephaeli A, Yang X, Nudelman A, VandenBerg SR, Haas-Kogan DA (2005) Butyric acid prodrugs are histone deacetylase inhibitors that show antineoplastic activity and radiosensitizing capacity in the treatment of malignant gliomas. *Molecular Cancer Therapeutics* 4:1952-1961
35. Eot-Houllier G, Fulcrand G, Magnaghi-Jaulin L, Jaulin C (2008) Histone deacetylase inhibitors and genomic instability. *Cancer Letters*
36. Esteller M (2008) Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 358:1148-1159
37. Fauth E, Scherthan H, Zankl H (1998) Frequencies of occurrence of all human chromosomes in micronuclei from normal and 5-azacytidine-treated lymphocytes as revealed by chromosome painting. *Mutagenesis* 13:235-241
38. Fazzari MJ, Grealley JM (2004) Epigenomics: beyond CpG islands. *Nat Rev Genet* 5:446-455
39. Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, Breslow R, Pavletich NP (1999) Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* 401:188-193
40. Fischer DD, Cai R, Bhatia U, Asselbergs FA, Song C, Terry R, Trogani N, Widmer R, Atadja P, Cohen D (2002) Isolation and characterization of a novel class II histone deacetylase, HDAC10. *J Biol Chem* 277:6656-6666
41. Flatmark K, Nome RV, Folkvord S, Bratland A, Rasmussen H, Ellefsen MS, Fodstad Ø, Ree AH (2006) Radiosensitization of colorectal carcinoma cell lines by histone deacetylase inhibition. *Radiation oncology (London, England)* 1:25
42. Forand A, Dutrillaux B, Bernardino-Sgherri J (2004) Gamma-H2AX expression pattern in non-irradiated neonatal mouse germ cells and after low-dose gamma-radiation: relationships between chromatid breaks and DNA double-strand breaks. *Biol Reprod* 71:643-649
43. Fricke A (2008) Untersuchungen zur Chromatinstruktur und DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur in menschlichen Zellen mittels ionisierender Strahlung, Dissertation, TU Darmstadt, Darmstadt.
44. Frühwald MC, Witt O (2008) The epigenetics of cancer in children. *Klinische Pädiatrie* 220:333-341
45. Gao L, Cueto MA, Asselbergs F, Atadja P (2002) Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem* 277:25748-25755
46. Göhde W (1968) Automatisiertes Meß- und Zählgerät für die Teilchen einer Dispersion. Patent DE1815352
47. 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. *Molecular Cell* 31:167-177

48. Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T (2001) Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* 20:6969-6978
49. Gregoretti IV, Lee YM, Goodson HV (2004) Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol* 338:17-31
50. Grønbaek K, Treppendahl M, Asmar F, Guldborg P (2008) Epigenetic changes in cancer as potential targets for prophylaxis and maintenance therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 103:389-396
51. Grozinger CM, Hassig CA, Schreiber SL (1999) Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:4868-4873
52. Gu J, Lu H, Tippin B, Shimazaki N, Goodman MF, Lieber MR (2007) XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *EMBO J* 26:1010-1023
53. Guardiola AR, Yao TP (2002) Molecular cloning and characterization of a novel histone deacetylase HDAC10. *J Biol Chem* 277:3350-3356
54. Guttenbach M, Schmid M (1994) Exclusion of specific human chromosomes into micronuclei by 5-azacytidine treatment of lymphocyte cultures. *Exp Cell Res* 211:127-132
55. Hall E, Giaccia AJ (2006) *Radiobiology for the radiologist*. 6th edn. edn Lippincott Wilkins & Williams, Philadelphia.
56. Hassig CA, Symons KT, Guo X, Nguyen PM, Annable T, Wash PL, Payne JE, Jenkins DA, Bonnefous C, Trotter C, Wang Y, Anzola JV, Milkova EL, Hoffman TZ, Dozier SJ, Wiley BM, Saven A, Malecha JW, Davis RL, Muhammad J, Shiao AK, Noble SA, Rao TS, Smith ND, Hager JH (2008) KD5170, a novel mercaptoketone-based histone deacetylase inhibitor that exhibits broad spectrum antitumor activity in vitro and in vivo. *Molecular Cancer Therapeutics* 7:1054-1065
57. Hebbes TR, Thorne AW, Crane-Robinson C (1988) A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J* 7:1395-1402
58. Heyne K (2007) *Neue Funktionen des p53-Tumorsuppressors an den Mitochondrien und im Zellkern*, Dissertation, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
59. Hickson I, Zhao Y, Richardson CJ, Green SJ, Martin NM, Orr AI, Reaper PM, Jackson SP, Curtin NJ, Smith GC (2004) Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer Research* 64:9152-9159
60. Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang XF, Yao TP (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417:455-458
61. Issa JP, Kantarjian HM (2009) Targeting DNA methylation. *Clin Cancer Res* 15:3938-3946
62. Jansen MS, Nagel SC, Miranda PJ, Lobenhofer EK, Afshari CA, McDonnell DP (2004) Short-chain fatty acids enhance nuclear receptor activity through mitogen-activated protein kinase activation and histone deacetylase inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:7199-7204
63. Jeggo P, Löbrich M (2006) Radiation-induced DNA damage responses. *Radiation Protection Dosimetry* 122:124-127



64. Johnstone RW (2002) Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nature reviews Drug discovery* 1:287-299
65. Jones PA, Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3:415-428
66. Jones PA, Taylor SM (1980) Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 20:85-93
67. Kao GD, McKenna WG, Guenther MG, Muschel RJ, Lazar MA, Yen TJ (2003) Histone deacetylase 4 interacts with 53BP1 to mediate the DNA damage response. *J Cell Biol* 160:1017-1027
68. Kao HY, Lee CH, Komarov A, Han CC, Evans RM (2002) Isolation and characterization of mammalian HDAC10, a novel histone deacetylase. *J Biol Chem* 277:187-193
69. Karagiannis T, Harikrishnan KN, Kn H, El-Osta A (2007) Disparity of histone deacetylase inhibition on repair of radiation-induced DNA damage on euchromatin and constitutive heterochromatin compartments. *Oncogene* 26:3963-3971
70. Kegel P, Riballo E, Kühne M, Jeggo PA, Löbrich M (2007) X-irradiation of cells on glass slides has a dose doubling impact. *DNA Repair* 6:1692-1697
71. Kim DK, Lee JY, Kim JS, Ryu JH, Choi JY, Lee JW, Im GJ, Kim TK, Seo JW, Park HJ, Yoo J, Park JH, Kim TY, Bang YJ (2003) Synthesis and biological evaluation of 3-(4-substituted-phenyl)-N-hydroxy-2-propenamides, a new class of histone deacetylase inhibitors. *J Med Chem* 46:5745-5751
72. Kim JA, Kruhlak M, Dotiwala F, Nussenzweig A, Haber JE (2007) Heterochromatin is refractory to gamma-H2AX modification in yeast and mammals. *J Cell Biol* 178:209-218
73. Kim YC, Gerlitz G, Furusawa T, Catez F, Nussenzweig A, Oh KS, Kraemer KH, Shiloh Y, Bustin M (2009) Activation of ATM depends on chromatin interactions occurring before induction of DNA damage. *Nat Cell Biol* 11:92-96
74. Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G (2008) Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Research* 36:5678-5694
75. Kiziltepe T, Hideshima T, Catley L, Raje N, Yasui H, Shiraishi N, Okawa Y, Ikeda H, Vallet S, Pozzi S, Ishitsuka K, Ocio EM, Chauhan D, Anderson KC (2007) 5-Azacytidine, a DNA methyltransferase inhibitor, induces ATR-mediated DNA double-strand break responses, apoptosis, and synergistic cytotoxicity with doxorubicin and bortezomib against multiple myeloma cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 6:1718-1727
76. Klug A, Rhodes D, Smith J, Finch JT, Thomas JO (1980) A low resolution structure for the histone core of the nucleosome. *Nature* 287:509-516
77. Kobayashi J, Tauchi H, Sakamoto S, Nakamura A, Morishima K, Matsuura S, Kobayashi T, Tamai K, Tanimoto K, Komatsu K (2002) NBS1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain. *Curr Biol* 12:1846-1851
78. Kornberg RD (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184:868-871
79. Kornberg RD, Lorch Y (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98:285-294

80. Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128:693-705
81. Kriaucionis S, Heintz N (2009) The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* 324:929-930
82. Kuendgen A, Lübbert M (2008) Current status of epigenetic treatment in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* 87:601-611
83. Kühne M (2003) Einfluss physikalischer und biologischer Faktoren auf die Reparatur strahleninduzierter DNA-Doppelstrangbrüche in menschlichen Zellen, Dissertation, Universität des Saarlandes, Saarbrücken.
84. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
85. Lavin MF, Kozlov S (2007) ATM activation and DNA damage response. *Cell Cycle* 6:931-942
86. Lieber MR (2008) The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem* 283:1-5
87. Llorca O, Rivera-Calzada A, Grantham J, Willison KR (2003) Electron microscopy and 3D reconstructions reveal that human ATM kinase uses an arm-like domain to clamp around double-stranded DNA. *Oncogene* 22:3867-3874
88. Löbrich M, Rief N, Kühne M, Heckmann M, Fleckenstein J, Rube C, Uder M (2005) In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:8984-8989
89. Lübbert M, Claus R (2007) Epigenetische Inaktivierung von Genexpression. *Onkologe* 13:46-55
90. Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389:251-260
91. Ma WW, Adjei AA (2009) Novel agents on the horizon for cancer therapy. *CA: a cancer journal for clinicians* 59:111-137
92. MacPhail SH, Banáth JP, Yu TY, Chu EH, Lambur H, Olive PL (2003) Expression of phosphorylated histone H2AX in cultured cell lines following exposure to X-rays. *Int J Radiat Biol* 79:351-358
93. Mahaney BL, Meek K, Lees-Miller SP (2009) Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J* 417:639-650
94. Mahlkecht U, Hoelzer D (2000) Histone acetylation modifiers in the pathogenesis of malignant disease. *Mol Med* 6:623-644
95. Mahlkecht U, Hoelzer D (2003) [Epigenetic regulators as novel therapeutic targets in hematology/oncology]. *Dtsch Med Wochenschr* 128:2423-2426
96. Mai A, Valente S, Nebbioso A, Simeoni S, Ragno R, Massa S, Brosch G, De Bellis F, Manzo F, Altucci L (2009) New pyrrole-based histone deacetylase inhibitors: Binding mode, enzyme- and cell-based investigations. *Int J Biochem Cell Biol* 41:235-247

97. Marchion DC, Bicaku E, Daud AI, Sullivan DM, Munster PN (2005) Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. *Cancer Research* 65:3815-3822
98. Marková E, Schultz N, Belyaev IY (2007) Kinetics and dose-response of residual 53BP1/gamma-H2AX foci: co-localization, relationship with DSB repair and clonogenic survival. *Int J Radiat Biol* 83:319-329
99. Marks PA, Breslow R (2007) Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nat Biotechnol* 25:84-90
100. Massa S, Mai A, Sbardella G, Esposito M, Ragno R, Loidl P, Brosch G (2001) 3-(4-aryloxy-1H-pyrrol-2-yl)-N-hydroxy-2-propenamides, a new class of synthetic histone deacetylase inhibitors. *J Med Chem* 44:2069-2072
101. Mathers CD, Loncar D (2006) Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 3:e442
102. Matsumoto M, Yaginuma K, Igarashi A, Imura M, Hasegawa M, Iwabuchi K, Date T, Mori T, Ishizaki K, Yamashita K, Inobe M, Matsunaga T (2007) Perturbed gap-filling synthesis in nucleotide excision repair causes histone H2AX phosphorylation in human quiescent cells. *J Cell Sci* 120:1104-1112
103. Meador KJ, Baker GA, Browning N, Clayton-Smith J, Combs-Cantrell DT, Cohen M, Kalayjian LA, Kanner A, Liporace JD, Pennell PB, Privitera M, Loring DW, Group NS (2009) Cognitive function at 3 years of age after fetal exposure to antiepileptic drugs. *N Engl J Med* 360:1597-1605
104. Morrison AJ, Highland J, Krogan NJ, Arbel-Eden A, Greenblatt JF, Haber JE, Shen X (2004) INO80 and gamma-H2AX interaction links ATP-dependent chromatin remodeling to DNA damage repair. *Cell* 119:767-775
105. Mortusewicz O, Schermelleh L, Walter J, Cardoso MC, Leonhardt H (2005) Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:8905-8909
106. Munshi A, Kurland JF, Nishikawa T, Tanaka T, Hobbs ML, Tucker SL, Ismail S, Stevens C, Meyn RE (2005) Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair activity. *Clin Cancer Res* 11:4912-4922
107. Notari RE, DeYoung JL (1975) Kinetics and mechanisms of degradation of the antileukemic agent 5-azacytidine in aqueous solutions. *Journal of pharmaceutical sciences* 64:1148-1157
108. Novik KL, Spinelli JJ, Macarthur AC, Shumansky K, Sipahimalani P, Leach S, Lai A, Connors JM, Gascoyne RD, Gallagher RP, Brooks-Wilson AR (2007) Genetic variation in H2AFX contributes to risk of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16:1098-1106
109. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99:247-257
110. Olive PL, Banáth JP (2004) Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58:331-335
111. Ornoy A (2009) Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus? *Reprod Toxicol* 28:1-10

112. Pali SS, Van Emburgh BO, Sankpal UT, Brown KD, Robertson KD (2008) DNA methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine induces reversible genome-wide DNA damage that is distinctly influenced by DNA methyltransferases 1 and 3B. *Molecular and Cellular Biology* 28:752-771
113. Panchuk-Voloshina N, Haugland RP, Bishop-Stewart J, Bhalgat MK, Millard PJ, Mao F, Leung W, Haugland RP (1999) Alexa Dyes, a Series of New Fluorescent Dyes that Yield Exceptionally Bright, Photostable Conjugates. *J Histochem Cytochem* 47:1179-1188
114. Pandita TK, Richardson C (2009) Chromatin remodeling finds its place in the DNA double-strand break response. *Nucleic Acids Research*
115. Papeleu P, Loyer P, Vanhaecke T, Elaut G, Geerts A, Guguen-Guillouzo C, Rogiers V (2003) Trichostatin A induces differential cell cycle arrests but does not induce apoptosis in primary cultures of mitogen-stimulated rat hepatocytes. *J Hepatol* 39:374-382
116. Patties I, Jahns J, Hildebrandt G, Kortmann R-D, Glasow A (2009) Additive effects of 5-aza-2'-deoxycytidine and irradiation on clonogenic survival of human medulloblastoma cell lines. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Röntgengesellschaft [et al]* 185:331-338
117. Pilch DR, Sedelnikova OA, Redon C, Celeste A, Nussenzweig A, Bonner WM (2003) Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. *Biochem Cell Biol* 81:123-129
118. Ramsahoye BH, Biniszkievicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, Jaenisch R (2000) Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:5237-5242
119. Rehm H (2006) *Proteinbiochemie / Proteomics*. Elsevier, München.
120. Reuvers AP, Greenstock CL, Borsa J, Chapman JD (1973) Letter: Studies on the mechanism of chemical radioprotection by dimethyl sulphoxide. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 24:533-536
121. 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. *Molecular Cell* 16:715-724
122. Richon VM, Emiliani S, Verdin E, Webb Y, Breslow R, Rifkind RA, Marks PA (1998) A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3003-3007
123. Richon VM, Webb Y, Merger R, Sheppard T, Jursic B, Ngo L, Civoli F, Breslow R, Rifkind RA, Marks PA (1996) Second generation hybrid polar compounds are potent inducers of transformed cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5705-5708
124. Riggs MG, Whittaker RG, Neumann JR, Ingram VM (1977) n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells. *Nature* 268:462-464
125. Rodriguez M, Yu X, Chen J, Songyang Z (2003) Phosphopeptide binding specificities of BRCA1 COOH-terminal (BRCT) domains. *J Biol Chem* 278:52914-52918
126. Rogakou EP, Boon C, Redon CE, Bonner WM (1999) Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 146:905-916

127. 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
128. Rosato RR, Almenara JA, Grant S (2003) The histone deacetylase inhibitor MS-275 promotes differentiation or apoptosis in human leukemia cells through a process regulated by generation of reactive oxygen species and induction of p21CIP1/WAF1 1. *Cancer Research* 63:3637-3645
129. Roth SY, Denu JM, Allis CD (2001) Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 70:81-120
130. Rothkamm K, Balroop S, Shekhdar J, Fernie P, Goh V (2007) Leukocyte DNA damage after multi-detector row CT: a quantitative biomarker of low-level radiation exposure. *Radiology* 242:244-251
131. Rothkamm K, Löbrich M (2003) Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:5057-5062
132. Rube CE, Grudzenski S, Kühne M, Dong X, Rief N, Löbrich M, Rube C (2008) DNA double-strand break repair of blood lymphocytes and normal tissues analysed in a preclinical mouse model: implications for radiosensitivity testing. *Clin Cancer Res* 14:6546-6555
133. Ruefli AA, Ausserlechner MJ, Bernhard D, Sutton VR, Tainton KM, Kofler R, Smyth MJ, Johnstone RW (2001) The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10833-10838
134. Saenger W (1984) Principles of nucleic acid structure. Springer, Berlin/Heidelberg/New York.
135. Sandoval N, Platzer M, Rosenthal A, Dörk T, Bendix R, Skawran B, Stuhmann M, Wegner RD, Sperling K, Banin S, Shiloh Y, Baumer A, Bernthaler U, Sennfelder H, Brohm M, Weber BH, Schindler D (1999) Characterization of ATM gene mutations in 66 ataxia telangiectasia families. *Hum Mol Genet* 8:69-79
136. Santi DV, Norment A, Garrett CE (1984) Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:6993-6997
137. Santos-Rosa H, Caldas C (2005) Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer* 41:2381-2402
138. Sato T, Friend C, De Harven E (1971) Ultrastructural changes in Friend erythroleukemia cells treated with dimethyl sulfoxide. *Cancer Research* 31:1402-1417
139. Saunders N, Dicker A, Popa C, Jones S, Dahler A (1999) Histone deacetylase inhibitors as potential anti-skin cancer agents. *Cancer Research* 59:399-404
140. Schatz DG, Spanopoulou E (2005) Biochemistry of V(D)J recombination. *Curr Top Microbiol Immunol* 290:49-85
141. Schmitz S (2007) Zellkultur. Elsevier, München.
142. Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A, Halazonetis TD (2000) p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* 151:1381-1390

143. Singh G, Driever PH, Sander JW (2005) Cancer risk in people with epilepsy: the role of antiepileptic drugs. *Brain* 128:7-17
144. Smith GC, Cary RB, Lakin ND, Hann BC, Teo SH, Chen DJ, Jackson SP (1999) Purification and DNA binding properties of the ataxia-telangiectasia gene product ATM. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:11134-11139
145. Smith LT, Otterson GA, Plass C (2007) Unraveling the epigenetic code of cancer for therapy. *Trends Genet* 23:449-456
146. Sonnemann J, Gänge J, Pilz S, Stötzer C, Ohlinger R, Belau A, Lorenz G, Beck JF (2006) Comparative evaluation of the treatment efficacy of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) and paclitaxel in ovarian cancer cell lines and primary ovarian cancer cells from patients. *BMC Cancer* 6:183
147. Sorm F, Pískala A, Cihák A, Veselý J (1964) 5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. *Experientia* 20:202-203
148. Stewart GS, Wang B, Bignell CR, Taylor AM, Elledge SJ (2003) MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature* 421:961-966
149. Stoilov L, Darroudi F, Meschini R, van der Schans G, Mullenders LH, Natarajan AT (2000) Inhibition of repair of X-ray-induced DNA double-strand breaks in human lymphocytes exposed to sodium butyrate. *Int J Radiat Biol* 76:1485-1491
150. Stokes GG (1880-1905) *Mathematical and Physical Papers*. Vol I-V Cambridge University Press, Cambridge.
151. Stresemann C, Lyko F (2008) Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int J Cancer* 123:8-13
152. Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP (2005) MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* 123:1213-1226
153. Suzuki T, Nagano Y, Matsuura A, Kohara A, Ninomiya S, Kohda K, Miyata N (2003) Novel histone deacetylase inhibitors: design, synthesis, enzyme inhibition, and binding mode study of SAHA-based non-hydroxamates. *Bioorg Med Chem Lett* 13:4321-4326
154. Thompson LH, Schild D (2002) Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat Res* 509:49-78
155. Ungerstedt JS, Sowa Y, Xu WS, Shao Y, Dokmanovic M, Perez G, Ngo L, Holmgren A, Jiang X, Marks PA (2005) Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:673-678
156. van Attikum H, Fritsch O, Hohn B, Gasser SM (2004) Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair. *Cell* 119:777-788
157. Villar-Garea A, Esteller M (2004) Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents. *Int J Cancer* 112:171-178

158. Voelter-Mahlknecht S, Ho AD, Mahlkecht U (2005) Chromosomal organization and localization of the novel class IV human histone deacetylase 11 gene. *Int J Mol Med* 16:589-598
159. Voelter-Mahlknecht S, Mahlkecht U (2006) Cloning, chromosomal characterization and mapping of the NAD-dependent histone deacetylases gene sirtuin 1. *Int J Mol Med* 17:59-67
160. Wahhab A, Smil D, Ajamian A, Allan M, Chantigny Y, Therrien E, Nguyen N, Manku S, Leit S, Rahil J, Petschner AJ, Lu AH, Nicolescu A, Lefebvre S, Montcalm S, Fournel M, Yan TP, Li Z, Besterman JM, Déziel R (2009) Sulfamides as novel histone deacetylase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 19:336-340
161. Walker JR, Corpina RA, Goldberg J (2001) Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 412:607-614
162. Wannemacher M, Debus J, Wenz F (2006) *Strahlentherapie*. Springer, Heidelberg.
163. Ward IM, Minn K, Jorda KG, Chen J (2003) Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX. *J Biol Chem* 278:19579-19582
164. Watson JD, Crick FH (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171:737-738
165. Whitby MC (2005) Making crossovers during meiosis. *Biochem Soc Trans* 33:1451-1455
166. Witt O, Deubzer H, Milde T, Oehme I (2008) HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Letters*
167. Wu TY, Hassig C, Wu Y, Ding S, Schultz PG (2004) Design, synthesis, and activity of HDAC inhibitors with a N-formyl hydroxylamine head group. *Bioorg Med Chem Lett* 14:449-453
168. Wykes SM, Piasentin E, Joiner MC, Wilson GD, Marples B (2006) Low-dose hyper-radiosensitivity is not caused by a failure to recognize DNA double-strand breaks. *Radiat Res* 165:516-524
169. Wyman C, Kanaar R (2006) DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu Rev Genet* 40:363-383
170. Wyman C, Warmerdam DO, Kanaar R (2008) From DNA end chemistry to cell-cycle response: the importance of structure, even when it's broken. *Molecular Cell* 30:5-6
171. Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA (2007) Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 26:5541-5552
172. Yang XJ, Seto E (2008) The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:206-218
173. Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T (1990) Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem* 265:17174-17179
174. Zhou X, Marks PA, Rifkind RA, Richon VM (2001) Cloning and characterization of a histone deacetylase, HDAC9. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10572-10577

- 
175. Ziv Y, Bielopolski D, Galanty Y, Lukas C, Taya Y, Schultz DC, Lukas J, Bekker-Jensen S, Bartek J, Shiloh Y (2006) Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nat Cell Biol* 8:870-876
176. Zschoernig B, Mahlknecht U (2008) SIRTUIN 1: regulating the regulator. *Biochem Biophys Res Commun* 376:251-255



## 7 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Purrucker JC, Fricke A, Ong MF, Rübe C, Rübe CE, Mahlknecht U (2010) HDAC inhibition radiosensitizes human normal tissue cells and reduces DNA double-strand break repair capacity. *Oncol Rep* 23:263-269

## 8 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Ulrich Mahlknecht, PhD, im José Carreras Zentrum in Kooperation mit dem Labor für molekulare Strahlenonkologie unter der Leitung von Frau PD Dr. Claudia E. Rube in Homburg (Saar) angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ulrich Mahlknecht, PhD, für die Überlassung des Dissertationsthemas und die stets überaus freundliche, kompetente und schnelle Betreuung während der gesamten Promotionszeit. Er ermöglichte mir tiefe Einblicke in das wissenschaftliche Denken und Arbeiten und in modernste molekularbiologische Arbeitstechniken. Ich habe viel durch ihn gelernt.

Ebenso gilt ganz besonderer Dank Frau PD Dr. Claudia E. Rube, die mich ebenso kompetent unterstützte, mir die nicht selbstverständliche Integration in ihre Arbeitsgruppe ermöglichte und immer für Fragen offen war.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Fricke bedanken, mit dem ich nicht nur bis spät nachts wissenschaftliche Fragestellungen diskutieren konnte, sondern den ich auch als absolut zuverlässigen und hilfsbereiten Menschen sehr schätzen gelernt habe.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Kühne, der bis zu seinem beruflichen Wechsel sehr hilfreiche Anregungen gegeben hat und für Fragestellungen jederzeit offen war.

Ein großes Dankeschön gehört auch Frau Daniela Ludwig, auf deren großen Erfahrungsschatz in Immunfluoreszenz-Techniken ich jederzeit zurückgreifen konnte.

Stets unbürokratische Unterstützung erhielt ich auch aus der AG Roemer, daher an dieser Stelle auch ein besonderer Dank an Frau Dr. Kristina Heyne.

Bedanken möchte ich mich auch bei Christian Dransfeld, der mir fachlich und menschlich immer zur Seite stand und mit dem ich Freud und Leid des Laboralltags teilte.

Dominic Braunagel danke ich ganz besonders für seine Bereitschaft mich in die Technik der Histonisolierung einzuführen. Es war eine Freude mit ihm zusammenzuarbeiten.

An dieser Stelle sei auch Indra-Navina Dahmke ganz herzlich für die kritische Durchsicht dieser Arbeit gedankt.

Alle Mitarbeiter des José Carreras Zentrums, der Hämato-/Onkologie, wie auch aus dem Labor für molekulare Strahlenonkologie standen mir stets mit Rat und Tat zur Seite und motivierten mich auch nach fehlgeschlagenen Experimenten immer wieder. Sie alle trugen zu dem freundlichen und lustigen Arbeitsklima bei.

Dank gilt auch Herrn PD Dr. S. Gräber, sowie Frau Dr. Ong aus dem Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik für die Unterstützung bei der Erstellung der statistischen Auswertung.

Ohne meine Familie, die mich immer motivierend auch während schwieriger Phasen unterstützte, wäre diese Arbeit allerdings nie zu Stande gekommen. Nicht zuletzt auch durch ihre finanzielle Unterstützung sind mir erst Studium, Auslandsaufenthalt und Promotion möglich geworden.

Bei meiner Freundin Gretel möchte ich mich ganz besonders für ihr großes Verständnis und ihren Verzicht auf so manche gemeinsame Stunde bedanken. Auch in schwierigsten Phasen der Arbeit konnte ich immer auf ihren Rückhalt vertrauen.

## 9 Lebenslauf

### Jan Christoph Purrucker

Geburtsdatum/-ort: 04. 05. 1982 in Göttingen  
 Familienstand: ledig

#### Schullaufbahn

1988 – 1993 Vorschule und Grundschule in Wohltorf  
 1993 – 2002 Gymnasium in Wentorf b. Hamburg

#### Zivildienst

09/2002 – 06/2003 Internistische Notaufnahme  
 Krankenhaus Reinbek St. Adolf-Stift

#### Studium

10/2003 – 05/2010 Medizinstudium an der Universität des Saarlandes  
 Medizinische Fakultät Homburg (Saar)  
 09/2005 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 08/2006 – 09/2007 Studium an der Universität de València, Spanien  
 ca. 05/2010 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

#### Famulaturen

Innere Medizin: Kardiologie, Pneumologie  
 Asklepios Klinik Wandsbek, Hamburg (2006)  
 Herzchirurgie: Blockkurs in Herzchirurgie  
 Cardiocentro Ticino, Lugano, Schweiz (2006)  
 Unfallchirurgie: Traumatología  
 Hospital General de Valencia, Spanien (2007)  
 Strahlentherapie: Ambulanz der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie  
 Universitätsklinikum des Saarlandes (2008)  
 Innere Medizin: Hämato-/Onkologie  
 Universitätsklinikum des Saarlandes (2008)

#### Praktisches Jahr

Universitätsklinikum des Saarlandes (02/2009 – 01/2010)  
 Wahlfach: Neurologie

#### Dissertation

Beginn 10/2007 Prof. Dr. U. Mahlkecht, PhD, José Carreras Zentrum für Immun-  
 und Gentherapie in Kooperation mit  
 PD Dr. C. Rube, Labor für molekulare Radioonkologie