

## Abstract

Locker ionisierende Strahlung deponiert Energie einerseits in einzelnen Ionisations-Ereignissen, andererseits aber auch in räumlich zusammenhängenden Ionisations-Ereignissen die als spurs and blobs bekannt sind. Treten solche Ionisationen in der Nähe der DNA auf, so werden multiple Läsionen innerhalb einiger Basenpaare (komplexe Läsionen) induziert, wobei sowohl Basen- als auch Zucker-Reste beschädigt werden. Diese Ereignisse sind stark auf die Bahnsuren der entsprechenden ionisierenden Teilchen begrenzt. Die Distanz zwischen aufeinanderfolgenden Ionisationen variiert zufällig entlang der Bahn des Teilchens und nimmt ab sobald das Teilchen sich verlangsamt und zu einem Halt kommt. Durch die starke Akkumulation von Ionisationen am Ende der Elektronensuren werden komplexe DNA Schäden erzeugt, die nur schwer reparierbar sind und deshalb maßgeblich zu den beobachteten negativen Folgen der Bestrahlung führen. Der DNA Doppelstrangbruch (DSB) ist die einfachste Form einer solchen komplexen Läsion. DSBs werden generiert, wenn zwei Ionisationen, oder durch Strahlung induzierte Radikale, in unmittelbarer Nähe den Zucker Phosphat Rückrat beider DNA Stränge zerstören. Wenn die Komplexität durch weitere Läsionen in der Nähe der DSBs weiter erhöht wird, erhöht sich auch das Risiko für biologische Konsequenzen. Solche komplexen Läsionen werden gegenwärtig sehr intensiv untersucht auch weil man vermutet dass die erhöhte Wirksamkeit von hoch LET Strahlung durch ihrer Induktion verursacht wird.

Eine weitere Dimension an Komplexität und ein besonders erhöhtes Risiko für biologische Konsequenzen wird erzeugt, falls zwei (oder mehrere) DSBs in unmittelbarer Nähe induziert werden, da dies zur kompletten Destabilisierung des Chromatins und zum Verlust von DNA führen könnte, welche die bekannten DNA Reparaturwege zu bewältigen nicht in der Lage sind. Obwohl diese Form von komplexen Läsionen in der Vergangenheit diskutiert wurden, gibt es bis heute keine mechanistischen Studien welche es ermöglichen deren biologischen Konsequenzen zu analysieren.

*In vitro* Manipulation der Plasmid DNA ermöglicht die Erzeugung von DSBs mit unterschiedlichen aber gut definierten Enden, meistens erzeugt durch die Behandlung mit entsprechenden Kombinationen von Restriktions Endonukleasen. Während diese

Testsysteme wichtige Aspekte von D-NHEJ rekapitulieren, haben mehrere Berichte gezeigt, dass in einer Vielzahl von D-NHEJ Mutanten diese Systeme es nicht schaffen die beobachtete Reduktion der DNA End-Verknüpfungs-Effizienz von genomischen DSBs zu reproduzieren. Dies deutet darauf hin, dass hauptsächlich die Funktion von B-NHEJ reflektiert wird.

In Vorbereitung für die oben erwähnten Studien von komplexen Läsionen haben wir auch die Effekte der Transfektion auf die Selektion des Reparaturweges hin untersucht. Wir haben herausgefunden, dass während Elektroporation Plasmid-End-Verknüpfung Ergebnisse in unterschiedlichen Mutanten hervorbringt, welche der Verknüpfung von genomischen DSBs sehr ähnlich sind, haben durch Lipofektion gewonnen Ergebnisse eine fast wild typ Effizienz für Plasmid-End-Verknüpfung in D-NHEJ Mutanten gezeigt. Wir konnten dabei zeigen, dass die subzelluläre Lokalisation der transfizierten Plasmide diese Unterschiede verursacht.

Mit dieser Information haben wir Studien durchgeführt um die Hypothese zu testen, dass das Clustering von DSBs mit einer Distanz, welche die nucleosomale oder lokale Chromatin Stabilität schädigt, besonders lethal für die Zelle ist. Anstatt die Energiedeposition und die allgemeinen Charakteristiken von geclusterten Schäden mathematisch zu modellieren und dieses Modell mit gemessenen biologischen Schäden zu korrelieren, modellieren wir hier die biologische Läsion in einer besonders spezifischen Weise, indem wir die möglichen Kandidat-Läsionen eingrenzen und die biologischen Schlüsselereignisse testen. Diese Herangehensweise hat den Vorteil, dass es die Charakterisierung der generellen Eigenschaften der durch Strahlung induzierter Läsionen, die Mutationen und Zell Läsionen verursachen, ermöglicht.

Wir beschreiben Model Systeme, in welchen geclusterte DSBs im Genom von humanen A549 Tumor Zellen durch die enzymatische Restriktion von I-SceI Erkennungsstellen, integriert in unterschiedlichen Kombinationen und an multiplen Stellen mit Hilfe der Transposon Technology, induziert werden.

Um unterschiedliche Komplexität zu erzeugen, haben wir Transposon basierte Konstrukte generiert, mit einer und zwei I-SceI Erkennungsstellen die 200bp voneinander getrennt, in kompatibler und nicht kompatibler Orientierung gesetzt waren. Der eingesetzte Vektor beinhaltet das neo<sup>R</sup> Gen als selektierbaren Marker.

Die Integration des Plasmids an multiplen Stellen wird anhand der Co Expression der hyperaktiven Transposase, reaktiviert von dem „Sleeping Beauty Transposon“, gewährleistet. Die Anzahl der Integrationsstellen von zufällig selektierten G418 resistenten Klonen wird mit Hilfe von Southern Blots gemessen. Bestände werden angelegt mit Klonen, die 3-12 Integrationen für alle Kombinationen an DSBs aufweisen.

Mit diesen Klonen wurde sowohl das Zell Überleben als Koloniebildungsvermögen, als auch Chromosomen Aberration Formation, einhergehend mit anderen Techniken wie mitotischem Index, G2-Checkpoint Aktivierung und die Induktion von EGFP-53BP1 Foci, gemessen. Die Ergebnisse weisen eine Korrelation zwischen der Komplexität der Läsion und dem Zelltod auf. Weiterhin wurden Anhaltspunkte für die Checkpoint-Aktivierung und Chromosomen Aberration Bildung erlangt, aber die Analyse dieser Endpunkte wurde erschwert aufgrund der apoptotischen Antwort des erzeugten Systems. Weitere Versuche sind notwendig um das Potential dieses Modellsystems auszuschöpfen und es als Model für die Untersuchung von Strahlen induzierten Schäden einzusetzen.

Schlüsselwörter: **Ionisierende Strahlung, Transposon, Komplexe Läsionen, LET, Nucleofektion, Lipofektion, Chromatin, D-NHEJ und B-NHEJ.**