

# **Nanoskopische Charakterisierung von strahlungsinduzierten DNA Schäden im Kontext der Chromatinstruktur und Reparaturproteinorganisation**

Benjamin Maximilian Schwarz M.Sc.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Luft- und Raumfahrttechnik der Universität der Bundeswehr München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Gutachter/Gutachterin:

1. Univ. -Prof. Dr. rer. nat. Judith Reindl

2. PD Dr. Steffen Dietzel, LMU

Die Dissertation wurde am 23.06.2020 bei der Universität der Bundeswehr München eingereicht und durch die Fakultät für Luft und Raumfahrttechnik am 19.02.2021 angenommen. Die mündliche Prüfung fand am 19.03.2021 statt.

# Zusammenfassung

Ionisierende Strahlung und durch diese induzierte DNA Doppelstrangbrüche (DSB) gehören zu den alltäglichen Belastungen eines Organismus. Jede Zelle besitzt verschiedene Reparaturmechanismen, um dieser gesundheitlichen Bedrohung zu begegnen. Jedoch birgt ionisierende Strahlung auch potentiell wichtige medizinische Anwendungen wie beispielsweise Strahlentherapie zur Behandlung von Tumorerkrankungen. Die Erforschung der zu Grunde liegenden DNA-Reparaturprozesse ermöglicht es hierbei nicht nur in Zukunft einen besseren Schutz vor ionisierender Strahlung zu ermöglichen, sondern die gezielte Anwendung von Strahlung im medizinischen Rahmen noch effizienter zu gestalten. Hierfür ist nicht nur die Identifikation einzelner DNA-Reparaturproteine und die Quantifizierung des induzierten Schadens wichtig, sondern auch die Lokalisation des Schadens im Kontext des Chromatins hilft dabei, die Reparaturprozesse besser zu verstehen und medizinische Ansätze zu optimieren. Diese Arbeit beschäftigt sich mit drei Hauptaspekten zur Charakterisierung von DSB-Reparaturmechanismen. Es konnte eine neue Methode zur quantitativen Messung von hoch-LET (Linearer Energietransfer) induzierten Strahlenschäden entwickelt und der dazugehörige Grundsatzbeweis erbracht werden. Durch In-Situ Ligationsverfahren in Kombination mit In-Situ DNA-Blunting, war es möglich, so genannte DNA Oligo Sonden, bestehend aus kurzen einzelsträngigen DNA-Sequenzen, welche sich in Lösung zu Haarnadelstrukturen ausbilden, mit Fluorophoren zu koppeln und spezifisch an Doppelstrangbrüche zu binden. Die reduzierte Größe und das reduzierte Bindestellenvorkommen ermöglicht hierbei eine genaue und verlässliche DSB Detektion mittels STED-Mikroskopie (eng. Stimulated Emission Depletion). Des Weiteren war es durch Bestrahlungsexperimente mit fokussierten Kohlenstoffionen möglich, nicht nur die grundlegendsten Reaktionen des Chromatins auf Bestrahlung mit hoch-LET Strahlung auszulösen und durch Lebendzellmikroskopie zu dokumentieren, sondern diese Chromatinremodellierungsprozesse auch zeitlich ab wenigen Sekunden bis mehreren Minuten nach Bestrahlung zu beobachten und mit Charakteristika mehrerer Reparaturproteine zu vergleichen. Ebenso war es möglich, durch die höchstauflösende Analyse von Überschneidungsbereichen der DNA-Reparaturproteine BRCA1, Rad51, 53BP1,  $\gamma$ H2AX und Bestandteile des Chromatins, ein detailliertes Modell zur DNA-Reparatur im Kontext der Chromatinorganisation und

im Einklang neuester Chromatinorganisationsmodelle, aufzustellen. Zusätzlich konnte im Laufe dieser Arbeit erstmals mittels  $\alpha$  - Bestrahlung von Zellkernen eine Migration von schwer reparierbaren DSB-Reparaturstellen vom Zellkerninneren zur Zellkernhülle und dort vermutlich zu spezialisierten Reparaturzentren dokumentiert und mittels STED-Mikroskopie zeitlich in existierende DSB-Reparaturprozesse eingeordnet werden.

# Abstract

Ionizing radiation and DNA double-strand breaks (DSB) induced by radiation are part of the everyday stresses of an organism. Every cell has different repair mechanisms to counteract this health threat. However, ionizing radiation also offers potentially important medical applications such as radiation therapy for the treatment of tumours. Researching the underlying DNA repair processes not only makes it possible to provide better protection against ionizing radiation in the future, but also to make the targeted use of radiation in medical settings even more efficient. Not only the identification of individual DNA repair proteins and the quantification of the induced damage is important, but also the localization of the damage in the context of chromatin helps to better understand the repair processes and to optimize medical approaches. This work focuses on three main aspects for the characterization of DSB repair mechanisms. A new method for the quantitative measurement of high-LET (Linear Energy Transfer) induced radiation damage was developed and the corresponding proof of principle was provided. Using in situ ligation techniques in combination with in situ DNA blunting, it was possible to couple so-called DNA oligo probes, consisting of short single-stranded DNA sequences that form hairpin structures in solution, with fluorophores and specifically bind them to double-strand breaks. The reduced size and the reduced number of binding sites allows an accurate and reliable DSB detection using STED microscopy (Stimulated Emission Depletion). In addition, irradiation experiments with focused carbon ions made it possible not only to trigger the most basic reactions of chromatin to irradiation with high-LET radiation and to document them by live cell microscopy, but also to observe these chromatin remodeling processes from a few seconds to several minutes after irradiation and to compare them with characteristics of several repair proteins. It was also possible to establish a detailed model for DNA repair in the context of chromatin organisation and in accordance with the latest chromatin organisation models by the high-resolution analysis of overlapping regions of the DNA repair proteins BRCA1, Rad51, 53BP1,  $\gamma$ H2AX and components of the chromatin. In addition, in the course of this work,  $\alpha$  - irradiation of cell nuclei - was used for the first time to document a migration of difficult to repair DSB repair sites from the cell nucleus interior to the cell nucleus envelope and presumably to specialized repair centers. Also, it was possible to match them temporally into existing DSB repair processes using STED microscopy.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Biologischer Hintergrund .....	6
2.1	Chromatin Organisation.....	9
2.2	DNA-Reparatur.....	12
2.3	Die Wahl des Reparaturmechanismus .....	13
2.4	Nicht Homologe Endenverknüpfung .....	15
2.5	Homologe Rekombination .....	18
2.6	Alternative Reparaturwege .....	20
2.7	Chromatinmobilität und DNA Reparatur .....	21
2.8	Reparaturmarker .....	24
3	Ionisierende Strahlung .....	31
3.1	Wechselwirkung von Ionen mit Materie .....	31
3.2	DSB Induktion durch ionisierende Strahlung .....	34
3.2.1	Direkte DSB Induktion.....	34
3.2.2	Indirekte DSB Induktion .....	35
3.3	Relative biologische Wirksamkeit .....	37
4	Mikroskopie und Datenverarbeitung.....	38
4.1	Fluoreszenz.....	38
4.2	Fluoreszenzmikroskopie.....	41
4.3	Optische Auflösung .....	42
4.4	Konfokale Mikroskopie .....	45
4.5	STED Mikroskopie.....	46
4.6	STED Prinzip.....	47
4.7	Auflösungsverbesserung durch Entfaltung .....	53
4.8	Cross-Talk .....	55
4.9	Immunfluoreszenzfärbung .....	56
4.10	Lebendzellmikroskopie.....	58
5	Aufbau und Funktion der verwendeten Bestrahlungsquellen .....	59
5.1	$\alpha$ - Quelle .....	59
5.2	Teilchenbeschleuniger.....	61
5.3	Supraleitendes Nanoskop für angewandte kernphysikalische Experimente (SNAKE).....	63
5.3.1	Lebendzellbestrahlung .....	63
5.3.2	Schrägbestrahlung.....	65

6	Experimentablauf .....	67
6.1	Bestrahlung .....	67
6.1.1	$\alpha$ -Bestrahlung .....	67
6.1.2	Schrägbestrahlung an SNAKE .....	67
6.1.3	Lebendzellbestrahlung .....	68
6.1.4	Strahlendosisberechnung .....	70
6.2	Zellpräparation.....	72
6.2.1	Durchführung der Zellaussaat.....	72
6.2.2	Zellfixierung.....	72
6.2.3	Immunfluoreszenzfärbung.....	72
6.2.4	Chromatin-Färbung durch EdU .....	76
6.2.5	Zellfärbung bei Lebendzellmikroskopie .....	76
6.3	Zelllinienpräparation für Lebendzellmikroskopie.....	78
6.3.1	Zelllinienpräparation und Transfektion .....	78
6.3.2	Zelllinientests .....	82
7	Datenaufnahme .....	88
7.1	STED-Mikroskopie fixierter Zellen .....	88
7.2	Lebendzellmikroskopie mittels STED .....	88
7.3	Lebendzellmikroskopie an SNAKE .....	89
7.4	Fluorophore .....	91
7.5	Entfaltung .....	91
8	Direktes Zählen von DNA Doppelstrangbrüchen .....	92
8.1	In Situ Ligation.....	93
8.2	Etablierung der Oligonukleotid Sonden Färbung zur DSB Detektion.....	95
9	Chromatinmobilität und Foci Migration.....	107
9.1	Reparaturstellenbildung und Chromatinbeweglichkeit.....	108
9.2	Foci Migration.....	115
9.3	DSB-Reparatur im Kontext der Chromatin-Struktur.....	122
9.4	Diskussion der Ergebnisse .....	132
9.4.1	Chromatinbeweglichkeit.....	132
9.4.2	Foci Migration .....	136
9.4.3	DSB Reparatur im Kontext der Chromatin Struktur.....	139
10	Ausblick .....	144
11	Anhang .....	146
12	Quellen .....	150
13	Danksagung.....	169

# 1 Einleitung

Sämtliche Materie in unserem bekannten Universum ist nach demselben Prinzip aufgebaut. Sie besteht aus einer Anordnung von Atomen. Die Kerne der Atome unterliegen entweder einem Zerfallsprozess, sind also instabil oder es wurde noch kein Zerfall festgestellt und werden daher als stabil bezeichnet. Instabile Atomkerne verlieren bei diesem Zerfall Energie und geben diese in Form von Strahlung an ihre Umgebung ab. Durch diesen radioaktiven Zerfall sind sämtliche Organismen auf der Erde stetig radioaktiver Strahlung ausgesetzt, welche durch ihre Umgebung, durch Luft, das umgebende Gestein und die Nahrung aufgenommen werden. Strahlung geht jedoch nicht nur von unserer Erde aus. Auch kosmische Strahlung stellt eine Belastung für uns Menschen dar. Hochenergetische Teilchen, meist bestehend aus Protonen und Elektronen, gehen von der Sonne und anderen Sternen aus und treffen mit einer höhenabhängigen Dosis auf die Erdoberfläche auf. Dabei ist die jährliche Strahlenbelastung für Flugpersonal mit 1,96 mSv/a zusätzlich zur Grundstrahlenbelastung ein ernst zu nehmendes Gesundheitsrisiko. Die stetige Strahlenexposition wird auch als Hintergrundstrahlung bezeichnet und ihre Dosis für den Menschen liegt in Deutschland im Mittel bei 2,4 mSv/a. Vergleichsweise setzt eine computertomographische Untersuchung (CT) des Abdomens den Patienten, nach Angaben des Bundesamts für Strahlenschutz, einer einmaligen Strahlendosis von 8-20 mSv aus. Der Schwellenwert zu akuten Strahlenschäden der Haut liegt bei ungefähr 500 mSv nach einmaliger Exposition. Eine einmalige Exposition wie im Falle der Reaktorunfälle 1986 in Tschernobyl oder 2011 in Fukushima setzt die betroffenen Personen also erheblichen gesundheitlichen Risiken aus und selbst heute ist die Angst der Bevölkerung vor Reaktorunglücken im grenznahen Ausland nicht zu unterschätzen. Strahlenexposition kann dabei nicht nur zu akuten Gewebsschädigungen und Strahlenkrankheit (engl.: Acute Radiation Syndrom; ARS)) führen, sondern auch das Krebsrisiko erheblich steigern. Schädigungen des Genoms können dazu führen, dass Zellen die Kontrolle über ihre eigene Proliferation verlieren und sich unkontrolliert teilen. Krebs entsteht. Nachdem ein lebender Organismus radioaktiver Strahlung ausgesetzt war, ist es für die Medizin schwierig, die genauen Folgen, sei es kurz- oder langfristig, für den Körper festzustellen oder gar Rückschlüsse über die Art und Dosis der Strahlung zu geben. Handelt es sich um eine strahlenüberwachte Person, welche stets ein physikalisches Dosimeter mit sich führt,

wäre dies unproblematisch nachvollziehbar, ohne Messgeräte ist man jedoch auf biologische Untersuchungsmethoden angewiesen. Die Biodosimetrie beschäftigt sich wie die physikalische Dosimetrie auch mit der Messung von Reaktionen auf radioaktive Strahlung, konzentriert sich jedoch dabei auf biologische Vorgänge auf molekularem Level. Die bestehenden Messmethoden sind in der Praxis leider nur unbefriedigend praktikabel. Kommt ein Patient in ärztliche Behandlung nachdem er radioaktiver Strahlung ausgesetzt war, muss anhand physiologischer Veränderungen und der aufgenommenen Strahlendosis entsprechend medizinisch behandelt werden. Als gängige Methode zur Feststellung der Dosis werden heutzutage standardisiert DIC Assays (dicentric chromosome assays) kombiniert mit physiologischen Tests durchgeführt. Dabei werden zuerst Sub-syndrome von ARS über das Blutbild, die Versehrtheit der Haut, Störungen des Verdauungssystems und über neurologische Auffälligkeiten klassifiziert und dann die Diagnose durch gentechnische Untersuchungen der Chromosomensymmetrie verfeinert. Das Vorkommen von dizentrisch aufgebauten Chromosomen bei der Untersuchung der peripheren Lymphozyten im Blutkreislauf einer strahlenexponierten Person im Zuge eines DIC Assays kann dabei eine Sensitivität von wenigen 0,1 bis 0,2 Gy gewährleisten. Diese Genauigkeit kann jedoch nur erreicht werden, wenn bei einer zu untersuchenden Person, ungefähr 500 bis 1000 Zellen, welche sich in Metaphase befinden, beobachtet werden. Eine Zahl an Untersuchungen, welche nur mit ausreichend Zeit und Fachpersonal in speziellen Laboren und unter nicht physiologischen Bedingungen durchgeführt werden kann. Die Messmethoden beruhen auf Untersuchungen der Schädigung des Genoms einer Zelle.

Die Induktion solcher Schäden findet in der Medizin auch für therapeutische Zwecke ihre Anwendung. Im Falle von Tumorerkrankungen ist es möglich, den Tumor von außen gezielt mit einer (für Tumorzellen) letalen Strahlendosis zu versehen. Das Ziel dieser Therapie, alle Tumorzellen zu zerstören, setzt jedoch voraus, dass möglichst wenig gesundes Gewebe, das Tumorgewebe jedoch komplett bestrahlt wird. Eine Bestrahlung des gesunden Gewebes, kann zu akuten Gewebsschädigungen mit Funktionsverlust (Haarausfall, Reduktion des Drüsengewebes) der betroffenen Zellen, oder im schlimmsten Fall zur Entstehung von Sekundärtumorerkrankungen führen. Bei herkömmlicher Strahlentherapie mittels Photonen, wird das Gewebe vor und hinter dem Tumor, durch die gleichmäßige Deposition der Energie entlang der Wegstrecke durch das Gewebe ohne relevanten Geschwindigkeitsverlust in gleicher Weise



geschädigt wie der Tumor selbst. Neuste Bestrahlungsmethoden durch beschleunigte Protonen, welche mit steigender Eindringtiefe in das Gewebe und sich reduzierender Geschwindigkeit eine steigende Energiedeposition erfahren, ermöglichen neue vielversprechende Therapiemöglichkeiten. Ihre Erforschung stellt jedoch die Wissenschaft in verschiedenen Aspekten auf die Probe. Gerade bei Strahlung mit hohem linearem Energietransfer (LET) ist die Einschätzung der Wirksamkeit an Hand einer genauen quantitativen Messung der Induzierten DNA-Schäden im physiologischen Umfeld essentiell. Ein solcher Ansatz zur Detektion von Strahlenschäden und Dosisbestimmung mit größerem zeitlichem Spielraum als bei Dosimetrie anhand von DIC Assays, bietet hier die Untersuchung auf DNA-Doppelstrangbrüche. Dabei wird anhand eines standardisiert angewendeten biologischen Markers, dem DNA-Reparaturprotein  $\gamma$ H2AX, welches im flankierenden Chromatin des strahleninduzierten DSB innerhalb von Sekunden durch die Serin-Proteinkinase ATM phosphoryliert wird, ein Antikörper basiertes Detektionsprotokoll angewandt. Mittels High-Throughput-Verfahren wird hierbei die Menge der Doppelstrangbrüche pro Zelle analysiert. Die unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbaren sogenannten IRIF (engl. Ionizing Radiation Induced Foci), also Akkumulationen des Proteins  $\gamma$ H2AX, geben anhand ihrer Menge, Größe und Dichte zueinander Aufschluss über die Dosis und Art der Strahlung. Jedoch ist die Biodosimetrie mittels  $\gamma$ H2AX auch mit einigen Nachteilen verbunden. Da  $\gamma$ H2AX ein Teil der DNA DSB Reparatur der Zelle ist und  $\gamma$ H2AX Foci weite Teile der umliegenden DNA als Reparaturstelle markiert, sind einzelne DSB in direkter Nachbarschaft zueinander nicht differenzierbar. Diese Problematik kann zu besonders gravierenden Messfehlern bei Bestrahlung mit hoch-LET Strahlung führen.

Aus dieser Motivation wurde im Laufe dieser Arbeit eine Methode zur höchst aufgelösten Detektion und Quantifizierung von DSB in menschlichen Zellen entwickelt. Mittels der Kombination von In-Situ DNA-Blunting, also der künstlichen Erzeugung von glatten DSB-Bruchstellen im Zellkern der Zelle, und In-Situ Ligation, dem Koppeln von so genannten fluoreszenten DNA-Oligo-Sonden an den DSB, wurde es möglich, Doppelstrangbrüche selektiv und mit höherer Genauigkeit mittels höchstauflösender STED Mikroskopie zu detektieren.

Jedoch ist die Dosismessung allein für die Entwicklung neuer Therapiemethoden und zur Erforschung von effizienten Präventivmaßnahmen nicht ausreichend. Auch das

Verständnis über die zelleigenen Schutzmaßnahmen, der DNA Reparatur, ist essentiell und somit ein Grund warum der Nobelpreis für Medizin 2015 für die Erforschung der Base-Excision-Repair zum Austausch schadhafter Basen der DNA vergeben wurde. In dieser Arbeit liegt der Focus auf der Reparatur von DSB, ausgelöst durch Bestrahlung mit ionisierender Strahlung, also Schadensstellen, bei welchen beide Stränge des Riboserückgrates durch Ionisationserreignisse durchtrennt wurden und somit lose DNA-Enden entstanden sind. Für diese Art von Schäden besitzt die Zelle die Möglichkeit der Reparatur durch homologe Rekombination, nicht homologe Endenverknüpfung und alternative Wege der Endenverknüpfung. Dank ihnen sind Doppelstrangbrüche und damit die allgegenwärtige Hintergrundstrahlenbelastung für die Zelle und den Organismus kein sicheres Todesurteil. Um jedoch bestehende Therapiemethoden im Falle einer Tumorerkrankung verbessern zu können oder neue, effizientere und gewebeschonendere Therapieansätze zu entwickeln, beginnt das Verständnis eines biologischen Mechanismus bei der Identifizierung der involvierten Proteine und der Definition seiner Lokalisation. Noch ist wenig bekannt darüber, wo genau sich die einzelnen Komponenten der DNA-Reparatur assemblieren und wo die Reparatur im Kontext des Aufbaus des Zellkerns und des Chromatins stattfindet. Seit Jahrzehnten versucht die strahlenbiologische Forschung die Chromatinorganisation mit der DNA-Reparatur zu vereinen und erst heute sind wir in der Lage, die auftretenden Fragen über den Aufbau dieser Prozesse nicht nur durch biochemische Verfahrensweisen erklären zu können. Dank neuester, höchstauflösender Mikroskopiemethoden ist es möglich, die Reparaturvorgänge zu beobachten und somit Rückschlüsse für eine sicherere und effizientere Anwendung der DSB Induktionen in der Medizin zu ermöglichen.

Im Zuge dieser Arbeit war es erstmals möglich durch Verwendung eines fokussierten Ionenstrahls und Fluoreszenzmikroskopie, die grundlegendsten Vorgänge der Chromatinauflockerung zur Initiation einer Strahlenantwort zu dokumentieren und somit eine Verbindung zwischen DNA-Reparatur und Chromatinorganisation herzustellen. Hierfür wurde das Rasterionenmikroskop SNAKE verwendet, um Kohlenstoffionen, durch den Tandemteilchenbeschleuniger des Maier-Leibnitz-Laboratoriums beschleunigt, auf Zellkerne zu schießen und die zellulären Prozesse mittels Epifluoreszenzmikroskopie in lebenden Zellen zu beobachten. Die Bestrahlung von Chromatin eukaryoter Zellen konnte zeigen, dass die Mechanismen der DNA-Reparatur zu Beginn sehr örtlich begrenzt agieren und Reparatur von DSB im Genom

innerhalb von Sekunden am Ort der Bestrahlung initiiert wird, wobei hierfür die Dichte des Chromatins nicht nur lokal, sondern auch global verringert wird. Die Verwendung einer  $\alpha$ -Bestrahlungsquelle zur senkrechten Bestrahlung von Zellkernen mit Hoch-LET  $\alpha$ -Teilchen, ermöglichte in zusätzlichen Experimenten die Untersuchung der Wanderungskinetiken von DNA-Reparaturfoci. Die Verwendung von STED-Mikroskopie und einer daraus resultierenden Auflösung von ca. 100 nm, gab erstmals die Möglichkeit die Migration von schwer reparierbaren DSB im Zellkern einer Zelle über eine Distanz von bis zu 7  $\mu\text{m}$  Richtung Zellkernmembran zu dokumentieren und die Lokalisation in die zeitliche Entwicklung der DNA-Reparatur einzugliedern. Ebenso konnte aus Schrägbestrahlungsexperimenten an SNAKE und dem Vergleich der überschneidenden Strukturen der DNA Reparaturproteine BRCA1, Rad51, 53BP1,  $\gamma\text{H2AX}$  und Bestandteile des Chromatins, ein detailliertes Modell zum Aufbau der DNA-Reparatur im Kontext der Chromatinorganisation erstellt werden.

Im Verlauf dieser Arbeit wird zuerst eine Einführung in die Thematik der Strahlenbiologie geboten, ebenso werden die zum Verständnis essentiellsten biologischen sowie physikalischen Hintergründe und verwendeten Techniken erklärt. Nach der Beschreibung der verschiedenen in dieser Arbeit durchgeführten Experimente legt sich der Fokus zuerst auf die Etablierung von Oligonukleotid-Sonden zur Färbung und Detektion ionenstrahlinduzierter Doppelstrangbrüche. Darauf folgend werden Untersuchungen zur Chromatinmobilität und Foci Migration beschrieben, sowie die Analysen zur DSB-Reparatur im Kontext der Chromatinstruktur erläutert.

## 2 Biologischer Hintergrund

Im Folgenden werden die biologischen Grundlagen, welche zum Verständnis dieser Arbeit essentiell sind, näher beschrieben. Dabei führt dieses Kapitel von der für die Entwicklung eines Organismus essentiellsten Struktur, der DNA, über ihre Funktion, Struktur und Organisation im Zellkern zu den Mechanismen, welche sie im Alltag vor internen und externen Gefahren schützen.

Desoxyribonukleinsäure:

Der Unterschied von lebenden Organismen zu unbelebter Materie wird durch mehrere Eigenschaften definiert. Betreibt der Organismus metabolische Prozesse und kann er sich reproduzieren? Ist er fähig Eigenschaften an seine Nachkommen zu übermitteln und reagiert er auf Reize seiner Umwelt? Letztlich beruhen diese Kriterien auf dem Vorhandensein von Desoxyribonukleinsäure (engl. Deoxyribonucleic acid-DNA) oder entsprechenden Analoga [92, 175]. Die DNA ist der Speicherort sämtlicher Informationen, welche für das Leben einer Zelle notwendig sind [8]. Sie besteht aus den vier stickstoffbasierten Nukleinbasen Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin, welche in zwei Gruppen einteilbar sind. Adenin und Guanin werden hierbei als Purinbasen und Thymin und Cytosin als Pyrimidinbasen klassifiziert. Sie bilden, mit Desoxyribose (Pentose) und Phosphat als Rückgrat, zueinander komplementär bindende Nukleotidstrukturen aus [134]. Dabei bindet Thymin komplementär über zwei Wasserstoffbrücken an Adenin und Cytosin über 3 Wasserstoffbrücken an Guanin. Durch eine kettenartige Verknüpfung der 2-Desoxyribose über Phosphodiesterverbindungen zwischen den benachbarten Nukleotiden, bildet sich eine kettenartige und letztlich Leiter-ähnliche Polynukleotidstruktur. Diese gilt als eine von zwei von Watson und Crick im Jahr 1953 postulierten Hauptprinzipien des Aufbaus der DNA. Die zwei antiparallel orientierten Stränge werden im Falle eines Replikationsvorgangs getrennt und bilden somit das Template für neu replizierte und genetisch identische DNA. Um den Strängen eine Richtung zu weisen zu können, wurden die Ausrichtungen in 5' und 3' definiert, zurückzuführen auf die Kohlenstoffatomnummer des durchnummerierten Ribosemoleküls (siehe Abbildung 1). Die zweite Besonderheit des Polymers besteht in der Ausbildung einer rechts

gedrehten, doppelten  $\alpha$ -Helix, stabilisiert durch Stapelwechselwirkungen zwischen Basen unterschiedlicher Windungsschichten [186].

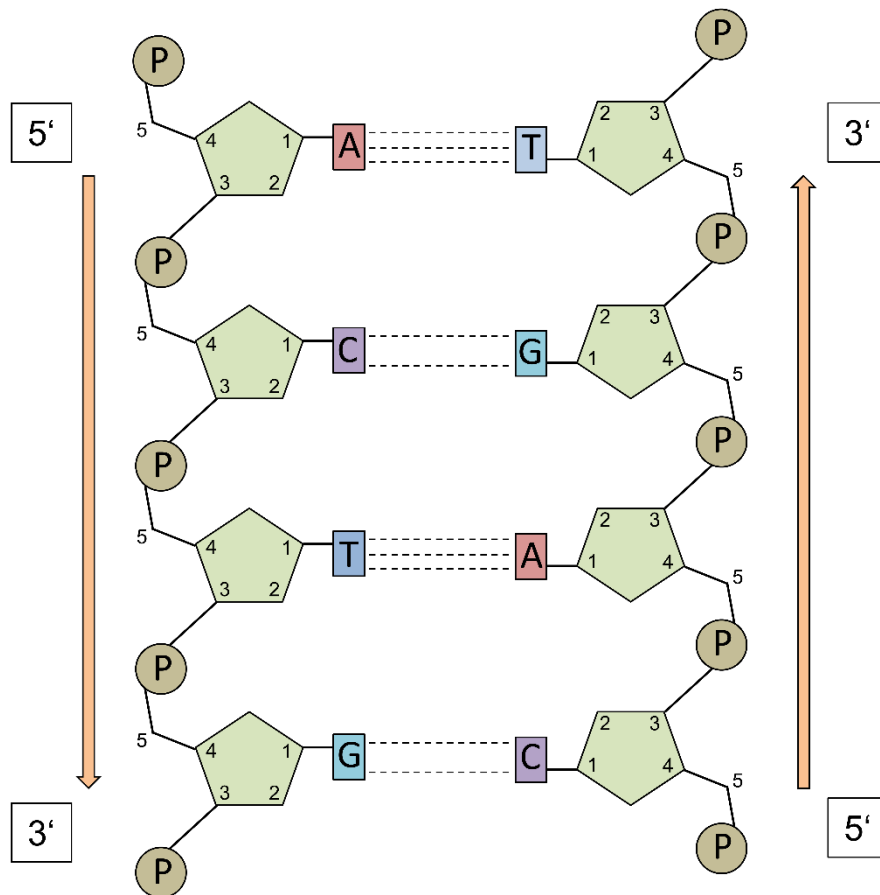


Abbildung 1: Molekülstruktur der DNA bestehend aus den Basen Adenin (rot), Thymin (dunkelblau), Cytosin (Violett), Guanin (hellblau), Desoxyribose (grün) und Phosphatrest (braun). Purinbasen mit Pyrimidinbasen verbunden über Wasserstoffbrückenbindungen. Leserichtung angegeben in 5'-3' (orange Pfeile).

Die Form der DNA spielt speziell eine Rolle in der Organisation des zum Beispiel beim Menschen 3324 Millionen Basenpaare (bp) umfassenden DNA-Stranges [82]. Als Quartärstruktur wird dieser bevorzugt in seiner B-Form 1,65 mal um so genannte Histonoktamere gewunden und zu einer Perlenkettenstruktur aneinandergereiht [190]. Nicht um Histone gewickelte DNA zwischen zwei Histonoktameren wird dabei „Linker DNA“ genannt und hat eine Länge zwischen 38 und 53 nm [94]. Histonoktamere bestehen aus acht Histonproteinen wobei jeweils zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4 verbaut sind [76]. Die Wicklung der DNA um Histone bietet der DNA dabei nicht nur Schutz vor äußeren Einflüssen, sondern spielt auch eine wichtige Rolle in der Regulierung der Genexpression und Epigenetik [25, 43]. Eine enge Wicklung um

Histone resultierend im so genannten 30 nm DNA Strang mit drastisch verkürzter Linker DNA bietet dem Genom Schutz vor versehentlichem Transkription inaktiver Gene. Somit kann durch Kondensation und Dekondensation der DNA signalisiert werden, welche Gene transkribiert werden müssen [43]. Das Ende der strukturellen Hierarchie bilden die Chromosomen. Sie bestehen aus unterschiedlich großen Teiles des Genoms, kommen im Zellkern in kondensierter und dekondensierter Form vor und vereinfachen die Zellteilung (siehe Abbildung 2).

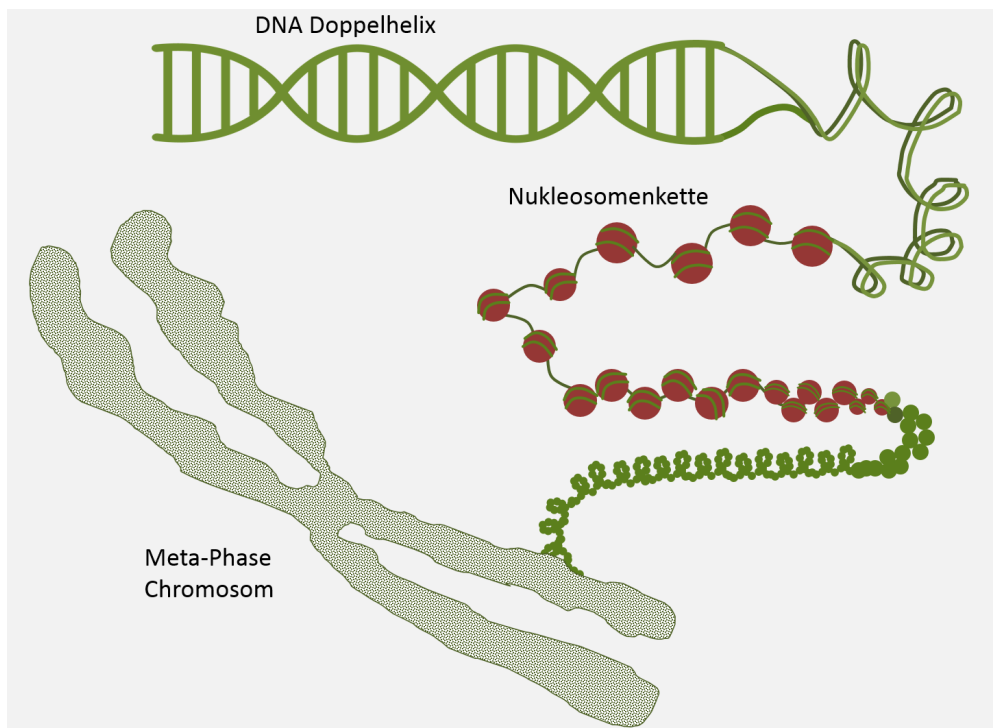
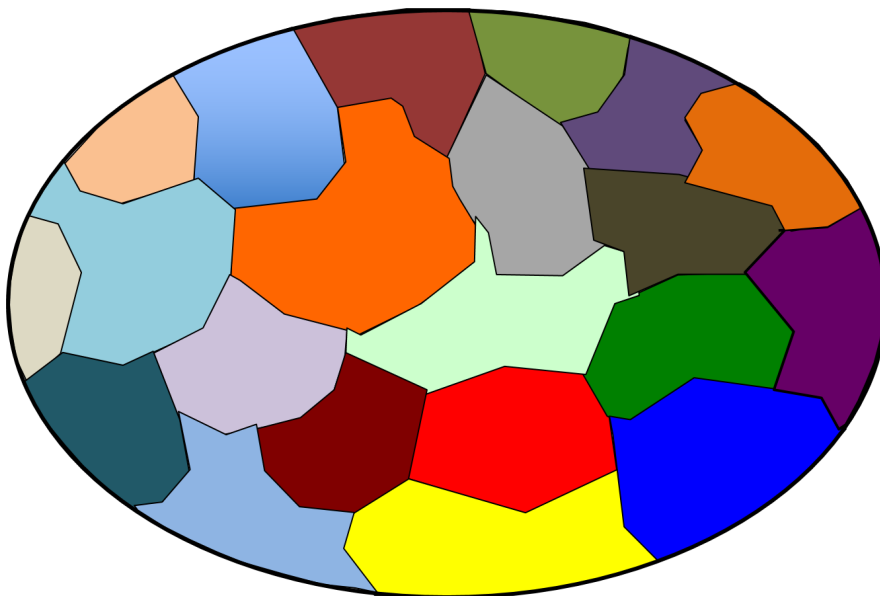


Abbildung 2: Übergeordnete Struktur der DNA im Chromatinverbund. Die 2 nm starke Doppelhelix wird auf Nukleosome bestehend aus 8 Histonuntereinheiten, gewickelt und verdichtet sich Perlenkettenähnlich zu einer 30 nm Faser. Zellzyklusabhängig bildet sich aus ihr in der Metaphase das Chromosom.

## 2.1 Chromatin Organisation

In verschiedene Chromosomen aufgeteilt und angeordnet, wird das im Zellkern befindliche Genom mit allen struktur- und funktionserhaltenden Proteinen auch Chromatin genannt. Für die Organisation des Chromatins im Zellkern existieren verschiedene Modelle. Eines der etabliertesten ist dabei das Chromatin Territory Interchromatin Compartment-Modell (CT-IC) von T. Cremer, welches das Chromatin zuerst in Chromosomendomänen (siehe Abbildung 3)



*Abbildung 3: Chromosomenterritorienmodell nach Bolzer et al. 2005 [16]. Schematische Darstellung aller Chromosomenterritorien (versch. Farben stehen für unterschiedliche Chromosomen).*

und untergeordnet in zwei unabhängige Bereiche teilt, die Chromatin-Territorien (CT) und das Interchromatin Compartment (IC) [33]. CTs beinhalten jeweils die DNA eines Chromosoms während der kompletten Interphase des Zellzyklus einer Zelle. Sie sind jedoch nicht fest kompartimentiert, sondern verändern ihre Form stetig [4]. Noch ist jedoch nicht geklärt, ob dies ungerichtet durch Brownsche Molekularbewegung oder durch eine gerichtete Bewegungsform etwa Aktin- bzw. Tubulin- und ATP-abhängig geschieht [41, 165]. Die CTs sind abgegrenzt durch die Kanäle und DNA-freien Lichtungen des ICs, die einerseits zum Stoff- und Proteintransit zu verschiedenen Genlocis sowie auch zur Zwischenlagerung von Proteinen und Substraten dienen [4].

Ein Großteil der dort lokalisierten Proteine sind Bestandteile des posttranslationalen Splicing Apparates, wozu auch das Splicing Protein SC35 zählt. Das nur 303 Aminosäuren große Protein aus der Familie der Serin-Arginin-Splicing-Faktoren (SR) übernimmt mit einer stark konservierter RNA-Bindedomäne die Weiterprozessierung von Transkriptionsprodukten im Zellkern. Seine große Anzahl im Nukleus und Zwischenlagerung in nuklearen „Speckles“ ermöglicht eine genaue mikroskopische Lokalisierung des IC [167, 173]. Dabei wird vermutet, dass CT und IC nicht direkt aneinander zu grenzen. Laut Fakan und van Driel et al. 2007 [52], befindet sich zwischengelagert eine < 200 nm dicke Grenzschicht aus weniger dichter DNA, die Perichromatin Region (PR). PR zeichnet sich, wie bisher vermutet wird, durch DNA-Bereiche mit aktiver Genexpression, DNA-Reparatur und Chromatin aus. Ein weiteres Modell, welches das CT-IC-Modell unterstützt, ist die Lokalisierung des Transkriptionsapparats nicht, wie oft vermutet, an einzelnen „super transcription facilities“, sondern vielmehr an Ort und Stelle des zu transkribierenden Gens in Form von variablen „transcription loops“ [56, 126]. Es besteht die Hypothese, dass im Bereich des PRs, aktive Gene in dekondensierter Form <200 nm lange Schleifen in die Perichromatin Region schlagen und dort vom Transkriptionsapparat bearbeitet werden (siehe Abbildung 4).

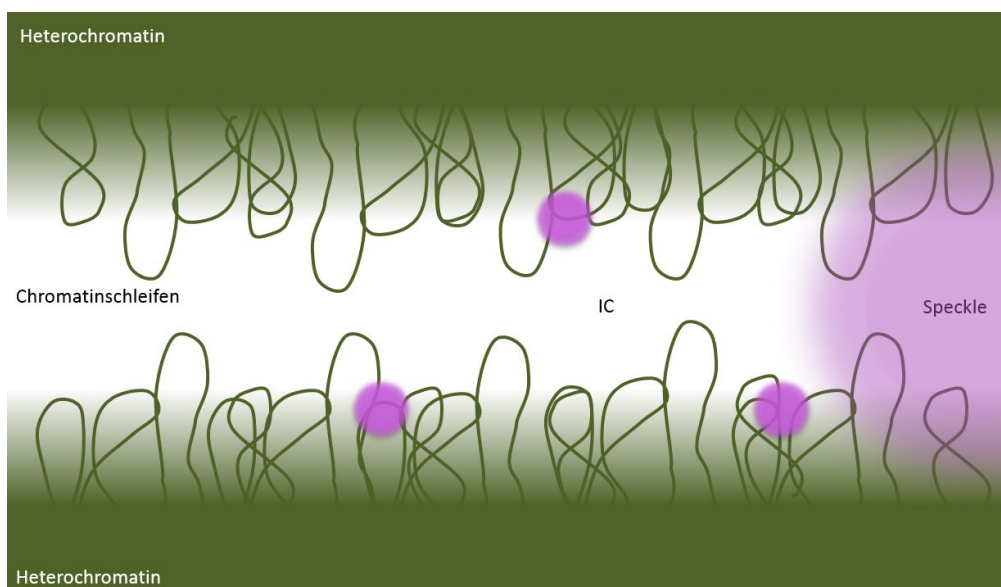


Abbildung 4: Modell der Transkriptionsregulierung durch Co-Lokalisation von Genen im Nukleus nach Fraser et al. 2007 [56]. Gene werden durch Transkriptionsfabriken (pink) im IC rekrutiert und durch Transkriptionsschleifen bewegt. Mitunter befinden sich auch Proteine des Splice-Apparates bereits im IC (splicing speckle in hellem rosa).



Dies würde zwar eine gewissen DNA-Beweglichkeit voraussetzen um am Genlocus Platz für Transkriptionsproteine zu schaffen, jedoch nicht im Maße anderer Modelle, welche die Gene aktiv zum Transkriptionsort über den kompletten Nukleus bewegen müssen. Für eine effiziente DNA-Reparatur, sei es mittels HR (Homologe Rekombination) oder NHEJ (Nicht homologe Endenverknüpfung, engl. Non-homologous end joining), ist jedoch nicht nur die Regulation durch den Aufbau und die Beweglichkeit der Reparaturstelle wichtig, auch die Feinstruktur der DNA und der Umgebung der IRIF, sowie die Position der IRIF im Gefüge des Chromatins sind von großer Relevanz um den Einfluss von DSB zu kontrollieren und die Integrität der DNA zu gewährleisten. Die Anlagerung von DNA-Reparaturproteinen ist stark abhängig von der Zugänglichkeit der Reparaturstelle. Der genaue Aufbau und die Organisation des Chromatins im Zellkern ist bis heute Teil intensiver Forschung und noch immer nicht vollends geklärt.

## 2.2 DNA-Reparatur

Das Genom kann durch äußere Einflüsse, wie ionisierende Strahlung, Schaden nehmen. Um diese effektiv reparieren zu können, besitzen lebende Zellen eine Reihe von speziellen Reparaturmechanismen, passend für verschiedene Schädigungen. Zu den häufigsten DNA-Schäden zählen Pyrimidindimerisierung, der Einbau fehlerhafter oder falscher Basen während der DNA-Replikation, DNA-Einzelstrangbrüche (SSB) und DNA-Doppelstrangbrüche (DSB)(siehe Abbildung 5) [55]. Durch Beschädigung funktionsunfähigen Gene und deren Proteine können diese nicht nur zu Zelltod und Nekrose führen, sondern sind auch direkt mit der unkontrollierten Proliferation von Zellen verbunden - Krebs entsteht. Die für die Zellgesundheit kritischste Schädigung der DNA ist der DNA-Doppelstrangbruch.

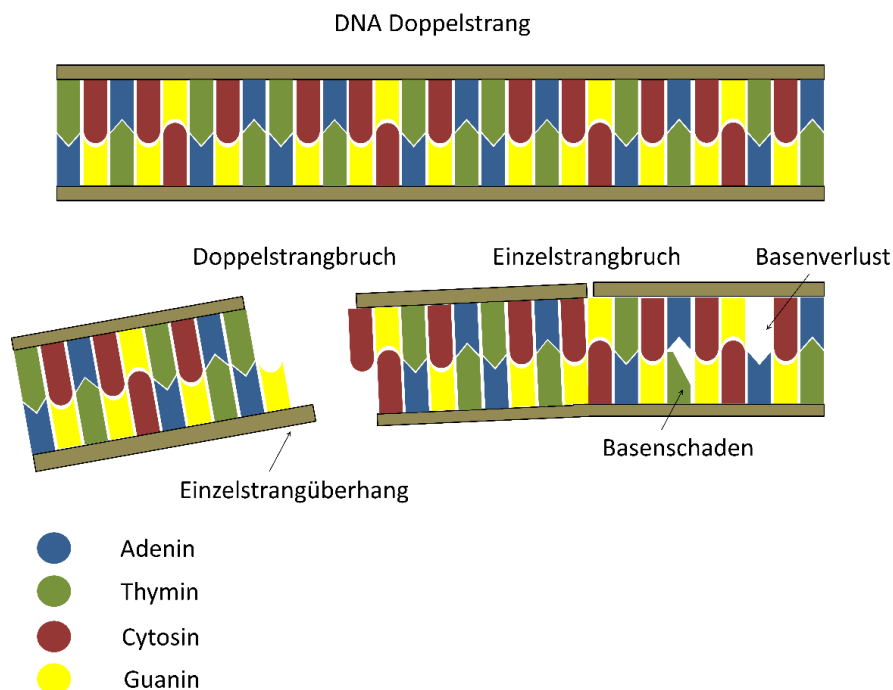


Abbildung 5: Schematische Darstellung der wichtigsten DNA Schäden. Oben zum Vergleich der Intakte DNA-Strang. Unten DNA-Schäden von Links nach rechts: DSB mit Einzelstrangüberhang. Weniger Komplexer Bruch mit kurzen Einzelstrangüberhängen und intakten Basen an der Bruchstelle; Einzelstrangbruch mit durchtrenntem Riboserückrat und Intakten Basen an der Bruchstelle; Basenschaden einer einzelnen Thyminbase. Die Mokekülstruktur des Thymin ist beschädigt und verhindert somit eine Bindung zum gegenüberliegenden Adenin; Basenverlust einer vollständigen Base. Auch bei dieser Art der Schädigung ist eine Aufrechterhaltung der Tertiärstruktur der DNA unmöglich.

## 2.3 Die Wahl des Reparaturmechanismus

Für die Reparatur kommen, je nach Komplexität des Doppelstrangbruchs, verschiedene Reparaturmechanismen zum Einsatz [164]. Die Brüche werden entweder durch (eine Art der) Homologie unabhängige(n) oder durch Homologie abhängige Reparaturprozesse (HDR, engl. homology directed repair) wie z.B. Einzelstranganlagerung (engl. SSA; Single strand annealing), alt-NHEJ (alternative nicht-homologe-Endenverknüpfung) und HR (Homologe Rekombination) repariert. Die Hauptreparaturmechanismen aus diesen zwei Klassen bilden die klassische (canonical) Nicht-homologe-Enden-Verknüpfung (c-NHEJ) und die HR. Der Entscheidungsprozess, bei welcher Art der Schädigung welcher Reparaturprozess Verwendung findet, ist bislang nicht vollends geklärt und ist Teil laufender Forschung. Es wird jedoch angenommen, dass der Prozess des DNA-Enden-Rückschnitts zur Entfernung schadhafter Nukleotide nach Induktion eines DSB den Entscheidungszeitpunkt darstellt [164]. Abhängig von Umstandsfaktoren wie Zellzyklusphase, Informationsgehalt des betroffenen Gens und Schadensart, wird die Schadensstelle in Einzelstrangüberhänge gekürzt oder nicht. Die erste Instanz bildet hier das so genannte „end clipping“ des Einzelstranges [24]. Ein erstes Zurückschneiden der ersten 20 möglicherweise geschädigten Basenpaare zu 3'Überhängen [81, 91, 176]. Durchgeführt durch die Proteine MRE11 und CtIP, wird schon an dieser Stelle entschieden, dass Homologie abhängige Prozesse zum Einsatz kommen. Die Proteine DNA-PKcs und Ku70/80 können nicht länger binden und c-NHEJ scheidet als Reparaturmechanismus aus [27]. Jedoch hat auch die c-NHEJ Cofaktoren, welche zu ihren Gunsten agieren und vor dem „end clipping“ zum Einsatz kommen, wie z.B. das Protein 53BP1. Nach Induktion eines Doppelstrangbruchs werden die Proteine 53BP1 und BRCA1 zum Schadensort rekrutiert, wobei BRCA1 den Endenrückschnitt begünstigt und 53BP1 ihm entgegenwirkt. Verschiebt sich das Gleichgewicht dieser Proteine zu Gunsten von 53BP1, wird CtIP durch 53BP1 räumlich daran gehindert, an die Schadensregion zu gelangen und den Rückschnitt durchzuführen. C-NHEJ findet statt (siehe Abbildung 6) [49, 107].

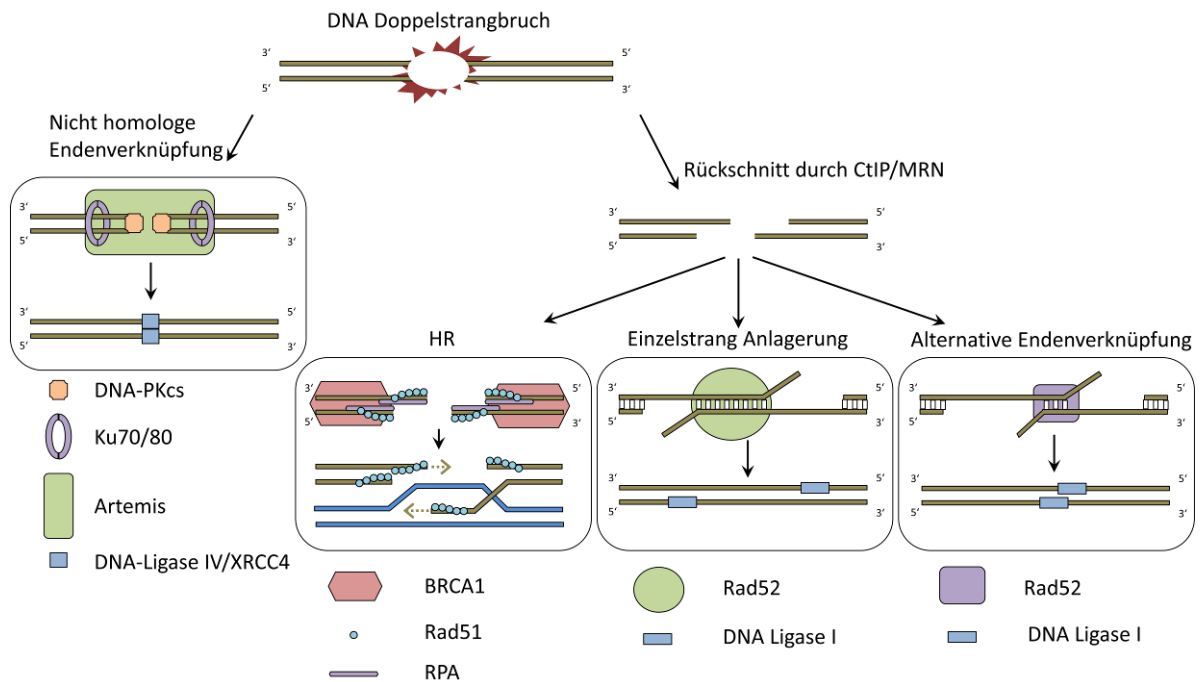


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Wahl des Reparaturmechanismus. Ausgehend von einem DSB wird entschieden, ob die Reparatur durch homologieabhängige Reparaturmechanismen erfolgen soll, oder ob eine Reparatur mittels NHEJ durchgeführt wird.

Ein weiterer Faktor, welcher die Wahl maßgeblich beeinflusst, dessen detaillierter Mechanismus jedoch noch unbekannt ist, ist die Komplexität des Bruchs. Wird durch Schadensinduktion mittels Hoch-LET-Strahlung ein Doppelstrangbruch mit sehr langen Einzelstrangüberhängen und komplexen Nukleotidschäden produziert, wird vermehrt Rad51 rekrutiert, bindet stabilisierend an die einzelsträngige DNA und HR übernimmt die Reparatur [125]. Doppelstrangbrüche, welche sich räumlich in enger Nachbarschaft häufen, laufen Gefahr bei Reparatur mittels NHEJ vermehrt Sequenzen zwischen mehreren DSB zu verlieren und somit das Zellüberleben zu riskieren. Auch deshalb unterscheidet die Zelle über die Wahl des Reparaturwegs von DSB zu DSB unabhängig.

## 2.4 Nicht Homologe Endenverknüpfung

Bei NHEJ werden die freien doppelsträngigen Enden des DSB schlicht verbunden. Ein neu entstandener DSB wird zuerst von dem Heterodimer Ku70/Ku80 erkannt. Das ringförmige Dimer wird auf die Enden des Doppelstrangs aufgefädelt und fungiert als Bindestelle für die zur weiteren Verarbeitung rekrutierten Proteine [44, 115]. Die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PKcs) hat hohe Bindeaffinität gegenüber Ku70/Ku80. Beide zusammen bilden den DNA-PK-Komplex [179]. Die erste Aufgabe dieses Komplexes besteht in der Rekrutierung des Proteinkomplex Artemis durch Autophosphorylierung. Artemis beginnt die ersten vier Nukleotide, welche, durch eventuelle Beschädigung, ein Verbinden der Doppelstränge blockiert, zu entfernen [113, 138]. Da jedoch nicht mehr als vier Nukleotide entfernt werden und somit RPA, bzw Rad51 nicht an die ssDNA anlagert, wird dies nicht als Signal für HDR erkannt. Da Artemis allein lediglich 5' Exonukleaseaktivität von einzelsträngiger DNA besitzt und somit nur einfache, glatte DSB um immer nur ein Nukleotid zurückschneiden könnte, ist es wichtig, dass Artemis an DNA-PK bindet. Durch diese Bindung erhält Artemis Endonukleaseaktivität in 5' und 3' Richtung und kann nun auch komplexere, durch ionisierende Strahlung entstandene DSB für die Reparatur vorbereiten, indem sie größere Sequenzen auf einmal entfernt (siehe Abbildung 7) [113].

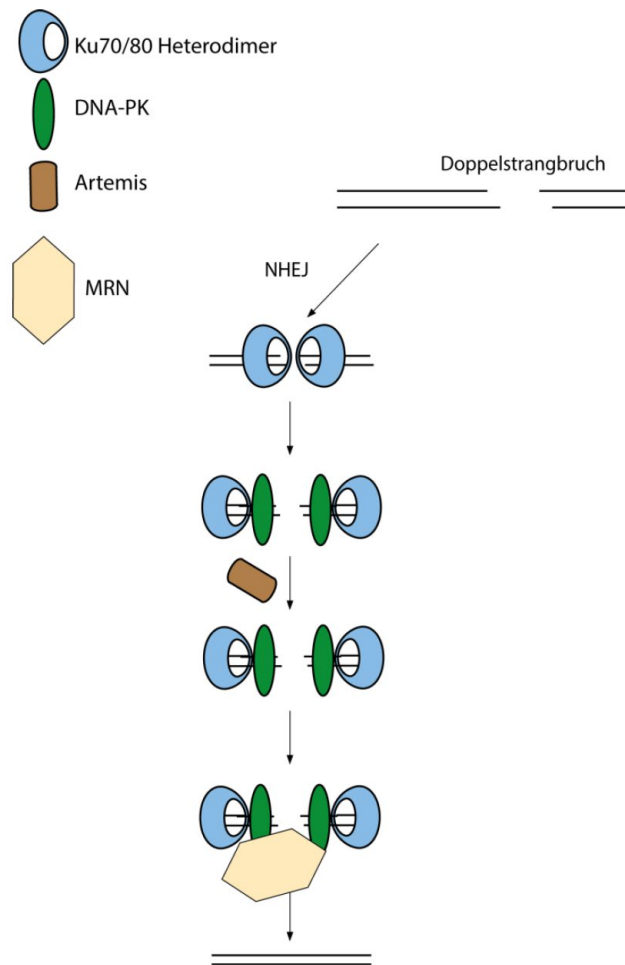


Abbildung 7: Vereinfachte schematische Darstellung des NHEJ, Die Legende zur Identifizierung der beteiligten Proteine sind Randständig dargestellt.

Um aus den zurückgeschnittenen Teilen der getrennten DNA wieder glatte miteinander kompatible DNA-Doppelstrangenden zu generieren, werden DNA-Polymerase  $\mu$  und Polymerase  $\lambda$  rekrutiert und über BRCT (BRCA1 terminus) Domänen an Ku70/80 gebunden [114]. Da beide Polymerasen nicht von einem komplementären DNA-Strang als Vorlage abhängig sind, kommt es vor, dass bei diesem Prozess Nukleotide in die DNA-Sequenz eingebaut werden (Additionen), welche vor der Reparatur nicht vertreten waren und ORF (Open Reading Frames) nicht eingehalten werden [19]. Das Ergebnis sind Nonsense-Mutationen, welche eine Zelle zum Zelltod oder zur unkontrollierten Zellteilung führen können. Derselbe Effekt kann entstehen, wenn im nächsten Schritt, dem Ligieren der zwei losen DNA-Enden, keine Kontrolle über fehlende DNA-Sequenzen geschieht (Deletionen) [19]. Der Ligationsprozess wird durch den Komplex aus DNA-Ligase IV und X-Ray repair cross-complementing protein 4 (XRCC4) durchgeführt. Aus den durch fehlende Qualitätssicherung entstehenden

Unsicherheiten für die genomische Stabilität, wird die NHEJ auch als fehleranfällig beschrieben. Ihre Stärke und den Vorteil, den Organismen mit NHEJ besitzen, besteht aus der sehr schnellen Reparaturzeit von unter 30 min und der möglichen Funktionsbereitschaft über den gesamten Zellzyklus hinweg [37] (siehe Abbildung 8).

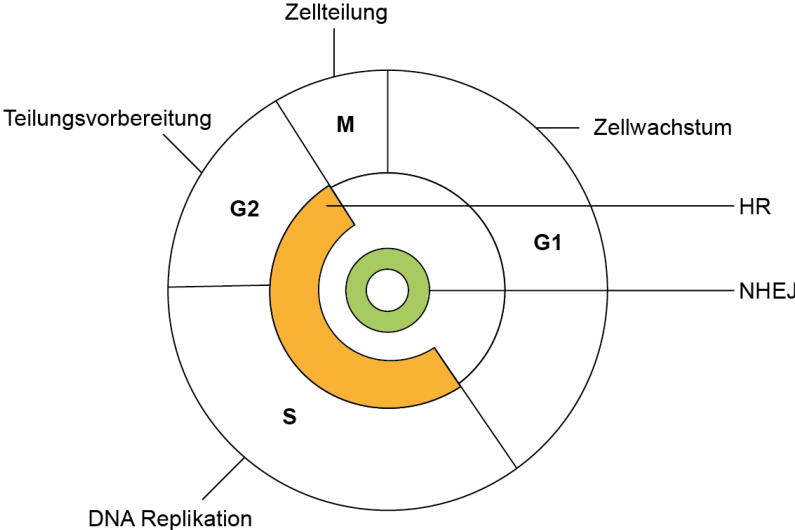


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Zellzyklus einer Zelle. Ersichtlich sind die verschiedenen Zellzyklusphasen und ihre jeweilige Hauptcharakteristik sowie die Verfügbarkeit der DNA Reparaturmechanismen.

## 2.5 Homologe Rekombination

Als vergleichsweise fehlerfrei gilt HR. Durch Verwendung eines homologen DNA-Strangs ist eine originalgetreue Nachbildung des ursprünglichen Genabschnitts möglich [66]. Die homologe DNA stammt entweder von homologen Genen oder, bevorzugt bei Eukaryoten, der komplementären DNA-Sequenz des Schwesterchromatids [89]. Da für diesen Prozess ein Schwesterchromatid verfügbar sein muss, findet die HR hauptsächlich in den Zellzyklusphasen G2 und S [149](siehe Abbildung 8). Wie zuvor beschrieben, besteht die Initiation der Homologen Rekombination grundsätzlich aus der Resektion der geschädigten DNA am DSB und dem Austausch von RPA gegen Rad51 Polymere, welche helikale Stützgerüste für die ssDNA bilden [149], und somit eine Homologiesuche auf einem vorhandenen Schwesterchromatiden ermöglichen [1, 10, 172]. Bei diesem noch wenig erforschten Vorgang namens „base-flipping“, werden einzelne Basen aus der Doppelhelix des Schwesterchromatids gelöst und ausgeklappt, um die Einzelstränge auf Homologien zu beproben [79]. Wurden größere Bereiche homologer Sequenzen identifiziert, bindet das Mediator-Protein BRCA1 an Rad51 und reguliert über Cofaktoren die sogenannte „strand invasion“, also das Aufschmelzen des Doppelstrangs des Schwesterchromatids und die Anlagerung des geschädigten DNA Einzelstrangs. Nun agieren die komplementären Sequenzen des Schwesterchromatids als Primer für DNA-Polymerasen, welche die lückenhaften Bereiche des schadhaften DNA Strangs mit Nukleotiden vervollständigen [197]. Dies führt zur Bildung der sogenannten Holliday-Junction, welche mit Hilfe von Helicasen und Ligasen aufgelöst wird [118] (siehe Abbildung 9). Der DNA-DSB ist repariert und die geschädigten Gene können wieder im Zuge der Proteinexpression abgelesen werden.



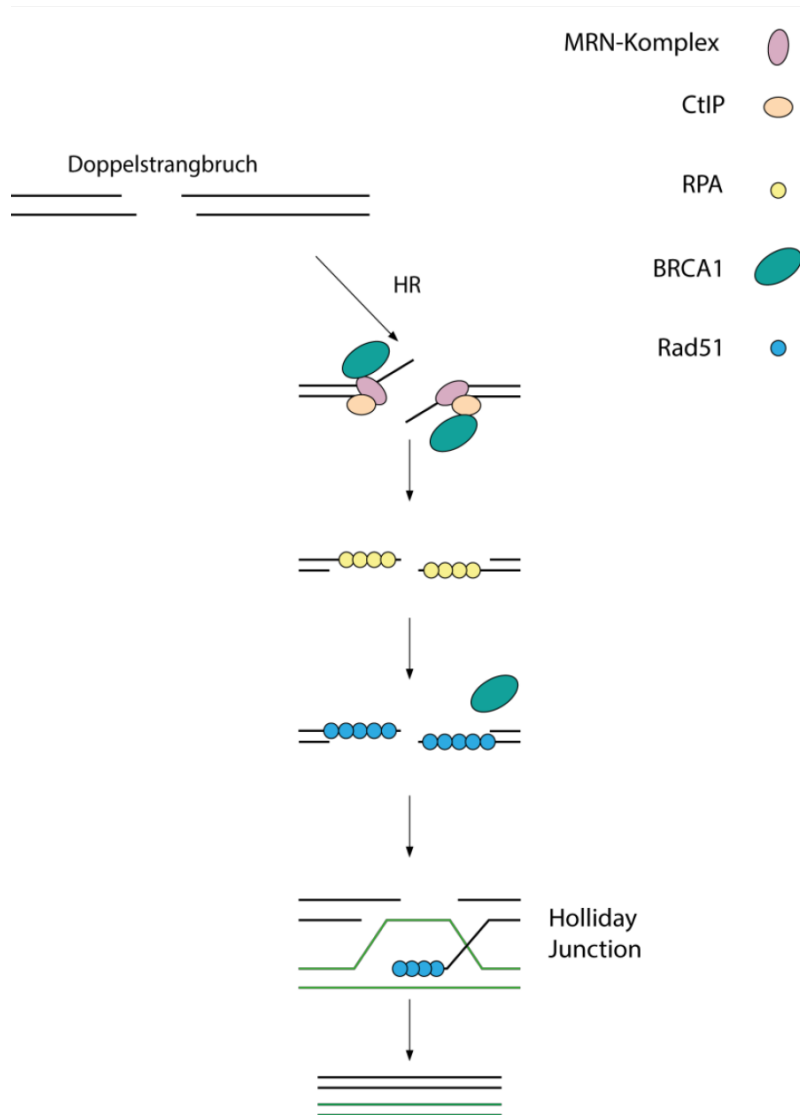


Abbildung 9: Vereinfachte schematische Darstellung der HR und NHEJ (links). Die Legende zur Identifizierung der beteiligten Proteine ist randständig dargestellt.

## 2.6 Alternative Reparaturwege

Die hohe Zahl an möglichen Ausprägungen eines DSB macht das korrekte Zusammenführen der losen DSB-Enden mit nur zwei Mechanismen unmöglich. Zwar würde nach gescheiterter HR, NHEJ stattfinden, doch selbst NHEJ kann nicht jeden Bruch reparieren. Für solche Fälle besitzen Zellen, wie erst in den letzten Jahren festgestellt wurde, alternative Abwandlungen von NHEJ (alt-NHEJ) wie Microhomology Mediated End Joining (MMEJ) und Single Strand Annealing (SSA) [26, 183]. Die Erforschung der genauen Mechanismen steht hierbei jedoch noch am Anfang. Sind im Zuge des MMEJ ssDNA 3' Enden am DSB nach Rückschnitt durch den Parp1 rekrutierten MRN/CtIP-Komplex in keiner Weise homolog zu benachbarten DNA-Strängen und ist auch keine Mikrohomologie von 8-20 Basen in der Umgebung zu finden, verlagert sich die Homologie Vorlage durch RPA-Umlagerung in 3' Richtung [104]. Selbst wenn Mikrohomologien nicht für eine fehlerfreie Reparatur ausreichen, wird der DNA-Strang bei Homologie-Bindung vermutlich durch Parp-1, MRN und Pol  $\theta$  Beteiligung verbunden [183]. Der ursprüngliche DSB wird durch XPF-ERCC1 im Gegensatz zur „extensive resection“ um kleine Sequenzbereiche zurückgeschnitten. Fehlende Nukleotide werden anhand der wenig homologen Vorlage aufgefüllt und durch LigIII- $\alpha$ /XRCC1 Komplex angefügt [155]. Der Mechanismus ist wenig genau, verlässt sich jedoch auf ein Mindestmaß an Homologie (<20 Fehlpaarungen) mit geringst möglichem Sequenzverlust [104, 154]. Homologie-Suche ohne Rücksicht auf exzessiven Sequenzverlust wird im Laufe von SSA praktiziert. Nach erfolgreichem 3' Enden-Rückschnitt, äquivalent zum MMEJ durch MRN/CtIP, wird über RPA die letzte Region komplementärer ssDNA über 25 bp in 3' Richtung detektiert und die DNA vom DSB bis zu dieser Region durch Exo1 oder DNA2 und ihrer „long range resection“-Aktivität entfernt [12, 156]. Katalysiert durch Rad52 werden die potentiell komplementären Sequenzen zu dsDNA verbunden und kurze ssDNA-Überhänge durch ERCC1/XPF, welche speziell Nukleotide an dsDNA-ssDNA Grenzregionen spaltet, entfernt [128, 148].

## 2.7 Chromatinmobilität und DNA Reparatur

Neben DNA-Reparaturmechanismen besitzt die Zelle jedoch weitere Schutzmechanismen welche unkontrollierte Interaktionen mit dem Erbgut noch vor Schadensinduktion verhindern. Die Regulation der DNA-Dichte und ihrer Beweglichkeit. Das Kollektiv an Proteinen und DNA, welches für die Kontrolle und Regulation dieser Sicherheitsbarriere verantwortlich ist, wird Chromatin genannt [117]. Das Chromatin kontrolliert, wie in Kapitel Chromatinorganisation erläutert, die Erreichbarkeit von Genen, die Flexibilität der DNA und ihre Bewegungsfähigkeit im Nukleus. Zu welchem Grad diese Mechanismen zur Steuerung der DSB-Reparatur Anwendung finden, ist aktuell Teil relevanter strahlenbiologischer Forschung und noch wenig bekannt. Essentiell erscheint jedoch, dass wichtige Gene einerseits geschützt werden müssen und andererseits von wichtigen Proteinen, wie dem DNA-Reparaturapparat erreichbar sein sollten [93]. Eine erste Barriere bildet hier die Modulierung der 10 nm breiten DNA-Histon Kette zum so genannten 30 nm Strang. Hierbei wird die DNA um sich selbst gewickelt und kann somit nicht mehr von Proteinen fälschlicherweise gebunden bzw. bearbeitet werden. Des Weiteren wird verhindert, dass die Chromosomen sich zu weitreichend im Nukleus bewegen können und dabei schadhafte Rekombinationen mit anderen Chromosomen eingehen. Eine zusätzliche Verdichtung der DNA, nämlich die Bildung von Euchromatin durch H3K9-Methylierung senkt letzten Endes jegliche Transkriptionsaktivität und schützt vor destruktiven enzymatischen Aktivitäten. Jedoch entstehen DNA-Schäden durch äußere Faktoren auch unabhängig von DNA-Struktur und Position im Zellkern. Um theoretisch an jeder Stelle DNA-Reparatur durchführen zu können, müssen diverse Chromatin Remodellierungs -Komplexe zum DSB rekrutiert werden, welche die Zugänglichkeit zur DNA wiederherstellen. Bei menschlichen Zellen sind dies die Proteine BAF, CHD3/CHD4, INO80 und SMARCAD1, zum Beispiel durch den Austausch von Histonen, wie im Fall von INO80-C, welches H2A.Z-H2B mit H2A-H2B ersetzt und somit den DSB-Enden-Rückschnitt ermöglicht oder SMARCAD1, ohne dessen Rekrutierung der Proteine Exo1 und DNA2, kein extensiver Rückschnitt vor RPA Anlagerung und folgend eine Homologie Suche durch Rad51 möglich wäre.

DNA-Reparatur setzt also eine Dekondensation der DNA voraus. Hierfür hat sich innerhalb der letzten Jahre das Phasentrennungsprinzip als plausibel erwiesen

Auf die DNA-Reparatur bezogen beginnt diese mit der Phosphorylierung der Histonuntereinheit H2AX. Die einhergehende Modifikation der Bindekapazität zwischen Histon und DNA führt nach Studien von Altmeyer et al. 2015 erstens zur Auslösung wichtiger Reparaturproteine aus Clusterverbunden in der Umgebung, dem so genannten „Liquid demixing“ und zur Bildung einer „liquid-like-droplet“-Struktur am Rande des Heterochromatins, welche aus frei beweglicher, PARP1 abhängig dekondensierter und zugänglicher DNA im Bereich des 200 nm dicken Perichromatins besteht [98, 169].

Hierbei ist es möglich, dass diese tropfenartigen Strukturen, katalysiert über das Heterochromatin Protein 1 alpha (HP1 $\alpha$ ), mit anderen Protein-DNA-Tropfen verschmelzen und sich wieder trennen können [101]. Dies würde zu einer für die Reparatur optimierten Arbeitsumgebung führen, eine Selektion der relevanten Reparaturproteine ermöglichen und Reparaturstellen von schwer zugänglichen Bereichen des Heterochromatins migrieren lassen. Noch nicht wissenschaftlich bestätigt für diese Theorie ist jedoch, ob nur eine Migration des Reparaturfokus oder eine allgemeine Lichtung schwer zugänglicher Bereiche stattfindet und in welchem Umfang, räumlich und zeitlich betrachtet, eine Migration der Reparaturstellen innerhalb des Zellkerns geschieht.

Die nächst größere Einheit der DNA-Regulation durch Chromatinmobilität besteht in der globalen Mobilität der DNA oder im Falle eines DNA-Schadens, des DSBs. Wie bereits für Hefezellen bekannt, steigt die Flexibilität der DNA nach Induktion von DSB innerhalb des Zellkerns, wobei der Grad der Flexibilitätssteigerung abhängig vom Codierungsgehalt der beschädigten DNA ist. Gründe für diese Maßnahme konnten bisher noch nicht bestätigt werden. Es wird jedoch vermutet, dass eine flexiblere DNA förderlich für die Homologiesuche im Zuge der HR ist und die Kontaktwahrscheinlichkeit zwischen homologen Sequenzen erhöht. Des Weiteren wird vermutet, dass Chromatinbeweglichkeit die Effizienz der DSB-Reparaturen steigert, indem sie „DSB-Clustering“ unterstützt und damit mehrere DSB in einer spezialisierten Reparaturstelle repariert werden können [23, 109].

Eine weitere sehr plausible Theorie zum Einfluss der Chromatinmobilität auf die DNA-Reparatur lag in den letzten Jahren bei der durch Chromatin-Beweglichkeit ermöglichten Verknüpfung von Reparaturstellen mit Proteinen der Zellkernhülle. Diese könnte die Wahrscheinlichkeit von unerwünschten Rekombinationsereignissen mit

ähnlichen Sequenzbereichen reduzieren und die Reparatur durch fehlerbehaftete und nicht passende Reparaturmechanismen verhindern. DSBs könnten durch solche Verknüpfungen zu spezialisierten Reparaturstellen transportiert werden oder sogar Signale über Kernporen Komplexe (engl.: Nuclear-Pore-Complex; NPC) ins Zytoplasma transferieren (zum Beispiel Apoptose). Wie sich die DNA-Reparatur letztlich in das Gefüge der Chromatinorganisation und in bestehende Modelle zur Chromatinmodellierung einfügt und wo sich die DSB-Reparatur letztendlich lokalisiert ist bis heute nicht geklärt.

## 2.8 Reparaturmarker

Auf Grund der Komplexität und Zufälligkeit der Ausprägung von DSB ist es schwierig DNA-Schäden direkt zu markieren und die enzymatischen Prozesse zu charakterisieren. Um dieses Problem zu umgehen bedient sich die Strahlenbiologie zur DSB-Detektion und Untersuchung der Reparatur an so-geannten Reparaturmarkern. Sie bestehen aus den Schlüsselproteinen welche, am DSB, wichtige Funktionen in der DSB Reparatur übernehmen und somit charakteristisch für den Aufenthaltsort des DSB in der Zelle stehen. Die Proteine  $\gamma$ H2AX, 53BP1, Rad51 und BRCA wurden im Laufe dieser Arbeit als Marker für die Struktur und Organisation der Reparatur im Kontext des Chromatins verwendet.

### $\gamma$ H2AX

H2AX ist ein Histonprotein aus der H2A Familie bestehend aus H2A1, H2A2, H2AX, H2AZ und einige Weitere wobei, beim Menschen ca. 2,5-25 % der H2A Familie aus H2AX besteht [17, 145]. Der hauptsächliche Unterschied zwischen diesen Histonproteinvarianten befindet sich hierbei in einem Polymorphismus des C-Terminus und der innewohnenden Aminosäuresequenz. Die DNA ist um die Histone und damit auch um H2AX gewickelt. H2AX ist jedoch nicht nur an bestimmten Regionen des Genoms vertreten, sondern verteilt sich ungleichmäßig über die gesamte DNA und den gesamten Nukleus hinweg. Einige Studien vermuten eine Häufung von H2AX in Sequenzabschnitten essentieller Gene und Bereichen mit hoher Gendichte [14, 139, 178]. Im Falle eines DNA DSB wird H2AX durch den Proteinkomplex ATM an Serin 139 phosphoryliert und wird fortan als  $\gamma$ H2AX bezeichnet [145]. Durch einen Prozess mit positiver Rückkopplung, nämlich der Bindung von MDC1 an die SQ[E/D] $\phi$  Domäne [157, 178, 192], welches als Substrat weiteren ATMs fähig ist, breitet sich die Aktivierung von H2AX in einem Bereich von mehreren Megabasen um den Schadensort aus [106] und dient im Laufe der DSB Reparatur, unabhängig von der Art des Reparaturprozesses als Ankerpunkt für alle Reparaturproteine mit konservierter BRCT Bindedomäne (BRCA1 carboxy-terminal repeats) [170]. Jedoch wird die Hauptaufgabe von  $\gamma$ H2AX nicht in der Rekrutierung von Reparaturproteinen gesehen, sondern vielmehr in der Umstrukturierung des Chromatins im Schadensbereich über

den INO80-Chromatin-Umformungskomplex [127]. Vermuten lässt dies der Fakt, dass H2AX teildefiziente Zellen Schwierigkeiten mit der Stabilität von DNA Reparaturstellen haben [137]. Da  $\gamma$ H2AX in großer Zahl und an jedem DSB vertreten ist, entwickelte sich  $\gamma$ H2AX zum Goldstandard der DSB Detektion. Die Akkumulation in einem so großen Bereich um den Schadensort ist jedoch für höchstauflösende Mikroskopieverfahren nachteilig und somit wurden im Laufe dieser Arbeit hierfür weitere Kandidaten untersucht.

## 53BP1

Das P53-binding protein 53BP1 ist, bestehend aus 1972 Aminosäuren [103], eines der essentiellsten Reparaturproteine in der DSB Reparatur wobei es Strukturanalysen zu Folge keine enzymatische Aktivität besitzt [28]. Trotzdem treten bei 53BP1-defizienten Zellen zu Positivkontrollen signifikant vermehrt DNA Schäden, unkontrollierte Zellproliferation sowie Zelltod auf [77, 184]. Mittels konservierter BRCT- und Tandem-Tudor-Bindedomänen sowie 28 endständigen (S/T-Q) Bindestellen übernimmt es die Koordination zwischen wichtigen Reparaturproteinen und besitzt damit eine essentielle Schlüsselposition in der DSB Reparatur obwohl von seiner genauen Funktionsweise noch wenig bekannt ist. Aktiviert wird 53BP1 durch Phosphorylierung mittels ATM [3, 69, 102]. Die Rekrutierung ATMs durch  $\gamma$ H2AX bringt die Aktivität von 53BP1 in Abhängigkeit zu einem der frühesten DSB Markern und ermöglicht eine fast sofortige Detektion des DSB (1,5 min – 3 min) [71]. Diese frühe Aktivierung ermöglicht es 53BP1 zu verhindern, dass in Zellzyklusphase G1 HR ohne geeignete homologe Sequenzen stattfinden kann, ohne jedoch auf einen Reparaturmechanismus begrenzt aktiv zu sein [54]. Denn auch wenn 53BP1 hauptsächlich NHEJ unterstützt, ist 53BP1 auch bei HR zu Gegen und übernimmt eine Fokusstruktur erhaltende Funktion. Hierfür spricht auch die Bindung an Chromatin Umstrukturierungsfaktoren wie EXPAND1 (auch MUM1) und PTIP [48, 80]. Ebenfalls deutet der strukturelle Aufbau von 53BP1 Foci mit vielen intermediären Kanälen und Lichtungen auf strukturbezogene Aufgaben hin [140]. 53BP1 begrenzt seinen Einsatz jedoch nicht nur auf die DNA Reparatur. Durch die Bindung und Aktivierung von RIF1 übernimmt 53BP1 ebenfalls wichtige Funktion in der „V(D)J Rekombination“ sowie „class switch recombination“ (CSR) im Zuge der adaptiven Immunantwort [40].

## Rad51

Ein Kandidat für genauere Untersuchungen der Lokalisation von DSBs ist das DNA Rekombinase Protein Rad51. Pulldown-Experimenten zufolge, geht Rad51 nicht nur Bindungen mit dsDNA und ssDNA ein, sondern wird auch von Mediatorproteinen der DNA-Reparatur wie BRCA1, BRCA2 und Rad52 gebunden [18, 112, 197]. Die Hauptaufgabe von Rad51 besteht in der Bindung an RPA bedeckten DNA Einzelsträngen und Formation einer helikalen Stützstruktur durch Polymerbildung [13, 168]. Diese Stützstruktur verhindert, dass im Falle eines DSB, der ssDNA-Strang von möglichen homologen Sequenzen wegdiffundiert und gewährleistet eine effiziente Homologiesuche [142]. Rad51 kann mittels höchstauflösender Mikroskopie als kompakte runde Foci mit einer Größe unter ~140 nm aufgelöst werden und eine genauere Lokalisation von DSB ermöglichen [140]. Rad51 ist auf eine Resektion des ssDNA-Strangs angewiesen und lagert demnach erst nach mehreren Minuten (ca. 13 min) am DSB an [161].

## BRCA1

Das wohl in der Öffentlichkeit bekannteste Krebs assoziierte Protein ist BRCA1. Mutationen des als Tumorsuppressor klassifizierten Phosphoproteins BRCA1 stehen in engem Zusammenhang mit der Bildung von Brust-, Eierstock-, Prostata-, und Bauchspeicheldrüsenkrebs [57, 67, 121]. Der Grund hierfür liegt in seiner essentiellen Schlüsselrolle während der DSB Reparatur durch Homologe Rekombination [151]. Das 1862 Aminosäuren große Protein [6], welches durch Abraxas zum Schadensort gelangt, besitzt mehrere aktive Bindedomänen und damit verbundene Aufgaben. Über RING (Really Interesting New Gene) Bindemotive und Interaktion mit Ubiquitintransferase BARD1 (BRCA1-BARD1 Komplex mit E3 Ubiquitin ligase Aktivität) übernimmt BRCA1 die Kontrolle über den Zellzyklus während der DSB-Reparatur und verhindert somit eine Replikation schadhafter Gene [39, 135]. Eine weitere Schlüsselfunktion übernimmt BRCA1, wie zuvor erwähnt, in der Wahl des DSB-Reparaturmechanismus [84]. Durch den gegenseitigen Antagonismus zwischen BRCA1 und 53BP1 kontrolliert BRCA1 die ssDNA-Resektion durch BRCT Domänen-



abhängige Rekrutierung von CtIP und verhindert somit NHEJ an DSB, welche durch Homologie fehlerfrei repariert werden können [195, 196]. Auch der darauffolgende Schritt der HR, die Rad51 Polymerbildung, wird von BRCA1 gesteuert [31]. Durch Interaktion mit PALP2 (BRCT Domäne) und dessen Aktivierung von BRCA2 wird Rad51 zur Anlagerung an die DSB Stelle rekrutiert [187]. BRCA1 Foci sind mikroskopisch weitreichend dimensioniert und besitzen ähnlich wie 53BP1 eine komplexe Substruktur, welche eine genaue Lokalisation des DSB unmöglich macht [161].

## Hürden der DSB Detektion

Nach Strahlenexposition wird, wie erwähnt, in den DSB flankierenden Bereichen des Chromatins H2AX über mehrere Kilobasenpaare (kbp) phosphoryliert und bildet somit eine Art universelles Signal für den DNA-Reparaturapparat zur Akkumulation. Liegen nun zwei oder mehrere Doppelstrangbrüche nah beisammen und werden von einem einzelnen  $\gamma$ H2AX Focus repräsentiert, entsteht ein mitunter nicht zu unterschätzender Fehler bei der Berechnung der Strahlendosis von Hoch-LET Strahlung. Zusätzlich ist mit herkömmlichen lichtmikroskopischen Methoden und einer Auflösung oberhalb des Abbe Limits von 250 nm eine Identifizierung zweier eng benachbarter Foci als getrennt schwer möglich, was den Fehler tendenziell noch weiter erhöhen könnte. Um dieses Problem zu umgehen, wurden neue Marker für die Quantifizierung von DSB untersucht. Ein möglicher Kandidat ist hierbei der Proteinkomplex aus Ku 70 und Ku 80. Ein ringförmig aufgebautes Dimer, welches sich schon Sekunden nach DSB Induktion um die zwei losen Enden der DNA auffädelt und als Ankerpunkt für viele weitere Reparaturproteine, speziell für Nicht-homologe Endenverknüpfung dient [53, 143]. Die geringe zum Schadensort rekrutierte Zahl der Proteine führt zur Bildung von nur sehr kleinen Foci mit einer durchschnittlichen Größe von unter 50 nm. Eine Größe, welche ausreichend klein wäre um DSB induziert durch dicht ionisierende Strahlung in enger Nachbarschaft mittels STED-Mikroskopie und einer Auflösung unter 100 nm zu differenzieren. Bei diesen Relationen spielt jedoch noch eine weitere Problematik eine entscheidende Rolle. Die Fluoreszenzmarkierung selbst.

Immunfluoreszenz bedeutet die Detektion eines Proteins von Interesse durch spezifisch gegen die Antigenstruktur des Proteins rekombinant hergestellte Antikörper, welche zuvor mit Fluorophoren gekoppelt wurden. Das Fluorophor erlaubt eine Visualisierung des Proteins von Interesse und damit eine Lokalisation des Proteins in Situ. Generell wird bei dieser Methode zwischen zwei Arten unterschieden.

Zum einen kann bei direkter Immunfluoreszenz wie in Kapitel „Sekundäre Epifluoreszenzmikroskopie“, ein Antikörper das bindende Epitop sowie am entgegengesetzten Ende des Antikörpers ein Fluorophor besitzen, oder man arbeitet mit sekundärer Immunfluoreszenz und koppelt das Fluorophor mit einem weiteren Antikörper welcher Bindeaffinität zum ersten Antikörper besitzt. Somit steigert man effektiv die Färbe- und Detektionsvariabilität. Die zuvor angesprochene Problematik

ergibt sich nun daraus, dass die Antikörper selbst auch eine bestimmte Größe im Bereich von wenigen 10-20 nm besitzen und damit die Lokalisationsgenauigkeit der Detektion durch gesteigerten Protein zu Fluorophor-Abstand um über 30nm vergrößern (siehe Abbildung 10) und das resultierende Bild erkenntnisrelevant verzerren können .

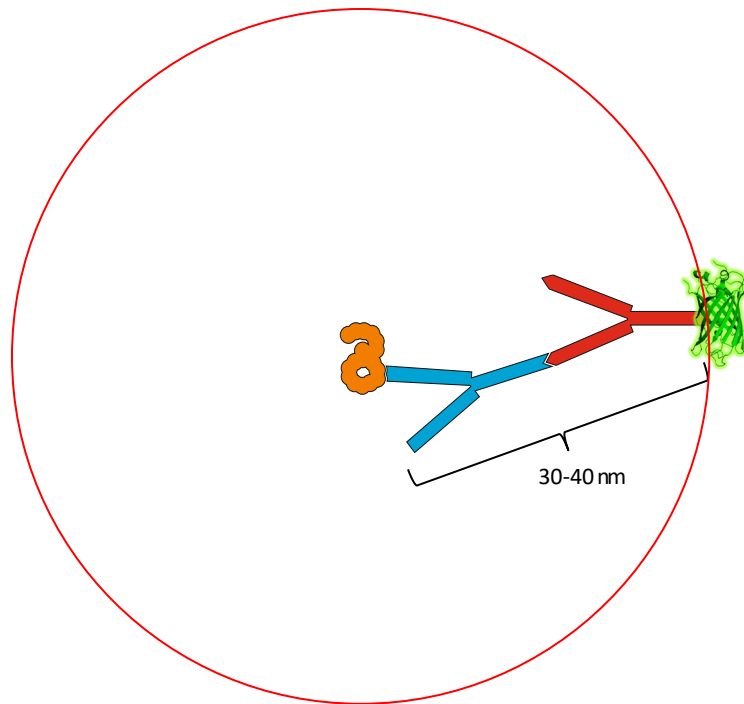


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Ungenauigkeit bei der Detektion von Proteinen mittels Sekundärer Immunfluoreszenz. Das Fluorophor (grün) kann sich theoretisch auf einer Kreisbahn mit dem Radius der doppelten Antikörpergröße (grün,rot) um das Protein von Interesse (orange) befinden.

Ein weiteres Problem der Immunfluoreszenzfärbung bei Fluoreszenzmikroskopie unterhalb des Abbe Limits bietet das Phänomen der Antigenverdeckung. Gerade bei Polymerstrukturen auf molekularer Ebene kann eine Verdeckung benachbarter Epitopbindestellen zu mangelhafter Quantifizierung von DSB durch sogenannte „spotty images“ führen (siehe Abbildung 11).

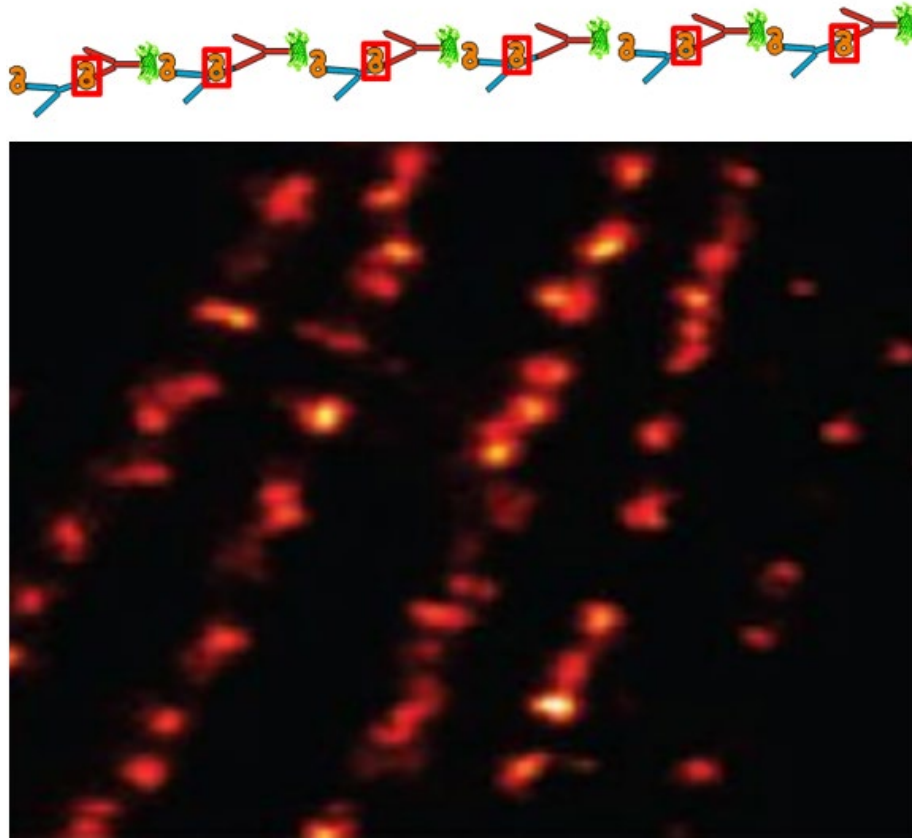


Abbildung 11: Schematische Darstellung des „spotty images“ Effekt bei der Proteinpolymer Detektion durch Sekundäre Immunfluoreszenz, auch Antigenverdeckung genannt (oben). STED mikroskopische Darstellung von Neurofilamenten mit bekanntermaßen durchgehender Struktur scheinen durch Sekundäre Immunfluoreszenz unterbrochen. Maßstab unbekannt. [105, 188]

Eine Zielsetzung dieser Arbeit war die Entwicklung einer direkten Detektionstechnik für DNA DSB ohne die Limitierungen der Immunfluoreszenzmikroskopie und mittels direkter Bindung an DNA-Doppelstrangbrüche für die Identifizierung und Quantifizierung von Strahlenschäden.

## 3 Ionisierende Strahlung

Teilchen oder elektromagnetische Strahlung, deren Energiegehalt groß genug ist, um anderen Atomen oder Molekülen Elektronen aus ihrer Atomhülle zu entfernen, nennt man ionisierend. Auch freie Teilchen wie Protonen, Elektronen oder schwere Ionen mit ausreichender kinetischer Energie, sind ionisierend. Im Folgenden wird ein Überblick über die Wirkung von ionisierender Strahlung im biologischen Kontext gegeben. Zuerst wird allgemein auf die Wechselwirkung von Ionen mit Materie und den Linearen Energietransfer (LET) eingegangen und danach die Wirkung auf biologische Gewebe, wie die DSB-Induktion und die Relative Biologische Wirksamkeit (RBE), näher beleuchtet.

### 3.1 Wechselwirkung von Ionen mit Materie

Beim Durchtritt ionisierender Strahlung durch Materie wird zwischen zwei Arten von Wechselwirkungen mit Atomen der Materie unterschieden. Elektronische Wechselwirkungen werden durch den Energieverlust von Ionen an getroffenen Elektronen der Materie beschrieben und sind dominant bei Energien ab ca.  $10^{-2} - 10^{-1} \text{MeV/u}$ .

Nukleare Wechselwirkungen beruhen auf elastischen Stößen der Teilchen mit Kernen des Targetmaterials und sind dominant für kleine Energien. In dieser Arbeit wurden Ionen verwendet mit  $E > 0,5 \text{ MeV/u}$ , weshalb nukleare Wechselwirkungen vernachlässigt werden können. Interessant hierbei ist der Durchgang von schnellen Ionen durch organische Materie. Dabei hängt die Höhe des Energieverlusts von der Teilchengeschwindigkeit, der Ladung und der Targetmaterie ab [95][38].

#### Linearer Energietransfer

Die in der Strahlenbiologie verwendete Größe ist der LET. Der LET beschreibt den mittleren Energieverlust  $\Delta E$  entlang der zurückgelegten Wegstrecke  $\Delta x$  des Teilchens durch die Materie

$$LET = \frac{\Delta E}{\Delta x}$$

Mit Hilfe des LET können unterschiedliche Strahlenarten also in verschiedene Kategorien betreffend der Dichte der Ionisierungsereignisse entlang ihrer Wegstrecke durch Materie eingeordnet werden. Diese Ionisierungsdichte ordnet Strahlung mit einem LET unter 10 keV/μm in locker ionisierende Strahlung (niedrig-LET) und LET über 10 keV/μm in dicht ionisierende Strahlung (hoch-LET) ein (siehe Abbildung 12) [5].

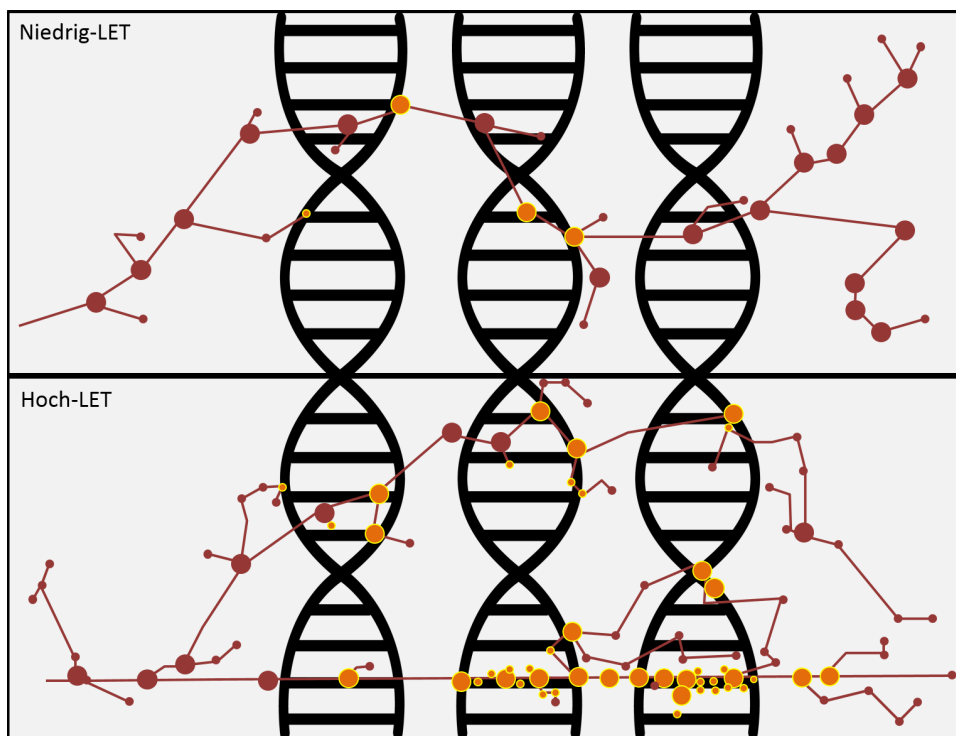


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Verteilung von Doppelstrangbrüchen, induziert durch hoch-LET Strahlung (unten) und niedrig-LET Strahlung (oben). Rote Linien stehen für den von ionisierenden Teilchen zurückgelegte Strecken. Rote Punkte stellen Ionisationsevents mit Molekülen der Umgebung dar. Orange schematisch dargestellt sind Ionisationsevents, welche zur Schädigung von DNA führen können.

## Dosis

Eine weitere in der Strahlenforschung wichtige Größe, wenn es um die Energiedeposition in biologischem Material geht, ist der Begriff der Dosis. Sie beschreibt die deponierte Energie  $\Delta E$  in einem zu bestrahlenden Teil eines Organismus mit der Masse  $m$ ,

$$D = \frac{E}{m}$$

wobei die Einheit von  $D$  Gray ( $Gy$ ) ist.

$$1Gy = 1 \frac{J}{kg}$$

Die Dosisleistung bezieht die Dosis dabei auf eine bestimmte Zeitspanne, in welcher das Target der Strahlung ausgesetzt wird.

Benötigt man die genaue Ionendosis, welche in ein Gewebe induziert werden soll, dient der LET auch zur Dosisberechnung, mit

$$D = F * \frac{LET}{\rho}$$

wobei  $F$  die Fluenz der Teilchen und  $\rho$  die Dichte des Targetmaterials ist. In dieser Arbeit interessant ist der Durchgang von Ionen durch biologische Materie. Da Zellen zu einem Großteil aus Wasser bestehen, kann zur Berechnung die Dichte von Wasser (ca.  $1 \text{ g/cm}^3$ ) verwendet werden.

## 3.2 DSB Induktion durch ionisierende Strahlung

Die Art und die Energie ionisierender Strahlung hat LET abhängig einen großen Einfluss darauf wie Strahlung zu Doppelstrangbrüchen führt. Während hoch-LET Teilchen nahezu jedes Atom auf ihrer Wegstrecke ionisieren, findet bei Photonen nur in einigen 100 nm Abständen eine ionisierende Wechselwirkung mit der Materie statt. Das ermöglicht diesen Strahlenarten mit geringerem LET eine weitere Reichweite im Gewebe und keine schnelle Abbremsung wie es bei Ionen der Fall ist. Auf dem Weg durch den Zellkern können DSB auf direkte oder indirekte Art und Weise induziert werden (siehe Abbildung 12) [5].

### 3.2.1 Direkte DSB Induktion

Bei direkter Induktion von DSBs kollidiert ein Teilchen direkt mit einem Atom der DNA und führt zum Auslösen eines Elektrons aus seiner Hülle. Durch Ladungsverschiebungen kommt es zum Bruch des Phosphodiesterückgrats [158]. Ein Einzelstrangbruch (SSB) ist entstanden. Die Induktion von mindestens zwei SSB in einem Abstand unter 10 bp (ca. 3 nm) zueinander, führt zum kompletten Durchtrennen des DNA Strangs und somit zum DSB [47]. Bei dicht ionisierender Strahlung ereignet sich dieses Event sehr lokal und in großer Zahl. Man spricht von geclustertem DNA-Schaden, definiert durch zwei oder mehr DNA-Brüche, ausgelöst durch einen einzigen Teilchendurchgang innerhalb einer oder zwei DNA-Windungen. Jedoch entstehen



DSB bei ionisierender Strahlung nicht nur durch die Erzeugung von geclusterten SSB (siehe Abbildung 13) [72][185][153].

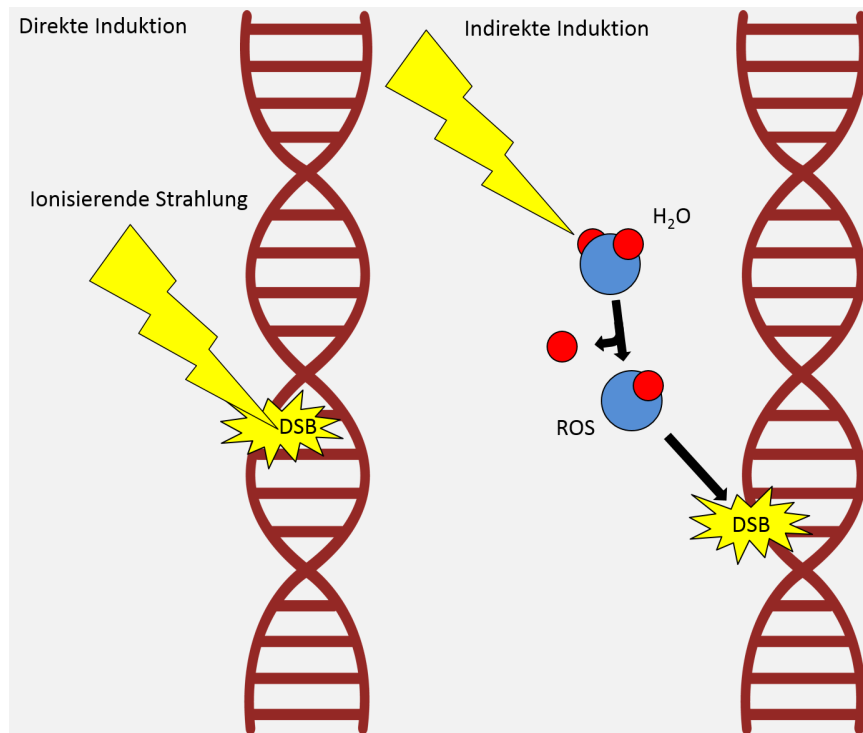


Abbildung 13: Beispielhafte schematische Abbildung einer direkten DSB-Induktion (links) und einer Indirekten DSB-Induktion (rechts) durch ionisierende Strahlung.

### 3.2.2 Indirekte DSB Induktion

Diese Art von DSB entstehen einerseits durch die Induktion von Einzelstrangbrüchen, sowie auch in Kombination mit missglückten Einzelstrangbruch-Reparaturmechanismen [21]. Die Verbindung zur ionisierenden Strahlung wird hierbei durch die Bildung von reaktiven Wasserstoff- und Sauerstoff-Spezies also freien Radikalen, hergestellt. Trifft ionisierende Strahlung im Zellkern auf Wassermoleküle, so kann eine Abspaltung von ROS (Reactive Oxygen Species, z.B. Hydroxyl-Radikale OH $\cdot$  oder Hyperoxid-Anionen O $_2^{\cdot-}$ ) ausgelöst werden [194]. Diese hoch reaktiven und deshalb kurzlebigen Moleküle interagieren mit in der Nähe befindlichen Molekülen wie DNA und führen dort zu Ladungsverschiebungen. Folglich entstehen im Falle von DNA, SSB, welche bei hoher Konzentration und fehlender SSB-Reparatur zu DSB

werden (siehe Abbildung 13). Weit gefährlicher für die Integrität der DNA ist jedoch die Bildung von  $H_2O_2$  durch ROS. Zwar ist  $H_2O_2$  weniger reaktiv als Hydroxyl-Radikale, jedoch erlaubt dies auch weitere Diffusionswege bevor es Schäden anrichten kann und ermöglicht somit, dass  $H_2O_2$  auch bei nicht direkter Bestrahlung des Zellkerns zur Schädigung der DNA führt. Die Tragweite von indirekter DSB-Induktion wird relevant, wenn man betrachtet dass 75,7 % des Nukleus aus Wasser besteht. Die Zahl der SSB, welche an einem Tag innerhalb einer eukaryotischen Zelle entstehen, beläuft sich auf 55000 Stück [21]. Bei  $\sim 10^4$  SSB pro DNA-Windung ist der passende DNA-Reparaturweg also kritisch [72, 76, 153, 185].

### 3.3 Relative biologische Wirksamkeit

Die Menge und Komplexität von induzierten DSB unterscheidet sich also erheblich zwischen den verschiedenen Strahlenarten. Relevant wird dieser Unterschied, wenn man die Auswirkung auf den gesamten Organismus untersucht. Um den durch spezifische Strahlung ausgelösten Schaden für eine Zelle oder einen Zellverbund bewerten zu können, wurde die Relative Biologische Wirksamkeit (engl.:relative biological effectiveness, RBE) als Messgröße eingeführt. Sie besteht aus dem Verhältnis der Dosis einer Referenzstrahlung zur Dosis der Zielbestrahlung und beschreibt, ab welcher Äquivalenzdosis der Zielstrahlung die Effekte der Referenzstrahlung eintreten. Mögliche Effekte sind hierbei z.B. die Anzahl von Chromosomenabberationen, DSB oder auch das 50 % Zellüberleben. Nach Bestrahlung lässt sich durch Vergleiche mit Referenzbestrahlungen, die relative biologische Wirksamkeit berechnen. [97] Der RBE für einen bestimmten Effekt definiert sich also mit

$$RBE_{Effekt} = \frac{D_{Referenz}}{D_{Ziel}}$$

## 4 Mikroskopie und Datenverarbeitung

Um die für diese Arbeit relevanten zellulären Prozesse charakterisieren zu können, bedarf es einer sehr detaillierten Betrachtung der Proteininteraktionen. Mittels Lichtmikroskopie ist es möglich, die Zelle und ihre Organellen mit einer beugungsbegrenzten Auflösung von  $\sim 250$  nm darzustellen, jedoch besitzen die Zellstrukturen ohne Färbung kaum Kontraste. Es ist schwierig, verschiedene Gewebearten voneinander abzugrenzen und unmöglich Proteine zu unterscheiden. Zu diesem Zweck greift man in der Biologie zur Fluoreszenzmikroskopie. Um möglichst kontraststarke und eindeutig identifizierbare Aufnahmen von verschiedenen Proteinen zu erhalten, welche sich von Strukturen der Umgebung unterscheiden, wird die Eigenschaft sogenannter Fluorophore genutzt, Licht spezifischer Wellenlänge zu emittieren. Durch Kopplung der Fluorophore an Proteine von Interesse und spezifische Detektion der von den Fluorophoren ausgehenden Photonen, ist eine eindeutige Zuordnung der Signale zum Protein von Interesse möglich.

### 4.1 Fluoreszenz

Fluoreszenz bezeichnet man den photophysikalischen Prozess, bei welchem ein Molekül, Licht spezifischer Wellenlänge absorbiert und energieärmeres Licht emittiert. Erreicht ein Photon mit einer spezifischen Anregungswellenlänge ein Fluorophor, werden dessen Elektronen von ihrem Grundzustand  $S_0$  in einen angeregten, energetisch höheren Zustand  $S_1$  überführt (siehe Abbildung 14). Ausschlaggebend hierfür ist die Energie des Anregungslichts. Die angeregten Elektronen verweilen eine für das Fluorophor spezifische Zeit (Fluoreszenzlebenszeit) in diesem Zustand und fallen unter Emission von Energie in Form von Photonen wieder auf ihren Grundzustand  $S_0$  zurück. Die Energiedifferenz zwischen absorbiertem Licht und emittiertem Licht ist hierbei auf Schwingungsrelaxationen des Elektrons und interne sowie externe Umwandlungen zurückzuführen (siehe Abbildung 14).

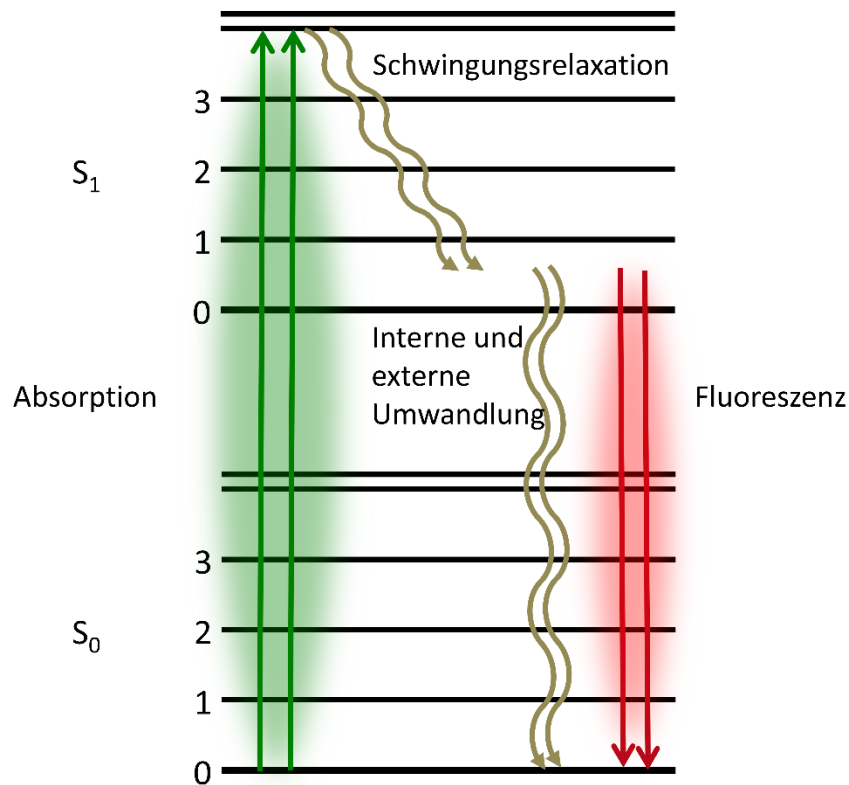


Abbildung 14: Jablonski Diagramm. Schematische Darstellung der Anregung sich im Grundzustand  $S_0$  befindlicher Elektronen durch Absorption von Licht (grün), interne und externe Umwandlungen, sowie Schwingungsrelaxationen führen zu Energieverlust. Die Elektronen fallen von ihrem angeregten Zustand  $S_1$  auf ihren Grundzustand  $S_0$  herab. Dabei wird die überschüssige Energie in Form von Fluoreszenz abgegeben (rot).

Dabei ist unter Schwingungsrelaxation der Verlust von Energie durch Wärmeabgabe innerhalb eines Energieniveaus (bis Schwingungsgrundzustand  $\nu = 0$ ) und unter interner und externer Umwandlungen der Energieverlust durch strahlungslose Übergänge auf ein energetisch tiefer liegendes elektronisches Niveau zu verstehen. Externe Umwandlungen geschehen hierbei jedoch nur bei Kontakt mit weiteren Molekülen. Die Fluoreszenzlebensdauer beträgt in der Regel wenige Nanosekunden. Dieser Wellenlängenunterschied wird nach seinem Entdecker Stokes Shift genannt (siehe Abbildung 15) [181].

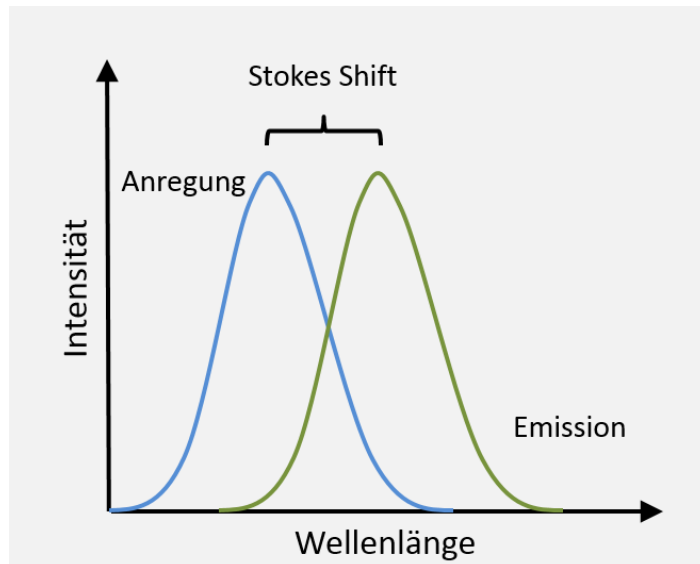


Abbildung 15: Graphische Darstellung des Stokes Shift im Koordinatensystem. Aufgetragen ist hierbei die Intensität der Absorption sowie der Emission von Photonen gegenüber der Wellenlänge des Lichts. Der Abstand der beiden Maxima bezeichnet den Stokes Shift eines Fluorophors.

## 4.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie macht sich den Stokes Shift zu Nutze, um Anregungs- und Emissionslicht zu trennen. Proteine von Interesse werden mit verschiedenen Fluorophoren gekoppelt, deren Fluoreszenzeigenschaften bekannt sind. Aufgrund der molekulspezifischen Unterschiede bei Anregungs- und Emissionslicht ist es möglich die Proteine zu unterscheiden.

Bei herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopen wird die Trennung der Anregung sowie der Emission durch in den Strahlengang eingebrachte Filtermodule durchgeführt. Eine Weißlichtquelle kann dabei so gefiltert werden, dass nur die passende Anregungswellenlänge zur Probe gelangt und auch nur die spezifische Emissionswellenlänge zur bildgebenden Kamera weitergegeben wird (siehe Abbildung 16). Bei weiter entwickelten Methoden, kann monochromatisches Licht (Laser) benutzt werden um das Fluorophor anzuregen. Auch bei Letzterem wird das Emissionslicht durch Filtereinheiten gefiltert um nur Photonen des Proteins von Interesse zu detektieren. Fluoreszenzmikroskopie bleibt wie Lichtmikroskopie beugungsbegrenzt.

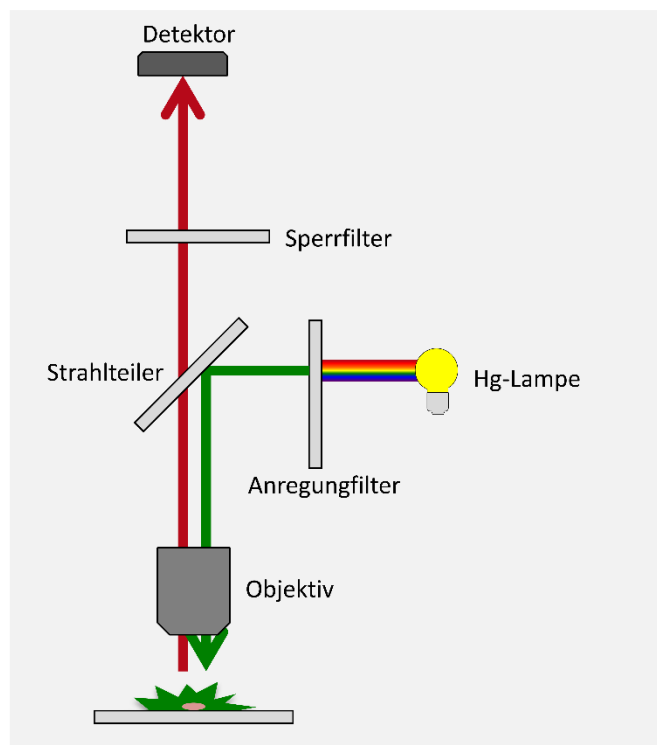
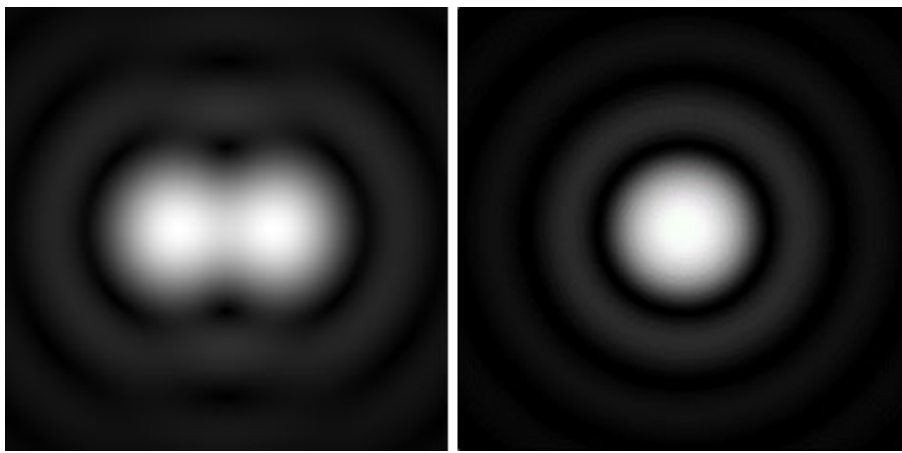


Abbildung 16: Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops

### 4.3 Optische Auflösung

Eine Herausforderung der Mikroskopie besteht darin, die Auflösung eines optischen Systems stetig zu verbessern, um immer kleinere z.B. biologische Systeme charakterisieren zu können. Die Auflösung eines optischen Systems bestimmt den minimalen Abstand zweier punktförmiger Objekte, bei dem sie noch unterschieden werden können (siehe Abbildung 17).



*Abbildung 17: (links) Abbildung zweier punktförmiger Lichtquellen abgebildet durch ein beugungsbegrenztes optisches System. Dargestellt ist die beinahe Verschmelzung der Bildpunkte durch Überlagerung ihrer Airy Disk Ringe. (rechts) Abbildung einer punktförmigen Lichtquelle, abgebildet durch ein beugungsbegrenztes optisches System. Klar zu erkennen ist die Ausbildung der Airy Disk in Form von konzentrischen Kreisen um das Zentrum der Lichtquelle.*

Jedoch ist kein Lichtmikroskop in der Lage ein perfektes Bild, welches den tatsächlichen Zustand der Probe abbildet, darzustellen. Dies beruht auf der Tatsache, dass eine punktförmige Lichtquelle in beugungsbegrenzten Systemen immer verbreitert erscheint (siehe Abbildung 17). Der Intensitätsverlauf folgt einer Airyfunktion in zwei Dimensionen und wird als Airy Disc bezeichnet (siehe Abbildung 18) [59].



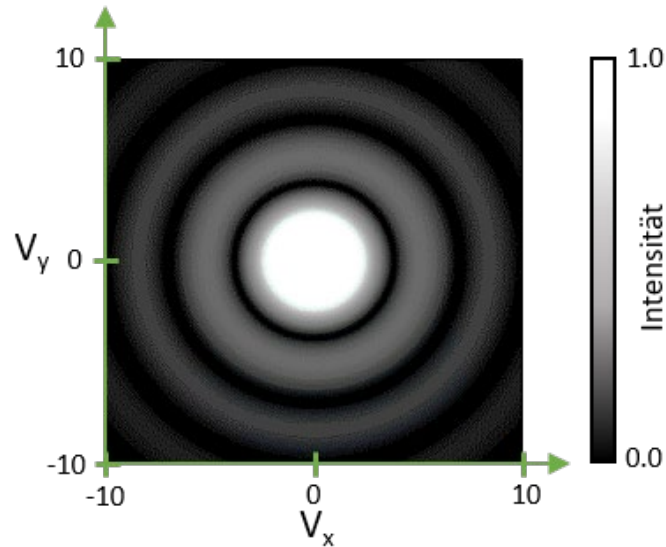


Abbildung 18: Dreidimensionale graphische Darstellung der Airy Disk im Koordinatensystem. Aufgetragen ist die Ausbreitung der Ringe im Raum  $V_y$  gegenüber  $V_x$ . Die dritte Dimension ist durch die Signalintensität von 0-1 gegeben.

Die Auflösung konventioneller Lichtmikroskopie ist also durch die Lichtbeugung begrenzt und wird durch das so genannte Abbe Limit beschrieben. Das Abbe-Limit begrenzt die minimal mögliche Auflösung in Abhängigkeit der Wellenlänge des gemessenen Lichts und definiert somit die Grenzen der gewöhnlichen Lichtmikroskopie mit

$$d_{min} = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha} = \frac{\lambda}{2NA}$$

mit  $\lambda$  der Wellenlänge des Lichts und  $NA = n \sin \alpha$  der numerischen Apertur des Objektivs, wobei  $n$  den Brechungsindex des Mediums zwischen der aufzulösenden Struktur und dem Objektiv darstellt und  $\alpha$  den halben Öffnungswinkel des Objektivs beschreibt. Wird von einem Trockenobjektiv, also einem Brechungsindex von Luft ( $n = 1$ ) und  $\alpha = 90^\circ$  und einer Wellenlänge von 500 nm ausgegangen, begrenzt dies die horizontale Auflösung auf 250 nm. Zwar kann durch die Verwendung eines Ölimmersionsobjektivs und einem Immersionsöl mit  $n = 1,518$ , die Auflösung auf  $\frac{\lambda}{3}$  reduziert werden, jedoch liegt die effektiv resultierende Auflösung auf Grund von material- und baubedingten Ungenauigkeiten vielmehr bei  $\frac{\lambda}{2}$  [132].

Um ein realistisches Abbild der Strukturen zu erhalten, muss jedoch beachtet werden, dass die Airy Disk auch in der Z-Ebene Auswirkungen auf die Auflösung besitzt und die Intensitätsverteilung der sogenannten PSF (Punktspreizfunktion) sich auch axial ausdehnt (siehe Abbildung 19).

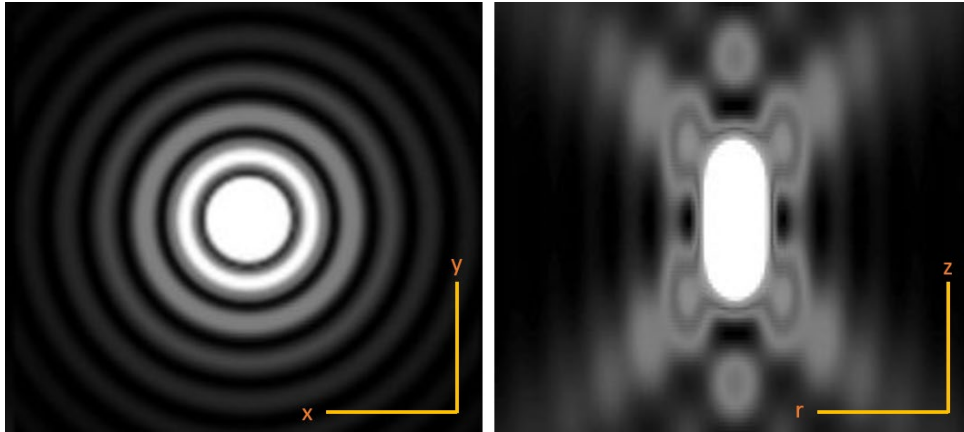


Abbildung 19: Darstellung der Point Spread Funktion in der X-Y Ebene (links) und axial (rechts).

Die Ausprägung (Größe sowie Form) der PSF hängt hierbei von der Qualität des optischen Systems ab. Zur Berechnung der Z-Auflösung eines optischen Systems bedient man sich der Halbwertsbreite der PSF in Abhängigkeit der  $NA$  des Objektivs und  $n$  des Mediums. Die minimale Z-Auflösung wird beschrieben als:

$$d_{min,axial} = \frac{0,88 \lambda}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}}$$

Dies ergibt eine Z-Auflösung von  $d_{min,axial} = 440 \text{ nm}$  bei der Verwendung der oben genannten Eigenschaften eines Trockenobjektivs.

Die Abbildung dreidimensionaler Objekte bietet jedoch weitere schwerwiegende Problematiken. Da dreidimensionale Strukturen Streulichter von außerhalb der Fokusebene mit sich bringen, reduziert sich der Kontrast um den Fokuspunkt und die Auflösung verschlechtert sich drastisch und befindet sich selbst bei Fluoreszenzmikroskopie weit von 250 nm entfernt. Um dieses Problem zu lösen, wurde 1955 die konfokale Mikroskopie entwickelt.

## 4.4 Konfokale Mikroskopie

Die Lösung liegt bei konfokaler Mikroskopie in der Verwendung eines Anregungslasers mit definierter Strahlbreite. Da durch die spezielle Konstruktion nur ein sehr kleiner Bereich und damit nur sehr begrenzt Fluorophore angeregt werden kann Streulicht minimiert und der Kontrast von Signal zu Hintergrund deutlich erhöht werden [123]. Dieser Anregungsbereich wird bei der so genannten Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) durch oszillierende Spiegel als Teil eines Scanningsystems über die gesamte Probe gerastert und die erhaltene Ortsinformation sowie die Anzahl der detektierten Photonen rechnerisch am Computer zu einem Bild zusammengesetzt [36]. Um zusätzlich zu verhindern, dass Streulicht von Fluorophoren aus Ebenen detektiert wird, welche nicht angeregt werden sollten, kann der Laserstrahl in eine bestimmte Ebene fokussiert werden. Dadurch können bessere Auflösungen als mit herkömmlicher Fluoreszenzmikroskopie erzielt werden. Durch die Variation der Lochblendengröße ist es zusätzlich möglich, den Wirkungsbereich weiter zu minimieren [136], die Airy Disk zu beschneiden und so die Auflösung weiter zu senken. Hierbei wird die Lochblendengröße angelehnt an den Radius des ersten Rings der PSF in Airy Units (AU) bestimmt. Die erreichte Auflösung mit einem Radius gleich des Minimums des ersten Airy Rings wird damit auch 1 AU bezeichnet und liegt bei ungefähr 200 nm X-Y Auflösung. Mit sehr leuchtstarken und bleichresistenten Fluorophoren ist auch eine Reduktion des Beobachtungsbereichs um 75 % möglich (0,25 AU), was in etwa einer Auflösung von 130 nm entspricht. Wird die Lochblende jedoch zu weit geschlossen, so vermindert sich die Lichtausbeute zu stark und es ist keine verlässliche Bildaufnahme mehr möglich. Bei biologischen Anwendungen ist selten eine Reduktion der Blendengröße unter 1 AU möglich. Trotz der gesteigerten Auflösung ist die konfokale Mikroskopie immer noch beugungsbegrenzt [46].

## 4.5 STED Mikroskopie

Um diese beugungsbedingte Auflösungsgrenze zu überwinden, wurde 1994 von Stefan Hell das STED-Mikroskop beschrieben und 1999 gebaut. Für die Entwicklung des STED-Mikroskops wurde Stefan Hell im Jahr 2014 der Nobelpreis für Chemie verliehen. Das STED-Mikroskop besteht Grundsätzlich aus einem CLSM-Mikroskop, welches zusätzlich mit einem Laser ausgestattet, wurde um Fluorophore zu einer stimulierten Emission in einem definierten Wellenbereich anzuregen. (Stimulated Emission Depletion). Der zweite Laser, auch Auslöschungslaser genannt, produziert einen doughnutförmigen Wirkungsbereich, welcher über den Lasers des konfokalen Mikroskops gelegt wird (siehe Abbildung 20). Somit reduziert sich der Emissionsbereich, welcher natürliche Fluoreszenzsignale emittiert, um ein Vielfaches und ermöglicht nach Ausfiltern der stimulierten Emissionssignale eine Auflösung weit unter der Beugungsgrenze [73].

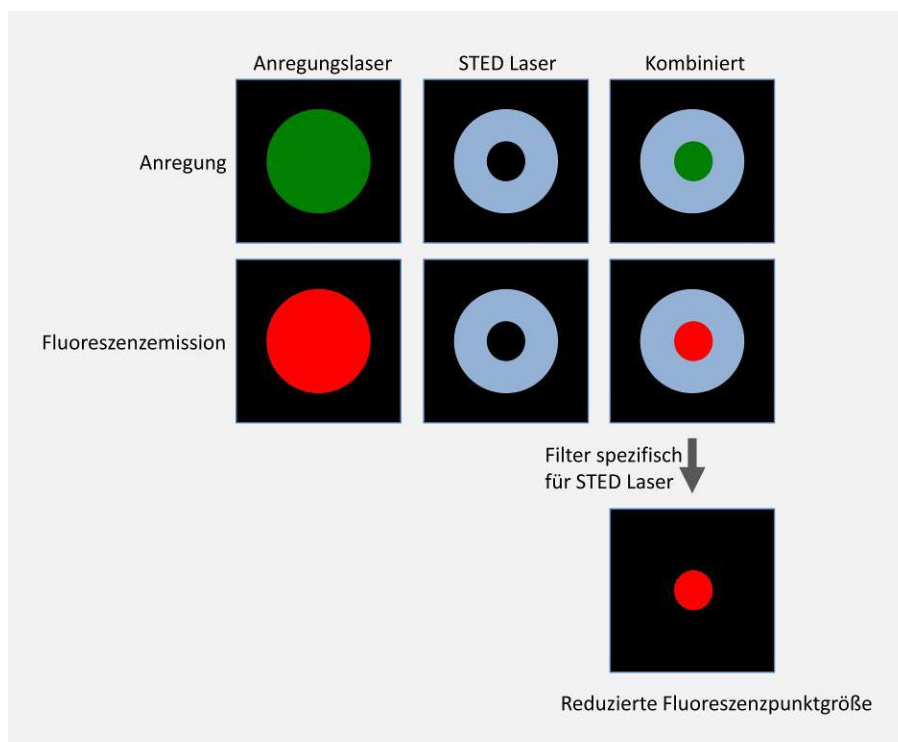


Abbildung 20: Schematische Abbildung der Reduktion des Anregungsbereichs bei STED-Mikroskopie durch Überlagerung mit dem doughnutförmigen STED-Laser.

## 4.6 STED Prinzip

Das STED Prinzip arbeitet also nicht wie der Name vermuten lassen würde, mit einer Auslöschung der Fluorophore im STED-Bereich, sondern regt die Fluorophore dazu an, beim Abstieg auf ein niedrigeres Energieniveau, Licht mit einer festgelegten Wellenlänge zu emittieren. Dadurch ist es möglich, durch Wellenlängenfilter genau dieses Licht zu filtern und nicht auf den Photonendetektor treffen zu lassen. Im Folgenden sind die photophysikalischen Prozesse des STED-Prinzips näher erläutert.

Der erste Schritt des STED-Prinzips besteht wie in Kapitel Fluoreszenz bereits beschrieben, aus der Anregung der Fluorophore.

Die zeitliche Entwicklung der Fluorophore vom Singulett Grundzustand  $S_0$ , welcher durch eine (siehe Kapitel Fluoreszenz), zum ersten angeregten Zustand  $S_1$ ,  $\delta N_1/\delta t$  lässt sich mit der Änderung der Besetzungszahl folgendermaßen beschreiben: Die Anzahl der nicht angeregten Fluorophore  $N_0$  ist

$$N_0 = N - N_1$$

wobei  $N$  die Gesamtzahl der Fluorophore sind und  $N_1$  die Fluorophore beschreibt, welche sich im angeregten Zustand befinden.

Die Anregung lässt sich beschreiben durch die Anregungsrate  $r_A$  und ist abhängig von der Intensität des eingesetzten Anregungslasers  $I_A$  und des Wirkungsquerschnitts  $\sigma_A$ , also der Wahrscheinlichkeit der Anregung des Fluorophors durch ein Photon. Es gilt

$$r_A = I_A \sigma_A$$

Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Fluorophor von seinem ersten angeregten Zustand spontan zum Grundzustand relaxiert, wird hierbei mit  $r_{sp} = \frac{1}{\tau}$  ( $\tau$ =Zeitkonstante) angenommen und als Übergangsrate bezeichnet.  $r_{sp}$  ist als die inverse Lebensdauer (siehe Kapitel 4.1 Fluoreszenz) des angeregten Zustands zu betrachten und beschreibt allgemein die Anzahl an Übergängen quantenmechanischer Objekte zwischen verschiedener Energieeigenzustände. Die Wahrscheinlichkeit ein Fluorophor zu stimulierter Emission anzuregen  $r_{st}$  ist

$$r_{st} = I_{STED} \sigma_{st}$$

und ist von der Intensität des STED Lasers  $I_{STED}$  und dem Wirkungsquerschnitt  $\sigma_{st}$  des Laserlichts und den betroffenen Elektronen des Fluorophors abhängig. Der Wirkungsquerschnitt ist abhängig von der Übergangsrate  $r_{sp}$  und der Photonenflussdichte und kann demnach als Flächeneinheit ( $\text{cm}^2$ ) angenommen werden.

Die Änderungsrate für Fluorophore im 1. Angeregten Zustand ergibt sich also aus

$$\begin{aligned} \frac{\delta N_1}{\delta t} &= N_0 r_A - N_1 (r_{sp} + r_{st}) \\ &= 0 = (N - N_1)r_A - N_1(r_{sp} + r_{st}) \\ &= Nr_A - N_1(r_{sp} + r_{st} + r_A) \\ N_1(r_{sp} + r_{st} + r_A) &= Nr_A \end{aligned}$$

und dadurch

$$N_1 = \frac{N \sigma_A I_A}{I_A \sigma_A + r_{sp} + I_{STED} \sigma_{st}}$$

Um eine Auflösungsverbesserung durch STED-Mikroskopie zu erhalten wird, nun angestrebt, im doughnutförmigen Wirkungsbereich des STED-Lasers  $N_1$  so klein wie möglich zu halten ( $r_{st} \gg r_{sp}$ ). Daraus ergibt sich [45]:

$$I_A \sigma_A + r_{sp} + I_{STED} \sigma_{st} \rightarrow \infty$$

Wenn laut Formel ( $N_1 = I_A \sigma_A + r_{sp} + I_{STED} \sigma_{st} \rightarrow \infty$ ) die Anregung  $I_A \sigma_A$  und die spontane Emission  $r_{sp}$  unabhängig von der Intensität  $I_{STED}$  des STED-Lasers sind, dann kann die Formel

$$I_{STED} \sigma_{st} \rightarrow \infty$$

angenommen werden.

Daraus folgt, dass im STED-Doughnut

$$I_{STED} \gg \frac{r_{st;S}}{\sigma_{st}} = I_S$$

sein soll, wobei  $I_S$  (Sättigungsintensität) die Laserintensität ist, bei welcher 50% der Elektronen sich nichtmehr im Anregungszustand  $N_1$  befinden [74, 75].

Im Doughnut Bereich ist die Intensität des Depletion Lasers und die Entvölkerung von  $N_1$  maximal, nimmt jedoch zum Doughnutzentrum ab und nähert sich 0 an [45]. Je größer die Gesamtintensität  $I_{STED}$  des Depletion-Lasers, desto steiler fallen die

Flanken der Depletion zum Doughnutzentrum. Beschrieben werden kann dies durch die Funktion

$I(x) = I_0 \sin^2\left(\frac{2\pi mx}{\lambda}\right)$ . Demnach gilt, dass (siehe Abbildung 21) ab  $I_{max} > I_S$  die stimulierte Emission immer effektiver, die Verteilung der Moleküle im angeregten Zustand mit steigender  $I_{max}$  steiler wird und die Übergangsbereiche zwischen STED-Wirkungsbereich und Anregungslaser Wirkungsbereich minimiert werden (siehe Abbildung 21).

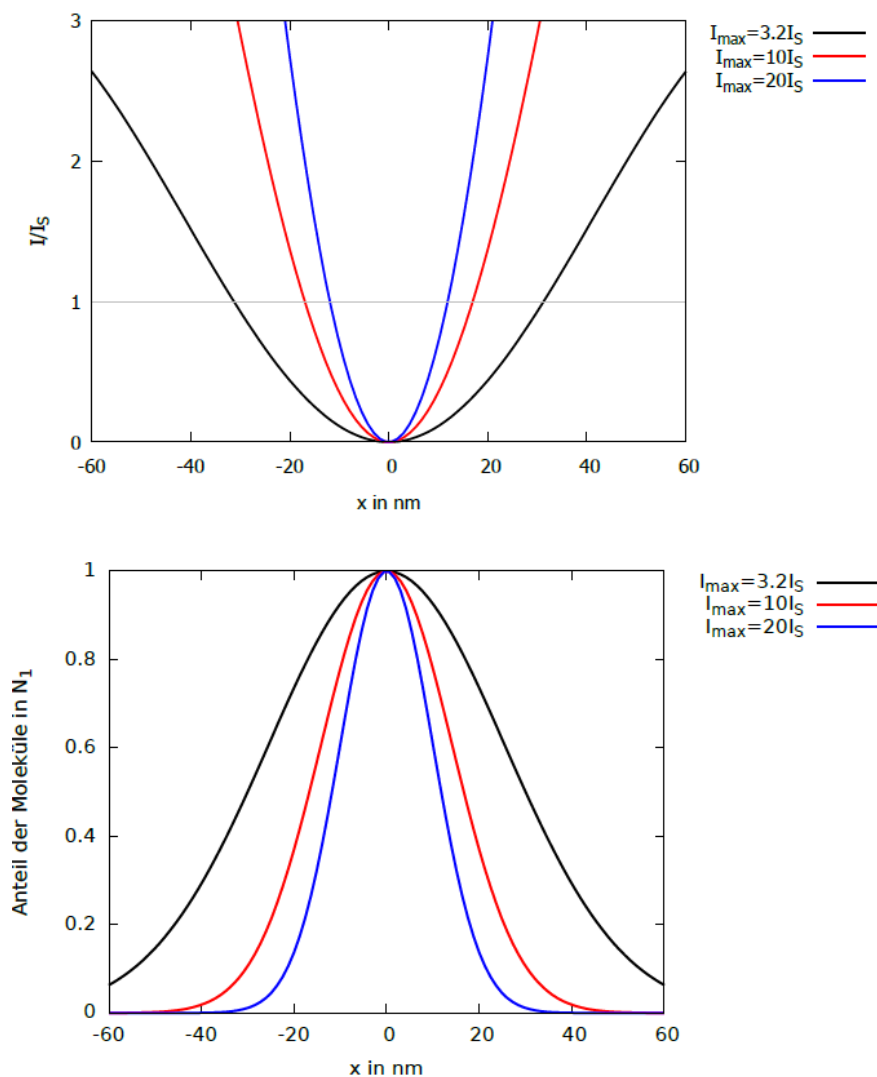


Abbildung 21: (oben) Darstellung dreier Maximalintensitäten des STED-Lasers und ihrer eindimensionalen Verteilung. Aufgetragen sind die Intensitäten gegen die Ausbreitung in der X-Ebene in nm. (unten) Ebenfalls dargestellt sind die zugehörigen Anteile angeregter Moleküle in  $N_1$  in Abhängigkeit von  $x$  in nm. Verschiedene Farben stehen für drei verschiedene hypothetische Maximalintensitäten. Die Graphen entstammen der Dissertation von Judith Reindl 2017 [88].

Die Auflösung des STED-Mikroskops ist somit an das Verhältnis von  $I/I_S$  und somit an die Laserintensität gebunden. Bringt man dieses Maß in Zusammenhang mit dem Auflösungs begriff nach Abbe (siehe Kapitel Optische Auflösung), so wird



$d_{min} = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha}$  lediglich um den Faktor  $1/\sqrt{1 + I_{max}/I_S}$  ergänzt.

Beschreibbar ist diese Abhängigkeit verbunden mit der Auflösungsformel gewöhnlicher Mikroskopie also durch

$$d_{min,STED} = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + \frac{I_{max}}{I_S}}}$$

Die theoretisch somit durch  $I_{max} \rightarrow \infty$  mögliche Auflösung gegen 0 nm, wird in der Praxis jedoch durch verschiedenste Faktoren relativiert [74]. Um für hohe Auflösungen ausreichend helle und kontrastreiche Bilder zu erhalten, müssen die Fluorophore und auch die biologischen Strukturen optimale Bedingungen ermöglichen. Ein großes Problem ist dabei, dass eine zu hohe STED-Intensität die Zahl der angeregten Fluorophore soweit reduzieren kann, dass die Photonenausbeute pro Voxel nicht ausreicht um daraus ein hoch aufgelöstes Bild zu erstellen. Um dieses Problem zu lösen, würden Fluorophore mit sehr hoher Photonenausbeute und hoher Bleichresistenz nötig sein, denn ein weiteres Problem bei der Erlangung von sehr hohen Auflösungen durch STED-Mikroskopie ist das Phänomen des Licht induzierten Bleichens der Fluorophore. Ein möglicher Mechanismus, welcher zum Bleichen des Fluorophors führen kann, ist, dass durch hohe Laserintensitäten bei der Anregung, die Elektronen des Fluorophors nicht vom Singulett Grundzustand auf einen Singulett Anregungszustand gehoben werden, sondern die absorbierte Energie ausreicht um die Elektronen auf einen angeregten Triplettzustand zu heben. Da Triplett Zustände langlebiger sind als Singulett Zustände (Mikrosekunden statt Nanosekunden), ist mit ihnen keine Mikroskopie möglich [45]. Ein weiteres Problem stellt Phototoxizität dar. Durchlaufen Fluorophore den Zyklus zwischen Anregung und Abregung zu oft, kann es zusätzlich zu photochemischen Schädigungen im Molekül kommen, worauf das Fluorophor nicht weiter angeregt werden kann. Triplettzustände erhöhen zusätzlich die Reaktionswahrscheinlichkeit mit Molekülen der Umgebung wie z.B. ROS, welche zur Schädigung des Moleküls führen können [144, 198]. Die Anzahl der möglichen Zyklen ist also stark an die Laserintensität und die Bleichresistenz des Fluorophors gebunden.

Werden bei STED-Mikroskopie sehr hohe Laserintensitäten, sei es durch den STED-Laser oder den Anregungslaser, benötigt um hohe Auflösungen zu erhalten. So kann es sein, dass die Fluorophore bleichen bevor genügend Photonen emittiert wurden um ein hochaufgelöstes Bild zu erhalten. Somit wurden zwar Aufnahmen nicht biologischer Strukturen mit einer lateralen Auflösung von 2,4 nm erreicht [189], mit biologischen Strukturen ist dies jedoch nicht möglich. Viele biologischen Gewebe, welche während der Messdauer den hohen Laserintensitäten des STED-Lasers ausgesetzt sind, würden durch die starken Energien ihre Integrität verlieren und denaturieren. Bisher bewegt sich die maximale Auflösung bei Aufnahmen biologischer Strukturen zwischen 20 nm und 50 nm [15].

## 4.7 Auflösungsverbesserung durch Entfaltung

Wie im Kapitel optische Auflösung erwähnt, wird jeder abzubildende Punkt in einem optischen System als punktförmige Lichtquelle in Form einer Punktspreizfunktion (PSF) abgebildet. Dies führt bei mikroskopischen Aufnahmen zur Bildung von unerwünschten Unschärfen in Lateraler und axialer Ebene. Bei allen beugungsbegrenzten Mikroskopietechniken ist deshalb die realitätstreue Darstellung von punktförmigen Lichtquellen nur möglich, wenn die PSF nachträglich und computergestützt aus dem Bild herausgerechnet wird. Mit dieser sogenannten Entfaltung der Bilddaten ist eine weitere Auflösungsverbesserung möglich (siehe Abbildung 22).



Abbildung 22: Schematische Abbildung der Entwicklung einer punktförmigen Lichtquelle über die Abbildung durch ein optisches System und die Rekonstruktion des Originalbildes durch Entfaltung (von links nach rechts).

Dabei handelt es sich, mathematisch betrachtet, um die Umkehrung der Faltung einer Funktion durch eine zweite, beschreibbar als

$$g = h * f$$

mit  $g$  als gefaltetes Bild von  $f$ , des ursprünglichen Abbildungsobjektes, verzerrt durch die PSF  $h$ .

Um die tatsächliche Ortsinformation jeder gemessenen Struktur durch die ortsbezogenen Signalintensitätsmessungen eines Bildes zu erhalten, muss, da die PSF eines Punktes in drei Dimensionen ausgebreitet ist, jeder Messpunkt mit den ortsspezifischen Werten der PSF in allen drei Dimensionen gewichtet werden. Rechnerisch ist dies nur möglich, indem die verschiedenen Faktoren in den Fourierraum transformiert werden. Dies führt zu folgender Gleichung:

$$G = H \cdot F$$

Hiermit würde sich theoretisch  $F$  bestimmen lassen als  $\frac{G}{H}$ . Dies ist jedoch in der Praxis nicht ganz zutreffend, da erstens  $H$  Nullstellen besitzen kann, die Funktion somit nicht definierbar wäre und in der Anwendung das Bild meist mit additivem Rauschen (Elektrisch und Photonenbedingt) behaftet ist.

Deshalb wird die Gleichung um diesen Störungsfaktor  $n$  erweitert. Es gilt:

$$G = H \cdot F + n$$

Durch den Störungsfaktor wird eine analytische Lösung der Gleichung unmöglich und bedarf einer iterativen Herangehensweise.

Um die Abbildung so realitätsgetreu wie möglich zu machen, ist es möglich entweder die PSF anhand von Referenzbildern zu vermessen oder mathematisch mittels der Mikroskopiedaten zu errechnen. Ein entsprechendes Beispiel für eine Annäherung an das Originalbild durch Entfaltung ist in Abbildung 22 zu sehen [62].

## 4.8 Cross-Talk

Da die in der Mikroskopie verwendeten Fluorophore, besonders bei der Mehrfarben STED-Mikroskopie, spektral betrachtet Emissionen und Absorptionsspektren in dichter Nachbarschaft zueinander besitzen müssen, kommt es häufig zur Bildung von Artefakten bei der Bildaufnahme. Photonen von Fluorophoren, welche im Moment der Aufnahme nicht gemessen werden sollen und deren Emissionsspektren nicht im Fokus der Messung liegen, werden durch die Detektoren detektiert. Dies geschieht obwohl durch die einstellbaren Anregungslaser und Detektionsfenster eine weitaus bessere Abgrenzung der verschiedenen Fluorophore im Gegensatz zur Epifluoreszenzmikroskopie möglich ist, da die Emissions- und Anregungsspektren der Fluorophore einer Normalverteilung folgen und nicht klar abgrenzbar sind. Für eine verlässliche Analyse ist es daher unerlässlich, diesen so genannten Cross-Talk zu bestimmen und zu entfernen. Hierfür werden Kalibrationsproben mit jeweils nur einem Fluorophor, also einer Farbe pro Probe, benötigt. Es wird je eine Messung mit den Aufnahmeeinstellungen für das tatsächlich vorhandene und erwünschte Fluorophor und eine Messung mit den Einstellungen des nicht auf der Probe vorhandenen Fluorophores durchgeführt. Aus den Bilddaten entnommenen auch „bleed through“ genannten Signale im jeweils falschen Kanal, ist es möglich die kanalfremden Signale aus zukünftigen Aufnahmen computergestützt zu entfernen.

## 4.9 Immunfluoreszenzfärbung

Eine nanoskopisch genaue Auflösung und realitätstreue Abbildung ist allein mit einer ausgeklügelten Mikroskopiertechnik jedoch trotz alledem nicht erreichbar. Unabdingbar hierfür ist die Probenvorbereitung. In Fluoreszenzmikroskopie-Systemen ist es essentiell die zu untersuchenden zellulären Strukturen mittels Fluorophoren sichtbar zu machen und Hintergrund-Fluoreszenz zu vermeiden. Dies wird in der Biologie mit Antikörpern bewerkstelligt. Hierbei macht sich die Wissenschaft die Bindespezifität von Antikörpern und ihren spezifischen Antigenen zu Nutze. Antikörper bestehen aus zwei schweren (H) und zwei leichten Aminosäureketten (L), welche durch kovalente Disulfidbrücken zu einer Y Form verbunden sind. An den beiden Enden des Kopfteils, den Fab Regionen (Antigen bindende Fragmenten), befinden sich sogenannte Paratope. Aminosäurekettenschleifen, welche durch ihre charakteristischen Windungen unterschiedliche Bindeaffinitäten zu verschiedensten zellulären Strukturen besitzen können. Durch die Kopplung von Fluorophoren an die stammartigen FC Regionen ist eine strukturspezifische Markierung möglich (siehe Abbildung 23). Die Produktion wird hauptsächlich durch Impfung des Antigens in Säugetieren wie Mäusen, Hasen und Ziegen erreicht, dessen humorale Immunantwort Antikörper mit Bindspezifität gegenüber dem Antigen erzeugt [42, 86].

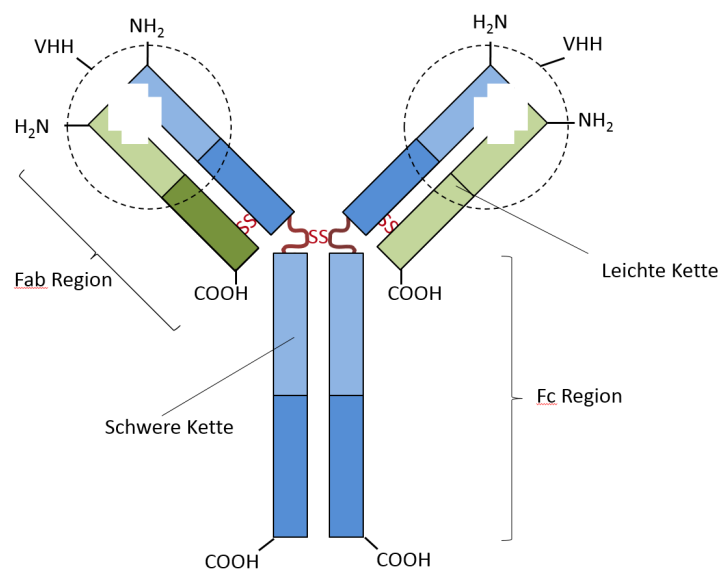


Abbildung 23: Schematische Abbildung eines Antikörpers, bestehend aus zwei leichten Ketten (grün) und zwei schweren Ketten (blau). Die Verbindung zwischen den zwei Kettenarten wird durch Schwefelbrücken (rot) bewerkstelligt. Die Endbereiche der Fab-Region bestehen aus variablen Antigenbindestellen (umkreist) auch VHHs genannt.

Bei Immunfluoreszenz-Mikroskopie werden also Antikörper, welche ein Protein von Interesse binden, chemisch mit Fluorophoren gekoppelt. So wird es möglich, die genaue Lokalisation des Proteins unter dem Fluoreszenzmikroskop zu untersuchen und zelluläre Strukturen zu charakterisieren. Um variabel die Fluorophore und somit auch die Wellenlängen für die Mikroskopie zu ändern, wird häufig mit sekundärer Immunfluoreszenz gearbeitet. Hier bindet zuerst ein primärer Antikörper an das gewünschte Antigen und ein zweiter fluoreszenzmarkierter Antikörper an den primären Antikörper (siehe Abbildung 24). Entscheidend hierfür ist die Reaktivität der verwendeten Immunglobuline. Da herkömmliche Antikörper für zelluläre Systeme mit ungefähr 15 nm relativ groß sind, können sie nicht einfach in die Zellmembran diffundieren. Verlässliche Färberesultate lassen sich demnach nur erreichen, wenn die Zellmembran durch Permeabilisation durchlässig gemacht wird. Dies setzt voraus, dass die Zelle tot und mit Fixierungsmitteln wie Formaldehyd fixiert wurde [42, 70].

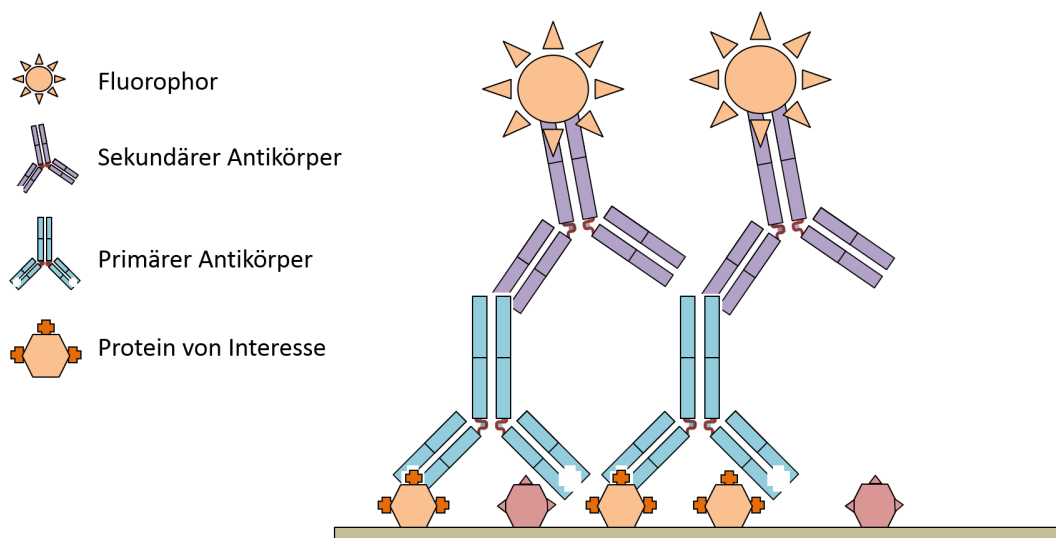


Abbildung 24: Schematische Darstellung der sekundären Immunfluoreszenzfärbung. Der Primäre Antikörper bindet spezifisch an Antigene eines Proteins von Interesse. Der auf den primären Antikörper spezifisch abgestimmte sekundäre Antikörper findet die Fc-Region des primären Antikörpers. Durch die Kopplung eines Fluorophors an die Fc-Region des sekundären Antikörpers ist eine fluoreszenzmikroskopische Detektion des Proteins möglich.

## 4.10 Lebendzellmikroskopie

Um lebendige Zellen mikroskopisch untersuchen zu können und zelluläre Prozesse *in vivo* zu charakterisieren, müssen andere Färbemethoden verwendet werden. Das Ziel hierbei ist es die Zelle so nah an den optimalen Kulturbedingungen zu behandeln wie es das Experiment zulässt, um die Zelle am Leben zu halten, während die zu untersuchenden Prozesse dokumentiert werden. Um jedoch Fluoreszenz-Mikroskopie durchführen zu können, bedient man sich der fluoreszenten Eigenschaft von Proteinen wie zum Beispiel GFP (engl. green fluorescent protein). Ursprünglich gewonnen aus der Quallenart *Aequorea victoria* [177] und heute rekombinant in allen Farben produziert, wird die Gensequenz von GFP „downstream“ des Gens des zu markierenden Proteins kloniert und über Transfektion in den Organismus eingebracht. Dies führt dazu, dass bei Proteinbiosynthese das Protein von Interesse gekoppelt an GFP synthetisiert wird. Mittels Fluoreszenzmikroskopie und geeigneten Aufbauten für die Stabilisierung des p.H.-Werts des Mediums und einer konstanten Temperaturregelung kann die Lokalisation des Proteins über längere Zeit in der lebenden Zelle durchgeführt werden [50].



## 5 Aufbau und Funktion der verwendeten Bestrahlungsquellen

### 5.1 $\alpha$ - Quelle

Für die Bestrahlung von eukaryoten Zellen mit  $\alpha$ -Teilchen, wurde die  $\alpha$ -Bestrahlungsquelle der Fakultät für angewandte Physik und Messtechnik der Universität der Bundeswehr in Neubiberg verwendet. Die  $\alpha$ -Quelle wurde 1989 von Roos und Kellerer [146] gebaut und besteht aus einer  $^{241}\text{Am}$  (Americium) Scheibe mit 85 mm Durchmesser, welche von einer 2  $\mu\text{m}$  dicken Gold- Palladium Legierung umschlossen ist. Die emittierten  $\alpha$ -Teilchen, also Helium-4-Kerne, besitzen eine Energie von  $\sim 5,49$  MeV. Die Gesamtaktivität der Quelle beläuft sich auf  $\sim 0,37$  GBq. Die aktive Scheibe befindet sich in einem zylinderförmigen Edelstahltopf mit 135 mm Höhe und 400 mm Durchmesser, dreht sich mit einer Frequenz von 5 Hz um ihr Zentrum und gleicht somit Inhomogenitäten bei der Bestrahlung aus. Dabei hilft auch ein über der Quelle angebrachter 15 mm dicker Aluminiumkollimator, der durch „wobbleartige“ Bewegungen eine gleichmäßige Bestrahlung ermöglicht. Der Kollimator hat wabenartig angeordnete Bohrungen, welche Teilchen höchstens in einem Winkel von  $12^\circ$  Abweichung von der senkrechten Achse passieren lassen. Der komplette Aluminiumtopf kann während der Bestrahlung mit Helium begast werden, um den Energieverlust der  $\alpha$ -Teilchen durch Kollisionen mit anderen Molekülen zu reduzieren. Die  $\alpha$ -Teilchen verlassen die Quellenkammer durch eine 2,5  $\mu\text{m}$  dicke Mylar Folie. Dies ermöglicht die Bestrahlung von Zellen in normaler Atmosphäre in der Probenkammer. Die Probenkammer ist ein kühlbarer zylinderförmiger Edelstahlbehälter, welcher auf der Quelle aufgebracht ist und durch Wasserreservoirs bei  $\text{H}_2\text{O}$ -gesättigter Atmosphäre gehalten werden kann. Dabei liegt die zu bestrahlende Probe in Form eines mit Zellen bewachsenen Deckglases, wobei die Zellen Richtung Strahlquelle zeigen, auf der oben genannten Mylar-Folie. Das Deckglas liegt jedoch nicht direkt auf der Folie auf. Als Abstandshalter, damit die sensible Zellschicht nicht durch direkten Folienkontakt beschädigt wird, dient ein 3 mm starker Kunststoffring, auf welchem die Deckgläser vorsichtig und mit Zellschicht nach unten aufgelegt werden (siehe Abbildung 25).

Die Dosisleistung beträgt hierbei 0,12 Gy/min. Durch den Energieverlust im Heliumgas, Mylarfolie, Luft und Medium verbleibt eine Restenergie von 2,0 MeV auf

Zellhöhe. Der LET beträgt  $150 \text{ KeV}/\mu\text{m}$ . Die  $\alpha$ -Teilchen der  $^{241}\text{Am}$ -Quelle eignen sich hervorragend, um biologische Experimente an Zellen aller Art durchzuführen und zelluläre Strukturen zufallsverteilt zu bestrahlen. Dabei wird eine verhältnismäßig hohe Energie in einem kleinen Bereich deponiert. Nachteilig an der Verwendung von  $\alpha$ -Teilchen ist die kurze Reichweite im zu untersuchenden Gewebe. Die von der Quelle ausgehenden  $5,49 \text{ MeV}$  reichen gerade aus um eine Zellschicht  $7,4 \mu\text{m}$  zu penetrieren und schränken demnach die Durchführbarkeit vieler Experimente ein.

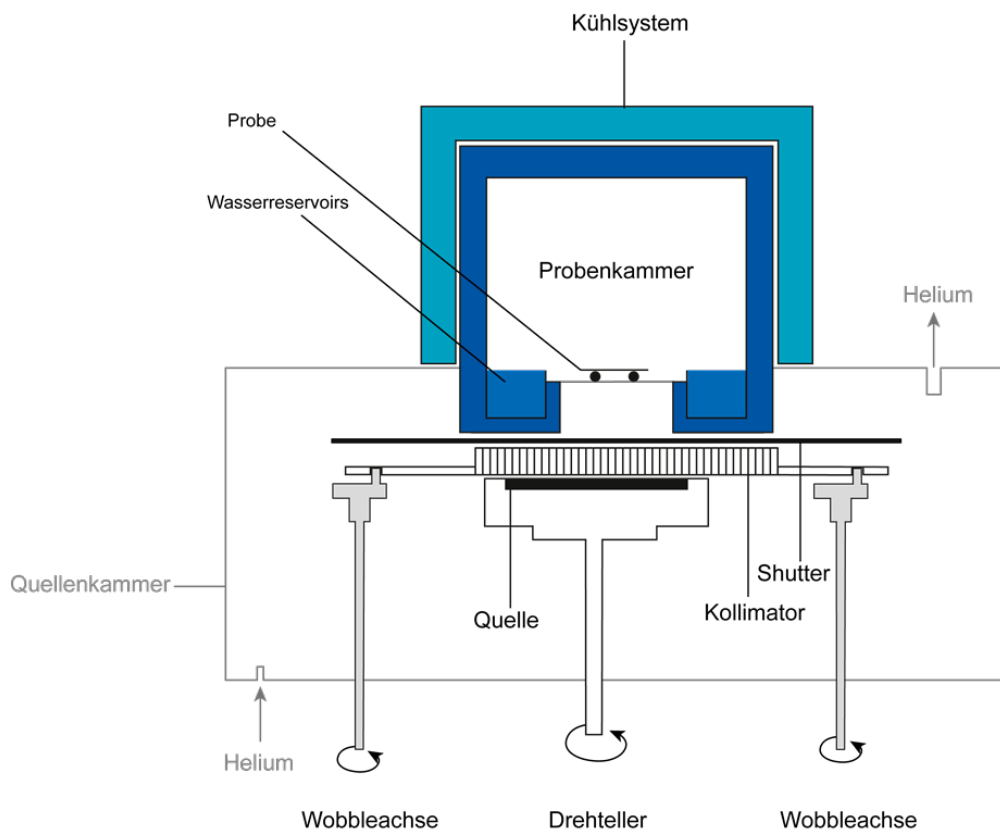


Abbildung 25: Schematischer Aufbau der  $\alpha$ -Quelle in Neubiberg.

## 5.2 Teilchenbeschleuniger

Eine Lösungsmöglichkeit für diese drei Probleme bietet die Bestrahlung mit beschleunigten Ionen am Supraleitenden Nanoskop für angewandte Kernphysikalische Experimente (SNAKE) am Maier-Leibnitz-Laboratorium in Garching. Die Beschleunigung der Teilchen wird hierbei durch einen 14 MV Tandembeschleuniger durchgeführt [7, 182]. Dieser Van-de-Graaf-Beschleuniger nutzt die Ladung eines Ions um es durch elektrische Felder bis nahezu Lichtgeschwindigkeit zu beschleunigen. Dies macht sie nicht nur für biologische Forschung, sondern auch für Materialuntersuchungen und medizinische Zwecke interessant. Ein Beispiel hierfür ist die gezielte Bestrahlung von Tumoren bei der Protonen-Strahlentherapie. Besitzt also ein Ion eine negative Ladung, so wird es von seiner Ionenquelle im Beschleuniger in Richtung eines positiv geladenen Terminals beschleunigt. Dabei ist die Spannung des Terminals für die Beschleunigung des Ions kritisch. Je höher die positive Ladung der Terminalelektrode ( $V_{\max} = 14 \text{ MV}$ ), desto schneller kann das Ion in der ersten Beschleunigungsphase beschleunigt werden. Um eine möglichst hohe Spannung erzeugen zu können, muss verhindert werden, dass durch die sehr hohe elektrische Feldstärke ein Überschlag zu anderen Bauteilen oder Leitern in der Umgebung entstehen. Dazu wird der Beschleunigertank mit dem Isoliertgas Schwefelhexafluorid  $\text{SF}_6$  gefüllt. Die zweite, für Tandem-Beschleuniger typische, Beschleunigungsphase besteht aus einer Beschleunigungsstrecke bis zur so genannten Stripperfolie [61]. Da ohne eine weitere Ladungsänderung das Ion langsam wieder Energie verlieren würde, wird es nach der Terminalelektrode innerhalb des Terminals durch eine Kohlenstofffolie geführt, welche beim Durchgang die Elektronen des Ions abstreift [61]. Die daraus resultierende positive Ladung des Ions ermöglicht eine zweite Beschleunigung zum Austritt des Beschleunigers, weg vom positiv geladenen Terminal (siehe Abbildung 26) [180].

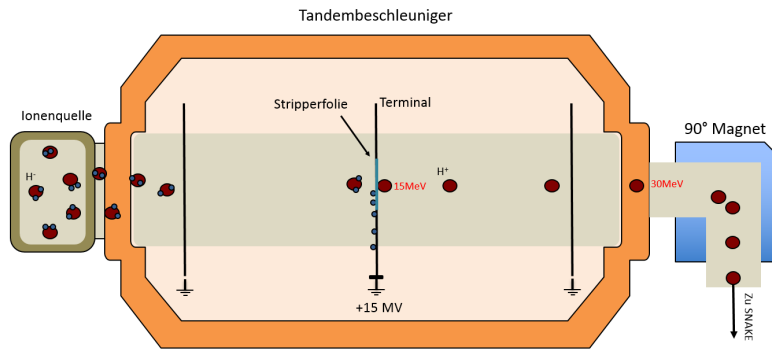


Abbildung 26 :Schematische Darstellung des Beschleunigungsvorgangs des Tandemteilchenbeschleunigers am Meier-Leibnitz-Laboratorium in Garching.

Durch diese Art von doppelter Beschleunigung ist es mit dem Tandembeschleuniger möglich, deutlich höhere Ionenenergien bei gleicher Spannung und Ionenart zu erhalten als andere Beschleunigungsarten. Der beschleunigte Ionenstrahl verlässt den Beschleuniger und wird mit Hilfe eines 90° Ablenkmagneten abgelenkt. Hierbei kann sichergestellt werden, dass nur Ionen mit dem gewünschten Ladungszustand in die Experimentstrahlrohre gelangen (siehe Abbildung 27).

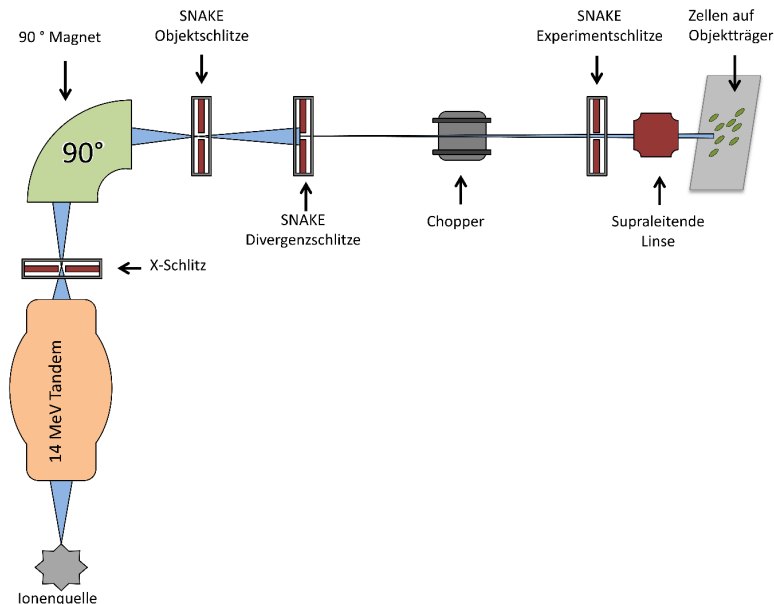


Abbildung 27: Schematischer Aufbau des Tandemteilchenbeschleunigers und des 90° Magneten am Meier-Leibnitz Laboratorium in Garching sowie der weitere Verlauf des 0° Stahlrohrs über SNAKE bis zur Probenebene. Aufbau und Strahldarstellung (blau)sind nicht maßstabsgetreu.

Die Ionenenergien für die hier beschreibenden Bestrahlungsexperimente betragen 55 MeV für Kohlenstoffionen, 33 MeV für Lithium und 20 MeV für Protonen.

## 5.3 Supraleitendes Nanoskop für angewandte kernphysikalische Experimente (SNAKE)

Die gezielte Bestrahlung zellulärer Strukturen erfolgt am Ionenmikrostrahl SNAKE [60]. Hier können Ionenstrahlen auf  $\sim 1 \mu\text{m}$  Größe fokussiert werden. SNAKE wurde 2002 von G. Datzmann am  $0^\circ$  Strahlrohr des 14 MV Tandembeschleunigers in Garching errichtet und wird seither für eine Fülle verschiedener wissenschaftlicher Experimente genutzt [35]. Der Ionenmikrostrahl besteht aus einer Anordnung von drei supraleitenden, magnetischen Quadrupollinsen in einer mit flüssigem Helium gekühlten Cryostatkammer). Werden die beschleunigten Ionen in Richtung SNAKE gelenkt, wird im weiteren Verlauf des Strahlrohrs der Strahl mittels horizontaler und vertikaler Schlitze auf ungefähr  $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$  zugeschnitten. Der vorbereitete Strahl tritt in den Bereich der Quadrupollinsen ein und wird durch Fokussierung der Ionen auf eine Größe von etwa  $1 \mu\text{m}$  gebündelt (siehe Abbildung 27). Die Ionen treten durch eine mit Kaptonfolie versiegelte Austrittsnase aus. Die Kaptonfolie dient hierbei zur Erhaltung des Vakuums und besitzt eine Stärke von  $7,5 \mu\text{m}$ . Hinter der Austrittsnase befindet sich die Probe auf dem Probenstisch eines um  $90^\circ$  Grad um die horizontale Achse gedrehten Epi-Fluoreszenzmikroskops (Axiovert 200M, Zeiss, Deutschland). Dieser Aufbau ermöglicht die Lebendzellbetrachtung der zu untersuchenden Organismen, während zelluläre Strukturen mit einer Genauigkeit von unter einem Mikrometer mit einer definierten Dosis bestrahlt werden können [2, 20]. Die Messung der induzierten Strahlendosis wird mit Hilfe eines hinter der Probe befindlichen Photomultiplierdetektors ermittelt. Dank einer schnell ansteuerbaren Strahlablenkungsanlage (Chopper) dem SNAKE vorgelagert, kann die Bestrahlung nach definierter Dosisinduktion beendet werden (siehe Abbildung 27).

### 5.3.1 Lebendzellbestrahlung

Für die Lebendzelleexperimente zur Charakterisierung von Chromatinkinetiken wurden die Zellen senkrecht in sogenannten Lebendzellkontainern (LCI-Kontainer; engl. live cell imaging) bestrahlt (siehe Abbildung 28). Die Kontainer bestehen aus einem Edelstahlkorpus, aufgebaut aus einem Deckel und einem Reservoir-Teil. Beide Bauteile besitzen eine Bohrung auf gleicher Höhe und ermöglichen somit die Bestrahlung durch die Kammer hindurch. Die Bohrung des Reservoir-Teils ist mit

einem EJ-228 Scintillator verschlossen, auf welchem die Zellen ausgesät werden. Da der Reservoir-Teil eine 6 ml Kulturmedium fassende Ausfräsung besitzt, können die Zellen ohne Deckel im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert werden. Das Design der LCI Kontainer geht auf die ursprüngliche Entwicklung von V. Hable im Zuge seiner Dissertation 2011 zurück [180]. Für die Bestrahlung wird der Deckel mit mehreren Schrauben aufgeschraubt, wobei die vorhin erwähnte Bohrung mit einer 4,7 µm dicken Polypropylenfolie verschlossen ist. Somit geht möglichst wenig Ionenenergie bei der Passage der Folie verloren. Der Kontainer kann nun zur Bestrahlung und anschließenden bzw. parallelen Mikroskopie bis mehr als 6 h in den Mikroskoptisch hinter der Austrittsnase am SNAKE positioniert werden und ermöglicht die simultane Bestrahlung der lebendigen Zellen und gleichzeitige Fluoreszenzmikroskopie (siehe Abbildung 28) Die Temperatur von 37 °C kann im LCI-Kontainer durch elektrisch beheizbare Halterungen gewährleistet werden. Der p.H-Wert des Mediums im Kontainer kann bei Langzeitaufnahmen von mehreren Stunden durch HEPES gepuffert werden.

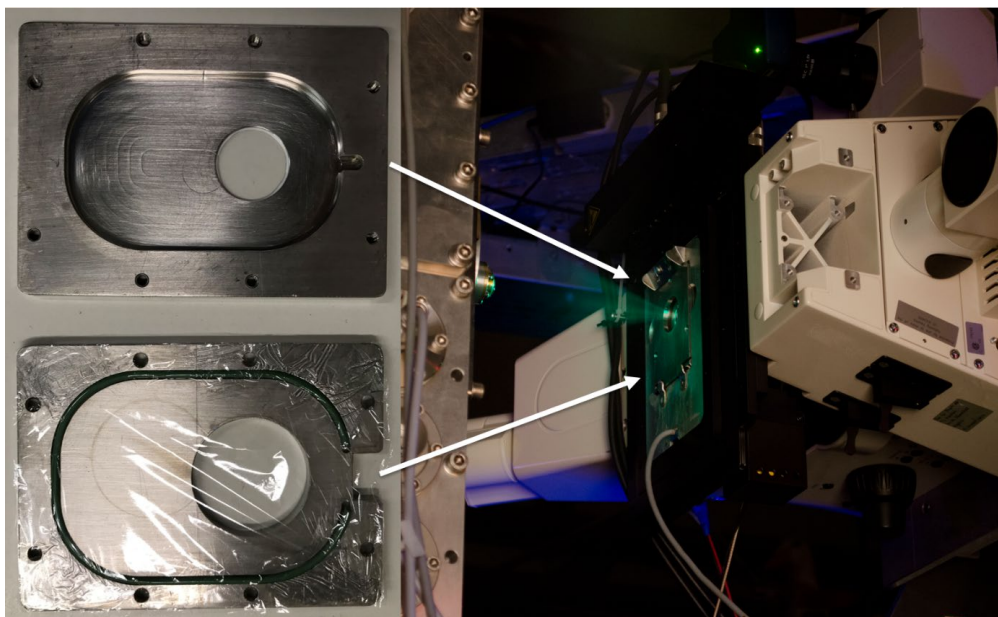


Abbildung 28: Fotografie der in dieser Arbeit verwendeten Weiterentwicklung des LCI-Containers nach Volker Hable (links). Abbildung des im Strahl eingebauten LCI-Containers auf dem Mikroskoptisch an SNAKE. (rechts, Bild von Christian Siebenwirth).

### 5.3.2 Schrägbestrahlung

In dieser Arbeit wurden Zellen an SNAKE auf zwei verschiedene Arten bestrahlt, jeweils abhängig vom gewünschten biologischen Endpunkt. Für die Analyse der Focistruktur und Kinetiken der untersuchten Reparaturproteine und des Chromatins wurde eine Schrägbestrahlung durchgeführt. Die Zellen befinden sich zum Bestrahlungszeitpunkt auf Deckgläschen und werden in einem Winkel von  $9^\circ$  zur Strahlrichtung bestrahlt (siehe Abbildung 29). Dies gewährleistet einen sogenannten DSB-Track in annähernd horizontaler Ausrichtung und macht die Analyse eines möglichst großen DNA-Fokus mittels höchst auflösender STED-Mikroskopie in x und y möglich. Hierfür wurde eine von J. Reindl 2017 [88] konstruierte Deckglashalterung benutzt, welche direkt auf dem Mikroskopisch hinter der Austrittsnase montiert werden kann (siehe Abbildung 29). Da die Ionen zu wenig Energie besitzen um die komplette Probe zu durchdringen und durch einen Ionendetektor gezählt werden können, muss die Bestrahlungsdosis anhand der zuvor gemessenen Ionenzählrate bestimmt werden.

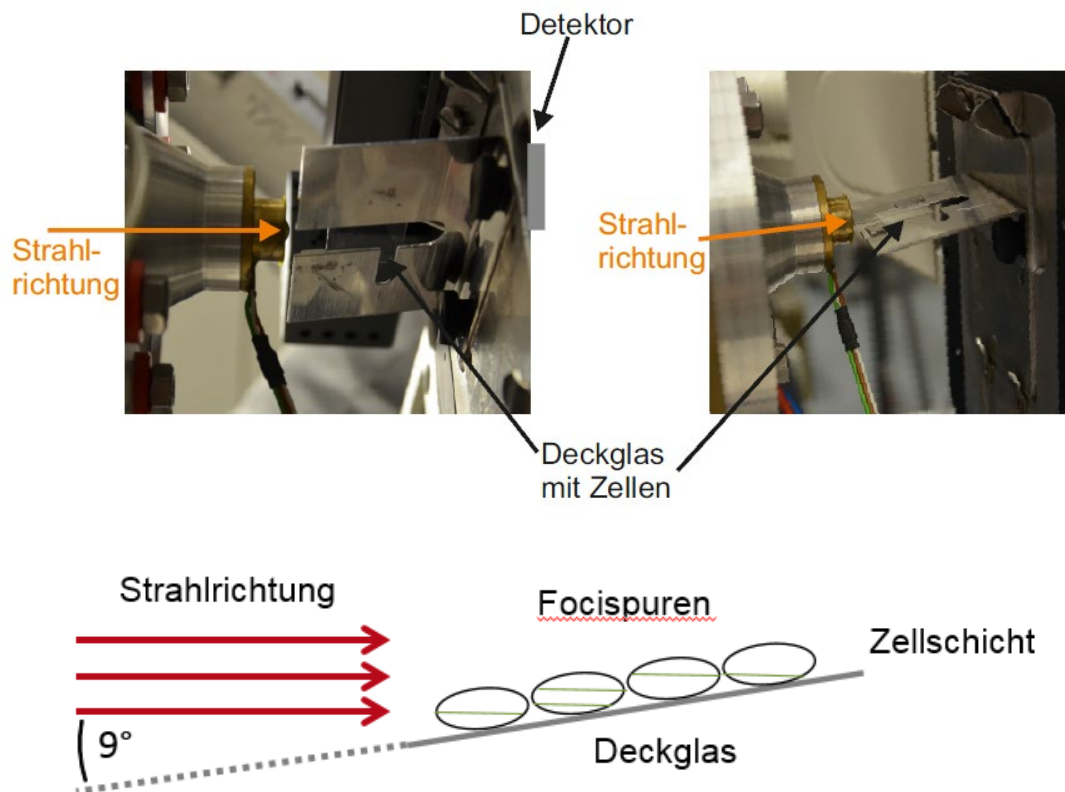


Abbildung 29: Schematische Darstellung (unten) der Schrägbestrahlung an SNAKE sowie Abbildungen des dafür nötigen Schrägbestrahlungshalters (oben), befestigt am Mikroskopisch zwischen SNAKE-Austrittsnase und dem Objektiv (Foto aus Dissertation Judith Reindl 2017).



## 6 Experimentablauf

### 6.1 Bestrahlung

#### 6.1.1 $\alpha$ -Bestrahlung

Am Vortag der Bestrahlung mittels der  $\alpha$ -Quelle in Neubiberg wurden je 200 000 Zellen (HeLa) auf Deckgläschen mit definierter Dicke ( $170; 00 \pm 0; 05 \mu\text{m}$ ) und den Maßen  $22 \times 22 \text{ mm}$  ausgesät. Es wurde angestrebt nach ca. 24 h Wachstumszeit einen möglichst dichten Zellbewuchs zu erhalten. Eine zu hohe Zelldichte wurde jedoch vermieden. Die Deckgläschen wurden zur Kultivierung in 6 Well-Platten platziert. Als Nährmedium diente RPMI-Medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) mit 10 % fetalem Kälber-Serum (FCS, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 1 % Penicillin sowie 1 % Streptomycin (Pen/Strep, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Die Zellen wurden im Brutschrank bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Am Bestrahlungstag wurden die Zellen der 6 Well-Platte entnommen und mit 1,2 Gy für 10 min bestrahlt. Hierfür wurden die Deckgläschen 30 s vor Bestrahlungsbeginn in  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  kaltes Medium mit 0,25 % HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) überführt um den p.H. Wert des Mediums ohne  $\text{CO}_2$ -Begasung zu stabilisieren. Anschließend wurden die Deckgläschen, wie in Kapitel 5 beschrieben, bestrahlt. Hierbei wurde besonders auf das Entfernen des Flüssigkeitsfilms auf dem Deckglas geachtet, da sonst keine homogene Bestrahlung mit einer einheitlichen Teilchenenergie gewährleistet werden kann. Für die Bestrahlung wird die Probenkammer auf ca  $4 - 6 \text{ }^\circ\text{C}$  heruntergekühlt und bei ausreichender  $\text{H}_2\text{O}$ -gesättigter Atmosphäre gehalten. Nachdem die Bestrahlung abgeschlossen war, wurden die Zellen erst kurz in ca.  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  warmem RPMI Medium ohne HEPES gewaschen und anschließend in ihrem ursprünglichen Kultivierungsmedium bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  im Brutschrank bis zur Fixierung inkubiert.

#### 6.1.2 Schrägbestrahlung an SNAKE

Die Zellen zur Schrägbestrahlung an SNAKE wurden am Vortag wie zuvor im Kapitel „ $\alpha$ -Bestrahlung“ beschrieben zu 200 000 Stück pro Deckglas ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Da die Schrägbestrahlung an SNAKE zählratenabhängig

lediglich wenige Sekunden benötigt, kann hier auf die Pufferung des p.H.-Wertes des Kulturmediums verzichtet werden. Kurz vor Bestrahlung wurde jeweils ein Deckglas dem Well entnommen. Mittels eines Labortuchs wurde überschüssiges Medium von der Deckglasoberfläche entfernt und das Deckglas nach kurzer (1 min) Trocknungszeit mit der Oberseite nach oben in den Deckglashalter eingelegt und mit einem Feld mit den Maßen 4 mm x 4 mm bestrahlt. Für die Schrägbestrahlung wurden ausschließlich Kohlenstoffionen mit einer Ausgangsenergie von 55 MeV verwendet. Jedoch verringert sich die effektiv bestrahlte Ionenenergie durch die 7,5 µm dicke Kaptonfolie, welche die Austrittsnase überspannt, durch die kurze Wegstrecke an Luft bis zum Mediumfilm, und den Mediumfilm selbst, welcher die Zellen überzieht, bevor letztlich die Zellebene erreicht wird. Eine Kohlenstoffbestrahlung an SNAKE ist effektiv nur möglich, wenn die Dicke des Mediumfilms 7,5 µm beträgt. Zusätzlich limitierend hierfür erweist sich der Bestrahlungswinkel von 9°, welcher eine vom Ion zurückzulegende Wegstrecke von 54 µm bedingt. Somit ergibt sich nach Abzug aller Energieverluste eine effektive Bestrahlungsenergie von  $(27 \pm 8)$  MeV und einem LET von  $(500 \pm 80)$  keV/µm [88]. Nach Bestrahlungsende wurden die Deckgläser schnellstmöglich zurück in 6-Well-Platten und RPMI Medium (10 % FCS, 1 % Pen/Strep) überführt und bis zur Fixierung nach 1 h Reparaturzeit im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 6.1.3 Lebendzellbestrahlung

Für Experimente bezüglich der Chromatinbeweglichkeit wurde im Verlauf dieser Arbeit Lebendzellmikroskopie an SNAKE durchgeführt. Hierfür wurden am Vortag der Bestrahlung 70 000 HeLa-Zellen auf der EJ-228 Szintillatorfläche der LCI-Kontainer ausgesät. Zuvor wurde eine Celltak Beschichtung mit 3,5 µg Celltak (Corning™ Cell-Tak Zell- und Gewebekleber, Corning, New York, USA) pro cm<sup>2</sup> anhand des beiliegenden Protokolls durchgeführt. Die Bestrahlung wurde bei 37 °C an SNAKE durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen mit einem Kreuzmuster aus Bestrahlungspunkten mit 1000 Kohlenstoffionen pro Punkt bestrahlt (siehe Abbildung 30) und anschließend für ca. 15 min fluoreszenzmikroskopisch beobachtet, wobei die Datenaufnahme 15 s ( $t_0 = -15$  s) nach Bestrahlung der Zelle gestartet wurde. Da sich der untersuchte Bereich (siehe Abbildung 30) auf der vertikalen Achse des Kreuzmusters befindet, welche von oben nach unten zeitlich vor der horizontalen

Achse bestrahlt wurde, entsteht ein Zeitfehler von bis zu 13 s. Da die Bestrahlung durch die Kaptonfolie der Austrittsnase, dem Luftweg zwischen Kaptonfolie und Polypropylenfolie der LCI-Container und durch die Polypropylenfolie selbst, stattfindet, reduziert sich die Ionenenergie auf 36 MeV und einem LET von 414 keV/ $\mu\text{m}$ . Um die bestrahlten Zellen mit unbestrahlten Zellen vergleichen zu können, wurde vor Bestrahlung eine Kontrollaufnahme durchgeführt. Insgesamt wurden 70 Zellen bestrahlt. Zur Untersuchung der Chromatinlockerung wurden vier Zellen (siehe Abbildung 30) genauer untersucht. Alle weiteren Analysen beziehen sich auf eine Stichprobengröße von  $n = 70$ . Als Maß der Dichte wurde die Intensität des Fluoreszenzsignals, berechnet aus den Grauwerten der RGB-Bilddaten mit Grauwerten zwischen 0 und 255, verwendet.

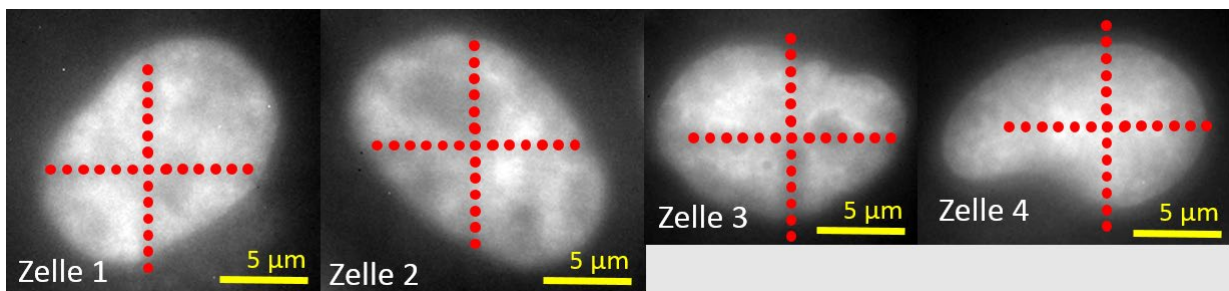


Abbildung 30: Kreuzmusterbestrahlung von vier HeLa-Zellkernen an SNAKE. Die Bestrahlung des Kreuzmusters fand von oben nach unten (vertikale Kreuzachse) und folgend von links nach rechts (horizontale Kreuzachse) statt.

## 6.1.4 Strahlendosisberechnung

Die Strahlendosis durch Ionenbestrahlung steht in Abhängigkeit zur Fluenz, also der Teilchenzahl, welche in der Bestrahlungsfläche der Probe induziert werden, der Energie der Ionen und ihrem LET sowie der Dichte  $\rho$  der Probe, die bei der Bestrahlung von Zellen als Dichte von H<sub>2</sub>O bei 20 °C, also 1 g/cm<sup>3</sup> angenommen werden kann.

Somit gilt für die Bestrahlungsexperimente dieser Arbeit folgende Dosisberechnung:

$$D = \frac{F * LET}{\rho}$$

### Dosis bei Schrägbestrahlung

Die Dosis zur Schrägbestrahlung bezieht sich auf eine Feldgröße von 4 x 4 mm. Die Bestrahlung wurde mittels Kohlenstoffionen mit einem LET von 414 KeV/ $\mu$ m durchgeführt. Die Fluenz konnte bei einer Teilchenrate von  $\sim$  80 kHz und einer Bestrahlungsdauer von  $\sim$  6 s auf 0,03/ $\mu$ m<sup>2</sup> definiert werden. Dies führt zu einer Bestrahlungsdosis von  $D_{\text{Schräg}} \approx 2$  Gy

### Dosis $\alpha$ -Bestrahlung

Die Bestrahlung an der  $\alpha$ -Quelle in Neubiberg wurde mit einer Teilchenenergie von 2,7 MeV, einem LET der  $\alpha$ -Teilchen von 138 keV/ $\mu$ m und einer Fluenzrate von  $4,7 \cdot 10^{-3} \frac{\text{Ionen}}{\mu\text{m}^2 \text{min}}$  durchgeführt. Somit war eine Bestrahlung mit einer Dosisleistung von  $\sim$  0,10 Gy/min möglich.

### Dosis bei LCI-Bestrahlung

Bei der Kreuzmusterbestrahlung wurden gezielt 1000 Kohlenstoff-Ionen pro Punkt induziert, mit einer Ionenenergie von  $(36 \pm 8)$  MeV pro Zellkern. Bei einer Punktzahl von 25 pro Kreuz ergibt dies eine Ionenzahl von 25 000 Kohlenstoff-Ionen pro Zellkern mit einem LET von  $(414 \pm 8)$  KeV/ $\mu$ m. Nach der Vermessung von 10 Zellen wurde eine

durchschnittliche Zellkernfläche für HeLa-Zellen von  $150 \mu\text{m}^2$  angenommen (Größe gestützt durch Hable 2011) [180]. Die Dichte der Probe wird mit der Dichte von Wasser mit  $1 \text{ g/cm}^3$  angenommen. Somit wurde eine Bestrahlungsdosis von  $D = 10350 \text{ Gy/Zelle}$  induziert.

## 6.2 Zellpräparation

### 6.2.1 Durchführung der Zellaussaat

HeLa Zellen (Zervikalkrebszellen, Leibniz-Institut, DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) wurden auf Deckgläser mit definierter Dicke ( $170,00 \pm 0,05 \mu\text{m}$  rund und quadratisch zur  $\alpha$ -Bestrahlung und Schrägbestrahlung an SNAKE) oder auf EJ-228 Szintillatoren ausgesät. Hierfür wurden die Zellen am Vortag jedes Experiments aus einer sich in exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Zellkultur (T75-Zellkulturflasche), kultiviert in RPMI-Medium (10 % FCS, 1 % Pen/Strep, 10 %  $\text{CO}_2$ , 37 °C) mit 3 ml Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) für 5 min bei 37 °C abtrypsinisiert. Die Trypsinaktivität wurde mit 7 ml Zellkulturmedium gestoppt und die Zellen durch mehrfaches Spülen von den Flaschenwänden entfernt. Mittels einer Neubauer-Zellzählkammer wurde die spezifische Zelldichte der Suspension festgestellt und die jeweils gewünschte Zellmenge ausgesät. Hierbei wurden für Deckgläser 2 ml Medium und für Scintillatoren 300  $\mu\text{l}$  Medium verwendet. Im Falle des Aussähens auf Scintillatoren, wurde nach ca. 1 h Anwuchszeit das Medium-Volumen auf 5-6 ml erhöht. Die Zellen wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  kultiviert.

### 6.2.2 Zellfixierung

Um die Zellen nach den gewünschten DSB-Reparaturzeitpunkten zu fixieren und sie somit im derzeitigen Zustand mikroskopieren zu können, wurden sie in einer 2 % Paraformaldehydlösung (PFA, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) in Phosphat gepufferter Saline (PBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) für 15 min bei Zimmertemperatur inkubiert.

### 6.2.3 Immunfluoreszenzfärbung

Damit bei der mikroskopischen Untersuchung der für diese Arbeit interessanten Proteine eine Flexibilität bei der Auswahl der verwendeten Antikörper und für die Analyse passenden Fluorophore gewährleistet werden konnte, wurde sekundäre

Immunfluoreszenz als Methodik ausgewählt (siehe Immunfluoreszenzmikroskopie). Die Antikörperauswahl und Reaktivität sowie Herkunft ist in Tabelle 1 einsehbar. Überbleibendes PFA wurde durch mehrmaliges waschen mit PBS entfernt. Zur Permeabilisation der Zellmembran wurde eine Lösung aus PBS und 0,15 % Triton (Triton X-100, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) dreimal für 5 min zu den Zellen gegeben. Unspezifische Bindestellen wurden durch 3 x 10 min Inkubation mit (PBS<sup>+</sup>) aus PBS, 0,15 g Glycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) und 1 % BSA (Bovine Serum Albumin, Rinderserum, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) bei Zimmertemperatur geblockt.

Darauffolgend wurde der jeweils zum Experiment passende primäre Antikörper spezifisch für das Protein von Interesse und einer spezifisch gewählten Reaktivität (siehe Tabelle 1) in einer Konzentration von 1:350 in PBS<sup>+</sup> zu den Zellen hinzugefügt und in einer H<sub>2</sub>O gesättigten Atmosphäre bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden die ungebundenen Antikörper mit drei kurzen Waschschritten mittels PBS abgewaschen. Die Zellen wurden erneut für 10 min mit PBS + Triton permeabilisiert und überschüssiges Triton mit PBS kurz gewaschen. Nach einem erneuten 7 min Blockierungsschritt mit PBS<sup>+</sup> wurde der für die gewünschte Detektionswellenlänge spezifische sekundäre Antikörper zugegeben. Die sekundären Antikörper wurden in einer 1:500 Verdünnung mit PBS<sup>+</sup> unter Lichtausschluss angewendet und für 2 h bei Zimmertemperatur in H<sub>2</sub>O gesättigter Atmosphäre bei Raumtemperatur und unter Ausschluss von Licht inkubiert. Nach zweimaligem kurzen Waschen mit PBS + Triton und fünfmaligem kurzen Spülen mit PBS, wurden die zellbewachsenen Deckgläschen mittels Prolong Gold Mounting Medium (Prolong Gold Antifade Reagent, Cell Signaling Technology Europe, Frankfurt am Main, Deutschland) auf einem gläsernen Mikroskopieobjektträger eingebettet, über Nacht bei Zimmertemperatur unter Lichtausschluss getrocknet. Die Aufbewahrung der Proben fand bei 4 °C unter Lichtausschluss statt.

Detaillierte Protokolle zur Zellfärbung wurden im Anhang beigefügt.

Tabelle 1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper für Sekundäre Immunfluoreszenzmikroskopie.

Primärer AK	Reaktivität/Herkunft	Verdünnung	Hersteller
<b>Anti-SC35 antibody [SC-35]</b>	Hase	1:350	Abcam plc. Cambridge, United Kingdom
<b>mAB Anti-BRCA1</b>	Maus	1:350	Abcam plc. Cambridge, United Kingdom
<b>mAB to 53BP1</b>	Maus	1:350	Abcam plc. Cambridge, United Kingdom
<b>pAB anti-gammaH2AX [pSer139]</b>	Hase	1:350	Novus biotech Brand, Centennial, Colorado, USA
<b>AntiRad51 (AB-1)</b>	Hase	1:350	Calbiochem, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
<b>pA Rad51 antibody [14B4] GTX70230</b>	Maus	1:350	GeneTex, Irvine, Kalifornien, USA



Tabelle 2: Liste der in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörper für Sekundäre Immunfluoreszenzmikroskopie

<b>Sekundärer AK</b>	<b>Reaktivität/Herkunft</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Alexa Fluor 647</b>	Ziege anti Hase	1:500	Life Technologies Corp., Eugene, USA
<b>Alexa Fluor 647</b>	Ziege anti Maus	1:500	Life Technologies Corp., Eugene, USA
<b>Abberior STAR 440SXP</b>	Ziege anti Maus	1:500	Abberior, Göttingen, Deutschland
<b>Alexa Fluor 488</b>	Ziege anti Maus	1:500	Life Technologies Corp., Eugene, USA
<b>Alexa Fluor 488</b>	Ziege anti Hase	1:500	Life Technologies Corp., Eugene, USA
<b>OregonGreen488</b>	Ziege anti Hase	1:500	Life Technologies Corp., Eugene, USA
<b>OregonGreen488</b>	Ziege anti Maus	1:500	Life Technologies Corp., Eugene, USA
<b>Chromeo™ 505</b>	Ziege anti Maus	1:500	Active Motive GmbH, La Hulpe, Belgien
<b>Alexa Fluor 532</b>	Ziege anti Hase	1:500	Life Technologies Corp., Eugene, USA
<b>Alexa Fluor 532</b>	Ziege anti maus	1:500	Life Technologies Corp., Eugene, USA

## 6.2.4 Chromatin-Färbung durch EdU

Eine weitere Färbemethode zur fluoreszenten Markierung von Chromatin, welche in dieser Arbeit Verwendung fand, war die EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) Färbung (Click-iT™ EdU Alexa Fluor™ 488 Imaging Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Hierbei wird durch den aktiven Einbau des Thymin-Analogons 5-ethynyl-2'-deoxyuridine eine Bindestelle für Fluorophore (Alexa 488) in das Genom der Zelle inkorporiert. Inkorporiertes EdU kann folgend mit einem Azid-gekoppelten Fluorophor mittels einer Kupfer katalysierten Click-Chemie-Reaktion kovalent gekoppelt werden. Der Einbau findet hier nicht nur als Folge der natürlichen Replikation im Laufe der Zellteilung in der S-Phase des Zellzyklus der Zelle statt, sondern wird ebenfalls im Laufe der DNA Reparatur durch verschiedene DNA Polymerasen durchgeführt. Bei einer Zellzyklusdauer von ungefähr 20 h für HeLa Zellen wäre eine gleichmäßige Inkorporation von EdU in alle sich replizierenden Zellen eines Versuchansatzes nach diesem Zeitraum zu erwarten [30]. Durch die Toxizität der EdU-Reagenz führt eine lange Inkubationszeit jedoch zu Unregelmäßigkeiten während der Replikation und somit fallweise zur Apoptose der Zellen. Experimentell ermittelte Daten aus der Masterarbeit von Mario Köhler 2018 [116] empfehlen deshalb eine maximale Inkubation der EdU-Reagenz von 2-4 h. Im Laufe der hier beschriebenen Experimente wurden die Zellen 1 h vor Bestrahlung an SNAKE mit EdU Reagenz inkubiert. Fixierung und Inkubationsende wurden nach 1 h nach Bestrahlung eingeleitet. Die Färbung wurde anhand des mitgelieferten Protokolls des Herstellers durchgeführt. Ein detailliertes Protokoll zur EdU-Färbung ist im Anhang einsehbar.

## 6.2.5 Zellfärbung bei Lebendzellmikroskopie

Zur Färbung des Chromatins wurde bereits zur Aussaat der Zellen, Silikon-Rhodamin (SiR) zugegeben. SiR-Farbstoffe besitzen eine hohe Leuchtkraft, sind photostabil und zellmembrangängig. Durch ihre Fluoreszenz im roten Wellenlängenbereich verringern sie die Phototoxizität, welche bei Fluoreszenzmikroskopie experimentkritisch sein kann. Ein wichtiger Vorteil der SiR-Farbstoffe liegt jedoch in ihrer Aktivierung durch Ligandenbindung. Die SiR-Fluorophore liegen akkumuliert in einer nicht fluoreszenten Spirolactone-Form vor und ändern ihre Struktur zu einem fluoreszierenden Zwitterion durch die Bindung an polare Proteinoberflächen der spezifischen Liganden. So kann

starkes Hintergrundsignal bei Mikroskopieanwendungen ausgeschlossen werden. Im Zuge dieser Arbeit wurden SiR-DNA-Kits der Firma Spirochrome (Stein am Rhein, Deutschland) verwendet. Bei Färbung über Nacht wurden die Zellen mit einer 100 nm Lösung in DMSO versetzt. Kurz vor Bestrahlung am nächsten Tag, wurden die LCI-Kontainer nach einem Mediumwechsel mit 6 ml frischem RPMI-Medium (10 % FCS, 1 % Pen/Strep) und einer 1000 nm Lösung SiR-DNA-Kit befüllt und mit den LCI-Kontainer-Deckeleinheiten verschlossen. Die Fluoreszenzspektren von SiR sind in Abbildung 31: Anregungs (blau) und Emissionsspektrum (rot) der SiR Farbstoffe der Firma Spirochrome dargestellt. Ein Protokoll des Herstellers ist im Anhang einsehbar.

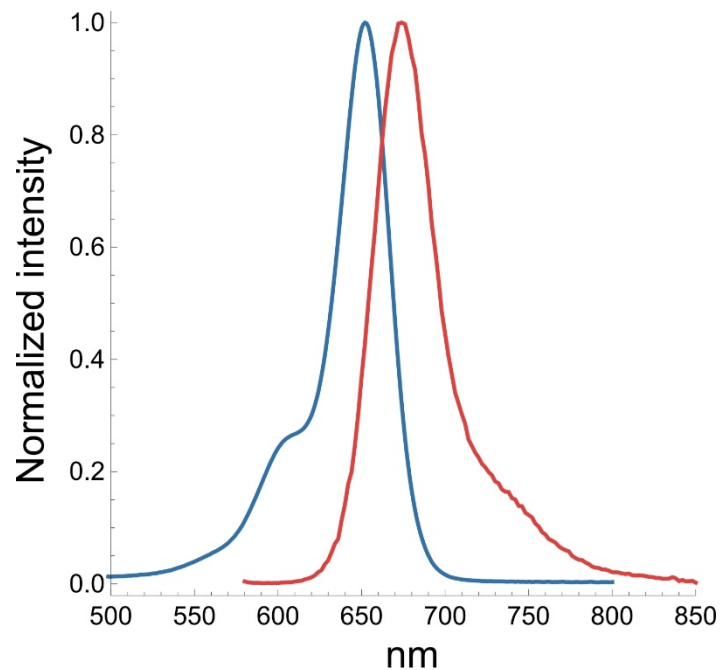


Abbildung 31: Anregungs (blau) und Emissionsspektrum (rot) der SiR Farbstoffe der Firma Spirochrome (<http://spirochrome.com> / Stand 16.09.2019).

## 6.3 Zelllinienpräparation für Lebendzellmikroskopie

### 6.3.1 Zelllinienpräparation und Transfektion

Um für Lebendzell-Experimente geeignete Zelllinien zur Verfügung zu haben, wurden Bestandszelllinien der Radioonkologie des Klinikums der Universität München (LMU) verwendet, sowie auch eigene Transfektionen durchgeführt. Die erhaltenen rekombinanten Zelllinien mit fluoreszent markiertem 53BP1 wurden auf Transfektionseffizienz, Markierungsspezifität und Fluoreszenzsignalintensität untersucht und verglichen. Hierbei stammen die verwendeten Plasmide aus der non-Profit Plasmiddatenbank der Firma „addgene.com“. Der letztlich zur Transfektion verwendete Plasmid sowie die Plasmidkarten der Zelllinien sind in Tabelle 3 sowie Abbildung 32 und Abbildung 33 einsehbar. Die getesteten Zelllinien sind in Tabelle 4 aufgelistet.

*Tabelle 3: Liste der in dieser Arbeit benutzten Plasmide zur Transfektion in HeLa Zellen.*

<b>Plasmidbezeichnung</b>	<b>Herkunft</b>
<b>pMC16-53BP1-GFP</b>	Klinikum der Universität München (LMU), Strahlentherapie und Radioonkologie, Anna Friedl, Guido Drexler
<b>pLVX_Apple_53BP1trunc</b>	Addgene, Ralph Weissleder, (Plasmid #69531)

Tabelle 4: Liste der durch Transfektion entstandenen HeLa-Zelllinien.

Zelllinienbezeichnung	Herkunft
U2OS m Apple_53BP1_Trunc #2	Im Laufe dieser Arbeit hergestellt
U2OS m Apple_53BP1_Trunc #3	"
U2OS m Apple_53BP1_Trunc #7	"
U2OS m Apple_53BP1_Trunc #11	"
U2OS m Apple_53BP1_Trunc #15	"
U2OS m Apple_53BP1_Trunc #16	"
U2OS pMC16_GFP_53BP1 #2	"
U2OS pMC16_GFP_53BP1 #12	"
HeLa pMC16_GFP_53BP1 subklon2	Klinikum der Universität München (LMU), Strahlentherapie und Radioonkologie, Anna Friedl, Guido Drexler

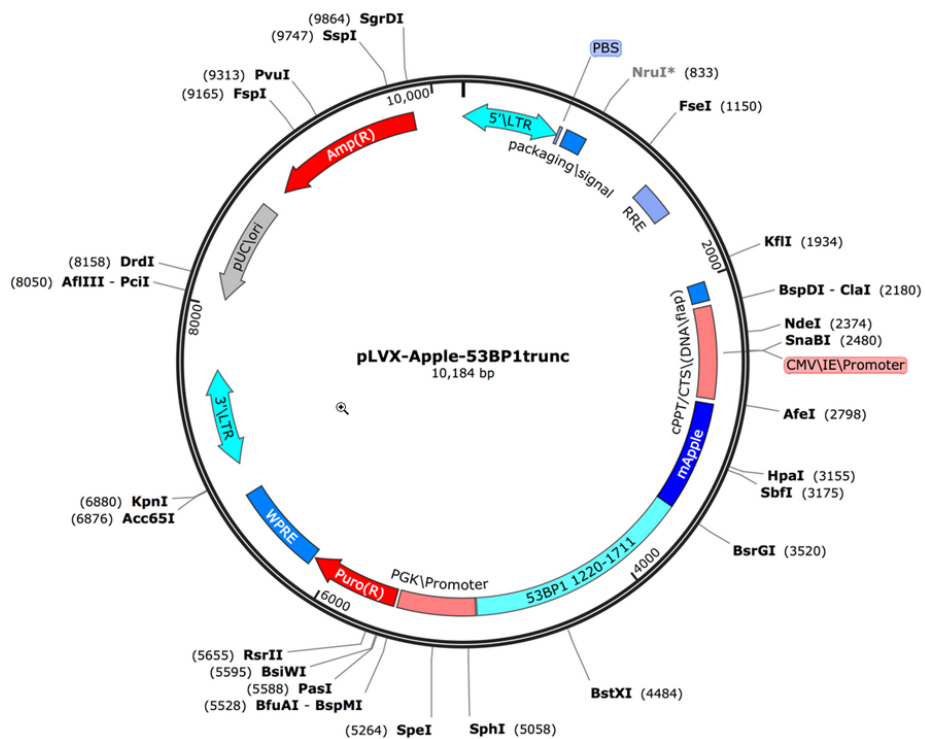


Abbildung 32: Plasmidkarte des Plasmids pLVX-Apple-53BP1trunc.

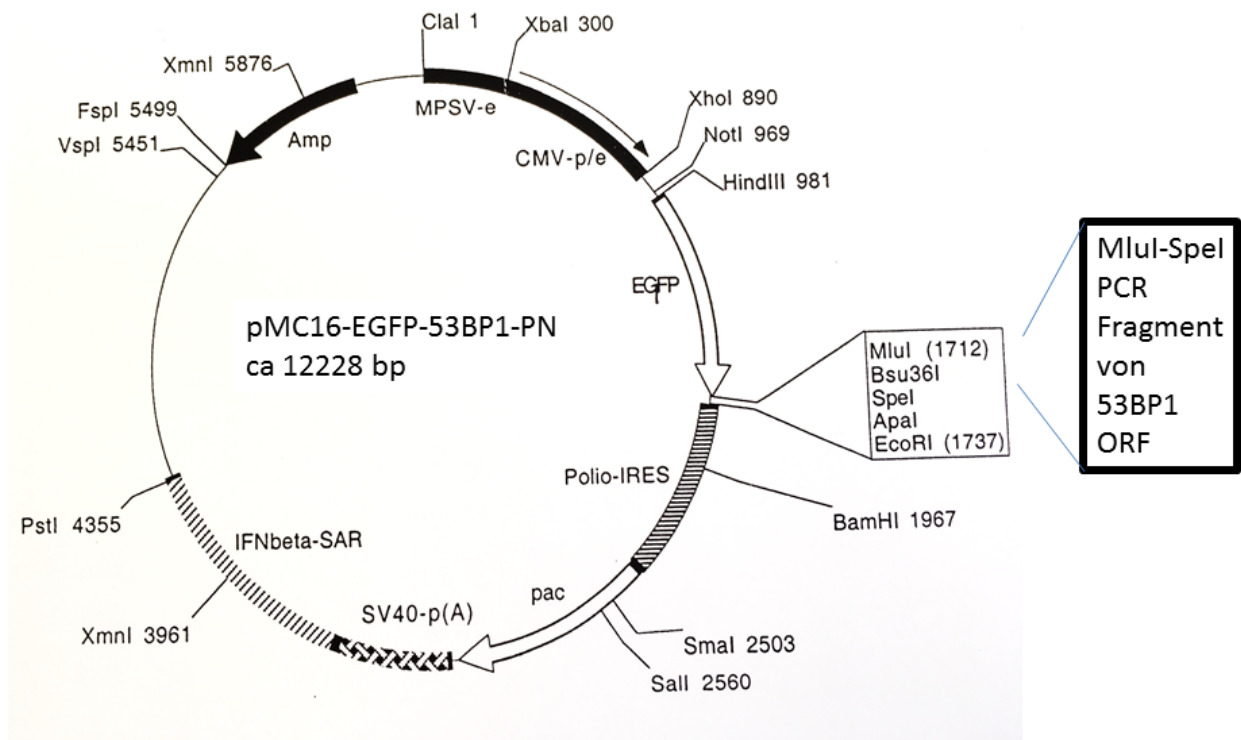


Abbildung 33: Plasmidkarte des Plasmids pMC16-EGFP-53BP1-PN.

Der verwendete Plasmid pLVX\_Apple\_53BP1trunc wurde als mikrobieller *E. coli* (*Escherichia. Coli*) Stock auf Agar seitens der Firma Addgene versendet und im Labor der Radioonkologie des Klinikums der Universität München (LMU) weiterverarbeitet. Zur Vervielfältigung des Plasmids, wurden die *E. coli* Bakterien in flüssigem LB-Medium (lysogeny broth, Sigma-Aldrich) mit Ampicilin (100 µg/ml, Sigma-Aldrich) und Kanamycin (30 µg/ml, Sigma-Aldrich) als Selektionsmarker (entsprechend der im Plasmid klonierten Resistenzgene) bei 37 °C angeimpft und über Nacht schüttelnd inkubiert. Mittels photometrischer Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Messwellenlänge von 600 nm wurde die Phase logarithmischen Wachstums der Kultur bestimmt und anschließend das Wachstum durch Abkühlen auf Zimmertemperatur gestoppt. Zur Isolierung der Plasmide wurde eine MaxiPrep (MaxiPrep Kit, Qiagen, Hildern, Deutschland) durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung wurde mittels Nanodrop (Nanodrop 2000, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. Die Aufreinigung der Plasmide wurde eine Agarose Gelelektrophorese mit 5 % Agarose und 95 % Tris-Acetate-EDTA, durchgeführt. Zur Färbung der DNA wurde Ethidiumbromid verwendet. Die Gel Extraktion wurde mit Gel-Extraktionskits der Firma Qiagen durchgeführt. Endkonzentration sowie Reinheit der Plasmidsuspension wurde mittels Nanodrop 2000 und den Wellenlängen 260 nm und 280 nm bestimmt. Hierbei wird aus dem Verhältnis der Ergebnisse dieser Dichtemessung die Bestimmung der Proteinfreiheit der Suspension möglich (Abbildung 34). Reine DNA sollte sich hierbei zwischen einem Wert von  $A_{260}/A_{280} = 1,8 - 2,0$  bewegen. Detaillierte Protokolle zur Durchführung einer Plasmid-Vervielfältigung sind im Anhang einzusehen.

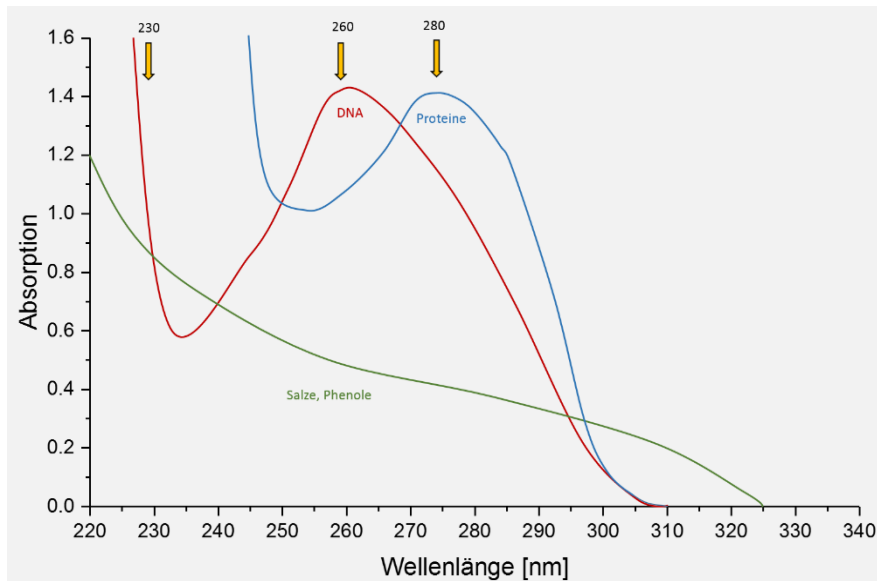


Abbildung 34: Graphische Darstellung der Absorptionsspektren von Zelllysatebestandteilen wie DNA (260nm), Proteine (280nm) und Zucker, Salzen und Phenole (230nm) zur photometrischen Bestimmung der DNA-Konzentration. Aufgetragen ist die Absorption gegen die Detektionswellenlänge.

Für die Transfektion wurden Reagenzien der Firma Lipocalyx GmbH (Halle (Saale), Deutschland), genauer, „Viromer-RED“ verwendet. Nach ungefähr zweimonatiger Kultivierung und Antibiotika gesteuerter Selektion (Puromycin; Hela 0,4µg/ml; U2OS 0,8µg/ml) der erfolgreich transfizierten Zellen (Transfektion anhand des mitgelieferten Protokolls, welches im Anhang zu finden ist), wurden die Zellen auf ihre Qualität geprüft.

### 6.3.2 Zellinientests

Eine erste Klassifizierung der Zelllinien wurde anhand fixierter Zellen auf Deckgläschen durchgeführt. Jeweils 200 000 Zellen pro Zelllinie wurden am Vortag wie in Kapitel „Durchführung der Zellaussaat“ auf Deckgläschen ausgesät und mit 1,2 Gy  $\alpha$ -Teilchen bestrahlt. Die Fixierung fand nach 1 h Reparaturzeit bei 37 °C statt. Die Datenaufnahme wurde mittels STED Mikroskopie (63x Vergrößerung) durchgeführt.



Tabelle 5: Liste der aus Transfektion entstandenen Zelllinien mit den Ergebnissen zur Transfektionseffizienz und Qualität der Zelllinie. Bei allen Zelllinien wurden Fluoreszenzfarbstoffe an 53BP1 gekoppelt.

Zelllinienbezeichnung	Transfektionseffizienz	Signal zu Hintergrund / Info
U2OS m Apple_53BP1_Trunc #2	29 %	In Ordnung
U2OS m Apple_53BP1_Trunc #3	32 %	Gut
U2OS m Apple_53BP1_Trunc #7	56 %	Vermeehrt Überexpressionen
U2OS m Apple_53BP1_Trunc #11	0 %	-
U2OS m Apple_53BP1_Trunc #15	100 %	Sehr gut
U2OS m Apple_53BP1_Trunc #16	97 %	Vermeehrt Überexpressionen; Fehlfärbung
U2OS pMC16_GFP_53BP1 #2	0 %	-
U2OS pMC16_GFP_53BP1 #12	0 %	-
HeLa pMC16_GFP_53BP1 #2 subklon2	95 %	Sehr Gut

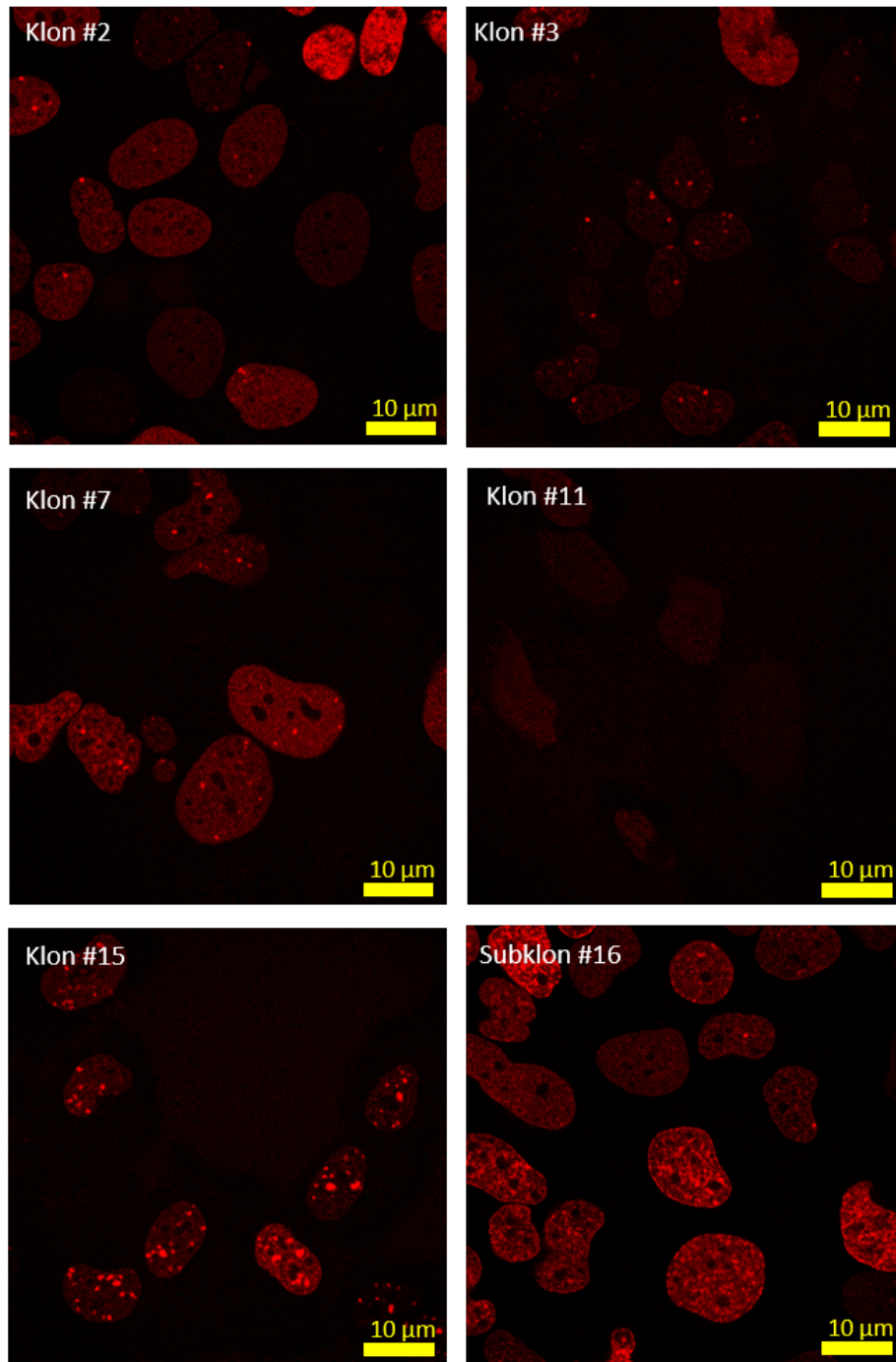


Abbildung 35: STED-Mikroskopie-Aufnahmen der aus Transfektion entstandenen Zelllinien zur Lebendzellmikroskopie. Die Eigenschaften der einzelnen Zelllinien sind in Tabelle 4 einsehbar.

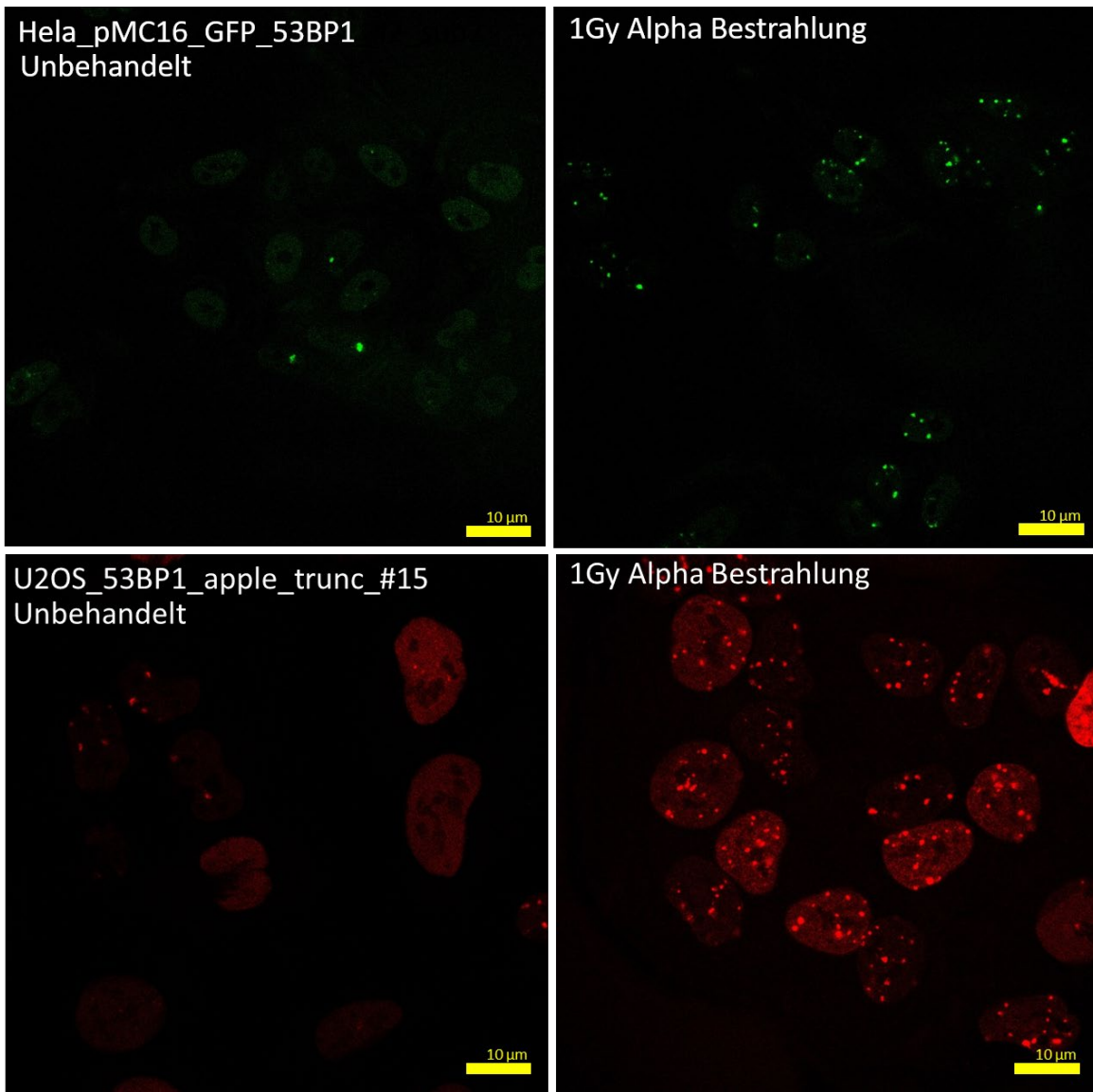


Abbildung 36: STED Mikroskopieaufnahme der transfizierten Zelllinien in Endauswahl zur Lebendzellmikroskopie. Die Zellen wurden hierfür Unbehandelt (links) und nach 1 Gy  $\alpha$ -Bestrahlung gemessen (rechts).

Auf Grund der erhaltenen Ergebnisse, konzentrierten sich die weiteren Experimente auf die Zelllinie HeLa pmc16 53BP1-GFP (siehe Abbildung 35 und Abbildung 36). Die Bestrahlung wurde an der  $\alpha$ -Quelle der UniBw in Neubiberg durchgeführt. Für die Bestrahlung mit anschließender Lebendzellbeobachtung am Leica TCS SP8 3X Mikroskop wurde eine speziell angepasste Lebendzellkammer entwickelt (Abbildung 37). Die Zellen wurden außerhalb der Kammer auf Deckgläsern aus Glas und mit definierter Stärke kultiviert. Hierfür eigneten sich, auch aufgrund der gesteigerten Bruchunempfindlichkeit, runde Deckgläschen mit einem Durchmesser von 25 mm und einer Stärke von  $(170,00 \pm 0,05) \mu\text{m}$ . Da die Reichweite der  $\alpha$ -Teilchen beschränkt ist, der Abstand zwischen Zellen und Folie 3 mm nicht überschreiten darf, fand die

Bestrahlung der Zellen außerhalb der Kammer statt. Um die zeitliche Diskrepanz zwischen Bestrahlung und Datenaufnahme so gering wie möglich zu halten, wurde die Bestrahlungskammer mit einem Drehspannsystem zur Fixierung des Deckgläschens ausgestattet, welches durch die Verwendung von zwei gegeneinander orientierten Gummidichtungen die Kammer mit dem Deckglas als Boden flüssigkeitsdicht abdichtet. Durch einen gläsernen Deckel kann auch während Datenaufnahmen über mehrere Stunden die Verdunstung von Medium vermieden und der p.H-Wert der Probe überwacht werden. Um den p.H.-Wert effektiv durch CO<sub>2</sub>-Spülung konstant puffern zu können, war es nötig den Deckel nicht komplett zu verschließen. So wurde zwar zu rasches Verdunsten des Mediums verhindert, jedoch Verdunstung nicht komplett gestoppt. Die Verwendung von leichtem Aluminium resultierend in einem Endgewicht von 82 g ermöglicht die Verwendung des Z-Galvo Feinjustiermechanismus des STED-Mikroskops. Die verwendeten Komponenten zur LCI-Mikroskopie sind in Kapitel „Lebendzellmikroskopie mittels STED“ einsehbar.



Abbildung 37: Abbildung der im Laufe dieser Arbeit entwickelten LCI-Kammer zur Lebendzellmikroskopie von Zellen auf Deckgläsern. Die Kammer besteht aus drei Teilen (oben rechts, mitte) und kann durch einen Schraubmechanismus zusammgebaut werden. Nach Einsetzen des Deckglases und Befüllung mit Medium kann die LCI-Kammer in den Z-Galvo-Feinfahrmechanismus des Leica-Mikroskops eingebaut werden (unten).

## 7 Datenaufnahme

### 7.1 STED-Mikroskopie fixierter Zellen

Die Datenaufnahme wurde mittels STED-Mikroskopie durchgeführt. Hierbei wurde ein Leica TCS SP8 CW STED 3X Mikroskop verwendet. Das Mikroskop ist mit drei STED-Lasern mit den Wellenlängen 592 nm (CW (continuous wave)), 660 nm (CW) und 775 nm (pulsed) ausgestattet und ermöglicht mit den in dieser Arbeit verwendeten Fluorophore eine Auflösung von ca. 105 nm in lateraler Ebene. Die Auslöschungswellenlängen wurden spezifisch für das zu mikroskopierende Fluorophor so definiert, dass die Wellenlänge des verwendeten STED-Lasers in der abfallenden Flanke des Emissionsbereichs des Fluorophors lag.

Die Anregung fand über einen einstellbaren Weißlicht-Laser statt, welcher Wellenlängen definiert zwischen 470 nm und 670 nm erzeugen kann. Die Detektion der Fluoreszenzsignale wurde mit so genannten Hybrid-Detektoren (HyD) durchgeführt. HyD bestehen hierbei aus einer Kombination von Photomultiplier und Avalanche Photodiode. Hierbei wird eine hohe Sensitivität gegenüber wenigen emittierten Photonen bei reduziertem unspezifischen Hintergrundsignal möglich. Um die Entfaltung der Aufnahmen zu ermöglichen, werden von jeder Probe Bilderstapel mit mindestens 5 Segmenten in Z-Richtung aufgenommen. Die Auflösung in Z-Richtung dieser Bilder ist durch die Verwendung eines Z-STED-Lasers, also einem in der Z-Ebene erzeugten Doughnut-förmigen Laserstrahls, auf ca. 200 nm reduziert. Die Pixelgröße bei sämtlichen Aufnahmen mittels STED Mikroskopie und der Verwendung der 100x Vergrößerung lag bei einer Seitenlänge von 40 nm. Die verwendeten Fluorophore sind in Tabelle 6 einsehbar.

### 7.2 Lebendzellmikroskopie mittels STED

Für Vorexperimente zur Chromatinbeweglichkeit wurde LCI mittels STED durchgeführt. Hierzu wurde das kommerzielle Leica TCS SP8 CW STED 3X Mikroskop verwendet. Um eine definierte Temperatur von 37 °C für die Dauer der Messung gewährleisten zu können, wurde eine LCI-Box mit Heizung und CO<sub>2</sub> Spülung der Firma Life Imaging Services (Basel, Schweiz) verwendet. Die CO<sub>2</sub>-Spülung hielt hierbei den

CO<sub>2</sub> Gehalt der Umgebungsluft in der LCI-Box bei 5 % konstant. Die p.H.-Stabilität konnte im Laufe der Messung durch die gläserne Abdeckung der LCI-Kammer anhand der Färbung des Phenolrots im Medium überwacht und neutral gehalten werden. Zur Datenaufnahme wurde die Leica-eigene Imaging Software LASX verwendet. Die verschiedenen Laserlinien wurden entsprechend der verwendeten Fluorophore (ersichtlich in Tabelle 6) verwendet. Für STED und konfokal LCI Experimente kamen die Objektive 100x und 63x zum Einsatz. Ein wichtiger Faktor, welcher die Datenaufnahme zeitlich begrenzte, war die Verdunstungsrate des Mediums. Da ohne CO<sub>2</sub>-Spülung, keine Pufferung des p.H.-Werts des Mediums stattfinden konnte, durfte der Deckel der Probengefäße nicht komplett verschlossen werden. Um jedoch eine Verschiebung der Fokusebene zu verhindern, konnte kein zusätzliches Medium zugegeben werden.

### 7.3 Lebendzellmikroskopie an SNAKE

Bei dem an SNAKE verwendeten Mikroskop handelt es sich um ein Zeiss (Oberkochen, Deutschland) Axiovert 200M Epifluoreszenzmikroskop. Zur Vergrößerung wurde ein LCI Plan-Neofluar Objektiv (Carl Zeiss Oberkochen, Deutschland) mit einer 63x Vergrößerung (mit Immersionsöl) sowie ein Plan Achromat (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) Objektiv mit einer 40x Vergrößerung verwendet. Für den SiR Farbstoff wurde spezifisch für Cy5 Farbstoffe das Reflektormodul 50 (siehe Abbildung 38, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verwendet und GFP-Signale wurden mit Reflektormodul 38 HE gefiltert (siehe Abbildung 39, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Die Spektren der Reflektormodule sind in Abbildung 38 und Abbildung 39 einsehbar. Zur Beleuchtung der Probe wurden zwei LEDs mit Wellenlängen von 590 nm für den SiR-Farbstoff und 470 nm für GFP verwendet. Die verwendeten Fluorophore sind in Tabelle 6 einsehbar. Zur Datenerfassung diente die AxioVision Software der Firma Zeiss.

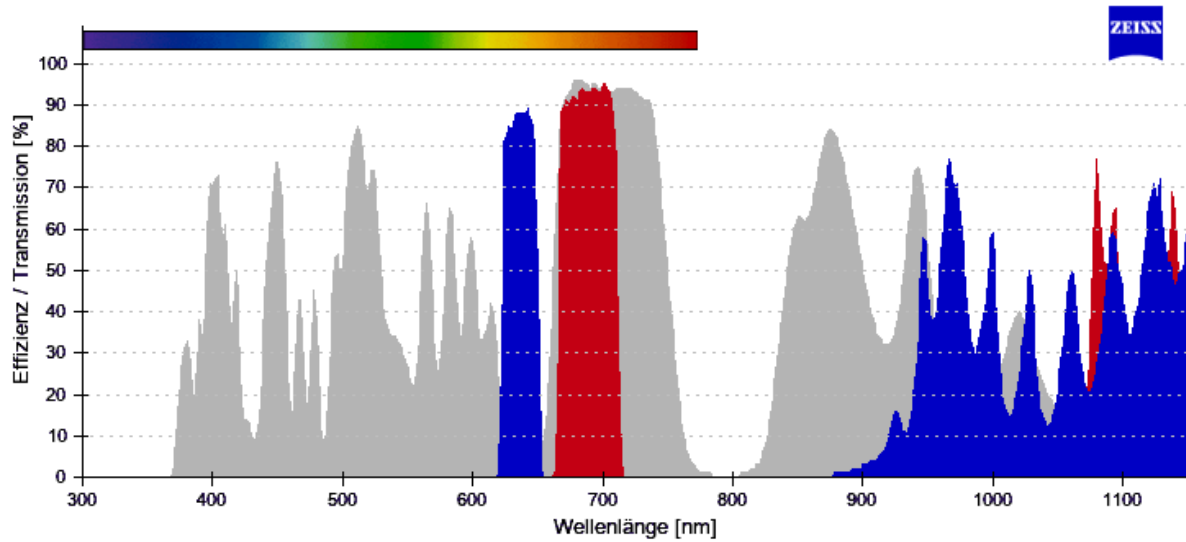


Abbildung 38: Abbildung der Filtereigenschaften/Spektren des Reflektormoduls 50 Firma Zeiss. Aufgetragen ist die Effizienz der Filter für Anregung (blau), Emission (rot) und der auszufilternden Wellenlängenbereiche (grau). Die Daten entstammen den Produktangaben der Firma Zeiss.

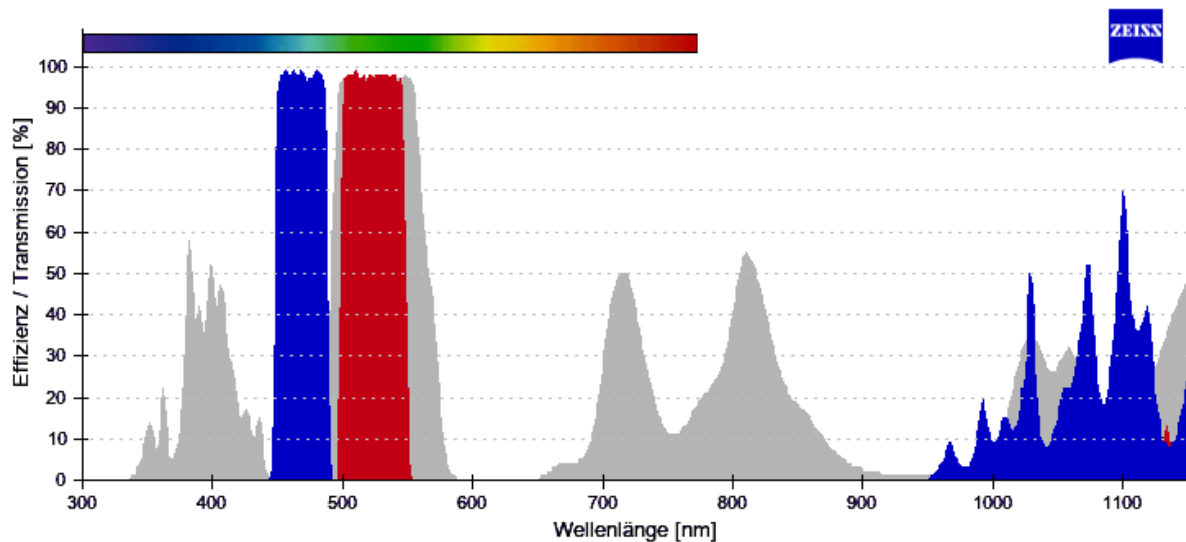


Abbildung 39: Abbildung der Filtereigenschaften/Spektren des Reflektormoduls 38 HE Firma Zeiss. Aufgetragen ist die Effizienz der Filter für Anregung (blau), Emission (rot) und der auszufilternden Wellenlängenbereiche (grau). Die Daten entstammen den Produktangaben der Firma Zeiss.



## 7.4 Fluorophore

Tabelle 6: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Fluorophore, sowie der zugehörigen Eigenschaften und Anwendungen. Eine Beschreibung der einzelnen Produkte ist in Tabelle 2 einsehbar.

Bezeichnung	Anregung	Emission	Verwendung
<b>Abberior STAR440SXP</b>	400-470 nm	510 nm	Foci-Migration
<b>Alexa Fluor 488</b>	488 nm	520 nm	Chromatinorganisation
<b>Alexa Fluor 532</b>	532 nm	550 nm	Chromatinorganisation
<b>EGFP</b>	488 nm	510 nm	Chromatinbeweglichkeit
<b>SiR Far Red</b>	620-640 nm	690 nm	Chromatinorganisation/ Foci-Migration
<b>OregonGreen 488</b>	488 nm	520 nm	Chromatinorgansiation
<b>Chromeo 505</b>	480 nm	530 nm	Foci-Migration
<b>Alexa Fluor 647</b>	647 nm	670 nm	Chromatinorganisation

## 7.5 Entfaltung

Wie in Kapitel „Auflösungsverbesserung durch Entfaltung“ erwähnt, können Bilder resultierend aus beugungsbedingten optischen Systemen mit einer Auflösung unter dem Abbe Limit nicht ohne Weiteres zur Analyse verwendet werden. Im Laufe dieser Arbeit wurde die Entfaltung anhand der Software Huygens Professional (Scientific Volume Imaging B.V., Hilversum, Niederlande) durchgeführt. Das Programm verwendet eine aus den Metadaten der Mikroskopiebilder bestimmte theoretische PSF zur Entfaltung. Die Entfaltung selbst erfolgt iterativ mittels einer klassischen Maximum-Likelihood Schätzung. Für eine verlässliche Entfaltung ist es essentiell wichtig die Werte bezüglich des Signal zu Rauschen Verhältnis (SNR) auf die Mikroskopie angepasst zu definieren. Hierbei konnte im Laufe dieser Arbeit auf Werte von J. Reindl (Dissertation 2017) zurückgegriffen werden, welche den SNR Wert auf 5 definierten.

## 8 Direktes Zählen von DNA Doppelstrangbrüchen

Wie einleitend erwähnt, ist es für die strahlenbiologische Forschung essentiell eine möglichst genaue Charakterisierung von DNA-Schäden durchzuführen. Hierfür ist jedoch eine exakte Quantifizierung von DSB durch direkte Markierung des Schadens erforderlich. Die Schwierigkeit DSB direkt zu detektieren, liegt in der großen Variation ihres Auftretens. Je nach Art der Strahlung und verwendeter Energie entstehen DNA Enden mit unterschiedlicher Komplexität. Einzelstrangüberhänge mit einer Größe zwischen 10 und 100 Basen entstehen oft LET-abhängig wobei hoch-LET Strahlung komplexere DSB verursacht als niedrig LET Strahlung. Dicht ionisierende Strahlung erhöht gleichzeitig die Rate an Ionisationsevents umliegender Moleküle, welche als reaktive Radikale wie z.B. ROS zu weiteren Ionisationen der DNA und zu höherer Komplexität der DSB führen können. Höhere Energien gehen wiederum mit kürzeren Überhängen und einfachen Brüchen einher. Ein weiterer Grad an Komplexität wird erreicht durch die Möglichkeit der Nukleotidschädigung. Basen können in ihrer Molekülstruktur geschädigt sein, Ladungsverschiebungen führen zum Verlust von Phosphatverbindungen und auch ein beschädigtes Riboserückgrat führt zu Konformationsänderungen und somit zu undefinierten ungleichmäßigen DNA-Enden mit zufälliger Struktur. DNA-Enden mit zufälliger Struktur können nicht durch Gemeinsamkeiten in ihrer Ausbildung definiert werden.

Eine Möglichkeit trotz undefinierter DNA-Enden ein gemeinsames Bindemotiv für die Anlagerung eines fluoreszenten Markers zu ermöglichen ist, dieses Motiv am Schadensort selbst zu erstellen. Für diesen Zweck eignet sich besonders der glatte DNA-Bruch ohne Einzelstrangüberhang, auch „blunt end“ genannt. Er kommt natürlicherweise nur als molekulares Signal für Apoptose in Bakterien vor und bedeutet Caspase3, den Zelltod einzuleiten. Diese biologische Seltenheit ermöglicht die einheitliche Markierung von DSB [108].

## 8.1 In Situ Ligation

Die Generierung dieser blunt end-Strukturen aus willkürlich ausgeprägten DSB wird durch eine Mischung aus „T4 Polymerase Editing“ und „In Situ Ligation“ erreicht. Hierfür wird T4 DNA-Polymerase aus T4-Bakteriophagen verwendet. Die DNA-Polymerase besitzt 5'→3' Polymerasefunktion sowie 3'→5' Exonukleasefunktion. Diese zwei Funktionen ermöglichen es in fixierten und permeabilisierten Zellen, durch die Zugabe von Enzymen, 3' Einzelstrangüberhänge zu „blunt ends“ aufzufüllen und im Anschluss 5' Überhänge selektiv bis zum „blunt end“ abzuverdauen (siehe Abbildung 40). T4-Polymerase wird gewöhnlich zur Adapterherstellung bei Next Generation Sequencing Analysen Verwendung findet.

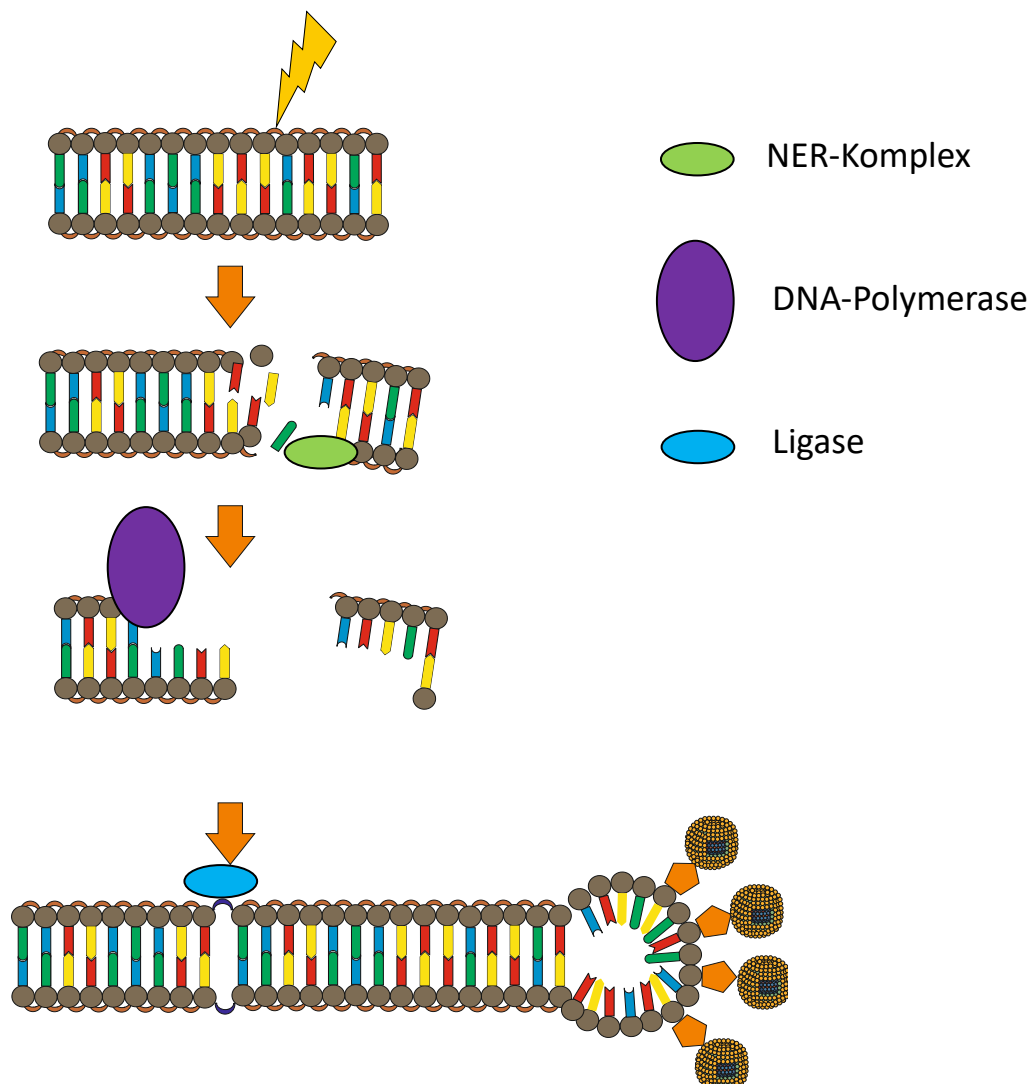


Abbildung 40: Schematische Darstellung der DSB-Detektion mittels DNA-Oligonukleotid-Sonden und den involvierten Proteinen für DNA-Blunting und In Situ Ligation. DNA erleidet durch Strahlung einen DSB. Der sofort aktivierte NER-Komplex entfernt beschädigte Nukleotide und T4 DNA Polymerase sorgt für die Generierung von „blunt“ DNA Enden. Im letzten Schritt findet die Kopplung einer Oligo-Sonde durch T4-DNA Ligase statt.

Um die selbst erzeugten „blunt ends“ lokalisieren zu können, werden durch In Situ Ligation fluoreszente so genannte, Hairpin-loop Oligo-Sonden an den glatten DSB gekoppelt (siehe Abbildung 40: Schematische Darstellung der DSB-Detektion mittels DNA-Oligonukleotid-Sonden und den involvierten Proteinen für DNA-Blunting und In Situ Ligation. DNA erleidet durch Strahlung einen DSB. Der sofort aktivierte NER-Komplex entfernt beschädigte Nukleotide und T4 DNA Polymerase sorgt für die Generierung von „blunt“ DNA Enden. Im letzten Schritt findet die Kopplung einer Oligo-Sonde durch T4-DNA Ligase statt. Bei dieser Methode wird die thermostabile T4 DNA Ligase aus T4-Bakteriophagen, welche DNA-Doppelstränge, in diesem Fall Oligonukleotid-Sonden (Kurzform im Folgenden „Oligo“), insbesondere mit „blunt“ und „sticky“ DNA-Enden verbindet. Die in dieser Arbeit verwendeten Oligo-Sonden bestehen aus einzelsträngiger DNA mit definierten Eigenschaften um eine Auflösungsverbesserung zur IRIF Quantifizierung unter STED-Mikroskopie zu erhalten. Sie falten sich in Lösung zu Haarnadelstrukturen mit „blunt ends“. Der entstandene Kopfteil der Haarnadel besitzt ein, selektiv markierbares, Nukleotid an exponierter Stelle. Der größte Vorteil dieser Methode liegt in der geringen Größe der Oligo Sonden von nur ca. 100 bp oder 340 Å (Länge des Oligos ohne Fluorophor). Die Sonden sind damit klein genug, um effizient die Zell- und Nukleusmembran zu durchdringen, sich im dichten Chromatingeflecht an den DSB zu heften und sich nicht gegenseitig sterisch zu hindern. Des Weiteren ermöglicht der geringe Abstand von Schadensstelle zu Fluorophor eine realistische Messung der DSB-Position.

## 8.2 Etablierung der Oligonukleotid Sonden Färbung zur DSB Detektion

Zur Etablierung der Oligonukleotid-Sonden-Färbung wurden im Laufe dieser Arbeit mehrere Prototypen mit verschiedenen DNA Sequenzen getestet. Ein erster vielversprechender Kandidat war Oligo1, welcher eine Weiterentwicklung der Sonden von A. Galbiati et al. 2017 darstellt [63].

Mit der DNA Sequenz

5'*GACTACCTTGAGAGTTACGCTAGGGATAACAGGGTAATATAGTTT*

[*BtndT*]*TTTCTATATTACCCTGTTATCCCTAGCGTAACTCTCAAGGTA*

*GTC* 3'

wird durch einen hohen Guanin/Cytosin Gehalt von ca. 66 % in der Stammregion eine stabile Faltung und „blunt ends“ gewährleistet. Ein Purin-Triplett am Hals des Loops und repetitive Thymin-Sequenzen im Loop selbst sichern die saubere Ausbildung eines Haarnadelkopfes. Im Zentrum des Kopfes wurde eine biotinylierte Thyminbase integriert, welche es ermöglicht durch die starke natürliche Bindung zwischen Biotin und Streptavidin, ein Streptavidin-gebundenes Fluorophor, im Falle dieser Arbeit ein Alexa488-Farbstoff, zu koppeln. Die Bindung der Fluorophore an Biomoleküle wie in diesem Fall Streptavidin, wird über Amin-reaktive Crosslinking Gruppen bewerkstelligt. Hierbei werden primäre Amine (-NH<sub>2</sub>), welche durch ihre hydrophile Ladungscharakteristik bei den meisten aminosäurebasierten Biomolekülen nach außen präsentiert werden, durch funktionelle Gruppen im zu verbindenden Molekül, meist NHS-Ester, gebunden. Die Produktion der ersten Oligo-Sonden mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde durch die Firma Eurofins Scientific (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt.

Zur Etablierung effizienter Färbeprotokolle wurden Permeabilisationszeiten und Permeabilisationsmittelkonzentrationen sowie verschiedene Pufferlösungen und Inkubationszeiten getestet. Ein ebenfalls kritischer Punkt war die Definition der richtigen Enzyme für DNA-Blunting und Ligation der Sonden sowie deren optimales Arbeitsumfeld. Zum Test der Oligo-Sonden wurden Zellen wie in Kapitel „ $\infty$ -Bestrahlung“ bestrahlt und mit PFA fixiert weiterbearbeitet. Die Zellen wurden 5 mal gewaschen um PFA-Reste vollständig zu entfernen. Um den Oligo Sonden die Passage in das Zytoplasma der Zelle und in den Zellkern zu ermöglichen, wurde ein Permeabilisationsschritt mit 0,2 % Triton-Lösung durchgeführt. Um unspezifische Hintergrundsignale durch fehlerhaft gebundene Oligos zu reduzieren, wurden die Zellen abschließend für 30 min mit 2 % PBS<sup>+</sup> (100 ml PBS + 2 g BSA + 0,15 g Glycin) geblockt. Das optimale Reaktionsmilieu der T4-Polymerase, wurde mit 1X „CutSmart“ Puffer erreicht (New England Biolabs) und die Zellen mit 5 min Inkubationszeit bei 25 °C inkubiert. Im Gegensatz zur kommerziell erwerbbaaren Varianten des „CutSmart“-Puffers wurde die Lösung im Zuge dieses Experiments mit PBS angesetzt, um ladungsbedingte Membrantransitbehinderungen zu minimieren. Nach einem kurzen Waschschrift mit „Blunting“ Puffer wurden die Zellen in einer Mischung aus 38  $\mu$ l sterilgefiltertem H<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ l „Blunting“ Puffer 10X, 5  $\mu$ l dNTP 1 mM, 0,5  $\mu$ l BSA (hochreine 20 mg/ml) und 1  $\mu$ l „Blunting“ Enzym Mix (New England Biolabs), bestehend aus T4 Polymerase und T4 Polynukelotid Kinase, für 60 min bei 25°C inkubiert.

Anschließend wurden die Proben kurz mit 1X „CutSmart“ Puffer gewaschen und das Arbeitsmilieu für die Ligation der Sonden mit einem zweimaligen Waschschrift mit 1X T4-Ligationspuffer (New England Biolabs) vorbereitet. Die In-Situ Ligation fand in einer H<sub>2</sub>O gesättigten Atmosphäre bei 21 °C über Nacht statt. Hierfür wurden die Zellen in einer Mischung aus 83  $\mu$ l steril gefiltertem H<sub>2</sub>O, 10  $\mu$ l T4-Ligasepuffer 10X, 1  $\mu$ l BSA (hochreine 20mg/ml), 1  $\mu$ l dATP Lösung 100 mM (New England Biolabs), 2  $\mu$ l T4 Ligase (New England Biolabs) und 2,5  $\mu$ l der Oligo Sonden in einer Konzentration von 10  $\mu$ M inkubiert. Um die Enzymreaktion zur Sonden Ligation zu unterbrechen wurden die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen. Da Biotin und Streptavidin physiologisch weit verbreitet sind, muss, um starkes Hintergrundsignal durch unspezifische Verbindungen des Streptavidins zu vermeiden, ein weiterer Bindestellen-Blockierschritt durchgeführt werden. Hierfür wurde der von Thermo-Fischer hergestellte Streptavidin-Biotin Blocking Reagent Kit (Thermo Fischer, E21390) nach beigefügtem Protokoll verwendet. Nach abgeblockten Streptavidin- bzw. Biotinbindestellen, wurde

ein weiterer Blockierschritt mit 6 % BSA (6 g BSA in 100 ml PBS) durchgeführt und anschließend alle überschüssigen Proteine durch einen dreiteiligen Waschschrift mit PBS entfernt. Die Kopplungsreaktion zwischen Streptavidin-Fluorophor-Adapter und Biotin fand durch 60 min Inkubation des Adapters in einer 40 nM Verdünnung mit PBS statt. Nach einmaligem Permeabilisationsschritt mit 0,2 % Triton-Lösung und dreier Waschschriftte mittels PBS wurden die zellbedeckten Deckgläser mittels ProlongGold (New England Biolabs) auf Glas Objektträgern positioniert und über Nacht bei Zimmertemperatur getrocknet.

Bei der Etablierung dieser Färbetechnik stellten sich zwei Limitierungen heraus. Anfangs wurde, um die Signalstärke des Oligos und somit das Signal zu Hintergrund Verhältnis so groß wie möglich zu halten, die Kopplung von vier Fluorophoren versucht (Abbildung 41)

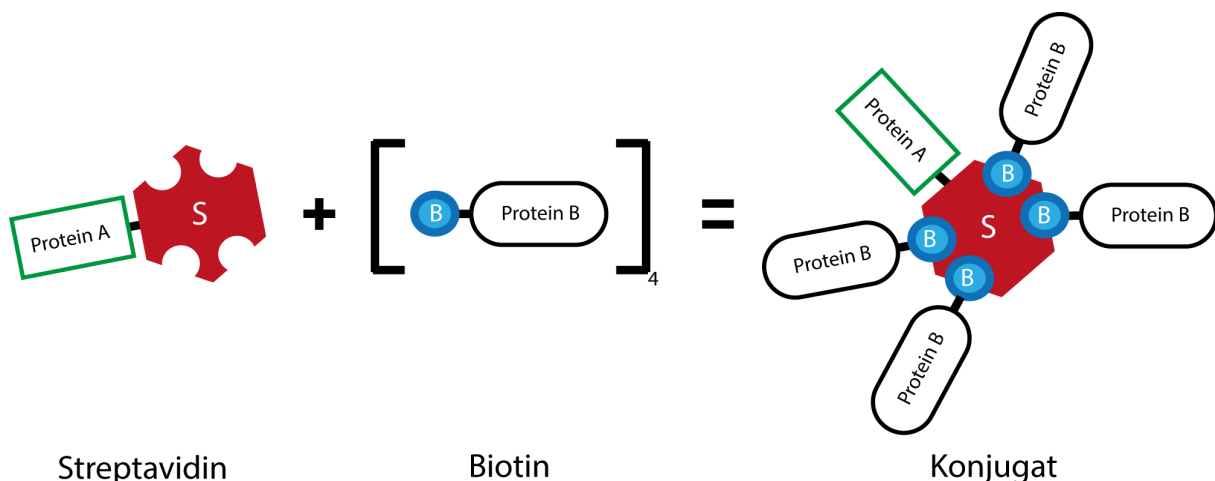


Abbildung 41: Schematische Darstellung der Kopplungsstrategie betreffend der Kopplung von 4 Fluorophoren (Protein B) an jeweils eine Oligo-Sonde (Protein A). Bewerkstelligt wurde die Kopplung über Streptavidin (S) und Biotin (B).

Da vier Fluorophore, gekoppelt jeweils an Streptavidin und Biotin in molekularem Maßstab mit ca. 217 kDa Masse, viel Raum in Anspruch nehmen, war die Zell- und Nukleus-Membrangängigkeit deutlich beeinträchtigt was in sehr unbefriedigenden Färberegebnissen resultierte (siehe Abbildung 42). Die Färbung war nicht spezifisch für DSB. Vielmehr wurde die Zelle gleichmäßig mit Fluorophoren versehen, welche sich auch durch die angewendeten Waschschriftte nicht entfernen ließen und somit keine Identifizierung von DSB möglich machten.

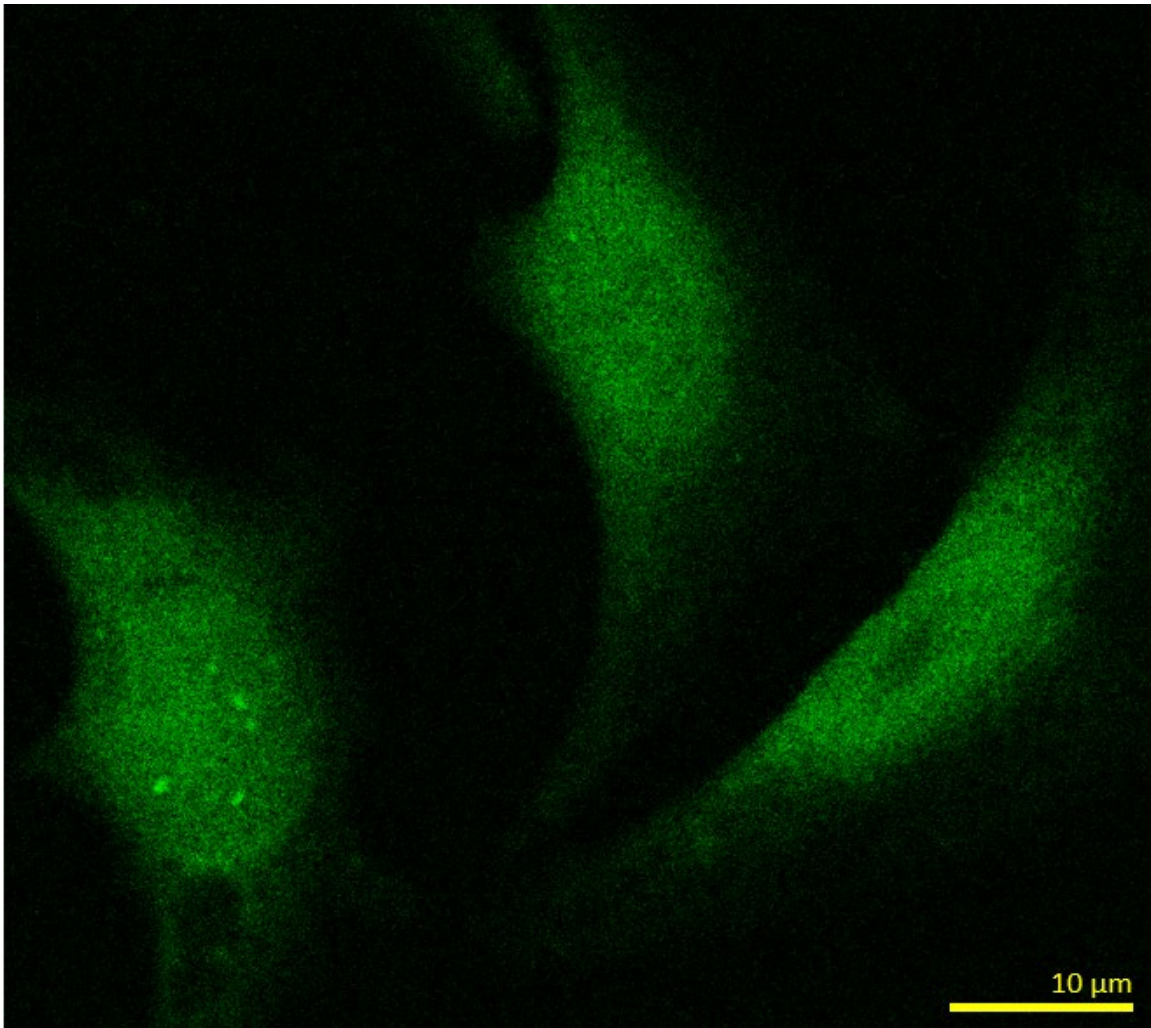


Abbildung 42: Exemplarische Fluoreszenzmikroskopieaufnahme der ersten Färberesultate mittels DNA-Oligonukleotid-Sonden. Deutlich zu sehen, ist eine unspezifische Färbung des Zellkerns sowie des Zytoplasmas. Durch zu starke Hintergrundsignale, ist es kaum möglich, existierende DSB zu identifizieren. Bestrahlung fand mit 1 Gy  $\alpha$ -Teilchen statt

Eine zweigeteilte Färbung durch nachträgliche Kopplung der Fluorophore in Situ verbesserte die Färbefeffizienz nur geringfügig. Erst die Kopplung nur eines einzigen Fluorophors pro Sonde, kombiniert mit einer zweigeteilten Färbung, ermöglichte einen effizienten Membrantransit und eine stabile Färbung mit reduziertem Signal im Zytoplasma (siehe Abbildung 43). Die Kopplung nur eines einzelnen Fluorophors wurde hierbei gewährleistet durch die Eigenschaft von Biotin, nur eine Verbindung zu jeweils einem Streptavidin eingehen zu können. Die Zuweisung von Streptavidin an das Fluorophor, also umgekehrt wie in Abbildung 41 zu sehen ist, gewährleistet, dass nur ein Fluorophor pro Oligo-Sonde verbaut wird.



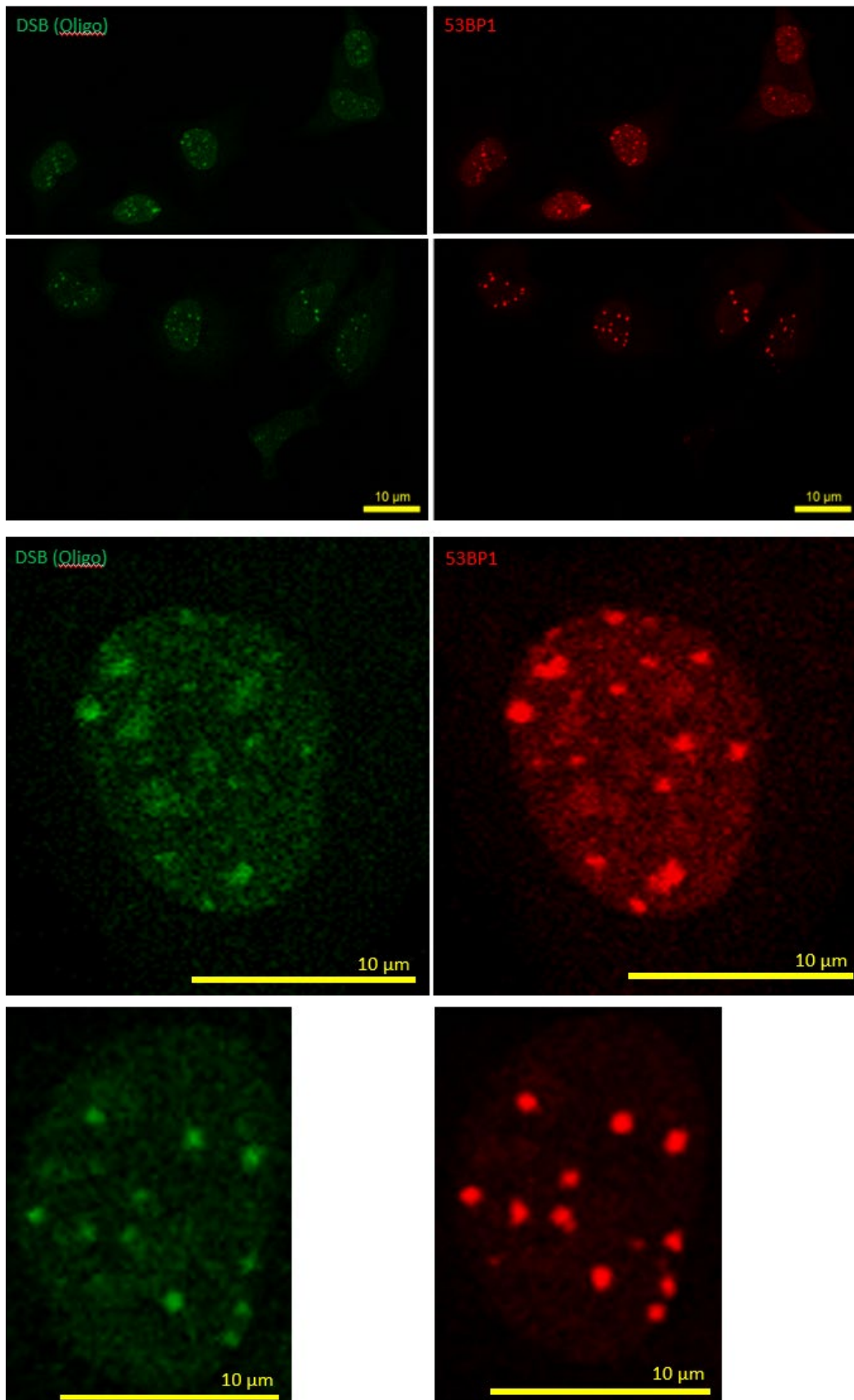


Abbildung 43: Mikroskopische Abbildung der DSB-Lokalisation in HeLa-Zellkernen mittels Oligonukleotid-Sonden (grün) und 53BP1 (rot). Die oberen vier Abbildungen zeigen Überblicke über die Färbereffizienz der Oligonukleotidtechnik im Vergleich zur Immunfluoreszenzfärbung von 53BP. Die Unteren vier Abbildungen zeigen exemplarisch an Hand zweier Zellkerne, die gesteigerte Detaildarstellung durch Färbung mit Oligonukleotid Sonden. Die Bilder konnten auf Grund ihrer Zweidimensionalität nicht entfaltet werden.

Obwohl die Ergebnisse der  $\infty$ -Bestrahlung eine sehr vielversprechende und fein aufgelöste Detektion der DSB dokumentieren, war die Methode auf andere Strahlenarten nicht anwendbar. Das Verhältnis zwischen Signal und Hintergrund war ausreichend, um die große Zahl der durch  $\infty$ -Teilchen induzierten DSB zu detektieren. Eine Detektion von DSB in IRIF mit geringerer Dichte (Schrägbestrahlung mit Protonen) war jedoch nicht möglich.

Es ging also darum, das Problem der schwachen Signalstärke und der starken Hintergrundfärbung zu beheben. Ein einziges anorganisches Fluorophor und ein einzelner DSB allein im Schadenscluster besitzt eine zu geringe Photonenausbeute um von unspezifisch gebundenen Signalen mittels STED-Mikroskopie unterschieden zu werden. Diese Limitierung wurde versucht durch einen Wechsel des Kopplungsmechanismus und der Verwendung von sogenannten Quantum Dots an Stelle der anorganischen Fluorophore, welche eine um über 100% höhere Photonenausbeute als herkömmliche Fluorophore erreichen können, zu umgehen.

Quantum Dots sind, molekular betrachtet, sehr kleine (ca.  $10^4$  Atome Gesamtgröße ohne Funktionalisierung) anorganische Halbleiterkristalle, welche durch ihre Kristallstruktur Fluoreszenz-Eigenschaften bei großer Bleichresistenz besitzen. Dabei bestimmt ihre Größe und Struktur die emittierenden Wellenlängen. Wie im Kapitel „STED-Mikroskopie“ beschrieben, ist die Auflösung der STED-Mikroskopie an die Intensität des STED und Anregungslasers gebunden. Durch die Bleichresistenz der Quantum Dots sollte es also nicht nur möglich sein einzelne Oligo Sonden zu detektieren, sondern diese auch besser aufzulösen. Eine Liste der verwendeten Quantum-Dots ist in Tabelle 7 einsehbar.

Tabelle 7: Lister der in dieser Arbeit verwendeten Quantum Dot-Produkte.

<b>Quantum Dots</b>	<b>Hersteller</b>		
<b>Qdot™ 705 ITK™ Carboxyl Quantum Dots</b>	Thermo	Fisher	Scientific,
	Massachusetts, USA		
<b>Qdot 525 ITK Amino (PEG) Quantum Dots</b>	Thermo	Fisher	Scientific,
	Massachusetts, USA		
<b>DotsQdot 705 ITK Amino (PEG) Quantum Dots</b>	Thermo	Fisher	Scientific,
	Massachusetts, USA		
<b>Qdot 565 ITK Streptavidin Quantum Dots</b>	Thermo	Fisher	Scientific,
	Massachusetts, USA		
<b>Qdot 705 ITK Streptavidin Quantum Dots</b>	Thermo	Fisher	Scientific,
	Massachusetts, USA		

Wie in Abbildung 44 zu sehen, weisen die verwendeten Quantum Dots auch in der Realität eine sehr hohe Resistenz gegen lichtinduziertes Bleichen auf. Bei 100 % STED-Laser Intensität über eine Belichtungszeitspanne von 5 min und 232 Bildern, verlieren die Quantum Dots in diesem Experiment lediglich ca. 3,8 % ihrer Intensität. Das organische Fluorophor Atto488 zeigt im Vergleich bei gleichen Aufnahmebedingungen eine Reduktion des Fluoreszenzsignals um 42%. Die Signalhöhen im Hintergrund zeigten dabei keine Veränderungen, womit ein globaler Effekt ausgeschlossen werden kann.

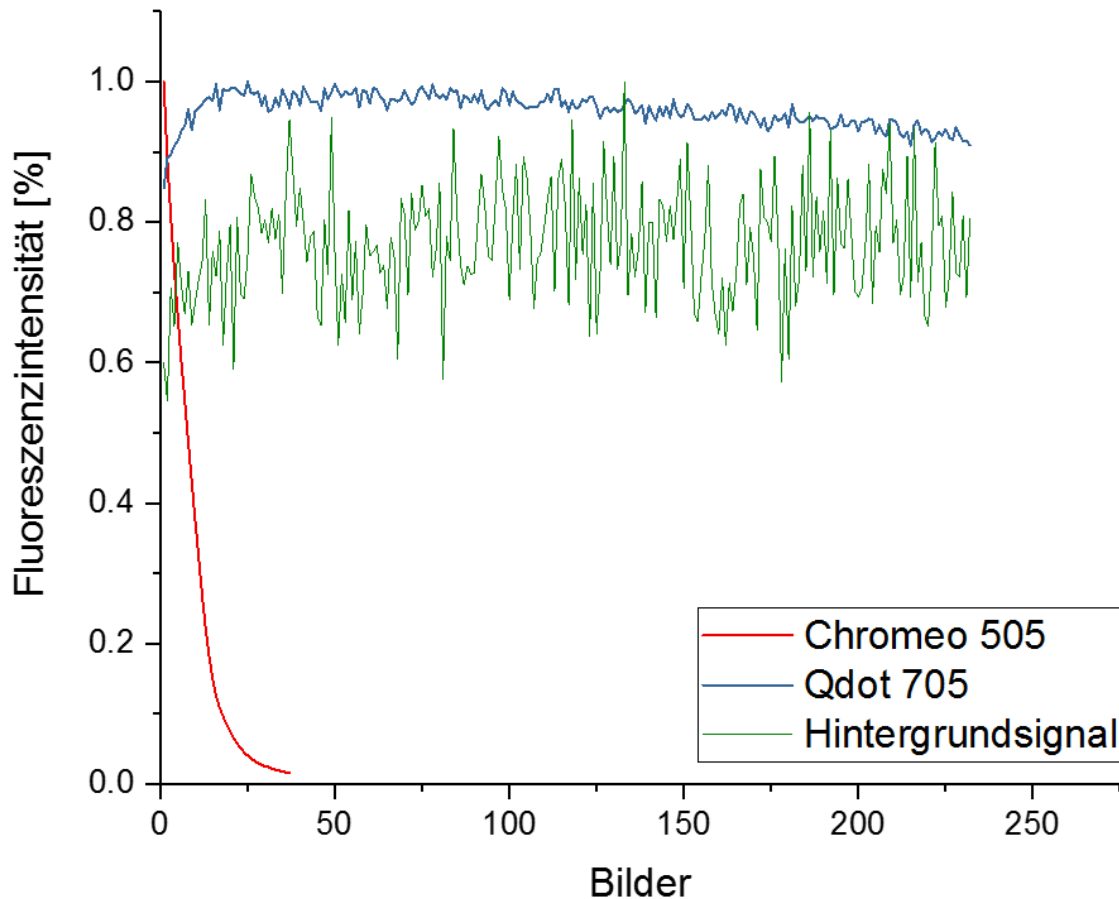
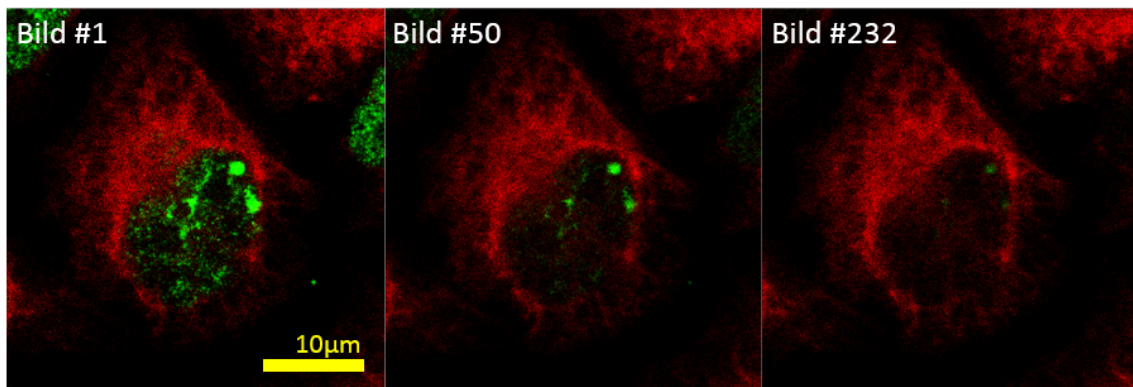


Abbildung 44: STED Mikroskopie Zeitserie über 5 min mit 100% STED Laserintensität. Quantum Dots mit unspezifischem Bindeverhalten im Zytoplasma (rot). Alexa488 markiertes Histon H2B (grün). Graph über die Fluoreszenzintensitätsentwicklung über die Messzeit von 5min und 232 Bildern (unten).

Eine unerwartete Problematik stellte die Membrangängigkeit der Quantum Dots dar. Trotz der Oberflächenoptimierung mit amphiphilen Polymerhüllen und ihrer geringen Größe war kein Transit der Quantum Dots in den Zellkern möglich [147]. Selbst der Versuch die Quantum Dot markierten Adapter mittels Lipid-Vesikeln und Verschmelzung der Zellbiomembran ins Innere der Zelle zu schleusen scheiterte. Dies liegt entweder an der großen Affinität der Quantum Dot-Oberfläche, sich mit

verschiedenen zellulären Strukturen zu verbinden, oder der Bindefreudigkeit des Streptavidinadapters. Ersichtlich wird dies aus Abbildung 45. Diese zeigt die Lipidvesikel der Fuse-it Reagenz der Firma Ibidi (Martinsried-Planegg, Deutschland), gefüllt mit rot fluoreszenten Quantum Dot-Streptavidin-Konjugaten. Im Laufe der Aufnahme wird ersichtlich, dass die Quantum Dots bei der Verschmelzung des Lipidvesikels mit der Zellbiomembran an diese gebunden wird und nicht in das Innere der Zelle vordringt. Somit werden die Quantum Dots bei jedem Waschschrift von der Probe entfernt und können nicht detektiert werden.

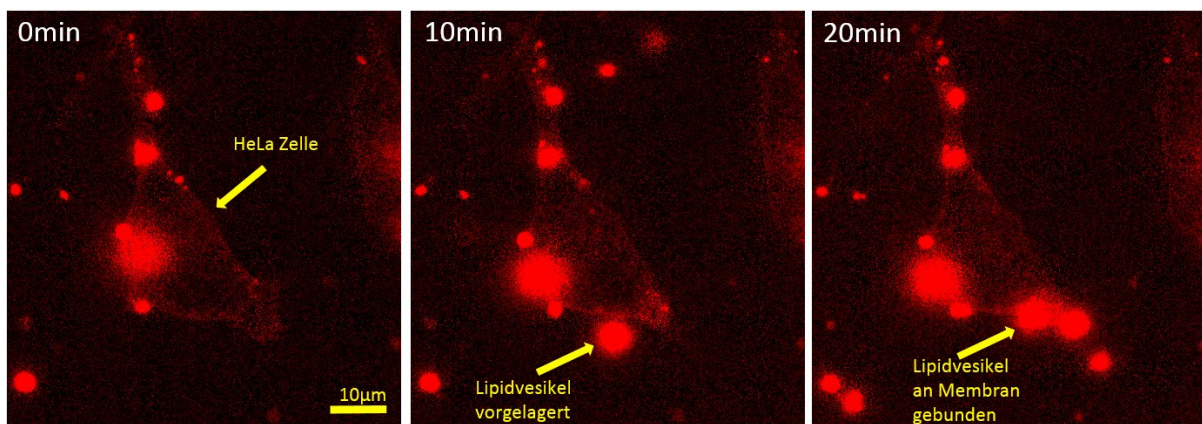


Abbildung 45: Lebendzellmikroskopische Aufnahme einer HeLa-Zelle und die versuchte Lipidvesikel gesteuerte Einbringung von Quantum Dot-Streptavidin (rot) Konjugaten in das Zytoplasma der Zelle. Zu erkennen ist, dass über die Zeit von 20 min keine Verschmelzung der Lipidvesikel mit der zellulären Biomembran stattfindet und die Konjugate nicht aufgenommen werden. Vielmehr ist zu beobachten, dass die Lipidvesikel sich an die Oberfläche der Zellmembran haften und akkumulieren.

Ein Versuch herauszufinden, an welcher Komponente die unspezifischen Bindungen entstanden sind, und den Fehler einzugrenzen oder eventuell die prominenten Hintergrundsignale bei Kopplung mit anorganischen Fluorophoren wie dem Alexa488 aus den Erstversuchen zu minimieren, lag darin, den Kopplungsmechanismus zu wechseln. Hierfür wurde ein Click-Chemie-System als Ersatz gewählt.

Bei dieser Art von kovalenter Kopplung handelt es sich um einen Mechanismus, welcher physiologisch nicht verbreitet außerdem biologisch inert ist und aus diesem Grund vielversprechend unspezifische Verbindungen unterbunden sein sollten. Die Kopplung durch Klick-Chemie ist hocheffizient mit einer sehr großen Ausbeute an Kopplungsprodukten, und die beteiligten Moleküle sind so klein, dass sie selten Inakzeptanz der gebundenen Biomoleküle auslösen. Für die Anwendung in dieser Arbeit wurde ein Thymin der Oligo Sonden zentral am Haarnadelkopf an ein Azid gebunden. Die Kopplung an einen alkingebundenen Fluorophor-Adapter (Atto488

bzw. Quantum Dots) wurde durch Azid-Alkin-Cycloaddition bewerkstelligt (siehe Abbildung 46).

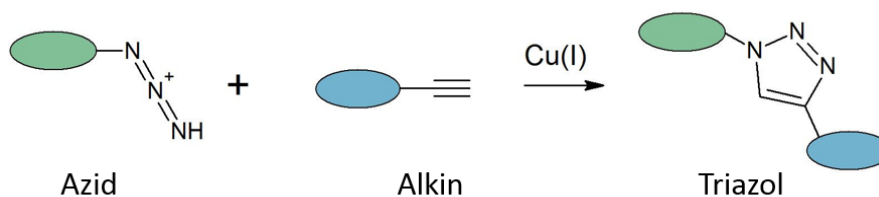


Abbildung 46: Azid-Alkin-Cycloaddition. Reaktionsgleichung der Click-Chemie Reaktion zur kupferkatalysierten Bindung von Azid an ein Alkin.

Die hierfür verwendeten individuell konstruierten Oligo-Sonden wurden von der Firma Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa, USA) gefertigt.

Die Basensequenz wurde wie folgt verwendet:

**5'TACTACCTCGAGAGTTACGCTAGGGATAACAGGGTAATATAGTTT[*iAzideN*]**  
**TTTCTATATTACCCTGTTATCCCTAGCGTAACTCTCGAGGTAGTA 3'**

Crosslinking des Azids wurde über NHS-Ester bewerkstelligt.

Die Fluorophor-Adapter stammen von der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA). Folgende Produkte wurden nach beiliegenden Protokollen verwendet (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Liste der, für die Konstruktion der Klick Chemie Oligo Sonden, benötigten Produkte.

<b>ALEXA FLUOR 488 ALKYNE (A10267)</b>	<b>Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)</b>
<b>CLICK-IT CELL REACTION BUFFER (C10269)</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
<b>Qdot™ 655 ITK™ Amino (PEG) Quantum Dots (Q21521MP)</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
<b>Alkyne-PEG5-N-hydroxysuccinimidyl ester</b>	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA



Ein erster Test der Click-Chemie Oligo-Sonden mit gekoppeltem Atto488-Farbstoff wurde nach Kohlenstoff-Schrägbestrahlung an SNAKE durchgeführt. Leider sind keine Foci-Spuren, sondern eine gleichmäßige Färbung der Zellmembran zu sehen. (siehe Abbildung 47). Es ist anzunehmen, dass die intrazelluläre Kopplung nicht erfolgreich war oder sogar der Zellmembrantransit fehlgeschlagen ist.

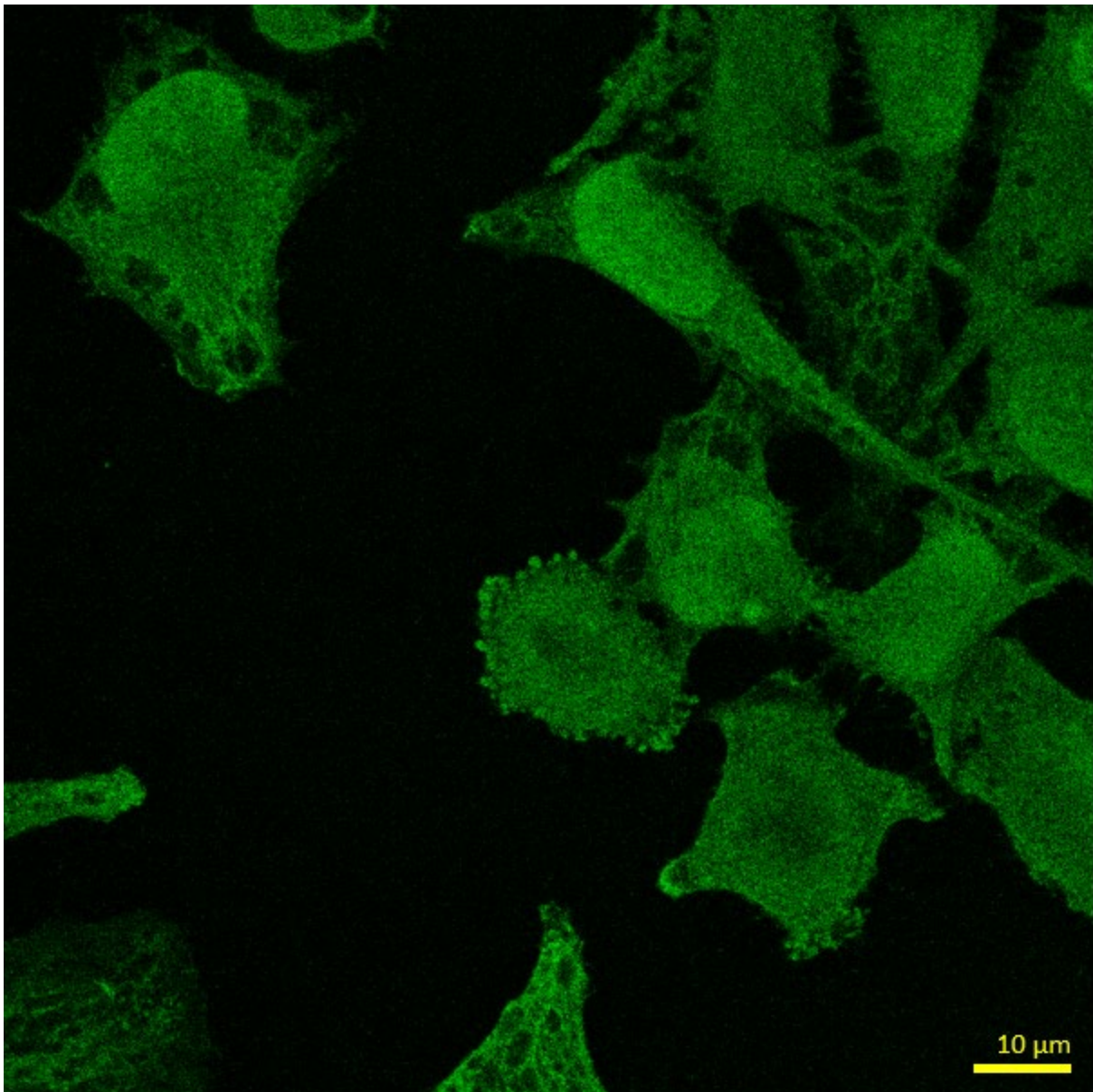


Abbildung 47: Mikroskopische Abbildung von HeLa-Zellen mittels Click-Chemie basierter DNAOligonukleotid Sonden. Unspezifische Bindung der Sonden mit der Zellmembranoberfläche führt zu seiner gleichmäßigen aber ungewollten Markierung der Zellmembran.

Demnach war es bisher mit dieser Methode noch nicht möglich, IRIF mit geringer DSB Dichte zu detektieren.

Um die genauen Mechanismen zu enthüllen, welche für die fehlerhafte Click-Chemie Färbung verantwortlich sind und, warum mit ihr keine spezifische Markierung der DSB möglich war, bedarf es weiterer Experimente. Ein erster Schritt zur Problemlösung wäre eine Anpassung des Färbeprotokolls und der Prüfung der einzelnen Komponenten. Leider war die weitere Entwicklung dieser Färbemethode im Zuge dieser Arbeit nicht weiter möglich. Bis zu diesem Punkt ist die Detektion von DSB durch Oligo-Sonden ein fähiges Werkzeug zur Markierung von DSB in größeren Clustern ( $\infty$  – Strahlungsinduziert) und der genaueren Lokalisation des IRIF Zentrums (Abbildung 43). Es konnten erfolgreich mehrere Oligo Kandidaten getestet und die allgemeine Funktionalität der Methode mittels  $\alpha$ -Bestrahlungsexperimenten bewiesen werden. Das Ziel, eine verbesserte Auflösung für die Mikroskopie von Reparaturstellen zu erhalten und auch vereinzelt Reparaturstellen (induziert durch Low-LET Bestrahlung an SNAKE) eindeutig zu definieren, konnte leider bisher nur teilweise erreicht werden. Jedoch bergen die bis zu diesem Zeitpunkt erlangten Ergebnisse viele Erkenntnisse, die den Grundstein für weitere zielorientierte Experimente legen können. Ein nächster Schritt wäre die Optimierung des Färbeprotokolls für die Färbung der Alexa488 Click-Chemie Sonden mit alternativen Permeabilisationsmethoden. Ebenso könnte versucht werden, die hohe Affinität der Sonden gegenüber der Zellmembran durch alternative Click-Chemie Kopplungen zu unterbinden.



## 9 Chromatinmobilität und Foci Migration

Wie in Kapitel „Chromatinmobilität und DNA-Reparatur“ erläutert, spielt die Beweglichkeit des Chromatins und auch der DSB eine große Rolle zum Schutz des Genoms. Für eine effiziente Reparatur ist es für die Zelle nötig, die Rekrutierung von Reparaturproteinen zur Schadensregion zu ermöglichen und das Chromatin zugänglich zu machen. Ebenso ist ein gewisses Maß an Beweglichkeit des Chromatins nötig, um eine für jeden DNA-Schaden optimale Reparaturumgebung zu schaffen.

Für Hefezellen und menschliche Zellen ist bisher bewiesen, dass bei DSB in schwer zugänglichen DNA-Strukturen, zumindest ein Abwandern des DSB zum Rand ihrer Chromatin-Territorien möglich ist [117]. Eine gezielte Wanderung in Richtung der inneren Zellmembran zu spezialisierten Reparaturzentren konnte bei menschlichen Zellen bisher nicht bestätigt werden. Ebenso ist nicht bewiesen, ob es sich bei diesen Bewegungsvorgängen um passive Prozesse über Diffusion und Subdiffusion in Subkompartimenten des Zellkerns handelt oder ob aktive, Zytoskelett abhängige (Tubulin bzw. Aktin) Prozesse beteiligt sind.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden zwei Ansätze zur Aufklärung der offenen Fragen in dieser Forschungsthematik unternommen. Um die allgemeine Fokusbildungsdynamik in Bezug auf Chromatinbeweglichkeit nach Induktion eines DSB zu testen und zu überprüfen, ob die DSB Reparatur direkt an der Schadensinduktionsstelle durchgeführt wird, wurden Zellen gezielt mit Kohlenstoff-Ionen in Kreuzmustern bestrahlt und im Anschluss die Chromatinbewegung mittels Fluoreszenz-Lebendzellmikroskopie dokumentiert.

Die Frage wie weit DNA-Reparaturstellen im Laufe der DSB-Reparatur von der Induktionsstelle abwandern und wohin, wurde durch die Induktion von DSB in Hela-Zellen mittels  $\alpha$ - Bestrahlung und einer Dokumentation der zu unterschiedlichen Reparaturzeiten fixierten Zellen beantwortet. Hierfür wurde das Migrationsverhalten der Foci für BRCA1 und Rad51 in einem Zeitraum von 0 h bis 24 h mittels STED-Mikroskopie beobachtet.

## 9.1 Reparaturstellenbildung und Chromatinbeweglichkeit

Die Zellen zur Untersuchung der Chromatinbeweglichkeit wurden mit Kohlenstoffionen in Kreuzmustern an SNAKE, wie in Kapitel „Lebendzellbestrahlung“ beschrieben, bestrahlt (siehe Abbildung 30). Anschließend wurden vier Zellen auf ihre Reaktion hinsichtlich der Chromatinauflockerung näher untersucht. Aus den folgenden Ergebnissen wird ersichtlich, dass in drei Zelle, eine Veränderung der Chromatindichte im Bestrahlungsbereich feststellbar war (siehe Abbildung 48). Als Maß der Dichte wurde die Intensität des Fluoreszenzsignals, berechnet aus den Bilddaten mit Grauwerten zwischen 0 und 255, verwendet. Die Dichteveränderung, tritt wie aus Abbildung 48 ersichtlich wird, schon vor Beginn des Überwachungszeitraumes  $t_1 = 0$  s, also unmittelbar nach Bestrahlung, auf. Dies wird später durch die Berechnung der Änderung der Chromatindichte über die Beobachtungszeit mittels der Amplituden der verschiedenen Gauss Anpassungen gestützt (Abbildung 52). Eine Gauss-förmige Ausweitung des Chromatinauflockerungsbereichs wird aufgrund der Verteilung der Ionendichte im Bestrahlungsbereich vermutet. Im Laufe des Überwachungszeitraums bis 540 s nach  $t_0$  ist eine fortschreitende Lockerung des Chromatins im Bestrahlungsbereichs feststellbar.

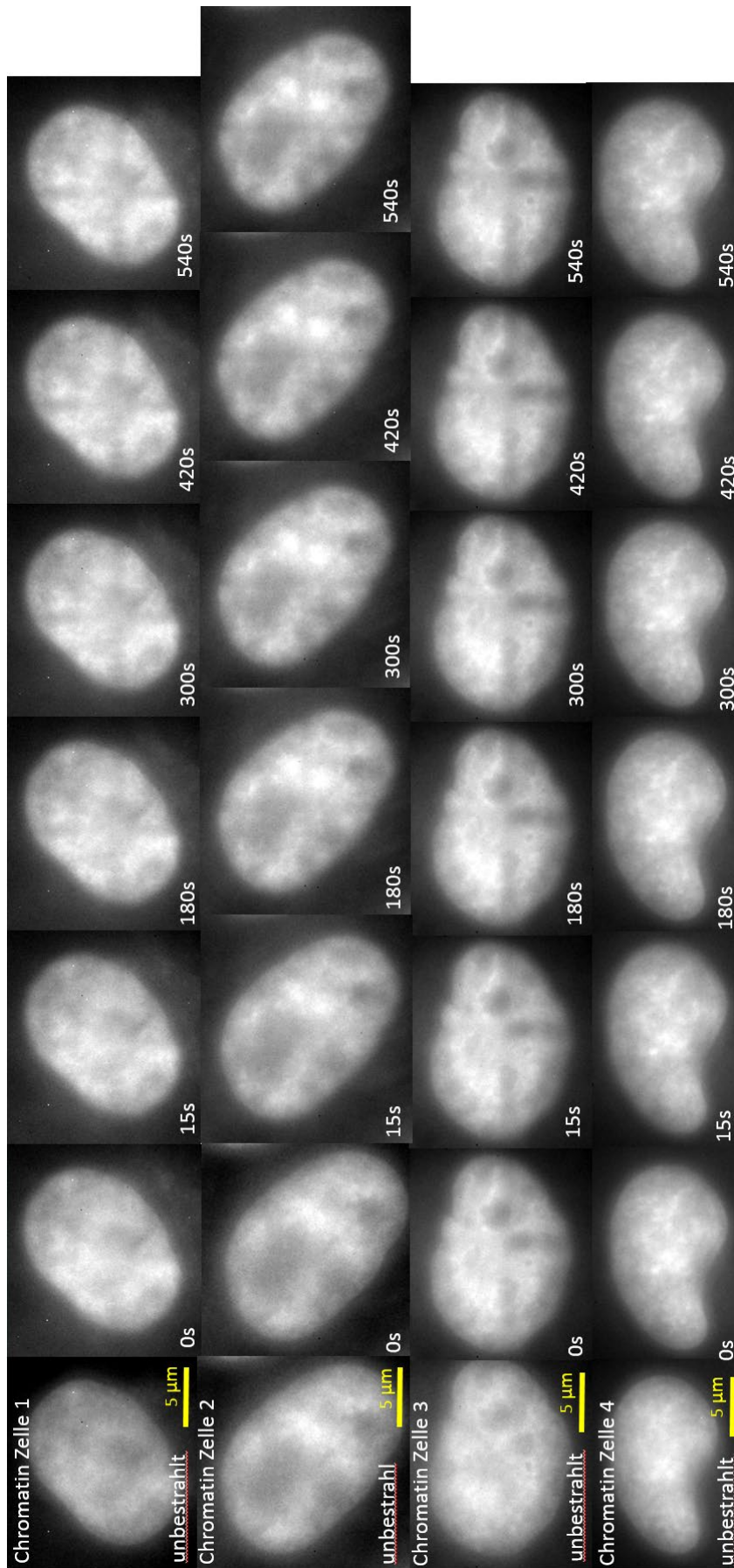


Abbildung 48: Zeitserie der 4 auf Chromatinauflockerung überwachten HeLa-Zellkerne vor Bestrahlung  $t_0$  bis Beobachtungsende  $t_{540}$ . Zelle 4 zeigt nach Bestrahlung keine Reaktion in Form von Chromatinauflockerung.

In 73 % der bestrahlten Zellen (n=70) fand eine Chromatinauflockerung nach Bestrahlung statt. Zellen, welche trotz gleicher Bestrahlungsbehandlung wie Zelle 1, 2 und 3, keine Reaktion in Form einer Chromatinauflockerung aufwiesen, waren hilfreich um auszuschließen, dass die Fluoreszenzsignalreduktion durch Zerstörung der Fluorophore ausgelöst wird (siehe Zelle 4 Abbildung 48). Selbst eine Bestrahlung mit doppelter Kohlenstoffionendosis führte zu keiner Auslöschung des Fluoreszenzsignals (siehe Abbildung 49). Daraus wird jedoch auch ersichtlich, dass nicht jede Zelle durch Bestrahlung zur Chromatinlockerung angeregt werden kann. In Abbildung 49 wird vielmehr deutlich, dass es auch zu einer lokalen Erhöhung der Chromatindichte durch Bestrahlung kommen kann. Eine ausbleibende Lockerung konnte jedoch nur in 27 % (n=70) der bestrahlten Zellen beobachtet werden. Die lokale Überhöhung im Bestrahlungsbereich wurde nur bei 4 % der Zellen nachgewiesen.

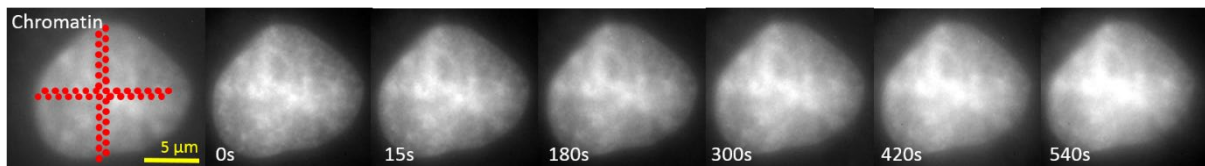


Abbildung 49: Lokale Überhöhung der Chromatindichte im Bestrahlungsbereich, nach doppelt induzierter Strahlendosis. Überwachungszeitraum von  $t_0$ - $t_{540}$ .

Um genauere Aussagen über die Kinetik der Chromatinbeweglichkeit machen zu können, wurde entlang der vertikalen Achse des bestrahlten Bereichs eine Region of Interest (ROI) definiert (siehe Abbildung 50), der Verlauf der Fluoreszenzintensität orthogonal zur Achsenrichtung über eine definierte Fläche gemessen und die Ergebnisse gemittelt. Bei der Definition der ROI wurde darauf geachtet, hauptsächlich Bereiche dichten Chromatins einzuschließen und Nukleoli- sowie vermehrt Euchromatin-enhaltene Bereiche zu vermeiden.

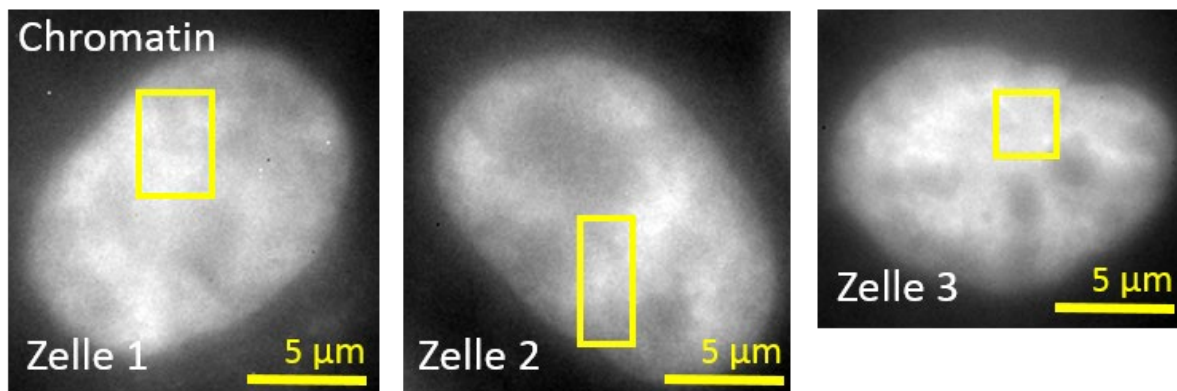


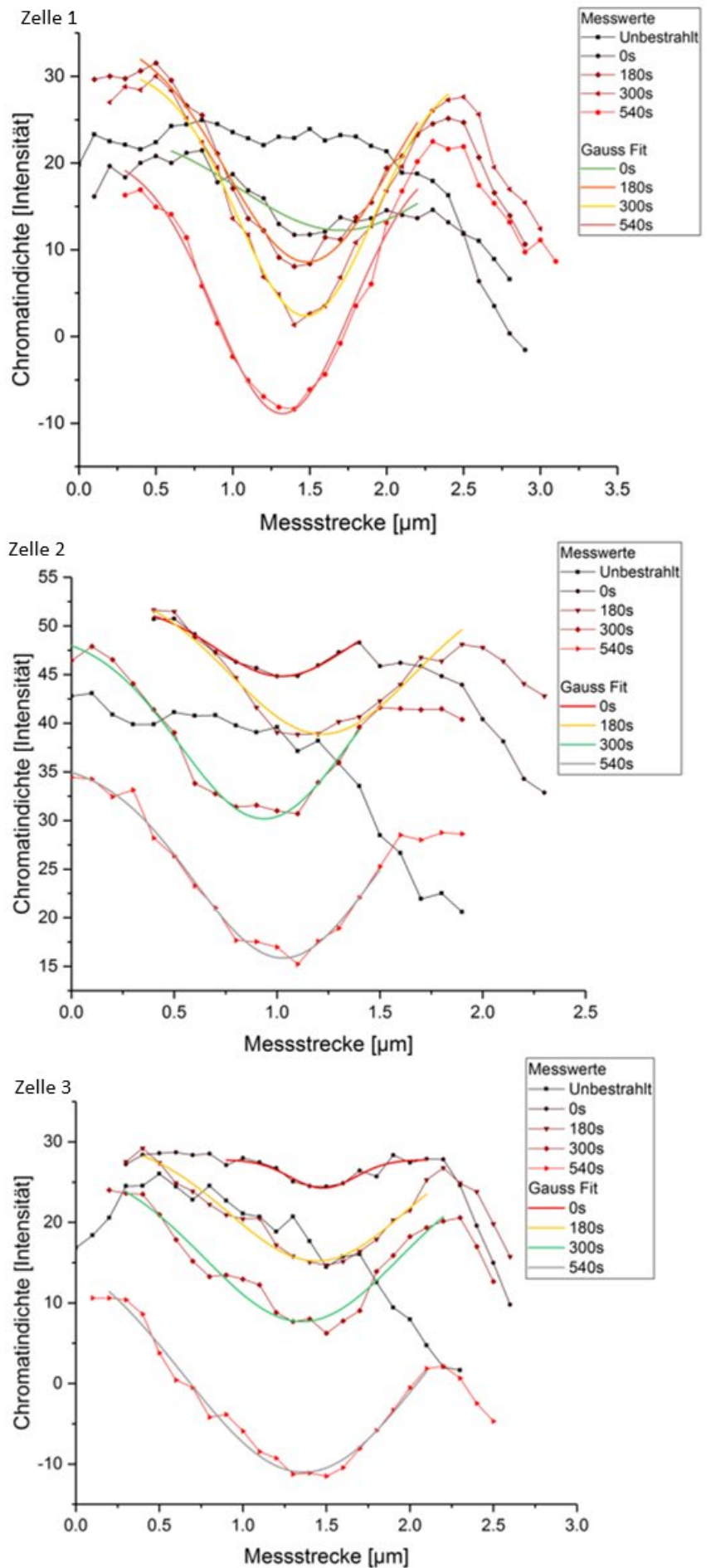
Abbildung 50: Definition der ROI im Zellkern der untersuchten Zellen.

Bei allen drei Zellen ist an Hand Abbildung 51 deutlich zu erkennen, dass die Chromatindichte der unbestrahlten Zelle über die Messstrecke keine ersichtliche Bildung eines lokalen Minimums aufweist. Die Graphen wurden auf die mittlere Chromatindichte des untersuchten Zellkerns normiert. Dabei ist, wie angestrebt, das Chromatin aller Messbereiche dichter als die mittlere Chromatindichte im Zellkern (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Übersicht der mittleren Chromatindichten im Zellkern und der ROI der jeweiligen Zellen 1-3. Das Maß für Chromatindichte wird aus der Signalintensität (0-255) gebildet. Der angegebene Fehler entspricht der Standardabweichung.

# Zelle	Chromatindichte	
	Zellkern	ROI
<b>Zelle 1</b>	209±12,645	229±8,377
<b>Zelle 2</b>	178±9,236	190±6,453
<b>Zelle 3</b>	200±11,254	212±7,247

Abbildung 51: Graph der Chromatindichten der Zellen 1-3, in der ROI von  $t_{-15}$ - $t_{540}$ , über die Breite der ROI (Punkte); Gaussgleichungen über die Intensitätsmessungen über die Beobachtungszeit (durchgängige Linie).



Nach Bestrahlung der Zellen ist eine signifikante Änderung des Intensitätsverlaufs zu beobachten. Schon bis Zeitpunkt 0 s nach Bestrahlung bildet sich in allen drei Graphen ein lokales Minimum der Chromatindichte im Bestrahlungsbereich, welche sich über die Dauer der Bestrahlung weiter auflockert. Beim direkten Vergleich der Übersichtsgraphen in Abbildung 51 mit fortlaufender Zeit nach Bestrahlung ist zu sehen, dass es an den Rändern des Bestrahlungsbereichs zu einer lokalen Überhöhung der Chromatindichte kommt, die Dichte global im Zellkern über die Zeit jedoch um ca 33 % abnimmt. Die Breite des Chromatinauflockerungsbereichs weist auf einen zweistufigen Prozess, einmal bis 15 s und ab 15 s hin, erfährt jedoch keine weitere Änderung innerhalb  $t_0-t_{15}$  und  $t_{15}-t_{540}$ . Der Mittelwert der Breite des Auflockerungsbereichs, gemessen an der Halbwertsbreite bis 15 s, liegt bei  $(603\pm 103)$  nm sowie einer maximalen Breite ab 15 s von  $(1200\pm 230)$  nm. Innerhalb des Beobachtungszeitraums wurde keine anschließende Wiederverdichtung des Chromatins festgestellt. Eine Messung der Änderung der Zellkernfläche über den Beobachtungszeitraum fand im Zuge dieser Arbeit nicht statt. Ersichtlich aus den Graphen über die Änderung der Chromatindichte im Bestrahlungsbereich (Abbildung 52) ist eine zweistufige Lockerung des Chromatins, nämlich bis 15 s und ab 15 s bis Beobachtungsende, zu erkennen, welche jedoch durch weitere Experimente auf Signifikanz geprüft werden muss. Ausgehend von einer maximalen Chromatindichte im Sättigungsniveau von 255 (Grauwerte) und einer minimalen Chromatindichte mit dem Grauwert 0 und der Voraussetzung eines annähernd linearen Modells, kann eine Lockerung der DNA von, im Mittel  $27 \pm 4,7$  Grauwertstufen, beobachtet werden, was einer Chromatindichtereduktion von 10 % entspricht. Wird angenommen, dass die minimale Chromatindichte durch die maximale Dichteänderung bis 540 s definiert wird (27 Grauwertstufen), entsteht eine Lockerungsgeschwindigkeit des Chromatins von  $0,124\%s^{-1}$ .

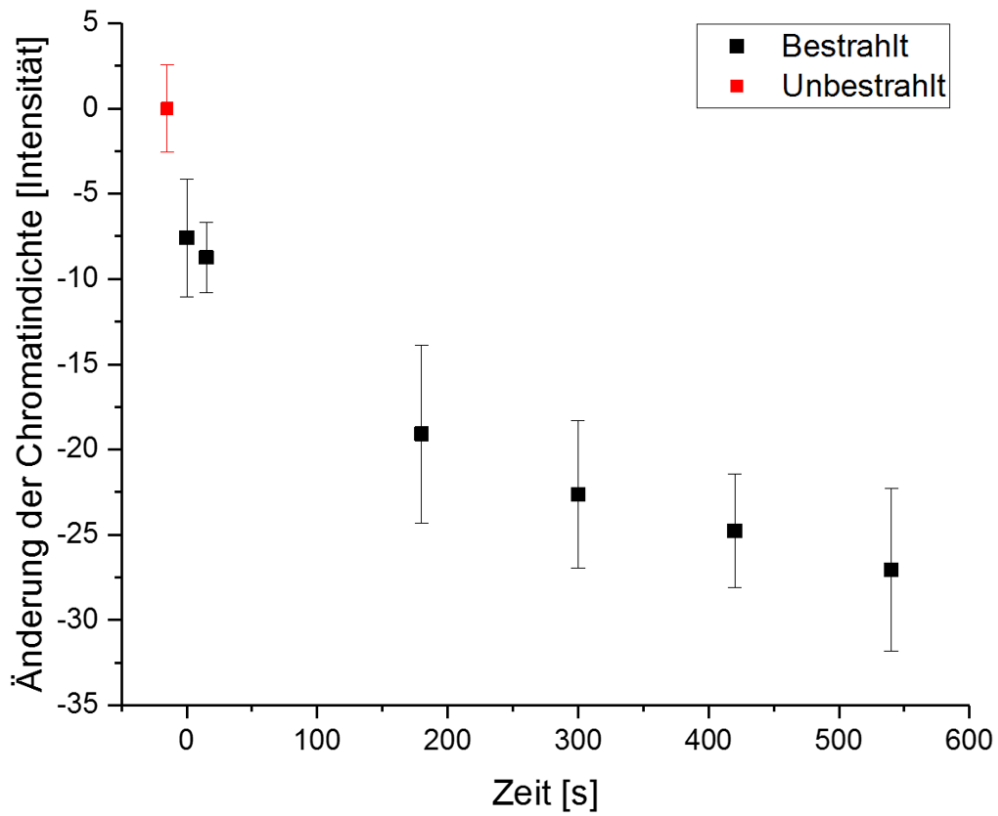


Abbildung 52: Graph über die Lockerung der Chromatindichte in der ROI der Zellen 1-3 über die Beobachtungszeit. Gemessen wurde die Änderung der Chromatindichte vom lokalen Maximum der Flanken der jeweiligen Gausskurve bis zum jeweiligen absoluten Minimum.



## 9.2 Foci Migration

Für die Untersuchung der Foci Migration wurden Zellen in zufälliger Verteilung mit  $\alpha$ -Teilchen bestrahlt. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt. Aufgrund der Varianzähnlichkeit wurden die beiden Wiederholungen gepoolt (ANOVA-Analyse; Signifikanzniveau=0,5;  $p=0,357264$ ). Zur Analyse herangezogen, wurden 20 Zellen pro Zeitpunkt mit Zeiteinheiten zwischen 13 min und 1440 min. Von Interesse war hierbei der Abstand einzelner IRIF zur Membran des Nukleus. Als IRIF wurden Foci gezählt, welche positive Signale bezüglich der Proteine Rad51 und BRCA1 zeigten. Somit ist die Anzahl der gemessenen Foci pro Zeitpunkt je nach Reparaturstatus der Zelle unterschiedlich und bewegt sich zwischen 50 und 250 IRIF pro Zeitpunkt. Da Rad51 und BRCA1 inflationär im Zellkern jedoch nicht im Zytoplasma vorkommen wurde die Nukleusmembran über die BRCA1- bzw. Rad51-positiven Bereiche definiert. Gemessen wurde jeweils der Abstand des Mittelpunkts des IRIF und dem äußersten Ende des „nuklear envelopes“ also der Zellkernhülle. Hierbei wurde stets der kürzest mögliche Abstand gemessen. Die Datenaufnahme wurde mittels STED Mikroskopie mit einer Auflösung von  $\sim 100$  nm durchgeführt. Da die Mittelpunktsbestimmung pixelgenau erfolgt ist, kann eine Genauigkeit unterhalb der Auflösungsgrenze von angenommen werden. Der hierbei entstandene Fehler (in Pixelgröße = 40 nm) kann somit vernachlässigt werden.

Um die erhaltenen Ergebnisse in einem passenden Maßstab bewerten zu können, wurden anhand 123 HeLa-Zellen, die durchschnittliche Zelldicke (Messschema siehe Abbildung 53) der HeLa-Zellen und damit die maximale Migrationsstrecke bestimmt. Mit einer durchschnittlichen Zellkerndicke von  $(14,34 \pm 2,4)$   $\mu\text{m}$  liegt der maximal mögliche Abstand eines IRIF zur Zellkernhülle bei  $\sim(7,17 \pm 2,4)$   $\mu\text{m}$  (siehe Abbildung 54).

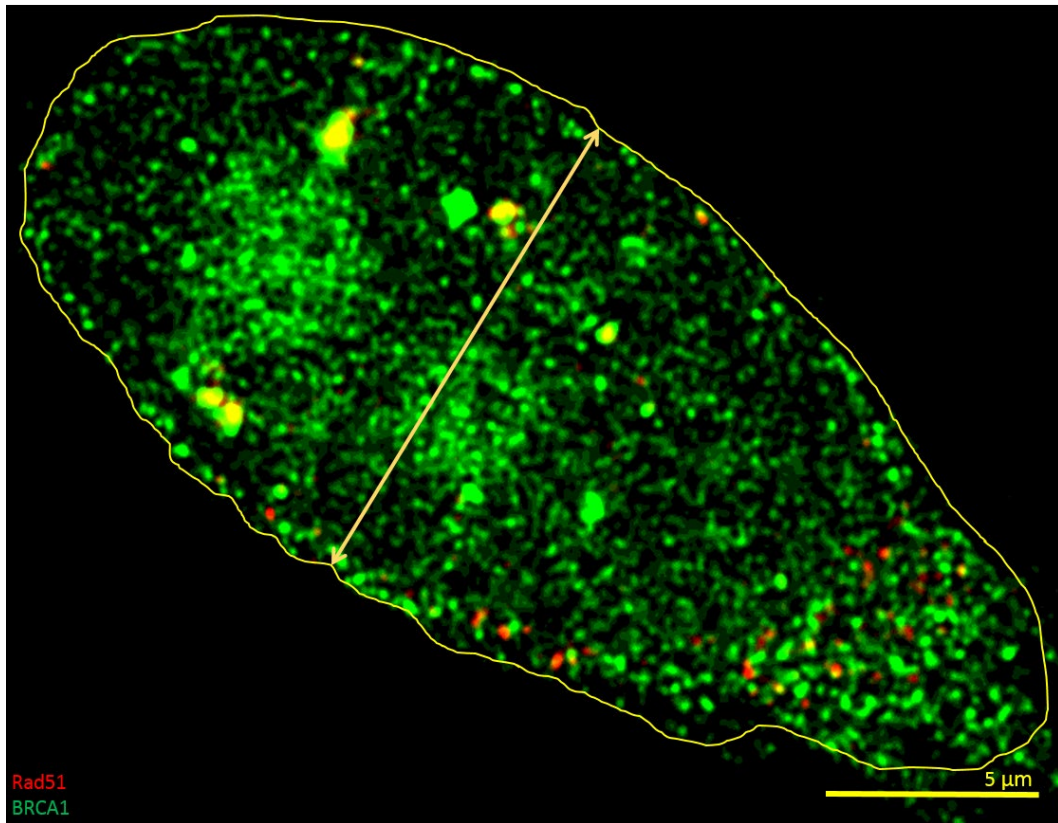


Abbildung 53: STED-Mikroskopische Aufnahme eines HeLa-Zellkerns mit Markierungen der Proteine Rad51 (rot) und BRCA1 (grün). Eingezeichnet in den Zellkern ist die Definition der Dicke des Zellkerns (gelber Pfeil).

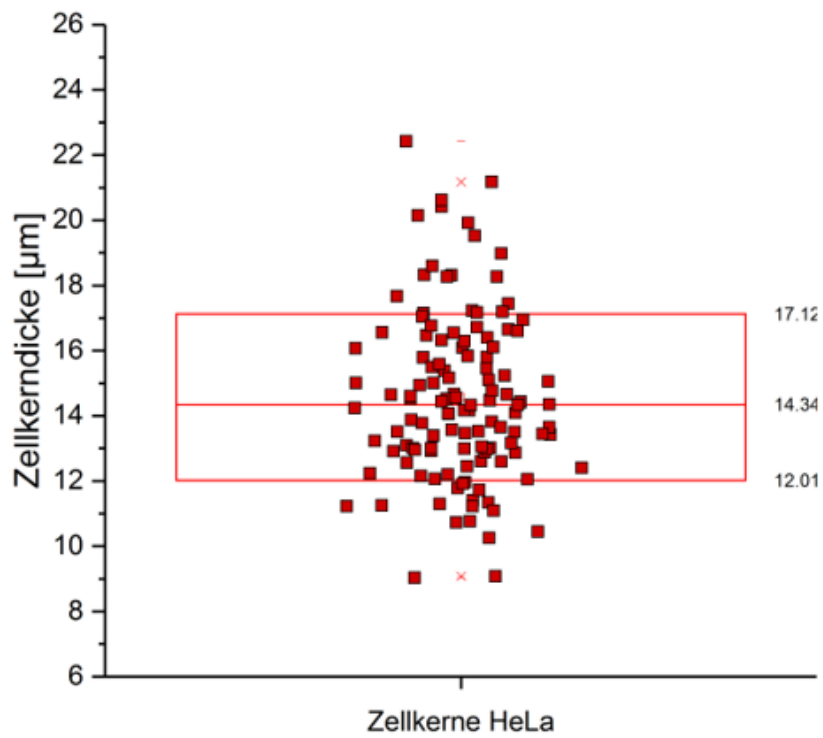


Abbildung 54: Blot der unterschiedlichen HeLa-Zellkerndicken.  $n=123$ .

Wie in Abbildung 55 beispielhaft ersichtlich, sind die IRIF in der frühen Phase der DNA-Reparatur noch bestrahlungsbedingt zufällig verteilt (Bsp. 60 min Reparaturzeit). Zu späteren Beobachtungszeitpunkten, wie hier beispielsweise bei 480 min Reparaturzeit, scheint eine gerichtete Umorganisation stattgefunden zu haben.

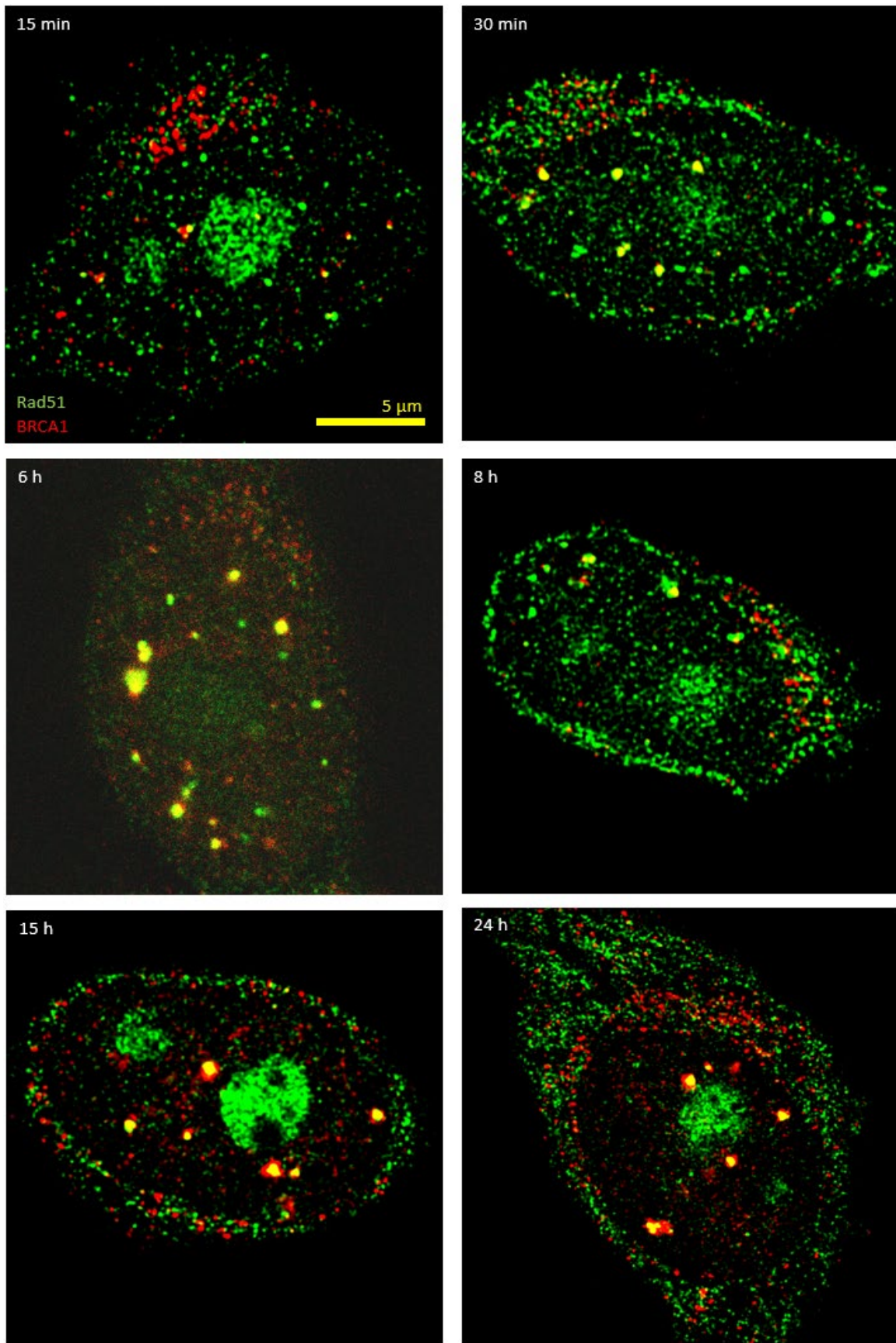


Abbildung 55: STED Mikroskopische Aufnahme von HeLa-Zellen 15 min-24 h nach  $\alpha$ -Bestrahlung. Markierungen der Proteine Rad51 (grün) und BRCA1 (rot). Zu erkennen ist die noch zufällige Verteilung der IRIF im Zellkern und die Verlagerung der Foci und Orientierung am Verlauf der Zellkernhülle. Zu späten Zeitpunkten sind hauptsächlich nicht verlagerte Foci zu sehen.

Die Messergebnisse zeigen eine deutliche, gerichtete Änderung der IRIF-Zellkernmembranabstände über die Reparaturzeit. Zu Beginn beträgt der mittlere Abstand  $3,28 \pm 0,13 \mu\text{m}$ . Bis 20 min folgt eine signifikante Reduktion der Abstände auf  $2,4 \pm 0,14 \mu\text{m}$ . Von 20 min Reparaturzeit bis 360 min verändern sich die Foci-Abstände unmerklich und pendeln um einen Wert von ca.  $(2,5 \pm 0,13) \mu\text{m}$ . Ab 360 min Reparaturzeit reduziert sich der mittlere Abstand bis 480min auf  $(1,92 \pm 0,1) \mu\text{m}$ . Von 480 min bis 1440 min und damit bis zum Ende des Beobachtungszeitraums, steigt der mittlere Abstand wieder stark an, klettert auf bis zu  $(3,37 \pm 0,17) \mu\text{m}$  und orientiert sich damit wieder an den Werten der ersten 13 min der DNA Reparatur (siehe Abbildung 56).

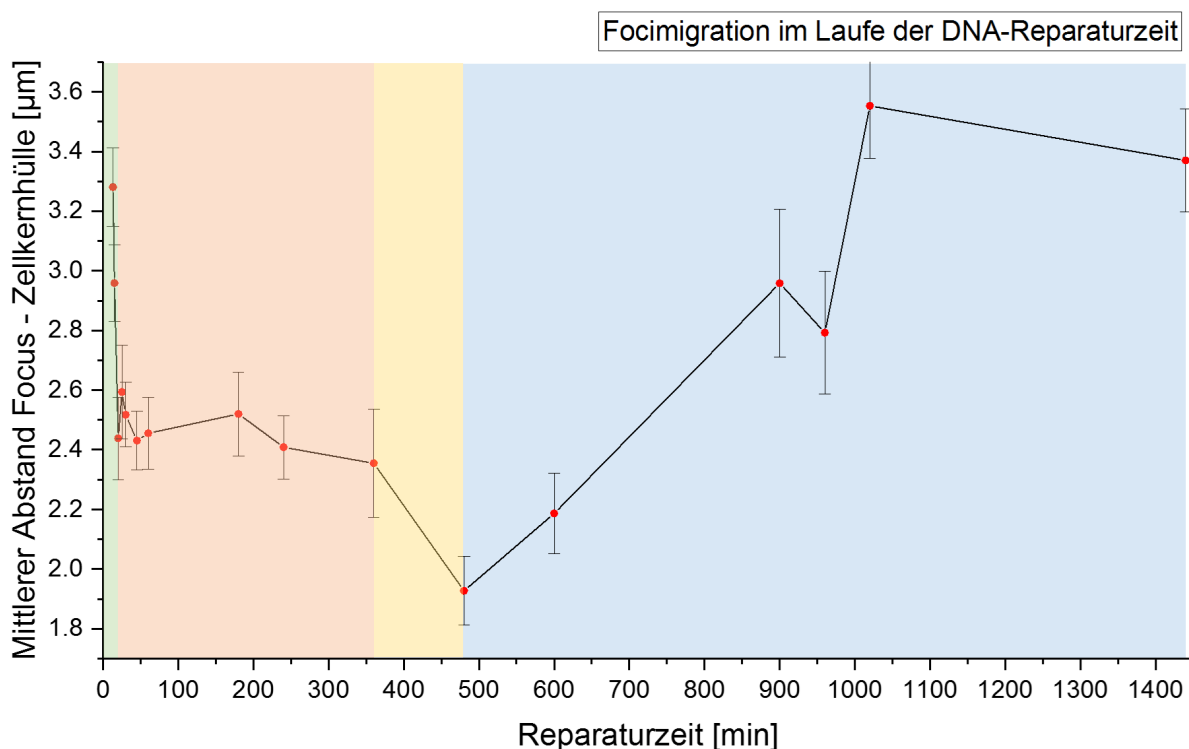


Abbildung 56: Graph der Focimigration im Laufe der DNA-Reparaturzeit von 13min bis 1440min gemessen am mittleren Abstand der Foci zur Zellkernmembran. Farblich hinterlegt ist die Unterteilung der Migration in verschiedene Aktivitätsphasen.

Um eine zufällige Verteilungsänderung von gerichteter Focimigration unterscheiden zu können, wurde zusätzlich eine zufällige Bestrahlung eines Zellkerns simuliert (siehe Abbildung 57). Der Zellkern mit den Maßen eines HeLa-Zellkerns von  $\sim 14 \mu\text{m}$

Zellkerndicke wurde über ein Matlab (MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, Vereinigte Staaten) basiertes Programm zur Zufallsverteilung von Foci mit einer simulierten Dosis von 1 Gy bestrahlt und anschließend mittels ImageJ bezüglich der Foci Abstände zur Zellkernmembran ausgewertet. Die Abstände wurden gemessen ausgehend von der inneren Zellkernhüllengrenze bis zum per Auge bestimmten Mittelpunkt des Focus (siehe Abbildung 57, grüner Pfeil). Somit sind die Größe der sowie die Dicke der Zellkernhülle nicht relevant für die weitere Auswertung. Messfehler unter 105 nm Auflösungsgrenze können, wie zuvor, vernachlässigt werden.

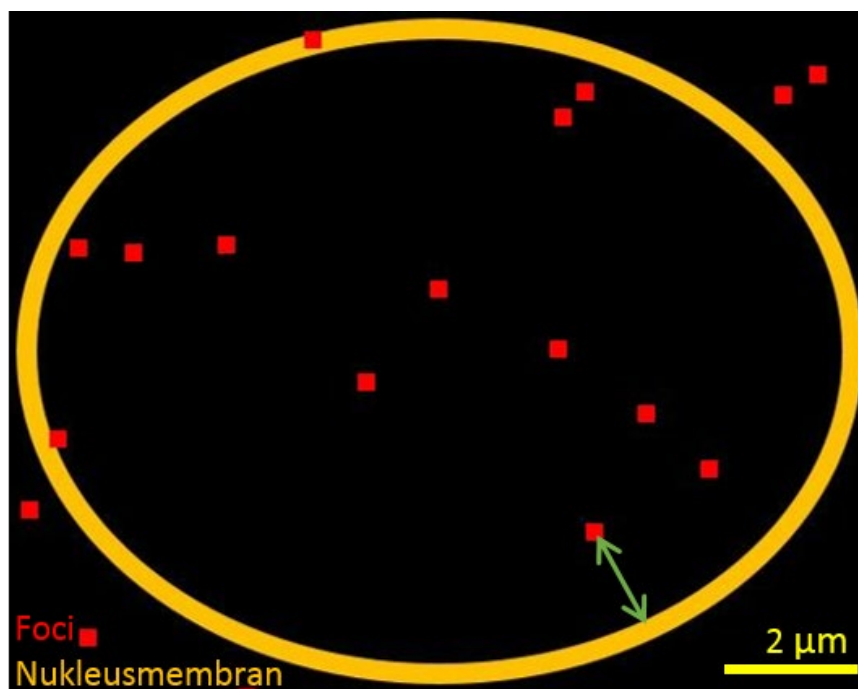


Abbildung 57: Simulierte  $\alpha$ -Bestrahlung eines Zellkerns mit 1,2 Gy Strahlendosis. Die Simulation folgt einer Zufallsverteilung der Foci auf dem gesamten Bildausschnitt. Gemessen wurde hierbei der Abstand von innerer Zellkernhülle zum per Auge bestimmten Mittelpunkt des Focus (grün). An die Kernhülle angrenzende Foci wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Wie in Abbildung 58 zu sehen ist, sind die gemessenen Abstände im Mittel ( $2,3 \pm 1,7$ )  $\mu\text{m}$  groß. Der Großteil ( $\sim 60\%$ ) der Abstände bewegt sich in einem Bereich zwischen  $0,86 \mu\text{m}$  und  $4,3 \mu\text{m}$ . In diesem Bereich scheint eine gleichmäßige Verteilung der Abstände gegeben zu sein. Über einem Abstand von  $4,3 \mu\text{m}$  reduziert sich die Zahl der gemessenen Abstände deutlich, obwohl die maximal mögliche Abstandsgröße von  $7 \mu\text{m}$  noch nicht erreicht wurde. Insgesamt wurden 100 simulierte Zellkerne ausgewertet.



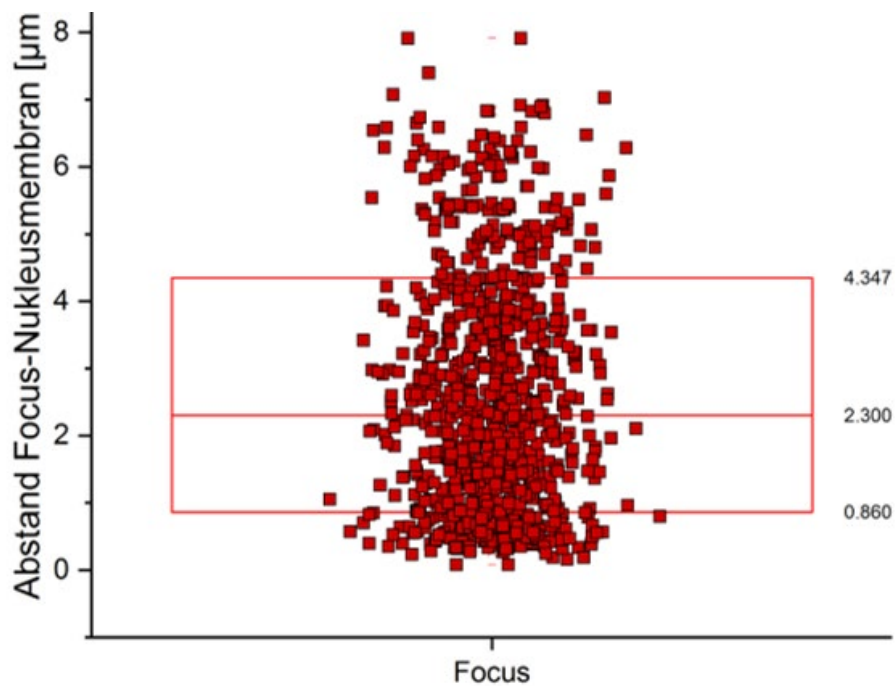


Abbildung 58: Plot der Abstände von Zellkernhülle und Foci von 100 simulierten Zellkernen nach simulierter  $\alpha$ -Bestrahlung mit 1,2Gy (ca. 7 Foci/Zellkern)

Anhand der Daten ist demnach eine deutliche Änderung in den mittleren Abständen der Foci zur Zellkernhülle über den Verlauf der Reparaturzeit zu beobachten. Nach Vergleichen mit simulierter Zufallsverteilung grenzt sich die Entwicklung teilweise stark von einer zufälligen Fociverteilung ab.

### 9.3 DSB-Reparatur im Kontext der Chromatin-Struktur

Viele Studien der letzten Jahre unterstützen die Modelle der strukturellen und funktionellen Chromatin-Organisation und ihren regulativen Einfluss auf DNA-bezogene Prozesse. Jedoch ist das Puzzle, welches das Chromatin in Bezug zur DNA-Reparatur darstellt, noch nicht vollends zusammengesetzt. Offen bleiben Nachweise über die tatsächliche Verteilung des ICs im Chromatin und auch die Funktion als Transitkanalsystem für Reparatur- und Transkriptionsproteine ist bis heute nicht eindeutig bewiesen. Des Weiteren ist unklar, wie die Chromatin-Organisation auf äußere Einflüsse wie ionisierende Strahlung reagiert, welche unabhängig von aktiver und inaktiver DNA die Anlagerung von wichtigen Reparaturproteinen erfordert, um das Überleben der Zelle zu sichern. Ebenso fehlen eindeutige Studien, welche die Reparaturprozesse örtlich in die bestehenden Chromatinmodelle eingliedern. Im Laufe dieser Arbeit wurde die DNA-Reparatur in den Kontext der Chromatinorganisation innerhalb des Zellkerns gesetzt und mittels Schrägbestrahlung (siehe Kapitel „Supraleitendes Nanoskop für angewandte Kernphysikalische Experimente (SNAKE)“) und anschließender höchstauflösender STED Mikroskopie nicht nur die Topographie der DNA Reparatur im Chromatin aufgedeckt, sondern auch die Verantwortlichkeiten verschiedener Reparaturproteine neu beleuchtet.

Um einen Überblick über die Zusammenhänge der verschiedenen zellulären Strukturen im Zellkern zu erhalten, wurden Analysen zur Überschneidung der Chromatinstrukturen durchgeführt. Hierfür wurde computergestützt verglichen wie viele Pixel einer Struktur mit der jeweils anderen, gegengefärbten Struktur colokalisiert sind. Verglichen wurden die DNA-Reparaturproteine Rad51,  $\gamma$ H2AX, 53BP1 sowie das Chromatin anhand DNA-interkalierender Marker (SiR-DNA Kit, siehe Kapitel „Lebendzellbetrahlung“) und die IC-Bereiche, markiert durch das Splicing Protein SC35. Zur Auswertung wurden pro Co-Lokalisationsexperiment jeweils 50 Zellen untersucht. Den Rahmen um die hier erhaltenen Ergebnisse einzuordnen, bildet der Vergleich des Chromatins mit den IC-Regionen des Zellkerns. In diese beiden Strukturen, ordnet sich die DNA-Reparatur nach Induktion von DNA-Schäden durch Bestrahlung ein. Diese Verknüpfung wird ermöglicht durch den Vergleich von 53BP1 mit Chromatin sowie 53BP1 mit IC. Zur örtlichen exakteren Eingrenzung des Strahlenschadens und der DNA-Schadensantwort wurde zusätzlich Rad51 mit  $\gamma$ H2AX sowie Rad51 zusammen mit Heterochromatin untersucht.



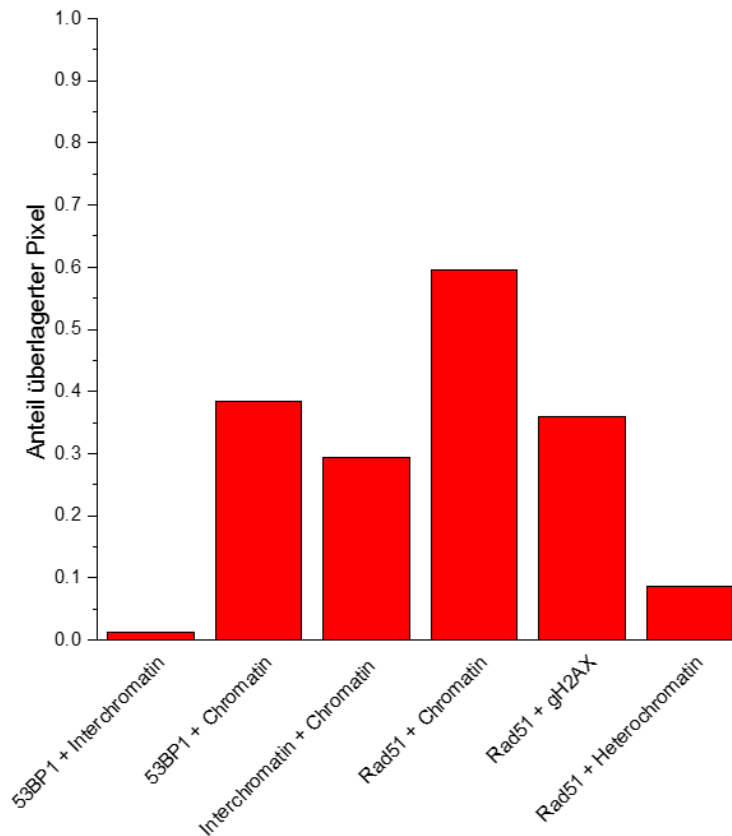


Abbildung 59: Übersicht über die Ergebnisse der Überschneidungsanalyse. Dargestellt ist der Anteil an überlagerten Pixel der untersuchten Strukturen. Hierbei bezieht sich die Angabe auf die Fläche der erst genannten Struktur mit der Fläche der zweitgenannten Struktur.

Anhand der Überschneidungsanalyse ist zu erkennen, dass sich Chromatin und IC zu  $(29 \pm 9)$  % überschneiden (Abbildung 59). Auf den Bilddaten ist ersichtlich, dass scheinbar kein Abstand zwischen Chromatinstrukturen sowie Strukturen des ICs besteht. Augenscheinlich ist zu bemerken, dass das Chromatin und der IC-Bereich sich größtenteils gegenseitig ausschließen und die Überschneidung als saumartig bezeichnet werden kann. Durch die Verwendung des Skeletonize-Plugins für die Bildanalysesoftware ImageJ kann bei Betrachtung der beiden Strukturen ein fein verzweigtes, ineinandergreifendes Netzwerk festgestellt werden (siehe Abbildung 60), welches jeden Abschnitt des Chromatins mit der Zellkernhülle verbindet und scheinbar von Kanälen des IC durchwachsen ist. Hierfür wurde iterativ jede Struktur um mehrere randständige Pixel (Pixel mit fehlendem Nachbarpixel) reduziert, ohne Verbindungen innerhalb der Struktur zu kappen. Die zweidimensionale Darstellung des Chromatingeflechts verhindert leider eine genauere Charakterisierung der IC Netzwerkstruktur.

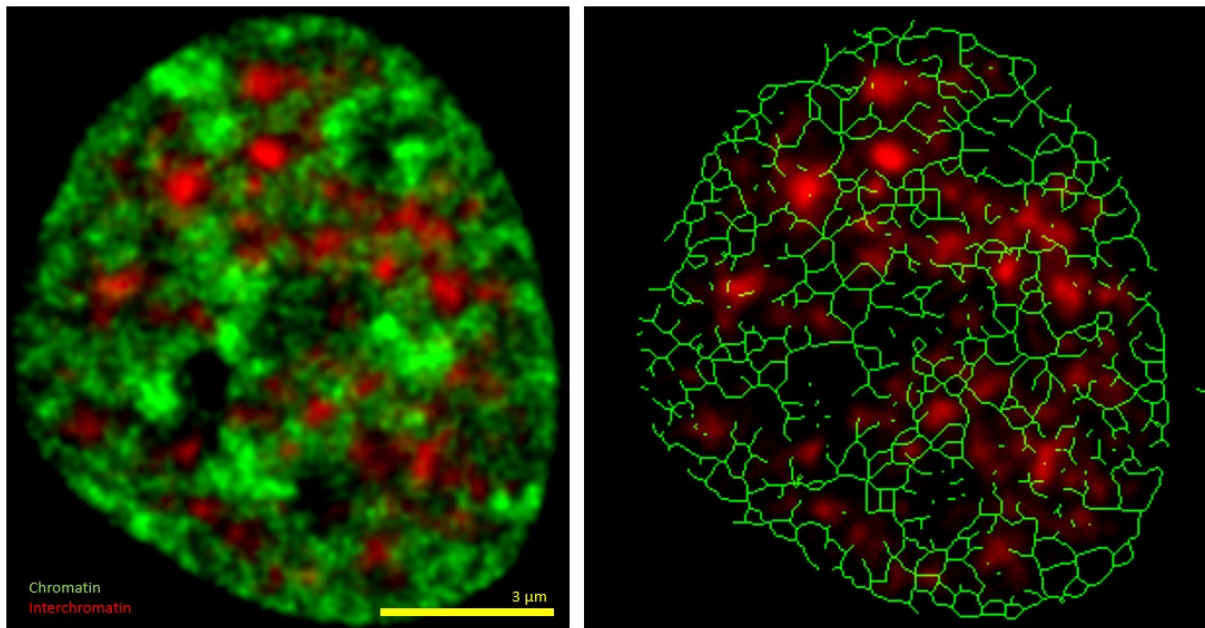


Abbildung 60: STED mikroskopische Aufnahme eines HeLa-Zellkerns markiert durch Chromatinmarker (rot) und SC35 als Interchromatinmarker (rot)(links). Reduktion des Chromatins auf ein zu Grunde liegendes Strukturskelett (rechts).

Die detailliertere Betrachtung der Überschneidungsdaten des DNA-Reparaturbereichs definiert durch 53BP1 und des Chromatins bestätigt den Eindruck des feinmaschigen Netzwerksystems seitens des Chromatins (Abbildung 61). Wie der Überschneidungsanalyse der zwei Strukturen zu entnehmen ist, sind die Strukturen jedoch zu einem größeren Teil, nämlich zu  $(38 \pm 14) \%$ , miteinander verwoben (Abbildung 59). Augenscheinlich wirken 53BP1 und das Chromatin zwar als würden sie sich gegenseitig ausschließen, überlappen jedoch punktuell, indem Äste des Chromatinnetzwerks in die Bereiche des 53BP1 hineinragen, wie auch der Netzwerkanalyse in Abbildung 61 zu entnehmen ist.

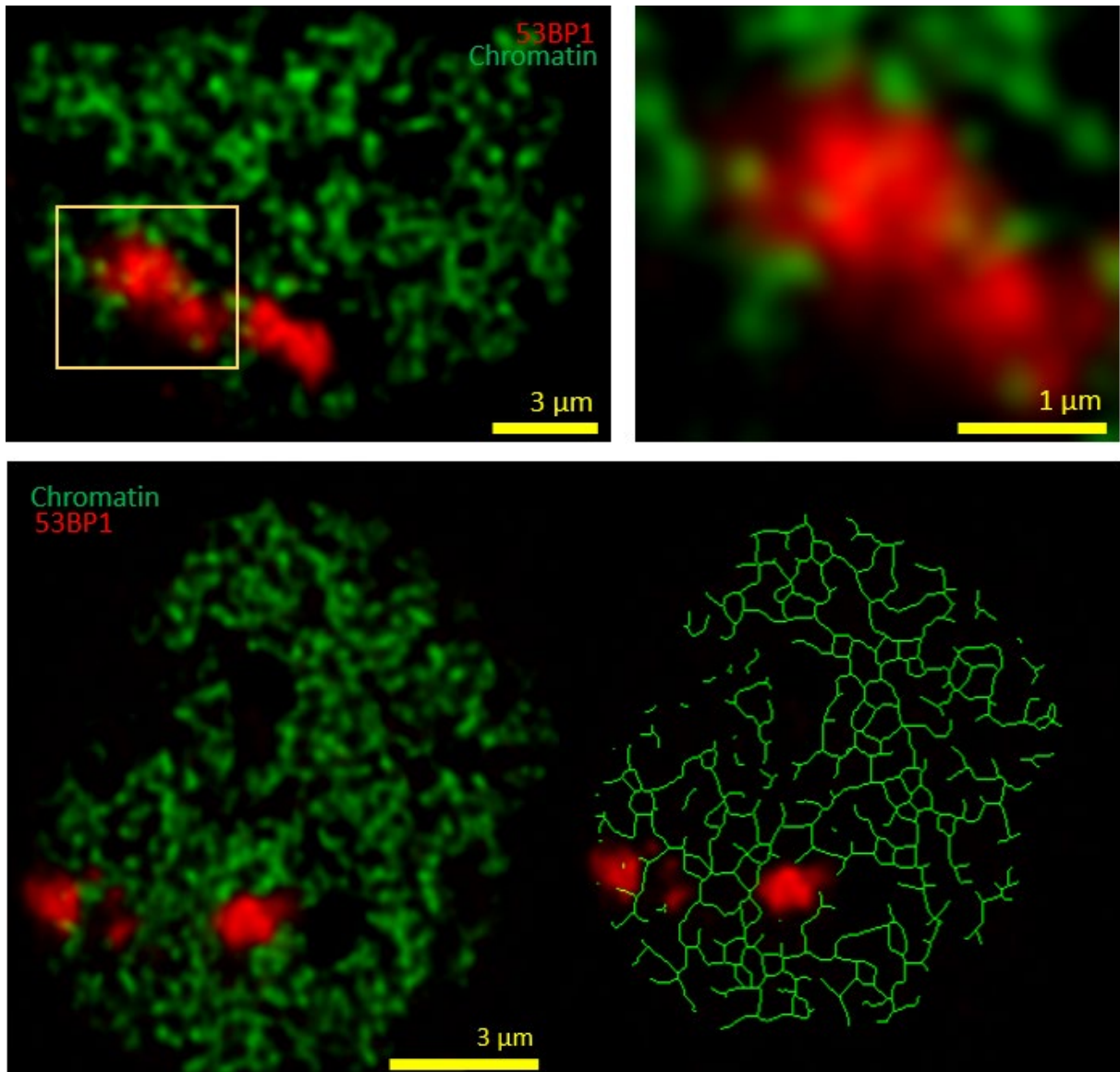


Abbildung 61: STED mikroskopische Aufnahme eines HeLa-Zellkerns markiert durch Chromatinmarker (rot) und 53BP1 (rot) nach Kohlenstoffionen-Schrägbestrahlung (oben). Reduktion des Chromatins auf ein zu Grunde liegendes Strukturskelett (unten).

Ein klarer gegenseitiger Ausschluss ist beim Vergleich zwischen 53BP1 und dem IC zu erkennen. Der durch die Überschneidungsanalyse gemessene Wert beträgt  $(1 \pm 0,2)$  % (Abbildung 59), was auch durch die Bilddaten bekräftigt wird. Das feinmaschige Netzwerk der IC-Kanäle, welches beinahe jeden Bereich des Zellkerns mit der Zellkernmembran verbindet (Abbildung 62) wird durch den Track von 53BP1 verdrängt und kategorisch ausgeschlossen.

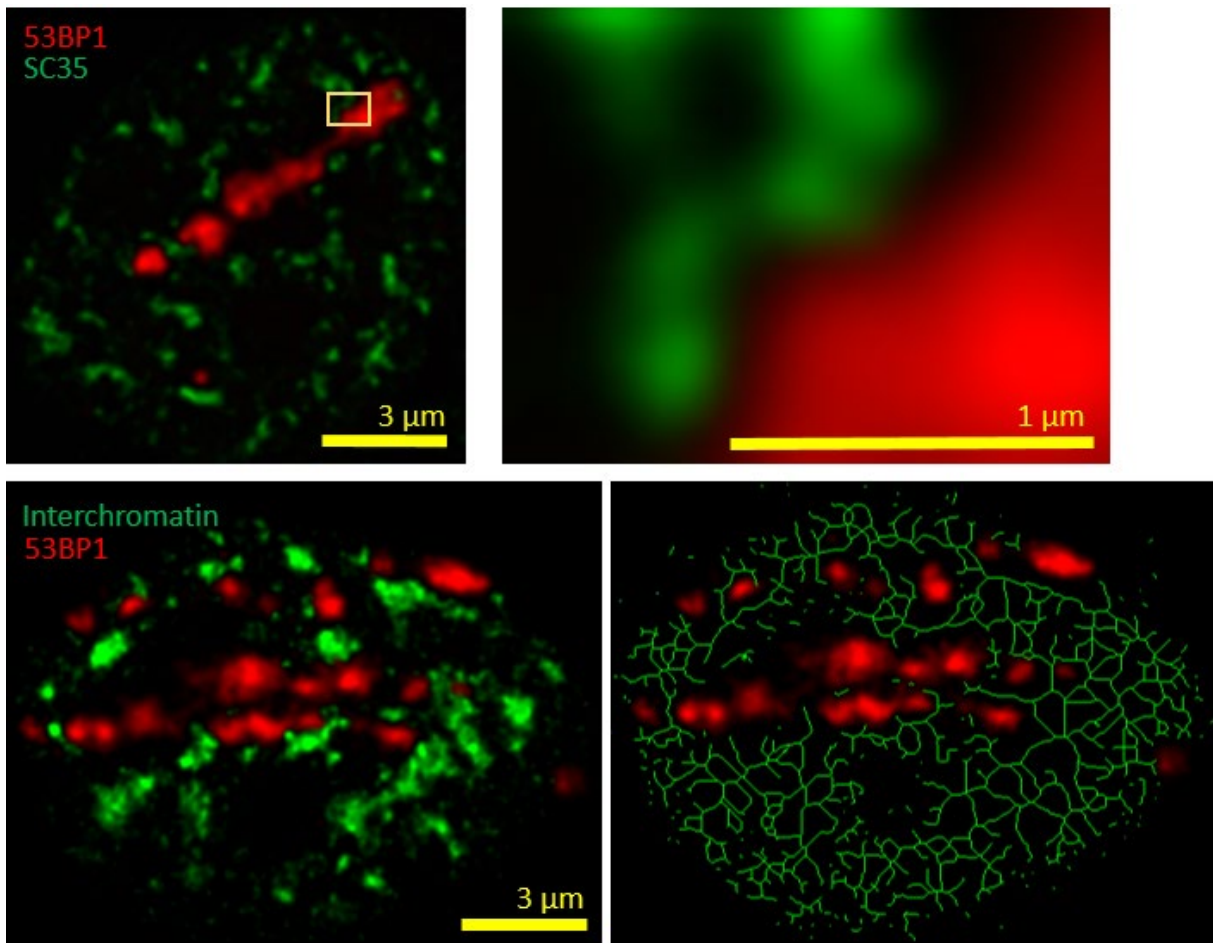


Abbildung 62: STED-mikroskopische Aufnahme eines HeLa-Zellkerns markiert durch 53BP1 (rot) und SC35 als Interchromatinmarker (rot)(oben). Reduktion des Interchromatins auf ein zu Grunde liegendes Strukturskelett (unten).

Die zwei Strukturen sind jedoch nicht einfach getrennt voneinander, sondern weisen eine Art Pufferzone auf. Jeweils um die Ionenspur, definiert durch 53BP1, ist ein  $(270 \pm 41)$  nm starker Bereich zu beobachten, welcher von keinem der beiden Proteine besetzt wird. Zur Vermessung dieser Pufferzone wurde bei 134 Foci mittels der linearen Intensitätsmessfunktion von ImageJ ein Fluoreszenzintensitätsprofil von Struktur 1 bis Struktur 2 gemessen (Abbildung 63, siehe gelbe Linie) und die Halbwertsbreiten der an die Profile angeglichenen Gaußkurven berechnet.

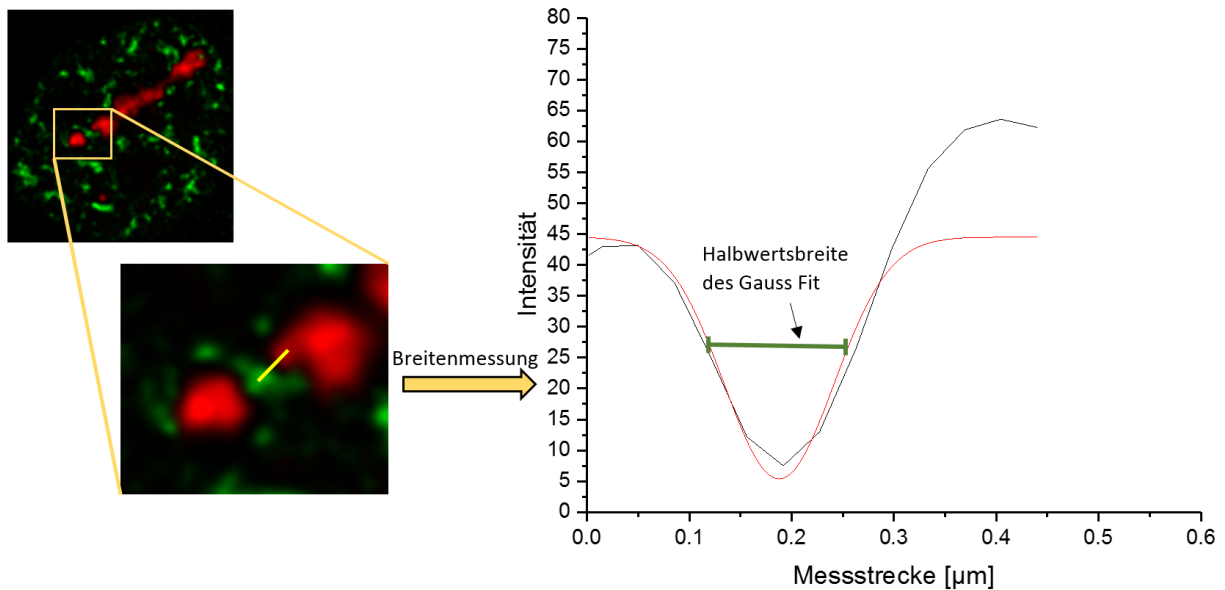


Abbildung 63: Darstellung der Pufferzonenvermessung bei STED-mikroskopischen Aufnahmen von HeLa-Zellkernen markiert mit 53BP1 (rot) und SC53 als Interchromatinmarker (grün). Die Messgerade zur Erstellung eines Intensitätsprofils, welches die zwei markierten Strukturen überspannt, ist in Gelb abgebildet. Der abgebildete Graph verdeutlicht die Breitenmessung der Pufferzone anhand einer Gauß Anpassung des Intensitätsprofils.

Weiter eingegrenzt wird die Lokalisation des induzierten DNA-Doppelstrangbruchs durch den Vergleich des Chromatins und Rad51. Auf den ersten Blick scheint Rad51 das Chromatin am Schadensort auszuschließen. Die Überschneidungsanalyse misst jedoch einen Co-lokalisationswert von  $(60 \pm 15) \%$ . Bei genauerer Untersuchung fällt auf, dass die Foci von Rad51 zwar in gelichteten Bereichen des Heterochromatins, welche den Tracks von 53BP1 ähneln, lokalisiert sind, dort jedoch größtenteils randständig auf Heterochromatinästen sitzen und in die Lichtungen hineinragen (siehe Abbildung 64) [85, 87, 161]. Dabei befindet sich ein kleiner Teil von  $(10 \pm 2) \%$  des Rad51 Focus im dichten Heterochromatin und der Rest auf weniger dichtem Euchromatin.



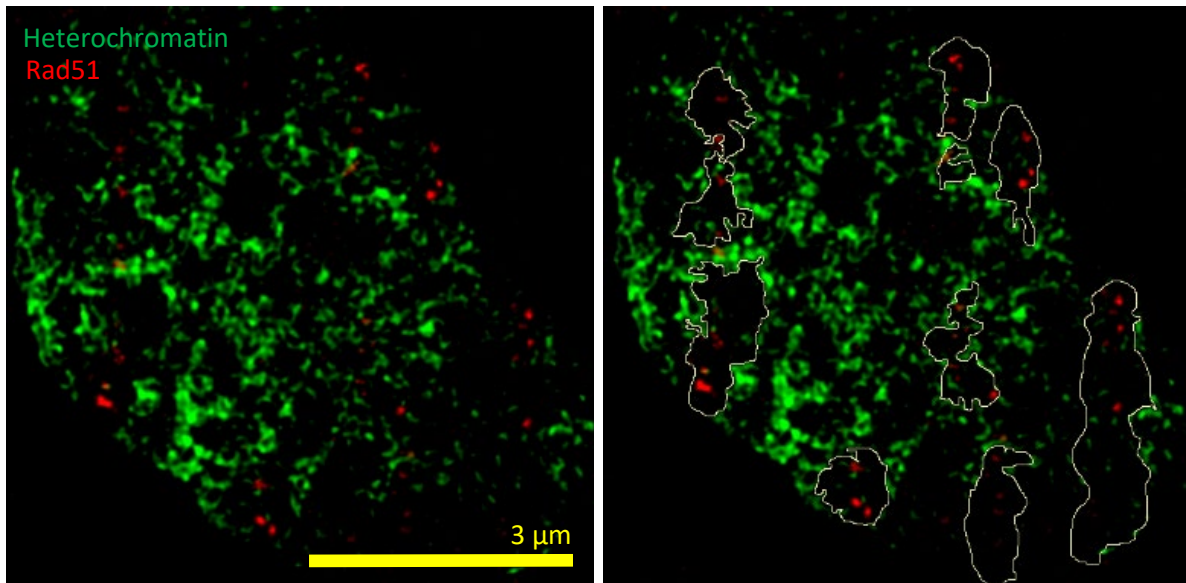


Abbildung 64: STED-mikroskopische Aufnahme eines HeLa-Zellkerns markiert mit einem Heterochromatinmarker (grün) und Rad51 (rot)(links). Heterochromatinlichtungen, welche in ihrer Form und Größe den Foci von 53BP1 ähneln, sind mit Grau umrandet dargestellt (rechts).

Um für diese Aussage Heterochromatin von Euchromatin zu trennen, wurde ein in der Literatur bestätigter Faktor zur Dichte des Heterochromatins verwendet [83]. Hierbei wurden Fluoreszenzsignale, welche sich unterhalb des 6,5-fach reduzierten Chromatinsignals abhängig vom Maximum der Signalintensität befanden aus der Analyse ausgeschlossen und als Euchromatin betrachtet. Dies bedeutet, dass durch die Bildanalyse-Software ImageJ die maximale Signalintensität als stärkstes Heterochromatinsignal definiert und somit mittels des Faktors 6,5 ein Schwellenwert für Euchromatin gesetzt wurde. Die Bilddaten wurden demnach um die Signale des Euchromatins reduziert. Wie in Abbildung 65 zu beobachten ist findet wie schon in den Ergebnissen des Kapitels „Reparaturstellbildung und Chromatinbeweglichkeit“ bestätigt, die Lockerung des Chromatins durch Ionendurchgänge und Schadensinduktion nur im Heterochromatin statt und reduziert dieses auf eine für Euchromatin typische Dichte.

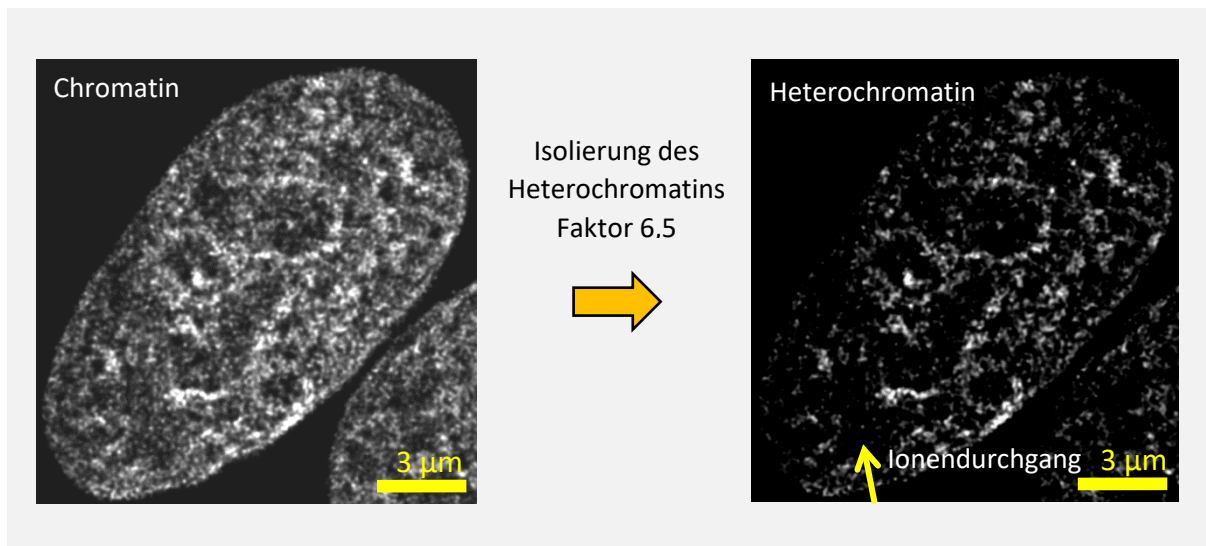


Abbildung 65: Abbildung des gesamten Chromatins eines HeLa Zellkerns mittels interkalierender SiR Farbstoffe (links). Nach Anwendung der Heterochromatinisolierung mit Faktor 6,5 wird die Heterochromatinlichtung am Ionendurchgang sichtbar (rechts).

Genauere Aussagen konnten über den Vergleich zwischen Rad51 und  $\gamma$ H2AX erhalten werden (siehe Abbildung 66). Der Überschneidungsanalyse zu Folge, befinden sich  $(36 \pm 15)$  % des Rad51 Focus auf Chromatinbereichen, welche mit  $\gamma$ H2AX zur DNA-Reparatur und zur Lockerung aktiviert wurden [29]. Die  $\gamma$ H2AX-Foci im Ionenspurtrack scheinen ebenfalls an geklärte Chromatinbereiche anzugrenzen. Diese Aussage jedoch, und auch die Frage, ob diese durch 53BP1 verursacht wurden, bedarf weiterer Untersuchungen. Es ist jedoch auffällig, dass die Fläche der Überschneidungsbereiche des Chromatins mit 53BP1 mit durchschnittlich  $(43 \pm 29)$  px ( $n=100$  Überschneidungsbereiche) sowie die Fociflächen von Rad51 mit durchschnittlich  $(48 \pm 21)$  px ( $n=100$  Foci) sehr ähnlich sind. Hierbei überschreitet keine Überlagerungsfläche eine maximale Größe von 320 px und kein Rad51 Focus die Fläche von 283 px (Abbildung 67).

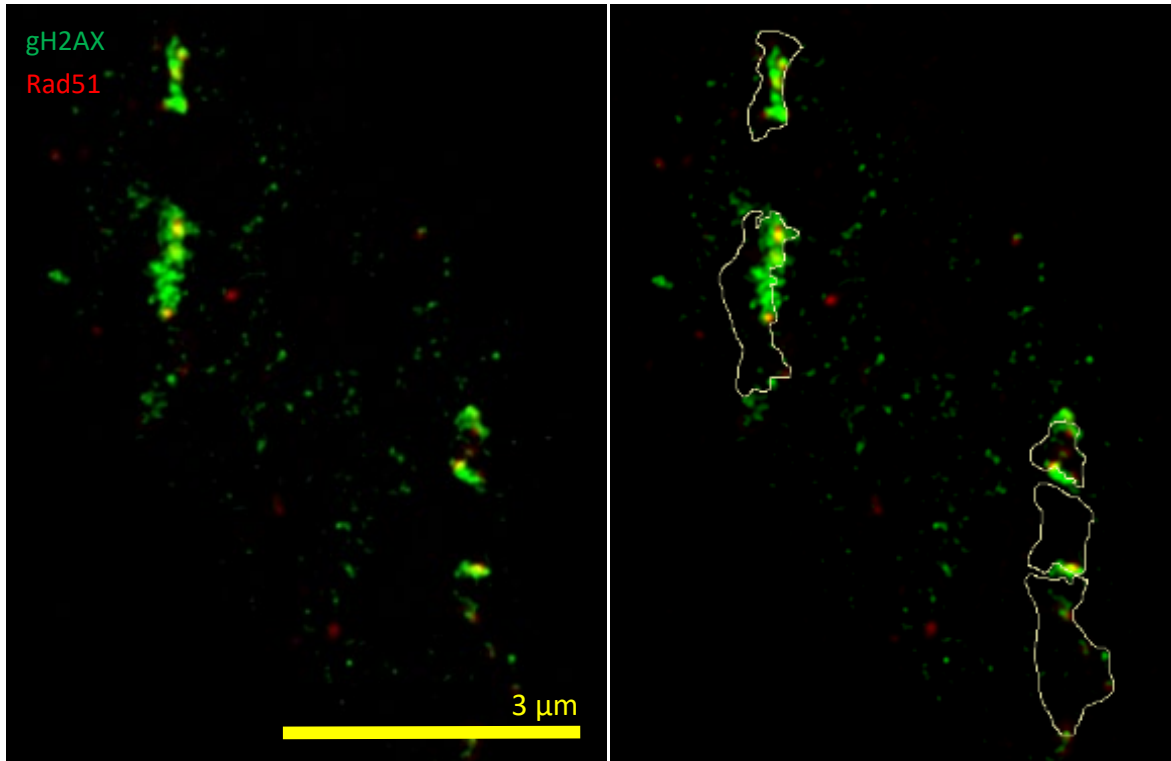


Abbildung 66: STED-mikroskopische Aufnahme eines HeLa-Zellkerns markiert mit Markern für  $\gamma$ H2AX (grün) und Rad51 (rot) nach Kohlenstoff-Schrägbestrahlung (links). Die vermuteten Lichtungen des Heterochromatins mit 53BP1-Foci ähnlicher Form und Größe wurden mit Grau umrandet dargestellt (rechts).

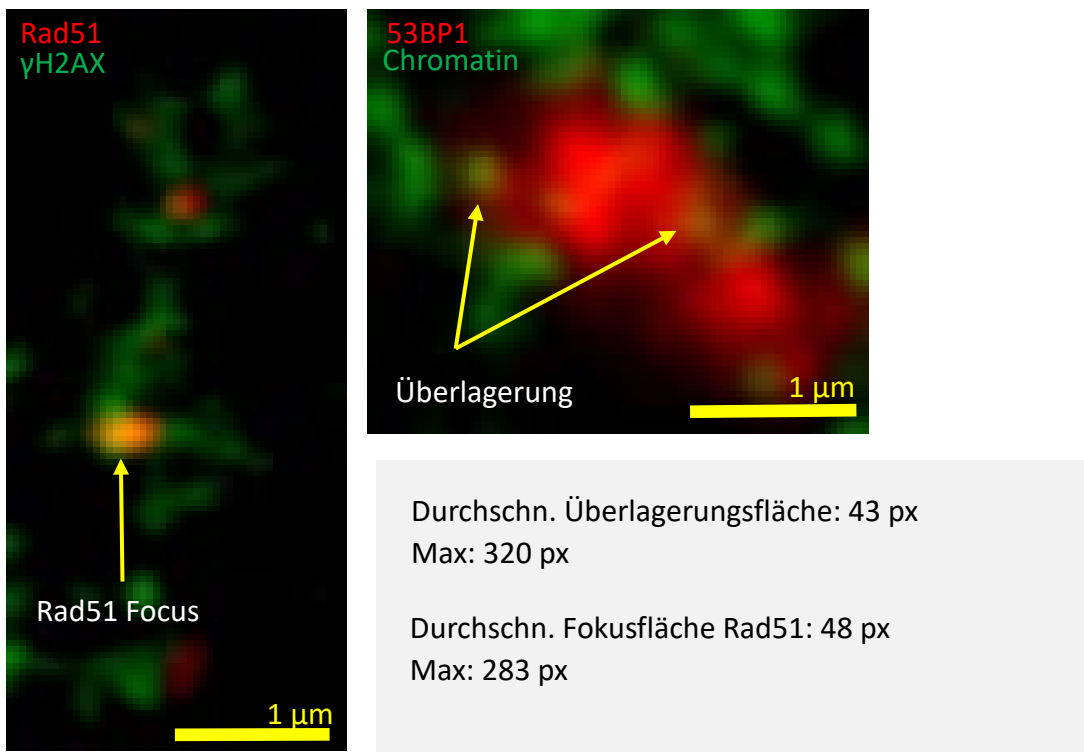


Abbildung 67: STED mikroskopische Aufnahme eines Rad51 Focus (rot) überlagert mit einem Focus von  $\gamma$ H2AX (grün) (links). STED mikroskopische Aufnahme eines 53BP1 Focus (rot) überlagert mit Bereichen des Chromatins (grün) (rechts). Punktuelle Überlagerungen sind mit gelben Pfeilen markiert. Die Proportionen zum Vergleich der Überlagerungsflächen von 53BP1 und Chromatin, sowie Rad51 und  $\gamma$ H2AX sind grau hinterlegt (in Pixel).





## 9.4 Diskussion der Ergebnisse

### 9.4.1 Chromatinbeweglichkeit

Die durch diese Experimente entstandenen Ergebnisse fügen sich gut in die aktuell gültige Anschauung der Chromatin Umformung nach DNA-Dopplestrangbruchinduktion ein. Die erste Chromatinveränderung, ausgelöst durch strahlungsbedingte Schäden, ist anhand der Daten schon bis 15 s nach Bestrahlung zu erkennen. Dies gleicht sich mit Ergebnissen von Kruhlak et al. 2006 [98], welche nach UV Laserbestrahlung von Säugetier-Zellkernen eine Lockerung des Chromatins früher als 20 s beobachten konnten. Die Beobachtungen bestätigen die Ähnlichkeit der Dynamik der Schadensantwort nach Schäden, ausgelöst durch UV-Laserbestrahlung und hoch-LET Bestrahlung wie durch V. Hable et al. 20012 durch Mdc1 Kinetiken postuliert wurde. Obwohl die Schadensstruktur von UV-Laserbestrahlung nicht in die ursprüngliche Definition des LET eingeschlossen werden kann, können demnach Vergleiche über die Komplexität von UV-Laser induzierten DSB gezogen werden. Jedoch muss bedacht werden, dass durch UV-Laserbestrahlung globale Effekte als Artefakte der Hoechst-Sensibilisierung möglich sind. Im Unterschied zu den Erkenntnissen der Literatur ist es uns jedoch erstmals möglich zu zeigen, dass eine solche beinahe sofortige Aktivierung der DNA Schadensantwort nicht nur bei relativ niedriger Dosis (85 DSB im bestrahlten Bereich; ca. 1 DSB/0,96 Mb durch UV-Laserbestrahlung), sondern auch bei Hoch-LET Strahlung (Kohlenstoffionen LET=  $(500 \pm 80)$  keV/ $\mu\text{m}$ ) mit einer Dosis von  $>10000$  Gy geschieht. Ebenso konnte auch gezeigt werden, dass eine derart hohe Strahlendosis lokal induziert, nicht zu sofortiger Inaktivierung der zellulären Reparaturprozesse führt. Die basalen Mechanismen zur Reparaturstellenbildung durch PARP1 und  $\gamma$ H2AX sind weiterhin aktiv und die Reparatur des Schadens wird versucht. Dies wird auch von Studien gestützt, welche bei Bestrahlung mit über 6 Gy zwar die Bildung von Foci beobachten konnten, die Zellen diese jedoch über Monate nicht auflösten oder nicht in Apoptose gingen, bevor die geschädigte DNA-Sequenz nicht abgelesen wurde oder die Zelle in Zellteilung gehen sollte [131]. Ebenso passen die Ergebnisse in die Messungen von Liu et al. 2017, welche eine PARP1 Rekrutierung nach ungefähr 500 ms beobachten konnten und ca. 20 s nach DSB-Induktion die Phosphorylierung von H2AX gemessen werden konnte. Dies steht im direkten Zusammenhang mit Chromatinumformungen [110]. Es

kann vermutet werden, dass erst die PARP1 induzierte Chromatinlockerung zur Bildung von  $\gamma$ H2AX führt, es also ATM erst nach einer initialen Chromatinlockerung möglich ist an H2A zu gelangen. Im Unterschied zur extrem schnellen Detektion des DSB durch PARP1 und der ebenfalls schnellen Initiation der Chromatinauflockerung nach den Messungen dieser Arbeit, dauert der Prozess der Chromatinauflockerung mit einer Lockerungsgeschwindigkeit von  $0,124\%s^{-1}$  jedoch erheblich länger und lässt darauf schließen, dass, wie zuvor erwähnt, eine Proteinkaskade mit einer Vielzahl an Proteinen involviert ist. Ein bedeutender Unterschied in der Kinetik der Chromatinauflockerung durch hoch-LET Bestrahlung und UV-Bestrahlung, also im Vergleich zu den Experimenten von Kruhlak et al. 2006, welche die vollständige Lockerung des Chromatins im Bestrahlungsbereich nach 180 s als abgeschlossen beobachteten, ist, dass der Auflockerungsprozess, durch Hoch-LET Strahlung initiiert, bis 450s andauerte. Gehen wir von ähnlich komplexen DSB aus, kann dies im Zusammenhang mit der Anzahl der induzierten DSB sowie der Größe des bestrahlten Bereichs stehen. Wie Kruhlak et al. 2006 durch Bestrahlungsexperimente unter ATP-Ausschluss festgestellt haben, findet die anfängliche Chromatinauflockerung unter Verbrauch von ATP statt. Je größer der Schadensbereich ist, desto höher der Bedarf an limitiert vorkommendem ATP im Zellkern. Somit lassen die Ergebnisse vermuten, dass ATP eine stark limitierte Ressource im Zellkern darstellt, welche Einfluss auf die Dauer der DNA-Reparatur besitzt. Diese Aussage kann gestützt werden durch Untersuchungen von Wright et al. 2017. Messungen der ATP-Level im Zellkern ließen darauf schließen, dass die Menge an vorrätigem ATP im Zellkern nicht für PARP1-abhängige, großflächige Chromatinumformungen ausreichen kann [191]. Mitochondriale ATP-Produktionsraten sind jedoch deutlich zu gering um den kurzfristig hohen Bedarf zu decken. Lediglich die Umwandlung von ADP-Ribose mit PPi (Pyrophosphat) zu ATP im Zellkern kann den erforderlichen ATP Bedarf decken, benötigt hierfür jedoch mehrere Minuten [131, 191]. Um definitive Aussagen über diesen Zusammenhang treffen zu können und somit eventuell die Strahlensensibilität über die Konzentration von ATP im Zellkern regulieren zu können, wäre jedoch eine Untersuchung mit definierten ATP Konzentration und Bestrahlungsbereichen unterschiedlicher Größe nötig. Ein weiterer Punkt, welcher sich von den Aussagen in der Literatur unterscheidet, ist die Begrenzung der Chromatinumformung auf den bestrahlten Bereich. Der hauptsächliche Auflockerungsprozess findet zwar im bestrahlten Bereich mit einer Breite von ca.  $1,2 \mu\text{m}$ , also der Breite des Ionenstrahls,

statt, es kann anhand der Daten jedoch auch eine leichte Reduktion der globalen Chromatindichte im Zellkern festgestellt werden. Dies widerspricht den Aussagen von Kruhlak et al. 2006, welche keine Veränderung der Chromatinkomposition mittels GFP-markierter Glucocortoid-Rezeptoren gebunden an Chromatin-Strukturen feststellen konnten. Neuere Studien jedoch werden von den Daten dieser Experimente gestützt [163]. Sharma et al. 2010 beobachteten eine Acetyltransferase MOF abhängige globale posttranslationale Modifikation (PTM) nach DSB-Induktion. MOF dient hierbei dazu, im gesamten Chromatin, die Konzentration an H4K16ac zu erhöhen und somit zu seiner leichten Konformationsänderung des Chromatins zu führen. Da ohne MOF keine Fociformation am DSB möglich ist, deuten die Ergebnisse im Zusammenhang mit den Beobachtungen dieser Arbeit darauf hin, dass, das Chromatin im Zellkern zwar global auf eine einzuleitende DNA-Reparatur vorbereitet wird und die Diffusionsrate der zur Foci-Initiierung benötigten Proteine (zB. Ku70/80) erhöht wird [78], die letztlich endgültige Chromatinauflockerung jedoch, genau wie die darauffolgende Focusbildung, TIP60 abhängig im Bestrahlungsbereich stattfindet [129]. Ebenso kann sich die, über den kompletten Beobachtungszeitraum stattfindende, Auflockerung der Peripherie des Bestrahlungsbereichs auch positiv auf eine eventuelle Homologiesuche im Falle von HR oder auch der Foci-Migration auswirken [122]. Eine Reduktion der Signalintensität durch Bleichen der Fluoreszenzfarbstoffe konnte anhand Vergleichen mit unbestrahlten Zellen ausgeschlossen werden. Es handelt sich also bei der Lockerung des Chromatins im Bestrahlungsbereich und der globalen Lockerung um unterschiedlich motivierte Prozesse. Im Bestrahlungsbereich wandelt sich die Lockerung von einer initialen Lockerung durch MOF in eine DSB-abhängige vollständige Auflockerung. Dies deckt sich mit der zu bestätigenden zweistufigen Lockerung des Chromatins, welche in dieser Arbeit beobachtet werden konnte. Dafür spricht auch, dass die Lockerung der DNA global und im Fokusbereich zuerst ohne Involvierung von H2AX stattfinden kann und eventuell durch die hydrotrope Wirkung von ATP katalysiert wird [191]. Die Rekrutierung von Reparaturproteinen im Fokusbereich beginnt. Die Reparaturstellenstruktur bei nicht-phosphoryliertem H2AX außerhalb des Reparaturbereichs kann jedoch nicht aufrecht erhalten werden, denn Reparaturproteine fallen nach Kruhlak et al. 2006 ohne  $\gamma$ H2AX wieder vom DSB ab. Die hier gewonnenen Daten regen ebenfalls zu Vermutungen an bezüglich der Frage, ob es sich bei der Chromatinumformung am DSB lediglich um eine Lockerung des

Chromatins handelt, oder ob auch eine örtliche Lichtung durch mechanische Prozesse, wie z.B. Verdrängung durch weitere Proteine, stattfindet. Auf Grund der Überhöhung der Flanken bei den Intensitätsmessungen wird ersichtlich, dass das Chromatin an den Grenzen des Bestrahlungsbereichs verdichtet wird. Dies bedeutet, dass der Zustand der Chromatin-Lichtung eventuell durch die Anlagerung von Reparaturproteinen mechanisch aktiv gehalten wird oder/und Randbereiche zur Schadensregion durch mechanische Verdichtung von falschen Rekombinationsereignissen geschützt werden [124]. Dabei muss es sich jedoch um Reparaturproteine handeln, welche innerhalb der ersten 15 s nach Bestrahlung rekrutiert werden, da teilweise bereits bei Zeitpunkt  $t=0$  eine Erhöhung der Flanken feststellbar ist. Um jedoch definitive Aussagen darüber treffen zu können, wären auch hier genauere Strukturuntersuchungen mittels nanoskopischer Bildgebungsverfahren nötig. Da bei den Experimenten dieser Arbeit sowohl Heterochromatinbereiche sowie auch weniger dichtes Chromatin und Nukleoli bestrahlt wurden, können auch Aussagen über die strukturspezifischen Reaktionen bezüglich der Chromatinumformung gemacht werden. Auffallend hierbei war, dass die Chromatinlockerung in sämtlichen Chromatinstrukturen, jedoch aber nicht in jedem Chromatindichtebereich gleich stark durchgeführt wird, sondern das Chromatin lediglich bis zu einer Grunddichte aufgelockert werden kann. Es ist jedoch anzunehmen, dass diese Grunddichte sich in verschiedenen Strukturen nicht unterscheidet und die höchste Erreichbarkeit der DNA strukturübergreifend einer Konformation entspricht. Dieser Effekt konnte augenscheinlich auch in Nukleoli beobachtet werden. Dichtebezogene Aussagen über Nukleoli sind jedoch mit Vorsicht zu betrachten, da Nukleoli als dichteste Struktur im Zellkern Farbstoffe nicht wie gewöhnliches Chromatin aufnehmen und somit ein widersprüchliches Resultat erlangt werden kann. Des Weiteren müssten Analysen mittels konfokaler Mikroskopie durchgeführt werden, da der reale Signalwert des Grundniveaus durch Fluoreszenzsignale aus nicht im Fokus liegenden Ebenen maskiert werden kann. Grundlegend erlauben die hier erhaltenen Ergebnisse die Aussagen, dass die DNA Reparatur am Ort der DSB Induktion stattfindet.

## 9.4.2 Foci Migration

Bezüglich der Mobilität der DSB im Laufe der DNA-Reparatur, fügen sich die Ergebnisse dieser Arbeit in die aktuelle Literatur ein. Ursprünglich bewiesen wurde die Fähigkeit von DSB zu subnuklearen Strukturen zu wandern von Nagai et al. 2008 [130], jedoch lediglich für Hefezellen. Weitere Studien wiesen auch bei Säugerzellen eine Wanderungscharakteristik von Chromatinstrukturen, wie beispielsweise Telomer-Enden, in Richtung Zellkernhülle auf [159]. Auch DSB von menschlichen Zellen konnten mittlerweile mit der Zellkernhülle in Verbindung gebracht werden, indem z.B. durch High Throughput Verfahren nachgewiesen wurde, dass Nup84, eine Untereinheit der Zellkernporen-Komplexe (NPC) und Msp3 [152], als Teil des Spindelapparates, Bindemotive für DSB besitzen [90, 130, 133]. Anhand der Ergebnisse ist es jedoch erstmals möglich, die Foci-Migrationsvorgänge in einen zeitlichen Kontext zu setzen und somit Rückschlüsse auf die involvierten Proteine bzw. Reparaturprozesse zu ziehen. So lassen sich die Kinetiken zur Foci-Migration in vier Phasen unterteilen. Vor Eintritt der Reparatur Phase 1, deuten die Ergebnisse auf eine Überzahl an Foci in weiterer Entfernung von der Zellkernhülle hin. Es könnte hierdurch vermutet werden, dass zu Beginn der Reparatur die Foci-Bildung zuerst im genreichen Zellkerninnern, und weniger in den genärmeren Peripherie-Bereichen, stattfindet [99, 119, 171, 174]. Dies würde im Einklang stehen mit Untersuchungen von Jakob et al. 2011, welche beobachten konnten, dass Foci im genarmen Heterochromatin vor Anlagerung des Reparaturapparates eine bis zu 20 minütige ATM unabhängige Transition vom Heterochromatin in Euchromatin erfahren [85]. Außerdem könnte damit auch erklärt werden, weshalb die erste Phase der Reparatur frühestens 13 min nach DSB-Induktion beginnt [161]. Beginnend nach der maximal 13-minütigen Chromatinumformung und Anlagerung diverser Reparaturfaktoren, lässt sich eine starke Reduktion der Foci-Zellkernhüllendistanz feststellen, welche bis 20 min nach Bestrahlung anhält. Da die Foci dieser Studie anhand der Proteine BRCA1 und Rad51 untersucht wurden, welche eine Rekrutierungszeit von mindestens 13 min besitzen [161], kann diese Reduktion also durch die zeitverzögerte Bildung der einzelnen Reparaturstellen erklärt werden, sowie durch die allmähliche Bildung von umgelagerten Reparaturstellen in der heterochromatinreichen Zellkernhülle. Dies würde auch Studien von Caridi et al. 2017 bekräftigen, welche einen Ausschluss von Rad51 aus Heterochromatin Bereichen und somit eine Reparaturverzögerung bis nach

der Heterochromatin-Euchromatin Transition dokumentieren [22]. In der zweiten Phase der Foci-Migration, welche von 20 min bis 6 h nach Bestrahlung anhält, pendeln die Werte um etwa die Hälfte des möglichen Maximalabstands und damit um die Werte der simulierten Zufallsverteilung. Nach Studien von Girst et al. 2013 über Subdiffusion von Mdc1 Foci, kann jedoch angenommen werden, dass in dieser Phase die Foci gerichtete Subdiffusion (d.h. die Fociverteilung im Diffusionsraum folgt keiner Normalverteilung) im Nanometerbereich erfahren. Da die Dauer der zweiten Phase, der Interaktionszeit zwischen Rad51, BRCA1 und 53BP1 stark ähnelt, kann angenommen werden, dass die Zelle in dieser Phase versucht sämtliche DSB mittels HR vor Ort zu reparieren [161]. Nach 6h, in Phase 3, kann eine starke Reduktion der mittleren Fociabstände beobachtet werden. Dies könnte bedeuten, dass Foci entweder zur Kernhülle abwandern oder dass die Reparatur im Zentrum des Zellkerns effizienter ist und erfolgreich reparierte Foci lösen sich dort früher auf und verschieben somit das Verhältnis in Richtung Zellkern Peripherie. Dies würde sich gut mit Studien von Nadine Schulz et al. 2017 decken [160], welche eine Reduktion von  $\gamma$ H2AX Foci nach 6 h Reparaturzeit beobachten konnten und somit die Reparaturdauer auf 6h beschränkten. Jedoch würde diese Theorie gegen den, nach 8h, in Phase 4 eintretenden Trend sprechen, dass sich das Verhältnis der Fociabstände bis zum Ende der Beobachtungszeit wieder in Richtung Zellkernzentrum verlagert. Dies deutet vielmehr auf ein gemischtes Modell für die Focimigration hin. Nach 6h beginnen schwer reparierbare Foci zur Zellkernhülle abzuwandern um dort spezifischere Reparaturmöglichkeiten zu erhalten. Die Wanderung wird möglich, da in den ersten Sekunden der Reparatur, laut den Ergebnissen dieser Arbeit, eine globale Reduktion der Chromatindichte erfolgt ist. Leicht reparierbare DSB werden repariert und lösen sich auf. Nicht-reparierbare Foci verbleiben im Zellkern verteilt. Nach 8 Stunden lösen sich vermehrt schwer reparierbare Foci im Peripheriebereich auf. Man würde nun eine Verschiebung des Abstandsverhältnisses orientiert am Wert zufallsverteilter Foci annehmen. Jedoch ist anhand der Datenlage eine Verlagerung der Fociabstände in weitere Entfernung von der Zellkernhülle zu beobachten. Dies könnte bedeuten, dass DSB im Heterochromatin längere Zeit benötigen, um eine Reparatur zu initiieren und auch die Reparaturzeit für solche Schäden verlängert ist [22, 64], die Reparatur jedoch, im Vergleich zu Schäden im Euchromatin, vermehrt zur Auflösung der Foci führt. Diese unreparierbaren Foci bleiben im Zellkern bestehen, bis die Zelle durch Komplikationen durch den Doppelstrangbruch gezwungen ist in Apoptose zu gehen.

Dies kann sich im Falle von sich selten replizierenden Zellen über Jahre erstrecken [131].



### 9.4.3 DSB Reparatur im Kontext der Chromatin Struktur

Das Gebiet der Chromatin-Organisation besteht aus einer Vielzahl unterschiedlicher Theorien. In dieser Arbeit wurde versucht mit deskriptiven Mikroskopiemethoden, weitere Puzzleteile an die vorhandenen biochemischen Erkenntnisse anzufügen um ein eindeutigeres Gesamtbild der DNA-Reparatur im Zusammenhang mit der Chromatinorganisation zu erhalten. Mit dem konzeptuellen Rahmen beginnend, stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit gut mit den Erkenntnissen von Rouquette et al. 2009 [150] überein. Die Daten bezeugen ebenfalls einen hohen Anteil (> 50%) an IC im Zellkern, definieren das Kernvolumen jedoch nicht als Entweder CT oder IC. Auf Grund der großen saumartigen Überlappung und der sehr fein verästelten Netzwerkstruktur der zwei Kompartimenten kann davon ausgegangen werden, dass die Abgrenzung der beiden nicht ohne weiteres möglich ist. Dies würde sich sehr gut mit dem CT-IC Modell von Cremer et al. 2010 [33] und dem Vorhandensein einer aktiven PR-Perichromatin Region (PR) in Chromosomenperipherie vereinen lassen [34, 51]. Daraus wäre folgendes Modell ableitbar. Die DNA in Nachbarschaft eines DSB wird dekondensiert und wickelt sich von ihren Histonen ab [58, 127]. Der dekondensierte DNA-Strang ist durch seine erhöhte Mobilität in der Lage in Peripheriebereiche des Heterochromatins zu migrieren [32, 96, 166]. Die entstandenen DNA Schleifen ragen in das angrenzende IC ein und werden dort vor Ort repariert. Die Grenzschicht wird definiert als PR [4, 51]. Die Reparatur findet also in direkter Nachbarschaft zur Induktionsstelle, an mobilen Reparaturstellen statt [120]. Für eine Lokalisation der Reparatur im Überschneidungsbereich des CTs und ICs und der Definition dieses Bereichs als PR, würde auch sprechen, dass selbst Bestrahlung durch einen exakt gerader UV Laserstrahl, nach 1h DNA Reparatur, nicht in einer geraden Foci Spur resultiert [85, 117]. Die Anlagerung markierten  $\gamma$ H2AX wird durch Heterochromatinbereiche beeinflusst und ein gewellter Track entsteht.

Den Bezugspunkt von Chromatinorganisation zu DNA-Reparatur bildet der Vergleich von 53BP1 mit Chromatin. Die beiden Strukturen scheinen sich im Zellkern gegenseitig auszuschließen und keine enzymatische Interaktion untereinander zu betreiben, was für eine mechanische Reparaturstellenerhaltung sprechen könnte und auch in der Literatur hypothetisiert wird [68, 140, 161]. Obwohl 53BP1 mehrheitlich nicht mit dem Chromatin überlappt und lediglich eng anliegt, wird durch die Überschneidungsanalyse sichtbar, dass über ein Drittel der Fläche von 53BP1 mit Bereichen des Chromatins

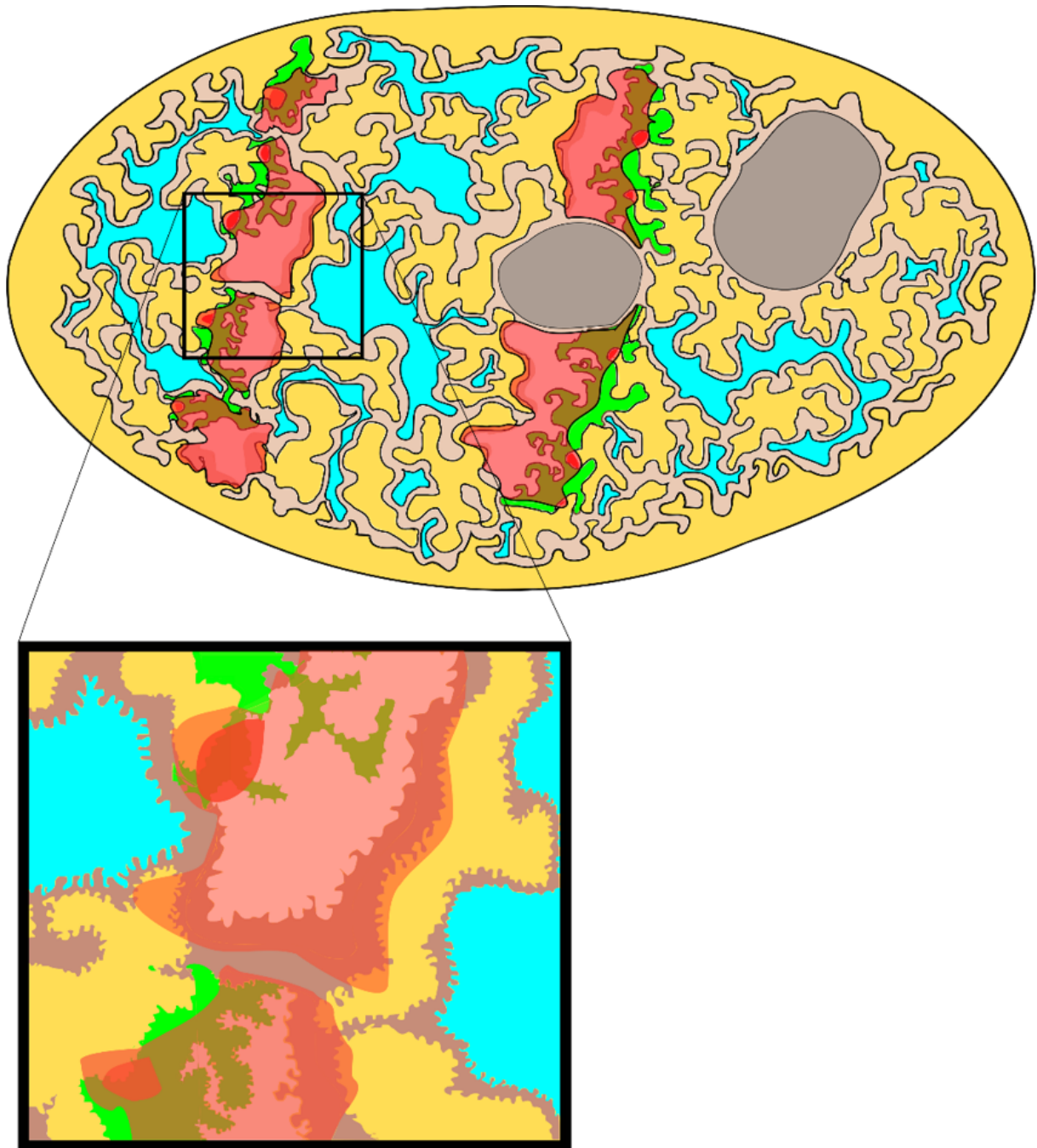
überlagert. Da die Überschneidung ausschließlich aus sehr punktuellen, astartigen Einwüchsen des Chromatins in den Reparaturbereich besteht, kann in diesen Ästen eine genauere Lokalisation der Schadensstelle vermutet werden. Um die ssDNA vor Endenschrückschnitt durch CtIP zu schützen und Rif1 zu kontrollieren, würde jedoch nicht die große Menge an 53BP1 um die komplette Reparaturstelle notwendig sein [193, 199]. Der verhältnismäßig große Focusbereich, welcher die Astenden umgibt, dient folglich 53BP1 auch zum Schutz der Reparaturstelle und verdrängt mögliche, schadhafte Rekombinationspartner des DSB.

Auch die Untersuchungen zum Überschneidungsbereich von 53BP1 und des ICs sprechen für eine mögliche Funktion als Türsteher der Schadensregion. 53BP1 und das IC schließen sich komplett gegenseitig aus und besitzen keine Überschneidungsbereiche. Obwohl vermutet werden könnte, dass der Reparaturproteintransit in den Reparaturstellenbereich von 53BP1 über das von NPC bis zu allen Bereichen des Chromatins reichenden Netzwerk des ICs abläuft [4], bestehen keine Berührungspunkte zwischen den zwei Strukturen. In der Literatur ist bekannt, dass einige Proteine der PTM zwar direkt an der Reparatur beteiligt sind, jedoch keine Splicing-Faktoren mit der Schadensstelle interagieren dürfen und Transkription unterbunden sein muss [11, 162]. Der Mechanismus hinter dieser Sortierung ist bisher komplett unbeleuchtet. In Kombination mit der zwischengelagerten Pufferzone lässt sich jedoch schlussfolgern, dass 53BP1 dafür sorgt, reparaturfremde Proteine von der Reparaturstelle fern zu halten. Die Breite der Pufferzone deutet allerdings darauf hin, dass 53BP1 diese Aufgabe nicht alleine verrichtet. 53BP1 liegt also dicht am Chromatin des geschädigten CTs an, nimmt die Schadensstelle in sich auf und schützt somit das komplette sich in Reparatur befindliche, PR. Für zukünftige Experimente wäre es jedoch interessant zu wissen, welches Protein eine größere Focusfläche besitzt als 53BP1, nicht Chromatin-assoziiert ist und in Frage kommt, zwischen 53BP1 und dem PTM Apparat zu stehen.

Die großen Überschneidungsbereiche zwischen Chromatin und Rad51 ergeben eine weitere Erhöhung der Lokalisationsgenauigkeit der Schadensstelle. Da Rad51 zur Homologiesuche den DSB direkt flankiert [9, 65, 141], kann anhand der Ergebnisse angenommen werden, dass die Reparatur sich in der Grenzregion von dichtem Chromatin und weniger dichtem Chromatin ansiedelt [111], wobei der Großteil der Reparatur, wie auch anhand der Untersuchungen zur Chromatinauflockerung feststellbar war, in aufgelockertem Chromatin stattfindet. Diese Randständigkeit wird

auch gestützt von Untersuchungen von Albiez et al. 2006, welche jedoch vermuteten, dass der nicht auf dichtem Chromatin angelagerte Teil des Focus lediglich dem Rad51-Nachschub zugeordnet werden kann [4]. In die bisherigen Erkenntnisse eingegliedert, sitzt das Zentrum der Reparaturstelle also randständig auf dichten Chromatinbereichen und ragt, auf DNA-Schleifen sitzend, in den von 53BP1 geschützten Bereich hinein. Eine Bestätigung, dass die Reparatur in re-modellierten Chromatinbereichen stattfindet, bietet auch die Untersuchung der Überlagerung von Rad51 und  $\gamma$ H2AX, da  $\gamma$ H2AX für die, zur Auflockerung führenden, Signalkaskade zuständig ist [127] und laut Untersuchungen von Lafon-Hughes et al. 2013 [100],  $\gamma$ H2AX vornehmlich in Bereichen geringer Chromatindichte lokalisiert ist. Die Daten suggerieren, dass  $\gamma$ H2AX sich ebenfalls mehrheitlich randständig an Chromatinlichtungen lokalisiert und somit die Grenzregion zwischen dichtem Chromatin und gelockertem Chromatin bildet. Da gelockertes Chromatin gegen unerwünschte Interaktionen mit Proteinen aus der Umgebung geschützt werden muss, wäre der Schutz durch 53BP1 auch für  $\gamma$ H2AX plausibel. Zu den Daten fügt sich die Überlagerung von Rad51 und  $\gamma$ H2AX mit ungefähr einem Drittel von Rad51 im  $\gamma$ H2AX Bereich und dem verbleibenden Teil im dichteren Chromatin sowie Bereichen, die in dieser Arbeit nicht weiter definiert wurden. Den letzten und genauesten Hinweis darauf, dass sich der DSB auf  $\gamma$ H2AX modulierten Chromatinästen innerhalb des PRs im Einflussbereich von 53BP1 befindet, ist der Vergleich der Rad51-Foci mit den Überschneidungsregionen zwischen Chromatin und 53BP1. Ihre ähnliche Größe festigt noch einmal die genaue Lokalisation des DSB im Kontext der Chromatinstruktur. Die erhaltenen Ergebnisse wurden im Laufe dieser Arbeit genutzt um ein detailliertes Modell der Chromatinorganisation im Zellkern aufzustellen. Die daraus resultierenden Erkenntnisse sind in Abbildung 68 dargestellt. Hierbei ist klar zu erkennen, wie eine Reparaturproteinakkumulation entlang eines strahlungsinduzierten DNA Schadenstracks aufgebaut ist. Grundsätzlich ist der netzwerkartige Aufbau des Heterochromatins die Grundlage dieses Arrangements. In diesem Geflecht entstehen nach Bestrahlung Lichtungen, welche der Größe des 53BP1 Focus entsprechen. Der Wirkungsbereich von 53BP1 überdeckt jedoch auch randständig Bereiche des Heterochromatins und bildet somit den strukturellen Rahmen der Reparaturstelle. Die Schnittmenge der durch  $\gamma$ H2AX aktivierten Schadensregionen und 53BP1, bildet die mögliche Lokalisierung der Schadensstelle wobei die genaue Bestimmung des DNA Schadens, durch die in 53BP1 und  $\gamma$ H2AX ragenden Äste des Heterochromatins

definiert wird. Das Resultat ist die genaue Lokalisation des DNA Schadens in Form von Rad51 Foci. (Siehe Abbildung 68).










- |   |                 |   |                            |
|---|-----------------|---|----------------------------|
|  | 53BP1           |  | Rad51                      |
|  | Heterochromatin |  | Euchromatin /Perichromatin |
|  | Interchromatin  |  | Nukleoli                   |
|  | $\gamma$ H2AX   |   |                            |

Abbildung 68: Aus den Ergebnissen dieser Arbeit resultierendes Modell der Chromatinorganisation im Bezug auf die Lokalisation des DNA Reparaturapparates im Falle eines DSB Tracks nach Schrägbestrahlung eines HeLa Zellkerns.

## 10 Ausblick

Für die Strahlenbiologie ist eine möglichst genaue Lokalisation des DSB und der Reparaturmaschinerie nach hoch-LET Bestrahlung unerlässlich. Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen einen großen Teil dazu bei, die Mechanismen der zellulären Strahlenantwort zu verstehen. Um zukünftigen Experimenten eine genaue Lokalisation der DSB zu ermöglichen und damit hoch-LET induzierte DSB Cluster in einzelnen DSB aufzulösen, konnten erfolgreich In-Situ Ligationsverfahren mit In-Situ DNA-Blunting Verfahren kombiniert, etabliert und mit der Entwicklung von DNA-Oligo Sonden begonnen werden. Die Ergebnisse dieser grundlegenden Arbeit versprechen die direkte Markierung von DSB und eine erste Reduktion der Lokalisationsungenauigkeit der strahleninduzierten DSB. Somit wäre es möglich, in zukünftigen Experimenten, auch aus hoch-LET strahlungsinduzierten Foci eine verlässliche Dosimetrie zu erhalten. Angewandt in medizinischen Therapiemethoden könnte die erhöhte Genauigkeit dieser Methode unter Anderem helfen, spezifischere und schonendere Strahlentherapieanwendungen zu entwickeln. Um die Methodik der DNA-Oligo-Sonden basierten Markierung von DNA-Schäden weiter zu optimieren und eine schnelle und verlässliche Abdeckung aller möglichen Bindestellen einer Schadensregion zu gewährleisten, ist im nächsten Schritt die Erprobung verschiedener Kopplungsmechanismen zwischen Farbstoff und Oligonukleotid essentiell. Die Abhebung des gewünschten Signals zur Hintergrundfluoreszenz bildet ein kritisches Nadelöhr, denn die Bindung des Fluorophors an unspezifische Bindestellen macht eine genau Trennung der Strukturen unmöglich. Aus diesem Grund bieten hochspezifische Kopplungsmechanismen die Möglichkeit in Zukunft völlig neue Level an Detektionsgenauigkeit zu liefern.

Doch auch die Lokalisation der an der Reparatur beteiligten Proteine ermöglicht detailliertere Forschung im Bereich der Medizin und des Strahlenschutzes. Durch die Untersuchung der Chromatinbeweglichkeit konnte in dieser Arbeit bewiesen werden, dass DSB-Reparatur zu Beginn ein lokal begrenzter Mechanismus ist und die Zelle eine örtliche Reparatur, mittels HR oder NHEJ, stets bevorzugt. Jedoch konnte ebenso gezeigt werden, dass ein solcher Schaden auch globale Auswirkungen in Form der Lockerung des Chromatins im gesamten Zellkern hat. Die globale Lockerung des Chromatins fördert die Chromatinmobilität und ermöglicht es schwer reparierbaren DSB nach missglückter Reparatur vor Ort, zu spezialisierten Reparaturzentren in über

7  $\mu\text{m}$  Entfernung zu migrieren. In der Zellkernhülle ist es Zellen daraufhin möglich die Foci aufzulösen oder eventuell Notsignale in das Zytoplasma zu senden.

Ein nächster Schritt um auf diese Erkenntnisse aufzubauen, wäre die Migration der Foci mit der Progression des Zellzyklus in Verbindung zu bringen. Die ausgebliebene Focimigration mancher, bestrahlter Zellen in dieser Arbeit, könnte ein Indiz dafür sein, dass Zellen in bestimmten Phasen des Zellzyklus nicht in der Lage sind diese drastischen Schritte zur Reparatur von DSB durchzuführen. Es könnte auch möglich sein, dass sich diese Zellen in Zellzyklusphasen mit gesteigerter Reparaturreffizienz befinden und keine Migration benötigen.

Der Ort und die Zeit der Reparatur spielen demnach eine große Rolle bezüglich der Effizienz der DNA Reparatur. Das im Laufe dieser Arbeit entstandene Modell zur DSB Reparatur im Kontext der Chromatinorganisation lokalisiert die Reparatur in der PR Region des Chromatins und verfeinert die bisherigen Erkenntnisse der strahlenbiologischen Forschung. Mit diesen weiteren Puzzleteilen, welche das Rätsel um die Organisation der DNA Reparatur und die Organisation von Schadensregionen im Chromatin, Teil um Teil der Aufklärung näher rücken, ist ebenso eine Grundlage für weitere Forschung geschaffen worden. Das wachsende Verständnis über diese Prozesse ermöglicht es, Strahlung als positives Werkzeug der modernen Medizin zu instrumentalisieren und gezielt mit steigender Effizienz epidemiologisch relevante Krankheitsbilder zu behandeln. Für zukünftige Experimente wäre es interessant, eine Verbindung zu anderen Reparaturproteinen herzustellen und das Mosaik der DNA-Reparatur in seinem vollen Umfang zu dokumentieren. Hierfür wäre der zeitliche Faktor von großem Interesse. Kann durch die Betrachtung der Reparaturstruktur zu unterschiedlichen Reparaturzeiten eine Dynamik im Zusammenspiel der Reparaturproteine und der Umgebung festgestellt werden? Eventuell könnte somit ein Zusammenhang zwischen den verschiedenen kursierenden Theorien zur DNA-Reparatur entstehen und ein unscharfes und dunkles Bild der zellulären Antwort auf DNA-Schäden beleuchtet werden.

# 11 Anhang

## Herstellerprotokoll Click-iT™ EdU Alexa Fluor™ 488 Imaging Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

- Zellen am Vortag des Experiments in gewünschter Dichte auf Deckgläsern aussähen.
- Zellkultivierung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in 2 ml Kultivierungsmedium über Nacht.
- Deckgläser in 6-Well Platten übertragen.
- 20 µM EdU Lösung mit vorgewärmten Kultivierungsmedium vorbereiten.
- 2 ml EdU Lösung pro Well hinzufügen.
- Inkubation der Zellen für 4 h im Brutschrank.
- Medium entfernen und Zellen mit PFA laut Kapitel „Zellfixierung“ fixieren.
- Zellen mehrmals in PBS waschen und laut Kapitel „Immunfluoreszenzfärbung“ permeabilisieren.
- 1X EdU Click-iT Reaktionspuffer vorbereiten indem 1 ml H<sub>2</sub>O dem Reaktionspuffer zugefügt werden.
- Click-iT Reaktionscocktail vorbereiten indem 100 µl Click-iT Reaktionspuffer, 800 µl CuSO<sub>4</sub> und 100 µl 1X Click-iT Reaktionspufferzusatz zu Alexa Fluor 488 Reaktionsgefäß zugegeben werden. (Cocktail innerhalb 15 min verbrauchen).
- Nach der fertigen Permeabilisation 0,5 ml Click-iT Reaktionspuffer pro Well zu den Zellen geben und durch Inkubationsschüttler unter Lichtausschluss für 30 min mixen.
- Reaktionscocktail nach Inkubation durch zweimaliges Waschen mit 3 % BSA in PBS waschen.
- Zellen laut Kapitel „Immunfluoreszenzfärbung“ auf Deckgläsern eindecken.



## Protokoll zur Zellpräparation

- Medium entfernen und die Probe mit 2ml PBS waschen.
- Zellen 15min bei Raumtemperatur mit 2% PFA inkubieren
- Kurz mit PBS waschen
- 3 x 5min mit 2ml PBS + 0.15% Triton waschen
- 3 x 10min mit 2ml PBS+ blocken
- Die zellbewachsenen Deckgläser mit 95 µl primärer Antikörperlösung in PBS+ versehen.
- Inkubation über Nacht bei 4°C
- 5min mit 2ml PBS waschen
- 10min mit 2ml PBS + 0.15% Triton waschen
- 5min mit 2ml PBS waschen
- 7min mit 2ml PBS+ blocken

→ ab hier unter Lichtausschluss arbeiten

- Die zellbewachsenen Deckgläser mit 95 µl sekundärer Antikörperlösung in PBS+ versehen
- 1-2 h bei Raumtemperatur inkubieren
- 2 x 5min mit 2ml PBS+0.15% Triton waschen
- 2 x schnell mit PBS waschen
- 20 x µl ProlongGold auf einen Objektträger geben und abgetropftes Deckglas mit den Zellen nach unten darauflegen (eindecken).
- Über Nacht trocknen lassen und bei 4°C lagern.

## Herstellerprotokoll SiR-DNA Live Cell Fluorogenic DNA Labelling Probe (Spirochrome AG, 8260 Stein am Rhein, Schweiz)

Vorbereitung einer 1 mM Stock Lösung.

- Inhalt des Vials mit SiR-DNA in 50  $\mu$ L wasserfreiem DMSO auflösen, um eine 1 mM Stammlösung herzustellen.
- Lösung sollte bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

Vorbereitung der Färbelösung.

- SiR-DNA bis auf die gewünschte Konzentration mit Kulturmedium verdünnen und kurz vortexen.
- Zugabe von 1-10  $\mu\text{M}$  Verapamil verbessert die Färbefizienz durch die Inhibierung von Efflux Pumpen.
- Stets frisch präparierte Färbelösung verwenden, da sich die Färbefizienz mit der Zeit verringern kann.

Zell Präparation und Färbung

- Zellen auf Glasdeckgläschen wachsen lassen.
- Sobald die Zellen die gewünschte Dichte erreicht haben, Medium mit Färbelösung ersetzen, bis alle Zellen bedeckt sind.
- Zellen bei  $37^{\circ}\text{C}$  in Brutschrank bei 5-10%  $\text{CO}_2$  Gehalt inkubieren (Färbezeit nach untenstehender Tabelle).

**Konzentration der Färbelösung      (nM) Färbezeit (h)\***

> 1000	0.5 – 1
500	2 – 4
200	4 – 6
< 100	6 – 12

## Herstellerprotokoll VIROMER® RED VIROMER® YELLOW plasmid DNA/mRNA Transfektion

### Herstellung Reaktionsgefäß 1 (pDNA/mRNA)

- pDNA/mRNA auf 11ng/µl mit mitgeliefertem Stock Solution Puffer verdünnen.

### Herstellung Reaktionsgefäß 2 ( 45 µl Transfektionsreagenz)

- 0.2-µl Tropfen Viromer® an die Wand des Gefäßes pipettieren
- Sofort 4.8µl Puffer zugeben und 4-8 Sekunden vortexen.(Immer den Puffer zu Viromer® geben, nicht andersherum!

### Zusammenführung » Gefäß 1 →Gefäß 2

- 45µl der pDNA/mRNA Lösung von Gefäß 1 zu den 5µl Viromer® solution in Gefäß 2 geben.
- Schnell mischen und für 15 min bei Zimmertemperatur inkubieren.

### 100 ng des Transfektionsansatzes auf ca. 15000 adhärenente Zellen geben

- Zellen wie üblich kultivieren. Mediumwechsel ist nicht nötig.
- Transfektionseffizienz alle 24-72 h prüfen.

## 12 Quellen

- [1] 2002. (*NAS Colloquium*) *Links Between Recombination and Replication*. National Academies Press, Washington, D.C.
- [2] W. F. A. Hauptner. 2006. Spatial distribution of DNA double-strand breaks from ion tracks. Vol. 52 of *Matematisk-fysiske Meddelelser. in Ion Beam Science: Solved and Unsolved Problems*.
- [3] Melissa M. Adams and Phillip B. Carpenter. 2006. Tying the loose ends together in DNA double strand break repair with 53BP1. *Cell division* 1, 19. DOI: <https://doi.org/10.1186/1747-1028-1-19>.
- [4] Heiner Albiez, Marion Cremer, Cinzia Tiberi, Lorella Vecchio, Lothar Schermelleh, Sandra Dittrich, Katrin Küpper, Boris Joffe, Tobias Thormeyer, Johann von Hase, Siwei Yang, Karl Rohr, Heinrich Leonhardt, Irina Solovei, Christoph Cremer, Stanislav Fakan, and Thomas Cremer. 2006. Chromatin domains and the interchromatin compartment form structurally defined and functionally interacting nuclear networks. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 14, 7, 707–733. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10577-006-1086-x>.
- [5] Andreas Hauptner. 2006. *Mikroskopisch genaue Zellbestrahlung mit hochenergetischen Ionen*. Technische Universität München.
- [6] A. Ashworth. 2001. BRCA1/BRCA2. In *Encyclopedia of Genetics*. Elsevier, 239–241. DOI: <https://doi.org/10.1006/rwgn.2001.1552>.
- [7] W. Assmann, J. de Boer, U. Meyer-Berkhout, S. Skorka, E. Huenges, P. Kienle, H. Morinaga, E. Nolte, H. Vonach, H. Münzer, L. Rohrer, and H. Schnitter. 1974. The Munich MP tandem. *Nuclear Instruments and Methods* 122, 191–203. DOI: [https://doi.org/10.1016/0029-554X\(74\)90482-0](https://doi.org/10.1016/0029-554X(74)90482-0).
- [8] O. T. Avery, C. M. MacLeod, and M. McCarty. 1979. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Inductions of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *The Journal of experimental medicine* 149, 2, 297–326. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.149.2.297>.
- [9] Adi Barzel and Martin Kupiec. 2008. Finding a match: how do homologous sequences get together for recombination? *Nature reviews. Genetics* 9, 1, 27–37. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg2224>.
- [10] Peter Baumann and Stephen C. West. 1998. Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. *Trends in Biochemical Sciences* 23, 7, 247–251. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(98\)01232-8](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(98)01232-8).

- [11] Petra Beli, Natalia Lukashchuk, Sebastian A. Wagner, Brian T. Weinert, Jesper V. Olsen, Linda Baskcomb, Matthias Mann, Stephen P. Jackson, and Chunaram Choudhary. 2012. Proteomic investigations reveal a role for RNA processing factor THRAP3 in the DNA damage response. *Molecular cell* 46, 2, 212–225. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.01.026>.
- [12] Nicole Bennardo, Anita Cheng, Nick Huang, and Jeremy M. Stark. 2008. Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS genetics* 4, 6, e1000110. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000110>.
- [13] F. E. Benson, P. Baumann, and S. C. West. 1998. Synergistic actions of Rad51 and Rad52 in recombination and DNA repair. *Nature* 391, 6665, 401–404. DOI: <https://doi.org/10.1038/34937>.
- [14] Jörg Bewersdorf, Brian T. Bennett, and Kendall L. Knight. 2006. H2AX chromatin structures and their response to DNA damage revealed by 4Pi microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 48, 18137–18142. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0608709103>.
- [15] H. Blom and H. Brismar. 2014. STED microscopy: increased resolution for medical research? *Journal of internal medicine* 276, 6, 560–578. DOI: <https://doi.org/10.1111/joim.12278>.
- [16] Andreas Bolzer, Gregor Kreth, Irina Solovei, Daniela Koehler, Kaan Saracoglu, Christine Fauth, Stefan Müller, Roland Eils, Christoph Cremer, Michael R. Speicher, and Thomas Cremer. 2005. Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS biology* 3, 5, e157. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030157>.
- [17] A. Bosch and P. Suau. 1995. Changes in core histone variant composition in differentiating neurons: the roles of differential turnover and synthesis rates. *European journal of cell biology* 68, 3, 220–225.
- [18] Rémi Buisson, Anne-Marie Dion-Côté, Yan Coulombe, Hélène Launay, Hong Cai, Alicja Z. Stasiak, Andrzej Stasiak, Bing Xia, and Jean-Yves Masson. 2010. Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. *Nature structural & molecular biology* 17, 10, 1247–1254. DOI: <https://doi.org/10.1038/nsmb.1915>.
- [19] Sandeep Burma, Benjamin P. C. Chen, and David J. Chen. 2006. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA repair* 5, 9-10, 1042–1048. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.05.026>.
- [20] C. Greubel. 2013. Einfluss der zeitlichen und räumlichen Fokussierung auf die strahlenbiologische Wirksamkeit von Protonen. Doktorarbeit.
- [21] Wendy J. Cannan and David S. Pederson. 2016. Mechanisms and Consequences of Double-strand DNA Break Formation in Chromatin. *Journal of cellular physiology* 231, 1, 3–14. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.25048>.

- [22] P. C. Caridi, Laetitia Delabaere, Grzegorz Zapotoczny, and Irene Chiolo. 2017. And yet, it moves: nuclear and chromatin dynamics of a heterochromatic double-strand break. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 372, 1731. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0291>.
- [23] Pierre Caron, Jonathan Choudjaye, Thomas Clouaire, Béatrix Bugler, Virginie Daburon, Marion Aguirrebengoa, Thomas Mangeat, Jason S. Iacovoni, Alejandro Álvarez-Quilón, Felipe Cortés-Ledesma, and Gaëlle Legube. 2015. Non-redundant Functions of ATM and DNA-PKcs in Response to DNA Double-Strand Breaks. *Cell Reports* 13, 8, 1598–1609. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.024>.
- [24] Raphael Ceccaldi, Beatrice Rondinelli, and Alan D. D'Andrea. 2016. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends in cell biology* 26, 1, 52–64. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.009>.
- [25] Howard Cedar and Yehudit Bergman. 2009. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature reviews. Genetics* 10, 5, 295–304. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg2540>.
- [26] Howard H. Y. Chang, Nicholas R. Pannunzio, Noritaka Adachi, and Michael R. Lieber. 2017. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature reviews. Molecular cell biology* 18, 8, 495–506. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.48>.
- [27] Pauline Chanut, Sébastien Britton, Julia Coates, Stephen P. Jackson, and Patrick Calsou. 2016. Coordinated nuclease activities counteract Ku at single-ended DNA double-strand breaks. *Nature communications* 7, 12889. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms12889>.
- [28] J. R. Chapman, Martin R. G. Taylor, and Simon J. Boulton. 2012. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Molecular cell* 47, 4, 497–510. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.029>.
- [29] Irene Chiolo, Aki Minoda, Serafin U. Colmenares, Aris Polyzos, Sylvain V. Costes, and Gary H. Karpen. 2011. Double-strand breaks in heterochromatin move outside of a dynamic HP1a domain to complete recombinational repair. *Cell* 144, 5, 732–744. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.012>.
- [30] Cooper, Ray, Sreeurpa. 2014. The Cell: A Molecular Approach. The eucaryotic cell cycle. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 87, 4, 603–604.
- [31] Isabelle Cousineau, Christine Abaji, and Abdellah Belmaaza. 2005. BRCA1 regulates RAD51 function in response to DNA damage and suppresses spontaneous sister chromatid replication slippage: implications for sister chromatid cohesion, genome stability, and carcinogenesis. *Cancer research* 65, 24, 11384–11391. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2156>.
- [32] Ian G. Cowell, Nicola J. Sunter, Prim B. Singh, Caroline A. Austin, Barbara W. Durkacz, and Michael J. Tilby. 2007. gammaH2AX foci form preferentially in

- euchromatin after ionising-radiation. *PloS one* 2, 10, e1057. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001057>.
- [33] Thomas Cremer and Marion Cremer. 2010. Chromosome territories. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, 3, a003889. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003889>.
- [34] Thomas Cremer, Katrin Küpper, Steffen Dietzel, and Stanislav Fakan. 2004. Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: on the way from structure to function. *Biology of the cell* 96, 8, 555–567. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biolcel.2004.07.002>.
- [35] Gerd Datzmann, Günther Dollinger, Christian Goeden, Andreas Hauptner, Hans-Joachim Körner, Patrick Reichart, and Oliver Schmelmer. 2001. The Munich microprobe SNAKE: First results using 20 MeV protons and 90 MeV sulfur ions. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 181, 1-4, 20–26. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-583X\(01\)00549-3](https://doi.org/10.1016/S0168-583X(01)00549-3).
- [36] P. Davidovits and M. D. Egger. 1969. Scanning laser microscope. *Nature* 223, 5208, 831. DOI: <https://doi.org/10.1038/223831a0>.
- [37] Anthony J. Davis and David J. Chen. 2013. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Translational cancer research* 2, 3, 130–143. DOI: <https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-676X.2013.04.02>.
- [38] Wolfgang Demtröder. 2010. *Experimentalphysik* (4., überarb. Aufl.). Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin, Heidelberg.
- [39] Chu-Xia Deng. 2006. BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic acids research* 34, 5, 1416–1426. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkl010>.
- [40] Javier M. Di Noia. 2015. Molecular biology: Unequal opportunity during class switching. *Nature* 525, 7567, 44–45. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature15209>.
- [41] Vincent Dion and Susan M. Gasser. 2013. Chromatin movement in the maintenance of genome stability. *Cell* 152, 6, 1355–1364. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.010>.
- [42] J. G. Donaldson. 2001. Immunofluorescence staining. *Current protocols in cell biology* Chapter 4, Unit 4.3. DOI: <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0403s00>.
- [43] Xianjun Dong and Zhiping Weng. 2013. The correlation between histone modifications and gene expression. *Epigenomics* 5, 2, 113–116. DOI: <https://doi.org/10.2217/epi.13.13>.
- [44] Jessica A. Downs and Stephen P. Jackson. 2004. A means to a DNA end: the many roles of Ku. *Nature reviews. Molecular cell biology* 5, 5, 367–378. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrm1367>.

- [45] Marcus Dyba and Stefan W. Hell. 2003. Photostability of a fluorescent marker under pulsed excited-state depletion through stimulated emission. *Applied optics* 42, 25, 5123–5129. DOI: <https://doi.org/10.1364/AO.42.005123>.
- [46] Edward H. Egelman and Yale E. Goldman, Eds. 2012. *Comprehensive biophysics*. Elsevier, Amsterdam.
- [47] Issam El Naqa, Ed. 2018. *A guide to outcome modeling in radiotherapy and oncology. Listening to the data*. Series in medical physics and biomedical engineering. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL.
- [48] Cristina Escribano-Díaz and Daniel Durocher. 2013. DNA repair pathway choice--a PTIP of the hat to 53BP1. *EMBO reports* 14, 8, 665–666. DOI: <https://doi.org/10.1038/embor.2013.99>.
- [49] Cristina Escribano-Díaz, Alexandre Orthwein, Amélie Fradet-Turcotte, Mengtan Xing, Jordan T. F. Young, Ján Tkáč, Michael A. Cook, Adam P. Rosebrock, Meagan Munro, Marella D. Canny, Dongyi Xu, and Daniel Durocher. 2013. A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. *Molecular cell* 49, 5, 872–883. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.001>.
- [50] Andreas Ettinger and Torsten Wittmann. 2014. Fluorescence live cell imaging. *Methods in cell biology* 123, 77–94. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420138-5.00005-7>.
- [51] Stanislav Fakan. 2004. The functional architecture of the nucleus as analysed by ultrastructural cytochemistry. *Histochemistry and cell biology* 122, 2, 83–93. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0681-1>.
- [52] Stanislav Fakan and Roel van Driel. 2007. The perichromatin region: a functional compartment in the nucleus that determines large-scale chromatin folding. *Seminars in cell & developmental biology* 18, 5, 676–681. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.08.010>.
- [53] Victoria L. Fell and Caroline Schild-Poulter. 2012. Ku regulates signaling to DNA damage response pathways through the Ku70 von Willebrand A domain. *Molecular and cellular biology* 32, 1, 76–87. DOI: <https://doi.org/10.1128/MCB.05661-11>.
- [54] Lin Feng, Ka-Wing Fong, Jiadong Wang, Wenqi Wang, and Junjie Chen. 2013. RIF1 counteracts BRCA1-mediated end resection during DNA repair. *The Journal of biological chemistry* 288, 16, 11135–11143. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.457440>.
- [55] Oliver Fleck and Olaf Nielsen. 2004. DNA repair. *Journal of cell science* 117, Pt 4, 515–517. DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.00952>.
- [56] Peter Fraser and Wendy Bickmore. 2007. Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature* 447, 7143, 413–417. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature05916>.



- [57] Bernard Friedenson. 2007. The BRCA1/2 pathway prevents hematologic cancers in addition to breast and ovarian cancers. *BMC cancer* 7, 152. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-7-152>.
- [58] Anna A. Friedl, Belinda Mazurek, and Doris M. Seiler. 2012. Radiation-induced alterations in histone modification patterns and their potential impact on short-term radiation effects. *Frontiers in oncology* 2, 117. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00117>.
- [59] G. B. Airy. 1835. *On the diffraction of an object-glass with circular aperture. On the diffraction of an object-glass with circular aperture.*
- [60] G. Datzmann. 2002. Aufbau und Charakterisierung des Hochenergie Rasterionenmikroskops SNAKE. Doktorarbeit.
- [61] G. Dollinger. 1990. Kohlenstoolien als Stripper für schwere Ionen. Doktorarbeit.
- [62] T. W. J. Gadella and Jens Rietdorf. 2005. *Microscopy techniques. Advances in biochemical engineering/biotechnology*, v. 95. Springer, Heidelberg, New York.
- [63] Alessandro Galbiati, Christian Beauséjour, and Fabrizio Di d'Adda Fagagna. 2017. A novel single-cell method provides direct evidence of persistent DNA damage in senescent cells and aged mammalian tissues. *Aging cell* 16, 2, 422–427. DOI: <https://doi.org/10.1111/accel.12573>.
- [64] Aaron A. Goodarzi, Angela T. Noon, Dorothee Deckbar, Yael Ziv, Yosef Shiloh, Markus Löbrich, and Penny A. Jeggo. 2008. ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Molecular cell* 31, 2, 167–177. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.017>.
- [65] Eric C. Greene. 2016. DNA Sequence Alignment during Homologous Recombination. *The Journal of biological chemistry* 291, 22, 11572–11580. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.724807>.
- [66] Josée Guirouilh-Barbat, Sarah Lambert, Pascale Bertrand, and Bernard S. Lopez. 2014. Is homologous recombination really an error-free process? *Frontiers in genetics* 5, 175. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00175>.
- [67] Mehmet Gunduz, Ed. 2015. *A concise molecular pathology of breast cancer.* InTech, Rijeka, Croatia.
- [68] Xiang Guo, Yongtai Bai, Meimei Zhao, Mei Zhou, Qinjian Shen, Cai-Hong Yun, Hongquan Zhang, Wei-Guo Zhu, and Jiadong Wang. 2018. Acetylation of 53BP1 dictates the DNA double strand break repair pathway. *Nucleic acids research* 46, 2, 689–703. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1208>.
- [69] Arun Gupta, Clayton R. Hunt, Sharmistha Chakraborty, Raj K. Pandita, John Yordy, Deepti B. Ramnarain, Nobuo Horikoshi, and Tej K. Pandita. 2014. Role of 53BP1 in the regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Radiation research* 181, 1, 1–8. DOI: <https://doi.org/10.1667/RR13572.1>.

- [70] Ramesh C. Gupta. 2015. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents* (2nd ed.). Elsevier Science & Technology; ProQuest, Saint Louis, Ann Arbor, Michigan.
- [71] Volker Hable, Guido A. Drexler, Tino Brüning, Christian Burgdorf, Christoph Greubel, Anja Derer, Judith Seel, Hilmar Strickfaden, Thomas Cremer, Anna A. Friedl, and Günther Dollinger. 2012. Recruitment kinetics of DNA repair proteins Mdc1 and Rad52 but not 53BP1 depend on damage complexity. *PloS one* 7, 7, e41943. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041943>.
- [72] Eric J. Hall and Amato J. Giaccia. 2012. *Radiobiology for the radiologist* (7th ed.). Wolters KluwerLippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- [73] S. W. Hell and J. Wichmann. 1994. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics letters* 19, 11, 780–782. DOI: <https://doi.org/10.1364/OL.19.000780>.
- [74] Stefan W. Hell. 2003. Toward fluorescence nanoscopy. *Nature biotechnology* 21, 11, 1347–1355. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt895>.
- [75] Stefan W. Hell, Marcus Dyba, and Stefan Jakobs. 2004. Concepts for nanoscale resolution in fluorescence microscopy. *Current opinion in neurobiology* 14, 5, 599–609. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.conb.2004.08.015>.
- [76] Bram Henneman, Clara van Emmerik, Hugo van Ingen, and Remus T. Dame. 2018. Structure and function of archaeal histones. *PLoS genetics* 14, 9, e1007582. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007582>.
- [77] Joonyoung Her, Chandni Ray, Jake Altshuler, Haiyan Zheng, and Samuel F. Bunting. 2018. 53BP1 Mediates ATR-Chk1 Signaling and Protects Replication Forks under Conditions of Replication Stress. *Molecular and cellular biology* 38, 8. DOI: <https://doi.org/10.1128/MCB.00472-17>.
- [78] Elizabeth Hinde, Xiangduo Kong, Kyoko Yokomori, and Enrico Gratton. 2014. Chromatin dynamics during DNA repair revealed by pair correlation analysis of molecular flow in the nucleus. *Biophysical journal* 107, 1, 55–65. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.05.027>.
- [79] Samuel Hong and Xiaodong Cheng. 2016. DNA Base Flipping: A General Mechanism for Writing, Reading, and Erasing DNA Modifications. *Advances in experimental medicine and biology* 945, 321–341. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-43624-1\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-43624-1_14).
- [80] Michael S. Y. Huen, Jun Huang, Justin W. C. Leung, Shirley M.-H. Sy, Ka M. Leung, Yick-Pang Ching, Sai W. Tsao, and Junjie Chen. 2010. Regulation of chromatin architecture by the PWWP domain-containing DNA damage-responsive factor EXPAND1/MUM1. *Molecular cell* 37, 6, 854–864. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.040>.
- [81] Pablo Huertas and Stephen P. Jackson. 2009. Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair. *The Journal of biological chemistry* 284, 14, 9558–9565. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M808906200>.

- [82] Human Genome Project. 2019. *Homo sapiens Genome Search* [https://grch37.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Info/Index](https://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index). Retrieved from.
- [83] Ryosuke Imai, Tadasu Nozaki, Tomomi Tani, Kazunari Kaizu, Kayo Hibino, Satoru Ide, Sachiko Tamura, Koichi Takahashi, Michael Shribak, and Kazuhiro Maeshima. 2017. Density imaging of heterochromatin in live cells using orientation-independent-DIC microscopy. *Molecular biology of the cell* 28, 23, 3349–3359. DOI: <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-06-0359>.
- [84] Mayu Isono, Atsuko Niimi, Takahiro Oike, Yoshihiko Hagiwara, Hiro Sato, Ryota Sekine, Yukari Yoshida, Shin-Ya Isobe, Chikashi Obuse, Ryotaro Nishi, Elena Petricci, Shinichiro Nakada, Takashi Nakano, and Atsushi Shibata. 2017. BRCA1 Directs the Repair Pathway to Homologous Recombination by Promoting 53BP1 Dephosphorylation. *Cell Reports* 18, 2, 520–532. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.042>.
- [85] Burkhard Jakob, Jörn Splinter, Sandro Conrad, Kay-Obbe Voss, Daniele Zink, Marco Durante, Markus Löbrich, and Gisela Taucher-Scholz. 2011. DNA double-strand breaks in heterochromatin elicit fast repair protein recruitment, histone H2AX phosphorylation and relocation to euchromatin. *Nucleic acids research* 39, 15, 6489–6499. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkr230>.
- [86] Charles Janeway. 2001. *Immunobiology. The immune system in health and disease* (5th ed.). Garland, New York.
- [87] Aniek Janssen, Serafin U. Colmenares, Timothy Lee, and Gary H. Karpen. 2018. *Timely double-strand break repair and pathway choice in pericentromeric heterochromatin depend on the histone demethylase dKDM4A*, 24.
- [88] Judith Reindl. 2017. *Nanoskopische Analyse von DNA Doppelstrangbrüchen in menschlichen Krebszellen nach Ionenbestrahlung*, Universität der Bundeswehr München.
- [89] L. C. Kadyk and L. H. Hartwell. 1992. Sister Chromatids Are Preferred over Homologs as Substrates for Recombinational Repair in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Genetics* 132, 2, 387–402.
- [90] Marian Kalocsay, Natalie J. Hiller, and Stefan Jentsch. 2009. Chromosome-wide Rad51 spreading and SUMO-H2A.Z-dependent chromosome fixation in response to a persistent DNA double-strand break. *Molecular cell* 33, 3, 335–343. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.016>.
- [91] Mark R. Kelley and Melissa L. Fishel, Eds. 2016. *DNA repair in cancer therapy. Molecular targets and clinical applications* (Second edition). Academic Press is an imprint of Elsevier, London, United Kingdom.
- [92] Thomas Kirchhoff, Nicole C. Karafyllis, Dirk Evers, Brigitte Falkenburg, Myriam Gerhard, Gerald Hartung, Jürgen Hübner, Kristian Köchy, Ulrich Krohs, Thomas Potthast, Otto Schäfer, Gregor Schiemann, Magnus Schlette, Reinhard Schulz, and Frank Vogelsang, Eds. 2017. *Naturphilosophie. Ein Lehr- und Studienbuch*. utb-studi-e-book, 4769. Mohr Siebeck; UTB GmbH, Tübingen, Stuttgart.

- [93] Adam Klosin and Anthony A. Hyman. 2017. Molecular biology: A liquid reservoir for silent chromatin. *Nature* 547, 7662, 168–170. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature23089>.
- [94] William S. Klug, Michael R. Cummings, and Charlotte A. Spencer. 2007. *Genetik* (8., aktualisierte Aufl. [der engl. Ausg.]). Pearson Studium bio Biologie. Pearson Studium, München.
- [95] Hans-Joachim Körner and Wolfgang Zinth. *Physik/Optik, Quantenphänomene und Aufbau der Atome*. De Gruyter.
- [96] P. M. Krawczyk, T. Borovski, J. Stap, T. Cijssouw, R. ten Cate, J. P. Medema, R. Kanaar, N. A. P. Franken, and J. A. Aten. 2012. Chromatin mobility is increased at sites of DNA double-strand breaks. *Journal of cell science* 125, Pt 9, 2127–2133. DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.089847>.
- [97] Hanno Krieger. 2009. *Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes* (3., überarbeitete und erw. Aufl.). Vieweg Studium. Vieweg + Teubner, Wiesbaden.
- [98] Michael J. Kruhlak, Arkady Celeste, Graham Dellaire, Oscar Fernandez-Capetillo, Waltraud G. Müller, James G. McNally, David P. Bazett-Jones, and André Nussenzweig. 2006. Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *The Journal of cell biology* 172, 6, 823–834. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.200510015>.
- [99] Katrin Küpper, Alexandra Kölbl, Dorothee Biener, Sandra Dittrich, Johann von Hase, Tobias Thormeyer, Heike Fiegler, Nigel P. Carter, Michael R. Speicher, Thomas Cremer, and Marion Cremer. 2007. Radial chromatin positioning is shaped by local gene density, not by gene expression. *Chromosoma* 116, 3, 285–306. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00412-007-0098-4>.
- [100] Laura Lafon-Hughes, María V. Di Tomaso, Pablo Liddle, Andrea Toledo, Ana L. Reyes-Ábalos, and Gustavo A. Folle. 2013. Preferential localization of  $\gamma$ H2AX foci in euchromatin of retina rod cells after DNA damage induction. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 21, 8, 789–803. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10577-013-9395-3>.
- [101] Adam G. Larson, Daniel Elnatan, Madeline M. Keenen, Michael J. Trnka, Jonathan B. Johnston, Alma L. Burlingame, David A. Agard, Sy Redding, and Geeta J. Narlikar. 2017. Liquid droplet formation by HP1 $\alpha$  suggests a role for phase separation in heterochromatin. *Nature* 547, 7662, 236–240. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature22822>.
- [102] Haemi Lee, Hee-Jin Kwak, Il-taeg Cho, Seok H. Park, and Chang-Hun Lee. 2009. S1219 residue of 53BP1 is phosphorylated by ATM kinase upon DNA damage and required for proper execution of DNA damage response. *Biochemical and biophysical research communications* 378, 1, 32–36. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.10.150>.

- [103] Ji-Hoon Lee, Aaron A. Goodarzi, Penny A. Jeggo, and Tanya T. Paull. 2010. 53BP1 promotes ATM activity through direct interactions with the MRN complex. *The EMBO Journal* 29, 3, 574–585. DOI: <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.372>.
- [104] Kihoon Lee, Jae-Hoon Ji, Kihoon Yoon, Jun Che, Ja-Hwan Seol, Sang E. Lee, and Eun Y. Shim. 2019. Microhomology Selection for Microhomology Mediated End Joining in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes* 10, 4. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes10040284>.
- [105] leica-microsystems. 2019. *Spotty Images* <https://www.leica-microsystems.com/science-lab>. Retrieved from.
- [106] Andreja Leskovic, Dragana Vujic, Marija Guc-Scekic, Sandra Petrovic, Ivana Joksic, Predrag Slijepcevic, and Gordana Joksic. 2010. Fanconi anemia is characterized by delayed repair kinetics of DNA double-strand breaks. *The Tohoku journal of experimental medicine* 221, 1, 69–76. DOI: <https://doi.org/10.1620/tjem.221.69>.
- [107] Jing Li and Xingzhi Xu. 2016. DNA double-strand break repair: a tale of pathway choices. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 48, 7, 641–646. DOI: <https://doi.org/10.1093/abbs/gmw045>.
- [108] J. Lips and B. Kaina. 2001. DNA double-strand breaks trigger apoptosis in p53-deficient fibroblasts. *Carcinogenesis* 22, 4, 579–585. DOI: <https://doi.org/10.1093/carcin/22.4.579>.
- [109] Michael Lisby, Uffe H. Mortensen, and Rodney Rothstein. 2003. Colocalization of multiple DNA double-strand breaks at a single Rad52 repair centre. *Nature cell biology* 5, 6, 572–577. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncb997>.
- [110] Chao Liu, Aditi Vyas, Muzaffer A. Kassab, Anup K. Singh, and Xiaochun Yu. 2017. The role of poly ADP-ribosylation in the first wave of DNA damage response. *Nucleic acids research* 45, 14, 8129–8141. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx565>.
- [111] Chu J. Ma, Bryan Gibb, Youngho Kwon, Patrick Sung, and Eric C. Greene. 2017. Protein dynamics of human RPA and RAD51 on ssDNA during assembly and disassembly of the RAD51 filament. *Nucleic acids research* 45, 2, 749–761. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1125>.
- [112] Emilie Ma, Pauline Dupaigne, Laurent Maloisel, Raphaël Guerois, Eric Le Cam, and Eric Coïc. 2018. Rad52-Rad51 association is essential to protect Rad51 filaments against Srs2, but facultative for filament formation. *eLife* 7. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32744>.
- [113] Yunmei Ma, Ulrich Pannicke, Klaus Schwarz, and Michael R. Lieber. 2002. Hairpin Opening and Overhang Processing by an Artemis/DNA-Dependent Protein Kinase Complex in Nonhomologous End Joining and V(D)J Recombination. *Cell* 108, 6, 781–794. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00671-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00671-2).

- [114] Kiran N. Mahajan, Stephanie A. Nick McElhinny, Beverly S. Mitchell, and Dale A. Ramsden. 2002. Association of DNA polymerase mu (pol mu) with Ku and ligase IV: role for pol mu in end-joining double-strand break repair. *Molecular and cellular biology* 22, 14, 5194–5202. DOI: <https://doi.org/10.1128/mcb.22.14.5194-5202.2002>.
- [115] Pierre-Olivier Mari, Bogdan I. Florea, Stephan P. Persengiev, Nicole S. Verkaik, Hennie T. Brüggerwirth, Mauro Modesti, Giuseppina Giglia-Mari, Karel Bezstarosti, Jeroen A. A. Demmers, Theo M. Luiders, Adriaan B. Houtsmuller, and Dik C. van Gent. 2006. Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 49, 18597–18602. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0609061103>.
- [116] Mario Köhler. 2018. Nanoscopic Analysis of Chromatin Organization during DNA Double-Strand Break Repair using STED Microscopy. Masterarbeit.
- [117] Aline Marnef and Gaëlle Legube. 2017. Organizing DNA repair in the nucleus: DSBs hit the road. *Current opinion in cell biology* 46, 1–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.12.003>.
- [118] Joao Matos and Stephen C. West. 2014. Holliday junction resolution: regulation in space and time. *DNA repair* 19, 176–181. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.03.013>.
- [119] Robert Mayer, Alessandro Brero, Johann von Hase, Timm Schroeder, Thomas Cremer, and Steffen Dietzel. 2005. Common themes and cell type specific variations of higher order chromatin arrangements in the mouse. *BMC cell biology* 6, 44. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2121-6-44>.
- [120] Peter Meister, Mickaël Poidevin, Stefania Francesconi, Isabelle Tratner, Patrick Zarzov, and Giuseppe Baldacci. 2003. Nuclear factories for signalling and repairing DNA double strand breaks in living fission yeast. *Nucleic acids research* 31, 17, 5064–5073. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkg719>.
- [121] Jacqueline Mersch, Michelle A. Jackson, Minjeong Park, Denise Nebgen, Susan K. Peterson, Claire Singletary, Banu K. Arun, and Jennifer K. Litton. 2015. Cancers associated with BRCA1 and BRCA2 mutations other than breast and ovarian. *Cancer* 121, 2, 269–275. DOI: <https://doi.org/10.1002/cncr.29041>.
- [122] Judith Miné-Hattab and Rodney Rothstein. 2012. Increased chromosome mobility facilitates homology search during recombination. *Nature cell biology* 14, 5, 510–517. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncb2472>.
- [123] M. Minsky. 1988. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* 10, 4, 128–138. DOI: <https://doi.org/10.1002/sca.4950100403>.
- [124] Yekaterina A. Miroshnikova, Michele M. Nava, and Sara A. Wickström. 2017. Emerging roles of mechanical forces in chromatin regulation. *Journal of cell science* 130, 14, 2243–2250. DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.202192>.

- [125] Emil Mladenov, Peter Kalev, and Boyka Anachkova. 2009. The complexity of double-strand break ends is a factor in the repair pathway choice. *Radiation research* 171, 4, 397–404. DOI: <https://doi.org/10.1667/RR1487.1>.
- [126] Garry T. Morgan. 2018. Imaging the dynamics of transcription loops in living chromosomes. *Chromosoma* 127, 3, 361–374. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00412-018-0667-8>.
- [127] Ashby J. Morrison, Jessica Highland, Nevan J. Krogan, Ayelet Arbel-Eden, Jack F. Greenblatt, James E. Haber, and Xuetong Shen. 2004. INO80 and gamma-H2AX interaction links ATP-dependent chromatin remodeling to DNA damage repair. *Cell* 119, 6, 767–775. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.037>.
- [128] Teresa A. Motycka, Tadayoshi Bessho, Sean M. Post, Patrick Sung, and Alan E. Tomkinson. 2004. Physical and functional interaction between the XPF/ERCC1 endonuclease and hRad52. *The Journal of biological chemistry* 279, 14, 13634–13639. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M313779200>.
- [129] Rabih Murr, Joanna I. Loizou, Yun-Gui Yang, Cyrille Cuenin, Hai Li, Zhao-Qi Wang, and Zdenko Herceg. 2006. Histone acetylation by Trrap-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks. *Nature cell biology* 8, 1, 91–99. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncb1343>.
- [130] Shigeki Nagai, Karine Dubrana, Monika Tsai-Pflugfelder, Marta B. Davidson, Tania M. Roberts, Grant W. Brown, Elisa Varela, Florence Hediger, Susan M. Gasser, and Nevan J. Krogan. 2008. Functional targeting of DNA damage to a nuclear pore-associated SUMO-dependent ubiquitin ligase. *Science (New York, N. Y.)* 322, 5901, 597–602. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1162790>.
- [131] Asao Noda, Yuko Hirai, Kanya Hamasaki, Hiroshi Mitani, Nori Nakamura, and Yoshiaki Kodama. 2012. Unrepairable DNA double-strand breaks that are generated by ionising radiation determine the fate of normal human cells. *Journal of cell science* 125, Pt 22, 5280–5287. DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.101006>.
- [132] 1997. *Optik*. Springer-Lehrbuch. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- [133] Pranav Oza, Sue L. Jaspersen, Adriana Miele, Job Dekker, and Craig L. Peterson. 2009. Mechanisms that regulate localization of a DNA double-strand break to the nuclear periphery. *Genes & development* 23, 8, 912–927. DOI: <https://doi.org/10.1101/gad.1782209>.
- [134] P. A. Levene. THE STRUCTURE OF YEAST NUCLEIC ACID: IV. AMMONIA HYDROLYSIS. *J. Biol. Chem.* 1919, 40: 415-.
- [135] J. W. Paterson. 1998. BRCA1: a review of structure and putative functions. *Disease markers* 13, 4, 261–274. DOI: <https://doi.org/10.1155/1998/298530>.
- [136] James Pawley. 2006 ;. *Handbook of Biological Confocal Microscopy* (3rd ed. 2006). Springer US; Imprint Springer, New York, NY.
- [137] Monika Podhorecka, Andrzej Skladanowski, and Przemyslaw Bozko. 2010. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer

- Therapy. *Journal of nucleic acids* 2010. DOI: <https://doi.org/10.4061/2010/920161>.
- [138] Lawrence F. Povirk, Tong Zhou, Ruizhe Zhou, Morton J. Cowan, and Steven M. Yannone. 2007. Processing of 3'-phosphoglycolate-terminated DNA double strand breaks by Artemis nuclease. *The Journal of biological chemistry* 282, 6, 3547–3558. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M607745200>.
- [139] Brendan D. Price and Alan D. D'Andrea. 2013. Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks. *Cell* 152, 6, 1344–1354. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.011>.
- [140] Judith Reindl, Stefanie Girst, Dietrich W. M. Walsh, Christoph Greubel, Benjamin Schwarz, Christian Siebenwirth, Guido A. Drexler, Anna A. Friedl, and Günther Dollinger. 2017. Chromatin organization revealed by nanostructure of irradiation induced  $\gamma$ H2AX, 53BP1 and Rad51 foci. *Scientific reports* 7, 40616. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep40616>.
- [141] Jörg Renkawitz, Claudio A. Lademann, and Stefan Jentsch. 2014. Mechanisms and principles of homology search during recombination. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15, 6, 369–383. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrm3805>.
- [142] Jörg Renkawitz, Claudio A. Lademann, Marian Kalocsay, and Stefan Jentsch. 2013. Monitoring homology search during DNA double-strand break repair in vivo. *Molecular cell* 50, 2, 261–272. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.02.020>.
- [143] Angel Rivera-Calzada, Laura Spagnolo, Laurence H. Pearl, and Oscar Llorca. 2007. Structural model of full-length human Ku70-Ku80 heterodimer and its recognition of DNA and DNA-PKcs. *EMBO reports* 8, 1, 56–62. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400847>.
- [144] Gordon C. K. Roberts, Ed. 2013. *Encyclopedia of Biophysics*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-16712-6>.
- [145] E. P. Rogakou, D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova, and W. M. Bonner. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *The Journal of biological chemistry* 273, 10, 5858–5868. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5858>.
- [146] H. Roos and A. M. Kellerer. 1989. Design criteria and performance parameters of an alpha irradiation device for cell studies. *Radiation research* 34, 12, 1823–1832. DOI: <https://doi.org/10.1088/0031-9155/34/12/006>.
- [147] Sandra J. Rosenthal, Jerry C. Chang, Oleg Kovtun, James R. McBride, and Ian D. Tomlinson. 2011. Biocompatible quantum dots for biological applications. *Chemistry & biology* 18, 1, 10–24. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.11.013>.
- [148] Eli Rothenberg, Jill M. Grimme, Maria Spies, and Taekjip Ha. 2008. Human Rad52-mediated homology search and annealing occurs by continuous interactions between overlapping nucleoprotein complexes. *Proceedings of the*



*National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 51, 20274–20279. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0810317106>.

- [149] Kai Rothkamm, Ines Krüger, Larry H. Thompson, and Markus Löbrich. 2003. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Molecular and cellular biology* 23, 16, 5706–5715. DOI: <https://doi.org/10.1128/MCB.23.16.5706-5715.2003>.
- [150] Jacques Rouquette, Christel Genoud, Gerardo H. Vazquez-Nin, Bernd Kraus, Thomas Cremer, and Stanislav Fakan. 2009. Revealing the high-resolution three-dimensional network of chromatin and interchromatin space: a novel electron-microscopic approach to reconstructing nuclear architecture. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* 17, 6, 801–810. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10577-009-9070-x>.
- [151] Rohini Roy, Jarin Chun, and Simon N. Powell. 2011. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nature reviews. Cancer* 12, 1, 68–78. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrc3181>.
- [152] Taehyun Ryu, Brett Spatola, Laetitia Delabaere, Katherine Bowlin, Hannah Hopp, Ryan Kunitake, Gary H. Karpen, and Irene Chiolo. 2015. Heterochromatic breaks move to the nuclear periphery to continue recombinational repair. *Nature cell biology* 17, 11, 1401–1411. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncb3258>.
- [153] Gopal B. Saha. 2013. *Physics and Radiobiology of Nuclear Medicine* (4th ed. 2013). Springer New York; Imprint; Springer, New York, NY.
- [154] Annahita Sallmyr and Alan E. Tomkinson. 2018. Repair of DNA double-strand breaks by mammalian alternative end-joining pathways. *The Journal of biological chemistry* 293, 27, 10536–10546. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.TM117.000375>.
- [155] Huseyin Saribasak, Robert W. Maul, Zheng Cao, Rhonda L. McClure, William Yang, Daniel R. McNeill, David M. Wilson, and Patricia J. Gearhart. 2011. XRCC1 suppresses somatic hypermutation and promotes alternative nonhomologous end joining in Igh genes. *The Journal of experimental medicine* 208, 11, 2209–2216. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.20111135>.
- [156] Alessandro A. Sartori, Claudia Lukas, Julia Coates, Martin Mistrik, Shuang Fu, Jiri Bartek, Richard Baer, Jiri Lukas, and Stephen P. Jackson. 2007. Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* 450, 7169, 509–514. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature06337>.
- [157] Velibor Savic, Bu Yin, Nancy L. Maas, Andrea L. Bredemeyer, Andrea C. Carpenter, Beth A. Helmink, Katherine S. Yang-lott, Barry P. Sleckman, and Craig H. Bassing. 2009. Formation of dynamic gamma-H2AX domains along broken DNA strands is distinctly regulated by ATM and MDC1 and dependent upon H2AX densities in chromatin. *Molecular cell* 34, 3, 298–310. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.012>.

- [158] K. Sax. 1938. Chromosome Aberrations Induced by X-Rays. *Genetics* 23, 5, 494–516.
- [159] Heiko Schober, Helder Ferreira, Véronique Kalck, Lutz R. Gehlen, and Susan M. Gasser. 2009. Yeast telomerase and the SUN domain protein Mps3 anchor telomeres and repress subtelomeric recombination. *Genes & development* 23, 8, 928–938. DOI: <https://doi.org/10.1101/gad.1787509>.
- [160] Nadine Schulz, Hassan Chaachouay, Katarzyna J. Nytko, Mathias S. Weyland, Malgorzata Roos, Rudolf M. Füchslin, Franco Guscetti, Stephan Scheidegger, and Carla Rohrer Bley. 2017. Dynamic In Vivo Profiling of DNA Damage and Repair after Radiotherapy Using Canine Patients as a Model. *International journal of molecular sciences* 18, 6. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18061176>.
- [161] Benjamin Schwarz, Anna A. Friedl, Stefanie Girst, Günther Dollinger, and Judith Reindl. 2019. Nanoscopic analysis of 53BP1, BRCA1 and Rad51 reveals new insights in temporal progression of DNA-repair and pathway choice. *Mutation research* 816-818, 111675. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2019.111675>.
- [162] Niraj M. Shanbhag, Ilona U. Rafalska-Metcalf, Carlo Balane-Bolivar, Susan M. Janicki, and Roger A. Greenberg. 2010. ATM-dependent chromatin changes silence transcription in cis to DNA double-strand breaks. *Cell* 141, 6, 970–981. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.038>.
- [163] Girdhar G. Sharma, Sairei So, Arun Gupta, Rakesh Kumar, Christelle Cayrou, Nikita Avvakumov, Utpal Bhadra, Raj K. Pandita, Matthew H. Porteus, David J. Chen, Jacques Cote, and Tej K. Pandita. 2010. MOF and histone H4 acetylation at lysine 16 are critical for DNA damage response and double-strand break repair. *Molecular and cellular biology* 30, 14, 3582–3595. DOI: <https://doi.org/10.1128/MCB.01476-09>.
- [164] Atsushi Shibata, Sandro Conrad, Julie Birraux, Verena Geuting, Olivia Barton, Amani Ismail, Andreas Kakarougkas, Katheryn Meek, Gisela Taucher-Scholz, Markus Löbrich, and Penny A. Jeggo. 2011. Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *The EMBO Journal* 30, 6, 1079–1092. DOI: <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.27>.
- [165] Soya Shinkai, Tadasu Nozaki, Kazuhiro Maeshima, and Yuichi Togashi. 2016. Dynamic Nucleosome Movement Provides Structural Information of Topological Chromatin Domains in Living Human Cells. *PLoS computational biology* 12, 10, e1005136. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005136>.
- [166] Michael J. Smith and Rodney Rothstein. 2017. Poetry in motion: Increased chromosomal mobility after DNA damage. *DNA repair* 56, 102–108. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2017.06.012>.
- [167] David L. Spector and Angus I. Lamond. 2011. Nuclear speckles. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3, 2. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000646>.

- [168] Mário Špírek, Jarmila Mlcošková, Ondrej Belán, Máté Gyimesi, Gábor M. Harami, Eszter Molnár, Jiri Novacek, Mihály Kovács, and Lumir Krejci. 2018. Human RAD51 rapidly forms intrinsically dynamic nucleoprotein filaments modulated by nucleotide binding state. *Nucleic acids research* 46, 8, 3967–3980. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gky111>.
- [169] Hilmar Strickfaden, Darin McDonald, Michael J. Kruhlak, Jean-Francois Haince, John P. H. Th'ng, Michele Rouleau, Toytaka Ishibashi, Gareth N. Corry, Juan Ausio, D. A. Underhill, Guy G. Poirier, and Michael J. Hendzel. 2016. Poly(ADP-ribosylation)-dependent Transient Chromatin Decondensation and Histone Displacement following Laser Microirradiation. *The Journal of biological chemistry* 291, 4, 1789–1802. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.694992>.
- [170] Manuel Stucki and Stephen P. Jackson. 2006. gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA repair* 5, 5, 534–543. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.01.012>.
- [171] H. B. Sun, J. Shen, and H. Yokota. 2000. Size-dependent positioning of human chromosomes in interphase nuclei. *Biophysical journal* 79, 1, 184–190. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76282-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76282-5).
- [172] Patrick Sung, Lumir Krejci, Stephen van Komen, and Michael G. Sehorn. 2003. Rad51 recombinase and recombination mediators. *The Journal of biological chemistry* 278, 44, 42729–42732. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.R300027200>.
- [173] R. Tacke and J. L. Manley. 1995. The human splicing factors ASF/SF2 and SC35 possess distinct, functionally significant RNA binding specificities. *The EMBO Journal* 14, 14, 3540–3551.
- [174] Hideyuki Tanabe, Felix A. Habermann, Irina Solovei, Marion Cremer, and Thomas Cremer. 2002. Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications. *Mutation research* 504, 1-2, 37–45. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(02\)00077-5](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(02)00077-5).
- [175] Georg Toepfer. 2011. *Historisches Wörterbuch der Biologie. Geschichte und Theorie der biologischen Grundbegriffe : Band 3: Parasitismus - Zweckmäßigkeit*. Verlag J.B. Metzler, Stuttgart, Weimar.
- [176] Lan N. Truong, Yongjiang Li, Linda Z. Shi, Patty Y.-H. Hwang, Jing He, Hailong Wang, Niema Razavian, Michael W. Berns, and Xiaohua Wu. 2013. Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 19, 7720–7725. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1213431110>.
- [177] Frederick I. Tsuji. 2010. Early history, discovery, and expression of Aequorea green fluorescent protein, with a note on an unfinished experiment. *Microscopy research and technique* 73, 8, 785–796. DOI: <https://doi.org/10.1002/jemt.20821>.

- [178] Valentina Turinetto and Claudia Giachino. 2015. Multiple facets of histone variant H2AX: a DNA double-strand-break marker with several biological functions. *Nucleic acids research* 43, 5, 2489–2498. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv061#>.
- [179] Naoya Uematsu, Eric Weterings, Ken-ichi Yano, Keiko Morotomi-Yano, Burkhard Jakob, Gisela Taucher-Scholz, Pierre-Olivier Mari, Dik C. van Gent, Benjamin P. C. Chen, and David J. Chen. 2007. Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *The Journal of cell biology* 177, 2, 219–229. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.200608077>.
- [180] V. Hable. 2011. Echtzeitbeobachtung schneller Reaktionskinetiken in lebenden Zellen nach Ionenmikrobestrahlung. Doktorarbeit.
- [181] Bernard Valeur and Mário N. Berberan-Santos. 2013. *Molecular Fluorescence. Principles and Applications* (2., Auflage). Wiley-VCH, Weinheim.
- [182] R. J. van de Graaff. 1960. Tandem Electrostatic Accelerators. *Nuclear Instruments and Methods* 8, 2, 195–202. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0029-554X\(60\)80006-7](https://doi.org/10.1016/S0029-554X(60)80006-7).
- [183] Hailong Wang and Xingzhi Xu. 2017. Microhomology-mediated end joining: new players join the team. *Cell & bioscience* 7, 6. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13578-017-0136-8>.
- [184] Irene M. Ward, Kay Minn, Jan van Deursen, and Junjie Chen. 2003. p53 Binding protein 53BP1 is required for DNA damage responses and tumor suppression in mice. *Molecular and cellular biology* 23, 7, 2556–2563. DOI: <https://doi.org/10.1128/MCB.23.7.2556-2563.2003>.
- [185] P. Wardman. 2009. The importance of radiation chemistry to radiation and free radical biology (The 2008 Silvanus Thompson Memorial Lecture). *The British journal of radiology* 82, 974, 89–104. DOI: <https://doi.org/10.1259/bjr/60186130>.
- [186] J. D. WATSON and F. H. CRICK. 1953. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 4356, 737–738. DOI: <https://doi.org/10.1038/171737a0>.
- [187] Donna R. Whelan, Wei T. C. Lee, Yandong Yin, Dylan M. Ofri, Keria Bermudez-Hernandez, Sarah Keegan, David Fenyo, and Eli Rothenberg. 2018. Spatiotemporal dynamics of homologous recombination repair at single collapsed replication forks. *Nature communications* 9, 1, 3882. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06435-3>.
- [188] D. Wildanger, R. Medda, L. Kastrup, and S. W. Hell. 2009. A compact STED microscope providing 3D nanoscale resolution. *Journal of microscopy* 236, 1, 35–43. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2009.03188.x>.
- [189] Dominik Wildanger, Brian R. Patton, Heiko Schill, Luca Marseglia, J. P. Hadden, Sebastian Knauer, Andreas Schönle, John G. Rarity, Jeremy L. O'Brien, Stefan W. Hell, and Jason M. Smith. 2012. Solid immersion facilitates fluorescence microscopy with nanometer resolution and sub-ångström emitter

- localization. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* 24, 44, OP309-13. DOI: <https://doi.org/10.1002/adma.201203033>.
- [190] Jerry L. Workman and Susan M. Abmayr, Eds. 2014. *Fundamentals of Chromatin*. Springer New York, New York, NY, s.l. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8624-4>.
- [191] Roni H. G. Wright, Francois Le Dily, and Miguel Beato. 2019. ATP, Mg<sup>2+</sup>, Nuclear Phase Separation, and Genome Accessibility. *Trends in Biochemical Sciences* 44, 7, 565–574. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.03.001>.
- [192] Anyong Xie, Andrea Hartlerode, Manuel Stucki, Shobu Odate, Nadine Puget, Amy Kwok, Ganesh Nagaraju, Catherine Yan, Frederick W. Alt, Junjie Chen, Stephen P. Jackson, and Ralph Scully. 2007. Distinct roles of chromatin-associated proteins MDC1 and 53BP1 in mammalian double-strand break repair. *Molecular cell* 28, 6, 1045–1057. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.12.005>.
- [193] Yixi Xu, Shaokai Ning, Zheng Wei, Ran Xu, Xinlin Xu, Mengtan Xing, Rong Guo, and Dongyi Xu. 2017. 53BP1 and BRCA1 control pathway choice for stalled replication restart. *eLife* 6. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.30523>.
- [194] Hiroshi Yamaguchi, Yukio Uchihori, Nakahiro Yasuda, Masashi Takada, and Hisashi Kitamura. 2005. Estimation of yields of OH radicals in water irradiated by ionizing radiation. *Journal of radiation research* 46, 3, 333–341. DOI: <https://doi.org/10.1269/jrr.46.333>.
- [195] Xiaochun Yu and Junjie Chen. 2004. DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains. *Molecular and cellular biology* 24, 21, 9478–9486. DOI: <https://doi.org/10.1128/MCB.24.21.9478-9486.2004>.
- [196] Haoxing Zhang, Hailong Liu, Yali Chen, Xu Yang, Panfei Wang, Tongzheng Liu, Min Deng, Bo Qin, Cristina Correia, Seungbaek Lee, Jungjin Kim, Melanie Sparks, Asha A. Nair, Debra L. Evans, Krishna R. Kalari, Pumin Zhang, Liewei Wang, Zhongsheng You, Scott H. Kaufmann, Zhenkun Lou, and Huadong Pei. 2016. A cell cycle-dependent BRCA1-UHRF1 cascade regulates DNA double-strand break repair pathway choice. *Nature communications* 7, 10201. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms10201>.
- [197] Weixing Zhao, Justin B. Steinfeld, Fengshan Liang, Xiaoyong Chen, David G. Maranon, Chu Jian Ma, Youngho Kwon, Timsi Rao, Weibin Wang, Chen Sheng, Xuemei Song, Yanhong Deng, Judit Jimenez-Sainz, Lucy Lu, Ryan B. Jensen, Yong Xiong, Gary M. Kupfer, Claudia Wiese, Eric C. Greene, and Patrick Sung. 2017. BRCA1-BARD1 promotes RAD51-mediated homologous DNA pairing. *Nature* 550, 7676, 360–365. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature24060>.
- [198] Qinsi Zheng and Scott C. Blanchard. 2013. Single Fluorophore Photobleaching. In *Encyclopedia of Biophysics*, Gordon C. K. Roberts, Ed. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2324–2326. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-16712-6\\_482](https://doi.org/10.1007/978-3-642-16712-6_482).

[199] Michal Zimmermann, Francisca Lottersberger, Sara B. Buonomo, Agnel Sfeir, and Titia de Lange. 2013. 53BP1 regulates DSB repair using Rif1 to control 5' end resection. *Science (New York, N.Y.)* 339, 6120, 700–704. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1231573>.

## 13 Danksagung

Im Laufe der gesamten Arbeit, welche für die Durchführung dieser Dissertation bewältigt werden musste, konnte ich mich glücklich schätzen stets Menschen, Kollegen, Freunde und Familie an meiner Seite gehabt zu haben. Ihnen möchte ich hiermit danken. Mein besonderer Dank gilt hierbei Professor Günther Dollinger, welcher mir die Chance gegeben hat als Biologe Teil seines Teams an der Universität der Bundeswehr zu werden. Ebenfalls möchte ich mich für diese Möglichkeit und die unermüdliche Betreuung bei Professor Judith Reindl bedanken. Die Zeit unserer Zusammenarbeit war sicherlich nicht immer die Einfachste aber ich bin froh darüber, stets ein offenes Ohr, konstruktive Ratschläge und volle Unterstützung von ihr erhalten zu haben. Dieser Dank geht auch an alle meine Kollegen des LRT2. Egal welches Problem im Raum stand, ich konnte mich stets darauf verlassen, dass es jemanden gab, der mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Nicht zu vergessen ist hierbei auch die Unterstützung, die ich von anderer Stelle erfahren habe. Das Team um und mit Anna Friedl war nie müde mir nicht nur Ratschläge zu meinem weiteren Vorgehen zu geben, sondern Claudia Böhland und Iris Bauer unterstützten mich mit vollem Enthusiasmus mit ihrem scheinbar unerschöpflichen praktischen Know-How. Wenn man all die Jahre zusammen an einem Strick zieht werden aus Kollegen Freunde und auch diese psychische Unterstützung ist nicht zu unterschätzen. Danke Matthias Sammer, Dietrich Walsh und der kompletten Truppe des ADK Verbands. Alles Für den Dackel, Alles Für den Club. Zu guter Letzt gilt ein ganz besonderer Dank meiner Familie und meiner Frau. Doktoranden sind trainiert darauf mit Rückschlägen jeder Art zurecht zu kommen und besitzen am Ende ihrer Promotion eine hohe Schmerztoleranz. Die Energie immer weiter zu machen kommt jedoch nicht von gutem Mensaessen, sondern von den Menschen, die hinter einem stehen.