

Generierung einer *PARP1-Knockout* Zelllinie zur Charakterisierung der Rolle von PARP1 in der DNA-Schadensantwort

Zur Erlangung des akademischen Grades einer
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN
(DR. RER. NAT.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)
genehmigte

DISSERTATION

von
Sabine Gajewski

1. Referentin: Prof. Dr. Andrea Hartwig
2. Referent: Prof. Dr. Holger Puchta

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.2021

The biggest limiting belief is the belief that you are limited.

*Für
meine Eltern*

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Darüber hinaus erkläre ich, dass die Arbeit nicht anderweitig als Prüfungsarbeit oder als Dissertation bei einer anderen Fakultät verwendet wird oder wurde.

Karlsruhe, den 25.02.2021

Sabine Gajewski

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	DNA-Schadensantwort	3
2.1.1	DNA-Schadenssignalisierung	5
2.1.2	DNA-Schäden und -Reparatur	6
2.1.3	Zellzyklusregulation	10
2.2	PARP1	15
2.2.1	Struktur der PARP1	15
2.2.2	Poly(ADP-Ribos)ylierung	17
2.2.3	Funktionen der PARP1 in der DNA-Schadensantwort	18
2.3	<i>Genome Editing</i> -System CRISPR/CAS9	30
2.3.1	Struktur, System und Herkunft	30
2.3.2	Funktion und Anwendung	33
3	FRAGESTELLUNG	35
4	MATERIAL UND METHODEN	37
4.1	Zellkultur	37
4.1.1	Zelllinien	37
4.1.2	Kultivierungsbedingungen der Zellen	37
4.1.3	Kryokonservierung und Inkulturnahme der Zellen	38
4.2	Generierung einer <i>PARP1-Knockout</i> Zelllinie	39
4.2.1	Plasmidaufarbeitung	39
4.2.2	Transfektion	41
4.2.3	Selektion mittels Antibiotikum und Einzelzellverdünnung	42
4.2.4	Validierung des <i>PARP1-Knockouts</i>	43
4.3	Analysen zum Wachstums- und Viabilitätsverhalten	46
4.3.1	Zellzahlbestimmung und Wachstumskurve	46
4.3.2	Koloniebildungsfähigkeit	47
4.4	Behandlung der Zellen zur Induktion der DNA-Schadensantwort	47
4.4.1	H ₂ O ₂ -Behandlung	47
4.4.2	UV-C Strahlung	47
4.4.3	Ionisierende Strahlung (Gammastrahlung)	48
4.5	Zellzyklusphasenverteilung mittels Durchflusszytometer	49
4.5.1	Inhibierung von ATM (ATMi)	50

4.6	Genexpressionsanalysen mittels <i>High-Throughput</i> RT-qPCR	51
4.6.1	Kultivierung der Zellen	51
4.6.2	RNA-Isolierung und -Quantifizierung	51
4.6.3	cDNA-Synthese - Reverse Transkription	52
4.6.4	Preamplifikation (STA) und Exonukleaseverdau	53
4.6.5	Primer- und Probenvorbereitung	54
4.6.6	96x96 <i>Dynamic Array IFC</i> qPCR Analyse	54
4.6.7	Datenanalyse und Auswertung der <i>High-Throughput</i> RT-qPCR	55
4.7	Analysen auf Proteinebene mittels Western Blot	57
4.7.1	Kultivierung der Zellen	57
4.7.2	Proteinextraktion und -quantifizierung	57
4.7.3	Elektrophoretische Trennung mittels SDS-PAGE	58
4.7.4	Proteintransfer mittels Western Blot	58
4.7.5	Immunodetektion mittels Chemilumineszenz	60
4.7.6	Semiquantitative Auswertung	61
4.8	Phosphorylierungsanalysen mittels Immunofluoreszenz	62
4.8.1	Kultivierung der Zellen	62
4.8.2	Fixierung und Permeabilisierung der Zellen	62
4.8.3	Immunodetektion mittels Fluoreszenz	62
4.8.4	Auswertung der Signalintensität	63
4.9	Statistik	64
5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	65
5.1	Generierung der U2OS <i>PARP1-Knockout</i> Zelllinie K3F11 mittels CRISPR/Cas9	65
5.1.1	Auswahl der Zelllinie	65
5.1.2	Bestimmung der Zielgenesequenz	66
5.1.3	Auswahl des Expressionssystem	69
5.1.4	Selektion der Klone	70
5.1.5	Validierung des <i>Knockouts</i>	70
5.2	Einfluss des <i>PARP1-KO</i> unter basalen Bedingungen	73
5.2.1	Wachstum und Koloniebildungsfähigkeit	73
5.2.2	Zellzyklusverteilung	75
5.2.3	Genexpressionsprofil	76
5.3	Einfluss des <i>PARP1-KO</i> auf das Genexpressionsprofil nach unterschiedlichen Arten von DNA-Schäden	81
5.3.1	H ₂ O ₂ -Behandlung	81
5.3.2	UV-C Strahlung	84
5.3.3	Ionisierende Strahlung	86
5.4	Rolle von PARP1 in der DNA-Schadensantwort nach ionisierender Strahlung	90
5.4.1	Genexpressionsanalyse	90
5.4.2	Proteinlevel von p53 und p21	94

5.4.3	Zellzyklusphasenverteilung	97
5.4.4	Phosphorylierung von ATM, H2AX und p53	108
6	ZUSAMMENFASSENDER DISKUSSION	115
7	LITERATURVERZEICHNIS	129
8	ANHANG	139
8.1	Abkürzungsverzeichnis	139
8.2	Verwendete Materialien	142
8.2.1	Chemikalien	142
8.2.2	Lösungen und Puffer	144
8.2.3	Kits	145
8.2.4	Verbrauchsmaterialien	146
8.2.5	Geräte	147
8.2.6	Software	148
8.3	Ergänzende Daten	149
8.3.1	Basale Bedingungen	149
8.3.2	Exposition mit IR	152
9	PUBLIKATIONSLISTE	155

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP1) spielt eine multifunktionale Rolle in der DNA-Schadensantwort (DDR) und gilt als Schlüsselprotein für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität. Nach Exposition mit ionisierender Strahlung (IR) wurde bereits gezeigt, dass PARP1 mit mehreren zentralen Signalproteinen der DDR interagiert und einen direkten Einfluss auf die p53-vermittelte Schadensreaktion zu nehmen scheint. Die Reichweite der PARP1-vermittelten Antwort, und inwieweit die Interaktionen grundlegend für die Schadensantwort sind, sind jedoch noch nicht geklärt. Diese Arbeit soll dazu beitragen, die multifunktionale Rolle von PARP1 im Signalnetzwerk der DDR besser einordnen zu können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mittels CRISPR/Cas9 eine U2OS-basierte *PARP1-Knockout* Zelllinie generiert, die anschließend dazu diente, die Rolle von PARP1 in der DDR zu untersuchen. Durchgeführt wurden Vergleichsuntersuchungen der U2OS Wildtyp Zelllinie und der U2OS *PARP1-Knockout* Zelllinie unter basalen Bedingungen sowie unter Einfluss verschiedener Schadensarten. Genexpressionsanalysen sowie die Analyse der Zellzyklusverteilung nach Behandlung mit ionisierender Strahlung offenbarten deutliche Unterschiede in der DNA-Schadensantwort, die eine neue potenzielle Verbindung zwischen den Signalwegen von dem Sensorprotein PARP1, dem *Transducer*-Protein ATM und p53, einer der wichtigsten Effektorproteine in der DDR, aufzeigte. Es konnte ferner gezeigt werden, dass PARP1 einen größeren Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von p53 hat als bisher angenommen. Der Grund hierfür lässt sich auf Signalwege *upstream* von p53 zurückführen, die sich unter anderem auf die Interaktion von PARP1 mit ATM zurückführen lassen. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass eine fehlende Funktion von PARP1 einen permanenten G₂-Arrest nach Schadensinduktion verursacht und den Zelltod der geschädigten Zellen maßgeblich beeinträchtigt. Letzteres lässt sich ebenfalls auf die durch PARP1 vermittelte p53-Aktivität zurückführen und darüber hinaus vermutlich auf den PARP1-abhängigen Zelltodmechanismus Parthanatos. Das Zusammenwirken von PARP1 und ATM scheint wesentlich beim Ablauf der DDR nach IR zu sein und beeinflusst hierbei die p53-abhängige Schadensantwort auf unterschiedlichen Ebenen. PARP1 spielt folglich eine wesentliche Rolle für eine funktionierende Schadensantwort nach ionisierender Strahlung. Der Einfluss von PARP1 auf ATM konnte in dieser Arbeit jedoch nicht auf funktioneller Ebene spezifiziert werden, sodass weitere Studien erforderlich sind, um die Interaktion von PARP1 und ATM im Kontext der DDR zu verifizieren.

ABSTRACT

Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) plays a multifunctional role in the DNA damage response (DDR) and is considered a key protein for the maintenance of genomic stability. After exposure to ionizing radiation (IR), PARP1 has previously been shown to interact with several essential signaling proteins of the DDR and appears to impact the p53-mediated damage response directly. However, the extent of the PARP1-mediated response and whether or not the interactions are fundamental to the damage response have not yet been elucidated. This work will help to understand better the multifunctional role of PARP1 in the signaling network of the DDR. In this work, a U2OS-based PARP1 knockout cell line was generated using CRISPR/Cas9, which was then used to investigate the role of PARP1 in the DNA damage response. Comparative studies of the U2OS wild-type cell line and the U2OS PARP1 knockout cell line were performed under basal conditions and after induction of different damage types. Gene expression analysis, as well as cell cycle distribution analysis after treatment with ionizing radiation, revealed significant differences in DNA damage response, pointing towards a new potential link between the signaling pathways of the sensor protein PARP1, the transducer protein ATM and p53, one of the major effector proteins in the DDR. It was further shown that PARP1 has a greater impact on the transcriptional activity of p53 than previously thought. The reason for this can be traced back to signaling pathways upstream of p53, which can be attributed, among other things, to the interaction of PARP1 with ATM. Furthermore, lack of function of PARP1 was found to cause permanent G₂-arrest after damage induction and to affect cell death of damaged cells. The latter can also be attributed to PARP1-mediated p53 activity and, in addition, to the PARP1-dependent cell death mechanism parthanatos. The synergism of PARP1 and ATM appears to be essential in the progression of the DDR after IR, thereby influencing the p53-dependent damage response at different levels. PARP1 consequently plays an essential role in a functional DNA damage response after ionizing radiation. However, the impact of PARP1 on ATM could not be specified at the functional level in this work, and further studies are needed to verify the interaction of PARP1 and ATM in the context of DDR.

2 EINLEITUNG

2.1 DNA-SCHADENSANTWORT

Die gesamte genetische Information des Organismus ist auf der DNA (*deoxyribonucleic acid*) im Zellkern einer Zelle gespeichert. Sie beinhaltet die Baupläne für die Gesamtheit aller Proteine, die von Stoffwechselreaktionen bis hin zu Stützfunktionen die Lebensgrundlage des Organismus darstellen. Ihre Integrität ist demnach nicht nur essenziell für das Fortbestehen der Zelle, sondern für das gesamte Lebewesen. Allerdings ist die DNA täglich 10.000en von Schäden ausgesetzt, die potenzielle Gefahren für die genomische Stabilität darstellen (JACKSON und BARTEK, 2009). Umwelteinflüsse wie ultraviolette (UV) Strahlung des Sonnenlichts, ionisierende Strahlung (*ionizing radiation*; IR) von kosmischer Strahlung oder medizinischen Behandlungen mit Röntgenstrahlen sowie genotoxische Chemikalien, die beispielsweise in der Krebstherapie angewendet werden, führen zu einer Vielzahl unterschiedlicher Läsionen im Genom. Neben diesen exogenen Einflüssen ist die DNA zusätzlich endogenen Faktoren ausgesetzt. Nebenprodukte des normalen Zellstoffwechsels, wie reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxidative species*; ROS; d.h. Superoxidanionen, Hydroxylradikale und Wasserstoffperoxid), die beispielsweise bei der Zellatmung entstehen, können ebenfalls DNA-Schäden verursachen. Durch diese unterschiedlichen Faktoren können viele verschiedene Arten von Läsionen im Genom entstehen, wie beispielsweise Einzel- (*single strand breaks*; SSBs) und Doppelstrangbrüche der DNA (*double strand breaks*; DSBs), Fehlpaarungen einzelner Basenpaare (*Mismatches*) und chemische Addukte (HOUTGRAAF et al., 2006).

Schäden an der DNA können dazu führen, dass die Genomreplikation – die Weitergabe der Information an Tochterzellen – und die Genomtranskription – die Umschreibung der genetischen Information für die Proteinbiosynthese – gehemmt werden und es zu einem Verlust der korrekten Sequenzinformation kommt. Solche Fehlinformationen in der DNA können wiederum Mutationen hervorrufen, deren Anhäufung die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass sich ein unkontrolliertes Zellwachstum (Onkogenese) entwickelt. Außerdem können Anomalien, wie strukturelle oder numerische Veränderungen des Chromosoms entstehen, die die Lebensfähigkeit der Zellen und im schwerwiegendsten Fall den gesamten Organismus bedrohen (JACKSON und BARTEK, 2009).

Um die genomische Stabilität trotz der zahlreichen Schäden zu gewährleisten, ist eine Vielzahl zellulärer Mechanismen vorhanden, die die DNA-Läsionen erkennen und ihre

Reparatur ermöglichen. Sie werden gemeinhin als DNA-Schadensantwort oder -reaktion (*DNA-damage response*; DDR) bezeichnet (HOUTGRAAF et al., 2006). Die zelluläre Antwort auf einen DNA-Schaden ist schematisch in Abb. 1 dargestellt.

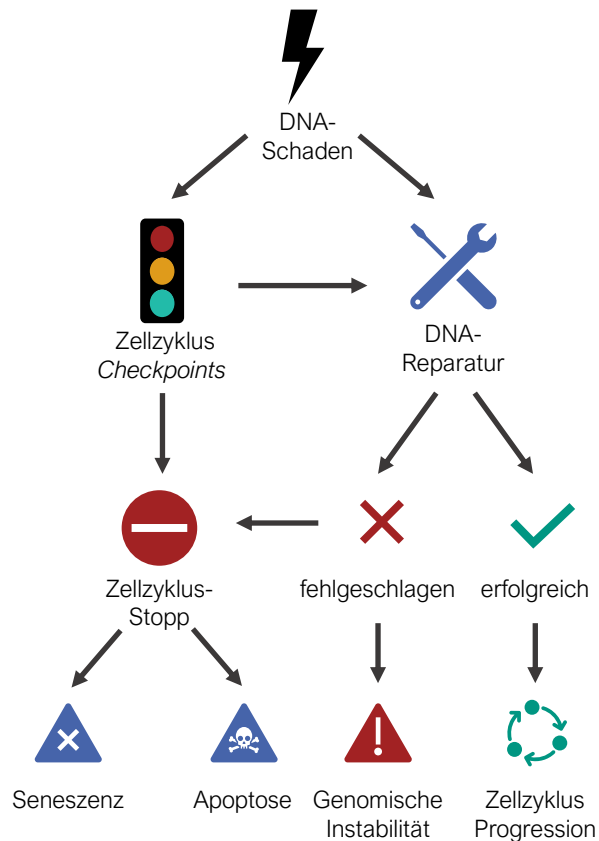


Abb. 1: Ablauf der zellulären Reaktion in der DNA-Schadensantwort (DDR). In proliferierenden Zellen werden Zellzyklus-*Checkpoints* aktiviert, die den Zellzyklus-Stopp einleiten und der Zelle Zeit geben, den DNA-Schaden zu reparieren. In ruhenden oder terminal ausdifferenzierten Zellen wird die DNA-Reparatur direkt eingeleitet. Wenn die Reparatur erfolgreich ist, kann die Zelle im Zellzyklus fortfahren. Kann der Schaden nicht repariert werden, wird entweder der Zellzyklus dauerhaft blockiert (Seneszenz) oder die Apoptose eingeleitet werden. Bleiben nicht reparierte Schäden unentdeckt, dann kann dies zu Mutationen und genomischer Instabilität führen (modifiziert nach HOUTGRAAF et al., 2006).

Während DNA-Schäden in ausdifferenzierten Zellen, wie beispielsweise Muskel- oder Nervenzellen, nach ihrer Erkennung eine umgehende DNA-Schadensreparatur einleiten, führen Läsionen in sich teilenden Zellen zuerst zu einer Aktivierung von sogenannten *Checkpoints* des laufenden Zellzyklus. Um zu verhindern, dass fehlerhafte genetische Informationen an die Tochterzellen weitergegeben werden, wird der Teilungsprozess unterbrochen und dadurch Zeit bereitgestellt, um den Schaden zu beheben (ZHOU und ELLEDGE, 2000). Wenn eine effektive DNA-Reparatur möglich ist, kommt es zur DDR-Inaktivierung, wodurch die normale Zellfunktion wieder aufgenommen wird. Kann der

Schaden nicht fehlerfrei behoben werden oder ist das Ausmaß des Schadens zu immens, um repariert zu werden, löst das DDR-Signal durch weiterführende Signalkaskaden alternativ den Zelltod durch Apoptose (programmierter Zelltod) oder die zelluläre Seneszenz (den permanenten Entzug des Zellzyklus) aus. Bleiben nicht reparierte Schäden unentdeckt, kann dies hingegen zu Mutationen und genomischer Instabilität führen (HOUTGRAAF et al., 2006; JACKSON und BARTEK, 2009).

2.1.1 DNA-SCHADENSSIGNALISIERUNG

Grundlage der DDR ist die Signaltransduktion verschiedener Proteine, deren Aktivierung und Interaktion abhängig von der Art des Schadens und der Zellzyklusphase ist. Obwohl häufig als Weg oder Pfad bezeichnet, ist die DDR genauer genommen ein komplexes Netzwerk von miteinander interagierenden Proteinen, die verknüpfte Signalpfade bilden. Anhand ihrer Aufgaben in der DDR, lassen sich die Proteine im Allgemeinen in Sensoren, Mediatoren, *Transducers* und Effektoren unterteilen (ZHOU und ELLEDGE, 2000). In Abb. 2 ist eine schematische Übersicht der DDR dargestellt.

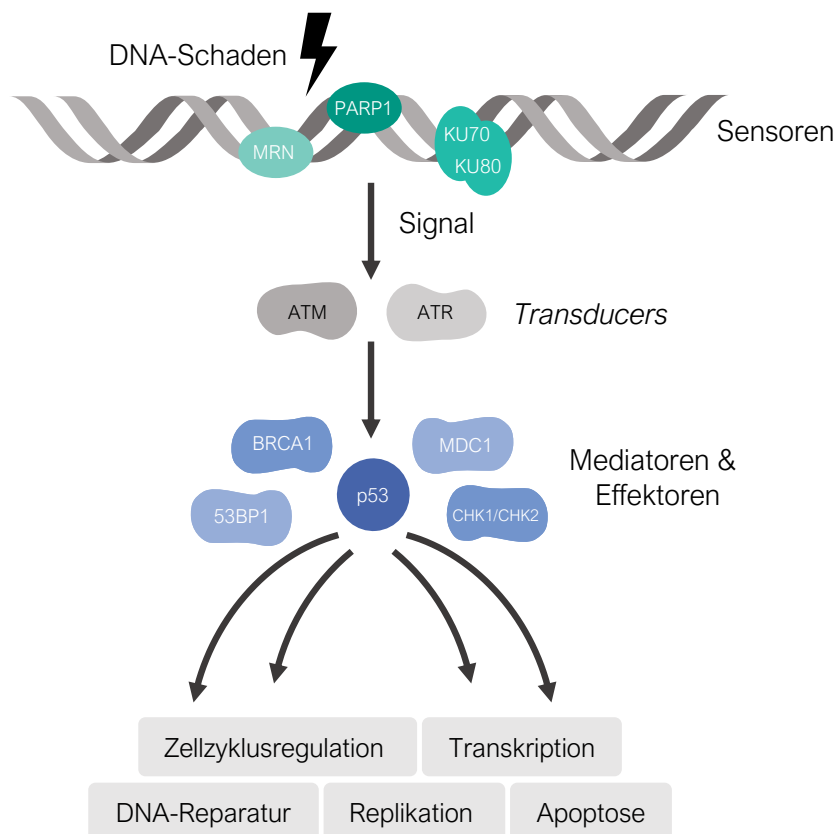


Abb. 2: Signalweiterleitung in der DNA-Schadensantwort (DDR). Je nach Art der Läsion, sind verschiedene Sensoren für die Schadenserkenkung zuständig. Die Sensoren initiieren Signalwege, die über *Transducer*- auf Mediator- und Effektorproteine weitergegeben werden und sich anschließend auf eine Vielzahl von

zellulären Prozessen auswirken. Diese Prozesse haben das gemeinsame Ziel, die genomische Stabilität zu bewahren (modifiziert nach ZHOU und ELLEDGE, 2000; HOUTGRAAF et al., 2006)

Nach der Schadenserkennung durch Sensorproteine kann das Signal über *Transducers* weitergeleitet und in der Signalkaskade an Mediatoren und Effektorproteine vermittelt werden. Je nach Art der Effektoren, werden weitere Proteine rekrutiert, die beispielsweise die Replikation beeinflussen, die Transkription spezifischer Proteine begünstigen, einen Zellzyklusarrest auslösen, die DNA-Reparatur einleiten oder letztendlich zur Apoptose führen können (HOUTGRAAF et al., 2006).

Bei der DNA-Schadenserkennung werden abhängig von der Art des Schadens unterschiedliche Sensor-Proteine rekrutiert. Die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP1) ist vor allem als Sensor von SSBs bekannt, spielt allerdings bei der Erkennung für unterschiedlichste Schadensarten eine Rolle und wird hier als eines der ersten Proteine an den Ort des Schadens rekrutiert (näheres in Kapitel 2.2) (LIU et al., 2017). Neben PARP1 sind auch der MRN Komplex, der sich aus den drei Proteinen MRE11 (*meiotic recombination protein 11*), Rad50 und NBS1 (*nijmegen breakage syndrome 1*) zusammensetzt, und der Ku-Komplex (Ku70/Ku80) Beispiele für Schadenssensoren, die vor allem als Erkennungsproteine von DSBs agieren. Die Proteine ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) und ATR (*ataxia-telangiectasia and RAD3-related*) spielen als *Transducers* eine wichtige Rolle bei der Signalweiterleitung, indem sie die Phosphorylierung und damit die Aktivierung mehrerer Mediator- und Effektorproteine wie p53, MDC1 (*mediator of DNA-damage checkpoint 1*), BRCA1 (*breast cancer type 1 susceptibility protein*), 53BP1 (*tumor protein P53 binding protein 1*) und CHK1/CHK2 (*checkpoint kinase 1/2*) kontrollieren (näheres zu p53 in Kapitel 2.1.3.1) (ZHOU und ELLEDGE, 2000). Mediatorproteine sind dabei meist zellzyklusspezifisch und assoziieren sich in bestimmten Phasen des Zellzyklus mit den entsprechenden Schadenssensoren, *Transducern* oder Effektoren und tragen so zur Spezifität der Signaltransduktion bei (HOUTGRAAF et al., 2006).

2.1.2 DNA-SCHÄDEN UND -REPARATUR

Die Vielfalt an DNA-Läsionstypen erfordert unterschiedliche DNA-Reparaturmechanismen. DNA-Schadensursachen können in zwei übergeordnete Kategorien eingeteilt werden, nämlich endo- und exogene Faktoren. Abb. 3 zeigt eine Übersicht der möglichen Schäden und die entsprechenden DNA-Schadensreparaturmechanismen. Die Haupt-DNA-Reparaturwege sind hierbei die Basen-Exzisionsreparatur (*base excision repair*; BER), die Nukleotid-Exzisionsreparatur (*nucleotide excision repair*; NER), die *Mismatch*-Reparatur

(*mismatch repair*; MMR), die Einzelstrangbruchreparatur (*single strand break repair*; SSBR) und die Doppelstrangbruchreparatur (*double strand break repair*; DBSR), wobei die Aktivität einiger Reparaturwege abhängig von der Zellzyklusphase ist (JACKSON und BARTEK, 2009; CHATTERJEE und WALKER, 2017).

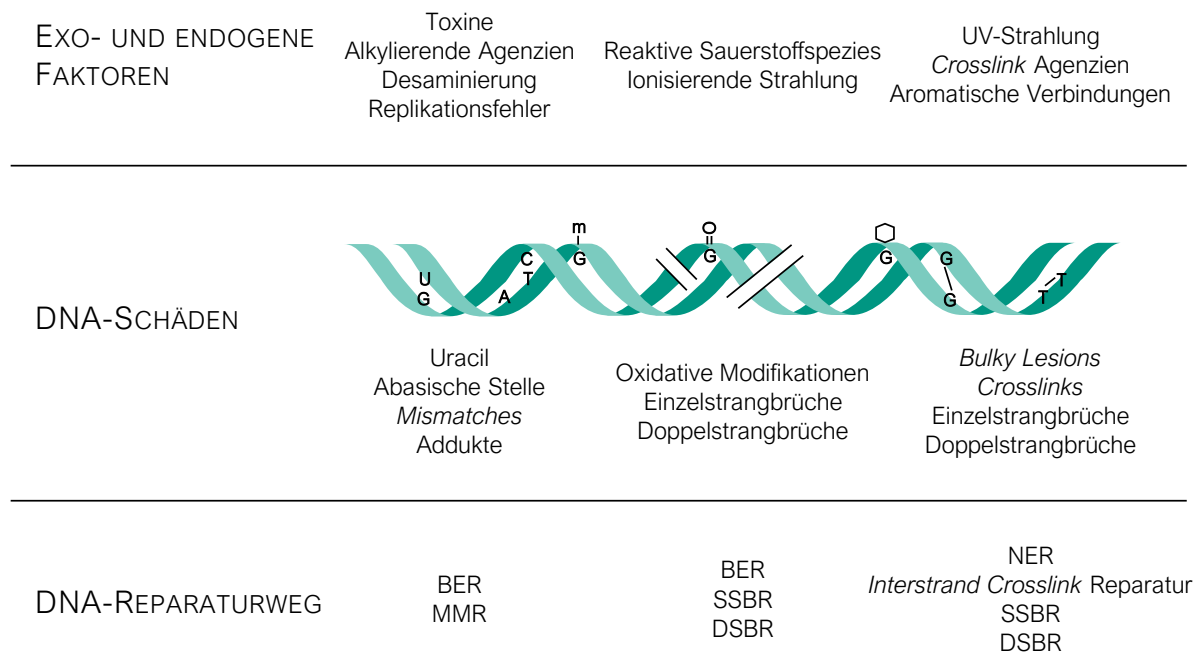


Abb. 3: Übersicht der unterschiedlichen DNA-Läsionen und möglichen Reparaturwege. Potenzielle DNA-schädigende Faktoren: Toxine, Alkylierungsmittel, spontane Basen-Desaminierung, Replikationsfehler, Reaktive Sauerstoffspezies, ionisierende und UV-Strahlung, *Crosslink* Agenzien und aromatische Verbindungen. Mögliche DNA-Schäden: Uracil durch Desaminierung von Cytosin (U:G), abasische Stelle durch den Verlust einer Base von einem DNA-Strang (A), Basenfehlpaarungen (C:T), methyliertes Guanin (G-m), 8-Oxo-Guanin-Läsionen (G=O), Einzelstrang- und Doppelstrangbrüche, helixverzerrende Läsionen wie *Bulky Lesions*, *Intra-* (T-T) und *Interstrand-* (G-G) *Crosslinks*. Zelluläre Reparaturwege: *Mismatch* Reparatur (MMR) korrigiert Replikationsfehler und Basenfehlpaarungen; Basen-Exzisionsreparatur (BER) entfernt Basenaddukte, Uracil, abasische Stellen und oxidative Läsionen; Einzelstrangbruchreparatur (SSBR) repariert Einzelstrangbrüche im DNA-Rückgrat; Doppelstrangbruchreparatur (DBSR) repariert Doppelstrangbrüche; Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) entfernt sperrige Läsionen (*Bulky Lesions*) und *Intrastrang-Crosslinks*; *Interstrand Crosslink* (ICL)-Reparatur entfernt *Interstrand-Crosslinks* (modifiziert nach CHATTERJEE und WALKER, 2017).

Im Folgenden wird näher auf die Schadensursachen und die entsprechenden Reparaturwege eingegangen.

2.1.2.1 SCHADENSURSACHEN

Endogene Faktoren

Endogene DNA-Schäden entstehen während biologischen zellulären Prozessen, wie beispielweise der Replikation der DNA. Hierbei können blockierte Replikationsgabeln, Basenfehlpaarungen (*Mismatches*) oder eine fehlerhafte Aktivität der DNA-Topoisomerase 1 (TOP1), die für die Aufhebung der Superspiralisierung zuständig ist, zu Schäden führen. Durch das wässrige Milieu in der Zelle begünstigt, treten zudem häufig spontane Hydrolysen in Form von Desaminierungen der Basen auf. Hierbei wird die Aminogruppe der Base durch ein Wassermolekül verdrängt, was wiederum die Bindungsaffinität zu den komplementären Basen verändert. Weiterhin kann es zur Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung kommen, die die Stickstoffbase und das Zuckerphosphat-Rückgrat verbindet, wodurch die entsprechende Base entfernt und eine abasische oder AP(apurinisch/apyrimidische)-Stelle in der DNA erzeugt wird. Da diese Basenmodifikationen instabil sind, wandeln sie sich leicht in SSBs der DNA um. ROS stellen eine weitere Quelle für oxidative Basenschäden und SSBs dar. Sie entstehen als Nebenprodukte der Elektronentransportkette bei der Zellatmung und erfüllen in geringer Konzentration wichtige zelluläre Funktionen als Botenstoffe. Im Überschuss können sie jedoch zu einer Vielzahl an DNA-Läsionen führen (CHATTERJEE und WALKER, 2017).

Exogene Faktoren

Exogene DNA-schädigende Faktoren sind zum einen verschiedene energiereiche Strahlungsarten und zum anderen diverse toxische Substanzen. Zur IR zählen im Allgemeinen alle Strahlungsarten, deren Energiedichte hoch genug ist, um Atome oder Moleküle zu ionisieren. Hierzu gehört unter anderem Gammastrahlung, die bei Kernzerfällen entsteht. IR kann die DNA entweder durch ihre direkte Ionisierung oder indirekt durch hochreaktive Hydroxyl-Radikale ($\text{OH}\cdot$), die aus der Ionisierung von H_2O -Molekülen resultieren, schädigen. Beide Mechanismen führen zu geschädigten Basen, SSBs, DSBs und DNA-*Crosslinks*. IR kommt in der Umwelt häufig vor und wird von verschiedenen Quellen erzeugt, die von Gestein bis hin zu kosmischer Strahlung und medizinischen Geräten reichen (MAIER et al., 2016).

Eine weitere DNA-schädigende Strahlungsart ist die UV-Strahlung. Die Auswirkungen von UV-Strahlung ist abhängig von dem jeweiligen Wellenlängenbereich. UV-Strahlung wird hierbei in drei Bereiche eingeteilt: UV-C (190-290 nm), UV-B (290-320 nm) und UV-A (320-

400 nm). Sonnenlicht besteht neben sichtbarem Licht auch aus UV-B und UV-A Strahlung. Die hoch energetische UV-C Strahlung wird zum größten Teil durch die Ozonschicht absorbiert. Je nach Wellenlängenbereich und damit Energiedichte der Strahlung, kann es zu Basenschäden, *Crosslinks* der DNA, DSBs und sperrigen DNA-Photoprodukten kommen. Letztere werden vor allem durch UV-C Strahlung in hohem Maße induziert und können unter anderem zu blockierten Replikationsgabeln führen (CHATTERJEE und WALKER, 2017).

Durch industrielle Prozesse, Zigarettenrauch, Pestizide oder Chemotherapeutika ist die DNA vielen weiteren exogenen Substanzen ausgesetzt, die mit der DNA reagieren und Basenschäden oder Veränderungen am Rückgrat der DNA, wie SSBs und DSBs, hervorrufen können. Dazu gehören alkylierende Substanzen, aromatische Verbindungen, PAKs (Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe) und andere Toxine, wie beispielsweise Aflatoxin B1 (CHATTERJEE und WALKER, 2017).

2.1.2.2 REPARATURWEGE

Reparatur von Basenschäden

Basenfehlpaarungen, die durch eine fehlerhafte Replikation erzeugt werden, können durch die MMR korrigiert werden. Basenmodifikationen, die durch Oxidation, Desaminierung oder Alkylierung entstehen, können mithilfe des BER-Systems wiederhergestellt werden. Die NER erkennt Helix-verzerrende Basenläsionen und ist in erster Linie für die Entfernung von sperrigen DNA-Addukten (*bulky lesions*) oder auch Intrastrang-*Crosslinks* verantwortlich, wie sie beispielsweise durch UV-Licht oder Umweltmutagene gebildet werden. Dabei wird zwischen zwei Reparaturwegen unterschieden, die in der Detektion der DNA-Schäden variieren. In der *global genome* NER (GG-NER) wird das gesamte Genom untersucht, während bei der *transcription-coupled* NER (TC-NER) die Reparatur dann aktiviert wird, wenn die RNA(*ribonucleic acid*)-Polymerase während der Transkription durch einen Schaden gestoppt wird (JACKSON und BARTEK, 2009; CHATTERJEE und WALKER, 2017).

Reparatur von DNA-Strangbrüchen

SSBs entstehen häufig durch oxidative Schäden der DNA, abasische Stellen oder eine fehlerhafte Aktivität des TOP1-Enzyms. SSBs können erfolgreich mittels SSBR repariert werden. Die Grundlage der Reparatur von SSBs ist das Ablesen der Sequenzabfolge auf dem komplementären Strang. Obwohl täglich eine Vielzahl von SSBs entstehen, stellen sie keine unmittelbare Gefahr für die genomische Stabilität dar, wenn der komplementäre

Strang intakt ist und als Vorlage für eine fehlerfreie Reparatur dienen kann. Wird ein SSB allerdings nicht erkannt und bleibt unrepariert oder kommt es zu einer lokalen Anhäufung der Läsionen, kann dies direkt oder während der DNA-Replikation zu DSBs führen (CHATTERJEE und WALKER, 2017).

DSBs stellen die schwerwiegendsten Läsionen der DNA dar, da es hierbei zu einem lokalen Informationsverlust des Genoms kommt, der zu Onkogenese-begünstigenden Mutationen oder zum Zelltod führen kann. Für die Reparatur von DSBs kommen je nach Zellzyklusphase zwei Hauptmechanismen zum Einsatz: Die homologe Rekombination (*homologous recombination*; HR) und die nicht-homologe Endverknüpfung (*non-homologous end joining*; NHEJ), wobei hier zwischen dem klassischen c-NHEJ und dem alternativen alt-NHEJ unterschieden wird (CICCIA und ELLEDGE, 2010). Die HR wird als nahezu fehlerfreie DSBR bezeichnet, da bei der Reparatur des geschädigten Strangs das gegenüberliegende Schwesterchromatid als Reparaturmatrize verwendet wird. Allerdings ist dieser Mechanismus, durch die Voraussetzung einer DNA-Vorlage, auf die Zellzyklusphasen beschränkt, in denen bereits eine Replikation der DNA erfolgreich stattgefunden hat. Folglich kann dieser Reparaturweg nur in der späten S- und in der G₂-Phase stattfinden (CICCIA und ELLEDGE, 2010). Im Gegensatz zur HR wird bei den *end-joining*-Reparaturvarianten keine Matrize verwendet, weshalb diese Reparaturwege unabhängig von der Zellzyklusphase stattfinden können. Beim c-NHEJ sowie dem alt-NHEJ werden die beiden Enden der DSB-Stellen miteinander verknüpft. Durch diesen simplen Mechanismus entstehen häufiger Fehler wie Insertionen, Deletionen oder auch Translokation, die zum Verlust der Sequenzinformation führen (CICCIA und ELLEDGE, 2010).

2.1.3 ZELLYKLUSREGULATION

Die Regulation des Zellzyklus legt fest, wann die Bedingungen günstig zur Proliferation und Teilung der Zelle sind oder wann es zur Wachstumshemmung kommt, um Reparatur- oder Apoptose-Mechanismen einzuleiten. In der Zellzyklusregulation sind sowohl tumorpromovierende (Onkogene) sowie tumorsuppressive Gene (Tumorsuppressoren) involviert. Veränderungen in diesen Genen führen häufig zu einer erhöhten genetischen Instabilität und einer höheren Wahrscheinlichkeit zur Onkogenese, weshalb sich in vielen Krebsarten eine Fehlregulation des Zellzyklus findet, die mit einer gestörten DDR einhergeht. Die korrekte Regulation des Zellzyklus ist daher essenziell für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität.

Der Zellzyklus besteht aus vier Phasen (Abb. 4), die letztendlich zur Teilung einer Zelle in zwei Tochterzellen führen: G₁, Synthese (S), G₂, Mitose (M) und eine Phase außerhalb des Zellzyklus (G₀). Die zwei Schlüsselereignisse des Zellzyklus finden in der S-Phase und in der M-Phase statt. Die S-Phase definiert den Zeitraum der DNA-Replikation, wobei eine exakte Kopie des Genoms erstellt wird. Die eigentliche Zellteilung findet in der M-Phase statt. In dieser Phase werden die Chromosomen so organisiert, dass zwei genetisch identische Tochterzellen entstehen können. Zwischen der M- und der S-Phase geht die Zelle in sogenannte "Gap"(G)-Phasen über. In der G₁ sowie G₂-Phase nimmt die Zelle jeweils an Größe zu und synthetisiert essenzielle Proteine, um sicherzustellen, dass zwei unabhängige Tochterzellen gebildet werden können. Ausdifferenzierte Zellen oder temporär ruhende Zellen befinden sich in einer Phase außerhalb des Zyklus, die G₀ (Ruhephase) genannt wird. In dieser Phase findet keine Zellteilung statt. Je nach Zelltyp kann die Verweildauer in der G₀-Phase bis zu mehrere Jahren dauern oder die Zelle bleibt dauerhaft in der Ruhephase (terminal ausdifferenzierte Zellen) (FUNK, 2005; HOUTGRAAF et al., 2006).

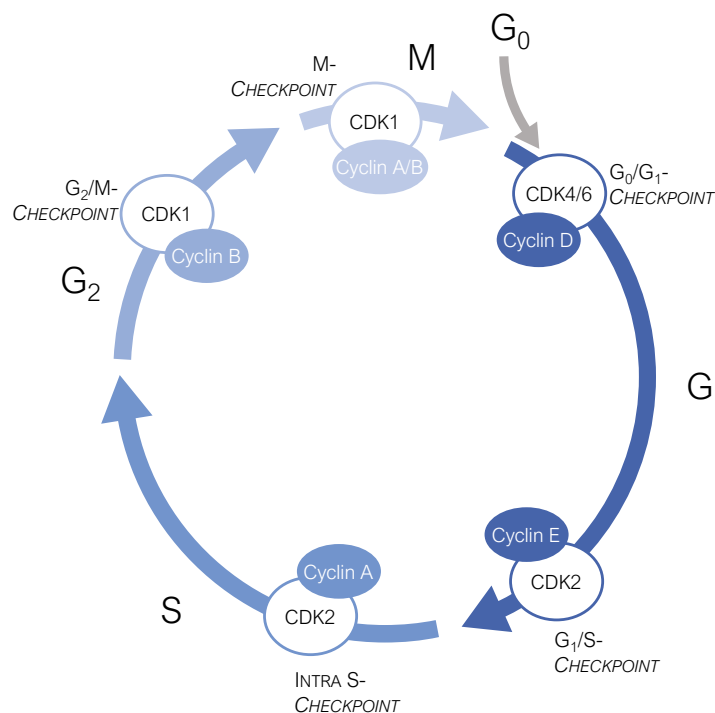


Abb. 4: Phasen und Checkpoints des Zellzyklus: G₁, Synthese (S), G₂, Mitose (M). Ruhende oder ausdifferenzierte Zellen befinden sich in der G₀-Phase. G₀ befindet sich außerhalb des Zellzyklus, hier findet keine Zellteilung statt. Verschiedene Cyclin-abhängige Kinase (CDK) / Cyclin-Komplexe sind die Schlüsselregulatoren der Zellzyklusphasen und an den Kontrollmechanismen (Checkpoints) beim Übergang von einer Zellzyklusphase zur nächsten beteiligt (modifiziert nach FUNK, 2005).

Während des Zellzyklus durchläuft die Zelle verschiedene Kontrollpunkte, sogenannte *Checkpoints*. *Checkpoints* sind komplexe Signaltransduktionswege, die die Abfolge der Ereignisse im Zellzyklus regulieren und die Zellzyklusprogression fördern oder inhibieren, um nach DNA-Schädigung die Reparatur zu integrieren. Auf molekularer Ebene wird die Regulation durch periodische Aktivierung und Inaktivierung von bestimmten Proteinkomplexen gesteuert. Der Kern dieses Kontroll-Komplexes besteht aus einem Cyclin, der regulatorischen Untereinheit, und einer Cyclin-abhängigen Kinase (CDK), der katalytischen Untereinheit (VERMEULEN et al., 2003). Welche Phase im Zellzyklus von welchem CDK-Cyclin-Komplex gesteuert wird, hängt vom Zeitpunkt ab. CDK1 paart sich mit den Cyclinen A/B in der G₂- und M-Phase, CDK2 hingegen interagiert während der G₁- und S-Phase mit Cyclin A/E und CDK4 sowie CDK6 interagieren mit den Cyclinen vom D-Typ in der frühen G₁-Phase (FUNK, 2005). Die Aktivität dieses Komplexes wird durch mehrere Ereignisse während des Zellzyklus reguliert: die räumliche Verteilung der Untereinheiten in verschiedene zelluläre Kompartimente, Auf- und Abbau des Cyclins, aktivierende und hemmende Phosphorylierung der CDKs und die Bindung von CDK-Inhibitoren an den Komplex (FUNK, 2005). Diese Ereignisse sind in der DDR durch zellzyklusspezifische Proteine reguliert, die das Fortschreiten des Zellzyklus an den jeweiligen *Checkpoints* verlangsamen oder stoppen (JACKSON und BARTEK, 2009).

2.1.3.1 P53 UND DIE SIGNALTRANSDUKTION NACH IR

Wichtige Regulator-Proteine, die an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt sind, sind ATM und ATR, CHK1 und CHK2 sowie p53 (MAIER et al., 2016). Abb. 5 zeigt die Signalkaskade des Zellzyklusarrest am Beispiel eines IR-induzierten DSBs.

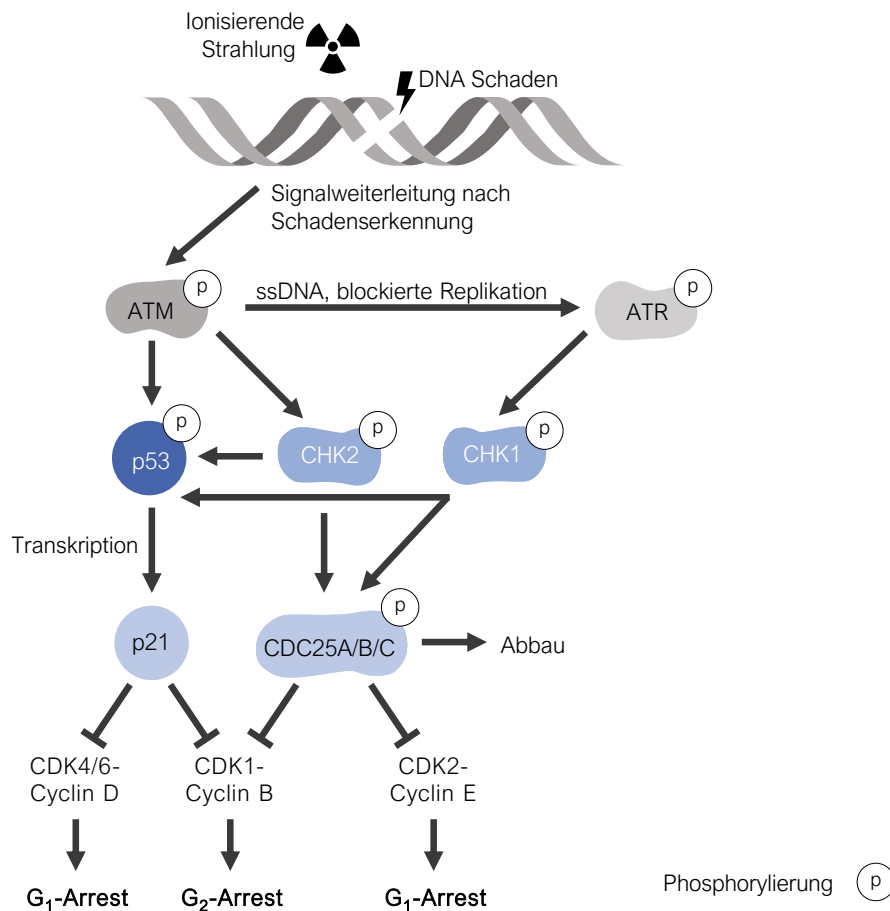


Abb. 5: Induktion des Zellzyklusarrests nach IR. Nach der Schadenserkennung wird ATM durch Phosphorylierung aktiviert und phosphoryliert seinerseits p53, entweder direkt oder indirekt über CHK2 und CHK1. ATR wird durch einzelsträngige DNA und blockierte Replikationsgabeln aktiviert und phosphoryliert CHK1. p53 wirkt als Transkriptionsfaktor und induziert die Expression des CDK-Inhibitors p21, was zum Arrest der G₁-/G₂-Phase führt. Die Aktivierung von CHK1 und CHK2 führt zur Phosphorylierung der drei CDC25-Isoformen. Dadurch wird CDC25 abgebaut und CDK1/2 folglich gehemmt, was ebenfalls zum G₁-/G₂-Arrest führt (modifiziert nach MAIER et al., 2016).

Wie bereits in 2.1.1 erwähnt, spielen ATM und ATR als *Transducers* in der DDR eine wichtige Rolle bei der Signalweiterleitung. Die Induktion von DSBs führt direkt zur Phosphorylierung und Aktivierung von ATM, beispielsweise durch den MRN Komplex. ATM phosphoryliert und aktiviert seinerseits CHK2 und p53 (CANMAN et al., 1998), wobei ATR wiederum CHK1 phosphoryliert und aktiviert. Dies passiert entweder nach Induktion von SSBs oder durch Blockaden der Replikationsgabel, die während Reparaturprozessen entstehen können (MAIER et al., 2016). ATM sowie CHK1 und CHK2 können p53 an unterschiedlichen Positionen phosphorylieren, was zu einer Stabilisierung und Aktivierung von p53 führt (BAI und ZHU, 2006). Unter basalen Bedingungen wird p53 fortwährend exprimiert, wobei die Konzentration im Zellkern durch dessen Regulator-Protein MDM2 (*murine double minute 2*) kontrolliert wird. MDM2 sorgt für eine Inaktivierung von p53, indem es an dessen

Transaktivierungsdomäne bindet und für die Ubiquitinierung von p53 zuständig ist. Diese Modifikation induziert den nukleären Export und proteasomalen Abbau von p53. Die Transkription des *MDM2*-Gens wird wiederum durch p53 selbst induziert. Der Abbau von p53 ist somit rückgekoppelt und ermöglicht eine Autoregulierung. Wird p53 in Folge der Schadensantwort phosphoryliert, führt dies zur Dissoziation von MDM2 und aktiviert somit p53 als wichtigen Transkriptionsfaktor in der DDR (BAI und ZHU, 2006; HAFNER et al., 2019).

Um einen Zellzyklusarrest einzuleiten, induziert p53 die Transkription von *CDKN1A* (*cyclin dependent kinase inhibitor 1A*), welches für das Protein p21 codiert. p21 führt zur Hemmung der Aktivität von CDK4 und CDK6 und folglich zum G₁-Arrest. Eine verstärkte Expression von p21 als Reaktion auf ein hoch aktiviertes p53 blockiert zusätzlich den Übergang der G₂- zur M-Phase. Hierbei bindet p21 an den CDK1-CyclinB-Komplex und verhindert dadurch die Zellzyklusprogression. Eine zusätzliche Kontrolle des Zellzyklus erfolgt durch CHK1 und CHK2. Neben der Aktivierung von p53, phosphorylieren die Kinasen ebenfalls die drei Isoformen A/B/C der CDC25(*cell division cycle 25*)-Phosphatase, die während der Zellteilung wichtige Übergänge zwischen den Phasen des Zellzyklus regulieren. Durch die Phosphorylierung wird die Degradation von CDC25A/B/C eingeleitet. Folglich werden die Komplexe CDK2-CyclinE sowie CDK1-CyclinB gehemmt, was zu einem Zellzyklusarrest in der G₁- beziehungsweise der G₂-Phase führt (MAIER et al., 2016).

Je nach Ausmaß des Schadens ist p53 nicht nur für die Zellzykluskontrolle wichtig, sondern auch für die Einleitung des Zelltods. Der Grad der DNA-Schädigung und die daraus resultierende Art der Modifikationen von p53 bestimmen, ob das Zellüberleben oder der Zelltod präferiert werden. Die Entscheidung zwischen Zellzyklusarrest und Apoptose wird durch das weitreichende Spektrum der p53-abhängigen Gene ausgelöst (HAFNER et al., 2019). Aufgrund dieser zentralen Rolle bei der Entscheidung über Zellüberleben oder Zelltod und der genomischen Stabilität wird p53 auch als "Wächter des Genoms" bezeichnet (MAIER et al., 2016).

2.2 PARP1

Die PARP1 ist an mehreren zellulären Signalwegen beteiligt und eine der Schlüsselfaktoren für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität. PARP1 gehört zur PARP-Enzymfamilie, deren gemeinsame Funktion die posttranslationale Modifikation bestimmter Zielproteine ist, die als Poly(ADP-Ribosyl)ierung (PARylierung) bezeichnet wird. PARP1 macht dabei die Mehrheit der enzymatischen Aktivität aller PARPs aus und ist für 90 % der zellulären PARylierung verantwortlich. Zielproteine der PARylierung können PARP1 selbst (Auto-PARylierung) oder auch andere nukleäre Akzeptorproteine sein (DULANEY et al., 2017). Die PARylierung stellt gleichzeitig das direkte Aktivierungssignal für Ziel-Proteine dar und vermittelt indirekt über Signalweiterleitungen weitere Funktionen in der Transkription, der Replikation und des Zellzyklus und spielt daher eine multifunktionale Rolle in der DDR.

2.2.1 STRUKTUR DER PARP1

PARP1 setzt sich strukturell aus drei Hauptdomänen zusammen. Dazu gehören eine DNA-Bindungsdomäne, die drei Zinkfinger motive enthält, eine Automodifikationsdomäne, die Protein-Protein Interaktionen ermöglicht, und eine hochkonservierte katalytische Domäne, die für die PARylierung verantwortlich ist (RAY CHAUDHURI und NUSSENZWEIG, 2017). Der schematische Aufbau der PARP1 ist in Abbildung Abb. 6a dargestellt.

Die drei Hauptdomänen schließen sechs individuell gefaltete Domänen ein. Am N-terminalen Ende befinden sich zwei homologe Zinkfinger motive (ZF1 und ZF2) und ein strukturell abweichender dritter Zinkfinger (ZF3). Die Zinkionen in ZF1 und ZF2 werden von drei Cysteinen und einem Histidin (Cys_3His_1) komplexiert, wohingegen die dritte Zinkfingerdomäne von vier Cysteinen (Cys_4) umgeben ist. Diese Zinkfingerstrukturen ermöglichen die Erkennung und Bindung von und an DNA-Schäden. ZF2 hat eine hohe Bindungsaffinität für spezifische DNA-Läsionen, wohingegen ZF1 und ZF3 durch die Ausbildung von Interdomänen-Kontakten entscheidend zur PARP1-Aktivierung beitragen. Ein Kernlokalisierungssignal (NLS), zwischen ZF2 und ZF3 ermöglicht die Zellkernaufnahme der PARP1 nach Proteinbiosynthese im Zytoplasma (LANGELIER und PASCAL, 2013).

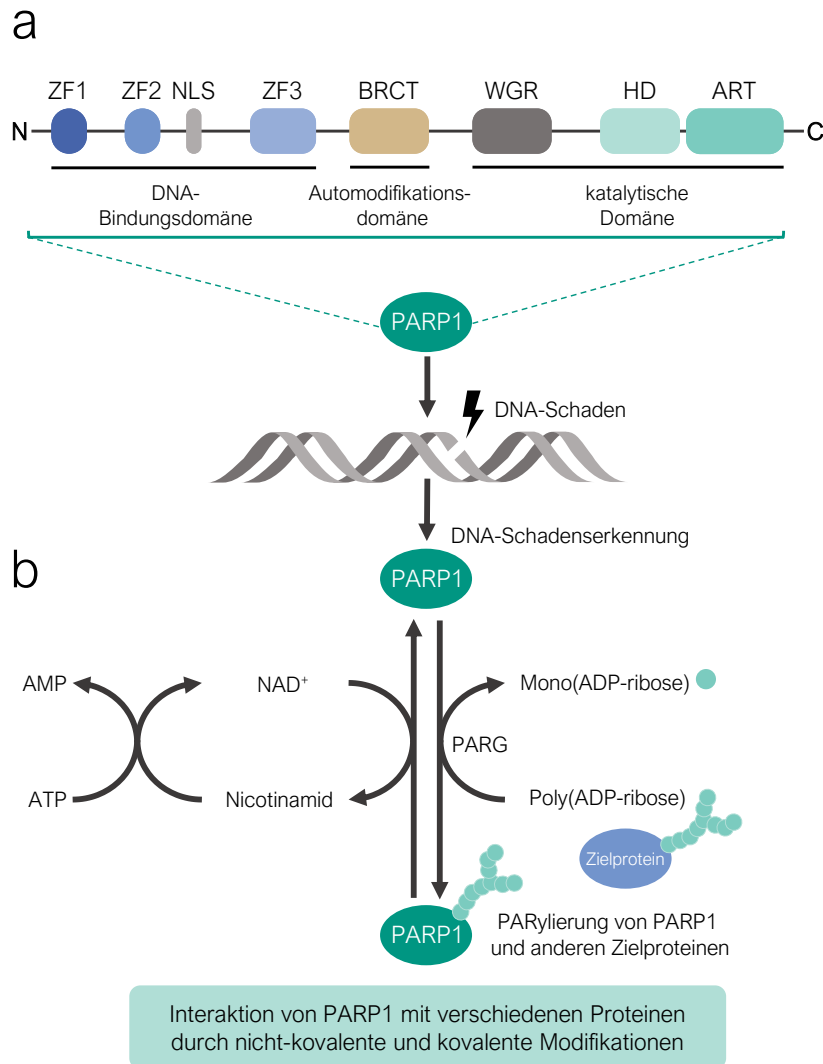


Abb. 6: Struktur der PARP1 (Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1) und ihre enzymatische Aktivität. (a) Die PARP1 setzt sich strukturell aus drei Hauptdomänen zusammen, darunter eine N-terminale DNA-Bindungsdomäne, die aus drei Zinkfingermotiven (ZF) besteht, eine Automodifikationsdomäne, die Protein-Protein Interaktionen ermöglicht und eine hochkonservierte, carboxyterminale, katalytische Domäne, die für die enzymatische Aktivität des Proteins (PARylierung) verantwortlich ist. (b) PARP1 erkennt den DNA-Schaden und PARyliert als Antwort neben anderen Zielproteinen auch sich selbst. Dabei wird NAD^+ (Nikotinamadenindinukleotid) als Substrat für die PAR-Bildung verwendet und aus Nicotinamid, unter Verbrauch von ATP (Adenosintriphosphat), wieder aufgefüllt. Die PAR-Ketten werden von der PAR-Glykohydrolase (PARG) wieder katabolisiert. Weitere Proteine binden infolge der PARylierung ebenfalls durch nicht-kovalente Wechselwirkungen an die PAR-Ketten der Proteine und werden so zur DNA-Schadensstelle rekrutiert (modifiziert nach MARTIN-HERNANDEZ et al., 2017; RAY CHAUDHURI und NUSSENZWEIG, 2017).

Die Automodifikationsdomäne ist reich an Glutamatresten, die als Akzeptoren für die PAR-Einheiten dienen. Im Falle einer DNA-Schädigung findet hier, vermittelt über die katalytische Domäne, eine Auto-PARylierung statt. Das enthaltene BRCT (*breast cancer susceptibility*

protein C terminus) Motiv ist nach Auto-PARYlierung wiederum für Protein-Protein Wechselwirkungen zuständig (ROULEAU et al., 2010; LANGELIER und PASCAL, 2013).

Das WGR-Motiv (Trypsin, Glycin und Arginin reiche Region – abgekürzt nach dem Einbuchstabencode für Aminosäuren) wird meist der katalytischen Domäne zugeordnet. Die WGR trägt zur DNA-Bindung bei und vermittelt gemeinsam mit ZF1 und ZF3 den Kontakt zwischen den Domänen, um eine effiziente DNA-schadensabhängige Aktivierung zu gewährleisten (LANGELIER und PASCAL, 2013).

Die katalytische Domäne am carboxyterminalen Ende vermittelt die enzymatische Aktivität von PARP1 (PARYlierung). Sie ist in zwei Unterdomänen eingeteilt: die helikale Domäne (HD) und die ADP(Adenosindiphosphat)-Ribosyltransferase-Domäne (ART), wobei letztere an der NAD⁺(Nicotinamidadeninukleotid)-Bindung und der PAR-Synthese beteiligt ist (LANGELIER und PASCAL, 2013).

2.2.2 POLY(ADP-RIBOS)YLIERUNG

Das Prinzip der PARYlierung ist in Abb. 6b dargestellt. Insgesamt werden durch die PARYlierung drei Reaktionen katalysiert: die Anhaftung des ersten ADP-Ribose-Moleküls, die Polymerisierung weiterer ADP-Ribose-Einheiten sowie mögliche Verzweigungen der PAR-Kette (LANGELIER und PASCAL, 2013). Die PARYlierung löst dabei zwei Hauptereignisse am Ort des DNA-Schadens aus. Zum einen wird die direkte Rekrutierung von kovalent oder nicht-kovalent PAR-bindenden Zielproteinen der DDR vermittelt und zum anderen – durch Histon-Modifikation – die Chromatin-Relaxation ausgelöst, die die Zugänglichkeit der DNA-Schadensstelle erhöht (RAY CHAUDHURI und NUSSENZWEIG, 2017). Auf molekularer Ebene wird bei dem Prozess der PARYlierung ADP-Ribose von NAD⁺ auf die Seitenkette einer Akzeptor-Aminosäure des entsprechenden Zielproteins transferiert. Das verbrauchte NAD⁺ wird durch die enzymatische Umwandlung von Nicotinamid in NAD⁺ unter Verbrauch von ATP (Adenosintriphosphat) wieder erneuert (ROULEAU et al., 2010).

Nach der PARYlierung am Schadensort muss die Modifikation wieder entfernt werden, um die Schadensstelle für die nachfolgenden Reparaturfaktoren zugänglich zu machen. Dies wird zum einen durch die Auto-PARYlierung reguliert. Dabei bewirkt eine entsprechende negativ geladene PAR-Kettenlänge, dass die PARP1 von der ebenfalls negativ geladenen DNA abdissoziiert. Zum anderen erfolgt eine katalysierte Abbaureaktion durch bestimmte Enzyme, wie der Poly(ADP-Ribose)-Glycohydrolase (PARG). PARG besitzt eine exo- und endoglycohydrolytische Aktivität und kann die glycosidische Bindung zwischen den ADP-

Ribose-Molekülen in der PAR-Kette hydrolysieren und Mono-ADP-Ribose freisetzen (LIU et al., 2017).

2.2.3 FUNKTIONEN DER PARP1 IN DER DNA-SCHADENSANTWORT

Wie bereits erwähnt, führt die PARylierung zur Rekrutierung und Aktivierung weiterer Signalproteine in der DDR. Die Liste der Proteine mit PAR-Bindungsmotiven ist umfangreich und umfasst unter anderem Proteine, die für die Erkennung und Reparatur von Schäden von Bedeutung sind und solche, die in der Zellzykluskontrolle, der Transkription und der Replikation eine Rolle spielen. Da die DDR ein komplexes Netzwerk aus verschiedenen Signalwegen darstellt, hat auch PARP1 durch seine vielfältigen Funktionen auf mehreren Ebenen einen Einfluss auf die DDR (ROULEAU et al., 2010; SWINDALL et al., 2013; DULANEY et al., 2017; RAY CHAUDHURI und NUSSENZWEIG, 2017). Einen Überblick der funktionellen Reichweite von PARP1 in der DDR ist als Netzwerk in Abb. 7 dargestellt. Die dunkelgrünen Verbindungen, die von PARP1 ausgehen, stellen den direkten Einfluss von PARP1 auf die jeweiligen Signalwege dar. Die hellgrünen Verbindungen symbolisieren die Einflüsse der einzelnen Signalwege untereinander. Dadurch entsteht ein komplexes Geflecht, das direkt sowie indirekt durch PARP1 beeinflusst wird. Im Folgenden werden ausgewählte Rollen von PARP1 in der DDR näher erläutert.

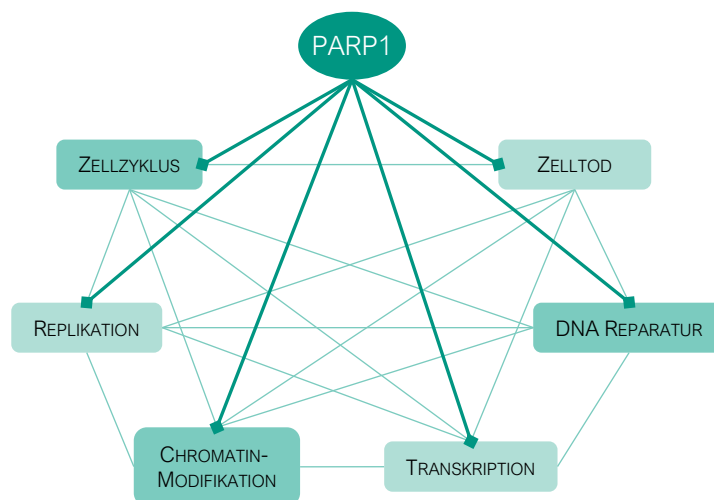


Abb. 7: Einfluss von PARP1 auf die unterschiedlichen Ebenen der DNA-Schadensantwort (DDR). Die DDR ist als Netzwerk aus verschiedenen Signalwegen dargestellt, die sich untereinander beeinflussen. Durch die vielfältigen Funktionen auf mehreren Ebenen, spielt der Einfluss von PARP1 direkt (dunkelgrüne Verbindungslinien) oder indirekt (hellgrüne Verbindungslinien) eine Rolle in der Zellzykluskontrolle, der Replikation, der Chromatin-Modifikation, der Transkription, der DNA-Reparatur und dem Zelltod.

2.2.3.1 CHROMATIN-MODIFIKATION

Histone sind basische Proteine, die mit der DNA interagieren und diese im Zellkern in strukturierte Einheiten organisieren. Die Verbindung zwischen DNA und Histonen wird als Chromatin bezeichnet, wobei die kleinste Einheit des Chromatins das Nukleosom darstellt. Hierbei ist je ein Teil der DNA mit einer Länge von 146 Basenpaaren um ein Kernhiston-Oktamer gewickelt. Die PARylierung der Histone führt zur Chromatin-Relaxation und dem Abbau des Nukleosoms, was wiederum die Zugänglichkeit der DNA für verschiedene zelluläre Prozesse erhöht. Durch diese Eigenschaft hat die PARylierung einen indirekten Einfluss auf alle Mechanismen, die durch die Chromatin-Modifikation bestimmt werden, wie beispielsweise die Transkription verschiedener Reparatur-Gene, die Replikation der DNA und die Begünstigung eines geeigneten Umfelds für die korrekte DNA-Reparatur (JI und TULIN, 2010; KRAUS und HOTTIGER, 2013; RAY CHAUDHURI und NUSSENZWEIG, 2017).

2.2.3.2 SCHADENSSENSOR

PARP1 ist eines der am häufigsten vorkommenden Kernproteine mit geschätzten 1-2 Millionen Molekülen pro Zellkern. Im Durchschnitt scannt ein PARP1-Molekül etwa 10 Nukleosomen des Chromatins nach potenziellen Schäden (LIU et al., 2017).

Abb. 8 zeigt die zeitliche Dynamik der Rekrutierung verschiedener DDR-Proteine an die Schadensstelle, die mit Hilfe der Laser-Mikrobestrahlung ermittelt werden konnte. Die Methode der Laser-Mikrobestrahlung erzeugt in der Zelle sowohl lokale SSBs als auch DSBs und ermöglicht eine Aktivitätsmessung von Proteinen innerhalb weniger Sekunden nach Induktion des Schadens. Dadurch ist es möglich die Dynamik von unterschiedlichen DDR-Proteinen an dem Schaden zu bestimmen (LIU et al., 2017). Dabei konnte gezeigt werden, dass PARP1 sowohl als Sensor für SSBs sowie DSBs fungiert und bereits innerhalb von ~1,6 s an die Schadensstelle ansetzt (HAINCE et al., 2008). PARP1 ist somit erste Instanz der Signalisierung von DNA-Läsionen. Nach Anlagerung an den DNA-Schaden steigt die katalytische Aktivität der Polymerase an und PARP1 bildet durch die PARylierung eine Plattform, um weitere DNA-Reparaturproteine über ihre PAR-Bindungsdomänen zu rekrutieren (LIU et al., 2017).

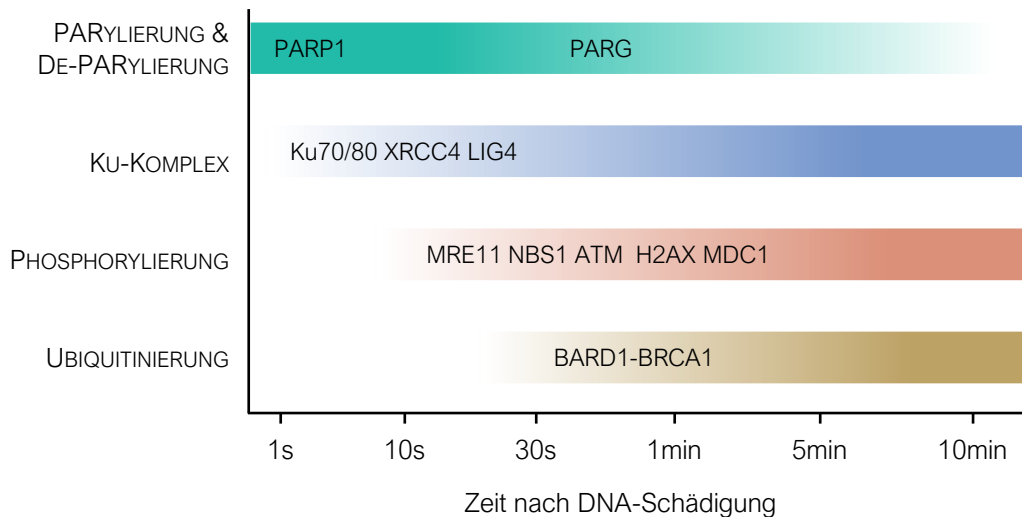


Abb. 8: Zeitliche Dynamik von DDR-Proteinen, die an die Schadensstelle rekrutiert werden (nach Laser-Mikrobestrahlung). Die PARYlierung durch die PARP1 ist eine der ersten Ereignisse am Schadensort, gefolgt von der Aktivierung des Ku-Komplexes und der anschließenden Phosphorylierung und Ubiquitinierung verschiedener Mediator- und Effektor-Proteine (modifiziert nach LIU et al., 2017).

Neben PARP1 lagert sich auch der Ku-Komplex, bestehend aus Ku70 und Ku80, innerhalb weniger Sekunden an die DNA an und bindet an die Schadensstelle. Der Ku-Komplex ist mit etwa 500.000 Molekülen pro Zelle ebenfalls reichlich vorhanden und stellt einen weiteren wichtigen DSB-Sensor dar (LIU et al., 2017). PARP1 und der Ku-Komplex gehören demnach zu den ersten Schadenssensoren. Es wird vermutet, dass PARP1 und der Ku-Komplex konkurrieren und die Wahl des DSB-Reparaturweges durch unterschiedliche Mechanismen vermitteln (WANG et al., 2006). Der Ku-Komplex interagiert mit zahlreichen c-NHEJ-Faktoren, darunter XRCC4 (*X-ray repair cross complementing 4*) und LIG4 (*DNA ligase 4*). Im Gegensatz dazu fördert die Bindung von PARP1 das alt-NHEJ und die HR, worauf näher in Kapitel 2.2.3.3 eingegangen wird (CHIRUVELLA et al., 2013). Daher könnte die Konkurrenz zwischen PARP1 und dem Ku-Komplex an DSBs eine wichtige Rolle bei der Bestimmung des Reparaturweges spielen (LIU et al., 2017).

Etwa 10 s nach der Schadensinduktion kommt es zur Phosphorylierung weiterer Sensoren, *Transducern* und Mediatoren wie MRE11, NBS1, ATM, H2AX und MDC1 (HAINCE et al., 2008). ATM ist die Hauptkinase, die für die Phosphorylierung an H2AX als Reaktion auf die DSB-Induktion verantwortlich ist. Der MRN-Komplex, der ebenfalls als Schadenssensor fungiert, scheint dabei wiederum wichtig für die ATM-Aktivierung zu sein (LIU et al., 2017). Nach Laser-Mikrobestrahlung beträgt die MRN-Rekrutierung ~13 s, was verglichen mit der PARP1-Rekrutierung annähernd zehnmal langsamer ist. Die verzögerte Rekrutierung des MRN-Komplexes lässt vermuten, dass dieser Komplex als sekundärer Sensor für die DSB-

Reparatur dient. NBS1 – als Teil des MRN-Komplexes - erkennt demnach die DNA-Schadens-induzierten PARylierungen und vermittelt daraufhin die Rekrutierung des gesamten MRN-Komplexes (HAINCE et al., 2008).

Etwa 1 min nach Schadensinduktion werden weitere Effektoren, wie der Reparatur-Komplex BRCA1/BARD1 rekrutiert. BARD1 (*BRCA1 Associated RING Domain 1*) erkennt das PAR-Signal und rekrutiert BRCA1 zur Schadensstelle, was wiederum den funktionellen BRCA1/BARD1-Komplex bildet, der eine wichtige Rolle bei der HR spielt (LIU et al., 2017).

2.2.3.3 DNA-REPARATUR

PARP1 interagiert mit verschiedenen DNA-Reparaturproteinen, wobei noch nicht vollständig geklärt ist, inwieweit diese Rollen von PARP1 essenziell für die Reparaturwege sind (RAY CHAUDHURI und NUSSENZWEIG, 2017).

Die Rolle von PARP1 in der Einzelstrangbruchreparatur (SSBR)

Bei den Reparaturmechanismen SSBR und BER werden jeweils SSBs repariert. Die SSBR repariert SSBs, die der SSBR als direkter Schaden vorangehen. Innerhalb der BER werden SSBs repariert, die während der Reparatur der Basenschäden indirekt entstehen. SSBs können außerdem das Resultat von fehlerhaften Aktivitäten zellulärer Enzyme, wie beispielsweise der TOP1, darstellen (RAY CHAUDHURI und NUSSENZWEIG, 2017). Der Ablauf der SSBR und die Rolle von PARP1 sind in Abb. 9 dargestellt.

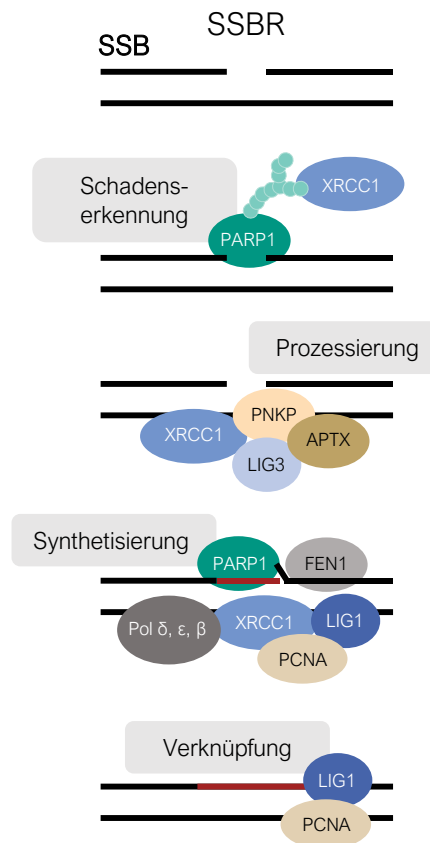


Abb. 9: PARP1 in der Einzelstrangbruchreparatur (SSBR). PARP1 ist für die Erkennung des Schadens und die Rekrutierung von XRCC1 (*X-ray repair cross-complementing protein 1*) zuständig, welches als Gerüst für die Rekrutierung weitere SSBR-Proteine dient, die zur Prozessierung der DNA-Enden, der Synthetisierung und letztendlich zur Ligation der DNA führen (modifiziert nach RAY CHAUDHURI und NUSSENZWEIG, 2017).

In der SSBR ist PARP1 neben der Schadensdetektion auch bei der Rekrutierung von XRCC1 (*X-ray repair cross-complementing protein 1*) beteiligt, das als Gerüst für weitere SSBR-Proteine fungiert (WEI und YU, 2016). Dabei stimuliert XRCC1 die Prozessierung der DNA-Enden, indem es APTX (*aprataxin 1*), LIG3 (*DNA ligase 3*) und PNKP (*polynucleotide kinase 3'-phosphatase*) aktiviert. Nach der Prozessierung der Enden erfolgt die DNA-Synthese, analog zur Sequenz des komplementären Strangs mit Hilfe der DNA-Polymerase (Pol δ , Pol ϵ und Pol β) unter Hilfe von PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) und FEN1 (*flap endonuclease 1*), welches durch PARP1 stimuliert wird. Anschließend werden die Teilstränge durch die LIG1 (*DNA ligase 1*) wieder verknüpft (CALDECOTT, 2008; RAY CHAUDHURI und NUSSENZWEIG, 2017). Die dargestellte Version der SSBR vereinfacht die involvierten Proteine in einen gesamten Prozess. Je nach Art und Ausmaß des Schadens kann die SSBR in eine *short-patch* oder *long-patch* Reparatur unterteilt werden (CALDECOTT, 2008).

Während der BER werden durch die AP-Endonuklease indirekt SSBs erzeugt, die dann durch die in der SSBR beschriebenen Reparaturfaktoren behoben werden. Verschiedene Studien lieferten zwar Hinweise darauf, dass PARP1 eine Rolle in der BER spielt, jedoch konnte bisher durch eine PARP1-Inhibierung keine eindeutige Hypersensitivität gegenüber basenschädigenden Agenzien gezeigt und demnach bisher keine eindeutige Beteiligung der PARP1 in der BER nachgewiesen werden (RAY CHAUDHURI und NUSSENZWEIG, 2017).

Die Rolle von PARP1 in der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER)

Die NER ist für die Reparatur von sperrigen DNA-Läsionen, sogenannten *bulky lesions*, verantwortlich, ihr Ablauf ist in Abb. 10 dargestellt. PARP1 spielt eine Rolle in der GG-NER, die für die Schadensprüfung im gesamten Genom zuständig ist. Im ersten Schritt, der Detektion des Schadens, findet eine Rekrutierung des DDB1/DDB2(*damage-binding protein 1/2*)Komplexes zur auto-PARYlierten PARP1 statt. Nachfolgend wird ALC1 (*chromodomain helicase DNA binding protein 1 like*; CHD1L) rekrutiert, was ebenfalls von PARP1 vermittelt wird (PINES et al., 2012). Dies führt zur Chromatin-Relaxation und -Neuanordnung, was XPC (*xeroderma pigmentosum, complementation group C*) und RAD23B an die Schadensstelle mobilisiert. Die Rekrutierung von XPB (*xeroderma pigmentosum, complementation group B*) und XPD (*xeroderma pigmentosum, complementation group D*) erfolgt anschließend durch die Interaktion von PARP1 mit dem Bindungspartner XPA (*xeroderma pigmentosum, complementation group A*). Nach Verifizierung der Läsion, wird der Schaden mithilfe von ERCC1 (*excision repair cross-complementation group 1*) und XPG entfernt und mittels DNA-Polymerasen (Pol δ , Pol ϵ und Pol β) und LIG1/3 die Lücke geschlossen und die DNA-Stränge wieder verknüpft (RAY CHAUDHURI und NUSSENZWEIG, 2017).

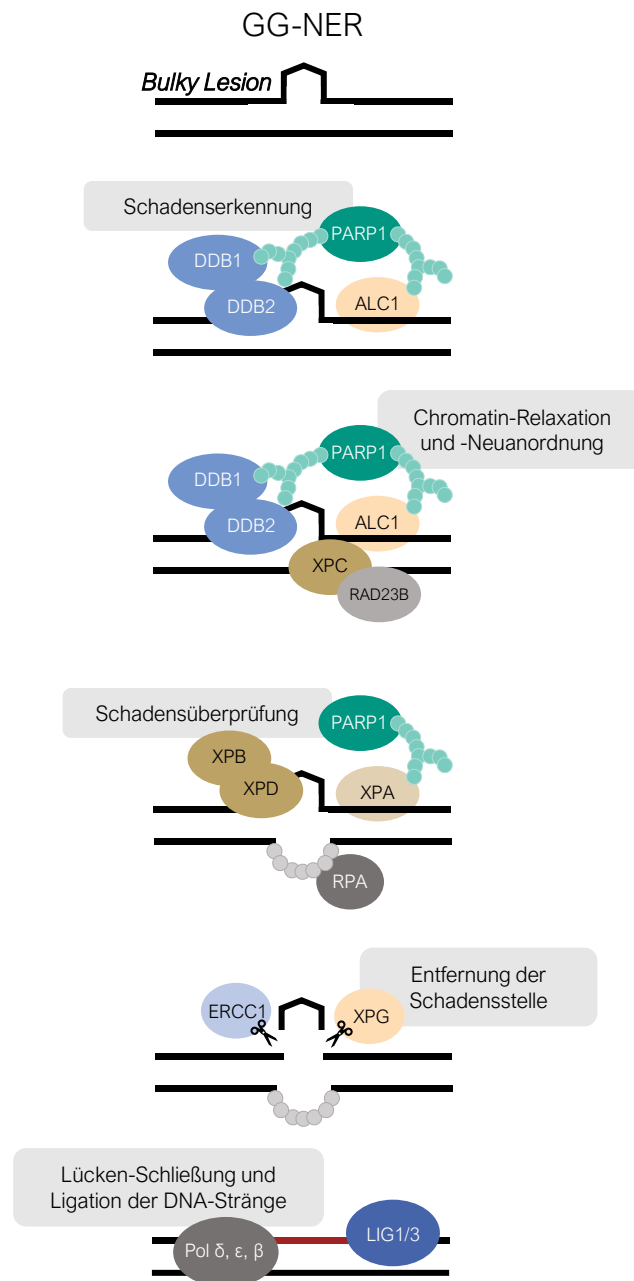


Abb. 10: PARP1 in der *global genome* NER (GG-NER). PARP1 unterstützt die Schadenserkennung, indem der DDB1/DDB2(*damage-binding protein 1/2*)Komplex durch Interaktion mit der auto-PARYlierten PARP1 an die Schadensstelle rekrutiert wird. Dies führt wiederum zur Rekrutierung weiterer Proteine, deren Aktivierung eine Chromatin-Relaxation auslöst. PARP1 vermittelt im weiteren Schritt, durch Interaktion mit XPA (*xeroderma pigmentosum, complementation group A*), die Schadensüberprüfung, bevor der Schaden anschließend entfernt und die Stränge nach Lücken-Schließung wieder ligiert werden (modifiziert nach RAY CHAUDHURI und NUSSENZWEIG, 2017).

Die Rolle von PARP1 in der Doppelstrangbruchreparatur (DSBR)

Wie schon im vorherigen Kapitel erwähnt, fungiert PARP1 auch als Schadenssensor für DSBs und ist dem MRN-Komplex sowie ATM in der Signalkaskade voran geschaltet. Es

konnte bisher gezeigt werden, dass PARP1 sowohl in der HR sowie in den *end-joining*-Reparaturen eine Rolle spielt (RAY CHAUDHURI und NUSSENZWEIG, 2017). Die Rolle von PARP1 in den drei verschiedenen Reparaturwegen sind in Abb. 11 dargestellt.

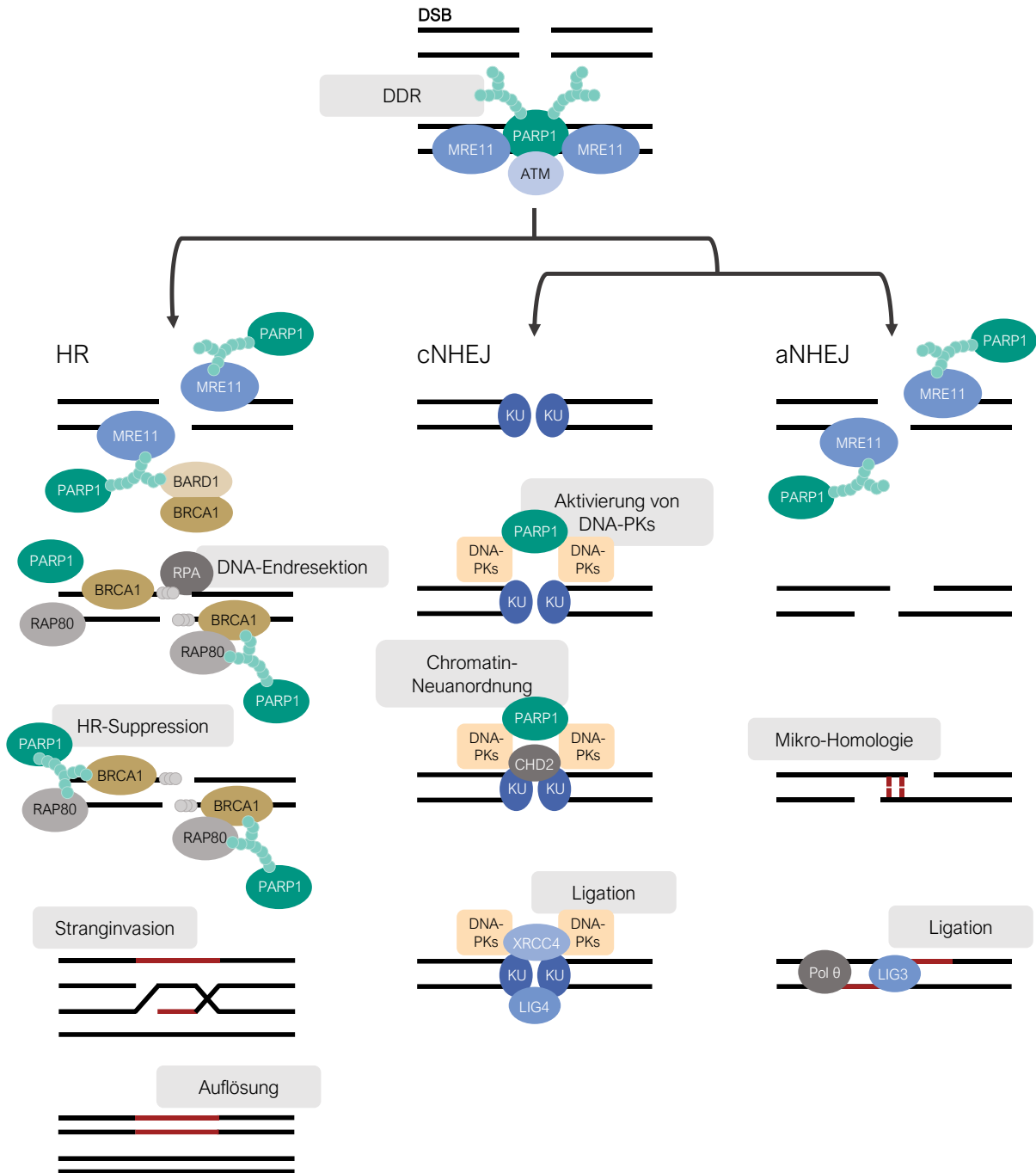


Abb. 11: PARP1 in der Doppelstrangbruchreparatur (DSBR). Neben seiner Rolle als Schadenssensor von DSBs hat PARP1 auch weitere Funktionen in der DSBR, indem es mit einer Vielzahl von Proteinen interagiert. In der HR unterstützt PARP1 die DNA-Endresektion sowie deren Suppression. Bei dem c-NHEJ ist PARP1 bei der Aktivierung der DNA-PKs involviert und fördert die Chromatin-Neuanordnung. Bei Abwesenheit des c-NHEJ findet das alt-NHEJ statt, bei dem PARP1 die Rekrutierung von MRE11 erleichtert (modifiziert nach RAY CHAUDHURI und NUSSENZWEIG, 2017).

In der HR interagiert PARP1 neben MRE11 - als Teil des MRN-Komplexes - auch mit dem BRCA1/BARD1 Komplex und spielt dabei eine Rolle bei der DNA-Endresektion. Für die Rekrutierung von BRCA1 wird die Bildung eines Heterodimers, das aus PAR und dem PAR-bindenden Protein BARD1 zusammengesetzt ist, an die Stelle des DNA-Schadens rekrutiert (DULANEY et al., 2017). PARP1 wird anschließend ebenfalls zur Unterdrückung der HR benötigt, indem die PARylierung von BRCA1 und RAP80 (*receptor-associated protein 80*) die Resektion der DNA begrenzt. Dies führt zu einer anschließenden Stranginvasion in den homologen Teilstrang (Schwesterchromatid). Abschließend erfolgt die DNA-Synthese und -Ligation, was zur Reparatur des DSBs führt (RAY CHAUDHURI und NUSSENZWEIG, 2017).

PARP1 soll auch im c-NHEJ eine Rolle spielen, indem es mit der katalytischen Untereinheit der DNA-PKs oder dem Ku-Heterodimer interagiert (RAY CHAUDHURI und NUSSENZWEIG, 2017). Außerdem ist PARP1 am Chromatin-Umbau beteiligt, indem es die Rekrutierung von CHD2 (*chromodomain helicase DNA binding protein 2*) erleichtert, was daraufhin zur Aktivierung von XRCC4 und LIG4 führt und schlussendlich zur DNA-Ligation beiträgt (MARTIN-HERNANDEZ et al., 2017).

PARP1 konkurriert mit dem Ku-Komplex um den Zugang zu den DNA-Enden. In Abwesenheit des Ku-Komplexes vermittelt die PARP1-Bindung an den DSB-Stellen die Reparatur über den alt-NHEJ-Weg. Bei diesem Reparaturweg werden häufig Mikro-Homologien verwendet (CHIRUVELLA et al., 2013). Das alt-NHEJ erfordert die Verarbeitung der DNA-Enden durch MRE11, welches wiederum von PARP1 rekrutiert wird. Die prozessierten Enden werden dann durch Sequenzmikrohomologie zusammengefügt und die Lücke mit Hilfe der DNA-Polymerase θ (Pol θ) gefüllt und durch die LIG3 ligiert (WOOD und DOUBLIÉ, 2016; RAY CHAUDHURI und NUSSENZWEIG, 2017).

2.2.3.4 P53 UND ZELLZYKLUS

Sowohl PARP1 als auch p53 spielen eine wesentliche Rolle bei der Reaktion auf DNA-Schäden. Während PARP1 für einen der ersten Schritte in der Erkennung von DNA-Schäden und für die Rekrutierung weiterer DNA-Schadensreaktionsfaktoren verantwortlich ist, fungiert p53 als Transkriptionsfaktor für Gene, die beispielsweise an der Kontrolle des Zellzyklus und der Apoptose beteiligt sind, und übernimmt damit je nach Ausmaß des Schadens die Rolle eines Entscheidungsträgers.

Bisher deuten mehrere Studien darauf hin, dass PARP1 an der Induktion, Stabilisierung und/oder Aktivität von p53 nach IR beteiligt ist (AGARWAL et al., 1997; BOUCHARD et al.,

2003; WIELER et al., 2003; NOZAKI und MASUTANI, 2018). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass p53 ein Substrat für die PARylierung darstellt. Die Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen kann sowohl über kovalente als auch nicht-kovalente Wechselwirkung erfolgen. Bei der kovalenten Wechselwirkung agiert p53 als Akzeptorprotein für die PARylierung. Daneben kann p53 mit auto-PARylierter PARP1 auch durch nicht-kovalente Wechselwirkungen interagieren (FISCHBACH et al., 2018). Die PARylierung könnte somit Auswirkungen auf die Aktivität von p53 haben, beispielsweise auf Proteininteraktionen sowie auf die Transkription verschiedener *downstream* Gene.

Dennoch sind die publizierten Ergebnisse bezüglich der Rolle von PARP1 auf die transkriptionelle Aktivität von p53 nach IR immer noch widersprüchlich und auf wenige *downstream* Faktoren von p53 beschränkt. So führte in verschiedenen humanen und murinen Zelllinien ein PARP1-Mangel (entweder durch Hemmung oder Deletion) zu einer verminderten Induktion spezifischer p53-abhängigen Faktoren wie *CDKN1A* und *MDM2* auf Transkript- und Proteinebene, die durch p53 transkriptionell aktiviert werden (VALENZUELA et al., 2002; WIELER et al., 2003; NOZAKI und MASUTANI, 2018). Im Gegensatz dazu war bei *PARP1*^{-/-} Mäusen (SURESH KUMAR et al., 2018) und Thymozyten von *PARP1*^{-/-} Mäusen (BENEKE et al., 2000) das Fehlen von PARP1 mit einer verstärkten Induktion von *MDM2* und *CDKN1A* und dementsprechend höheren p53-Aktivität assoziiert.

Als weiterer Punkt der PARP1-Beteiligung auf das Zellzyklusgeschehen wurde postuliert, dass die PARP1-Aktivierung vor der ATM-abhängigen Phosphorylierung innerhalb der ersten Reaktion auf den DNA-Schaden stattfindet. Dies wurde bereits in 2.2.3.2 angesprochen (LIU et al., 2017). Dabei konnte gezeigt werden, dass PARP1 die ATM-abhängige Phosphorylierung weiterer Signalproteine wie p53 und H2AX begünstigt. Dies geschieht sowohl durch die PARylierung von ATM als auch durch physikalische Interaktion, was darauf hindeutet, dass PARP1 für die ATM-Kinaseaktivität entscheidend ist (AGUILAR-QUESADA et al., 2007; HAINCE et al., 2007).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es bisher verschiedene postulierte Wege der DNA-Schadensantwort nach IR gibt, aber die Beteiligung von PARP1 am gesamten Signalweg noch nicht vollständig aufgeklärt ist.

2.2.3.5 ZELLTOD

Abhängig von dem Ausmaß des Schadens, kann die Zelle verschiedene Zelltodwege aktivieren. PARP1 soll an der Regulierung unterschiedlicher Zelltodmechanismen beteiligt sein, wobei sowohl die unterschiedlichen Vorgänge selbst als auch der Einfluss von PARP1 auf den Zelltod noch nicht vollständig aufgeklärt sind. PARP1 wurde bisher eine Rolle bei der Apoptose sowie bei verschiedenen Formen der Nekrose und der Autophagie zugesprochen (BÜRKLE und VIRÁG, 2013; AREDIA und SCOVASSI, 2014).

Die Apoptose stellt eine programmierte und streng regulierte Form des Zelltods dar. Sie kann über Zell-interne (intrinsischer Signalweg) sowie -externe (extrinsischer Signalweg) Signale ausgelöst werden, die jeweils zur Induktion verschiedener Caspasen führen. Der Apoptoseprozess ist dabei gekennzeichnet durch die Chromatinkondensation, die DNA-Fragmentierung und die Bildung apoptotischer Körperchen, die letztendlich kontrolliert abgebaut werden. Ein essenzieller Unterschied im Vergleich mit anderen Zelltodmechanismen ist, dass der Vorgang Energie-abhängig verläuft. Da NAD⁺ und ATP während der PARylierung verbraucht werden, führt eine erhöhte PARP1-Aktivität gleichzeitig zu einer Depletion von ATP, was den Energiehaushalt der Zelle beeinträchtigt. Dies kann zur Nekrose führen, was mit einer Entzündungsreaktion einhergeht. Um diesem Vorgang entgegenzuwirken, wird PARP1 durch Caspasen in zwei Fragmente (24 und 86 kDa) gespalten und somit inaktiviert (CHIARUGI und MOSKOWITZ, 2002; AREDIA und SCOVASSI, 2014). Obwohl die katalytische Aktivität verloren geht, behält das N-terminale Fragment (24 kDa) eine starke DNA-Bindungsaktivität und hemmt dadurch die katalytische Aktivität von noch ungespaltener PARP1, was wiederum den Apoptosevorgang unterstützt, da die PARylierung gehemmt und der ATP-Verbrauch eingeschränkt wird (D'AMOURS et al., 2001; BOUCHARD et al., 2003).

Ein Zelltodmechanismus, der direkt über PARP1 reguliert wird, ist der sogenannte Parthanatos (Neologismus aus *PAR* und *thanatos*, griech. für Tod), welcher als PARP1-induzierte, programmierte Nekrose beschrieben wird (PROKHOROVA et al., 2020). In den letzten zwei Jahrzehnten konnte festgestellt werden, dass eine ausgeprägte PAR-Akkumulation, als Resultat der verstärkten PARP1-Aktivität aufgrund von immensen DNA-Schäden, die Freisetzung von dem *apoptosis inducing factor* AIF auslöst (HONG et al., 2006). Diese PAR-Akkumulation führt wohl zu einem Austreten von PAR aus dem Zellkern in das Zytoplasma, was wiederum die Freisetzung von dem in den Mitochondrien lokalisierten AIF stimuliert. AIF wandert daraufhin in den Zellkern führt anschließend über die Aktivierung

weiterer Effektoren zur Fragmentierung der DNA. Zudem geht die Hyperaktivierung von PARP1 mit einer ATP-Depletion und dem Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials einher, was, wie bereits erwähnt, den nekrotischen Zelltod begünstigt. Allerdings ist der molekulare Mechanismus dieses Zelltodvorgangs noch nicht vollständig verstanden. Fraglich ist beispielsweise noch, wie PAR vom Zellkern in das Zytoplasma übergeht. Vermutet wird, dass PARG hierfür verantwortlich sein könnte, indem die PAR-Kette hydrolysiert und die einzelnen Mono-ADP-Ribose-Moleküle freisetzt (WANG et al., 2019; PROKHOROVA et al., 2020).

Daneben wird PARP1 auch eine Rolle bei weiteren nekrotischen Wegen, wie der Nekroptose, zugesprochen und soll ebenfalls in die Autophagie involviert sein (ARELIA und SCOVASSI, 2014).

2.3 GENOME EDITING-SYSTEM CRISPR/CAS9

Genome Editing bezeichnet die Methode das Genom zielgerichtet zu modifizieren. Dabei kann es sich beispielsweise um das Ausschalten von bestimmten Genen handeln, einem sogenannten *Knockout*, oder um das Einbringen beziehungsweise Austauschen von neuem Genmaterial in das Zielgenom, einem *Knockin*. Das Anwendungsspektrum für Genmodifizierungen reicht von der Grundlagenforschung über den Einsatz in der Landwirtschaft bis hin zur Gentherapie. In den letzten Jahren wurden im *Genome Editing* laufend Fortschritte erzielt. Zum einen konnte die Technologie präzisiert werden, um ungewollte Änderungen im Genom zu minimieren, zum anderen konnte die Handhabung vereinfacht werden, wodurch sich die Einsatzmöglichkeiten erweitert haben.

Es haben sich im Laufe der letzten Jahrzehnte unterschiedliche Systeme des *Genome Editing* etabliert. Dazu gehören die ZFNs (*zinc-finger nucleases*), die TALENs (*transcription activator-like effector nucleases*) und das CRISPR/Cas9-System, als das jüngste der drei Systeme. Alle drei Technologien basieren jeweils auf zwei Kernfunktionen, die das *Genome Editing* möglich machen: Zum einen die Erkennung der genomischen Zielsequenz, die editiert werden soll, und zum anderen das Erzeugen eines zielgerichteten DSBs in der DNA, durch dessen fehlerbehaftete Reparatur es schließlich zu einem Informationsverlust kommt. Die beiden Methoden ZFN und TALEN haben gemeinsam, dass die zwei Kernfunktionen des Systems Protein-basiert sind. Beide Methoden beruhen auf einem einzigen Protein, welches sowohl die Zielerkennung als auch den DNA-Schnitt übernimmt. Im Gegensatz dazu besteht das CRISPR/Cas9-System aus einer Nuklease, die den DSB induziert, und einer spezifischen RNA, die mittels Watson-Crick-Basenpaarung an die Ziel-DNA bindet und das System somit zur gewählten Genomsequenz leitet (RAN et al., 2013; DOUDNA und CHARPENTIER, 2014).

2.3.1 STRUKTUR, SYSTEM UND HERKUNFT

Das CRISPR/Cas-System ist ursprünglich ein bakterieller Abwehrmechanismus gegenüber Viren. Das Akronym CRISPR steht hierbei für *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (dt.: regelmäßige sich abwechselnde kurze palindromische Wiederholungen). Das System ist schematisch in Abb. 12a dargestellt. Die CRISPR-Abschnitte befinden sich im bakteriellen Genom und bestehen aus sich wiederholenden Abschnitten, sogenannten *Repeats*, die sich mit den *Spacer*-Abschnitten abwechseln. Zuerst entdeckt wurde diese CRISPR Abfolge in Prokaryoten 1987 (ISHINO et al., 1987). Erst Jahre später wurde festgestellt, dass es sich bei den *Spacern* um Teile externer DNA handelt (MOJICA et al., 2000; MAKAROVA et al., 2002; BOLOTIN et al., 2005;

POURCEL et al., 2005) und dass das CRISPR/Cas-System als bakterieller Abwehrmechanismus gegen Viren fungiert (BARRANGOU et al., 2007). Das CRISPR-System agiert als eine Art Immunsystem-Äquivalent, indem es die Information der viralen DNA aus vergangenen Angriffen speichert. Bei einer viralen Infektion, genauer durch Bakteriophagen, werden Abschnitte der viralen DNA an einen dafür vorgesehenen Platz im eigenen Genom (*Spacer*) eingebaut. Im Laufe der Zeit ergibt sich so eine Informationsbibliothek aller vorangegangenen viralen Angriffe und dient der Abwehr erneuter Angriffe (DOUDNA und CHARPENTIER, 2014). Neben den CRISPR-Abschnitten im prokaryotischen Genom befinden sich „CRISPR-assoziierte Gen-Abschnitte“, die sogenannten *Cas*-Gene, welche für die entsprechenden *Cas* Proteine codieren, wie unter anderem das *Cas9* (*S. pyogenes*-System), eine Endonuklease, die beim *Genome Editing* Einsatz findet. Den *Cas*-Genen vorangehend, ist die Information der *tracrRNA* gespeichert. Sie dient später im System als Bindeglied zwischen dem *Cas* Protein und der Leitsequenz, der *crRNA* (LA FUENTE-NÚÑEZ und LU, 2017).

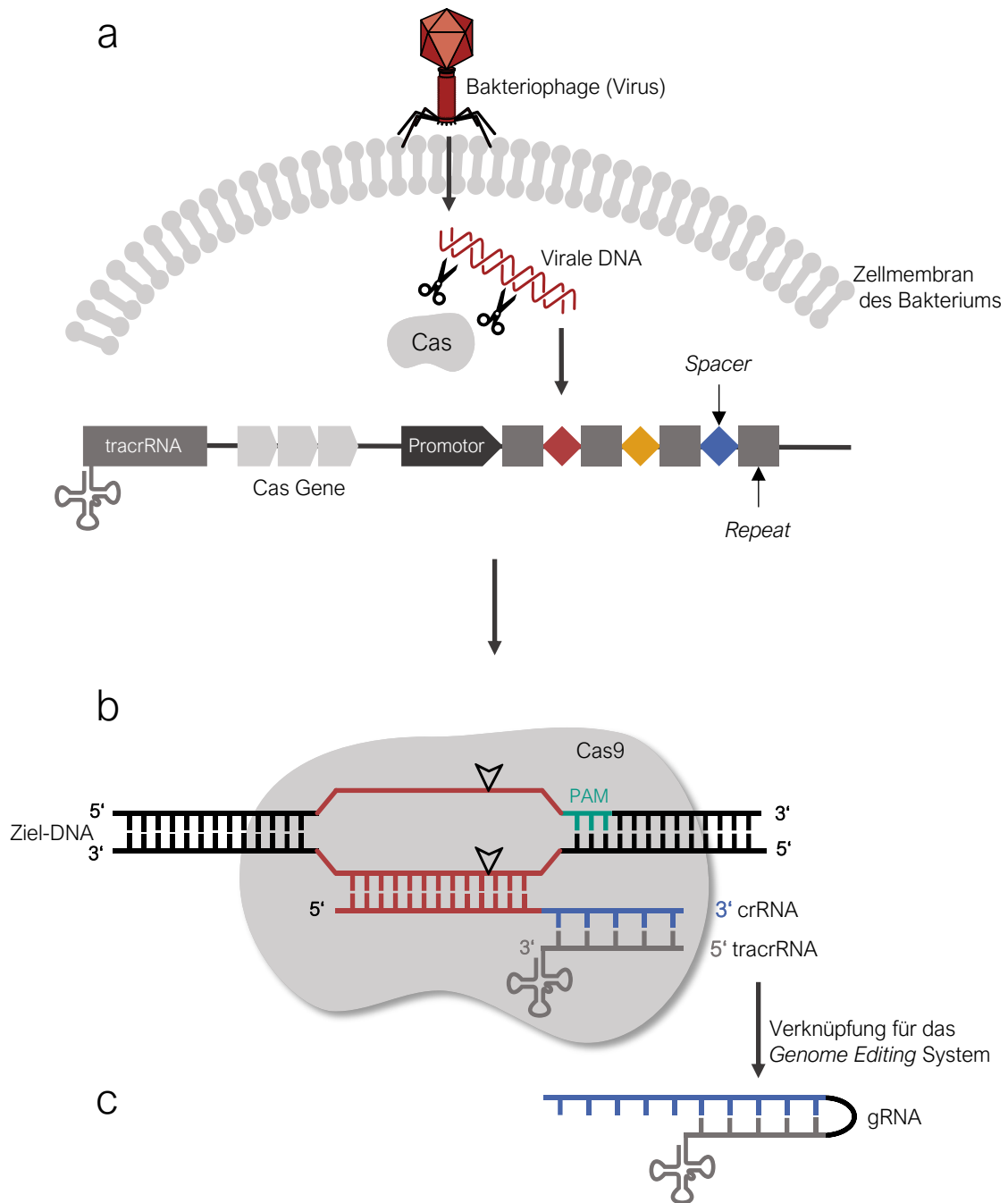


Abb. 12: Das CRISPR/Cas9-System. (a) CRISPR/Cas ist ein bakterieller Abwehrmechanismus gegenüber viraler DNA, bei dem Teile viraler DNA im eigenen Genom als *Spacer* gespeichert werden, die sich mit *Repeats* abwechseln. Der CRISPR-Region vorangehend, ist die Geninformation der Cas-Gene und der tracrRNA gespeichert, welche später als Bindeglied zwischen dem Cas-Protein und der crRNA fungiert. (b) Bei einem erneuten Angriff wird das Cas9-Protein (*S.pyogenes*) gebildet und die passende RNA-Sequenz übersetzt, die aus einer crRNA und einer tracrRNA besteht und komplementär zum Zielstrang ausgerichtet ist. Das System induziert dadurch einen Doppelstrangbruch drei Basenpaare vor der PAM(*protospacer adjacent motif*)-Sequenz in der viralen DNA und wehrt so den Angriff ab. (c) Als *Genome Editing Tool* funktioniert das System analog, jedoch wurden zur Vereinfachung die beiden RNA Komponenten zu einer variablen gRNA zusammengefasst (modifiziert nach LA FUENTE-NÚÑEZ und LU, 2017).

2.3.2 FUNKTION UND ANWENDUNG

Die Funktionsweise des CRISPR/Cas9-Systems ist in Abb. 12b dargestellt. Im Zuge eines erneuten Angriffs bildet die Bakterienzelle das Cas-Protein (*S.pyogenes* - Cas9), transkribiert die passende crRNA und eine tracrRNA, die dazu dient beide Komponenten zu einem System zusammenzuführen. Durch die crRNA, die komplementär zur Ziel-DNA des Virus ausgerichtet ist, findet das System die entsprechende Sequenz und die Cas9-Endonuklease zerschneidet die virale DNA, was die Virus-Infektion abwehrt (DOUDNA und CHARPENTIER, 2014). Voraussetzung dafür ist außerdem die sogenannte PAM(*protospacer adjacent motif*)-Sequenz, die direkt am 3' Ende an die Zielsequenz der DNA anschließen muss, da dies das Erkennungsmerkmal für das jeweilige Cas-Proteins darstellt (RAN et al., 2013).

In der Anwendung als *Genome Editing-Tool* wurde das System so angepasst, dass eine chimärische RNA aus crRNA und tracrRNA synthetisiert wurde, die als *single guide* RNA oder *guide* RNA (sgRNA oder gRNA) bezeichnet wird. Diese gRNA kann spezifisch zur Zielsequenz des Genoms verändert werden, um eine zielgerichtete Modifikation zu ermöglichen. Das System funktioniert hierbei analog zum bakteriellen Abwehrmechanismus. Die verwendete gRNA besteht aus einer 20-nt (Nukleotid) langen, variablen Sequenz und einem nicht variablen Teil, die der tracrRNA gleicht und zur Verankerung an das Cas9 dient. Die gRNA paart sich mit der Zielsequenz der zu modifizierenden DNA. Ist das Ziel ein *Knockout* des Gens zu generieren, vermittelt Cas9 drei Basenpaare entfernt vom PAM-Motiv einen DSB. Wie bereits in 2.1.2.2 beschrieben, können DSBs auf zwei unterschiedliche Arten repariert werden. Wesentlich häufiger werden DSBs über das NHEJ repariert, da diese Art der Reparatur unabhängig vom Zellzyklus ausgeführt werden kann. Das fehleranfällige NHEJ führt dabei zu Insertionen oder Deletionen, die zur Verschiebung des Leserasters bei der Transkription führen können. So entstehen verfrühte Stopp-Codons, die die Transkription des Gens unterbrechen. Durch diese CRISPR/Cas9-vermittelte gezielt fehlerhafte Reparatur kommt es letztendlich zu einem Funktionsverlust des Zielgens (RAN et al., 2013; LA FUENTE-NÚÑEZ und LU, 2017).

CRISPR/Cas9 ist in den vergangenen Jahren zu einem immer wichtiger werdenden Werkzeug des *Genome Editing* geworden. 2012 wurde die Entdeckung des CRISPR/Cas9-Systems und sein Nutzen als *Genome Editing*-Werkzeug publiziert. Die Umsetzung erwies sich als weitaus spezifischer, effizienter und einfacher als die bisherigen Methoden (JINEK et al., 2012). Der erste Einsatz in Humanzellen erfolgte 2013 (JINEK et al., 2013; LE CONG et al., 2013; MALI et al., 2013). Seitdem wurde CRISPR/Cas9 in vielen Bereichen eingesetzt,

verbessert und weiterentwickelt. Durch Modifikationen an verschiedenen Cas-Enzymen kann dieses System mittlerweile, neben dem Schneiden der DNA, auch für andere Varianten zur Beeinflussung der Genaktivitäten eingesetzt werden, wie der Aktivierung, Unterdrückung und Regulierung spezifischer Gene oder als Methode für epigenetische Modifikationen (Hsu et al., 2014).

Durch die simple Handhabung des CRISPR/Cas9-Systems und die Möglichkeit der Generierung gezielter *Knockouts*, kann das System auch eingesetzt werden, um den Einfluss spezifischer Proteine in ausgewählten Signalwegen, wie der DDR, aufzuklären. Da die DDR als komplexes Netzwerk verschiedene Signalwege miteinander vereint und viele Proteine multifunktionale Rollen in der DDR einnehmen, ist die Analyse der Signalwege nicht trivial. Durch Ausschalten einzelner Gene können gezielt die Einflüsse dieser *Knockouts* im Gesamtsystem beobachtet und auf verschiedenen Ebenen untersucht werden.

3 FRAGESTELLUNG

Die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität, also die Integrität des Erbguts und die fehlerfreie Weitergabe der Information an die nachfolgenden Generationen, ist essenziell für das Überleben eines Organismus. Die DNA ist täglich immensen Schäden ausgesetzt, die entweder durch natürliche, zelluläre Prozesse entstehen oder auch durch Exposition äußerer Faktoren, wie Strahlung oder toxischen Substanzen hervorgerufen werden können. Das umfangreiche System der DDR sorgt dafür, dass die entstanden Läsionen entweder repariert oder durch einen programmierten Zelltod nicht an die Tochterzellen weitergegeben werden. So wird die Anzahl an Mutationen im Genom begrenzt, die letztendlich die genomische Stabilität bedrohen können.

Das System der DDR ist aufgrund seiner Vielschichtigkeit sehr komplex und bis heute nur in Teilen aufgeklärt. Es fungiert als interagierendes Netzwerk aus mehreren Signalwegen, wie beispielsweise der Chromatin-Modifikation, der DNA-Reparatur, der Zellzykluskontrolle und der Apoptose, die gemeinsam zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität beitragen. Den ersten Schritt der DDR stellt die Schadenserkennung dar. Hierbei sind, je nach Art des Schadens, verschiedene Proteine beteiligt. Ein wichtiges Protein stellt hierbei PARP1 dar. PARP1 wurde bekannt als Schlüssel-Protein der SSBR, wobei sich in den letzten Jahren zeigte, dass es ebenso an der Erkennung und Reparatur anderer Schäden beteiligt ist und zudem eine weitreichende Rolle in der gesamten DDR spielt. Dies könnte unter anderem mit der Interaktion von PARP1 mit p53 zusammenhängen, welches eine zentrale Rolle als Entscheidungsträger in der DDR einnimmt. Es wurde gezeigt, dass PARP1 Einfluss auf die Induktion, Stabilisierung sowie Aktivität von p53 haben kann, indem p53 kovalent sowie nicht-kovalent mit PAR-Einheiten interagiert (FISCHBACH et al., 2018), und eine Rolle in der p53-abhängigen Schadensantwort nach IR induzierten Schäden zu spielen scheint. (AGARWAL et al., 1997; VALENZUELA et al., 2002; WIELER et al., 2003; NOZAKI und MASUTANI, 2018; SURESH KUMAR et al., 2018). IR induziert die Aktivität von ATM, welches wiederum p53 phosphoryliert und dadurch aktiviert (CANMAN et al., 1998). PARP1 trägt sowohl durch PARylierung von ATM als auch durch physikalische Interaktion zur ATM-Aktivität bei, was die Phosphorylierung von Signalproteinen wie p53 begünstigt (AGUILAR-QUESADA et al., 2007; HAINCE et al., 2007). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bisher gezeigt wurde, dass PARP1 mit verschiedenen wichtigen Signalproteine der DDR interagiert, jedoch noch nicht geklärt ist, ob die Interaktionen von entscheidender Bedeutung für die Schadensantwort sind und wie weitreichend die PARP1-abhängige Antwort ist.

Um die Beteiligung von PARP1 in der DDR besser aufzuklären, soll im Rahmen dieser Arbeit mittels CRISPR/Cas9 das *PARP1* Gen in U2OS-Zellen ausgeknockt und die Auswirkungen auf verschiedenen zellulären Ebenen bestimmt werden. Zu Beginn soll das CRISPR/Cas9-System im Arbeitskreis etabliert und anschließend die generierte *Knockout*-Zelllinie mit dem Wildtyp-Modell verglichen werden, um potenzielle Änderungen auf basaler Ebene festzustellen. Hierfür werden sowohl die Wachstumseigenschaften als auch die Koloniebildungsfähigkeit analysiert und die Zellzyklusverteilungen der Zelllinien verglichen. Außerdem wird die *High-Throughput* RT-qPCR genutzt, um den Einfluss des PARP1-Defizites auf transkriptioneller Ebene zu analysieren.

Da PARP1 an der Detektion und Reparatur verschiedener Läsionen beteiligt ist, wird die weitere Analyse unter Einbeziehung verschiedener Schadensarten durchgeführt, um Unterschiede der DDR zwischen dem KO- und dem WT-Modell festzustellen. Dazu sollen Genexpressionsprofile nach Behandlung mit H₂O₂ sowie UV-C Strahlung und IR erstellt und die Profile beider Zelltypen miteinander verglichen werden. Ein Fokus wird hierbei vor allem auf die p53-vermittelte Schadensantwort nach IR gelegt. Die Ergebnisse sollen Aufschluss über potenzielle PARP1-abhängige Änderungen in der transkriptionellen Regulation geben und mögliche Unterschiede zwischen den Schadensarten aufzeigen. Da die Zellzyklusregulation einen wichtigen Bestandteil der Schadensantwort darstellt, wird die zeitabhängige Zellzyklusphasenverteilung nach IR in beiden Zelllinien miteinander verglichen und verschiedene Regulatorproteine mit und ohne Bestrahlung auf Proteinlevel mittels Western Blot analysiert. Weiterhin wird analysiert, inwieweit der *Knockout* einen Einfluss auf unterschiedliche Phosphorylierungsaktivitäten hat. Dafür wird mittels Immunofluoreszenz die Phosphorylierung von unterschiedlichen Schadenserkennungs- und Signalproteinen überprüft.

Die Ergebnisse sollen dazu beitragen, den Einfluss von PARP1 in der DDR besser einordnen und die Signalwege, vor allem in der Schadensantwort nach IR, besser verstehen zu können.

4 MATERIAL UND METHODEN

Eine Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Lösungen und Geräte befindet sich in Anhang 8.2. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle nachfolgenden Versuche jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt.

4.1 ZELLKULTUR

4.1.1 ZELLINIEN

Für alle durchgeführten Versuche wurde die U2OS Zelllinie (ATCC HTB-96) verwendet. Dabei handelt es sich um eine Osteosarkom Zelllinie, die in der Zellkultur adhärent als *Monolayer* wächst. Die Zellen stammen ursprünglich aus einer Gewebeprobe eines mäßig differenzierten Sarkoms des Schienbeins eines 15-jährigen kaukasischen Mädchens (PONTÉN und SAKSELA, 1967). Die Zellen besitzen die Wildtyp Version des *p53* Gens (DILLER et al., 1990).

Die Echtheit der Zelllinie wurde zu Beginn der Laborarbeiten unabhängig durch das Institut für Forensische Genetik (IFG) in Münster verifiziert. Die in unserem Labor generierte *PARP1-Knockout* Zelllinie „K3F11“ basiert ebenfalls auf der U2OS Zelllinie. Im Folgenden werden zur einfacheren Unterscheidung die U2OS *PARP1*-Wildtyp Zellen als „U2OS“ oder „WT“ und die U2OS *PARP1-Knockout* als „K3F11“ beziehungsweise „KO“ bezeichnet.

4.1.2 KULTIVIERUNGSBEDINGUNGEN DER ZELLEN

Die Kultivierung beider Zelllinien erfolgte im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit. Die Zellen wurden in dem Zellkulturmedium *dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM), mit Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 100 U/mL Penicillin sowie 100 µg/mL Streptomycin, kultiviert.

Die Zellen wurden zwei Mal pro Woche im Verhältnis 1/5 (U2OS) und 1/4 (K3F11) in 100 mm Zellkulturschalen subkultiviert, um eine Konfluenz zu vermeiden. Im Rahmen des Subkultivierens wurde das verbrauchte Medium entfernt und der Zellrasen mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) gewaschen. Danach wurden die Zellen mit einer 0,25 %igen Trypsinlösung bei 37°C im Brutschrank für 3 min inkubiert und anschließend von der Oberfläche abgelöst. Trypsin ist eine Serinprotease und katalysiert die hydrolytische

Spaltung von Proteinen und Peptiden der extrazellulären Matrix, wodurch sich der Zellverband auflöst. Die abgelösten Zellen wurden in frisches Medium aufgenommen, vereinzelt und entsprechend des Subkultivungsverhältnisses in neue Zellkulturschalen aufgeteilt und weiter kultiviert.

4.1.3 KRYOKONSERVIERUNG UND INKULTURNAHME DER ZELLEN

Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen kryokonserviert. Dazu wurde das Medium entfernt, die Zellen wie bereits beschrieben mit PBS gewaschen und trypsiniert. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4°C und 1400 rpm für 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 1 mL Einfrierlösung (FKS mit 10 % DMSO) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein Kryoröhrchen (Einfrierampulle) überführt. Für das stufenweise Einfrieren wurden die Zellen zunächst über Nacht bei -80 °C aufbewahrt und dann bis auf weiteres in Flüssigstickstoff gelagert, um letztendlich auf -196 °C abzukühlen.

Zur Inkulturnahme wurde die Zellsuspension in dem Kryoröhrchen im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und die 1 mL-Suspension in eine Zellkulturschale mit 9 mL vorgelegtem Medium überführt. Nach 4-5 h erfolgte ein Medienwechsel, um das toxische DMSO zu entfernen. Je nach Konfluenz wurden die Zellen 24 h – 48 h nach Inkulturnahme subkultiviert.

4.2 GENERIERUNG EINER *PARP1*-KNOCKOUT ZELLINIE

Zur Erzeugung der *PARP1* KO-Zelllinie wurde das *Genome Editing*-System CRISPR/Cas9 eingesetzt. Die Auswahl der gRNA für das System wurde mit Hilfe der webbasierten Software *Benchling* durchgeführt. Die ausgewählte gRNA entsprach der Sequenz TTCTAGTCGCCCATGTTTTTGA und als Vektor wurde das Plasmid pSpCas9(BB)-2APuro (PX459) V2.0 (Addgene #62988) mit einem Puromycin-Resistenzgen verwendet (RAN et al., 2013). Das Gesamtkonstrukt aus Plasmidvektor und klonierter gRNA wurde von *GenScript* erworben. Der Aufbau des Plasmids ist in 5.1.3 genauer beschrieben (Abb. 21). Die Plasmid-DNA (4 µg) lag lyophilisiert vor und wurde daher nach Zentrifugation bei 6000 rcf für 1 min und 4 °C in 50 µL TE-Puffer gelöst, bevor sie verwendet werden konnte. Anschließend wurde das Plasmid wie folgt amplifiziert und aufgereinigt, bevor es für die eigentliche Transfektion verwendet wurde.

4.2.1 PLASMIDAUFARBEITUNG

Zur Erhöhung der Transfektionseffizienz wurde die Plasmid-DNA in Bakterienzellen transformiert, dadurch repliziert und anschließend isoliert und aufgereinigt. Zur Vervielfältigung und Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde das Plasmid in den kompetenten *Escherichia coli* (*E.coli*) DH5 α -Stamm transformiert. Zur Selektion wurde Ampicillin verwendet. Die Präparation des Plasmids erfolgte in drei Schritten, die in Abb. 13 dargestellt sind und im Folgenden näher erläutert werden.

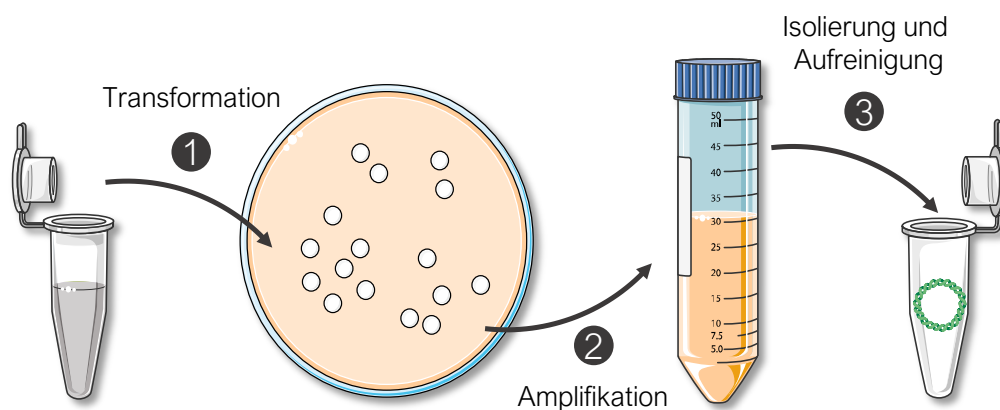


Abb. 13: Arbeitsschritte der Plasmidaufarbeitung. (1) Die Plasmid-DNA wurde in *E.coli* Zellen mittels Hitzeschock transformiert, auf mit Ampicillin versetzte Agarplatten beimpft und über Nacht kultiviert. (2) Anschließend wurde eine Einzelkolonie gepickt und zur Amplifikation in ein Röhrglas mit vorgelegtem LB-Medium übertragen. (3) Nach der Amplifikation über Nacht erfolgte die Isolierung und Aufreinigung der Plasmid-DNA mittels *E.Z.N.A.*® *Endo-free Plasmid DNA Mini Kit I*.

4.2.1.1 TRANSFORMATION IN *E. COLI*

Die sterilen Arbeiten mit Bakterienkulturen wurden an der Flamme durchgeführt. Die Bakterienzellen wurde nach vorheriger Lagerung bei -80 °C auf Eis langsam aufgetaut und anschließend 2 µL der *E.coli* DH5α-Zellen mit 1 µL (80 ng) Plasmid-DNA versetzt und kurz zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die Transformation mittels Hitzeschock. Die Bakterienzellen wurden dafür 5 min auf Eis gestellt, dann für 30 s bei 42 °C im Wasserbad erwärmt und zuletzt erneut für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde mit 200 µL LB (*lysogeny broth*)-Medium resuspendiert und auf zuvor autoklavierte und mit Ampicillin (100 µg/mL) versetzte Agar-Platten beimpft. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht bis zur sichtbaren Koloniebildung der Bakterienzellen kultiviert.

4.2.1.2 AMPLIFIKATION UND LAGERUNG

Zur Amplifikation des Plasmids wurde am darauffolgenden Tag eine Einzelkolonie von der Agarplatte isoliert und in ein 50 mL Röhrchen mit 5 mL vorgelegtem LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/mL) gegeben. Das beimpfte Medium wurde über Nacht unter Schütteln (225 rpm) bei 37 °C inkubiert. Eine sichtbare Trübung des Mediums am nächsten Tag zeigte die Vermehrung der Bakterienzellen. Dieser Bakterien-Ansatz wurde für die Isolierung weiterverwendet.

Für die Langzeitlagerung wurde außerdem ein Glycerol-Stock der transformierten Bakterien angesetzt. Hierzu wurden 500 µL Glycerol in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß vorgelegt, 500 µL Bakterienlösung zugegeben und die Lösungen homogen vermischt. Der Glycerol-Stock wurde bei -80 °C gelagert.

4.2.1.3 ISOLIERUNG UND AUFREINIGUNG

Die Isolierung und Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte mittels *E.Z.N.A.*® *Endo-free Plasmid DNA Mini Kit I* von Qiagen nach Angaben des Herstellers. Dazu wurde die Bakterienlösung bei 4000 rcf bei Raumtemperatur (RT) für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und verworfen. Dem Zellpellet wurden 250 µL der Lösung I (RNase A) zugegeben und mittels vortexen gründlich durchmischt. Die Suspension wurde dann in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und mit 250 µL Lösung II versetzt. Das Gefäß wurde so lange invertiert, bis sich ein klares Lysat bildete. Danach wurden 125 µL eiskalter N3 Puffer zugegen und erneut vorsichtig invertiert, bis ein flockiger, weißer Niederschlag zu sehen war. Anschließend wurde bei 15000 rcf für 10 min zentrifugiert und das gereinigte

Lysat in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Dann wurde die äquivalente Volumenmenge an ETR-Bindungspuffer zugegeben und die Lösung zum Mischen mehrmals invertiert.

Um die Plasmid-DNA aufzufangen, wurde zunächst eine *HiBind*[®] DNA-Mini-Säule in ein 2 mL Reaktionsgefäß gesetzt und anschließend das Lysat auf die Säule gegeben. Danach wurde bei 15000 rcf für 1 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und mehrmals mit 500 µL ETR-Waschpuffer gewaschen. Danach wurde erneut zentrifugiert und der Überstand jeweils verworfen. Um die Säule zu trocknen, wurde diese nach den Waschschrritten nochmals bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Säule mit der gebundenen Plasmid-DNA wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß transferiert und mit Elutionspuffer von der Säule eluiert. Dazu wurden 50 µL Elutionspuffer auf die Mitte der Säulenmembran gegeben, bei RT für 1 min inkubiert und anschließend erneut zentrifugiert, um die Plasmid DNA von der Säule zu eluieren.

Die Qualität und der Gehalt der Plasmid-DNA wurde photometrisch mittels NanoQuant-Platte am *Tecan Infinite*[®] bestimmt. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Absorption bei 260 nm gemessen. Um die DNA auf Verunreinigungen mit Proteinen, Zuckern, Salzen und Phenolen zu überprüfen, wurden außerdem die Absorptionen bei 280 nm und 230 nm gemessen. Dazu wurde jeweils das Verhältnis der Absorptionen bei 260/280 nm und 260/230 nm gebildet. Eine hohe Reinheit der DNA entsprach einem Verhältnis von 1,8 – 2,0 bei 260/280 nm und $\geq 2,0$ bei 260/230 nm. Bis zur weiteren Verwendung wurde die isolierte und aufgereinigte Plasmid-DNA bei -20°C gelagert.

4.2.2 TRANSFEKTION

Vor der Transfektion wurden die U2OS-Zellen zunächst drei bis vier Mal nach Inkulturnahme (4.1.3) subkultiviert. Zur optimalen Transfektionseffizienz wurde mit einer Konfluenz der Zellen von ca. 70 % gearbeitet. Dafür wurden 7×10^5 U2OS-Zellen in 60 mm Zellkulturschalen ausgestreut und für 24 h kultiviert. Die Transfektion erfolgte mittels *Effectene*[™] Transfektions-Kit von Qiagen. Hierbei wird der Transfektionsvorgang durch den *Enhancer* sowie das *Effectene*[™] Transfektions Reagenz unterstützt. In Abb. 13 ist das Prinzip schematisch dargestellt. Mittels *Enhancer* wird die Plasmid DNA kondensiert und das *Effectene*[™] trägt anschließend zur Komplexierung der DNA in Micellen bei, sodass die Plasmid DNA die Zell- und Kernmembran passieren kann. Das empfohlene Verhältnis des Herstellers von DNA/*Enhancer*/*Effectene*[™] beträgt 1/8/25.

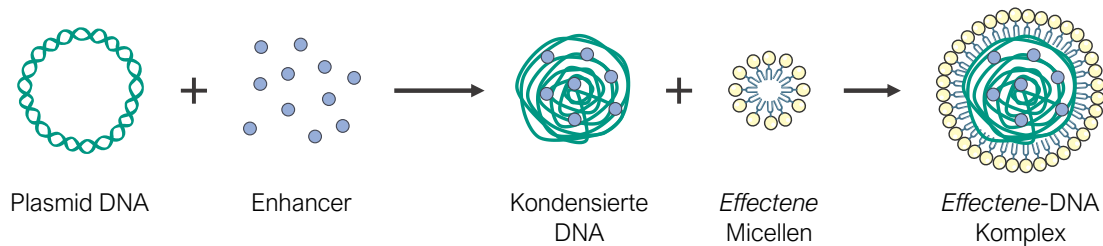


Abb. 14: Transfektionsvorgang mittels *Effectene*[™] Transfektions Kit von Qiagen. Der *Enhancer* unterstützt die Kondensation der Plasmid-DNA. *Effectene*[™] trägt anschließend zur Komplexbildung der DNA in Micellen bei, sodass die Plasmid-DNA die Zell- und Kernmembran passieren kann.

Für die Transfektion einer 60 mm Zellkulturschale (70 % Konfluenz) wurde eine DNA-Menge von 1 µg eingesetzt. Die Transfektion erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Im ersten Schritt wurde 1 µg der aufgereinigten Plasmid-DNA in der entsprechenden Menge EC-Puffer gelöst, um ein Gesamtvolumen von 150 µL zu erreichen. Danach wurden 8 µL Enhancer zugegeben und 1 s gevortext. Anschließend wurde für 5 min bei RT inkubiert, bevor 25 µL des *Effectene*[™] Transfektions Reagenz zupipettiert wurde. Nach 10 s vortexen wurde für 10 min bei RT inkubiert. Während der Inkubationszeit der Transfektions-Lösung wurde das alte Medium von den zu transfizierenden Zellen entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und 4 mL frisches Medium zugegeben. Anschließend wurde dem Transfektions-Komplex 1 mL Medium zugegeben, die Lösung resuspendiert und direkt tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 h bei 37 °C bis zur Antibiotikum-Selektion mit Puromycin kultiviert.

4.2.3 SELEKTION MITTELS ANTIBIOTIKUM UND EINZELZELLVERDÜNNUNG

Der erste Selektionsschritt erfolgte mittels Antibiotikum Inkubation. 24 h post-Transfektion wurde das Medium abgenommen, der Zellrasen mit PBS gewaschen und das Selektionsmedium zugegeben. Die Puromycin-Konzentration des Selektionsmediums für die U2OS Behandlung betrug hierbei 2 µg/mL.

Nach 24 h Puromycin-Inkubation wurden das Selektionsmedium entfernt, die Zellen erneut mit PBS gewaschen und für die Einzelzellverdünnung trypsinisiert und vereinzelt. Die Zellzahl der Zellsuspension wurde mittels CASY[®] Zellzählgerät bestimmt und die Suspension auf eine Konzentration von 1 Zelle/100 µL verdünnt. Anschließend wurde mit Hilfe einer Multikanalpipette die Zellsuspension (je 100 µL) in die Kavitäten einer 96 well-Platte pipettiert, um eine Zellverteilung von 1 Zelle pro Kavität zu erreichen. Zusätzlich wurden in

eine der 96 Kavitäten 100 Zellen ausgestreut, um die späteren visuellen Untersuchungen am Mikroskop zu erleichtern. So ließen sich die Zellen einfacher finden und fokussieren.

Die Zellen wurden anschließend 7-14 Tage kultiviert und regelmäßig unter dem Mikroskop auf Kolonien in den einzelnen Kavitäten überprüft. Es wurden lediglich Kolonien weiter kultiviert, die isoliert in einer Kavität angewachsen waren. Bildeten sich zwei oder mehrere Kolonien, wurden diese Versuchsansätze verworfen. Die Einzelkolonien wurden regelmäßig einem Mediumswechsel unterzogen und bei zu starker lokaler Anhäufung gegebenenfalls vereinzelt, sodass die Zellen gleichmäßig in der Kavität anwachsen konnten.

Bei Erreichen von 80-90 % Konfluenz in der 96-Well Platte, wurden die Zellen in 24-Well Platten überführt. Dazu wurde das alte Medium entfernt, die Zellen mit 100 µL PBS gewaschen und 20 µL Trypsin zugegeben. Nach 30 s Inkubation bei RT, wurde das Trypsin vorsichtig wieder entfernt und die Zellen für weitere 2 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit 100 µL Medium vereinzelt und in eine Kavität der 24-Well Platte überführt. Nachfolgend wurden 400 µL Medium zugegeben und die Zellen weiter kultiviert, bis sie die benötigte Konfluenz für die Validierung erreichten.

4.2.4 VALIDIERUNG DES *PARP1-KNOCKOUTS*

Die Validierung des *PARP1-Knockouts* wurde zum einen auf Proteinebene durch einen Immunoblot (Western Blot) von PARP1 und zum anderen auf funktioneller Ebene durch Bestimmung der PARylierungsaktivität getestet. Bei allen Validierungsuntersuchungen wurde jeweils immer eine Probe der nicht transfizierten U2OS *PARP1*-Wildtyp Zellen als PARP1-profiziente Kontrolle mitgeführt.

4.2.4.1 PARP1 MITTELS *SCREENING* WESTERN BLOT

Die Validierung auf Proteinebene wurde mittels einer gekürzten Variante des Western Blots durchgeführt, die im Folgenden als *Screening* Western Blot bezeichnet wird. Der Ablauf und die Theorie des regulären Western Blots wird in 4.7 genauer erklärt. Bei der *Screening* Variante findet im Gegensatz zum regulären Western Blot keine Proteinextraktion statt. Die Zellpellets werden direkt mit Ladepuffer versetzt, denaturiert und für die Gelbeladung verwendet.

Ab einer Konfluenz von 30 % in den 24-Well Platten konnten die Klone für den *Screening* Western Blot eingesetzt werden. Das verbrauchte Medium wurde entfernt, die Zellen mit 200 µL PBS gewaschen und für 30 s mit 100 µL Trypsin inkubiert. Das Trypsin wurde

entfernt und die Zellen mit 500 μ L Medium vereinzelt. 400 μ L der Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 1400 rpm und 4 °C für 4 min pelletiert. Die zurückgebliebenen 100 μ L wurden mit 400 μ L frischem Medium resuspendiert und zur weiteren Kultivierung in der Kavität belassen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, das Zellpellet mit 500 μ L PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert und der Überstand abermals abgenommen. Bis zur weiteren Verwendung konnte das Zellpellet bei -20 °C gelagert werden.

Um die Proteine in der Probe anschließend anhand ihres Molekulargewichts auftrennen zu können, wurden die enthaltenen Proteine denaturiert. Dafür wurde das Zellpellet mit 20 μ L Ladepuffer (ROTI® Load von Roth) versetzt, resuspendiert und bei 95 °C für 10 min erhitzt. Die denaturierte Probe wurde anschließend zur Beladung des Gels verwendet. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis*) elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend vom Gel mittels *Wet Blot* über Nacht auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran übertragen, was dem regulären Vorgang des Western Blot entsprach und in 4.7 detailliert erläutert wird.

Nach dem *Blotting* wurde die Membran zur Vorbereitung auf die Antikörper-Inkubation für 1 h mit 5 %iger Milch-Blockierlösung (Milchpulver in PBST) inkubiert. Alle nachfolgenden Antikörperlösungen wurden ebenfalls mit 5 %iger Milch-Blockierlösung verdünnt. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper anti PARP1 H250 *rabbit* (sc-7150; VF: 1/500) auf dem Rotator inkubiert. Nach der Primärantikörper-Inkubation wurde die Membran drei Mal für jeweils 5 min mit PBST gewaschen und mit dem Sekundärantikörper *mouse anti rabbit igG-HRP* (sc-2357; VF: 1/1000) erneut für 2 h bei RT auf dem Rotator inkubiert. Nach der Sekundärantikörper-Inkubation wurde erneut drei Mal für jeweils 5 min mit PBST gewaschen und die Detektion des PARP1 Signals mit Hilfe des *Amersham™ ECL Prime Western-Blot-Detektionsreagenz am Luminescent Image Analyzer LAS-3000* mittels Chemilumineszenz-Messung (*Sensitivity: High*) bestimmt.

Um sicher zu stellen, dass genug Protein für die Chemilumineszenz-Messung vorlag, wurde als Referenz ebenfalls eine Immunodetektion gegen ein Haushaltsprotein durchgeführt. Dafür wurde die Membran mit dem Primärantikörper anti α -Tubulin *mouse* (sc-32293; VF: 1/500) für 1 h bei RT auf dem Rotator inkubiert. Anschließend wurde drei Mal für jeweils 5 min mit PBST gewaschen und mit dem Sekundärantikörper *goat anti mouse* (sc-2005; VF: 1/5000) erneut für 1 h unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Die Messung erfolgte unter den bereits genannten Bedingungen am *Luminescent Image Analyzer LAS-3000*.

Zeigten die getesteten Klone bei dem *Screening* Western Blot kein PARP1 Signal, jedoch ein deutliches Signal der Ladekontrolle, wurde die Probe zur Bestätigung mittels klassischem Western Blot nochmals überprüft. Dazu wurden die Zellen weiter kultiviert, in eine 6-Well Platte überführt und bei 70 % Konfluenz nochmals auf Proteinebene untersucht. Konnte der Wiederholungsversuch das Fehlen von PARP1 auf Proteinebene erneut bestätigen, wurde der Klon auf die PARylierungsaktivität mittels Immunofluoreszenz untersucht.

Proben, die weder ein PARP1 Signal noch ein Signal für die Ladekontrolle zeigten, wurden weiter kultiviert und der Versuch mit einer höheren Zellzahl erneut durchgeführt. Zeigte sich jedoch ein Signal für PARP1, wurden die Klone verworfen.

4.2.4.2 PARYLIERUNGSAKTIVITÄT MITTELS IMMUNOFLUORESCENZ

Um den Funktionsverlust von PARP1 zu bestätigen, wurden die Klone, die kein PARP1 Signal auf Proteinebene zeigten, auf ihre PARylierungsaktivität immunofluorimetrisch untersucht. Die PARylierung wurde hierfür durch eine H₂O₂-Inkubation induziert. Die anschließende Detektion der PAR-Ketten erfolgte mit Hilfe eines spezifischen anti-PAR Primärantikörpers und eines Alexa Fluor®488 gekoppelten Sekundärantikörpers. Die Signale wurden mikroskopisch ausgewertet.

Für den Immunofluoreszenz Versuch wurden $1,5 \times 10^5$ der zu validierenden *Knockout*-Zellen sowie $1,5 \times 10^5$ der U2OS-Zellen auf Deckgläschen (\varnothing 12 mm) in 35 mm Zellkulturschalen jeweils in Doppelbestimmungen ausgestreut und für 48 h kultiviert. Zur Induktion der PARylierungsaktivität wurden die Zellen mit einer 100 μ M H₂O₂-Lösung für 5 min inkubiert. Dazu wurde eine 10 μ M H₂O₂-Lösung vorbereitet und 20 μ L der Lösung in ein 15 mL Röhrchen je Probe vorgelegt. Kurz vor der Inkubation wurde das Medium der Zellen (V = 2 mL) abgenommen, in das Röhrchen überführt, gevortext und die Inkubationslösung (c = 100 μ M) auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde bei 37 °C für 5 min inkubiert, nach Ablauf der Zeit die Lösung abgenommen, die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und das PBS wieder entfernt. Zusätzlich wurde je Zelllinie eine nicht behandelte Kontrolle mitgeführt.

Nach dem Waschschrift wurden die Zellen mit je 1 mL eiskaltem 100 %igem Methanol bei RT für 5 min auf den Deckgläschen fixiert und erneut zwei Mal mit eiskaltem PBS unter Schwenken der Schale gewaschen. Auf die Fixierung folgte die Permeabilisierung der Zell- und Kernmembran, um die Zugänglichkeit für die Antikörper zu ermöglichen. Dazu wurden

die Zellen je Schale mit je 1 mL 0,2 %igem Triton X-100 in PBS für 10 min bei RT inkubiert und erneut zwei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen.

Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen, wurde eine 5 %ige Milch-Blockierlösung (Milchpulver in PBST) auf die Zellen gegeben und die Proben für 30 min bei RT inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine einstündige Inkubation mit 50 µL der Primärantikörperlösung anti *Poly(ADP-Ribose) Polymer [10H]* (ab14459; VF: 1/800) in einer feuchten Kammer bei RT. Die Deckgläschen wurden nach der Inkubation wieder zurück in die Zellkulturschalen gelegt und zwei Mal mit 2 mL eiskaltem PBS für je 5 min gewaschen. Die Sekundärantikörper-Inkubation erfolgte analog zum Primärantikörper mit dem anti *mouse IgG-FITC* (M5899, VF: 1/100) für 30 min bei 37 °C. Nach erneutem Waschen wurden die Deckgläschen mit *Vectashield Mounting Medium with DAPI* (4',6-diamidino-2-phenylindole) auf Objektträger aufgebracht und luftdicht mit Lack versiegelt.

Die Auswertung der PAR-Signale erfolgte durch Auswahl kolokalisierter Fluoreszenzsignale von FITC (*fluorescein isothiocyanate*) und DAPI mittels *AxioVision* Software Rel. 4.9.1 von Zeiss. Die Signalintensitäten der behandelten sowie unbehandelten *PARP1-Knockout* Zellen wurden mit den H₂O₂-behandelten U2OS (Positivkontrolle) und nicht behandelten U2OS (Negativkontrolle) verglichen. War die Singalintensität des behandelten *Knockout* Klons vergleichbar mit der unbehandelten Probe sowie der Intensität der U2OS Negativkontrolle, galt der *Knockout* ebenfalls auf funktionaler Ebene als validiert.

4.3 ANALYSEN ZUM WACHSTUMS- UND VIABILITÄTSVERHALTEN

4.3.1 ZELLZAHLBESTIMMUNG UND WACHSTUMSKURVE

Zur Quantifizierung des Zellwachstums und der daraus resultierenden Populationsverdopplungszeit (*population doubling time*, PDT) wurden je 5x10⁵ der U2OS oder K3F11-Zellen in 60 mm Schalen, jeweils in Doppelbestimmungen, ausgesät und für 24, 48, 72, 96 und 168 h kultiviert. Im Anschluss der Nachinkubation wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und trypsinisiert. Die Zellzahl wurde am CASY® Zellzählgerät bestimmt. Die PDT in der exponentiellen Wachstumsphase (zwischen 24 h und 96 h) wurde anhand der folgenden Formel berechnet:

$$PDT = \Delta t / (\log(N_t) - \log(N_0)) / \log(2),$$

wobei Δt die Periode des Zellwachstums (24 h), N_0 die Zellzahl zu Beginn der Kultivierung und N_t die Zellzahl am Ende der Kultivierungszeit ist. Die PDT wurde anschließend als

Durchschnitt von drei Werten berechnet, die alle 24 h in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt wurden (Zeiträume für die PDT-Bestimmung: 24 h - 48 h, 48 h - 72 h und 72 h - 96 h).

4.3.2 KOLONIEBILDUNGSFÄHIGKEIT

Für die Versuche zur Koloniebildungsfähigkeit wurden 5×10^2 U2OS sowie K3F11-Zellen pro Schale (\varnothing 60 mm) jeweils in Doppelbestimmungen ausgesät. Anschließend wurden die Zellen für 10-14 Tage kultiviert. Danach wurde das Medium verworfen, die Zellen mit PBS gewaschen, mit 96 %igem eiskaltem Ethanol fixiert und mit einer Giemsa®-Färbelösung angefärbt, um Kolonien auf der Zellkulturschale sichtbar zu machen. Anschließend wurden die Kolonien mit ddH₂O gewaschen, und die Kolonien wurden mit Unterstützung des Koloniezählers BZG-30 ausgezählt.

4.4 BEHANDLUNG DER ZELLEN ZUR INDUKTION DER DNA-SCHADENSANTWORT

Zur Aktivierung der DDR wurden die Zellen unterschiedlichen Behandlungen unterzogen, um verschiedene Schäden und dementsprechende Signalwege der DDR zu induzieren.

4.4.1 H₂O₂-BEHANDLUNG

Zur Induktion von oxidativen Schäden und SSBs wurden die Zellen mit 100 beziehungsweise 250 μ M H₂O₂ für 5 min bei 37 °C inkubiert. Dafür wurde eine entsprechende Inkubationslösung vorbereitet, das alte Medium in 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt und die H₂O₂-Lösung auf die Zellen gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Lösung abgenommen, zwei Mal mit PBS gewaschen, das PBS entfernt und das Medium aus den Zentrifugenröhrchen wieder auf die Zellen gegeben. Abhängig von der Nachinkubationszeit wurden die Zellen weiter kultiviert.

4.4.2 UV-C STRAHLUNG

Zur definierten Induktion von DNA-Photoprodukten wurden die Zellen mit einer UV-C Lampe (ThermoFisher Scientific) bestrahlt. Um die Bestrahlung durchzuführen, wurde zunächst das Medium der Zellkulturschale in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt und 2 mL PBS auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellkulturschalen einzeln für jeweils 5 beziehungsweise 10 s in PBS (ohne Zellkulturschalendeckel) bestrahlt. Dies entsprach bei einer gewählten Bestrahlungsintensität von $1 \pm 0,001$ W/m² einer Dosis von 5

beziehungsweise 10 J/m². Nach dem anschließenden Entfernen des PBS wurde das Medium aus den Zentrifugenröhrchen wieder auf die Zellen gegeben und abhängig von der Nachinkubationszeit weiter kultiviert.

4.4.3 IONISIERENDE STRAHLUNG (GAMMASTRAHLUNG)

Im Rahmen der Versuche wurde Gammastrahlung als Art der ionisierenden Strahlung verwendet. Für die Induktion von DSBs wurden die Zellen unter Verwendung einer ⁶⁰Co-Quelle (Cell-Rad; Faxitron) bei 130 kV und 4,5 mA bei einer Dosis von 1 beziehungsweise 10 Gy bestrahlt und abhängig von der jeweiligen Nachinkubationszeit weiter kultiviert.

4.5 ZELLYKLUSPHASENVERTEILUNG MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETER

Die Zellzyklusphasenverteilung wurde mit Hilfe des DNA-interkalierenden Farbstoffs DAPI gemessen. Über die DAPI-Signalintensität konnte anschließend die prozentuale Verteilung der Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase ermittelt werden.

Um die Verteilung des Zellzyklus unter basalen Bedingungen zu bestimmen, wurden 2×10^5 der U2OS- oder K3F11-Zellen in 60 mm Schalen ausgesät und für 24, 48, 72 und 96 h kultiviert. Für die Analyse des Einflusses von ionisierender Strahlung auf die Zellzyklusverteilung, wurden die Zellen 24 h nach dem Ausstreuen bestrahlt (siehe 4.4.3) und für weitere 24, 48, 72 und 144 h nachinkubiert.

Im Anschluss der jeweiligen Kultivierungsdauer wurden das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert, in ein 15 mL Röhrchen überführt und auf Eis gelagert. Darauffolgend wurden die Zellen bei 1400 rpm und 4°C für 4 min zentrifugiert und, nach Abnahme des Überstands, das Zellpellet mit 1 mL PBS resuspendiert und in ein 5 mL Durchflusszytometrie-Röhrchen (Falcon ®) überführt. Zur Fixierung der Zellen wurde unter konstantem Vortexen tropfenweise 3 mL eiskalter 96 %iger Ethanol zugegeben und über Nacht bei -20 °C gelagert. Danach wurden die Zellen bei 4000 rpm für 4 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Zellpellet mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Proben wurden anschließend in 300 µL DAPI-Färbelösung resuspendiert und 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert.

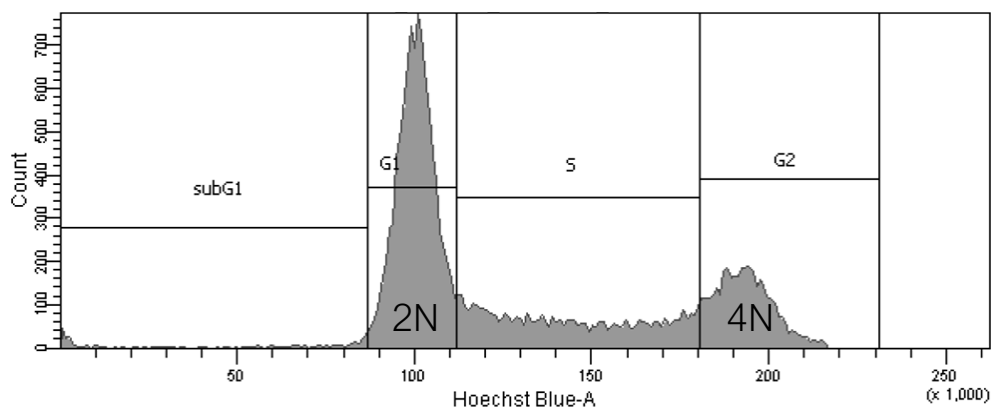


Abb. 15: Histogramm einer beispielhaften *Gating*-Strategie zur Ermittlung der Zellzyklusphasenverteilung nach Messung an der BD LSRFortessa. Die Fluoreszenzintensität (Emissionswellenlänge des DAPI Signals gleich dem Farbstoff Hoechst) ist gegen die gemessene Zellzahl (*count*) aufgetragen.

Die Messung des DAPI-Signals erfolgte anschließend durchflusszytometrisch an der BD LSRFortessa (20000 Events, Exzitation des Lasers: 405 nm, Bandpassfilter Emission: 450/50 nm). In Abb. 15 ist eine beispielhafte *Gating*-Strategie für die Ermittlung der Zellzyklusphasenverteilung gezeigt. Die Anzahl der Zellen (*counts*) wurde in einem Histogramm über das DAPI-Signal aufgetragen. Die Verdopplung der Signalintensität entspricht dabei einer Verdopplung des DNA-Gehalts, wodurch sich von der G₁-Phase (2N) auf die G₂-Phase (4N) schließen lässt, sowie auf die S-Phase, die zwischen den beiden Peaks lokalisiert ist. Die Auswertung der Zellzyklusphasenverteilung erfolgte in Bezug auf die Lebendzellpopulation und bezieht die Anteile der G₁-, S- und G₂- Phase mit ein. Zu beachten ist, dass im Rahmen dieser Methode nicht zwischen G₀ und G₁ Zellen sowie zwischen Zellen der G₂- und M-Phase unterschieden werden kann.

Zudem gibt der Signalbereich vor der G₁-Phase den Anteil apoptotischer Zellen an (subG₁). Dem liegt zugrunde, dass während der Apoptose die DNA in kleinere Fragmente gespalten wird und der DNA-Gehalt der Zellen sich zudem durch die Bildung apoptotischer Körperchen verringert, wodurch wiederum die Signalintensität abnimmt und als subG₁-Peak im Histogramm erscheint (POZAROWSKI und DARZYNKIEWICZ, 2004; PLESCA et al., 2008). Die Auswertung des subG₁-Anteils erfolgt in Bezug auf die Gesamtzellpopulation.

4.5.1 INHIBIERUNG VON ATM (ATMi)

Um den Einfluss einer ATM-Inhibierung mit dem Einfluss des *PARP1-Knockouts* auf die Zellzyklusphasenverteilung nach DNA-Schaden zu vergleichen, wurde ein ATM-Inhibitor eingesetzt. Hierbei wurde der Inhibitor KU55933 (ATMi) verwendet. Der Inhibitor lag gelöst in DMSO in einer Konzentration von 10 mM vor. Die Zellen wurden 1 h vor der Bestrahlung mit 10 µM ATMi inkubiert. Dazu wurde die Inkubationslösung direkt in das Zellmedium pipettiert und bis zum Versuchsabbruch auf den Zellen belassen.

4.6 GENEXPRESSIONSANALYSEN MITTELS *HIGH-THROUGHPUT* RT-QPCR

Mit Hilfe der *High-Throughput* RT-qPCR (*quantitative real-time polymerase chain reaction*) lassen sich Genexpressionsprofile erstellen, die Aufschluss über mögliche Änderungen in verschiedenen Signalwegen und zellulären Prozessen geben können. Um diese Profile zu erstellen, wurden Gene, die im Fremdstoffmetabolismus, der Metallhomöostase, der oxidativen Stressantwort, der Apoptose und der Zellzyklusregulation sowie der DNA-Schadensantwort und Reparatur beteiligt sind, herangezogen. Die im folgenden beschriebene Methode der *High-Throughput* RT-qPCR erlaubt eine simultane Bestimmung von 95 Genen in 96 Proben und wurde im Arbeitskreis etabliert (FISCHER et al., 2016).

4.6.1 KULTIVIERUNG DER ZELLEN

Für die Genexpressionsanalysen wurden je Zellkulturschale (Ø 60 mm) 5×10^5 der U2OS- sowie K3F11-Zellen ausgestreut und für 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen entweder mit H₂O₂-Lösung (4.4.1) inkubiert, mit UV-C (4.4.2) bestrahlt, oder mit IR (4.4.3) behandelt, um unterschiedliche DNA-Schadensantworten zu induzieren. Je Zelllinie und Behandlungsart wurde jeweils eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Alle Versuche wurden in Doppelbestimmungen angesetzt.

Nach Induktion des jeweiligen Schadens, wurden die Zellen für 8 h nachinkubiert und anschließend pelletiert. Dafür wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und gemäß 4.1.2 abgelöst. Die Zellsuspension wurde nachfolgend in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4°C und 1400 rpm für 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 1 mL PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert und das PBS abgenommen. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurde das Zellpellet bei -20 °C gelagert.

4.6.2 RNA-ISOLIERUNG UND -QUANTIFIZIERUNG

Die Isolierung der RNA aus den Zellpellets wurde mit dem *NucleoSpin® RNA Plus Kit* (Macherey Nagel) durchgeführt. Nach Empfehlungen des Herstellers wurden die folgenden Arbeiten unter sterilen Bedingungen und auf Eis durchgeführt.

Die Zellpellets wurden in 350 µL Lysepuffer resuspendiert, gevortext und auf eine *Nucleo Spin gDNA Removal*-Säule mit einem 2 mL *Collection Tube* überführt. Diese wurde danach für 30 s bei 4 °C und 11000 rcf zentrifugiert. Die Säule mit der gebunden genomischen DNA

(gDNA) wurde anschließend verworfen und das Filtrat weiterverwendet. Dem Filtrat wurden 100 µL Binding Solution zugegeben, die Lösung resuspendiert und auf eine RNA-bindende Säule mit einem 2 mL *Collection Tube* überführt. Diese wurde erneut für 20 s bei 4 °C und 11000 rcf zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Anschließend wurde die Säulen-gebundene RNA zunächst mit 200 µL Waschpuffer I, dann mit 600 µL Waschpuffer II und nochmals mit 250 µL Waschpuffer II versetzt. Nach jedem Waschvorgang wurde zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Im Anschluss an die Waschschritte wurde die Säule auf ein steriles 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und die RNA mit 30 µL Nuklease-freiem Wasser für 1 min bei 4 °C und 11000 rcf zentrifugiert. Das Eluat wurde erneut auf die Säule gegeben und unter den genannten Bedingungen wiederholt zentrifugiert. Die isolierten RNA-Proben konnten für zwei Wochen bei -80 °C gelagert werden.

Vor der cDNA-Synthese erfolgte die Quantifizierung und Bestimmung der Reinheit der RNA mittels NanoQuant-Platte am *Tecan Infinite*® bei 260 nm in Doppelbestimmungen. Um die Reinheit der Proben zu gewährleisten, wurde der Quotient von RNA zu Proteinen (260 nm/280 nm) herangezogen, der für eine ausreichende Reinheit > 2,00 betragen musste.

4.6.3 cDNA-SYNTHESE - REVERSE TRANSKRIPTION

Die nachfolgenden Arbeitsschritte fanden in einem separaten Raum an unterschiedlichen PCR-Sterilwerkbänken statt, abhängig von der Arbeit mit RNA oder DNA.

Die isolierte RNA wurde mit Hilfe des *qScript™ cDNA Synthesis Kits* in cDNA umgeschrieben. Pro Ansatz wurden dafür 1 µg RNA eingesetzt. Die RNA-Probe wurde entsprechend verdünnt, um ein Gesamtvolumen von 15 µL zu erhalten. Die Lösung wurde danach mit 5 µL Mastermix (4 µL *5x Reaction Mix* + 1 µL *iScript Reverse Transcriptase*) versetzt, gevortext und zentrifugiert. Die Synthesereaktion fand in einem Thermocycler statt mit dem in Tab. 1 angegeben Temperaturprogramm. Die cDNA konnte anschließend bei -20 °C aufbewahrt werden.

Tab. 1: Temperaturprogramm der cDNA-Synthese.

Zeit	Temperatur (°C)
5 min	25
30 min	42
5 min	85
∞	4

4.6.4 PREAMPLIFIKATION (STA) UND EXONUKLEASEVERDAU

Um eine ausreichende Menge an Template für die *High-Throughput RT-qPCR* zu gewährleisten, wurde eine Preamplifikation (*specific target amplification*, STA) durchgeführt. Hierfür wurde zunächst ein *Pooled Primer Mix*, welcher alle Primerpaare der Zielgene enthielt, mit DNA-Suspensionspuffer auf eine End-Konzentration von 500 nM verdünnt (Lagerung bei -20°C). Anschließend wurde pro Ansatz ein Pre-Mix aus je 2,5 µL *TaqMan PreAmp Master Mix*, 0,5 µL des *Pooled Primer Mix* und 0,75 µL PCR-zertifiziertem Wasser hergestellt und gevortext. Für ein Reaktionsansatz von 5 µL wurden anschließend je 3,75 µL des Pre-Mix vorgelegt und 1,25 µL der jeweiligen cDNA-Probe zugegeben. Neben den Proben wurden außerdem eine Wasser-Kontrolle (NTC-STA) und eine nicht umgeschriebene RNA-Kontrolle (NoRT) mitgeführt. Letztere wurde je Zelllinie mitgeführt. Daraufhin wurde zentrifugiert, gevortext, erneut zentrifugiert und die Proben mittels Thermocycler unter dem Temperaturprogramm in Tab. 2 amplifiziert.

Tab. 2: Temperaturprogramm der Preamplifikation.

Zeit	Temperatur (°C)	
10 min	95	12 Zyklen
15 s	95	
4 min	60	
∞	4	

Nach der Preamplifikation fand ein Exonukleaseverdau statt, sodass ungebundene Primer und Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) entfernt wurden. Pro Ansatz wurden dafür 1,4 µL PCR-zertifiziertes Wasser, 0,2 µL *Exonuclease I Reaction Buffer* und 0,4 µL *Exonuclease I* (20 units/µL) angesetzt ($V_{\text{ges}} = 2 \text{ mL}$) und zu den Proben gegeben. Der Verdau und die

anschließende Inaktivierung der Exonuklease verlief im Thermocycler unter dem in Tab. 3 angegebenen Temperaturprogramm.

Tab. 3: Temperaturprogramm des Exonukleaseverdaus.

Zeit	Temperatur (°C)
40 min	37
15 s	80
∞	4

Anschließend wurden die Proben fünffach mit TE-Puffer (18 µL je Probe) verdünnt und nach wiederholtem Vortexen und Zentrifugieren bei -20 °C gelagert.

4.6.5 PRIMER- UND PROBENVORBEREITUNG

Um die Arbeitskonzentration der Primer von 5 µM zu erhalten, wurden 2,5 µL jedes 100 µM Primer-Paars (*forward* und *reverse* Primer) mit 25 µL *2x Assay Loading Reagent* und 22,5 µL DNA-Suspensionspuffer verdünnt. Der Reaktionsmix wurde bei -20°C gelagert.

Für die Probenvorbereitungen wurde zu den mit STA und Exo I behandelten Proben je 2,5 µL *2x SsoFast EvaGreen Supermix with Low ROX* und 0,25 µL *20x DNA Binding Dye Sample Loading Reagent* zugegeben, gevortext und zentrifugiert.

Zusätzlich wurde eine *no reaction control* (NRC) mitgeführt, die PCR-zertifiziertes Wasser anstelle des Primerpaars enthielt und eine *no template control* (NTC) mit PCR-zertifiziertem Wasser anstatt der Probe (NTC).

4.6.6 96X96 DYNAMIC ARRAY IFC QPCR ANALYSE

Nach der Vorbereitung der Primer und Proben erfolgte die *High-Throughput RT-qPCR* in einem 96x96 *Dynamic Array IFC (integrated fluidic circuit)* von Fluidigm. Vor der eigentlichen Beladung des Chips wurde zunächst ein *Priming* durchgeführt, indem beide Akkumulatoren des Chips mit einem *Control Line Fluid* befüllt wurden und mittels *IFC Controller HX* von Fluidigm und eigens dafür ausgelegtem *Prime* Programm das Fluid in die Mikrokanäle der Arrays gepumpt wurde. Danach konnte die Beladung des Chips durchgeführt werden. Dafür wurden pro Kavität 5 µL der vorbereiteten Primerpaare sowie der Proben als technische Replikate luftblasenfrei in die Kavitäten pipettiert. Mit Hilfe des *IFC Controller HX* wurden die

Primer und Proben unter dem Programm *Load Mix* in den Reaktionskammern vermischt. Danach wurde die Platte in das BioMark™-System überführt. Dort fand die qPCR und Schmelzkurvenanalyse unter dem in Tab. 4 angegebenen Temperaturprogramm statt.

Tab. 4: Temperaturprogramm der qPCR.

	Zeit	Temperatur (°C)
Thermale Durchmischung	2400 s	70
	30 s	60
<i>Hot Start</i>	60 s	95
PCR (30 Zyklen)	5 s	96
	20 s	60
Schmelzkurve	3 s	60
	1 °C/3 s	bis 95

4.6.7 DATENANALYSE UND AUSWERTUNG DER *HIGH-THROUGHOUT* RT-QPCR

Die Analyse der Rohdaten wurden mit der Software *Fluidigm Real-Time PCR Analysis* durchgeführt. Zunächst wurde anhand des ROX-Signals (Referenzfarbstoff) die gleichmäßige Beladung der Reaktionskammern überprüft. Für die Ermittlung der C_q-Werte wurde der DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff *EvaGreen* verwendet. Hierbei ist das erhaltene Fluoreszenzsignal proportional zur Amplifikatmenge. Um die C_q-Werte zu präzisieren, wurde außerdem eine Basislinienkorrektur mit Hilfe der enthaltenen Schwellenwert-Methode durchgeführt. Anhand der Darstellung der C_q-Werte als *Heatmap* beziehungsweise anhand der dargestellten Schmelzkurven wurde die erste optische Qualitätskontrolle der RT-qPCR durchgeführt. Hierfür wurden vor allem die Negativkontrollen NoRT, NTC, NTC-STA und NRC überprüft.

Die C_q-Werte wurden im Anschluss mit Hilfe des Programms *GenEx* prozessiert. Dabei wurden zunächst alle Proben, die einen C_q-Wert über 22 aufwiesen, entfernt. Anschließend wurde die Analyse der relativen Genexpression mittels $\Delta\Delta C_q$ -Methode durchgeführt (LIVAK und SCHMITTGEN, 2001). Im ersten Schritt erfolgte eine Normalisierung auf die Referenzgene (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *GUSB*, *HPRT1*), danach wurden die technischen Replikate gemittelt und anschließend die relative Änderung der behandelten Probe in Bezug zur unbehandelten Kontrolle berechnet (siehe Gleichung 1-3). Zusätzlich wurde die Expression der unbehandelten K3F11 in Bezug zu den unbehandelten U2OS gesetzt, um eine

Genexpressionsänderung durch das Fehlen von PARP1 unter basalen Bedingungen feststellen zu können.

$$\Delta Cq = Cq_{\text{Zielgen}} - Cq_{\text{Referenzgen}} \quad (1)$$

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq_{\text{Behandlung}} - \Delta Cq_{\text{Kontrolle}} \quad (2)$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Cq} \quad (3)$$

Die normierten Proben wurden anschließend in log₂-Werte umgerechnet, sodass die Kontrolle dem Nullwert gleicht. Eine Änderung von ± 1 wurde als relevanter Einfluss angesehen. Dies entsprach einer Verdopplung (2-fache Induktion) beziehungsweise Halbierung (0,5-fache Repression) der Genexpression im Vergleich zur Kontrolle.

4.7 ANALYSEN AUF PROTEINEBENE MITTELS WESTERN BLOT

Zur Bestimmung des Proteinlevels von p53 und p21 wurde eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot durchgeführt. Der Western Blot ermöglicht eine größenabhängige Auftrennung der Proteine und eine anschließende, spezifische Antikörpergekoppelte Markierung, die das Proteinsignal schließlich sichtbar macht.

4.7.1 KULTIVIERUNG DER ZELLEN

Für die Western Blot Analysen wurden je Versuchsansatz 1×10^6 der U2OS und K3F11-Zellen in Einfachbestimmung in 100 mm Zellkulturschalen ausgestreut und für 24 h kultiviert. Zur Induktion der p53-abhängigen Schadensantwort wurden die Zellen mit IR bestrahlt (siehe 4.4.1) und für 2, 4, 6 und 24 h nachinkubiert. Die Inkubation wurde durch Entfernen des Mediums, Waschen mit PBS und Abtrypsinieren der Zellen abgebrochen. Die Zellen wurden danach in Medium vereinzelt und in ein 15 mL Röhrchen überführt. Mittels Zentrifugation bei 4°C und 1400 rpm für 4 min wurden die Zellen pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 1 mL PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert und das PBS abgenommen. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurde das Zellpellet bei -20 °C gelagert.

4.7.2 PROTEINEXTRAKTION UND -QUANTIFIZIERUNG

Zur Extraktion der Proteine wurden die Zellpellets auf Eis mit einem Mix aus 50 µL Lysepuffer und 1x Proteaseinhibitor versetzt und 30 min auf Eis unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Pellets bei 14000 rpm und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur nächsten Verwendung bei -20 °C gelagert. Das Sediment wurde verworfen.

Die Analyse der Proteingehalte erfolgte mit Hilfe der quantitativen Proteinbestimmung nach Bradford. Bei dieser Analyse handelt es sich um eine photometrische Methode, bei der die Ermittlung der Proteingehalte auf einer Farbreaktion mit dem Farbstoff Comassie Brilliant Blau G-250 basiert. Der Farbstoff bindet in saurer Lösung an die Aminogruppen der Proteine und induziert dadurch eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm. Zur Quantifizierung wurde eine Kalibrierung mit Rinderserumalbumin (BSA) der Konzentrationen von 0,01 bis 0,075 mg/mL hergestellt. Für die Messung wurden die Proben 1:300 mit bidestilliertem Wasser (ddH₂O) verdünnt und anschließend je 20 µL der Proben sowie Kalibrierlösung in eine Kavität einer 96-Well Platte pipettiert. Anschließend wurden 180 µL Bradford-Reagenz (140 µL ddH₂O und 40 µL Bio Rad Bradford-Reagenz) zugegeben, 30 s geschüttelt und nach weiteren 5 min Inkubation die kolorimetrische

Reaktion am TECAN *Infinite*® bei 595 nm gemessen. Innerhalb des Kalibrierbereichs war die Proteinkonzentration linear abhängig zur Absorption und konnte somit quantitativ für die Proben bestimmt werden. Für die Gelelektrophorese wurden die Proben anschließend auf eine Endkonzentration von 50 µg Protein / 20 µL Probenlösung verdünnt.

4.7.3 ELEKTROPHORETISCHE TRENNUNG MITTELS SDS-PAGE

Die Trennung der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE, einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese, bei der mit Hilfe des anionischen Detergens SDS die Einzelladungen der Proteine überdeckt wurden. Dadurch ließen sich die Proteine ausschließlich anhand ihres Molekulargewichts auftrennen und nicht aufgrund ihrer Ladung. Dafür wurden die Zellpellets jeweils mit 6,25 µL ROTI® Load (4x) von Roth versetzt und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Anschließend konnten die Proben für die Gelelektrophorese verwendet werden.

Für die Gelelektrophorese wurden ein 10 %iges Trenngel und ein 4 %iges Sammelgel (Zusammensetzung siehe 8.2.2) hergestellt, in eine Elektrophoresekammer eingespannt und mit Laufpuffer befüllt. Anschließend wurde das Gel mit 8 µL einer Proteinleiter als Molekulargewichtsmarker (Thermo Scientific™ *PageRuler*™ *Prestained Protein Ladder*, 10 bis 180 kDa) und je 26,25 µL der Proben beladen. Die Auftrennung erfolgte zunächst für 5 min bei 50 V und anschließend für ca. 60 min bei 140 V. Das Sammelgel sorgte zu Beginn der Elektrophorese für eine Aufkonzentrierung der Proben. Beim Eintreten der Proteine in das feinporigere Trenngel kam es zu weiteren Anstauereffekten, wodurch eine Bandenschärfung erreicht werden konnte. Die Proteine befanden sich im Trenngel in einem homogenen Puffer und konnten aufgrund ihrer Molekülgröße aufgetrennt werden.

4.7.4 PROTEINTRANSFER MITTELS WESTERN BLOT

Nach der Auftrennung erfolgte der Proteintransfer mittels *Wet-Blot* über Nacht auf eine PVDF-Membran. Der Aufbau des Tank-Blot-Systems ist in Abb. 16 dargestellt. Membran und Gel wurden direkt von je zwei *Whatman*-Papieren umgeben, die wiederum in einem Vlies eingebettet waren. Alle Komponenten wurden vor dem Zusammenbau in Transferpuffer äquilibriert, wobei die PVDF Membran zuvor in Methanol aktiviert wurde. Das Tank-Blot-System wurde in eine Apparatur gesetzt und mit gekühltem Transferpuffer befüllt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 4 °C über Nacht bei 30 V.

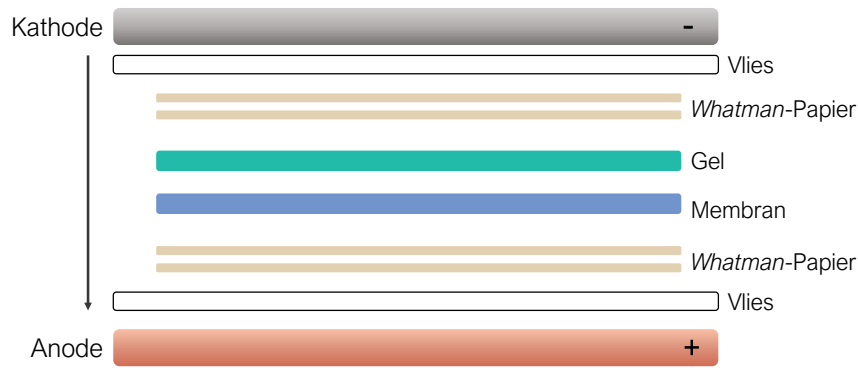


Abb. 16: Aufbau des Tank-Blot-Systems. Die Membran wird anodenseitig in das System eingebracht. Durch Anlegen einer Spannung wandern die negativ geladenen Proteine von dem Gel in Richtung Anode auf die Membran. Vlies und *Whatman*-Papiere umschließen Gel und Membran und garantieren bei der Übertragung einen gleichbleibenden Fluss des Transferpuffers.

Der erfolgreiche Proteintransfer wurde anschließend mit der reversiblen Ponceau-S Färbung überprüft. Dafür wurde die Membran für 1 min in der Ponceau-S Färbung inkubiert und anschließend für 5 min unter Schwenken mit ddH₂O gewaschen, um überschüssige Farbe zu entfernen. Für die semiquantitative Auswertung über die Gesamtprotein Normalisierung wurde außerdem ein digitales Bild der Membran am *Luminescent Image Analyzer* LAS-3000 erstellt. Ein Beispiel ist in Abb. 17 dargestellt. Nach Färbung mit Ponceau sind die einzelnen Proteinbanden der Probe zu erkennen, die jeweils eine Protein-*Lane* bilden. Die Intensität der Proteinbanden einer *Lane* ergeben die Gesamtkonzentration der Probe. Mittels ddH₂O wurde die Färbelösung anschließend wieder entfernt.

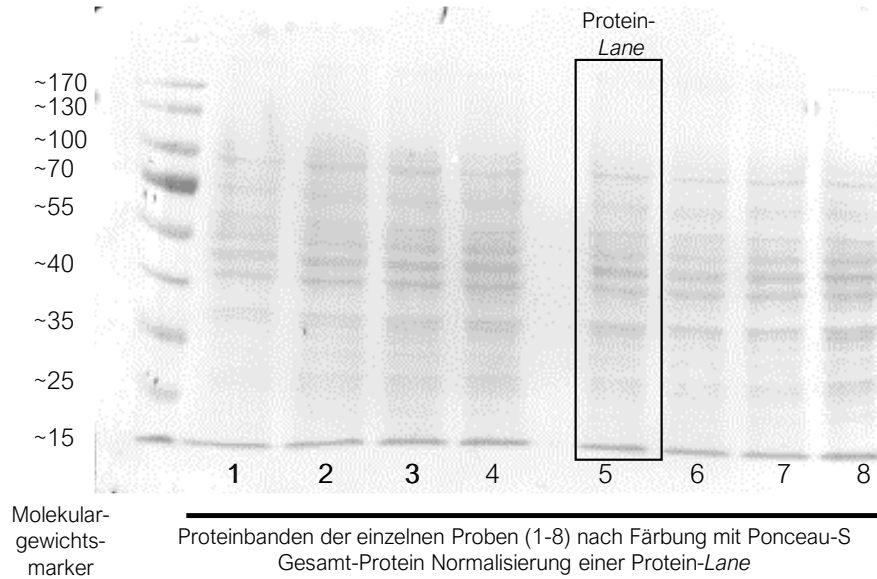


Abb. 17: Beispiel für die Gesamtprotein Normalisierung. Die Membran wurde nach dem Wet-Blot mit der Färbelösung Ponceau-S angefärbt und am *Luminescent Image Analyzer* LAS-3000 ein digitales Bild erstellt. Die Intensitäten aller Proteinbanden einer *Lane* ergeben die Gesamtprotein Konzentration der Probe.

4.7.5 IMMUNODETEKTION MITTELS CHEMILUMINESZENZ

Die nachfolgend verwendeten Antikörper und die entsprechenden Verdünnungen sind in Tab. 5 aufgelistet. Vor der spezifischen Immunodetektion wurde die Membran für 1 h mit 5 %iger Milch-Blockierlösung (Milchpulver in PBST) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzuschirmen. Alle nachfolgenden Antikörperlösungen mit Ausnahme der p21 Antikörperlösung wurden ebenfalls mit 5 %iger Milch-Blockierlösung verdünnt. Der p21 Antikörper wurde mit 5 %iger BSA-Lösung verdünnt.

Nach dem Blockieren wurde die Membran anschließend über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper anti p53 auf dem Rotator inkubiert. Nach der Primärantikörper-Inkubation wurde die Membran drei Mal für jeweils 5 min mit PBST gewaschen und mit dem anti *mouse* (m-IgGκ) Sekundärantikörper für 2 h bei RT auf dem Rotator inkubiert. Nach der Sekundärantikörper-Inkubation wurde erneut drei Mal für jeweils 5 min mit PBST gewaschen. Das Chemilumineszenz-Signal konnte mit Hilfe des *Amersham™ ECL Prime Western-Blot-Detektionsreagenz* am LAS-3000 von FujiFilm sichtbar gemacht werden. Zur Detektion wurde eine Lösung aus den beiden enthaltenen Reagenzien (Luminol- und Peroxid-Lösung) im Verhältnis 1:1 erstellt und auf die Membran aufgetragen. Nach einer Wirkungszeit von 60 s wurde die überschüssige Lösung abgenommen und die Chemilumineszenz unmittelbar danach am *Luminescent Image Analyzer* LAS-3000 gemessen.

Analog erfolgte die Detektion von p21 mit den entsprechenden Primärantikörpern und dem anti *rabbit* Sekundärantikörper (siehe Tab. 5).

Tab. 5: Übersicht der Primärantikörper im Western Blot.

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Label
anti p53	<i>mouse</i>	1/500	GA616 DAKO
anti p21 Waf1/Cip1	<i>rabbit</i>	1/1000	#2947 Cell Signaling

Tab. 6: Übersicht der Sekundärantikörper im Western Blot.

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Label
m-IgGk BP-HRP	-	1/1000	sc-516102 Santa Cruz
anti <i>rabbit</i> igG-HRP	<i>mouse</i>	1/1000	sc-2357 Santa Cruz

4.7.6 SEMIQUANTITATIVE AUSWERTUNG

Die semiquantitative Auswertung des Proteinlevels erfolgte mit Hilfe der Software *Aida Image Analyzer* v.3.27. Hierbei wurden die Peakflächen der Zielproteine sowie die Peakfläche für die Gesamtprotein Konzentration bestimmt. Für die Berechnung wurde anschließend zunächst jeweils die Peakfläche der Bande des Zielproteins (*target protein*; TP) auf die Peakflächen der gesamten Protein Lane für die jeweilige Probe (*whole protein*; WP) normiert, woraus sich der NDW (*normalized density to WP*) ergab. Um die relative Änderung beziehungsweise Bandenintensität (*relative intensity*, RI) der behandelten Proben zur Kontrolle zu berechnen, wurde das Verhältnis der NDW der Probe zur NDW der Kontrollprobe gebildet. Die Berechnungen sind in Formel (4) und (5) dargestellt.

$$NDW = \frac{TP \times WP_{Kontrolle}}{WP} \quad (4)$$

$$RI = \frac{NDW}{NDW_{Kontrolle}} \quad (5)$$

4.8 PHOSPHORYLIERUNGSANALYSEN MITTELS IMMUNOFLUORESZENZ

Mit Hilfe der Immunofluoreszenzreaktion wurde die Phosphorylierung von ATM, H2AX und p53 in der DDR untersucht. Dafür wurden spezifische Fluoreszenz-markierte Antikörper gewählt, die an das jeweilige Phosphoprotein binden. Die Fluoreszenzintensität konnte anschließend quantitativ am Mikroskop mit Hilfe der Software Zen2 Pro (Zeiss) ausgewertet werden.

4.8.1 KULTIVIERUNG DER ZELLEN

Für Versuche wurden je $1,5 \times 10^5$ Zellen auf Deckgläschen (\varnothing 12 mm) in 35 mm Zellkulturschalen in Doppelbestimmungen ausgestreut und für 24 h kultiviert. Zur Induktion der DDR wurden die Zellen mit 10 Gy bestrahlt (siehe 4.4.1). Je nach Zielprotein wurden die Nachinkubationszeiten unterschiedlich gewählt. Für die Proteine der DNA-Schadenserkennung ATM und H2AX wurden die Proben für 0,5, 2 und 6 h nachinkubiert. Für die Detektion der Phosphorylierung von p53 wurde die Nachinkubation nach 2, 6 und 24 h abgebrochen.

4.8.2 FIXIERUNG UND PERMEABILISIERUNG DER ZELLEN

Im Anschluss an die Nachinkubationszeit wurde das Medium entfernt und die Zellen mit je 1 mL 3,7 %igem Formaldehyd bei RT für 10 min inkubiert, sodass die Zellen auf den Deckgläschen fixiert wurden. Im Anschluss wurden die Zellen drei Mal für 5 min auf dem Schüttler mit PBS gewaschen.

Um die Zugänglichkeit der Antikörper zu ermöglichen, wurden die Zellen mit je 2 mL 0,2 % Triton X-100 Lösung (in PBS) für 10 min bei 4 °C behandelt.

4.8.3 IMMUNODETEKTION MITTELS FLUORESZENZ

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Zellen über Nacht bei 4 °C mit 2 %iger BSA-Blockierlösung inkubiert. Danach wurden die Proben mit je 50 μ L der Primärantikörperlösungen, die in Tab. 7 dargestellt sind, in einer feuchten Kammer für 1 h bei RT inkubiert. Die anti p-p53 Antikörper wurden jeweils in Kombination mit anti p53 inkubiert, alle anderen Inkubationen erfolgten separat. Die Deckgläschen wurden nach der Inkubation wieder zurück in die Zellkulturschalen gelegt und drei Mal mit 2 mL eiskaltem PBS für je 5 min gewaschen. Die jeweilige passende Sekundärantikörper Inkubation erfolgte analog zum Primärantikörper. Nach erneutem Waschen wurden die Deckgläschen mit

Fluoroshiled Mounting Medium with DAPI (abcam104139) auf Objektträger aufgebracht und luftdicht mit Lack versiegelt.

Tab. 7: Übersicht der Primärantikörper in der Immunofluoreszenz

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Label
anti p-ATM (Ser1981)	<i>mouse</i>	1/1000	sc-47739 <i>Santa Cruz</i>
anti γ H2AX (Ser139)	<i>mouse</i>	1/2000	JBW 301 <i>Milipore</i>
anti p-p53 (Ser15)	<i>rabbit</i>	1/500	9284 <i>Cell Signaling</i>
anti p-p53 (Ser20)	<i>rabbit</i>	1/500	11537140 <i>Invitrogen</i>
anti p53	<i>mouse</i>	1/200	11374663 <i>Invitrogen</i>

Tab. 8: Übersicht der Sekundärantikörper in der Immunofluoreszenz

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Label
Alexa Fluor 488- <i>conjugated</i> anti <i>mouse</i>	<i>goat</i>	1/1000	A-11001 <i>Invitrogen</i>
Cy3- <i>conjugated</i> anti <i>rabbit</i>	<i>goat</i>	1/1000	111-165-003 <i>Jackson</i>

4.8.4 AUSWERTUNG DER SIGNALINTENSITÄT

Die Auswertung der Signale der verschiedenen DDR-Proteine erfolgte durch Auswahl kolokalisierter Fluoreszenzsignale von Alexa Fluor 488 beziehungsweise Cy3 und DAPI unter dem Mikroskop. Pro Deckgläschen wurden zehn Fotos erstellt. Daraus wurde mit Hilfe der Software Zen2 Pro (Zeiss) jeweils die Gesamtfluoreszenz des Zellkerns ausgewertet. Anschließend wurde die Signalintensität der behandelten Proben jeweils auf die unbehandelte Kontrolle bezogen und somit die relative Änderung ermittelt.

4.9 STATISTIK

Die Daten wurden als Mittelwert von mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten dargestellt, von denen, wenn nicht anders angegeben, die Versuche jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Unterschiede im Zellwachstum, in der Fähigkeit zur Koloniebildung, in der Verteilung des Zellzyklus sowie in den Veränderungen der Genexpression wurden mit einem gepaarten, zweiseitigen t-Test analysiert. Ein Wert von $p \leq 0,05$ wurde als signifikanter Unterschied angesehen.

5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden vorab publiziert in GAJEWSKI, S. UND A. HARTWIG 2020: PARP1 Is Required for ATM-Mediated p53 Activation and p53-Mediated Gene Expression after Ionizing Radiation. *Chemical research in toxicology*, 33 (7), 1933–1940.

5.1 GENERIERUNG DER U2OS *PARP1-KNOCKOUT* ZELLINIE K3F11 MITTELS CRISPR/CAS9

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zu Beginn das *Genome Editing*-System CRISPR/Cas9 im Arbeitskreis etabliert und die *PARP1-Knockout* Zelllinie K3F11 generiert. Abb. 18 zeigt die Abfolge der einzelnen Arbeitsschritte, die für die Generierung notwendig waren.

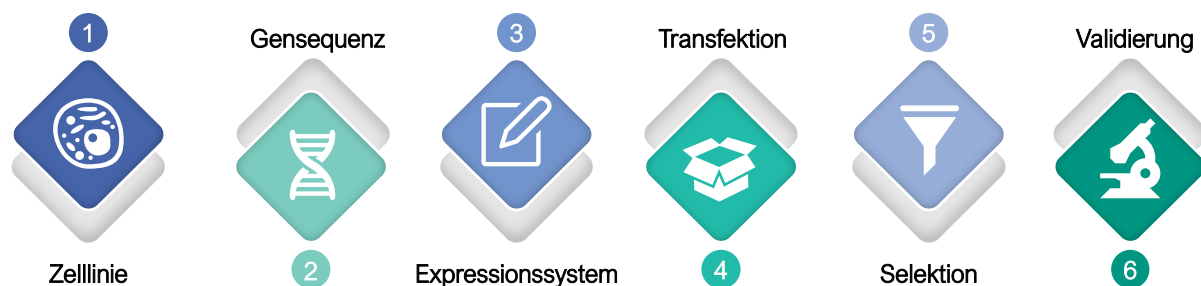


Abb. 18: Arbeitsabfolge zur Generierung einer *Knockout* Zelllinie mittels CRISPR/Cas9. (1) Auswahl der geeigneten Zelllinie, (2) Recherche einer geeigneten Zielsequenz für die komplementäre gRNA, (3) Auswahl des Expressionssystems für die Transfektion, (4) Wahl des passenden Transfektionsreagenzes, (5) Auswahl einer geeigneten Methode zur Selektion der Klone, (6) Validierung des *Knockouts*.

Im Material- und Methoden-Teil findet sich die genaue Durchführung der einzelnen Schritte (siehe 4.2). Im Folgenden wird näher auf die Entwicklung der Arbeitsprozesse und die letztendliche Validierung des K3F11 *Knockout*-Klons eingegangen. Daher werden zunächst folgende Prozessschritte genauer beschrieben: Die Auswahl der Zelllinie, die Bestimmung der Zielsequenz im Genom, die Auswahl des Expressionssystems und die Selektion der Klone. Abschließend werden die Ergebnisse der Validierung gezeigt.

5.1.1 AUSWAHL DER ZELLINIE

Die Auswahl der passenden Modell-Zelllinie richtete sich nach dem Ziel der Fragestellung. Da vor allem die DNA-Schadensantwort nach ionisierender Strahlung untersucht werden sollte, war es notwendig eine Zelllinie heranzuziehen, die p53 profizient war und keine

Mutation im *p53*-Gen (*p53wt*) vorwies (siehe 2.1.3.1). Die meisten immortalisierten Zelllinien, die in der Forschung Einsatz finden, stammen aus Tumorgewebe. Allerdings ist die Inaktivierung von p53 durch eine Mutation im entsprechenden Gen eines der häufigsten Ereignisse, die während der Kanzerogenese auftreten. Neben dem genetischen Defekt kann die p53-Funktion auch über eine Virusinfektion gehemmt werden, wie es in der Gebärmutterhalskrebs-Zelllinie HeLa beschrieben wird. Die Zellen weisen zwar einen *p53wt* Status auf, allerdings konnte gezeigt werden, dass die Virus-exprimierten Proteine (E6 und E7) mit p53 interagieren, den Tumorsuppressor inaktivieren und zu seinem proteasomalen Abbau führen können (HOPPE-SEYLER und BUTZ, 1993; THOMAS et al., 1999; YIM und PARK, 2005).

Eine Modell-Zelllinie, die daher speziell für Fragestellungen der DNA-Reparatur herangezogen wird, ist die Osteosarkom Zelllinie U2OS. Sie besitzt einen *p53wt* Status, keine Virusinfektion und eine funktionierende p53-Schadensantwort (DILLER et al., 1990). Die Zelllinie ist chromosomal stark verändert, wobei die Chromosomenzahl im hypertriploiden Bereich liegt. Sie gilt als einfach zu handhaben und gut zu transfizieren (ATCC® HTB-96™). Aufgrund der genannten Eigenschaften wurde daher die U2OS Zelllinie für die Generierung des *PARP1-Knockouts* mittels CRISPR/Cas9 gewählt.

5.1.2 BESTIMMUNG DER ZIELGENSEQUENZ

Die Spezifität der Cas9-Nuklease (*S. pyogenes*) wurde durch die 20-nt lange Leitsequenz innerhalb der gRNA bestimmt. Für die Funktion von Cas9 musste diese Zielsequenz zum einen unmittelbar vor einer 5'-NGG PAM stehen, die nicht Teil dieser Zielsequenz ist, und zum anderen mussten die Basen der Leitsequenz komplementär zum entgegengesetzten Strang ausgerichtet sein. Das verwendete System ist in Abb. 19 veranschaulicht. Cas9 induzierte folglich einen Schnitt drei Basenpaare vor der PAM-Sequenz (RAN et al., 2013).

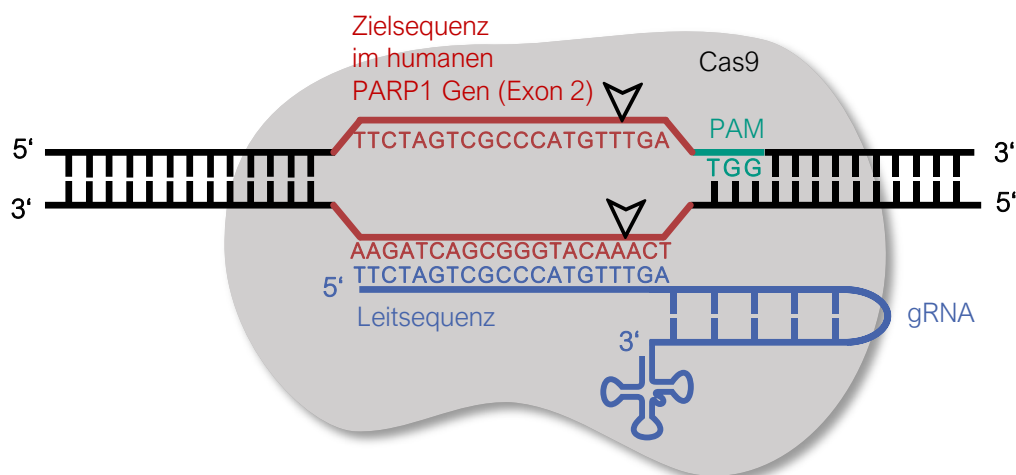


Abb. 19: CRISPR/Cas9-System mit zielgerichteter gRNA für den *PARP1-Knockout* im humanen Genom. Die Leitsequenz der gRNA (blau) paart sich mit dem DNA-Ziel (rot) direkt vor dem für das Cas9 erforderlichen 5'-TGG PAM-Motiv (grün). Cas9 vermittelt einen Doppelstrangbruch drei Basenpaare vor der PAM-Sequenz.

Neben dem Kriterium der 5'-NGG PAM-Sequenz, galt es zum andern die sogenannte *Off-Target*-Aktivität des Systems zu minimieren. *Off-Target*-Effekte entstehen, wenn das Zielgenom homologe Sequenzen zur Zielsequenz an variierenden Genloci aufweist und es infolgedessen zu ungewollten DSBs und Mutationen kommt. Im Vergleich zu anderen Mutageneseverfahren treten diese, aufgrund der hohen Spezifität des CRISPR/Cas9-Systems, weniger häufig auf (RAN et al., 2013). Das Ausmaß, in dem eine bestimmte Zielsequenz eine *Off-Target*-Aktivität aufweist, hängt von einer Kombination verschiedener Faktoren ab, die experimentell ermittelt wurden (HSU et al., 2013) und mittlerweile in diversen Online CRISPR-Design Tools (*Benchling*, *CasOFFinder*, *CHOPCHOP*, *CRISPOR*) Anwendung finden. Mit Hilfe dieser Tools ist eine mathematische Evaluation von *Off-Target*-Bereichen in Zielsequenzen möglich. So ist beispielsweise die Wahrscheinlichkeit einer Fehlpaarung abhängig vom Ort innerhalb einer Leitsequenz. Der Bereich am 5'-Ende der Leitsequenz zeigt häufiger Fehlpaarungen als das 3'-Ende. Außerdem werden nur bis zu drei *Mismatches* toleriert, andernfalls kommt es zu keiner Fehlpaarung der gRNA. Basierend auf diesen experimentell ermittelten Daten, kann eine umfassende Analyse nach *Off-Target*-Sequenzen im Zielgenom durchgeführt werden. Ein *Off-Target Score* der Sequenz von > 50 gilt dabei als hoch spezifisch. Diese Scores werden auch bei den genannten Online CRISPR-Design Tools verwendet (HSU et al., 2013; RAN et al., 2013).

Für die Analyse der geeigneten Zielsequenz wurde daher die webbasierte Software *Benchling Life Sciences R&D* herangezogen, die den *Off-Target Score* nach HSU et al., 2013

berechnet. Die Software bietet ein *Tool* mit dem gRNAs für verschiedene CRISPR-Systeme designt werden können. Die Software berechnet außerdem einen *On-Target Score*, der jedoch nicht für die Auswahl miteinbezogen wurde. Ein Screenshot der Arbeitsoberfläche von *Benchling Life Sciences R&D* ist in Abb. 20 dargestellt. Hierbei wurden die für den Arbeitsprozess relevanten Bereiche hervorgehoben. Links ist ein Ausschnitt der humanen Gensequenz von *PARP1* zu sehen, welcher das für die Editierung ausgewählte Exon 2 (grau markiert) zeigt. Das grün beziehungsweise rot gefärbte Quadrat unter der gRNA-Sequenz entspricht dem *On-* (rot; 19) beziehungsweise *Off-* (grün; 83) *Target Score* und die Position gibt den potenziellen DNA-Schnitt an. Rechts oben dargestellt ist der Auswahlbereich, in dem die entsprechenden gRNAs ausgewählt werden. Rechts unten sind die ermittelten gRNAs mit der jeweiligen Position im Genom, dem Strang (*sense + / antisense -*), der entsprechenden Nukleotidsequenz, dem zugehörigen PAM und dem *On-* beziehungsweise *Off-Target Score* aufgelistet.

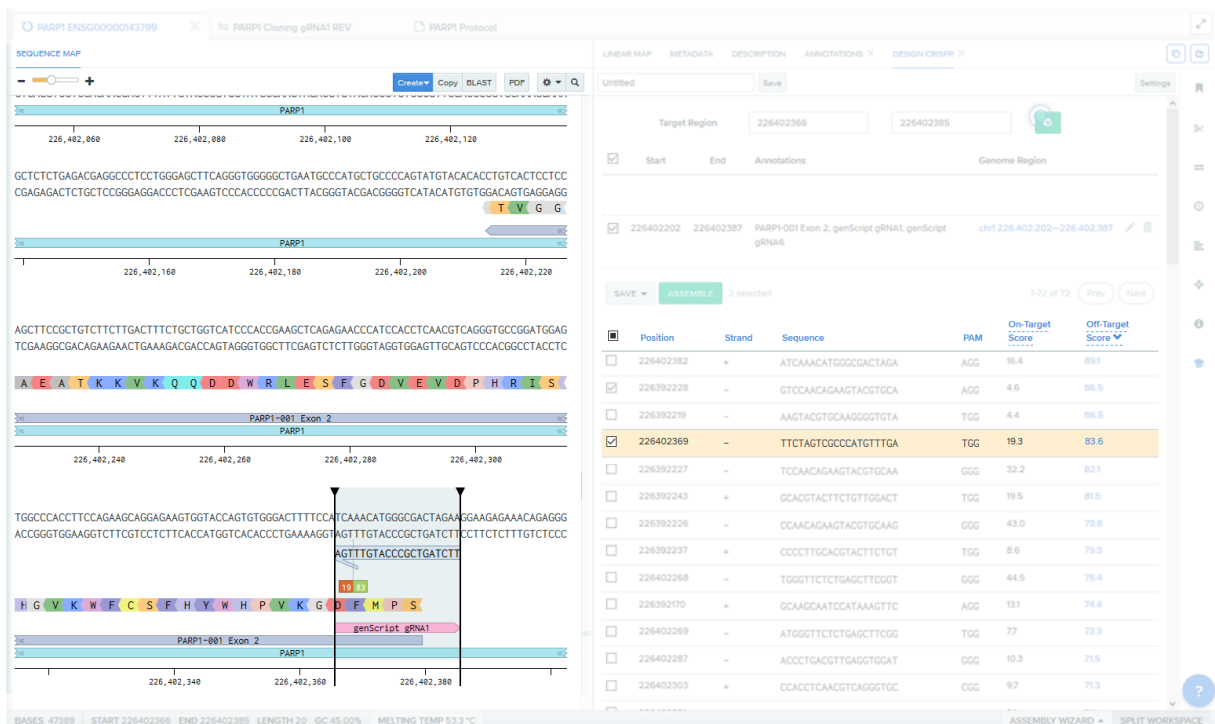


Abb. 20: Ausschnitt der Arbeitsoberfläche der webbasierten *Benchling Life Sciences R&D* Software (Erstellt am 22.01.18). Ermittlung der gRNA für den *PARP1-Knockout* im humanen Genom. Links ist ein Ausschnitt der humanen Gensequenz von *PARP1* zu sehen. Rechts oben dargestellt ist der Auswahlbereich, in dem nach gRNAs gesucht wurde und rechts unten die ermittelten gRNAs mit der jeweiligen Position im Genom, dem Strang (+/-), der Sequenz, dem PAM und dem *On-* und *Off-Target Score*. Analysiert wurde der *Off-Target Score* nach HSU et al., 2013. Die verwendete „GenScript gRNA1“ ist im linken sowie rechten Abschnitt hervorgehoben.

Um die Wahrscheinlichkeit eines frühen Stopcodons durch einen reparaturbedingten *Frameshift* zu erhöhen, wurden für die Auswahl der geeigneten gRNA nur die ersten Exons (1-4) des *PARP1*-Gens herangezogen. Es zeigten sich auch mögliche Sequenzen mit einem höheren Score, die allerdings in späteren Exons lokalisiert wurden. Für die Anwendung im Zielgen *PARP1* (ENSG00000143799) wurde die gRNA der Sequenz TTCTAGTCGCCCCATGTTTGA (*antisense-strand*) im Exon 2 ausgewählt, auf der die PAM Sequenz TGG folgte, zu sehen im CRISPR/Cas9-System in Abb. 19 und hervorgehoben als „GenScript gRNA1“ in Abb. 20. Der berechnete *Off-Target Score* der gRNA betrug 83,6 und entsprach damit einer hohen Spezifität.

5.1.3 AUSWAHL DES EXPRESSIONSSYSTEM

Für die Expression des CRISPR/Cas9-Systems in den U2OS-Zellen wurde ein gRNA-exprimierendes Plasmid gewählt, das in Abb. 21 dargestellt ist. Als Plasmidgerüst diente das Cas9-exprimierende pSpCas9(BB)-2APuro (PX459) V2.0 (*Addgene #62988*). Das Plasmid besaß ein gRNA-Gerüst und entsprechende Klonierungsstellen (RAN et al., 2013). Die Klonierung der ausgewählten gRNA wurde von *GenScript* durchgeführt.

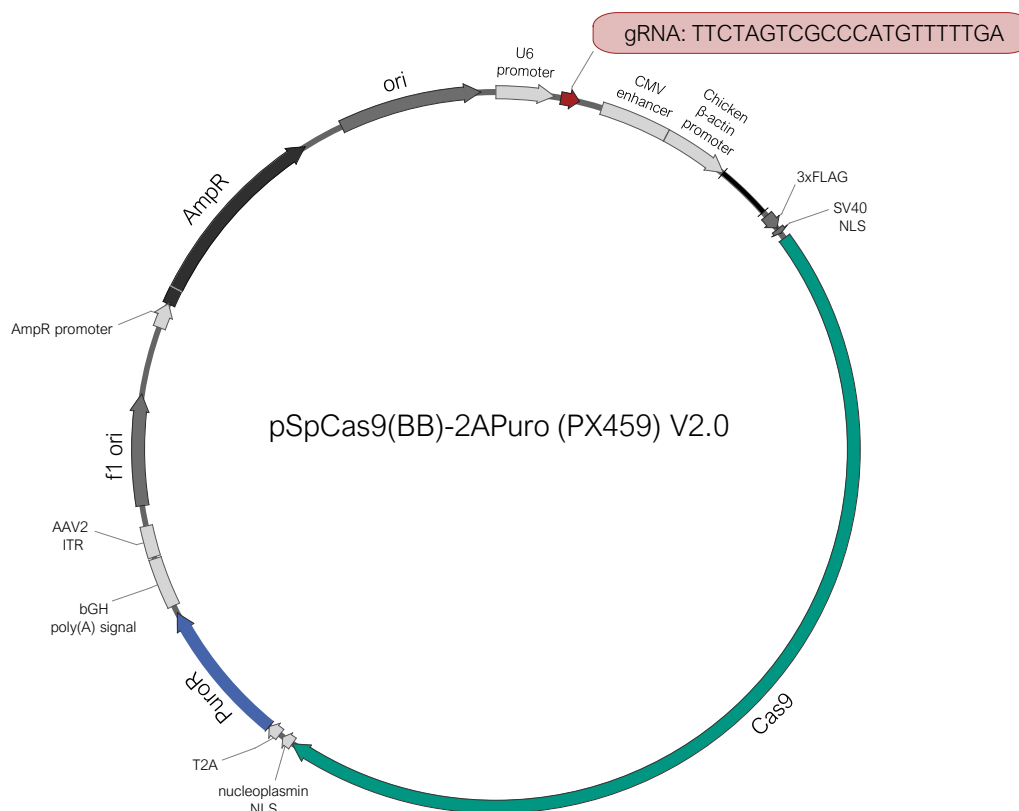


Abb. 21: Aufbau des verwendeten Plasmids pSpCas9(BB)-2APuro (PX459) V2.0 (*Addgene #62988*). Das Plasmid wurde mit bereits klonierter gRNA der Sequenz TTCTAGTCGCCCCATGTTTGA von *GenScript* bezogen (Darstellung mit Hilfe der Software *Snapgene* erstellt).

Für seine Replikation und Selektion in *E.coli* Zellen, besaß das Plasmid zum einen den bakteriellen Replikationsursprung (ORI) und zum anderen einen selektierbaren Marker, der eine Antibiotikaresistenz gegen Ampicillin (AmpR) kodierte. Durch Zugabe von Ampicillin zum Nährmedium konnten die *E.coli* Kolonien nach Amplifikation der Plasmid-DNA somit selektiert werden.

Das nach 4.2.1 aufgearbeitete Plasmid wies eine hohe Reinheit auf und entsprach einer Konzentration von 865,3 µg/µL.

5.1.4 SELEKTION DER KLONE

Eine stabile Transfektion entspricht dem Einbau fremden Genmaterials in das Zielgenom. Enthält das fremde Genmaterial zusätzlich ein Antibiotika-Resistenzgen, wird oft nach Transfektion ein sogenannter Selektionsdruck aufgebaut, indem die transfizierten Zellen fortwährend mit Antibiotika-zugesetztem Medium kultiviert werden. Dadurch können nur Zellen, die das Resistenzgen eingebaut haben und stabil exprimieren, weiter überleben. Im Gegensatz dazu wird bei der eingebrachten CRISPR/Cas9-Information eine transiente Expression des Editierungssystems angestrebt. Die anschließende, spezifische Editierung der DNA führt zu einer permanenten Veränderung des Zielgenoms, wobei die CRISPR/Cas9-Information selbst nicht in das Zielgenom eingebracht, sondern mit fortwährender Proliferation der Zellen wieder abgebaut wird. Das verwendete Plasmidkonstrukt enthielt einen Bereich, welcher für die Puromycin-Resistenz kodierte. Dies wurde zur kurzfristigen Selektion innerhalb von 24 h nach Transfektion der Zellen genutzt. Hierfür wurde im Voraus die visuelle Toxizität unter dem Mikroskop bestimmt, um die geringste Konzentration für die U2OS-Zellen zu ermitteln, bei der 100 % der nicht transfizierten Zellen innerhalb von 24 h abstarben. Der ermittelte Wert lag bei 2 µg/mL. Die Behandlung der Zellen mit Puromycin-zugesetztem Medium nach der Transfektion führte demnach zu einem Absterben aller Zellen, in denen es zu keiner erfolgreichen Expression des Systems kam. Nach der Puromycin-Inkubation lag die Konfluenz der Zellen bei 50 %, was einer Transfektionseffizienz von ebenfalls 50 % entsprach. Abschließend wurden die Zellen mittels Einzelzellverdünnung isoliert und die Klone hochkultiviert.

5.1.5 VALIDIERUNG DES *KNOCKOUTS*

Die einzelnen Klone wurden mittels *Screening* sowie klassischem Western Blot auf den erfolgreichen *PARP1-Knockout* getestet und anschließend immunofluorimetrisch auf die PARylierungsaktivität untersucht. Für den *Screening* Western Blot wurde entsprechend

4.2.4.1 vorgegangen. Die Ergebnisse des K3F11-Klons sowie ausgewählter weiterer Klone sind in Abb. 22 gezeigt. Als Ladekontrolle wurde α -Tubulin verwendet.

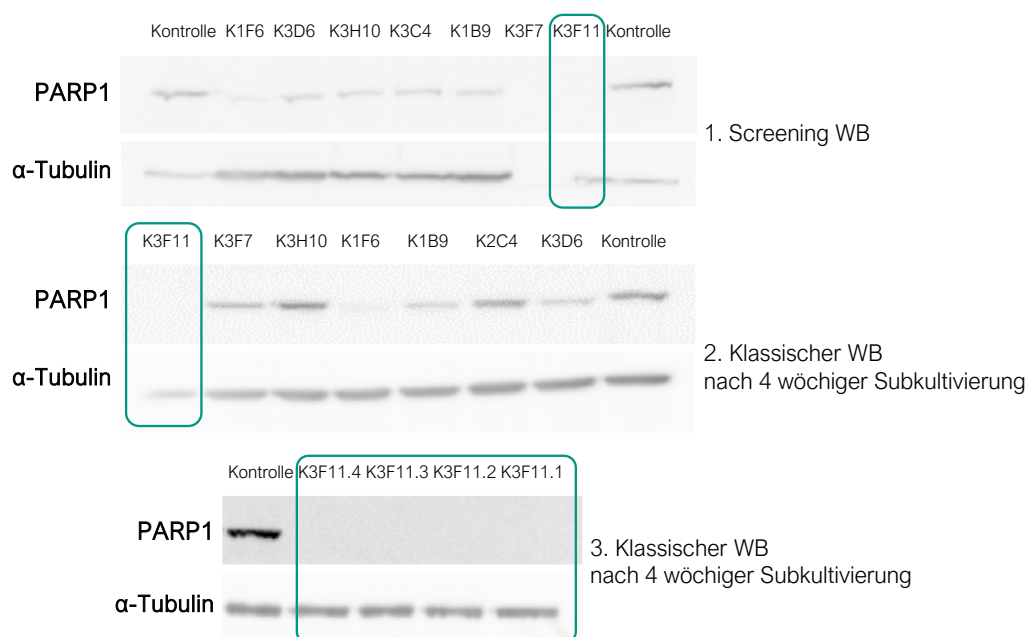


Abb. 22: Validierung des U2OS *PARP1-Knockouts* K3F11 durch Analyse auf Proteinebene mittels (1.) *Screening* und (2. & 3.) klassischem Western Blot (WB). Zu sehen sind jeweils die PARP1 (116 kDa) Banden der Kontrolle (U2OS Wildtyp) und die der einzelnen Klone. Als Ladekontrolle diente das Haushaltsprotein α -Tubulin (52 kDa). Die 1., 2. und 3. Analyse lagen jeweils etwa vier Wochen auseinander. Nach dem 2. Western Blot wurde der K3F11 Klon gesplittet und vier Varianten über einen vierwöchigen Zeitraum kultiviert, bis die einzelnen Varianten nochmals getestet wurden.

Die erste Aufnahme zeigt das Ergebnis eines Blots mit der Kontrolle (U2OS Wildtyp) und mehreren getesteten Klone, die bis auf K3F11 ein schwaches bis deutlich positives PARP1 Signal zeigten (Abb. 22 1.). Das Signal der Ladekontrolle von α -Tubulin war bei K3F11 nicht eindeutig. K3F11 sowie weitere vielversprechende Klone wurden im klassischen Western Blot nach einer etwa vierwöchigen Kultivierungszeit nochmals getestet (Abb. 22 2.). Die 2. Analyse zeigte keine Proteinbande für PARP1 im K3F11 Klon, jedoch ein deutliches Signal der Ladekontrolle. Bei allen weiteren getesteten Klone konnte ein PARP1-Signal detektiert werden. K1F6 zeigte beispielsweise eine sehr schwache Bande, was möglicherweise auf einen *Knockdown* zurückzuführen war. Da das Ziel ein vollständiger *Knockout* von *PARP1* war, wurde lediglich K3F11 für alle weiteren Versuche herangezogen. Um zu bestätigen, dass es sich um einen dauerhaften *PARP1*-Verlust handelte, wurden nach weiteren vier Wochen mehrere Subkultivierungsansätze des K3F11 Klons nochmals in einem klassischen Western Blot auf das Fehlen des PARP1-Signals getestet, was in der letzten Aufnahme (Abb. 22 3.) zu sehen ist. Alle Proben zeigten ein deutliches Signal der α -Tubulin Bande, jedoch

keine Bande für PARP1. Im nächsten Schritt wurde die PARylierungsaktivität des K3F11 Klons im Vergleich zu den U2OS untersucht. Abb. 23 zeigt die *Knockout* Validierung von K3F11 auf funktioneller Ebene. Hierfür wurden die U2OS sowie die K3F11-Zellen mit 100 μ M H_2O_2 für 5 min behandelt, um die PARylierungsaktivität zu induzieren. Die PAR-Signale wurden anschließend durch Immunfluoreszenzmarkierung analysiert. Zudem wurden die Zellkerne mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff DAPI angefärbt.

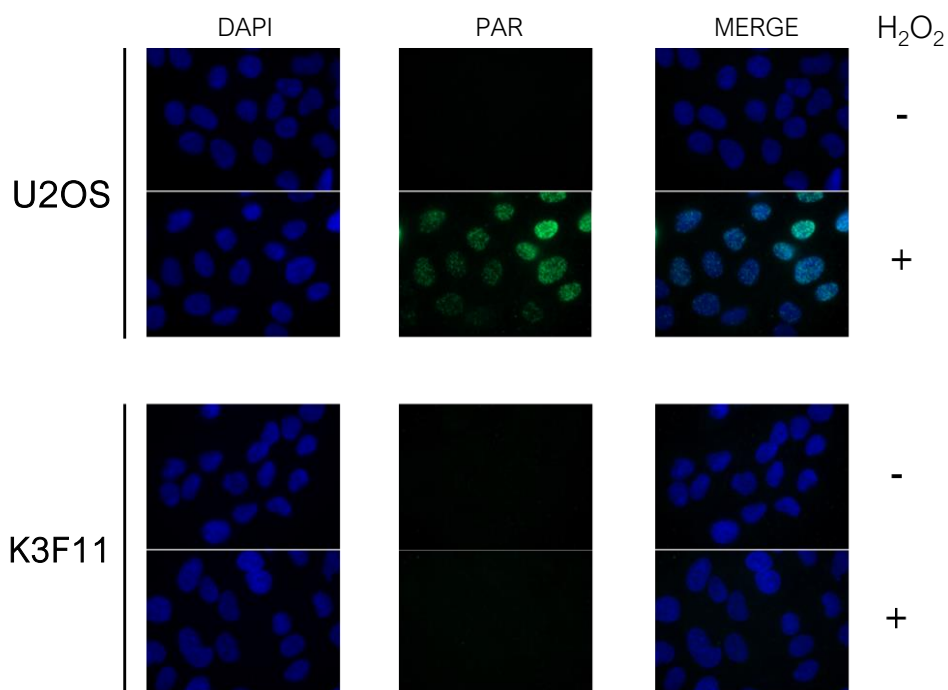


Abb. 23: Validierung des U2OS *PARP1-Knockouts* durch immunfluorimetrische Analyse der PARylierung. Die PARylierungsaktivität wurde durch Behandlung der U2OS sowie K3F11-Zellen mit 100 μ M H_2O_2 für 5 min induziert. Die Zellen wurden auf Deckgläschen fixiert und mit einem anti PAR-Antikörper sowie DAPI inkubiert. Zu sehen sind jeweils die unbehandelten Kontrollen sowie die mit H_2O_2 behandelten Proben beider Zelllinien.

In den U2OS-Zellen wurden im Zellkern nach der Behandlung mit H_2O_2 im Vergleich zur unbehandelten U2OS Kontrolle deutliche PARylierungssignale identifiziert. Die mit H_2O_2 behandelten K3F11-Zellen zeigten keine Signalunterschiede zur unbehandelten K3F11 Kontrolle und waren ebenfalls vergleichbar mit der U2OS Kontrolle, was den vollständigen und funktionellen *Knockout* von *PARP1* bestätigte.

5.2 EINFLUSS DES *PARP1*-KO UNTER BASALEN BEDINGUNGEN

Nach Generierung der K3F11 Zelllinie (*Knockout*; KO) wurden zunächst Charakterisierungsanalysen durchgeführt, um den Einfluss des *PARP1* KO unter basalen Bedingungen mit der *PARP1* profizienten U2OS Zelllinie (*Wild type*; WT) zu vergleichen. Hierfür wurden die Wachstumseigenschaften der Zelllinien verglichen, die Koloniebildungsfähigkeit bewertet und die Zellzyklusverteilung über einen Zeitraum von 96 h analysiert. Außerdem wurde überprüft, ob das Fehlen von *PARP1* unter basalen Bedingungen zu transkriptionellen Veränderungen führt. Hierfür wurde ein Genexpressionsprofil mit Genen der DNA-Reparatur, der Zellzyklusregulation, der Proliferation, der Apoptose, der Stressantwort sowie ausgewählter Transkriptionsfaktoren erstellt.

5.2.1 WACHSTUM UND KOLONIEBILDUNGSFÄHIGKEIT

Um mögliche Unterschiede in den Wachstumseigenschaften festzustellen, wurde die Verdopplungszeit der Population (*population doubling time*; PDT) und die Fähigkeit zur Koloniebildung beider Zelllinien miteinander verglichen.

Für die Bestimmung der Wachstumseigenschaften wurden die Zellen ausgestreut und über einen Zeitraum von 168 h kultiviert. Dabei wurde nach jeweils 24 h die Zellzahl ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 24a als Wachstumskurven beider Zelllinien dargestellt. Bereits während der Kultivierung der KO-Zellen war ein verlangsamtes Wachstum im Vergleich zu den WT-Zellen visuell feststellbar. Die PDT wurde für beide Zelllinien innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase von 24 h bis 96 h ermittelt (siehe 4.3.1). Ab einer Wachstumsdauer von 72 h zeigte sich ein Unterschied der Wachstumsrate zwischen den Zelllinien. Die KO-Zellen zeigten eine etwas verlangsamte Wachstumsrate im Vergleich zu den WT-Zellen mit einer PDT von 29,1 h für die KO-Zelllinie beziehungsweise einer PDT von 25,6 h für die WT-Zelllinie. Die hier ermittelten PDT Werte für die U2OS-Zellen sind vergleichbar mit Literaturwerten von etwa 24 h (PEREGO et al., 1999; SOLLY et al., 2004).

Darüber hinaus wurde untersucht, ob das Fehlen von *PARP1* langfristige Auswirkungen auf die Fähigkeit zur Koloniebildung hatte. Hierfür wurden die Zellen für 10-14 Tage kultiviert, bis Kolonien sichtbar waren. Diese Kolonien wurden im Anschluss ausgezählt. Die Koloniebildungsfähigkeit der KO-Zellen wurde auf die der WT-Zellen bezogen und in Abb. 24b dargestellt. Die KO-Zellen bildeten im Vergleich zu den WT-Zellen etwa 40 % weniger Kolonien.

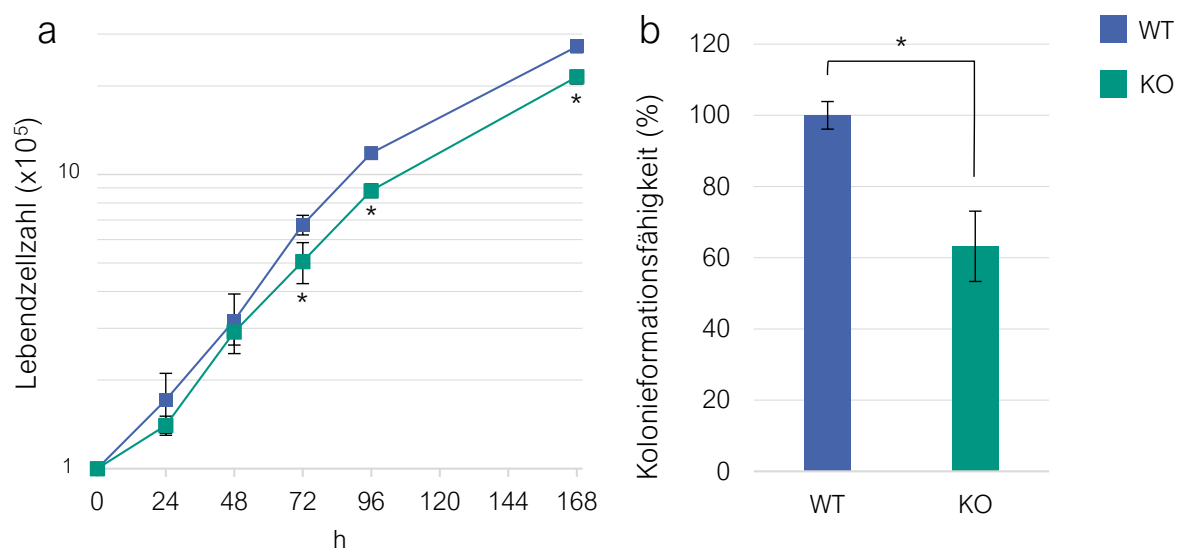


Abb. 24: Vergleich der Wachstumseigenschaften der U2OS (WT) und U2OS *PARP1-Knockout* (KO) Zellen. (a) Wachstumskurven der WT- und KO-Zelllinie über einen Zeitraum von 168 h. Die Lebendzellzahl wurde hierbei gegen die Zeitpunkte in Stunden, an denen die Zellzahl bestimmt wurde, aufgetragen. (b) Vergleich der Koloniebildungsfähigkeit für WT- und KO-Zellen. Gezeigt sind für beide Versuche die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen, die jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Abweichungen der KO- zu den WT-Zellen wurde mittels gepaartem t-Test ($*p \leq 0,05$) bestimmt.

Die Untersuchungen zeigten, dass das Fehlen von PARP1 einen Einfluss auf die Wachstumsaktivität der Zellen zu haben scheint. Der Verlust von PARP1 in U2OS-Zellen führte zu einem verminderten Zellwachstum über den gesamten untersuchten Zeitraum von 168 h und zu einer ausgeprägten Verminderung der Koloniebildungsfähigkeit.

Die Ergebnisse bestätigen frühere Studien von Li et al., die ebenfalls mit U2OS-Zellen durchgeführt wurden. Hierbei wurde *PARP1* mittels siRNA gehemmt (Reduktion um 70 % auf Proteinebene). Dieser *Knockdown* führte zu einer verminderten Proliferation der Zellen, wobei sich eine signifikante Reduktion der Proliferationsrate nach 48 h im Vergleich zur Kontrolle zeigte. Weiterhin konnte die Arbeitsgruppe eine ebenso deutlich gehemmte Koloniebildungsfähigkeit beobachten (Li et al., 2016). Weitere Studien mit anderen Zelllinien, in denen *PARP1* vollständig ausgeknockt wurde, zeigten die gleichen Beobachtungen. Eine Studie mit *PARP1*-KO Varianten der Kolonkarzinom Zelllinie HCT116 sowie eine Studie mit der Gebärmutterhalskrebszelllinie HeLa, konnten ebenfalls eine verlangsamte Proliferation und eine reduzierte Koloniebildungsfähigkeit der *PARP1*-KO-Variante in ihren Versuchen feststellen (RANK et al., 2016; GHOSH et al., 2018).

5.2.2 ZELLYKLUSVERTEILUNG

Um mögliche Gründe für das reduzierte Zellwachstum zu untersuchen, wurde die Zellzyklusverteilung für beide Zelllinien bestimmt. Die Zellen wurden für 24, 48, 72 und 96 h kultiviert, mittels DAPI angefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. In Abb. 25 ist der zeitabhängige Verlauf der Zellzyklusphasenverteilung für die WT- und KO-Zellen dargestellt.

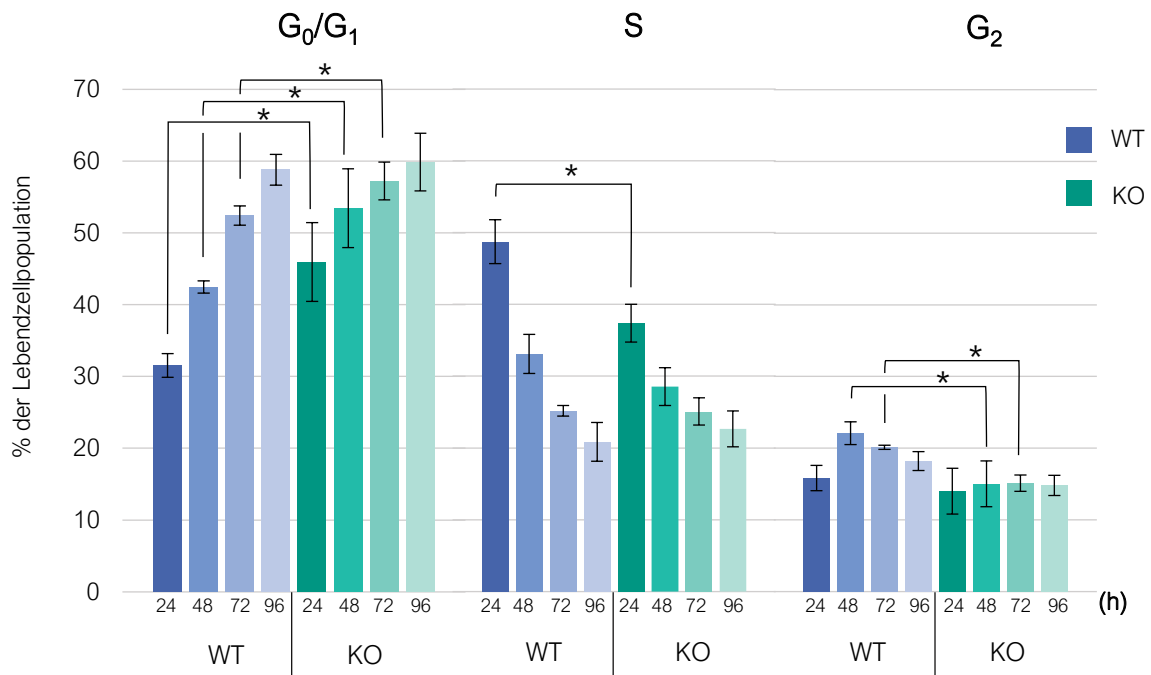


Abb. 25: Zeitabhängige Zellzyklusphasenverteilung der U2OS (WT) und *PARP1-Knockout* Zellen (KO). Um die Verteilung des Zellzyklus zu bestimmen, wurden die Zellen mit DAPI angefärbt und die entsprechenden Phasen mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen, die jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Abweichungen der KO- zu WT- Zellen wurden mittels gepaartem t-Test (* $p \leq 0,05$) bestimmt.

Beide Zelllinien zeigten im Verlauf des beobachteten Zeitraums eine Akkumulation in der G₁-Phase. Dennoch war die relative Verteilung der KO-Zellen in der G₁-Phase in den ersten 72 h signifikant höher als in WT-Zellen. Beispielsweise akkumulierten nach 24 h im Vergleich zu den WT-Zellen 15 % mehr KO-Zellen in der G₁-Phase. Im Gegensatz dazu war nach 24 h der Anteil der KO-Zellen innerhalb der S-Phase signifikant reduziert. Es befanden sich lediglich 37 % der KO-Population in der S-Phase, während 48 % der WT-Zellen in der S-Phase anzutreffen waren. Nach 48 h glich sich die relative Verteilung zwischen den Zelllinien in der S-Phase wieder an. Darüber hinaus kam es nach 48 h zu einer Zunahme der G₂-Phase in den WT-Zellen, was bei den KO-Zellen nicht zu beobachten war, da hier die G₂-Phase

über die analysierte Zeit hinweg konstant blieb. Nach 96 h waren die Zellzyklusverteilungen aller Phasen in beiden Zelllinien vergleichbar.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der *PARP1-Knockout* zu einem verlängerten Verweilen der Zellen in der G₁-Phase zu führen scheint. Dies verursachte wiederum eine langsamere Progression durch den Zellzyklus und damit auch eine verlangsamte Proliferation der KO-Zellen, was bereits in den Wachstumsversuchen bestätigt werden konnte. Die Ergebnisse stimmen mit den Studien von LI et al. und GHOSH et al. überein, die neben der geringeren Proliferationsrate ebenfalls einen höheren Anteil an Zellen in der G₁-Phase für die KO-Zellen, im Gegensatz zu den WT-Zellen, beobachten konnten (LI et al., 2016; GHOSH et al., 2018).

Ebenfalls mitanalysiert wurde die subG₁-Phase, die die Anzahl der apoptotischen Zellen angibt. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen führte der *Knockdown* von *PARP1* bei den Arbeiten von LI et al. nach 48 h zu einer erhöhten Apoptoserate (LI et al., 2016), was in den durchgeführten Experimenten nicht beobachtet wurde, da sich über den gesamten Zeitraum keine Änderung des subG₁-Peaks zeigte, weder für den KO noch für den WT (siehe Anhang, Abb. 50).

5.2.3 GENEXPRESSIONSPROFIL

Neben seiner Rolle in der Erkennung und Reparatur von DNA-Läsionen, soll PARP1 ebenso bei verschiedenen Transkriptionsprozessen involviert sein und dabei als Chromatinmodulator sowie als Co-Regulator für DNA-bindende Transkriptionsfaktoren agieren (KRAUS und HOTTIGER, 2013). Aufgrund dessen hat die Forschung an PARP1 in der Genregulation in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen (KRAUS, 2008; JI und TULIN, 2010; SCHIEWER und KNUDSEN, 2014; KE et al., 2019).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des *PARP1-Knockouts* auf Transkriptionsebene untersucht, um mögliche Unterschiede im Genexpressionsprofil festzustellen. Hierfür wurde ein *High-Throughput* RT-qPCR Ansatz gewählt, welcher es ermöglicht, vergleichende Genexpressionsanalysen von 95 Genen sowohl in den WT- als auch in den KO-Zellen durchzuführen. Das verwendete Genset umfasst Gene, die eng mit der genomischen Stabilität in Verbindung gebracht werden. Es beinhaltet Gene der DNA-Reparatur, der DNA-Schadensantwort, der Zellzyklusregulation, der Proliferation sowie der Apoptose. Gene des Fremdstoffmetabolismus und der Metallhomöostase, welche ebenfalls in dem Genset enthalten sind, wurden für die weiterführende Auswertung nicht miteinbezogen. Eine

vollständige Auflistung der Gencluster und dazugehörigen Gene sind in Anhang 8.3.1.2 zu finden.

Der transkriptionelle Einfluss des *PARP1-Knockouts* unter basalen Bedingungen ist als *Heatmap* in Abb. 26 gezeigt. Die Werte wurden als Farbskala dargestellt und repräsentieren die relative Änderung der Genexpression (\log_2) der KO-Zellen. Für die Auswertung wurde hierfür die $\Delta\Delta C_q$ -Methode angewendet. Die C_q -Werte der KO-Zellen wurden dabei auf die der WT-Zellen bezogen. In der *Heatmap* repräsentieren rote Farben eine höhere, und blaue Farben eine verminderte Expression. Die Expression von *PARP1* wurde in der Darstellung ausgegraut, da der Wert $(-6,21 \pm 0,14)$ außerhalb der Skalierung lag, was einem um fast 99 % verminderten Transkriptionsniveau im Vergleich zu den WT-Zellen entsprach. Obwohl dies auf eine gewisse Restaktivität der *PARP1*-Transkription in den KO-Zellen hinweist, ist, wie unter 5.1.5 beschrieben, kein funktionsfähiges PARP1-Protein nachweisbar. Die \log_2 -Werte aller hier dargestellten Gene sind in Anhang 8.3.1.2 zu finden.

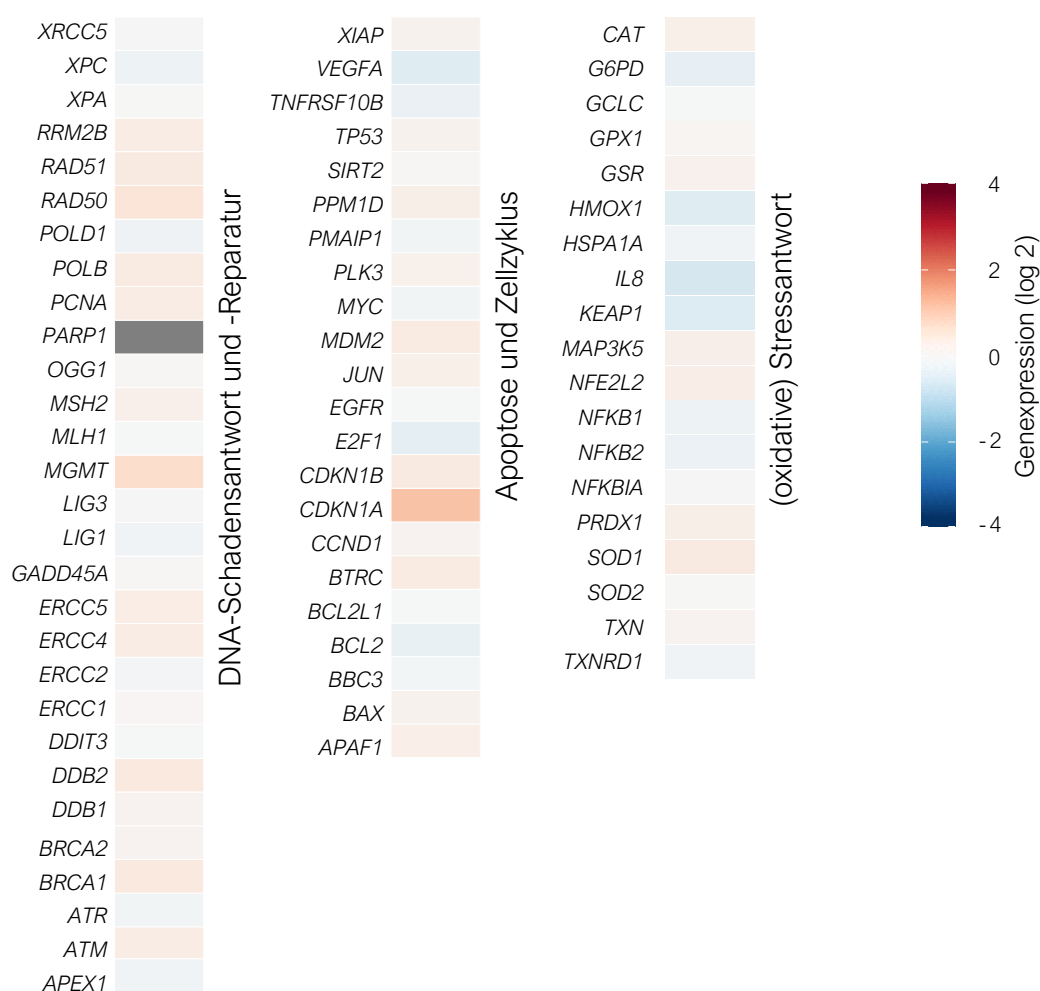


Abb. 26: Auswirkung des *PARP1-Knockouts* auf das basale Genexpressionsprofil in U2OS-Zellen, analysiert mittels *High-Throughput* RT-qPCR und dargestellt als *Heatmap*. Gezeigt sind die Änderungen (\log_2) der

Transkriptmenge der *PARP1-Knockout* (KO)-Zellen im Vergleich zu den U2OS (WT)-Zellen. Höher exprimierte Gene sind in roten Farben dargestellt, während blaue Farben eine verminderte Expression repräsentieren. *PARP1* ist in grauer Farbe dargestellt, da die relative Änderung von $-6,21 \pm 0,14$ außerhalb der Skalierung lag. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden.

Um die Signifikanz der Änderungen darzustellen, wurden die Gene zusätzlich als *Vulcano Plot* in Abb. 27 abgebildet. Hierbei wurde die Änderung der Genexpression (\log_2) gegen den errechneten p-Wert ($-\log_{10}$) aufgetragen. Das Signifikanzniveau α entsprach dabei 0,05. Jedes Gen ist als Kreis dargestellt, wobei der Durchmesser der relativen Genexpressionsänderung entspricht. Demnach wurden Gene, die rechts der Verdopplungs- (+1) oder links der Halbierungsmarke (-1) lagen, als relevante Änderungen angesehen. Gene, deren Änderungslevel oberhalb des Signifikanzniveaus lagen, wurden zudem als signifikant bewertet. Unter Anwendung dieser Kriterien zeigte *CDKN1A* eine signifikant höhere Expression in den KO- als in WT-Zellen mit einer 2,2-fachen Expression. *CDKN1A* kodiert für p21 und steht, wie bereits unter 2.1.3.1. beschrieben, im Zusammenhang mit der Regulation des Zellzyklus. Darüber hinaus kam es zu einer leichten Induktion von *Rad50*, welches im Vergleich zu WT-Zellen um etwa 40 % höher exprimiert vorlag. *Rad50* ist Teil des MRN-Komplexes und an der Schadenserkennung von DSBs beteiligt.

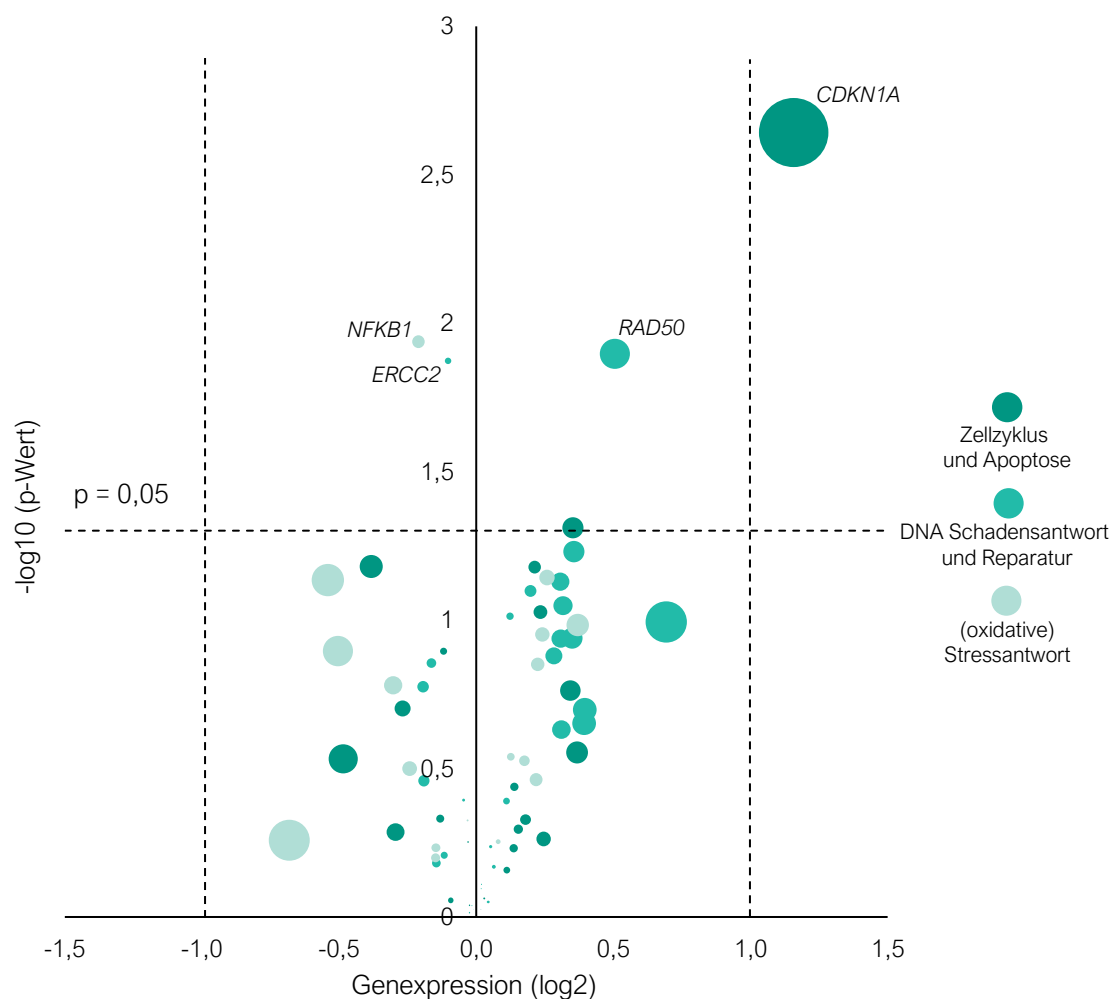


Abb. 27: *Vulcano Plot* der log₂-Änderungen der Genexpressionsdaten des *PARP1-Knockouts*, aufgetragen gegen den p-Wert (-log₁₀). Die p-Werte wurden anhand der Änderungen der KO-Werte zu den WT-Werten bestimmt (t-Test, gepaart, $\alpha=0,05$). Gezeigt sind Gene des Zellzyklus, der Apoptose, der DNA-Schadensantwort und -Reparatur sowie der (oxidativen) Stressantwort. Jedes Gen ist als Kreis dargestellt, wobei der Durchmesser der relativen Expressionsänderung entspricht. Gene, die signifikant induziert wurden, wurden oberhalb der horizontalen Linie gekennzeichnet. Gene, die 2-fach und höher hochreguliert (+1) wurden, befinden sich rechts der gestrichelten Linie (*PARP1* ist nicht dargestellt).

Da p21 einer der Hauptregulatoren des G₁-Arrests darstellt, könnte die erhöhte Expression von *CDKN1A* ein möglicher Grund für den verstärkten G₁-Arrest und die verlangsamte Proliferation der KO-Zellen sein, was im vorherigen Kapitel 5.2.2 beschrieben wurde. Diesen Zusammenhang bestätigen die Ergebnisse der *PARP1*-defizienten HCT116 Zellen in den Studien von GHOSH et al., 2018. In diesen Untersuchungen ging eine erhöhte Regulation von *CDKN1A* mit einer verminderten Proliferation der Zellen und einem verstärkten G₁-Arrest einher (GHOSH et al., 2018).

Darüber hinaus zeigte das Genexpressionsprofil leichte Tendenzen zur erhöhten Expression von Genen, die an verschiedenen Reparaturwegen beteiligt sind (siehe Abb. 26). Dazu gehörten Gene der NER (*DDB2*, *ERCC4*, *ERCC5*), der DSBR (*RAD51*, *BRCA1*) und *MGMT*, welches vorwiegend für die Reparatur von alkylierten Schäden an der DNA, wie O⁶-Methylguanin, verantwortlich ist (CHRISTMANN et al., 2003). Erklären ließe sich dies möglicherweise durch spontane DNA-Schäden, deren Erkennung und Reparatur ohne PARP1 verzögert ist. Diese Verzögerung könnte zudem zu einer verstärkten Aktivierung des Tumorsuppressors p53 führen, was wiederum auch die gesteigerte Induktion von *CDKN1A* und die damit einhergehende verstärkten G₁-Phase erklären würde. Zu beachten ist hierbei, dass nach den zuvor genannten Kriterien die Effekte der DNA-Reparaturgene allerdings nur schwach und daher eher von geringerer Relevanz sind. Unter basalen Bedingungen führt der *PARP1-Knockout* demnach nicht zu weitreichenden Veränderungen des Genexpressionsprofils. Eine Ausnahme stellte hierbei, neben *PARP1*, das Gen *CDKN1A* dar.

Das hier betrachtete Genset der bereits zuvor beschriebenen *High-Throughput* RT-qPCR Methode (FISCHER et al., 2016) beinhaltet wichtige regulatorische Gene, die auch Teil der DDR-Signalwege sind. Natürlich spiegeln diese ausgewählten Gene nur einen sehr kleinen Teil der transkriptionellen Vielfalt in den Zellen wider. Eine Möglichkeit einen detaillierten Überblick des gesamten Transkriptoms zu erhalten, gelingt nur unter Verwendung von DNA-*Microarray*-Methoden, die die qualitative Analyse mehrerer tausender Gene gleichzeitig ermöglichen. Die Ergebnisse einer *Microarray*-Studie von OGINO et al., 2007 berücksichtigten 9.907 Gene in *PARP1*^{-/-} murinen embryonalen Stammzellen. Unter basalen Bedingungen zeigten 9,6% der Gene veränderte Transkriptionsraten, wovon die meisten Gene Prozessen, wie dem Stoffwechsel, der Signaltransduktion, der Zellzykluskontrolle oder der Transkriptionsmaschinerie zugeordnet werden konnten. Es wurde demnach geschlussfolgert, dass PARP1 für die Aufrechterhaltung der transkriptionellen Regulation einer Vielzahl von Genen erforderlich ist (OGINO et al., 2007). Allerdings ließen sich keine Übereinstimmungen einzelner Gene mit den durchgeführten Untersuchungen finden.

Zusammenfassend führte der *PARP1-Knockout* in den U2OS-Zellen zu einer verminderten Wachstumsrate und Koloniebildungsfähigkeit, was vermutlich auf eine erhöhte Aktivität von *CDKN1A* und dem daraus resultierenden verlängerten G₁-Arrest zurückzuführen war (siehe als Zusammenfassung Abb. 45).

5.3 EINFLUSS DES *PARP1*-KO AUF DAS GENEXPRESSIONSPROFIL NACH UNTERSCHIEDLICHEN ARTEN VON DNA-SCHÄDEN

Im Anschluss an die Untersuchungen des *PARP1*-KO unter basalen Bedingungen wurde die *High-Throughput* RT-qPCR genutzt, um die transkriptionelle Schadensantwort beider Zelllinien nach verschiedenen DNA-Schäden zu vergleichen. Dafür wurden beide Zelllinien jeweils mit drei unterschiedlichen, exogenen DNA-schädigenden Faktoren exponiert. Zur Induktion von oxidativen Schäden und SSBs, wurden die Zellen mit einer H₂O₂-Lösung inkubiert. Weiterhin wurden die Zellen mit UV-C Strahlung behandelt, was vor allem zu Photoaddukten der DNA führt. Für die Induktion von DSBs wurden die Zellen mit IR bestrahlt. Die Expositionen erfolgten in jeweils zwei Konzentrationen, beziehungsweise Intensitäten, um mögliche konzentrations- oder intensitätsabhängige Änderungen der Genaktivität zu erkennen. Nach Exposition wurden die Zellen jeweils für 8 h nachinkubiert und für die Genexpressionsanalyse vorbereitet.

Die Genexpression der Proben wurde mittels $\Delta\Delta C_q$ -Methode ausgewertet und hierbei die relative Änderung der jeweiligen behandelten Probe in Bezug zur unbehandelten Kontrolle berechnet. Aufgrund des bereits beschriebenen Zusammenhangs zwischen *PARP1* und *p53*, lagen vor allem die Gene im Fokus der Auswertung, die Teil der *p53*-abhängigen Schadensantwort sind. Zur Einordnung dieser Zielgene von *p53*, wurde die KEGG Datenbank (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) herangezogen (KANEHISA und GOTO, 2000).

5.3.1 H₂O₂-BEHANDLUNG

PARP1 ist in der SSBR das agierende Schlüsselprotein, indem es die SSBs erkennt und die Reparatur vermittelt (2.2.3.3). Eine defekte *PARP1*-Aktivität führt nach H₂O₂-Behandlung zu einem Ausbleiben der Reparatur induzierter SSBs, was wiederum die Entstehung von DSBs in der Zelle begünstigt. WOODHOUSE et al. zeigten, dass sich, bereits während der ersten Stunden nach H₂O₂-induzierten Schäden, aus den nicht reparierten SSBs DSBs bilden und die Reparatur der Läsionen durch die umfangreichere DSBR im Vergleich zur SSBR mehr Zeit in Anspruch nimmt (etwa 8 h anstatt 2 h) (WOODHOUSE et al., 2008).

Um den Einfluss von *PARP1* auf die transkriptionelle Schadensantwort zu untersuchen, wurden die WT- sowie KO-Zellen mit 100 μ M beziehungsweise 250 μ M H₂O₂-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und für die Genexpression aufgearbeitet. Die Genexpressionsprofile nach Behandlung mit H₂O₂ sind in Abb. 28

dargestellt. Die Darstellung umfasst Antwortmechanismen auf Transkriptionsebene beider Zelllinien, welche in die Gencluster apoptotischer Faktoren und Zellzyklusregulatoren, DNA-Schadensantwort- und -Reparaturgene sowie der (oxidativen) Stressantwort unterteilt wurden.

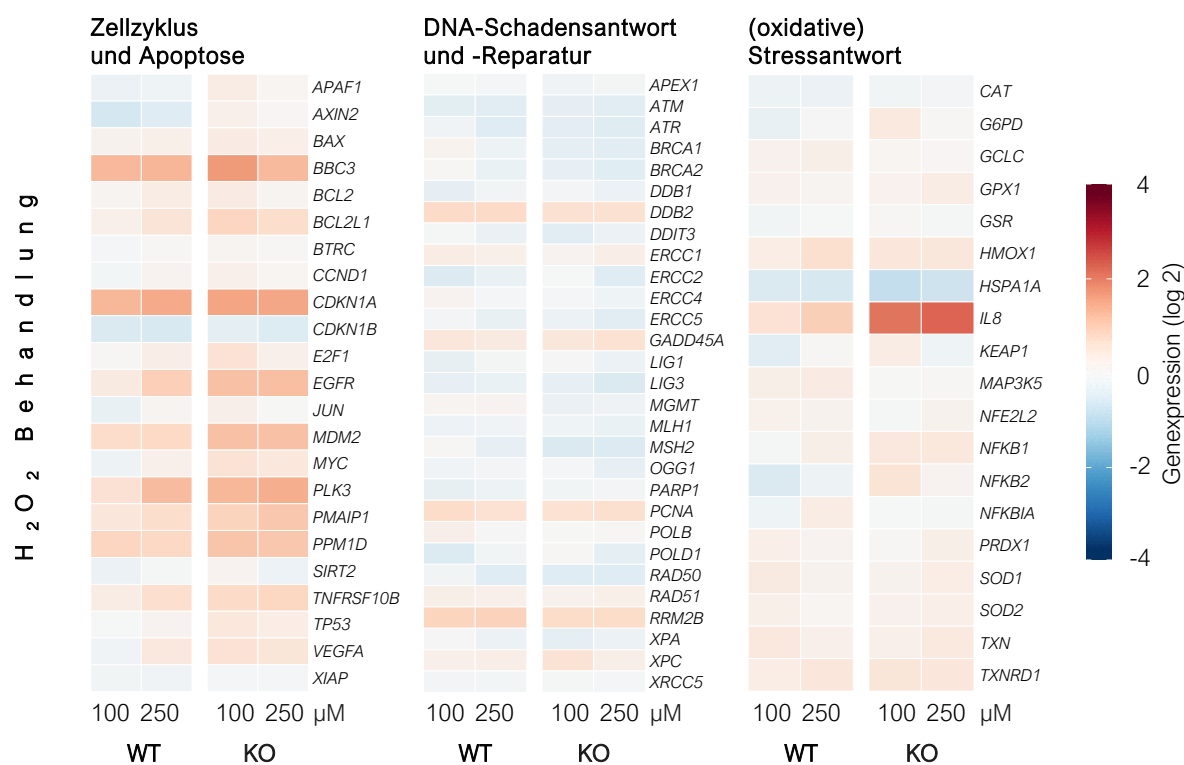


Abb. 28: Genexpressionsprofile einer *High-Throughput* RT-qPCR der U2OS (WT) und *PARP1-Knockout* Zellen (KO) nach Behandlung mit 100 beziehungsweise 250 µM H₂O₂-Lösung und einer Nachinkubationszeit von 8 h. Die Visualisierung erfolgte mithilfe einer *Heatmap*. Die Genexpressionsänderungen (log₂) der behandelten Probe sind im Vergleich zur jeweils unbehandelten Kontrolle aufgeführt. Höher exprimierte Gene sind in roten Farben dargestellt, während blaue Farben eine verminderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle repräsentieren. Gezeigt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden.

In den *Heatmaps* der Genexpressionsanalysen zeigte sich in beiden Zelllinien vor allem eine erhöhte Induktion der Gene aus dem Cluster der Zellzyklus- und Apoptoseregulation. Die Inkubation mit 100 µM H₂O₂-Lösung bedingte in den KO-Zellen, im Vergleich mit den WT-Zellen, bereits eine verstärkte Aktivierung einzelner Gene. Dabei zeigten einige Gene eine relevante Induktion, wie die Zellzyklusregulatoren *CDKN1A* (WT: 2,5-fach; KO: 2,9-fach), *MDM2* (WT: 1,6-fach; KO: 2,2-fach), *PLK3* (WT: 1,5-fach; KO: 2,5-fach) und *PPM1D* (*protein phosphatase, Mg-dependent 1D*) (WT: 1,8-fach; KO: 2,2-fach). *PPM1D* unterliegt der transkriptionellen Regulation von p53 und ist für dessen Dephosphorylierung zuständig.

Sowohl *PPM1D* als auch *MDM2* sind an der Rückkopplung beteiligt, die die p53-Aktivität bei zellulärem Stress negativ reguliert (siehe 2.1.3.1) (LU et al., 2007). Die Behandlung führte außerdem zur Induktion des pro-apoptotischen Gens *BBC3* (*BCL2 binding component 3*) (WT: 2,5-fach; KO: 3,3-fach), welches für das Protein PUMA kodiert, und des Wachstumsfaktors *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*) (WT: 1,3-fach; KO: 2,3-fach), welches für das gleichnamige Zelloberflächenprotein kodiert und durch Bindung an Wachstumsfaktoren zur Zellproliferation führt (LO und HUNG, 2006). Weitere Gene im KO zeigten die Tendenz einer Induktion, die allerdings nicht im relevanten Bereich lagen. Für die beiden Behandlungskonzentrationen konnte keine signifikante Konzentrationsabhängigkeit in den Zelllinien nachgewiesen werden (analysiert mittels gepaartem t-Test, $\alpha=0,05$; Daten nicht gezeigt). Die Behandlung mit 250 μM zeigte in den WT- sowie den KO-Zellen eine vergleichbare Induktionsintensität. Zu nennen sind hierbei die Gene der Zellzyklusregulation *CDKN1A* (WT: 2,8-fach; KO: 2,9-fach), *MDM2* (WT: 1,7-fach; KO: 2,2-fach) und *PLK3* (WT: 2,4-fach; KO: 2,7-fach). Außerdem zeigte sich für beide Zelllinien eine etwa 2-fache Induktion von *EGFR* (WT: 2-fach; KO: 2,3-fach). Auch *PPM1D* zeigte eine erhöhte Transkriptionsaktivität (WT: 1,8-fach; KO: 2,1-fach) in beiden Zelllinien. Die Behandlung führte außerdem zur Induktion der beiden pro-apoptotischen Genen *BBC3* (*BCL2 binding component 3*) (WT: 2,5-fach; KO: 2,4-fach) und *PMAIP1* (*phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*) (WT: 1,6-fach; KO: 2,1-fach). *PMAIP1* kodiert für das pro-apoptotische Protein NOXA. PUMA sowie NOXA können durch einen DNA-Schaden über p53 transkriptionell aktiviert werden und so den intrinsischen Apoptoseweg einleiten (FISCHER, 2017).

Die Behandlung mit H_2O_2 führte im Cluster der DNA-Schadensantwort und -Reparatur lediglich zu geringen, ebenfalls konzentrationsunabhängigen Induktionen der p53-vermittelten Transkriptionen von *DDB2* (*damage specific DNA binding protein 2*), *GADD45A* (*growth arrest and DNA damage inducible alpha*), *PCNA* (*proliferating cell nuclear antigen*) und *RRM2B* (*ribonucleotide reductase regulatory p53 inducible subunit M2B*), die jedoch nicht im relevanten Bereich lagen. Auch hier zeigte sich ein vergleichbares Profil für die WT- sowie KO-Zellen bei beiden Behandlungskonzentrationen.

Ein deutlicher Unterschied in der Genexpression zeigte sich im Cluster der Stressantwort. Die Behandlung mit H_2O_2 führte in den KO-Zellen zu einer verstärkten Antwort des Inflammationsmarkers *IL8*, welcher nach Behandlung mit 250 μM um das 2,7-fache verstärkt exprimiert wurde. Die WT-Zellen zeigten eine 1,9-fache Expression im Vergleich zur Kontrolle. PARP1 spielt in der Inflammationsantwort eine Rolle als Co-Regulator der

Transkription von *NF-κB*, welches, neben *IL8*, weitere pro-inflammatorische Gene reguliert. Im Gegensatz zu den hier dargestellten Ergebnissen konnten vorausgegangene Studien zeigen, dass die Inhibierung von PARP1 mit einer verminderten Expression von *NF-κB* und damit einer reduzierten inflammatorischen Antwort einhergeht, was auch die verminderte Expression von *IL8* einschließt (KRAUS und HOTTIGER, 2013). Eventuell ließe sich die verstärkte inflammatorische Antwort der KO-Zellen durch eine erhöhte Anfälligkeit für H₂O₂-induzierte DNA-Strangbrüche aufgrund des *PARP1*-Defizienz erklären.

Insgesamt konnte zwar eine p53-abhängige Induktion der DDR auf transkriptioneller Ebene festgestellt werden, welche jedoch unabhängig von PARP1 zu sein scheint. Die beiden Expressionsprofile zeigen, bis auf die verstärkte Induktion von *IL8* in den KO-Zellen, ein vergleichbares Muster. Die bereits bei 100 μM beobachtete, leicht verstärkte Expression in den KO-Zellen (im Vergleich zu den WT-Zellen) ließe sich vermutlich durch eine erhöhte Sensitivität der Zellen ohne PARP1 gegenüber oxidativen Schäden erklären, die allerdings bei der höheren Behandlungskonzentration von 250 μM nicht mehr ersichtlich war. Es zeigte sich außerdem keine verstärkte Induktion der Gene der DSBR, die die eingangs erwähnten Schlussfolgerungen einer erhöhten Aktivität der DSBR von WOODHOUSE et al. auf transkriptioneller Ebene bestätigen würden.

5.3.2 UV-C STRAHLUNG

Wie eingangs erwähnt, ist PARP1 auch in der Erkennung und Reparatur von NER-induzierenden Schäden beteiligt (siehe 2.2.3.3). Um den Einfluss des *PARP1*-KOs auf Genexpressionsebene zu untersuchen, wurden sowohl die KO- also auch WT-Zellen mit UV-C Strahlung der Intensität 5 beziehungsweise 10 J/m² exponiert. Die Genexpressionsprofile sind in Abb. 29 dargestellt.

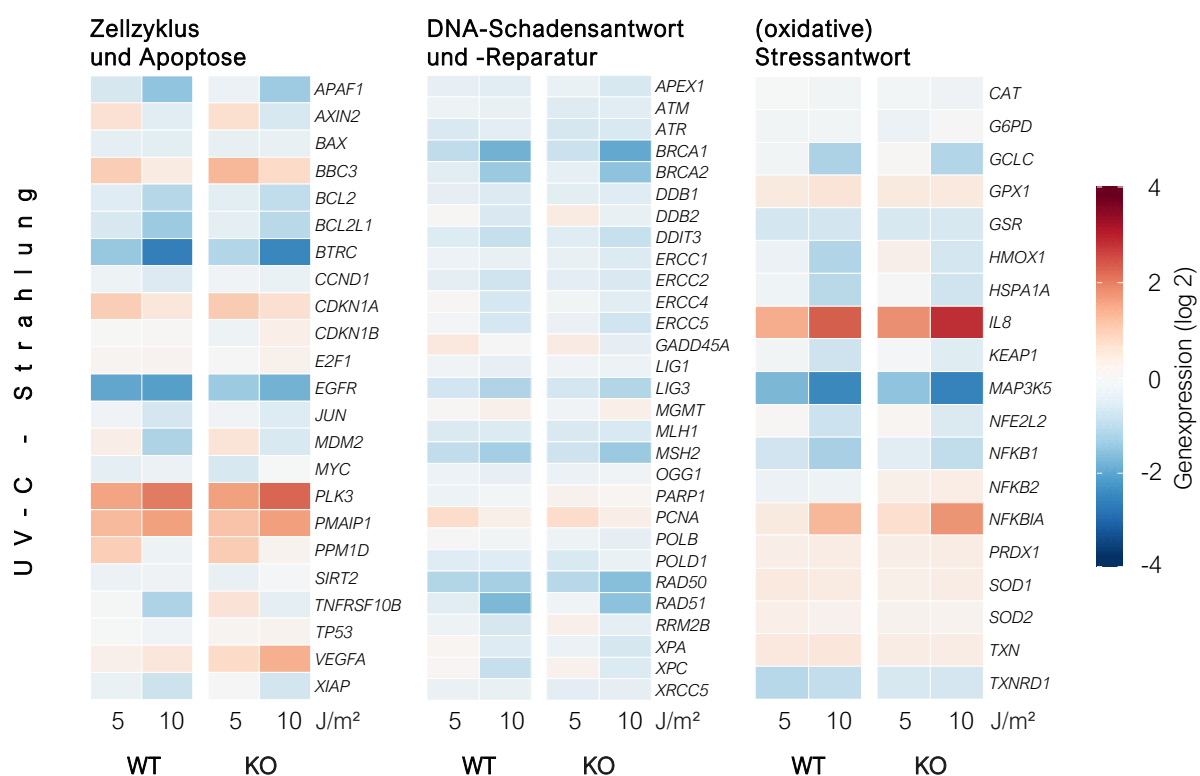


Abb. 29: Genexpressionsprofile einer *High-Throughput* RT-qPCR der U2OS (WT) und *PARP1-Knockout* Zellen (KO) nach Behandlung mit 5 beziehungsweise 10 J/m² und einer Nachinkubationszeit von 8 h. Die Visualisierung erfolgte mithilfe einer *Heatmap*. Die Genexpressionsänderungen (log₂) der behandelten Probe sind im Vergleich zur jeweils unbehandelten Kontrolle aufgeführt. Höher exprimierte Gene sind in roten Farben dargestellt, während blaue Farben eine verminderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle repräsentieren. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden.

Beide Zelllinien zeigen nach der Bestrahlung mit UV-C Strahlung ein weitestgehend vergleichbares Profil. Nach Behandlung mit 5 J/m² wurden vereinzelte p53-vermittelte Gene, wie *CDKN1A* (WT: 2-fach; KO: 2-fach), *PLK3* (WT: 3-fach; KO: 3,1-fach), und *PPM1D* (WT: 2,4-fach; KO: 2-fach), sowie die pro-apoptotischen Gene *BBC3* (WT: 2-fach; KO: 2,4-fach) und *PMAIP1* (WT: 2,4-fach; KO: 2,2-fach) verstärkt induziert. Auffällig ist, dass in allen Clustern vermehrt Gene herunterreguliert wurden. Dieser Effekt war nach Bestrahlung mit 10 J/m² verstärkt zu beobachten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Repression der, mit der DNA-Schadensantwort assoziierten, Gene mit der Einleitung der zellulären Seneszenz einhergeht (COLLIN et al., 2018). Die Seneszenz tritt als mögliche Antwort auf einen immensen DNA-Schaden auf, der nicht mehr reparabel ist. Folglich wird ein permanenter Entzug des Zellzyklus signalisiert, was wiederum die Weitergabe der geschädigten Erbinformation verhindert (HOUTGRAAF et al., 2006). Unterschiede in der

Expression zeigten sich bei drei Genen nach Behandlung mit 10 J/m², hierbei war eine verstärkte Expression in den KO-Zellen für *VEGFA* (*vascular endothelial growth factor A*) (WT: 1,4-fach; KO: 2,7-fach), *IL8* (WT: 5,3-fach; KO: 7,7-fach) und *NFKBIA* (NF-κB Inhibitor) (WT: 2,5-fach; KO: 3,4-fach) im Vergleich zu den WT-Zellen zu beobachten. *VEGFA* fördert unter anderem die Proliferation und die Migration von Endothelzellen und spielt ebenso wie *IL8* eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen, wobei hierbei bereits ein Zusammenhang zwischen den Expressionen von *VEGFA*, *IL8* und NF-κB nachgewiesen werden konnte (MARTIN et al., 2009). Zudem gilt die Überexpression von *IL8* als Seneszenz-assoziiierter Marker (ORTIZ-MONTERO et al., 2017). Weiterhin zeigte sich ein Unterschied bei dem proapoptotischen Gen *TNFRSF10B* (*tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10B*), welches für den entsprechenden Todesrezeptor kodiert und Teil des extrinsischen Apoptosewegs ist. In den WT-Zellen zeigt das Gen eine Repression um fast 50 % nach Bestrahlung mit 10 J/m², wobei in den KO-Zellen das mRNA-Level nach 5 J/m² erst zunimmt (1,5-fach) und nach 10 J/m² sinkt (0,8-fach).

Die Bestrahlung mit der geringen Intensität von 5 J/m² zeigte zwar eine Regulierung p53-abhängiger Gene, allerdings sind die Genexpressionsprofile der WT- mit den KO-Zellen, bis auf die vereinzelt Gene der Inflammation und *TNFRSF10B* insgesamt vergleichbar. Dies deutet wiederum daraufhin, dass die Schadensantwort nach UV-C Strahlung, ebenso wie nach Behandlung mit H₂O₂, unabhängig des PARP1-Status zu verlaufen scheint.

5.3.3 IONISIERENDE STRAHLUNG

VALENZUELA et al. postulierten bereits 2002, dass PARP1 an der p53-abhängigen Schadensantwort beteiligt zu sein scheint. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass es in murinen PARP1^{-/-} Zellen zu einer schwächeren Induktion der beiden p53 Zielgene *CDKN1A* und *MDM2* kommt und schlussfolgerten demnach, dass PARP1 in einer p53 vorgeschalteten Signalkaskade beteiligt ist. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit der transkriptionelle Einfluss des *PARP1-Knockouts* in der DDR nach IR überprüft, indem sowohl die WT- als auch die KO-Zellen mit 1 beziehungsweise 10 Gy exponiert wurden. Die Genexpressionsprofile sind in Abb. 30 dargestellt.

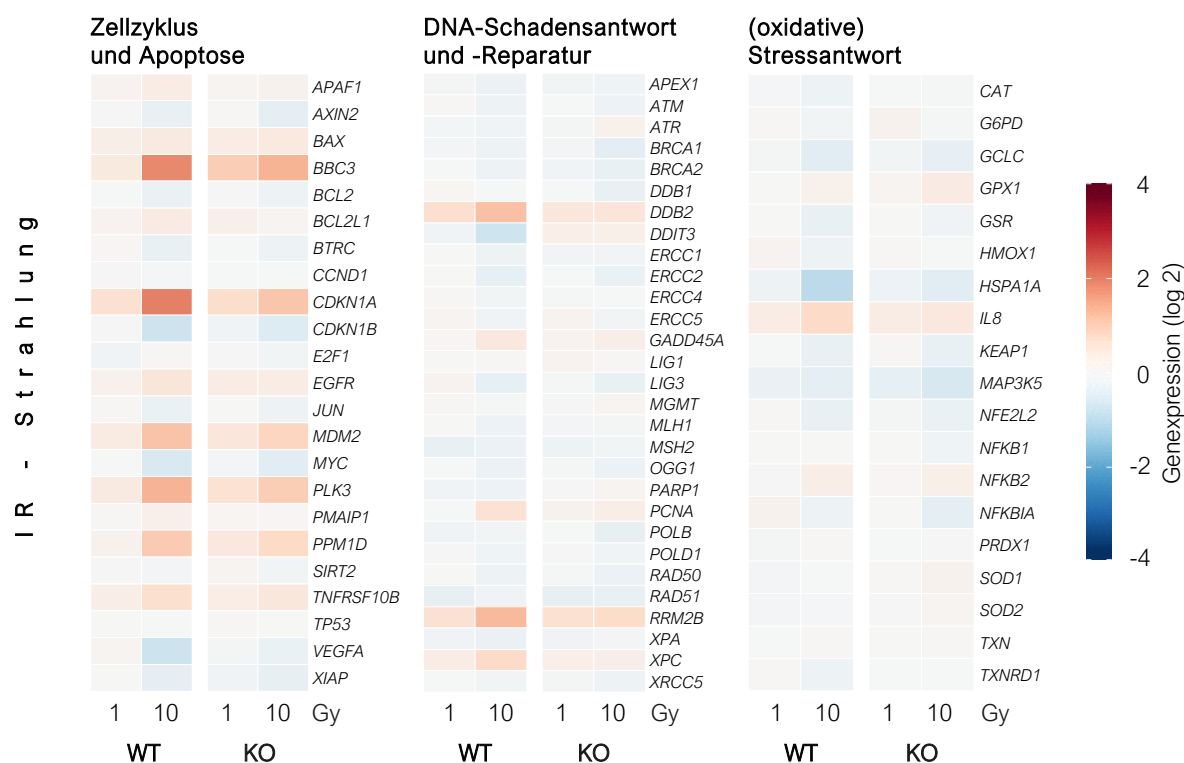


Abb. 30: Genexpressionsprofile einer *High-Throughput* RT-qPCR der U2OS (WT) und *PARP1-Knockout* Zellen (KO) nach Behandlung mit 1 beziehungsweise 10 Gy und einer Nachinkubationszeit von 8 h. Die Visualisierung erfolgte mithilfe einer *Heatmap*. Die Genexpressionsänderungen (\log_2) der behandelten Probe sind im Vergleich zur jeweils unbehandelten Kontrolle aufgeführt. Höher exprimierte Gene sind in roten Farben dargestellt, während blaue Farben eine verminderte Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle repräsentieren. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden.

Insgesamt rief die Exposition mit IR vor allem eine Aktivierung im Gencluster der Zellzyklus- und Apoptoseregulation sowie in einzelnen Genen der DNA-Schadensantwort und -Reparatur hervor. Im Bereich der oxidativen Stressantwort traten nur wenige relevante Veränderungen der Transkription auf. Lediglich eine Repression des Hitzeschock-Gens *HSPA1A* (0,5-fach) war zu beobachten. Hitzeschockproteine stabilisieren andere Proteine gegen Aggregation und vermitteln die Faltung von Proteinen nach deren Translation (KASIOUMI et al., 2019). Andere Gene der zellulären Stressantwort zeigten keine relevanten Änderungen der vorliegenden Ausgangstranskriptmengen.

Die Behandlung mit einer Intensität von 1 Gy führte in beiden Zelllinien zu keinen relevanten Veränderungen der transkriptionellen Reaktion. Zudem konnte kein Unterschied im Genexpressionsprofil zwischen den WT- und den KO-Zellen nachgewiesen werden. Lediglich *BBC3* schien in den KO-Zellen, im Vergleich zu den WT-Zellen, leicht

hochreguliert, was Hinweise auf eine leichte Aktivierung der DNA-Schadensantwort gibt. Dieser Effekt war jedoch vergleichsweise gering und erreichte keine 2-fache Induktion.

Die Bestrahlung mit 10 Gy provozierte demgegenüber eine gesteigerte Schadensantwort, was sich anhand der verstärkten Veränderungen im Genexpressionsmuster zeigte. Dieser Effekt war vor allem in den WT-Zellen deutlich zu erkennen. Die erhöhte Strahlungsintensität führte hierbei zu einer verstärkten Induktion von Genen der Zellzyklusregulation, der Apoptose, der DNA-Schadenserkennung und -Reparatur. So zeigte *BBC3* (WT: 3,8-fach; KO: 2,6-fach), welches für das pro-apoptotische Protein PUMA kodiert, bei den WT-Zellen nach Bestrahlung mit 10 Gy eine deutliche Hochregulation. Eine ausgeprägte Aktivierung konnte außerdem für *CDKN1A* (WT: 4,1-fach; KO: 2,1-fach) beobachtet werden. Darüber hinaus zeigten *MDM2* (WT: 2,2-fach; KO: 1,8-fach) und *PPM1D* (WT: 2-fach; KO: 1,7-fach) nach Behandlung eine relevante Induktion. Beide Gene sind Teil der p53-Rückkopplungsschleife, wie in 2.1.3.1 näher erläutert (LU et al., 2007). Darüber hinaus wurden Gene, wie *DDB2* (WT: 2,3-fach; KO: 1,4-fach) und *XPC* (WT: 1,7-fach; KO: 1,1-fach), die an der Erkennung von DNA-Schäden während der NER assoziiert sind, hochreguliert. Auch Gene, die an anderen DNA-Reparaturwegen sowie der DNA-Replikation beteiligt sind, zeigten eine Induktion. Als Beispiele hierfür sind *RRM2B* (WT: 2,4-fach; KO: 1,6-fach) und *PCNA* (WT: 1,5-fach; KO: 1,2-fach) zu nennen (XU und MORRIS, 1999; ADIMOOLAM und FORD, 2002). Laut der KEGG sind alle genannten Gene, bei denen eine Aktivierung nach Bestrahlung mit 10 Gy beobachtet werden konnte, Teil des p53-Signalweges und ihre Transkription wird durch p53 vermittelt (KANEHISA und GOTO, 2000). Außerdem erfolgte die Aktivierung des *PLK3* Gens (WT: 2,6-fach; KO: 2-fach), das *upstream* von p53 in einer ATM-abhängigen Weise reguliert wird und, wie ATM selbst, auch für die Phosphorylierung von p53 zuständig ist. PLK3 spielt eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus und scheint auch an der zellulären Stressantwort beteiligt zu sein (XIE et al., 2001; BAHASSI et al., 2002).

Obwohl auch in den KO-Zellen nach Behandlung mit 10 Gy eine Aktivierung dieser Gene zu sehen war, war das transkriptionelle Muster dem nach 1 Gy recht ähnlich. Demgegenüber schien die Schädigung durch 10 Gy in den WT-Zellen zu einer erhöhten Transkriptionsaktivität der p53-vermittelten Gene hervorzurufen, was auf eine zusätzliche PARP1-abhängige transkriptionelle Aktivierung der Schadensantwort zurück zu führen sein könnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Behandlungen mit H₂O₂, UV-C oder IR Strahlung zu einer p53-abhängigen Schadensantwort in den Genexpressionsprofilen führt.

Dabei schien die transkriptionelle Schadensantwort nach Behandlung mit H₂O₂ sowie nach Bestrahlung mit UV-C Strahlung in keinem relevanten Abhängigkeitsverhältnis von PARP1 zu stehen. Unterschiede in den Genexpressionsmustern der WT- und der KO-Zelllinien waren zu vernachlässigen.

Die hochenergetische IR-Behandlungen mit 10 Gy führten hingegen zu einem deutlichen Unterschied zwischen den Zelllinien. Hierbei zeigte sich eine verstärkte Aktivierung p53-abhängiger Gene, sowie *PLK3* in den WT-Zellen. Diese Ergebnisse unterstützen die postulierte Beteiligung von PARP1, *upstream* von p53, an den initialen Schritten der IR-induzierten DNA-Schadensantwort (VALENZUELA et al., 2002; WIELER et al., 2003; NOZAKI und MASUTANI, 2018).

Um diesen transkriptionellen Effekt weiter zu analysieren, wurde die PARP1-Abhängigkeit der p53-vermittelten Schadensantwort nach IR im weiteren Verlauf auf unterschiedlichen Ebenen näher betrachtet.

5.4 ROLLE VON PARP1 IN DER DNA-SCHADENSANTWORT NACH IONISIERENDER STRAHLUNG

Die Betrachtung der erstellten Genexpressionsprofile lieferte erste Hinweise auf mögliche Zusammenhänge der PARP1- und p53-abhängigen Schadensantwort. Aufgrund der Beobachtung, dass PARP1 für eine verstärkte Schadensantwort nach IR notwendig zu sein schien, wurde die Änderung der Genexpression nachfolgend statistisch ausgewertet. Des Weiteren wurden p53 sowie p21, als wichtige Regulatoren der Schadensantwort und des Zellzyklus, auf Proteinebene analysiert und die Zellzyklusphasenverteilung nach Exposition mit IR untersucht. Da zudem postuliert wurde, dass PARP1 für die Kinaseaktivität von ATM zuständig sein soll (AGUILAR-QUESADA et al., 2007; HAINCE et al., 2007), wurde außerdem in den WT-Zellen ein ATM-Inhibitor eingesetzt, um die Kinaseaktivität zu reduzieren. Die Zellzyklusphasenverteilung nach ATM-Inhibierung wurde anschließend mit den Ergebnissen des KO-Typs verglichen. Um zu überprüfen, ob PARP1 einen Einfluss auf die Phosphorylierungsaktivität verschiedener Reparaturproteine nimmt, wurde zuletzt die Phosphorylierung der Signalproteine ATM, H2AX und p53 nach IR Exposition untersucht.

5.4.1 GENEXPRESSIONSANALYSE

In Abb. 31 sind erneut die Gene als *Heatmap* zusammengefasst, die nach Bestrahlung mit 10 Gy in den WT-Zellen zu einer verstärkten Induktion der Schadensantwort geführt haben (vollständiges Profil siehe 5.3.3). Bis auf *PLK3* werden alle Gene *downstream* von p53 reguliert (KANEHISA und GOTO, 2000; BAHASSI et al., 2002).

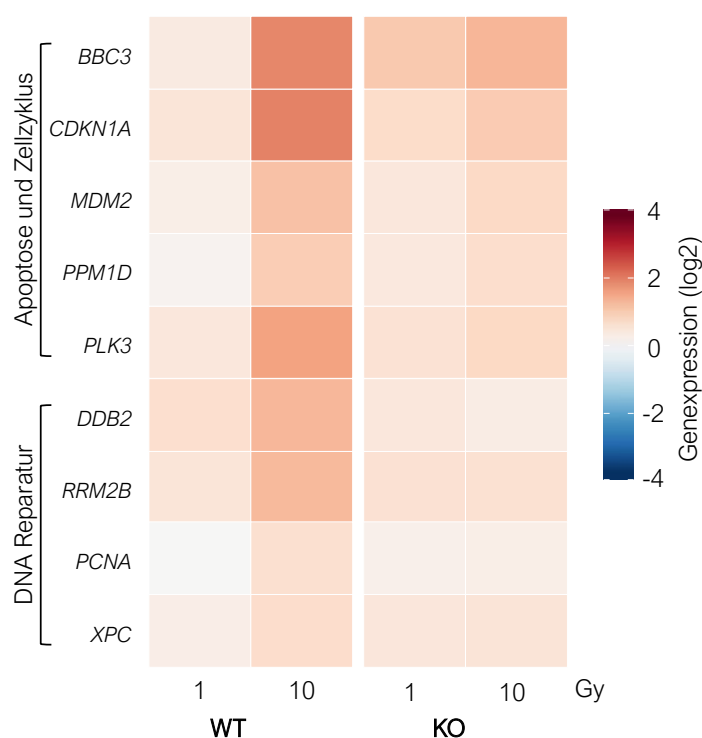


Abb. 31: *Heatmap* ausgewählter Gene nach Bestrahlung mit 10 Gy. Aufgeführt sind die Gene, die nach Bestrahlung in den WT-Zellen zu einer verstärkten Induktion der Schadensantwort geführt haben.

Die *Heatmap* in Abb. 31 zeigt nochmals deutlich, dass eine Bestrahlung mit 10 Gy in den WT-Zellen zu einer verstärkten Aktivierung der Schadensantwort führte, die in den KO-Zellen nicht stattzufinden schien. Um zusätzlich die Signifikanz der Ergebnisse darzustellen, wurden unterschiedliche statistische Analysen (t-Test, gepaart, $\alpha=0,05$) der Genexpressionsänderungen der WT- sowie der KO-Zellen durchgeführt. Zum einen wurde der p-Wert für die Genexpressionsänderung von der unbehandelten Kontrolle auf 10 Gy betrachtet, zum anderen wurde der p-Wert für die Aktivierung von 1 Gy auf 10 Gy ermittelt. Die berechneten p-Werte wurden in einem *Vulcano Plot* jeweils gegen die entsprechende Transkriptionsänderung (\log_2) nach der Behandlung mit 10 Gy aufgetragen. Die *Vulcano Plots* sind in Abb. 32 dargestellt. Die Kreise repräsentieren dabei je ein Gen, wobei der Durchmesser der relativen Genexpressionsänderung entspricht.

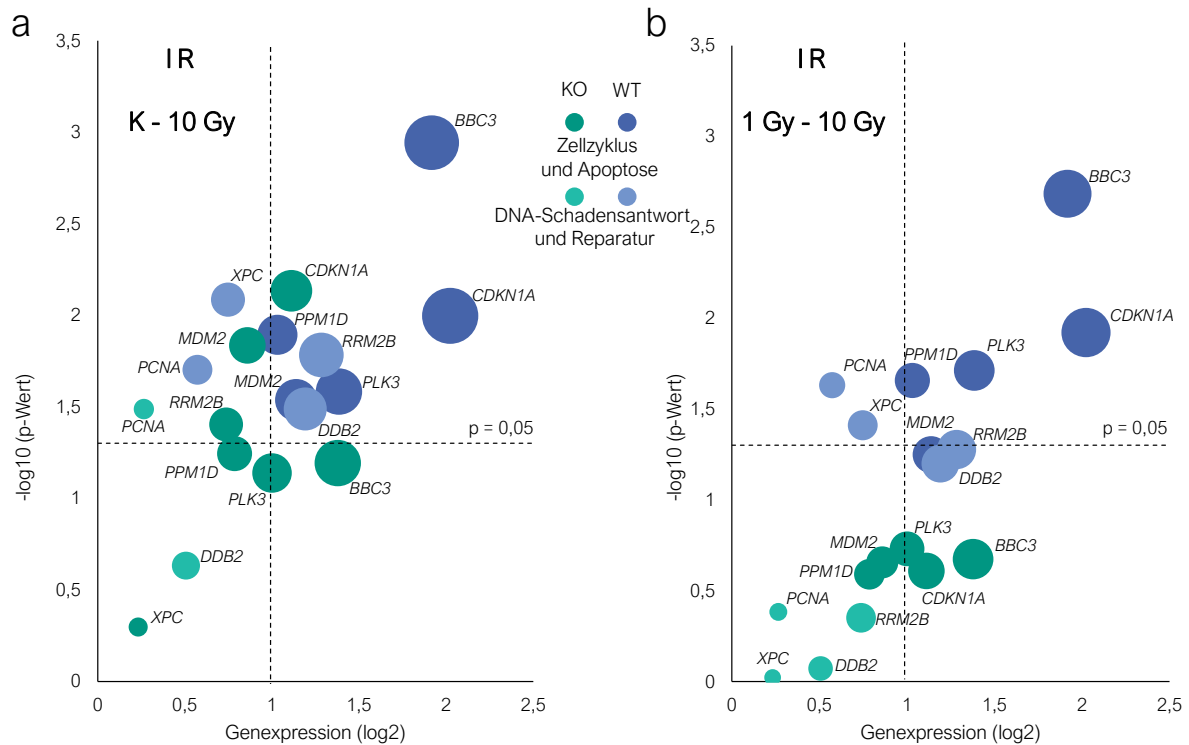


Abb. 32: *Vulcano Plots* der \log_2 -Änderungen ausgewählter Gene nach Bestrahlung mit 10 Gy, aufgetragen gegen den jeweiligen p-Wert ($-\log_{10}$). (a) zeigt die Signifikanz der Genexpressionsänderung von der Kontrolle (K) auf 10 Gy und (b) zeigt die Änderungen von 1 Gy auf 10 Gy (t-Test, gepaart, $\alpha=0,05$). Die dargestellten Gene entsprechen denen aus der *Heatmap* in Abb. 31.

Die Abb. 32 (a) zeigt die Signifikanz der Genexpressionsänderung ausgewählter p53-abhängiger Gene von der Kontrolle (K) auf 10 Gy, wobei Abb. 32 (b) die Änderungen von 1 Gy auf 10 Gy dargestellt. Gene, die signifikant ($p \leq 0,05$) hochreguliert waren, befinden sich oberhalb der horizontalen, gestrichelten Linie. Gene, die eine mindestens 2-fache Induktion zeigten, befinden sich rechts der vertikalen, gestrichelten Linie. Bei Betrachtung der Änderungen von K auf 10 Gy, wird ersichtlich, dass die Bestrahlung in beiden Zelllinien zu einer Aktivierung der p53-abhängigen Schadensantwort führte, jedoch die Induktion der Gene im WT ausgeprägter war, was durch die höhere Induktion der Gene deutlich wird. Dies ist in dem *Vulcano Plot* dadurch zu erkennen, dass sich die blauen Kreise (WT) tendenziell weiter rechts als die grünen Kreise (KO) befinden. Zudem befinden sich alle dargestellten Gene des WT oberhalb des Signifikanzniveaus. Bis auf *XPC* und *PCNA* kommt es hierbei in den WT-Zellen für alle ausgewählten Gene zu einer 2-fachen oder höheren Induktion. In den KO-Zellen zeigte lediglich *CDKN1A* eine relevante Hochregulierung.

Die Verstärkung der Schadensantwort von 1 auf 10 Gy ist in Abb. 32 (b) zu sehen. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass bei den KO-Zellen keine zusätzlichen, signifikanten

Genexpressionsänderungen auftraten. Diese Beobachtung macht den Effekt der durch PARP1 verstärkten Schadensantwort deutlich und deutet auf eine verminderte p53-Transkriptionsaktivität in den KO-Zellen hin.

In Bezug auf die Expression von *CDKN1A* sowie *MDM2* zeigten sich Analogien zu Ergebnissen vorausgegangener Studien. In verschiedenen humanen sowie murinen Zelllinien führte die Inhibierung oder der *Knockout* von *PARP1* zu einer verminderten Induktion von *CDKN1A* und *MDM2* (VALENZUELA et al., 2002; WIELER et al., 2003; NOZAKI und MASUTANI, 2018). Im Rahmen der hier durchgeführten Genexpressionsanalysen konnte zudem gezeigt werden, dass PARP1, neben den beiden genannten Genen, ebenso die Transkription von *BBC3*, *PPM1D*, *DDB2*, *RRM2B*, *PCNA* und *XPC* unterstützt.

Interessanterweise fanden sich in einer Studie von HEINLOTH et al., die Genexpressionsuntersuchungen mit *ATM*-KO Zelllinien nach Bestrahlung mit IR durchführten, Übereinstimmungen einiger Genexpressionsänderungen mit den hier gezeigten Daten. So wurden die Gene *DDB2*, *CDKN1A* sowie *PCNA* in der *ATM*-KO Zelllinie im Vergleich zum WT ebenfalls vermindert induziert. Diese Korrelation könnte ebenfalls Hinweise auf den Einfluss von PARP1 *upstream* von p53 im Zusammenspiel mit ATM geben. p53 kann, wie bereits erwähnt, durch PLK3 phosphoryliert werden, welches *upstream* von p53 in einer ATM-abhängigen Weise reguliert wird (XIE et al., 2001; BAHASSI et al., 2002). PARP1 würde dabei den DNA-Schaden erkennen und die ATM-abhängige Phosphorylierung erleichtern. Infolgedessen würden sowohl PLK3 als auch p53 aktiviert. Daher könnte das hier beobachtete Fehlen der p53-Transkriptionsaktivität in den KO-Zellen auch auf das Ausbleiben *upstream* gelegener Signaltransduktionsmechanismen der DNA-Schadensantwort zurückzuführen sein. Folglich würden die erlangten Ergebnisse die Rolle von PARP1 auch *upstream* von ATM unterstützen (LIU et al., 2017). Die hier beobachtete gesteigerte Aktivierung von *PLK3* der WT-Zellen unterstützt diese Vermutung (siehe als Zusammenfassung Kapitel 6, Abb. 46).

Einen Einfluss von PARP1 auf die Expression des für p53 kodierenden Gens *TP53* (siehe Abb. 30) konnte nicht gezeigt werden. Da p53 konstitutionell exprimiert und hauptsächlich auf Proteinebene reguliert wird, können Untersuchungen auf Proteinebene Aufschluss über eine veränderte p53-Aktivität geben.

5.4.2 PROTEINLEVEL VON P53 UND P21

Um festzustellen, ob PARP1 einen Einfluss auf die Regulation und Stabilisierung von p53 hat, wurde der Tumorsuppressor mittels Western Blot Analyse auf Proteinebene in den zwei Zelllinien untersucht. Da Genexpressionsuntersuchungen auf eine verminderte p53-Transkriptionsaktivität schließen ließen, wurde vermutet, dass dies ebenfalls zu einer verminderten Stabilisierung und/oder Aktivität von p53 auf Proteinebene führt. Dafür wurden die WT- und KO-Zellen mit 10 Gy bestrahlt, für 2, 6 und 24 h nachinkubiert und anschließend die p53 Proteinexpression mittels chemoluminometrischer Methoden nachgewiesen. Als Kontrolle diente die jeweilige unbehandelte Zelllinie. Die Ergebnisse des Western Blots für p53 sind in Abb. 33 dargestellt. Hierbei ist sowohl die Aufnahme der p53 Banden sowie die semiquantitative Auswertung beider Zelllinien dargestellt. Für die semiquantitative Auswertung wurde, wie unter 4.7 erläutert, das p53-Signal auf die Gesamtproteinkonzentration normiert.

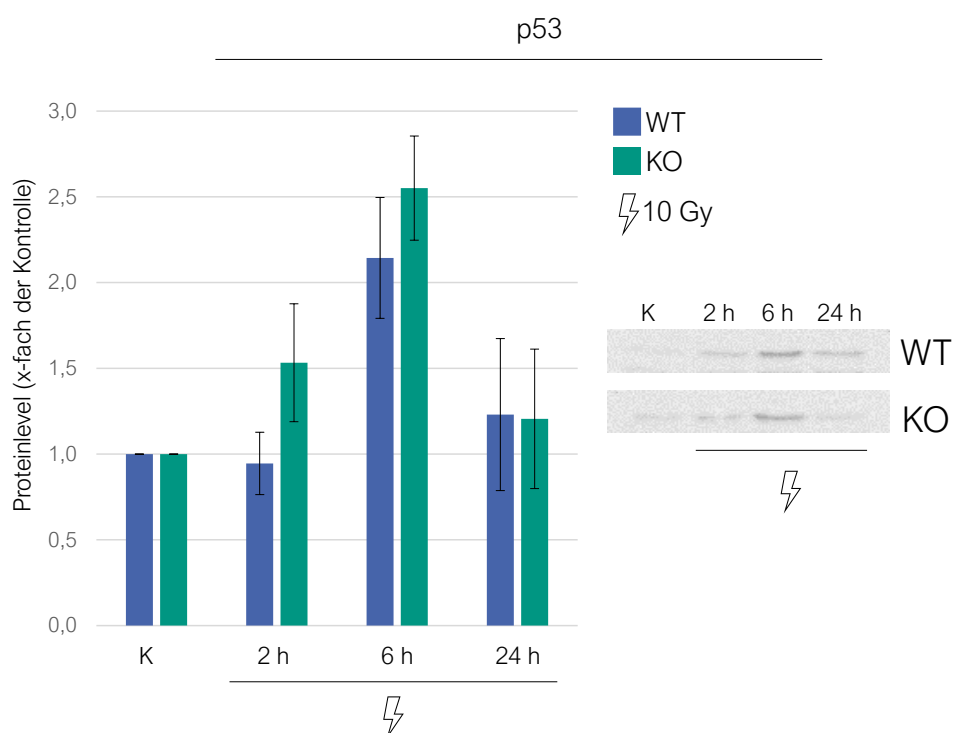


Abb. 33: Proteinexpression von p53 in U2OS (WT) und *PARP1-Knockout* Zellen (KO). Die Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt und für 2, 6, oder 24 h nachinkubiert. Je Zelllinie wurde eine nicht bestrahlte Kontrolle (K) mitgeführt. Anschließend wurden die Zellen pelletiert, lysiert und die Proteinextrakte für den Western Blot verwendet. Normiert wurden die Proben jeweils auf ihre Gesamtproteinintensität. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen, die jeweils in Einfachbestimmung durchgeführt wurden.

Die Signalintensität der p53-Banden war für die nicht behandelten Proben der beiden Zelllinien vergleichbar, wonach PARP1 unter normalen zellulären Bedingungen keinerlei Einfluss auf die Stabilisierung von p53 zu haben scheint. In beiden Zelllinien war nach Bestrahlung mit 10 Gy eine zeitabhängige Aktivierung der p53-Expression erkennbar, die 6 h nach Schadensinduktion die 2-fache (WT) beziehungsweise 2,5-fache (KO) Proteinkonzentration erreichte. Die Aktivierung schien dabei in den KO-Zellen tendenziell stärker als in den WT-Zellen, wobei hier in Anbetracht der Standardabweichungen keine eindeutigen Unterschiede festgestellt werden konnten und die Aufnahmen der Banden keine deutlichen Unterschiede zeigten. In dem Zeitraum von 6 h bis 24 h sank das Proteinlevel in beiden Zelllinien wieder annähernd auf das Basalniveau. Zwischen den Zelllinien konnte weder auf basalem Level noch nach Bestrahlung mit 10 Gy ein eindeutiger Unterschied in der Expression von p53 beobachtet werden. PARP1 scheint demnach in den analysierten U2OS-Zellen keinen eindeutigen Einfluss auf die Stabilisierung von p53 nach IR zu haben.

Weiterhin wurde die p53-Aktivität durch Untersuchung des *downstream* Proteins p21 untersucht. Die Genexpressionsanalysen zeigten in den KO-Zellen, im Vergleich zu den WT-Zellen, eine verminderte Transkriptmenge von *CDKN1A*, dessen Induktion über p53 vermittelt wird. Daher wurde die Proteinexpression von p21 in beiden Zelltypen überprüft. Abb. 34 zeigt die Expressionsniveaus von p21 beider Zelllinien.

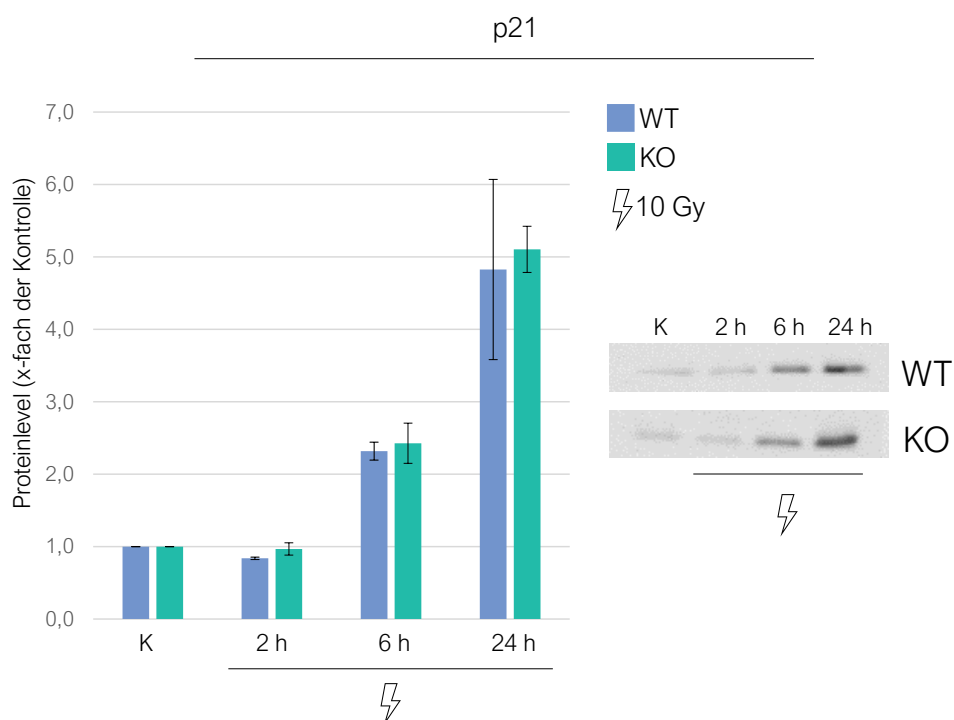


Abb. 34: Proteinexpression von p21 in U2OS (WT) und *PARP1-Knockout* Zellen (KO). Die Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt und für 2, 6, oder 24 h nachinkubiert. Je Zelllinie wurde eine nicht bestrahlte Kontrolle

(K) mitgeführt. Anschließend wurden die Zellen pelletiert, lysiert und die Proteinextrakte für den Western Blot verwendet. Normiert wurden die Proben jeweils auf ihre Gesamtproteinintensität. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen, die jeweils in Einfachbestimmung durchgeführt wurden.

Eine semiquantitative Auswertung ergab, dass 2 h nach Schadensinduktion in beiden Zelllinien noch keine erhöhte p21 Proteinexpression vorlag. Eine deutliche Induktion konnte 6 h nach Bestrahlung beobachtet werden, wobei sich jeweils eine 2,5-fache Signalintensität im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle zeigte. Nach 24 h war die p21 Konzentration um das 5-fache erhöht. Insgesamt kam es zu einer schadensinduzierten Aktivierung des Zellzyklusregulators p21 nach Bestrahlung mit 10 Gy, jedoch war die Induktion in den WT- sowie KO-Zellen vergleichbar. Trotz der deutlichen Induktion der mRNA-Expression von *CDKN1A* konnten diese Beobachtung auf Proteinebene für p21 nicht bestätigt werden. Da an der Umwandlung von mRNA zu Protein unterschiedliche Faktoren sowie eine Vielzahl komplexer Mechanismen beteiligt sind, treten Korrelationen zwischen mRNA- und Proteinexpression häufig nur bedingt auf. Zum einen werden beide Prozesse – die Transkription sowie die Translation – unterschiedlich und in verschiedenen Stufen reguliert (posttranskriptionelle Regulation sowie posttranslationale Modifikation), was ebenso zu einem Unterschied in der Expressionsrate führt aus (VOGEL und MARCOTTE, 2012). In humanen Zellen verläuft die Transkription mit einer Geschwindigkeit von ca. 10 min / Gen langsamer als die Translation, deren Rate etwa 10 mal so hoch ist (SHAMIR et al., 2016). Zum anderen wirkt sich die Stabilität der jeweiligen Produkte auf die gemessene Expression aus. Die Halbwertszeiten von mRNA und Protein variieren je nach Transkript beziehungsweise Protein. *CDKN1A* gilt als eher kurzlebiges Transkript und weist eine Halbwertszeit von ungefähr 120 min (MELANSON et al., 2011) auf. Das entsprechende Proteinprodukt p21 hat in U2OS Zellen eine Halbwertszeit von etwa 80 min (CHANG und EASTMAN, 2012). Diese Faktoren könnten mögliche Gründe für die unterschiedlichen Beobachtungen für p21 auf Gen- sowie Proteinebene sein.

Einige bereits genannte Studien mit humanen und murinen Zellen berichten dementsgegen nach Exposition mit ionisierender Strahlung von einer geringeren Transkriptions- sowie Proteinexpression von p53 sowie p21 in PARP1 defizienten Zellen (AGARWAL et al., 1997; WĘSIERSKA-GĄDEK und SCHMID, 2001; VALENZUELA et al., 2002). Dementsgegen stehen Studien, die auf Transkriptionsebene gegensätzliche Beobachtungen zeigten. Bei *PARP1*^{-/-} Mäusen (SURESH KUMAR et al., 2018) sowie murinen *PARP1*^{-/-} Thymozyten (BENEKE et al., 2000) ging das Fehlen von PARP1 mit einer verstärkten Induktion von *MDM2* und *CDKN1A* und einer dementsprechend höheren p53-Aktivität einher. Die Gründe für diese

Unterschiede sind noch unklar. SURESH KUMAR et al. postulierte jedoch die Hypothese, dass die Unterschiede möglicherweise auf die verschiedenen verwendeten Gewebearten zurückzuführen sein könnten und der damit zusammenhängenden unterschiedlichen Expression von PARP1 und anderen PARP-Familienmitgliedern. So schlussfolgerten sie, dass in Abwesenheit von PARP1 die p53-gesteuerte transkriptionelle Antwort auf Strahlung beispielsweise in Fibroblasten oder Zellen epithelialen Ursprungs vermindert sein könnte, während der Verlust von PARP1 in Zellen mit lymphoiden / myeloiden Ursprungs den gegenteiligen Effekt haben könnten (SURESH KUMAR et al., 2018).

In den hier analysierten U2OS-Zellen konnte zusammenfassend kein Einfluss von PARP1 auf die p53- sowie p21- Proteinexpression festgestellt werden. Im Weiteren wurde der Einfluss des *Knockouts* auf die Zellzyklusphasenverteilung untersucht.

5.4.3 ZELLZYKLUSPHASENVERTEILUNG

Nach Exposition mit IR sind zwei unterschiedliche *G₂/M-Checkpoint* Mechanismen relevant, die zum *G₂*-Arrest der Zellen führen können. Diese sind abhängig davon, in welcher Phase sich die Zelle zum Zeitpunkt der Schadensinduktion befindet. Zum einen verhindert der frühe *G₂-Checkpoint*, dass die Zellen, die während der *G₂*-Phase bestrahlt und somit geschädigt wurden, in die Mitose übergehen. Zum anderen akkumulieren die Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in früheren Phasen des Zellzyklus befanden, zeitabhängig nach der Bestrahlung in der *G₂*-Phase (XU et al., 2002). Generell können während eines Zellzyklusarrests Signalkaskaden aktiviert werden, die beispielsweise der Reparatur des Schadens dienen oder bei einem irreparablen Schaden den programmierten Zelltod einleiten.

Um zu überprüfen, ob eine Induktion des Zellzyklusarrests in den KO-Zellen nach Bestrahlung stattfindet, wurde im nächsten Schritt die Zellzyklusphasenverteilung nach Exposition mit 10 Gy untersucht und mit der Verteilung der WT-Zellen verglichen. Abb. 35 zeigt die zeitabhängige Zellzyklusphasenverteilung der Lebendzellpopulation, nach Bestrahlung, für die WT- sowie die KO-Zellen über einen Zeitraum von 144 h.

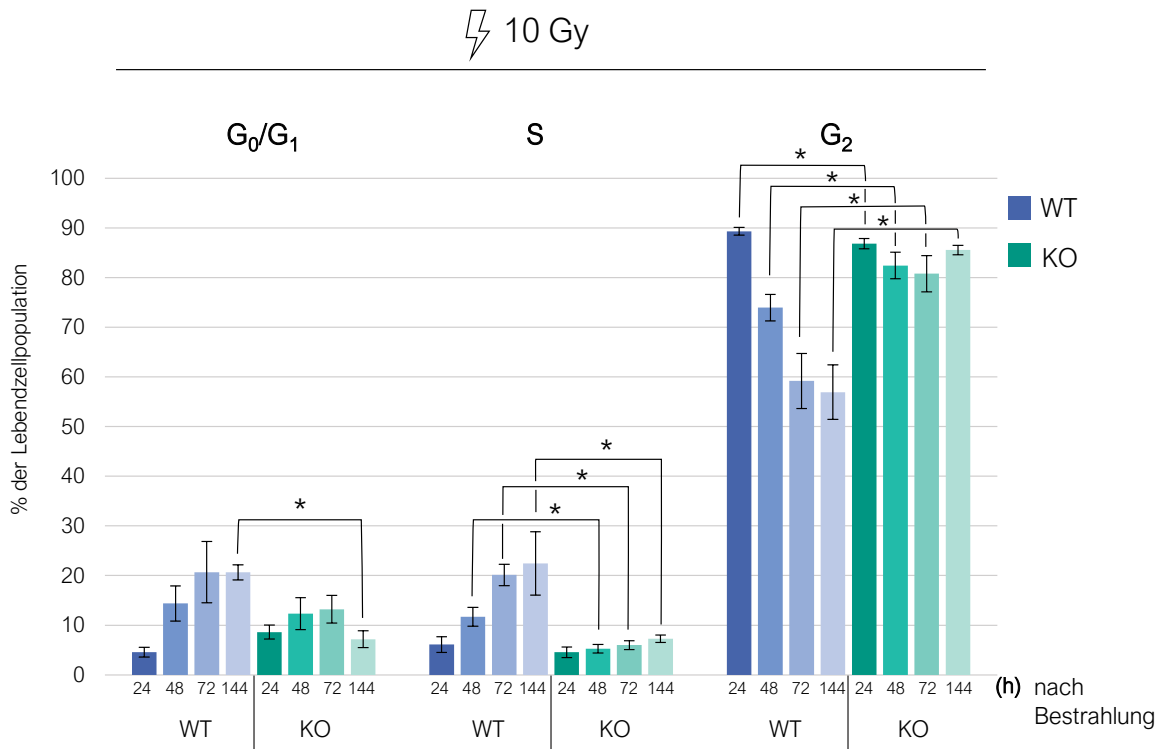


Abb. 35: Zeitabhängige Zellzyklusphasenverteilung der U2OS (WT) und *PARP1-Knockout* Zellen (KO) nach Bestrahlung mit 10 Gy. Um die Zellzyklusverteilung zu bestimmen, wurden die Zellen mit DAPI angefärbt und die entsprechenden Phasen mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Dargestellt ist die Verteilung der Lebendzellpopulation. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen, die jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Abweichungen der KO- zu WT- Zellen wurden mittels gepaartem t-Test ($*p \leq 0,05$) bestimmt.

24 h nach der Bestrahlung mit 10 Gy kam es in beiden Zelllinien zu einem deutlichen Arrest der Zellen in der G₂-Phase, wodurch sich etwa 90 % der viablen WT- und KO-Zellen in der G₂-Phase befanden. In den WT-Zellen nahm der Anteil der G₂-Phase über die Zeit sukzessive wieder ab, bis der Anteil nach 144 h bei etwa 60 % lag. Gleichzeitig stieg sowohl der Anteil der G₁- sowie der der S-Phase, bis sich zum gemessenen Endzeitpunkt jeweils 20 % der viablen Zellen in beiden Phasen befanden. Daraus ließe sich schließen, dass ein Teil der Zellen, nach erfolgreicher Reparatur der Schäden, wieder in den regulären Zellzyklus übergeht. Der Anteil der KO-Zellen in der G₂-Phase blieb über den beobachteten Zeitraum von 144 h unverändert. Dementsprechend veränderten sich auch die Anteile der G₁- sowie der S-Phase über den Zeitverlauf kaum. Die KO-Zellen scheinen nach Exposition mit IR in der G₂-Phase zu stagnieren, was eine Progression in den normalen Zellzyklus verhindert.

Da beide Zelllinien 24 h post-Bestrahlung einen deutlichen G₂-Arrest zeigten, scheint der *Checkpoint*-Mechanismus zur Induktion des G₂-Arrests in den KO-Zellen intakt zu sein und PARP1-unabhängig zu verlaufen. In der Literatur finden sich Beobachtungen, die ein Fehlen

von PARP1 mit einem verstärkten und schnelleren G₂-Arrest assoziieren. LU et al. untersuchten den G₂-Arrest nach IR in murinen PARP1^{-/-} im Vergleich zu PARP1^{+/+} Zellen. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass es in den PARP1-defizienten Zellen zu einer schnelleren und stärkeren G₂-Akkumulation nach Bestrahlung mit IR (6 Gy) kam. Die Messungen der Zellzyklusverteilung erfolgten stündlich innerhalb von 0 bis 6 h nach der Bestrahlung, wobei das Maximum der Akkumulation nach 6 h zu beobachten war (LU et al., 2006). Ähnliche Beobachtungen eines verstärkten G₂-Arrests konnten ebenso nach einer Hemmung der PARYlierungsaktivität beobachtet werden (MASUTANI et al., 1995; MADISON et al., 2011). Allerdings finden sich bisher keine Beobachtungen für Zeiträume, die über 24 h hinaus gingen. Zudem muss beachtet werden, dass die genannten Beobachtungen einen verstärkten G₂-Arrest in den PARP1-defizienten Zellen zeigten, wobei es sich in den hier dargestellten Versuchen um einen zu Beginn prozentual vergleichbaren Anteil an Zellen in der G₂-Phase handelt. Erst im weiteren Verlauf zeigte sich eine Persistenz des G₂-Arrests. Da die erste Messung nach 24 h durchgeführt wurde, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob es zu einer unterschiedlich schnellen Akkumulation der Zellen in der G₂-Phase kam.

LU et al. postulieren, dass die stärkere G₂-*Checkpoint*-Antwort in Abwesenheit von PARP1 auf einen überaktivierten ATR/CHK1-Signalweg zurückzuführen sei (Signalweg siehe 2.1.3.1), der in einer ATM-unabhängigen Weise reguliert wird (LU et al., 2006). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von ATM ebenfalls zu einer verstärkten sowie darüber hinaus zu einer verlängerten Akkumulation der Zellen in der G₂-Phase führte (bis zu einem Zeitpunkt von 72 h nach Bestrahlung mit IR) (XU et al., 2002; FERNET et al., 2010). Xu et al. zeigten hierbei, dass die beiden eingangs genannten G₂/M-*Checkpoint*-Mechanismen unterschiedlich reguliert werden. Der frühe G₂-*Checkpoint* ist demnach ATM-abhängig, während die G₂/M-Akkumulation ATM-unabhängig zu sein scheint (XU et al., 2002), was die Vermutung der Aktivierung des G₂-Arrests über den ATR/CHK1-Signalweg bestätigen würde. Möglicherweise wäre dieser Weg auch eine Erklärung für den hier beobachteten induzierten G₂-Arrest der KO-Zellen.

Ein Grund für den anhaltenden G₂-Arrest der bestrahlten KO-Zellen könnte die erhöhte Anzahl an DNA-Schäden aufgrund der gestörten Reparatur sein. Zwei Gründe dafür wurden bereits von LU et al. beschrieben. Eine Möglichkeit wäre, dass die beeinträchtigte SSBR aufgrund des Fehlens von PARP1 in den KO-Zellen zu einer Anhäufung nicht reparierter Läsionen führt, die die Replikationsgabeln kollabieren lassen und folglich zur Aktivierung des ATR/CHK1-Wegs führen. Eine zweite Möglichkeit stellt die beeinträchtigte DSBR in der

G₂-Phase dar (LU et al., 2006). PARP1 dient als wichtiger Regulator der Reparatur bei DSBs, indem es beispielsweise mit dem Ku-Komplex konkurriert. In der S- sowie der G₂-Phase wird das alt-NHEJ, welches über PARP1 vermittelt wird, verstärkt aktiviert (YANG et al., 2018). Daher postulierten LU et al., dass die gestörte Reparatur auch durch einen Mangel der alt-NHEJ-Aktivität in den KO-Zellen zustande kommen könnte (LU et al., 2006). Zudem ist PARP1 ebenfalls Vermittler in der Aktivierung der HR, die sich vorwiegend in der G₂-Phase abspielt (RAY CHAUDHURI und NUSSENZWEIG, 2017). Daher lässt sich schlussfolgern, dass der persistierende G₂-Arrest auf eine insgesamt gestörte Reparaturfähigkeit zurückzuführen sein könnte, die sowohl durch eine defekte SSBR als auch durch eine eingeschränkte DSBR zustande kommt.

Neben der Analyse der Zellzyklusverteilung für die Lebendzellpopulation wurde ferner der subG₁-Anteil für beide Zelllinien nach Bestrahlung mit 10 Gy bestimmt (siehe 4.5). In Abb. 36 ist der prozentuale subG₁-Anteil, bezogen auf die Gesamtzellpopulation, angegeben.

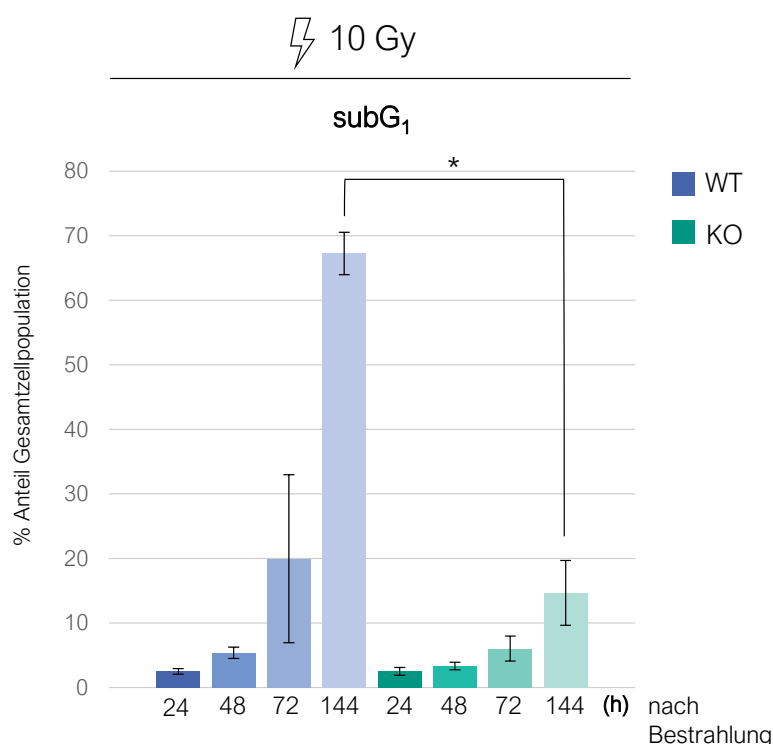


Abb. 36: Zeitabhängige Analyse der subG₁-Phase der U2OS (WT) und *PARP1-Knockout* Zellen (KO) nach Bestrahlung mit 10 Gy, bezogen auf die Gesamtzellpopulation. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SD aus drei unabhängigen Versuchen, die jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Abweichungen der KO- zu WT- Zellen wurden mittels gepaartem t-Test (*p ≤ 0,05) bestimmt.

In beiden Zelllinien kam es nach der Bestrahlung mit 10 Gy zu einem Anstieg des subG₁-Anteils. Auffällig ist jedoch die signifikant höhere Zunahme des subG₁-Anteils in den

WT-Zellen im Gegensatz zu den KO-Zellen. Nach 144 h stieg der Anteil in den WT-Zellen auf 67 % der Gesamtzellpopulation, wobei nur 15 % der KO-Zellen in der subG₁-Phase zu finden waren.

KIM et al. konnten zeigen, dass U2OS-Zellen nach Bestrahlung mit 5 Gy innerhalb von 72 h eine Zunahme der subG₁-Phase auf etwa 20 % des Gesamtzellanteils zeigten, was mit den hier gezeigten Versuchen übereinstimmt. Zudem konnte die Arbeitsgruppe den apoptotischen Anteil zusätzlich mittels spezifischer *Annexin V*-Färbung bestätigen. Diese Färbemethode lässt in Kombination mit Propidiumiodid (PI) eine Unterscheidung von lebenden, apoptotischen und nekrotischen / spätapoptotischen Zellen zu (KIM et al., 2017).

Offensichtlich scheint die Mehrheit der induzierten Schäden in den WT-Zellen zu groß, um erfolgreich repariert werden zu können, was den Großteil der Zellen schließlich zum Einleiten der Apoptose zwingt. Interessanterweise zeigten die KO-Zellen dementsgegen nur einen geringen Anstieg apoptotischer Zellen. Der beobachtete, persistierende G₂-Arrest in den KO-Zellen verhindert demnach sowohl einen Wiedereintritt in den Zellzyklus als auch ein Ausführen der Apoptose. Beobachtungen über einen längeren Zeitraum und vergleichbare Untersuchungen der subG₁-Phase mit PARP1-defizienten Zellen sind bisher in der Literatur nicht bekannt. PARP1 spielt offensichtlich eine entscheidende Rolle bei dem Schicksal der Zelle nach dem eingesetzten Zellzyklusarrest, vor allem in Bezug auf die Apoptose. Wie bereits in 2.2.3.5 beschrieben, werden PARP1 einige Rollen in unterschiedlichen Zelltodmechanismen zugesprochen, allerdings ist der Einfluss von PARP1 in der Apoptose bisher nicht ganz eindeutig. Es gab Berichte, in denen die PARP1-Inhibierung die Apoptoserate erhöhte, während andere zeigen konnten, dass es zu einem geringen Apoptoseanteil in verschiedenen Zelltypen kam (GHORAI et al., 2015).

Im Vorgang der Apoptose ist bisher bekannt, dass PARP1 eine vorwiegend passive Rolle einnimmt, indem es durch Caspasen gespalten und so die Depletion von ATP verhindert wird, die andernfalls zur Nekrose der Zelle führt (AREZIA und SCOVASSI, 2014). Dieser Mechanismus erklärt allerdings nicht den signifikanten Unterschied im subG₁-Anteil zwischen den Zelllinien, der auf eine aktive Rolle von PARP1 hinweist. Denkbare Möglichkeiten, wie PARP1 aktiv Einfluss auf die Apoptose nehmen kann, wären zum einen indirekt über p53 und zum anderen direkt über den PARP1-vermittelten Zelltodweg Parthanatos. Die KO-Zellen zeigten im Vergleich mit dem WT nach Exposition mit IR in der Genexpressionsanalyse eine geringere Expression des proapoptotischen und p53-abhängigen Gens *BBC3* (WT: 3,8-fach; KO: 2,6-fach), welches für PUMA kodiert (siehe 5.3.3). Die Induktion von PUMA aktiviert den intrinsischen Apoptoseweg, bei dem

Cytochrom C aus dem Mitochondrium freigesetzt wird, was wiederum zur Induktion der Caspasen führt, die Schlüsselenzyme der Apoptose (PLESCA et al., 2008). Die Unterschiede im subG₁-Anteil könnten daher auf die fehlende PARP1-vermittelte Aktivierung von p53 zurückzuführen sein. Eine weitere mögliche Ursache wäre der PARP1-abhängige Zelltodmechanismus Parthanatos, der durch das PAR-vermittelte Freisetzen von AIF induziert wird (siehe 2.2.3.5). Unter anderem aufgrund der morphologischen Veränderungen wird dieser Zelltod als Variante des nekrotischen Zelltods bezeichnet. Allerdings findet auch hier eine Fragmentierung der DNA statt (WANG et al., 2019), was somit im subG₁-Peak sichtbar wäre. Daher könnte der beobachtete subG₁-Anteil in den WT-Zellen sowohl auf die durch PARP1 vermittelte p53-Aktivität, die den intrinsischen Apoptoseweg aktiviert, als auch auf den durch PARP1 induzierten Nekrosemechanismus Parthanatos zurückzuführen sein.

Es wurde außerdem die zytotoxische Wirkung der IR mit der Strahlungsintensität 10 Gy über den Zeitraum von 144 h mittels RCC(*relative cell count*)-Tests am CASY® untersucht und ferner die Koloniebildungsfähigkeit analysiert. Der RCC-Test über 144 h zeigte wider Erwarten kein erhöhtes Absterben der WT-Zellen. Die Bestrahlung führte in beiden Zelllinien zu einer Hemmung der Proliferation und die Lebendzellzahl nach 144 h war vergleichbar (siehe Anhang Abb. 51). Das CASY® erfasst bei der Analysemessung den elektrischen Widerstand, den die Zelle beim Durchtritt der Messspore erzeugt. Durch den veränderten Widerstand kann zwischen lebenden Zellen (intakte Zellmembran, hoher Widerstand) und toten Zellen (geschädigte Zellmembran, niedriger Widerstand) unterschieden werden (OLS OMNI LIFE SCIENCE GMBH & CO KG., 2018). Daher ist durch diese Messung nicht erkennbar, ob die Zellen bereits apoptotischen Prozessen unterliegen. Hierfür stellt die durchflusszytometrische Methode die spezifischere Analysemethode dar. Beide Zelllinien zeigten zudem 14 Tage nach der Bestrahlung kein Koloniewachstum (Daten nicht gezeigt). Das Fehlen der Koloniebildungsfähigkeit und der anhaltende G₂-Arrest in den KO-Zellen könnten auf eine Seneszenz hindeuten, was jedoch durch Untersuchung eines spezifischen Seneszenzmarkers wie der *senescence-associated-β-galactosidase* (SA-β-gal) in weiterführenden Untersuchungen bestätigt werden müsste (GIRE und DULIC, 2015).

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die gestörte Reparaturfähigkeit in den KO-Zellen und die damit einhergehende erhöhte Anzahl an verbleibenden Schäden vermutlich zu dem anhaltenden G₂-Arrest führte. Wie eingangs in Kapitel 2.2.3.3 erwähnt, ist PARP1 in verschiedenen Reparaturprozessen involviert. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Aktivität der SSBP sowie die der DSBP durch das Fehlen von PARP1 vermindert

ist und dies ein erhöhtes Ausmaß an verbliebenen DNA-Schäden zur Folge hat. Weiterhin scheint PARP1 eine wesentliche Rolle bei der Zellzyklusregulation zu spielen, indem es den Austritt des Zellzyklusarrest und das Schicksal der Zelle mitbestimmt. Die in den WT-Zellen beobachtete erhöhte subG₁-Phase könnte daher aufgrund einer PARP1-vermittelten Aktivität von p53 sowie aufgrund des durch PAR-induzierten Zelltodmechanismus Parthantos erklärt werden.

Um die zuvor erwähnte Korrelation des verstärkten und verlängerten G₂-Arrests zwischen dem *PARP1-Knockout* und der ATM-Inhibierung zu überprüfen, wurde im Folgenden ein ATM-Inhibitor für die Zellzyklusuntersuchungen eingesetzt.

5.4.3.1 INHIBIERUNG VON ATM

Mit Hilfe des ATM Inhibitors KU99533 (ATMi) wurde überprüft, ob die Inhibierung der Kinaseaktivität in den WT-Zellen ebenfalls zu einem verlängerten G₂-Arrest führt und wie sich die Inhibierung von ATM auf den subG₁-Anteil auswirkt.

Der eingesetzte Inhibitor KU99533 hemmt gemäß der Herstellerangaben ATM bei einer Konzentration von 10 µM. Bevor die Zellzyklusversuche durchgeführt wurden, wurde die Effektivität der Inhibierung überprüft. Generell wird ATM selbst nach einem DNA-Schaden induziert und phosphoryliert als Antwort p53 an der Aminosäure Ser15. Zur Überprüfung des Inhibitors wurde daher die phospho-p53(p-p53)-Intensität an Ser15 immunofluorimetrisch bestimmt. Dazu wurden die WT-Zellen 1 h vor Bestrahlung mit dem ATMi inkubiert und 1 h nach der Bestrahlung auf die Fluoreszenzintensität von p-p53 überprüft. Zum Vergleich wurden zwei Kontrollen ohne ATMi Behandlung mitgeführt: eine nicht bestrahlte sowie eine bestrahlte Vergleichskontrolle. Das Ergebnis ist in Abb. 37 gezeigt. Die Bestrahlung führte in den WT-Zellen zu einer 3,8-fachen Steigerung der Phosphorylierungsintensität. Durch Inkubation mit dem ATMi entsprach die Phosphorylierung annähernd der unbehandelten Kontrolle und lag nur noch bei einer 1,3-fachen Induktion, was einer effektiven Inhibierung von ATM entspricht.

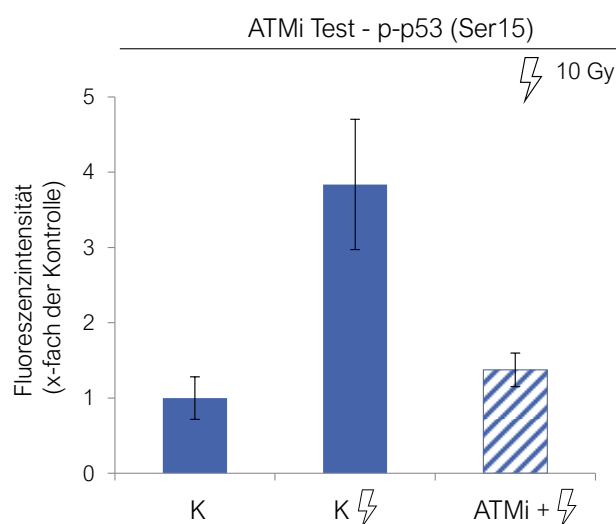


Abb. 37: Test des ATM Inhibitors KU99533 (ATMi) in U2OS Wildtyp Zellen. Die Zellen wurden 1 h vor der Bestrahlung (10 Gy) mit 10 μ M ATMi inkubiert und 1 h nach Bestrahlung die Phosphorylierungsintensität von p53 an Ser15 mittels Immunofluoreszenz ermittelt. Außerdem wurden zwei Vergleichskontrollen ohne ATMi mitgeführt: eine nicht bestrahlte und eine bestrahlte Kontrolle. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität x-fach zur nicht bestrahlten Kontrolle (K) ohne ATMi. Der Funktionstest wurde einfach in Doppelbestimmungen durchgeführt.

Der Inhibitor wurde daraufhin für die Zellzyklusversuche verwendet. Dafür wurden die WT- sowie die KO-Zellen, 1 h vor Exposition mit 10 Gy, mit dem Inhibitor inkubiert und anschließend die Zellzyklusphasenverteilung über einen Zeitraum von 144 h am Durchflusszytometer bestimmt. Die Ergebnisse wurden danach im Vergleich mit den bereits durchgeführten Analysen der KO-Zellen betrachtet. Der Vergleich der Zellzyklusverteilungen der WT-Zellen mit ATMi-Behandlung und der bereits analysierten KO-Zellen ohne ATMi-Behandlung ist in Abb. 38 veranschaulicht.

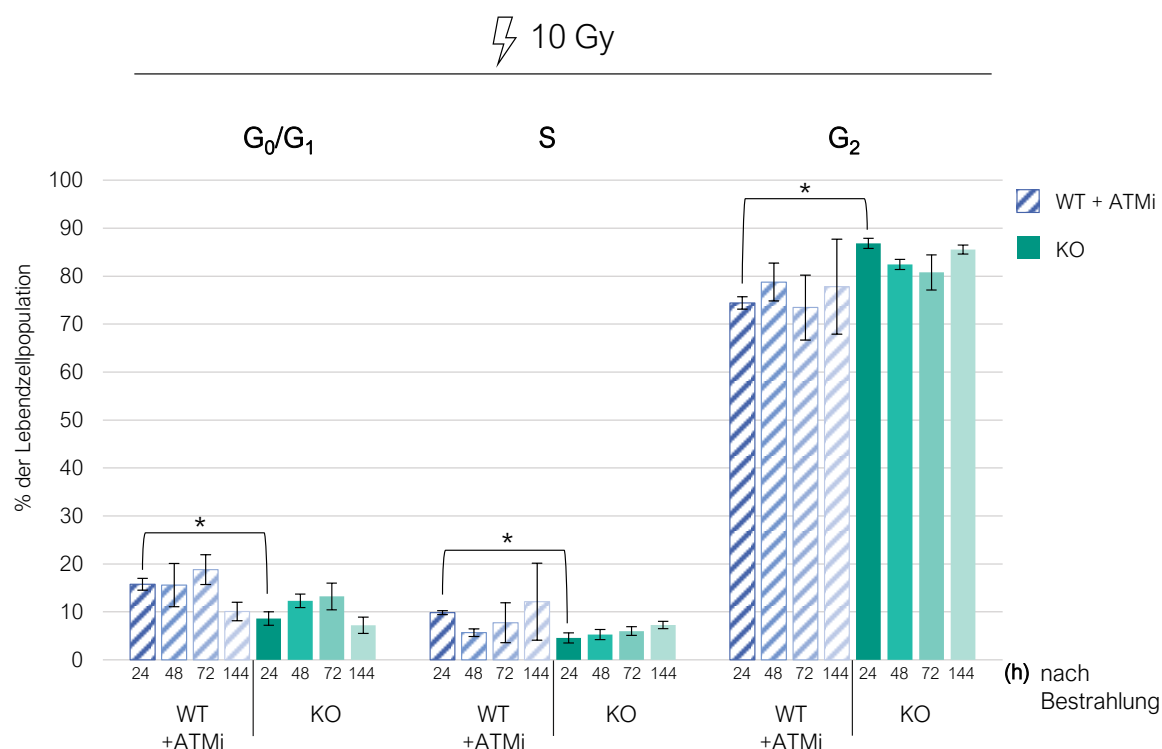


Abb. 38: Vergleich der zeitabhängigen Zellzyklusphasenverteilung der U2OS Zellen nach Inkubation mit dem Inhibitor ATMi KU99533 (WT + ATMi) und der *PARP1-Knockout* Zellen (KO) ohne Inhibitor, jeweils nach Bestrahlung mit 10 Gy. Die WT-Zellen wurden mit 10 μ M ATMi 1 h vor Bestrahlung inkubiert. Um die Verteilung des Zellzyklus zu bestimmen, wurden die Zellen mit DAPI angefärbt und die entsprechenden Phasen mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen, die jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Abweichungen der WT- zu KO- Zellen wurden mittels gepaartem t-Test (* $p \leq 0,05$) bestimmt.

Nach Behandlung mit dem ATMi zeigten die WT-Zellen ebenfalls einen persistierenden G₂-Arrest, was auch im direkten Vergleich mit den unbehandelten WT-Zellen deutlich wurde (siehe Anhang, Abb. 52). Der Anteil an WT-Zellen in der G₂-Phase schwankte nach Behandlung mit dem ATMi zwischen 75 -78%, wobei in den KO-Zellen der Anteil bei 81-87 % lag. 24 h nach Bestrahlung war die Akkumulation in der G₂-Phase in Folge des *PARP1-Knockouts* ausgeprägter als nach der ATM-Inhibierung. Gleichzeitig zeigte sich in den WT-Zellen ein leicht höherer Anteil an Zellen in der G₁- und S-Phase (etwa 10 % und 5 %). Nichtsdestotrotz zeichnete sich nach Inhibierung der ATM-Kinaseaktivität in den WT-Zellen eine vergleichbare Zellzyklusverteilung wie in Folge des *PARP1-Knockouts* ab. Diese Beobachtung bestätigt die vorangegangenen Ergebnisse und bestärkt die Hypothese, dass die Induktion des beobachteten G₂-Arrest in den KO-Zellen ATM- sowie PARP1-unabhängig über den ATR/CHK1 *backup*-Signalweg zu verlaufen scheint (XU et al., 2002; LU et al., 2006; FERNET et al., 2010). In den *PARP1-KO* Zellen könnte daher der ATR/CHK1-induzierte G₂-Arrest, neben der gestörten Reparaturfähigkeit, auch durch die fehlende ATM-Interaktion

ausgelöst werden. Die Korrelation der beiden Zellzyklusverteilungen lässt vermuten, dass das Zusammenspiel zwischen PARP1 und ATM entscheidend für eine funktionierende DDR ist, da es bei fehlender Aktivität eines der beiden Proteine zu einem dauerhaften G₂-Arrest kommt.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden ebenfalls die KO-Zellen mit dem ATMi behandelt und die Zellzyklusphasenverteilung der Lebendzellpopulation bestimmt. Nimmt PARP1 eine regulative Rolle *upstream* von ATM ein, wäre zu erwarten, dass die Zellzyklusanalyse nach Behandlung der KO-Zellen mit ATMi zu keiner zusätzlichen Veränderung in der Zellzyklusverteilung führt. Das Ergebnis der Analyse ist in Abb. 39 dargestellt.

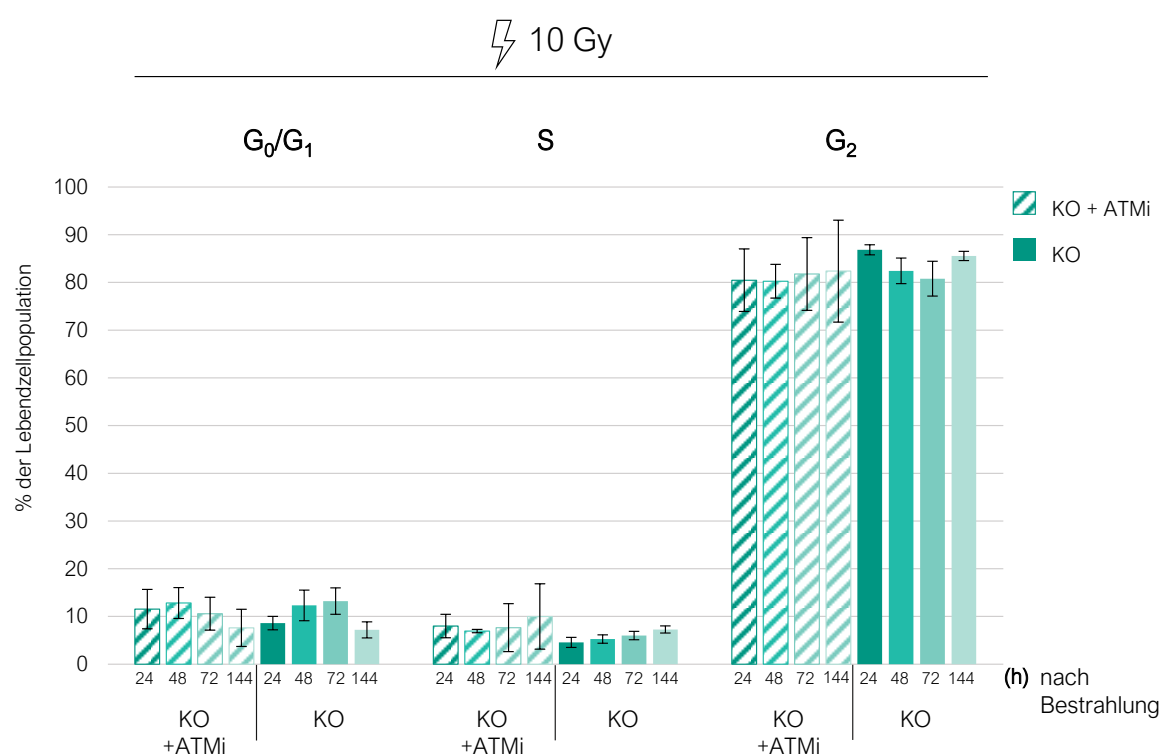


Abb. 39: Vergleich der zeitabhängigen Zellzyklusphasenverteilung der *PARP1-Knockout* Zellen nach Inkubation mit dem Inhibitor ATMi KU99533 (KO + ATMi) und der *PARP1-Knockout* Zellen (KO) ohne ATMi, jeweils nach Bestrahlung mit 10 Gy. Die KO-Zellen wurden mit 10 μ M ATMi 1 h vor Bestrahlung inkubiert. Um die Verteilung des Zellzyklus zu bestimmen, wurden die Zellen mit DAPI angefärbt und die entsprechenden Phasen mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen, die jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Abweichungen der KO- zu WT- Zellen wurden mittels gepaartem t-Test (* $p \leq 0,05$) bestimmt.

Die Behandlung der *PARP1-KO* Zellen mit dem ATMi zeigte eine vergleichbare Zellzyklusverteilung wie ohne ATMi-Behandlung. Die zusätzliche ATM-Inhibierung führte folglich zu keinen zusätzlichen, signifikanten Änderungen in der Zellzyklusverteilung. Sowohl

der *PARP1*-KO selbst als auch die Kombination mit dem ATMi lösten einen persistierenden G₂-Arrest aus. Da auch die Inhibierung von ATM allein zu einem anhaltenden G₂-Arrest führte (Abb. 38), scheinen beide Proteine wesentlich an der Regulation der G₂-Phase beteiligt zu sein. Allerdings bestärkt das Gleichbleiben der Zellzyklusphasenverteilung des *PARP1*-KO nach zusätzlicher ATM-Inhibierung die Hypothese, dass PARP1 eine wichtige regulatorische Rolle für die Aktivität von ATM einnimmt.

Um zu überprüfen, ob die AMTi-Behandlung einen Einfluss auf den subG₁-Anteil hat, wurden im Weiteren die subG₁-Phase in Bezug auf die Gesamtzellpopulation in den WT- sowie KO-Zellen ausgewertet und mit den Ergebnissen ohne ATMi-Behandlung (siehe 5.4.3) verglichen. Die Ergebnisse sind in Abb. 40 dargestellt.

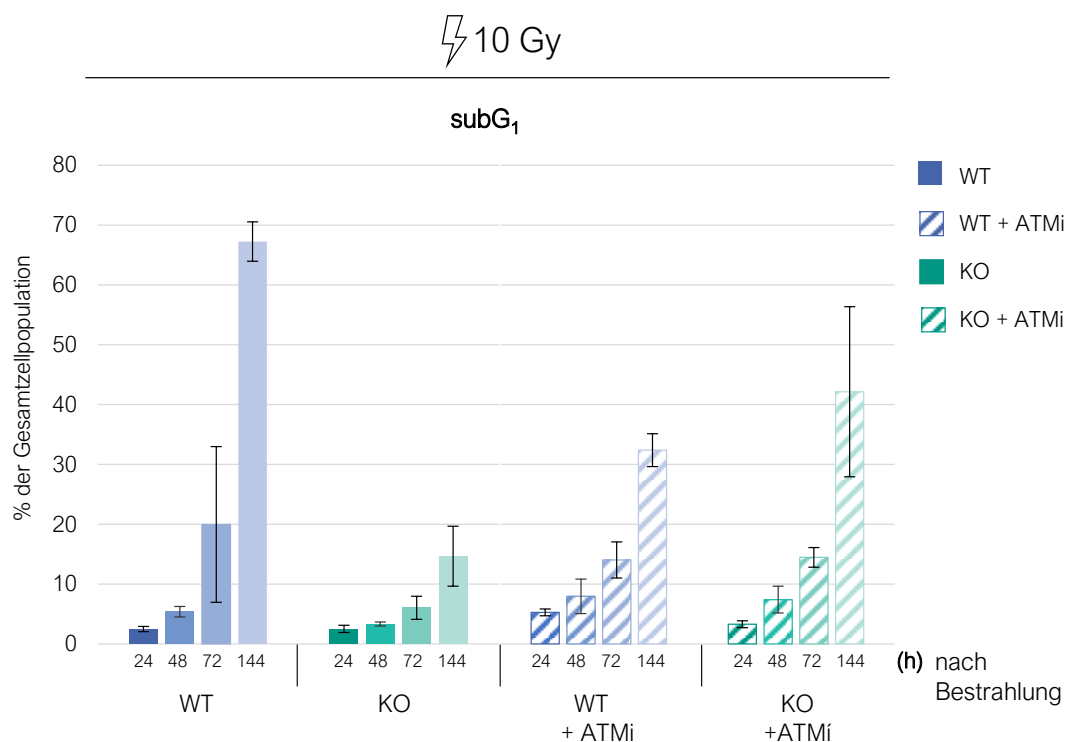


Abb. 40: Zeitabhängige Analyse der subG₁-Phase der U2OS (WT) und *PARP1*-Knockout Zellen (KO) mit und ohne ATMi (KU99533) Behandlung, nach Bestrahlung mit 10 Gy, bezogen auf die Gesamtzellpopulation. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SD aus drei unabhängigen Versuchen, die jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden.

Der Vergleich der gemessenen subG₁-Anteile zeigt, dass die WT-Zellen mit funktionierender PARP1- sowie ATM-Aktivität nach 144 h den höchsten subG₁-Anteil aufweisen (67 %) und folglich der Großteil der Population wenige Tage nach Bestrahlung in den Zelltod übergeht. Wie schon in 5.4.3 beschrieben, war der Anteil für die KO-Zellen im Vergleich deutlich geringer (144 h - 15%). Eine Hemmung von ATM in den WT-Zellen (WT + ATMi) bewirkte

eine merkliche Reduktion des subG₁-Anteils, verglichen mit den unbehandelten WT-Zellen (WT). Nach 144 h lag der Anteil hier bei etwa 32 %. Verglichen mit den KO-Zellen (KO), schien es durch die ATM-Inhibierung allein (WT + ATMi) zu einer verstärkten Apoptosereaktion der Zellen zu kommen, was vermutlich an den bereits erwähnten Zelltod-vermittelnden Funktionen von PARP1 liegt. Der deutlich geringer ausgeprägte subG₁-Verlauf nach ATMi-Hemmung in den WT-Zellen (WT + ATMi), verglichen mit den unbehandelten WT-Zellen (WT), spricht dafür, dass auch ATM eine wichtige Rolle bei der Regulation der Apoptose einnimmt. Vermutlich ist jedoch der ATR/CHK1-Signalweg auch zu einem gewissen Maß für das Einleiten der Apoptose in den Zellen ohne PARP1 und/oder ATM-Aktivität verantwortlich. Dieser *backup*-Weg kann neben dem Auslösen des G₂-Arrest auch über CHK1 zur Aktivierung von p53 beitragen und folglich die Apoptose vermitteln (siehe 2.1.3.1). Die Hemmung von ATM in den *PARP1*-KO Zellen (KO + ATMi) zeigte eine vergleichbare Verteilung wie die ATM-Inhibierung in den WT-Zellen (WT + ATMi). Hierbei ist unklar, wieso die zusätzliche ATM-Inhibierung in den *PARP1*-KO Zellen (KO + ATMi) den subG₁-Anteil erhöht, verglichen mit einer *PARP1*-Defizienz (KO) allein. Womöglich führt das Ausmaß des Schadens durch die eingeschränkte DDR, aufgrund des Fehlens beider Proteine, über weitere *backup*-Mechanismen zum Tod der Zelle.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass höchstwahrscheinlich das Zusammenwirken von PARP1 und ATM wesentlich für eine funktionierende DDR ist. Sowohl eine *PARP1*-Defizienz als auch eine ATM-Inhibierung allein lösten einen persistierenden G₂-Arrest aus, der vermutlich zur Seneszenz der Zellen führt. Ist die Funktion beider Proteine gegeben, findet ein konsequentes Absterben der geschädigten Zellen statt, was die genomische Stabilität bewahrt. Da die KO-Zellen in den durchgeführten Zellzyklusanalysen die stärkste G₂-Akkumulation zeigten und es zu keiner Veränderung in der Verteilung nach zusätzlicher Behandlung mit dem ATMi kam, kann geschlussfolgert werden, dass *PARP1* eine wichtige regulatorische Rolle für die Aktivität von ATM spielt, was bereits in der Literatur postuliert wurde (AGUILAR-QUESADA et al., 2007; HAINCE et al., 2007; LIU et al., 2017).

Um den Zusammenhang zwischen *PARP1* und ATM auf funktioneller Ebene genauer zu untersuchen, wurden im Weiteren Phosphorylierungsanalysen verschiedener ATM-abhängiger Signalproteine durchgeführt.

5.4.4 PHOSPHORYLIERUNG VON ATM, H2AX UND P53

Nach IR-induziertem DNA-Schaden wird ATM infolgedessen phosphoryliert und somit in seiner Kinaseaktivität selbst aktiviert. ATM phosphoryliert seinerseits das Histon H2AX an

Ser129 sowie p53 an Ser15 (GULERIA und CHANDNA, 2016). Um den Einfluss von PARP1 auf die Induktion und Aktivität von ATM zu untersuchen, wurden verschiedene Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Hierfür wurde p-ATM (Ser1981) selbst sowie die beiden Zielproteine der Phosphorylierung γ H2AX (Ser129) und p-53 (Ser15) nach Bestrahlung mit 1 beziehungsweise 10 Gy analysiert.

Da p53 nicht nur über ATM phosphoryliert und aktiviert werden kann, sondern auch CHK1, CHK2 und PLK3 solche Aktivierungen ermöglichen, wurde zudem die p-p53 Stelle an Ser20 analysiert, die von den drei genannten Proteinen phosphoryliert wird (BAHASSI et al., 2006). Parallel zur Phosphorylierungsaktivität von p53 wurde zusätzlich der p53-Status mittels Immunfluoreszenz überprüft. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zelllinien. Die immunfluorimetrischen Untersuchungen von p53 bestätigen somit die Ergebnisse der Western Blot Analyse (siehe Anhang, Abb. 53).

Die Phosphorylierungsantwort von p-ATM ist in Abb. 41 als Balkendiagramm dargestellt. Die Auswertung erfolgte über die Gesamtfluoreszenz im Zellkern.

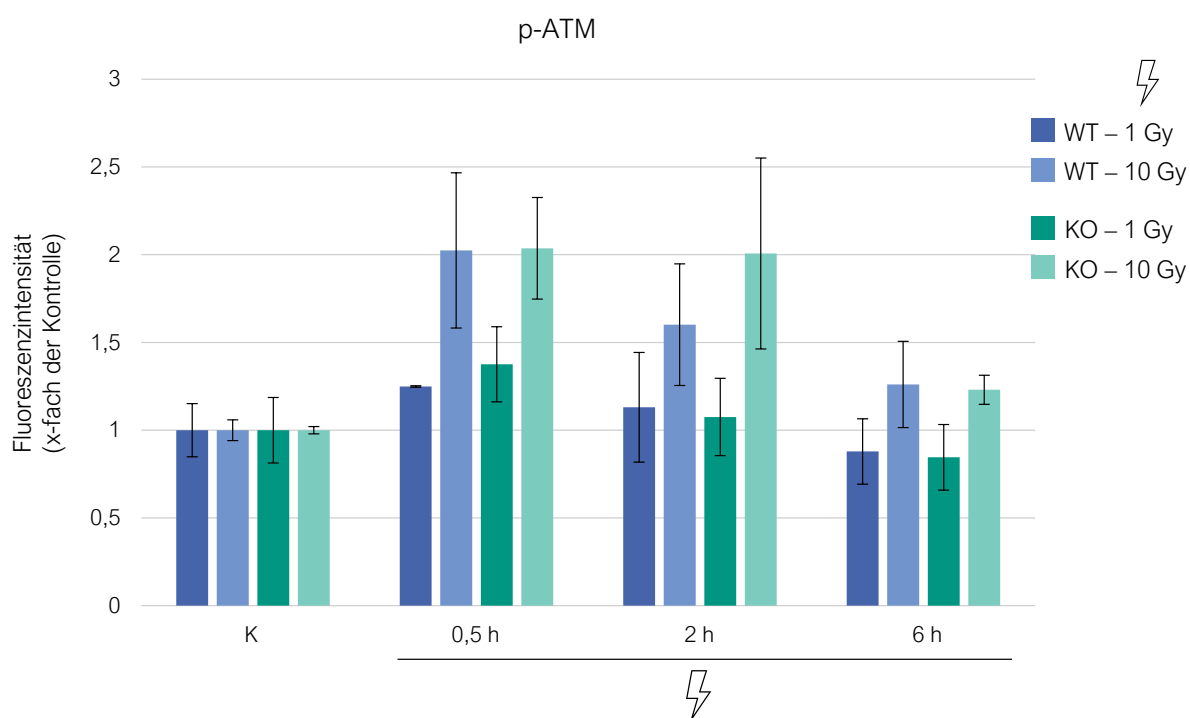


Abb. 41: Fluoreszenzintensitäten des p-ATM-Signals nach Bestrahlung mit IR in den U2OS (WT) und den *PARP1-Knockout* Zellen (KO). Die Zellen wurden mit 1 beziehungsweise 10 Gy bestrahlt, danach für 0,5, 2 oder 6 h nachinkubiert. Die Auswertung erfolgte über die Bestimmung der Gesamtfluoreszenz und anschließende Normierung auf die jeweilige nicht bestrahlte Kontrolle. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen, die jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden.

Nach Bestrahlung mit 1 Gy kam es nach 0,5 h zu einer leichten Erhöhung der Signalintensität auf das 1,2-fache für die WT-Zellen und auf das 1,3-fache für die KO-Zellen. Die Induktion nahm anschließend wieder ab und erreichte nach 6 h bereits das basale Level. Die Exposition mit 10 Gy führte zu einer deutlicheren Intensitätssteigerung. Hierbei kam es in den WT- sowie in den KO-Zellen jeweils bereits nach 0,5 h zu einer Verdopplung der Phosphorylierungsaktivität. Nach 6 h nahm auch hier das Signal in beiden Zelllinien wieder ab. Zwischen den Zelllinien ergab sich kein eindeutiger Unterschied in der Phosphorylierungsintensität von p-ATM, weder nach Bestrahlung mit 1 Gy noch 10 Gy. Demnach schien PARP1 keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von ATM nach unterschiedlichen Bestrahlungsintensitäten mit IR zu haben.

Um einen möglichen Einfluss von PARP1 auf die Aktivität der ATM-Kinase festzustellen, wurde γ H2AX nach der gleichen Schadensinduktion analysiert. Die Phosphorylierung des Histons H2AX nach Bestrahlung ist als Balkendiagramm in Abb. 42 gezeigt.

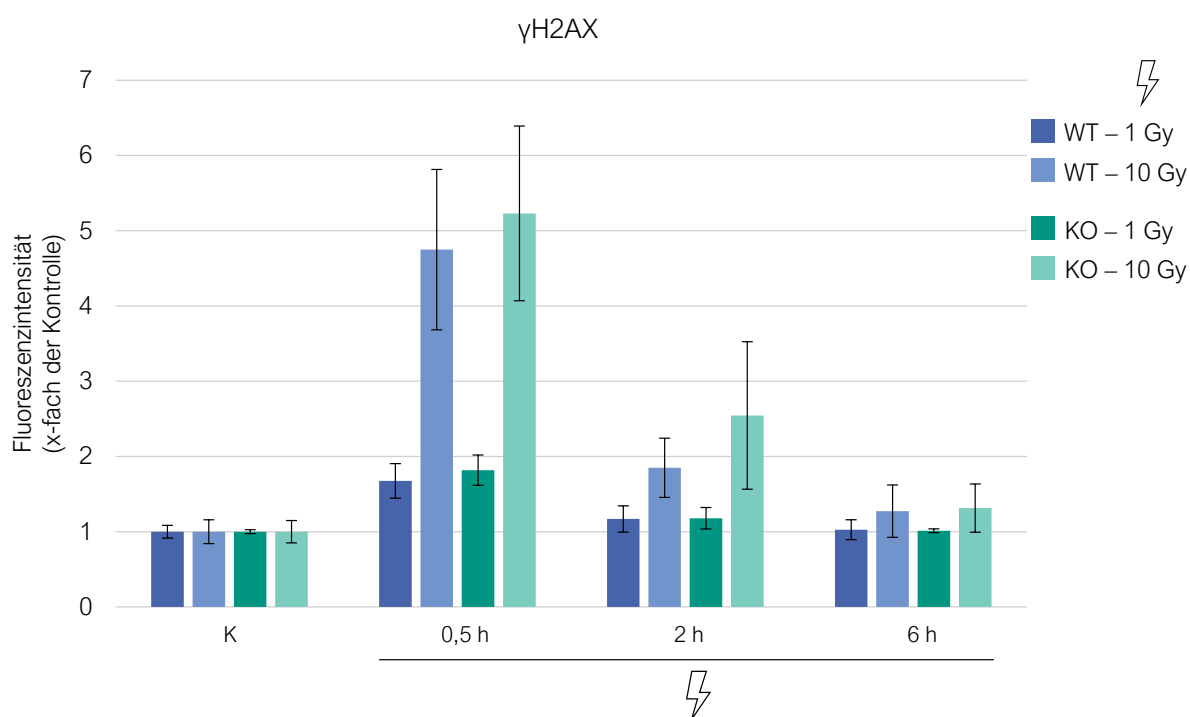


Abb. 42: Fluoreszenzintensität des γ H2AX-Signals nach Bestrahlung mit IR in den U2OS (WT) und den *PARP1-Knockout* Zellen (KO). Die Zellen wurden mit 1 beziehungsweise 10 Gy bestrahlt, danach für 0,5, 2 oder 6 h nachinkubiert. Die Auswertung erfolgte über die Bestimmung der Gesamtfluoreszenz und anschließende Normierung auf die jeweilige nicht bestrahlte Kontrolle. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen, die jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden.

Eine halbe Stunde nach Schadensinduktion durch Exposition mit 1 Gy zeigte sich in den WT- sowie KO-Zellen nur eine kurzzeitige, leichte Erhöhung der Fluoreszenzintensität von γ H2AX

auf das 1,7-fache (WT) beziehungsweise 1,8-fache (KO) der Kontrolle. Bereits 2 h nach Bestrahlung war das Level annähernd wieder auf dem basalen Niveau. Die Bestrahlung mit 10 Gy verursachte in den WT-Zellen eine 4,7-fache und in den KO-Zellen eine 5,2-fache Phosphorylierungsintensität, jeweils im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle. Auch hier war die Fluoreszenzintensität nach 6 h wieder mit der nicht bestrahlten Kontrolle vergleichbar. Insgesamt konnte auch für γ H2AX, unabhängig von der Bestrahlungsintensität, kein Unterschied zwischen den WT- und den KO-Zellen festgestellt werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die ATM-Aktivität in Bezug auf γ H2AX unabhängig von PARP1 zu sein scheint.

In der Literatur wurde postuliert, dass die Interaktion von PARP1 und ATM wichtig für die Phosphorylierung von H2AX sei. Dabei wurde gezeigt, dass ein *PARP1-Knockout* zu einer defekten ATM-Kinaseaktivität führte und folglich auch zu einer geringen H2AX-Phosphorylierung nach Exposition mit IR (AGUILAR-QUESADA et al., 2007). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass es ebenso zu einer geringeren Phosphorylierung von p53 an Ser15 kam, wobei lediglich eine Inhibierung von PARP1 nicht zu diesem Effekt führte (VALENZUELA et al., 2002). HAINCE et al. zeigten dementsprechend, dass es ebenso bei einer PARP1-Inhibierung zu einer geringen Phosphorylierung von H2AX sowie auch p53 (Ser15) kam. Wie bereits in Kapitel 2.2.3.4 erläutert, wurde bisher vermutet, dass die Interaktion von ATM mit PAR-Einheiten die Rekrutierung an die Schadensstelle unterstützt und zur Induktion der Kinaseaktivität führt (HAINCE et al., 2007). WATANABE et al. zeigten gegensätzliche Ergebnisse. Hierbei wurde festgestellt, dass PARP1 ATM negativ reguliert, da ein *PARP1-Knockout* zu einer erhöhten ATM-Aktivität sowie einer erhöhten H2AX-Phosphorylierung führte. Allerdings wurde in diesen Untersuchungen das DSB-induzierende Agens NCS (Neocarzinostatin) eingesetzt und nicht mit IR behandelt (WATANABE et al., 2004).

Weiterhin wurde die ATM-Kinaseaktivität in Bezug auf p-p53 an Ser15 immunofluorimetrisch analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 43 dargestellt.

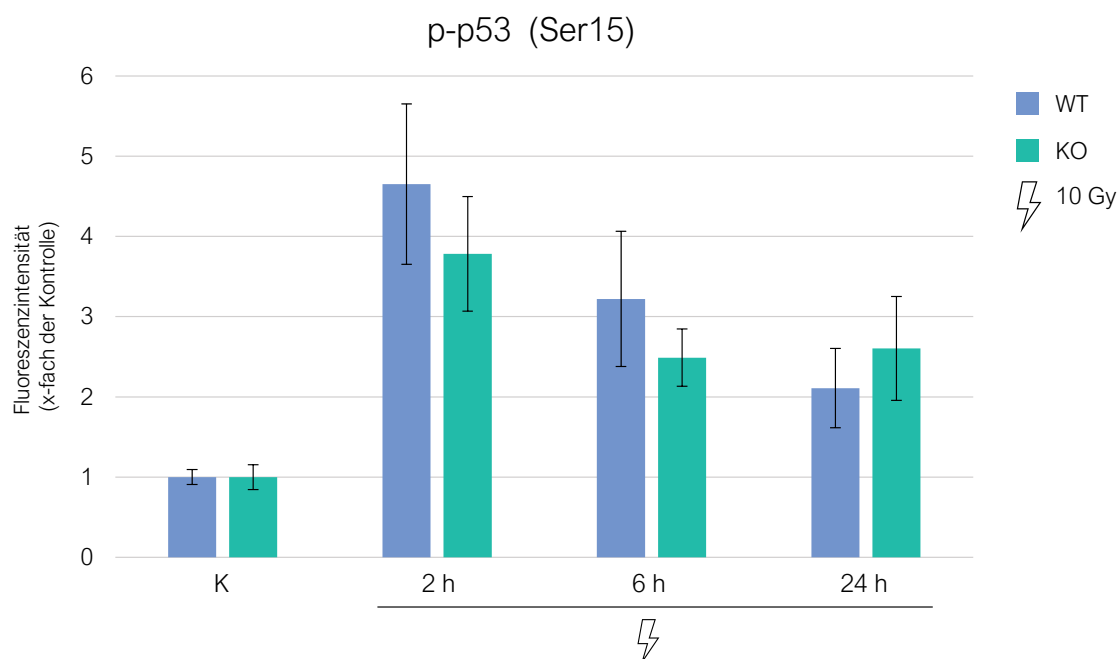


Abb. 43: Fluoreszenzintensität des p-p53(Ser15)-Signals nach Bestrahlung mit IR in den U2OS (WT) und den *PARP1-Knockout* Zellen (KO). Die Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt, danach für 2, 6 oder 24 h nachinkubiert. Die Auswertung erfolgte über die Bestimmung der Gesamtfluoreszenz und anschließende Normierung auf die jeweilige nicht bestrahlte Kontrolle. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen, die jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden.

Die Bestrahlung mit 10 Gy führte in den WT-Zellen nach 2 h zu einer 4,6-fachen Steigerung der p-p53(Ser15)-Signalintensität und in den KO-Zellen zu einer 3,8-fachen Induktion. Die Phosphorylierungsintensität an Ser15 nahm demnach innerhalb der ersten 2 h nach Bestrahlung in den WT-Zellen tendenziell stärker zu als in den KO-Zellen. Nach 6 h zeigte sich für die WT-Zellen eine 3,2-fache und für die KO-Zellen eine 2,5-fache Aktivität. Die Intensität nahm im Laufe der Zeit wieder ab und lag nach 24 h noch immer bei einer 2,1- (WT) beziehungsweise 2,6-fachen (KO) Phosphorylierungsintensität. Es zeigte sich insgesamt die Tendenz einer stärkeren Phosphorylierung von p-p53 (Ser15) in den WT-Zellen, was einer erhöhten Aktivität von ATM zugrunde liegen könnte. Wie bereits vermutet, könnte diese durch PARP1 mitvermittelt werden. Allerdings handelt es sich hierbei um eine Tendenz und keinen signifikanten Einfluss.

Um die Rolle von PLK3 bei der Aktivierung von p53 zu untersuchen, wurde im Weiteren die Phosphorylierung von p53 an der Aminosäure Ser20 analysiert. Diese Position kann neben PLK3 auch von CHK1 und CHK2 phosphoryliert werden. Die Ergebnisse von p-p53 (Ser20) sind in Abb. 44 dargestellt.

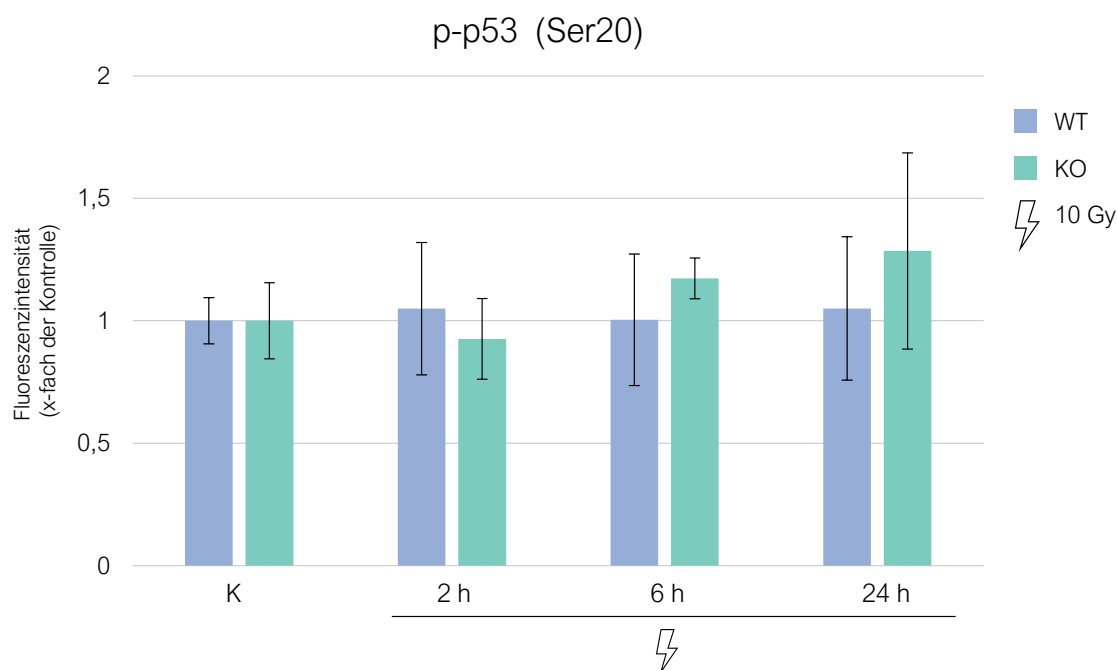


Abb. 44: Fluoreszenzintensität des p-p53(Ser20)-Signals nach Bestrahlung mit IR in den U2OS (WT) und den *PARP1-Knockout* Zellen (KO). Die Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt, danach für 2,6 oder 24 h nachinkubiert. Die Auswertung erfolgte über die Bestimmung der Gesamtfluoreszenz und anschließende Normierung auf die jeweilige nicht bestrahlte Kontrolle. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen, die jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden.

In der Analyse von p-p53 an Ser20 zeigte sich nach Bestrahlung mit 10 Gy eine kaum gesteigerte Phosphorylierungsintensität in beiden Zelllinien. Nach 24 h konnte eine leichte Tendenz zur erhöhten Intensität (1,3-fach) in den KO-Zellen beobachtet werden. In beiden Zelllinien blieb die Fluoreszenzintensität nach Schadensinduktion jedoch insgesamt auf einem vergleichbaren Niveau, ähnlich zur Kontrolle. Die Bestrahlung mit 10 Gy führte demnach zu keiner eindeutigen Phosphorylierung von p53 an Ser20. Dadurch ließe sich schlussfolgern, dass es zu keiner direkten, relevanten Aktivierung von p53 über CHK1, CHK2 oder PLK3 kam.

Insgesamt bedingte der *PARP1-Knockout* nur geringe Veränderungen in den analysierten Phosphorylierungsmustern. Kein Unterschied zwischen den Zelllinien war bei p-ATM sowie bei der Phosphorylierung des Histons H2AX und bei p53 an Ser20 zu erkennen. Die Phosphorylierung von p53 an Ser15 zeigte eine leichte Tendenz hin zu einer erhöhten Phosphorylierung in den WT-Zellen. Möglicherweise gibt diese Tendenz einen Hinweis auf die PARP1-vermittelte ATM-Aktivität. In der Literatur finden sich bisher keine vergleichbaren Untersuchungen zu den Auswirkungen eines *PARP1-KO* oder einer Inhibierung von PARP1 auf die Phosphorylierungsaktivitäten von p53 nach der Exposition mit IR.

6 ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit sollte dazu beitragen, die multifunktionale Rolle von PARP1 in den miteinander agierenden Signalwegen der DDR besser einordnen zu können. Bekannt wurde PARP1 als das Schlüsselprotein in der SSBR. Mittlerweile werden PARP1 vielfältige Rollen in der DDR zugesprochen, indem es durch seine PARylierungsaktivität die Signalweiterleitung auf verschiedenen Ebenen der DDR vermittelt, entweder durch direkte PARylierung oder durch nicht-kovalente Wechselwirkungen der Signalproteine mit den PAR-Einheiten.

So beeinflusst PARP1, durch PARylierung der Histone, beispielsweise die Chromatin-Relaxation, wodurch die Schadensstelle für weitere Reparaturproteine zugänglich gemacht wird. Weiterhin spielt PARP1 bei der Erkennung unterschiedlicher Läsionen und bei Reparaturprozessen, wie der DSBR und NER eine Rolle. Ein Protein, das ebenfalls mit PAR-Einheiten interagiert und selbst PARyliert werden kann, ist der Tumorsuppressor p53, welcher eine essenzielle Regulatorrolle in der DDR einnimmt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass PARP1 die Induktion, die Stabilisierung sowie die Aktivität von p53 beeinflussen kann. P53 vermittelt nach Schädigung der DNA den Zellzyklusarrest, induziert die Transkription von DNA-Reparaturproteinen oder Apoptose-einleitenden Proteinen und spielt daher eine wichtige Rolle beim Erhalt der genomischen Stabilität.

Um den Einfluss von PARP1 in dem Signalnetzwerk der DDR untersuchen zu können, wurde die Generierung einer *PARP1-Knockout* Zelllinie gewählt. Durch das gezielte Ausschalten eines Gens können, im Vergleich mit dem Wildtyp, potenzielle Unterschiede auf Transkriptions-, Protein-, sowie funktioneller Ebene sichtbar gemacht werden. Zu diesem Zweck wurde das *Genome Editing*-System CRISPR/Cas9 im Arbeitskreis etabliert, indem ein Arbeitsablauf konzipiert wurde, der darauf hinzielte, eine *PARP1-KO* Zelllinie zu generieren. Als passende Zelllinie wurde die U2OS Zelllinie gewählt, die sich vor allem aufgrund ihrer funktionierenden p53-Schadensantwort für die Untersuchungen eignete. Zu Beginn wurde die Zielsequenz für das CRISPR/Cas9-System bestimmt. Mithilfe der webbasierten *Benchling Life Sciences R&D* Software wurde eine gRNA ausgewählt, die komplementär zur Zielsequenz im Exon 2 des *PARP1* Gens ausgerichtet war. Ein weiteres Kriterium für die gRNA war eine möglichst geringe Wahrscheinlichkeit für *off-Target* Effekte, die ebenfalls, basierend auf experimentellen Daten, rechnerisch von *Benchling* ermittelt wurde (Hsu et al., 2013). Als Expressionssystem wurde das Plasmidgerüst pSpCas9(BB)-2APuro (PX459) V2.0 (*Addgene* #62988) eingesetzt, welches eine Klonierungsstelle für die gRNA besaß und das

Cas9 sowie einen Puromycin-Resistenzmarker exprimierte. Die Klonierung der ausgewählten gRNA wurde von *GenScript* durchgeführt. Vor der eigentlichen Transfektion der U2OS-Zellen wurde die Plasmid-DNA in *E.coli* transformiert, um sie zu amplifizieren und nach der Isolierung aufzureinigen. Nachdem die Transfektion der Zellen mit der aufgereinigten Plasmid-DNA erfolgte, wurden die Zellen 24 h post-Transfektion mittels Puromycin selektiert. Anschließend wurden die Zellen durch eine Einzelzellverdünnung isoliert. Nach einer mehrwöchigen Kultivierungsphase erfolgte die Validierung des *Knockouts*. Dafür wurde die verbliebene Proteinexpression von PARP1 in den einzelnen Klonen mit Hilfe eines *Screening* Western Blots überprüft. Eine PARP1-Expression blieb im Klon K3F11 aus. Die Validierung dieser Ergebnisse erfolgte zusätzlich mithilfe immunofluorimetrischer Nachweismethoden auf funktioneller Ebene nach Inkubation mit dem PARylierungs-Initiator H₂O₂. Hierbei war die gemessene Fluoreszenzintensität der behandelten K3F11-Zellen vergleichbar mit den gemessenen Intensitäten der unbehandelten K3F11-Zellen sowie der unbehandelten U2OS-Zellen. Demnach konnte der mittels CRISPR/Cas9 generierte *PARP1-Knockout* in den U2OS-Zellen auf Protein- sowie auf funktioneller Ebene bestätigt werden.

Im Anschluss wurden Vergleichsuntersuchungen durchgeführt, um den Einfluss des *Knockouts* unter basalen Bedingungen zu überprüfen. Dafür wurden die Wachstumseigenschaften, die Koloniebildungsfähigkeiten sowie die Zellzyklusphasenverteilungen beider Zelllinien (WT und KO) miteinander verglichen. Die Versuche zur Bestimmung der Verdopplungszeit ergaben eine leicht höhere PDT der KO-Zellen von 29,1 h im Vergleich zu den WT-Zellen mit 25,6 h. Zudem hatten die KO-Zellen eine um 40 % eingeschränkte Koloniebildungsfähigkeit. Die Analyse der Zellzyklusverteilung zeigte den möglichen Grund für die verlangsamte Proliferation der KO-Zellen durch eine zum einen signifikant erhöhte G₁-Phase und zum anderen durch eine langsamere Progression der Zellen durch den Zellzyklus. Die Beobachtungen bestätigen die Aussagen der Literatur, dass sowohl ein *Knockdown* als auch ein *Knockout* von *PARP1* zu einer verminderten Proliferation und Koloniebildungsfähigkeit führt (LI et al., 2016; RANK et al., 2016; GHOSH et al., 2018). Weiterhin wurden die Transkriptionsniveaus 95 verschiedener Gene analysiert. Darunter befanden sich unter anderem Gene der DNA-Reparatur, der DNA-Schadensantwort, der Zellzyklusregulation, der Proliferation sowie der Apoptose und der oxidativen Stressantwort. Die Genexpressionsanalyse wurde mittels *High-Throughput* RT-qPCR durchgeführt, die bereits zuvor im Arbeitskreis etabliert worden war (FISCHER et al., 2016). Mithilfe dieser Daten wurden Genexpressionsprofile der KO-Zellen erstellt, um potenzielle Änderungen auf Transkriptionsebene festzustellen. Der Vergleich der ermittelten

ΔCq -Werte beider Zelllinien zeigte eine signifikant höhere Expression von *CDKN1A* in den KO- gegenüber den WT-Zellen. *CDKN1A* kodiert für p21, welches für die Regulation des G_1 -Arrests verantwortlich ist und daher Auslöser für den erhöhten Anteil der KO-Zellen in der G_1 -Phase und die einhergehende verlangsamte Proliferation sein könnte. Diese Erkenntnisse wurden bereits durch GHOSH et al. postuliert (GHOSH et al., 2018). Bis auf die gesteigerte Induktion von *CDKN1A* kam es zu keinen weiteren relevanten Unterschieden in den analysierten Genexpressionsprofilen. Zusammenfassend bedingte der *PARP1*-KO in den U2OS-Zellen eine verlangsamte Wachstumsrate sowie eine verringerte Koloniebildungsfähigkeit, die höchstwahrscheinlich auf die erhöhte Genexpression von *CDKN1A* und dem daraus resultierenden verstärkten G_1 -Arrest zurückzuführen war. Eine mögliche Ursache könnte die erhöhte Anzahl spontaner, unreparierter Schäden sein, die unter Normalbedingungen durch das Fehlen von *PARP1* bedingt werden. Vermutlich führt dies zu einer verstärkten Aktivierung des Tumorsuppressors p53, der wiederum die Transkription von *CDKN1A* vermittelt. Die Auswirkungen des *PARP1*-KO unter basalen Bedingungen sind in Abb. 45 zusammengefasst.

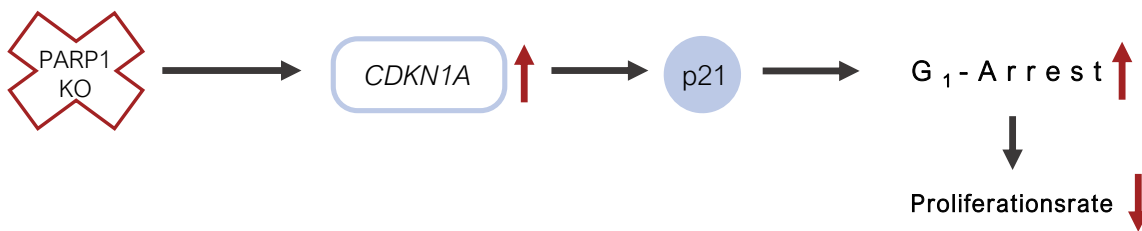


Abb. 45: Auswirkungen des *PARP1*-Knockouts (KO) auf die U2OS-Zellen unter basalen Bedingungen. Der *Knockout* von *PARP1* führt zu einer Induktion von *CDKN1A* (siehe 5.2.3). *CDKN1A* kodiert für das Zellzyklusregulatorprotein p21. Dessen Induktion bedingt einen verstärkten G_1 -Arrest der KO-Zellen im Vergleich zu den WT Zellen (siehe 5.2.2), was zu einer verlangsamten Progression durch den Zellzyklus und folglich zu einer verlangsamten Proliferationsrate führt (siehe 5.2.1).

Um die Auswirkungen des *PARP1*-KO auf die Schadensantwort zu untersuchen, wurden für beide Zelllinien zudem Genexpressionsprofile nach Behandlung mit unterschiedlichen schadensinduzierenden Faktoren erstellt. Zur Induktion von oxidativen DNA-Schäden und SSBs wurden die Zellen mit 100 beziehungsweise 250 μM H_2O_2 behandelt und nach einer Nachinkubationszeit von 8 h die Transkriptionsaktivitäten der bereits genannten Gen-Cluster analysiert. Analog wurde nach Bestrahlung mit UV-C Strahlung der Intensitäten 5 beziehungsweise 10 J/m^2 sowie IR in der Bestrahlungsintensität von 1 beziehungsweise 10 Gy verfahren. Insgesamt zeigte sich nach allen drei Behandlungsarten eine Induktion p53-vermittelter Gene in beiden Zelllinien. Dabei schien die Schadensantwort nach

Inkubation mit H₂O₂ sowie nach Bestrahlung mit UV-C nicht konzentrationsabhängig sowie unabhängig von PARP1 aktiviert zu werden. In den KO-Zellen zeigte sich, im Vergleich zu den WT-Zellen, eine scheinbar höhere Sensitivität der Zellen gegenüber oxidativen Schäden, da die Inkubation mit 100 µM H₂O₂-Lösung zu leicht verstärkten Effekten in vereinzelt Genen der DDR führte. Diese Beobachtung war allerdings nach Erhöhung der Behandlungskonzentration nicht mehr sichtbar. Zudem war nach Exposition mit UV-C Strahlung der höheren Intensität (10 J/m²) im Genexpressionsmuster eine verstärkte Repression der Gene der DNA-Schadensantwort zu erkennen, was für die Einleitung der Seneszenz in den Zellen spricht. Die Behandlung mit IR der Intensität 10 Gy löste eine unterschiedliche Schadensantwort in den Zelllinien aus. In den WT-Zellen verursachte die IR eine verstärkte Aktivierung von Genen der Zellzyklusregulation und Apoptose sowie der DNA-Reparatur und Replikation, darunter *BBC3*, *CDKN1A*, *MDM2*, *PPM1D*, *PLK3*, *DDB2*, *RRM2B*, *PCNA* und *XPC*. Entsprechend der KEGG Datenbank sind, bis auf *PLK3*, alle genannten Gene *downstream* von p53 reguliert (KANEHISA und GOTO, 2000). *PLK3* wird hingegen *upstream* von p53 in einer ATM-abhängigen Weise induziert sowie phosphoryliert und kann seinerseits p53 aktivieren (BAHASSI et al., 2002). In den KO-Zellen zeigte sich zwar eine leichte Induktion der genannten Gene, jedoch waren die Transkriptionsniveaus der Gene denen nach 1 Gy ähnlich und verglichen mit denen des WT nach 10 Gy deutlich geringer. PARP1 schien demnach wesentlich die Induktion der p53-abhängigen Schadensantwort zu beeinflussen. Um die Signifikanz der Genexpressionsänderungen für die genannten p53-abhängigen Gene und *PLK3* zu ermitteln, wurden zwei unterschiedliche statistische Auswertungen durchgeführt. Zum einen wurde der p-Wert ermittelt, der die Änderung der Expression von dem basalen Kontrollniveau auf das Expressionsniveau bei 10 Gy angab. Zum anderen wurde der Wert bestimmt, der die verstärkte Expressionsänderung von 1 Gy auf 10 Gy widerspiegelte. Die Analysen wurden für beide Zelllinien durchgeführt. Die statistische Auswertung der Genexpressionsänderung von dem basalen Kontrollniveau auf das Expressionsniveau bei 10 Gy zeigte für die WT-Zellen eine signifikante Induktion für alle p53-abhängigen Gene sowie *PLK3*. In den KO-Zellen waren die Induktionen einiger p53-abhängiger Gene ebenfalls signifikant, jedoch insgesamt wesentlich geringer als in den WT-Zellen. Zudem konnte die Analyse der Genexpressionsänderung von 1 Gy auf 10 Gy bestätigen, dass es, im Gegensatz zu den WT-Zellen, bei den KO-Zellen zu keiner weiteren signifikanten Induktion kam. In Bezug auf die beiden Gene *CDKN1A* sowie *MDM2* finden sich übereinstimmende Beobachtungen in der Literatur. In verschiedenen humanen sowie murinen Zelllinien führte die Inhibierung oder der *Knockout* von *PARP1* zu einer geringeren Induktion von *CDKN1A* sowie *MDM2* im Vergleich zum Wildtyp (VALENZUELA et al., 2002; WIELER et al., 2003; NOZAKI und MASUTANI,

2018). Im Rahmen der hier durchgeführten Genexpressionsanalysen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass PARP1 neben den zwei bereits genannten p53 *downstream* Genen auch die Transkription von *BBC3*, *PPM1D*, *DDB2*, *RRM2B*, *PCNA* und *XPC* zu begünstigen scheint. Die geringere Genexpression von *PLK3* in den KO-Zellen gibt zudem einen Hinweis auf die fehlende DNA-Schadenssignaltransduktion *upstream* von p53. Dies könnte wiederum die reduzierte p53-Transkriptionsaktivität erklären, die sich in der verminderten Expression der p53-*downstream* Gene in den KO-Zellen zeigte. Folglich würden die Ergebnisse die Rolle von PARP1 auch *upstream* von ATM unterstützen, wobei PARP1 den DNA-Schaden erkennt und die ATM-abhängige Phosphorylierung erleichtert, welche anschließend PLK3 und schließlich p53 aktiviert. Die erhöhte Expression von *CDKN1A* nach Expression mit 10 Gy im WT steht hierbei nicht im Widerspruch zur höheren basalen Expression des Gens in den KO-Zellen, da die Transkriptionsaktivität von p53 je nach Schadensantwort unterschiedlich induziert werden kann, wovon folglich die Induktion von p21 abhängt. Die Abb. 46 zeigt die Zusammenfassung der postulierten Hypothese der PARP1-vermittelten DDR nach IR, basierend auf den ermittelten Genexpressionsdaten und den bereits genannten Studien zur Interaktion zwischen PARP1 und p53.

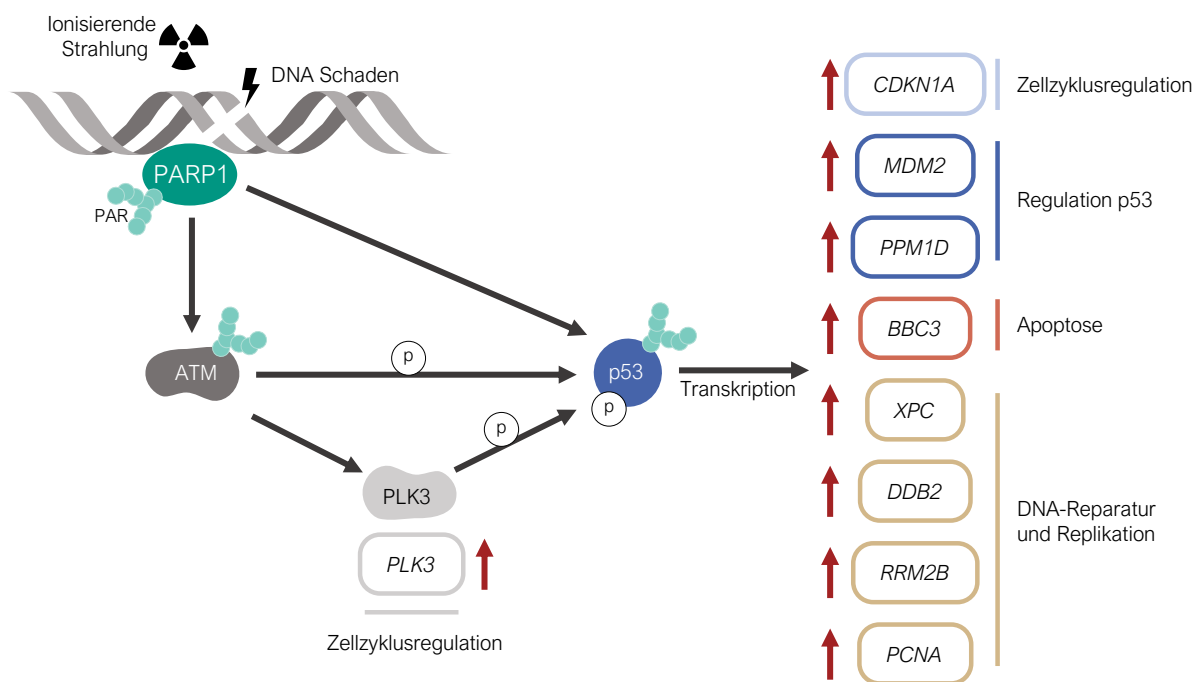


Abb. 46: Darstellung der postulierten Hypothese der PARP1-vermittelten DNA-Schadensantwort nach ionisierender Strahlung (siehe 5.3.3 und 5.4.1). Die gesteigerte Genexpression der p53-*downstream* Gene in den WT-Zellen lässt sich möglicherweise durch die *upstream* von p53 liegende Signalkaskade erklären. PARP1 kann nach Schadenserkennung entweder direkt mittels PARylierung (kovalent oder durch nicht-kovalente Interaktionen) die Aktivität von p53 begünstigen oder indirekt über die Aktivierung von ATM

und/oder PLK3. ATM kann p53 direkt phosphorylieren, zum anderen kann es PLK3 aktivieren, welches seinerseits p53 phosphoryliert.

Nach Schadenserkennung kann PARP1 entweder direkt durch PARylierung (kovalent oder durch nicht-kovalente Interaktionen) die Aktivität von p53 begünstigen oder indirekt über die Aktivierung von ATM und/oder PLK3, was sich schließlich durch eine gesteigerte Transkription der DNA-Schadensantwortgene äußert. ATM wiederum kann p53 direkt phosphorylieren oder die Phosphorylierung über die Aktivierung von PLK3 vermitteln, was ein möglicher Grund für die gesteigerte Induktion von *PLK3* sein könnte.

Um die erhaltenen Zusammenhänge auf Genexpressionsebene auch auf Proteinebene zu verifizieren, wurde p53 sowie das *downstream* Signalprotein p21 im Western Blot nach Bestrahlung mit 10 Gy analysiert. Dafür wurde die Proteinexpression von p53 sowie p21 für 2, 6 und 24 h nach Exposition bestimmt und zwischen den Zelllinien verglichen. Die Ergebnisse der Western Blot Analyse zeigten vergleichbare Ergebnisse des p53- sowie des p21-Levels in beiden Zelllinien nach 10 Gy. PARP1 schien in den analysierten U2OS-Zellen keinen Einfluss auf die Proteinexpression von p53 sowie p21 nach IR zu haben. Auch das basale Level der beiden Proteine unterschied sich in den Zelllinien nicht. Trotz der deutlichen Induktion von *CDKN1A* in den KO-Zellen konnte diese Beobachtung auf Proteinebene nicht bestätigt werden (siehe 5.4.2). Eine mögliche Erklärung für die scheinbar voneinander abweichenden Ergebnisse auf Genexpressions- und Proteinebene könnte in den Unterschieden der Regulierung und Geschwindigkeit der Transkription und Translation liegen sowie aufgrund unterschiedlicher Halbwertszeiten der mRNA und des Proteins bedingt sein (VOGEL und MARCOTTE, 2012).

Um zu überprüfen, ob die Bestrahlung mit IR zu einem Zellzyklusarrest in den KO-Zellen führt, wurde die Zellzyklusphasenverteilung für beide Zelllinien über einen Zeitraum von 144 h nach einer Strahlendosis von 10 Gy durchflusszytometrisch untersucht und im Anschluss miteinander verglichen. Die Dosis verursachte in beiden Zelllinien einen G₂-Arrest, durch den nach 24 h etwa 90 % der Zellen in der G₂-Phase akkumulierten. Im weiteren zeitlichen Verlauf zeigte sich ein deutlicher Unterschied der Zellzyklusphasenverteilung zwischen den Zelllinien. Ab 48 h nahm die G₂-Phase in den WT-Zellen mit der Zeit wieder ab und der Anteil an Zellen in der G₁- und S-Phase stieg dementsprechend an. Dies ist vermutlich durch eine erfolgreiche Schadensreparatur und den darauffolgenden erneuten Eintritt in den Zellzyklus zu erklären. Im Gegensatz dazu blieb der Anteil der KO-Zellen in der G₂-Phase über den betrachteten Zeitraum von 144 h nahezu konstant. Der permanente G₂-Arrest der KO-Zellen könnte auf eine Seneszenz hindeuten

(GIRE und DULIC, 2015). In der Literatur finden sich hierzu bisher nur Daten, die über einen kürzeren Zeitraum von maximal 24 h erhoben wurden. Hierbei konnte nach Hemmung der PARylierungsaktivität sowie in *PARP1*-defizienten Zellen ein verstärkter G_2 -Arrest beobachtet werden (MASUTANI et al., 1995; LU et al., 2006; MADISON et al., 2011). LU et al. postulieren, dass die stärkere G_2 -Antwort in Abwesenheit von PARP1 auf einen überaktivierten ATR/CHK1-Signalweg zurückzuführen ist, der in einer ATM-unabhängigen Weise reguliert wird (LU et al., 2006). Auslöser dieser alternativen Antwort könnte die Anhäufung nicht reparierter Läsionen sein, bedingt durch die eingeschränkte Reparatur. Zum einen aufgrund der beeinträchtigte SSBR, als auch aufgrund der eingeschränkten DSBR in der G_2 -Phase, da PARP1 auch hier in verschiedene Reparaturprozesse (alt-NHEJ, HR) involviert ist. Die verbleibenden Schäden begünstigen unter anderem das Blockieren der Replikationsgabeln, was letztendlich zur Aktivierung des ATR/CHK1 Weges führt (LU et al., 2006). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von ATM zu einer verstärkten und verlängerten Akkumulation der Zellen in der G_2 -Phase führte, die ebenfalls über ATR und CHK1 ausgelöst wird (nach Bestrahlung mit IR) (XU et al., 2002; FERNET et al., 2010). Daher wurde vermutet, dass sowohl PARP1 als auch ATM eine wesentliche Rolle im Ablauf der DDR nach IR spielen. Um diese Beobachtungen zu überprüfen, wurde die ATM-Kinaseaktivität in den WT- sowie den KO-Zellen mit einem ATMi (Ku99533) gehemmt und anschließend analog die zeitabhängige Zellzyklusphasenverteilung nach Bestrahlung am Durchflusszytometer bestimmt. Die Inhibierung der ATM-Kinase führte in den WT-Zellen zu einer vergleichbaren Verteilung wie in den KO-Zellen, was zum einen die genannten Ergebnisse der Literatur bestätigt und zum anderen die Hypothese bestärkt, dass die Akkumulation der Zellen in der G_2 -Phase PARP1- sowie ATM-unabhängig verläuft. Dies konnte zusätzlich durch die gleichbleibende Verteilung der Zellzyklusphasen nach zusätzlicher Behandlung der KO-Zellen mit dem ATMi bestätigt werden. In der Literatur wurde bereits gezeigt, dass die G_2 -Akkumulation nach ATM-Inhibierung ebenso über den ATR/CHK1 *backup*-Signalweg ausgelöst wird (XU et al., 2002; FERNET et al., 2010). Folglich könnte dieser Signalweg in den KO-Zellen auch aufgrund der fehlenden Interaktion von PARP1 mit ATM ausgelöst werden und somit den G_2 -Arrest auslösen. Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die Akkumulation der KO-Zellen in der G_2 -Phase vermutlich, neben der beeinträchtigten Reparaturfähigkeit und der daraus resultierenden erhöhten Anzahl an verbleibenden Schäden, auch auf die fehlende Interaktion mit ATM zurückzuführen sein könnte. PARP1 sowie ATM scheinen wesentlich an der Regulation der G_2 -Phase in der DDR beteiligt zu sein. Darüber hinaus bestärkt die gleichbleibende Verteilung der Zellzyklusphasen des *PARP1*-KO nach ATM-Inhibierung die Hypothese, dass PARP1 eine wichtige regulatorische Rolle für die Aktivität von ATM einnimmt und das

Zusammenspiel zwischen PARP1 und ATM wesentlich für eine funktionierende DDR nach IR ist, da es bei fehlender Aktivität eines der beiden Proteine zu einem persistierenden G₂-Arrest kommt.

Weiterhin wurde im Rahmen der Zellzyklusuntersuchungen der subG₁-Bereich erfasst, welcher den Anteil fragmentierter DNA wiedergibt und daher als Indikator für den apoptotischen Zellanteil gilt (POZAROWSKI und DARZYNKIEWICZ, 2004). Hierbei konnte gezeigt werden, dass 144 h nach Exposition mit IR die Mehrheit der WT-Zellpopulation (67 %) in der subG₁-Phase zu finden war, wobei der subG₁-Anteil der KO-Zellen signifikant geringer war (15 %). PARP1 könnte zum einen über die Vermittlung der p53-Transkriptionsaktivität das Auslösen der Apoptose begünstigen, was hier bereits durch Expressionsunterschiede des proapoptischen Gens *BBC3* gezeigt werden konnte. Auch die Überexpression des Zellzyklusregulators *PLK3* steht im Zusammenhang mit einer Induktion der Apoptose, welche ebenfalls in der Genexpression der WT-Zellen ersichtlich war (5.4.1) (CONN et al., 2000). Darüber hinaus führt die Überexpression von *PLK3* zur Akkumulation von CDC25, was wiederum den Zellzyklusarrest begünstigt (MYER et al., 2005). Zum anderen könnte PARP1 aktiv über den PARP1-abhängigen Mechanismus Parthanatos den Zelltod induzieren. Hierbei kommt es in Folge einer Hyper-PARYlierung zu einer PAR-vermittelten Freisetzung von AIF aus dem Mitochondrium (HONG et al., 2006). Sowohl beim Vorgang der Apoptose als auch bei Parthanatos kommt es zur Fragmentierung der DNA, die in der durchflusszytometrisch ermittelten subG₁-Phase sichtbar ist. Eine zusätzliche ATM-Inhibierung führte nach 144 h sowohl in den WT- als auch in den KO-Zellen zu einem geringeren subG₁-Anteil (32 %), verglichen mit den WT-Zellen. ATM scheint demnach ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Regulation der Apoptose einzunehmen. Unklar ist, wieso eine zusätzliche ATM-Inhibierung in den *PARP1*-KO Zellen einen erhöhten subG₁-Anteil auslöst. Vermutlich bedingt das Fehlen beider Schlüsselproteine der Schadensantwort eine stark eingeschränkte DDR, die jedoch aufgrund des Schadensausmaß weitere Signalwege aktiviert, um letztendlich über *backup*-Wege den Zelltod einzuleiten.

Die postulierte Aktivierung des G₂-Arrests und die verschiedenen Schicksale der Zelle, abhängig vom PARP1-Status, sind in Abb. 47 zusammengefasst.

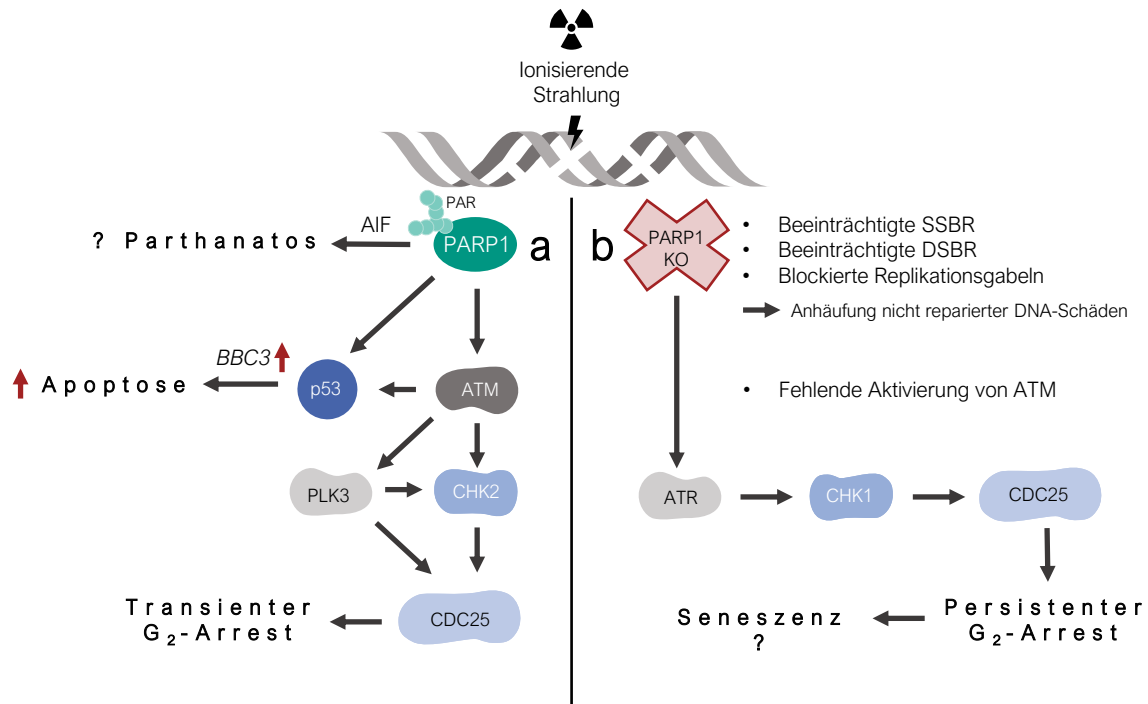


Abb. 47: Hypothese der unterschiedlichen Aktivierungen des G₂-Arrests nach Exposition mit ionisierender Strahlung mit (a) und ohne PARP1 (b). (a) PARP1 vermittelt nach Schadenserkenkung die Aktivität von ATM, wodurch über weitere Signalwege, unterstützt durch PLK3 (siehe 5.4.1) und CHK2, ein transienter G₂-Arrest ausgelöst wird, um Schäden zu beheben oder den Zelltod einzuleiten (siehe 5.4.3). Die p53 Aktivität, vermittelt sowohl über ATM als auch über PARP1, führt unter anderem durch die Aktivierung des proapoptotischen Gens *BBC3* (siehe 5.4.1) zur Einleitung der Apoptose. Darüber hinaus könnte PARP1 über das PAR-vermittelte Freisetzen von AIF aus dem Mitochondrium den Zelltodmechanismus Parthanasos einleiten. (b) Das Fehlen von PARP1 begünstigt die Anhäufung nicht reparierter Schäden durch die beeinträchtigte Reparaturfähigkeit. Blockierte Replikationsgabeln sowie die fehlende Aktivierung von ATM durch PARP1 (siehe 5.4.3.1) lösen den ATR/CHK1 Signalweg aus, was einen persistenten G₂-Arrest in *PARP1-Knockout* Zellen auslöst und vermutlich zur Seneszenz der Zellen führt.

Die Korrelation der Zellzyklusverteilung des *PARP1-KO* mit der Verteilung des WT nach Behandlung mit dem ATMi spricht dafür, dass das Zusammenspiel zwischen PARP1 und ATM entscheidend beim Ablauf der DDR zu sein scheint. Um den Zusammenhang auf funktioneller Ebene genauer zu untersuchen, wurden Phosphorylierungsanalysen mittels Immunfluoreszenz von p-ATM sowie verschiedener ATM-abhängiger Signalproteine durchgeführt. Die p-ATM Intensität wurde nach Bestrahlung der Zellen mit 1 sowie 10 Gy analysiert. Die Behandlung mit 1 Gy induzierte in beiden Zelllinien nur eine geringe Phosphorylierungsaktivität, dementsgegen provozierte die Behandlung mit 10 Gy nach 0,5 h eine Verdopplung der Phosphorylierungsaktivität, die mit der Zeit abnahm und nach 24 h wieder das basale Level erreichte. Es konnte jedoch kein eindeutiger Unterschied zwischen den WT- sowie den KO-Zellen festgestellt werden. Die Phosphorylierungsintensität von ATM scheint unabhängig von PARP1 abzulaufen. Um zu analysieren, ob der *PARP1-Knockout* die

Aktivität der ATM-Kinase beeinflusst, wurde das *downstream* Signalprotein γ H2AX immunofluorimetrisch analysiert, welches direkt durch ATM phosphoryliert wird. Hierbei kam es nach 10 Gy zwar zu einer Phosphorylierungsaktivität in beiden Zelllinien, allerdings war auch diese zwischen den WT- und KO-Zellen vergleichbar. Ein weiteres Ziel der ATM-Phosphorylierung stellt p53 an der Aminosäure Ser15 dar, welches zusätzlich betrachtet wurde. Diesbezüglich zeigte sich in den WT-Zellen nach Bestrahlung eine leichte, jedoch nicht signifikante Tendenz einer verstärkten Phosphorylierung an Ser15 im Gegensatz zu den KO-Zellen. Möglicherweise gibt diese Tendenz einen Hinweis auf die PARP1-vermittelte ATM-Aktivität. Um die Rolle von PLK3 bei der Aktivierung von p53 zu untersuchen, wurde zudem p-p53 an Ser20 untersucht. Neben PLK3, können auch CHK1 und CHK2 p53 an Ser20 phosphorylieren. Die Bestrahlung mit 10 Gy induzierte in beiden Zelllinien eine kaum messbare Steigerung der Phosphorylierungsintensität im Vergleich zur Kontrolle. Daran abzuleiten ist, dass es wohl zu keiner relevanten Phosphorylierung und demnach Aktivierung von p53 über CHK1, CHK2 oder PLK3 kam. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die verschiedenen Signalwege, die zur Phosphorylierung von p53 führen in der Gesamtinduktion zu der Transkriptionsaktivität von p53 beitragen. In Abb. 48 sind die möglichen, über PARP1 vermittelten Phosphorylierungen beziehungsweise Aktivierungen von p53 in einer Übersicht zusammengefasst.

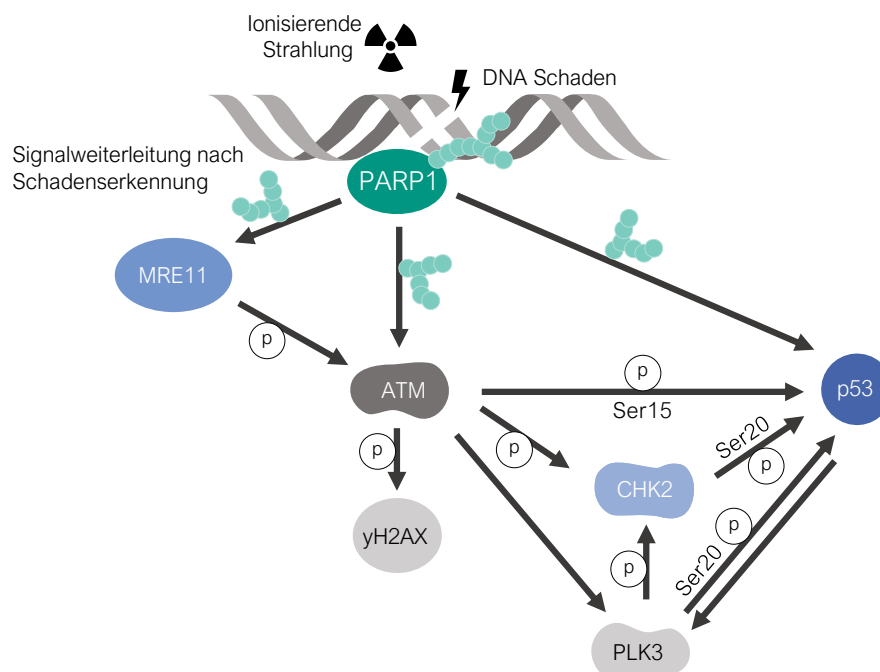


Abb. 48: Mögliche Phosphorylierungs- bzw. Aktivierungsmöglichkeiten von p53 nach Exposition durch ionisierende Strahlung, vermittelt über PARP1 (5.4.4). PARP1 kann mittels kovalenter oder nicht-kovalenter PARylierung MRE11, ATM sowie p53 aktivieren. MRE11 phosphoryliert ATM, welches wiederum yH2AX,

p53, CHK2 und PLK3 phosphoryliert. Sowohl CHK2 als auch PLK3 gelten ebenfalls als effektive p53-Kinasen. Die gezeigten Signalwege führen zur Induktion der Transkriptionsaktivität von p53.

Zusammenfassend stellt die vorliegende Arbeit eine neue potenzielle Verbindung der PARP1-, ATM- sowie p53-Signalwege dar und ordnet diese in den aktuellen Kenntnisstand der Wissenschaft ein, was als grafische Übersicht in Abb. 49 zusammengefasst ist. Die gewonnenen Erkenntnisse ergänzen und bestätigen die bereits postulierte Rolle von PARP1 in der DDR nach IR. Es konnte gezeigt werden, dass PARP1 einen größeren Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von p53 hat als bisher angenommen. Dies könnte auf den Einfluss von PARP1 in Signalwegen *upstream* von p53 zurückzuführen sein, die unter anderem der Interaktion mit ATM zugeschrieben werden können. PARP1 zeigte eine wesentliche Rolle für eine funktionierende DDR, da eine fehlende Funktion von PARP1 einen permanenten G₂-Arrest nach Schadensinduktion verursachte. Zudem scheint PARP1 einen maßgeblichen Einfluss auf die Regulation des Zelltods zu haben, was sich wiederum ebenfalls auf die Vermittlung der p53-Transkriptionsaktivität sowie darüber hinaus auf den Zelltodvorgang Parthanatos zurückführen lässt. Die Ergebnisse der Arbeit deuten darauf hin, dass das Zusammenwirken von PARP1 und ATM wesentlich beim Ablauf der DDR nach IR zu sein scheint und im Besonderen einen wesentlichen Einfluss auf die p53-abhängige Signalkaskade hat. Allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von PARP1 auf ATM nicht auf funktioneller Ebene spezifiziert werden, weshalb weitere Untersuchungen nötig sind, die die Interaktion von PARP1 und ATM für die Notwendigkeit einer funktionierenden DDR überprüfen.

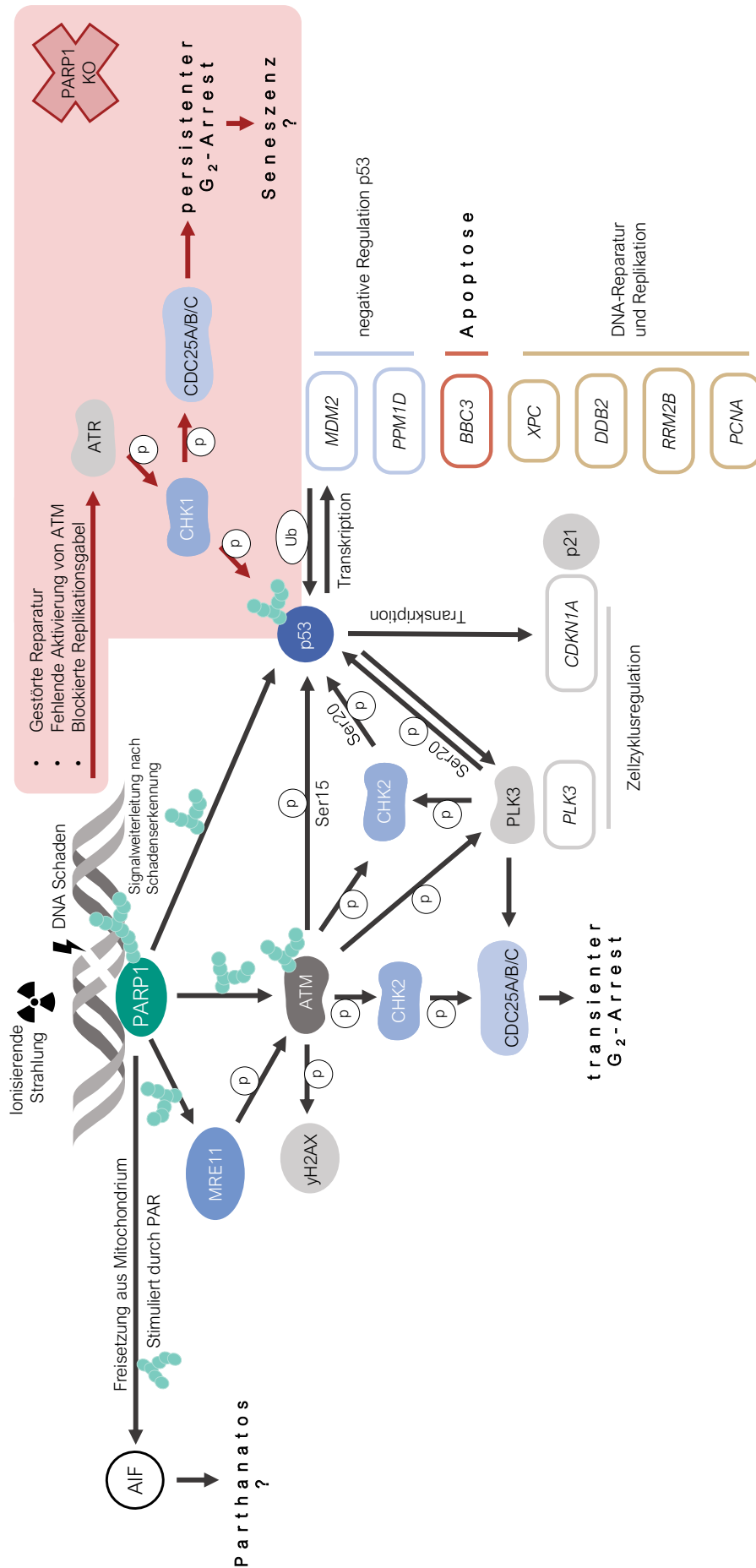


Abb. 49: Grafische Zusammenfassung der potenziellen PARP1-abhängigen Wege der DNA-Schadensantwort (DDR) nach ionisierender Strahlung. Hierbei wurden die Ergebnisse der durchgeführten Genexpression-, Protein-, Zellzyklus- sowie Phosphorylierungsanalysen des *PARP1*-KO in den aktuellen Wissensstand der Literatur eingeordnet.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- ADIMOOLAM, S. UND J.M. FORD **2002**: p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99 (20), 12985–12990.
- AGARWAL, M.L., A. AGARWAL, W.R. TAYLOR, Z.Q. WANG, E.F. WAGNER UND G.R. STARK **1997**: Defective induction but normal activation and function of p53 in mouse cells lacking poly-ADP-ribose polymerase. *Oncogene*, 15 (9), 1035–1041.
- AGUILAR-QUESADA, R., J.A. MUÑOZ-GÁMEZ, D. MARTÍN-OLIVA, A. PERALTA, M.T. VALENZUELA, R. MATÍNEZ-ROMERO, R. QUILES-PÉREZ, J. MENISSIER-DE MURCIA, G. de MURCIA, M. RUIZ DE ALMODÓVAR UND F.J. OLIVER **2007**: Interaction between ATM and PARP-1 in response to DNA damage and sensitization of ATM deficient cells through PARP inhibition. *BMC Mol. Biol.*, 8, 29.
- AREDA, F. UND A.I. SCOVASSI **2014**: Poly(ADP-ribose): a signaling molecule in different paradigms of cell death. *Biochemical pharmacology*, 92 (1), 157–163.
- BAHASSI, E.M., C.W. CONN, D.L. MYER, R.F. HENNIGAN, C.H. MCGOWAN, Y. SANCHEZ UND P.J. STAMBROOK **2002**: Mammalian Polo-like kinase 3 (Plk3) is a multifunctional protein involved in stress response pathways. *Oncogene*, 21 (43), 6633–6640.
- BAHASSI, E.M., D.L. MYER, R.J. MCKENNEY, R.F. HENNIGAN UND P.J. STAMBROOK **2006**: Priming phosphorylation of Chk2 by polo-like kinase 3 (Plk3) mediates its full activation by ATM and a downstream checkpoint in response to DNA damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 596 (1), 166–176.
- BAI, L. UND W.-G. ZHU **2006**: p53: Structure, Function and Therapeutic Applications. *Journal of Cancer Molecules*, 2 (4), 141–153.
- BARRANGOU, R., C. FREMAUX, H. DEVEAU, M. RICHARDS, P. BOYAVAL, S. MOINEAU, D.A. ROMERO UND P. HORVATH **2007**: CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315 (5819), 1709–1712.
- BENEKE, R., C. GEISEN, B. ZEVNIK, T. BAUCH, W.U. MÜLLER, J.H. KÜPPER UND T. MÖRÖY **2000**: DNA excision repair and DNA damage-induced apoptosis are linked to Poly(ADP-ribosyl)ation but have different requirements for p53. *Mol. Cell. Biol.*, 20 (18), 6695–6703.
- BOLOTIN, A., B. QUINQUIS, A. SOROKIN UND S.D. EHRLICH **2005**: Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology (Reading, England)*, 151 (Pt 8), 2551–2561.
- BOUCHARD, V.J., M. ROULEAU UND G.G. POIRIER **2003**: PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Exp. Hematol.*, 31 (6), 446–454.
- BÜRKLE, A. UND L. VIRÁG **2013**: Poly(ADP-ribose): PARadigms and PARadoxes. *Molecular aspects of medicine*, 34 (6), 1046–1065.

- CALDECOTT, K.W. **2008**: Single-strand break repair and genetic disease. *Nature reviews. Genetics*, 9 (8), 619–631.
- CANMAN, C.E., D.S. LIM, K.A. CIMPRICH, Y. TAYA, K. TAMAI, K. SAKAGUCHI, E. APPELLA, M.B. KASTAN UND J.D. SILICIANO **1998**: Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*, 281 (5383), 1677–1679.
- CHANG, L.-J. UND A. EASTMAN **2012**: Differential regulation of p21 (waf1) protein half-life by DNA damage and Nutlin-3 in p53 wild-type tumors and its therapeutic implications. *Cancer biology & therapy*, 13 (11), 1047–1057.
- CHATTERJEE, N. UND G.C. WALKER **2017**: Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and molecular mutagenesis*, 58 (5), 235–263.
- CHIARUGI, A. UND M.A. MOSKOWITZ **2002**: Cell biology. PARP-1--a perpetrator of apoptotic cell death? *Science*, 297 (5579), 200–201.
- CHIRUVELLA, K.K., Z. LIANG UND T.E. WILSON **2013**: Repair of double-strand breaks by end joining. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5 (5), a012757.
- CHRISTMANN, M., M.T. TOMICIC, W.P. ROOS UND B. KAINA **2003**: Mechanisms of human DNA repair: An update. *Toxicology*, 193 (1-2), 3–34.
- CICCIA, A. UND S.J. ELLEDGE **2010**: The DNA damage response: Making it safe to play with knives. *Molecular cell*, 40 (2), 179–204.
- COLLIN, G., A. HUNA, M. WARNIER, J.-M. FLAMAN UND D. BERNARD **2018**: Transcriptional repression of DNA repair genes is a hallmark and a cause of cellular senescence. *Cell death & disease*, 9 (3), 259.
- CONN, C.W., R.F. HENNIGAN, W. DAI, Y. SANCHEZ UND P.J. STAMBROOK **2000**: Incomplete cytokinesis and induction of apoptosis by overexpression of the mammalian polo-like kinase, Plk3. *Cancer research*, 60 (24), 6826–6831.
- D'AMOURS, D., F.R. SALLMANN, V.M. DIXIT UND G.G. POIRIER **2001**: Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. *Journal of cell science*, 114 (Pt 20), 3771–3778.
- DILLER, L., J. KASSEL, C.E. NELSON, M.A. GRYKA, G. LITWAK, M. GEBHARDT, B. BRESSAC, M. OZTURK, S.J. BAKER UND B. VOGELSTEIN **1990**: p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Mol. Cell. Biol.*, 10 (11), 5772–5781.
- DOUDNA, J.A. UND E. CHARPENTIER **2014**: Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (New York, N.Y.)*, 346 (6213), 1258096.
- DULANEY, C., S. MARCROM, J. STANLEY UND E.S. YANG **2017**: Poly(ADP-ribose) polymerase activity and inhibition in cancer. *Seminars in cell & developmental biology*, 63, 144–153.
- FERNET, M., F. MÉGNIN-CHANET, J. HALL UND V. FAVAUDON **2010**: Control of the G2/M checkpoints after exposure to low doses of ionising radiation: Implications for hyper-radiosensitivity. *DNA repair*, 9 (1), 48–57.

- FISCHBACH, A., A. KRÜGER, S. HAMPP, G. ASSMANN, L. RANK, M. HUFNAGEL, M.T. STÖCKL, J.M.F. FISCHER, S. VEITH, P. ROSSATTI, M. GANZ, E. FERRANDO-MAY, A. HARTWIG, K. HAUSER, L. WIESMÜLLER, A. BÜRKLE UND A. MANGERICH **2018**: The C-terminal domain of p53 orchestrates the interplay between non-covalent and covalent poly(ADP-ribose)ation of p53 by PARP1. *Nucleic Acids Res.*, 46 (2), 804–822.
- FISCHER, B.M., D. NEUMANN, A.L. PIBERGER, S.F. RISNES, B. KÖBERLE UND A. HARTWIG **2016**: Use of high-throughput RT-qPCR to assess modulations of gene expression profiles related to genomic stability and interactions by cadmium. *Arch. Toxicol.*, 90 (11), 2745–2761.
- FISCHER, M. **2017**: Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene*, 36 (28), 3943–3956.
- FUNK, J.O. **2005**: Cell Cycle Checkpoint Genes and Cancer. *Encyclopedia of Lifescience*.
- GAJEWSKI, S. UND A. HARTWIG **2020**: PARP1 Is Required for ATM-Mediated p53 Activation and p53-Mediated Gene Expression after Ionizing Radiation. *Chemical research in toxicology*, 33 (7), 1933–1940.
- GHORAI, A., A. SARMA, N.P. BHATTACHARYYA UND U. GHOSH **2015**: Carbon ion beam triggers both caspase-dependent and caspase-independent pathway of apoptosis in HeLa and status of PARP-1 controls intensity of apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 20 (4), 562–580.
- GHOSH, R., S. ROY UND S. FRANCO **2018**: PARP1 depletion induces RIG-I-dependent signaling in human cancer cells. *PLoS One*, 13 (3), e0194611.
- GIRE, V. UND V. DULIC **2015**: Senescence from G2 arrest, revisited. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 14 (3), 297–304.
- GULERIA, A. UND S. CHANDNA **2016**: ATM kinase: Much more than a DNA damage responsive protein. *DNA repair*, 39, 1–20.
- HAFNER, A., M.L. BULYK, A. JAMBHEKAR UND G. LAHAV **2019**: The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20 (4), 199–210.
- HAINCE, J.-F., S. KOZLOV, V.L. DAWSON, T.M. DAWSON, M.J. HENDZEL, M.F. LAVIN UND G.G. POIRIER **2007**: Ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling network is modulated by a novel poly(ADP-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA-damaging agents. *J. Biol. Chem.*, 282 (22), 16441–16453.
- HAINCE, J.-F., D. McDONALD, A. RODRIGUE, U. DÉRY, J.-Y. MASSON, M.J. HENDZEL UND G.G. POIRIER **2008**: PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. *The Journal of biological chemistry*, 283 (2), 1197–1208.
- HEINLOTH, A.N., R.E. SHACKELFORD, C.L. INNES, L. BENNETT, L. LI, R.P. AMIN, S.O. SIEBER, K.G. FLORES, P.R. BUSHEL UND R.S. PAULES **2003**: ATM-dependent and -independent gene expression changes in response to oxidative stress, gamma irradiation, and UV irradiation. *Radiation research*, 160 (3), 273–290.

- HONG, S.J., T.M. DAWSON UND V.L. DAWSON, **2006**: PARP and the Release of Apoptosis-Inducing Factor from Mitochondria. In: *Poly(ADP-Ribosyl)ation*, Boston, MA, Springer US, S. 103–117, DOI: 10.1007/0-387-36005-0.
- HOPPE-SEYLER, F. UND K. BUTZ **1993**: Repression of endogenous p53 transactivation function in HeLa cervical carcinoma cells by human papillomavirus type 16 E6, human mdm-2, and mutant p53. *Journal of Virology*, 67 (6), 3111–3117.
- HOUTGRAAF, J.H., J. VERSMISSEN UND W.J. VAN DER GIESSEN **2006**: A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovascular revascularization medicine : including molecular interventions*, 7 (3), 165–172.
- HSU, P.D., E.S. LANDER UND F. ZHANG **2014**: Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157 (6), 1262–1278.
- HSU, P.D., D.A. SCOTT, J.A. WEINSTEIN, F.A. RAN, S. KONERMANN, V. AGARWALA, Y. LI, E.J. FINE, X. WU, O. SHALEM, T.J. CRADICK, L.A. MARRAFFINI, G. BAO UND F. ZHANG **2013**: DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature biotechnology*, 31 (9), 827–832.
- ISHINO, Y., H. SHINAGAWA, K. MAKINO, M. AMEMURA UND A. NAKATA **1987**: Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*, 169 (12), 5429–5433.
- JACKSON, S.P. UND J. BARTEK **2009**: The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461 (7267), 1071–1078.
- Ji, Y. UND A.V. TULIN **2010**: The roles of PARP1 in gene control and cell differentiation. *Current opinion in genetics & development*, 20 (5), 512–518.
- JINEK, M., K. CHYLINSKI, I. FONFARA, M. HAUER, J.A. DOUDNA UND E. CHARPENTIER **2012**: A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 337 (6096), 816–821.
- JINEK, M., A. EAST, A. CHENG, S. LIN, E. MA UND J. DOUDNA **2013**: RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife*, 2, e00471.
- KANEHISA, M. UND S. GOTO **2000**: KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.*, 28 (1), 27–30.
- KASIOUMI, P., P. VRAZELI, P. VEZYRAKI, S. ZERIKIOTIS, C. KATSOURAS, A. DAMALAS UND C. ANGELIDIS **2019**: Hsp70 (HSP70A1A) downregulation enhances the metastatic ability of cancer cells. *International journal of oncology*, 54 (3), 821–832.
- KE, Y., J. ZHANG, X. LV, X. ZENG UND X. BA **2019**: Novel insights into PARPs in gene expression: Regulation of RNA metabolism. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*.
- KIM, E.H., M.-S. KIM, K.-H. LEE, S. SAI, Y.K. JEONG, J.-S. KOH UND C.-B. KONG **2017**: Effect of low- and high-linear energy transfer radiation on in vitro and orthotopic in vivo models of osteosarcoma by activation of caspase-3 and -9. *International journal of oncology*, 51 (4), 1124–1134.

- KRAUS, W.L. **2008**: Transcriptional control by PARP-1: Chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. *Current opinion in cell biology*, 20 (3), 294–302.
- KRAUS, W.L. UND M.O. HOTTIGER **2013**: PARP-1 and gene regulation: Progress and puzzles. *Molecular aspects of medicine*, 34 (6), 1109–1123.
- LA FUENTE-NÚÑEZ, C. de UND T.K. LU **2017**: CRISPR-Cas9 technology: applications in genome engineering, development of sequence-specific antimicrobials, and future prospects. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, 9 (2), 109–122.
- LANGELIER, M.-F. UND J.M. PASCAL **2013**: PARP-1 mechanism for coupling DNA damage detection to poly(ADP-ribose) synthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 23 (1), 134–143.
- LE CONG, F.A. RAN, D. COX, S. LIN, R. BARRETTO, N. HABIB, P.D. HSU, X. WU, W. JIANG, L.A. MARRAFFINI UND F. ZHANG **2013**: Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science (New York, N.Y.)*, 339 (6121), 819–823.
- LI, S., Z. CUI UND X. MENG **2016**: Knockdown of PARP-1 Inhibits Proliferation and ERK Signals, Increasing Drug Sensitivity in Osteosarcoma U2OS Cells. *Oncol. Res.*, 24 (4), 279–286.
- LIU, C., A. VYAS, M.A. KASSAB, A.K. SINGH UND X. YU **2017**: The role of poly ADP-ribosylation in the first wave of DNA damage response. *Nucleic Acids Res.*, 45 (14), 8129–8141.
- LIVAK, K.J. UND T.D. SCHMITTGEN **2001**: Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25 (4), 402–408.
- LO, H.-W. UND M.-C. HUNG **2006**: Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. *British journal of cancer*, 94 (2), 184–188.
- LU, H.-R., X. WANG UND Y. WANG **2006**: A Stronger DNA Damage-Induced G2 Checkpoint Due to Over-Activated CHK1 in the Absence of PARP-1. *Cell Cycle*, 5 (20), 2364–2370.
- LU, X., O. MA, T.-A. NGUYEN, S.N. JONES, M. OREN UND L.A. DONEHOWER **2007**: The Wip1 Phosphatase Acts as a Gatekeeper in the p53-Mdm2 Autoregulatory Loop. *Cancer Cell*, 12 (4), 342–354.
- MADISON, D.L., D. STAUFFER UND J.R. LUNDBLAD **2011**: The PARP inhibitor PJ34 causes a PARP1-independent, p21 dependent mitotic arrest. *DNA repair*, 10 (10), 1003–1013.
- MAIER, P., L. HARTMANN, F. WENZ UND C. HERSKIND **2016**: Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. *Int. J. Mol. Sci.*, 17 (1).
- MAKAROVA, K.S., L. ARAVIND, N.V. GRISHIN, I.B. ROGOZIN UND E.V. KOONIN **2002**: A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucleic acids research*, 30 (2), 482–496.

- MALI, P., L. YANG, K.M. ESVELT, J. AACH, M. GUELL, J.E. DICARLO, J.E. NORVILLE UND G.M. CHURCH **2013**: RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science*, 339 (6121), 823–826.
- MARTIN, D., R. GALISTEO UND J.S. GUTKIND **2009**: CXCL8/IL8 stimulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the autocrine activation of VEGFR2 in endothelial cells by activating NFkappaB through the CBM (Carma3/Bcl10/Malt1) complex. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (10), 6038–6042.
- MARTIN-HERNANDEZ, K., J.-M. RODRIGUEZ-VARGAS, V. SCHREIBER UND F. DANTZER **2017**: Expanding functions of ADP-ribosylation in the maintenance of genome integrity. *Seminars in cell & developmental biology*, 63, 92–101.
- MASUTANI, M., T. NOZAKI, K. WAKABAYASHI UND T. SUGIMURA **1995**: Role of poly(ADP-ribose) polymerase in cell-cycle checkpoint mechanisms following γ -irradiation. *Biochimie*, 77 (6), 462–465.
- MELANSON, B.D., R. BOSE, J.D. HAMILL, K.A. MARCELLUS, E.F. PAN UND B.C. MCKAY **2011**: The role of mRNA decay in p53-induced gene expression. *RNA (New York, N.Y.)*, 17 (12), 2222–2234.
- MOJICA, F.J., C. DÍEZ-VILLASEÑOR, E. SORIA UND G. JUEZ **2000**: Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular microbiology*, 36 (1), 244–246.
- MYER, D.L., E.M. BAHASSI UND P.J. STAMBROOK **2005**: The Plk3-Cdc25 circuit. *Oncogene*, 24 (2), 299–305.
- NOZAKI, T. UND M. MASUTANI **2018**: Involvement of Parp1 in the downstream of p53 dependent signaling pathway induced after gamma-irradiation. *J. Transl. Sci.*, 5 (5).
- OGINO, H., T. NOZAKI, A. GUNJI, M. MAEDA, H. SUZUKI, T. OHTA, Y. MURAKAMI, H. NAKAGAMA, T. SUGIMURA UND M. MASUTANI **2007**: Loss of Parp-1 affects gene expression profile in a genome-wide manner in ES cells and liver cells. *BMC genomics*, 8, 41.
- OLS OMNI Life Science GmbH & Co KG., **2018**: Casy Brochure. Bremen.
- ORTIZ-MONTERO, P., A. LONDOÑO-VALLEJO UND J.-P. VERNOT **2017**: Senescence-associated IL-6 and IL-8 cytokines induce a self- and cross-reinforced senescence/inflammatory milieu strengthening tumorigenic capabilities in the MCF-7 breast cancer cell line. *Cell communication and signaling : CCS*, 15 (1), 17.
- PEREGO, P., C. CASERINI, L. GATTI, N. CARENINI, S. ROMANELLI, R. SUPINO, D. COLANGELO, I. VIANO, R. LEONE, S. SPINELLI, G. PEZZONI, C. MANZOTTI, N. FARRELL UND F. ZUNINO **1999**: A novel trinuclear platinum complex overcomes cisplatin resistance in an osteosarcoma cell system. *Molecular pharmacology*, 55 (3), 528–534.
- PINES, A., M.G. VROUWE, J.A. MARTEIJN, D. TYPAS, M.S. LUIJSTERBURG, M. CANSOY, P. HENSBERGEN, A. DEELDER, A. de GROOT, S. MATSUMOTO, K. SUGASAWA, N. THOMA, W. VERMEULEN, H. VRIELING UND L. MULLENDERS **2012**: PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1. *The Journal of cell biology*, 199 (2), 235–249.

- PLESCA, D., S. MAZUMDER UND A. ALMASAN, **2008**: Chapter 6 DNA Damage Response and Apoptosis. In: *Programmed Cell Death, The Biology and Therapeutic Implications of Cell Death, Part B*, Elsevier, S. 107–122.
- PONTÉN, J. UND E. SAKSELA **1967**: Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours. *International journal of cancer*, 2 (5), 434–447.
- POURCEL, C., G. SALVIGNOL UND G. VERGNAUD **2005**: CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology (Reading, England)*, 151 (Pt 3), 653–663.
- POZAROWSKI, P. UND Z. DARZYNKIEWICZ **2004**: Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 281, 301–311.
- PROKHOROVA, E.A., A.Y. EGORSHINA, B. ZHIVOTOVSKY UND G.S. KOPEINA **2020**: The DNA-damage response and nuclear events as regulators of nonapoptotic forms of cell death. *Oncogene*, 39 (1), 1–16.
- RAN, F.A., P.D. HSU, J. WRIGHT, V. AGARWALA, D.A. SCOTT UND F. ZHANG **2013**: Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.*, 8 (11), 2281–2308.
- RANK, L., S. VEITH, E.C. GWOSCH, J. DEMGENSKI, M. GANZ, M.C. JONGMANS, C. VOGEL, A. FISCHBACH, S. BUERGER, J.M.F. FISCHER, T. ZUBEL, A. STIER, C. RENNER, M. SCHMALZ, S. BENEKE, M. GROETTRUP, R.P. KUIPER, A. BÜRKLE, E. FERRANDO-MAY UND A. MANGERICH **2016**: Analyzing structure-function relationships of artificial and cancer-associated PARP1 variants by reconstituting TALEN-generated HeLa PARP1 knock-out cells. *Nucleic acids research*, 44 (21), 10386–10405.
- RAY CHAUDHURI, A. UND A. NUSSENZWEIG **2017**: The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 18 (10), 610–621.
- ROULEAU, M., A. PATEL, M.J. HENDZEL, S.H. KAUFMANN UND G.G. POIRIER **2010**: PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nature reviews. Cancer*, 10 (4), 293–301.
- SCHIEWER, M.J. UND K.E. KNUDSEN **2014**: Transcriptional roles of PARP1 in cancer. *Molecular cancer research : MCR*, 12 (8), 1069–1080.
- SHAMIR, M., Y. BAR-ON, R. PHILLIPS UND R. MILO **2016**: SnapShot: Timescales in Cell Biology. *Cell*, 164 (6), 1302-1302.e1.
- SOLLY, K., X. WANG, X. XU, B. STRULOVICI UND W. ZHENG **2004**: Application of real-time cell electronic sensing (RT-CES) technology to cell-based assays. *Assay and drug development technologies*, 2 (4), 363–372.
- SURESH KUMAR, M.A., E.C. LAIAKIS, S.A. GHANDHI, S.R. MORTON, A.J. FORNACE UND S.A. AMUNDSON **2018**: Gene Expression in *Parp1* Deficient Mice Exposed to a Median Lethal Dose of Gamma Rays. *Radiat. Res.*, 190 (1), 53–62.
- SWINDALL, A.F., J.A. STANLEY UND E.S. YANG **2013**: PARP-1: Friend or Foe of DNA Damage and Repair in Tumorigenesis? *Cancers*, 5 (3), 943–958.

- THOMAS, M., D. PIM UND L. BANKS **1999**: The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*, 18 (53), 7690–7700.
- VALENZUELA, M.T., R. GUERRERO, M.I. NÚÑEZ, J.M. RUIZ DE ALMODÓVAR, M. SARKER, G. de MURCIA UND F.J. OLIVER **2002**: PARP-1 modifies the effectiveness of p53-mediated DNA damage response. *Oncogene*, 21 (7), 1108–1116.
- VERMEULEN, K., D.R. VAN BOCKSTAELE UND Z.N. BERNEMAN **2003**: The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*, 36 (3), 131–149.
- VOGEL, C. UND E.M. MARCOTTE **2012**: Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature reviews. Genetics*, 13 (4), 227–232.
- WANG, M., W. WU, W. WU, B. ROSIDI, L. ZHANG, H. WANG UND G. ILIAKIS **2006**: PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic acids research*, 34 (21), 6170–6182.
- WANG, Y., W. LUO UND Y. WANG **2019**: PARP-1 and its associated nucleases in DNA damage response. *DNA repair*, 81, 102651.
- WATANABE, F., H. FUKAZAWA, M. MASUTANI, H. SUZUKI, H. TERAOKA, S. MIZUTANI UND Y. UEHARA **2004**: Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibits ATM kinase activity in DNA damage response. *Biochemical and biophysical research communications*, 319 (2), 596–602.
- WEI, H. UND X. YU **2016**: Functions of PARylation in DNA Damage Repair Pathways. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 14 (3), 131–139.
- WEŚSIERSKA-GĄDEK, J.A. UND G. SCHMID **2001**: Poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates the stability of the wild-type p53 protein. *undefined*.
- WIELER, S., J.-P. GAGNÉ, H. VAZIRI, G.G. POIRIER UND S. BENCHIMOL **2003**: Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Is a Positive Regulator of the p53-mediated G1 Arrest Response following Ionizing Radiation. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (21), 18914–18921.
- WOOD, R.D. UND S. DOUBLIÉ **2016**: DNA polymerase θ (POLQ), double-strand break repair, and cancer. *DNA repair*, 44, 22–32.
- WOODHOUSE, B.C., I.I. DIANOVA, J.L. PARSONS UND G.L. DIANOV **2008**: Poly(ADP-ribose) polymerase-1 modulates DNA repair capacity and prevents formation of DNA double strand breaks. *DNA repair*, 7 (6), 932–940.
- XIE, S., H. WU, Q. WANG, J.P. COGSWELL, I. HUSAIN, C. CONN, P. STAMBROOK, M. JHANWAR-UNİYAL UND W. DAI **2001**: Plk3 functionally links DNA damage to cell cycle arrest and apoptosis at least in part via the p53 pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (46), 43305–43312.
- XU, B., S.-T. KIM, D.-S. LIM UND M.B. KASTAN **2002**: Two molecularly distinct G(2)/M checkpoints are induced by ionizing irradiation. *Molecular and cellular biology*, 22 (4), 1049–1059.

- XU, J. UND G.F. MORRIS **1999**: p53-mediated regulation of proliferating cell nuclear antigen expression in cells exposed to ionizing radiation. *Mol. Cell. Biol.*, 19 (1), 12–20.
- YANG, G., C. LIU, S.-H. CHEN, M.A. KASSAB, J.D. HOFF, N.G. WALTER UND X. YU **2018**: Super-resolution imaging identifies PARP1 and the Ku complex acting as DNA double-strand break sensors. *Nucleic Acids Research*, 46 (7), 3446–3457.
- YIM, E.-K. UND J.-S. PARK **2005**: The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated Cervical Carcinogenesis. *Cancer Research and Treatment : Official Journal of Korean Cancer Association*, 37 (6), 319–324.
- ZHOU, B.B. UND S.J. ELLEDGE **2000**: The DNA damage response: Putting checkpoints in perspective. *Nature*, 408 (6811), 433–439.

8 ANHANG

8.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

53BP1	<i>tumor protein P53 binding protein 1</i>
ADP	Adenosindiphosphat
ALC1	<i>chromodomain helicase DNA binding protein 1 like; CHD1L</i>
APTX	<i>aprataxin 1</i>
ART	ADP-Ribosyltransferase-Domäne
ATM	<i>ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ataxia-telangiectasia and RAD3-related</i>
BARD1	<i>BRCA1 Associated RING Domain 1</i>
BER	<i>base excision repair</i>
BRCA1	<i>breast cancer type 1 susceptibility protein</i>
BRCT	<i>breast cancer susceptibility protein C terminus</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CDC25	<i>cell division cycle 25</i>
CDKN1A	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 1A</i>
cDNA	komplementäre DNA
CHD2	<i>chromodomain helicase DNA binding protein 2</i>
CHK	<i>checkpoint kinase</i>
Cq	<i>cycle of quantification</i>
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
crRNA	CRISPR RNA
Cys	Cystein
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DDB	<i>damage-binding protein</i>
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DDR	<i>DNA damage response</i>
DMEM	<i>dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DSB	<i>double strand break</i>

DSBR	<i>double strand break repair</i>
ERCC1	<i>excision repair cross-complementation group 1</i>
FEN1	<i>flap endonuclease 1</i>
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
GG-NER	<i>global genome NER</i>
gRNA	<i>guide RNA</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HD	helikale Domäne
His	Histidin
HR	<i>homologous recombination</i>
IR	<i>ionizing radiation</i>
K3F11	U2OS PARP1-Knockout Zelllinie
KO	<i>knockout</i>
LIG1/3	<i>DNA ligase 1/3</i>
MDC1	<i>mediator of DNA-damage checkpoint 1</i>
MDM2	<i>murine double minute 2</i>
MMR	<i>mismatch repair</i>
MRE11	<i>meiotic recombination protein 11</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NBS1	<i>nijmegen breakage syndrome 1</i>
NER	<i>nucleotide excision repair</i>
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i>
NLS	Kernlokalisierungssignal
NoRT	<i>no reverse transcriptase</i>
NRC	<i>no reaction control</i>
Nt	Nukleotid
NTC	<i>no template control</i>
PAM	<i>protospacer adjacent motif</i>
PAR	<i>Poly(ADP-ribose)</i>
PARG	<i>Poly(ADP-ribose) glycohydrolase</i>
PARP1	<i>Poly(ADP-ribose) polymerase 1</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PDT	<i>population doubling time</i>
PI	Propidiumiodid

PNKP	<i>polynucleotide kinase 3'-phosphatase</i>
Pol	<i>DNA polymerase</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAP80	<i>receptor-associated protein 80</i>
RCC	<i>relative cell count</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROS	<i>reactive oxidative species</i>
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
SA- β -gal	<i>senescence-associated-β-galactosidase</i>
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis</i>
sgRNA	<i>single guide RNA</i>
SSB	<i>single strand break</i>
SSBR	<i>single strand break repair</i>
STA	<i>specific target amplification</i>
TALEN	<i>transcription activator-like effector nucleases</i>
TC-NER	<i>transcription-coupled NER</i>
TOP1	<i>DNA topoisomerase 1</i>
tracrRNA	<i>trans-activating crRNA</i>
UV	Ultraviolett
WB	Western Blot
WT	Wildtyp; eng.: <i>wild type</i>
XPA/B/C/G	<i>xeroderma pigmentosum, complementation group A/B/C/G</i>
XRCC	<i>X-ray repair cross-complementing protein</i>
ZF	Zinkfinger
ZFN	<i>zinc-finger nucleases</i>

8.2 VERWENDETE MATERIALIEN

8.2.1 CHEMIKALIEN

Bezeichnung	Hersteller
20x DNA Binding Dye Sample Loading Reagent	Fluidigm (San Francisco, USA)
2x Assay Loading Reagent	Fluidigm (San Francisco, USA)
2x TaqMan [®] PreAmp Master Mix	Applied Biosystem (Foster City, USA)
Aceton 100 %	VWR (Radnor, USA)
Acrylamid (Rotiphorese [®] Gel 37,5:1)	Roth (Karlsruhe, DE)
Agar	Roth (Karlsruhe, DE)
Albumin Fraktion V	Roth (Karlsruhe, DE)
Ammoniumperoxodisulfat (APS, ≥98 %)	Roth (Karlsruhe, DE)
Ampicilin	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DE)
Bradford-Reagenz	BioRad (München, DE)
Bromphenolblau	Sigma Aldrich (Steinheim)
CASY [®] Ton	OMNI Life Science (Bremen, DE)
DAPI (CyStain [®] DNA/Protein)	Sigma Aldrich (Steinheim)
Dimethylsulfoxid ≥99,9 %	Sigma Aldrich (Steinheim)
di-Natriumhydrogenphosphat ≥99 %	Roth (Karlsruhe, DE)
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Sigma Aldrich (Steinheim, DE)
DNA Away	Roth (Karlsruhe, DE)
DNA-Suspensionspuffer	TEKnova (Hollister, USA)
EDTA ≥99 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Ethanol	Roth (Karlsruhe, DE)
Exonuklease I, 20 U/μl	New England (Massachusetts, USA)
Exonuklease Reaktionspuffer	New England (Massachusetts, USA)
FACS Flow	BD (Heidelberg, DE)
FACS Rinse	BD (Heidelberg, DE)
Fetales Kälberserum	Gibco (Carlsbad, USA)
Fluoroshiled Mounting Medium with DAPI	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Formaldehyd 37 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Giemsa [®] -Stammlösung	Roth (Karlsruhe, DE)
Glycerin (Rotipuran [®]) 99,5 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Glycin ≥99,5 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Immersionsöl	Zeiss (Oberkochen, DE)

KU55933 (ATM Inhibitor)	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DE)
Ladepuffer Roti®-Load 1 4x Konz.	Roth (Karlsruhe, DE)
LB-Medium	Roth (Karlsruhe, DE)
Methanol ≥99, 5%	Roth (Karlsruhe, DE)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumchlorid ≥99,5 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumdodecylsulfat (SDS) 10 %	AppliChem (Darmstadt, DE)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, (10 bis 180 kDa)	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DE)
PCR-zertifiziertes Wasser	TEKnova (Hollister, USA)
Penicillin/Streptomycin-Lösung (Penicillin: 5.000 U/ml; Streptomycin: 5 mg/l)	Sigma Aldrich (Steinheim, DE)
Ponceau S	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DE)
Primer-Paare	Fluidigm (San Francisco, USA), Eurofins Scientific (Luxemburg)
Protease-Inhibitor-Cocktail (cOmplete Mini™)	Roche (Basel, CH)
Puromycin	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DE)
RNase A	Roche (Basel, CH)
SsoFast™ EvaGreen© Supermix with Low ROX	BioRad (San Francisco, USA)
TEMED	Roth (Karlsruhe, DE)
TE-Puffer	TEKnova (Kristiansand, NOR)
Tris ≥99,5 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Triton X-100 10 %	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DE)
Trypsin	Sigma Aldrich (Steinheim)
Tween®20	Roth (Karlsruhe)
Vectashield Mounting Medium with DAPI	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, DE)
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck (Darmstadt, DE)

8.2.2 LÖSUNGEN UND PUFFER

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
10x Protease Inhibitor	1 Tablette cOmplete Mini Protease-Inhibitor, in 1mL ddH ₂ O
BSA-Blockierlösung (5 %)	5 g Rinderserumalbumin 100 mL PBST
Laufpuffer (10x)	1,92 M Glycin 0,25 M Tris in ddH ₂ O
Laufpuffer (1x)	192 mM Glycin 25 mM Tris 0,1 % SDS in ddH ₂ O
Lysepuffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 250 mM NaCl 1 mM EDTA 0,1 % Triton-X100 in ddH ₂ O
Milch-Blockierlösung (5 %)	5 g Milchpulver 100 mL PBST
PBS (pH 7,4)	100 mM NaCl 4,5 mM KCl 7 mM Na ₂ HPO ₄ 3 mM KH ₂ PO ₄ in ddH ₂ O
PBS-EDTA	0,05 M Na ₂ -EDTA in PBS
PBST	0,05 % Tween [®] 20 in PBS
Ponceau S-Färbelösung (0,1 %)	0,1 g Ponceau S 5 mL Essigsäure 95 mL ddH ₂ O
Sammelgel (4 %)	500 µL Tris (1 M, pH 6,8) 40 µL SDS (10 %) 80 µL EDTA (0,1 M) 2,93 mL ddH ₂ O

	400 µL Acrylamid (40 %)
	40 µL APS (10 %)
	10 µL TEMED
Transferpuffer	192 mM Glycin
	25 mM Tris
	20 % Methanol
Trenngel (10 %)	1,25 mL Tris (1,5 M, pH 8,8)
	50 µL SDS (10 %)
	50 µL Glycerol
	100 µL EDTA (0,1 M)
	2,245 mL ddH ₂ O
	1,25 mL Acrylamid (40 %)
	50 µL APS (10 %)
	5 µL TEMED
Trypsin-Lösung	0,25 % Trypsin in PBS-EDTA

8.2.3 KITS

Kit	Hersteller
Amersham™ ECL Prime Western Blot Detektionsreagenz	GE Healthcare (Buckinghamshire)
Effectene™ Transfektions-Kit	Qiagen (Venlo, NL)
E.Z.N.A.® Endo-free Plasmid DNA Mini Kit I	Omega Bio-Tek (Norcross, USA)
NucleoSpin® RNA Plus Kit	Macherey-Nagel (Düren, DE)
qScript™ cDNA Synthesis Kits	Bio-Rad (München, DE)

8.2.4 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Bezeichnung	Hersteller
12-Well Platten	TPP (Trasadingen, CH)
24-Well Platten	TPP (Trasadingen, CH)
6-Well Platten	TPP (Trasadingen, CH)
96-Well Platten	TPP (Trasadingen, CH)
CASY®-Cups	Roche (Mannheim, DE)
Dynamic Array™ IFC	Fluidigm (San Francisco, USA)
Eppendorf-Reaktionsgefäße, 1,5 mL und 2 mL	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Falcon Tubes	BD (Heidelberg, DE)
Glaspipetten	Roth (Karlsruhe, DE)
Glasplatte (Short Plates, Spacer Plates)	BioRad (München, DE)
Handschuhe (Latex)	VWR International (Darmstadt, DE)
Handschuhe (Nitril)	Ansell (Richmond, USA)
Kryoröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Mini Cell Buffer Dams	BioRad (München, DE)
Mini-PROTEAN® Casting Frame	BioRad (München, DE)
Mini-PROTEAN® Casting Stand	BioRad (München, DE)
Mini-PROTEAN® Comb, 10-well	BioRad (München, DE)
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	BioRad (München, DE)
Mini-PROTEAN® Tetra Electrode Assembly	BioRad (München, DE)
Objektträger	Roth (Karlsruhe, DE)
Parafilm	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Pipettenspitzen 10 µL	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Pipettenspitzen 100-1000 µL	Brandt (Wertheim, DE)
Pipettenspitzen 10-200 µL	Ratiolab (Deieck, DE)
Pipettenspitzen 5 mL	Eppendorf (Hamburg, DE)
Plastik-Zentrifugenröhrchen 15 mL und 50 mL	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Polyvinylidenfluorid Membran	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
Nano Eppendorf (Multypl©-µ Strip 0,2 ml Kette)	Sarstedt (Nürnberg, DE)
Nano Eppendorf Deckelkette für 0,2 ml Kette	Sarstedt (Nürnberg, DE)
Wägeschiffchen	Roth (Karlsruhe, DE)
Whatman-Papier, 3 mm	Whatman (Maidstone, UK)
Zellkulturschalen (ø 15 cm, ø 10 cm, ø 6 cm)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)

8.2.5 GERÄTE

Gerät	Hersteller
Autoklav D-150	Systemec GmbH (Linden, DE)
Axio Imager Z2	Zeiss (Oberkochen)
Axio Observer	Zeiss (Oberkochen)
Axiovert 40C	Zeiss (Oberkochen)
Biomark	Fluidigm (San Francisco, USA)
Biofreezer Herarfeeze top	Thermo Scientific (Langenselbold, DE)
Blotting Kammer	Peqlab (Erlangen, DE)
Brutschrank Heracell 150i	Thermo Scientific (Langenselbold, DE)
CASY® TTC Cell Couter & Analyzer System	Roche (Mannheim, DE)
Centrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg, DE)
Koloniezähler BZG-30	WTW (Weilheim, DE)
Durchflusszytometer BD LSRFortessa	BD (Heidelberg, DE)
Elektrophorese Kammer	BioRad (München)
Feinwaage BP 61 S	Sartorius (Göttingen, DE)
Heißluftsterilisator	Memmert (Büchenbach, DE)
Heizschüttler Thermomixer C	Eppendorf (Hamburg, DE)
IFC Controller HX	Fluidigm (San Francisco, USA)
Luminescent Image Analyzer LAS-3000	Fujifilm (Tokio, JPN)
Megafuge 1.0	Heraeus (Hanau, DE)
Multipipette 20 – 200 µL	Eppendorf (Hamburg, DE)
NanoQuant Platte	Tecan Group (Crailsheim, DE)
PCR Workstation Pro	Peqlab (Erlangen, DE)
pH-Meter 3210	WTW (Weilheim, DE)
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, D)
Pipette 1000-5000 µL	Eppendorf (Hamburg, DE)
Pipette 100-1000 µL	Eppendorf (Hamburg, DE)
Pipette 10-100 µL	Eppendorf (Hamburg, DE)
Pipette 2,5-10 µL	Eppendorf (Hamburg, DE)
Pipette 20-200 µL	Eppendorf (Hamburg, DE)
Röntgenröhre CellRad	Faxitron (Hennef, DE)
Roto-Shake Genie Scientific Industries	(New York, USA)
Sterilwerkbank HERAsafeKS	Thermo Scientific (Langenselbold, DE)

T100 Thermal Cycler	BioRad (München, DE)
Tecan Infinite M200 PRO	Tecan Group (Crailsheim, DE)
UVC-Lampe VL-6C Thermo Scientific	(Langenselbold, DE)
UV-Radiometer 211 PRC	(Berlin, DE)
Vortex-Genie 2T	Scientific Industries (New York, USA)
Waage VWR 1502	Sartorius (Göttingen, DE)
Wasserbad Memmert	(Schwabach, DE)

8.2.6 SOFTWARE

Software	Hersteller
AIDA Image Analyzer v.3.27	Raytest (Straubenhardt, DE)
AxioVision Software Rel. 4.9.1	Zeiss (Oberkochen, DE)
BD FACSDiva™	BD (Heidelberg, DE)
Fluidigm Real Time PCR Analysis	Fluidigm (San Francisco, USA)
GenEx	MultiD Analyses (Gotberg)
SnapGene	GSL Biotech LLC (San Diego, USA)
Zen2 Pro	Zeiss (Oberkochen, DE)

8.3 ERGÄNZENDE DATEN

8.3.1 BASALE BEDINGUNGEN

8.3.1.1 SUBG₁ VERGLEICH

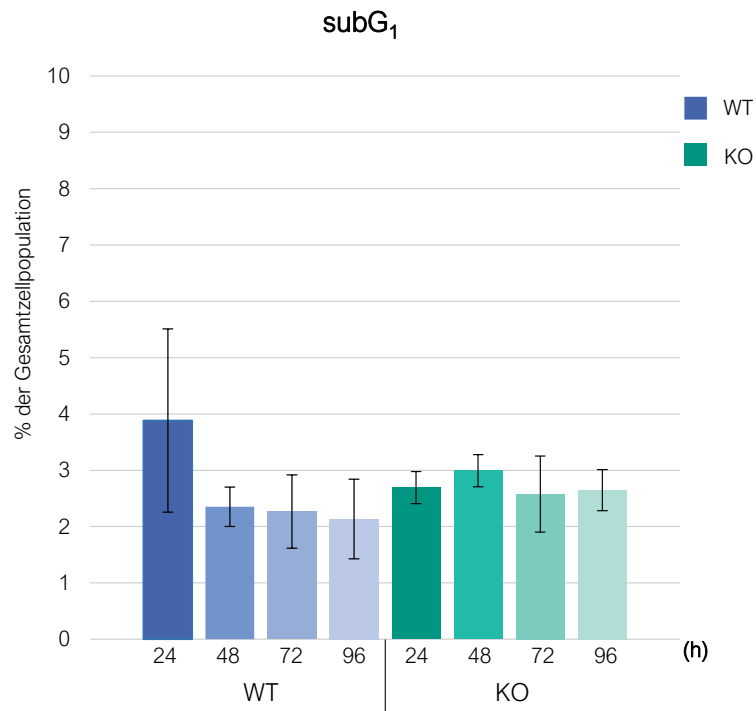


Abb. 50: Darstellung des subG₁-Anteils der U2OS (WT) und *PARP1-Knockout* Zellen (KO) unter basalen Bedingungen über einen Zeitraum von 96 h, bezogen auf die Gesamtzellpopulation. Die Zellen wurden mit DAPI angefärbt und die entsprechenden Phasen mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen, die jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden.

8.3.1.2 GENEXPRESSION

In Tab. 9 sind die Gene des verwendeten Gensets der eingesetzten *High Throughput RT-qPCR*-Methode dargestellt. Die Primer-Sequenzen können FISCHER et al. entnommen werden (FISCHER, 2017).

ANHANG

Tab. 9: Übersicht der Gencluster und zugehörigen Gene der eingesetzten *High Throughput* RT-qPCR-Methode.

Referenzgene	Metall-homöostase	Oxidative Stressantwort	Apoptotische Faktoren/ Zellzyklus-regulatoren	DNA-Schadens-antwort und --Reparatur	Fremdstoff-metabolismus
<i>ACTB</i>	<i>FTH1</i>	<i>CAT</i>	<i>APAF1</i>	<i>APEX1</i>	<i>ABCB1</i>
<i>B2M</i>	<i>MT1X</i>	<i>G6PD</i>	<i>AXIN2</i>	<i>ATM</i>	<i>ABCC1</i>
<i>GAPDH</i>	<i>MT2A</i>	<i>GCLC</i>	<i>BAX</i>	<i>ATR</i>	<i>ADH1B</i>
<i>GUSB</i>	<i>SLC30A1</i>	<i>GPX1</i>	<i>BBC3</i>	<i>BRCA1</i>	<i>ALDH1A1</i>
<i>HPRT1</i>	<i>TFRC</i>	<i>GPX2</i>	<i>BCL2</i>	<i>BRCA2</i>	<i>CYP1A1</i>
		<i>GSR</i>	<i>BCL2L1</i>	<i>DDB1</i>	<i>EPHX1</i>
		<i>HMOX1</i>	<i>BTRC</i>	<i>DDB2</i>	<i>GSTP1</i>
		<i>HSPA1A</i>	<i>CCND1</i>	<i>DDIT3</i>	<i>NAT1</i>
		<i>IL8</i>	<i>CDKN1A</i>	<i>ERCC1</i>	<i>NQO1</i>
		<i>KEAP1</i>	<i>CDKN1B</i>	<i>ERCC2</i>	<i>SULT1A1</i>
		<i>MAP3K5</i>	<i>CDKN2B</i>	<i>ERCC4</i>	<i>UGT1A</i>
		<i>NFE2L2</i>	<i>E2F1</i>	<i>ERCC5</i>	
		<i>NFKB1</i>	<i>EGFR</i>	<i>GADD45A</i>	
		<i>NFKB2</i>	<i>JUN</i>	<i>LIG1</i>	
		<i>NFKBIA</i>	<i>MDM2</i>	<i>LIG3</i>	
		<i>PRDX1</i>	<i>MYC</i>	<i>MGMT</i>	
		<i>SEPP1</i>	<i>PLK3</i>	<i>MLH1</i>	
		<i>SOD1</i>	<i>PMAIP1</i>	<i>MSH2</i>	
		<i>SOD2</i>	<i>PPM1D</i>	<i>OGG1</i>	
		<i>TXN</i>	<i>SIRT2</i>	<i>PARP1</i>	
		<i>TXNRD1</i>	<i>TNFRSF10B</i>	<i>PCNA</i>	
			<i>TP53</i>	<i>POLB</i>	
			<i>VEGFA</i>	<i>POLD1</i>	
			<i>XIAP</i>	<i>RAD50</i>	
				<i>RAD51</i>	
				<i>RRM2B</i>	
				<i>XPA</i>	
				<i>XPC</i>	
				<i>XRCC5</i>	

ANHANG

Tab. 10: Überblick über die Auswirkungen des *PARP1-Knockouts* auf das basale Genexpressionsprofil, analysiert mittels *High-Throughput* RT-qPCR. Darstellung der log2-fachen Änderungen (\pm SD) der Transkriptleveländerungen der U2OS *PARP1-Knockout* (KO)-Zellen im Vergleich zu den U2OS Wildtyp (WT)-Zellen.

Gen	log2	\pm SD	Gen	log2	\pm SD	Gen	log2	\pm SD
<i>APEX1</i>	-0,16	0,12	<i>APAF1</i>	0,25	0,59	<i>CAT</i>	0,22	0,31
<i>ATM</i>	0,31	0,15	<i>BAX</i>	0,15	0,33	<i>G6PD</i>	-0,30	0,25
<i>ATR</i>	-0,12	0,35	<i>BBC3</i>	-0,09	0,93	<i>GCLC</i>	-0,03	0,06
<i>BRCA1</i>	0,40	0,36	<i>BCL2</i>	-0,29	0,66	<i>GPX1</i>	0,08	0,20
<i>BRCA2</i>	0,11	0,18	<i>BCL2L1</i>	-0,02	0,35	<i>GSR</i>	0,18	0,22
<i>DDB1</i>	0,12	0,07	<i>BTRC</i>	0,35	0,14	<i>HMOX1</i>	-0,50	0,35
<i>DDB2</i>	0,39	0,39	<i>CCND1</i>	0,11	0,42	<i>HSPA1A</i>	-0,15	0,46
<i>DDIT3</i>	-0,03	0,93	<i>CDKN1A</i>	1,16	0,10	<i>IL8</i>	-0,68	1,66
<i>ERCC1</i>	0,06	0,23	<i>CDKN1B</i>	0,37	0,43	<i>KEAP1</i>	-0,54	0,27
<i>ERCC2</i>	-0,10	0,02	<i>E2F1</i>	-0,38	0,18	<i>MAP3K5</i>	0,22	0,16
<i>ERCC4</i>	0,31	0,20	<i>EGFR</i>	-0,03	0,07	<i>NFE2L2</i>	0,26	0,13
<i>ERCC5</i>	0,28	0,20	<i>JUN</i>	0,21	0,10	<i>NFKB1</i>	-0,21	0,04
<i>GADD45A</i>	0,04	0,48	<i>MDM2</i>	0,34	0,29	<i>NFKB2</i>	-0,24	0,32
<i>LIG1</i>	-0,15	0,49	<i>MYC</i>	-0,12	0,08	<i>NFKBIA</i>	0,02	0,35
<i>LIG3</i>	0,02	0,11	<i>PLK3</i>	0,18	0,35	<i>PRDX1</i>	0,24	0,15
<i>MGMT</i>	0,69	0,41	<i>PMAIP1</i>	-0,13	0,26	<i>SOD1</i>	0,37	0,22
<i>MLH1</i>	-0,05	0,08	<i>PPM1D</i>	0,23	0,13	<i>SOD2</i>	-0,01	0,24
<i>MSH2</i>	0,20	0,10	<i>SIRT2</i>	0,03	0,26	<i>TXN</i>	0,13	0,15
<i>OGG1</i>	0,05	0,14	<i>TNFRSF10B</i>	0,14	0,21	<i>TXNRD1</i>	-0,15	0,40
<i>PARP1</i>	-6,21	0,14	<i>TP53</i>	-0,27	0,25			
<i>PCNA</i>	0,32	0,18	<i>VEGFA</i>	-0,49	0,60			
<i>POLB</i>	0,35	0,22	<i>XIAP</i>	0,14	0,37			
<i>POLD1</i>	-0,19	0,27						
<i>RAD50</i>	0,51	0,10						
<i>RAD51</i>	0,36	0,16						
<i>RRM2B</i>	0,31	0,32						
<i>XPA</i>	-0,02	0,23						
<i>XPC</i>	-0,19	0,16						
<i>XRCC5</i>	0,02	0,10						

DNA-Schadensantwort und -Reparatur

Apoptose- und Zellzyklusregulation

Oxidative Stressantwort

8.3.2 EXPOSITION MIT IR

8.3.2.1 RCC TEST

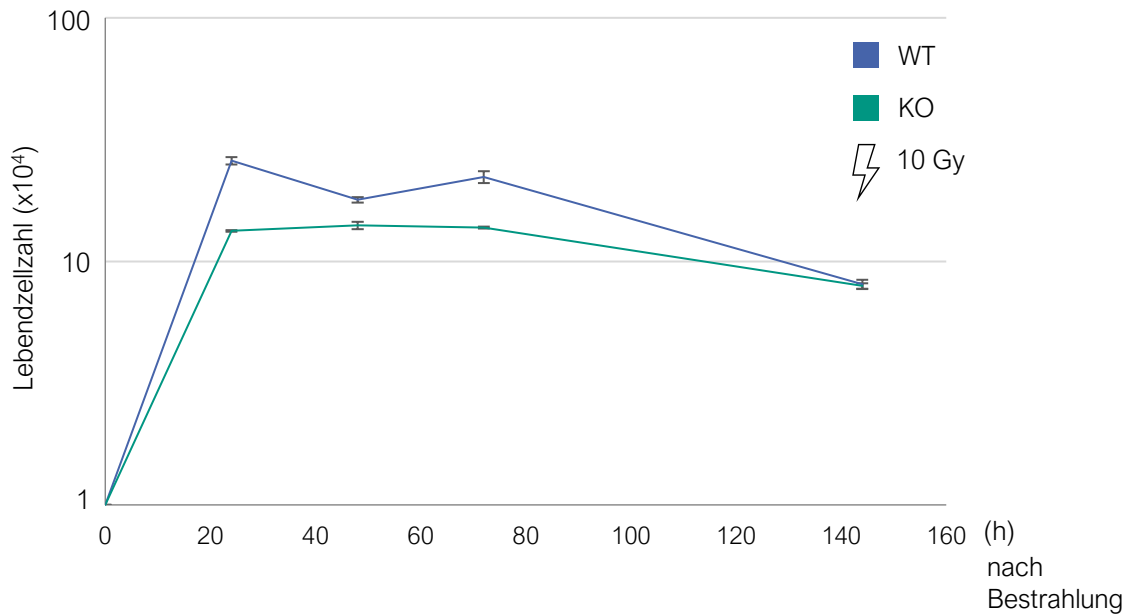


Abb. 51: RCC (*relative cell count*) Test der U2OS (WT) und U2OS *PARP1-Knockout* (KO) Zellen nach Bestrahlung mit 10 Gy. Es wurden 1×10^4 ausgestreut, für 24 h kultiviert und anschließend mit 10 Gy bestrahlt. Nach weiteren 24, 48, 72 und 144 h wurde jeweils für beide Zelllinien die Zellzahl am CASY® Zellzählgerät bestimmt. Gezeigt sind für beide Versuche die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen, die jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden.

8.3.2.2 ZELLYKLUSVERTEILUNG

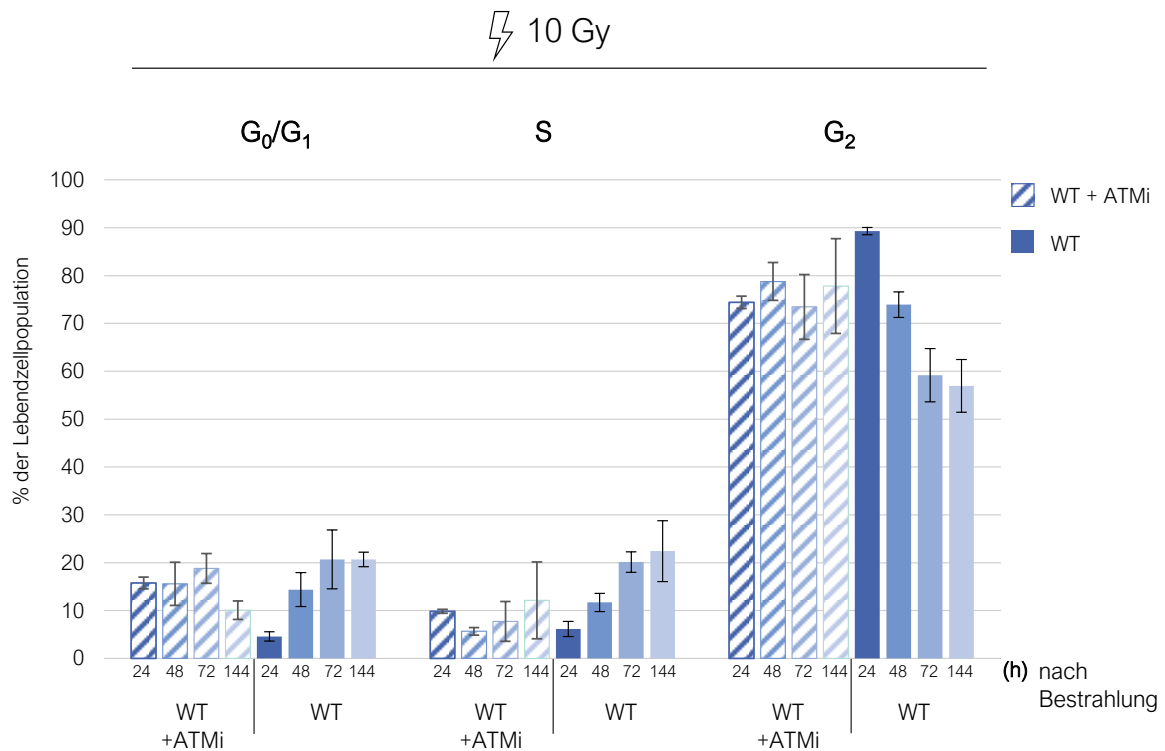


Abb. 52: Vergleich der zeitabhängigen Zellzyklusphasenverteilung der U2OS Zellen nach Inkubation mit dem Inhibitor ATMi KU99533 (WT + ATMi) und der unbehandelten U2OS Zellen (WT) ohne Inhibitor, jeweils nach Bestrahlung mit 10 Gy. Die WT-Zellen wurden mit 10 μ M ATMi 1 h vor Bestrahlung inkubiert. Um die Verteilung des Zellzyklus zu bestimmen, wurden die Zellen mit DAPI angefärbt und die entsprechenden Phasen mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen, die jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden.

8.3.2.3 PHOSPHORYLIERUNGSANALYSEN

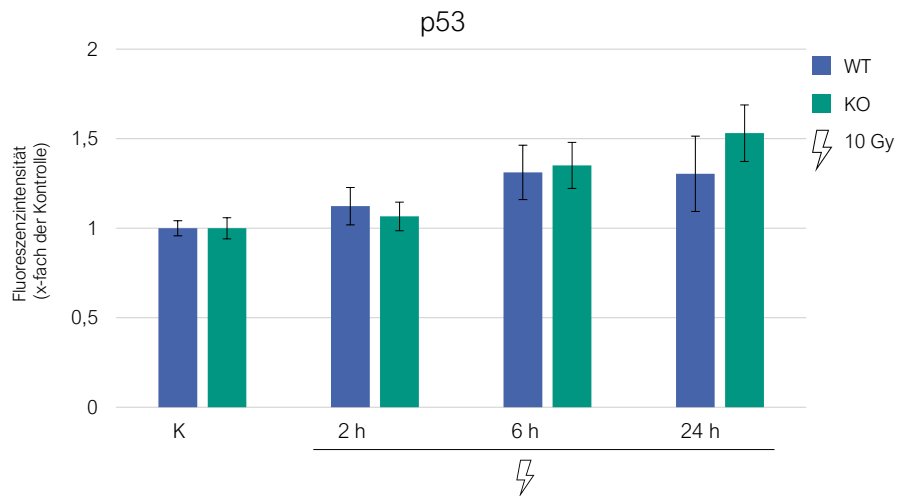


Abb. 53: Fluoreszenzintensitäten des p53-Signals nach Bestrahlung mit IR in den U2OS (WT) und den *PARP1*-Knockout Zellen (KO). Die Zellen wurden mit 1 beziehungsweise 10 Gy bestrahlt, danach für 2, 6 oder 24 h nachinkubiert. Die Auswertung erfolgte über die Bestimmung der Gesamtfluoreszenz und anschließende Normierung auf die jeweilige nicht bestrahlte Kontrolle. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus sechs unabhängigen Versuchen, die jeweils in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden.

9 PUBLIKATIONSLISTE

Publikationen in Fachzeitschriften

- **Gajewski, Sabine**; Hartwig, Andrea (2020): PARP1 Is Required for ATM-Mediated p53 Activation and p53-Mediated Gene Expression after Ionizing Radiation. In: *Chemical research in toxicology* 33 (7), DOI: 10.1021/acs.chemrestox.0c00130.
- Schoch, Sarah; **Gajewski, Sabine**; Rothfuß, Jana; Hartwig, Andrea; Köberle, Beate (2020): Comparative Study of the Mode of Action of Clinically Approved Platinum-Based Chemotherapeutics. In: *International journal of molecular sciences* 21 (18), DOI: 10.3390/ijms21186928
- Schoch, Sarah; Sen, Vasily; **Gajewski, Sabine**; Golubev, Valery; Strauch, Bettina; Hartwig, Andrea; Köberle, Beate (2018): Activity profile of the cisplatin analogue PN149 in different tumor cell lines. In: *Biochemical pharmacology* 156, DOI: 10.1016/j.bcp.2018.08.025

Publikation in Vorbereitung

- **Gajewski, Sabine**; Hartwig, Andrea
„The synergistic interaction between PARP1 and ATM is essential for the maintenance of genomic stability after exposure to ionizing radiation.“

Beiträge auf Fachtagungen

- **Gajewski, Sabine**; Hartwig, Andrea
„PARP1 knockout: Impact on DNA damage response and arsenic genotoxicity.“
Conference of the German Environmental Mutagen Society (GUM) 2019,
01.09.-04.09.2019, Basel (CH)