

Moritz Frister

Dr. med.

Ultrastrukturelle Untersuchung zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in verschiedenen Normalgewebszelllinien nach Bestrahlung mit Photonen, Elektronen und ¹²C-Kohlenstoffionen mit Hilfe superhochauflösender Fluoreszenzmikroskopie

Fach/Einrichtung: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Peter E. Huber

Für diese Arbeit wurde die räumliche Organisation sowie das Zusammenwirken verschiedener bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligter Proteine untersucht. Als zu diesem Zeitpunkt auf diesem Gebiet noch nicht etablierte Methode kam superhochauflösende Lichtmikroskopie durch Depletion mittels stimulierter Emission zum Einsatz. Ziel war es, Unterschiede bezüglich der Organisation der Reparaturmaschinerie zwischen Strahlung mit hohem und niedrigem linearen Energietransfer auf supraauflösender Ebene aufzudecken. Besonders sollten hier die Aspekte Wahl des Reparaturwegs sowie Einflüsse von Zellzyklusphase und Chromatindichte berücksichtigt werden. Die Untersuchungen wurden an drei verschiedenen Normalgewebszelllinien durchgeführt.

Um Vergleiche zwischen den Strahlenarten bei vergleichbarer biologischer Schädigung durchführen zu können, wurde zunächst das klonogene Überleben der verschiedenen Zellen für die Strahlenarten Photonenbestrahlung, Elektronenbestrahlung sowie Bestrahlung mit ¹²C-Kohlenstoffionen bestimmt. Hier ergaben sich relative biologische Wirksamkeiten für ¹²C-Kohlenstoffionen zwischen 2.7 und 3.9 im Vergleich zu Photonen. Das klonogene Überleben nach Elektronenbestrahlung zeigte sich gegenüber Photonen nicht signifikant verändert.

Die mikroskopischen und durchflusszytometrischen Untersuchungen zur Doppelstrangbruchreparatur wurden an Zellen durchgeführt, welche mit biologischen Äquivalentdosen bestrahlt wurden. In der Durchflusszytometrie zeigte sich nach ¹²C-Kohlenstoffionenbestrahlung ein geringeres Aktivitätsniveau des Doppelstrangbruchmarkers γ H2AX. Dies konnte in den mikroskopischen Untersuchungen bestätigt werden und deutet auf eine geringere Gesamtzahl von Doppelstrangbrüchen hin.

In den weiteren mikroskopischen Untersuchungen sollten Hinweise gefunden werden, warum Bestrahlung mit ¹²C-Kohlenstoffionen trotz niedrigerer Anzahl an induzierten Doppelstrangbrüchen eine vergleichbare Reduktion des klonogenen Überlebens verursacht. Die Haupthypothese, die hier bestätigt werden konnte, erklärt dies mit der höheren Schadenskomplexität und dichterem Clusterung der Schäden.

In dieser Arbeit konnten bisher nicht beschriebene Substrukturen des am nicht-homologen End-Joining beteiligten Proteins pDNA-PKcs und des an homologer Rekombinationsreparatur beteiligten Proteins pBRCA1 beschrieben werden. Für pDNA-PKcs konnten signifikant größere und dichtere Cluster nach ¹²C-Kohlenstoffionenbestrahlung nachgewiesen werden. Dies traf jedoch nur zu, wenn diese Cluster nicht mit dem ebenfalls an homologer Rekombinationsreparatur beteiligten Replikationsprotein A kolokalisierten. pBRCA1-Foci ließen sich nur in Zellen nachweisen, welche sich zum Zeitpunkt der Bestrahlung in der S-Phase befanden. Ihre Größe, Dichte und Komplexität zeigte keine Abhängigkeit von der Bestrahlungsart, was in der S-Phase auch für pDNA-PKcs zutraf. Dies unterstreicht die deutlich abgewandelte Reparaturkinetik während der DNA-Replikation.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sowohl Doppelstrangbruchmarker als auch pDNA-PKcs in Zellkernbereichen mit niedriger DNA-Dichte signifikant stärker repräsentiert waren. Lediglich für pBRCA1 konnte eine Überrepräsentierung in dichter DNA gezeigt werden, was

nahelegt, dass homologe Rekombinationsreparatur in Heterochromatin eine hervorgehobene Rolle spielt.

Alle Untersuchungsergebnisse bezüglich pDNA-PKcs werden durch Spezifitätsprobleme und möglicher Kreuzreaktivität zum Protein 53BP1 des verwendeten Antikörpers relativiert, welche erst nachträglich bei Experimenten mit Knockout-Zelllinien identifiziert wurden. Dies verdeutlicht die Wichtigkeit konsequenter Antikörpervalidierung, spezifisch für die geplante Anwendung, was, wie auch in dieser Arbeit, häufig zu spät oder gar nicht durchgeführt wird. Die vorliegende Arbeit demonstriert das große Potenzial, welches superhochauflösende Mikroskopie für morphologische Untersuchungen auf Zellkernniveau besitzt. Außerdem liefert sie Evidenz für eine stärkere Berücksichtigung von spezifischen DNA-Reparaturproteinen und Zellteilungsraten bei der Auswahl von Bestrahlungsart und Pharmakon in der Tumorthherapie. Nicht zuletzt wurde mit der Immunpräzipitation, gefolgt von quantitativer Massenspektrometrie, eine Methode demonstriert, wie Antikörperkreuzreaktivitäten zielgerichtet aufgedeckt werden können.