

Schlussbericht

Vorhaben:

**„Über die Rolle von „backup“ Reparaturwegen der
nichthomologen Endverknüpfung (NHEJ) in
Schwerionen Karzinogenese“**

Förderkennzeichen: 50 WB0929

Projektleitung:

**Prof. Dr. G. Iliakis
Universitätsklinikum Essen
Institut für Med. Strahlenbiologie**

I: Kurze Darstellung zu

1. Aufgabenstellung:

Der Arbeitsplan des Forschungsvorhabens war konzipiert um drei Ziele zu verfolgen: **Ziel 1** sollte den Beitrag von „backup“ Nichthomologe-Endverknüpfung (B-NHEJ) auf die Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen (DSB) als Funktion des linearen Energietransfers (LET) der verwendeten, ionisierenden Strahlenart untersuchen. **Ziel 2** sollte den Beitrag der homologen Rekombinationsreparatur (HRR) auf die Prozessierung von strahleninduzierten DSB als Funktion des LET untersuchen. **Ziel 3** sollte Signalwege, die zur Checkpoint-Aktivierung dienen, in Zellen, die verschiedener Strahlenarten ausgesetzt werden, analysieren.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde:

Karzinogenese ist eines der Hauptrisiken für Menschen im Weltraum. Es ist deshalb sehr wichtig, die zugrunde liegenden Mechanismen in ihren molekularen Einzelheiten zu verstehen. Aus diesem Hintergrund und als zentrale Vorbereitung für bemannte Weltraumflüge, wurde von der europäischen Weltraumagentur (ESA) ein Programm initiiert, um die zugrunde liegenden biologischen Effekte der im Weltraum befindlichen und für die Strahlenschäden verantwortlichen Schwerionen und Protonen mechanistisch zu untersuchen.

Das vorliegende Projekt stellt einen Beitrag zu dieser Initiative dar. Als solches hat also einen direkten Bezug auf die förderpolitischen Ziele des Ministeriums, das die langfristigen Ziele von ESA durch die Gewinnung von wissenschaftlichen Erkenntnissen unterstützt.

Das Vorhaben testet die Hypothese, dass Schwerionen Karzinogenese über die Fehlreparatur von DNA Doppelstrangbrüchen (DSB) verursacht wird. Zu diesem Zweck wird mit besonderem Nachdruck der Beitrag auf Fehlreparatur eines neuen von uns beschriebenen „backup“ Reparaturweges der nichthomologen Endverknüpfung (B-NHEJ) nach Schwerionenbestrahlung untersucht.

Essenzielle Voraussetzung für die Durchführung des Vorhabens war das Vorhandensein von für biologische Experimente einsetzbaren Schwerionen bei der Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI) in Darmstadt. Eine weitere und für dieses Vorhaben besonders wichtige Voraussetzung war das Vorhandensein in Essen eines Zyklotrons, wo Bestrahlungen mit Neutronen durchgeführt werden konnten. Neutronen stellen, wie Schwerionen, ein hoch-LET Strahlungsart dar und erlaubten uns viele Experimente durchzuführen, die entweder als Prüfung für GSI Experimente mit Schwerionen dienten, oder

Fragestellungen behandelten, die bei der GSI, aufgrund der großen Entfernung und der mit dem Transport von biologischem Material assoziierten Komplikationen, nicht durchgeführt werden konnten. Auch das Vorhandensein vor Ort von Röntgengeräten für die Produktion von Röntgenstrahlen, eine nieder-LET Strahlenart, die als Kontrolle für alle mit Hoch-LET-Strahlung durchgeführten Experimente dient, war eine wichtige Voraussetzung für die Durchführung des vorliegenden Vorhabens.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens:

Das Projekt wurde sorgfältig mit der GSI-Darmstadt, wo alle Bestrahlungen mit Schwerionen stattfanden, wie auch mit den Kliniken für Strahlentherapie und Nuklearmedizin, die die Verantwortung für die Zyklotronanlage am Universitätsklinikum Essen tragen, koordiniert. Für die Durchführung des Projektes selbst, wurden zuerst die dazu benötigten biologischen Systeme standardisiert und anschließend die geplanten Experimente durchgeführt. Gewonnene Daten wurden immer zeitnah analysiert und weitere Forschungsaktivitäten an die gewonnenen Erkenntnisse angepasst. Schließlich wurden die Ergebnisse zusammengefasst, und in anerkannten Fachzeitschriften mit internationalen Zirkulation und strikter Begutachtung publiziert.

4. wissenschaftlichem und technischem Stand, an den angeknüpft wurde, insbesondere:

- Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden:

Das Projekt basiert sich auf langjährige Vorarbeiten im Institut für Medizinische Strahlenbiologie am UK-Essen, die gezeigt haben, dass anders als bisher geglaubt, DSB werden von Zellen nicht nur über NHEJ und HRR repariert, sondern auch über einen noch nicht vollständig beschriebenen Reparaturweg der ohne Sequenzhomologie arbeiten kann und eine quasi „backup“ Funktion ausübt.

Konstruktionen, die bei der Durchführung des Projektes in Anspruch genommen wurden, beinhalten die gesamte Ausrüstung des Instituts für Medizinische Strahlenbiologie, das Zyklotron der Klinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikum Essen, wie auch die Anlagen der Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI) in Darmstadt.

Schutzrechte wurden bei der Durchführung des Projektes nicht beansprucht oder in Anspruch genommen.

- Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste:

Bei der Vorbereitung, wie auch bei der Durchführung des Projektes, wurde des Öfteren auf die strahlenbiologische Fachliteratur zurückgegriffen. Entscheidend dabei waren natürlich auch eigene Publikationen auf dem Gebiet des Vorhabens. Die Ergebnisse der im Rahmen dieses Projektes durchgeführten Experimente wurden in der Zwischenzeit auch in der Fachliteratur publiziert. Eine Liste der resultierten Publikationen ist unter II.6 zusammengefasst. Sonderdrucke der Publikationen selbst sind diesem Bericht ebenfalls beigefügt. Weiterhin wurden die Ergebnisse im Rahmen von Fachtagungen und internen Veranstaltungen diskutiert. Weitere Informations- und Dokumentationsdienste wurden nicht in Anspruch genommen.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen.

Das Projekt wurde in enger Zusammenarbeit mit der Biophysikabteilung der GSI durchgeführt, die die für dieses Projekt notwendigen Schwerionen, nach den besonderen Anforderungen der geplanten Experimente, zur Verfügung gestellt hat. Die Biophysikabteilung der GSI hat mit uns weiterhin über alle Aspekte der Anlage und des Strahlenschutzes beraten, und die Dosimetrie-Messungen durchgeführt. Von der GSI wurde auch wertvolles Knowhow, wie auch manuelle und intellektuelle Hilfe zur Verfügung gestellt, die von maßgeblicher Bedeutung für den Erfolg des Projektes waren.

Sehr hilfreich für die erfolgreiche Durchführung des Projektes war auch die Zusammenarbeit mit der Klinik für Strahlentherapie unter der Leitung von Prof. Dr. Martin Stuschke, wie auch der Klinik für Nuklear Medizin unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Andreas Bockisch.

II. Eingehende Darstellung

1. der Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele:

Erstes Ziel des vorliegenden Projektes war, die Reparatur von DSBs als Funktion des LET zu untersuchen mit besonderem Nachdruck auf die Funktionalität des B-NHEJ mit steigendem LET.

Als ersten Schritt dieser Bewertung haben wir Strahlenempfindlichkeit, wie auch die Induktion und Reparatur von DSBs nach Bestrahlung mit Schwerionen, Neutronen, und Röntgenstrahlen in ausgewählten Zelllinien ermittelt.

Um die Strahlenempfindlichkeit zu bestimmen, haben wir das Koloniebildungsvermögen als Endpunkt eingesetzt. Dazu wurden exponentiell wachsende und Plateau-phase-MO59K Zellen und deren strahlempfindliche

Variante MO59J verschiedener Strahlenarten ausgesetzt. Letztere Zellen weisen einen Defekt in das Enzym DNA-PKcs auf, was den D-NHEJ-Reparaturweg ausschaltet. Die MO59J-Zellen nutzen dann B-NHEJ und vielleicht auch HRR für die Prozessierung von strahleninduzierten DSBs.

Wie in Abbildung 1A dargestellt, zeigen Zellen mit funktionierenden D-NHEJ-Reparaturweg (MO59K) eine deutlich höhere Strahlenempfindlichkeit nach Exposition an Hoch-LET-Strahlung im Vergleich zu Röntgenstrahlung. Die Strahlenempfindlichkeit von MO59K Zellen ist gegenüber Schwerionen und Neutronen vergleichbar; und dieser Trend wird nicht signifikant von der Wachstumsphase in der die Zellen bestrahlt werden, beeinflusst.

Im Gegensatz dazu, zeigen D-NHEJ defiziente Zellen (MO59J) eine sehr ähnliche Strahlenempfindlichkeit bei Bestrahlung mit Hoch-LET-Strahlung und Röntgenstrahlen (Abbildung 1B). Dadurch wird der Unterschied in der Strahlenempfindlichkeit zwischen den beiden Zelllinien, M059K und M059J, nach Exposition mit Hoch-LET-Strahlung sehr viel geringer. Das deutet darauf hin, dass D-NHEJ wenig zum Zellüberleben nach Exposition an Hoch-LET-Strahlung beiträgt, was auf die zunehmende Bedeutung von HRR und B-NHEJ hinweist.

Allerdings, da HRR ein weitgehend fehlerfreier Prozess ist, bringen diese Ergebnisse, in einer sehr überzeugenden Art und Weise, die mögliche Dominanz von B-NHEJ auf das Absterben von Zellen, die Hoch-LET-Strahlung ausgesetzt werden, wie auch auf die mögliche zentrale Rolle dieses Reparaturweges auf Karzinogenese, hervor.

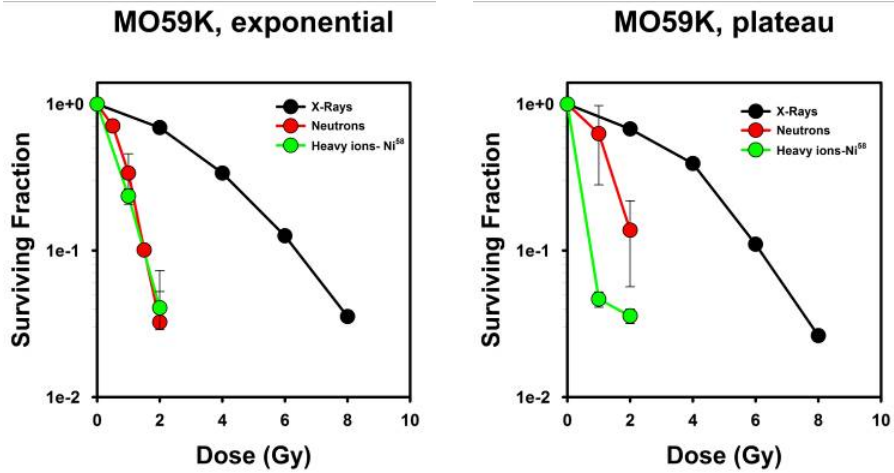
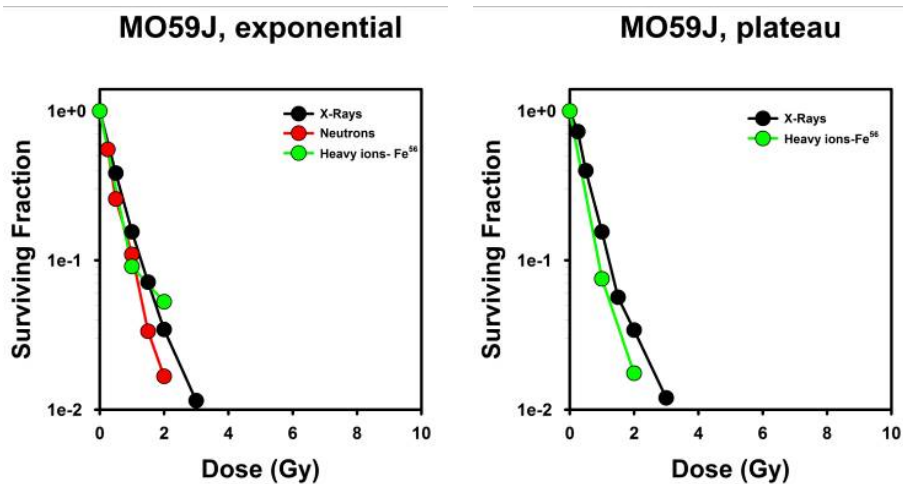
A**B**

Abbildung 1: Überlebenskurven von MO59K und MO59J Zellen nach Bestrahlung mit Röntgenstrahlen, Neutronen und Schwerionen. Der Anteil von überlebenden Zellen ist aufgetragen auf eine logarithmische Skala gegen verschiedene Dosen von Röntgenstrahlen (schwarze Kreise), Neutronen (rote Kreise) oder Schwerionen (grüne Kreise), die auf einer linearen Skala aufgetragen sind. A. exponentiell wachsenden und plateau-phase MO59K Zellen. B. exponentiell wachsenden und plateau-phase MO59J Zellen.

Zur Beurteilung der Wirkung von ^{56}Fe Strahlung auf die Entstehung von DSBs, wurden Pulse-Feld Gelelektrophorese Versuche unter Standard Lysierungsbedingungen durchgeführt. Abbildung 2 fasst die gewonnenen Ergebnisse mit M059K Zellen zusammen. Aus diesen Daten ist es direkt ersichtlich, dass die Induktion von DSB, unter den angewandten Messbedingungen, ähnlich für Schwerionen und Röntgenstrahlung ist.

Dieser Befund steht in starkem Kontrast zur deutlich erhöhten Strahlenempfindlichkeit von M059K Zellen nach Bestrahlung mit Schwerionen,

und weist auf Mechanismen der Strahlenempfindlichkeit, die über die Induktion von DSB hinausgehen müssen. Der erste nahe liegende Parameter in dieser Hinsicht ist die Reparierbarkeit der induzierten DSB und wurde in Experimenten, die weiter unten beschrieben werden, untersucht.

Im Laufe der oben aufgeführten Experimente und Analysen, und direkt relevant für die dargestellte Problematik, wurde eine weitere Dimension des Strahlenschadens und der molekularen Struktur des Doppelstrangbruches entdeckt, die für unser Verständnis über die Wirkung von Hoch-LET-Strahlung von entscheidender Bedeutung sein könnte. Wir konnten nämlich zeigen, dass die weit verbreitete Annahme, dass alle DSBs prompt induziert werden und sofort nach Bestrahlung in exponierten Zellen vorliegen, eine Simplifizierung ist. Vielmehr generiert ionisierende Strahlung, zusätzlich zu den prompt-produzierten DSBs, auch DSB die über thermisch empfindliche Strahlenschäden hervorgehen und deshalb erst einige Minuten, bis zu einer Stunde, nach Bestrahlung in Zellen entstehen. Obwohl die Induktion solcher thermisch empfindlichen DSB bereits früher gezeigt worden war, wurden diese Befunde als Artefakte der Messmethode und als Effekte ohne nennenswerte biologische Konsequenz abgetan.

Wir konnten dagegen zeigen, dass Läsionen des Zuckers Desoxyribose, die zum Bruch des Zucker-Phosphat-DNA-Rückgrates führen können, nicht sofort als eine Rückgrat brechende Läsion auftreten, sondern sich erst zu einer solchen Läsion nach Ablauf chemischer Prozesse entwickeln. Diese Vorgänge laufen in der bereits mit der Reparatur befassten Zelle ab und zwar in der ersten Stunde nach Bestrahlung. Diese Beobachtungen stellen die weit verbreitete Annahme in Frage, dass alle durch Strahlung induzierten Doppelstrangbrüche sofort nach Bestrahlung in der Zelle präsent sind.

Die potentielle Relevanz dieses Befundes auf die Wirkung von Strahlung auf Säugetierzellen, hat uns veranlasst, die Abhängigkeit der Induktion von thermisch labilen DSB auf das LET zu untersuchen. Diese thermisch empfindlichen DSBs müssen von den temperaturunabhängig induzierten DSBs unterschieden werden, da sie möglicherweise unterschiedliche biologische Effekte auslösen.

Aus den in Abbildung 2 dargestellten Ergebnissen ist ersichtlich, dass in starkem Gegensatz zu Röntgenstrahlung, keine thermisch empfindliche DSBs nach Exposition mit ^{56}Fe in den getesteten Zellen gemessen werden kann. Erhöhte Lysis-Temperaturen haben auf die Induktion dieser DSBs keinen weiteren Effekt. Dabei sind fast 40% der gemessenen DSBs nach Exposition an Röntgenstrahlung thermisch labil.

Dass thermisch labile DSBs nach Exposition mit ^{56}Fe in diesen Zellen nicht induziert werden, kann der Komplexität der durch Schwerionen induzierten Läsionen zugeschrieben werden. Eine Exposition der gleichen Zellen zu

Röntgenstrahlen führt zu einer deutlichen Reduktion der gemessenen DSBs, wenn die Messung unter Bedingungen durchgeführt wird, die die Umwandlung von thermisch labilen Läsionen in DSBs verhindern. Ähnliche Ergebnisse werden mit M059J- und M059K-Zellen gewonnen, was darauf hindeutet, dass die DNA-PKcs-Mutation in M059J Zellen keinen Einfluss auf die charakteristische Induktion von thermisch instabilen Strahlenschäden hat.

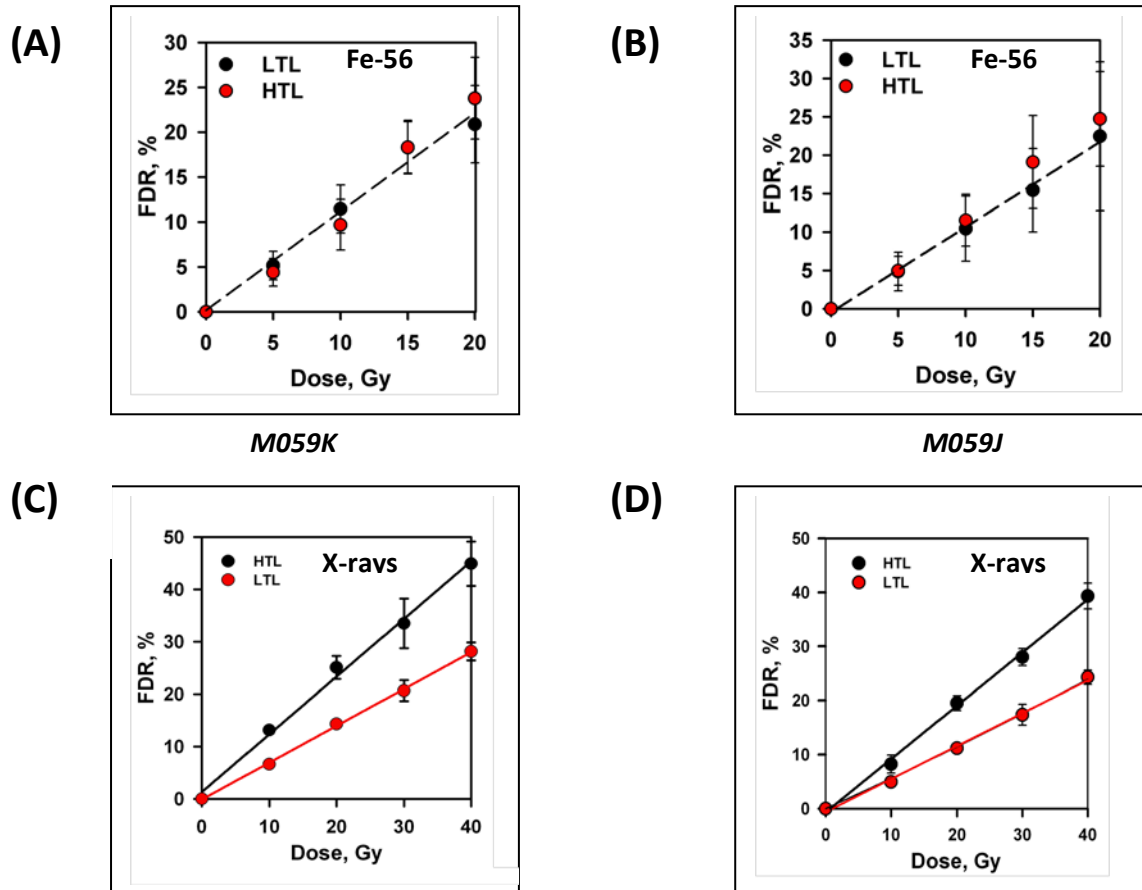


Abbildung 2: Ausbeute der DSB (gemessen als FDR) als Funktion der Strahlendosis für M059K und M059J Zellen, die entweder den ^{56}Fe - oder Röntgenstrahlen ausgesetzt wurden. Die Lyse erfolgte entweder nach dem Standard-Hochtemperatur-Lyse-Protokoll (HTL) oder mit einem besonders für niedrige Temperaturen konzipierten Lyse-Protokoll (LTL).

Diese Befunde weisen auf eine bis dato unbekannt Dimension des Strahlenschadens hin, und definieren Parameter, die für die Wirkung von Hoch-LET-Strahlung von entscheidender Bedeutung für die zu Grunde liegenden Mechanismen sein könnten. Sie werden in den Publikationen 1-3 ausführlich diskutiert und bilden eine wesentliche Komponente von bereits konzipierten Anschlussprojekten.

Als nächste Parameter wurde die Reparierbarkeit von durch Hoch-LET-Strahlung induzierten DSBs untersucht, wie sie erfolgen könnte, entweder über D-NHEJ oder B-NHEJ.

Schwerionen erzeugen umfangreiche lokalisierte Schäden in der DNA und zerstören vermutlich lokal das Chromatin und dessen Struktur. Dies kann Auswirkungen auf die Effizienz sowohl von D-NHEJ wie auch von B-NHEJ haben.

Um diese Frage zu beantworten, und die relative Empfindlichkeit von D-NHEJ und B-NHEJ auf das LET zu untersuchen, wurde die Reparatur von DSB nach Schwerionen-Bestrahlung in $LIG4^{-/-}$ und Wildtyp MEF Zellen untersucht (Abbildung 3). Die Reparatur zeigte sich nach Schwerionenbestrahlung (15 Gy) von Wildtyp-Zellen langsamer ab als nach Exposition zu Röntgenstrahlen, was auf eine leichte Erschwerung der DSB Reparatur über den D-NHEJ Reparaturweg mit zunehmender Komplexität des Schadens hindeutet.

Interessanterweise war Auswirkung der Hoch-LET-Strahlung auf die Reparatur von $LIG4^{-/-}$ Zellen höher als für die Wildtyp-Zellen. Wir können also daraus schließen, dass die Auswirkung der Hoch-LET-Strahlung stärker für B-NHEJ als für D-NHEJ ist, oder dass B-NHEJ eine höhere Anfälligkeit als D-NHEJ an der Komplexität des DNA Schadens hinweist. Dieses Ergebnis konnte auf eine Reihe von Zelllinien bestätigt werden, und hat uns die Möglichkeit gegeben, eine weitere, wichtige Eigenschaft von B-NHEJ offen zu legen.

Bei niedriger Temperatur Lyse (LTL) wurden die relativen Reparaturwerte bezogen auf Zeitpunkt 0 h genommen, da die Dosis-Wirkungs-Kurve keine reale Darstellung der in vivo Induktion von DSBs ermöglicht. Die Reparaturkinetik der $LIG4^{-/-}$ Zellen nach LTL zeigte nicht den typischen Buckel für die frühen Zeitpunkte. Diese Beobachtung steht im Einklang mit dem oben berichteten Mangel an DSB Induktion von hitzelabilen DNA Läsionen nach Exposition mit Hoch-LET-Strahlung. Diese Ergebnisse sind zum Teil bereits publiziert und werden ausführlich in den Publikationen 1-3 diskutiert.

Insgesamt haben die Untersuchungen im Ziel 1 folgende neue Erkenntnisse erbracht:

1. Läsionen, die über D-NHEJ prozessiert werden tragen wenig zum Zellüberleben nach Exposition zu Hoch-LET-Strahlung.
2. Die Reparatur über D-NHEJ von durch Hoch-LET-Strahlung induzierten DSBs ist erschwert verglichen mit der Reparatur durch den gleichen Reparaturweg von durch Röntgenstrahlung erzeugten DSBs.
3. Die höhere Komplexität des Strahlenschadens beeinträchtigt DSB Reparatur über B-NHEJ stärker als über D-NHEJ.

4. Die höhere Komplexität des Strahlenschadens reduziert den Anteil von überhitzelablen Läsionen induzierten DSBs.

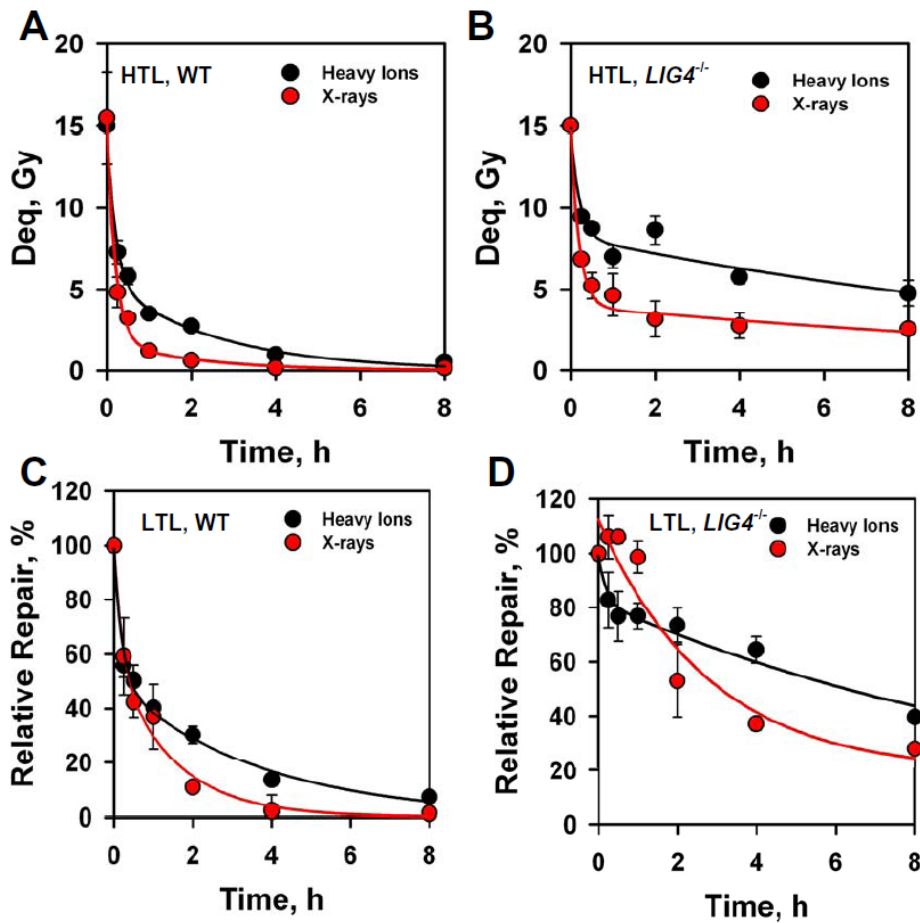


Abbildung 3: Auswirkung der Läsion Komplexität auf die B-NHEJ Effizienz. Exponentiell wachsende wt und LIG4^{-/-} MEF-Zellen wurden mit 15 Gy Schwerionen (1 GeV, Ni) oder Röntgenstrahlen bestrahlt. Die Zellen wurden nach der Bestrahlung nach dem HTL (A und B) oder LTL (C und D) Lyse Protokoll verarbeitet und anschließend durch PFGE analysiert. Abbildungen A und B zeigen die Äquivalenzdosis während Abbildung C und D die relative Reparatur im Vergleich zu 0h Zeitpunkt.

Zweites Ziel des Projektes war die Bestimmung des Beitrages des Homologen Rekombinations-Reparaturweges (HRR) als Funktion des LET.

Da die Ergebnisse der oben diskutierten Experimente auf Rekrutierungsverschiebungen zwischen den DSBs Reparaturwegen als Funktion des LET hingewiesen haben, haben wir nach Möglichkeiten gesucht, die Aktivität des HRR Reparaturweges in Zellen, die Schwerionen ausgesetzt sind zu untersuchen, und diese mit den Ergebnissen, die nach Röntgenbestrahlung gewonnen werden, zu vergleichen.

Zu diesem Zweck haben wir die Bildung von Rad51 und Mre11 Foci als Endpunkt gewählt. Beide Proteine sind zentral für diese Form der DSB Reparatur, und ihre Rekrutierung und Akkumulierung als Foci im Zellkern wird als Hinweis für HRR-Einsatz an dieser Stelle, für die dort befindlichen DSBs, interpretiert.

Da aber der HRR-Reparaturweg, aufgrund seines Bedarfes nach einem Schwesterchromatid als Homologie-Substrat, das erst in der S-phase synthetisiert wird, maximal aktiv nur während der S- und der G2-Phase des Zellzyklus ist, wird es erforderlich, solche Analysen nur in Zellen, die sich in diesen Phasen des Zellzyklus befinden, durchzuführen. Wir haben deshalb bei diesen Versuchen zwei Immunfluoreszenzfärbungen gleichzeitig angewandt, um einerseits das Rad51 Protein an DSBs sichtbar zu machen und andererseits, um über Cyclin B1 Färbung Zellen am Ende der S-, oder in der G2-Phase zu identifizieren und gezielt zu analysieren. Dabei wurde angenommen, dass die Bildung und die Anzahl von Rad51 Foci in einer Zelle ein Maßstab für die HRR-Aktivität in dieser Zelle ist.

Abbildung 4 fasst die Ergebnisse der Rad51 Foci Untersuchungen in MO59K und MO59J Zellen zusammen. Im Wildtyp MO59K Zellen steigt die Anzahl der Rad51 Foci pro Zelle schnell mit der Dosis an und sinkt langsam nach Bestrahlung mit Dosen über 2 Gy ab. Die bei diesen Experimenten beobachtete Sättigung der Rad51 Focibildung ist ähnlich wie in Zellen, die Röntgenstrahlung ausgesetzt sind, was auf ähnliche Grundmechanismen der Strahlenantwort bei beiden Strahlenarten hinweist.

Obwohl die Ergebnisse des in Abbildung 4 zusammengefassten Experimentes gegenüber Ergebnisse, die mit Röntgenbestrahlung gewonnen werden, auf einen schnelleren Anstieg der Rad51 Foci als Funktion der Dosis vermuten lassen, schränkt leider die dramatisch unterschiedliche räumliche Verteilung der Ionisationsereignisse zwischen den beiden Strahlenarten solche Vergleiche erheblich ein. Das liegt daran, dass die Ionisationen nach Röntgenbestrahlung relativ gleichmäßig in der Zelle verteilt sind; im Gegensatz dazu treten die Ionisationen nach Bestrahlung mit Schwerionen höchst konzentriert und in sehr hohen Zahlen, hauptsächlich entlang der Laufbahn des Partikels. Dadurch

entsteht entlang der Partikellaufbahn eine sehr hohe Anzahl von DSBs, die aber in den oben aufgeführten Immunfluoreszenz Experimenten und aufgrund der geringen räumlichen Auflösung der Methode, als ein einziger Focus erscheinen. Letzteres führt dazu, dass die Anzahl der tatsächlichen Rad51 Foci, d.h. der DSBs, die zu jedem Moment über HRR prozessiert wurden, stark unterschätzt. Als Ergebnis dieser Methode inhärenten Limitierungen erlauben Experimente dieser Art nicht die Frage eines möglichen, höheren Einsatzes von HRR nach Schwerionenbestrahlung quantitativ zu beantworten.

In M059J-Zellen wurde ebenfalls eine dosisabhängige Zunahme der Rad51 Foci zwischen 0 und 2 Gy beobachtet. Allerdings war die Abhängigkeit dieser Zunahme von der Dosis unterschiedlicher als bei M059K-Zellen und ein Plateau konnte bis 2 Gy nicht erreicht werden.

Diese auf HRR-Funktion konzentrierten Ergebnisse zeigen auch, dass die Strahlqualität, in Form des LET, die Balance zwischen Reparaturwegen von dem nach locker ionisierender Strahlung Grundzustand verschiebt, und dass diese Verschiebung weiter von einer Inaktivierung des D-NHEJ, und der dadurch entstehende Überaktivierung des B-NHEJ beeinflusst wird.

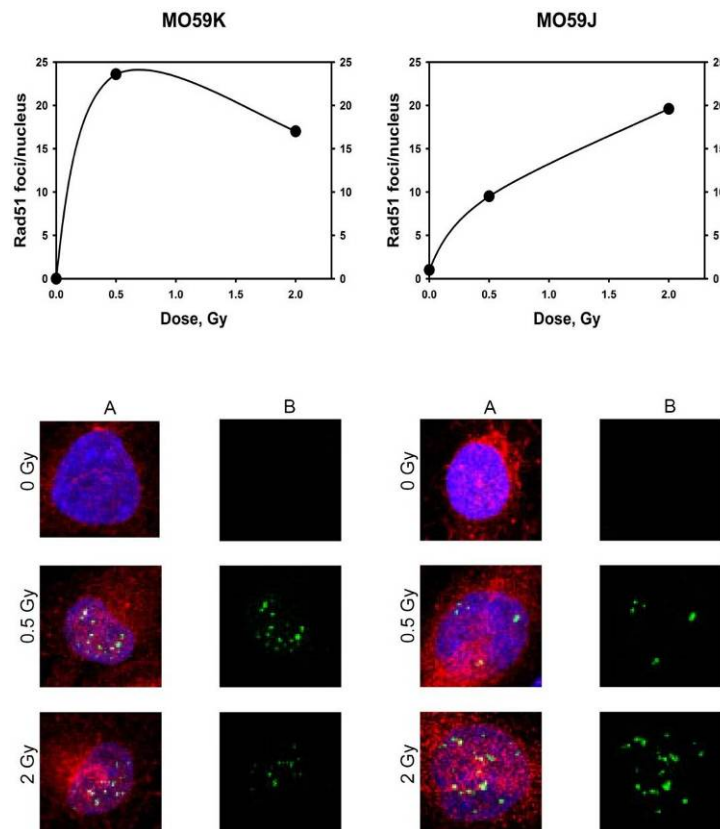


Abbildung 4: Rad51 Dosis-Wirkungs-Kurven in M059K und M059J Zellen nach Bestrahlung mit 0, 0,5, 2 Gy Ni-Schwerionen. Für die Dosis-Wirkungs-Kurven wurden die maximalen Foci Zahlen in der entsprechenden Reparatur Kinetik aufgetragen. A: Cyclin B1 (rot, markiert G2-Zellen), DAPI (blau), Rad51 (grün), B: Rad51 (grün).

Um den Beitrag der HRR bei der DSB-Reparatur insgesamt und durch unabhängige Verfahren zu bewerten, wurde auch die Mre11 Foci Bildung nach Exposition mit ^{56}Fe Strahlung in M059K und M059J Zellen verfolgt. Die Ergebnisse wurden, hier auch, mit denen nach Röntgenstrahlen verglichen. Aus den zusammengefassten Ergebnissen in Abbildung 5 ist ersichtlich, dass M059K Zellen, die mit Röntgenstrahlen behandelt werden, zwei deutliche Mre11 Foci Kinetik Maxima in der G1-Phase des Zellzyklus ausbilden. Diese Spitzen hängen von der Zeit und der Dosis ab und zeigen ähnliche Abläufe bei Zellen, die in der G2-Phase des Zellzyklus analysiert werden (nicht gezeigt).

Ein sich schnell entwickelndes Maximum wurde beobachtet, wenn die Zellen niedrigen Strahlendosen ausgesetzt waren; nach hohen Strahlendosen entwickelte sich dieses Maximum langsamer. Vergleicht man die Auswirkung von hoher und niedriger LET Strahlung, so wird deutlich, dass die Mre11 Fokus Anzahl viel geringer ist nach ^{56}Fe Bestrahlung, wenn exponentiell wachsende Zellen analysiert werden, die sowohl G2, als auch S- und G1-Zellen beinhalten, als nach Röntgenstrahlung.

Die Reparatur in den M059J Zellen ist langsamer. Dies ergibt sich aus der erhöhten Mre11 Foci Anzahl bei 48 Stunden, was auf einen insgesamt langsamen Reparaturprozess hindeutet.

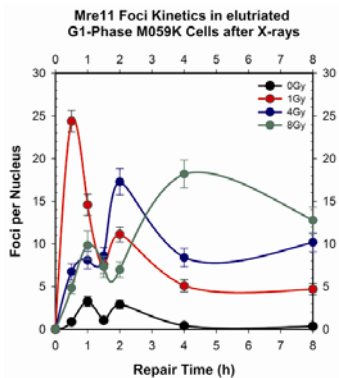


Abbildung 4a: Mre11 Foci Kinetik in elutrierte G1 M059K Zellen.

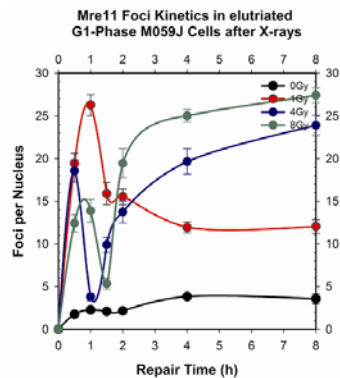


Abbildung 4b: Mre11 Fokus Kinetik in elutrierte G1 M059J Zellen.

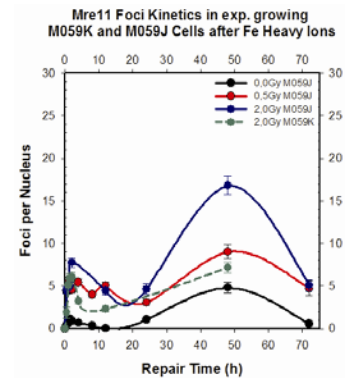


Abbildung 4c: Mre11 Foci Kinetik in exponentiell wachsenden M059J Zellen ^{56}Fe ausgesetzt.

Diese Ergebnisse befestigen die Hypothese, dass erhebliche, und für die Effektivität von Hoch-LET-Strahlung relevante Verschiebungen, im DSB-Reparaturweggleichgewicht auftreten, die aber in ihren Einzelheiten komplex sind und weiterer Verarbeitung in Anschlussprojekten bedürfen. Unsere Untersuchungen haben weiterhin gezeigt, dass nach Hemmung des D-NHEJ Reparaturweges, und der damit verbundenen Stärkung des B-NHEJ, weitere Verschiebungen in dem Reparaturweggleichgewicht auftreten. Diese

Verschiebungen und deren Rückwirkung auf B-NHEJ bedürfen ebenfalls weiterer Untersuchungen.

Insgesamt haben uns die bei diesem Ziel durchgeführten Experimente zu folgenden Erkenntnissen verholfen:

1. Es ist sehr wahrscheinlich, dass Hoch-LET-Strahlung DSB Reparatur zu HRR verschiebt. Die molekulare Analyse dieser Verschiebung bedarf aber weiterer Modellsysteme, die die Komplexität des DNA-Schadens in einer definierten Art und Weise erhöhen, und die eine mögliche Erhöhung des Einsatz HRR-Einsatzes quantitativ erfassen.
2. Alternativ, oder ergänzend, sollten Mikroskopie Methoden mit einer besseren räumlichen Auflösung entwickelt werden, die es erlauben, die Reparatur einzelner DSBs entlang der Partikellaufbahn zu verfolgen.

Drittes Ziel des vorliegenden Projektes waren Untersuchung der Checkpoint Signaling Variationen in der G1 und G2-Phase des Zellzyklus auf zellulärer und molekularer Ebene nach verschiedenen LET-Strahlenexpositionen durchzuführen.

Da viele Aspekte dieses Zieles in direkter Verbindung zu Aspekten, die in Zielen 1 und 2 untersucht wurden, standen, und weil die oben präsentierten Experimente neue und wichtige Erkenntnisse hervor brachten, die mit Priorität untersucht werden müssten, sind die Experimente dieses Ziels in den Hintergrund geraten.

Außerdem waren Experimente dieser Art nach Bestrahlung mit Schwerionen aus logistischen Gründen komplizierter als ursprünglich geplant. Die Bestrahlungen mit Schwerionen dauerten generell lang, und eine Haltung der Zellen auf 37° C war während dieser Zeit bei der GSI nicht vorgesehen. In Vorexperimenten haben wir aber gesehen, dass Temperaturschwankungen starke Effekte auf den normalen Verlauf der Zellen durch den Zyklus haben, was die quantitative Erfassung von strahleninduzierten Veränderungen stark eingrenzt. Eine weitere logistische Komplikation in dieser Hinsicht war auch die Entfernung von der GSI, die eine Zellerhaltung auf optimalen Bedingungen erschwerte.

Im Laufe dieses Projektes konnten wir aber Aspekte, die für die eigentliche Führung des Projektes, und auch für seine weitere Entwicklung von Relevanz waren, untersuchen.

So wurden Aspekte der B-NHEJ Inhibierung in nicht proliferierenden Zellen näher untersucht und Grundaspekte definiert, die nun mit Hoch-LET-Strahlung untersucht werden sollen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Publikation 4 zusammengefasst.

Außerdem wurde der Einfluss von HDAC Inhibierung, eine Behandlung die Chromatinstruktur beeinträchtigt, auf B-NHEJ untersucht, und die Befunde dieser Experimente sind in Publikation 6 zusammengefasst.

Schließlich wurde die Funktion von B-NHEJ relevanten Proteinen analysiert um mechanistische Einsichten auf diesen Reparaturweg zu erhalten, und die erzielten Ergebnisse sind in Publikation 4 zusammengefasst.

2. der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises:

| Position | Gesamtfinanzierungsplan | Entstandene Ausgaben |
|----------|-------------------------|----------------------|
| 0812 | €160.596,00 | €168.415,75 |
| 0843 | €75.000,00 | €76.046,58 |
| 0846 | €7.848,00 | €1.792,48 |
| Gesamt | €243.444,00 | €246.254,81 |

3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit:

Ionisierende Strahlung tötet Zellen und kann auch zu Krebsentstehung führen, was den Bedarf für einen strengen Strahlenschutz auf der Erde weckt, und ganz besonders im Weltall. Diese Effekte ionisierender Strahlen sind hauptsächlich auf Schäden, die in der DNA gesetzt werden, zurückzuführen. Interessanterweise sind diese DNA-Schäden vergleichbar mit denen, die über den in jeder Zelle immer währenden oxidativen Stress induziert werden. Allerdings kann ionisierende Strahlung aufgrund der räumlichen Verteilung der Schadensereignissen zu Brüchen der DNA Doppelhelix, in der Form eines Doppelstrangbruches, führen.

Es ist bereits vor Jahren erkannt worden, dass im falschen Prozessieren von DNA Doppelstrangbrüchen die Hauptverantwortung für den strahleninduzierten Zelltod und die Krebsentstehung liegt. Aus diesem Grund ist es äußerst wichtig, den DNA Doppelstrangbruch als biologische Läsion in seinem molekularen Aufbau zu beschreiben, und die biologischen Prozesse, die seiner Reparatur zugrunde liegen, zusammen mit deren Fehleranfälligkeit in ihren Details zu verstehen. Dies ist ein zentrales Ziel dieses Projektes und betont die Notwendigkeit und die Angemessenheit der geleisteten Arbeit auf dem Gebiet.

4. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans:

Die aus diesem Projekt erzielten Ergebnisse haben unser Verständnis über die Wirkung ionisierender Strahlen und ganz besonders Schwerionen erheblich bereichert. Die Information wird von Nutzen sein, um Strahlenschutzaspekte im Weltall Rationell zu bearbeiten und Verbesserungen zu entwickeln.

Karzinogenese ist eines der Hauptrisiken für Menschen im Weltraum. Aus diesem Hintergrund wurde von der europäischen Weltraumagentur (ESA) ein Programm initiiert, um die zugrunde liegenden biologischen Effekte der im Weltraum befindlichen und für die Strahlenschäden verantwortlichen Schwerionen und Protonen mechanistisch zu untersuchen. Die hier geleisteten Arbeiten stellen einen Beitrag zu dieser Initiative dar. Als solches hat also einen direkten Bezug auf die förderpolitischen Ziele des Ministeriums, das die langfristigen Ziele von ESA durch die Gewinnung von wissenschaftlichen Erkenntnissen unterstützt.

5. des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen:

Es sind keine wesentlichen Fortschritte auf dem Gebiet bekannt geworden, die die Relevanz und Aktualität der hier durchgeführten Arbeiten in Frage stellen könnten. Auch sind keine Fortschritte bekannt geworden, die eine Umplanung des Projektes veranlassen könnten.

6. der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 6:

1. Singh SK, Bencsik-Theilen, A., Jacob B, Taucher-Scholz G, Iliakis G

Reduced contribution of thermally labile sugar lesions to DNA double strand break formation after exposure to heavy ions.

Submitted to BMC-Radiation Oncology, December 15, 2012

2. Singh SK, Wu W, Stuschke M, Bockisch A, Iliakis G

Reduced Contribution of Thermally-Labile Sugar Lesions to DNA Double-Strand Break Formation after Exposure to Neutrons.

Radiat Res 2012, 178: 581-590

3. Singh SK, Wang M, Staudt C, Iliakis G

Post-irradiation chemical processing of DNA damage generates double-strand breaks in cells already engaged in repair.

Nucleic Acids Res 2011, 39: 8416-8429

4. Singh SK, Bednar T, Zhang L, Wu W, Mladenov E, Iliakis G

Inhibition of B-NHEJ in Plateau-Phase Cells Is Not a Direct Consequence of Suppressed Growth Factor Signaling.

Int J Radiation Oncol Biol Phys, doi:10.1016/j.ijrobp.2012.03.060

5. Stankova K, Ivanova K, Mladenov E, Rosidi B, Sharma A, Boteva R, Iliakis G

Conformational transitions of proteins engaged in DNA double-strand break repair, analysed by tryptophan fluorescence emission and FRET.

Biochem J 2012, 443: 701-709

6. Manova VI, Singh SK, Iliakis G

Processing of DNA double strands breaks by alternative non-homologous end-joining in hyperacetylated chromatin.

Genome Integrity 2012, 3:4 doi:10.1186/2041-9414-3-4

III. Erfolgskontrollbericht

„Über die Rolle von „backup“ Reparaturwegen der nichthomologen Endverknüpfung (NHEJ) in Schwerionen Karzinogenese“

Förderkennzeichen: 50 WB0929

Projektleitung:

Prof. Dr. G. Iliakis

Universitätsklinikum Essen

Institut für Med. Strahlenbiologie

- 1. Den Beitrag des Ergebnisses zu den förderpolitischen Zielen, z.B. des Förderprogramms (ggf. unter Angabe des Schwerpunkts) – soweit dies möglich ist.**

Karzinogenese ist eines der Hauptrisiken für Menschen im Weltraum. Es ist deshalb sehr wichtig, die zugrunde liegenden Mechanismen in ihren molekularen Einzelheiten zu verstehen. Aus diesem Hintergrund und als zentrale Vorbereitung für bemannte Weltraumflüge, wurde von der europäischen Weltraumagentur (ESA) ein Programm initiiert, um die zugrunde liegenden biologischen Effekte der im Weltraum Befindlichen und für die Strahlenschäden verantwortlichen Schwerionen und Protonen mechanistisch zu untersuchen.

Das vorliegende Projekt stellt einen Beitrag zu dieser Initiative dar. Als solches hat also einen direkten Bezug auf die förderpolitischen Ziele des Ministeriums, das die langfristigen Ziele von ESA durch die Gewinnung von wissenschaftlichen Erkenntnissen unterstützt.

- 2. Das wissenschaftlich-technische Ergebnis des Vorhaben, die erreichten Nebenergebnisse und die gesammelten wesentlichen Erfahrungen:**

Das Vorhaben hat die Hypothese getestet, dass Schwerionen Karzinogenese über die Fehlreparatur von DNA Doppelstrangbrüchen (DSB) verursacht wird. Es wurde mit besonderem Nachdruck der Beitrag auf Fehlreparatur eines neuen von uns beschriebenen „backup“ Reparaturweges der nichthomologen Endverknüpfung (B-NHEJ) nach Schwerionenbestrahlung untersucht. Die erzielten Ergebnisse zeigen deutliche Verschiebungen in der chemischen Identität der Strahlenläsionen mit steigendem LET, wie auch Verschiebungen in dem Einsatz verschiedener DNA DSB Reparaturwege.

Insbesondere, es wurde gezeigt dass:

1. Läsionen, die über D-NHEJ prozessiert werden, wenig zum Zellüberleben nach Exposition zu Hoch-LET-Strahlung beitragen.
2. Die Reparatur über D-NHEJ von durch Hoch-LET-Strahlung induzierten DSBs erschwert ist, verglichen mit der Reparatur durch den gleichen Reparaturweg von durch Röntgenstrahlung erzeugten DSBs.
3. Die höhere Komplexität des Strahlenschadens DSB Reparatur über B-NHEJ stärker als über D-NHEJ beeinträchtigt.
4. Die höhere Komplexität des Strahlenschadens den Anteil von über hitzelabilen Läsionen induzierten DSBs reduziert.
5. Es sehr wahrscheinlich ist, dass Hoch-LET-Strahlung DSB Reparatur zu HRR verschiebt.

3. Die Fortschreibung des Verwertungsplans. Dieser soll, soweit im Einzelfall zutreffend, Angaben zu folgenden Punkten enthalten (Geschäftsgeheimnisse des Zuwendungsempfängers brauch nicht offenbart zu werden). Planung und Ablauf des Vorhabens:

Erfindungen/Schutzrechtsanmeldungen und erteilte Schutzrechte, die vom Zuwendungsempfänger oder von am Vorhaben Beteiligten gemacht oder in Anspruch genommen wurden, sowie deren standortbezogene Verwertung (Lizenzen u.a.) und erkennbare weitere Verwertungsmöglichkeiten),

KEINE

Wirtschaftliche Erfolgsaussichten nach Projektende (mit Zeithorizont) – z.B. auch funktionale/wirtschaftliche Vorteile gegenüber Konkurrenzlösungen, Nutzen für verschiedene Anwendergruppen/-industrien am Standort Deutschland, Umsetzungs- und Transferstrategien (Angaben, soweit die Art des Vorhabens dies zulässt),

NICHT RELEVANT

Wissenschaftliche und/oder technische Erfolgsaussichten nach Projektende (mit Zeithorizont) – u.a. wie die geplanten Ergebnisse in anderer Weise (z.B. für öffentliche Aufgaben, Datenbanken, Netzwerke, Transferstellen etc) genutzt werden können. Dabei ist auch eine etwaige Zusammenarbeit mit anderen Einrichtungen, Firmen, Netzwerken, Forschungsstellen u.a. einzubeziehen,

Das Projekt wurde in enger Zusammenarbeit mit der Biophysikabteilung der GSI durchgeführt, die die für dieses Projekt notwendigen Schwerionen, nach

den besonderen Anforderungen der geplanten Experimente, zur Verfügung gestellt hat. Sehr hilfreich für die erfolgreiche Durchführung des Projektes war auch die Zusammenarbeit mit der Klinik für Strahlentherapie, wie auch der Klinik für Nuklear Medizin am UK-Essen.

Aus dem Projekt sind wichtige Erkenntnisse gewonnen, die zu einem Anschlussprojekt mit ESA geführt haben. In dieser Hinsicht soll das vorliegende Projekt als sehr erfolgreich angesehen werden.

Wissenschaftliche und wirtschaftliche Anschlussfähigkeit für eine mögliche notwendige nächste Phase bzw.

Wie oben bereits aufgeführt, sind aus dem Projekt wichtige Erkenntnisse gewonnen worden, die zu einem Anschlussprojekt mit ESA geführt haben.

4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben,

Es gab keine Arbeiten die zu keiner Lösung geführt haben.

5. Präsentationsmöglichkeiten für mögliche Nutzer – z.B. Anwenderkonferenzen (Angaben, soweit die Art des Vorhabens dies zulässt),

Die im Rahmen dieses Projektes gewonnenen Ergebnisse sind bereits und werden auch in die Zukunft über verschiedene Schienen von Konferenzen verbreitet.

6. Die Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung.

Ausgaben und Zeitplanung wurden wie geplant durchgeführt.

Berichtsblatt

| | |
|--|---|
| 1. ISBN oder ISSN Noch nicht bekannt | 2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht |
| 3. Titel Über die Rolle von „backup“ Reparaturwegen der nichthomologen Endverknüpfung (NHEJ) in Schwerionen Karzinogenese | |
| 4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Iliakis, George | 5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.05.2012 |
| | 6. Veröffentlichungsdatum |
| | 7. Form der Publikation |
| 8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Universitätsklinikum Essen Institut für Med. Strahlenbiologie Hufelandstraße 55 45147 Essen | 9. Ber. Nr. Durchführende Institution |
| | 10. Förderkennzeichen 50 WB0929 |
| | 11. Seitenzahl 20 |
| 12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie 53107 Bonn | 13. Literaturangaben 6 Publikationen |
| | 14. Tabellen keine |
| | 15. Abbildungen 5 |
| 16. Zusätzliche Angaben | |
| 17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) Prof. Dr. George Iliakis, Essen, 15.01.2013 | |
| 18. Kurzfassung Karzinogenese ist eines der Hauptrisiken für Menschen im Weltraum. Es ist deshalb sehr wichtig, die zugrunde liegenden Mechanismen in ihren molekularen Einzelheiten zu verstehen. Aus diesem Hintergrund und als zentrale Vorbereitung für bemannte Weltraumflüge, wurde von der europäischen Weltraumagentur (ESA) ein Programm initiiert, um die zugrunde liegenden biologischen Effekte der im Weltraum befindlichen und für die Strahlenschäden verantwortlichen Schwerionen mechanistisch zu untersuchen. Als Teil dieser Initiative, testet dieses Vorhaben die Hypothese, dass Schwerionen Karzinogenese über die Fehlreparatur von DNA Doppelstrangbrüchen (DSB) über einen neuen von uns beschriebenen „backup“ Reparaturweg der nichthomologen Endverknüpfung (B-NHEJ) verursacht wird. Der Arbeitsplan testete: 1. Den Beitrag von B-NHEJ auf die Reparatur von DSB als Funktion des linearen Energietransfers (LET) der verwendeten, ionisierenden Strahlenart. 2. Den Beitrag der homologen Rekombinationsreparatur (HRR) auf die Prozessierung von DSB als Funktion des LET. Die Untersuchungen haben folgende neue Erkenntnisse erbracht: 1. Läsionen, die über NHEJ prozessiert werden tragen wenig zum Zellüberleben nach Exposition zu Hoch-LET-Strahlung. 2. Die Reparatur über NHEJ von durch Hoch-LET-Strahlung induzierten DSB ist erschwert verglichen mit der Reparatur von durch Röntgenstrahlung erzeugten DSB. 3. Die höhere Komplexität des Strahlenschadens beeinträchtigt DSB Reparatur über B-NHEJ stärker als über NHEJ und reduziert den Anteil von über hitzelabilen Läsionen induzierten DSB. 4. Hoch-LET-Strahlung könnte DSB Reparatur zu HRR verschieben. Die aus diesem Projekt erzielten Ergebnisse bereichern unser Verständnis über die Wirkung ionisierender Strahlen und ganz besonders Schwerionen auf Säugetierzellen. Die Information wird von Nutzen sein, um Strahlenschutzaspekte im Weltall Rationell zu bearbeiten und Verbesserungen zu entwickeln. | |
| 19. Schlagwörter Strahlenschutz; Weltraum; Ionisierende Strahlung; Schwerionen; DNA Reparatur; Doppelstrangbruchreparatur | |
| 20. Verlag | 21. Preis |

Document Control Sheet

| | | |
|---|--|---------------------|
| 1. ISBN or ISSN Not known yet | 2. type of document (e.g. report, publication) Report | |
| 3. title Studies on the role of backup pathways of non-homologous end joining in heavy ion carcinogenesis | | |
| 4. author(s) (family name, first name(s)) Iliakis, George | 5. end of project 31.05.2012 | 6. publication date |
| | 7. form of publication | |
| | 9. originator's report no. | |
| 8. performing organization(s) (name, address) University of Duisburg-Essen Medical School Institute for Medical Radiation Biology Hufelandstraße 55 45147 Essen | 10. reference no. 50 WB0929 | |
| | 11. no. of pages 20 | |
| | 13. no. of references 6 | |
| 12. sponsoring agency (name, address) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn | 14. no. of tables no | |
| | 15. no. of figures 5 | |
| | 16. supplementary notes | |
| 17. presented at (title, place, date) Prof. Dr. George Iliakis, Essen, 15.01.2013 | | |
| 18. Abstract Cancer is the main health risk during space travel. It is therefore important to understand the mechanisms of carcinogenesis in their molecular details. From this background and as key preparation for manned flights, the European Space Agency (ESA) initiated a program aiming at the mechanistic characterization of the biological effects of heavy ions present in space. This proposal is part of this initiative and tests the hypothesis that heavy ion carcinogenesis derives from error-prone repair of DNA double strand breaks (DSB) through the function of a new DSB repair pathway that we recently described and termed backup non-homologous end-joining (B-NHEJ). The work plan was aiming to test: 1. The contribution of B-NHEJ in the repair of DSB as a function of the linear energy transfer (LET) of the radiation used. 2. The contribution of homologous recombination repair (HRR) in the processing of DSB as a function of radiation LET. The experiments performed allow the following conclusions: 1. Lesions processed by classical NHEJ have only a small contribution to high LET radiation killing. 2. Repair of DSB through classical NHEJ is compromised after exposure to high LET radiation, as compared to X-ray exposure. 3. The increased complexity of radiation damage generated by exposure to high LET radiation compromises repair of DSB by B-NHEJ and reduces the proportion of DSB that are generated through the conversion to DNA breaks of heat labile sites. 4. High LET radiation may shift DSB repair towards HRR. These results improve our understanding of the action of ionizing radiation in general and of heavy ions in particular on mammalian cells. It is expected that the generated information will be useful for the rational development of improvements for radiation protection during space travel. | | |
| 19. keywords Radiation Protection; Space; Ionizing Radiation; Heavy Ion; DNA Repair; Double Strand Break Repair | | |
| 20. publisher | 21. price | |