

Universitätsklinikum Essen
Institut für Medizinische Strahlenbiologie
Prof. Dr. phil. nat. G. Iliakis

Fachlicher Schlussbericht für das Projekt

„COLLAR: Komplexe DNA-Läsionen und deren Bedeutung auf die zelluläre Antwort nach Bestrahlung“

Förderkennzeichen:

02NUK043B

Laufzeit des Vorhabens

01.07.2015 bis 31.12.2020

Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) unter dem Förderkennzeichen 02NUK043B gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.



 Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

I. Kurze Darstellung zum Vorhaben

1. Aufgabenstellung

Das Institut für Medizinische Strahlenbiologie des Universitätsklinikums Essen erforscht verschiedene Fragestellungen auf dem Gebiet der DNA Doppelstrangbruch (DSB) Reparatur. Der DSB gilt unter einer Vielzahl von Läsionen, die durch ionisierende Strahlung hervorgerufen werden, im Falle einer fehlerhaften oder fehlenden Reparatur als die Ursache von Zelltod, Transformation oder Mutation. In Zellen höherer Eukaryoten können DSBs durch verschiedene Reparaturwege beseitigt werden, die unterschiedliche Effizienzen sowie Reparaturgenauigkeiten aufweisen. Die Wahl des Reparaturweges hängt neben anderen Faktoren stark von der Komplexität des DSBs ab.

Ziel dieses Vorhabens war es zu untersuchen inwiefern das Ausmaß der DSB-Komplexität einen Einfluss auf die Wahl des Reparaturweges, die Erzeugung von Verarbeitungsfehlern und die Aktivierung von Kontrollpunkten im Zellzyklus ausübt. Vor allem die höchst gefährliche Form der DNA-Schädigung, die DSB-Cluster, die ein besonders hohes Risiko für eine fehlerhafte Reparatur aufweisen und damit schließlich zum Zelltod oder zu genomischer Instabilität führen, sollten im Fokus der Untersuchungen stehen.

Die Klinik für Strahlentherapie am Universitätsklinikum Essen ist spezialisiert auf die Behandlung von vorrangig Krebspatienten mit ionisierender Strahlung. Eine erhöhte DSB-Komplexität kann ebenso durch die Kombination von ionisierender Strahlung und Cisplatin (CP) erreicht werden, welches eines der erfolgreichsten Chemotherapeutika in der Krebstherapie ist und oft mit Bestrahlung kombiniert wird. Das Ziel dieses Vorhabens war ebenso häufig auftretende CP-Resistenzen und die sie beeinflussenden Faktoren zu untersuchen, da sie in der klinischen Anwendung ein zentrales Problem darstellen.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Bereits in der Vergangenheit stand DSB-Clustering unter Verdacht die Hauptursache vieler irreversibler Effekte ionisierender Strahlung zu sein. Dies konnte aber nicht experimentell getestet werden, sondern lediglich indirekt mithilfe mathematischer Modellierung von zellulären Überlebens- und DSB-Reparatur-Daten ermittelt werden. Im Rahmen eines in der Vergangenheit vom BMBF/KVSF geförderten Projektes konnte ein auf Restriktionsendonukleasen (RE)-basierendes System entwickelt werden, das Aussichten auf vielversprechende Antworten auf die Frage des Einflusses der DSB-Komplexität gab. In diesem Ansatz wurden DSBs durch die I-SceI Endonuklease erzeugt. Die Erkennungssequenz von I-SceI kommt in dem Genom der Zellen höherer Eukaryoten nicht vor, weshalb dieses System die Möglichkeit bietet durch gezieltes Einsetzen solcher Erkennungssequenzen in einer kontrollierten Art und Weise DSBs in unterschiedlichen Konstellationen zu erzeugen. Die Erkennungssequenzen wurden durch Integration entsprechend konstruierter Vektoren in die Genome der Testzellen eingefügt. Die eigentliche Erzeugung der Brüche wurde dann durch eine transiente Transfektion eines die Nuklease kodierenden Vektors ermöglicht. Um die DSB-Komplexität und die Imitation der ionisierenden Strahlung besser nachahmen zu können, wurde die Anzahl der Integrationen im Genom mithilfe des „Sleeping beauty“-Transposons erhöht. In dem hier vorliegenden Projekt sollte dieser Ansatz weiterentwickelt werden und der Einfluss der DSB-Cluster-Komplexität auf die Erzeugung von Verarbeitungsfehlern untersucht werden.

Im Rahmen der patientenbezogenen Strahlentherapie für fortgeschrittene Lungentumore gilt eine Hochdosis-Strahlentherapie mit kombinierter CP-haltiger Chemotherapie als die Standardtherapieoption. Dennoch bleibt die 5-Jahre-Überlebensrate von Patienten mit Lungenkrebs unter 15 % und ist die Hauptursache von Krebstodesfällen weltweit. Häufig bildet die Entwicklung von Resistenzen gegenüber CP eine große Einschränkung in dieser Form der Krebs-Chemotherapie. Solche Resistenzen hängen von vielen Faktoren, wie z.B. der DNA Reparatur, ab, die ihrerseits von der Zugänglichkeit des Schadens abhängig

ist. In diesem Vorhaben sollte daher die Wirkung von CP auf durch ionisierende Strahlung induzierte Kontrollpunktaktivierung, die Wahl der Reparaturwege, genomische Instabilität und Strahlenempfindlichkeit in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzelllinien (NSCLC) untersucht werden, um sowohl die anfängliche Tumorantwort zu verbessern als auch die erworbene Arzneimittel- oder Strahlenresistenz zu überwinden.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Um die oben genannten Arbeiten auf die nächste Stufe voranzutreiben haben wir folgende Aufgaben bearbeitet:

1. Bereits vorhandene klonale CHO Zelllinien mit Integrationen des Systems zur Induktion von DSB-Clustern sollten um Klone mit zusätzlichen Integrationen erweitert werden. Das System sollte in eine immortalisierte humane Fibroblasten-Zelllinie eingebracht und eine Batterie an Klonen mit unterschiedlicher Anzahl von Integrationen generiert werden. Der Einfluss der DSB-Cluster auf das Zellüberleben in sämtlichen klonalen Zelllinien sollte getestet werden. Der Einfluss von DSB-Clustern auf die Entstehung von chromosomalen Aberrationen sollte bestimmt werden. Die Einwirkung von DSB-Clustern auf die genomische Stabilität sollte anhand der Detektion einer Vielzahl genomischer Veränderungen durch Next Generation Sequencing (NGS) untersucht werden. Der Einfluss der Abstände zwischen den I-SceI Sites auf die Letalität des Clusters sollte geprüft werden. Die Auswirkung von DSB-Clustern mit inkompatiblen Enden, sowie der Resektion auf die Zellletalität sollte ermittelt werden.

2. Parameter für eine regulierte Aktivierung der I-SceI Restriktionsendonuklease im Zellkern sollten ermittelt werden. Dafür sollten die Expression von mit Glucocorticoid-Rezeptor- (GCR) und Destabilisierungsdomänen (DD) gekoppelter I-SceI Proteine in Abhängigkeit der Konzentrationen der jeweiligen Liganden und ihrer Inkubationszeiten und die daraus resultierende Induktion von DSB gemessen werden. Im Folgenden sollte das System zur induzier- und regulierbaren Expression von I-SceI in die im Rahmen von UDE-1 (s. 1.) generierten Zelllinien, die bereits Integrationen des Systems zur Induktion von

DSB-Clustern durch I-SceI enthalten, eingebracht werden. Dies sollte eine bessere zeitliche Kontrolle der DSB Induktion ermöglichen und es erlauben, den Prozess der Transfektion und den damit verbundenen Stress für die Zellen zu vermeiden. In den so erzeugten modifizierten Zellklonen sollten dann ebenfalls das Zellüberleben, die Bildung von Chromosomenaberrationen (CAs), sowie weitere genomische Alterationen (NGS) in Folge der Induktion von DSB-Clustern untersucht werden.

3. Mögliche Parameter für die CP- und Strahlenresistenz sollten gesucht und Strategien entwickelt werden um diese zu umgehen. Hierzu sollten die Wirkung von CP und IR induzierten komplexen DNA Schäden auf die Kontrollpunkt-Aktivierung im Zellzyklus, die Wahl der Reparaturwege, genomische Instabilität und Strahlenempfindlichkeit in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzelllinien (NSCLC) bewertet werden. Die Beziehung zwischen diesen funktionellen Endpunkten und möglichen Prädiktoren (Aktivierung unterschiedlicher Reparaturwege, Zellzyklusphasenabhängigkeit, Akkumulation residualer Schäden während fraktionierter Bestrahlung, die Chromatinstruktur, d.h. Histonmodifizierungen und EGFR Status der Zellen) sollten analysiert werden.

4. Angaben zum wissenschaftlichen und technischen Stand, an den angeknüpft wurde, insbesondere Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden, Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der nutzten Informations- und Dokumentationsdienste

In welchem Maß die Komplexität eines DSBs die Wahl des Reparaturweges, die Erzeugung von Verarbeitungsfehlern und die Aktivierung von Kontrollpunkten im Zellzyklus beeinflusst war bisher unbekannt. Vor allem die gefährlichste Form, die DSB-Cluster, zeigen ein besonders hohes Risiko für eine fehlerhafte Reparatur und einen damit einhergehenden Zelltod oder genomische Instabilität. Für die hier geplanten Untersuchungen wurde auf ein bereits zuvor entwickeltes

System zurückgegriffen. Die DSBs wurden dabei mit der I-SceI Endonuklease in klonalen CHO (*chinese hamster ovary*) Zelllinien gezielt induziert und somit DNA-Schäden verschiedener Komplexitäten erzeugt. Dieses System sollte um humane Zelllinien (A549, RPE-1 hTert und 82-6 hTert) erweitert werden, die dann zusammen mit dem bereits vorhandenen CHO Zelllinien als Basis aller im Projekt geplanten Untersuchungen dienen sollten. Ebenso sollten diese Zelllinien zusammen mit den NSCLC zur Untersuchung der CP-Resistenzen genutzt werden.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Während der Projektdauer gab es regen Zusammenarbeit und Informationsaustausch zwischen den partizipierten Gruppen. Darüber hinaus wurde mit folgenden Stellen und Personen ebenfalls zusammengearbeitet:

- Department of Radiation Oncology und Helen Diller Family Cancer Center, University of California San Francisco, in San Francisco, Kalifornien, USA (Mary Helen Barcellos-Hoff, Qi Liu, Jade Moore, Ines Guix und John Murnane)
- Biological Systems and Engineering Division, Berkeley Biomedical Data Science Center, Lawrence Berkeley National Laboratory, in Berkeley, Kalifornien, USA (Jian-Hua Mao)
- Clinical Research Division, Fred Hutchinson Cancer Research Center, in Seattle, Washington, USA (Amanda G Paulovich, Jeffrey R Whiteaker und Richard G Ivey)
- ProCURE, Catalan Institute of Oncology, Oncobell, Bellvitge Institute for Biomedical Research (IDIBELL), L'Hospitalet del Llobregat, in Barcelona, Spanien (Roderic Espín, Alvaro Aytés und Miquel Angel Pujana)
- Institute of Cancer Sciences and Beatson West of Scotland Cancer Centre, University of Glasgow, in Glasgow, Schottland, Vereinigtes Königreich (Anthony J Chalmers)
- Radiation Research Program (RRP) / Molecular Pharmacology Branch / Cancer Therapy Evaluation Program, Division of Cancer Treatment and Diagnosis, NCI/NIH, in Rockville, Maryland, USA (Mansoor Ahmed und C Norman Coleman/Beverly A Teicher/Richard L Piekarz)

- Department of Radiation Oncology, Rush University Medical Center, in Chicago, Illinois, USA (Dian Wang)
- Institut für Zellbiologie, Universitätsklinikum Essen, Deutschland (Jürgen Thomale)

Nationale und internationale Treffen wie die Jahrestagungen der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung (GBS), der European Radiation Research Society (ERRS) und der Radiation Research Society (RRS) wurden zur Diskussion und zum Austausch der Ergebnisse genutzt. Des Weiteren fand während des ganzen Projektzeitraums eine stetige Zusammenarbeit zwischen den beteiligten Forschergruppen in Form von regelmäßigen Treffen statt. Dabei wurden die neuesten Ergebnisse der Projekte in Form von Vorträgen präsentiert und untereinander kritisch diskutiert.

II. Eingehende Darstellung

Die hier berichteten Ergebnisse wurden in drei Doktorarbeiten eingehend beschrieben. Die direkt relevanten Doktorarbeiten sind als Appendizes diesem Bericht angehängt.

Dabei handelt es sich um:

Appendix 1:

Chaudhary, S. Promotion zum Dr. rer. nat.: DSB clusters impair the efficiency of both homologous recombination and c-NHEJ and initiate Rad52 dependent error prone processing

Appendix 2:

Hasan, MSM. Promotion zum Dr. rer. nat.: Regulated systems of I-SceI expression for in-depth studies of the biological effects of DSBs and DSB clusters

Appendix 3:

Erol, YB. angestrebte Promotion zum Dr. rer. nat.: The effect of increased DSB complexity generated by combined treatment with cisplatin and IR on the radiosensitization of lung cancer cell lines

Die Wichtigsten Befunde als Stichpunkte aufgelistet:

- Erhöhte Komplexität der DSBs führt zu vermehrter Bildung von chromosomalen Aberrationen und Deletionen
- C-NHEJ ist hauptsächlich an der Reparatur von einfachen DSBs beteiligt, wohingegen DNA-Endresektion, HRR und SSA vor allem bei komplexen Läsionen wichtig werden
- Unterschiede in Radiosensibilisierung in Kombination mit CP verschiedener NSCLCs – Kategorisierung in sensitive und resistente Zelllinien
- CP vermindert γ -H2AX, 53BP1 und Rad51 Foki – aber keine Unterschiede zwischen sensitiven und resistenten Zelllinien
- Sensibilisierung durch Mirin in Kombination mit CP in resistenten Zelllinien (kein Effekt in sensitiven) gemessen an cNHEJ (53BP1 Foki), HR (Rad51 Foki) und CP-Addukt Bildung
- Dieselben Experimente in nicht-transformierten Zellen zeigten keine Sensibilisierung

Es folgt eine zusammengefasste Darstellung der wichtigsten Ergebnisse und Befunde mit Verweisen zum Appendix, in dem mehr Informationen bereitstehen.

1. Erzielte Ergebnisse

zu 1.

Die bereits vorhandenen CHO-Zelllinien mit Integrationen des I-SceI-Konstrukts zur Induktion von DSB mit unterschiedlicher Komplexität (DSB-Cluster) wurden um weitere Klone ergänzt. Außerdem wurde dieses System auch in humane Zelllinien überführt. Somit konnte basierend auf der humanen Tumorzelllinie A549 wie auf immortalisierten, humanen normalen Zelllinien (RPE-1 hTert, epithelial und 82-6 hTert, Fibroblasten) eine ganze Reihe von Klonen mit Integrationen hergestellt werden. Diese Zelllinien enthalten nun Konstrukte mit I-SceI Schnittstellen in folgenden Konfigurationen: Ein Konstrukt mit je zwei I-SceI Schnittstellen mit entweder 50, 100 oder 200 bp Abstand zwischen den

Erkennungssequenzen, oder ein Konstrukt mit je vier I-SceI Schnittstellen mit 200, 62 und 200 bp Abstand zwischen den Erkennungssequenzen.

Die Analyse von γ H2AX und 53BP1 Foki wies nach, dass die transiente Expression von I-SceI in den transgenen RPE-1 Zellen zur Erzeugung von DSBs führte, deren Anzahl nahezu perfekt mit der Anzahl der γ H2AX- und 53BP1-Foki übereinstimmte. Zusätzlich wurden die Klone hinsichtlich des Überlebens nach DSB Induktion untersucht. Dabei konnten wir feststellen, dass das Zellüberleben mit zunehmender Komplexität des DNA Schadens abnahm. Die stärksten Effekte traten dabei in Zelllinien auf, in denen die Expression von I-SceI zur Ausbildung eines Clusters von vier DSBs führte.

In Übereinstimmung mit den Überlebensergebnissen stieg auch die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung von Chromosomenaberrationen mit der Komplexität der DSB Cluster, was auch mit mFISH Experimenten gezeigt werden konnte. Interessanterweise spielt hierbei die Distanz zwischen den induzierten Brüchen insofern eine wesentliche Rolle, als dass ein Cluster mit einer Distanz von der Länge eines Nukleosoms toxischer ist, als ein Konstrukt mit zwei eng beieinanderliegenden DSBs. Im weiteren Verlauf der Experimente konnten wir zeigen, dass zusätzlich zu der Distanz zwischen den Brüchen ebenso die Orientierung der Schnittstellen/Erkennungssequenzen für I-SceI zueinander eine wichtige Rolle hinsichtlich der Komplexität spielt.

Um die Bedeutung verschiedener Reparaturwege auf die Reparatur von DSB-Clustern zu untersuchen, wurde das Modellsystem in verschiedene, bereits vorhandene Reparatur-defiziente CHO Mutanten integriert. Parallel wurde mit Hilfe der CRISPR/Cas9 Technologie unter Einsatz des Astrios Zellsorters an der Generierung eines Panels von humanen K.O.-Zelllinien für zentrale Reparatur- und Signalproteine gearbeitet, in die im Weiteren das Modellsystem integriert werden sollte.

Die Verwendung verschiedener Inhibitoren sowie von Klonen, die in DNA-PKcs oder Ku80 (Komponenten von c-NHEJ) mutiert sind, zeigte, dass c-NHEJ eine wichtige Rolle bei der Reparatur vor allem von einfachen Brüchen spielt. Eine erhöhte Sensitivität in klonogenen Überlebenstests der Klone mit einzelnen DSBs in Kombination mit zusätzlichem RNF8/RNF168-Knockdown bestätigt

dies. Im Gegensatz dazu konnte unter diesen Bedingungen keine signifikante Verschlechterung des Überlebens in Klonen mit komplexen DSB-Clustern festgestellt werden. In zytogenetischen Untersuchungen konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden: chromosomale Translokationen stiegen um 50 % in Zellen mit einzelnen DSBs an, während in Zellen mit DSB-Clustern kein entsprechender Anstieg erfasst werden konnte. Mithilfe des NGS konnten wir feststellen, dass DSB-Cluster im Gegensatz zu einfachen DSBs eine höhere Wahrscheinlichkeit für die Deletionen größerer Bereiche aufweisen, was wiederum auf eine fehleranfällige Reparatur schließen lässt.

Untersuchungen der Effizienz der an sich fehlerfreien HRR hinsichtlich der Reparatur verschieden komplexer DSBs mittels Rad51-Foki in G2-Zellen zeigten eine erhöhte Beteiligung der HRR vor allem an komplexen DSBs. Im Verlaufe dieses Projekts konnten diese Analysen noch genauer mithilfe multiparametrischer quantitativer bildbasierter Hochdurchsatz-Zytometrie (QIBC) und eines Rad51-Knockdowns bestätigt werden. Weitere zytogenetische Untersuchungen untermauern diese Ergebnisse, da die Hemmung sowie die Herunterregulierung von Rad51 zu einer Erhöhung der Anzahl von Chromosomenbrüchen und Aberrationen vornehmlich bei DSB-Clustern höchster Komplexität (>60%) führt. Somit konnten wir zeigen, dass HRR eine sehr wichtige Rolle bei der Reparatur komplexer Läsionen einnimmt.

Für alle DSB-Reparaturwege mit Ausnahme des c-NHEJ spielt die DNA-Endresektion eine vorbereitende Rolle. Das Knockdown von CtIP, einem zentralen Faktor der Resektion, zeigt eine erhöhte Suppression der Aberrationen entstehend nach Induktion komplexer DSBs. Mithilfe des Rad52-Knockdowns (essentieller Faktor von SSA) und einem Rad52 Inhibitors wurde ebenfalls die Anhäufung von Chromosomenaberrationen abhängig von der Schadenskomplexität untersucht. Tatsächlich konnte eine Verringerung der Aberrationen, wie schon zuvor für CtIP, vor allem bei komplexen DSB-Clustern gezeigt werden und eine Beteiligung von SSA somit bestätigt werden. Vor allem SSA führt zu dem Verlust größerer DNA Bereiche, was hinsichtlich der NGS-Ergebnisse die Beteiligung des SSA an der Reparatur komplexer DSB-Cluster untermauert.

Hinsichtlich der Beteiligung und des Zusammenspiels mit der Resektion von alt-EJ wurde der an diesem Reparaturweg beteiligte Faktor PARP1 inhibiert. In Kombination mit c-NHEJ Mutanten wurde eine Erhöhung der Translokationen in Klonen mit Schnittstellen in reverser Orientierung zueinander gezeigt, wohingegen Klone mit Schnittstellen in direkter Orientierung einen Rückgang der Translokationen aufwiesen. Die Kombination mit CtIP-Knockdown jedoch zeigte einen dramatischen Anstieg von Aberrationen in allen Klonen, unabhängig der Komplexität. Der zugrundeliegende Mechanismus konnte noch nicht geklärt werden, wird aber aktuell intensiv erforscht.

Diese Ergebnisse werden detailliert in den Appendizes 1 und 2 beschrieben und zurzeit für die Veröffentlichung vorbereitet.

zu 2.

In diesem Teilprojekt wurde daran gearbeitet, ein induzierbares sowie degradierbares I-SceI Konstrukt stabil in die in UDE-1 verwendeten Klone einzubringen. Dies sollte eine bessere zeitliche Kontrolle der DSB Induktion ermöglichen und es erlauben, den Prozess der Transfektion und den damit verbundenen Stress für die Zellen zu vermeiden. In den so erzeugten modifizierten Zellklonen sollten dann ebenfalls das Zellüberleben, die Bildung von Chromosomenaberrationen (CAs), sowie weitere genomische Alterationen (NGS) in Folge der Induktion von DSB-Clustern untersucht werden.

Zunächst wurde ein durch die Zugabe von Glucocorticoid induzierbares System in einige der verwendeten CHO-Zelllinien eingebracht und getestet. In der Tat konnte die Induktion von DSBs durch die Zugabe von Glucocorticoid erreicht werden. Nach Abbruch der Induktion verschwanden die DSB innerhalb weniger Stunden. Erste Experimente mit diesem System bestätigten zudem die in UDE-1 gefunden Ergebnisse (erhöhtes Risiko für das Entstehen von Chromosomenaberrationen bei komplexen DSBs im Gegensatz zu einfachen DSBs). Leider kam es bei diesem System gelegentlich zum Verlust der Induzierbarkeit, was durch alternative Resistenzen als Selektionsmarker behoben werden konnte. In weiteren Experimenten haben wir jedoch die Kenntnis erlangt, dass eine Stimulation mit dem GCR-Liganden nicht wie beabsichtigt zur Translokation des Proteins in den Nukleus führt – was allerdings

eine grundlegende Voraussetzung für die Funktionalität des Systems darstellt. Daher haben wir zwei neue Plasmide für die stabile und induzierbare Expression von I-SceI entwickelt, die auf der Fusion von I-SceI mit einem Estrogenrezeptor (ER) und einer destabilisierenden Domäne (DD) basieren. Tatsächlich konnten wir die erfolgreiche Expression des chimären I-SceI-Proteins nach Transfektion von CHO-I-SceI-Zellen nachweisen und haben bestätigt, dass das Protein exklusiv nach Verabreichung der Liganden effizient in den Kern transloziert und dort I-SceI-Schnittstellen gezielt schneidet.

Die weitere stabile Integration dieses Konstrukts in die übrigen CHO und humanen Klone hat sich jedoch als problematisch erwiesen. Möglicherweise könnte die Expression von I-SceI ausgehend von den zur Integration transfizierten Plasmiden während der Selektionsphase gestört sein. Es ist uns bis zum Ende des Projekts leider nicht gelungen diese Problematik zu lösen und stabile Zelllinien, die die I-SceI Schnittstellen sowie das chimäre ER-I-SceI-DD-Protein enthalten, zu generieren.

Wir verwendeten daher die bereits vorhandenen Zelllinien in Kombination mit der transienten Transfektion mit dem induzierbaren Konstrukt und konnten im Zuge dessen ein Teilergebnis aus UDE-1, nämlich dass gruppierte DSBs überwiegend durch resektionsabhängige DSB-Reparaturpfade verarbeitet werden, bestätigen.

Dennoch sind wir davon überzeugt, dass die Suche und Generierung eines stabilen, induzierbaren Systems erheblichen Mehrwert für unsere zukünftigen Studien haben wird.

zu 3.

Um die kombinierte Strahlen- und CP-basierende Chemotherapie zu verbessern und möglicherweise auftretende Resistenzen zu umgehen, wurden zunächst verschiedene NSCLC Zelllinien charakterisiert, die im weiteren Verlauf als Grundlage für die Experimente dienen sollten. Dafür wurden Proliferationsversuche, Zellzyklusanalysen, Koloniebildungstests und die Analyse von CP-DNA Adduktbildung unter Verwendung verschiedener CP-Konzentrationen durchgeführt. Die Analyse verschiedener Reparaturfokibildungen sollte dabei zur Untersuchung der DSB Reparatur-

Signalkaskaden sowie –Wege dienen (γ -H2AX und 53BP1 für die Reparatur durch klassische nicht-homologe Endverknüpfung (*classical non-homologous end joining*, cNHEJ), Rad51 für Homologe Rekombinationsreparatur (*homologous recombination*, HR)).

Zunächst konnten die neun getesteten NSCLC Zelllinien anhand der Proliferationstests in für CP sensitive und resistente Zelllinien unterteilt werden. Koloniebildungsexperimente konnten diese Einteilung auch hinsichtlich der Radiosensitivierung in Kombination mit CP bestätigen. Um diese Beobachtungen mechanistisch zu untersuchen, wurde in allen Zelllinien die Bildung von γ -H2AX Foki nach Bestrahlung und Behandlung mit CP untersucht. Alle Zelllinien zeigten eine Reduktion in der γ -H2AX Foki Bildung, was zuvor publizierte Ergebnisse der Gruppe bestätigte. Genauso wurde auch eine Reduktion der Bildung von Rad51 Foki beobachtet. Jedoch konnten keine Unterschiede zwischen sensitiven und resistenten Zelllinien gefunden werden. Ebenso konnte keine Korrelation zwischen der Sensitivierung und der Bildung von CP-Addukten aufgezeigt werden.

Als weiterer Anhaltspunkt wurde der MRE11 Inhibitor Mirin eingesetzt, welcher die Radiosensibilisierung der zuvor als resistent klassifizierten Zelllinien deutlich erhöhen konnte. In sensitiven Zelllinien zeigt er hingegen keinen additiven Effekt. Auch hier wurden daraufhin die Bildung der Reparaturfoki in Kombination mit Mirin untersucht. Vor allem in den resistenten Zelllinien konnte eine deutliche Reduktion von 53BP1 Foki als Maß für die cNHEJ Effizienz beobachtet werden. Auch dieser Effekt konnte nur in den resistenten NSCLC Zelllinien gefunden werden. Dieselben Ergebnisse wurden auch für die Bildung von Rad51 Foki, die die DSB Reparatur durch HR repräsentieren, sowie für die Bildung von CP-Addukten erzielt.

Schlussendlich wurden zur Kontrolle neonatale und adulte Hautfibroblasten, die nicht transformierte Zellen im Gegensatz zu den NSCLC Zelllinien darstellen, für dieselben Experimente verwendet. Interessanterweise, zeigt die Kombination von Mirin und CP keine Verschlechterung des Zellüberlebens nach Bestrahlung, sondern verbessert dieses sogar leicht. Auch die anderen, zuvor beschriebenen

Messendpunkte zeigten im Gegensatz zu den NSCLC Zelllinien keine Effekte durch die Verwendung von Mirin in Kombination mit CP.

Alles in allem konnten wir zeigen, dass MRE11 Inhibierung großes Potenzial hat als Target für die Sensibilisierung von Tumorzellen auf die kombinierte Therapie mit CP und ionisierender Strahlung hat, ohne einen negativen Einfluss auf gesundes Gewebe auszuüben. Trotzdem müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die hier gefundenen Ergebnisse weiter im Detail aufzuklären.

Diese Ergebnisse werden detailliert in Appendix 3 beschrieben.

2. Notwendigkeit der geleisteten Arbeit und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Das Projekt hatte zwei Ziele: 1. die wissenschaftlichen Kenntnisse der Strahlenwirkung mit Fokus auf die Komplexität des Schadens zu vertiefen und, 2. die gezielte Ausbildung von Studenten um die Kompetenz auf dem Gebiet der Wirkung ionisierender Strahlen zu fördern.

Die Schadensreparatur spielt eine zentrale Rolle in der Strahlenforschung, da das Erbgut des Menschen schädigende Faktoren für die DNA wie Umweltgiften oder Strahlung ausgesetzt ist. Neben einer Vielzahl an unterschiedlichen DNA Schäden können speziell durch ionisierende Strahlung DNA Doppelstrangbrüche (DSB) entstehen, die besonders schwierig zu reparieren sind und daher besonders schwerwiegende Läsionen darstellen. Werden DSBs nicht oder falsch repariert, bewirken sie entweder den Zelltod oder sind die Grundlage von genetischen Veränderungen, die sich destabilisierend auf das Genom auswirken und zu Langzeiteffekten wie Krebsentstehung führen können. Die hier untersuchten Auswirkungen der Schadenskomplexität steht in starkem Zusammenhang mit der Strahlentherapie zur Behandlung von Tumoren, sowie deren Auswirkungen auf eine erfolgreiche Behandlung in Kombination mit der CP-basierenden Chemotherapie. Ein genaues mechanistisches und quantitatives Verständnis der Effekte verschiedener Komplexitäten auf die Reparaturvorgänge ist deshalb sowohl für die Risikovorhersage, als auch für

gezielte Eingriffsmöglichkeiten zur Modifizierung der Strahlenwirkung und der Krebstherapie notwendig.

Entsprechend führte dieses Projekt in seiner Laufzeit zur Ausbildung von 3 Doktoranden, von denen 2 bereits mit der Promotion abgeschlossen haben und einer kurz vor dem Abschluss steht. Die dazugehörigen Dissertationen finden sich im Appendix 1 bis 3. Dadurch hat dieses Projekt die entsprechende Nachwuchsförderung und den Kompetenzerhalt in der Biologischen Strahlenforschung gewährleistet.

3. Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordene Ergebnisse anderer Stellen

Keine.

4. Erfolgte Veröffentlichungen

Chaudhary, S. Promotion zum Dr. rer. nat.: DSB clusters impair the efficiency of both homologous recombination and c-NHEJ and initiate Rad52 dependent error prone processing

Hasan, MSM. Promotion zum Dr. rer. nat.: Regulated systems of I-SceI expression for in-depth studies of the biological effects of DSBs and DSB clusters

Erol, YB. angestrebte Promotion zum Dr. rer. nat.: The effect of increased DSB complexity generated by combined treatment with cisplatin and IR on the radiosensitization of lung cancer cell lines

Schipler, A., Mladenova, V., Soni, A., Nikolov, V., Saha, J., Mladenov, E. and Iliakis, G.; Chromosome thripsis by DNA double strand break clusters causes enhanced cell lethality, chromosomal translocations and 53BP1-recruitment. *Nucleic Acids Res.* 2016 Sep 19;44(16):7673-90.

Riaz A. M., Sak A., Erol B. Y., Groneberg M., Melnikova M., Thomale J., Stuschke M.;Metformin potentiates radiosensitizing effect of cisplatin in NSCLC cells. *Strahlenther Onkol*, 2017 (Suppl) 193:S27.

Riaz A. M., Sak A., Erol B. Y., Groneberg M., Melnikova M., Thomale J., Stuschke M.; Combined effects of metformin and cisplatin on radiation sensitivity in non-small cell lung cancer cells. *Strahlenther Onkol*, 2018 (Suppl) 194:S100.

Soni A., Li F., Wang Y., Grabos M., Krieger LM., Chaudhary S., Hasan MSM., Ahmed M., Coleman CN., Teicher BA., Piekarz RL., Wang D., Iliakis GE. Inhibition of Parp1 by BMN673 Effectively Sensitizes Cells to Radiotherapy by Upsetting the Balance of Repair Pathways Processing DNA Double-Strand Breaks. *Mol Cancer Ther*, 17 (10), 2206-2216, Oct 2018.

Riaz A. M., Sak A., Erol B. Y., Groneberg M., Thomale J., Stuschke M. Metformin enhances the radiosensitizing effect of cisplatin in non-small cell lung cancer cell lines with different cisplatin sensitivities. *Sci Rep.* 2019 Feb 4;9(1):1282.

Iliakis G, Mladenova V., Sharif M., Chaudhary S., Mavragani I.V., Soni A., Saha J., Schipler A., Mladenov E.; Defined biological models of high-let radiation lesions. *Radiat Prot Dosimetry.* 2019 May 1;183(1-2):60-68.

Soni A., Murmann-Konda T., Magin S., Iliakis G. A Method for the Cell-Cycle-Specific Analysis of Radiation-Induced Chromosome Aberrations and Breaks. *Mutat Res*, 815, 10-19, May 2019.

Erol B. Y., Sak A., Riaz A. M., Groneberg M., Melnikova M., Thomale J., Stuschke M. Inhibition of Mre11 enhances radiosensitizing effect of cisplatin in NSCLC cell lines. *Strahlenther Onkol*, 2019 (Suppl 1) 195:S176.

Mladenov E., Fan X., Dueva R., Soni A., Iliakis G. Radiation-dose-dependent Functional Synergisms Between ATM, ATR and DNA-PKcs in Checkpoint Control and Resection in G2-phase. *Sci Rep*, 9 (1), 8255, 2019 Jun 4.

Sak A., Gronenberg M., Stuschke M.; DNA-dependent protein kinase: effect on DSB repair, G2/M checkpoint and mode of cell death in NSCLC cell lines. *Int J Radiat Biol.* 2019 Sep;95(9):1205-1219.

Mladenov E., Fan X., Paul-Konietzko K., Soni A., Iliakis G. DNA-PKcs and ATM Epistatically Suppress DNA End Resection and Hyperactivation of ATR-dependent G2-checkpoint in S-phase Irradiated Cells. *Sci Rep*, 9 (1), 14597, 2019 Oct 10.

Iliakis G., Mladenov E., Mladenova V.; Necessities in the Processing of DNA Double Strand Breaks and Their Effects on Genomic Instability and Cancer. *Cancers (Basel).* 2019 Oct 28;11(11).

Mladenov E., Staudt C., Soni A., Murmann-Konda T., Siemann-Loekes M., Iliakis G. Strong suppression of gene conversion with increasing DNA double-strand break load delimited by 53BP1 and RAD52. *Nucleic Acids Res* 48(4):1905-1924. 2020 Feb 28.

Soni A., Murmann-Konda T., Siemann-Loekes M., Pantelias G.E., Iliakis G. Chromosome breaks generated by low doses of ionizing radiation in G2-phase are processed exclusively by gene conversion. *DNA Repair (Amst).* 89:102828, 2020 May.

Li F., Mladenov E., Mortoga S., Iliakis G. SCFSKP2 regulates APC/C-CDH1-mediated degradation of CTIP to adjust DNA-end resection in G2-phase. *Cell Death Dis.* 11(7):548, 2020 Jul 18.

Liu Q., Palomero L., Moore J., Guix I., Espín R., Aytés A., Mao J-H., Paulovich A.G., Whiteaker J.R., Ivey R.G., Iliakis G., Luo D., Chalmers A.J., Murnane J., Pujana M.A., Barcellos-Hoff M.H. Loss of TGF beta signaling increases alternative end-joining DNA repair that sensitizes to genotoxic therapies across cancer types. *Sci Transl Med.*, 13(580):eabc4465, 2021 Feb 10.

Soni A., Mladenov E., Iliakis G. Proficiency in homologous recombination repair is prerequisite for activation of G2-checkpoint at low radiation doses. *DNA Repair (Amst).* 101:103076, 2021 May.

Iliakis G. New Players in the Regulation of DNA-PK Activity: Survivin Joins the Crowd. *Cancer Res.*, 81(9):2270-2271, 2021 May 1.

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN Noch nicht bekannt	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Tite Verbundprojekt: COLLAR: Komplexe DNA-Läsionen und deren Bedeutung für die zelluläre Antwort nach Bestrahlung	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Iliakis, George Krieger, Lisa Marie Magin, Simon Sak, Ali	5. Abschlussdatum des Vorhabens Dezember 2020
	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 02NUK043B
	11. Seitenzahl 477
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 489
	14. Tabellen 34
	15. Abbildungen 162
16. Zusätzliche Angaben	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)	
18. Kurzfassung Ziel dieses Vorhabens war es zu untersuchen inwiefern das Ausmaß der DSB-Komplexität einen Einfluss auf die Wahl des Reparaturweges und die Erzeugung von Verarbeitungsfehlern ausübt. Zudem sollten häufig auftretende Cisplatin-Resistenzen und die sie beeinflussenden Faktoren untersucht werden, da sie in der klinischen Anwendung im Rahmen der kombinierten Strahlen-Chemotherapie ein zentrales Problem darstellen. Dafür wurden zuvor entwickelte, I-Scel basierende Konstrukte verwendet und erweitert sowie verschiedene nicht-kleinzellige Lungenkarzinomzelllinien. Die wichtigsten Ergebnisse sind hier stichpunktartig aufgeführt: <ul style="list-style-type: none"> • Erhöhte Komplexität der DSBs führt zu vermehrter Bildung von chromosomalen Aberrationen und Deletionen • C-NHEJ ist hauptsächlich an der Reparatur von einfachen DSBs beteiligt, wohingegen DNA-Endresektion, HRR und SSA vor allem bei komplexen Läsionen wichtig werden • Unterschiede in Radiosensibilisierung in Kombination mit CP verschiedener NSCLCs – Kategorisierung in sensitive und resistente Zelllinien • CP vermindert γ-H2AX, 53BP1 und Rad51 Foci – aber keine Unterschiede zwischen sensitiven und resistenten Zelllinien • Sensibilisierung durch Mirin in Kombination mit CP in resistenten Zelllinien (kein Effekt in sensitiven) gemessen an c-NHEJ (53BP1 Foci), HR (Rad51 Foci) und CP-Addukt Bildung • Dieselben Experimente in nicht-transformierten Zellen zeigten keine Sensibilisierung. 	
19. Schlagwörter DNA Doppelstrangbruchreparatur, Komplexität, chromosomale Aberrationen, Cisplatin, NSCLC	
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 Joint Project: COLLAR: Complex DNA lesions and their role in the cellular response after irradiation	
4. author(s) (family name, first name(s)) Iliakis, George Krieger, Lisa Marie Magin, Simon Sak, Ali	5. end of project December 2020
	6. publication date
	7. form of publication
8. performing organization(s) (name, address) Universitätsklinikum Essen Institut für Med. Strahlenbiologie Hufelandstraße 55 45147 Essen	9. originator's report no.
	10. reference no. 02NUK043B
	11. no. of pages 477
12. sponsoring agency (name, address) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. no. of references 489
	14. no. of tables 34
	15. no. of figures 162
16. supplementary notes	
17. presented at (title, place, date)	
18. abstract Aim of this project was to investigate to what extent DSB complexity influences the choice of repair pathway and determines thus the probability of processing errors. In addition, frequently occurring cisplatin resistances and the factors influencing them should be investigated, as they represent a central problem in the clinical application in context of combined radiation-chemotherapy. For this purpose, previously developed, I-SceI-based constructs were used and expanded, as well as various non-small cell lung carcinoma cell lines. The most important results are: <ul style="list-style-type: none"> • Increased complexity of DSBs leads to an increased formation of chromosomal aberrations and deletions and increased lethality • C-NHEJ is mainly involved in the repair of simple DSBs, whereas DNA end resection, HRR and SSA are especially important in the repair of complex lesions • Differences in radiosensitization in combination with CP of different NSCLCs - categorization into sensitive and resistant cell lines • CP reduces γ-H2AX, 53BP1 and Rad51 foci - but no differences between sensitive and resistant cell lines • Sensitization by Mirin in combination with CP in resistant cell lines (no effect in sensitive ones) measured by cNHEJ (53BP1 foci), HR (Rad51 foci) and CP adduct formation • The same experiments in non-transformed cells showed no sensitization. 	
19. keywords DNA double strand break repair, damage complexity, chromosomal aberrations, cisplatin, NSCLC	
20. publisher	21. price