

**Schlussbericht zum Forschungsvorhaben
02NUK054C**

***Erkennung, Verarbeitung und biologische
Konsequenzen von Chromatinschäden nach
Teilchenbestrahlung II
(VERCHROMT II)***

Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 02NUK054C gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Projektleiter und den Autoren.

Ausführende Stelle: Technische Universität Darmstadt, Fachbereich Biologie

Projektleiter: Prof. Dr. Markus Löbrich

Inhaltsangabe

I. Kurze Darstellung zu	1
1. Aufgabenstellung und wissenschaftlicher Stand der Forschung	1
2. Ablauf des Vorhabens und wesentliche Ergebnisse.....	1
II. Eingehende Darstellung	3
1. der Verwendung der Zuwendung und der erzielten Ergebnisse im Einzelnen im Vergleich zur ursprünglichen Antragsstellung.....	3
1.1 Die Reparatur von DSBs in Zellen mit Defekten im BRCA2-Gen	3
1.2 Die Reparatur von DSBs in Zellen mit Defekten im ATRX-Gen.....	7
1.3 Literaturverzeichnis	16
2. der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises	18
3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit	19
4. des voraussichtlichen Nutzens, insbesondere der Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans	20
5. des während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen.....	20
6. der erfolgten oder geplanten Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr.6	20

I. Kurze Darstellung zu

1. Aufgabenstellung und wissenschaftlicher Stand der Forschung

Ziel unseres Projektes war es, Ergebnisse und Erkenntnisse zu generieren, welche die Entwicklung besserer Therapiekonzepte zur Inaktivierung von Tumorzellen bei gleichzeitiger Schonung von Normalgewebszellen erlauben. Solche Konzepte basieren darauf, dass Tumorzellen oftmals Eigenschaften aufweisen, die sich von denen normaler Zellen unterscheiden und die ausgenutzt werden können, gezielt und selektiv die Tumorzellen abzutöten. Dabei spielt die Reparatur von DNA-Schäden, welche therapiebedingt erzeugt werden, eine wichtige Rolle, da Reparaturmechanismen in Tumorzellen oftmals fehlreguliert oder gänzlich ausgefallen sind. Ein wichtiger bei der Tumorthherapie auftretender Schaden ist der DNA-Doppelstrangbruch (DSB), der über den Vorgang der homologen Rekombination (HR) repariert werden kann. Interessanterweise weisen viele Tumorarten mehr oder weniger stark ausgeprägte Defekte an diesem Reparaturmechanismus auf, so dass sie effizient therapiert werden können. Trotz beachtlicher Erfolge moderner Therapieansätze treten aber oftmals Rezidive auf, was darauf zurückgeführt wird, dass die Tumorzellen alternative Reparaturwege aktivieren, um die Therapie-bedingten DSBs zu reparieren. Außerdem liegen bei vielen Tumortypen zwar Veränderungen im HR-Vorgang vor, die allerdings nicht zu einem Ausfall dieses Reparaturweges führen und somit keine gezielte Inaktivierung der Tumorzellen ermöglichen. Unser Projekt zielte daher zum einen darauf ab, Beiträge zu einer verbesserten Therapie HR-defekter Tumor zu liefern, indem die in den Tumorzellen aktivierten alternativen Reparaturwege besser charakterisiert werden. Zum anderen war es Ziel unseres Projektes, Tumorzellen mit vorhandenen Veränderungen im HR-Vorgang so zu modifizieren, dass dieser Reparaturweg vollständig defekt ist und die Tumore erfolgreich therapiert werden können.

2. Ablauf des Vorhabens und wesentliche Ergebnisse

Der vielleicht bekannteste Fall von Tumoren mit Defekten im HR-Vorgang sind solche, die Veränderungen im sogenannten BRCA2-Gen aufweisen. Diese Veränderungen führen dazu, dass die Tumorzellen sehr gut auf eine Therapie mit bestimmten chemischen Agentien, sogenannten PARP-Inhibitoren, ansprechen und erfolgreich therapiert werden können. Trotzdem treten selbst nach dieser Therapie oftmals Rezidive auf und es wurde vermutet, dass dabei die Aktivierung eines bestimmten alternativen DSB-Reparaturweges, des sogenannten TMEJ, eine Rolle spielen könnte. Wir haben daher die Reparatur von DSBs in BRCA2-defekten Tumorzellen untersucht und dabei gefragt, auf welche Weise das TMEJ die in den BRCA2-defekten Zellen unreparierten DSBs beheben könnte. Wir haben dazu verschiedenste Agentien verwendet, einschließlich ionisierender Strahlung und der therapeutisch eingesetzten PARP-Inhibitoren, und die Reparatur der DSBs in einzelnen Zellen während ihres

Wachstums verfolgt. Dabei haben wir das überraschende Ergebnis erhalten, dass die erzeugten DSBs in den BRCA2-defekten Zellen erst einmal unrepariert bleiben und erst dann vom TMEJ-Weg repariert werden, wenn die Zellen sich teilen. Durch viele weitere Ansätze konnten wir dann belegen, dass der TMEJ-Reparaturweg spezifisch für die Zellzyklusphase ist, in der sich Zellen teilen, und nur dann operieren kann. Diese Arbeit wurde auch international viel beachtet und hat zusammen mit Nachfolgearbeiten, die unsere Ergebnisse bestätigten und den TMEJ-Weg noch genauer charakterisierten, dazu geführt, dass Möglichkeiten zum Ausschalten des TMEJ-Weges entwickelt werden. Wir haben für diese Arbeiten mit unserem langjährigen Kooperationspartner Prof. Dr. Wolf-Dietrich Heyer von der *University of California* in Davis, USA, zusammen gearbeitet, der unsere zellulären Studien mit biochemischen Ansätzen ergänzt hat, die über unsere eigenen experimentellen Möglichkeiten hinaus gehen.

Im zweiten Projektteil haben wir uns der Frage gewidmet, wie Tumorzellen, die schon bestimmte Veränderungen im HR-Vorgang aufweisen, so modifiziert werden können, dass sie einen kompletten Verlust ihrer HR-Fähigkeit erleiden. Dazu ist zu bemerken, dass sich der HR-Vorgang nach ersten gemeinsamen Schritten in zwei Unterwege aufteilt, die beide zur Vollendung der Reparatur benutzt werden können. Viele Tumorzellen haben Defekte in einem dieser Unterwege, verfügen aber noch über die Möglichkeit, den zweiten Unterweg zu benutzen. Unser konzeptioneller Ansatz bestand darin, den einzigen in diesen Tumorzellen noch aktiven Unterweg zu eliminieren und so eine HR-Defizienz zu erzeugen. Da normale Zellen beide Unterwege zur Verfügung haben, führt das Ausschalten eines Weges nicht zum Verlust der HR-Kapazität, so dass über diesen Ansatz eine HR-Defizienz spezifisch in den Tumorzellen erzeugt werden kann. Wir haben zur Umsetzung des Ansatzes zuerst untersucht, welche Faktoren spezifisch in nur einem der HR-Unterwege operieren und die Funktion dieser Faktoren charakterisiert. Danach haben wir gezeigt, dass das gleichzeitige Ausschalten zweier Faktoren, die an unterschiedlichen HR-Unterwegen beteiligt sind, einen kompletten Verlust der HR-Kapazität zur Folge hat, wohingegen das Ausschalten von nur einem dieser Faktoren nahezu keine Auswirkung hat. Weiterhin konnten wir zeigen, dass Zellen, in denen beide Unterwege ausgeschaltet wurden, nach einer Behandlung mit den therapeutisch eingesetzten PARP-Inhibitoren genauso stark absterben wie Zellen, die durch den Verlust von BRCA2 keine HR mehr ausführen können. Die Ergebnisse dieses Projektteils stellen gewissermaßen einen *proof of principle* dar, dass über chemische Modifikationen bestimmte Tumore so verändert werden können, dass sie Defekte im HR-Vorgang aufweisen und therapeutisch gut behandelt werden können. Den beachtlichen wissenschaftlichen Erfolgen unseres Projektes ist hinzuzufügen, dass die beteiligten Wissenschaftler für ihre Arbeit auf Kongressen und mit Stipendien ausgezeichnet wurden, was die Qualität unserer Nachwuchsförderung unterstreicht.

II. Eingehende Darstellung

1. der Verwendung der Zuwendung und der erzielten Ergebnisse im Einzelnen im Vergleich zur ursprünglichen Antragsstellung

1.1 Die Reparatur von DSBs in Zellen mit Defekten im BRCA2-Gen

Die Regulation der DSB-Reparatur in BRCA2-defekten Zellen über RAD52 und POL θ

Mutationen im BRCA2-Gen führen häufig zu Brust- und Ovarialkarzinomen sowie anderen Tumorarten (Roy *et al.*, 2012). BRCA2 ist an dem Prozess der HR beteiligt, welcher für die Reparatur von solchen DSBs benötigt wird, die durch verschiedenste tumortherapeutische Ansätze erzeugt werden (Prakash *et al.*, 2015). Da unreparierte DSBs zum Zellabsterben führen, ergibt sich die vielversprechende Möglichkeit, BRCA2-defekte Tumorzellen gezielt mit solchen Agentien zu behandeln, die das Überleben der Tumorzellen stark beeinträchtigen, während die Normalgewebszellen mit funktionalem BRCA2, die durch die Therapie erzeugten DSBs reparieren und überleben. Als besonders vielversprechend hat sich dabei die Behandlung der BRCA2-defekten Tumore mit sogenannten PARP-Inhibitoren herausgestellt, die DSBs erzeugen, deren Reparatur vollständig von BRCA2 abhängig ist. PARP-Inhibitoren werden mittlerweile schon vielfältig in der Klinik eingesetzt und haben das Überleben vieler tausend Patientinnen schon maßgeblich verbessert (Ashworth *et al.*, 2018). Trotz des großen klinischen Erfolges werden aber immer wieder Resistenzmechanismen festgestellt, die zum Überleben der Tumorzellen nach Therapie und letztendlich zum wiederkehrenden Tumorwachstum führen. Es ist daher von großem gesellschaftlichem Interesse, solche Resistenzmechanismen zu verstehen und verbesserte Behandlungen zu ermöglichen (Higgins & Boulton, 2018).

Zu Beginn des Projektes war bekannt, dass Zellen mit Defekten im BRCA2-Gen von bestimmten anderen Faktoren abhängig sind, die in Normalgewebszellen keine bedeutende Rolle spielen. Einer dieser Faktoren ist RAD52, dessen Ausfall zum Absterben von BRCA2-defekten Zellen führt, in Normalzellen aber keine Auswirkung hat (Feng *et al.*, 2011). Ein anderer Faktor ist die Polymerase Theta (POL θ), die den Reparaturweg des *POL θ -mediated end-joining* (TMEJ) vermittelt, und ebenso ausschließlich in BRCA2-defekten, nicht aber in Normalzellen essentiell ist (Ceccaldi *et al.*, 2015; Mateos-Gomez *et al.*, 2015). Diese bekannten Befunde haben dazu geführt, dass Inhibitoren für diese Faktoren entwickelt werden, die in Zukunft zusammen mit PARP-Inhibitoren zur Behandlung BRCA2-defekter Tumore eingesetzt werden sollen. Dabei sind aber die molekularen Mechanismen, über die RAD52 und POL θ ihre in BRCA2-defekten Zellen essentielle Funktion ausüben, weitestgehend unbekannt. Mit dieser Frage hat sich dieser Projektteil befasst und wichtige Erkenntnisse gewinnen können.

In zu Beginn des Projektes durchgeführten Studien haben wir beobachten können, dass die letale Wirkung einer POL θ -Inhibition in HR-defizienten Zellen auch ohne eine zusätzliche, durch die Therapie hervorgerufene DNA-Schädigung auftritt. Dies lässt vermuten, dass das TMEJ für die Reparatur während der S-Phase spontan auftretender DSBs essentiell ist. Wir konnten dann feststellen, dass diese spontanen DSBs in BRCA2-defizienten Zellen in der S/G2-Phase unrepariert verbleiben, dann aber während der Mitose mittels TMEJ nahezu vollständig repariert werden. Zellen, in denen die HR und POL θ zusammen ausgeschaltet wurden, zeigten dagegen hohe Zahlen an unreparierten DSBs und sogenannte *lagging chromosomes* in der Mitose. Letztere sind Chromosomen-Fragmente, die bei der Aufteilung der DNA in die beiden Tochterzellen verloren gehen. Diese meist letalen Ereignisse könnten das starke Zellsterben von HR-defizienten Zellen erklären, wenn POL θ ausgeschaltet wird (Llorens-Agost *et al.*, 2021a).

Als nächstes untersuchten wir, warum das TMEJ nur während der Mitose auftritt, einer Zellzyklusphase in der DSB-Reparaturprozesse sonst häufig unterdrückt werden. Spontane DSBs sind meist ein-endig, durch eine benachbarte Replikationsgabel kann aber ein zweites Bruch-Ende erzeugt werden, was die Möglichkeit einer Reparatur über einfache Endverknüpfung eröffnet (Ensminger & Löbrich, 2020). Erfolgen solche Prozesse jedoch ohne zweites Bruch-Ende, kann es zur Verknüpfung von Enden unterschiedlicher DSBs und zur Fusion zweier Chromosomen kommen. In der Regel stellt dies ein letales Ereignis dar. Daher scheint es plausibel, die Reparatur ein-endiger DSBs auf post-replikative Zellzyklusphasen zu beschränken, wenn sichergestellt ist, dass ein zweites Bruch-Ende vorliegt. Zudem könnte der Kondensationsgrad des Chromatins die Reparatur beeinflussen. In der Interphase liegt das Chromatin entspannt vor, so dass die beiden Bruch-Enden weit voneinander entfernt sein können. Dies erhöht die Gefahr einer Verknüpfung von Enden unterschiedlicher DSBs. Durch die starke Kondensation des Chromatins in der Mitose werden die Bruch-Enden dagegen in räumlicher Nähe zu einander ausgerichtet, was eine Verknüpfung korrekter Enden via TMEJ ermöglicht (Llorens-Agost *et al.*, 2021a).

In unseren weiteren Studien konnten wir mit RAD52 zudem einen Faktor identifizieren, der eine Nutzung des TMEJ in der S/G2-Phase unterdrückt. Nach Inhibition von RAD52 konnten wir in BRCA2-defizienten Zellen eine TMEJ-vermittelte Reparatur bereits in der G2-Phase beobachten, die allerdings mit einer signifikanten Zunahme der Zahl an Chromosomen-Fusionen einherging (Llorens-Agost *et al.*, 2021a). Dies unterstützt unser Modell, dass eine vorzeitige Nutzung des TMEJ zur Ausbildung eben dieser toxischen Läsionen führt. Dies ist umso spannender, da RAD52, wie oben erwähnt, ein weiterer Faktor ist, dessen Verlust zum Absterben von BRCA2-defizienten Tumorzellen führt und wogegen therapeutisch einsetzbare Inhibitoren entwickelt werden (Huang *et al.*, 2016).

Zusammenfassend konnten unsere Untersuchungen erklären, warum POL θ und RAD52 für das Überleben von BRCA2-defizienten Zellen essentiell sind. POL θ ermöglicht eine Reparatur spontan auftretender DSBs mittels TMEJ und RAD52 reguliert diesen Prozess. Wird das TMEJ verhindert (z.B. nach POL θ -Inhibition) oder erfolgt es vorzeitig (z.B. nach RAD52-Inhibition), entstehen unterschiedliche Chromosomen-Aberrationen, die zum Absterben der Zelle führen (Abb. 1). Diese Arbeiten wurden in einer hochrangigen Fachzeitschrift veröffentlicht (Llorens-Agost *et al.*, 2021a) und in begleitenden Artikeln bezüglich ihrer wissenschaftlichen Relevanz diskutiert (Llorens-Agost *et al.*, 2021b; Ensminger *et al.* 2022).

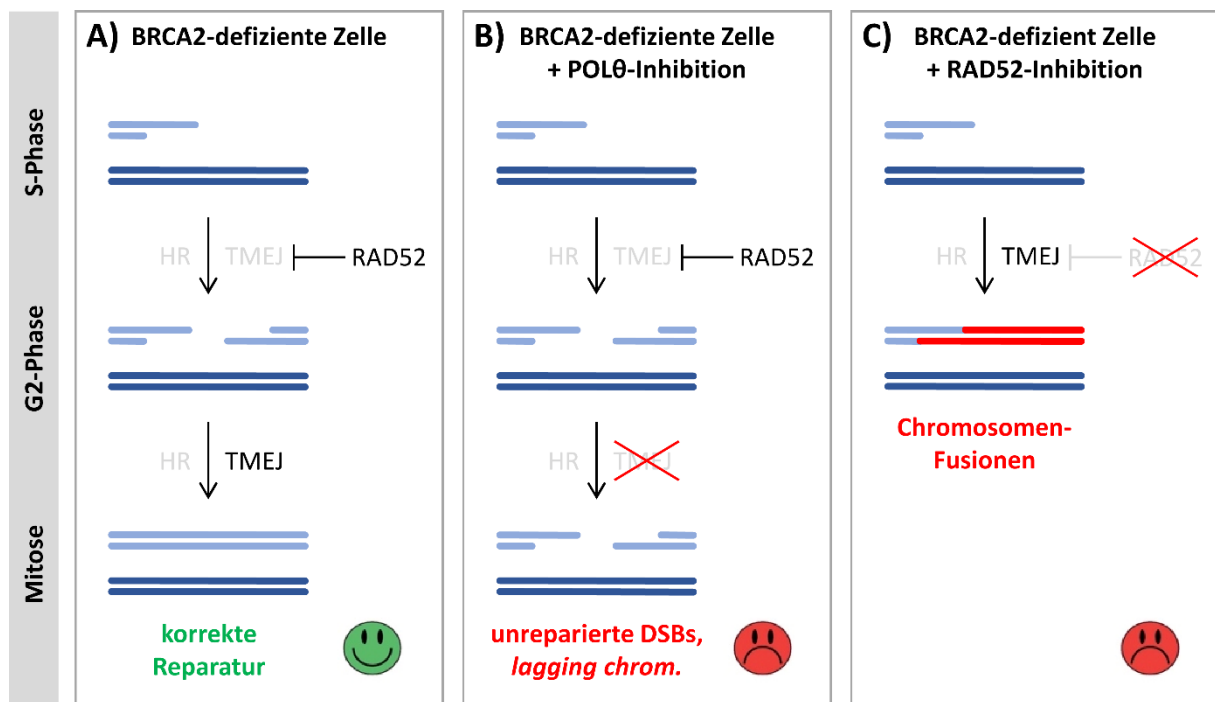


Abb. 1: Reparatur ein-endiger DSBs via TMEJ. BRCA2-defiziente Zellen sind HR-defekt. Nach Erzeugung eines zweiten Bruch-Endes durch eine benachbarte Replikationsgabel können diese DSBs während der Mitose mittels TMEJ repariert werden (A). Sowohl eine Hemmung des TMEJ in der Mitose (B) als auch eine vorzeitige Nutzung des TMEJ in S/G2 (C) erzeugt Chromosomen-Aberrationen, die zum Zelltod führen. Entnommen aus Ensminger *et al.* (2022).

Die Regulation der DSB-Reparatur in BRCA2-defekten Zellen über TMEJ und/oder CIP2A

Nach der Veröffentlichung der oben beschriebenen Ergebnisse haben wir uns in diesem Projektteil im Wesentlichen zwei Fragenkomplexen gewidmet. Zum einen untersuchten wir, ob und auf welche Weise Defekte in der HR, die nicht auf Mutationen im BRCA2-Gen zurück zu führen sind, auch das TMEJ als einen überlebenswichtigen DSB-Reparaturweg benötigen. Obwohl nämlich BRCA2 eines des am häufigsten mutierten DSB-Reparaturgens in Tumoren darstellt, spielen auch Mutationen in anderen HR-Faktoren für die Tumorentwicklung eine Rolle und können tumortherapeutisch ausgenutzt werden. Dabei nimmt BRCA1 eine wichtige

Rolle eine, aber auch andere Faktoren wie z.B. PALB2, RAD54, u.a. liegen häufig in Tumoren mutiert vor (Cerbinskaite *et al.* 2012; Jeggo & Löbrich, 2015). Wir haben daher unsere Arbeiten auf diese Faktoren ausgeweitet und untersucht, ob eine Inhibition des TMEJ auch in Zellen mit Defekten in diesen HR-Faktoren zum Zellabsterben führt. Dabei ergab sich, dass Zellen mit Defekten in HR-Faktoren, die an frühen Schritten des Reparaturvorgangs beteiligt sind, eine starke Abhängigkeit vom TMEJ zeigen. Dagegen führen Defekte in später operierenden HR-Faktoren zu einer deutlich kleineren oder sogar gar keiner TMEJ-Abhängigkeit. Dieser Befund lässt sich damit erklären, dass der HR-Vorgang während späterer Schritte Redundanzen aufweist und über verschiedene Unterwege fortschreiten kann, so dass Defekte in nur einem Unterweg die HR nicht vollständig inaktivieren, sondern die Reparatur der DSBs noch über den anderen Unterweg zulassen. Eine genauere Untersuchung der HR-Unterwege und wie Defekte in entsprechenden Faktoren klinisch ausgenutzt werden können, waren Gegenstand des zweiten Teils unseres Projektes und werden an entsprechender Stelle beschrieben (Kapitel 1.2).

Während unseres Projektfortschritts wurde von anderen Arbeitsgruppen berichtet, dass BRCA2-defekte Zellen von der Funktion eines weiteren Faktors, CIP2A, abhängen. Dieser Faktor wurde in einem CRISPR-Cas9-basierten Letalitätsscreen unter PARP-Behandlung identifiziert, bei dem präferentiell Tumorzellen mit Mutationen im BRCA2-Gen, nicht jedoch Zellen mit intaktem BRCA2, abstarben (Adam *et al.*, 2021). Die Autoren berichteten weiterhin, dass CIP2A die durch die PARP-Behandlung erzeugten DSBs während der Mitose zusammenhält und dadurch deren Reparatur ermöglicht (De Marco Zompit *et al.*, 2022). Aufbauend auf diesen Arbeiten haben wir untersucht, ob es sich bei dem über CIP2A-vermittelten DSB-Reparaturvorgang um das von uns beschriebene TMEJ handelt. Interessanterweise konnten wir aber feststellen, dass die CIP2A-vermittelte DSB-Reparatur einen anderen Reparaturweg als das TMEJ darstellt, so dass die Inaktivierung beider mitotischer Reparaturwege einen größeren Defekt und ein noch stärkeres Absterben von BRCA2-mutierten Zellen bewirkt. Dieser Befund ist ebenfalls von beträchtlicher klinischer Relevanz, da parallel zu RAD52- und POL θ -Inhibitoren gegenwärtig auch Inhibitoren gegen CIP2A entwickelt werden. Unsere Arbeiten zur Wirkungsweise der CIP2A-vermittelten DSB-Reparatur und dass sich diese vom TMEJ unterscheidet, stellten die Grundlage für einen DFG-Antrag dar. Dieser wurde vor wenigen Monaten genehmigt und erlaubt die tiefere Untersuchung dieser beiden mitotischen DSB-Reparaturwege sowie ihre Bedeutung für die Behandlung BRCA2-defekter Tumorzellen (LO 677/6-1: Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in BRCA2-defizienten Zellen mittels POL θ und CIP2A). Insgesamt haben sich aus diesem Projektteil sowohl mehrere wissenschaftliche Fachpublikationen ergeben als auch wissenschaftliche Erkenntnisse, welche die Grundlage weiterer erfolgreicher

Forschungsvorhaben bildeten und dadurch in bedeutendem Maße zum Kompetenzerhalt in der Strahlenforschung beigetragen haben.

1.2 Die Reparatur von DSBs in Zellen mit Defekten im ATRX-Gen

In diesem Projektteil widmeten wir uns der Frage, ob auch Defizienzen von Tumorzellen in HR-Faktoren, die während späterer Schritte des Reparaturvorgangs eine Rolle spielen, klinisch ausgenutzt werden können. Dazu war und ist es wichtig, den HR-Vorgang mechanistisch besser zu verstehen, weshalb die für das Verständnis des Berichtes wichtigsten Schritte hier kurz rekapituliert werden sollen. Zuerst werden nach Auftreten eines DSB die Bruchenden so prozessiert, dass einzelsträngige Enden entstehen, die in der Lage sind, an eine homologe Sequenz auf dem Schwesterchromatid zu binden und dort die für den Reparaturvorgang notwendige und am DSB verloren gegangene DNA-Sequenz zu kopieren. Die dabei auftretende DNA-Struktur wird D-loop genannt und wird für alle Formen und Unterwege der HR benötigt (Elbakry & Löbrich, 2021). Abhängig davon, wie sich dieser D-loop weiterentwickelt und letztendlich aufgelöst wird, unterscheidet man den HR-Unterweg des *synthesis-dependent strand annealing* (SDSA) von einem Unterweg, bei dem sogenannte doppelte Holliday Junctions (dHJs) auftreten (benannt nach dem Wissenschaftler Robin Holliday). Ohne auf die Spezifitäten der beiden HR-Unterwege einzugehen sei hier erwähnt, dass ein Ausfall beider Unterwege einem kompletten Verlust der Fähigkeit zur HR gleichkommt.

Der wissenschaftliche Ansatz beruht auf der Tatsache, dass Tumorzellen häufig Defekte in einem der beiden HR-Unterwege aufweisen und für die Durchführung des Reparaturvorganges auf den anderen Unterweg angewiesen sind (Cerbinskaite *et al.* 2012; Jeggo & Löbrich, 2015). Eine Inaktivierung dieses Weges mittels chemischer Inhibitoren im Zuge der Tumorthherapie führt dann in Tumorzellen zum Verlust der HR. Dagegen können die Normalgewebszellen mit zwei intakten HR-Unterwegen den nicht durch die chemischen Inhibitoren inaktivierten Unterweg benutzen und daher die während der Tumorthherapie erzeugten DSBs reparieren. Um diesen Ansatz in die Klinik transferieren zu können, müssen die Faktoren, die für die jeweiligen HR-Unterwege spezifisch sind, bekannt und möglichst gut charakterisiert sein, damit entsprechende chemische Inhibitoren entwickelt werden können. Ein Schema dieses Ansatzes ist in Abbildung 2 beschrieben und wurde in einer Übersichtsarbeit von uns diskutiert (Elbakry & Löbrich, 2021).

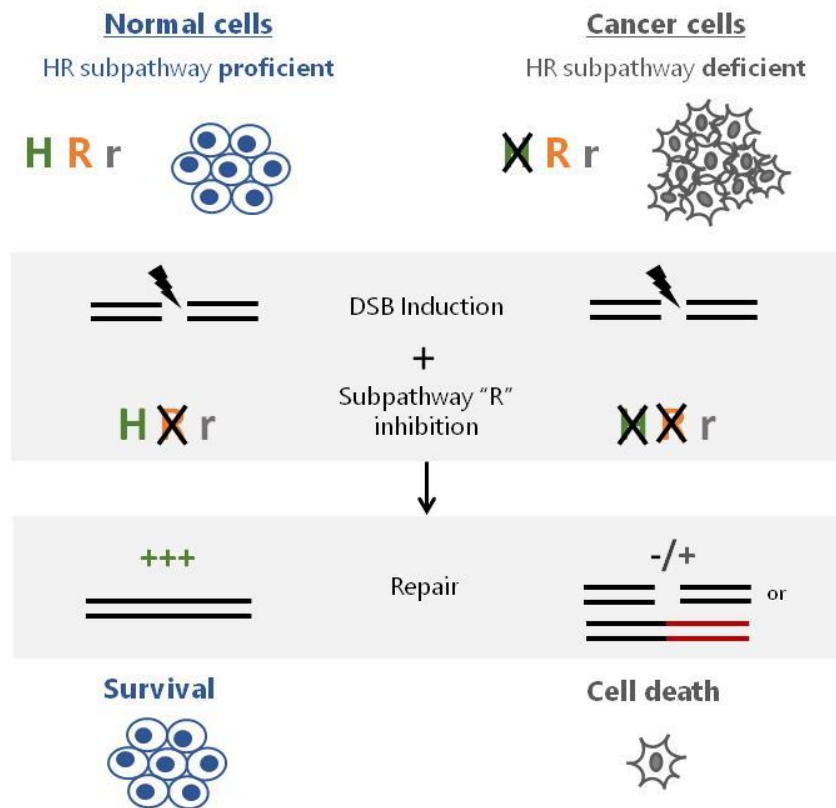


Abb. 2: Benutzung von HR-Unterwegen in Normal- und Tumorzellen. Normalgewebszellen mit intakter HR benutzen einen der beiden Unterwege (als „H“ und „R“ beschrieben). Dagegen sind Tumorzellen oftmals in einem der beiden HR-Unterwege defekt (im gezeigten Fall für den Unterweg „H“) und für die Reparatur der DSBs auf den anderen Weg beschränkt (im gezeigten Fall auf den Unterweg „R“). Eine chemische Inhibition des HR-Unterweges „R“ hat in Normalgewebszellen keine signifikante Auswirkung, so dass sie die während der Tumorthherapie erzeugten DSBs reparieren können und überleben. Dagegen führt die chemische Inhibition des Unterweges „R“ in Tumorzellen zum Verlust der HR und nach Behandlung mit DSB-erzeugenden Therapeutika zum Zelltod, da diese Zellen keinen der beiden HR-Unterwege zur Reparatur zur Verfügung haben und auf fehlerhafte alternative Reparaturwege angewiesen sind (im gezeigten Fall als „r“ beschrieben). Entnommen aus (Elbakry & Löbrich, 2021).

Die Arbeiten zu diesem Projektteil bauten auf unserer früheren Arbeit zur Funktion des Reparaturfaktors ATRX auf (Juhász *et al.*, 2018, Elbakry *et al.*, 2018). Interessanterweise haben 10-15% aller Tumore einen Defekt im ATRX-Gen (Dilley & Greenberg, 2015). Diese Klasse der Tumore benutzt zur Aufrechterhaltung ihrer Telomere, einem wichtigen Schritt bei der Immortalisierung, einen HR-abhängigen Reparaturweg (genannt ALT für *alternative lengthening of telomeres*), für dessen Funktionalität gerade die Inaktivierung von ATRX notwendig ist (Maciejowski & de Lange, 2017). Wir konnten zeigen, dass ATRX an der HR von strahleninduzierten DSBs beteiligt ist und dabei während der Reparatur-Synthese die Chromatinstruktur wiederherstellt (Juhász *et al.*, 2018, Elbakry *et al.*, 2018).

Zu Beginn des Projektes haben wir dann die Funktion von ATRX bei der HR weiter charakterisiert und bestätigen können, dass es am dHJ-Unterweg beteiligt ist. Dabei kompetiert es mit einem für das SDSA wichtigen Faktor, der Helikase RECQ5 (Elbakry *et al.*, 2021). Wir haben herausfinden können, wie diese Konkurrenz reguliert ist und dass in normalen Zellen der dHJ-Weg den SDSA-Weg dominiert. Im Gegensatz zu normalen Zellen benutzen ATRX-defiziente Tumorzellen RECQ5-abhängiges SDSA (Elbakry *et al.*, 2021). Diese Arbeit hat den Grundstein für weitere Studien gelegt, in denen wir neue, bisher nicht bekannte Faktoren untersucht haben, um aufzuklären, in welchem der beiden HR-Unterwege diese beteiligt sind.

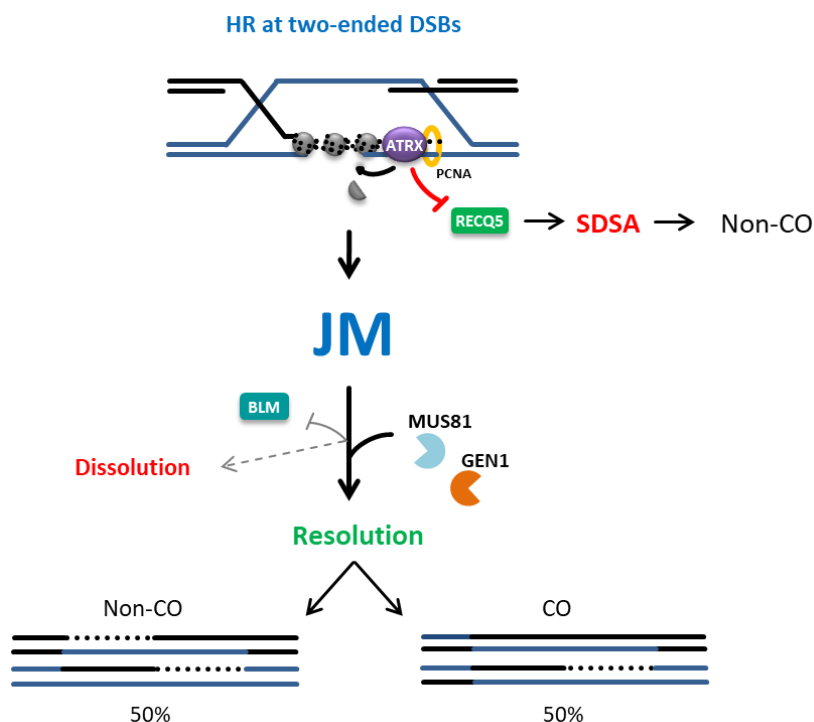


Abb. 3: Schematisches Modell für das Wechselspiel zwischen ATRX und RECQ5 bei der Regulation der Wahl zwischen den beiden HR-Unterwegen. Über die Bindung an den DNA-Synthesefaktor PCNA supprimiert ATRX den Zugang des SDSA-Faktors RECQ5 zum D-loop und ermöglicht das Auftreten von dHJs, die über weitere Schritte aufgelöst werden. Dabei unterdrückt die über ATRX vermittelte Wiederherstellung des Chromatins auch den Zugang des Faktors BLM und führt dadurch zur Auflösung der dHJs über die Resolutionsfaktoren MUS81 und GEN1. Dadurch treten Austausche (im Bild als „CO“ beschrieben) zwischen den am Reparaturvorgang beteiligten Schwesterchromatiden, sogenannte *sister chromatid exchanges* (SCEs) auf. Entnommen aus (Elbakry *et al.*, 2021).

Im Weiteren werden weitere Faktoren beschrieben, die spezifisch an einem der beiden HR-Unterwege beteiligt sind. Da diese Arbeiten bisher noch unveröffentlicht sind, soll dabei etwas genauer auf die erhaltenen Ergebnisse und die dabei verwendeten Ansätze eingegangen werden.

RECQ5 ist ein Mitglied der Familie der RECQ-Helikasen (Sharma & Brosh, 2007). Wir haben uns daher als nächstes gefragt, welche weiteren Helikasen am HR-Vorgang beteiligt sein könnten und entdeckt, dass RECQ1, ebenso wie RECQ5, im SDSA-Vorgang involviert ist. Wir haben dazu die auch in den anderen Publikationen verwendeten Ansätze, einschließlich Immunfluoreszenz-Mikroskopie zum Nachweis von DSB-Markern, eingesetzt (Llorens-Agost *et al.*, 2021a; Elbakry *et al.*, 2021). Ebenso wie RECQ5 ist auch RECQ1 für den SDSA-Vorgang spezifisch und spielt bei der Reparatur von DSBs über den dHJ-Weg keine Rolle. Um die genaue Funktion von RECQ1 beim SDSA aufzuklären, haben wir als nächstes RECQ1 *knock out* (KO) Zellen mittels des CRISPR-Cas9-Verfahrens erzeugt und diese mit Vektoren komplementiert, die verschiedene Mutationen des RECQ1-Gens enthielten. Während eine Komplementation mit dem RECQ1 Wildtyp-Gen das Reparaturverhalten der RECQ1 KO Zellen wiederherstellte, führte eine Komplementation mit einer RECQ1-Mutante, welche in der für die Helikase-Aktivität wichtige ATPase-Funktion defekt ist (Sharma *et al.*, 2007), nicht zu einer Wiederherstellung des normalen Reparaturverhaltens. Weiterhin beobachteten wir, dass Mutanten mit Defekten in der *annealing* Funktion von RECQ1 (Pike *et al.*, 2015) ebenso nicht in der Lage waren, die Reparaturfunktion wiederherzustellen. Die *annealing* Funktion beim SDSA-Vorgang ist wichtig, um nach der Reparatur-Synthese die beiden Bruchenden wieder miteinander zu verbinden. Somit legen unsere Daten eine Rolle von RECQ1 während später Schritte des SDSA-Vorgangs nahe.

Um diese späte Rolle mechanistisch besser zu verstehen, haben wir weitere Funktions-Analysen durchgeführt und dabei festgestellt, dass die Helikase-Aktivität von RECQ1 wichtig ist, um das Protein RAD52 von einzelsträngigen DNA-Bereichen zu entfernen. Solche einzelsträngigen Bereichen treten nach der Reparatur-Synthese auf, und das Binden von RAD52 an diese Bereiche unterbindet den *annealing* Vorgang und somit die Fertigstellung der DSB-Reparatur über SDSA. Die Funktion von RECQ1 besteht also darin, zuerst RAD52 mittels seiner Helikase-Funktion von den einzelsträngigen DNA-Bereichen zu entfernen und dann die beiden Bruchenden über seine *annealing* Funktion miteinander zu verbinden. Interessanterweise konnten wir auch beobachten, dass RECQ1 KO Zellen keinen Defekt im SDSA-Vorgang aufweisen, wenn RAD52 nicht vorhanden ist. Dies legt nahe, dass auch andere Faktoren mit *annealing* Funktionen den SDSA-Vorgang abschließen können, wenn Zellen kein RAD52 aufweisen. Wir haben daher verschiedenste Faktoren mittels *small interfering RNA* (siRNA) Ansätzen depletiert und zeigen können, dass die Helikase HELQ (Anand *et al.*, 2022) ebenso wie RECQ1 nach erfolgter Reparatur-Synthese die beiden Bruchenden miteinander verbinden kann. Im Gegensatz zu RECQ1 hat HELQ aber keine Funktion, RAD52 zu entfernen, so dass HELQ gewissermaßen als Ersatzfaktor für den SDSA-Vorgang zu betrachten ist, der nur die Brüche repariert, welche von RECQ1 nicht behoben werden konnten. Ein zusammenfassendes Schaubild zur Funktion von RECQ1 im Wechselspiel mit RAD52 und HELQ ist in

Abbildung 4 zeigt. Die Arbeiten zur Rolle von RECQ1 am SDSA haben auch einen wichtigen Beitrag zur Einwerbung eines DFG-finanziertes Projekt geleistet, welches sich u.a. mit der biochemischen Analyse und der Wirkungsweise von RECQ1 befasst, welche die beschriebenen Arbeit ergänzen (Projektnummer 393547839 – SFB 1361).

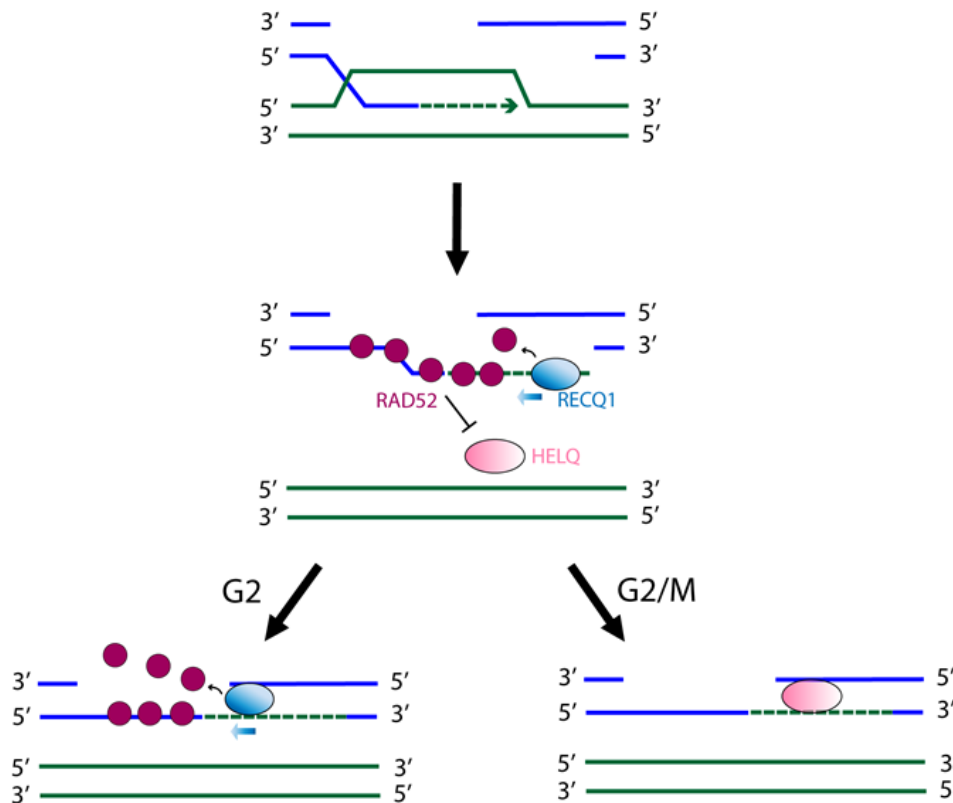


Abb. 4: Schematisches Modell für das Wechselspiel zwischen RECQ1, RAD52 und HELQ beim SDSA-Vorgang. Nach erfolgter Reparatur-Synthese wird der durch die Synthese verlängerte einzelsträngige DNA-Bereich von RAD52 gebunden, um ihn vor Degradation zu schützen. Mittels seiner Helikase-Funktion ist RECQ1 in der Lage, RAD52 zu entfernen und über seine *annealing* Funktion mit dem zweiten Bruchende zu verbinden. Falls dies nicht rechtzeitig geschieht und Zellen mit unreparierten DSBs in die Mitose laufen, übernimmt HELQ die *annealing* Funktion. Dies ist möglich, da RAD52 während der Mitose durch die Chromatin-Kondensation von den Bruchenden entfernt wird, so dass HELQ ungehinderten Zugang zum DSB hat und den Reparatur-Vorgang finalisieren kann. Diese redundante *annealing* Funktion von RECQ1 und HELQ unterstreicht die Wichtigkeit des SDSA-Vorgangs für das Überleben der Zellen, insbesondere in Zellen, denen der dHJ-Weg nicht zur Verfügung steht. Die Wichtigkeit von RECQ1 für die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität wird auch dadurch belegt, dass Mutationen von RECQ1 in der Keimbahn zu schwerwiegenden Entwicklungsstörungen bei Menschen führen (Abu-Libdeh *et al.*, 2022).

Als nächstes haben wir uns der Frage gewidmet, wie die Wahl zwischen den beiden HR-Unterwegen reguliert wird. Dabei spielt die Ausbildung des D-loops wie eingangs erwähnt eine Schlüsselrolle. Bei diesem Vorgang bindet der gebrochene DNA-Bereich an die homologe Sequenz auf dem Schwesterchromatid und kopiert dort die durch den DSB verloren gegangene Sequenz. Eine Schlüsselstruktur für die Homologiesuche ist das RAD51-

Nukleoprotein-Filament, welches die homologe Sequenz gewissermaßen findet (Sung *et al.*, 2003). Anschließend muss jedoch RAD51 entfernt werden, damit sich ein stabiler D-loop ausbilden und die Reparatur-Synthese beginnen kann. Dabei kommt dem RAD54-Protein eine zentrale Rolle zu, so dass sich ohne RAD54 keine stabile D-loop Struktur ausbilden kann (Heyer *et al.*, 2006). In unserer früheren Arbeit zur Funktion von ATRX haben wir daher erwartungsgemäß auch beobachten können, dass RAD54 im selben Reparaturweg wie ATRX operiert und für den dHJ-Weg essentiell ist (Juhász *et al.*, 2018).

Um zu untersuchen, ob RAD54 auch für den zweiten HR-Unterweg, den SDSA-Weg, benötigt wird, haben wir die Reparatur von DSBs in ATRX-defekten Zellen studiert. Überraschenderweise zeigte sich, dass ein Ausschalten von RAD54 in ATRX-defekten Zellen nicht zu einem Reparaturdefekt führt, was belegt, dass es sich bei RAD54 um einen für den dHJ-Weg spezifischen Reparaturfaktor handelt, der beim SDSA keine Rolle spielt. Daraufhin studierten wir einen zu RAD54 ähnlichen Faktor, das sogenannte Paralog von RAD54, nämlich RAD54B (Wesoly *et al.*, 2006). Beim siRNA-vermittelten Ausschalten von RAD54B zeigte sich in der Tat in ATRX-defekten Zellen ein DSB-Reparaturdefekt, was wir durch Untersuchungen mit von uns erzeugten RAD54B KO Zellen belegen konnten. Weiterhin komplementierten wir RAD54B KO Zellen mit verschiedenen Mutationen des RAD54B-Gens. Dabei beobachteten wir, dass eine Komplementation mit dem RAD54B Wildtyp-Gen das Reparaturverhalten der RAD54B KO Zellen wiederherstellte, während eine Komplementation mit einer RAD54B-Mutante, welche in der ATPase-Funktion defekt ist, zu einem anhaltenden Reparaturdefekt führt. Die Notwendigkeit der ATPase-Funktion von RAD54B belegt, dass RAD54B, ebenso wie RAD54, bei der Ausbildung eines stabilen D-loops für die Entfernung von RAD51 notwendig ist. Zusammen mit unserer Beobachtung, dass ATRX-kompetente Zellen keine Abhängigkeit von RAD54B zeigen, ergab sich das Bild, dass RAD54 und RAD54B für die spezifische Ausbildung von D-loops für die HR-Unterwege des dHJ und SDSA verantwortlich sind. Dieser Befund war durchaus bemerkenswert, da er zeigte, dass die Wahl des HR-Unterweges bereits während der Ausbildung der D-loop Struktur stattfindet.

Diese Beobachtung führte uns dazu zu fragen, ob sich vielleicht die durch RAD54B bzw. RAD54 vermittelten D-loop Strukturen in ihrer Stabilität unterscheiden. Während der Ausbildung eines D-loops spielen Enzyme eine Rolle, die den D-loop hinsichtlich seiner Stabilität überprüfen und nicht passende Strukturen direkt wieder auflösen. Dadurch wird sichergestellt, dass sich ein stabiler D-loop nur dann ausbildet und die Reparatursynthese nur dann beginnt, wenn die perfekte homologe Sequenz auf dem Schwesterchromatid gefunden wurde. Das Schlüsselenzym bei dieser Überprüfungsfunktion ist die Topoisomerase 3A (TOP3A) (Fasching *et al.*, 2015; Harami *et al.*, 2022). Wir haben deshalb untersucht, welchen Einfluss ein Ausschalten von TOP3A auf die Wahl des HR-Unterweges hat. Wir beobachteten,

dass ein Ausschalten von TOP3A in ATRX-defekten Zellen dazu führt, dass diese jetzt RAD54 anstelle von RAD54B zur Ausbildung des D-loops benutzen. Dies legt nahe, dass bei Abwesenheit von ATRX ein RAD54-vermittelter D-loop instabiler ist als ein RAD54B-vermittelter, so dass letzterer für die Durchführung des SDSA-Weges benutzt wird. Dagegen führt das Vorhandensein von ATRX in normalen Zellen dazu, dass der RAD54-vermittelte D-loop stabilisiert und zur Durchführung des dHJ-Weges benutzt wird. Ein zusammenfassendes Schaubild zur Funktion von RAD54B und RAD54 bei der Ausbildung von D-loops sowie ihrer Regulation über TOP3A ist in Abbildung 5 gezeigt. Die Regulation der Wahl des HR-Unterweges ist zum einen von grundlegendem Interesse, hat aber auch wichtige Implikationen für die Behandlung von Tumoren mit Defekten in Faktoren, die für HR-Unterwege spezifisch sind. So liegt z.B. RAD54B in vielen Tumoren verändert vor (Cerami *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2013; de Bruijn *et al.*, 2023), so dass diese sehr wahrscheinlich einen anderen HR-Unterweg zur Reparatur von DSBs benutzen als Normalgewebszellen und daher klinisch gezielt behandelt werden können.

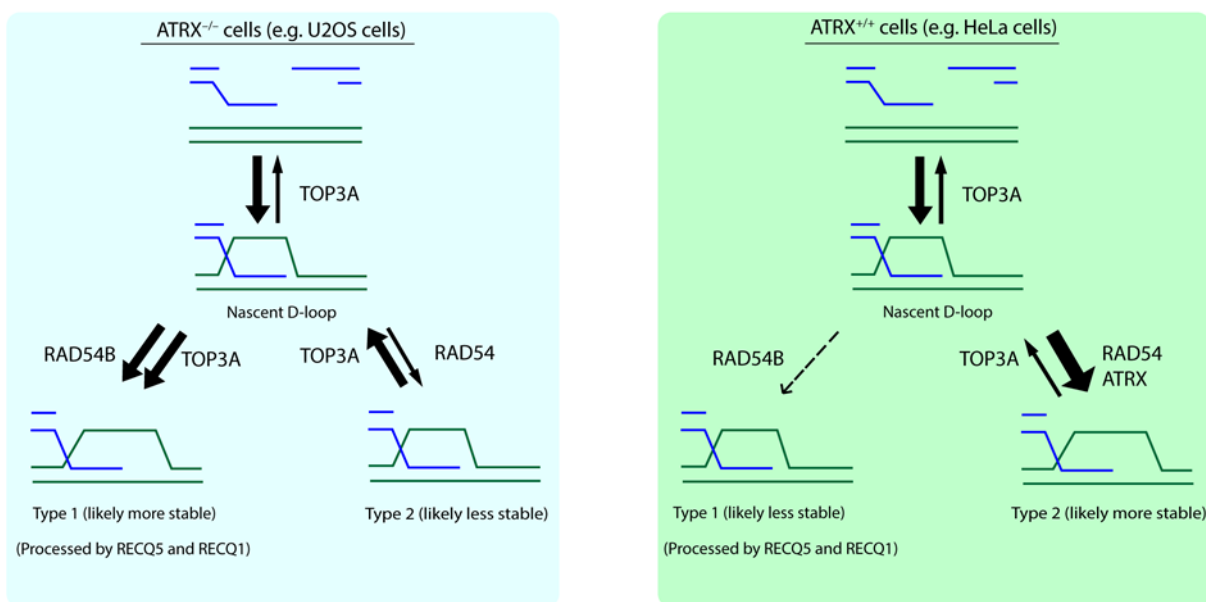


Abb. 5: Schematisches Modell für die Funktion von RAD54B und RAD54 bei der Ausbildung von D-loops. ATRX-defekte Tumorzellen bilden RAD54B-vermittelte D-loop Strukturen aus, die über den SDSA-Weg repariert werden (linkes Schaubild). Dabei spielt die TOP3A eine wichtige Rolle, da sie weniger stabile RAD54-vermittelte D-loops auflöst. Dagegen stabilisiert ATRX in normalen Zellen RAD54-vermittelten D-loops, so dass das SDSA unterdrückt und der dHJ-Weg für die Reparatur der DSBs benutzt wird (rechtes Schaubild). Außerdem übt TOP3A gewissermaßen noch eine Kontrollfunktion aus, indem es sich ausbildende D-loops (im Bild als „nascent D-loop“ bezeichnet) auf ihre Stabilität hin überprüft. Dies stellt sicher, dass der HR-Vorgang nur an Sequenzbereichen durchgeführt wird, die eine perfekte Homologie zum gebrochenen DNA-Molekül aufweisen.

Basierend auf unseren Ergebnissen, dass die Wahl des HR-Unterweges schon auf der Ebene der Ausbildung von D-loops reguliert wird, haben wir mit RAD51AP1 einen weiteren Faktor untersucht, der beschriebenermaßen bei der Ausbildung von D-loops eine Rolle spielen

könnte (Wiese *et al.*, 2007; Selemenakis *et al.*, 2022). Dazu haben wir RAD51AP1 mittels siRNA-Ansätzen in ATRX-profizienten und -defizienten Zellen depletiert und das Reparaturverhalten studiert. Interessanterweise zeigte sich, dass RAD51AP1 in ATRX-profizienten Zellen keine Rolle spielt und daher für den dHJ-Weg nicht gebraucht wird, während es in ATRX-defizienten Zellen und folglich für das SDSA essentiell ist. Somit spielen für das SDSA mindestens zwei Faktoren, RAD54B und RAD51AP1, für die Ausbildung eines D-loops eine essentielle Rolle, wohingegen für den dHJ-Weg diese Aufgabe von RAD54 alleine übernommen wird.

Für die bezüglich RAD54, RAD54B und RAD51AP1 durchgeführten Untersuchungen wurden ATRX-profiziente bzw. -defiziente Zellen bestrahlt oder mit anderen genotoxischen Agentien behandelt und das Reparaturvermögen innerhalb einer definierten Zeitspanne bestimmt. Dadurch war es möglich, die Faktoren eindeutig einem der beiden HR-Unterwege zuzuordnen. Auf der Idee beruhend, dass ein Ausfall beider Unterwege dem kompletten Verlust der HR-Fähigkeit gleichkommt, sollten also Zellen mit einer kombinierten Defizienz von RAD54 und RAD54B oder von RAD54 und RAD51AP1 ein mit BRCA2-defizienten Zellen vergleichbares Absterben nach Behandlung mit den gegenwärtig klinisch eingesetzten PARP-Inhibitoren zeigen. Um dies zu testen, haben wir in ATRX-profizienten Tumorzellen entweder das RAD54- oder das RAD51AP1-Gen mittels CRISPR-Cas9 ausgeschaltet und die beiden KO Zellen jeweils mit verschiedensten weiteren guide RNAs (gRNAs) gegen zusätzliche DSB-Reparaturfaktoren behandelt. Dabei zeigte sich, dass RAD54 KO Zellen nach zusätzlicher Inaktivierung von RAD51AP1 oder RAD54B durch eine Behandlung mit PARP-Inhibitoren genauso stark abstarben wie BRCA2-defekte Zellen. Ebenso zeigten RAD51AP1 KO Zellen nach zusätzlicher Inaktivierung von RAD54 den gleichen Effekt. Dagegen führte der kombinierte Verlust von RAD51AP1 und RAD54B zu keiner ausgeprägten Empfindlichkeit gegenüber einer PARP-Inhibitor-Behandlung, da diese Zellen den RAD54-vermittelten dHJ-Weg zum Überleben benutzen konnten. Diese Toxizitäts-Studien mit kombinierten Verlusten von Faktoren, die an der Ausbildung von D-loops beteiligt sind, untermauern die über unsere Reparatorexperimente erhaltene Zuordnung der Faktoren zu den jeweiligen HR-Unterwegen. Weiterhin stellen sie gewissermaßen auch ein *proof of principle* dar, dass bei kombiniertem Verlust beider HR-Unterwege eine auf PARP-Inhibitoren basierende Therapie möglich und erfolgreich sein kann. Da, wie schon ausgeführt, Tumorzellen oftmals einen Defekt in einem der beiden HR-Unterwege aufweisen, kann mittels Inhibitoren der zweite Unterweg inaktiviert und so eine individualisierte, tumortypspezifische Therapie angewendet werden.

Zusammenfassend haben wir in unserem Projekt zwei therapeutisch wichtige Ansätze verfolgt. Zum einen haben wir untersucht, wie Tumorzellen mit Defekten im BRCA2-Gen DSBs reparieren, die durch eine PARP-Inhibitor-Behandlung oder ähnliche genotoxische Agentien

erzeugt werden. Es ist bekannt, dass ein beträchtlicher Teil aller Tumore Defekte in diesem Gen aufweisen, was ausgenutzt wird, um eine tumortypspezifische Behandlung mit PARP-Inhibitoren anzuwenden, auf welche BRCA2-defekte Tumorzellen stark ansprechen. Trotz großer klinischer Erfolge treten bei diesen Tumoren aber auch häufig Rezidive auf, was die Frage aufwirft, wie diese Zellen ohne funktionelle HR die Behandlung mit PARP-Inhibitoren überleben können. Wir haben einen wichtigen wissenschaftliche Beitrag zur Beantwortung dieser Frage geliefert, indem wir zeigen konnten, dass in diesen Zellen die induzierten DSBs während der Mitose über einen alternativen DSB-Reparaturweg, das TMEJ, behoben werden. Dabei spielt die Kondensation des Chromatins während der Mitose eine wichtige Rolle, die es erlaubt, dass dieser ansonsten recht fehlerhafte Reparaturweg, die Reparatur der DSBs in der Art erlaubt, die ein Überleben der Zellen ermöglicht. Wir haben weiterhin zeigen können, dass ein weiterer mitotischer Reparaturweg in BRCA2-defekten Zellen wichtig ist und ebenso zum Überleben dieser Zellen nach PARP-Inhibitor-Behandlung beitragen könnte. Diese Ergebnisse könnten einen wichtigen Beitrag dazu leisten, über eine kombinierte Behandlung mit PARP-Inhibitoren und Inhibitoren gegen den TMEJ-Weg den Therapieerfolg von BRCA2-defekten Tumoren weiter zu verbessern.

Im zweiten Ansatz haben wir die Idee verfolgt, gezielt in Tumorzellen durch chemische Inhibition bestimmter Reparaturfaktoren einen HR-Defekt zu erzeugen, der dann klinisch ausgenutzt werden kann, wiederum z.B. durch Behandlung der Tumore mit PARP-Inhibitoren. Dazu ist es wichtig zu berücksichtigen, dass es zwei Unterwege der HR gibt und dass Tumore oftmals Defekte in einem dieser Unterwege aufweisen. Dies hat zur Folge, dass eine Inhibition des einen in diesen Zellen noch intakten Unterweges einen vollständigen Verlust der HR hervorruft, während es in den Normalgewebszellen mit zwei intakten Unterwegen keine oder nahezu keine Auswirkung hat. Dadurch kann ein gezielter funktioneller Unterschied zwischen Tumor- und Normalgewebszellen erzeugt werden, und Tumorzellen können selektiv abgetötet werden. Wir haben in unserem Projekt einen wichtigen Beitrag zur Umsetzung dieser Idee erbracht, indem wir verschiedene Faktoren identifiziert und charakterisiert haben, die spezifisch in einem der beiden HR-Unterwege eine Rolle spielen. Wir haben dann zeigen können, dass bei einem kombinierten Verlust beider Unterwege eine mit BRCA2-defekten Zellen vergleichbare Situation erreicht werden kann, so dass diese Zellen ebenfalls gezielt mit PARP-Inhibitoren inaktiviert werden können. In der klinischen Umsetzung könnte also bei Vorliegen tumorspezifischer Mutationen in Faktoren der HR-Unterwege durch Inhibition des zweiten Unterweges ein klinisch gut behandelbarer Tumorstatus geschaffen werden.

1.3 Literaturverzeichnis

- Abu-Libdeh, B. et al. RECON syndrome is a genome instability disorder caused by mutations in the DNA helicase RECQL1. *J. Clin. Invest.* **132**, e147301 (2022).
- Adam, S. et al. The CIP2A–TOPBP1 axis safeguards chromosome stability and is a synthetic lethal target for BRCA-mutated cancer. *Nat. Cancer* **2**, 1357–1371 (2021).
- Anand, R. et al. HELQ is a dual-function DSB repair enzyme modulated by RPA and RAD51. *Nature* **601**, 268–273 (2022).
- Ashworth, A. & Lord, C.J. Synthetic lethal therapies for cancer: what's next after PARP inhibitors? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **15**, 564–576 (2018).
- Ceccaldi, R. et al. Homologous-recombination-deficient tumours are dependent on Polθ-mediated repair. *Nature* **518**, 258–262 (2015).
- Cerami, E. et al. The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data. *Cancer Discov.* **2**, 401–404 (2012).
- Cerbinskaite, A. et al. Defective homologous recombination in human cancers. *Cancer Treat. Rev.* **38**, 89–100 (2012).
- de Bruijn, I. et al. Analysis and Visualization of Longitudinal Genomic and Clinical Data from the AACR Project GENIE Biopharma Collaborative in cBioPortal. *Cancer Res.* **83**, 3861–3867 (2023).
- De Marco Zompit, M. et al. The CIP2A-TOPBP1 complex safeguards chromosomal stability during mitosis. *Nat. Commun.* **13**, 4143 (2022).
- Dilley, R.L. & Greenberg, R.A. ALternative Telomere Maintenance and Cancer. *Trends Cancer* **1**, 145–156 (2015).
- Elbakry, A. et al. DNA repair synthesis and histone deposition partner during homologous recombination. *Mol. Cell. Oncol.* **5**, e1511210 (2018).
- Elbakry, A. & Löbrich, M. Homologous Recombination Subpathways: A Tangle to Resolve. *Front. Genet.* **12**, 723847 (2021).
- Elbakry, A. et al. ATRX and RECQ5 define distinct homologous recombination subpathways. *Proc Natl. Acad. Sci.* **118**, e2010370118 (2021).
- Ensminger, M. & Löbrich, M. One end to rule them all: Non-homologous end-joining and homologous recombination at DNA double-strand breaks. *Br. J. Radiol.* **93**, 20191054 (2020).
- Ensminger, M. et al. Reparaturwege in Krebszellen gezielt ausschalten. *Biospektrum* **3**, 159–161 (2022).
- Fasching, C.L. et al. Top3-Rmi1 dissolve Rad51-mediated D loops by a topoisomerase-based mechanism. *Mol. Cell* **57**, 595–606 (2015).
- Feng, Z. et al. Rad52 inactivation is synthetically lethal with BRCA2 deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 686–691 (2011).
- Gao, J. et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* **6**, pl1 (2013).
- Harami, G.M. et al. The topoisomerase III alpha-RMI1-RMI2 complex orients human Bloom's syndrome helicase for efficient disruption of D-loops. *Nat. Commun.* **13**, 654 (2022).
- Heyer, W.D. et al. Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination? *Nucleic Acids Res.* **34**, 4115–4125 (2006).
- Higgins, G.S. & Boulton, S.J. Beyond PARP-POLθ as an anticancer target. *Science* **359**, 1217–1218 (2018).

Huang, F. et al. Targeting BRCA1-and BRCA2-deficient cells with RAD52 small molecule inhibitors. *Nucleic Acids Res.* **44**, 4189–4199 (2016).

Jeggo, P.A. & Löbrich, M. How cancer cells hijack DNA double-strand break repair pathways to gain genomic instability. *Biochem. J.* **471**, 1-11 (2015).

Juhász, S. et al. ATRX Promotes DNA Repair Synthesis and Sister Chromatid Exchange during Homologous Recombination. *Mol. Cell* **71**, 11-24 (2018).

Llorens-Agost, M. et al. POL θ -mediated end joining is restricted by RAD52 and BRCA2 until the onset of mitosis. *Nat. Cell Biol.* **23**, 1095-1104 (2021a).

Llorens Agost, M. et al. Turning end-joining upside down in mitosis. *Mol. Cell. Oncol.* **8**, 2007029 (2021b).

Maciejowski, J. & de Lange, T. Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **18**, 175-186 (2017).

Mateos-Gomez, P.A. et al. Mammalian polymerase θ promotes alternative NHEJ and suppresses recombination. *Nature* **518**, 254–257 (2015).

Pike, A.C.W. et al. Human RECQ1 helicase-driven DNA unwinding, annealing, and branch migration: insights from DNA complex structures. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 4286–4291 (2015).

Prakash, R. et al. Homologous recombination and human health: The roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a01660 (2015).

Selemenakis, P. et al. RAD51AP1 and RAD54L can underpin two distinct RAD51-dependent routes of DNA damage repair via homologous recombination. *Front. Cell Dev. Biol.* **10**, 866601 (2022).

Sharma, S. & Brosh, R.M. Jr. Human RECQ1 is a DNA damage responsive protein required for genotoxic stress resistance and suppression of sister chromatid exchanges. *PLoS One* **2**, e1297 (2007).

Sharma, S. et al. RECQL, a member of the RecQ family of DNA helicases, suppresses chromosomal instability. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 1784–1794 (2007).

Sung, P. et al. Rad51 Recombinase and Recombination Mediators. *J. Biol. Chem.* **278**, 42729–42732 (2003).

Roy, R. et al. BRCA1 and BRCA2: Different roles in a common pathway of genome protection. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 68–78 (2012).

Wesoly, J. et al. Differential contributions of mammalian Rad54 paralogs to recombination, DNA damage repair, and meiosis. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 976–989 (2006).

Wiese, C. et al. Promotion of homologous recombination and genomic stability by RAD51AP1 via RAD51 recombinase enhancement. *Mol. Cell* **28**, 482–490 (2007).

2. der wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Personal

Für die Durchführung des Projektes wurde eine Finanzierung für zwei Wissenschaftlerstellen, bestehend aus einem Postdoc und einem Doktoranden, bewilligt. Als Doktoranden konnten wir Herrn Ki Choi Chan gewinnen, der schon während seiner Masterarbeit am renommierten Francis-Crick-Institut in London in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Steven West auf dem Gebiet der DNA-Reparaturforschung gearbeitet hat und wichtige Vorkenntnisse in das Projekt einbringen konnte. Herr Chan hat während der Projektlaufzeit die experimentellen Arbeiten für seine Dissertation erfolgreich abgeschlossen und wird in wenigen Wochen seine Dissertation verteidigen. Herr Chan hat sich mit dem zweiten Teilprojekt beschäftigt und viele der beschriebenen Experimente zur Wirkungsweise von RECQ1, HELQ, RAD54, RAD54B und TOP3A durchgeführt und entsprechende Interpretationen entwickelt.

Mit Herrn Dr. Michael Ensminger konnten wir einen erfahrenen Wissenschaftler für dieses Projekt gewinnen, der schon als Doktorand in meiner Arbeitsgruppe tätig war und auch am Vorgängerprojekt (Verchromt I) mitgearbeitet hatte. Herr Dr. Ensminger brachte durch seine Erfahrung viel Fachwissen und Expertise sowie eine von ihm etablierte Vernetzung in den Projektverbund ein. Solch eine nachhaltige Finanzierung von Wissenschaftlern über ihre Doktorarbeitszeit hinaus gewährleistet die Kontinuität der Forschungsrichtung und ermöglicht die Weitergabe benötigter Kenntnisse und Hintergrundwissen an die nächste Generation von Doktoranden. Im Projekt hat sich Herr Dr. Ensminger mit Aspekten von beiden Teilprojekten befasst, wobei hervorgehoben werden soll, dass er bei der Aufklärung der Funktionsweise des TMEJ-Weges im ersten Teilprojekt eine tragende Rolle innehatte. Über seinen direkten projektbezogenen Forschungsbeitrag hinaus hat sich Herr Dr. Ensminger intensiv in die Lehre eingebracht und somit sein Fachwissen und seine strahlenbiologischen Grundkenntnisse an viele Studenten vermittelt. Herr Dr. Ensminger hat auch ein eigenständiges Wahlmodul in den Lehrkanon an unserem Fachbereich eingebracht und dadurch zum Kompetenzerhalt in der Strahlenforschung maßgeblich beigetragen. Nicht zuletzt sei erwähnt, dass Herr Dr. Ensminger sowie auch Herr Chan während der Projektlaufzeit viele Bachelorarbeiten zum Forschungsthema betreut und dadurch direkt zur Nachwuchsförderung beigetragen haben.

Die Stelle für Herrn Dr. Ensminger wurde nur anteilig (~60%) über das Projekt finanziert und über universitäre Mittel auf 100% aufgestockt. Durch die dadurch eingesparten Gelder konnten wir mit Dr. Amira Elbakry noch einen zweiten Wissenschaftler zeitlich begrenzt für das Projekt gewinnen. Frau Dr. Elbakry hatte in meiner Arbeitsgruppe vor ihrem Einstieg in das Projekt ihre Doktorarbeit absolviert. Im Projekt hat sie maßgeblich zu den Arbeiten zur Funktionsweise von RECQ5 und die darüber berichteten Veröffentlichungen beigetragen (siehe Publikationsliste unten). Im Anschluss an ihre Projektstätigkeit hat Frau Dr. Elbakry die

Möglichkeit wahrgenommen, an der renommierten Harvard Medical School in Boston am Institut von Prof. Dr. Alan d'Andrea ihre Forschungsarbeiten weiterzuführen. Dabei wurde sie über ein von ihr erworbenes Walter-Benjamin-Stipendium der DFG unterstützt, für dessen Bewilligung ihre erfolgreiche Mitarbeit am Projekt eine wichtige Rolle gespielt hat. An der Harvard Medical School hat Frau Dr. Elbakry die Möglichkeit, ihr Wissen in direkt klinisch orientierte Projekte einzubringen. Insgesamt konnten mit Herrn Chan, Herrn Dr. Ensminger und Frau Dr. Elbakry die drei maßgeblich am Projekt beteiligte Wissenschaftler ihre Karriere in der strahlenbiologischen Grundlagenforschung entwickeln und weiter ausbauen.

Neben diesen drei Wissenschaftlern wurden auch noch Frau Dr. Na Wei, Frau Johanna Ertl und Frau Dr. Anastasia Kovina für ein paar wenige Monate durch Projektmittel unterstützt. Diese drei Wissenschaftlerinnen haben ganz gezielte Teilaufgaben übernommen und mit ihren spezifischen Expertisen zum Gelingen des Projektes beigetragen. So waren Frau Ertl und Frau Dr. Kovina an der Klonierung von RECQ1-, RAD54B- und RAD54-Konstrukten sowie an der Herstellung entsprechender KO Zelllinien beteiligt. Frau Dr. Wei hat ihre Erfahrung mit der Klonierung von RAD52-Konstrukten und der entsprechenden Verifizierung über Sequenzierungsanalysen in das Projekt eingebracht. Diese flexible Stellenbesetzung sowie die Einbindung von Bachelor- und Masterstudierenden in das Forschungsthema hat die Ausbildung mehrerer Nachwuchswissenschaftler in der Strahlenbiologie ermöglicht und somit entscheidend zum längerfristigen Kompetenzerhalt in der Strahlenforschung beigetragen. Zu jeder Zeit stand selbstverständlich allen beteiligten Doktoranden und Postdocs mein Fachwissen zur Verfügung.

Sach- und Reisemittel

Die zur Verfügung gestellten Sachmittel deckten die Kosten für die Verbrauchsmaterialien, die für die Durchführung der Experimente der Wissenschaftler und der beteiligten Studierenden benötigt wurden. Insbesondere sei erwähnt, dass viele der für die genetischen Veränderungen von Zelllinien benötigten Transfektionsreagentien und Materialien sowie die dafür notwendigen Arbeiten in unseren Laboren der gentechnischen Sicherheitsstufe 2 sehr kostenintensiv sind und ohne die großzügige Projektunterstützung nicht möglich gewesen wären.

Die Reisekosten ermöglichten den beteiligten Wissenschaftlern die Teilnahme an nationalen und internationalen Konferenzen (siehe Kongressbeiträge unten).

3. der Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Sämtliche geleistete Arbeit war für das Erreichen der Projektziele notwendig and angemessen.

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

Der geplante Nutzen sowie die Verwertbarkeit der erhaltenen Ergebnisse wurde schon ausführlich innerhalb Kapitel 1 beschrieben und diskutiert. Zum einen handelt es sich dabei um einen Erkenntnisgewinn im Sinne der wissenschaftlichen Grundlagenforschung. Zum anderen haben unsere Ergebnisse das Potential, neue klinische Anwendungen im Sinne einer individualisierten Tumorthherapie zu ermöglichen bzw. gegenwärtige Anwendung weiter zu verbessern.

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

Das Projekt behandelt ein Thema, welches weltweit von hunderten von Arbeitsgruppen beforscht wird, wobei nahezu täglich neue Erkenntnisse publiziert werden. Die von uns bearbeiteten Themen zur Reparatur von DSBs in BRCA2-defekten Zellen (erstes Teilprojekt) und zum Verständnis von HR-Unterwegen (zweites Teilprojekt) werden auch von anderen Gruppen erforscht. Die dabei publizierten Erkenntnisse haben direkten Einfluss in die Ausrichtung unserer Experimentansätze gehabt. Sie veränderten unsere Fragestellung allerdings nicht wesentlich, sondern trugen vielmehr zur Fokussierung auf die relevanten Aspekte bei.

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

Erfahrungen und Ergebnisse, die im Rahmen des Projektes gewonnen wurden, flossen in folgende Publikationen ein:

Publikationen (peer-review):

Ensminger, M. & Löbrich, M. One end to rule them all: Non-homologous end-joining and homologous recombination at DNA double-strand breaks. *Br. J. Radiol.* **93**, 20191054 (2020).

Elbakry, A. et al. ATRX and RECQ5 define distinct homologous recombination subpathways. *Proc Natl. Acad. Sci.* **118**, e2010370118 (2021).

Elbakry, A. & Löbrich, M. Homologous Recombination Subpathways: A Tangle to Resolve. *Front. Genet.* **12**, 723847 (2021).

Llorens-Agost, M. et al. POL θ -mediated end joining is restricted by RAD52 and BRCA2 until the onset of mitosis. *Nat. Cell Biol.* **23**, 1095-1104 (2021a).

Llorens Agost, M. et al. Turning end-joining upside down in mitosis. *Mol. Cell. Oncol.* **8**, 2007029 (2021b).

Publikationen (in Magazinen):

Ensminger, M. et al. Reparaturwege in Krebszellen gezielt ausschalten. *Biospektrum* **3**, 159-161 (2022).

Weitere Manuskripte (in Vorbereitung)

Chan, K.C. Regulation of homologous recombination sub-pathway at two-ended double-strand breaks. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) and der Technischen Universität Darmstadt (Verteidigung im August/September 2025).

Chan, K.C., Ertl, J., Kovina, A., Ensminger, M. et al. Regulation of distinct D-loop structures during homologous recombination by synthesis-dependent strand annealing and the double Holliday Junction pathway (geplante Einreichung Oktober 2025).

Kovina, A., Chan, K.C., et al. Characterization of the role of RECQ1 during homologous recombination by synthesis-dependent strand annealing (geplante Einreichung 2026).

Bachelorarbeiten (intern veröffentlicht)

Born, L. M. Charakterisierung der Rollen von RAD52 Domänen bei der DSB-Reparatur (28.09.2020).

Jelinek, N.S.S. Charakterisierung von RAD52 Mutanten und ihrer Rolle in der Doppelstrangbruch-Reparatur (28.09.2020).

Straßner, C. Charakterisierung von RAD52 Mutanten und ihrer Rolle in der Doppelstrangbruch-Reparatur (28.09.2020).

van Wickeren, F. Charakterisierung von RAD52 Mutanten und ihrer Rolle in der Doppelstrangbruch-Reparatur (28.09.2020).

Dörsam, S. Beitrag von POL θ zur Reparatur von CPT-induzierten Brüchen in WT und CHK1-inhibierten Zellen (06.03.2022).

Van Mai, N. Beitrag von POL θ zur Reparatur von CPT-induzierten Brüchen in Zellen depletiert für neu identifizierte SDSA-Faktoren (13.03.2022).

Schudt, T.P. Beteiligung von POL θ an der Reparatur von CPT bedingten DNA-Brüchen in Zellen ohne ATRX (14.03.2022).

Wisser, P. Regulatorische Kontrolle homologer Rekombinationsunterwege durch RECQ1-Helikasen (19.09.2022).

Sattel, J. Beziehung zwischen BLM/TOP3A und SDSA-Faktoren und HR-vermittelten Signalwegen (26.02.2024).

Hensel G.E.C. Identifizierung der Funktionen von SLX1 und TOP3A in der homologen Rekombination und Untersuchung von Schwesterchromatidaustauschen, induziert durch replikationsstörende Agenzien (09.09.2024).

Die Ergebnisse wurden bei folgenden Kongressen und eingeladenen Vorträgen präsentiert

DNA Repair and Human Disease, DGDR, Jena (2022)

Restore, Reorganise, Repurpose: The many faces of DNA repair, SFB1361, Mainz (2022)
(Posterpreis für Herrn Chan)

The future of radiation science, jDeGBS Young Scientist Symposium, Schönthal (2022)

Eingeladener Vortrag an der Harvard Medical School, Dana Faber Cancer Institute, Boston (2022).

Eingeladener Vortrag an der University of Massachusetts Medical School, Worcester (2023)

Balancing Genome Fidelity & Plasticity Conference, Fusion Conference, Tulum (2023)

Impulse. Kompetenzen. Projekte, Kernthemen, Dresden (2023)

Recombination Mechanisms, Fusion Conference, Lissabon (2023)
(Posterpreis für Herrn Chan)

6th German-French DNA Repair Meeting, Mainz (2023)

24. Jahrestagung der DeGBS, Pforzheim (2023)

6th DNA Repair/Replication Structures & Cancer Conference, Fusion Conference, Cancun (2024)