Fachlicher Schlussbericht zum BMBF-Forschungsvorhaben

Einflüsse strahleninduzierter, multipler und einzelner spezifisch-targetierter DNA-Strangschäden auf die übergeordnete meso- und nanoskalige Chromatinarchitektur und die Topologie von Reparaturfoci

Akronym: **NANOSTRANG**

Teilprojekt B (FKZ: 02 NUK 058B) des Verbundprojektes

Antragsteller: Universität des Saarlandes

Projektleitung: Prof. Dr. Claudia E. Rübe

Klinik für Strahlentherapie & Radioonkologie
Universitätsklinikum des Saarlandes
Kirrbergerstrasse Gebäude 6.5
66421 Homburg/ Saar

Laufzeit des Vorhabens: 01.10.2020 – 31.03.2024

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 02NUK058B gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Teil I: Kurzbericht

Ursprüngliche Aufgabenstellung: Bei der Antragstellung wurden folgende Ziele definiert:

„…*Mittels Radionuklid markierten Oligonukleotiden (TFO) sollen in Kernen ausgewählter Zellinien DNA-Schäden spezifisch induziert werden (Partner: FZ Jülich). Die Auswahl der Schadensorte erfolgt an definierten Chromatinloci, so dass neben einzelnen auch multiple Schäden gezielt induziert werden. Mittels hochauflösenden Mikroskopieverfahren (Fluoreszenz-Lokalisationsmikroskopie: Verbundpartner Universität Heidelberg) und Transmissions-Elektronen-mikroskopie (Verbundpartner Universität des Saarlandes) werden die topologischen Veränderungen der Chromatinumgebung nach der Schädigung und während der darauffolgenden Reparatur systematisch in der näheren und ferneren Umgebung im Zellkern untersucht. Hierzu werden Hetero- und Euchromatin mittels Antikörper sowie repetitive Sequenzen mittels fluoreszenter Oligonukleotide spezifisch markiert und analysiert. Die Topologien der Strangbrüche (Bruchenden), Target-Regionen (γH2AX-Foci) und Reparatur-Foci (Rekrutierung der relevanten DNA-Reparaturproteine) werden mittels hochauflösenden Mikroskopieverfahren detektiert und mittels mathematischer Verfahren (Partner: Universität Heidelberg) analysiert. Durch systematischen Vergleich sollen charakteristische Parameter der Chromatin-Architektur und Reparaturfoci ermittelt und mit der Strahlenresistenz der ausgewählten Zellen korreliert werden*.“

Ablauf des Vorhabens: Das Projekt wurde zum 1.10.2020 zunächst für eine Laufzeit von 3 Jahren bewilligt. Im Verlauf des Projektes kam es durch die Restriktionen während der COVID-Pandemie zu zeitlichen Verschiebungen im Ablauf der Arbeitspakete (siehe Zwischenberichte 2021/22), die es erforderlich machten, das Projekt kostenneutral bis zum 30.3.2024 zu verlängern. Darüber hinaus wurden im Teilprojekt des FZ Jülich die TFO-bezogenen Untersuchungen aus personellen Gründen nicht (wie ursprünglich projektiert) umgesetzt, sondern durch Versuche unter Nutzung von Basenanaloga zur Setzung von komplexen DNA Doppelstrangbrüchen (DSB) in definierten Zellzyklus-Phasen ersetzt. Unsere ultrastrukturellen Analysen mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie zeigten jedoch, dass die Prozessierung dieser in unterschiedlichen Zellzyklus-Phasen strahlenexponierten Zellpräparate zu ausgeprägten Artefakten in der Zell- und Zellkern-Struktur führten. Aufgrund der stark veränderten Ultrastruktur des Chromatins konnte das DNA-Schadensmuster und die Chromatin-Architektur in diesen Präparaten der Jurkat-Zellen nicht sinnvoll analysiert werden. Daher wurden zusätzlich TEM-Analysen bei humanen adhärent-wachsenden Fibroblasten, die eine klar definierte Kern- und Chromatin-Architektur aufweisen, durchgeführt.

Wesentlichen Ergebnisse und Zusammenarbeit mit anderen Forschungseinrichtungen: Insgesamt konnte gezeigt werden, dass nach Exposition mit unterschiedlichen Strahlenqualitäten strahleninduzierte Schäden in genomischer DNA nicht nur lokal direkt am Schadensort zu veränderten Chromatin-Strukturen, sondern auch weiträumig die Chromatin-Architektur im Zellkern beeinflusst. Die Dynamik dieser Chromatin-Umstrukturierung wird durch unterschiedliche Mechanismen der Chromatin-Remodellierung reguliert, wie insbesondere durch den Einbau spezifischer Histonvarianten in das Chromatin. Die strahleninduzierte Inkorporation der Histonvariante H2A.J führt zu einer weitreichenden Umstrukturierung der Chromatin-Architektur, wodurch die Bindungsfähigkeit von Transkriptionsfaktoren und schließlich durch die unterschiedliche Aktivierung der

Gentranskription die zellulären Funktionen nach Strahlenexposition entscheidend beeinflusst werden.

Dieses Verbundprojekt gliederte sich in mehrere Arbeitspakete. Im Rahmen der gemeinsamen Versuchsvorhaben wurden vom Verbundpartner Jülich (Teilprojekt Jülich, 02NUK058C) bei Jurkat-Zellen nach erfolgter Zellzyklus-Synchronisation verschiedene Iod-125-Expositions-Szenarien durchgeführt, um durch Einbau von radioaktivem Iod komplexe DNA-Läsionen gezielt im Euchromatin bzw. Heterochromatin zu induzieren (Abschnitt 1.1). Darüber hinaus wurden bei Jurkat-Zellen nach Zellzyklus-Synchronisation Bestrahlungsexperimente in verschiedenen Zellzyklus-Phasen (Abschnitt 1.2) bzw. in Ab- oder Anwesenheit von Radikalfängern (Abschnitt 1.3) durchgeführt. Diese Zellpräparate wurden den Kooperationspartnern zu weiteren Analysen zur Verfügung gestellt. Mittels hochauflösender Fluoreszenz-Lokalisationsmikroskopie (Teilprojekt Heidelberg, 02NUK058A) bzw. Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) (Teilprojekt Homburg; 02NUK058B) wurden anhand dieser Zellpräparate die topologischen Veränderungen der Chromatin-Architektur auf der Meso- bzw. Nanoskala nach erfolgter Schädigung und während der darauffolgenden Reparaturprozesse untersucht. Darüber hinaus wurden im Rahmen des Teilprojektes B zusätzliche Analysen mit verschiedenen Elektronenmikroskopischen Verfahren durchgeführt, um die Struktur-Funktions-Beziehungen zwischen strahleninduzierten DNA-Schäden, lokaler und globaler Chromatin-Umstrukturierung, sowie ihre Auswirkungen auf verschiedene Zellfunktionen zu untersuchen. Aufgrund ihrer klar strukturierten Chromatin-Organisation wurden zusätzlich adhärent-wachsende Fibroblasten ausgewählt, um das DNA-Schadensmusters nach Exposition mit multiplen bzw. einzelnen spezifisch-targetierter Kohlenstoff-Ionen direkt nach Schädigung und während der anschließenden Reparaturprozesse mittels TEM zu analysieren (Abschnitt 1.4). Um Struktur-Funktions-Zusammenhänge zu analysieren, wurde die komplexe 3D-Architektur bestrahlter Fibroblasten mittels Volumen-Elektronenmikroskopie untersucht. Es zeigte sich, dass hohe Strahlendosen nicht nur zu veränderten Chromatin-Architekturen führen, sondern dass beschädigte Chromatin-Fragmente im Rahmen der strahleninduzierten Seneszenz durch die Bildung von Mikrokernen eliminiert werden (Abschnitt 1.5). Darüber hinaus wurde zur Charakterisierung des strahleninduzierten DNA-Schadensmusters mittels TEM die automatisierte Bildanalyse etabliert. Dabei wurden mithilfe KI-basierter Software die unterschiedlichen DNA-Schadensmuster nach Strahlenexposition mit hohen bzw. niedrigen linearen Energietransfer (LET) in den verschiedenen Chromatin-Kompartimenten automatisiert analysiert (Abschnitt 1.6). Nach Strahlenexposition ist die massive Umstrukturierung des Chromatins mit der Inkorporation der Histonvariante H2A.J assoziiert. Durch ein Fibroblasten-Modell mit supprimierter bzw. überexprimierter H2A.J-Expression konnte gezeigt werden, dass H2A.J die Bindungsfähigkeit von Transkriptionsfaktoren und durch unterschiedliche Aktivierung der Gentranskription die zellulären Funktionen nach Strahlenexposition entscheidend beeinflusst (Abschnitt 1.7). Dabei ist die Histonvariante H2A.J nicht nur mit der prämaturen Seneszenz nach Strahlenexposition assoziiert, sondern moduliert insbesondere den Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP). In einem Maus-Modell der Strahlendermatitis konnte gezeigt werden, dass das Fehlen einer strahleninduzierten H2A.J-Expression in epidermalen Keratinozyten der H2A.J *knock-out* Haut mit einer erhöhten Seneszenz-Induktion, einer Modulation der SASP-Expression und einer Verstärkung der entzündlichen Hautreaktionen verbunden ist (Abschnitt 1.8). Demgegenüber scheint eine Überexpression von H2A.J zur potenziellen Radioresistenz und zur onkogenen Transformation möglicherweise durch die Aktivierung des WNT-Signalweges zu führen (Abschnitt 1.9).

Teil II: Ausführliche Darstellung der wissenschaftlichen Ergebnisse

1.1. Untersuchungen zur Chromatin-Organisation nach Schädigung von Eu- und Heterochromatin durch inkorporierte 125I-UdR Nukleosidanaloga

Das Euchromatin wird in der frühen, das Heterochromatin wird bevorzugt in der späten S-Phase des Zellzyklus repliziert. Der selektive Einbau des Nukleosid-Analogons 125I-UdR in der frühen bzw. der späten S-Phase ermöglicht daher die exklusive Schädigung des Eu- bzw. Heterochromatins. Vom Verbundpartner Jülich wurden in Suspensions-Kultur wachsende Jurkat-Zellen mittels Aphidicolin synchronisiert, anschließend mit 125I-UdR in der frühen S-Phase (Euchromatin) bzw. späten S-Phase (Heterochromatin) puls-gelabelt und nach Einwanderung in die G1-Phase zur Akkumulation von radioaktiven Zerfällen eingefroren. Nach Zerfalls-Akkumulation wurden die Zellen aufgetaut und zu verschiedenen Zeitpunkten für die Elektronenmikroskopie fixiert. Für Vergleichsuntersuchungen wurden Zellen in der G1- bzw. G2/M-Zellzyklusphase auf Eis γ-bestrahlt und anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten fixiert. Begleitende Zellzyklus-Analysen zeigten hinsichtlich der Expositions-Szenarien in der G1-Phase, dass die Synchronisierung effektiv war und im Mittel ca. 85% der Zellen in der G1-Phase mit 125I bzw. γ-Strahlung exponiert wurden. Beim G2/M-Phase Expositions-Szenario zeigten die Analysen, dass im Mittel ca. 70% der Zellen in der G2/M-Phase γ-bestrahlt wurden.

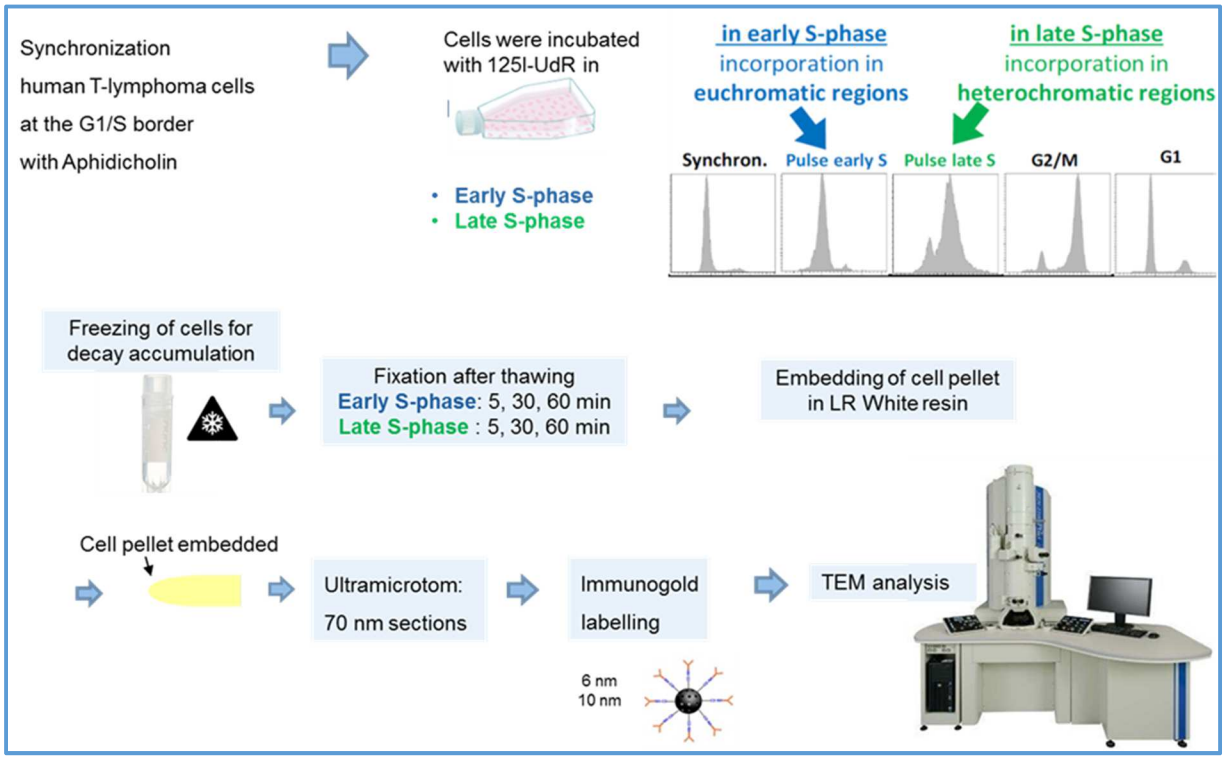

Abb. 1.1.1: Versuchsablauf für die TEM-Analyse zur Charakterisierung des DNA-Schadensmusters nach dem Puls-Labeling mit 125I-UdR in der frühen bzw. späten S-Phase der Jurkat-Zellen.

Für die Elektronen-Mikroskopie wurden Hochdosis-exponierte Proben (im Mittel ca. 2000 akkumulierte 125I-Zerfälle/Zelle bzw. 10Gy γ-Strahlung) vom Projektpartner Jülich zur Verfügung gestellt. Diese Hochdosis-exponierten Proben zeigten in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie starke γ-H2AX bzw. 53BP1 Signal-Intensitäten mit einer starken Überlagerung der Foci, so dass ausreichend DSBs in den Ultradünnschnitten für die TEM-Analyse erzeugt wurden. Nach entsprechender Zerfalls-Akkumulation wurden die Zellen aufgetaut und zu verschiedenen Zeitpunkten (5, 30, 60 min) chemisch mit Aldehyden für die TEM-Analysen fixiert und zur weiteren Zell-Präparation zum Kooperationspartner versendet. Nach Ankunft im Labor für molekulare Radioonkologie des Universitätsklinikums des Saarlandes wurden die Zellproben durch das Überführen in steigende Konzentrationen organischen Lösungsmittels entwässert und das Lösungsmittel wurde durch flüssiges Harz ersetzt. Nach der Polymerisierung wurden von den Zellproben unter Nutzung eines Ultramikrotoms ca. 70 nm dicke Schnitte angefertigt und auf Grids überführt. Nach Inkubation mit entsprechenden Primär-Antikörpern wurden die Präparate gewaschen und anschließend mit 6 bzw. 10nm Nanopartikel-gekoppelten Sekundär-Antikörpern markiert. Nach Kontrastierung der Schnitte mit Uranylacetat wurden die Zellproben dann mittels TEM (Tecnai Biotwin™, FEI, Eindhoven, The Netherlands) analysiert. Die Ergebnisse der TEM-Analyse zeigten, dass direkt nach dem Auftauen (5 min) nur sehr wenige DNA-Schäden nachweisbar waren, wahrscheinlich da die Reparaturfaktoren noch nicht an den Schadensorten rekrutiert werden konnten. Nach 30 min waren grundsätzlich deutlich mehr DNA-Schäden nachweisbar; der höchste DNA-Schadenslevel war jedoch nach 60 min zu beobachten. Möglicherweise ist für Erkennung vorhandener DSBs durch entsprechende Sensoren und für die effektive Transduktion des Schadenssignals zunächst ein entsprechendes Chromatin-Remodelling erforderlich. 60 min nach dem Auftauen beobachteten wir ein DNA-Schadensmuster vergleichbar mit dem von Zellen nach niedrig-LET Bestrahlung. Einzelne pKu70 Nanopartikel markieren unreparierte DSBs, deutlich mehr 53BP1-Nanopartikel markieren bereits reparierte Brüche, und zwar immer in Randbereichen des Heterochromatins, aber nicht im kompakten Heterochromatin. Bei der 125I-UdR Inkorporation in der frühen S-Phase zeigten sich geringere DNA-Schäden, möglicherweise da im locker gepackten Euchromatin durch die begrenzte Reichweite der Auger-Elektronen weniger DNA-Schäden induziert werden. Bei der 125I-UdR Inkorporation in der späten S-Phase zeigten sich deutlich mehr DNA-Schäden; aufgrund der dicht gepackten DNA im Heterochromatin können auch bei den kurzreichenden Auger-Elektronen offensichtlich mehr DNA-Schäden induziert werden. Beim radioaktiven Zerfall des inkorporierten Iod-125 Atoms entstehen kurzreichende Auger-Elektronen in unmittelbarer Nähe zum Zerfallsort und führen zu hohen Ionisationsdichten (≤28 Auger-Elektronen pro Zerfall innerhalb von 1-10 nm). Es wurde daher vermutet, dass nach dem radioaktiven Zerfall

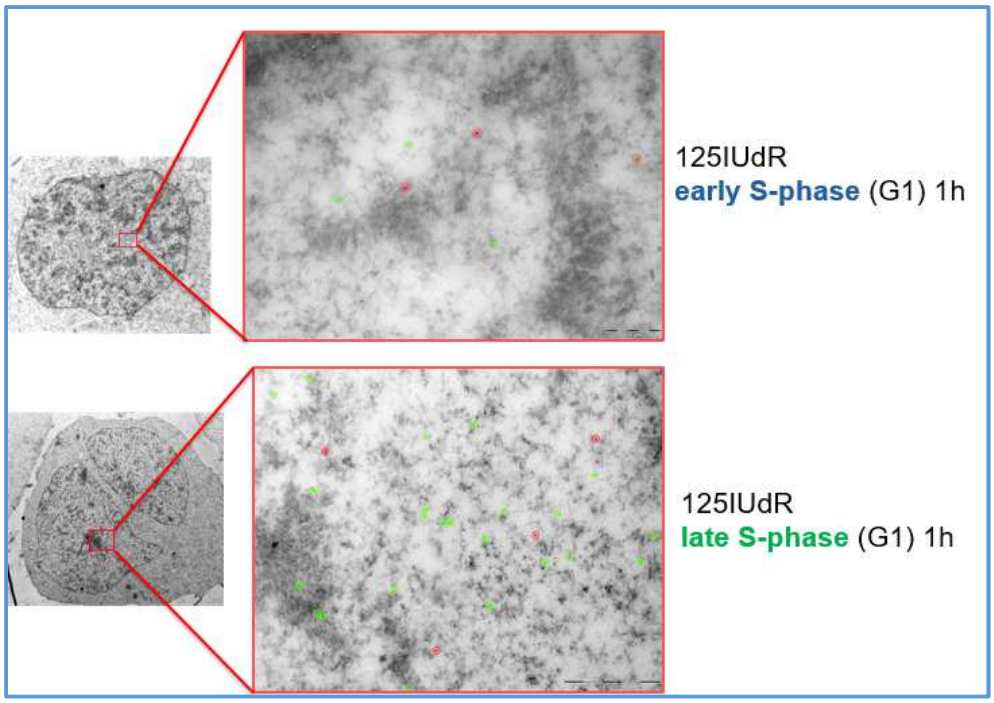

Abb. 1.1.2: TEM-Aufnahmen zur Charakterisierung des DNA-Schadensmusters nach dem Puls-Labeling mit 125I-UdR in der frühen bzw. späten S-Phase der Jurkat-Zellen.

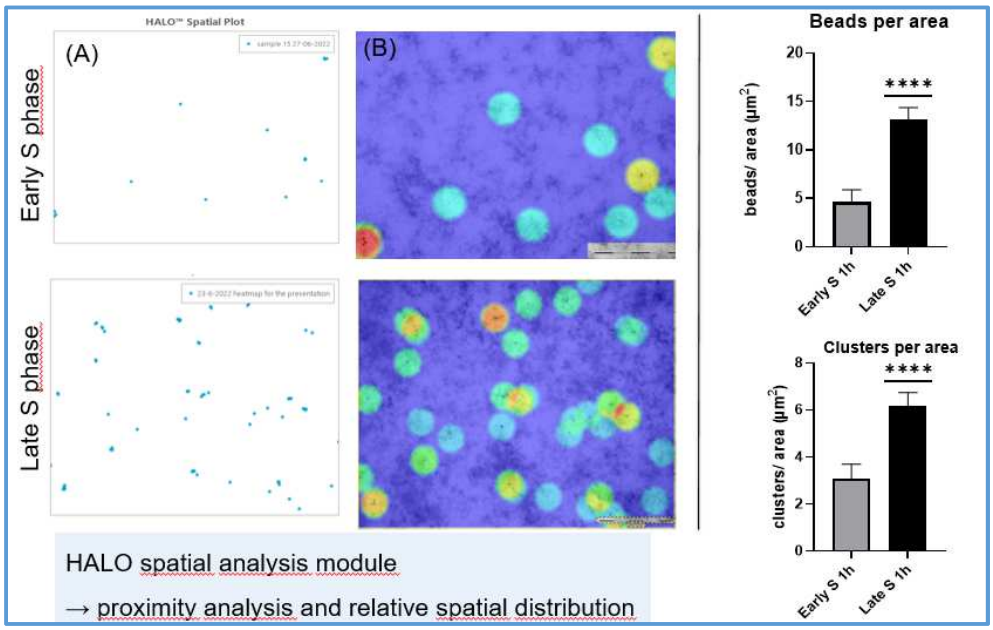

Abb. 1.1.3: Quantifizierung der Beads und Cluster mittels automatisierter Bildanalyse von TEM-Aufnahmen zur Charakterisierung des DNA-Schadensmusters nach dem Puls-Labeling mit 125I-UdR in der frühen bzw. späten S-Phase der Jurkat-Zellen.

des inkorporierten Iod-125 Atoms hochkomplexe DNA-Läsionen innerhalb weniger Basenpaaren entstehen. In diesem TEM-Proben konnte jedoch kein stärkeres Clustering der Nanopartikel für pKu70 oder 53BP1 detektiert werden, wie dies in früheren Arbeiten nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen beobachtet wurde. Möglicherweise ist die Reichweite oder die Energie der Auger-Elektronen zu gering, um gleichzeitig multiple DSBs zu induzieren.

1.2. Induktion und Reparatur von DNA-Schäden in der G2/M-Zellzyklus-Phase nach γ-Bestrahlung

Die Jurkat-Zellen wurden vom Projektpartner Jülich synchronisiert und nach Einwanderung in der G2/M Phase auf Eis mit 10Gy bestrahlt und anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten (1h, 5h und 24h post-IR) für die Elektronen-Mikroskopie fixiert.

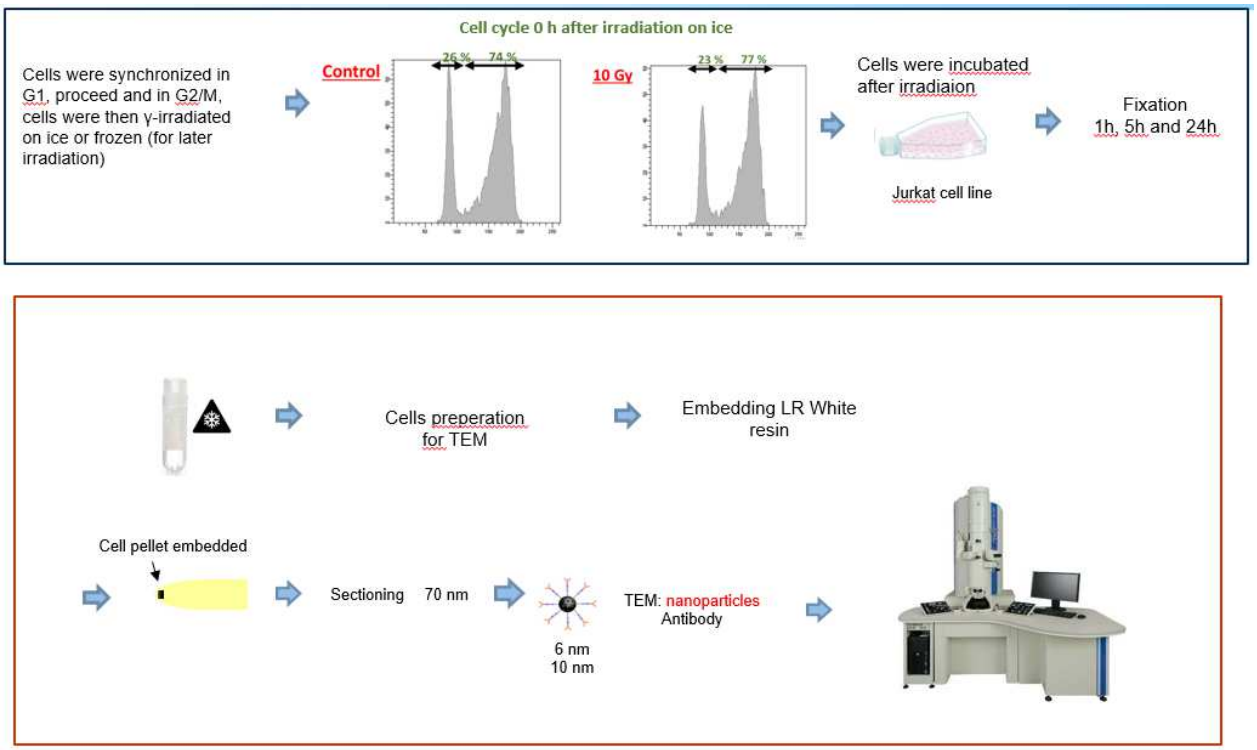

Abb. 1.2.1: Versuchsablauf für die TEM-Analyse zur Charakterisierung des DNA-Schadensmusters nach Bestrahlung in der G2/M-Zellzyklusphase der Jurkat-Zellen.

Bei der Analyse dieser Jurkat-Zellen stellten sich folgende technische Probleme:

(1) Zunächst erhielten wir aus Jülich Proben mit fehlenden bzw. unzureichenden Zellpellets, so dass zunächst die Asservierung und Fixierung der Zellen in Absprache mit dem Projektpartner zunächst verbessert werden musste, um eine entsprechende Probenqualtität erhalten zu können.

(2) Die Erfassung nativer Zustände bei biologischen Proben erfordert spezielle Verfahren der Kryopräperation, da anonsten die Kristallbildung in den eingefrorenen Proben bei tiefen Temperaturen zu massiven Zellschäden führen. Dementsprechend müssen im Präparationsverlauf die Zellen mittels organischer Lösungsmittel und Fixierzusätze dehydriert und chemisch konserviert werden, bevor sie in eine Kunstharz-Einbettung für die Elektronen-Mikroskopie überführt werden können. Da die Zellen auf Eis bestrahlt bzw. vor Bestrahlung eingefroren wurden, zeigten sich regelmäßig massive Artefakte in der Zell- und Zellkern-

Struktur. Daher war die Aussagekraft ultrastruktureller Beobachtungen mittels der Elektronen-Mikroskopie deutlich eingeschränkt.

(3) Nach ihrer Synchronisation wurden die proliferierenden Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus mit 10Gy bestrahlt. Entsprechend der Zellzyklus-Analysen vom Projektpartner Jülich befanden sich ca. 70% der Zellen in der G2/M-Phase. Bei den Ultradünn-Schnitten der TEM-Analysen besteht das Problem, dass die G2/M-Zellen im Zellpellet nicht zu identifizieren sind. Jurkat-Zellen (immortalisierte T-Lymphozyten Zelllinie) sind Suspensions- und somit nicht-adhärente Zellen, die in der Schwebe wachsen und nicht nicht an Kulturoberflächen haften. Dadurch kann weder die Größe und Form des Zellkerns, noch die Chromatinstruktur in den Ultradünnschnitten der TEM-Analyse vor und nach Bestrahlung systematisch charakterisiert werden. Bei den Jurkat-Zellen ist eine klare Differenzierung zwischen Euchromatin und Heterochromatin allein aufgrund der unterschiedlichen Elektronen-Absorption (hell versus dunkel, wie wie beispielsweise bei adhärend-wachsenden Fibroblasten) nicht möglich. Auch durch die Nutzung von Markern für bestimmte Histon-Modifikationen konnte keine klare Zuordnung zu Euchromatin bzw. Heterochromatin in den Jurkat-Zellen erzielt werden. H3K9me3 und H3K4me3 sind epigenetische Modifikation des DNA-Verpackungsproteins Histon H3, die an der Regulierung der Genexpression beteiligt sind, indem sie die DNA-Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren beeinflussen. Doch beide Marker zeigten keine klare Zuordnung zu verdichteten bzw. offenen Chromatin-Bereichen.

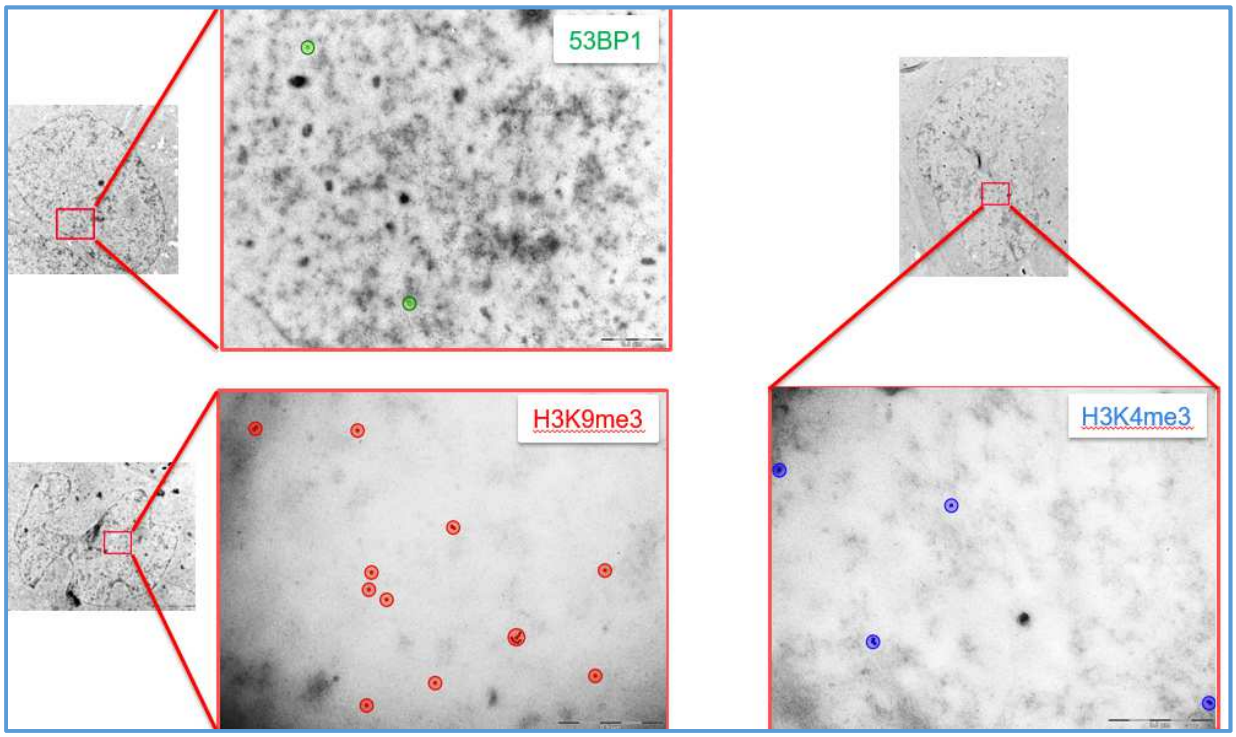

Abb. 1.2.2: TEM-Aufnahmen nach Bestrahlung der Jurkat-Zellen in der G2/M-Zellzyklusphase: Markierungen für 53BP1, sowie für die Histon-Modifikationen H3K9me3 und H3K4me3.

(4) Nach Immunfluoreszenz-Färbungen zeigte sich nicht nur bei den bestrahlten Jurkat-Zellen sondern auch bei nicht-exponierten Zellproben unspezifische Fluoreszenz-Signale für die DNA-Reparaturmarker Rad51 (wichige Funktion beim Strang-Austausch im Rahmen der homologen Rekombination) und dem Replikationsprotein A (RPA, zentrale Funktion bei der Abschirmung einzelsträngiger DNA in der S/G2-Phase, im Rahmen der DNA-Replikation, Reparatur und Rekombination). Insbesondere für RPA zeigten sich sowohl in bestrahlten als auch in unbestrahlten Zellen ein unspezifisches, über den Zellkern diffus verteiltes, homogenes Signal. Da eine Auswertung dieser Fluoreszenz-Signale nicht möglich war, wurden Präextraktion-Experimente mit Diethiothreitol (DTT) und Triton durchgeführt, um die unspezifischen Signale in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie (IFM) zu reduzieren. Hierbei reduziert DTT Disulfidbrücken, wodurch Proteine denaturiert und dadurch Hintergrund-Signale minimieren werden sollen. Nach mehreren Optimierungsschritten konnte in der IFM sowohl in bestrahlten als auch in unbestrahlten präextrahierten Zellen eine Reduktion der diffusen RPA Signale und eine deutliche Induktion strahleninduzierter RPA-Foci gegenüber nicht-präextrahierten Zellen erreicht werden. Nach dieser methodischen Optimierung wurden die Zellen synchronisiert, in der G2/M Phase auf Eis mit 10Gy bestrahlt, für 1h, 5h und 24h weiter kultiviert, danach präextrahiert und für TEM fixiert. Die für die TEM-Analysen fixierten Zellen zeigten jedoch eindrucksvolle Artefakten in der Zell- und Zellkern-Struktur aller Zellen mit einer massiv veränderten Ultrastruktur des Chromatins, so dass eine weitere Auswertung nicht möglich war.

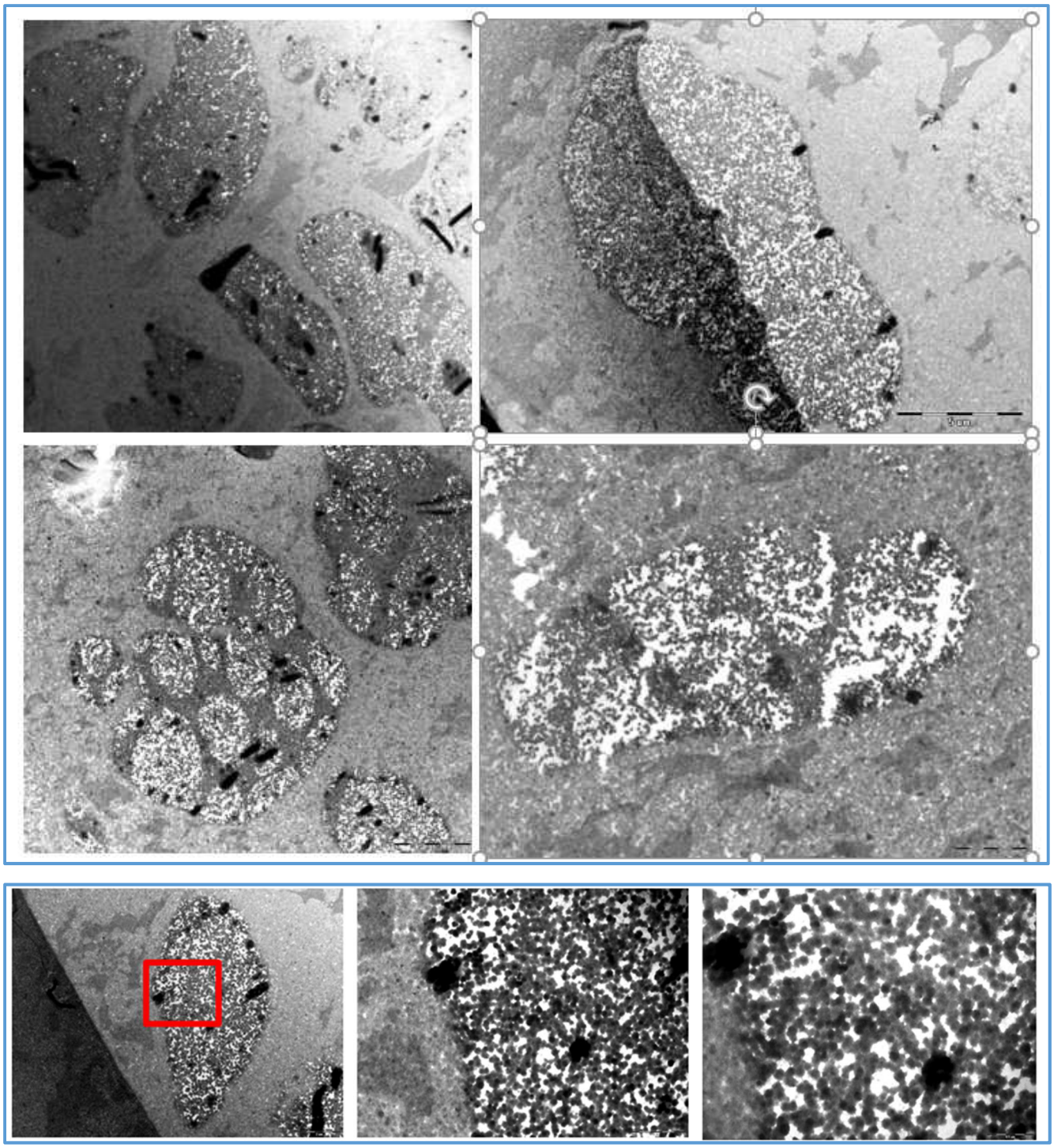

Abb. 1.2.3: TEM-Aufnahmen von präextrahierten Jurkat-Zellen: Die Präextraktion führt zu eindrucksvollen Artefakten in der Zell- und Zellkern-Struktur mit einer massiv veränderten Ultrastruktur des Chromatins.

1.3. Einfluss des Radikalfängers DMSO auf die Induktion von DNA-Schäden

Ionisierende Strahlen können die genomische DNA sowohl durch direkte Strahlenwirkung als auch indirekt durch Bildung reaktiver Sauerstoff-Radikale schädigen. Bei der indirekten Strahlenwirkung spielt insbes. die Radiolyse des Wassers eine besondere Rolle, da chemisch reaktive Sauerstoff-Verbindungen (*Reactive Oxygen Species*, ROS) im hohen Maße gebildet werden. Aufgrund ihrer hohen chemischen Reaktivität können diese ROS bei räumlicher Nähe eine Vielzahl von DNA-Schäden induzieren. Um diese indirekten Strahleneffekte mittels hochauflösender Mikroskopie-Verfahren eingehender zu untersuchen, wurden Zellen mit bzw. ohne dem Radikalfänger Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) bestrahlt und anschließend hinsichtlich DSB-Induktion untersucht.

Zunächst wurden vom Projektpartner Jülich Experimente durchgeführt, um äquivalente Effektdosen für spätere Präparationen zu identifizieren, und somit Zellen mit bzw. ohne DMSO-Behandlung mit einem ähnlichen DNA-Schadensniveau auszuwerten zu können. Hierfür wurden Jurkat-Zellen zunächst ohne bzw. mit DMSO (10%) auf Eis bestrahlt (0, 2, 4 und 10Gy), für 0.5h, 1h und 2h kultiviert und anschließend fixiert, um die Bildung von Reparatur-Foci zu untersuchen. Vergleichende Analysen mittels Durchflusszytometrie zeigten bei allen Expositionsbedingungen eine maximale DSB-Induktion nach 1-stündiger Kultivierung. Vergleichende Analysen der Zellen, die in Gegenwart von DMSO bzw. ohne DMSO bestrahlt wurden, zeigten bezüglich der kalkulierten Regressionsgeraden ein Verhältnis von ca. 3:1. Daher wurden für die TEM-Analysen synchronisierte Zellen in der G1-Phase auf Eis mit DSMO und 30Gy bestrahlt bzw. ohne DMSO mit 10Gy bestrahlt und für die Analyse nach 1h, 5h bzw. 24h fixiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde vom Projektpartner Jülich eine starke und sehr ähnliche γH2AX-Induktion in den G1-Zellen, die in Gegenwart von DMSO mit 30Gy bzw. ohne DMSO mit 10Gy bestrahlt wurden, beobachtet. Demgegenüber zeigten sich bei den TEM-Analysen mehr DNA-Schäden in den mit 30Gy mit DMSO bestrahlten versus den mit 10Gy ohne DMSO bestrahlten Zellen. Aufgrund der unterschiedlichen Bestrahlungsdosen konnte der potenziell protektive Effekt von DMSO nicht ermittelt werden. Daher wurde auf eine systematische Quantifizierung der Nanopartikel mittels automatisierter Bildanalyse verzichtet. Auch konnte kein systematischer Unterschied zwischen diesen bestrahlten Zellproben (30Gy mit DMSO versus 10Gy ohne DMSO) hinsichtlich dem DNA-Schadensmuster beobachtet werden. Insgesamt ergaben die vergleichenden TEM-Analysen dieser Zellproben keine Hinweise darauf, inwieweit jeweils die direkt-vermittelte bzw. indirekte ROS-vermittelte Strahlenwirkung zum DNA-/Chromatin-Schadensmuster beitragen. Somit können keine Aussagen getroffen werden, inwieweit der Radikalfänger DMSO die ROS-vermittelte DNA-Schädigung und somit die Gesamtwirkung der Strahlung reduziert.

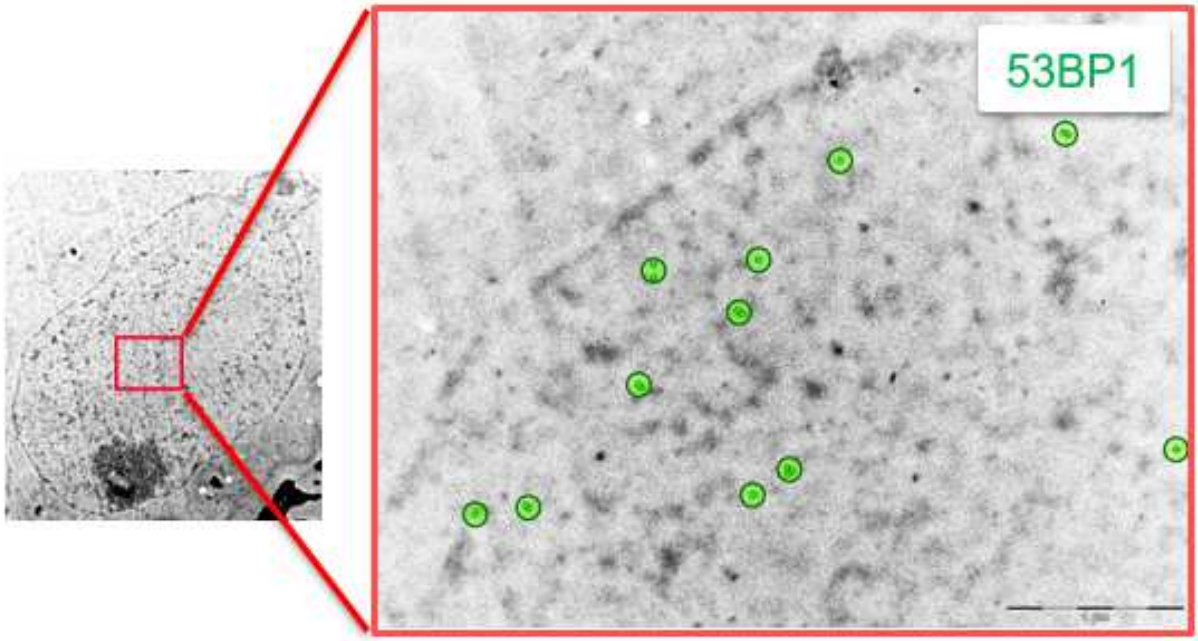

Abb. 1.3.1: TEM-Aufnahmen von Jurkat-Zellen mit 30Gy und DMSO bestrahlt. Zahlreiche 53BP1-Nanopartikel markieren DSBs.

.

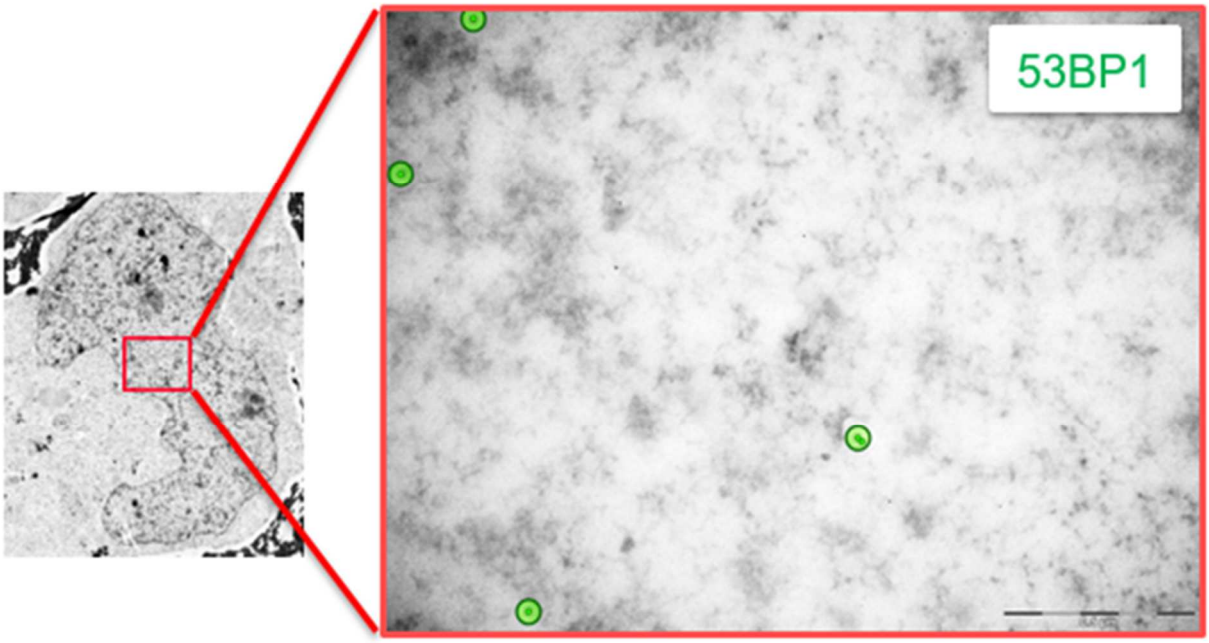

Abb. 1.3.2: TEM-Aufnahmen von Jurkat-Zellen mit 10Gy ohne DMSO bestrahlt. Wenige 53BP1-Nanopartikel markieren DSBs.

1.4 Charakterisierung des DNA-Schadensmusters nach Exposition mit multiplen und einzelnen spezifisch-targetierter Kohlenstoff-Ionen

Bei der Radiotherapie mit Kohlenstoff-Ionen wird die verbesserte Wirksamkeit mit der räumlichen Clusterbildung von DNA-Schäden aufgrund der hoch-lokalisierten Energiedeposition erklärt; doch ist aufgrund unzureichender Auflösung herkömmlicher Mikroskopie-Verfahren die Visualisierung und somit Charakterisierung dieses DNA-Schadensmusters nicht möglich. In diesem Forschungsprojekt wurde das durch einzelne und multiple Kohlenstoff-Ionen induzierten DNA-Schadenmuster im nukleären Chromatinumfeld mittels verschiedener hochauflösender Mikroskopie-Verfahren analysiert. Mit dem Schwerionen-Mikrobeam SNAKE (*Superconducting Nanoprobe for Applied nuclear physics Experiments*) wurden Fibroblasten-Monolayer mit definierten Zahlen von Kohlenstoff-Ionen (1/10/100 Ionen pro Puls, ipp) bestrahlt, die auf mikrometer-große Streifen oder Punkte fokussiert waren. Strahlungsinduzierte Läsionen wurden als DNA-Schadenfoci (γH2AX, 53BP1) durch konventionelle IFM visualisiert. Auf der Mikro- und Nanoskala wurden DSBs im Kontext des Chromatins visualisiert, indem das Ku-Heterodimer durch Nanopartikel markiert wurde. Einzelne und geclusterte pKu70-markierte DSBs wurden in eu- und heterochromatischen Regionen zu definierten Zeitpunkten nach Bestrahlung mittels TEM quantifiziert. Eine zunehmende Anzahl von Kohlenstoff-Ionen pro Bestrahlungsstelle führte zur verstärkten räumlichen Clusterbildung von DNA-Schäden und erhöhter Schadenskomplexität mit zwei oder mehr DSBs in engster Nähe (im Nanometer-Bereich). Dieser Effekt war in Euchromatin nachweisbar, war jedoch im Heterochromatin (mit dicht-gepackter DNA) deutlich ausgeprägter. Die Analyse der Dynamik der Schadensverarbeitung zeigt, dass euchromatische DSBs effizient verarbeitet und zeitgerecht (innerhalb weniger Stunden) repariert werden. Im Heterochromatin hingegen nahm die Anzahl der geclusterten DSBs in den ersten Stunden nach der Bestrahlung kontinuierlich zu. Aufgrund unserer Ergebnisse vermuten wir, dass erst im Rahmen der allmählichen Chromatin-Dekondensation, diese geclusterten DSBs zeitlich verzögert im Heterochromatin nachgewiesen werden können. Insgesamt führt eine zunehmende Anzahl von Kohlenstoff-Ionen in subnuklearen Chromatin-Regionen zur verstärkten räumlichen DSB-Clusterbildung und erhöht die Schadenskomplexität insbesondere in heterochromatischen Regionen.

Focused Ion Microbeam Irradiation Induces Clustering of DNA Double-Strand Breaks in Heterochromatin Visualized by Nanoscale-Resolution Electron Microscopy.
Lorat Y, Reindl J, Isermann A, Rübe C, Friedl AA, **Rübe CE.** Int J Mol Sci. 2021 Jul 16;22(14):7638. doi: 10.3390/ijms22147638.PMID: 34299263

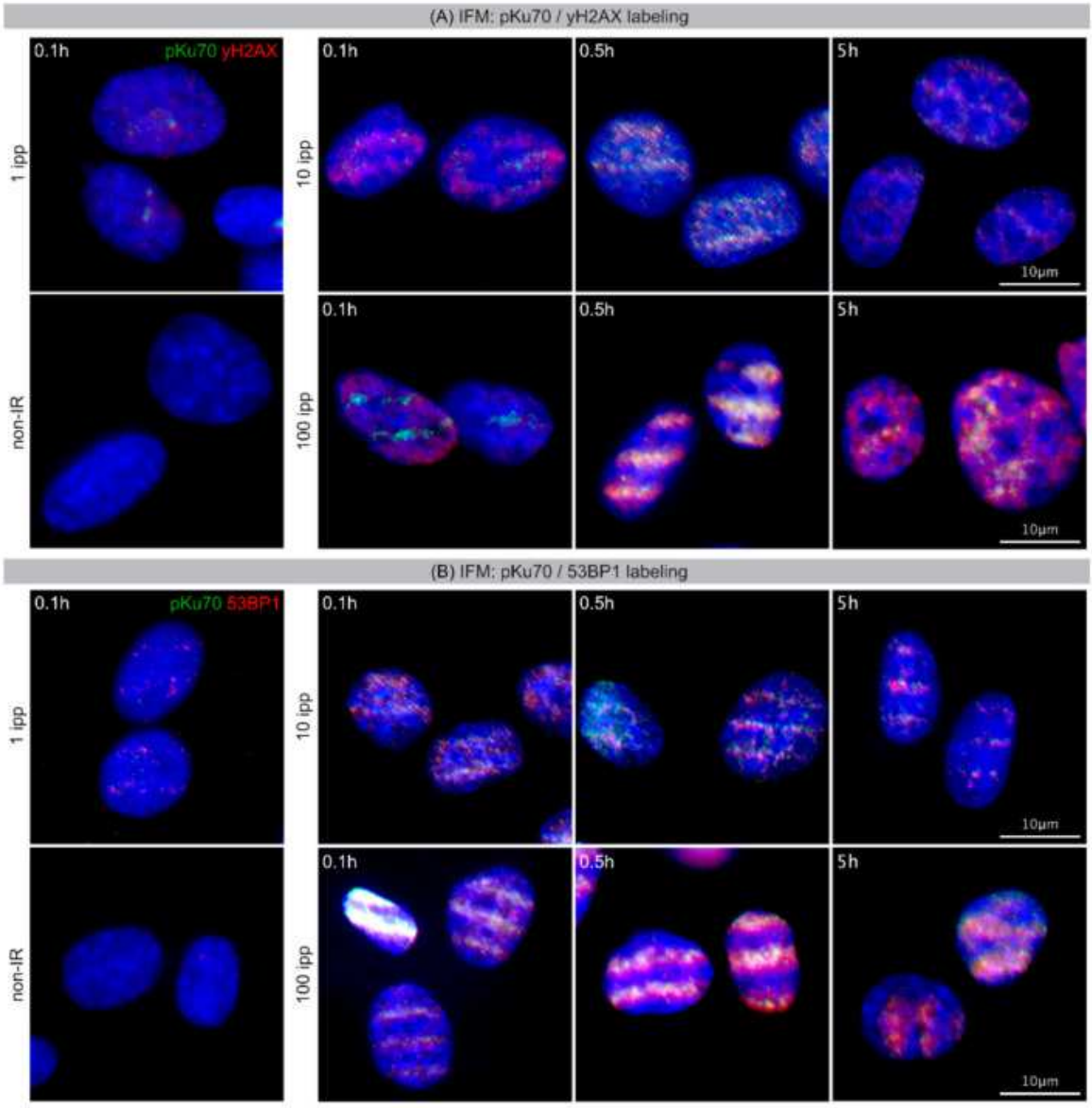

Abb. 1.4.1: Strahlungsinduzierte DNA-Schadensmuster, visualisiert durch konventionelle IFM.

(A) Mikroaufnahmen der Doppelfärbung für pKu70 (grün) mit γH2AX (rot) in DAPI-gefärbten Kernen, analysiert 0.1h, 0.5h und 5h nach linearer Mikrostrahl-IR mit 1, 10 und 100 ipp Kohlenstoff-Ionen im Vergleich zu nicht-bestrahlte Zellen.

(B) Mikroaufnahmen der Doppelfärbung für pKu70 (grün) mit 53BP1 (rot) in DAPI-gefärbten Kernen, analysiert 0.1h, 0.5h und 5h nach linearer Mikrostrahl-IR mit 1, 10 und 100 ipp Kohlenstoff-Ionen, im Vergleich zu nicht-bestrahlte Zellen.

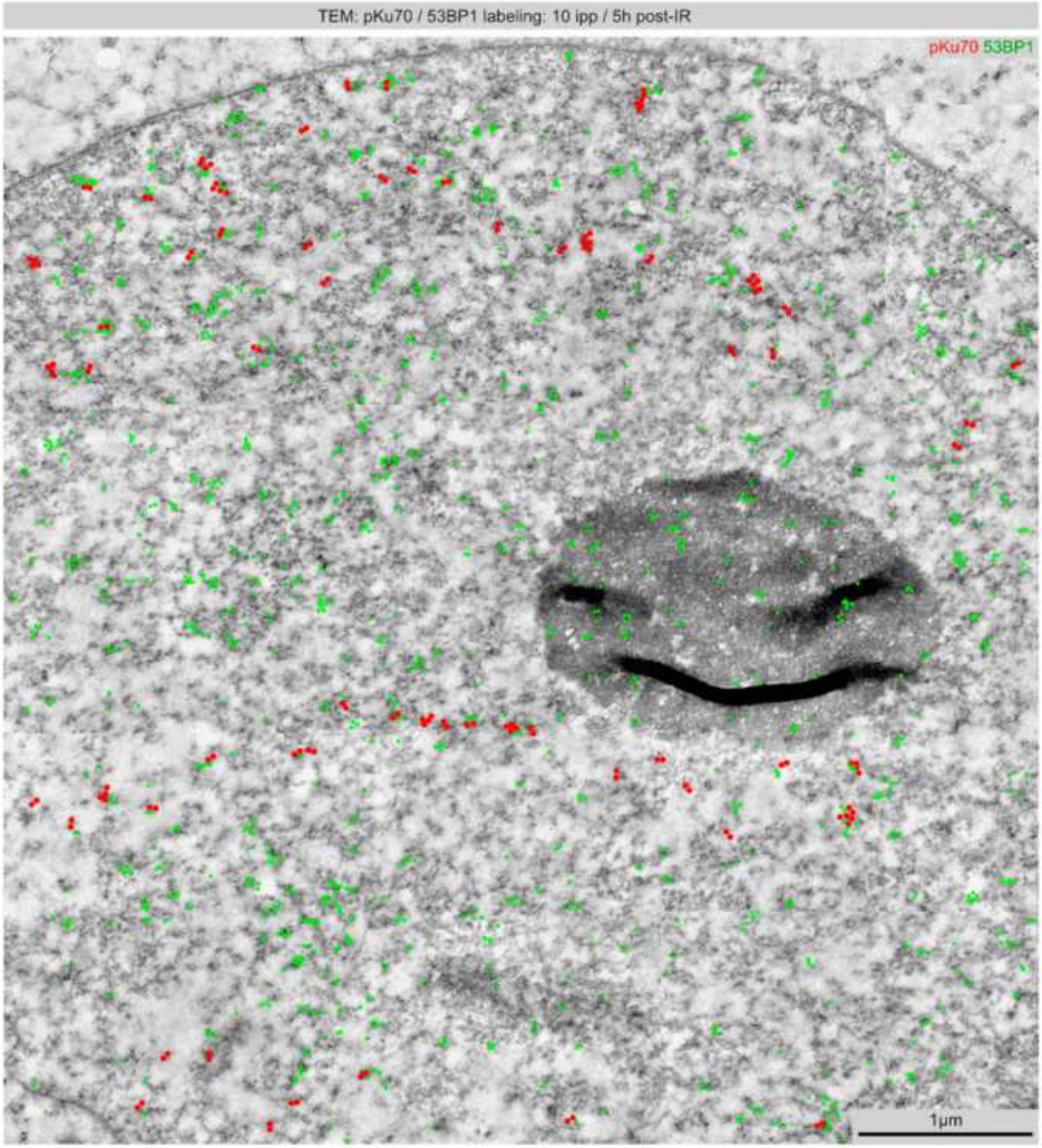

Abb. 1.4.2: Visualisierung der räumlichen Verteilung von DNA-Läsionen im Zellkern, die durch multiple Kohlenstoff-Ionen (10 ipp) induziert wurden. TEM-Aufnahmen der Doppelmarkierung für pKu70 (10-nm Partikel, rot gefärbt) und 53BP1 (6-nm Partikel, grün gefärbt) 5 Stunden nach Mikrostrahl-IR mit 10 ipp Kohlenstoff-Ionen.

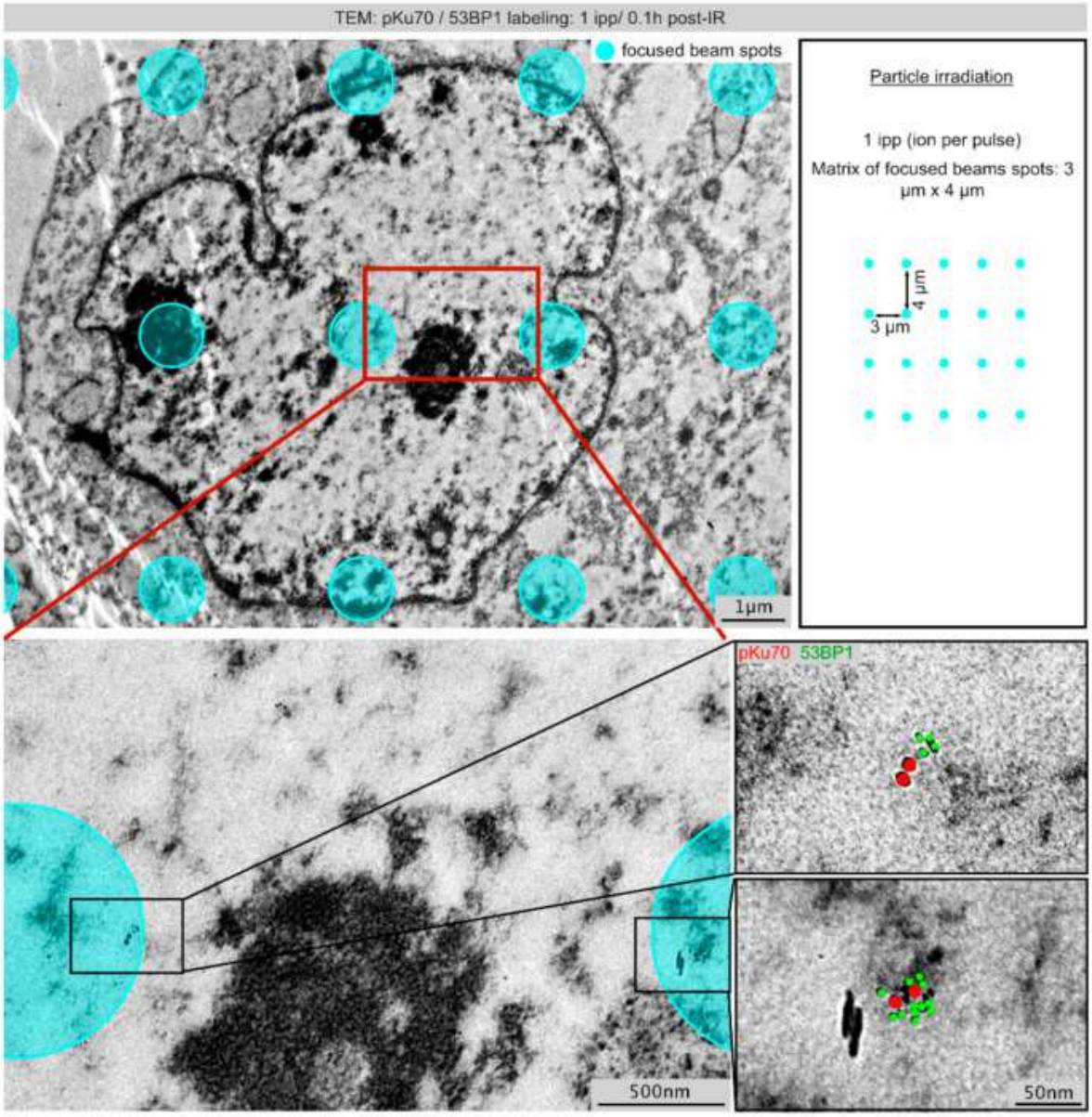

Abb. 1.4.3: Visualisierung der räumlichen Verteilung von DNA-Läsionen, die durch einzelne Kohlenstoffionen (1 ipp) verursacht wurden. TEM-Aufnahme der Doppelmarkierung für pKu70 (10-nm Partikel, rot gefärbt) und 53BP1 (6-nm Partikel, grün gefärbt) nach fokussierter Mikrostrahl-IR mit 1 ipp Kohlenstoff-Ionen. Die vordefinierte IR-Matrix mit mikrometergroßen Strahlflecken ist als kreisförmige Flächen (Cyan) dargestellt. Eingerahmte Bereiche werden in höherer Vergrößerung dargestellt.

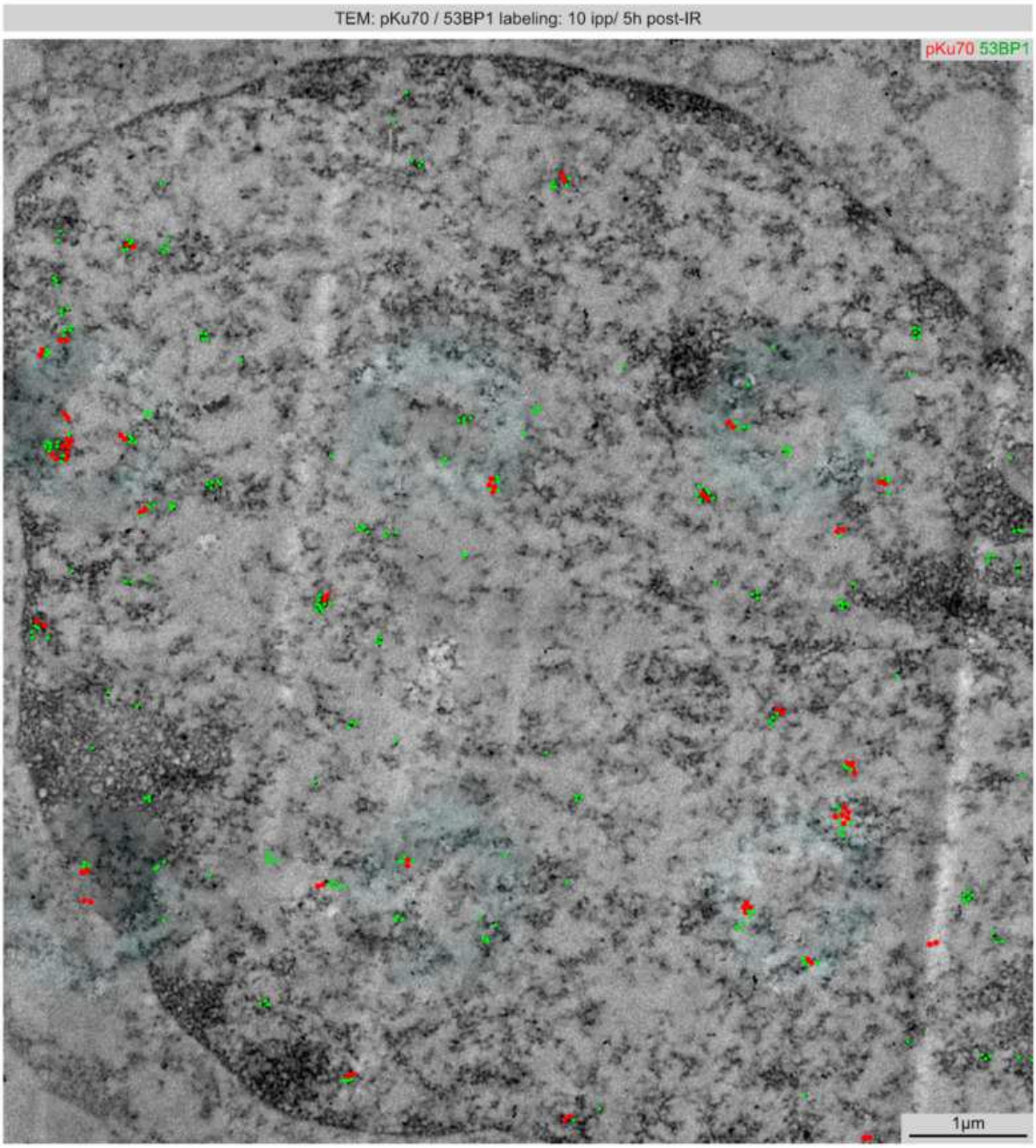

Abb. 1.4.4: Visualisierung der räumlichen Verteilung von DNA-Läsionen, die durch mehrere Kohlenstoffionen (10 ipp) verursacht wurden. TEM-Aufnahme mit Doppelmarkierung für pKu70 (10-nm Partikel, rot gefärbt) und 53BP1 (6-nm Partikel, grün gefärbt) 5 Stunden nach fokussiertem Mikrostrahl-IR mit 10 ipp Kohlenstoff-Ionen.

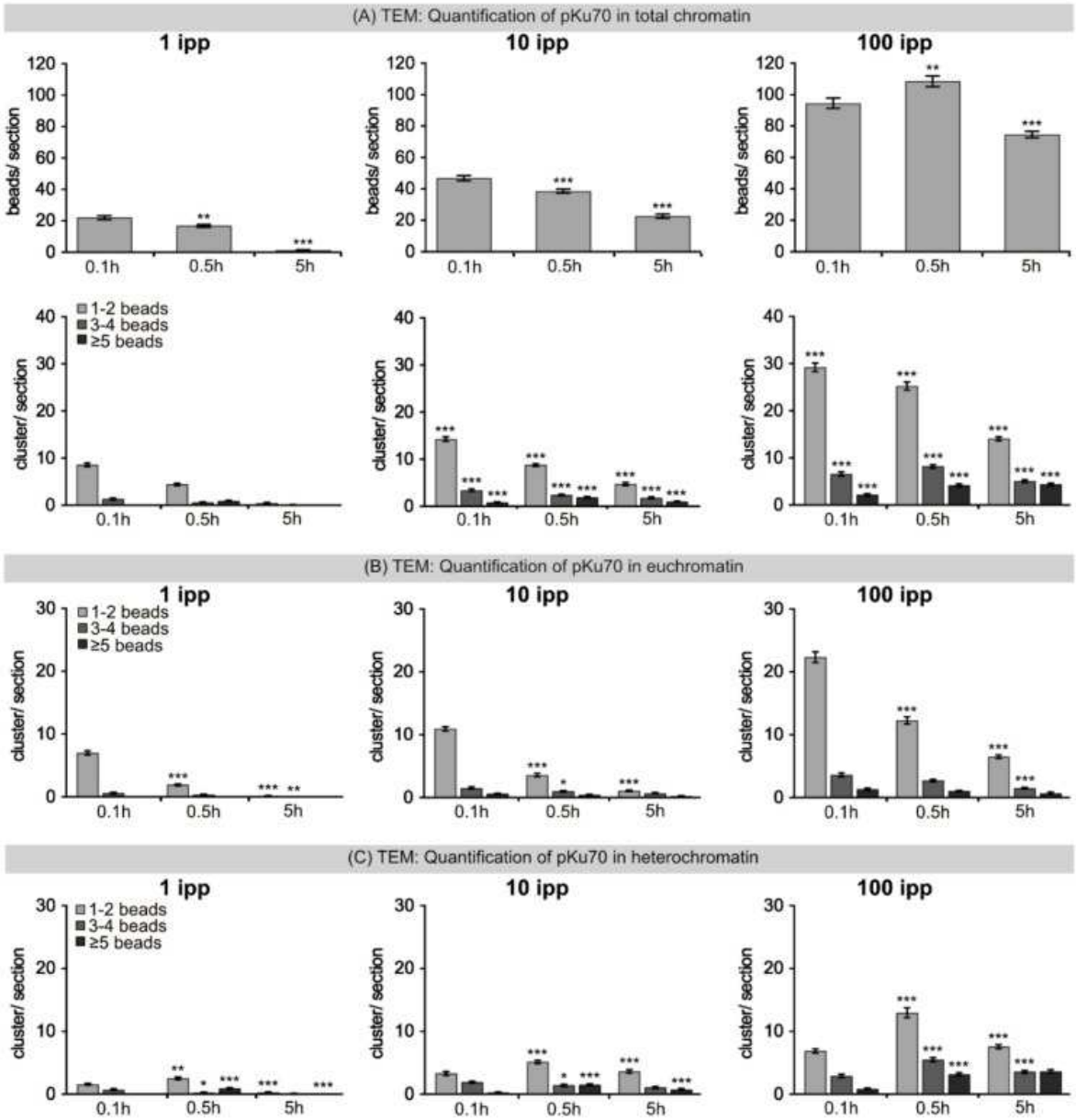

Abb. 1.4.5: Quantifizierung der pKu70-Partikel und -Cluster nach Mikrostrahl-IR mit Kohlenstoff-Ionen.

(A) Für pKu70 wurde die Anzahl der Partikel und Cluster (mit 1–2, 3–4 und ≥5 Partikel pro Cluster, korreliert mit der Komplexität der Läsion) im Gesamtchromatin von ≥25 Kernanschnitten nach fokussierter Mikrostrahl-IR mit 1, 10 und 100 pro Punkt quantifiziert. Statistische Signifikanz für Partikel/ Cluster basierend auf dem Vergleich zum vorherigen Zeitpunkt. Statistische Signifikanz für Cluster/Abschnitt basierend auf dem Vergleich mit der äquivalenten Clustergröße und dem Zeitpunkt der niedrigeren Dosis (d. h. 10 ipp vs. 1 ipp, 100 ipp vs. 10 ipp).

(B) Für pKu70 wurde die Anzahl der Cluster (mit 1–2, 3–4 und ≥5 Partikel pro Cluster) in Euchromatin nach Mikrostrahl-IR mit 1, 10 und 100 ipp angezeigt. Statistische Signifikanz basierend auf dem Vergleich der äquivalenten Clustergröße und -dosis zum vorherigen Zeitpunkt. (C) Für pKu70 wird die Anzahl der Cluster (mit 1–2, 3–4 und ≥5 Partikel pro Cluster) in Heterochromatin nach Mikrostrahl-IR mit 1, 10 und 100 ipp angezeigt. Statistische Signifikanz basierend auf dem Vergleich der äquivalenten Clustergröße und -dosis zum vorherigen Zeitpunkt. Die Daten werden als Mittelwert von 3 technischen Replikaten ± SEM dargestellt. Signifikanter statistischer Unterschied * ($p < 0{,}05$), ** ($p < 0{,}01$), *** ($p < 0{,}001$).

1.5. Strahleninduzierte DNA-Schäden führen zur veränderten Chromatin-Architektur mit Ausschleusung geschädigter Chromatin-Fragmente aus dem Zellkern

Irreparable DNA-Schäden nach ionisierender Strahlung (IR) lösen eine anhaltende DNA-Schadensreaktion aus und können zur vorzeitigen Seneszenz führen. Die zelluläre Seneszenz wird insbesondere durch den permanenten Zellzyklus-Arrest, durch Chromatin-Umstrukturierungen und veränderte Zellkern- und Zell-Morphologien sowie dem sekretorischen Phänotyp (Seneszenz-assoziierter sekretorischer Phänotyp, SASP) charakterisiert. Die pathophysiologischen Zusammenhänge zwischen strahleninduzierten DNA-Schäden und diesen Seneszenz-assoziierten Charakteristika sind bislang noch unzureichend verstanden. In humanen Fibroblasten wurde die strahleninduzierte Seneszenz mittels IFM und TEM , sowie Massenspektrometrie (MS) basierter Proteomik analysiert, um die Wechselwirkungen zwischen veränderter Chromatin-Architektur, Destabilisierung der Kernhülle und die Loslösung zytoplasmatischer Chromatin-Fragmente (*cytosolic chromatin fragments, CCF*) zu untersuchen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die strahleninduzierte Seneszenz zur umfassenden Umstrukturierung des Chromatins und Destabilisierung der Kernmembran mit Freisetzung von Chromatin-Fragmenten ins Zytosol führt, wodurch die cGAS-STING-abhängige Interferon-Signalisierung aktiviert wird. Mittels serieller Blockflächen-Rasterelektronen-Mikroskopie (s*erial block-face scanning electron microscopy, SBF-SEM*) wurde die komplexe morphologische Organisation seneszenter Fibroblasten erfasst. Durch hochauflösende 3D-Rekonstruktionen konnte die Loslösung der Chromatin-Fragmente vom Hauptkern und ihre Fusion mit Lysosomen im Zytoplasma visualisiert werden. Darüber hinaus konnten mittels 3D-Elektronen-Mikroskopie röhrenförmige Kanäle in seneszenten Zellnuklei identifiziert werden, die als nukleo-zytoplasmatischen Nanoröhren ebenfalls eine potenzielle Bedeutung für die Eliminierung geschädigtem Chromatins besitzen.

Nuclear Fragility in Radiation-Induced Senescence: Blebs and Tubes Visualized by 3D Electron Microscopy. Freyter BM, **Abd Al-Razaq MA**, Isermann A, Dietz A, Azimzadeh O, Hekking L, Gomolka M, **Rübe CE.** Cells. 2022 Jan 13;11(2):273. doi: 10.3390/cells 11020273.PMID: 35053389

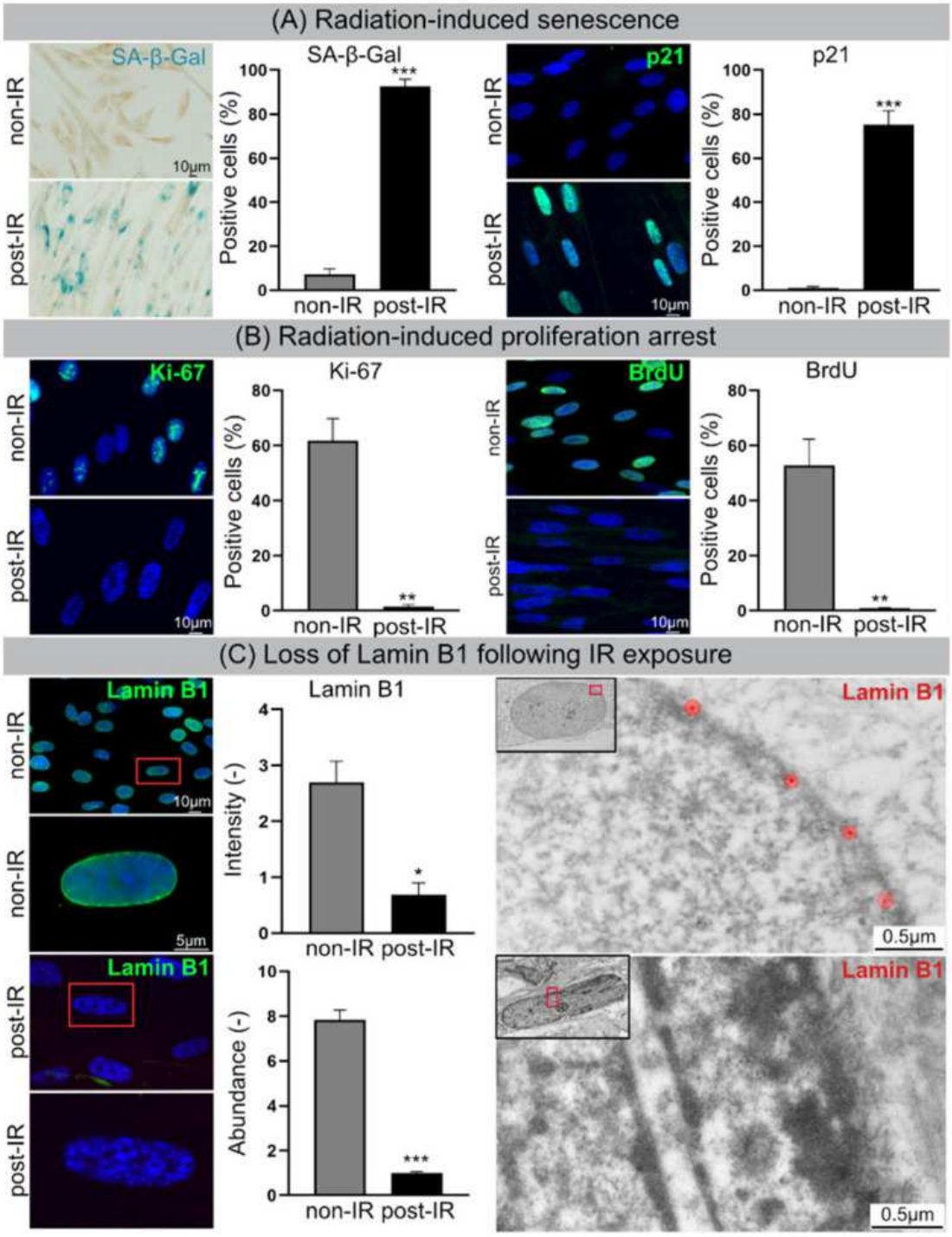

Abb. 1.5.1: Strahleninduzierte Seneszenz

(A) Erhöhte Anzahl von SA-β-Gal+ und p21+ Zellen nach IR-Exposition.
(B) Abnahme der Ki-67+ und BrdU+ Zellen nach IR-Exposition.
(C) Lamin-B1-Verlust in der Kernhülle nach IR-Exposition, visualisiert durch IFM (links) und TEM (rechts). Quantifizierung von Lamin B1 in WI-38-Fibroblasten durch IFM (oben Mitte) und MS (unten Mitte). Die Daten werden als Mittelwert ± SEM dargestellt, * $p < 0{,}05$, ** $p < 0{,}01$, *** $p < 0{,}001$.

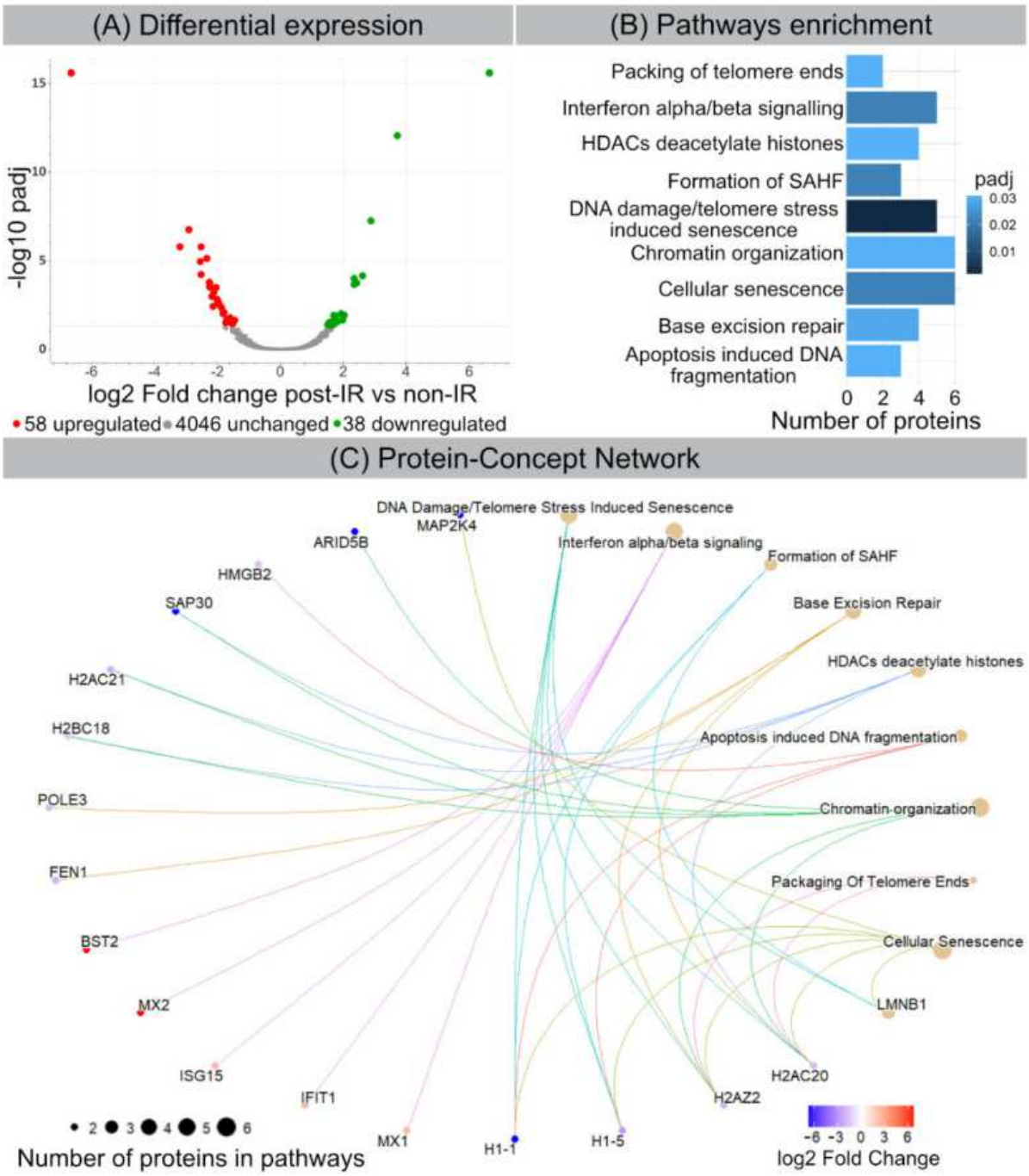

Abb. 1.5.2: Strahlungsinduzierte Veränderungen der Protein-Expression.

(A) Vulkandiagramm der unterschiedlichen Protein-Expression nach IR
(B) Ergebnisse der Seneszenz-assoziierten Signalweg-Analyse mittels dem Reactome PA R-Paket
(C) Visualisierung angereicherter Pfadkomponenten durch das Enrichplot R-Paket.

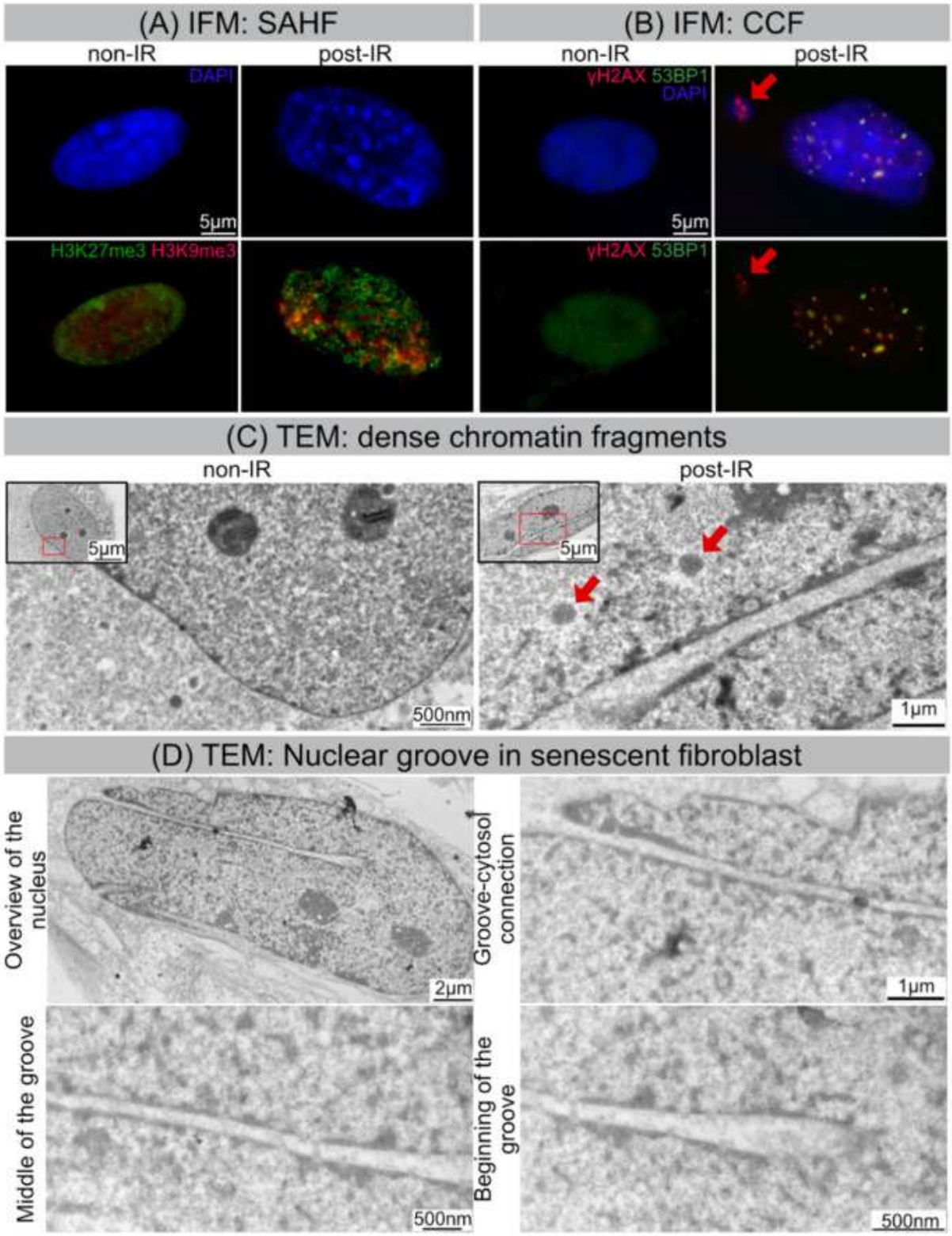

Abb. 1.5.3: IR-induzierte morphologische Veränderungen in WI-38-Fibroblasten.

(A) Visualisierung der SAHF-Bildung durch IFM.

(B) Visualisierung der CCF-Bildung durch IFM.

(C) Visualisierung dichter Chromatinfragmente (markiert durch rote Pfeile) durch TEM.

(D) Visualisierung von Kernfurchen in seneszenten Fibroblasten durch TEM.

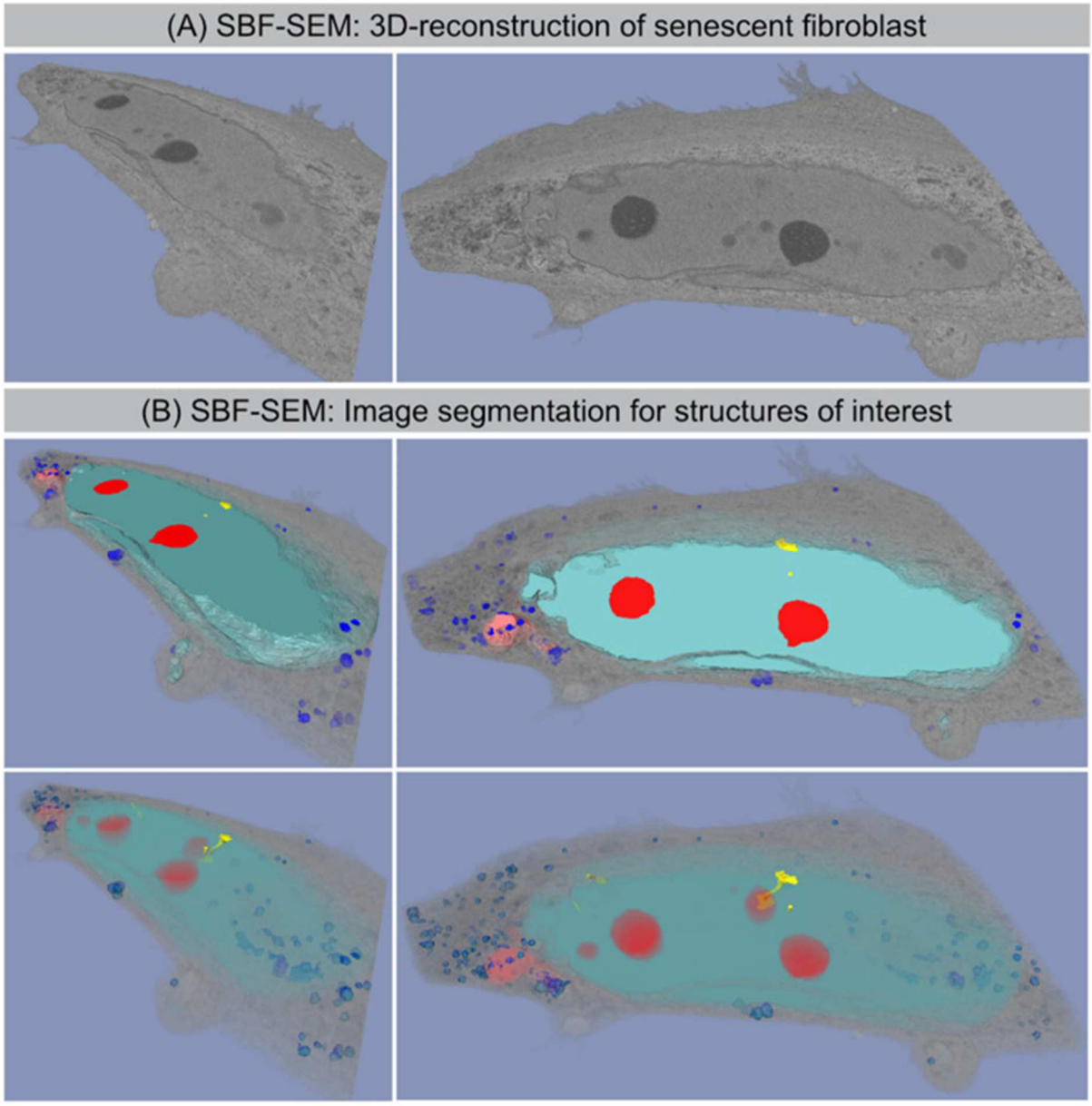

Abb. 1.5.4: SBF-SEM: 3D-Rekonstruktion von seneszenten Fibroblasten.

(A) Für die 3D-Rekonstruktion wurden Original-SBF-SEM-Abschnitte verwendet.
(B) Serielle SBF-SEM-Schnitte wurden für folgende Strukturen segmentiert: Kern (hellblau), Nukleolen (rot), Lysosomen (blau) und CCF (hellrot), Nanoröhren (gelb), Zytosol (grau) und zur 3D-Visualisierung verwendet (untere Reihe: transparente Ansicht).

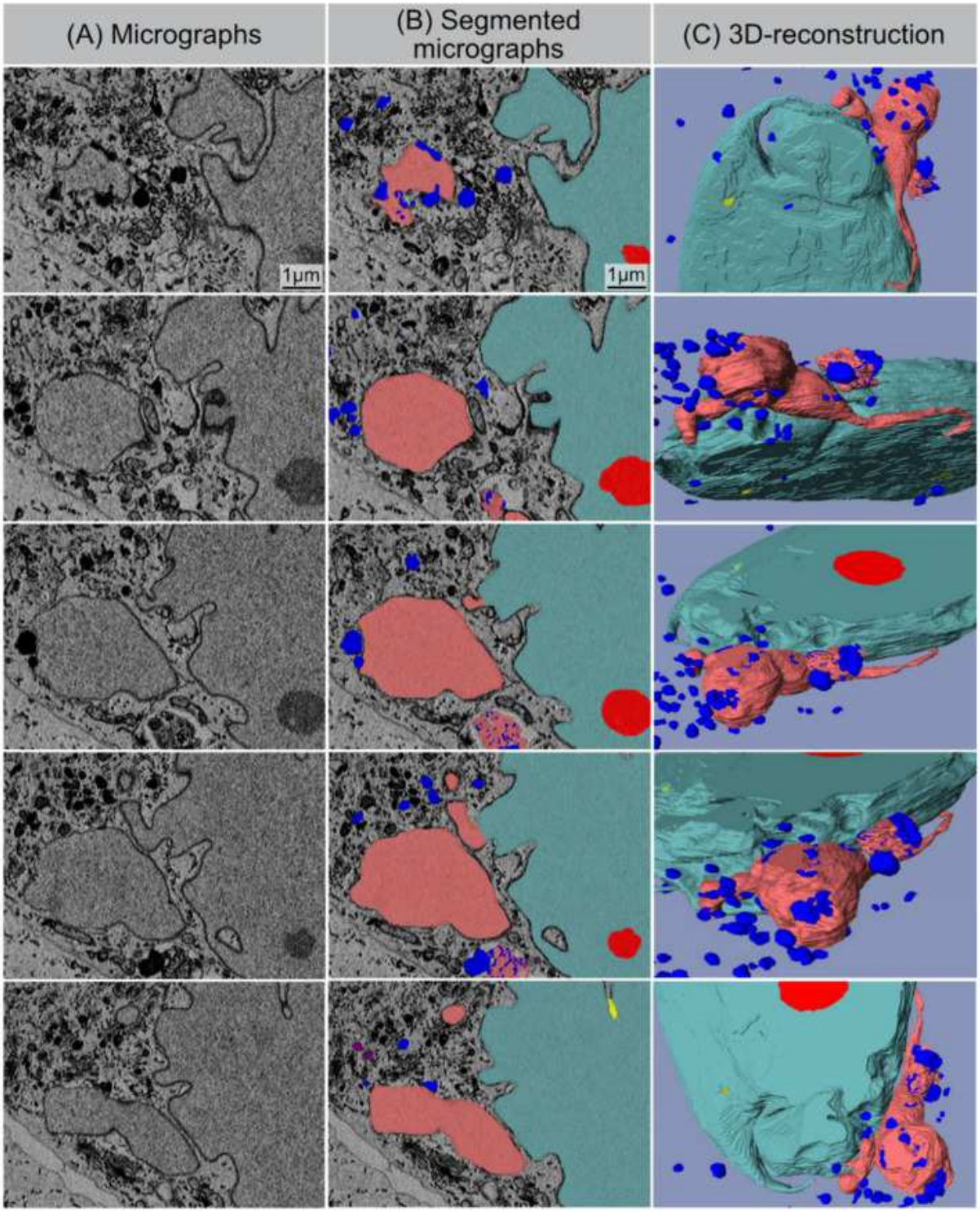

Abb. 1.5.5: SBF-SEM: Trennungsprozess von CCF.

(A) Ursprüngliche mikroskopische Aufnahmen, die sich ablösendes CCF zeigen.
(B) Segmentierte mikroskopische Aufnahmen derselben Regionen.
(C) 3D-Rekonstruktion des sich ablösenden CCF.
Kern (hellblau), Nukleolen (rot), Lysosomen (blau) und CCF (hellrot), Nanoröhren (gelb).

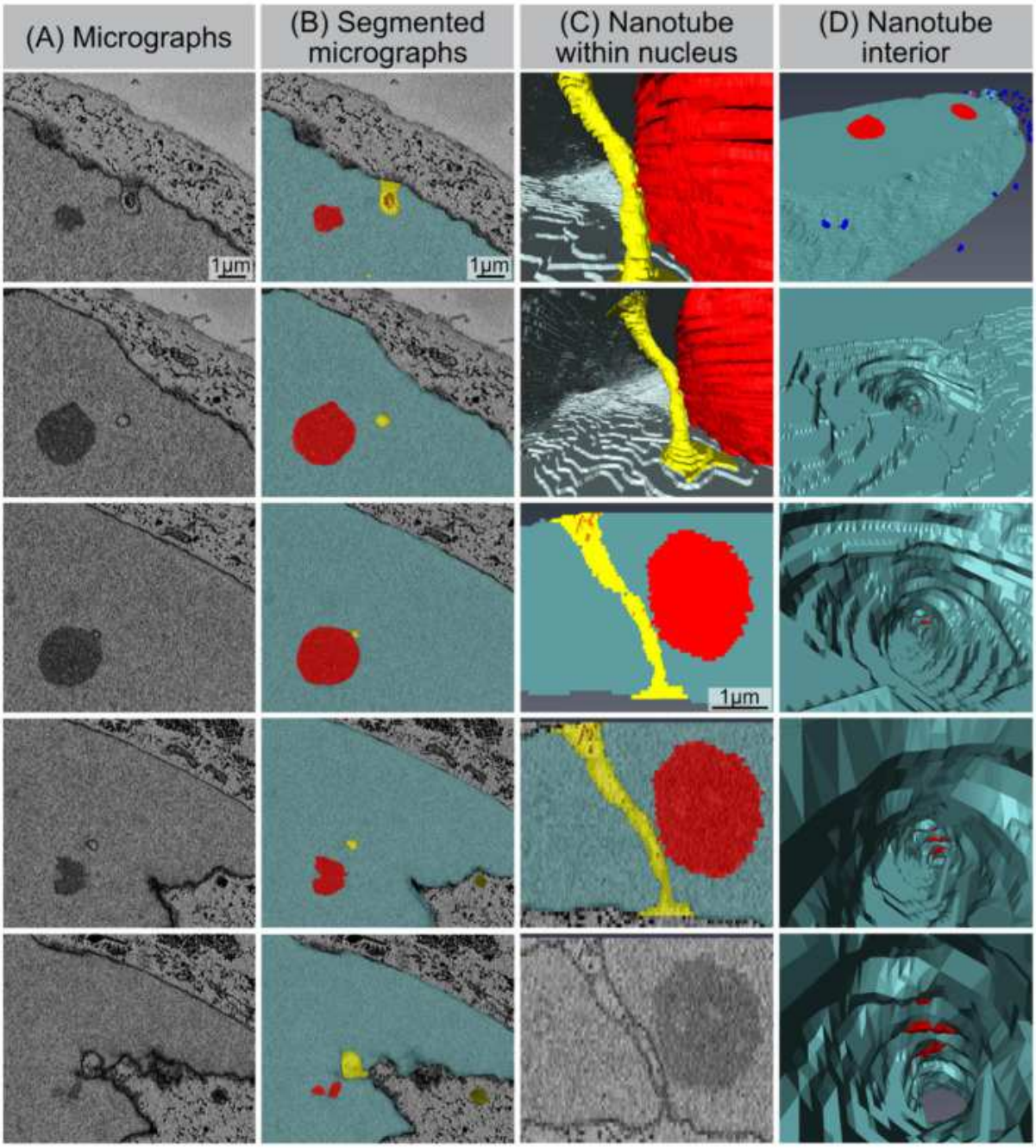

Abb. 1.5.6: Nukleo-zytoplasmatische Nanoröhre.

(A) Original-Mikroaufnahmen, die Querschnitte der Nanoröhre zeigen.
(B) Segmentierte Mikroaufnahmen für denselben Bereich: Kern (hellblau), Nukleolen (rot), Nanoröhren (gelb).
(C) Modelle, die das Aussehen der Nanoröhre aus dem Inneren des Kerns zeigen (1. und 2. Bild von oben), segmentiertes Volumen, das die Nanoröhre von der Seite zeigt (3. und 4. Bild von oben), und Original-Mikroskop-Aufnahme derselben Region. (D) Visualisierung des Inneren der Nanoröhre.

1.6. Charakterisierung des strahleninduzierten DNA-Schadensmusters mittels Transmissions-Elektronen-Mikroskopie und automatisierter Bildanalyse

Im Vergleich zur Radiotherapie mit Photonen zeichnet sich die Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen durch eine erhöhte biologische Wirksamkeit aus, da durch die hohe Energiedeposition (*linear energy transfer*, LET) entlang der Partikelbahnen von Kohlenstoff-Ionen sog. geclusterte DNA-Läsionen entstehen. Um die räumlich-zeitliche Dynamik der DNA-Reparatur und des Chromatin-Remodelings zu untersuchen, wurde die automatisierte Bildanalyse etabliert, um Aufnahmen der Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) systematisch auszuwerten zu können. Humane Fibroblasten wurden mittels Kohlenstoff-Ionen (hoher LET) bzw. mittels Photonen (niedriger LET) bestrahlt. Zu definierten Zeitpunkten (0,1h; 0,5h; 5h und 24h) nach Strahlenexposition wurden die verschiedenen Reparaturfaktoren mit Nanopartikeln markiert (53BP1, pKu70, pKu80, DNA-PKcs) und in der Chromatin-Struktur des Interphase-Zellkerns mittels TEM visualisiert. Mithilfe von KI-basierten Software wurde das DNA-Schadensmuster, d.h. die räumliche Verteilung dieser Reparaturmarker in den unterschiedlichen Chromatin-Kompartimenten, automatisiert analysiert. Nach Photonen-Bestrahlung werden einzelne DSBs im gesamten Zellkern induziert, doch die meisten dieser DNA-Läsionen wurden effizient und ohne sichtbare Veränderungen der Chromatin-Kompaktierung repariert. Nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen konzentrieren sich geclusterte DNA-Schäden entlang der Partikelbahnen, die durch stark dekondensiertes Chromatin charakterisiert waren. Mithilfe der automatisierten Bildanalyse konnte die genaue Anzahl der unterschiedlich großen Nanopartikel, ihr Abstand zueinander und ihre genaue Position innerhalb der TEM-Mikroaufnahmen bestimmt werden. Aufgrund der verschiedenen Graustufen konnte das Chromatin in unterschiedliche Organisations-Zustände eingeteilt und dementsprechend können die Nanopartikel automatisiert dem Euchromatin oder Heterochromatin zugeordnet werden. Nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen ist das Chromatin in den Partikelbahnen stark dekondensiert. Mithilfe automatisierter Segmentierung konnten diese Partikelbahnen automatisiert abgegrenzt und die räumliche Verteilung von Nanopartikeln im Verhältnis zu diesen segmentierten Tracks bestimmt werden. Die Ergebnisse dieser Bildanalysen zeigen, dass die Bestrahlung mit Kohlenstoff-Ionen eine Chromatin-Relaxation entlang der Partikelbahnen induziert, wahrscheinlich um die kritische Reparatur geclusterter DNA-Schäden zu ermöglichen. Insgesamt erlaubt die TEM in Kombination mit der automatisierten Bildanalyse das spezifische DNA-Schadensmuster in der Chromatin-Ultrastruktur des Zellkerns nach Exposition unterschiedlicher Strahlungsqualitäten präzise zu charakterisieren.

Automated Image Analysis of Transmission Electron Micrographs: Nanoscale Evaluation of Radiation-Induced DNA Damage in the Context of Chromatin.Abd Al-Razaq MA, Isermann A, Hecht M, **Rübe CE.** Cells. 2023 Oct 10;12(20):2427. doi: 10.3390/cells12202427.PMID: 37887271

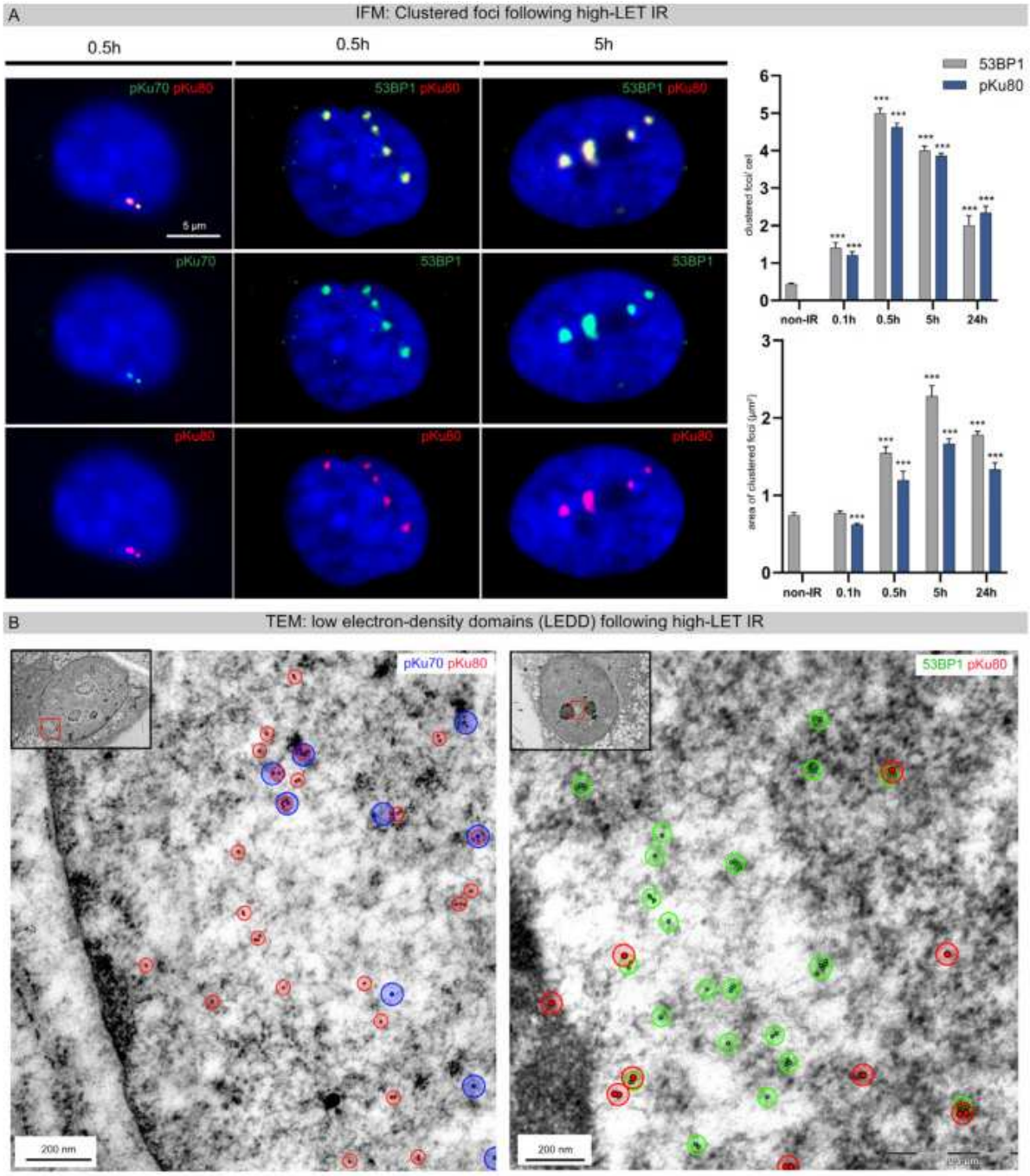

Abb. 1.6.1: Geclusterte Foci und dekondensierte Chromatin-Regionen (*low electron-density domains*, LEDDs) nach IR mit hohem LET.

(A) IFM-Aufnahmen von DAPI-gefärbten Kernen, doppelt gefärbt für pKu70 (grün) mit pKu80 (rot) oder 53BP1 (grün) mit pKu80 (rot), analysiert nach 0.5h und 5h nach hoch-LET IR (vertikale Strahlrichtung). Für 53BP1 und pKu80 wurden die Anzahl und Fläche der geclusterten Foci 0.1h, 0.5h, 5h und 24h nach IR mit hohem LET quantifiziert.
(B) TEM-Aufnahmen von mit Nanopartikeln markiertem pKu70 (blau), pKu80 (rot) und 53BP1 (grün) in der Chromatin-Ultrastruktur. Innerhalb von 5h nach IR mit hohem LET bildeten gelegentlich mehrere pKu70- (blau), pKu80- (rot) und 53BP1-Nanopartikel Cluster, die innerhalb und außerhalb von LEDDs verteilt waren. Einschübe: Übersichtsbilder des Kerns; Eingerahmte Bereiche werden in höherer Vergrößerung gezeigt. Statistisch signifikante Unterschiede werden im Vergleich zum vorherigen Untersuchungspunkt als Sternchen direkt über dem Balken angezeigt (*** $p < 0{,}001$).

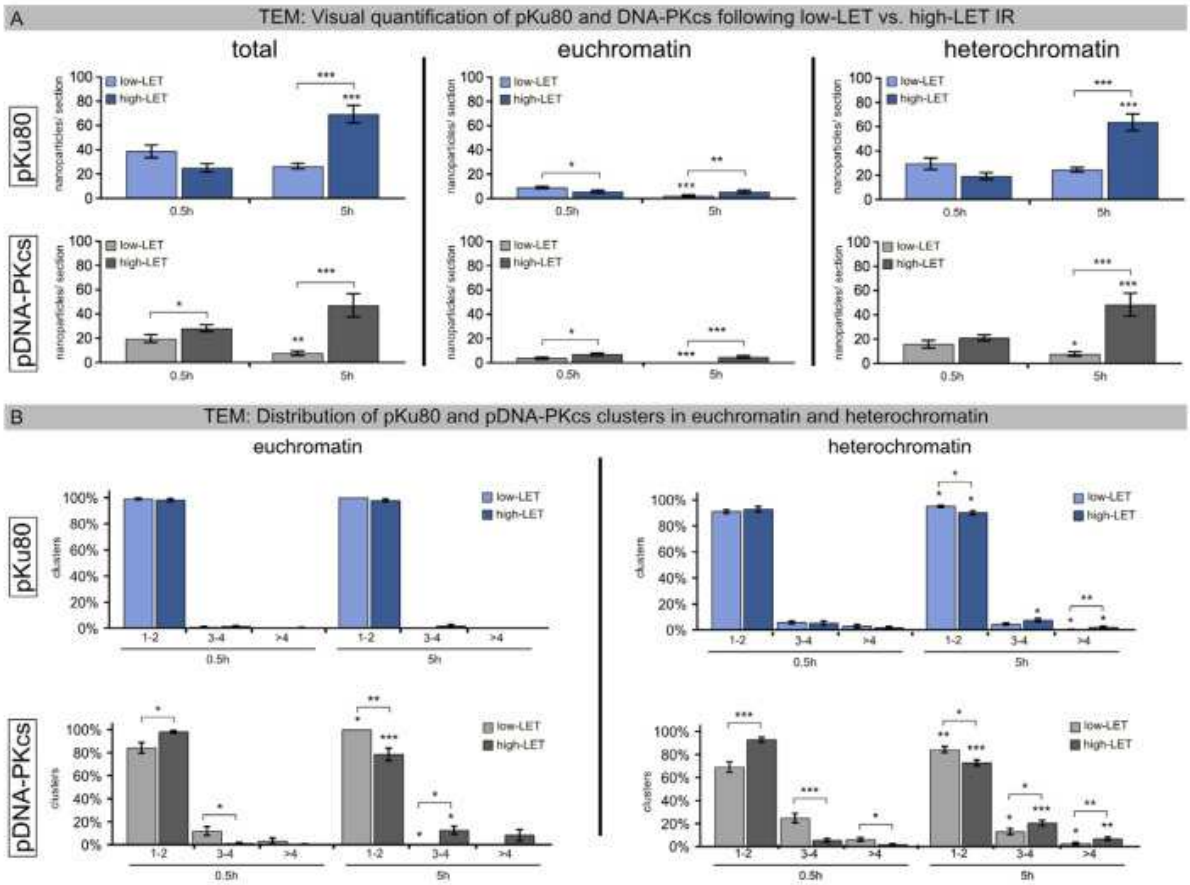

Abb. 1.6.2: Quantifizierung von pKu80 und DNA-PKcs nach IR mit niedrigem LET im Vergleich zu IR mit hohem LET.

(A) Die mittlere Anzahl von Nanopartikeln, die pKu80 und DNA-PKcs markieren (pro Kern-Anschnitt) in Euchromatin und Heterochromatin.

(B) Prozentsatz der Cluster (unterteilt in die Kategorien 1–2, 3–4 und >4 Partikel) in Euchromatin und Heterochromatin, quantifiziert in Kern-Anschnitten mittels TEM 0.5h und 5h nach IR mit niedrigem LET im Vergleich zu IR mit hohem LET. Statistisch signifikante Unterschiede werden beim Vergleich mit dem vorherigen Zeitpunkt als Sternchen direkt über dem Balken und beim Vergleich zwischen zwei verschiedenen Studiengruppen als Sternchen über Klammern angezeigt (* $p < 0{,}05$, ** $p < 0{,}01$ und *** $p < 0{,}001$).

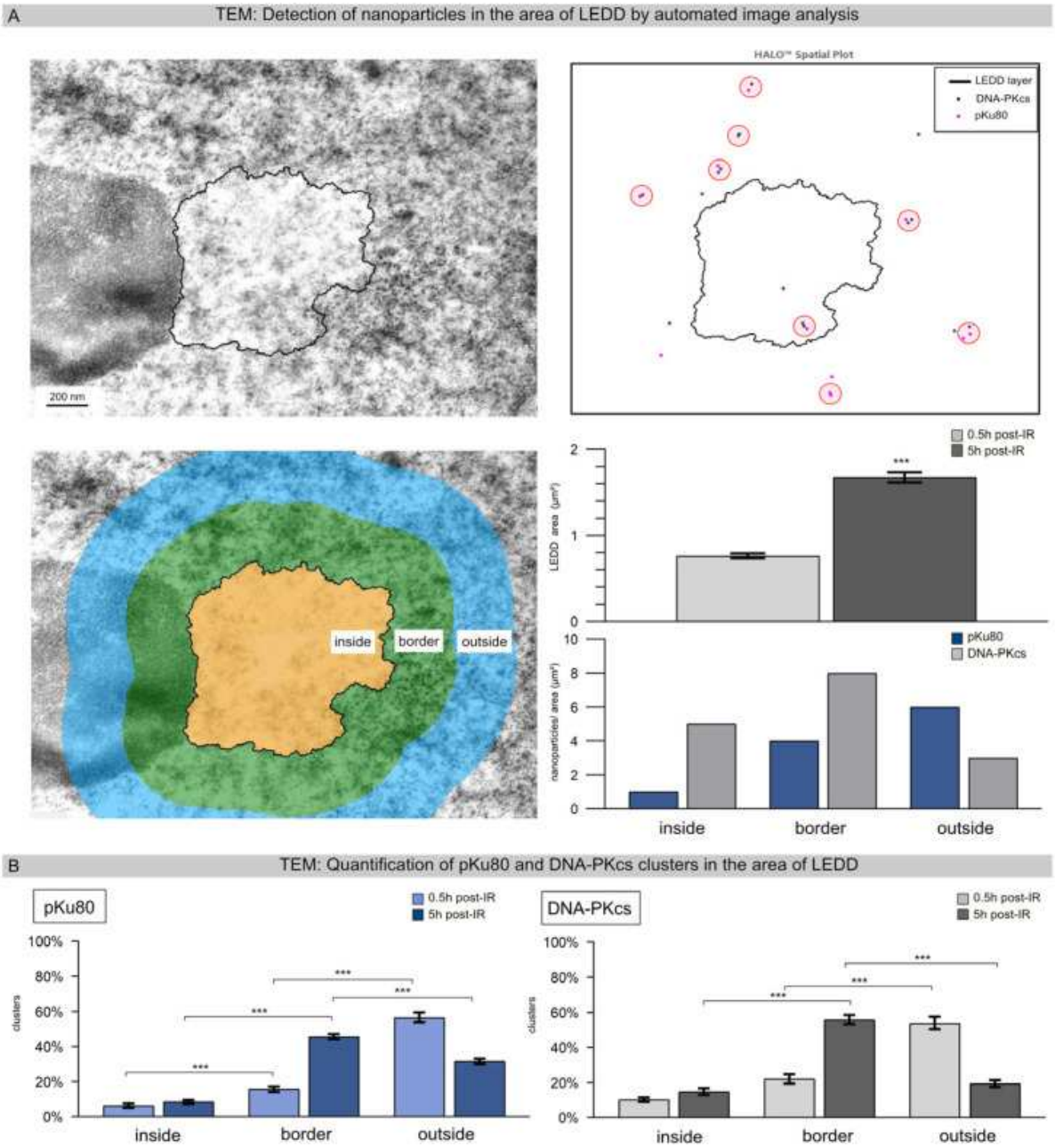

Abb. 1.6.3: Nachweis von Nanopartikeln in den Bereichen von LEDDs mittels automatisierter Bildanalyse.

(A) TEM-Aufnahmen 5h nach hoch-LET IR zeigen ein LEDD neben dem Nukleolus. Mit dem räumlichen Analysetool der HALO-Software (Version 3.4.2986, Indica Labs, Albuquerque, NM, USA) wurde das LEDD automatisch segmentiert und die unterschiedlich großen Nanopartikel detektiert. Zur weiteren Charakterisierung der Reparaturfaktoren in Bezug zur LEDD wurden die Bereiche innerhalb und außerhalb der LEDD sowie der Grenzbereich definiert und die Anzahl der pKu80 und DNA-PKcs Nanopartikel automatisch quantifiziert. Die Fläche jedes LEDD wurde 0.5h und 5h nach hoch-LET IR quantifiziert.

(B) Quantifizierung von pKu80 und DNA-PKcs Cluster innerhalb und außerhalb des LEDD sowie im Grenzbereich, analysiert 0.5h und 5h nach IR mit hohem LET. Statistisch signifikante Unterschiede werden beim Vergleich mit dem vorherigen Zeitpunkt als Sternchen direkt über dem Balken und beim Vergleich zwischen zwei verschiedenen Studiengruppen als Sternchen über Klammern angezeigt (*** $p < 0{,}001$).

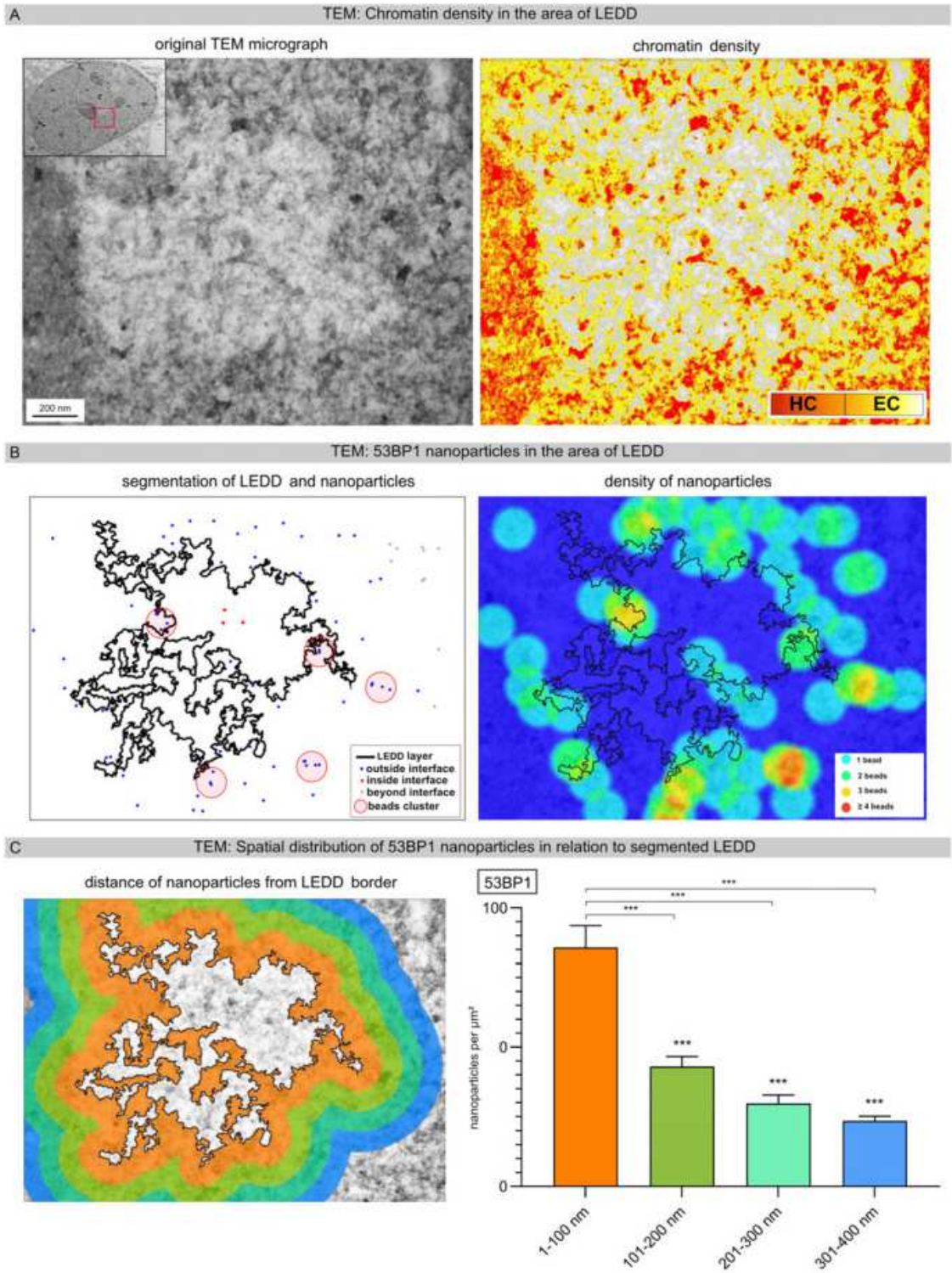

Abb. 1.6.4: Präzise Analyse der LEDD-Grenzen mittels automatisierter Bildanalyse.
(A) Basierend auf der ursprünglichen TEM-Aufnahme wurde die Chromatin-Dichte anhand von Graustufen-Merkmalen definiert und in Euchromatin und Heterochromatin eingeteilt.
(B) Hoch-LET-IR induzierte LEDDs und Nanopartikel wurden mithilfe automatisierter Segmentierung abgegrenzt. Die räumliche Verteilung der Nanopartikel, insbesondere hinsichtlich der Clusterbildung, wurde als Dichte-Heatmap visualisiert.
(C) Verschiedene Grenzregionen um die hoch-LET-IR induzierten LEDDs wurden definiert und die räumliche Verteilung von Nanopartikeln relativ zu segmentierten LEDDs bestimmt. Im Einschub zeigt das rote Quadrat den vergrößerten Bildausschnitt des gesamten Zellkerns. Statistisch signifikante Unterschiede werden im Vergleich zum vorherigen Untersuchungspunkt als Sternchen direkt über dem Balken angezeigt (*** $p < 0{,}001$).

1.7. Strahleninduzierte Inkorporation der Histonvariante H2A.J führt zur globalen Umstrukturierung des Chromatins mit weitreichenden Folgen für die Zellfunktion

Die strahleninduzierte Seneszenz ist durch eine tiefgreifend veränderte Organisation des Chromatins im Zellkern gekennzeichnet. Ein wichtiges Charakteristikum dieser Chromatin-Veränderungen ist die Bildung der Seneszenz-assoziierten Heterochromatin-Foci (SAHF). Diese strukturellen Veränderungen des Chromatins können den Zugang der Transkriptions-Maschinerie zu bestimmten DNA-Bereichen verhindern, und somit ganze Gengruppen abschalten. Die Anordnung und Modifikation von Nukleosomen sind zentrale Prozesse der Chromatin-Dynamik, die es ermöglichen, dass Chromatin zwischen offenen und kompakten Strukturen (mit höheren oder niedrigeren Gen-Aktivitäten) wechseln kann. Diese Flexibilität wird durch die Inkorporation der Histonvariante H2A.J entscheidend moduliert, wodurch die Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren und insbesondere für inflammatorische Gene im Rahmen des SASP reguliert wird. In dieser Arbeit wurde die epigenetische Bedeutung der Histonvariante H2A.J im Rahmen der strahleninduzierten Seneszenz analysiert. Hierfür wurden primäre und genetisch-modifizierte humane Fibroblasten mit verstärkter (*knock-in*, KI) oder supprimierter (*knock-down*, KO) H2A.J-Expression nach Strahlenexposition hinsichtlich Chromatin-Remodelling mittels verschiedener Mikroskopie-Verfahren untersucht. Die dynamischen Veränderungen in der Chromatin-Organisation mit der Rekrutierung spezifischer Transkriptionsfaktoren, sowie der Expression definierter Transkriptom-Signaturen wurden durch ATAC-seq und RNA-seq Analysen integrativ untersucht. Parallel wurde die Sekretion von SASP-Faktoren im Zellüberstand mittels ELISA und RT-PCR analysiert. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die unterschiedliche Inkorporation von H2A.J in die Nukleosomen tiefgreifende Auswirkungen auf die Chromatin-Organisation und auf die epigenetische Etablierung der prämaturen Seneszenz nach Strahlenexposition besitzt. Unsere integrativen Analysen der ATAC-seq und RNA-seq Datensätze zeigen, dass H2A.J-assoziierte Veränderungen der Chromatin-Zugänglichkeit die Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren und somit die Expression inflammatorischer Gene entscheidend modulieren. Als Reaktion auf strahleninduzierte DNA-Schäden moduliert eine präzise abgestimmte H2A.J Chromatin-Inkorporation die epigenetische Steuerung des Seneszenz-Programms. Eine deregulierte H2A.J-Inkorporation beeinflusst dieses Chromatin-Remodeling und dadurch die nachfolgenden biologischen Prozesse, wie insbes. die Inflammation. Auch im komplexen Normalgewebe wie dem Lungenparenchym zeigen Pneumozyten eine dosisabhängige H2A.J-Expression als Reaktion auf strahleninduzierte DNA-Schäden und tragen somit zu inflammatorischen Gewebereaktionen bei.

Role of Histone Variant H2A.J in Fine-Tuning Chromatin Organization for the Establishment of Ionizing Radiation-Induced Senescence. **Abd Al-Razaq MA**, Freyter BM, Isermann A, Tewary G, Mangelinck A, Mann C, **Rübe CE.** Cells. 2023 Mar 16;12(6):916. doi: 10.3390/cells12060916.PMID: 36980257

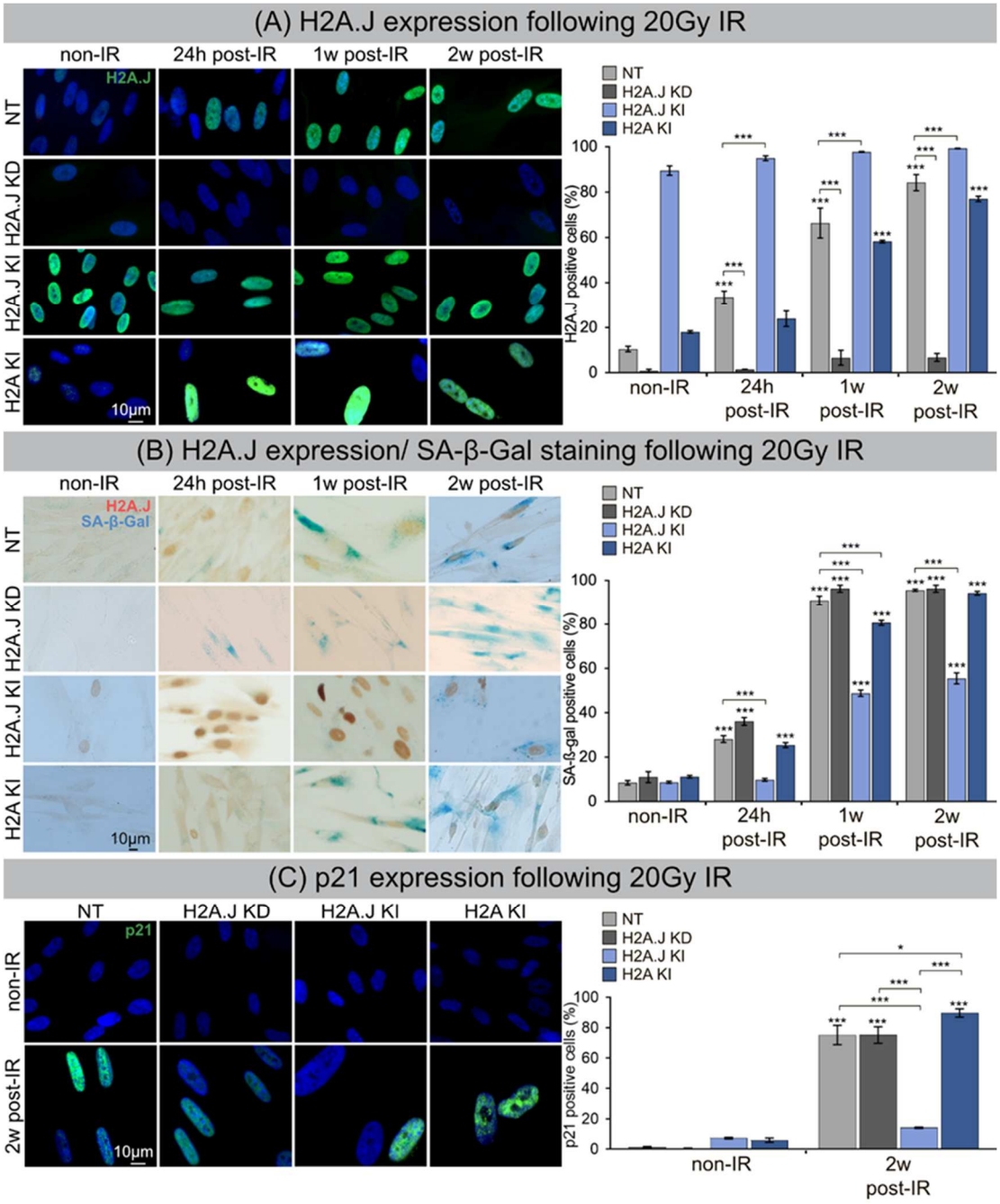

Abb. 1.7.1:

(A) H2A.J-Expression nach 20 Gy IR. IFM-Aufnahmen und Quantifizierung der H2A.J+-Fibroblasten bei NT, H2A.J-KD, H2A.J-KI und H2A-KI Zelllinien 24 Stunden, 1 und 2 Wochen nach IR im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen.

(B) H2A.J-Expression und SA-β-Gal-Färbung nach 20 Gy IR. IHC-Mikroaufnahmen und Quantifizierung der SA-β-Gal+ Zellen bei NT-, H2A.J-KD, H2A.J-KI und H2A-KI Zelllinien nach 20 Gy 24 Stunden, 1 und 2 Wochen nach IR im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen.

(C) p21-Expression nach 20 Gy IR. IFM-Aufnahmen und Quantifizierung der p21+ Fibroblasten bei NT, H2A.J-KD, H2A.J-KI und H2A-KI Zelllinien 2 Wochen nach IR im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen. Die Daten werden als Mittelwert aus drei Experimenten ±SE dargestellt. Signifikanter statistischer Unterschied im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen (nur Sternchen) oder zwischen Zelllinien (Sternchen über den Klammern): * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

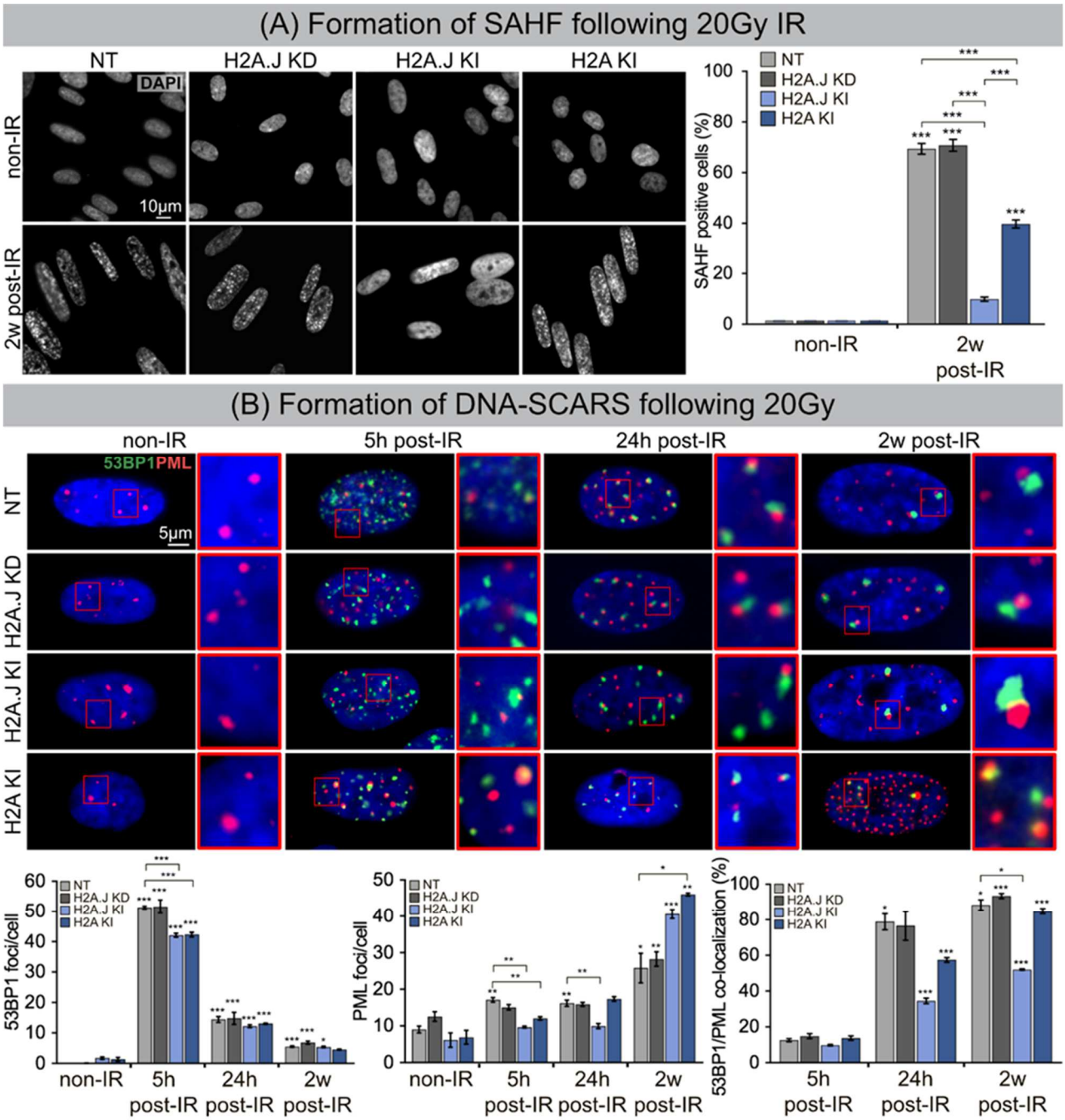

Abb. 1.7.2:

(A) Bildung von SAHF nach 20 Gy IR. IFM-Aufnahmen und Quantifizierung der SAHF nach DAPI-Färbung von NT, H2A.J-KD, H2A.J-KI und H2A-KI Zelllinien 2 Wochen nach IR im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen.

(B) Bildung von DNA-SCARS nach 20 Gy IR. IFM-Aufnahmen zeigen Doppelfärbungen für 53BP1 und PML sowie die Quantifizierungen der 53BP1-Foci/Zelle, der PML-Foci/Zelle und der 53BP1/PML Co-Lokalisierung in NT, H2A.J-KD, H2A.J-KI und H2A-KI Fibroblasten 5 und 24 Stunden, sowie 2 Wochen nach IR.

Die Daten sind als Mittelwerte aus drei Experimenten ± SE dargestellt. Signifikanter statistischer Unterschied im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen (nur Sternchen) oder zwischen Zelllinien (Sternchen in eckigen Klammern): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

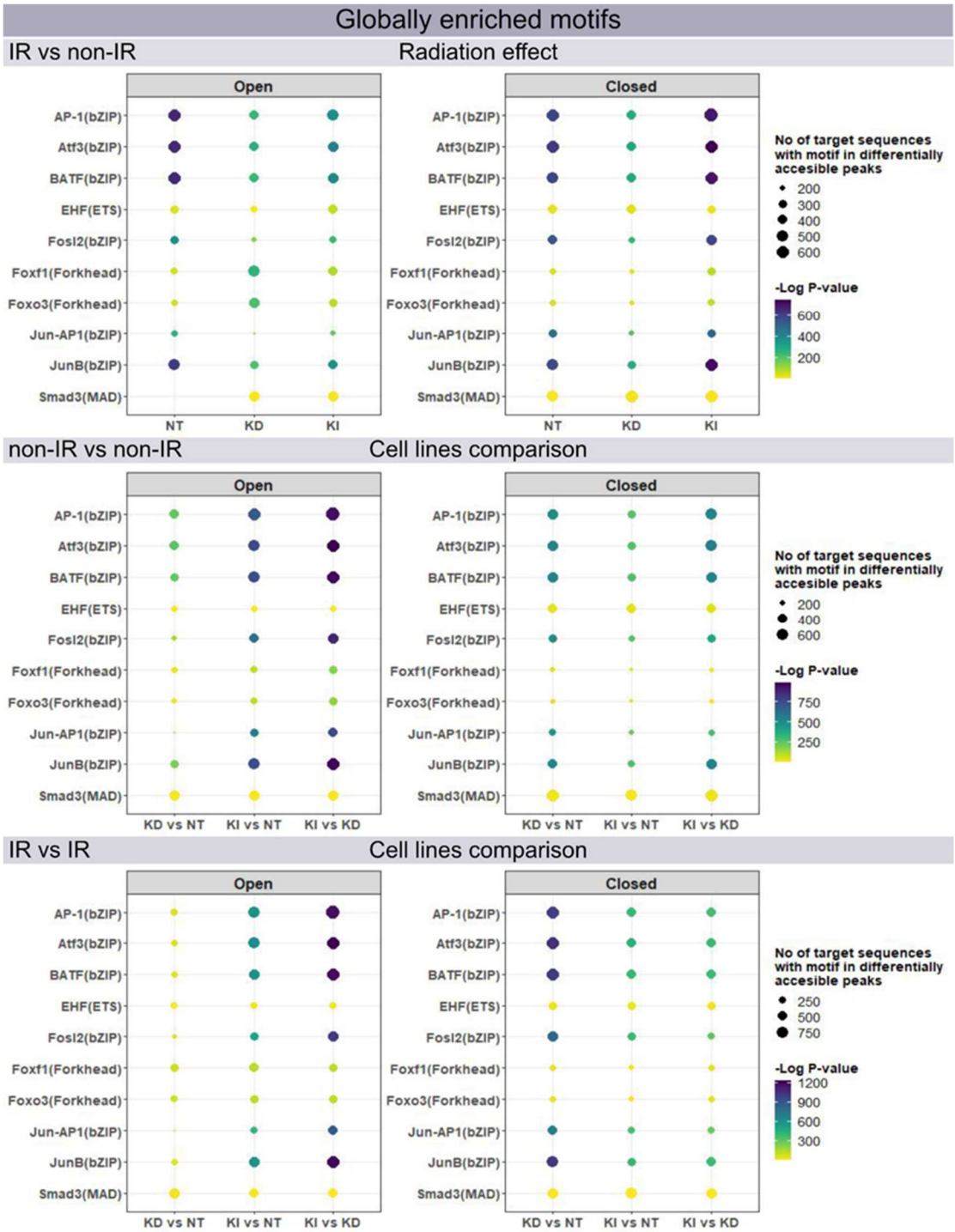

Abb. 1.7.3: Genomweite Kartierung von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen.

Veränderungen in der Chromatin-Zugänglichkeit der Transkriptionsfaktor-Bindungsmotive in NT, H2A.J-KD und H2A.J-KI Fibroblasten 2 Wochen nach IR im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen (A) und zwischen NT, H2A.J-KD und H2A.J-KI Fibroblasten im unbestrahlten (B) und im bestrahlten Zustand (C).

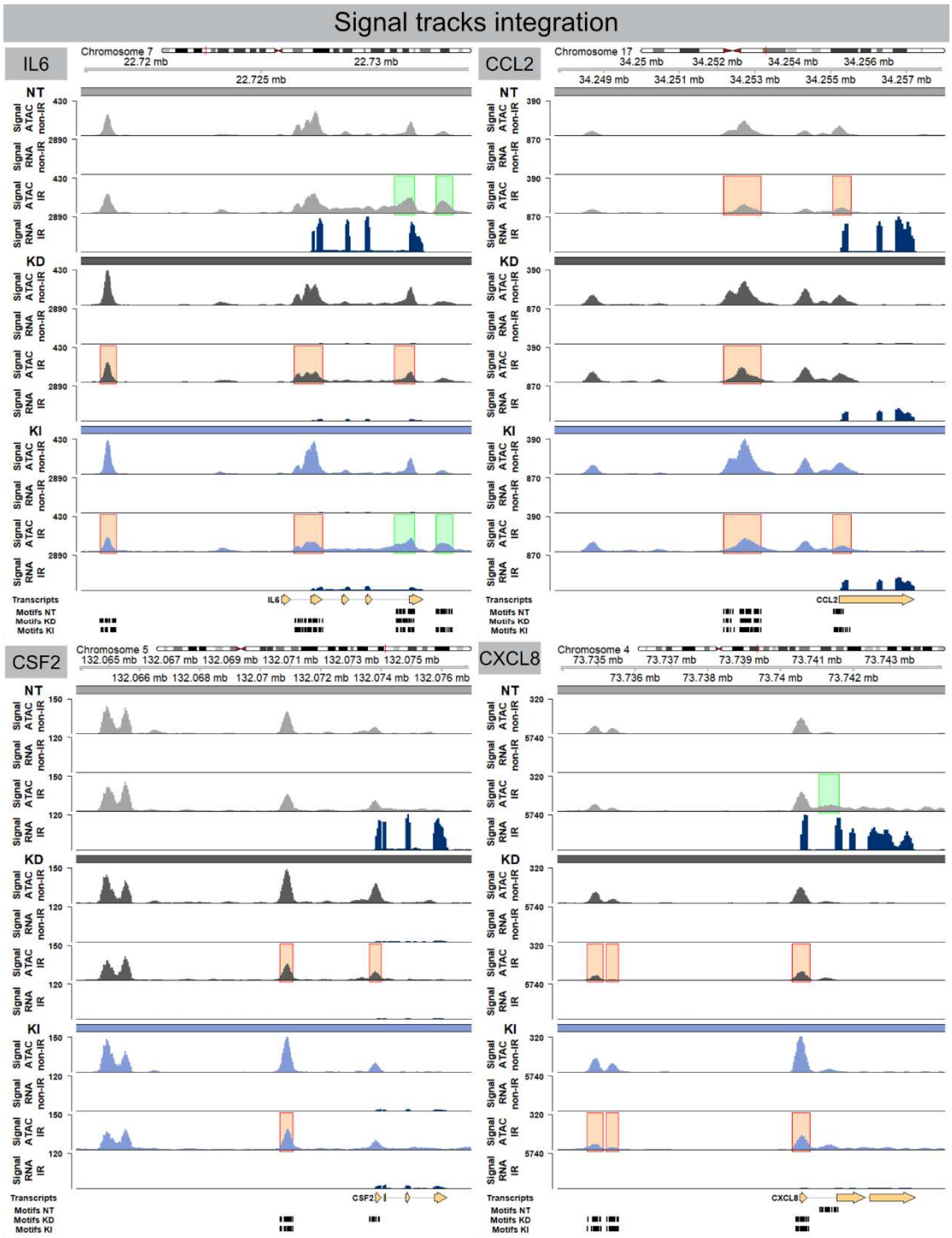

Abb. 1.7.4: Integrative Auswertung der ATAC-seq und RNA-seq Signale.

Region-spezifische Analyse der Chromatin-Zugänglichkeit (ATAC-seq) und der RNA-Expression (RNA-seq) für die SASP-Faktoren IL6, CSF2, CCL2 und CXCL8 in NT, H2A.J-KD und H2A.J-KI Fibroblasten 2 Wochen post-IR im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen. Die farbcodierten Kästchen zeigen für die ATAC-seq Signalspuren unter bestrahlten Bedingungen mehr (grün) oder weniger (rot) zugängliche Chromatin-Regionen im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen an und korrelieren mit den RNA-seq Signalen (dunkelblau).

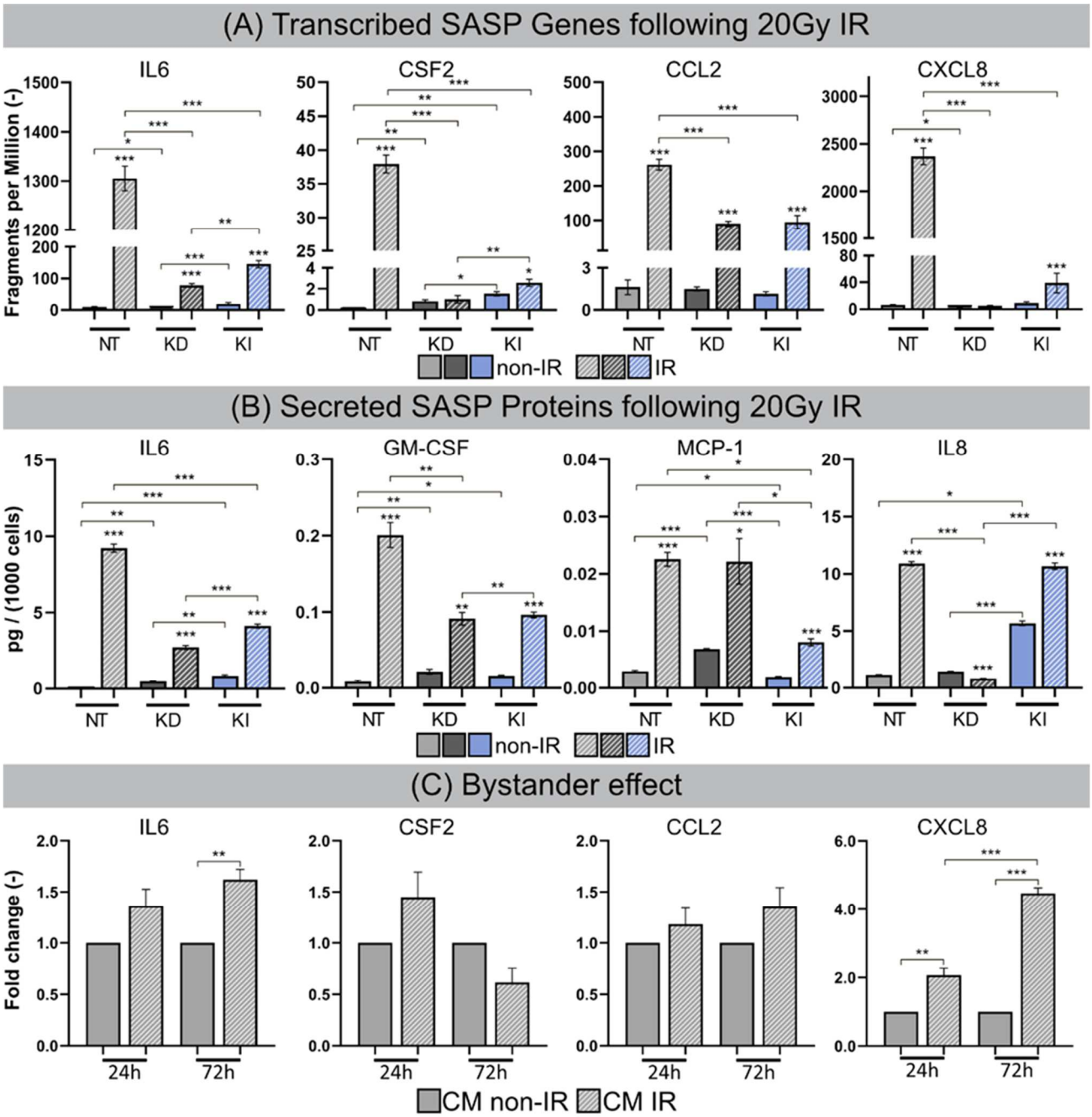

Abb. 1.7.5:

(A) Transkribierte SASP-Gene nach 20 Gy IR. Quantifizierung der mRNA-Expression (mRNA-seq) für IL6, CSF2, CCL2 und CXCL8 in NT, H2A.J-KD und H2A.J-KIFibroblasten 2 Wochen nach IR im Vergleich zu nicht bestrahlten Kontrollen.

(B) Sezernierte SASP-Proteine nach 20 Gy IR. Quantifizierung der Proteinexpression (ELISA) für IL6, GM-CSF, MCP-1, IL8 in konditioniertem Medium von NT, H2A.J-KD und H2A.J-KI Fibroblasten 2 Wochen nach IR im Vergleich zu unbestrahltem Kontrollen.

(C) Bystander-Effekt. Quantifizierung der mRNA-Expression (RT-PCR) für IL6, CSF2, CCL2 und CXCL8 in NT-Fibroblasten nach 24- oder 72-stündiger Exposition gegenüber konditioniertem Medium bestrahlter (CM IR) oder nicht bestrahlter (CM non-IR) NT-Fibroblasten.

Signifikanter statistischer Unterschied im Vergleich zu nicht bestrahlten Kontrollen (nur durch Sternchen gekennzeichnet) oder zwischen Zelllinien (Sternchen in eckigen Klammern): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

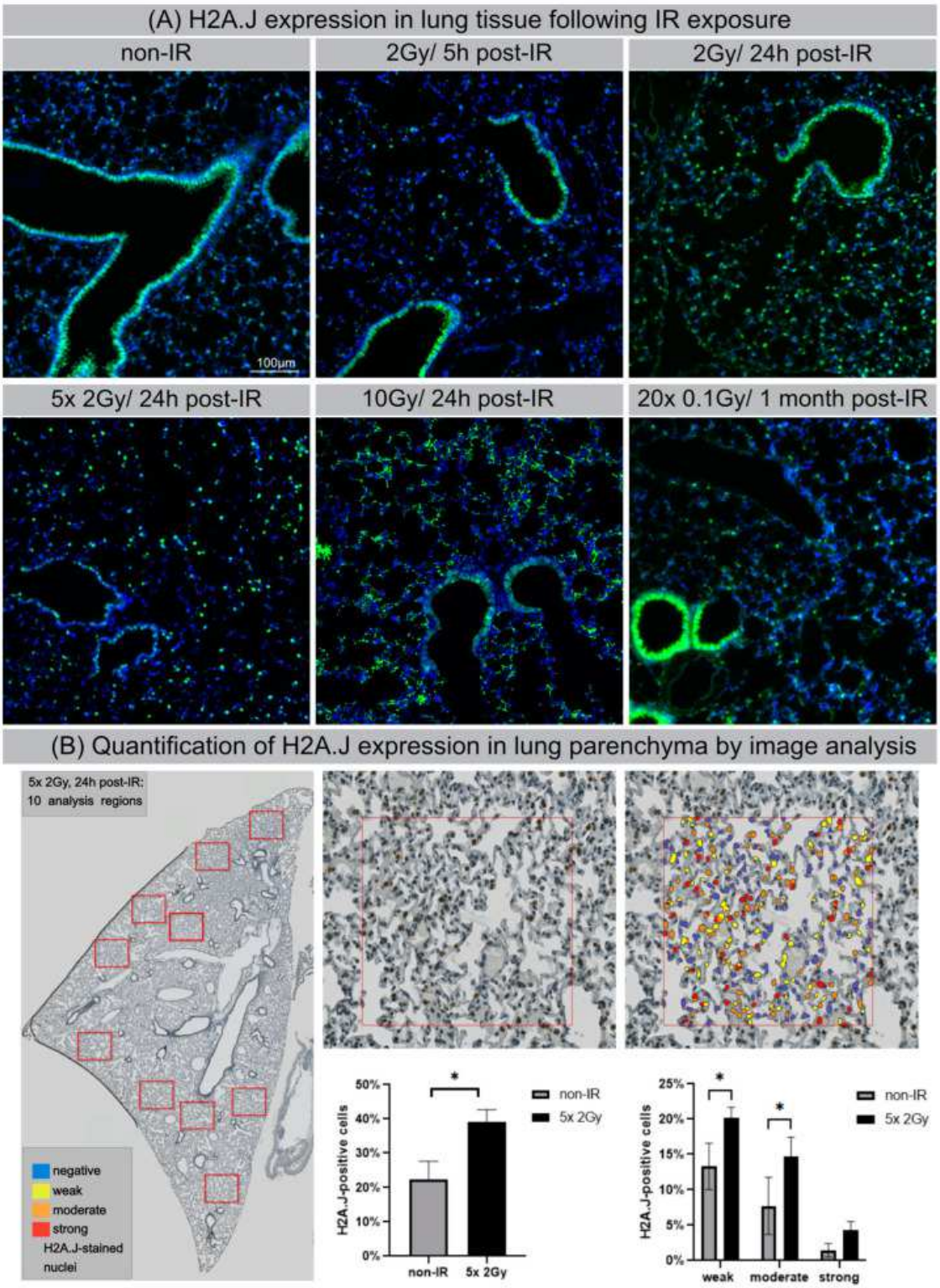

Abb. 1.7.6: H2A.J-Expression im Lungengewebe nach Strahlenexposition.

(A) IFM-Aufnahmen der H2A.J-Expression im Lungengewebe nach Einzeldosis-Exposition mit 2Gy (5 und 24 Stunden nach IR) oder 10Gy (24 Stunden nach IR) und nach fraktionierter IR mit 5× 2Gy oder 20× 0.1Gy im Vergleich zu unbestrahltem Kontrollgewebe.

(B) Quantitative Bildanalyse der nuklearen H2A.J-Expression im Lungenparenchym nach fraktionierter IR (5× 2Gy; 24h nach IR). Signifikanter statistischer Unterschied im Vergleich zu nicht bestrahlten Kontrollen (Sternchen in eckigen Klammern): * $p < 0{,}05$.

1.8. Immunmodulatorische Wirkung der Histonvariante H2A.J im Rahmen der Strahlendermatitis

Die Histonvariante H2A.J ist mit der prämaturen Seneszenz nach Strahlenexposition assoziiert und moduliert den Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP). Um die funktionelle Bedeutung von H2A.J im Rahmen der Strahlendermatitis zu untersuchen, wurden die Rückenhaut von H2A.J-*wildtyp* (WT) und H2A.J-*knockout* (KO) Mäusen mit mäßigen bzw. hohen Dosen (Hautfalten-Bestrahlung mit 20Gy,) bestrahlt. Die strahlungsinduzierten Hautreaktionen wurden bis zu 2 Wochen nach Strahlenexposition auf makroskopischer und mikroskopischer Ebene untersucht. H2A.J und andere Seneszenz-Marker sowie DNA-Schadens- und Proliferations-Marker wurden mittels Immunhistochemie, Immunfluoreszenz und Elektronenmikroskopie untersucht. Nach hochdosierter Strahlenexposition wurden das Protein-kodierende Transkriptom durch RNA-Sequenzierung, die Immunzell-Infiltration mittels Durchflusszytometrie und die Genexpression mittels RT-PCR in (nicht-) bestrahlter WT- versus KO-Haut analysiert. In WT-Haut zeigten die epidermale Keratinozyten nach Strahlenexposition eine zeit- und dosisabhängige H2A.J-Akkumulation. Das Fehlen von H2A.J führte bei den Keratinozyten-Populationen der KO-Haut zu einer deutlich erhöhten Seneszenz-Induktion nach Bestrahlung, mit stärkeren Entzündungsreaktionen, erhöhter Epidermis-Dicke und verstärktem Haarfollikel-Verlust. Insbesondere die Haarfollikel-Stammzellen wurden stark geschädigt, wodurch es zu einer massiven Follikel-Atrophie kam. Nach hochdosierter Bestrahlung ergaben die Transkriptom Analysen verstärkte Seneszenz-assoziierte Signaturen in bestrahlter KO-Haut mit verstärkter Expression von SASP-Faktoren. Mittels Durchflusszytometrie konnte eine erhöhte Infiltration von Immunzellen sowohl in der WT- als auch in der KO-Haut nachgewiesen werden. Dabei führten spezifische Chemokin-vermittelte Signale in bestrahlter KO-Haut zu einer stärkeren Rekrutierung von Neutrophilen, wodurch die Strahlentoxizität aggraviert wurde. Die verstärkte Hautschädigung nach Bestrahlung von KO-Mäusen führte zur reaktiven Hyperproliferation, zur abnormaler Differenzierung und Verhornung der Keratinozyten, begleitet von einer Dysregulierung des Transkriptionsfaktors JunB. Insgesamt ist das Fehlen einer strahleninduzierten H2A.J-Expression in den Keratinozyten der KO-Haut mit einer erhöhten Seneszenz-Induktion, einer Modulation der SASP-Expression und einer Verstärkung der entzündlichen Hautreaktionen verbunden. Insgesamt reguliert die H2A.J-vermittelte Genexpression die Immunfunktion der Keratinozyten im Rahmen strahleninduzierter Entzündungsprozesse und spielt somit eine wesentliche Rolle für Homöostase der Haut nach Bestrahlung.

Immunomodulatory Effects of Histone Variant H2A.J in Ionizing Radiation Dermatitis.
Tewary G, Freyter B, **Al-Razaq MA**, Auerbach H, Laschke MW, Kübelbeck T, Kolb A, Mangelinck A, Mann C, Kramer D, **Rübe CE.** Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2024 Mar 1;118(3):801-816. doi: 10.1016/j.ijrobp.2023.09.022. Epub 2023 Sep 25.PMID: 37758068

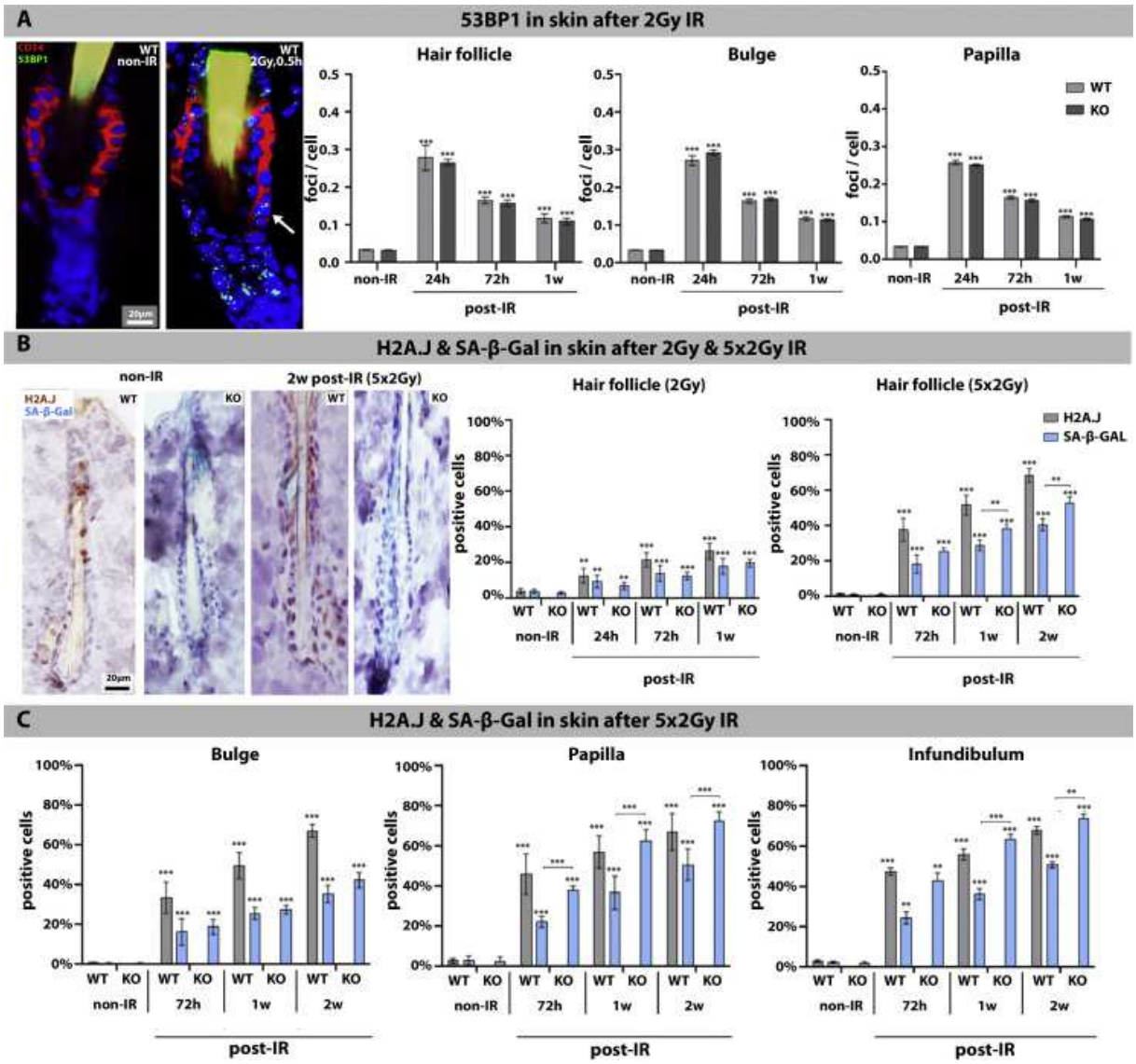

Abb. 1.8.1: Reparatur von DSBs und Seneszenz-Induktion nach Ganzkörper-IR mit moderaten Dosen.

(A) IFM-Aufnahmen von 53BP1- und CD34-Doppelfärbungen im Haarfollikel nach IR-Exposition (2Gy; 0.5h post-IR) im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Grafische Quantifizierung der 53BP1-Foci (Pfeil Markierung) in verschiedenen Haarfollikel-Segmenten.

(B) ICH-Aufnahmen der Doppelfärbung von H2A.J und SA-β-Gal im Haarfollikel nach IR-Exposition (5× 2Gy; 2w post-IR) im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Grafische Darstellung der Quantifizierung von H2A.J+ und SA-β-Gal+ Zellen nach IR mit 2Gy (24h, 72h, 1w post-IR) oder 5× 2Gy (72h, 1w, 2w post-IR).

(C) Quantifizierung von H2A.J+ und SA-β-Gal+ Zellen 72h, 1w, 2w nach IR mit 5× 2Gy. Die Daten werden als Mittelwert ± Standardabweichung (n = 3) dargestellt. Für Wildtyp (WT) und Knock-out (KO) Mäuse wurden die Werte zu verschiedenen Zeitpunkten nach IR mit entsprechenden unbestrahlten Kontrollen verglichen (Signifikanz-Sternchen direkt über den entsprechenden Balken). Darüber hinaus wurden die Werte für WT mit KO-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach IR miteinander verglichen (dargestellt durch verbindende Klammern mit Signifikanz-Sternchen). Statistische Signifikanzen werden als *p <0.05, ** p <0.01, P < 0,001 dargestellt.

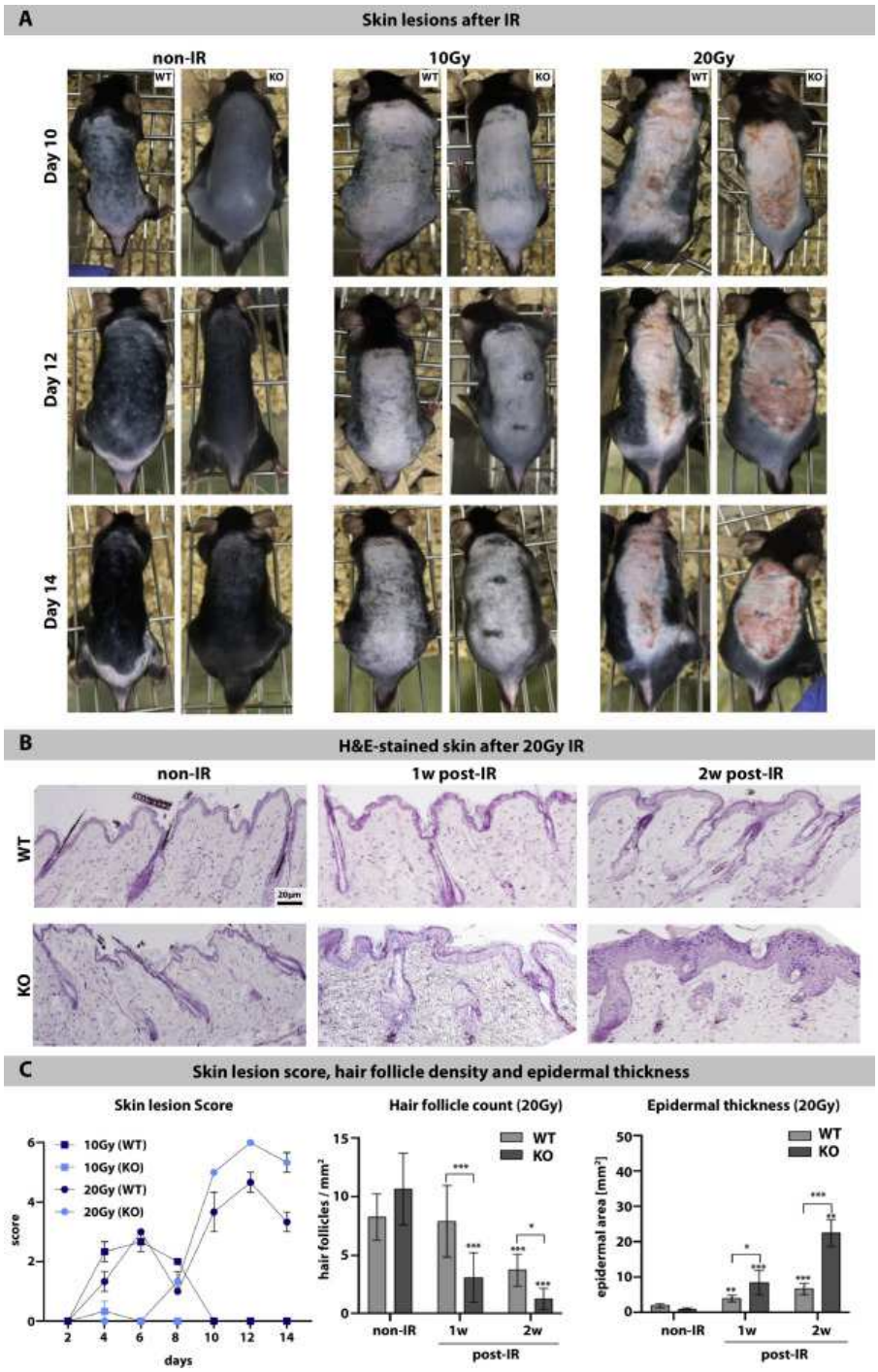

Abb. 1.8.2: Analyse der Hautläsionen nach hochdosierter IR-Exposition der dorsalen Hautfalten.

(A) Fotodokumentation der Hautreaktionen in bestrahlten Hautbereichen von WT- und KO-Mäusen nach 10Gy oder 20Gy Exposition im Vergleich zur unbestrahlten Kontrollen.

(B) Histologische Mikroaufnahmen von H&E-gefärbter Haut von WT und KO-Mäusen nach 20Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrollen.

(C) Grafische Darstellung der Hautläsions-Scorewerte, Haarfollikel-Dichten und epidermalen Dicke der WT- und KO-Haut nach 20Gy-Exposition im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Die Daten wurden als Mittelwert ± Standardabweichung (n = 3) dargestellt. Für WT und KO-Mäuse wurden die Werte zu verschiedenen Zeitpunkten nach IR mit entsprechenden unbestrahlten Kontrollen verglichen (Signifikanz-Sternchen direkt über den entsprechenden Balken). Darüber hinaus wurden die Werte für WT mit KO-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach IR miteinander verglichen (verbindende Klammern mit Signifikanz-Sternchen). Statistische Signifikanzen werden als *p <0.05, **<0.01, ***p <0.001 dargestellt.

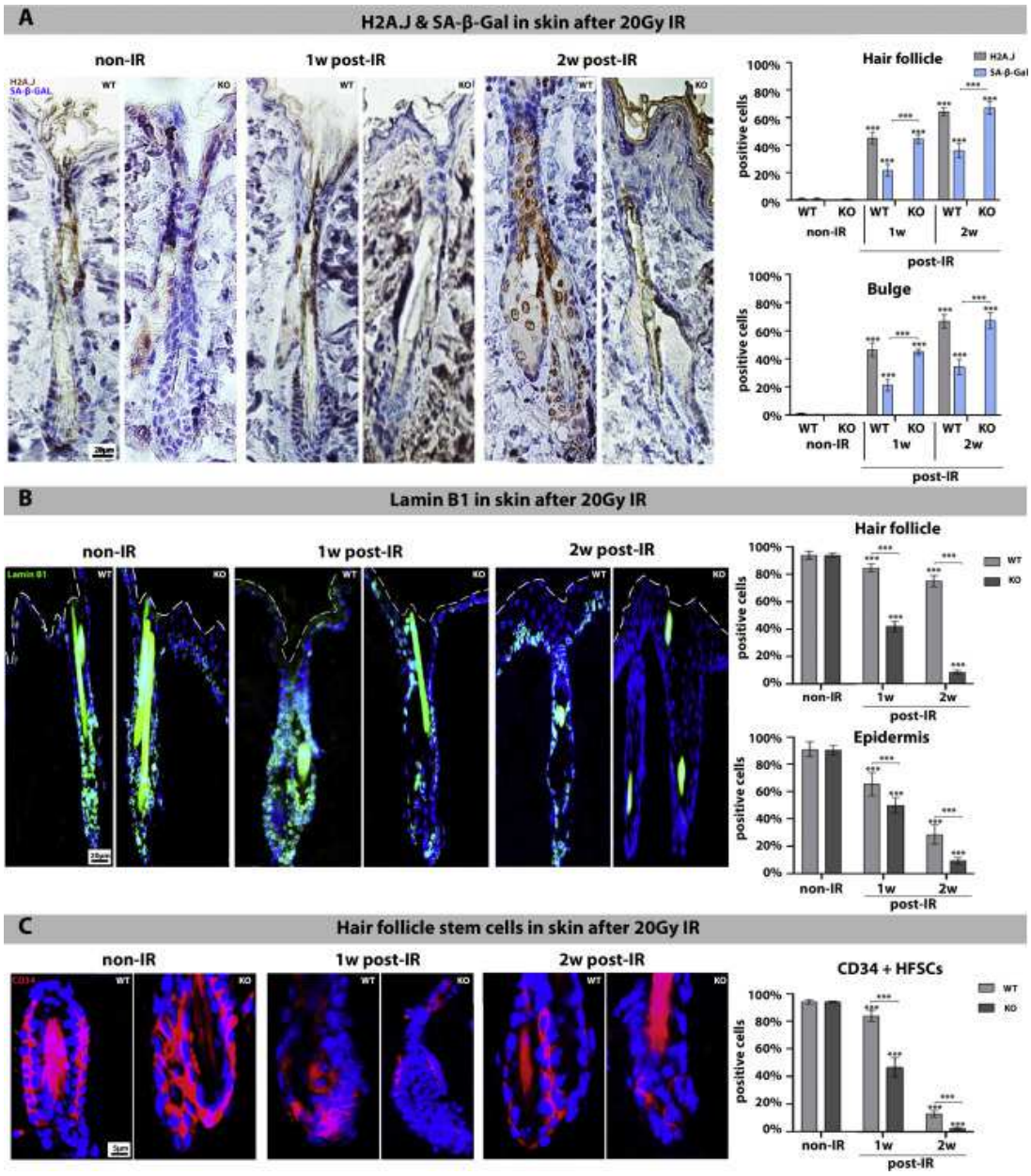

Abb. 1.8.3: Seneszenz-Induktion und Haarfollikel-Stammzell-Depletion nach Hochdosis-IR von dorsalen Hautfalten.

(A) ICH-Aufnahmen der Doppelfärbung von H2A.J und SA-β-Gal im Haarfollikel Quantifizierung von H2A.J+ und SA-β-Gal+ Zellen nach 20Gy im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle.

(B) IF-Mikroaufnahmen der Lamin-B1-Färbung im Haarfollikel nach 20 Gy im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen und Quantifizierung der Lamin-B1+ Zellen im Haarfollikel und in der Epidermis.

(C) IF-Mikroaufnahmen der CD34-Färbung in den Bulge-Regionen von Haarfollikeln. Quantifizierung der CD34+ Haarfollikel-Stammzellen nach 20Gy im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen.

Die Daten wurden als Mittelwert ± Standardabweichung (n = 3) dargestellt. Für WT und KO-Mäuse wurden die Werte zu verschiedenen Zeitpunkten nach IR mit entsprechenden unbestrahlten Kontrollen verglichen (Signifikanz-Sternchen direkt über den entsprechenden Balken). Darüber hinaus wurden die Werte für WT mit KO-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach IR miteinander verglichen (verbindende Klammern mit Signifikanz-Sternchen). Statistische Signifikanzen werden als *p <0.05, **<0.01, ***p <0.001 dargestellt.

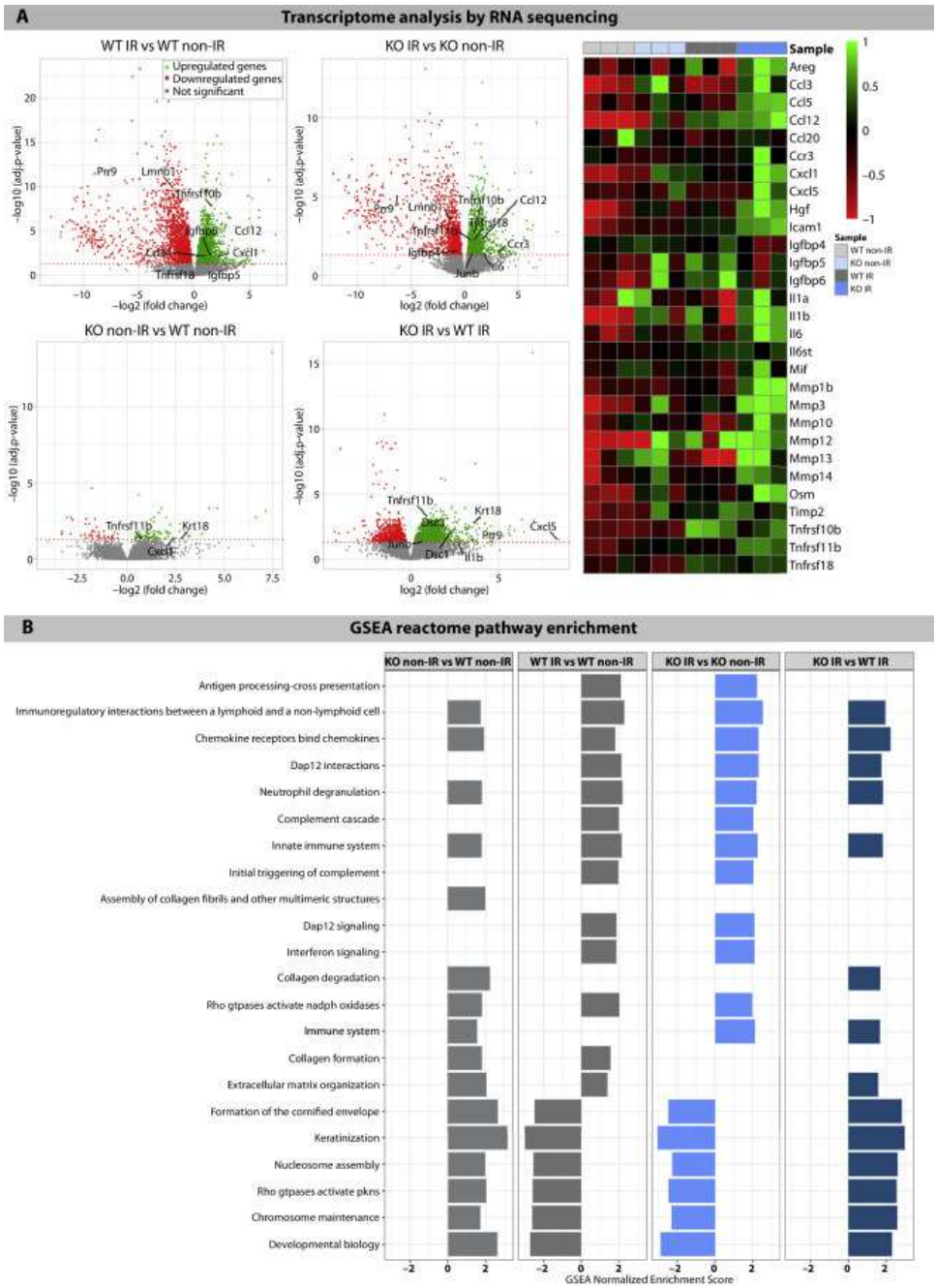

Abb. 1.8.4: Analyse des Transkriptoms nach hochdosierter Hautfalten-Bestrahlung.

(A) Vulkandiagramme unterschiedlich exprimierter Gene zwischen WT-bestrahlt (WT_IR) und WT-unbestrahlt (WT_non-IR), KO-bestrahlt (KO_IR) und KO-unbestrahlt (KO_non-IR) und KO-unbestrahlt (KO_non-IR) gegenüber unbestrahlt WT (WT_non-IR) und KO-bestrahltem (KO_IR) gegenüber unbestrahlt WT (WT_IR). Das Streudiagramm zeigt die statistische Signifikanz (*-log10 padj*) im Vergleich zum Ausmaß der Änderung (*log2FC*). Gene wurden gefärbt, wenn sie die Schwellenwerte für *log10padj* und *log2FC* überschreiten: Rote/grüne Punkte kennzeichnen herunter-/hochregulierte Genexpression, blaue Punkte kennzeichnen SASP-Faktoren. Heatmap der RNA-seq Expression der SASP-Gene in (un-)bestrahlter WT- und KO-Haut. Die Genexpression wird in normalisierten log2-Werten angezeigt. Differenziell exprimierte Gene wurden basierend auf einer ±1-fachen Änderung und einem FDR <0,05 ausgewählt.

(B) Die GSEA-Reactome Signalweg-Analyse ergab 22 statistisch signifikante Signalwege, die separat für KO_non-IR gegenüber WT_non-IR, WT_IR gegenüber WT_non-IR, KO_IR gegenüber KO_non-IR und KO_IR gegenüber WT_IR aufgeführt sind. Der GSEA *Normalized Enrichment Score* wurde verwendet, um Analyse-Ergebnisse verschiedener Gensätzen zu vergleichen. Abkürzungen: FDR = *False Discovery Rate*; GSEA = *Gen-Set-Enrichment-Analyse*

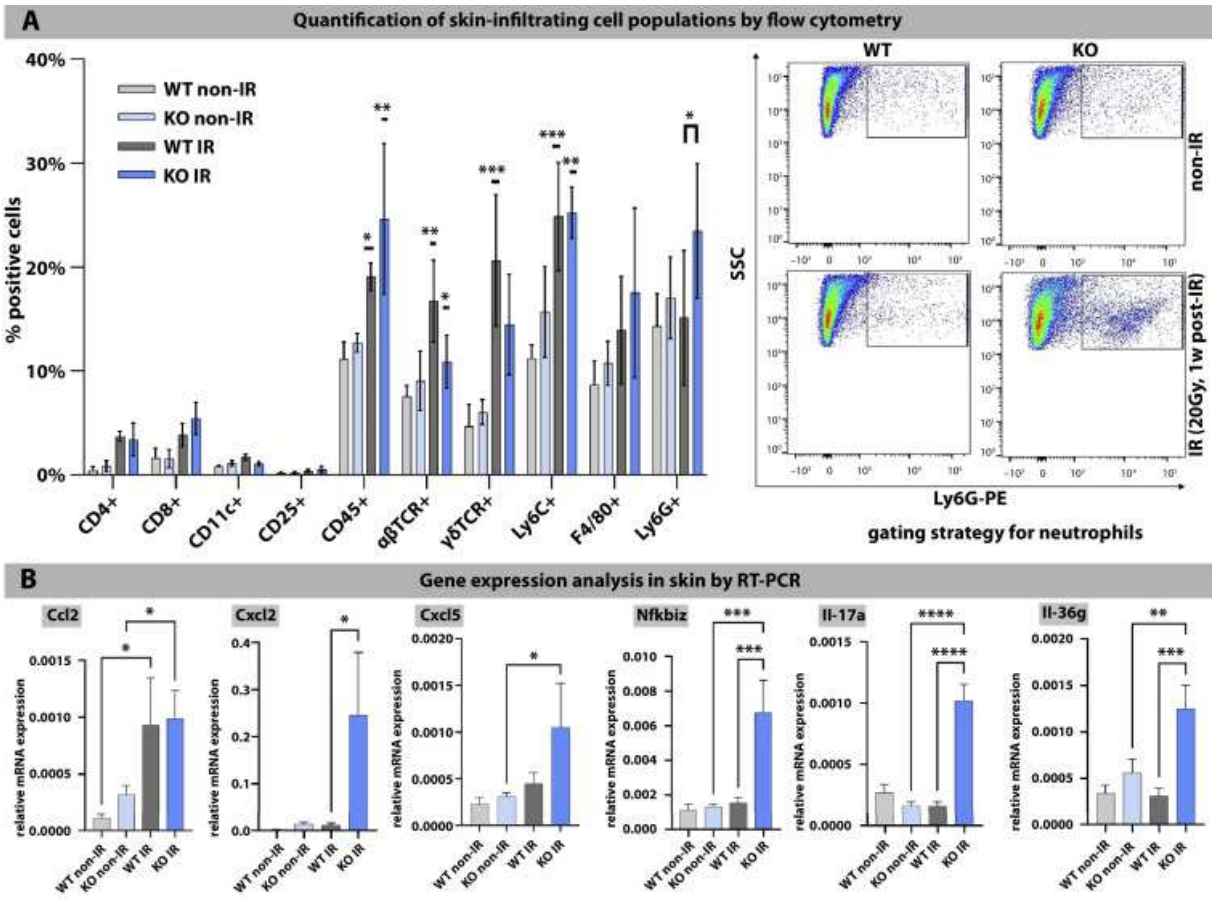

Abb. 1.8.5: Infiltration von Immunzellen nach hochdosierter Hautfalten-Bestrahlung.

(A) Durchflusszytometrie-Analyse für CD4+-, CD8+-, CD11+-, CD25+-, CD45+-, αβTCR+-, γδTCR+-, Ly6C+-, F4/80+- und Ly6G+-Zellen in (un-)bestrahlter WT- und KO-Haut.

(B) Genexpressions-Analyse in (un-)bestrahlter WT- und KO-Haut durch Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion.

Die Daten wurden als Mittelwert ± Standardabweichung (n = 3) dargestellt. Für WT und KO Mäuse wurden die Werte zu verschiedenen Zeitpunkten nach IR mit entsprechenden unbestrahlten Kontrollen verglichen (Signifikanz-Sternchen direkt über den entsprechenden Balken). Darüber hinaus wurden die Werte für WT mit KO Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach IR miteinander verglichen (verbindende Klammern mit Signifikanz-Sternchen). Statistische Signifikanzen werden als *p <0.05, **<0.01, ***p <0.001 dargestellt.

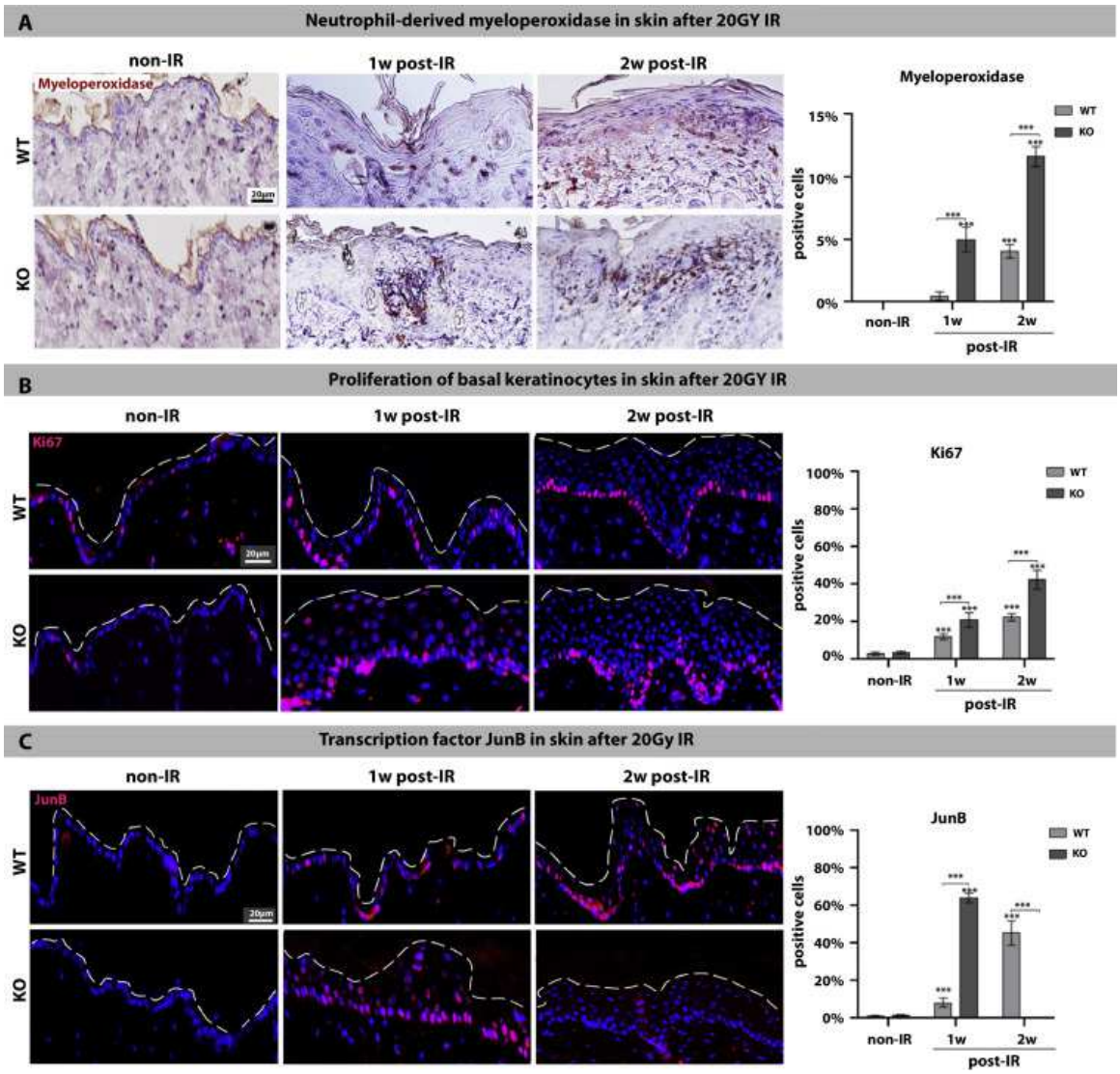

Abb. 1.8.6: Neutrophilen-bedingte Haut-Entzündung und erhöhte Proliferation basaler Keratinozyten.

(A) Immunhistochemische Aufnahmen der von Neutrophilen-assoziierten Myeloperoxidase in der Epidermis nach 20 Gy (1w und 2w post-IR) im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Quantifizierung von Myeloperoxidase+ Zellen (in Prozent).

(B) IF-Mikroaufnahmen von Ki67 in der Epidermis nach 20 Gy (1w und 2w post-IR) im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Quantifizierung von Ki67+-Zellen (in Prozent).

(C) IF-Mikroaufnahmen des Transkriptionsfaktors JunB in der Epidermis nach 20 Gy (1 und 2 Wochen nach IR) im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle. Quantifizierung von JunB+ Zellen (in Prozent).

Die Daten wurden als Mittelwert ± Standardabweichung (n = 3) dargestellt. Für WT und KO Mäuse wurden die Werte zu verschiedenen Zeitpunkten nach IR mit entsprechenden unbestrahlten Kontrollen verglichen (Signifikanz-Sternchen direkt über den entsprechenden Balken). Darüber hinaus wurden die Werte für WT mit KO Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach IR miteinander verglichen (verbindende Klammern mit Signifikanz-Sternchen). Statistische Signifikanzen werden als *p <0.05, **<0.01, ***p <0.001 dargestellt.

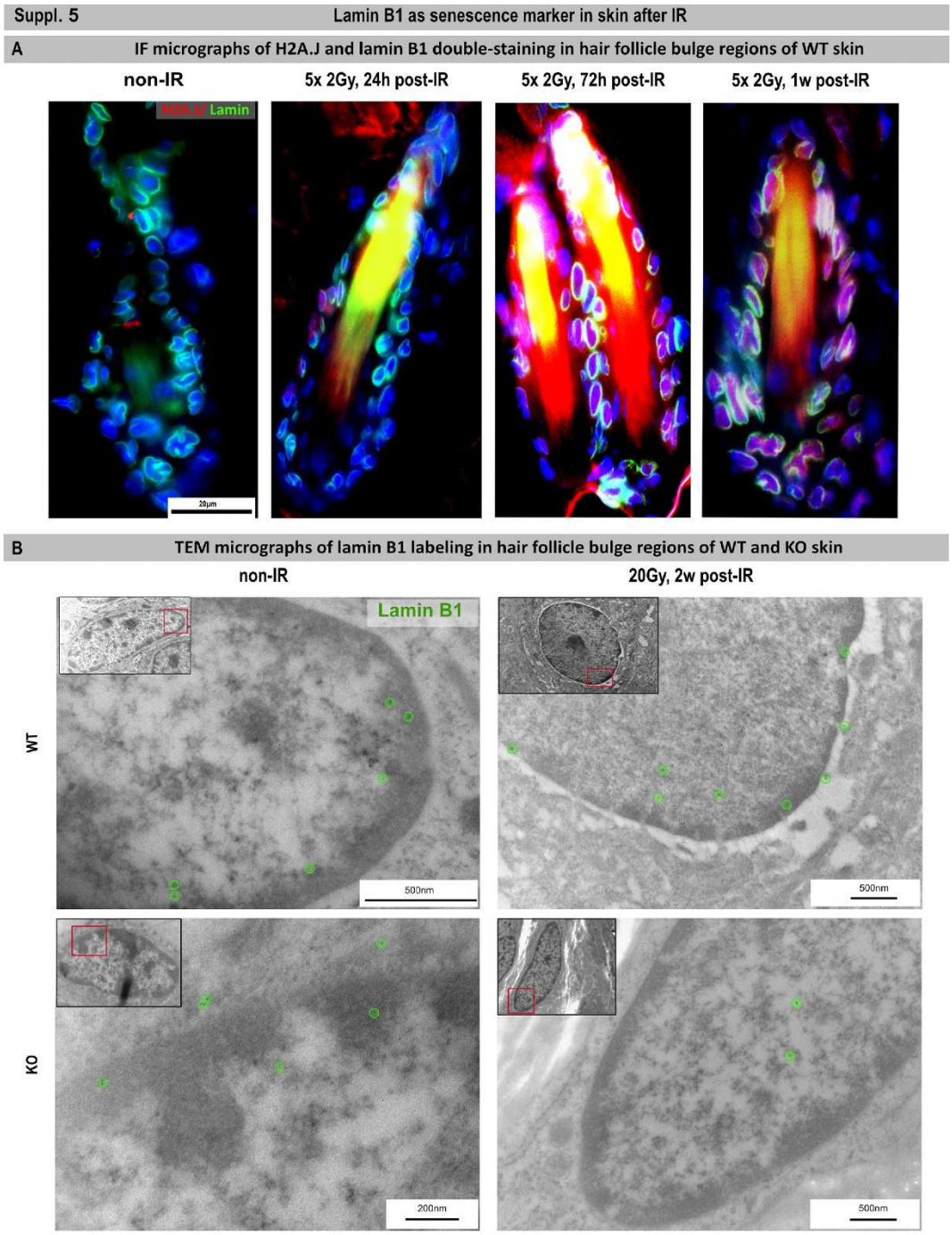

Abb. 1.8. Supplement: Nachweis der Seneszenz-Induktion im murinen Haarfollikel nach Bestrahlung durch IFM- (A) und TEM-Analysen (B) von Lamin B1.

1.9. Die Überexpression der Histonvariante H2A.J induziert Strahlenresistenz und fördert die onkogene Transformation

Die zelluläre Seneszenz als Reaktion auf ionisierende Strahlung (IR) begrenzt die Replikation geschädigter Zellen, indem sie einen dauerhaften Zellzyklus-Arrest induziert. IR kann jedoch auch überlebensfördernde Signalwege induzieren, die das Ausmaß der strahleninduzierten Zytotoxizität verringern und die Entwicklung einer Strahlenresistenz fördern. Der differenzielle Einbau der Histonvariante H2A.J hat tiefgreifende Auswirkungen auf die Chromatin-Organisation und auf die epigenetische Etablierung der strahleninduzierten Seneszenz. Um die epigenetische Bedeutung einer H2A.J-Überexpression nach Strahlenexposition zu untersuchen, wurden primäre (*no target*, NT) und genetisch-modifizierte (*H2A.J-overexpressing*, H2A.J-OE) H2A.J-überexprimierende Fibroblasten mit 20 Gy bestrahlt und mittels Immunhisto-/Immunfluoreszenz-Mikroskopie hinsichtlich strahleninduzierter Seneszenz untersucht. Das Transkriptom wurde in (nicht-) bestrahlten NT- und H2A.J-OE-Fibroblasten durch RNA-Sequenzierung analysiert. Da H2A.J eine wichtige Rolle in der epidermalen Homöostase der humanen Haut spielt, wurde auch das onkogene Potenzial von H2A.J in kutanem Plattenepithelkarzinom (*cutaneous squamous cell carcinoma*, cSCC) untersucht. Die Gewebe-Mikroarrays von cSCC wurden mittels automatisierter Bildanalyse hinsichtlich dem Expressionsmuster von H2A.J analysiert. Unsere Ergebnisse zeigen, dass als Reaktion auf strahleninduzierte DNA-Schäden die Bildung von Seneszenz-assoziierten Heterochromatin-Foci (SAHF) und dadurch die SAHF-vermittelte Stilllegung proliferations-fördernder Gene gehemmt wird. Die dysregulierte Aktivierung von Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen inhibiert den Zellzyklus-Arrest, so dass H2A.J-OE-Fibroblasten die strahleninduzierte Seneszenz überwinden können. Vergleichende Transkriptom-Analysen ergaben eine signifikant erhöhte WNT16-Signalisierung in H2A.J OE-Fibroblasten nach Bestrahlung, wodurch grundlegende Mechanismen der Tumorentwicklung und -progression gefördert werden, einschließlich der epithelial-mesenchymalen Transition. Die quantitativen Analysen der cSCCs ergaben, dass undifferenzierte Tumoren mit einer hohen nukleären H2A.J-Expression assoziiert sind. Aufgrund unserer Ergebnisse folgern wir, dass eine Überexpression von H2A.J zur Strahlenresistenz führt und die onkogene Transformation durch die Aktivierung der WNT-Signalweges fördert.

Studies on Human Cultured Fibroblasts and Cutaneous Squamous Cell Carcinomas Suggest That Overexpression of Histone Variant H2A.J Promotes Radioresistance and Oncogenic Transformation.
Freyter BM, **Abd Al-Razaq MA**, Hecht M, Rübe C, **Rübe CE.** Genes (Basel). 2024 Jun 27;15(7):851. doi: 10.3390/genes15070851.PMID: 39062630

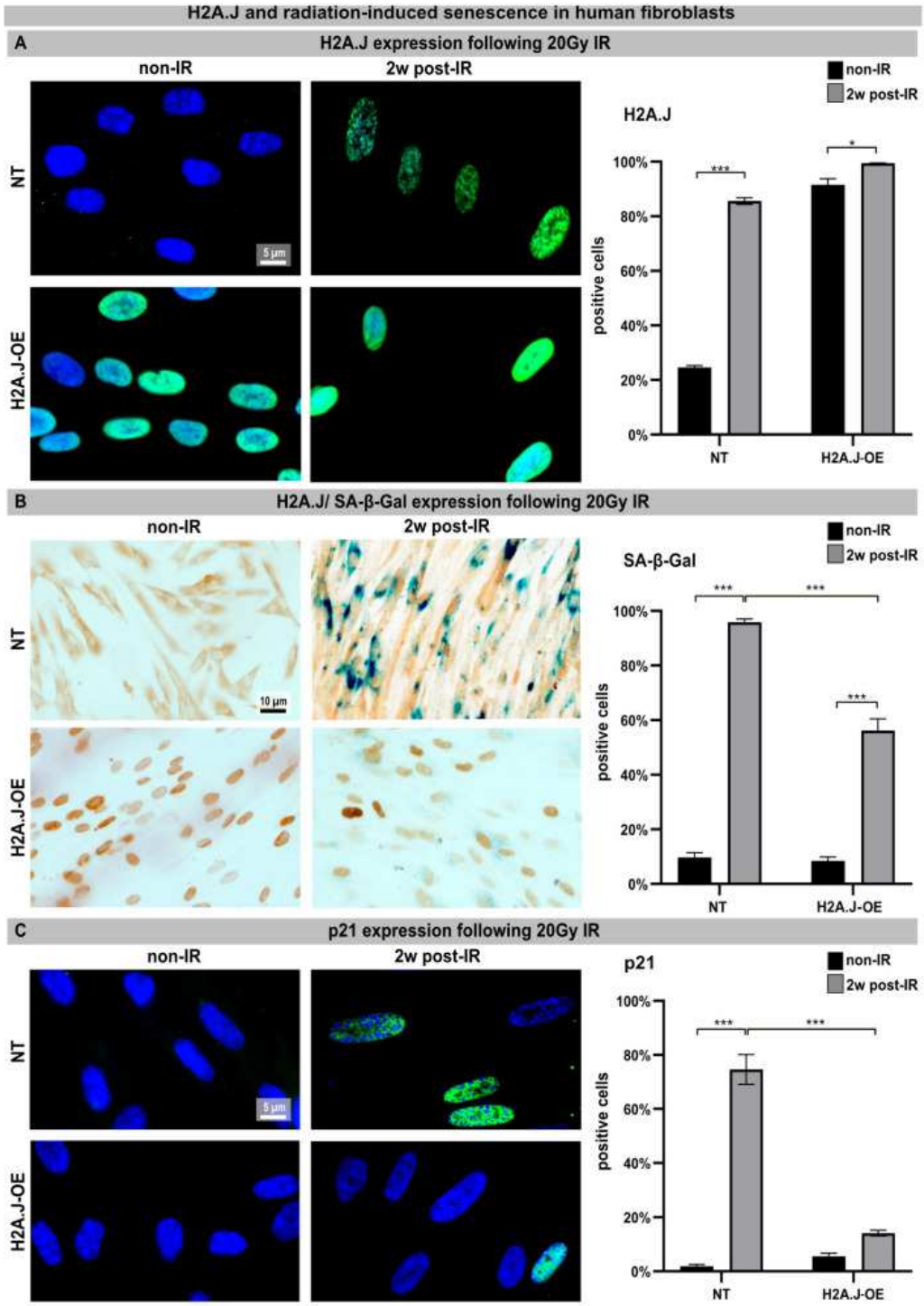

Abb. 1.9.1:

(A) H2A.J-Expression: IFM-Aufnahmen und Quantifizierung der H2A.J+ Zellen bei NT und H2A.J-OE Zelllinien 2 Wochen nach IR im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen.

(B) H2A.J-Expression und SA-β-Gal-Färbung: IHC-Aufnahmen und Quantifizierung der H2A.J+ und SA-β-Gal+ Zellen bei NT und H2A.J-OE Zelllinien 2 Wochen nach IR im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen.

(C) p21-Expression: IFM-Aufnahmen und Quantifizierung der p21+-Zellen bei NT und H2A.J-OE Zelllinien 2 Wochen nach IR im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollen.

Daten werden als Mittelwert aus drei Experimenten ± SE dargestellt. Signifikante statistische Unterschiede sind durch Sternchen über den Klammern gekennzeichnet: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

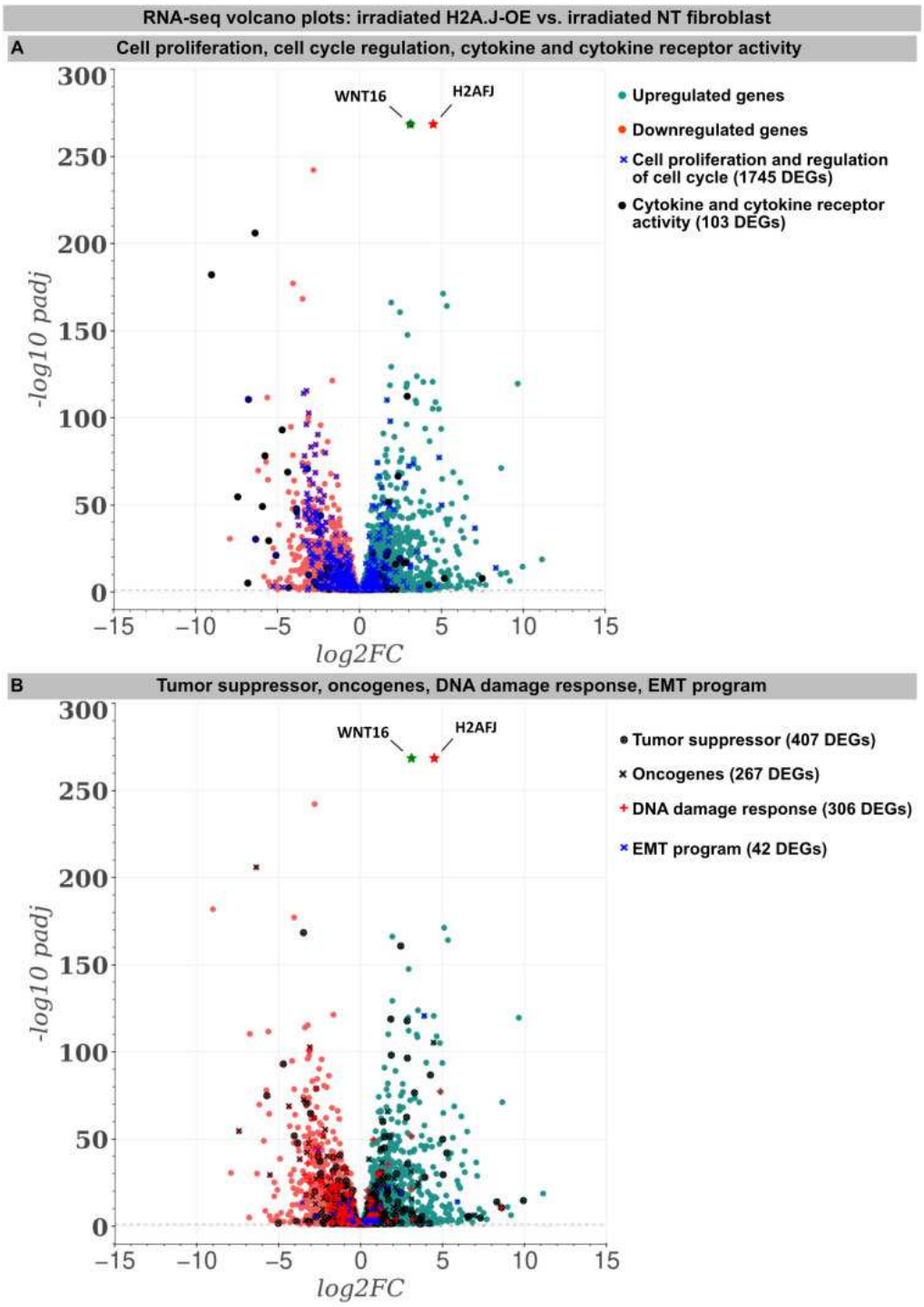

Abb. 1.9.2:

Transkriptom-Analyse: Vulkandiagramme der differentiell exprimierten Gene (DEG) zwischen bestrahlten H2A.J-OE und bestrahlten NT-Fibroblasten. Die Streudiagramme zeigen die statistische Signifikanz *(-log10 padj)* gegenüber dem Ausmaß der Änderung (*log2FC*). Die Gene sind gefärbt, wenn sie die Schwellenwerte für *-log10padj* und *log2FC* überschreiten: Rote/ grüne Punkte kennzeichnen herunter-/ hochregulierte Genexpression. Die DEG wurden entsprechend den KEGG-Signalwegen klassifiziert und im Vergleich zu anderen Genen visualisiert.

(A) Zytokin- und Zytokinrezeptor-Aktivität, Zellproliferation und Regulierung des Zellzyklus,

(B) Tumorsuppressoren und Onkogene, DNA-Schadensreaktion und EMT-Programm.

Beachten Sie, dass WNT16 neben dem H2AFJ-Gen das am stärksten hochregulierte Gen war.

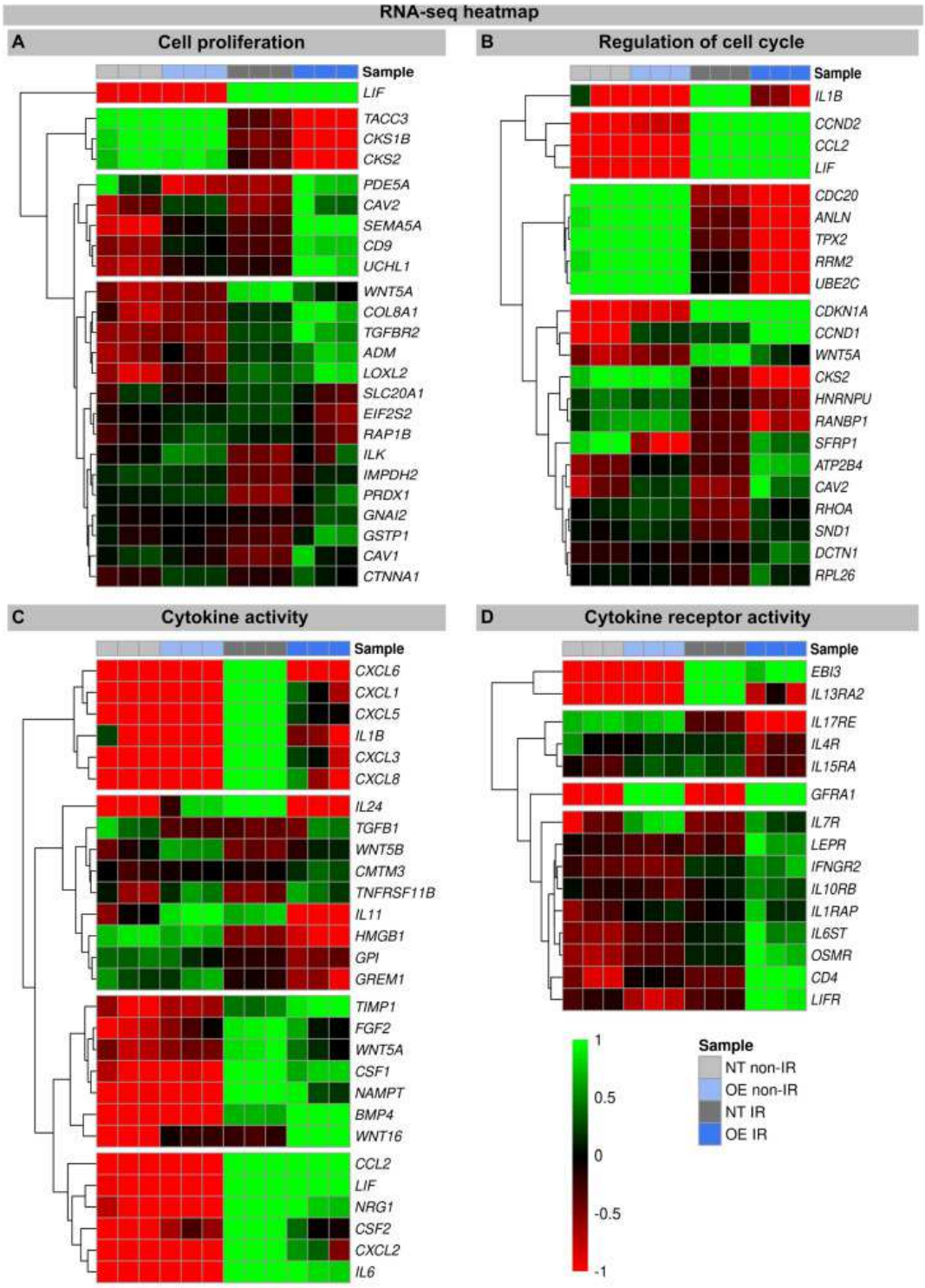

Abb. 1.9.3: Heatmap der RNA-seq Expression.

Die DEGs zwischen (nicht-) bestrahlten H2A.J-OE und NT-Fibroblasten wurden entsprechend folgender KEGG-Signalwege klassifiziert: (A): Zellproliferation; (B): Regulierung des Zellzyklus; (C): Zytokin-Aktivität; (D): Zytokinrezeptor-Aktivität. DEGs wurden basierend auf einer ±1-fachen Änderung und einem FDR <0,05 ausgewählt.

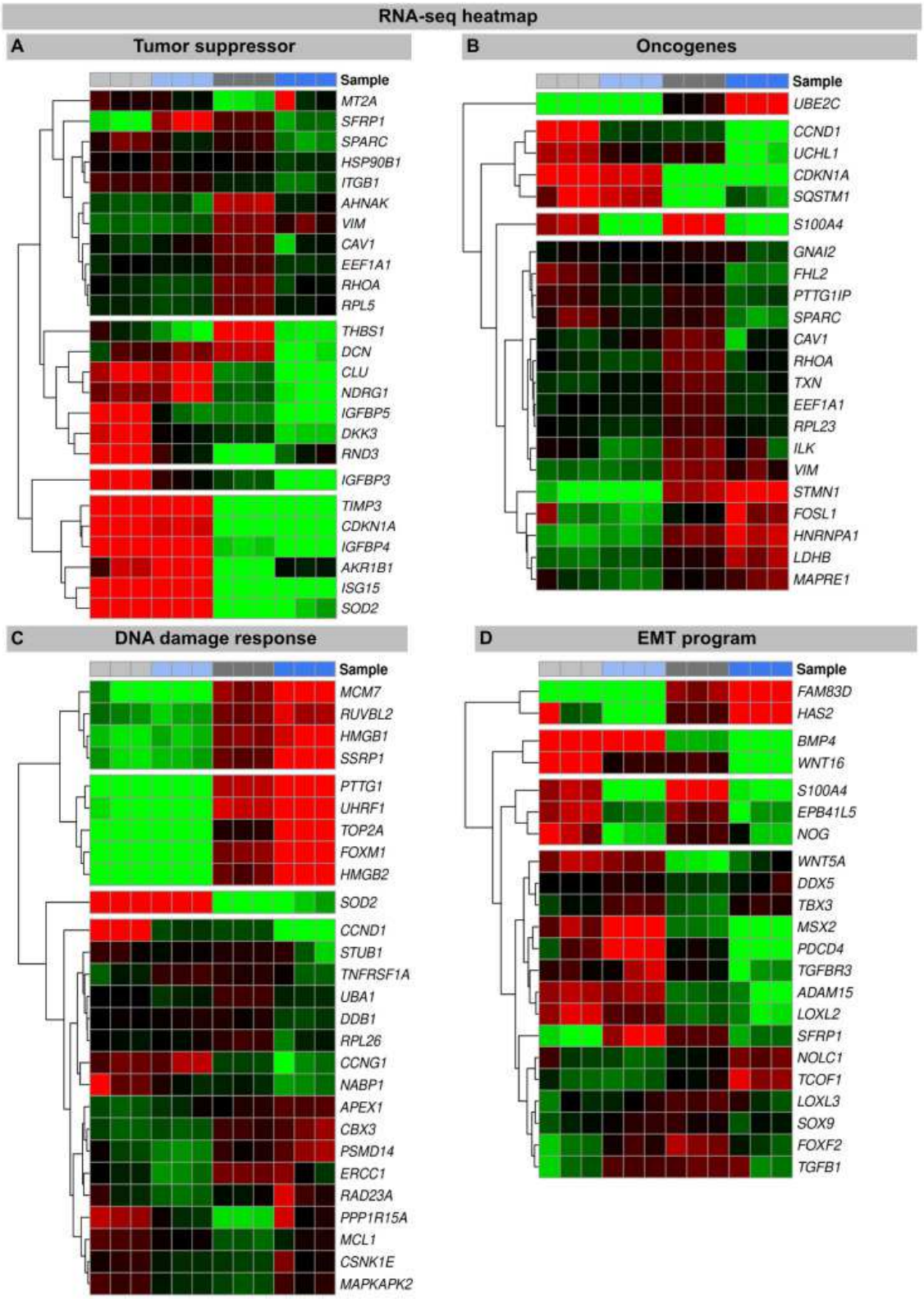

Abb. 1.9.4: Heatmap der RNA-seq Expression.

Die DEGs zwischen (nicht-) bestrahlten H2A.J-OE und NT-Fibroblasten wurden entsprechend folgender KEGG-Signalwege klassifiziert: (A): Tumorsuppressor; (B): Onkogene; (C): DNA-Schadensreaktion; (D): EMT-Programm. DEGs wurden basierend auf einer ±1-fachen Änderung und einem FDR <0,05 ausgewählt.

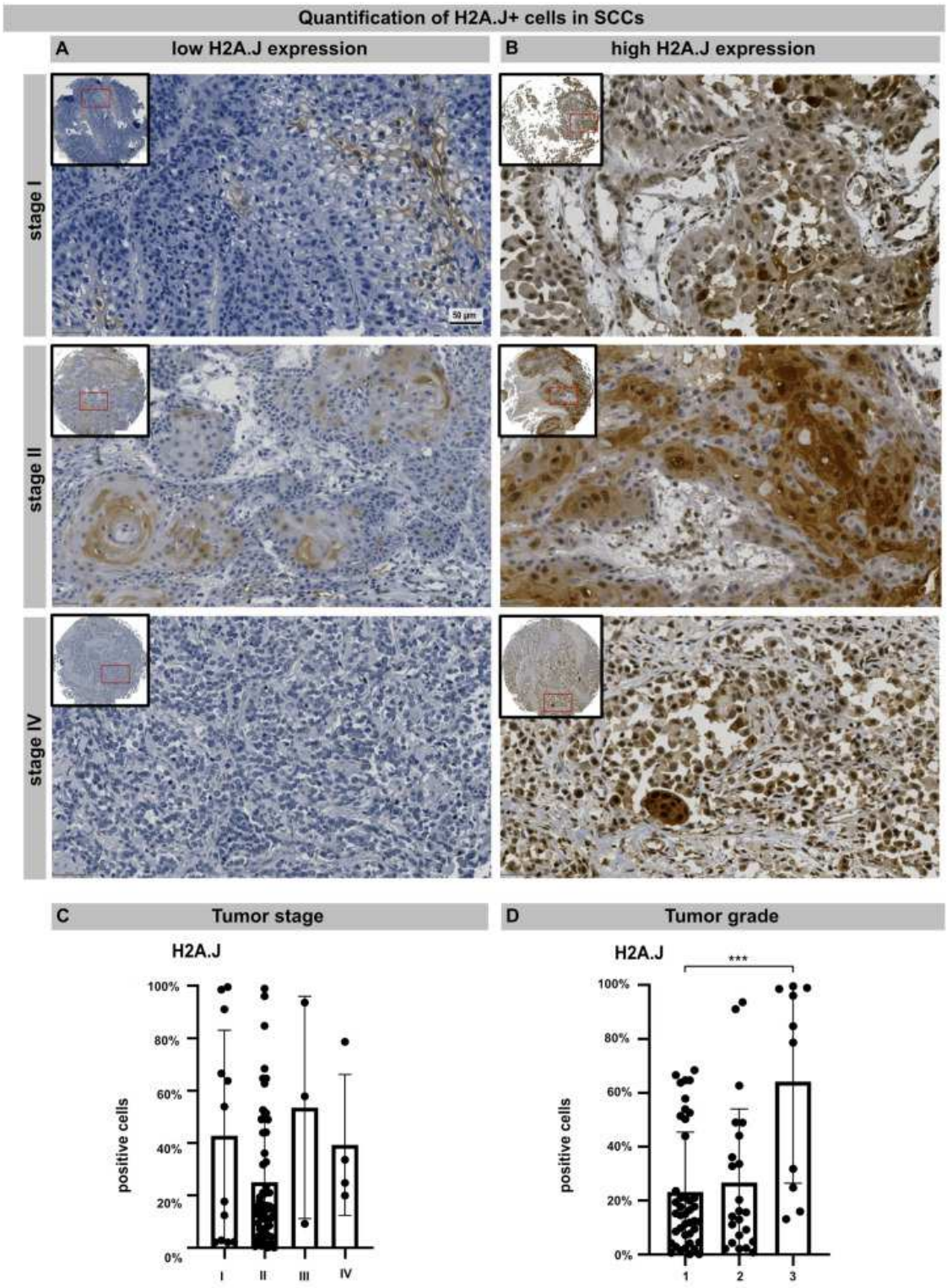

Abb. 1.9.5:

IHC-Mikroaufnahmen zeigen eine niedrige (A) oder hohe (B) H2A.J-Expression in cSCC, unabhängig vom Tumorstadium. Quantifizierung von H2A.J+ Zellen in Bezug auf Tumor-Stadium (C) und Tumor-Grading (D). Signifikante statistische Unterschiede sind durch Sternchen gekennzeichnet: *** $p < 0{,}001$.

2. Wichtige Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Fördermittel wurden gemäß der im Mittelbescheid festgelegten und im Verwendungsnachweis belegten Höhe und Ausgabenart sachgebunden für die Durchführung dieses Forschungsprojektes verwendet. Die Personalmittel wurden gemäß der Bewilligung für die Stellenfinanzierung eines naturwissenschaftlichen Doktoranden verwendet (65% TV-L 13 für 3 Jahre). Dementsprechend konnte sich Mutaz Abd Al-razaq im Rahmen dieses Verbundprojektes erfolgreich zum Dr. rer. nat. promovieren, d.h. die kumulative Promotionsarbeit wurde bereits beim Dekanat der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes eingereicht. Die beantragten Reisekosten wurden für die Präsentation der im Projekt erzielten Ergebnisse auf nationalen und internationalen Tagungen verwendet.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten

Alle durchgeführten Experimente waren in Anzahl und Ausführung für das Erreichen der gesetzten Ziele sinnvoll und angemessen. Aufgrund der Änderungen beim Projektpartner Jülich wurden zusätzliche Untersuchungen durchgeführt, um das angestrebte Forschungsziel bei optimalem Ressourcen-Einsatz zu erreichen. Insgesamt konnte ein deutlicher Zuwachs an wissenschaftlichem Erkenntnissen erzielt werden.

4. Voraussichtlicher Nutzen der erzielten Ergebnisse

In diesem Verbundprojekt konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass nach Strahlenexposition eine strahleninduzierte Schädigung genomischer DNA nicht nur lokal am Schadensort zu einer veränderten Chromatin-Struktur führt, sondern auch weiträumig die Chromatin-Architektur im Zellkern beeinflusst. Dabei scheint das spezielle DNA-Schadensmuster der verwendeten Strahlenqualität die Dynamik der Chromatin-Remodellierung zu beeinflussen. Insbesondere konnte die funktionelle Bedeutung der Histonvariante H2A.J für die strahleninduzierte Umstrukturierung der Chromatin-Organisation herausgearbeitet werden. Die strahleninduzierte Inkorporation der Histonvariante H2A.J beeinflusst die Chromatin-Architektur und dadurch die Bindungsfähigkeit von Transkriptionsfaktoren, so dass durch eine unterschiedliche Aktivierung der Gentranskription entscheidend die zellulären Funktionen nach Strahlenexposition beeinflusst werden. H2A.J besitzt nicht nur für verschiedene Zellpopulationen der Normalgewebe, sondern möglicherweise auch für Tumorgewebe wichtige pathophysiologische Funktionen, da es insbesondere die Strahlenempfindlichkeit bzw. Strahlenresistenz maßgeblich beeinflusst.

5. Fortschritte auf dem Gebiet während der Durchführung der Arbeiten

Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens wurden die oben bereits dargestellten Arbeiten in 6 Publikationen veröffentlicht.

- Focused Ion Microbeam Irradiation Induces Clustering of DNA Double-Strand Breaks in Heterochromatin Visualized by Nanoscale-Resolution Electron Microscopy. Lorat Y, Reindl J, Isermann A, Rübe C, Friedl AA, **Rübe CE.** Int J Mol Sci. 2021 Jul 16;22(14):7638. doi: 10.3390/ijms22147638.PMID: 34299263

- Nuclear Fragility in Radiation-Induced Senescence: Blebs and Tubes Visualized by 3D Electron Microscopy. Freyter BM, **Abd Al-Razaq MA**, Isermann A, Dietz A, Azimzadeh O, Hekking L, Gomolka M, **Rübe CE.** Cells. 2022 Jan 13;11(2):273. doi: 10.3390/cells 11020273.PMID: 35053389

- Automated Image Analysis of Transmission Electron Micrographs: Nanoscale Evaluation of Radiation-Induced DNA Damage in the Context of Chromatin. Abd Al-Razaq MA, Isermann A, Hecht M, **Rübe CE.**Cells. 2023 Oct 10;12(20):2427. doi: 10.3390/cells12202427.PMID: 37887271

- Role of Histone Variant H2A.J in Fine-Tuning Chromatin Organization for the Establishment of Ionizing Radiation-Induced Senescence. **Abd Al-Razaq MA**, Freyter BM, Isermann A, Tewary G, Mangelinck A, Mann C, **Rübe CE.** Cells. 2023 Mar 16;12(6):916. doi: 10.3390/cells12060916.PMID: 36980257

- Immunomodulatory Effects of Histone Variant H2A.J in Ionizing Radiation Dermatitis. **Tewary G**, Freyter B, **Al-Razaq MA**, Auerbach H, Laschke MW, Kübelbeck T, Kolb A, Mangelinck A, Mann C, Kramer D, **Rübe CE.** Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2024 Mar 1;118(3):801-816. doi: 10.1016/j.ijrobp.2023.09.022. Epub 2023 Sep 25.PMID: 37758068

- Studies on Human Cultured Fibroblasts and Cutaneous Squamous Cell Carcinomas Suggest That Overexpression of Histone Variant H2A.J Promotes Radioresistance and Oncogenic Transformation. Freyter BM, **Abd Al-Razaq MA**, Hecht M, Rübe C, **Rübe CE.** Genes (Basel). 2024 Jun 27;15(7):851. doi: 10.3390/ genes15070851.PMID: 39062630

6. Erfolgte und geplante Veröffentlichungen

Die Ergebnisse wurden auch als Vorträge bzw. Poster auf nationalen und internationalen Fachtagungen publiziert. Es werden zurzeit weitere Fachaufsätze u.a. zusammen mit den Verbundpartnern vorbereitet.

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel Einflüsse strahleninduzierter, multipler und einzelner spezifisch-targetierter DNA-Strangschäden auf die übergeordnete meso- und nanoskalige Chromatinarchitektur und die Topologie von Reparaturfoci	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Prof. Dr. med. Claudia E. Rübe	5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.03.2024
	6. Veröffentlichungsdatum
	7. Form der Publikation Wissenschaftliche Artikel, Poster, Vorträge
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Universität des Saarlandes Klinik für Strahlentherapie & Radioonkologie Universitätsklinikum des Saarlandes Kirrbergerstrasse Gebäude 6.5 66421 Homburg/ Saar	9. Ber. Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen 02 NUK 058B
	11. Seitenzahl 53
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 6 Publikationen
	14. Tabellen 0 Tabellen
	15. Abbildungen 41 Abbildungen

16. Zusätzliche Angaben

Fortschreibung des Verwertungsplans: Die Forschungsergebnisse wurden und werden der Wissenschaft durch Veröffentlichungen in referierten Fachjournalen und Vorträgen und Postern auf nationalen und internationalen Tagungen zugänglich gemacht. Die gewonnenen Datensätze wurden nach vorgegebener Struktur archiviert, so dass sie für weitere wissenschaftliche Arbeiten genutzt werden können. Es erfolgten keine Schutzanmeldungen. Das Projekt liefert wichtige Ergebnisse für die Grundlagenforschung, auf die anschließende Projekte aufgebaut werden können.

Angaben zu Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben: Solche Arbeiten lagen nicht vor.

Angaben über die Einhaltung der Ausgaben- und der Zeitplanung: Über die Ausgaben wurde ein rechnerischer Verwendungsnachweis vorgelegt. Bedingt durch Restriktionen während der COVID-Pandemie gab es in Abstimmung mit dem Projektträger zeitliche und inhaltliche Verschiebungen im Ablauf der Arbeitspakete. Darüber hinaus wurden im Teilprojekt des FZ Jülich die TFO-bezogenen Untersuchungen aus personellen Gründen nicht umgesetzt, wie ursprünglich projektiert, sondern durch Versuche unter Nutzung von Basenanaloga zur Setzung von komplexen DNA Doppelstrangbrüchen in definierten Zellzyklus-Phasen ersetzt. Die Bearbeitung dieser Präparate mit Exposition der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen erforderte Änderungen in den entsprechenden Arbeitspaketen, die jedoch ohne prinzipielle Änderungen der Aufgabenstellung zielführend durchgeführt wurden. Aufgrund zusätzlicher Kontrollexperimenten musste das Projekt kostenneutral um 6 Monate verlängert werden.

17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)

18. Kurzfassung

In diesem Verbundprojekt konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass nach Strahlenexposition eine strahleninduzierte Schädigung genomischer DNA nicht nur lokal am Schadensort zu einer veränderten Chromatin-Struktur führt, sondern auch weiträumig die Chromatin-Architektur im Zellkern beeinflusst. Dabei scheint das spezielle DNA-Schadensmuster der verwendeten Strahlenqualität die Dynamik der Chromatin-Remodellierung zu beeinflussen. Insbesondere konnte die funktionelle Bedeutung der Histonvariante H2A.J für die strahleninduzierte Umstrukturierung der Chromatin-Organisation herausgearbeitet werden. Die strahleninduzierte Inkorporation der Histonvariante H2A.J beeinflusst die Chromatin-Architektur und dadurch die Bindungsfähigkeit von Transkriptionsfaktoren, so dass durch eine unterschiedliche Aktivierung der Gentranskription entscheidend die zellulären Funktionen nach Strahlenexposition beeinflusst werden. H2A.J besitzt nicht nur für verschiedene Zellpopulationen der Normalgewebe, sondern möglicherweise auch für Tumorgewebe wichtige pathophysiologische Funktionen, da es insbesondere die Strahlenempfindlichkeit bzw. Strahlenresistenz maßgeblich beeinflusst.

19. Schlagwörter

Ionisierende Strahlen, strahleninduzierte DNA-Schäden, Chromatin-Organisation

20. Verlag	21. Preis