

Untersuchungen zum Einfluss von Zink auf die Aktivität der DNA-Reparaturproteine PARP-1, OGG1 und APE1

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich
genehmigte
DISSERTATION

von
Diplom-Lebensmittelchemikerin

Elisa Schulze

aus
Neuruppin

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky
Referent: Prof. Dr. Andrea Hartwig
Korreferent: Prof. Dr. Mirko Bunzel
Tag der mündlichen Prüfung: 18.07.2014

Für meine Mutter.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Zink	3
2.1.1	Vorkommen und Verwendung	3
2.1.2	Biochemische Funktionen	3
2.1.3	Zinkmangel und -toxizität	4
2.1.4	Zinkhomöostase	5
2.1.5	Pufferung und Signalwirkung „freier“ Zinkionen	7
2.2	Zellulärer Redoxstatus und die Rolle von Zink	9
2.3	DNA-Reparatur	11
2.3.1	Bedeutung der OGG1, APE1 und PARP-1 in der DNA-Reparatur	12
2.3.1.1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1)	12
2.3.1.2	8-Oxoguanin-DNA-Glykosylase 1 (OGG1)	13
2.3.1.3	Apurinische/Apyrimidinische Endonuklease 1 (APE1)	16
2.3.2	DNA-Einzelstrangbruchreparatur	18
2.3.2.1	Reparatur direkt gebildeter DNA-Einzelstrangbrüche	18
2.3.2.2	Reparatur indirekt gebildeter DNA-Einzelstrangbrüche	19
3	Fragestellung	23
4	Ergebnisse und Diskussion	25
4.1	Zytotoxizität von ZnSO ₄	25
4.2	Einfluss von ZnSO ₄ auf den zellulären Redoxstatus	27
4.2.1	Einfluss von Zink auf die Anzahl an H ₂ O ₂ -generierten DNA-Strangbrüchen	27
4.2.2	Einfluss von Zink auf die Aktivität H ₂ O ₂ -detoxifizierender Enzyme	30
4.2.3	Quantifizierung des zellulären Gesamtglutathiongehalts	32
4.3	Einfluss von Zink auf die Prozesse der DNA-Einzelstrangbruchreparatur	33
4.3.1	Reparatur von H ₂ O ₂ -generierten DNA-Strangbrüchen	33
4.3.2	Einfluss von Zink auf die Poly(ADP-Ribosyl)ierung	35
4.3.2.1	Einfluss von Zink auf die Poly(ADP-Ribosyl)ierung in Kernextrakten	35
4.3.2.2	Einfluss von Ca ²⁺ , Mg ²⁺ und Thiolreagenzien auf die Poly(ADP-Ribosyl)ierung in Kernextrakten	39

4.3.2.3	Einfluss von Zink auf die isolierte PARP-1	40
4.3.2.4	Einfluss von Zink auf die Poly(ADP-Ribosyl)ierung in HeLa-S3-Zellen . .	42
4.4	Einfluss von ZnSO ₄ auf die BER Proteine OGG1 und APE1	43
4.4.1	Einfluss von Zink auf die OGG-Aktivität in Zellextrakten	44
4.4.2	Einfluss von Zink auf die isolierte hOGG1	47
4.4.3	Einfluss von Zink auf APE-Aktivität in Zellextrakten unter Zusatz von MgCl ₂	49
4.4.4	Einfluss von Zink auf die isolierte humane APE1 unter Zusatz von MgCl ₂	53
4.4.5	Einfluss von Zink auf die APE-Aktivität in Zellextrakten ohne Zusatz von MgCl ₂ . .	54
4.4.6	Einfluss von ZnSO ₄ auf die OGG- und APE-Aktivität in intakten IPEC-J2-Zellen . .	57
4.5	Bioverfügbarkeit	60
4.5.1	Basalgehalt an intrazellulärem gesamten Zn ²⁺ in IPEC-J2-Zellen	61
4.5.2	Intrazelluläre Gesamtaufnahme und relative Genexpression von <i>mt-1a</i> in IPEC-J2-Zellen	61
4.5.3	Bestimmung der „freien“ Zn ²⁺ in IPEC-J2-Zellen	64
5	Zusammenfassende Diskussion	65
6	Material und Methoden	71
6.1	Zellkultur	71
6.1.1	Kultivierung der Zellen	71
6.1.2	Behandlung der Zellen	71
6.1.3	Zellzahlbestimmung und Metabolische Aktivität	71
6.2	Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen	72
6.2.1	Versuchsansatz	73
6.2.2	Alkalische Entwindung	73
6.2.3	Hydroxylapatit-Chromatographie	73
6.2.4	Berechnung	73
6.3	Quantifizierung der Enzymaktivitäten	74
6.3.1	Versuchsansatz und Präparation der Zellextrakte	74
6.3.2	Quantifizierung der Glutathionperoxidase-Aktivität	74
6.3.3	Berechnung der Glutathionperoxidase-Aktivität	75
6.3.4	Quantifizierung der Katalase-Aktivität	75
6.3.5	Berechnung der Katalase-Aktivität	76
6.3.6	Quantifizierung der Glutathionreduktase-Aktivität	76
6.3.7	Berechnung der Glutathionreduktase-Aktivität	76
6.4	Quantifizierung von Gesamtglutathion	77

6.4.1	Versuchsansatz und Präparation der Zellextrakte	77
6.4.2	Recycling Assay	78
6.4.3	Berechnung des Gesamtglutathiongehalts	78
6.5	Quantifizierung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung in Kernextrakten und der isolierten PARP-1	79
6.5.1	Versuchsansatz und Präparation der Kernextrakte	79
6.5.2	Proteinbestimmung nach Bradford	79
6.5.3	Quantifizierung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung in Kernextrakten	79
6.5.4	Nachweis der Poly(ADP-Ribosyl)ierung mittels SDS-Gelelektrophorese	80
6.5.5	Quantifizierung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung der isolierten PARP-1	81
6.5.6	Kettenlängenanalyse von ³² P-markierten ADP-Ribosepolymeren	81
6.6	Quantifizierung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung in intakten HeLa-S3-Zellen	82
6.6.1	Versuchsansatz, Induktion der PAR-Einheiten, Fixierung	82
6.6.2	Antikörper-Inkubation	82
6.6.3	Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung	82
6.7	Inzisionstest	82
6.7.1	Hybridisierung der Oligonukleotide	83
6.7.2	Native Polyacrylamidgelelektrophorese	84
6.7.3	Versuchsansatz und Präparation der Gesamtzellextrakte	84
6.7.4	Quantifizierung der OGG- und APE-Aktivität in Zellextrakten	85
6.7.5	Quantifizierung der Aktivität isolierter hOGG1	85
6.7.6	Quantifizierung der Aktivität isolierter APE1	86
6.7.7	Quantifizierung der OGG- und APE-Aktivität in intakten Zellen	86
6.8	Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie	87
6.8.1	Versuchsansatz und Präparation der Zellpellets	87
6.8.2	Saurer Aufschluss und Analyse	87
6.8.3	Berechnung der intrazellulären Gesamtkonzentration	88
6.9	Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der intrazellulären „freien“ Zn ²⁺ -Ionen	88
6.10	Bestimmung der relativen Genexpression	89
6.10.1	Versuchsansatz und Präparation der Zellpellets	89
6.10.2	RNA-Isolierung	89
6.10.3	Umschreibung in cDNA	89
6.10.4	Herstellung der Primer und Bestimmung der Effizienzen	90
6.10.5	Amplifizierung der cDNA	90
6.10.6	Berechnung	91

Literaturverzeichnis		93
A Anhang		107
A.1	Abkürzungsverzeichnis	107
A.2	Verwendete Chemikalien	109
A.3	Puffer und Lösungen	112
A.4	Verbrauchsmaterialien	117
A.5	Geräte	118
A.6	Ergänzende Daten	120
A.6.1	Relative Genexpression	120
A.6.2	Inzisionstest	123
A.6.3	Proteinsequenzvergleich	124
A.6.4	Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie	128
B Publikationsliste		129
C Danksagung		131

1. Zusammenfassung

Das essentielle Spurenelement Zink ist Bestandteil von mehr als 3000 Proteinen, die an einer Vielzahl von zellulären Prozessen, wie der DNA-Reparatur, zellulären Signalwegen, der antioxidativen Abwehr sowie der Genexpression, beteiligt sind. Die bedeutende Rolle von Zink in der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität ist unumstritten. Während allerdings die Auswirkungen einer Unterversorgung mit Zink in Hinblick auf die genomische Stabilität vielfältig in der Literatur beschrieben sind (Ho und Ames, 2002; Ho et al., 2003; Sharif et al., 2011a,b), existieren nur vereinzelt Hinweise hinsichtlich der Wirkung auf die genomische Stabilität bei einer Überversorgung mit Zink (Sliwinski et al., 2009).

Jedoch können erhöhte intrazelluläre „freie“ Zinkkonzentrationen zu unspezifischen Reaktionen führen und möglicherweise die Integrität der DNA schädigen, wobei insbesondere die starke Thiolaffinität von Zink aus mechanistischer Sicht von Relevanz war. Mit Blick auf die Bedeutung von Zink für die genomische Stabilität lag der Fokus dieser Arbeit vor allem auf der Wechselwirkung von Zink mit Proteinen, die an der Basenexzisionsreparatur sowie der DNA-Einzelstrangbruchreparatur mitwirken.

Anhand mechanistischer Untersuchungen in Zellextrakten, isoliert aus Epithelzellen des Schweinedünndarms (IPEC-J2) und den isolierten Proteinen, sollte zunächst eine potentielle Interferenz mit der 8-Oxoguanin-DNA-Glykosylase 1 (OGG1) und der Apurinischen/Apyrimidinischen-Endonuklease 1 (APE1), die die Schadenserkennung der BER einleiten, betrachtet werden. Die OGG-Aktivität der isolierten Zellextrakte erniedrigte sich in Gegenwart von ZnSO_4 , was vermutlich auf eine direkte Interaktion mit der OGG1 zurückzuführen ist. Die APE-Aktivität in isolierten Zellextrakten wurde in Abhängigkeit des Kofaktors Mg^{2+} beleuchtet. In Anwesenheit von Mg^{2+} verminderte ZnSO_4 die APE-Aktivität sowohl in isolierten Zellextrakten als auch in der isolierten humanen APE1. War der Kofaktor Mg^{2+} abwesend, erhöhte die Behandlung mit ZnSO_4 die APE-Aktivität in isolierten Zellextrakten. Während jedoch die Behandlung mit 1 mM MgCl_2 die APE-Aktivität stark erhöhte, steigerte die Behandlung mit 1 mM ZnSO_4 die APE-Aktivität nur zu etwa 50% im Vergleich zur Behandlung mit MgCl_2 .

Des Weiteren war das Zinkfingerprotein Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 (PARP-1) von Interesse, das u.a. an DNA-Einzelstrangbrüche bindet, infolgedessen das Enzym aktiviert wird und weitere DNA-Reparaturproteine zum Schaden dirigiert. Wir beobachteten eine verminderte Poly(ADP-Ribosyl)ierung sowohl in isolierten Kernextrakten humanen Ursprungs als auch in Darmepithelzellen, isoliert aus dem Schwein, was vermutlich auf eine direkte Interaktion mit der PARP-1 zurückzuführen ist. Mechanistisch scheint die Wechselwirkung mit kritischen Thiolgruppen von Bedeutung zu sein, da zum einen weniger thiolaffine zweiwertige Metallionen, wie Mg^{2+} und Ca^{2+} , keinen inhibitorischen Effekt vermittelten und da zum anderen thiolhaltige Reagenzien protektiv auf die Zink-vermittelte Hemmung wirkten.

Um im Folgenden die Relevanz der erhaltenen Ergebnisse aus isolierten Extrakten und der isolierten Proteine abzuschätzen, wurde der Einfluss von Zink exemplarisch auf die Reparatur von H_2O_2 -generierten DNA-Einzelstrangbrüchen in intakten IPEC-J2-Zellen betrachtet.

Während auch nach längerfristiger Inkubation mit ZnSO_4 alleine keine direkten DNA-schädigenden Effekte in den kultivierten Darmepithelzellen zu verzeichnen waren, ermittelten wir einen konzentrationsabhängigen verstärkenden Effekt von ZnSO_4 im nicht-zytotoxischen Konzentrationsbereich auf H_2O_2 -induzierte DNA-Strangbrüche, insbesondere nach einer einstündigen Vorinkubationsphase. Eine Erweiterung der Vorinkubationsphase mit ZnSO_4 auf 24 h erhöhte nicht die Häufigkeit an H_2O_2 -generierten DNA-Strangbrüchen, resultierte aber in einer deutlichen Zunahme des intrazellulären Gesamtgehalts an Zink, verbunden mit der

Induktion der Metallothionein-Genexpression und der Erhöhung des zellulären Gesamtglutathiongehalts. Sowohl Metallothionein als auch Glutathion erhöhen die Pufferkapazität der Zelle und ermöglichen dieser daher, mehr Zink aufzunehmen.

Die synergistische Zunahme an H₂O₂-generierten DNA-Strangbrüchen war nicht auf eine verminderte Aktivität der H₂O₂-detoxifizierenden Enzyme Glutathionperoxidase und Katalase zurückzuführen. Vielmehr müssen interferierende Effekte mit der Beseitigung der H₂O₂-generierten DNA-Strangbrüche durch DNA-Reparatursysteme in Betracht gezogen werden. Ausgehend von den Untersuchungen zur Poly(ADP-Ribosyl)ierungsaktivität in isolierten Kernextrakten und der isolierten humanen PARP-1 war insbesondere die Interferenz mit der am initialen Schritt der DNA-Einzelstrangbruchreparatur beteiligten PARP-1 bedeutsam. Die hier verwendete immunfluorometrische Methode erlaubte uns keine konkrete Aussage darüber zu treffen, ob die gezeigte Zink-vermittelte Hemmung der DNA-Einzelstrangbruchreparatur auf eine Beeinflussung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung in intakten Zellen zurückzuführen ist. Bezüglich der zellulären OGG- und APE-Aktivität konnten wir weder einen stimulierenden noch hemmenden Effekt durch Zink detektieren.

Anhand der hier präsentierten Daten wird deutlich, dass das essentielle Spurenelement potentiell mit den initialen Proteinen der Basenexzisionsreparatur OGG1 und APE1 sowie der PARP-1 der DNA-Einzelstrangbruchreparatur interferieren kann. Es zeigte sich allerdings im zellulären System kein Einfluss auf die DNA-Reparaturproteine OGG1 und APE1, was die Wichtigkeit einer strikt regulierten Zinkhomöostase widerspiegelt. Dennoch beobachteten wir zellulär eine Hemmung der DNA-Einzelstrangbruchreparatur nach Kurzzeitinkubation mit ZnSO₄, dessen mechanistische Ursache noch der Aufklärung bedarf. Da die Effektivität zellulärer Reparaturmechanismen allerdings von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität ist, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass eine Überversorgung mit Zink im Falle prooxidativer Bedingungen mit einer Instabilität des Genoms verbunden sein könnte.

2. Einleitung

2.1 Zink

2.1.1 Vorkommen und Verwendung

Das Element Zink (Zn) bildet zusammen mit Cadmium und Quecksilber die 2. Nebengruppe des Periodensystems und besitzt die Ordnungszahl 30. Im hochreinen Zustand ist es ein bläulich-weißes Metall, das auf Grund seiner Elektronenkonfiguration $3d^{10}4s^2$ in seinen Verbindungen nur in der Oxidationsstufe +2 auftritt. Die voll besetzte d-Unterschale bedingt, dass Zink nicht zu den Übergangsmetallen gezählt wird, allerdings ähnlich wie diese zur Bildung zahlreicher Komplexe befähigt ist. In der Natur liegt Zink nicht in gediegener Form vor, sondern als Zinkerz. Zu nennen sind Zinksulfid (ZnS), das als kubische Zinkblende (Sphalerit) und als hexagonaler Wurtzit vorkommt, sowie Smithsonit ($ZnCO_3$; auch Zinkspat oder Galmei genannt). Anwendung findet Zink als Zinkblech, das für Dächer, Dachrinnen und Trockenbatterien genutzt wird. Auch in der Metallurgie hat Zink in Form von Zinkstaub als Reduktionsmittel Bedeutung. Des Weiteren dient Zink als Korrosionsschutz für Eisen (Verzinken) und ist Bestandteil von Legierungen (zusammengefasst in Riedel, 2004). Zinkoxid wird in der pharmazeutischen Industrie in Pulvern und Salben eingesetzt, aber auch in Kunststoffen und Gummi findet es als weißes Pigment Gebrauch (zusammengefasst in Hartwig, 2012).

2.1.2 Biochemische Funktionen

Die Essentialität des Spurenelementes Zink für den Menschen wird einem bewusst, wenn man sich vor Augen führt, dass das menschliche Genom für ungefähr 3000 zinkhaltige Proteine, einschließlich 1000 Enzyme, codiert (Andreini et al., 2006). In allen sechs Enzymklassen (Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Ligasen und Isomerasen) sind zinkhaltige Enzyme vertreten. Die Enzyme üben neben ihrer katalytischen Funktion (z.B. Carboanhydrase) (Keilin und Mann, 1940) auch eine strukturelle Funktion (z.B. Aspartat-Transcarbamylase) (Honzatko et al., 1982) aus. Als strukturelle Komponente fungiert Zink vor allem in sogenannten Zinkfingerstrukturen, in denen ein Zinkatom tetraedrisch durch vier Cysteine und/oder Histidine komplexiert wird. Dabei wird die Voraussetzung für Protein-Protein- bzw. DNA-Protein-Wechselwirkungen geschaffen (zusammengefasst in Hartwig, 2001; Witkiewicz-Kucharczyk und Bal, 2006; Gamsjaeger et al., 2007). Miller et al. (1985) beschrieben als Erste die strukturelle Bedeutung von Zink im Zinkfinger des *Xenopus* Transkriptionsfaktors IIIA (TF IIIA). Neben Zinkfingern existieren auch Zink-Twists (z.B. Glucocorticoid-Rezeptor) und Zink-Cluster (z.B. Metallothionein) (Vallee et al., 1991), deren Bezeichnung durch die Anordnung von Aminosäuren und Zink bestimmt wird. Neben Transkriptionsfaktoren stellen DNA-Reparaturproteine (u.a. Xeroderma Pigmentosum A, XPA) sowie das Tumorsuppressorprotein p53 weitere Beispiele dar, in denen Zink-bindende Domänen präsent sind. Die Mannigfaltigkeit der zinkhaltigen Proteine und deren Mitwirkung in zellulären Prozessen, wie der Zellproliferation und -differenzierung, zellulären Signalwegen, der antioxidativen Abwehr, der DNA-Reparatur sowie der Genexpression, verdeutlicht die essentielle Rolle von Zink in der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität (zusammengefasst in Beyersmann und Haase, 2001; Ho, 2004).

2.1.3 Zinkmangel und -toxizität

Um einen Zinkmangel sowie eine Überversorgung zu vermeiden, wurden von der Gesellschaft für Ernährung in Deutschland (DGE), Österreich (ÖGE) und der Schweiz (SGE/SVE) die sogenannten D-A-CH-Referenzwerte für die tägliche Zinkzufuhr festgelegt. Für eine Frau bzw. einen Mann zwischen 25 und 51 Jahren wird eine Aufnahmemenge von 7 mg/Tag bzw. 10 mg/Tag empfohlen (DGE, 2013). Zudem existieren Empfehlungen, die die tägliche Zinkzufuhr begrenzen sollen (Tabelle 2.1) sowie Richt- und Grenzwerte in der Umwelt und am Arbeitsplatz (Tabelle 2.2) (zusammengefasst in Grossklaus und Ziegenhagen, 2006; Hartwig, 2012).

Tabelle 2.1: Höchstmengen für die tägliche Zinkzufuhr (Hartwig, 2012)

European Food Safety Authority (EFSA)	25 mg/Tag Gesamtzinkzufuhr
US-Food National Board (FNB)	40 mg/Tag Gesamtzinkzufuhr
Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)	2,25 mg/Nahrungsergänzungsmittel ¹

Tabelle 2.2: Grenz- und Richtwerte in der Umwelt und am Arbeitsplatz (Hartwig, 2012)

Trinkwasserverordnung	Richtwert 4 mg/L
MAK-Wert Zinkoxid-Rauch	1 mg/m ³

Zinkmangel beim Menschen ist relativ selten, dennoch können Faktoren wie armutsbedingte Unterernährung, begrenzte Nahrungsaufnahme, Nahrung mit einem geringen Anteil an bioverfügbarem Zink sowie Krankheiten, die eine verminderte intestinale Absorption und/oder eine vermehrte Ausscheidung begünstigen, dazu führen. In den Industrieländern spielt eine unzureichende Nahrungszufuhr als Ursache für den Zinkmangel eher eine untergeordnete Rolle. Hier sind vielmehr Krankheiten von Bedeutung, wie z.B. Acrodermatitis enteropathica, bei der es sich um eine autosomal-rezessiv vererbte Malabsorption handelt, der eine Mutation im ZIP4-Transporter zugrunde liegt (Kury et al., 2002; Wang et al., 2002). Symptome, die durch Zinkmangel beschrieben werden, sind u.a. Wachstumsstörungen, Veränderungen der Haut, Veränderungen des Immunsystems sowie Haarausfall (zusammengefasst in Maret und Sandstead, 2006; SCF, 2003). Neben Zinkmangel sind toxische Wirkungen durch Zink-Überversorgung beschrieben, die vor allem durch die Einnahme von Zinkpräparaten oder durch berufliche Exposition auftreten. Eine toxische Wirkung durch die normale Ernährung ist nicht zu befürchten. Akute Intoxikationen treten beim Menschen nur selten auf. Allerdings sind Fälle beschrieben, in denen es zu Vergiftungserscheinungen durch den Verzehr von Lebensmitteln und Fruchtsäften kam, die in verzinkten Gefäßen aufbewahrt wurden. Symptome der akuten Toxizität äußern sich in Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe und abdominalen Krämpfe. Die niedrigste letale Dosis (LD_{low}) hängt von der Art des Zinksalzes ab und beträgt beim Menschen für $ZnCl_2$ 50 mg/kg KG, für $ZnSO_4$ 106 mg/kg KG. In der Ratte beträgt der LD_{50} nach oraler Gabe für Zinksalze 237-638 mg/kg KG, bei intraperitonealer Injektion 28-73 mg/kg KG und durch Inhalation von $ZnCl_2$ 2000 mg/m³ (zusammengefasst in Peganova und Eder, 2004; Maret und Sandstead, 2006).

¹Keine Supplementierung bei Kindern und Jugendlichen bis zum vollendeten 17. Lebensjahr

Durch Zink herbeigeführte chronisch toxische Effekte treten hingegen häufiger auf. Insbesondere das Supplementieren durch Nahrungsergänzungsmittel (NEM) im Bereich von 50-300 mg Zn/Tag über einen längeren Zeitraum sind u.a. mit einem veränderten Immunsystem, Kupferstoffwechsel und Lipoprotein-Metabolismus verbunden. Dabei zeigt sich der Kupferstatus als kritischster Parameter. Eine erhöhte Zinkkonzentration wird mit einer erhöhten Synthese von Metallothionein (MT) in der Darmzelle assoziiert. Da Kupfer eine höhere Affinität zum MT besitzt als Zink, wird infolgedessen mehr Kupfer in der Zelle gespeichert und nur unzureichend an das Blut abgegeben. Die Exposition zinkhaltiger Stäube am Arbeitsplatz kann u.U. zum Metalldampffieber führen, was sich u.a. in Form von Fieber, Hustenreiz, Schwächegefühl und Muskelschmerzen äußert (zusammengefasst in Hartwig, 2012; Maret und Sandstead, 2006; SCF, 2003).

2.1.4 Zinkhomöostase

Der Gesamtkörperbestand an Zink beträgt ca. 1,5-2,5 g (70-kg-Mann); die Plasmakonzentration liegt bei 11-20 μM . Die Regulation der Zinkhomöostase ist ein Zusammenspiel der Resorption im Dünndarm und der Ausscheidung über die Galle bzw. das Pankreassekret. 15-40% des aufgenommenen Zinks werden vorwiegend im Jejunum und Ileum resorbiert, wobei die Ausscheidung zu ca. 90% über die Galle und das Pankreassekret verläuft. Die Resorption ist dabei abhängig von der Zusammensetzung des Nahrungsmittels. So wirken sich Aminosäuren (Cystein, Histidin) sowie organische Säuren fördernd auf die Resorption aus, Phytate sowie Eisen und Kupfer hingegen werden als hemmende Faktoren beschrieben. Das resorbierte Zink wird gebunden an Plasmaproteine zu seinem Zielort transportiert. Bezogen auf die gesamten Plasmaproteine sind etwa zwei Drittel schwach an Albumin und ein Drittel fest an α_2 -Makroglobulin gebunden. Die höchsten Zinkgehalte in den Körpergeweben finden sich v.a. in Muskulatur, Knochen, Haut und Haaren sowie der Leber (zusammengefasst in Reyes, 1996; Hartwig, 2012; Löffler et al., 2007). Auf zellulärer Ebene wird die Zinkhomöostase über Zink-Importproteine (ZIP), Zink-Exportproteine (ZnT) sowie Zink-bindende Proteine reguliert. Der *divalent metal-ion transporter 1* (DMT1) spielt nur eine untergeordnete Rolle in der Zinkhomöostase (Kordas und Stoltzfus, 2004) (Abbildung 2.1).

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden zwei Familien von Zinktransportern identifiziert. Dazu zählt die ZIP-Familie, von der 14 Mitglieder in Säugetieren bekannt sind, jedoch nur ZIP1 bis ZIP8 und ZIP14 zum Import von Zink befähigt sind. Die ZIPs werden durch die Gene der *solute linked carrier 39* (SCL39)-Gruppe codiert und erhöhen die intrazelluläre Zinkkonzentration, indem sie den Einstrom in die Zelle und aus Vesikeln heraus (z.B. Endoplasmatisches Retikulum) fördern (zusammengefasst in Cousins et al., 2006; Hill und Link, 2009). Vor allem ZIP4 ist maßgeblich am Import beteiligt. Eine Mutation in diesem Gen äußert sich in der Krankheit Acrodermatitis enteropathica, einer gestörten Zinkresorption (Wang et al., 2002; Kury et al., 2002). Computergestützte Analysen sagen voraus, dass die meisten ZIPs aus acht Transmembrandomänen bestehen. Zudem zeichnen sie sich durch eine intrazelluläre histidinreiche Schleife aus, die als mögliche Metallbindungsstelle fungiert, sowie durch extrazelluläre N- und C-Termini (Taylor und Nicholson, 2003; Gaither und Eide, 2000). Der zugrundeliegende Mechanismus des Zinkimports ist bisher nur teilweise geklärt. Allerdings wird angenommen, dass der Zinkimport ATP-unabhängig über erleichterte Diffusion, getrieben durch einen Konzentrationsgradienten, verläuft. Zudem wird ein möglicher Symport-Mechanismus mit HCO_3^- postuliert (Gaither und Eide, 2000, 2001). Menard und Cousins (1983) lieferten in Studien anhand isolierter Vesikel aus der Bürstensaummembran des Rattendünndarms erste Ergebnisse zum Zinktransport. Die Autoren vermuteten einen Carrier-vermittelten Transport, der vor allem bei nied-

rigen extrazellulären Zinkkonzentrationen sowie in Vesikeln aus Zink-depletierten Ratten auftrat. Zudem beschreiben sie einen passiven Transport bei höheren extrazellulären Konzentrationen.

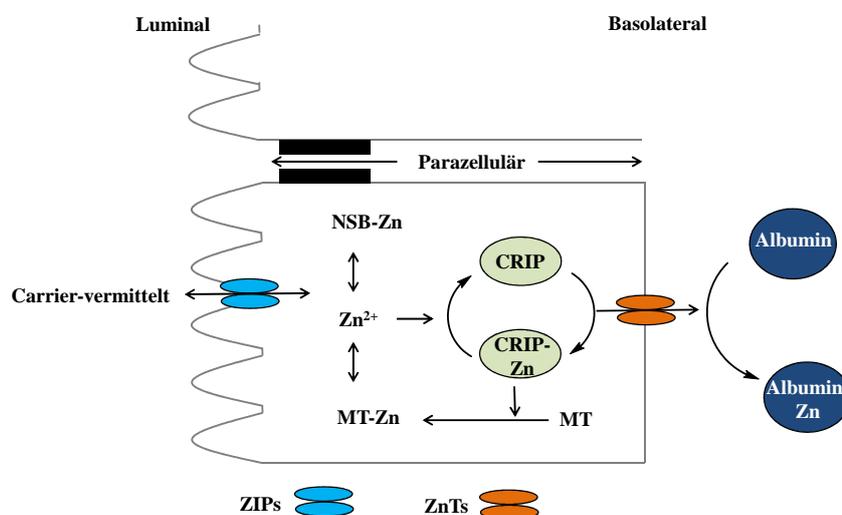


Abbildung 2.1: Vereinfachte Darstellung der Zinkhomöostase. Die intrazelluläre Zinkhomöostase wird über Zink-Importproteine (ZIPs), Zink-Exportproteine (ZnTs) und Zink-bindende Proteine aufrechterhalten. ZIPs transportieren Zink in die Zelle hinein und aus Vesikeln heraus, wodurch sich die intrazelluläre Zinkkonzentration erhöht. ZnTs senken die intrazelluläre Zinkkonzentration, indem sie den Efflux von Zink in den Extrazellulärraum bzw. die Speicherung in Vesikeln fördern. Das *cysteine-rich intestinal protein* (CRIP) dient als diffusionsfähiger Carrier von Zink zur basolateralen Seite der Membran. CRIP konkurriert mit Metallothionein (MT) und nicht-spezifischen Zink-bindenden Proteinen (NSB) um Zink (modifiziert nach Heme und Cousins, 1992).

Die Gegenspieler stellen die ZnTs dar, von denen in Säugetieren zehn Mitglieder (ZnT1-10) beschrieben und durch die Gene der SLC30-Familie codiert werden. Ihre Funktion besteht in der Verminderung der intrazellulären Zinkkonzentration, indem sie den Efflux in den extrazellulären Raum bzw. in intrazelluläre Vesikel fördern (zusammengefasst in Palmiter und Huang, 2004; Cousins et al., 2006). Bis auf ZnT5 sind die Mitglieder der ZnTs strukturell durch sechs Transmembrandomänen aufgebaut und weisen N- und C-Termini auf, die der zytoplasmatischen Seite der Membran zugewandt sind. In Analogie zu den ZIPs besitzen die ZnTs intrazelluläre histidinreiche Schleifen. Eine Ausnahme bildet ZnT6, der sich durch serinreiche Schleifen auszeichnet. Der ZnT-vermittelte Mechanismus ist bisher nicht bekannt (Seve et al., 2004; Palmiter und Huang, 2004). Sowohl die Mitglieder der ZIPs als auch der ZnTs werden in unterschiedlichen Geweben exprimiert (zusammengefasst in Jeong und Eide, 2013; Sekler et al., 2007), wobei die Expressionsrate von der Zinkzufuhr abhängt (McMahon und Cousins, 1998; Cragg et al., 2005).

Das durch Margoshes und Vallee (1957) erstmals charakterisierte MT ist vor allem an der Speicherung und Freisetzung des Zinks beteiligt. Von MT sind vier verschiedene Isoformen bekannt (MT1-4), von denen MT1 und MT2 ubiquitär exprimiert werden. MT3 und MT4 zeigen nur eine gewebsspezifische Expression. Das 7kDa große Protein besteht aus 61-68 Aminosäuren, wobei ein Drittel der Aminosäuren Cysteine darstellen, die in ihrer Position und Anzahl hoch konserviert sind (zusammengefasst in Kaegi und Schaeffer, 1988; Coyle et al., 2002). MT ist aus zwei Domänen aufgebaut; der α -Domäne und der β -Domäne, die insgesamt bis zu sieben Metallionen durch S-Atome in Thiolatclustern mit tetraedrischer Geometrie binden (Robbins et al., 1991; Boulanger et al., 1982). Das humane MT-2a bindet Zink mit einer hohen thermodynamischen Stabilität ($K_D = 1,25 \cdot 10^{-13} M$), wobei die Bindungsstärke der einzelnen

Bindungsstellen für die Zinkionen unterschiedlich ist. So existiert eine Bindungsstelle mit niedriger Affinität ($K_D = 2,0 \cdot 10^{-8}M$), zwei weitere mit mittlerer Affinität ($K_D = 1,0 \cdot 10^{-10}M$) und vier Zinkionen werden stark ($K_D = 1,5 \cdot 10^{-12}M$) gebunden (Krezel und Maret, 2007). Die hohe thermodynamische Stabilität, aber kinetische Labilität bedingt die Funktion des MTs als zellulärer Zinkspeicher sowie die schnelle Freisetzung der gebundenen Zinkionen für essentielle Funktionen. Die Induktion von MT wird über den *metal-responsive transcription factor 1* (MTF-1) reguliert, der sechs Zinkfinger des Typs Cys₂His₂ enthält (Brugnera et al., 1994). Die Anwesenheit von Zink führt zur Aktivierung des MTF-1, welcher infolgedessen mit vier seiner Zinkfingerdomänen spezifisch an das *metal response element* (MRE) in der Promotorregion des MT-Gens bindet, wodurch die MT-Synthese eingeleitet wird (Wang et al., 2004; Zhang et al., 2003; zusammengefasst in Hartwig, 2012). Es wurde gezeigt, dass MTF-1 die basale und Metall-induzierte Expression der ubiquitär vorkommenden Isoformen MT-1 und MT-2 reguliert (Heuchel et al., 1994).

Das *cysteine-rich intestinal protein* (CRIP) wird vorwiegend im Dünndarm und Dickdarm exprimiert und fungiert als intrazellulärer diffusionsfähiger Carrier für Zink. Die im Protein enthaltene konservierte Aminosäuresequenz aus Cystein- und Histidinresten, die als LIM-Motiv (lin-11, isl-1 und mec-3 Gene) bezeichnet wird, spielt beim Transfer des Zinks von der apikalen zur basolateralen Seite eine wichtige Rolle. CRIP und MT konkurrieren um die Zinkionen im Enterozyten, wobei im Falle einer niedrigen alimentären Versorgung mit Zink der Hauptteil an CRIP gebunden ist. Eine hohe Zufuhr von Zink förderte hingegen die vermehrte Bindung an MT (Hempe und Cousins, 1991, 1992).

2.1.5 Pufferung und Signalwirkung „freier“ Zinkionen

Die Vielzahl an biochemischen Reaktionen, in denen Zink eine elementare Funktion einnimmt, wirft die Frage der Regulation und der zellulären Verteilung „freier“, d.h. zellulär leicht verfügbarer, Zinkionen auf. Der Bereich an „freiem“ Zink wird innerhalb eines engen Bereichs streng reguliert. Dieser ist optimal, um die Funktionen der Zink-abhängigen Proteine zu gewährleisten und unspezifische Reaktionen mit anderen Proteinen sowie Metallen zu vermeiden. Zinksensoren (MTF-1) und -transporter (ZIP, ZnT) sowie Zink-bindende Proteine (z.B. MT) sind an dem Prozess beteiligt, der zur Aufrechterhaltung der „freien“ Zinkkonzentration beiträgt (Vgl. 2.1.4). Die Dissoziationskonstanten der Zink-bindenden Proteine, die ein Maß für die intrazellulär „frei“ vorkommenden Zinkionen darstellen, liegen im pikomolaren Bereich (zusammengefasst in Maret und Li, 2009). Das bedeutet, dass von den mehreren hundert mikromolar vorkommenden intrazellulären Zinkionen nur pikomolare Konzentrationen „frei“ vorliegen. In differenzierten Zellen werden dem gegenüber bis zu niedrige nanomolare Konzentrationen an „freien“ Zinkionen gemessen. Diese Schwankungen sind nur möglich durch das Vorhandensein Zink-bindender Proteine, die die Pufferung der „freien“ Zinkionen gewährleisten. Dabei ist vor allem die Bindung an S-Liganden in Zn-Cystein-Clustern von Bedeutung (Krezel und Maret, 2006). Aufgrund der unterschiedlichen Stabilität dieser Zink-Cystein-Komplexe folgt die zelluläre Zinkverteilung einem thermodynamischen Gradienten. Allerdings würde das bedeuten, dass der Zinktransfer nur in eine Richtung, zum Ort der Bindungsstelle mit höherer Affinität, stattfindet (zusammengefasst in Maret, 2004). Das sogenannte *Muffling* („Dämpfung“) ergänzt den Prozess der Pufferung, indem ansteigende zytosolische „freie“ Zinkkonzentrationen mit Hilfe von Transportproteinen (ZnTs) aus der Zelle heraus oder in zytosolische Vesikel hinein transportiert werden. *Muffling* ist demnach ein kinetischer Prozess, der wahrscheinlich die Bindung von Zink an MT oder andere Zink-bindende Proteine voraussetzt. MT nimmt mit seinen Eigenschaften als Donor und Akzeptor von Zinkionen nicht nur

eine Funktion bei der Pufferung ein, sondern auch eine Schlüsselrolle beim *Muffling*. Erreichen die „freien“ Zinkkonzentrationen ein ausreichend hohes Niveau, wird der einzige in Vielzeller charakterisierte Zinksensor, MTF-1, über die Bindung durch Zink aktiviert und in den Zellkern transloziert. In dessen Folge werden MT (Heuchel et al., 1994) und ZnT-1 (Langmade et al., 2000) exprimiert (Vgl. 2.1.4) (Abbildung 2.2).

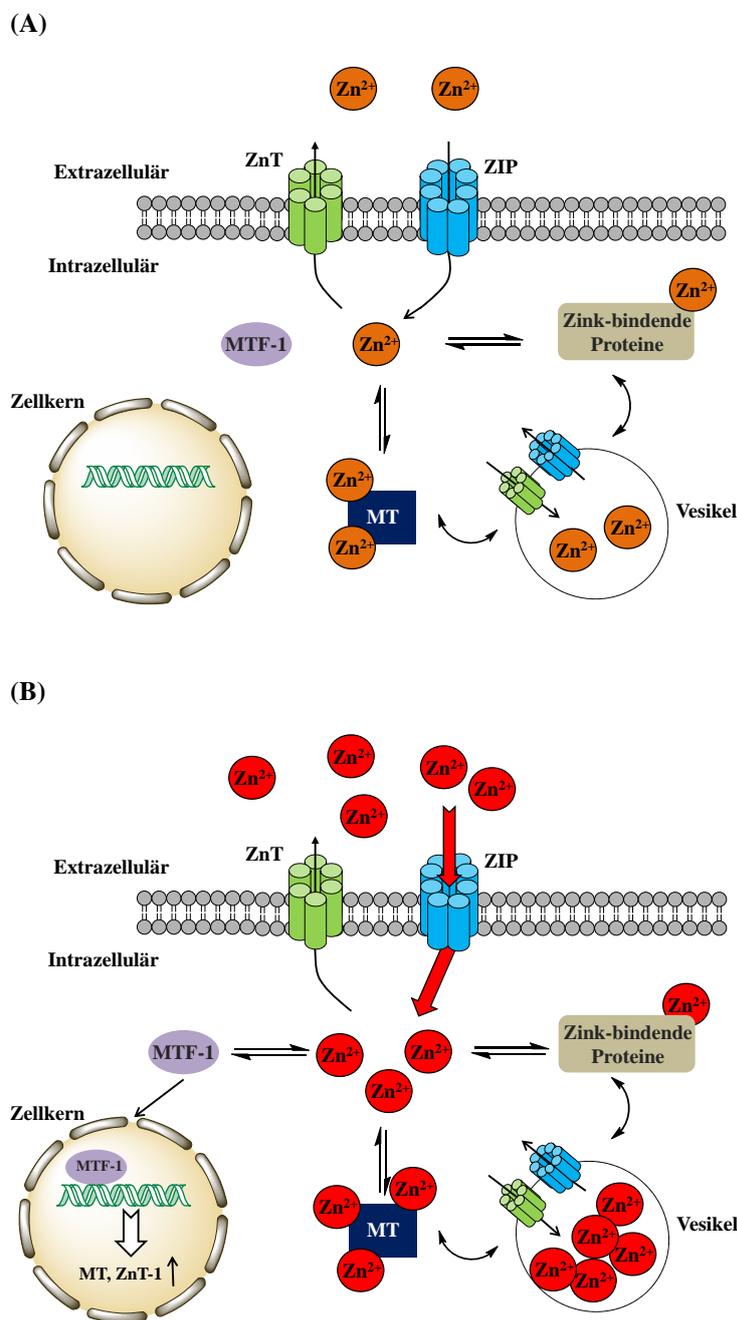


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der intrazellulären Zinkionen-Homöostase. (A) Im „steady-state“ wird die intrazelluläre Konzentration an „freien“ Zinkionen über Zink-bindende Proteine (v.a. MT) und Zinktransporter (ZIPs, ZnTs) aufrechterhalten. Ebenfalls dargestellt ist der Zinksensor MTF-1, der im „steady-state“ nicht mit Zinkionen besetzt ist. (B) Im Falle eines gestörten „steady-state“ werden ansteigende „freie“ Zinkkonzentrationen über Transportproteine (ZnTs) aus der Zelle heraus oder in Vesikel hinein transportiert, was die Bindung von Zink an MT oder andere Zink-bindende Proteine voraussetzt („Muffling“). Erreicht die „freie“ Zinkkonzentration ein ausreichend hohes Niveau, erfolgt die Bindung an den Zinksensor MTF-1, der dadurch aktiviert wird und in den Zellkern transloziert, infolgedessen MT und ZnT-1 vermehrt exprimiert werden (modifiziert nach Colvin et al., 2010).

Ursachen wie ein vermehrter Einstrom von Zink, die Freisetzung aus intrazellulären Vesikeln sowie oxidativer Stress bedingen die Erhöhung der „freien“ Zinkkonzentration (zusammengefasst in Colvin et al., 2010; Maret, 2008).

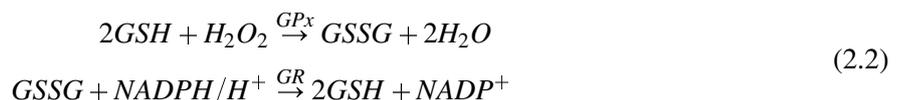
Nicht nur die gebundenen, sondern auch die „freien“ Zinkionen, welche intrazellulär als Botenstoffe fungieren, kontrollieren Enzymaktivitäten, zelluläre Signalwirkung und die Genexpression. Ist die Zelle jedoch einem Überschuss an „freien“ Zinkionen ausgesetzt, können daraus unspezifische Reaktionen resultieren. In-vitro-Untersuchungen zeigten, dass Zink bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich glykolytische Enzyme (z.B. Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) (Maret et al., 1999) sowie Enzyme, die an der zellulären Signalwirkung (z.B. Caspase-3, Proteintyrosinphosphatasen) beteiligt sind, inhibierte (Maret et al., 1999; Haase und Maret, 2003).

2.2 Zellulärer Redoxstatus und die Rolle von Zink

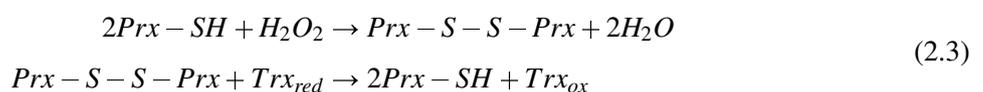
Der zelluläre Redoxstatus wird durch die Anwesenheit Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowie der zellulären Schutzmechanismen bestimmt. Endogen entstehen ROS, wie Superoxidradikalanionen (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxyradikale ($\cdot\text{OH}$) als Nebenprodukt der mitochondrialen Atmungskette bei der schrittweisen Reduktion von Sauerstoff, von denen bis zu 1,5% freigesetzt werden. Einen weiteren Entstehungsort bilden phagozytierende Zellen des Immunsystems, die während Entzündungsprozessen ROS generieren. Als exogene Quellen sind u.a. ionisierende Strahlung und redoxaktive Metalle zu nennen. Im Gegenzug verfügt die Zelle über antioxidative Abwehrmechanismen, wie detoxifizierende Enzyme (Superoxiddismutase (SOD), Katalase (CAT), Glutathionperoxidase (GPx), Peroxiredoxine (Prx)), reduziertes Glutathion (GSH) und Antioxidantien (Vitamine). Die SOD katalysiert die Umsetzung von O_2^- zu H_2O_2 , das entweder über die Katalase (Gleichung 2.1), die Glutathionperoxidase (Gleichung 2.2) oder Peroxiredoxin (Gleichung 2.3) detoxifiziert wird (zusammengefasst in Halliwell und Gutteridge, 1985; Rhee et al., 2005; Hartwig, 2013).



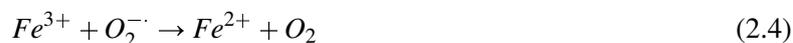
Die durch die GPx katalysierte Reduktion des H_2O_2 verläuft GSH-abhängig, wobei das bei der Reaktion gebildete GSSG über die NADPH/ H^+ -abhängige Reaktion der GR wieder reduziert wird (Gleichung 2.2).



Die Prx-katalysierte Reaktion ist hingegen an den Thiothioninzyklus gekoppelt (Gleichung 2.3) (zusammengefasst in Rhee et al., 2005).



Ist die Detoxifizierung von H_2O_2 nicht ausreichend gewährleistet, kann es durch Fenton oder Fenton-ähnliche Reaktion mit Übergangsmetallionen (z.B. Fe^{2+} , Cu^{1+}) zur vermehrten Bildung hochreaktiver, kurzlebiger $\cdot OH$ -Radikale kommen. Die Fenton-Reaktion, welche Teil des Haber-Weiss-Zyklus (Gleichung 2.5, 2.4) ist, ist in Gleichung 2.5 dargestellt (zusammengefasst in Halliwell und Gutteridge, 1985, 1992).



Neben $\cdot OH$ -Radikalen ist auch Singulett-Sauerstoff (1O_2), der bei der Spinkonversion der beiden ungepaarten Elektronen des molekularen Sauerstoffs gebildet wird, in der Lage, mit der DNA zu reagieren. Abhängig von der Natur der gebildeten ROS ergibt sich ein unterschiedliches Spektrum an Läsionen, wie u.a. DNA-Basenmodifikationen, DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche, Apurinische bzw. Apyrimidinische (AP)-Stellen sowie DNA-DNA-Quervernetzungen. Unter den genannten Radikalen sind nur $\cdot OH$ -Radikale in der Lage, DNA-Einzelstrangbrüche über die Abstraktion eines H-Atoms des 2-Desoxyribose-Resestes zu generieren (zusammengefasst in Halliwell und Gutteridge, 1985; Halliwell und Aruoma, 1991; Hartwig, 2013). 1O_2 bildet dagegen spezifisch oxidative DNA-Basenmodifikationen wie 8-Oxoguanin (8-OxoG) (Pflaum et al., 1994). Ist das Gleichgewicht zwischen der Entstehung der ROS und den vorhandenen Abwehrmechanismen nicht mehr gegeben, spricht man von oxidativem Stress.

Im Gegensatz zu anderen Spurenelementen, wie Eisen oder Kupfer, ist Zink redox-inert, da es nur in der Oxidationsstufe +2 vorkommt. Allerdings wird Zink über die Bindung an Schwefel-Liganden in Cysteinresten von Proteinen redox-regulierbar. Innerhalb dieser Zink-Cystein-Cluster kann der Schwefel-Ligand abhängig vom Redoxstatus der Zelle oxidiert oder reduziert und Zink dementsprechend freigesetzt oder gebunden werden (Abbildung 2.3) (zusammengefasst in Maret, 2006).



Abbildung 2.3: Verbindung von Redoxstatus und Zn-Cystein-Cluster. Eine oxidative Umgebung setzt Zink aus Zink-Cystein-Clustern frei, eine reduktive Umgebung hingegen fördert die Bindung von Zink in Zink-Cystein-Clustern (modifiziert nach Maret, 2006).

Dabei ist zu beachten, dass nicht nur die Eigenschaften des Proteins, aus dem es freigesetzt wurde, sondern auch die, an denen es bindet, verändert werden. Änderungen in der „freien“ Zinkkonzentration, d.h. sowohl eine Verminderung als auch eine Erhöhung, induzieren oxidativen Stress, u.a. über die vermehrte Bildung von ROS, durch den verminderten Anteil antioxidativer Abwehrmechanismen sowie durch Fehler in der Reparatur oxidativer DNA-Schäden (zusammengefasst in Hao und Maret, 2005; Maret, 2008, 2006). Liegt Zink in physiologischen Konzentrationen vor, wird dem Spurenelement eine Beteiligung an der antioxidativen Abwehr zugeschrieben, da es zum einen Teil der SOD ist und zum anderen über die Aktivierung des

Zinksensors MTF-1 sowohl MT (Heuchel et al., 1994; Wang et al., 2004; Zhang et al., 2003) als auch die schwere Kette der γ -Glutamylcysteinyligase (γ -GCL) (Günes et al., 1998) hochreguliert (zusammengefasst in Maret, 2006).

2.3 DNA-Reparatur

Die DNA unterliegt der ständigen Einwirkung von exogenen und endogenen Faktoren, die die DNA schädigen können. Als Träger der genetischen Information muss die Intaktheit der DNA durch ein effizientes Reparatursystem aufrechterhalten werden. So greift die Zelle je nach nach Art des entstandenen DNA-Schadens auf unterschiedliche Reparaturmechanismen zurück (Abbildung 2.4).

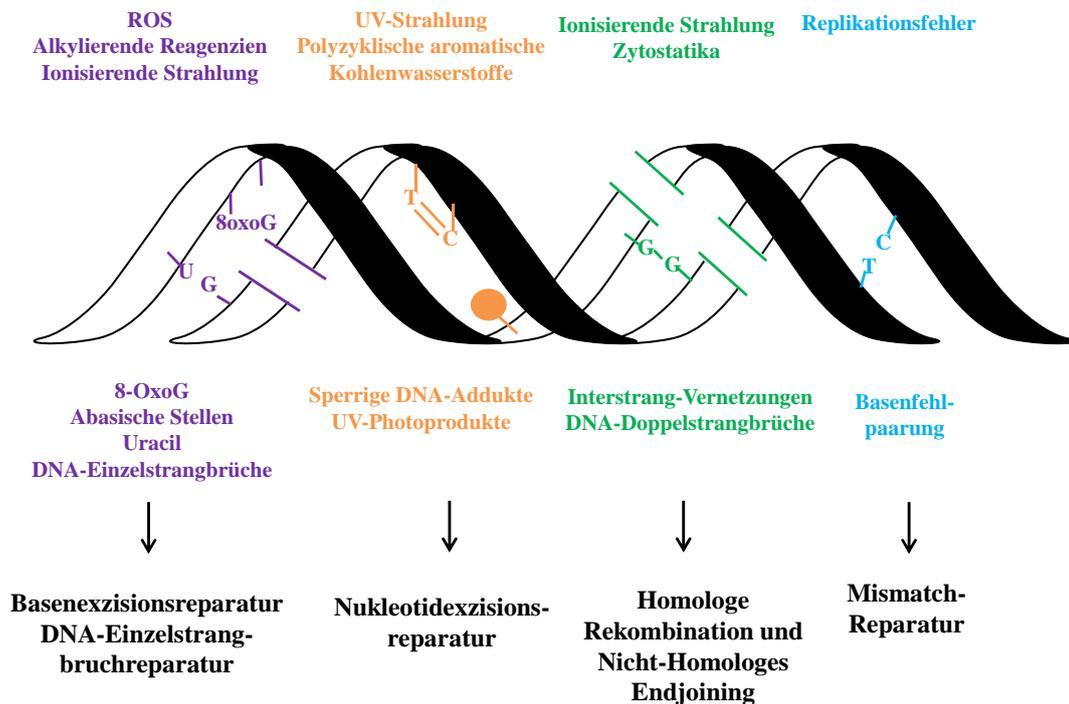


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der wichtigsten DNA-Schäden, deren Induktoren und den zuständigen Reparaturmechanismen (modifiziert nach Hoeijmakers, 2001).

Kleinere DNA-Schäden, wie oxidative DNA-Basenmodifikationen oder DNA-Einzelstrangbrüche, werden sehr effektiv von der Basenexzisionsreparatur (BER) sowie der DNA-Einzelstrangbruchreparatur (SSBR) beseitigt. Sperrige DNA-Addukte und UV-Photoprodukte, die vorwiegend aus exogenen Quellen herrühren, werden von der Nukleotidexzisionsreparatur entfernt, während Fehler bei der Replikation über die Mismatch-Reparatur beseitigt werden. Zu den gravierendsten DNA-Schäden sind DNA-Doppelstrangbrüche zu zählen, die über die Homologe Rekombination und das Nicht-Homologe Endjoining repariert werden (zusammengefasst in Hoeijmakers, 2001).

2.3.1 Bedeutung der OGG1, APE1 und PARP-1 in der DNA-Reparatur

Bei der DNA-Reparatur ist das Erkennen und Entfernen des Schadens von großer Bedeutung. So gibt es verschiedene DNA-Reparaturproteine, die an der initialen Phase beteiligt sind. Im Folgenden soll näher auf die DNA-Reparaturproteine eingegangen werden, die die SSB und BER einleiten.

2.3.1.1 Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1)

Die Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) ist ein im Kern lokalisiertes 113 kDa großes Zinkfingerprotein, das zur Familie der PARPs gezählt wird. Die humane PARP-1 (hPARP-1) besteht strukturell aus drei Domänen (Abbildung 2.5) (Kameshita et al., 1984). Die N-terminale DNA-Bindungsdomäne (46 kDa, Reste 1-374) enthält die bipartite Kernlokalisationssequenz (NLS) (Schreiber et al., 1992), eine Schnittstelle für die Caspasen 3 und 7 (C 3/7) sowie drei Zinkfinger (ZF) (Langelier et al., 2008). ZF I und II besitzen ein Cys-X₂-Cys-X₍₂₈₋₃₀₎-His-X₂-Cys-Motiv, in dem Zink durch drei Cysteinreste und ein Histidinrest komplexiert ist. Das außergewöhnlich große Zinkfingermotiv ist des Weiteren noch in der Ligase III vorzufinden (zusammengefasst in de Murcia und de Murcia, 1994). Aus der Bindung der ZF an DNA-Einzel- oder DNA-Doppelstrangbrüche resultiert die Aktivierung der PARP-1. Interessanterweise ist an der Aktivierung durch DNA-Einzelstrangbrüche sowie DNA-Doppelstrangbrüche nur ZF I beteiligt. ZF II hingegen ist für die Erkennung von DNA-Einzelstrangbrüchen, aber nicht von DNA-Doppelstrangbrüchen, ausschlaggebend (Ikejima et al., 1990). Der erst kürzlich aufgeklärte ZF III hingegen koordiniert Zink durch vier hoch konservierte Cysteinreste (Cys²⁹⁵-X₂-Cys²⁹⁸-X₍₁₂₎-Cys³¹¹-X₉-Cys³²¹-Motiv) und fungiert als Vermittler zu der carboxyterminal befindlichen katalytischen Domäne, die die Voraussetzung für die Aktivierung der PARP-1 bildet (Langelier et al., 2008, 2010). Die zentral liegende Automodifikationsdomäne (22 kDa, Reste 375-525), enthält ein BRCT-Motiv (BRCA1 C-Terminus) für Protein-Protein-Interaktionen, wodurch im Verlauf der SSB DNA-Reparaturproteine rekrutiert werden. Zudem ist die Region reich an Glutamatresten (Glu), die für die Automodifikation der PARP-1 essentiell sind. Die katalytische Domäne (54 kDa, Reste 526-1014) ist innerhalb der PARP-Superfamilie hoch konserviert und stellt die aktive Stelle (*Active Site*) für die NAD⁺-Bindung bereit (zusammengefasst in Langelier et al., 2008; D'Amours et al., 1999).

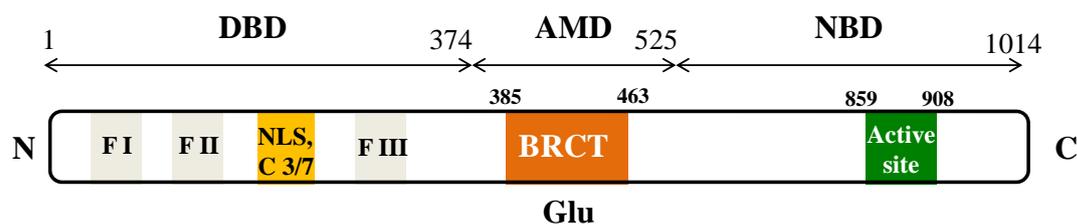


Abbildung 2.5: Struktur der humanen PARP-1. Schematische Darstellung der humanen PARP-1 mit ihren drei Domänen; die N-terminale DNA-Bindungsdomäne (DBD), die mittlere Automodifikationsdomäne (ADM) und die C-terminale katalytische Domäne (NBD). Innerhalb der DBD befinden sich drei Zinkfinger (ZF), die Schnittstelle für die Caspasen 3/7 (C 3/7) sowie das Kernlokalisationssignal (NLS). Die glutamatreiche ADM enthält das BRCT-Motiv für Protein-Protein-Interaktionen. Die NBD enthält die aktive Stelle (*Active Site*) für die NAD⁺-Bindung (modifiziert nach Langelier et al., 2010; de Murcia und de Murcia, 1994).

Die PARP-1 ist intrazellulär zu 90% an der Synthese von Poly(ADP-Ribose) (PAR) innerhalb der Familie beteiligt und trägt daher zum größten Teil an der PARsylierung bei, die in Säugetieren, Pflanzen sowie niederen Eukaryonten beobachtet wird. Hefen fehlt allerdings die Fähigkeit zur PARsylierung (zusammengefasst

in Diefenbach und Bürkle, 2005). Bei der PARsylierung handelt es sich um eine transiente, posttranslationale Modifikation von Kernproteinen, die erstmals 1963 beschrieben wurde (Chambon et al., 1963). Im initialen Schritt wird ein ADP-Ribose-Monomer vom Substrat NAD^+ auf die in Akzeptorproteinen enthaltenen Glutamatreste, Aspartatreste und carboxyterminale Lysinreste übertragen. Die PARP-1 fungiert neben anderen im Kern lokalisierten Proteinen (u.a. Histonen, p53) als Hauptakzeptor (Automodifikation). Die nachfolgende Addition weiterer ADP-Ribose-Einheiten aus dem Substrat führt zur sukzessiven Synthese von langen und verzweigten PAR-Polymeren. Die gebildeten negativ geladenen Polymere haben nur eine geringe Halbwertszeit von weniger als einer Minute, da die Poly(ADP-Ribose)-Glycohydrolase (PARG) die Degradation zu ADP-Ribose-Monomeren katalysiert (Abbildung 2.6) (zusammengefasst in Davidovic et al., 2001; D'Amours et al., 1999). Die PARsylierung unterstützt und beschleunigt DNA-Reparatur und spielt somit eine bedeutende Rolle in der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität.

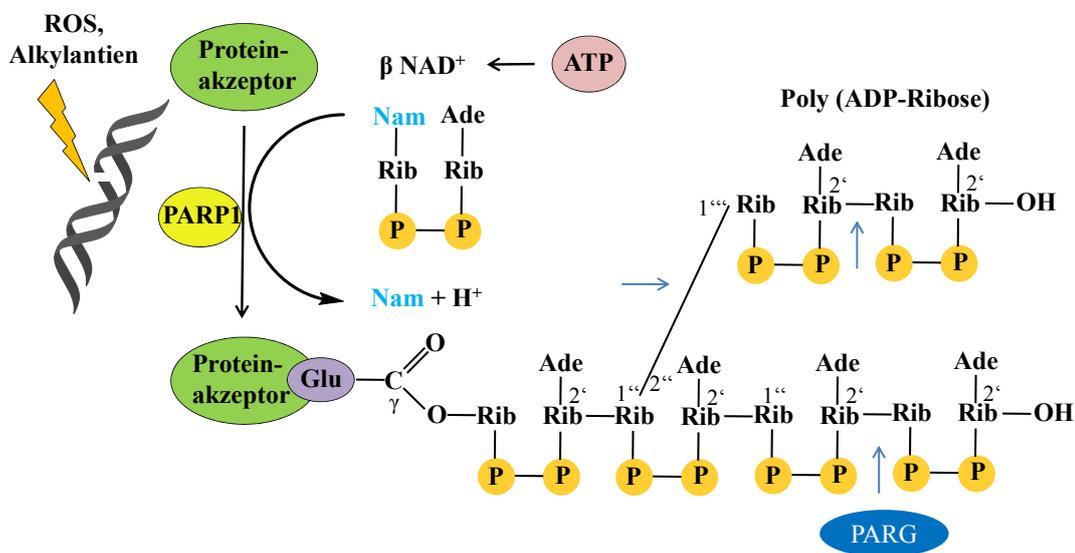


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der PARP-1-initiierten PARsylierung nach der Induktion von DNA-Strangbrüchen. In Reaktion auf den DNA-Strangbruch hydrolysiert PARP-1 NAD^+ unter Abgabe von Nicotinamid (Nam) und einem Proton (H^+) und katalysiert im initialen Schritt die Übertragung von einem ADP-Ribose-Monomer auf die γ -Carboxylgruppe des Glutamats (Glu), des Aspartats oder der carboxylterminalen Lysinreste von Akzeptorproteinen. Die Anlagerung weiterer ADP-Ribose-Reste führt zur Bildung langer und verzweigter PAR-Polymere. Die PARG schneidet über ihre endo- und exoglykolytische Aktivität die glykosidischen Bindungen zwischen den ADP-Ribose-Einheiten und führt damit zur Degradation der PAR-Polymere (modifiziert nach Schreiber et al., 2006).

2.3.1.2 8-Oxoguanin-DNA-Glykosylase 1 (OGG1)

Bedingt durch das niedrige Oxidationspotential des Guanins im Vergleich zu den anderen DNA-Basen ist 8-OxoG die am häufigsten auftretende DNA-Basenmodifikation. Es paart fälschlicherweise mit Adenin (A) anstatt mit Cytosin (C) (Abbildung 2.7), was in replizierenden Zellen zu GC nach TA-Transversionen führt (Kasai und Nishimura, 1984; Cheng et al., 1992). 8-OxoG ist demzufolge potentiell mutagen, weshalb die effektive Entfernung dieses Schadens für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität unabdingbar ist.

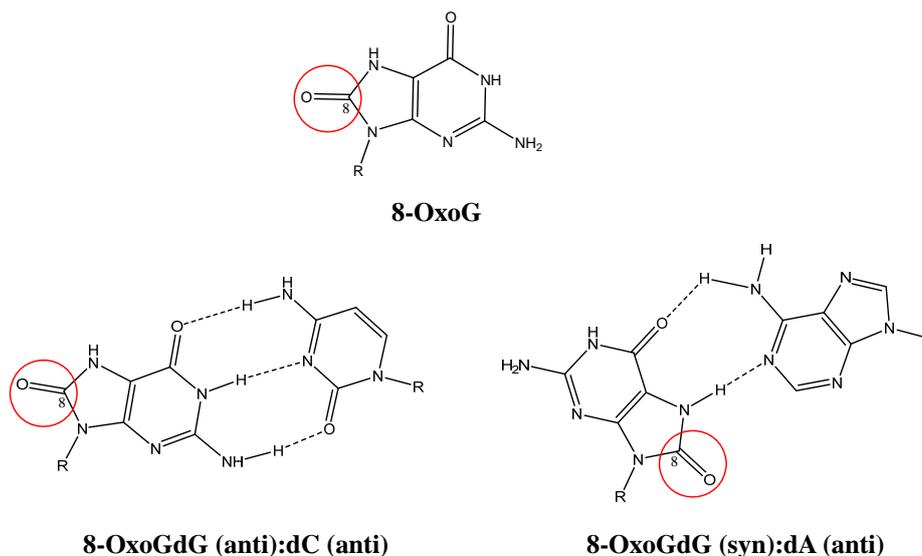


Abbildung 2.7: Struktur von 8-OxoG und mögliche Paarung mit den Basen Adenin und Cytosin. Durch den Einbau einer Oxogruppe an Position C8 des Guanins (G) entsteht das potentiell mutagene 8-OxoG. Dieses paart in *anti*-Konformation mit Cytosin (8-OxoG:dC), welches der ungeschädigten Paarung entspricht (dG:dC). Die Konformationsänderung in *syn*-Stellung des 8-OxoG führt zur bevorzugten Paarung mit Adenin (8-OxoG:dA) (modifiziert nach David et al., 2007).

Die 8-Oxoguanin-DNA-Glykosylase (OGG1) ist hauptsächlich für die Entfernung von 8-OxoG aus 8-Oxo-G/C-Basenpaaren verantwortlich und nur ein kleiner Teil der Schadensentfernung ist auf Back-Up-Systeme, wie die Endonuklease VIII-like 1 (NEIL1), zurückzuführen (zusammengefasst in Paz-Elizur et al., 2008). Die OGG1 stellt das Homolog der in *Escherichia coli* (*E. coli*) vorkommenden Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (Fpg) dar. Die beiden Enzyme stimmen allerdings nur in ihrer Funktion, nicht aber in ihrer Struktur überein. Die OGG1 wurde als erstes in der Hefeart *Saccharomyces cerevisiae* (*yOGG1*) identifiziert (Van Der Kemp et al., 1996; Nash et al., 1996) und weitere Homologe in menschlichen und anderen Säugetierzellen identifiziert und charakterisiert (Lu et al., 1997).

Die humane OGG1 (*hOGG1*) stimmt hinsichtlich ihrer gesamten Sequenz zu 38% mit der *yOGG1* überein, allerdings zeigen einige Regionen eine Homologie von mehr als 60%. Dazu zählt das Helix-Hairpin-Helix-Motiv, gefolgt von einer Glycin/Prolinreichen Schleife und einem konservierten Aspartatrest (Asp268 beim Menschen, Asp260 in der Hefe) wie es auch in anderen Proteinen der Endonuklease III-Familie vorzufinden ist. Das Gen der *hOGG1* ist auf dem Chromosom 3p25 lokalisiert und codiert für insgesamt zwölf gespleißte Isoformen. Die zwei Hauptformen bilden die α -*hOGG1* (345 Aminosäuren) und die β -*hOGG1* (424 Aminosäuren), die nur hinsichtlich der ersten 316 Aminosäuren identisch sind. Der unterschiedliche C-terminale Rest bedingt die Lokalisierung der α -*hOGG1* im Kern bzw. der β -*hOGG1* in den Mitochondrien, da nur Erstere ein Kernlokalisierungssignal aufweist (zusammengefasst in Bruner et al., 2000; Boiteux und Radicella, 2000).

Als bifunktionelle Glykosylase verfügt die *hOGG1* neben ihrer DNA-Glykosylase-Aktivität auch über eine AP-Lyase-Aktivität, die sie zum Einschneiden von AP-Stellen befähigt. Die Effizienz der AP-Lyase-Aktivität folgt dem gleichen Muster wie die Glykosylase-Aktivität: AP:C > AP:T \gg AP:G, sowie einer nicht messbaren Aktivität gegenüber AP:A (zusammengefasst in Boiteux und Radicella, 2000; Bjoras et al., 1997). Allerdings fungiert die *hOGG1* unter physiologischen Bedingungen sowie in Anwesenheit der APE1 als monofunktionelle Glykosylase (Vidal et al., 2001; Morland et al., 2005).

Die Entfernung von 8-OxoG/C-Basenpaaren wird dem „Basen-Flipping“ zugeordnet, der dem sogenannten „pinch-push-plug-pull“ Mechanismus unterliegt. Der molekulare Mechanismus der Schadenserkenkung ist noch nicht vollständig geklärt. Im ersten Schritt führt die Bindung der hOGG1 an das DNA-Zucker-Phosphat-Rückgrat zur Krümmung und Verzerrung der DNA-Doppelhelix („pinch“). Bei der Bindung an die DNA wechselwirkt His270 der hOGG1 mit dem DNA-Zucker-Phosphat-Rückgrat nahe der geschädigten DNA-Base. Als „push“ wird das Herausdrehen der schadhaften Base 8-OxoG bezeichnet. Dieser Schritt wird durch die Einlagerung einer Aminosäureseitenkette der Glykolyse erleichtert, welche als „plug“ fungiert und gleichzeitig die verzerrte DNA-Doppelhelix stabilisiert. Im letzten, als „pull“ bezeichneten Schritt erfolgt das Einziehen der geschädigten Base 8-OxoG in eine basenspezifische Erkennungstasche (zusammengefasst in Bruner et al., 2000; David et al., 2007), in der es zur Wechselwirkungen der Aminosäurereste Phe319, Cys253, Gln315 und Gly42 der hOGG1 mit der geschädigten Base kommt. Das Einschneiden der N-glykosidischen Bindung zwischen dem 8-OxoG und dem DNA-Zucker-Phosphat-Rückgrat erfolgt über die Lys249-Seitenkette der hOGG1, die an der Grenze des Helix-Hairpin-Helix-Motiv lokalisiert ist (Bjoras et al., 1997). Dieser Lysinrest fungiert als starkes Nukleophil, welcher das C1-Atom der Desoxyribose angreift, wodurch 8-OxoG entfernt und die abasische Stelle gebildet wird. Die anschließende Ringöffnung und Bildung einer Schiff'schen Base setzt die vorherige Protonierung des O-1'-Atoms voraus, das von dem Aminosäurerest His270 übernommen wird. Die daran folgende β -Eliminierung führt zum Einschneiden des DNA-Zucker-Phosphat-Rückgrats auf der 3'-Seite (Abbildung 2.8) (Bjoras et al., 1997; zusammengefasst in Bruner et al., 2000).

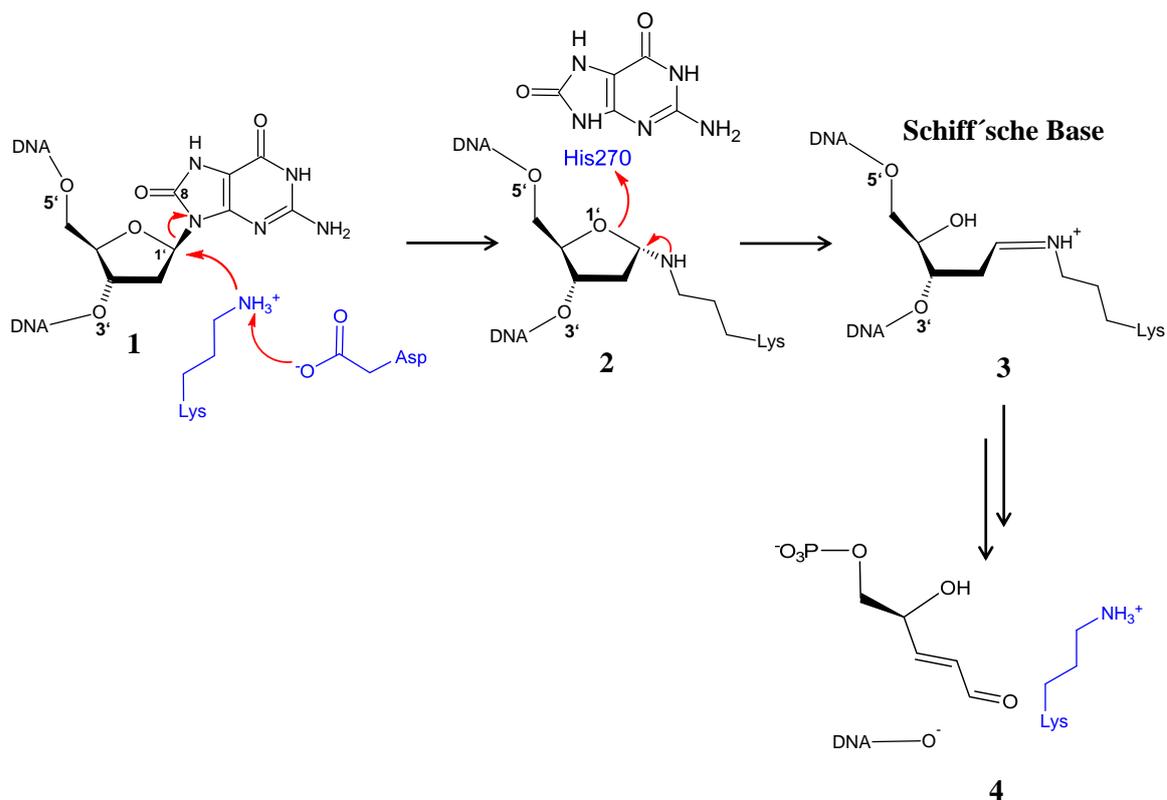


Abbildung 2.8: Katalysemechanismus der Basenexzision der bifunktionellen hOGG1. (1) Der aktivierte Lysinrest (Lys249) der hOGG1 greift nukleophil das DNA-Zucker-Phosphat-Rückgrat an, infolgedessen die geschädigte Base 8-OxoG abgespalten wird. (2) In Folge der Protonierung des O-1'-Atoms durch His270 kommt es (3) zur Ringöffnung und Ausbildung eines Schiff'schen Basen-Intermediats. (4) Die sich anschließende β -Eliminierung bedingt das Einschneiden des DNA-Zucker-Phosphat-Rückgrats auf der 3'-Seite (modifiziert nach Bruner et al., 2000).

2.3.1.3 Apurinische/Apyrimidinische Endonuklease 1 (APE1)

AP-Stellen entstehen entweder durch spontane Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung oder über die Entfernung geschädigter Basen durch DNA-Glykosylasen (zusammengefasst in Lindahl, 1993; Krokan et al., 1997). Die Entfernung von prämutagenen AP-Stellen erfolgt vorwiegend über spezifische AP-Endonukleasen, die von Bakterien, über *Drosophila* bis hin zu Säugetieren exprimiert werden (Barzilay et al., 1995). AP-Endonukleasen werden in zwei Familien, entsprechend ihrer Homologie zu den in *E. coli* hauptsächlich vorkommenden AP-Endonukleasen, eingeteilt. Dazu zählen die Exonuklease III (Exo III oder Xth)-Familie, die zu ungefähr 90% für die Reparaturkapazität in *E. coli* verantwortlich ist sowie die Endonuklease VI (Endo IV oder nfo)-Familie. Das Genom von Säugetieren codiert allerdings nur für eine AP-Endonuklease, die APE1 (auch Ref-1, APEX1), welche zur Exo III-Familie gezählt wird. Die APEs der Exo III-Familie zeichnen sich durch ihre 5'-Endonukleaseaktivität aus, welche das Einschneiden des Zucker-Phosphat-Rückgrats der DNA auf der 5'-Seite ermöglicht, woraus ein 3'-Hydroxylrest (3'-OH) und ein 5'-Desoxyribose-5-Phosphatrest (5'-dRP) resultiert. Mitglieder dieser Familie verfügen zudem über eine 3'-Phosphodiesteraseaktivität sowie 3'-Phosphataseaktivität, wobei erstere für die Entfernung von α,β -ungesättigten Aldehyden und 3'-Phosphoglykolatresten (3'-PG) (Winters et al., 1994) bedeutend ist und letztere 3'-Phosphatreste (3'-P) umsetzt. In menschlichen Zellen werden 95% der Endonukleaseaktivität der APE1 zugeschrieben (zusammengefasst in Wilson und Barsky, 2001; Evans et al., 2000). Daneben wurde eine zweite humane APE, APE2, welche ebenfalls zur Exo III-Familie gezählt wird, erfolgreich kloniert (Hadi und Wilson, 2000). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen zwischen der humanen APE1 (hAPE1) und verschiedenen Säugetierspezies (u.a. Ratte, Maus und Hamster) zeigt mit über 85% einen hohen Grad an Sequenzhomologie, wobei dem C-Terminus die Hauptrolle in der Endonukleaseaktivität zukommt. Der N-Terminus hingegen ist essentiell für die Redoxaktivität und enthält zudem das Kernlokalisierungssignal (zusammengefasst in Evans et al., 2000; Wilson und Barsky, 2001). Strukturanalysen der hAPE1 ergaben, dass es sich um ein globuläres 37 kDa großes α/β -Protein handelt, welches aus zwei Domänen aufgebaut ist und ein vierschichtiges α/β -Sandwich formt. Sechsstängige β -Faltblätter umgeben von α -Helices sind die typischen Charakteristika aus denen jede Domäne gebildet wird (Gorman et al., 1997). Des Weiteren besitzt die APE1 analog zur Exo III in *E. coli* eine Bindungsstelle für divalente Metallionen, wobei die Aktivität in Anwesenheit von Mg^{2+} am höchsten ist (Barzilay et al., 1995). Allerdings wird angenommen, dass Mg^{2+} nicht für die Bindung an die DNA relevant ist, sondern die primäre Rolle darin besteht, den Einschnitt in das DNA-Zucker-Phosphat-Rückgrat zu erleichtern (Erzberger und Wilson III, 1999).

Mutagenesestudien einzelner Aminosäuren der hAPE1 deuten darauf hin, dass Glu96 hauptsächlich als Metall-koordinierender Rest fungiert und zudem an der Endonukleaseaktivität beteiligt ist. Auch den Resten Asp308 und Asp70 wird eine Metall-koordinierende Funktion zugeschrieben (Barzilay et al., 1995; Erzberger und Wilson III, 1999). Weitere Untersuchungen weisen auf eine enorme Bedeutung von His309 und Asp283 in der Endonukleaseaktivität hin (Barzilay et al., 1995). Für die Affinität zur DNA wird Cys99 eine wichtige Rolle zugesprochen (Mantha et al., 2008; Kim et al., 2011). Die Spaltung des Phosphodiester-Rückgrats erfolgt über einen S_N2 -Mechanismus. Die Interaktion zwischen His309 und Asp283 ermöglicht es dem His309, als Base zu fungieren, die ein H-Atom aus dem Wassermolekül abstrahiert (zusammengefasst in Wilson und Barsky, 2001). Das gebildete ^-OH -Nukleophil spaltet hydrolytisch die Phosphodiesterbindung. Asp210 scheint als Protonendonator zu fungieren und die Abgangsgruppe zu stabilisieren (Erzberger und Wilson III, 1999) (Abbildung 2.9).

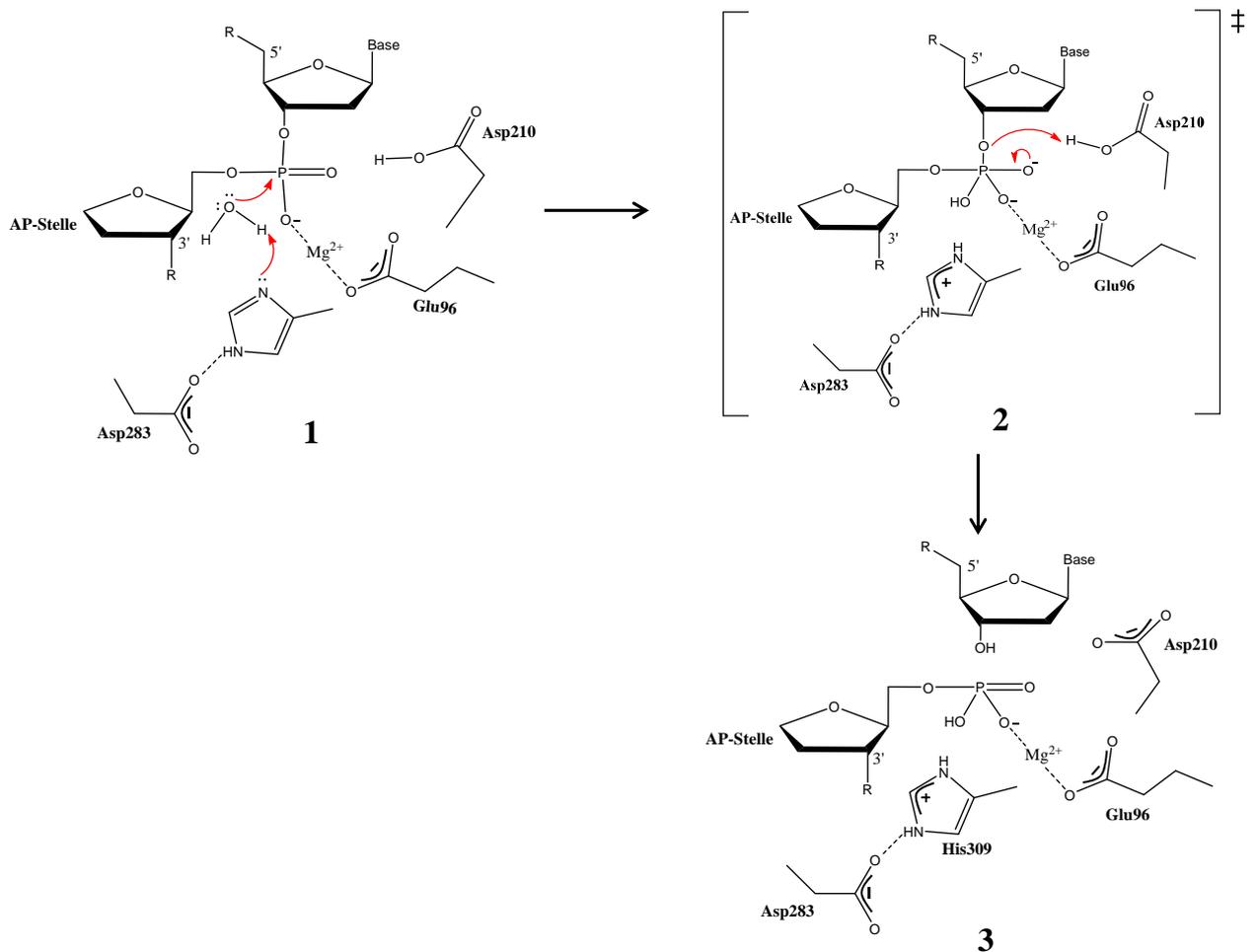


Abbildung 2.9: Katalysemechanismus zur Entfernung von AP-Stellen durch die hAPE1. (1) His309 generiert über die Abstraktion eines Protons (H^+) eines H_2O -Molekül das Nucleophil OH^- , während Mg^{2+} einen elektronenziehenden und wahrscheinlich orientierenden Effekt auf das Phosphat ausübt. (2, 3) Das protonierte Asp210 stabilisiert die Abgangsgruppe (modifiziert nach Wilson und Barsky, 2001).

Wie bereits angesprochen, wird dem N-terminalen Teil der hAPE1 eine bedeutende Funktion in der Redoxaktivität zugesprochen. Neben seiner Aufgabe in der DNA-Reparatur ist die APE1 daher auch ein wichtiger Redoxfaktor, der die DNA-Bindung zahlreicher Transkriptionsfaktoren stimuliert, u.a. die Untereinheiten des *activator protein 1* (AP-1) Fos und Jun sowie *nuclear factor- κ B* (NF- κ B), *early growth response-1* (EGR-1), *hypoxia inducible factor-1 α* (HIF-1 α), *HIF-like factor* (HLF), Mitglieder der *B cell specific transcription factor/paired box gene* (BSAP/Pax)-Familie und p53. Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren kann sowohl redox-abhängig oder redox-unabhängig vermittelt werden. Zudem wirkt es als Repressor des Parathyroid Hormon Promotors. Durch Phosphorylierung, Acetylierung und Ubiquitinierung werden die Funktionen der APE1 posttranslational reguliert (zusammengefasst in Evans et al., 2000; Kim et al., 2011).

2.3.2 DNA-Einzelstrangbruchreparatur

Die Art der DNA-Einzelstrangbrüche wird hinsichtlich ihrer Entstehung unterschieden. DNA-Einzelstrangbrüche können direkt über die Abstraktion eines H-Atoms aus dem 2-Desoxyriboseerest oder indirekt als Intermediat während der BER generiert werden. Direkt generierte DNA-Einzelstrangbrüche weisen häufig blockierte 3'-Enden, wie zu ca. 70% Monophosphate und zu ca. 30% Phosphoglykolate, auf. Die 5'-Enden sind meistens konventionelle 5'-P-Reste, allerdings besitzen einige auch ein 5'-OH-Rest. Abhängig vom BER-Mechanismus besitzen indirekt gebildete DNA-Einzelstrangbrüche blockierte Reste, wie einen 5'-dRP-Rest oder einen α,β -ungesättigten Aldehyd (zusammengefasst in Caldecott, 2003a). Eine weitere Plattform für die Bildung von DNA-Einzelstrangbrüchen bietet die Topoisomerase I (Topo I), welche als Teil ihres katalytischen Zyklus die DNA einschneidet und wieder ligiert. Unter bestimmten Umständen kommt es zur Entkopplung der Topo I-Aktivität vom DNA-Einzelstrangbruch, der infolgedessen nicht verschlossen wird. Nicht reparierte DNA-Einzelstrangbrüche können in replizierenden Zellen zum Zusammenbruch der DNA-Replikationsgabel in der S-Phase führen, wodurch potentiell klastogene und/oder lethale DNA-Doppelstrangbrüche entstehen (zusammengefasst in Caldecott, 2001, 2008).

2.3.2.1 Reparatur direkt gebildeter DNA-Einzelstrangbrüche

Die Erkennung von direkten DNA-Einzelstrangbrüchen erfolgt durch die PARP-1 (Vgl. 2.3.1.1), welche daraufhin aktiviert wird (Abbildung 2.10). Die Automodifikation mit negativ geladenen PAR-Einheiten induziert die Rekrutierung des Komplexes, bestehend aus *X-ray repair cross-complementing protein 1* (XRCC1) und Ligase 3 α (Lig 3 α), welcher die PARP-1 verdrängt und als molekulare Plattform für weitere Proteine dient (a). Für die prozessierenden Schritte der Reparatur ist zuvor die Konvertierung blockierter 5'- und 3'-Reste in konventionelle 5'-P- und 3'-OH-Reste erforderlich.

Blockierte Enden wie 5'-OH stellen das Substrat für die 5'-DNA-Kinaseaktivität der Polynukleotidkinase-3'-Phosphatase (PNKP) dar, die ebenfalls über ihre assoziierte 3'-Phosphataseaktivität 3'-P-Reste umwandeln kann (Whitehouse et al., 2001). Neben 3'-P-Resten bilden die 3'-PG-Reste das Substrat für die APE1 (b) (Winters et al., 1994). Der Einbau des Nukleotids erfolgt durch die Polymerase β (Pol β), gefolgt von der Ligation durch die Lig3 α (c, d). Neben dem hier beschriebenen *short-patch*-Reparaturweg wird im Falle bestehender blockierter 5'-Enden der *long-patch*-Reparaturweg eingeleitet, der im Abschnitt 2.3.2.2 näher erläutert wird (zusammengefasst in Caldecott, 2001, 2008; Mitra et al., 2001).

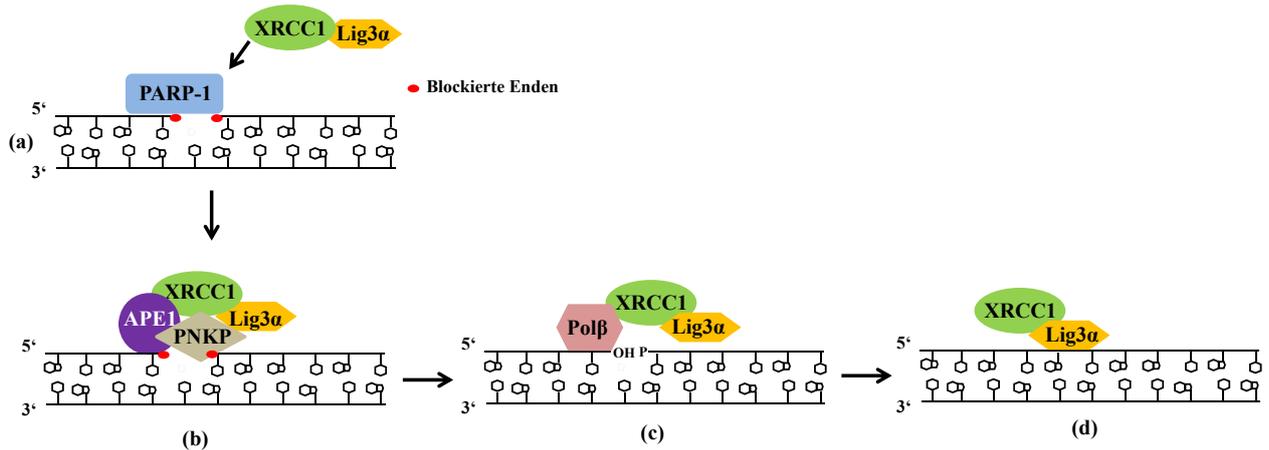


Abbildung 2.10: Ablauf der Reparatur direkt gebildeter DNA-Einzelstrangbrüche. Die PARP-1 wird durch den DNA-Einzelstrangbruch aktiviert und leitet die Reparatur ein. Vor der Prozessierung werden blockierte 5'- und 3'-Enden durch die APE1 und PNKP in konventionelle 5'-P- und 3'-OH-Enden umgewandelt. Der Einbau des Nucleotids sowie die Ligation erfolgen über die Pol β bzw. Lig 3 α (modifiziert nach Caldecott, 2003b).

2.3.2.2 Reparatur indirekt gebildeter DNA-Einzelstrangbrüche

Die zweite Form von DNA-Einzelstrangbrüchen kann als Intermediat der BER entstehen, indem DNA-Glykosylasen zur hydrolytischen Spaltung der N-glykosidischen Bindung zwischen der geschädigten Base und dem DNA-Zucker-Phosphat-Rückgrat führen. Hierbei unterscheidet man zwischen bifunktionellen, wie der OGG1 (Vgl. 2.3.1.2) und monofunktionellen DNA-Glykosylasen (Abbildung 2.11). Die bifunktionelle DNA-Glykosylase verfügt zudem über eine AP-Lyase-Funktion und führt zum Einschneiden des DNA-Strangs auf der 3'-Seite der Desoxyribose, woraus ein DNA-Einzelstrangbruch resultiert, der am 3'-Ende einen α,β -ungesättigten Aldehyd besitzt (a). Für die weiteren Schritte wird der α,β -ungesättigte Aldehyd über die 3'-Endonukleaseaktivität der APE1 entfernt und dadurch die für die prozessierenden Schritte erforderlichen 5'-P- und 3'-OH-Reste gebildet (b). Die monofunktionelle DNA-Glykosylase dagegen hinterlässt eine AP-Stelle (c), die durch die APE1 erkannt und eingeschnitten wird, wodurch als Konsequenz ein 3'-OH-Rest und ein 5'-dRP-Rest zurückbleibt (d). Die APE1 rekrutiert die Pol β zum DNA-Einzelstrangbruch, die ein Nucleotid einbaut (e, f). Zudem entfernt die Pol β über ihre dRPase-Aktivität den durch die APE1 entstandenen 5'-dRP-Rest (Matsumoto und Kim, 1995; Deterding et al., 2000) (g). Die Ligation erfolgt wie bei der SSB über die Lig3 α (h) (*short-patch*).

Oxidierter und reduzierter 5'-dRP-Reste werden von der Pol β nicht entfernt, wodurch in der Konsequenz der *long-patch* Reparaturweg eingeleitet wird (i). In diesem Fall werden zwei bis sieben weitere Nucleotide durch die *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA)-abhängigen Pol δ und ϵ (Stucki et al., 1998; Frosina et al., 1996) an das von Pol β insertierte Nucleotid angeknüpft (j). Das Resultat ist eine überstehende 5'-dRP-, „Flap“-Struktur, die durch die PCNA-stimulierte *flap structure-specific endonuclease 1* (FEN1) entfernt wird (k). Die Lig 1 ligiert den DNA-Strang (l) (zusammengefasst in Nilsen und Krokan, 2001; Fortini und Dogliotti, 2007).

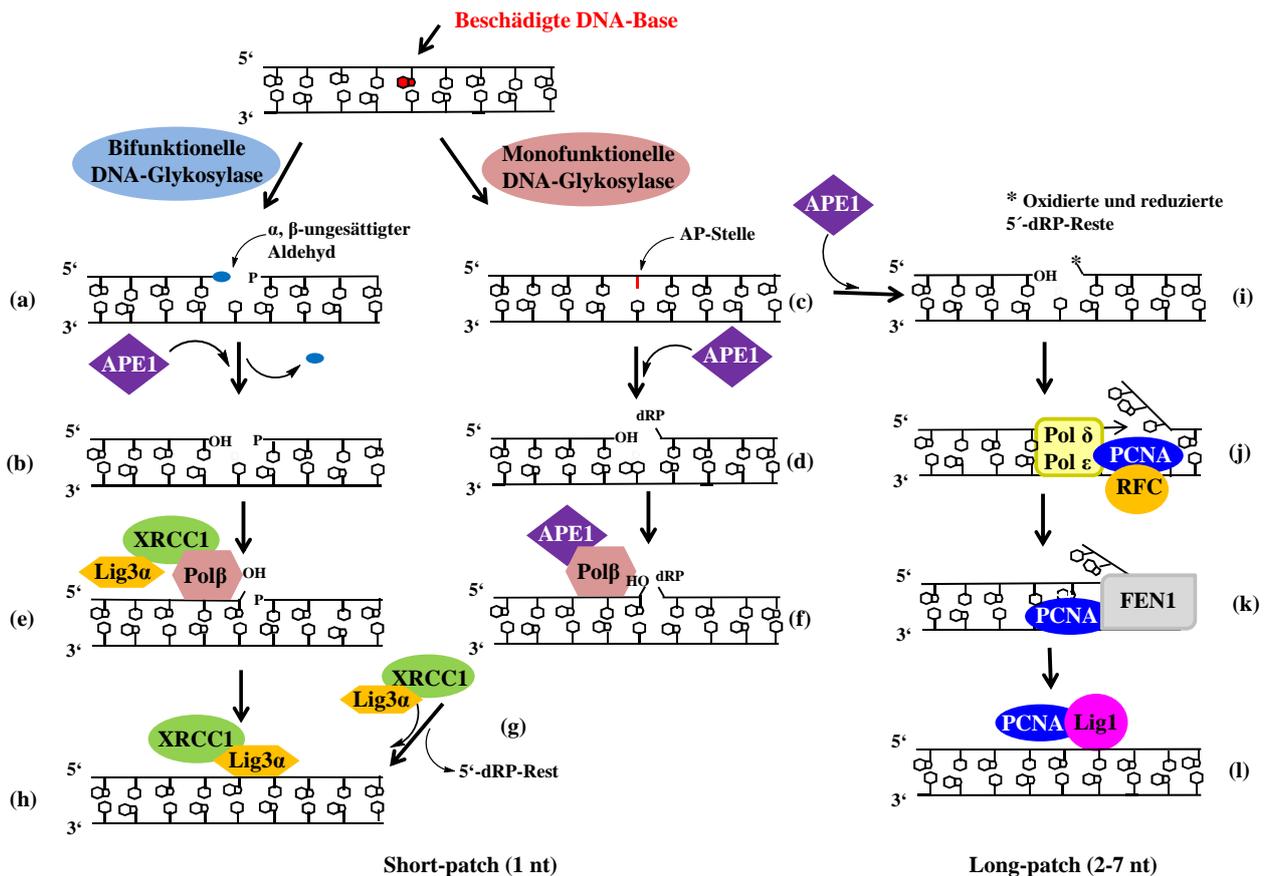


Abbildung 2.11: Ablauf der Reparatur indirekt gebildeter DNA-Einzelstrangbrüche. Die als Intermediat der BER gebildeten DNA-Einzelstrangbrüche werden über den *short-patch*-Weg (a-h) oder den *long-patch*-Weg (i-l) repariert (modifiziert nach Slupphaug et al., 2003).

In der Literatur wird der PARP-1 eine mögliche Rolle bei der Reparatur indirekt generierter DNA-Einzelstrangbrüche zugeschrieben (Le Page et al., 2003; Trucco et al., 1998). So wird vermutet, dass PARP-1 das Schadensprotein XRCC1 zu DNA-Strangbrüchen rekrutiert, die nach dem Einschnitt der AP-Stelle von der APE1 „entkoppelt“ wurden (Stroem et al., 2011; Caldecott, 2003b). Vor allem die Beteiligung an der *long-patch* BER und die Interaktion mit der daran beteiligten FEN1 wird diskutiert (Sanderson und Lindahl, 2002; Dantzer et al., 2000; Prasad et al., 2001). Dantzer et al. (2000) veröffentlichten Ergebnisse zur Interaktion der PARP1 und der Pol β , die nicht nur einen essentiellen Teil der *short-patch* BER darstellt, sondern auch an der *long-patch* BER mitwirkt. Innerhalb der *long-patch* BER ist die Pol β für die Verschiebung des DNA-Strangs verantwortlich und kontrolliert zusammen mit der FEN1 die Größe der überhängenden „Flap“-Struktur (Klungland und Lindahl, 1997; Dianov et al., 1999; Horton et al., 2000; Prasad et al., 2000). Die PARP-1 ist unter Mitwirkung der FEN1 für die Stimulierung der DNA-Strangverschiebung durch Pol β verantwortlich (Prasad et al., 2001). Mittels Immunoblot-Analyse wurde zudem eine verminderte Expression der Proteine FEN1 und Lig1 in PARP1-defizienten Zellen gezeigt (Sanderson und Lindahl, 2002). Im Fall von ATP-Mangel kann die PARP-1 auch als Alternative für den Ligationsschritt dienen (Oei und Ziegler, 2000). Allerdings existieren in der Literatur auch Ergebnisse, die der PARP-1 keine Bedeutung in der BER zusprechen (Vodenicharov et al., 2000), was möglicherweise auf den relativen Anteil der *short-patch* und *long-patch* BER in der verwendeten Zelllinie zurückzuführen ist. Die Abbildung 2.12 gibt die Rolle der PARP-1 im *long-patch*-Reparaturweg wieder.

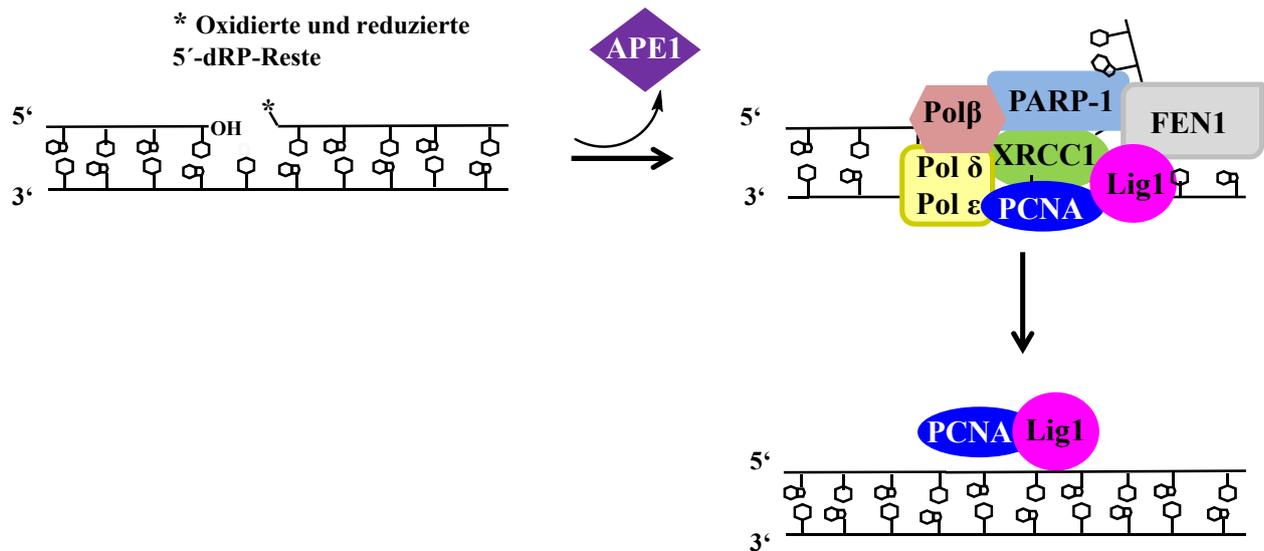


Abbildung 2.12: Beteiligung der PARP-1 im *long-patch*-Reparaturweg. Das von der APE1 hinterlassene blockierte 5'-Ende (z.B. oxidierte und reduzierte 5'-dRP-Reste) leitet den *long-patch*-Reparaturweg ein. Über die Interaktion mit der Pol β und der FEN1 ist die PARP-1 an den prozessierenden Schritten der *long-patch*-Reparatur involviert (modifiziert nach Caldecott, 2008).

3. Fragestellung

Das Spurenelement Zink ist essentiell für den Menschen, da es an einer Vielzahl zellulärer biochemischer Prozesse, wie der DNA-Reparatur, der Zellproliferation- und differenzierung, der zellulären Signalübertragung sowie der Genexpression mitwirkt (zusammengefasst in Beyersmann und Haase, 2001; Ho, 2004). Zahlreiche Hinweise aus der Literatur deuten darauf hin, dass eine Unterversorgung mit Zink physiologisch kritisch anzusehen ist, jedoch können auch im Falle einer Überversorgung mit Zink neben akut toxischen Effekten (z.B. Magenkrämpfen) auch chronische Effekte (v.a. Interferenz mit dem Kupferhaushalt) auftreten. Vor allem die zunehmende Supplementierung von Zink-Präparaten kann schnell zum Überschreiten der empfohlenen täglichen Höchstmenge führen (zusammengefasst in Hartwig, 2012; Maret und Sandstead, 2006; SCF, 2003).

Zink liegt in der Zelle hauptsächlich gebunden an Metallothionein vor; die biochemisch wirksame Form bilden die „freien“ Zinkionen, die in erhöhten Konzentrationen zu unspezifischen Reaktionen mit Proteinen führen können. Mechanistisch ist vor allem die unspezifische Bindung an kritische Thiolgruppen von Proteinen relevant, woraus Änderungen der Proteinfunktionen und damit assoziiert die Instabilität der DNA-Integrität resultieren können.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Fragestellung, ob Zink über die Interferenz mit Proteinen, die am zellulären Redoxstatus sowie in der DNA-Reparatur beteiligt sind, indirekt genotoxische Effekte vermittelt. Dafür bietet sich insbesondere die kombinierte Untersuchung von H_2O_2 und Zink im zellulären System an, um zum einen Veränderungen H_2O_2 -detoxifizierender Enzyme zu erfassen und zum anderen den Reparaturverlauf von H_2O_2 -generierten DNA-Strangbrüchen zu verfolgen. Die nicht-transformierte Epithelzelllinie aus dem Schweinedünndarm (IPEC-J2) dient als Zellmodell, da der Dünndarm den primären Resorptionsort von Zink darstellt. Hinsichtlich der antioxidativen Abwehr sollen die zellulären Aktivitäten der H_2O_2 -detoxifizierenden Enzyme, Glutathionperoxidase und Katalase in Gegenwart von Zink ermittelt werden. Aber auch andere Faktoren, die eine wichtige Rolle in der antioxidativen Abwehr spielen, wie die zelluläre Aktivität der Glutathionreduktase und der zelluläre Gesamtglutathiongehalt, sollen betrachtet werden. Als Reparaturweg wird exemplarisch die DNA-Einzelstrangbruchreparatur gewählt, die durch H_2O_2 induziert wird. Die Reparatur dieser DNA-Schäden ist unerlässlich für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität, da nicht reparierte Schäden zu klastogenen und lethalen DNA-Doppelstrangbrüchen in replizierenden Zellen führen können (Kuzminov, 2001).

Da die initialen Proteine der DNA-Einzelstrangbruchreparatur sowie der Basenexzisionsreparatur mit ihren kritischen Thiolgruppen, die für ihre katalytische Aktivität essentiell sind, potentielle Angriffspunkte für Zink darstellen, widmen sich die weiteren Untersuchungen der Interferenz von Zink mit diesen Proteinen. Zu den ausgewählten DNA-Reparaturproteinen zählt die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1, die sowohl in der initialen Phase der DNA-Einzelstrangbruchreparatur als auch in der prozessierenden Phase der Basenexzisionsreparatur mitwirkt. Des Weiteren stehen die 8-Oxoguanin-DNA-Glykosylase 1 und Apurinische/Apyrimidinische-Endonuklease 1 im Mittelpunkt, die an der Schadenserkennung und -entfernung innerhalb der Basenexzisionsreparatur beteiligt sind. Neben der Auswirkung des essentiellen Spurenelements auf die zelluläre Aktivität der zuvor genannten DNA-Reparaturproteine sollen Untersuchungen mit isolierten Extrakten sowie den isolierten Proteinen eine mögliche direkte Interferenz von Zink mit den DNA-Reparaturproteinen abklären. Die Quantifizierung der intrazellulären Gesamtkonzentration von Zink und der „freien“ Zinkkonzentration sowie die Bestimmung des Gehalts an Metallothionein auf Transkrip-

tionsebene sollen zur Beurteilung der Zinkhomöostase in IPEC-J2-Zellen herangezogen werden.

4. Ergebnisse und Diskussion

In dieser Arbeit sollten vor allem indirekt durch Zink vermittelte genotoxische Effekte, die die DNA-Integrität beeinflussen können, näher betrachtet werden. Im Fokus standen vor allem ausgewählte Enzyme des zellulären Redoxstatus, die an der antioxidativen Abwehr beteiligt sind, sowie das in der Zelle vorherrschende Thiol Glutathion. Des Weiteren sollte der Einfluss auf die DNA-Reparatur und eine mögliche Interaktion mit essentiellen Proteinen, die daran beteiligt sind, analysiert werden. Exemplarisch wurde die SSBR von H₂O₂-generierten DNA-Strangbrüchen gewählt, die durch die PARP-1 initiiert wird. Zudem wurden die an der Schadenerkennung und -entfernung der BER beteiligten Enzyme, OGG1 und APE1 hinsichtlich eines möglichen Einflusses von Zink untersucht.

4.1 Zytotoxizität von ZnSO₄

ZnSO₄ wird, neben weiteren Zinksalzen, zur Herstellung von Lebensmitteln für bestimmte Ernährungszwecke sowie in Nahrungsergänzungsmitteln eingesetzt, sodass die toxikologische Bewertung von großer Bedeutung ist (SCF, 2003). Zur Einschätzung des zytotoxischen Potentials von ZnSO₄ wurde die Viabilität von Intestinalzellen (IPEC-J2) anhand der Bestimmung der Zellzahl sowie der metabolischen Aktivität (WST-8) als Endpunkte erfasst.

Eine verminderte Zellzahl kann verursacht sein durch eine Zellzyklusarretierung mit verminderter Proliferation oder aber durch den Zelltod bedingt durch apoptotische oder nekrotische Prozesse.

Zur Erfassung des Effekts von Zink auf die Zellzahl wurden IPEC-J2-Zellen sowohl für 1 h als auch für 24 h mit ZnSO₄ behandelt. Nach einstündiger Inkubation mit ZnSO₄ war keine signifikante Verminderung der Zellzahl im gesamten Konzentrationsbereich von 0-300 µM nachweisbar (Abbildung 4.1). Nach 24-stündiger Inkubation blieb die Zellzahl bis zu einer Konzentration von 75 µM zunächst unverändert. Ab 100 µM ZnSO₄ sank die Zellzahl signifikant ab, wobei im Vergleich zur Kontrolle noch 80% vitale Zellen detektiert wurden. Bei der höchsten Konzentration von 125 µM waren noch 50% vitale Zellen zu verzeichnen (Abbildung 4.2). Zudem bietet die Bestimmung der metabolischen Aktivität über den Einsatz von kolorimetrischen Assays ebenfalls die Möglichkeit, eine Aussage über die Zellviabilität zu treffen. Das in dieser Arbeit verwendete „Cell Counting Kit-8 (CCK-8)“ enthält das wasserlösliche Tetrazoliumsalz WST-8 sowie den Elektronencarrier 1-Methoxy-5-Methylphenaziniummethylsulfat (mPMS). Das pinke WST-8 wird extrazellulär in Gegenwart metabolisch aktiver Zellen durch die zellulären NAD⁺/NADP⁺-abhängigen Dehydrogenasen zum orangefarbenen Formazan umgesetzt (Ishiyama et al., 1997). Das Produkt ist direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen. Die schnelle und einfache Anwendung ist ein großer Vorteil dieses kolorimetrischen Testsystems, allerdings können Wechselwirkungen mit Metallen das Ergebnis verfälschen (Semisch und Hartwig, 2014). Im Falle des redox-inerten Zinks ergaben die Untersuchungen zur metabolischen Aktivität sowohl für 1 h als auch für 24 h die gleichen Ergebnisse wie die der Zellzahlbestimmung (Abbildungen 4.1 und 4.2). Als Konsequenz wurden für alle weiteren Versuche zu Zink-induzierten Effekten in IPEC-J2-Zellen deshalb der Konzentrationsbereich für 24 h von 50-125 µM festgelegt, um Zink-vermittelte Effekte unter nicht-zytotoxischen (bis 75 µM), beginnend zytotoxischen (100 µM) und stark zytotoxischen (125 µM) Konzentrationen von ZnSO₄ analysieren zu können. Der betrachtete Konzentrationsbereich von 50-150 µM für eine Inkubationsdauer von 1 h ist nicht-zytotoxisch und wurde ausgewählt, um direkte, kurzfristig induzierte Effekte erfassen zu können.

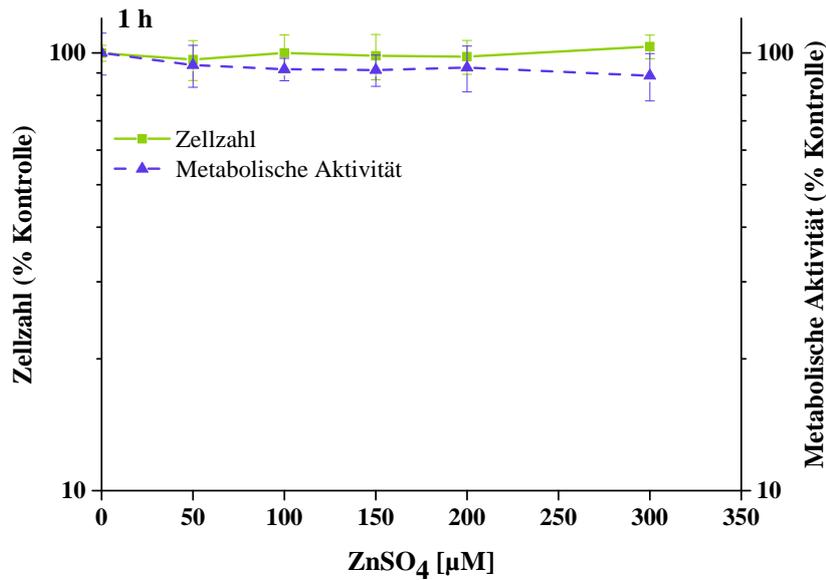


Abbildung 4.1: Einfluss einer einstündigen Inkubation mit ZnSO_4 auf die Zellzahl und auf die metabolische Aktivität in IPEC-J2-Zellen. IPEC-J2-Zellen wurden für 1 h mit ZnSO_4 inkubiert. Im Falle der Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen nach dem Ende der Behandlung mit Trypsin abgelöst und die Zellzahl mittels eines automatischen Zellzählgerätes bestimmt. Für die Bestimmung der metabolischen Aktivität wurden die Zellen nach dem Ende der Inkubation mit dem CCK-8-Reagenz für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Absorption wurde bei 450 nm am Mikrotiterplattenlesegerät erfasst. Gezeigt sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen (mindestens in Doppelbestimmung) \pm SD.

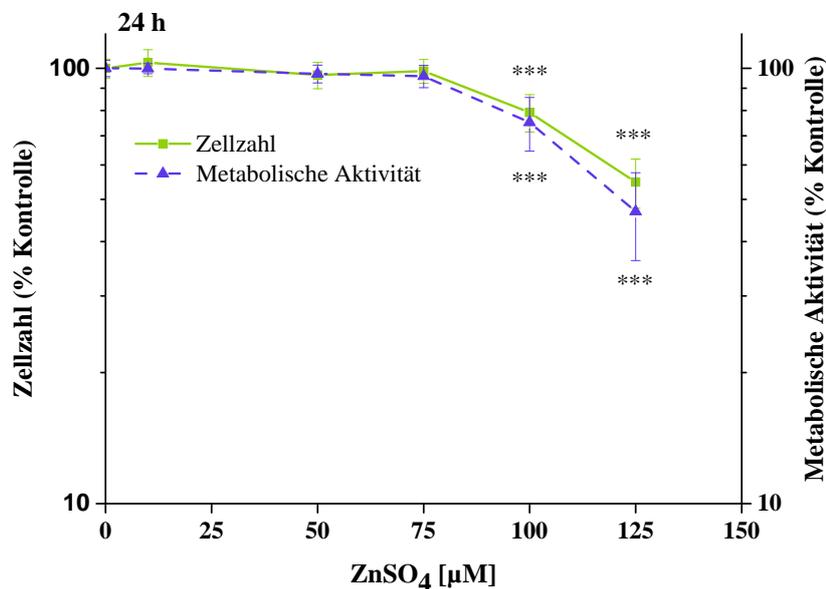


Abbildung 4.2: Einfluss von ZnSO_4 auf die Zellzahl und auf die metabolische Aktivität in IPEC-J2-Zellen nach 24 h. IPEC-J2-Zellen wurden für 24 h mit ZnSO_4 inkubiert. Die Zellen wurden nach dem Ende der Behandlung mit Trypsin abgelöst und die Zellzahl mittels eines automatischen Zellzählgerätes bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte aus mindestens vier unabhängigen Versuchen (in Doppelbestimmung). Statistisch signifikant verschieden von der Kontrolle: $p^{***} < 0,001$ (ANOVA, Dunnett T). Für die Bestimmung der metabolischen Aktivität wurden die Zellen nach dem Ende der Inkubation mit dem CCK-8-Reagenz für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Absorption wurde bei 450 nm am Mikrotiterplattenlesegerät erfasst. Gezeigt sind Mittelwerte aus mindestens fünf unabhängigen Versuchen (in Dreifachbestimmung) \pm SD. Statistisch signifikant verschieden von der Kontrolle: $p^{***} < 0,001$ (ANOVA, Dunnett T3).

Bereits in früheren Studien wurden zytotoxische Effekte von ZnSO₄ in intestinalen Zelllinien unterschiedlicher Spezies gezeigt (Cario et al., 2000; Zödl et al., 2003; Lodemann et al., 2013). Besonders interessant sind die von Lodemann et al. (2013) publizierten Daten zur Zytotoxizität in der intestinalen Zelllinie, IPEC-J2, wobei darauf hinzuweisen ist, dass im Unterschied zu der von uns gewählten Versuchsdurchführung die Zytotoxizitätstests sowohl an postkonfluenten als auch an präkonfluenten IPEC-J2-Zellen durchgeführt wurden. Die präkonfluenten IPEC-J2-Zellen zeigten sich wesentlich sensitiver gegenüber einer Inkubation mit ZnSO₄ und die Ergebnisse entsprechen den von uns ermittelten Werten. Zudem beobachten Lodemann et al. (2013) mit steigender ZnSO₄-Konzentration eine zunehmende LDH-Abgabe, die als Parameter für den Verlust der Membranintegrität herangezogen wurde sowie einen Abfall des ATP-Gehalts, der auf den Zelltod, verursacht durch Nekrose, hindeutet.

Pavlica et al. (2009) verglichen verschiedene Zinksalze in neuronalen PC12-Zellen hinsichtlich ihres zytotoxischen Potentials und mechanistischer Wirkungsweise. Die Inkubation mit anorganischen Zinkverbindungen wies auf verminderte metabolische Aktivitäten von neuronalen PC12-Zellen nach 24-stündiger Inkubation hin, wobei im Vergleich für ZnSO₄ das höchste zytotoxische Potential erfasst wurde. Auch in dieser Publikation wurde der Zelltod im Falle von ZnSO₄ mit der Depletion des ATP- und GSH-Gehalts in Verbindung gebracht.

Neben der diskutierten ATP- und GSH-Depletion als Ursache für den Zink-vermittelten Zelltod wurde in der Literatur auch die Induktion des apoptotischen Wegs diskutiert (Zödl et al., 2003; Cario et al., 2000).

4.2 Einfluss von ZnSO₄ auf den zellulären Redoxstatus

In der Literatur wird sowohl Zinkmangel als auch eine Zink-Überdosierung in Verbindung mit oxidativem Stress gebracht (zusammengefasst in Hao und Maret, 2005). Insbesondere Zinkmangel und die adversen Folgen werden in der Literatur häufig diskutiert. Ausgangspunkt der hier beschriebenen Untersuchungen war hingegen vor allem die Fragestellung, ob die Kultivierung von Zellen unter Zink-Überdosierung indirekt oxidative DNA-Schäden generiert, indem Zink über seine hohe Thiolaffinität mit Proteinen des zellulären Redoxstatus wechselwirkt. Im Fokus stand dabei vor allem die Beeinflussung von Zink auf die Induktion von H₂O₂-generierten DNA-Strangbrüchen. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde ebenfalls die Aktivität der H₂O₂-detoxifizierenden Enzyme Katalase und Glutathionperoxidase erfasst. Der Einfluss auf die Glutathionreduktase sowie des zellulären Gesamtglutathionstatus sollten als weitere potentielle Angriffspunkte von Zink betrachtet werden.

4.2.1 Einfluss von Zink auf die Anzahl an H₂O₂-generierten DNA-Strangbrüchen

Für die Untersuchung eines möglichen Einflusses von Zink auf die Häufigkeit von H₂O₂-generierten DNA-Strangbrüchen wurden IPEC-J2-Zellen für 1 h bzw. 24 h mit ZnSO₄ vorinkubiert und anschließend für die Induktion der DNA-Strangbrüche für 5 min mit H₂O₂ koinkubiert. Die Methode der Alkalischen Entwindung (Hartwig et al., 1993) diente zur Quantifizierung der erhaltenen DNA-Läsionen. H₂O₂ bildet das Substrat für Fenton oder Fenton-ähnliche Reaktionen, infolgedessen hochreaktive ·OH-Radikale entstehen. H₂O₂-generierte ·OH-Radikale induzieren vorwiegend DNA-Einzelstrangbrüche, da sie das DNA-Zucker-Phosphat-Rückgrat gleichverteilt angreifen. Durch ionisierende Strahlung induzierte ·OH-Radikale führen hingegen zur Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen, da sie Cluster von ·OH-Radikalen bilden, die beide

DNA-Stränge in räumlicher Nähe angreifen können (zusammengefasst in Friedberg et al., 2005). Damit diente H_2O_2 als Modellsystem zur Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen.

Im Falle der alleinigen Inkubation mit ZnSO_4 waren weder nach 1 h noch nach 24 h veränderte DNA-Strangbruchraten im Vergleich zur Kontrolle detektierbar (Abbildung 4.3 und 4.4). In Kombination mit H_2O_2 zeigte sich in Abhängigkeit der Inkubationsdauer mit ZnSO_4 ein unterschiedliches Ausmaß an H_2O_2 -generierten DNA-Strangbrüchen. Die einstündige Vorinkubation mit ZnSO_4 in nicht-zytotoxischen Konzentrationen von 50-150 μM erhöhte die Häufigkeit an H_2O_2 -generierten DNA-Strangbrüchen konzentrationsabhängig und synergistisch (Abbildung 4.3). Bei der niedrigsten Konzentration von 50 μM ZnSO_4 war bereits ein signifikanter Anstieg um das 1,6-Fache (2,3 DNA-Strangbrüche/ 10^6 Bp) der H_2O_2 -generierten DNA-Strangbrüche im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit 12,5 μM H_2O_2 (1,4 DNA-Strangbrüche/ 10^6 Bp) zu detektieren. Die Inkubation mit der höchsten Konzentration von 150 μM ZnSO_4 erhöhte die Häufigkeit von H_2O_2 -generierten DNA-Strangbrüchen um den Faktor 3,6 (5,1 DNA-Strangbrüche/ 10^6 Bp). Der Anstieg an H_2O_2 -generierten DNA-Strangbrüchen verlief zunächst bis zu einer Konzentration von 125 μM linear. Bei einer Konzentration von 150 μM war lediglich noch ein Anteil von 10% dsDNA detektierbar, sodass ab hier von einer Sättigung des Testsystems auszugehen ist (Hartwig et al., 1996).

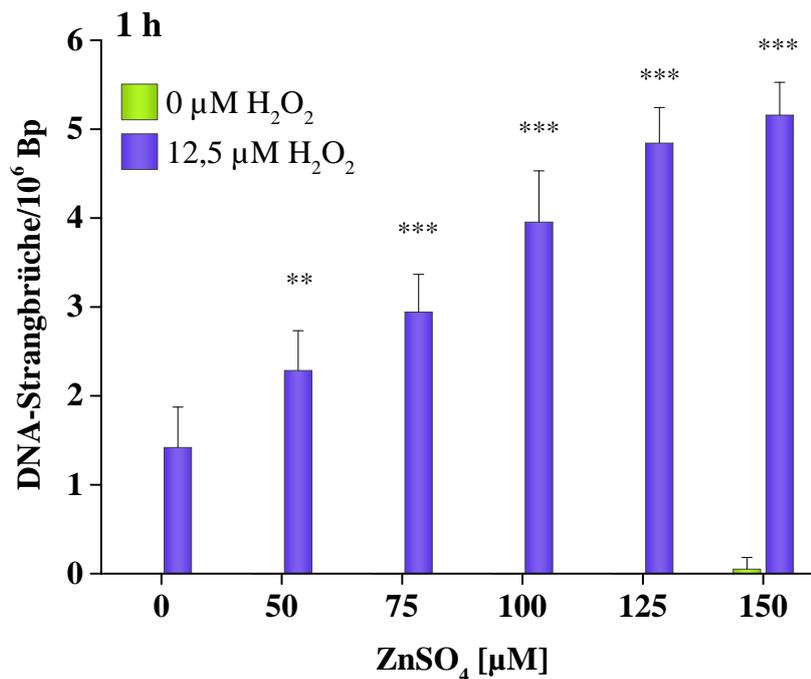


Abbildung 4.3: Einfluss einer einstündigen Vorinkubation mit ZnSO_4 auf H_2O_2 -generierte DNA-Strangbrüche in IPEC-J2-Zellen. IPEC-J2-Zellen wurden 1 h mit ZnSO_4 vorinkubiert und anschließend für 5 min mit 12,5 μM H_2O_2 kokubiert. Die Anzahl an DNA-Strangbrüchen wurde mittels Alkalischer Entwindung quantifiziert. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (in Dreifachbestimmung) + SD. Statistisch signifikant verschieden von der Kontrolle: $p^{**} < 0,01$, $p^{***} < 0,001$ (ANOVA, Dunnett T).

Überraschenderweise erhöhte eine 24-stündige Vorinkubation mit ZnSO₄ das Ausmaß an H₂O₂-generierten DNA-Strangbrüchen nur noch bei der höchsten, zytotoxischen Konzentration von 125 µM (1,6 DNA-Strangbrüche/10⁶ Bp) im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit 10 µM H₂O₂ (0,87 DNA-Strangbrüche/10⁶ Bp), was möglicherweise darauf hindeutet, dass es in Folge der längerfristigen Vorinkubationsphase zur Pufferung der eingeströmten Zn²⁺-Ionen kommt, was zur Aufrechterhaltung der zellulären Zinkhomöostase beiträgt (Abbildung 4.4).

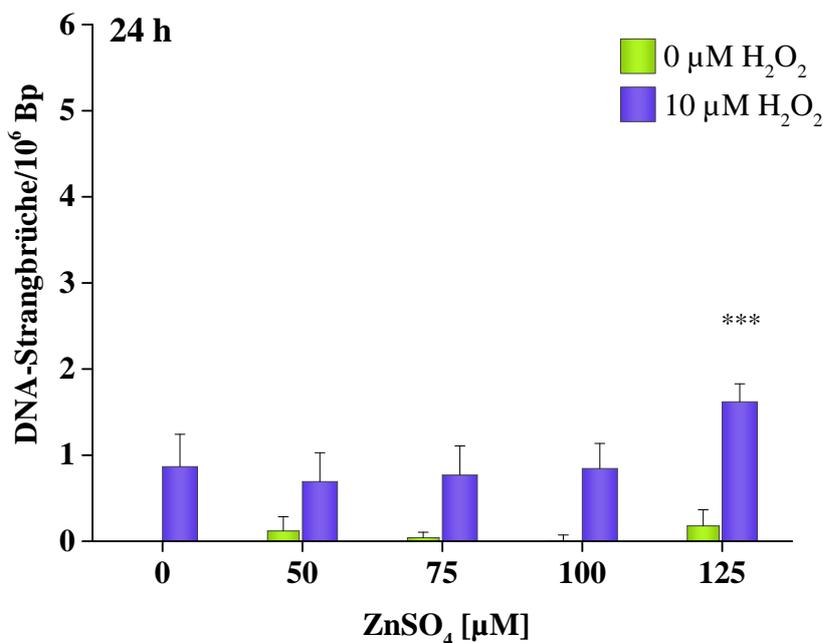


Abbildung 4.4: Einfluss einer 24-stündigen Vorinkubation mit ZnSO₄ auf H₂O₂-generierte DNA-Strangbrüche in IPEC-J2-Zellen. IPEC-J2-Zellen wurden 24 h mit ZnSO₄ vorinkubiert und anschließend für 5 min mit 10 µM H₂O₂ koinkubiert. Die Anzahl an DNA-Strangbrüchen wurde mittels Alkalischer Entwindung quantifiziert. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (in Dreifachbestimmung) + SD. Statistisch signifikant verschieden von der Kontrolle: p*** < 0,001 (ANOVA, Dunnett T).

In der Literatur wird sehr häufig die vermehrte Induktion von DNA-Strangbrüchen in Zink-depletierten Zellen anstatt in Zink-supplementierten Zellen diskutiert (Sharif et al., 2011a,b; Ho und Ames, 2002). Sharif et al. (2011a,b) wiesen eine gesteigerte Bildung von DNA-Strangbrüchen in Zink-depletierten Zellen mittels Comet-Assay verbunden mit einer verminderten Zellviabilität nach. Eine Veröffentlichung zur Koinkubation mit H₂O₂ liegt bereits in der humanen Blutzelllinie HL-60 vor (Elgohary et al., 1998). Im Unterschied zu den hier gezeigten Ergebnissen wurden die DNA-Strangbrüche nicht in Abhängigkeit der Zinkkonzentration, sondern der H₂O₂-Konzentration ermittelt. Die Resultate stimmen insoweit mit unseren überein, dass eine 24-stündige Vorinkubation mit 100 µM ZnCl₂ in Kombination mit 25 µM H₂O₂ keinen statistisch signifikanten Anstieg an H₂O₂-generierten DNA-Strangbrüchen zur Folge hatte. Im Unterschied zu unseren Untersuchungen betrug die Zeit der Koinkubation mit H₂O₂ allerdings 30 min.

Die beobachtete verstärkte Induktion H₂O₂-induzierter DNA-Strangbrüche könnte mechanistisch zum einen auf eine verminderte Aktivität H₂O₂-detoxifizierender Enzyme in Gegenwart von Zinkionen oder auf andere Faktoren, die indirekt an der Detoxifizierung beteiligt sind, zurückzuführen sein. Da bereits während der fünfminütigen Inkubation mit H₂O₂ die SSBR eingeleitet wurde, könnten auch Interferenzen mit Prozessen der DNA-Reparatur, insbesondere der SSBR, zur Anhäufung von DNA-Schäden geführt haben.

4.2.2 Einfluss von Zink auf die Aktivität H₂O₂-detoxifizierender Enzyme

Die unter Abschnitt 4.2.1 synergistische Zunahme an H₂O₂-generierten DNA-Strangbrüchen nach einstündiger Vorbehandlung mit ZnSO₄ in IPEC-J2-Zellen könnte mechanistisch auf eine Inhibierung von H₂O₂-detoxifizierender Enzyme zurückzuführen sein. Um diesen Einfluss analysieren zu können, wurde die Aktivität der Enzyme CAT, GPx und GR mit und ohne Zinkbehandlung bestimmt. Insbesondere die GPx und die CAT sind vorwiegend für die Detoxifizierung von H₂O₂ verantwortlich. Die GR wirkt indirekt bei der Detoxifizierung von H₂O₂ mit, da das Enzym zur Aufrechterhaltung des reduzierten GSH-Gehalts dient (zusammengefasst in Arteel und Sies, 2001).

IPEC-J2-Zellen wurden zunächst hinsichtlich ihrer basalen Enzymaktivitäten charakterisiert, die in Tabelle 4.1 dargestellt sind.

Tabelle 4.1: Grundaktivitäten der Enzyme in IPEC-J2-Zellen

Enzym	Aktivität ± SD (nmol/min/10 ⁶ Zellen)
Katalase	622,0 ± 77,0
Glutathionreduktase	3,9 ± 0,3
Glutathionperoxidase	(7,6 ± 1,2)·10 ⁻²

Im Anschluss wurde der Einfluss von ZnSO₄ auf die Aktivität der drei Enzyme analysiert. Im Falle einer kurzzeitigen Inkubation mit ZnSO₄ zeigte sich ein negativ modulierender Effekt des Zinks auf die zelluläre Enzymaktivität der GR beginnend ab einer Konzentration von 150 µM. Wir beobachteten hingegen keine Veränderung der zellulären CAT-Aktivität oder GPx-Aktivität nach Zink-Inkubation (Abbildung 4.5).

In Analogie zu diesen Ergebnissen ermittelten Bishop et al. (2007) eine Hemmung der GR in primären Astrozyten, beginnend ab 100 µM Zinkacetat nach 4 h; allerdings wurden keine Untersuchungen zur Aufnahme von Zinkacetat in den Zellen durchgeführt. Ein besonderes Interesse galt einer Studie, die ebenfalls in einer intestinalen Zelllinie, den CaCo-2-Zellen, durchgeführt wurde. Die CaCo-2-Zellen wurden im undifferenzierten und differenzierten Zustand für 24 h mit Zink inkubiert und im Anschluss die CAT- und GPx-Aktivität bestimmt. Sowohl in undifferenzierten als auch differenzierten Zellen wurde ein leicht stimulierender Effekt auf die Aktivität der GPx nachgewiesen, der allerdings nicht signifikant war. Der gleiche Effekt wurde für die CAT-Aktivität in differenzierten Zellen detektiert, in undifferenzierten Zellen zeigte sich vielmehr eine leichte Inhibierung (Zödl et al., 2003). Die differierenden Ergebnisse aus der Literatur und der beobachteten Effekte in IPEC-J2-Zellen können auf verschiedene Inkubationszeiten zurückzuführen sein, weshalb möglicherweise Unterschiede im Verhältnis von „freien“ und gebundenen Zinkionen entstehen.

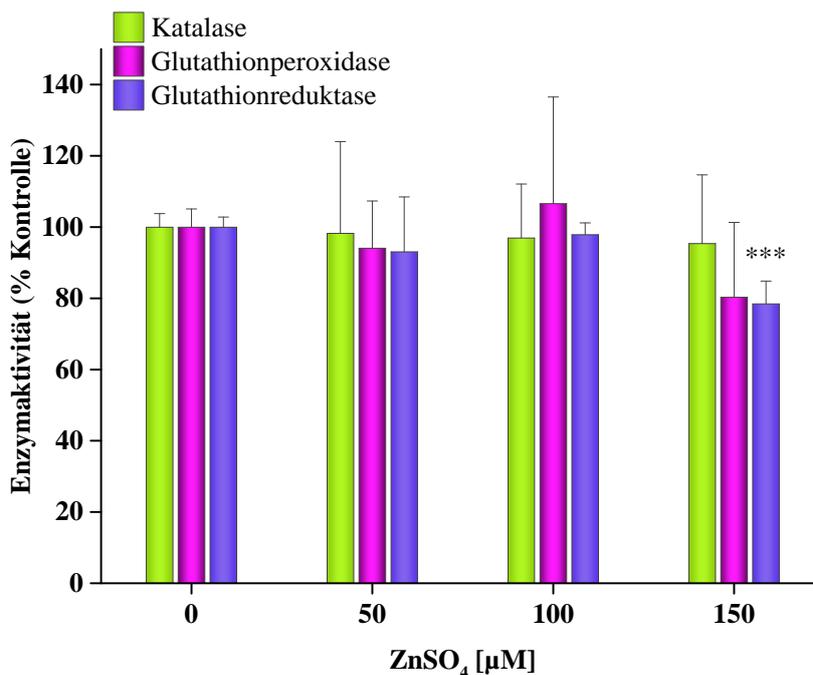


Abbildung 4.5: Einfluss von ZnSO₄ auf die CAT-, GPx- und GR-Aktivität in IPEC-J2-Zellen. IPEC-J2-Zellen wurden 1 h mit ZnSO₄ vorinkubiert und anschließend die Aktivität des jeweiligen Enzyms bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (in Zweifachbestimmung) + SD. Statistisch signifikant verschieden von der Kontrolle: p*** < 0,001 (ANOVA, Dunnett T3).

Im Hinblick auf einen direkten inhibitorischen Effekt von Zinkionen auf die GPx und GR wurde in der Literatur eine verminderte Aktivität der isolierten Enzyme in Anwesenheit von Zink im mikromolaren Konzentrationsbereich gezeigt (Mize und Langdon, 1962; Splittgerber und Tappel, 1979; Maret et al., 1999). Allerdings lagen die Zinkkonzentrationen, die zur Hemmung eingesetzt wurden, damit drei Größenordnungen höher als die in der Zelle normalerweise „frei“ vorkommenden Zinkionen (Krezel und Maret, 2006). Im Zusammenhang mit den für die IPEC-J2-Zellen erhaltenen Ergebnisse unserer Arbeit, sprechen diese Resultate dafür, dass die durch Zink vermittelten Effekte der GR-Hemmung zellulär vielmehr einem indirekten Mechanismus zugeschrieben werden müssten.

Die bisher gezeigten Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass die Beeinflussung H₂O₂-detoxifizierender Enzyme wie GPx oder CAT nicht primär für den Anstieg an H₂O₂-generierten DNA-Strangbrüchen verantwortlich sein kann. Interessanterweise wurde im Zusammenhang mit einer verminderten zellulären GR-Aktivität nach Zinkinkubation, die auch in unseren Versuchen in IPEC-J2-Zellen auftrat (Abbildung 4.5), eine Depletion des zellulären GSH-Pools beobachtet (May und Contoreggi, 1982). Im Hinblick auf die immense Bedeutung des thiolhaltigen Tripeptids für die Detoxifizierung von reaktiven Sauerstoffverbindungen und H₂O₂ wurde daher nachfolgend überprüft, ob eine GSH-Depletion in IPEC-J2-Zellen durch Zink-Inkubation herbeigeführt werden kann (Abschnitt 4.2.3).

4.2.3 Quantifizierung des zellulären Gesamtglutathiongehalts

Zur Quantifizierung des Gesamtglutathiongehalts wurde der von Tietze (1969) publizierte „Recycling Assay“ herangezogen, der auf der photometrischen Messung der gelb gefärbten 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure (TNB) bei 412 nm beruht, die bei der Reduktion des 5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure (DTNB, „Ellman's Reagenz“) durch GSH entsteht. Intrazellulär liegen über 99% des Gesamtglutathions in der reduzierten Form (GSH) vor. GSH liefert 90% der zellulären nicht-proteinhaltigen Thiolgruppen und ist damit entscheidend an der antioxidativen Abwehr beteiligt (zusammengefasst in Meister und Anderson, 1983; Meister, 1988).

Der „Recycling Assay“ nach Tietze (1969) ermöglichte die Quantifizierung des Gesamtglutathions in IPEC-J2-Zellen, der in unbehandelten Zellen bei 1,1 mM lag. Damit liegt der Basalgehalt in IPEC-J2-Zellen im unteren Bereich im Vergleich zu den in der Literatur veröffentlichten Werten der intrazellulären GSH-Konzentration, die im Bereich zwischen 0,5-10 mM gemessen wurden (zusammengefasst in Meister, 1988). Die in Abbildung 4.6 dargestellten Daten zeigen, dass eine einstündige Behandlung der IPEC-J2-Zellen den Gesamtglutathiongehalt nicht beeinflusste. Wurden die Zellen hingegen 24 h vorinkubiert, war ein signifikanter Anstieg, beginnend ab 75 μM ZnSO_4 , zu verzeichnen, der bei der höchsten Konzentration von 125 μM um ca. das Vierfache im Vergleich zur Kontrolle anstieg.

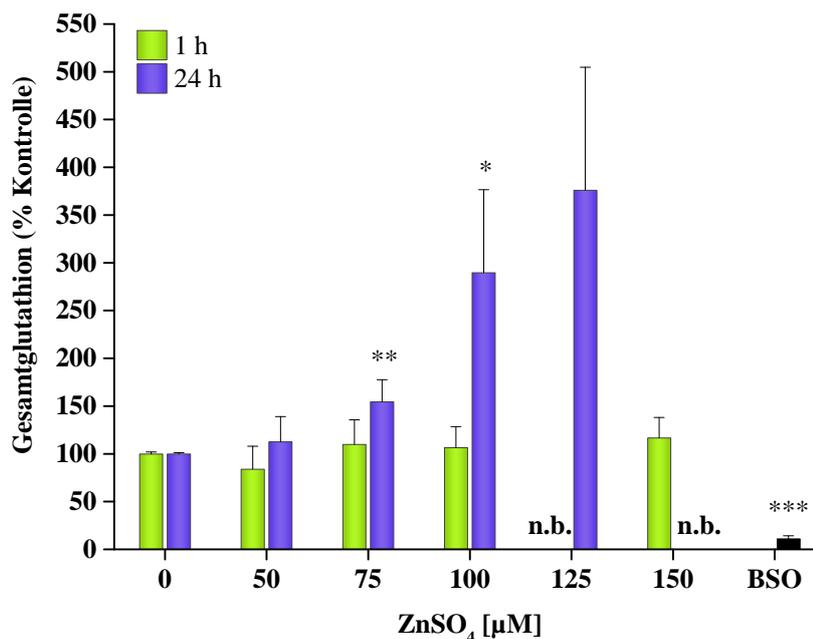


Abbildung 4.6: Einfluss von ZnSO_4 auf den Gehalt an Gesamtglutathion in IPEC-J2-Zellen nach 1 h und 24 h. IPEC-J2-Zellen wurden 1 h bzw. 24 h mit ZnSO_4 vorinkubiert. Als Positivkontrolle wurde BSO zur gezielten GSH-Depletion mitgeführt. Das Gesamtglutathion wurde mittels „Recycling Assay“ erfasst. Gezeigt sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Statistisch signifikant verschieden von der Kontrolle: $p^* < 0,05$, $p^{**} < 0,01$, $p^{***} < 0,001$ (ANOVA, Dunnett T3). n.b. = nicht bestimmt.

Ergebnisse aus der Literatur beziehen sich vorwiegend auf einen veränderten GSH-Status in Zellen, die unter Zinkmangel kultiviert wurden (Ho und Ames, 2002; Ho et al., 2003; Sharif et al., 2011a,b). Studien zum GSH-Status in Gegenwart von Zink hingegen wurden vorwiegend in Zellen des Nervensystems durchgeführt. Bishop et al. (2007) ermittelten in primären Astrozyten ebenfalls einen Anstieg des Gesamtglutathi-

ons. Allerdings untersuchten die Autoren frühere Zeitpunkte und konnten nur einen leicht signifikanten Anstieg nach 8 h ab 100 μM Zinkacetat auf 125% im Vergleich zur Kontrolle detektieren. Pavlica et al. (2009) beobachteten bei zweistündiger Inkubation mit 100 μM ZnSO_4 eine Depletion des Gesamtglutathiongehalts in neuronalen PC-12 Zellen auf 40% im Vergleich zur Kontrolle.

Diese von Pavlica et al. (2009) gezeigte GSH-Depletion bietet einen interessanten und möglichen Erklärungsansatz für den in IPEC-J2-Zellen beobachteten Effekt des erhöhten Gesamtglutathiongehalts nach 24-stündiger Inkubation. Denkbar wäre demnach eine zeitabhängige GSH-Depletion durch Zink, gefolgt von der Überkompensation durch Neusynthese des Tripeptids, was in der Zunahme des Gesamtglutathions nach 24 h in IPEC-J2-Zellen resultiert. GSH-Depletion kann das Resultat der Oxidation von GSH zu GSSG sein, das aus der Zelle transportiert wird (Hirrlinger et al., 2001), wenn es nicht durch die GR wieder reduziert wird. In der Literatur ist beschrieben, dass Zink das Ausmaß an ROS erhöhte (Bishop et al., 2007; Noh und Koh, 2000). Demnach wäre auch die Oxidation von GSH und damit verbunden eine GSH-Depletion denkbar. Die Zunahme an Gesamtglutathion nach 24 h ließe sich auch auf molekularer Ebene durch induzierende Effekte der Transkription erklären. Zink vermittelt die Aktivierung des MTF-1, der wiederum an die MRE-Region im Promoter der schweren Kette des γ -GCL-Gens bindet (Günes et al., 1998). Die γ -GCL katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der GSH-Biosynthese (zusammengefasst in Lu, 2009). Letzteres scheint die vorherrschende Ursache zu sein, da die Zink-induzierte Zunahme der relativen Genexpression von MT nach 24 h, dessen Aktivierung ebenfalls über MTF-1 vermittelt wird (Heuchel et al., 1994), im gleichen Konzentrationsbereich von 75-125 μM ZnSO_4 gesteigert wurde (Vgl. Abschnitt 4.5.2).

4.3 Einfluss von Zink auf die Prozesse der DNA-Einzelstrangbruchreparatur

Aus den bisher gezeigten Resultaten ließ sich schlussfolgern, dass die in Gegenwart von Zink beobachtete Erhöhung der H_2O_2 -induzierten DNA-Strangbrüche nach einstündiger Inkubation nicht unmittelbar auf hemmende Effekte der Detoxifizierung von H_2O_2 zurückzuführen sind. Folgend sollte daher überprüft werden, inwiefern sich modulierende Effekte auf Prozesse der DNA-Reparatur, insbesondere auf die der SSBR, ergeben. Des Weiteren sollten Untersuchungen klären, ob Zink in die initiale Phase der SSBR eingreift.

4.3.1 Reparatur von H_2O_2 -generierten DNA-Strangbrüchen

Um die Kinetik der Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen in IPEC-J2-Zellen zu verfolgen, wurden die Zellen mit 150 μM ZnSO_4 für 1 h vorbehandelt und 5 min mit H_2O_2 inkubiert. Die Reparatur der H_2O_2 -generierten DNA-Strangbrüchen wurde in An- bzw. Abwesenheit von ZnSO_4 über 30 min verfolgt und die verbleibenden DNA-Strangbrüche mit der Methode der Alkalischen Entwindung quantifiziert (Hartwig et al., 1993).

Der Einfluss von Zink auf die Reparatur von H_2O_2 -generierten DNA-Strangbrüchen in intestinalen Zellen wurden unseres Wissens hier das erste Mal demonstriert. Wie aus der Abbildung 4.7 zu entnehmen ist, wurden in Abwesenheit von ZnSO_4 bereits 50% der Initialschäden innerhalb der ersten 10 min beseitigt. In Gegenwart von ZnSO_4 wurden noch 70% der DNA-Schäden detektiert, was darauf hindeutet, dass möglicherweise initiale Prozesse der Reparatur in Gegenwart von Zink beeinflusst werden. Während die

H_2O_2 -generierten DNA-Strangbrüche sich in Abwesenheit von ZnSO_4 nach 30 min zu ca. 80% repariert hatten, wurden in ZnSO_4 -behandelten Zellen nur 60% repariert, was auf eine Interferenz mit prozessierenden Proteinen der SSBR zurückzuführen sein könnte.

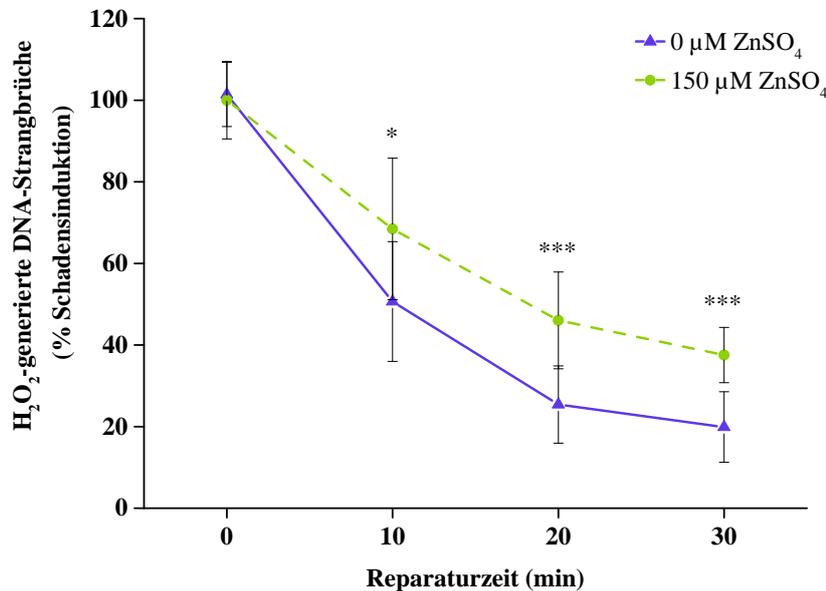


Abbildung 4.7: Einfluss von ZnSO_4 auf die Reparatur von H_2O_2 -generierten DNA-Strangbrüchen in IPEC-J2-Zellen. IPEC-J2-Zellen wurden für 1 h mit $150 \mu\text{M ZnSO}_4$ vorinkubiert. Die Schadensinduktion erfolgte für 5 min mit $15 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$. Die Reparatur fand in An- bzw. Abwesenheit von ZnSO_4 für den angegebenen Zeitraum statt. Die verbleibende Anzahl an DNA-Strangbrüchen wurde mittels Alkalischer Entwindung quantifiziert. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (in Dreifachbestimmung) \pm SD. Statistisch signifikant verschieden zur Reparatur ohne ZnSO_4 -Behandlung: $p^* < 0,05$, $p^{***} < 0,001$ (ANOVA, Student-t-Test).

In der Literatur sind bisher nur wenige Untersuchungen zu modulierenden Effekten von Zink auf die SSBR beschrieben. In HeLa-S3-Zellen, die allerdings keine Intestinalzellen darstellen, ist die hemmende Wirkung von Zink auf die Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen demonstriert worden (Snyder et al., 1989). Allerdings wurden die DNA-Einzelstrangbrüche mittels ionisierender Strahlung induziert, wobei die dadurch generierten $\cdot\text{OH}$ -Radikale über das sogenannte Clustering auch zur Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen in der Lage sind (zusammengefasst in Friedberg et al., 2005). Li et al. (2009) wiesen mittels Comet-Assay eine verlangsamte Reparatur von H_2O_2 -induzierten DNA-Strangbrüchen in Zink-behandelten primären neuronalen Kulturen aus dem embryonalen Gehirn nach. Die lange Reparaturzeit von bis zu 4 h deutet darauf hin, dass vorrangig modulierende Effekte auf die BER verfolgt wurden. Die von Sliwinski et al. (2009) publizierten Daten stimmen mit unseren insoweit überein, dass eine einstündige Vorinkubation mit Zink das Ausmaß an H_2O_2 -generierten DNA-Strangbrüchen signifikant erhöhte, was vermutlich ebenso auf eine Zink-vermittelte Hemmung der Reparatur von H_2O_2 -generierten DNA-Strangbrüchen zurückzuführen ist. Im Unterschied zu unseren Untersuchungen, die in einer nicht-transformierten Zelllinie durchgeführt wurden, beobachteten die Autoren diesen Effekt von Zink nur in Karzinomzellen, jedoch nicht in einer normalen Zelllinie.

4.3.2 Einfluss von Zink auf die Poly(ADP-Ribosyl)ierung

Für die Koordination und den Ablauf der initialen Schritte der SSBR ist die PARsylierung von entscheidender Bedeutung. Diese posttranslationale proteinmodifizierende Reaktion wird in Zellen vorrangig von dem Enzym PARP-1 katalysiert. Die N-terminale Domäne der PARP-1 ist durch drei ZF-Motive charakterisiert, in denen Zink als strukturgebende Komponente fungiert und die Voraussetzung für die Bindung an DNA-Einzelstrangbrüche sowie an DNA-Doppelstrangbrüche schafft (Ikejima et al., 1990; Langelier et al., 2008). Daraus resultiert die Aktivierung der PARP-1. Fraglich ist bisher, ob im Falle eines Zinküberschusses das Verhältnis von Zinkionen und PARP-1 überschritten wird und daraus unspezifische Wechselwirkungen resultieren, die mit dem Funktionsverlust der PARP-1 einhergehen.

Die unter Abschnitt 4.3.1 beschriebene Hemmung der SSBR könnte auf die Inhibierung der PARsylierung zurückzuführen sein. Untersuchungen zum Einfluss von Zink auf die PARsylierung in Kernextrakten, der isolierten PARP-1 sowie im intakten Zellsystem sollten Aufschluss über den zugrundeliegenden Mechanismus der beobachteten Hemmung der Reparatur von H₂O₂-induzierten DNA-Einzelstrangbrüchen geben.

4.3.2.1 Einfluss von Zink auf die Poly(ADP-Ribosyl)ierung in Kernextrakten

Es gibt Hinweise aus der Literatur, dass Zink isolierte DNA-Reparaturproteine und teilweise die Aktivität dieser Proteine in Zellextrakten hemmt (Larsen et al., 1982; Zharkov und Rosenquist, 2002; Wang et al., 2006). Jedoch sind derzeit noch keinerlei Ergebnisse zu modulierenden Effekten von Zink auf die PARsylierung in Kernextrakten aus Intestinalzellen beschrieben. Um diesbezüglich Untersuchungen durchführen zu können, war es zunächst nötig, die PARsylierungsaktivität und die Kinetik des PAR-Metabolismus in Kernextrakten aus IPEC-J2-Zellen zu bestimmen.

Dafür wurden Kernextrakte aus IPEC-J2-Zellen isoliert und anschließend mit sonifizierter Lachsspermien-DNA und ³²P-markiertem NAD⁺ inkubiert. Danach wurde die Menge an eingebauter ³²P-ADP-Ribose bestimmt und anschließend mit der Aktivität aus HeLa-S3-Kernextrakten verglichen. Die hier erstmals dargestellte Kinetik der PARsylierung in Kernextrakten, isoliert aus IPEC-J2-Zellen, zeigt, dass im Vergleich zu Kernextrakten aus HeLa-S3-Zellen die ³²P-ADP-Ribose-Einbauraten niedriger sind (Vgl. Abbildung 4.8A und 4.8B).

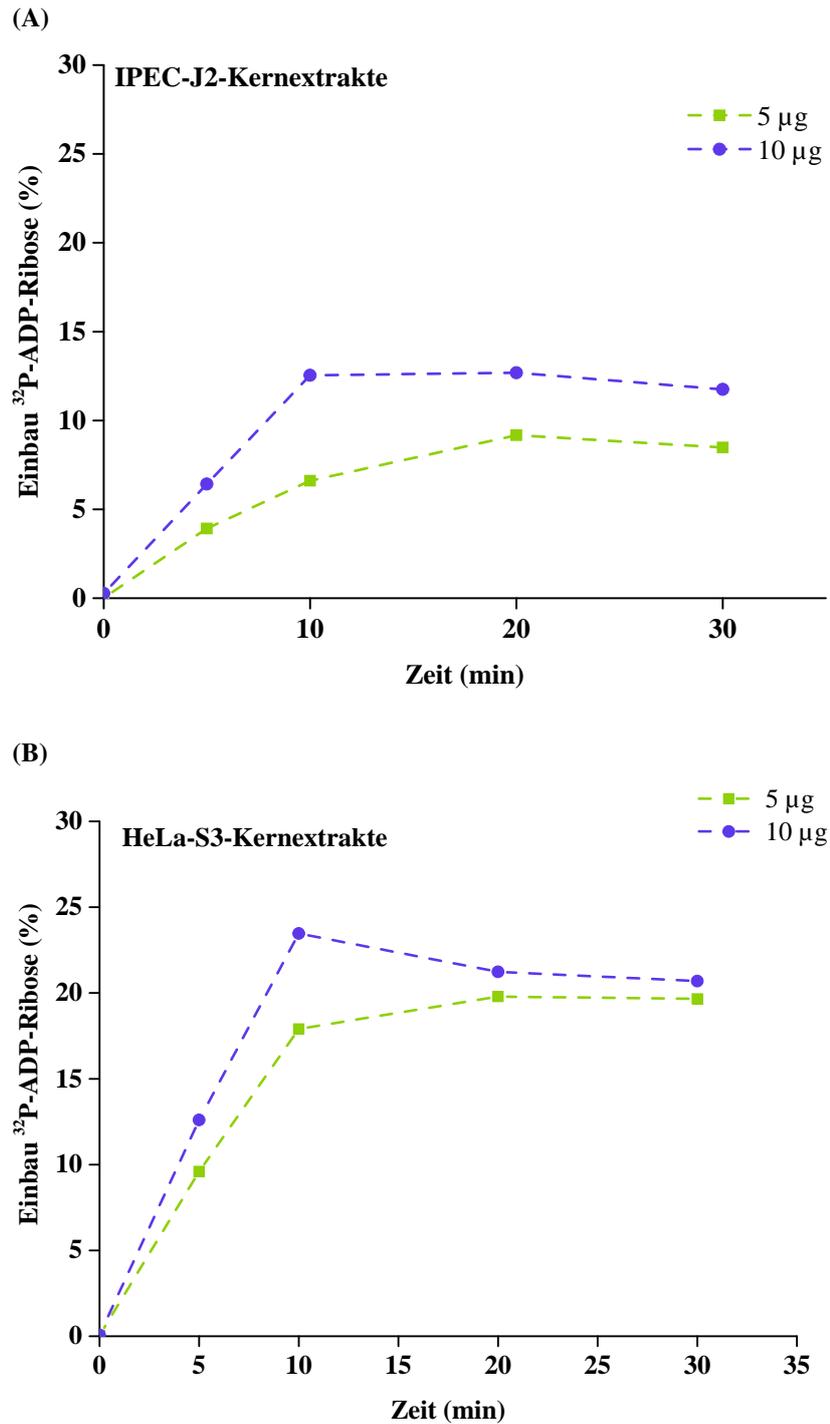


Abbildung 4.8: Einbau von ^{32}P -ADP-Ribose in (A) IPEC-J2- und (B) HeLa-S3-Kernextrakten. 5 µg HeLa-S3-Kernextrakt bzw. 10 µg IPEC-J2-Kernextrakt wurden mit 10 µg/µL sonifizierter DNA und 10 µM [α - ^{32}P]-NAD⁺ inkubiert. Die Reaktion wurde durch TCA-Fällung abgestoppt und die Menge an eingebauter ^{32}P -ADP-Ribose mittels Cerenkov-Zählung bestimmt.

Ein möglicher Erklärungsansatz für die Unterschiede in der Effizienz der PARsylierung könnte auf einen verminderten PARP1-Proteingehalt in den Kernextrakten aus IPEC-J2-Zellen zurückzuführen sein. Diese These wird von D'Amours et al. (1999) unterstützt, die auf Schwankungen zwischen $0,2-2 \cdot 10^6$ Molekülen der Polymerase pro Zelle in unterschiedlichen Zelltypen hinweisen. Von Ludwig et al. (1988) publizierte Experimente, in denen eine vergleichende Immunquantifizierung der PARP-1 in unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt wurde, weisen ebenso auf deutlich höhere PARP-1 Gehalte in humanen Zelllinien hin.

Ebenso vorstellbar wäre, dass die Synthese von PAR durch die humane PARP-1 deutlich effizienter und schneller erfolgt. Hierfür liegen noch keine Daten zu gereinigter PARP-1, isoliert aus Darmgeweben oder intestinalen Zellen des Schweines, vor. Allerdings kann aus den Daten von Holtlund et al. (1981) vermutet werden, dass die aus HeLa-S3-Zellen isolierte Polymerase gegenüber der isolierten Polymerase aus Gewebeproben des Schweines über eine ca. 1,5-fach höhere Affinität für das Substrat NAD^+ aufweist. Inwiefern sich daraus Unterschiede in der katalytischen Effizienz ergeben, muss zukünftig abgeklärt werden. Des Weiteren wäre ein beschleunigter Abbau der PAR-Polymere durch die PARG im Zuge des PAR-Katabolismus in den Kernextrakten der IPEC-J2-Zellen denkbar.

Zudem weisen zahlreiche vorangegangene Studien darauf hin, dass die Synthese von PAR sowohl in Zellen als auch in Zellextrakten, abhängig von der Wechselwirkung der PARP-1 mit Interaktionspartnern maßgeblich sowohl positiv (Stimulation) als auch negativ (Hemmung) beeinflusst werden kann. Die verminderte PARsylierungsaktivität in IPEC-J2-Kernextrakten könnte demzufolge auch auf das Fehlen von PARP-1 stimulierenden Faktoren, wie dem DNA-Reparaturprotein OGG1 (Hooten et al., 2011), Histone (Naegli und Althaus, 1991; Kun et al., 2004) sowie den Transkriptionsfaktoren YY1 und p53 (Oei et al., 1998; Mendoza-Alvarez und Alvarez-Gonzalez, 2001), zurückgeführt werden. Zudem könnte auch die vermehrte Anwesenheit von inhibitorischen Proteinen, wie DNA-PK $_c$ (Ariumi et al., 1999; Ruscetti et al., 1998), APE1 (Cistulli et al., 2004; Peddi et al., 2006) oder XRCC1 (Masson et al., 1998), die Ursache sein.

Nach der Charakterisierung der IPEC-J2-Kernextrakte bezüglich ihrer PARsylierungsaktivität sollte der Effekt von Zink untersucht werden. Dafür wurden zunächst die bei der Reaktion gebildeten PAR-Polymere auf einem Gel separiert und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Visualisierung der Zink-vermittelten Wirkung in IPEC-J2-Zellextrakten ist in Abbildung 4.9 dargestellt und verdeutlicht den inhibitorischen Einfluss von Zink mit steigender Konzentration. Zudem ist deutlich zu erkennen, dass die höchste eingesetzte Konzentration von $200 \mu\text{M}$ ZnSO_4 die PARsylierung in Kernextrakten aus IPEC-J2-Zellen vergleichsweise stark hemmte wie die typischen PARP-1-Inhibitoren 3-Aminobenzamid (3-AB) und 8-Hydroxy-2-methylquinazoline-4-one (NU 1025). Daran anschließend wurde eine Quantifizierung des inhibitorischen Effektes von Zink sowohl in Kernextrakten aus IPEC-J2-Zellen als auch aus HeLa-S3-Zellen vorgenommen und miteinander verglichen. In Kernextrakten, die aus beiden Zelllinien isoliert wurden, inhibierte Zink die PARsylierung konzentrationsabhängig. Allerdings war die inhibierende Wirkung in Kernextrakten aus HeLa-S3-Zellen stärker ausgeprägt. In HeLa-S3-Kernextrakten war bereits ab $100 \mu\text{M}$ ZnSO_4 eine Hemmung von 30% zu verzeichnen, die in IPEC-J2-Kernextrakten erst bei einer Konzentration von $150 \mu\text{M}$ auftrat. In Kernextrakten aus beiden Zelllinien wurde bei der höchsten Konzentration von $200 \mu\text{M}$ eine fast vollständige Hemmung beobachtet. Die verbliebene Aktivität bei dieser Konzentration betrug 1% (HeLa-S3-Kernextrakt) bzw. 10% (IPEC-J2-Kernextrakt) (Abbildung 4.10).

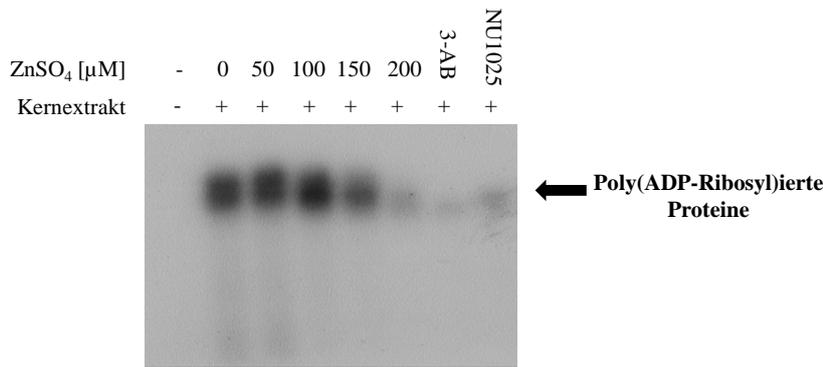


Abbildung 4.9: Visualisierung der inhibierenden Wirkung von Zink auf die PARsylierung in IPEC-J2-Kernextrakten. 10 μg IPEC-J2-Kernextrakt wurde für 30 min auf Eis mit ZnSO₄ oder den klassischen PARP-Inhibitoren 3-AB (50 μM) bzw. NU 1025 (0,5 μM) vorinkubiert und die PARsylierung gestartet. Nach dem Abstoppen der Reaktion und Denaturierung der gebildeten poly(ADP-ribosyl)ierten Proteine wurden diese auf einem Gel separiert und mittels Autoradiographie visualisiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Gel.

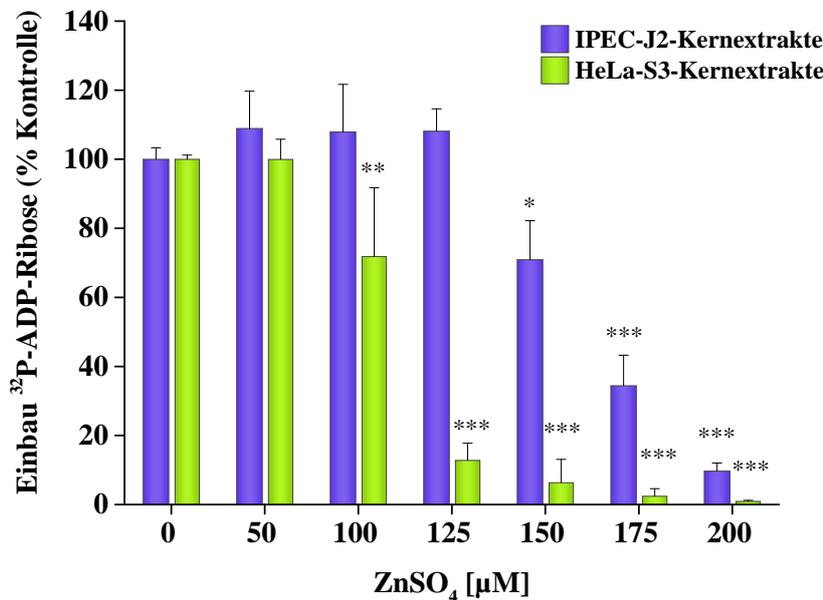


Abbildung 4.10: Einfluss von ZnSO₄ auf die PARsylierung in Kernextrakten. 5 μg HeLa-S3-Kernextrakt bzw. 10 μg IPEC-J2-Kernextrakt wurde für 30 min auf Eis mit ZnSO₄ vorinkubiert und die PARsylierung durch Zugabe von 10 μg/μL sonifizierter DNA gestartet. Im Falle des HeLa-S3-Kernextrakts verlief die Reaktion in Anwesenheit von ZnSO₄ und 10 μM [α-³²P]-NAD⁺ für 10 min bei 30°C. Die Reaktion verlief für den IPEC-J2-Kernextrakt analog, allerdings betrug die Reaktionszeit 20 min. Die Reaktion wurde durch TCA-Fällung abgestoppt und die Menge an eingebauter ³²P-ADP-Ribose mittels Cerenkov-Zählung bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen (in Dreifachbestimmung) + SD. Statistisch signifikant verschieden von der Kontrolle: p* < 0,05; p** < 0,01; p*** < 0,001 (ANOVA, Dunnett T3).

Ähnliche Ergebnisse lieferten Larsen et al. (1982), indem sie den Einfluss von $ZnCl_2$ auf die PARsylierung in Kernextrakten aus HeLa-S3-Zellen durch den Einbau von $[U-^{14}C]$ -markiertem NAD^+ untersuchten. Im Vergleich zu unseren Ergebnissen war bereits eine signifikante Hemmung durch $ZnCl_2$ ab einer Konzentration von $50 \mu M$ in Kernextrakten zu verzeichnen, die möglicherweise auf das Fehlen von Chelatoren während der Kernextraktpräparation zurückzuführen sein könnten (Whitlock und Simpson, 1976).

4.3.2.2 Einfluss von Ca^{2+} , Mg^{2+} und Thiolreagenzien auf die Poly(ADP-Ribosyl)ierung in Kernextrakten

Weiterführende Untersuchungen sollten den Mechanismus der Zink-vermittelten Inhibierung der PARsylierung aufklären. Dafür wurden Protektionsversuche durchgeführt. Diese zeigten, dass Thiolreagenzien, wie GSH und N-Acetylcystein (NAC), eine protektive Wirkung auf die Zink-induzierte Hemmung der PARsylierung ausübten. Diese schützende Wirkung war im Falle des GSH stärker ausgeprägt im Gegensatz zu NAC (Abbildung 4.11). Die biologische Relevanz des GSH ist zudem größer als die des synthetisch hergestellten NAC, da es in der Zelle im millimolaren Bereich vorliegt und Teil der antioxidativen Abwehr ist (zusammengefasst in Meister und Anderson, 1983).

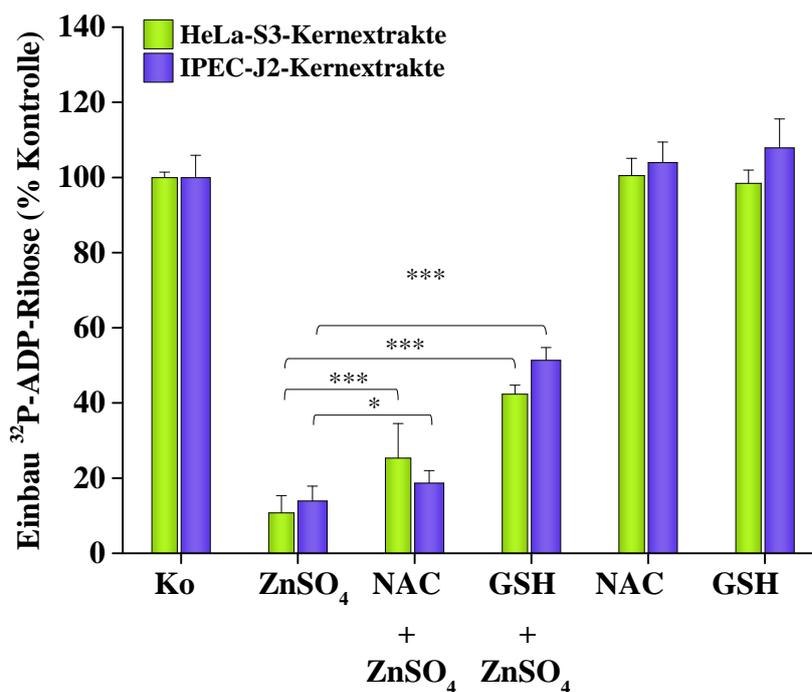


Abbildung 4.11: Protektion vor der Zink-vermittelten Inhibierung der PARsylierung in Kernextrakten durch Thiolreagenzien. $5 \mu g$ der HeLa-S3-Kernextrakte wurden mit $125 \mu M$ GSH oder NAC für 15 min auf Eis vorinkubiert. Nach der Zugabe von $125 \mu M$ $ZnSO_4$ wurden die Kernextrakte für weitere 15 min auf Eis inkubiert. Die PARsylierung wurde durch Zugabe von $10 \mu g/\mu L$ sonifizierter DNA gestartet und mit $10 \mu M$ $[\alpha-^{32}P]$ - NAD^+ für 10 min bei $30^\circ C$ inkubiert. Die Reaktion wurde durch TCA-Fällung abgestoppt und die Menge an eingebauter ^{32}P -ADP-Ribose mittels Cerenkov-Zählung bestimmt. Im Falle der IPEC-J2-Kernextrakte wurde der Versuchsansatz wie zuvor beschrieben durchgeführt, allerdings betrug die Menge an Kernextrakt $10 \mu g$ und die Inkubationen erfolgten mit $200 \mu M$ GSH oder NAC und $ZnSO_4$. Die Zeit der Hauptreaktion betrug 20 min. Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen (in Dreifachbestimmung) + SD. Statistisch signifikant verschieden von der Zink-vermittelten Inhibierung: $p^* < 0,05$; $p^{***} < 0,001$ (ANOVA, Dunnett T).

Wurden HeLa-S3-Kernextrakte mit anderen zweiwertigen Metallen (Ca^{2+} , Mg^{2+}), die eine geringere Thiolaffinität als Zink besitzen, behandelt, zeigte sich kein Einfluss auf die PARsylierung (Abbildung 4.12).

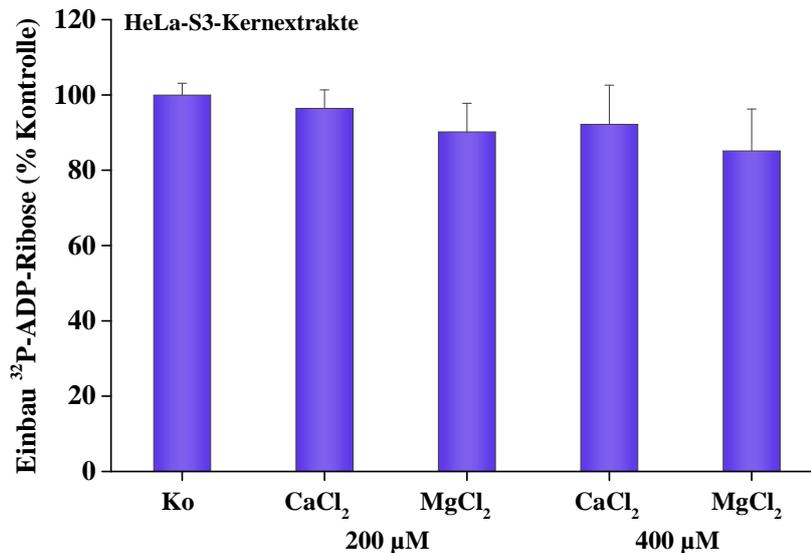


Abbildung 4.12: Einfluss anderer zweiwertiger Ionen Ca^{2+} und Mg^{2+} auf die PARsylierung in Kernextrakten. 5 µg HeLa-S3-Kernextrakt wurde mit 200-400 µM CaCl_2 oder MgCl_2 für 30 min auf Eis vorinkubiert. Die PARsylierung wurde durch Zugabe von 10 µg/µL sonifizierter DNA 10 µM [α - ^{32}P]-NAD⁺ für 10 min bei 30°C gestartet. Die Reaktion wurde durch TCA-Fällung abgestoppt und die Menge an eingebauter ^{32}P -ADP-Ribose mittels Cerenkov-Zählung bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen (in Dreifachbestimmung) + SD.

Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, dass der hohen Affinität von Zink zu Thiolgruppen eine entscheidende Bedeutung bei der Inhibierung der PARsylierung zugesprochen werden kann. Die nur partielle Protektion könnte zudem darauf hindeuten, dass kritische, innerhalb des Proteins schwer zugängliche Thiolgruppen betroffen sind. Neben der hohen Affinität zu S-Atomen in Cysteinresten weist Zink auch eine Affinität zu N-Atomen im Imidazolrings des Histidins sowie zum O-Atom der Carboxylgruppe von den Seitenketten des Glutamats oder Aspartats auf (zusammengefasst in Maret und Li, 2009). Daher könnte auch die Art und Anzahl der Aminosäurereste, an denen Zink gebunden ist, die Bindungsstärke der Zinkionen im Molekül beeinflussen und eine Erklärung für die nur partiell beobachtete Protektion der Zink-vermittelten Inhibierung liefern.

4.3.2.3 Einfluss von Zink auf die isolierte PARP-1

Um zu untersuchen, ob die beobachtete Hemmung in Kernextrakten auf eine direkte Interaktion der PARP-1 mit Zink zurückzuführen ist, wurde die Aktivität einer durch rekombinante Expression und Reinigung generierten humanen PARP-1 (Giner et al., 1992) in Gegenwart von ZnSO_4 , über die Menge an eingebauter ^{32}P -ADP-Ribose, quantifiziert.

Die Abbildung 4.13A demonstriert die bei der PARsylierung gebildeten PAR-Polymere, die auf einem Gel separiert und mittels Autoradiographie visualisiert wurden. Die von uns verwendete rekombinante humane PARP-1 generierte in Abwesenheit von ZnSO_4 langkettige, verzweigte PAR-Polymere. Dies wurde auch bei der isolierten PARP aus dem Kälberthymus beschrieben (Mendoza-Alvarez et al., 2000). In Gegenwart von ZnSO_4 bilden sich deutlich kürzere und vermutlich auch weniger stark verzweigte Ketten. Dies spricht

dafür, dass möglicherweise die Elongationsreaktion, d.h. die Verlängerung der PAR-Ketten, betroffen sein könnte, jedoch nicht die initiale Anheftung des ersten ADP-Ribose-Monomers an den Akzeptor. Die Abbildung 4.13B stellt die quantitative Auswertung dar, anhand derer gezeigt ist, dass Zink die Aktivität der isolierten PARP-1 konzentrationsabhängig zwischen 10-250 μM ZnSO_4 reduziert. Ausgehend von der Tatsache, dass im Gegensatz zu den vorher gezeigten Ergebnissen in Kernextrakten (Abschnitt 4.3.2.1) für die Untersuchungen zum direkten Einfluss der Zinkionen auf die Aktivität der isolierten PARP-1 keine weiteren protektiven oder modulierenden Proteine vorlagen, ist die Auswirkung der Inhibierung bereits ab 50 μM ZnSO_4 zu erkennen und bei 100 μM hochsignifikant.

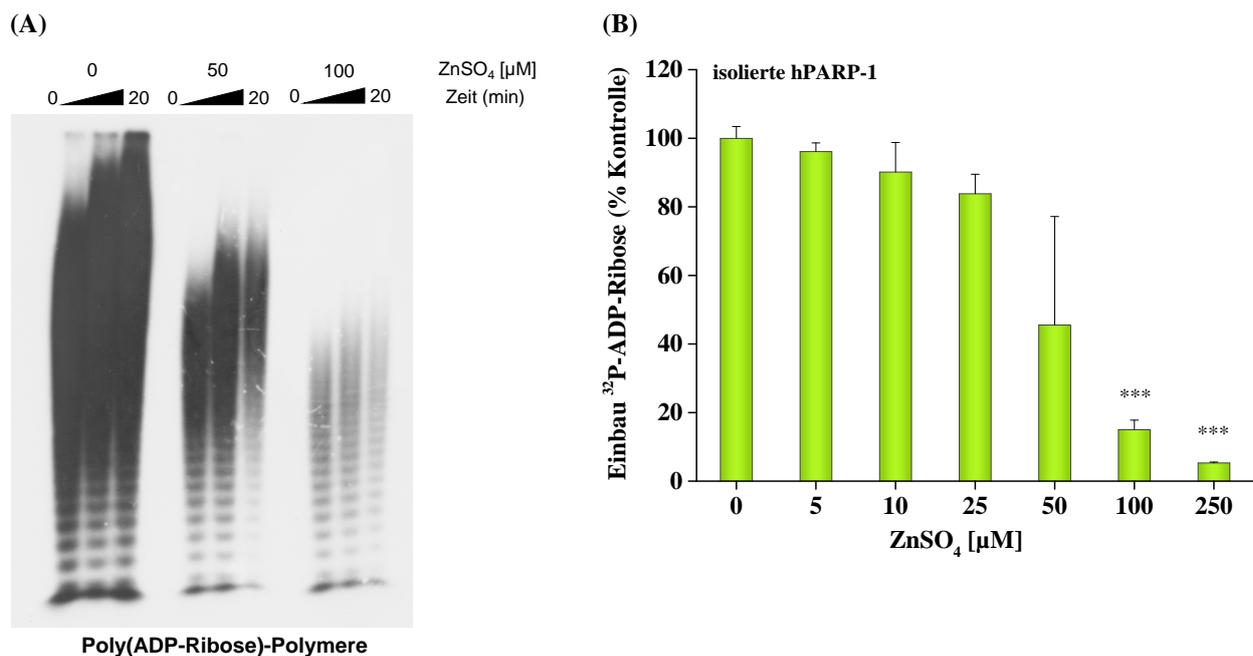


Abbildung 4.13: Einfluss von ZnSO_4 auf die isolierte humane PARP-1. (A) Die bei der unter (B) beschriebenen Reaktion gebildeten ^{32}P -ADPR-Polymere wurden vom Protein abgetrennt, auf ein Gel separiert und mittels Autoradiographie detektiert. Gezeigt ist ein repräsentatives Gel. (B) 17,7 nM der isolierten hPARP-1 wurde mit ZnSO_4 inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 4 mg/mL sonifizierter Lachsspermien-DNA und 50 μM [α - ^{32}P]-NAD $^+$ für 10 min bei 30°C gestartet. Gezeigt sind Mittelwerte aus mindestens drei Bestimmungen + SD. Statistisch signifikant verschieden von der Kontrolle: $p^{***} < 0,001$ (ANOVA, Dunnett T3).

Diese Ergebnisse stimmen mit den von Larsen et al. (1982) durchgeführten Untersuchungen an der isolierten PARP-1 überein, obwohl die Autoren bereits ab einer Konzentration von 50 μM ZnCl_2 nur noch ca. 20% Aktivität detektierten. Dieses Ergebnis könnte möglicherweise auf die Verwendung der isolierten PARP-1 aus dem Schweinethymus zurückzuführen sein.

Ein Vergleich der Primärsequenz zwischen der hPARP-1 und eine als porcine PARP-1 vorhergesagte Polymerase zeigt für das Protein des Schweines das Vorhandensein aller für den Katalysemechanismus wichtigen und erforderlichen Aminosäuren an konservierten Positionen (Rolli et al., 1997; Simonin et al., 1990, 1993; Ruf et al., 1998b,a) (Alignment siehe Anhang A.6.3). Sowohl in der hPARP-1 als auch in der PARP-1 des Schweines sind kritische Thiolgruppen außerhalb der Zinkfingerstrukturen in der Automodifikationsdomäne (375-525) sowie in der katalytischen Domäne (526-1014) anzutreffen. Vor allem Cys908, welches im

Schwein an Position 912 vertreten ist, scheint bei der hPARP-1 essentiell für die katalytische Aktivität zu sein, da die Mutagenese dieses Cysteins zu Arginin in einer vollständigen Inaktivierung der hPARP-1 resultierte (Rolli et al., 1997). Ebenso möglich ist auch die Bindung an Glu988 (entspricht Glu992 im Schwein) bzw. Glu923 (entspricht Glu927 im Schwein) und dem damit verbundenen Verlust der Elongations- bzw. der Verzweigungsreaktion (Rolli et al., 1997; Trucco et al., 1999). Zudem besitzt die PARP-1 im Schwein noch einen weiteren Cysteinrest an Position 987, über dessen Rolle in der katalytischen Aktivität jedoch nichts bekannt ist.

4.3.2.4 Einfluss von Zink auf die Poly(ADP-Ribosyl)ierung in HeLa-S3-Zellen

Da der inhibierende Effekt von Zink auf die PARsylierung in Kernextrakten nachgewiesen wurde (Abschnitt 4.3.2.1) und bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Veröffentlichungen zum Einfluss von Zink auf die PARsylierung in intakten Zellen vorhanden sind, war es von Interesse, den Einfluss von Zink auf die PARsylierung im intakten Zellsystem zu betrachten.

Um den Effekt von Zink auf die PARsylierung in HeLa-S3-Zellen zu ermitteln, wurde das Ausmaß der gebildeten PAR-Einheiten *in situ* immunfluorimetrisch bestimmt. Dafür wurden HeLa-S3-Zellen für 5 min mit H_2O_2 inkubiert, was in Folge der H_2O_2 -generierten DNA-Einzelstrangbrüche zur Induktion der PAR-Synthese führte. Gebildete PAR-Polymere wurden in fixierten Zellen unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers 10H und anschließender Kopplung an einen sekundären Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gekoppelten Antikörper mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert und quantifiziert. Die FITC-Fluoreszenz spiegelt dabei das Ausmaß der PARsylierung in den Zellen wider (Hartwig et al., 2003).

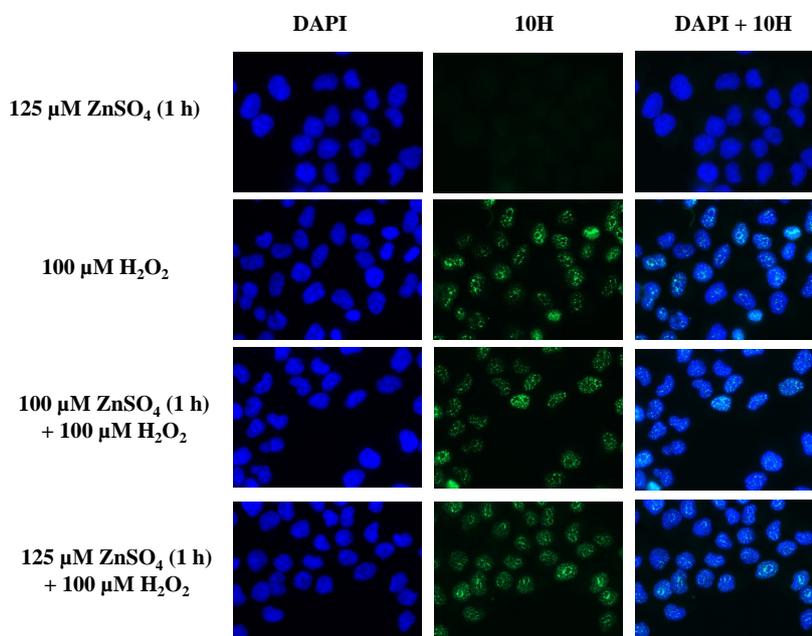


Abbildung 4.14: Einfluss von ZnSO_4 auf die PARsylierung in HeLa-S3-Zellen. HeLa-S3-Zellen wurden für 1 h mit ZnSO_4 vorinkubiert, anschließend für 5 min mit 100 μM H_2O_2 koinkubiert. Nach dem Waschen und der Fixierung folgte die Inkubation mit dem Antikörper 10H, der gegen PAR gerichtet ist. Dargestellt sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der DAPI- und FITC-Fluoreszenz, wobei letztere das Ausmaß an PARsylierung widerspiegelt.

Die Abbildung 4.14 gibt den Einfluss von Zink auf die PARsylierung in HeLa-S3-Zellen wieder. In Kontrollzellen detektierten wir kein signifikantes FITC-Signal (Daten nicht gezeigt). Die fehlende FITC-Fluoreszenz in Zellen, die ausschließlich mit $ZnSO_4$ inkubiert wurden, impliziert keine durch Zink ausgelöste Induktion von DNA-Strangbrüchen oder eine Stimulation der PARP-1. In den von unserem Arbeitskreis bereits publizierten Studien wurde die Kinetik des PAR-Metabolismus nach H_2O_2 -Stimulation von HeLa-S3-Zellen bereits demonstriert (Hartwig et al., 2003; Schwerdtle et al., 2007). Entsprechend diesen Ergebnissen wurde auch in der vorliegenden Arbeit ein maximaler PAR-Gehalt im Zellkern der HeLa-S3-Zellen nach fünfminütiger Inkubation mit H_2O_2 nachgewiesen. In den anschließenden 60 min nahm das FITC-Signal als Folge des PAR-Katabolismus signifikant ab (Hartwig et al., 2003; Althaus, 1992; Brochu et al., 1994). Auch die hier gezeigten Daten weisen eine hohe Fluoreszenz in den mit $100 \mu M H_2O_2$ für 5 min behandelten Zellen nach. Wurden die Zellen mit $ZnSO_4$ für 1 h vorinkubiert, beobachteten wir sowohl eine aktivierende als auch eine hemmende Wirkung durch Zink. Um ein eindeutiges Resultat zu erhalten, müssen weitere Versuche mit einer empfindlicheren Methode durchgeführt werden. Eine gute Möglichkeit dafür bietet die von Martello et al. (2013) publizierte LC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung der zellulären PARsylierung.

4.4 Einfluss von $ZnSO_4$ auf die BER Proteine OGG1 und APE1

Zusätzlich zur PARP-1 standen die bei dem initialen Schritt der BER beteiligten Proteine, OGG1 und APE1, im Mittelpunkt der weiteren Untersuchungen. Die beiden DNA-Reparaturproteine sind im Gegensatz zur PARP-1 keine Zinkfingerproteine, aber enthalten wie auch die PARP-1 mögliche Angriffspunkte für Zink. Zudem ist die APE1 an der Entfernung blockierter Reste beteiligt, die während der DNA-Einzelstrangbruchreparatur auftreten können (zusammengefasst in Caldecott, 2001).

Die OGG- und APE-Aktivität wurde mittels eines nicht-radioaktiven Inzisionstest (Hamann et al., 2009) bestimmt. Das Prinzip beruht auf der Inkubation eines fluoreszenzmarkierten Oligonukleotids, das als Substrat entweder ein 8-OxoG (Oligonukleotid I) oder ein Tetrahydrofuran (THF) als AP-Stellen-Analogon (Oligonukleotid II) enthält, entweder mit Zellextrakten oder mit den isolierten Proteinen. Das THF-enthaltende Oligonukleotid bildet ausschließlich das Substrat für die APE1 und kann nicht von der AP-Lyase-Aktivität der OGG1 umgesetzt werden (Hamann, 2009a). Die Oligonukleotide werden in Abhängigkeit der OGG1- bzw. APE1-Aktivität eingeschnitten und das eingeschnittene Produkt von dem intakten Substrat mittels einer denaturierenden Harnstoff-PAGE separiert. Die nachstehende Abbildung 4.15 verdeutlicht das Prinzip anhand des THF-enthaltenden Oligonukleotids. Findet keine Inkubation mit der isolierten hAPE1 bzw. dem Zellextrakt statt, ist auch keine Inzision erkennbar. Erfolgt die Inkubation hingegen in Gegenwart der isolierten APE1 bzw. eines Zellextrakts, wird das Oligonukleotid eingeschnitten, woraus zwei Banden resultieren. Je größer der Anteil des intakten Substrats ist, desto niedriger ist die Aktivität der Enzyme.

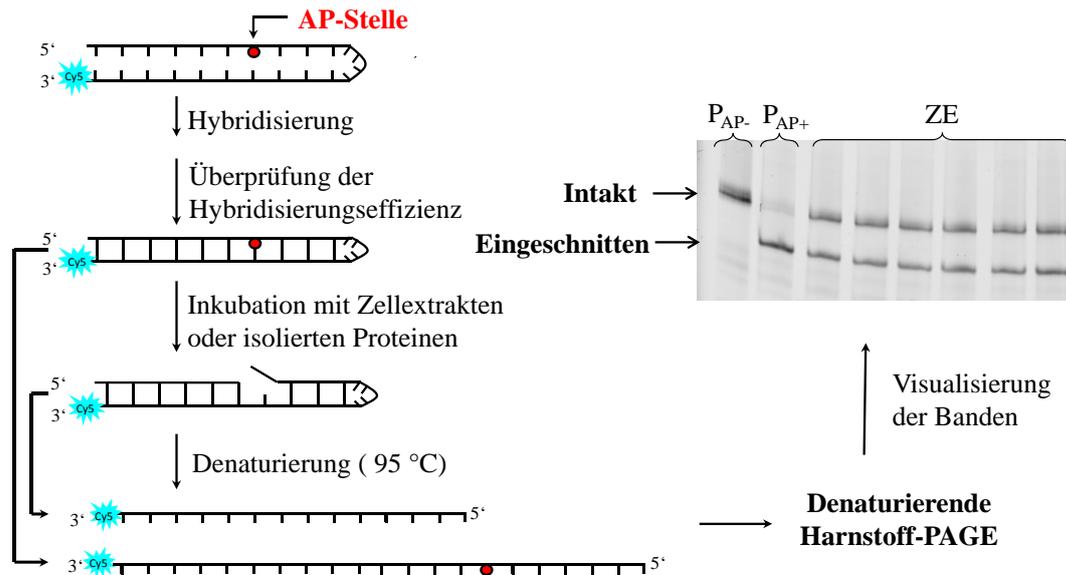


Abbildung 4.15: Schematische Darstellung des nicht-radioaktiven Inzisionstests. P_{AP-}/P_{AP+} : Oligonukleotid II $-/+$ isolierte APE1, ZE: Zellextrakt (modifiziert nach Hamann, 2009a).

Abhängig vom experimentellen Verlauf ist es möglich, den Effekt von Zink auf die zelluläre OGG- und APE-Aktivität zu erfassen, indem man Zellextrakte aus Zink-behandelten IPEC-J2-Zellen mit dem jeweiligen Oligonukleotid inkubiert. Eine direkte Wirkung detektiert man, indem Zellextrakte, generiert aus un-behandelten IPEC-J2-Zellen, direkt mit $ZnSO_4$ inkubiert werden. In beiden Fällen erfasst man die totale OGG- bzw. APE-Aktivität, da in den präparierten Zellextrakten mehrere Enzymaktivitäten vorliegen, die in der Lage sind 8-OxoG und AP-Stellen zu entfernen. Jedoch geht die Hauptaktivität gegenüber 8-OxoG aus 8-OxoG/C DNA-Basenpaaren auf die DNA-Glykosylase-Aktivität der OGG1 zurück (zusammengefasst in Paz-Elizur et al., 2008). Zudem konnte gezeigt werden, dass der verwendete Inzisionstest spezifisch für die OGG1-Aktivität ist. OGG1-defiziente Mäusefibroblasten (OGG1 $-/-$ MEF) zeigten nur eine 5%ige Inzisionsaktivität im Vergleich zu den OGG1-profizienten Zellen (OGG1 $+/+$ MEF) (Hamann et al., 2009). Ebenfalls wird davon ausgegangen, dass die APE1 überwiegend die Endonuklease-Aktivität in Säugerzellen vermittelt (zusammengefasst in Demple und Harrison, 1994; Mitra et al., 2007).

4.4.1 Einfluss von Zink auf die OGG-Aktivität in Zellextrakten

Ergebnisse aus der Literatur, die sich auf die basale OGG-Aktivität in Zellextrakten beziehen, wurden vorwiegend aus Präparaten aus humanen Zelllinien gewonnen (Hamann et al., 2009; Bravard et al., 2009). Untersuchungen hinsichtlich der basalen OGG-Aktivität in einer porcinen Zelllinie wurden bisher nicht veröffentlicht.

Dafür wurden unterschiedliche Proteinmengen mit dem Oligonukleotid I für 90 min inkubiert und der prozentuale Einschnitt anhand des Verhältnisses aus eingeschnittenem Produkt und intaktem Substrat ermittelt. Die in der Abbildung 4.16 dargestellten Ergebnisse spiegeln einen linearen Zusammenhang zwischen der eingesetzten Proteinmenge und der OGG-Aktivität in Zellextrakten aus intestinalen Zellen des Schweines wider. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde eine Proteinmenge von $20 \mu g$ gewählt, da diese mit ca. 16% Inzision im linearen Bereich lag.

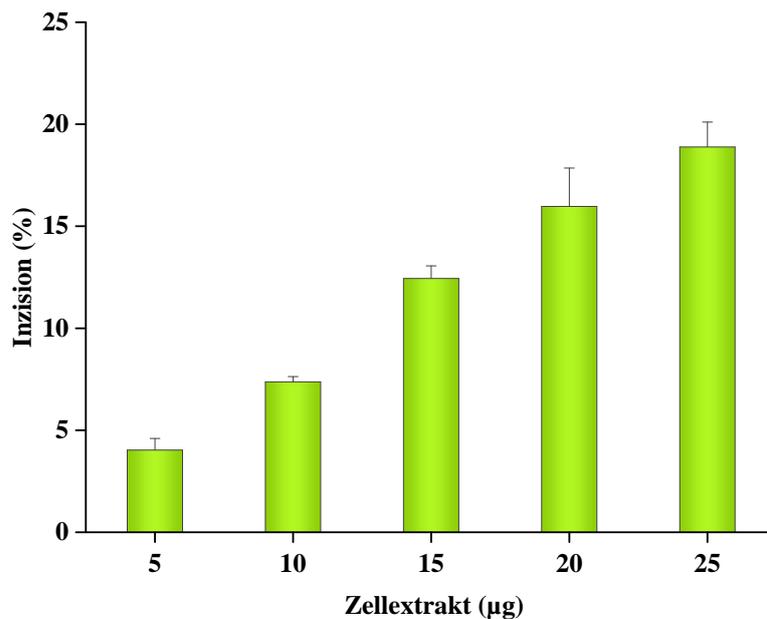


Abbildung 4.16: Ermittlung der einzusetzenden Proteinmenge für IPEC-J2-Zellextrakte. 5-25 µg Zellextrakt, präpariert aus unbehandelten IPEC-J2-Zellen, wurde mit 40 fmol Oligonukleotid I für 90 min bei 37°C inkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung + SD

Nachdem die basale OGG-Aktivität in IPEC-J2-Zellextrakten ermittelt wurde, sollte der Einfluss von Zink auf die Aktivität näher betrachtet werden (Abbildung 4.17). Die direkte Behandlung der Zellextrakte mit $ZnSO_4$ erniedrigte die OGG-Aktivität signifikant und konzentrationsabhängig ab 75 µM. Bei der höchsten Konzentration von 150 µM wurde noch eine Restaktivität von 66% detektiert.

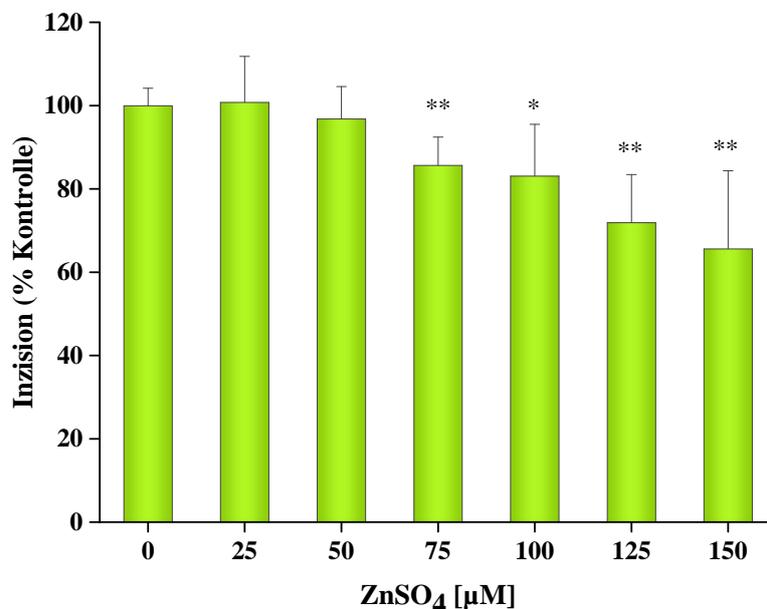


Abbildung 4.17: Einfluss von $ZnSO_4$ auf die OGG-Aktivität in Zellextrakten aus IPEC-J2-Zellen. 20 µg Zellextrakt, präpariert aus unbehandelten IPEC-J2-Zellen, wurde in Anwesenheit von $ZnSO_4$ mit 40 fmol Oligonukleotid I für 90 min bei 37°C inkubiert. 100% Inzision der Kontrolle entsprach $16,9 \pm 3,7\%$. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (in Dreifachbestimmung) + SD. Statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle: $p^* < 0,05$, $p^{**} < 0,01$ (ANOVA, Dunnett T3).

Es existiert nur eine Publikation, die sich dem Einfluss von Zink auf die OGG-Aktivität in Zellextrakten, allerdings aus einer humanen Zelllinie, widmete. Deren Ergebnis steht jedoch im Widerspruch zu den hier gezeigten Daten, da die Autoren keine Zink-vermittelte Auswirkung auf die OGG-Aktivität erfassten (Li et al., 2009). Demnach wurde die Zink-vermittelte Inhibierung der OGG-Aktivität in Zellextrakten hier das erste Mal gezeigt.

Mechanistisch könnte die beobachtete Hemmung der OGG-Aktivität in IPEC-J2-Zellextrakten das Resultat der Bindung von Zink an kritische Thiolgruppen sowie an Histidin- und Aspartatreste innerhalb der OGG1 sein. Aminosäurereste, die für die katalytische Aktivität essentiell sind, werden im Zusammenhang mit den Ergebnissen der isolierten hOGG1 diskutiert (Abschnitt 4.4.2).

Weitere Untersuchungen sollten Aufschluss über den Mechanismus der Zink-vermittelten Inhibierung der OGG-Aktivität in Zellextrakten geben. Dafür wurden Revertierungsversuche mit dem Thiolreagenz, GSH, durchgeführt. Anhand der Abbildung 4.18 ist deutlich zu erkennen, dass GSH den Zink-vermittelten inhibitorischen Effekt nicht revertierte. Die Ursache für die irreversible Inhibierung könnte in der Unzugänglichkeit einiger Aminosäuren liegen, die für die katalytische Aktivität von Bedeutung sind.

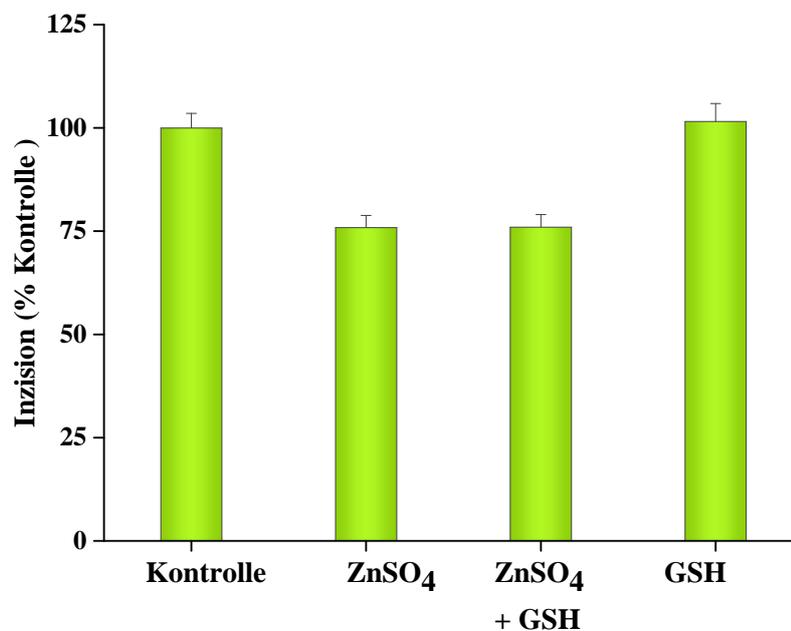


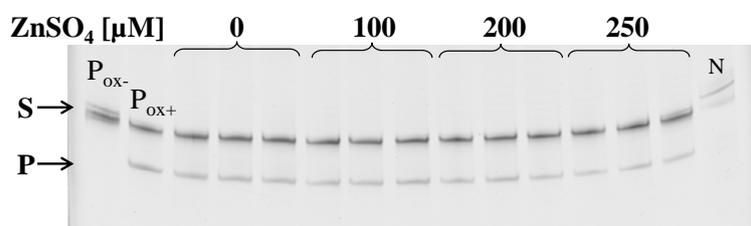
Abbildung 4.18: Einfluss von Glutathion auf die Zink-vermittelte Inhibierung der OGG-Aktivität in IPEC-J2-Zellextrakten. 20 µg Zellextrakt, präpariert aus unbehandelten IPEC-J2-Zellen, wurde mit 250 µM ZnSO₄ für 15 min bei 37°C vorinkubiert und anschließend mit 75 µM GSH für 15 min bei 37°C koinkubiert. Die Konzentration von ZnSO₄ im Koinkubationsansatz betrug 145 µM. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 40 fmol Oligonukleotid I gestartet und für 60 min bei 37°C inkubiert. 100% Inzision der Kontrolle entsprach $13,9 \pm 1,8\%$. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (in Dreifachbestimmung) + SD.

4.4.2 Einfluss von Zink auf die isolierte hOGG1

Aus den unter Abschnitt 4.4.1 gezeigten Daten ergaben sich Hinweise auf eine Zink-vermittelte Hemmung der OGG-Aktivität in Zellextrakten aus Intestinalzellen des Schweines. Da während der Präparation der Zellextrakte noch weitere Proteine aufgearbeitet wurden, die einen stimulierenden oder modulierenden Effekt auf die OGG1 ausüben können, soll im Folgenden die Frage eines direkt oder indirekt inhibitorischen Effekts beantwortet werden.

Um eine direkte Wechselwirkung von Zink mit dem spezifischen Enzym OGG1 zu untersuchen, wurde die isolierte hOGG1 mit ZnSO₄ inkubiert und unter Anwendung des von Hamann et al. (2009) etablierten Testsystems die Aktivität der hOGG1 in Gegenwart von ZnSO₄ bestimmt. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der hOGG1 und der des Schweines zeigt, dass alle für den Katalysemechanismus bedeutsamen Aminosäuren übereinstimmen (Alignment siehe Anhang A.6.3), sodass die hOGG1 als Modellsystem verwendet wurde.

(A)



(B)

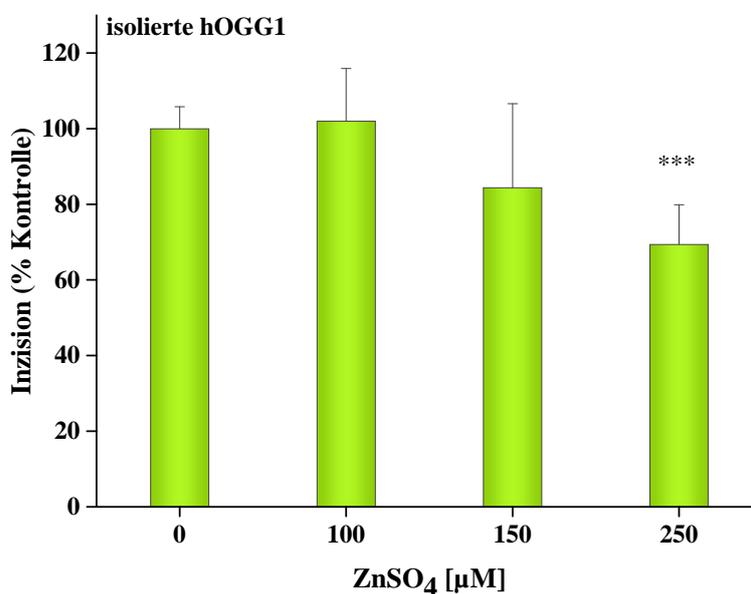


Abbildung 4.19: Einfluss von ZnSO₄ auf die Aktivität der isolierten hOGG1. (A) Visualisierung der Zink-vermittelten Inhibition der isolierten hOGG1. Die Zink-vermittelte Inhibition der isolierten hOGG1 ist auf einem repräsentativen Gel dargestellt. Positivkontrollen P_{ox-/ox+}: Oligonukleotid I +/- 10 ng isolierte hOGG1, Negativkontrolle N: Oligonukleotid III + 10 ng isolierte hOGG1. S: intaktes Oligonukleotid, P: eingeschnittenes Oligonukleotid. (B) 2,5 μg der isolierten hOGG1 wurden in Gegenwart von ZnSO₄ mit 40 fmol Oligonukleotid I für 60 min bei 37°C inkubiert. 100% Inzision der Kontrolle entsprach 17,5 ± 1,5%. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (in Dreifachbestimmung) + SD. Statistisch signifikant verschieden von der Kontrolle: p* < 0,05, p*** < 0,001 (ANOVA, Dunnett T).

Das in Abbildung 4.19A repräsentative Gel visualisiert die Zink-vermittelte Inhibierung der isolierten hOGG1. Die obere Bande im Gel repräsentiert das intakte Oligonukleotid; die untere Bande gibt den Anteil an eingeschnittenem Oligonukleotid wieder. Gut zu erkennen ist der abnehmende Anteil an eingeschnittenem Oligonukleotid mit zunehmender ZnSO₄-Konzentration, d.h. der inhibitorische Effekt nimmt mit steigender Konzentration an ZnSO₄ zu. Die Anteile an intaktem und eingeschnittenem Oligonukleotid wurden mittels der Software *Image Quant TLv2005* ausgewertet und die Inzision darüber quantifiziert. Die Quantifizierung des Effekts von Zink ergab für den Fall einer 60-minütigen Inkubation mit 250 µM ZnSO₄ eine signifikante Hemmung von 30% (Abbildung 4.19B).

Im Vergleich zu den Ergebnissen aus dem Zellextrakt (Abschnitt 4.4.1) waren höhere Konzentrationen für eine signifikante Hemmung erforderlich. Geht man allerdings von der Tatsache aus, dass bei der Untersuchung der direkten Wirkung von Zink auf das isolierte Protein im Vergleich zum Zellextrakt keine protektiven oder modulierenden Proteine vorlagen, wäre eine Hemmung bei niedrigeren Konzentrationen zu erwarten gewesen. Eine mögliche Erklärung könnte in dem für die isolierte hOGG1 verwendeten Aufbewahrungspuffer liegen, der 1 mM EDTA enthielt. Aus der weiteren Verdünnung des isolierten Proteins lagen in der Hauptreaktion noch 25 µM EDTA vor, was einen Teil der zugesetzten Zinkionen komplexieren könnte. Denkbar wäre auch ein indirekt vermittelter inhibitorischer Effekt von Zink auf die OGG-Aktivität in Zellextrakten über die Modulierung eines Proteins, das in Wechselwirkung mit der OGG1 steht. So ist bekannt, dass die OGG1 mit weiteren DNA-Reparatur- und Zellzykluskontrollproteinen wechselwirkt. Dazu zählen das XRCC1 (Marsin et al., 2003), die APE1 (Hill et al., 2001), der XPC-HR23B-Komplex (D'Errico et al., 2006), die PARP-1 (Hooten et al., 2011), Rad52 (de Souza-Pinto et al., 2009) und der Rad9-Rad1-Hus1-Komplex (Park et al., 2009), die die Inzisionsaktivität der OGG1 beeinflussen könnten.

In der Literatur ist sowohl der Einfluss von Zink auf die isolierte hOGG1 (Li et al., 2009) als auch auf die isolierte mOGG1 (Zharkov und Rosenquist, 2002) beschrieben, allerdings mit widersprüchlichen Ergebnissen. In Übereinstimmung mit den hier für die hOGG1 gezeigten Ergebnissen, publizierten Zharkov und Rosenquist (2002), dass die DNA-Glykosylase-Aktivität der isolierten mOGG1 über 100 µM ZnCl₂ erniedrigt wurde. Li et al. (2009) hingegen beobachteten keine Auswirkung auf die isolierte hOGG1, was ebenfalls in Diskrepanz zu unseren Daten steht.

Wie bereits erwähnt, weisen die Proteinsequenzen der hOGG1 und die OGG1 des Schweines einen hohen Grad an Homologie auf (Alignment siehe Anhang A.6.3). Das bedeutet, dass die für die katalytische Effizienz beschriebenen Aminosäuren einen potentiellen Angriffspunkt für Zink darstellen können und als Erklärung für den hemmenden Effekt von Zink auf die OGG1 dienen. Als potentielle Ziele werden, neben dem N-Atom im Imidazolring des Histidins und dem O-Atom der Carboxylgruppe des Aspartats und Glutamats, insbesondere die Bindung an das S-Atom in Cysteinen diskutiert (zusammengefasst in Maret und Li, 2009). Vorstellbare Aminosäuren innerhalb der hOGG1, an denen Zink binden könnte, sind Cys253 (korrespondiert mit Cys243 im Schwein), das nahe des aktiven Zentrums lokalisiert ist und mit dem π -Elektronensystem des 8-oxoG wechselwirkt. Zudem His270 (korrespondiert mit His260 in der OGG des Schweines), das eine wichtige Rolle in der Schadenserkenung einnimmt, indem es eine H-Brückenbindung zum 5'-P des geschädigten Nukleotids bildet (Bruner et al., 2000; Zharkov und Rosenquist, 2002). Aus Mutagenesestudien geht hervor, dass Asp268 (korrespondiert mit Asp258 im Schwein) zwar essentiell für die katalytische Aktivität ist, nicht aber für die Erkennung des Schadens erforderlich (Norman et al., 2003). Je nachdem, an welche Aminosäure Zink bindet, beeinflusst das Spurenelement die Schadenserkenung oder die Basenentfernung.

4.4.3 Einfluss von Zink auf APE-Aktivität in Zellextrakten unter Zusatz von $MgCl_2$

Analog zu den Untersuchungen der OGG-Aktivität fehlen bisher eindeutige Studien, die die APE-Aktivität in Anwesenheit von Zink analysieren. Zum Grundstatus der APE-Aktivität in Zellextrakten aus intestinalen Zellen des Schweines sind wie bei der PARsylierung in Kernextrakten (Abschnitt 4.3.2.1) und der OGG-Aktivität in Zellextrakten (Abschnitt 4.4.1) keine Daten präsent, sodass hier zum ersten Mal die basale APE-Aktivität in porcinen Zellextrakten gemessen wurde. Im Folgenden sollte zunächst die Wirkung von $ZnSO_4$ auf die APE-Aktivität in Gegenwart von $MgCl_2$ betrachtet werden. Weiterführende Untersuchungen beschäftigten sich mit dem Einfluss von $ZnSO_4$ auf die APE-Aktivität in Zellextrakten in Abwesenheit von $MgCl_2$ (Abschnitt 4.4.5).

Für die Aktivität der APE1 ist das Vorhandensein ihres Kofaktors Magnesium unabdingbar. Die Konzentration an „freiem“ intrazellulären Mg^{2+} wird auf 0,5-0,7 mM geschätzt (zusammengefasst in Romani, 2007). Die Untersuchungen sollten daher die basale APE-Aktivität in Anwesenheit von 1 mM $MgCl_2$ erfassen; aber auch die Auswirkung einer 10 mM $MgCl_2$ -Lösung sollte betrachtet werden.

Aus der vergleichenden Betrachtung der Abbildungen 4.20 und 4.21 wird ersichtlich, dass eine höhere $MgCl_2$ -Konzentration eine steigende APE-Aktivität mit sich bringt. So waren im Falle der APE-Aktivität in Anwesenheit von 1 mM $MgCl_2$ wesentlich höhere Proteinmengen zur Erreichung des gleichen Einschnitts notwendig wie in Anwesenheit von 10 mM $MgCl_2$. Dieses Verhalten konnte auch für Zellextrakte aus humanen Zellen nachgewiesen werden (Hamann, 2009a).

Aus der Inkubation des Oligonukleotids II mit 0,5-1,5 μg IPEC-J2-Zellextrakt in Anwesenheit von 1 mM $MgCl_2$ für 10 min ist ein linearer Anstieg bis zu einer Proteinmenge von 1 μg der Inzision ersichtlich. Ab einer Proteinmenge von 1,25 μg war der Sättigungsbereich erreicht (Abbildung 4.20). Die optimale Proteinmenge von 0,5 μg wurde für die nachfolgenden Versuche gewählt, da mit einer Inzision ca. 50% sowohl eine Hemmung als auch eine Aktivierung beobachtet werden konnte.

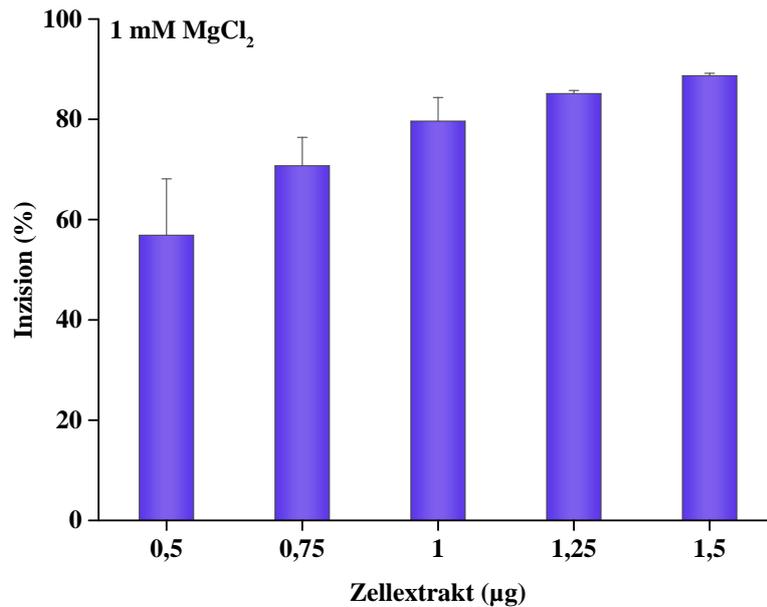


Abbildung 4.20: Bestimmung der basalen APE-Aktivität in IPEC-J2-Zellextrakten in Anwesenheit von 1 mM MgCl₂. In Anwesenheit von 1 mM MgCl₂ wurde 0,5-1,5 µg Zellextrakt, präpariert aus unbehandelten IPEC-J2-Zellen, mit 40 fmol Oligonukleotid II für 10 min bei 37°C inkubiert. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung + SD.

Sollten die Versuche in Anwesenheit von 10 mM MgCl₂ stattfinden, wurde das Oligonukleotid II mit 0,01-0,25 µg IPEC-J2-Zellextrakt für 5 min inkubiert. Die Ergebnisse demonstrieren einen linearen Anstieg zwischen 0,025-0,25 µg IPEC-J2-Zellextrakt (Abbildung 4.21). Die Wahl der einzusetzenden Proteinmenge fiel auf 0,1 µg, da bei einer Inzision von ca. 60% hemmende und stimulierende Effekt detektierbar waren.

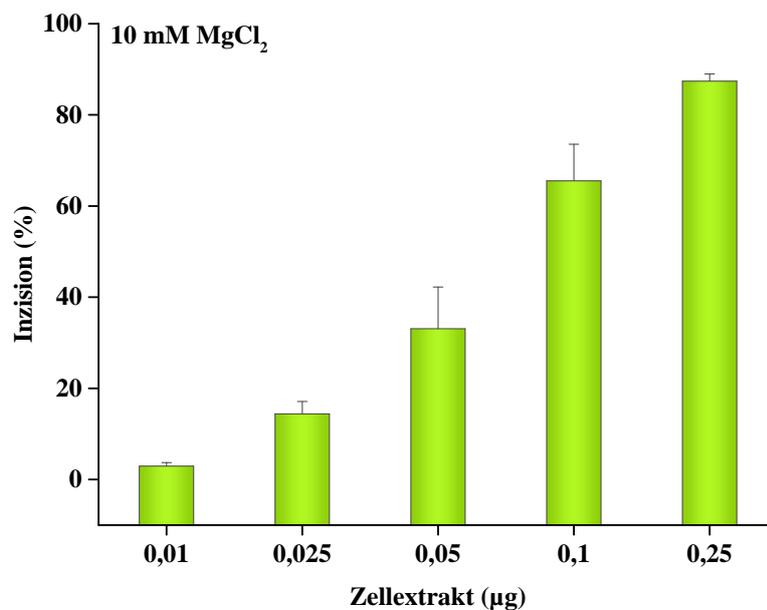
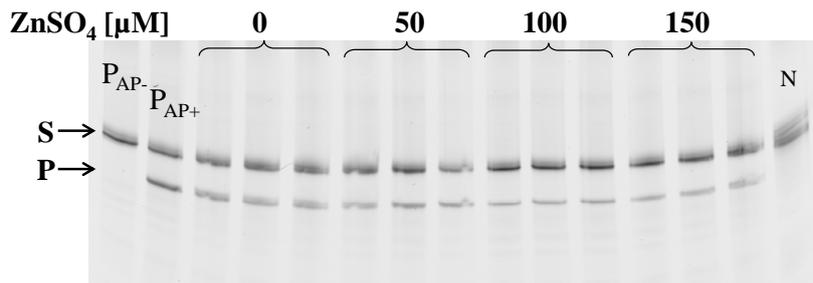


Abbildung 4.21: Bestimmung der basalen APE-Aktivität in IPEC-J2-Zellextrakten in Anwesenheit von 10 mM MgCl₂. In Anwesenheit von 10 mM MgCl₂ wurde 0,01-0,25 µg Zellextrakt, präpariert aus unbehandelten IPEC-J2-Zellen, mit 40 fmol Oligonukleotid II für 5 min bei 37°C inkubiert. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung + SD.

Um den Einfluss von ZnSO₄ auf die APE-Aktivität in Anwesenheit von 1 mM MgCl₂ zu visualisieren, wurde das während der Inkubation gebildete Inzisionsprodukt und -substrat mittels einer denaturierenden Harnstoff-PAGE separiert und mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors sichtbar gemacht. Auf dem repräsentativen Gel (Abbildung 4.22A) ist eine abnehmende Intensität der unteren Bande, die das Inzisionsprodukt darstellt, mit zunehmender ZnSO₄-Konzentration ersichtlich, d.h. Zink hemmt die APE-Aktivität in Zellextrakten in Anwesenheit von 1 mM MgCl₂.

(A)



(B)

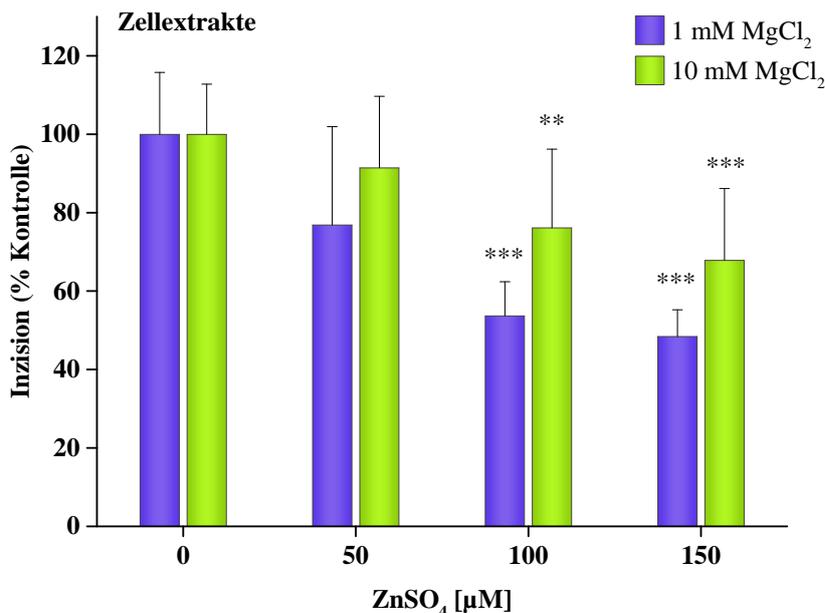


Abbildung 4.22: Einfluss von ZnSO₄ auf APE-Aktivität in IPEC-J2-Zellextrakten unter Zusatz von MgCl₂. (A) Visualisierung der Zink-vermittelten Inhibierung der APE-Aktivität in IPEC-J2-Zellextrakten. Die Zink-vermittelte Inhibierung der APE-Aktivität in Anwesenheit von 1 mM MgCl₂ ist auf einem repräsentativen Gel dargestellt. Positivkontrollen P_{AP-}/P_{AP+}: Oligonukleotid II +/- 0,2 pg isolierte APE-1, Negativkontrolle N: Oligonukleotid III + Zell-extrakt aus unbehandelten IPEC-J2-Zellen. S: intaktes Oligonukleotid, P: eingeschnittenes Oligonukleotid. (B) In Anwesenheit von 1 mM MgCl₂ wurde 0,5 μg des Zellextrakts aus unbehandelten IPEC-J2-Zellen mit ZnSO₄ und 40 fmol Oligonukleotid II für 10 min bei 37°C inkubiert. 100% Inzision der Kontrolle entsprach 41,9 ± 19,4%. Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen (in Dreifachbestimmung) + SD. Wurden die Versuche in Anwesenheit von 10 mM MgCl₂ durchgeführt, erfolgte die Inkubation von 40 fmol Oligonukleotid II mit 0,1 μg Zell-extrakt aus unbehandelten IPEC-J2-Zellen und ZnSO₄ für 5 min bei 37°C. 100% Inzision der Kontrolle entsprach 62,8% ± 12,8%. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (in Dreifachbestimmung) + SD. Statistisch signifikant unterschiedlich von der Kontrolle: p** < 0,01, p*** < 0,001 (ANOVA, Dunnett T).

Die Quantifizierung des eben beschriebenen Effekts ist in Abbildung 4.22B dargestellt. Es ist erkennbar, dass sich in Anwesenheit von 1 mM MgCl₂ die APE-Aktivität zunächst konzentrationsabhängig verringerte, allerdings ab einer Konzentration von 150 µM ZnSO₄ eine Sättigung erreicht wurde. Ein ähnlicher Kurvenverlauf ergab sich in Anwesenheit von 10 mM MgCl₂. Im Vergleich zu den Untersuchungen in Gegenwart von 1 mM MgCl₂, zeigte sich eine Tendenz zu einem verminderten inhibitorischen Effekt ohne statistische Signifikanz (Abbildung 4.22B). Hinter dieser Beobachtung könnte ein möglicher protektiver Mechanismus bei höheren MgCl₂-Konzentrationen stehen. Dieser protektive Wirkmechanismus wurde bereits im Falle des zweiwertigen Ions Cd²⁺ angenommen (Hamann, 2009a).

Widersprüchliche Ergebnisse wurden von Li et al. (2009) publiziert, die nach der Behandlung von Kernextrakten, extrahiert aus primären neuronalen Kulturen des embryonalen Gehirns, keinen Einfluss auf die APE-Aktivität durch Zink feststellten. Weitere Veröffentlichungen zum Einfluss von Zink auf die APE-Aktivität in Zellextrakten sind nicht bekannt, sodass hier erstmals der Verlust der APE-Aktivität in Zellextrakten in Anwesenheit von Zink nachgewiesen wurde. Der zugrundeliegende Mechanismus wird im Weiteren im Zusammenhang mit der isolierten hAPE1 unter Abschnitt 4.4.4 diskutiert.

Vertiefende Studien sollten den Mechanismus des hemmenden Effekts von Zink auf die APE-Aktivität untersuchen. Analog zu den Untersuchungen der zum Einfluss von Zink auf die OGG-Aktivität (Abschnitt 4.4.1) wurden Revertierungsversuche mit Thiolreagenz dem GSH durchgeführt. Äquivalente Konzentrationen an GSH konnten den Zink-vermittelten inhibitorischen Effekt jedoch nicht revertieren (Abbildung 4.23).

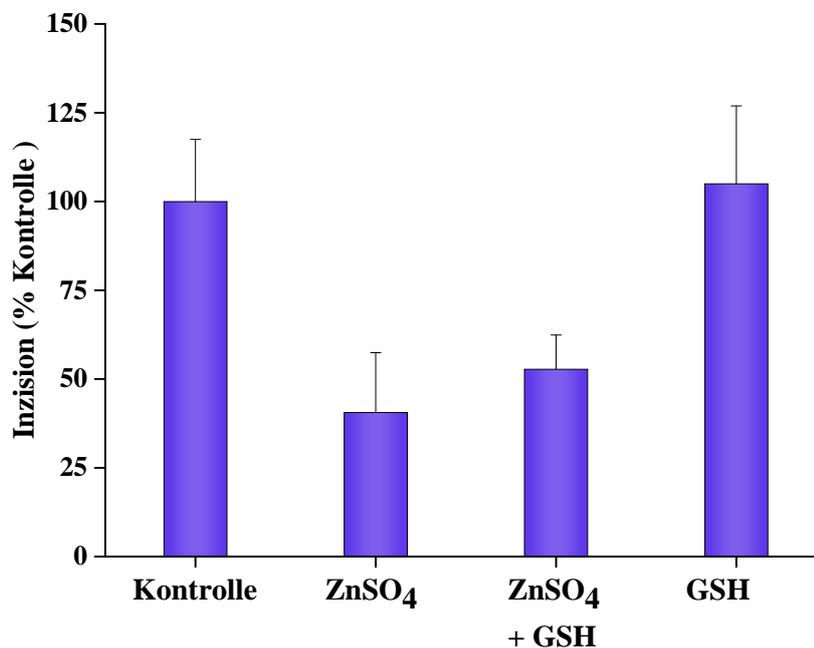


Abbildung 4.23: Einfluss von Glutathion auf die Zink-vermittelte Inhibition der APE-Aktivität in IPEC-J2-Zellextrakten. 0,075 µg Zellextrakt, präpariert aus unbehandelten IPEC-J2-Zellen, wurde mit 250 µM ZnSO₄ in Anwesenheit von 10 mM MgCl₂ für 15 min bei 37°C vorinkubiert und anschließend mit 150 µM GSH für 15 min bei 37°C koinkubiert. Im Koinkubationsansatz betrug die Konzentration von ZnSO₄ 145 µM. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 40 fmol Oligonukleotid II gestartet und für 10 min bei 37°C inkubiert. 100% Inzision der Kontrolle entsprach 56,2 ± 20,5%. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (in Dreifachbestimmung) + SD.

Da, wie bereits angesprochen, keine Daten zum inhibitorischen Effekt von Zink auf die APE-Aktivität in Zellextrakten existieren, sind in der Literatur auch keine Vergleichsdaten zur Revertierung des hemmenden Effekts gegenwärtig. Ebenso wie bei den Daten zur OGG-Aktivität in Zellextrakten (Abschnitt 4.4.1) kann die Irreversibilität in der Unzugänglichkeit bedeutsamer Aminosäuren für die katalytische Effizienz begründet sein.

4.4.4 Einfluss von Zink auf die isolierte humane APE1 unter Zusatz von MgCl₂

Ebenso wie für die OGG-Aktivität in Zellextrakten (Abschnitt 4.4.1), konnte auch für die APE-Aktivität in Zellextrakten in Anwesenheit von MgCl₂ eine inhibierende Wirkung von Zink belegt werden. Auch hier stellte sich die Frage, ob der Zink-vermittelte Effekt im Zellextrakt auf eine direkte Interaktion mit der APE1 zurückzuführen ist. Zum Nachweis der direkten Interaktion von Zink mit der APE1 wurde die isolierte hAPE1 herangezogen. Ein Vergleich der Proteinsequenzen der hAPE1 und der APE1 des Schweines zeigte eine nahezu vollständige Homologie in der für den katalytischen Mechanismus relevanten Aminosäuren (Alignment siehe Anhang A.6.3). Die Aktivität der isolierten hAPE1 in Anwesenheit von ZnSO₄ wurde mittels des nicht-radioaktiven Inzisionstests erfasst.

Wurde die isolierte hAPE1 mit ZnSO₄ in Anwesenheit von MgCl₂ inkubiert, zeigte sich ein verminderter Einschnitt des Oligonukleotids II, was mit einer Hemmung durch Zink assoziiert ist. Die Abbildung 4.24 gibt eine konzentrationsabhängige Verringerung der Aktivität nach Behandlung mit ZnSO₄ wieder, wobei bei der höchsten Konzentration von 300 µM eine Hemmung von 70% zu verzeichnen war.

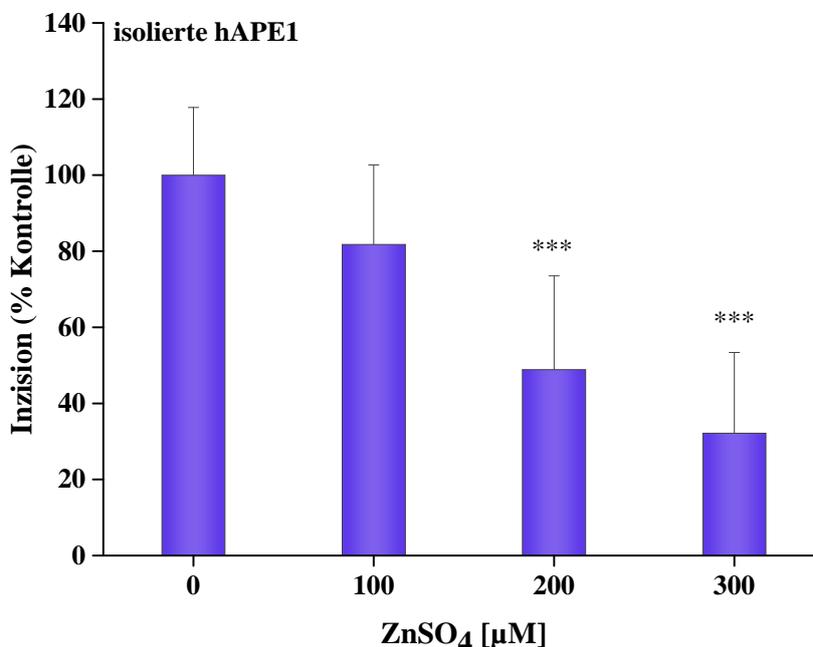


Abbildung 4.24: Einfluss von ZnSO₄ auf die Aktivität der isolierten hAPE1. 0,04 pg der isolierten hAPE1 wurde für 15 min in Anwesenheit von 1 mM MgCl₂ mit unterschiedlichen Konzentrationen an ZnSO₄ bei RT vorinkubiert. Der Vorinkubationsansatz wurde mit Oligonukleotid II gemischt und für 30 min bei 37°C in Anwesenheit von 0,4 mM MgCl₂ und unterschiedlichen Konzentrationen an ZnSO₄ inkubiert. 100% Inzision der Kontrolle entsprach $48,5 \pm 8,6\%$. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (in Dreifachbestimmung) + SD. Statistisch signifikant verschieden von der Kontrolle: $p^{***} < 0,001$ (ANOVA, Dunnett T).

Diese Tatsache spricht für eine direkte Interaktion des spezifischen Enzyms APE1 mit Zink. Nichtsdestotrotz ist die Inhibierung wider Erwarten in den Zellextrakten stärker als die der isolierten hAPE1. Gründe dafür können die gleichen sein wie zuvor bei der isolierten hOGG1 diskutiert (Abschnitt 4.4.2). So waren in der Vorinkubation noch 50 μM DTT und 25 μM EDTA sowie in der Hauptinkubation noch 20 μM DTT und 10 μM EDTA vorhanden. Des Weiteren könnte der Zellextrakt im Gegensatz zur isolierten hAPE1 stimulierende und modulierende Proteine enthalten, über die Zink indirekt inhibitorisch wirken könnte.

In Übereinstimmung mit dem Ergebnis aus Abbildung 4.24, ermittelten Wang et al. (2006) eine Inhibierung der isolierten hAPE1 von 20% bei 100 μM ZnCl_2 , allerdings betrug die restliche Aktivität bei 300 μM noch 60%. Diese Diskrepanz könnte mit abweichenden experimentellen Bedingungen erklärt werden. Über die Grundaktivität der isolierten hAPE1 wurde keine Aussage getroffen. Die eingesetzte Menge an isolierter hAPE1 von Wang et al. (2006) lässt auf eine niedrigere Grundaktivität schließen, da die Konzentration 0,38 nM betrug, in unserem Fall jedoch nur 0,12 pM verwendet wurden. Des Weiteren wurden im Falle der von Wang et al. (2006) durchgeführten Experimente sowohl in der Vor- als auch in der Hauptinkubation die Zeit auf 10 min festgelegt, hingegen erfolgte in unseren Versuchen die Vorinkubation für 15 min und die Hauptinkubation für 30 min.

Der direkte Vergleich der Primärstruktur zeigt, dass die in der hAPE1 als kritisch angesehenen Aminosäuren His309 und Cys99 in der APE1 des Schweines an gleicher Position auftreten (Mantha et al., 2008; Kim et al., 2011) (Alignment siehe Anhang A.6.3). Die katalytische Aktivität wird der Aminosäure His309 zugeschrieben, wohingegen Cys99 für die Affinität zur DNA verantwortlich ist. Ein Verlust der beobachteten Aktivität in Zellextrakten sowie der isolierten hAPE1 könnte mit der Bindung von Zink an diese Aminosäuren begründet werden (Mantha et al., 2008; Kim et al., 2011). Sollte dies der Fall sein, würde die Bindung von Zink an His309 mit dem Verlust der katalytischen Aktivität assoziiert werden. Die Bindung an Cys99 hätte eine Beeinflussung der Schadenserkennung zur Folge.

4.4.5 Einfluss von Zink auf die APE-Aktivität in Zellextrakten ohne Zusatz von MgCl_2

Mit den vorhergehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass Zink in Anwesenheit des für die APE1 notwendigen Kofaktors Mg^{2+} die APE-Aktivität in Zellextrakten sowie die isolierte hAPE1 inhibierte (Abschnitt 4.4.3 und 4.4.4).

Indem die Zellextrakte mit ZnSO_4 und dem Oligonukleotid II in Abwesenheit von MgCl_2 inkubiert wurden, sollte ermittelt werden, ob Zink als potentieller Kofaktor fungieren kann. Aber zunächst musste das Testsystem hinsichtlich der einzusetzenden Proteinmenge aus IPEC-J2 Zellextrakten und Inkubationszeit optimiert werden, da die Abwesenheit von MgCl_2 zu einer verminderten APE-Aktivität und demzufolge zu einem geringeren Inzisionsprodukt führt.

Aus den vorangegangenen Optimierungsversuchen der APE-Aktivität in Gegenwart von MgCl_2 aus Abschnitt 4.4.3 konnte die einzusetzende Proteinmenge für die Versuche in Abwesenheit von MgCl_2 eingeschätzt werden. Inkubierte man das Oligonukleotid II in Abwesenheit von MgCl_2 mit 4 μg IPEC-J2-Zellextrakt für 10 min, ergab sich ein Einschnitt von $36 \pm 7,7\%$. Im Laufe der folgenden Versuche war der Einsatz neu hybridisierter Oligonukleotide erforderlich, wodurch jedoch ein nahezu kompletter Einschnitt des Oligonukleotids II durch die Inkubation mit 4 μg Zellextrakt für 10 min resultierte. Um einen gleichbleibenden Einschnitt zu gewährleisten, wurde das Oligonukleotid II daher mit einer konstanten Proteinmenge von

4 µg für verschiedene Zeiten von 1-10 min inkubiert. Die Kinetik ist in Abbildung 4.25 dargestellt und verdeutlicht, dass die enzymatisch katalysierte Umsetzung des Substrats bis zu einer Inkubationszeit von fünf Minuten linear verlief und ab Minute sechs die Sättigung erreichte. Aus diesem Grund entschieden wir uns, für die weiteren Versuche mit der gleichen Proteinmenge, jedoch mit einer veränderten Inkubationszeit von 1,5 min fortzufahren, bei der sich im Mittel eine absolute APE-Inzisionsaktivität von $30 \pm 3,5\%$ ergab.

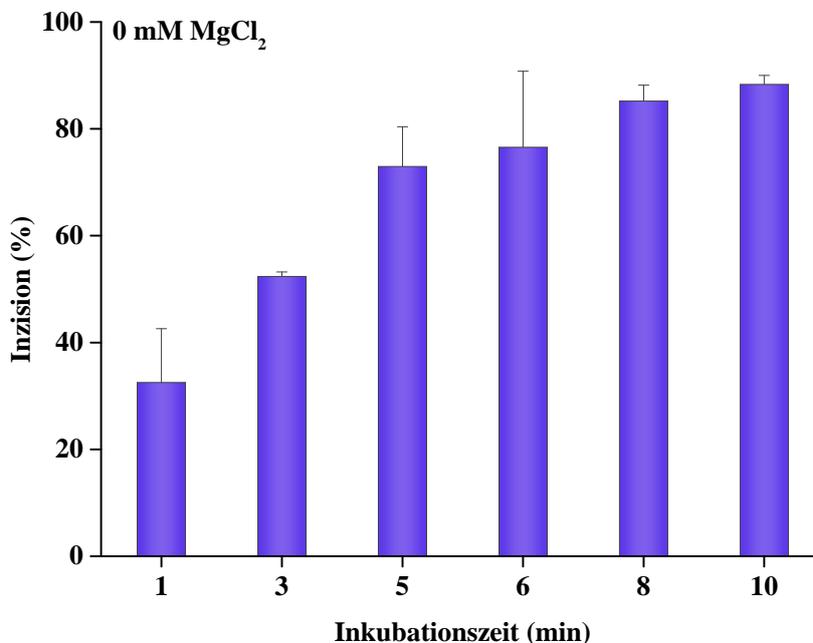


Abbildung 4.25: Einfluss von ZnSO₄ auf APE-Aktivität in IPEC-J2-Zellextrakten ohne Zusatz von MgCl₂. 4 µg Zellextrakt, präpariert aus unbehandelten IPEC-J2-Zellen, wurde mit verschiedenen ZnSO₄-Konzentrationen und 40 fmol Oligonukleotid II für 1-10 min bei 37°C inkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung + SD.

Wurden die Versuche unter den zuvor beschriebenen Bedingungen durchgeführt, zeigte sich ein Anstieg zwischen 50-150 µM ZnSO₄, der bei der höchsten Konzentration von 150 µM dem zweifachen Wert im Vergleich zur Kontrolle entsprach (Abbildung 4.26).

Weiterführende Untersuchungen sollten klären, ob die Inkubation der Zellextrakte mit ZnSO₄ in gleichem Maße die APE-Aktivität steigert wie die Inkubation mit MgCl₂. Durch Inkubation der IPEC-J2-Zellextrakte mit entweder 1 mM MgCl₂ oder 1 mM ZnSO₄ und dem Oligonukleotid II und anschließender Separation des intakten und eingeschnittenen Oligonukleotids erhielt man mittels Fluoreszenzdetektion das dargestellte repräsentative Gel (Abbildung 4.27A). Im Falle von 1 mM MgCl₂ ist nur die untere Bande eindeutig zu erkennen, was einen nahezu kompletten Einschnitt des Oligonukleotids II bedeutet, wohingegen in Anwesenheit von ZnSO₄ noch zwei Banden sichtbar sind. Die Quantifizierung dieses Effekt in Abbildung 4.27B demonstriert, dass es zu einer vollständigen APE-Aktivierung in Anwesenheit von MgCl₂ kam. Die Inkubation von ZnSO₄ steigerte die APE-Aktivität nur auf über 50% im Vergleich zur Behandlung mit MgCl₂.

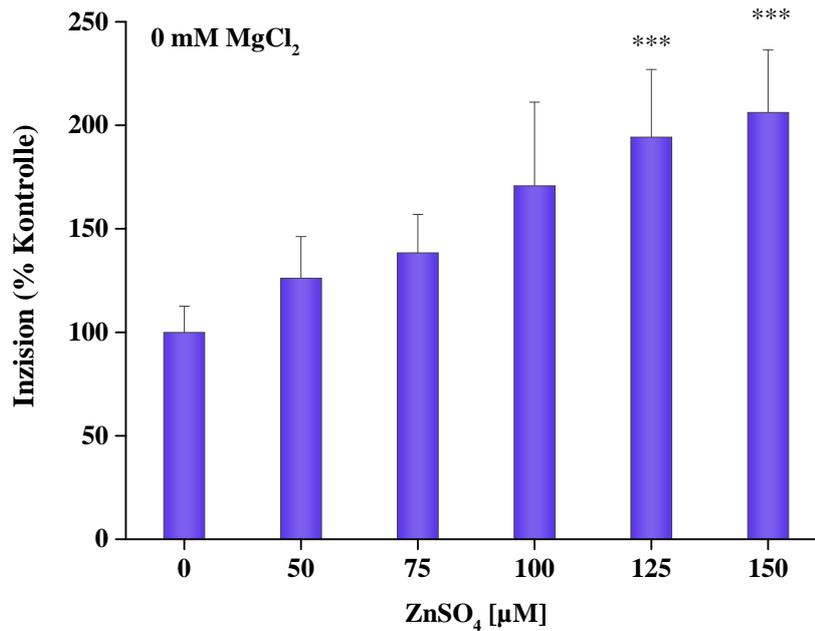


Abbildung 4.26: Einfluss von ZnSO₄ auf APE-Aktivität in IPEC-J2-Zellextrakten ohne Zusatz von MgCl₂ 4 µg Zellextrakt, präpariert aus unbehandelten IPEC-J2-Zellen, wurde mit verschiedenen ZnSO₄-Konzentrationen und 40 fmol Oligonukleotid II für 1-10 min bei 37°C inkubiert. 100% Inzision der Kontrolle entsprach $35,7 \pm 8,7\%$. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (in Dreifachbestimmung) + SD. Statistisch signifikant von der Kontrolle: $p^{***} < 0,001$ (ANOVA, Dunnett T3).

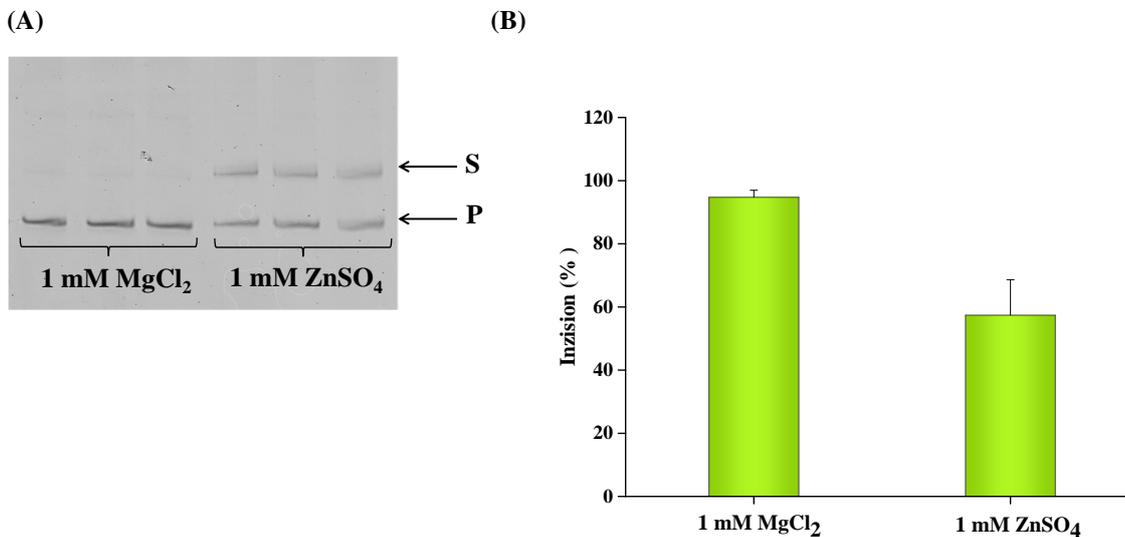


Abbildung 4.27: Vergleich der APE-Aktivität in IPEC-J2-Zellextrakten nach Inkubation mit MgCl₂ bzw. ZnSO₄. (A) Visualisierung der Mg- und Zn-vermittelten Effekte auf die APE-Aktivität. Gezeigt ist ein repräsentatives Gel. S: intaktes Oligonukleotid, P: eingeschnittenes Oligonukleotid. (B) Quantitative Darstellung. 1 µg Zellextrakt, extrahiert aus unbehandelten IPEC-J2-Zellen, wurde für 10 min mit 1 mM MgCl₂ oder ZnSO₄ bei RT vorinkubiert, anschließend mit 40 fmol Oligonukleotid II für weitere 10 min bei 37°C in Anwesenheit von 1 mM MgCl₂ oder ZnSO₄ inkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (in Dreifachbestimmung) + SD.

Untersuchungen, die sich mit der APE-Aktivierbarkeit durch Zink in Abwesenheit von MgCl₂ beschäftigen, sind in der Literatur bis dato nicht beschrieben und wurden hier das erste Mal durchgeführt. Die höhere APE-Aktivität in Zellextrakten in Gegenwart von MgCl₂ im Vergleich zu ZnSO₄ könnte mit der Überlagerung der folgenden beiden Effekte erklärt werden: die hemmende Wirkung durch die Bindung von Zink an Aminosäuren, die für die Aktivität essentiell sind, und die aktivierende Wirkung durch die Bindung an Magnesium-koordinierende Reste.

Ob der stimulierende Effekt von Zink auf die APE-Aktivität in Zellextrakten in Abwesenheit von MgCl₂ auf eine direkte Interferenz mit dem isolierten Protein zurückzuführen ist, konnte nicht untersucht werden, da die Abwesenheit von MgCl₂ während der Reaktion zum vollständigen Verlust der Aktivität der isolierten APE1 führte (Daten nicht gezeigt).

Allerdings publizierten Barzilay et al. (1995), dass die isolierte hAPE1 in Gegenwart von Mg²⁺ ihre höchste Aktivität im Vergleich mit anderen zweiwertigen Kationen zeigte. Sie konnten die EDTA-inaktivierte isolierte hAPE1 durch die Zugabe von Mn²⁺, Ni²⁺ und Zn²⁺ partiell reaktivieren, wobei Zn²⁺ im Vergleich zu Mg²⁺ weniger als 10% zur Aktivierung beitrug. Auch für das zweiwertige Cadmiumion konnte eine Aktivierung der isolierten hAPE1 nachgewiesen werden (Hamann et al., 2012).

Eine bedeutende Rolle für die Aktivierung der APE1 spielen dabei vor allem die Magnesium-koordinierenden Aminosäurereste Glu96, Asp70, Asp210 und Asp308 in der hAPE1, welche auch andere zweiwertige Metallionen koordinieren können (Erzberger und Wilson III, 1999; Mantha et al., 2008). Zn²⁺ und Mg²⁺ weisen mit 74 Å bzw. 72 Å einen ähnlichen Ionenradius auf, sodass eine Bindung von Zink an die Magnesium-koordinierenden Aminosäuren denkbar wäre.

4.4.6 Einfluss von ZnSO₄ auf die OGG- und APE-Aktivität in intakten IPEC-J2-Zellen

Die vorangegangenen Abschnitte zeigten, dass Zink die OGG-Aktivität in Zellextrakten hemmte, was sehr wahrscheinlich auf eine direkte Interferenz mit dem spezifischen Enzym der OGG1 zurückgeführt werden kann. Während Zink auf die APE-Aktivität in Zellextrakten in Anwesenheit des Kofaktors Mg²⁺ hemmend wirkte, erwies sich Zink in Abwesenheit von Mg²⁺ als Stimulanz (Abschnitte 4.4.1, 4.4.2, 4.4.3 und 4.4.5). Die Auswirkung von Zink im zellulären System zu analysieren, weckt daher großes Interesse, insbesondere da bisher keine Daten in der Literatur vorliegen. Im zellulären System erfasst man nicht nur den direkten Einfluss auf die beiden DNA-Reparaturproteine, sondern auch Effekte, die indirekt, z.B. auf Transkriptions- und Translationsebene, stattfinden und die Proteininstabilität oder post-translationale Modifikationen beeinflussen.

Die zelluläre OGG- und APE-Aktivität wurde bestimmt, indem Zellextrakte, präpariert aus Zink-behandelten IPEC-J2-Zellen, mit dem Oligonukleotid I oder Oligonukleotid II inkubiert wurden. In den Abschnitten 4.4.1 und 4.4.3 wurden bereits die einzusetzenden Proteinmengen für die Bestimmung des Einflusses von Zink auf die OGG- und APE-Aktivität in isolierten Zellextrakten erfasst. Um den Einfluss von Zink auf die OGG- und APE-Aktivität in intakten Zellen zu ermitteln, musste allerdings den erforderlichen Puffern, wie Extraktions-, Verdünnungs- und Lysepuffer, 0,5 mM DTT und 1 mM EDTA zugesetzt werden. Damit sollte gewährleistet werden, dass der Effekt auf die DNA-Reparaturproteine ausschließlich auf die Wirkung von Zink während der Inkubation zurückzuführen ist und nicht auf möglicherweise freigesetzte Metallionen während der Präparation. Aus internen Daten geht hervor, dass der Zusatz von DTT und EDTA in den Puffern eine Änderung der Grundaktivität beider Enzyme zur Folge hatte (Hamann, 2009a), sodass die optimale

Proteinmenge für beide DNA-Reparaturproteine aus unbehandelten IPEC-J2-Zellextrakten zunächst ermittelt wurde.

Die optimale Proteinmenge für die OGG-Aktivität wurde bestimmt, indem 10-25 μg des Zellextrakts, präpariert aus unbehandelten IPEC-J2-Zellen, für 60 min mit dem Oligonukleotid I inkubiert wurde. Die Inzision nahm mit steigender Proteinmenge zu und erreichte bei 25 μg einen Einschnitt von ca. 19% (Abbildung 4.28A). Da man mit einer Proteinmenge von 20 μg im linearen Bereich des Testsystems lag und ein ausreichender Einschnitt detektiert wurde, wurden 20 μg und eine Inkubationszeit von 60 min als optimale Parameter gewählt.

Zur Erfassung der einzusetzenden Proteinmenge für die Bestimmung der zellulären APE-Aktivität wurden 2-20 μg der IPEC-J2 Zellextrakte mit dem Oligonukleotid II für 20 min inkubiert. Die APE-Inzisionsaktivität nimmt mit steigender Proteinmenge zwischen 2 und 15 μg linear zu und strebt ab 20 μg einer Sättigung entgegen. Um sowohl hemmende als auch stimulierende Effekte durch Zink zu erfassen, erwiesen sich 10 μg Zellextrakt und eine 20-minütige Inkubation und damit assoziiert ein 50%iger Einschnitt als optimal (Abbildung 4.28B). Aufgrund eines neu erhaltenen AP-Oligonukleotids musste die einzusetzende Proteinmenge im Laufe der Untersuchungen neu ermittelt werden, sodass sich für die Bestimmung der zellulären APE-Aktivität in Zellextrakten aus Zink-behandelten IPEC-J2-Zellen eine Proteinmenge von 20 μg ergab. Damit war gewährleistet, dass die durch die APE-Aktivität vermittelte Inzision innerhalb der Versuche annähernd identisch war.

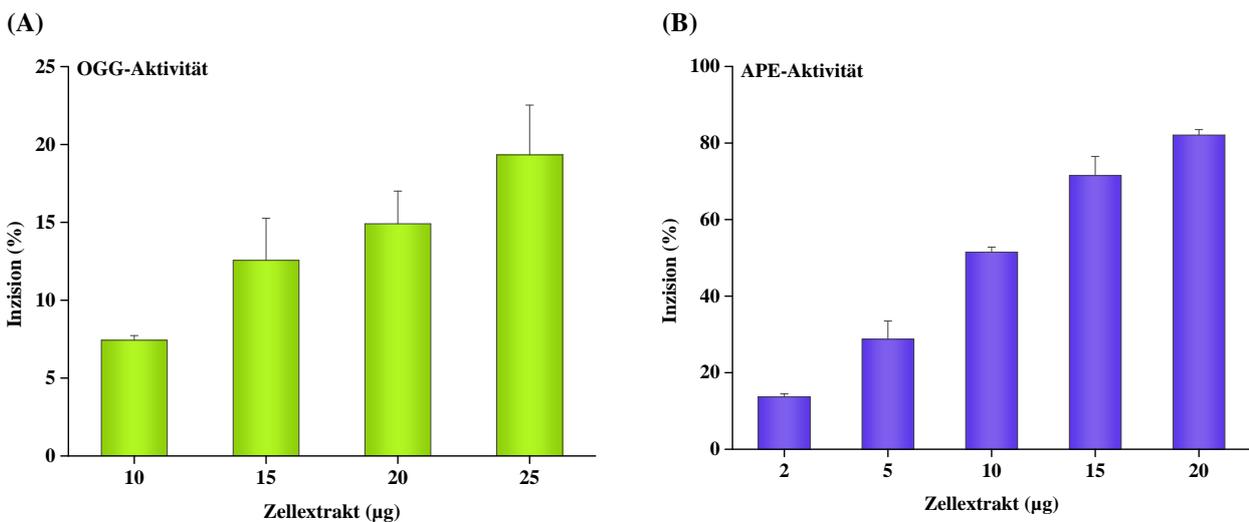


Abbildung 4.28: Bestimmung der einzusetzenden Proteinmenge zur Erfassung der OGG- und APE-Aktivität für IPEC-J2-Zellextrakte. (A) 10-25 μg Zellextrakt, präpariert aus unbehandelten IPEC-J2-Zellen, wurde mit 20 fmol Oligonukleotid I für 60 min bei 37°C inkubiert. Im Extraktions-, Verdünnungs- und Reaktionspuffer waren 0,5 mM DTT und 1 mM EDTA vorhanden. (B) 2-20 μg der präparierten IPEC-J2-Zellextrakte wurden mit 40 fmol Oligonukleotid II für 20 min bei 37°C inkubiert. Im Extraktions-, Verdünnungs- und Reaktionspuffer waren 0,5 mM DTT und 1 mM EDTA vorhanden. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung + SD.

Im Anschluss an die Erfassung der optimalen Parameter wurden Zellextrakte aus einstündig bzw. 24-stündig mit ZnSO_4 inkubierten IPEC-J2-Zellen mit dem Oligonukleotid I bzw. Oligonukleotid II inkubiert, um die zelluläre OGG- bzw. APE-Aktivität zu bestimmen. Im Gegensatz zur direkten Behandlung der Zellextrakte mit ZnSO_4 , die zur Modulierung der APE- bzw. OGG-Aktivität führte (Abschnitte 4.4.1, 4.4.3 und 4.4.5), zeigen die Ergebnisse in Abbildung 4.29 und 4.30, dass bei einer einstündigen Inkubation mit

ZnSO₄ über den gesamten gewählten Konzentrationsbereich von 50-250 µM keine Änderung der OGG- oder APE-Aktivität zu verzeichnen war. Selbst die Behandlung mit 100 µM ZnSO₄ für 24 h resultierte in keiner Modulation der zellulären OGG- und APE-Aktivität.

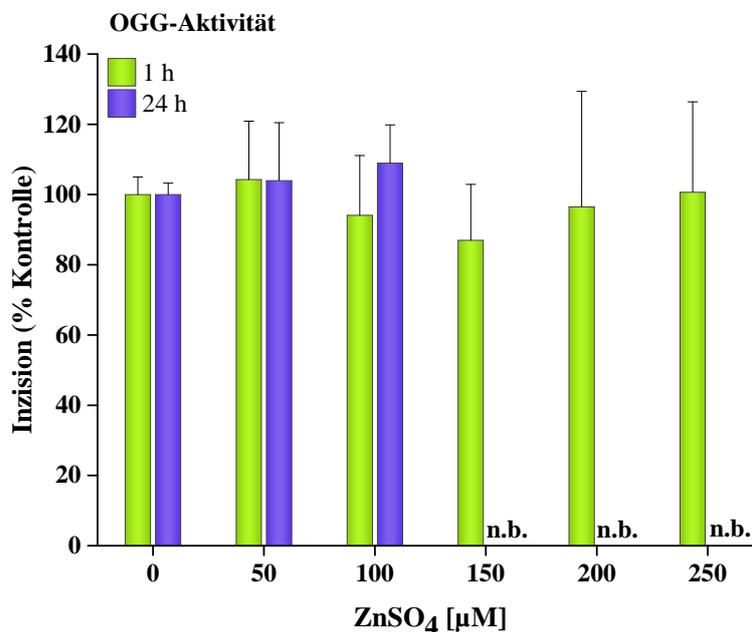


Abbildung 4.29: Einfluss von ZnSO₄ auf die OGG-Aktivität in IPEC-J2-Zellen nach 1 h und 24 h. IPEC-J2-Zellen wurden für 1 h bzw. 24 h mit ZnSO₄ inkubiert. Zur Bestimmung der OGG-Aktivität wurde im Falle der einstündigen Inkubation 20 µg Zellextrakt mit 40 fmol Oligonukleotid I für 60 min bei 37°C inkubiert. 100% Inzision der Kontrolle entsprach $14,9 \pm 2,4\%$. Im Falle der 24-stündigen Inkubation wurde 20 fmol Oligonukleotid I mit 20 µg Zellextrakt für 60 min bei 37°C inkubiert. 100% Inzision der Kontrolle entsprach $13,8 \pm 0,4\%$. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (in Dreifachbestimmung) + SD. n.b. = nicht bestimmt.

Um ausschließen zu können, dass fehlende Effekte auf die zelluläre OGG- und APE-Aktivität möglicherweise auf präparative Artefakte zurückzuführen sind, wurden im Folgenden Zellextrakte in Abwesenheit des Metallchelators EDTA und des Thiolreagenz DTT hergestellt. Jedoch zeigte sich auch unter diesen Bedingungen keine Modulation der zellulären OGG- und APE-Aktivität nach Zinkinkubation (siehe Anhang Abschnitt A.6.2).

In der Literatur sind bisher keine Daten zum Einfluss von Zink auf die OGG- und APE-Aktivität in anderen Zelllinien beschrieben, jedoch wiesen vorangegangene Studien auf modulierende Effekte der OGG1-Expression hin. Sharif et al. (2011a) bestimmten nicht die Aktivität, sondern die Expression der OGG1 mittels Western-Blot in Zink-supplementierten und -depletierten WIL2-NS-Zellen; nur die Zink-depletierten Zellen waren hinsichtlich ihrer OGG1-Expression beeinflusst. Die Zellen wiesen eine erhöhte OGG1-Expression auf. Glioma-C6-Zellen aus Ratten, die unter Zinkmangel kultiviert wurden, zeigten in Western-Blot-Analysen eine vermehrte APE-Expression, vermutlich als Reaktion auf die induzierten DNA-Schäden (Ho und Ames, 2002).

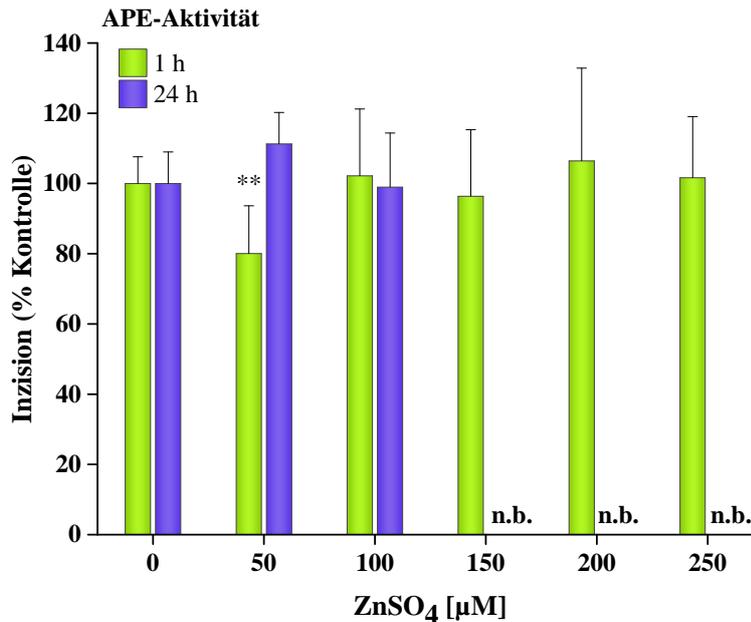


Abbildung 4.30: Einfluss von ZnSO₄ auf die APE-Aktivität in IPEC-J2-Zellen nach 1 h und 24 h. IPEC-J2-Zellen wurden für 1 h bzw. 24 h mit ZnSO₄ inkubiert. Zur Bestimmung der APE-Aktivität wurde im Falle der einstündigen Inkubation 20 µg Zellextrakt mit 40 fmol Oligonukleotid II für 20 min bei 37°C inkubiert. 100% Inzision der Kontrolle entsprach $45,2 \pm 7,6\%$. Im Falle der 24-stündigen Inkubation wurde 10 µg des Zellextrakts mit 20 fmol Oligonukleotid II für 20 min bei 37°C inkubiert. 100% Inzision der Kontrolle entsprach $33,5 \pm 4,1\%$. Gezeigt sind Mittelwerte aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen (in Dreifachbestimmung) + SD. Statistisch signifikanter Unterschied von der Kontrolle: $p^{**} < 0,01$ (ANOVA, Dunnett T3). n.b. = nicht bestimmt.

4.5 Bioverfügbarkeit

Führt man sich noch einmal die vorangegangenen Abschnitte vor Augen, konnten wir belegen, dass eine einstündige, aber keine 24-stündige Vorinkubation mit ZnSO₄ zu einer synergistischen Steigerung von H₂O₂-generierten DNA-Strangbrüchen führte, was aller Wahrscheinlichkeit nach auf eine Reparaturhemmung der H₂O₂-generierten DNA-Strangbrüche und nicht auf eine Inhibierung H₂O₂-detoxifizierender Enzyme, wie CAT oder GPx, zurückzuführen ist. DNA-Reparaturproteine, wie die PARP-1, die OGG1 und APE-1 wurden im zellulären System nicht beeinflusst, aber die direkte Behandlung von Zellextrakten sowie der isolierten Proteine mit ZnSO₄ führte zu Änderungen der Enzymaktivitäten.

Die eben genannten Beobachtungen warfen die Frage auf, ob die Unterschiede in der Zunahme an H₂O₂-generierten DNA-Strangbrüchen nach einstündiger bzw. 24-stündiger Inkubation in der intrazellulären Gesamtaufnahme bzw. der „freien“ Zinkkonzentrationen begründet sind. Ebenfalls abzuklären bleibt der Sachverhalt, dass Zink die Aktivität der Proteine OGG1 und APE1 in Zellextrakten und der isolierten Proteine beeinflusste, im zellulären System aber keine hemmenden oder stimulierenden Effekte beobachtet wurden. Für die Beantwortung dieser Fragen ist es von essentieller Bedeutung, die Bioverfügbarkeit von Zink in IPEC-J2-Zellen näher zu betrachten. Als Endpunkte wurden hierfür drei Parameter herangezogen: die intrazelluläre Gesamtaufnahme, die Bestimmung der intrazellulären „freien“ Zinkkonzentration und die relative MT-Genexpression. Intestinalzellen, wie IPEC-J2-Zellen, eignen sich als ein hervorragendes Modellsystem, da sie aufgrund ihrer Morphologie sowie mit den Zink-transportierenden und Zink-bindenden Proteinen dem Dünndarm als primären Resorptionsort des Zinks am ähnlichsten sind (Martin et al., 2013; Zakrzewski et al.,

2013). Die Zusammenwirkung der an der Aufrechterhaltung der Zinkhomöostase beteiligten Proteine wurde im Einleitungsteil (Abschnitt 2.1.4) ausführlich diskutiert.

4.5.1 Basalgehalt an intrazellulärem gesamten Zn^{2+} in IPEC-J2-Zellen

Die intrazelluläre Gesamtkonzentration an Zink wurde mittels Flammen-Absorptionsspektroskopie (F-AAS) bestimmt. Mit dieser Methode erfasst man sowohl die gebundenen sowie die in der Zelle „frei“ vorliegenden Zinkionen. Um auszuschließen, dass die Zellen nicht bereits unter Zinküberschuss kultiviert wurden, wurde die Zinkkonzentration in dem verwendeten Medium quantifiziert. Das verwendete Medium DMEM/Ham's F12, dem 10% FKS zugesetzt wurden, enthielt $3,6 \mu\text{M}$ Zink.

Über den Basalgehalt weder der intrazellulären Gesamtkonzentration noch der „freien“ Zinkkonzentration in IPEC-J2-Zellen liegen nach unserem Kenntnisstand in der Literatur bisher keine Ergebnisse vor. Die hier zum ersten Mal mittels F-AAS gemessene intrazelluläre Gesamtkonzentration an Zn^{2+} in unbehandelten IPEC-J2-Zellen betrug im Mittel $\approx 130 \mu\text{M}$. Für eine Bewertung der in IPEC-J2-Zellen bestimmten intrazellulären Gesamtkonzentration können allerdings Vergleiche mit anderen intestinalen Zelllinien, wie der humanen Kolonkarzinom-Zelllinie (HT-29), herangezogen werden, dessen intrazelluläre Zinkkonzentration mit $264 \mu\text{M}$ angegeben wurde (Krezel und Maret, 2006).

4.5.2 Intrazelluläre Gesamtaufnahme und relative Genexpression von *mt-1a* in IPEC-J2-Zellen

Nachdem die IPEC-J2-Zellen hinsichtlich ihres Grundstatus an intrazellulärem Gesamt-Zink charakterisiert wurden, sollte im Folgenden der Aufnahmeverlauf von $ZnSO_4$ in die Zellen mittels F-AAS sowie die MT-Genexpression untersucht werden. Zur Bestimmung der relativen Genexpression wurde die in IPEC-J2-Zellen erhaltene cDNA mittels RTq-PCR auf den Gehalt an *mt-1a*-Transkripten analysiert und auf das invariante Gen *gapdh* normiert. Unter den vier verschiedenen Isoformen von MT werden nur MT-1 und MT-2 ubiquitär in Geweben exprimiert, wozu auch der Darm zu zählen ist (zusammengefasst in Coyle et al., 2002). Aufgrund dessen sowie aufgrund der Tatsache, dass die beiden Isoformen MT-1 und MT-2 hinsichtlich ihrer Nukleotidsequenz homolog sind (Alignment siehe Anhang A.6.3), wurde über die geeignete Auswahl der Primer für die RTq-PCR sowohl die Expression von *mt-1a* als auch *mt-2a* erfasst.

Die relative Genexpression von *mt-1a* nach zweistündiger Behandlung der IPEC-J2-Zellen mit $ZnSO_4$, die in Abbildung 4.31B dargestellt ist, zeigt bereits ab $50 \mu\text{M}$ eine geringe Induktion, die dem Dreifachen der Kontrolle entsprach. Die relative Genexpression in zweistündig mit $ZnSO_4$ -behandelten IPEC-J2-Zellen erhöhte sich konzentrationsabhängig und erreichte bei der höchsten Konzentration von $125 \mu\text{M}$ das Zehnfache der Kontrolle. Ein Vergleich mit den Aufnahmeuntersuchungen nach 2 h ergab, dass die intrazelluläre Gesamtkonzentration über einen weiten Konzentrationsbereich aufrechterhalten wurde und bis zu einer extrazellulären Konzentration von $100 \mu\text{M}$ dem Basalgehalt in den Zellen entsprach. Erst ab der höchsten Konzentration von $125 \mu\text{M}$ $ZnSO_4$ war ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen, bei der die intrazelluläre Zinkkonzentration mehr als das Zweifache der extrazellulären Konzentration betrug (Abbildung 4.31A).

MTF-1 ist der in der Zelle einzige bekannte Zinksensor, der durch den Einstrom „freier“ Zinkionen aktiviert wird und die MT-Genexpression induziert (Heuchel et al., 1994). Die bereits beginnende Induktion von

mt-1a bei der niedrigsten Konzentration von 50 μM kann als ein Hinweis für den vorhandenen Zinkimport in die Zelle gewertet werden. Die fehlende Zunahme der intrazellulären Gesamtaufnahme bis einschließlich 100 μM könnte auf die mangelnde Präzision der F-AAS zurückgeführt werden, sodass minimale Unterschiede in der intrazellulären Gesamtkonzentration nicht detektiert wurden.

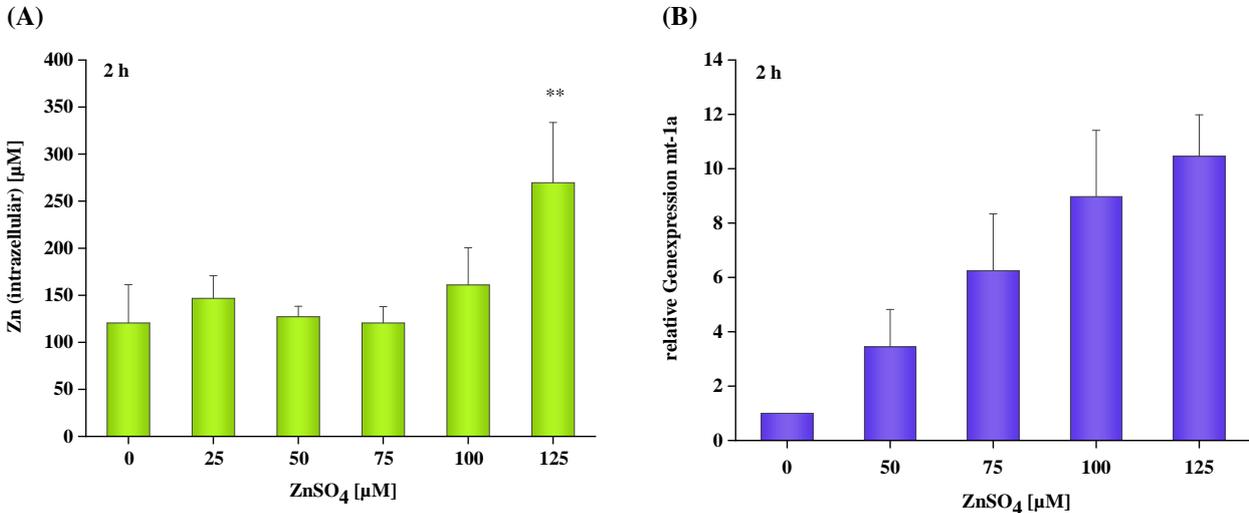


Abbildung 4.31: Intrazelluläre Gesamtaufnahme von Zn^{2+} sowie relative Genexpression von *mt-1a* nach zwei-stündiger Behandlung mit ZnSO_4 in IPEC-J2-Zellen. IPEC-J2-Zellen wurden 2 h mit ZnSO_4 inkubiert. (A) Für die Bestimmung der intrazellulären Gesamtkonzentration wurden die aus IPEC-J2-Zellen erhaltenen Zellpellets sauer verascht und der intrazelluläre Gesamtgehalt an Zn^{2+} mittels F-AAS bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen + SD. Statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle: $p^{**} < 0,01$ (ANOVA, Dunnett T). (B) Für die Bestimmung der relativen Genexpression von *mt-1a* wurden die aus IPEC-J2-Zellen isolierten mRNA-Gehalte mittels RTq-PCR bestimmt und auf das invariante Gen *gapdh* normiert. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (in Doppelbestimmung) + SD.

Ein exponentieller Kurvenverlauf für die Gesamtaufnahme ergab sich hingegen nach 24 h. Auch hier wie im Falle der zweistündigen Inkubation ist bei niedrigen Konzentrationen bis einschließlich 50 μM kein Anstieg der intrazellulären Gesamtkonzentration zu detektieren. Erst ab einer Konzentration von 75 μM wurde ein signifikanter Anstieg der intrazellulären Zinkkonzentration auf 375 μM gemessen, was einem Anreicherungsfaktor von drei im Vergleich zur extrazellulären Konzentration entspricht. Bei der höchsten Konzentration von 125 μM betrug die intrazelluläre Zinkkonzentration 882 μM , sodass sogar das Sechsfache im Vergleich zur extrazellulären Konzentration angereichert wurde (Abbildung 4.32A). Die erhöhte Toxizität (Vgl. Abschnitt 4.1) könnte die Ursache für die verstärkte Aufnahme von Zink ab 100 μM sein. Die Schädigung der Zellmembran, die in IPEC-J2-Zellen mittels vermehrter Abgabe von LDH gemessen wurde (Lodemann et al., 2013), könnte zu einem erleichterten Durchtritt der Zinkionen führen, da die in intakten Zellen vorhandenen Transportmechanismen nicht mehr garantiert sind. Im Unterschied zur intrazellulären Gesamtkonzentration ist bei 50 μM ZnSO_4 bereits ein sechsfacher Anstieg der relativen Genexpression von *mt-1a* nach 24-stündiger Behandlung im Vergleich zur Kontrolle detektierbar, was mit einem Import von Zn^{2+} assoziiert wird. Die Behandlung mit 75-125 μM ZnSO_4 resultierte in einem konzentrationsabhängigen Anstieg der relativen Genexpression von *mt-1a* (Abbildung 4.32B).

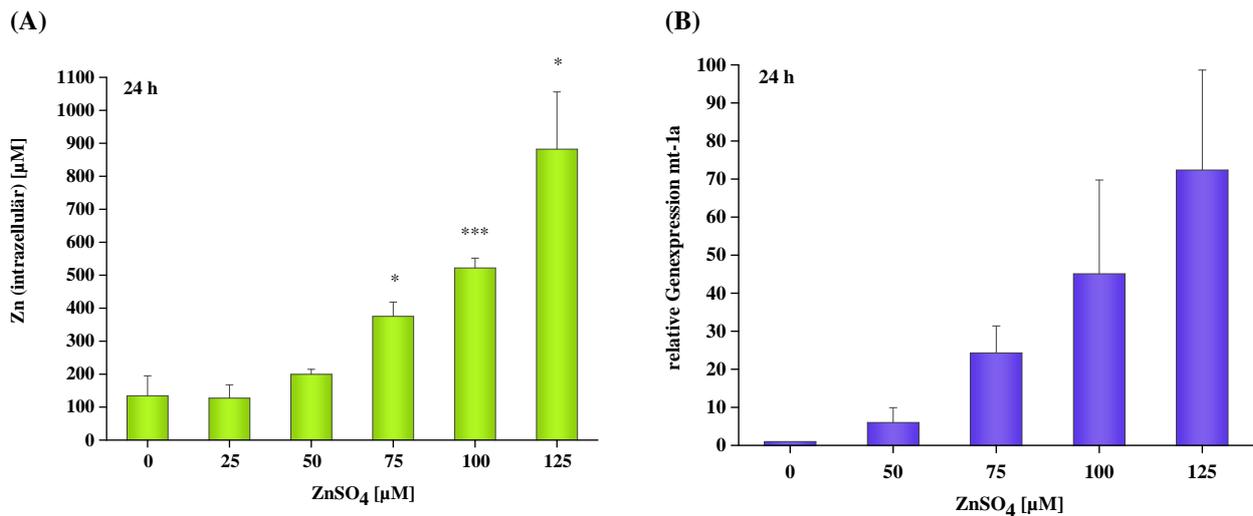


Abbildung 4.32: Intrazelluläre Gesamtaufnahme von Zn²⁺ sowie relative Genexpression von *mt-1a* nach 24-stündiger Behandlung mit ZnSO₄ in IPEC-J2-Zellen. IPEC-J2-Zellen wurden 24 h mit ZnSO₄ inkubiert. **(A)** Für die Bestimmung der intrazellulären Gesamtkonzentration wurden die aus IPEC-J2-Zellen erhaltenen Zellpellets sauer verascht und der intrazelluläre Gesamtgehalt an Zn²⁺ mittels F-AAS bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen + SD. Statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrolle: p* < 0,05, p*** < 0,001 (ANOVA, Dunnett T3). **(B)** Für die Bestimmung der relativen Genexpression von *mt-1a* wurden die aus IPEC-J2-Zellen isolierten mRNA-Gehalte mittels RTq-PCR bestimmt und auf das invariante Gen *gapdh* normiert. Gezeigt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (in Doppelbestimmung) + SD.

Auch in anderen Zelllinien, die allerdings keine Intestinalzellen sind, wurde ein konzentrationsabhängiger Anstieg der intrazellulären Zinkkonzentration nach 24 h gezeigt (Schroeder und Cousins, 1991; Steinebach und Wolterbeek, 1993). Die Aufnahmeuntersuchungen von Haase und Beyersmann (1999) nach 3 h sind vergleichbar mit dem hier dargestellten Aufnahmeprofil in IPEC-J2-Zellen nach 2 h. Vor allem die Untersuchungen in IPEC-J2-Zellen hinsichtlich ihres MT-Status und der relativen Genexpression des Zink-Importproteins ZIP4 und des Zink-Exportproteins ZnT1 publiziert von Martin et al. (2013), ergänzen die hier gezeigten Aufnahmeuntersuchungen sehr gut. Neben einer konzentrationsabhängigen Erhöhung des MT auf Transkriptionsebene nach 24 h zeigten die Autoren auch eine Steigerung auf Translationsebene.

Festzuhalten bleibt, dass die Gesamtkonzentration an intrazellulärem Zn²⁺ in IPEC-J2-Zellen nach 2 h über einen weiten Konzentrationsbereich aufrecht erhalten blieb, allerdings signalisierte die Induktion des *mt-1a* ab 50 µM den Import von Zn²⁺. Erst bei der höchsten Konzentration zeigte sich ein signifikanter Anstieg der intrazellulären Zinkkonzentration. Nach 24-stündiger Behandlung der Zellen wurden im niedrigen Konzentrationsbereich bis 50 µM ZnSO₄ analoge Effekte wie bei der zweistündigen Behandlung mit ZnSO₄ beobachtet. Ab 75 µM extrazellulärem ZnSO₄ erhöhten sich die intrazelluläre Gesamtkonzentration und die relative Genexpression von *mt-1a* konzentrationsabhängig.

4.5.3 Bestimmung der „freien“ Zn^{2+} in IPEC-J2-Zellen

Mittels der F-AAS lässt sich keine Aussage über die Konzentration an „freien“ Zinkionen treffen. Diese sind allerdings von enormer Bedeutung, da sie potente Signale innerhalb der Zelle darstellen (Vgl. Abschnitt 2.1.5).

Für die Bestimmung der „freien“ Zinkkonzentration kamen spezifische Zinksonden zum Einsatz. An der Uniklinik RWTH Aachen in der Gruppe von Prof. Dr. Hajo Haase wurden mittels spezifischer Zinksonden Messungen zur Bestimmung der „freien“ Zinkkonzentration durchgeführt. Die verwendeten Zinksonden (FluoZin-3, ZinPyr-1, Zinquin Ethylester und 6-Methoxy-8-p-toluensulfonamido-quinolin (TSQ)) binden die „freien“ Zinkionen, wodurch sich die Fluoreszenzeigenschaften ändern. Das entstehende Fluoreszenzsignal kann mittels Mikrotiterplattenlesegerät ermittelt werden. Mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass bei Verwendung von FluoZin-3 und ZinPyr-1, nur in Vesikeln lokalisierte „freie“ Zinkionen sichtbar wurden. Auch der Einsatz von Zinquin E und TSQ erlaubte keine Aussage über die intrazelluläre „freie“ Zinkkonzentration, weder in unbehandelten noch in behandelten IPEC-J2-Zellen, da nur ein schwaches Signal detektierbar war. Demnach kann keine Aussage über den Gehalt an „freien“ Zn^{2+} in IPEC-J2-Zellen getroffen werden.

Zinquin E ist Membran-permeabel, dessen Esterfunktion nach dem Eintritt in die Zelle über zytosolische Esterasen gespalten wird. Die gebildete negativ geladene Säure des Zinquins verbleibt in der Zelle. Ein möglicher Mangel oder Defekt zytosolischer Esterasen in IPEC-J2-Zellen, in dessen Konsequenz es nicht zur Spaltung der Esterfunktion und damit auch nicht zur Bildung der Membran-impermeablen Zinquin-Säure kommt, könnte als Ursache für die fehlende Fluoreszenz in Frage kommen. Zudem könnten auch die gemessenen Dissoziationskonstanten der freien Säure des Zinquins, die im nanomolaren Bereich vorliegen, als Erklärungsansatz verwendet werden. Da die Zinquin-Säure sowohl 1:1 und 1:2 Zn^{2+} -Komplexe bildet, sind zwei Dissoziationskonstanten von 370 nM und 85 nM gemessen worden (Zalewski et al., 1993). Liegt die Konzentration an „freien“ Zinkionen in IPEC-J2 Zellen unterhalb nanomolarer Konzentrationen, könnte die nicht detektierbare Fluoreszenz in IPEC-J2-Zellen auch einer mangelnden Sensitivität der verwendeten Sonde zugeschrieben werden.

5. Zusammenfassende Diskussion

Der Fokus der hier präsentierten Arbeit lag auf dem Spurenelement Zink, das zweifellos von essentieller Bedeutung für den Menschen ist. Zink ist u.a. an der zellulären Signalwirkung, antioxidativen Abwehr, der DNA-Reparatur sowie der Genexpression beteiligt und damit für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität unerlässlich (zusammengefasst in Beyersmann und Haase, 2001; Ho, 2004). Die Bewahrung der zuvor genannten biochemischen Prozesse setzt die strikte Kontrolle der intrazellulären „freien“ Zn^{2+} -Ionen voraus, die als Botenstoffe in der Zelle fungieren (zusammengefasst in Hao und Maret, 2005; Maret, 2008). Somit sollte sowohl ein Mangel als auch eine Überversorgung vermieden werden. Während eine Unterversorgung mit dem essentiellen Spurenelement in den Industrieländern aufgrund einer ausreichenden Nahrungszufuhr eher selten ist, kann die zunehmende Verwendung von Nahrungsergänzungsmitteln bzw. mit Zink angereicherten Lebensmitteln schnell zur Überversorgung führen (zusammengefasst in Hartwig, 2012; SCF, 2003).

Auf zellulärer Ebene zeigte sich, dass die Folgen eines Überschusses an Zink mit einer verminderten Pufferkapazität und in der Konsequenz mit der Erhöhung der intrazellulären „freien“ Zn^{2+} -Ionen (Krezel und Maret, 2006) assoziiert werden, was zu ungewollten unspezifischen Nebenreaktionen führen könnte. Aus mechanistischer Sicht sind insbesondere, bedingt durch die hohe Thiolaffinität des Zinks, Wechselwirkungen mit kritischen Thiolgruppen in Proteinen von Interesse. In diesem Kontext ist v.a. die Publikation von Hartwig (2013) zu nennen, die u.a. die Interferenz mit redox-sensitiven Proteinstrukturen, wie z.B. kritischen Thiolgruppen und Zink-bindenden Strukturen, als eine mechanistische Grundlage für die Metall-induzierte genomische Instabilität nennt. Insbesondere toxische Metallionen, wie z.B. Cadmium und Antimon, aber auch das essentielle Spurenelement Kupfer, können DNA-Reparaturprozesse über die Interaktion mit den zuvor genannten redox-sensitiven Proteinstrukturen in DNA-Reparaturproteinen inhibieren (Schwerdtle et al., 2010; Grosskopf et al., 2010; Schwerdtle et al., 2007). Allen genannten Metallionen sowie dem hier in der Diskussion stehenden Spurenelement Zink ist die hohe Affinität zu Thiolgruppen gemein, sodass sich infolgedessen die Frage stellte, ob Zink über vergleichbare Mechanismen DNA-Reparaturproteine hemmt und die damit verbundenen DNA-Reparaturprozesse beeinflusst.

Im Fokus der vorliegenden Arbeit standen insbesondere die Enzyme OGG1 und APE1, die in Folge des Auftretens prämutagener Läsionen, z.B. 8-oxoG oder AP-Stellen, die BER einleiten. Da diese in vielen Phasen mit der SSBR übereinstimmt, befassten wir uns zudem mit dem Einfluss von Zink auf die Entfernung von H_2O_2 -generierten DNA-Einzelstrangbrüchen und dem am initialen Schritt beteiligten Enzym PARP-1 (zusammengefasst in Christmann et al., 2003; Caldecott, 2008).

Um zunächst eine potentielle Interaktion mit den genannten DNA-Reparaturproteinen abzuklären, wurden Untersuchungen zur Aktivität der OGG1, APE1 und PARP1 sowohl in isolierten Zell- bzw. Kernextrakten humanen Ursprungs als auch in aus dem Schwein isolierten Darmepithelzellen und anhand der isolierten Proteine durchgeführt. Im Folgenden sollen zunächst die Zink-vermittelten Effekte auf die OGG1 und APE1 sowie der möglicherweise zugrunde liegende Mechanismus erläutert werden.

Untersuchungen zur OGG- und APE-Aktivität in Zellextrakten sowie der isolierten hOGG1 und hAPE1 wurden mittels des von Hamann et al. (2009) entwickelten nicht-radioaktiven Inzisionstests durchgeführt. Bezüglich der OGG-Aktivität in isolierten Zellextrakten war tatsächlich ein durch Zink vermittelter hemmender Effekt, beginnend ab $75 \mu M$, detektierbar. Da wir ebenfalls einen Aktivitätsverlust der isolierten hOGG1 in Gegenwart von Zink ermittelten, ist die Zink-vermittelte Inhibierung in isolierten Zellextrak-

ten vermutlich aus der direkten Interaktion mit der OGG1 begründet. Der Aktivitätsverlust der isolierten hOGG1, die in allen für ihre katalytische Aktivität relevanten Aminosäuren mit der OGG1 im Schwein übereinstimmt (Alignment siehe Anhang A.6.3), könnte über die Bindung von Zink an diese kritischen Aminosäuren erklärt werden. Die Tatsache, dass Zink neben seiner hohen Affinität zu Thiolgruppen auch mit dem N-Atom des Imidazolrings des Histidins und den Carboxylgruppen aus Aspartat- und Glutamatresten wechselwirken kann, macht die für die Schadenserkennung essentiellen Aminosäuren Cys253 (korrespondiert mit Cys243 im Schwein) und His270 (korrespondiert mit His260 im Schwein) der hOGG1 zu potentiellen Angriffspunkten (Bruner et al., 2000; Zharkov und Rosenquist, 2002). Zudem könnte Zink über die Bindung an Asp268 (korrespondiert mit Asp258 im Schwein), das eine elementare Rolle für die katalytische Aktivität spielt, die Schadenserkennung beeinflussen (Norman et al., 2003).

Jedoch muss darauf hingewiesen werden, dass die isolierte hOGG1 erst bei höheren Konzentrationen im Vergleich mit dem isolierten Zellextrakt signifikant durch Zink gehemmt wurde. Dafür kann z.B. die Lagerung der isolierten hOGG1 in einem EDTA-enthaltenen Puffer als möglicher Grund in Frage kommen, da das EDTA in der späteren Inkubation zur Komplexbildung von Zn^{2+} befähigt ist. Zudem sind auch indirekt inhibitorische Effekte in isolierten Zellextrakten denkbar. So ist aus Studien in der Literatur bekannt, dass die OGG1 mit verschiedenen DNA-Reparatur- oder Zellzykluskontrollproteinen interagiert, die die Inzisionsaktivität beeinflussen können (Marsin et al., 2003; Park et al., 2009; de Souza-Pinto et al., 2009; D'Errico et al., 2006). In diesem Kontext ist v.a. die APE1 zu nennen, die *in vitro* die DNA-Glykosylase-Aktivität, nicht aber die AP-Lyase-Funktion der OGG1 stimuliert (Hill et al., 2001) und auf die im Weiteren näher eingegangen werden soll.

Die APE1 katalysiert den Einschnitt von AP-Stellen oder entfernt den von der bifunktionellen DNA-Glykosylase hinterlassenen α,β -ungesättigten Aldehyd, wobei ihre katalytische Aktivität von dem Kofaktor Magnesium abhängig ist (zusammengefasst in Lindahl, 1993; Krokan et al., 1997). Je nach Wahl der experimentellen Bedingungen, wurde die APE-Aktivität in isolierten Zellextrakten in Abwesenheit von $MgCl_2$ nach Behandlung mit $ZnSO_4$ stimuliert, in Anwesenheit des Kofaktors zeigte sich hingegen eine Hemmung der APE-Aktivität in isolierten Zellextrakten signifikant ab $100 \mu M ZnSO_4$.

Die Zink-vermittelte Stimulation der APE-Aktivität in isolierten Zellextrakten in Abwesenheit von $MgCl_2$ könnte mechanistisch auf die Bindung an Aminosäuren wie Glu96, Asp70, Asp210 und Asp308, die in der hAPE1 als Magnesium-koordinierende Reste postuliert werden (Mantha et al., 2008; Erzberger und Wilson III, 1999) und in der APE1 im Schwein an gleicher Stelle auftreten (Alignment siehe Anhang A.6.3), zurückgeführt werden. Allerdings kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich tatsächlich um eine direkt stimulierende Wirkung handelt, da keine experimentellen Daten zur Untersuchung des Einflusses von Zink auf die isolierte hAPE1 in Abwesenheit ihres Kofaktors vorliegen.

In Gegenwart von $MgCl_2$ führte Zink zur Verminderung der Aktivität der isolierten hAPE1 sowie der APE-Aktivität in isolierten Zellextrakten. Zur Inhibierung der isolierten hAPE1 waren im Vergleich mit dem isolierten Zellextrakt höhere Konzentrationen an $ZnSO_4$ erforderlich. Das könnte möglicherweise wie auch bei der isolierten hOGG1 auf die Anwesenheit von EDTA im Aufbewahrungspuffer der isolierten APE1 zurückzuführen sein. Dennoch scheint die inhibitorische Wirkung von Zink auf die APE-Aktivität in Zellextrakten zum Teil auf die direkte Interaktion mit der APE1 zurückzugehen. Der Aktivitätsverlust der isolierten hAPE1 könnte mechanistisch zum einen über die Beeinflussung der Schadenserkennung, was mit der Bindung von Zink an Cys99 assoziiert werden würde, zum anderen über die Bindung an His309 und damit einer Beeinflussung der katalytischen Aktivität, erklärt werden (Mantha et al., 2008; Kim et al., 2011).

Als drittes DNA-Reparaturprotein war die PARP-1 von Interesse, die sowohl die initialen Schritte der SSB-R einleitet als auch mit Proteinen der prozessierenden Phase der BER wechselwirkt (zusammengefasst in Caldecott, 2008). Zink ist als strukturelle Komponente für die in der PARP-1 enthaltenen drei Zinkfinger, über die die DNA-Bindung und in Folge dessen die Aktivierung des Enzyms erfolgt, für die Aktivität des Enzyms von essentieller Bedeutung (Ikejima et al., 1990; Langelier et al., 2008, 2010).

Interessanterweise zeigten die vorliegenden Ergebnisse eine Hemmung der PAR-Synthese in Gegenwart von ZnSO₄ sowohl in isolierten Kernextrakten als auch für die isolierte hPARP-1. Ein Verlust der PAR-sylierungsaktivität der isolierten hPARP-1 in Anwesenheit von Zink könnte auf die Wechselwirkung mit kritischen Aminosäuren zurückzuführen sein, wobei v.a. Cys908 (korrespondiert mit Cys912 im Schwein) zu nennen ist. Mutagenesestudien wiesen auf die elementare Bedeutung des Cys908 für den Katalysemechanismus hin (Rolli et al., 1997). Zudem scheint der Zink-inhibierende Mechanismus über seine Thiolaffinität vermittelt zu sein, da andere zweiwertige weniger stark thiolaffine Metallionen, wie Mg²⁺ und Ca²⁺, weder einen stimulierenden noch einen hemmenden Effekt auf PARsylierungsaktivität in isolierten Kernextrakten ausübten. Zudem deuten die Protektionsversuche mit GSH und NAC auf thiolhaltige Aminosäuren als potentielle Ziele von Zink hin. Des Weiteren konnten wir beobachten, dass möglicherweise die Elongationsreaktion der isolierten hPARP-1 in Anwesenheit von Zink beeinflusst wurde, jedoch nicht die initiale Anheftung des ADP-Ribose-Monomers. Zusammen mit den von Ruf et al. (1998b), Rolli et al. (1997) und Trucco et al. (1999) publizierten Strukturdaten für die katalytischen Domäne der PARP-1 könnte dies mit einer direkten Wechselwirkung der Zinkionen mit den für den Elongationsmechanismus essentiellen Aminosäuren Glu988 und Glu923 (korrespondiert mit Glu922 und Glu927 im Schwein) zusammenhängen (Alignment siehe Anhang A.6.3).

Die Erkennung und Entfernung von DNA-Schäden folgt einem strikt koordinierten Prozessablauf, der die strukturelle und funktionelle Integrität des für den Schaden zu entfernenden DNA-Reparaturproteins voraussetzt. Störungen in der katalytischen Funktion der DNA-Reparaturproteine führen in der Konsequenz zu Fehlern im DNA-Reparaturprozess, infolgedessen sich nicht reparierte DNA-Schäden manifestieren und möglicherweise zu Mutationen führen können (zusammengefasst in Hoeijmakers, 2001). Daher sollte die Relevanz der erhaltenen Ergebnisse aus den isolierten Extrakten und den isolierten Proteinen im Zellmodell exemplarisch anhand der Reparatur von H₂O₂-induzierten DNA-Einzelstrangbrüchen in der intestinalen Zelllinie des Schweinedünndarms (IPEC-J2) untersucht werden. Interessanterweise zeigte sich im Rahmen der Untersuchungen zur SSB-R, dass bereits eine einstündige Vorinkubation mit nicht-zytotoxischen Konzentrationen an ZnSO₄ die Häufigkeit der H₂O₂-generierten DNA-Strangbrüche synergistisch erhöhte, was allerdings nicht auf eine Interferenz von H₂O₂-detoxifizierenden Enzymen oder einer Depletion des an der antioxidativen Abwehr beteiligten Tripeptids GSH zurückgeführt werden konnte. Erstaunlicherweise führte eine längere Vorinkubationszeit von 24 h mit ZnSO₄ erst bei einer stark zytotoxischen Konzentration zur signifikanten Erhöhung der Schadensinduktion. Mit Blick auf die beschriebenen Mechanismen zum Erhalt der zellulären Zinkhomöostase wäre denkbar, dass der Zelle innerhalb der 24-stündigen Behandlung mit ZnSO₄ genügend Zeit zur Verfügung stand, um die für die Pufferung wichtigen Zink-bindenden Proteine (z.B. MT) zu synthetisieren sowie möglicherweise über *Muffling*-Reaktionen eine Umverteilung der „freien“ Zinkionen über die Speicherung in zelluläre Vesikel zu bewerkstelligen und infolgedessen den „steady-state“ zu erreichen (zusammengefasst in Colvin et al., 2010). In diesem Zusammenhang ist insbesondere auf die von uns detektierte Erhöhung der relativen Genexpression von MT nach 24 h zu verweisen, die im gleichen Konzentrationsbereich durchgeführt wurde wie die Untersuchungen zum Einfluss von ZnSO₄

auf H₂O₂-generierte DNA-Strangbrüche. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den von Martin et al. (2013) gezeigten Daten, in denen sie neben einem gesteigerten MT-Gehalt nach 24-stündiger Behandlung der IPEC-J2 Zellen mit ZnSO₄ auf Transkriptionsebene, auch einen erhöhten Proteingehalt nachwiesen. Aber auch andere thiolgruppenhaltige Moleküle können zur Pufferung der „freien“ Zinkionen beitragen, wie z.B. das in der Zelle vorherrschende Thiol GSH, dessen Gehalt in IPEC-J2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation konzentrationsabhängig anstieg. Da die Zink-vermittelte Aktivierung des Zinksensors MTF-1 nicht nur für die vermehrte Induktion von MT (Heuchel et al., 1994; Wang et al., 2004; Zhang et al., 2003), sondern auch für die schwere Kette der γ -GCL (Günes et al., 1998), die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der GSH-Biosynthese katalysiert, verantwortlich ist, erklärt das die Erhöhung beider Parameter nach 24-stündiger Inkubationsphase der IPEC-J2 Zellen mit ZnSO₄.

Für eine toxikologische Bewertung und auch aus mechanistischer Sicht hochinteressant ist die Beobachtung, dass die Häufigkeit an H₂O₂-generierten DNA-Strangbrüchen nach einstündiger Vorinkubation mit ZnSO₄ konzentrationsabhängig stieg. Unseren Ergebnissen nach zu urteilen, scheint vermutlich die Inhibierung der SSBR, die bereits während der fünfminütigen Koinkubation mit H₂O₂ eingeleitet wurde, die Ursache zu sein. Ausgehend von den Untersuchungen zur PARsylierungsaktivität in isolierten Kernextrakten und der isolierten PARP-1, die in Anwesenheit von ZnSO₄ erniedrigt wurde, könnte der zugrundeliegende Mechanismus für die langsamere Entfernung der H₂O₂-generierten DNA-Strangbrüche in der Hemmung des initialen Schritts der SSBR liegen, der über die Bindung der PARP-1 an DNA-Einzelstrangbrüche und dessen Aktivierung eingeleitet wird (Ikejima et al., 1990). Vertiefende Untersuchungen sollten daher die Auswirkung einer einstündigen Vorinkubation mit ZnSO₄ auf die PARsylierungsaktivität in einer humanen Zelllinie betrachten. Anhand der zur Quantifizierung verwendeten immunfluorometrischen Methode konnte jedoch nicht geschlussfolgert werden, ob die initiale Phase der Reparatur von H₂O₂-generierten DNA-Strangbrüchen über eine verminderte PARsylierungsaktivität im zellulären System vermittelt wurde.

Hinsichtlich der zellulären OGG- und APE-Aktivität deuteten unsere Untersuchungen weder auf einen stimulierenden noch einen hemmenden Einfluss von Zink hin. Aus den Aufnahmeuntersuchungen nach Kurzzeitinkubation ging hervor, dass Zink erst bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 125 μ M ZnSO₄ in der Zelle akkumuliert. Die intrazelluläre Gesamtkonzentration entsprach etwa 260 μ M. Nach 24-stündiger Inkubation mit 100 μ M erreichte die intrazelluläre Gesamtkonzentration einen Wert von 522 μ M. Allerdings bilden die biochemisch wirksame Form die „freien“ Zinkionen, die, wie aus der Literatur bekannt ist, nur im pikomolaren Konzentrationsbereich vorliegen (Krezel und Maret, 2006). Für die Zink-vermittelte Inhibierung der isolierten Proteine wurden jedoch Konzentrationen im mikromolaren Konzentrationsbereich eingesetzt. Daher ist der Grund für den fehlenden Effekt in Zellen vermutlich durch die effiziente zelluläre Pufferungskapazität (z.B. Bindung an MT, Speicherung in Vesikeln) der einströmenden Zinkionen und damit einer niedrigen intrazellulären „freien“ Zinkkonzentration erklärbar.

Weitere Ansätze, die zur Erklärung der Zink-vermittelten Inhibierung der SSBR bei höheren extrazellulären ZnSO₄-Konzentrationen beitragen, jedoch noch eines experimentellen Beweises erfordern, werden im Folgenden diskutiert. Demnach wäre mechanistisch auch die Inhibierung von Proteinen denkbar, die an der prozessierenden Phase der SSBR mitwirken. Hinweise aus der Literatur ergeben sich insoweit, dass Zink im isolierten Kernextrakt sowohl den Polymerisationsschritt verzögerte, was mit der Inhibierung der Pol β assoziiert wird, als auch den Ligationsschritt (Li et al., 2009). Weitaus interessanter sind allerdings die Ergebnisse von Snyder et al. (1989), die eine Akkumulation an DNA-Strangbrüchen in UV-behandelten Zellen nachwiesen und dahinter eine Hemmung des Polymerisations- bzw. Ligationsschritts durch Zink

vermuteten. Die durch UV-Behandlung induzierten großräumigen DNA-Addukte werden über die Nukleotidexzisionsreparatur entfernt. Den dabei mitwirkenden prozessierenden Proteinen Pol ϵ , Pol δ und Lig1 wird ebenfalls eine Rolle im *long-patch*-Reparaturweg der SBR zugeschrieben (zusammengefasst in Caldecott, 2008).

Zudem besteht die Möglichkeit, dass Zink über seine höhere Affinität zu MT potentiell gebundene Fe²⁺-Ionen (Ding et al., 1994; Good und Vasak, 1986; Baird et al., 2006) verdrängt. Diese könnten infolgedessen mit dem zugesetzten H₂O₂ bereits bei niedrigen Konzentrationen (< 1 μ M) über Fenton-Reaktion zur Generierung von hochreaktiven \cdot OH-Radikalen führen, die die vermehrte Bildung von DNA-Strangbrüchen fördern (zusammengefasst in Halliwell und Gutteridge, 1992). Unterstützend tragen dazu die Resultate von Elgohary et al. (1998) bei, die eine Zunahme des Eisengehalt in HL-60 nach Behandlung mit Zink detektierten.

Insgesamt demonstrieren die hier gezeigten Daten, dass Zink im zellulären System über indirekte Mechanismen die genomische Stabilität gefährden könnte. Dies äußerte sich bereits bei niedrigen extrazellulären Konzentrationen durch die synergistische Zunahme an H₂O₂-generierten DNA-Strangbrüchen, die sich mit höheren ZnSO₄-Konzentrationen weiter steigerten. Bei höheren extrazellulären Konzentrationen ist dieser Effekt möglicherweise auf eine Inhibierung der Reparatur durch H₂O₂-induzierte DNA-Einzelstrangbrüche zurückzuführen. Allerdings trat die Erhöhung nur nach kurzer Expositionsdauer auf und war nach 24-stündiger Inkubation nicht mehr detektierbar.

Die Folge nicht reparierter DNA-Einzelstrangbrüche in proliferierenden Zellen äußert sich in der Blockierung und dem Zusammenbruch der Replikationsgabel während der S-Phase des Zellzyklus, in dessen Folge lethale und klastogene DNA-Doppelstrangbrüche gebildet werden (Kuzminov, 2001), die für die Zelle wohl die schwerwiegendsten DNA-Schäden darstellen. Bemerkenswerterweise sind Zellen fähig, diese Form von DNA-Schäden über die Mechanismen der DNA-Doppelstrangbruchreparatur zu reparieren. Jedoch kann die DNA-Doppelstrangbruchreparatur bei einer immensen Erhöhung der DNA-Einzelstrangbrüche überlastet sein, sodass dies in Folge zu genetischen Instabilitäten und/oder dem Zelltod führen könnte (zusammengefasst in Caldecott, 2008).

Im nicht-zellulären System zeigten unsere Untersuchungen eine potentielle Interferenz mit den initialen DNA-Reparaturproteinen der BER OGG1 und APE1 sowie mit der PARP-1, die die DNA-Einzelstrangbruchreparatur einleitet. Als mechanistische Grundlage vermuten wir die Wechselwirkung mit kritischen Thiolgruppen im Protein, aber auch mit dem N-Atom des Imidazolrings des Histidins und der Carboxylgruppe des Aspartats und Glutamats. Während der Einfluss von Zink auf die PARsylierung in intakten Zellen im Weiteren mit einer empfindlicheren Methode abgeklärt werden muss, übte das Spurenelement keinen Einfluss auf die zelluläre OGG- und APE-Aktivität aus. Die unterschiedlichen Effekte von Zink auf die DNA-Reparaturproteine im zellulären und nicht-zellulärem System verdeutlichen die Wichtigkeit einer intakten zellulären Zinkhomöostase.

Adverse Folgen durch Zink sind bei einer ausgewogenen Ernährung nicht zu erwarten, jedoch ist der Bereich zwischen ausreichender Zinkversorgung und Überdosierung relativ gering, sodass es in Folge von Supplementierung in Form von NEM schnell zum Überschreiten der empfohlenen Höchstmenge von 25 mg/Tag kommen kann (zusammengefasst in Hartwig, 2012). Das BfR empfiehlt daher auch eine Höchstmenge von Zink von 2,5 mg pro NEM, rät allerdings komplett von einer Supplementierung bei Kindern und Jugendlichen bis zum vollendeten 17. Lebensjahr ab (zusammengefasst in Grossklaus und Ziegenhagen, 2006). Geht man von einem Verdauungsvolumen von 1,5 L aus, ergibt sich für ein NEM mit 2,5 mg Zink eine Konzen-

tration von 25 μM , die nur geringfügig unter den hier verwendeten extrazellulären Konzentrationen liegt und die damit eingesetzten experimentellen Konzentrationen als durchaus relevant anzusehen sind. Allerdings sind auch Präparate mit 30 mg Zink keine Seltenheit.

Anhand der experimentellen Daten ist auch zu erkennen, dass das Spurenelement alleine keine Wirkung auf die DNA-Integrität ausübte, allerdings in Kombination mit dem oxidativen Stressor H_2O_2 die prooxidativen Effekte verstärkte. Diese Ergebnisse haben für den Menschen insoweit Bedeutung, dass während des Alterungsprozesses, aber auch pathophysiologische Erscheinungen (z.B. Diabetes) beim Menschen oft mit oxidativen Stress einhergehen. In diesem Zusammenhang wird die Supplementierung mit Zinkpräparaten als therapeutische und präventive Maßnahme erfolgreich eingesetzt (zusammengefasst in Prasad, 2009; Haase et al., 2008). Allerdings sollte aufgrund des genotoxischen Potentials von Zink in Kombination mit oxidativen Stress auf eine kontrollierte Aufnahme der Zink-Präparate geachtet werden, damit das Spurenelement die gewollte antioxidative Wirkung erzielt und nicht zur Verstärkung der prooxidativen Bedingungen und infolgedessen möglicherweise zur Instabilität des Genoms beiträgt.

6. Material und Methoden

Eine Zusammenstellung aller verwendeter Lösungen, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte befindet sich im Anhang.

6.1 Zellkultur

6.1.1 Kultivierung der Zellen

Als Zellmodell diente zum einen die adhärenente permanente, nicht-transformierte Epithelzelllinie, IPEC-J2, ursprünglich isoliert aus dem Jejunum ungesäugter Ferkel und zum anderen die adhärenente humane Epithelzelllinie, HeLa-S3, isoliert aus dem Zervixkarzinom. IPEC-J2-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Zentek (Freie Universität Berlin) zur Verfügung gestellt und wuchsen in DMEM/Hams F12 mit 10% FKS, 100 U/mL Penicillin und 100 µg/L Streptomycin. HeLa-S3-Zellen wurden hingegen käuflich bei American Type Culture Collection (ATCC) erworben und wuchsen in DMEM, dem 10% FKS, 100 U/mL Penicillin und 100 µg/L Streptomycin zugesetzt wurden. Beide Zelllinien wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C in 90% FKS und 10% DMSO.

Um das Wachstum als Monolayer zu gewährleisten, wurden die Zellen alle 2 bis 3 Tage passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen anschließend mit 0,25%igem Trypsin gewaschen. Im Anschluss daran erfolgte eine erneute Zugabe von 0,25%igem Trypsin für 30 s unter Schwenken. Nach dem Absaugen des Trypsins wurden die IPEC-J2-Zellen für mindestens 5 min und die HeLa-S3-Zellen für 2,5 min in den Brutschrank gestellt und anschließend die abgelösten Zellen durch Zugabe von neuem Kulturmedium vereinzelt, anschließend gezählt und ein Aliquot der Zellsuspension in frisches Kulturmedium gegeben. Die Zählung beider Zelllinien erfolgte an einem automatischen Zellzählgerät in einem Größenbereich von 12,6-40,0 µm.

6.1.2 Behandlung der Zellen

Für die Behandlung der Zellen wurde eine 100-mM-ZnSO₄-Stammlösung in steril filtriertem (Ø 0,2 µm, Celluloseacetat), bidestillierten Wasser hergestellt. Die gewünschten Verdünnungen wurden vor dem jeweiligen Versuch frisch angesetzt. Für die Inkubation der Zellen wurde das Restvolumen des Mediums von drei Zellkulturschalen mittels einer Messpipette bestimmt und der Mittelwert zur Berechnung der gewünschten ZnSO₄-Endkonzentration verwendet.

Die H₂O₂-Inkubationslösungen wurden aus einer 30%igen H₂O₂-Stammlösung hergestellt. Die Zeit der Koinkubation mit ZnSO₄ betrug 5 min.

6.1.3 Zellzahlbestimmung und Metabolische Aktivität

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden $2,5 \cdot 10^5$ IPEC-J2-Zellen in Zellkulturschalen (Ø 60 mm) ausgesät und für die gewünschte Dauer in der logarithmischen Wachstumsphase inkubiert. Nach dem Ende der

Behandlung wurden die Zellen abtrypsiniert, in frischem DMEM/Ham's F12-Medium vereinzelt und die Zellzahl mit einem automatischen Zellzählgerät bestimmt.

Zur Messung der metabolischen Aktivität wurde das Cell Counting Kit-8 (CCK-8) verwendet, das das wasserlösliche Tetrazoliumsalz WST-8 sowie den Elektronencarrier mPMS enthält. Das Prinzip beruht auf der extrazellulären Umsetzung des pinken WST-8-Reagenz in Gegenwart metabolisch aktiver Zellen durch die zellulären $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ -abhängigen Dehydrogenasen zum orangefarbenen Formazan (Ishiyama et al., 1997). Die gemessene Absorption bei 450 nm ist proportional zum Anteil lebender Zellen.

Für die Bestimmung der metabolischen Aktivität wurden $5 \cdot 10^3$ IPEC-J2-Zellen pro 100 μL Medium pro Well einer 96-Well-Platte ausgestreut und in der logarithmischen Wachstumsphase inkubiert. Nach dem Ende der gewünschten Inkubationsdauer wurden 10 μL des CCK-8 Reagenz pro Well pipettiert und nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurde die Absorption bei 450 nm am Mikrotiterplattenlesegerät gemessen.

6.2 Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen

Die Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen erfolgte mit Hilfe der Alkalischen Entwindung (AU) (Hartwig et al., 1993). Die Methode beruht auf dem Prinzip der Entwindung der DNA im alkalischen Milieu bei pH 12,3, die durch die anschließende Neutralisation und Sonifizierung abgestoppt wird. Die dabei generierten Anteile an einzel- und doppelsträngiger DNA werden mittels Hydroxylapatitchromatographie separiert und durch Zugabe eines Fluoreszenz-Farbstoffs quantifiziert.

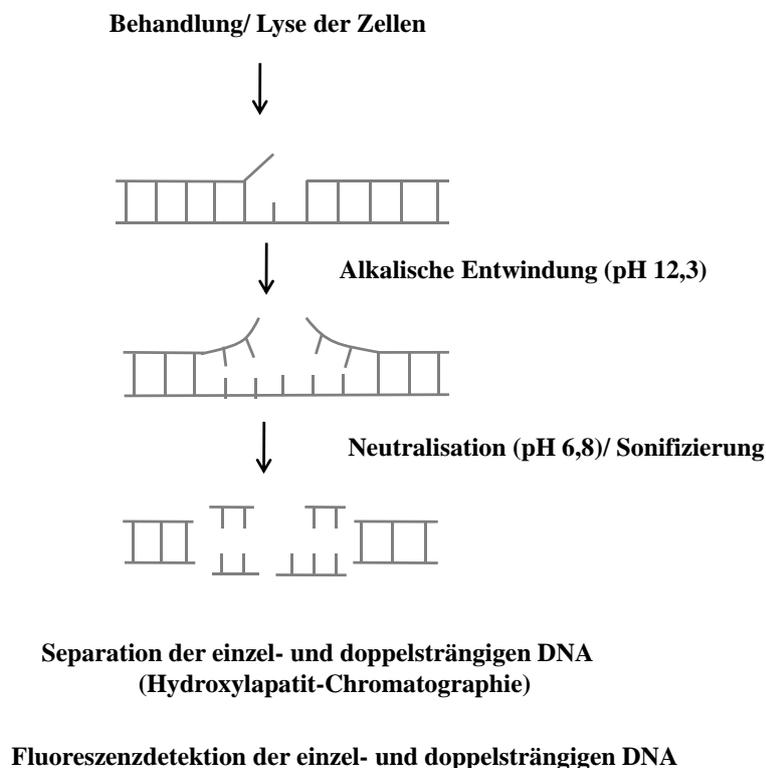


Abbildung 6.1: Schematischer Ablauf der Alkalischen Entwindung (AU).

6.2.1 Versuchsansatz

Alle nachstehenden Schritte wurden im Dunkeln durchgeführt. Zunächst wurden $1,5 \cdot 10^5$ IPEC-J2-Zellen pro Zellkulturschale (\varnothing 40 mm) ausgesät und in der logarithmischen Wachstumsphase für die gewünschte Dauer mit ZnSO_4 inkubiert. Zur Ermittlung des Einflusses von Zink auf das Ausmaß von H_2O_2 -generierten DNA-Strangbrüchen erfolgte zudem eine fünfminütige Koinkubation mit H_2O_2 . Nach dem Ende der Inkubation wurde das Medium entfernt, die Zellen wurden mit PBS (4°C) gewaschen und bis zur Lyse auf Eis gestellt.

6.2.2 Alkalische Entwindung

Für die Alkalische Entwindung wurde das PBS abgesaugt und die Zellen mit 1,5 mL alkalischer Lösung für 30 min bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln stehen gelassen. Durch Zugabe von 0,1 N HCl erfolgte die Neutralisation (pH 6,8) und im Anschluss wurden die lysierten Zellen für 15 s auf Eis beschallt. Um eine Renaturierung der DNA-Fragmente zu vermeiden, wurden die Proben mit SDS (Endkonzentration 0,5%) suspendiert und bis zur Chromatographie bei -20°C gelagert.

6.2.3 Hydroxylapatit-Chromatographie

Mittels Hydroxylapatit-Chromatographie wurden die einzel- und doppelsträngige DNA bei 60°C voneinander getrennt. Alle folgenden Pufferlösungen sowie die Säulen wurden zuvor auf 60°C temperiert. Für die Säulenpräparation wurde 0,1 g/mL Hydroxylapatit in 0,01 M Na-Phosphatpuffer für 30 min bei 60°C quellen lassen. Je 1 mL dieser Suspension wurde in eine 3-mL-Spritze (Säule) überführt, die oben und unten mit einer Glasfilterfritte abgeschlossen wurde. Die Säulen wurden zunächst mit 1,5 mL 0,5 M K-Phosphatpuffer gewaschen und anschließend mit 1,5 mL 0,01 M Na-Phosphatpuffer vorkonditioniert. Nach dem Aufgeben der Proben auf die Säulen, wurden diese mit 2,5 mL Na-Phosphatpuffer gespült, um nicht-bindende Bestandteile zu entfernen. Die einzelsträngige DNA wurde mit 1,5 mL 0,15 M K-Phosphatpuffer und die doppelsträngige DNA mit 1,5 mL 0,35 M K-Phosphatpuffer in 24-Lochplatten eluiert. Durch die Zugabe des Farbstoffs HOECHST 33258 (Bis-Benzimid, Endkonzentration $7,7 \cdot 10^{-7}$ M) wurde die Fluoreszenz (Anregungswellenlänge: 360 nm, Emissionswellenlänge: 455 nm) mittels eines Mikrotiterplattenlesegerätes bestimmt.

6.2.4 Berechnung

Die Anzahl an DNA-Strangbrüchen pro Zelle bzw. pro 10^6 Basenpaaren (Bp) wurden nach Hartwig et al. (1993) und Hartwig et al. (1996) berechnet. Der Anteil doppelsträngiger DNA (dsDNA) wurde aus dem Verhältnis der Fluoreszenz doppelsträngiger DNA (F_{ds}) und der Fluoreszenz einzelsträngiger DNA (F_{ss}) nach vorheriger Subtraktion der Blindwerte errechnet (Gleichung 6.1).

Anteil dsDNA

$$dsDNA = \frac{F(ds)}{F(ds) + 2,1F(es)} \quad (6.1)$$

Die Anzahl an DNA-Strangbrüchen pro Zelle ergibt sich anhand der nachstehenden Gleichung 6.2, die dividiert durch den Faktor 6000 die Anzahl an DNA-Strangbrüche pro 10^6 Basenpaare ergeben (Gleichung 6.3).

Berechnung DNA-Strangbrüche pro Zelle

$$n(SB)_{Zelle} = -\ln \frac{dsDNA_{Behandlung}}{dsDNA_{Kontrolle}} * 16666 \quad (6.2)$$

Berechnung DNA-Strangbrüche pro 10^6 Bp

$$n(SB)_{10^6 Bp} = \frac{n(SB)_{Zelle}}{6000} \quad (6.3)$$

6.3 Quantifizierung der Enzymaktivitäten

Die Untersuchungen zur Bestimmung der zellulären Katalase-, Glutathionperoxidase- und der Glutathionreduktase-Aktivitäten erfolgte aus einem Zellextrakt, der aus Zink-behandelten Zellen präpariert wurde. Die optimale Menge an Zellextrakt wurde zunächst in Vorversuchen bestimmt und für die jeweilige Enzymaktivitätsbestimmung entsprechend verdünnt.

6.3.1 Versuchsansatz und Präparation der Zellextrakte

Pro Zellkulturschale (\varnothing 150 mm) wurden $2,5 \cdot 10^6$ IPEC-J2-Zellen ausgestreut und in ihrer logarithmischen Wachstumsphase für die gewünschte Dauer mit $ZnSO_4$ inkubiert. Für den Abbruch der Inkubation wurde das Medium entfernt, die Zellen trypsiniert und die Zellzahl mittels eines automatischen Zellzählgerätes erfasst. Anschließend wurden $10 \cdot 10^6$ IPEC-J2-Zellen weiter gesetzt und zentrifugiert (650 g, 5 min, $4^\circ C$). Nach dem Entfernen des Überstands wurden die Zellen in 200 μL Lysepuffer (1% reduziertes TritonX-100 in 0,1 M KH_2PO_4 -Puffer (pH 7,0)) kräftig resuspendiert (Zellkonzentration $0,5 \cdot 10^5$ Zellen pro μL). Nach erfolgter Sonifizierung (Ultraschallspitze, Branson; 2 Zyklen mit 3 s Puls (10% Amplitude) und 20-minütiger Inkubation auf Eis wurde das Lysat zentrifugiert (16600 g, 15 min, $4^\circ C$) und der erhaltene Überstand (Zellextrakt) in einem 1,5-mL-Reaktionsgefäß bei $-20^\circ C$ gelagert.

6.3.2 Quantifizierung der Glutathionperoxidase-Aktivität

Die Bestimmung der zellulären GPx-Aktivität erfolgte wie nach der Methode von Sharov et al. (1999) beschrieben. Das Prinzip basiert auf der GPx-katalysierten Reduktion des Substrats *tert*-Butylhydroxid (*tert*BOOH). Bei dieser Reaktion wird GSH zu GSSG durch die GPx oxidiert. Das gebildete GSSG wird durch die GR unter Verbrauch des Reduktionsäquivalents NADPH wieder zu GSH reduziert. Die Quantifizierung der GPx-Aktivität erfolgte indirekt über den Verbrauch von NADPH bei 340 nm.

Dafür wurden pro Well 100 μL des Reaktionsmix A in einer 96-Well-Platte vorgelegt. 100 μL Reaktionsmix A enthielten 60 μL 3,3 mM Diethylentriaminpentaessigsäure (DETAPAC) in 0,166 M KH_2PO_4 -Puffer

(pH 7,0), 20 μL 10 mM reduziertes Glutathion (GSH) und 20 μL der isolierten GR (6 U/mL). Anschließend wurden 60 μL Lysepuffer als Blindwert bzw. des Zellextrakts pro Well pipettiert und für 2 min bei RT inkubiert. 60 μL des Zellextrakts entsprachen der Aufarbeitung aus $2,1 \cdot 10^6$ IPEC-J2-Zellen. Die Hintergrundabsorption, d.h. die Oxidation des NADPH wurde durch Zugabe von 20 μL 10 mM NADPH am Mikrotiterplattenlesegerät über 8 Zyklen in einer Intervallzeit von 20 s bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen. Der Start der Reaktion wurde durch die Zugabe von 20 μL *tert*BOOH induziert und die Absorption über 31 Zyklen mit einer Intervallzeit von 20 s bei einer Wellenlänge von 340 nm erfasst. Als Positivkontrolle diente die isolierte GPx mit einer Aktivität von 0,1 U/mL, von der 20 μL pro Well pipettiert wurden.

6.3.3 Berechnung der Glutathionperoxidase-Aktivität

Für die Berechnung der GPx-Aktivität wurde zunächst die Änderung der Absorption bei 340 nm (ΔA) pro Minute anhand der Gleichung 6.4 sowohl für die Probe als auch für den Blindwert (BW) bestimmt und anschließend $(\Delta A/\text{min})_{\text{BW}}$ von $(\Delta A/\text{min})_{\text{Probe}}$ subtrahiert (Gleichung 6.5).

$$(\Delta A/\text{min})_{\text{Probe/BW}} = \frac{A(7 \text{ min}) - A(2 \text{ min})}{7 \text{ min} - 2 \text{ min}} \quad (6.4)$$

$$\text{Korrigiertes } (\Delta A/\text{min})_{\text{Probe}} = (\Delta A/\text{min})_{\text{Probe}} - (\Delta A/\text{min})_{\text{BW}} \quad (6.5)$$

Die GPx-Aktivität in mol/min errechnete sich mit Hilfe des korrigierten molaren Extinktionskoeffizienten für ein Well von NADPH bei 340 nm ($\epsilon = 3732 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) und unter Einbeziehung des Endvolumens von 200 μL (Gleichung 6.6).

$$\text{GPx-Aktivität (mol/min)} = \frac{\text{Korrigiertes } (\Delta A/\text{min})_{\text{Probe}}}{3732 \text{ M}^{-1}} \cdot 2 \cdot 10^{-4} \text{ L} \quad (6.6)$$

Die GPx-Aktivität (mol/min) wurde im letzten Schritt auf 10^6 Zellen normiert. Die GPx-Aktivität der unbehandelten Zellen wurde 100% gesetzt und die Aktivität der behandelten Zellen darauf bezogen.

6.3.4 Quantifizierung der Katalase-Aktivität

Die Messung der CAT-Aktivität wurde mit minimalen Änderungen wie in der Methode von Li und Schellhorn (2007) beschrieben durchgeführt und erfasst die Abnahme des Substrats H_2O_2 , dass durch die CAT katalytisch umgesetzt wird.

In die für die Messung verwendeten UV-transparenten 96-Well-Platten wurde pro Well 20 μL Lysepuffer (Blindwert) bzw. Probe vorgelegt. 20 μL Probe entsprachen dabei der Aufarbeitung aus $1 \cdot 10^5$ IPEC-J2-Zellen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 μL 5,5 mM H_2O_2 in 0,1 M KH_2PO_4 -Puffer (pH 7,0) gestartet, sodass sich eine Endkonzentration von 5 mM H_2O_2 ergab. Die Absorption wurde über 31 Zyklen mit einer Intervallzeit von 10 s bei 240 nm am Mikrotiterplattenlesegerät bestimmt. Von der isolierten CAT wurden 20 μL mit einer Aktivität von 25 U/mL als Positivkontrolle mitgeführt.

6.3.5 Berechnung der Katalase-Aktivität

Für die Berechnung der CAT-Aktivität wurde zunächst die Änderung der Absorption bei 240 nm (ΔA) pro Minute anhand der Gleichung 6.7 sowohl für die Probe als auch für den Blindwert (BW) bestimmt und anschließend $(\Delta A/\text{min})_{BW}$ von $(\Delta A/\text{min})_{Probe}$ subtrahiert (Gleichung 6.8).

$$(\Delta A/\text{min})_{Probe/BW} = \frac{A(4 \text{ min}) - A(1 \text{ min})}{4 \text{ min} - 1 \text{ min}} \quad (6.7)$$

$$\text{Korrigiertes } (\Delta A/\text{min})_{Probe} = (\Delta A/\text{min})_{Probe} - (\Delta A/\text{min})_{BW} \quad (6.8)$$

Die CAT-Aktivität in mol/min errechnete sich mit Hilfe des korrigierten molaren Extinktionskoeffizienten für ein Well von H_2O_2 bei 240 nm ($\epsilon = 39,4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) und unter Einbeziehung des Endvolumens von 220 μL (Gleichung 6.9).

$$\text{CAT-Aktivität (mol/min)} = \frac{\text{Korrigiertes } (\Delta A/\text{min})_{Probe}}{39,4 \text{ M}^{-1}} \cdot 2,2 \cdot 10^{-4} \text{ L} \quad (6.9)$$

Die CAT-Aktivität (mol/min) wurde im letzten Schritt auf 10^6 Zellen normiert. Die CAT-Aktivität der unbehandelten Zellen wurde 100% gesetzt und die Aktivität der behandelten Zellen darauf bezogen.

6.3.6 Quantifizierung der Glutathionreduktase-Aktivität

Die Methode zur Bestimmung der GR-Aktivität basiert auf der Methode von Cenas et al. (2006) und beruht auf der durch GR-katalysierten Umsetzung des Substrats GSSG zu GSH unter Verbrauch des Reduktionsäquivalents NADPH.

Hierfür wurden pro Well einer 96-Well-Platte 80 μL 0,1 M KH_2PO_4 -Puffer (pH 7,0) vorgelegt und anschließend 20 μL Lysepuffer (Blindwert) bzw. Probe zu pipettiert. 20 μL Probe entsprachen dabei der Aufarbeitung aus $2 \cdot 10^5$ IPEC-J2-Zellen. Durch Zugabe von 100 μL einer 10 mM GSSG/0,4 mM NADPH-Lösung wurde die Reaktion gestartet und über 21 Zyklen mit einer Intervallzeit von 20 s bei 340 nm die Absorption gemessen. Als Positivkontrolle wurden 20 μL der isolierten GR mit einer Aktivität von 0,25 U/mL mitgeführt.

6.3.7 Berechnung der Glutathionreduktase-Aktivität

Für die Berechnung der GR-Aktivität wurde zunächst die Änderung der Absorption bei 340 nm (ΔA) pro Minute anhand der Gleichung 6.10 sowohl für die Probe als auch für den Blindwert (BW) bestimmt und anschließend $(\Delta A/\text{min})_{BW}$ von $(\Delta A/\text{min})_{Probe}$ subtrahiert (Gleichung 6.11).

$$(\Delta A/\text{min})_{Probe/BW} = \frac{A(5 \text{ min}) - A(2 \text{ min})}{5 \text{ min} - 2 \text{ min}} \quad (6.10)$$

$$\text{Korrigiertes } (\Delta A/\text{min})_{Probe} = (\Delta A/\text{min})_{Probe} - (\Delta A/\text{min})_{BW} \quad (6.11)$$

Die GR-Aktivität in mol/min errechnete sich mit Hilfe des korrigierten molaren Extinktionskoeffizienten für ein Well von NADPH bei 340 nm ($\epsilon = 3732 M^{-1} \cdot cm^{-1}$) und unter Einbeziehung des Endvolumens von 200 μL (Gleichung 6.12).

$$\text{GR-Aktivität (mol/min)} = \frac{\text{Korrigiertes } (\Delta A/\text{min})_{\text{Probe}}}{3732 M^{-1}} \cdot 2 \cdot 10^{-4} L \quad (6.12)$$

Die GR-Aktivität (mol/min) wurde im letzten Schritt auf 10^6 Zellen normiert. Die GR-Aktivität der unbehandelten Zellen wurde 100% gesetzt und die Aktivität der behandelten Zellen darauf bezogen.

6.4 Quantifizierung von Gesamtglutathion

Die intrazelluläre Konzentration an Gesamt-GSH kann mit Hilfe des Recycling Assays nach Tietze (1969) quantifiziert werden. Die Messung beruht auf der photometrischen Messung der gelb gefärbten 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure (TNB) bei 412 nm, die bei der Reduktion des 5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure (DTNB, „Ellman’s Reagenz“) durch GSH entsteht. Das bei der Reaktion gebildete GSSG wird durch Zugabe der GR und dem Reduktionsäquivalent NADPH zum GSH reduziert, sodass es wieder zu weiteren Reaktion mit DTNB zur Verfügung steht. Mit dieser Methode wird neben dem vorherrschendem Thiol GSH auch das Disulfid GSSG erfasst. In Abbildung 6.2 ist das Reaktionsschema dargestellt.

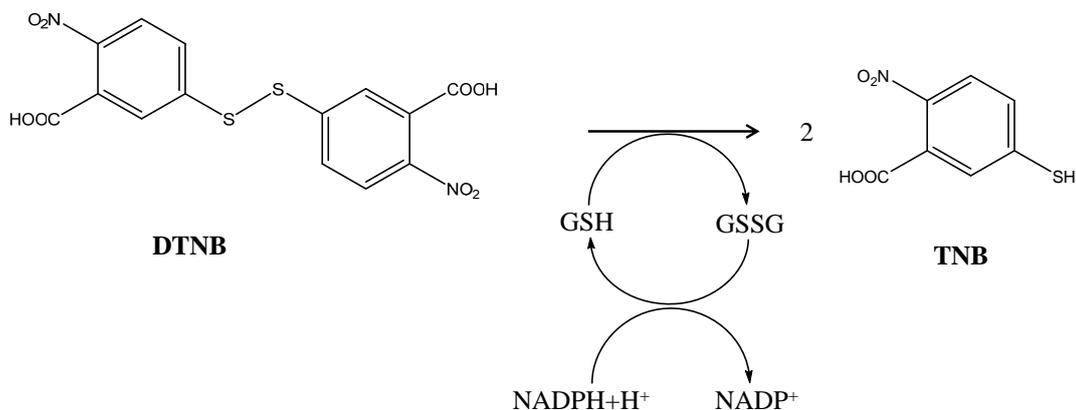


Abbildung 6.2: Reaktionsverlauf des Recycling Assay nach Tietze. DTNB: 5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure, TNB: 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure.

6.4.1 Versuchsansatz und Präparation der Zellextrakte

Pro Zellkulturschale (\varnothing 100 mm) wurden $1,0 \cdot 10^6$ IPEC-J2-Zellen ausgestreut und in der logarithmischen Wachstumsphase für die gewählte Dauer mit $ZnSO_4$ inkubiert. Zur gezielten GSH-Depletion diente 100 μM D, L-Buthionin-[S, R]-Sulfoximin (BSO), mit dem die Zellen für 24 h behandelt wurden. Die Inkubation wurde durch das Absaugen des Mediums beendet. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert, in frischem Medium suspendiert und die Zellzahl und das Zellvolumen mittels eines automatischen Zellzählgerätes erfasst. Für die Messung wurde eine definierte Zellzahl in ein neues Reaktionsgefäß überführt, für 5 min bei 1800 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das erhaltene Zellpellet in K-Phosphatpuffer (pH 7,4, 4°C) resuspendiert, so dass sich eine Zellkonzentration von $0,5 \cdot 10^6/120 \mu L$ er-

gab. Die Lagerung erfolgte bei -80°C . Zur Zellyse wurden die Proben aufgetaut und anschließend 5 min im Ultraschallbad sonifiziert und ein weiteres Mal bei -80°C über Nacht gelagert. Nach erneuter Auftau-Ultraschallbehandlung wurden die Proben zur Proteinfällung mit $30\ \mu\text{L}$ einer 6,5%igen 5-Sulfosalicylsäure-Lösung (5-SSA) (Endkonzentration 1,3%) versetzt, gevortext und für 10 min auf Eis gestellt. Nach der Zentrifugation für 20 min bei 2000 g und 4°C wurde der Überstand abgenommen und zur Bestimmung des Gesamtglutathiongehalts eingesetzt.

6.4.2 Recycling Assay

Parallel zur Analyse der Proben wurde eine Kalibrierung im Bereich von $5\text{-}50\ \mu\text{M}$ GSH mitgeführt. Als externe Wiederfindung und damit zur Überprüfung der Methode diente eine $20\ \mu\text{M}$ GSSG-Lösung, die $39,9\ \mu\text{M}$ GSH entspricht. Analog zu den Proben enthielten die Standardlösungen sowie die GSSG-Lösung, 5-SSA in einer Endkonzentration von 1,3%. Der Recycling Assay wurde in 96-Well-Platten durchgeführt. Pro Kavität wurden $40\ \mu\text{L}$ K-Phosphatpuffer (pH 7,4) vorgelegt, $20\ \mu\text{L}$ Standard bzw. Probe und $100\ \mu\text{L}$ einer $2\ \text{mM}$ DTNB/ $0,3\ \text{mM}$ NADPH-Lösung zugegeben. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von $40\ \mu\text{L}$ der isolierten GR (Aktivität $678,9\ \text{U/mL}$) gestartet. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von $412\ \text{nm}$ in 8 Zyklen über 4 min mit Hilfe eines Mikrotiterplattenlesegeräts erfasst.

6.4.3 Berechnung des Gesamtglutathiongehalts

Die Berechnung der Extinktion erfolgt anhand der nachstehenden Gleichung 6.13, wobei die Änderung der Extinktion sich aus der Differenz zwischen Zyklus 1 und 4 rechnerisch bestimmen lässt (Gleichung 6.14).

$$E = \Delta E(\text{Probe}) - \Delta E(\text{Blindwert}) \quad (6.13)$$

$$\Delta E = E(\text{Zyklus 4}) - E(\text{Zyklus 1}) \quad (6.14)$$

Anhand der mitgeführten externen Kalibrierung erfolgte die Berechnung des Gesamtglutathiongehalts in der Probe in μM , der mittels des zuvor bestimmten Zellvolumens in die intrazelluläre Gesamtglutathionkonzentration umgerechnet werden kann. Der Gesamtglutathiongehalt der unbehandelten Zellen wurde 100% gesetzt und der gesamte Glutathiongehalt der behandelten Zellen darauf bezogen.

6.5 Quantifizierung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung in Kernextrakten und der isolierten PARP-1

Die Untersuchungen zur PARsylierungsaktivität in Kernextrakten sowie der isolierten PARP-1 wurden in Kooperation mit Frau Dr. Claudia Keil (Technische Universität Berlin) anhand des Einbaus radioaktiv-markierter ADP-Ribose ermittelt.

6.5.1 Versuchsansatz und Präparation der Kernextrakte

Für die Präparation der Kernextrakte (KE) nach der Methode von Schreiber et al. (1989) wurden ca. $10 - 15 \cdot 10^6$ IPEC-J2-Zellen bzw. HeLa-S3-Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden abtrypsiniert, in 10 mL 5% FKS/PBS (4°C) aufgenommen und in ein 15-mL-Röhrchen überführt. Nach der Zentrifugation (1500 rpm, 5 min, 4 °C) wurde das Pellet mit zweimal 700 µL PBS (4°C) in ein neues 1,5-mL-Reaktionsgefäß überführt und ein weiteres Mal zentrifugiert (2000 rpm, 5 min, 4°C). Das entstandene Pellet wurde in 1600 µL KE-Puffer A (pH 7,9) resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 125 µL 10% NP-40 (Igepal CA-630) zugegeben und für 30 s gevortext und erneut für 5 min auf Eis inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation (3000 rpm, 2 min, 4°C) wurde das im Überstand enthaltene Zytoplasma entfernt und das Pellet in 200 µL KE-Puffer B (pH 7,9) resuspendiert. Die Suspension wurde für 10 min abwechselnd kräftig gevortext und gekühlt. Nach der Zentrifugation (13000 rpm, 15 min, 4 °C) erhielt man im Überstand den Kernextrakt. Die Proteinbestimmung der Kernextrakte erfolgte wie unter Abschnitt 6.5.2 beschrieben.

6.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Das Prinzip der Proteinbestimmung nach Bradford (1976) beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie-Brillantblau G250 von 495 nm nach 595 nm in Gegenwart von Proteinen. Die Zell- bzw. Kernextrakte wurden entsprechend ihrer Menge an aufgearbeiteten Zellen verdünnt und 20 µL dieser Probenverdünnung in eine 96-Well-Platte pipettiert (in Dreifachbestimmung). Nach der Zugabe von 180 µL Bradford-Reagenz (40 µL Bio Rad Reagenz, 140 µL bidestilliertem Wasser) wurde nach 5 min die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm am Mikrotiterplattenlesegerät bestimmt. Die Kalibrierung mit Rinderserumalbumin (BSA) als Referenz erfolgte parallel zur Analyse der Proben. Ausgehend von einer BSA-Stammlösung mit einer Konzentration von 10 mg/mL wurde eine Kalibriergerade im Bereich von 0-75 µg/mL BSA erstellt.

6.5.3 Quantifizierung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung in Kernextrakten

Zur Bestimmung der PARsylierungsaktivität in Kernextrakten aus IPEC-J2-Zellen und HeLa-S3-Zellen wurden diese mit sonifizierter Lachsspermien-DNA und NAD⁺ inkubiert. Die Menge an inkorporierter ADP-Ribose wurde nach Trichloressigsäure (TCA)-Fällung bestimmt.

Um den Einfluss von ZnSO₄, CaCl₂, MgCl₂ sowie klassischer PARP-Inhibitoren (3-Aminobenzamid (3-AB), 8-Hydroxy-2-methylquinazoline-4-one (NU1025)) auf die Kapazität der PARsylierung zu untersuchen, enthielten die Reaktionsansätze die in Tabelle 6.1 dargestellte Zusammensetzung.

Tabelle 6.1: Poly(ADP-Ribosyl)ierungsaktivität in Kernextrakten

		Volumen	Konzentration	Endkonzentration
Mix 1:	Kernextrakt	0-5 µL	variabel	5-10 µg
	3-AB	2,0 µL	500 µM	50 µM
	NU1025	2,0 µL	5 µM	0,5 µM
	ZnSO ₄ bzw. CaCl ₂ oder MgCl ₂	2,0 µL	0,5-5 mM	50-500 µM
	1x HEPES-Puffer	ad. 20 µL	-	
Mix 2:	Sonifizierte DNA	1,2 µL	10 mg/mL	480 µg/mL
	10 µM NAD ⁺	2,5 µL	10 µM	1 µM
	[α- ³² P]-NAD ⁺	variabel	-	mind. 100.000 cpm
	1x HEPES-Puffer	ad. 5 µL		

Ansatzvolumen: 25 µL

Der in Tabelle 6.1 aufgelistete Mix 1 wurde zunächst für 30 min auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Mix 2 gestartet und für 20 min (IPEC-J2-Kernextrakte) bzw. 10 min (HeLa-S3-Kernextrakte) bei 30 °C inkubiert. Die ³²P-markierten Proteine wurden mit 150 µL 40%iger TCA-Lösung bei 4 °C für 20 min gefällt und die gesamte Radioaktivität in den Ansätzen durch Cerenkov-Messung quantifiziert. Nach dem Zentrifugieren (13000 rpm, 20 min, RT) wurde das Präzipitat mit 5% TCA und anschließend mit 70% Ethanol gewaschen. Mittels Cerenkov-Messung wurde die verbliebene Menge an Radioaktivität quantifiziert. Aus dem prozentualen Einbau des ³²P-NAD⁺ wurde die Menge an inkorporierter ADP-Ribose bestimmt.

6.5.4 Nachweis der Poly(ADP-Ribosyl)ierung mittels SDS-Gelelektrophorese

Um den Einfluss von ZnSO₄ und typischen PARP-Inhibitoren, wie 3-AB und NU1025, auf die PARsilylierung in Kernextrakten zu visualisieren, wurde die Reaktion wie unter 6.5.3 beschrieben durchgeführt und nach 20 min durch Zugabe von 5 µL 5x SDS-Probenpuffer abgestoppt. Die Radioaktivität wurde mittels Cerenkov-Messung quantifiziert und die Proben wurden anschließend erhitzt (95°C, 5 min). Äquivalente Mengen an Radioaktivität wurden mittels SDS-PAGE separiert und die poly(ADP-ribosyl)ierten Produkte unter Verwendung der Autoradiographie sichtbar gemacht.

6.5.5 Quantifizierung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung der isolierten PARP-1

Die PARsylierungsaktivität der isolierten PARP-1 in Gegenwart von ZnSO₄ wurde nach dem gleichen Prinzip wie unter 6.5.3 bestimmt.

Die Reaktionsansätze enthielten folgende Zusammensetzung (Tabelle 6.2):

Tabelle 6.2: Poly(ADP-Ribosyl)ierungsaktivität der isolierten PARP-1

		Volumen	Konzentration	Endkonzentration
Mix 1:	isolierte PARP-1	0,5 µL	1 mg/mL	17,7 nM
	1 x HEPES-Puffer	ad. 20 µL	-	
Mix 2:	sonifizierte DNA	1,2 µL	10 mg/mL	480 µg/mL
	NAD ⁺	2,5 µL	500 µM	50 µM
	[α- ³² P]-NAD ⁺	variabel	-	mind. 100.000 cpm
	ZnSO ₄	2,5 µL	50 µM-2,5 mM	5 µM-250 µM
	1x HEPES-Puffer	ad. 5 µL	-	

Ansatzvolumen: 25 µL

Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Mix 2 gestartet und der Ansatz für 10 min bei 30°C inkubiert. Die folgenden Schritte erfolgten wie unter 6.5.3 beschrieben.

6.5.6 Kettenlängenanalyse von ³²P-markierten ADP-Ribosepolymeren

Die durch die Reaktion der isolierten PARP-1 gebildeten ³²P-markierten ADPR-Polymere wurde nach der Methode von Panzeter und Althaus (1990) aufgereinigt. Die Reaktion wurde wie unter 6.5.5 beschrieben durchgeführt und die ³²P-markierten ADPR-Polymere nach dem letzten Waschschrift durch alkalische Lyse bei 60°C in TE-Puffer (pH 12,0) unter Schütteln vom Protein abgetrennt. Die Proteine wurden mittels Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt und die Proben umgehend an einem Flüssigszintillationszähler ausgezählt. Nach der Zugabe von PAR-Probenpuffer (pH 8,0) wurden die Proben in einem Sequenziergel (18% Polyacrylamid in TBE-Puffer (pH 8,3) bzw. 8% Polyacrylamid, 7 M Harnstoff in TBE-Puffer (pH 8,3)) für 1,5 h bei 30 mA und 300 V elektrophoretisch getrennt. Die auf dem Gel vorliegenden radioaktiv markierten Polymere wurden mittels Autoradiographie detektiert. Dafür musste das Gel zuvor auf eine Plastikfolie transferiert und mit einer Plastikhülle geschützt werden.

6.6 Quantifizierung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung in intakten HeLa-S3-Zellen

Die Detektion der PAR-Polymere in intakten HeLa-S3-Zellen erfolgte anhand eines monoklonalen Antikörpers, der spezifisch gegen die PAR-Einheiten gerichtet ist. Die gebildeten PAR-Einheiten wurde durch die Inkubation mit einem FITC-gekoppelten Sekundär-Antikörpers unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops detektiert. Die FITC-Fluoreszenz spiegelt das Ausmaß an generierten PAR-Einheiten wider.

6.6.1 Versuchsansatz, Induktion der PAR-Einheiten, Fixierung

$2 \cdot 10^5$ HeLa-S3-Zellen wurden auf sterilen Deckgläschen in Zellkulturschalen (\varnothing 40 mm) ausgesät und in der logarithmischen Wachstumsphase für den im Ergebnisteil angegebenen Zeitraum mit ZnSO_4 inkubiert. Zur Induktion der DNA-Strangbrüche wurden die Zellen für 5 min mit $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 bei 37°C inkubiert. Nach fünfminütiger H_2O_2 -Inkubation wurden die Deckgläschen mit Hilfe einer Pipette aus den Zellkulturschalen entfernt, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und für mindestens 10 min in eiskalter 10%iger TCA-Lösung permeabilisiert und gleichzeitig fixiert. Darauf erfolgten drei sukzessive Waschschrte in 70%, 90% und absolutem Ethanol (-20°C) für 5 min, an die sich die Trocknung der Deckgläschen an der Luft anschloss.

6.6.2 Antikörper-Inkubation

Die luftgetrockneten Deckgläschen wurden durch zweimaliges Eintauchen in PBS (RT) rehydratisiert und mit dem spezifischen monoklonalen Antikörper 10H (Verdünnung 1:30 in PBS/5% Milchpulver) in einer feuchten Kammer bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Deckgläschen wurden nach viermaligen Waschen in PBS mit dem sekundären FITC-gekoppelten Antikörper (Verdünnung 1:30 in PBS/5% Milchpulver) für 30 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgte ebenfalls ein viermaliger Waschschrte, bevor die Deckgläschen auf einem mit VECTASHIELD Mounting Medium mit DAPI präparierten Objektträger aufgebracht und mit klarem Lack versiegelt wurden.

6.6.3 Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung

Die Fluoreszenzintensitäten konnten mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Die Quantifizierung erfolgte anhand der kolokalisierten DAPI- und FITC-Fluoreszenz.

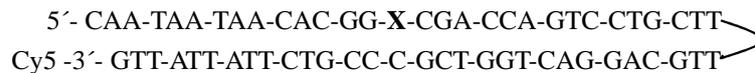
6.7 Inzisionstest

Der nicht-radioaktive Inzisionstest (Hamann et al., 2009) wurde zur Bestimmung der OGG- und APE-Aktivität in Zellextrakten und der isolierten Proteine angewendet. Das Prinzip der Methode beruht auf der Inkubation eines Cy5-markierten Oligonukleotids, das entweder ein 8-OxoG (Oligonukleotid I) oder ein Tetrahydrofuran (THF) als AP-Stellen-Analogon (Oligonukleotid II) enthält, mit Zellextrakten oder den isolierten Proteinen. In Folge der Inkubation wird der DNA-Schaden durch die im Zellextrakt enthaltenen

Enzyme oder durch die isolierten Proteine erkannt und das jeweilige Oligonukleotid eingeschnitten. Das intakte, nicht-ingeschnittene Inzisionssubstrat wird vom eingeschnittenen kürzeren Inzisionsprodukt mittels einer denaturierenden Harnstoff-PAGE separiert und der Anteil beider mittels eines Fluoreszenzscanners detektiert. Das Prinzip des Inzisionstests ist in Abschnitt 4.4 dargestellt.

6.7.1 Hybridisierung der Oligonukleotide

Als DNA-Substrate wurden synthetische 60-mer-Oligonukleotide (Eurogentec) verwendet, die am 3'Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert sind. Alle Arbeiten mit dem Oligonukleotid wurden daher im Dunkeln durchgeführt. Die drei verwendeten Oligonukleotide besitzen die folgende Sequenz:



Die Position 15 (= X) ist variabel. Oligonukleotid I besitzt an dieser Position eine 8-oxoG-Einheit, Oligonukleotid II ein Tetrahydrofuran (THF), welches ein AP-Stellen-Analogon darstellt. Oligonukleotid III enthält keinen spezifischen Schaden, sondern ein Guanin an Position 15 und fungiert damit als Negativkontrolle. Die Sequenz der Oligonukleotide enthält vier aufeinanderfolgende Thymidine, wodurch es nach der Hybridisierung zur Ausbildung einer stabilen Haarnadelstruktur kommt.

Die im lyophilisierten Zustand gelieferten Oligonukleotide wurden in der vom Hersteller angegebenen Menge TE1-Puffer gelöst. Die genaue Konzentration der Oligonukleotide sowie die Menge an Cy5-Markierung wurde mit Hilfe einer Nanoquantplatte am Mikrotiterplattenlesegerät bestimmt. Die nicht hybridisierten Oligonukleotide wurden weiter auf eine Konzentration von 5 pmol/ μ L in TE1-Puffer verdünnt und Aliquote bei -20°C gelagert. Zur Hybridisierung wurden in einem 1,5-mL-Reaktionsgefäß 6 pmol des Oligonukleotids vorgelegt und anschließend mit TE2-Puffer und NaCl (Endkonzentration 50 mM) auf 60 μ L aufgefüllt. Die Oligonukleotidlösungen mit einer finalen Konzentration von 100 fmol/ μ L wurden im vorgeheizten Heizblock für 15 min bei 90°C unter Schütteln denaturiert. Die Hybridisierungsansätze verblieben im Heizblock, während dieser langsam herunterkühlte (Tabelle 6.3).

Tabelle 6.3: Temperaturprogramm Hybridisierungsansätze

Temperatur	Zeit
90°C	15 min
90°C auf 85°C	10 min
85°C auf 80°C	10 min
80°C auf 70°C	30 min
70°C auf 60°C	30 min
60°C auf 45°C	30 min
45°C auf 30°C	30 min

Von den gebrauchsfertigen Lösungen wurden 13 μL -Aliquote bei -20°C gelagert. Die Hybridisierungseffizienz wurde anhand einer nativen PAGE regelmäßig überprüft.

6.7.2 Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Hybridisierungseffizienz wurde anhand einer nativen PAGE unter Verwendung eines nativen 20%igen Polyacrylamidgels überprüft. Dafür wurden pro Ansatz 4 μL Gelshiftpuffer (pH 7,0), 8,5 μL bidestilliertem Wasser, 1,0 μL Oligonukleotidlösung (100 fmol/ μL) und 1,5 μL Ladepuffer (pH 8,0) gemischt. Der gesamte Ansatz wurde auf das Gel aufgetragen und der Gellauf konstant bei 200 V für 5 h bei RT in TBE1-Puffer (pH 8,0) durchgeführt. Das fertige Gel wurde am Typhoon Imager eingescannt.

6.7.3 Versuchsansatz und Präparation der Gesamtzellextrakte

Pro Zellkulturschale (\varnothing 150 mm) wurden $2,0 \cdot 10^6$ IPEC-J2-Zellen ausgetreut und in der logarrithmischen Wachstumsphase für den gewünschten Zeitraum inkubiert. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen trypsiniert, in 10 mL PBS/10% FKS (4°C) aufgenommen, in ein 15-mL-Röhrchen überführt und die Zellzahl an einem automatischen Zellzählgerät bestimmt. Nach der Zentrifugation bei 290 g für 5 min (4°C) wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet mit 10 mL PBS (4°C) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (290 g, 5 min, 4°C) wurde das Zellpellet bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert bzw. die Proteinextraktion sofort im Anschluss durchgeführt. Zur Erfassung der zellulären OGG- und APE-Aktivität wurden zur Proteinextraktion die Zellpellets ($4 \cdot 10^6$ Zellen) in je 80 μL Extraktionspuffer A (pH 7,1) resuspendiert und auf Eis sonifiziert (Ultraschallspitze, Branson; 10 Zyklen mit 1 s Puls (10% Amplitude) + 9 s Pause). Die anfallenden Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 20800 g für 20 min (4°C) abgetrennt. Der erhaltene Überstand wurde in Verdünnungspuffer A (pH 7,1) 1:5 verdünnt. Der verdünnte Zellextrakt wurde in eine Microcon-Filtereinheit mit einem cut-off Filter der Größe 10 kDa gefüllt und durch Zentrifugation bei 20800 g für 30 min (4°C) aufkonzentriert. Durch Umdrehen der Microcon-Filtereinheit in eine frisches Reaktionsgefäß und erneuter Zentrifugation bei 1000 g für 6 min (4°C) erhielt man den Zellextrakt. Nach Bestimmung der Proteinmenge nach Bradford (Abschnitt 6.5.2) wurde der Zellextrakt bis zur weiteren Verwendung aliquotiert und bei -80°C gelagert. Für die direkte Behandlung von IPEC-J2-Zellextrakten mit

ZnSO₄ wurde sowohl im Extraktionspuffer B als auch im Verdünnungspuffer B auf die Anwesenheit von EDTA und DTT verzichtet.

6.7.4 Quantifizierung der OGG- und APE-Aktivität in Zellextrakten

Im Falle der direkten Behandlung der IPEC-J2-Zellextrakte mit ZnSO₄ wurde auf die Anwesenheit von EDTA und DTT im Reaktionspuffer verzichtet. Die gewünschte Menge an Reaktionspuffer B (pH 7,1) wurde pro Reaktionsansatz (10 µL) in ein 1,5-mL-Reaktionsgefäß vorgelegt. Sollte die Reaktion in Anwesenheit von ZnSO₄ erfolgen, wurde dem Reaktionspuffer B die entsprechende Menge an ZnSO₄-Lösung zugesetzt. Pro Reaktionsansatz wurde ein „Hairpin-Mix“ hergestellt, der in 1,4 µL 40 fmol Oligonukleotid I bzw. II und 1 µg acetyliertes BSA enthielt (1,0 µL acetyliertes BSA (1 mg/mL) und 0,4 µL Oligonukleotid I bzw. II (100 fmol/µL)). Jeweils 1,4 µL des „Hairpin-Mix“ und die gewünschte Menge des Zellextrakts aus unbehandelten Zellen wurden an den Rand des Reaktionsgefäßes pipettiert und die Reaktion durch kurzes Zentrifugieren gestartet. Die Reaktion erfolgte für die angegebene Zeit bei 37°C unter leichtem Schütteln. Als Positivkontrolle wurde Oligonukleotid I mit 10 ng isolierter hOGG1 (England New Biolabs) bzw. Oligonukleotid II mit 0,2 pg isolierter hAPE1 (New England Biolabs) inkubiert und mitgeführt. Im Falle der isolierten hAPE1 enthielt der Reaktionsansatz zusätzlich MgCl₂ in einer Endkonzentration von 5 mM. Als Negativkontrolle wurde 20 fmol Oligonukleotid III, das keinen spezifischen Schaden enthält, mit der gewünschten Menge Extrakt aus unbehandelten Zellen inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µL Auftragepuffer (pH 8,0) abgestoppt. Die Denaturierung der Proben erfolgte bei 95°C für 5 min. Die Proben wurden quantitativ auf ein vorgewärmtes (50°C) denaturierendes 20%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und das intakte und eingeschnittene Oligonukleotid für 2 h in 1x TBE2-Puffer (pH 8,0) bei konstant 15 W pro Gel elektrophoretisch getrennt. Das Gel wurde am Typhoon Imager eingescannt und mittels der Software *Image Quant TLv2005* ausgewertet. Die Aktivität der Kontrolle wird 100% gesetzt und die Aktivitäten der behandelten Zellextrakte auf die Kontrolle bezogen.

6.7.5 Quantifizierung der Aktivität isolierter hOGG1

Die isolierte hOGG1 mit einer Konzentration von 500 ng/µL wurde in Aufbewahrungspuffer A (pH 8,0) von der Firma New England Biolabs geliefert und bei -20°C gelagert. Das isolierte Protein wurde für jeden Versuchsansatz auf eine Konzentration von 10 ng/µL in Aufbewahrungspuffer A verdünnt. Die weitere Verdünnung auf 1 ng/µL erfolgte in Reaktionspuffer C (pH 7,1).

Pro Reaktionsansatz wurde die gewünschte Menge an Reaktionspuffer C vorgelegt. Sollte die Reaktion in Anwesenheit von ZnSO₄ ablaufen, wurde die gewünschte Menge an ZnSO₄-Lösung zugesetzt. 1,4 µL des „Hairpin-Mix“ (40 fmol Oligonukleotid I und 1 µg acetyliertes BSA) und 2,5 ng isolierte hOGG1 wurden an den Rand des Reaktionsgefäßes pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde durch kurzes Zentrifugieren gemischt und die Reaktion gestartet. Die Reaktionsansätze wurden für die angegebene Zeit bei 37°C inkubiert. Als Positivkontrolle wurden 40 fmol Oligonukleotid I mit 10 ng isolierter hOGG1 inkubiert. Als Negativkontrolle wurden 20 fmol Oligonukleotid III mit 2,5 ng isolierter hOGG1 inkubiert.

Die Separation, Denaturierung und Quantifizierung erfolgte wie unter Abschnitt 6.7.4 beschrieben.

6.7.6 Quantifizierung der Aktivität isolierter APE1

Die isolierte hAPE1 wurde in Aufbewahrungspuffer B (pH 8,0) mit einer Konzentration von 5,5 pg/ μ L von der Firma New England Biolabs geliefert und bei -20°C gelagert. Das isolierte Protein wurde in Aufbewahrungspuffer B auf eine Gebrauchslösung von 0,2 pg/ μ L verdünnt. Die isolierte hAPE1 wurde zunächst ohne (Kontrolle) oder mit ZnSO_4 in Anwesenheit von 1 mM MgCl_2 für 20 min bei 20°C vorinkubiert. Dafür wurde pro Vorinkubationsansatz der Reaktionspuffer C in ein 1,5-mL-Reaktionsgefäß vorgelegt. Die jeweilige Menge an ZnSO_4 , MgCl_2 und isolierter hAPE1 wurde an den Rand des Reaktionsgefäßes pipettiert. Durch kurzes Zentrifugieren wurde der Ansatz gemischt und eine Konzentration von 0,01 pg/ μ L isolierte hAPE1 im Vorinkubationsansatz erreicht.

Pro Vorinkubationsansatz wurden drei Hauptinkubationsansätze (10 μ L) durchgeführt. Dazu wurde der Reaktionspuffer C in einem 1,5-mL-Reaktionsgefäß vorgelegt. Sollte die Hauptreaktion in Anwesenheit von ZnSO_4 stattfinden, wurde die Menge an ZnSO_4 zugesetzt, sodass die gleichen Konzentrationen wie in der Vorinkubation erreicht wurden. 1,2 μ L des „Hairpin-Mix“ (20 fmol Oligonukleotid II und 1 μ g acetyliertes BSA) und 0,04 pg der isolierten APE1 aus dem Vorinkubationsansatz (4- μ L-Vorinkubationsansatz) wurden an den Rand des Reaktionsgefäßes pipettiert und der Reaktionsansatz durch kurzes Zentrifugieren gemischt und gestartet. Die Hauptreaktion erfolgte in Anwesenheit von 0,4 mM MgCl_2 bei 37°C für die angegebene Zeit. Als Positivkontrolle wurden 40 fmol Oligonukleotid II mit 0,2 pg isolierter hAPE1 inkubiert. Als Negativkontrolle wurden 20 fmol Oligonukleotid III mit 0,04 pg isolierter hAPE1 aus dem Vorinkubationsansatz in Anwesenheit von 0,4 mM MgCl_2 inkubiert.

Die Separation, Denaturierung und Quantifizierung erfolgte wie unter Abschnitt 6.7.4 beschrieben.

6.7.7 Quantifizierung der OGG- und APE-Aktivität in intakten Zellen

In einem Gesamtvolumen von 10 μ L wurde der Zellextrakt mit 40 fmol Oligonukleotid und 100 ng acetyliertem BSA inkubiert. Dafür wurde pro Ansatz in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß die entsprechende Menge an Reaktionspuffer A (pH 7,1) vorgelegt. Jeweils 1,4 μ L des „Hairpin-Mix“ (40 fmol Oligonukleotid I bzw. II und 1 μ g acetyliertes BSA) und die gewünschte Menge des Zellextrakts wurden an den Rand des Reaktionsgefäßes pipettiert und die Reaktion durch kurzes Zentrifugieren gestartet. Die Inkubation erfolgte für die gewünschte Dauer bei 37°C .

Alle weiteren Schritte sowie das Mitführen von Positiv- und Negativkontrolle erfolgten wie im Abschnitt 6.7.4 beschrieben.

6.8 Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie

Die Quantifizierung von intrazellulärem Zink in IPEC-J2-Zellen erfolgte mittels F-AAS. Das Prinzip der F-AAS basiert zunächst auf der Überführung der Probelösung in ein Aerosol, das innerhalb der Flamme atomisiert wird. Durch Wechselwirkung der freien Atomen mit dem eingestrahlenen Licht, z.B. der Hohlkathodenlampe (HKL) kommt es zur Schwächung der Strahlung (Absorption). Dabei gilt das Lambert-Beer'sche Gesetz, das besagt, dass die gemessene Absorption proportional zur Konzentration des Analyten in der Probe ist.

Um einen zusätzlichen Eintrag von Zink aus der Umgebung während der Aufarbeitung zu vermeiden, wurden zinkfreie Gebrauchsmaterialien, wie z.B. Kunststoffpipettenspitzen und Reaktionsgefäße, verwendet.

6.8.1 Versuchsansatz und Präparation der Zellpellets

Für die Versuche wurden $2,5 \cdot 10^6$ IPEC-J2-Zellen in Zellkulturschalen (\varnothing 150 mm) ausgestreut und in der logarithmischen Wachstumsphase mit ZnSO_4 inkubiert. Für den Abbruch der Inkubation wurde das Medium entfernt, die Zellen trypsinisiert, in 10 mL PBS/FKS (5%) vereinzelt und die Zellsuspension in ein 15-mL-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde für 4 min bei 1250 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand anschließend abgesaugt, das erhaltene Zellpellet in 5 mL PBS_{UVC} resuspendiert und die Zellzahl sowie das mittlere Zellvolumen mittels eines automatischen Zellzählgerätes erfasst. Nach dem Weitersetzen von $2,5 \cdot 10^6$ bis $5 \cdot 10^6$ Zellen wurde erneut für 4 min bei 1250 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 1 mL PBS_{UVC} resuspendiert und in ein 2-mL-Reaktionsgefäß überführt. Das 15-mL-Röhrchen wurde mit 500 μL PBS_{UVC} nachgespült und in das 2-mL-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde ein weiteres Mal abgesaugt und das Zellpellet bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert.

6.8.2 Saurer Aufschluss und Analyse

Jedes Zellpellet wurde mit 500 μL salpetersaurer H_2O_2 (65% HNO_3 (suprapur) + 30% H_2O_2 (suprapur) im Verhältnis 1:1) versetzt. Um übermäßiges Schäumen zu vermeiden, wurde die Lösung im Thermoschüttler schrittweise auf 95°C hochgeheizt und anschließend ca. 10 h bis zur Trockne eingedampft. Der erhaltene Rückstand wurde in 1 mL bidestilliertem Wasser gelöst. Um den Eintrag von Zink aus der Umgebung während des sauren Aufschlusses zu ermitteln, wurden 2-mL-Reaktionsgefäße mit 500 μL salpetersaurer H_2O_2 versetzt, bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 1 mL bidestilliertem Wasser aufgenommen. Die ermittelte Absorption der Blindwerte wurde von der Absorption der Proben subtrahiert.

Zur Analyse der Proben erfolgte manuell mittels F-AAS. Die gewählten Parameter der F-AAS sowie die Wiederfindung, Bestimmungs-, Erfassungs- und Nachweisgrenze sind im Anhang unter Abschnitt A.6.4 angegeben.

6.8.3 Berechnung der intrazellulären Gesamtkonzentration

Die Quantifizierung erfolgte anhand einer externen Kalibrierung im Bereich von 0,25-1,00 mg/L Zink. Unter Einbeziehung des mittleren Zellvolumens (ZV), der Zellzahl (ZZ) und der molaren Masse (M) von Zink wurden die Ergebnisse in die intrazelluläre Konzentration (c_{Zn}) anhand der nachstehenden Gleichung 6.15 umgerechnet.

$$c_{Zn} [\mu M] = \frac{c_{Messung} (g/mL)}{M_{Zn} (g/mol) \cdot ZZ (mL^{-1}) \cdot ZV (L)} \cdot 10^{-6} \quad (6.15)$$

6.9 Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der intrazellulären „freien“ Zn^{2+} -Ionen

Die Bestimmung der intrazellulären „freien“ Zinkionen erfolgte an der RWTH Uniklinik Aachen im Arbeitskreis von Prof. Dr. Hajo Haase.

Mittels spezifischer Zinksonden kann die intrazelluläre „freie“ Konzentration an Zinkionen quantifiziert werden. Die einzusetzende Sonde ist abhängig von der Zelllinie und musste zuvor mittels Fluoreszenzmikroskop bestimmt werden. Das Prinzip beruht der Bindung der „freien“ Zinkionen, wodurch sich die Fluoreszenzeigenschaften der jeweiligen Sonde ändert. Mittels fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen wurde die Verteilung der Sonde in IPEC-J2-Zellen bestimmt.

$1,0 \cdot 10^5$ IPEC-J2-Zellen wurden auf Deckgläschen in sterilen Zellkulturschalen (\varnothing 40 mm) ausgestreut und für mindestens 24 h anwachsen lassen. Die Zellen wurden mit der jeweiligen Sonde (Tabelle 6.4) für 30 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Die Inkubation wurde durch das Absaugen des Mediums beendet und die Zellen ca. 1 mL Inkubationspuffer gewaschen. Der Inkubationspuffer wurde abgesaugt und genau 1 mL Inkubationspuffer zugegeben. Anschließend wurden die Zellen für 10 min mit 100 μM Zn/50 μM Pyrithion oder verschiedenen $ZnSO_4$ -Konzentrationen behandelt. Nach dem Aufbringen der Deckgläschen auf einen Objektträger wurde die Verteilung der Sonde unter den in Tabelle 6.4 angegeben Wellenlängen mittels eines Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Tabelle 6.4: Verschiedene Zinksonden zur Bestimmung des „freien“ intrazellulären Zn^{2+}

Sonde	c_A [mM]	c_E [μM]	λ (Anregung) (nm)	λ (Emission) (nm)
Zinquin E	5	25	360	465
FluoZin-3	1	1	485	535
ZinPyr-1	5	5	490	530

6.10 Bestimmung der relativen Genexpression

Die Expression von Metallothionein wurde mittels Real-Time reverse Transkriptase-PCR (RTq-PCR) bestimmt. Das Prinzip basiert dabei zunächst auf der Umschreibung der mRNA in die komplementäre DNA (cDNA), die durch eine DNA-Polymerase und spezifischer Primer zu einem Doppelstrang synthetisiert wird. Der Doppelstrang wird während der PCR amplifiziert und durch Zugabe des interkalierenden Farbstoffs SYBR Green kann auf die Menge der amplifizierten DNA geschlossen werden.

6.10.1 Versuchsansatz und Präparation der Zellpellets

Für die Versuche wurden $1 \cdot 10^6$ IPEC-J2-Zellen in Zellkulturschalen (\varnothing 100 mm) ausgestreut und in der logarithmischen Wachstumsphase mit ZnSO_4 inkubiert. Zum Abbruch der Inkubation wurde das Medium entfernt, die Zellen abgelöst, in 5 mL PBS/FKS 10% aufgenommen und in ein 15-mL-Röhrchen überführt. Nach der Zentrifugation (1300 rpm, 3 min, 4°C) wurde der Überstand entfernt, das Zellpellet in 1 mL PBS (4°C) resuspendiert und zur erneuten Zentrifugation (1300 rpm, 3 min, 4°C) in ein 2-mL-Reaktionsgefäß überführt. Das erhaltene Zellpellet wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

6.10.2 RNA-Isolierung

Die RNA wurde mit Hilfe des Kits MN Nucleo Spin II isoliert. Die RNA-Isolierung wurde mit autoklavierten Kunststoffpipettenspitzen durchgeführt.

Das Zellpellet wurde zunächst in 100 μL PBS (steril) resuspendiert, bevor die Zugabe von 350 μL Lysepuffer (RA1) und 3,5 μL β -Mercaptoethanol erfolgte. Die Proben wurden gut gevortext und anschließend durch fünfmaliges Aufziehen durch eine Kanüle (\varnothing 0,4 mm) geschert. Nach der Zugabe von 350 μL Ethanol (70%) wurden die Proben erneut gemischt, bevor 700 μL der Proben auf einer Säule aufgetragen und zentrifugiert (9000 rpm, 30 s, RT) wurden. Der Durchgang wurde verworfen und auf die Säule wurden 350 μL MDB (*membrane desalting buffer*)-Puffer gegeben und für 1 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Dieser Durchgang wurde ebenfalls verworfen. Zum DNase-Verdau wurden 95 μL der DNase-Reaction-Mixture (10 μL DNase + 90 μL DNase Reaktionspuffer) auf die Säule gegeben und für 15 min bei RT stehen gelassen. Das Abstoppen des DNase-Verdau erreichte man durch die Zugabe von 200 μL RA2-Puffer. Nach der Zentrifugation (9000 rpm, 30 s, RT) wurde dieser Durchgang ebenfalls verworfen. Durch die Zugabe von 600 μL RA3-Puffer wurde die Probe gewaschen und zentrifugiert (9000 rpm, 30 s, RT). Ein weiteres Mal wurde mit 250 μL RA3-Puffer gewaschen, zentrifugiert (13000 rpm, 2 min, RT) und der Durchgang verworfen. Die auf der Säule vorhandene RNA wurde zweimal mit je 50 μL RNase-freiem Wasser durch Zentrifugation (13000 rpm, 1 min, RT) in ein neues Reaktionsgefäß eluiert. Die RNA wurde bei -80°C gelagert. Die RNA-Konzentration der Probe wurde mittels einer Nanoquant-Platte am Mikrotiterplattenlesegerät bei 260 nm bestimmt. Die Integrität der RNA wurde mittels einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft (Anhang siehe Abschnitt A.6.1).

6.10.3 Umschreibung in cDNA

Das Kit „qScript cDNA Synthese Kit“ diente zum Umschreiben der isolierten RNA in die cDNA. Dafür wurden je 1 μg RNA mit RNase-freiem Wasser auf 15 μL ergänzt und je 5 μL des Mastermixes (4 μL Re-

action Mix (5x) + 1 µL Reverse Transcriptase) versetzt. Die Umschreibung erfolgte für das angegebene Temperaturprogramm (5 min 25°C, 30 min 42°C, 5 min 85°C) am CFX96TM Real-Time System. Jede Probe wurde zweimal in cDNA umgeschrieben. Die erhaltene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

6.10.4 Herstellung der Primer und Bestimmung der Effizienzen

Die Primer wurden in der vom Hersteller (Eurofins MWG Operon) angegebenen Menge in sterilem TE-Puffer (100 mM Tris (pH 8,0), 10 mM EDTA) gelöst und auf eine Konzentration von 10 µM verdünnt. Die Primer wurden bei -20°C gelagert.

Die Effizienz eines jeden Primerpaares lässt sich über eine Verdünnungsreihe der cDNA ermitteln. Aus der logarithmischen Auftragung der Menge an eingesetzter cDNA über den erhaltenen *threshold cycle* (Ct)-Wert erhält man über die Steigung (m) die Effizienz (E) nach $E = 10^{-1/m}$.

Die verwendeten Gene, deren Sequenzen sowie die ermittelten Effizienzen und einzusetzenden Konzentrationen befinden sich in Tabelle 6.5.

Tabelle 6.5: Primersequenzen, -effizienzen sowie eingesetzte Konzentrationen

Gen	Primersequenz	Primereffizienz	c [µM]
<i>mt-1a_{pig}</i>	fwd: 5'-ATGGACCCCAACTGCTCCT-3'	0,939	0,5
	rev: 5'-AGCAGCAGCTCTTCTTGCAG-3'		
<i>gapdh_{pig}</i>	fwd: 5'-CCCTCAAGATCGTCAGCAAT-3'	0,915	0,4
	rev: 5'-GTCATGAGTCCCTCCACGAT-3'		

6.10.5 Amplifizierung der cDNA

Die Amplifizierung der cDNA erfolgte mit Hilfe des PerfeCTa^RSYBR^R Green Supermix for iQTM (MgCl₂, dNTPs, Accu Start Taq Polymerase, SYBR Green I Farbstoff, 20 nM Fluoreszin, Stabilisatoren) und wurde im CFX96TM Real-Time System durchgeführt. Der SYBR Green Farbstoff interkaliert unspezifisch in doppelsträngige DNA, wodurch er fluoreszenzaktiv wird. Die Amplifizierung der cDNA konnte demnach in Echtzeit verfolgt und durch die Zunahme der Fluoreszenz auf die Menge an PCR-Produkte geschlossen werden. Für jedes Gen wurde ein Mastermix hergestellt, der den PerfeCTa^RSYBR^R Green Supermix for iQTM, forward und reverse Primer (Tabelle 6.5) sowie Wasser (ad 15 µL) enthielt. Die cDNA wurde 1:10 in Wasser verdünnt und 10 µL dieser Verdünnung zu dem in 0,2-mL-Reaktionsgefäßen vorgelegtem Mastermix pipettiert. Die Reaktionsansätze (Tabelle 6.6) wurden herunterzentrifugiert und dem im Anhang stehenden Temperaturprogramm unterzogen. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden einer Schmelzkurvenanalyse unterzogen, um das Vorhandensein unspezifischer Produkte auszuschließen (Anhang siehe Abschnitt A.6.1).

Tabelle 6.6: Reaktionsansätze

	<i>mt-1a</i> _{pig}	<i>gapdh</i> _{pig}
SYBR Green Supermix	12,5 µL	12,5 µL
forward Primer	1,25 µL	1,0 µL
reverse Primer	1,25 µL	1,0 µL
cDNA (1:10)	10 µL	10 µL
Wasser	-	0,5 µL
Ansatzvolumen: 25 µL		

6.10.6 Berechnung

Zur Quantifizierung bediente man sich den Ct-Werten, die den Beginn der exponentiellen Phase der Kurve angibt. Zur Berechnung (Gleichung 6.16) der relativen Genexpression wurde die Expression des Zielgens *mt-1a* auf die des invarianten Gens *gapdh* bezogen.

$$R = \frac{(E_{GenX})^{(\Delta Ct_{GenX}(Ct_{GenX,Kontrolle} - Ct_{GenX,behandelt}))}}{(E_{Gengapdh})^{(\Delta Ct_{Gengapdh}(Ct_{Gengapdh,Kontrolle} - Ct_{Gengapdh,behandelt}))}} \quad (6.16)$$

Literaturverzeichnis

- Althaus, F.R. (1992) Poly ADP-ribosylation - A Histone Shuttle Mechanism In DNA Excision Repair. *Journal of Cell Science*, 102, S. 663–670.
- Andreini, C., Banci, L., Bertini, I. und Rosato, A. (2006) Counting the Zinc-Proteins Encoded in the Human Genome. *Journal of Proteome Research*, 5(1), S. 196–201.
- Ariumi, Y., Masutani, M., Copeland, T.D., Mimori, T., Sugimura, T., Shimotohno, K., Ueda, K., Hatanaka, M. und Noda, M. (1999) Suppression of the poly(ADP-ribose) polymerase activity by DNA-dependent protein kinase in vitro. *Oncogene*, 18(32), S. 4616–4625.
- Arteel, G.E. und Sies, H. (2001) The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10(4), S. 153–158.
- Baird, S.K., Kurz, T. und Brunk, U.T. (2006) Metallothionein protects against oxidative stress-induced lysosomal destabilization. *Biochemical Journal*, 394, S. 275–283.
- Barzilay, G., Mol, C.D., Robson, C.N., Walker, L.J., Cunningham, R.P., Tainer, J.A. und Hickson, I.D. (1995) Identification of critical active-site residues in the multifunctional human DNA repair enzyme HAP1. *Nat Struct Biol*, 2(7), S. 561–8.
- Beyersmann, D. und Haase, H. (2001) Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biometals*, 14(3-4), S. 331–341.
- Bishop, G.M., Dringen, R. und Robinson, S.R. (2007) Zinc stimulates the production of toxic reactive oxygen species (ROS) and inhibits glutathione reductase in astrocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(8), S. 1222–1230.
- Bjoras, M., Luna, L., Johnson, B., Hoff, E., Haug, T., Rognes, T. und Seeberg, E. (1997) Opposite base-dependent reactions of a human base excision repair enzyme on DNA containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites. *Embo Journal*, 16(20), S. 6314–6322.
- Boiteux, S. und Radicella, J. (2000) The Human OGG1 Gene: Structure, Functions, and Its Implication in the Process of Carcinogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 377(1), S. 1–8.
- Boulanger, Y., Armitage, I.M., Miklossy, K.A. und Winge, D.R. (1982) ¹¹³Cd NMR study of a metallothionein fragment. Evidence for a two-domain structure. *Journal of Biological Chemistry*, 257(22), S. 13717–13719.
- Bradford, M.M. (1976) Rapid and Sensitive Method For Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), S. 248–254.
- Bravard, A., Vacher, M., Moritz, E., Vaslin, L., Hall, J., Epe, B. und Radicella, J.P. (2009) Oxidation Status of Human OGG1-S326C Polymorphic Variant Determines Cellular DNA Repair Capacity. *Cancer Research*, 69(8), S. 3642–3649.
- Brochu, G., Duchaine, C., Thibeault, L., Lagueux, J., Shah, G.M. und Poirier, G.G. (1994) Mode of Action of Poly(ADP-ribose) Glycohydrolase. *Biochimica Et Biophysica Acta-gene Structure and Expression*, 1219(2), S. 342–350.

- Brugnera, E., Georgiev, O., Radtke, F., Heuchel, R., Baker, E., Sutherland, G.R. und Schaffner, W. (1994) Cloning, Chromosomal Mapping and Characterization of the Human Metal-Regulatory Transcription Factor MTF-1. *Nucleic Acids Research*, 22(15), S. 3167–3173.
- Bruner, S.D., Norman, D.P.G. und Verdine, G.L. (2000) Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature*, 403(6772), S. 859–866.
- Caldecott, K.W. (2001) Mammalian DNA single-strand break repair: an X-ra(y)ted affair. *Bioessays*, 23(5), S. 447–55, caldecott, K W Review England Bioessays. 2001 May;23(5):447-55.
- Caldecott, K.W. (2003a) Protein-protein interactions during mammalian DNA single-strand break repair. *Biochemical Society Transactions*, 31, S. 247–251.
- Caldecott, K.W. (2003b) XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair*, 2(9), S. 955–969.
- Caldecott, K.W. (2008) Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet*, 9(8), S. 619–631.
- Cario, Jung, d’Heureuse, H., Schulte, Sturm, Wiedenmann, Goebell und Dignass (2000) Effects of exogenous zinc supplementation on intestinal epithelial repair in vitro. *European Journal of Clinical Investigation*, 30(5), S. 419–428.
- Cenas, N., Prast, S., Nivinskas, H., Sarlauskas, J. und Arnér, E.S.J. (2006) Interactions of Nitroaromatic Compounds with the Mammalian Selenoprotein Thioredoxin Reductase and the Relation to Induction of Apoptosis in Human Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 281(9), S. 5593–5603.
- Chambon, P., Mandel, P. und Weill, J.D. (1963) Nicotinamide Mononucleotide Activation of A New Dna-dependent Polyadenylic Acid Synthesizing Nuclear Enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 11(1), S. 39–43.
- Cheng, K.C., Cahill, D.S., Kasai, H., Nishimura, S. und Loeb, L.A. (1992) 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G-T and A-C substitutions. *Journal of Biological Chemistry*, 267(1), S. 166–172.
- Christmann, M., Tomicic, M.T., Roos, W.P. und Kaina, B. (2003) Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology DNA Repair in Toxicology*, 193, S. 3–34.
- Cistulli, C., Lavrik, O.I., Prasad, R., Hou, E. und Wilson, S.H. (2004) AP endonuclease and poly(ADP-ribose) polymerase-1 interact with the same base excision repair intermediate. *DNA Repair*, 3(6), S. 581–591.
- Colvin, R.A., Holmes, W.R., Fontaine, C.P. und Maret, W. (2010) Cytosolic zinc buffering and muffling: Their role in intracellular zinc homeostasis. *Metallomics*, 2, S. 306–317.
- Cousins, R.J., Liuzzi, J.P. und Lichten, L.A. (2006) Mammalian Zinc Transport, Trafficking, and Signals. *Journal of Biological Chemistry*, 281(34), S. 24085–24089.
- Coyle, P., Philcox, J.C., Carey, L.C. und Rofe, A.M. (2002) Metallothionein: The multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(4), S. 627–647.
- Cragg, R.A., Phillips, S.R., Piper, J.M., Varma, J.S., Campbell, F.C., Mathers, J.C. und Ford, D. (2005) Homeostatic regulation of zinc transporters in the human small intestine by dietary zinc supplementation. *Gut*, 54(4), S. 469–478.

- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I. und Poirier, G.G. (1999) Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochemical Journal*, 342, S. 249–268.
- Dantzer, F., de la Rubia, G., Murcia, J.M.D., Hostomsky, Z., de Murcia, G. und Schreiber, V. (2000) Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry*, 39(25), S. 7559–7569.
- David, S.S., O'Shea, V.L. und Kundu, S. (2007) Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*, 447(7147), S. 941–50.
- Davidovic, L., Vodenicharov, M., Affar, E.B. und Poirier, G.G. (2001) Importance of Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase in the Control of Poly(ADP-Ribose) Metabolism. *Experimental Cell Research*, 268(1), S. 7 – 13.
- Demple, B. und Harrison, L. (1994) Repair of Oxidative Damage to DNA - Enzymology and Biology. *Annual Review of Biochemistry*, 63, S. 915–948.
- D'Errico, M., Parlanti, E., Teson, M., de Jesus, B.M.B., Degan, P., Calcagnile, A., Jaruga, P., Bjoras, M., Crescenzi, M., Pedrini, A.M., Egly, J.M., Zambruno, G., Stefanini, M., Dizdaroglu, M. und Dogliotti, E. (2006) New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage. *Embo Journal*, 25(18), S. 4305–4315.
- Deterding, L.J., Prasad, R., Mullen, G.P., Wilson, S.H. und Tomer, K.B. (2000) Mapping of the 5'-2-deoxyribose-5-phosphate lyase active site in DNA polymerase beta by mass spectrometry. *Journal of Biological Chemistry*, 275(14), S. 10463–10471.
- DGE (Herausgeber) (2013) *Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr*. Umschau, Bonn, erste Auflage, ISBN 978-3-86528-143-2.
- Dianov, G.L., Prasad, R., Wilson, S.H. und Bohr, V.A. (1999) Role of DNA Polymerase β in the Excision Step of Long Patch Mammalian Base Excision Repair. *Journal of Biological Chemistry*, 274(20), S. 13741–13743.
- Diefenbach, J. und Bürkle, A. (2005) Poly-ADP-ribosylation in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 62(7-8), S. 721–730.
- Ding, X.Q., Butzlaff, C., Bill, E., Pountney, D.L., Henkel, G., Winkler, H., Vasak, M. und Trautwein, A.X. (1994) Mossbauer and Magnetic-susceptibility Studies On Iron(II) Metallothionein From Rabbit Liver - Evidence For the Existence of An Unusual Type of $[M_3(CysS)_9]^{3-}$ Cluster. *European Journal of Biochemistry*, 220(3), S. 827–837.
- Elgohary, W.G., Sidhu, S., Krezoski, S.O., Petering, D.H. und Byrnes, R.W. (1998) Protection of DNA in HL-60 cells from damage generated by hydroxyl radicals produced by reaction of H₂O₂ with cell iron by zinc-metallothionein. *Chemico-Biological Interactions*, 115(2), S. 85–107.
- Erzberger, J.P. und Wilson III, D.M. (1999) The role of Mg²⁺ and specific amino acid residues in the catalytic reaction of the major human abasic endonuclease: new insights from EDTA-resistant incision of acyclic abasic site analogs and site-directed mutagenesis. *J Mol Biol*, 290(2), S. 447–457.
- Evans, A.R., Limp-Foster, M. und Kelley, M.R. (2000) Going APE over ref-1. *Mutation Research/DNA Repair*, 461(2), S. 83–108.

- Fortini, P. und Dogliotti, E. (2007) Base damage and single-strand break repair: Mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA Repair*, 6(4), S. 398–409.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., Wood, R.D., Schultz, R.A. und Ellenberger, T. (2005) *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM Press, Washington, D.C.
- Frosina, G., Fortini, P., Rossi, O., Carrozzino, F., Raspaglio, G., Cox, L.S., Lane, D.P., Abbondandolo, A. und Dogliotti, E. (1996) Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 271(16), S. 9573–9578.
- Gaither, L.A. und Eide, D.J. (2001) Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biometals*, 14(3-4), S. 251–270.
- Gaither, L.A. und Eide, D.J. (2000) Functional Expression of the Human hZIP2 Zinc Transporter. *Journal of Biological Chemistry*, 275(8), S. 5560–5564.
- Gamsjaeger, R., Liew, C.K., Loughlin, F.E., Crossley, M. und Mackay, J.P. (2007) Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(2), S. 63–70.
- Giner, H., Simonin, F., De Murcia, G. und Ménissier-de Murcia, J. (1992) Overproduction and Large-scale Purification of the Human Poly(adp-ribose) Polymerase Using A Baculovirus Expression System. *Gene*, 114(2), S. 279–283.
- Good, M. und Vasak, M. (1986) Iron(II)-substituted Metallothionein - Evidence For the Existence of Iron Thiolate Clusters. *Biochemistry*, 25(26), S. 8353–8356.
- Gorman, M.A., Morera, S., Rothwell, D.G., de La Fortelle, E., Mol, C.D., Tainer, J.A., Hickson, I.D. und Freemont, P.S. (1997) The crystal structure of the human DNA repair endonuclease HAP1 suggests the recognition of extra-helical deoxyribose at DNA abasic sites. *The EMBO Journal*, 16(21), S. 6548–6558.
- Grossklaus, R. und Ziegenhagen, R. (2006) [Vitamins and minerals in food supplements. Up-to-date risk assessment]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, 49(2), S. 202–10.
- Grosskopf, C., Schwerdtle, T., Mullenders, L.H. und Hartwig, A. (2010) Antimony impairs nucleotide excision repair: XPA and XPE as potential molecular targets. *Chem Res Toxicol*, 23(7), S. 1175–83.
- Günes, C., Heuchel, R., Georgiev, O., Muller, K.H., Lichtlen, P., Bluthmann, H., Marino, S., Aguzzi, A. und Schaffner, W. (1998) Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the metal-responsive transcriptional activator MTF-1. *Embo Journal*, 17(10), S. 2846–2854.
- Haase, H. und Beyersmann, D. (1999) Uptake and intracellular distribution of labile and total Zn(II) in C6 rat glioma cells investigated with fluorescent probes and atomic absorption. *Biometals*, 12(3), S. 247–254.
- Haase, H. und Maret, W. (2003) Intracellular zinc fluctuations modulate protein tyrosine phosphatase activity in insulin/insulin-like growth factor-1 signaling. *Experimental Cell Research*, 291(2), S. 289 – 298.
- Haase, H., Ober-Blöbaum, J.L., Engelhardt, G., Hebel, S., Heit, A., Heine, H. und Rink, L. (2008) Zinc Signals Are Essential for Lipopolysaccharide-Induced Signal Transduction in Monocytes. *The Journal of Immunology*, 181(9), S. 6491–6502.
- Hadi, M.Z. und Wilson, D.M. (2000) Second human protein with homology to the Escherichia coli abasic endonuclease exonuclease III. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 36(4), S. 312–324.

- Halliwell, B. und Gutteridge, J.M.C. (1985) The Importance of Free-Radicals and Catalytic Metal-Ions in Human-Diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, 8(2), S. 89–193.
- Halliwell, B. und Aruoma, O.I. (1991) DNA damage by oxygen-derived species Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters*, 281(1-2), S. 9–19.
- Halliwell, B. und Gutteridge, J.M.C. (1992) Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation: An update. *FEBS Letters*, 307(1), S. 108–112.
- Hamann, I. (2009a) *Etablierung eines nicht-radioaktiven Inzisionstests zur Messung der DNA-Reparaturkapazität gegenüber oxidativen DNA-Schäden und der Einfluss von Kupfer und Cadmium*. Dissertation, Technische Universität (TU) Berlin, http://www.opus4.kobv.de/opus4-tuberlin/files/2291/hamann_ingrit.pdf.
- Hamann, I., König, C., Richter, C., Jahnke, G. und Hartwig, A. (2012) Impact of cadmium on hOGG1 and APE1 as a function of the cellular p53 status. *Mutat Res*, 736(1-2), S. 56–63.
- Hamann, I., Schwerdtle, T. und Hartwig, A. (2009) Establishment of a non-radioactive cleavage assay to assess the DNA repair capacity towards oxidatively damaged DNA in subcellular and cellular systems and the impact of copper. *Mutat Res*, 669(1-2), S. 122–30.
- Hao, Q. und Maret, W. (2005) Imbalance between pro-oxidant and pro-antioxidant functions of zinc in disease. *Journal of Alzheimers Disease*, 8(2), S. 161–170.
- Hartwig, A. (2001) Zinc finger proteins as potential targets for toxic metal ions: Differential effects on structure and function. *Antioxidants & Redox Signaling*, 3(4), S. 625–634.
- Hartwig, A. (2012) Zink. In Dunkelberg, H., Gebel, T. und Hartwig, A. (Herausgeber) *Vitamine und Spurenelemente*, Kapitel 10, S. 287–303, Wiley-VCH Verlag, erste Auflage.
- Hartwig, A. (2013) Metal interaction with redox regulation: An Integrating Concept in metal carcinogenesis? *Free Radical Biology and Medicine*, 55, S. 63–72.
- Hartwig, A., Pelzer, A., Asmuss, M. und Burkle, A. (2003) Very low concentrations of arsenite suppress poly(ADP-ribosyl)ation in mammalian cells. *International Journal of Cancer*, 104(1), S. 1–6.
- Hartwig, A., Dally, H. und Schlepegrell, R. (1996) Sensitive analysis of oxidative DNA damage in mammalian cells: use of the bacterial Fpg protein in combination with alkaline unwinding. *Toxicology Letters*, 88(1-3), S. 85–90.
- Hartwig, A., Klyszcz-Nasko, H., Schlepegrell, R. und Beyersmann, D. (1993) Cellular damage by ferric nitrilotriacetate and ferric citrate in V79 cells: interrelationship between lipid peroxidation, DNA strand breaks and sister chromatid exchanges. *Carcinogenesis*, 14(1), S. 107–112.
- Hempe, J.M. und Cousins, R.J. (1991) Cysteine-rich intestinal protein binds zinc during transmucosal zinc transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(21), S. 9671–9674.
- Hempe, J. und Cousins, R. (1992) Cysteine-rich intestinal protein and intestinal metallothionein: an inverse relationship as a conceptual model for zinc absorption in rats. *J Nutr*, 122(1), S. 89–95.
- Heuchel, R., Radtke, F., Georgiev, O., Stark, G., Aguet, M. und Schaffner, W. (1994) The Transcription Factor Mtf-1 Is Essential for Basal and Heavy Metal-Induced Metallothionein Gene-Expression. *Embo Journal*, 13(12), S. 2870–2875.

- Hill, G.M. und Link, J.E. (2009) Transporters in the absorption and utilization of zinc and copper. *Journal of Animal Science*, 87, S. E85–E89.
- Hill, J.W., Hazra, T.K., Izumi, T. und Mitra, S. (2001) Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: potential coordination of the initial steps in base excision repair. *Nucleic Acids Research*, 29(2), S. 430–438.
- Hirrlinger, J., König, J., Keppler, D., Lindenau, J., Schulz, J.B. und Dringen, R. (2001) The multidrug resistance protein MRP1 mediates the release of glutathione disulfide from rat astrocytes during oxidative stress. *Journal of Neurochemistry*, 76(2), S. 627–636.
- Ho, E. (2004) Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(10), S. 572–578.
- Ho, E. und Ames, B.N. (2002) Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NF κ B, and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26), S. 16770–16775.
- Ho, E., Courtemanche, C. und Ames, B.N. (2003) Zinc Deficiency Induces Oxidative DNA Damage and Increases P53 Expression in Human Lung Fibroblasts. *The Journal of Nutrition*, 133(8), S. 2543–2548.
- Hoeijmakers, J.H.J. (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411(6835), S. 366–374.
- Holtlund, J., Kristensen, T., Ostvold, A.C. und Laland, S.G. (1981) A Comparison of Purified Poly(ADP-ribose) Polymerases From Ehrlich Ascites Tumor-cells, Pig Thymus, and Hela S3 Cells. *European Journal of Biochemistry*, 119(1), S. 23–29.
- Honzatko, R.B., Crawford, J.L., Monaco, H.L., Ladner, J.E., Edwards, B.F., Evans, D.R., Warren, S.G., Wiley, D.C., Ladner, R.C. und Lipscomb, W.N. (1982) Crystal and molecular structures of native and CTP-liganded aspartate carbamoyltransferase from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 160(2), S. 219 – 263.
- Hooten, N.N., Kompaniez, K., Barnes, J., Lohani, A. und Evans, M.K. (2011) Poly(ADP-ribose) Polymerase 1 (PARP-1) Binds to 8-Oxoguanine-DNA Glycosylase (OGG1). *Journal of Biological Chemistry*, 286(52), S. 44679–44690.
- Horton, J.K., Prasad, R., Hou, E. und Wilson, S.H. (2000) Protection against Methylation-induced Cytotoxicity by DNA Polymerase β -Dependent Long Patch Base Excision Repair. *Journal of Biological Chemistry*, 275(3), S. 2211–2218.
- Ikejima, M., Noguchi, S., Yamashita, R., Ogura, T., Sugimura, T., Gill, D.M. und Miwa, M. (1990) The zinc fingers of human poly(ADP-ribose) polymerase are differentially required for the recognition of DNA breaks and nicks and the consequent enzyme activation. Other structures recognize intact DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 265(35), S. 21907–13.
- Ishiyama, M., Miyazono, Y., Sasamoto, K., Ohkura, Y. und Ueno, K. (1997) A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta*, 44(7), S. 1299 – 1305.
- Jeong, J. und Eide, D.J. (2013) The SLC39 family of zinc transporters. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2–3), S. 612–619.

- Kaegi, J.H.R. und Schaeffer, A. (1988) Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry*, 27(23), S. 8509–8515.
- Kameshita, I., Matsuda, Z., Taniguchi, T. und Shizuta, Y. (1984) Poly (ADP-Ribose) synthetase. Separation and identification of three proteolytic fragments as the substrate-binding domain, the DNA-binding domain, and the automodification domain. *Journal of Biological Chemistry*, 259(8), S. 4770–6.
- Kasai, H. und Nishimura, S. (1984) Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Research*, 12(4), S. 2137–2145.
- Keilin, D. und Mann, T. (1940) Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme. *Biochem Jour*, 34(8/9), S. 1163–1176.
- Kim, Y.J., Kim, D., Illuzzi, J.L., Delaplane, S., Su, D., Bernier, M., Gross, M.L., Georgiadis, M.M. und Wilson, D. M., r. (2011) S-glutathionylation of cysteine 99 in the APE1 protein impairs abasic endonuclease activity. *J Mol Biol*, 414(3), S. 313–26.
- Klungland, A. und Lindahl, T. (1997) Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *The EMBO Journal*, 16(11), S. 3341–3348.
- Kordas, K. und Stoltzfus, R.J. (2004) New Evidence of Iron and Zinc Interplay at the Enterocyte and Neural Tissues. *The Journal of Nutrition*, 134(6), S. 1295–1298.
- Krezel, A. und Maret, W. (2006) Zinc-buffering capacity of a eukaryotic cell at physiological pZn. *J Biol Inorg Chem*, 11(8), S. 1049–62.
- Krezel, A. und Maret, W. (2007) Dual nanomolar and picomolar Zn(II) binding properties of metallothionein. *Journal of the American Chemical Society*, 129(35), S. 10911–10921.
- Krokan, H.E., Standal, R. und Slupphaug, G. (1997) DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem. J.*, 325(1), S. 1–16.
- Kun, E., Kirsten, E., Mendeleyev, J. und Ordahl, C.P. (2004) Regulation of the enzymatic catalysis of poly(ADP-ribose) polymerase by dsDNA, polyamines, Mg²⁺, Ca²⁺, histones H-1 and H-3 and ATP. *Biochemistry*, 43(1), S. 210–216.
- Kury, S., Dreno, B., Bezieau, S., Giraudet, S., Kharfi, M., Kamoun, R. und Moisan, J.P. (2002) Identification of SLC39A4, a gene involved in acrodermatitis enteropathica. *Nature Genetics*, 31(3), S. 239–240.
- Kuzminov, A. (2001) Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(15), S. 8241–46.
- Langelier, M.F., Ruhl, D.D., Planck, J.L., Kraus, W.L. und Pascal, J.M. (2010) The Zn₃ Domain of Human Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Functions in Both DNA-dependent Poly(ADP-ribose) Synthesis Activity and Chromatin Compaction. *Journal of Biological Chemistry*, 285(24), S. 18877–18887.
- Langelier, M.F., Servent, K.M., Rogers, E.E. und Pascal, J.M. (2008) A Third Zinc-binding Domain of Human Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Coordinates DNA-dependent Enzyme Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(7), S. 4105–4114.
- Langmade, S.J., Ravindra, R., Daniels, P.J. und Andrews, G.K. (2000) The Transcription Factor MTF-1 Mediates Metal Regulation of the Mouse ZnT1 Gene. *Journal of Biological Chemistry*, 275(44), S. 34803–34809.

- Larsen, A.G., Ostvold, A.C., Holtlund, J., Kristensen, T. und Laland, S.G. (1982) The Inhibitory Effect of Zn^{2+} on Poly(ADP-Ribose) Polymerase-Activity and Its Reversal. *Biochemical Journal*, 203(2), S. 511–513.
- Le Page, F., Schreiber, V., Dhérin, C., de Murcia, G. und Boiteux, S. (2003) Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Is Required in Murine Cell Lines for Base Excision Repair of Oxidative DNA Damage in the Absence of DNA Polymerase β . *Journal of Biological Chemistry*, 278(20), S. 18471–18477.
- Li, H., Swiercz, R. und Englander, E.W. (2009) Elevated metals compromise repair of oxidative DNA damage via the base excision repair pathway: implications of pathologic iron overload in the brain on integrity of neuronal DNA. *Journal of Neurochemistry*, 110(6), S. 1774–1783.
- Li, Y. und Schellhorn, H.E. (2007) Rapid kinetic microassay for catalase activity. *J Biomol Tech*, 18(4), S. 185–7.
- Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362(6422), S. 709–715.
- Lodemann, U., Einspanier, R., Scharfen, F., Martens, H. und Bondzio, A. (2013) Effects of zinc on epithelial barrier properties and viability in a human and a porcine intestinal cell culture model. *Toxicology in Vitro*, 27(2), S. 834–843.
- Löffler, G., Petrides, P. und P.C., H. (2007) *Biochemie und Pathochemie*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 8. Auflage.
- Lu, R., Nash, H.M. und Verdine, G.L. (1997) A mammalian DNA repair enzyme that excises oxidatively damaged guanines maps to a locus frequently lost in lung cancer. *Current Biology*, 7(6), S. 397–407.
- Lu, S. (2009) Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med*, 30(1-2), S. 42–59.
- Ludwig, A., Behnke, B., Holtlund, J. und Hilz, H. (1988) Immunoquantitation and size determination of intrinsic poly(ADP-ribose) polymerase from acid precipitates. An analysis of the in vivo status in mammalian species and in lower eukaryotes. *Journal of Biological Chemistry*, 263(15), S. 6993–6999.
- Mantha, A.K., Oezguen, N., Bhakat, K.K., Izumi, T., Braun, W. und Mitra, S. (2008) Unusual Role of a Cysteine Residue in Substrate Binding and Activity of Human AP-Endonuclease 1. *J Mol Biol*, 379(1), S. 28–37.
- Maret, W. (2004) Zinc and sulfur: A critical biological partnership. *Biochemistry*, 43(12), S. 3301–3309.
- Maret, W. (2006) Zinc coordination environments in proteins as redox sensors and signal transducers. *Antioxidants and Redox Signaling*, 8(9-10), S. 1419–1441.
- Maret, W. (2008) Metallothionein redox biology in the cytoprotective and cytotoxic functions of zinc. *Experimental Gerontology*, 43(5), S. 363–369.
- Maret, W., Jacob, C., Vallee, B.L. und Fischer, E.H. (1999) Inhibitory sites in enzymes: Zinc removal and reactivation by thionein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(5), S. 1936–1940.
- Maret, W. und Sandstead, H.H. (2006) Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 20(1), S. 3–18.
- Maret, W. und Li, Y. (2009) Coordination Dynamics of Zinc in Proteins. *Chemical Reviews*, 109(10), S. 4682–4707.

- Margoshes, M. und Vallee, B.L. (1957) A Cadmium Protein From Equine Kidney Cortex. *Journal of the American Chemical Society*, 79(17), S. 4813–4814.
- Marsin, S., Vidal, A.E., Sossou, M., Murcia, J.M.d., Le Page, F., Boiteux, S., de Murcia, G. und Radicella, J.P. (2003) Role of XRCC1 in the Coordination and Stimulation of Oxidative DNA Damage Repair Initiated by the DNA Glycosylase hOGG1. *Journal of Biological Chemistry*, 278(45), S. 44068–44074.
- Martello, R., Mangerich, A., Sass, S., Dedon, P.C. und Bürkle, A. (2013) Quantification of Cellular Poly(ADP-ribosyl)ation by Stable Isotope Dilution Mass Spectrometry Reveals Tissue- and Drug-Dependent Stress Response Dynamics. *ACS Chemical Biology*, 8(7), S. 1567–1575.
- Martin, L., Lodemann, U., Bondzio, A., Gefeller, E.M., Vahjen, W., Aschenbach, J.R., Zentek, J. und Pieper, R. (2013) A High Amount of Dietary Zinc Changes the Expression of Zinc Transporters and Metallothionein in Jejunal Epithelial Cells in Vitro and in Vivo but Does Not Prevent Zinc Accumulation in Jejunal Tissue of Piglets. *The Journal of Nutrition*, 143(8), S. 1205–1210.
- Masson, M., Niedergang, C., Schreiber, V., Muller, S., Ménissier-de Murcia, J. und de Murcia, G. (1998) XRCC1 Is Specifically Associated with Poly(ADP-Ribose) Polymerase and Negatively Regulates Its Activity following DNA Damage. *Molecular and Cellular Biology*, 18(6), S. 3563–3571.
- Matsumoto, Y. und Kim, K. (1995) Excision of Deoxyribose Phosphate Residues By DNA Polymerase β During Dna-repair. *Science*, 269(5224), S. 699–702.
- May, J.M. und Contoreggi, C.S. (1982) The Mechanism of the Insulin-Like Effects of Ionic Zinc. *Journal of Biological Chemistry*, 257(8), S. 4362–4368.
- McMahon, R.J. und Cousins, R.J. (1998) Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(9), S. 4841–4846.
- Meister, A. (1988) Glutathione Metabolism and Its Selective Modification. *Journal of Biological Chemistry*, 263(33), S. 17205–17208.
- Meister, A. und Anderson, M.E. (1983) Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 52, S. 711–760.
- Menard, M.P. und Cousins, R.J. (1983) Zinc Transport by Brush Border Membrane Vesicles from Rat Intestine. *J. Nutr.*, 113(7), S. 1434–1442.
- Mendoza-Alvarez, H. und Alvarez-Gonzalez, R. (2001) Regulation of p53 sequence-specific DNA-binding by covalent poly(ADP-ribosyl)ation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(39), S. 36425–36430.
- Mendoza-Alvarez, H., Chavez-Bueno, S. und Alvarez-Gonzalez, R. (2000) Chain length analysis of ADP-ribose polymers generated by poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) as a function of β -NAD⁺ and enzyme concentrations. *Iubmb Life*, 50(2), S. 145–149.
- Miller, J., McLachlan, A.D. und Klug, A. (1985) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from Xenopus oocytes. *The EMBO Journal*, 4, S. 1609–1614.
- Mitra, S., Boldogh, I., Izumi, T. und Hazra, T.K. (2001) Complexities of the DNA base excision repair pathway for repair of oxidative DNA damage. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 38(2-3), S. 180–190.
- Mitra, S., Izumi, T., Boldogh, I., Bhakat, K.K., Chattopadhyay, R. und Szczeny, B. (2007) Intracellular trafficking and regulation of mammalian AP-endonuclease 1 (APE1), an essential DNA repair protein. *DNA Repair*, 6(4), S. 461–469.

- Mize, C.E. und Langdon, R.G. (1962) Hepatic Glutathione Reductase: I. Purification and General Kinetic Properties. *Journal of Biological Chemistry*, 237(5), S. 1589–1595.
- Morland, I., Luna, L., Gustad, E., Seeberg, E. und Bjørås, M. (2005) Product inhibition and magnesium modulate the dual reaction mode of hOgg1. *DNA Repair*, 4(3), S. 381–387.
- de Murcia, G. und de Murcia, J.M. (1994) Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends in Biochemical Sciences*, 19(4), S. 172–176.
- Naegli, H. und Althaus, F.R. (1991) Regulation of Poly(ADP-ribose) Polymerase - Histone-specific Adaptations of Reaction-products. *Journal of Biological Chemistry*, 266(16), S. 10596–10601.
- Nash, H.M., Bruner, S.D., Scharer, O.D., Kawate, T., Addona, T.A., Sponner, E., Lane, W.S. und Verdine, G.L. (1996) Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily. *Current Biology*, 6(8), S. 968–980.
- Nilsen, H. und Krokan, H.E. (2001) Base excision repair in a network of defence and tolerance. *Carcinogenesis*, 22(7), S. 987–998.
- Noh, K.M. und Koh, J.Y. (2000) Induction and activation by zinc of NADPH oxidase in cultured cortical neurons and astrocytes. *J Neurosci*, 20(23), S. RC111.
- Norman, D.P.G., Chung, S.J. und Verdine, G.L. (2003) Structural and Biochemical Exploration of a Critical Amino Acid in Human 8-Oxoguanine Glycosylase. *Biochemistry*, 42(6), S. 1564–1572.
- Oei, S.L., Griesenbeck, J., Schweiger, M. und Ziegler, M. (1998) Regulation of RNA polymerase II-dependent transcription by poly(ADP-ribosyl)ation of transcription factors. *Journal of Biological Chemistry*, 273(48), S. 31644–31647.
- Oei, S.L. und Ziegler, M. (2000) ATP for the DNA Ligation Step in Base Excision Repair Is Generated from Poly(ADP-ribose). *Journal of Biological Chemistry*, 275(30), S. 23234–23239.
- Palmiter, R. und Huang, L. (2004) Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflügers Archiv*, 447(5), S. 744–751.
- Panzeter, P.L. und Althaus, F.R. (1990) High-resolution Size Analysis of Adp-ribose Polymers Using Modified Dna Sequencing Gels. *Nucleic Acids Research*, 18(8), S. 2194–2194.
- Park, M.J., Park, J.H., Hahm, S.H., Ko, S.I., Lee, Y.R., Chung, J.H., Sohn, S.Y., Cho, Y., Kang, L.W. und Han, Y.S. (2009) Repair activities of human 8-oxoguanine DNA glycosylase are stimulated by the interaction with human checkpoint sensor Rad9–Rad1–Hus1 complex. *DNA Repair*, 8(10), S. 1190–1200.
- Pavlica, S., Gaunitz, F. und Gebhardt, R. (2009) Comparative in vitro toxicity of seven zinc-salts towards neuronal PC12 cells. *Toxicology in Vitro*, 23(4), S. 653–659.
- Paz-Elizur, T., Sevilya, Z., Leitner-Dagan, Y., Elinger, D., Roisman, L.C. und Livneh, Z. (2008) DNA repair of oxidative DNA damage in human carcinogenesis: Potential application for cancer risk assessment and prevention. *Cancer Letters*, 266(1), S. 60–72.
- Peddi, S.R., Chattopadhyay, R., Naidu, C.V. und Izumi, T. (2006) The human apurinic/aprimidinic endonuclease-1 suppresses activation of poly(adp-ribose) polymerase-1 induced by DNA single strand breaks. *Toxicology*, 224(1-2), S. 44–55.

- Peganova, S. und Eder, K. (2004) Zinc. In Merian, E., Anke, M., Ihnat, M. und Stoeppler, M. (Herausgeber) *Elements and their compounds in the environment.*, Band 2, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, zweite Auflage.
- Pflaum, M., Boiteux, S. und Epe, B. (1994) Visible-Light Generates Oxidative DNA-Base Modifications in High Excess of Strand Breaks in Mammalian-Cells. *Carcinogenesis*, 15(2), S. 297–300.
- Prasad, A.S. (2009) Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. *Current Opinion In Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 12(6), S. 646–652.
- Prasad, R., Lavrik, O.I., Kim, S.J., Kedar, P., Yang, X.P., Vande Berg, B.J. und Wilson, S.H. (2001) DNA polymerase beta-mediated long patch base excision repair - Poly(ADP-ribose) polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 276(35), S. 32411–32414.
- Prasad, R., Dianov, G.L., Bohr, V.A. und Wilson, S.H. (2000) FEN1 Stimulation of DNA Polymerase β Mediates an Excision Step in Mammalian Long Patch Base Excision Repair. *Journal of Biological Chemistry*, 275(6), S. 4460–4466.
- Reyes, J.G. (1996) Zinc transport in mammalian cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 270(2), S. C401–410.
- Rhee, S.G., Yang, K.S., Kang, S.W., Woo, H.A. und Chang, T.S. (2005) Controlled elimination of intracellular H₂O₂: Regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7(5-6), S. 619–626.
- Riedel, E. (2004) *Anorganische Chemie*. Walter de Gruyter GmbH & Co.KG, 6. Auflage.
- Robbins, A.H., Mc Ree, D.E., Williamson, M., Collett, S.A., Xuong, N.H., Furey, W.F., Wang, B.C. und Stout, C.D. (1991) Refined Crystal-structure of Cd, Zn Metallothionein At 2.0 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*, 221(4), S. 1269–1293.
- Rolli, V., O'Farrell, M., Menissier-de Murcia, J. und de Murcia, G. (1997) Random mutagenesis of the poly(ADP-ribose) polymerase catalytic domain reveals amino acids involved in polymer branching. *Biochemistry*, 36(40), S. 12147–54.
- Romani, A. (2007) Regulation of magnesium homeostasis and transport in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys*, 458, S. 90–102.
- Ruf, A., de Murcia, G. und Schulz, G.E. (1998a) Inhibitor and NAD⁺ Binding to Poly(ADP-ribose) Polymerase As Derived from Crystal Structures and Homology Modeling. *Biochemistry*, 37(11), S. 3893–3900.
- Ruf, A., Rolli, V., de Murcia, G. und Schulz, G.E. (1998b) The mechanism of the elongation and branching reaction of Poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and mutagenesis. *Journal of Molecular Biology*, 278(1), S. 57–65.
- Ruscetti, T., Lehnert, B.E., Halbrook, J., Le Trong, H., Hoekstra, M.F., Chen, D.J. und Peterson, S.R. (1998) Stimulation of the DNA-dependent protein kinase by poly(ADP-ribose) polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(23), S. 14461–14467.
- Sanderson, R.J. und Lindahl, T. (2002) Down-regulation of DNA repair synthesis at DNA single-strand interruptions in poly(ADP-ribose) polymerase-1 deficient murine cell extracts. *DNA Repair*, 1(7), S. 547–558.
- SCF (2003) Opinion of the scientific committee on food on the tolerable upper intake level of zinc. Europäische Kommission, http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out177_en.pdf.

- Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M.M. und Schaffner, W. (1989) Rapid Detection of Octamer Binding-proteins With Mini-extracts, Prepared From A Small Number of Cells. *Nucleic Acids Research*, 17(15), S. 6419–6419.
- Schreiber, V., Molinete, M., Boeuf, H., de Murcia, G. und Ménessier-de Murcia, J. (1992) The Human Poly(ADP-ribose) Polymerase Nuclear-localization Signal Is A Bipartite Element Functionally Separate From Dna-binding and Catalytic Activity. *Embo Journal*, 11(9), S. 3263–3269.
- Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J.C. und de Murcia, G. (2006) Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(7), S. 517–528.
- Schroeder, J.J. und Cousins, R.J. (1991) Maintenance of Zinc-Dependent Hepatic Functions in Rat Hepatocytes Cultured in Medium without Added Zinc. *Journal of Nutrition*, 121(6), S. 844–853.
- Schwerdtle, T., Ebert, F., Thuy, C., Richter, C., Mullenders, L.H. und Hartwig, A. (2010) Genotoxicity of soluble and particulate cadmium compounds: impact on oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. *Chem Res Toxicol*, 23(2), S. 432–42.
- Schwerdtle, T., Hamann, I., Jahnke, G., Walter, I., Richter, C., Parsons, J.L., Dianov, G.L. und Hartwig, A. (2007) Impact of copper on the induction and repair of oxidative DNA damage, poly(ADP-ribosyl)ation and PARP-1 activity. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(2), S. 201–210.
- Sekler, I., Sensi, S.L., Hershinkel, M. und Silverman, W.F. (2007) Mechanism and regulation of cellular zinc transport. *Molecular Medicine*, 13(7-8), S. 337–343.
- Semisch, A. und Hartwig, A. (2014) Copper Ions Interfere with the Reduction of the Water-Soluble Tetrazolium Salt-8. *Chem Res Toxicol*.
- Seve, M., Chimienti, F., Devergnas, S. und Favier, A. (2004) In silico identification and expression of SLC30 family genes: An expressed sequence tag data mining strategy for the characterization of zinc transporters' tissue expression. *BMC Genomics*, 5(1), S. 32.
- Sharif, R., Thomas, P., Zalewski, P. und Fenech, M. (2011a) Zinc deficiency or excess within the physiological range increases genome instability and cytotoxicity, respectively, in human oral keratinocyte cells. *Genes & Nutrition*, S. 1–16.
- Sharif, R., Thomas, P., Zalewski, P., Graham, R.D. und Fenech, M. (2011b) The effect of zinc sulphate and zinc carnosine on genome stability and cytotoxicity in the WIL2-NS human lymphoblastoid cell line. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 720(1-2), S. 22–33.
- Sharov, V.S., Briviba, K. und Sies, H. (1999) Peroxynitrite Diminishes Gap Junctional Communication: Protection by Selenite Supplementation. *IUBMB Life*, 48(4), S. 379–384.
- Simonin, F., Ménessier-de Murcia, J., Poch, O., Muller, S., Gradwohl, G., Molinete, M., Penning, C., Keith, G. und de Murcia, G. (1990) Expression and site-directed mutagenesis of the catalytic domain of human poly(ADP-ribose)polymerase in Escherichia coli. Lysine 893 is critical for activity. *Journal of Biological Chemistry*, 265(31), S. 19249–56.
- Simonin, F., Poch, O., Delarue, M. und de Murcia, G. (1993) Identification of Potential Active-Site Residues in the Human Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, 268(12), S. 8529–8535.
- Sliwinski, T., Czechowska, A., Kolodziejczak, M., Jajte, J., Wisniewska-Jarosinska, M. und Blasiak, J. (2009) Zinc salts differentially modulate DNA damage in normal and cancer cells. *Cell Biology International*, 33(4), S. 542–547.

- Slupphaug, G., Kavli, B. und Krokan, H.E. (2003) The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res*, 531(1-2), S. 231–51.
- Snyder, R.D., Davis, G.F. und Lachmann, P.J. (1989) Inhibition by Metals of X-Ray and Ultraviolet-Induced DNA-Repair in Human-Cells. *Biological Trace Element Research*, 21, S. 389–398.
- de Souza-Pinto, N.C., Maynard, S., Hashiguchi, K., Hu, J., Muftuoglu, M. und Bohr, V.A. (2009) The Recombination Protein RAD52 Cooperates with the Excision Repair Protein OGG1 for the Repair of Oxidative Lesions in Mammalian Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 29(16), S. 4441–4454.
- Spittgerber, A.G. und Tappel, A.L. (1979) Inhibition of Glutathione-Peroxidase by Cadmium and Other Metal-Ions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 197(2), S. 534–542.
- Steinebach, O.M. und Wolterbeek, H.T. (1993) Effects of Zinc on Rat Hepatoma HTC Cells and Primary Cultured Rat Hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 118(2), S. 245–254.
- Stroem, C.E., Johansson, F., Uhlén, M., Szigyarto, C.A.K., Erixon, K. und Helleday, T. (2011) Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) is not involved in base excision repair but PARP inhibition traps a single-strand intermediate. *Nucleic Acids Research*, 39(8), S. 3166–3175.
- Stucki, M., Pascucci, B., Parlanti, E., Fortini, P., Wilson, S.H., Hubscher, U. und Dogliotti, E. (1998) Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon. *Oncogene*, 17(7), S. 835–843.
- Taylor, K.M. und Nicholson, R.I. (2003) The {LZT} proteins; the LIV-1 subfamily of zinc transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1611(1–2), S. 16–30.
- Tietze, F. (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem*, 27(3), S. 502–522.
- Trucco, C., Javier Oliver, F., de Murcia, G. und Ménissier-de Murcia, J. (1998) DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines. *Nucleic Acids Research*, 26(11), S. 2644–2649.
- Trucco, C., Rolli, V., Oliver, F.J., Flatter, E., Masson, M., Dantzer, F., Neidergang, C., Dutrillaux, B., Ménissier-de murcia, J. und de Murcia, G. (1999) A dual approach in the study of poly (ADP-ribose) polymerase: In vitro random mutagenesis and generation of deficient mice. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 193(1-2), S. 53–60.
- Vallee, B.L., Coleman, J.E. und Auld, D.S. (1991) Zinc Fingers, Zinc Clusters, and Zinc Twists In Dna-binding Protein Domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(3), S. 999–1003.
- Van Der Kemp, P.A., Thomas, D., Barbey, R., De Oliveira, R. und Boiteux, S. (1996) Cloning and expression in Escherichia coli of the OGG1 gene of Saccharomyces cerevisiae, which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(11), S. 5197–5202.
- Vidal, A.E., Hickson, I.D., Boiteux, S. und Radicella, J.P. (2001) Mechanism of stimulation of the DNA glycosylase activity of hOGG1 by the major human AP endonuclease: bypass of the AP lyase activity step. *Nucleic Acids Research*, 29(6), S. 1285–1292.
- Vodenicharov, M.D., Sallmann, F.R., Satoh, M.S. und Poirier, G.G. (2000) Base excision repair is efficient in cells lacking poly(ADP-ribose) polymerase 1. *Nucleic Acids Research*, 28(20), S. 3887–3896.

- Wang, K., Zhou, B., Kuo, Y.M., Zemansky, J. und Gitschier, J. (2002) A Novel Member of a Zinc Transporter Family Is Defective in Acrodermatitis Enteropathica. *The American Journal of Human Genetics*, 71(1), S. 66–73.
- Wang, P., Guliaev, A.B. und Hang, B. (2006) Metal inhibition of human N-methylpurine-DNA glycosylase activity in base excision repair. *Toxicology Letters*, 166(3), S. 237–247.
- Wang, Y., Lorenzi, I., Georgiev, O. und Schaffner, W. (2004) Metal-responsive transcription factor-1 (MTF-1) selects different types of metal response elements at low vs. high zinc concentration. *Biological Chemistry Biol Chem*, 385(7), S. 623–32.
- Whitehouse, C.J., Taylor, R.M., Thistlethwaite, A., Zhang, H., Karimi-Busheri, F., Lasko, D.D., Weinfeld, M. und Caldecott, K.W. (2001) XRCC1 Stimulates Human Polynucleotide Kinase Activity at Damaged DNA Termini and Accelerates DNA Single-Strand Break Repair. *Cell*, 104(1), S. 107–117.
- Whitlock, J.P. und Simpson, R.T. (1976) Preparation and Physical Characterization of A Homogeneous Population of Monomeric Nucleosomes From Hela-cells. *Nucleic Acids Research*, 3(9), S. 2255–2266.
- Wilson, D.M. und Barsky, D. (2001) The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutation Research/DNA Repair*, 485(4), S. 283–307.
- Winters, T.A., Henner, W., Russell, P.S., McCullough, A. und Jorgensen, T.J. (1994) Removal of 3-phosphoglycolate from DNA strand-break damage in an oligonucleotide substrate by recombinant humanapurinic/aprimidinic endonuclease 1. *Nucleic Acids Research*, 22(10), S. 1866–1873.
- Witkiewicz-Kucharczyk, A. und Bal, W. (2006) Damage of zinc fingers in DNA repair proteins, a novel molecular mechanism in carcinogenesis. *Toxicology Letters*, 162(1), S. 29–42.
- Zakrzewski, S.S., Richter, J.F., Krug, S.M., Jebautzke, B., Lee, I.F.M., Rieger, J., Sachtleben, M., Bondzio, A., Schulzke, J.D., Fromm, M. und Guenzel, D. (2013) Improved Cell Line IPEC-J2, Characterized as a Model for Porcine Jejunal Epithelium. *Plos One*, 8(11), S. e79643.
- Zalewski, P.D., Forbes, I.J. und Betts, W.H. (1993) Correlation of Apoptosis With Change In Intracellular Labile Zn(II) Using Zinquin [(2-methyl-8-p-toluenesulphonamido-6-quinolyloxy)acetic Acid], A New Specific Fluorescent-probe For Zn(II). *Biochemical Journal*, 296, S. 403–408.
- Zhang, B., Georgiev, O., Haggmann, M., Gunes, C., Cramer, M., Faller, P., Vasak, M. und Schaffner, W. (2003) Activity of metal-responsive transcription factor 1 by toxic heavy metals and H₂O₂ in vitro is modulated by metallothionein. *Molecular and Cellular Biology*, 23(23), S. 8471–8485.
- Zharkov, D.O. und Rosenquist, T.A. (2002) Inactivation of mammalian 8-oxoguanine-DNA glycosylase by cadmium(II): implications for cadmium genotoxicity. *DNA Repair*, 1(8), S. 661–670.
- Zödl, B., Zeiner, M., Sargazi, M., Roberts, N.B., Marktl, W., Steffan, I. und Ekmekcioglu, C. (2003) Toxic and biochemical effects of zinc in Caco-2 cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 97(4), S. 324–330.

A. Anhang

A.1 Abkürzungsverzeichnis

γ -GCL	γ -Glutamylcysteinilgase
8-OxoG	8-Oxoguanin
3-AB	3-Aminobenzamid
ADM	Automodifikationsdomäne
AP-Stelle	Apurinische-/Apyrimidinische-Stelle
APE1	AP-Endonuklease 1
AP-1	<i>activator protein 1</i>
Asp	Aspartat bzw. Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BER	Basenexzisionsreparatur
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
Bp	Basenpaare
BRCT	<i>breast cancer C-terminal domain</i>
BSAP	<i>B cell specific transcription factor</i>
BSO	D,L-Buthionin-[S,R]-Sulfoximin
C 3/7	Caspasen 3/7
CCK-8	Cell Counting Kit-8
cDNA	komplementäre DNA
CRIP	<i>cyteine rich intestinal protein</i>
Ct	<i>threshold cycle</i>
Cys	Cystein
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMT-1	<i>divalent metal transporter 1</i>
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
5'-dRP	5'-Desoxyribose-5-Phosphatrest
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EGR-1	<i>early growth response protein 1</i>
Endo oder nfo	Endonuklease
esDNA	einzelsträngige DNA
Exo oder nfo	Exonuklease
F-AAS	Flammen-Absorptionsspektrometrie
FEN-1	<i>flap structure-specific endonuclease 1</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FNB	US-Food National Board
Fpg	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
fwd	<i>forward</i>
Glu	Glutamat bzw. Glutaminsäure
GPD	Glycin/Prolinreiche Schleife mit einem konservierten Aspartat

GPx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion (reduziert)
GSSG	Glutathion (oxidiert)
HIF	<i>hypoxia inducible faktor</i>
His	Histidin
HLF	<i>HIF-like factor</i>
HR23B	<i>human homolog of Rad 23B</i>
HUS1	<i>human homologs of Schizosaccharomyces</i>
K_D	Dissoziationskonstante
KG	Körpergewicht
LD	Lethale Dosis
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LIM	lin-11, isl-1 und mec-3 Gene
Lig	Ligase
MAK	Maximale Arbeitsplatz-Konzentration
mPMS	1-Methoxy-5-Methylphenaziniummethylsulfat
MRE	<i>metal response element</i>
MT	Metallothionein
MTF-1	<i>metal transkription factor 1</i>
NAC	N-Acetylcystein
NAD^+	Nicotinamidadenindinukleotid
Nam	Nicotinamid
NBD	N-Terminale Bindungsdomäne (auch: katalytische Domäne)
NEIL 1	<i>Nei-like protein 1</i>
NEM	Nahrungsergänzungsmittel
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NLS	<i>nuclear localization sequence</i>
nt	Nukleotid
NSB	nicht-spezifische Zink-bindende Proteine
ÖGE	Österreichische Gesellschaft für Ernährung
PARP	Poly(ADP-Ribose) Polymerase
PAR	Poly(ADP-Ribose)
PARsylierung	Poly(ADP-Ribosyl)ierung
PARG	Poly(ADP-Ribose) Glykohydrolase
PAX	<i>paired box gene</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PKc	Proteinkinase C
PNKP	Polynukleotidkinase-3'-Phosphatase
Prx	Peroxiredoxine
Pol	Polymerase
Ref-1	Redoxfaktor 1
rev	<i>reverse</i>
RFC	<i>replication factor C</i>
RT	Raumtemperatur
RTq-PCR	Real-Time reverse Transkriptase-PCR

ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SCF	Scientific Committee on Food
SD	<i>Standard Deviation</i> (Standardabweichung)
SGE	Schweizerische Gesellschaft für Ernährung
SLC	<i>solute linked carrier</i>
SOD	Superoxiddismutase
SSBR	DNA-Einzelstrangbruchreparatur
TCA	Trichloressigsäure
TF III A	Transkriptionsfaktor III A
THF	Tetrahydrofuran
TNB	5-Thio-2-Nitrobezoessäure
Topo I	Topoisomerase I
TSQ	6-Methoxy-8-p-toluensulfonamido-quinolin
UDG	Uracil-DNA-Glykosylase
UV	Ultraviolett
WST	<i>water soluble tetrazolium salt</i>
XP	Xeroderma Pigmentosum
XRCC1	<i>X-ray cross complementing protein 1</i>
yOGG1	8-Oxoguanin-DNA-Glykosylase 1 aus <i>S. cerevisiae</i>
YY1	Ying-Yang 1
ZF	Zinkfinger
ZIP	Zink-Importprotein
ZnT	Zink-Exportprotein

A.2 Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth (Karlsruhe)
acetyliertes BSA	Sigma-Aldrich (Steinheim)
N-Acetylcystein	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Acrylamid Rotiphorese Gel 40 (19:1)	Roth (Karlsruhe)
Acrylamid Rotiphorese Gel 40 (37:1)	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumperoxodisulfat, $\geq 98\%$	Roth (Karlsruhe)
3-Aminobenzamid, 98%	Alfa Aesar GmbH & Co KG (Karlsruhe)
Anti-Maus-Antikörper, FITC-gekoppelt (Herkunft: Ziege)	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg)
Anti-PAR-Antikörper 10H (Herkunft: Maus)	Isolation AK Hartwig
APE-1 (human)	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Aprotinin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Borsäure	Roth (Karlsruhe)
Bradford-Reagenz (Protein Assay Farbstoff-Konzentrat)	Bio-Rad (München)
Bromphenolbau	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Calciumchlorid	Roth (Karlsruhe)

D, L-Buthionin-[S, R]-Sulfoximin (BSO), $\geq 97\%$	Sigma-Aldrich (Steinheim)
D-Glucose, $\geq 99,5\%$	Roth (Karlsruhe)
Dextranblau	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Diethylentriaminpentaessigsäure (DETAPAC)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
di-Kaliumhydrogenphosphat (wasserfrei), $\geq 99\%$	Roth (Karlsruhe)
p.a.	
Dimethylsulfoxid, $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich (Steinheim)
di-Natriumhydrogenphosphat, $\geq 99\%$ p.a.	Roth (Karlsruhe)
5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB), $\geq 99\%$ p.a.	Roth (Karlsruhe)
1,4-Dithiothreitol (DTT), $\geq 99\%$ p.a.	Roth (Karlsruhe)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium/ Ham's Nu- trient Mixture F12 (DMEM/Ham's F-12) mit L- Glutamin	Biochrom (Berlin)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), $\geq 99\%$ p.a.	Roth (Karlsruhe)
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA), $\geq 99\%$ p.a.	Roth (Karlsruhe)
Ethanol vergällt, $\geq 96\%$	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ethanol unvergällt, $\geq 99,8\%$	Roth (Karlsruhe)
Fetales Kälberserum	Gibco (Darmstadt)
Formamid, $\geq 99,5\%$	Roth (Karlsruhe)
Formaldehyd (37%)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (10000x in Wasser)	Biotium (Hayward, USA)
Glycerin, $\geq 99\%$	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Glutathionreduktase aus <i>S. cerevisiae</i>	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Glutathionperoxidase aus den Erythrozyten des Rinds	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Harnstoff	Roth (Karlsruhe)
Hoechst 33258	Fluka (Buchs, Schweiz)
Hydroxylapatit, high resolution	Merck Millipore (Darmstadt)
8-Hydroxy-2-methylquinazoline-4-one (NU 1025), > 98%	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth (Karlsruhe, D)
Kaliumchlorid, $\geq 99,5\%$ p.a.	Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat, $\geq 99\%$ p.a.	Roth (Karlsruhe)
Katalase aus der Rinderleber	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Lachsspermien-DNA, ultrapur	Invitrogen (Darmstadt)
Leupeptin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
L-N-Acetylcystein, $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich (Steinheim)
L-Glutathion reduziert, $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich (Steinheim)
L-Glutathion oxidiert, $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Magnesiumchlorid, $\geq 98,5\%$ (wasserfrei)	Roth (Karlsruhe)
Metallothionein-Primer	Eurofins MWG Operon (Ebersberg)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
β -Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)
Milchpulver, blotting grade	Roth (Karlsruhe)
3-(N-Morpholino)-propan-sulfonsäure (MOPS)	Roth (Karlsruhe)

Natriumdihydrogenphosphat, $\geq 98\%$ p.a.	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid, $\geq 99,5\%$ p.a.	Roth (Karlsruhe)
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumhydroxid, $\geq 98\%$ p.a.	Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS) Feststoff, p.a.	Molekula (Taufkirchen)
Natriumdodecylsulfat (SDS) 10%ige Lösung	Applichem (Darmstadt)
Natriumvanadat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natronlauge (0,1 N, 4 N)	Roth (Karlsruhe)
Nicotinamidadenindinukleotid, $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH), $\geq 95\%$	Sigma-Aldrich (Steinheim)
NP-40 (Igepal CA-630)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Nucleo Spin® RNA II	Macherey-Nagel (Düren)
³² P- Nicotinamidadenindinukleotid, 800 Ci/mmol	Perkin Elmer (Rodgau)
OGG1 (human)	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Pepstatin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
PerfeCTa® SYBR® Green SuperMix for iQ™	Quanta Biosciences (Gaithersburg, USA)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Rekombinante PARP-1	Enzo Life Science (Lörrach, CAT-Nr. ALX-201-063-C020)
Salzsäure (0,1 N, 4 N)	Roth (Karlsruhe)
Salpetersäure (69%), Supra Qualität	Roth (Karlsruhe)
qScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad (München)
5-Sulfosalicylsäure (SSA), $\geq 99\%$	Roth (Karlsruhe)
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED), $\geq 99\%$ p.a.	Roth (Karlsruhe)
Trichloressigsäure (TCA), $\geq 99\%$ reinst	Roth (Karlsruhe)
Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan (TRIS) Ultra Qualität, $\geq 99,9\%$	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100 (10%ige Lösung)	ThermoScientific (Karlsruhe)
Triton X-100 (reduced form)	Fluka (Buchs, Schweiz)
Trypsin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tween 20	Roth (Karlsruhe)
VECTASHILD Mounting Medium mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Vector Laboratories Inc. (Burlingame, USA)
Wasserstoffperoxid (30%), suprapure	Merck (Darmstadt)
Xylencyanol	Fluka (Buchs, Schweiz)
Zink-Standardlösung	Roth (Karlsruhe)
Zinksulfat-Heptahydrat	Roth (Karlsruhe)
Zinquin Ethylester, ultrapure	Enzo Life Sciences (Lörrach)
8-OxoG-Oligonukleotid	Eurogentec (Köln)
THF-Oligonukleotid	Eurogentec (Köln)
G-Oligonukleotid	Eurogentec (Köln)

A.3 Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Puffer, Lösungen und Kulturmedien für die Zellkulturversuche wurden steril filtriert.

Zellkultur

Kulturmedium IPEC-J2-Zellen	DMEM/F12	
	10%	FKS
	100 U/mL	Penicillin
	100 µg/mL	Streptomycin
Kulturmedium HeLa-S3-Zellen	DMEM	
	10%	FKS
	100 U/mL	Penicillin
	100 µg/mL	Streptomycin
Trypsin-Lösung	0,25%	Trypsin in PBS-EDTA
PBS (pH 7,4)	136,8 mM	NaCl
	8,45 mM	Na ₂ HPO ₄
	2,15 mM	KCl
	2,18 mM	KH ₂ PO ₄
PBS-EDTA (pH 7,4)	100 mM	NaCl
	7 mM	Na ₂ HPO ₄
	4,5 mM	KCl
	3 mM	KH ₂ PO ₄
	0,5 mM	EDTA
PBS _{UVC} (pH 7,4)	137 mM	NaCl
	8 mM	Na ₂ HPO ₄
	2 mM	KCl
	1 mM	KH ₂ PO ₄
PBST	0,05%	Tween-20 in PBS

Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen

Alkalische Lösung (pH 12,3)	0,9 M	NaCl
	0,01 M	Na ₂ HPO ₄
	0,03 M	NaOH
Na-Phosphatpuffer (0,01 M)	0,0051 M	NaH ₂ PO ₄
	0,0049 M	Na ₂ HPO ₄
K-Phosphatpuffer (0,15 M)	0,0765 M	KH ₂ PO ₄
	0,0735 M	K ₂ HPO ₄
K-Phosphatpuffer (0,35 M)	0,1785 M	KH ₂ PO ₄

	0,1715 M	K ₂ HPO ₄
K-Phosphatpuffer (0,5 M)	0,255 M	KH ₂ PO ₄
	0,245 M	K ₂ HPO ₄

Quantifizierung von Gesamtglutathion

K-Phosphatpuffer (pH 7,4)	Lösung A	
	0,1 M	K ₂ HPO ₄
	1 mM	EDTA
	Lösung B	
	0,1 M	KH ₂ PO ₄
	1 mM	EDTA

Lösung A wurde mit Lösung B auf pH 7,4 eingestellt

Quantifizierung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung in Kernextrakten und der isolierten PARP-1

Kernextraktionpuffer A (pH 7,9)	10 mM	HEPES
	10 mM	KCl
	0,1 mM	EDTA
	1 mM	DTT
	0,5 mM	PMSF
Kernextraktionpuffer B (pH 7,9)	20 mM	HEPES
	400 mM	KCl
	1 mM	EDTA
	1 mM	DTT
	1 mM	PMSF
10x HEPES-Puffer (pH 8,0)	400 mM	HEPES
	10 mM	MgCl ₂
	150 mM	NaCl
5x SDS-Probenpuffer	10 mL 3,75 M	Tris-HCl
	6 mL 50% (v/v)	SDS-Lösung
	3 mL	Glycerin
	15 mL	β-Mercaptoethanol
	1,8 mg	Bromphenolblau
SDS-PAGE	10%iges Trenngel	
	7,5 mL	Rotiphorese Gel 40 (37,5:1)
	2,8 mL	Trenngelpuffer
	4,6 mL	H ₂ O
	56 µL	SDS-Lösung (v/v) 20%

	5 µL	TEMED
	50 µL	APS 10%
	5%iges Sammel-	
	gel	
	0,625 mL	Rotiphorese Gel 40 (37,5:1)
	0,625 mL	Sammelgelpuffer
	2,47 mL	H ₂ O
	25 µL	SDS-Lösung (v/v) 20%
	3 µL	TEMED
	20 µL	APS 10%
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M	Tris-HCl
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,5 M	Tris-HCl
SDS-Laufpuffer	0,3%	Tris
	1,4%	Glycerin
	0,1%	SDS

Kettenlängenanalyse von ³²P-markierten ADP-Ribosepolymeren

TE-Puffer (pH 12,0)	10 mM	Tris
	1 mM	EDTA
TBE-Puffer (pH 8,3)	90 mM	Tris-HCl
	90 mM	Borsäure
	2 mM	EDTA
PAR-Probenpuffer (pH 8,0)	7 M	Harnstoff
	25 mM	NaCl
	4 mM	EDTA
	0,02% (w/v)	Bromphenolblau
	0,02% (w/v)	Xylen Cyanol

Aliquotierung Oligonukleotide

TE1-Puffer (pH 7,0)	100 mM	Tris-HCl
	10 mM	EDTA

Hybridisierung Oligonukleotide

TE2-Puffer (pH 8,0)	100 mM	Tris-HCl
	10 mM	EDTA

Native PAGE

20%iges natives Gel (pro 1 Gel)	3,75 mL	TBE1-Puffer
	13,66 mL	H ₂ O
	18,75 mL	Rotiphorese Gel 40 (19:1)
	1,25 mL	Glycerin 80%
	15 µL	TEMED
	75 µL	APS 40%
10x TBE1-Puffer (pH 8,0)	500 mM	Tris-HCl
	500 mM	Borsäure
	10 mM	EDTA
Elektrophoresepuffer	1x	TBE1-Puffer (pH 8,0)
Ladepuffer	0,5x	TBE1-Puffer (pH 8,0)
	40%	Glycerin

Inzisionstest

Extraktionspuffer A (pH 7,1)	50 mM	Tris-HCl
	250 mM	NaCl
	20%	Glycerin
	0,5 mM	PMSF
	10 µg/mL	Aprotinin
	5 µg/mL	Leupeptin
	1 µg/mL	Pepstatin
	50 mM	NaF
	1 mM	Na ₃ VO ₄
	1 mM	EDTA
Extraktionspuffer B (pH 7,1)	0,5 mM	DTT
	50 mM	Tris-HCl
	250 mM	NaCl
	20%	Glycerin
	0,5 mM	PMSF
	10 µg/mL	Aprotinin
	5 µg/mL	Leupeptin
	1 µg/mL	Pepstatin
	50 mM	NaF
	1 mM	Na ₃ VO ₄
Verdünnungspuffer A (pH 7,1)	50 mM	Tris-HCl
	20%	Glycerin
	1 mM	EDTA
	0,5 mM	DTT

Verdünnungspuffer B (pH 7,1)	50 mM 20%	Tris-HCl Glycerin
Reaktionspuffer A (pH 7,1)	50 mM 50 mM 1 mM 0,5 mM 20%	Tris-HCl NaCl EDTA DTT Glycerin
Reaktionspuffer B (pH 7,1)	40 mM 40 mM 20%	Tris-HCl NaCl Glycerin
Reaktionspuffer C (pH 7,1)	50 mM 50 mM 20%	Tris-HCl NaCl Glycerin
20%iges denaturierendes Gel (pro 1 Gel)	3,75 mL 3 mL 15,75 g 18,75 mL 15 µL 75 µL	TBE2-Puffer H ₂ O Harnstoff Rotiphorese Gel 40 (19:1) TEMED APS 40%
10x TBE2-Puffer (pH 8,0)	890 mM 890 mM 20 mM	Tris-HCl Borsäure EDTA
Elektrophoresepuffer	1x	TBE2-Puffer (pH 8,0)
Auftragepuffer	90% 0,5% 0,1 mM	Formamid Dextranblau EDTA (pH 8,0)
Aufbewahrungspuffer A für hOGG1 (pH 8,0)	20 mM 50 mM 1 mM 200 µg/mL 50%	Tris-HCl NaCl EDTA BSA Glycerin
Aufbewahrungspuffer B für hAPE1 (pH 8,0)	10 mM 50 mM 0,05 mM 1 mM 200 µg/mL 50%	Tris-HCl NaCl EDTA DTT BSA Glycerin

Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung „freier“ Zn²⁺

Inkubationspuffer (pH 7,35)	25 mM	HEPES
	120 mM	NaCl
	5,4 mM	KCl
	5 mM	Glucose
	1,3 mM	CaCl ₂
	1 mM	MgCl ₂
	1 mM	NaH ₂ PO ₄
0,3%	BSA	

RNA-Elektrophorese

20x MOPS (pH 7,0)	400 mM	MOPS
	100 mM	Na-Acetat
	10 mM	EDTA
Formamid-Denaturierungspuffer	54 µL	H ₂ O
	35 µL	Formaldehyd (37%)
	10 µL	MOPS (20x)
	100 µL	Formamid
	1 µL	Gel-Red
4x Lämmli-Ladepuffer (pH 6,8)	320 mM	Tris
	8%	SDS
	40%	Glycerin
	8%	Mercaptoethanol
	0,04%	Bromphenolblau
Elektrophoresepuffer	1x	MOPS (pH 7,0)

Herstellung der Primer für die relative Genexpression

TE-Puffer (pH 8,0)	100 mM	Tris
	10 mM	EDTA

A.4 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
96-Well-Platten, transparent	TTP (Trasadingen, Schweiz)
96-Well-Platten, UV-Star	Greiner bio one (Frickenhausen)
24-Well-Platten, transparent	Greiner bio one (Frickenhausen)
3-mL-Einwegspritzen	Braun (Melsungen)
1-mL-Einwegspritzen	Terumo (Vertrieb: Eschborn)

Accuvetten	Beckmann Coulter (Krefeld), Roche Innovatis AG (Reutlingen)
Deckgläschen, Ø 12 mm	Roth (Karlsruhe)
Glaspipetten (1, 2, 5, 10, 20 ml)	Roth (Karlsruhe)
Glasfaserfilterfritte	Whatman (Maidstone, UK)
Kanüle (0,4 x 20 mm)	Terumo (Eschborn)
Microcon Filtereinheiten, 10 kDa	Merck Millipore (Darmstadt)
Mikroreaktionsgefäße (1,5 und 2 mL)	Sarstedt (Nümbrecht)
Messkolben, PP (25, 50, 100 ml)	Roth (Karlsruhe)
Objektträger superfrost	Roth (Karlsruhe)
Parafilm	Sigma-Aldrich (Steinheim)
PCR-Reaktionsgefäße	Sarstedt (Nümbrecht)
Pinzetten für Deckgläser	Roth (Karlsruhe)
Pipettenspitzen (0,1–20 micro L)	Brand (Wertheim)
Pipettenspitzen (1–200 micro L)	Roth (Karlsruhe)
Pipettenspitzen (100–1000 micro L)	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen (500–5000 micro L)	Eppendorf (Hamburg)
Plastikzentrifugenröhrchen (15 und 50 mL)	Sarstedt (Nümbrecht)
Spitzen für Multipette (1 und 5 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Spitzen für Multipette (1250 µL)	Gilson (Limburg an der Lahn)
Sterilfilter (500 ml), 0,2 µm, PES	VWR International (Darmstadt)
Teflonmagnetrührkerne	Roth (Karlsruhe)
Wägeschiffchen	Roth (Karlsruhe)
Zellkulturschalen (verschiedene Größen)	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zellkulturflaschen (verschiedene Größen)	TPP (Trasadingen, Schweiz)
zinkfreie Mikroreaktionsgefäße (1,5 und 2 mL)	AHN Biotechnologie (Nordhausen)
zinkfreie Pipettenspitzen (10 µL, 1-200 µL, 100-1000 µL, 5000 µL)	AHN Biotechnologie (Nordhausen)
zinkfreie Plastikzentrifugenröhrchen (15 und 50 mL)	AHN Biotechnologie (Nordhausen)

A.5 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Atomabsorptionsspektrometer Pinaccl 900T	Perkin Elmer (Rodgau)
Axio Imager Z2 (Auflichtmikroskop)	Carl Zeiss (Oberkochen)
Biofreezer Herafreeze top	Thermo Scientific (Langenselbold)
Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
Brutschrank Heracell 150i	Thermo Scientific (Langenselbold)
Centrifuge 5810 R	Eppendorf (Hamburg)
Centrifuge 5417 R	Eppendorf (Hamburg)
Centrifuge 5702	Eppendorf (Hamburg)
Chromatographieblock	Georg, Franz und Brose (Berlin)
CFX96 TM Real-Time System	Bio Rad (München)
Electrophoresis Power Supply EPS 601	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)
Elektrophoreseeinheit (Agarose)	Peqlab (Erlangen)

Elektrophoreseeinheit (SE600 Standard Dual Cooled Vertical Unit)	Hoefler (Holliston, USA)
Elektrophoreseplatten für Fluoreszenzscanner	Amersham Bioscience Corp. (Piscataway, USA)
Feinwaage, Micro MC 5	Sartorius (Göttingen)
Fluoreszenzimager Typhoon	GE Healthcare (Uppsala, Schweden)
Formgießer für SE600	Hoefler (Holliston, USA)
Galaxy Mini Centrifuge	VWR International (Darmstadt)
Gas-Sicherheitsbrenner 1SCS micro	Roth (Karlsruhe)
Heizrührer RH basic 2 IKAMAG	IKA (Staufen)
Heizrührer MR 3001 K	Heidolph (Schwabach)
Heizschüttler SH 26	CAT (Staufen)
Heizschüttler TS- 100	peqlab (Erlangen)
Heizschüttler MKR 13 (zur Hybridisierung)	HLC-BioTech (Bovenden)
Infinite M200 Pro Mikrotiterplattenlesegerät	Tecan (Männedorf, Schweiz)
Kolbenhubpipetten (verschiedene Volumina)	Eppendorf (Hamburg)
Kühl- und Gefrierschränke	Bosch (Stuttgart)
LAS 3000 Geldokumentationsgerät	raytest (Straubenhardt)
Laborspülmaschine Professional G7883	Miele (Bielefeld)
Magnetrührer Variomag Poly Komet	VWR International (Darmstadt)
MicroCentrifuge	Roth (Karlsruhe)
Mikroskop Axiovert 40C (Durchlichtmikroskop)	Carl Zeiss (Oberkochen)
Multipette	Eppendorf (Hamburg)
Multipette	Gilson (Limburg an der Lahn)
NanoQuant Platte	Tecan (Männedorf, Schweiz)
pH-Meter 3210	WTW (Weilheim)
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Reinstwasseranlage Milli-Q	Merck Millipore (Darmstadt)
Rotator	Labinco B.V. (Bredastadt)
Schüttler Shaker DOS-10L	Neolab (Heidelberg)
Software ZEN	Carl Zeiss (Oberkochen)
Sterilbank HERAsafeKS	Thermo Scientific (Langenselbold)
Taumler 3012	GFL (Burgwedel)
Tischinkubator B15	Thermo Scientific (Langenselbold)
Ultrafeinwaage BP 61S	Sartorius (Göttingen)
Ultraschallbad Sonorex TK52	Brandelin (Berlin)
Ultraschallspitze	Branson (Dietzenbach, D)
Umwälzthermostat MA 6	Julabo (Seelbach)
Umwälzthermostat MA 26	Julabo (Seelbach)
Vakuum System BVC21NT	Vakuubrand (Wertheim)
Vortex-Genie 2T	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Waage VWR 1502	Sartorius (Göttingen)
Waage BP 61S	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad	Memmert (Schwabach)
Wasserbad	Julabo (Seelbach)
Zellzählgerät Coulter Z2	Beckman Coulter (Krefeld)
Zellzählgerät Casy	Roche Innovatis AG (Reutlingen)

A.6 Ergänzende Daten

A.6.1 Relative Genexpression

RNA-Integrität

Die Intaktheit der RNA wurde mittels einer denaturierenden Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Das 1,2%ige Agarosegel, welches man durch Aufkochen von 1,2 g Agarose, 83 mL Wasser und 5 mL 20x MOPS-Puffer (pH 7,0) erhielt, wurde nach dem Abkühlen auf 65°C 12 mL Formaldehydlösung (12%) zugegeben. 2 µg der isolierten RNA wurden mit Formamid-Denaturierungspuffer auf 15 µL ergänzt und für 10 min. bei 65°C denaturiert. Nach der Zugabe von 1,5 µL 4x Lämmli-Ladepuffer (pH 6,8) erfolgte die elektrophoretische Trennung für 2 h bei 60 V in MOPS-Puffer. Die Banden wurden am FUji LAS 3000 visualisiert. Den Hauptteil der isolierten RNA machen die ribosomale RNA 28S und 18S aus, deren Banden eindeutig auf dem Gel erkenntlich sind und die Integrität der RNA nachweisen (Abbildung A.1).

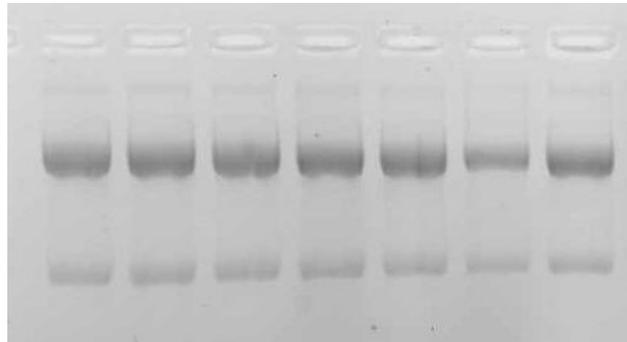
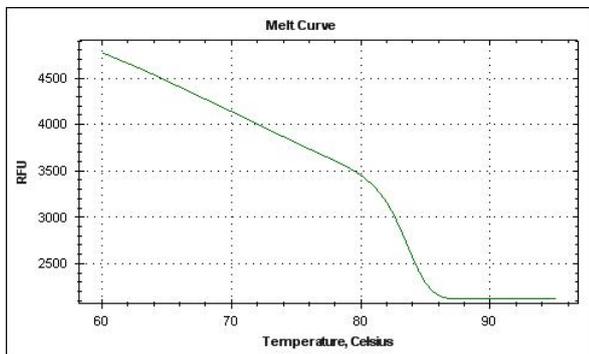


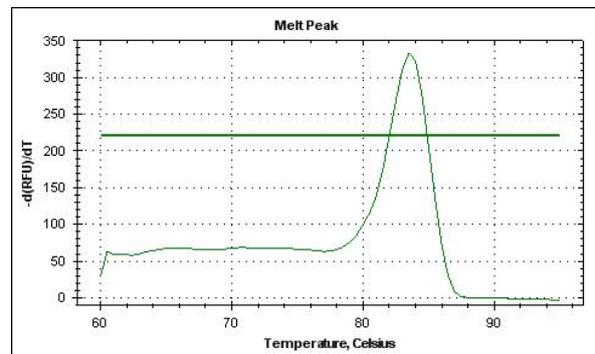
Abbildung A.1: RNA-Integrität. Die obere Bande spiegelt die 28S und die untere Bande die 18S ribosomale RNA wider.

Schmelzkurvenanalyse

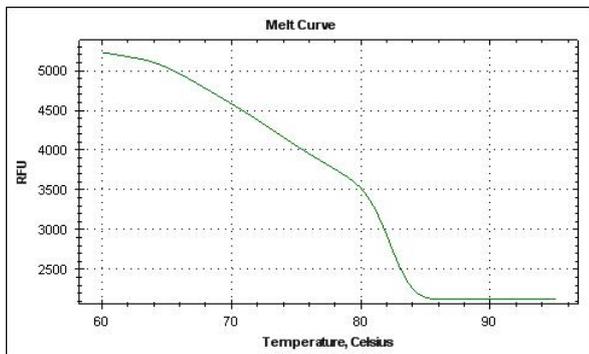
(A)



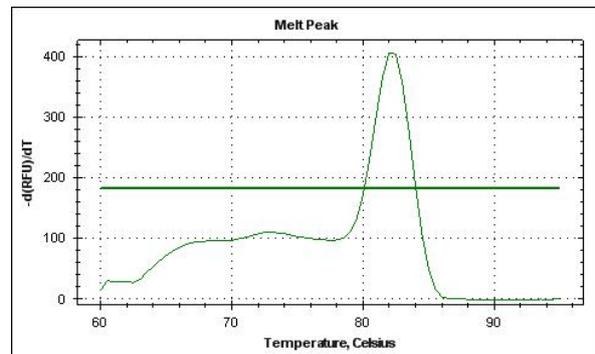
(B)

Abbildung A.3: (A) Schmelzkurve mit (B) Ableitungsfunktion für den Primer *mt-1a* (0,5 µM).

(A)



(B)

Abbildung A.4: (A) Schmelzkurve mit (B) Ableitungsfunktion für den Primer *gapdh* (0,4 µM).

PCR-Analysenprogramm

Tabelle A.17: PCR-Analysenprogramm

Zyklenanzahl	Prozess	Temperatur (°C)	Zeit (min:s)
1	Aktivierung der Polymerase	95,0	1:30
	Denaturierung	95,0	0:30
40	Primer-Anlagerung	60,0	1:00
	Elongation	72,0	0:15
1	Denaturierung	95,0	1:00
1	Zusammenlagerung	60,0	1:00
70	Schmelzkurvenanalyse	60,0-95 (in 0,5°C-Schritten)	0:10

A.6.2 Inzisionstest

Vergleich der OGG- und APE-Aktivität in Zink-behandelten Zellen in An- und Abwesenheit von EDTA und DTT

Um auszuschließen, dass fehlende zelluläre Effekte von Zink auf die OGG- und APE-Aktivität nicht durch die Anwesenheit von EDTA und DTT im Extraktions-, Verdünnungs- und Reaktionspuffer bedingt sind, wurde der Einfluss von Zink auf die zelluläre OGG- und APE-Aktivität ebenfalls in Abwesenheit von EDTA und DTT durchgeführt.

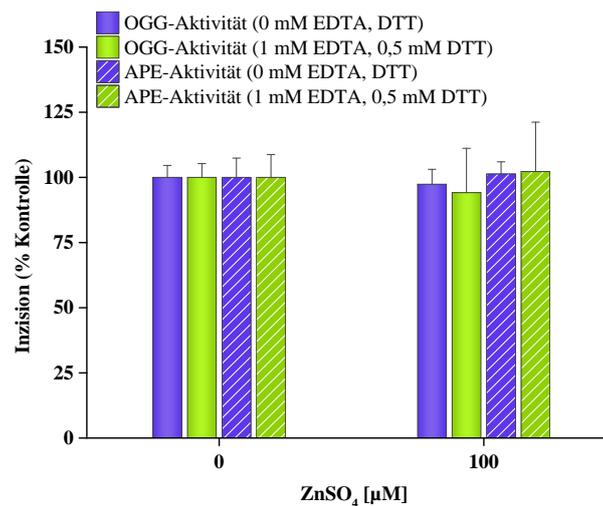


Abbildung A.5: Vergleich des Einflusses von ZnSO₄ auf die zelluläre OGG- und APE-Aktivität in An- und Abwesenheit von EDTA und DTT. IPEC-J2-Zellen wurden für 1 h mit ZnSO₄ vorinkubiert und die Präparation der Zellextrakte, wie unter Abschnitt 6.7.3 beschrieben in An- oder Abwesenheit von EDTA und DTT, durchgeführt. Die Durchführung des Inzisionstest erfolgte wie unter Abschnitt 6.7.4 oder 6.7.7 beschrieben. Gezeigt sind Mittelwerte aus mindestens einer Dreifachbestimmung + SD.

Proteinmenge der isolierten hOGG1

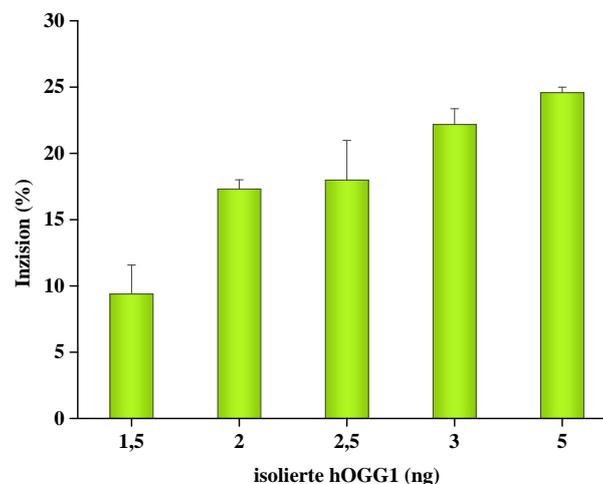


Abbildung A.6: Bestimmung der einzusetzenden Proteinmenge der isolierten hOGG1. 40 fmol Oligonukleotid I wurde mit verschiedenen Proteinmengen der isolierten hOGG1 für 60 min bei 37°C inkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung + SD.

		429		
Homo sapiens	GTANKASIQISTKKEVEKMNKKMEEVKEANIRVVSEDFLQDVSASTKSLQELFLAHILSP			480
Sus scrofa	GTASKASIQVSTKKEVDKMSKKMEEVKEANVRVVSEDFLQDVSASTKSLQELLLCTHILSP			480
	*** . ***** : ***** : ** . ***** : ***** : ***** : *****			
Homo sapiens	WG---AEVKAEPVEVVAPRGKSGAALSKKSKGQVKEEGINKSEKRMKLTLLKGGAAVDPD			536
Sus scrofa	WGAEMKAEVKAEPVEAVAPRGKSGGALPKKSKGPIREGANKSEKRMKLTLLKGGAAVDPD			540
	** . ***** . ***** . ** . ***** : : ** . *****			
Homo sapiens	SGLEHSAHVLEKGGKVFVSATLGLVDIVKGTNSYYKLQLEDDKENRYWIFRSWGRVGTVI			596
Sus scrofa	SGLEHSAHVLEKGGKVFVSATLGLVDIVKGTNSYYKLQLEDDKESRYWIFRSWGRVGTVI			600
	***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . *****			
Homo sapiens	GSNKLEQMPSKEDAIIEHFMKLYEECTGNAWHSKNFTKYPKKFYPLEIDYGQDEEAVKKLT			656
Sus scrofa	GSNKLEQMPSKEDAIDHFMKLYEECTGNAWHSKNFTKYPKKFYPLEIDYGQDEEAVKKLT			660
	***** : ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . *****			
Homo sapiens	VNPGTKSKLPKPVQDLIKMIFDVESMKKAMVEYEIDLQKMPGKLSKRQIQAAYSILSEV			716
Sus scrofa	VNPGTKSKLPKSVQELIKMIFDVESMKKAMVEYEIDLQKMPGKLSKRQIQAAAYAILSEV			720
	***** . ** : ***** . ***** . ***** . ***** . *****			
Homo sapiens	QQAVSQGSSDSQILDLSNRFYTLIPHDFGMKKPPLLNNADSVQAKVEMLDNLLDIEVAYS			776
Sus scrofa	QQAVSQGSSDSQILDLSNRFYTLIPHDFGMKKPPLLNNADSVQAKVEMLDNLLDIEVAYS			780
	***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . *****			
Homo sapiens	LLRGGSDSSKDPIDVNYEKLKTDIKVVDRDSEEAEIIRKYVKNTHATTHNAYDLEVIDI			836
Sus scrofa	LLRGGSDSSKDPIDVNYEKLKTDIKVVDRDSEEAEIIRKYVKNTHATTHNAYDLEVIDI			840
	***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . *****			
			Active Site	
Homo sapiens	FKIEREGECQRYKPFKQLHNRRLLLWHGSRTTNFAGILSQGLRIAPPEAPVTGYMFGKGIY			896
Sus scrofa	FKIEREGESQRYKPFKQLHNRRLLLWHGSRTTNFAGILSQGLRIAPPEAPVTGYMFGKGIY			900
	***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . *****			
		908	923	
Homo sapiens	FADMVSKSANYCHTSQGDP IGLILLG E VALGNMYELKHASHISKLPKGKHSVKGLGKTTP			956
Sus scrofa	FADMVSKSANYCHTSQGDP IGLILLG E VALGNMYELKHASHISKLPKGKHSVKGLGKTTP			960
	***** . ***** . ***** . ***** . ***** . ***** . *****			
		988	993	
Homo sapiens	DPSANISLDGVDVPLGTGISSGVNDTSLLYN E YIVY DIAQVNLKYLKLFNFKTSW			1014
Sus scrofa	DPAASITMDGVEVPLGTGIPSGVNDTCLLYN E YIVY DIAQVNLKYLKLFNFKTSW			1018
	** : * . * : : ** : ***** . ***** . ***** . ***** . *****			

Abbildung A.8: CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment der humanen PARP-1 und der PARP-1 des Schweines. Identische Aminosäuren sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Ungleiche, aber ähnliche Aminosäuren wurden mit einem (·) und hoch konservierte Bereiche mit (:) gekennzeichnet. Graue Boxen kennzeichnen die Zinkfinger I bis III. Die gestrichelte Box markiert die hoch konservierte *Active Site* der PARP-1. Cystein- und Histidinreste, die Bestandteil der Zinkfinger motive sind sowie die für die katalytische Effizienz der PARP-1 erforderlichen Aminosäuren sind rot markiert und eingekästelt.

Alignment der humanen APE1 und der APE1 des Schweines

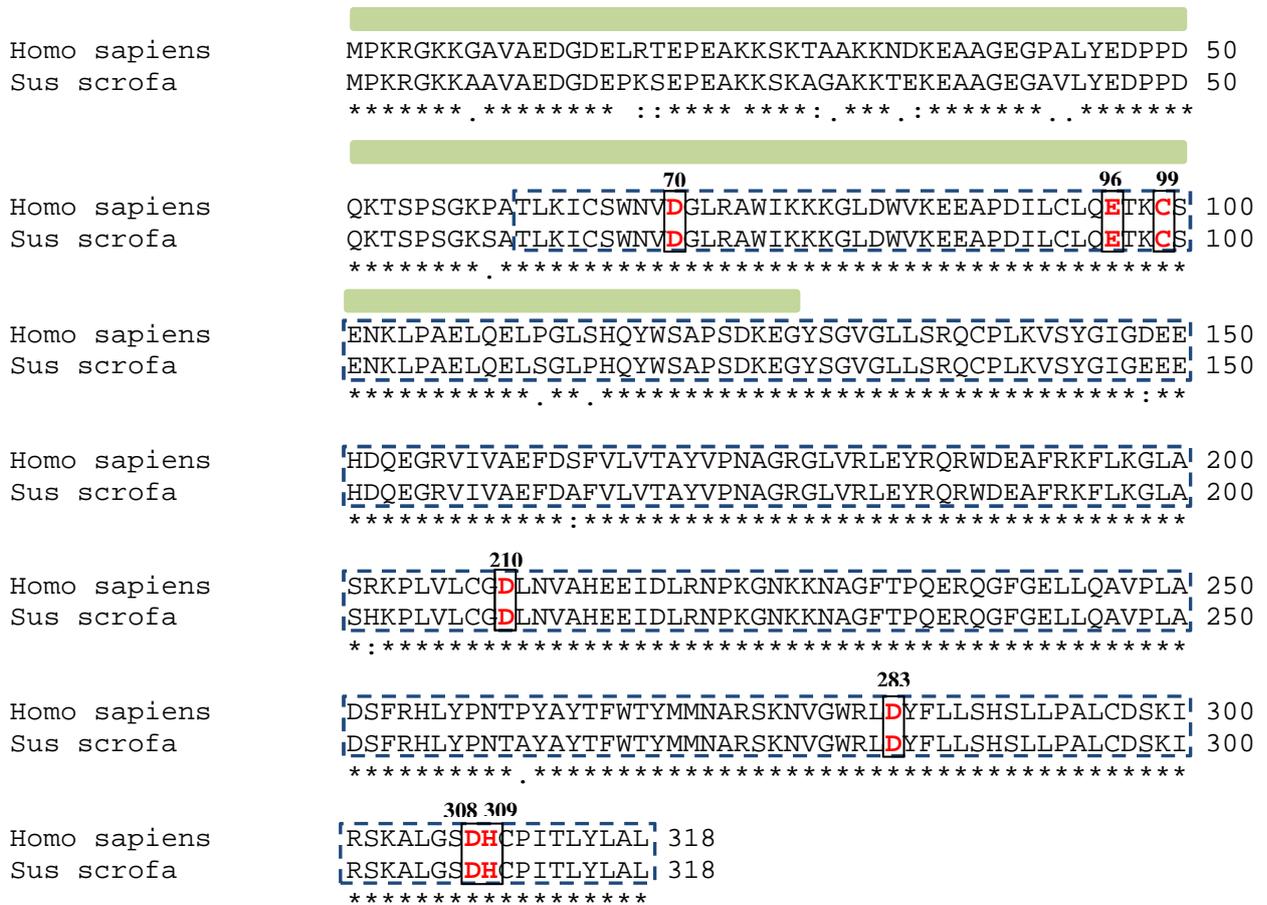


Abbildung A.10: CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment der humanen APE1 und der APE1 des Schweines. Identische Aminosäuren sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Ungleiche, aber ähnliche Aminosäuren wurden mit einem (·) und hoch konservierte Bereiche mit (:) gekennzeichnet. Grüne Boxen kennzeichnen den N-Terminus, der für die Redoxaktivität der APE1 verantwortlich ist. Der blau gestrichelte Kasten kennzeichnet die DNA-Reparatur-Domäne. Aminosäuren, die für Argumentation der Zink-vermittelten Inhibierung/Aktivierung der APE1 herangezogen wurden, sind rot markiert und eingekästelt.

A.6.4 Flammen-Atomabsorptionsspektrometrie

Wiederfindung

Die Bestimmung der Wiederfindungsrate dient dazu den Verlust des Analyten während des Veraschens abzuschätzen. Dafür wurden Zellpellets aus $2,5 \cdot 10^6$ IPEC-J2 Zellen wie unter Abschnitt 6.8.1 beschriebenen präpariert und vor dem Veraschen mit einer bestimmte Menge des Zink-Standards versetzt. Die Konzentrationen des Zink-Standards wurden so gewählt, dass sie sich im unteren (0,2 mg/L), mittleren (0,4 mg/L) und oberen (0,6 mg/L) Kalibrierbereich lagen. Die Wiederfindung betrug im Mittel 90%.

Bestimmungs-, Erfassungs- und Nachweisgrenze

Die Grenzen wurden durch Vermessen von 10 Blindwerten nach der Leerwertmethode (DIN 32645) bestimmt. Den Blindwert erhielt man, indem 500 μ L eines 1:1-Gemisches aus HNO_3 : H_2O_2 für ca. 10 h bei 95°C verdampft wurden und anschließend in 1 mL bidestilliertem H_2O aufgenommen wurden.

Nachweisgrenze: $0,046 \text{ mg/L} = 0,71 \mu\text{M}$

Ermittlungsgrenze: $0,092 \text{ mg/L} = 1,42 \mu\text{M}$

Bestimmungsgrenze: $0,139 \text{ mg/L} = 2,13 \mu\text{M}$

Einstellungen der Pin Aacle 900 T

Tabelle A.18: Einstellungen Pin Aacle 900 T

Luft	10,0 L/min
Acetylen	2,5 L/min
Wellenlänge	213,86 nm
Spaltbreite	0,7 nm

B. Publikationsliste

Publikationen

E. Schulze, L.Kromm, A. Hartwig; *Zinc affects the base excision repair proteins OGG1 and APE1*; in Vorbereitung

Veröffentlichte Beiträge

E. Schulze, C. Keil, J. Schrank, J. Zentek, A. Hartwig; *Zink beeinflusst den zellulären Redoxstatus und die Basenexzisionsreparatur (BER)*. Schriftenreihe der Gesellschaft für Mineralstoffe und Spurenelemente, S. 104-116; Hrsg. A.Hartwig, B.Köberle, B. Michalke; KIT Scientific Publishing 2013 (ISBN 978-3-7315-0079-7)

Vorträge auf Fachtagungen

28. Jahrestagung der Gesellschaft für Mineralstoffe und Spurenelemente (GMS); Karlsruhe, 11.-13. Oktober 2012; *The essential trace element zinc affects the cellular redox state and base excision repair (BER)*. E. Schulze, C. Keil, J. Schrank, A. Hartwig

Posterbeiträge

11. Meeting der Deutschen Gesellschaft für DNA Reparaturforschung (DGDR); Jena, 07.- 10. September 2010; *Development of a sensitive immunoassay for metallothionein using an affinity peptide tag*. E. Schulze, S.L. Oei, A. Hartwig

25. Tagung der Gesellschaft für Umwelt- und Mutationsforschung (GUM); Potsdam, 12.-15. Oktober 2010; *Ein Peptid-basierter sensitiver kompetitiver ELISA zur Quantifizierung von Metallothionein in kultivierten Zellen*. E. Schulze, S.L. Oei, A. Hartwig

39. Deutscher Lebensmittelchemikertag; Stuttgart, 20.-22. September 2010; *Etablierung eines kompetitiven Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assays auf der Grundlage eines chemisch synthetisierten Peptids zur Quantifizierung von Metallothionein in kultivierten Zellen*. E. Schulze, S.L. Oei, A. Hartwig

7. GUM Workshop, Münster; 28.-29. März 2011; *Peptide based competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. E. Schulze, S.L. Oei, A. Hartwig

41. European Environmental Mutagen Society (EEMS) Meeting, Barcelona; 04.-07. Juli 2011; *The effect of zinc on the extent of DNA damage*. E. Schulze, J. Schrank, A. Hartwig

Toxikologie Network; Konstanz, 13. Oktober 2011; *Effect of zinc on the induction of DNA strand breaks and the inhibition of the human 8-oxo-guanine glycosylase 1 (hOgg1)*. E. Schulze, C. Keil, J. Schrank, A. Hartwig

26. Tagung der Gesellschaft für Umwelt- und Mutationsforschung (GUM); Mainz, 29. Februar – 02. März 2012; *The essential trace element zinc affects the cellular redox state and base excision repair (BER)*. E. Schulze, C. Keil, J. Schrank, A. Hartwig

12. Meeting der Deutschen Gesellschaft für DNA Reparaturforschung (DGDR); München, 17.-20. September 2012; *Impact of zinc on the repair of oxidative DNA damage and DNA single strand breaks*. E. Schulze, C. Keil, J. Schrank, A. Hartwig

Toxikologie Network; Karlsruhe, 23. November 2012; *OGG1 and PARP1: Molecular targets of BER inhibition by zinc*. E. Schulze, C. Keil, J. Schrank, A. Hartwig

Regionalverbandstagung Südwest; Karlsruhe, 19.-20. März 2013; *Zink beeinflusst die PARP-1 und den zellulären Redoxstatus*. E. Schulze, C. Keil, A. Hartwig

Regionalverbandstagung Südwest; Karlsruhe, 19.-20. März 2013; *Einfluss von Zink auf die Aktivität der Proteine OGG und APE der Basenexzisionsreparatur*. L. Kromm, E. Schulze, A. Hartwig

C. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Andrea Hartwig, die mich während der gesamten Promotionszeit unterstützte und mir auch den Freiraum ließ meinen eigenen wissenschaftlichen Ideen nachzugehen.

Herrn Prof. Dr. Mirko Bunzel möchte ich für die Übernahme des Korreferats danken.

Finanziell wurde diese Arbeit durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Sonderforschungsbereich (SFB) 852 „Ernährung und intestinale Mikrobiota–Wirtsinteraktionen beim Schwein“ und im Rahmen der Exzellenzinitiative des Karlsruher Instituts für Technologie unterstützt. Prof. Dr. Jürgen Zentek (Institut für Tierernährung, FU Berlin) danke ich für die freundliche Bereitstellung der IPEC-J2-Zellen.

Liebe Claudia Keil, dir danke ich so sehr für die zahlreichen praktischen Tipps, dem wissenschaftlichen Input und insbesondere für das kritische Korrekturlesen meiner Dissertation. Ohne dich wären zudem die Untersuchungen zur PARsylierung in Kernextrakten und der isolierten PARP-1 nicht möglich gewesen. Nicht zu vergessen bleiben auch die entspannten und amüsanten Tagungsabende.

Dem gesamten Karlsruher AK danke ich für die schöne Zeit und die Diskussionsbereitschaft. Vor allem die intellektuellen Gespräche mit Daniel, aber auch die amüsanten Geschichten von Chris machten den Arbeitsalltag nie langweilig. Barbara, bei dir möchte ich mich für die zahlreiche Hilfe bei den gefühlten tausend AUs bedanken. Beate, du hast deine Zeit für das Lesen meiner Arbeit geopfert und hattest auch bei praktischen Problemen im Labor immer einen guten Tipp parat.

Meinen Diplomandinnen Lisa Kromm, Daniela Schroth und Julia Schrank gilt ein großer Dank für die tollen Ergebnisse, ihren Fleiß und vor allem für die schöne Zusammenarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Hajo Haase und Silke Hebel der RWTH Uniklinik Aachen für die Hilfe bei den Bestimmungen zum intrazellulären „freien“ Zinkgehalt und für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Ein großes Dankeschön gebührt ebenfalls Claudia Grosskopf, die vor allem in der Karlsruher Anfangszeit ein guter Ansprechpartner war. Ingrid, dir danke ich für die Einarbeitung in den nicht-radioaktiven Inzisionstest.

Sabine, ein dickes Dankeschön an dich für das Korrigieren meiner Arbeit aus der Sicht einer Linguistin.

Dir, Fabian möchte ich dafür danken, dass du meine tausend Fragen zu \LaTeX und vor allem auch mich in der Zeit ertragen hast.

All meinen Freunden aus dem Studium, der Heimat und den neu gewonnen Freunden aus Karlsruhe gilt mein Dank dafür, dass ihr während meiner Anfangszeit in einer neuen Stadt immer ein offenes Ohr hattet.

Meinen Eltern und meiner Schwester gilt ein besonderer Dank, da sie immer eine Stütze für mich waren.